

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861860

研究課題名(和文) GLP-1を介する咀嚼の糖尿病予防効果に関する研究

研究課題名(英文) Study on effect of mastication for prevention of diabetes via GLP-1

研究代表者

豊下 祥史 (Toyoshita, Yoshifumi)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：20399900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GLP-1はインスリン分泌を促進するホルモンであり、血糖値の調整に関与している。一方、咀嚼は自律神経系に影響を及ぼし、咀嚼によって迷走神経が活性化することが知られている。そこで咀嚼が迷走神経を介し、GLP-1の分泌を上昇させるという仮説を立て研究を行った。

ラットに咀嚼行為をさせると、有意にGLP-1の分泌を高めたが、副交感神経を遮断するとその変化は消失した。また、長期間咀嚼を行ったラットはインスリンを分泌する細胞数が多い傾向にあった。よって咀嚼を行うことは迷走神経を介しGLP-1分泌を促進し、そのGLP-1によって細胞に保護作用が働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：GLP-1 is synthesized in the intestine and has a function called incretin effect to lower levels of glucose in the blood. In this study, I built the hypothesis that mastication promotes GLP-1 by parasympathetic nerve, and we examined mastication affect secretion of GLP-1 and number of pancreatic beta-cells.

Active GLP-1 levels in rats that masticated solid feed, was higher than that in the rats that drank liquid feed. In case of intraperitoneal administration of atropine to block parasympathetic nerve, GLP-1 level in the both groups were approximately equal level. After breeding by solid feed or liquid feed for 3 months, pancreatic beta-cells in the solid feed group were observed more than that in the liquid feed group. In this study, it is suggests that mastication affects the secretion of GLP-1 via parasympathetic nerve and GLP-1 protects pancreatic beta-cells in rats.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：咀嚼 GLP-1 糖代謝 咬合

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病とは、生活習慣が要因となって発生する諸疾患を指し、「食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣が、その発症・進行に關与する疾患群」とされる。具体的にはインスリン非依存性糖尿病（成人型糖尿病）、肥満、高脂血症、高尿酸血症、循環器疾患、大腸癌、高血圧症、肺扁平上皮癌、慢性気管支炎、肺気腫、アルコール性肝障害、歯周病、骨粗鬆症などが含まれる。生活習慣のうち、食習慣は生命の維持に必要な栄養素を取り入れるための重要な習慣の1つであり、食事を摂取するための咀嚼行為は、生活習慣病に影響を及ぼす重要な因子の1つであると考えられる。咀嚼の方法を変えることにより、肥満症の改善につながる事が報告されており、日本肥満学会による肥満治療ガイドラインには、肥満対策の行動療法の一つとして「咀嚼法」が盛り込まれている。咀嚼が肥満の予防につながるメカニズムとしては、咀嚼を開始することによって、視床下部からヒスタミンの分泌が起こり、このヒスタミンが満腹中枢を刺激し、エネルギー摂取の調整を行っていることがわかっている。また、この中枢ヒスタミン系は内臓脂肪の分解を促進することも知られており、肥満の予防に寄与している。

さらに、近年、このヒスタミン系とは別に、咀嚼が糖代謝をコントロールするホルモンの分泌に關与することが報告されている。Cassadyらは食事時の咀嚼回数を変化させると消化管ホルモン glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GLP-1) の分泌に影響を与えることを報告した。GLP-1は主として小腸から分泌される腸管ホルモンで、アミノ酸配列の相同性からグルカゴン・セクレチン・VIP スーパーファミリーに分類されている。このホルモンは食事由来の刺激により主としてL細胞から門脈血中に分泌され、膵臓ランゲルハンス島の細胞からそれぞれのG蛋白共役性受容体を介して血糖依存性にインスリンの合成および分泌を促進することが知られている。咀嚼が血糖値の維持に重要な働きをし、糖尿病の予防や血糖のコントロールに有効であることが示されれば、歯科補綴治療による失われた咬合・咀嚼機能の回復が糖尿病の予防にも役立つことが期待できる。

そこで、本研究では、モデル動物を用いた咀嚼と糖尿病の予防との関わりを解明することを目的として、咀嚼行為とGLP-1分泌の關係についての検索を行うこととした。

2. 研究の目的

GLP-1は食物による腸管への機械的刺激、迷走神経の活性化、血糖値の上昇などにより小腸の腸内分泌細胞であるL細胞から分泌される。GLP-1は膵臓の細胞に作用し、インスリン分泌を促進することにより、上昇した

血糖を抑制する。一方、咀嚼は自律神経系の活動に影響を及ぼし、咀嚼によって迷走神経が活性化することが知られている。そこで咀嚼が迷走神経を介し、GLP-1の分泌を上昇させるという仮説を立て実験を行うこととした。

本研究の目的はモデル動物において、GLP-1に対する咀嚼の短期的効果と長期的効果、およびそのメカニズムについて検討を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物として12週齢Wistar系雄性ラットを使用した。また液体飼料として経口経管両用栄養剤を、固形飼料として液体飼料の近似値配合固形飼料を用いた。液体飼料と固形飼料の栄養素は等しく設定した。

(2) ラットを24時間絶食させ、ランダムにラットを振り分け、固形飼料を摂取する咀嚼群、液体飼料を摂取する非咀嚼群を設定した。各飼料を10kcal/kg摂取させた。摂取の確認はビデオカメラによる撮影(図1)と飼料の重量によって行った。摂取開始時、15分後、30分後、60分後および90分後にGLP-1が分解されないようDPP-4阻害剤を添加した採血管を用いて尾静脈より血液の採取を行った。採血した血液を、クーロメトリーを利用した酵素電極法で血糖値を測定した後、遠心分離を行い血清を抽出し、血清中の活性型GLP-1濃度をGLP-1 active form assay Kitを用いたELISA法により測定した。血清中のGLP-1を抗GLP-1抗体および酵素標識抗体と反応させた後、吸光度測定器で標準物質である活性型GLP-1と血清サンプルの450nmの波長における吸光度を測定した。標準物質の吸光度から検量線を作成し、血清中の活性型GLP-1濃度を算出した。

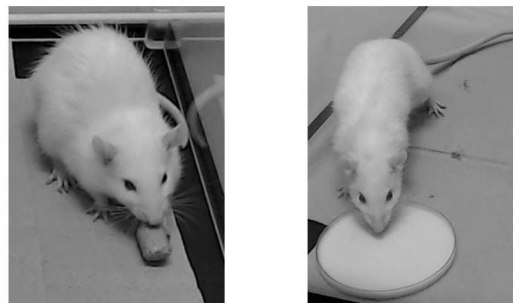


図1 摂食行為の確認の一例

(3) GLP-1の調整メカニズムには腸管による機械的刺激、血糖値の変動、迷走神経を介する調節などが知られている。咀嚼がGLP-1分泌に影響を及ぼす場合、そのメカニズムを解明するため、迷走神経を遮断した場合の咀嚼の効果について実験を行った。

迷走神経をブロックする薬剤としてアトロピンを用いた。両群のラットを 24 時間絶食後、飼料摂取 5 分前にアトロピンを 0.1 g/kg 腹腔内投与した。その後、各飼料を摂取させ、(1)と同様の手法で、血糖値および血清中の GLP-1 濃度を測定した。

(4) 咀嚼行為の相違が長期に渡る場合の GLP-1 分泌の相違および GLP-1 の作用の相違を調べるため、固形飼料を給餌する咀嚼群と液体飼料を給餌する非咀嚼群を設定し、90 日間飼育した。飼料形状の差が栄養の吸収に影響を及ぼしていないことを確かめるため、15 日ごとに体重測定を行った。

飼育開始から 90 日後にラットを安楽死させ、脾臓を摘出した。4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋を行った後、薄切切片を作製し、アルデヒドフクシン染色を行った。組織標本を光学顕微鏡で観察し、ランゲルハンス島の細胞数をカウントした。

4. 研究成果

(1) 血糖値、GLP-1 の測定を行い、個体差による分散等を把握し、基準となるベースラインを決定した。Wister ラットの随時血糖は約 120 ± 15 mg/dl、空腹時血糖は約 70 ± 15 mg/dl であり血清中の GLP-1 濃度は約 60 ± 20 pmol/l であった。

(2) 24 時間絶食させ空腹になったラットに固形飼料または液体飼料を与え、摂取を確認した後、血糖値および GLP-1 の測定を行った。血糖値は給餌確認後から上昇を始め、摂食 30 分後をピークに降下をしたが、両群間に有意な差を認めなかった(図 2)。

一方、血清中の GLP-1 濃度は測定時間中、上昇または下降を変動を繰り返した。その際、摂食確認後 30 分および 90 分で咀嚼群が非咀嚼群に比較して有意に高い値を示した(図 3)。

以上の結果から、咀嚼の動作は GLP-1 の分泌に影響を与えることが示唆された。

(3) 24 時間絶食させ空腹になったラットに副交感遮断薬であるアトロピンを腹腔内投与し、固形飼料または液体飼料を与えた。食物摂取を確認した後、血糖値および GLP-1 の測定を行った。血糖値は(1)と同様に給餌確認後から上昇を始め、摂食 30 分後をピークに降下をしたが、両群間に有意な差を認めなかった(図 4)。

一方、血清中の GLP-1 濃度は測定時間中、上昇と下降の変動を繰り返した。その際、(1)における摂食確認後 30 分および 90 分での有意差は消失した(図 5)。

GLP-1 の調節機構には腸管の機械的刺激、血糖値、迷走神経が知られているが、以上の

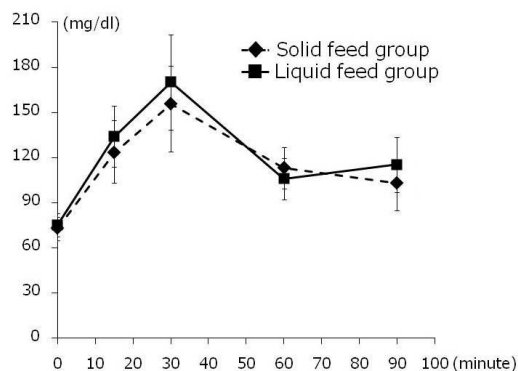


図 2 給餌後の血糖値の変化

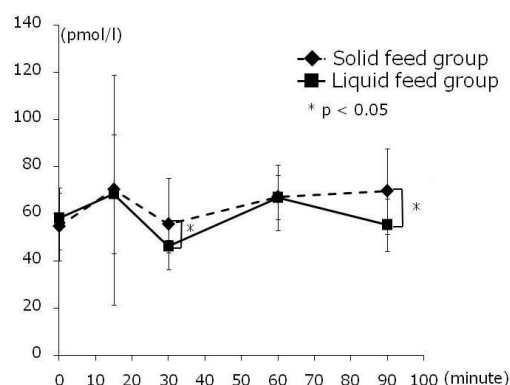


図 3 給餌後の GLP-1 濃度の変化

結果から、咀嚼の動作による GLP-1 分泌への影響は迷走神経を介して行われていることが示唆された。

(4) 固形飼料のみを給餌する咀嚼群と液体飼料のみを給餌する非咀嚼群を設定し、90 日間飼育した。飼料による栄養吸収に差がないことを確認するため体重をモニターした。両群の体重は実験期間中増加し続けたが、両群間に有意な差は認めなかったことから(図 6) 飼料形状による栄養吸収の差はないと判断した。

3 か月間後、血清中の GLP-1 濃度を測定したところ、咀嚼群の平均 GLP-1 濃度は 55.3 ± 25.2 pmol/l であり非咀嚼群のそれは 41 ± 28.7 pmol/l で咀嚼群の方が有意に高い値を示した。

次に、GLP-1 の作用の 1 つである細胞の保護作用を確認するため、両群の脾臓をホルマリン固定しパラフィン包埋した後、薄切切片を作製し、アルデヒドフクシン染色を行いランゲルハンス島の細胞を光学顕微鏡で確認した。視野あたりの細胞数は非咀嚼群に比較して咀嚼群で多い傾向を示した(図 7)。

以上の結果から、咀嚼を行うことは迷走神経を介し GLP-1 分泌を促進し、その GLP-1 によってインスリンを分泌する細胞に保護作用が働いていることが示唆された。

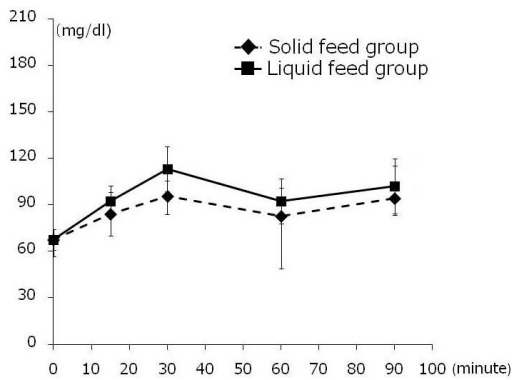


図4 迷走神経遮断時の給餌後の血糖値の変化

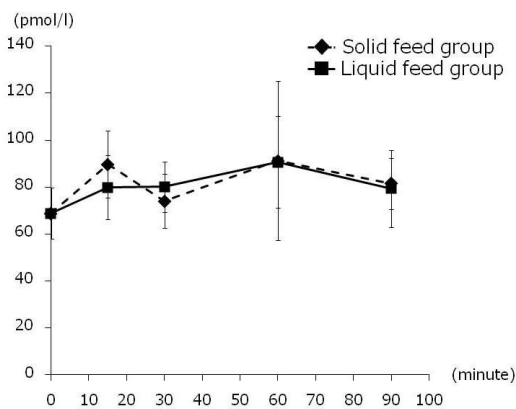


図5 迷走神経遮断時の給餌後のGLP-1濃度の変化

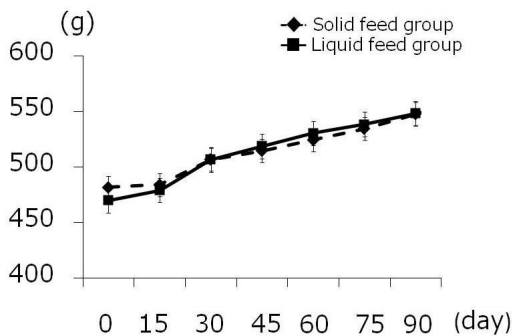


図6 体重変化の推移

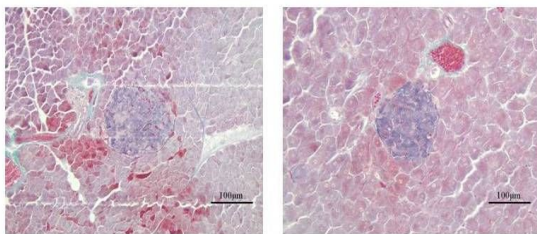


図7 ラングレルハンス島の細胞の観察例。左：非咀嚼群 右：咀嚼群 細胞が青紫色に染色されている。

<引用文献>

Fujise T, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Oohara A., Kang M, Nakata M, Sakata T, Satiation and masticatory function modulated by brain histamine in rats. Proc. Soc Exp Biol Med, 217 巻、1998、228 - 234

Cassady BA1, Hollis JH, Fulford AD, Considine RV, Mattes RD, Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response, Am J Clin Nutr., 89 巻、2009、794 - 800

〔雑誌論文〕(計3件)

渡部真也、豊下祥史、川西克弥、會田英紀、越野 寿、咀嚼による脳由来神経栄養因子を介したコレステロール合成の促進、日本補綴歯科学会誌、査読有、Vol.6、No.2、2014、pp167 - 174、https://www.jstage.jst.go.jp/article/ajps/6/2/6_167/_article/-char/ja/

佐々木みづほ、豊下祥史、川西克弥、會田英紀、越野 寿、脳梗塞後遺障害の回復に対する咀嚼の有効性、日本咀嚼学会雑誌、査読有、Vol.24、No.2、2014、pp50 - 57、http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=dr3masti/2014/002402/001&name=0050-0058j&UserID=210.137.146.24&base=jamas_pdf

Toyoshita Y, Nuka S, Kawanishi K, Kono M, Aita H, Koshino H, The correlation among practical training components in preclinical training of complete denture prosthodontics, 北海道医療大学歯学会雑誌、査読有、Vol.32、No.1、2013、pp1-6 <http://id.nii.ac.jp/1145/00010136/>

〔学会発表〕(計9件)

Toyoshita Y, Kan Y, Sasaki M, Kawanishi K, Aita H, Koshino H, Effect of Mastication on GLP-1 and Pancreatic Beta-cells, The 45th Annual Meeting & Exhibition of the AADR, 2016年3月18日、ロサンゼルス(アメリカ合衆国)

菅 悠希、豊下祥史、佐々木みづほ、川西克弥、會田英紀、越野 寿、糖尿病モデルマウスにおける飼料性状の違いによるGLP-1の変化、第124回日本補綴歯科学会学術大会、2015年5月30日大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

Toyoshita Y, Kan Y, Sasaki M, Kawanishi K, Aita H, Koshino H, The effect of mastication for glycometabolism, 93th General Session & Exhibition of the IADR, 2015年3月12日、ボストン(アメリカ合衆国)

菅 悠希、豊下祥史、佐々木みづほ、川西克弥、會田英紀、越野 寿、飼料性状の違いによる GLP-1 分泌の比較、北海道医療大学歯学会第 33 回学術大会、2015 年 3 月 7 日、北海道医療大学札幌サテライトキャンパス（北海道・札幌市）

佐々木みづほ、豊下祥史、菅悠希、川西克弥、會田英紀、玉城均、寺澤秀朗、越野 寿、咀嚼がマウスの GLP-1 分泌に与える影響、平成 26 年度日本補綴歯科学会東北・北海道支部学術大会、2014 年 10 月 25 日、市民交流プラザ（福島県・郡山市）

Kan Y, Toyoshita Y, Kawanishi K, Aita H, Koshino H, The effect of mastication on glp-1 via parasympathetic nerve, The 38th Annual Conference of the European Prosthodontic Association & 21st Scientific Congress of the Turkish Prosthodontic and Implantology Association, 2014 年 9 月 26 日、イスタンブール（トルコ共和国）

菅 悠希、豊下祥史、川西克弥、會田英紀、安齋 隆、昆 邦彦、古川裕三、越野 寿、咀嚼動態の相違が GLP-1 の分泌に与える影響、第 123 回日本補綴歯科学会学術大会、2014 年 5 月 24 日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

川西克弥、佐々木みづほ、豊下祥史、菅 悠希、會田英紀、越野 寿、咀嚼動態の差異が脳内抗酸化能に及ぼす影響について、日本咀嚼学会第 24 回総会・学術大会、2013 年 10 月 4 日、新潟大学駅南キャンパスときめいと・チサンホテル新潟（新潟県・新潟市）

Toyoshita Y, Kawanishi K, Kan Y, Aita H, Koshino H, The Effect of food forms on the secretion of glucagon-like peptide-1 in the Rat, 15th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists, 2013 年 9 月 18 日、トリノ（イタリア共和国）Torino Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊下 祥史 (TOYOSHITA, Yoshifumi)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：20399900