

# マウスにおける咀嚼動態および咀嚼習慣の相違が GLP-1分泌に与える影響

著者	菅 悠希
学位名	博士（歯学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成28年度
学位授与番号	30110乙第285号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00064484/">http://id.nii.ac.jp/1145/00064484/</a>

論文題目

マウスにおける咀嚼動態および咀嚼習慣の相違が  
GLP-1 分泌に与える影響

平成 28 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

菅 悠希

## 【緒言】

近年，我が国の糖尿病患者数は急速な増加を示している．糖尿病は発症すると患者の QOL を低下させるため，発症の予防が重要である．糖尿病罹患の前徴として耐糖能異常が存在し，その成因として生活習慣がある．生活習慣の 1 つである食習慣はカロリー摂取量，栄養の質など耐糖能異常に関係する種々の因子を含んでおり，咀嚼はそこに関わる重要な因子の 1 つである．咀嚼は栄養摂取行動の一部であるとともに，消化管ホルモン分泌を促すことが報告されている(二宮ら，1993；Naim et al., 1978)．

消化管ホルモンのインクレチンの 1 つであるグルカゴンライクペプチド-1 (GLP-1)は， $\beta$  細胞に作用してインスリン分泌を促進し，血糖の上昇を抑制する作用と  $\beta$  細胞を保護する作用を有している(Holst, 2007；Janssen et al., 2010)．GLP-1 は小腸上皮の内分泌細胞である L 細胞から分泌され，食物による腸管への機械的刺激と迷走神経により調整を受けている(Holst, 2007)．しかしながら，咀嚼とこれらの因子との関係は不明である．

そこで本研究では耐糖能異常の予防に対する咀嚼の有用性を検証するため，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の下，マウスにおいて，固形飼料または液体飼料の摂取による咀嚼動態の相違と，固形飼料と液体飼料の飼育による咀嚼習慣の相違が，GLP-1 に与える影響，さらに膵  $\beta$  細胞，インスリン分泌へ与える影響について検討した．

## 【方法】

本研究は北海道医療大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号 023 号)．実験動物には c57BL/6J 雄性マウス 190 匹を用いた．本研究では咀嚼および咀嚼習慣が GLP-1 に与える影響について検討するため，実験 1 として咀嚼が糖代謝系に与える影響について検討

した。また、実験 2 として咀嚼習慣が糖代謝系に与える影響について検討した。

## 1. 固形飼料と液体飼料

本研究では固形飼料を摂取することを咀嚼群、液体飼料を摂取することを非咀嚼群と設定した。また、飼料性状の長期にわたる変更を咀嚼習慣の相違と設定した。液体飼料として経腸栄養剤、固形飼料として経腸栄養剤と同一の栄養成分を配合し製作した固形飼料を用いた。また、血糖値と各種ホルモン濃度に影響を与えない飼料として、熱量を有しない飼料を用いた。

## 2. 咀嚼が糖代謝系に与える影響について

### 1) 咀嚼が血糖値と活性型 GLP-1 およびインスリンの分泌に与える影響

16 週齢のマウスを絶食後、固形飼料を摂取する群を咀嚼群(n=10)、液体飼料を摂取する群を非咀嚼群(n=10)とした。両群の飼料摂取開始前、摂取開始 30、60、90、120 分後の各時点で血糖値、活性型 GLP-1 濃度、およびインスリン濃度の測定を行った。

### 2) アトロピン投与後の咀嚼が血糖値と活性型 GLP-1 およびインスリンの分泌に与える影響

飼料摂取 5 分前にアトロピンを投与し、固形飼料を摂取する群をアトロピン咀嚼群(n=10)、液体飼料を摂取する群をアトロピン非咀嚼群(n=10)とした。両群の飼料摂取開始 30 分後に血糖値、活性型 GLP-1 濃度、およびインスリン濃度の測定を行った。

### 3) 熱量を有しない飼料を用いた場合の咀嚼が血糖値と活性型 GLP-1 およびインスリンの分泌に与える影響

ゼロカロリー砂糖代替甘味料を含む固形飼料を摂取する群をノンカロリー咀嚼群(n=10)、水を摂取する群をノンカロリー非咀嚼群(飲水群)(n=10)とした。両群の飼料摂取開始 30 分後に血糖値、活性型 GLP-1 濃度、およびインスリン濃度の測定を行った。

#### 4) 4 週齢マウスにおける咀嚼が血糖値と活性型 GLP-1 およびインスリンの分泌に与える影響

4 週齢で固形飼料を摂取する群を 4 週齢咀嚼群(n=10)、液体飼料を摂取する群を 4 週齢非咀嚼群(n=10)とした。両群の飼料摂取開始 30 分後に血糖値、活性型 GLP-1 濃度、およびインスリン濃度の測定を行った。

### 3. 咀嚼習慣が糖代謝系に与える影響についての検討

#### 1) 咀嚼習慣が糖代謝、空腹時活性型 GLP-1 およびインスリンの分泌に与える影響

飼育開始時の 4 週齢を 4 週群(n=10)、固形飼料を用いて飼育する群を長期咀嚼群(n=10)、液体飼料を用いて飼育する群を長期非咀嚼群(n=10)とした。長期咀嚼群、長期非咀嚼群を 12 週飼育した。その間、1 週ごとに体重と血糖値を測定した。飼育終了時に経口糖負荷試験(2 g/kg)を行った。また、飼育開始前と飼育終了時の各群において、空腹時活性型 GLP-1 濃度、インスリン濃度の測定を行った。

#### 2) 咀嚼習慣が $\beta$ 細胞面積に与える影響

飼育開始前の 4 週群(n=10)、長期咀嚼群(n=10)、および長期非咀嚼群(n=10)の膵臓の摘出を行った。ホルマリン固定、パラフィン包埋後 5  $\mu$ m の厚さで薄切した。1 次抗体として guinea pig 抗 Insulin 抗体、2 次抗体として Goat 抗 Rabbit Ig-Fab-Peroxidase Conjugate を用いた免疫染色後、ImageJ にて観察された全ての膵島内の  $\beta$  細胞の面積を測

定した。

#### 4. 統計処理

統計解析は SPSS を用い、群内の経時的な比較に対して ANOVA 検定で比較した後、多重比較は Tukey 法を用いた。2 群間の比較は Mann-Whitney U test (MWU) を用いた。4 群間の比較は Kruskal-Wallis 検定で比較した後、MWU を用い、Bonferroni の修正を行った。有意差基準を  $p < 0.05$  とした。

#### 【結果】

実験 1 では咀嚼群，非咀嚼群の血糖値は両群の飼料摂取後 30 分，60 分，90 分において上昇を確認し(ANOVA,  $p < 0.05$ )，両群間に有意な差は認めなかった。活性型 GLP-1 濃度は咀嚼群で 0 分と比較して 30 分と 90 分で上昇し(ANOVA,  $p < 0.05$ )，飼料摂取 30 分後に咀嚼群で有意に高い値を認めた(MWU,  $p < 0.05$ )。

飼料摂取後 30 分で見られた活性型 GLP-1 濃度の有意差は迷走神経ブロックした場合と熱量を有しない飼料を用いた場合，分泌は低下し(Kruskal-Wallis MWU,  $p < 0.05$ )，さらに両群間の有意差は消失した。また活性型 GLP-1 濃度において，4 週齢咀嚼群で 4 週齢非咀嚼群と比較して有意に高い値を認めた(MWU,  $p < 0.05$ )。全ての場合において，インスリン分泌に有意な差は認めなかった。

実験 2 では実験期間中の体重と血糖値，糖負荷試験において両群間に有意な差は認めなかった。空腹時活性型 GLP-1 濃度とインスリン濃度において，飼育開始前と比較して飼育終了時に長期咀嚼群で上昇し(MWU,  $p < 0.05$ )，さらに長期咀嚼群は長期非咀嚼群と比較して有意に高い値を認めた(MWU,  $p < 0.05$ )。また，飼育開始前と比較して 16 週齢時では両群ともに  $\beta$  細胞面積が増加し(MWU,  $p < 0.05$ )，さらに 16 週齢時の  $\beta$  細胞面積において，長期咀嚼群で有意に増加した(MWU,  $p$

< 0.05)

### 【考察】

本研究では 固形飼料と液体飼料による飼料性状の相違を利用し咀嚼運動に変化を与えた(Suzuki et al., 2013; 渡部ら, 2014). 咀嚼は飼料摂取 30 分後において, 活性型 GLP-1 分泌を上昇させた. Sonoki et al.(2013)はヒトにおいて通常摂食, 早食い, および 30 回咀嚼を比較して, 30 回咀嚼群の食品摂取 30 分後に活性型 GLP-1 濃度が最も上昇したと報告している. また Jie et al. (2011)はヒトにおいて 15 回咀嚼と 40 回咀嚼を比較して, 40 回咀嚼はエネルギー摂取量の減少とグレリン濃度の低下, 活性型 GLP-1 濃度とコレシストキニン濃度の上昇を示したと報告している. さらに Jianping et al. (2015)はヒトで糖質を含まないガム咀嚼を行うことにより, ガム咀嚼 30 分後の活性型 GLP-1 濃度で有意に高い値を示したと報告している. 本研究の結果では, これらの報告と, 実験対象, 方法において異なっているが, 咀嚼が活性型 GLP-1 濃度に影響を与えるという点で同様の結果が得られている. また, 咀嚼群と非咀嚼群の活性型 GLP-1 の有意差は迷走神経ブロックした場合と熱量を有しない飼料を用いた場合に消失した. このことから, 咀嚼による活性型 GLP-1 の分泌は迷走神経と腸管の栄養素の吸収が関わる可能性が示唆された.

さらに咀嚼はインスリン分泌に影響を与えなかったが, 咀嚼習慣はインスリンの分泌にも影響を与えた. また,  $\beta$  細胞面積の比較から, 咀嚼習慣は GLP-1 を介し  $\beta$  細胞の分化増殖に関与する可能性が示唆された.

これまでに糖尿病予防の観点から, 咀嚼は過食の防止に有効であることが知られている. 本研究から咀嚼および咀嚼習慣が過食の予防のみならず GLP-1 を中心とした糖代謝に関与し, 耐糖能異常の防止, ひいては糖尿病の予防に重要な役割を担うことが考えられる.

【文献】

- Holst JJ. The physiology of glucagon-like Peptide 1. *Physiol. Rev.* 87: 1409–1439, 2007.
- Janssen P, Rotondo A, Mule F, & Tack J. Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1. *Gerodontology*, 19: 398–403, 2010.
- Jianping X, Xinhua X, Yuxiu L, Jia Z, Wenhui L, Qian Z, & Zhixin W. The effect of gum chewing on blood GLP-1 concentration in fasted, healthy, non-obese men. *Endocr. J.* 50: 93–98, 2015.
- Jie L, Zhang N, Ze L, Rui L, Cong L, & Shuran W. Improvement in chewing activity reduces energy intake in one meal and modulates plasma gut hormone concentrations in obese and lean young chinese men. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 709–716, 2011.
- Naim M, Morley RK & Aldred MM. Effects of oral stimulation on the cephalic phase of pancreatic exocrine secretion in dogs. *Physiol. Behav.* 20: 563–570, 1978.
- 二宮雄三，野村孝之，川村早苗，望月一道，花井一光．口腔感覚情報の生体機能調節における役割．日咀嚼誌，3：3–9，1993．
- Sonoki K, Iwase M, Tanaka Y, Nakamoto T, Masaki C, Hosokawa R, Murakami S, Chiwata K & Inoue H. Effect of thirty-times chewing per bite on secretion of glucagon-like-peptide-1 in healthy volunteers and type 2 diabetic patients. *Endocr. J* 60: 311–319, 2013.
- Suzuki H, Tanaka M, Kawanishi K, Koshino H, Toshihiro H. Alteration of Masticatory Function by Diet Change Induces Stress Responses in Wistar Rats. *in vivo* 27: 611–616, 2013.
- 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．日補綴会誌



6 : 167–175, 2014.