

〔原著〕

## ラットにおける咀嚼動態の変化に伴う酸化ストレス誘導に関する研究

鈴木 裕仁

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系・咬合再建補綴学分野

### Alteration of masticatory performance caused by diet change induces oxidative stress in Wistar rats

Hirohito SUZUKI

Division of Oral Rehabilitation, Department of Occlusion and Removable Prosthodontics,  
Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry

#### Abstract

Mastication is essential for homeostasis maintenance. Mastication disturbance induces physical and psychological stress. The levels of free radicals, such as superoxide, have been shown to increase following physical and psychological stress and lead to various disorders, including cancer and gastrointestinal ulcers. In this study, we investigated whether masticatory dysfunction causes oxidative stress by changing the feeding style from solid to liquid in a rat model. Seven days after the diet was changed from solid to liquid, serum adrenaline and noradrenaline concentrations increased 205% and

158%, respectively, compared to basal levels. Superoxide production was higher in rats fed a liquid diet than in rats fed a solid diet. Furthermore, serum superoxide dismutase (SOD) activity was lower in rats fed a liquid diet. Decreased serum SOD activity was observed from day 21 to day 84 after the diet was changed from solid to liquid. In rats fed a liquid diet, serum SOD activity returned to normal levels 7 days after the liquid diet was changed back to solid diet. These results show that oxidative stress continues when mastication is disturbed.

**Key words** : mastication, oxidative stress, superoxide dismutase, animal feed, occlusion

#### 1. 緒 言

円滑で調和のとれた咬合・咀嚼機能の営みは、Quality of life (QOL) の確立に重要な因子の一つで、生体情報伝達系である「神経系-内分泌系-免疫系」を賦活し、生体のホメオスタシスに深く関与している。ヒトにおける検討で歯の喪失などによる咬合障害が、顎口腔系機能の低下を引き起こすことのみならず、痴呆の発現、さらには全身の病的老化を促進させ、体幹・四肢の運動機能低下など全身の健康状態を憎悪させることが報告されて

いる (Yoshida, 2006)。ラットにおける検討では、臼歯の切除や飼育飼料形態の変更による咬合・咀嚼機能障害が、大脳の対角帯核・内側中隔核のコリン作動性ニューロン数の減少を引き起こすこと (Makiura et al., 2000)、さらに、海馬におけるアセチルコリン濃度の低下により、記憶・学習機能が低下する (Terasawa et al., 2002) など、中枢神経系との関連が報告されている。

現代社会において、精神的・物質的な因子が複雑に絡み合う社会環境が、我々に身体的・精神的ストレスを与え、活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) の産生

受付：平成25年4月10日 受理：平成25年5月23日

亢進、酸化力が抗酸化力を上回った酸化ストレスを誘導する。酸化ストレスはレドックスバランスが破綻し、臓器機能の異常を導くため、虚血性疾患、脳神経疾患、肝疾患、発癌などの病態の関連要因として注目されている (Moller et al., 1998)。ROSの最上流に位置するスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) は、細胞障害が強く、好中球、好酸球、単球、マクロファージなどの血液細胞でNADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) オキシターゼやミトコンドリア呼吸鎖などから多く産生されている (Miyano et al., 2005)。一方、産生された $O_2^-$ は抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) により消去される。酸化ストレスは、身体的ストレスで好中球 $O_2^-$ 産生の亢進や、心理的ストレス下によるSOD活性の変化など、 $O_2^-$ やSODを指標として評価されている (Sanchez et al., 2006)。

しかし、咬合や咀嚼機能の低下と酸化ストレスの関連は未だ明らかにされていない。そこで、本研究ではラットに液体飼料のみを摂取させ、咀嚼動態に変化を与えることが、酸化ストレスを誘導するのか、活性酸素発生機構として好中球 $O_2^-$ 生成能、および酸化に対する防御代謝として血清SOD活性の両面から酸化ストレスを評価した。

## 2. 実験方法

### 1) 実験動物と飼育条件

実験動物はWistar/ST雄性ラット (三協ラボサービス社製) 9週齢96匹を、1ケージ2匹を上限で飼育した。飼育条件Aとして、すべてのラット (計64匹) は通常の固形飼料 (オリエンタル酵母社製) で飼育を開始し、10週齢になった時点で、液体飼料 (ヒト経腸栄養剤エンシユア・リキッド, アボットジャパン社製) で飼育する液体飼料飼育群と、液体飼料と同一成分で作製された固形飼料で飼育する固形飼料飼育群の2群を設定し各々の検討を行った (図1)。飼育条件Bとして、10週齢になった時点で、液体飼料飼育群と固形飼料飼育群の2群 (計16匹) を設定し、飼育飼料変更後4週目以降に、液体飼料飼育群では、液体飼料から通常の固形飼料へと戻した (図1)。飼育条件Cは、咬合挙上を4週間施行した咬合挙上群と、正常の咬合で飼育した対照群の2群 (計16匹) を設定した (図1)。

飼育飼料および水は自由摂取とした。飼育条件は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $65 \pm 5\%$ 、換気回数10回以上/時間、白色蛍光灯による人工照明とし、午前8時から午後8時までを明期に、午後8時から午前8時までを暗期に維持された明暗環境下の本学動物実験センターにて飼育し

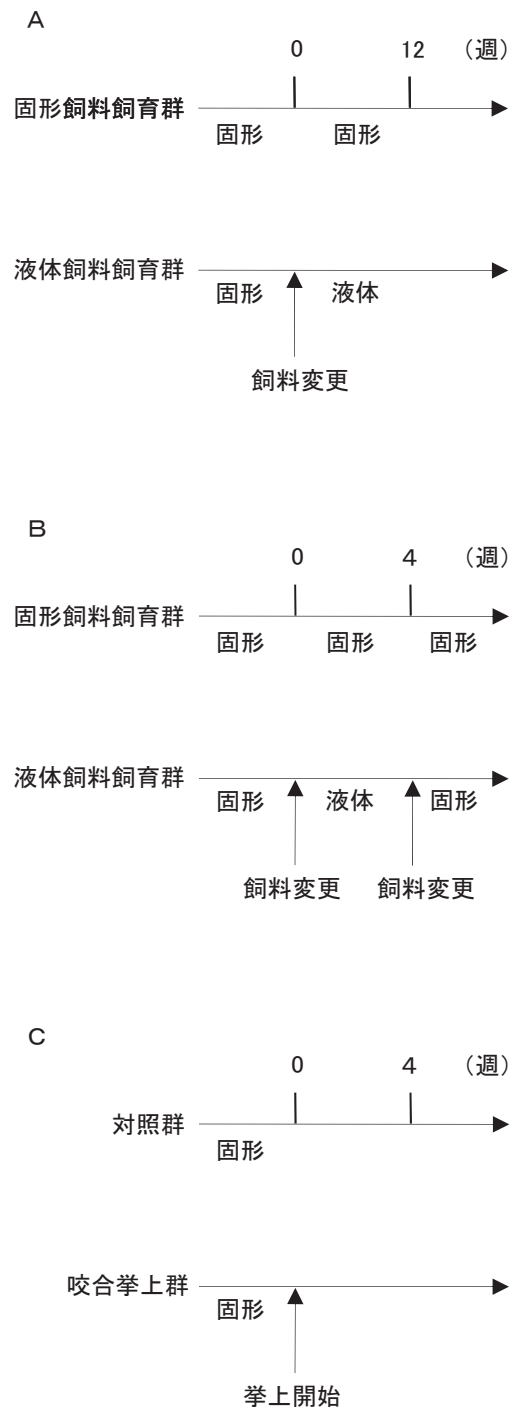


図1

A: 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の飼育条件  
B: 液体飼料から固形飼料へ飼料変更した飼育条件  
C: 咬合挙上群と対照群の飼育条件  
各図上記記載の週齢は飼料変更後の週齢を示す。

た。

### 2) 体重測定

飼育飼料変更後1週間隔で、12週目まで、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群のラットの体重測定を、明期である午後8時に行った。

### 3) 血中カテコールアミン濃度の測定

飼料変更後1週間隔で、ジエチルエーテル麻酔下、定

時刻に尾部より採血し血漿を回収した。アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン濃度の測定は、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detector; HPLC-ECD) を用いてアルミナ吸着法により行った。1.5M Tris buffer (pH8.6) 1 ml, 0.1M EDTA・2 Na100 $\mu$ l, 酸化アルミナ30 $\mu$ g, 内部標準物質としてイソプロテレノール (Isoproterenol・HCl) に、血漿を加え、5分間振盪させ、アルミナに吸着させた。その後、アルミナを水洗し、遠心分離式ディスポーザブル限外濾過器 (Ultrafree-MC, MILLIPORE社製) に移し替え、4 $^{\circ}$ C, 2000rpmで5分間、遠心分離した。アルミナに2%酢酸を反応させ、受器を交換後2000rpmで5分間、遠心分離し、ろ液をHPLC-ECDに注入した。測定には、電気化学検出器ECD-300 (エイコム社製, 京都), カラム (EICOMPAK SC-5 ODS  $\phi$ 3.0mm $\times$ 150mm), プレカラム (PREPAK  $\phi$ 4.0mm $\times$ 5.0mm), 送液ポンプ (EP-300), カラム恒温槽 (ATC-300), 脱気装置 (DG-300), データ処理装置 (EPC-500) によって構成されているHPLC-ECDを使用した。移動相は、EDTA・2 Na (5 mg/l), 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (100mg/l), およびメタノール (17%), を含む0.1Mクエン酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.5) を用いた。条件は、流速 (0.5ml/min), 作用電極 (WE-3 G, ガスケットGS-25), 印加電圧 (+750mV vs Ag/AgCl), 設定温度 (25 $^{\circ}$ C) とした。アドレナリン, ノルアドレナリン, およびドーパミン濃度は、クロマトグラムピーク高さより内標準法を用いて算出した (Hamaue et al., 1999)。

#### 4) 好中球O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能の測定

O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能は、二波長分光光度計 (556型, 日立製作所社製) を用いてシトクロムc (Cyt c) 還元法により測定した。ジエチルエーテル麻酔下において、5%カゼイン (和光純薬社製) 溶液 (in0.9%saline) 100ml/kg量を、腹腔内投与し16時間後に好中球を含む腹腔内滲出液を回収し、2000rpm, 5分間, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離を行った。その後、下層の細胞層を0.1%NaCl溶液 (低張) と1.7%NaCl溶液 (高張) にて溶血させ、リン酸緩衝液にて洗浄し、好中球懸濁液を作成した (Mege et al., 1986; Laurent et al., 1991)。好中球数と生存率の測定は、自動血球カウンター (Nucleo counter, 株式会社エムエステクノシステムズ社製) を用いた。好中球懸濁液に細胞膜を破壊する目的の細胞処理試薬 (株式会社エムエステクノシステムズ社製) を加え、蛍光染色された細胞核を測定する自動血球カウンターにて全細胞数を測定した。同時に死細胞数も測定して生存率 (全細胞数-死細胞) を

求め、好中球数を算出した。1 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/mlに調整した好中球懸濁液に、Cyt c (1 mg/ml) (Sigma社製) を添加し、刺激前のベースラインを記録した。好中球の刺激物質であるホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸塩 (PMA) (Sigma社製) を25 $\mu$ g/mlの濃度で、好中球懸濁液に加えて攪拌し、Cyt cとの還元反応を開始させ、550nmの吸光度の増加 (Cyt c還元速度) を10分間計測した。各測定はウマ赤血球由来のSOD (10 $\mu$ g/ml) (Sigma社製) を加え、Cyt cとO<sub>2</sub><sup>-</sup>の還元反応が停止することを確認した。好中球O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能 (nmol/min/10<sup>7</sup> cells) は、計算式 [各測定で得られた反応曲線の最大傾斜線の傾き $\div$ Cyt cの吸光度係数19.1 $\times$ 1000と、1 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/ml $\times$ 0.2ml (好中球懸濁液添加量)] より、10<sup>7</sup> cells当たりで算出し、その平均値を求めた (Hattori et al., 2005)。

#### 5) 血清SOD活性の解析

ジエチルエーテル麻酔下、尾部より採血を行い、血清を回収した。測定は電子スピン共鳴装置 (Electron Spin Resonance spectrometer, 日本電子社製) を使用した。O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生は、hypoxanthine (ヒポキサンチン, HX, 和光純薬社製) とxanthine oxidase (キサンチンオキシダーゼ, XOD, Roche社製), O<sub>2</sub><sup>-</sup>の捕捉剤にはCYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propanoate cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolineN-oxide, ラジカルリサーチ社製) (Kotake et al., 2006), 安定剤にはDTPA (Diethylene Triamine Pentaacetic Acid, Sigma社製) を用い電子スピン共鳴 (ESR)・スピントラッピング法にてO<sub>2</sub><sup>-</sup>の消去能を測定した (Hujii et al., 2006; Kohno, 2010)。ESR装置の測定条件は、Sweep width = 5 mT, Sweep Time = 2 min, Gain = 6.3 $\times$ 100, Modulation Width = 1.0 $\times$ 0.1 mT, Time constant = 0.1 sec, Center Field = 335.5 mT, Power = 10 mW, Frequency = 9.43GHzで、測定は室温で行った。マイクロチューブに、リン酸緩衝液 (100mM), CYPMPO (200mM), DTPA (10mM), HX (10mM), および、10 $\mu$ lの血清と10 $\mu$ lのXOD (0.2U/ml) を加え30 $^{\circ}$ Cで5分間静置させた。反応液を毛细管に移し、30秒後よりESR装置にてCYPMPO-スーパーオキシド-スピンアダクトのシグナル強度を得た。その解析は、リン酸緩衝液によるESRスペクトラム量をコントロールの100%とし、血清のESRスペクトラム量を、計算式 [血清のスーパーオキシド抑制率 = control- sample/sample; control (リン酸緩衝液), sample (血清)] から抑制率を求めて行った。得られた各検体の抑制率を、ウマ赤血球由来の標準SOD (Sigma社製) で作成した検量線を用いて、血清SOD活性を解析した (Naito et al., 1994; Owada, 2005)。

### 6) 咬合挙上群の血清SOD活性の解析

ジエチルエーテル麻酔下、ラット上顎臼歯部（第1臼歯、第2臼歯、第3臼歯）両側咬合面を良く乾燥させて歯面処理を施した後、歯科用接着性レジン（スーパーボンド；サンメディカル株式会社製）を約1mmの高径にて築盛した咬合挙上モデルラット（咬合挙上群）を作製した（Yoshihara et al., 2001）。咬合挙上群と通常の固形飼料で飼育した対照群を設定し、飼育開始より1週間隔で4週目まで体重測定と尾部より採血を行い、血清を回収し、血清SOD活性を解析した。

### 7) 統計処理

実験結果は、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の2群間で、平均値をStudent *t* testを用いて統計処理を行った。有意水準は5%に設定し、統計解析ソフトSPSSを用いた。

なお、本研究におけるすべての動物実験は、北海道医療大学実験動物委員会、札幌医科大学実験動物委員会の承認を得て行った。

## 3. 結 果

### 1) 体重変化

体重測定は、飼育飼料変更前を0週とし、飼料変更後12週目まで測定した。固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の両群間での体重変化は、有意差を認めなかった（図2）。また、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群において、血液一般（赤血球数、白血球数、血色素、ヘマトクリット、平均赤血球容積、平均赤血球血色素、平均赤血球血色素濃度）、および生化学的検査（総タンパク、アルブミン、中性脂肪）は両群間に差異がなかった。

2) 固形から液体への飼料形態の変化は血中カテコールアミン濃度を上昇させる

固形から液体への飼料形態の変化が、ストレスとなりうるのか、ストレスマーカーの指標である血中カテコールアミン濃度をHPLC法にて測定した。血中アドレナリン濃度（pg/ml）は、液体飼料飼育群では827.1 ± 320.1（1週目）、866.1 ± 330.1（2週目）、692.1 ± 400.1（3週目）、854.5 ± 189.4（4週目）、固形飼料飼育群では378.1 ± 218.1（1週目）、278.1 ± 142.8（2週目）、214.1 ± 95.6（3週目）、316.3 ± 126.2（4週目）、および、血中ノルアドレナリン濃度（pg/ml）は、液体飼料飼育群では610.1 ± 47.6（1週目）、625.4 ± 114.1（2週目）、614.6 ± 115.5（3週目）、784.9 ± 339.9（4週目）、固形飼料飼育群では331.7 ± 69.7（1週目）、440.1 ± 106.4（2週目）、332.1 ± 118.6（3週目）、463.3 ± 107.2（4週目）であり、飼料変更後1, 2, 3, 4週目において、血中アドレナリンとノルアドレナリン濃度は固形飼料飼育群に比べ、液体飼料飼育群では有意に増加していた（ $p < 0.05$ ）（図3）。一方、血中ドーパミン濃度は、両群とも測定感度以下であり、測定不能であった。

3) 固形から液体への飼料形態の変化は好中球の $O_2^-$ 生成能を亢進する

固形から液体への飼料形態の変化が、好中球 $O_2^-$ 生成能に影響を与えるのか、Cyt c還元法にて検討した。固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の好中球の生存率は平均95%以上であった。 $O_2^-$ 生成能（nmol/min/10<sup>7</sup> cells）は、液体飼料飼育群では4.53 ± 0.34（1週目）、4.80 ± 1.76（2週目）、5.55 ± 1.66（3週目）、4.77 ± 1.79（4週目）、固形飼料飼育群では2.60 ± 0.23（1週目）、2.51 ± 0.26（2週目）、3.43 ± 1.50（3週目）、3.57 ± 1.75（4週目）であり、飼料変更後1, 2, 3週目において、液体飼料飼育群では固形飼料飼育群と比較し、有意

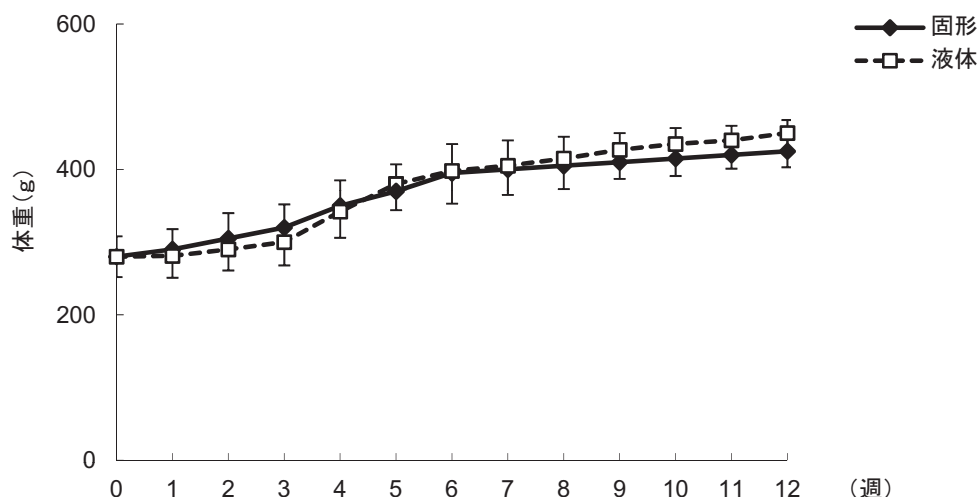


図2 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群における飼料変更後の体重標準偏差をエラーバーで示す。両群間での体重変化には有意差を認めなかった。



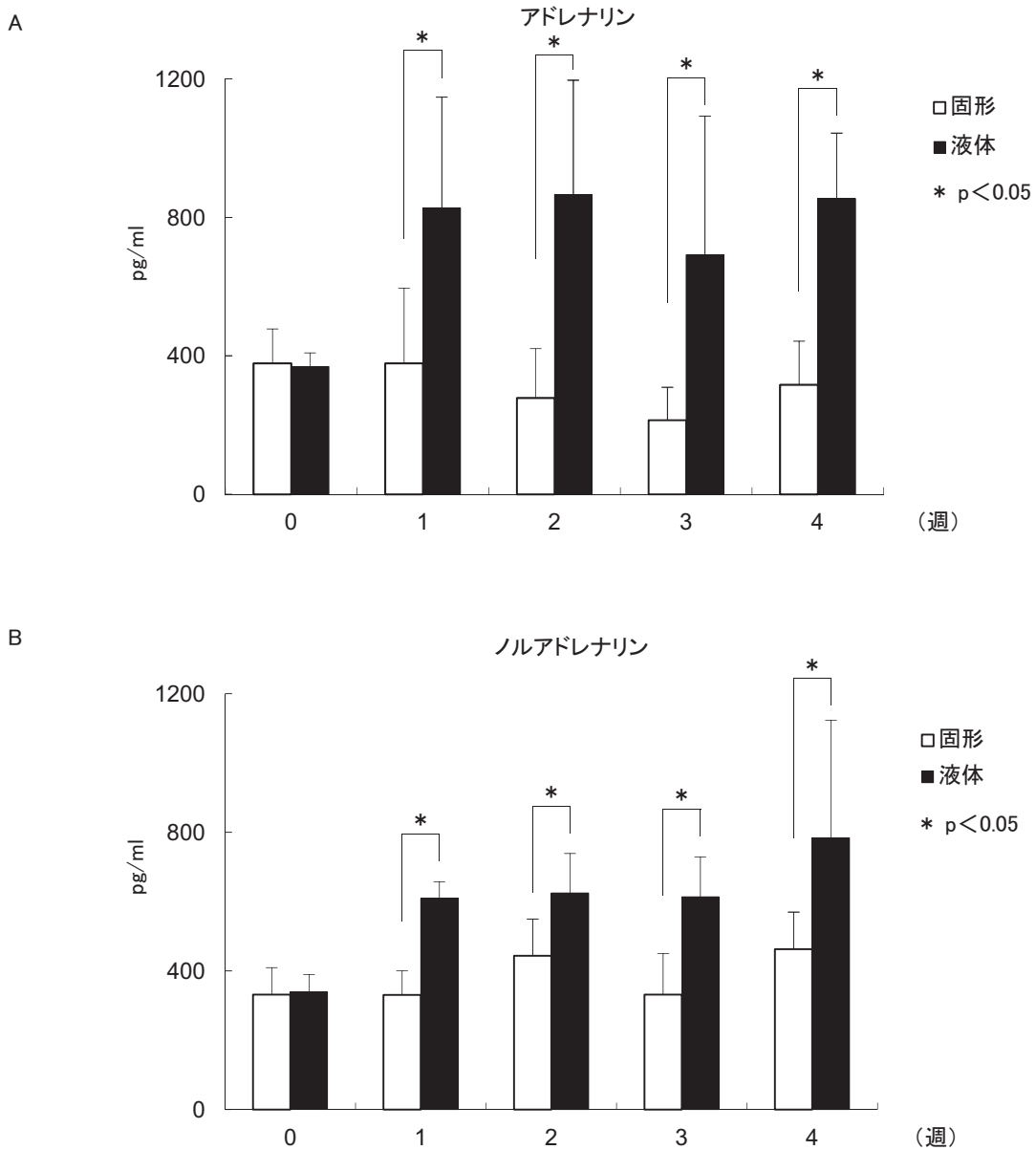


図3 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群のHPLC法による血中アドレナリン (A) とノルアドレナリン (B) 量の経時変化標準偏差をエラーバーで示す。\*: 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

に亢進していた ( $p < 0.05$ )。飼料変更後4週目においても両群に有意差はなかったものの、液体飼料飼育群では好中球 $O_2^-$ 生成能の亢進がみられた (図4)。

4) 固形から液体への飼料形態の変化は血清SOD活性を低下させる

ESRスペクトラムは、CYPMPOで捕捉した $O_2^-$ に特異的な4番目のピークを解析した。血清の $O_2^-$ の消去率 (%) は、液体飼料飼育群では、 $52.7 \pm 6.6$  (1週目),  $49.5 \pm 5.8$  (2週目),  $42.7 \pm 8.7$  (3週目),  $39.8 \pm 7.5$  (4週目), 固形飼料飼育群では $56.3 \pm 4.6$  (1週目),  $55.5 \pm 5.6$  (2週目),  $54.6 \pm 4.7$  (3週目),  $54.8 \pm 6.5$  (4週目)であった。固形飼料飼育群に比べ、液体飼料飼育群ではESRスペクトラムのピークが高く、 $O_2^-$ 消去能の低下が認められた (図5)。検量線 (図5)

から解析した血清SOD活性は、飼料変更後、1, 2週目において、両群間に有意差を認めなかった。しかし、3週目以降、12週目まで液体飼料飼育群は、固形飼料飼育群と比較して、血清SOD活性の有意な低下が認められた ( $p < 0.05$ ) (図6)。

さらに、液体飼料飼育から固形飼料飼育へと、飼育飼料形態を元に戻した時の血清SOD活性を検討した。10週齢で飼料変更を行い、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の2群を設定した。飼育飼料変更後4週目に、液体飼料飼育を固形飼料へと戻し血清SOD活性を解析した。飼育飼料を固形飼料飼育へと戻した5週目以降で、固形飼料飼育し続けた群と同程度まで血清SOD活性は明らかに上昇し、両群間において有意な差は認められなくなった (図7)。

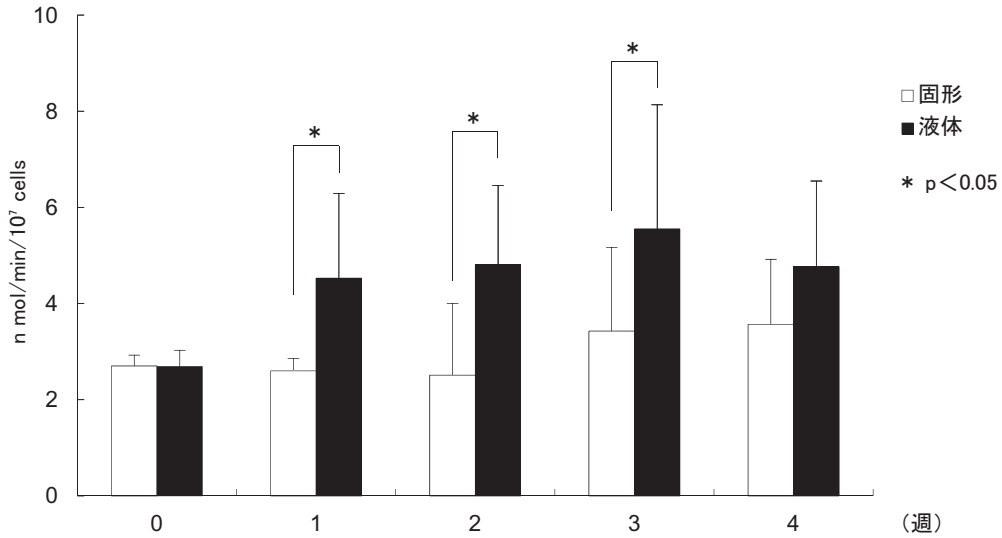


図4 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群における好中球スーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 生成能の経時変化  
標準偏差をエラーバーで示す。\* : 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた (p<0.05)。

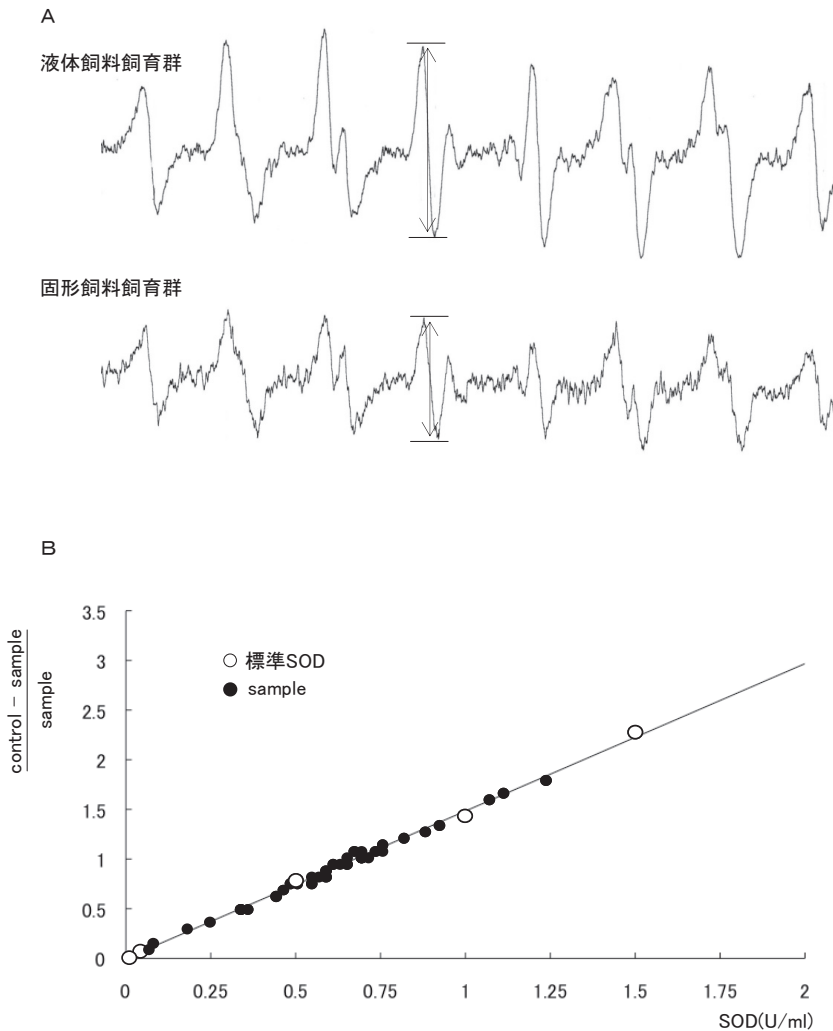


図5  
A : 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群のESR (Electron Spin Resonance) スペクトラム  
上段は液体飼料飼育群, 下段は固形飼料飼育群のESRスペクトラムを示す。  
ESRスペクトラムは, CYPMPPOで捕捉したO<sub>2</sub><sup>-</sup>に特異的な左から4番目のピークを解析した。固形飼料飼育群に比べ, 液体飼料飼育群ではスペクトラムのピークが高く, O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去能の低下が認められた。  
B : SOD活性の検量線

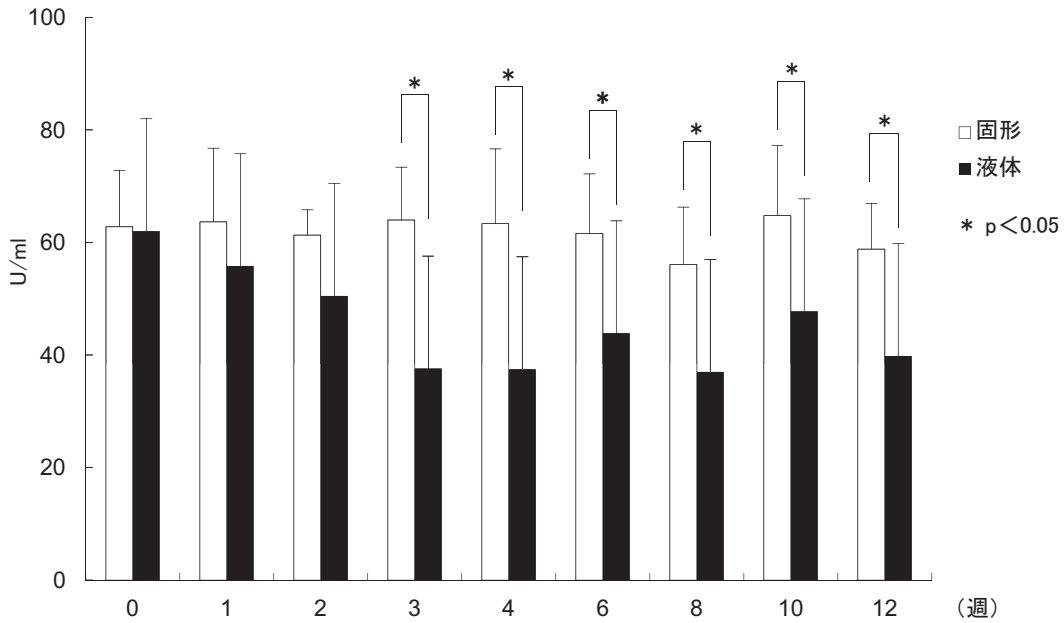


図6 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群における血清SOD活性の経時的変化  
標準偏差をエラーバーで示す。\*：固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

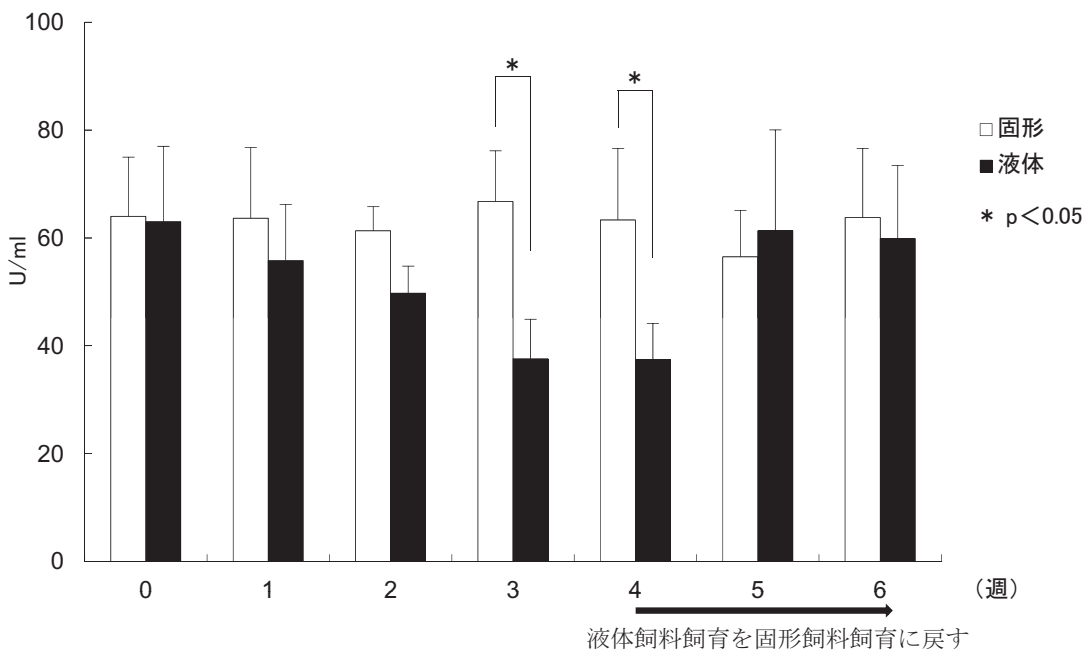


図7 液体飼料から固形飼料へと飼育飼料を戻した時の血清SOD活性  
標準偏差をエラーバーで示す。\*：固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。  
しかし、飼育飼料を固形飼料飼育へと戻した5週目以降で、固形飼料飼育し続けた群と同程度まで血清SOD活性は明らかに上昇し、両群間において有意差は認められなくなった。

5) 咬合挙上は血清SOD活性を低下させる

咬合挙上が酸化ストレスを誘導するのか否か、血清SOD活性を検討した。体重測定は、飼育開始から4週目まで測定し、咬合挙上群と対照群の両群間で差異を認めなかった。また、咬合挙上を行った1週目以降で、咬合挙上群は、対照群と比較し血清SOD活性の有意な低下を認めた ( $p < 0.05$ ) (図8)。

4. 考 察

咬合・咀嚼の機能異常とカテコールアミンに関する基礎的研究は、ラットを用いた粉末飼料飼育、および、臼歯の歯冠切除や咬合挙上モデルにより検討されている (Takigami, 2002; Ichihashi et al., 2008)。噛むことが習性であるラットを液体飼料で飼育すると、脳内の神経伝達機構の障害により行動リズムの変化が生じること、ストレス応答としてHPA (Hypothalamic-Pituitary-

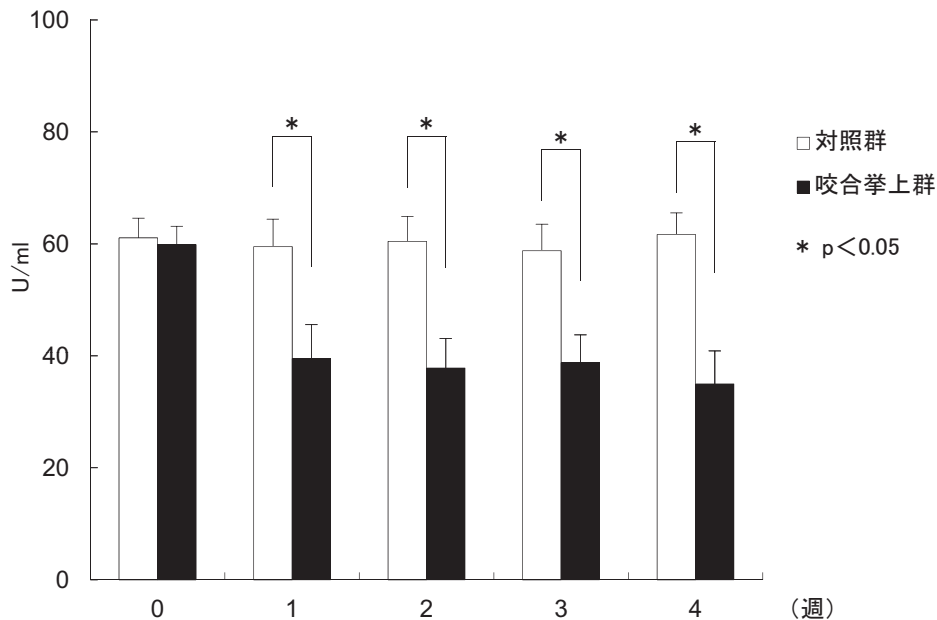


図8 咬合拳上群と対照群における血清SOD活性の経時的変化  
標準偏差をエラーバーで示す。\*：咬合拳上群と対照群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

Adrenocortical) 系が活性化することが報告されている (吉原ら2001,.)。さらに、咬合干渉がSAM (Sympathetic nervous-Adrenal Medullary) 系およびHPA系の活性化を促すことが、明らかとなっている (Sasaki, 2002)。本研究では、飼料を液体飼料に変更後、1週目から4週目まで、血中アドレナリンとノルアドレナリン濃度は固形飼料飼育群に比べて、有意に増加していた。ラットの正常値は血中アドレナリン300~500pg/ml, ノルアドレナリン100~300pg/ml, ドーパミン10pg/ml以下である (Eldrup et al., 2000)。液体飼料飼育群で血中アドレナリン $827.1 \pm 320.1$ pg/ml (飼料変更後1週目), ノルアドレナリン $610.1 \pm 47.6$ pg/ml (飼料変更後1週目)と正常値より増加を示し、咀嚼動態の変化がラットに対してストレスとなることが考えられた。液体飼料飼育は、咀嚼時の感覚入力に変化を及ぼし、その情報が大脳皮質辺縁系から視床下部に伝わり、SAM系が活性促進したためにアドレナリンおよびノルアドレナリン量が増加したと推測される。また、血中ドーパミンは速やかにノルアドレナリンに代謝されるため、血中では低濃度であり、本研究では測定できなかったと考えられる。

酸化ストレスの評価は、DNA、脂質や糖などの酸化、抗酸化関連酵素および抗酸化物質により生化学的、免疫学的に行われているが、日内変動や正常値・カットオフ値の設定など多くの問題を有している (渡辺ら, 2007; Matsumoto et al., 2008)。本研究では、カゼイン溶液を腹腔内投与して誘導された好中球をCyt c還元法により、活性酸素産生系として $O_2^-$ 生成能を測定した。顆粒球を含む好中球は、末梢血から採取するのが一

般的である。しかし、齧歯類ではその回収効率が低いために、腹腔内に誘導した好中球を用いた (Mathison et al., 2006)。Cyt c還元法は測定方法の簡便なこと、さらに酵素同士の連鎖反応が少ないことから $O_2^-$ の半定量的測定に適している (Kusakabe et al., 2008)。

$O_2^-$ 産生亢進は、ノルアドレナリンによりNADPHオキシターゼが活性化することで生じる (Xiong et al., 2012)。また、拘束ストレス負荷時による血中カテコールアミンやコルチコイドの上昇が、IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン量を増加させる (Lan, 1995; Kopprasch et al., 1997; Pedersen et al., 2003)。液体への飼料変更は、血中カテコールアミン量を増加させ、好中球のNADPHオキシターゼを活性化し $O_2^-$ 産生が生じたと考えられる。

一方、活性酸素消去系の検討は、血清による $O_2^-$ 消去能を電子スピン共鳴 (ESR)・スピントラッピング法にて、血清SOD活性の解析を試みた。SODは $O_2^-$ の消去酵素で、その活性の測定にはCyt c法、ニトロブルー・テトラゾリウム (NBT) 法、亜硫酸法などの分光学的方法や、抗原抗体反応を利用したRIA法、EIA法などが用いられている。しかしながら、測定感度、再現性、特異性、コスト面および操作が煩雑であるなど様々な問題点がある。ESR・スピントラッピング法は、操作性や感度が良く、しかも、不安定なフリーラジカルをトラップ剤と反応させるため、安定したスピニアダクトに返還させて解析する方法である (高山, 2002)。本研究は、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼ系で人工的に $O_2^-$ を産生させ、トラップ剤としてCYPMPPOを用い



CYPMPO-O<sub>2</sub><sup>-</sup>スピアダクトに返還し、ESR装置にて画像化し検討した。Kamibayashi (2010) が開発したCYPMPOは、ヒドロキシラジカル(OH<sup>-</sup>)とO<sub>2</sub><sup>-</sup>の区別がスペクトラムの波形より可能で、O<sub>2</sub><sup>-</sup>アダクトの半減期が長く、さらに、室温での安定性が高いことなどの特徴を有している。

SODは、Cu, Zn-SOD (細胞質内)、Mn-SOD (ミトコンドリア内)、EC-SOD (細胞外分泌型) の3種類のアイソザイムがある。Cu, Zn-SODやMn-SODは細胞内に存在しているが、Marklandら (1996) により血中に存在するEC-SODが発見された。EC-SODは、血管壁にヘパラン硫酸を介して結合している。しかしながら、血清中では、C末端プロテアーゼ分解され、様々な親和性をもった分画を有するEC-SODも存在すると考えられている (Adachi T et al., 1996)。炎症疾患や虚血-再還流時にO<sub>2</sub><sup>-</sup>は、好中球から多量に産生し (Roberto, 1989)、血管内皮細胞に障害を与える。液体飼料飼育による好中球O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能の亢進は飼料変更後1週目以降、SOD活性の低下は飼料変更後3週目以降に生じた。この経時的動態の差違は、好中球から生成されるO<sub>2</sub><sup>-</sup>が持続的に増加したことにより、血管内皮細胞が損傷を受け、EC-SOD活性が低下したと考えられる。

飼育飼料を液体から固形へと戻すことで、固形飼料で飼育し続けた群と同程度まで血清SOD活性が回復した。これは、飼料形態を元に戻すことで好中球の活性化が抑制され、活性酸素の産生系と消去系のバランスが平衡状態を呈し、生体が受けていた酸化ストレスから解放されたためであると予想される。生体は咀嚼動態の変化に順応することなく、生体で適応した咀嚼が営まれるようになると、早期にストレス負荷が軽減されることが推察された。

また、顎口腔系の機能異常を解析することは、咀嚼動態の変化に留まらず、咬合も考慮することが重要である。咬合挙上による咬合干渉が生体に与える影響は、動物モデルのみならずヒトの研究で多く報告されているが (Ibaraki, 1992)、酸化ストレスとの関連は明らかにされていない。本研究では、咬合干渉が血清SOD活性を低下させることで、酸化ストレスを誘導している可能性が示唆された。

## 5. 結 論

本研究では、液体飼料飼育による咀嚼動態の変化に伴う生体への影響を、ラットを用いた動物モデルで、酸化ストレスを指標に、活性酸素発生機構 (産生系) と防御代謝 (消去系) の両面から検討した。本研究の結果か

ら、ラットの飼料形態の変更による咀嚼障害がストレスとなり、生体に酸化ストレスを誘導することが示唆された。健康の維持・向上のためにも、適正な咬合・咀嚼機能の保持が必要不可欠であり、QOLの阻害因子を取り除くために、歯科医学からのアプローチも重要であると考えられる。

## 文 献

- Adachi T, Yamada H, Kato K & Hirano K. Substitution of glycine for arginine-213 in extracellular-superoxide dismutase impairs affinity for heparin and endothelial cell surface. *J Biol Chem* 313 : 235-240, 1996.
- Angela G, Alicia B, Susanne K, Florian H & Johannes M. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels : involvement of corticotropin-releasing hormone. *Neuroscience* 21 : 4822-4829, 2001.
- Eldrup E & Erik A. DOPA, dopamine, and DOPAC concentrations in the rat gastrointestinal tract decrease during fasting. *J Physiol Endo* 279 : 815-822, 2000.
- Hamaue N, Yamazaki N & Minami M. Effect of isatin, an endogenous MAO inhibitor, on acetylcholine and dopamine levels in the rat striatum. *Biol Amines* 15 : 367-377, 1999.
- Hattori H, Imai H, Hanamoto A, Furuhashi K & Nakagawa Y. Up-regulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat casein-induced polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 389 : 279-287, 2005.
- Hori N. Biting suppresses stress-induced expression of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat hypothalamus. *J Dent Res* 83 : 124-128, 2004.
- Hujii H, Aoki M, Haishi T, Itoh K & Sakata M. Development of an ESR/MR dual-imaging system as a tool to detect bioradicals. *Magnetic Res Med Sci* 5 : 17-23, 2006.
- Ibaraki R. Effect of in occlusal vertical dimension on chewing movements part I. Influence on the rhythm of chewing movements. *J Jpn Prosthodont Soc* 36 : 1273-1278, 1992.
- Ichihashi Y, Arakawa Y, Kurata C, Iinuma M, Tamura Y, Kubo K & Iwaku F. Participation with occlusal disharmony and stress. *Dent J Health Sci Univ Gifu* 34 : 87-92, 2008.
- Kamibayashi M. Influences of organic solvents on CYPMPO-electron spin resonance spectrain in radical generation systems. *Magnetic Res Med Sci* 10 : 1-12, 2010.

- Kohno M. Application of electron spin resonance spectrometry for reactive oxygen species and reactive nitrogen species research. *J Clin Biochem Nutr* 47 : 1-11, 2010.
- Kopprasch S, Gatzweiler A, Graessler J & Schroder HE.  $\beta$ -adrenergic modulation of FMLP-and zymosan-induced intracellular and extracellular oxidant production by polymorphonuclear leukocytes. *Mol Cell Biol Chem* 168 : 133-139, 1997.
- Kotake Y. Synthesis and characterization of a practically better DEPMPO-type spin trap, 5-(2, 2-dimethyl-1, 3-propoxy cyclophosphoryl) -5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO). *Free Radic Res* 40 : 1166-1172, 2006.
- Kusakabe M, Kambayashi I, Hujii H & Takeda H. Measurement of superoxide-generating activity of neutrophils using electron spin resonance spectroscopy. *Hlth Sci Med Univ Sapporo* 11 : 21-29, 2008.
- Lan HC. Effect of stress on interleukin-2 receptor expression by bovine mononuclear leukocytes. *Immunopathol*. 49 : 241-249, 1995.
- Laurent F, Benoliel AM, Capo C & Bongrand P. Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes : modulation by adhesive stimuli. *J Leu Biol* 49 : 217-226, 1991.
- Makiura T, Ikeda Y & Hirai T. Influence of diet and occlusal support on learning memory in rats behavioral and biochemical studies. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107 : 269-277, 2000.
- Markland SL & Carlsson LM. The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *J Biol Chem* 93 : 5219-5222, 1996.
- Mathison RD & Davison JS. The tripeptide feG regulates the production of intracellular reactive oxygen species by neutrophils. *J Infla* 143-9, 2006.
- Matsumoto Y, Ogawa Y, Yoshida R, Kasai H & Ohta H. The stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), when stored at room temperature. *J Occup Health* 50366-50372, 2008.
- Mege JL, Capo C, Benoliel AM & Bongrand P. Self-limitation of the oxidative burst of rat polymorphonuclear leukocytes. *J Leu Biol* 39 : 599-616, 1986.
- Miyano K, Tamura M & Sumimoto H. Molecular mechanism for production of reactive oxygen species by neutrophils. *Infla Reg* 25 : 113-118, 2005.
- Moller P, Wallin H & Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *J Biol Chem* 102 : 17-36, 1996.
- Nicole G, Schommer MS & Clemens K. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress. *Psychosomatic Med* 65 : 450-460, 2003.
- Okimoto K. Influence of function immune system-effect of denture on immunological parameters. *J Jpn Prosthodont Soc* 42 : 591-596, 1998.
- Pedersen BK, Plomgaard P & Febbraio MA. Muscle-derived interleukin-6 : lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch* 446 : 9-16, 2003.
- Roberto B. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Med Sci* 86 : 4695-4699, 1989.
- Sanchez R, Santiago E & Mendoza-Nunez VM. Relationship between oxidative stress and cognitive impairment in the elderly of rural vs. urban communities. *Life Sci* 78 : 1682-1687, 2006.
- Sasaki K. Effects of loss of occlusal support on the central nervous system in rats. *J Jpn Prosthodont* 46 : 185-194, 2002.
- 高山房子. フリーラジカルと酸化ストレス - ESRによる測定法を中心に -. *Folia Pharmacol* 120 : 229-236, 2002.
- Takeichi T. Psychological stress caused by occlusal appliances which increased vertical dimension. *Dent J Aichi Gakuin* 38 : 605-609, 2000.
- Takigami K. The influences of different feed forms and altered feed nutrition on the growth and development of the masticatory organs of rats. *Hlth Sci Med Univ Shiga* 17 : 29-41, 2002.
- Terasawa H, Hirai T, Ninomiya T, Ikeda Y, Ishijima T, Yajima T, Hamaue N, Nagase Y, Kang Y & Minami M. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats. *Neurosci Res* 43 : 373-379, 2002.
- 渡辺明治, 新田早実 & 木野山真紀. 心理的ストレスによる酸化ストレス発現のメカニズム. *日本病態栄養学会誌* 10 : 5-23, 2007.
- Xiong F, Xiao D & Zhang L. Norepinephrine causes epigenetic repression of PKCepsilon gene in rodent oxygen species production. *FASEB J* 26 : 2753-2763, 2012
- Yoshida M. Relationship between dental occlusion and falls among the elderly with dementia. *Prosthodont Res*

5 : 52-56, 2006.

Yoshihara T, Matsumoto Y & Ogura T. Occlusal disharmony affects plasma corticosterone and hypothalamic noradrenaline release in rats. J Dent Res 80 : 2089-2092, 2001.

吉原俊博, 松本祐子 & 小椋正. 液体飼料による周期的制限給餌がラット行動リズムに及ぼす影響. 小児歯科学雑誌 39 : 449, 2001.



鈴木 裕仁

昭和56年1月生まれ, 北海道函館市出身  
平成11年3月 函館中部高等学校卒業  
平成18年3月 北海道医療大学歯学部歯学科卒業  
平成23年3月 北海道医療大学歯学研究科博士課程修了  
現在 札幌市内歯科医院勤務