

〔学位論文〕

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

Research for Derivation of Oxidative Stress with Changes
of Mastication Dynamic Stage in Rats

Hirohito SUZUKI

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

緒 言

咬合・咀嚼は健康の維持に不可欠な因子の一つで、生体情報伝達系である神経系－内分泌系－免疫系の相互作用に深く関与している (Hori, 2004)。咬合・咀嚼が正常に営まれなくなるとストレス者となり、生体に様々な影響を及ぼす可能性が示唆されている (Yoshikawa, 2000)。一方、生体がストレスを受けると、抗酸化能が低下するという報告が多くなされている。それに伴い、活性酸素の産生系と消去系の均衡関係が崩壊し、酸化ストレスが誘導され、生体に障害が生じる (Cernak et al., 2000)。

本研究では、ラットの飼育飼料形態を固形から液体へ変化させること、すなわち咀嚼の在り方が、酸化ストレスを誘導するのか否かを、活性酸素の産生系として好中球のスーパーオキシド生成と、消去系としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様活性の両面から検討した。

方 法

実験動物には9週齢のWistar系雄性ラットを124匹用いた。飼育環境は1ケージ2匹で飼育し、飼料と水は自由摂取とした。すべてのラットは、通常の固形飼料で飼育を開始し、10週齢になった時点で、ヒト経腸栄養剤エンシュアリキッドで飼育する液体飼料飼育群と、液体飼料と同一成分の固形飼料で飼育する固形飼料飼育群の2群を設定し、以下の測定を行った。

1) 飼育飼料変更後、1週間隔で84日目まで体重の経時的変化を調べた。

2) 飼育飼料変更後、1週間隔で28日目まで、ラット尾部から採血し血漿を回収し、ストレスマーカーである血中カテコールアミン (アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン) 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法にて測定した。

3) 好中球のスーパーオキシド生成能は、飼育飼料変更後、1週間隔で28日目まで5%カゼイン溶液を腹腔内投与し、16時間後に腹腔内より好中球を含む滲出液を回収した。好中球を 1×10^7 cells/mlに調整し、ホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸塩 (PMA) にて刺激し、二波長分光光度計を用いてシトクロムc還元法により測定した (Hattori et al., 2005)。

4) 血清SOD様活性は、飼育飼料変更後、1週間隔で28日目まで、それ以降は2週間隔で84日目まで、ラット尾部より採血し血清を回収し、電子スピン共鳴 (electron spin resonance; ESR) 法にて解析した。ESRは、一定の磁場をかけた状態に電磁波を照射し、フリーラジカルの不対電子が共鳴する信号をスペクトラムとして記録する装置である。

スーパーオキシドを安定した状態で捉える捕捉剤にはCYPMPO (5-2, 2-dimethyl-1, 3-propoxycyclophosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide) を用いた。測定はhy-poxanthine/xanthine oxidase系で人工的にスーパーオキシドを発生させ、血清による消去能を求めた後、ウマ赤血球由来のSODを用いた検量線により、血清SOD様活性を

解析した (Hujii et al., 2006 ; Kohno, 2010).

5) 好中球のスーパーオキシド生成を担う酵素系であるNADPHオキシダーゼの構成タンパクp47phoxの発現量を, ウエスタンブロッティング法により解析した.

6) 液体飼料飼育を28日間行ない, 通常の固形飼料飼育に戻すことで, 血清SOD様活性に影響があるか検討した.

結 果

1) 飼料変更後の体重については, 固形飼料飼育群, 液体飼料飼育群ともにその増加傾向を示し, 両群間に差異は認めなかった.

2) 血中アドレナリン, ノルアドレナリン濃度については, 飼料変更後7日目から28日目まで, 固形飼料飼育群に比べて液体飼料飼育群で, 有意に増加していた ($p < 0.05$). 一方, 血中ドーパミン濃度においては, 両群とも低濃度で検出することが出来なかった.

3) 好中球のスーパーオキシド生成能は, 飼料変更後7日目, 14日目, 21日目で, 固形飼料飼育群に比べて液体飼料飼育群で, 有意な増加傾向が認められた ($p < 0.05$).

4) 血清SOD様活性は, 飼料変更後, 7日目, 14日目は両群間で変化は認められなかったが, 21日目以降84日目まで, 液体飼料飼育群は固形飼料飼育群と比べて, 有意に低下していた ($p < 0.05$).

5) 固形飼料飼育群と比較して液体飼料飼育群において, 好中球細胞膜のp47phoxタンパク発現量は増加していた ($p < 0.05$).

6) 液体飼料飼育から再び固形飼料飼育へと戻すと, 血清SOD様活性は固形飼料で飼育し続けた群と同程度まで回復し, 両群間に差は認められなくなった.

考 察

血中アドレナリン, ノルアドレナリン濃度の増加によ

り, 噛むことが習性であるラットの飼育飼料形態の変化がストレスヤーとなっていることが窺えた. 好中球のスーパーオキシド産生は, 液体飼料飼育に変更後7日目に増加したが, 血清SOD様活性においては, 飼育飼料変更後21日目に低下傾向を認めた. つまり, 咀嚼動態は, 先に活性酸素の産生系, その後に消去系に影響を及ぼし, 酸化ストレスを誘導することを明らかにした. また, 長期間の液体飼料飼育という咀嚼動態の変化が起こると, 生体は順応することなく, 持続的に酸化ストレスを受け続けることが示唆され, 液体飼料から再び固形飼料へと戻すことにより, 生体は素早く酸化ストレスから解放され, 正常な状態まで抗酸化能を回復させた. これらの結果から, 生体の健康を維持・増進するためには適正な咬合・咀嚼機能の保持が不可欠であり, 咬合・咀嚼機能障害を持つ患者においても, 早期治療が生体の健康の維持・増進に寄与すると考えられる.

参 考 文 献

- Cernak I, Savic V & Kotur J. Alterations in magnesium and oxidative status during chronic emotional stress. *Manage Res* 13 : 29–36, 2000.
- 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* 280 : 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* 5 : 17–23, 2006.
- 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.
- Yoshikawa H. Effects of experimental occlusal interference on dopamine release in rat prefrontal cortex. *J Dent Res* 79 : 284–291, 2000.



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