

〔原 著〕

## 幼若ラットの咬筋に対する粉末飼料の影響

太田 勲, 石井 久淑, 山根 美子, 猪股孝四郎, 山口 明彦\*

\*北海道医療大学歯学部口腔生理学講座

\*北海道医療大学基礎教養部

(主任：猪股孝四郎教授)

## Effect of powdered diet on masseter muscles of young rats

Isao OOTA, Hisayoshi ISHII, Yoshiko YAMANE,  
Koshiro INOMATA and Akihiko YAMAGUCHI

Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Health Sciences  
University of Hokkaido

\*Department of General Education

(Chief : Prof. Koshiro INOMATA)

### Abstract

The effect of powdered diet on masseter muscles was investigated in young rats. Rats were fed either a pellet (pelleted diet group) or powder (powdered diet group) diet. There was no significant difference between the body weights of rats in two groups. The weights and fiber diameters of the masseter muscles in both groups increased with age (from 4 to 10 weeks). However, the increments in masseter muscle weight and fiber diameters in the powdered diet group were significantly lower than those in the pelleted diet group. The NADH activity of muscle fibers in the powdered diet group was lower than that in the pelleted diet group.

These results indicate that the powdered diet in young rats retards the development of masseter muscles.

**Key words** : young rats, masseter muscle, powdered diet

## 緒 言

咀嚼筋の活動は、顎骨ならびに口腔の諸機能の発育を制御する重要な要因の一つとして注目されている<sup>2),4),7),19),22),24)</sup>。従来から咀嚼筋の活動を制御する手段として、固型（ペレット状）飼料を粉末飼料に換えて動物を飼育する方法が用いられている<sup>18),19),20),21)</sup>。しかし、これらの報告は離乳直後の限られた一時期の個体<sup>18)</sup>、あるいは成熟期<sup>21)</sup>の個体に関するものであり、幼若ラットの咀嚼筋に対する粉末飼料の影響を長期間にわたって検討した報告はない。

本論文では、咬筋の発育に対する粉末飼料の影響を明らかにする目的で、4週齢から10週齢まで粉末飼料で飼育したラットと固型飼料で飼育したラットの咬筋の湿重量、ならびに筋線維の直径について比較検討した。

## 材料と方法

### 1. 材料

実験にはラット（Wistar, ♂, 三協ラボ）の咬筋を用いた。3週齢で離乳したラットを固型飼料（飼育用MF, オリエンタル酵母）で4週齢まで飼育し、そのまま固型飼料を摂取させた群（固型飼料群）と4週齢から粉末飼料（飼育用粉末MF, オリエンタル酵母）を摂取させた群（粉末飼料群）に分けて10週齢まで飼育した。本実験で用いた固型飼料および粉末飼料は形状のみが異なり、組成、栄養価ならびに水分含量は等しいものである。

なお、実験に用いたラットは本学動物実験センターにおいて恒常的条件下（明暗周期12時間、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ）で飼育し、飼育期間中の飼料および水の摂取は自由にさせた。また、飼育および実験は「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」（日本生理学会制定）に基づいて行った。

### 2. 凍結切片の作製

ラットの腹腔内にsodium pentobarbital (50 mg/kg body weight) を投与し、麻酔した条件で速やかに両側の咬筋を摘出した。摘出した右側の咬筋浅部の筋腹中央部を小組織片とし、これを可能な限り素早く、液体窒素で冷却したイソペンタン中に投入して凍結固定した。凍結した小組織片は、クリオスタット（Cold tome CM-501, サクラ精機）にて $-25^\circ\text{C}$ 下で厚さ10  $\mu\text{m}$ の連続切片とした。

### 3. 筋線維の直径の測定

切片を室温で30分以上乾燥させた後、NADH-TR染色用の反応液（NADH 3.2mg, nitroblue tetrazolium 8.0mg, MOPS buffer 2.0ml, 蒸留水8.0ml）中で $37^\circ\text{C}$ 下に40分間インキュベートした。その後、グリセリンゼリーにて封入し、顔面神経が横走している近傍に存在する筋線維の直径を画像処理&解析システム（Quantimet 600, ライカ）を用いて測定した。なお、筋線維の直径は、石井ら<sup>8)</sup>の方法に準じて測定した。

## 結 果

### 1. 体重の変化

体重と週齢の関係をFig.1に示す。固型飼料群と粉末飼料群に分ける時点の4週齢のラットの体重は、 $102.6 \pm 4.7\text{g}$  (mean  $\pm$  SD)であった。その後、固型飼料群の体重は、5週齢で $144.8 \pm 11.2\text{g}$ 、6週齢で $199.0 \pm 11.3\text{g}$ 、7週齢で $241.2 \pm 15.1\text{g}$ 、8週齢で $278.7 \pm 15.1\text{g}$ 、9週齢で $316.5 \pm 15.7\text{g}$ 、および10週齢で $338.5 \pm 18.0\text{g}$ であった。一方、粉末飼料群の体重は、5週齢で $143.7 \pm 14.1\text{g}$ 、6週齢で $189.2 \pm 16.4\text{g}$ 、7週齢で $247.7 \pm 22.2\text{g}$ 、8週齢で $266.2 \pm 24.2\text{g}$ 、9週齢で $310.7 \pm 27.5\text{g}$ 、および10週齢で $343.2 \pm 19.2\text{g}$ であった。

以上のように、体重はいずれの週齢においても固型飼料群ならびに粉末飼料群の間に有意差

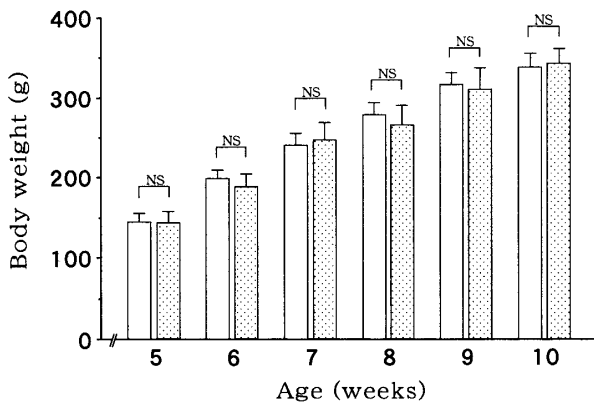


Fig.1 Effect of dietary consistency on body weight in rats. Open and dots bars indicate the pelleted diet group and the powdered group in rats. Each bar and its vertical line represent the mean and SD, respectively.

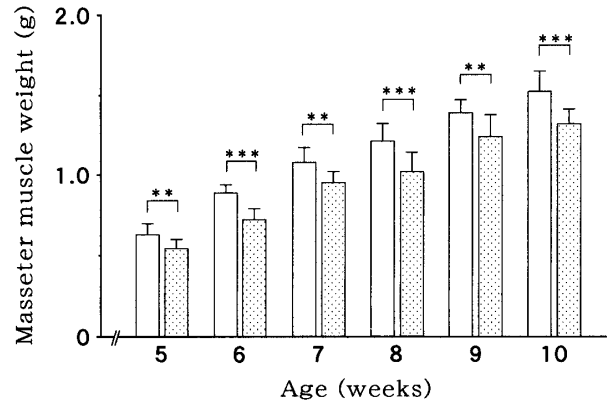


Fig.3 Effect of dietary consistency on masseter muscle weight in rats. Open and dots bars indicate the pelleted diet group and the powdered group in rats. Each bar and its vertical line represent the mean and SD, respectively. \*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001.

はなく、週齢とともに増加した。

## 2. 筋湿重量の変化

咬筋湿重量はFig.2に示すように、いずれの週齢においても左側と右側との間には有意な差は認められなかった。そこで、左側の咬筋について湿重量を測定し、右側の咬筋から組織標本を作製した。

筋湿重量と週齢の関係をFig.3に示す。固型飼料群と粉末飼料群に分ける時点の4週齢の咬筋湿重量は、460±40(mean±SD)mgであった。

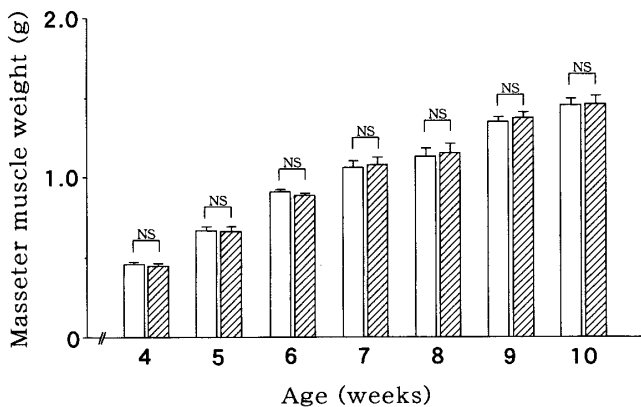


Fig.2 Wet weight of masseter muscles in rats of various ages. Open and diagonal bars indicate the right and the left muscles. Each bar and its vertical line represent the mean and SD, respectively.

5週齢における固型飼料群の筋湿重量は、630±70mgであった。これに対して粉末飼料群の筋湿重量は、540±60mgであり、粉末飼料群の筋湿重量は、固型飼料群に対して有意に低い値を示した。固型飼料群および粉末飼料群の各週齢におけるそれぞれの筋湿重量は、6週齢では890±50mgと720±70mg、7週齢では1080±90mgと950±70mg、8週齢では1210±110mgと1020±120mg、9週齢では1390±80mgと1240±140mg、および10週齢では1520±130mgと1320±90mgであった。

以上のように、両群における咬筋湿重量は週齢とともに有意に増加した。しかし、粉末飼料群における咬筋の湿重量はいずれの週齢においても固型飼料群に比較し、平均14パーセント低い値を示し、この差は有意であった。

## 3. 筋線維の直径の変化

7週齢のラットの咬筋の横断面像をFig.4に示す。固型飼料群における咬筋浅部の筋線維は、NADHの染色性が高い線維 (high NADH activity fiber) と染色性の低い線維 (low NADH activity fiber) および両者の中間的な染色性を示す線維 (intermediate NADH activity fiber) の3タイプに分けることができた。こ

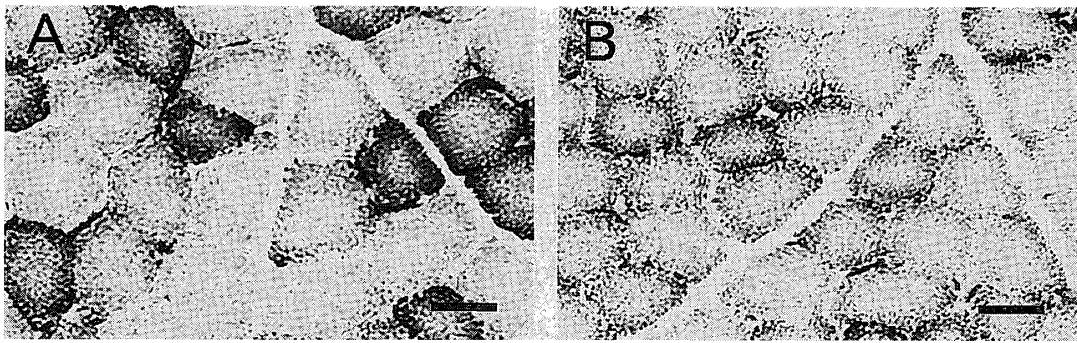


Fig.4 Cross sections of masseter muscles in the pelleted diet group (A) and powdered diet group (B) stained with NADH-TR. These image are made using an Image Processing and Analysis System (Quantimet 600, Leica) connected to a personal computer. Bar : 50 $\mu$ m.

の結果は、従来の報告<sup>18),21)</sup>と一致していた。しかし、Fig.4より明らかなように、粉末飼料群のNADHの染色性は固型飼料群に比較して全体に低く、筋線維のタイプの識別が困難であった。したがって、本実験では両群とも筋線維をタイプに分けることなく、顔面神経が横走している近傍に存在する筋線維の直径を測定した。

筋線維の直径と週齢の関係をFig.5に示す。固型飼料群および粉末飼料群それぞれにおける筋線維の直径は、5週齢では $26.3 \pm 2.7$  (mean  $\pm$  SD) $\mu$ mと $23.5 \pm 3.2\mu$ m、6週齢では $30.4 \pm 3.6$

$\mu$ mと $28.8 \pm 4.0\mu$ m、7週齢では $36.3 \pm 4.2\mu$ mと $31.9 \pm 4.0\mu$ m、8週齢では $37.8 \pm 5.1\mu$ mと $32.9 \pm 4.4\mu$ m、9週齢では $38.7 \pm 5.4\mu$ mと $35.3 \pm 4.6\mu$ m、および10週齢では $42.3 \pm 6.8\mu$ mと $37.5 \pm 5.2\mu$ mであった。

以上のように筋線維の直径は週齢とともに有意に増大した。しかし、粉末飼料群における筋線維の直径はいずれの週齢においても固型飼料群に比較し、平均10パーセント低い値を示し、この差は有意であった。

## 考 察

本実験において、粉末飼料群における体重は固型飼料群のものと有意差がなく、週齢とともに増加した (Fig.1)。このことは、ラットは粉末飼料からでも固型飼料におけると同様に十分な栄養を摂取できることを示す。同様な結果は、ラットならびにマウスについて報告されている<sup>19),21)</sup>。一方、粉末飼料群における咬筋の筋湿重量、ならびに筋線維の直径はいずれの週齢においても固型飼料群より低く、その低下の程度はそれぞれ平均14% (Figs.2,3)と平均10%であった (Fig.5)。この様に、粉末飼料群における咬筋湿重量と筋線維の直径の低下の程度が近似していることから、成長期における粉末飼料の摂取は咬筋の発育を遅延させ、その主な原因は筋

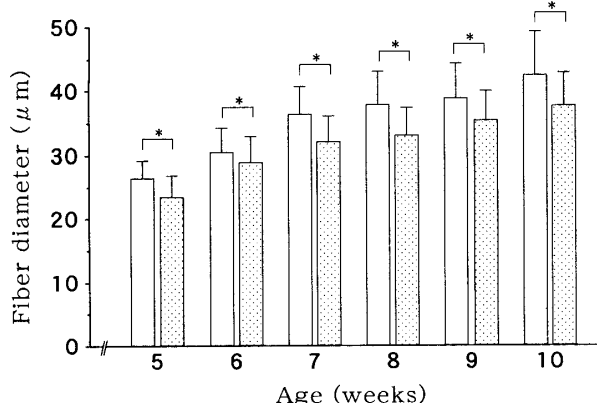


Fig.5 Effect of dietary consistency on fiber diameter in masseter muscles in rats of various ages. Open and dots bars indicate the pelleted diet group and the powdered group in rats. Each bar and its vertical line represent the mean and SD, respectively. \*P<0.001.

線維の肥大の抑制であると考えられる。

一般にヒラメ筋や足底筋の発育過程においては、筋線維の肥大や酵素活性の増強が起こり、これらは適切な運動負荷により促進されることが知られている<sup>5),6),10),11),18),19)</sup>。固型飼料群のラットは、摂食時に飼料を破砕や粉細する必要があるが、粉末飼料群のラットではそれを必要としない。したがって、咬筋にかかる負荷は粉末飼料群より固型飼料群で大きいと考えられる。換言すれば、粉末飼料摂取時の咬筋に対する運動負荷は、固型飼料摂取時よりも軽減していると考えられる。この運動負荷の軽減が、前述の粉末飼料群における咬筋の発育を遅延させた原因の一つであることを示唆する。さらに、咀嚼筋に対する負荷の軽減の効果は、粉末飼料を摂取してほぼ1週間で発現することが明らかにされた。

骨格筋を構成する筋線維は、収縮速度が遅く疲労しにくい NADH 活性が高い線維、収縮速度が速く疲労しやすい NADH 活性が低い線維、およびこれらの中間的な性質をもつ線維の3タイプに分類されている<sup>1),3),12),19)</sup>。また、筋全体としての機能的な特徴は、これら3タイプの筋線維の構成比によることも知られている<sup>1),3)</sup>。咀嚼筋における筋線維の構成比は、動物種によって異なり、摂食時の顎運動様式に深い関係があると考えられている<sup>23)</sup>。すなわち、ラットやマウスなどの齧歯類の咀嚼運動は、咀嚼リズムの速い垂直運動が主体であり、酸化酵素活性が低く疲労しやすい筋線維の構成比が高いことが報告されている。一方、牛や羊に代表される反芻動物では、長時間にわたる臼磨運動を主体とした咀嚼運動に適応して、酸化酵素活性が高く疲労しにくい筋線維の構成比が高いことが知られている。

ラット咬筋浅部は、NADH活性の低い線維が約60%、NADH活性が中等度の線維が約30%、NADH活性の高い線維はごく少数しか存在せ

ず、筋線維の構成比からは比較的速い運動を行うが、疲労しやすい筋に近いことが知られている<sup>9),21)</sup>。本研究においても咬筋浅部は、3タイプの筋線維が認められた。しかし、粉末飼料群の咬筋におけるNADHの染色性は、いずれの週齢においても固型飼料群より低い傾向を示した (Fig. 4)。この結果は、粉末飼料群の咬筋は固型飼料群に比較して、酸化的エネルギー産生能力がさらに低下していること、機能的には速い運動は可能であっても、耐疲労性はさらに低下していることを示唆する。このことは、粉末飼料群のラットは固型飼料群に比べて咬筋に対する負荷が軽減しているという、前述の我々の考えを支持する。なお、酸化的エネルギー産生の過程はミトコンドリアの機能と深い関係にあることが知られている<sup>5)</sup>。したがって、ミトコンドリアの微細構造ならびに酸化酵素活性に対する粉末飼料の影響についての詳細な検討が必要である。

## 結 論

成長期における咬筋の発育に及ぼす飼料の形状の影響を明らかにする目的で、固型飼料群と粉末飼料群に分けて飼育し、咬筋の筋湿重量ならびに筋線維の直径を比較検討した。固型飼料群ならびに粉末飼料群の体重はいずれの週齢においても両群の間に有意差は認められなかった。両群の筋湿重量および筋線維の直径は、週齢とともに有意に増大した。しかし、粉末飼料群の筋湿重量および筋線維の直径は、いずれの週齢においても固型飼料群に対して有意に低い値を示した。また、粉末飼料群の咬筋のNADH活性は固型飼料群に対して全体的に低い傾向を示した。

以上より、粉末飼料を摂取した幼若ラットにおいては咬筋の発育が遅延し、この遅延は咀嚼筋に対する運動負荷の軽減によることが示唆された。

## 引用文献

1. Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Furukawa, T. and Peter, J. B. : Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.*, 220 : 410-414, 1971.
2. Belser, U.C. and Hannam, A.G. : The contribution of the deep fibers of the masseter muscle to selected tooth-clenching and chewing tasks. *J. Prosthet. Dent.*, 56(5) : 629-635, 1986.
3. Edogerton, V. R. and Simpson, D. R. : The intermediate muscle fiber of rats and guinea pigs. *J. Histochem. Cytochem.*, 17 : 828-838, 1969.
4. Endo, Y., Mizuno, T., Fujita, K., Funabashi, T. and Kimura, F. : Soft-diet feeding development enhances later learning abilities in female rats. *Physiol. Behav.*, 56 : 629-633, 1994.
5. Gollnick, P. D. and King, D. W. : Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 216 : 1502-1509, 1969.
6. Holloszy, J. O. : Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 242 : 2278-2282, 1967.
7. Houston, W. J. B. : Growth of the muscles of mastication in the rat. *Trans. Eur. Orthod. Soc.* : 85-90, 1974.
8. 石井久淑, 太田 勲, 山根美子, 猪股孝四郎 : ラット咀嚼筋線維の肥大あるいは萎縮を評価する指標について, 東日本歯学誌, 第17巻 : 61~66, 1998.
9. Kiliaridis, S., Engström, C. and Thilander, B. : Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet. *Archs oral Biol.*, 33(3) : 187-193, 1988.
10. Kiliaridis, S. and Shyu, B.C. : Isometric muscle tension generated by masseter stimulation after prolonged alteration of the consistency of the diet fed to growing rats. *Archs oral Biol.*, 33(7) : 467-472, 1988.
11. Kowalski, K., Gordon, A., Martinez, A. and Adamek, J. : Changes in enzyme activities of various muscle fiber types in rat induced by different exercises. *J. Histochem. Cytochem.*, 17 : 601-607, 1969.
12. Kowalewski, R. and Miltzow, M. : Postnatal development of masticatory muscles in the Wistar rat (*Rattus Norvegicus Berkenhout*). A histochemical study. *Anat. Anz.*, 170 : 205-211, 1990.
13. 町野 守, 前田憲彦, 増田 屯, 久米川正好 : マウス咀嚼筋の生後発達の研究(1)咬筋浅部を構成する筋線維の分化に関する研究, 城歯大紀要10(1) : 111~116, 1981.
14. 町野 守 : ゲッ歯類の咀嚼器官の生後発達について, 城歯大紀要12(3) : 425-439, 1983.
15. 前田憲彦, 花井 汎 : 咀嚼器官の生後分化に関する研究(1)咬筋を構成する筋線維の分化, 城歯大紀要, 7(2) : 219-222, 1978.
16. 前田憲彦, 花井 汎 : ラットにおける咀嚼器官の生後分化に関する研究(2)  $K_2 \cdot EDTA$  前処理後のATPase活性を指標としたM. masseter muscle superficialisの生後発達の解析, 城歯大紀要, 8(2) : 135-138, 1979.
17. ラットにおける咀嚼器官の生後分化に関する研究(3)幼若ラットのM. masseter superficialisを構成する筋線維の径およびATPase活性に対するホルモンの影響, 城歯大紀要, 8(2) : 139-142, 1979.
18. Maeda, N., Hanai, H. and Kumegawa, M. : Postnatal development of masticatory organs in rats III Effect of mastication on the postnatal development of the M. masseter superficialis. *Anat. Anz.*, 150 : 424-427, 1981.
19. 前田憲彦, 久米川正好 : 咀嚼器官および消化器官の生後発達とその制御要因について, 歯基礎誌, 26 : 993-1011, 1984.
20. Maeda, N., Kawasaki, T., Osawa, K., Yamamoto, Y., Sumida, H., Masuda, T. and Kumegawa, M. : Effects of long-term intake of a fine-grained diet on the mouse masseter muscle. *Acta. Anat.*, 128 : 326-333, 1987.
21. Miyata, H., Sugiura, T., Kawai, Y. and Shigenaga, Y. : Effect of soft diet and aging on rat masseter muscle and its motoneuron. *Anat. Rec.*, 237 : 415-420, 1993.
22. Moss, M.L. : Functional analysis of the coronoid process in the rat. *Acta Anat.* 77 : 11-24, 1970.
23. Suzuki, A. : A comparative histochemical study of the masseter muscle of the cattle, sheep, swine, dog, guinea pig and rat. *Histochemistry*,

- 51 : 121-131, 1977.
24. Ulgen, M., Baran, S., Kaya, H. and Karadede, I. : The influence of the masticatory hypofunction on the craniofacial growth and development in rats. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 111(2) : 189-198, 1997.
25. Vilmann, H., Kirkeby, S. and Kronborg, D. : Histomorphometrical analysis of the influence of soft diet on masticatory muscle development in the muscular dystrophic mouse. *Archs oral Biol.*, 35(1) : 37-42, 1990.