

総 説

咬合不全と慢性ストレス

市橋幸子¹⁾ 荒川容子¹⁾ 倉田知香¹⁾ 飯沼光生¹⁾
田村康夫¹⁾ 久保金弥²⁾ 岩久文彦²⁾

Participation with Occlusal Disharmony and Stress

ICHIHASHI YUKIKO¹⁾, ARAKAWA YOKO¹⁾, KURATA CHIKA¹⁾, IINUMA MITSUO¹⁾
TAMURA YASUO¹⁾, KUBO KIN-YA²⁾ and IWAKU FUMIHIKO²⁾

本研究は、高次脳中枢の中でストレスによる影響を最も受けやすいといわれている海馬にスポットをあて、老化促進モデルマウス P8 系を用いて、咬合不全が海馬機能に与える影響を検討した。咬合拳上は、マウスの上顎臼歯部に歯科用光重合レジンをもることにより行った。はじめに、ストレス物質である血中のコルチコステロン (CO) 濃度を測定した。その結果、老齢期の咬合拳上マウスでは、血中 CO 濃度が顕著に上昇していたため、咬合拳上がストレスラーとして作用していることが確認された。次いで、海馬の記憶機能が測定できる Morris 水迷路学習テストを行い、咬合拳上と空間認知能との関係を検討した。また、Fos 陽性細胞の発現率から記憶運動にリンクした海馬への情報入力量を検討した。その結果、老齢期の咬合拳上マウスでは、水迷路テストによりプラットホームへの到達時間が延長するとともに、Fos 陽性細胞数が減少していたことから、咬合拳上により海馬への情報入力量が減少し、空間認知能が低下することが示唆された。次に水迷路テスト終了後、咬合拳上と老化プロセスとの関連を検討するため、海馬神経細胞数の計測を行った。老齢期の咬合拳上マウスでは、海馬神経細胞数の減少がみられたことから、咬合拳上が海馬の老化を促進させることがわかった。最後に、海馬におけるグルココルチコイドレセプター陽性細胞とグルココルチコイドレセプター mRNA の発現状況を調べ、咬合拳上が視床下部 下垂体 副腎皮質 (HPA-axis) に与える影響を検討した。咬合拳上マウスでは、GR 陽性細胞と GR mRNA の発現が減少したことから、海馬から HPA-axis へのネガティブフィードバック機構が抑制されていることが判明した。

本実験により、咀嚼機能の維持や咬合不調和の改善は、「食べることができる」ようにするというだけでなく、海馬機能 (記憶能力) の維持に重要であることが脳科学的に証明された。また、歯の喪失している高齢者の有病率や認知症発症率が高いという疫学調査の結果を考え合わせれば、高齢化が進む我が国において咬合の維持・回復は認知症予防につながる可能性があると期待される。

キーワード：咬合不全，ストレス，海馬，SAMP 8，グルココルチコイド

We examined the effect of occlusal disharmony in senescence-accelerated (SAMP 8) mice on plasma corticosterone levels, spatial learning in the water maze, fos induction, hippocampal number, expression of glucocorticoid receptors (GR) and glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid (GRmRNA) in hippocampus and inhibitor of glucocorticoid (metyrapone)

Bite-raised aged mice had significantly greater plasma corticosterone levels than age-matched control mice as well as impaired spatial memory and decreased Fos induction and a number of neurons in hippocampus. GR and GRmRNA expressions were significantly decreased in aged bite-raised mice compared with age-matched control mice. Pretreatment with metyrapone inhibited not only the bite-raised induced increase in plasma corticosterone levels, but also the

¹⁾朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座小児歯科学分野
²⁾口腔構造機能発育学講座口腔解剖学分野
501 0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

¹⁾Departments of Pediatric Dentistry, Division of Oral Structure, Function and Development

²⁾Department Oral Anatomy, Division of Oral Structure Function and Development

Asahi University School of Dentistry
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan
(平成19年11月1日受理)

reduction in the number of hippocampal neurons and impaired spatial learning.

These data suggest that the bite-raised condition may enhance the aging process in hippocampus, thereby leading to impairment of spatial memory by stress.

Key words: occlusal disharmony, stress, hippocampus, SAMP8, glucocorticoid

はじめに

咬合維持・回復は歯科医師にとって極めて重要な歯科医療行為である。歯科臨床の場では咬合を改善することにより、顎関節症、頭頸部の疼痛および肩こりなどが緩和される症例が数多く経験されていること¹⁻⁴⁾から、咬合不全がこれらの疾患と関連があると考えられてきた。

近年、実験的にヒトに咬合干渉処置を施すと不快症状に一致して脳波の変化が誘発されることが報告された^{5,6)}。また、ラットに咬合挙上装置を装着すると、視床下部を含む中枢のカテコールアミンの分泌量、血中のコルチコステロン濃度や尿中のグルココルチコイド濃度が上昇することがわかった⁷⁻⁹⁾。さらに、最近、咬合挙上モデルマウスを用いた我々の研究において、咬合挙上が記憶の座である海馬機能に依存した空間認知の減退だけではなく海馬の形態学的変化を引き起こすことがわかってきた¹⁰⁻¹³⁾。これらの事実は咬合挙上が慢性ストレスとして作用し、中枢を介して全身的なストレス反応を引き起こす可能性のあることを示唆するものである。本稿では咬合挙上とストレスに関連した最新の知見を解説する。

咬合挙上と空間認知

マウスの上顎臼歯部に歯科用光重合レジンを含み咬合高径を持続的に高くした咬合挙上モデルマウスを作った。このモデルマウスを用いて咬合挙上処置後8日目からモリス水迷路学習テストを行い、空間認知能力を測定した¹⁰⁻¹³⁾。モリス水迷路学習テストは海馬機能を反映した空間認知能力を調べるために用いられる最もポピュラーな検査方法である^{14,15)}。このテストには直径90cm、深さ30cmのプールを用いて、深さ23cmまで水を入れ、水面下1cmの深さに直径12cmの台(プラットフォーム)を置き、水面には直径1~2mmのスチレンビーズを浮かべて水中のプラットフォームが見えないようにした。3、5および9か月齢のマウスを1日4回ずつ1週間連続してこのプールで泳がせてプラットフォームに辿り着く時間を計測した。プラットフォームの存在を知らないマウスははじめのうちは水面を泳ぎ回っているが、そのうち偶然にプラットフォームに辿り着く。テスト回数を重ねるにつれて、

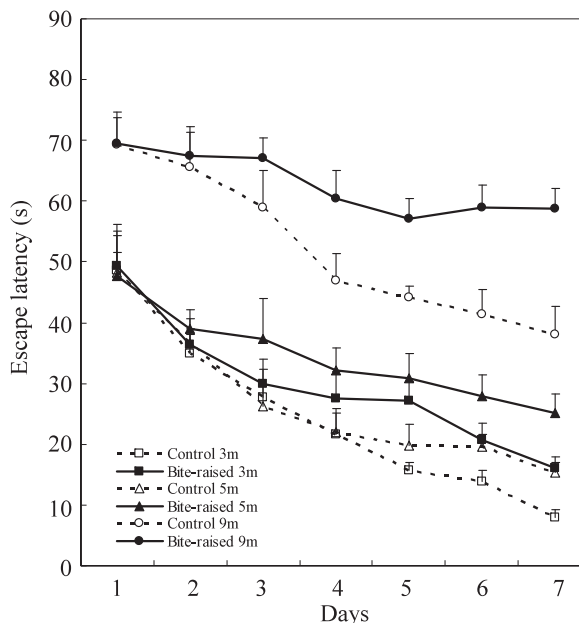


Fig. 1. Spatial learning in the water maze test. The results are expressed as the mean score (mean \pm SE, $n = 6$ for each group) of four trials per day. Note that 9-mo-old bite-raised mice required a significantly longer time to reach the platform than age-matched controls.

マウスはプラットフォームとプール周囲の目標物との位置関係からプラットフォームの位置を記憶するようになり、プラットフォームへの到達時間が次第に早くなる。

Fig. 1は咬合挙上処置マウスと非処置マウスのモリス水迷路学習テストの結果を示す。両群のどの年齢のマウスも日を経るにしたがってプラットフォームへの到達時間が短縮した。また、9か月齢の咬合挙上マウスでは同齢の非処置マウスに比較してプラットフォームへの到達時間の短縮ペースが抑制された。しかし、3および5か月齢マウスでは到達時間の短縮ペースに咬合挙上処置群と非処置群の間で有意な差は認められなかった。空間認知能力は加齢に伴い低下するといわれていること¹⁶⁾から、咬合挙上は加齢による空間認知能力の低下をさらに加速させることがわかった。

咬合挙上と海馬への情報入力量

空間認知能力は海馬機能に依存しているため海馬が障害されると空間認知能力が障害される¹⁷⁾。情報が神経細

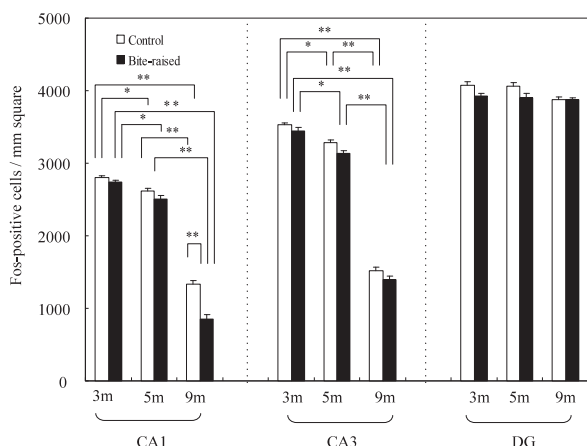


Fig. 2. Effect of bite-raised on the number of Fos-positive cells in hippocampal CA1, CA 3 and dentate gyrus (DG). The results are expressed as the mean number of Fos-positive cells/mm squared (mean \pm SE, $n=5$ for each group). Note that the greater reduction in the number of Fos-positive cells in CA1 subfield of the 9-month-old bite-raised mice. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

胞に入力されると c-fos 遺伝子が発現し Fos タンパクが産生される^{18,19}。このため Fos タンパクの発現量を調べることで海馬神経細胞への情報入力量の推定ができる²⁰。我々はモリス水迷路学習テストを一週間行った後、咬合挙上処置マウスと非処置マウスを同じ条件で遊泳させたときの海馬3領域 [CA1, CA3およびDG (歯状回)] での Fos 発現量を調べた¹⁰ (Fig. 2)。

咬合挙上処置群も非処置群も加齢に伴い海馬3領域で Fos 陽性細胞数が減少した。9か月齢咬合挙上処置マウスの海馬CA1領域では非処置マウスのそれに比較して有意に Fos 陽性細胞数が減少した。しかし、CA3およびDGでは両群間で有意な差はみられなかった。

これらの結果は老齢マウスでは咬合挙上させることにより海馬への情報入力量が減少したを示している。外部情報は海馬へ伝達された後コード化され、CA1から大脳皮質連合野へ出力され長期記憶が形成されること¹⁷から、咬合不全は大脳連合野への情報入力量を減少させ、記憶形成を障害させる可能性のあることが示唆された。

咬合挙上と海馬ニューロン死

海馬の典型的な加齢的变化は空間認知能の低下と神経細胞死であるといわれている^{16,17}。咬合挙上によりマウスの空間認知能の低下が認められたので、次に咬合挙上が海馬神経細胞数に及ぼす影響を調べた¹²。モリス水迷路学習テスト終了後、マウスの海馬を薄切し、

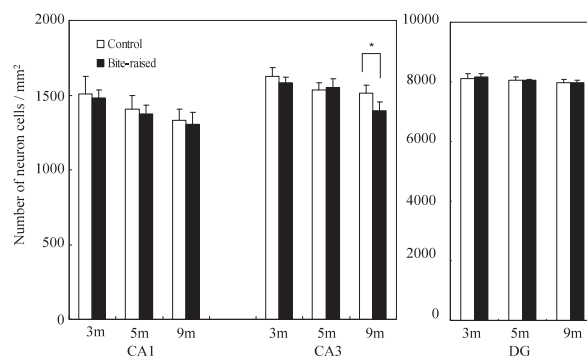


Fig. 3. Photomicrographs showing Nissl staining of the hippocampal formation. Note that there were fewer pyramidal cells within the CA 3 region of 9-month-old bite-raised mice, but not different in the CA 1 and DG regions.

ニッスル染色を行った後、海馬CA1, CA3およびDGの神経細胞数をカウントした (Fig. 3)。咬合挙上処置を施した9か月齢マウスのCA3領域で錐体細胞の有意な減少が認められた (Fig. 4)。しかし、海馬CA1およびDGでは処置群と非処置群との間で神経細胞数に有意な差はみられなかった。これに対して、3および5か月齢マウスの海馬3領域では処置群と非処置群との間で神経細胞数に有意な差は認められなかった。これらの結果から、咬合挙上は海馬の加齢的变化を加速させることがわかった。

咬合挙上とグルココルチコイド

咬合挙上した老齢マウスでみられた行動学的および形態学的変化は慢性ストレス環境下やグルココルチコイド (GC) の長期投与下での海馬の変化と酷似していること^{21,22}から、咬合挙上処置マウスの血中コルチコステロン (CO) 濃度を測定した¹²。GCは霊長類ではコルチゾール、齧歯類でCOが代表的で強い作用を示す²³。Fig. 5に示したように老齢咬合挙上処置マウスの血中コルチコステロン濃度が同齢の非処置マウスと比較して有意に上昇していた。これに対して、3および5か月齢マウスでは処置群と非処置群との間で血中CO濃度に有意な差はみられなかった。また、CO濃度の上昇した老齢咬合挙上処置マウスでは海馬CA3領域で錐体細胞数の減少が確認された。

ラットの切歯に咬合挙上装置を装着すると、血中のGCの上昇や脳内のカテコールアミンの上昇が起こることが報告されている⁷⁻⁹。これらの結果は、咬合挙上がストレスラーとして作用することを意味しており、特に慢性化するとGCの血中濃度が上昇し、海馬の神経細胞死が引き起こされるものと考えられる。

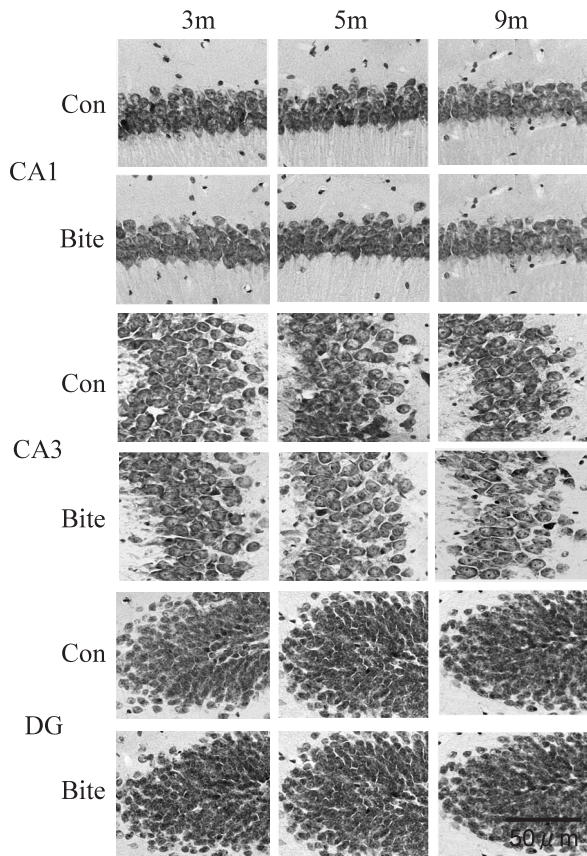


Fig. 4. Effect of the bite-raised condition on neuron number in the hippocampal formation. The results are expressed as the mean number of neurons/mm² (mean \pm SE, n = 5 for each group). Note the greater reduction in the number of neurons in the CA 3 subfield of the 9-mo-old bite-raised mice. No difference was seen in the CA 1 and DG subfields. *: $P < 0.05$.

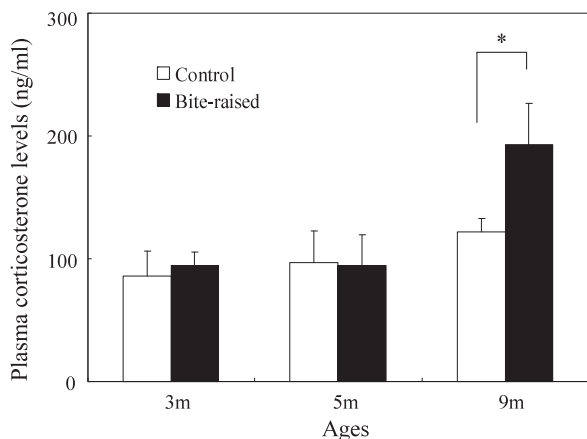


Fig. 5. Effect of bite-raising condition on plasma corticosterone levels. Mean (\pm SE) plasma corticosterone levels (ng/ml) in control and bite-raising mice (n = 4 for each column). Note that the significant increase in plasma corticosterone levels in 9-mo-old bite-raised mice than control mice. *: $P < 0.05$.

グルココルチコイド拮抗剤による影響

GCが海馬の機能的および器質的变化を引き起こすことを確認するため、GC生成阻害剤であるメチラボン^{24,25}を投与して、咬合挙上がモリス水迷路学習テストと海馬神経細胞数に及ぼす影響を検討した¹¹)。メチラボンを投与した老齢咬合挙上処置マウスでは血中CO濃度が上昇しないだけでなく、モリス水迷路学習テストによる空間認知能の低下や海馬での神経細胞死も抑制された。ストレスによるこれまでの報告を考え合わせると、咬合挙上の結果上昇したCOが海馬の機能的および器質的变化を引き起こしていることが強く示唆された。

咬合グルココルチコイドレセプター

GCはストレス環境下でホメオスターシスの維持に重要な役割をはたしていることが知られている²³)。コルチコステロイドはGCとミネラルコルチコイドに大別される²³)。脳内にはミネラルコルチコイドレセプター(MR)とグルココルチコイドレセプター(GR)が存在し、血中CO濃度が低い場合にはMRが優位に、また高い場合にはGRが優位に働くといわれている^{23,26,27})。したがって、CO濃度の高い慢性ストレス下ではGRが重要な役割を演じているものと考えられる。脳内の広い範囲でGRが存在し、海馬でもCA1とDG領域でその存在が確認されている²³)。海馬のGRと分泌されたGCとが結合すると、視床下部-下垂体-副腎皮質系へのネガティブフィードバック機構が作用し、GCの分泌を抑制している²⁸)。

一般的に、慢性ストレス環境下では海馬においてGRやGRmRNAのダウンレギュレーションが起こると報告されている²⁸⁻³¹)。そこで、咬合挙上処置マウスの海馬におけるGRとGRmRNA量の変化を免疫組織化学とin situ hybridization法を用いて検討した(Fig. 6, 7, 8)。その結果、老齢咬合挙上処置マウスでは海馬CA1およびDGでGRの減少が、またCA1, CA3およびDGではGRmRNAの顕著な減少が確認された。一般的に老化に伴い血中のGCが上昇するといわれており³²)、GCが脳の老化を促進させるといふ仮説も発表されている³¹)。GCレベルがもともと上昇している老齢マウスにおいて慢性ストレスによりさらに血中GCレベルが上昇すると、海馬におけるGRmRNAとGRのダウンレギュレーションが起こり、GRが減少する。その結果、海馬から視床下部へのネガティブフィードバック機構が抑制され、さらに上昇したGCレベルが、海馬の神経細胞障害を引き起こすものと考えられる。

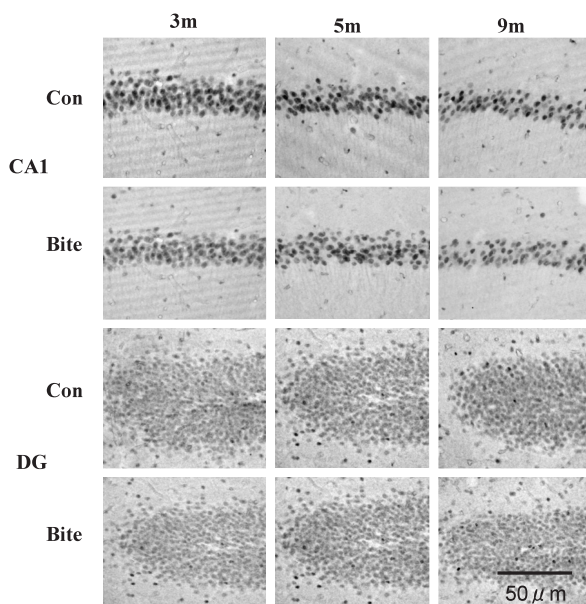


Fig. 6. Photomicrographs showing CA1, and DG subfields. Note that there were no GR-immunoreactive cells in CA 3 and there were fewer GR-immunoreactive cells within the CA 1 and DG regions of 9 -mo-old bite-raised mice, but there were no differences in CA 1 and DG regions of 3-and 5-mo-old bite raised mice.

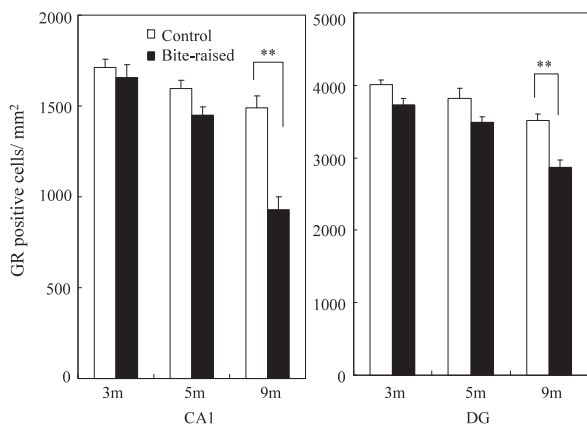
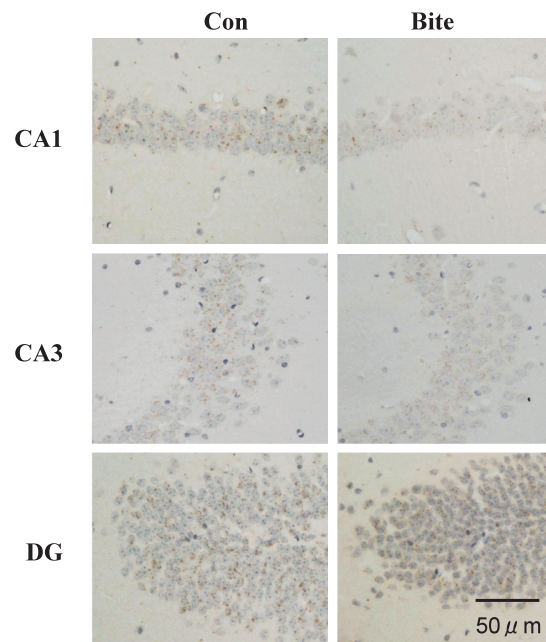


Fig. 7. Effect of the bite-raised condition on the number of GR-immunoreactive cells in the hippocampal CA 1 and DG regions. The results are expressed as the mean number of neurons/mm² (mean ± S. E., n = 5 for each group). Note the greater reduction in the number of GR-immunoreactive cells in the CA 1 and DG subfields of the 9-mo-old bite-raised mice, but there was little reduction in the number of GR-immunoreactive cells in the CA 1 and DG subfields of the 3-and 5-mo-old bite-raised mice. **P < 0 .01.

おわりに

これまで、咬合不全の影響は歯科臨床の場で経験されてきた症例報告がほとんどであった。最近になって



		3m	5m	9m
CA1	Control	176.0 ± 4.8	163.4 ± 8.2	135.2 ± 4.7
	Bite-raised	172.8 ± 4.8	148.4 ± 7.3	93.6 ± 7.1 **
CA3	Control	307.0 ± 12.0	281.0 ± 8.5	204.0 ± 11.4
	Bite-raised	294.4 ± 4.4	268.6 ± 7.3	162.6 ± 11.3 **
DG	Control	464.0 ± 18.4	420.0 ± 11.2	309.0 ± 16.6
	Bite-raised	431.2 ± 11.8	391.4 ± 10.8	273.8 ± 7.7 **

Fig. 8. Photomicrographs showing GRmRNA of hippocampal CA1, CA3, and DG subfields of 9-mo-old mice(upper). Note that there were fewer positive GRmRNA signals in the CA1, CA 3 and DG subfields of the 9-mo-old bite-raised mice.(lower)Number of GRmRNA signals/high power field in hippocampal CA1, CA3, and DG subfields in 3-, 5-, and 9-mo-old mice. Note that there were significantly fewer GRmRNA signals in the CA1, CA3, and DG subfields of 9-mo-old bite-raised mice. **P < 0 .01.

ようやく「咬合不全がストレスになる」ことが科学的に検証がなされはじめた。今後さらなる研究により咬合不全が全身に及ぼす影響が解明されることが期待される。

引用文献

- 1) Christensen J. Effect of occlusion-raising procedures on the chewing system. *Dent Pract Dent Res.* 1970; 20: 233-238.
- 2) 永松敬. 咬合拳上し咬合の安定を行い、不定愁訴が改善した1例. *佐世保市立総合病院紀要*, 2006; 30 : 89-90.
- 3) 尾澤文貞. 咬合改善による不定愁訴の変化, *日本未病システム学会雑誌*. 2003; 2 : 164-167.

- 4) 横山政高. 難症例・失敗例・長期観察例 顎位を変えて不定愁訴が治った症例の13年間. *DENTL DIAMOND*. 2000; 25: 54-60.
- 5) 虫本栄子, 田中久敏, 市川大. 口蓋床および咬合干渉付与による口腔環境の変化が脳波に及ぼす影響. *補綴誌*. 2001; 45: 295-304.
- 6) 市川大. 実験的早期接触による咀嚼系ならびに精神生理学的応答とその脳波学的検討. *補綴誌*. 2001; 45: 305-314.
- 7) Areso MP, Giralt MT, Sainz B, Prieto M, Garcia-Vallejo P and Gomez FM. Occlusal disharmonies modulate central catecholaminergic activity in the rat. *J Dent Res*. 1999; 78: 1204-1213.
- 8) Budtz-Jørgensen E. Occlusal dysfunction and stress. *J Oral Rehab*. 1981; 8: 1-9.
- 9) Yoshihara T, Matsumoto Y and Ogura T. Occlusal disharmony affects plasma corticosterone and hypothalamic noradrenaline release in rats. *J Dent Res*. 2001; 80: 2089-2092.
- 10) Kubo K, Ichihashi Y, Iinuma M, Iwaku F, Tamura Y and Onozuka M. Involvement of glucocorticoid response in hippocampal activities in aged SAMP 8 mice with occlusal disharmony. *Biogenic Amines*. 2007 (in press).
- 11) Kubo K, Iwaku F, Arakawa Y, Ichihashi Y, Iinuma M, Tamura Y, Karasawa N, Nagatsu I, Sasaguri K and Onozuka M. The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents bite-raising induced impairment of hippocampal function in aged senescence-accelerated prone mice (SAMP 8). *Biogenic Amines*. 2007 (in press).
- 12) Kubo K, Yamada Y, Iinuma M, Iwaku F, Tamura Y, Watanabe K, Nakamura H and Onozuka M. Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal degeneration via stress in SAMP 8 mice. *Neurosci Lett*. 2007; 414: 188-191.
- 13) Ichihashi Y, Arakawa Y, Iinuma M, Tamura Y, Kubo K, Iwaku F, Sato Y and Onozuka M. Occlusal Disharmony attenuates glucocorticoid negative feedback in aged SAMP 8 mice. *Neurosci Lett*. 2007 (in press).
- 14) Morris RGM. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in that rat. *J Neurosci Methods*. 2007; 11: 47-60.
- 15) Skelton RW and Mc Namara RK. (1992) Bilateral knife cuts to the perforant path disrupt spatial learning in the Morris water maze. *Hippocampus*. 1992; 2: 73-80.
- 16) Morrison JH and Hof RP. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 1997; 278: 412-419.
- 17) Olton DS, Becker JT and Handelman GE. Hippocampus space and memory. *Behav. Brain Sci*. 1979; 2: 313-365.
- 18) Anokhin KV, Mileusnic R, Shamakina IY and Rose SP. Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain. *Brain Res*. 1991; 544: 101-107.
- 19) Hess U, Lynch SG and Gall CM. Changes in c-fos mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: Differential involvement of hippocampal subfields CA 1 and CA 3. *J. Neurosci*. 1995; 15: 4786-4795.
- 20) Watanabe K, Ozono S, Nishiyama K, Saito S, Tonosaki K, Fujita M and Onozuka M. The molarless condition in aged SAMP 8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance. *Behav Brain Res*. 2002; 128: 19-25.
- 21) Luine V, Villegas M, Martinez C and McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res*. 1994; 639: 167-170.
- 22) Watanabe Y, Gould E and McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA 3 pyramidal neurons. *Brain Res*. 1992; 588: 341-345.
- 23) 小澤一史, 謝蔵霞, 小川弘, 西真弓, 河田光博. ストレスとグルココルチコイド受容体. *脳の科学*. 2002; 24: 219-226.
- 24) Krugers HJ, Maslam S, Krof J and Joëls M. The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus. *Stroke*. 1998; 2: 237-249.
- 25) Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tonosaki K and Saito S. Evidence for involvement of glucocorticoid response in the hippocampal changes in aged molarless SAMP 8 mice. *Behav Brain Res*. 2002; 131: 125-129.
- 26) Arriza J, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE and Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor cDNA: structure and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 1987; 237: 268-275.
- 27) Hollenberg S, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfield MG and Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. 1985; 318: 635-641.
- 28) Sapolsky RM, Krey BS and McEwen BS. Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology*. 1984; 114: 287-292.
- 29) Freeman AI, Munn HL, Lyons V, Dammermann A, Seckl JR and Chapman KE. Glucocorticoid down-regulation of rat glucocorticoid receptor does not involve differential promoter regulation. *J Endocrinology*. 2004; 183: 365-374.
- 30) Herman JP, Adams D and Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*. 1995; 61: 180-190.
- 31) Sapolsky RM, Krey LC and McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*. 1986; 7: 284-301.
- 32) Lladfield PW, Waymire JC and Lynch G. Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science*. 1978; 202: 1098-1102.