

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2018年度 博士論文

加齢に伴う歯肉微小循環変化に対する物理的刺激
(歯肉マッサージ) の効果

2019年3月1日

日高 弘一
Ko-ichi Hidaka

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
口腔科学講座

論文内容要旨

歯肉マッサージ（物理的刺激）は、機械的清掃と組み合わせることにより、加齢に伴う循環機能の低下を抑制する可能性がある。身体各部への物理的刺激は、加齢に伴って顕在化する頸部や肩部の疼痛等に対する治療効果の他に、血液循環の改善等、全身への効果に関する報告も多い。一方、歯肉マッサージによる歯肉微小循環の変化についての報告は少なく、とくに加齢に伴う口腔内の循環動態の変化への影響についてはほとんど研究されていない。

本研究は、歯肉マッサージが加齢に伴う歯肉微小循環の変化にどのような影響を与えるかを検討することを目的として行った。7週齢、6ヶ月齢、1年齢のWistar rat（雄）を歯肉マッサージ群とコントロール群の2群に分けた。歯肉マッサージは、市販の電動ハブラシと高速反転タイプ専用ヘッドにプロフィーカップを装着して、イソフルラン吸入麻酔下で、上顎左側第一臼歯近心歯肉に5秒間、刺激圧5~10 gfで週に2回の頻度で4週間、合計8回行った。マッサージから3日後に吸入麻酔下で、レーザードップラー血流計を用いて、同部の血流速度を測定し、反応性充血を指標に機能的解析を行った。4週間の血流測定終了後に、ペントバルビタールナトリウム（45 mg/kg, *i.p.*）麻酔下でラットを屠殺し、Hematoxylin and Eosin (HE) + 墨汁染色標本、レジン鑄型標本を作製し、形態学的解析を行った。その結果、歯肉の血流測定において、1年齢のコントロール群で、7週齢と比較して、基底血流量（Base flow）の低下が認められた。また、7週齢、6ヶ月齢と比較して、最大血流量（Peak）は低下し、最大血流量の半減時間（ $T_{1/2}$ ）は短縮した。歯肉マッサージ群では、コントロール群と比較して、 $T_{1/2}$ が7週齢と1年齢で延長し、増加総血流量（Mass）が6ヶ月齢と1年齢で増加した。HE + 墨汁染色標本では、6ヶ月齢、1年齢のコントロール群に対して歯肉マッサージ群で、墨汁染色血管が多く見られた。レジン鑄型標本では、6ヶ月齢、1年齢群において、血管内腔が粗造なコントロール群と比較して歯肉マッサージ群ではループ状の血管が多く認められた。

これまでの報告と本研究結果から、加齢により、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）タンパク質発現量が減少し、一酸化窒素（NO）量が低下した可能性がある。また、歯肉マッサージによるズリ応力により、eNOSの活性化を介したNO増加に起因した、血管拡張に伴う血流増加が生じたと考えられる。本研究により、加齢に伴う歯肉微小循環の機能の低下と血管構築の変化が認められ、これに対し、歯肉マッサージは、機能・形態の両面から歯肉微小循環を賦活化し、口腔の健康保持に有効である可能性が示唆された。

論文審査要旨

歯肉マッサージ（物理的刺激）は、機械的清掃と組み合わせることにより、加齢に伴う循環機能の低下を抑制する可能性がある。身体各部への物理的刺激は、加齢に伴って顕在化する頸部や肩部の疼痛等に対する治療効果の他に、血液循環の改善等、全身への効果に関する報告も多い。一方、歯肉マッサージによる歯肉微小循環の変化についての報告は少なく、とくに加齢に伴う口腔内の循環動態の変化への影響についてはほとんど研究されていないことから研究を企画している。

本研究では、歯肉マッサージが加齢に伴う歯肉微小循環の変化にどのような影響を与えるかを検討することを目的として行っている。加齢のモデルとして7週齢、6ヶ月齢、1年齢のWistar rat（雄）を選択し、歯肉マッサージ群とコントロール群の2群に分けて実施している。歯肉マッサージは、市販の電動ブラシと高速反転タイプ専用ヘッドにプロフィーカップを装着して、イソフルラン吸入麻酔下で、上顎左側第一臼歯近心歯肉に5秒間、刺激圧5~10 gfで週に2回の頻度で4週間、合計8回行うこととした。マッサージから3日後に吸入麻酔下で、レーザードップラー血流計を用いて、同部の血流速度を測定し、反応性充血を指標に機能的解析を行っている。4週間の血流測定終了後に、ペントバルビタールナトリウム（45 mg/kg, *i.p.*）麻酔下でラットを屠殺し、Hematoxylin and Eosin (HE) + 墨汁染色標本、レジン鑄型標本を作製し、形態学的解析も行い、反応性充血を指標に機能的解析評価とそれに伴う血管形態の評価を形態学的に観察していることは評価できる点と考えられる。その結果、歯肉の血流測定において、1年齢のコントロール群で、7週齢と比較して、基底血流量（Base flow）の低下を認めている。また、7週齢、6ヶ月齢と比較して、最大血流量（Peak）は低下し、最大血流量の半減時間（ $T_{1/2}$ ）は短縮していた。歯肉マッサージ群では、コントロール群と比較して、 $T_{1/2}$ が7週齢と1年齢で延長し、増加総血流量（Mass）が6ヶ月齢と1年齢で増加していた。HE + 墨汁染色標本では、6ヶ月齢、1年齢のコントロール群に対して歯肉マッサージ群で、墨汁染色血管が多くみとめられ、レジン鑄型標本では6ヶ月齢、1年齢群において、血管内腔が粗造なコントロール群と比較して歯肉マッサージ群ではループ状の血管が多く観察されている。これまでの報告と本研究結果から考察すると、加齢により血管内皮細胞由来の一酸化窒素合成酵素（eNOS）タンパク質発現量が減少し、一酸化窒素（NO）量が低下した可能性が考えられる。また、歯肉マッサージによるズリ応力により、eNOSの活性化を介したNO増加に起因したものであり、血管拡張に伴う血流増加が生じたと考えられる。

本研究により、加齢に伴う歯肉微小循環の機能の低下と血管構築の変化が認められたことから、歯肉マッサージは機能・形態の両面から歯肉微小循環を賦活化し、従来の歯周病治療における歯周病原菌の機械的除去に加え、加齢要因のみならず生体側の防御反応のサポートの一助となる可能性を示している。本審査委員会は、すべての教育課程を修了し、教育理念に相応しい成果が認められ、高度専門職として豊かな学識を有すると判定されたことから、申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2019年3月1日

主 査：児玉 利朗 教授

副 査：浜田 信城 教授

副 査：青山 典生 准教授

目 次

緒 言	1
実験材料および方法	4
結 果	9
考 察	12
結 論	17
謝 辞	18
文 献	19
付 図 説 明	28
図 1	29
図 2	31
図 3	32
図 4	33
図 5	34

1. 緒 言

加齢と、高血圧、心疾患、生活習慣病などとの関係は、これまでに数多く報告されている^{1,2)}。これら循環に関連した生活習慣病には歯周病が含まれ、初期には、末梢血管の内皮機能障害を介して循環機能障害が生じる³⁾。これらを含め末梢の循環不全、あるいはそれを原因とする痛みや違和感に対して人々は意識せずにその患部に“手を当てる”“さする”“揉む”“圧迫する”などの行為を行う⁴⁾。これらはいわゆるマッサージと呼ばれ、口腔内を含めて全身の広い範囲で行われている^{4,5)}。

全身に対するマッサージは、最も有効かつ普遍的に行われている代替療法の1つであり、マッサージ療法の様々な効果は、これまでに数多く報告されてきた。マッサージは運動とは異なる機序を介して早産児の体重増加をもたらす⁶⁾。また、頸部や肩部の疼痛に対するマッサージの疼痛緩和効果は即効性があり、マッサージの頻度依存性に増加することが報告されている^{7,8)}。歯肉マッサージは、機械的清掃による歯周病原菌の除去などの従来のアプローチと組み合わせることにより、加齢に伴って増加する歯周病の治癒を促進させる可能性が示されている⁵⁾。

マッサージの効果とそのメカニズムには、筋肉の緊張緩和、関節部筋肉のバランス保持、筋肉の機械的変化、関節の柔軟性および固有感覚の増加、リンパ循環の増加、免疫および炎症反応の変化、睡眠の改善、および疼痛シグナルの遮断等が考えられている⁹⁻¹⁶⁾。また、マッサージによる迷走神経の活性化と全身へもたらす効果については、数多く報告されている^{6,17)}。運動能力に対して期待されるマッサージの効果は、循環血液量の増加である。実際には、血液循環の促進を目的として、運動直後にマッサージが行われることが多い¹⁸⁾。

これまでに、ヒトの口腔内においては、加齢に伴う歯肉での血流量の低下が示されている¹⁹⁾。一方で、ブラッシングによる血流量の増加が観察されている²⁰⁾。イヌを用いた実験では、歯肉微小循環機能の改善に対する機械的刺激の有効性についても報告されている²¹⁾。しかしながら、口腔領域の微小循環調節機構に対するマッサージの効果についての機能的・形態的な解析はほとんど報告されていない。さらに、加齢に伴う口腔内の循環動態の変化に対するマッサージの効果についてはほとんど研究されていない。

レーザードップラー血流測定法 (LDF : laser Doppler

flowmetry) は，ヒトおよび動物の組織における微小循環機能の評価が可能である。この方法は非侵襲性で，容易に行える技術であるため，1980年より軟組織の循環機能評価に用いられてきた²²⁾。本研究室でも微小循環機能の指標として用いられる歯肉反応性充血（GRH : gingival reactive hyperemia) を，このLDFにより解析している²³⁻²⁶⁾。Dopplerが提唱したLDFの原理は，「動く物体によって放射された，または物体から反射された振動エネルギーは，物体の相対的な速度に比例して振動の周波数を変化させる²⁷⁾。」という理論で，速く移動する物体は遅く移動する物体よりも周波数をより大きく変化させるというものである。LDFは，赤血球の運動速度を測定するためのエネルギー源として，既知の周波数で発振するレーザー光を使用する。血管内には，異なる速度で動く赤血球が不均一に存在しており，入射光の周波数は，赤血球の速度に比例して変化する。速く移動する赤血球は，周波数の変化が大きく，遅く移動する赤血球は，周波数の変化が小さい。受光器に戻ってくる周波数が変化した光の割合は赤血球数に比例し，周波数の変化の大きさは血流速度に比例する。このため，理論的には赤血球数と血流速度の積の総和から血流量を算出できる²⁸⁾。

反応性充血（RH：reactive hyperemia）は，臓器や組織への動脈血の流入を一時的に遮断し，再灌流させた際に見られる一過性の血流増加現象であり，この反応は虚血前のレベルを超えて起こる。RHは，内皮依存性の血管弛緩反応であり，血管内皮細胞機能や末梢での微小循環調節機能の指標となる²⁵⁾。我々は，この方法を用いて口腔の微小血管機能の非侵襲的解析を行ってきた^{25,26,29,30)}。さらに，口腔内の微小循環動態と全身の循環動態との関連性についても研究を重ねてきた^{25,26)}。そこで，今回我々は，このGRHを指標に7週齢，6ヶ月齢，1年齢のラットを用いて，加齢に伴う歯肉微小循環変化を解析し，それに対する物理的刺激（歯肉マッサージ）の効果を検討した。

2. 実験材料および方法

2.1. 実験動物

本研究では，雄性 Wistar rat（ラット，7週齢：191.1±4.5~289.2±9.1 g，6ヶ月齢：386.3±7.9~418.8±11.1 g，1年齢：470.0±10.7~503.7±12.7 g）を使用した（日本 SLC，静岡，日本）。ラットは，照明（12時間明暗サイクル）および室温（22±3℃）の管理された部屋で，1ケージあたり 3~5

匹で飼育し，餌と水を自由に与えた。個々の週齢のラット（7週齢，6ヶ月齢，1年齢）を対照群（control群）と歯肉マッサージ群（MSG群）とに分け，各群5~8匹とした^{25,26,29}）。

本研究では，動物の苦痛を最小限に抑え，実験動物の数を必要最小限にした。また，本研究は神奈川歯科大学動物実験倫理委員会によって承認された（承認番号：16-056, 16-057, 16-064, 17-001, 17-002, 17-016, 17-017）。全ての実験は，神奈川歯科大学の動物実験のガイドラインに従って実施された。

2.2. 歯肉マッサージ

各週齢のすべてのラットをイソフルランで麻酔し，2.5%の濃度で維持した^{25,26}）。体重を測定した後に，37℃に維持した保温台（30×45 cm）上でラットを仰臥位にさせた。全ての四肢を，身体の正中線に対して45度になるように粘着テープで固定し，タコ糸にて上顎と下顎の切歯を開口位に固定した²⁵）。歯肉マッサージは上顎左側第一臼歯近心歯肉に5秒間，刺激圧5~10 gfで週に2回行った。実験期間を4週間とし，歯肉マッサージは合計8回行った（図1A）。歯肉マッサージには，GUM電動ハブラシ：TS-45（サンスタ

一、大阪、日本)と、高速反転タイプ専用のヘッド(回転数約 2,500 回/分, サンスター, 大阪, 日本), に先端を直径約 2.0 mm に切断したプロフィーカップ(#1805: ポイントスクリータイプ, エイコー, 東京, 日本)を装着したものを使用した。control 群は, イソフルランによる吸入麻酔のみを行った。歯肉マッサージの圧力測定は, センサーインタフェースとアダプタに上記の電動歯ブラシを接続して行い, モニター上に記録した(PCD-400A, UI-55A, 共和電業, 東京, 日本)。データは, 解析用のソフトウェア(DCS-100A, 共和電業, 東京, 日本)を用いて解析した。

2.3. 歯肉の血流測定

歯肉マッサージ時と同様の方法で, ラットをイソフルランで吸入麻酔した後, ラットの四肢を保温台に固定した。レーザードップラー血流測定装置(LDF: laser Doppler flowmeter, TBF-LN1, ユニークメディカル, 東京, 日本)付属の血流測定用プローブ(直径 2.0 mm)を用いて, 上顎左側第一臼歯の近心歯肉の血流量(GBF: gingival blood flow)の測定を行った²⁵⁾。歯肉反応性充血(GRH: gingival reactive hyperemia)は血流測定用プローブにより, マッサージ部位

の歯肉を 1 分間圧迫後，解放することにより誘発させた。GRH は，基底血流量（Base flow），最大血流量（Peak），最大血流量が半減するのに要する時間（ $T_{1/2}$ ）および増加総血流量（Mass）を指標に評価した（図 1B）。さらに GRH の心機能への影響を判断するために，心拍数を同時にモニターした。測定された出力信号は，A/D 変換器を介してコンピュータのハードディスクに記録され，同時にモニターに表示された。記録された GBF は，データ解析ソフトウェア（Chart v. 8.1.8, AD Instruments, コロラド，米国）により分析された²⁵⁾。

2.4. 形態学的解析

2.4.1. Hematoxylin & Eosin(HE) + 墨汁注入標本の作製

各群ラットをペントバルビタールナトリウム（45 mg/kg, *i.p.*）麻酔下で上行大動脈より 0.2%ヘパリン含有の生理食塩水を灌流し脱血させた。組織を固定し，血管腔を維持するために，10%中性緩衝ホルマリン液を灌流させた³¹⁾。血管内に墨汁を灌流させ，上顎骨を摘出した後，塩酸を用いて硬組織を脱灰させ，パラフィン包埋して 50 μm の切片を作製した。その後，通法に従って HE 染色を行った。光学

顕微鏡下で，血管内の墨汁注入状態を観察した³²⁾。本論文の形態学的な画像は，全て典型的な結果を示す。

2.4.2. 血管鑄型標本の作製

微小血管網の三次元構造の変化を観察するため，血流測定実験終了後に血管のレジン鑄型標本を作製した。

各群ラットをペントバルビタールナトリウム（45 mg/kg, *i.p.*）麻酔下で上行大動脈より 0.2%ヘパリン含有の生理食塩水を灌流し脱血させた。組織を固定し，血管腔を維持するために，10%中性緩衝ホルマリン液を灌流させた。固定後，合成樹脂（Mercox2, Ladd Research industries, バーモント，米国）を血管内に注入した。5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬し，軟組織を分解した。全ての標本を 40℃の温水で洗浄し，凍結乾燥させた。標本を白金 - パラジウムでコーティング（JFC1200, JEOL, 東京，日本）した後，走査型電子顕微鏡（SEM : scanning electron microscope, JSM6301F, JEOL, 東京，日本）を用いて観察した³³⁾。本論文の形態学的な画像は，全て典型的な結果を示す。

2.5. 試薬

実験には以下の薬物を用いた：イソフルラン（インターベット，東京，日本），ペントバルビタールナトリウム（共立製薬，東京，日本），ヘパリンナトリウム（味の素製薬，東京，日本）。

2.6. 統計学的解析

3つの群の比較には，一元配置分散分析（one way ANOVA：one way analysis of variance）を行った後に，Tukey法を用いた。また，2つの群の比較には，Studentのt検定（unpaired t-test）を用いた。データは平均±標準誤差（SEM：standard error of the mean）で表した。P値0.05未満を統計的に有意であるとした。データ分析には，Microsoft Excel 2013（Microsoft，ワシントン，米国）を用いた。

3. 結果

3.1. GRHによる血管反応の評価

全ての血流測定において，プローブで歯肉を圧迫すると，心機能に影響を与えることなくGBFが直ちに減少した。1分間の歯肉圧迫後に解放するとGRHが観察された（図1B）。

加齢に伴う GRH の変化の検討は各齢 control 群間の比較で行った。1 年齢では，7 週齢と比較して Base flow は低下し，7 週齢，6 ヶ月齢と比較して Peak は低下し， $T_{1/2}$ は短縮した（図 2A, B, C）。また，control 群と MSG 群との比較では，4 週間の反復マッサージにより， $T_{1/2}$ が 7 週齢と 1 年齢で延長し，Mass が 6 ヶ月齢と 1 年齢で増加した（図 3C, D）。

3.2. HE + 墨汁注入標本における形態学的所見

7 週齢 control 群では，歯肉表層の外縁上皮直下に存在する歯肉固有層の凹凸に一致してループ状の血管が観察された（図 4A 白矢印）。図左方の付着上皮直下にも血管網が観察された。6 ヶ月齢 control 群では，ループ状の血管の高さが減少し（図 4B 白矢印），一部に墨汁の途絶した部分が観察された（図 4B 黒矢印）。1 年齢 control 群では，7 週齢でみられたループ状血管はほぼ平坦になり（図 4C 白矢印），墨汁が途絶した循環障害を生じている血管が多く観察された（図 4C 黒矢印）。全ての週齢群において，MSG 群では control 群と比較して，墨汁の注入された循環を維持している血管の密度が高く観察された（図 4D, E, F 白矢印）。

3.3. 血管鑄型標本における形態学的所見

血管鑄型標本による三次元的観察でも，墨汁注入切片と同様の像が観察された。7週齢では，歯頸部を取り囲んで背の高いループ状血管が観察された（図 5A 白矢印）。6ヶ月齢では，ループの高さが減じると共に規則性も失われており（図 5B 白矢印），血流途絶血管が認められた（図 5B 黒矢印）。1年齢では歯頸部周囲を数本の血管網が取り囲み，ループ状の形態は失われ，血流途絶血管が認められた（図 5C 黒矢印）。また，control 群では，表層が粗造な血管が観察された（図 5A, B, C）。この構造は血管内腔の形態的变化を示しており，加齢とともに増加していた。

MSG 群では，7週齢においてループを含む血管密度が高くなり，循環が回復している像が示された（図 5D 白矢印）。6ヶ月齢では，ループの高さは7週齢 MSG 群に比べて低いものの，密な血管網を有していた（図 5E 白矢印）。1年齢では，ループは高さを減じ，平坦な血管網へと変化していたが，control 群と比較すると明確な血管が観察された（図 5F 白矢印）。

4. 考 察

反応性充血（RH：reactive hyperemia）は，局所の循環を調節し，虚血した組織に酸素を再供給するとともに³⁰⁾，代謝機能，筋原性機能，および身体機能を含む様々な血管の調節過程に関与することが知られている³³⁾。また，RHを指標とした血管機能評価法は，医科では前腕部のRHを指標とした血流依存性血管拡張反応（FMD：flow-mediated dilatation）やプレチスモグラフィが広く使用されており，生活習慣病等の発症のリスク予測，あるいは症状の評価が行われている^{34,35)}。石橋らの報告によると，喫煙者では，非喫煙者と比較して血管内皮細胞機能の低下を認めている³⁵⁾。歯肉に分布する微小血管は，加齢により障害を受ける可能性がある。このため我々は，このRHを指標とした本法を口腔内に応用して，測定・解析を行ってきた^{25,26)}。本研究では，口腔内の循環動態の加齢変化と，それに対する物理的刺激（歯肉マッサージ）による改善を検討するために，GRHを指標として，血管内皮依存性の弛緩反応についての解析を行った。

加齢によるRHの変化については，LDFによる機能的解析の結果より，1年齢では，血管反応性の低下が示された（図

2A, B, C)。これまでに、高齢者および高齢動物を用いた実験では、内皮依存性弛緩反応の低下を含むいくつかの血管障害が実証されている^{36,37)}。高齢の動物における内皮依存性の血管拡張反応の低下は、血管内皮細胞の血管拡張に対する受容体の数の減少³⁸⁾、一酸化窒素 (NO : nitric oxide) 産生量の減少³⁶⁾、血管平滑筋細胞におけるグアニル酸シクラーゼ活性の低下³⁹⁾等によると考えられている。本研究の結果からも、加齢に伴う血管内皮機能の低下が認められたが、これは、加齢に伴い内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS : endothelial nitric oxide synthase) タンパクの発現量が減少し、NO量が低下したためであると考えられる。また、Zhangらは、加齢に伴いマクロファージからの活性酸素種 (ROS : reactive oxygen species) の産生が増加し、酸化ストレスが亢進することを報告している⁴⁰⁾。これまでの研究で、我々は酸化ストレスの亢進により、血管内皮機能が低下することを示している²⁵⁾。我々は、この血管内皮機能の低下にはスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) が関与していることを確認している²⁵⁾。本研究の結果で示された加齢に伴う血管内皮機能の低下にも、加齢に伴って増加した $O_2^{\cdot-}$ が NO を消去したことにより、血管弛緩反応の低下が生じた可

能性もある。一方，血管鑄型標本では，一部の血管は粗造な構造を呈していた（図 5A, B, C）。この構造は血管内腔の形態的変化を示しており，微小循環障害が生じている可能性を示唆している。さらに，HE + 墨汁注入標本と血管鑄型標本より，加齢に伴い血流途絶血管が認められるようになった（図 4B, C 黒矢印，図 5 B, C 黒矢印）。これは加齢に伴って，NO による血管弛緩反応が低下したために，血流が途絶したものと考えられる。以上のように，形態的解析の結果からも，血管弛緩反応が低下していることが考えられる。

加齢に伴う RH の低下の機能的解析結果では，4 週間の歯肉マッサージにより，血管反応性の低下が抑制された（図 3C, D）。これは歯肉マッサージによって，血管内皮細胞にずり応力が加わり，NO を介した内皮依存性の血管弛緩反応による血流増加（再灌流）を生じたためであると考えられる。ずり応力は，血流による血管壁に作用する接線方向の摩擦力と定義される⁴¹⁾。ずり応力は，細胞内遊離 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の非依存性メカニズムによっても eNOS を活性化させ，さらに，いくつかのキナーゼ阻害剤に対して感受性があることも報告されている⁴²⁾。ホスファチジルイノシト

ール 3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤は, セリン残基のリン酸化を阻害するため, eNOS の活性化が阻害される。また, ずり応力は, PI3K およびセリン / スレオニンキナーゼ Akt を含む経路を活性化させ, eNOS をリン酸化させることが示唆されている。このリン酸化は, 安静時の $[Ca^{2+}]_i$ で, eNOS 活性を直接増加させる⁴³⁾。本研究でも, MSG 群では血管内皮細胞由来の NO が control 群と比較して増加した可能性がある。これは歯肉マッサージによるずり応力により eNOS の活性化が生じ, NO 量が増加したためであると考えられる。

一方, HE + 墨汁注入標本において, MSG 群では control 群と比較して, 墨汁の注入された血管が多く認められた(図 4D, E, F 白矢印)。また, 血管鑄型標本においては, MSG 群では control 群と比較して, ループ状の血管が多く認められるようになった(図 5D, E, F 白矢印)。ループ状の血管は, 健康な歯肉に認められることが報告されており³¹⁾, MSG 群でループ状の血管が増加したことは, 歯肉マッサージにより血管形態が改善されたことを示唆している。血管の分布密度が高くなったのは, NO の増加により血管弛緩反応が起こり, 血流の途絶した血管での血流が再開したためであると考えられる。以上のように, 形態的解析の結果からも,

加齢に伴う歯肉微小循環に対する歯肉マッサージの効果が認められた。

本研究の歯肉マッサージの時間設定は、松本らの研究を参考とした⁴⁴⁾。松本らは、電動歯肉マッサージ器による刺激を1ヶ所に5秒間と10秒間行った場合に、歯肉循環機能を亢進させるが、20秒間刺激群では、無刺激群との間に有意差が認められなかったと報告している⁴⁴⁾。この報告はマッサージ時間により、歯肉に過剰な刺激を与える可能性があること、また、10秒以内の比較的短時間のマッサージでは歯肉循環に対して改善効果が期待できることを示している。本研究でも、5秒間のマッサージで、加齢に伴う歯肉微小循環の機能低下と血管構築変化に対し、歯肉微小循環の機能と形態が改善されたことが示された。

さらに、全ての週齢にマッサージの効果が認められたことから、歯肉マッサージを若年から行うことにより、健康な歯肉微小循環の機能と形態の維持が期待でき、また、高齢からのマッサージ開始であっても、歯肉微小循環の機能低下と血管構築変化の改善効果が期待できると考えられる。すなわち、歯肉マッサージの開始時期や年代には関係なく、歯肉微小循環の変化に対して効果があると考えられる。こ

これは歯肉マッサージによるずり応力により，eNOSが活性化され，NOが増加して血管弛緩反応が起こるためであると考えられる。また，本研究の結果から，加齢に伴う歯肉微小循環に対する歯肉マッサージ効果が期待されたが，加齢とともに増加する O_2^- を特徴付ける実験を行っていないため，さらなる研究が必要である。

5. 結 論

本研究では，加齢に伴う口腔内の循環動態の変化と，物理的刺激が加齢による歯肉微小循環の変化に与える影響について検討した。その結果，加齢に伴い歯肉微小循環機能は低下した。さらに，形態学的所見より，とくに高齢ラットの標本では，血流が停滞した結果，循環障害が生じていると考えられる血管が多く認められた。また，加齢に伴い低下した歯肉微小循環は，物理的刺激によって改善されることが示された。このことから，加齢に伴い歯肉微小循環は機能的にも形態的にも変化することが示された。また，物理的刺激（歯肉マッサージ）は，歯肉微小循環機能と形態を改善させ，口腔の健康保持に有効であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました口腔科学講座 高橋俊介教授，高橋聡子准教授に深甚なる感謝の意を表します。

また，本研究に対し多くの御教示と御校閲を戴いた口腔科学講座 松尾雅斗教授，東雅啓助教に深く感謝の意を示します。ならびに本研究の遂行に対し，御指導と御鞭撻を戴いた口腔科学講座 吉野文彦准教授，吉田彩佳助教，口腔科学講座の皆様感謝いたします。

利益相反

利益相反はありません。

引用文献

1. Franklin SS, Gustin W 4th, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation*. **96**: 308-315, 1997.
2. Matsushita S, Kuroo M, Takagi T, Hou E, Kuramoto K. Cardiovascular disease in the aged: overview of an autopsy series. *Jpn Circ J*. **52** (5): 442-448, 1988.
3. Koskinen J, Magnussen CG, Taittonen L, Räsänen L, Mikkilä V, Laitinen T, Rönnemaa T, Kähönen M, Viikari JS, Raitakari OT, Juonala M. Arterial structure and function after recovery from the metabolic syndrome: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Circulation*. **121** (3): 392-400, 2010.
4. 川原由佳里, 奥田清子. 看護におけるタッチ/マッサージの研究: 文献レビュー, 日看技会誌, **8** (3): 91-100, 2009.
5. Ekuni D, Yamanaka R, Yamamoto T, Miyauchi M, Takata T, Watanabe T. Effects of mechanical stimulation by a powered toothbrush on the healing of periodontal tissue in a rat model of periodontal disease. *J Periodontal Res*. **45** (1): 45-51, 2010.

6. Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M. Preterm infant weight gain is increased by massage therapy and exercise via different underlying mechanisms. *Early Hum Dev.* **90** (3): 137-140, 2014.
7. Sherman KJ, Cook AJ, Wellman RD, Hawkes RJ, Kahn JR, Deyo RA, Cherkin DC. Five-week outcomes from a dosing trail of therapeutic massage for chronic neck pain. *Ann Fam Med.* **2**: 112-120, 2014.
8. Kong LJ, Zhan HS, Cheng YW, Yuan WA, Chen B, Fang M. Massage therapy for neck and shoulder pain: a systematic review and meta-analysis. *Evid Based Complement Altemat Med.* **2013**: 613279, 2013.
9. Schaible HG, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* **55**: 5-54, 1993.
10. Ahles TA, Tope DM, Pinkson B, Walch S, Hann D, Whedon M, Dain B, Weiss JE, Mills L, Silberfarb PM. Massage therapy for patients undergoing autologous bone marrow transplantation. *J Pain Symptom Manage.* **18** (3): 157-163, 1999.
11. Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M, Shaw K, Friedman L,

- Ironson G. HIV adolescents show improved immune function following massage therapy. *Int J Neurosci.* **106** (1-2): 35-45, 2001.
12. Nayak S, Matheis RJ, Agostinelli S, Shifleft SC. The use of complementary and alternative therapies for chronic pain following spinal cord injury: a pilot survey. *J Spinal Cord Med.* **24**: 54-62, 2001.
13. Poole AR, Ionescu M, Fitzcharles MA, Billingham RC. The assessment of cartilage degradation in vivo: development of and immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *J Immunol Methods.* **294**: 145-153, 2004.
14. Sagar SM, Dryden T, Myers C. Research on therapeutic massage for cancer patients: potential biologic mechanisms. *J Soc Integr Oncol.* **5** (4): 155-162, 2007.
15. Billhult A, Lindholm C, Gunnarsson R, Stener-Victorin E. The effect of massage on immune function and stress in women with breast cancer—a randomized controlled trial. *Auton Neurosci.* **150**: 111-115, 2009.
16. Perlman AI, Ali A, Njike VY, Hom D, Davidi A,

- Gould-Fogerite S, Milak C, Katz DL. Massage therapy for osteoarthritis of the knee: a randomized dose-finding trial. *PLoS One*. **7** (2): e30248, 2012.
17. Diego MA, Field T. Moderate pressure massage elicits a parasympathetic nervous system response. *Int J Neurosci*. **119** (5): 630-638, 2009.
 18. Weerapong P, Hume PA, Kolt GS. The mechanisms of massage and effects on performance, muscle recovery and injury prevention. *Sports Med*. **35** (3): 235-256, 2005.
 19. Ohsugi Y, Nagashima Y, Nakatsu S, Sato K, Chiba A, Fujinaka H, Yano Y, Niki Y. Age-related changes in gingival blood flow parameters measured using laser speckle flowmetry. *Microvasc Res*. **122**: 6-12, 2019.
 20. Perry DA, McDowell J, Goodis HE. Gingival microcirculation response to tooth brushing measured by laser Doppler flowmetry. *J Periodontol*. **68** (10): 990-995, 1997.
 21. Tanaka M, Hanioka T, Kishimoto M, Shizukuishi S. Effect of mechanical toothbrush stimulation on microcirculatory functions in inflamed gingiva of dogs. *J Clin Periodontol*. **25**

(7): 561-565, 1998.

22. Ayepa Alain Kouadio, Fabienne Jordana, N'goran Justin Koffi, Pierre Le Bars, Assem Soueidan. The use of laser Doppler flowmetry to evaluate oral soft tissue blood flow in humans: A review. *Arch Oral Biol.* **86**: 58-71, 2018.
23. Baab DA, Oberg PA, Holloway GA. Gingival blood flow measured with a laser Doppler flowmeter. *J Periodontal Res.* **21** (1): 73-85, 1986.
24. Kerdvongbundit V, Vongsavan N, Soo-Ampon S, Phankosol P, Hasegawa A. Microcirculation of the healthy human gingiva. *Odontology.* **90** (1): 48-51, 2002.
25. Funaki S, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Maehata Y, Miyamoto C, Toyama T, Sato T, Hamada N, Lee MC, Takahashi S-S. *Porphyromonas gingivalis* infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microb Pathog.* **92**: 36-42, 2016.
26. Sugiyama S, Takahashi S-S, Tokutomi F, Yoshida A, Kobayashi K, Yoshino F, Wada-Takahashi S, Toyama T, Watanabe K, Hamada N, Todoki K, Lee MC. Gingival

vascular functions are altered in type 2 diabetes mellitus model and/or periodontitis model. *J Clin Biochem Nutr.* **51** (2): 108-113, 2012.

27. Doppler C. On the coloured light of the double stars and certain other stars of the heavens. *Proceedings of the Royal Bohemian Society of Sciences.* **2**: 103-133, 1842.
28. Hoke JA, Burkes EJ, White JT, Duffy MB, Klitzman B. Blood-flow mapping of oral tissues by laser Doppler flowmetry. *Int J Oral Maxillofac Surg.* **23**: 312-315, 1994.
29. Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Sugiyama S, Toyama T, Sato T, Hamada N, Tsukinoki K, Takahashi S-S, Lee MC. *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss is accelerated in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Arch Oral Biol.* **60** (6): 911-918, 2015.
30. Omori Y, Takahashi S-S, Todoki K. Role of nitric oxide in post-ischemic gingival hyperemia in anesthetized dogs. *Redox Rep.* **7** (5): 300-303, 2002.
31. Matsuo M, Okudera T, Takahashi S-S, Wada-Takahashi S, Maeda S, Iimura A. Microcirculation alterations in experimentally induced gingivitis in dogs. *Anat Sci Int.* **92**

(1): 112-117, 2017.

32. Hock J, Niki K. A vital microscopy study of the morphology of normal and inflamed gingiva. *J Periodontal Res.* **6**: 81-88, 1971.
33. Bache RJ, Cobb FR, Greenfield JC Jr. Limitation of the coronary vascular response to ischemia in the awake dog. *Circ Res.* **35** (4): 527-535, 1974.
34. Black MA, Cable NT, Thijssen DH, Green DJ. Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans. *Hypertension.* **51** (2): 203-210, 2008.
35. Ishibashi Y, Takahashi N, Shimada T, Sugamori T, Sakane T, Umeno T, Hirano Y, Oyake N, Murakami Y. Short duration of reactive hyperemia in the forearm of subjects with multiple cardiovascular risk factors. *Circ J.* **70** (1): 115-123, 2006.
36. Chinellato A, Pandolfo L, Ragazzi E, Zambonin MR, Frolidi G, De Biasi M, Caparrotta L, Fassina G. Effect of age on rabbit aortic responses to relaxant endothelium-dependent and endothelium-independent agents. *Blood Vessels.* **28** (5): 358-365, 1991.
37. Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ, Creager MA. Aging

- progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*. **27** (4): 849-853, 1996.
38. Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Fujii K, Nagao T, Fujishima M. Age-related changes in P2-purinergic receptors on vascular smooth muscle and endothelium. *Hypertension*. **19** (3): 286-289, 1992.
39. Moritoki H, Yoshikawa T, Hisayama T, Takeuchi S. Possible mechanisms of age-associated reduction of vascular relaxation caused by atrial natriuretic peptide. *Eur J Pharmacol*. **210** (1): 61-68, 1992.
40. Zhang B, Bailey WM, McVicar AL, Gensel JC. Age increases reactive oxygen species production in macrophages and potentiates oxidative damage after spinal cord injury. *Neurobiol Aging*. **47**: 157-167, 2016.
41. Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AH, Wang DL. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci*. **21**: 3, 2014.

42. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand.* **168** (1): 81-88, 2000.
43. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* **399** (6736): 601-605, 1999.
44. 松本厚枝. 歯肉マッサージにおける自作電動歯肉マッサージ器の有用性についての評価 第2報 ラットの歯肉炎に対する効用について, 日衛学誌 **3** (1): 41-46, 2008.

付図説明

図 1 実験デザイン

図 2 加齢に伴う反応性充血の変化

図 3 加齢に伴う反応性充血の低下に対する
歯肉マッサージの効果

図 4 形態学的解析（HE + 墨汁注入標本）

図 5 形態学的解析（血管鑄型標本）

図 1

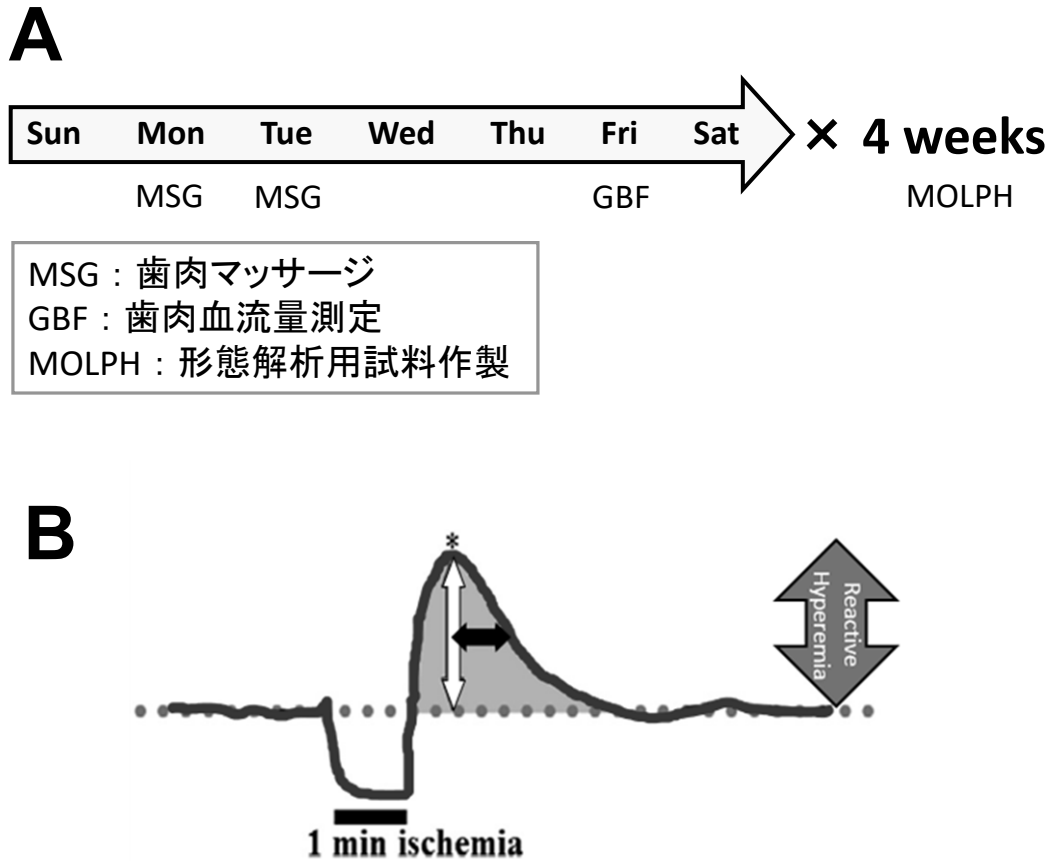


図 1 実験デザイン

A : 実験スケジュールを示す。歯肉マッサージは上顎左側第一臼歯近心歯肉に週に 2 回の頻度で 4 週間、合計 8 回行った。歯肉マッサージから 3 日後にレーザードップラー血流計を用いて、同部の血流速度を測定した。4 週間の血流測定終了後に、Hematoxylin and Eosin (HE) + 墨汁注入標本，レジンを注入した血管鑄型標本を作製した。

B : 反応性充血時の歯肉の典型的な血流量 (GBF : gingival blood flow) 変化を示す。基底血流量 (点線 : Base flow), 最大血流量 (* Peak), 最大血流量が 1/2 に低下するまでに要する時間 (黒い両矢印 : $T_{1/2}$), 増加総血流量 (灰色の部分 : Mass)

図 2

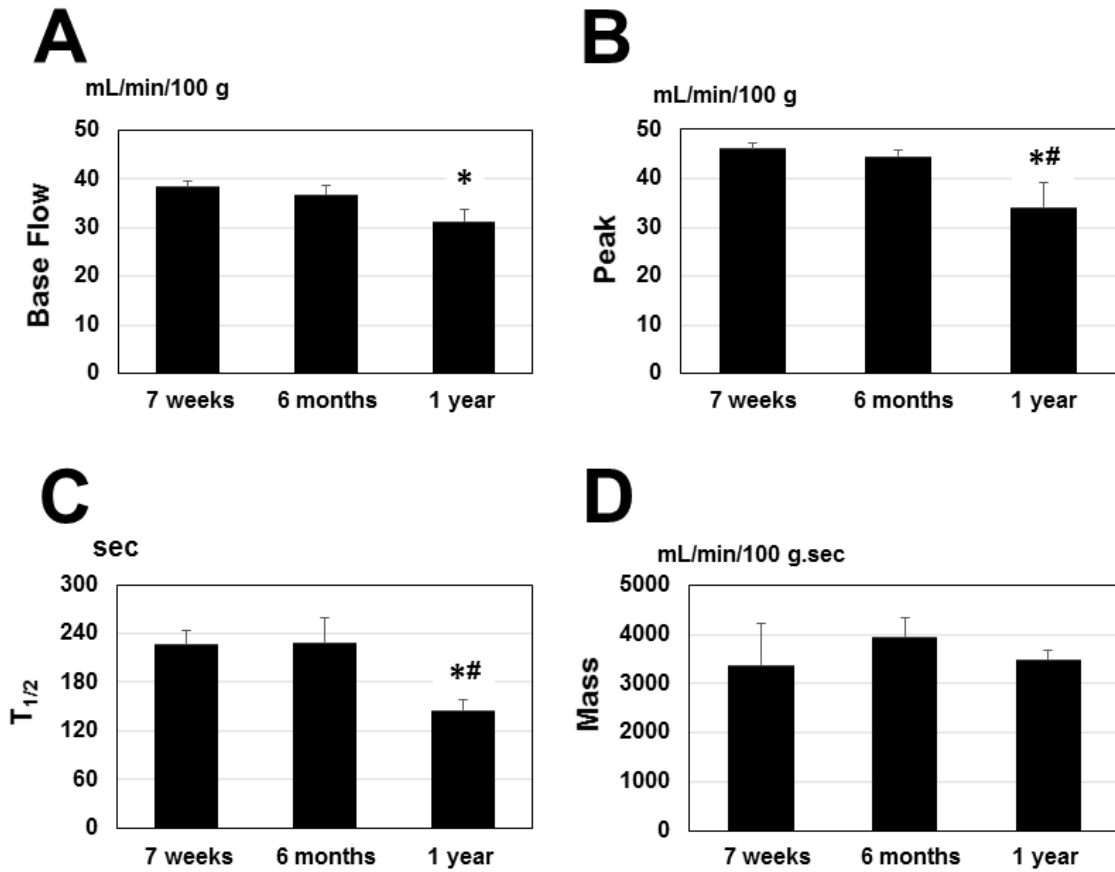


図 2 加齢に伴う反応性充血の変化

A : Base flow, B : Peak, C : $T_{1/2}$, D : Mass を示す。

1 年 齢 で は , 7 週 齢 と 比 較 し て Base flow は 低 下 し , 7 週 齢 , 6 ヶ 月 齢 と 比 較 し て Peak は 低 下 し , $T_{1/2}$ は 短 縮 し た 。 デ ー タ は mean \pm SEM (n=5~8) で 示 す 。

* $P < 0.05$ vs. 7 weeks, # $P < 0.05$ vs. 6 months.

図 3

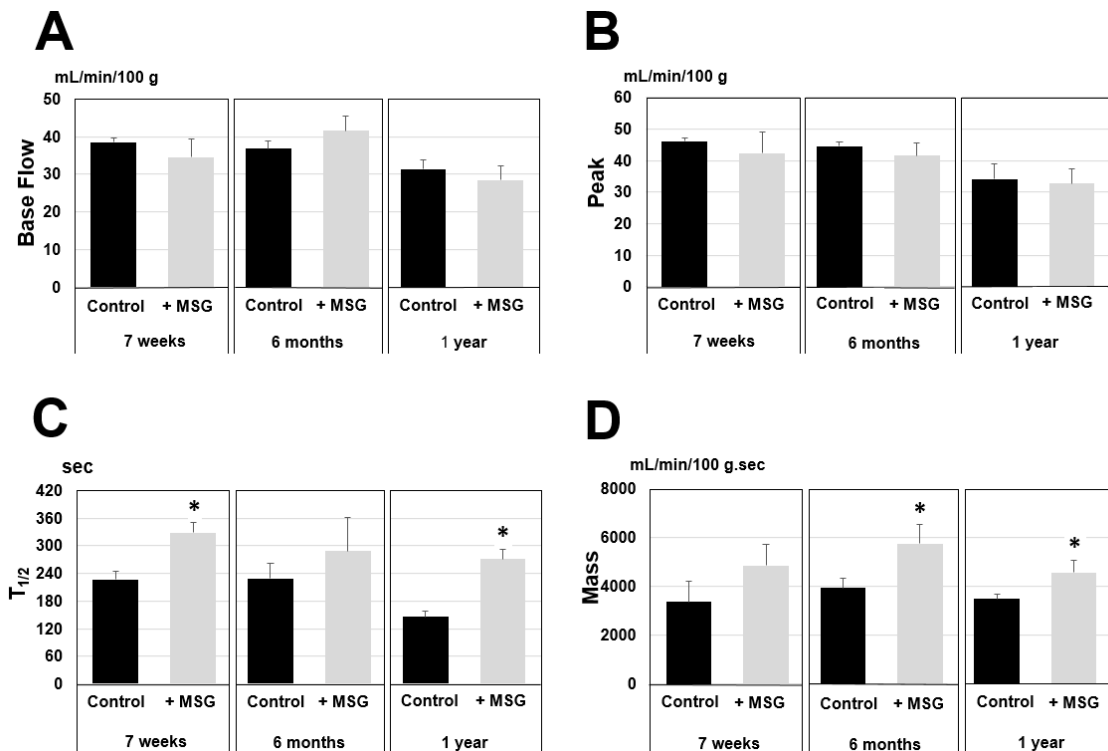


図 3 加齢に伴う反応性充血の低下に対する歯肉マッサージの効果

A : Base flow, B : Peak, C : $T_{1/2}$, D : Mass を示す。

control 群と比較して, MSG (歯肉マッサージ) 群では, 4 週間の反復マッサージにより, $T_{1/2}$ が 7 週齢と 1 年齢で延長し, Mass が 6 ヶ月齢と 1 年齢で増加した。データは mean \pm SEM (n=5~8) で示す。

* $P < 0.05$ vs. each control groups.

図 4

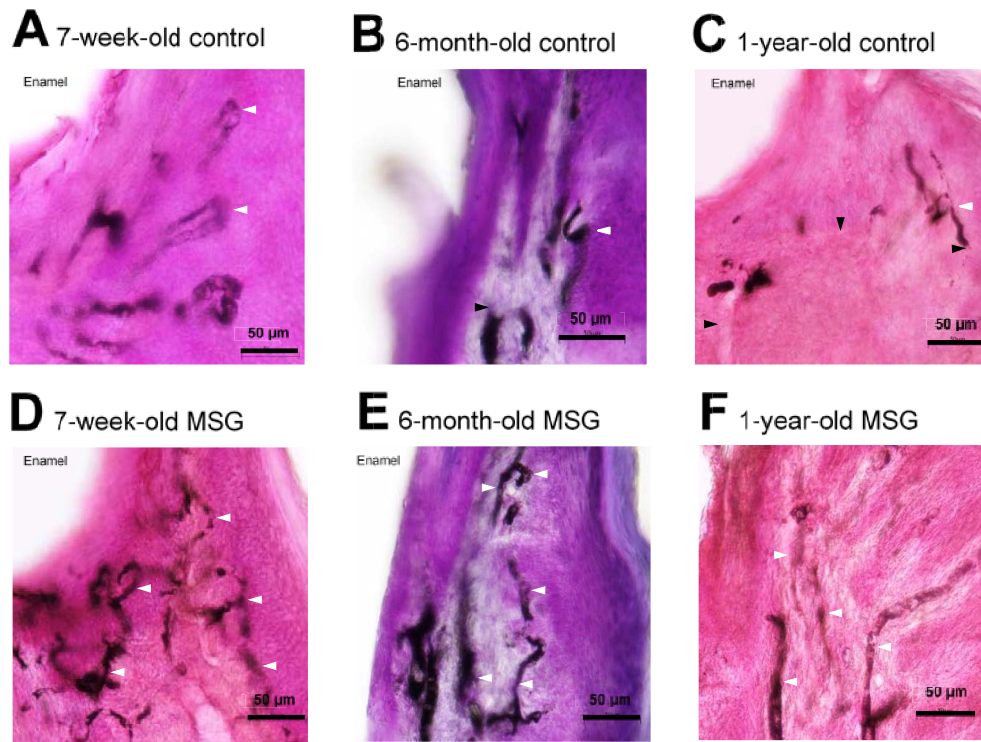


図 4 形態学的解析 (HE + 墨汁注入標本)

A~C : control 群, A : 7 週齡, B : 6 ヶ月齡, C : 1 年齡,
D~F : MSG (歯肉マッサージ) 群, D : 7 週齡, E : 6 ヶ月
齡, F : 1 年齡を示す。ループ状の血管は, 歯肉表層の外
縁上皮下の固有層に一致して観察された。control 群では,
加齡に伴いループ状血管 (白矢印) の高さが減少してい
た。また, 墨汁が流入しない血流の途絶した血管 (黒矢
印) が認められた。MSG 群では, control 群と比較して墨
汁の注入された循環を維持している血管 (白矢印) が多
く認められた。

図 5

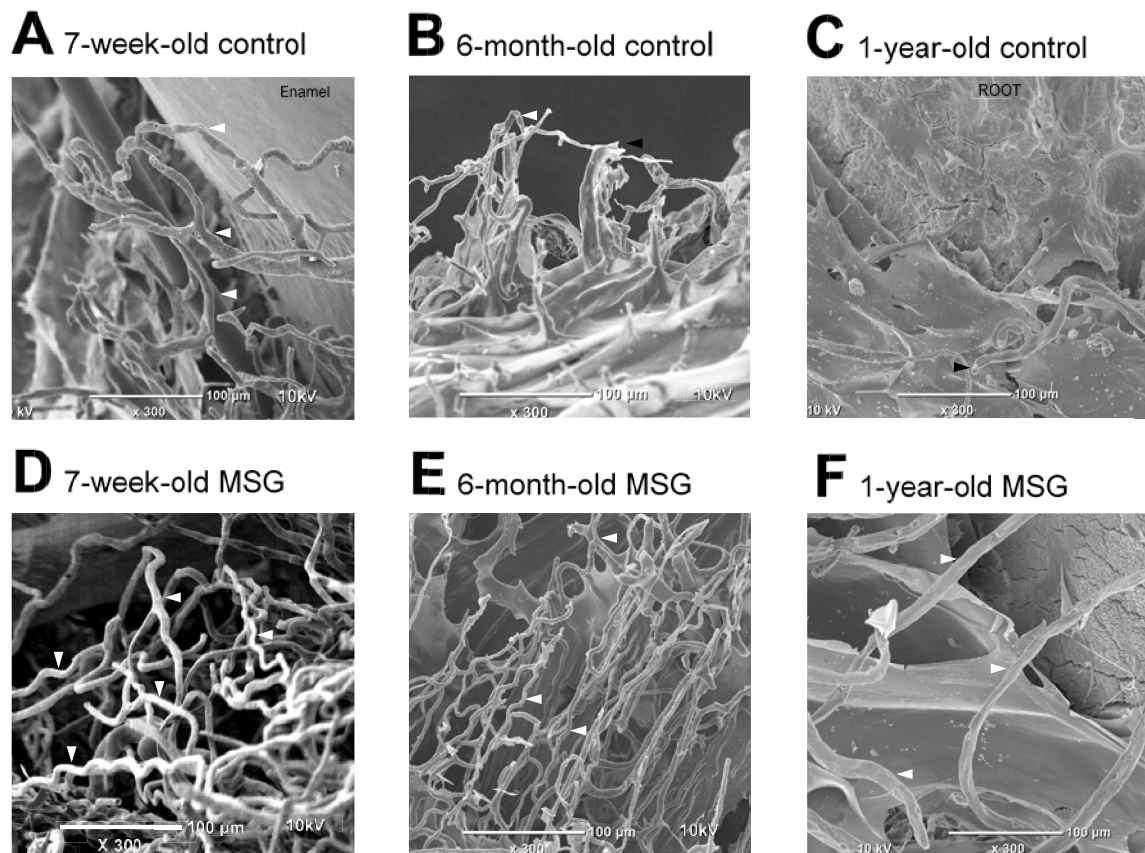


図 5 形態学的解析（血管鑄型標本）

A~C : control 群， A : 7 週 齡， B : 6 ヶ 月 齡， C : 1 年 齡，
D~F : MSG（歯肉マッサージ）群， D : 7 週 齡， E : 6 ヶ 月 齡， F : 1 年 齡 を 示 す。 control 群 で は， 加 齢 に 伴 い ル ー プ（白矢印）の高さが減じると共にループ状の形態も失われていた。また，一部の血管の表層は粗造であり，血流途絶血管（黒矢印）が認められた。MSG 群では，control 群と比較してループ（白矢印）を含む血管密度が高くなり，密な血管網を有していた。