

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18592156
 研究課題名（和文）臼歯喪失部位の違いが老化促進モデルマウスの咀嚼能力・学習記憶能力に与える影響
 研究課題名（英文）Effect of partial molar loss on learning and memory, masticatory abilities in Senescence Accelerated Mouse (SAM)
 研究代表者
 伊藤 裕 (ITO YUTAKA)
 愛知学院大学歯学部 教授
 研究者番号：20139950

研究成果の概要：

咀嚼が全身に与える影響を検討するために、実験動物の臼歯を部分的に喪失させることで、咀嚼能力・学習記憶能力にどのような変化をもたらすかを検討した。実験動物として平均寿命が 12 ヶ月と短い老化促進モデルマウスを用いることで、加齢に伴う変化についても併せて検討することとした。結果、咀嚼能力については低下する群がみられた。学習記憶能力については低下する個体もみられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 補綴理工系歯学

キーワード：歯科補綴学一般

1. 研究開始当初の背景

近年、咀嚼が全身に様々な影響を与えていることが示唆され、咀嚼の重要性が再認識されている。しかし、ヒトにおいて、加齢や歯の喪失、あるいは両者の影響による咀嚼能力の変化及び学習記憶能力の変化について、十分な検討がなされていない。今までわれわれは老化促進、加齢に伴う学習記憶障害の自然発症を特徴とし、平均寿命が 12 ヶ月と短い老化促進モデルマウス P8 (以下 SAMP8) を用いて上顎全臼歯の抜歯を行い、加齢に伴う咀嚼能力の変化と臼歯喪失期間の違いによる咀嚼能力の変化について検討を行ってきた。

また、学習記憶能力については、受動的回避実験および細胞数の変化によって検討を行ってきた。

ヒトにおける歯の喪失様相は少数歯からすべての歯に至るまで様々であり、全身状態に与える影響も、全部の臼歯を喪失した場合と、部分的にそうした場合には異なることが予想される。上記の問題に関連したこれまでの実験動物を用いた研究では、その多くが上顎左右臼歯のすべてを喪失させており、臼歯列を部分的に喪失させて追求した試みはほとんど見られない。

2. 研究の目的

本研究では、老化促進モデルマウスの臼歯列を部分的に喪失させ、これが学習記憶能力および全身状態に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1)実験動物

実験動物には、老化促進モデルマウスを用いた。このマウスは、正常な成長過程後に急速かつ不可逆的に進展する病的老化を示す P 系統と、正常老化を示す R 系統に分かれている。前者の P 系統は促進老化兆候に加えて、学習記憶障害、老年性アミロイド症、老年性白内障、変形性顎関節症、骨粗鬆症、老年期脳障害などを発症することが知られている。

本研究では、P 系統の中でも平均寿命が約 12 ヶ月と通常のマウスの約半分と短く、加齢依存性の学習記憶能力の低下を示す老化促進モデルマウス SAMP8 を用いた。

(2)飼育環境

飼育環境は、コンベンショナル条件下で、室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、照明時間を 12 時間サイクル（明期 7～19 時、暗期 19～7 時）に設定した。またホームケージには、マウス用プラスチックケージ(215W×320L×130Hmm)を用いた。飼育密度は 1 ケージあたり 3 匹以内とし、水道水と固形飼料（日本クレア社製、CE-2）は自由に摂取させた。

(3)実験群の設定

SAMP8 は、上下顎ともに切歯 1 対、臼歯 3 対の歯を有しており、切歯は生涯にわたって萌出を続ける。臼歯の咬合面は、第 1 臼歯が近遠心径、頬舌径ともに最も大きく、続いて第 2 臼歯、第 3 臼歯の順に小さくなる。

本研究では、2 ヶ月齢（若齢期）のオス 48 匹を用い、ランダムに 6 群に分配した。その内訳は、残存歯で咬合支持が確保されている中間欠損状態を想定して上顎左右側第 2 臼歯だけを喪失させた群（以下、第 2 臼歯喪失群）を、5 ヶ月齢まで飼育した群 8 匹、同じく 8 ヶ月齢まで飼育した群 8 匹、また第 3 臼歯だけが咬合接触を有するが咬合支持のない状態を想定して上顎左右側第 1、第 2 臼歯を喪失させた群（以下、第 1・第 2 臼歯喪失群）を、5 ヶ月齢まで飼育した群 8 匹、同じく 8 ヶ月齢まで飼育した群 8 匹、および歯を喪失させない群（以下、非処置群）を、5 ヶ月齢まで飼育した群 8 匹、同じく 8 ヶ月齢まで飼育した群 8 匹の計 6 群とした。

(4)抜歯処置

抜歯処置は、2 ヶ月齢のマウスを対象に pentobarbital 0.2mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下で耳小骨鉗子を用いて行った。非

処置群にも同様の負荷を与える目的で、2 ヶ月齢時に全身麻酔だけを施行した。

(5)実験 1：学習記憶能力

学習記憶能力は、受動的回避試験を用いて評価した。この試験は行動を起こすと好ましくない事態が生じる状況に動物をおいて、その動物に行動しないことが有利であることを覚えさせる試験である。本研究では、マウスが暗く狭い場所を好む性質を利用したステップスルー試験法を用いた。

自作した実験装置は、大小 2 つのコンパートメントからなり、大きいコンパートメント ($25\times 25\times 30\text{cm}$) は暗室で、小さいコンパートメント ($9\times 9\times 25\text{cm}$) は 40cm の高さから 40w の白色灯で照明された明室になっている。2 室はスライド式ドアで仕切られており、暗室の床には通電ができるようになっている。

ステップスルー試験法は、獲得試行と保持テストの 2 つの過程からなる。まず獲得試行として、マウスを 1 匹ずつ個別の箱に移し、暗室で 1 時間以上の安静状態とする。次に明室にマウスを入れ、30 秒間順化させた後にドアを開放し、マウスが暗室に完全に入ると同時にドアを閉め、電気刺激（交流 0.3mA ）を 3 秒間与えた。そして 24 時間後に、保持テストを獲得試行と同様の手順で行い、暗室へ移動するまでの時間を反応潜時として最大 300 秒まで計測し、学習記憶能力を評価する。獲得試行時における電気刺激を不快な経験として学習記憶しているほど、保持テスト時に暗室へ入るまでの時間（反応潜時）はより長くなる。一方、この反応潜時は学習記憶能力の低下に伴い短縮することになる。この試験では、測定者の動きや周囲環境の変化をできるだけ排除してマウスに外的刺激を与えないよう配慮した。

(6)実験 2：咀嚼能力

咀嚼能力は、試料摂食後、胃の内容物の粒子径を測定して評価した。すべての実験群のマウスを対象に、測定前に 24 時間絶食させた後、個別にして試料のアーモンドを自由に 30 分間摂食させた。その直後にエーテルにて屠殺し、胃の内容物を取り出してその粒子径を測定した。測定にはレーザ回折/散乱式粒度分布測定装置 LA-920（堀場製作所社製）を用い、測定した粒径別ヒストグラム ($0.02\sim 2000\mu\text{m}$) から粒子径の平均値を算出して各個体の代表値とした。この値が大きいほど、咀嚼能力は低いとみなした（図 1）。

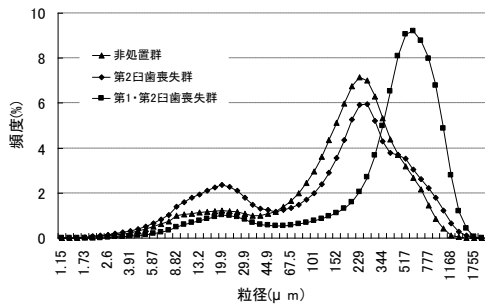


図1 粒子径ヒストグラムの一例(5ヶ月齢)

(7)実験3：全身状態の評価

全身状態を評価するために、老化度、体重、摂水量および摂餌量を指標として用いた。実験開始時の2ヶ月齢から、老化度は1ヶ月ごとに、体重、摂水量、摂餌量は1週間ごとに計測した。体重、老化度については1匹ごとに計測を行い、摂水量、摂餌量についてはケージごとに計測して1匹あたりの量に換算した。老化度の評価には、竹田らによって考案されたSAM特有のGrading Score System(老化度判定基準)を用いた。これは、マウスの外観、行動の変化を項目別に分け、その変化をそれぞれの程度に応じて0~4点あるいは0~3点の評点を与え、その合計値で評価する。合計値が高いほど、老化度は進んでいると判定する。本研究では、眼所見を除く、行動、皮膚、脊椎に関する項目を実験群の個体すべてに対して、同一の環境、時間帯、測定者によって測定した。また、測定者はSAM研究協議会の主催する老化度判定基準講習会を受講し、その評価法を習得している。

(1)統計処理

学習記憶能力および咀嚼能力については、実験群間(非処置群、第2臼歯喪失群、第1・第2臼歯喪失群)の比較にはKruskal-Wallis検定を用い、有意差が検出された場合、多重比較の対比較をSteel-Dwass検定により行った。また、5ヶ月齢と8ヶ月齢とを比較する場合にはMann-Whitney検定を用いた。

全身状態を評価するための指標に用いた老化度、摂水量、摂餌量については、実験群間の比較をKruskal-Wallis検定を用いて行った。また体重については、実験群間の比較を一元配置分散分析法で行った。さらに2ヶ月齢から8ヶ月齢までの経時的様相をとらえるために、実験群ごとに、老化度、摂水量、摂餌量についてはSpearmanの順位相関係数検定を、体重についてはPearsonの相関係数検定を行った。統計的有意性は、有意水準5%($P<0.05$)で判断した。

4. 研究成果

老化促進モデルマウスSAMP8を用いて、臼歯列の部分的喪失が学習記憶能力、咀嚼能

力に及ぼす影響について検討した。

その結果、学習記憶能力については加齢による低下は確認されたが、臼歯列の部分的喪失による影響は明確にはみられなかった。しかし、学習記憶能力は臼歯列が部分的に喪失すると、個体差が大きくなり、かなり低下する個体も認められた(図2,3)。

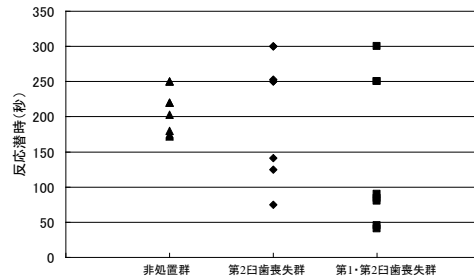


図2 受動的回避試験の結果(5ヶ月齢の標本分布)

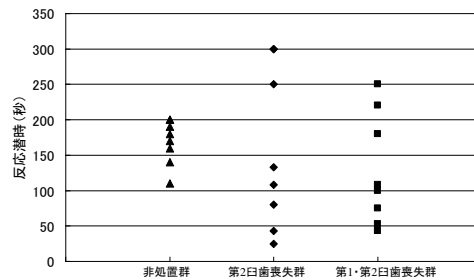


図3 受動的回避試験の結果(8ヶ月齢の標本分布)

咀嚼能力は、上顎左右第1第2臼歯が喪失すると、5ヶ月齢の中年期で有意に低下した。上顎左右第2臼歯だけを喪失した場合には、咀嚼能力は有意に低下しなかった。また、咀嚼能力は8ヶ月齢の老齢期では臼歯列が部分的に喪失すると、個体差が大きくなり、かなり低下する個体も認められた。(図4,5)

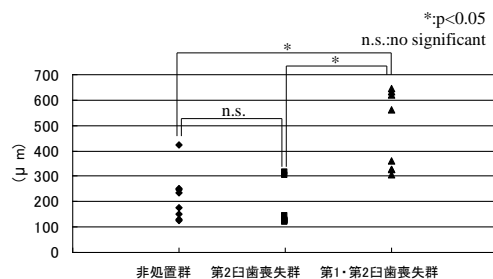


図4 実験群の粒子径の比較(5ヶ月齢の標本分布)

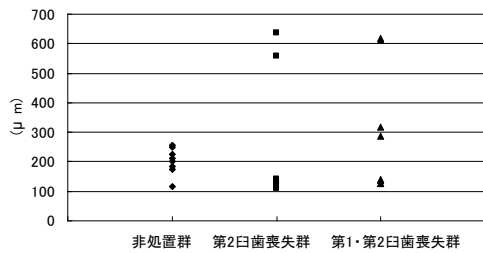


図5 実験群の粒子径の比較(8ヶ月齢の標本分布)

Grading Score System による老化度の評価では、各群間に有意な差を認めなかった。(図6)

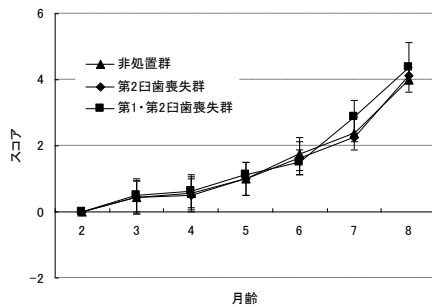


図6 グレーディングスコアの経時的変化
(値は中央値と四分位偏差)

学習記憶能力、咀嚼能力は、臼歯列の部分的喪失によって顕著な変化はみられなかったが、臼歯列が部分的に喪失すると加齢に伴って個体差が大きくなり、学習記憶能力および咀嚼能力がかなり低下する個体が認められことには注意すべきだと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 土屋智昭、横山隆、加藤大輔、村上弘、百合草誠、犬飼敏博、森隆司、伊藤裕、老化促進モデルマウスにおける臼歯の部分的欠損と学習記憶能力・咀嚼能力の関係 愛知学院大学歯学会誌 45 巻 1 号 p 51- p 58 2007 査読有り

[学会発表] (計3件)

- ① Y. ITO, T. TSUCHIYA, D. KATO, T. YOKOYAMA, H. MURAKAMI, T. TAKIGAWA, Effect of partial molar loss on mastication, memory in SAMP8, International Association for Dental Research 2006. 6. 29 Brisbane Australia
- ② Y. ITO, T. TSUCHIYA, D. KATO, T.

YOKOYAMA, T. TAKIGAWA, Effect of partial molar loss on mastication in SAMP8, International Association for Dental Research 2007. 3. 23 New Orleans, USA

- ③ Y. ITO, D. KATO, T. TSUCHIYA, T. YOKOYAMA, K. NAGATA, Y. INUKAI, Effect of Aging and Teeth Loss on Mastication SAMP8, International Association for Dental Research 2008. 7. 4 Toronto, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 裕 (ITO YUTAKA)
愛知学院大学歯学部 教授
研究者番号: 20139950

(2) 研究分担者

横山 隆 (TAKASHI YOKOYAMA)
愛知学院大学歯学部 講師
研究者番号: 90319202
平成 18, 20 年度参画

加藤 大輔 (KATO DAISUKE)
愛知学院大学歯学部 講師
研究者番号: 00367616

土屋 智昭 (TOMOAKI TSUCHIYA)
愛知学院大学歯学部 非常勤助教
研究者番号: 90460526
平成 19 年度参画

(3) 連携研究者

なし