

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792226
研究課題名（和文） 臼歯抜歯後の咬合支持の回復と慢性ストレスが高次脳機能に与える影響
研究課題名（英文） The influence between the recovery of the occlusal support after tooth extraction and the chronic stress.
研究代表者
黒住 明正（KUROZUMI AKIMASA）
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20599790

研究成果の概要（和文）：

臼歯抜歯による咬合支持の喪失は空間記憶能の減退を引き起こし、その後の実験用義歯による咬合支持の回復により、空間記憶能の減退が抑制される可能性がある。また、組織学的にも咬合支持の喪失は海馬錐体細胞密度の低下を招くことが示唆された。ストレス値を比較すると、対照群、義歯装着群、および臼歯抜歯群の間に有意差を認めなかったことから、実験終了時点において、実験義歯装着はストレスサーとなっていなかったことが示された一方、臼歯抜歯による慢性ストレスは認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Occlusal disturbance caused by the extraction of molar teeth or occlusal disharmony accelerate impairment of spatial learning and memory. It is possible that the loss of occlusal support by teeth extraction caused a decline of the spatial memory, and the recovery of occlusal support wearing the experimental denture controlled a decline of the spatial memory. Also, it was suggested that the loss of occlusal support caused a decline of hippocampus pyramidal cell density. Compared to chronic stress, it was not significant difference between control, denture-wearing, and tooth extraction groups. While wearing the experimental denture wasn't under stress, the chronic stress caused by occlusal disharmony was not accepted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：咬合支持、臼歯抜歯、慢性ストレス

1. 研究開始当初の背景

日本の高齢化は上昇の一途をたどり、2025年には高齢化率は約30%になると予想されている。一方、高齢化率の上昇に伴

い、認知症患者の増加という新たな社会問題が深刻化している。また、歯牙の喪失は、アルツハイマー型認知症の疫学的リスクフ

アクターの1つとなる可能性があること (Agerberg G *et al*, *Acta. Odontol. Scand*, 39, 147-153, 1980.), 老人の口腔衛生状態や咬合関係・咀嚼機能などが認知症の状態に関連すること (Miura H *et al*, *J. Oral Rehabil*, 30, 808-811, 2003.) が報告されている。

動物実験においても臼歯抜歯されたラットでは、大脳皮質におけるアセチルコリン放出量の減少と、8方向放射状迷路における空間記憶の減退が認められている (Kato T *et al*, *Behav. Brain Res*, 83, 239-242, 1997.)。また、老齢 SAMP8 マウスの臼歯喪失は空間記憶の減退とアストロサイトの反応変化をもたらすと考えられている (Onozuka M *et al*, *Behav Brain Res*, 108, 145-155, 2000.)。このように、咀嚼機能の減少や咬合支持の喪失が学習ならびに記憶能力の減退を引き起こし、中枢神経系に影響を与えていることが明らかになりつつある。我々は、過去に老齢 Wistar 系ラットの上顎臼歯抜歯後に実験用義歯を装着した咬合回復モデルを作成し行動学的・組織学的評価を行い、臼歯抜歯後の咬合回復が実験動物の空間記憶能を改善し1次記憶を貯蔵すると考えられる海馬の錐体細胞の退行性変化を抑制することを明らかにした (黒住, *岡山歯学会誌*, 2009; 28(1):1-9.)。しかしながら、臼歯の喪失後の咬合支持の回復が、空間記憶や中枢神経系に与える影響については未だ十分ではない。咬合支持を失った高齢患者に対する補綴治療が毎日の臨床において当たり前のように行われているが、欠損補綴が単に咀嚼

機能を回復するだけでなく、中枢神経系に与える影響を解明することは極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

近年、咬合による慢性ストレスが中枢神経系における器質的变化を及ぼすことが明らかになりつつある (Yoshihara *et al*, *J Dent Res*, 2001; 80: 2089-2092.)。咬合不全が慢性ストレスとなる可能性があるという知見を受けて、前述した我々の製作した実験用義歯の装着が実験動物にとって慢性ストレスとなり実験結果に影響を与えている可能性を検証する必要性に迫られた。そこで本研究では、上記の咬合回復モデルを使用して8方向放射状迷路課題を用いた空間記憶能の行動学的評価と海馬錐体細胞の組織学的評価を改めて行う。同時に実験動物の血中 corticosterone 濃度を計測することで、臼歯抜歯後の実験用義歯装着により生じると考えられる慢性ストレスが実験動物の高次脳機能に与える影響について明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 実験動物の振り分け

実験には60匹のWistar系雄性ラットを用いた。これらのラットは、上顎臼歯抜歯手術を施行する臼歯抜歯群20匹、上顎臼歯抜歯後に実験用義歯を装着する義歯装着群20匹、対照群20匹の3群に無作為に振り分けた。また、全期間を通して個々のラットの体重変動を記録した。

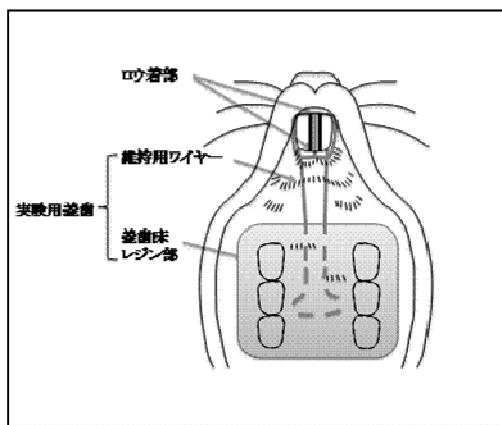
(2) 上顎臼歯抜歯術

臼歯抜歯群及び義歯装着群ラットに対しては、7週齢時にペントバルビタール (Nenbutal, Abotto, USA) を用い深麻酔下 (30mg/kg) において、全ての上顎臼歯抜歯

を施行した。対照群には麻酔のみの偽手術を行った。3群には実験期間を通して固形飼料を摂取させた。

(3) 実験用義歯を用いた咬合支持回復術

義歯装着群ラットには、臼歯抜歯後に咬合支持の回復のために実験用義歯を装着した。抜歯3週後にレジントレーとシリコン系印象材を使用して口腔内の印象採得を行い、間接法にて下図に示すように維持用ワイヤーと常温重合型レジン (ACRON, GC, 東京) にて構成される実験用義歯を製作後、11週齢時に上顎に装着した。装着時には実験用義歯の装着によるストレスを可能な限り排除するために、前歯の被蓋関係が、抜歯前と変化しないように咬合調整を行った。11週齢以降、3群60匹を飼育室内にて50週齢まで老化させた。



(4) 迷路試行

行動学的評価には、8方向放射状迷路 (Radial arm maze, ニューロサイエンス, 東京) を用いる。それぞれのアームの端には45mgの報酬用ペレット (Dustless Precision Pellets, Bioserv, Germany) を置くためのフードキャップが設置されている。ラットは迷路を取り囲む周囲の事物を視覚的手掛かりとしていると考えられている (Leung L. S *et al.* *Behav. Neurosci.* 110, 1017-24, 1996.) ため、迷路の配置、机などの位置を含む室内風景は実験期間中を通

し一定とし、47週齢以降、水分に関しては完全に自由摂取とした。一方、食餌に関しては体重がWistar系雄性ラットの同一週齢における平均体重に対して80-85%に維持されるように固形飼料を制限した。

実際の迷路実験が始まる前に、ラットを迷路装置に慣れさせ実験室内の情報を覚えさせるために馴化試行を5日間行った。馴化試行の後、空間記憶能を評価するための迷路試行を開始した。

各群には50週齢時から20日間、1日1回の迷路試行を行わせた。各試行においてパソコンと接続したCCDカメラを迷路上方に設置し各試行におけるラットの動きを記録した。記録されたデータを2次元画像解析ソフト (Move-tr/2D, Library Co., Ltd., Tokyo, Japan) によって再生し、1度侵入したアームへ被験ラットの四肢が再度侵入したことをエラーと定義して、各試行におけるエラー数を計測した。

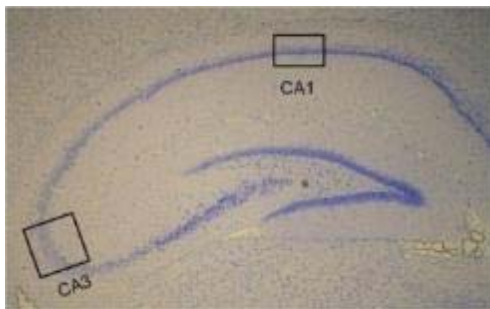
(5) ストレス値の計測

実験終了後のラットのストレス値を計測することを目的として、3群のラット尾静脈から採血を行った。

(6) 組織学的評価

最終試行の後、ラットをペントバルビタールにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて通法により灌流固定を行った。脳組織は摘出後、4°Cで同液にて24時間固定した。脳組織はパラフィン包埋し、4μmの前頭断切片として、Nissl染色を施した。海馬計測部位は、ラット脳解剖図譜 (Paxinos, G. and Watson, C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates* 4th edition. San Diego: *Academic Press*, 1998.) に示される左側背側海馬CA1, CA3領域を中心に観察した。観察部位は、Asanumaら (Asanuma A *et al.* *Mech*

Ageing Dev. 83, 55-64, 1995.) の方法を参考として, CA1 では頭頂皮質方向を上方として, 第三脳室直上の彎曲点から $50\mu\text{m}$ 離れた領域に, CA3 では CA1 から歯状回に向かう彎曲点の頂点に領域を設定した。CA1 では, 縦 $100\mu\text{m}$, 横 $200\mu\text{m}$ の範囲, CA3 では縦 $200\mu\text{m}$, 横 $200\mu\text{m}$ の範囲を観察範囲とした。計測は, 光学顕微鏡を用いて $100\mu\text{m}$ 間隔で 5 切片を抽出し, 1 切片 4 回の合計 20 回行った。その平均を算出し代表値として単位面積あたりに存在する細胞数 (細胞密度) を計測した。計測した海馬錐体細胞は, 細胞形態ならびに核小体が明瞭なものとした。



(7) .統計学的分析

実験期間を通じたラットの体重変動, 8 方向放射状迷路試行における 3 群間のエラー数, ならびに, CA1・3 領域の細胞密度の統計学分析には分散分析後に Tukey 法を用いた。有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 体重変動

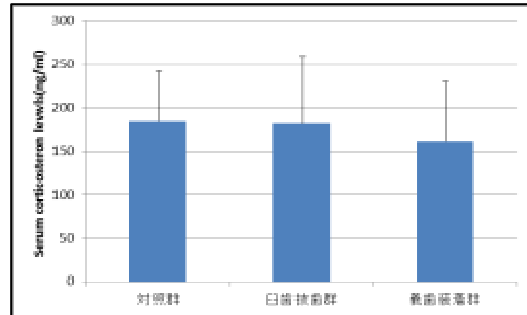
実験期間を通じて 3 群間の体重変動に有意差を認めなかった。

(2) ストレス値の計測

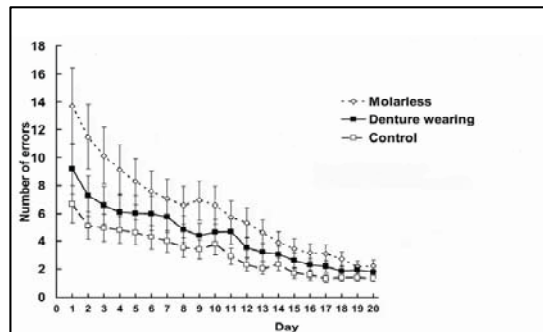
3 群間のラットより採血を行い Corticosterone Level (ストレス値) を計測した結果, 3 群間に有意差を認めなかった。実験用義歯の装着と臼歯抜歯は実験動物にとって慢性ストレスとならないことが推察されたが, ストレス値の計測

が実験終了後の 1 回のみであったため, 実験動物に加わる実験開始からの継時的なストレス値の詳細について考察する必要性があると考えられた。

(3) 迷路試行



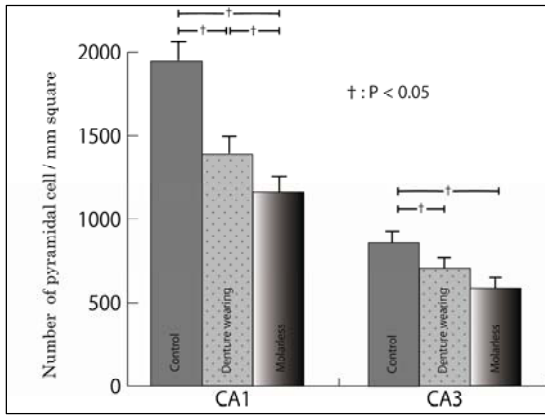
エラー数は 3 群ともに経時的に減少傾向を見せた。3 群間のエラー数において有意差を認めた [$F(2, 57)=48.57, p<0.01$]。



(4) 海馬錐体細胞濃度

3 群の CA1 ならびに CA3 領域の海馬錐体細胞濃度について比較した。CA1 領域における細胞密度は, 臼歯抜歯群 [1161.13 ± 239.85] は他 2 群 [義歯装着群 (1388.25 ± 243.38), 対照群 (1945.37 ± 142.56)] よりも低く, 3 群間に有意差を認めた。

また, CA3 領域における細胞濃度の比較においては, 臼歯抜歯群 (586.63 ± 119.38) と義歯装着群 (705.01 ± 113.25) は対照群よりも有意に低かった。



(5) 総括

咬合による慢性ストレスが中枢神経系に器質的変化を及ぼすことが明らかになりつつあり (Yoshihara *et al*, *J Dent Res*, 2001; 80: 2089-2092.), 咬合不調和と空間認知能の関連性について調べていく上でその原因の一つと考えられる慢性ストレスの影響について考慮する必要がある。

本研究の結果をまとめると、これまでの先行研究に従うように、臼歯抜歯による咬合支持の喪失は空間記憶能の減退を引き起こし、その後の実験用義歯による咬合支持の回復により、空間記憶能の減退が抑制される可能性がある。また、組織学的にも咬合支持の喪失は海馬錐体細胞密度の低下を招くことが示唆された。

血中 corticosterone 濃度を比較すると、3群間に有意差を認めなかったことから、実験終了時点において、実験義歯装着はストレスサーとなっていなかったことが示された一方、臼歯抜歯による慢性ストレスは臼歯抜歯群に認められなかった。臼歯抜歯群の行動学的・組織学的結果には慢性ストレスが影響していると予想していたが、結果は異なるものとなった。

今回のように実験終了時点のみのストレス計測では、実験過程において慢性ストレスが各群にどの程度の影響を与えたのかについては明らかにできなかった。今後は経時的な

ストレス計測により、臼歯抜歯や咬合支持の回復が実験動物の中枢神経系に与えている影響を詳しく検証していく必要がある。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① T. HARA, T. MIYAZAKI, S. SAKAMOTO, S. IIDA, D. ARAKI, A. KUROZUMI, C. KURODA-ISHIMINE, M. OKA, and S. MINAGI, Contralateral Hippocampal Pyramidal Cells is Reduced by Unilateral Tooth Extraction, The IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition, Seattle, U.S.A. March 20-23, 2013
- ② D. ARAKI, K. KAWATA, T. HARA, S. IIDA, M. OKA, C. KURODA-ISHIMINE, A. KUROZUMI, S. SAKAMOTO, T. MIYAZAKI, and S. MINAGI, Effect of cyclic compressive force in rat gingival fibroblasts. The 60th Annual Meeting of IADR Japanese Division. Niigata, December 14-15, 2012.
- ③ T. HARA, J. TANAKA, S. IIDA, D. ARAKI, T. MIYAZAKI, S. SAKAMOTO, C. KURODA, A. KUROZUMI, M. OKA, T. MATSUMOTO, and S. MINAGI, Adaptation of PMMA/divinyl adipate resin for denture base, The AADR Annual Meeting to be held in Tampa, Fla. USA. March 21-24, 2012.
- ④ S. IIDA, D. ARAKI, T. HARA, C. KURODA, M. OKA, A. KUROZUMI, K. KAWATA, S. SAKAMOTO, T. MIYAZAKI and S. MINAGI, Memory-related gene expression in the rat hippocampus by the learning, The AADR Annual Meeting to be held in Tampa, Fla. USA. March 21-24, 2012.
- ⑤ 原 哲也, 黒住明正, 坂本準一, 飯田祥与, 荒木大介, 黒田知沙, 岡森彦, 白井肇, 皆木省吾, 森慎吾, 衣田圭宏. 咬合支持回復時の空間認知脳に対する分散学

習の影響. 第 22 回老年歯科医学会, 東京, 2011 年 6 月 15 日.

⑥坂本隼一, 原 哲也, 黒住明正, 岡 森彦, 黒田知沙, 河田かずみ, 荒木大介, 飯田祥与, 皆木省吾. 長期間咬合支持を喪失させたラットにおける咬合支持の回復が空間認知脳に与える影響. 第 120 回日本補綴歯科学会, 広島, 2011 年 5 月 20 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒住 明正 (KUROZUMI AKIMASA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 20599790

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者