

TrkB mRNA 発現からみたラット 臼歯喪失歯数の多寡と高次脳機能の関連

山崎 薫子, 虫本 栄子

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座

(主任: 鈴木 哲也 教授)

(受付: 2004年12月20日)

(受理: 2004年12月24日)

Purpose : The purpose of this study was to investigate changes in spatial learning and memory in rats after extraction of maxillary molar teeth by 8-arm radial maze test and measurements of numbers of TrkB mRNA positive cells in hippocampal pyramidal cells.

Materials and Methods : Seventy-two male Wistar rats (7 weeks old) were divided into four groups for this study. In Group A, molar teeth were left intact. In Group B, maxillary first molar teeth were extracted. In Group C, maxillary first and second molar teeth were extracted. In Group D, maxillary first, second and third molar teeth were extracted. A series of spatial memory tasks were performed in an 8-arm radial maze at 1, 4 and 7 weeks for all four groups. Following completion of this task period, levels of pyramidal cells and TrkB positive cells were observed.

Results : At 7 weeks, the results showed that Groups B, C and D exhibited significant behavioral dysfunction compared to group A, yet behavioral dysfunction was more remarkable the greater the number of lost molar teeth. Group B, C and D also showed a significant decrease in the number of hippocampal pyramidal cells and TrkB positive cells in CA1, CA 3 and CA4.

Conclusions : In conclusion, since the effects of experimental tooth extractions in rats caused decreased amounts of TrkB mRNA positive cells in hippocampal pyramidal cells, spatial learning and memory were affected. As the number of teeth lost increased, higher brain function decreased. (241 words)

Key words : molar tooth loss
higher brain function
8-arm radial maze
hippocampal pyramidal cells
TrkB mRNA positive cells

緒 言

ラットの歯の喪失と高次脳機能の関連について、教室の千葉¹⁾は、上顎臼歯喪失マウスで空

間学習記憶能が障害され、海馬錐体神経細胞数が減少したことを報告した。空間学習能力については、歯冠切除よりも臼歯抜歯で²⁾、硬い飼料よりも軟らかい飼料の飼育で³⁾低下すると報

The Relationship Between the Number of Molar Teeth Lost and Higher Brain Function in Rats Using an Expression of TrkB mRNA

Kaoruko YAMAZAKI, Eiko MUSHIMOTO

Department of Removable Prosthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

告され、この軟食飼育群では老化の早期進行や寿命の短縮⁴⁾も認めたとする。このような実験結果は歯根膜を介する求心性の情報量の多寡が、空間学習記憶能の優劣に影響する可能性を示している。

近年、学習記憶のメカニズムについて分子レベルでの解明が進歩し、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や Tyrosine kinase B (TrkB) が学習記憶に関与することが報告されている。BDNF は神経の生存に重要な生理活性蛋白質⁵⁾で、TrkB は BDNF の特異的高親和性受容体である⁶⁾。迷路訓練後にラット海馬体において BDNF が著明に増加していたとの報告^{7,8)}があり、シナプス伝達能の亢進には BDNF の発現上昇あるいは TrkB-BDNF 結合の促進が起こると考えられる。従って、上顎臼歯喪失マウスで観察された著明な海馬錐体神経細胞数の減少は TrkB を持つ神経細胞とどのように関連するのか知ることは重要である。

そこで、本研究ではラットにおいて臼歯喪失歯数の違いが高次脳機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、臼歯喪失後の空間学習記憶能の変化、海馬錐体神経細胞数および錐体神経細胞中の TrkB mRNA を発現する細胞数の変動について検討した。

研究方法

1. 実験動物と体重計測と実験期間と群の設定

実験には生後 7 週齢 Wistar 系雄性ラット (日本 SLC, 浜松) を用いた。それぞれの迷路実験前の体重の 80~90% を維持するよう食餌制限を行った。

実験群は、非抜歯群 (A 群)、上顎両側第一臼歯抜歯群 (B 群)、同第一、二臼歯抜歯群 (C 群)、同第一、二、三臼歯抜歯群 (D 群) の計 4 群を設定した。抜歯は、迷路馴化後 8 週齢の時点で、pentobarbital 35.0mg/kg (Nembutal[®], 大日本製薬) 腹腔麻酔後に行った。A 群は腹腔麻酔のみを行った。なお、抜歯後 1 週間は自由行動させた。

実験期間は抜歯後最長 7 週までとし、各実験群において 1 週、4 週、7 週に実験を行った。1 週を超えた実験で 4 週までの実験では、1 週と 4 週の 2 回、また 7 週までの実験では 1 週、4 週と 7 週の 3 回で以下に示す行動学的実験、組織学的実験を行った。また、TrkB mRNA 陽性細胞の分子生物学的観察は 7 週のラットにのみ行った (Fig. 1)。

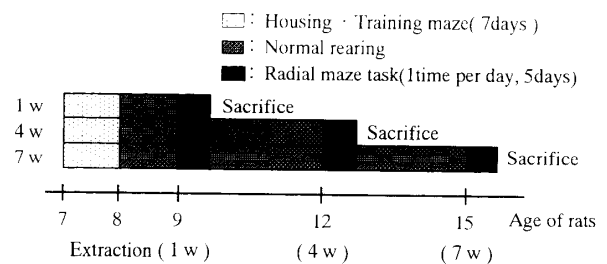


Fig. 1. Time table

Training maze was done for 5 days. Rats were divided into four experimental groups by numbers of molar teeth loss. A series of spatial memory tasks were performed in an 8-arm radial maze at 1, 4 and 7 weeks for all four groups. Following completion of this task period, levels of pyramidal cells and TrkB positive cells were observed.

2. 行動学的観察

1) 迷路装置

8 方向放射状迷路は Olton⁹⁾ らに準じ製作した。床面から 50cm の高架式とし、中央プラットホームは直径 33.5cm、各アームの長さは 60cm、幅 12cm、側壁の高さ 12cm とした。8 本のアームの先端に報酬となる餌皿を設けた。実験中は、ラットに触れたり装置外に取り出したりせず、また、馴化期間、実験期間を通して装置の設置場所および実験時間を可能な限り一定にし、環境変化を避けた。

2) 学習方法と評価項目

迷路実験に先立ち、ラットを実験環境に馴化させるために複数匹を同時に迷路内に放し、自由に走行、餌取りさせ、その手続きを各群とも 1 日 3 時間、5 日間行った。実験時には、各アームの先端に餌を置き、ラットを 1 匹ずつ中央プラットホームに放し、餌をすべて取り終え

るまでを1試行と規定した。迷路実験は各群個々のラットに1日1回の試行を、5日間繰り返した (Fig. 1)。

学習記憶能の評価項目には、アームに侵入し、餌を取得した回数を正選択数、既に餌を取ったアームに再び4本の足が侵入した回数をエラー数、1試行に要した時間を試行時間と定義し、学習記憶の獲得度を評価した。

3. 組織学的観察

脳は、迷路実験終了後4%paraformaldehydeで灌流固定を行い摘出した。4%中性緩衝ホルマリン固定液で24時間浸漬固定し、脱水、水洗、通法に従いパラフィン包埋した。厚さ7 μ mの前頭断連続切片を作製¹⁰⁾し、Nissl染色した。海馬CA1, CA3, CA4を光学顕微鏡 (Nikon, UFX) を用いて観察し、左右半球の単位面積あたり (縦100 μ m, 横100 μ mの範囲) に存在する細胞形態および核小体が明瞭な海馬錐体神経細胞数をそれぞれ5回ずつ計測し、平均値を代表値とした。なお、各領域の設定はAsanuma¹¹⁾らの方法を参考にランドマークを設定した。

4. 分子生物学的観察

7週目の迷路実験を行ったラット脳切片を用いて、TrkB mRNA陽性細胞の観察、計測を行った。赤色に染色された細胞をTrkB mRNA陽性細胞とした (Fig. 2)。

In situ hybridizationのプローブ選択は、Dragunow¹²⁾らの方法に準じ、合成オリゴヌクレオチドプローブとした。塩基配列は、TrkB; アンチセンスプローブ5'-GAGAGGGCTGGCAGAGTCGTTGCTGATGACGGAAGCTGGGC-3'であり、合成後3'末端にDigoxigenin標識を行った。*In situ* hybridizationには、Micro-probe™ Staining System (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) を用い、核染色にはmethyl green¹³⁾を用いた。TrkB mRNA陰性細胞は同一個体で観察された海馬錐体神経細胞数からTrkB mRNA陽性細胞数を差し引いて求めた。

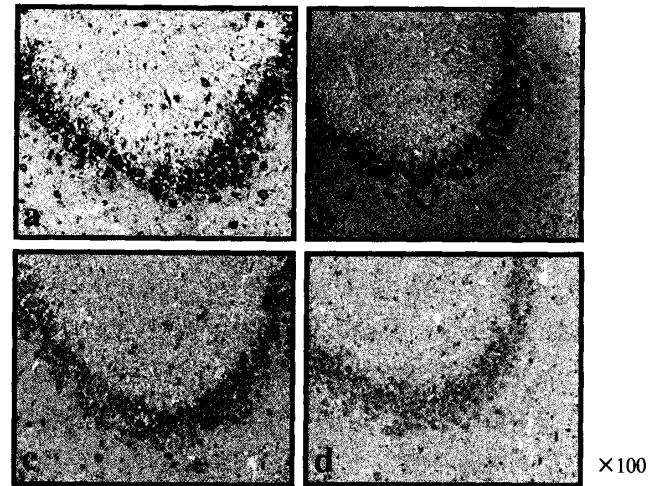


Fig. 2. An Aspect of expression of TrkB mRNA positive cells per unit area of region CA3

- a : molar teeth were left intact (Group A)
- b : maxillary first molar teeth were extracted (Group B)
- c : maxillary first and second molar teeth were extracted (Group C)
- d : maxillary first, second and third molar teeth were extracted (Group D)

5. 統計処理

行動学的、組織学的データは、主変動因子に群間と抜歯後の観察週を設定した反復測定分散分析を、分子生物学的データは、領域ごとに群間および左右差を主変動因子とした二元配置分散分析を行った。多重比較にはFisher's PLSDを用い、有意水準は危険率5%とした。

研究結果

1. 空間学習記憶能の結果

体重変化は、主変動因子の群間に有意性を認めず抜歯後の観察週およびその交互作用効果に有意性 ($p < 0.0001$, $p < 0.001$) を認め (Table 1), 観察期間中体重は暫時増加したが、喪失歯数の差は影響しなかった (Fig. 3)。

迷路実験における評価項目の正選択数は、主変動因子および交互作用効果のすべてに有意性 ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.01$) を認め (Table 2), 群間ではA, B, C, D群の順に減少し (Fig. 4), 抜歯後1週と4週には差がなかったが、7週で有意に増加した (Fig. 5)。すなわ

Table 1. Body weight in rats (by ANOVA)

Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	713.22	237.74	1.20	0.33
Error 1	20	3949.67	197.48		
Week	4	86340.97	21585.24	479.94	< 0.0001
Week × Group	12	2024.84	168.74	3.75	0.0002
Error 2	80	3597.99	44.98		

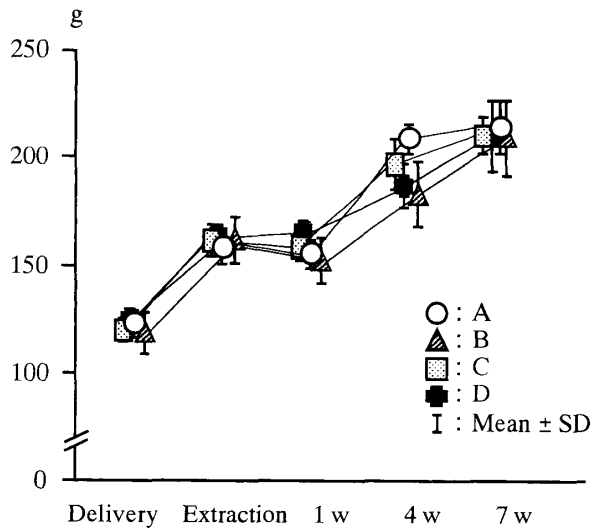


Fig. 3. Rat body weight
Rat body weight was putting on until experimental period. No difference was found between group A, B, C and D.

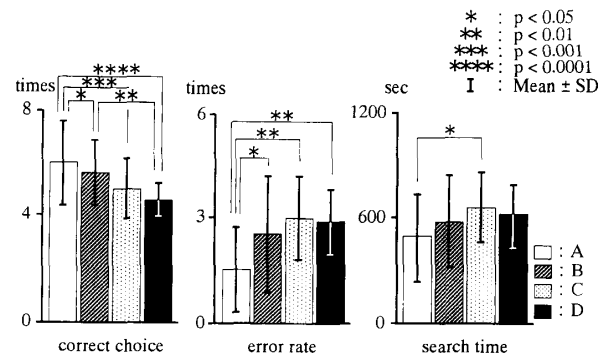


Fig. 4. The correlation between mean number of correct choices, errors rates and search times after 8-arm radial maze task(per Group)

Correct choice was an ability of choosing a non-invade arms, error rate was an evaluation of searching ability and search time was executing time per 1 time of radial maze task.

Table 2. Results of 8-arm radial maze task (by ANOVA)

Correct choice					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	30.60	10.20	12.65	< 0.0001
Error 1	20	16.12	0.81		
Week	2	20.54	10.27	16.60	< 0.0001
Week × Group	6	15.14	2.52	4.08	< 0.01
Error 2	40	24.75	0.62		
Error rate					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	24.94	10.20	6.04	< 0.01
Error 1	20	27.52	0.81		
Week	2	19.03	10.27	8.17	< 0.01
Week × Group	6	19.44	2.52	2.78	< 0.05
Error 2	40	46.59	0.62		
Search time					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	219459.68	73153.23	1.85	0.17
Error 1	20	791385.47	39569.27		
Week	2	701273.79	350636.90	12.11	< 0.0001
Week × Group	6	740480.21	12413.37	4.26	< 0.01
Error 2	40	1158170.13	28954.25		

ち、群間の差は1, 4週では少ないが、7週になると顕著となり、喪失歯数の増加に比例して減少し、1, 4, 7週とA, B群は増加したのに対し、C, D群では変化しなかった (Fig. 6)。

エラー数も、主変動因子および交互作用効果のすべてに有意性 ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$) を認め (Table 2), 群間ではA, B, C, D群の順に増加傾向を示し (Fig. 4), 抜歯後1週と4週には差がなかったが、7週で有意に減少した (Fig. 5)。すなわち、群間の差は1, 4週では鮮明ではなかったが、7週では喪失歯数の増加に比例して増加した (Fig. 6)。

試行時間は群間に有意性を認めず、抜歯後の観察週および交互作用効果に有意性 ($p < 0.0001$, $p < 0.01$) を認め (Table 2), 1週に比べて4, 7週で短縮した (Fig. 5)。すなわち、群間の差は1, 4週では不明確であったが、7週になると顕著となり喪失歯数の増加に比例して延長傾向を示した (Fig. 6)。

2. 組織学的観察結果

海馬錐体神経細胞数は、CA 1, CA 3, CA 4のいずれの観察領域においても主変動因子および交互作用効果のすべてに有意性 ($p < 0.0001$, CA 3の群間のみ $p < 0.01$) を認めた (Table 3)。群間では、CA 1とCA 4ではA群に対してB, C, D群はそれぞれ有意に減少したが、

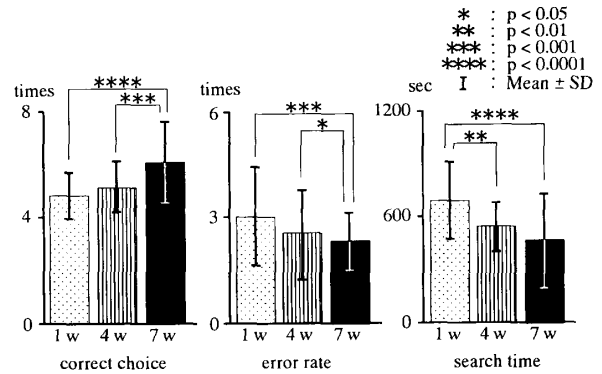


Fig. 5. The correlation between mean number of correct choices, error rates and search times after 8-arm radial maze task (per Week)

CA 3ではA, B群に差はなかった (Fig. 7)。抜歯後の観察週では、いずれの領域でもそれぞれ相互に有意差を認め、7週では著しく減少した (Fig. 8)。また、CA 1とCA 3では7週でA群に対してB, C, D群は有意に減少したが、CA 4では4週でも群間に差を認めた (Fig. 9)。

3. 分子生物学的観察結果

いずれの観察領域においても、主変動因子の群間のみ有意性 (いずれも $p < 0.0001$) を認め (Table 4), TrkB mRNA 陽性細胞数は、A群に対してB, C, D群で有意に減少した (Fig. 2, 10)。Fig. 11は海馬錐体神経細胞数, TrkB

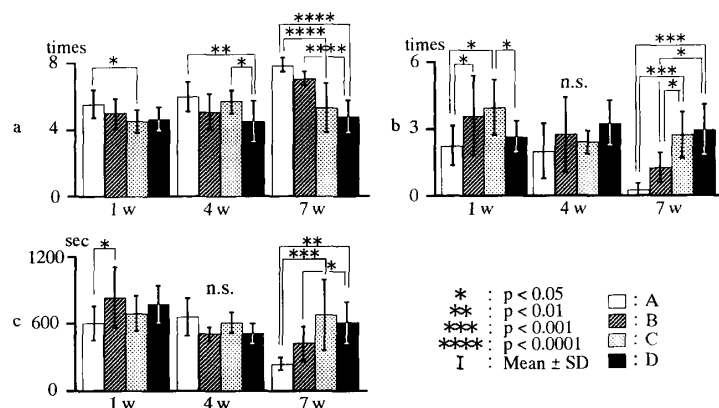


Fig. 6. The correlation between mean number of correct choices, error rates and search times after 8-arm radial maze task

a. correct choice b. error rate c. search time

At 7 weeks, Group B, C and D exhibited significant behavioral dysfunction, compared to group A; behavioral dysfunction was more remarkable tendency, the greater to number of lost molar teeth.

Table 3. Results of the change in number of hippocampal pyramidal cells (by ANOVA)

CA 1					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	403.66	134.55	33.66	<0.0001
Error 1	18	71.95	4.00		
Week	2	2449.80	1224.90	169.01	<0.0001
Week×Group	6	770.41	128.40	17.72	<0.0001
Error 2	36	260.92	7.25		
CA 3					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	127.95	42.65	6.62	0.003
Error 1	18	115.99	6.44		
Week	2	6608.09	3304.05	964.34	<0.0001
Week×Group	6	321.69	53.62	15.65	<0.0001
Error 2	36	123.34	3.43		
CA 4					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	507.06	169.02	45.92	<0.0001
Error 1	18	66.26	3.68		
Week	2	5238.50	2619.25	772.93	<0.0001
Week×Group	6	339.94	56.66	16.72	<0.0001
Error 2	36	121.99	3.39		

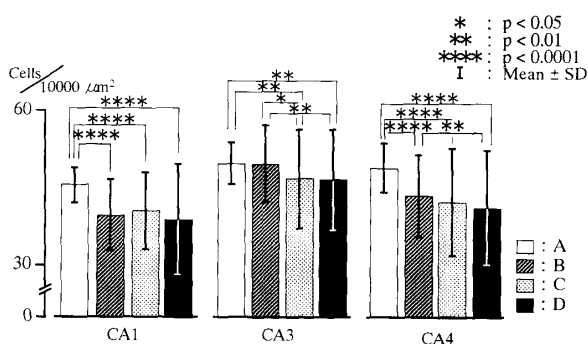


Fig. 7. Number of hippocampal pyramidal cells per unit area of regions CA1, CA3, CA 4 (per Group)

In CA1 and CA4, Group B, C and D showed a significant decrease in the number of hippocampal pyramidal cells than Group A. In CA3, no difference was found between group A and B.

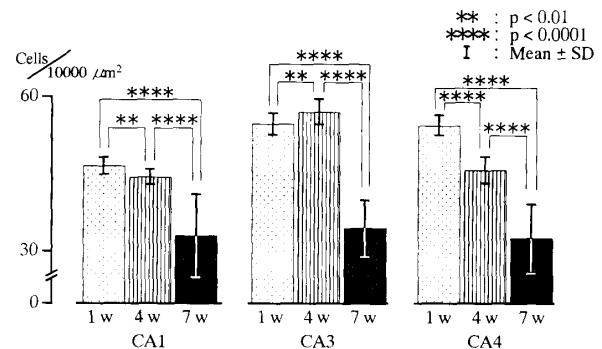


Fig. 8. Number of hippocampal pyramidal cells per unit area of regions CA1, CA3, CA 4 (per Week)

In CA1, CA3 and CA4, 7w showed a significant decrease in the number of hippocampal pyramidal cells the most.

mRNA 陽性および陰性細胞数の変化を示す。A群において海馬錐体神経細胞数と TrkB mRNA 陽性細胞数を比較すると、CA1で両細胞数はほぼ同数であり、CA1細胞はほとんど TrkB mRNA 陽性細胞であったと言える。しかし、CA3, CA4では TrkB mRNA 陽性細胞

数は海馬錐体神経細胞数より有意に少なく、TrkB mRNA 陰性細胞がかなりの割合で存在した。そこで、B, C および D 群で抜歯後7週目でこれらの細胞がどのように変化するか調べたところ、A群に比べて TrkB mRNA 陽性細胞数と陰性細胞数は同じ割合で減少した (Fig.

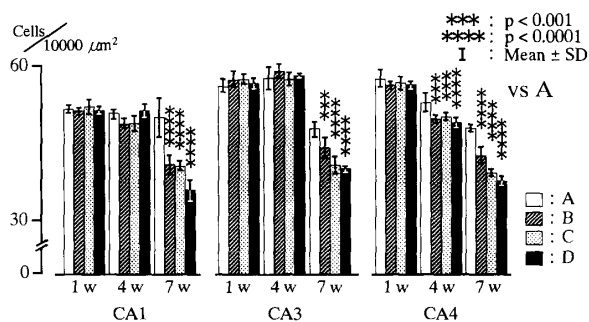


Fig. 9. Number of hippocampal pyramidal cells per unit area of regions CA 1, CA 3, CA 4

In CA1, CA 3 and CA4, Group B, C and D showed a significant decrease in the number of hippocampal pyramidal cells than Group A in 7 w. In CA4, Group B, C and D also showed a significant decrease in the number of hippocampal pyramidal cells than Group A in 4 w

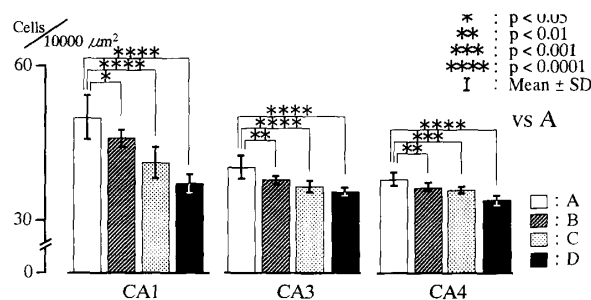


Fig. 10. Number of the TrkB positive cells per unit area of regions CA1, CA3, CA 4

In CA1, CA 3 and CA4, Group B, C and D showed a significant decrease in the number of TrkB mRNA positive cells than Group A.

Table 4. Two-way analysis of variance table for the number of TrkB positive cells after 7 weeks following extraction

CA 1					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	2540.75	846.92	22.75	<0.0001
Side	1	24.08	24.08	0.97	0.34
Side×Group	3	93.42	31.14	1.25	0.32
Error	20	496.50	24.83		
CA 3					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	326.23	108.74	15.18	<0.0001
Side	1	0.02	0.02	0.004	0.95
Side×Group	3	13.90	4.63	0.78	0.52
Error	20	118.58	5.93		
CA 4					
Source	df	Sum of square	Mean square	F-value	P-value
Group	3	191040	63.80	22.62	<0.0001
Side	1	9.19	9.19	3.82	0.65
Side×Group	3	1.23	0.41	0.17	0.92
Error	20	48.08	2.40		

11)。従って、抜歯は TrkB mRNA 陽性細胞も陰性細胞にも影響することが分かった。しかし、陽性細胞数の割合は陰性細胞より大きく、抜歯は TrkB mRNA 陽性細胞により大きな影響を与えると言うことが出来る。

考 察

1. 研究方法について

1) 迷路装置, 実験期間と抜歯

本研究では 8 方向放射状迷路を用いた。本装置は、海馬系の損傷に鋭敏で、かつ再現性が高いなどが評価され、教室の田中ら¹⁴⁾も空間学習記憶能の評価に適していたと報告し、これまで

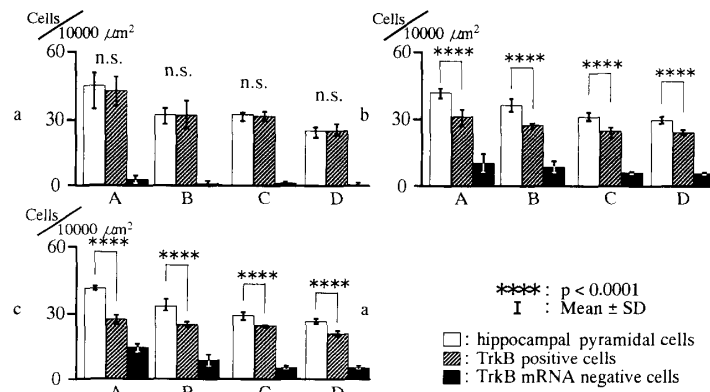


Fig. 11. The correlation between mean number of hippocampal pyramidal cells, TrkB positive cells and TrkB mRNA negative cells per CA1, CA 3 and CA 4
a. CA 1 b. CA 3 c. CA 4

In CA1, the number of hippocampal pyramidal cells and TrkB mRNA positive cells were the almost same. In CA 3 and CA4, the number of TrkB mRNA positive cells showed a significant decrease than hippocampal pyramidal cells.

系統的に実験^{1,2)}を行ってきた。一方、近年の分子生物学的研究では水迷路が多用されていることから、著者らは8方向放射状迷路と比較、検討した。その結果、水迷路は8方向放射状迷路よりもストレス要因が大きく、抜歯後7週で喪失歯数の多寡が行動学的成績に明らかな差として表れなかった。逆に、8方向放射状迷路は7週で群間の差を認め、喪失歯数の多寡と空間学習記憶能の関係を適切に評価することが分かった。したがって、本研究では本装置を使用した。

なお、迷路課題の遂行は参照記憶と作業記憶を必要とし¹⁵⁾、迷路内外の事物の記憶が重要であることから、迷路の設置位置や実験時間は可及的に一定とした。

実験期間および抜歯手技は、教室で確立した手法に従った。実験期日は、抜歯後7週^{1,2)}を基準に1週から等間隔で設定した。

喪失歯数の設定は、上顎臼歯群が最も成績が劣っていたとの千葉の報告¹⁾に従い、上顎に左右3本ずつ存在するラット臼歯を前方より順に左右1本ずつ抜去した。

2) 行動学的観察

空間学習記憶能の評価項目は、未侵入のアームを選択する能力を評価する正選択数、探索行動を評価するエラー数、運動能力も含めた課題遂行に要した試行時間とし、すべてが獲得試行

において性質の異なった項目であると理解した。

3) 組織学的ならびに分子生物学的観察

空間学習記憶能低下の発症メカニズムに関連して解析するために、海馬錐体神経細胞数の計測のほか、*In situ* hybridization法を用い、海馬におけるTrkB mRNA発現を観察した。

BDNFは神経栄養因子の一つで¹⁶⁾、神経細胞の生存・分化に関与し⁵⁾、神経伝達物質合成の調節やシナプス機能の制御に関与するとされる。本研究で検討したTrkBはBDNFの特異的高親和性受容体で、神経伝達の増強作用を有するとされている⁶⁾。

一般的に、BDNFはアルツハイマー病患者で著明に減少すること¹⁷⁾、海馬における長期増強(LTP)誘導後に増加すること¹⁸⁾、BDNFとTrkBは加齢による学習記憶障害に伴い減少すること¹⁹⁾などが知られ、行動実験でも、迷路訓練後にラット海馬体でBDNFが著明に増加していたとの報告^{7,8)}がある。しかし、BDNFの発現上昇だけでなくTrkB-BDNF結合の促進が起こることがシナプス伝達能の亢進には必要である²⁰⁾ことから、海馬においてTrkB mRNA量を観察することは、BDNFの伝達機構の解明に有用で海馬錐体神経細胞数の減少を説明する一助となると考えた。

5) 脳内観察部位

観察部位は教室の方法に従って海馬 CA 1, CA 3, CA 4 領域とした。海馬は、短期記憶を長期記憶へ定着させる²¹⁾、海馬交連の切断により迷路課題の成績が低下した⁹⁾との報告から、学習・記憶の神経機構解明の手がかりとなる部位とされている。

CA 4 は、大脳皮質感覚連合野や扁桃体からの情報が入力される最初の感覚入力領域²²⁾、CA 3 は加齢変化に鋭敏な領域²³⁾、CA 1 は脳虚血に伴う遅発性神経細胞死が生じる領域^{24, 25)}でもあるとされる。各領域は細胞層の構造が均一であることから、可能な限り細胞層以外の部分を除き、再現性を考慮してランドマークを設定した。

2. 実験結果について

搬入から屠殺までの全期間を通して群間の体重変動に有意差を認めず^{1, 26, 27)}、体重の増加からみて摂食量や栄養状態に影響はなかった。

行動学的観察において、喪失歯数が多くなるのに伴って、正選択数は減少、エラー数は増加、試行時間は延長し、この傾向は7週で顕著となり、千葉¹⁾の報告と一致した。つまり、抜歯の影響は抜歯後7週で空間学習記憶能に反映されてくる可能性が強くなった。

海馬錐体神経細胞数は、CA 1, CA 4 では A 群に対して B, C, D 群それぞれ有意に減少したが、CA 3 では A, B 群に差はなかった。また、CA 1 と CA 4 では1週よりも4, 7週と経時的に有意に減少したが、ここでも CA 3 は他とモードが異なり4週でわずかに増加を示したが、7週ではいずれの領域とも著明に減少していた。CA 3 は加齢による行動認知能力の低下と細胞変性が一致する部位²³⁾とされている。抜歯後4週の12週齢は未だ若齢であり細胞数の増加をただちに考察することは困難であるが、未だ脳細胞に負の変性は及んでないものと解釈した。千葉¹⁾は臼歯抜歯で、Onozuka²⁸⁾は歯冠切除で海馬錐体神経細胞数の減少を報告している。抜歯後の観察期間及び観察時期など異なる

点が多いものの、咬合の喪失が長期に及ぶと海馬錐体神経細胞数は減少することが示唆され、喪失歯数の増加に比例することが考えられた。

群間と抜歯後の観察週の交互作用効果からいずれの観察領域においても1週では群間に差はなく4週では CA 4 でのみ群間に差を認め、7週では CA 1, CA 3, CA 4 とも A 群に対して、B, C, D 群は有意に減少した。つまり、臼歯喪失期間が短い場合は、海馬錐体神経細胞数に影響を及ぼさないとする報告²⁹⁾と一致する結果となったが、CA 4 で観察された早期の細胞減少は、大脳皮質感覚連合野や扁桃体からの情報が入力する最初の感覚入力領域²²⁾という部位的特性の表出と考えた。

TrkB mRNA 陽性細胞数はすべての観察領域で A 群に比較して B, C, D 群は有意に少なかった。A 群において CA 1 で海馬錐体神経細胞数と TrkB mRNA 陽性細胞数はほぼ同数であったこと、CA 3, CA 4 では、TrkB mRNA 陰性細胞が出現するもののその出現の様相から海馬錐体神経細胞数はそのほとんどが学習記憶に関する TrkB mRNA 陽性細胞が占めることが明らかになった。

また、海馬錐体神経細胞数の減少とともに TrkB mRNA 陽性細胞数の減少が観察されたことは、臼歯喪失に伴う学習記憶障害が海馬錐体神経細胞の減少により惹起されるとした千葉の考察¹⁾を一步踏み込み、海馬錐体神経細胞の生存維持に必要な BDNF を受容できないこと、すなわち TrkB mRNA の減少がシナプス伝達を低下させ、海馬錐体神経細胞の減少を引き起こし、結果として学習記憶能力が低下するというメカニズムが推察された。

結 論

臼歯喪失歯数の違いが高次脳機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、非抜歯群 (A 群)、上顎両側第一臼歯抜歯群 (B 群)、同第一、二臼歯抜歯群 (C 群)、同第一、二、三臼歯抜歯群 (D 群) について、空間学習記憶能、海馬錐体神経細胞数、TrkB mRNA 陽性細胞数の観察・計

測から検討し、以下の結論を得た。

1. 抜歯後の全実験期間を通して群間に体重差を認めなかった。
2. 抜歯後1, 4週では正選択数, エラー数, 試行時間ともに各群の差は明らかではなかったが, 7週で各群の差が明確となり喪失歯数の増加に伴い空間学習記憶能は低下した。
3. 海馬錐体神経細胞数はA群に比較してB, C, D群で有意に少なく, 特にCA4においては早期に各群の差が生じた。
4. TrkB mRNA 陽性細胞数はA群に比較してB, C, D群で有意に少なかった。海馬錐体神経細胞数のほとんどはTrkB mRNA 陽性細胞であった。

以上より, ラット臼歯喪失により海馬錐体神経細胞数, TrkB mRNA 陽性細胞数が減少したことから, TrkB は, BDNF を受容できず, 海馬錐体神経細胞数を減少させた結果, 空間学習記憶能に影響を及ぼす可能性が推察された。また, 臼歯喪失歯数の違いによっても影響されることが示唆された。

稿を終えるにあたり, 温かな御助言とご指導を頂きました恩師田中久敏名誉教授に深甚たる謝意を表すとともに, 多くの御支援を頂きました岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座教室員各位ならびに大学院生各位に心より感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第111回日本補綴歯科学会学術大会(平成16年5月21日, 東京)において, その概要を発表した。

文 献

- 1) 千葉 晃: 歯の喪失が高次脳機能に及ぼす影響に関する行動学的, 組織学的研究, 補綴誌, 43: 299-311, 1999.
- 2) 佐々木快輔: 臼歯の咬合支持の喪失がラットの脳機能に及ぼす影響-臼歯抜歯と臼歯歯冠切除の違い-, 補綴誌, 46: 185-194, 2002.
- 3) 船越正也: 咀嚼情報の生理学的意義, 阪大歯誌, 35: 1-5, 1990.
- 4) 平良梨津子, 飯沼光生, 鈴木康秀, 田村康夫: 粉末食飼育が老化促進マウス(SAMP1)の成長・老化に及ぼす影響, 小児歯誌, 37: 798-809, 1999.
- 5) Leibrock,J., Lottspeich,F., Hohn,A., Hofer,M., Hengerer, B., Masiakowski, R., Thoenen, H., Barde,Y.A.: Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149-152, 1989.
- 6) Minichiello,L., Korte,M., Wolfer,D., Kuhn,R., Unsicker,K., Cestari,V., Arnaud,C.R., Lipp,H.P., Bonhoeffer,T., Klein,R.: Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24: 401-414, 1999.
- 7) Kesslak,J.P., So,V., Choi,J., Cotman,C.W., Pinilla,F.G.: Learning up-regulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav.Neurosci.* 112: 1012-1019, 1998.
- 8) Mizuno,M., Yamada,K., Olariu,A., Nawa,H., Nabeshima,T.: Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J.Neurosci.* 20: 7116-7121, 2000.
- 9) Olton,D.S., Samuelson,R.J.: Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J.Exp Psychol. Anim.Behav.Processes.* 2: 97-116, 1976.
- 10) Paxinos,G.F., Watson,C.: The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. 1-78, San Diego: Academic Press, 1998.
- 11) Asanuma,A., Yamauchi,Y., Koga,T., Katayama,I.: Suppression of age-related changes in mouse hippocampal CA3 nerve cells by a free radical scavenger. *Mech.Ageing Dev.* 83: 55-64, 1995.
- 12) Dragunow,M., Hughes,P., Mason-Parker,S.E., Lawlor,P., Abraham,W.C.: TrkB expression in dentate granule cells is associated with a late phase of long-term potentiation. *Mol.Brain Res.* 49: 274-280, 1996.
- 13) 虫本栄子, 小林琢也, 千葉晃, 田中久敏, 宇月美和, 澤井高志: ラットにおける実験的咬合干渉が脳内 c-fos mRNA 発現に及ぼす影響-ストレスとの関連-, 補綴誌, 48: 173-182, 2004.
- 14) 田中久敏, 虫本栄子, 千葉晃, 岩淵安信, 猪苗代盛昭: 空間記憶学習能の評価に用いる各種迷路装置の検討, 補綴誌, 43: 363-372, 1999.
- 15) 平賀義裕, 岩崎庸男: ラットの記憶研究における最近の動向-放射状迷路課題を中心として-, 薬物・精神・行動, 3: 99-108, 1983.
- 16) Connor,B., Dragunow,M.: The role of neuronal growth factors in neuro-degenerative disorders of the human brain. *Brain Res.Rev.* 27: 1-39, 1998.
- 17) Connor,B., Young,D., Yan,Q., Fau-II,R.L.M., Synek,B., Dragunow,M.: Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Mol.Brain Res.* 49: 71-81, 1997.
- 18) Castren,E., Pitkanen,M., Sirvio,J., Parsadanian, A., Lindholm,D., Thoenen,H., Riekkinen,P.J.:

- The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. *Neuro.Report* 4 : 895-898, 1993.
- 19) Croll,S.D., Ip,N.Y., Lindsay,R.M., Wiegand,S.J. : Expression of BDNF and TrkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res.* 812 : 200-208, 1998.
- 20) Beck,K.D., Lamballe,F., Klein,R., Barbacid,M., Schauwecker, P. E., Mc-Neill, T. H., Finch, C. E., Hefti,F., Day,J.R. : Induction of noncatalytic TrkB neurotrophin receptors during axonal sprouting in adult hippocampus. *J.Neurosci.* 13 : 4001-4014, 1993.
- 21) Milner, B., Corkin,S. : Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome :14-year follow-up study of H.M. *Neuropsychologia* 6 : 215-234, 1968.
- 22) Morimoto M, Morita N, Ozawa H. et al. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain : an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26 : 235-269, 1996.
- 23) Kadar,T., Silbermann,M., Brandeis,R., Levy,A. : Age-related structural changes in the rat hippocampus : correlation with working memory deficiency. *Brain Res.* 512 : 113-120, 1990.
- 24) Morgan,S.Z., Squire,L.R., Amara-I,D.G. : Human amnesia and medial temporal resion : enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA 1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* 6 : 2950-2967, 1986.
- 25) Kirino,T. : Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239 : 57-69, 1982.
- 26) 檜山達郎 : 抜歯による実験的咬合変化が顎関節に及ぼす影響に関する病理組織学的研究. *口病誌*, 35 : 598-612, 1968.
- 27) 梅田健吾, 沢木佳弘, 伊藤正夫, 増田晃司, 竹原公善, 上田実, 金田俊郎 : 歯牙喪失が成熟ラットの学習能力に及ぼす影響. 第一報 : 臼歯喪失が迷路学習に及ぼす影響. *口科誌*, 40 : 377-383, 1991.
- 28) Onozuka,M., Watanebe,K., Mirb-od,S.M., Ozono,S., Nishiyama,K., Karasawa,N., Nagatsu,I. : Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP 8 mice. *Brain Res.* 826 : 148-153, 1999.
- 29) 加藤大輔, 穂積英治, 村上弘, 横山隆, 伊藤裕, 前田初彦, 亀山洋一郎 : 加齢及び臼歯喪失が老化促進モデルマウスの海馬錐体細胞に及ぼす影響 - 形態学的検討 -. *老年歯学*, 16 : 327-335, 2002.