

実験的な歯間離開が マウスの記憶能力と脳内神経伝達物質に及ぼす影響

神 智昭

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任：三浦 廣行 教授)

(受付：2003年2月18日)

(受理：2003年3月11日)

Abstract : In the present study, the effects of experimental separation of the lower incisor on memory function and the levels of brain neurotransmitters and related compounds were examined in mice at day 2, 7 and 14 after separation (0.5 or 1.0 mm) treatment. The effects of the treatment on memory functions were tested by the multiple maze, T-maze and radial maze methods. The effects of the treatment on levels of neurotransmitter-related compounds in the hippocampus, cerebral cortex, striatum and hypothalamus were examined by high-performance liquid chromatography with an electrochemical detection system after the end of the each memory test. In mice, the experimental incisor separation induced dysfunction of all memory tested and increased the levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), the main metabolite of the neurotransmitter noradrenaline, in all brain areas only on day 2 after treatment. These results suggest that incisor separation may inhibit the memory function of mice via activation of the central noradrenergic system.

Key words : mouse, tooth separation, memory function, brain neurotransmitters

緒 言

動物に対して歯間離開や歯の移動などの処置を行うと、局所のおよび全身的な生体反応が発現する。例えば、局所的な反応としては、歯根吸収¹⁾や歯根膜内 cyclic AMP の増加²⁾、歯髄内神経線維の変性³⁾、顎下腺の重量やシスタチン S mRNA 発現量の増加⁴⁾などの変化が報告されている。また全身的な反応としては、副腎および血中アスコルビン酸量の減少⁵⁾、脳下垂体よりの ACTH 分泌の促進⁶⁾、副腎コルチコステロンの増加⁷⁾などの変化が報告されている。この

ような全身的な生体反応は、Selye⁸⁾ が示した全身適応症候群とみなされるもので、局所的な刺激がストレッサーとして生体機能全般に影響を及ぼす可能性を示唆するものである⁹⁻¹¹⁾。

最近、中枢神経系活性に対する各種ストレスの影響を分析した研究が多数行われてきている^{12,13)}。しかしながら、実験的な歯の移動処置を中枢神経系に対するストレッサーとして、両者の関係を研究した報告は数少ない。例えば、中野¹⁴⁾は上顎切歯の歯間離開処置を行ったマウスにおいて、自発運動量の減少ならびに脳内モノアミン神経系の活性上昇を認めており、また中

The effects of experimental tooth separation on memory function and brain neurotransmitters in mice

Tomoaki JIN

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University,
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 28 : 38-53, 2003

野¹⁴⁾と類似した歯間離開処置を行ったマウスを用いた斎藤¹⁵⁾は、脳内アミノ酸系神経伝達物質の変動を報告している。ラットを用いた実験としては、高¹⁶⁾は歯の移動処置と心理的ストレスとの組み合わせにより、情動機能と関与する脳部位でのノルアドレナリン量の上昇を観察し、最近では、藤江⁴⁾が上顎切歯の歯間離開処置を行ったラットにおいて、脳内ノルアドレナリン量とドパミン量の有意な増加を報告している。これらの知見は、中枢神経系に対して、実験的な歯の移動処置もストレス^{5~7, 14, 15)}として影響しうることを示唆している。しかしながら、このような神経化学的な変化が、中枢神経系のどのような機能への影響を反映するものなのかについては、中野¹⁴⁾によって報告された情動機能と関連する探索行動への影響以外、まだ知られていない。

ヒトや動物に対する各種のストレス負荷は、学習・記憶機能に影響を及ぼすことが報告されている^{13, 17~19)}。したがって、実験的な歯の移動処置も中枢神経系に対するストレス¹⁾の一つとして作用した場合には、学習・記憶機能に関してなんらかの影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究において、実験的な歯の移動処置の実験モデル動物として、下顎切歯の歯間離開処置を行ったマウスの記憶能力の検討を行った。また記憶実験の終了後に、中枢モノアミン神経系、アセチルコリン神経、アミノ酸系神経に関係する脳内神経伝達物質とそれらの関連代謝物質について検討を行った。

材料ならびに方法

1. 実験動物

5週齢のddY系雄性マウス（日本エスエルシー、静岡）を用いた。マウスを飼育開始から実験終了まで室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ に維持された12時間照明（サイクル：明期7:00-19:00、暗期19:00-7:00）の環境で飼育し、実験動物用固形飼料（MF、オリエンタル酵母工業、東京）を粉砕して作製した粉末飼料と水道水を自由に摂取させて飼育した。なお、本研究は岩手

医科大学動物実験センターの許可を受け、岩手医科大学動物実験指針に基づいて行った。

2. 実験方法

1) 下顎切歯に対する歯間離開方法

歯間離開処置は、中野¹⁴⁾の手技を改変して以下のように行った。最初にマウスをペントバルビタール（50mg/kg）の腹腔内投与で全身麻酔後、次のような手順で歯間離開を行った。まず下顎切歯の歯間乳頭頂の高さで歯間距離が1.0mmとなるように小ゴム片を挿入した。30分後に小ゴム片を除去し、切歯の近心面を65%正リン酸で30秒間エッチングした後、水洗、乾燥し、アクリル系レジンを接着剤（Super-Bond ORTHOMITE[®], サンメディカル, 滋賀）（以下レジンと略する）で切歯を固定した。歯間距離が歯間乳頭頂の高さで1.0mmであることを矯正ノギス（YS-33, 山浦製作所, 東京）で計測、確認した。レジンの高さは切歯の切縁から歯間乳頭頂までの高さとし、厚さは切歯の厚さとした。対照群には全身麻酔のみのシャムオペレーションを行った。なお、0.5mmの歯間離開に対しても同様な処置を行った。離開維持の状態（レジ装着状態）を毎日確認し、レジンの脱落があったマウスは実験例から除外した。Fig. 1にレジ装着状態の模式図を示した。

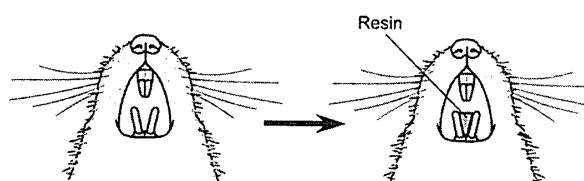


Fig. 1 The schema for the tooth separation method.

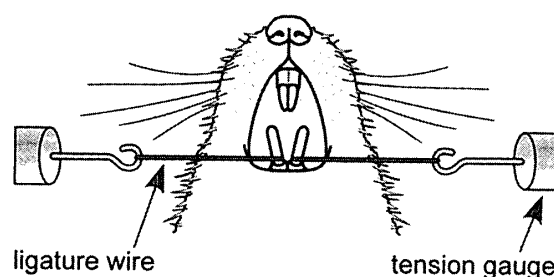
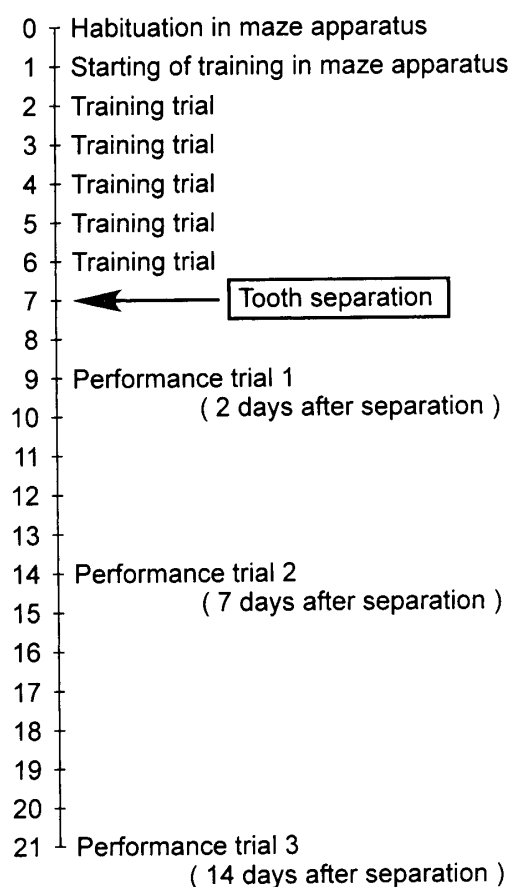


Fig. 2 The schema for the measurement of the load quantity.

Multiple maze & T-maze apparatuses



Radial maze apparatus

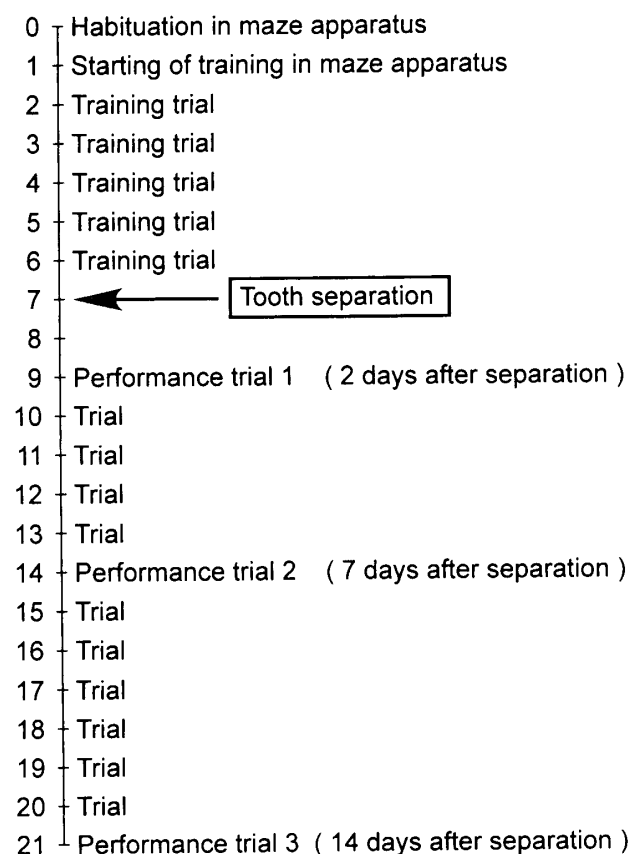


Fig. 3 Experimental schedules of training and performance trial on the three maze methods in mice. Left panel is for the multiple maze and the T-maze methods and right panel is for the radial maze method.

2) 歯間離開に要する荷重の測定

離開処置後2日目, 7日目, 14日目のマウスをペントバルビタールで全身麻酔した後, 歯間部のレジン除去した。歯間乳頭頂の高さで正中線と垂直方向に, かつ固定板と平行に結紮線を装着し, 下顎切歯間をテンションゲージ(YS-31D, 山浦製作所, 東京)で左右に牽引した。1.0mmおよび0.5mm歯間離開群とも, マウス1匹につき3回の測定を行い, その平均値を歯間離開に要する荷重とした。Fig. 2に測定方法の模式図を示した。

3) 実験期間中の体重変化

マウスの体重測定は, 実験開始から終了まで毎日午前中に行った。歯間離開処置群のマウスの体重は, 処置後1日目において対照群よりも有意に減少した。しかし, 処置後2日目では両群間の体重増加曲線に有意な差は認められな

かった。迷路実験の測定は離開処置後2日目から開始した。

4) 自発運動量に対する影響の検討

実験はマウス用の回転式運動量測定装置(KN-78-M, 夏目製作所, 東京)を用いて行った。マウス1匹ずつの回転数を測定し, 全体を2群に分けた場合, 2群の平均回転数が類似するように群分けをした。歯間離開処置はこの群分けの翌日に行った。実験は処置後2日目, 7日目, 14日目に再び回転数を測定し, 対照群と離開群とで比較した。

5) 記憶能力に対する影響の検討

(1) 迷路実験における実験スケジュール

すべての実験において, 迷路の習得訓練を実施し, 一定の成績に達した日の翌日に歯間離開処置を行った。飼育開始から実験終了までの実験スケジュールをFig. 3に示した。なお, すべ

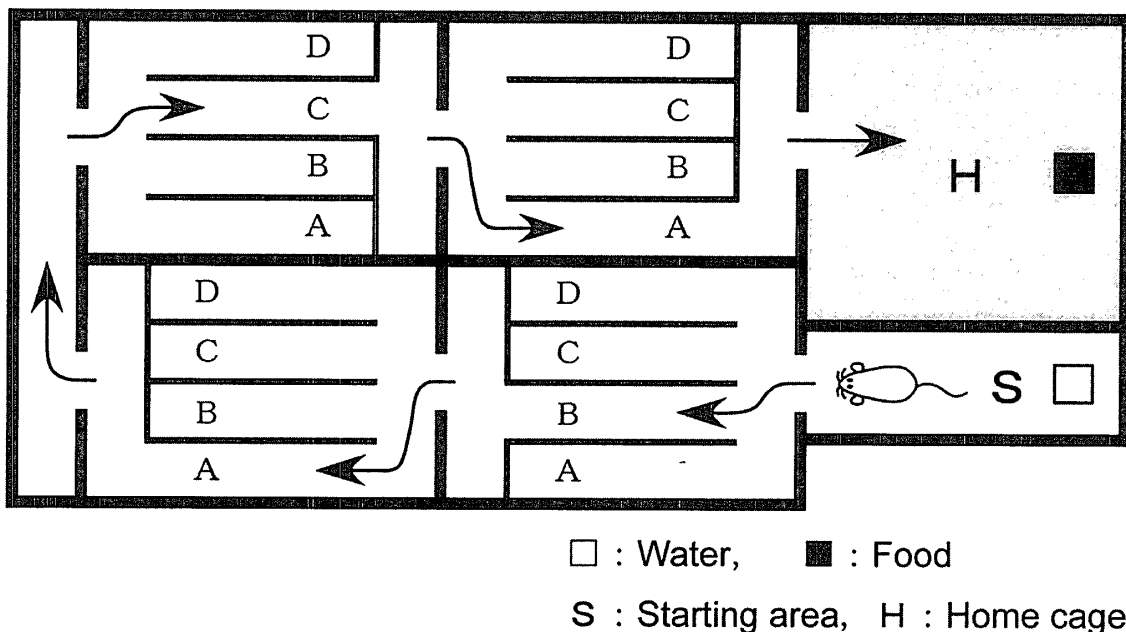


Fig. 4 Schematic diagram of a top view of the multiple maze apparatus.

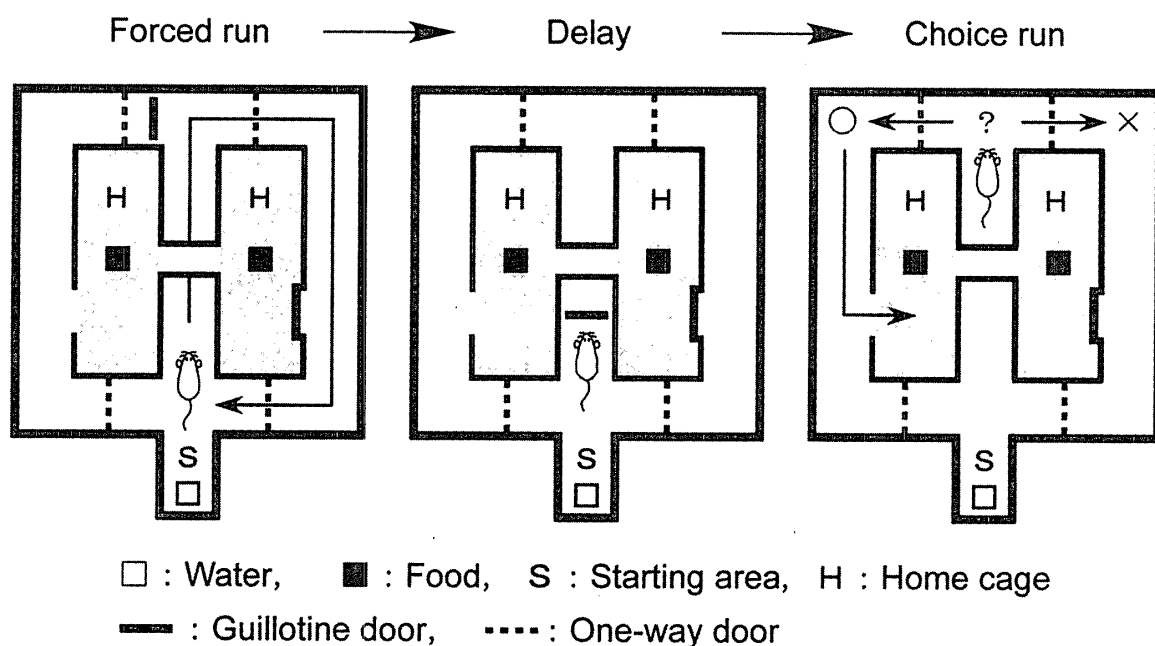


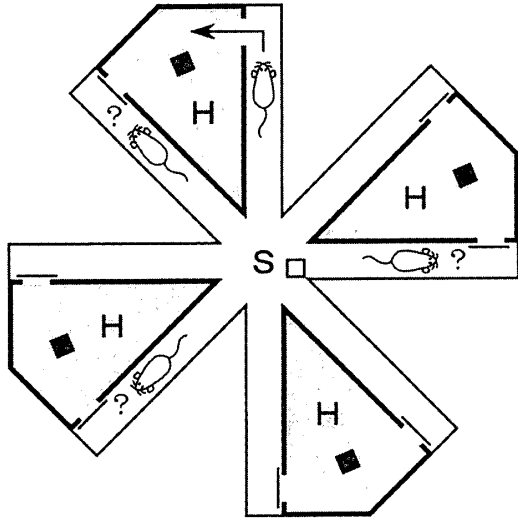
Fig. 5 Schematic diagram of a top view of the T-maze apparatus and the trial procedure.

での測定は午前中に行った。迷路装置は、試行ごとによく清掃し、迷路に付着した臭気がマウスの迷路の走行に影響することを避けた。

(2) 記憶想起能力の実験 (多重迷路)

本実験には多重迷路装置を用いる増田ら²⁰⁾の方法を一部改変した Murai ら²¹⁾の方法を用いた (Fig. 4)。この実験は過去 (数日から数週間前) に学習・固定した記憶内容を正確に思い出せるかを調べるものである。

実験では水飲み場 (スタート地点) に置かれたマウスが、餌を得るために迷路を通り、ホームケージに戻るまでのエラー (行き止まりの通路への進入) 数を測定した。このような測定を連日行い、習得訓練で全マウスのエラー数の平均値が1.0以下を示した時に、正解路を習得したと判断し、歯間離開処置を行った。処置後2日目, 7日目, 14日目に試行を行い、処置前に覚えた正解路を正しく想起できるかを、対照群と



□ : Water, ■ : Food, S : Starting area
H : Home cage, — : Guillotine door

Fig. 6 Schematic diagram of a top view of the radial maze apparatus.

離開群で比較した。

(3) 短期記憶能力の実験 (T型迷路)

本実験はT型迷路装置を用いる Masuda ら²²⁾の方法を一部改変して行った。この実験は数秒から数分前に記憶した作業内容を保持できているかを検討するもので、作業記憶能力実験とも呼ばれている。実験はFig. 5に示した強制走行(左の図)、遅延時間の挿入(中央の図)、選択走行(右の図)の順序で行った。習得訓練では、遅延時間5秒での測定をマウス1匹につき1日5回行い、正反応率の平均値が3日連続して80%以上を示した時に、習得訓練を終了し、歯間離開処置を行った。処置後2日目、7日目、14日目に試行を行い、短期記憶の保持能力を、対照群と離開群で比較した。この場合の遅延時間の設定はいずれも120秒とした。

(4) 空間認知記憶能力の実験 (放射状迷路)

本実験には8本のアーム(通路)をもつ放射状迷路装置を用いる Masuda ら²³⁾の方法を用いた(Fig. 6)。この実験は迷路内外の視覚の手がかりから、自己の位置を判断し、記憶する能力を調べるためのものである。

迷路内での行動に対する評価は、装置の中央の水飲み場(スタート地点)からスタートした

マウスが、未探索のアームに入った場合を正選択、既に探索を終えたアームに再び入った場合を誤選択(エラー)とした。記憶能力に対する評価は、最初のエラーが生じるまでの連続した正選択の数(正選択数)とした^{24,25)}。習得訓練は、全マウスの正選択数の平均値が2日連続して7.0以上を示した時に終了し、歯間離開処置を行った。処置後2日目より14日目まで連日試行を行い、処置前に覚えた作業内容を正しく実行できるかを、対照群と処置群で比較した。

6) 脳内神経伝達物質に対する影響の分析

(1) 屠殺と分割脳標本の作製

歯間離開処置を行ったマウスを、処置後2日目、7日目、14日目に屠殺した。なお、0.5mm離開群に関しては、処置後2日目のみ屠殺した。すべての屠殺は測定物質の死後変化を防ぐために、マイクロウェーブ照射により行った。屠殺後、全脳を摘出し、Glowinski and Iversen法²⁶⁾の変法により、海馬、大脳皮質、線条体、視床下部を分離した。分離された脳組織を、秤量後、サンプル作製時まで -80°C で凍結保存した。各脳組織を0.1mM EDTA および $100\mu\text{M}$ エチルホモコリン(EHC、アセチルコリン測定時の内部標準物質)を含む0.1M 過塩素酸溶液中で超音波破碎し、遠心分離(12,000g, 15分, 4°C)後、 $0.45\mu\text{m}$ フィルターで濾過した上清を -80°C で測定時まで凍結保存した。

(2) 脳内モノアミン神経伝達物質および関連代謝物質量の測定

ノルアドレナリンとその主要代謝物質3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG)、ドパミンとその主要代謝物質3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC) と homovanillic acid (HVA)、セロトニンとその主要代謝物質5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)量の測定は、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)を用いる Saito ら²⁷⁾の方法により行った。

(3) 脳内アセチルコリン神経伝達物質および関連物質(コリン)量の測定

アセチルコリンおよびコリン量の測定は、

HPLC-ECDと固定化酵素カラムを用いる Murai ら²⁸⁾の方法により行った。

(4) 脳内神経活性アミノ酸量の測定

アスパラギン酸 (Asp), グルタミン酸 (Glu), グルタミン (Gln), グリシン (Gly), タウリン (Tau), γ -アミノ酪酸 (GABA) 量の測定は, HPLC-ECDとo-フタルアルデヒド誘導体化反応を用いる Murai ら²⁹⁾の方法により行った。

7) 使用薬物

重酒石酸ノルアドレナリン, セロトニン塩酸塩, 塩化テトラメチルアンモニウム, 塩化コリン, β -メルカプトエタノール, o-フタルアルデヒド, 標準アミノ酸は和光純薬より, 塩酸ドパミンは関東化学より, HVA, MHPG ヘミピペラジン塩, 塩化アセチルコリンはSigma社より, DOPAC, 5-HIAAはAldrich社より入手した。EHCは, Potter ら³⁰⁾の方法により岩手医科大学歯学部歯科薬理学講座で合成した。

8) 統計学的処理

実験結果の判定には, 測定値の種類により学生t検定, マン-ホイットニーのU検定, カイ2乗検定を用い, 危険率0.05%をもって有意性ありと判定した。

結 果

1. 歯間離開の維持率

本実験で行ったマウス下顎切歯に対する歯間離開維持率は, 1.0mm離開の場合, 約85% (7日目), 約70% (14日目), 約50% (21日目)であった。

2. 荷重の経時的变化

下顎切歯間を, 1.0mmと0.5mm離開するために必要な初期荷重は, それぞれ約250gと約150gで, 1.0mm離開群と0.5mm離開群の荷重には有意な差が認められた。このような両群間の荷重の差は処置後2日目でも認められたが, 処置後7日目および14日目では認められなかった。1.0mm離開群の場合, 処置後2日目の値は処置後7日目の値より有意に高かったが, 処置後7日目の値と処置後14日目の値との間に有意な差は認め

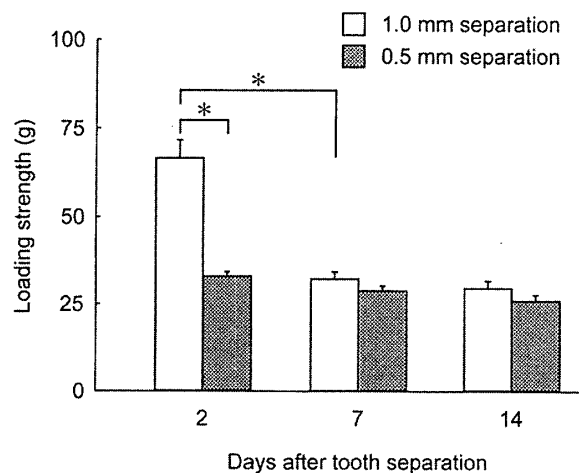


Fig. 7 The time-dependent change of the loading strength after treatment of tooth separation.

Values are the mean \pm SEM (n = 8).

* p < 0.05 by Student's t-test.

られなかった。0.5mm離開群の場合, 処置後2日目, 7日目, 14日目における荷重に有意な差は認められなかった。Fig. 7に荷重の経時的变化を示した。

3. 体重への影響

本実験で使用した迷路実験の方法は, いずれも習得訓練の前夜に絶食 (水道水は自由摂取が可能) が行われたため, マウスの体重は, 習得訓練の開始直後に一時的に減少した。またマウスの体重は, 歯間離開処置の直後に一時的に減少したが, その後は実験終了まで対照群との差は認められなかった (Fig. 8)。

4. 自発運動量に対する影響

1.0mm離開群の自発運動量は, 処置後2日目でのみ対照群と比較して有意な減少を示した。一方, 0.5mm処置群の自発運動量は, 処置後2日目で対照群との差は認められなかった (Fig. 9)。

5. 記憶能力に対する影響

1) 記憶想起能力

多重迷路におけるエラー数は, 1.0mm離開群の処置後2日目において有意な増加を示した。このような増加は処置後7日目および14日目の測定では認められず, また0.5mm離開群の処置後2日目においても認められなかった (Fig. 10)。

2) 短期記憶能力

T型迷路における遅延時間120秒での正反応

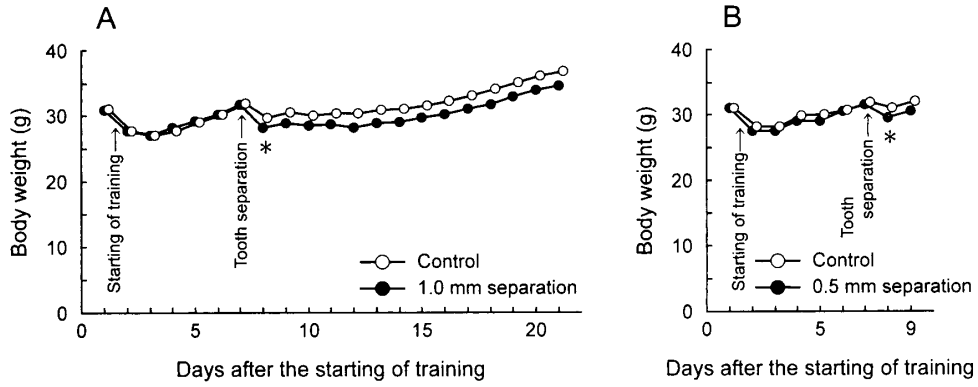


Fig. 8 The body weight change of mice during the experimental period.
 A : 1.0 mm separation, B : 0.5 mm separation.
 Values are the mean (n=16).
 * p<0.05 by Student's t-test.

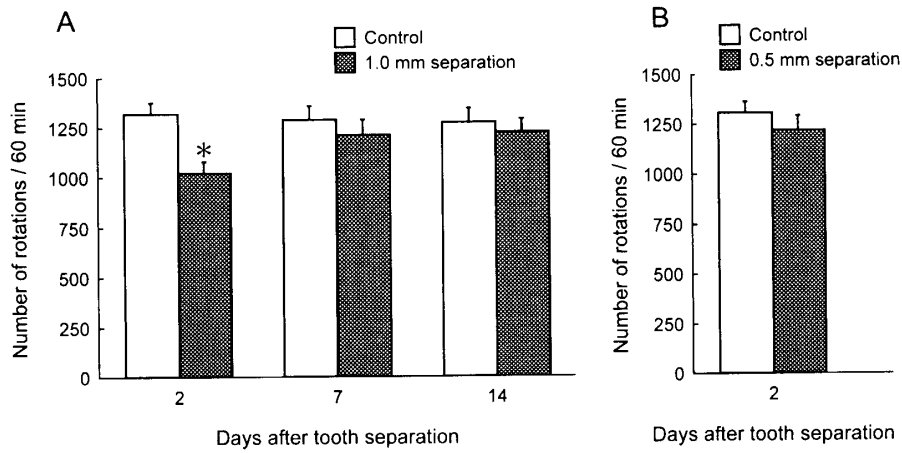


Fig. 9 The time-dependent change of the number of rotations measured by the wheel-running apparatus after treatment of tooth separation.
 A : 1.0 mm separation, B : 0.5 mm separation.
 Values are the mean \pm SEM (n=16).
 * p<0.05 by Student's t-test.

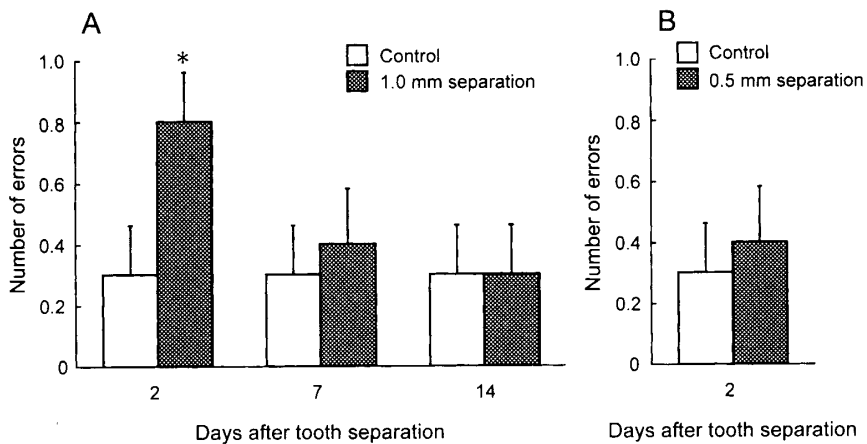


Fig. 10 The change of the number of errors on the multiple maze method after treatment of tooth separation.
 A : 1.0 mm separation, B : 0.5 mm separation.
 Values are the mean \pm SEM (n=16).
 * p<0.05 by Mann-Whitney's U-test.

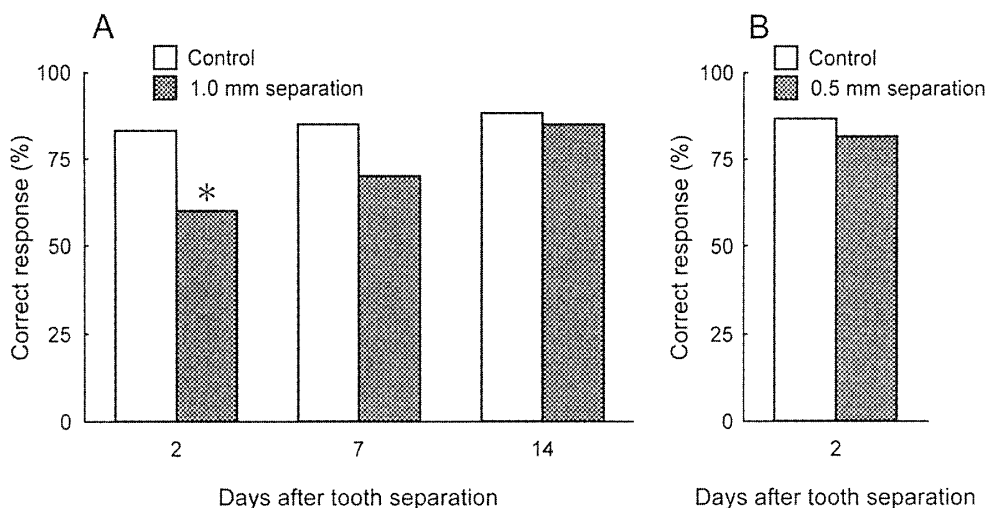


Fig. 11 The change of the correct response in alternation task at delays of 120 sec on the T-maze method after treatment of tooth separation.

A : 1.0 mm separation, B : 0.5 mm separation.

Values are the mean (n=16).

* p<0.05 by chi-square test.

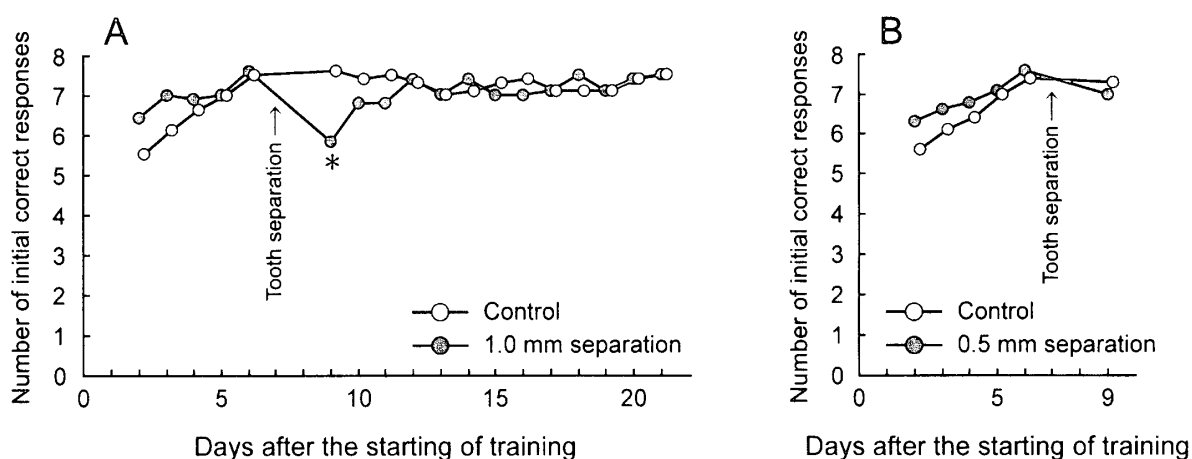


Fig. 12 The change of the number of initial correct responses on the radial maze method after treatment of tooth separation.

A : 1.0 mm separation, B : 0.5 mm separation.

Values are the mean (n=16).

* p<0.05 by Mann-Whitney's U-test.

率は、1.0mm離開群の処置後2日目において有意な低下を示した。このような低下は処置後7日目および14日目の測定では認められず、また0.5mm離開群の処置後2日目においても認められなかった (Fig. 11)。

3) 空間認知記憶能力

放射状迷路における空間認知試験において、1.0mm離開群の処置後2日目においてのみ正選択数の有意な減少を示した。このような減少は処置後3日目以降14日目までの測定では認められず、また0.5mm離開群の処置後2日目において

も認められなかった (Fig. 12)。

6. 脳内神経伝達物質に対する影響

1) 脳内モノアミン神経伝達物質および関連代謝物質量の測定

マウスの海馬、大脳皮質、線条体、視床下部におけるノルアドレナリン神経関連物質 (ノルアドレナリンと主要代謝物質の MHPG)、ドパミン神経関連物質 (ドパミンと主要代謝物質の DOPAC, HVA) およびセロトニン神経関連物質 (セロトニンと主要代謝物質の 5-HIAA) に関して、1.0mm離開群の処置後2日目における

Table 1 Effect of 1.0 mm of tooth separation on the levels of monoaminergic neurotransmitters and related compounds in the hippocampus of mice.

	Day 2 ^a		Day 7 ^a		Day 14 ^a	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
NA	2.81 ± 0.12	2.85 ± 0.07	2.65 ± 0.12	2.59 ± 0.12	2.81 ± 0.11	2.77 ± 0.20
MHPG	0.27 ± 0.01	0.32 ± 0.01*	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01
DA	0.63 ± 0.05	0.69 ± 0.04	0.59 ± 0.03	0.64 ± 0.08	0.69 ± 0.05	0.80 ± 0.12
DOPAC	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01
HVA	0.25 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.38 ± 0.02
5-HT	2.82 ± 0.11	2.91 ± 0.12	2.54 ± 0.07	2.68 ± 0.19	2.87 ± 0.10	2.80 ± 0.12
5-HIAA	1.38 ± 0.09	1.49 ± 0.06	1.29 ± 0.03	1.34 ± 0.11	1.30 ± 0.03	1.31 ± 0.05

Values represent the mean ± SEM (n = 7 - 9) and compound levels are expressed in nmol/g tissue weight.

^a Mice were killed by microwave irradiation at day 2, 7 and 14 after tooth separation.

* p < 0.05 by Student's t-test.

NA : noradrenaline, MHPG : 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, DA : dopamine, DOPAC : 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, HVA : homovanillic acid, 5-HT : serotonin, 5-HIAA : 5-hydroxyindoleacetic acid.

Table 2 Effect of 1.0 mm of tooth separation on the levels of monoaminergic neurotransmitters and related compounds in the cerebral cortex of mice.

	Day 2 ^a		Day 7 ^a		Day 14 ^a	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
NA	1.77 ± 0.06	1.87 ± 0.05	2.19 ± 0.13	2.11 ± 0.12	1.96 ± 0.09	1.80 ± 0.14
MHPG	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.01*	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01
DA	3.15 ± 0.23	3.01 ± 0.22	3.72 ± 0.22	3.59 ± 0.25	3.98 ± 0.19	4.43 ± 0.31
DOPAC	0.37 ± 0.02	0.40 ± 0.04	0.44 ± 0.06	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.01	0.46 ± 0.02
HVA	0.92 ± 0.07	0.89 ± 0.04	1.11 ± 0.06	0.99 ± 0.04	1.06 ± 0.17	1.02 ± 0.05
5-HT	2.57 ± 0.09	2.72 ± 0.14	2.92 ± 0.10	3.02 ± 0.16	2.73 ± 0.05	2.74 ± 0.11
5-HIAA	0.66 ± 0.05	0.75 ± 0.04	0.70 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.76 ± 0.04	0.77 ± 0.02

Values represent the mean ± SEM (n = 7 - 9) and compound levels are expressed in nmol/g tissue weight.

^a Mice were killed by microwave irradiation at day 2, 7 and 14 after tooth separation.

* p < 0.05 by Student's t-test.

The explanation of abbreviations is given in Table 1.

Table 3 Effect of 1.0 mm of tooth separation on the levels of monoaminergic neurotransmitters and related compounds in the striatum of mice.

	Day 2 ^a		Day 7 ^a		Day 14 ^a	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
NA	1.11 ± 0.05	1.29 ± 0.08	1.36 ± 0.05	1.37 ± 0.07	1.41 ± 0.08	1.37 ± 0.15
MHPG	0.20 ± 0.01	0.26 ± 0.02*	0.28 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02
DA	76.86 ± 2.19	85.16 ± 3.41	75.80 ± 3.85	78.83 ± 4.65	78.26 ± 4.23	73.87 ± 2.52
DOPAC	3.61 ± 0.18	4.26 ± 0.28	3.69 ± 0.20	3.64 ± 0.36	3.58 ± 0.18	3.69 ± 0.18
HVA	5.69 ± 0.19	6.09 ± 0.23	6.21 ± 0.42	6.41 ± 0.26	6.10 ± 0.31	5.93 ± 0.27
5-HT	3.54 ± 0.09	3.54 ± 0.16	3.77 ± 0.11	4.15 ± 0.24	4.64 ± 0.09	4.19 ± 0.24
5-HIAA	1.45 ± 0.06	1.62 ± 0.06	1.58 ± 0.07	1.75 ± 0.09	1.68 ± 0.04	1.69 ± 0.05

Values represent the mean ± SEM (n = 7 - 9) and compound levels are expressed in nmol/g tissue weight.

^a Mice were killed by microwave irradiation at day 2, 7 and 14 after tooth separation.

* p < 0.05 by Student's t-test.

The explanation of abbreviations is given in Table 1.

Table 4 Effect of 1.0 mm of tooth separation on the levels of monoaminergic neurotransmitters and related compounds in the hypothalamus of mice.

	Day 2 ^a		Day 7 ^a		Day 14 ^a	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
NA	9.41 ± 0.34	8.58 ± 0.30	9.62 ± 0.18	10.34 ± 0.44	10.15 ± 0.47	10.17 ± 0.53
MHPG	0.50 ± 0.02	0.61 ± 0.03*	0.59 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02
DA	4.61 ± 0.10	4.55 ± 0.25	4.92 ± 0.21	4.93 ± 0.20	4.95 ± 0.25	4.91 ± 0.22
DOPAC	1.12 ± 0.02	1.30 ± 0.11	1.30 ± 0.07	1.34 ± 0.08	1.34 ± 0.07	1.37 ± 0.09
HVA	1.58 ± 0.07	1.54 ± 0.07	1.73 ± 0.06	1.67 ± 0.07	1.73 ± 0.06	1.62 ± 0.09
5-HT	7.41 ± 0.22	7.12 ± 0.17	8.27 ± 0.27	8.49 ± 0.44	8.08 ± 0.24	7.83 ± 0.39
5-HIAA	2.33 ± 0.10	2.49 ± 0.05	2.42 ± 0.05	2.61 ± 0.14	2.33 ± 0.09	2.32 ± 0.12

Values represent the mean ± SEM (n = 7 - 9) and compound levels are expressed in nmol/g tissue weight.

^a Mice were killed by microwave irradiation at day 2, 7 and 14 after tooth separation.

* p < 0.05 by Student's t-test.

The explanation of abbreviations is given in Table 1.

Table 5 Effect of 1.0 mm of tooth separation on the levels of acetylcholine and choline in the discrete brain areas of mice.

	Day 2 ^a		Day 7 ^a		Day 14 ^a	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Hippocampus						
ACh	29.6 ± 0.7	30.0 ± 0.4	26.5 ± 1.0	26.6 ± 1.2	30.1 ± 1.7	30.6 ± 3.6
Ch	19.6 ± 0.9	17.9 ± 0.8	22.2 ± 1.4	20.7 ± 1.9	21.1 ± 1.7	21.1 ± 1.6
Cerebral cortex						
ACh	23.3 ± 0.9	22.2 ± 0.7	26.4 ± 2.3	27.8 ± 3.1	25.7 ± 1.2	26.0 ± 0.9
Ch	22.3 ± 1.2	20.2 ± 1.0	28.1 ± 1.3	25.3 ± 3.5	29.6 ± 1.6	29.4 ± 2.0
Striatum						
ACh	81.0 ± 1.7	82.8 ± 2.2	79.5 ± 3.4	81.2 ± 3.7	88.3 ± 2.4	91.2 ± 2.9
Ch	34.6 ± 1.3	33.8 ± 0.8	36.5 ± 1.4	34.2 ± 2.5	44.2 ± 1.1	44.8 ± 2.0
Hypothalamus						
ACh	37.5 ± 0.8	35.6 ± 1.8	35.2 ± 1.1	36.8 ± 1.5	40.5 ± 2.1	38.5 ± 1.9
Ch	32.3 ± 0.7	33.3 ± 1.4	32.5 ± 1.2	30.3 ± 2.2	39.1 ± 0.8	42.9 ± 2.1

Values represent the mean ± SEM (n = 7 - 9) and compound levels are expressed in nmol/g tissue weight.

^a Mice were killed by microwave irradiation at day 2, 7 and 14 after tooth separation.

ACh : acetylcholine, Ch : choline.

Table 6 Effect of 1.0 mm of tooth separation on the levels of neurotransmitter amino acids in the hippocampus of mice.

	Day 2 ^a		Day 7 ^a		Day 14 ^a	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Asp	2.13 ± 0.07	2.03 ± 0.06	2.04 ± 0.05	2.02 ± 0.04	2.06 ± 0.05	2.00 ± 0.05
Glu	9.44 ± 0.19	9.57 ± 0.12	9.51 ± 0.14	9.38 ± 0.13	9.97 ± 0.18	9.69 ± 0.18
Gln	4.13 ± 0.11	4.22 ± 0.09	4.37 ± 0.08	4.10 ± 0.17	4.19 ± 0.07	4.02 ± 0.09
Gly	0.70 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.69 ± 0.02	0.73 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.73 ± 0.01
Tau	10.62 ± 0.11	10.40 ± 0.11	10.59 ± 0.18	10.82 ± 0.21	11.29 ± 0.23	10.83 ± 0.33
GABA	1.90 ± 0.04	1.91 ± 0.04	1.94 ± 0.03	1.92 ± 0.05	1.98 ± 0.05	2.03 ± 0.05

Values represent the mean ± SEM (n = 7 - 9) and compound levels are expressed in μmol/g tissue weight.

^a Mice were killed by microwave irradiation at day 2, 7 and 14 after tooth separation.

Asp : aspartic acid, Glu : glutamic acid, Gln : glutamine, Gly : glycine, Tau : taurine, GABA : γ-aminobutyric acid.

MHPG 量だけが対照群と比較して有意な増加を示した。このような MHPG 量の増加は処置後 7 日目および 14 日目の測定では認められず、また 0.5mm 離開群の処置後 2 日目においても認められなかった (Tables 1-4)。

2) 脳内アセチルコリン神経伝達物質およびコリン量の測定

マウスの海馬、大脳皮質、線条体、視床下部におけるアセチルコリン神経関連物質 (アセチルコリンとコリン) は、すべての離開群において対照群と比較して有意な差を示さなかった (Table 5)。

3) 脳内神経活性アミノ酸量の測定

マウスの海馬、大脳皮質、線条体、視床下部における神経活性アミノ酸 (Asp, Glu, Gln, Gly, Tau, GABA) は、すべての離開群において対照群と比較して有意な差を示さなかった。代表例として、海馬での結果を Table 6 に示した。

考 察

実験的な歯の移動処置が、いわゆるストレスラーとして動物の中樞神経系の活性に影響を及ぼすことについては、マウスを用いた中野¹⁴⁾やラットを用いた藤江⁴⁾の報告から明らかである。しかしながら、そのような中樞神経系の活性変化との関連性が推定される行動学的変化を具体的にとらえた研究は少なく、わずかに中野¹⁴⁾による探索行動の低下が報告されているだけである。また装置の装着期間が、中野¹⁴⁾が 3 日間、藤江⁴⁾が 7 日間と短かったことより、本研究では歯間離開方法に改良を加え、実験期間の延長を行った。その結果、1.0mm 離開処置における歯間離開維持率は、処置後 7 日目で約 85%、14 日目で約 70%、21 日目で約 50% の成績であった。

各種のストレス負荷が動物の学習・記憶能力に影響を及ぼすことは、広く知られている¹⁹⁾。また咀嚼量の減少、歯の喪失、抜歯および歯冠切除などによる口腔領域から高次脳機能への求心性情報量の変化が、動物の学習・記憶能力に影響するとの報告がある^{31~34)}。これらの知見は、

中樞神経系に対してストレスラーとして作用し、また正常とは異なる求心性情報量を持続的に送ると推定される実験的な歯の移動処置は、動物の学習・記憶能力に対してなんらかの影響を及ぼす可能性があると考えられる。そこで本研究においては、中樞神経系の機能を反映する指標として、記憶能力および脳内神経伝達物質について長期間 (14 日間) の分析を行った。以下、実験項目ごとに考察する。

1. 体重への影響

ラットに矯正装置を装着した実験において、摂食障害による体重の減少が報告されている^{35,36)}。そこで本研究では、摂食障害による影響を最小限にするため、飼育開始時から通常の固形飼料ではなく、粉末飼料での飼育を行った。この飼育条件下で、マウスの体重は歯間離開処置後 1 日目に有意に減少したが、処置後 2 日目を以降は対照群と同じ体重増加曲線 (Fig. 8) を示したことから、歯間離開装置の装着による摂食障害は発現しないと判断して、行動実験の測定を処置後 2 日目から開始した。

2. 自発運動量に対する影響

本実験において、回転式運動量測定装置により測定されたマウスの自発運動量は、1.0mm 離開群の処置後 2 日目でのみ有意な減少を示した。この結果は本実験と類似した歯間離開処置を行い、処置後 3 日目まで自発運動量の減少を認めた中野¹⁴⁾の報告と一致する。動物の自発運動は、中樞神経系の活性を反映する指標として広く測定されており³⁷⁾、また種々のストレス負荷により変動することが多数報告されている^{38,39)}。ただし、本実験の場合、自発運動量の有意な減少は処置後 7 日目および 14 日目では発現せず、また 0.5mm 離開群の処置後 2 日目でも認められなかった。これらの結果は、1.0mm 離開処置によるストレスは 0.5mm 離開処置よりも強いことを示しており、またこのストレスに対する生理的適応⁴⁰⁾は急速に発現することを示している。離開処置のような物理的ストレスに対する適応が発現する場所としては、中樞神経系と末梢部位の両者が考えられる。しかしながら、Fig. 7 で示

したように、1.0mm離開処置による荷重は処置後7日目の時点で著しく減少し、自発運動量の変化を引き起こさない0.5mm離開群の荷重と同程度となった結果から、離開処置によるストレスに対する適応発現の主な場所は末梢部位であるように考えられる。すなわち、処置後2日目で認められた自発運動量の減少がその後消失した結果は、切歯の移動とともに離開処置に伴う疼痛や違和感などの末梢からの感覚情報量が減少したためと解釈される。

3. 記憶能力に対する影響

記憶には即時記憶、短期記憶、長期記憶など時間的要素により分類されるものと、作業記憶、参照記憶、空間認知記憶など記憶内容の種類から分類されるものがある^{41,42)}。そのため、様々な記憶能力測定法が開発されており⁴³⁾、通常、いくつかの測定法が組み合わされて研究が行われる。そこで本研究では、種類の違った3種類の記憶能力—記憶想起能力、短期記憶能力、空間認知記憶能力—に対する測定を行った。

記憶の想起能力を測定する多重迷路実験において、対照群のエラー数は、2日目、7日目、14日目で全く変わらなかった。この結果は、多重迷路に対する作業内容が習得訓練により完全に固定され、そして確実に想起できる状態が、少なくともシャムオペレーション後14日間持続されていたことを示している。この習得訓練を受けたマウスにおいて、1.0mm離開群の処置後2日目のエラー数は、対照群と比較して軽度ではあったが有意に増加した。このようなエラー数の増加は処置後7日目および14日目では発現しなかった。これらの結果は、完全に固定された記憶に対する想起能力が、離開処置により一時的に低下したことを示唆している。また処置後7日目および14日目の測定において、エラー数の有意な変化が認められなかったことより、記憶の長期保持能力は影響を受けないと考えられる。

作業内容に対する記憶を短時間保持する能力を測定するため、T型迷路実験を実施した。対

照群の正選択率は、多重迷路実験の結果と同様に、2日目、7日目、14日目で全く変わらなかった。一方、1.0mm離開群の処置後2日目の正選択率は、対照群と比較して有意に低下した。この結果は、作業内容を一定時間保持する能力（短期記憶能力）の低下を示している。しかし、正選択率の低下は処置後7日目および14日目では発現しなかったことより、歯間離開処置による短期記憶能力の低下も一時的な現象と考えられる。

放射状迷路実験は、主に空間認知記憶能力の測定を目的として使用される。本実験の方法は多重迷路実験やT型迷路実験とは異なり、処置後2日目より連日の測定が行われ、その間、対照群の正選択数は実験終了まで一定の水準を維持した。一方、1.0mm離開群の処置後2日目の正選択数は、対照群と比較して有意に減少した。しかし、この有意な減少は処置後3日目の測定では消失し、以後、実験終了まで対照群と同じレベルの正選択数を示した。これらの結果は、空間認知記憶能力も歯間離開処置により影響を受けるが、その影響は上記2つの記憶能力に対するのと同様に、一時的であったことを示している。

4. 脳内神経伝達物質に対する影響

脳内モノアミン神経系（ノルアドレナリン神経、ドパミン神経、セロトニン神経）に対する短期間の歯間離開処置の影響については、中野¹⁴⁾により主要代謝物質を含めた詳細な分析が行われており、また藤江⁴⁾によりノルアドレナリン量とドパミン量についての検討結果が報告されている。しかしながら、中野¹⁴⁾の研究は処置後3日目までの分析であり、一方、処置後7日目まで実験した藤江⁴⁾は神経系の活性の指標となる代謝物質の変化の測定を行っていない。また特に学習・記憶機構と関連性が深い脳内コリン作動性神経⁴⁴⁾や、同じく記憶機構との関連性が指摘されている脳内アミノ酸神経系^{45,46)}に関しては、全く研究が行われていない。そこで本研究では、脳内モノアミン作動性神経関連物質、コリン作動性神経関連物質、アミノ

酸系神経関連物質に関して、歯間離開処置後14日目までの測定を行った。

その結果、認められた唯一の変化は、1.0mm離開群の処置後2日目ですべての脳部位（海馬、大脳皮質、線条体、視床下部）における、ノルアドレナリンの主要代謝物質である MHPG 量の有意な増加だけであった。

中枢ノルアドレナリン神経の代謝回転を検討する手段の1つとして、脳内ノルアドレナリン量とノルアドレナリン神経末端から放出されたノルアドレナリンの代謝物質である MHPG 量の測定が行われる。ノルアドレナリン量は、合成系や再取り込み機構などにより比較的一定に維持されており、また神経内に存在するノルアドレナリンのプールサイズが大きいことなどから、神経の興奮によりノルアドレナリンの放出量が増加しても、それに伴う減少を認めにくいパラメーターである。本実験においても、測定したすべての脳部位において、ノルアドレナリン量の有意な変動は認められなかった。一方、脳内 MHPG 量は、中枢ノルアドレナリン神経が興奮し、神経末端からのノルアドレナリン放出を増加させた場合には顕著に増加することから、中枢ノルアドレナリン神経の興奮を間接的に反映する指標とみなされている^{27, 47, 48)}。本実験では、処置後2日目だけであったが、測定したすべての脳部位で MHPG 量の有意な増加が発現した。動物に対する各種のストレス負荷は中枢ノルアドレナリン神経を興奮させ、MHPG 量を増加させることが多数報告されている¹⁾。したがって、本実験において MHPG 量が増加した結果は、歯間離開処置がストレスラーとして中枢ノルアドレナリン神経を興奮させ、神経終末からのノルアドレナリンの放出を促進させたためと解釈される。

ストレス負荷による脳内 MHPG 量の増加の程度は、ストレスの種類により相違する⁴⁹⁾が、ストレス強度とは必ずしも相関しない⁵⁰⁾ことがラットで報告されている。例えば、同じ拘束ストレスでも、海馬内 MHPG 量の増加率は、仰臥位拘束で1.38倍、金網製ホルダー内拘束では

2.84倍と、金網製ホルダー内拘束ストレスの方が有意に高値であった⁵⁰⁾。また心理的ストレスと電撃ストレスの比較でも、視床下部内 MHPG 量の増加率は、前者が1.18倍であったのに対して、後者は1.74倍であった⁴⁹⁾。一方、ストレス強度を示す指標の1つである胃潰瘍の発生率（ラット1匹あたりの発生個数）は、仰臥位拘束で1.0個、金網ホルダー内拘束では0.3個と、仰臥位拘束ストレスの方が有意に高値であった⁵⁰⁾。これらの知見は、脳内 MHPG 量はストレス負荷により明らかに増加するものの、その増加率は必ずしもストレスの強度を反映しないことを示唆している。本実験の場合、ストレス感受の指標として、MHPG 量の変動のみを測定したため、ストレス強度を推測する手がかりはない。本実験で行った歯間離開処置がどの程度の強度のストレスであったかは、今後の検討課題である。

本実験における行動学的結果と神経化学的結果には、以下のような関係が認められた。(1)ストレス強度が1.0mm離開群より弱いと思われる0.5mm離開群では、行動の変化も MHPG 量の増加も認められなかった。(2)1.0mm離開群の処置後2日目では、行動の変化と MHPG 量の増加が同時に発現した。(3)処置後7日目および14日目の結果が示すように、行動の変化が認められない時には、MHPG 量の変化も認められなかった。(4)歯間離開処置群において、ノルアドレナリン神経以外の神経系の活性を示唆するような変化は認められなかった。ストレス負荷により分泌されるカテコールアミンは、記憶機能に対しては逆U字型の作用を及ぼす。すなわち、ラットに対してアドレナリンを脳内投与した場合、ある一定量までの投与では記憶を増強させるが、それを越えると逆に記憶を減弱させることが報告されている⁵¹⁾。本実験で使用したストレスの強度は不明であるが、これらの知見から、本実験で用いた歯間離開処置は、学習・記憶機能に関して特に密接に関係する中枢コリン作動性機構に対する作用ではなく、中枢ノルアドレナリン神経を特に強く興奮させ、ノルア

ドレナリンの放出量を増加させた結果、マウスの記憶機能を抑制した可能性が示唆される。

本実験において、歯間離開処置はドパミン神経やセロトニン神経活性には全く影響を及ぼさなかった。一方、中野¹⁴⁾は歯間離開処置によりドパミン神経やセロトニン神経活性の変化を報告している。ストレス負荷に対する中枢モノアミン神経系の反応性は、ノルアドレナリン神経が最も鋭敏で、ストレス強度が強い場合にはドパミンやセロトニン神経系にも影響が発現することが知られている^{52,53)}。歯間離開方法に関して、本実験の方法と中野¹⁴⁾の方法では手技的に類似しているが、離開した部位は下顎切歯と上顎切歯と異なっている。予備的検討において、1.0mm離開に要する初期荷重は、中野¹⁴⁾が行った上顎切歯では本実験で行った下顎切歯よりも約1.5倍程度大きな荷重が必要であったことから、中枢モノアミン神経系に関する本実験の結果と中野¹⁴⁾の結果との相違は、おそらく動物が受けたストレスの強度に違いがあったためと解釈される。

拘束ストレス、電撃ストレス、心理的ストレス、恐怖条件付けストレスなど、ストレスの種類が異なっても、ノルアドレナリンの主要代謝産物である MHPG 量の増加が共通する現象である⁹⁾。ただし、拘束ストレスや電撃ストレスのような種類のストレスの場合、MHPG 量の増加は広範囲な脳部位で発現し、また反復負荷により適応が生じ、MHPG 量の増加の程度が弱まるという特徴がある。一方、心理的ストレスや恐怖条件付けストレスなど情動機能への影響が強いストレスでは、MHPG 量の増加部位は視床下部、扁桃核、青斑核部などに限定されており、また反復負荷により、MHPG 量の増加の程度が強まることが知られている¹¹⁾。本実験における MHPG 量の変化のパターンは、測定したすべての脳部位で発現し、また処置後7日目および14日目では消失したことから、歯間離開処置は拘束ストレスや電撃ストレスに類似した種類のストレスであるように思われる。

実験的な歯の移動処置により動物が受けるストレス強度と、矯正歯科臨床において患者が受けるストレス強度との相関性はまだ不明である。しかしながら、これまで報告されたストレスに関する知見と本実験より得られた知見から、矯正歯科臨床においても、中枢神経系の機能の一部に、例えば、学習・記憶機能のような高次脳機能に一時的な影響が発現する可能性があることを考慮すべきである。田中ら¹¹⁾は、電撃ストレスによるラットの脳内 MHPG 量が、心理的ストレスの付加によりさらに増加することを報告しており、また高⁶⁾も歯の移動処置を行ったラットの海馬や視床下部の MHPG 量が、心理的ストレスを付加した場合、より強く発現したことを報告している。これらの知見は、実験的な歯の移動によるストレスにその他のストレスがさらに付加された場合には、ストレスラーとしての影響がより強まる可能性があることを示唆しており、今後、これらの点の検討も必要であろう。

結 語

実験的な歯の移動処置として、下顎切歯の歯間離開を行ったマウスを用いて、記憶能力および脳内モノアミン神経系、アセチルコリン神経、アミノ酸系神経に関係する脳内神経伝達物質とそれらの関連代謝物質量に対する影響を、処置後14日目まで測定した。

1. 歯間離開処置は、マウスの記憶能力に対して一時的な抑制を示した。
2. この抑制が発現した時点でのみ、脳内ノルアドレナリン神経の活性を示す MHPG 量の増加が認められた。

以上の結果より、歯間離開処置は中枢ノルアドレナリン神経の活性を特に上昇させるストレスラーとして、マウスの記憶機能に影響したと考えられる。また記憶機能や自発運動量に対する歯間離開処置の影響が短期間で消失し、それとほぼ平行して歯間離開処置による荷重が減少したことより、歯間離開処置によるストレスに対する適応の発現場所は、主に末梢部位と推

定される。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました歯科矯正学講座三浦廣行教授、歯科薬理学講座加藤裕久教授、口腔生理学講座北田泰之教授に深甚なる謝意を表すとともに、本研究の遂行にあたり数多くのご教示いただきました歯科薬理学講座村井繁夫博士、増田義勝博士、斎藤弘子博士に衷心より謝意を捧げます。また多大なるご協力をいただきました歯科薬理学講座の皆様ならびに歯科矯正学講座の皆様は厚く感謝いたします。

本論文の要旨は、岩手医科大学歯学会第55回例会（2003年2月、盛岡）において発表した。

文 献

- 1) 小沢 操：ラット上顎臼歯歯根吸収に及ぼす実験的歯の移動の影響，日矯歯会誌，41：616-630, 1982.
- 2) Saito, S., Davidovitch, Z., Saito, M., El-Kinany, W., Sakuma, Y., Yamasaki, K., Shibasaki, Y. and Fukuhara, T. : Immunohistochemical localization of prostaglandin E and cyclic AMP in periodontal ligament of orthodontically treated cats. *J. Jpn. Orthod. Soc.* 51 : 308-317, 1992.
- 3) 有松稔晃：矯正的歯の移動がラットの臼歯歯髄内神経線維へ及ぼす影響，九州歯会誌，48：53-78, 1994.
- 4) 藤江 徹：上顎切歯側方拡大装置の脳，副腎および唾液腺に及ぼす影響，福岡歯大会誌，25：303-320, 1998.
- 5) 河田照茂：歯科矯正刺戟によつて誘発される血中のクエン酸，アスコルビン酸量等の変動に関する研究，日矯歯会誌，23：1-12, 1964.
- 6) 滝本和男，河田照茂，中川皓文，藤井正久，大西馨：実験的歯牙移動にともなう血中総17-Ketosteroids量の変動に関する研究，日矯歯会誌，25：67-69, 1966.
- 7) 谷田部賢一：歯科矯正力のadrenal responseに及ぼす影響について（I）経時的変動について，日矯歯会誌，30：1-9, 1971.
- 8) Selye, H. : A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138 : 32, 1936.
- 9) 田中正敏，中川良一，河野康子，戸島信夫，長崎信行：ラット脳内各部位のノルアドレナリン代謝におよぼす拘束ストレスの影響，精薬療基金研年報，11：103-113, 1979.
- 10) 田中正敏，河野康子，中川良一，戸島信夫，井田能成，長崎信行，野田安孝：ストレス状況に対する脳内各部位のノルアドレナリンニューロンの反応性の経時的部位特性，精薬療基金研年報，12：45-53, 1980.
- 11) 田中正敏，井田能成，津田 彰：脳内ノルアドレナリンとストレス，臨精医，15：1459-1473, 1986.
- 12) 田中正敏：ストレス，山村雄一 監修：代謝VOL. 26 臨時増刊号「脳代謝とその異常」，第1版，中山書店，東京，122-131ページ，1989.
- 13) McEwen, B. S. and Sapolsky, R. M. : Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5 : 205-216, 1995.
- 14) 中野錦吾：ストレッサーとして歯間離開処置を行なったマウスの自発運動と脳内モノアミン神経関連物質の変化について，日歯心身医学会誌，2：38-44, 1987.
- 15) 斎藤祐一：実験的歯の移動がStreptozotocin糖尿病マウスのMHPG，血糖値，および脳内アミノ酸系神経伝達物質に及ぼす影響について，岩手医大歯誌，14：224-232, 1989.
- 16) 高 大松：心理的ストレスとその矯正歯科治療への影響，明海大歯誌，22：201-210, 1993.
- 17) Seligman, M. E. P. and Maier, S. F. : Failure to escape traumatic shock. *J. Exp. Psychol.* 74 : 1-9, 1967.
- 18) 村松太郎，鹿島晴雄：ストレスと記憶，松下正明編集：外傷後ストレス障害（PTSD）（臨床精神医学講座S6），第1版，中山書店，東京，90-100ページ，2000.
- 19) 鶴飼 良：ストレスと学習記憶，日神精薬理誌，20：93-96, 2000.
- 20) 増田義勝，村井繁夫，吉田 熙，斎藤弘子，阿部英一，村上秀元，伊藤忠信：マウスの学習・記憶を評価するための簡便な多重迷路実験法：学習と記憶におよぼすScopolamineの効果への応用，日薬理誌，98：251-257, 1991.
- 21) Murai, S., Saito, H., Masuda, Y., Odashima, J. and Itoh, T. : AF64A disrupts retrieval processes in long-term memory of mice, *Neuroreport* 6 : 349-352, 1995.
- 22) Masuda, Y., Murai, S., Saito, H., Abe, E. and Itoh, T. : A simple T-maze method for estimating working memory in mice. Effect of ethylcholine mustard aziridinium ion (AF64A). *J. Pharmacol. Methods* 28 : 45-48, 1992.
- 23) Masuda, Y., Odashima, J., Murai, S., Saito, H., Itoh, M. and Itoh, T. : Radial arm maze behavior in mice when a return to the home cage serves as the reinforcer. *Physiol. Behav.* 56 : 785-788, 1994.
- 24) 岩崎庸男：放射状迷路課題と向精神薬，田所作太郎 編集：抗痴呆薬の探求－学習と記憶の動物実験－，第1版，星和書店，東京，61-71ページ，1985.
- 25) 平賀義裕：ラットの遅延放射状迷路課題の遂行

- に及ぼす Scopolamine の効果, 日薬理誌, 97 : 351-359, 1991.
- 26) Glowinski, J. and Iversen, L. L. : Regional studies of catecholamines in the rat brain - I. *J. Neurochem.* 13 : 655-669, 1966.
- 27) Saito, H., Murai, S., Abe, E., Masuda, Y. and Itoh, T. : Rapid and simultaneous assay of monoamine neurotransmitters and their metabolites in discrete brain areas of mice by HPLC with coulometric detection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42 : 351-356, 1992.
- 28) Murai, S., Miyate, H., Saito, H., Nagahama, H., Masuda, Y. and Itoh, T. : Simple determination of acetylcholine and choline within 4 min by HPLC-ECD and immobilized enzyme column in mice brain areas. *J. Pharmacol. Methods* 21 : 255-262, 1989.
- 29) Murai, S., Saito, H., Abe, E., Masuda, Y. and Itoh, T. : A rapid assay for neurotransmitter amino acids, aspartate, glutamate, glycine, taurine and γ -aminobutyric acid in the brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Neural Transm.* 87 : 145-153, 1992.
- 30) Potter P. E., Meek J. L. and Neff N. H. : Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J. Neurochem.* 41 : 188-194, 1983.
- 31) 寺澤秀朗, 池田和博, 平井敏博 : 咬合・咀嚼機能が高週齡ラットの中樞神経系に及ぼす影響, 日本学術会議咬合学研究連絡委員会 監修 : 口腔保健と全身的な健康, 第1版, 口腔保健協会, 東京, 71-73ページ, 1997.
- 32) 増田義勝, 村井繁夫, 染井宏祐 : マウスの記憶に及ぼす粉末飼料飼育の影響, 日本学術会議咬合学研究連絡委員会 監修 : 口腔保健と全身的な健康, 第1版, 口腔保健協会, 東京, 74-77ページ, 1997.
- 33) 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, 日補綴歯会誌, 43 : 299-311, 1999.
- 34) 佐々木快輔 : 臼歯の咬合支持の喪失がラットの高次脳機能に及ぼす影響 - 臼歯抜歯と臼歯歯冠切除の違い -, 日補綴歯会誌, 46 : 185-194, 2002.
- 35) 日置茂弘 : 歯科矯正処置における咬合挙上の唾液腺に及ぼす影響について, 岐阜歯会誌, 9 : 67-95, 1981.
- 36) Abe, K., Yokota, Y., Kawazoe, T., Hioki, S., Kishimoto, T. and Dawes, C. : The effects of an incisal bite plane on rat submandibular glands. *J. Dent. Res.* 62 : 721-724, 1983.
- 37) 栗原 久, 田所作太郎 : 向精神薬の行動薬理学 - 前臨床試験について -, 神精薬理, 7 : 299-334, 1985.
- 38) Thurmond J. B. and Heishman S. J. : Effect of catecholamine precursors on stress-induced changes in motor activity, exploration, and brain monoamines in young and aged mice. *Behav. Neurosci.* 98 : 506-517, 1984.
- 39) Lehnert, H., Reinstein, D. K., Strowbridge, B. W. and Wurtman, R. J. : Neurochemical and behavioral consequences of acute, uncontrollable stress: effects of dietary tyrosine. *Brain Res.* 303 : 215-223, 1984.
- 40) 伊藤眞次 : 生理的適応の概念, 伊藤眞次, 川上正澄 編集 : 適応と脳ホルモン, 第1版, 理工学社, 東京, 1-16ページ, 1979.
- 41) 二木宏明 : 脳と心理学 - 適応行動の生理心理学 -, 第1版, 朝倉書店, 東京, 171-228ページ, 1984.
- 42) 栗原 久 : 学習・記憶の定義, 田所作太郎 監修 : 行動薬理学の実践 - 薬物による行動変化 -, 第1版, 星和書店, 東京, 116-119ページ, 1991.
- 43) 広中直行 : 動物における記憶研究法, 日神精薬理誌, 15 : 211-222, 1995.
- 44) 下濱 俊 : 知的機能と神経伝達物質, 中村重信 編集 : 神経伝達物質 update - 基礎から臨床まで, 第1版, 中外医学社, 東京, 75-78ページ, 1991.
- 45) 浅野富子 : GABA レセプター, 小川紀雄 編集 : 新 脳のレセプター, 第1版, 世界保健通信社, 大阪, 254-280ページ, 1989.
- 46) 萩田喜代一, 米田幸雄 : 興奮性アミノ酸レセプター, 小川紀雄 編集 : 新 脳のレセプター, 第1版, 世界保健通信社, 大阪, 281-327ページ, 1989.
- 47) Stone, E. A. : Accumulation and metabolism of norepinephrine in rat hypothalamus after exhaustive stress. *J. Neurochem.* 21 : 589-601, 1973.
- 48) Kohno, Y., Tanaka, M., Nakagawa, R., Toshima, N. and Nagasaki, N. : Regional distribution and production rate of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulphate (MHPG-SO₄) in rat brain. *J. Neurochem.* 36 : 286-289, 1981.
- 49) Iimori, K., Tanaka, M., Kohno, Y., Ida, Y., Nakagawa, R., Hoaki, Y., Tsuda, A. and Nagasaki, N. : Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16 : 637-640, 1982.
- 50) Glavin, G. B., Tanaka, M., Tsuda, A., Kohno, Y., Hoaki, Y. and Nagasaki, N. : Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19 : 287-290, 1983.
- 51) McGaugh, J. L. : Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annu. Rev. Neurosci.* 12 : 255-287, 1989
- 52) Morgan, W. W., Rudeen, P. K. and Pfeil, K. A. : Effect of immobilization stress on serotonin content and turnover in regions of the rat brain. *Life Sci.* 17 : 143-150, 1975.
- 53) De Souza, E. B. and Van Loon, G. R. : Brain serotonin and catecholamine responses to repeated stress in rats. *Brain Res.* 367 : 77-86, 1986.