

歯の喪失が中枢コリン作動性ニューロンに及ぼす影響：高週齢ラットを用いた免疫組織化学的, 生化学的検討(北海道医療大学博士論文の内容および審査の結果要旨(平成10年度))

著者名(日)	寺澤 秀朗
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	18
号	1
ページ	256-258
発行年	1999-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008436/

し、non-invasive法の一方法でもある容量結合型電気刺激法 (CCEF) を大腿骨内の、インプラント体周囲に作用させ、骨形成促進効果により作られた骨を病理組織学的ならびに力学的に検索を行い、さらに、骨形成促進因子を増強させるという報告がある薬剤のプロスタグランジン_{E₁}を併用して骨形成の促進ならびに装置装着時間の短縮の可能性を検討し、以下の結果を得た。

1. 家兎大腿骨インプラント埋入モデルにおいて、同一個体で実験側の大腿骨にCCEF刺激を2週間、1日8時間と1日4時間で行った結果、対照とした反対側に比較して、有意に骨形成を促進した。
2. 骨接触率、骨面積比率、回転除去トルク値では、CCEF刺激1日8時間が1日4時間より高い傾向を示したものの、両実験群の間に有意差は認められなかった。
3. 本実験の評価法に、トルクレンチを用いたインプラ

ント体の回転除去トルク値を測定したのは、これまでにやってきた実験結果を力学的に裏付けるのに非常に有用であった。

4. 最近、骨形成促進作用の報告があるPGE₁に着目し、家兎大腿骨インプラント埋入モデルにPGE₁を静脈注射にて投与した結果、対照群に対し有意に骨形成を促進した。

5. CCEF 4時間刺激と同時にPGE₁を静脈注射にて投与した結果、CCEF刺激単独ならびにPGE₁投与のみの効果よりも骨形成が有意に促進された。

以上よりCCEF刺激の口腔インプラント法への応用、およびCCEF刺激にPGE₁を併用することによるCCEF刺激装置装着時間、短縮化への可能性が示唆されたことにより本研究の成果は、博士(歯学)の学位を与えるにふさわしい内容である事を認める。

氏名・(本籍)	寺澤秀朗(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第55号
学位授与の日付	平成10年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	歯の喪失が中枢コリン作動性ニューロンに及ぼす影響 —高週齢ラットを用いた免疫組織化学的、生化学的検討—
論文審査委員	主査 教授 平井敏博 副査 教授 矢嶋俊彦 副査 助教授 太田勲

論文内容の要旨

[目的]

咬合・咀嚼機能と全身の機能との関連が注目されている。特に、高齢者に関しては、咬合・咀嚼が全身の健康保持や寝たきりおよび痴呆の予防などのために重要な役割を果たしていること、また、咬合・咀嚼機能の低下が全身の病的老化を進行させる因子の一つとなり得る可能性があることなどが示唆されている。

咀嚼運動は、末梢の感覚受容器からの種々の情報が、脳神経と脊髄神経を通して大脳皮質咀嚼野などの上位中

枢や、「パターン・ジェネレーター」と呼ばれる咀嚼リズム発生器がある脳幹などの「中枢処理系」へ運び込まれて統合・制御され、体性あるいは自立性の遠心性情報として、筋をはじめとする「末梢効果器系」へフィードバックされることにより営まれている。したがって、咬合・咀嚼による慢性の中枢神経系への刺激は、大脳皮質をはじめとするニューロンへの「長期増強」となり、シナプス可塑性を促進する要因となること、さらには、咬合・咀嚼機能の低下に伴う求心性情報の障害が中枢神経系、特にコリン作動性ニューロンの機能低下をもたらすこと

が考えられる。

本研究では、学習能力の低下や老年痴呆に関与していることが知られているコリン作動性ニューロンの指標となるcholine acetyltransferase (ChAT) とacetylcholine (ACh) に着目し、咀嚼動態の変化による高週齢ラット脳への影響を免疫組織化学的ならびに生化学的に検討した。

[方法と材料]

1. 実験動物の飼育法

実験にはWistar系雄性ラット84匹を用い、25週齢の時点で7群、12匹ずつに分割した。すなわち、対照群として、全実験期間を通じて固形飼料にて飼育した25週齢群、40週齢群、60週齢群の3群、粉末飼料群として、25週齢になった時点で固形飼料を同一成分の粉末飼料に変更して飼育した40週齢群と60週齢群の2群、さらに、臼歯切除群として、25週齢の時点で臼歯冠部を切除するとともに、粉末飼料群と同様の飼料で飼育した同2群である。なお、飼育に際しては、各群ともに1ケージあたり3匹ずつとした。また、実験期間中の飼料と水は自由摂取とした。

2. 免疫組織化学的技法

各々の観察週齢になった時点で、各群の6匹については、コリン作動性ニューロンを免疫組織化学的技法の一つである酵素抗体法により観察した。すなわち、各観察週齢になった時点で、吸入麻酔および腹腔内注射による全身麻酔下にて、固定液による灌流固定後、直ちに脳の全摘出を行い、厚さ50 μ mの薄切切片を作成した。その後、得られた切片について、内因性ペルオキシダーゼ活性阻害後、ヤギ正常血清と反応させ、一次抗体としてanti-ChATポリクローナル抗体を、また、二次抗体としてビオチン標識第二抗体を、さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用い、ジアミノベンジジン溶液によって発色させ、光線顕微鏡により、対角帯核・中隔核および三叉神経運動核におけるコリン作動性ニューロン数を算出した。なお、1匹における連続する切片のコリン作動性ニューロン数を算出し、各群の平均値を求めた。

3. ACh定量法

各群の残りの6匹については脳内ACh濃度の測定を行った。すなわち、観察週齢になった時点で、ラット全身にマイクロウェーブを1.5秒照射後、脳を全摘し、Glowinskiらの方法に基づいて海馬と線条体を採り出し、 -80°C にて保存した。これらをホモジナイズした後、内部標準物質としてエチルホモコリンを加えて、遠心分離を行った。そして、上清を同量の0.1M炭酸水素カリウムで中和・濾過した。濾液中のACh濃度を電気化学検出

器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) にて測定した。なお、ACh濃度は別に求めたLowry法による蛋白量にて補正し、nmol/mgproteinとして表示し、各群の平均値を求めた。

[結果と考察]

1. 光線顕微鏡所見

脳の前頭断により得られた切片において、対角帯核・中隔核、線条体、前交連、側脳室、大脳皮質を確認することができた。また、染色されたコリン作動性ニューロンが対角帯核・中隔核に多く認められた。

対角帯核・中隔核における強拡大像から、染色された神経細胞の細胞体と神経突起を確認することができた。

2. コリン作動性ニューロン数について

対角帯核・中隔核におけるコリン作動性ニューロンの数は、対照群に比して臼歯切除群では、40週齢、60週齢のいずれにおいても、有意な減少が認められた ($P < 0.01$)。また、三叉神経運動核においては、対照群、粉末飼料群および臼歯切除群の各群間に有意差は認められなかった。なお、各群の両観察部位において、加齢に伴うコリン作動性ニューロン数の減少は認められなかった。

これらのことから、末梢感覚受容器からの情報の減少は、脳内においてACh投射の中心である対角帯核・中隔核におけるコリン作動性ニューロンの脱落に関与したと考えられる。

3. 脳内ACh濃度について

40週齢臼歯切除群の海馬における脳内ACh濃度は、同週齢の対照群に比して、有意な低下が認められた ($P < 0.05$)。しかし、60週齢においては、差は認められなかった。一方、線条体においては、40週齢および60週齢ともに、有意な低下は認められなかった。また、各群の両観察部位においては、脳内ACh濃度の加齢に伴う有意な低下は認められなかった。

40週齢対照群の海馬と同週齢臼歯切除群のそれとの間のACh濃度の有意な差が認められたことは対角帯核・中隔核におけるコリン作動性ニューロン数の減少に起因するものと考えられる。また、線条体におけるACh濃度に差が認められなかったが、三叉神経運動核におけるコリン作動性ニューロン数に差異が認められなかった理由と同様に、咀嚼筋に存在する筋紡錘からの求心性情報には変化がなかったためと考えられる。

なお、海馬と線条体を測定部位とした理由は、強力なコリン作動性線維束が対角帯核・中隔核から発し、海馬に終わっているとの報告があること、リズムカルな顎運動のリズム形成に線条体一黒質一網様体投射が関与しているとの報告があるためである。

本研究結果から、臼歯切除による咬合支持の喪失および飼育飼料形態の変化が中枢神経系への求心性情報を障

害し、コリン作動性ニューロンを脱落させ、さらに、ACh合成能を低下させていることが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

近年、伝承として言及されていた口腔と全身との関連が「科学」として捉えられるようになり、顎口腔系機能の全身の機能へ及ぼす影響が注目されている。特に、咬合・咀嚼によって生じる長期間の中枢神経系への高頻度の刺激は、海馬や大脳皮質をはじめとするニューロンへの「長期増強」を起こし、シナプス可塑性を促進する要因となることが考えられるため、高齢者においては、咬合・咀嚼が全身の健康保持や寝たきりおよび痴呆の予防などのために重要な役割を果たしていることが推測される。

本研究では、高週齢ラットにおける歯の喪失および飼育飼料形態の変化が中枢神経系に及ぼす影響について検討するために、脳内に広く存在する神経伝達物質であるアセチルコリン (acetylcholine, ACh) に着目し、記憶および学習能力の低下や老年痴呆に深く関与することが報告されているコリン作動性ニューロンに関して、以下の実験を行った。高週齢ラット脳内に存在するコリン作動性ニューロンをコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase, ChAT) により免疫組織化学的に染色し、対角帯核・中隔核および三叉神経運動路核のコリン作動性ニューロン数をカウントする一方、海

馬および線条体のACh濃度を測定した。なお、実験にはWistar系雄性ラットを用い、全実験期間を通じて固形飼料にて飼育した25週齢群、40週齢群、60週齢群の3群、粉末飼料群として、25週齢になった時点で固形飼料を同一成分の粉末飼料に変更して飼育した40週齢群と60週齢群の2群、さらに、臼歯切除群として、25週齢の時点で臼歯歯冠部を切除するとともに、粉末飼料群と同様の飼料で飼育した同2群、以上の7群12匹ずつを用いた。

本研究において、申請者は、臼歯切除群における対角帯核・中隔核のコリン作動性ニューロン数の有意な減少と、40週齢臼歯切除群の海馬におけるACh濃度の有意な低下を認めた。そして、これらの結果から、臼歯切除による咬合支持の喪失および飼育飼料形態の変化が中枢神経系への求心性情報の入力を障害し、その結果、コリン作動性ニューロンを脱落させ、さらに、ACh合成能を低下させることを示唆した。

本研究によって得られたこれらの結果は、歯科補綴学ならびに関連諸学科の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、本論文は学位授与に値すると判定した。