

## 〔学位論文〕

## 脳梗塞モデルラットにおける固形飼料飼育と液体飼料飼育の学習記憶機能の後遺障害の回復に及ぼす差異

川西 克弥

北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 咬合再建補綴学分野

## Effect of Mastication on Recoveries of Learning/Memory Function after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

Katsuya KAWANISHI

Division of Occlusion and Removable Prosthodontics, Department of Oral Rehabilitation, Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry

Key words : Ischemia, Occlusion, Mastication, learning/memory

## 緒 言

近年、歯科医学領域において、咬合・咀嚼と脳機能との関連についての多くの研究がなされており、ラットにおける歯の喪失や飼育飼料形態が学習記憶機能と密接な関連にあるとの報告が多くなされている (Terasawa et al., 2002; Makiura et al., 2000). 一方、リハビリテーション医学分野の臨床現場から、脳血管障害患者のリハビリテーション治療の中で、早期の経口摂食が後遺障害の改善に有効である旨の報告がなされている (紙屋克子, 1997). しかし、その効果や回復過程についての詳細は明らかとなっていない。

本研究では、脳梗塞モデルラットを作製し、固形および液体飼料飼育が感覚運動機能障害と学習記憶機能障害の回復過程に及ぼす影響について検討した。

## 方 法

実験には8週齢のWistar/ST雄性ラット36匹を用いた。飼育環境は1ケージ2匹で飼育し、飼料と水は自由摂取とした。脳梗塞モデルラットの作製は、Longaらの方法 (1989) に従い、右側中大脳動脈を永久的に梗塞した (Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion, 以下MCAOとする)。全身麻酔下にて、頸部正中部を切開後、総頸動脈および外頸動脈、内頸動脈を露出させた。次に外頸動脈を結紮し、その血流を遮断した。さらに、

外頸動脈の起始部の血流をマイクロクリップで一時的に遮断して外頸動脈を切断し、4-0ナイロン糸を加工した栓塞子を頸動脈分岐部まで到達させた。マイクロクリップの除去後、栓塞子を内頸動脈から中大脳動脈起始部まで約20mm挿入し、中大脳動脈への血流を遮断した。術後には、左側前肢部の屈曲があることを確認し、脳梗塞モデルの完成とした。術後2週間は液体飼料を与え、術後2週目の時点で、固形飼料を給餌するMCAO固形群 (n=13) と、引き続き液体飼料を給餌するMCAO液体群 (n=13)、さらに偽手術後に固形飼料を給餌するSham固形群 (n=10) の3群を設定し、以下の検討を行った。なお、液体飼料にはヒト経腸栄養剤エンシュア・リキッドを用い、固形飼料には同一成分の固形物を特注・作製し、給餌した。

## 1) 体重測定および感覚運動機能の評価

体重測定および感覚運動機能評価は、飼料変更1週間隔で28日目まで行った。なお、感覚運動機能評価にはLimb Placement Test (LPT) を用いた。なお、LPTスコアは16点満点で評価するものであり、その合計点数が高いほど障害の程度は軽度であることを示す。

## 2) 自発運動量の測定

自発運動量の測定は飼料変更後28日目に行った。小動物運動解析装置 (SCANET MV-20, メルクエスト) を用い、近赤外線センサによって運動量 (unit) をカウントし、水平的、垂直的位置を連続して計測した。

受付：平成22年3月30日

### 3) 学習記憶機能の評価

学習記憶機能評価として、Morris Water Maze Task (以下、MWMとする)を飼料変更後35日目から開始した。実験装置には直径150cm、高さ44cmのプールを用いた。水を34cmの高さまで入れ、プール中央を中心として4つの区画に分けた。さらにPlatformとして直径10cm、高さ32cmの台を北西区画の中央に設置した。獲得試行は5日間連続で行い、120秒間以内に装置内に設置したPlatformに到達するまでの時間 (Escape time) と壁周辺の遊泳 (Thigmotaxis: 接触走性) 時間を測定した。なお、評価には後者を前者で除した値、すなわちPeripheral pool timeを用いた。

### 4) 脳の梗塞部体積の測定

飼料変更後42日目にラットの脳を摘出し、凍結切片を作製後、2% TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride) 溶液にて37°Cで30分間インキュベートし、染色を行った後、脳梗塞体積をImage J softwareを用いて算出した。

## 結果および考察

得られた結果は以下の通りである。

- 1) 体重変化および感覚運動機能障害の回復はMCAO両群に有意差は認められなかった。
- 2) 自発運動量はMCAO液体群がSham固形群よりも有意に高値を示し、MCAO固形群では低値を示した。
- 3) MWMにおいて、獲得試行5日目において、MCAO液体群はMCAO固形群よりもPeripheral pool timeが有意に高値を示した。
- 4) TTC染色において、脳梗塞体積にMCAO両群間に有意差が認められなかったことから、永久脳梗塞モデルラットの作製に差はなかったことが示された。

なお、空間的学習記憶障害が海馬の障害と関連性があることが報告されており、Devanら (1999) はThigmotaxis様の遊泳について、この遊泳パターンが線条体尾状核被殻や海馬の障害を受けたラットと類似していることを報告している。本研究における空間的学習記憶障害の改善に関しては、MCAO固形群における咀嚼作用の営みが考えられる。すなわち、MCAO液体群では歯根膜と咀嚼筋からの三叉神経中脳路核への求心性入力が増加し、脚橋被蓋核のコリン作動性ニューロンの活動が低下した結果、対角帯核・内側中隔核での一酸化窒素 (NO) の発生が海馬や大脳皮質へ影響を及ぼし、学習記憶障害をもたらす可能性が考えられる (Kang et al., 2007)。また、MCAO後の海馬歯状回において、ニューロン新生が生じること (Arvidsson et al., 2001) や、哺乳類におけ

る成体の海馬歯状回にニューロン新生が起こることが報告されており (Gage & Taupin, 2002)、本研究の結果においてもMCAO固形群が咬合・咀嚼によって海馬に刺激を与えることにより、成体におけるニューロン新生を促し、空間的学習記憶障害の回復に寄与したことも考えられる。

## 結 論

本研究の結果から、脳梗塞モデルラットの後遺障害の一つである学習記憶機能障害の回復に咀嚼が有効であることが示された。このことから、適切な経口摂食訓練プログラムの適用は早期リハビリテーションの効果を高める可能性があると考えられる。

## 参考文献

- Arvidsson A, Kokaia Z and Lindvall O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14 : 10-18, 2001.
- Devan BD, McDonald RJ and White NM. Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviors in the water maze : relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res* 100 : 5-14, 1999.
- Gage FH, & Taupin P. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69 : 745-749, 2002.
- 紙屋克子. 経口摂食が意識回復過程に及ぼす効果. 口腔保健と全体的な健康, 60-63, 東京: 口腔保健協会, 1997.
- Kang Y, Denpo Y, Ohashi A, Saito M, Tyoda H, Sato H, Koshino H, Maeda Y and Hirai T. Nitric oxide activates leak K (+) currents in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *J Neurophysiol* 98 : 3397-3410, 2007.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S and Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20 : 84-91, 1989.
- Makiura T, Ikeda Y, Hirai T, Terasawa H, Hamaue N and Minami M. Influence of diet and occlusal support on learning memory in rats behavioral and biochemical studies. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107 : 269-277, 2000.
- Terasawa H, Hirai T, Ninomiya T, Ikeda Y, Ishijima T, Yajima T, Hamaue N, Nagase Y, Kang Y and Minami M. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats : immunohistochemical and biochemical studies. *Neurosci Res* 43 : 373-379, 2002. *Behav Brain Res* 173 : 171-180, 2006.