

学位論文審査の要旨

癌の転移、浸潤、造腫瘍性など悪性形質は、腫瘍増殖期における周囲微少環境との関連により獲得されるものと考えられている。この悪性化進展の機序として、発癌時の遺伝子変化に加え、増殖過程における更なる遺伝子変異が重積することにより生じるものと推察されている。先に岡田らによりマウス退縮型線維肉腫細胞（以下QR-32癌細胞）において、サイモシン $\beta 4$ の発現と悪性化進展に相関が見い出されているが、サイモシン $\beta 4$ の悪性化進展における役割は不明のままとなっていた。そこで、申請者は、遺伝子工学的手法を用い、サイモシン $\beta 4$ 遺伝子の発現とQR-32癌細胞の悪性形質獲得との関連について検討した。その結果、QR-32癌細胞株においてサイモシン $\beta 4$ 遺伝子の発現の亢進が炎症依存性悪性化進展株で認められ、遺伝子導入によるサイモシン $\beta 4$ の発現の調節により、悪性形質はセンス導入で亢進し、アンチセンス導入では低下を示した。また、サイモシン $\beta 4$ 遺伝子は、癌の悪性形質のうち特に転移能との関連が深く、ア

クチンフィラメントの制御を介して癌細胞の運動能に関与していることが示唆された。

本研究は、QR-32癌細胞の悪性化進展において、アクチン調節蛋白サイモシン $\beta 4$ 遺伝子の発現が、癌細胞の運動能やin vivoでの転移の亢進とサイモシン $\beta 4$ の発現が深く関与していることを、初めて立証し、癌細胞中のサイモシン $\beta 4$ mRNAの発現程度が癌細胞の悪性化進展の指標の一つとなり得ることを示したものである。またヒト口腔癌細胞株（HSC-3）においても、その発現が観察され、癌細胞中のサイモシン $\beta 4$ の発現の程度が口腔扁平上皮癌の悪性化進展度、治療法の選択ないし、予後因子の一つになる可能性を示唆した。

以上のことから、本論文は、癌の悪性形質の獲得の機序の一端を明らかにし、今後の口腔癌の研究、治療の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	牧 浦 哲 司 (奈良県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第90号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	咬合支持と飼育飼料形態がラットの記憶・学習行動に及ぼす影響
論文審査委員	主 査 教 授 平 井 敏 博 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 姜 英 男

論文内容の要旨

I. 目 的

近年、咬合・咀嚼機能と全身の機能との密接な関連が報告されている。特に、歯の喪失が中枢神経系へ及ぼす影響が注目されており、ラットにおいては、臼歯切除による咬合支持の喪失は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、アセチルコリ

ン合成能を低下させることが示唆されている。なお、AChは記憶・学習機能や、老年痴呆にコリン作動性ニューロンの破壊が深く関与していることがすでに報告されている。さらに、アルツハイマー型老年痴呆患者の死後脳におけるMeynert核のアセチルコリン合成酵素活性の低下が報告され、また、歯の喪失が本疾患の危険因子の一つとして挙げられている。一方、記憶機能を含む認知機

能障害にドーパミン(以下、DAとする)機能異常が関連していることや、前頭前野のDAを枯渇させると空間記憶が傷害されることが報告されている。なお、DAの投射経路には、黒質および腹側被蓋野から線条体へ投射し錐体外路系機能に関係する黒質-線条体系がある。また、腹側被蓋野、黒質、線条件を含む大脳基底核は、咀嚼運動に関与していることが報告されている。さらに、他の投射経路には腹側被蓋野から前頭前野へ投射し記憶、学習、情動、行動などと関係する中脳-皮質系がある。

そこで本研究では、ラットにおける咬合支持の喪失と飼育飼料形態の変更が中枢神経系へ及ぼす影響を検討するために、受動的回避反応実験による反応潜時の測定、海馬、大脳皮質および線条体におけるAChならびDA濃度の測定、中脳腹側被蓋野におけるDA作動性ニューロン数の測定を行った。

II. 方法と材料

1. 実験動物と飼育方法

実験には、Wistar系雄性ラット54匹を用い、全実験期間を通して固形飼料にて飼育した固形飼料群と、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粉末飼料群、および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臼歯切除群の3群を設定した。なお、飼育に際しては、各群ともに1ケージあたり2匹ずつとし、飼料と水は自由摂取とした。

2. 受動的回避反応

実験動物が40週齢になった時点で、各群12匹については、ステップスルー型受動的回避反応測定装置を用いて学習・記憶実験を行った。すなわち、明室と暗室に2分され、暗室への進入を弱電流で阻止する装置により、一度、暗室での電気ショックを受けた経験のある夜行性であるラットがその記憶をどの位の期間保持していることができるか、換言すると、電気ショックを経験したラットが明室から暗室に入るまでの時間(反応潜時)を測定した。なお、その測定は、電気ショックの記憶を獲得した翌日である1日目から、2日目、3日目、4日目、7日目に行った。

3. 脳内ACh濃度およびDA濃度の測定

受動的回避反応実験の終了後、脳内ACh濃度およびDA濃度の測定を行った。すなわち、ラット全身にマイクロウェーブを照射した後、脳を全摘出し、Glowinskiらの方法に基づいて海馬、大脳皮質および線条体を採り出し、 -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ACh定量にはエチルホモコリンを、DA定量には3,4-ジヒドロキシベンジルアミンを加え

て、遠心分離を行った。そして、上清を濾過し、濾液中のACh濃度およびDA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、測定値を組織重量にて補正し、ACh濃度を「nmol/mg wet tissue」、DA濃度を「ng/mg wet tissue」として表示し、各群の平均値を求めた。

4. 腹側被蓋野におけるDA作動性ニューロン数の測定

各群の残り6匹については、腹側被蓋野におけるチロシンヒドロキシラーゼ抗体(以下TH抗体とする)陽性に反応するDA作動性ニューロン数を免疫組織学的技法により観察・測定した。すなわち、40週齢になった時点で、全身麻酔下にて灌流固定を行い、直ちに脳の全摘出を行った後、厚さ $15\mu\text{m}$ の凍結切片を作成した。その後、得られた切片について、一次抗体としてanti-THモノクローナル抗体を用い、発色させた標本を光線顕微鏡により観察した。なお、1匹における連続する12枚の切片のDA作動性ニューロン数を算出し、各群の平均値を求めた。

5. 統計処理

測定値間の統計処理においては、各群間における平均値の差を一元配置分散分析およびDuncan multiple range testにより検定した。

III. 結果と考察

1. 受動的回避反応について

臼歯切除群における4日目および7日目の反応潜時には、固形飼料群に比しての有意な短縮が認められた($p < 0.05$)。なお、受動的回避反応実験は、記憶・学習に関する行動学的検索法の一つであり、「反応潜時」は、記憶の保持機能を評価するパラメーターとして用いられている。本研究の結果から、ラットにおける咬合支持の喪失と粉末飼料飼育への変更が記憶保持機能に傷害をもたらす可能性が示唆された。

2. 海馬、大脳皮質および線条体におけるACh濃度およびDA濃度について

臼歯切除群および粉末飼料群における海馬および大脳皮質のACh濃度には、固形飼料群に比しての有意な減少が認められた($p < 0.05$)。また、臼歯切除群における大脳皮質のDA濃度には、固形飼料群及び粉末飼料群に比しての有意な減少が認められた($p < 0.05$)。本研究の結果から、顎口腔系からの求心性情報の障害が記憶・学習機能に関与するAChやDAの合成能を低下させる可能性が示唆された。

3. DA作動性ニューロン数について

臼歯切除群および粉末飼料群における中脳腹側被蓋野のDA作動性ニューロン数には、固形飼料群に比しての

有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。なお、咀嚼運動に関与する大脳基底核は興奮性神経伝達物質に入力を大脳皮質から受け、視床を介して大脳皮質に、また、黒質を介して上丘や脳幹網様体へ出力していることが報告されている。本研究の結果から、咬合支持の喪失と粉末飼料飼育によって引き起こされる咀嚼運動の障害が大脳皮質および大脳基底核の神経連絡に影響を及ぼし、腹側被蓋野におけるDA作動性ニューロン数の減少を引き起こしたことが推測される。

学位論文審査の要旨

近年、国民の健康に対する関心は非常に高く、生活の質 (QOL) の維持・向上の必要性や積極的健康 (positive health) の意識が高まってきている。このようななか、厚生省は昨年4月から、痴呆や寝たきりにならない状態で生活できる期間 (健康寿命) を延伸させることなどを目標として、「健康日本21」と命名した健康づくり運動を推進している。このなかには、「歯の健康」が「改善目標対象分野」の一つとして設定されており、咀嚼機能の維持の重要性が強調されている。

咬合や咀嚼と脳機能との関連に関しては、ラットにおける臼歯切除による咬合支持の喪失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、アセチルコリン (以下、ACh) 合成能を低下させることが示唆されている。さらに、アルツハイマー型老人痴呆患者の死後脳におけるMeynert核のACh合成酵素活性の低下が報告され、歯の喪失が本疾患の危険因子の一つとして挙げられている。一方、ドーパミン (以下、DA) 機能異常が記憶機能を含む認知機能障害に関連していること、前頭前野のDAの枯渇により空間記憶が障害されることなどが報告されている。

以上の結果から、ラットにおける咬合支持の喪失と粉末飼料飼育による中枢神経系への求心性情報の障害が海馬および大脳皮質におけるアセチルコリン合成能の低下と、中脳腹側被蓋野におけるドーパミン作動性ニューロン数の減少、さらには大脳皮質へのドーパミン性入力の低下を引き起こすことによって、記憶・学習行動に影響を及ぼす可能性が示唆された。

本研究は、ラットにおける咬合支持の喪失と飼育飼料形態の変更が学習・記憶機能に及ぼす影響について検討したものであり、今後解明されるべき最重要課題の一つである。

申請者は、咬合支持と飼育飼料形態の異なるラット群を設定し、生化学的解析、免疫組織学的解析、行動学的解析を行い、咬合支持の喪失と粉末飼料飼育による求心性情報の障害が、海馬および大脳皮質におけるACh合成能の低下、大脳皮質への入力に関与する中脳腹側被蓋野にあるDA作動性ニューロンの数の減少、受動的回避反応実験における反応潜時の短縮を確認した。これらの結果から、歯の喪失とそれに伴う咀嚼機能の変化が記憶・学習行動に影響を及ぼす可能性を示唆した。

周到な研究計画の立案および複雑な種々の実験の遂行と多くの参考文献の検索によって制作された本学位論文には、申請者の大いなる努力の跡が認められる。加えて、本研究によって得られた結果は、歯科医学のみならず、健康科学ならびに関連諸学科の進歩と発展に寄与するところが大きいと判断される。

審査の結果、本論文は学位授与に値すると判定した。