

# 学位論文

歯の喪失および食形態の違いが  
マウスの学習・記憶能に及ぼす影響

学位申請者 竹田 洋輔

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

医歯薬学専攻

(主指導教員：津賀一弘教授)

平成28年度



歯の喪失および食形態の違いが マウスの学習・記憶能に及ぼす影響

竹田 洋輔

Molar loss and powder diet leads to memory impairment in adult mice.

Yosuke Takeda

緒言

世界的な高齢社会を迎え、要介護の原因として認知症が大きな問題となっている。様々な研究から認知症と口腔衛生の関連が指摘されており、認知症患者は健常者と比較するとう蝕、歯周病、喪失歯が多いこと<sup>1-3)</sup>、装着義歯が不安定であり義歯および残存歯の清掃が不良であること<sup>4)</sup>が報告されていることから、認知症は口腔内環境を悪化させると考えられている。一方で、近年、口腔衛生および咀嚼機能の保持は口腔機能だけでなく、全身疾患や脳機能にも影響を与えると考えられ始めており<sup>5-7)</sup>、口腔衛生と認知機能障害との関連が注目されている。

これまでの研究から歯の喪失はアルツハイマー病の危険因子として挙げられ

ており<sup>8)</sup>、施設に入所する高齢者は、残存歯数が少ないほど認知機能検査の点数が低下したこと<sup>9)</sup>。また、少数の残存歯もしくは義歯の不使用者は、残存歯が20歯以上ある人と比較し、認知症のリスクが1.85倍に上昇することが報告されている<sup>10)</sup>。また、動物研究では、歯の喪失を含めた口腔機能障害が記憶障害を引き起こすことが示唆されており、咬合支持の喪失は海馬アセチルコリン濃度の低下から記憶保持能力を低下させること<sup>11)</sup>、さらに、歯の喪失が海馬錐体細胞の脱落の惹起によりアルツハイマー病の発症に影響を及ぼすこと<sup>12)</sup>が報告されている。また、刺激の乏しい環境下で長期間飼育したマウスは学習能率が低下すること<sup>13)</sup>や、ストレスへの長期的暴露は神経細胞の新生を抑制し、学習・記憶能を低下させる<sup>14)</sup>など長期的な刺激が脳に及ぼす影響も報告されている。しかしながら、口腔と脳の関係については、短期的な影響の報告が多く、長期的観察を行った動物研究はほとんど見当たらない。

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor : BDNF) は、神経成長因子の一種であり、中枢神経系に広く分布し、海馬の学習・記憶過程の制御に重要な役割を有する<sup>15)</sup>として近年、注目を集めている。BDNFは海馬シナプスの構造および機能的可塑性に関与する重要な物質である<sup>15)</sup>。加えて、BDNFの精神神経疾患への関与についても、アルツハイマー病やパーキンソン病患者のBDNFは健常者と比較すると有意に少ないこと<sup>16,17)</sup>、アルツハイマー病患者に認められるBDNFの減少は認知症の重症度と相関すること<sup>18)</sup>が報告され、BDNFは脳の機能的バイオマーカーであると考えられている。

BDNFは、視床下部室傍核への発現によって、摂食とエネルギー代謝に関与すると考えられている<sup>19)</sup>。また、BDNFの活性はinsulin receptor substrate-1 (IRS-1)、phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ )、protein kinase B (PKB, Akt)の活性化に関与するとされており、BDNFの高親和性受容体であるtyrosine

receptor kinase B (TrkB) と結合することで、神経伝達経路を活性化し、神経回路網の形成や発達、安定に重要な役割を担っている<sup>20)</sup>。いくつかのマウスやラットを用いた動物実験による検討では、TrkB は歯の喪失によって減少すること<sup>21)</sup>、液体飼料によって咀嚼運動が減少し、学習・記憶能の低下および BDNF 関連タンパクの変動を生じること<sup>22)</sup>が報告されており、歯の喪失および軟性飼料の摂取が BDNF の発現に影響を及ぼすことが示唆されている。

一方、噛めないと実感している人は、残存歯数が少なく軟性食品を多く摂取する傾向にあること<sup>23)</sup>や、普通食を食べている施設高齢者の割合は、残存歯が 20 歯以上の人で 84.8%であるのに対し、0 歯の人は 54.5%であったこと<sup>24)</sup>から、歯の喪失や咀嚼機能の低下により、食形態を変更している事例が多くみられる。しかしながら、歯の喪失および食形態の両方を実験条件として変化させて認知機能に及ぼす影響を検討した研究は見当たらない。

本研究では咀嚼機能と認知機能との関連をより詳細に明らかにするため、BDNF とその高親和性受容体である TrkB に着目し、咀嚼機能に深く関わる歯の喪失と食形態の変化がマウスの学習・記憶能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究は、広島大学動物実験規則に従って計画し、同大学動物実験委員会の承認の上で遂行した。(承認番号：A13-81)

## 材料および方法

研究 1 歯の喪失および食形態の違いが学習・記憶能に短期的に及ぼす影響の検討

## 実験動物の調製

実験動物には 28 週齢の雄性 C57 BL/6J マウス 60 匹を使用した。飼育室の室温は  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  とし、12 時間の明暗サイクルとした。飼育は設定飼料と水道水摂取により行った。生後 28 週齢の時点でペントバルビタール  $35 \text{ mg/kg}$ （ネンブタール、共立製薬）の腹腔内投与を行い、全身麻酔のみの維持群と、全身麻酔下で、耳小骨鉗子を用いて上顎両側臼歯部を抜歯した喪失群を設定した。さらに、ペレット状の固形飼料を与えた固形群と、固形飼料と同様の栄養を含む粉末飼料を与えた粉末群を設定した。すなわち、マウスは維持/固形群（ $n = 15$ ）、維持/粉末群（ $n = 15$ ）、喪失/固形群（ $n = 15$ ）、喪失/粉末群（ $n = 15$ ）の 4 群として調製した。

## 実験スケジュール（図 1）

実験期間は 28 週齢から 32 週齢までの 4 週間とした。各マウスは歯の喪失および食形態の変更による全身状態への影響を評価するため、実験期間中 1 週間隔で体重、飼料摂取量を測定した。32 週齢の時点で、学習・記憶能の測定を行い、その後に、実験動物を屠殺し、組織切片の作製あるいは Real-time PCR 分析を行った。

## 学習・記憶能の評価

学習・記憶能を評価する行動実験は 32 週齢の時点で行った。この行動実験には、マウスが移動できるよう明室と暗室がギロチンドアで連結されているステップスルー型受動的回避試験装置（MANUAL STEP-THROUGH TEST SYSTEM FOR MOUSE MODEL MST-01SM, 室町機械）を用いた（図 2）。まず、マウスをこの装置の明室に投入し、暗室に移動し終わった時間を計測して、これを反応潜時時間とした。次いで、暗室に移動したところで電気ショッ

ク (3 mA, 3 s) を与え, マウスには暗室に入室したら嫌悪刺激を受けるとの記憶を獲得させた (獲得試行). 獲得試行の 24 時間後, 再度マウスを明室に投入し, 暗室に移動する反応潜時時間を計測した (保持試行). なお, 暗室に入室しないと判断した最大観察時間としてのカットオフ値を 300 s に設定した<sup>12)</sup>.

#### 錐体細胞数の計測

屠殺後, 採取した脳をパラホルムアルデヒドで固定後, 脱水を経てパラフィン包埋し, 約 10  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製した. この切片を通法により脱パラフィン処理し, Nissle 染色を施した後, 海馬 CA1 および CA3 領域の錐体細胞数を算出した. すなわち, cresyl violet 水溶液に浸漬, 脱水封入を行った標本を蛍光顕微鏡 (HS オールインワン顕微鏡, BZ-9000, キーエンス) にて明視野で画像をコンピューター (Hewlett-Packard Company) に取り込んだ後, 海馬 CA1 領域では 100  $\mu\text{m}$   $\times$  300  $\mu\text{m}$ , CA3 領域では 200  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$  の観察領域を設定して (図 3), 各領域内の錐体細胞数を計測した<sup>12, 25)</sup>.

#### BDNF, TrkB 染色像の観察

Nissle 染色と同様に切片を脱パラフィン処理し, 抗 BDNF 抗体, 抗 TrkB 抗体を用いた免疫組織染色を施して光顕的に観察した. 免疫組織化学染色はスキムミルクでブロッキング処理を行い, 1 次抗体として抗 BDNF 抗体 (Rabbit polyclonal to BDNF, ab101752, abcam), 抗 TrkB 抗体 (Rabbit polyclonal to TrkB, ab33655, abcam) を用い, ビオチン標識 2 次抗体を反応させた. 次いでアビジン-ビオチン標識酵素複合体を反応させた後, 酵素基質溶液 (Impact DAB, Vector Laboratories) を用いて, 反応させた. 得られた標本を蛍光顕微鏡にて明視野でコンピューターに取り込んだ後, 海馬 CA1 および CA3 領域を光顕的に

観察した。

### Real-time PCR による分析

マウスの脳を取り出し、海馬、視床下部の2つの部位に切離し、 $-80^{\circ}\text{C}$ の液体窒素内で急速冷凍した。各組織より total RNA は RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した total RNA は SuperScript III (Invitrogen), oligo (dT) 20 プライマーを用いて逆転写反応により cDNA を合成した。BDNF (F 5'-CGACGACATCACTGGCTGACA-3', R 5'-CCAAAGGCACTTGACTGC GAG-3'), TrkB (F 5'-CAAGAACGAGTATGGGAAGGATGAG- 3', R 5'-TTGG CGTGGTCCAGTCTTCATA-3'), および内部標準遺伝子として用いたグリセルアルデヒド3リン酸化脱水素酵素 (Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase, GAPDH, F 5'-GTAGACAAAATGGTGAAGGTCGGT-3', R 5'-ACAATCTCCAC TTTGCCACTGC-3') のプライマーを鋳型とし、cDNA に対し Stratagene Mx3000P QPCR system (Agilent Technologies) を用いて、DNA の変性を  $95^{\circ}\text{C}$ , 15 s, アニーリングを  $60^{\circ}\text{C}$ , 1 分間の条件下で 40 サイクル行った。遺伝子の増幅反応の検出には THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。PCR 終了後、遺伝子増幅のモニタリング結果から Ct 値を得た。各遺伝子発現量は  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法により算出した。

### 統計学的分析

学習・記憶能の変化は Mann-Whitney  $U$  検定、群間比較は二元配置分散分析および Tukey 検定を用いて統計学的に分析した。有意水準はいずれも危険率 5% とした。



## 研究 2 歯の喪失および食形態の違いが学習・記憶能に長期的に及ぼす影響を 検討

### 実験動物の調製

実験動物には 28 週齢の雄性 C57 BL/6J マウス 64 匹を使用した。飼育室の室温は  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  とし、12 時間の明暗サイクルとした。飼育は設定飼料と水道水摂取により行った。実験 1 と同様に、生後 28 週齢の時点ですべてのマウスは維持/固形群 ( $n = 16$ )、維持/粉末群 ( $n = 16$ )、喪失/固形群 ( $n = 16$ )、喪失/粉末群 ( $n = 16$ ) の 4 群として調製した。

### 実験スケジュール (図 4)

実験期間は 28 週齢から 44 週齢までの 16 週間とした。各マウスは歯の喪失および食形態の変更による全身状態への影響を評価するため、実験期間中 1 週間隔で体重、飼料摂取量の測定を行った。44 週齢の時点で、学習・記憶能の測定を行い、その後に、実験動物を屠殺し、組織切片の作製あるいは Real-time PCR 分析を行った。

### 学習・記憶能の評価および組織学的評価

評価項目は実験 1 と同様に体重および飼料摂取量、学習・記憶能、錐体細胞数、BDNF、TrkB 染色像の観察、BDNF、TrkB の mRNA 発現量を評価した。

### 統計学的分析

学習・記憶能の変化は Mann-Whitney  $U$  検定、群間比較は二元配置分散分析および Tukey 検定を用いて統計学的に分析した。有意水準はいずれも危険率 5% とした。

## 結果

### 研究 1 歯の喪失および食形態の違いが学習・記憶能に短期的に及ぼす影響の検討

#### 体重および飼料摂取量

体重および飼料摂取量はほぼ一定に推移し、すべての群間に有意な差を認めなかった (図 5).

#### ステップスルー型受動的回避試験

すべての群で獲得試行と比較して、保持試行での反応潜時時間が延長しており有意差を認めた。すなわち、すべての群に学習・記憶能の低下は認めなかった (図 6).

加えて、各群の獲得試行時の反応潜時時間を比較すると、各群に有意差は認めなかった。また、各群の保持試行時の反応潜時時間を比較すると、同飼料群では維持群よりも、喪失群で有意な低下を認めた (図 7).

二元配置分散分析で保持試行時の各群を比較した結果、歯の喪失による影響： $F(1, 44) = 9.79$ ,  $P < 0.05$ , 食形態の変更による影響： $F(1, 44) = 0.81$ ,  $P = 0.37$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響： $F(1, 44) = 0.00$ ,  $P = 0.96$  となり、反応潜時時間の低下は、歯の喪失による有意な影響を認めた。

#### 錐体細胞数

海馬 CA1 領域では、固形飼料群で歯の喪失の影響によって錐体細胞数は有意な減少を認めた (図 8).

海馬 CA3 領域では、喪失群で錐体細胞数が減少し、同飼料群で歯の喪失による影響を認めた (図 9).

二元配置分散分析で各群を比較した結果、海馬 CA1 領域では、歯の喪失による影響:  $F(1, 20) = 12.52$ ,  $P < 0.01$ , 食形態の変更による影響:  $F(1, 20) = 1.36$ ,  $P = 0.26$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響:  $F(1, 20) = 0.91$ ,  $P = 0.35$  となり、歯の喪失による有意な影響を認めた. 海馬 CA3 領域では、歯の喪失による影響:  $F(1, 20) = 15.79$ ,  $P < 0.01$ , 食形態の変更による影響:  $F(1, 20) = 2.57$ ,  $P = 0.12$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響:  $F(1, 20) = 0.01$ ,  $P = 0.94$  となり、歯の喪失による有意な影響を認めた.

#### BDNF, TrkB 染色像の観察

##### BDNF 染色像 (図 10, 11)

海馬 CA1 領域では、すべての群は同程度の染色像を示した.

海馬 CA3 領域では、維持群と比較して喪失群で BDNF 発現の減少が観察された.

##### TrkB 染色像 (図 12, 13)

海馬 CA1 領域の観察から、すべての群で同程度の染色像を示した.

海馬 CA3 領域の観察から、喪失群で TrkB 発現の減少傾向を認め、特に維持/粉末群と比較すると喪失/粉末群では、TrkB 発現の減少が観察された.

#### 遺伝子発現量

##### 視床下部 (図 14)

BDNF, TrkB 遺伝子発現量は、各群に有意差は認めなかった.

二元配置分散分析で各群を比較した結果、BDNF 遺伝子発現量では、歯の喪

失による影響 :  $F(1, 20) = 0.53$ ,  $P = 0.48$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 20) = 0.14$ ,  $P = 0.71$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響 :  $F(1, 20) = 0.05$ ,  $P = 0.82$ , TrkB 遺伝子発現量では, 歯の喪失による影響 :  $F(1, 20) = 0.05$ ,  $P = 0.82$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 20) = 0.00$ ,  $P = 0.98$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響 :  $F(1, 20) = 0.08$ ,  $P = 0.78$  となり, それぞれの因子による有意な影響を認めなかった.

海馬 (図 15)

BDNF 遺伝子発現量は, 粉末群では維持群と比較して喪失群で有意に減少し, 喪失群では固形飼料と比較して粉末飼料を摂取することによって有意に減少した.

TrkB 遺伝子発現量は, 各群に有意差を認めなかった.

二元配置分散分析で各群を比較した結果, BDNF 遺伝子発現量では, 歯の喪失による影響 :  $F(1, 20) = 4.36$ ,  $P = 0.05$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 20) = 1.19$ ,  $P = 0.29$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響 :  $F(1, 20) = 1.08$ ,  $P = 0.31$ , TrkB 遺伝子発現量では, 歯の喪失による影響 :  $F(1, 20) = 0.48$ ,  $P = 0.50$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 20) = 0.00$ ,  $P = 0.99$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響,  $F(1, 20) = 0.04$ ,  $P = 0.85$  となり, それぞれの因子による有意な影響を認めなかった.

研究 2 歯の喪失および食形態の違いが学習・記憶能に長期的に及ぼす影響の検討

体重および飼料摂取量

体重および飼料摂取量はほぼ一定に推移し, すべての群間に有意な差を認め

なかった (図 16).

#### ステップスルー型受動的回避試験

維持/固形群と維持/粉末群は、獲得試行と比較して保持試行での反応潜時時間が延長しており有意差を認めた。したがって、維持/固形群と維持/粉末群には学習・記憶能の低下を認めなかった。一方で、喪失/固形群と喪失/粉末群は、獲得試行と比較して保持試行での反応潜時時間に有意差は認めなかった。したがって、喪失/固形群と喪失/粉末群では学習・記憶能の低下を認めた (図 17)。

加えて、各群の獲得試行時の反応潜時時間に有意差は認めなかった。また、各群の保持試行時の反応潜時時間は、同飼料群では維持群よりも喪失群で有意な低下を認め、維持群では粉末飼料に変更することで有意な低下を認めた。さらに、カットオフ値である 300 s に到達したマウスは観察されなかった (図 18)。

二元配置分散分析で保持試行時の各群を比較した結果、歯の喪失による影響： $F(1, 40) = 31.09$ ,  $P < 0.05$ , 食形態の変更による影響： $F(1, 40) = 0.70$ ,  $P = 0.41$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響： $F(1, 40) = 6.23$ ,  $P < 0.05$ , となり、反応潜時時間の低下は、歯の喪失による有意な影響を認めるとともに、歯の喪失と食形態の変更との交互作用による影響を認めた。

#### 錐体細胞数

海馬 CA1 領域では、歯の喪失によって錐体細胞数の減少を認め、維持群では粉末飼料への変更によって錐体細胞は有意に減少した (図 19)。

海馬 CA3 領域では、喪失群での錐体細胞数が減少を示し、同飼料群で歯の喪失による影響を認めた。さらに組織像では、喪失群での錐体細胞が萎縮している像が観察された (図 20)。

二元配置分散分析で各群を比較した結果、海馬 CA1 領域では、歯の喪失による影響： $F(1, 20) = 70.93$ ,  $P < 0.01$ , 食形態の変更による影響： $F(1, 20) = 42.75$ ,  $P < 0.01$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響： $F(1, 20) = 8.72$ ,  $P < 0.01$  となり、歯の喪失および食形態の変更による有意な影響を認めるとともに、歯の喪失と食形態の変更との交互作用による影響を認めた。海馬 CA3 領域では、歯の喪失による影響： $F(1, 20) = 16.57$ ,  $P < 0.01$ , 食形態の変更による影響： $F(1, 20) = 3.13$ ,  $P = 0.09$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響： $F(1, 20) = 0.35$ ,  $P = 0.56$  となり、歯の喪失による有意な影響を認めた。

#### BDNF, TrkB 染色像の観察

##### BDNF 染色像 (図 21, 22)

海馬 CA1 領域では、すべての群で同程度の染色像を示した。

海馬 CA3 領域では、維持群と比較すると喪失群で BDNF 発現の増加が観察された。

##### TrkB 染色像 (図 23, 24)

海馬 CA1 領域では、すべての群で同程度の染色像を示した。

海馬 CA3 領域では、維持群と比較すると喪失群で TrkB 発現の減少が観察された。

#### 遺伝子発現量

##### 視床下部 (図 25)

BDNF 遺伝子発現量は同飼料群では歯の喪失による影響で有意に減少した。

TrkB 遺伝子発現量は各群に有意差は認めなかった。

二元配置分散分析で各群を比較した結果、BDNF 遺伝子発現量では、歯の喪

失による影響 :  $F(1, 28) = 16.71$ ,  $P < 0.05$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 28) = 1.13$ ,  $P = 0.30$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響 :  $F(1, 28) = 0.86$ ,  $P = 0.36$  となり, 歯の喪失による有意な影響を認めた. **TrkB** 遺伝子発現量では, 歯の喪失による影響 :  $F(1, 28) = 0.14$ ,  $P = 0.71$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 28) = 0.33$ ,  $P = 0.57$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響 :  $F(1, 28) = 0.38$ ,  $P = 0.55$  となり, それぞれの因子による有意な影響を認めなかった.

海馬 (図 26)

**BDNF** 遺伝子発現量は同飼料群では歯の喪失による影響で有意に減少し, 喪失群では固形飼料と比較して粉末飼料を摂取することによって有意に減少した.

**TrkB** 遺伝子発現量は維持/固形群では, 粉末群および喪失群への変更により有意に減少した.

二元配置分散分析で各群を比較した結果, **BDNF** 遺伝子発現量では, 歯の喪失による影響 :  $F(1, 32) = 45.37$ ,  $P < 0.05$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 32) = 0.37$ ,  $P = 0.54$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響 :  $F(1, 32) = 8.80$ ,  $P < 0.05$  となり, 歯の喪失による有意な影響を認めるとともに, 歯の喪失と食形態の変更との交互作用による影響を認めた. **TrkB** 遺伝子発現量では, 歯の喪失による影響 :  $F(1, 32) = 3.50$ ,  $P = 0.07$ , 食形態の変更による影響 :  $F(1, 32) = 0.26$ ,  $P = 0.87$ , 歯の喪失 × 食形態の変更による影響 :  $F(1, 32) = 8.21$ ,  $P < 0.05$  となり, 歯の喪失と食形態の変更との交互作用による影響を認めた.

## 考察

本研究では、実験的に歯の喪失および食形態の変化を生じさせた成熟期のマウスを調製したが、これは臨床モデルとしては、う蝕、歯周病により生じた歯の喪失によって咀嚼機能が低下した患者を想定したものである。

ヒトに関する研究では、咬合の不調和は脳の神経細胞を減少させ、記憶能力の障害を引き起こすことが示唆されている<sup>2, 26)</sup>。一方、動物研究では、成長期の臼歯の喪失や軟性食は、成長に悪影響を及ぼすことが示唆されている<sup>22, 27)</sup>。しかしながら、歯の喪失および食形態の違いにより生じる咀嚼機能の変化が脳に及ぼす影響を検討した研究はみられない。

従来、歯の喪失が一定の水準を超えると咀嚼機能の低下により、軟性食品の選択傾向が生じると考えられている<sup>28)</sup>。過去の動物研究では、臼歯の喪失が脳に及ぼす影響について、主に成長期のマウスもしくはトランスジェニックマウスが使用されてきた<sup>29, 30)</sup>。本研究では、成人での歯の喪失および軟性食品摂取の影響に着目するため、成熟期のマウスを使用した。C57BL/6J マウスの体重は20週齢まで増加することが知られている。20週齢後の28週齢まで体重の増加は安定したことから、我々は体重変化による影響を除外するため、28週齢で臼歯を抜去した。

過去の報告には、対照群と比較して臼歯を喪失した群および軟性飼料を与えた群の体重は、有意に低下した<sup>31, 32)</sup>もの、軟性飼料および液体飼料の摂取による体重の有意な変化は示さなかった<sup>22)</sup>ものの両者が見られる。本研究では体重および飼料摂取量を測定した結果、ともに有意な変化は認めなかった。この結果は、マウスが他の研究よりも成熟していたことで成長や加齢への影響が少なかったと考えられる。



今回の結果からは、長期的な歯の喪失は BDNF 遺伝子発現の減少を引き起こすことが明らかとなった。BDNF およびその高親和性受容体である TrkB は摂食および自発的行動に関与する視床下部に多く発現する<sup>20)</sup>ことが知られており、BDNF は摂食抑制もしくはエネルギー代謝に重要な役割を有すると考えられている。視床下部は摂食行動や体重制御に関与することが知られており、継続的に神経細胞の新生を生じることが示唆されている<sup>20, 33)</sup>。さらに、軟性飼料を摂取させたマウスの視床下部では神経細胞の増殖が低下すると報告されている<sup>34)</sup>。すなわち、歯の喪失は BDNF の発現に影響を及ぼし生体恒常性を障害する可能性がある。しかしながら、長期間観察した喪失群のマウスでは体重および飼料摂取量には有意な変化を認めなかった。したがって、さらに長期の観察を行うことによって体重、飼料摂取量に影響を及ぼすことも考えられる。また、視床下部はストレス反応の中核であり、特に視床下部室傍核ではストレスに応答して様々な神経ペプチド、ホルモンが産生・分泌され、生体のストレス反応に対して重要な役割を担っている。これまで、ストレスが臼歯の喪失や咬合の不調和に関与し、学習・記憶能を障害すると報告されている<sup>31, 35)</sup>。しかしながら、口腔機能の変化によって生じるストレスが視床下部に及ぼす影響は未だ明らかになっていない。

8 方向放射状迷路や水迷路のような多くの行動実験が、学習・記憶能の測定に用いられている<sup>36, 37)</sup>。これらのテストは、BDNF の発現に影響する自発的行動を必要とする<sup>38)</sup>。我々が用いたステップスルー型受動的回避試験は、自発的行動の影響を除外し、他の行動実験よりも簡便であるとされている。短期的観察では、すべての群は学習記憶能の低下は示さなかった。しかしながら、長期的観察では、喪失/固形群と喪失/粉末群で学習・記憶能の低下を示した。これらの結果から成熟期のマウスにおいて短期的な歯の喪失では学習・記憶能低下を生

じない一方、長期的な歯の喪失は学習・記憶能の低下を生じる可能性がある。さらに獲得試行と保持試行の反応潜時時間を各群で比較した結果、保持試行では歯の喪失および粉末飼料の摂取によって反応潜時時間の有意な減少を認めた。これらの観察から学習・記憶能障害を引き起こすには、軟性飼料の摂取よりも歯の喪失が大きく影響することが明らかとなった。現在、抜歯もしくは液体飼料摂取により生じた口腔領域の感覚性刺激の減少は、記憶障害を誘発すると考えられている<sup>22, 31)</sup>。しかしながら、成熟期のマウスでは、脳のシナプス間の連結が既に成熟している為、短期的な感覚性刺激の減少では記憶能障害を生じなかった可能性が示唆される。成熟期のマウスの臼歯を抜歯し、4週間飼育した結果、学習・記憶能障害が生じたと報告もある<sup>31, 39)</sup>。しかしながら、これらの研究では、トランスジェニックマウスを用いており、老化促進マウスやトランスジェニックマウスは、ノーマルマウスとは異なる成長過程を辿ることが影響していると考えられる。

海馬は記憶に重要な役割を有しており、海馬 CA1, CA3 領域における錐体細胞の減少や萎縮は、記憶能の障害を生じることが示唆されている<sup>40)</sup>。したがって、本研究では、海馬 CA1, CA3 領域の錐体細胞数を評価した。その結果、喪失群は4週間および16週間の実験期間で、海馬 CA1, CA3 領域における錐体細胞の減少を認めた。また、固形群と比較して粉末群での錐体細胞数は減少した。さらに、BDNF および TrkB の遺伝子発現量は維持群と比較して喪失群で減少傾向を示した。短期的観察では、歯の喪失による影響を認めたが、粉末飼料摂取による影響はほとんど認めなかった。しかし、長期的観察では、歯の喪失と粉末飼料の摂取によって BDNF, TrkB 遺伝子発現量、錐体細胞数が減少した。この結果は、歯の喪失と比較して粉末飼料摂取の影響が少ないことを示している。これまで、歯を喪失し、歯根膜が喪失することにより歯根膜咬筋反射

が消失し、咬合力を増強できなくなること、閉口筋の活動が弱くなり十分に噛みしめられないこと<sup>41-43)</sup>が報告されており、結果として求心性の刺激の減少が生じるとされている。したがって、歯根膜刺激の有無が脳に大きな影響を与えていることを示唆している。また、短期的観察では、喪失群でも学習・記憶能に変化は生じなかった。一方で、長期的観察では、喪失群の学習記憶能が低下を示した。マウスの臼歯を抜歯し、空間記憶学習能を評価した研究において、抜歯後1週間では、コントロール群と抜歯群に差はなかったが、抜歯7週目になるとコントロール群に比べ抜歯群の成績が低下したと報告している<sup>44)</sup>。また、窪田らはサルの臼歯を抜歯した場合、歯槽骨神経は変性するが、抜歯の影響が中枢へ現れるのは他の組織と比較してかなり遅いと報告している<sup>45)</sup>。したがって、本研究の結果では、学習・記憶能障害の顕在化と脳の構造的変化にタイムラグが生じていたと考えられる。

本研究では、Real-time PCR とともに免疫組織化学染色によって、海馬における BDNF, TrkB 染色像の観察を行った。その結果、短期的観察では、海馬 CA3 領域において喪失群の BDNF, TrkB 発現の減少を認めた。したがって、BDNF, TrkB 発現の減少が錐体細胞の減少に影響を及ぼしていることが示唆された。興味深いことに、長期的観察では、海馬 CA3 領域の BDNF 発現は増加した。Okihara らは、成長期に液体飼料を与えて飼育したマウスの海馬 BDNF をウエスタンブロッティングで測定したところ、対照群と比較して BDNF 発現が増加したと報告している<sup>22)</sup>。また、坐骨神経損傷時に骨髄由来細胞が損傷組織周囲に集積し、BDNF を合成および分泌していることが報告されており<sup>46)</sup>、BDNF が損傷部位に対して神経の修復や保護を行っていることが示唆されている。以上より、海馬においても歯の喪失による咀嚼機能の低下から生じる神経細胞の損傷が一定の水準を超えると、損傷組織で BDNF の合成が増加し、神経

組織の修復に作用している可能性が考えられる。

臼歯の喪失は血中コルチコステロンを上昇させ<sup>47, 48)</sup>、空間記憶能の障害を引き起こす<sup>36)</sup>と報告されている。ストレスやコルチコステロンの増加は、海馬での神経細胞増殖能を低下すると考えられている<sup>49-51)</sup>。また、軟性飼料の摂取により血漿コルチコステロンの値の増加が示唆されている<sup>52-54)</sup>。さらに、軟性飼料をラットに与える実験では、海馬のドーパミン放出の減少により酸化ストレスを高めるとされる<sup>55)</sup>。一方で、ラットに液体飼料や軟性飼料を与えた研究では、ストレスに有意差を認めておらず、一貫性のない結果となっている<sup>35)</sup>。我々は予備研究で、マウス臼歯の抜歯を行い、ストレスのマーカである血中コルチコステロンを測定した。その結果、対照群と比較し臼歯を抜歯したマウスでは、抜歯当日の血中コルチコステロンの値は上昇傾向を示したものの、徐々に低下し、抜歯後 1 ヶ月まで測定を行ったが、どの時点でも有意差は認めなかった。したがって、本研究では、抜歯による全身的ストレスは生じなかったと考えられる。しかしながら、口腔環境の変化により生じるストレスが脳に及ぼす影響はさらなる検討を行う必要がある。

## 総括

歯の喪失および食形態の違いは短期間と長期間で脳に及ぼす影響が異なることが明らかとなり、歯の喪失および食形態の違いと学習・記憶能との関連の一端が明らかとなった。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門（先端歯科補綴学）津賀一弘教授に深甚なる謝意を表します．また，御教示，御校閲を賜りました本学大学院医歯薬保健学研究院基礎生命科学部門（口腔生理学）杉田誠教授，統合健康科学部門（公衆口腔保健学）杉山勝教授，応用生命科学部門（先端歯科補綴学）安部倉仁講師，名古屋市立大学大学院医学研究科（病態生化学）道川誠教授ならびに本学赤川安正名誉教授に感謝の意を捧げます．また，本研究を行うにあたり，御助言，御協力を頂きました本学大学院医歯薬保健学研究院基礎生命科学部門（口腔顎顔面病理病態学）高田隆教授ならびに応用生命科学部門（先端歯科補綴学）吉川峰加准教授に深謝いたします．さらに研究遂行上および本論文作成上の御助言と御鞭撻を賜りました本学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門（先端歯科補綴学）是竹克紀診療講師ならびに大上博史助教に厚く御礼申し上げます．また，多くのご支援，ご協力を頂きました本学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門（先端歯科補綴学）の教室員の方々，特に研究遂行に御助力頂きました岡田信輔助教，河野聖先生，佐々木美和先生に感謝いたします．また最後に常に私を支えてくれた両親に感謝いたします．

## 参考文献

- 1) Avlund K, Holm-Pedersen P, Morse DE, Viitanen M, Winblad B. Tooth loss and caries prevalence in very old Swedish people: the relationship to cognitive function and functional ability. *Gerodontology* 2004; 21: 17-26.
- 2) Wu B, Plassman BL, Crout RJ, Liang J. Cognitive function and oral health among community-dwelling older adults. *J Gerontol* 2008; 63: 495-500.
- 3) Syrjälä AM, Ylöstalo P, Ruoppi P, Komulainen K, Hartikainen S, Sulkava R, Knuuttila M. Dementia and oral health among subjects aged 75 years or older. *Gerodontology* 2012; 29: 36-42.
- 4) Adam H, Preston AJ. The oral health of individuals with dementia in nursing homes. *Gerodontology* 2006; 23: 99-105.
- 5) Joshipura K. The relationship between oral conditions and ischemic stroke and peripheral vascular disease. *J Am Dent Assoc* 2002; 133: 23-30.
- 6) Watanabe K, Ozono S, Nishiyama K, Saito S, Tonosaki K, Fujita M, Onozuka M. The molarless condition in aged SAMP8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance. *Behav Brain Res* 2002; 128(1): 19-25.
- 7) Aberg F, Helenius-Hietala J, Meurman J, Isoniemi H. Association between dental infections and the clinical course of chronic liver disease. *Hepatol Res* 2014; 44(3): 349-353.

- 8) Kondo K, Niino M, Shido K. A case-control study of Alzheimer's disease in Japan - significance of life-styles. *Dementia* 1994; 5: 314-326.
- 9) Kaye EK, Valencia A, Baba N, Spiro A 3rd, Dietrich T, Garcia RI. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. *J Am Geriatr Soc* 2010; 58(4): 713-718.
- 10) Yamamoto T, Kondo K, Hirai H, Nakade M, Aida J, Hirata Y. Association between selfreported dental health status and onset of dementia: a 4-year prospective cohort study of older Japanese adults from the Aichi Gerontological Evaluation Study (AGES) Project. *Psychosom Med* 2012; 74: 241-248.
- 11) Terasawa H, Hirai T, Ninomiya T, Ikeda Y, Ishijima T, Yajima T, Hamaue N, Nagase Y, Kang Y, Minami M. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats: immunohistochemical and biochemical studies. *Neurosci Res* 2002; 43(4): 373-379.
- 12) Oue H, Miyamoto Y, Okada S, Koretake K, Jung CG, Michikawa M, Akagawa Y. Tooth loss induces memory impairment and neuronal cell loss in APP transgenic mice. *Behav Brain Res* 2013; 252: 318-325.
- 13) Diniz DG, Foro CA, Rego CM, Gloria DA, de Oliveira FR, Paes JM, de Sousa AA, Tokuhashi TP, Trindade LS, Turiel MC, Vasconcelos EG, Torres JB, Cunningham C, Perry VH, Vasconcelos PF, Diniz CW. Environmental impoverishment and aging alter object recognition,

- spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci* 2010; 32(3): 509-519.
- 14) McKim DB, Niraula A, Tarr AJ, Wohleb ES, Sheridan JF, Godbout JP. Neuroinflammatory dynamics underlie memory impairments after repeated social defeat. *J Neurosci* 2016; 36(9): 2590-2604.
  - 15) McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 295-318.
  - 16) Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 27(1): 1-39.
  - 17) Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 63(1): 71-124.
  - 18) Szeszko PR, Lipsky R, Mentschel C, Robinson D, Gunduz-Bruce H, Sevy S, Ashtari M, Napolitano B, Bilder RM, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry* 2005; 10(7): 631-636.
  - 19) Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 2000; 19(6): 1290-1300.
  - 20) Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci* 2015; 11(6): 1164-1178.
  - 21) Yamazaki K, Wakabayashi N, Kobayashi T, Suzuki T. Effect of tooth loss on spatial memory and trkB-mRNA levels in rats.



- Hippocampus 2008; 18(6): 542-547.
- 22) Okihara H, Ito J, Kokai S, Ishida T, Hiranuma M, Kato C, Yabushita T, Ishida K, Ono T, Michikawa M. Liquid diet induces memory impairment accompanied by a decreased number of hippocampal neurons in mice. *J Neurosci Res* 2014; 92(8): 1010-1017.
  - 23) Yamauchi T, Koide A. The relationship between masticatory ability and dietary intake in elderly. *Bull Nagoya Women's University* 2008; 54: 89-98.
  - 24) 佐々木勝忠. 口腔機能と栄養. *日本歯科医師会雑誌* 2013; 65: 72-73.
  - 25) Tsutsui K, Kaku M, Motokawa M, Tohma Y, Kawata T, Fujita T, Kohno S, Ohtani J, Tenjoh K, Nakano M, Kamada H, Tanne K. Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice. *Biomed Res* 2007; 28(1): 1-7.
  - 26) Bergdahl M, Habib R, Bergdahl J, Nyberg L, Nilsson LG. Natural teeth and cognitive function in humans. *Scand J Psychol* 2007; 48(6): 557-565.
  - 27) Onozuka M, Watanabe K, Mirbod SM, Ozono S, Nishiyama K, Karawasa N, Nagatsu I. Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. *Brain Res.* 1999; 826: 148-153.
  - 28) Noble JM, Scarmeas N, Papapanou PN. Poor oral health as a chronic, potentially modifiable dementia risk factor: review of the

- literature. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013; 13: 384.
- 29) Watanabe K, Tonosaki K, Kawase T, Karasawa N, Nagatsu I, Fujita M, Onozuka M. Evidence for involvement of dysfunctional teeth in the senile process in the hippocampus of SAMP8 mice. *Exp Gerontol* 2001; 36(2): 283-295.
  - 30) Su S, Qi T, Su B, Gu H, Wang J, Yang L. Tooth loss inhibits neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Neural Regen Res* 2014; 9(17): 1606-1609.
  - 31) Kawahata M, Ono Y, Ohno A, Kawamoto S, Kimoto K, Onozuka M. Loss of molars early in life develops behavioral lateralization and impairs hippocampus-dependent recognition memory. *BMC Neurosci* 2014; 15: 4.
  - 32) Nose-Ishibashi K, Watahiki J, Yamada K, Maekawa M, Watanabe A, Yamamoto G, Enomoto A, Matsuba Y, Nampo T, Taguchi T, Ichikawa Y, Saido TC, Mishima K, Yamaguchi Y, Yoshikawa T, Maki K. Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: Potential increase in vulnerability to mental disorders. *Neuroscience* 2014; 263: 257-268.
  - 33) Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pillon D. Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci* 2010; 32(12): 2042-2052.
  - 34) Patten AR, Moller DJ, Graham J, Gil-Mohapel J, Christie BR. Liquid diets reduce cell proliferation but not neurogenesis in the

- adult rat hippocampus. *Neuroscience* 2013; 254: 173-184.
- 35) Kubo KY, Yamada Y, Iinuma M, Iwaku F, Tamura Y, Watanabe K, Nakamura H, Onozuka M. Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice. *Neurosci Lett* 2007; 414(2): 188-191.
- 36) Kesslak JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance. *Behav Neurosci* 1998; 112(4): 1012-1019.
- 37) Watanabe T, Yamagata N, Takasaki K, Sano K, Hayakawa K, Katsurabayashi S, Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2009; 1249: 222-228.
- 38) Nofuji Y, Suwa M, Moriyama Y, Nakano H, Ichimiya A, Nishichi R, Sasaki H, Radak Z, Kumagai S. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor in trained men. *Neurosci Lett* 2008; 437(1): 29-32.
- 39) Onozuka M, Watanabe K, Nagasaki S, Jiang Y, Ozono S, Nishiyama K, Kawase T, Karasawa N, Nagatsu I. Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. *Behav Brain Res* 2000; 108(2): 145-155.
- 40) Tanaka M, Asanuma A, Ikuta J, Yamada H, Shimizu S, Koga T,

- Kakishita T. Age-related memory impairment and hippocampal damage in ddY male mice. *Exp Anim* 1995; 43(5): 697-702.
- 41) Lavigne G, Kim JS, Valiquette C, Lund J. Evidence that periodontal presso-receptors provide positive feedback to jaw closing muscles during mastication. *J Neurophysiol* 1978; 58: 342-358.
- 42) Yamamura C, Kosugi S, Ono K, Shimada K. Patterns of jaw reflexes induced by incisal and molar pressure stimulation in relation to background levels of jaw clenching force in humans. *J Physiol* 1993; 43: 87-102.
- 43) Yamamura C, Shimada K. Differential controls of small and large motor unit activity in the masseter muscle with incisal stimulation in humans. *Brain Res* 1993; 632: 339-341.
- 44) 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* 1999; 43: 299-311.
- 45) Kubota K, Nagae K, Shibanaï S, Hosaka K, Iseki H, Odagiri N, Lee MS, Chang CM, Ohkubo K, Narita N, Sonoda Y. Degenerative changes of primary neurons following tooth extraction. *Anat Anz Jena* 1988; 116: 133-139.
- 46) Takemura Y, Imai S, Kojima H, Katagi M, Yamakawa I, Kasahara T, Urabe H, Terashima T, Yasuda H, Chan L, Kimura H, Matsusue Y. Brain-derived neurotrophic factor from bone marrow-derived cells promotes post-injury repair of peripheral nerve. *PLoS One* 2012; 7: e44592.

- 47) Iinuma M, Ichihashi Y, Hioki Y, Kurata C, Tamura Y, Kubo KY. Malocclusion induces chronic stress. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2008; 85(1): 35-42.
- 48) Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K, Morita M. Occlusal disharmony increases amyloid- $\beta$  in the rat hippocampus. *Neuromolecular Med* 2011; 13(3): 197-203.
- 49) Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(6): 3168-3171.
- 50) Tanapat P, Galea LA, Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci* 1998; 16(3-4): 235-239.
- 51) Brummelte S, Galea LA. Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience* 2010; 168(3): 680-690.
- 52) Ichihashi Y, Arakawa Y, Iinuma M, Tamura Y, Kubo KY, Iwaku F, Sato Y, Onozuka M. Occlusal disharmony attenuates glucocorticoid negative feedback in aged SAMP8 mice. *Neurosci Lett* 2007; 427(2): 71-76.
- 53) Ichihashi Y, Saito N, Arakawa Y, Kurata C, Iinuma M, Tamura Y, Iwaku F, Kubo KY. The bite-raised condition in aged SAMP8 mice reduces the expression of glucocorticoid receptors in the dorsal and ventral hippocampus. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2008; 84(4):

137-142.

- 54) Weijenberg RA, Scherder EJ, Lobbezoo F. Mastication for the mind - the relationship between mastication and cognition in ageing and dementia. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35(3): 483-497.
- 55) Yoshino F, Yoshida A, Hori N, Ono Y, Kimoto K, Onozuka M, Lee MC. Soft-food diet induces oxidative stress in the rat brain. *Neurosci Lett* 2012; 508(1): 42-46.

## 付図説明

### 図 1 研究 1 の実験スケジュール

28 週齢の時点でマウスの上顎両側臼歯部を抜歯（維持群：抜歯をしない群，喪失群：抜歯した群）および食形態の変更（固形群：固形飼料を継続，粉末群：粉末飼料に変更）を行い，すべてのマウスは維持/固形群，維持/粉末群，喪失/固形群，喪失/粉末群の 4 群に調製した．実験期間を 28 週齢から 32 週齢までの 4 週間飼育し，32 週齢で学習・記憶能を評価し，その後，実験動物を屠殺した．

### 図 2 ステップスルー型受動的回避試験

行動実験にはステップスルー型受動的回避試験装置を用いた．明室，暗室，ショックジェネレーターから構成されており，明室と暗室はマウスが移動できるようにギロチンドアにより連結されている．

### 図 3 海馬 CA1 および CA3 領域における錐体細胞数の測定方法

海馬 CA1 および CA3 領域を観察領域として設定した．海馬 CA1 領域では 100  $\mu\text{m}$ ×300  $\mu\text{m}$ ，CA3 領域では 200  $\mu\text{m}$ ×200  $\mu\text{m}$  の観察領域を設定，各領域内の錐体細胞数を測定した．

### 図 4 研究 2 の実験スケジュール

28 週齢の時点でマウスの上顎両側臼歯部を抜歯（維持群：抜歯をしない群，喪失群：抜歯した群）および食形態の変更（固形群：固形飼料を継続，粉末群：粉末飼料に変更）を行い，すべてのマウスは維持/固形群，維持/粉末群，喪失/

固形群，喪失/粉末群の4群に調製した．実験期間を28週齢から44週齢までの16週間飼育し，44週齢で学習・記憶能を評価し，その後，実験動物を屠殺した．

#### 図5 研究1 各群の体重および飼料摂取量の結果

体重および飼料摂取量はほぼ一定に推移し，すべての群間に有意差を認めなかった．

#### 図6 研究1 各群のステップスルー型受動的回避試験の結果

各群ともに獲得試行と比較して保持試行での反応潜時時間が延長しており，有意差を認めた．\*  $P < 0.05$

#### 図7 研究1 各群の反応潜時時間の比較

獲得試行時の反応潜時時間について，各群間に有意差は認めなかった．一方，保持試行時の反応潜時時間について，同飼料群では維持群よりも喪失群で有意な低下を認めた．

\*  $P < 0.05$  vs 同飼料群内の喪失群

#### 図8 研究1 各群の錐体細胞数の結果 (CA1)

上段：維持群と比較して，喪失群での錐体細胞数が減少を認め，食形態変更による影響は認めなかった．

\*\*  $P < 0.01$  vs 同飼料群内の喪失群

下段：各群の組織像

#### 図9 研究1 各群の錐体細胞数の結果 (CA3)



上段：維持群と比較して，喪失群での錐体細胞数が減少を認め，食形態変更による影響は認めなかった

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs 同飼料群内の喪失群

下段：各群の組織像

#### 図 10 研究 1 各群の BDNF 染色像 (CA1)

同程度の染色像が観察された。

#### 図 11 研究 1 各群の BDNF 染色像 (CA3)

維持群と比較すると喪失群は BDNF 発現の減少が観察された。

#### 図 12 研究 1 各群の TrkB 染色像 (CA1)

同程度の染色像が観察された。

#### 図 13 研究 1 各群の TrkB 染色像 (CA3)

喪失群で TrkB 発現の減少傾向を認め，特に維持/粉末群と比較すると喪失/粉末群では，TrkB 発現の減少が観察された。

#### 図 14 研究 1 各群の視床下部における BDNF, TrkB 遺伝子発現量の結果

遺伝子発現量は各サンプルで内部標準遺伝子 GAPDH に対する比で算出した。

#### 図 15 研究 1 各群の海馬における BDNF, TrkB 遺伝子発現量の結果

遺伝子発現量は各サンプルで内部標準遺伝子 GAPDH に対する比で算出した。

\*  $P < 0.05$  vs 同飼料群内の喪失群, †  $P < 0.05$  vs 喪失群内の粉末群

図 16 研究 2 各群の体重および飼料摂取量の結果

体重および飼料摂取量はほぼ一定に推移し、すべての群間に有意な差を認めなかった。

図 17 研究 2 各群のステップスルー型受動的回避試験の結果

維持/固形群と維持/粉末群では、獲得試行と比較して保持試行での反応潜時時間が延長しており、有意差を認めた。一方で、喪失/固形群と喪失/粉末群では、獲得試行と比較して保持試行での反応潜時時間が延長しており、有意差を認めた。\*  $P < 0.05$

図 18 研究 2 各群の反応潜時時間の比較

各群の獲得試行時の反応潜時時間を比較すると、各群に有意差は認めなかった。また、各群の保持試行時の反応潜時時間を比較すると、同飼料群で維持群よりも、喪失群で有意な低下を認め、維持群では粉末飼料に変更することで有意な低下を認めた。さらに、カットオフ値である 300 s に到達したマウスは観察されなかった。

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs 同飼料群内の喪失群, #  $P < 0.05$  vs 喪失群内の粉末群

図 19 研究 2 各群の錐体細胞数の結果 (CA1)

上段：歯の喪失によって錐体細胞数の減少を認め、維持群では粉末飼料への変更によって錐体細胞は有意に減少した。

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs 同飼料内の喪失群, ##  $P < 0.01$  vs 維持群内の喪失群

下段：各群の組織像

図 20 研究 2 各群の錐体細胞数の結果 (CA3)

上段：維持群と比較すると喪失群での錐体細胞数が減少を示した。さらに組織像では、錐体細胞が萎縮している像が観察された。

\*\*  $P < 0.01$  vs 同飼料内の喪失群

下段：各群の組織像

図 21 研究 2 各群の BDNF 染色像 (CA1)

各群ともに同程度の染色像が観察された。

図 22 研究 2 各群の BDNF 染色像 (CA3)

喪失群の BDNF 発現が維持群と比較して増加していることが観察された。

図 23 研究 2 各群の TrkB 染色像 (CA1)

維持群と比較すると喪失群で TrkB 発現の減少が観察された。

図 24 研究 2 各群の TrkB 染色像 (CA3)

維持群と比較すると喪失群で TrkB 発現の減少が観察された。

図 25 研究 2 各群の視床下部における BDNF, TrkB 遺伝子発現量の結果

遺伝子発現量は各サンプルで内部標準遺伝子 GAPDH に対する比で算出した。

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs 同飼料内の喪失群

図 26 研究 2 各群の海馬における BDNF, TrkB 遺伝子発現量の結果

遺伝子発現量は各サンプルで内部標準遺伝子 GAPDH に対する比で算出した。

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs 同飼料群内の喪失群, #  $P < 0.05$  vs 維持群内の粉末群, †  $P < 0.05$  vs 喪失群内の粉末群

## 実験スケジュール

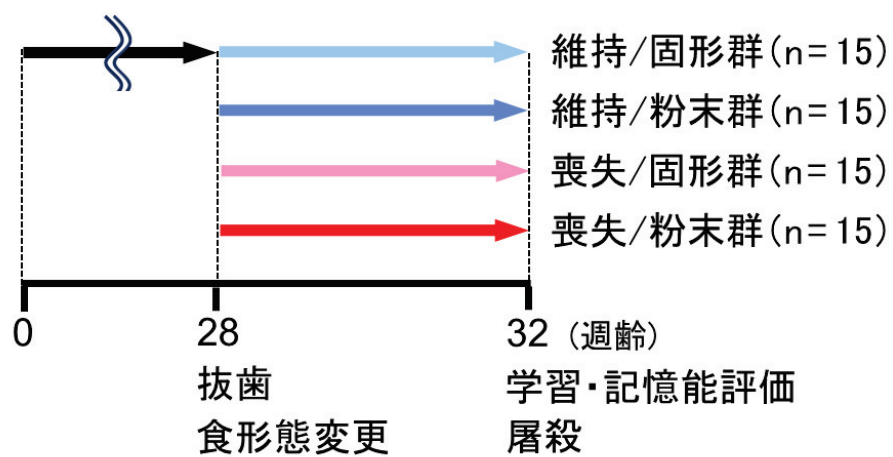


図 1

## ステップスルー型受動的回避試験装置

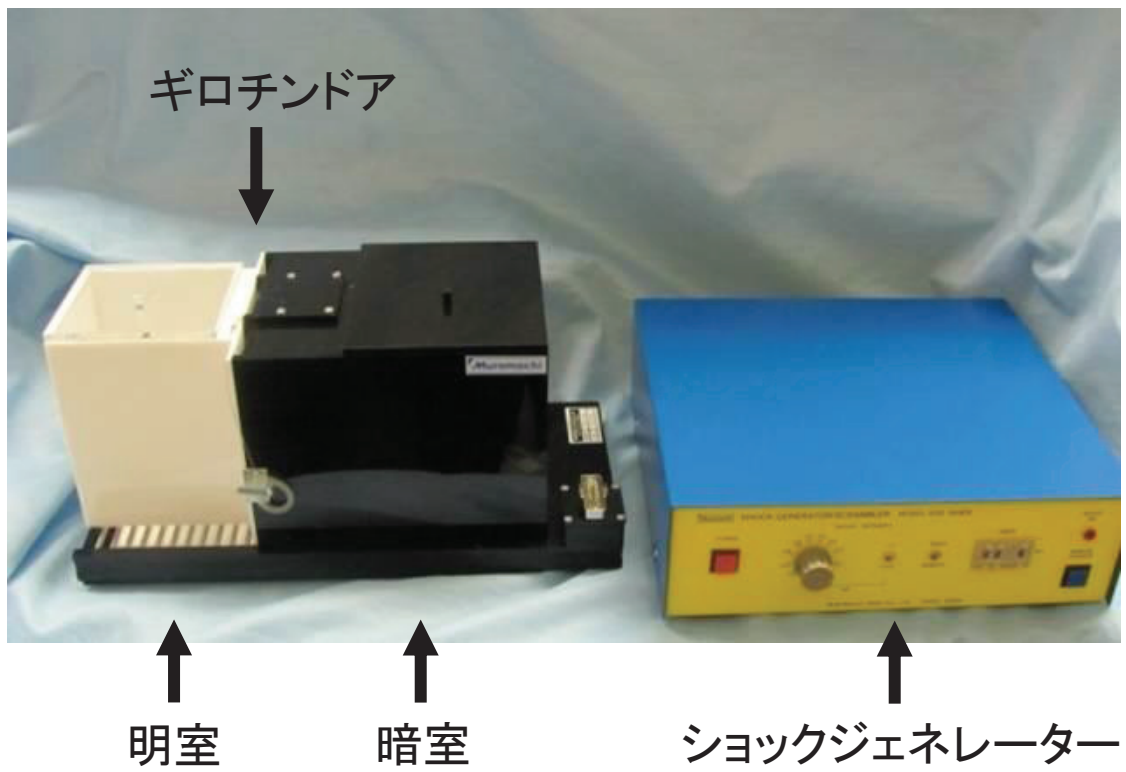


図 2

# 錐体細胞数の観察領域

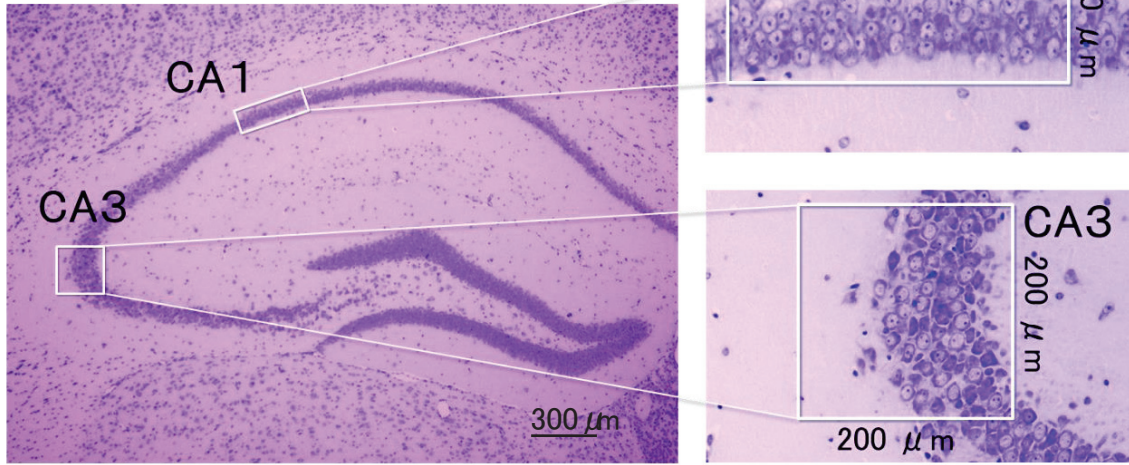


図 3

## 実験スケジュール

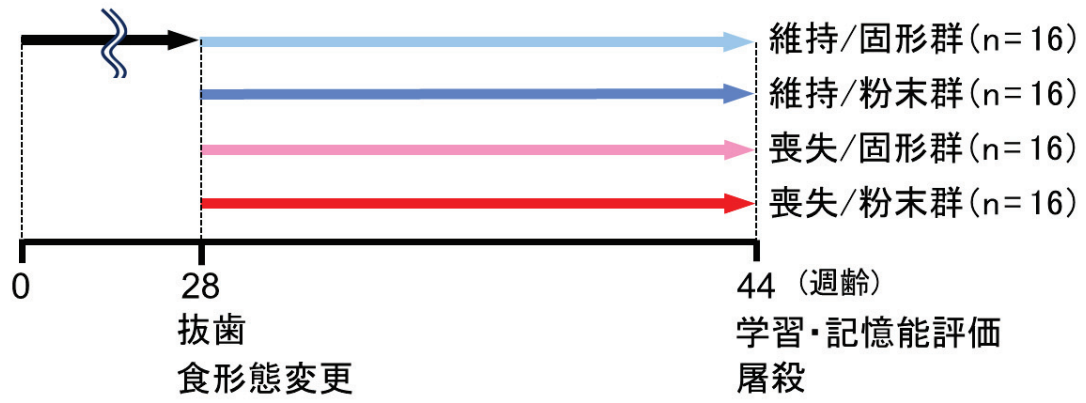


図 4



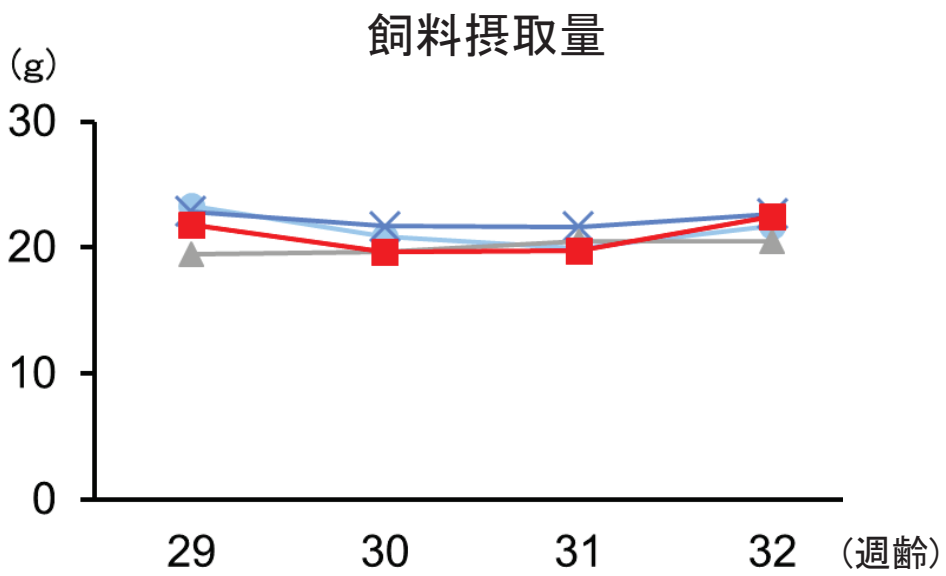
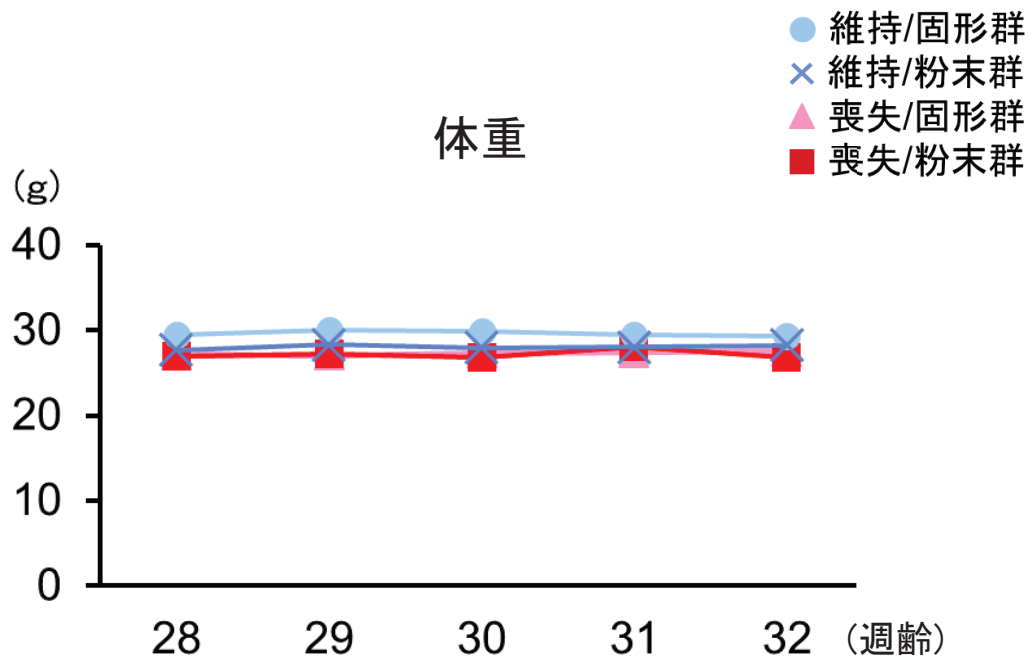


図 5

\*  $P < 0.05$

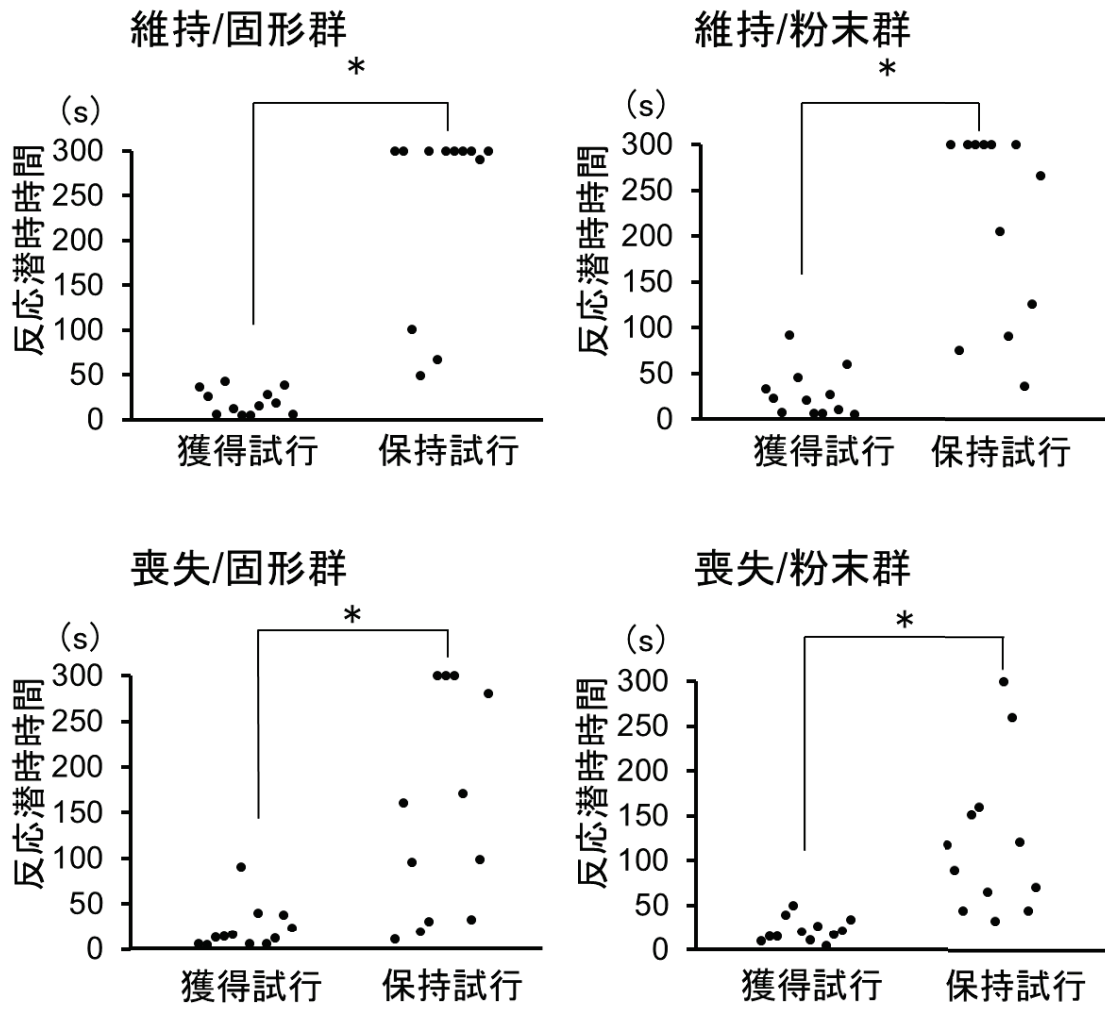


図 6

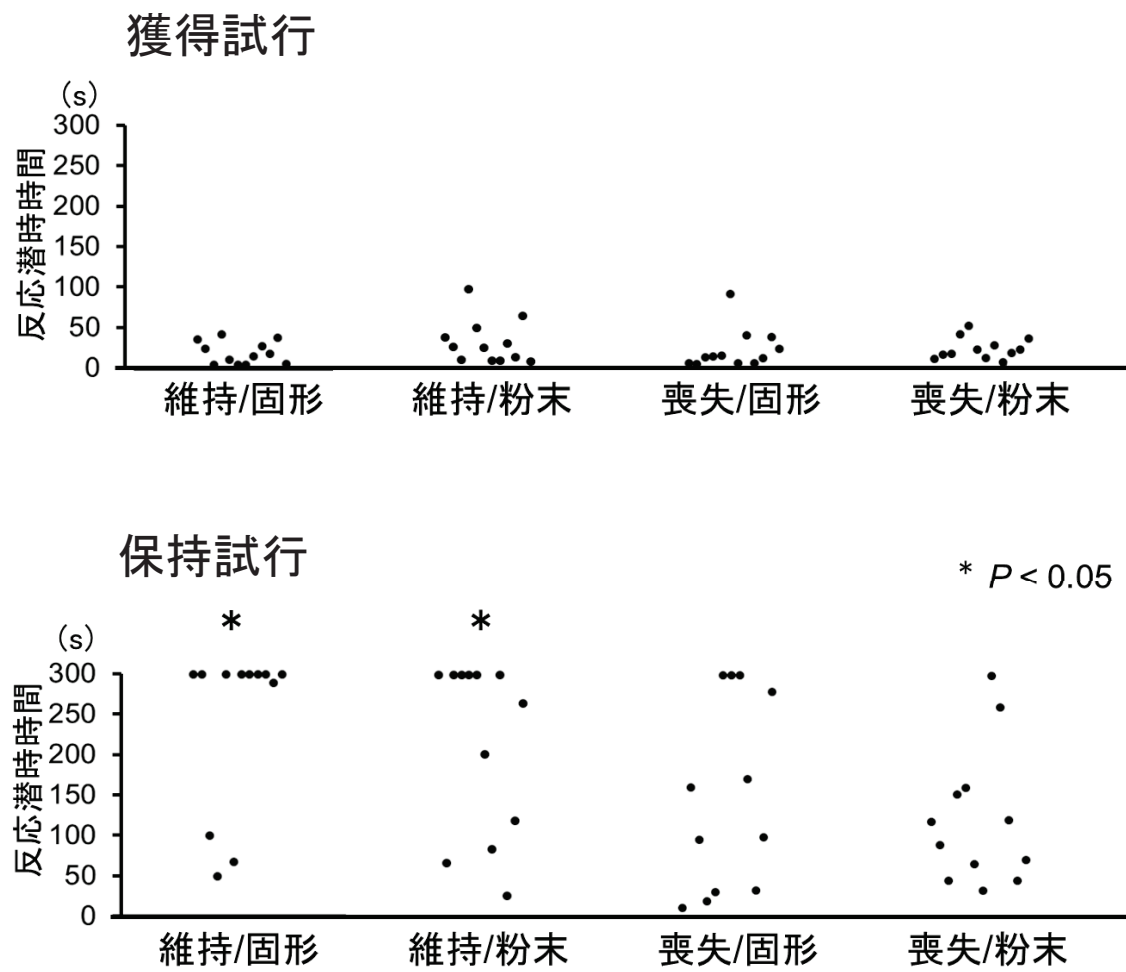


図 7

■ 維持/固形群    ■ 維持/粉末群  
■ 喪失/固形群    ■ 喪失/粉末群

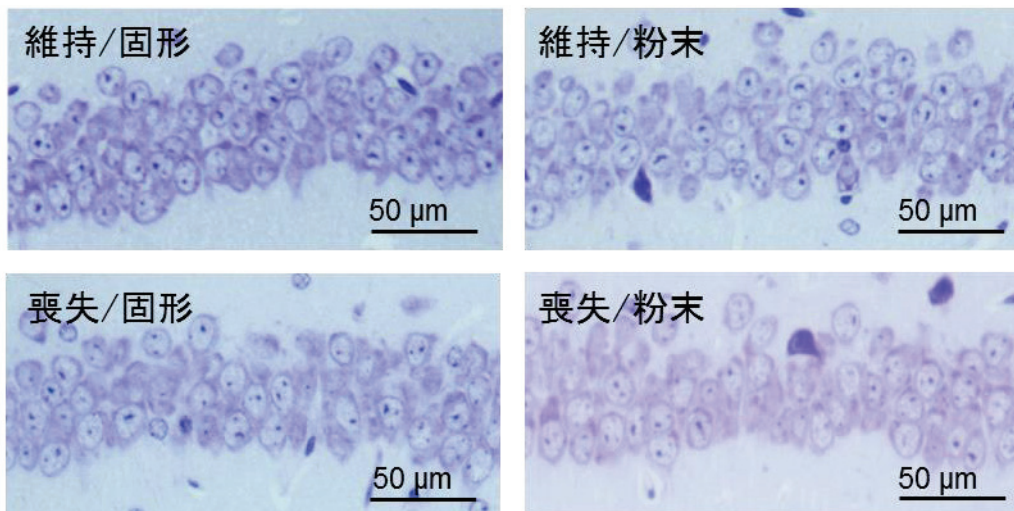
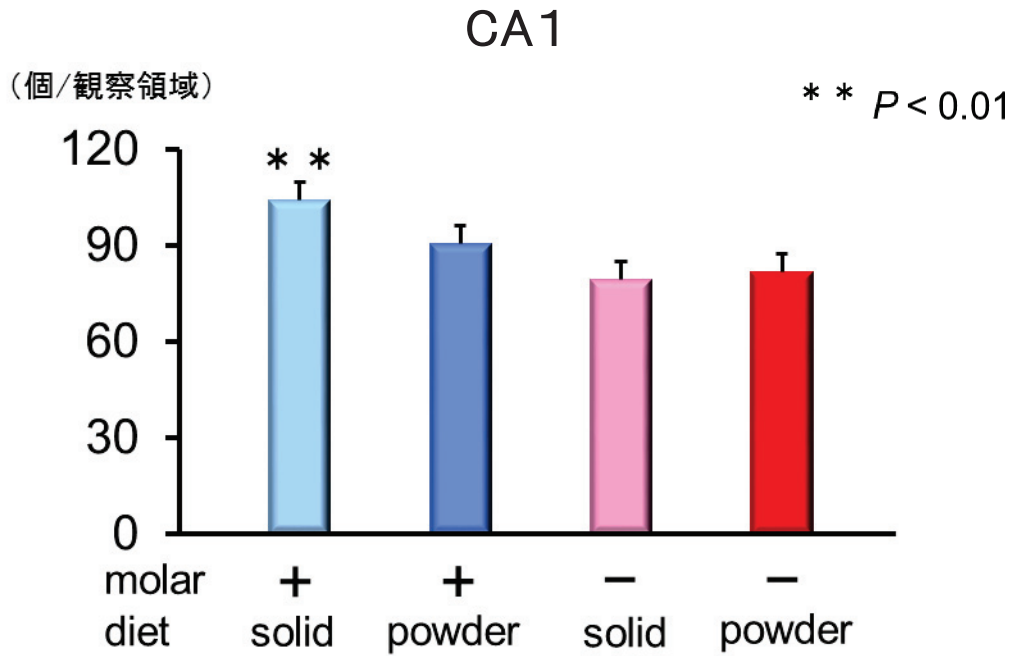


図 8

■ 維持/固形群 ■ 維持/粉末群  
 ■ 喪失/固形群 ■ 喪失/粉末群

### CA3

(個/観察領域)

\*\* , \*  $P < 0.01, 0.05$

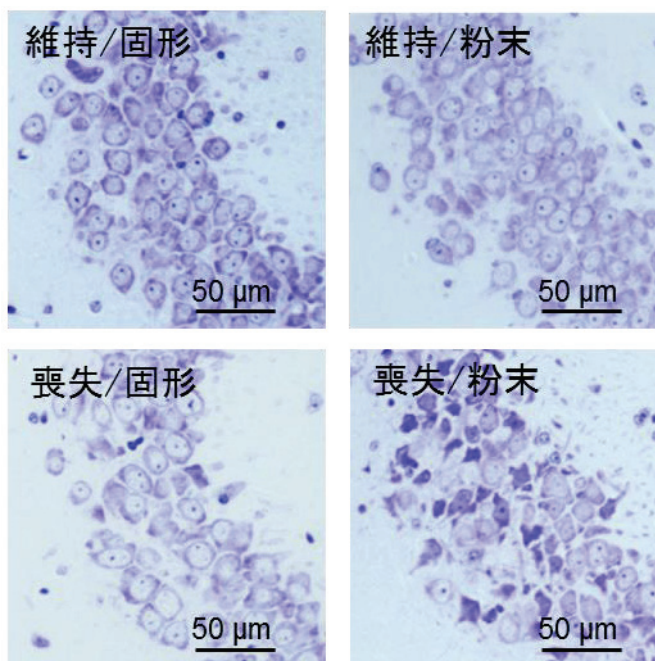
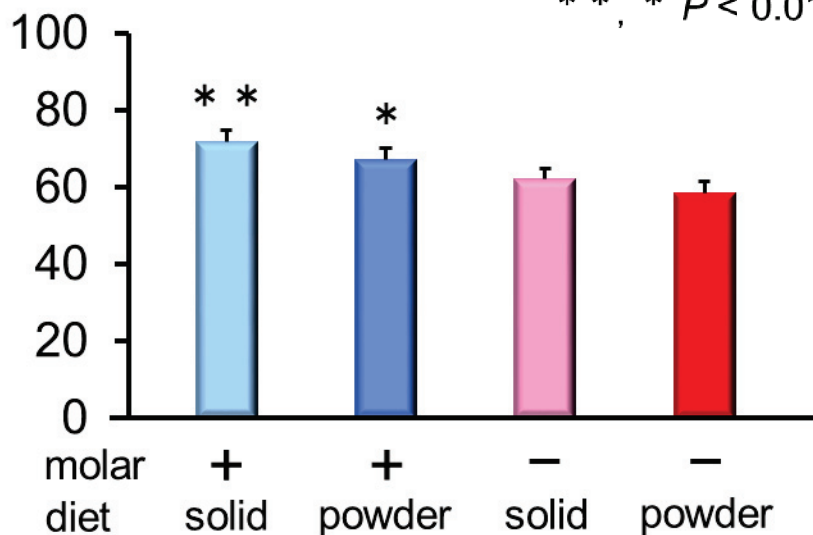
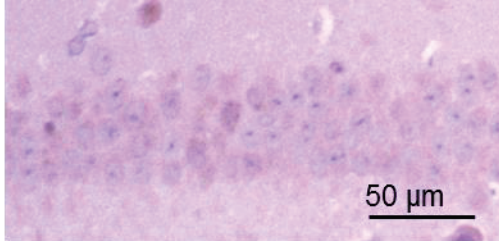


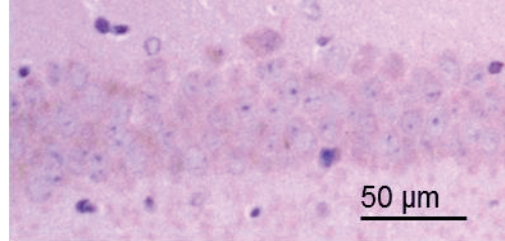
図 9

# CA1

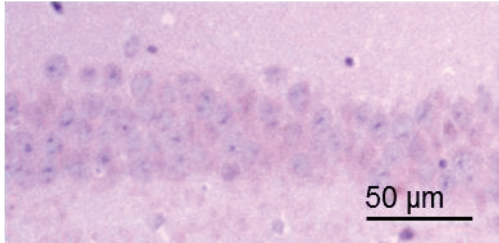
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

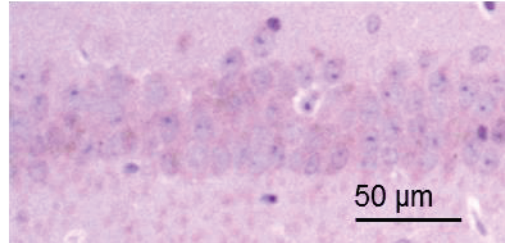
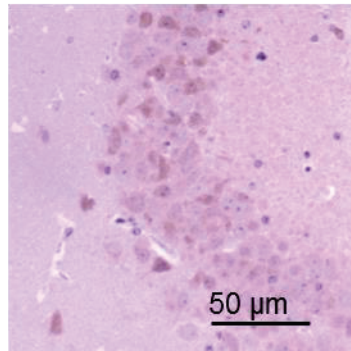


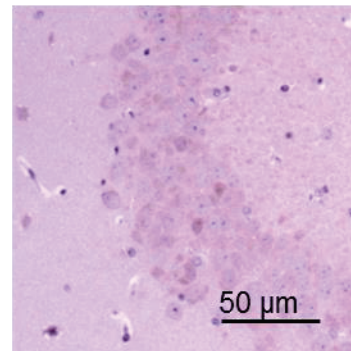
図 10

# CA3

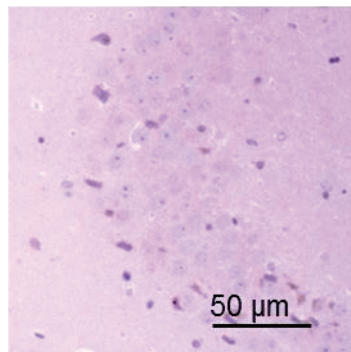
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

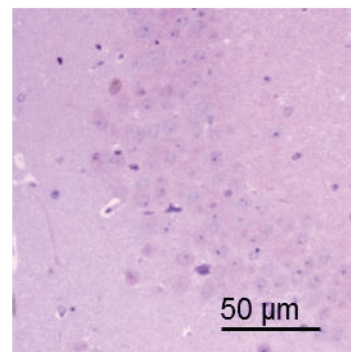
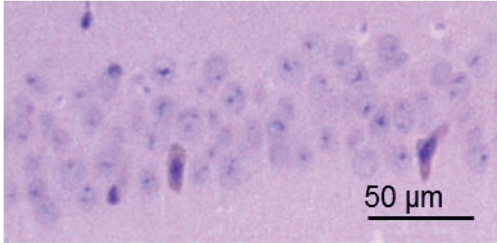


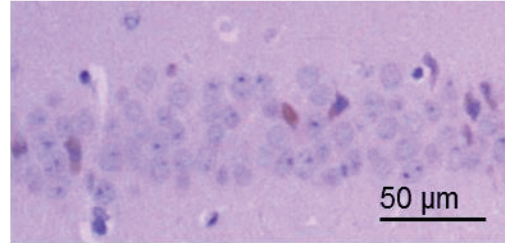
図 11

# CA1

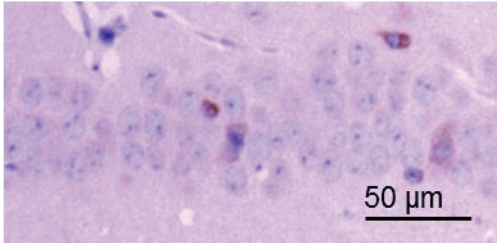
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

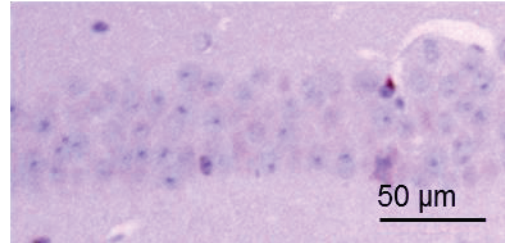
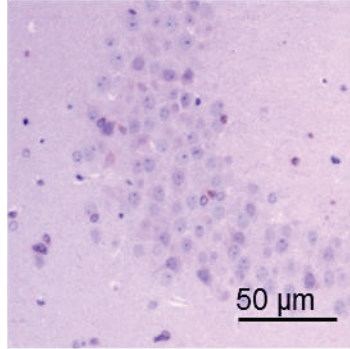


図 12

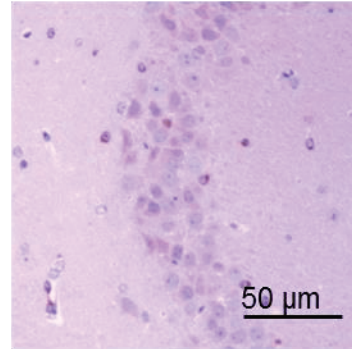


# CA3

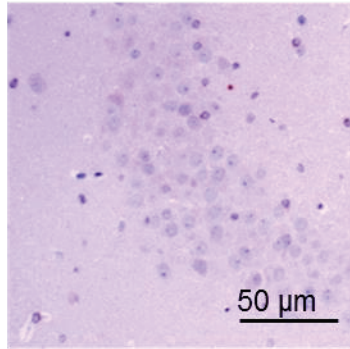
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

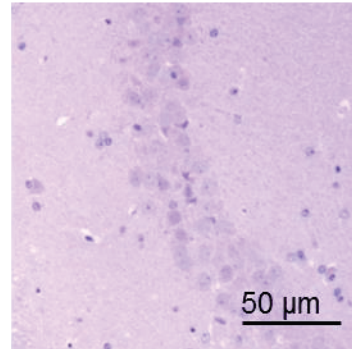


図 13

■ 維持/固形群 ■ 維持/粉末群  
■ 喪失/固形群 ■ 喪失/粉末群

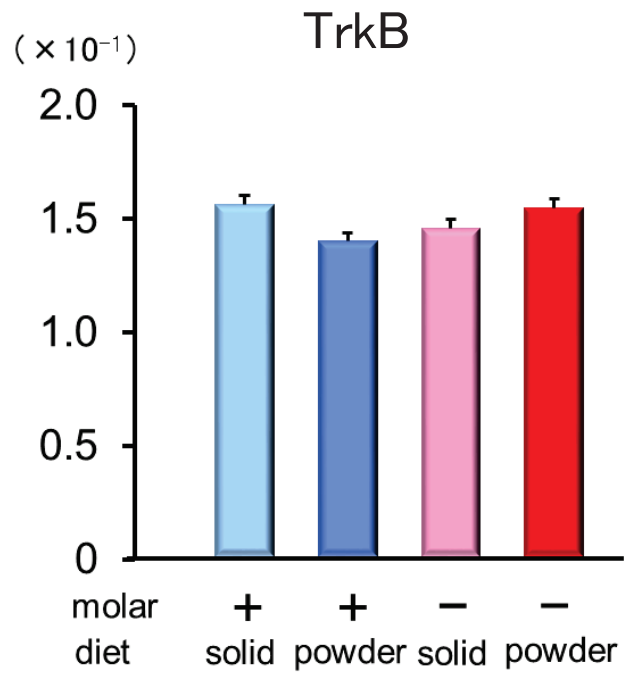
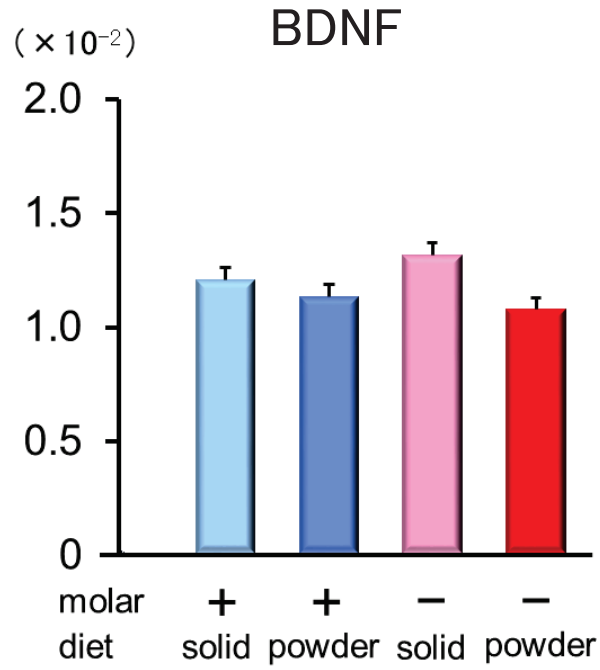


図 14

■ 維持/固形群    ■ 維持/粉末群  
■ 喪失/固形群    ■ 喪失/粉末群

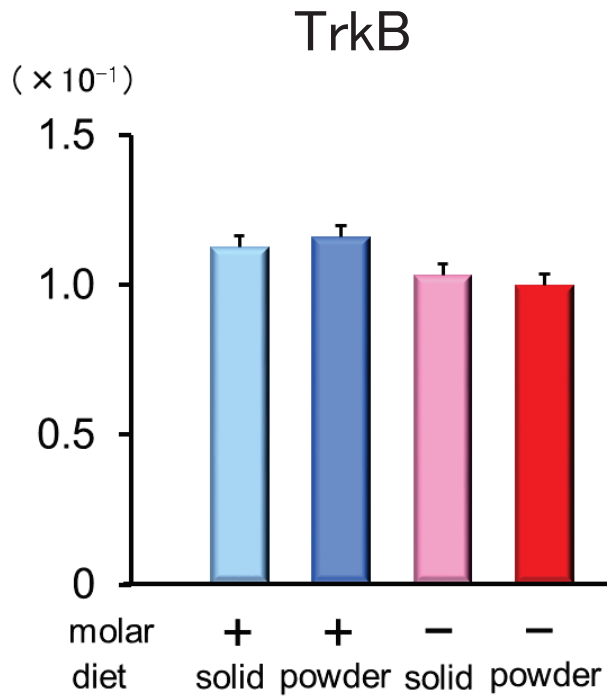
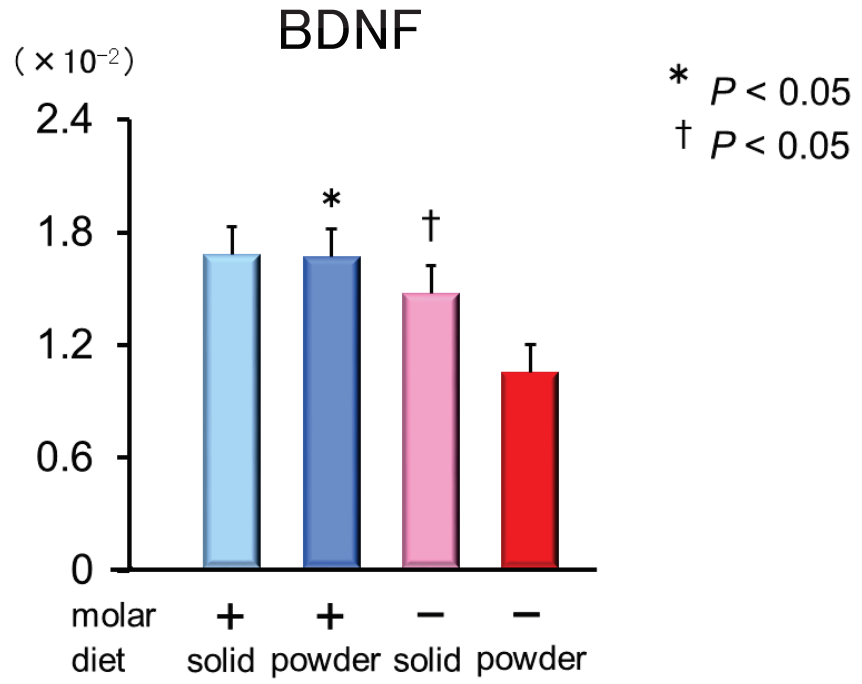


図 15

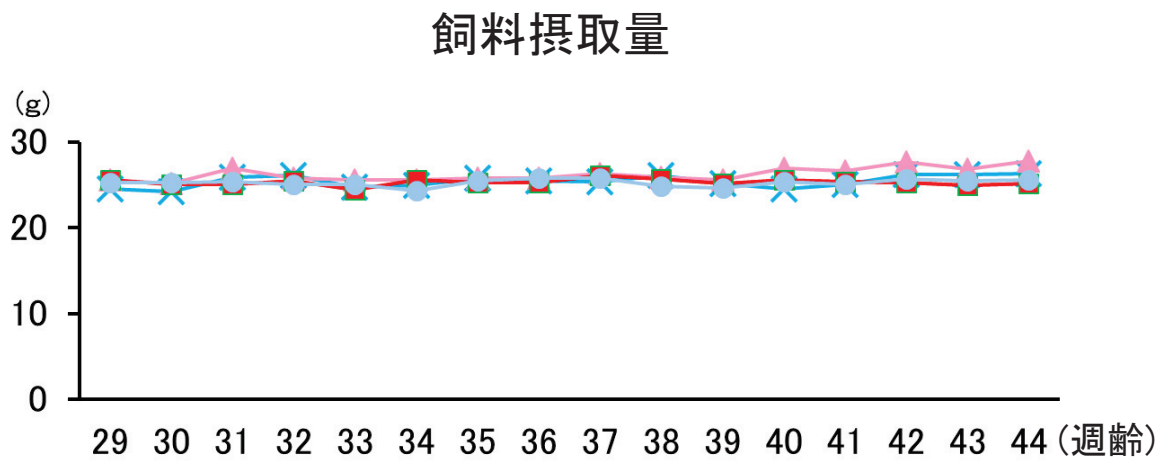
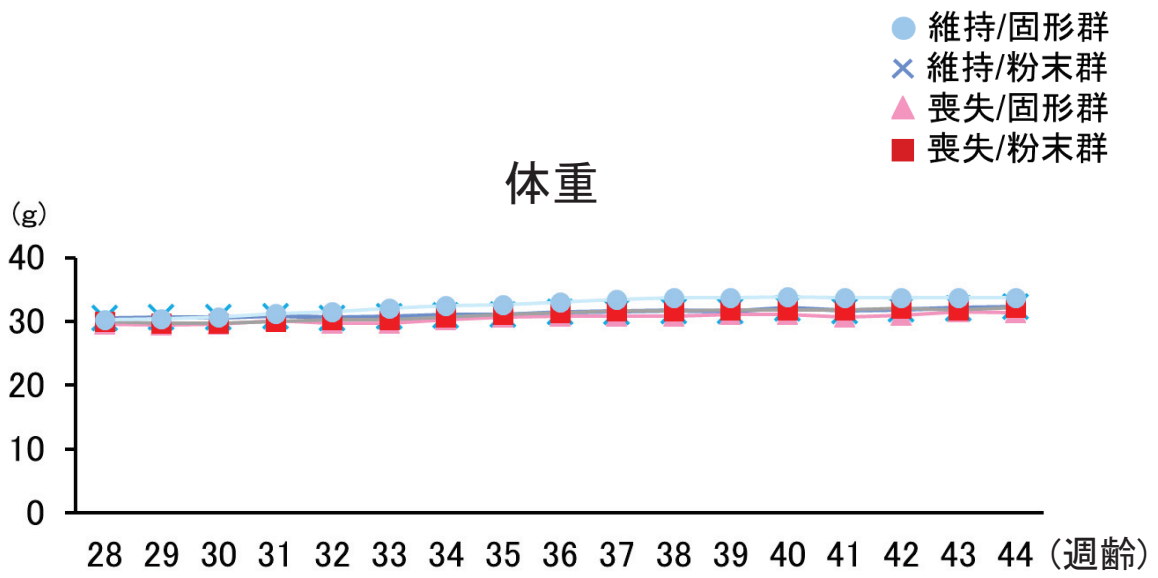


図 16

\*  $P < 0.05$

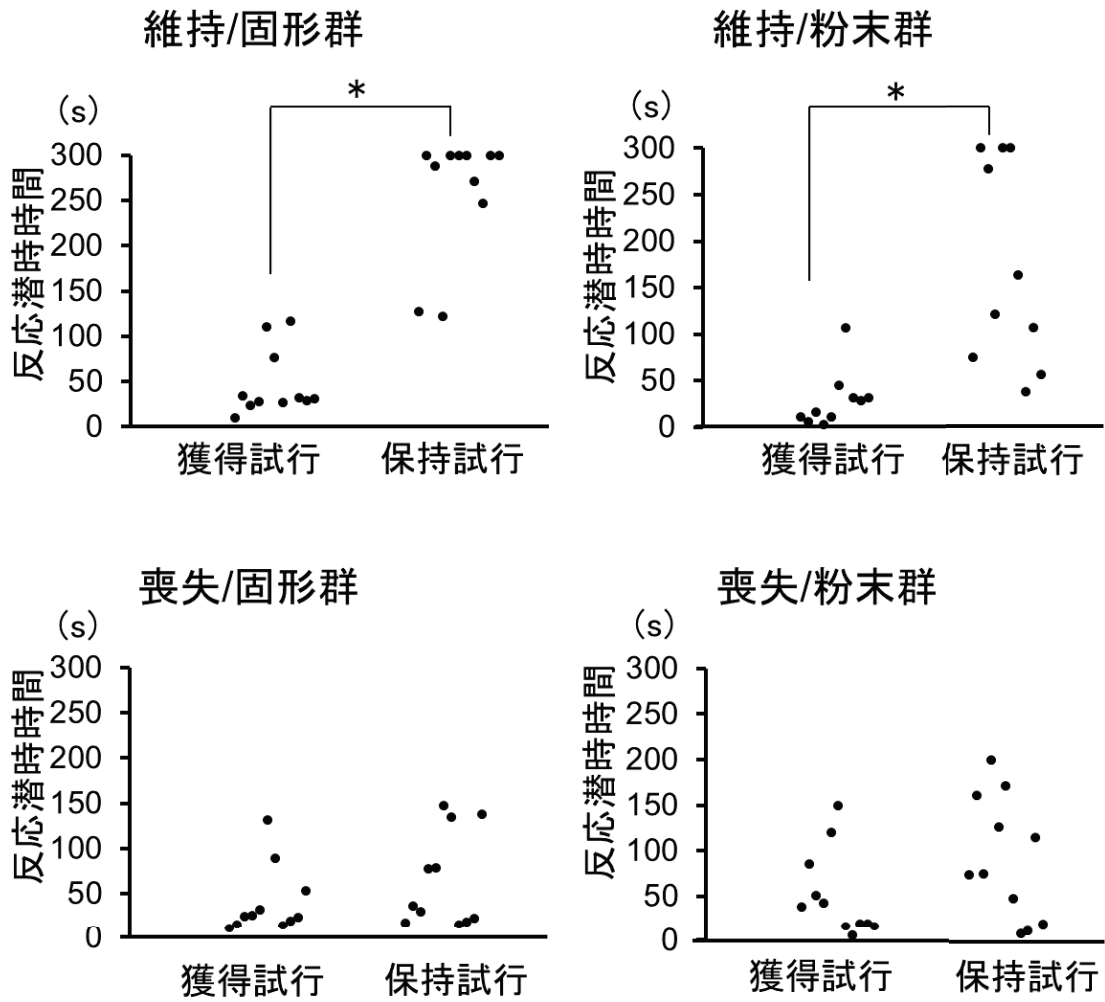
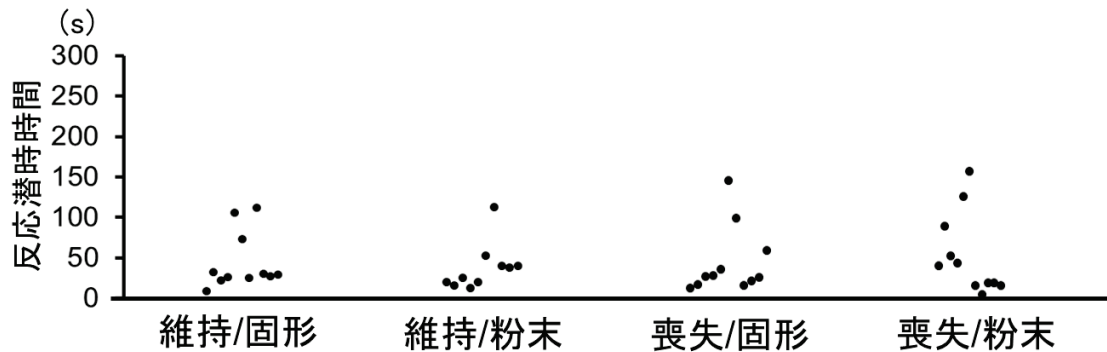


図 17

### 獲得試行



### 保持試行

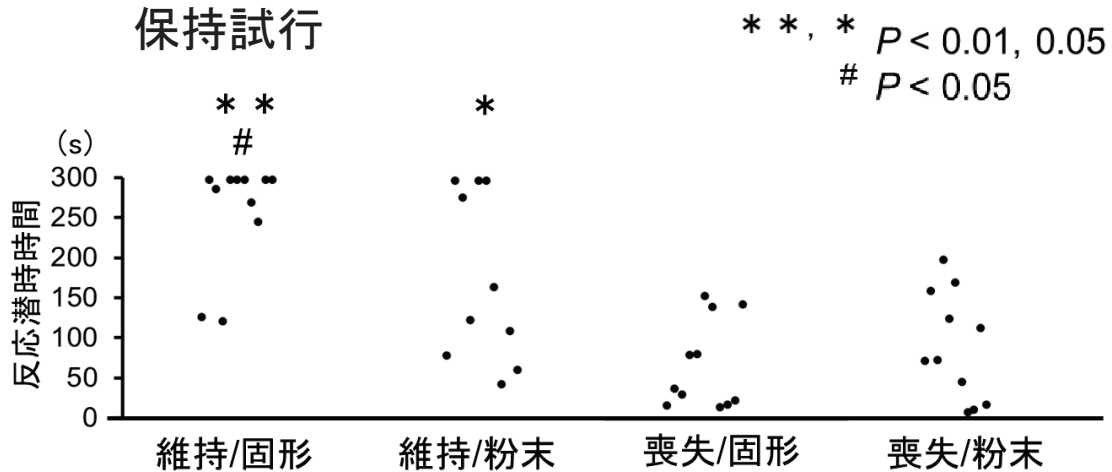


図 18

■ 維持/固形群 ■ 維持/粉末群  
 ■ 喪失/固形群 ■ 喪失/粉末群

### CA1

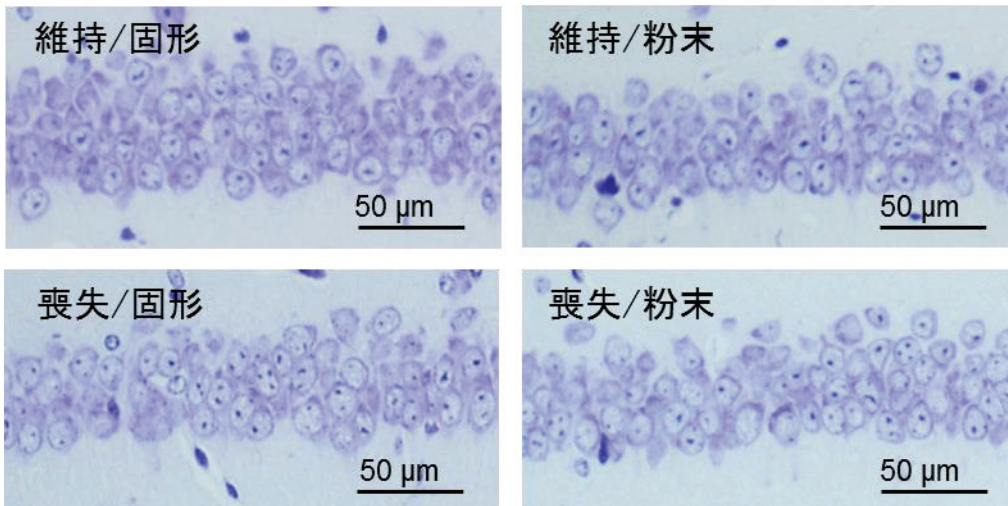
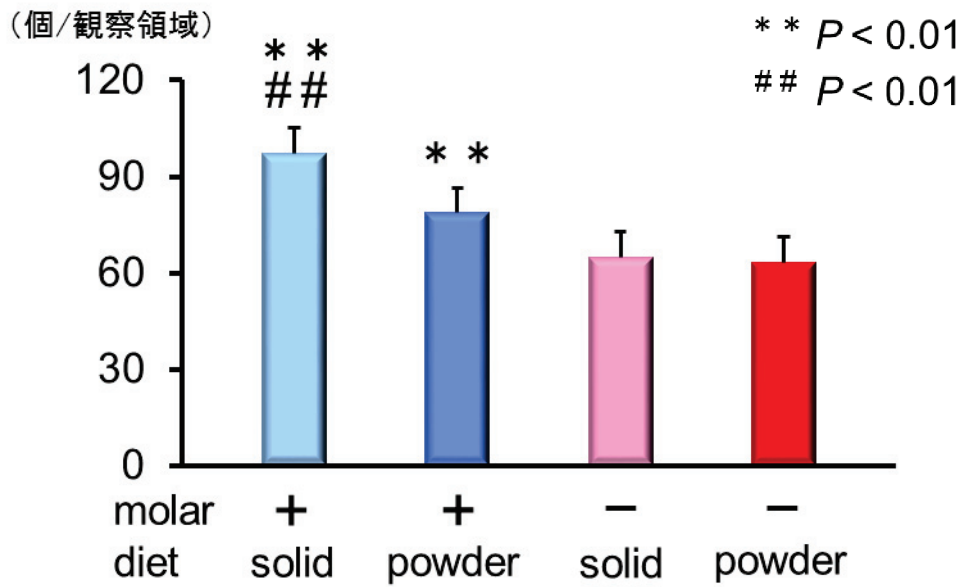


図 19

■ 維持/固形群 ■ 維持/粉末群  
 ■ 喪失/固形群 ■ 喪失/粉末群

### CA3

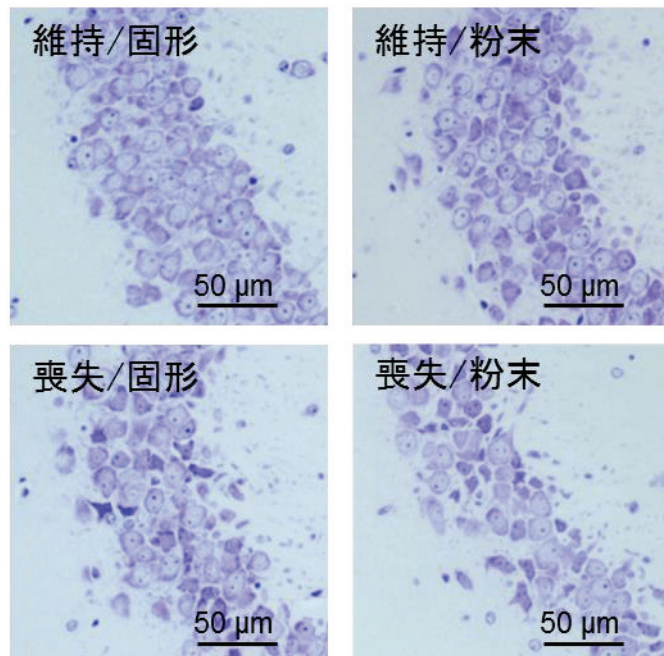
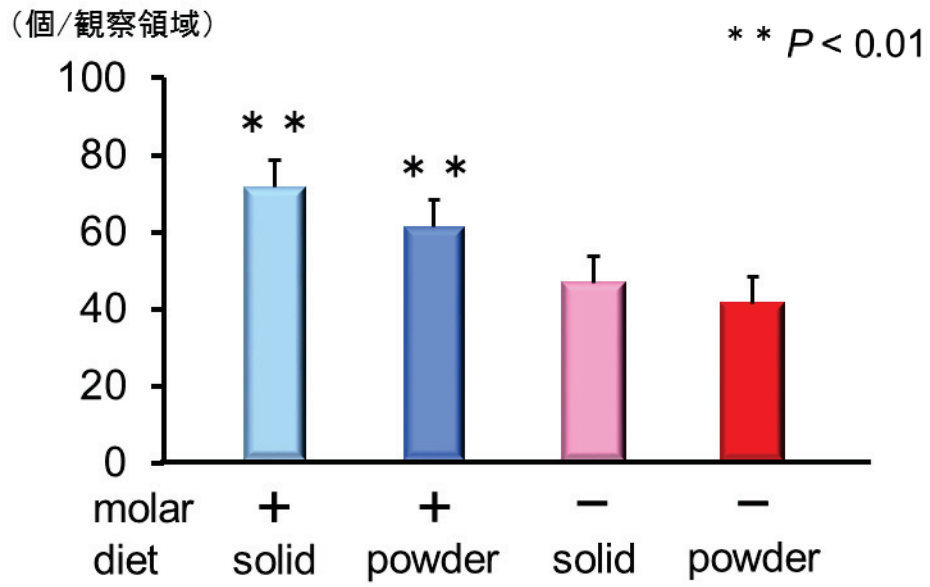
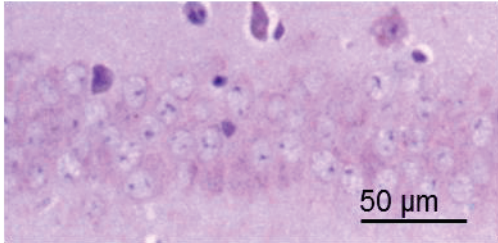


図 20

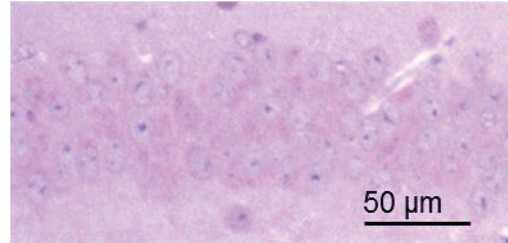


# CA1

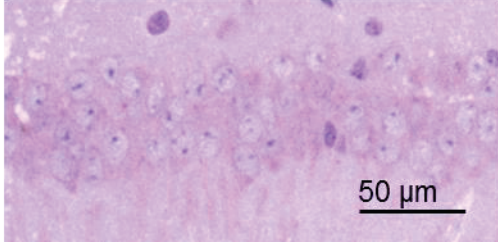
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

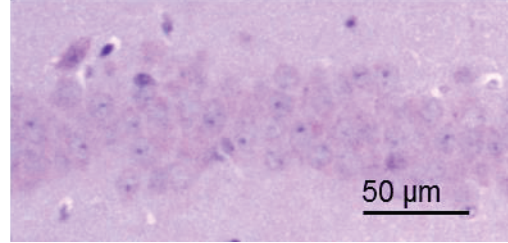
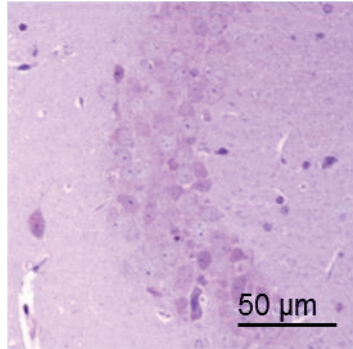


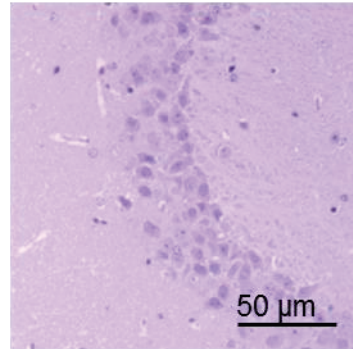
図 21

# CA3

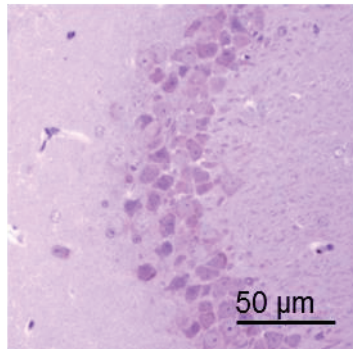
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

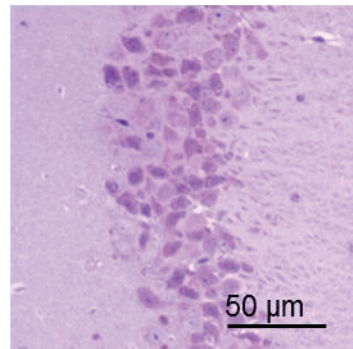
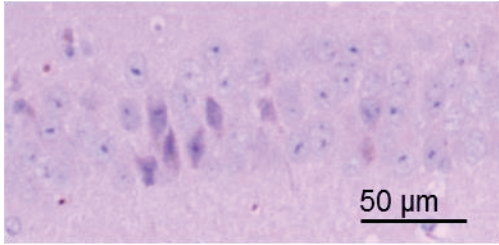


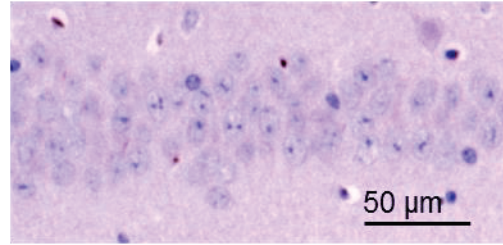
図 22

# CA1

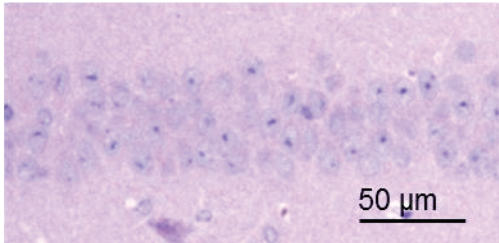
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

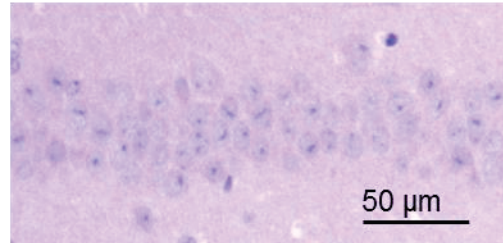
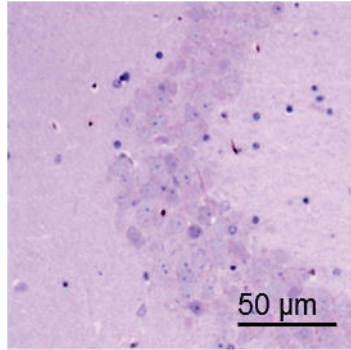


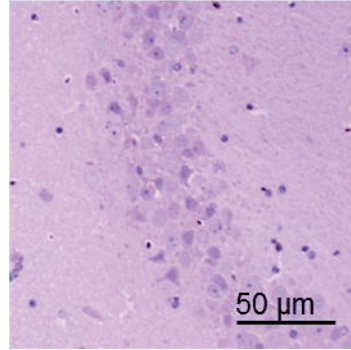
図 23

# CA3

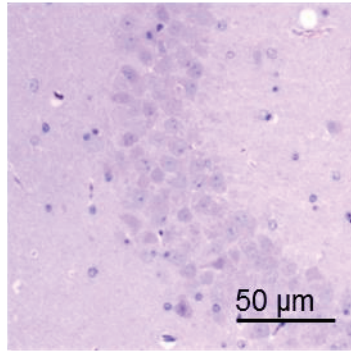
維持/固形



維持/粉末



喪失/固形



喪失/粉末

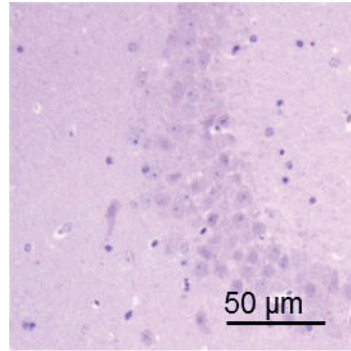


図 24

■ 維持/固形群 ■ 維持/粉末群  
■ 喪失/固形群 ■ 喪失/粉末群

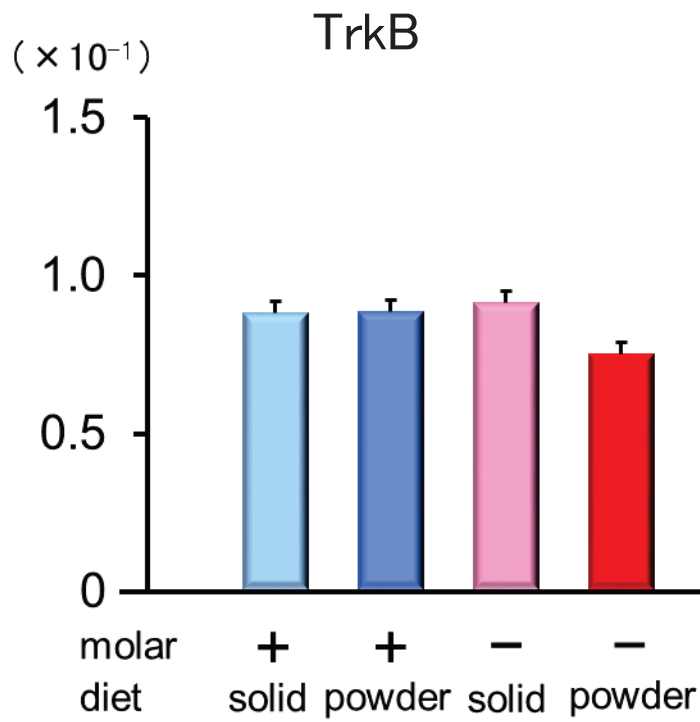
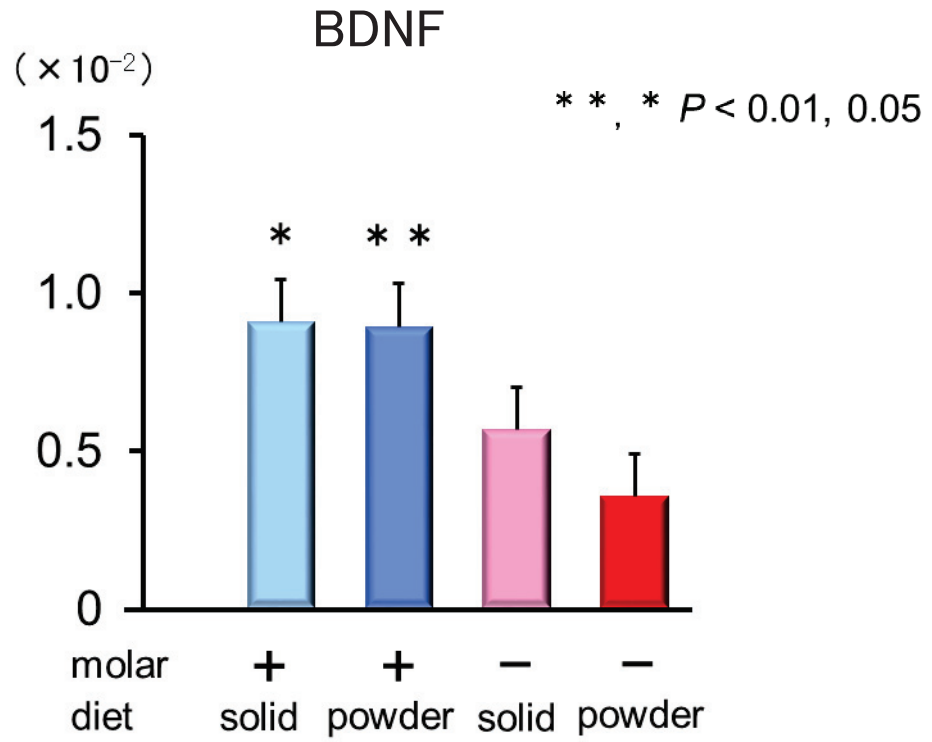


図 25

■ 維持/固形群 ■ 維持/粉末群  
■ 喪失/固形群 ■ 喪失/粉末群

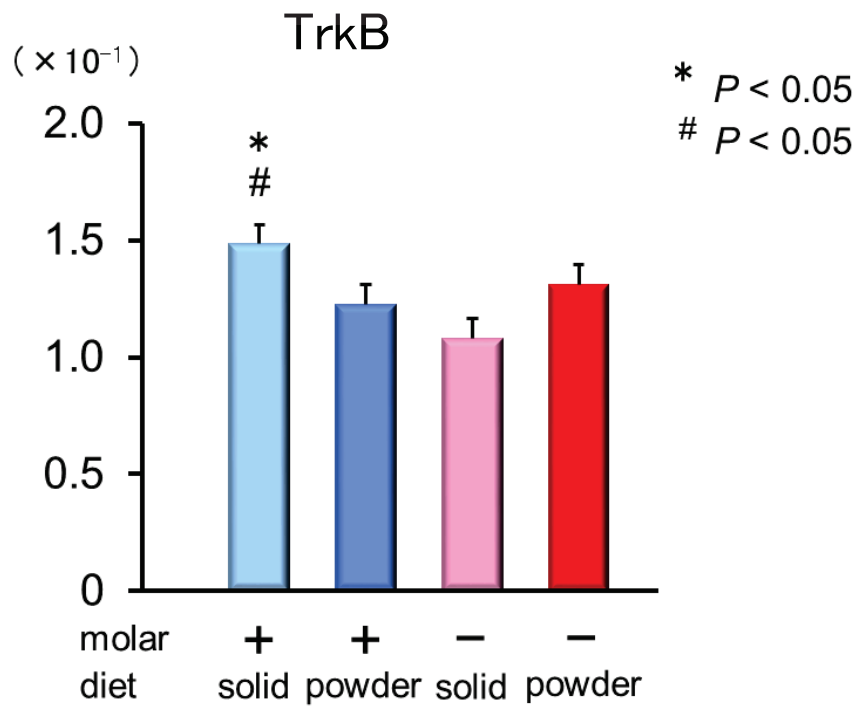
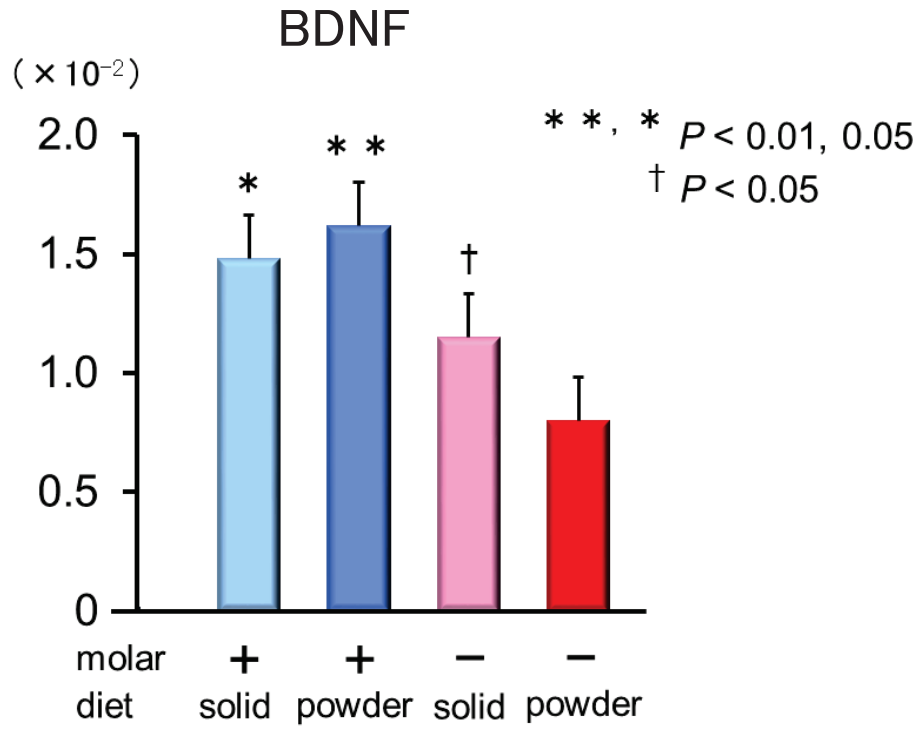


図 26