

# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	片山 祐	
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学教授 藤原 周 (副 査) 朝日大学歯学教授 田村 康夫 (副 査) 朝日大学歯学教授 江尻 貞一	
論文題目	咬合挙上ストレスがアセチルコリン系に及ぼす影響	
論文内容の要旨	<p>目的</p> <p>咬合異常は、顎関節症、ブラキシズムや不定愁訴の原因になることが臨床的に報告されている。これまでの研究報告から、老齢期のマウスに咬合挙上処置を施すと①血中コルチコステロン濃度が上昇すること、②海馬神経細胞が減少すること、および③空間認知能の低下が引き起こされることなどを明らかにしてきた。これらの結果は咬合挙上が慢性ストレスとして作用し、海馬の機能的および器質的障害を引き起こすことを示唆するものである。一般的に慢性ストレス環境下では海馬への入力機構が障害され、グルタミン酸などの分泌量が増加し、アセチルコリン (ACh) の分泌量が減少することが報告されている。そこで本研究では、咬合挙上ストレス下において中隔核から海馬への ACh 作動性入力の動態を検索し、咬合挙上による海馬機能障害の原因を検討した。</p> <p>方法</p> <p>実験には 3, 5, 9 か月齢の雄の老化促進モデルマウス (SAMP8) を用いた。マウスをコントロール群と咬合挙上群に分類した。咬合挙上処置はマウスの上顎臼歯部に歯科用光重合レジンを盛ることにより行った。処置後 8 日目から、1 週間連続して Morris 水迷路学習テストを行い、咬合挙上状態と空間認知能との関係を検討した。次に、9 か月齢マウス海馬内の ACh 遊離量を <i>in vivo</i> マイクロダイアリシス法で調べるために水迷路学習テスト終了後、マウスをペントバルビタール麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭皮および骨膜を手術用メスで切開・剥離した。Franklin と Paxios の脳図譜を用いて海馬の上方に相当する (Bregma より 1.8mm 後方, 1.5mm 左側方, 頭蓋表面より深さ 1.5mm) 部位に歯科用ドリルを用いて小穴を開けた。小穴より海馬にガイドカニューレを挿入した。挿入位置より対側の位置にアンカービスを埋め込むための小穴を歯科用ドリルで開けた。小穴にアンカービスを埋め込み歯科用即時重合レジンを用いてガイドカニューレとアンカービスを機械的に固定した。術後翌日、透析プローブを挿入し、リンゲル液を流速 2<math>\mu</math>l/min で 180 分間灌流した。ACh の回収は 15 分おきにマイクロフラクションコレクタを用いて回収した。灌流して 1 時間後に ACh 放出促進のために高濃度カリウムリンゲル液 (High K<sup>+</sup>) を 15 分間流した。15 分間隔で回収した ACh のサンプルは冷凍保存した。サンプルはマニュアルインジェクトにより高速液体クロマトグラフィー、電気化学検出器で分析した。最後に、マウスを 4°C の 4% パラホルムアルデヒド固定液を用いて灌流固定を行い、厚さ 40<math>\mu</math>m の中隔核の連続切片を作製した。ACh 合成酵素に対する抗体である抗 ChAT (choline-acetyl-transferase 抗体) を用いてこれらの連続切片に ABC 法による免疫染色を施し、中隔核の ChAT 陽性細胞数を定量的に</p>	

計測した。これらの実験結果は多重比較検定にて統計処理し、比較検討した。

## 結果

Morris 水迷路学習テストの結果、咬合挙上群、コントロール群とも年齢に関係なく日を経るに従ってプラットフォームへの到達時間が短縮した ( $p<0.01$ )。咬合挙上群およびコントロール群の両群で、加齢にともなってプラットフォームへの到達時間が有意に延長した ( $p<0.01$ )。3および5か月齢のマウスは咬合挙上群とコントロール群との間で到達時間の短縮ペースに有意な差は認めなかったが、これに対して9か月齢咬合挙上マウスでは、同齢のコントロールマウスに比較してプラットフォームへの到達時間が有意に延長した ( $p<0.05$ )。9か月齢マウスを用いた *in vivo* マイクロダイアリシス法では、高濃度カリウム刺激を用いて ACh の遊離を促した。分析開始後、最初の 60 分間の基礎遊離量（高カリウム刺激前）はコントロール群と咬合挙上群の間で有意な差は見られなかった。コントロール群では刺激後 ACh の遊離前の約 400%まで有意に上昇した ( $p<0.05$ )。また、コントロール群では、刺激後 45 分後に基礎遊離量とほぼ同じ値にまで回復した。一方、咬合挙上群では、刺激後の ACh の遊離量が刺激前の約 250%までしか上昇せずコントロール群の約 64%程度に留まった。また、咬合挙上群では刺激後 2 時間を経過してもコントロール群の値にまで回復しなかった。免疫組織染色による分析結果では、咬合挙上群の中隔核における ChAT 陽性細胞数はコントロール群の約 42%で、コントロール群に比較して有意に減少した ( $p<0.01$ )。

## 考察

海馬は記憶の座であり、学習・記憶の中心的な役割を演じ、内側中隔核から ACh 性線維の投射を受けている。ACh は海馬での学習、記憶活動に密接に関係しており、ACh 線維の変性や伝達障害は空間認知能の低下を招くといわれている。実際、多くのアルツハイマー性認知障害の症例でコリン作動性線維の変性が観察されている。今回の実験で、空間認知能の低下がみられた9か月齢咬合挙上群の中隔核で ChAT 陽性細胞数が減少していたことから、同齢咬合挙上群の中隔核では ACh の合成能が低下している可能性が示唆された。また、*in vivo* マイクロダイアリシス法での分析結果から、刺激により ACh の遊離を促すと、咬合挙上群では刺激後 2 時間経過しても刺激前のレベルまで ACh の遊離量が回復しなかったことから海馬での ACh の分泌能が低下しているものと思われる。

## 結論

老齢期マウスでは咬合挙上ストレスが中隔核での ChAT 活性の低下を招き、結果として、海馬アセチルコリンの放出量の低下が引き起こされ、空間認知能の障害が引き起こされることが明らかになった。