

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

土屋 淳弘

論文題目

飼料性状の変更が老化促進モデルマウス P8 (SAMP8)  
の海馬に与える影響

## I. 諸 言

現在、超高齢社会の中で、認知症患者数の増加が社会問題となっている。また、認知症の重要なリスクファクターは生活習慣病である糖尿病や高血圧とともに、多数歯の喪失が挙げられている。そのため歯科領域において、歯の喪失が学習記憶能力や海馬に及ぼす影響を検討するなど、歯の喪失と認知症の関連についての報告がみられる。しかし、これらの報告は、歯の喪失に対する影響のみであり、咀嚼刺激の変化に関する報告はみられない。

当講座では、認知症のモデルマウスとされる老化促進モデルマウス P8 (以下 SAMP8 と略す) を用いて、粉末飼料飼育による咀嚼刺激の減少が、臼歯の喪失と同様に学習記憶能力の低下を早期に引き起こすことを明らかにした。その結果を踏まえ、飼育期間中に粉末から固形飼料へ飼料性状の変更による咀嚼刺激の回復が、海馬に影響を与える可能性が十分に考えられる。

そこで本研究では、実験 1 として、SAMP8 を用いて咀嚼刺激の影響が海馬に与える影響を検討するため、固形および粉末飼料飼育のマウスにおいて海馬の錐体細胞を病理組織学的に検討した。また、実験 2 として、実験 1 の結果を踏まえ、飼育期間中に粉末から固形飼料へと飼料性状の変更による咀嚼刺激の増加が、海馬の錐体細胞に与える影響を検討した。

## II. 方 法

### 1. 実験方法

実験動物は、平均寿命が通常マウスの半分の約 12 ヶ月と短く、8 ヶ月齢

より加齢依存的に学習記憶能力の低下を 100%自然発症する SAMP8//Ymi を本学動物実験施設で継代繁殖させ、雄性のみを用いた。

飼育飼料は、固形飼料として通常飼育に用いられる CLEA Rodent Diet CE-2\* (日本クレア社製) の固形タイプと、粉末飼料として市販の粉末タイプを 50mesh の篩にかけて  $300\mu\text{m}$  以下に調整し、咀嚼せずに嚥下可能な状態とした。

実験 1 では、飼料性状の違いによる咀嚼刺激の影響を検討するため、離乳時期の 3 週齢より開始して、成熟期にあたる 5 ヶ月齢および老齢初期にあたる 7 ヶ月齢まで飼育した。実験群は、5 ヶ月齢まで飼育する群において、固形飼料のみの a 群、粉末飼料のみの d 群とした。また、7 ヶ月齢まで飼育する群において、固形飼料のみの A 群、粉末飼料のみの D 群とした。

実験 2 では、飼料性状の変更による咀嚼刺激の回復を検討するため、実験 1 と同様に 3 週齢より開始して、5 ヶ月齢および 7 ヶ月齢まで飼育した。

実験群は、5 ヶ月齢まで飼育する群において、固形飼料のみの a 群、3 ヶ月齢にて粉末から固形飼料へ変更する b 群、粉末飼料のみの d 群とした。また、7 ヶ月齢まで飼育する群において、固形飼料のみの A 群、3 ヶ月齢にて粉末から固形飼料へ変更する B 群、5 ヶ月齢にて粉末から固形飼料へ変更する C 群、粉末飼料のみの D 群とした。各群 5 匹を用いた。

すべてのマウスは、各月齢まで飼育した時点で脳を全摘出し、通法に従って、厚さ  $4\mu\text{m}$  の切片を各個体より 5 枚作製し、Crysil Violet 溶液によ

る Nissl 染色を行った。その後、左側海馬 CA1、CA3 領域の錐体細胞を光学顕微鏡下にて撮影し、画像処理ソフト ImageJ (NIH) を用い、二重盲検法にて各切片について単位面積あたり 3 ヲ所の錐体細胞数と錐体細胞面積を計測した。単位面積は、CA1 領域では  $50 \times 150 \mu\text{m}$ 、CA3 領域では  $100 \times 100 \mu\text{m}$  と設定した。錐体細胞数は、3 ヲ所の単位面積あたりの平均値とした。錐体細胞面積は、単位面積あたりの最も大きい細胞から順に 5 つを計測し、計 3 ヲ所の全 15 細胞の平均値とした。今回の実験では、核小体および境界が明瞭な細胞のみを計測対象とした。

さらに、全身的影響を検討するため、すべての群において体重を 2 ヲ月齢より 2 週ごとに計測した。

なお、実験動物の飼育、管理ならびに実験方法については、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認 (AGUD-180) を受けて行った。

## 2. 統計処理

実験 1 では、飼料性状の違いによる影響を検討するため、実験群間で、月齢ごとに Student' s t-test を用いた。

実験 2 では、飼料性状の変更による影響を検討するため、実験群間の比較に一元配置分散分析法を用いて検定し、さらに有意差が認められた場合には Tukey test による多重比較を行った。

統計的有意性は、有意水準は 5% ( $p < 0.05$ ) にて判断した。

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 病理組織学的検討

##### (1) 5 ヶ月齢まで飼育した群について

###### ① 錐体細胞数

実験 1 では、CA1、CA3 領域ともに、d 群は a 群に比べて有意に錐体細胞数の減少が認められた。実験 2 では、CA3 領域において、d 群は a 群と b 群に比べて有意に減少が認められた。

###### ② 錐体細胞面積

実験 1 では、CA1、CA3 領域ともに、d 群は a 群に比べて有意に錐体細胞面積が小さい値を示した。実験 2 では、CA1 領域において、b 群は a 群より有意に小さい値を示した。

##### (2) 7 ヶ月齢まで飼育した群について

###### ① 錐体細胞数

実験 1 では、CA1、CA3 領域ともに、D 群は A 群に比べて有意に錐体細胞数の減少が認められた。実験 2 では、CA1 領域において、C 群と D 群は A 群と比べて有意に減少が認められた。また、C 群は B 群と D 群に比べて有意に減少が認められた。CA3 領域において、C 群と D 群は A 群に比べて有意に減少が認められた。

###### ② 錐体細胞面積

実験 1 では、CA1、CA3 領域ともに、d 群は a 群に比べて有意に錐体細胞

面積が小さい値を示した。実験 2 では、CA1 領域において、B 群、C 群、D 群は、A 群に比べて有意に小さい値を示した。CA3 領域において、C 群と D 群は A 群と B 群に比べて有意に小さい値を示した。

## 2. 全身的影響

実験 1 および実験 2 において、すべての実験群で正常な成長による体重の増加が認められたが、実験群間における有意な差は認められなかった。

## IV. 考 察

### 1. 全身的影響

飼育飼料の違いおよび変化による影響を検討するため、各個体の体重を定期的に計測して比較検討した。すべての実験群において、加齢的な体重の増加は認められたが、実験群間で有意な差は認められなかった。このことから、飼料性状の違いや飼育飼料の変更は全身的にほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

### 2. 飼料性状の変更による影響

今回 b 群と B 群では、a 群と A 群に類似した傾向を示した。これは、学習記憶能力の低下前に、粉末から固形飼料へと飼料性状を変更し、咀嚼刺激を増加させることにより、病理組織学的に海馬の錐体細胞の萎縮や減少を抑制したことから、認知症の発症を遅延させる可能性が示唆された。一方、CA1、CA3 領域ともに C 群では D 群に類似した値を示した。これは、長期間の粉末飼料飼育による咀嚼刺激の減少は、海馬の錐体細胞の萎縮や減少を

生じ、一度変性した錐体細胞は、飼育途中で咀嚼刺激を増加させても、錐体細胞の変性を回復させることは困難であることが示唆され、その結果 D 群と類似した結果を示したと考えられた。

しかし、CA1 領域の錐体細胞面積では、b 群が a 群より小さい値になっていること、B 群と D 群が近い値を示したことから、咀嚼刺激の変化は少なからず錐体細胞へ影響を与えていることが示唆された。

今回の結果より、ヒトにおいても歯の喪失後に長期間治療を行わず、咀嚼刺激の減少した状態が継続すると、海馬の錐体細胞の萎縮や減少が生じ、認知症を早期に発症する危険性があると考えられた。また早期に咀嚼刺激を増加させた b 群および B 群においても、わずかに海馬の錐体細胞への影響が確認された。このことは、海馬の形態学的変化が認知機能障害に先行して起こるとの報告から考えると、咀嚼刺激の減少は、海馬の錐体細胞に影響が生じてから、学習記憶能力の低下などの行動学的変化に現れる可能性が考えられた。この結果から、ヒトにおいて歯の欠損に対して補綴治療による、いち早い咀嚼刺激の回復が、認知症の予防において重要であると考えられる。

しかし、今回の実験では、成熟期の 5 ヶ月齢と老齢初期の 7 ヶ月齢のみの検討であり、咀嚼刺激の影響を検討するには、さらに詳細に各月齢の海馬の状態を把握することが必要であると思われる。また今回は、海馬の CA1、CA3 領域のみの検討であり、他部位の錐体細胞については言及できていない。

そのため、今後は学習記憶に関連する大脳皮質や大脳基底核といった、他の部位についても検討が必要であると思われる。

## V. 結論

本研究において SAMP8/Ymi を用い、咀嚼刺激の回復が、海馬に及ぼす影響について病理組織学的検討を行った。その結果、学習記憶能力の低下前に粉末から固形飼料に飼料性状変更による咀嚼刺激の回復が、海馬の錐体細胞の萎縮、減少を抑制する傾向を示唆した。しかし、学習記憶能力の低下後に飼料性状を変更し、咀嚼刺激を回復させても、海馬への影響はほとんどみられなかった。