

## 咬合支持の有無が記憶学習能と酸化ストレスに及ぼす影響

宮崎 貴子

### 緒 言

我が国においては 65 歳以上の高齢者（以下、高齢者と略す）の増加に伴い 2007 年に超高齢社会を迎え、総務省発表の推計人口（2014 年 9 月現在）では高齢者人口の総人口に占める割合は 25.9%と過去最高を更新し、人口の 4 人に 1 人が高齢者となった<sup>1)</sup>。高齢者の増加に伴い、高齢者の認知症有病率は 15%と推計され、認知症患者の増加という社会問題が深刻化している<sup>2)</sup>。

アルツハイマー型認知症は認知症の最も多いタイプの重要な原因疾患であり、歯の喪失がアルツハイマー型認知症の疫学的リスクファクターの 1 つであることが報告されている<sup>3)</sup>。さらに、残存歯数が多いほど認知能力が高いことや、歯の喪失と高齢者の日常生活動作との間には関連性があることが報告されている<sup>4,5)</sup>。また、動物実験によっても咀嚼機能の減少や咬合支持の喪失が記憶学習能の低下を引き起こすことが報告されてきた<sup>6-8)</sup>。我々研究グループにおいても、これまでに上顎臼歯を抜歯したラットでは海馬の錐体細胞数が減少して空間認知能が低下し、咬合支持を回復させると空間認知能の低下を抑制するということを報告してきた<sup>9,10)</sup>。

酸化ストレスとは、生体内で生成する活性酸素種（Reactive Oxygen Species：以下、ROS と略す）の酸化損傷能力と生体内の抗酸化システムによる抗酸化力とのバランスが酸化に傾いた状態のことである<sup>11)</sup>。その結果、酵素・DNA・脂質・タンパク質の機能障害や細胞膜障害が引き起こされ、癌、免疫関連疾患、パーキンソン病、生活習慣病など様々な病気が発症することが知られている<sup>12-14)</sup>。特に、酸化ストレスと記憶学習能障害についての関連性については、酸化ストレスがアルツハイマー型認知症の危険因子であることが明らかになり<sup>15)</sup>、軽度認知障害患者では認知症発症前に脳酸化障害が起こっていたことも報告されている<sup>16)</sup>。動物実験においても、酸化ストレスによって学習ならびに記憶能力などの認知機能障害が惹起されることが示唆されている<sup>17)</sup>。このように、酸化ストレスと記憶学習能障害との間には関連性があることが示されつつある。

一方、軟性食餌による咀嚼機能の変化が脳内の酸化ストレスを増加すると報告されている<sup>18)</sup>が、咬合支持の有無が記憶学習能及び酸化ストレスに与える影響については十分な検討が行われているとはいえない。この点を解明することは残存歯の保存と補綴歯科治療の重要性を示し、超高齢社会における健康の維持・増進に関して有用であると考えられる。

本研究では、上顎臼歯抜歯によって咬合支持を喪失したラットと実験用義歯によって咬合支持を回復させたラットを用いて、咬合支持の有無が記憶学習能と酸化ストレスに及ぼす影響について検討を加えた。本研究においては、行動学的観察には受動的回避実験を用い、酸化ストレス

の影響と抗酸化作用の測定には ELISA 法を用いて検討した。

## 材料ならびに方法

### 1. 実験動物

実験動物には Wistar 系雄性ラット 21 匹を用いた。ラットは全ての上顎臼歯を抜歯した臼歯抜歯群 7 匹，上顎臼歯抜歯後に実験用義歯を装着した義歯装着群 7 匹，対照群 7 匹の 3 群に無作為に振り分けた。ラットは 12 時間毎の明暗サイクルの飼育室内において硬性飼料（MF：オリエント酵母工業株式会社，東京，日本）および水分を自由摂取できる環境で飼育した。また，全期間を通して個々のラットの体重変動を記録した。この実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い，同委員会の承諾を得て行った（OKU-2012561）。

### 2. 上顎臼歯抜歯

臼歯抜歯群及び義歯装着群は，7 週齢時にペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル：共立製薬，東京，日本）を用いた腹腔内麻酔下（50mg/kg）において全ての上顎臼歯抜歯を施行した。対照群には麻酔のみの偽手術を行った。

### 3. 義歯を用いた咬合支持回復

義歯装着群は、臼歯抜歯後に咬合支持の回復のための実験用義歯を装着した。実験用義歯は、9週齢時にレジン製のトレーとシリコーン系印象材を使用してラット口腔内の印象採得を行い間接法で作製後、10週齢時に上顎に装着した。対照群および臼歯抜歯群には麻酔のみの偽手術を行った。実験用義歯は、切歯部に維持用ワイヤーを設定し、義歯床レジン部は加熱重合型レジン（ACRON：ジーシー，東京，日本）によって構成した（図1）。咬合高径は前歯の被蓋関係が対照群のそれと同様になるように義歯床の厚みを調整し、さらに下顎対合歯が均一に接触するように調整した。

#### 4. 記憶学習能の評価

実験に用いた受動的回避実験装置（センサー付ステップスルーケージ：メルクエスト，富山，日本）は明箱（20×20×20cm）と暗箱（20×20×20cm）に区切られており、ギロチンドアによって開閉できる構造である（図2）。暗闇を好むラットが暗箱へ移動したことが赤外線センサーによって感知されると、ショックジェネレーターから床面のグリッドを通して電気刺激（0.8mA，3秒間）が伝わる設定とした。受動的回避実験は、18週齢時から実行し獲得試行と再生試行で構成した。試行前の2分間、ラットを明箱中で周囲の環境に順応させた後、ギロチンドアを開けラットが暗箱に侵入するまでの反応時間を計測した。獲得試行においては、ラットが暗箱に入ったと同時にギロチンドアを閉めて床面のグリッドから電気刺激を与え、電気刺激終了後にギロチンドアを開けてラット

を明箱に移動させた。この獲得試行を全てのラットが 300 秒明箱に待機できるようになるまでの期間として 3 日間試行した。再生試行は、電気刺激を与えない点以外は獲得試行を同じ試行を 5 日間行った。再生試行の最大待機時間は 600 秒とした。獲得試行、再生試行は 1 日 1 回とし、実験中は周囲の環境を一定とし、日内変動の影響を最小とするため同時に試行した。

#### 5. 血液と海馬の採取方法

受動的回避実験の最終試行の後、ラットに対してペントバルビタールナトリウム (100mg/kg) 投与による麻酔を行い心臓より血液を採取した後に、脳組織を摘出して海馬組織を採取した。採取した血液は遠心分離 (2000rpm, 10 分間) して血漿を採取した。採取した血漿と海馬組織は -80℃ で保存した。

#### 6. 血漿コルチコステロン濃度の測定

血漿コルチコステロン濃度の測定には、YK240 Corticosterone EIA キット (矢内原研究所, 静岡, 日本) を用いた。

#### 7. 酸化ストレスの影響と抗酸化作用の測定

酸化ストレスマーカーとして 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), カルボニル化タンパク質, チオバルビツール酸反応物質 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances: 以下, TBARS と略す), SOD (superoxide dismutase)

の計測を行った。8-OHdG の測定には、高分子成分の影響を除去するため分画分子量 10,000 の限外濾過膜（ナノセップ遠心ろ過デバイスオメガメンブレン：日本ポール株式会社，東京，日本）を用いて測定直前に濾過処理を行った血漿を使用し，高感度 8-OHdG Check ELISA キット（日本老化制御研究所，静岡，日本）を用いた。カルボニル化タンパク質の測定には，海馬組織ホモジネート上清を使用した。ホモジネート上清は海馬組織に哺乳類組織溶解/抽出用試薬（CelLytic™ MT：SIGMA-ALDRICH®，東京，日本）と Protease Inhibitor Cocktail（SIGMA-ALDRICH®，東京，日本）を添加して粉砕機（バイオマッシャー II：株式会社ニッピ，東京，日本）を用いて調整したホモジネートを遠心分離（12500rpm，10 分間，4℃）することで採取した。測定には，OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit（コスモ・バイオ株式会社，東京，日本）を用いた。TBARS の測定には，血漿を使用し OxiSelect™ TBARS Assay Kit（MDA Quantitation）（コスモ・バイオ株式会社，東京，日本）を用いた。SOD の測定には海馬組織 1 容量に対して 9 容量の PBS(pH7.4) を添加して粉砕したホモジネートを遠心分離（14,000rpm，30 分間，4℃）して上清を使用し，SOD 活性測定キット（日本老化制御研究所，静岡，日本）を用いた。血漿コルチコステロン濃度，8-OHdG，カルボニル化タンパク質，TBARS，SOD の吸光度測定には，マイクロプレート用吸光度計（Model680：BIO RAD，東京，日本）を用いた。

## 8. 統計学的分析

血漿コルチコステロン濃度と酸化ストレスの影響と抗酸化作用の測定結果は 1 元配置分散分析，体重変動と受動的回避実験における暗箱に侵入するまでの反応時間は 2 元配置分散分析のち Tukey 法による多重比較を行った。また，酸化ストレスの影響と抗酸化作用の測定結果の相関関係を検討した。統計学的有意差の検定には統計ソフト（PASW Statistics 18：SPSS Japan，東京，日本）を用いて有意水準は 5%とした。

## 結 果

### 1. 体重変動

観察期間を通じていずれの実験群も同様の体重変動を示した（図 3）。

### 2. 血漿コルチコステロン濃度

受動的回避実験の最終試行時における血漿コルチコステロン濃度はいずれの実験群においても約 600ng/ml であり，有意な差は認めなかった（図 4）。

### 3. 記憶学習能（受動的回避実験）

2 元配置分散分析の結果を表 1 に示す。獲得試行では，いずれのラットも経時的に長時間明箱に留まるようになったが，2 日目の臼歯抜歯群では対照群と比較して有意に短時間で暗箱に入った。4 日目には，いず

れのラットも 300 秒以上明箱に留まるようになった。再生試行では，対照群は記憶を保持していたが，臼歯抜歯群では 7 日目以降は，対照群と比較して有意に短時間で暗箱に入った。義歯装着群では，8 日目に対照群と比較して有意に短時間で暗箱に入った（図 5）。

#### 4. 酸化ストレスと抗酸化作用（図 6）

##### 4-1. 8-OHdG

臼歯抜歯群と義歯装着群では，対照群に比べて有意に高値を認めた。臼歯抜歯群と義歯装着群間には，有意差は認められなかった。

##### 4-2. カルボニル化タンパク質

臼歯抜歯群と義歯装着群では，対照群に比べて有意に高値を認めた。臼歯抜歯群と義歯装着群間には，有意差は認められなかった。

##### 4-3. TBARS

臼歯抜歯群では，対照群に比べて有意に高値を認めた。義歯装着群では臼歯抜歯群との間には有意差はないものの，臼歯抜歯群よりも減少する傾向がみられた。

##### 4-4. SOD

臼歯抜歯群では，対照群に比べて有意に低値を認めた。義歯装着群では臼歯抜歯群ならびに対照群との間に有意差は認められなかった。

##### 4-5. 相関関係

酸化ストレスの影響と抗酸化作用の測定結果の相関について検討した結果，TBARS 値と SOD 値には強い負の相関を認めた（図 7， $r=-0.743$ ， $p$



<0.05)。また，対照群では SOD 値が高く TBARS 値が低い動物が多く，臼歯抜歯群では SOD 値が低く TBARS 値が高い動物が多かった。義歯装着群では全体に分散する傾向が見られた。

## 考 察

歯の喪失がアルツハイマー型認知症の疫学的リスクファクターの 1 つであることが報告され<sup>3)</sup>，咀嚼機能の減少や咬合支持の喪失が記憶学習能の減退を引き起こし，高次脳機能の低下に関連していることが次第に明らかになりつつある<sup>6-8)</sup>。軟性食餌による咀嚼機能の変化が酸化ストレスを増強し<sup>18)</sup>，酸化ストレスの増強はアルツハイマー型認知症の危険因子であることが知られている<sup>15)</sup>が，咬合支持の有無が記憶学習能及び酸化ストレスに与える影響については詳細な検討が加えられているとはいえない。したがって本研究では上顎臼歯抜歯によって咬合支持を喪失させたラットと実験用義歯によって咬合支持を回復させたラットを用いて，咬合支持の有無が記憶学習能と酸化ストレスに及ぼす影響について検討した。

SAMP8 マウスは，寿命 12 か月で生後 6 か月頃から老化に伴う学習や記憶障害を見せ始める実験動物でありアルツハイマー型認知症動物実験モデルとして研究に頻用されている<sup>19,20)</sup>。しかし，SAMP8 マウスの口腔内は小さく，抜歯ならびに実験用義歯を作製・装着することが非常に

困難であるため，本研究では十分な口腔内の大きさを持ち，受動的回避実験にも用いられたことのある実験動物として Wistar 系雄性ラットを被験動物とした。

最近のアルツハイマー型認知症モデル動物実験では，軟性食餌は硬性食餌に比較して記憶学習能を低下させ，認知機能に影響を及ぼすことが示唆されている<sup>21)</sup>。そこで，本研究では全ての実験動物に実験期間を通じて同一の硬性飼料を与えた。その結果，臼歯抜歯群及び義歯装着群の体重は対照群と同程度の変動を示した。ラットは切歯を用いて硬性飼料を粉砕するため，臼歯抜歯群及び義歯装着群においても対照群と同程度の成長を示すだけの飼料を摂取することが可能であったと考えられる。このことから，抜歯及び実験義歯を用いた咬合支持の回復には摂食行動ならびに栄養状態への影響はなかったと推察された。

実験動物に歯冠切除あるいは咬合挙上といった咬合不調和を与えると慢性ストレスマーカーである血中コルチコステロン濃度が上昇して空間認知能の低下を惹起する<sup>22,23)</sup>が，切除した歯冠をレジンをを用いて修復して咬合を回復させると血中コルチコステロン濃度は対照群と同程度まで低下すること<sup>23)</sup>や，咬合挙上によって上昇した尿中コルチゾール濃度が咬合挙上前の咬合状態に回復させると基準値まで低下すること<sup>24)</sup>が報告されている。本研究では抜歯による咬合支持の喪失，実験用義歯の装着による咬合支持の回復および受動的回避実験がラットに与える慢性ストレスを血漿コルチコステロン濃度によって評価した。本研究において製作した実験用義歯は，前歯の被蓋関係が対照群のそれと同様になるよ

うに義歯床の厚みを調整し、咬合不調和が生じないように配慮した。さらに、義歯装着から受動的回避実験までは8週間の期間を設けており、実験用義歯に対する十分な順応時間を確保したことで臼歯抜歯群と義歯装着群の血漿コルチコステロン濃度に有意な影響を与えなかったと推察される。しかし、本研究では血液採取を経時的に行っていないので血漿コルチコステロン濃度の経時変化は不明なため、先行研究と直接的に比較することができないと考えられる。また、我々が過去に示した<sup>10,25)</sup>血漿コルチコステロン濃度より高い数値を示した要因として、受動回避実験の電気刺激が考えられるが、臼歯抜歯群と義歯装着群の血漿コルチコステロン濃度は対照群のそれと有意な差が認められなかったことから、本研究の受動的回避実験の結果に慢性ストレスは影響を及ぼさなかったと考えられる。

本研究において、記憶学習能の評価に用いた受動的回避実験は記憶学習試験の1つであり、ラットが明るい環境よりも暗い環境を好むために自発的に暗箱への移動する習性を利用する簡便な評価方法で、抗認知症薬のスクリーニングにも頻用されている方法である。本研究における記憶学習能の評価の結果から、獲得試行では臼歯抜歯群は対照群と比較して記憶獲得に長時間を要し、再生試行では記憶保持の低下を早期から認めた。過去の研究において臼歯抜歯により咬合支持が喪失した実験動物では、再生試行の反応時間の有意な短縮が認められ、歯の喪失が記憶学習能に影響を及ぼすことが報告されている<sup>8,26)</sup>。長期間の歯牙喪失によって歯根膜神経が変性し歯根膜の感覚受容器からの感覚入力が増加する

ことが示唆されており<sup>27)</sup>、また、咬合支持の喪失が海馬アセチルコリン濃度を低下し対角帯核と内側中核のコリン作動性ニューロン数の減少を引き起こすことで記憶や記憶保持能力を低下させることが示されている<sup>28)</sup>。本研究においても咬合支持の喪失に伴う咀嚼感覚刺激の減少が海馬への神経伝達回路の活性を低下させ、記憶学習能の低下を助長したと推察される。

また本研究において義歯装着群は臼歯抜歯群より記憶学習能の低下が遅れて発現し、臼歯抜歯群と比較して長期間記憶を保持していることが示された。健常者を対象とした咀嚼と高次脳機能の研究では、咀嚼運動が前頭葉の脳血流量を増加させるだけでなく記憶能力の維持・向上にも寄与する可能性が示唆されている<sup>29)</sup>。また、義歯装着者においても義歯装着によって脳血流量が増加すること<sup>30)</sup>、大脳皮質の神経活動が賦活されること<sup>31)</sup>が示され、咬合支持の回復による咀嚼機能の効率化および咀嚼筋活動の活性化が脳活動の賦活を引き起こし高次脳機能に影響を与える可能性が報告されている。このことから、咬合支持の回復によってラット咀嚼筋活動の活性化や、下顎残存歯の歯根膜感覚受容器から中枢神経系への咀嚼感覚刺激の活性化が神経伝達回路や脳活動の賦活を引き起こし、記憶学習能障害を抑制したと推察される。

酸化ストレスとは、ROSと抗酸化システムとのアンバランスと定義されており、過剰に発生したROSにより酸化反応が亢進しDNA、タンパク質、脂質に障害を与える。本研究ではDNA酸化損傷測定のため8-OHdG濃度を測定した。8-OHdGは、活性酸素によりDNA中のグアニン塩基が

酸化され生成される物質で<sup>32-34)</sup>、最近の虚血再灌流障害の病態、神経変性疾患、慢性腎不全に関する研究では DNA 損傷マーカーとして使用されている<sup>35-37)</sup>。アルツハイマー型認知症患者の核・ミトコンドリア内の 8-OHdG 濃度は、対照被験者と比較して 3 倍に増加することが報告されている<sup>38)</sup>。口腔内においては、ブラッシングが歯肉 8-OHdG 陽性線維芽細胞の密度と血漿 8-OHdG の濃度を低下させること<sup>39)</sup>、ココアに富んだ食事は歯肉 8-OHdG 濃度の低下させること<sup>40)</sup>が報告されている。しかし、咬合支持の喪失および回復が 8-OHdG に及ぼす影響については報告が少ない。本研究の結果から、臼歯抜歯群と義歯装着群における 8-OHdG 濃度は対照群と比較して増加したことから、臼歯抜歯によって DNA の酸化が亢進したが、臼歯抜歯群と義歯装着群の間には有意差がなかったことから、咬合支持の回復は DNA の酸化には関与したかどうかは不明である。

カルボニル化タンパク質はタンパク質中のプロリン、アルギニン、リシン、スレオニンなどのアミノ酸が多様な ROS により酸化修飾を受け、カルボニル誘導体となったタンパク質の総称である。脳内カルボニル化タンパク質は SAMP8 マウスでは加齢とともに増加し<sup>41-43)</sup>、アルツハイマー型認知症患者の海馬においては健常者に比べて 42% 増加したことが報告されている<sup>44)</sup>。また、老化マウスを対象とした水迷路実験における空間認知能の低下と脳内カルボニル化タンパク質の増加に相関があり<sup>45)</sup>、カルボニル化タンパク質と認知機能障害との関連性が示されている。本研究の結果から、臼歯抜歯群と義歯装着群のカルボニル化タンパク質

濃度は対照群と比較して増加したことから、抜歯によってタンパク質の酸化が亢進したが、臼歯抜歯群と義歯装着群の間には有意差がなかったことから、咬合支持の回復はタンパク質の酸化には関与したかどうかは不明である。

脂質過酸化反応の副生物とチオバルビツール酸とが縮合した **TBARS** は、脂質過酸化反応のスクリーニングとモニタリングで用いられる物質である。本研究では脂質過酸化反応の測定に酸化ストレスマーカーとして利用されるマロンジアルデヒドを対象として **TBARS** 濃度を測定した。過去の研究において、アルツハイマー型認知症およびパーキンソン病に代表される神経変性疾患では酸化ストレスおよび脂質過酸化反応が増加していると報告されている<sup>46,47)</sup>。また、動物実験においてアルツハイマー型認知症の原因物質の1つであるアミロイドβの蓄積<sup>48)</sup>に先行して脂質過酸化反応の増加が報告されている<sup>49)</sup>。このように脂質過酸化反応の増加によってアミロイドβが沈着して記憶学習能が低下するという過程が推察されている。本研究の結果から、対照群と比較して臼歯抜歯群の脂質過酸化反応が増加したことから、咬合支持の喪失によって脂質過酸化反応が亢進し、義歯装着群は臼歯抜歯群と比較して脂質過酸化反応が減少する傾向がみられたことから、咬合支持の回復は脂質過酸化反応を回復させ記憶学習能障害が緩和されたと推察される。したがって、咬合支持の有無は脂質過酸化反応を介して記憶学習能に影響している可能性が示唆された。

通常、生体内には **SOD**、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ

などフリーラジカルを除去する働きのある抗酸化酵素が備わっており、予防型抗酸化システムを形成する<sup>50)</sup>。本研究においては、抗酸化作用測定のため SOD 濃度を測定した。過去の研究において、SOD ノックアウトマウスは高い酸化ストレス状態を示し DNA 変異の頻度、酸化損傷 DNA 量、酸化タンパク質や過酸化脂質量が増加すること<sup>51,52)</sup>や、アルツハイマー型認知症患者の前頭皮質、海馬および小脳においては SOD が 25%～35% 減少することが報告されている<sup>53)</sup>。本研究の結果から、SOD による抗酸化作用は臼歯抜歯群では対照群と比較して低下したことから、咬合支持の喪失により抗酸化作用が低下して高い酸化ストレス状態となり記憶学習能障害が発現したと推察される。また、義歯装着群では臼歯抜歯群との間に有意差がないものの、対照群との間にも有意差は認められなかったことから、咬合支持の回復は抗酸化作用を回復させて記憶学習能障害が緩和された可能性があるかと推察される。したがって、咬合支持の有無は抗酸化作用を介して記憶学習能に影響している可能性が示唆された。

そこで、TBARS と SOD の相関について検討したところ、両者の間には強い負の相関が認められた。対照群では SOD 値が高く TBARS 値が低い傾向を示し、抜歯群では逆に SOD 値が低く TBARS 値が高い動物が多く見られ、義歯装着群では両群の中間の傾向を示した。この傾向は受動的回避実験の結果と整合性を示しており、臼歯の抜歯と義歯装着によって TBARS と SOD が相関を持って変化して記憶学習能に影響したことを示唆するものと考えられる。

## 結 論

咬合支持を喪失したラットでは抗酸化作用が低下し脂質過酸化反応が亢進した酸化ストレス状態となり記憶学習能障害が発現し，咬合支持を回復させたラットでは脂質過酸化反応と抗酸化作用が回復し，記憶学習能障害が抑制されたと推察される。したがって，咬合支持の有無による酸化ストレスの変動は，記憶学習能に影響を与える可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う貴重な機会を与えていただき，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました岡山大学医歯薬学総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野の皆木省吾教授に謹んで感謝の意を表します。また，本研究の遂行に際し，始終懇切なる御指導いただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野の原 哲也准教授に深く感謝いたします。また，様々な面にわたり貴重な御助言と御協力くださった，岡山大学医歯薬学総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野ならびに，岡山大学病院咬合・義歯補綴科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。最後に，研究の遂行に際し，多くの理解を示し，多方面にわた



り協力してくれた両親，姉妹に感謝します。

#### 参考文献

- 1) 総務省統計局：高齢者人口 平成26年9月15日。
- 2) 厚生労働省老健局高齢者支援課認知症・虐待防止対策推進室：認知症有病率等調査について 平成25年6月25日。
- 3) Kondo, K., Niino, M., Shido, K.: A case-control study of Alzheimer's disease in Japan - significance of life-styles. *Dementia.*, **5**, 314-326, 1994.
- 4) Takata, Y., Ansai, T., Soh, I., Sonoki, K., Awano, S., Hamasaki, T., Yoshida, A., Ohsumi, T., Toyoshima, K., Nishihara, T., Takehara, T.: Cognitive function and number of teeth in a community-dwelling elderly population without dementia. *J Oral Rehabil.*, **36**, 808-813, 2009.
- 5) McMillan, A.S., Wong, M.C.M.: Emotional effects of tooth loss in community-dwelling elderly people in Hong Kong. *Int J Prosthodont.*, **17**, 172-176, 2004.
- 6) Kato, T., Usami, T., Noda, Y., Hasegawa, M., Ueda, M., Nabeshima, T.: The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. *Behav Brain Res.*, **83**, 239-242, 1997.

- 7) Onozuka, M., Watanabe, K., Mirbod, S.M., Ozono, S., Nishiyama, K., Karasawa, N., Nagatsu, I.: Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. *Brain Res.*, **826**, 148-153, 1999.
- 8) Makiura, T., Ikeda, Y., Hirai, T., Terasawa, H., Hamaue, N., 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.
- 9) 黒住明正: 臼歯抜歯後の咬合支持の回復が空間認知の再生及び海馬神経細胞密度に与える影響. *岡山歯誌*, **28**, 1-9, 2009.
- 10) Sakamoto, S., Hara, T., Kurozumi, A., Oka, M., Kuroda-Ishimine, C., Araki, D., Iida, S., Minagi, S.: Effect of occlusal rehabilitation on spatial memory and hippocampal neurons after long-term loss of molars in rats. *J Oral Rehabil.*, **41**, 715-722, 2014.
- 11) Sies, H.: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Amer. J. Med.*, **91**, 31-38, 1991.
- 12) Gius, D. and Spitz, D.R.: Redox signaling in cancer biology. *Antioxid Redox Signal.*, **8**, 1249-1252, 2006.
- 13) Poon, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G., Butterfield, D.A.: Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med.*, **20**, 329-359, 2004.
- 14) Butterfield, D.A., Drake, J., Pocernich, C., Castegna, A.: Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid

- beta-peptide. *Trends Mol. Med.*, **7**, 548-554, 2001.
- 15) Nunomura, A., Castellani, R.J., Zhu, X., Moreira, P.I., Perry, G., Smith, M.A.: Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **65**, 631-641, 2006.
- 16) Praticò, D., Clark, C.M., Liun, F., Lee, V.Y.M., Trojanowski, J.K.: Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment : a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol.*, **59**, 972-976, 2002.
- 17) Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., Urano, S.: Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann NY Acad Sci.*, **928**, 168-175, 2001.
- 18) 木本克彦: 咬合・咀嚼不全と脳機能 - 神経伝達物質と酸化ストレスについて. *日咀嚼誌*, **21**, 13-18, 2011.
- 19) Hosokawa, M., Abe, T., Higuchi, K., Shimakawa, K., Omori, Y., Matsushita, T., Kogisi, K., Deguchi, E., Kishimoto, Y., Yasuoka, K., Takeda, T.: Management and design of the maintenance of SAM mouse strains: an animal model for accelerated senescence and age-associated disorders. *Exp Gerontol.*, **32**, 111-116, 1997.
- 20) Hosokawa, M., Umezawa, M., Higuchi, K., Takeda, T.: Interventions of senescence in SAM mice. *J. Anti-Aging Med.*, **1**, 27-37, 1998.
- 21) Kushida, S., Kimoto, K., Hori, N., Toyoda, M., Karasawa, N., Yamamoto, T., Kojo, A., Onozuka, M.: Soft-diet feeding decreases dopamine release

- and impairs aversion learning in Alzheimer model rats. *Nuerosci Lett.*, **439**, 208-211, 2008.
- 22) Kubo, K.Y., 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. *Nuerosci Lett.*, **414**, 188-191, 2007.
- 23) Irie, K., Ekuni, D., Tomofuji, T., Azuma, T., Endo, Y., Kasuyama, K., Morita, M.: Occlusal disharmony induces BDNF level in rat submandibular gland. *Arch Oral Biol.*, **56**, 35-40, 2011.
- 24) Budtz-Jorgensen, E.: Occlusal dysfunction and stress: an experimental study in macaque monkeys. *J Oral Rehabil.*, **8**, 1-9, 1981.
- 25) Iida, S., Hara, T., Araki, D., Ishimine-Kuroda, C., Kurozumi, A., Sakamoto, S., Miyazaki, T., Minagi, S.: Memory-related gene expression profile of the male rat hippocampus induced by teeth extraction and occlusal support recovery. *Arch Oral Biol.*, **59**, 133-141, 2014.
- 26) Andoh, T., Sakuma, Y., Yamamoto, S., Matsuno, A., Maeda, T., Kotani, J.: Influences of molar loss of rat on learning and memory. *J Prosthodont.*, **53**, 155-160, 2009.
- 27) Kubota, K., Nagae, K., Shibantai, S., Hosaka, K., Iseki, H., Odagiri, N., Lee, M.S., Chang, C.M., Ohkubo, K., Narita, N., Sonoda, Y.: Degenerative changes of primary neurons following tooth extraction. *Anat Anz.*, **166**, 133-139, 1988.

- 28) 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.*, **43**, 373-379, 2002.
- 29) Hirano, Y., Obata, T., Kashikura, K., Nonaka, H., Tachibana, A., Ikehira, H., Onozuka, M.: Effects of chewing in working memory processing. *Neurosci Lett.*, **436**, 189-192, 2008.
- 30) Miyamoto, I., Yoshida, K., Tsuboi, Y., Iizuka, T.: Rehabilitation with dental prosthesis can increase cerebral regional blood volume. *Clin Oral Implants Res.*, **16**, 723-727, 2005.
- 31) Hosoi, T., Morokuma, M., Shibuya, N., Yoneyama, Y.: Influence of denture treatment on brain function activity. *Jpn Dent Sci Rev.*, **47**, 56-66, 2011.
- 32) 葛西宏: 酸化ストレスのマーカー8-OHdGの測定. *FFI Journal.*, **194**, 10-16, 2001.
- 33) 蔵重淳: DNA酸化損傷バイオマーカー8-OHdGの測定. 臨床検査, **7**, 271-280, 2001.
- 34) Loft, S., Fischer-Nielsen, A., Jeding I.B., Vistisen, K., Poulsen, H.E.: 8-hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health.*, **40**, 391-404, 1993.
- 35) Cordis, G.A., Maulik, G., Bagchi, D., Riedel, W., Das, D.K.: Detection of

- oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *J Mol Cell Cardiol.*, **30**, 1939-1944, 1998.
- 36) Kikuchi, A., Takeda, A., Onodera, H., Kimpara, T., Hisanaga, K., Sato, N., Nunomura, A., Castellani, R.J., Perry, G., Smith, M.A., Itoyama, Y.: Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Dis.*, **9**, 244-248, 2002.
- 37) Akagi, S., Nagake, Y., Kasahara, J., Sarai, A., Kihara, T., Morimoto, H., Yano, A., Nakao, K., Nanba, K., Ichikawa, H., Makino, H.: Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with chronic renal failure. *Nephrology.*, **8**, 192-195, 2003.
- 38) Mecocci, P., MacGarvey, U., Beal, M.F.: Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, **36**, 747-751, 1994.
- 39) Ekuni, D., Tomofuji, T., Tamaki, N., Sanbe, T., Azuma, T., Yamanaka, R., Yamamoto, T., Watanabe, T.: Mechanical stimulation of gingiva reduces plasma 8-OHdG level in rat periodontitis. *Arch Oral Biol.*, **53**, 324-329, 2008.
- 40) Tomofuji, T., Ekuni, D., Irie, K., Azuma, T., Endo, Y., Tamaki, N., Sanbe, T., Murakami, J., Yamamoto, T., Morita, M.: Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J Periodontol.*, **80**, 1799-1808, 2009.

- 41) Nomura, Y., Wang, B.X., Qi, S.B., Namba, T., Kaneko, S.: Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse. *Exp Gerontol.*, **24**, 49-55, 1989.
- 42) Butterfield, D.A., Howard B.J., Yatin, S., Allen, K.L., Carney, J.M.: Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butylalpha- phenylnitrone. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94**, 674-678, 1997.
- 43) Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R.J., Miyahara, Y.: Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging.*, **23**, 639-644, 2002.
- 44) Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S.P., Wu, J.F., Carney, J.M., Lovell, M., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A.: Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.*, **65**, 2146-2156, 1995.
- 45) Forster, M.J., Dubey, A., Dawson, K.M., Stutts, W.A., Lal, H., Sohal, R.S.: Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **93**, 4765-4769, 1996.
- 46) Beal, M.F.: Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.*, **38**, 357-366, 1995.
- 47) Markesbery, W.R.: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease.

- Free Rad. Biol. Med.*, **23**, 134-147, 1997.
- 48) Kumar, V.B., Farr, S.A., Flood, J.F., Kamlesh, V., Franko, M., Banks, W.A., Morley, J.E.: Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides.*, **21**, 1769-1775, 2000.
- 49) Li, F., Calingasan, N.Y., Yu, F., Mauck, W.M., Toidze, M., Almeida, C.G., Takahashi, R.H., Carlson, G.A., Beal, M.F., Lin, M.T., Gouras, G.K.: Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *Neurochem.*, **89**, 1308-1312, 2004.
- 50) Naito, Y., Lee, M.C., Kato, Y., Nagai, R., Yonei, Y.: Oxidative stress markers. *アンチ・エイジ医*, **7**, 36-44, 2010.
- 51) Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Remmen, H.V.: Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.*, **43**, 477-503, 2007.
- 52) Muller, F.L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T.T., Epstein, C.J., Roberts, L.J., Csete, M., Faulkner, J.A., Remmen, H.V.: Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med.*, **40**, 1993-2004, 2006.
- 53) Richardson, J.F.: Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci.*, **695**, 73-76, 1993.



## 表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 咬合・有床義歯補綴学分野（主任：  
皆木省吾教授）

本論文の一部は，第25回日本老年歯科医学会学術大会（2014年6月，  
福岡）において発表した。

## 図表の説明

### 図 1

実験用義歯の模式図

### 図 2

受動的回避実験装置（センサー付ステップスルーケージ）の模式図

### 図 3

実験動物の体重変動

臼歯抜歯群及び義歯装着群は、対照群と比較して同程度の体重変動を示した。各群の平均値±標準偏差を示す（n=7）。

### 図 4

受動的回避実験の最終試行時における血漿コルチコステロン濃度

受動的回避実験の最終試行時における各群間の血漿コルチコステロン濃度に有意な差は認めなかった。各群の平均値±標準偏差を示す（n=7）。

### 表 1

受動的回避実験の結果

記憶学習能(受動的回避実験)の2元配置分散分析の結果を表に示す。  
(n=7) (Two way ANOVA/Tukey)。

## 図 5

### 受動的回避実験の結果

記憶学習能（受動的回避実験）の獲得試行と再生試行の結果を示す。獲得試行では、いずれのラットも経時的に長時間明箱に留まるようになったが。再生試行では、対照群は記憶を保持していたが、臼歯抜歯群では7日目以降に、義歯装着群では、8日目に対照群と比較して有意に短時間で暗箱に入った。各群の平均値±標準偏差を示す（n=7）（Two way ANOVA/Tukey：\* p<0.05 vs 対照群， † p<0.05 vs 義歯装着群）。

## 図 6

### 酸化ストレスと抗酸化作用の結果

酸化ストレスの影響と抗酸化作用の測定の結果を示す。8-OHdG とカルボニル化タンパク質の臼歯抜歯群と義歯装着群では、対照群に比べて有意に高値を認めた。臼歯抜歯群と義歯装着群間には、有意差は認められなかった。TBARSの臼歯抜歯群では、対照群に比べて有意に高値を認めた。義歯装着群では臼歯抜歯群との間には有意差はないものの、臼歯抜歯群よりも減少する傾向がみられた。SODの臼歯抜歯群では、対照群に比べて有意に低値を認めた。義歯装着群では臼歯抜歯群ならびに対照群との間に有意差は認められなかった。各群の平均値±標準偏差を示す（n=7）（One way ANOVA/Tukey：\* p<0.05 vs 対照群）。

図 7

TBARS と SOD の相関

TBARS と SOD 間には強い負の相関を認めた ( $r=-0.743$ ,  $p<0.05$ )。