

博士論文

ドパミン神経系に及ぼす咀嚼及び加齢の影響

高橋 弘樹

平成 23 年度提出

東北大学

緒言

咀嚼は全身機能及び脳機能に多様な影響を及ぼすことが近年明らかになってきている。臨床研究では疫学研究や形態学的研究が、一方、動物を用いた基礎研究では行動評価学的研究、組織学的研究及び神経化学的研究など種々の研究方法が用いられている。

臨床研究における全身機能に対する咀嚼の影響に関しては、咀嚼と全身の健康、体力及び運動機能との関連における疫学研究の結果、歯の喪失の予防や、歯牙欠損部に対する治療を行うことによる咀嚼能力の低下を防止することが、全身の健康の向上や体力維持につながると報告されており¹⁻⁴⁾、歯の喪失と運動機能の低下の間に正の相関があることが確認されている。脳機能に対する咀嚼の影響に対する臨床研究においては、咀嚼障害が記憶や認知機能の障害及びアルツハイマー病の危険因子となる可能性が報告されている^{5,6)}。また、咀嚼と脳機能の活性化に関する形態学的研究において、咀嚼時に脳の活動部位で局所脳血流が上昇することが報告されている^{7,8)}。

一方、咀嚼の影響に関する基礎研究において、老化促進マウスを用いて上顎臼歯の抜歯や臼歯部咬合挙上及び咬頭の切除による擬似的な咀嚼障害が、コリン作動性神経系の衰退や空間認知機能の障害及び海馬の神経細胞の変性、脱落が年齢依存的に生ずるといふ報告がされている⁹⁻¹²⁾。また、長期的な軟性食餌飼育が学習、記憶能力の減少を引き起こすことも報告されている¹³⁻¹⁸⁾。山本ら¹³⁾は、SAMR1 及び SAMP8 マウスに対する **eight-arm radial maze test** において、粉末食餌飼育群に比べ固形食餌飼育群の成績が良かったことを示し、初老期の大脳皮質及び海馬の神経細胞数が粉末食群で大きく減少することを示した。同様に筒井ら¹⁴⁾は、マウスを用いた粉末食餌飼育で、空間記憶機能の低下と、海馬における錐体細胞数の減少を示した。またラットを用いた研究において、寺沢ら¹⁵⁾は臼歯部の抜歯後に粉末食餌飼育を供したラットの場合、海馬への投射元となる対角帯・内側中隔核におけるコリン系神経細胞の減少が起こり、続いて海馬のアセチルコリン濃度の一過性の減少を引き起こすことを示し、青木ら¹⁶⁾はラットに対する軟性

食餌飼育により、海馬歯状回の細胞増殖が抑制されることを示した。さらに *in vivo* 研究において、加藤ら¹⁷⁾は臼歯抜歯後 135 週経過した老齢ラットにおいて大脳皮質のアセチルコリンレベルが低下することにより、空間認知機能の障害が生じること示し、串田ら¹⁸⁾は、アルツハイマーモデルラットに粉末食餌飼育を 7 週間行った結果、固形食餌群と比較して、腹側被蓋野におけるドパミン神経系の細胞数に差は認められないものの、海馬のドパミン放出量が減少し、さらに学習機能の障害も確認されたことを報告している。

これらの報告から、咀嚼時には脳の活性が上がること、また、長期的な咀嚼障害は全身の健康状態や運動機能及び記憶や学習機能の低下につながる可能性が考えられる。さらに、ラットやマウスに軟性食餌を長期的に与えることにより、同様に脳機能の低下を引き起こす。その上、この背景には運動や記憶と関連する局所脳部位における神経細胞数の減少や、神経伝達物質濃度の変化が起こっており、それは老化とともに増加することであることを示している。

これらの先行研究から鑑みると、咀嚼が高次脳機能及び他の脳神経系の機能と密接に関係していることは明らかであると考えられる。特に基礎研究においては、咀嚼が脳機能に与える影響を神経細胞数や神経伝達物質濃度の評価を通して解明することが試みられてきた。しかしながら、これらの研究は *in vitro* の研究が大多数であり、得られる情報の多くは脳細胞をホモジナイズした溶液を使って得られた情報や、脳切片の標本から得られた情報である。脳は常に活動しており、多数の神経細胞が複雑に絡み合い機能を構築している。過去の多くの脳神経科学の研究により、以下のような詳細な事実が明らかにされている。

脳は 1000 億個もの神経細胞から構成されており、分化を終えた神経細胞は、軸索と樹状突起と呼ばれる二種類の突起を伸ばしネットワークを形成している。軸索と樹状突起の間には、**synapse** と呼ばれる特殊な細胞間接合（20 nm の間隙）が形成され、二つの神経細胞は **synapse** を介して情報を伝達する。この **synapse** を介した情報伝達は脳の主要機能であり、これによる飛躍的な情報伝達効率の増大は記憶・学習・運動機能など

の基盤となっている²⁵⁾。また、この synapse 間の情報伝達は神経伝達物質によってなされており、pre-synapse (軸索側) で合成された神経伝達物質は synapse 間隙 (細胞間隙) に放出され、post-synapse (樹状突起側) の「特異的」な受容体に結合する。神経伝達物質が受容体に結合することが引き金となり、post-synapse に生化学的変化が起こり、情報の伝達が行われる。これが脳の主要機能である情報伝達の仕組みである。また受容体数は絶えず変動しており、神経伝達物質やホルモン環境、金属イオンなどにより調整を受け、合成と代謝のバランスをとっている。実際、高次脳機能やその他の神経機能はこのような分子レベルでのダイナミックな変動や、synapse 及び神経回路の構造の変化などの上に成り立っている。

すなわち、咀嚼が脳機能に及ぼす影響を解明するためには、現在までに行われてきた行動評価学的な研究や組織学的評価及び *in vitro* での分子レベルの評価だけではなく、分子の動的な変化、つまり synapse 部での神経伝達物質放出の変化に加え、それに対応する受容体の変化を評価することが重要であると考えられる。

現在、生体に対する脳神経系の探索として、microdialysis (MD)、voltammetry 法、functional magnetic resonance imaging、positron emission tomography (PET)、single photon emission computed tomography、near infrared spectroscopy、Magnetoencephalography、electroencephalography などが使用されている。

特に、非侵襲的に生体内情報の定量化・画像化が可能な PET は、疾患の病態解明・診断・創薬研究・micro-dosing 試験等の臨床現場において利用されている。また、より基礎的な研究分野にも応用されており、生体機能解明を目的とした受容体機能の *in vivo* イメージングにも利用されている¹⁹⁻²³⁾。

MD は無麻酔・無拘束下で pre-synapse からの神経伝達物質放出量の測定が可能であり、現在、ブレインダイアリシスとしてアセチルコリン、モノアミン、アミノ酸などの神経伝達物質の測定^{10,16,18,33-35,65)}の他、肝臓などの臓器ダイアリシス、血液中で測定する血液ダイアリシスとしても用いられている。

過去の研究報告を参照すると、咀嚼が脳機能に与える影響について神経伝達物質放出の変化を MD により評価した報告^{10,16,18)}が僅かにあるだけで、受容体への影響について PET を用いて評価した報告は無い。したがって、この PET 及び MD を用い *in vivo* の評価をすることで、過去の組織学的研究などの *in vitro* 研究で得られた知見をさらに発展出来ると考えられる。

これまで報告されている咀嚼が脳機能に与える影響に関する研究は、行動評価学的に結果の出ている記憶・学習機能に注目し、その機能と関連の深い辺縁系（海馬など）や大脳皮質を評価している研究が多い。しかし、咀嚼はプログラムされた緻密な運動形態であるため、記憶・学習などの高次脳機能に影響を与えるよりも、運動の制御に関連した中枢の部位に影響が出やすいのではないかと考えられる。

ここで、脳を神経学的に分類すると²⁶⁾、前脳・中脳・菱脳の三部位に大分類することができる。さらに前脳は終脳と間脳の二つに小分類でき、終脳の主な構造は大脳皮質・大脳基底核・辺縁系の三部位である。辺縁系の重要な構造の一つである海馬は、エピソード記憶や空間認知機能に重要である。また、大脳皮質は機能が場所によって異なっており、運動や体性感覚、視覚、聴覚、言語、学習及び記憶など多くの機能を担っている。終脳のもう一つの構造である大脳基底核は運動系の重要な構成要素であり、線条体（尾状核と被核を合わせた名称）や淡蒼球・黒質・視床下核で構成されている。大脳基底核は大脳皮質との間に神経回路のループを形成し、体性感覚情報をモニターし運動野で計画され実行されている運動の情報を得ることで、運動発現を制御している。そのため、大脳基底核に障害が起こると運動機能障害が生じる。このように、終脳を構成する大脳皮質・大脳基底核・辺縁系は運動・学習・記憶などの機能に重要であり、それぞれが互いに神経回路を形成することにより密接に関わっている。

大脳基底核の線条体について、咀嚼との関連がいくつか報告^{27,28)}されている。百瀬ら²⁷⁾は、安静時に比べガム咀嚼時に線条体における内因性のドーパミンの放出量が増加することを報告している。また咀嚼時に線条体の脳血流量が増加することも報告している²⁸⁾。

これは咀嚼が脳皮質や辺縁系だけではなく脳基底核とも関連していることを示している。線条体はドパミン系の神経支配が豊富であり、加えてドパミン受容体が高濃度で存在し、運動機能制御にとって重要な部位である^{29,42)}。ドパミンは中枢神経系の主な神経伝達物質の一つであり、運動の制御・報酬系・動機づけ・認知に関与している。また脳内にはドパミン作動性神経の複数の系があり、中でも黒質線条体系は運動機能にとって重要であると考えられている^{30,31)}。以上より本研究では測定部位としてこの線条体及びドパミン神経系に着目した。

さらに、本研究では長期的な研究を行うため、咀嚼の影響のみならず、ドパミン神経系の加齢による影響についても考える必要がある。ドパミン神経系の加齢変化については多くの研究報告^{32-40,44,57,63,64)}があり、一般的に加齢に伴う運動能力の低下や行動の鈍化は、ドパミン神経系の障害が関与していると考えられている^{42,43,57,58)}。*in vivo* と *in vitro* の研究でそれぞれの結果に差はあるが、ヒトをはじめマウス・ラットを用いた研究から、線条体のドパミン量は加齢とともに減少するという報告があり、中でもドパミン作動性の黒質線条体系が加齢によって障害されやすいと考えられている^{32-36,57)}。また、線条体のドパミン受容体についても、加齢に伴い減少することがヒト、サル、ラット、マウス、ウサギなどで報告されている^{32,37-40,57)}。

ラット脳線条体におけるドパミン放出量の加齢変化は、出生後 6 週齢でピークに達するという報告や³⁵⁾、3.8 カ月齢で最大になるという報告⁶³⁾がある。その後の加齢による減少は、10 週齢以降から始まるという報告³⁵⁾や、18 ヶ月齢以降³⁴⁾、また 24 ヶ月齢以降³³⁾に始まるなどの報告がある。さらに、ドパミンの代謝を調べた研究では、ラットのドパミン神経系の活性は生後 2~3 ヶ月で最大になり、その後加齢とともに減少すると報告している^{35,64)}。

一方、同部位のドパミン受容体に関しては、生後約 30 日 (約 4 週齢) までに成熟期の量に達するという報告⁴⁴⁾や、ドパミン D₁受容体 (D₁R) とドパミン D₂受容体 (D₂R) の密度のピークはそれぞれ 1 ヶ月齢及び 3 ヶ月齢であるという報告⁶⁵⁾がある。また、そ

の後の加齢変化が表れるのは *in vitro* では 6~12 ヶ月齢の間^{39,40)}で、*in vivo* では 12~18 ヶ月齢の間であるという報告³⁹⁾がある。

つまり、ラットにおける脳ドパミン神経系の加齢変化は、性成熟期から青年期後期までの 6~12 週齢あたりまで急速に発達し、その後は徐々に加齢変化が進み、特に受容体に関しては 12~18 ヶ月齢の間に加齢変化が現れやすいと考えられる。そこで本研究では、咀嚼が脳機能に与える影響を調べる時期として、脳神経系が急速に発達する時期と、加齢変化が起こってくる時期に着目し、測定時期の参考とした。

以上より、本研究は長期的な咀嚼の違いが脳機能に与える影響を *in vivo* で解明することを目的とした。ラットに対し長期的な軟性食餌飼育を行い、日常的に咀嚼量の少ない老化モデルラットを作成し、硬性食餌群との比較を行った。観察部位は線条体のドパミン神経系で、*post-synapse* に存在するドパミン受容体への影響について PET を用いて検討し、また *pre-synapse* からのドパミン放出量への影響について MD を用いて検討した。

研究方法

1. 被験動物と飼育条件

被験動物として、3週齢の近交系 F344 雄性ラットを 17 匹使用した（日本チャールス・リバー株式会社より購入）。飼育は 3 週齢より単独飼育を行い、4 週齢に達するまですべてのラットに固形食を与えた。4 週齢以降、固形食餌群（S 群：solid）と粉末食餌群（P 群：powder）に分け、引き続き単独飼育を行った。固形食には MF 固形を使用し、粉末食には MF 粉末を使用した（オリエンタル酵母より購入）。飼料及び飲料水は自由摂取とし、すべてのラットの飲水量・摂食量・体重変化を経時的に記録した。飼育環境は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、明暗 12 時間周期とした。動物実験に際しては本学における動物実験等に関する規定に従って行った。この条件下で飼育したラットを以下の実験に供した。

2. PET を用いたドパミン受容体の評価

2-1 PET の原理

生体に微量に投与された陽電子放出核種は、安定化のために原子核内の陽子 1 個が中性子に変わり、その際陽電子（電子の反粒子）を放出する。この陽電子は、近傍の電子と対消滅を起こし、 180° 反対方向に 511 keV の消滅 γ 線が 2 本放出される。PET は、この 2 本の消滅 γ 線を対向する一対の検出器で同時に検出し、それらの検出器を結んだ線上に核種が存在するという情報から、被験体内の放射能分布を視覚化する方法である（図 1）。

2-2 PET 撮影時期

PET 撮影は 4 週齢（4 週齢群：n=4）、8~10 週齢（8 週齢 ↑ S 群：n=2、8 週齢 P 群：n=1）及び 60~70 週齢（60 週齢 ↑ S 群：n=2、60 週齢 ↑ P 群：n=3）に行った。

2-3 イメージングプローブ

本研究ではドパミン D₂ 受容体に特異的に結合する ¹¹C-Raclopride (¹¹C-RAC : 東北大学サイクロトロン・RI センターで製造) をイメージングプローブとして使用した。¹¹C は ¹⁵O や ¹⁸F などと共にポジトロン放出核種と呼ばれており、半減期が約 20 分と非常に短いため購入することができず、サイクロトロンによる原子核反応によって得ることができる。RAC はベンザマイド系抗精神病薬で D₂R に選択的に結合するアンタゴニストである。¹¹C-RAC は 1985 年に Farde ら²⁴⁾により開発され、現在 D₂R の画像化に使用される世界標準の PET プローブとなっている。¹¹C-RAC 標識合成のスキームを図 2 に示した。

2-4 PET 装置

PET 装置は、東北大学サイクロトロン・RI センター内の Clairvivo-PET(SHIMADZU) を使用した。Clairvivo-PET の仕様は以下の通りである。

シンチレータ : LYSO(Cerium doped Lutetium Yttrium Orthosilicate);

1.28 mm × 2.68 mm × 7 mm : 2 層、41,088 個)

断面内視野 : 100 mm

対軸方向視野 : 151 mm

空間分解能 (視野中心) : 1.5 mm

最大スライス数 : 213 枚

スライスピッチ : 0.7 mm

収集モード : LIST モード

Depth Of Interaction(深さ位置情報)検出器と大きな立体角により高感度、高分解能を両立している。

2-5 PET 撮影スケジュール及び PET 撮影方法

^{11}C -RAC の合成は 3 ヶ月間に 5 回行われており、一日の撮影スケジュールは午前 1 回、午後 1 回の最大 2 回行うことができる。薬剤が供給される時間は 11:15 前後及び、14:45 前後であり、供給されて間もなくラットに投与した。ラットへの麻酔は薬剤投与の 30 分前に行った。塩酸ケタミン+塩酸キシラジン(120 mg/kg+20 mg/kg : i.m.)麻酔の下、ベットに固定し、 ^{11}C -RAC を尾静脈より投与した(17.0±3.9 MBq)。投与直後より 60 分間の PET 撮影を行い(10 min×6 frames 作成)、収集データに対し画像再構成を行った。再構成法は 3D-DRAMA (3D-dynamic RAMLA: row action maximum likelihood algorithm) で、再構成マトリックスは 128×128 (Pixel Size: 0.8×0.8×0.7 mm) とし、キャリブレーションの変換係数を 1 Bq/mL とした。

2-6 ^{11}C -RAC 集積部位の位置確認のための CT 撮影

本研究では、PET 撮影により得られた ^{11}C -RAC の集積部位の位置情報を得るため、PET 撮影終了直後に CT 撮影を行った。PET データの画像再構成後に得られた集積画像に、CT 画像を解析コンソール上で重ね合わせた。使用した CT 装置は Clairvivo-CT(SHIMADZU)で、撮影条件は以下の通りである。

モード：オフセットコーンビーム

スケーリング係数：100

X 線管電圧：90 kV

X 線管電流：110 μA

断面内視野：123.4 mm

対軸方向視野：60.8 mm

ボクセルサイズ：0.241 (mm/voxel)

スキャンタイム：5 min

再構成：FBP 法 (filtered back projection 法)

2-7 データ解析

解析ソフト (Image J) を用いて再構成後に得られた集積画像の左右線条体にそれぞれ関心領域(Region of Interest: ROI)を設定した。ROI の大きさは David ら⁶⁶⁾の報告を参考に 15 pixel の大きさの円形 ROI とした (図 3)。鈴木ら³⁹⁾、崎山ら⁴⁶⁾の研究を参考に左右の平均 ROI 値(=組織内放射能 : Bq/ml)及び投与量(Bq)を以下の式に当てはめ、%ID/mL (the percentage of injected dosage per volume tissue) を算出した。得られた%ID/mL の値を用いて個体間の比較を行った。

$$\%ID/mL = \frac{\text{Tissue radioactivity (Bq/mL)}}{\text{Injection dose (ID: Bq)}} \times 100.$$

2-8 PET の 2 匹同時撮影について

PET 撮影は、¹¹C-RAC 製造のマシントイムの関係により回数が限られているため、例数を増やすには非効率的である。そこで本研究では効率的に例数を増やすため、一回の PET 撮影で 2 匹のラットを同時に撮影することも行った。2 匹のラットを向かい合わせるようにベッドにセッティングし固定した。2 匹のラットの頭部がガントリー内に収まっているのを確認し、¹¹C-RAC を同時に投与し、投与終了後直ちに PET 撮影を開始した。

2-9 D₁R ではなく D₂R を評価した理由について

ドパミン神経系の post-synapse 機能は ¹¹C-RAC による D₂R の測定が最も一般的である。¹¹C-SCH23390 を用いて D₁R の評価も行えるが、¹¹C-SCH23390 はセロトニン受容体への親和性も多少あるということも考慮し、本研究では ¹¹C-RAC を用いて D₂R の評価を行った。

3. MD によるドパミン放出量の測定

3-1 MD について

MD の概要を図 4 に示す。測定は図のような半透膜（透析膜）が先端に付いたプローブを、あらかじめ目的の部位にガイドカニューレ挿入手術を施したラットに挿入、固定する。その後、このプローブにマイクロシリンジポンプを用いてリングル液などを一定の流速で灌流させ、半透膜から細胞外液を回収する。回収したサンプルを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び電気化学検出器（ECD）で分析することにより、synapse 間隙に存在する神経伝達物質をフリームービング状態で経時的に測定する。この MD は *in vivo* における生体サンプリング機能として非常に重要である。

3-2 MD 測定時期

MD による測定は、4 週齢(4 週齢群：n=1)、8~10 週齢(8 週齢↑S 群：n=3、8 週齢 P 群：n=1)及び 60~70 週齢（60 週齢↑S 群：n=2、60 週齢↑P 群：n=2）に行った。なお 60 週齢以降のラットについては、PET 撮影を行ったラットを使用した。

3-3 ガイドカニューレ挿入手術

ラットをペントバルビタール(50 mg/kg：i.p.)で麻酔後、脳定位固定装置（ナリシゲ）に頭部を固定した。頭蓋骨を露出させた後、ラット脳アトラス⁴⁵⁾に基づいて、目的部位上の頭蓋骨表面にドリルで 0.6 mm 程度の孔を開けた。この孔より 5 mm 程度離れた位置の二か所にアンカービス（ステンレス製：3 mm）を打ち込み、その後深さ 8 mm のガイドカニューレ（AG-8:エイコム）を目的の深さ（線条体：Bregma より吻側 0.7 mm、正中より側方 3.0 mm、頭蓋骨表面より深さ 4.0 mm）まで挿入し、歯科用即時重合レジレンで固定した。手術後、ガイドカニューレにダミーカニューレを挿入し、キャップナットで固定した。挿入手術を終えた直後にガイドカニューレ先端の位置を確認するため CT 撮影を行った。

4 週齢のラットに対して MD を行っている過去の報告は一つしかなく³⁵⁾、ガイドカニューレ挿入位置の座標も 1 カ月齢から 22 カ月齢までのそれぞれのラットに対し一つの座標しか示されていなかった。またラット脳アトラス⁴⁵⁾で使用しているラットは雄性 Wistar ラット (290g) であり本研究で使用したラット (65g) とは大きさが全く異なるため、ガイドカニューレ挿入手術を行う前に解剖学的に線条体の位置を確認した。4 週齢ラットの頭蓋骨の厚みや大きさを調べるため CT 撮影 (再構成マトリックス 1024×1024、pixel size: 0.12×0.12 mm) を行い、その後脳を摘出し、ホルマリン液により組織固定後線条体の位置及び大きさを計測した。この情報をもとにガイドカニューレ挿入手術を行った。

3-4 ラット脳線条体のドパミン放出量の測定

ガイドカニューレ挿入手術による侵襲からの回復を考え、3 日後にドパミンの測定を行った。脳内微小透析用プローブは直管型 (内径 0.2 mm、外径 0.22 mm、カットオフ分子量 50 kDa、A-I 型 8-03;エイコム) を用い、ガイドカニューレより 3 mm 突出させた状態で使用した。測定は無麻酔、無拘束下で行い、マイクロシリンジポンプ (EP-60;エイコム) を用いて透析液 (リンゲル液 : 147 mM Na⁺、4 mM K⁺、2.3 mM Ca²⁺、155.6 mM Cl⁻) を 2 μL/min の流速で灌流させ、25 分毎に回収したものを試料とした。ドパミンの定量は HPLC-ECD を用い、以下の条件で測定し、二点検量線法により濃度を求めた。

分析カラム : EICOMPACK CA-5ODS 2.1 mm φ × 150 mm

pre カラム : EICOM PREPACSET-CA 3 mm φ × 4 mm

分析温度 : 25°C

移動相 : 80% 0.1M リン酸緩衝液(Na⁺) pH6.0

20% メタノール

500 mg/L 1-オクタンスルホン酸ソーダ(SOS)

50 mg/L EDTA · 2Na

流速：0.23 mL/min

検出器：電気化学検出器 (ECD-100:エイコム)

設定加電圧：+450 mV vs Ag/AgCl (参照電極)

作用電極：グラファイト電極 WE-3G

ガスケット：GS-25

ガイドカニューレにプローブを挿入し、ドパミンの挙動が安定したのを確認した後(約2時間後)から100分間の総放出量(nM)を求め、個体間の比較を行った。また、ラットのサーカディアンリズムを考慮し測定的时间をほぼ一致させた(おおよそ13:00から100分間)。

結果

1. ラットの体重変化

飼育期間中のラットの体重推移を図 5 に示す。S 群、粉末食群の体重は約 10 週齢まで急激に増加し、その後は徐々に増加した。両群の体重変化に大きな差は無かった。

2. 摂食量及び摂水量

各週一匹当たりの総摂食量及び総摂水量をそれぞれ図 6,7 に示す。飼育期間中、S 群および P 群の摂食量及び摂水量に大きな差は認められなかった。摂食量では、S 群及び P 群で 8 週齢以降及び 60 週齢以降に一時的な減少が観察された。

3. 咀嚼が線条体の post-synapse に存在するドパミン受容体に与える影響

3-1 ^{11}C -RAC 集積部位の解剖学的位置の確認

PET 撮影により得られた ^{11}C -RAC の集積画像と CT 画像を重ね合わせることで、硬組織に対する集積部分の位置情報を得ることができた (図 8-A,B,C,D)。図 8-A は ^{11}C -RAC の集積画像を示しており、図の赤い部分が高集積部位である。図 8-B は PET 撮影直後に撮影した CT 画像であり、頭蓋骨及び周囲の硬組織が確認できた。図 8-C,D は重ね合わせ画像で、それぞれ矢状面、冠状面を示している。また、線条体の吻側寄りに集積している部位がハーダー腺で、腹側の集積部位が唾液腺であることが確認できた。

頭蓋骨内の ^{11}C -RAC の集積部位は頭蓋骨後縁の内側面より 15.5 mm 吻側、頭蓋骨表面より 4.5 mm 腹側に位置していた (図 9-A)。また、この位置における冠状面では、集積部位が正中より 3 mm 外側に位置していた (図 9-B)。

この頭蓋骨内の集積部位が線条体であることの詳細な確認は、ラット脳アトラス⁴⁵⁾を参考にし、解剖学的位置の比較を行うことにより確認した (図 10)。上記の位置情報は 60 週齢を超えたラットにおける計測であり、8 週齢、4 週齢のラットでは頭蓋骨後縁の

内側面よりそれぞれ 14.5 mm、11.5 mm 吻側に位置していた。

3-2 ドパミン受容体に対する咀嚼の影響

線条体における $^{11}\text{C-RAC}$ の集積の結果を図 11 に示した。各群における例数は 1~4 であり、8 週齢 P 群 (n=1) を除いて平均値±標準偏差で示した。4 週齢群は他のすべての群に比べ低い値となった (0.07 ± 0.01)。8 週齢の若齢期ラットでは S 群及び P 群でそれぞれ 0.36 ± 0.03 、 0.41 となった。60 週齢以降の老齢期ラットでは、S 群及び P 群でそれぞれ 0.29 ± 0.01 、 0.23 ± 0.07 となった。

例数は非常に少ないが、4 週齢群・8 週齢↑S 群・60 週齢↑S 群に着目すると、8 週齢まで $^{11}\text{C-RAC}$ の集積は増加し、その後加齢とともに減少していく傾向が示された。また、4 週齢群・8 週齢 P 群・60 週齢↑P 群に着目すると、S 群の場合と同様に 8 週齢まで $^{11}\text{C-RAC}$ の集積は増加し、その後加齢とともに減少していく傾向が示された。S 群と P 群を比較すると、ここでも例数が非常に少ないが、8 週齢群では S 群に比べ P 群がやや高い傾向があり、60 週齢↑群では S 群に比べ P 群が低い傾向が示された。

8 週齢↑S 群を基準として、60 週齢↑群と比較すると、S 群では約 20%減少し、P 群では約 37%減少した。このことから加齢に伴い、P 群の方が S 群に比べ $^{11}\text{C-RAC}$ の集積が大きく減少する傾向が示された。

4. 咀嚼が線条体における pre-synapse からのドパミン放出量に与える影響

4-1 CT によるガイドカニューレ先端位置の確認

ガイドカニューレ挿入手術直後の CT 撮影により得られた結果を図 12 に示す。図 12-A は矢状面で図 12-B は冠状面の CT 画像を示している。白く直線状に映っているものがガイドカニューレで、その後方には固定の維持として働くアンカービス、周囲に歯科用レジンが確認できた。ガイドカニューレ及びアンカービスは金属性であるためエックス線が吸収され、その直下は画像が黒く抜けているが、先端位置の確認は十分可能であった。

ガイドカニューレの先端は頭蓋骨表面より 4 mm 腹側、正中より 3 mm 外側に位置していた。実際、ドパミン量の測定時には先端より 3 mm の半透膜が突出するが、ラット脳アトラス⁴⁵⁾により、半透膜がすべて線条体内に収まることが確認できた。以上のことから、過去の研究では実験後に脳を取り出してガイドカニューレ及び半透膜の挿入位置の確認を行っていたが、CT を用いることで、測定を行う前に挿入位置の確認が出来ることが明らかとなった。従って、CT を用い実験に使用した全てのラットについて挿入位置の確認を行った。

4-2 4 週齢ラットに対するガイドカニューレ挿入手術

MD による測定を 4 週齢のラットに対して行った過去の報告が僅かしかいないため、本研究では 4 週齢のラット脳の解剖学的形態を確認した後、ガイドカニューレ挿入手術を行った。頭蓋骨の厚みは CT 画像から計測した結果約 0.6 mm であった (図 13-A)。また、ブレグマ位置での脳のスライス面を観察すると、大脳皮質、外包、線条体を確認できた (図 13-B)。正中線から外側 3 mm の位置での大脳皮質と外包を合わせた厚みは 2.6 mm であり、線条体の厚みは 3.8 mm であった。以上の結果から、線条体は頭蓋骨表面から 3.2 mm 腹側に位置することが分かったため、ガイドカニューレはブレグマの位置で正中から 3 mm 外側の骨表面から、確実に線条体に届く 3.4 mm の深さまで挿入することにした。この位置でガイドカニューレ先端から 3 mm の半透膜が突出しても、すべて線条体内に収まることになる。

ガイドカニューレ挿入手術を行った直後の CT 撮影の結果を図 14 に示す。4 週齢ラットの CT 画像においても、先端位置の確認は十分可能であった。

4-3 ドパミン放出量に対する咀嚼の影響

線条体における 100 分間のドパミン総放出量の結果を図 15 に示す。各群における例数は 1~2 であり、4 週齢群と 8 週齢 P 群を除いて平均値±標準偏差で示した。8 週齢↑S

群では 14.6 ± 3.7 nM となり、60 週齢↑の S 群及び P 群ではそれぞれ 14.6 ± 4.7 nM、 16.8 ± 7.5 nM であった。また、4 週齢群及び 8 週齢 P 群のドパミン放出量はそれぞれ 18.7 nM、20.3 nM であった。

例数は非常に少ないが、4 週齢群・8 週齢↑S 群・60 週齢↑S 群に着目すると、加齢と共にドパミン放出量が減少していく傾向が示された。また、4 週齢群・8 週齢 P 群・60 週齢↑P 群に着目すると、P 群では加齢とともにドパミン放出量が増加していく傾向が示された。S 群と P 群を比較すると、8 週齢群及び 60 週齢↑群で共に P 群が高い傾向が示された。

考察

1. 実験方法について

1-1 モデルラットの作成について

近交系 F344 ラットは寿命が長く丈夫であり、小型・温和で取り扱いやすいという特徴がある。また、近交系ラットは環境因子や遺伝的な交絡因子が排除でき、加齢変化や神経系（中枢、行動）などの *in vivo* 実験で多く使用されている。本研究では長期の飼育が必要であったことや、過去の長期飼育実験や脳神経系の研究^{33,47-49)} において使用例があったという理由から、被験動物として近交系 F344 ラットを使用した。飼育は摂食量や摂水量の差をなるべく無くすため、すべてのラットを同じ環境下で単独飼育した。ラットは集団で生活する習性があり、単独飼育はストレスになるという報告⁵⁰⁾ や、学習機能に差が出るという報告^{51,52)} もある。しかし、すべてのラットに対し単独飼育を行っているため、本研究ではこのストレスの影響は相殺されると判断した。また、軟性食餌として粉末食を用いたが、固形食を常食とする群に比べて切歯が挺出することで、摂食障害となるのではないかという問題が考えられたが、飼育期間中この問題は起こらなかった。過去の研究で、ラットの軟性食餌飼育による切歯挺出に対し、咬耗やケージを咬むことにより対処しているという報告⁵³⁾ や、ラットの固形食群と粉末食群の間で切歯挺出に差がないという報告⁵⁴⁾ があるため、本研究でも同様に対処していたのだと考えられる。固形食と粉末食の咀嚼の違いについては、瀧上の粉末食は固形食にくらべ咀嚼筋の発達低下を招くという報告⁵⁵⁾ がある。また、固形食群では飼料を前歯で数秒間咀嚼した後、臼歯で数秒間咀嚼するという咀嚼様式であったのに対し、粉末食群では臼歯で数秒間咀嚼するのみであり、筋活動電位も粉末食群が固形食群に比べ低かったという報告⁵⁶⁾ もあることから、粉末食の咀嚼は固形食の咀嚼に比べ咀嚼量が少なく、咀嚼様式も違うと考えられる。

本研究では、ラットの体重変化や摂食量及び摂水量はS群とP群の間で大きな差は認め

られなかった (図5-7)。また、固形食と粉末食の成分に違いは無いため、食餌から得た栄養量に差は無かったと考えられる。以上のことから、S群とP群の飼育期間中の主な違いは、咀嚼量や咀嚼様式の長期的な違いであったと考えられるため、本研究では老齢期に達するまで習慣的に咀嚼量が少ないモデルラットを作成出来たと考えられる。一方、各週一匹当たりの総摂食量 (図6) において、S群及びP群で、8週齢以降及び60週齢以降に一時的な減少が起こったが、その原因としてPET撮影時の麻酔の影響が考えられる。

1-2 CTを用いたガイドカニューレ先端位置の確認について

本研究ではガイドカニューレ挿入位置の確認にCTを用いた。過去のMDによる研究^{10,16,18,33-35,65)}では、実験終了後に脳を摘出して挿入位置の確認を行っており、CTによる確認を行っている例は無かった。つまり、今までは目的の部位を外れていたラットについては実験終了後に結果を削除しなければいけなかったが、CTを用いることで実験前に確認できるため、測定を行うことができるか否かを早期に判断できることになる。MDではガイドカニューレ及び透析プローブの挿入部位にグリア細胞が増殖するなどの理由から、二回目以降の測定では神経伝達物質の濃度が減少すると考えられている。しかし過去の実験⁵⁹⁾で、一ヶ月後に行った二回目の測定で伝達物質の濃度に変化は無かったという結果が得られていることから、MDの経時的な測定をする際に、CTを用いた確認は有用であると考えられる。また、測定後にそのまま長期的な飼育をして、さらに他の実験に使用するなど、長期飼育実験に応用できる可能性がある。

1-3 4週齢のラットに対するMDについて

4週齢のラットに対して *in vitro* でドパミン放出量を計測した研究はあるが⁶⁰⁻⁶²⁾ MDによる *in vivo* での測定は過去に一例しかない³⁵⁾。本研究ではガイドカニューレを bregma から 3 mm 外側の位置で頭蓋骨表面から 3.4 mm 挿入し、先端が僅かに線条体内に入るようにした(約 0.2 mm)。本研究ではその位置から 3 mm の半透膜が突出すると

線条体内にちょうど収まるということが確認できた。また、ドパミンの測定も問題なく行うことができたため、本研究で得たガイドカニューレ挿入位置の座標は今後の研究に利用できると考えられる。

1-4 PET 及び MD の経時的な測定について

PET は生体に対して非侵襲的に、また経時的に測定が可能であるため、同一個体の生きたまの情報を継続して得られることが特徴であり、利点でもある。MD はフリーミングの状態での測定が可能である。つまり、同一個体に対して、PET 及び MD の両方の測定を経時的に行うことが最も望ましい。しかし、MD については二回目の測定時に細胞外液の回収率の低下が起こる可能性があるため、何回まで継続的に測定が可能なのかを調べる必要がある。また金属製のガイドカニューレを挿入、固定しているため、この金属製のガイドが挿入された状態で PET 撮影を行う場合、PET 画像に金属の影響が出てくるかを検討する必要がある。PET 撮影は同一個体を経時的に撮影することができるが本研究では PET 撮影の時期や回数に制限があったため、4 週齢群、8 週齢↑群、60 週齢↑群の PET 撮影には別々の個体を用いた。また、MD についても上記の問題点があったため、4 週齢群、8 週齢↑群、60 週齢↑群と別々の個体を用いた。ただし、60 週齢↑群の MD については、PET 撮影を行った後、MD の測定を行ったため、60 週齢以上の S 群及び P 群に関しては、同一個体に対して PET 及び MD を行っている。今後、同一個体に対して経時的な測定を行う場合、PET については可能であるが、MD についてはさらなる検討が必要である。

1-5 PET の二匹同時撮影について

$^{11}\text{C-RAC}$ 製造のマシンタイムには限りがあり、また半減期が約 20 分と短く、比放射能の関係から合成後直ちに投与し撮影する必要がある。例えば、60 分間の PET 撮影後に直ちに 2 回目の撮影に移ったとしても、 $^{11}\text{C-RAC}$ の比放射能は約 8 分の 1 まで減少し

てしまい、十分な集積画像を得ることは出来なくなってしまう。つまり、 $^{11}\text{C-RAC}$ を用いた PET 撮影は非効率的であり、例数を増やすことが非常に難しい。本研究で使用した Clairvivo-PET は対軸方向の視野範囲が 151 mm と非常に長く、また撮影部位がラットの頭部と限られていたため、2 匹のラットを向かい合わせるようにベッドにセッティングし同時に撮影することができた。2 匹のラットをガントリー内で 2 段にして撮影を行う方法もあるが、このような方法だと一方の被写体から出た消滅 γ 線が他方の被写体のより吸収されてしまうという欠点がある。そこで本研究ではラットの頭部を向かい合わせることで、他の被写体による消滅 γ 線の吸収の影響を無くした。また、互いの線条体の位置を約 8 cm 離すようにセッティングしており、散乱線に対する補正も行っているため、片方のラットからの消滅 γ 線の散乱によるノイズの影響はほとんど考えなくてよい。以上の方法により、PET 撮影の効率化を図ることができると考えられる。

1-6 PET 撮影時の麻酔の影響について

ラットに対する麻酔では、100 mg/kg のケタミン麻酔によって側坐核における内因性ドパミン放出量が増加するという報告⁸⁷⁾があることから、線条体においても内因性のドパミンが増加し、その結果 $^{11}\text{C-RAC}$ の集積に影響を及ぼす可能性がある。また、麻酔深度の違いが影響を与える可能性もあるが、本研究では麻酔の開始から薬剤投与までの時間をほぼ一定にしていることから、麻酔深度による影響は僅かであると考えられる。

2. ラット脳線条体ドパミン神経系の加齢変化及び咀嚼の影響について

2-1 ドパミン神経系への加齢の影響

図 11 の 4 週齢群及び S 群の変化をみると、線条体の D_2R への $^{11}\text{C-RAC}$ の集積は 8~10 週齢まで急速に増加しておりその後加齢とともに減少している。例数が非常に少ないが、これは鈴木ら³⁹⁾の *in vivo* の加齢変化の結果とおおよそ一致している。また、図 15 についても同様に例数が非常に少ないが、4 週齢群及び S 群の変化をみると、ドパミン放

出量の加齢に伴う減少が確認できた。中野ら³⁵⁾の報告では、4週齢から6週齢まで急速に増加しこの時点ピークに10週齢、24週齢、72週齢と減少を続けている。4週齢から10週齢あたりまでの神経系の急速な発達の時期におけるドパミン放出量の変化は、本研究の結果と違いがあるが、60~70週齢あたりまで減少が続いている点では一致している。

ここで、図11及び図15の4週齢群をみると、ドパミン放出量は成熟期と同程度であるにも関わらず、D₂Rへの¹¹C-RACの集積は他の週齢と比較して低くなっている。荒木ら⁶⁷⁾は*in vitro*の研究で、F344ラットにおけるD₂Rの量は3週齢と成熟期で差がないと報告している。本研究での*in vivo*の結果は4週齢で低い値となっており、*in vivo*と*in vitro*の結果に差があることが示された。この原因として考えられることは、ROIの大きさによる影響や、内因性のドパミンとの競合作用による影響が考えられる。ROIの大きさは15pixelと統一しているが、4週齢のラットの脳は成熟したラットの脳と大きさが違うため、15pixelの大きさのROIでは線条体をはみ出していた可能性がある。また、¹¹C-RACはD₂Rへの選択性が高く、解離が速い放射性薬剤であるため、内因性のドパミンと競合し結合能が変化する。つまり、4週齢ラットではD₂R量は多いにもかかわらず、内因性のドパミン量が多いため、結果として¹¹C-RACの集積が下がった可能性がある。

一方、60週齢↑の加齢による¹¹C-RACのD₂Rへの集積低下の原因は、post-synapseにおけるD₂R密度の減少であると考えられる。それは過去の研究^{38,68)}で、ラット線条体におけるD₂Rの加齢変化は、親和性の減少ではなく、数(B max)の減少であると報告しているからである。さらに、加齢に伴う受容体数の減少の背景には、受容体の合成能力の低下が考えられる。ドパミン受容体のアルキル化剤をラットに投与してドパミン受容体を破壊し、その後の受容体の回復速度をみた研究では、加齢に伴いその速度が減少すると報告している^{69,70)}。

また、60週齢↑のドパミン放出量の減少に関しては、加齢に伴い神経細胞が委縮し減少した結果、放出量が減少したとも考えられるが、それ以上に、pre-synapseの神経細

胞内のドパミン合成能が低下したからであると考えられる。ドパミン合成の第一ステップはチロシンの水酸化反応であり、この反応を触媒するチロシン水酸化酵素 (TH) はドパミン合成の速度を決める律速酵素である。ドパミン神経系での TH 活性の加齢による低下はラットを用いた研究で確立されている^{71,72)}。また、寺澤ら¹⁵⁾の研究では、ラットの海馬におけるアセチルコリン系神経細胞は、加齢による減少は認められず、主な変化は神経伝達物質の合成や放出のメカニズムであると述べている。

以上のことから、S 群では加齢に伴い pre-synapse のドパミン放出量及びその受け手である post-synapse の受容体数が減少したことが示された。このような加齢変化は神経細胞の委縮や減少などの前駆的な現象として起こり、その結果として synapse における情報伝達機能が低下していくのではないかと考えられる。

2-2 ドパミン神経系への咀嚼の影響

図 11 の結果から、線条体 8 週齢では固形食群 (S 群) に比べ粉末食群 (P 群) が高く、60 週齢↑では S 群に比べ P 群が低くなっている。これは、脳神経系が急速に発達する時期では、P 群の方が ¹¹C-RAC の D₂R への集積が高く、その後加齢変化が起こるまで粉末食を与え続けると、60 週齢↑では P 群の方が低くなる傾向があることを示している。一方、図 15 では S 群が加齢に伴い減少しているのに対し、P 群では加齢に伴い増加している傾向が確認できた。前述したようにラット線条体におけるドパミン放出量は加齢に伴い減少していくのが一般的である。つまり、粉末食による咀嚼の違いがドパミン神経系に与える影響は、短期的 (4~8 週齢の間) にも長期的 (4~60 週齢↑の間) にも起こり、粉末食群のラットでは、synapse における情報伝達機能が神経伝達物質及び受容体レベルで影響が出たことが示された。

8 週齢 P 群について、S 群と比較してドパミン放出量が多かったこと、及び ¹¹C-RAC の D₂R への集積が高かったことの原因として次の三つのことが考えられる。

(1) 他の神経系との相互作用によりドパミン神経系の機能が亢進した。

(2) 食物性状の変化がストレスとなりドーパミン放出及び受容体数に変化が起こった。

(3) synapse 間隙におけるドーパミン遊離量増加による一時的な受容体の誘導が起こった。

(1) については、他の神経系としてセロトニン神経系が考えられる。咀嚼は脳内のセロトニンの放出を増加させることが知られており⁷³⁾、また脳内でセロトニン神経系はドーパミン神経系の活動を抑制的に制御し、セロトニン受容体への刺激が黒質線条体系の神経終末からのドーパミン放出を抑制することが報告されている⁷⁴⁾。つまり、粉末食による咀嚼の減少及び咀嚼からの求心性入力 of 減少により、このセロトニン神経系の活動が低下し、その結果線条体のドーパミン神経系への抑制作用が弱まったことでドーパミン神経系が活発化したのではないかと考えられる。

(2) については、過去の研究でラットへの粉末食餌飼育がストレスとなる可能性があるという報告^{75,76)}があるため、本研究においても P 群にストレスが加わっていた可能性がある。また神経系の発達が活発な時期はストレスの影響を受けやすく、Brunson⁷⁷⁾はラットを用いた研究で、人生の初期に受けるストレスは、後年の海馬機能低下の原因となり得ると報告している。脳神経系へのストレスの影響については、急性ストレスで前頭前皮質部のドーパミン遊離量が増加するという報告⁷⁸⁾や、同部位で4週間の慢性ストレスでドーパミン D₁受容体数が増加するという報告がある⁷⁹⁾。本研究では線条体のドーパミン神経系を観察しているが、過去の報告のように、人生の早期に加わったストレスが原因でドーパミン放出量の増加と D₂R の増加が起こった可能性がある。

(3) については、何らかの原因によって synapse 部のドーパミンの代謝回転の低下や、pre-synapse の再取り込み機能の低下などが生じ、その結果 synapse 間隙のドーパミンの遊離量が多くなった可能性がある。また一般的に、神経伝達物質量が持続的に多い場合やアゴニストの持続投与を行った場合は、受容体の down-regulation が生ずるはずである。しかし、アゴニストの連続投与で逆に受容体が増加する場合があるという報告がある⁸⁰⁾。これを受容体の誘導と呼んでいるおり、本研究でも受容体の誘導が起こることに

よって一時的に受容体数が増加した可能性がある。または、受容体側の恒常性維持機能の低下が起こっているという可能性もある。

次に 60 週齢 ↑P 群については、60 週齢 ↑S 群と比較して $^{11}\text{C-RAC}$ の集積が低かった一方でドパミン放出量が多かったことの原因として次の三つのことが考えられる。

- (1) 内因性ドパミンとの競合により $^{11}\text{C-RAC}$ 集積の低下が起こった。
- (2) 慢性的にドパミン放出量が多かったことにより受容体の down-regulation が起こった。
- (3) 加齢に伴う受容体の減少または変性などが P 群で著しく、恒常性維持のため synapse 間隙におけるドパミンの代謝活性を抑えた。

(1)、(2) については様々な原因により synapse 間隙のドパミン遊離量が慢性的に増加し、その結果 $^{11}\text{C-RAC}$ の集積が減少したという考えである。S 群に比べて P 群のドパミン遊離量が多い原因として以下の 3 つのことが考えられる。

- ①加齢に伴う代謝酵素活性の低下が S 群に比べ P 群で著しい。
- ②加齢に伴う pre-synapse に存在するドパミントランスポーター (DAT) の減少が S 群に比べ P 群で著しい。
- ③ストレスの影響や他の神経系との相互作用。

①について、ドパミンの代謝酵素の活性が加齢に伴い変化するという過去の報告⁸¹⁻⁸⁵⁾がある。ドパミンの代謝酵素は monoamineoxidase (MAO-A,B) と catechol-o-methyltransferase (COMT) である。それぞれの代謝酵素の活性の加齢変化は MAO-A 及び COMT は減少を示し、MAO-B の活性は加齢に伴い上がることが報告されている⁸¹⁾。また存在部位については、MAO-A は主に pre-synapse の神経細胞内に存在し、放出前のドパミンを分解している。MAO-B は synapse 部周囲に存在しているグリア細胞内に存在している。COMT は主に post-synapse 内の細胞質表層や粗面小胞体及びグリア細胞内に存在している。MAO-B、COMT は synapse 間隙に放出されたドパミンの代謝を行っている⁸²⁻⁸⁵⁾。つまり、P 群の synapse 間隙におけるドパミン遊離量の増加は、MAO-A、

COMT の加齢による活性の低下が P 群で著しく起こったか、または MAO-B の加齢に伴う活性の上昇が弱かったかであると思われる。このような現象が実際に起こっているかの確認は、MD のドパミン代謝物を測定できる系を利用することで可能となると考えられる。

②については、PET 及び ^{11}C -CFT を用いた研究で加齢に伴う DAT の減少が報告されており⁸⁶⁾、本研究においては S 群に比べ P 群で DAT の減少が大きかったため、遊離しているドパミンの再取り込みが減少し、結果として慢性的にドパミン遊離量が増加した可能性がある。このことは老齢の P 群に対し、川村ら⁸⁶⁾と同様の実験を行うことで確認できると思われる。

③については前述したように、ラットの習性に反した長期的な粉末食餌飼育によるストレスやセロトニン神経系など他の神経系への影響による相互作用の可能性はある。

以上の①~③などが原因となって、P 群の synapse 間隙部におけるドパミン遊離量が慢性的に多い状態が続き、(1)では D_2R の数は S 群と変わらないものの内因性のドパミンと競合作用が起こり、また(2)では D_2R の down-regulation が起こったことにより、結果として ^{11}C -RAC の結合が減少したと考えられる。

(3)については、咀嚼の影響が post-synapse に優先的に起こったという考えである。つまり、長期的な粉末食餌飼育により、post-synapse の神経細胞数の減少や、その前駆的な現象としてドパミン受容体の変性や親和性の低下、または受容体の合成・分解の代謝回転の低下によるドパミン受容体合成の減少などが起こり、synapse 伝達の機能が低下し、それに対して生体は恒常性を維持するために、synapse 間隙のドパミンの代謝機能を抑制し遊離量を減らさないようにすることで頻繁に受容体に結合できる状態を作り出した可能性がある。MAO-B は加齢に伴い活性が上昇し、老齢になっても機能が保たれているので、主にグリア細胞内の MAO-B の活性を抑えることで、pre-synapse から放出されたドパミンを分解しないようにしているのではないかと思われる。これらを詳細に検討するには、今後ドパミン代謝物の測定を行う必要がある。

以上のことから、固形食と粉末食の咀嚼の違いが線条体ドーパミン神経系に与える影響は、pre-synapse 及び post-synapse の両方で起こることが示唆された。また pre-synapse と post-synapse で互いに影響しあい、ドーパミン放出量の変化やドーパミン受容体の発現の変化など分子のダイナミックな変動が起こっているものと思われる。さらに、咀嚼の影響は若齢の時期と、老齢の時期で違いがあることが示唆された。過去の研究における、粉末食餌飼育や咀嚼障害が原因となって起こる高次脳機能の低下や運動機能の低下、及び神経細胞の減少や神経伝達物質濃度の減少などの背景にはこのような synapse 部の動的な変化が根底にあるのだと思われる。

また本研究ではドーパミン D₂ 受容体の評価を行ったが、ドーパミン受容体には D₁ 受容体 (D₁R) もある。D₁R は post-synapse にのみ存在し、D₂R は post-synapse 及び pre-synapse に存在している。pre-synapse の D₂R はオートレセプターとして働き、ドーパミンの合成を抑制している。一方、大脳皮質と大脳基底核はループを形成しており、線条体からの出力はすべて抑制性 (BAG 作動系) である。この出力には直接経路と間接経路があり、淡蒼球 (外節・内節)、視床下核、視床を經由して最終的に大脳皮質にそれぞれ興奮性 (直接経路)、抑制性 (間接経路) に投射する。線条体には二つのゾーンが存在し、両者とも黒質のドーパミン神経系から投射を受けている。一つ目のゾーンの神経細胞は D₁R をもっていてドーパミンが結合すると、線条体からの直接経路の出力を興奮させる。二つ目のゾーンは D₂R が存在し、線条体の間接経路の出力を抑制する。この二種類の受容体にドーパミンが作用すると、最終的にはどちらの経路でも大脳皮質に対し興奮性に働く。つまり、黒質から線条体へのドーパミン入力が増加すると、大脳皮質への興奮性の入力が増加し、逆に黒質からの入力の減少や、受容体側の異常がある場合は、大脳皮質への興奮性の入力が増加する。したがって、D₁R、D₂R のどちらかに異常が起こったとしても最終的に運動を抑制することになる。本研究は、長期的な粉末食餌飼育により D₂R の減少が起こることが示唆されたので、咀嚼量の減少や、咀嚼機能障害による全身の運動機能の低下は、線条体のドーパミン受容体の変化が原因なのかもしれない。

以上より、本研究の *in vivo* の情報、特に受容体の動的な変化に関する情報は、今後咀嚼が脳機能に与える影響のメカニズムを解明するうえで非常に有益なものであったと思われる。

結論

1. CT を用いたガイドカニューレ挿入位置の確認では、ガイド先端位置の確認が十分可能であった。このことから、今後長期の飼育実験などに応用できる可能性が期待される。
2. 脳線条体ドパミン神経系の加齢変化は、ドパミン放出量に関して、S 群では加齢とともに減少したが、P 群では加齢とともに放出量が増加することが示された。
3. 8 週齢では、P 群が S 群に比べて、 $^{11}\text{C-RAC}$ の集積が高く、またドパミン放出量も多いということが示された。
4. 60 週齢では、P 群が S 群に比べて、 $^{11}\text{C-RAC}$ の集積は低く、反対にドパミン放出量が多いということが示された。

謝辞

本研究の進行に際し、終始懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター 核薬学研究部 助教 船木善仁先生に深厚なる感謝の意を表します。また、稿を終えるにあたり、御高閲を賜りました東北福祉大学社会福祉学部教授（本学大学歯学研究科加齢歯科学分野前教授） 渡邊誠先生に心より拝謝致します。本論文作成にあたり御高閲と多くの御助言を賜りました東北大学病院総合歯科診療部 菊池雅彦教授に深く感謝いたします。また、本学大学歯学研究科加齢歯科学分野 准教授 坪井明人先生、同分野 助教 山口哲史先生にも重ねて深謝いたします。 ^{11}C -Raclopride の合成に際し、多大なるご協力を頂きました本大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター 核薬学研究部 教授 磐田錬先生に深く感謝いたします。さらに、Clairvivo-PET の使用に際し、有益な御指導を頂きました株式会社島津製作所の関川克己氏、及び HPLC-ECD による測定に際し多大なる御協力を頂きましたアクト・サイエンス株式会社 渡邊雅信氏に深く感謝いたします。最後に、惜しめない御支援、御協力を頂きました加齢歯科学分野教室員各位に厚く御礼申し上げます。

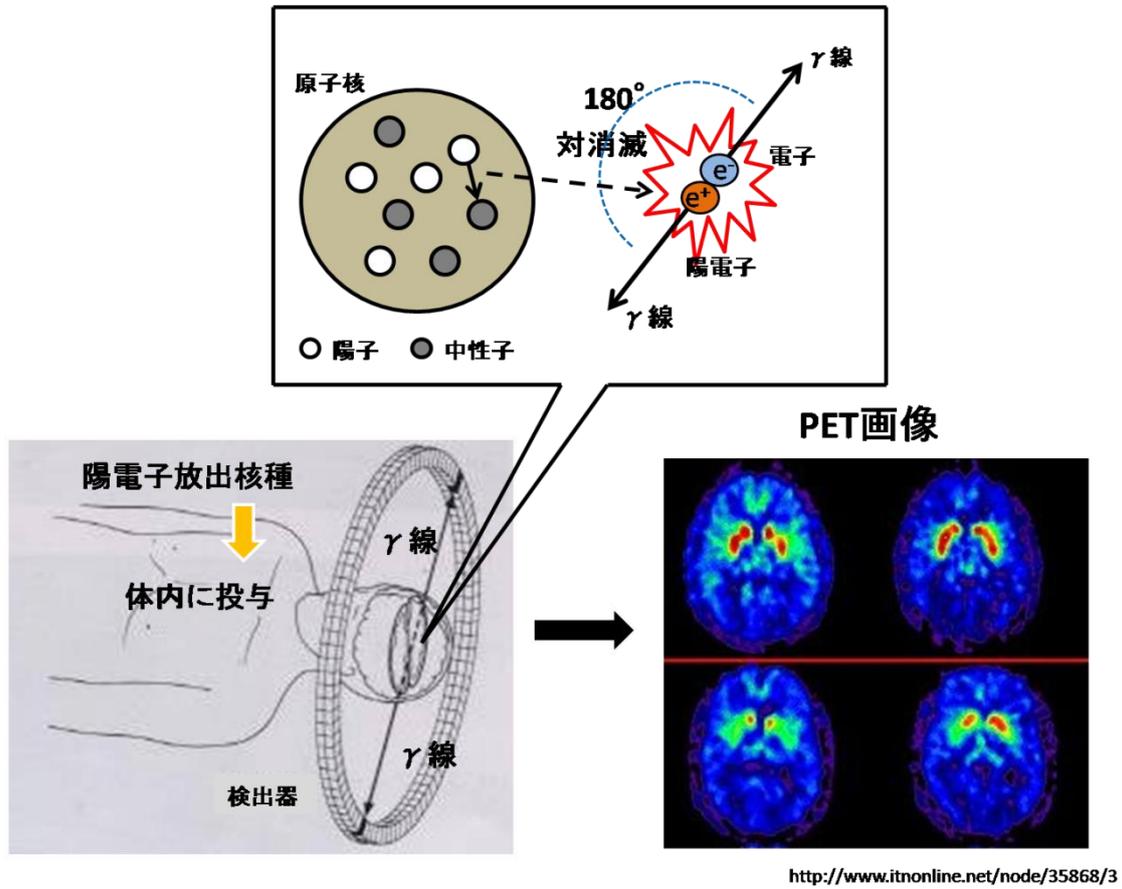


図 1 : PET の原理

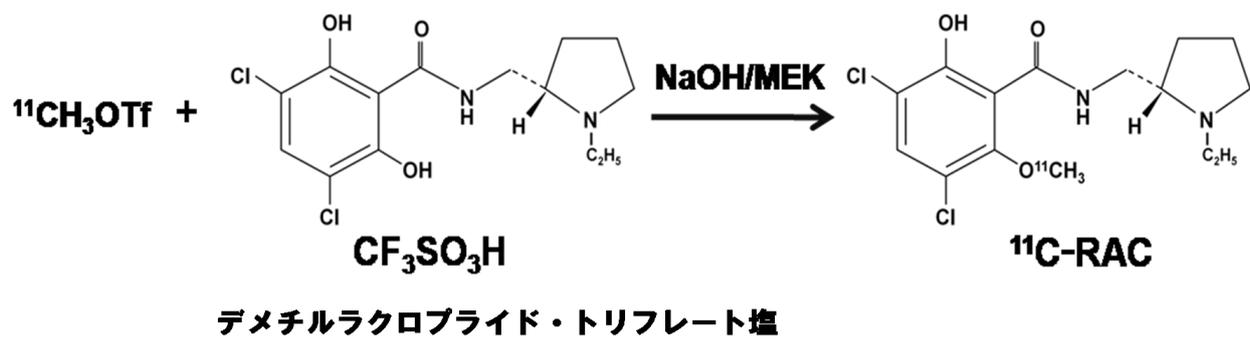


図 2 : ^{11}C -RAC の標識合成

$^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$: [^{11}C] メチルトリフレート

$\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$: トリフルオロメタンスルホン酸 (トリフレート塩)

MEK : メチルエチルケトン

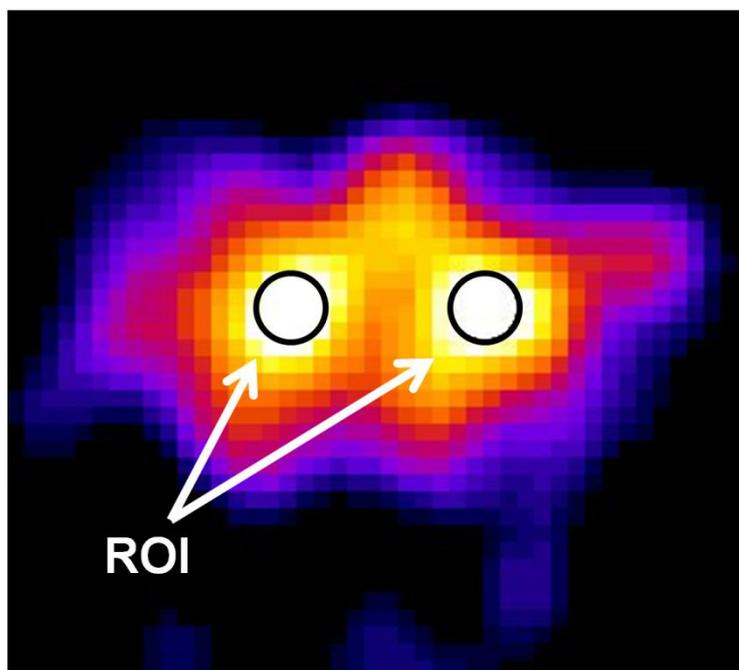
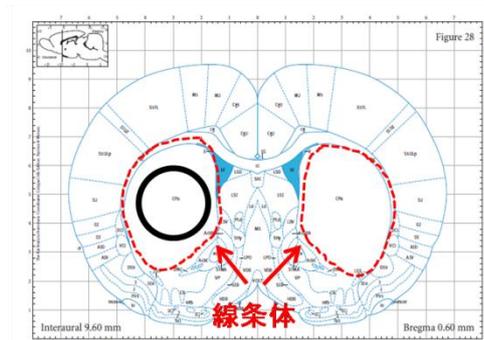


図 3 : 左右線条体への ROI の設定

ROI : Region of Interest

図の一部はラット脳アトラス⁴⁵⁾から引用し改変した。

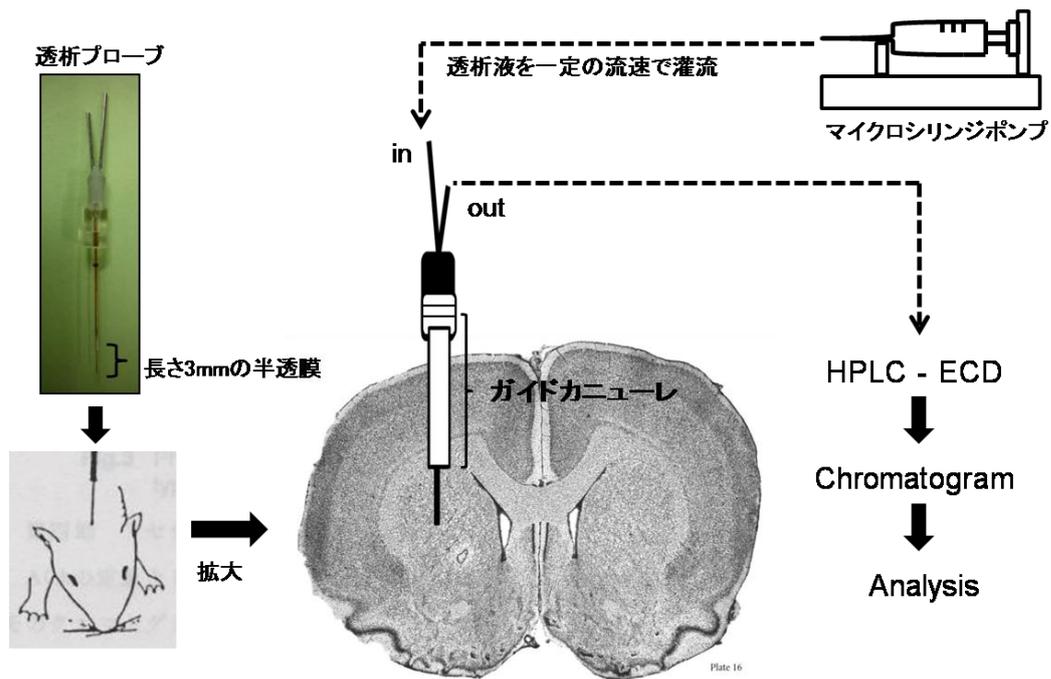


図 4 : MD の原理

HPLC: high performance liquid chromatography

ECD: Electrochemical detector

図の一部はラット脳アトラス⁴⁵⁾から引用し改変した。

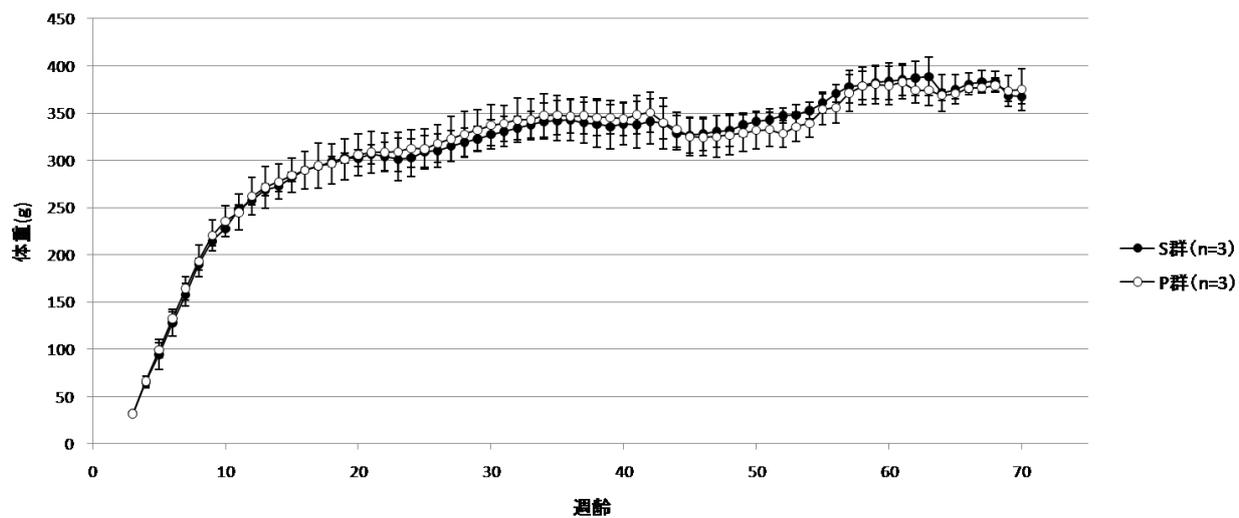


図 5：ラットの体重変化

横軸には週齢を、縦軸には体重を示した。両群の例数は 3 であり、平均値±標準偏差で示した。

(●：固形食群、○：粉末食群)

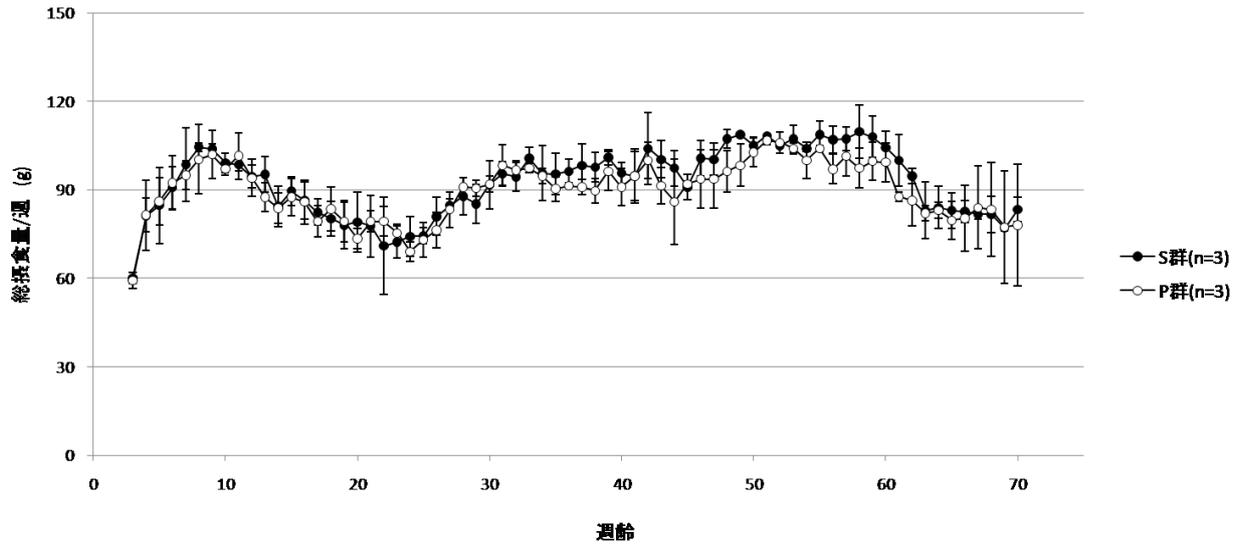


図 6：各週一匹当たりの総摂食量

横軸に週齢を、縦軸に一週間当たりの総摂食量を示した。両群の例数は 3 であり、平均値±標準偏差で示した。

(●：固形食群、○：粉末食群)

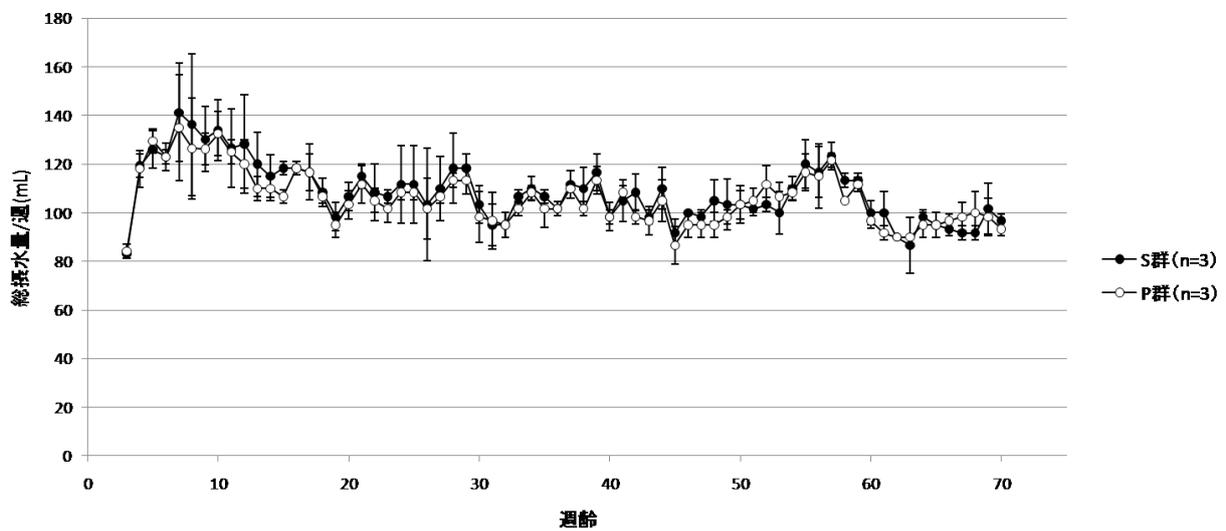


図 7：各週一匹当たりの総摂水量

横軸に週齢を、縦軸に一週間当たりの総摂水量を示した。両群の例数は 3 であり、平均値±標準偏差で示した。

(●：固形食群、○：粉末食群)

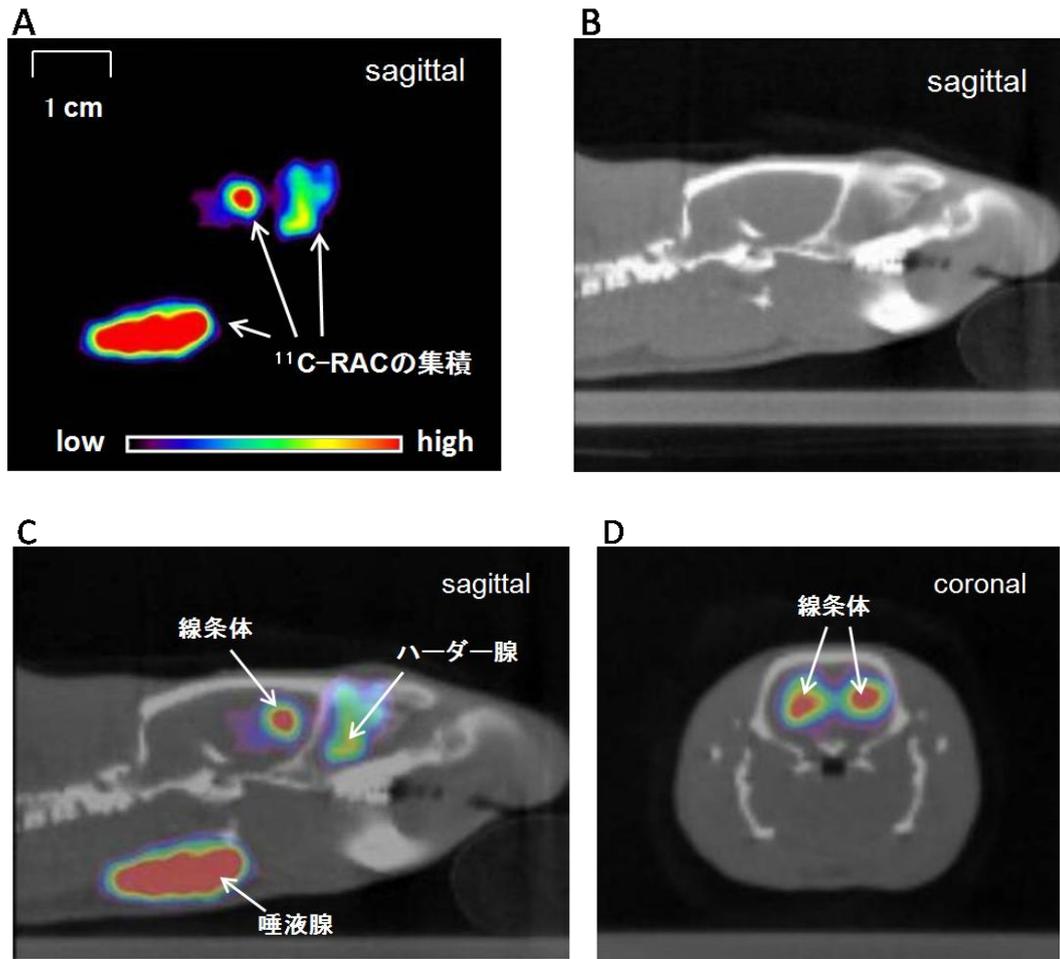


図 8 : ^{11}C -RAC の集積画像及び CT 画像との重ね合わせ

図はそれぞれ、A: ^{11}C -RAC の集積画像、B:CT 画像、C:重ね合わせ画像（矢状面）、D:重ね合わせ画像（冠状面）を示している。

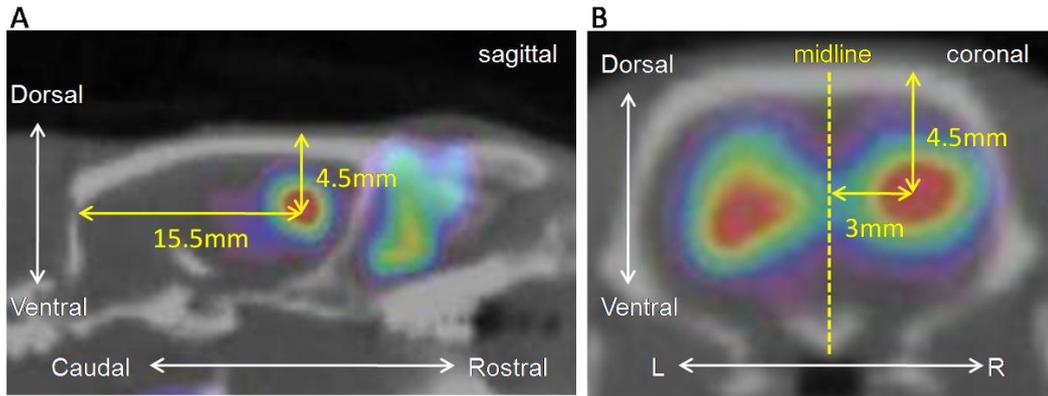


図 9 : ^{11}C -RAC の集積部位と頭蓋骨との位置関係

図は PET 画像と CT 画像の重ね合わせ画像でそれぞれ、A:正中より 3 mm 外側の矢状面画像、B:頭蓋骨後部内面より 15.5 mm 吻側の冠状面画像を示している。

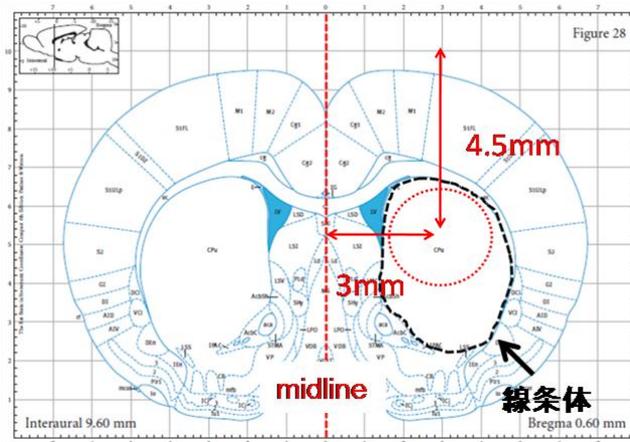


図 10 : ラット脳アトラス (冠状面)

このスライス面は脳後縁から 15.6 mm 吻側における冠状面である。図はラット脳アトラス⁴⁵⁾から引用し改変した。

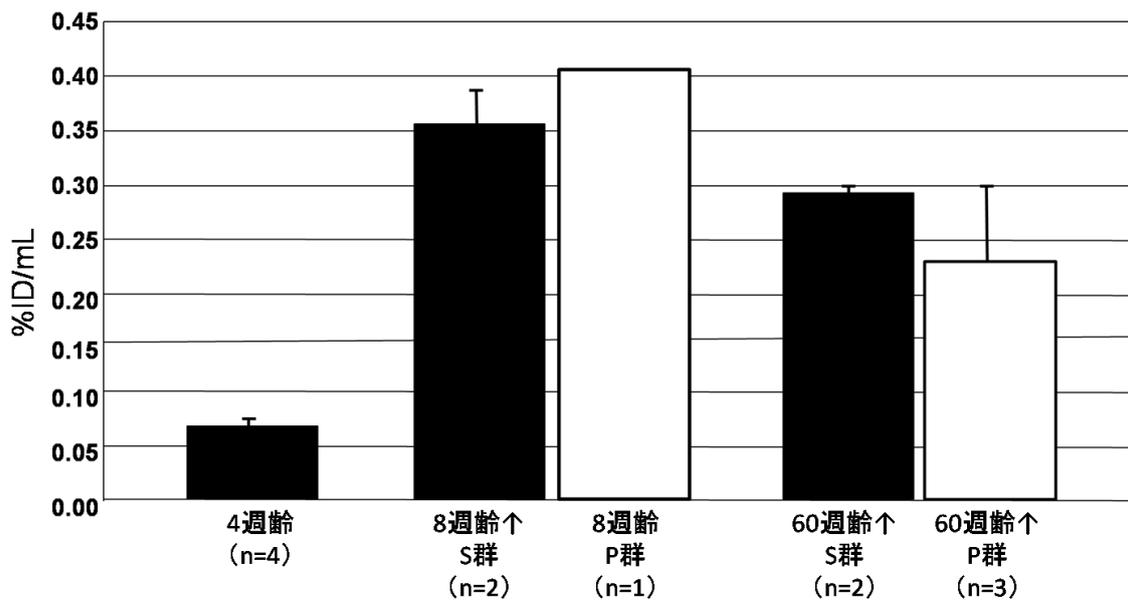


図 11：ラット線条体における ^{11}C -raclopride の集積

各群における例数は 1~4 であり、平均値±標準偏差で示した。

S 群：固形食群 (solid)

P 群：粉末食群 (powder)

8 週齢↑：8~10 週齢

60 週齢↑：60~70 週齢

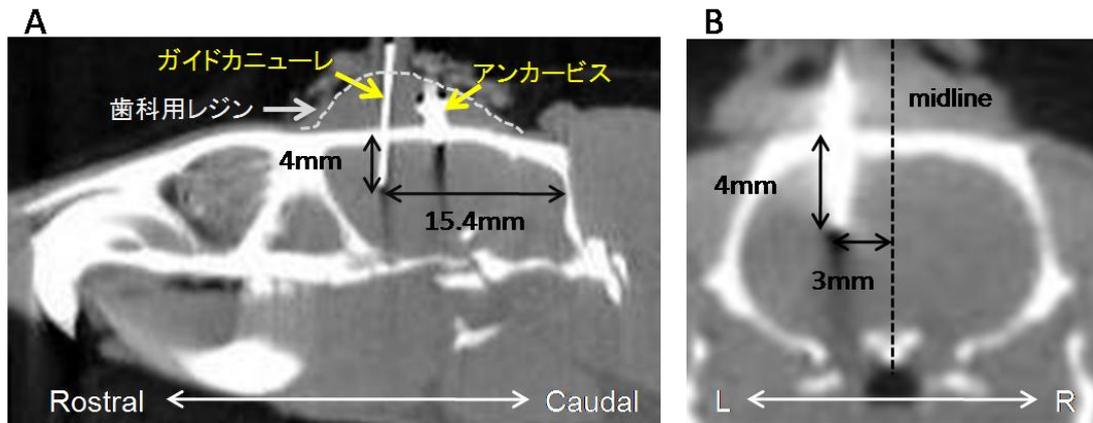


図 12 : ガイドカニューレ挿入手術後の CT 画像

正中より 3 mm 外側の矢状面 CT 画像及び冠状面 CT 画像をそれぞれ図 12-A,B に示した。

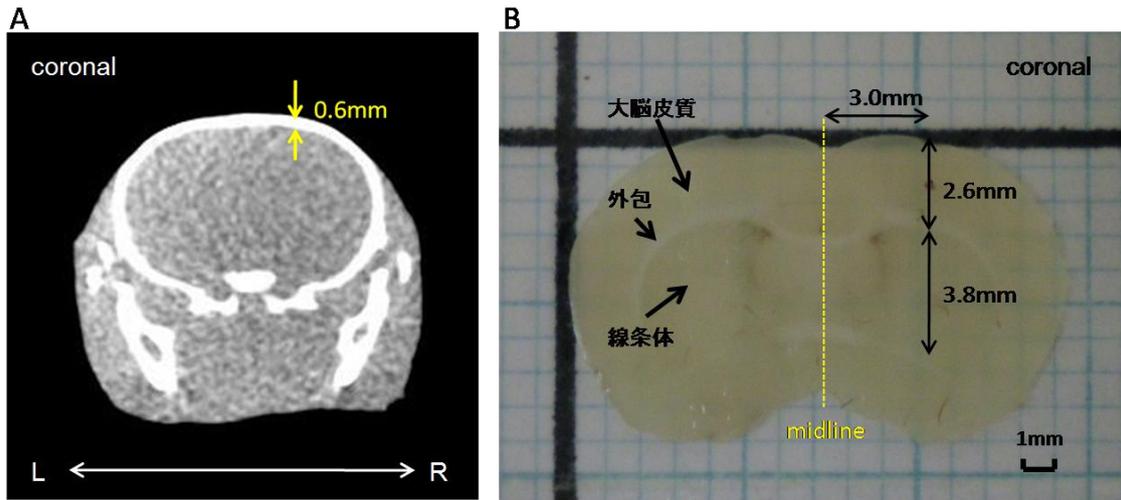


図 13 : 4 週齢ラットの冠状面 CT 画像及びブレグマ直下の脳断面

図 13-A は 4 週齢ラットの頭蓋骨後縁の内側面から 11.5 mm 吻側の冠状面 CT 画像であり、図 13-B は同ラットの脳断面である。

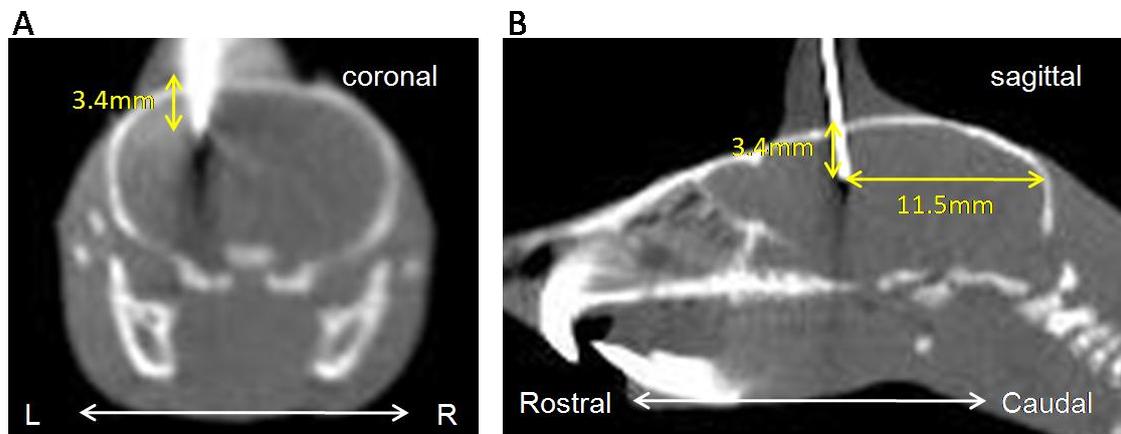


図 14 : 4 週齢ラットの CT によるガイドカニューレ先端位置の確認

図 14-A がガイドカニューレ挿入部（ブレグマ部）の冠状面、14-B が正中より 3 mm 外側の矢状面の CT 画像を示している。

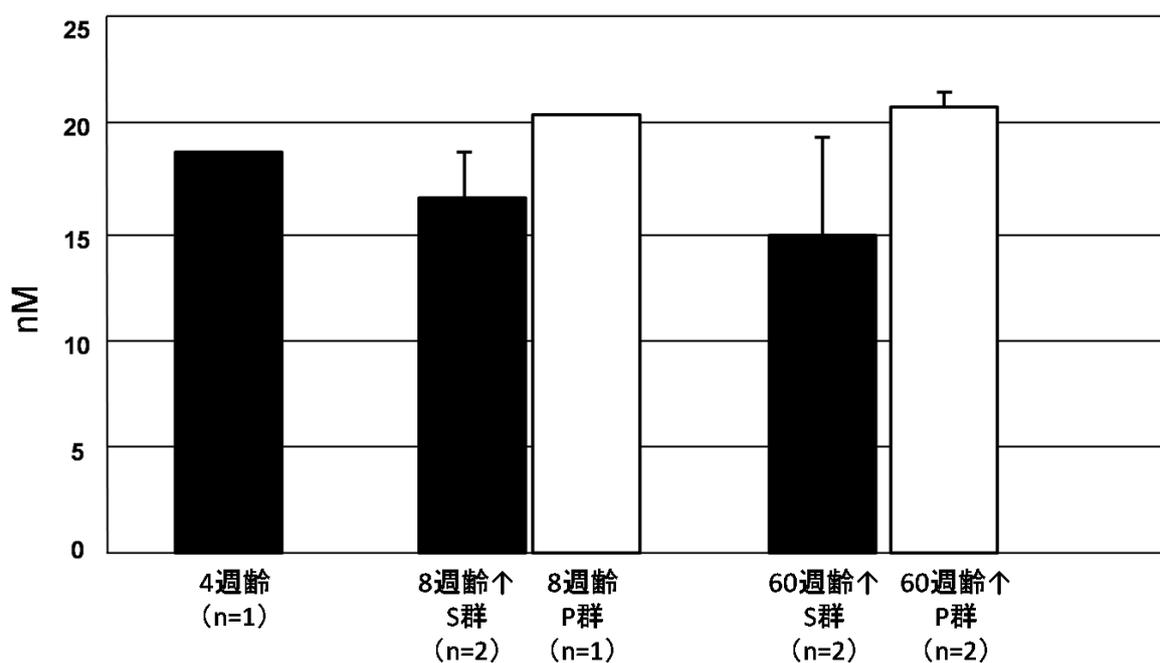


図 15：ラット脳線条体におけるドパミンの 100 分間総放出量

ラット脳線条体の pre-synapse からのドパミン放出量を HPLC-ECD を用いて定量し、二点検量線法で濃度を求めた。各群の例数は 1~2 であり、平均値±標準偏差で示した。

S 群：固形食群 (solid)

P 群：粉末食群 (powder)

8 週齢↑：8~10 週齢

60 週齢↑：60~70 週齢

参考文献

- 1) Miura, H., Miura, K., Mizugai, H., Arai, Y., Umenai, T., Isogai, E.: Chewing ability and quality of life among the elderly residing in a rural community in Japan. *Journal of Oral Rehabilitation*, 27: 731-4, 2000.
- 2) Takata, Y., Ansai, T., Awano, S., Hamasaki, T., Yoshitake, Y., Kimura, Y., Sonoki, K., Wakisaka, M., Fukuhara, M., Takehara, T.: Relationship of physical fitness to chewing in an 80-year-old population. *Oral Diseases*, 10: 44-9, 2004.
- 3) Akifusa, S., Soh, I., Ansai, T., Hamasaki, T., Takata, Y., Yohida, A., Fukuhara, M., Sonoki, K., Takehara, T.: Relationship of number of remaining teeth to health-related quality of life in community-dwelling elderly. *Gerodontology*, 22: 91-7, 2005.
- 4) Shimazaki, Y., Soh, I., Saito, T., Yamashita, Y., Koga, T., Miyazaki, H., Takehara, T.: Influence of dentition status on physical disability, mental impairment, and mortality in institutionalized elderly people. *Journal of Dental Research*, 80: 340-5, 2001.
- 5) Gatz, M., Mortimer, J.A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Berg, S., Reynolds, C.A., Pedersen, N.L.: Potentially modifiable risk factors for dementia in identical twins. *Alzheimer Dement*, 2: 110-117, 2006.
- 6) Pamela, Sparks, Stein, Mark, Desrosiers, Sara, Jean, Donegan, Juan, F., Yepes, Richard, J., Kryscio: Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. *The Journal of the American Dental Association*, 138: 1314-1322, 2007.
- 7) Kimoto, K., Ono, Y., Tachibana, A., Hirano, Y., Otsuka, T., Ohno, A., Yamaya, K., Obata, T., Onozuka, M.: Chewing-induced brain activity in edentulous patients who received mandibular implant-supported overdentures: A preliminary report.

- Journal of Prosthodontic Research, 55: 89-97, 2011.
- 8) Narita, N., Kamiya, K., Yamamura, K., Kawasaki, S., Matsumoto, T., Tanaka, N.: Chewing-related prefrontal cortex activation while wearing partial denture prosthesis: Pilot study. *Journal of Prosthodontic Research*, 53: 126-135, 2009.
 - 9) Kubo, K., Yamada, Y., Iinuma, M., Iwaku, F., Tamura, Y., Watanabe, K., Nakanura, H., Onozuka, M.: Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice. *Neuroscience Letters*, 414: 188-191, 2007.
 - 10) Onozuka, M., Watanabe, K., Fujita, M., Tomida, M., Ozono, S.: Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behavioural Brain Research*, 133: 197-204, 2002.
 - 11) 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. *Behavioural Brain Research*, 108: 145-155, 2000.
 - 12) Onozuka, M., Watanabe, K., Mirbod, SM., 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 Research*, 826: 148-153, 1999.
 - 13) Yamamoto, T., Hirayama, A.: Effect of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. *Brain Research*, 902: 255-263, 2001.
 - 14) 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. *Biomedical Research*, 28 (1): 1-7, 2007.
- 15) 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. *Neuroscience Research*, 43: 373-379, 2002
- 16) Aoki, H., Kimoto, K., Hori, N., Toyoda, M.: Cell Proliferation in the Dentate Gyrus of rat Hippocampus Is Inhibited by Soft Diet Feeding. *Grontology*, 51: 369-374, 2005.
- 17) Kato, T., Usami, T., Noda, Y., Hasegawa, M., Ueda, M., Nabeshima, T.: The effect of the molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. *Behavioural Brain Research*, 83: 239-242, 1997.
- 18) Kushida, S., Kimoto, K., Hori, N., Toyoda, M., Karasawa, N., Yamamoto, T., Kojo, A., Onozuka, M.: Soft-diet feeding decrease dopamine release and impairs aversion learning in Alzheimer model rats. *Neuroscience Letters*, 439: 208-211, 2008.
- 19) Frost, J. J.: Imaging neuronal biochemistry by emission computed tomography focus on neuroreceptors. *Trends in pharmacological Science*, 7: 490-496, 1986.
- 20) Terry, Jones.: The role of positron emission tomography within the spectrum of medical imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 23: 207-211 1996.
- 21) VOLKOW, N. D., FOWLER, J. S., GATLEY, S. J., LOGAN, J., WANG, G.-J., DING, Y.-S., DEWEY, S.: PET evaluation of the dopamine system of the human brain. *The Journal of nuclear medicine*, 37: 1242-1256, 1996.
- 22) NORA D. VOLKOW, BRUCE ROSEN, AND LARS FARDE.: Imaging the living human brain: magnetic resonance imaging and positron emission tomography.

- The national Academy of science of the USA, 94: 2787-2788, 1997.
- 23) Bergström, M., Långström, B.: Pharmacokinetic studies with PET. *Progress in Drug Research*, 62: 279-317, 2005.
- 24) Farde, L., Ehrin, E., Eriksson, L., Greitz, T., Hall, H., Hedström, CG., Litton, JE., Sedvall, G.: Substituted benzamides as ligands for visualization of dopamine receptor binding in the human brain by positron emission tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 3863-3867, 1985.
- 25) 塩坂貞夫: 動くシナプスと神経ネットワーク. 金芳堂, 2003.
- 26) 泰羅雅登, 中村克樹: 第3版 カールソン神経科学テキスト 脳と行動. 丸善, 2010.
- 27) 百瀬敏光, 成田紀之, 水口俊介, 高橋美和子, 小島良紀, 佐藤誠, 佐々木良太: ガム咀嚼時の内因性ドパミン放出に関する研究. *日本補綴誌*, 118: 157, 2009.
- 28) Momose, T., Nishikawa, J., Watanabe, T., Sasaki, Y., Senda, M., Kubota, K., Sato, Y., Funakoshi, M., Minakuchi, S.: Effect of mastication on regional cerebral blood flow in humans examined by positron-emission tomography with ¹⁵O-labelled water and magnetic resonance imaging. *Archives of Oral Biology*, 42(1): 57-61, 1997.
- 29) J.A. Joseph., G.S. Roth., R. Strong.: The striatum, a microcosm for the examination of age-related alteration in the CNS. *Review of biological research in aging*, 181-189, 1990.
- 30) Hikosaka, O., Takikawa, Y., Kawagoe, R.: Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological Reviews*, 80: 954-978, 2000.
- 31) Wolfram, Schultz.: Predictive reward signals of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80: 1-27, 1998.
- 32) 長正徳, 佐藤昭夫: 脳・神経系のエイジング, 朝倉書店, 1989.

- 33) Greg A. Gerhardt., Ronald E. Maloney Jr.: Microdialysis studies of basal levels and stimulus-evoked overflow of dopamine and metabolites in the striatum of young and aged Fischer 344 rats. *Brain Research*, 816: 68-77, 1999.
- 34) David M. Yurek., Susan B. Hipkens., Meleik A. Hebert., Don M. Gash., Greg A. Gerhardt.: Age-related decline in striatal dopamine release and motoric function in Brown Norway/Fischer 344 hybrid rats. *Brain Research*, 791: 246-256, 1998.
- 35) Nakano, M., Mizuno, T.: Age-related changes in the metabolism of neurotransmitters in rat striatum: a microdialysis study. *Mechanisms of Ageing and Development*, 86: 95-104, 1996.
- 36) David G. Morgan., Caleb E. Finch.: Dopaminergic Changes in the Basal Ganglia A Generalized Phenomenon of Aging in Mammals. *Annals of the New York Academy of Science*, 515: 145-160. 1988.
- 37) Pedata, F., Slavikova, J., Kotas, A., Pepeg, G.: Acetylcholine release from rat cortical slices during postnatal development and aging. *Neurobiology of Aging*, 4: 31-35, 1983.
- 38) O'Boyle, K. M., Waddington, J. L.: Loss of rat striatal dopamine receptors with aging is selective for D-2 but not D-1 sites: Association with increased non-specific binding of D-1 ligand [³H]piflutixol. *European Journal of Pharmacology*, 15: 171-174, 1984.
- 39) Suzuki, M., Hatano, K., Sakiyama, Y., Kawasumi, Y., Kato, T., Ito, K.: Age Related Changes of Dopamine D₁-Like and D₂-Like Receptor Binding in the F344/N Rat Striatum Revealed by Positron Emission Tomography and In vitro Receptor Autoradiography. *SYNAPSE*, 41:285-293, 2001.
- 40) H. GOZLAN., G. DAVAL., D. VERGE., U. SPAMPINATO., C. M. FATTACCINI., M. C. GALLISSOT., S. EL MESTIKAWY., M. HAMON. : Aging Associated

- Changes in Serotonergic and Dopaminergic Pre- and Postsynaptic Neurochemical Markers in the Rat Brain. *Neurobiology of Aging*, 11: 437-449, 1990
- 41) Morgan DG., Finch CE.: Dopaminergic changes in the basal ganglia : a generalized phenomenon of aging in animals. *Annals of the New York Academy of Science*, 515: 145-160, 1988.
- 42) J. A. Joseph., G. S. Roth.: Upregulation of striatal dopamine receptors and improvement of motor performance in senescence. *Annals of the New York Academy of Science*, 515: 355-362, 1988.
- 43) Marshall, J. F.: Sensorimotor disturbances in the aging rodent. *Journal of Gerontology*, 37: 548-554, 1982.
- 44) Bruinink, A., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M.: Pre- and Postnatal ontogeny and characterization of dopamine D₂, serotonergic S₂, and spirodecane binding sites in rat forebrain. *Journal of Neurochemistry*, 40: 1227-1236, 1983.
- 45) Paxinos, G., Watson, C.: *THE RAT BRAIN in Stereotaxic Coordinate Compact 6th Edition*. ACADEMIC, 2009.
- 46) Sakiyama, Y., Hatano, K., Tajima, T., Kato, T., Kawasumi, Y., Suzuki, M., Ito, K.: An atlas-based image registration method for dopamine receptor imaging with PET in rats. *Annals of Nuclear Medicine*, 21: 455-462, 2007.
- 47) Marilyn, N. Friedemann., Greg, A. Gerhardt.: Regional Effects of Aging on Dopaminergic Function in the Fischer-344 Rat. *Neurobiology of Aging*, 13: 325-332, 1992.
- 48) Suzuki, M., Hatano, K., Sakiyama, Y., Kawasumi, Y., Kato, T., Ito K.: Age Related Changes of Dopamine D₁-Like and D₂-Like Receptor Binding in the F344/N Rat Striatum Revealed by Positron Emission Tomography and In vitro Receptor

Autoradiography. SYNAPSE, 41: 285–293, 2001

- 49) Kawamura, K., Oda, K., Ishiwata, K.: Age-related changes of the [¹¹C]CFT binding to the striatal dopamine transporters in the Fischer 344 rats: a PET study. *Annals of Nuclear Medicine*, 17(3): 249-253, 2003.
- 50) R. N. Hughes., Lesley A. Syme.: The role of social isolation and sex in determining effects of chlordiazepoxide and methylphenidate on exploratory behaviour. *Psychopharmacology*, 27: 359-366, 1972.
- 51) Einon, Dorothy.: Spatial memory and response strategic in rats: Age, sex and rearing difference in performance. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 32: 473-489, 1980.
- 52) Juraska, JM., Henderson, C., Müller, J.: Differential rearing experience, gender, and radial maze performance. *Developmental Psychobiology*, 1984; 17(3): 209-215, 1984.
- 53) Watt, D. G., Williams, C. H.: The effects of the physical consistency of food on the growth and development of the mandible and the maxilla of the rat. *American Journal of Orthodontics*, 37: 895-928, 1951.
- 54) 添野一樹：固形飼料ならびに粉末飼料ラットの咀嚼筋機能および下顎枝の成長発育に関する研究。岩医大歯誌 17: 1-15, 1992.
- 55) 瀧上啓志：飼料の形状、栄養量がラット咀嚼器官の成長や発達におよぼす影響についての検討。滋賀医大誌, 17: 29-41, 2002.
- 56) 山田元：粉末飼料飼育が発育途上ラット咬筋並びに下顎骨形態に与える影響。岐歯学誌, 19: 284-301, 1992.
- 57) S, Reeves., C, Bench., R, Howard.: Ageing and the nigrostriatal dopaminergic system. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 17: 359-370, 2002.
- 58) Nora D. Volkow., Ruben C. Gur., Gene-Jack Wang., Joanna S. Fowler., Paul J.

- Moberg., Yu-Shin, Ding., Robert Hitzemann., Gwenn, Smith., Jean, Logan.:
Assosiation Between Decline in Brain Dopamine Activity With Age and Cognitive
and Motor Impairment in Healthy Individuals. *The American Journal of
Psychiatry*, 155: 344-349, 1998.
- 59)船木善仁: 神経伝達系変成モデルの作成. 東北大学大学院薬学研究科修士論文, 1993.
- 60)T. Hedner., P. Lundborg., J. Engel.: Brain Biochemical and Behavioral Changes in
4 Weeks Old Rats After Neonatal Oxygen Deprivation. *Pharmacology
Biochemistry & Behavior*, 10: 647-650, 1979.
- 61)Ungethüm, U., Chen, Y., Gross, J., Bjelke, B., Bolme, P., Eneroth, P., Heldt, J.,
Loidl, C.F., Herrera Marschitz, M., Andersson, K.: Effect of perinatal asphyxia on
the mesostriatal/mesolimbic dopamine system of neonatal and 4-week-old male
rats. *Experimental Brain Research*, 112: 403-410, 1996.
- 62)Franca, Ponzio., Nicoletta, Brunello., S. Algeri.: Catecholamine synthesis in brain
of aging rat. *Journal of Neurochemistry*, 30: 1617-1620, 1978.
- 63)Stamford, J.A.: Development and aging of the rat nigrostriatal dopamine system
studied with fast cyclic voltammetry. *Journal of Neurochemistry*, 52: 1582-1589,
1989.
- 64)Ben H.C. Westerink.: Sequence and significance of dopamine metabolism in the
rat brain. *Neurochemistry International*, 7: 221-227, 1985.
- 65)John Hyttel.: Age-related decrease in the density of dopamine D₁ and D₂ receptors
in corpus striatum of rats. *Pharmacology & Toxicology*, 61: 126-129, 1987.
- 66)David L. Alexoff., Paul Vaska., Douglas Marsteller., Timofei Gerasimov., Juan Li.,
Jean Logan., Joanna S. Fowler., Nicholas B. Taintor., Panayotis K. Thanos., Nora
D. Volkow.: Reproducibility of ¹¹C-Raclopride Binding in the Rat Brain Measured
with MicroPET R4: Effects of Scatter Correction and Tracer Specific Activity. *The*

Journal of Nuclear Medicine, 44: 815-822, 2003.

- 67) Araki, T., Kato, H., Shuto, K., Fujiwara, T., Itoyama, Y.: Effect of aging dopaminergic receptor and uptake sites in the rat brain studied by receptor autoradiography. *Journal of The Neurological Sciences*, 148: 131-137, 1997.
- 68) Patrizia, Popoli., Peppino, Betto., Roberto, Rimondini., Rosaria, Reggio., Antonella, Pe'zzola., Giuseppe, Ricciarello., Kjell, Fuxe., Sergi, Ferre.: Age-related alteration of the adenosine/dopamine balance in the rat striatum. *Brain Research*, 1998; 795: 297-300, 1998.
- 69) Andrew B. Norman, George, Battaglia., Ian, Creese.: Differential Recovery Rates of D₂ Dopamine Receptors as a Function of Aging and Chronic Reserpine Treatment Following Irreversible Modification: A Key to Receptor Regulatory Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 7(5): 1484-1491, 1987.
- 70) Stuart E. Leff., Ray, Gariano., Ian, Creese.: Dopamine receptor turnover rates in rat striatum are age-dependent. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 3910-3914, 1984.
- 71) E. G. MCGEER., H. C. FIBIGER., P. L. MCGEER., V. WZCKSON.: Aging and brain enzymes. *Experimental Gerontology*, 6: 391-396, 1971.
- 72) N. Tümer., C. Hale., J. Lawler., R. Strong.: Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat adrenal gland by exercise: effect of age. *Molecular Brain Research*, 14(1-2): 51-6, 1992.
- 73) Mohri, Y., Fumoto, M., Sato-Suzuki, I., Umino, M., Arita, H.: Prolonged rhythmic gum chewing suppresses nociceptive response via serotonergic descending inhibitory pathway in humans. *Pain*, 118(1-2): 35-42, 2005.
- 74) Yukihiro, Ohno.: Therapeutic Role of 5-HT_{1A} Receptors in The Treatment of Schizophrenia and Parkinson's Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17:

58-65, 2011.

- 75)岩崎一生, 越野寿, 平井敏博: ラットにおける粉末飼料飼育の情動活動に及ぼす影響. 日本咀嚼学会雑誌, 18(1): 29-36, 2008.
- 76)牧浦哲司, 池田和博, 平井敏博, 寺沢秀朗, 石島勉: 咬合支持の喪失とそれに伴う粉末飼料飼育への変更がラットの学習・記憶機能に及ぼす影響. 老年歯学, 16: 179-185, 2001.
- 77)Kristen L. Brunson, Enikő Kramár, Bin Lin, Yuncai Chen, Laura Lee Colgin, Theodore K. Yanagihara, Gary Lynch, Tallie Z. Baram.: Mechanisms of Late-Onset Cognitive Decline after Early-Life Stress. *The Journal of Neuroscience*, 25(41): 9328-9338, 2005.
- 78)Bita, Moghaddam., Mark, Jackson.: Effect of stress on prefrontal cortex function. *Neurotoxicity Research*, 6: 73-78, 2004.
- 79)Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishida, A., Sasaki, H., De-Hua Chui, Tabira, T.: Chronic Stress Induces Impairment of Spatial Working Memory Because of Prefrontal Dopaminergic Dysfunction. *The Journal of Neuroscience*, 20(4): 1568-1574, 2000.
- 80)Ogawa, N., Nukina, I., Hirose, Y., Fukushima, M., Mori, A.: Effect of Calcium Hopantenate on Neurotransmitter Receptors in the Rat Brain. *Japanese Journal of Pharmacology*, 37: 45-50, 1985.
- 81)J.L. Venero, A. Machado and J. Cano.: Age effect on monoamine turnover of the rat substantia nigra. *Brain Research*, 557:109-114, 1991.
- 82)Lundström K, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, Ulmanen I.: Cloning , expression and structure of catechol-O-methyltransferase. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1251: 1-10, 1995.
- 83)Ulmanen I, Peränen J, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P,

- Bernasconi L, Aubry JP, Lundström K.: Expression and intracellular localization of catechol-O- methyltransferase in transfected mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*, 243: 452-459, 1997.
- 84)Boadie W. Dunlop, Charles B. Nemeroff.: The Role of Dopamine in the Pathophysiology of Depression. *ARCHIVES OF GENERAL PSYCHIATRY*, 64: 327-337, 2007.
- 85)Peter, Miu., Farouk, Karoum., Gino, Toffano., and John W. Commissiong.: Regulatory aspects of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Experimental Brain Research*, 91: 489-495, 1992.
- 86)Kawamura, K., Oda, K., Ishiwata, K.: Age-related changes of the [¹¹C]CFT binding to the striatal dopamine transporters in the Fischer 344 rats: PET study. *Annals of Nuclear Medicine*, 17(3): 249-253, 2003.
- 87)Masuzawa, H., Nakao, S., Miyamoto, E., Yamada, M., Murao, K., Nishi, K., Shingu, K.: Pentobarbital Inhibits Ketamine-Induced Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens: A Microdialysis Study. *Anesth Analg*, 96: 148-52, 2003.