

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	池田 侑平
論文審査担当者	主査 山口 朗 副査 高野 吉郎、木野 孔司
論文題目	Mechanical loading leads to osteoarthritis-like changes in the hypofunctional temporomandibular joint in rats
(論文内容の要旨) <緒言> 顎関節症は多因子疾患であり、歯科矯正臨床において注意すべき病態の一つである。特に顎関節の変形性関節症 (Osteoarthritis; OA) は下顎頭の変形、軟骨変性、軟骨下骨の吸収を主たる特徴とし、顎顔面の骨格形態に影響を与えることが報告されている。全身の関節に生じる退行性疾患である OA は年配者に多く発症し、超高齢化社会において、特に膝関節や股関節における罹患者数が今後も増加することが見込まれ、その予防法および治療法の確立が急務である。また OA の原因としては形態異常、筋力低下、過剰な負荷、外傷、遺伝的要因等が挙げられる。 臨床研究において下顎頭の吸収は下顎枝の成長不全を誘発することで下顎の後方回転を生じ、歯科矯正治療中に予期しない咬合変化が起こることが報告されている。また顎関節症を有する骨格性Ⅱ級開咬患者は下顎下縁平面角や下顎角が有意に大きく、下顎後退症患者は咬合平面角が大きく、長顔型を呈しているため、矯正治療に加えて下顎骨前方移動術や骨延長を併用した外科的矯正治療が必要であることが報告されている。しかしそのような患者は画像診査より下顎頭が細くて小さく、負荷に対する抵抗性が低く、術後に骨格的な後戻りを生じやすいと考えられているが、下顎頭の形態と負荷に対する抵抗性について比較検討した先行研究はない。 下顎頭軟骨は顎関節に対する負荷吸収や、関節窩と下顎頭の摩耗防止により、円滑な顎運動遂行の一端を担っており、変性した場合には顎運動に支障をきたす。軟骨の変性は主成分であるⅡ型コラーゲンをコラゲナーゼが分解することにより起こり、軟骨の細胞外基質の構造や構成を変化させる。コラゲナーゼである Matrix Metalloproteinase (MMP) は関節疾患の進行に関与しており、特に MMP-13 は膝関節や顎関節 OA の軟骨の変性に関与していると報告されている。 顎関節に関する基礎研究においては成長期ラットの咬筋切断や液状飼料飼育により、実験的に咀嚼筋力を低下させると、下顎枝の高径や下顎頭軟骨の厚径が減少することが報告されている。つまり、咬筋切断や液状飼料飼育ラットでは咀嚼筋力低下により下顎骨が十分に成長発育しないため、機能低下した下顎頭が形成される。また顎関節 OA モデルとして、顎関節円板の外科的除去や、不正咬合の誘発、遺伝子変異、強制開口による顎関節への機械的な負荷を与える手法が用いられている。そこで本研究では成長期ラットを異なる性状の飼料で飼育した後、機械的負荷を与えることで顎関節に生じる変化を比較し、機能低下した脆弱なラットの顎関節は機械的負荷が	

かかることで OA 様変化を生じやすくなるか否かを検討することとした。OA 様変化の観察にはマイクロ CT を用いた下顎頭軟骨下骨の形態的評価や、トルイジンブルー染色および MMP-13 免疫組織化学染色による下顎頭軟骨の組織学的評価を用いた。

<材料および方法>

21 日齢 Wistar 系雄性ラット 40 匹を固形飼料飼育群 (Control : C 群) 及び液状飼料飼育群 (Liquid diet feeding : L 群) に分け、それぞれの群の半数を 63 日齢から 5 日間連続、1 日 3 時間の強制開口を 8% 抱水クロラルによる腹腔内麻酔下にて行い、強制開口群 (Wide open : W 群)、液状飼料飼育 + 強制開口群 (Liquid diet feeding + Wide open : LW 群) とした。開口装置は直径 0.9 mm コバルトクロム合金ワイヤーを用いて、最大開口位 (上下顎切歯間距離 : 20 mm) で維持されるように作製した。直径 0.8 mm では開口位を維持するには弱く不十分であり、直径 1.0 mm では開口時に関節脱臼することが懸念されたため、直径 0.9 mm が最大開口位を維持する上で最適であった。

68 日齢にて 4% パラホルムアルデヒドにより灌流固定を行った後、マイクロ CT を用いた下顎頭の形態解析を行った。パラメータとして骨量 : BV/TV (Bone Volume Fraction)、骨梁幅 : Tb.Th (Trabecular Thickness)、骨梁数 : Tb.N (Trabecular Number)、骨梁間隔 : Tb.Sp (Trabecular Separation)、骨梁中心距離 : Tb.Spac (Trabecular Spacing) を用いた。下顎頭矢状断面中央を選択し、前方半分 (前方部)、後方部四分の一 (後方部) およびそれらの間の領域 (中央部) の 3 部位に分け、それぞれの領域において 0.2×0.2×0.15 mm 範囲内を評価領域とした。形態的評価後、4.13% EDTA にて 8 週間脱灰後、パラフィン包埋し、6µm 厚顎関節矢状断切片を作製した。組織学的評価としてトルイジンブルー染色切片において下顎頭矢状断面中央部の軟骨細胞層の厚径を各群 3 部位全てにおいて計測した。また抗 MMP-13 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行い、抗 MMP-13 抗体 (50 倍希釈) にて 4℃ で 2 時間の一次抗体反応後、二次抗体反応を行った。その後 DAB により免疫反応部位を可視化し、単位面積あたりの MMP-13 陽性細胞数を各群 3 部位全てにおいて計測した。評価領域は下顎頭矢状断 3 部位それぞれの中央部で軟骨層を含む 400×200µm 範囲内とした。以上の項目に関しては、統計学的評価としてマンホイットニーの U 検定およびボンフェローニ補正を行った。また、飼料の違いによる開口時の変化量の比較には、ステューデントの t 検定を用いた。 (p<0.05)

<結果>

実験期間中のラットの体重は 4 群間で有意な差は認められなかった。

・形態的評価

液状飼料飼育により、BV/TV は 3 部位全てで減少したが、特に開口させることで中央から後方部にかけて有意に減少した。また Tb.Th、Tb.N も LW 群の中央から後方部で有意に減少しており、Tb.Sp、Tb.Spac は有意に増加した。飼料の違いによる開口時の変化量を比較したところ、C 群と W 群の変化量よりも L 群と LW 群の変化量の方が中央部において Tb.N が有意に減少し、Tb.Sp、Tb.Spac が有意に増加した。また後方部においては BV/TV、Tb.Th、Tb.N が有意に減少し、Tb.Sp、Tb.Spac は有意に増加した。

・組織学的評価

軟骨層厚径は C 群と比較して実験群全ての 3 部位において減少した。LW 群の下顎頭中央から後方部では MMP-13 陽性細胞率が有意に増加し、軟骨細胞層区分の乱れや成熟層における無細胞領域が認められ、他の領域では認められない軟骨変性および OA 様変化が特異的に認められた。また飼料の違いにより開口時の変化量を比較したところ、C 群と W 群の変化量よりも L 群と LW 群の変化量の方が中央部および後方部において有意に増加した。

<考察>

日常生活における下顎頭への負荷は、外傷や大きな欠伸による瞬間的な負荷や睡眠時ブラキシズム、うつ伏せで寝ること等の持続的な負荷が想定されるが、実験動物モデルとして下顎頭への負荷を確実に得るために強制開口モデルを選択した。実験的開口のプロトコールとしてこれまでに 1 日 3 時間の強制開口を 5 日間や 1 日 1 時間の強制開口を 20 日間施行する実験法が顎関節 OA モデルとして報告されている。後者は前者より顕著な OA 様変化を生じているが、本研究の目的は機能低下した顎関節が OA 様変化を生じることを評価することであったため、確実に下顎頭に負荷をかけられる条件設定とした。先行研究から、強制開口により下顎頭中央から後方部が圧迫されることが軟 X 線評価により示されている。本研究の強制開口による負荷も同様に下顎頭中央から後方部にかかっていた。マイクロ CT を用いた形態的評価では LW 群の骨梁構造に退行性変化が認められたが、OA の特徴である骨棘形成などの形成系変化は認められなかった。骨の形成系変化を評価するためにはより長期的な計画が必要となると考えられ、本研究は OA の初期段階の変化を示していると考えられる。

MMP13 は軟骨分化に影響するため機械的負荷に対する軟骨細胞の反応性を評価する上で重要なマーカーの一つである。LW 群の中央から後方部にかけて特異的に発現した無細胞領域は同様の先行研究においても類似した所見が多く認められている。基質の合成は認められたが、不均一で疎となっており軟骨変性が認められたことから、軟骨の細胞死および細胞分化の異常との関連が示唆され、OA 様変化と考えられた。また OA の初期変化として細胞死が起こることから、細胞死と軟骨変性の関連について将来的に分子細胞レベルの研究が期待される。

下顎頭への機械的負荷は下顎頭軟骨に直接的にかかると考えられるが、軟骨変性の後に軟骨下骨が変化するという報告がある。一方、機械的負荷は軟骨変性に先立って軟骨下骨の変化を生じ、その変化が下顎頭軟骨への機械的負荷に対する反応性をより敏感にするという報告もある。つまり、本研究においては成長期ラットの液状飼料飼育により軟骨下骨の骨梁構造の退行性変化が生じたことにより、その軟骨下骨における変化が軟骨の負荷に対する抵抗性に対して影響を与えている可能性も示唆された。以上のことから、歯科矯正治療および外科的矯正治療の際には、下顎頭吸収のリスクを冒さないように下顎頭へ負荷がかかるような処置を避けることで、下顎頭の負荷に対する抵抗性を考慮に入れた治療計画を立案するべきである。

<結論>

成長期ラットの機能低下した脆弱な顎関節は機械的負荷により形態的、組織学的評価で退行性変化が認められ、OA 様変化を生じたことから、負荷に対する抵抗性が低下していることが示唆

された。また成長期における顎関節への適度な機械的刺激は正常な顎関節の成長や負荷に対する抵抗性の獲得のために重要であることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 4777 号	池田 侑平
論文審査担当者	主 査 山口 朗 副 査 高野 吉郎、木野 孔司	
(論文審査の要旨)		
歯科矯正臨床において注意すべき病態の一つに下顎頭の軟骨変性、軟骨下骨の吸収を主たる特徴とする顎関節の変形性関節症（Osteoarthritis; OA）が挙げられる。下顎後退症患者は咬合平面角が大きく、長顔型を呈しており、下顎骨前方移動術や骨延長を併用した外科的矯正治療の必要性が報告されている。しかし、そのような患者は下顎頭が細くて小さく、負荷に対する抵抗性が低く、術後に骨格的な後戻りを生じやすいと考えられているが、下顎頭の形態と負荷に対する抵抗性について比較検討した先行研究はない。このような背景のもと、池田は成長期ラットを液状飼料飼育により実験的に咀嚼筋力を低下させ、脆弱な下顎頭を形成し、その下顎頭に対して強制開口による機械的負荷を与えるモデルを作製した。機能低下した脆弱なラットの顎関節は機械的負荷がかかることで OA 様変化を生じやすいという仮説の下、成長期ラットを異なる性状の飼料で飼育した後、機械的負荷を与えることで顎関節に生じる変化を食餌の種類および負荷の有無により比較検討を行った。またマイクロ CT を用いた下顎頭軟骨下骨の形態的評価や、トルイジンブルー染色および MMP-13 免疫組織化学染色による下顎頭軟骨の組織学的評価を行い、興味深い結果を報告した。 研究方法としては、21 日齢 Wistar 系雄性ラット 40 匹を固形飼料飼育群（Control：C 群）及び液状飼料飼育群（Liquid diet feeding：L 群）に分け、それぞれの群の半数を 63 日齢から 5 日間連続、1 日 3 時間の強制開口を腹腔内麻酔下にて行い、強制開口群（Wide open：W 群）、液状飼料飼育＋強制開口群（Liquid diet feeding＋Wide open：LW 群）とした。開口装置は直径 0.9 mm コバルトクロム合金ワイヤーを用いて、最大開口位（上下顎切歯間距離：20 mm）で維持されるように作製した。68 日齢にて灌流固定し、マイクロ CT を用いた下顎頭の形態解析を行い、脱灰後、パラフィン包埋し、6μm 厚顎関節矢状断切片を作製した。評価領域は下顎頭矢状断面中央部の前方半分（前方部）、後方部四分の一（後方部）およびそれらの間の領域（中央部）の 3 部位に分けた。組織学的評価としてトルイジンブルー染色切片において軟骨細胞層厚径の計測および抗 MMP-13 抗体を用いた免疫組織化学染色を行っている。本研究の目的および実験計画は妥当であり、本研究が周到な準備と綿密な計画の下に実施されたものと判断される。 研究結果としては、以下の知見を得ている。 1. 下顎頭の形態的評価より、C 群と比較して L 群では骨梁構造の退行性変化が認められた。また、W、LW 群では開口させることで下顎頭中央から後方部において骨梁構造の退行性変化が認められた。 2. 組織学的評価より、C 群と比較して実験群の軟骨層厚径の減少が認められた。また LW 群の		

下顎頭中央から後方部においては MMP-13 陽性細胞率が有意に増加し、軟骨細胞層区分の乱れや成熟層における無細胞領域の出現など、他の領域では認められない軟骨変性および OA 様変化が特異的に認められた。

3. それぞれの評価方法において飼料の違いによる開口時の変化量を比較したところ、C 群と W 群の変化量よりも L 群と LW 群の変化量の方が下顎頭の中央から後方部において有意に大きな差が認められたことから、開口による影響は液状飼料飼育した LW 群のラット下顎頭に、より大きく現れることが示唆された。

以上の結果から、成長期ラットの機能低下した脆弱な顎関節は、機械的負荷により、下顎頭に形態的、組織学的評価で退行性変化が認められ、OA 様変化が生じることが確認された。これについて池田は、液状飼料飼育による骨梁構造の退行性変化が軟骨の負荷に対する抵抗性に影響を及ぼす可能性を指摘し、それに起因して機械的負荷に対する下顎頭の抵抗性の低下が誘発されたと考察している。

以上のように、本研究は成長期の咀嚼環境の違いが下顎頭の形態と負荷に対する抵抗性に及ぼす影響を比較検討し、機能低下した脆弱な顎関節は機械的負荷に対する抵抗性が低下していることを初めて明らかにしたものであり、成長期ラット顎関節への適度な機能刺激が機械的負荷に対する抵抗性の獲得のために重要であることが示唆された。これらの成果は今後の歯学の基礎および臨床の各分野における発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。