

実験的咬合異常によって惹起されるラット下顎頭軟骨層の変化について

山本, 昌家
九州大学歯学部口腔外科学第二講座

<https://doi.org/10.15017/7325069>

出版情報：福岡醫學雜誌. 85 (3), pp.78-90, 1994-03-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



原 著

実験的咬合異常によって惹起される
ラット下顎頭軟骨層の変化について

九州大学歯学部口腔外科学第二講座 (指導: 岡 増一郎教授)

山 本 昌 家

**Involvement in Morphological Changes of the Articular Cartilage
of Rat Temporomandibular Joint Induced by Experimental Malocclusion**

Masaie YAMAMOTO

*The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Faculty of Dentistry, Kyushu University 71, Fukuoka 812*

The effect of malocclusion induced by increase in unilateral occlusal vertical dimension on the articular cartilage of rat mandibular condyle was histologically and immunohistologically examined.

WKA rats (8 weeks) were divided into three group A: untreated (control) rats, group B: rats forced to mouth open just for 20 min, and group C: rats given malocclusion by putting the 1 mm diameter wire on the right upper molar continuously. After treatment, each rat was sacrificed periodically up to 9 weeks, and the morphological changes of condylar cartilage (articular, embryonic and transitional zones of cartilage layer) were histologically investigated. The thickness of articular cartilage in all groups was decreased in a time-dependent manner (up to 9 weeks after treatment). In group C rats, whose articular cartilage was thinnest in three groups, the reduced thickness of cartilage in the non-treated side (the left side) was same as that in the treated side which was presented with excessive molar contact. But, its occurrence in the treated side was seen 2 weeks earlier than that in the non-treated side.

Even in group B rats which were only forced to open the mouth for 20 min without setting of permanent malocclusion, the thickness of condylar cartilage was decreased more than that of group A rats. When the condylar cartilages of all three groups were immunohistologically examined with anti-interleukin-1 (IL-1) antibody in order to investigate the pathophysiological involvement of IL-1, which is well-known catabolic factor to cartilage, some chondrocytes in articular cartilage were positively stained. The ratio of IL-1 positive cells increased time-dependently. IL-1-producing cells in group B and the non-treated side of group C reached to the maximal ratio at the same time when the condylar cartilage markedly decreased in thickness. However, the ratio of IL-1-positive chondrocytes in the treated side of group C was maximal four weeks after the decrease of cartilage thickness. In respect with the size of cells in cartilage, the occurrence of decreased thickness in condylar cartilage corresponded to that of the reduction of cellular size, especially in the embryonic zone of group C. These results described above suggest that malocclusion, unilateral immature occlusion, can induce the thinning of condylar cartilage which may result from the reducing size of articular chondrocytes (differentiated chondrocytes) and the accompanying decreased cartilage matrix. This change of cartilage may be caused by IL-1 that articular chondrocyte seemed to produce. In addition, non-treated side of temporomandibular joint in unilateral malocclusion and excessive opening of mouth should be paid attention to regarding to the cartilage changes in temporomandibular joint, which may cause

arthrosis or arthritis.

はじめに

顎関節病変は栄養失調、感染やリウマチなどによる炎症、咬合高径の不調和などにより発症しその病態も様々であるが、なかでも顎関節症は不正咬合や歯冠修復などによる咬合高径の不調和といった咬合異常がその主な原因の一つとされている³⁴⁾。咬合異常という慢性刺激が下顎頭形態にどのような影響を及ぼしているかという研究は1940年 Breitner⁵⁾によるサルを用いた実験が最初とされており、今日まで数多くの研究がなされている。それらによると、ラットやサルを用いた実験で片側臼歯部に実験的咬合異常を惹起させ下顎頭の軟骨部に比較的早期より軟骨層厚径の減少や細胞数の減少がみられるという報告⁸⁾¹³⁾¹²⁾¹¹⁾²⁰⁾や、反対に下顎頭の肥大がみられたという報告³⁶⁾、軟骨層を5層に分け第2層に特異的な変化がみられたという報告¹¹⁾などであるが、これらの変化は用いた実験動物の種、年齢(週齢)、食餌、咬合異常の付与の方法などにより様々であり、また、いずれも形態学的観察であり咬合刺激により何故そのような変化が生じるのかという究明にまでは至っていない。

最近、骨、軟骨などの硬組織破壊およびリモデリングには Interleukin-1 (IL-1) や Tumor necrosis factor (TNF) などのサイトカインの関与が示唆され、近年の遺伝子工学の進歩により、遺伝子組み換え型(リコンビナント)の純度の高いサイトカインが大量に入手可能になり、培養軟骨細胞を用いた in vitro の実験結果が多数報告されている²¹⁾²⁷⁾¹⁹⁾が、顎関節疾患にこれらサイトカインの関与については検討されていない。

臨床的に顎関節症を引き起こす咬合異常の原因としては咬合挙上によるものが多いと報告されている²²⁾²³⁾²⁸⁾²⁵⁾が、今回筆者はラット臼歯部を挙上することにより実験的咬合異常を惹起させ、下顎頭軟骨部における形態学的変化とサイトカインの出現を経時的、免疫組織化学的に検討し興味ある知見を得たので報告する。

対象および方法

実験動物には生後8週齢(260 g $\pm$ 20 g) WKA 雄ラット 64 匹を用いた。実験的咬合異常を起こさせるため、ラットにエーテル吸入麻酔後 pentobarbital sodium (ネンブタール®, 40 mg/kg) を筋注し、開口

器にて開口させ、右側上顎臼歯部に 1 mm の咬合挙上を付与した。それには歯牙防湿、エッチング処理後、サンメデイカル社製スーパーボンド®による筆積法にて直径 1 mm の鋼線をラット臼歯咬合面に装着した。なお、咬合挙上を付与する作業時間は 20 分間で統一した。これを咬合挙上群とし、20 匹のラットを用い 4 匹ずつ 5 グループに分けた。咬合挙上による刺激を確実にするため 7 日毎に同側の下顎切歯の反復切削を行った。さらに、20 分間の持続開口のみを行った群を強制持続開口群とし、20 匹のラットを用い、同様に 5 グループに分けた。また、この両者いずれの刺激も加えていないものを対照群とし 24 匹のラットを用い、4 匹ずつの 5 グループに加え実験開始時のコントロールを含む 6 グループに分けた。ラットは日本クレア社製固形飼料 CE-2 を用いて飼育した。なお、栄養状態による顎関節への影響を検討するため、各群とも 1 週間隔で体重を測定した。

実験開始後より 1, 3, 5, 7, 9 週後にエーテル麻酔下脱血により屠殺し、乾燥させないよう phosphate buffer solution (PBS) に適宜浸漬し顎関節を摘出した。なお、対照群では生後 8 週齢すなわち実験開始時に相当する時期のラットを同様に屠殺し、0 週目の標本とした。その後ただちに 2% パラフォルムアルデヒド含有 periodate lysine paraformaldehyde (PLP) 固定液にて 6 時間浸漬固定を行い、10% シュークローズ含有 phosphate buffer saline (PBS) にて 4 時間、15% シュークローズ含有 PBS にて 4 時間、20% シュークローズ含有 PBS にて 6 時間の固定液の洗浄の後、TISSUE-TEK® (Miles, USA) に包埋し、ただちにドライアイス-アセトンにて凍結した。

凍結包埋した下顎頭を Reichert-Jung 社製 2800 Frigocut を用い前額断面で 4~6 μ m で薄切し、下顎頭最前端部が確認できた時点から 1000 μ m 目の切片から採取を行い、Takeuchi ら³²⁾の方法に従いストレプトアビジン-ビオチン (SAB) 法により免疫組織化学染色をおこない光顕にて観察した。SAB 法については、ニチレイ社製ヒストファイン SAB-PO (R) および SAB-PO (M) キットを用い、組織薄切後 (4~6 μ m)、風乾、PBS にて洗浄後ブロッキング処理を行い rabbit anti-mouse IL-1- α polyclonal antibodies (500 倍希釈)、hamster anti-murine TNF (α & β) monoclonal antibody (500 倍希釈) (いずれも Gen-

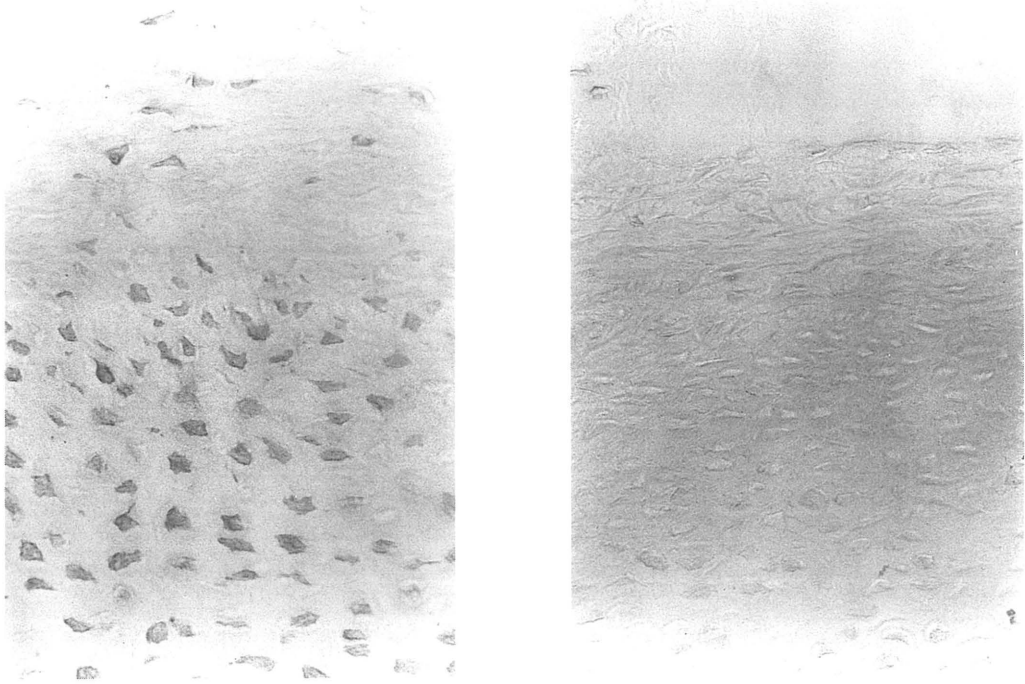


写真1 染色された軟骨細胞（左）およびそのネガティブコントロール（右）

*この写真は核染色は行っていない。

軟骨細胞の胞体が染色されている。

ネガティブコントロールは軟骨細胞の胞体が染色されていない。

zyme, Cosmo Bio., Tokyo) を各々1次抗体として4°C over night にて反応させた。ネガティブコントロールにはニチレイ社製10%ラビット正常血清, ニチレイ社製10%マウス正常血清を用いた。次いでビオチン標識2次抗体の添加反応(10 min 室温), ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンの添加反応(5 min 室温)後, AEC 発色基質にて発色し, マイヤーヘマトキシリンにて核染色を行った。なお, 今回の検索では各軟骨細胞のうち胞体が染色されたものを IL-1 陽性細胞としてカウントした(写真1)。

測定項目としては顎関節軟骨層を野口²⁹⁾の方法に従い, 第1層 (articular zone), 第2層 (embryonic zone), 第3層 (transitional zone), 第4層 (hypertrophic zone), 第5層 (erosion zone) の5層に分け, その中央部を幅 300 μm の範囲で各観察期間ごとに, オリンパス社製 objectivemicrometer を用い100倍顕微鏡下に, 細胞の最大径については400倍顕微鏡下に以下の項目について測定した(図1, 写真2)。1) 各群における下顎頭軟骨層の厚径, 2) 各軟骨層ごとの厚径, 3) 各軟骨層の幅 300 μm あたりの細胞数, 4)

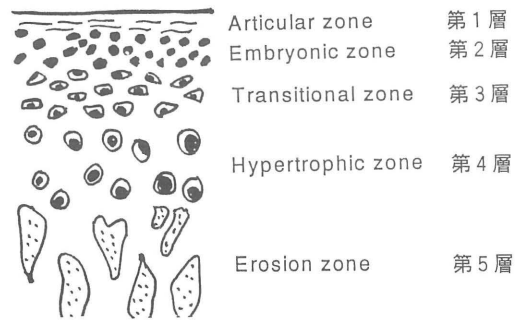


図1 ラット下顎頭軟骨層の模式図

Ar. Articular zone (第1層)
Em. Embryonic zone (第2層)
Tr. Transitional zone (第3層)
Hy. Hypertrophic zone (第4層)
Er. Erosion zone (第5層)

各軟骨層における細胞の最大径, 5) 各軟骨層における IL-1 α および TNF- α & β 陽性細胞の割合を計測した。なお, 同条件下の測定限界は5 μm である。

また, 第4層 (hypertrophic zone) は骨質に接した

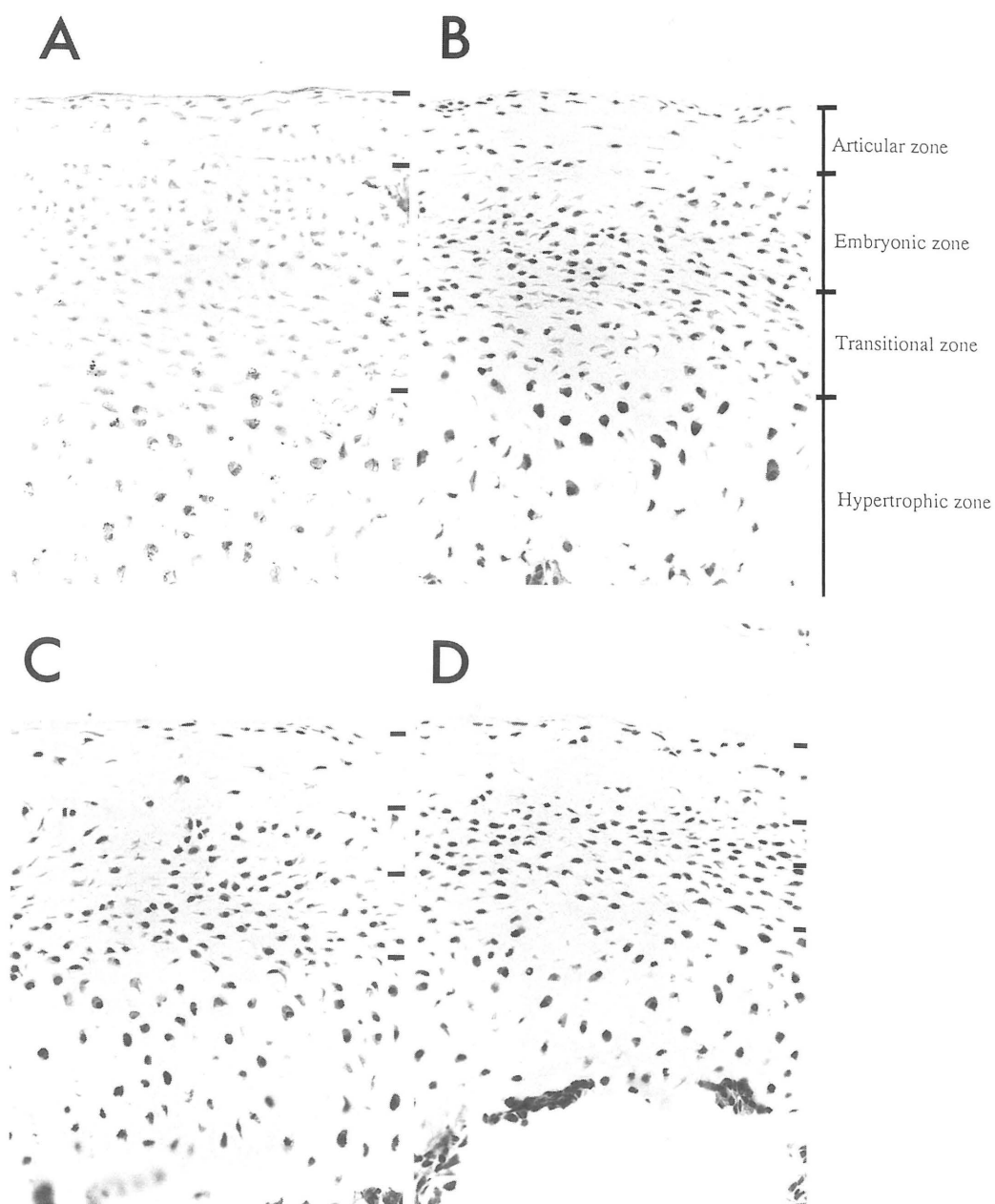


写真 2 A：対照群の下顎頭軟骨層
B：強制持続開口群の下顎頭軟骨層
C：咬合非挙上側の下顎頭軟骨層
D：咬合挙上側の下顎頭軟骨層

いずれも術後9週目の標本を示す

部位では凹凸が著しく、層の厚径の推移を観察するには不相当と考えられ、加えて、同層では標本により切片作製の際、下部の第5層である骨組織と共にとんでしまうことがあり、計測から除外せざるを得ないものが多く、また、切片の周辺部では、組織の捲れ上がりのため fales positive を呈するものがあり今回の検索の対象から第4層および第5層は除外した。

統計は下顎頭軟骨細胞層の厚径の統計処理は各群とも1側の下顎頭より2枚の切片を計測し、片側最大8個のサンプルにつき行った。

各測定項目について Student T-test, または Wilcoxon signed rank test を用い、危険率5%にて統計学的有意の検定を行った。

結 果

1. 実験動物の体重変化 (図2)

対照群, 強制持続開口群および咬合挙上群ともに実験期間を通して同一の体重増加が認められ、栄養の過不足による下顎頭軟骨への変化はないものと考えられた。

2. 下顎頭軟骨層の厚径の推移 (図3)

下顎頭部の全軟骨層 (第1層から第3層まで) の厚径は、対照群では実験開始時 ($203.3 \pm 6.53 \mu\text{m}$, SE, $n=15$), 第1週後 ($205.6 \pm 4.38 \mu\text{m}$, SE, $n=8$), 第3週後 ($201.1 \pm 3.90 \mu\text{m}$, SE, $n=9$) まで変化なく、第5週後 ($194.5 \pm 2.40 \mu\text{m}$, SE, $n=10$) には実験開始時と比較して有意にその厚さの減少が観察された。しかし、第7週後 ($190.0 \pm 2.57 \mu\text{m}$, SE, $n=6$) および第9週後 ($186.7 \pm 3.33 \mu\text{m}$, SE, $n=6$) までは第5

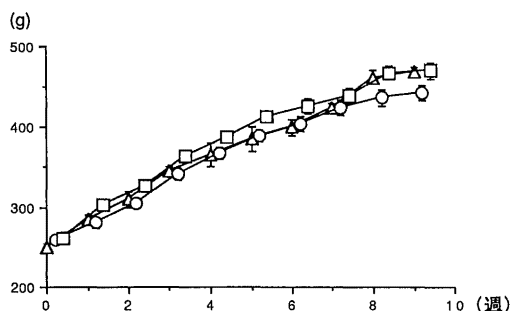


図2 実験動物の体重変化

すべての群とも実験期間を通して同一の体重増加がみられた。

対照群 (—△—), 咬合挙上群 (—○—), 強制持続開口群 (—□—)

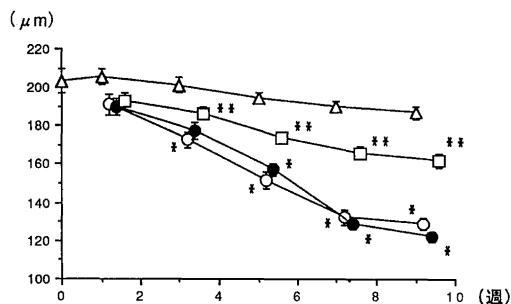


図3 下顎頭軟骨層の厚径 (第3層まで)

対照群 (—△—): 実験開始時より第3週後まで変化なく第5週後に開始時と比し有意にその厚さに減少がみられた。それ以後は変化はみられない。

強制持続開口群 (—□—): 第3週以降対応する対照群に比し有意の差を認めた。

挙上側 (—○—): 第3週以降対応する強制持続開口群に比し有意の差を認めた。

非挙上側 (—●—): 第5週以降対応する強制持続開口群に比し有意の差を認めた。

*強制持続開口群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

**対照群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

週後のそれとは変化なかった。強制持続開口群では、第1週後 ($192.7 \pm 4.41 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) では実験開始時と変化なく、第3週後 ($186.2 \pm 3.33 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) 以降対応する対照群に比し有意の差を認めた。

咬合挙上群のうち咬合挙上側の第1週後 ($191.1 \pm 5.39 \mu\text{m}$, SE, $n=8$) では対応する強制持続開口群のそれと統計学的有意の差が認められなかったが、第3週目 ($172.6 \pm 3.97 \mu\text{m}$, SE, $n=8$) 以降に対応する強制持続開口群に比し有意に減少が観察された。また、同群の非挙上側では、実験開始後5週目以降 ($157.1 \pm 3.18 \mu\text{m}$, SE, $n=8$) に有意の減少が観察されたが咬合挙上側とは有意の差は見られなかった。

すなわち、強制持続開口群では術後第3週目より対照群に比し有意に全軟骨層の減少を認めた。また咬合挙上側では強制持続開口群と同時期の第3週目より、非挙上側では第5週目に対応する強制持続開口群に比し有意に全軟骨層の減少が観察された。

3. 下顎頭軟骨各層の厚さの推移 (図4)

下顎頭軟骨層の厚さの変化がどの層の変化によるか

を検索するため各層における軟骨層の厚さの推移を検索した。

a) 第1層 (articular zone) : 対照群では経時的にその厚さの減少が認められ、実験開始時 ($72.0 \pm 1.07 \mu\text{m}$, SE, $n=15$), 第1週後 ($70.6 \pm 2.40 \mu\text{m}$, SE, $n=8$), 第3週後 ($66.7 \pm 1.67 \mu\text{m}$, SE, $n=9$), 第5週後 ($65.0 \pm 1.51 \mu\text{m}$, SE, $n=11$), 第7週後 ($60.0 \pm 1.67 \mu\text{m}$, SE, $n=9$), 第9週後 ($60.0 \pm 1.67 \mu\text{m}$, SE, $n=9$) と徐々に減少傾向を示した。強制持続開口群では実験開始後より対照群と酷似の厚さの減少がみられた。また、咬合挙上群の挙上側では7週目 ($50.5 \pm 2.97 \mu\text{m}$, SE, $n=8$) 以降、強制持続開口群に比し有意の減少が認められた。同群の非挙上側では9週後 ($48.3 \pm 1.46 \mu\text{m}$, SE, $n=8$), 強制持続開口群に比し有意の減少が認められた。

b) 第2層 (embryonic zone) : 対照群では実験開始時、第1週後 ($73.8 \pm 1.83 \mu\text{m}$, SE, $n=8$), 第3週後 ($74.4 \pm 2.42 \mu\text{m}$, SE, $n=8$), 第5週後 ($71.0 \pm 1.00 \mu\text{m}$, SE, $n=8$), 第7週 ($70.0 \pm 0.00 \mu\text{m}$, SE, $n=6$), 第9週後 ($70.0 \pm 0.00 \mu\text{m}$, SE, $n=6$) と有意の変化は認められなかった。強制持続開口群では、第3週後 ($65.1 \pm 2.01 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) から観察期間の第9週 ($56.0 \pm 1.63 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) まで対応する対照群に比し有意の減少を示したが第5週目 ($57.9 \pm 1.57 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) 以降はその程度が緩慢であった。咬合挙上群の挙上側では第5週目 ($50.8 \pm 1.89 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) から、非挙上側では第7週目 ($40.0 \pm 1.87 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) から強制持続開口群に比して有意の減少が認められたが、観察期間を通じて両側間には有意の差はなかった。

c) 第3層 (transitional zone) : 対照群では観察期間中を通じてその厚さに有意の変化は認められなかった。強制持続開口群では実験開始後5週目 ($53.1 \pm 0.84 \mu\text{m}$, SE, $n=16$) から対応する対照群との間に有意の減少が認められた。咬合挙上群では、挙上側、非挙上側共に実験開始後3週目より対応する強制持続開口群に比して有意の減少が認められたが、両側間に有意の差はなかった。

4. 下顎頭軟骨各層の細胞数の推移 (図5)

第1層の細胞数は第1週目に対照群に比し他の3群で減少傾向を示したが統計学的有意の差はなく、観察期間を通じて各群間に有意の差は観察されなかった。第2層でも観察期間を通じて細胞数の推移に統計学的有意の差は認められなかった。第3層でも観察期間を

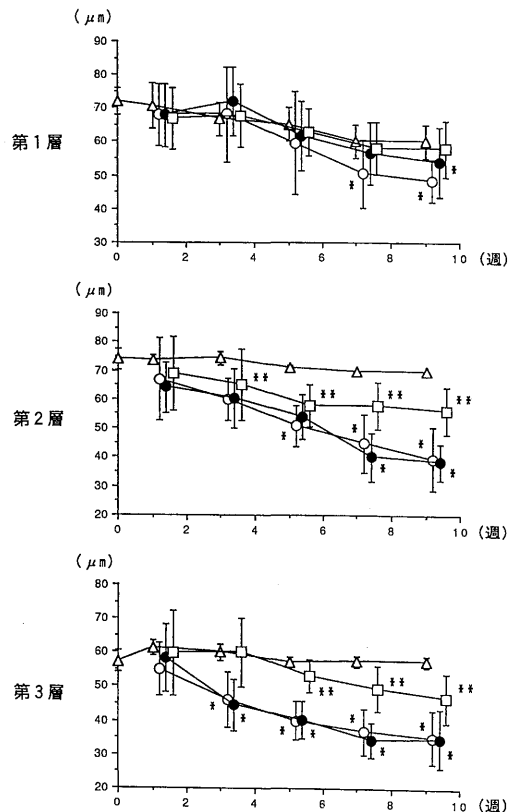


図4 下顎頭軟骨各層の厚径

- 第1層 : 対照群は経時的厚さの減少を認めた。
強制持続開口群は対照群と酷似の減少を認めた。
挙上側は第7週後以降強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。
非挙上側第9週後以降強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。
- 第2層 : 対照群は実験開始より第9週目まで有意の減少はみられなかった。
強制持続開口群は第3週目から第9週目まで有意の減少を認めた。
挙上側は第5週後以降強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。
非挙上側は第7週後以降強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。
- 第3層 : 対照群は実験開始より第9週目まで有意の減少はみられなかった。
強制持続開口群は第5週目より対応する対照群と有意の減少を認めた。
挙上側は第3週後以降強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。
非挙上側は第3週後以降強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。

対照群 (—△—), 強制持続開口群 (—□—)
挙上側 (—○—), 非挙上側 (—●—)
*強制持続開口群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

**対照群と比較して有意差あり ($p < 0.01$)

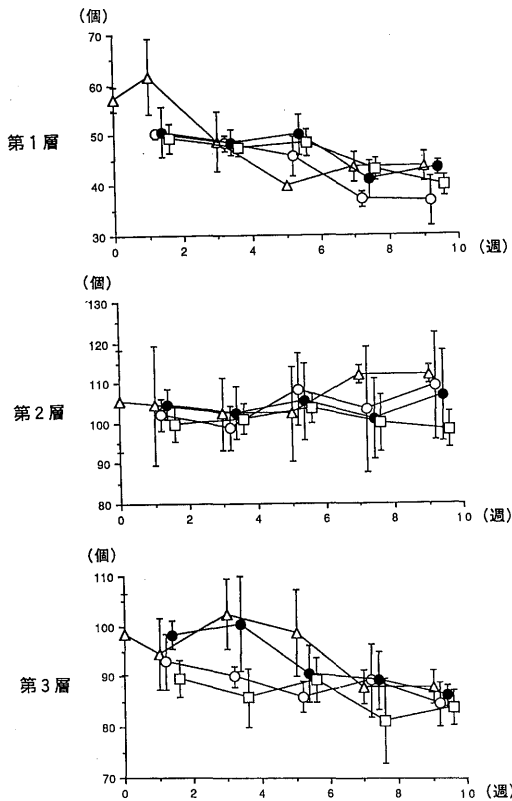


図5 下顎頭軟骨各層における軟骨細胞数

第1層：第1週目に対照群に比し他の3群は有意の減少を認めたが他の実験期間を通じて有意の差はみられなかった。
 第2層：観察期間を通じて細胞数の推移に有意の差はみられなかった。
 第3層：観察期間を通じて細胞数の推移に有意の差はみられなかった。
 対照群(—△—), 強制持続開口群(—□—)
 挙上側(—○—), 非挙上側(—●—)

通じて各群間に統計学的有意の差は認められなかった。

5. 下顎頭軟骨各層における細胞の大きさの推移(図6)

幅 300 μm における各層の軟骨細胞の大きさを無作為に 60 個抽出してその最大径を計測した。各層とも第1週目より第9週目まで対照群と強制持続開口群における細胞の大きさに有意の差は認められず同様の推移が観察された。咬合挙上群のうち、第1層および第2層では、挙上側と非挙上側の間には有意の差は認められなかったが、両側とも第1週目より強制持続開口群に比べ有意に軟骨細胞の大きさの減少がみられた。興

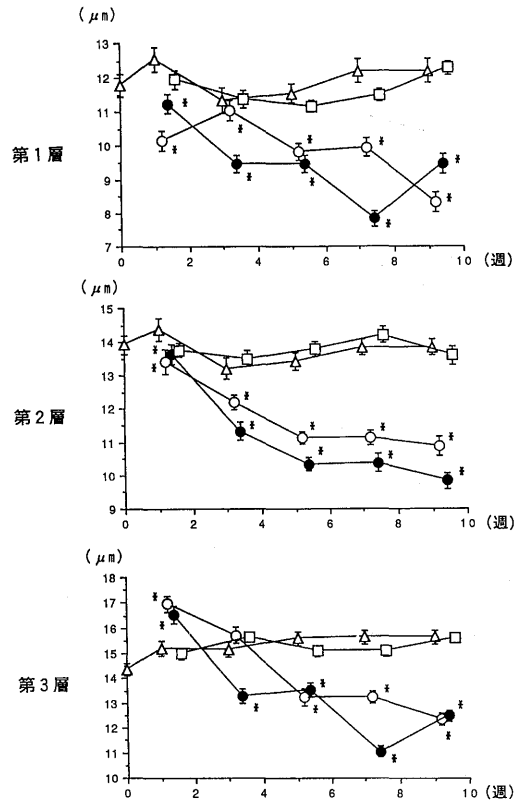


図6 下顎頭軟骨各層における軟骨細胞の大きさ

第1層：対照群と強制持続開口群は実験期間を通じて有意の差はみられなかった。
 挙上側、非挙上側は強制持続開口群に比し第1週目より有意の減少を認めた。
 第2層：対照群と強制持続開口群は実験期間を通じて有意の差はみられなかった。
 挙上側、非挙上側は強制持続開口群に比し第1週目より有意の減少を認めた。
 第3層：挙上側で第3週目に強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。
 非挙上側で第5週目に強制持続開口群に比し有意の減少を認めた。
 対照群(—△—), 強制持続開口群(—□—)
 挙上側(—○—), 非挙上側(—●—)

*強制持続開口群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

**対照群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

味あることに第3層において咬合挙上群(挙上側および非挙上側)で第1週目に対応する強制持続開口群に比し有意の細胞径の増加が認められたが非挙上側では第3週目、挙上側では第5週目以降は有意に減少していた。すなわち、咬合挙上群の第3層における初期の段階では細胞の大きさは強制持続開口群に比し増大す

る傾向にあり、非挙上側の方が挙上側よりも早期に減少することが観察された。

次に、軟骨細胞外基質の合成阻害と破壊および軟骨細胞の分化の抑制に関与しているとされている IL-1 の関与を検索した。

6. IL-1 陽性細胞の割合の推移 (図7)

今回の実験においてネガティブコントロールでは辺縁部は組織捲れ上がりのため偽陽性となっているが、軟骨細胞の胞体部分は染色されておらず、実験群では胞体部分が染色されていることから陽性と判断した。

第1層における IL-1 陽性細胞の割合は対照群では第3週目 ($11.9 \pm 3.29 \mu\text{m}$, SE, $n=4$) に若干の増加傾向を認めたが有意の増加ではなく、観察期間を通じて8%程度の陽性率を示した。強制持続開口群では第1週目 ($10.8 \pm 7.59 \mu\text{m}$, SE, $n=3$) に対照群 ($7.42 \pm 4.40 \mu\text{m}$, SE, $n=4$) に比しやや高値を示したが第5週目 ($12.5 \pm 0.79 \mu\text{m}$, SE, $n=4$) に有意の高値を示し、その後は対照群との間には有意の差は観察されず、1峯性の増加が観察された。咬合挙上群のうち挙上側では第1週目 ($13.9 \pm 1.84 \mu\text{m}$, SE, $n=3$) より強制持続開口群 ($10.8 \pm 7.58 \mu\text{m}$, SE, $n=3$) に比し統計学的に有意の高値を示し、その後観察期間を通じて増加していた。なお、そのピークは第7週目 ($26.3 \pm 1.83 \mu\text{m}$, SE, $n=3$) に観察された。非挙上側では第1週目 ($9.40 \pm 1.95 \mu\text{m}$, SE, $n=3$) に対照群 ($7.42 \pm 4.40 \mu\text{m}$, SE, $n=4$) に比し、やや高値を示し、第3週目 ($22.5 \pm 2.96 \mu\text{m}$, SE, $n=2$) 以降、強制持続開口群に比し有意の高値を示した。なおそのピークは咬合挙上側よりも早期の第3週目 ($22.5 \pm 2.96 \mu\text{m}$, SE, $n=2$) に観察された。この挙上側のピークが第7週目、非挙上側のピークが第3週目にあることは第2層、第3層においても認められ強制持続開口群との間に有意の差がみられた。

7. TNF 陽性細胞の推移

ラット下顎頭軟骨層における TNF 陽性細胞は対照群は0週、1週、3週、5週、7週、9週において第1層、第2層、第3層ともネガティブコントロールと染色状態に変化なく陽性細胞は観察されなかった。

強制持続開口群は1週、3週、5週、7週、9週において第1層、第2層、第3層ともネガティブコントロールと染色状態に変化なく陽性細胞は観察されなかった。

咬合挙上群の挙上側は1週、3週、5週、7週、9

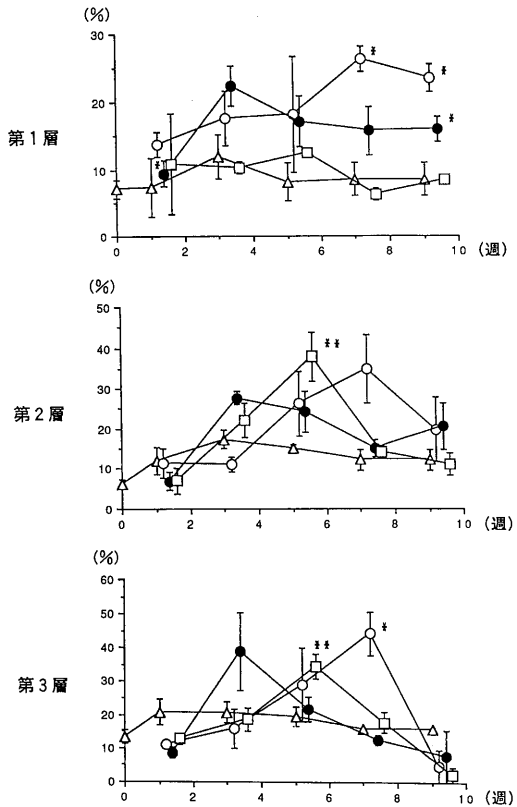


図7 下顎頭軟骨各層における IL-1 陽性細胞の割合
第1層：強制持続開口群は第5週目に対照群と比し有意の高値を示した。

挙上側は第1週目より強制持続開口群に比し有意の高値を示し、ピークは第7週目に観察された。

非挙上側は第3週目より強制持続開口群に比し有意の高値を示しピークは第3週目に観察された。

第2層：挙上側はピークは第7週目に観察され、強制持続開口群に比し有意の差を認めた。

非挙上側ピークは第3週目に観察され、強制持続開口群に比し有意の差を認めた。

第3層：挙上側はピークは第7週目に観察され、強制持続開口群に比し有意の差を認めた。

非挙上側ピークは第3週目に観察され、強制持続開口群に比し有意の差を認めた。

対照群 (—△—), 強制持続開口群 (—□—)

挙上側 (—○—), 非挙上側 (—●—)

*強制持続開口群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

**対照群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

週において第1層, 第2層, 第3層ともネガティブコントロールと染色状態に変化なく陽性細胞は観察されなかった。非挙上側は1週, 3週, 5週, 7週, 9週において第1層, 第2層, 第3層ともネガティブコントロールと染色状態に変化なく陽性細胞は観察されなかった。

考 察

下顎頭部の咬合異常による変化は, 主として矯正学的見地から1940年Brightner⁵⁾によるサルを用いた実験的前歯部咬合挙上後の観察が最初である。その後, ApplebaumとLevy¹⁾, BaumeとDerichsweiler³⁾などの報告があるが, いずれも下顎頭部の骨変化に注目しており, 下顎頭部の軟骨の変化については報告されていない。また, 補綴学および口腔外科学的見地からの報告も散見されるがいずれも詳細は不明である⁹⁾¹⁰⁾。従来の報告では, 実験に用いた動物が幼弱なほど咬合高径の変化が下顎頭部に及ぼす影響は大であるとされている¹⁶⁾¹⁷⁾。Furstman⁸⁾によればラットの下顎頭軟骨層の厚径は, 経時的に減少するが, 生後50日以降はほぼ一定となるとしている。今回の検索では, 主として成人後に発症する顎関節症を念頭に置いているため, 下顎頭軟骨の成長が停止したとされる8週齢のラットを用いた。

実験動物の食餌による下顎頭の変形について, ラットを用いた実験で1988年Bouvier⁴⁾の報告では軟らかい食餌をさせた群の下顎頭の萎縮が顕著であるとし, 軟らかい食餌による下顎頭の退行性変化を報告している。本実験では各群とも飼育繁殖用固型飼料(CE-2, 日本クレア株式会社製)を使用し, 各週毎に体重を測定した結果, 咬合挙上群, 強制持続開口群および対照群との間には体重の有意の差は無く, 栄養による下顎頭の変化は除外された。すなわち, 観察された下顎頭の変化は咬合挙上または強制持続開口によるものであることが強く示唆された。

咬合異常の付与方法については, 咬合高径をBitesplintなどを用いて挙上する方法³⁾¹⁾²⁹⁾²⁰⁾³⁵⁾¹⁴⁾³⁶⁾と臼歯を抜歯または削除して咬合高径を低下させる方法がある²⁾⁸⁾¹³⁾¹⁸⁾¹²⁾。山崎³⁶⁾, 鬼塚²⁶⁾, 福田⁷⁾によれば, 下顎頭の変化は咬合を挙上させる方がその変化の程度が大きいとされている。

同じ咬合異常の付与下でも, 用いる実験動物および報告者により出現する下顎頭の形態変化は異なるようである。サルでは片側臼歯部咬合挙上後, 下顎頭軟骨層の肥大をみたという報告³⁶⁾と, 萎縮をみたという報

告¹²⁾がある。しかし, 成熟ラットでは咬合挙上または歯牙削合いずれの場合も下顎頭軟骨層は萎縮するとされている⁸⁾¹¹⁾¹³⁾²⁰⁾。本実験では臨床的に顎関節症の原因として多いとされている片側の臼歯を挙上することによる両側の下顎頭軟骨の変化を観察した。

ラットを用いた今回の実験とほとんど同一の条件下で行われた近藤²⁰⁾の報告では, 1mmの咬合挙上で2週後に挙上側の軟骨層における増殖層(第2層), 分化層(第3層)で軟骨細胞の数の減少が, 4週後に増殖層(第2層), 分化層(第3層), 肥大層(第4層)の厚さの減少と軟骨細胞の数の減少が, 8週後に表層(第1層), 増殖層(第2層), 分化層(第3層), 肥大層(第4層)の厚さの減少と軟骨細胞の数の減少がみられたとしている。今回の実験では肥大層の計測には無理があるので割愛したが, 第2層および第3層において術後第3週目より軟骨細胞層の厚径の菲薄化が観察された。また, 非挙上側の下顎頭軟骨層においても同時期に同様の所見が観察されたとしている。

咬合挙上群の下顎頭軟骨層の変化は, サルを用いた山崎³⁶⁾, 福田⁷⁾の報告やラットの臼歯抜歯や削合による咬合高径の低下の影響を観察したFurstman⁸⁾, 檜山¹³⁾, 粉¹¹⁾の報告でも同様の結果が報告されており, 片側の咬合異常の影響が反対側にも及ぶことを示唆している。今回の検索でも非挙上側の軟骨層の厚径は有意に減少した。軟骨層全体としては咬合挙上側と第9週目には同等の減少を示したが, 挙上側より約2週遅れてプラトーに達していた。各層における観察では第2および第3層での厚径の減少が著しく咬合挙上側と同様の変化が観察された。

なお下顎頭軟骨層の組織形態計測を行った近藤²⁰⁾の報告でも対照群の下顎頭表層, 増殖層, 分化層+肥大層の厚さは経時的に減少しており, 対照群における下顎頭軟骨層の厚径の減少は加齢的变化によるものであると示唆された。

興味あることに20分間強制開口をさせた群でも軟骨層の減少が観察された。とくに第2層では早期(第1週目)から厚径の減少が観察されたが, その程度は咬合挙上群より軽度であった。また第3層では第5週目より有意の厚径の減少が認められた。このことは顎関節症の発症動機として欠伸または, 長時間に及ぶ歯科治療などの大開口の存在を反映していることが示唆され, 持続する過度の開口が顎関節に与える影響として今後の研究が待たれる。

以上のように下顎頭軟骨層の変化は第2層および第3層に顕著に認められたが, このことに関して, 樋田¹²⁾

はニホンザルの両側下顎第1小臼歯より下顎第3大臼歯までを抜歯することにより下顎頭の変化をみた研究によると第1層は他の軟骨層に較べ変化は小さいとし、粉¹¹⁾のラットの上顎左右臼歯を抜去した実験および今村¹⁶⁾のラットの下顎頭を偏位させた実験によると、この層は機械的刺激の影響をあまり受けず下顎頭軟骨の表面を保護するものとされている。また、Folkeら⁶⁾は³H-thymidineを用いたオートラジオグラフィによる研究で第2層は細胞増殖の最も盛んな層でこの層の細胞増殖が下顎の成長をコントロールしているようであると報告しており、粉¹¹⁾もラットを用いた実験にてこの層に最も大きな変化が生じたとしている。

今村¹⁶⁾は³H-prolineを用いたオートラジオグラフィによる観察で第3層が最も多く³H-prolineを取り込むとし、このことが細胞増殖よりも基質形成面で重要な働きをしていることを裏付けるものであると述べている。粉¹¹⁾は第4層は細胞増殖能や基質形成能はほとんどなく基質の石灰化に関与していると考えられているとしている。

これらのことからすると、咬合挙上または持続的強制開口による下顎頭軟骨層の厚径の減少は第2層軟骨細胞の増殖阻害による細胞数の減少、軟骨細胞の分化の障害または栄養障害による細胞の大きさの減少、または第3層軟骨細胞の細胞外基質の形成阻害と破壊の結果ではないかと推察される。

そこで各軟骨層の細胞数を検索した。第1層では各群共に加齢によると思われる細胞数の減少が認められ対照群と同様の傾向を示した。また、細胞の増殖に関与していると考えられている第2層では観察期間を通じて有意の変動は観察されなかった。第3層でも有意の変動は観察されなかった。近藤²⁰⁾の報告では外傷性咬合により下顎頭軟骨層が著名に障害され軟骨層の細胞数および層の厚さの減少がみられたとしているが、本実験では観察期間を通じて各群間に有意の変動はなく、厚径の減少と細胞数の減少の時間経過は一致せず、咬合挙上または強制持続開口による下顎頭軟骨層の厚径の減少は軟骨細胞の数の減少によるものとは考えられなかった。

各軟骨層の軟骨細胞の最大径を計測した。第1層の軟骨細胞の最大径は水平方向に細長い形態で、この増減は厚径の増減にほとんど関与せず、第2層および第3層の比較的丸い形態をとる細胞の最大径が厚径の増減に直接関与すると考えられる。第2層において第3週目より咬合挙上群と対照群および強制持続開口群の間で有意差がみられ、非挙上側が挙上側より軟骨細胞

の大きさの減少が観察された。第3層では咬合挙上側および非挙上側ともにそれぞれ術後第3週目または第5週目より対照群および強制持続開口群に比べ有意に減少していた。これら細胞径の減少は細胞分化の抑制または栄養の不足によるものと考えられるが、栄養の不足は体重の変動から否定できる。しかし、局所のなんらかの原因による循環障害がもたらす栄養の不足は否めず、今後の研究が望まれる。一方、細胞分化の抑制あるいは、脱分化による比較的細胞径の小さな軟骨細胞の出現の可能性は古賀ら¹⁹⁾のいうIL-1による軟骨細胞の脱分化によるものの可能性が推察された。なお、各層における細胞の大きさは各層ともに対照群と強制持続開口群においては有意の差は認められなかった。軟骨細胞層の細胞の最大径の減少経過と厚径の減少経過は、とくに第2層において咬合挙上群は酷似しており、この群における厚径の減少は細胞の大きさの減少が反映していると考えられた。

また、ラット肋軟骨を用いた古賀ら¹⁹⁾の報告ではIL-1 α が培養軟骨細胞のグリコサミノグリカン(GAG)の合成を著明に抑制するとしていることから、とくに細胞の大きさの変化を伴わずに軟骨細胞層の厚径の減少が観察された強制持続開口群では、細胞外基質の合成阻害によるものではないかと推察された。また、咬合挙上群における第1週および第3週における細胞の大きさの増大は軟骨細胞層の厚径の増大には関与せず、かえって3週目では全体として厚径の減少が観察されたことより、この群でも比較的初期に細胞外基質の合成阻害による軟骨細胞層の厚径の減少の存在が推察された。

近年の遺伝子工学の進歩により、遺伝子組み換え型(リコンビナント)の純度の高いサイトカインが大量に入手可能になり、培養軟骨細胞を用いた実験結果が多数報告されており、軟骨細胞に対するサイトカインの作用が解明されつつある。in vitroにおけるこれまでの報告では、滑膜細胞で産生されるIL-1は、滑液で栄養される関節軟骨細胞に作用し、プロテオグリカン産生を抑制することにより軟骨基質の生成を阻害し、さらに軟骨細胞、滑膜細胞からのコラゲナーゼ産生分泌を活性化することにより軟骨基質を破壊するとされている³³⁾。一方、IL-1は軟骨細胞のDNA合成を促進するという報告³⁰⁾とDNA合成にはほとんど関与しないという報告がある¹⁹⁾。IL-1は軟骨細胞のDNA合成を促進するという見地に立つと咬合異常による下顎頭軟骨層では軟骨細胞数の増加が観察されることが予想され、この細胞増殖は軟骨細胞層の肥厚をもたらす

のではなく、軟骨細胞外基質の生成抑制をもたらし、軟骨層の菲薄化を起こすことが考えられる。今回の検索では各群ともに全期間を通じて明確な細胞数の変動は観察されず、細胞数の変動による下顎頭軟骨層の厚径の増加は認められず、反対に厚径の減少が観察された。また、IL-1はDNA合成にはほとんど関与しないという説に従うと、細胞数の増加無しに基質の生成阻害と破壊がもたらされることとなる。IL-1が軟骨基質の生成阻害と破壊に中心的な役割を果たし、結果として軟骨層の菲薄化をもたらすならば、滑膜細胞がそのIL-1の産生源と考えられる。しかし、軟骨細胞自身もIL-1を産生することが報告³³⁾されており、下顎頭軟骨細胞のIL-1産生を軟骨層の厚径と比較することは興味ある問題と思われる。そこで、軟骨層におけるIL-1陽性細胞の割合の推移を検索してみた。軟骨層の厚径の減少が顕著な第2層および第3層においてIL-1陽性細胞は実験期間を通じて対照群では有意の変動はなかった。しかし、咬合挙上側では軟骨層の厚径の減少にあわせて増加し、そのピークは7週目に観察された。しかし、非挙上側では第3週目にピークを示した。また、興味深いのは強制持続開口群では第5週目にピークを示す変動があり、その後、対照群と同一レベルまで減少する一過性的変動が観察された。今回の実験では軟骨細胞の胞体がIL-1陽性のものをカウントしており、カウントされた細胞は1987年 Towleら³³⁾により報告された外因性（この場合異常咬合などにより惹起された滑膜細胞由来の）IL-1により刺激されてIL-1を産生している軟骨細胞、すなわちIL-1産生細胞と推察された。もし、IL-1の陽性細胞率の変動が軟骨層厚径の減少を直接反映するものであれば、IL-1陽性細胞の割合の変動と軟骨層の厚径の減少経過は一致すると考えられる。しかし、実際は軟骨層の厚径の減少が咬合挙上側より遅れて出現する非挙上側の方が早期にIL-1陽性細胞の割合が上昇し、次いで非挙上側より刺激強度が小さいと思われる強制持続開口群の方が非挙上側より早く出て出現している。興味あることに咬合挙上側ではIL-1陽性細胞の割合のピークが強制持続開口群のそれより遅れて出現していた。これらの現象は片側咬合挙上後、両側の下顎頭軟骨部に加わる複雑な慢性刺激の種類および強弱の相違によるものかも知れない。即ち、咬合挙上側では関節頭部は関節円板を介しての関節窩との機械的刺激を緩和する方向に作用し、実験的異常咬合付与の際の強制持続開口による滑膜由来のIL-1による軟骨基質の合成阻害と適度な機械的刺激を欠くことによって惹起される廃用性萎縮、

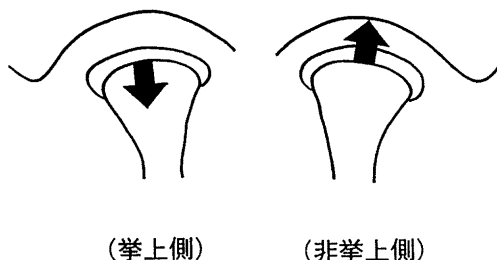


図8 下顎頭における挙上側および非挙上側の機械的ストレスの模式図

または、関節部の長期に渡る過度の伸展による局所の循環障害がもたらす栄養障害による厚径の減少に起因するとも考えられる(図8)。また、非挙上側では反対に機械的刺激が加重され、その結果早期より滑膜由来のIL-1が軟骨細胞を活性化し軟骨細胞自身によるIL-1産生を促し、軟骨細胞の脱分化を惹起し、大きさの小さな細胞が増加し軟骨層の厚径の菲薄化が起こる可能性が推察される。また、この早期からの慢性的刺激と滑膜由来のIL-1との関連について今後の検討が望まれる。

ちなみに、IL-1と同様に骨、軟骨組織の吸収および破壊に関与するとされているTNFは実験期間を通じて観察されず、実験的咬合挙上によるラット下顎頭軟骨の吸収、破壊にはTNFは関与していないことが示唆された。

総 括

今回の実験では、ラット右側上顎臼歯部に咬合挙上を付与することにより実験的な咬合異常を惹起させその咬合による下顎頭軟骨層の変化とサイトカインの出現を経時的、免疫組織化学的に検討した。

1. WKA ラットの右側上顎臼歯部を1mm 挙上し下顎頭軟骨第3層までの変化を観察した。
2. 手術操作による影響を除外するために pseudo operation group に用いた咬合を挙上していない強制持続開口群(20分間)でも対照群に比べ有意に軟骨層の厚径が減少した。このことは顎関節症の発生の原因として長時間に及ぶ歯科治療や欠伸など持続する大開口があげられていることの反映であることが示唆された。
3. 咬合挙上群のうち、咬合を挙上していない非挙上側においても挙上側と同程度の厚径の減少が観察され、片側の咬合異常が反対側にまで影響することが証明された。しかし、咬合挙上側の方が非挙

上側より早期に厚径の減少が観察された。

4. IL-1 産生細胞と思われる細胞の出現時期とその割合を観察した結果、強制持続開口群と咬合挙上群の非挙上側では厚径の減少時期とほぼ一致して IL-1 産生細胞の割合がピークを示したが、咬合挙上側では厚径の減少に遅れてピークを示した。
5. 軟骨層の細胞の最大径の減少経過と軟骨層の厚径の減少経過は、とくに第 2 層において咬合挙上群で酷似しており、この群における厚径の減少は細胞の大きさの減少が反映していると考えられた。
6. 各軟骨層の厚径の減少と細胞数の推移の間には明確な関連性は観察されず、咬合異常による下顎頭軟骨層の厚径の減少は軟骨細胞数の減少によるものではなく、主として軟骨細胞の大きさの減少によることが示唆された。
7. 咬合挙上群および強制持続開口群では IL-1 産生細胞と思われる細胞の出現率が観察期間を通じて対照群より高値を示し、20 分間の強制持続開口のみでも顎関節部に比較的長期にわたる慢性刺激を惹起することが示唆された。

以上の結果より直接慢性的機械刺激の増加を受ける非挙上側の下顎頭軟骨においては軟骨層の菲薄化に IL-1 の関与が推察されたが、機械的刺激を軽減する挙上側においては他のメカニズムの存在が示唆された。

本論文の作製にあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました九州大学歯学部口腔外科学第二講座、岡 増一郎教授ならびに御校閲を賜りました安部 喜八郎講師、池辺 哲郎先生に深く感謝いたします。

本研究の概要は平成 5 年、第 6 回日本顎関節学会総会にて報告した。また、本研究の一部は平成 5 年度文部省科学研究費一般研究 (B) (課題番号 05454544) により行われた。

文 献

- 1) Applebaum E and Levy H P: Changes in the mandibular condyle of mice following the use of orthodontic bite plates. *Am. J. Orthod.* 40: 775-782, 1954.
- 2) Avant F B, Averil Ch J and Hahn W E: Changes in the temporomandibular joint of rats caused by alterations in the intermaxillary relationships of the teeth (Abst). *J. Dent. Res.* 31: 499-500, 1952.
- 3) Baume L J and Derichsweiler H: Is the condylar growth center responsive to orthodontic therapy?. *Oral Surg.* 14: 347-362, 1961.
- 4) Bouvier M: Effects of age on the ability of the rat temporomandibular joint to respond to

changing functional demands. *J. Dent. Res.* 67: 1206-1212, 1988.

5) Breitner C: Bone changes resulting from experimental orthodontic treatment. *Am. J. Orthod.* 26: 521-547, 1940.

6) Folk L E A and Stallard R E: Condylar adaptation to a change in intermaxillary relationship. *J. Periodont. Res.* 1: 79-89, 1966.

7) 福田仁一, 山崎 博, 鬼塚啓史他: 実験的咬合異常による顎関節の変化 — 咬合挙上冠による影響 —. *九州歯会誌* 38: 148-156, 1984.

8) Furstman L: The effect of loss of occlusion upon the mandibular joint. *Am. J. Orthod.* 51: 245-261, 1965.

9) 布施修一郎, 野口五十雄: 咬合異常における顎関節軟骨と関節円板の走査電子顕微鏡による実験的研究 (会). *日口外誌* 22: 933, 1976.

10) 布施修一郎, 野口五十雄: 咬合異常における顎関節構成体の SEM による実験的研究 (会). *日口外誌* 24: 1362, 1978.

11) 粉 浩一: 実験的咬合異常がラット下顎頭に及ぼす影響に関する病理組織学および走査電子顕微鏡的研究. *九州歯誌* 39: 66-85, 1985.

12) 樋田謙二郎: 両側下顎臼歯部欠損による顎関節への影響に関する実験的研究. *九州歯会誌* 36: 136-156, 1982.

13) 檜山達郎: 抜歯による実験的咬合変化が顎関節に及ぼす影響に関する病理組織学的研究. *口病誌* 35: 598-612, 1968.

14) 本間 博: 実験的咬合性外傷のサル歯周組織におよぼす影響に関する研究. *日歯周誌* 19: 289-302, 1977.

15) Ikebe T, Hirata M and Koga T: Effects of human recombinant tumor necrosis factor- α and interleukin 1 on the synthesis of glycosaminoglycan and DNA in cultured rat costal chondrocytes. *J. Immunol.* 140: 827-831, 1988.

16) 今村正史: 下顎を偏位させた際のラット下顎頭軟骨の反応. *口病誌* 40: 457-475, 1973.

17) Kanouse M C: Condylar growth in rhesus monkeys. *J. Dent. Res.* 48: 1171-1176, 1969.

18) 喜久田利弘: 片側歯牙欠損によるサル顎関節の病理組織学的研究. *九州歯会誌* 34: 254-274, 1980.

19) 古賀敏生, 池辺哲郎, 入部英明: 軟骨細胞に対するサイトカインの作用. *炎症* 8: 9-16, 1988.

20) 近藤喜一郎: ラットの下顎頭におよぼす実験的外傷性咬合の影響. *愛院大歯誌* 28: 123-157, 1990.

21) Murphy G, Hembry R M and Reynolds J J: Characterization of a specific antiserum to rabbit stromelysin and demonstration of the synthesis of collagenase and stromelysin by stimulated rabbit articular chondrocytes. *Collagen Rel. Res.* 6: 351-364, 1986.

22) 中村允也: 顎関節症の臨床的研究. *口病誌* 26: 986-1012, 1959.

23) 野口規久男：外力を与えた際の幼若ラット下顎頭の研究。口病誌 37：222-241, 1970.

24) 岡 達：顎関節症の研究 — 成因および臨床像を中心に。口科誌 16：116-123, 1967.

25) 鬼塚謙治：学関節症に関する臨床的研究。九州歯会誌 30：662-708, 1977.

26) 鬼塚啓史：咬合挙上冠除去後の顎関節への影響に関する実験的研究。九州歯会誌 37：340-359, 1983.

27) Postlethwaite A E, Raghow R and Stricklin G P: Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 α and β . J. Cell. Biol. 106: 311-318, 1988.

28) 関 秀孝：顎関節症の補綴学的研究。口病誌 35：213-227, 1968.

29) 始平堂弘昌：外傷性咬合による変形性骨関節症の発症に関する実験的研究。歯学 68：675-699, 1980.

30) Soder O and Madsen K: Stimulation of

chondrocyte DNA synthesis by Interleukin-1. Br. J. Rheumatol. 27: 21-26, 1988.

31) 高木勇蔵：外傷性咬合による歯の支持組織の変化に関する実験的研究。廣大歯誌 10：70-88, 1978.

32) Takeuchi Y, Tonai I, Kaneda T and Nagura H: Immunohistochemical analysis of cells in mucosal lesions of oral lichen planus. J. Oral Pathol. 17: 367-373, 1988.

33) Towel C A, Trice M E and Ollivierre F: Regulation of cartilage remodeling by IL-1: Evidence for autocrine synthesis of IL-1 by chondrocytes. J. Rheumatol. 14: 11-13, 1987.

34) 上野 正：顎関節疾患の診断と治療。日歯評論 70：1-7, 1957.

35) 浦井照彦：実験的外傷性咬合による歯周組織の変化に関するX線学的研究。日歯周誌 15：173-208, 1973.

36) 山崎 博：片側咬合挙上による両側顎関節の変化に関する実験的研究。九州歯会誌 33：257-280, 1979.

(受付 1994-1-27)