

〔学位論文〕

咬合変化による生力学環境変化が成長期ラット関節円板の反応特性に及ぼす影響

中尾 友也

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系 歯科矯正学分野

Effects of altered biomechanical environment caused by modification of dental occlusion on TMJ disc reactions of the growing rats

Yuya NAKAO

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : 咬合変化, 顎関節, proteoglycan, glycosaminoglycan (GAG)

緒 言

顎関節症は、齲蝕、歯周病に次ぐ主要な歯科疾患であり、顎関節症患者の増加とその若年化傾向が歯科全体で問題となっている。しかし、齲蝕や歯周病とは異なり、顎関節症の原因はいまだ不明な点が多い。

顎関節は、側頭骨と下顎骨を連結する関節であり、生体の関節の中でも最も複雑な形態および機能を有する。顎関節の構成要素のひとつである関節円板は線維性結合組織であり、これらの存在が顎関節の円滑な運動を可能としている (Tanaka et al., 1994)。関節円板の細胞外マトリックスはcollagenやproteoglycanなどから構成され (Nakano & Scott, 1996; Mizoguchi et al., 1998), collagen線維は牽引に対する抵抗性を、proteoglycanはそれに結合するGAG鎖を介して剪断や圧縮に対する抵抗性を示すことが知られている (Scott et al., 1997; Robbins et al., 1997)。この関節円板に器質的な変化 (脆弱化, 変形および転位) が生じた場合には、顎関節の円滑な顎運動が阻害され、顎関節症の主病態である顎関節内障を生じる (Stegenga et al. 1991)。関節円板の器質的な変化には、荷重負荷関連因子が関与することが指摘されており、過去、荷重負荷と細胞外基質との関係性を検討した研究は数多く存在する (Scott et al., 1997; Robbins et al., 1997)。しかし、いずれもin vitroの研究が多く、in vivoでの生力学環境変化と細胞外基質の組成の変化について

の基礎的知見は極めて乏しい。

そこで本研究では、生力学環境変化に対する関節円板の反応性を明らかにすることを目的とし、ラット咬合変化モデルを用い、関節円板の反応性を免疫組織学的、および分子生物学的に検討した。

材料および方法

本研究では、生後7週齢のWistar系雄性ラットを用い、顎関節部への機械的負荷を増大させるため、上顎切歯部にレジン製咬合板を装着し、ラット咬合変化モデルを作製した。実験期間は7, 14, 21, 28日とし、装置未装着同週齢ラットを対象群として用いた。

1. 試料の固定とパラフィン切片の作製

各実験期間終了後、ラットはジエチルエーテル深麻酔下にて頸椎脱臼後、屠殺した。屠殺後、顎関節部組織摘出し、4% paraformaldehyde / 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で浸漬固定し、10% EDTAで脱灰後、通法に従ってパラフィンに包埋した。組織片は厚さ7 μmの連続切片を作製した。

2. 関節円板における形態変化の観察

関節円板の形態変化は関節円板の厚径を計測することで確認した。Sunら (2009) の方法に従い、Hematoxylin-Eosin染色した組織像を用いて、関節円板の前方肥厚部、中央狭窄部、および後方肥厚部の厚径を計測した。

3. 関節円板におけるGAG局在の観察

関節円板のGAG局在を観察するために、Toluidine Blue (pH 4.1) 染色を行った。薄切切片を通常法に従い脱パラフィン後、0.04% Toluidine Blue (pH 4.1) 染色を行い、鏡検した。

4. 関節円板におけるGAG含有量の定量

各実験期間終了後、GAGを抽出するために、採取した顎関節円板をホモジナイズし、パパイン消化処理を24時間行った。その後、Dimethylmethylene-blue (DMB)法を用いて関節円板におけるGAG含有量を定量した。

5. 関節円板におけるDNA含有量の定量

GAG含有量と同様の手順で、関節円板からDNAを抽出した。その後、蛍光プレートリーダーを用い、関節円板におけるDNA含有量を定量した。

6. 関節円板における各ProteoglycanのmRNA発現の定量

各実験期間終了後、採取した顎関節円板からtotal RNAを抽出し、RT法によりcDNAの調整を行った。各proteoglycanおよびGAPDH (内的標準) に対し、連続希釈系の試料を作製し、それぞれのcDNA定量のための外的標準とした。各proteoglycanとGAPDHに対するprimerおよびexonuclease probe (TaqMan probe) を作製し、Step One Real Time PCR Systemを用いて、qPCR法によるmRNA発現量の定量を行った。

7. 関節円板におけるversicanコアタンパク質の局在

薄切切片を通常法に従い脱パラフィンし、免疫染色を行った。免疫染色には、抗versican抗体 (5D5) を用い、ABC法にてタンパク質を検出した。

8. 統計学的処理

多変量分散分析 (MANOVA) と単変量F検定により解析した。

結 果

1. 関節円板の厚径は、実験群の前方肥厚部で減少し、とくに21日以降で有意な減少が認められた。中央狭窄部では、対照群と実験群を比較して変化はなかった。後方肥厚部では、顕著な増加がみられた。下顎頭部の組織学的所見は、実験群において線維層の肥厚、未分化間葉系細胞層の細胞密度の減少、および軟骨細胞層の肥厚が確認された。なお、実験群の顎関節部において、炎症所見は観察されなかった。

2. 関節円板におけるDNA含有量は、実験期間を通して、対照群と実験群の間に有意差は認められなかった。

3. GAG量は、対照群と比べ、挙上後14日以降で有意に増加した。

4. 関節円板における各proteoglycanのmRNA発現は、

biglycanでは14日以降、decorinでは28日、versicanでは21日以降、およびcondroadherinでは14日以降で、対照群と比較して有意に高い値を示した。

5. 関節円板の免疫組織学的観察において、対照群では中央狭窄部から前方肥厚部においてversicanに対する中等度の免疫反応を認めたが、実験群では後方肥厚部でversicanに対する強い免疫反応を認めた。

考 察

本研究では、生力学環境の変化に対する関節円板の反応性を明らかにすることを目的とし、切歯部咬合挙上板を用いた。過去の報告によると、切歯部咬合時に顎関節部への荷重負荷が増大することが明らかにされており (Weijs & Dantuma, 1975)、この装置では、臼歯部咬合の状態を完全に除去し、切歯部咬合の頻度あるいは持続期間を延長するように設計されている。本研究では、関節円板後方肥厚部において厚径の増加、および顕著なGAGの局在を認めた。これらの結果は、切歯部咬合により関節円板後方肥厚部に荷重が負荷され、それに抵抗性を示した結果であると解釈できる (Robbins et al., 1997; Tanaka et al., 2003)。また、咬合改変群においてGAG含有量の有意な増加とGAG鎖結合部位を多く含むproteoglycanが有意に増加したという結果からも同様のことがいえる (Mao, 1997; Robbins et al., 1997; Mizoguchi et al., 1998)。つまり本研究の結果は、切歯部咬合挙上に伴い、関節円板に荷重負荷の増大が生じた。その結果、荷重負荷に特異的なproteoglycanおよびそれに結合するGAG鎖が増加し、それに伴って、関節円板後方肥厚部の厚径が増加したと考えられる。これら一連の流れは、関節円板における生力学環境変化に対する適応反応であることが示唆される。

結 論

成長期ラットの関節円板では、生力学環境変化に対して各々のproteoglycanのmRNAとタンパク質における特異的発現変化を生じることが明らかとなった。これらの変化は、顎関節組織維持のための生物学的意義と生力学的環境の変化に対する適応反応であることが示唆された。



中尾 友也

平成21年 3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業

平成26年 3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 終了

平成26年 4月 北海道医療大学 特別研究員