

## 【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, ラット咬合改変モデルを用い, 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。

## 【試料と方法】

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, ラット咬合改変モデルを作製した。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  $\mu\text{m}$  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, Dimethylmethylen-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、生力学環境変化により形態変化を生じることが明らかとなった。さらにこの形態変化は、proteoglycan の量的変化によるものと考えられ、生力学的環境の変化への適応反応であることが示唆された。

#### 【文献】

Mao JJ, Rahemtulla F & Scott PG. Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. J Dent Res 77:1520-1528, 1998.

Mizoguchi I, Scott PG, Dodd CM, Rahemtulla F, Sasano Y, Kuwabara M, Satoh S, Saitoh S, Hatakeyama Y, Kagayama M & Mitani H. An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc. Arch Oral Biol 43:889-898, 1998.

Nakano T & Scott PG. Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. Arch Oral Biol 41:845-853, 1996.

Robbins JR, Evanko SP, Vogel KG. Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendon. Arch Biochem Biophys 342:203-11, 1997.

Scott PG, Nakano T, Dodd CM. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. 

1
---

  
Biochim Biophys Acta 1336:254-62, 1997.

Stegenga B, de Bont LG, Boering G & van Willigen JD. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint: a review. J Oral Maxillofac Surg 49:1079-1088, 1991.

Sun L, Wang M, He J, Liu L, Chen S, Widmalm SE. Experimentally created nonbalanced occlusion in rats increase thicker on the thickness of the temporomandibular joint disc in rats. Angle Orthod 79:51-3, 2009.

- Tanaka E, Tanne K & Sakuda M. A three-dimensional finite element model of the mandible including the TMJ and its application to stress analysis in the TMJ during clenching. *Med Eng Phys* 16:316-322, 1994.
- Tanaka E, Aoyama J, Tanaka M, Van Eijden T, Sugiyama M, Hanaoka K, Watanabe M & Tanne K. The proteoglycan contents of the temporomandibular joint disc influence its dynamic viscoelastic properties. *J Biomed Mater Res* 65:386-392, 2003.
- Weijs WA, Dantuma R. Electromyography and mechanics of mastication in the Albino rat. *J Morphol* 146:1-34, 1975.