



Title	開口制限が成熟ラット顎関節に及ぼす影響
Author(s)	松本, 章子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3184214">https://doi.org/10.11501/3184214</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 開口制限が成熟ラット顎関節に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科

歯学臨床系専攻（口腔外科学第二）

松本 章子

## ＜緒言＞

開口障害は、顎関節症をはじめとする顎関節疾患や、様々な口腔外科疾患において高い頻度でみられる症状の一つである。開口障害が生じている期間は様々で長期に及ぶこともあり、さらに開口障害の結果、軟食しか摂取できない場合もある。このような長期間にわたる顎運動の制限や負荷の軽減は顎関節に影響を及ぼすことが考えられる。膝や股関節などの荷重関節では、実験的に不動化や運動制限、神経切除を行う研究が数多く行われており、周囲の靭帯、筋で廃用性萎縮を生じたり<sup>1)</sup>、骨量減少を引き起こす<sup>2)</sup>ことが明らかにされている。顎関節における研究については、過去数例のサル<sup>3~6)</sup>、ウサギ<sup>7)</sup>、ラット<sup>8,9)</sup>を用いた不動化実験で、下顎頭に組織変化が生じる事が報告されている。しかし、おもに下顎骨の変化について調べられており軟組織の変化について言及したものは少ない。顎関節は側頭骨下顎窩に下顎骨下顎頭が陷入する骨構造をとっている。そして骨の外側は軟骨で被覆されている。この軟骨層は、表層から内側に向かって増殖層、分化層、肥大層と呼ばれる分層に区分できる。下顎窩と下顎頭の間には、密な膠原線維から構成される関節円板が介在しており上関節腔と下関節腔が形成されている。関節包は、顎関節の外側を被覆する膠原線維を多く含む線維性結合組織で、脂肪細胞と多くの動脈、神経を含んでいる。そのため、関節包は、下顎頭の外側および前方、後方への運動を制限する働きをするだけではなく、関節成分に栄養を供給し、運動などの生理的機能を調節する上で重要な役割を果たす<sup>10)</sup>と考えられる。

顎関節の神経支配については、神経特異蛋白 protein gene product 9.5 (PGP 9.5)<sup>11)</sup>や、知覚神経に多く含まれる substance P (SP) と calcitonin gene-related peptide (CGRP)，交感神経節後線維に多く含まれる neuropeptide Y (NPY)，副交感神経節後線維に多く含まれる vasoactive intestinal polypeptide (VIP)<sup>12)</sup>などの神経ペプチドに対する抗体を用いた免疫組織化学的検討や酵素トレーサー法、神経切除実験によって、知覚

神経、交感神経、副交感神経が、関節包、関節円板、滑膜に分布する事が、ヒト<sup>13)</sup>、ラット<sup>14~23)</sup>、ヒツジ<sup>24)</sup>等の頸関節で報告されている。これらの神経ペプチドは、局所の血流、骨等の調節因子としての役割を果たす<sup>25~28)</sup>と報告されており、ヒトの頸関節の滑液<sup>29)</sup>にも存在している。また、実験動物の炎症モデルで、これらの神経ペプチドの濃度が、三叉神経節<sup>30)</sup>、頸関節において変化する<sup>31~33)</sup>ことも知られている。しかしながら頸運動を抑制した場合での変化については未だ研究が行われていない。

本研究では、開口制限が頸関節に及ぼす影響を明らかにするため、成熟ラットを用いて開口制限モデルを作成し、開口制限が頸関節の骨・軟骨、関節円板、関節包に及ぼす影響について検討した。

## ＜材料と方法＞

### 1. 動物と飼料

実験には、生後 9 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラット（体重  $310 \pm 20$  g）（日本 SLC, 静岡）を用いた。固体飼料（MF; オリエンタル酵母工業, 東京）を与える、自由飲水させて、6~8 日間順化したのち生後 10 週齢で実験に供した。液体飼料として調整栄養食品エンリッチ（ダイナボット, 大阪）2 倍希釈液を吸水瓶にて投与した。粉体飼料は固体飼料と同じ成分の飼料を粉体としたものを用いた。なお、本実験は大阪大学歯学部動物実験ガイドラインに従って行った。さらに倫理規定を設けて体重が処置時の体重の 10% 以上の減少を認めた時に実験は中止とすることとした。

### 2. 開口制限法

ラットを抱水クロラール（0.04 mg/kg）腹腔内投与で全身麻酔したのち、以下の 3 通りの固定方法を用いて開口を制限した。

#### 1) 歯牙固定（n=8）：

レジン系接着セメント（スーパー・ボンド C&B；サンメディカル, 滋賀）を用いて、咬合位で上下切歯を固定した。飼料としては処置 1 日前から液体飼料を投与した。

#### 2) 頸外固定群（n=3）：

布と即時重合レジンで作製した抑制具を頭部に装着して、頸運動を制限した。飼料として処置 1 日前から液体飼料を投与した。

#### 3) 外科的開口制限（左側頬骨－下頸骨間結紮）（n=16）：

抱水クロラールにて全身麻酔したのち、1/8 万エピネフリン含有 2% リドカイン（歯科用 キシロカイン注射液 2%；アストラゼネカ, 大阪）0.4 ml を用いて局所麻酔を行った。術後摂食しやすいうように下頸切歯を歯肉縁上でダイヤモンドポイント（松風, 京都）を用

いて削合した。左側顔面皮膚に切開を加え咬筋を剥離し頬骨と下顎骨を露出させたのち、下顎骨に歯科用のステンレスバー（松風、京都）を用いて小孔を形成した。ウレタンゴム製矯正用パワーチェーン（F.M.Ringlet, closed type；ロッキーマウンテンモリタ、東京）を咬筋下に通し断端の下顎骨側はステンレスワイヤー（径 0.3 mm, 三金工業、東京）を小孔に通し結紮し、頬骨側はシリコンチューブ（径 0.5 mm, 信越ポリマー、東京）で結紮固定した（図 1）。創部を縫合したのち、感染予防のため抗生素（FMOX, 0.08 g/kg; 塩野義、大阪）を筋注した。外科的処置前 1 日間は、液体飼料と固形飼料の併用投与を行い、外科的処置後 3 日間は液体飼料を用いて、4 日後からは粉体飼料を用いて飼育を行った。

### 3. 開口制限実験スケジュール

実験動物としては、生後 10 週齢ラット 33 匹を用い、以下の実験群に区分した。実験群 1 は、開口制限を行わず固形飼料を投与した（固形飼料非制限群）。実験群 2 は、開口制限を行わず粉体飼料を投与した（粉体飼料非制限群）。実験群 3 には、外科的開口制限を行い粉体飼料を投与した（粉体飼料制限群）。実験群 1 には、実験期間を通して固形飼料を投与した。実験群 2 は、4 日間液体飼料を投与したのち、粉体飼料で飼育した。実験群 3 では、1 日間液体飼料を固形飼料と併用投与したのち開口制限処置を行い、その後 3 日間は液体飼料のみで飼育した。4 日後からは実験期間終了までは粉体飼料を投与した。開口制限処置より 2, 4, 6 週間経過した各時点での実験群 1 各 3 匹、実験群 2 各 4 匹、実験群 3 各 4 匹の顎関節を組織学的検索に供した（図 2）。

### 4. 実験動物の処理と組織学的検索

実験スケジュールにしたがって、抱水クロラール（0.04 mg/kg）腹腔内投与による全

身麻酔を行い、経心臓的に 0.02 M リン酸塩緩衝液 (PBS) で灌流脱血した後、灌流固定液 (4% パラホルムアルデヒド, 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) で固定を行った。その後すみやかに頭部を摘出し、24 時間同固定液で浸漬固定を行った。顎関節を一塊として摘出後、脱灰液 (10% エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム, pH7.4) に浸漬し、4°C にて 3~4 週間脱灰処置を行った。脱灰終了後、30% ショ糖含有 0.02 M PBS に 4°C で 24 時間浸漬した。OCT コンパウンド (SAKURA Fine technical Co, CA, U.S.A.) にて包埋後、クリオスタット (LEICA CM3050 ; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) を用いて厚さ 16  $\mu$ m の矢状断連続凍結切片を作成した。切片は MAS (Matsunami adhesive slide) コート付きスライドグラス (松波, 大坂) に貼付し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した。

## 5. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色には高分子ポリマー法 (EnVision+法<sup>34,35)</sup>) を用いた。神経特異蛋白 PGP 9.5 に対するウサギポリクローナル抗体は、Chemicon (CA, U.S.A.) より購入した。神経ペプチド SP, CGRP, NPY, VIP に対するウサギポリクローナル抗体は、Oncogene research products (MA, U.S.A.) より購入した。4% パラホルムアルデヒド固定組織の凍結切片を 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (TBS, pH7.6) で洗浄後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノールに 30 分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。TBS 洗浄後、2% normal swine serum (DAKO, Copenhagen, Denmark) 含有 0.05 M TBS を用いて PGP 9.5, SP, CGRP, NPY あるいは VIP に対する抗体をそれぞれ 1/5000, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/3000 に希釈したのち 4°C にて 48 時間作用させた。反応後 0.1% Tween20 含有 0.05M TBS (TBST) にて洗浄し、5 倍希釈の EnVision+試薬 (DAKO) を 4°C で 24 時間反応させた。3,3'-ジアミノベンチジン発色液 (Stable DAB ;

Research Genetics, AR, U.S.A.) にて発色させたのち, メチルグリーンにて対比染色し, 上昇アルコールにて脱水, リモネン (Hemo-De; ファルマ, 東京) にて透徹後, Entellan (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) に封入し光学顕微鏡 (Nikon Microphot-FXA; Nikon, 東京) で観察した。

## 6. 組織像の計測法と統計処理

HE 染色を施した頸関節の組織像を顕微鏡から CCD カメラ (C5810-01; Hamamatsu photonics, 静岡) を介しパソコン用コンピューターに取り込み, 画像解析ソフト Mac Scope (三谷商事, 東京) を用いて, 関節矢状断の連続切片中央付近の下頸頭の前方部, 中央部, 後方部を計測点とし, 軟骨層 (表層, 増殖層, 分化層 + 肥大層) を計測した (図 3 A, B)。関節円板の厚径は, 軟骨層と同様に関節矢状断を作成し下頸頭中央部で計測した。各動物あたり 3 枚の組織切片を用いて計測し, 平均値 ± 標準偏差を求めた。計測値は, Scheff's F test を用いて検定を行った。

## ＜結果＞

### 1. 開口制限モデル作成

顎運動を抑制するため、接着用レジンセメントを用いて上下切歯部で歯牙固定を行った場合、100% (8/8) の動物において切歯の萌出が阻害され、そこから顎骨に感染が波及した。その結果、摂食障害を引き起こして、実験開始時の体重と比較して2週間以内に顕著な体重減少が認められ、実験中止時、平均で70%にまで減少した。顎外固定を行った動物は常に固定装置を除去しようとする動作を繰り返し、ストレスのため摂食不良となつた。そのため固定3日後の平均体重は固定開始時の80%にまで減少した。外科的開口制限法として、ウレタンゴム製パワーチェーンを頬骨と下顎骨間に装着した場合、顎運動が抑制されたにもかかわらず2週間での平均体重は処置時の体重の95%の状態を保つことができた。この固定法における開口制限量を知るため、麻酔下で開口量を測定した。処置前40gの力を加えた最大開口量は平均で18.3mmであったが、ウレタンゴム製パワーチェーン装着後に同じ40gの力で牽引し強制的に開口させた場合の最大開口量の平均は5.4mmであった。

### 2. 開口制限が体重に及ぼす影響

開口制限モデル作成実験の結果、外科的開口制限法では2週間の経過観察中顕著な体重変化をきたさずに安定な開口制限を得られることが明らかになった。そこでこの方法を用いて開口制限実験を行い経時的な体重変化を観察した。開口制限を加えずに固形飼料を投与した群（実験群1）あるいは粉体飼料を投与した群（実験群2）、開口制限を加えて粉体飼料を与えた群（実験群3）のすべてにおいて体重減少は認めなかった。処置6週後での体重は、実験群2, 3でやや低値を示したが実験群間で有意差は認めなかった（図4）。

### 3. 開口制限が下顎頭骨・軟骨層に及ぼす影響

開口制限が下顎頭に及ぼす影響を知るため、下顎頭中央部矢状断で切片を作成し組織学的検索を行った。下顎頭の骨構造については、固形飼料の実験群1と比較して、粉体飼料の実験群2, 3の骨髓腔が拡大していた。特に実験群3において、経時的に骨髓腔の拡大が強くなり、下顎頭部での骨基質の減少が認められた。さらに実験群3の開口制限処置6週後の動物において、破骨細胞の出現を伴った骨吸收と線維性組織の増殖が認められた（図5）。なお、実験群2でも破骨細胞は散見された。軟骨の観察において、実験群1では、正常な軟骨構造である表層、増殖層、分化層、肥大層が認められたが、開口制限6週後の実験群3では、軟骨層が菲薄化しており、特に前方部では軟骨層のうち分化層と肥大層が縮小していた（図5）。そこで、2, 4, 6週の検体につき、下顎頭の前方、中央、後方部における軟骨厚径の計測を行った。前方部において、開口制限処置2週後に計測した下顎頭軟骨層の厚径の平均値は、実験群1, 2, 3の右側でそれぞれ $122\mu\text{m}$ ,  $68\mu\text{m}$ ,  $56\mu\text{m}$ で左側では、 $158\mu\text{m}$ ,  $70\mu\text{m}$ ,  $54\mu\text{m}$ であり、粉体飼料群で顕著に両側軟骨層の厚径が減少していた（図6）。処置4, 6週後の結果も同様であり1群と比較して3群では両側とも軟骨厚径は減少しており、有意差（ $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ）が認められた。粉体飼料を投与し開口制限しない実験群2と開口制限した実験群3との比較では、左右両側とも実験群3の方が低値を示したが、有意差が認められなかった。関節矢状断面の中央部においても処置後2, 4週後は、前方部と同様に実験群1に比較して実験群2, 3で低値を示した。6週後での下顎頭軟骨の平均厚径は、実験群1, 2, 3の右側でそれぞれ $145\mu\text{m}$ ,  $150\mu\text{m}$ ,  $96\mu\text{m}$ であり、左側では $142\mu\text{m}$ ,  $150\mu\text{m}$ ,  $80\mu\text{m}$ と、この部位では、粉体飼料による軟骨層の減少はみられなくなったが、開口制限群（実験群3）での軟骨厚径の減少は持続していた。後方部において、処置6週後での軟骨層の厚径は実験群1, 2, 3の右側は、それぞれ $212\mu\text{m}$ ,  $215\mu\text{m}$ ,  $187\mu\text{m}$ 、左側は $203\mu\text{m}$ ,  $250\mu\text{m}$ ,  $195\mu\text{m}$ であり実験期

間を通じて実験群間で明らかな差を認めなかった（図 6）。下顎頭前方部における軟骨層厚径で変化がみられたため、軟骨層を更に増殖層と分化層＋肥大層に区分して検討した（図 7）。実験群 2において、実験開始 2 週後より分化層＋肥大層は減少傾向にあり、この変化は食餌形態の変更により早期に生じるものであった（図 7 B）。増殖層でも実験群 2 と 3 では厚径は、実験期間を通じ菲薄化傾向を示していた（図 7 A）。したがって、軟骨の変化はこれら 3 層すべてで生じていることが明らかとなった。

#### 4. 開口制限が関節円板に及ぼす影響

開口制限が関節円板に及ぼす影響を知るため、関節矢状断面の組織切片を用いて組織化学的変化の検討および関節円板厚径を計測を行った。実験群 1 の正常ラットの関節円板の中央部を構成する線維束は太く、屈曲が少ない状態で密に前後方向に配列していた。実験群 2, 3 においても形状の変化や線維配列の乱れおよび線維の剥離等の変化を示す組織所見はみられなかった。処置 2 週後において、実験群 1, 2, 3 右側での関節円板厚径は、それぞれ  $55 \mu\text{m}$ ,  $51 \mu\text{m}$ ,  $37 \mu\text{m}$ , 左側では  $58 \mu\text{m}$ ,  $65 \mu\text{m}$ ,  $38 \mu\text{m}$  で実験群 3 が最も低値を示した（図 8）。4, 6 週後の計測においても各実験群の関節円板厚径はばらつきを示したが、実験群 3 においてその変化は最も顕著であった。

#### 5. 開口制限が関節包組織に及ぼす影響

頸関節の神経線維は血管と伴走して関節包に入り滑膜と線維膜の間で細い枝に分枝している。関節包は関節外側で発達し、神経線維もこの部で豊富である<sup>15,23,36)</sup>。開口制限が頸関節の神経・血管に及ぼす影響を知るため、神経・血管分布が豊富な関節包外側で矢状断面を作成し組織変化を観察した（図 9 a, b）。固形飼料で飼育した実験群 1, すなわち、正常ラットの左側関節包において、関節包の上部ならびに中央部は線維性結合組織を主体

とする構造であり、上部で脂肪細胞が散在していた。中央部では、彎曲した線維束が平行して走行しており、実験期間を通じて変化を認めなかった（図 9c, e）。関節包下部には、小動静脈と太い神経束が数多くみられた（図 9g）。開口制限を行わず粉体飼料を投与した実験群 2 においても同様の所見であった。一方、開口制限した実験群 3 の左側では、2 週後、顕著な変化は認められなかったが（図 9d）、6 週後には、関節包の中央部の彎曲した線維成分が減少しており、代わりに胞体の明るい脂肪細胞が増加し、細い血管の増殖もみられた（図 9f）。これらの変化は反対側関節包でも認められた。また、実験群 3 の関節包下部では、4 週をピークとして拡大した血管が散見された。開口制限とともに神経分布、神経束の変化はみられなかった（図 9h）。

## 6. 開口制限が関節包の神経に及ぼす影響

開口制限にて組織変化を生じた関節包中央部と血管・神経が豊富である関節包下部における神経線維と神経ペプチドの発現を免疫組織化学染色にて検討した。実験群 1 において、神経特異蛋白 PGP 9.5<sup>11)</sup>は、関節包の上部、中央部、下部の結合組織および血管周囲に発現がみとめられ、一部は数珠状の腫脹（varicosity）を伴った細径の線維として発現がみられた（図 10a）。実験群 2 でも、PGP 9.5 陽性線維は同様の分布を示した。実験群 3 の関節包中央部では、線維性結合組織が脂肪細胞で置き換わっており、同部で蛇行した線維状に PGP 9.5 陽性線維がみられた。実験群 1, 2 と比較して数は、左右側ともにやや増加していた（図 10b）。

神経ペプチド SP<sup>12)</sup>は、いずれの実験群でも関節包下部の神経束とその周囲結合組織で発現しており（図 10c, d），関節包の上部、中央部ではその発現がみられなかった。また、実験期間中発現が変化することもなかった。

神経ペプチド CGRP<sup>12)</sup>は、関節包の上部、中央部、下部の血管周囲の結合組織と下部

の神経束周囲の結合組織で発現を認めた。実験群 3においては、関節包の中央部の血管周囲と脂肪細胞周囲で発現しており、処置 4 週後より免疫陽性線維の増加を認めた（図 10e, f）。関節包下部においては、4 週以降、開口制限を行った実験群 3 では陽性線維が増加し、実験群 2 では減少する傾向がみられた。

神経ペプチド NPY<sup>12)</sup>は、実験群 1において、関節包下部の結合組織周囲、下部の動脈壁周囲、関節包中央部で網目状に varicosity を伴って発現が認められた。一方、開口制限を行った実験群 3 では、関節包中央部で処置 4,6 週後には、血管周囲に網目状の発現が多く認められるようになった（図 10h）。実験群 2 での発現はやや低下した。

神経ペプチド VIP<sup>12)</sup>は、関節包下部の一部の動脈壁周囲に限局してみられた（図 10i, j）。実験群 2 では処置 4,6 週でやや発現が低下し、実験群 3 では増加する傾向がみられた。表 1 は、関節包の中央部と下部における神経線維と各種神経ペプチドの発現につき、免疫組織化学染色結果を表にまとめたものである。開口制限による脂肪化と血管の増加がみられた関節包中央部において、SP, VIP は発現していなかった。実験群 3 では、PGP 9.5 と CGRP, NPY の発現増加がみられた。関節包下部では、検討したすべての抗体で発現がみられた。PGP 9.5 と CGRP, NPY, VIP の染色において、抗体反応陽性線維は実験群 2 では減少し、実験群 3 では増加する傾向がみられた。なお、左右差はみられなかった。

## ＜考察＞

成熟ラットを用いて、開口制限実験を行い、顎関節の組織学的变化につき検討した。その結果、開口制限には頬骨と下顎骨をウレタンゴム製パワーチェーンを用いる外科的固定法が適しており、この開口制限法を施したラットでは下顎頭軟骨の局所的菲薄化をきたすこと、関節円板には器質的变化はないこと、関節包では脂肪細胞、血管、神経線維の増加をきたすことが明らかになった。

顎関節の不動化実験としては、サル<sup>3~6)</sup>、ウサギ<sup>7)</sup>、ラット<sup>8,9)</sup>を用いた研究が行われている。サルにおいては、顎を中心咬合位で不動化するため、サルを首枷付き monkey cage に入れ、head cap の左右側に骨釘を打ち込む顎骨骨折用創外固定器を用いた方法<sup>3)</sup>と歯牙を鋼線で結紮固定する方法<sup>4~6)</sup>が行われている。ウサギでは、口蓋と下顎骨を鋼線で結紮して顎関節を不動化する外科的処置<sup>7)</sup>が行われている。ラットにおいては、head cap<sup>9)</sup>、鋼線による歯牙結紮<sup>8)</sup>にて顎関節不動化実験が行われている。ヒトの咬合を考えると実験動物としてはサルが最も適した実験動物と思われるが、個体数の確保の問題や顎運動抑制に対する系統的な研究を行う上で困難な点も多い。これに対して、ラットの場合、顎運動はヒトと同様に下顎頭が前方滑走を行う<sup>37)</sup>ことが知られており、個体数の確保、発育成長において個体差が少ないなど下顎頭前方滑走を抑制する開口制限モデル作成にあたっては多くの利点がある。ラットを用いた顎関節の研究は、幼若動物での関節の発達に関するもの<sup>14,19,23)</sup>、正常動物の関節円板や関節包に関するもの<sup>15,17,21,22)</sup>、関節炎を惹起した動物での神経ペプチドの定量を行ったもの<sup>30~32)</sup>、特に関節炎の惹起に関するものが数多く行われている。しかしながら、顎運動を制限して、関節に対する影響を検討した研究は、極めて少ない。その理由として、小動物では開口制限が困難なことが挙げられる。本研究においても、サル、ウサギ、ラットで行われた head cap と鋼線による開口制限を試みたが、いずれの方法も経口では、栄養摂取が不良となり、体重の減少をきたして実験継

続が困難であった。鋼線の場合、径が太いと頬骨の剪断が起こり、細いと鋼線の剪断を生じた。幼若ラットを用いた開口制限の実験系<sup>9)</sup>では、咬合床を咬ませた状態で head cap を頭部にはめて固定し経管チューブで流動餌を与えていたが、やはり体重の急激な減少をきたすと思われ、実験期間はわずかに 4 日間であった。そこで、組織親和性の高いシリコンチューブとウレタンゴム製矯正用パワーチェーンを組み合わせた固定方法を考案した。実験に使用する動物の週齢に関しては、ラットの頬関節の軟骨内骨化が終了するのは生後 3 ヶ月<sup>38,39)</sup>であるが、軟骨層の厚径は生後 50-60 日後までには一定となる<sup>40,41)</sup>。それ以前の成長期のラットに咬合異常<sup>42)</sup>、頬運動制限<sup>9)</sup>、短期間外力を作用<sup>43)</sup>させた場合、影響力が大きいことなどから 10 週齢の成熟ラットを用いることとした。本研究においては開口制限の条件として、処置後の開口量が、処置前の 1/3 以下に抑えられていること、処置後の体重減少が処置前の 10% を超えないこと、2 週間以上開口制限状態を維持できることを目標としたが、本研究での外科的開口制限法はこの条件を満たすものであった。すなわち開口制限処置 2 週後での体重の減少は 5% であり、ラットの最大開口量約 20mm<sup>44)</sup>を約 5mm に制限することができた。過去に報告されたサルの系<sup>3~6)</sup>では、中心咬合位で咬合しており強度の固定を行っている。また、ウサギでの鋼線による固定<sup>7)</sup>では、開口制限量が明らかにされていない。ラットの実験系<sup>8,9)</sup>においても強度の歯牙固定を行っている。これに対して、今回作成したラットの実験系は、過去の報告と異なり開口量を一定に制限する特徴があり、しかも小動物において栄養状態の影響が少なく長期実験に耐える初めての開口制限実験系といえる。

この実験モデルを用いて、固体飼料で通常の飼育をした実験群 1、開口制限を行わずに固体飼料を投与した実験群 2 との間で、頬関節の骨・軟骨構造の比較検討を行った結果、6 週間開口制限を行った実験群 3 のラット下顎頭では、骨髓腔の拡大と破骨細胞の出現を認め、骨融解像を呈した。下顎頭の軟骨に関しては、開口制限処置 2 週後の時点で、関節

の前方と中央部で、顕著な軟骨層厚径の減少をきたした。この軟骨変化は同じ粉体飼料を投与した実験群でも認められたが、その程度は、実験期間を通じて常に開口制限群でより強く認められた。同様の下顎頭軟骨の変化はウサギを用いた実験でも観察されている。この場合、上下顎を鋼線で固定しており、3週後には、左右の下顎頭軟骨厚径は対照の1/2まで減少した<sup>7)</sup>と報告されている。より強固な顎外固定を行ったサルでは、顎関節では退行性変化が顕著であり、軟骨層の消失に続いて骨組織の破壊にまで至っている。小川ら<sup>9)</sup>は4日間の上下顎固定でも、ラット下顎頭軟骨層が減少したとしている。また、Shimaharaら<sup>8)</sup>が行った歯牙結紮による顎運動制限では3週で骨髓腔の拡大がみられ、5週では下顎頭の扁平化と形態異常が出現している。したがって、下顎頭軟骨層の減少は、顎運動制限によって出現する共通の早期変化といえる。

一方、下顎頭軟骨層は顎運動の制限を行わなくとも食餌を軟飼料にするだけで減少することが報告されている。Kiliaridisら<sup>45)</sup>は、成長期のラットを用いて固形飼料を与えた群と軟飼料を与えた群での関節軟骨を比較研究しており、軟飼料摂取動物では、下顎頭の前方で軟骨層が薄くなり、後方で厚くなると報告している。Bouvier<sup>46)</sup>が行った成長期および成熟ラットに軟飼料を与えた実験でも、下顎頭中央部の軟骨層の減少が認められた。また、固形飼料と軟飼料を投与した動物で、下顎頭でのプロタイプIコラーゲンとタイプIIコラーゲンの発現様式が異なること、軟飼料群では軟骨芽細胞数が減少する<sup>47)</sup>ことが報告されている。本研究において開口制限を行わずに粉体飼料を投与した実験群2でも、開口制限群と同様に下顎頭軟骨層の前方と中央部で厚径が減少することが明らかとなった。また、深沢<sup>48)</sup>は閉口運動に関与する筋肉群を切除し9週間飼育した結果、下顎頭軟骨の厚径が減少したとしている。したがって、ラットが固形飼料を前歯部で破碎し、臼歯で咀嚼する際に加わる生理的咬合圧が下顎頭軟骨構造の維持に重要であるものと思われる。一方、山本<sup>49)</sup>は、ラットを用いて実験的に片側性の咬合異常を惹起させた下顎頭を観察し、

咬合の拳上側と非拳上側の両方で軟骨層の菲薄化を生ずること、また、強制持続開口を行った群でも、厚径の減少を認めたとしている。咬合拳上と強制開口では、いずれも下顎頭は側頭骨に圧接された形となり、下顎頭に対して過度の機械的負荷が加わって、下顎頭軟骨層が退行性変化をきたすものと思われる。本研究における開口制限群では、ウレタンゴム製固定装置の働きで、一定以上の開口を制限している。安静時は装置による牽引力は働いていないが、開口運動時には、装置の弾性反発力で下顎頭に過剰の負荷がかかるものと思われる。したがって、開口制限し粉体飼料を投与した実験群3では、生理的咬合圧の低下と開口制限による過剰の機械的負荷がともに作用する可能性がある。このどちらがより軟骨層の菲薄化に重要な役割を果たすかは不明であるが、開口制限時の軟骨変化には、これら複数の因子が関与するものと思われる。

下顎骨は、内軟骨性骨化にて成長する<sup>50)</sup>。軟骨増殖層は細胞分裂にて新しい軟骨細胞を供給しており、これらの細胞が下層にいくに従って分化、肥大化して、肥大軟骨細胞層が形成される。肥大軟骨細胞の間隙に存在する軟骨基質に、骨髓側から骨芽細胞が侵入し、肥大軟骨細胞の骨化が起こる<sup>51,52)</sup>とされている。成長した動物の下顎骨においては、軟骨細胞の分裂と肥大軟骨細胞の骨化のバランスで軟骨層の厚径は維持される<sup>38~41,50)</sup>と考えられている。本研究において、軟骨層を増殖層、分化層+肥大層に区分し、その厚径を計測したが、これらの層はすべて菲薄化することが明らかとなった。ただ、分化軟骨細胞と肥大軟骨細胞はその細胞径が大きく、これらの細胞層が占める割合が高いため、分化層+肥大層での減少が軟骨層全体の菲薄化に大きく貢献したものと思われる。軟骨層厚径の減少は、軟骨細胞の分裂能が低下する場合、あるいは軟骨層での骨化が亢進する場合に生ずる<sup>48)</sup>とされているが、本研究の結果では、分化層+肥大層だけでなく増殖層でも厚径が減少しており、開口制限にて、軟骨前駆細胞の分裂能が低下し、さらに幼弱軟骨細胞の分化、肥大化の過程も阻害されたと考えられる。一方、開口制限6週後のラット下顎頭で

は破骨細胞と骨吸収が確認された。このような環境では軟骨から骨への置換が亢進するとは考え難い。したがって、骨髓側からの骨化が亢進したのではなく軟骨形成が強く抑制されたことで、軟骨層の菲薄化をきたしたものと考えられる。

軟骨細胞の増殖が抑制される機構として、栄養補給の低下が考えられる。関節頭軟骨は無血管性の組織であり、栄養は滑液の拡散にて供給されており、グルコースなどの低分子量の栄養素や酸素は、関節運動の影響を受けることはないが、他の栄養素は関節運動によって加えられる周期的な負荷（pumping）によって供給をうける<sup>53)</sup>ことが報告されている。頸関節の場合、開閉口運動によって滑液中の栄養素が軟骨内に送り込まれる一方で、軟骨内の代謝物が滑液中に排泄されると考えられるが、開口制限処置は、この pumping による下頸頭軟骨への栄養供給に対して抑制的に働くと思われる。以上より、開口運動の制限は栄養補給面でも下頸頭軟骨層の形成に抑制的に作用するものと考えられた。開口制限により、実験期間を通じて前方ならびに中央部での軟骨層菲薄化はみられたが、粉体飼料で開口制限を行わなかった実験群 2 では軟骨層中央部で、4, 6 週後の回復がみられた。この実験群 2 では、下頸頭への生理的咬合圧は軽減するが開口運動は阻害されていない。そのため滑液からの栄養補給は維持されており、しだいに軟骨層が回復するものと思われる。全身的栄養については、本実験モデルで開口制限を行っても 6 週後までの観察で体重変化の減少はみられておらず、全身的な栄養が軟骨層菲薄化の要因とは考えられない。

関節円板に関して、組織学的な変化はいずれの群でも認められなかった。関節円板の厚径を関節中央部で計測したが、開口制限を行った実験群 3 においても、期間を通じて関節円板の肥厚や菲薄化は明らかでなかった。これは、実測値のばらつきに起因するものであり、結果には示していないが、中央部で厚径が低値の検体でも前方部を観察すると厚径の増大がみられた。また、外側の組織上で円板が肥厚していた場合、内側の円板は逆に菲薄化している検体も観察された。したがって、開口制限は関節円板の厚径に顕著な影響

を与えるというよりは、むしろ、その位置異常を生じさせる可能性が高いと考えられた。

ヒトの頸関節においては、神経線維は血管と伴走して関節包に入り滑膜と線維膜との間で細い枝に分枝し、特に後方、外側部で不完全な神経叢を呈し、これから出る細い枝が関節包内に分布している<sup>36)</sup>。関節包は関節外側で発達し、神経線維もこの部で豊富である。ヒトでは、関節包後方部は三叉神経第三枝の耳介側頭神経からの関節枝、前方部は、咬筋神経、後深側頭神経から関節枝が分布している<sup>36)</sup>。ラットにおいても頸関節に分布する知覚神経はすべて三叉神経由来<sup>16)</sup>と考えられており、関節前方ならびに後方部から血管とともに侵入する<sup>17,23)</sup>。また、頸関節の自律神経線維は、関節に分布する動静脈の血管壁周囲に網目状に豊富に存在する<sup>18,20)</sup>とされている。本研究では、関節での神経・血管分布の豊富な関節包に着目し、開口制限が神経、血管の分布に及ぼす影響を明らかにするため、関節包への血管の侵入部位を含む連続的な矢状断面での検索を行った。実験群1, 2の関節包断面を観察した結果、関節包の上部と中央部では、線維性結合組織が主体をなしており、下部では、血管が豊富で、神経束の断面も数多く認められた。開口制限した実験群3でも関節包の上部と下部では、他の実験群と同様の組織像を呈したが、関節包中央部では、線維性結合組織が減少し、かわりに脂肪細胞の増加が認められた。また、脂肪細胞に近接して細い血管の新生が認められた。粉体飼料で開口制限を行わなかった実験群2では、このような組織変化は認められておらず、線維性結合組織の減少と脂肪細胞の増加は開口制限に特有の関節包の組織変化と考えられた。また、開口制限が、関節包下部での小動静脈の分布や形態に大きな影響を及ぼすことはないと考えられた。

頸関節と神経ペプチドとの関連性については、数多くの報告がなされている。例えば、アジュバント性の頸関節炎を惹起したラットでは、後根神経節でのSPとCGRP濃度が上昇しており、ラット頸関節の炎症性疾患に神経系が重要な役割を果たす<sup>30)</sup>とされている。一方、生後のラット頸関節において、吸啜や咀嚼といった機能的な刺激が、神経線維

の発達に関与する<sup>19,23)</sup>との報告もあり、頸運動が逆に神経線維の発達や分布に影響を及ぼすことも考えられる。そこで、開口制限動物において、各種神経ペプチドを有する神経の分布につき、神経・血管が豊富な関節包で検討を行った。その結果、開口制限によって大きな組織変化を示した関節包中央部において、一部の知覚神経が含有する神経ペプチドである CGRP は、脂肪細胞間隙と血管周囲で、また交感神経が含有する NPY は血管壁周囲で検出された。CGRP は血管に対して強い拡張作用を示す<sup>12,28)</sup>ことが知られている。

一方、脂肪細胞には知覚神経が分布<sup>54)</sup>しており、神経毒であるカプサイシンで知覚神経を脱神経した場合、加齢による脂肪増殖が減少する<sup>55)</sup>ことから、CGRP が脂肪細胞の増殖促進因子として作用する可能性も示唆されている。したがって、開口制限ラットの関節包でみられた CGRP を含む神経線維の増加は、脂肪細胞の増加と新生血管の拡張に関与している可能性がある。また、同じく開口制限動物で発現した交感神経が含有する神経ペプチド NPY は、本来血管の収縮を増強する<sup>56)</sup>とされているが、最近、血管内皮細胞に対する増殖促進作用を示す<sup>57)</sup>ことも明らかにされている。したがって、NPY 陽性神経線維が関節包中央部で血管形成に働くとも考えられる。

関節包下部は、血管の豊富な部位で、検討したすべての抗体と反応する神経の存在が確認された。NPY、VIP といった交感神経、副交感神経に多く含まれる神経ペプチドは小動脈の血管壁で検出され、SP は比較的太い神経束の断面で検出された。開口制限群では神経ペプチドを有する神経が増加し、開口制限を行わずに粉体飼料を投与した動物では、発現が減少する傾向がみられた。開口制限群では、神経ペプチドを有する神経が増加する傾向を示した。この場合、神経特異蛋白 PGP 9.5 の発現も増加した。したがって、HE 染色像では明らかでなかったが、開口制限動物においては、関節包下部でも新たな CGRP、NPY、VIP といった神経ペプチドを含有する神経線維が増加するものと思われた。一方、開口制限を行わずに粉体飼料を投与した動物では、CGRP と NPY の発現が減少す

る傾向がみられた。その理由は明らかでないが、次のように説明できるかも知れない。すなわち、SP, CGRPなどの神経ペプチドは神経細胞で合成されており、神経線維が分布する組織との間で輸送が行われていること、ラット膝関節からの求心性線維の一部は、通常の関節運動によって活性化されること<sup>58~60)</sup>が示唆されている。したがって、ラットの頸関節においても、固体飼料の咀嚼による刺激で関節包に分布する神経が活性化され、その結果、神経細胞内で神経ペプチドが合成され、神経線維内のペプチド量が維持されている可能性がある。この場合、粉体飼料に変えることで末梢からの刺激が減少すると神経細胞での合成が低下し神経線維の神経ペプチド量も減少するものと思われる。実際、開口非制限で粉体飼料の実験群2では、神経ペプチドの発現減少にもかかわらず、PGP 9.5は影響を受けなかった。したがって、実験群2では神経線維数が減少するのではなく、神経線維に分布する神経ペプチド量が減少した可能性が考えられる。免疫組織化学染色で明らかとなったもうひとつの注目すべき点は、SP陽性線維が、実験群3の脂肪化組織で発現しなかったことである。SPは炎症にともなって発現する神経ペプチドで、この発現は頸関節炎の滑液中にみられ、疼痛と密接に関係する<sup>29)</sup>とされている。本研究では、血管、神経が豊富な関節包下部では検出されたが、開口制限でその発現に変化はなかった。したがって、開口制限による頸関節の変化は、炎症を伴わない病的変化であり、通常開口制限を行っても頸関節での疼痛が少ないという臨床所見とよく合致している。

本研究では、ウレタンゴム製パワーチェーンを片側の頬骨一下頸骨間に結紮固定して開口制限を行っており、開口制限の原因がたとえ片側性でも、両側の関節に影響が及ぶことも明らかとなった。頸関節に生じた主な変化は、下頸頭軟骨層の菲薄化と関節包の脂肪化と血管形成であり、骨変化は軽度であったが開口制限を継続すると骨組織の退行性変化はさらに進展するものと思われる。したがって、たとえ頸骨骨折、頸関節脱臼、頸変形症の術後で開口制限を継続的に行う場合でも、固定期間に対する配慮が必要と思われる。また、

顎関節疾患のなかで最も頻度が高い顎関節症では、症状が悪化すると強い開口制限に加えて疼痛を伴うことがある。顎関節症には、複数の因子が関与しており、開口制限モデル単独でその病態を再現できるものではないが、今後、本研究で示した開口制限モデルを軸として、顎関節での炎症モデルなど複数の系を導入することで、ヒトにおける顎関節症をより反映する実験系の確立が可能と思われる。

## ＜結語＞

成熟ラットを用いて開口制限モデルの作成と開口制限が顎関節に及ぼす影響につき検討を行い、以下の結果が得られた。

1. ウレタンゴム製パワーチェーンを頬骨と下顎骨に固定する外科的開口制限法を用いることで、長期実験に耐えうる開口制限モデルを作成した。
2. 外科的開口制限法を用いて開口制限を行った結果、下顎頭前方部の軟骨層の菲薄化と骨吸収が両側性に認められた。軟骨層では、増殖層、分化層+肥大層で厚径の減少傾向がみられた。
3. 開口制限を加えず、粉体飼料を与えて下顎頭への負荷を軽減しても軟骨層は減少し、下顎頭前方部に破骨細胞の出現と骨吸収を認めた。
4. 開口制限にて、関節円板に器質的変化を生ずることはなかった。
5. 開口制限にて、関節包中央部での線維性結合組織の脂肪化と血管形成が認められた。
6. 開口制限にて、関節包中央部での神経特異蛋白 PGP 9.5 と神経ペプチド CGRP, NPY の発現増加が認められた。
7. 関節包中央部では、神経ペプチド SP は発現しておらず、開口制限を行った動物で発現することもなかった。

以上より、頬骨と下顎骨をウレタンゴム製パワーチェーンで牽引固定する外科的固定法を用いることで一定の開口制限が得られること、この実験的開口制限モデルにおいて下顎頭軟骨の菲薄化と骨吸収をきたすこと、関節円板には器質的変化はないこと、関節包では線維性結合組織の減少と脂肪細胞、血管、神経の増加をきたすことが明らかとなった。

## ＜謝辞＞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学歯学部口腔外科学第二講座 作田 正義名誉教授、由良 義明教授、松本 憲助教授に慎んで感謝の意を表します。さらに、本研究に際し終始御理解と御協力を頂きました大阪大学歯学部口腔外科学第二講座の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

## ＜参考文献＞

- 1) Trudel, G., Uhrthoff, H.K. and Brown, M. (1999) : Extent and direction of joint motion limitation after prolonged immobility: an experimental study in the rat. *Arch. Phy. Med. Rehabil.*, **80**, 1542-1547.
- 2) Weinreb, M., Rodan, G.A. and Thompson, D.D. (1989) : Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation. *Bone*, **10**, 187-194.
- 3) 今上茂樹 (1977) : 顎関節の機能障害に関する研究, 顎の非可動化が顎関節に及ぼす影響に関する実験的研究. 口科誌, **26**, 414-430, 昭和47.
- 4) Glineburg, R.W., Laskin, D.M. and Blaustein, D.I. (1982) : The effects of immobilization on the primate temporomandibular joint: a histologic and histochemical study. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **40**, 3-8.
- 5) Ellis, E. and Hinton, R.J. (1991) : Histologic examination of the temporomandibular joint after mandibular advancement with and without rigid fixation, an experimental investigation in adult macaca mulatta. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **49**, 1316-1327.
- 6) Isacsson, G., Carlson, D.S., McNamara, J.A. and Isaberg, A.M. (1993) : Effect of maxillomandibular fixation on condylar growth in juvenile macaca mulatta, a cephalometric and histologic study. *Scand. J. Dent. Res.*, **101**, 103-109.
- 7) Lydiatt, D.D. and Davis, L.F. (1985) : The effects of immobilization on the rabbit temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **43**, 188-193.
- 8) Shimahara, M., Ono, K., Hashiguchi, N., Yoshida, Y., Kono, K., and Dote, T. (1991) : An experimental study on mandibular movement and osteoporosis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **74**, 287-297.
- 9) 小川光康, 川元龍夫, 深田健二, 伊藤公一, 鈴木聖一, 黒田敬之 (1999) : 下顎の運動制限を施した成長期ラット下顎頭軟骨の組織変化に関する研究.

- 日矯齒誌, 58, 335-343, 平成 11.
- 10) 木野孔司 (1989) : 顎関節円板支持組織とその病態 ; 顎関節症の臨床  
歯界展望別冊 (岡 達, 藍 稔 編) . 1版, 医歯薬出版, 東京, pp60-65,  
平成 1 .
- 11) Thompson, R.J., Doran, J.F., Jackson, P., Dhillon, A.P. and Rode, J. (1983) :  
PGP9.5- a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res.*, **278**, 224-228.
- 12) 稲垣 忍 (1987) : 末梢神経 ; 化学的神経機能解剖学 (遠山正彌,  
塩谷弥兵衛 編) . 1 版, 厚生社, 東京, pp509-548, 昭和62.
- 13) Haeuchi, Y., Matsumoto, K., Ichikawa, H. and Maeda, S. (1999) :  
Immunohistochemical demonstration of neuropeptides in the articular disk of the  
human temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs*, **164**, 205-211.
- 14) Ichikawa, H., Wakisaka, S., Matsuo, S. and Akai, M. (1989) : Peptidergic  
innervation of the temporomandibular disk in the rat. *Experientia*, **45**, 303-304.
- 15) Kido, M.A., Kiyoshima, T., Kondo, T., Ayasaka, N., Moroi, R., Terada, Y. and  
Tanaka, T. (1993) : Distribution of substance P and calcitonin gene-related  
peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint.  
*J. Dent. Res.*, **72**, 592-598.
- 16) Kido, M.A., Kondo, T., Ayasaka, N., Terada Y. and Tanaka, T. (1991) : The  
peripheral distribution of trigeminal nerve fibers in the rat temporomandibular  
joint studied by an anterograde axonal transport method with wheat germ  
agglutinin-horseradish peroxidase. *Arch. Oral Biol.*, **36**, 397-400.
- 17) 小林龍彰, 大橋 靖, 前田健康, 高野吉郎 (1994) : ラット顎関節の神経支配,  
抗 PGP 9.5 血清を用いた免疫組織学的研究. 日科誌, **43**, 369-385, 平成 6 .

- 18) 大須賀敏 (1996) : ラット顎関節の神経支配に関する組織化学的研究, 特に自律神経の分布とその由来について. 口科誌, **45**, 399-415, 平成 8.
- 19) Shimizu, S., Kido, M.A., Kiyoshima, T. and Tanaka, T. (1996) : Postnatal development of protein gene product 9.5- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint. *Anat. Rec.*, **245**, 568-576.
- 20) 江田 哲 (1998) : ラット顎関節の交感神経支配に関する組織化学的研究, 交感神経線維の由来とその経路について. 明海大歯誌, **27**, 8-19, 平成 10.
- 21) Uddman, R., Grunditz, T., Kato, J. and Sundler, F. (1998) : Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anat. Embryol.*, **197**, 273-282
- 22) Schwab, W. and Funk, R.H.W. (1998) : Innervation pattern of different cartilagenous tissues in the rat. *Acta Anat.*, **163**, 184-190.
- 23) 植木伸隆, 内田 隆, 田中栄二, 丹根一夫 (1999) : ラット顎関節における神経線維の生後発達. 日顎誌, **11**, 119-127, 平成11.
- 24) Tahmasebi-Sarvestani, A., Tedman, R. and Goss, A.N. (1997) : Distribution and coexistence of neuropeptides in nerve fibers in the temporomandibular joint of late gestation fetal sheep. *J. Anat.*, **191**, 245-257.
- 25) D'souza, S.M., Macintyre, I., Grgis, S.I. and Mundy, G.R (1986) : Human synthetic calcitonin gene-related peptide inhibits bone resorption in vitro. *Endocrinology*, **119**, 58-61.
- 26) Hohmann, E.L., Elde, R.P., Rysavy, J.A., Einzig, S. and Gebhard, R.L. (1986) : Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science*, **232**, 868-871.
- 27) Bjurholm, A., Kreicbergs, A., Brodin, E. and Schultberg, M. (1988) :

- Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides*, **9**, 165-171.
- 28) Brain, S.D. and Williams, T.J. (1988) : Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Nature*, **335**, 73-75.
- 29) Holmlund, A., Ekblom, A., Hansson, P., Lind, J., Lundeberg, T. and Theodorsson, E. (1991) : Concentrations of neuropeptides substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid of the human temporomandibular joint. A correlation with symptoms, signs and arthroscopic findings. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **20**, 228-231.
- 30) Hutchins, B., Spears, R., Hinton, R.J. and Harper, R.P. (2000) : Calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in rat trigeminal ganglia and brainstem following adjuvant-induced inflammation of the temporomandibular joint. *Arch. Oral Biol.*, **45**, 335-345.
- 31) Carleson, J., Alstergren, P., Appelgren, A., Appelgren, B., Kopp, S., Theodorsson, E. and Lundeberg, T. (1996) : A model for experimental induction of acute temporomandibular joint inflammation in rats : effects of substance P (SP) on neuropeptide-like immunoreactivity. *Life Sci.*, **59**, 1193-1201.
- 32) Carleson, J., Kogner, P., Bileviciute, I., Theodorsson, E., Appelgren, A., Appelgren, B., Kopp, S., Yousef, N. and Lundeberg, T. (1997) : Effects of capsaicin in temporomandibular joint arthritis in rats. *Arch. Oral Biol.*, **42**, 869-876.
- 33) Lundeberg, T., Alstergren, P., Appelgren, A., Appelgren, B., Carleson, J., Kopp, S. and Theodorsson, E. (1996) : A model for experimentally induced temporomandibular joint arthritis in rats : effects of carrageenan on neuropeptide-like immunoreactivity. *Neuropeptides*, **30**, 37-41.
- 34) Vyberg, M. and Nielsen, S. (1998) : Dextran polymer conjugate two-step visualization system for immunohistochemistry a comparison of EnVision+ with two tree-step avidin-biotin techniques. *Appl. Immunohistochem.*, **6**, 3-10.
- 35) Sabattini, E., Bisgaard, K., Ascani, S., Poggi, S., Piccioli, M., Ceccarelli, C., Pieri, F., Fraternali-Orcioni, G. and Pileri, S.A. (1998) : The EnVision<sup>TM</sup> + system : a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate<sup>TM</sup>, CSA, LABC, and SABC

- techniques. *J. Clin. Pathol.*, **51**, 506-511.
- 36) 石橋克禮 (1966) : ヒト顎関節の支配神経に関する研究, 第1報 肉眼解剖学的研究. *歯基礎誌*, **8**, 46-57. 昭和 41.
- 37) Weijs, W.A. (1975) : Mandibular movements of the albino rat during feeding. *J. Morphol.*, **145**, 107-124.
- 38) 三木 育 (1972) : ラット顎関節の発生並びに発育に関する研究. *京大口腔紀要*, **12**, 1-33, 昭和 47.
- 39) 野々部憲志 (1992) : ラットの下顎頭の加齢的変化に関する組織学的ならびに組織形態計測学的研究. *愛院大歯誌*, **30**, 91-108, 平成 4.
- 40) Furstman, L. L. (1966) : Normal age changes in the rat mandibular joint. *J. Dent. Res.*, **45**, 291-296.
- 41) Campos, M.N.M. and Cruz, A.R. (1985) : Morphometric study of the mandibular condyle of the rat during postnatal development. *Acta Anat.*, **123**, 189-194.
- 42) Kuboyama, N. and Moriya, Y. (1995) : Influence of diet composition and malocclusion on masticatory organs in rats. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, **37**, 91-96.
- 43) 野口規久男 (1970) : 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, 昭和 45.
- 44) Risnes, S. (1973) : Mandibular movement capacity in the rat. *Scand. J. Dent. Res.*, **81**, 170-173.
- 45) Kiliaridis, S., Thilander, B., Kjellberg, H., Topouzelis, N. and Zafiriadis, A. (1999) : Effect of low masticatory function on condylar growth : a morphometric study in the rat. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, **116**, 121-125.

- 46) Bouvier, M. (1988) : Effects of age on the ability of the rat temporomandibular joint to respond to changing functional demands. *J. Dent. Res.*, **67**, 1206-1212.
- 47) Tuominen, M., Kantomaa, T., Pirttiniemi, P. and Poikela, A. (1996) : Growth and type-II collagen expression in the glenoid fossa of the temporomandibular joint altered loading, a study in the rat. *Eur. J. Orthod.*, **18**, 3-9.
- 48) 深沢裕文 (1980) : 閉口運動に関する筋群切除後のラット下顎頭の成長発育に関する研究. *日矯歯誌*, **39**, 303-318, 昭和55.
- 49) 山本昌家(1994) : 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. *福岡医誌*, **85**, 78-90, 平成6.
- 50) 岡田充泰 (1977) : ラット下顎頭の発育に関する実験的研究, 皮下移植した下顎頭の発育について, *阪大歯誌*, **22**, 21-45, 昭和52.
- 51) 須田立雄, 小澤英浩 (1985) : 軟骨と軟骨の細胞 ; 骨の科学 (須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明 著). 1版, 医歯薬出版, 東京, pp11-29, 昭和60.
- 52) 高瀬俊幸 (1979) : 成長軟骨細胞と骨髄細胞との相互作用, *in vitro*における石灰化機構の解析, *阪大歯誌*, **24**, 74-94, 昭和54.
- 53) O'Hara, B.P., Urban, J.P.G. and Maroudas, A. (1990) : Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, **49**, 536-539.
- 54) Fishman, R.B. and Dark, J. (1987) : Sensory innervation of white adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, **253**, R942-R944.

- 55) Melnyk, A. and Himms-Hagen, J.(1995) : Resistance to aging-associated obesity in capsaicin-desensitized rats one year after treatment. *Obes. Res.*, **3**, 337-344.
- 56) Kim, D., Duran, W.R., Kobayashi, I., Daniels, A.J. and Duran, W.N. (1994) : Microcirculatory dynamics of neuropeptide Y. *Microvascular Res.*, **48**, 124-134.
- 57) Zukowska-Grojec, Z., Karwatowska Prokopcuk, E., Rose, W., Rone, J., Movafagh, S., Ji, H., Yeh, Y., Chen, W.T., Kleinman, H.K., Grouzmann, E. and Grant, D.S. (1998) : Neuropeptide Y : a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ. Res.*, **83**, 187-195.
- 58) Ahmed, M., Bjurholm, A., Schultzberg, M., Theodorsson, E. and Kreicbergs, A. (1995) : Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis, *Arthritis Rheum.*, **38**, 699-709.
- 59) Brimijoin, S., Lundberg, J.M., Brodin, E., Hökfelt, T. and Nilsson, G. (1980) : Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig, *Brain Res.*, **191**, 443-457.
- 60) Schaible, H-G. and Grubb, B.D. (1993) : Afferent and spinal mechanisms of joint pain, *Pain*, **55**, 5-54.

## 図の説明

### 図 1 外科的開口制限法

全身麻酔下に、ラット左側顔面皮膚に切開を加え咬筋を剥離し頬骨と下顎骨を露出させた。下顎骨にステンレスバーを用いて小穴を形成し、ウレタンゴム製矯正用パワーチェーンをステンレスワイヤーとシリコンチューブにて結紮固定した。 z：頬骨、ma：下顎骨、p：パワーチェーン、w：ワイヤー、s：シリコンチューブ、con：下顎頭

### 図 2 開口制限実験スケジュール

生後 10 週齢ラット 33 匹を用い、開口制限を行わず固形飼料を投与する実験群 1 (固形飼料非制限群)、開口制限を行わず粉体飼料を投与する実験群 2 (粉体飼料非制限群)、外科的開口制限を行い粉体飼料を投与する実験群 3 (粉体飼料制限群) にグループ分けした。実験群 1 には、実験期間を通して固形飼料を投与し、実験群 2 は、4 日間液体飼料を投与したのち粉体飼料で飼育した。実験群 3 では、1 日固形飼料と液体飼料を併用投与したのち開口制限手術を行い、その後 3 日間は液体飼料で飼育した。4 日後からは実験期間終了時まで粉体飼料を投与した。実験開始時より 2, 4, 6 週後に実験群 1 各 3 匹、実験群 2 各 4 匹、実験群 3 各 4 匹の顎関節を組織学的検索に供した。

### 図 3 下顎骨軟骨層の厚径測定部位と軟骨の組織像

全身麻酔下に経心臓的に PBS で灌流脱血した後、灌流固定を行い、顎関節を一塊として摘出した。脱灰後、矢状断連続凍結切片を作成し、HE 染色を施した。A. 下顎骨軟骨層の厚径は①前方部、②中央部、③後方部で計測した。B. 下顎頭軟骨層は表層、増殖層、分化層 + 肥大層に区分した。斜線部は関節腔を示す。a：関節円板、car：軟骨層、

con：下顎頭， t：側頭骨， ant：前方， pos：後方

#### 図 4 開口制限がラットの体重に及ぼす影響

図 2 で示したスケジュールで開口制限実験を行った。実験開始時点から 6 週間の体重を測定し、その平均値±標準偏差(g)を求めた。

#### 図 5 開口制限がラット下顎頭組織像に及ぼす影響

固形飼料非制限の実験群 1 (a, d), 粉体飼料非制限の実験群 2 (b, e), 外科的開口制限を行った粉体飼料制限の実験群 3 (c, f)のラット下顎頭につき骨・軟骨層の組織を、開口制限開始より 2 週(a, b, c), 6 週(d, e, f) 後に観察した。

バー :  $100 \mu\text{m}$ , 棒線部が軟骨層を示す。矢印 : 破骨細胞, 矢頭 : 骨融解部位

#### 図 6 開口制限が下顎頭軟骨に及ぼす影響

下顎頭軟骨の厚径を図 3 で示した①前方部, ②中央部, ③後方部で開口制限処置 2, 4, 6 週後に計測した。実験群間で計測値の検定 (Scheff's F test) を行った。前方部では、実験群 1 と実験群 2, 3 の間で有意差が認められた。

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

#### 図 7 開口制限が下顎頭軟骨の増殖層、分化層+肥大層に及ぼす影響

A. 開口制限処置より 2, 4, 6 週後の下顎頭軟骨増殖層の厚径を前方部で計測した。B. 開口制限処置より 2, 4, 6 週後の下顎頭軟骨分化層+肥大層の厚径を前方部で計測した。実験群間で計測値の検定 (Scheff's F test) を行った。2 週後の左側増殖層において実験群 1 と実験群 3 の間で有意差を認めた。4 週後の右側分化層+肥大層, 6 週後の左側分化層

+ 肥大層において実験群 1 と実験群 3 の間で有意差を認めた。\*  $P < 0.05$

#### 図 8 開口制限が関節円板に及ぼす影響

固体飼料非制限の実験群 1, 粉体飼料非制限の実験群 2, 粉体飼料制限の実験群 3 のラット関節円板につき、開口制限処置 6 週後にその厚径を図 3 に示した左側下顎頭中央部②で計測した。

#### 図 9 開口制限が関節包の組織像に及ぼす影響

ラット関節包を外側で連続的に矢状切断し (a) 組織切片 (b) を作成した。固体飼料非制限の実験群 1 (c, e, g), 粉体飼料制限の実験群 3 (d, f, h) の関節包矢状断面中央部の組織像を実験開始 2 週 (c, d), 6 週 (e, f) 後に観察した。また、関節包下部での組織像は、6 週 (g, h) 後に観察した。バー:  $50 \mu\text{m}$ , 実線: 矢状断面, 破線内: 関節包, con: 下顎頭, cap: 関節包, fa: 脂肪細胞, m: 筋, ne: 神経束, t: 側頭骨, 矢印: 血管

#### 図 10 開口制限が関節包神経に及ぼす影響

実験開始 6 週後の固体飼料非制限の実験群 1 (a, c, e, g, i), 粉体飼料制限の実験群 3 (b, d, f, h, j) のラット関節包につき、神経特異蛋白 PGP 9.5 (a, b), 知覚神経が含有する神経ペプチド SP (c, d), 知覚神経が含有する神経ペプチド CGRP (e, f), 交感神経が含有する神経ペプチド NPY (g, h), 副交感神経が含有する神経ペプチド VIP (i, j) の抗体反応陽性線維の発現を免疫組織化学染色で検索した。PGP 9.5, CGRP, NPY は関節包中央部で、SP, VIP は関節包下部での組織像を示した。陽性線維は彎曲した褐色線維として、あるいは類円形の褐色の神経束として検出された。fa: 脂肪細胞, ve: 血管, ne: 神経束

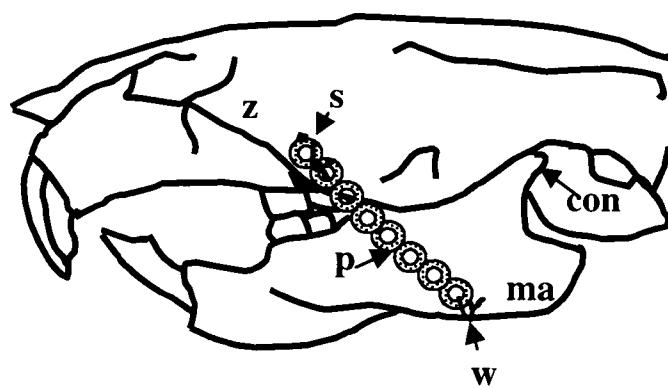
## 表の説明

表 1 関節包における神経特異蛋白と各種神経ペプチドの発現

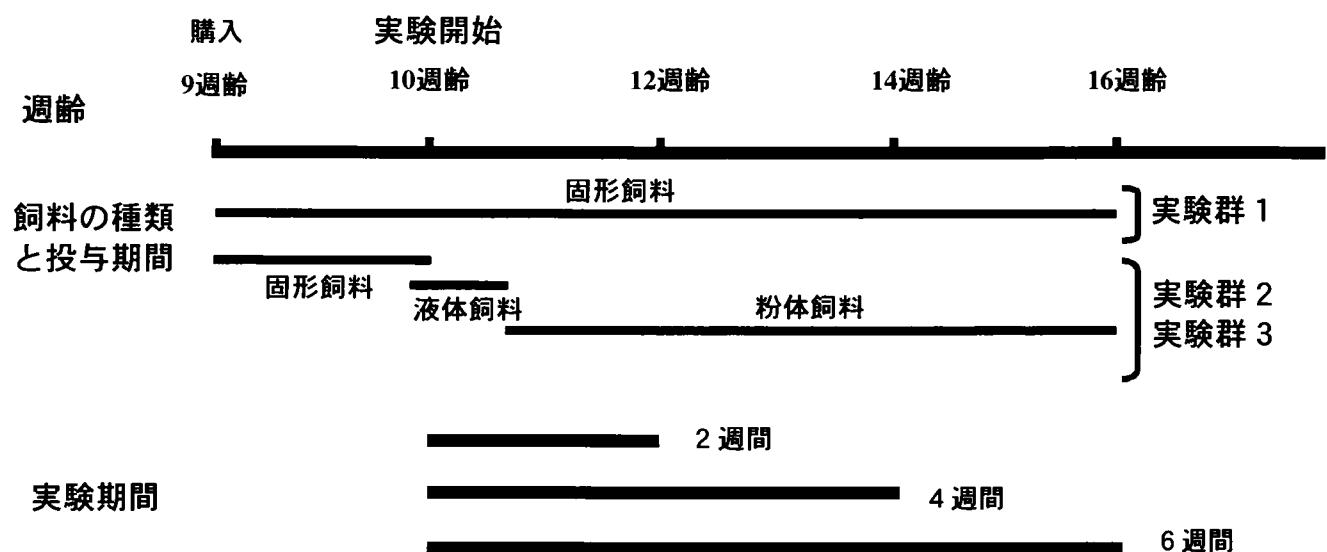
＋：抗体反応陽性, －：抗体反応陰性

↗：抗体反応陽性線維の増加, ↘：抗体反応陽性線維の減少

図 1



## 図 2



### 図 3

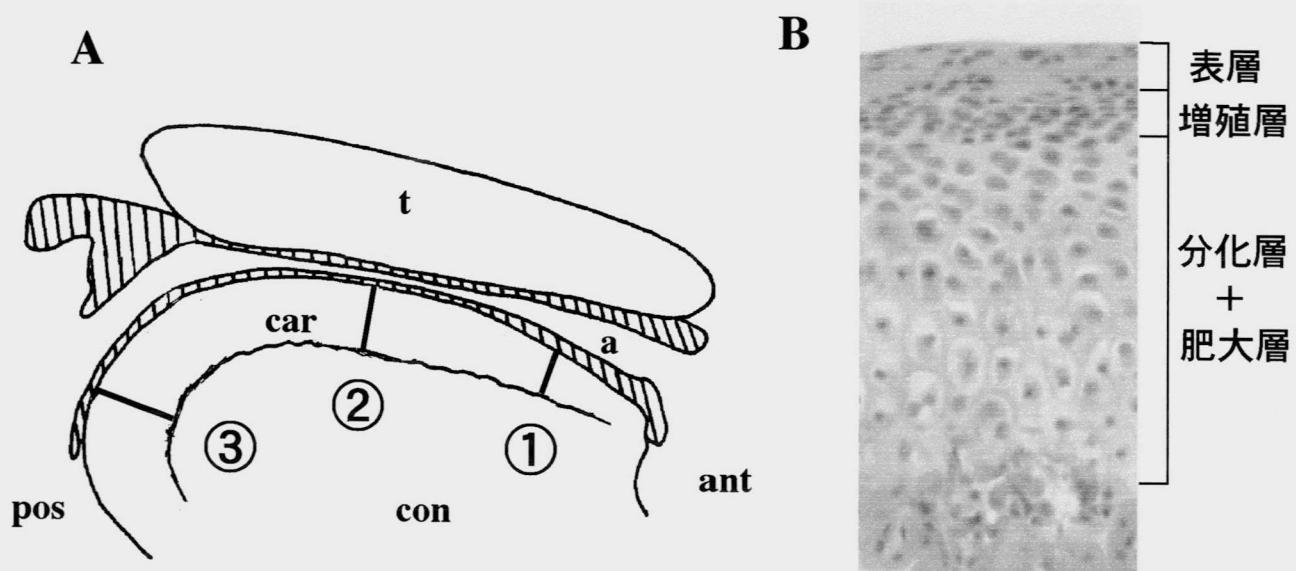
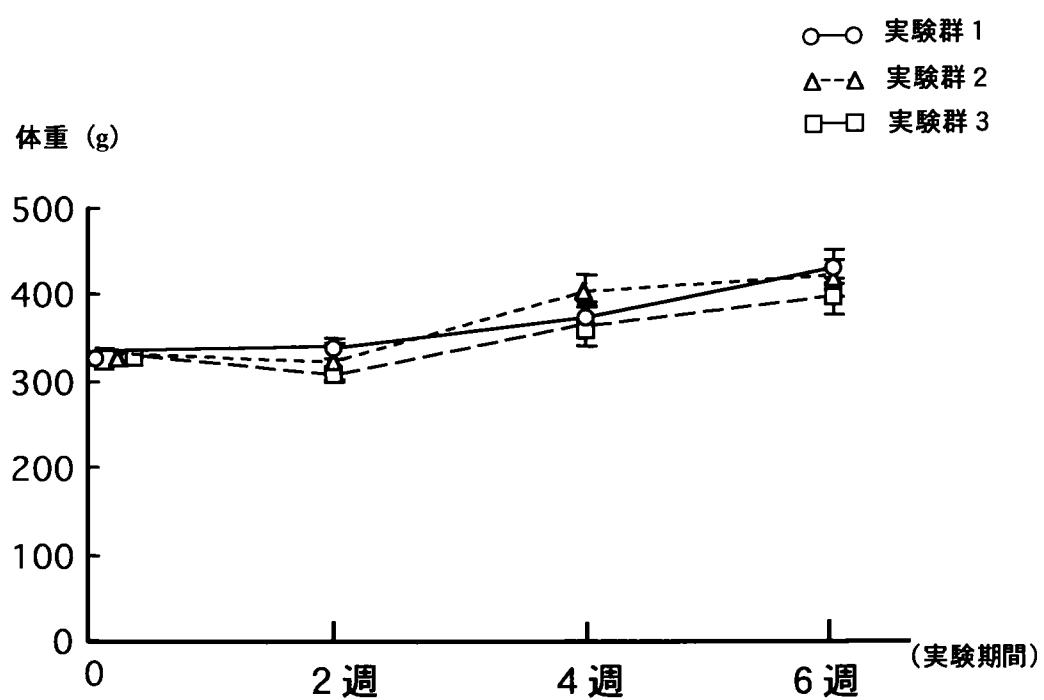
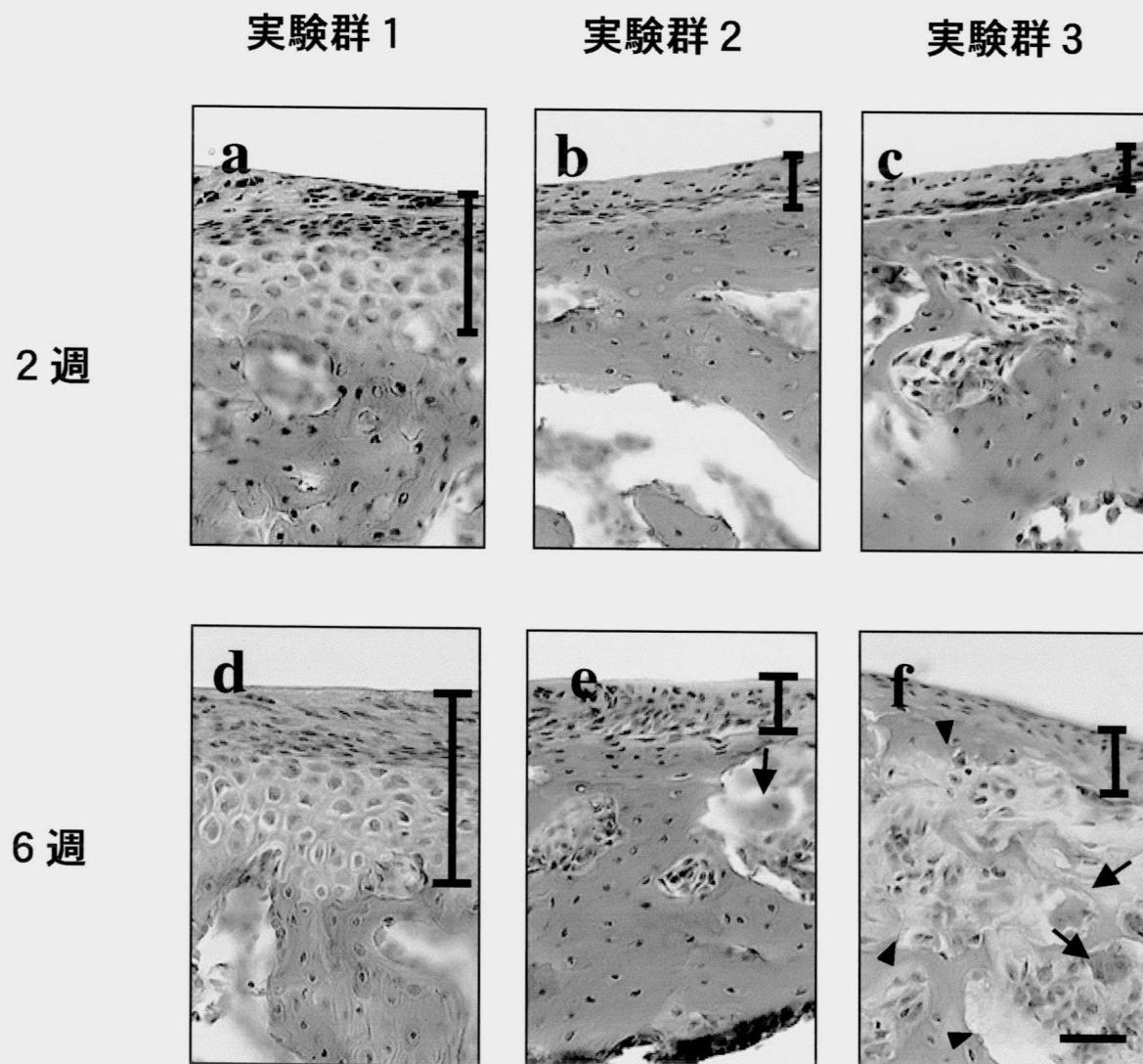


図 4



# 図 5



# 図 6

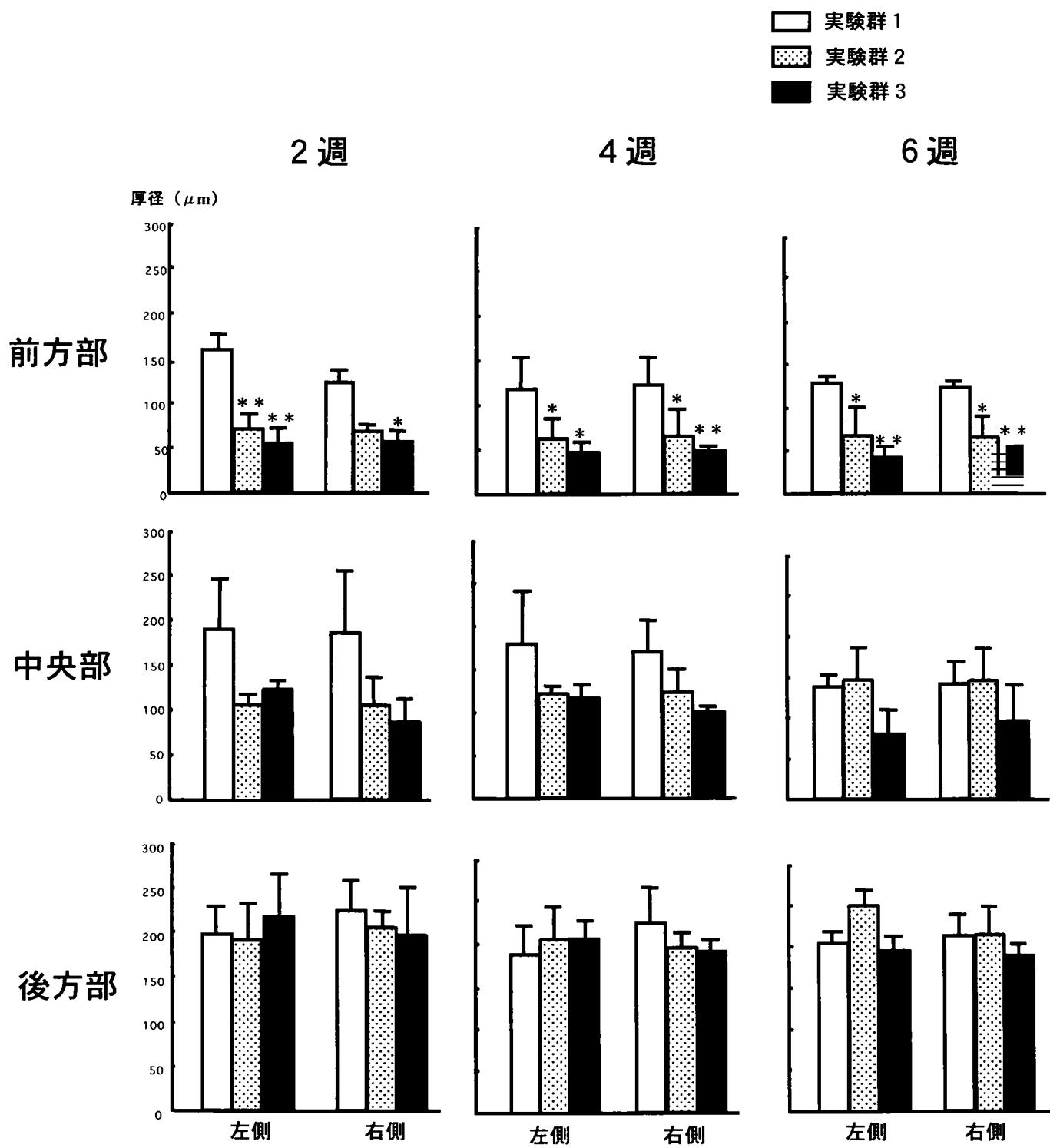
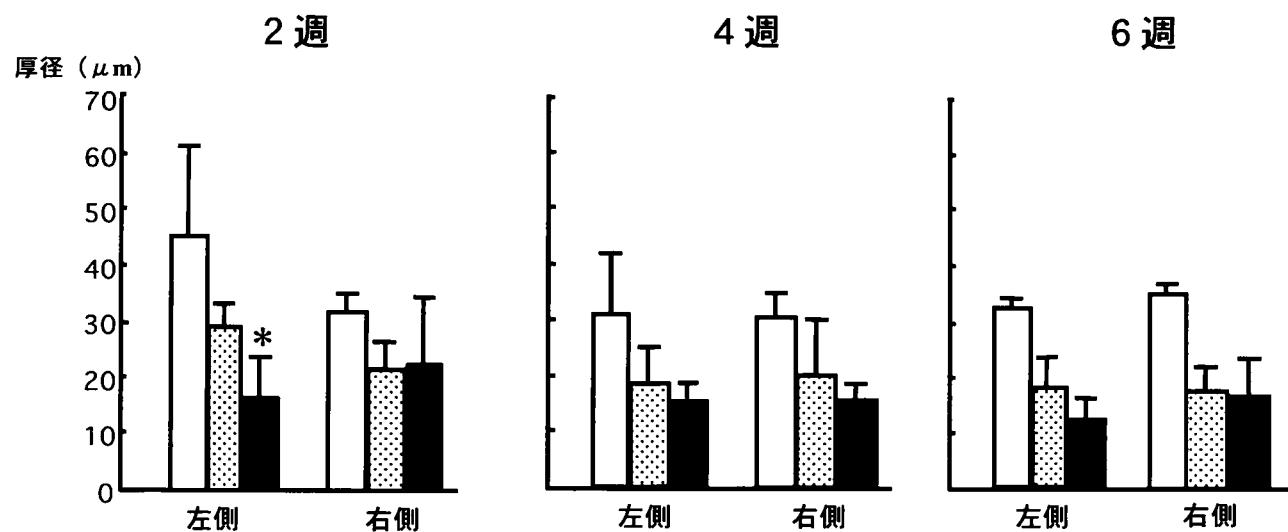


図 7

■ 実験群 1  
■ 実験群 2  
■ 実験群 3

A 増殖層



B 分化層 + 肥大層

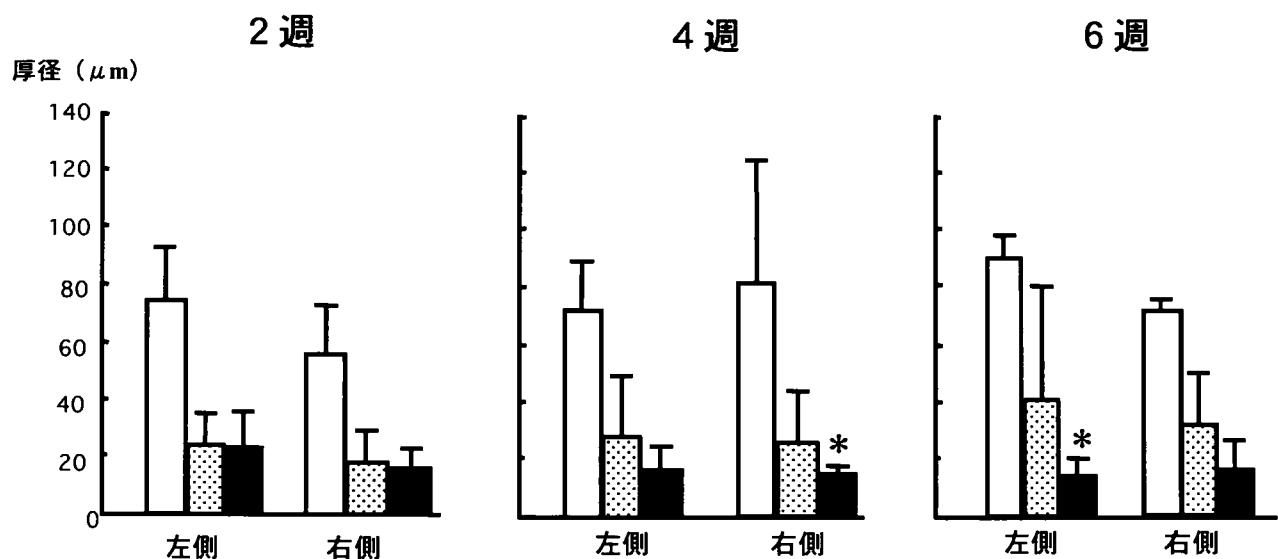
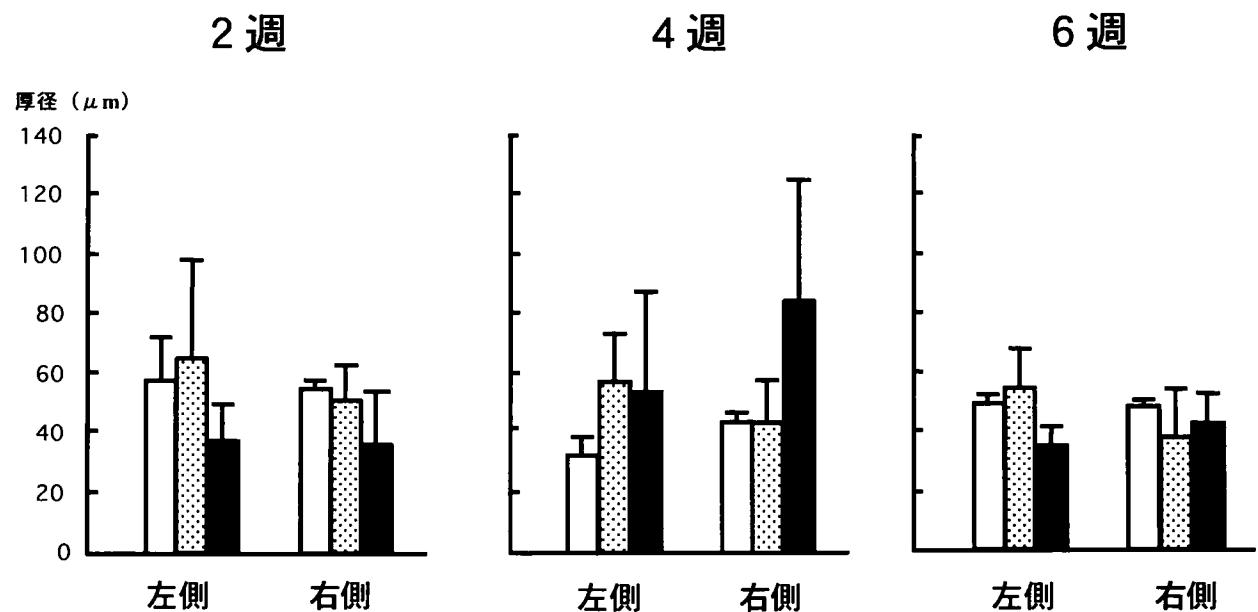
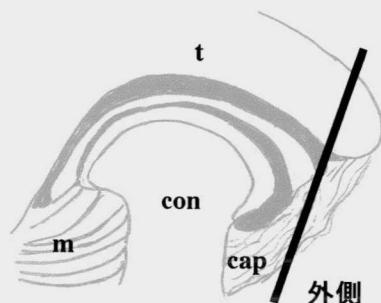


図 8

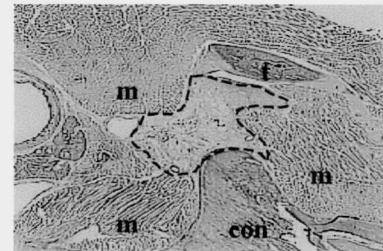
実験群 1  
実験群 2  
実験群 3



# 図 9



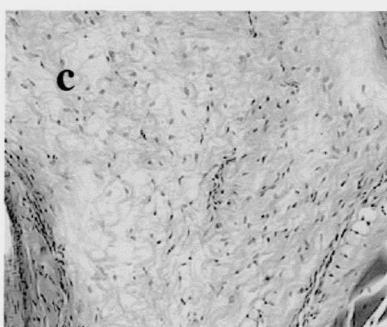
a



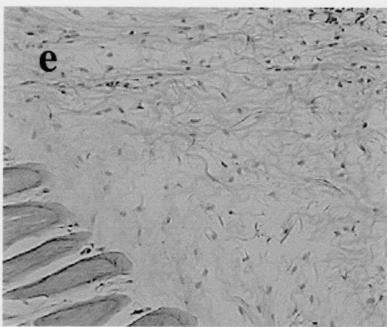
b

実験群 1

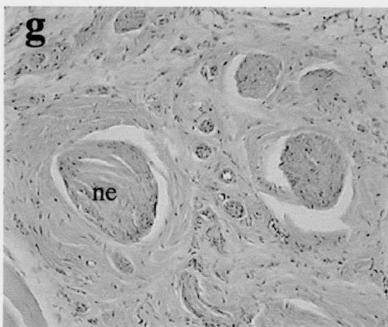
2週



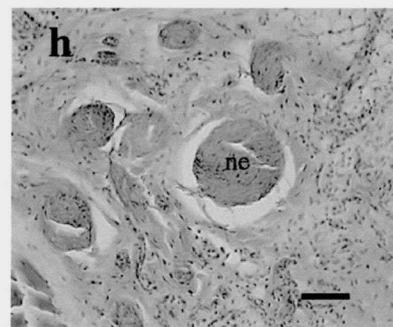
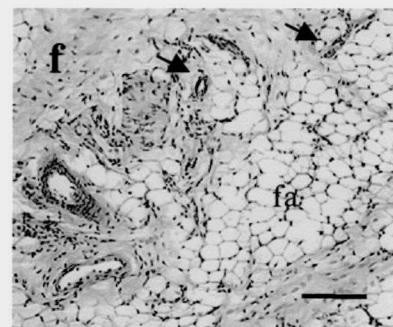
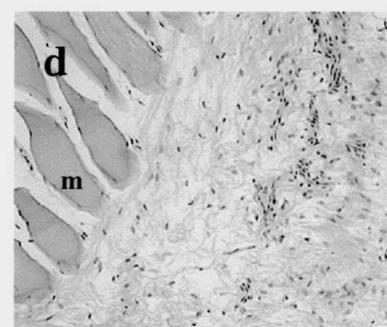
6週



6週



実験群 3

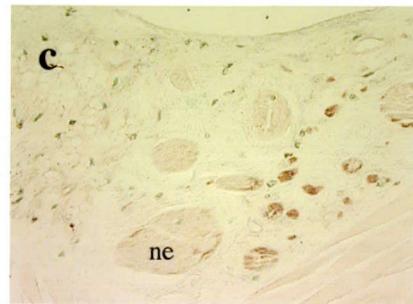


実験群 1

PGP 9.5



SP



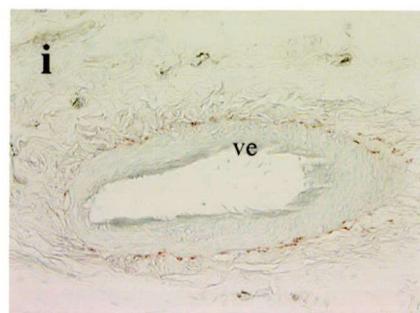
CGRP



NPY



VIP



実験群 3

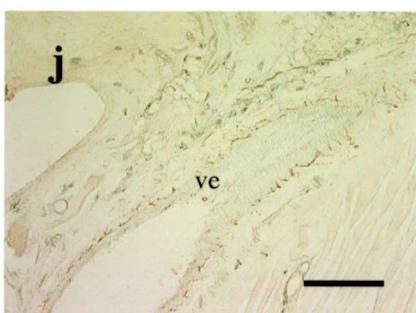
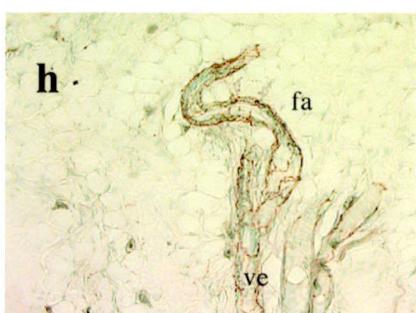
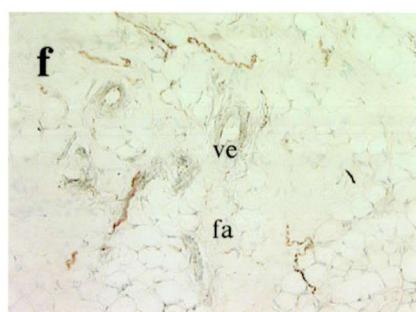
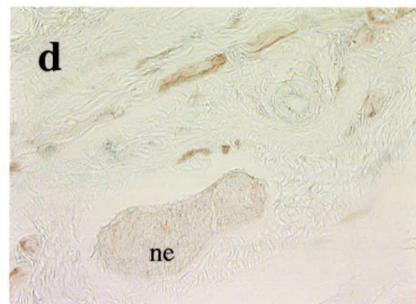


表1 関節包における神経特異蛋白と各種神経ペプチドの発現

		PGP9.5	SP	CGRP	NPY	VIP
中央部	2週	実験群1	+	-	+	+
		実験群2	+	-	+	+
		実験群3	+	-	+	-
	4週	実験群1	+	-	+	+
		実験群2	+	-	+ (→)	+ (→)
		実験群3	+ (→)	-	+ (→)	+ (→)
	6週	実験群1	+	-	+	+
		実験群2	+	-	+ (→)	+ (→)
		実験群3	+ (→)	-	+ (→)	+ (→)
下部	2週	実験群1	+	+	+	+
		実験群2	+	+	+	+
		実験群3	+	+	+	+
	4週	実験群1	+	+	+	+
		実験群2	+	+	+ (→)	+ (→)
		実験群3	+ (→)	+	+ (→)	+ (→)
	6週	実験群1	+	+	+	+
		実験群2	+	+	+ (→)	+ (→)
		実験群3	+ (→)	+	+ (→)	+ (→)