



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	液状飼料飼育による成長期ラット顎関節軟骨に関する免疫組織化学的および微細形態学的研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	上北, 広樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11697号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58835
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Uekita_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 上 北 広 樹

学 位 論 文 題 名

液状飼料飼育による成長期ラット顎関節軟骨に関する免疫組織化学的および
微細形態学的研究

【目的】顎関節の健全な成長は、成長期における良好な咀嚼や食生活により誘導されるといわれているが、現代の食生活では柔らかい食品が好まれる傾向にあり、顎関節の成長に及ぼされる影響が懸念されている。このような背景から、成長期の動物にソフトフードを与える実験的研究が行われてきた。それらは形態計測学的手法を用いたものが多いが、顎関節軟骨の詳細な性状については明らかではない。そこで本研究では、成長期におけるソフトフード摂取が顎関節軟骨の性状や微細形態に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】Wistar 系雄性ラット 48 匹を 21 日齢で離乳させ、対照群（固形飼料）と実験群（液状飼料）に分け 1～8 週間飼育した。実験期間が終了したラットを灌流固定後、頭部を脱灰した。脱灰後、顎関節部を一塊として切り出し、通法に従ってパラフィンあるいは Epon812 に包埋した。パラフィンプロックから 4 μ m の前頭断連続切片を作製し、HE 染色、アルシアンブルー染色、Azan 染色、I, II, X 型コラーゲン免疫染色を行った。Epon ブロックより前頭断超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡で観察した。

【結果】下顎頭において、実験群の 2 週以降の軟骨層は対照群よりも菲薄であった。アルシアンブルーの染色性は、8 週の成熟細胞層で実験群の方が弱かったが、Azan 染色では大きな差は認めなかった。免疫染色に関しては、I 型コラーゲンでは 2 週以降の成熟細胞層と 4 週の肥大細胞層で、II 型コラーゲンでは全ての実験期間の成熟細胞層と 2, 4 週の肥大細胞層で、X 型コラーゲンでは全ての実験期間の肥大細胞層でそれぞれ対照群よりも実験群の方が弱い反応であった。電顕的には、対照群の成熟細胞層において 1～4 週では線維間基質とコラーゲン細線維が豊富に観察された。肥大細胞層では、1～2 週で様々な方向に配列している細線維がみられ、経時的にその密度が増し、4 週以降、規則的な配列を示すようになった。一方、実験群ではいずれの期間においても成熟細胞層と肥大細胞層の細線維は対照群よりも少なく、線維間を拡大して確認しても細線維はわずかであり線維間基質が観察された。

下顎窩において、対照群と比較して実験群の軟骨層は 1～4 週で菲薄となり、アルシアンブルー陽性を示す範囲は狭く、染色性も低下していた。Azan 染色では、1, 2 週の成熟細胞層と肥大細胞層で対照群より強く染色された。免疫染色に関しては、I 型コラーゲンでは 2 週の成熟細胞層と肥大細胞層で、II 型コラーゲンでは 1～4 週の成熟細胞層と 1, 2 週の肥大細胞層で、X 型コラーゲンでは 2 週の肥大細胞層において、対照群では陽性反応が認められるが、実験群では弱陽性あるいは陰性であった。電顕的には、対照群における 1, 2 週の成熟細胞層の細胞は典型的な軟骨細胞の形態を示していた。4 週ではさらに、細胞質が暗く細胞内小器官が発達した骨細胞様の細胞が見られ、8 週では同様の細胞がわずかに認められた。実験群では、1 週の成熟細胞層の細胞の多くが骨細胞様の形態を示し、2, 4 週になるとその数は増加していた。軟骨基質に関しては、対照群の 1, 2 週の成熟細胞層では細線維と線維間基質が明瞭にみられ、肥大細胞層へ向かうにつれ細線維の量が増えていった。経時的にコラーゲン線維束が増え、8 週では線維間基質はほとんど認められなくなった。実験群の 1 週では、成熟細胞層において、基質中にコラーゲン線維束が認められ、線維間基質を拡大するとわずかな細線維しか観察されなかった。肥大細胞層では線維間基質は少なくコラーゲン線維束が観察された。2 週以降になると、基質のほとんどがコラーゲン線維束であった。

【考察】本研究では、I 型、II 型、X 型コラーゲンの減少が確認された。また、電顕的にもコラーゲン細線維の減少が観察された。このような結果は成長期のソフトフード摂取が顎関節の大きさだけでなく、軟骨の性状にも好ましくない影響を与えることを示している。また、下顎窩ではそれに加え早期に軟骨細胞の形態変化も認められた。微細形態的特徴からこれらの細胞は骨細胞様細胞と考えられ、下顎窩の成長が早期に停止することを示している。このような顎関節軟骨の質的变化はどのようにして起こるのかは、本研究の結果のみでは明らかではない。しかし、メカニカルストレスによりコラーゲン合成が亢進する、ソフトフード飼育下の顎関節軟骨ではコラーゲン mRNA 発現が低下する、などの過去の報告を考え合わせるとソフトフード摂取による顎関節軟骨の質的变化はメカニカルストレスの低下に起因していると考えられるであろう。ソフトフード摂取が顎関節の大きさに与える影響は飼育開始後 4 週以降と報告されている。本研究では軟骨の変化はさらに早くに認められた。これには 2 つの要因が考えられる。1 つは、軟骨細胞数の減少である。ソフトフード摂取動物では、増殖層の細胞増殖活性が早期に低下することが知られており、基質コラーゲンを分泌する軟骨細胞数の減少が短期間で起こっていると思われる。もう一つの要因は軟骨細胞の分泌機能低下である。これを直接的に示している報告はないが、軟骨細胞にメカニカルストレスを加える *in vitro* の実験によると、実験開始後数時間でコラーゲン mRNA 発現の亢進が起こる。このことから、軟骨細胞のメカニカル

ストレスに対する反応は迅速であると考えられ、メカニカルストレス低下に対しても素早く反応し、分泌機能が低下したのではないかと思われる。両群間における顎関節軟骨の性状の違いは後期では小さくなっていた。これについては以下のように考えられる。一般的にラット顎関節は 50 日齢頃で成熟期に達するとされている。したがって、成長初期の対照群の軟骨では細胞増殖や基質合成など盛んな成長が行われているが、顎関節の成熟期に近づくと対照群でも成長の程度が緩やかになる。このようなことより両群間の軟骨性状の違いは早期におけるものよりも小さくなっていったと考えられる。

【結論】本研究の結論として、成長期におけるソフトフード摂取はラット顎関節軟骨のコラーゲン線維の種類や量および軟骨細胞の微細形態などに影響を与えることが明らかとなり、また、このような影響はソフトフード摂取開始後比較的早期に起こっていることも明らかとなった。