



Title	成長期におけるソフトフード摂取がラット顎関節に与える影響
Author(s)	加藤, 剛士
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11246号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11246
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60638
Type	doctoral thesis
File Information	Tsuyoshi_Kato.pdf



博士論文

成長期におけるソフトフード摂取が
ラット顎関節に与える影響

平成 26 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

加藤 剛 士

抄録:最近では軟らかい食事を好んで摂取している現代人が増加している. このような食習慣が咀嚼筋や顔面骨格に与える影響を調べるため, 実験的研究が行われてきた. 本研究では, 成長期ラットにソフトフードを継続的に摂取させた時, 顎関節にどのような影響が及ぶのかを形態学的, 免疫組織化学的に明らかにすることを目的とした. 実験にはWistar系雄性ラット24匹を用い, 21日齢で離乳させた. 離乳後, 液状食(実験群)あるいは固形食(対照群)を与え, 1~8週間飼育した. 飼育期間が終了した動物は5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を投与した後, 4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し, 頭部を摘出した. 以後通法に従って前頭断連続切片を作製した. 切片にはヘマトキシリン・エオジン染色を施し, 顎関節部の3次元的大きさ, および軟骨層の厚さについて組織計量を行った. また一部の切片にはBrdU免疫染色を施し, 顎関節部の細胞増殖活性を測定した. 組織計量学的には, 実験群の下顎窩相当部頬骨突起は4週(高径)と8週(幅径、高径)で, 下顎頭は4週(幅径)と8週(幅径、長径)で対照群よりも小さかった. 軟骨層の厚さに関しては, 下顎窩では4週のarticular zone(AZ)とhypertrophic zone(HZ), 8週のAZとintermediate zone(IZ)で, 下顎頭では4週の3層全てと8週のAZで実験群の方が菲薄であった. 免疫組織化学的には, BrdU陽性細胞のほとんどはIZに認められた. BrdU陽性率では対照群より実験群が概して低く, 下顎窩では4週, 下顎頭では1週と4週で有意差が認められた. 以上の結果から成長期におけるソフトフード摂取はラット顎関節の成長を阻害することが明らかとなり, これにはIZ中の細胞増殖活性低下が関連していると考えられた.

キーワード: 液状食, 顎関節, 成長期, 組織計量, BrdU

緒言

最近では軟らかい食事を好んで摂取している人が増加している^{1,2)}。このような食習慣が幼少期から大人になるまで長期間続くことで、顎骨や咀嚼筋などへの影響があると懸念されている。この影響を検討する目的で、普通固形食とは異なり、咀嚼運動をあまり必要としないソフトフード、すなわち粉末食や液状食を成長期に摂取させた動物実験が数多く行われてきた。それらの報告によると下顎骨では、下顎枝へ添加する骨量の減少³⁾や下顎頭における石灰化量の減少^{4,5)}が認められる。顔面骨では全ての縫合部で縫合間の幅が狭くなり⁶⁾、咀嚼筋付着部での骨成長が抑制され⁷⁾、脳頭蓋が高くなることも報告されている⁸⁾。ソフトフードを継続的に摂取させた後の咀嚼筋では、筋線維の種類構成割合の変化が組織学的に観察されている^{9,10)}。また、筋電図を使用した研究によると咀嚼中の筋活動量が増加するが^{11,12)}、咬筋の最大緊張時の筋収縮力は減少するという¹³⁾。咀嚼サイクルへの影響として、開口量が小さく、前後的運動量が大きくなり¹¹⁾、1回の咀嚼間隔は長くなる¹²⁾ことも報告されている。以上のように成長期におけるソフトフード摂取は顎骨や咀嚼筋に好ましくない影響を与えることが次第に明らかとなってきた。

顎関節は、側頭骨と下顎骨を連結する関節であり、左右の関節が調和して運動すること、下顎窩と下顎頭の間に関節円板が存在していることなどの機能的、構造的特徴を有している。顎関節は口腔領域において極めて重要な役割を担っていることから、成長期におけるソフトフード摂取が顎関節に与える影響を検討した研究も少なくない。下顎頭の大きさについて検索した研究によるとソフトフードを摂取した実験群は固形食を摂取した対照群より小さくなるという。しかしこれらの研究は幅径、高径、長径を肉眼的に測定した研究¹⁴⁻¹⁶⁾や

Micro-CT を使用して体積を測定した研究¹⁷⁾であり、組織計量学的に 3 次元の大きさを詳細に測定した研究はない。下顎頭の軟骨層の厚さを検索した研究では、対照群より薄くなると報告しているものが多い^{3, 14, 16, 17)}が、逆に厚くなると報告している研究^{15, 18)}もある。また、下顎頭軟骨の細胞増殖活性を調査した研究では、対照群よりも増殖活性が高くなるとした報告¹⁹⁾がある一方で、低くなると述べている研究^{17, 20)}があり、一定の見解には至っていない部分もみられる。さらに、顎関節の他の構成要素である関節円板や下顎窩に関しては、下顎頭で行われているような研究報告はみられない。

そこで本研究では、成長期におけるソフトフード摂取がラット顎関節、特に下顎窩、下顎頭、関節円板に与える影響を明らかにすることを目的とした。この目的のために、離乳直後より液状食を摂取させたラットの顎関節を組織計量学的に検索するとともに、細胞増殖活性について免疫組織化学的に検索した。

材料と方法

1. 動物実験

本研究には生後 21 日齢で離乳させた Wistar 系雄性ラット 24 匹を用い、対照群と実験群に分けた。離乳直後より対照群の動物には固形食としてラボ MR スタンダード（日本農産工業製）を、実験群の動物にはこの飼料を粉末状にしたものと水道水を重量比 1:2 の割合で混ぜ合わせた液状食を与えた。給水は自動給水とした。両群とも 1 週, 4 週, 8 週の 3 期間に分けて飼育し、各群各期間の動物数は 4 匹とした。実験期間中は毎日実験動物の体重を測定するとともに体調を目視にて観察した。飼育期間が終了した動物には 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (2.5mg/体重 100g)を腹腔内投与し、1 時間後にペントバルビタールによる全身麻酔下にて灌流固定を 4%パラホルムアルデヒド溶液で行った。次に顎関節を含む頭部を切り出し、同液にて 12 時間浸漬固定および 10%EDTA 溶液 (pH7.4)にて脱灰し、その後通法に従ってパラフィン包埋した。パラフィンブロックより顎関節部の 4 μ m 前頭断連続切片を作製した。切片は、左右両側の外耳道を通り、咬合平面に垂直な面で作製した。その際には、下顎頭が出現するまで、左右の上顎洞の大きさを基準として切片に傾きやずれがないかを常に確認しながら薄切を行なった。

本実験は北海道大学動物実験委員会の承認を受け、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規約（平成 19 年 4 月 1 日海大達 61 号）」に基づき行った。

2. 組織計量

パラフィン切片にはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し光学顕微鏡にて組織学的に観察するとともに、連続切片の中から下顎頭幅径が最大となる

切片を選び顎関節の構造について組織計量した。計量を行った顎関節は右側とし、以下の項目について測定した（図 1a）。下顎窩相当部の頬骨突起幅径（FW: 側頭骨内側縁から垂線を引き、頬骨突起外側端までの最大となる距離）、下顎窩相当部の頬骨突起高径（FH: FW 中央における頬骨突起の厚さ）、下顎頭幅径（CW: 下顎頭の左右間最大幅径）、下顎頭高径（CH: 下顎頭最上部から CW までの距離）、関節円板厚さ（T: 関節円板最薄部の距離）、下顎頭長径は、 $4\mu\text{m} \times$ （連続切片の下顎頭軟骨出現から消失までの切片の枚数）とした。また、下顎窩（図 1b）と下顎頭（図 1c）の軟骨各層の厚さについても測定した。軟骨各層の分類は Blackwood の分類²¹⁾に従い、articular zone (AZ), intermediate zone (IZ), hypertrophic zone (HZ) とした。各層の計測位置は、下顎窩と下顎頭の高径を測定した位置とした。

3. BrdU 免疫染色

各動物の下顎頭を前方、中央、後方の 3 つに分け、それぞれの部分から任意の切片 1 枚を選んだ。切片を脱パラフィンし、内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.4% 過酸化水素水/メタノールを反応させた。抗原賦活化処理として 37°C で 0.1% トリプシンを 20 分、3N/HCl を 10 分反応させた。前処理後、一次抗体として 50 倍希釈抗 BrdU-マウスモノクローナル抗体（Bu20a, DakoCytomation, Denmark）を 120 分、二次抗体として 100 倍希釈ビオチン標識抗マウス-ウサギポリクローナル抗体（DakoCytomation）を 60 分、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン・ビオチン複合体（DakoCytomation）を 30 分、順に反応させた。陽性部位を 3,3'-ジアミノベンチジン・四塩酸塩で茶褐色に呈色後、ヘマトキシリンにて核染色を行った。免疫染色した切片（各動物につき 3 枚）に対して

光学顕微鏡下で、下顎窩の IZ, 下顎頭の IZ, 関節円板の全細胞数と陽性細胞数をカウントし, BrdU 陽性率を算出した.

4. 統計処理

得られた体重の値, 各測定値および BrdU 陽性率については対照群と実験群の間において有意差検定を行った. 検定法には Mann-Whitney U 検定を用い, 有意水準は 5%とした.

結果

1. 体重変化

ラットの体重は対照群，実験群とも経時的に増加していったが，いずれの日においても両群間には有意差は見られなかった（図 2）．実験期間中に下痢など体調不良症状は認められず，ラットの全身状態は良好であった．また，切歯が伸長し，咬合異常が生じることはなかった．

2. 組織計量学的検索

下顎窩相当部頬骨突起の幅径，高径はともに1週から4週にかけて増加したが，4週から8週で大きな違いは認められなかった．対照群と実験群を比べると，1週ではいずれも有意差は認められなかったが，4週では高径で実験群の方が有意に小さい値を示し，さらに8週で幅径においても有意に小さい値を示した（図 3a, b）．下顎頭の3次元的な大きさに関しては，下顎窩と同様に1週から4週の間で成長が見られたが，4週から8週の間では大きな変化は認められなかった．両群間で比べると，1週では幅径，高径，長径，全てで有意差は認められなかったが，4週では幅径で実験群の方が有意に小さい値を示し，さらに8週では長径においても実験群の方が有意に小さい値を示していた（図 3c-e）．関節円板に関しては両群とも経時的に厚みを増していたが，いずれの週数においても有意差は認められなかった（図 3f）．

下顎窩軟骨の組織計量によると，1週では全ての層の厚さに両群間で有意差は認められなかった．しかし，4週では対照群のAZとHZ（図 4a）に比べて実験群では光顕的に薄く観察され（図 4b），統計学的にも有意差が認められた（図 3g, i）．8週になるとHZは両群ともほとんど観察されなくなった．AZとIZでは

対照群に比べて実験群の方が有意に小さい値を示していた（図 3g-i）．一方，下顎頭軟骨では 1 週の全ての層の厚さにおいて両群間に有意差は認められなかったが，4 週においては全ての層で実験群の方が有意に小さい値を示した（図 3j-l）．8 週では AZ においてのみ実験群の方が有意に小さく薄くなっていた（図 3j, 4c, 4d）．

3. 免疫組織化学的検索

下顎窩、下顎頭の軟骨層において BrdU 陽性を示す細胞は IZ に観察され，AZ と HZ にはほとんど BrdU 陽性細胞は見られなかった（図 5）．BrdU 陽性率は下顎窩，下顎頭，関節円板ともに経時的に低くなっていった（図 6）．統計学的には，下顎窩では 4 週（図 5a, b, 6a） ，下顎頭では 1 週（図 5c, d） と 4 週で実験群の方が有意に小さい値を示していた（図 6b）．関節円板では各週の両群間に有意差は認められなかった（図 6c）．

考察

ソフトフードの顎関節への影響を調べるため、飼料として液状食が実験的研究で用いられてきた。液状食を作製する際に粉末飼料と水の比率には1:4^{5, 12)}、2:5^{7, 8, 13, 22)}とあるが、これらの研究では実験群（液状食群）と対照群（固形食群）との間に体重差は認められず、実験群の動物に体調不良を示す症状は見られていない。本研究では粉末飼料と水の重量比率を1:2として実験を行ったが、両群間でいずれの日数においても体重で有意差は認められなかった。このようなことは本研究よりも長期間ソフトフードで飼育した実験^{5, 23)}においても報告されている。従って液状食飼育が全身に与える影響はほとんどないと考えられ、本実験において観察される顎関節の変化はラットの全身状態の変化によるものではなく液状食の直接的な影響によるものと考えられる。

IZは軟骨の成長に重要な層で、細胞が密集し、有糸分裂が頻繁に発生している部位である²¹⁾。本研究では、このIZの増殖活性が実験群の下顎窩および下顎頭の両方で飼育期間4週以内において低下しているものが認められた。この結果は、粉末食投与ラットを48時間まで検索し、下顎頭IZの増殖活性が低下したと述べたPirttiniemiら²⁰⁾の報告を支持するものである。これまで、IZにおける細胞増殖活性はメカニカルストレスによって高まることがin vitro²⁴⁻²⁶⁾の実験を中心に示されている。また、in vivoの実験では頭蓋底の軟骨²⁷⁾においても同様のことが報告されている。以上のことを考え合わせると、本研究では液状食飼育により咀嚼刺激が低下し、それによってIZの増殖活性低下が引き起こされたと思われる。一方、Satoら¹⁹⁾は固形食飼育ラットでは下顎頭IZの増殖活性は経時的に減少したのに対して粉末食飼育では減少しなかったと述べており、本研究の結果と異なっている。その違いがなぜ生じたのかについては不明であるが、

これには増殖活性の計測方法の相違が関係しているかもしれない。Sato ら¹⁹⁾は単位面積当たりの免疫陽性細胞数だけをカウントしているが、各切片によりカウント対象となる細胞数は常に同じであるとは限らない。従って、陽性細胞数のみをカウントすると増殖活性を正しく把握できない恐れがあると思われる。そこで本研究では陽性、陰性両細胞全てをカウントし、陽性率として算出した。

本研究で用いた Blackwood の分類では軟骨層を 3 つに区分している。このうち AZ は主として線維性結合組織からなっている層である^{21, 28)}。本研究では実験群の下顎窩および下顎頭の AZ はともに 4 週以降で対照群よりも薄くなっていた。これは長期間にわたる液状食摂取のため軟骨表面への咀嚼刺激が低下し、軟骨を保護する必要性が低くなったため、AZ が薄くなったのではないかと考えられる。なぜならば AZ は独自の細胞代謝能を持っていて、軟骨表面を保護する役割があるとされているからである²¹⁾。本研究では IZ と HZ に関しても 4 週あるいは 8 週で実験群が薄くなっている場合が多かった。IZ の細胞は増殖した後、軟骨芽細胞や軟骨細胞に分化して HZ へと移行する²¹⁾。このようなことから IZ と HZ の菲薄化は IZ の増殖活性低下によってもたらされたと考えられる。この考えは IZ の増殖活性低下より遅れて IZ と HZ の菲薄化が起こっていることとも符合していると思われる。また IZ の増殖活性に変化がみられた後、IZ 層の厚さに変化がみられる時期は、下顎頭に比べて下顎窩で遅れていた。本研究ではこの理由は明確ではないが、下顎頭の方が咀嚼刺激に対する反応が早いことによるのかもしれない。なぜならば、下顎窩では成長すると軟骨層が消失するのに対して、下顎頭では生涯軟骨層が残り、咀嚼刺激に対して柔軟に対応すると考えられている²⁹⁾からである。しかし、この点を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

これまでのソフトフードを摂取させた動物実験^{14-17, 30, 31)}では、いずれにおいても実験群の方で下顎頭の大きさが小さくなっており、本研究の結果はこれらと一致した。一方、下顎窩相当部の骨の大きさについてはこれまで研究報告が無く、本研究によって実験群の方で小さくなるのが初めて明らかとなった。また、実験群の下顎頭と下顎窩の大きさが小さかったのは飼育 4~8 週目であり、両部分の HZ の厚さが薄くなった時期 (4 週目) よりも遅れていた。このことは、両部分の骨の成長において HZ の軟骨細胞が一定期間後、骨へ置換されるという過程²⁾に要する時間を反映したものであると考えられる。これまで述べてきた下顎窩と下顎頭に関する考察を総合すると、ソフトフード摂取により両部分に加わる咀嚼刺激が低下し、IZ の増殖活性が低下する。これは HZ の発達を抑制し、その結果、下顎窩と下顎頭の成長が阻害されたと考えられる。これに関する詳細なメカニズムは、本研究のみならず過去の研究においても明らかではない。しかしながら *in vitro* の実験で、軟骨細胞に圧力を加えると **extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK 1/2)** のリン酸化が生じ **ERK 1/2** 経路が活性化して、これが軟骨細胞の増殖を引き起こすとした報告²⁶⁾がある。本研究において実験群の IZ の増殖活性が低下したのは、咀嚼刺激低下により、この経路の活性が低下したことによるのかもしれない。

関節円板に関しては、厚さおよび細胞増殖活性では対照群と実験群の間に有意差は認められなかった。このことは、下顎窩や下顎頭とは異なり、関節円板は成長期におけるソフトフード摂取の影響を受けないことを意味している。本研究とは逆に顎関節に継続的な負荷をかけた研究によると関節円板のコラーゲン線維の減少が起こり、負荷を除去すると元の状態へ回復するという³²⁾。これらを合わせて考えると、関節円板は強い咀嚼刺激にのみ影響を受け、適度ないし

弱い咀嚼刺激には反応しないのかもしれない.

結論

本研究では、液状食で4週間以上飼育されたラットの下顎窩相当部頬骨突起と下顎頭は、固形食で飼育されたラットよりも有意に小さかった。このような動物の下顎窩、および下顎頭では対照群に比べて菲薄化した軟骨層が認められた。一方、実験群の下顎窩および下顎頭IZのBrdU陽性率は、4週以内において有意に小さい値を示していた。

以上の結果より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の発達を阻害することが明らかとなり、これにはIZの細胞増殖活性低下が深く関与していることが示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり数々のご支援、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科リハビリ補綴学教室 大畑 昇 名誉教授と教室員各位、また北海道大学大学院歯学研究科口腔機能解剖学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

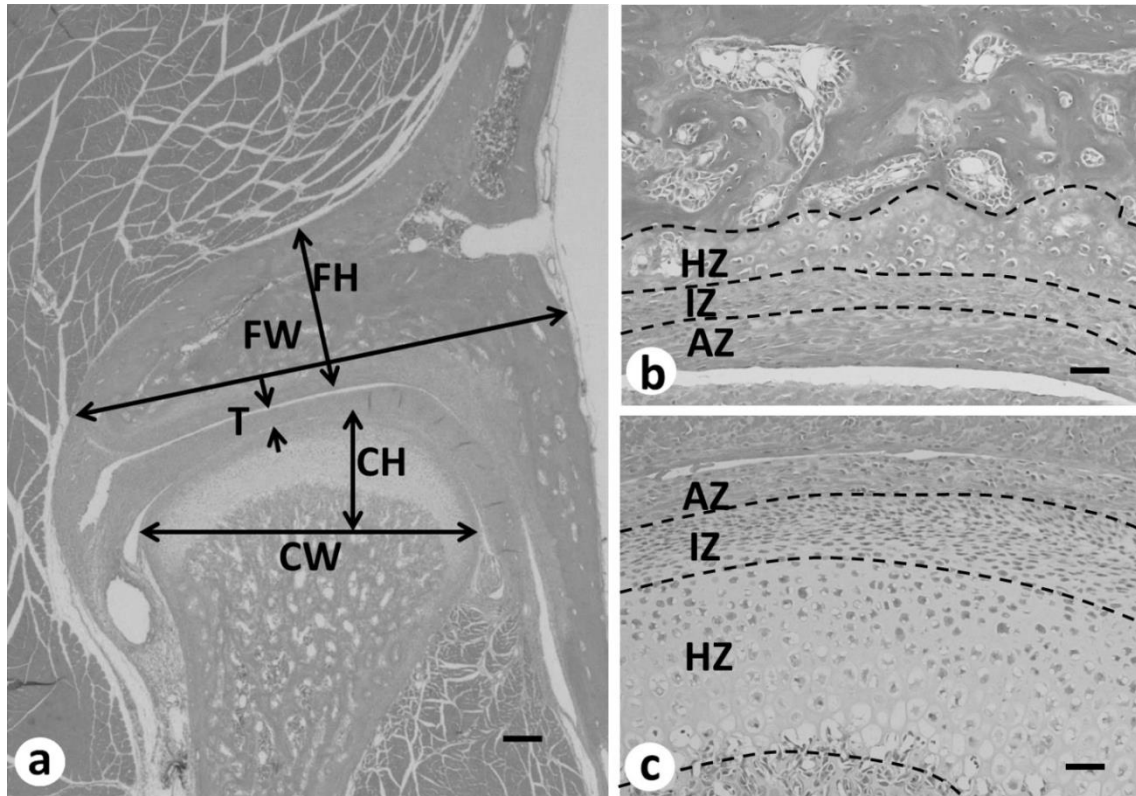


図1 顎関節の組織計量方法

(a) 顎関節

FW: 下顎窩相当部頬骨突起幅径, FH: 下顎窩相当部頬骨突起高径, CW: 下顎頭幅径, CH: 下顎頭高径, T: 関節円板の厚さ, スケールバー=250 μ m

(b)下顎窩, (c)下顎頭の軟骨各層の測定

AZ: articular zone, IZ: intermediate zone, HZ: hypertrophic zone

スケールバー=50 μ m

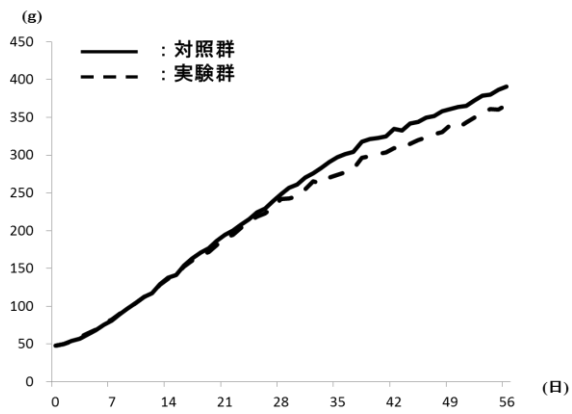


図2 ラットの体重変化

—— : 対照群 - - - : 実験群

体重は経時的に両群とも増加した. いずれの日数においても両群間では体重に有意差は見られなかった. ($p < 0.05$)

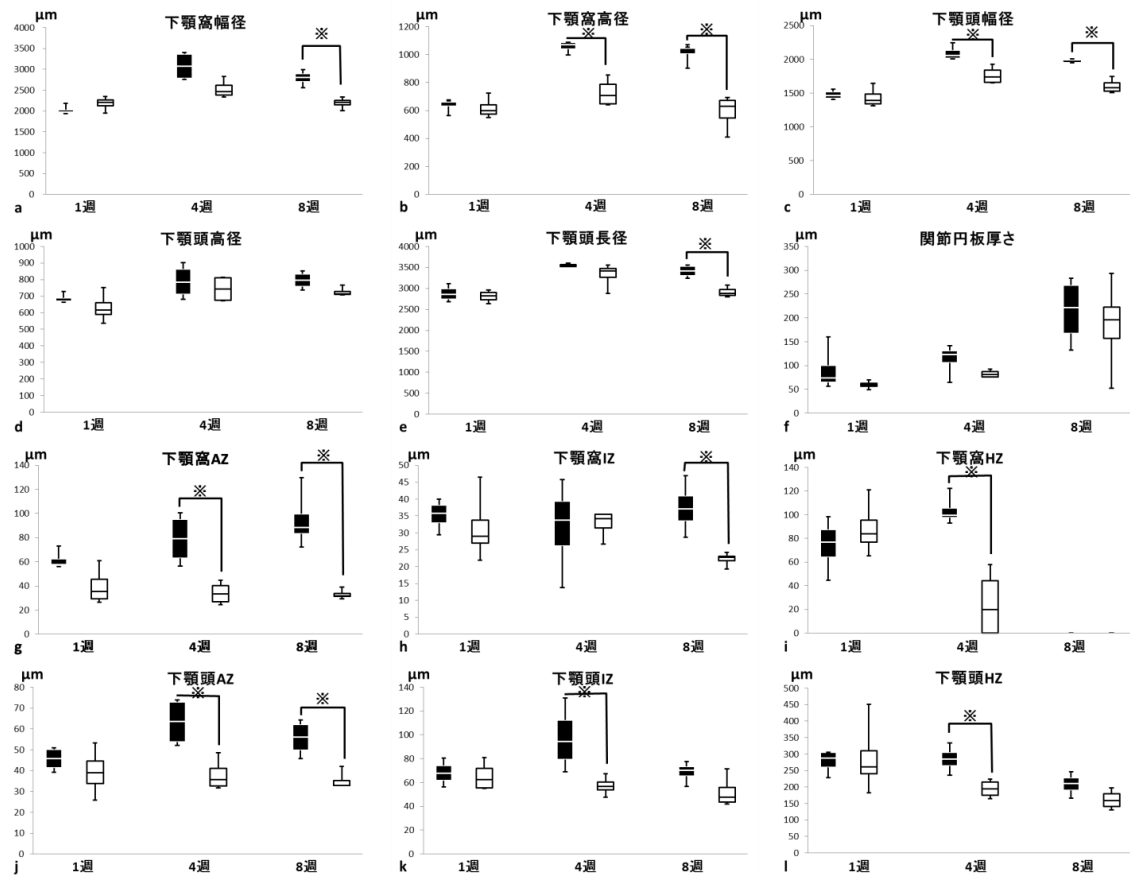


図3 顎関節の組織計量

(a)下顎窩幅径, (b)下顎窩高径, (c)下顎頭幅径, (d)下顎頭高径, (e)下顎頭長径, (f) 関節円板厚さ, (g)下顎窩AZ, (h)下顎窩IZ, (i)下顎窩HZ, (j)下顎頭AZ, (k)下顎頭IZ, (l)下顎頭HZ

■ : 対照群 □ : 実験群

※ : 有意差有 ($p < 0.05$)

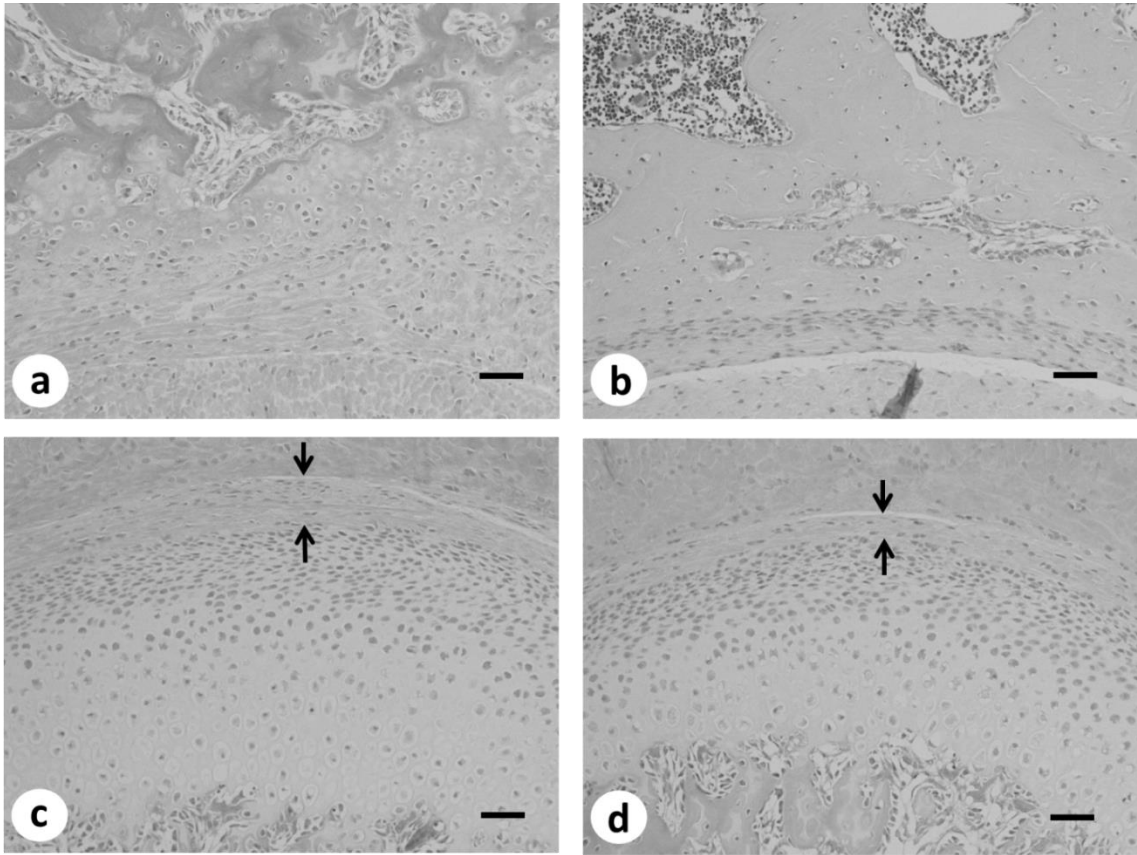


図4 HE染色像

(a)4週対照群の下顎窩, (b)4週実験群の下顎窩, (c)8週対照群の下顎頭, (d)8週実験群の下顎頭

4週の下顎窩では対照群(a)において厚いHZが認められるのに対して, 実験群(b)ではほとんど見られない. 8週の下顎頭では対照群(c)より実験群(d)の方でAZ(→ ←)が薄い. スケールバー=50 μ m

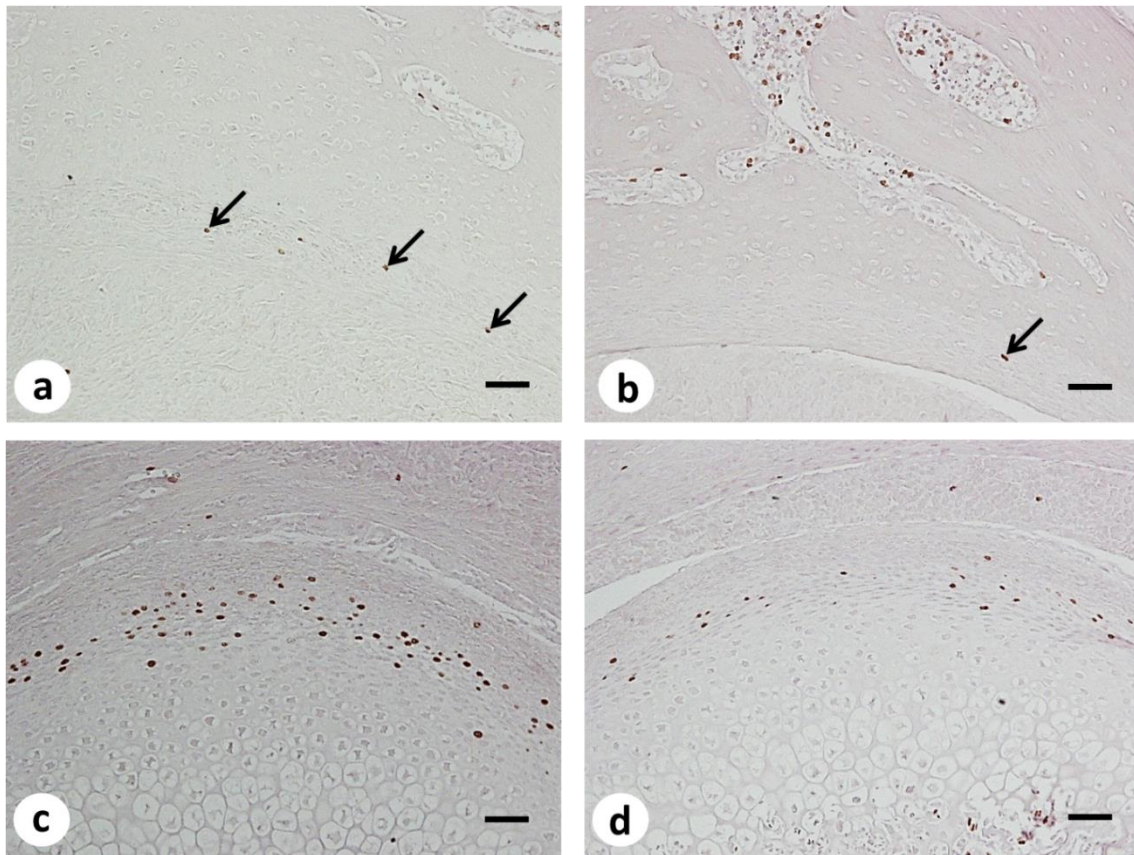


図5 BrdU 免疫染色像

(a)4週対照群の下顎窩, (b)4週実験群の下顎窩, (c)1週対照群の下顎頭, (d)1週実験群の下顎頭

BrdU 陽性細胞 (矢印) はどちらの群においても, そのほとんどが IZ に認められる. 4週の下顎窩では対照群において BrdU 陽性細胞が散見される(a)のに対して, 実験群では極めて少ない(b). 1週の下顎頭では対照群で BrdU 陽性細胞が多数認められる(c)のに対して, 実験群では少ない(d). スケールバー=50 μ m

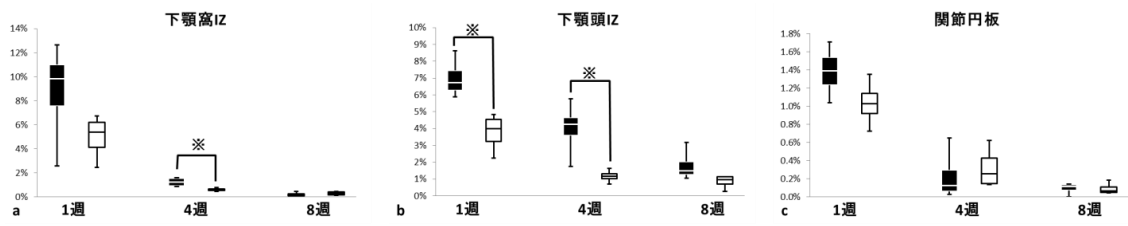


図6 BrdU 陽性率

(a)下顎窩 IZ, (b)下顎頭 IZ, (c)関節円板

■ : 対照群 □ : 実験群

※ : 有意差有 ($p < 0.05$)

参考文献

- 1) 内藤真理子, 川原玲子, 井手口博, 上田和茂, 鶴田靖, 吉永久秋, 内藤徹, 木村光孝: 学童の嗜好を踏まえた食生活指導 (第3報) 食習慣に関する調査. 小児歯誌 35 : 625-630, 1997.
- 2) 宮井信行, 白石龍生, 後藤英二: 児童・生徒の摂食および咀嚼習慣に関する調査研究. 大阪教大紀Ⅲ自然科・応用科 42 : 61-68, 1993.
- 3) Yamada K, Kimmel DB: The effect of dietary consistency on bone mass and turnover in the growing rat mandible. Arch Oral Biol 36 : 129-138, 1991.
- 4) Dias GJ, Cook RB, Mirhosseini M: Influence of food consistency on growth and morphology of the mandibular condyle. Clin Anat 24 : 590-598, 2011.
- 5) Tanaka E, Sano R, Kawai N, Langenbach GEJ, Brugman P, Tanne K, van Eijden TMGJ: Effect of food consistency on the degree of mineralization in the rat mandible. Ann Biomed Eng 35 : 1617-1621, 2007.
- 6) Katsaros C, Kiliaridis S, Berg R: Functional influence on sutural growth. A morphometric study in the anterior facial skeleton of the growing rat. Eur J Orthod 16 : 353-360, 1994.
- 7) Katsaros C, Berg R, Kiliaridis S: Influence of masticatory muscle function on transverse skull dimensions in the growing rat. J Orofac Orthop 63 : 5-13, 2002.
- 8) Kiliaridis S, Engstrom C, Thilander B: The relationship between

- masticatory function and craniofacial morphology: I. A cephalometric longitudinal analysis in the growing rat fed a soft diet. *Eur J Orthod* 7 : 273-283, 1985.
- 9) Kiliaridis S, Engstrom C, Thilander B: Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet. *Arch Oral Biol* 33 : 187-193, 1988.
 - 10) Kitagawa Y, Mitera K, Ogasawara T, Nojyo Y, Miyauchi K, Sano K: Alterations in enzyme histochemical characteristics of the masseter muscle caused by long-term soft diet in growing rabbits. *Oral Dis* 10 : 271-276, 2004.
 - 11) Yamada M, Koga Y, Okayasu I, Sanefuji K, Yamada Y, Oi K, Yoshida N: Influence of soft diet feeding on development of masticatory function. *J Jpn Soc Stomatognath Funct* 12 : 118-125, 2006.
 - 12) Liu ZJ, Ikeda K, Harada S, Kasahara Y, Ito G: Functional properties of jaw and tongue muscles in rats fed a liquid diet after being weaned. *J Dent Res* 77 : 366-376, 1998.
 - 13) Kiliaridis S, Shyu BC: Isometric muscle tension generated by masseter stimulation after prolonged alteration of the consistency of the diet fed to growing rats. *Arch Oral Biol* 33 : 467-472, 1988.
 - 14) Bouvier M, Hylander WL: The effect of dietary consistency on gross and histologic morphology in the craniofacial region of young rats. *Am J Anat* 170 : 117-126, 1984.
 - 15) Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H, Topouzelis N, Zafiriadis A:

- Effect of low masticatory function on condylar growth: A morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 116 : 121-125, 1999.
- 16) Vaid LK, Pradhan P, Chakrabarti S: Effect of dietary consistency on the growth of the condylar cartilage of the mandible in rats. *J Anat. Soc. India* 51 : 229-231, 2002.
 - 17) Chen J, Sobue T, Utreja A, Kalajzic Z, Xu M, Kilts T, Young M, Wadhwa S: Sex differences in chondrocyte maturation in the mandibular condyle from a decreased occlusal loading model. *Calcif Tissue Int* 89 : 123-129, 2011.
 - 18) Kantomaa T, Tuominen M, Pirttiniemi P: Effect of mechanical forces on chondrocyte maturation and differentiation in the mandibular condyle of the rat. *J Dent Res* 73 : 1150-1156, 1994.
 - 19) Sato I, Uneno R, Miwa Y, Sunohara M: Distribution of tenascin-C and tenascin-X, apoptotic and proliferating cells in postnatal soft-diet rat temporomandibular joint (TMJ). *Ann Anat* 188 : 127-136, 2006.
 - 20) Pirttiniemi P, Kantomaa T, Sorsa T: Effect of decreased loading on the metabolic activity of the mandibular condylar cartilage in the rat. *Eur J Orthod* 26 : 1-5, 2004.
 - 21) Blackwood HJJ: Growth of the mandibular condyle of the rat studied with tritiated thymidine. *Arch Oral Biol* 11 : 493-496, 1966.
 - 22) Bresin A, Kiliaridis S, Strid K-G: Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *Eur J Oral*

- Sci 107 : 35-44, 1999.
- 23) 酒井秀彰: 成長期ラットにおける各種硬度の飼料摂取による咀嚼筋の組織学的変化および下顎骨の形態計測学的変化. 日矯歯誌 51 : 126-141, 1992.
- 24) Horizon H, Owan I, Kudoh H, Arakaki H, Kanaya F: Mechanical stress regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral bone formation. Ryukyu Med. J. 26 : 57-67, 2007.
- 25) Wang P-Y, Chow H-H, Lai J-Y, Liu H-L, Tsai W-B: Dynamic compression modulates chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis in chitosan/gelatin scaffolds. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 91B : 143-152, 2009.
- 26) Ryan JA, Eisner EA, DuRaine G, You Z, Reddi AH: Mechanical compression of articular cartilage induces chondrocyte proliferation and inhibits proteoglycan synthesis by activation of the ERK pathway: implications for tissue engineering and regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med 3 : 107-116, 2009.
- 27) Wang X, Mao JJ: Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses. J Dent Res 81 : 701-705, 2002.
- 28) Blackwood HJJ: Vascularization of the condylar cartilage of the human mandible. J Anat 99 : 551-563, 1965.
- 29) 城戸瑞穂, 田中輝男: 顎関節の構造, 脇田稔, 前田健康, 山下靖雄, 赤坂年隆, 口腔組織・発生学, 285-293, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2006.

- 30) Chen J, Sorensen KP, Gupta T, Kilts T, Young M, Wadhwa S: Altered functional loading causes differential effects in the subchondral bone and condylar cartilage in the temporomandibular joint from young mice. *Osteoarthritis Cartilage* 17 : 354-361, 2009.
- 31) Enomoto A, Watahiki J, Yamaguchi T, Irie T, Tachikawa T, Maki K: Effects of mastication on mandibular growth evaluated by microcomputed tomography. *Eur J Orthod* 32 : 66-70, 2010.
- 32) Magara J, Nozawa-Inoue K, Suzuki A, Kawano Y, Ono K, Nomura S, Maeda T: Alterations in intermediate filaments expression in disc cells from the rat temporomandibular joint following exposure to continuous compressive force. *J Anat* 220 : 612-621, 2012.

Effects of soft diet on temporomandibular joint of growing rats

Tsuyoshi Kato¹⁾, Shigeru Takahashi²⁾, Takanori Domon²⁾

¹⁾Department of Oral Rehabilitation, Division of Oral Function Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-8586 Japan (Chief: Lecturer. Yasuo Ueda)

²⁾Department of Oral Functional Anatomy, Division of Oral Function Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-8586 Japan (Chief: Prof. Takanori Domon)

ABSTRACT : Modern people tends to have soft food . Therefore experimental studies have been performed to examine unfavorable influences to growth of masticatory muscles and craniofacial bone induced by such a dietary habits. The aim of the present study was to clarify the effects of soft diet on the temporomandibular joint (TMJ) in growing rats using the histomorphometrical and immunohistochemical methods. Twenty-four male Wistar rats were weaned at age 21 days and were divided into control and experimental groups. Control rats were fed a solid food and experimental ones fed a liquid food from 1 to 8 weeks. After injection with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), the animals were perfused with 4% paraformaldehyde solution and the whole heads were removed. Serial coronal sections of TMJ were stained with Haematoxylin and Eosin or with

BrdU-immunohistochemistry. Three dimensions and the thickness of cartilage layer of the TMJ were measured using histological sections, and cell proliferation in the TMJ was examined using immunostained sections. The height and width of the zygomatic process of mandibular fossa in experimental group were smaller than in control group after 4 weeks. The width and length of the condyle of experimental animals were also smaller than those of controls after 4 weeks. In the mandibular fossa, articular zone (AZ) and hypertrophic zone (HZ) at 4 weeks and AZ and intermediate zone (IZ) at 8 weeks in the experimental groups were thinner than in the control. All zones at 4 weeks and AZ at 8 weeks of the condyle in the experimental group were also thinner. The labeling indices of BrdU in IZ of the mandibular fossa and of the condyle in the experimental groups were lower than in the controls at 4 weeks and at 1 and 4 weeks, respectively. These findings suggest that the soft food-intake inhibits the growth of the TMJ of rats, due to low proliferative activity of cells in IZ.

Key Words : Liquid food, Temporomandibular joint, Growth, Histomorphometry, BrdU