

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者	小熊 哲史
論文題目	高脂肪飼料摂取がマウスの変形性顎関節症の進行に与える影響について

## I. 緒言

変形性関節症(OA)は、慢性的かつ進行性の関節疾患であり、関節軟骨や軟骨下骨、または滑膜組織において退行性変化を引き起こすとされている。顎関節(TMJ)におけるOA、変形性顎関節症(TMJ OA)は、顎関節症の病態の一つに分類されており、顎関節の関節円板転位や退行性変化をみとめる。OAのリスク因子として、年齢、性別、肥満、糖尿病、食事、関節への負荷などが挙げられる。肥満は脂肪組織の過剰な増加がみられ、2型糖尿病の発症にも強く関係しているため、2型糖尿病とOAの両者において肥満は共通したリスク因子とされている。膝関節のような荷重関節においては、肥満による体重増加によって、関節への機械的負荷が増加することでOAが進行すると考えられていたが、手指関節のような体重負荷と関係の無い関節においても、肥満がOAの進行に関与していることが報告されてきた。また、過去の疫学的研究からも、糖尿病が独立したOA進行のリスク因子であることも報告されている。肥満と糖尿病がOA進行のリスク因子であるならば、他部位の非荷重関節OAと同様に、TMJ OA進行のリスク因子となる可能性が考えられるが、これまでの動物実験において、それぞれの関連について検討した報告はみられない。

本研究では、高脂肪飼料を摂取したC57BL/6Jマウスにたいし、外科的処置によってTMJ OAを誘発させ、下顎頭の形態や関節軟骨の変化について普通飼料を摂取したマウスと比較することで、肥満による脂肪組織の増加

や糖尿病による血糖の上昇が、マウスの TMJ OA 進行に与える影響について検討したので報告する。

## II. 材料および方法

### 1. 実験動物、材料

実験動物には雄性マウス C57BL/6J を使用した。マウスは普通飼料摂取群 (ND 群) と、高脂肪飼料摂取群 (HF 群)、超高脂肪飼料摂取群 (SHF 群) の 3 群 (各群 16 匹) に分けた。ND 群には普通飼料 (12% Fat kcal) を、HF 群には高脂肪飼料 (33% Fat kcal) を、SHF 群には超高脂肪飼料 (57% Fat kcal) を、後述する関節円板切除を行う 8 週前である生後 4 週齢から、飼育終了時の生後 28 週齢までそれぞれの群に与えて飼育した。

### 2. 実験方法

#### 1) 関節円板切除

各群 16 匹の半数、各群 8 匹にたいし、生後 12 週齢時に左側顎関節の関節円板切除を行った。全身麻酔と耳前部に局所麻酔後、実体顕微鏡を使用し、耳前部で縦方向に皮膚切開を加え、皮下の筋層を切開しながら顎関節腔を開放した。関節円板を把持し、マイクロ剪刀で周囲組織より切離し、関節円板の切除を行った。創部は縫合し終了した。また、各群 16 匹の半数、各群 8 匹は、偽手術群として関節円板切除を行わなかった。なお、本実験におけるマウスの取り扱いは、愛知学院大学歯学部動物実験指針に従って行い、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認 (承認番号 AGUD368 号)

を受けている。

## 2) 体重・空腹時血糖測定

マウスは、関節円板切除時と術後4週毎に夜間約10時間の絶食の後に体重測定を行い、また同時に、簡易血糖測定器を用い、尾静脈から血液を採取して空腹時血糖を測定した。

## 3) 組織学的処理、染色

すべてのマウスは手術後16週(生後28週齢時)に屠殺し、断頭後に頭部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。頭部の左半分を、10%EDTA溶液で4週間脱灰を行った。脱灰終了後、通法に従いパラフィンに包埋し、5 $\mu$ mで下顎頭と周囲組織を含めた前頭断方向の連続組織切片を作製した。組織切片はHE染色およびサフラニン0-ファストグリーン染色を行った。

## 4) 組織形態計測学的観察

下顎頭の形態的評価として、撮影した組織切片の画像上で、下顎頭の横径、縦径、軟骨層の厚さの測定を行った。

## 5) 変形性関節症の評価

変形性関節症の評価としてYudohらのModified Mankin Scoreを用い、サフラニン0-ファストグリーン染色性、軟骨細胞の減少、構造の項目についてOAの進行の程度を点数化した。

## 6) 統計学的分析

すべての結果は中央値で算出し、ND群に対するHF群、SHF群の結果の比

較を Mann-Whitney-U 検定で分析し、 $P < 0.05$  で有意差ありとした。

### III. 結 果

#### 1. 体重・空腹時血糖

偽手術群と関節円板切除群の間で、全実験期間を通して体重と空腹時血糖の変化に有意差はみられなかった。体重では、ND 群と比較し SHF 群の体重は 1.7~1.8 倍増加し、HF 群では 1.1~1.2 倍増加しており、SHF 群、HF 群は全実験期間を通して有意に体重が増加していた。空腹時血糖では、ND 群と比較し SHF 群の空腹時血糖は 1.6~2.1 倍上昇し、HF 群では 1.3~1.6 倍上昇しており SHF 群、HF 群は全実験期間を通し有意な空腹時血糖の上昇がみられた。

#### 2. 組織形態計測学的観察

偽手術群では、SHF 群において、ND 群と比較し縦径と軟骨層の厚さが有意に減少していた。関節円板切除群では、SHF 群と HF 群において、ND 群と比較し縦径と軟骨層の厚さが有意に減少していた。SHF 群では横径も有意に減少していた。

#### 3. 変形性関節症の評価

偽手術群では、軟骨細胞の配列は規則的であり、下顎頭の滑走面は平滑であったが、サフラニン O-ファストグリーン染色の染色性については、SHF 群と HF 群で軽度の低下がみられた。関節円板切除群では、各群すべての下顎頭で、サフラニン O-ファストグリーン染色の染色性の低下や、軟骨細胞

のコロニー形成や細胞数の減少、軟骨層に裂隙や欠損を認めた。Modified Mankin Score による評価では、ND 群と比較し SHF 群は有意に点数が高く、特にサフラニン O-ファストグリーン染色性、軟骨細胞の減少の項目において変化が大きかった。ND 群と比較し HF 群においても点数は高い傾向を示したが、すべての項目において有意差はみられなかった。

#### IV. 考 察

本研究で使用した C57BL/6J マウスは、高脂肪飼料を摂取することで、肥満による体重増加とインスリン抵抗性による血糖の上昇を示し、糖尿病の病態を示すことが明らかになっている。

SHF 群、HF 群ともに有意な体重増加をみとめた。特に SHF 群においては著しい体重増加をみとめ、肥満の状態が進行していたことが考えられた。また、ND 群と比較して SHF 群の関節円板切除後の下顎頭軟骨においては、軟骨層の裂隙や、軟骨基質の欠損などの OA 変化が著しく進行していた。肥満は、全身的に代謝性の機能障害を引き起こす。肥満による体重増加は荷重関節 OA の進行と関連があることは明らかであるが、脂肪組織は荷重関節だけでなく非荷重関節の軟骨においても代謝ストレスを与え、軟骨細胞において炎症を誘発させることが示されており、肥満は非荷重関節においても OA のリスク因子となることが明らかになっている。また、脂肪細胞は骨芽細胞にたいし脂肪毒性があり、脂肪細胞が骨芽細胞の形成を抑制することが明らかになっている。SHF 群、HF 群の関節円板切除後の下顎頭で縦径

の減少がみられたことについては、この脂肪毒性が下顎頭の軟骨下骨に影響した可能性も考えられた。

また、ND 群と比較し、SHF 群と HF 群では有意な空腹時血糖の上昇をみとめた。特に SHF 群では、顎関節手術後から屠殺する 16 週間、空腹時血糖は測定時には常に 150 mg/dl をかなり超えており、糖尿病の病態が進行していたことが考えられた。また、下顎頭の形態的变化として、SHF 群の関節円板切除後の下顎頭では ND 群と比較し矮小化していた。糖尿病患者では骨密度は正常もしくは高い数値を示すが、糖尿病がコラーゲンの架橋形成の障害に関与するため、骨折のリスク因子となることが報告されている。さらに、糖尿病による高血糖やそれに伴う分子によって、骨芽細胞や骨細胞の機能に障害をもたらし、骨のリモデリングを抑制させる。また、SHF 群の関節円板切除後の下顎頭において、軟骨層の厚さは減少し、OA 変化も著しく進行していた。糖尿病により過剰に生成される最終糖化産物 (AGEs) は、関節軟骨に蓄積し軟骨の破壊に関与することが明らかになっており、さらに OA 軟骨細胞は高濃度の糖に暴露されると、細胞内に糖が蓄積され活性酸素を産生し、軟骨破壊が進行することも明らかになっている。また、ラットにおける実験では、誘発された糖尿病が細胞外マトリックスの代謝に影響し、関節軟骨におけるコラーゲン生成を有意に減少させたことが示されている。

C57BL/6J マウスでは、顎関節の関節円板を切除することで、TMJ OA を誘発する方法は確立されている。本研究でも、関節円板切除後の下顎頭では、

すべての群で OA に特徴的な変化を示した。また、本研究の偽手術群の下顎頭では、有意差は無いものの ND 群と比較して HF 群や SHF 群で軽度の OA 変化がみられ、SHF 群では有意に縦径と軟骨層の厚さが減少していたことから、高脂肪飼料によって誘発された肥満や高血糖が、偽手術群の下顎頭の軟骨、骨代謝にも影響を及ぼしたことが考えられた。

#### V. まとめ

関節円板切除により誘発されたマウスの TMJ OA は、超高脂肪飼料を摂取していた SHF 群において著明な OA の進行を認め、肥満や糖尿病は TMJ OA の進行に影響することが示された。