

ラット顎関節円板のフィブリルコラーゲンの加齢変化と咬合状態の影響

棚 橋 友 哉

朝日大学大学院歯学研究科口腔生化学専攻(主任：藤田 厚教授)

抄録 顎関節円板はフィブリルコラーゲンとグリコサミノグリカンを主体とする線維性組織で、機能負荷に対応する緩衝装置の役割を果たしている。顎関節円板に加わる負荷は年齢や咬合状態などによって大きなバリエーションを生ずる。本研究では、成長期における関節円板のフィブリルコラーゲンの量的および質的变化を観察するとともに、拳上あるいは抜歯により咬合状態の変化がそれらにおよぼす影響についての基礎的資料を収集した。

ラット顎関節円板から不溶性コラーゲンを抽出したヒドロキシプロリン量を指標とした化学分析を行い、さらに、コラーゲン分子間架橋結合を酵素限定消化法で切断しコラーゲンの可溶化をはかった。可溶化コラーゲンは熱変性させたのち、途中還元電気泳動法を応用して分子内架橋結合の切断と α 鎖の分離を行い、ウェスタンブロットティング法で解析した。

ラット顎関節円板のフィブリルコラーゲン量は4週齢で増加し、その後は一定値を維持した。分子種はI型コラーゲンを主体として、II型、III型コラーゲンが分布し、その構成比率はI型コラーゲンではほぼ一定であるが、加齢と咬合関係の不調和はII型、III型コラーゲンに影響を及ぼすことが示唆された。

キーワード：コラーゲン，関節円板

緒 言

顎関節円板は、側頭骨下顎窩および関節隆起と下顎骨下顎頭との間に介在し、関節腔を上下に二分している線維性組織である。関節円板の主体をなす構造タンパク質はフィブリルコラーゲン分子であり¹⁾、関節円板は主としてこの分子のもつ物理化学的特性によって顎運動による機能的負荷に対応するための緩衝装置の役割を担っている^{2,3)}。円板組織がコラーゲン代謝に対する影響下にあることから、構造タンパク質の主要組成であるフィブリルコラーゲン分子の消長は組織の性状や機能に影響を波及することが考えられる。とくに、関節円板に加わる負荷は年齢や咬合状態などによって大きなバリエーションを生ずることから、このバリエーションに対応する円板組織の組織構築には、フィブリルコラーゲン分子の量的あるいは質的变化がその一端を担っている可能性が十分に考えられる。

ところで、フィブリルコラーゲンは多彩なコラーゲンタンパク質のスーパーファミリーのなかで、線維を形成するという共通の類似性をもつ一群として規定されている⁴⁾。フィブリルコラーゲンは組織内で線維形

成と同時に、酵素反応により分子内および分子間に架橋結合を形成する。さらに時間の経過とともに非酵素的なメイラード反応により架橋結合に進展することも知られている⁵⁾。コラーゲン線維は加齢に伴って物理化学的に安定性を増していくが、この過程は線維の成熟に伴うコラーゲン分子種の構成変化と架橋結合とにより惹起される。この現象は各組織においてほぼ一定の特徴をもって維持され、さらに組織の加齢によっても特徴的な変化が進行し、その特異性が組織構築と機能の発現の保持に密接に関与している。

関節円板のコラーゲン線維については光学あるいは電子顕微鏡による形態学的な観察が種々行われてきたが、フィブリルコラーゲン分子に視点をおいて生化学的に検索した報告はほとんどみられない^{1,6,7)}。このような観点から、本研究では、ラットの成長期における関節円板のフィブリルコラーゲンの量的および質的变化についての基礎的資料を収集するとともに、拳上あるいは抜歯による咬合関係の不調和がそれらに及ぼす影響について検討した。

本論文の要旨は、第10回朝日大学歯学研究科発表会(平成14年12月16日、岐阜)において発表した。
(平成15年7月23日 受理)

材料および方法

1. 実験動物

実験動物には雄性Sprague-Dawley系ラット(日本エルエスシー, 浜松)を用い, 実験は「朝日大学実験動物取扱指針」に従い行った. ラットは温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $60 \pm 5\%$, 12時間の明暗周期で飼育し, 粉末飼料(MF, オリエンタル酵母工業, 東京)と水を自由に摂取させた. なお, 栄養状態を確認するために体重を3~4日ごとに測定した.

2. 実験の構成

関節円板フィブリルコラーゲンに及ぼす成長および咬合状態の影響を検討するため, 以下の実験を構成した.

1) 加齢変化

3, 4, 6および10週齢のラットから関節円板を採取して実験に供した.

2) 咬合関係の不調和の影響

3週齢のラットを用い, ブラケット装着群と抜歯群の2群に分けた.

ラット腹腔内にペントバルビタールナトリウム(ソムノベンチル, Schering-Plough Animal Health, Union, NJ, USA)を $30\text{mg}/\text{kg}$ 体重の割合で投与し, 麻酔の奏効を確認した. ブラケット装着群は, ラット上顎両側臼歯部の咬合面を歯面清掃, エッチング処理したのち, 厚さ 1.3mm の歯科矯正用ブラケット(トミー, 東京)をスーパーボンド(サンメディカル, 守山)で接着した. 抜歯群はラット上顎両側第一, 第二臼歯を抜去し, その14日後に第三臼歯を抜去した.

ブラケット装着群および抜歯群の各群ラットから, 処置1週, 3週, 7週間後に関節円板を採取し実験に供した. また, 同一週齢の無処置ラット関節円板を対照とした.

3. 関節円板の採取および試料の調製

ラットをエーテル麻酔下で脱血死させ, 関節円板を摘出した. 採取した関節円板はReesの区分⁸⁾を参考にして, 実体顕微鏡下で非円板組織を可及的に取り除いたのち, 冷生理食塩水で洗浄した.

1) 不溶性コラーゲン画分の調製

採取した関節円板は可及的に細切し, 20% 塩化ナトリウムを含む 50mM トリス塩酸緩衝液($\text{pH}7.5$)に懸濁し, ポリトロンPT1200(Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland)で10秒回転, 5秒休止を5回繰り返して, ホモゲナイズした. ついで, ホモジネートを $10,000 \times g$, 15分間遠心し, 沈渣を回収した. 沈渣は蒸留水で2回洗浄し, 蒸留水に対して1昼夜透析したのち, 凍結乾燥して不溶性コラーゲン画分とした. これらの操作は $0 \sim 4^\circ\text{C}$ で行い, 得られた画分は用時まで -30°C で保存した.

2) グリコサミノグリカン画分の調製



図1 上顎両側臼歯部へのブラケット装着

細切した円板組織の一部にアセトンを加えホモゲナイズしたのち, クロロホルム-メタノール($2:1$, v/v)およびエーテルで脱脂, 脱水し, 乾燥試料とした. 乾燥試料からのグリコサミノグリカンの抽出は通法に従い, 100°C の熱処理を30分間, 0.1N 水酸化ナトリウムによるアルカリ処理を 4°C , 18時間, プロナーゼE(科研製薬, 東京)によるタンパク消化を 40°C , 48時間, 10% トリクロル酢酸による除タンパクおよび透析の各操作を順次行い, 凍結乾燥してグリコサミノグリカン画分を得た. 得られた画分は用時まで -30°C で保存した.

4. 生化学的分析

1) 試料の前処理

タンパク質量およびヒドロキシプロリン量の測定のための前処理として, 不溶性コラーゲン画分の酸による加水分解を行った. 試料画分に 6N 塩酸を加えて, 110°C , 24時間加水分解したのち, ロータリーエバポレーターで減圧乾固して塩酸を除去した. 乾固物に 0.001N 塩酸を加えて測定範囲濃度となるように調整して, 測定試料とした.

2) タンパク質量

タンパク質量は, Starcherの方法⁹⁾に準じ, 生じたニンヒドリン陽性物質をBiolumin960(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)を用い, 560nm の吸光度で測定した. 標準としてウシ血清アルブミン(Pierce, Rockford, IL, USA)の加水分解物を用いた.

3) ヒドロキシプロリン量の測定

ヒドロキシプロリン量は4-ヒドロキシ-L-プロリン(ナカライテスク, 京都)を標準として用い, Stegemannの方法¹⁰⁾で測定した. コラーゲン量はヒドロキシプロリン量に換算係数 7.55 を乗じて算出した¹¹⁾.

4) ウロン酸の定量

ウロン酸量はグリコサミノグリカン画分を試料とし, D-グルクロン酸(ナカライテスク)を標準として用い, カルバゾール-硫酸反応のBitter-Muir法¹²⁾で測定した.

5. フィブリルコラーゲン分子種の分離および分析

1) コラーゲンの可溶性

フィブリルコラーゲンの可溶性はMillerの方法¹³⁾に準じたペプシンによる限定消化法で行った。不溶性コラーゲン画分を0.3%ペプシン(2回結晶, ナカライテスク)を含む0.5M酢酸に懸濁のち, 4°C, 72時間攪拌した。限定消化後の試料は80,000×g, 40分間遠心し, 上清を回収した。その上清に終濃度2Mとなるように塩化ナトリウムを添加し, 24時間攪拌のち, 80,000×g, 40分間遠心して沈殿を回収した。沈殿は0.5M酢酸に24時間攪拌して溶解させたのち, 0.5M酢酸で透析後, 凍結乾燥し, ペプシン可溶性コラーゲン画分とした。

2) 途中還元電気泳動

ペプシン可溶性コラーゲンの α 鎖分離は, Sykesら¹⁴⁾の2-メルカプトエタノールによる途中還元ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法に準じて行った。試料は0.01%プロモフェノールブルー(BPB)を含む試料用緩衝液(1% SDSおよび30%グリセロールを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液, pH6.8)に溶解後, 非還元条件下で100°C, 2分間熱変性処理した。熱変性試料は, 5%ポリアクリルアミドゲル(高さ80×幅100mm)を支持体とし, SDS-トリス-グリシン緩衝液(0.1% SDS, 192mMグリシン, 25mMトリス, pH8.3)を泳動溶媒として, 30mAで泳動した。BPBが完全に分離ゲル内に移動したのち, 通電を停止し, 10%2-メルカプトエタノールを含む試料用緩衝液を各ウェルに15 μ l積層し, 30分間還元処理を行った。通電を再開し, BPBがゲル下端約2mmに到達するまで泳動した。

なお, I型(Becton Dickinson, Bedford, MA, USA), II型(コラーゲン技術研修会, 東京), III型(Chemicon

International, Temecula, CA, USA)の各コラーゲン標準品はタンパク質量1 μ g, ペプシン可溶性コラーゲン画分試料は2 μ gをアプライ量とした。

3) ウェスタンブロットティング

途中還元電気泳動で分離されたコラーゲンの α 鎖は, クマシー染色によりコラーゲンタンパク質を確認のち, ウェスタンブロットティング法¹⁵⁾で検出した。膜転写にはポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜(ポアサイズ0.22 μ m; Millipore, Bedford, MA, USA)を用い, 5%メタノールを含む50mMホウ酸-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.0)で, 30V, 15時間転写した。転写後のPVDF膜は, 5%スキムミルクおよび0.05%アジ化ナトリウムを含むTBS-T(137mM塩化ナトリウムおよび0.1%ツィーン20を含む20mMトリス塩酸緩衝液, pH7.6)で, 室温, 1時間ブロッキングした。その後, 同溶液で希釈した抗体と室温で2時間反応させ, ついでTBS-Tで1,000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識プロテインA(Amersham Biosciences)と37°C, 1時間反応させた。

なお, 一次抗体はラットI型, ラットII型およびウシIII型コラーゲンに対する抗体(エル・エス・エル, 東京)をそれぞれ2,000倍, 1,000倍, 600倍に希釈して用いた。

4) 画像解析

PVDF膜上で生じた抗原-抗体-プロテインA複合体はECLウェスタンブロットティング検出システム(Amersham Biosciences)で化学発光として検出し, シグナルをX線フィルム上に記録した。シグナルは, AE-6920-Mデンシトグラフ(アトー, 東京)で解析した。

5) データの検定

データ間の検定は, Studentのt-検定で行った。

結 果

1. 加齢変化

1) 関節円板湿重量

加齢に伴う関節円板の1個あたりの湿重量の変化を図2に示した。円板湿重量は, 3週齢では1.61mgであった。4, 6, 10週齢では, それぞれ2.18mg(3週齢の1.36倍), 2.93mg(1.83倍), 3.72mg(2.32倍)と成長とともに増加した。

2) 組織水分含量

加齢に伴う関節円板の組織水分含量の変化を図3に示した。組織水分含量は3週齢では74.5%で, 4週齢では75.7%と変化は少なかったが, 6週齢では70.0%に低下し, 10週齢では68.0%であった。

3) タンパク質量

加齢に伴う円板組織湿重量あたりのタンパク質量の変化を図4に示した。タンパク質量は3週齢では81.2mg/g, 4週齢では101.1mg/g(1.24倍)に増加し, その

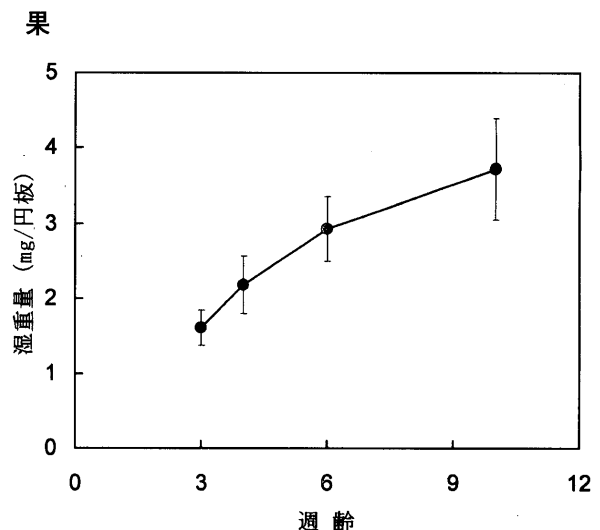


図2 関節円板湿重量の加齢変化
バーは標準偏差を示す。n=16~20

後は6週齢で103.8mg/g, 10週齢で102.6mg/gとほぼ

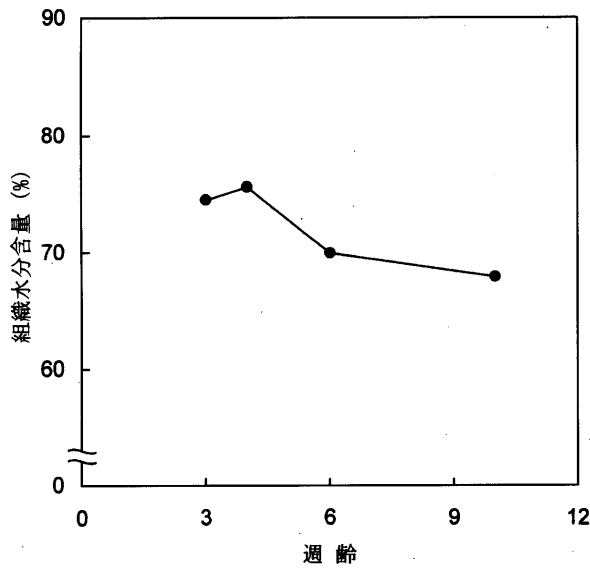


図3 関節円板組織水分含量の加齢変化
n = 10~12

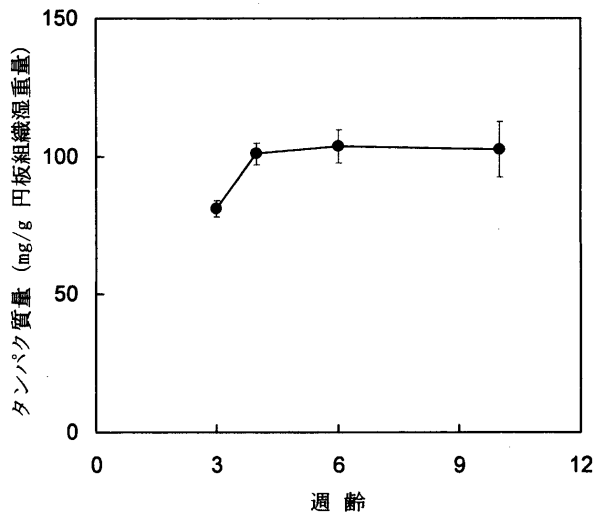


図4 関節円板タンパク質量の加齢変化
バーは標準偏差を示す. n = 16~20

一定値で推移した。

4) ヒドロキシプロリン量

加齢に伴う円板組織湿重量あたりのヒドロキシプロリン量の変化を図5に示した。ヒドロキシプロリン量は3週齢では19.6mg/gであったが、4週齢では25.4mg/g(1.30倍)に増加し、その後は6週齢で25.5mg/g、10週齢で26.2mg/gとほぼ一定値で推移した。

加齢に伴うヒドロキシプロリン量の変化(図5)とタンパク質量の変化(図4)はよく類似した推移を示した。

5) 総タンパク質に占めるコラーゲン量の割合

ヒドロキシプロリン量からコラーゲン量を算出し、加齢に伴う関節円板総タンパク質に占めるコラーゲンタンパク質の割合の変化を図6に示した。すべての週齢において、この比率は75%程度であり、成長に伴う顕著な変化は見られなかった。

6) ウロン酸量

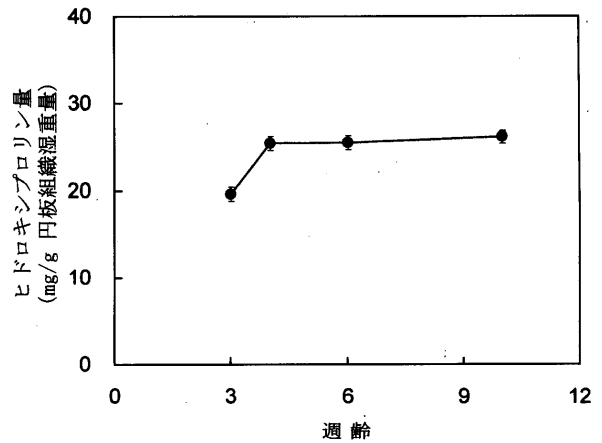


図5 関節円板ヒドロキシプロリン量の加齢変化
バーは標準偏差を示す. n = 16~20

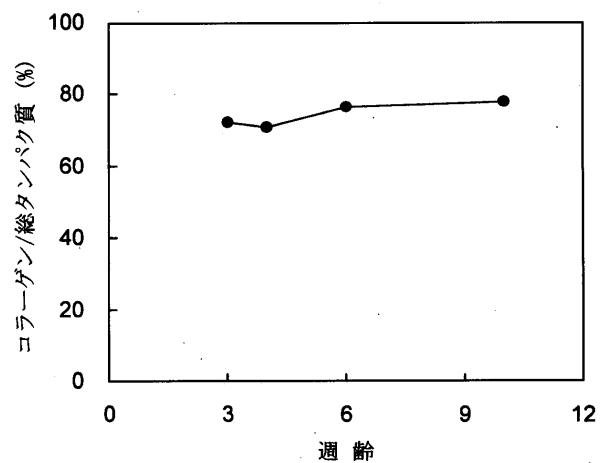


図6 関節円板総タンパク質量に占めるコラーゲン量の加齢変化
n = 16~20

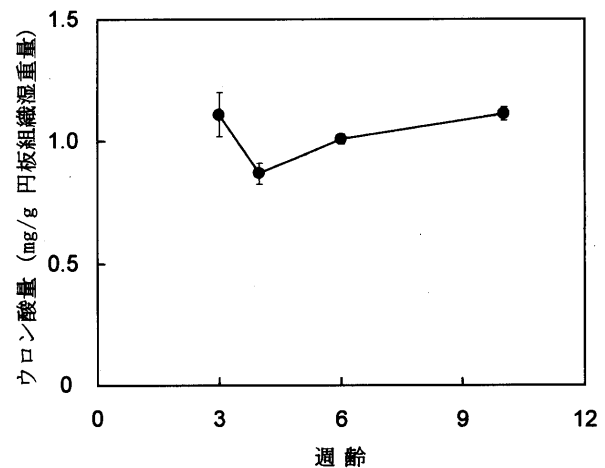


図7 関節円板ウロン酸量の加齢変化
n = 10~12

加齢に伴う円板組織湿重量あたりのウロン酸量の変化を図7に示した。ウロン酸量は3週齢で1.11mg/g、4週齢で0.87mg/g(0.78倍)と減少したが、その後は6週齢で1.01mg/g(0.91倍)と増加し、10週齢で1.12mg/gを示した。

7) ウロン酸量に対するヒドロキシプロリン量の比率
 ウロン酸はグリコサミノグリカン量の指標、ヒドロキシプロリンはコラーゲン量の指標として、両者の比

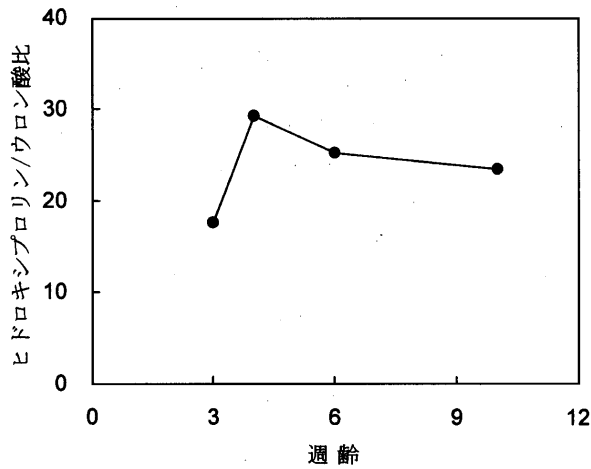


図8 関節円板ウロン酸量に対するヒドロキシプロリン量の比率の加齢変化
 n=10~12

率の加齢に伴う変化を図8に示した。3週齢では17.6で、4週齢で29.2(1.66倍)と顕著に上昇したが、その後は6週齢で25.2、10週齢で23.5で顕著な変化なく推移した。

8) フィブリルコラーゲン分子種の構成比率

I型コラーゲンのウェスタンブロットティング像と総フィブリルコラーゲンに対する構成比率の加齢に伴う変化を、それぞれ図9と図10に示した。関節円板におけるI型コラーゲンの構成比率は3週齢で85.7%、4週齢で84.4%、6週齢で89.6%、10週齢で88.2%を占めたことから、成長に伴う変化はほとんど観察されなかった。

II型コラーゲンのウェスタンブロットティング像と総コラーゲンに対する構成比率の加齢に伴う変化を、それぞれ図11と図12に示した。II型コラーゲンの構成比率は3週齢で7.48%、4週齢で10.13%、6週齢で5.55%、10週齢で8.27%と増減を示した。

III型コラーゲンのウェスタンブロットティング像と総

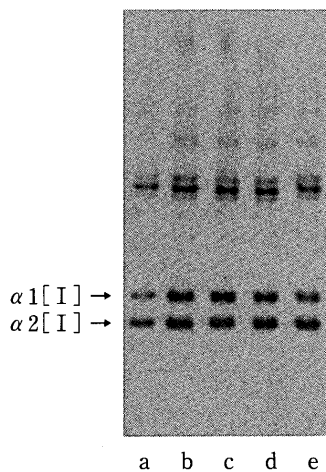


図9 関節円板I型コラーゲンのウェスタンブロットティング像
 a: I型コラーゲン, b: 3週齢, c: 4週齢, d: 6週齢, e: 10週齢. n=16~20

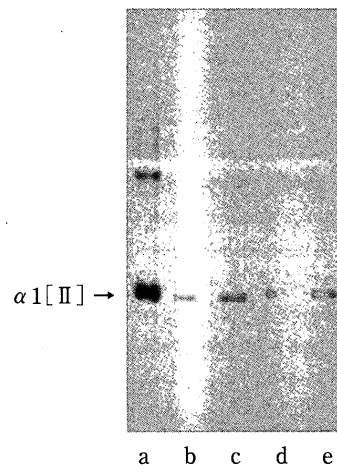


図11 関節円板II型コラーゲンのウェスタンブロットティング像
 a: II型コラーゲン, b: 3週齢, c: 4週齢, d: 6週齢, e: 10週齢. n=16~20

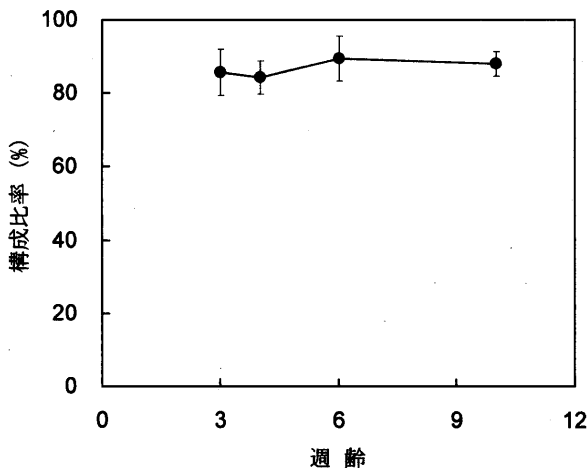


図10 関節円板I型コラーゲンの構成比率の加齢変化
 バーは標準偏差(n=16~20)を示す。

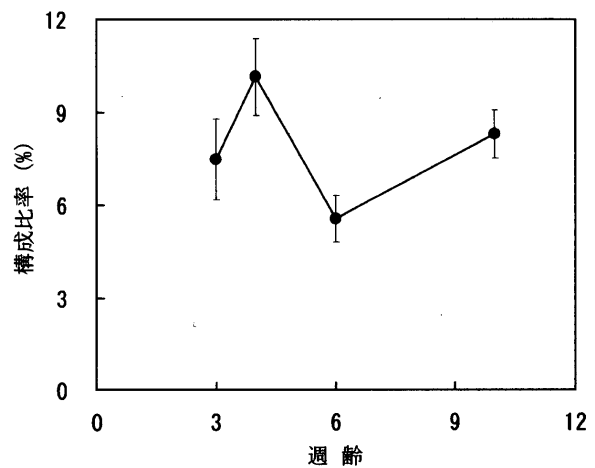


図12 関節円板II型コラーゲンの構成比率の加齢変化
 バーは標準偏差を示す。n=16~20

コラーゲンに対する構成比率の加齢に伴う変化を、それぞれ図13と図14に示した。Ⅲ型コラーゲンの構成比率は3週齢で6.80%、4週齢で5.47%、6週齢で4.84%、10週齢で3.49%と成長に伴い減少傾向を示した。

2. 咬合関係の不調和の影響

1) 体重の変化

実験期間中のラット体重の変化を図15に示した。ブラケット装着群、抜歯群とも対照群との間で差異は認められなかった。

2) 関節円板湿重量の推移

咬合関係の不調和に伴う関節円板湿重量の推移を図16に示した。円板1個あたりの湿重量は、ブラケット装着群の処置後1週では1.99mg、3週では2.67mg、7週では3.77mgで、全期間を通して対照群と同様の变化で推移し、有意な差($p < 0.05$)は認められなかった。一方、抜歯群の処置後1週では2.05mgで対照群との間に有意な差($p < 0.05$)は認められなかったが、

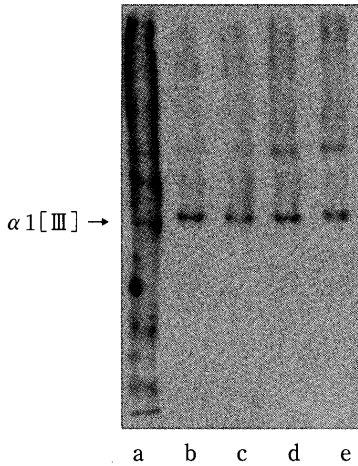


図13 関節円板Ⅲ型コラーゲンのウェスタンブロットティング像
a: Ⅲ型コラーゲン, b: 3週齢, c: 4週齢, d: 6週齢, e: 10週齢. n=16~20

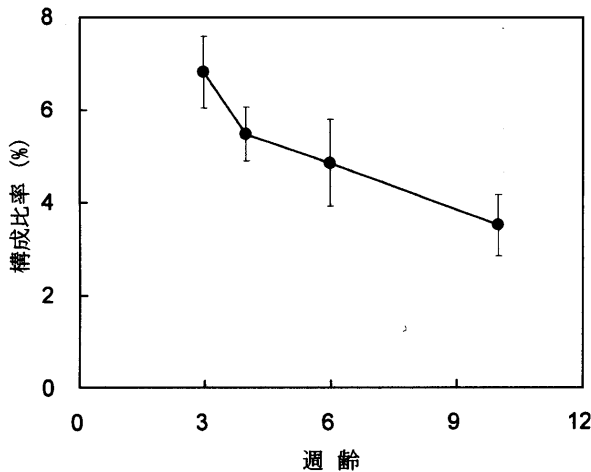


図14 関節円板Ⅲ型コラーゲンの構成比率の加齢変化
バーは標準偏差を示す. n=16~20

その後の増加は対照群より低く、3週では2.42mg ($p < 0.02$)および7週では2.94mgで有意な差 ($p < 0.02$)が認められた。

3) タンパク質量の推移

咬合関係の不調和に伴う円板組織湿重量あたりのタンパク質量の推移を図17に示した。ブラケット装着群の処置後1週では対照群より低値 ($p < 0.02$)の89.7 mg/gであったが、3週で98.6mg/gおよび7週で104.3mg/gで有意な差 ($p < 0.05$)は認められなかった。抜歯群では、1週では対照群より低値 ($p < 0.02$)の98.9mg/gであったが、その後顕著に増加し、3週で119.0mg/g、7週で121.5mg/gであった。

4) ヒドロキシプロリン量の推移

咬合関係の不調和に伴う円板組織湿重量あたりのヒドロキシプロリン量の推移を図18に示した。ブラケット装着群の処置後1週では対照群より低値 ($p < 0.02$)の21.5mg/gであったが、その後は3週で26.6mg/g、7週で26.7mg/gの対照群とほぼ同程度の値で推移し

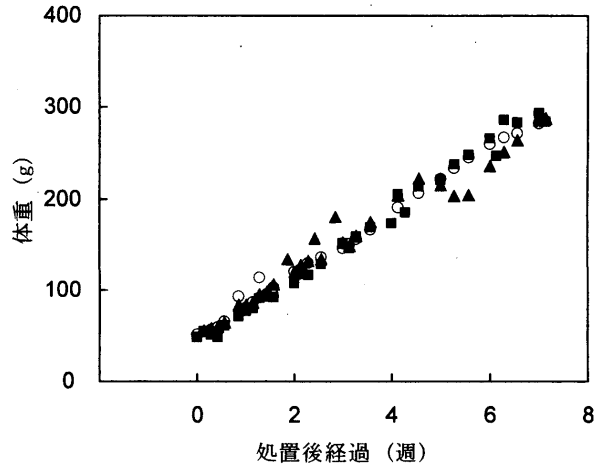


図15 咬合不調和によるラット体重の変化
○: 対照群, ■: ブラケット装着群, ▲: 抜歯群. n=8~10

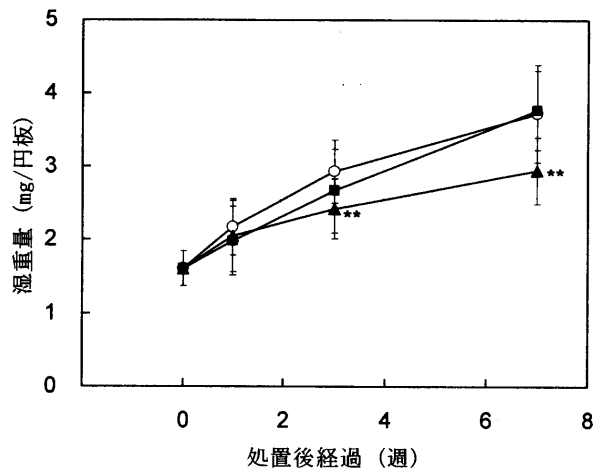


図16 咬合不調和による関節円板湿重量の推移
○: 対照群, ■: ブラケット装着群, ▲: 抜歯群. 対照群との有意差は, ** ($p < 0.02$)で示す. バーは標準偏差を示す. n=16~20

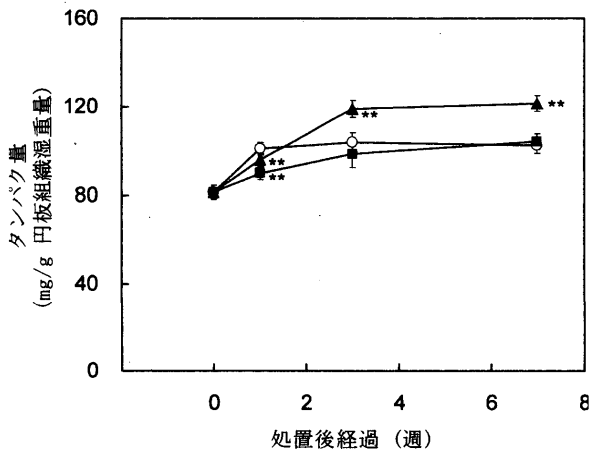


図17 咬合不調和による関節円板タンパク量の推移
○：対照群，■：ブラケット装着群，▲：抜歯群。
対照群との有意差は，** ($p < 0.02$) で示す。バーは標準偏差を示す。n=16~20



図18 咬合不調和による関節円板ヒドロキシプロリン量の推移
○：対照群，■：ブラケット装着群，▲：抜歯群。
対照群との有意差は，** ($p < 0.02$) で示す。バーは標準偏差を示す。n=16~20

た。抜歯群では、1週で対照群とほぼ同程度の24.2 mg/gであったが、その後は対照群より増加し ($p < 0.02$)、3週で30.5mg/g、7週で30.8mg/gを維持した。

ブラケット装着および抜歯による咬合状態が及ぼすヒドロキシプロリン量の推移(図18)とタンパク質量の推移(図17)はよく類似した消長を示した。

5) 総タンパク質量に占めるコラーゲン量の割合

ヒドロキシプロリン量からコラーゲン量を算出し、関節円板の総タンパク質量に占めるコラーゲンタンパク質量の咬合関係の不調和に伴う変化を図19に示した。ブラケット装着群、抜歯群ともに、すべての期間を通して70.3~73.6%ではほぼ一定の比率を維持した。また、対照群と比較しても差異は認められなかった。

6) フィブリルコラーゲン分子種の構成比率

I型コラーゲンのウェスタンブロットティング像と総フィブリルコラーゲンに対する構成比率の咬合関係の不調和に伴う推移を、それぞれ図20と図21に示した。

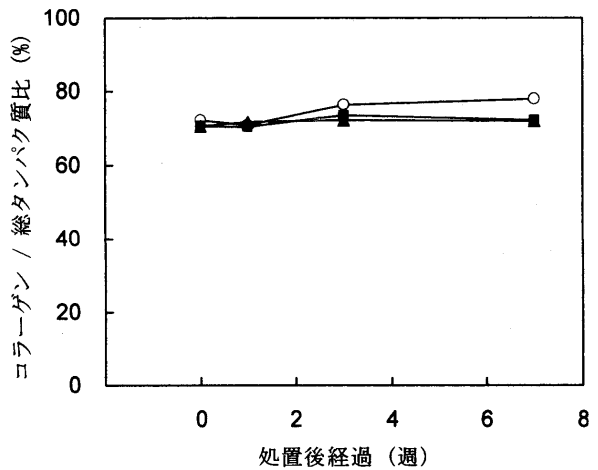


図19 関節円板総タンパク質量に占めるコラーゲン量の咬合不調和による変化
○：対照群，■：ブラケット装着群，▲：抜歯群。
n=16~20

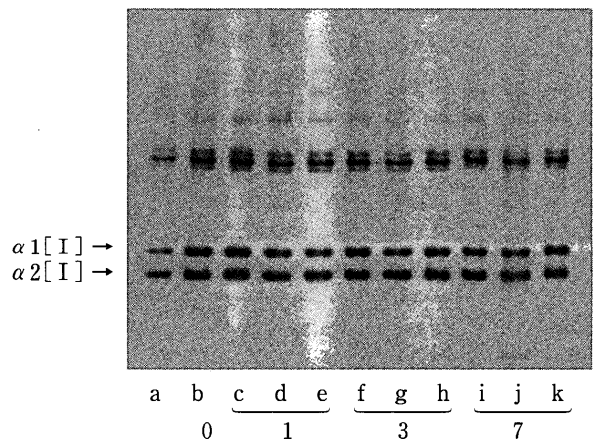


図20 咬合不調和による関節円板I型コラーゲンのウェスタンブロットティング像
a：I型コラーゲン，b：実験開始時，c，f，i：対照群，d，g，j：ブラケット装着群，e，h，k：抜歯群。数字は処置後経過(週)を表す。n=16~20

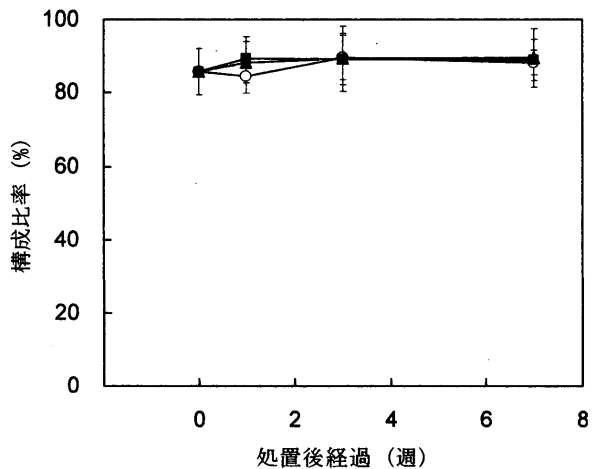


図21 関節円板I型コラーゲンの構成比率の咬合不調和による推移
○：対照群，■：ブラケット装着群，▲：抜歯群。
バーは標準偏差を示す。n=16~20

関節円板におけるⅠ型コラーゲンの構成比率はブラケット装着群、抜歯群ともに、すべて期間を通して85.7~89.5%で変化はほとんど認められなかった。また、対照群と比較しても差異は認められなかった。

Ⅱ型コラーゲンのウェスタンブロットティング像と総フィブリルコラーゲンに対する構成比率の咬合関係の不調和に伴う推移を、それぞれ図22と図23に示した。関節円板におけるⅡ型コラーゲンの構成比率はブラケット装着群の1週は3.87%と減少し、対照群より低率($p < 0.02$)であったが、その後3週で5.39%、7週では7.07%と上昇した。抜歯群の1週は6.11%で、対照

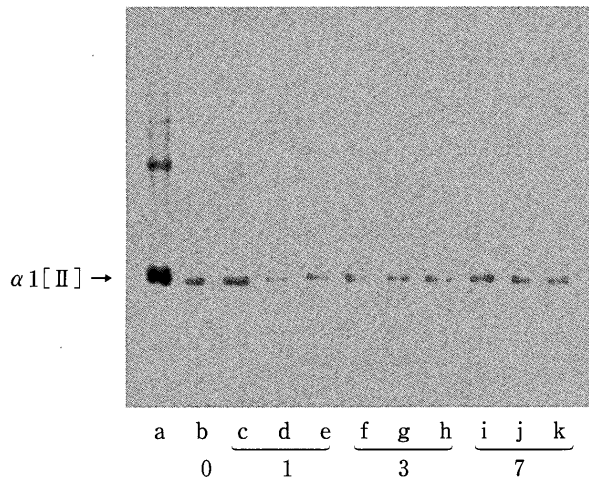


図22 咬合不調和による関節円板Ⅱ型コラーゲンのウェスタンブロットティング像
a: Ⅱ型コラーゲン, b: 実験開始時, c, f, i: 対照群, d, g, j: ブラケット装着群, e, h, k: 抜歯群. 数字は処置後経過(週)を表す. n=16~20

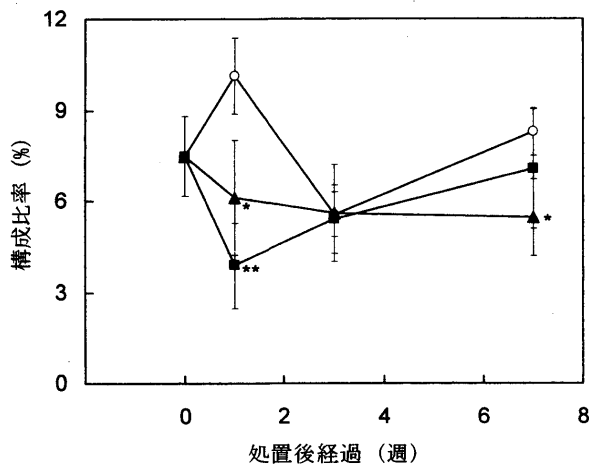


図23 関節円板Ⅱ型コラーゲンの構成比率の咬合不調和による推移
○: 対照群, ■: ブラケット装着群, ▲: 抜歯群. 対照群との有意差は, * ($p < 0.05$) または ** ($p < 0.02$) で示す. バーは標準偏差を示す. n=16~20

群よりわずかに低率($p < 0.05$)であったが、その後3週で5.60%、7週で5.45%とほぼ一定比率で推移した。

Ⅲ型コラーゲンのウェスタンブロットティング像と総フィブリルコラーゲンに対する構成比率の咬合関係の不調和に伴う推移を、それぞれ図24と図25に示した。関節円板におけるⅢ型コラーゲンの構成比率はブラケット装着群では、1週で6.67%、3週で5.49%、7週で4.05%と対照群と同様な減少傾向を示した。抜歯群の1週で5.67%、3週で5.11%であり、対照群と同程度の減少傾向を示したが、その後は変化なく、7週では5.06%となり対照群より高率($p < 0.05$)を示した。

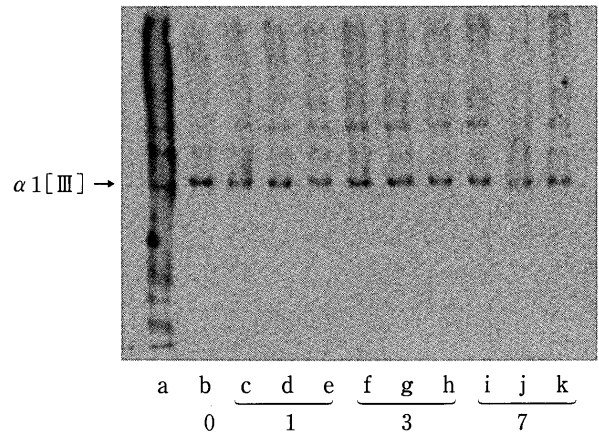


図24 咬合不調和による関節円板Ⅲ型コラーゲンのウェスタンブロットティング像
a: Ⅲ型コラーゲン, b: 実験開始時, c, f, i: 対照群, d, g, j: ブラケット装着群, e, h, k: 抜歯群. 数字は処置後経過(週)を表す. n=16~20

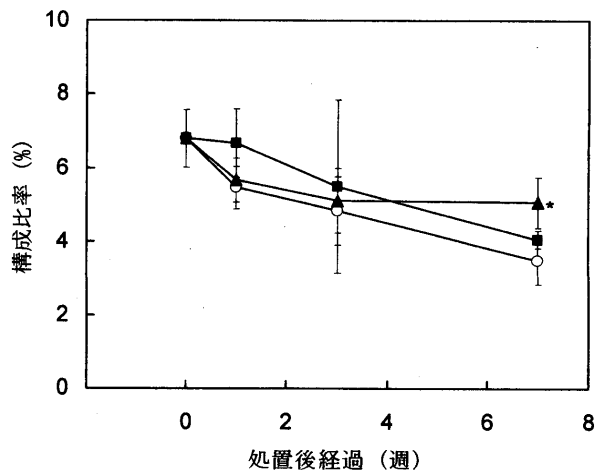


図25 関節円板Ⅲ型コラーゲンの構成比率の咬合不調和による推移
○: 対照群, ■: ブラケット装着群, ▲: 抜歯群. 対照群との有意差は, * ($p < 0.05$) で示す. バーは標準偏差を示す. n=16~20

考 察

関節円板は下顎頭の運動に伴って常に移動し¹⁶⁾、同時に絶えず変化する圧も受けていることから¹⁷⁾、円板組織の構造は、これに対応できるものである必要がある。ラット関節円板の加齢に伴う組織変化は、下顎頭、下顎窩に出現した形態変化に対応して出現する¹⁸⁾といわれ、また、下顎頭、関節窩は生後50日頃までは急激に発育し、その後は穏やかに発育する¹⁹⁾と報告されている。本研究では顎関節の成長の変化が著しいこの時期を中心に、円板組織細胞外マトリックスのフィブリルコラーゲンの消長に視点を置いて、加齢に伴う変化と咬合関係の不調和がそれらに及ぼす影響を検討した。

ラット関節円板の湿重量は加齢に伴って順調な増加をしたことから、実験期間中、正常な成長過程をたどったと考える。関節円板の組織構築の変化を反映する指標としてコラーゲン性および非コラーゲン性の両タンパク質量は類似の代謝動態をとり、4週齢でほぼプラトゥーに達し、以後はその値を維持する経過をとったが、皮膚では20週齢で最高値に達し、以後緩やかに減少すると報告されている²⁰⁾。また、関節円板のコラーゲン性タンパク質は、3週齢でそのほとんどが不溶性であったので、タンパク分解酵素による限定消化を施し、可溶化をはかった。これは、不溶化の現象を引き起こす因子として、コラーゲン分子間に安定性の強い架橋結合が形成されたことを裏付ける結果ともいえる。一般に、生体組織は加齢に伴って不溶性コラーゲンの占める割合が顕著に高くなるが、とくに関節円板においては、コラーゲンを基礎とした強固な線維組織を構築して、強い支持機能を発揮するため、コラーゲンの不溶化現象は顕著であると考えられる。円板組織の不溶形基質と線維基質の相関関係をウロン酸量に対するヒドロキシプロリン量の比率で表わすと、4週齢で増加し、6週齢で減少してその後一定値を示した。グリコサミノグリカンの大部分は、組織中ではコアタンパク質と結合したプロテオグリカンの状態で存在しており²¹⁾、線維基質とともに、細胞外マトリックス成分の大部分を占める。4週齢までにみられるヒドロキシプロリン/ウロン酸比の上昇は、この時期にコラーゲン新生⁷⁾をとともなう組織構築が進行している可能性が示唆される。一方、4週齢以降では、ヒドロキシプロリン/ウロン酸比の変動はそれ以前の時期に比較して小さい。これらの知見と観察期間を通して総タンパク量に占めるコラーゲンタンパク質量が一定値を維持することを考えあわせると、関節円板は組織構築が加速された組織であり、比較的早い時期に組織構築を終えて、負荷の緩衝装置としての役割にふさわしい構造形態を構築すると考えられる。

咬合状態の変化が顎関節部に及ぼす影響については、これまでに多くの報告があり、なかでもCimasoni²²⁾は

ラットの臼歯を抜歯した場合に下顎頭軟骨細胞周囲の石灰化や壊死および関節円板の構造の変化が生じたと報告している。ラット下顎頭を過剰運動させた実験^{23,24)}では、顎関節滑膜に滑膜炎を、また関節円板前方肥厚部直前の円板組織に線維性組織による肥厚を認め、それは、下顎頭の形態変化に一致した円板の対応が要因であると報告している。三木¹⁹⁾は、関節円板のアタッチメント周囲部に出現する弾性線維は吸引運動開始とともに現れ、咀嚼運動開始の離乳期に最も多く太くなり、以後次第に少なくなって生後60~70日には消失すると報告している。これらの報告を考え合わせると、成長期の咬合関係の不調和は、円板組織のコラーゲン線維の構築に影響が及ぶ可能性が示唆される。

実験的に咬合状態を変化させる手段として、一般に咬合挙上あるいは抜歯が用いられる。しかし、これらの処置は、栄養摂取に大きな影響を及ぼすことから、注意が必要である。ラットは臼歯部で約1mmの安静空隙量があるとされている²⁵⁾。また、赤川²⁶⁾は臼歯部で1, 2および3mm挙上した場合に、2mm挙上で処置後2日間の体重減少をきたし、3mm挙上では致死的な体重減少が生じることを報告している。そのため、挙上量は栄養状態に影響を及ぼさない範囲で安静空隙を十分に超える1.3mmとした。また、ラットは下顎正中縫合に可動性があることから、両側性の挙上処置を施し、挙上効果を確実なものとした。抜歯群についても、ブラケット装着群と同様の理由で両側性の処置とした。さらに、これらの処置を施すことで、咀嚼能の低下による栄養状態の低下^{26,27)}が生じることが予想されることから、粉末飼料を与えることで、栄養状態の低下を極力予防した。その結果、本実験では、ブラケット装着群および抜歯群ともに、対照群と比較して体重の変化は認められず、咬合状態の変化による成長発育の障害は観察されなかった。

関節円板の湿重量の推移から観察すると、ブラケット装着群では対照群と同様な増加を示したのに対し、抜歯群では処置後3週より増加率の低下を招き、形態形成に影響がより波及する。挙上を施すと、コラーゲン量の増加は遅延するものの、処置後3週には対照群とほぼ同程度の値となること、また、円板組織湿重量の変化が対照群とほぼ一致することから、咬合状態の変化に比較的よく適応していくものと考えられる。一方、抜歯を施すと円板組織湿重量の増加率は著しく低下し、コラーゲン量の増加が続き、対照群より高値になっていく。本実験の結果から抜歯群のコラーゲン性および非コラーゲン性の両タンパク質量はいずれも増加することが確認された。この変化を明瞭に説明することはできないが、関節円板にかかる負荷により構造タンパク質の代謝回転が低下し、組織に蓄積する可能

性も否定できない。

コラーゲントタンパク質は、組織の機械的な支持機能を担うフィブリルコラーゲン分子のほかに、マイナーコラーゲンと呼ばれるファシット、短鎖、基底膜性およびその他のコラーゲン分子が見いだされ、それらの多彩な分子種がスーパーファミリーを構成している現況⁴⁾である。各コラーゲン分子はアミノ酸組成、分子構造、組織分布などが解明されつつあるが、その機能や存在が意味する生物学的意義についてはいまだ不明な点も多い。本実験では関節円板のフィブリルコラーゲンを検索対象とした。フィブリルコラーゲンのI型、II型、III型、V型の各分子種は組織で共存しており、分子状態が不均一で、単離精度を上げるとポリメリックコラーゲンや分解ペプチドなどのartificial productsを生じる。それを避けるために単離操作を緩やかにすると、非コラーゲン性タンパク質やさらに多くの成分を抱き込むことは避けられず、低精度の標品しか回収できないことになる。また、フィブリルコラーゲン各分子の α -ペプチド鎖は通常の電気泳動法では分離不能である。III型コラーゲンは、非還元下での電気泳動では、3本の α 鎖がジスルフィド結合しているため30万の分子量を示し、還元後、10万の分子量になることで同定される。しかし、I型コラーゲンと共存していることが多く、しかもI型コラーゲンの α 鎖と同じ移動度を示すため同定が困難となる²⁸⁾。そのため、フィブリルコラーゲンの分離には、電気泳動の途中で還元剤を用いる方法¹⁴⁾を用い、ウェスタンブロッティング法¹⁵⁾で確認した。

ラット関節円板にはI型、II型およびIII型コラーゲンが確認された。I型コラーゲンの細線維にはIII型のほかに、微量のV型コラーゲンが会合することがあることから、本実験でV型コラーゲンの検出を試みたがその存在を確認できなかった。関節円板のフィブリルコラーゲン分子の分布は、動物種によっても異なり、ウシ胎児²⁹⁾、ブタ¹⁾ではI型およびわずかにIII型を含み、ウサギ³⁰⁾ではI型、II型およびIII型、ヒトでは、I型のみであるという報告^{1,6)}や、I型とIII型を含む³¹⁾という様々な報告がある。

I型コラーゲンは円板組織の主要成分であり、その構成比率は84~90%を占め、加齢や咬合関係の不調和によってもほとんど影響を受けなかった。しかし、II型およびIII型コラーゲンの構成比率では変化を確認した。すなわち、II型コラーゲンは4週齢で一時的に上昇し、その後再び低下するという加齢による推移を示し、III型は継続した減少傾向を示した。また、II型コ

ラーゲンはブラケット装着および抜歯の咬合関係の不調和とともに処置後1週で減少したのち、3週以後は一定あるいは増加傾向で推移した。III型コラーゲンはブラケット装着群で全期間を通して減少傾向を示したが、抜歯群では減少傾向が減速した推移を示した。Minarelliら³¹⁾は、ヒト関節円板を対象とした研究で、年齢や咬合状態によってI型、III型コラーゲンの構成比率が変化すると報告している。コラーゲンの合成過程に関しては、Carvalhoら⁷⁾は、ラット関節円板の3~12週齢の成長過程で新生されるIII型コラーゲン量に2つのピークがあり、1つは3~4週齢に、もう1つは7~8週齢にあり、後者が最も大きいピークで下顎骨成長量のピークと一致すると報告している。II型コラーゲンは軟骨主要構成成分であることから、その合成には軟骨細胞の関与が考えられる。鈴木^{18,32,33)}は、動物種によって関節円板の軟骨様細胞の存在が異なること、また、ラットの関節円板に軟骨細胞が存在することを報告している。歯の萌出と関節円板の軟骨細胞の分化との間に相関関係があり、第一、第二臼歯が萌出途上である25日齢では軟骨様細胞が出現し、全歯の萌出が完了する40日齢では軟骨細胞が明瞭になることを観察している³³⁾。一方、加齢あるいは機能変化に対応して、代謝活性が低下した領域に存在する線維芽細胞が化生変化し、軟骨様細胞が出現するという報告もある³⁴⁾。またAliら³⁰⁾は、外科的に前方転位させたウサギ関節円板において、軟骨様細胞の消失とともにI型およびII型コラーゲンが減少すると報告している。関節部におけるコラーゲンの分解は、コラーゲンの断片化を引き起こす種々の酵素の作用によるもので³⁵⁾、その断片は関節液中へ放出されると考えられている³⁶⁾。さらに、コラーゲナーゼなどの酵素は刺激された軟骨細胞³⁷⁾、刺激された滑膜細胞³⁸⁾あるいは炎症性の食細胞³⁹⁾から過剰に分泌されて、関節液の中に放出される⁴⁰⁾という報告もある。本実験結果およびこれらの報告、知見を総括すると、加齢および咬合関係の不調和に伴うコラーゲン分子種の構成比率はI型とIII型コラーゲンの代謝回転と関節円板あるいはその周囲に分布する軟骨様細胞が関与したコラーゲン代謝でもたらされた結果と考えられる。

フィブリルコラーゲンは構造タンパク質として組織を構築する機能を果たし、その量や質の変化は組織の構造的な変化に相応するものと考えられる。しかし、量的あるいは質的变化の成因については、各コラーゲン分子の合成速度と分解速度を統合した代謝回転とその調節因子の解明が必要である。

結 論

ラット顎関節円板フィブリルコラーゲンの加齢変化を観察するとともに、咬合関係の不調和がそれらに及ぼす影響について検討し、以下の結果を得た。

- 1) コラーゲン量は4週齢で増加し、その後はほぼ一定値で推移した。一方、すべての週齢において総タンパク質に占めるコラーゲン量の比率は75%程度で

あった。

- 2) コラーゲン分子種の構成比率は、I型コラーゲンが84~90%で加齢変化はほとんどなかったが、II型コラーゲンは一定傾向がなく増減し、III型コラーゲンは減少傾向を示した。
- 3) コラーゲン量は、ブラケット装着群の処置後1週で対照群より低く、3週以後は同程度の値で推移した。抜歯群では1週で対照群よりわずかに低く、3週以後は急激に増加し高値を示した。
- 4) コラーゲン分子種の構成比率は、両群ともI型コラーゲンはほぼ一定であった。II型コラーゲンは、両群ともに1週で減少したのち、3週以後はブラケット装着群で対照群と同様の増加傾向を示し、抜歯群ではほぼ一定比率で推移した。III型コラーゲンは

ブラケット装着群で全期間を通して減少傾向を示したが、抜歯群では1週以後は一定比率で推移した。

以上の結果から、関節円板は4週齢で組織の線維構築を終え、負荷の緩衝装置としての役割に相応すると考えられる。また、フィブリルコラーゲン分子種の構成比率はI型コラーゲンではほぼ一定であるが、II型、III型コラーゲンでは加齢と咬合関係の不調和の影響を受けることが示唆された。

稿を終えるに臨み、本研究を行う機会を与えて頂き、御指導賜りました本学歯学部口腔生化学講座藤田 厚教授に深謝いたします。また、研究に際して御指導頂きました本学歯学部歯科矯正学講座丹羽金一郎教授に感謝いたします。最後に、本学歯学部口腔生化学講座および歯科矯正学講座諸氏の御援助に対して御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 鹿島健司：顎関節円板構成コラーゲンの生化学的分析。日口外誌, 34 : 424~437, 1988.
- 2) Wright, V., Dowson, D. and Kerr, J. : The structure of joints. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 6 : 105~125, 1973.
- 3) Saamanen, A. -M., Tammi, M., Kiviranta, I., Jurvelin, J. and Helminen, H. J. : Maturation of proteoglycan matrix in articular cartilage under increased and decreased joint loading. A study in young rabbits. *Connect. Tissue Res.*, 16 : 163~175, 1987.
- 4) 二宮善文：細胞外マトリックス～臨床医学への応用～(3. 遺伝子とその発現)(渡辺明治, 岡崎 勲編), メディカルレビュー社(東京), 43~52, 1996.
- 5) Pongor, S., Ulrich, P. C., Bencsath, F. A. and Cerami, A. : Aging of proteins. Isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 2684~2688, 1984.
- 6) 小林淳二：顎関節の構造と機能に関わる基質成分。日病誌, 59 : 105~123, 1992.
- 7) Carvalho, R. S., Yen, E. H. K. and Suga, D. M. : The effect of growth on collagen and glycosaminoglycans in the articular disc of the rat temporomandibular joint. *Arch. Oral Biol.*, 38 : 457~466, 1993.
- 8) Rees, L. A. : The structure and function of the mandibular joint. *Br. Dent. J.*, 96 : 125~133, 1954.
- 9) Starcher, B. : A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal. Biochem.*, 292 : 125~129, 2001.
- 10) Stegemann, H. : Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 311 : 41~45, 1958.
- 11) 栗田賢一：家兎抜歯窩創治癒過程におけるコラーゲンの変動—コラーゲン合成量と分子種比率(III/I, V/I)の推移—。日口外誌, 30 : 1293~1303, 1984.
- 12) Bitter, T. and Muir, H. M. : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4 : 330~334, 1962.
- 13) Miller, E. J. : Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. *Biochemistry*, 11 : 4903~4909, 1972.
- 14) Sykes, B., Puddle, B., Francis, M. and Smith, R. : The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72 : 1472~1480, 1976.
- 15) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350~4354, 1979.
- 16) Mongini, F. : 顎口腔系機能障害の診断とリハビリテーション(小林義典, 鳥居建吾訳), クインテッセンス出版(東京), 35~44, 1989.
- 17) 藍 稔：顎機能異常と咬合, 医歯薬出版(東京), 29~49, 1999.
- 18) 鈴木 禎：各種動物の顎関節円板にみられる軟骨細胞の分布並びに機能的意義について。3. 実験的咬合異常によって生ずるラット顎関節部の変化：特に顎関節円板の変化について。歯科学報, 71 : 1337~1348, 1971.
- 19) 三木 毅：ラット顎関節の発生並びに発育に関する研究。京大口科紀要, 12 : 1~30, 1972.
- 20) Schnider, S. L. and Kohn, R. R. : Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *J. Clin. Invest.*, 67 : 1630~1635, 1981.
- 21) 梶川欽一郎：結合組織, 金原出版(東京), 319~365, 1984.
- 22) Cimasoni, G. : Histopathology of the temporomandibular joint following bilateral extractions of molars in the rat. A preliminary report. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 16 : 613~621, 1963.
- 23) 武藤寿孝, 川上譲治, 道谷弘之, 金澤正昭：ラット下顎頭の過剰運動に伴う顎関節滑膜の病理組織学的変化。日病誌, 7 : 67~76, 1995.

- 24) 武藤寿孝, 川上讓治, 金澤正昭: ラット下顎頭の過剰運動に伴う顎関節滑膜の病理組織学的変化. 第2報: 長期的観察. 日顎誌, 8: 75~83, 1996.
- 25) Rayne, J. and Crawford, G. N. C.: The relationship between fibre length, muscle excursion and jaw movements in the rat. *Arch. Oral Biol.*, 17: 859~872, 1972.
- 26) 赤川安正: 咬合挙上が咀嚼筋に及ぼす影響に関する実験的研究. 補綴誌, 24: 206~224, 1980.
- 27) 加藤慎也: 実験的咬合の変化を与えたマウス顎関節部におけるTGF- β 1の発現. 岐阜学誌, 27: 209~225, 2000.
- 28) 服部俊治: 細胞外マトリックス研究法 第I部 生化学的研究法 (b. コラーゲンの分析法(1) SDSポリアクリルアミド電気泳動) (畑隆一郎, 服部俊治, 新井克彦編), コラーゲン技術研修会(東京), 58~64, 1998.
- 29) Hirschmann, P. N. and Shuttleworth, C. A.: The collagen composition of the mandibular joint of the foetal calf. *Arch. Oral Biol.*, 21: 771~773, 1976.
- 30) Ali, A. M. and Sharawy, M.: An immunohistochemical study of the effects of surgical induction of anterior disc displacement in the rabbit craniomandibular joint on type I and type II collagens. *Arch. Oral Biol.*, 40: 473~480, 1995.
- 31) Minarelli, A. M. and Liberti, E. A.: A microscopic survey of the human temporomandibular joint disc. *J. Oral Rehabil.*, 24: 835~840, 1997.
- 32) 鈴木 禎: 各種動物の顎関節円板にみられる軟骨細胞の分布並びに機能的意義について. 1. 各種動物の顎関節円板の組織構造. 歯科学報, 71: 1311~1330, 1971.
- 33) 鈴木 禎: 各種動物の顎関節円板にみられる軟骨細胞の分布並びに機能的意義について. 2. 出生後におけるラット顎関節部の変化: 特に歯牙の萌出と顎関節円板の組織変化について. 歯科学報, 71: 1331~1336, 1971.
- 34) 杉崎正志, 木野孔司: 顎関節の臨床解剖. 第4報. 顎咬合誌, 11: 5~11, 1990.
- 35) Ehrlich, M. G., Armstrong, A. L., Treadwell, B. V. and Mankin, H. J.: The role of proteases in the pathogenesis of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* (suppl. 14), 14: 30~32, 1987.
- 36) Myers, S. L., Flusser, D., Brandt, K. D. and Heck, D. A.: Prevalence of cartilage shards in synovium and their association with synovitis in patients with early and endstage osteoarthritis. *J. Rheumatol.*, 19: 1247~1251, 1992.
- 37) Lefebvre, V., Peeters-Joris, C. and Vaes, G.: Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type-IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor α . *Biochim. Biophys. Acta*, 1094: 8~18, 1991.
- 38) Martel-Pelletier, J. and Pelletier, J. -P.: Neutral proteases in human osteoarthritic synovium: Quantification and characterization. *J. Rheumatol.* (suppl. 14), 14: 38~40, 1987.
- 39) Mainardi, C. L., Hastly, K. A. and Hibbs, M. S.: Collagen degradation by inflammatory phagocytes. *J. Rheumatol.* (suppl. 14), 14: 59~60, 1987.
- 40) Al-Haik, N., Lewis, D. A. and Struthers, G.: Neutral protease, collagenase and elastase activities in synovial fluid from arthritic patients. *Agents Actions*, 15: 436~442, 1984.

The Effect of Growth and Occlusal Disharmony on Fibril Collagen in the Articular Disc of the Rat Temporomandibular Joint

TOMOYA TANAHASHI

Department of Oral Biochemistry, Division of Oral Structure, Function and Development

Asahi University Graduate School of Dentistry

(Chief : Prof. Atsushi Fujita)

1851 Hozumi, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

Key words : Collagen, Articular disc

Abstract *This paper reports the biochemical investigation in fibril collagen in the articular disc of the rat temporomandibular joint with experimental occlusal disharmony. The articular discs were removed from rats at 3, 4, 6 and 10 weeks after birth. Fibril collagen was extracted from the discs and solubilized by pepsin digestion. Pepsin-soluble collagen molecules were fractionated by interrupted gel electrophoresis in a denatured state and analyzed immunochemically by Western blotting. The content of fibril collagen increased with age, especially in the 4-week extracts. The fibril collagen in discs consisted mainly of type I, and small amounts of type II and III. No remarkable changes were observed on the distribution amount for type I collagen with age. Quantitative changes of type II and III collagen with age and occlusal disharmony may be related to the functional role of the articular disc.*