

断乳時期の違いによるマウスの成長発育変化

山内 旬美^{1,2} 加川千鶴¹

Differences in Growth and Development in Mice Weaned at Different Ages

Hiromi YAMAUCHI^{1,2} and Chiduyo KAGAWA¹

To date, no findings have been reported on the relationships of early weaning to body weight gain, jaw bone size, and changes in type X collagen expression in the hypertrophic cell zone, which is implicated in the ossification of mandibular condylar cartilage.

It is possible that the timing of weaning affects not only jawbone size but also mandibular condylar cartilage cells, which, in turn, influences the ossification process. Here we measured bodyweight and jaw bone size of mice weaned at different ages.

We also examined the morphological change of the mandibular condylar cartilage, with an emphasis on type X collagen, a hypertrophic cartilage cell marker. Mouse pups which were kept with their dams and underwent natural weaning (control group) were compared with those which were force-weaned at postnatal day 14 (P14 group), 18 (P18 group), and 23 (P23 group). In the forced-weaned groups, pups fed on their lactating dams until the weaning date. The dams were fed a liquid diet while kept with their offspring. Pups were separated from their dams on the weaning date and allowed to consume solid feed and water ad libitum. Body weight, food intake, maxillary and mandibular widths, dental arch dimensions, and mandibular height were measured in all the groups. Specimens stained with hematoxylin and eosin were examined to measure lamellae thickness in the mandibular condylar cartilage. Immunofluorescence was performed to examine the distribution of type X collagen in the cartilage. Our assessment revealed the following :

1. The early weaning (P14) group showed early weight gain. However, no differences in bodyweight were seen between the groups on postnatal day 38.
2. Food intake on postnatal day 38 was lower in the P14 group than in the controls.
3. The maxillary width was slightly narrower and the anterior arch of the mandible was longer on postnatal day 23 in the P14 group than in the controls. However, on postnatal day 38, these jaw bone dimensions were generally smaller in the P14 group than in the controls.
4. Immunohistochemical staining for type X collagen in the hypertrophic cell zone in the cartilage was weaker in the P14 group than in the controls.

受付：平成25年4月6日，受理：平成25年5月10日
奥羽大学歯学部成長発育歯学講座小児歯科学分野¹
やまうち歯科医院²
(指導：島村和宏教授)

Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral
Growth and Development, Ohi University School of
Dentistry¹
Yamauchi Dental Clinic²
(Director : Prof. Kazuhiro SHIMAMURA)

Taken together, early weaning affected the growth of the jawbone with the cartilage ossification delayed. These may be partly because type X collagen expression of the hypertrophic cell zone of condylar cartilage was weak, and delayed in the early weaning group.

Key words : weaning, mandibular condylar cartilage, type X collagen, mice

緒 言

母乳などの液体栄養から固形食による栄養摂取に移行する離乳は、十分な栄養補給による身体の正常な成長発育を促すためにも重要である。近年、離乳食の開始時期と完了時期は遅くなる傾向にあり、わが国においても生後6か月以降での離乳期間を推奨している¹⁾。一方、早く親と同じような食事に移行させたいからか、4か月までに開始して11か月までの間で早期に離乳完了し母乳あるいは人工乳を止める（以下断乳）場合も少なくない¹⁾。

厚生労働省の調査²⁾では、小児の食事に関する保護者の悩みとして、「咬めない」や「軟食を好む」などが挙げられている。二木³⁾はヒトでは硬すぎる離乳食、あるいは離乳の進め方が早すぎて早く断乳するとその後の摂食機能発達が遅れると述べている。またモルモットを用いた咀嚼機能発達に関する研究では、断乳時期が不適切な場合、咀嚼リズム形成に遅れが生じる可能性を指摘している⁴⁾。摂食・嚥下の基本的な機能の獲得期は離乳期に相当するといわれ、この時期は食べることによって顎口腔機能の獲得と顎口腔諸器官の成長を促す重要な時期と考えられている。顎口腔系の成長発育に及ぼす飼料形状や栄養量に関する研究から、マウスの顎運動記録や咀嚼筋活動に関して、液状飼料飼育では固形飼育に比較して下顎運動量や運動範囲が小さいこと⁵⁾や飼料形状と栄養量に関して、粉末飼料飼育ラットは固形飼料飼育ラットに比べて上顎歯列弓の幅径や下顎高径が小さくなり、また栄養価が低い飼料でも顎骨の成長量は小さくなる⁶⁾などの指摘がある。また下顎骨の成長については下顎頭軟骨が機械的な力によって変化し、リモデリングすることが指摘されており^{7,8)}、食性の違いが下顎頭軟骨の厚さにも影響する可能性も示

されている⁹⁾。さらに下顎骨における各種コラーゲン分布状況を把握するために、免疫組織化学的検索が行われてきた^{10,11)}。特に下顎頭軟骨の成長に関する免疫組織化学的検索としては、Ⅰ型とⅡ型のコラーゲンに関する報告^{12,13)}やⅩ型コラーゲンについての報告^{12,14)}がある。成長期の下顎頭軟骨は細胞および組織の形態から線維層、増殖層、成熟層および肥大細胞層（以下 肥大層）の4層に分類され^{15,16)}、線維層でのプロテオグリカン4の発現¹⁷⁾や増殖層における副甲状腺ホルモン関連ペプチドや成熟層でのⅡ型コラーゲンの局在とともに肥大層におけるⅩ型コラーゲンが存在するという報告もある¹⁸⁾。しかしながら、標準的な断乳時期よりも早すぎる場合の身体成長の様相や、下顎頭軟骨におけるコラーゲンの局在、特に軟骨の骨化に強く関与すると考えられる肥大層内のⅩ型コラーゲンについて断乳時期との関連を検索したものは見あたらない。

そこで本研究では、断乳時期の違いによって、成長過程での顎骨の大きさばかりでなく、下顎頭軟骨の細胞にも影響して変化が現れると考え、マウスの体重、顎骨成長量を検索するとともに、肥大軟骨細胞のマーカーであるⅩ型コラーゲンに着目し、下顎頭軟骨の成長過程について形態学的に検討した。

材料と方法

1. 材 料

実験動物には、生後3週齢のICR系雌、雄性マウス（日本クレア社）を各5頭ずつペアリングさせて生じた生後14日～38日齢の仔マウス85匹を用いた。通常通り母マウスとともに飼育した群と、断乳時期を変えて飼育した群に分けた。離乳時期は生後2～3週頃に相当し、徐々に固形飼料を摂取し生後3週頃に終了（以下 断乳）すると



図1 飼育条件

されていることから、断乳が早すぎる場合を生後14日目と設定した。また断乳の時期は通常に近いものの、固形食摂取の練習をさせず、母乳摂取期間を長くした例として、生後18日目と23日目を設定した。それぞれの飼育条件を図1に示す。

対照群：通常飼育と動揺に母マウスおよび仔マウスをともに飼育した。仔マウスは生後2週目頃までは母乳のみを摂取し、その後徐々に少量ずつ固形飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）を摂取するようになり、生後3週頃に自然に母乳摂取を止め固形食に移行した。母乳、水および固形飼料は自由に摂取させた。

生後14日断乳群（以下 P14）：出生後13日目まで母マウスと伴に飼育し母乳栄養のみとした。14日より母マウスと分離して水と固形飼料を自由に摂取させた。

生後18日断乳群（以下 P18）：出生後17日目まで母マウスと伴に飼育した。母マウスには、出産後14日目まで固形飼料と水を自由摂取させ、15日～17日の間は、仔マウスに固形飼料を摂取させないために、栄養量を固形飼料と同等の1.5Cal/ml に調整した液体飼料 F2LCW（オリエンタル酵母工業株式会社）を与えた。仔マウスは生後17日目までは母乳のみとし、18日から母マウスと分離して水および固形飼料を自由に摂取させた。

生後23日断乳群（以下 P23）：出生後22日目まで母マウスと伴に飼育した。母マウスには、出産

後14日目まで固形飼料と水を自由摂取させ、15日～22日の間は、仔マウスに固形飼料を摂取させないために、1.5Cal/ml に調整した液体飼料とした。仔マウスは母乳と液体飼料のみを与え、23日目から母マウスと分離して水および固形飼料を自由に摂取させた。全ての動物は明期8：00～20：00、暗期20：00～8：00に調整された環境にて飼育した。

なお、本実験は奥羽大学動物実験研究施設施行規則を遵守し、動物実験委員会の承認を受けた。

2. 体重および食餌摂取量測定

体重計測は、生後14、18、23、25、28、31、38日目の午前8時に電子天秤 GR-120（（株）エー・アンド・デイ社）を用いて計測した。

食餌摂取量の測定は、まず食餌摂取量直前の時期12時間絶食させ、午前8時に飼育ケージ毎に固形飼料を100g ずつ与え、午前8時30分に残った飼料を回収して電子天秤を用いて残った飼料の重量を計測し、減少した飼料重量を仔マウス数で除して1頭あたりの捕食量平均値を算出した。測定は生後21、23、25、28、31、38日目とした。

3. 顎骨の計測

顎骨計測は、各群の生後23、38日目の各日齢のマウスをジエチルエーテルによる麻酔下に頸椎脱臼後、断頭して下顎骨を摘出し周囲軟組織を除去してデジタルノギス SR44（Mitutoyo 社）を用いて計測した。計測項目を図2に示す。

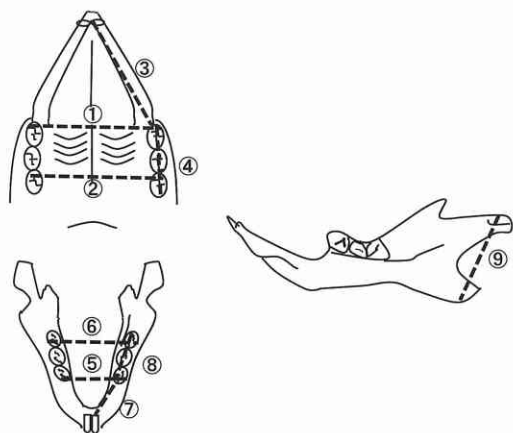


図2 計測項目

上顎：①上顎左右第1臼歯近心頬側咬頭頂間距離(①口蓋前方幅)②上顎左右第3臼歯近心頬側咬頭頂間距離(②口蓋後方幅)③上顎切歯舌側歯頸部中央～第1臼歯近心面歯頸部中央間距離(③歯列前方長)④上顎第1臼歯近心最大豊隆部～第3臼歯遠心最大豊隆部間距離(④歯列後方長)

下顎：⑤下顎左右第1臼歯近心頬側咬頭頂間距離(⑤下顎前方幅)⑥下顎左右第3臼歯近心頬側咬頭頂間距離(⑥下顎後方幅)⑦下顎切歯舌側歯頸部中央～第1臼歯近心最大豊隆部間距離(⑦歯列前方長)⑧下顎第1臼歯近心最大豊隆部～第3臼歯遠心最大豊隆部間距離(⑧歯列後方長)⑨下顎頭頂点～下顎角間距離(⑨下顎高)

4. 組織学的観察

1) 組織画像解析

計測の終了した顎骨を、4℃4%パラホルムアルデヒドにて24時間浸漬固定した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、4℃4%EDTA(pH7.0)で14日間脱灰した。通法によりパラフィン包埋し、下顎頭頂点の前後0.5mmの範囲から5μmで、下顎頭前頭断の連続切片をマイクロームで作製した。下顎頭組織像の観察として、作製した組織切片にヘマトキシリン-エオジン染色(H-E染色)を行い、光学顕微鏡にて観察し、撮影した画像を以下の計測に用いた。Saburiら¹⁵⁾とShibataら¹⁶⁾に準じ、下顎頭を構成する線維層、増殖層、成熟層および細胞肥大層(以下肥大層)それぞれの厚さを、画像解析処理ソフトImageJ(Ver.1.45)(WayneRasband(NIH)USA)を用いて計測した。

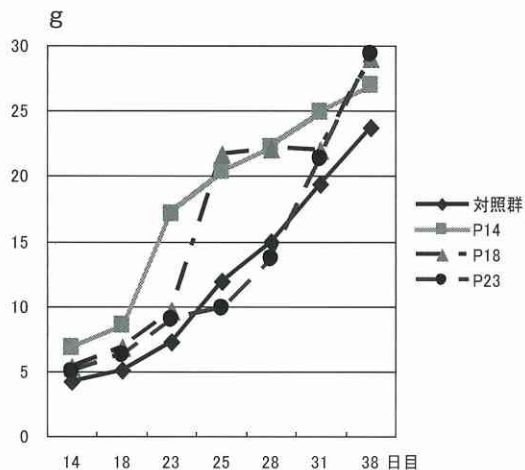


図3 断乳時期別平均体重の推移

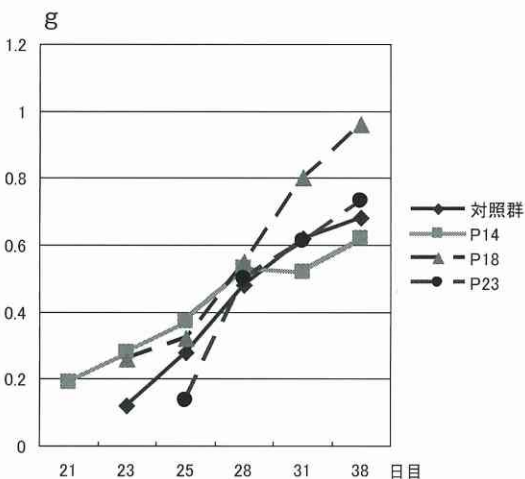


図4 断乳時期別平均食餌摂取量の推移

2) 免疫組織化学的観察

軟骨細胞内のX型コラーゲン局在を観察する目的で、蛍光法による免疫組織化学的染色を行った。切片を通法に従って脱パラフィンした後にPBSで洗浄し、一次抗体反応として400倍に希釈したウサギ由来抗X型コラーゲンポリクローナル抗体(Sigma-Aldrich・USA)を室温で一晩反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体反応として200倍希釈したローダミン標識ヤギ由来抗ウサギ抗体(Sigma-Aldrich・USA)を暗室内にて室温で一晩反応させた。PBSで洗浄後DAPI(VECTOR Laboratories Inc, USA)を反応させてから蛍光

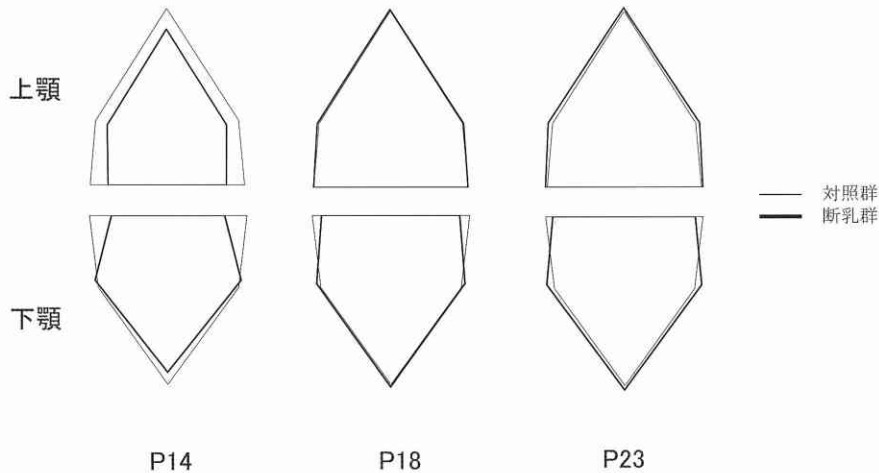


図5 生後38日目の上下顎骨模式図
各計測値の差を2倍に拡大した。
細線：対照群の計測結果を表す模式図
太線：各断乳群の計測結果を表す模式図

表 1 上下顎骨距離計測値

生後23日目	上顎骨	①口蓋前方	②口蓋後方	③歯列前方	④歯列後方	
	対照群	4.22(0.12)	4.40(0.19)	4.54(0.16)	3.22(0.19)	
	P14	4.03(0.20)	4.23(0.17)	4.81(0.28)	2.80(0.20)	*
	P18	4.24(0.05)	4.52(0.09)	4.94(0.11)	3.21(0.16)	
	P23	3.07(0.21)	3.21(0.25)	3.80(0.30)	2.86(0.20)	
	下顎骨	⑤下顎前方	⑥下顎後方	⑦歯列前方	⑧歯列後方	⑨下顎高
	対照群	3.68(0.04)	3.87(0.04)	3.65(0.05)	3.01(0.03)	4.30(0.24)
	P14	3.58(0.19)	3.91(0.06)	4.10(0.13)	2.90(0.22)	4.61(0.47)
	P18	3.67(0.13)	3.90(0.12)	4.29(0.13)	3.16(0.12)	4.85(0.08)
	P23	2.90(0.31)	3.08(0.43)	3.07(0.54)	2.79(0.13)	3.96(0.16)
	上顎骨	①口蓋前方	②口蓋後方	③歯列前方	④歯列後方	
	対照群	4.53(0.11)	4.90(0.01)	5.68(0.02)	3.28(0.04)	
	P14	4.16(0.45)	4.33(0.57)	4.87(0.28)	3.02(0.23)	
	P18	4.59(0.22)	4.89(0.36)	5.82(0.20)	3.24(0.16)	
	P23	4.67(0.08)	4.94(0.16)	5.85(0.12)	3.29(0.06)	
	下顎骨	⑤下顎前方	⑥下顎後方	⑦歯列前方	⑧歯列後方	⑨下顎高
生後38日目	対照群	4.03(0.01)	4.52(0.05)	4.49(0.07)	3.33(0.06)	5.95(0.06)
	P14	4.11(0.36)	3.88(0.34)	4.27(0.22)	3.01(0.20)	5.37(0.50)
	P18	4.16(0.17)	4.25(0.24)	4.79(0.18)	3.17(0.14)	6.27(0.44)
	P23	4.24(0.26)	4.31(0.37)	4.84(0.15)	3.18(0.11)	5.97(0.24)

* : P < 0.05

顕微鏡にて観察した。

5. 統計処理

対照群と P14, P18 および P23 との比較統計の有意差検定は Unpaired Student’s t-test と Mann-Whitney U-test で行い, 統計学的有意水準を P<0.05 とした。

結 果

1. 断乳時期別の体重と食餌摂取量

断乳時期別の体重増加の推移をみると, P14 と P18 は対照群に比べて全ての計測時点で体重が重く, 特に P14 は生後18日から23日にかけて急激に増加した。P18 は生後23日から25日にかけて急

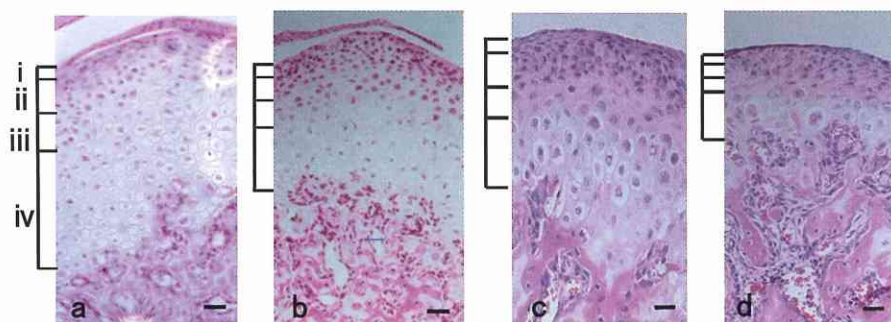


図6 生後23日目の下顎頭軟骨のH-E染色像

a : 対照群 b : P14 c : P18 d : P23

i : 線維層 ii : 増殖層 iii : 成熟層 iv : 細胞肥大層 スケールバー : 20 μ m

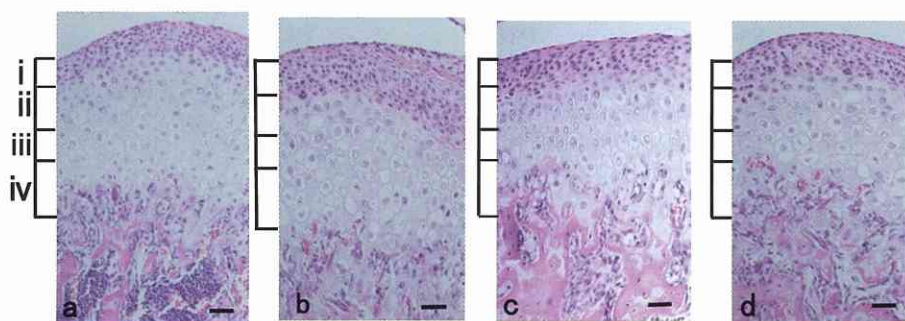


図7 生後38日目の下顎頭軟骨のH-E染色像

a : 対照群 b : P14 c : P18 d : P23

i : 線維層 ii : 増殖層 iii : 成熟層 iv : 細胞肥大層 スケールバー : 20 μ m

激に増加していた。P23は対照群と同様になだらかな増加傾向を示した。いずれの群も38日目にはほぼ同等の体重となったが、対照群が最も小さかった（図3）。

食餌摂取量の推移をみると、P14は23日目で対照群よりも多かったものの、38日目では対照群よりも少なくなっていた。P18では生後25日目まではP14よりも少なかったものの、以後は対照群を含めいずれの群よりも多かった。P23は断乳直後の25日目から28日目にかけて摂取量が急激に増加し38日目では対照群よりも多かった（図4）。

2. 離乳時期別の上顎骨の大きさ

生後23日目と38日目の上下顎骨の距離計測値を表1に、生後38日目の上下顎骨形態の模式図を図5に示した。生後23日目の上顎骨では、対照群に比べてP14は歯列後方の長さが有意に小さく、その他の値もすべて小さい傾向を示した。P18の上顎骨は、対照群に比べ歯列前方の長さが

有意に長く、口蓋後方の幅でも大きい傾向を示した。P23は対照群に比べて歯列前方の長さが有意に小さかった。その他の計測値いずれにおいても対照群を含め他群に比較して小さかった（表1）。

生後23日目の下顎骨では、P14は対照群に比べ歯列前方の長さが有意に大きく、下顎高も対照群と比べ大きい傾向を示した。P18は対照群に比べ、歯列前方および後方の長さと同様に下顎高が有意に大きかった。P23は対照群に比べいずれの計測値も小さく、特に歯列後方の長さと同様に下顎高は有意に小さかった（表1）。生後38日目の上顎骨では、P14は対照群に比べいずれの計測項目でも小さく、特に歯列前方の長さは有意に小さかった。またP18、P23に比較しても小さかった。P18はいずれの計測項目も対照群とほぼ同等の結果となった。P23は統計的有意差はなかったものの、対照群と比べいずれの計測項目も大きかった（表1、図5）。

生後38日目の下顎骨では、P14は対照群に比べ

表2 生後23日目の下顎頭軟骨細胞層計測値 単位：μm

	線維層	増殖層	成熟層	肥大層
対照群	2.2(0.8)	7.4(1.6)	5.3(2.2)	15.5(1.2)
P14	1.9(0.4)	9.6(1.9)	5.4(1.6)	14.9(1.7)
P18	2.2(0.4)	7.5(1.1)	5.0(0.6)	17.7(2.1)
P23	2.6(0.8)	7.9(1.6)	4.9(1.4)	8.4(1.3)

* : P < 0.05 ** : P < 0.01

表3 生後38日目の下顎頭軟骨細胞層計測値 単位：μm

	線維層	増殖層	成熟層	肥大層
対照群	6.7(1.2)	6.1(1.4)	6.7(1.4)	22.1(2.8)
P14	4.9(1.3)	6.8(1.3)	6.2(1.6)	24.2(2.8)
P18	2.9(0.5)	6.5(1.9)	6.0(1.1)	22.4(1.4)
P23	3.3(0.5)	9.6(0.9)	7.0(1.1)	23.7(2.5)

* : P < 0.05 ** : P < 0.01

下顎後方の幅が小さく、歯列前方および後方の長さは有意に小さかった。また下顎高も有意に小さく、P18と P23よりも小さかった。P18は対照群に比べ、下顎後方の幅が小さかったものの全体的には対照群に近い大きさとなり、歯列前方の長さは、対照群に比べ有意に大きかった。P23は対照群に比べ下顎後方の幅が小さかったが、下顎前方の幅や歯列前方の長さでは対照群よりも大きく、全体的には対照群の大きさに近くなっていた（表1，図5）。

3. 下顎頭軟骨の H-E 染色像

下顎頭部の H-E 染色像では、関節頭表面から、水平的に細胞が配列している線維層、垂直方向に細胞が配列しその数を増している増殖層、一つ一つの細胞が大きくなっている成熟層、およびさらに細胞が大きさを増して核も大きくなっている肥大層が区別して観察された（図6，7）。

4. 下顎頭軟骨細胞層の厚さ

下顎頭軟骨細胞層の厚さを計測した結果、離乳時期の違いによって厚みに差が見られた。生後23日目では、P14は対照群に比較して増殖層の厚さが大きかったが、肥大層ではわずかに小さかった。P18では、対照群に比べ肥大層が有意に厚さを増していた。P23では対照群に比べ肥大層が有意に薄かった（表2，図8）。

生後38日目では、P14は対照群に比べ線維層が有意に薄かったが、肥大層では対照群よりもわず

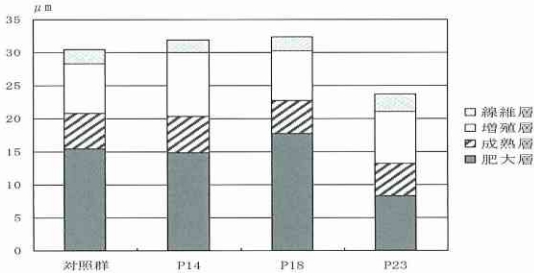


図8 生後23日目の下顎頭軟骨細胞層の厚さ

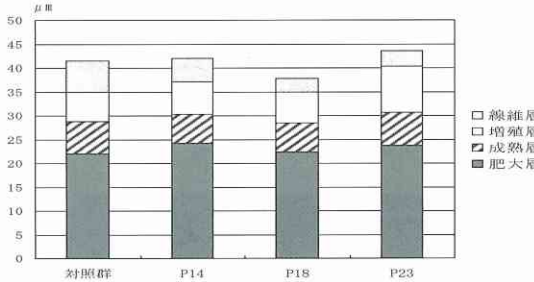


図9 生後38日目の下顎頭軟骨細胞層の厚さ

かに厚かった。P18は対照群に比べ線維層が有意に薄かったが、他の細胞層は対照群と同程度の厚さであった。P23は対照群と比べ、線維層が有意に薄かったが、逆に増殖層では有意に厚かった。成熟層と肥大層も対照群よりも厚く、細胞層全体厚さも厚かった（表3，図9）。

5. X型コラーゲンの局在

生後23日目では、各群で肥大層内にX型コラーゲンの発現が認められたが、P14と P23は他群に比べ発現が弱かった（図10）。生後38日目では、23日目では対照群と比べて発現の弱かった P14と P23でも、X型コラーゲンの発現がみられた。各群とも、肥大層下の軟骨基質部分にもX型コラーゲンの強い発現が観察された（図11）。

考 察

1. 身体成長について

マウスの歯の萌出は生後10日頃で、固形飼料の摂取はその頃から可能とも考えられたが、離乳時期は生後2～3週間徐徐に進むことから、生後14日未満での母マウスとの分離は困難と判断し、本研究では最も早く断乳して固形飼料を開始する時期を生後14日目とした。図3に示すよう

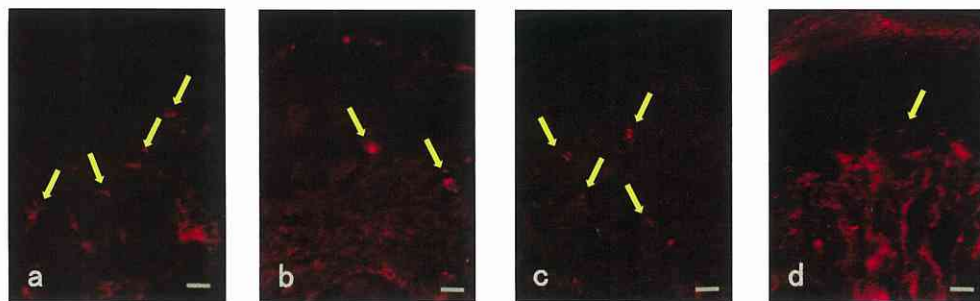


図10 生後23日目のX型コラーゲンの局在

生後23日目ではP14, P18, P23で肥大層内にX型コラーゲンの発現が認められた(矢印)。対照群(a)に比べ、P14(b)とP23(d)は発現が弱く、P18(c)は発現が強かった。

a : 対照群 b : P14 c : P18 d : P23

矢印：肥大細胞層における免疫陽性反応

スケールバー：20 μ m

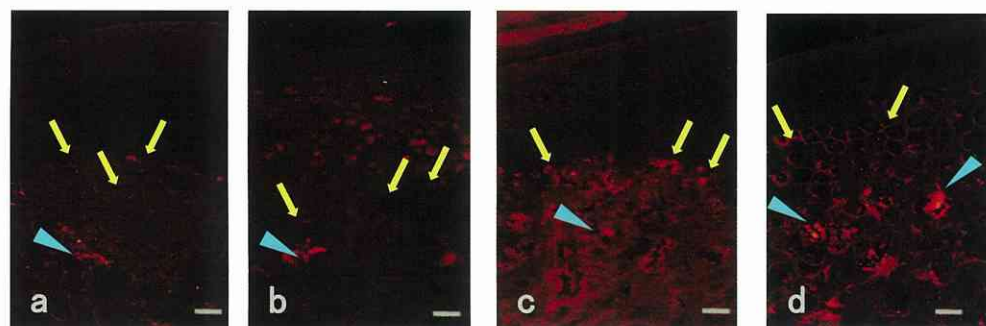


図11 生後38日目のX型コラーゲンの局在

生後38日目では対照群に比べ、P14, P18, P23においてもX型コラーゲンの発現が強く認められた(矢印)。P14, P18, P23の肥大層下の軟骨基質部分にもX型コラーゲン陽性が認められた(矢頭)。

a : 対照群 b : P14 c : P18 d : P23

矢印：肥大細胞層における免疫陽性反応

矢頭印：軟骨基質内における免疫陽性反応

スケールバー：20 μ m

に断乳時期を早めた P14 の体重は、対照群よりも計測期間を通して常に重く、生後18日から23日にかけて急激に増加していた。また、図4の通り食餌摂取量についても、生後23日～28日までは対照群よりも多かった。本研究に用いた固形飼料と液状飼料の栄養量は業者指定に基づいており、固形と液状飼料の栄養量は同じであることから、母マウスとともにいる期間の違いによって、食餌摂取のタイミングや量に違いが生じたと考えられ、離乳期間における母マウスの存在は仔マウスの摂食行動に影響を及ぼすことが示唆された。近年、乳児期の栄養過多により早期に体重増加すること

が、その後成長期や成人期での肥満や生活習慣病リスク上昇につながるとの報告^{19, 20)}があり、乳児期早期の急速な体重増加に対する懸念が示されている¹⁾。本研究において P14 で対照群よりも体重増加が早まり、断乳初期の飼料摂取量も多かったことから、早すぎる断乳により、食餌摂取量が増加する可能性が示唆された。

食行動の発達に関しては、先天的に歯が萌出せず、歯根膜からの感覚性入力遮断された状態でも、吸啜運動から咀嚼運動への変換が起こるという報告²¹⁾がある。また、離乳期ラットの非経口栄養摂取による顎骨成長への影響に関する研究では、

咀嚼筋の付着に関与する下顎枝、顎関節などで成長の遅延²⁰⁾がみられている。

本研究ではP14の生後23日目での顎骨の大きさは、対照群に比較して上顎では統計学的な有意差はなかったものの口蓋の幅が小さく歯列後方の長さでは有意に小さかった。下顎においては、歯列前方の長さは有意に大きいものの、その他の計測結果ではほぼ同様な大きさであった。P14の顎骨の高さは、早期に固形飼料に移行したことが機械的刺激となったのか、P23よりも大きいものの、図5の通り生後38日目では逆に対照群を含む他群より小さかった。特に上顎歯列前方の長さや下顎歯列後方の長さおよび下顎高は有意に小さかった。久保田²²⁾は吸啜期において適切な刺激を与えなかった場合、顎発育や筋機能の発達に大きな影響をもたらすとしている。本研究においては、離乳期間における早い時期での固形物摂取による顎骨への刺激は、適切な時期の適切な刺激とはいえ、そのためP14は生後38日目の顎骨の下顎高や下顎後方の長さが小さくなったと考えられる。瀧上⁶⁾も飼料形状が異なることにより上下顎歯列の幅径や下顎高が小さくなるとしている。離乳時期の食習慣が咀嚼機能の獲得と発達に重要であり、マウスの咀嚼運動を解析した研究²³⁾では、液状飼料飼育では飼料の硬さ・性状の識別する能力が劣り、咀嚼パターンとリズムが不安定になるとしている。モルモットを用いた研究⁴⁾でも、咀嚼リズム獲得には咬む訓練により徐々に離乳させる過程が必要であるとしている。さらに、吉田²⁴⁾は液状飼料でマウスを飼育した結果、咬筋と側頭筋の筋重量が有意に小さくなり、筋線維の分化や筋線維直径の成長にも遅れがでると報告している。このような顎骨に付着する咀嚼筋への影響も顎骨成長に関連していると推察される。生後38日目の顎骨計測において、P23は対照群とほぼ同じ大きさであったが、P14は対照群よりも小さかった。

以上のことから、本研究結果において断乳時期を早めたP14で、生後38日目では対照群よりも小さかった原因として、固形飼料など咀嚼による一定の機械的刺激が顎骨成長にとってプラスになるものの、顎骨周囲の筋の成長や咀嚼機能の獲得とのバランスが図られなかったことで、スムーズな

成長には結びつかなかったと考えられる。つまり断乳が早すぎ、十分な固形食摂取のための訓練ができない場合には、上下顎骨の幅や長さあるいは下顎高などが小さくなることを示唆している。

2. 組織学的変化について

軟骨の成長過程では、軟骨細胞の増殖と肥大化、および細胞外基質の産生によってその量と大きさを増していき、中心部では最も古い軟骨細胞が肥大化して変性し、その肥大化した細胞の周囲の基質に石灰化が始まる。図6, 7の通り、本研究でのマウス下顎頭軟骨のH-E染色像をみると、23日目のH-E染色像では、対照群やP18あるいはP23に比較してP14の成熟層と肥大層の細胞は小さく、細胞の成長が遅れていると考えられた。生後38日目ではそれぞれ成熟が進んだものの、P14は他群に比べて肥大層下の骨基質が少なくなっていた。各細胞層の厚みをみると、生後38日目では図9の通り対照群とP14の線維層は比較的厚くなっていたが、断乳が遅く母乳のみの期間が長いP18とP23は対照群に比べ薄かった。線維層は、下顎頭に機械的圧力がかかる際の、下顎頭軟骨の外殻の役目を果たすと考えられ¹²⁾、経口栄養摂取による刺激の有無によって、軟骨膜層厚径が減少する可能性が指摘されており²²⁾、内部の骨の成長状況に合わせて線維層の厚みも変わる可能性が考えられた。また図8の通り生後23日目の増殖層はP14において特に厚く、肥大層はP23で薄かったが、図7の通り38日目の増殖層ではP23が有意に厚く、肥大層ではいずれの群も差がなくなっていた。これは、成長初期段階では断乳後の固形食摂取等の影響により細胞の増殖が活発なため増殖層の厚みが増したと考えられた。

一方で軟骨内骨化に関わる肥大層の厚さは、P14で対照群に比べ薄くなっていた。適切な訓練期間のない早すぎる断乳では、軟骨内骨化の過程に遅れが生じる可能性があると考えられた。さらにX型コラーゲンの局在を検索した結果から、図10に示すように生後23日目のP14では肥大層のX型コラーゲンの発現が弱く、38日目では対照群、P18あるいはP23と同様な発現がみられた。X型コラーゲンは肥大した軟骨細胞に得意的に発現され、軟骨の石灰化および軟骨内骨化の際に、細胞

を支持する足場を供給する役目を持ち、軟骨の骨化に大きく関与していると考えられている¹²⁾。本研究結果でも、肥大層でX型コラーゲンの局在が観察され、骨化の足がかりとなっていると考えられた。しかし下顎頭軟骨の成長には適度な過重ストレスが必要であるとされる⁷⁻⁹⁾が、断乳時期の違いにより食性が変化すると、吸啜あるいは咀嚼運動による適正な刺激が適切な期間で加わらなくなる可能性があると思われる。固形食への準備としてそれに対応できる顎関節の成長が必要であり、マウスにおいては生後3週齢を境に成長や過重ストレスに変化が起きるとの報告⁹⁾もなされていることから、生後2週齢で早期断乳した本研究におけるP14での下顎頭軟骨へのストレスは、定型的な発育を促す程度ではなかったと推測される。本研究の結果、断乳時期が早すぎることは、下顎頭軟骨の肥大層におけるX型コラーゲンの発現とその後の軟骨内骨化に影響を与え、骨の硬さなど成熟度も低下すると考えられた。

3. 断乳時期と成長について

WHOは離乳開始時期を生後6か月とし、それまでは母乳のみで育て、2歳までは母乳の継続を勧めている²⁵⁾。しかし、同時に適切な補完食を与えらるゝとしており、徐々に固形食を摂取するための十分な時間が必要であることを意味し、いたずらに離乳あるいは断乳を遅らせることを推奨しているものではない。

本研究の結果、断乳時期を著しく早めた場合、体重や食餌摂取量の早期増加あるいは増加スピードを早める可能性があり、下顎骨の成長量に違いが現れることが示された。さらに、下顎頭軟骨細胞層の厚さにも影響し、X型コラーゲンの発現時期に遅れを来たして骨化過程に影響することが示唆された。離乳期間においては、個々の成長の様子を見ながら、適切な時期に適切な順序での進行することが必要であると考えられた。

結 論

本研究の結果、以下の結論を得た。

1. 離乳時期を早め早期に固形飼料に移行したP14では、対照群に比べ体重増加が早かったが、38日目では差がなかった。

2. P14の飼料摂取量は、生後38日目では対照群に比べ少ない傾向を示した。

3. 顎骨計測では、P14は生後23日目においては対照群よりも上顎の幅がわずかに小さく、下顎歯列前方の長さが大きかったものの、生後38日目では対照群より全体的に小さかった。

4. 免疫組織化学的観察では、P14の軟骨内の肥大細胞層におけるX型コラーゲンの陽性反応は、対照群に比べて弱かった。

以上の結果から、マウスの断乳時期を早めた場合、軟骨の骨化に伴う顎骨の成長に遅延が認められた。その一因として、下顎頭軟骨の肥大細胞層のX型コラーゲン発現は弱く、発現時期の遅れがあると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに際し、終始ご懇篤なご指導とご校閲を賜りました奥羽大学歯学部 成長発育歯学講座 小児歯科学分野 島村和宏教授に深甚なる感謝の意を表します。またご専門の立場からご校閲を賜りました奥羽大学歯学部生体構造学講座 渡邊弘樹教授、口腔機能分子生物学講座 宗形芳英教授ならびに口腔病態解析制御学講座 伊東博司教授に衷心より感謝申し上げます。さらに本研究の遂行にあたりご協力頂きました、奥羽大学歯学部口腔機能分子生物学講座口腔生理学分野ならびに成長発育歯学講座小児歯科学分野の諸先生方に篤く御礼申し上げます。

本研究の要旨の一部は、第53回奥羽大学歯学会（平成24年6月16日 郡山）において発表した。

文 献

- 1) 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課：授乳・離乳の支援ガイド；<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/03/dl/s0314-17.pdf>
- 2) 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課：平成17年度乳幼児栄養調査報告書；<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/06/h0629-1.html>
- 3) 二木 武：第1章 栄養と発達。小児の発達栄養行動（二木 武，川井 尚，庄司順一郎編）第1版；78 医歯薬出版 東京 1995。
- 4) 廬 兆民，平良梨津仔，玉井良尚，飯沼光生：モルモットにおける離乳時期が咀嚼機能獲得に及ぼす影響。小児歯誌 35；715-721 1997。
- 5) Yamada, M., Koga, Y., Okayasu, I., Sanefuji, K., Yamada, Y., Oi, K. and Yoshida, N.: Influence of soft diet feeding on development of

- masticatory function. *J. Jpn. Soc. Stomatognath. Funct.* **12** ; 118-125 2006.
- 6) 瀧上啓志：飼料の形状、栄養量がラット咀嚼器官の成長や発達におよぼす影響についての検討。滋賀医大誌 **17** ; 29-41 2002.
 - 7) Luder, H. U., Leblond, C. P. and von der Mark, K. : Cellular stages in cartilage formation as revealed by morphometry, radioautography and type II collagen immunostaining of the mandibular condyle from weanling rats. *Am. J. Anat.* **182** ; 197-214 1988.
 - 8) Wadhwa, S. and Kapila, S. : TMJ disorders : Future innovations in diagnostics and therapeutics. *J. Dent. Educ.* **72** ; 930-947 2008.
 - 9) 島田真弓：発生・成長時のマウス下顎骨関節頭軟骨における25kDa 熱ショック蛋白質 (Hsp25) の局在とその役割。金沢大十全医会誌 **111** ; 256-266 2002.
 - 10) 木村晃大：マウス下顎骨形成期の骨形成細胞における基質タンパクの産生とその遺伝子発現。歯科学報 **103** ; 335-345 2003.
 - 11) 清水麻理子：マウスにおける形成期下顎角部の組織学的並びに免疫組織化学的観察。J. Hard Tissue Biology **14** ; 346-350 2005.
 - 12) 蘆田貴司：成長期ラット下顎頭軟骨における I , II および X 型コラーゲンの免疫組織化学的研究。歯基礎誌 **38** ; 80-88 1996.
 - 13) 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 collagen. *Arch. Oral Biol.* **40** ; 473-480 1995.
 - 14) Chen, J., Gupta, T., Barasz, J. A., Kalajzic, Z., Yeh, W. C., Drissi, H., Hand, A. R. and Wadhwa, S. : Analysis of microarchitectural changes in mouse temporomandibular joint osteoarthritis model. *Arch. Oral Biol.* **54** ; 1091-1098 2009.
 - 15) Saburi, N., Taguchi, N., Kaneda, T. and Hoshino, T. : The fate of hypertrophic chondrocytes of the rat mandibular condyle in strontium rickets. *Jpn. J. Oral Biol.* **29** ; 244-252 1987.
 - 16) Shibata, S., Fukada, K., Suzuki, S. and Yamashita, Y. : Immunohistochemistry of collagen types II and X, and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J. Anat.* **191** ; 561-570 1997.
 - 17) Ohno, S., Schmid, T., Tanne, Y., Kamiya, T., Honda, K., Ohno-Nakahara, M., Swentko, N., Desai, T. A., Tanne, K., Knudson, C.B. and Knudson, W. : Expression of superficial zone protein in mandibular condyle cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **14** ; 807-813 2006.
 - 18) Shibukawa, Y., Young, B., Wu, C., Yamada, S., Long, F., Pacifici, M. and Koyama, E. : Temporomandibular joint hedgehog signaling. *Dev. Dyn.* **236** ; 426-434 2007.
 - 19) Reynaldo, M., Aryeh, D. S. and Dirk, G. S. : Early nutrition and later adiposity. *J. Nutr.* **131** ; 874S-880S 2001.
 - 20) 塚田久江, 三浦克久, 城戸照彦, 佐伯和子, 川島ひろ子, 伊川あけみ, 西 正美, 森河裕子, 西条旨子, 中西由美子, 由田克士, 中川秀昭：乳幼児期肥満と成人期肥満との関連－石川県における出生後20年間の縦断研究－。公衆衛生誌 **50** ; 1125-1133 2003.
 - 21) Kobayashi, M., Masuda, Y., Kishino, M., Ishida, T., Maeda, N. and Morimoto, T. : Characteristic of mastication in the anodontic mouse. *J. Dent. Res.* **81** ; 594-597 2002.
 - 22) 久保田 悠, 大岡貴史, 拝野俊之, 馬谷原光織, 弘中祥司, 向井美恵：離乳期ラットにおける胃瘻からの栄養摂取が顎骨の成長に与える影響。障歯誌 **31** ; 51-58 2010.
 - 23) 吉田教明：成長期における咀嚼機能の発達と学習のメカニズム解明に向けた実験的アプローチについて。顎機能誌 **13** ; 2-10 2006.
 - 24) 吉田礼子：液状飼料飼育マウスの咀嚼筋筋線維の分化と発達に関する研究。日矯歯誌 **54** ; 52-63.
 - 25) WHO : 10 facts on breastfeeding. [http : // www.who.int/features/factsfiles/breastfeeding/facts/en/index.html](http://www.who.int/features/factsfiles/breastfeeding/facts/en/index.html)
- 著者への連絡先：山内旬美，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部成長発育歯学講座小児歯科学分野
- Reprint requests : Hiromi YAMAUCHI, Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan