

# ラット片側臼歯喪失に対する下顎頭軟骨の 組織化学的検索

高橋 一人

## Histochemical Study of Mandibular Condylar Cartilage of Rats with Experimentally Induced Unilateral Teeth Loss

Kazuto TAKAHASHI

The purpose of this study was to identify the cellular mechanisms occurring in the functional changes of chondrocytes of the temporomandibular joint (TMJ). For this purpose, immunohistochemical analyses were performed to examine the proliferation and differentiation of chondrocytes in rat TMJ cartilage with experimentally induced unilateral tooth loss. The upper right-side molars were extracted from adult female rats, and then the animals were sacrificed to remove both the right (tooth-extracted) and the left (non-tooth-extracted) sides of the mandibular condyles 3, 5, 7, and 14 days later. H-E, alcian blue, and immunohistochemical stainings of the sections were carried out. The antibodies used in immunohistochemical stainings were as follows : anti-PCNA, -BrdU, -Sox9, -Indian Hedgehog (Ihh), -PTHrP, -type II collagen, and -type X collagen antibodies. Our findings suggest that the imbalanced mechanical force that was experimentally induced by the unilateral loss of teeth influenced cartilage metabolism, and caused morphological changes in TMJ cartilage by controlled growth factor cascades.

Key words : condylar cartilage, unilateral teeth loss, temporomandibular joint

### 緒 言

顎関節の関節面に存在する下顎頭軟骨<sup>1-4)</sup>は、様々な顎機能によって発生する圧縮、剪断あるいは引張応力に適應するために負荷の支持点となる領域であると考えられている<sup>5)</sup>。そのため、下顎頭軟骨は成長や改造に対して特別な多角的適應力を持ち、軟骨形成の改造や再生、それに続く軟骨内骨化を通して、機械的負荷に適應できる機能を有する<sup>6,7)</sup>。下顎頭軟骨において観察される軟骨形成と、その結果として起こる軟骨内骨形成はイン

スリン様成長因子などの成長因子によって調節されている<sup>8)</sup>。軟骨形成における細胞の増殖、分化、成熟の調整に対して重要なシグナルをもたらすいくつかの細胞外成長因子が明らかになってきている<sup>9)</sup>。

さらに顎関節は滑膜関節のひとつであるが、蝶番運動のみならず滑走運動も行い、運動の終末位が咬合により規定されていることが特徴である。したがって咬合の変化により顎関節における圧の負担状態に変化が生じることが想像される。咬合あるいは咀嚼の機能不全、臼歯の喪失、片側性の

咀嚼様式やブラキシズムのような生体力学的な要素は、関節構造の絶対的あるいは相対的な過重負担を通して退行性の顎関節症の開始あるいは進行に関与することが指摘されている<sup>10)</sup>。咬合接触が片側のみに存在する場合、下顎位が不安定になり、咬合力により咬合接触点を中心に反対側の咬合高径が減少し、下顎位が反対側に偏位する。この状況で過度の咬合力が顎関節に加わると、歯、歯周組織および顎関節が崩壊する危険性が非常に高くなることが知られている<sup>11)</sup>。

基本的に類似の構造を備える動物の顎関節においても、同様の現象が生じることが考えられている。したがって動物モデルにおける臼歯の片側抜歯による下顎頭の変化は、顎関節への負荷に対する生体の反応と捉えることができる。このような観点から、片側性の臼歯抜歯を行った研究では、顎関節の形態学的変化として円板後部における局所循環の障害、線維の走行が不規則になり、下顎頭軟骨における軟骨細胞の凝集、顎関節における関節軟骨の破壊等の組織学的変化がヒトおよびラットにおいて報告されている<sup>12,13)</sup>。

持続的な片側性咀嚼は顎関節に対して咬合の不均衡により機械的負荷の変化を引き起こす可能性があり、顎関節に対する不適切な咬合の影響、あるいは咬合の変化に対する顎関節の適応性を検討することは、顎関節と咬合の相互的な関連性を明らかにするという点において臨床的に重要であると考えられる。しかし、このような顎関節への機械的負荷が変化した状況で、顎関節の下顎頭軟骨における細胞生物学レベルでの詳細な検討は十分に行われていない。そこで本研究では、ラットを用いた片側性の臼歯喪失が下顎頭軟骨に及ぼす影響を細胞レベルで検討し、顎関節の軟骨代謝の調節機構の一端を明らかにすることを目的とした。そのために、実験的な片側臼歯抜歯を行い、軟骨細胞の増殖及び分化マーカーを用いた免疫組織化学染色により下顎頭軟骨を形態学的に検索した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物と方法

実験は奥羽大学動物実験規定に従って行った。10週齢の雌SDラット（日本クレア社）を用い、

エーテル麻酔下にて無痛的に実験を行った。無処置を対照群、右側上顎第1、第2臼歯および第3臼歯の抜歯を行った側を抜歯側群、非抜歯側を非抜歯側群とした。被検体の対照群は30匹の右側とし、実験群は30匹とし、抜歯後3、5、7日および14日に下顎骨を採取した。また採取の2時間前に50mg/kg体重の5-ブロモデオキシウリジン（Sigma社、USA）を抗BrdU抗体による細胞増殖の評価のために投与した。下顎骨を採取後ただちに4℃、中性緩衝ホルマリンに浸漬し、20時間固定を行った。その後、4℃、10% EDTAにて14日間脱灰し、通法に従い脱水し下顎骨を水平的には咬合平面で、前後的には下顎切痕最深处で分割しパラフィン包埋して、約5μmの連続切片を作成した。これらの切片に対してHematoxylin-Eosin (H-E) 染色、Alcian blue 染色および免疫組織化学染色を行った。

### 2. 染色方法

一般染色としてH-E染色およびAlcian blue 染色を通法に従って行った<sup>14)</sup>。免疫組織化学染色は増殖マーカーのウサギ抗ラット Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz社、USA)、分化マーカーのウサギ抗ラット Sox9ポリクローナル抗体 (Santa Cruz社、USA)、ヤギ抗ラット Indian hedgehog (Ihh) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz社、USA)、ウサギ抗ラット Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz社、USA)、軟骨基質マーカーのウサギ抗ラット type II collagen ポリクローナル抗体 (メルク社、日本)、ウサギ抗ラット type X collagen ポリクローナル抗体 (メルク社、日本)、増殖マーカーのマウス抗ラット Bromodeoxyuridine (BrdU) モノクローナル抗体 (Chemicon社、USA) を一次抗体として使用した。二次抗体及びストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼは、ヒストファイブキット（ニチレイバイオサイエンス、東京）を用いた。切片をキシレンにより脱パラフィンし、エタノール系列で親水後、内因性ペルオキシダーゼの活性を阻害するために3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に5分間浸漬した。0.01mol/L リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4) で洗浄後、

非特異的発色を抑えるために抗 Ihh 抗体の免疫組織化学的染色に対しては10%ウサギ正常血清-PBS(blocking buffer, ヒストファインキット, ニチレイ)と30分間反応させた。抗 PCNA 抗体, 抗 Sox9抗体, 抗 PTHrP 抗体の免疫組織化学的染色に対しては10%ヤギ正常血清-PBS (blocking buffer, ヒストファインキット, ニチレイ)と30分間反応させた。次に, blocking buffer で100倍に希釈した一次抗体と, モイスチャーチャンバー内にて4℃のもと1時間反応させた。反応後 PBS で洗浄し, 抗 Ihh 抗体の免疫組織化学的染色に対しては二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体と室温で10分間反応させた。抗 PCNA 抗体, 抗 Sox9抗体, 抗 PTHrP 抗体の免疫組織化学的染色に対しては二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と室温で10分間反応させた。反応後, PBS で5分間3回洗浄し, 次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと7分間反応させた。抗 type II collagen 抗体, 抗 type X collagen 抗体に対しては, キシレンにより脱パラフィンし, エタノール系列で親水後, 2.5% ヒアルノニダーゼ (和光純薬工業株式会社, 日本) で1時間処理後, 内因性ペルオキシダーゼの活性を阻害するために3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に5分間浸漬した。10%ヤギ正常血清-PBS(blocking buffer)と30分間反応させた。次に, モイスチャーチャンバー内にて4℃のもと1時間 blocking buffer で100倍に希釈した一次抗体と反応させた。PBS で洗浄し, 二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と室温で10分間反応させた。反応後, PBS で5分間3回洗浄し, 次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと7分間反応させた。抗 BrdU 抗体に対しては2N HClに1時間浸漬し, PBS で洗浄後, 10%ウサギ正常血清-PBS(blocking buffer)と30分間反応させた。次に, モイスチャーチャンバー内に4℃で1時間 blocking buffer で100倍に希釈した一次抗体と反応させた。PBS で洗浄後, 二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗マウス IgG 抗体と室温で10分間反応させた。反応後, PBS で洗浄し, 次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと7分間反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプト

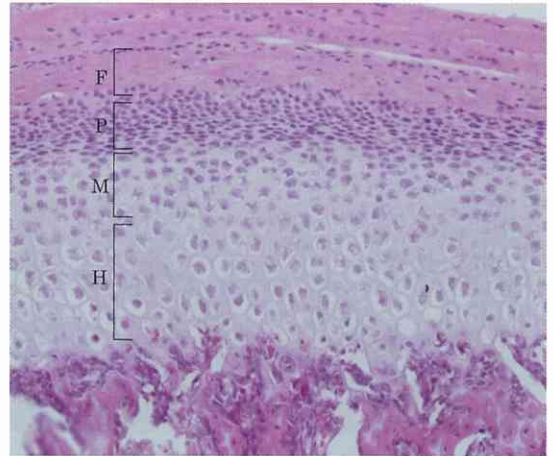


図1 10週齢ラット下顎頭軟骨の顕微鏡写真。線維層(F), 増殖層(P), 成熟層(M), 肥大層(H)がみられる。

アビジンを反応させた全ての切片に対して PBS で洗浄後, 3,3'-diaminobenzidine (DAB 基質キット, ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用いて5分間発色させた。その後, 通法に従い脱水, 封入した切片を光学顕微鏡にて観察した。なお, 陰性対照として一次抗体を省略した後, それぞれの二次抗体を反応させ, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた。全ての陰性対照群の切片には非特異的反応がみられないことが確認された。

### 3. 定量的分析

Rabie AB ら<sup>15)</sup>の方法に則り, ImageJ {National Institutes of Health (NIH), USA} を用いて, 各切片の下顎頭中央部の400×400 $\mu$ mの領域における細胞数および面積を計測した。

### 4. 統計処理

有意差検定には, Kruskal-Wallis 順位検定を行い, 多重比較に Bonferroni 補正 Mann-Whitney 検定を用いた。

## 結 果

### 1. H-E 染色

ラット下顎頭軟骨には細胞の形態により関節腔から石灰化側にむかって4つの層が認められる(図1)。線維層(F)は2~3層の扁平ないし紡錘形の細胞からなる。増殖層(P)の細胞は線維層のものと比較してやや丸みをおびた楕円形の

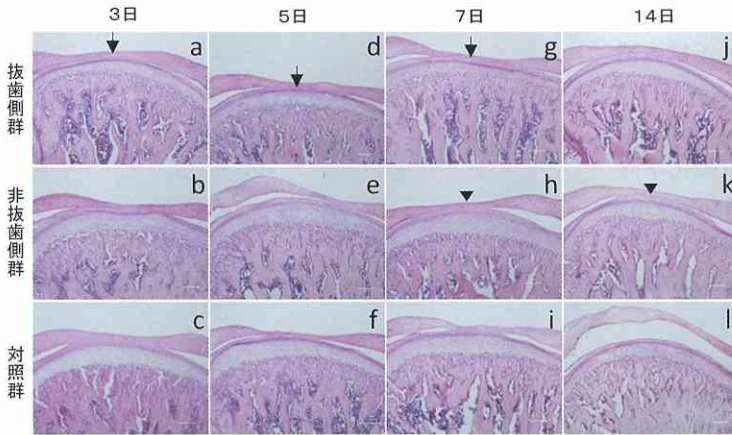


図2 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群におけるH-E染色所見。(a, d, g, j) : 抜歯側群, (b, e, h, k) : 非抜歯側群, (c, f, i, l) : 対照群。(a-c) : 実験3日後, (d-f) : 実験5日後, (g-i) : 実験7日後, (j-l) : 実験14日後。スケールバー=200 $\mu$ m。矢印: 厚さの減少がみられた領域, 矢じり: 厚さの増加がみられた領域。

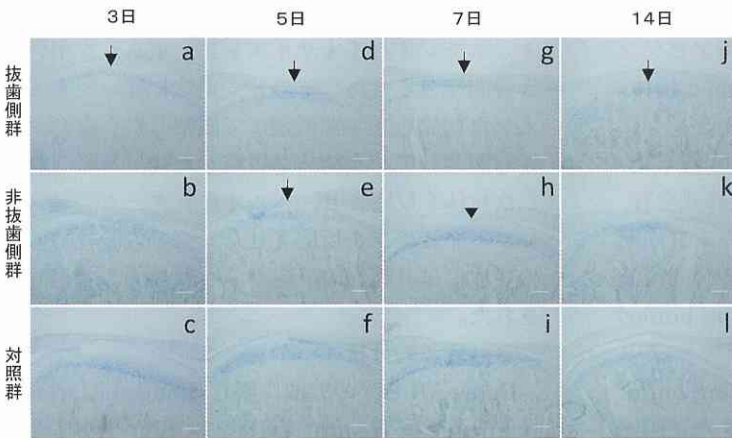


図4 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群におけるアルシアンブルー染色所見。(a, d, g, j) : 抜歯側群, (b, e, h, k) : 非抜歯側群, (c, f, i, l) : 対照群。(a-c) : 実験3日後, (d-f) : 実験5日後, (g-i) : 実験7日後, (j-l) : 実験14日後。スケールバー=200 $\mu$ m。矢印: 染色面積の減少した領域, 矢じり: 染色面積の増加した領域。

細胞からなる。成熟層 (M) では細胞形態はさらに大きくなり類円形を示す。肥大層 (H) の軟骨細胞は著しい肥大を示すが、その細胞構造が崩壊しているものが存在する。

H-E 染色所見を図2に示す。また軟骨層の厚さの比較を図3に示す。抜歯側群では、対照群と比較して、3日、5日、および7日後に軟骨層の厚さに減少が認められた。これに対して非抜歯側群では、7日、および14日後に軟骨層の厚さに増加が認められた。

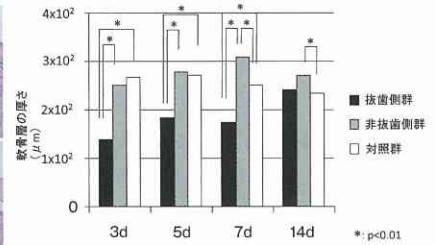


図3 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群における軟骨層の厚さの比較。\*:  $p < 0.01$ 。対照群と比較して、抜歯側群では、3日、5日、および7日後に軟骨層の厚さに減少が認められた。これに対して非抜歯側群では、7日、および14日後に軟骨層の厚さに増加が認められた。

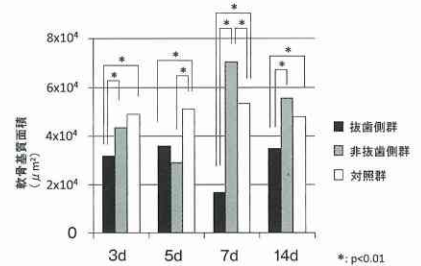


図5 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群におけるアルシアンブルー染色面積の比較。\*:  $p < 0.01$ 。対照群と比較して、抜歯側群では、3日、5日、7日および14日後に染色性の減少が認められた。これに対して非抜歯側群では、7日後に染色性の増加が認められた。

増加が認められた。

## 2. Alcian blue 染色

Alcian blue 染色所見を図4に示す。また軟骨基質の染色面積の比較を図5に示す。対照群では、肥大層における軟骨基質に染色性が認められた。対照群と比較して、抜歯側群では、3日、5日、7日および14日後に染色性の減少が認められた。これに対して非抜歯側群では、7日後に染色性の増加が認められた。

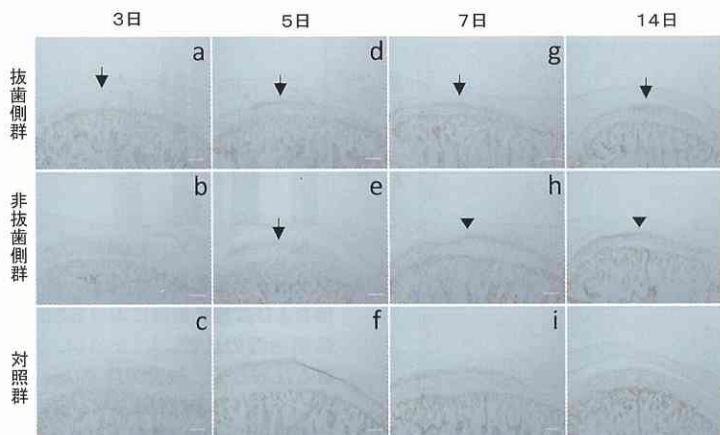


図6 ラット下顎頭軟骨の対照群，抜歯側群および非抜歯側群におけるPCNAの免疫組織化学的染色所見。(a, d, g, j)：抜歯側群，(b, e, h, k)：非抜歯側群，(c, f, i, l)：対照群。(a-c)：実験3日後，(d-f)：実験5日後，(g-i)：実験7日後，(j-l)：実験14日後。スケールバー=200 $\mu$ m。矢印：陽性細胞数の減少した領域，矢じり：陽性細胞数の増加した領域。

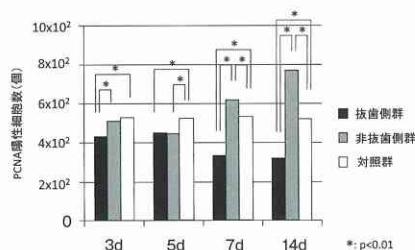


図7 ラット下顎頭軟骨の対照群，抜歯側群および非抜歯側群におけるPCNA陽性細胞数の比較。\*： $p < 0.01$ 。対照群と比較して，抜歯側群では，3日，5日，7日，および14日後に，PCNA陽性細胞数の減少が観察された。非抜歯側群では5日，7日，および14日後に，PCNA陽性細胞数の増加が観察された。

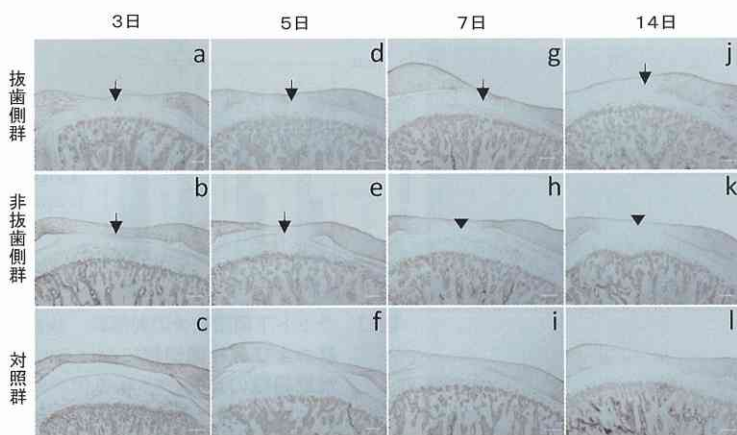


図8 ラット下顎頭軟骨の対照群，抜歯側群および非抜歯側群におけるBrdUの免疫組織化学的染色所見。(a, d, g, j)：抜歯側群，(b, e, h, k)：非抜歯側群，(c, f, i, l)：対照群。(a-c)：実験3日後，(d-f)：実験5日後，(g-i)：実験7日後，(j-l)：実験14日後。スケールバー=200 $\mu$ m。矢印：陽性細胞数の減少した領域，矢じり：陽性細胞数の増加した領域。

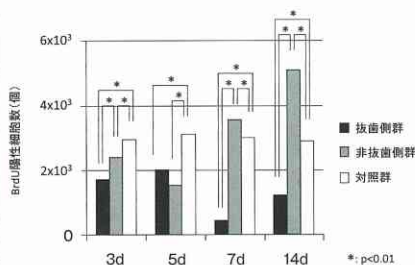


図9 ラット下顎頭軟骨の対照群，抜歯側群および非抜歯側群におけるBrdU陽性細胞数の比較。\*： $p < 0.01$ 。対照群と比較して，抜歯側群では，3日，5日，7日，および14日後に，BrdU陽性細胞数の減少が観察された。非抜歯側群では7日，および14日後に，BrdU陽性細胞数の増加が観察された。

### 3. 免疫組織化学的検索

#### 1) PCNA の発現

PCNA の発現を図6に示す。また PCNA 陽性細胞数の比較を図7に示す。対照群では，増殖層，成熟層および肥大層の細胞の核にその発現がみられた。抜歯側群では，3日，5日，7日，および14日後に，増殖層，成熟層および肥大層における PCNA 陽性細胞数の減少が観察された。これに対して，非抜歯側群では5日，7日，および

14日後に，増殖層，成熟層および肥大層における PCNA 陽性細胞数の増加が観察された。

#### 2) BrdU の発現

BrdU の発現を図8に示す。また BrdU 陽性細胞数の比較を図9に示す。対照群では，増殖層，成熟層および肥大層の軟骨細胞にその発現がみられた。抜歯側群では，3日，5日，7日，および14日後に，増殖層，成熟層および肥大層の軟骨細胞における BrdU 陽性細胞数の減少が観察さ

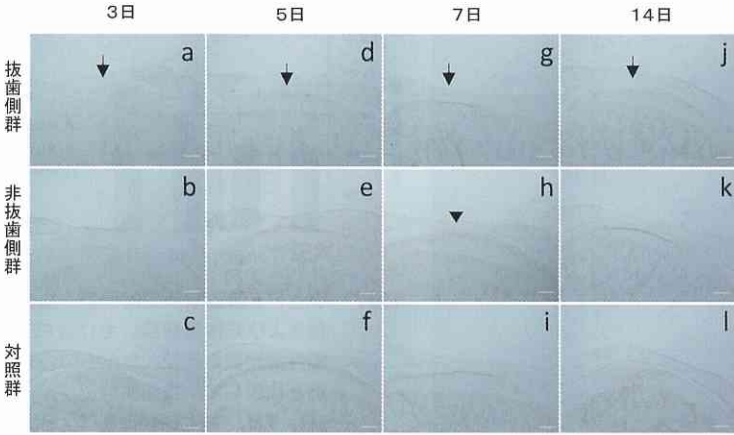


図10 ラット下顎頭軟骨の対照群, 抜歯側群および非抜歯側群におけるSox9の免疫組織化学的染色所見。(a, d, g, j) : 抜歯側群, (b, e, h, k) : 非抜歯側群, (c, f, i, l) : 対照群。(a-c) : 実験3日後, (d-f) : 実験5日後, (g-i) : 実験7日後, (j-l) : 実験14日後。スケールバー=200 $\mu$ m。矢印: 陽性細胞数の減少した領域, 矢じり: 陽性細胞数の増加した領域。

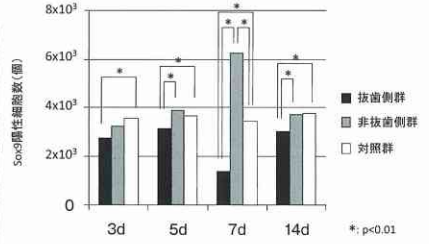


図11 ラット下顎頭軟骨の対照群, 抜歯側群および非抜歯側群におけるSox9陽性細胞数の比較。\*: p<0.01。対照群と比較して, 抜歯側群では, 3日, 5日, 7日, および14日後に, Sox9陽性細胞数の減少が観察された。非抜歯側群では7日後に, Sox9陽性細胞数の増加が観察された。

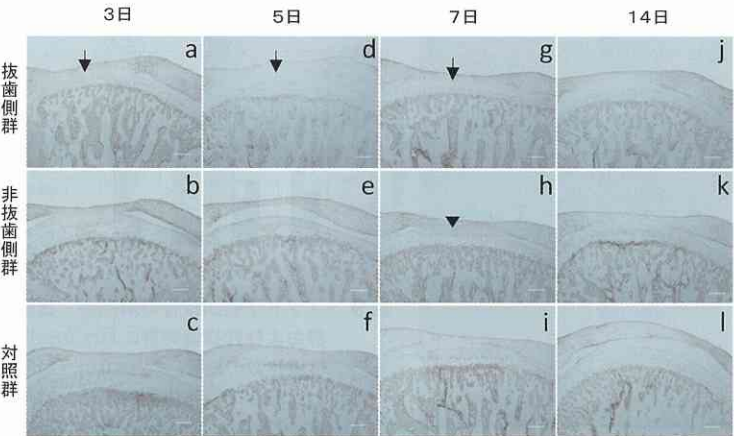


図12 ラット下顎頭軟骨の対照群, 抜歯側群および非抜歯側群におけるIhhの免疫組織化学的染色所見。(a, d, g, j) : 抜歯側群, (b, e, h, k) : 非抜歯側群, (c, f, i, l) : 対照群。(a-c) : 実験3日後, (d-f) : 実験5日後, (g-i) : 実験7日後, (j-l) : 実験14日後。スケールバー=200 $\mu$ m。矢印: 陽性細胞数の減少した領域, 矢じり: 陽性細胞数の増加した領域。

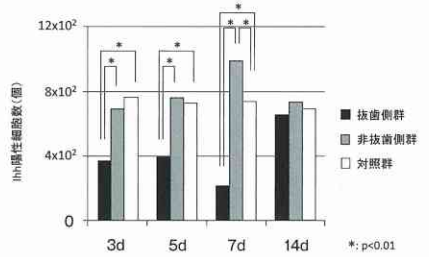


図13 ラット下顎頭軟骨の対照群, 抜歯側群および非抜歯側群におけるIhh陽性細胞数の比較。\*: p<0.01。対照群と比較して, 抜歯側群では, 3日, 5日, および7日後に, Ihh陽性細胞数の減少が観察された。非抜歯側群では7日後にIhh陽性細胞数の増加が観察された。

れた。これに対して, 非抜歯側群では7日, および14日後に, 増殖層, 成熟層および肥大層の軟骨細胞におけるBrdU陽性細胞数の増加が観察された。

3) Sox9の発現

Sox9の発現を図10に示す。また Sox9陽性細胞数の比較を図11に示す。対照群では, 増殖層および成熟層の軟骨細胞にその発現がみられた。抜歯側群では, 3日, 5日, 7日, および14日後に,

増殖層および成熟層の軟骨細胞における Sox9陽性細胞数の減少が観察された。これに対して, 非抜歯側群では7日後に, 増殖層および成熟層の軟骨細胞における Sox9陽性細胞数の増加が観察された。

4) Ihhの発現

Ihhの発現を図12に示す。また Ihh陽性細胞数の比較を図13に示す。対照群では, 増殖層および成熟層の軟骨細胞にその発現がみられた。抜

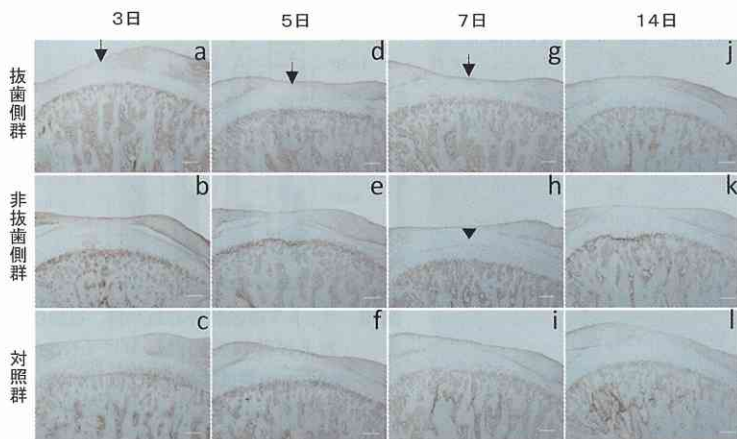


図14 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群におけるPTHrPの免疫組織化学的染色所見。(a, d, g, j)：抜歯側群，(b, e, h, k)：非抜歯側群，(c, f, i, l)：対照群。(a-c)：実験3日後，(d-f)：実験5日後，(g-i)：実験7日後，(j-l)：実験14日後。スケールバー＝200 $\mu$ m。矢印：陽性細胞数の減少した領域，矢じり：陽性細胞数の増加した領域。

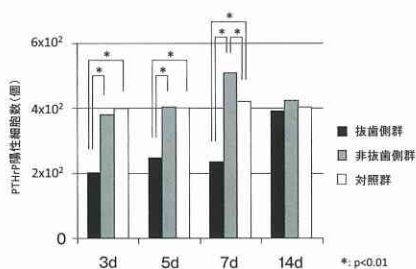


図15 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群におけるPTHrP陽性細胞数の比較。\*：p<0.01。対照群と比較して、抜歯側群では、3日、5日、および7日後に、PTHrP陽性細胞数の減少が観察された。非抜歯側群では7日後にPTHrP陽性細胞数の増加が観察された。

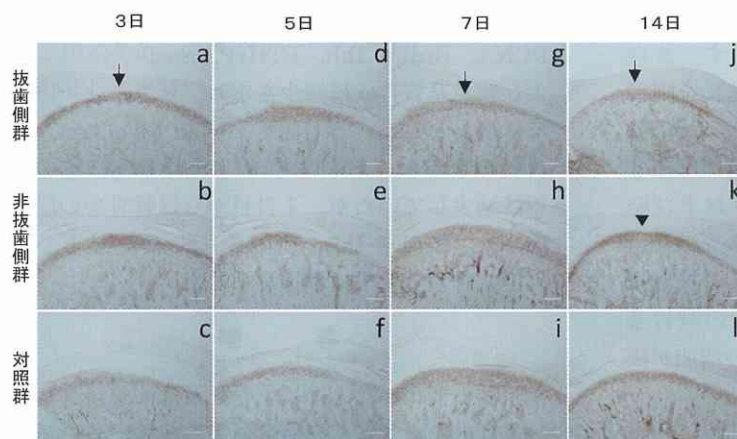


図16 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群におけるtype II collagenの免疫組織化学的染色所見。(a, d, g, j)：抜歯側群，(b, e, h, k)：非抜歯側群，(c, f, i, l)：対照群。(a-c)：実験3日後，(d-f)：実験5日後，(g-i)：実験7日後，(j-l)：実験14日後。スケールバー＝200 $\mu$ m。矢印：染色面積の減少した領域，矢じり：染色面積の増加した領域。

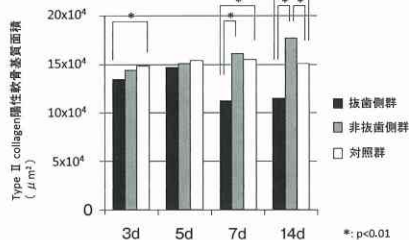


図17 ラット下顎頭軟骨の対照群、抜歯側群および非抜歯側群におけるtype II collagen染色面積の比較。\*：p<0.01。対照群と比較して、抜歯側群では、3日、7日、および14日後に、type II collagenの染色性の減少が観察された。非抜歯側群では14日後にtype II collagenの染色性の増加が観察された。

歯側群では、3日、5日、および7日後に、増殖層および成熟層の軟骨細胞におけるIhh陽性細胞数の減少が観察された。これに対して、非抜歯側群では7日後に増殖層および成熟層の軟骨細胞におけるIhh陽性細胞数の増加が観察された。

5) PTHrPの発現

PTHrPの発現を図14に示す。またPTHrP陽性細胞数の比較を図15に示す。対照群では、増

殖層および成熟層の軟骨細胞にその発現がみられた。抜歯側群では、3日、5日、および7日後に、増殖層および成熟層の軟骨細胞におけるPTHrP陽性細胞数の減少が観察された。これに対して、非抜歯側群では7日後に増殖層および成熟層の軟骨細胞におけるPTHrP陽性細胞数の増加が観察された。

6) Type II collagenの発現

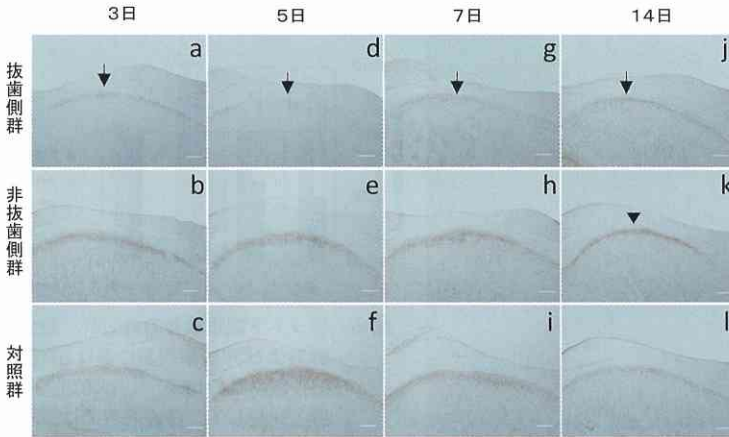


図18 ラット下顎頭軟骨の対照群, 抜歯側群および非抜歯側群におけるtype X collagenの免疫組織化学的染色所見。(a, d, g, j): 抜歯側群, (b, e, h, k): 非抜歯側群, (c, f, i, l): 対照群。(a-c): 実験3日後, (d-f): 実験5日後, (g-i): 実験7日後, (j-l): 実験14日後。スケールバー=200 $\mu$ m。矢印: 染色面積の減少した領域, 矢じり: 染色面積の増加した領域。

Type II collagenの発現を図16に示す。また Type II collagen 陽性軟骨基質面積の比較を図17に示す。対照群では, 成熟層, および肥大層の軟骨基質にその発現がみられた。抜歯側群では, 3日, 7日, および14日後に, 成熟層, および肥大層の軟骨基質における type II collagen の染色性の減少が観察された。これに対して, 非抜歯側群では14日後の成熟層, および肥大層の軟骨基質における type II collagen の染色性の増加が観察された。

#### 7) Type X collagen の発現

Type X collagen の発現を図18に示す。また Type X collagen 陽性軟骨基質面積の比較を図19に示す。対照群では, 肥大層の軟骨基質にその発現がみられた。抜歯側群では, 3日, 5日, 7日, および14日後に, 肥大層の軟骨基質における Type X collagen の染色性の減少が観察された。これに対して, 非抜歯側群では14日後に肥大層の軟骨基質における Type X collagen の染色性の増加が観察された。

これらの結果より, 各群における軟骨層の厚さの変化(表1), 増殖マーカー陽性細胞数の変化(表2), 分化マーカー陽性細胞数の変化(表3), 軟骨基質面積の変化(表4)を表に示す。対照群と比較して, 抜歯側では3日目から軟骨層の厚さ,

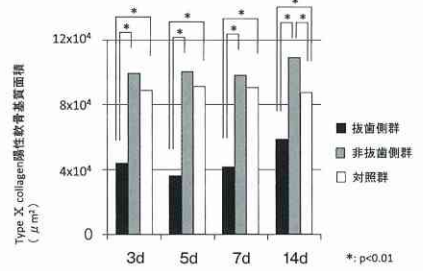


図19 ラット下顎頭軟骨の対照群, 抜歯側群および非抜歯側群におけるtype X collagen染色面積の比較。\*:  $p < 0.01$ 。対照群と比較して, 抜歯側群では, 3日, 5日, 7日, および14日後に, Type X collagenの染色性の減少が観察された。非抜歯側群では14日後に肥大層の軟骨基質におけるType X collagenの染色性の増加が観察された。

PCNA, BrdU, Ihh, PTHrP, Sox9の発現, および軟骨基質合成は減少を示し, 一方, 非抜歯側では例外として, 5日目の Alcian blue 染色, 5日目の PCNA, 3日および5日目の BrdU の発現は減少していたが, 7日目からは軟骨層の厚さ, PCNA, BrdU, Ihh, PTHrP, Sox9の発現, および軟骨基質合成は増加を示した。

## 考 察

咀嚼の変化が顎関節に影響を及ぼす可能性については, 今まで多くの研究によって検討されてきた<sup>9-12)</sup>。しかしながら顎関節への機械的負荷が変化した状態における軟骨細胞の分化・増殖については, 未だ詳細には検討されていない。今回ラットに対して片側抜歯を行うことにより人工的に関節負荷モデルを作製し, 下顎頭軟骨においてどのような変化が生ずるかを形態学および免疫組織化学的に検討した。基本的に類似の構造を備える動物の顎関節においても, 片側性の咀嚼による下顎の偏位が生じることが報告されており, 動物モデルにおける臼歯の片側抜歯による下顎頭の変化は, 不適切な顎関節への負荷に対する生体の反応と捉えることができるとしている<sup>12)</sup>。

### 1. 軟骨層の厚さについて

下顎頭軟骨の軟骨層の厚さは軟骨細胞の増殖と



表1 各群における軟骨層の厚さの変化

実験日数	抜歯側群				非抜歯側群			
	3日	5日	7日	14日	3日	5日	7日	14日
軟骨層の厚さ	↓	↓	↓				↑	↑

↑：対照群と比較して増加。↓：対照群と比較して減少。

表2 各群における増殖マーカー陽性細胞数の変化

実験日数	抜歯側群				非抜歯側群			
	3日	5日	7日	14日	3日	5日	7日	14日
PCNA	↓	↓	↓	↓		↓	↑	↑
BrdU	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑

↑：対照群と比較して増加。↓：対照群と比較して減少。

表3 各群における分化マーカー陽性細胞数の変化

実験日数	抜歯側群				非抜歯側群			
	3日	5日	7日	14日	3日	5日	7日	14日
Sox9	↓	↓	↓	↓			↑	
Ihh	↓	↓	↓				↑	
PTHrP	↓	↓	↓				↑	

↑：対照群と比較して増加。↓：対照群と比較して減少。

表4 各群における軟骨基質面積の変化

実験日数	抜歯側群				非抜歯側群			
	3日	5日	7日	14日	3日	5日	7日	14日
Alcian blue	↓	↓	↓	↓		↓	↑	
Type II collagen	↓		↓	↓				↑
Type X collagen	↓	↓	↓	↓				↑

↑：対照群と比較して増加。↓：対照群と比較して減少。

石灰化の調和によって維持されている<sup>16)</sup>。したがって、増殖活性の減少は軟骨層の厚さの減少の一因であると言える。下顎頭軟骨の厚さの減少は、間葉細胞の増殖、軟骨芽細胞への分化の減少あるいは軟骨細胞の成熟、肥大化の段階における時間の短縮によって起こる。下顎頭軟骨への圧縮応力が1週間以上継続した場合に、軟骨層の厚さを減少させることが *in vitro*<sup>17)</sup>、および *in vivo*<sup>18)</sup> の実験で示されている。軟骨組織の量は関節の運動、咀嚼による力などの生理的な力の喪失あるいは、静的な圧縮力が加わることによって減少するが、一方間欠的な力のような適切な力を加えることによって増加する傾向にある<sup>19)</sup> ことが言われている。

本研究において、ラット上顎臼歯を片側のみ抜歯することにより、抜歯側群では、対照群と比較して、3日、5日、および7日後に軟骨層の厚さに減少が認められた。これに対して非抜歯側群では、7日、および14日後に軟骨層の厚さに増加が認められたことから、機械的負荷の変化によって抜歯側においては、細胞の分化、増殖および軟骨基質が減少した結果として、軟骨層の厚さの減少が起き、逆に非抜歯側においては、細胞の分化、増殖および軟骨基質の増加した結果として、軟骨層の厚さの増加が起きていることが示された。

## 2. PCNA および BrdU の発現について

細胞増殖の状態を検索するために、PCNA お

よび BrdU を用いた。PCNA は cyclin と呼ばれ、DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の DNA sliding clamp として機能し、真核生物の染色体 DNA の複製に必須である。そのため、細胞増殖のマーカーとして使用されてきた<sup>20)</sup>。下顎頭軟骨において、PCNA 陽性細胞は軟骨細胞の有糸分裂時に著明に高くなる<sup>21,22)</sup>ことが報告されている。PCNA の合成の割合は中期 G1 期で最も低く、後期 G1 期中に増加し、中期 S 期に最大になり、その後、後期 S 期中には元のレベルにまで減少する<sup>23)</sup>。そのため、PCNA 陽性細胞は細胞周期の G1 相と S 相に存在すると言える。また下顎前方移動装置を装着した結果、下顎頭軟骨の全領域の増殖層および成熟層に PCNA 陽性細胞が増加する<sup>24,25)</sup>ことが報告されている。さらに軟骨細胞に周期的な伸張力を加えた結果、PCNA の mRNA 量が増加する<sup>25)</sup>ことが報告されている。これらのことから下顎頭軟骨において機械的刺激によって細胞の DNA 合成が促進され、PCNA 陽性細胞は増殖している細胞として検出されることが示された。また、BrdU はハロゲン化ピリミジンの一種でチミジンの類似物質であるため、チミジンの代わりに DNA 合成期にある複製している細胞に取り込まれるため S 期細胞の優れたマーカーである<sup>26)</sup>ことが報告されている。さらに BrdU 陽性細胞は下顎頭軟骨への圧縮応力により減少した<sup>27)</sup>ことが報告されている。また下顎を側方変位させる装置を装着することにより機能的側方への変位を起こした場合には、下顎頭が前方移動した側では BrdU 陽性細胞が増加し、対側においては減少する<sup>28)</sup>ことが報告されている。下顎前方移動装置においても陽性細胞は増加する<sup>29)</sup>ことが報告されている。これらのことから下顎頭軟骨への機械的刺激の種類によって DNA 合成が促進または抑制されることが示唆された。よって本研究の結果では、PCNA および BrdU の発現において、対照群では、増殖層、成熟層および肥大層の細胞の核にその発現がみられた。抜歯側群では、3 日、5 日、7 日、および 14 日後に、増殖層、成熟層および肥大層における PCNA および BrdU 陽性細胞数の減少が観察された。これに対して、非抜歯側群では 7 日、および 14 日後に、増殖層、成熟層および肥大層に

おける PCNA および BrdU 陽性細胞数の増加が観察されことから、片側臼歯の抜歯による顎関節に対する機械的負荷の変化によって、抜歯側では、PCNA および BrdU 発現が減少し、DNA 合成の抑制が起きていることが示された。一方、非抜歯側においては、7 日、および 14 日後に PCNA および BrdU の発現が増加し、DNA 合成の促進が起きていることが示された。さらに本研究における非抜歯側で起こる顎関節の変化は、以前の下顎前方移動装置における実験と同様の変化であることが推測される。

### 3. *Ihh*, PTHrP および *Sox9* の発現について

軟骨細胞の成熟と肥大軟骨細胞への分化の状態を検索するために、それらを調節する因子である *Ihh*, PTHrP の発現を調べた。インディアンヘッジホッグ (*Ihh*) は、多くの発生過程の調節に必須の役割を果たすヘッジホッグ (*Hh*) ファミリーの一員であり、顎関節の発生過程における軟骨細胞の肥大化や骨形成両方を支配する重要なシグナル分子である。*Ihh* は前肥大軟骨細胞で発現し、副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) とネガティブフィードバックを形成することによって軟骨分化の開始を調節している<sup>30,31)</sup>。*Ihh* は関節周囲あるいは関節の軟骨細胞の PTHrP 発現を活性化し、PTHrP は PTH/PTHrP 受容体を通して軟骨細胞の肥大化を抑制し、軟骨細胞を増殖の状態に保つことによってさらなる *Ihh* の発現を抑えている<sup>30,32,33)</sup>。ラットに下顎前方移動装置を装着した結果、実験 7 日後に増殖層に存在する間葉細胞において *Ihh* の発現が著明に増加する<sup>34,35)</sup>ことが報告されている。また、引張応力を培養軟骨細胞に加えると PTHrP 非依存的に *Ihh* 発現が増加する<sup>36)</sup>ことが報告されている。Tang GH ら<sup>34,36,37)</sup>は、下顎頭の成長における機械的負荷の影響を分析し、下顎頭において *Ihh* は機械的負荷を軟骨細胞の分化を刺激する信号に変換するために必須の調節因子、すなわち機械的形質導入仲介因子であることを報告した。このことは、顎関節への機械的負荷に反応して、増殖層の間葉細胞および軟骨芽細胞において *Ihh* の発現が増加し、間葉細胞の分化が促進されることを示している。また、副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) は、

甲状腺ホルモン (PTH) ファミリーに属する。循環ホルモンである PTH と比べてその特徴は著しく異なり、PTHrP は多くの組織において多様な機能を伴う局所のメッセンジャーである<sup>38)</sup>。骨格形成の間の、軟骨における PTHrP の生理学的作用は、軟骨細胞の分化と成熟を制御することによる軟骨内骨形成の調整である<sup>39,40)</sup>。ラットに下顎前方移動装置を装着した結果、実験7日後に増殖層に存在する間葉細胞において著明に PTHrP の発現が増加する<sup>15,41)</sup> ことが報告されている。これは顎関節への機械的負荷が PTHrP の発現を引き起こし、下顎頭軟骨細胞のさらなる増殖を可能にすることを示唆している<sup>15)</sup>。また PTHrP は Sox9 の転写を上昇調節<sup>42)</sup> し、下顎頭において間葉細胞から軟骨芽細胞への分化の促進を引き起こす<sup>15)</sup> ことが報告されている。転写因子 Sox9 は、HMG box DNA 結合タンパクの Sry-related family に属し、様々な系統の、細胞の運命の決定に関わる多くの要素を含んでいる。Sox9 はまた間葉細胞が軟骨細胞へ分化する遺伝的プログラムを支配する最も重要な転写因子である<sup>43)</sup>。長管骨端軟骨<sup>44)</sup> および下顎頭軟骨<sup>45)</sup> において、間葉細胞の軟骨芽細胞への分化経路を調整するのに決定的な役割を果たすことが報告されている。また、軟性の食餌を与えたラットにおいて、増殖層および成熟層の上部で Sox9 の発現の増加が実験12時間後から認められた<sup>46)</sup> ことが報告され、このことから機械的負荷の減少と Sox9 の発現の増加が一致することが示された。さらに、下顎前方移動装置を装着した場合には実験5日後に増殖層の軟骨細胞に最も強い発現が観察され、実験7日後に成熟層の軟骨細胞に最も強い発現が観察された<sup>47)</sup>。よって本研究の結果では、Ihh および PTHrP の発現において、対照群では、増殖層および成熟層の軟骨細胞にその発現がみられた。抜歯側群では、3日、5日、および7日後に、増殖層および成熟層の軟骨細胞における Ihh および PTHrP 陽性細胞数の減少が観察された。これに対して、非抜歯側群では7日後に増殖層および成熟層の軟骨細胞における Ihh および PTHrP 陽性細胞数の増加が観察された。Sox9 の発現においては、対照群では、増殖層および成熟層の軟骨細胞にその発現がみら

れた。抜歯側群では、3日、7日、および14日後に、増殖層および成熟層の軟骨細胞における Sox9 陽性細胞数の減少が観察された。これに対して、非抜歯側群では7日後に、増殖層および成熟層の軟骨細胞における Sox9 陽性細胞数の増加が観察された。以上のことから、機械的負荷の変化によって、抜歯側では、Ihh および PTHrP 発現の減少に引き続き、Sox9 の発現が減少した結果、間葉細胞から軟骨芽細胞への分化は抑制され、反対に非抜歯側では7日目から Ihh および PTHrP 発現の増加に引き続き、Sox9 の発現が増加した結果、分化が促進された可能性が示された。

#### 4. 軟骨基質の合成について

軟骨細胞に発現した Sox9 は、下顎頭軟骨基質の主要な構成要素である type II collagen の合成を調節している<sup>48)</sup> ことが報告されている。そこで、軟骨基質の合成の変化を検索するためにアグリカン、type II collagen、および type X collagen の発現量を調べた。

軟骨の主要なプロテオグリカンはコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸であり、これらのグリコサミノグリカンがコアプロテインとヒアルロン酸とともに巨大な分子構造を示すアグリカンを形成する<sup>49)</sup>。アルシアンブルー染色 (pH1.0) では軟骨基質に含まれるプロテオグリカンの硫酸基が染色される<sup>50)</sup> ことが報告されている。また、type II collagen は、成長途中の下顎頭の軟骨基質の骨格を形作るコラーゲンの主な種類であり、軟骨細胞によって合成される<sup>51-53)</sup>。そして軟骨基質が形成された後、軟骨細胞は成熟し肥大化する。肥大軟骨細胞は type X collagen を分泌し、それは軟骨内骨化の開始と、肥大軟骨基質の骨への置換を特徴づける<sup>45)</sup>。type X collagen は軟骨内骨化を運命づける肥大軟骨のコラーゲン骨格を形成し、type II collagen と比較して容易に吸収される<sup>54,55)</sup> ことが報告され、Type X collagen の軟骨代謝に及ぼす作用として、軟骨内骨化における軟骨基質の石灰化を調整することがあげられる<sup>56)</sup>。また胎児の間葉細胞を用いた微量培養の in vitro 研究では、圧縮力はアグリカンの遺伝子発現を上昇調節する<sup>57)</sup> ことが示された。関節軟骨を用いた移植片研究では、断続的な圧力によってアグリカンおよ

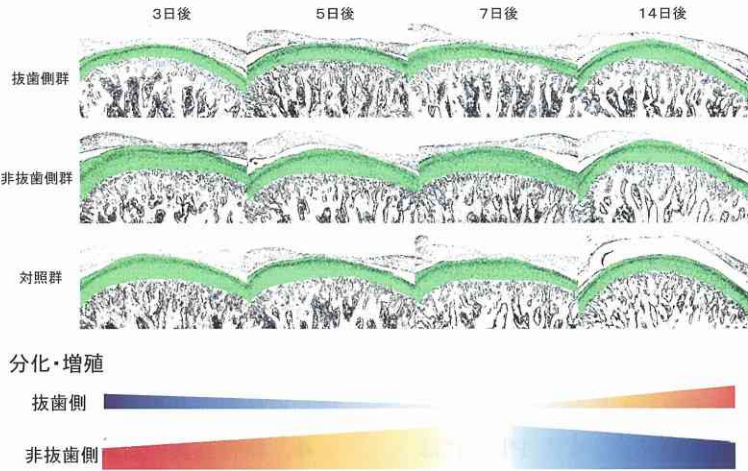


図20 片側臼歯抜歯による軟骨層の厚さの変化と軟骨細胞の分化・増殖との関連性の概略図。上段：軟骨層の部分のみを緑色に着色した切片。下段：軟骨細胞の分化・増殖の傾向。

び type II collagen の mRNA 量が増加する<sup>58)</sup>ことが示された。そして長期の静的な圧縮力はアグリカンおよび type II collagen の mRNA 量を減少させる<sup>59)</sup>ことが報告されている。また、ラットに下顎前方移動装置を装着した結果、実験21日後に肥大層に存在する軟骨基質において著明に type X collagen の発現が増加し<sup>60,61)</sup>、実験14日後に type X collagen の mRNA 量が著明に増加する<sup>61,62)</sup>ことが報告されている。これらのことより機械的的刺激が軟骨基質の合成に影響を与えることが示唆された。よって本研究における Alcian blue 染色の結果では、対照群において、肥大層における軟骨基質に染色性が認められた。抜歯側群では、3日、5日、および7日後に染色面積の減少が認められた。これに対して非抜歯側群では、7日後に染色面積の増加が認められた。Type II collagen の結果では、対照群では、成熟層、および肥大層の軟骨基質にその発現がみられた。抜歯側群では、3日、7日、および14日後に、成熟層、および肥大層の軟骨基質における type II collagen の染色面積の減少が観察された。これに対して、非抜歯側群では14日後の成熟層、および肥大層の軟骨基質における type II collagen の染色面積の増加が観察された。Type X collagen の結果から、対照群では、肥大層の軟骨基質にそ

の発現がみられた。抜歯側群では、3日、5日、7日、および14日後に、肥大層の軟骨基質における Type X collagen の染色面積の減少が観察された。これに対して、非抜歯側群では14日後に肥大層の軟骨基質における Type X collagen の染色面積の増加が観察された。これらのことから、機械的負荷の変化によって、抜歯側では軟骨細胞によるアグリカンおよびコラーゲンの合成量の減少が起こり、非抜歯側では7日後において軟骨細胞によるアグリカンの合成の増加が起こった。その後遅れて、14日後にコラーゲンの合成の増加が起きていることが示された。このことは、ラットに下顎の移動を制限する装置を装着した実験において、コラーゲンよりも早期にアグリカンに発現が減少した結果から、アグリカンの方がコラーゲンよりも機械的負荷に対して影響を受けやすい<sup>50)</sup>という研究とも一致している。

本実験におけるラット片側臼歯抜歯に対する軟骨層の反応の概略図を図20に示す。軟骨層の厚さは、対照群と比較して、抜歯側では7日後をピークとして菲薄化が認められ、14日後では若干の回復傾向を示した。非抜歯側では7日後をピークとして軟骨層の肥厚が認められ、14日後においてもその傾向が継続していた。軟骨細胞の分化、増殖も同様に、抜歯側、非抜歯側共に7日後を中

心として変化がみられた。片側臼歯抜歯による顎関節に対する機械的負荷の変化によって、Ihh, PTHrP, Sox9といった調節因子を通して、軟骨細胞の分化、増殖が調節された結果、軟骨層の厚さに変化が起こる可能性が明らかにされた。

## 結 論

本研究から、顎関節に対する機械的負荷の変化によって、抜歯側においてはIhh, PTHrP, およびSox9の発現が減少した結果、細胞の分化、増殖が抑制され、これと関連して軟骨基質であるアグリカン, type II collagen, およびtype X collagenの減少が認められた。このことから、間葉細胞集団からの細胞供給が減少した結果、軟骨層の厚さの減少が起きたと考えられる。逆に非抜歯側においては、Ihh, PTHrP, およびSox9の発現が増加した結果、細胞の分化、増殖が促進し、これと関連して軟骨基質であるアグリカン, type II collagen, およびtype X collagenの増加が認められた。このことから、間葉細胞集団からの細胞供給が増加した結果、軟骨層の厚さの増加が起きたと考えられる。以上のことから、片側臼歯の抜歯によって引き起こされた機械的負荷の変化はIhh, PTHrP, Sox9といった成長因子が関与し、顎関節の軟骨代謝に影響を及ぼす可能性が明らかにされた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なるご指導、御校閲を賜りました奥羽大学歯学部歯科保存学講座横瀬敏志教授に対し衷心より感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第46回奥羽大学歯学会（平成20年11月8日 郡山市）において発表した。

## 文 献

- 横瀬敏志, 田島義文, 内海順夫：ラット下顎頭軟骨のレクチン組織化学的研究—正常軟骨とビタミンD欠乏・低石灰化モデルにおけるWGA結合様式の比較検討—。歯基礎誌 31；117-124 1989.
- 横瀬敏志：ラット下顎頭軟骨のレクチン組織細胞化学的研究。歯基礎誌 33；411-427 1991.
- Yokose, S., Tajima, Y., Ohno, J., Seki, T., Utsumi, N. : Light and electron microscopic demonstration of wheat germ agglutinin binding in the pericellular matrix of rat mandibular condylar cartilage. Arch. Oral. Biol. 36；401-404 1991.
- Yokose, S. and Tajima, Y. : In vivo effects of tunicamycin on chondrocytes of rat mandibular condyles as revealed by lectin cytochemistry. Cell Tissue Res. 269；235-239 1992.
- MaKay, G. and Yemm, R. : The structure and function of the temporomandibular joint. In Clinical oral science (Ed., Malcolm, H., Edgar, M., Meghji, S.)；141-149 Butterworth-Heinemann Ltd 1998.
- Sakamoto, Y. and Takano, Y. : Morphological influence of ascorbic acid deficiency on endochondral ossification in osteogenic disorder Shionogi rat. Anat. Rec. 268；93-104 2002.
- Kantomaa, T. and Ronning, O. : Growth mechanisms of the mandible. In Fundamentals of craniofacial growth (Ed., Dixon, AD., Hoyte, DA., Ronning, O.)；189-204 CRC Press 1997.
- Itoh, K., Suzuki, S. and Kuroda, T. : Effects of local administration of insulin-like growth factor-I on mandibular condylar growth in rats. J. Med. Dent. Sci. 50；79-85 2003.
- Shen, G. and Ali Darendeliler, M. : The adaptive remodeling of condylar cartilage—a transition from chondrogenesis to osteogenesis. J. Dent. Res. 84；691-699 2005.
- Haskin, CL., Milam, SB. and Cameron, IL. : Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 6；248-277 1995.
- Mongini, F. : Anatomic and clinical evaluation of the relationship between the temporomandibular joint and occlusion. J. Prosthet. Dent. 38；539-551 1977.
- Granados, JI. : The influence of the loss of teeth and attrition on the articular eminence. J. Prosthet. Dent. 42；629-635 1979.
- Christensen, LV. and Ziebert, GJ. : Effects of experimental loss of teeth on the temporomandibular joint. J. Oral Rehabil. 13；587-598 1986.
- Scott, JE., Quintarelli, G. and Dellovo, MC. : The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. I. The mechanisms of Alcian Blue staining；Histochemie 4；73-85 1964.
- Rabie, AB., Tang, GH., Xiong, H. and Hagg, U. : PTHrP regulates chondrocyte maturation in condylar cartilage. J. Dent. Res. 82；627-631

- 2003.
- 16) Luder, HU., Leblond, CP. 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.
  - 17) Nakai, H., Niimi, A. and Ueda, M. : The influence of compressive loading on growth of cartilage of the mandibular condyle in vitro. *Arch. Oral. Biol.* **43** ; 505-515 1998.
  - 18) Endo, Y., Mizutani, H., Yasue, K., Senga, K., Ueda, M. : Influence of food consistency and dental extractions on the rat mandibular condyle. a morphological, histological and immunohistochemical study ; *J. Cranio. Maxill. Surg.* **26**, 185-190, 1998.
  - 19) Teramoto, M., Kaneko, S., Shibata, S., Yanagishita, M., Soma, K. : Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J. Bone. Miner. Metab.* **21** ; 276-286 2003.
  - 20) Tsurimoto, T. : PCNA binding proteins. *Front. Biosci.* **4** ; D849-D858 1999.
  - 21) Sharawy, MM., Ali, AM. and Choi, WS. : Immunohistochemical localization and distribution of proliferating cell nuclear antigen in the rabbit mandibular condyle following experimental induction of anterior disk displacement. *Cranio.* **20** ; 111-115 2002.
  - 22) Kantomaa, T., Tuominen, M. and 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.
  - 23) Bravo, R., Frank, R., Blundell, PA. and MacDonald-Bravo, H. : Cyclin/PCNA is auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* **326** ; 515-517 1987.
  - 24) Hajjar, D., Santos, MF. and Kimura, ET. : Pulsive appliance stimulates the synthesis of insulin-like growth factors I and II in the mandibular condylar cartilage of young rats. *Arch. Oral. Biol.* **48** ; 635-642 2003.
  - 25) Marques, MR., Hajjar, D., Franchini, KG., Moriscot, AS., Santos, MF. : Mandibular appliance modulates condylar growth through integrins. *J. Dent. Res.* **87** ; 153-158 2008.
  - 26) Wynford-Thomas, D. and Williams, ED. : Use of bromodeoxyuridine for cell kinetics studies in intact animals. *Cell Tissue Kinet.* **19** ; 179-182 1986.
  - 27) Teramoto, M., Kaneko, S., Shibata, S., Yanagishita, M., Soma, K. : Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J. Bone Miner. Metab.* **21** ; 276-286 2003.
  - 28) Fuentes, MA., Opperman, LA., Buschang, P., Bellinger, LL., Carlson, DS., Hinton, RJ. : Lateral functional shift of the mandible : Part I. Effects on condylar cartilage thickness and proliferation. *Am. J. Orthod. Dentofac.* **123** ; 153-159 2003.
  - 29) Rabie, AB., Wong, L. and Tsai, M. : Replicating mesenchymal cells in the condyle and the glenoid fossa during mandibular forward positioning. *Am. J. Orthod. Dentofac.* **123** ; 49-57 2003.
  - 30) St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. and McMahon, AP. : Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* **13** ; 2072-2086 1999.
  - 31) Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, GV., Kronenberg, HM., Tabin, CJ. : Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273** ; 613-622 1996.
  - 32) Lanske, B., Karaplis, AC., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, LH., Ho, C., Mulligan, RC., Abou-Samra, AB., Juppner, H., Segre, GV., Kronenberg, HM. : PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* **273** ; 663-666 1996.
  - 33) Karp, SJ., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., McMahon, AP. : Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development* **127** ; 543-548 2000.
  - 34) Tang, GH., Rabie, AB. and Hagg, U. : Indian hedgehog : a mechanotransduction mediator in condylar cartilage. *J. Dent. Res.* **83** ; 434-438 2004.
  - 35) Ng, TC., Chiu, KW., Rabie, AB. and Hagg, U. : Repeated mechanical loading enhances the expression of Indian hedgehog in condylar cartilage. *Front. Biosci.* **11** ; 943-948 2006.
  - 36) Wu, Q., Zhang, Y. and Chen, Q. : Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation ; *J. Biol. Chem.* **276** ; 35290-35296 2001
  - 37) Chayanupatkul, A., Rabie, AB. and Hagg, U. : Temporomandibular response to early and late removal of bite-jumping devices. *Eur. J. Or-*

- thod. **25** ; 465-470 2003.
- 38) Strewler, GJ. : The physiology of parathyroid hormone-related protein. *New Engl. J. Med.* **342** ; 177-185 2000.
- 39) Karaplis, AC., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, RT., Tybulewicz, VL., Kronenberg, HM., Mulligan, RC. : Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* **8** ; 277-289 1994.
- 40) Amling, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., Philbrick, WM., Broadus, AE., Baron, R. : Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J. Cell Biol.* **136** ; 205-213 1997.
- 41) Ng, AF., Yang, YO., Wong, RW., Hagg, EU., Rabie, AB. : Factors regulating condylar cartilage growth under repeated load application. *Front. Biosci.* **11** ; 949-954 2006.
- 42) Huang, W., Chung, UI., Kronenberg, HM. and de Crombrughe, B. : The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **98** ; 160-165 2001.
- 43) Akiyama, H., Chaboissier, MC., Martin, JF., Schedl, A., de Crombrughe, B. : The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16** ; 2813-2828 2002.
- 44) Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, JM., Behringer, RR., de Crombrughe, B., Lefebvre, V. : The transcription factor L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* **1** ; 277-290 2001.
- 45) Rabie, AB. and Hagg, U. : Factors regulating mandibular condylar growth. *Am. J. Orthod. Dentofac.* **122** ; 401-409 2002.
- 46) Alexandra, KP., Dionysios, JP., Stavros, AC., Pertti, P., Athanasios, GP., Efthimia, KB. : Load application induces changes in the expression levels of Sox-9, FGFR-3 and VEGF in condylar chondrocytes. *FEBS Letters* **581** ; 2041-2046 2007.
- 47) Rabie, AB., She, TT. and Hagg, U. : Functional appliance therapy accelerates and enhances condylar growth. *Am. J. Orthod. Dentofac.* **123** ; 40-48 2003.
- 48) Xiong, H., Rabie, AB. and Hagg, U. : Mechanical strain leads to condylar growth in adult rats. *Front. Biosci.* **10** ; 67-73 2005.
- 49) Yanagishita, M. : Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Kokubyo Gakkai Zasshi* **64** ; 193-204 1997.
- 50) Fukada, K., Shibata, S., Suzuki, S., Ohya, K., Kuroda, T. : In situ hybridisation study of type I, II, X collagens and aggrecan mRNAs in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible. *J. Anat.* **195** ; 321-329 1999.
- 51) Mizoguchi, I., Nakamura, M., Takahashi, I., Kagayama, M., Mitani, H. : An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. *Histochemistry* **93** ; 593-599 1990.
- 52) Pirttiniemi, P., Kantomaa, T., Salo, L. and Tuominen, M. : Effect of reduced articular function on deposition of type I and type II collagens in the mandibular condylar cartilage of the rat. *Arch. Oral Biol.* **41** ; 127-131 1996.
- 53) Kantomaa, T. and Pirttiniemi, P. : Differences in biologic response of the mandibular condyle to forward traction or opening of the mandible. An experimental study in the rat. *Acta Odontol. Scand.* **54** ; 138-144 1996.
- 54) Beelman, CA. and Parker, R. : Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* **81** ; 179-183 1995.
- 55) Poole, AR. and Pidoux, I. : Immunoelectron microscopic studies of type X collagen in endochondral ossification. *J. Cell. Biol.* **109** ; 2547-2554 1989.
- 56) Bonen, DK. and Schmid, TM. : Elevated extracellular calcium concentrations induce type X collagen synthesis in chondrocyte cultures. *J. Cell. Biol.* **115** ; 1171-1178 1991.
- 57) Takahashi, I., Nuckolls, GH., Takahashi, K., Tanaka, O., Semba, I., Dashner, R., Shum, L., Slavkin, HC. : Compressive force promotes Sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1 beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb and mesenchymal cells. *J. Cell. Sci.* **111** ; 2067-2076 1996.
- 58) Smith, RL., Rusk, SF., Ellison, BE., Wessells, P., Tsuchiya, K., Carter, DR., Caler, WE., Sandell, LJ., Schurman, DJ. : In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. *J. Orthop. Res.* **14** ; 53-60 1996.
- 59) Ragan, PM., Badger, AM., Cook, M., Chin, VI., Gowen, M., Grodzinsky, AJ., Lark, MW. : Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magni-

- tude and duration. *J. Orthop. Res.* **17** : 836-842 1999.
- 60) Rabie, AB., Xiong, H. and Hagg, U. : Forward mandibular positioning enhances condylar adaptation in adult rats. *Eur. J. Orthod.* **26** : 353-358 2004.
- 61) Shen, G., Zhao, Z., Kaluarachchi, K. and Rabie, AB. : Expression of type X collagen and capillary endothelium in condylar cartilage during osteogenic transition---a comparison between adaptive remodelling and natural growth. *Eur. J. Orthodont.* **28** : 210-216 2006.
- 62) Shen, G., Rabie, AB., Zhao, ZH. and Kaluarachchi, K. : Forward deviation of the mandibular condyle enhances endochondral ossification of condylar cartilage indicated by increased expression of type X collagen. *Arch. Oral. Biol.* **51** : 315-324 2006.
- 著者への連絡先 : 高橋一人, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部歯科保存学講座(保存修復学)  
Reprint requests : Kazuto Takahashi, Division of Operative Dentistry, Department of Conservative Dentistry, Ohi University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan