

In vivo micro-CT によるリウマチ性関節炎モデルマウスの下顎頭の観察

山 田 久 弥

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻
(指導: 本田和也 教授, 江島堅一郎 助教)

要旨: 関節リウマチ(RA)患者の顎関節形態変化について詳細な検討は十分に行われておらず不明な点も多い。本研究では, *In vivo* micro-CT 装置 R_mCT(micro-CT; リガク)を使用して, リウマチ性関節炎モデルマウス(SKG マウス; 日本クレア)における下顎頭形態変化について観察を行った。

実験は, SKG マウス 38 匹 76 関節についての観察を行った。この実験動物のうち 21 匹には, ラミナリン 30 mg を投与し, ラミナリン投与群とした。残りの 17 匹には同量の生理食塩水を投与し, 非投与群とした。これらマウスを 48 週齢まで飼育し, 安楽死させた後検体を作成し, すべての顎関節について micro-CT 撮影を行った。また飼育終了時にリウマチスコアを記録した。

micro-CT 画像では, 64.5% に下顎頭形態変化が認められた。性別による比較では, 変化の頻度はオスが有意に高かった。ラミナリン投与の影響については, 有意差は認められなかった。

リウマチスコアについては, 性別の比較では, 有意差は認められなかった。またラミナリン投与群において有意に高値を示していた。また下顎頭形態変化とリウマチスコアの関係では, 形態変化群が非変化群と比較して有意な差を認めた。

以上の観察結果より, SKG マウスにおいては, 下顎頭において形態変化が認められ, その変形はリウマチスコアと関連することが示された。

キーワード: リウマチ性関節炎, 顎関節, *In vivo* micro-CT, SKG マウス

緒 言

関節リウマチ(RA)は生体内の免疫反応が, 過剰に誘発されることで発症する自己免疫疾患で, 主に関節痛や関節変形が症状として認められる代表的な膠原病の一つである。RA の発症を誘導する因子については, 遺伝的要因やある種の微生物の感染などが考えられているが^{1,2)}, 発症に至る機序については不明な点が多い。

顎顔面領域では, 顎関節における RA が注目されており, 成人 RA 患者の 50% 以上において, 顎関節の腫脹, 疼痛, 顎運動障害, 下顎頭の変形といった臨床症状が認められる³⁻⁷⁾。小児の RA 患者では, 下顎頭破壊によって下顎骨の発育障害と顔面の変形を認める場合があり, 重度になると顎関節強直症が発症することもある^{6,7)}。RA 患者の顎関節における X 線所見では, 発病の早期には骨吸収像は認められないが, 症状が進行すると骨吸収を伴う X 線透過像を認める^{3,4)}。しかし, RA 患者の顎関節の変化については十分な検討は行われておらず不明な点が多い。

リウマチ性関節炎モデルマウス(SKG マウス; 日本クレア)は, 1994 年坂口らが, 系統維持されていた BALB/c 系マウスコロニーにおいて遺伝的突然変異のため関節腫脹を示したマウスを発見し, これが兄弟交配により確

立したもので, ヒト RA と酷似した非特異性炎症として関節炎を自然発症する^{8,9)}。SKG マウスの関節腫脹は, 生後 2 ヶ月頃から前肢指骨間関節から左右対称に始まり, 次第に進行して, 前肢と後肢の他の関節, そして全身の関節に及ぶ。病理組織学的には, 滑膜の増殖, 滑膜下組織への炎症性細胞浸潤から始まり, 関節周囲炎, パンヌスの形成, 軟骨・骨組織の破壊, 線維化へと進み, 関節強直に到る。関節外病変としては, 間質性肺炎, 皮膚炎, 血管炎がみられる⁹⁻¹³⁾。また, 血清中には, IgM 型リウマチ因子, 抗 II 型コラーゲン抗体, 熱ショック蛋白 70 と反応する抗体が検出できると報告されている⁸⁾。この SKG マウスを使用して数多くの RA の研究が実施されているが, 顎関節形態の変化についての報告は行われていない。

そこで本研究では, *In vivo* micro-CT 装置 R_mCT(micro-CT; リガク)を使用して, SKG マウスの下顎頭の形態変化を観察した。

材料および方法

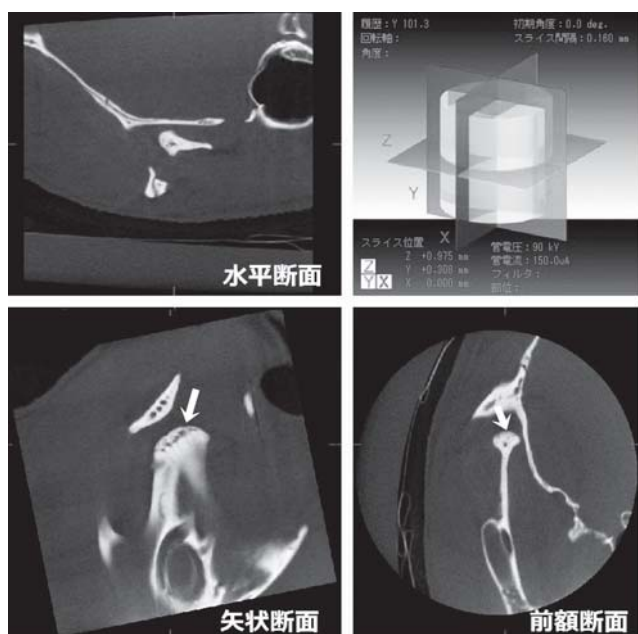
1. SKG マウス

実験動物として, 8 週齢の SKG マウス 38 匹(オス: 17 匹, メス: 21 匹), 76 関節を使用した。ラミナリン投与群では, 21 匹(オス: 9 匹, メス: 12 匹)に, 多くの研究

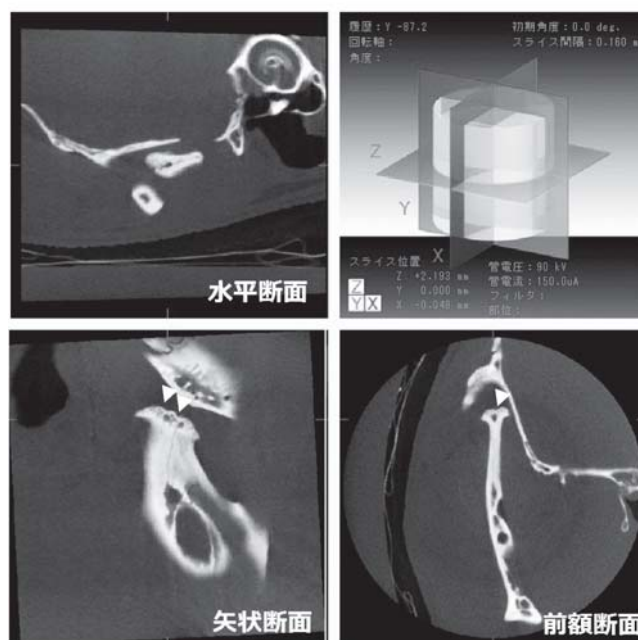
(受付: 平成 27 年 1 月 24 日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

で用いられており、またリウマチ性関節炎の発現を促進する物質として知られるムコ多糖である β グルカンのラミナリン 30 mg を腹腔内投与した^{11,14,15)}。非投与群で



A



B

第1図 micro-CT 画像

A は下顎頭形態変化なし、B は変化ありと判定した SKG マウスの顎関節部分を示す例。A の矢印で示した下顎頭部に変形は認められないが、B の矢印で示した部に erosion を認める。

は、17 匹(オス：8 匹，メス：9 匹)に同量の生理食塩水を腹腔内投与した(第1表)。マウスには全て飼料として通常食(CMF，オリエンタル酵母工業)を与え、12 時間の明暗サイクルおよび恒温・恒室の環境下で、飼料と水道水を自由に摂取させ飼育した。このマウスを 48 週齢まで飼育した後、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル，共立製薬)過剰投与により安楽死させた後、10% 中性ホルマリン水溶液で固定した。なお本実験は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認(AP09D028)を得て行なわれた。

2. 撮影装置および撮影方法

ホルマリン固定した SKG マウス 38 匹，左右 76 関節について、顎関節部の micro-CT 撮影を行った。撮影条件は、管電圧 90 kV，管電流 200 μ A，撮影時間 17 秒とした。撮影倍率は 10 倍とし，voxel size は 20 \times 20 \times 20 μ m であった。

撮影後，Vostro 200 computer(DELL)を用いて合計 512 枚の 3 次元データを画像構築した。直径 2.4 cm，高さ 2.4 cm の円筒状 volume data(481 \times 481 \times 483 の voxel matrix size set)を画像再構成処理ソフト i-View-R(リガク)を使用して画像を再構成した。

3. 画像評価法

評価は micro-CT の画像を Dimension 4700 computer (DELL)に取り込み，液晶モニタ上で分析した。

下顎頭形態変化については第1図 A に示すようにスムーズな形態を示すものを“非変化”(第1図 A 矢印)とし，第1図 B に示すような下顎頭が粗造な外形を呈するものを“変化”(第1図 B 矢頭)と判定した。

4. リウマチスコア

リウマチ症状の評価として，リウマチスコア⁹⁾を micro-CT 撮影と同時に記録した。リウマチスコアは，掌部に腫脹が認められないものを 0，前肢指および後肢指に腫脹が認められるものを指 1 本につき 0.1，手根骨部および足根骨部にくびれが無くなる程度の中等度の腫脹が認められるものを 1 ヶ所につき 0.5，手根骨部および足根骨部に重度の腫脹が認められるものを 1 ヶ所につき 1.0 とした(第2図 A)。したがって，マウスの前肢指

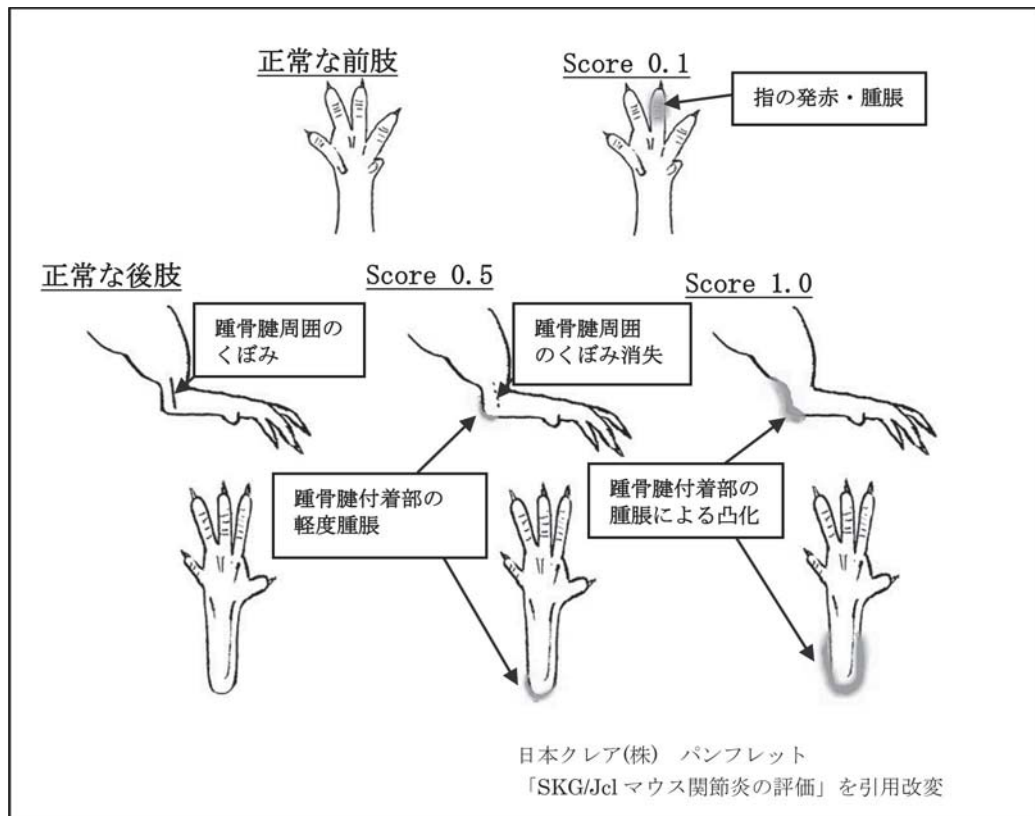
第1表 研究資料の群別詳細

	性別	個体数	関節数
ラミナリン投与群	Male	9	18
	Female	12	24
非投与群	Male	8	16
	Female	9	18
計		38	76

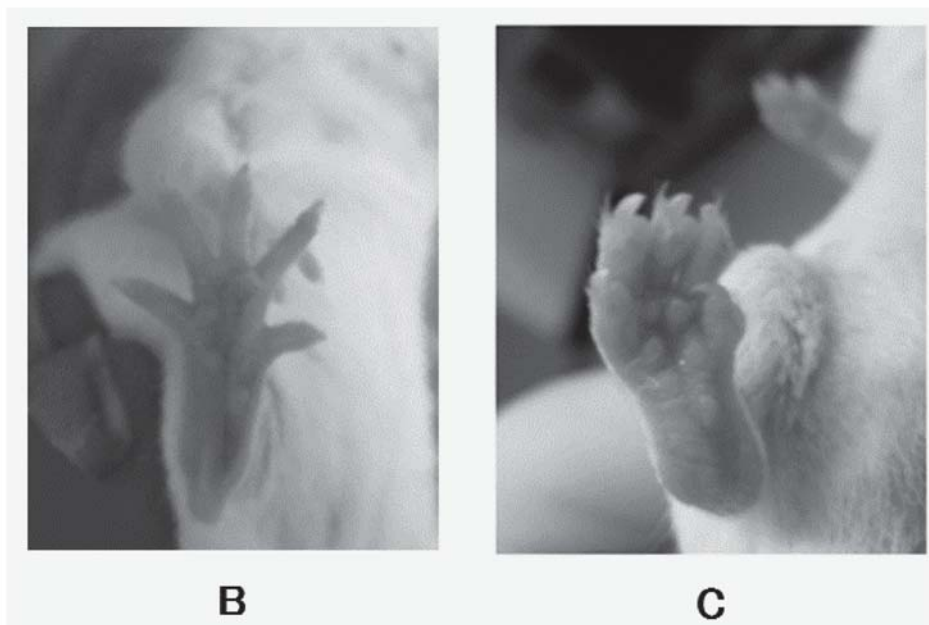
は4本、後肢指は5本であることから、その最大値は5.8となる。例として、第2図Bにリウマチスコア0となる正常例マウスの後肢を、第2図Cにリウマチスコア1.5となる関節炎発症例のマウスの後肢を示す。

5. 統計処理

判定結果の群ごとの比較には、SPSS Statistics(IBM)による χ^2 検定および対応の無い t 検定を行い、有意水準は5%とした。



A



第2図 リウマチスコアの判定図(A)とSKGマウスの後肢部の判定例(B, C)

Bは正常例、Cはリウマチ発症例である。Bのリウマチスコアは0、Cのリウマチスコアは指 0.1×5 、足根骨部1.0で計1.5である。

結 果

1. micro-CT による下顎頭形態変化について

下顎頭の形態学的変化は全 76 関節中 49 関節 (64.5%) に認められた。

性別では、オスで 34 関節中 27 関節 (79.4%)、メスで 42 関節中 22 関節 (52.4%) に変形が認められ、オスの方が有意に高い傾向を示した ($p < 0.05$) (第 2 表)。

ラミナリン投与群では 42 関節中 27 関節 (64.3%)、非投与群では 34 関節中 22 関節 (64.7%) に変形を認めたが、2 群間に有意差は認められなかった (第 3 表)。

2. リウマチスコア

性別では、オスが平均値 2.22 (範囲: 1.2 ~ 4.4)、メスが平均値 1.97 (範囲: 0 ~ 4.2) を示し、2 群間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (第 4 表)。

ラミナリン投与群のリウマチスコアは平均値 2.57 (範囲: 1.0 ~ 4.4)、非投与群は平均値 1.48 (範囲: 0 ~ 3.1) であり、2 群間に有意差を認めた ($p < 0.05$) (第 5 表)。

3. 下顎頭形態変化とリウマチスコア

下顎頭形態変化群のリウマチスコア平均値は 2.35 (範囲: 0 ~ 4.4)、非変化群の平均値は 1.44 (範囲: 0 ~ 3.9) であり、下顎頭形態変化群が有意に高い傾向を示した ($p < 0.05$) (第 6 表)。

考 察

慢性関節リウマチ (RA) は原因不明の慢性炎症性疾患であり、その病態には不明な点が多く、今回、自然発症

モデルである SKG マウスを用いて、従来解明されていない顎関節 (TMJ) の病態を検索した。従来の RA 実験モデルや遺伝子操作モデルのほとんどは、ヒト RA の病態の一部を模しているが、発症機序を解明するのに適切なモデルとは言い難く、実用性も低かった。本研究に使用している SKG マウスは自己免疫性関節炎を自然発症し、ヒト RA との病態の酷似性や高い発症頻度を有するモデル動物として実用化されている。しかし、このモデルを用いた顎関節についての報告は行われていない。

今回使用した micro-CT は、小型実験動物用であり、その最小画素数サイズは $10 \mu\text{m}$ の高解像度である¹⁶⁾。亀岡らは、マウスの下顎頭を micro-CT で撮影し、その形態をマクロ解剖と比較し検討した結果、診断精度は、Sensitivity が 0.96、Specificity が 1.00、Accuracy が 0.98 と高い数値であり、micro-CT による下顎頭形態変化の診断が可能と報告した¹⁷⁾。

SKG マウスは、BALB/c バックグラウンドの単一遺伝子ミュータントマウスであり、その関節炎は常染色体性劣性遺伝を示す。通常の飼育環境下、四肢の関節炎の発症頻度はほぼ 100% といわれている⁸⁾。しかし今まで研究では顎関節部については検索をしておらず、その病態は不明である。通常食で 48 週齢まで飼育した SKG マウスを使用した本研究では、micro-CT による下顎頭形態の観察において、76 関節中 49 関節 (64.5%) で形態変化が認められた。臨床では、RA による骨変化の発症には順番があり、顎関節の形態変化は最後に影響を受ける関

第 2 表 micro-CT による下顎頭形態変化と性別

	変化群	非変化群	下顎頭総数	変化率 (%)
Male	27	7	34	79.4*
Female	22	20	42	52.4*

*: $p < 0.05$

第 3 表 micro-CT による下顎頭形態変化とラミナリン投与別

	変化群	非変化群	下顎頭総数	変化率 (%)
ラミナリン投与群	27	15	42	64.3
非投与群	22	12	34	64.7

第 4 表 リウマチスコアの性別結果

	関節数	リウマチスコア			
		平均値	SD	最大値	最小値
Male	34	2.22	0.67	4.4	1.2
Female	42	1.97	1.71	4.2	0.0
計	76	2.04	1.18	4.4	0.0

SD : Standard Deviation

第 5 表 リウマチスコアのラミナリン投与別結果

	関節数	リウマチスコア			
		平均値	SD	最大値	最小値
ラミナリン投与群	42	2.57*	1.11	4.4	1.0
非投与群	34	1.48*	0.79	3.1	0.0
計	76	2.04	1.18	4.4	0.0

SD : Standard Deviation *: $p < 0.05$

第 6 表 下顎頭の形態変化とリウマチスコアとの比較

	リウマチスコア	
	関節数	49
下顎頭変化群	平均値	2.35*
	SD	1.19
	最大値	4.4
	最小値	0.0
下顎頭非変化群	関節数	37
	平均値	1.44*
	SD	0.95
	最大値	3.9
	最小値	0.0

SD : Standard Deviation *: $p < 0.05$

節の一つと報告されている⁵⁾。我々の結果はSKG マウスにおいても同様に、顎関節部の発症には時間がかかることを示唆している。

また今回の結果では、リウマチスコアはラミナリン投与群の方が有意に高かった。しかし、下顎頭形態変化の頻度は、ラミナリン投与によって違いは認められなかった。48 週齢でラミナリン投与はSKG マウスの四肢の関節に炎症を誘発するが、下顎頭形態には影響が少ないと考えられた。

なお本研究における下顎頭形態変化の発現率は、通常マウスの Adjuvant 誘導 RA における発現率より高い値であった¹⁷⁾。このことより RA による下顎頭変化やリウマチ性顎関節炎の検討にSKG マウスが有用であると考えられた。

性別によるSKG マウスの他部位の関節炎の報告では、メスの方が高い傾向を示しており(第3表)、これは女性ホルモンがその発症に関連するためと報告されている⁹⁻¹³⁾。しかし、本研究の下顎頭形態変化の発現率は、オスの方が有意に高い傾向を示した。これは、顎関節では、関節円板の存在など他部位の関節と異なる構造であり、骨質の違いおよび女性ホルモンの影響も異なることなどにより、このような傾向になったと考えられた。

下顎頭変化とリウマチスコアでは、下顎頭変化群のリウマチスコア平均値は、非変化群の平均値よりも有意に高い傾向を示した。これにより、今回確認された下顎頭形態変化と四肢の腫脹との関連性が示唆された。

また形態学的には、48 週齢では下顎頭形態変化は下顎頭中央頂縁部付近の erosion がほとんどであった。ヒト RA における下顎頭形態変化は下顎頭前方部に erosion が初発するといわれるが、進行時では頂縁部を中心に認められる場合も報告されている⁶⁾。初発部位の検討は重要であるので、今後は、micro-CT による縦断的観察を行い、初発の部位についての検討を行っていく予定である。

結 論

本実験の結果、以下のような結論を得た。

1. SKG マウス下顎頭の形態変化については76 関節中49 関節(64.5%)で変形が認められた。
2. 性別では、メスで52.4%、オスで79.4%に下顎頭形態変化がみられ、オスの方が有意に高かった。
3. ラミナリン投与群で64.3%、非投与群で64.7%に形態変化がみられたが、有意差は認められなかった。
4. リウマチスコアについては、性別ではオスが2.22、メスが1.97であり、有意差は認められなかった。
5. ラミナリン投与群のリウマチスコアは2.57、非投与群で1.48であり、ラミナリン投与群で有意に高かった。
6. 下顎頭変形群のリウマチスコアは2.35、非変形群は1.44であり、有意差を認めた。

以上のことから、SKG マウスは下顎頭に形態変化を起し、その変形はリウマチスコアと関連することが示された。

今後、SKG マウスは、顎関節部の新しいリウマチ治療薬などの開発研究に使用できるのではないかと考える。

本研究遂行にあたり、格別な御指導と御高閲を賜りました本学歯科放射線学講座本田和也教授、また直接研究を御指導いただいた江島堅一郎助教および川嶋祥史助教、*In vivo* micro-CT 撮像について、ご助言をいただいた本学新井嘉則特任教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に対して御協力いただいた歯科放射線学講座各位に深く感謝申し上げます。

本研究は平成24年度日本大学大学院歯学研究科研究費(学生分：山田久弥)によってなされた。

文 献

- 1) Kawahito Y, Ichinose S, Sano H, Tsubouchi Y, Kohno M, Yoshikawa T, Tokunaga D, Hojo T, Harasawa R, Nakano T, Matsuda K (2008) Mycoplasma fermentans glycolipid-antigen as a pathogen of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 561-566.
- 2) Hu Y, Costenbader KH, Gao X, Al-Daabil M, Sparks JA, Solomon DH, Hu FB, Karlson EW, Lu B (2014) Sugar-sweetened soda consumption and risk of developing rheumatoid arthritis in women. *Am J Clin Nutr* 100, 959-967.
- 3) Larheim TA, Smith HJ, Aspestrand F (1990) Rheumatic disease of the temporomandibular joint: MR imaging and tomographic manifestations. *Radiology* 175, 527-531.
- 4) Gynther GW, Tronje G, Holmlund AB (1996) Radiographic changes in the temporomandibular joint in patients with generalized osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 81, 613-618.
- 5) 横江秀隆, 鷗澤一弘, 渡辺俊英, 土田豊実, 丹沢秀樹, 内山聡, 守屋秀繁(2002)慢性関節リウマチ患者の顎関節障害に関する統計的観察, 千葉医学 78, 83-86.
- 6) Ringold S, Cron RQ (2009) The temporomandibular joint in juvenile idiopathic arthritis: frequently used and frequently arthritic. *Pediatr Rheumatol Online J* 7,11.
- 7) Arvidsson LZ, Smith HJ, Flatø B, Larheim TA (2010) Temporomandibular joint findings in adults with long-standing juvenile idiopathic arthritis: CT and MR imaging assessment. *Radiology* 256, 191-200.
- 8) 坂口教子, 坂口志文(2000)リウマチ様関節炎を自然発症するSKG マウスについて, 第17回和漢医薬学会学術大会要旨集, 16, (抄録).
- 9) Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S (2003) Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426, 454-460.
- 10) Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Iwakura Y, Sekikawa K, Azuma Y, Kanai C, Moriizumi E, Nomura T,

- Nakamura T, Sakaguchi S (2004) Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest* 114, 582-588.
- 11) Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, Hirota K, Tanaka S, Nomura T, Miki I, Gordon S, Akira S, Nakamura T, Sakaguchi S (2005) A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 201, 949-960.
 - 12) Sakaguchi S, Benham H, Cope AP, Thomas R (2012) T-cell receptor signaling and the pathogenesis of autoimmune arthritis: insights from mouse and man. *Immunol Cell Biol* 90, 277-287.
 - 13) Inoue K, Inoue E, Imai Y (2013) Female sex hormones ameliorate arthritis in SKG mice. *Biochem Biophys Res Commun* 434, 740-745.
 - 14) Kushida T, Saito T, Umeda M, Oe K, Okamoto N, Iida H, Ikehara S (2005) Prevention of autoimmune diseases in SKG/Jcl Mice using Intra-Bone Marrow- Bone Marrow Transplantation. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society abstract, 335, abstract.
 - 15) Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, Prieto-Martin Paz, Nomura T, Sakaguchi N, Köhl J, Heyman B, Takahashi M, Fujita T, Mimori T, Sakaguchi S (2010) Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* 207, 1135-1143.
 - 16) Arai Y, Yamada A, Ninomiya T, Kato T, Masuda Y (2005) Micro-computed tomography newly developed for *in vivo* small animal imaging. *Oral Radiology* 21, 14-18.
 - 17) Kameoka S, Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Matsumoto K, Asano M, Arai Y, Shirakawa T (2009) Diagnostic accuracy of microcomputed tomography for osseous abnormalities in the rat temporomandibular joint condyle. *Dentomaxillofac Radiol* 38, 465-469.