

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30mg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、安樂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ヵ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

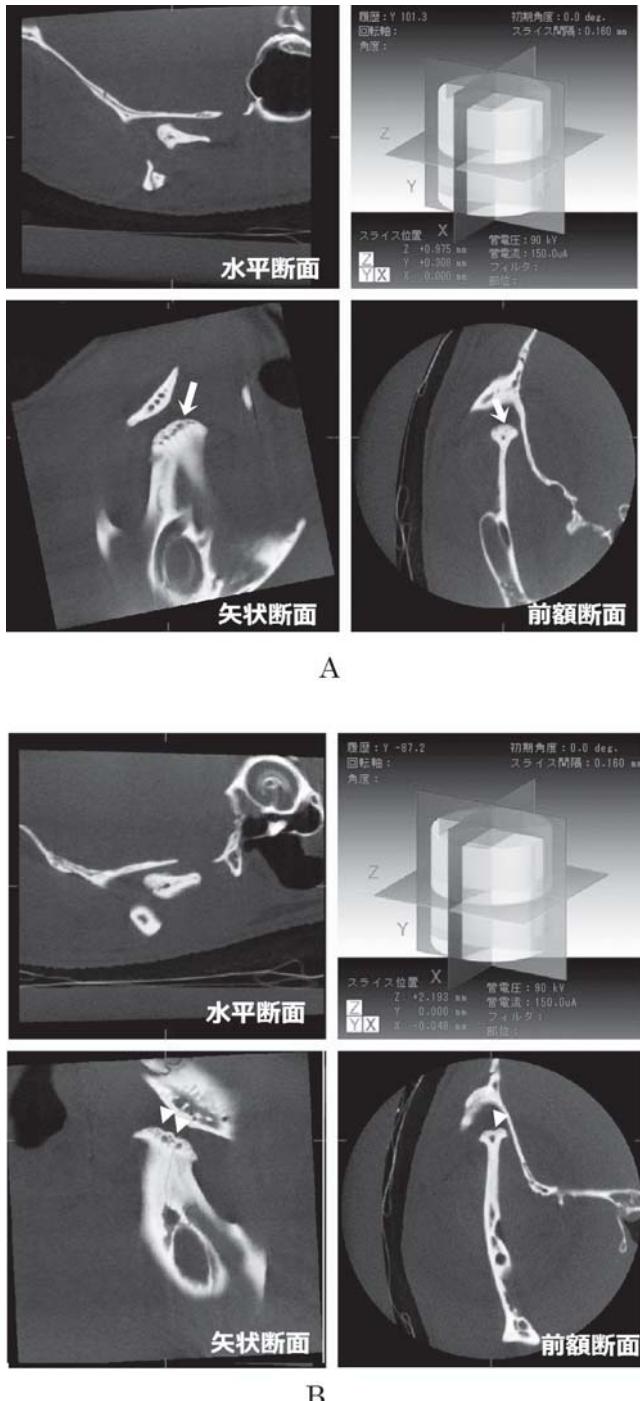
1. SKGマウス

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



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 マウスの頸関節部分を示す例。Aの矢印で示した下顎頭部に変形は認められないが、Bの矢頭で示した部に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)を与えた。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)過剰投与により安樂死させた後、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、頸関節部の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 $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ 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

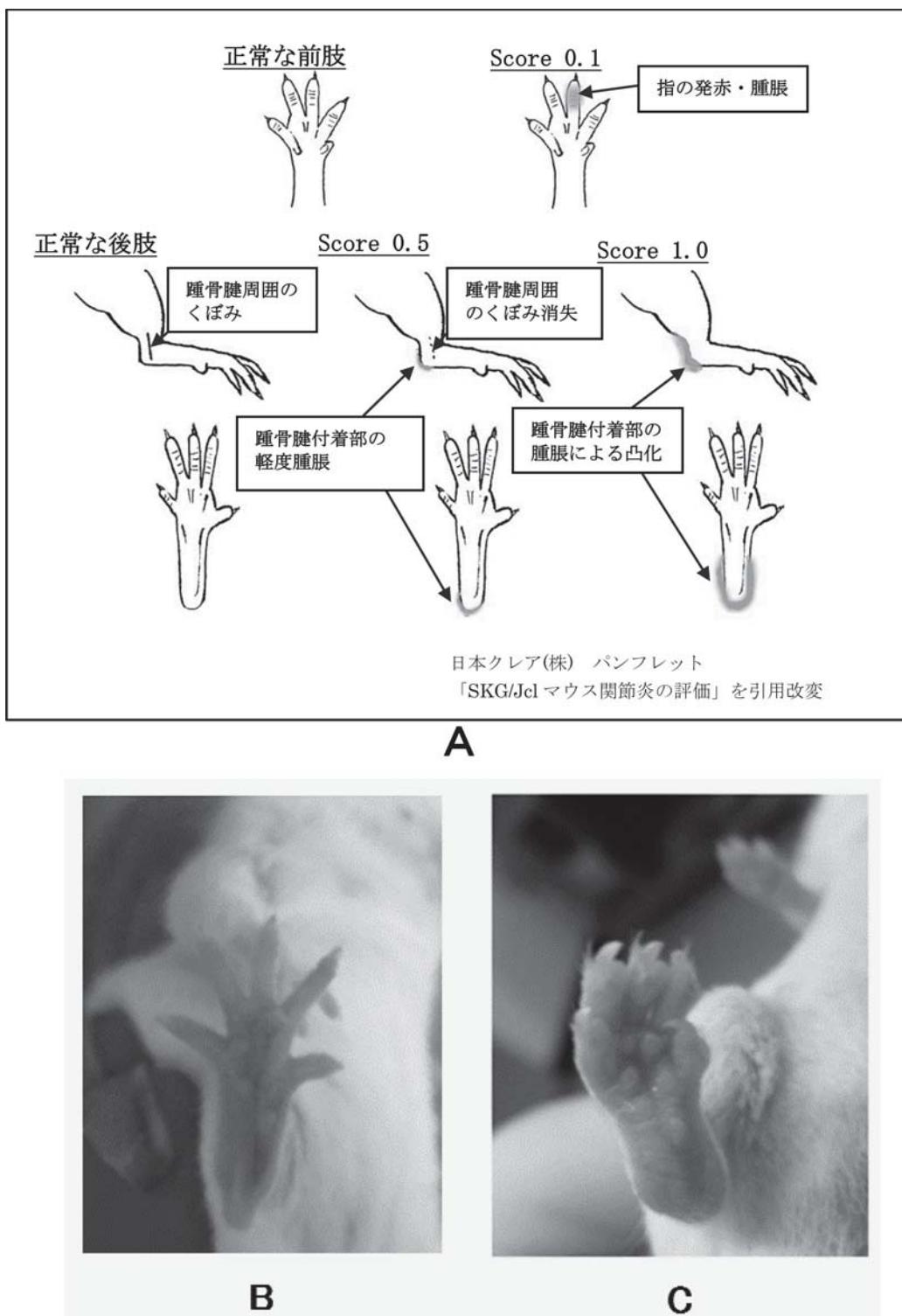
第1表 研究資料の群別詳細

	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。



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

- micro-CTによる下顎頭形態変化について
下顎頭の形態学的变化は全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)。
- 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)。
- 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

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
Female	42	1.97	1.71	4.2
計	76	2.04	1.18	4.4

SD: Standard Deviation

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 μm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

下顎頭変化群	リウマチスコア			
	関節数	49		
	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生率は、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。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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こし、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闇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員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

- 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.
- Hu Y, Costenbader KH, Gao X, Al-Dabil 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.
- Larheim TA, Smith HJ, Aspestrand F (1990) Rheumatic disease of the temporomandibular joint: MR imaging and tomographic manifestations. *Radiology* 175, 527-531.
- 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.
- 横江秀隆、鶴澤一弘、渡辺俊英、土田豊実、丹沢秀樹、内山聰、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.
- Ringold S, Cron RQ (2009) The temporomandibular joint in juvenile idiopathic arthritis: frequently used and frequently arthritic. *Pediatr Rheumatol Online J* 7,11.
- 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.
- 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).
- Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihamura 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.
- 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, Ikebara S (2005) Prevention of autoimmune diseases in SKG/Jcl Mice using Intra-Bone Marrow- Bone Marrow Transplantation. 55 th 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.