実験技術

小動物を用いた口腔内実験法

藤井 彰*, 松本 裕子, 山根 潤一, 姜 桂珍

要約: ラット口腔内を用いた実験は、歯科医学関係のものが多いが、近年では薬物の副作用に唾液分泌の亢進または抑制などの項目も多く見られるようになり、一概に歯科医学の研究対象だけではなくなっている。しかしながら、ラットの口腔内を対象にした実験を行う場合、ラットの口腔は微小であり、開口量は比較的大きいが操作が煩雑であるという欠点がある。そこで、実験を容易に行うための開口器を試作した。本器は口腔内が見やすく、しかも気道を圧迫する恐れのないもので、術中に死に至ることもなく、盲嚢（ポケット）内に結紮糸を留置し物理的刺激を加えることによる歯周炎の作成、歯周病原菌の盲嚢内定着による歯周病の作成、歯の移動のためのデバイスの装着、口腔粘膜、歯肉、舌の特定部位への物質の投与等の実験に有用である。近年、歯周疾患に起因する全身疾患（心血管疾患、糖尿病、呼吸器疾患、骨粗鬆症等）や低体重児に関しても多く研究されるようになり、歯周疾患動物モデルの作成も重要な位置を占めるに至っている。また、骨粗鬆症による全身的骨脆弱化が歯の欠損と有意に相関があることが多く報告されている。しかしながら、骨粗鬆症における大腿骨と顎骨の関連については報告が少ない。本報告では、これらの実験を小動物を用いて行う場合に有用である小動物用開口器を開発し使用しているので紹介する。

1. はじめに

ラット口腔内を用いた実験は、歯科医学関係のものが多いが、近年では薬物の副作用に唾液分泌の亢進または抑制などの項目も多く見られるようになり、一概に歯科医学の研究対象だけではなくなっている。歯周疾患に起因する全身疾患（心血管疾患、糖尿病、呼吸器疾患、骨粗鬆症等）や低体重児に関しても多く

研究されるようになり、歯周疾患動物モデルの作成も重要な位置を占めるに至っている。例えば、疫学的研究により歯周炎に罹患している患者では心血管疾患を2倍以上発症しやすいこと、歯周炎が重症なほど心血管疾患の発症リスクが高いこと、血管粥状硬化部位で歯周疾患の原因菌の *P. gingivalis* が見出されることなどが明らかにされている。また、歯周治療によりHbA1c、血糖値の低下が認められたという報告があるが、これは歯周炎の病巣で産生されたTNF- α が種々の細胞のインスリン抵抗性を高めているためと推測されている。さらに、近年歯周病に罹患した妊婦は早産（preterm low birth weight, PLBW）や、低体重児（low-birth weight infants, LBWI）に対するオッズ比が歯周病に罹患していない妊婦に比べ2~8と報告されているが、原因としてTNF- α 、IL-1等が示唆されている。呼吸器疾患に関しては、口腔内細菌の誤嚥が最も疑われている。骨粗鬆症に関しては、因果関係がまだ明らかにされていない。また、歯周疾患に罹患した場合には歯槽骨の吸収が起こることは明らかであるが、骨粗鬆症に罹患した場合には顎骨の脆弱化が起こることも予測されるが、その状態については不明な部分が多く興味を持たれる。本報告では、これらの実験を小動物を用いて行う場合に有用である小動物用開口器を開発し使用しているので紹介する。

2. ラット口腔内実験用開口器

ラットの口腔は微小であり、開口量は比較的大きいが操作が煩雑であるという欠点がある。そこで、実験を容易に行うための開口器を試作した（図1）（1）。本器は口腔内が見やすく、しかも気道を圧迫する恐れのないもので、術中に死に至ることもなく、盲嚢（ポケット）内に結紮糸を留置し物理的刺激を加えること

キーワード：小動物用開口器、実験的歯周炎、顎骨骨密度

日本大学松戸歯学部 口腔病態制御学系口腔分子薬理学講座（〒271-8587 松戸市栄町西 2-870-1）

* e-mail: fujii.akira27@nihon-u.ac.jp 原稿受領日：2006年8月9日、会誌編集委員会依頼原稿

Title: Experiment in the oral region using small animals. Author: Akira Fujii, Hiroko Matsumoto, Junichi Yamane, Gui-Zhen Jiang

による歯周炎の作成, 歯周病原菌の盲嚢内定着による歯周病の作成, 歯の移動のためのデバイスの装着, 口腔粘膜, 歯肉, 舌の特定部位への物質の投与等の実験に有用である. ラットをペントバルビタール (35 mg/kg, i.p.) にて麻酔し, 図 1 (a) に示した「1」上にラットを腹位に保定し, ワイヤー「2」で上顎切歯を固定し, ワイヤー「3」で下顎切歯を固定し開口する. また, 「2」部で示した切り込みは鼻部がスムーズに入るようになっている. 図 1 (b) に実際にラットを保定したところを示す. 図 1 (c) に示すように実体顕微鏡に, 図 1 (b) に示した保定器に保定したラットを置き, 顕微鏡下に冷光源を用いて口腔内を観察する. 図 1 (d) は開口部を拡大したものである. 舌が視界を遮る場合には, 舌先端に結紮糸をかけて引くか, または先端に綿を巻いたコッヘルで舌の先端部を保定して引く.

1) 実験的歯周炎の作成

盲嚢 (ポケット) 内に結紮糸を留置する場合には針の規格 S 8 mm 以下を用い, 下顎第一大臼歯頰側および舌側ポケット底に糸を通し, 盲嚢 (ポケット) 内に糸を沈めるようにして近心盲嚢 (ポケット) 内で結紮する. この方法により, 4~8 週間で歯周炎を発症させることができる. 直接播種することにより盲嚢 (ポケット) 内に *P. gingivalis* を定着させる試みは, *P. gingivalis* のリン酸緩衝液懸濁液をそのまま注入しても良い結果を得られないが, *P. gingivalis* の CMC 1~2% 懸濁液を下顎臼歯部盲嚢 (ポケット) 内に注入することにより *P. gingivalis* の定着率が飛躍的に向上し, 解決できる. 盲嚢 (ポケット) 内に注入するには, 先端を細く加工した滑らかなプラスチック製のものが最適である. ラットの歯肉は軟らかいので, 取り扱いには細心の注意が必要であることは言うまでもない. 実験的歯周炎を作成したラットを用いて, 歯周疾患の全身的影響を検討する実験も多くなされるようになっていく.

2) 実験的歯肉肥厚の局所療法

ラットに実験的薬物性歯肉肥厚を発症させること, またその局所療法を試みることもできる. 歯肉肥厚を発症する薬物 (フェニトイン, サイクロスポリン A, ニフェジピン等) を 2~4 週間投与し, 経時的に歯肉肥厚の状態を観察する. 肥厚が進むと, 外側に歯肉が伸展するのが見られる. 実験条件に合致するラットをグループ分けし, 盲嚢 (ポケット) 内に基材 (現在は, ペリオフィール® 基材: 昭和薬品化工を用いている) に薬物を分散させ, 上述の先端を細く加工した滑らかなプラスチック製のデバイスを用いて投与する. 薬物

投与時に経時的に歯肉肥厚の状態をラット口腔内実験用開口器を用いて定性的に観察する. 最終的にはラットを安楽死させ, 下顎部を常法により固定, 脱灰し, 薄切標本を H-E 染色することにより歯肉肥厚部を観察する (2, 3).

3) その他有効と考えられる実験

口腔内に腫瘍を形成する目的で, 舌の特定部位に発癌物質あるいは癌細胞を投与する場合には, 開口器を用いることにより正確に投与部位を確認することができる. また, 唾液分泌を正確に測定するためのカニューレの装着にも利用できると考えられる. これらは, 未だ実際に行っていないが, 将来検討したいと考えている.

3. 骨粗鬆症ラットの顎骨骨密度の検討

近年, 骨粗鬆症による全身的骨脆弱化が歯の欠損と有意に相関があることが多く報告されている (4-10). Krall ら (4) は, 脊椎, 橈骨の骨密度 (BMD) が残存歯数とよく相関があることを報告しており, 骨粗鬆症による顎骨の脆弱化が歯の喪失に関連があることを示唆している.

炎症性骨破壊における骨梁構造を非破壊的に解析する方法が種々検討されている (11). Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) もその一つであるが, 我々は pQCT を用いてラットを用いた実験的骨粗鬆症における大腿骨と顎骨との相関を種々検討しており, ここで実験結果の一端を紹介する.

1) 実験的骨粗鬆症ラットを用いた実験

骨粗鬆症におけるラット大腿骨, 顎骨における変化については, 若干の成績が得られている (12-14). その一端を紹介する.

Wistar 系雌性ラット, 11 週齢を購入し, 26 週齢で卵巣摘出術 (OVX) を施し, 実験的骨粗鬆症ラットを得た. 卵巣摘出術 (OVX) は, あらかじめ背部皮膚を剃毛したラットにペントバルビタール (35 mg/kg, i.p.) 投与により麻酔し, 背部皮膚 (腎臓相当部のやや腰部寄り), 広背筋 - 胸腰筋部を 5 mm 程度切開し, マウス用胃ゾンデを適当に曲げたもので卵巣を引っ張り出し, 卵巣 - 子宮結合部を結紮した後, 卵巣部を摘出し, 切断部をヨードチンキで消毒後, 筋層, 皮膚を縫合した. この処置で, ラットは抗菌薬を投与しなくても感染を起すことなく約 2 週間で切開部も完全に治癒するが, 念のため 4 週間の回復期を設けた. マウス用胃ゾンデは先端部が鋭利でないため, 腹腔内の組織を傷つけず卵巣を探ることができ, また例数をこなすと一度で取り出すことができる.

図1 ラット用開口器（試作品）

(a) 開口器1にラットを腹位に保定し、上顎切歯をワイヤー2にかけ、下顎切歯をワイヤー3にかける。(b) ラットを開口器に保持した状態。(c) 開口器を実体顕微鏡にセットした状態。(d) 開口部の拡大図。

図2 実験のプロトコール

Wistar系SPF雌ラット54匹を4群に分けた。26週齢で、ペンタバルビタール（35 mg/kg pentobarbital, i.p.）麻酔下に30匹のラットに卵巣摘出術を施し、12匹のラットは偽手術群（Sham）とした。30週齢で15匹のラットにエチドロネート（Etid, 5 mg/kg/day, 5 days a week, s.c.）を2週間投与した。42週齢で全てのラットを安楽死させ、大腿骨と下顎骨を摘出し、軟組織を除去した後70%エタノール中に保存した。Ba：正常飼料投与群（1.0%カルシウム含有）。Sh：偽手術群（カルシウム欠乏飼料投与；0.1%カルシウム含有）。OVX：卵巣摘出群（カルシウム欠乏飼料投与；0.1%カルシウム含有）。Et：卵巣摘出＋エチドロネート投与群（カルシウム欠乏飼料投与；0.1%カルシウム含有）。

図4 ラット下顎骨(a)と大腿骨(b)でpQCTの測定点(下顎骨においては第一大臼歯中心と大腿骨においては中心)とそれらの代表的なpQCTスキャン

図3 pQCTにセットしたラット保定装置

ラットをペントバルビタール (35 mg/kg, i.p.) 麻酔下に耳孔をガイドとして腹位に保定し, pQCTにセットする。

図5 ラット下顎骨(a)と大腿骨(c)における3点曲げ試験

左右下顎骨は頰側を上にし, 左右大腿骨は内側の平面部2支点 (間隔 10 mm) 上に置き別々に測定し, その平均をもって1個体のデータとした。中心位での荷重は, 下顎骨においては第1大臼歯の中心, 大腿骨においては近心遠心長の中心とした。(b), (d): 荷重先端移動距離と荷重の関係から破断強度が導かれる。荷重負荷速度は 5 mm/min とした。

次いで, 陽性対照としてエチドロネートを用い, 図2のスケジュールで実験を行った。顎骨および大腿骨の骨密度 (BMD), 骨量 (BMC) の経時的变化は図3の先端鈍のプラスチックを耳孔に挿入し頭部を固定する装置を pQCT 装置に装着して, ラットをペントバルビタール麻酔下にて測定可能であるが, 現在のところ目安とするのみで, 摘出した骨を用いる方が規格を決定するのも簡単で, 正確な値を得ることができる。

42 週齢でラットをペントバルビタール過量投与により安楽死させ, 下顎骨, 大腿骨を摘出し, pQCT (図

図6 破断強度と皮質骨断面積 (a) または皮質骨厚 (b) との相関

4) および三点曲げ試験 (図5) の試料とした。

結果をまとめたものを, 表1および表2に示した。また, その中で, 骨強度 (破断強度) と皮質骨断面積, 皮質骨厚との相関関係については, 図6に示した。中でも総骨密度, 皮質骨密度, 皮質骨厚等においては骨強度との間にかなり高い相関が見られる。

pQCT による測定では, 骨粗鬆症により下顎臼歯部直下の海綿骨の吸収が最も大きく, 骨密度の減少が著しいことが認められている。特に第一大臼歯直下の減少は大きい, エチドロネート投与により正常のラットとほとんど同程度まで回復することも認められている (14)。

4. 歯の移動

歯の移動を行う実験系は, 主として矯正学分野で多く行われている。人の歯を移動する場合には, それぞれの歯にかかる力を測定することが可能であるが, 小動物を用いた場合にはそれが困難であるが, 種々の試

表1 pQCT における上顎骨と大腿骨の骨密度および幾何学的図形パラメーター

実験群	正常飼料群 (n = 12)	Sham 群 (n = 12)	卵巣摘出群 (n = 15)	エチドロネート群 (n = 15)
上顎骨				
総骨密度 (mg/cm ³)	939.65 ± 13.95	921.78 ± 19.04 ^b	895.26 ± 20.82 ^{cf}	925.23 ± 19.98 ⁱ
皮質骨密度 (mg/cm ³)	1271.89 ± 11.17	1279.40 ± 8.96 ^b	1284.17 ± 10.05 ^c	1283.64 ± 8.54 ^c
皮質骨断面積 (mm ²)	5.38 ± 0.39	4.79 ± 0.36 ^c	4.74 ± 0.29 ^c	5.09 ± 0.35 ^{ei}
皮質骨厚 (mm)	0.49 ± 0.03	0.44 ± 0.03 ^c	0.43 ± 0.02 ^c	0.46 ± 0.04 ^{dh}
横断面慣性モーメント (mm ⁴)	15.70 ± 1.73	13.85 ± 1.45 ^c	14.61 ± 1.70 ^a	15.10 ± 1.57 ^d
骨強度指標 (mm ³)	7.97 ± 0.64	7.34 ± 0.56 ^c	7.46 ± 0.57 ^b	7.74 ± 0.45 ^d
大腿骨				
総骨密度 (mg/cm ³)	950.23 ± 29.95	893.88 ± 48.16 ^c	836.22 ± 40.36 ^{cf}	918.56 ± 35.16 ^{di}
皮質骨密度 (mg/cm ³)	1334.15 ± 11.97	1313.79 ± 16.06 ^c	1292.19 ± 16.61 ^{cf}	1322.75 ± 9.88 ^{di}
皮質骨断面積 (mm ²)	4.76 ± 0.25	4.40 ± 0.21 ^c	4.26 ± 0.30 ^c	4.69 ± 0.24 ^h
皮質骨厚 (mm)	0.65 ± 0.03	0.60 ± 0.03 ^c	0.56 ± 0.03 ^{cf}	0.63 ± 0.02 ^h
横断面慣性モーメント (mm ⁴)	3.15 ± 0.30	2.92 ± 0.30 ^a	3.03 ± 0.39	3.22 ± 0.39 ^d
骨強度指標 (mm ³)	4.63 ± 0.41	4.23 ± 0.32 ^c	4.17 ± 0.36 ^c	4.57 ± 0.39 ^{ei}

結果は mean ± SD で表示, 正常飼料群に対する有意差: ^aP<0.05, ^bP<0.01, ^cP<0.001. Sham 群に対する有意差: ^dP<0.05, ^eP<0.01, ^fP<0.001. OVX 群に対する有意差: ^gP<0.05, ^hP<0.01, ⁱP<0.001.

表2 三点曲げ試験による顎骨と大腿骨の骨強度

実験群	正常飼料群 (n = 12)	Sham 群 (n = 12)	卵巣摘出群 (n = 15)	エチドロネート群 (n = 15)
下顎骨				
骨強度 (N)	149.71 ± 19.74	132.32 ± 24.19 ^a	121.17 ± 17.12 ^b	141.17 ± 21.56 ^c
大腿骨				
骨強度 (N)	162.22 ± 17.06	138.38 ± 15.74 ^b	128.85 ± 9.73 ^{bc}	152.60 ± 12.82 ^{df}

結果は mean ± SD で表示, 正常飼料群に対する有意差: ^aP<0.01, ^bP<0.001. Sham 群に対する有意差: ^cP<0.05, ^dP<0.001. OVX 群に対する有意差: ^eP<0.01, ^fP<0.001.

みがなされている。最も一般的なのは, Wald and Rothblatt (15) により開発された 0.5 mm 厚のゴムバンドを第一大臼歯 - 第二大臼歯間に挿入する方法 (図 7) で, 現在でも標準的な方法の一つであるが, 歯間にかかる力がどのくらいかはっきりしないところが弱点といえる (16-18)。実際にかかる力を予め測定し, 金属を口腔内に適応する方法も各種検討されている。Verna ら (19) は pre-calibrated 25 g Sentalloy を用い,

Garat ら (20) は 51 g, 75 g の力を上顎第一大臼歯にかけようとしてステンレス製装置を用い, Brunson ら (21) はニッケル - チタンコイルを用い 80 g の力をかけ, Kokkinos ら (22) は直径 0.25 mm のステンレス線を 2.5 回転したコイルを用い 56 g の力をかけ, Hung ら (23) はコイル状バネを用いて 50 g の力をかけ, Hamaya ら (24) は 0.25 mm のステンレス線を用い 10 g の力をかけるようにしている (図 8)。荷重を変

図7 ゴムバンド (E) を第一大臼歯と第二大臼歯間に挿入し, 第一大臼歯を近心に移動させる。
F → : 力のかかる方向, M1 : 第一大臼歯, M2 : 第二大臼歯, M3 : 第三大臼歯 (文献 17, Fig. 1 を改変)

図8 ニッケル-チタン直線矯正用ワイヤーを用いてラットの上顎左側第一大臼歯を移動する。
F → : 力のかかる方向, M1 : 第一大臼歯, M2 : 第二大臼歯, M3 : 第三大臼歯, I : 切歯 (文献 24, Fig. 1 を改変)

えることにより, それぞれの実験目的に合った実験系を選択することが可能である。

これらの実験系を用いて, 歯を移動する時にかかる力により影響を受ける組織変化に対する生体物質に関する検討が種々なされている。

5. おわりに

小動物の口腔内を対象とした実験は多数あるが, 開口量が十分得られず, 特に歯牙または歯周組織を用いる場合には困難なことが多い。動物に侵襲を与えずに, 気道を圧迫することなく長時間の実験に耐えうる開口器を考案することは, 実験を進める上で大きなメリットが得られるであろうと考えられた。そこで, 簡便に作ることができ, 実験室で十分に使用に耐えるものを考案し, それを用いて若干のデータを蓄積した。何かの参考になれば幸いである。

文 献

- 1) 藤井 彰. 2003; 特開 2003-159264.
- 2) Matsumoto H, et al. J Dent Res. 1995;74 Suppl:1409.
- 3) Fujii A, et al. Jpn J Pharmacol. 1997;73 Suppl 1:99p.
- 4) Krall EA, et al. Calcif Tissue Int. 1996;59:433-437.
- 5) Taguchi A, et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1995;79:127-132.
- 6) Wactawski-Wende J, et al. J Periodontol. 1996;67:1076-1084.
- 7) Jonasson G, et al. Acta Odontol Scand. 1999;57:155-161.
- 8) Kribbs PJ. J Prosthet Dent. 1990;63:218-222.
- 9) Payne JB, et al. Osteoporosis Int. 1999;10:34-40.
- 10) Elovic RP, Calcif Tissue Int. 1995;56:305-310.
- 11) 木本愛之. 日薬理誌. 2006;127:289-296.
- 12) Matsumoto H, et al. Int J Oral-Med Sci. 2002;1:10-16.
- 13) Jiang G, et al. J Bone Miner Metab. 2003;21:388-395.
- 14) Jiang G, et al. J Oral Sci. 2004;46:75-85.
- 15) Wald CM, et al. J Dent Res. 1954;33:481-486.
- 16) Deguchi T, et al. J Dent Res. 2006;85:658-663.
- 17) Kawakami M, et al. J Bone Miner Metab. 2004;22:541-546.
- 18) Wilde J, et al. Cell Tissue Res. 2003;312:345-351.
- 19) Verna C, et al. Orthod Craniofacial Res. 2006;9:57-62.
- 20) Garat JA, et al. J Periodont Res. 2005;40:441-445.
- 21) Brunson JJ, et al. J Calcif Dent Assoc. 2005;33:951-959.
- 22) Kokkinos PP, et al. Calcif Tissue Int. 1993;53:333-337.
- 23) Hung SR, et al. Cell Tissue Res. 2003;313:167-175.
- 24) Hamaya M, et al. Calcif Tissue Int. 2002;70:117-126.

著者プロフィール

藤井 彰 (ふじい あきら)

日本大学松戸歯学部口腔病態制御学系口腔分子薬理学講座, PhD, MS, 歯学博士。
◇1970年 St. Thomas Institute 化学・生物化学部博士課程修了, '74年 St. Thomas Institute Associate Professor, '97年日本大学松戸歯学部薬理学(現口腔分子薬理学)講座教授, 現在に至る。◇研究テーマ: 薬物性歯肉肥厚の発症機序とその薬物療法, 骨粗鬆症治療薬の開発, 口腔組織における薬物動態, Probiotics. ◇賞: 1974年 Sigma- Xi award. ◇趣味: 美味探求, 仕事。◇主な著書: 歯科領域における偶発症の予防とその対策(クインテッセンス出版, 編著), 現代歯科薬理学(医歯薬出版, 分担執筆), スタンダード歯学薬理学(学建書院, 編著)。

左より 山根, 藤井, 松本, 姜

松本 裕子 (まつもと ひろこ)

日本大学松戸歯学部口腔病態制御学系口腔分子薬理学講座, 博士(歯学)。
◇1984年日本大学生産工学部卒業, '89年日本大学松戸歯学部副手, '03年日本大学松戸歯学部薬理学(現口腔分子薬理学)講座講師, 現在に至る。◇研究テーマ: 薬物性歯肉肥厚の発症機序とその薬物療法, 骨粗鬆症治療薬の開発, 口腔組織における薬物動態。◇趣味: 美味探求, 仕事。◇主な著書: 現代歯科薬理学(医歯薬出版, 分担執筆)。

山根 潤一 (やまね じゅんいち)

日本大学松戸歯学部口腔病態制御学系口腔分子薬理学講座, 歯学博士。
◇1989年日本大学大学院松戸歯学研究科修了, 同年日本大学松戸歯学部薬理学(現口腔分子薬理学)講座助手, '93年同講師現在に至る。◇研究テーマ: 局所麻酔薬の毒性。◇趣味: 美味探求, 仕事。◇主な著書: 現代歯科薬理学(医歯薬出版, 分担執筆), スタンダード歯学薬理学(学建書院, 分担執筆)。

姜 桂珍 (Gui-Zhen Jiang)

日本大学松戸歯学部口腔病態制御学系口腔分子薬理学講座, 医学修士, 博士(歯学)。
◇1989年中国医科大学大学院修士課程口腔医学専攻修了, '92年長崎大学歯学部助手('94年まで), '00年日本大学松戸歯学部薬理学(現口腔分子薬理学)講座助手, 現在に至る。◇研究テーマ: 骨粗鬆症治療薬の開発。◇趣味: 美味探求, 仕事。