その他

マウス口腔内実験に用いる開口器の開発と使用例

倉治竜太郎^{*1}, 橋本修一^{*2}, 伊藤 弘^{*1}, 沼部幸博^{*1}

^{*1} 日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座

^{*2} 日本歯科大学

(受付日: 2016 年 6 月 22 日 受理日: 2016 年 8 月 3 日)

要旨: 歯周病学をはじめ口腔内の研究では、齧歯類を対象として実験を行うことが多い。こうした動物の口腔内に種々の処置を行う場合は、開口状態の保持や視野確保が実験手技を安定させる上で極めて重要な要素となる。しかし、マウスの開口を保持する専用器具は提案されていない。そこで我々は、既存のラット開口器を応用し、幅広い週齢のマウスに適合する規格化された開口器の作製を目的として、開発を行った。本考案は、1.5 mm ステンレス線を用いた長方形の切歯係止フレームと、フレーム内側に対向して取り付けられた左右口角鉤、フレーム基端部に取り付けられた開口調節体から構成される開口器である。各週齢マウスへの本器の適合性を評価するため、4 週齢、6 週齢、10 週齢 BALB/c マウスを対象に、本器各部による開口保持状態を観察した。本器の開口調節体により、体重の異なる全週齢マウスの開口を安定して保持することができ、口腔内観察を良好に実施できた。また本器装着時の口腔内実験への応用例として、口蓋歯肉への薬液注射、および上顎臼歯への絹糸結紮による実験的歯周炎作成を行い、本器を用いた場合の処置時の視野確保と器具の到達性などを検討した。本器を用いた開口保持により、各種器具を挿入した口腔内実験を良好に実施できた。なお、総ステンレス製の本器は、オートクレーブ、乾熱滅菌も可能となっている。本器は実用新案登録済みである（公開番号 2014-004789）。

日本歯周病学会誌（日歯周誌）58（3）：148-154, 2016

キーワード：開口器、マウス、薬液投与、実験的歯周炎、動物実験

緒 言

歯周病学をはじめとする歯科分野の研究において、ラットやマウスなど齧歯類の口腔内を対象とした実験を行うことが多い。こうした動物の口腔内に種々の処置を行う場合には、開口状態の安定した保持や視野確保が極めて重要な要素となる。しかし、齧歯類の口腔内は狭小で、舌や頬粘膜が歯列、歯肉に容易に接触するため、視野が得られにくい。こうした問題が口腔内での実験操作を煩雑にする。

齧歯類の開口には、これまで便宜的に既製のピンセットや持針器などが用いられてきたが、これら器具は構造上、片手もしくは両手で把持するため、長時間の安定した口腔内視野確保には向いていない。また、

藤井ら(2006)¹⁾は、ラット口腔内実験用の開口器を考案しているが、この装置は外側に上下切歯を牽引し、大型のフレームで頭部を固定する必要があるため、大掛かりで手軽に利用することは難しい。そこで、我々はすでにラットに利用できる装着が簡便で開口量が調整できる小型の内側性開口フレームを開発し、この開口器が安定した開口状態保持と口腔内実験に有効であることを報告した^{2,3)}。

一方で、マウスに適合した汎用開口器具については現在も報告されていない。近年では、齧歯類を用いて糖尿病や慢性関節リウマチ、冠血管疾患などの全身疾患と歯周病との関係を研究した実験が多く行われている。特にマウスを用いた実験的歯周炎惹起モデルの作製には、口腔内での精確な器具操作が必要となる。そこで我々は、歯周病学の実験に汎用される 4 から 10 週齢のマウス全てにおいて、口腔内の実験に用いることができる開口器の開発を進めてきた。今回、我々は広範な週齢のマウスに対応して開口量が調節できる規格化された開口器を開発したので、本器を用いた開口保持下における、歯周炎惹起のための臼歯への結紮糸留置と口蓋粘膜への溶液投与と共に紹介する。

連絡先：倉治竜太郎

〒102-8159 東京都千代田区富士見 1-9-20

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座

E-mail: r-kuraji@tky.ndu.ac.jp

doi: 10.2329/periodo.58.148

図1 開口器の各部名称

図2 開口器装着時の全体像

材料および方法

本動物実験は日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会により承認（承認番号：15-38）され，規定に従って実施した。

1) マウス開口器の構造

開口器の骨格には外径 1.5 mm のステンレス線を用いた。本器は，長方形の(A)切歯係止フレーム，フレーム内側に左右対向して取り付けけた口角鉤；非可動性の(B)右側頬粘膜牽引フックと可動性の(C)左側頬粘膜牽引フック，左側頬粘膜牽引フックを止める(D)固定リング，フレーム左基端部に取付けられた(E)開口調節体（上下顎切歯牽引ダイヤル）の5つの部品から構成されている（図1）。

2) 実験動物

本器の検証には，4週齢（体重； 18.3 ± 1.1 g），6週齢

（体重； 21.5 ± 0.9 g），10週齢（体重； 30.4 ± 2.1 g）のBALB/c系雄性マウス各4匹を用いた。以下に示す手順により各週齢マウスに本器を装着し，開口状態の評価および口腔内実験の実施例として，①口蓋粘膜への溶液投与と②実験的歯周炎作成のため臼歯への結紮糸留置を行った。飼養には粉末飼料（CE-2，日本クレア，東京）を用いた。

3) 開口器の使用方法

本器の基本的な使用方法については，同じ構造を有するラット開口器に関する安田ら³⁾の既報に準じ，以下の手順で装着した（図1，2）。

1. 各週齢のマウスにペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg）を腹腔内投与し，全身麻酔下で本器を装着する。
2. 図1に示した(E)開口調節体の上下顎切歯牽引ダイヤルを回し，開口量を最小にする。
3. 仰臥位で，右側口角に(B)右側頬粘膜牽引フックを挿入し，マウス上顎切歯を(A)切歯係止フレームの上顎切歯保持部に掛ける。
4. 次に下顎切歯を(A)切歯係止フレームの下顎切歯保持部に掛け，(C)左側頬粘膜牽引フック先端を(D)固定リングを通して，左側口角に挿入し，頬粘膜を牽引する。
5. 再度，(E)開口調節体のダイヤルを回し，実験に適合した上下開口量に調整する。
6. 舌が術野の妨げになる場合には，図2に示したように必要に応じて，舌を小型クリップなどで口腔外に保持する。

4) 開口状態の評価

図3Aに示したように，本器装着時と既存の器具を使用した場合の開口状態を比較するため，各週齢マウ

A

ピンセット1本による
上下開口保持 ピンセット2本による
上下左右開口保持 開口器装着による
開口保持

B

図3 開口状態の評価方法

A: ピンセット1本または2本を用いた場合と開口器装着時の比較

B: 開口状態における計測項目 (a. 上下開口距離, b. 左右口角間距離)

A

4週齢マウス

6週齢マウス

10週齢マウス

B

図4 開口器の適合と装着時の視野

A: 各週齢マウス (4 ~ 10 週齢) への適合状態, B: 対側からの歯列の観察

スに対し以下の3通りの開口操作を行った: a) ピンセット1本で上下顎切歯のみを最大に広げ左右頬粘膜の強制牽引は行わなかった, b) ピンセットを2本用いて上下切歯と左右頬粘膜をそれぞれ最大に広げた。c) 開口器を装着し上下顎切歯と左右頬粘膜を牽引した。開口操作は、術者が最大と判断できる状態まで開口し、開口量を計測した。

開口量の評価項目として、下顎切歯と下顎牽引フックの接触点(下顎切歯舌側面)から上顎切歯と上顎牽引フックの接触点(上顎切歯口蓋側面)を結んだ上下開口距離とこれに直交する左右口角間距離とをそれぞれノギス(M型ノギス, 松井精密, 新潟, 日本)を用いて測定した(図3B)。ピンセット使用時の左右口角間距離は、ピンセット1本で上下開口した時の自然な左右口角間距離を非牽引口角間距離とし、もう1本のピ

ンセットを口腔内に挿入して開き左右頬粘膜を拡大した時の左右口角間距離を牽引口角間距離とした。

5) 開口器を応用した局所への溶液投与および実験的歯周炎の作成

①口腔粘膜への溶液投与

各週齢のマウス上顎左側口蓋側辺縁歯肉に、31 G 針付きマイクロシリンジを用いて、生理食塩水 10 μ l を投与した。刺入部位は、上顎左側第一臼歯口蓋側とし、針先を左側歯列に沿って2 mm 進めたところで注入した。また、投与部位の視認性を向上させるため、生理食塩水には青色色素インディゴカルミンを混合した。

②絹糸結紮による実験的歯周炎の作成

実験的歯周炎作成のため、各週齢のマウス上顎右側

第一大臼歯 (M1) と第二大臼歯 (M2) 歯間部に口蓋側より金属製ウェッジを挿入して歯間離開させ、咬合面より M1-M2 間に 5-0 絹糸を挿入した。絹糸を M1 歯頸部に結紮後、結び目部分を M1 近心面に位置付けた。絹糸の結び目と M1 近心側歯面とを固定するため、M1 周囲を簡易防湿、前処理 (G-ボンドプラス, ジーシー, 東京) した後、フロアブルコンポジットレジン (ユニフィル®ローフロープラス, ジーシー, 東京) を塗布し、光重合により硬化させた。結紮 1 週間後に再び開口器を装着し、M1 と結紮糸の状態を観察した。

③統計処理

各開口操作における上下開口距離の差についての有意差検定は、対応のない t 検定を用い、3 通りの方法で評価した口角間距離の統計処理については、一元配置分散分析と Tukey 法による多重比較検定を用いた。すべての統計処理は解析ソフトウェア (SPSSver.15.0 j.; IBM, Chicago, Illinois) を用いた。

表 1 上下開口距離 (mm) の比較

	ピンセット使用時	開口器装着時
4週齢	10.5 ± 0.4	10.9 ± 0.5
6週齢	10.1 ± 0.7	11.6 ± 0.6
10週齢	11.3 ± 0.7	12.0 ± 0.9

ピンセット使用または開口器装着時における上下開口距離。データは上下切歯間距離の平均値 ± 標準偏差 (n = 4) を示す。

結 果

1) 各週齢マウスにおける開口器装着時の適合性と口腔内観察

本器自体は開口調節体のダイヤル操作により、最大上下開口距離 14.0 mm, 最小上下開口距離 7.0 mm の範囲で開口の調整が可能である。図 4A に示したように、本器は 4, 6, 10 週齢のすべてのマウスに適合した。また左右頬粘膜牽引フックの付与により、口唇から咽頭部にかけて頬粘膜全体を圧排でき、切歯から第三臼歯までの広い範囲で口腔内の観察が可能であった (図 4B)。さらに、本器は頭頸部周囲を圧迫しない構造であるため、気道を閉塞する恐れがなく、術中に死亡することはなかった。

2) 各週齢における開口状態の評価

表 1, 2 には 4, 6 と 10 週齢のマウスに対し、ピンセットまたは開口器を用いた時の開口量を示した。すべての週齢において、開口器装着時の上下開口距離は、ピンセット使用時と比べて有意な差は認められなかった (表 1)。

これに対し、左右口角間距離について表 2 に示した。ピンセット 1 本で上下開口しただけの非牽引口角間距離は、ピンセット 2 本を用いた牽引口角間距離と開口器装着時の口角間距離に比べ 3 分の 1 程度しかなく、口腔内を観察することはできなかった ($P < 0.05$, Tukey-test, $n=4$)。また、牽引口角間距離と開口器装着時口角間距離の両者を比較すると、4 週齢で平均 0.8 mm, 6 週齢で平均 0.7 mm の有意な差を認めた。しかし、開口量は 9 mm 前後あり、実験を行う上で十分な視野を得ることができた。

表 2 左右口角間距離 (mm) の比較

	1本ピンセット使用時 非牽引口角間距離	2本ピンセット使用時 牽引口角間距離	開口器装着時 口角間距離
4週齢	3.4 ± 0.6	9.4 ± 0.3 *	8.6 ± 0.4 *†
6週齢	3.0 ± 0.5	9.2 ± 0.2 *	8.9 ± 0.2 *†
10週齢	3.2 ± 0.3	9.7 ± 0.6 *	9.2 ± 0.6 *

ピンセット使用または開口器装着時における左右口角間距離。データは左右口角間距離の平均値 ± 標準偏差 (n = 4) を示す。

* $P < 0.001$: 非牽引口角間距離と比較して有意差あり

† $P < 0.05$: 牽引口角間距離と比較して有意差あり

図5 開口器を応用した口腔内実験

A : 31 G 針の刺入, B : 刺入部位の拡大, C : インディゴカルミンの注入
 D : ウェッジによる歯間離開, E : 結紮器具の操作, F : 5-0 結紮糸の挿入
 G : 結紮終了後, H : レジン固定後, I : 結紮後1週間経過時 (矢印はレジンを示す)

3) 口腔粘膜への溶液投与

本器装着により、局所への溶液投与および実験的歯周炎作製に要する一連の操作を、全週齢のマウスにおいて検証した。本器により上下顎切歯、左右頬粘膜を四方から牽引することで術野を広く、かつ長時間安定して確保でき、両手が自由になった術者は31 G マイクロシリンジで薬液を投与することができた(図 5A-C)。

4) 絹糸結紮による実験的歯周炎の作成

術者は絹糸結紮に用いる金属製ウェッジ、持針器、ピンセットなどの実験器具(図 5D, E)を障害なく口腔内に挿入、使用することができた。とくに、実験的歯周炎作成における M1-M2 歯間部への絹糸挿入時には、M1 頬側と口蓋側の両方から持針器を操作する必要があるが、右側頬粘膜牽引フックによる頬粘膜の圧排で、頬側の器具操作も良好に行うことができた(図 5F, G)。また、口腔内の写真撮影やレジン固定をスムーズに行うため、舌を口腔外に牽引し綿球などを留置することで、唾液を確実に排除することが可能であった。結紮糸とレジンとは 1 週間後も、脱落することなく残存していた(図 5H, I)。

考 察

歯科医学におけるラット、マウスなどの齧歯類を用いた口腔内実験は、舌、口蓋粘膜、臼歯そして歯周組織など幅広い部位で行われてきた。とりわけマウスは、ラットに比べて小型であることから、省スペースで飼養でき、薬剤、特殊飼料の使用コストが少なく、また遺伝子組み換え実験にも応用しやすいなどの利点から、歯科分野の研究においても広く用いられている。

しかし、マウスの口腔内はラットの 1/2 程度で、粘膜や歯槽骨も薄く脆弱であるため、実験はより困難になる。さらに舌や頬粘膜の術野への侵入は精確な器具操作の妨げとなり、操作時の無用な組織損傷の理由となる。これらの問題を取り除き実験を安定して実施するためには、開口が長時間保持され、視野が明瞭に得られ、口腔内での器具の操作空間が確保されることが望まれる。しかしながら、現在もマウス口腔内実験において規格化された開口方法はなく、実験者が便宜的に作成した開口装置や既製の実験器具を用いて実施している。

我々は過去にラットに用いる専用開口器を開発し、これを報告した²⁾。既報のラット専用開口器は、本マウス開口器と同じく、フレームに頬粘膜フックと開口調節体を取り付けた構造であり、6 週齢から 20 週齢のラットへの応用が可能である。しかし、ラット開口器のフレームは、ラット開口量と咬合圧力に合わせて本器より太い外径 3 mm のステンレス線を用いており、そのままの素材と構造では大型となり、マウス口腔内

への挿入はできない。

今回開発したマウス専用開口器は、単に既報のラット開口器を小型化したものでなく、ラットとマウスの口腔解剖学的な差異を考慮して各部の構造を設計し直した。本器はラット開口器と同様、開口調節体の操作によって、広範な週齢のマウスに対し最適な開口量を設定することができた。また、切歯係止フレームの左右両端に付与された頬粘膜牽引フックにより、口角を十分に拡大し、頬粘膜を傷つけることなく臼歯列外側へ圧排することが可能になった。特にマウスでは口腔前庭が浅く、また頬粘膜は咽頭、口狭への移行部で急激に狭小化するため、頬粘膜牽引フックの先端 1/2 を強く下顎方向と内側に屈曲させることで粘膜損傷を防止した。また、切歯保持部の固定源であるマウス切歯の舌側形態は、根元が太い楔状のラット切歯に比べ、板状でアンダーカットがなく平滑な構造であるため、歯係止フレームで固定しにくかった。そこで歯係止フレームの上下顎切歯保持部を口腔内側に向けて前屈させ、表面を粗糙にすることで切歯の保持力を高めた。さらに、本器のフレームは 1.5 mm ステンレス線のみを用いているため、様々な角度からの器具挿入や舌の口腔外への牽引を妨げず、舌を口腔外へ排除、固定しておくことも容易にできた。

すべての週齢のマウスにおいて、本器装着時の最大開口距離は約 10 mm 以上、口角間距離は約 9 mm となり、両手でピンセットを使用した場合と、同等の開口保持効果であった(表 1, 2)。ピンセット 1 本による上下開口のみでは、左右口角間距離は 3 mm 程度であり、口腔内観察のみならず片手での煩雑な器具操作は極めて困難であった。一方で、ピンセット 2 本で上下左右を牽引すると、両手が塞がってしまうため、術者一人で口腔内実験を実施することは不可能となる。したがって、本器を使用することで初めて、両手が自由になり、薬物投与や M1 への絹糸結紮による実験的歯周病惹起を容易に実施できることが明らかになった。

本器を使用することで、マウスにおける実験的歯周炎作成や薬物投与だけではなく、外科処置や臼歯を対象とした歯内治療、放射線の口腔内照射実験などにも応用できることが示唆された。また、本器フレームに新たな外部アタッチメントを接続し、口腔内で用いる器具の基軸とすることで、舌固定や器具の挿入の深さ、角度を規格化することに役立つかもしれない。

本器は、総ステンレス製であるため、オートクレーブや乾熱滅菌後、繰り返し使用することができる。また、本器は実用新案登録(番号: 14-22)済みである。

謝 辞

本器の考案に際して、日本歯科大学麻酔学講座 砂田勝久先生、株式会社 野中理化学製作所の協力を深く感謝する。

今回の論文に関連して、開示すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) 藤井 彰, 松本裕子, 山根潤一, 姜 桂珍: 小動物を用いた口腔内実験法. 日薬理誌, 128: 315-320, 2006.

- 2) 倉治竜太郎, 橋本修一, 伊藤 弘, 安田佑理, 沼部幸博: ラット口腔内実験に用いる開口器の開発—実験的歯周炎モデルへの応用—. 第58回秋季日本歯周病学会学術大会 プログラムおよび演題抄録集, 57: 134, 2015.
- 3) 安田佑理, 橋本修一, 倉治竜太郎, 村田奈保子, 篠原健一郎, 砂田勝久: ラット口腔内実験に用いる開口器の開発. 日歯麻誌, 44: 147-149, 2016.

Development and Usage of Mouth Gag for Oral Experiments in the Mouse

Ryutaro Kuraji^{*1}, Shuichi Hashimoto^{*2}, Hiroshi Ito^{*1} and Yukihiro Numabe^{*1}

^{*1}Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo,
Nippon Dental University, Tokyo, Japan

^{*2}Nippon Dental University, Tokyo, Japan

(Received: June 22, 2016 Accepted: August 3, 2016)

Abstract: Rodent models, such as mouse and rat models, are often used in investigations of the oral cavity, including in the field of periodontology. When various treatments are carried out in the oral cavity, keeping the animals' mouths in an open state in addition to securing a field of view is extremely important to ensure consistency of the experimental procedures. However, few mouth gags for mice have been developed so far. We developed a standardized mouth gag conforming to various sizes of the oral cavity for mice of different ages, as well as similar gags for rats.

The gag is composed of a rectangular incisor-opening frame constructed from a stainless steel wire with a diameter of 1.5 mm, right and left buccal-towing hooks disposed in opposite directions to each other inside the frame, and an adjustment dial for the amount of opening. BALB/c mice (n = 4) aged 4 weeks (weight; 18.3 ± 1.1 g), 6 weeks (21.5 ± 0.9 g) and 10 weeks (30.4 ± 2.1 g) were used to evaluate the suitability of the gag for the oral cavities of mice.

By adjusting the dial to alter the amount of mouth opening, both maintenance of the open state and intraoral observation could be accomplished favorably in all the mice of different ages and weights. Tweezers as a control device corresponding to the mouth gag were utilized. The amount of mouth opening by the gag was measured. The distance between the upper and lower incisors was 10.9-12.0 mm and the width between the left and right corners of the mouth was 8.6-9.2 mm.

As tests for application of the gag in oral experiments on mice, periodontal experiments involving a drug injection and silk ligature placement around the maxillary first molar were performed. Furthermore, usability of some of the oral experimental instruments was examined as using the gag. The gag for the mice allowed insertion of various instruments into the oral cavity in these experiments. The gag can be autoclaved and sterilized by dry heat.

The gag has been already registered as a utility model (publication number 2014-004789).

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 58 (3): 148-154, 2016

Key words: mouth gag, mouse, drug injection, experimental periodontitis, animal test

Corresponding author: Ryutaro Kuraji

Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

E-mail: r-kuraji@tky.ndu.ac.jp