

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791527
 研究課題名 (和文) 顎関節症における関節内酸化ストレスの測定と消長についての研究
 研究課題名 (英文) Studies on analysis of oxidative stress in the temporomandibular joint with TMDs.
 研究代表者
 河合 良明 (KAWAI YOSHIAKI)
 神奈川歯科大学・顎顔面外科学講座・助教
 研究者番号：00333154

研究成果の概要：顎関節症発症における病態メカニズムの一つとしての活性酸素（フリーラジカル）は、健常者においても常に存在し、生理学的に重要な分子としてその恒常性を維持している。しかし炎症に起因した結果に出現する活性酸素種が多く出現することにより生理機能として維持していた活性酸素を組織障害性の強い活性酸素に変化させ、その症状を増強すると考えられた。そして、これまで仮説として示されているメカニカルストレスに起因する虚血再灌流障害は活性酸素の誘発を助長する結果とはならないことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2007 年度 | 1,200,000 | 0 | 1,200,000 |
| 2008 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 270,000 | 3,670,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎関節症・滑液・活性酸素・ESR・Bioredox

1. 研究開始当初の背景

顎運動時に顎運動時疼痛や開口障害を主訴とする、顎関節症患者が漸増し、この疾患に対する幾つかの治療方針が存在するにも関わらず、顎関節症の臨床像は各人ごとに異なり、複雑多岐であるため、明確な治療の科学的根拠の証明なされていない。近年、顎関節疾患において特に、顎内障および変形性顎関節症における病態メカニズムとして、顎関節症患者の上顎関節腔内静水圧は、クレンジング時に約 200 mmHg に上昇する (Nitzan; J. Oral Maxillofac. Surg., 52: 671, 1994)。

顎関節に過剰に加わった圧力は関節周囲に存在する末梢毛細血管灌流圧を遥かに凌駕しており、顎関節内微小循環系を破綻させ組織虚血に導く、この虚血再灌流メカニズムは活性酸素（フリーラジカル）産生に十分な環境である。そしてメカニカルストレスにより生じた虚血再灌流や炎症により発生した活性酸素は、直接的に関節周囲組織を破壊するとともに関節内で最も重要な滑液の粘度低下（ヒアルロン酸の分解）、また間接的に神経線維に存在するサブスタンス P (SP) やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) などの

遊離に依存した神経原性炎症分子を誘導し炎症性サイトカイン(IL-1, TNF- α)の増加, 軟骨破壊に重要な役割を示すマトリックスメタロ プロテアーゼ (MMP) など増加させると考えられている. これまで, われわれは, 生体における顎関節滑液中の活性酸素を測定する前段階として実験的顎関節炎モデルとしてラット顎関節腔に IL-1 を注入し炎症を誘導した顎関節滑液を採取し, 滑液中に三種類のフリーラジカル (ヒドロキシルラジカル, 水素ラジカル, カーボンラジカル) の存在を確認し, 生体内分子では消去機構が存在しない最も組織障害を引き起こすヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) の信号強度は, コントロール群と比較し有意に高値を示すことを明らかにし, さらに $\text{HO}\cdot$ の発生由来であるスーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の不均化酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) により滑液中の $\text{HO}\cdot$ 信号強度がさらに増強される結果をわれわれは報告している (Kawai *et al.*; J. Dent. Res., 79: 1489-1495, 2000). また, 顎関節症患者滑液での反応についても, 臨床症状の違いにより SOD により $\text{HO}\cdot$ の産生が減少する反応と逆に増強される反応に別れ, 軟骨基質の破壊および病能期間により滑液中のラジカル産生系が変化することをすでに報告している (Kawai *et al.*; 磁気共鳴と医学 1999;10:148-152), (Lee MC, Kawai Y, *et al.*; Redox Rep. 2004;9(6):331-336).

2. 研究の目的

顎関節症における臨床病態とフリーラジカル発生メカニズムの解明および消長.

(1) 最先端の技術として *in vivo ESR* により動物モデル (ラット) にサイトカインの関節腔内注射によりヒト顎関節炎を疑似させた顎関節炎を誘導させ関節周囲に存在するフリーラジカルを画像として消長を計測評価する. (2) L-band ESR を使用しスピンプローブ剤 (C-PROXYL) を用いることにより関節周囲での酸化ストレスの局在を評価する.

(3) フリーラジカルのスカベンジャーによる除去効果. (4) 臨床症状と滑液中フリーラジカルの関係. (5) 滑液中のフリーラジカルの同定. 関節はそれ自体で, 破壊そして再構成をくり返しその臨床症状と滑液の生化学的分析の判断が極めて難しい部分であり, 必ず滑液採取のために関節腔内の穿刺が

必要とされる. そこで, われわれは関節穿刺による疼痛刺激や恐怖心がなく, 関節周囲の活性酸素分布画像のイメージング解析することにより関節内の生化学的情報を引き出し患者個人の関節状態を分かりやすく瞬時に計測し日々の臨床に役立てまた, 関節内のフリーラジカルを制御 (フリーラジカルの反応経路を操作) することにより新しい治療法を開発することを最大の目的とする.

3. 研究の方法

(1) 実験モデルラットの作成: 関節穿刺により, サイトカイン (IL-1 β , TNF- α) を注入し顎関節症モデルを作成 (予備実験で十分に実験目的のために応用可能であることを確認).

① *In vivo ESR*: 安定スピンプローブ剤ニトロキシドラジカル (C-PROXYL) を尾静脈に注入, 生体成分による誘電損失をさけるため L-band 帯域のマイクロ波を利用して ESR 測定を実行する. ニトロキシドラジカルは注入局所での酸素由来ラジカル産生が増加すれば, これに依存して還元を受け減弱するため, この減弱速度から $\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ラジカルなどの挙動を ESR スペクトルとして検出把握する.

② 虚血再還流障害による酸化ストレスレベルの測定として顎関節炎モデルラットに下顎強制閉口器により過剰咬合負担を加え, 微小循環の虚血と再還流を誘発し, これを非接触がた LED レーザードップラにて循環状態を計測し顎関節の酸化ストレスを L-band ESR により定量し仮説として示される虚血再還流障害による活性酸素の定量を行う.

(2) 顎関節症障害レベルと活性酸素の関係: 顎関節症患者 (パンピング・マニュピレーション適応患者) に障害レベルとして顎運動量の計測それに伴う疼痛レベルを VAS 法により計測, 同様にプレッシャーエルゴメーターを用い顎開口筋および閉口筋の圧痛を数値として算定. 画像診断として X 線および MRI により関節内部の疾患状態 (円板の転移状態, 貯留する滑液, 骨および軟骨の状態) をレベル分けし滑液中のナイトロオキシイト (NO) を NO オキシメーターにより測定, さらにヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) を X-band ESR を用い比較し臨床病態と活性酸素の因果関係を検索評価する.

4. 研究成果

(1) ブラキシズムやクレンチングなどの日常生活悪習癖は、顎関節症の発症の最も重要な因子であり、これら顎関節に加わるメカニカルストレスが顎関節内または、関節周囲組織で虚血再灌流障害を導き、フリーラジカルを産生させ炎症を誘発すると示唆されている。①TNF- α により顎関節炎症を誘発させた動物実験モデルラット顎関節に過剰なメカニカルストレスとして関節部に垂直的な強制過剰交合を断続的に85分間加え、確実に顎関節周囲組織への虚血再灌流状態把握するために非接触型血流測定器により血流状態を確認した。その後、4分以内にフリーラジカルのスピンプローブ剤であるC-PROXYL(140mM)をラット尾静脈に注射し1分後(再灌流状態から5分後)にL-band ESRによりラット顎関節周囲のフリーラジルの存在を生体内ラジカルの電子喪失率(減衰率)により評価を行った結果、顎関節に生理食塩水を加えたコントロール群とTNF- α 誘導顎関節炎群において、いずれも過剰なメカニカルストレスを加えることによりC-PROXYLの減衰率は減弱を示し、Control群の減衰率の差は $Y=-0.01238X$ であり、顎関節炎群での減衰率の差は $Y=-0.0524X$ と示され、いずれも減衰率は減弱された(図1)。顎関節に長時間ストレスを加えることによりフリーラジカルの産生は逆に抑制される傾向が示された。これ実験結果から、顎関節内にはフリーラジカルに対する生体の防御反応機構が存在する可能性が強く示唆された。

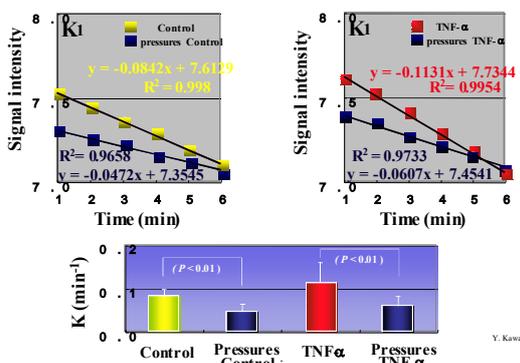


図1. L-band ESRによる虚血再灌流障害に伴う酸化ストレスの測

②最新の技術として3D-ESRシステムを利用しマーカーとなるC-PROXYLを画像として表現することにより上顎関節腔の立体構造が得られた(図2)。

この方法は非常に画期的ではあるが酸化ストレス存在下においてC-PROXYLは消失するため、コントロール群での検出は可能であるが炎症状態の画像での把握は困難であり、更なる技術開発が要求される結果となった。

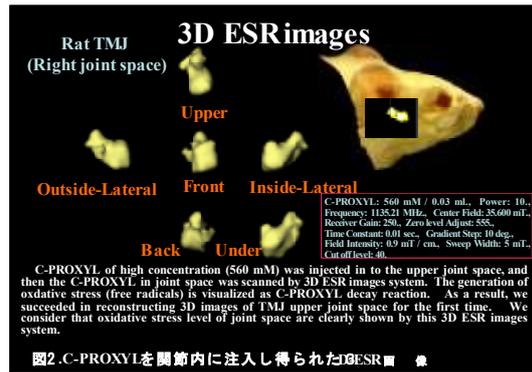


図2. C-PROXYLを顎関節内に注入し得られた3DESR画像

(2) 顎関節症患者滑液の研究として、顎関節症患者で繰り返しパンピングマニピュレーション療法を施術し、得られた滑液中のHO \cdot (hydroxyl radical)をスピントラップ剤としてDMPOを用いたX-band ESR法にて測定し、さらに電極法によるNOの濃度を測定した。

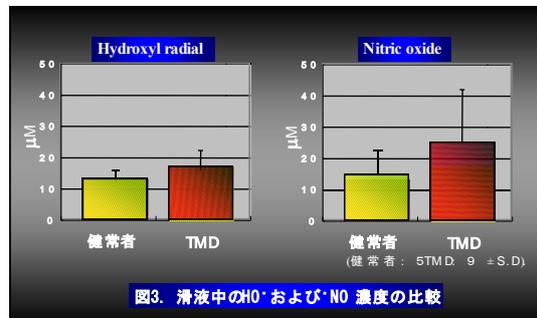


図3. 滑液中のHO \cdot およびNO濃度の比較

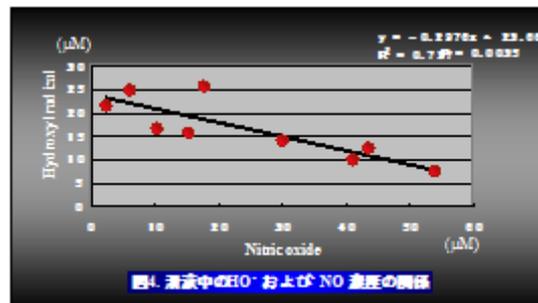


図4. 滑液中のHO \cdot およびNO濃度の関係

①実際の臨床症状と比較した結果顎運動痛におきの疼痛レベルとHO \cdot 濃度は比例関係を示したが、興味あることにNO濃度とは反比例する結果となった。②健常者と比較した結果、HO \cdot とNO濃度は高値を示した(図3)。また顎関節症患者滑液中のHO \cdot とNOとの関係は反比例する傾向が示された(図4)。これまで行った我々の結果と今回の結果から顎関節症に関わる活性酸素種の分子スキームとして炎症に伴い過剰に産生された superoxide anion radical (O $_2^{\cdot-}$) が滑液中で superoxide dismutase(SOD)と iron ion(Fe $^{3+}$)またはNOによる3者の競合反応が生じると考えられ、これらを反応速度定数で示すとO $_2^{\cdot-}$ とFe $^{3+}$ の反応速度定数は $10^6 M^{-1} sec^{-1}$ でFe $^{3+}$ はFe $^{2+}$ と変

化しこれは Fenton 反応に利用される。さらに $O_2^{\cdot-}$ と SOD の反応速度は $2.0 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$ で H_2O_2 に不均化され、その後フェントン反応により HO^{\cdot} が産生する。しかしながら $O_2^{\cdot-}$ と NO の反応速度定数は $6.7 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$ であり $O_2^{\cdot-}$ と SOD 不均化反応の 3 倍以上であり NO は peroxinitrite ($ONOO^{\cdot}$) に変化し組織障害をもたらすと考えられる。また炎症の軽減にともない $O_2^{\cdot-}$ 濃度が減少する事により NO 濃度が安定化すると考えられた。また HO^{\cdot} の産生は $O_2^{\cdot-}$ 由来以外に生体内に多く存在する H_2O_2 やアラキドン酸カスケードなどから発生し炎症症状により増減をされると考えられた。また、L-band ESR による動物実験から過剰な咬合ストレスによる虚血再灌流障害実験からのフリーラジカルの発生は抑制的結果となりフリーラジカルに対する生体防御反応が存在する可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Kawai, Y., Tajima, D., Yoshino, F., Takahashi, S., Lee, MC. and Kubota, E.: Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in synovial fluid of Temporomandibular disease patient. Bull Kanagawa Dent Col 36: 93-96. 2008. 査読無し

Kawai, Y., Lee, MC. and Kubota, E.: Oxidative Stress and Temporomandibular Joint Disorders. JDSR 44:145-150. 2008. 査読有り

Tajima, D., Kawai, Y., Shoji, H., Lee, MC. and Kubota, E.: Noninvasive measurement of oxidative stress in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint *in vivo* ESR system. Bull Kanagawa Dent Col 36: 47-53. 2008. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

顎関節症患者滑液中の Redox 反応の解析
田島 大太郎, 河合 良明, 吉野 文彦, 高橋 俊介, 李 昌一, 久保田英朗
神奈川歯科大学学会総会 2007. 12. 08

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 良明 (KAWAI YOSHIAKI)
神奈川歯科大学・顎顔面外科学講座・助教
研究者番号: 1 8 7 9 1 5 2 7

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者