

実験的歯の移動における強い矯正力とジグリング力の
炎症性サイトカイン発現動態の比較検討

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

疋田 拓史

(指導：葛西 一貴 教授)

本稿は、主となる参考論文 Comparison of orthodontic root resorption under heavy and jiggling forces during experimental tooth movement (*Korean Journal of Orthodontics* 共著 掲載予定) および副となる参考論文 Jiggling Force Induces Orthodontic Root Resorption during Tooth Movement in Rats (*International Journal of Oral-Medical Sciences* 2015 June 1. Vol.14 共著 p. 13-20) をまとめたものである。

緒言

歯科矯正治療は顎口腔機能の改善や審美性の回復など多くのメリット[1]を有するが、程度の差はあるものの、歯根吸収を生じることが知られている。歯科矯正治療における歯根吸収は、予測することが困難な偶発症の一つであるが、歯根が広範に吸収されることにより歯の動揺をきたし、咀嚼機能に大きな影響を及ぼすことがある。Kaleyら[2]は、歯科矯正治療を受けたほとんどの患者に歯根吸収が認められ、その中の3%が上顎中切歯において重度歯根吸収（根長の4分の1以上の吸収）が出現したと報告している。

歯根吸収の原因について、矯正力の大きさ[3]、治療期間の長期化[4]、歯根の形態異常[4]、外傷の既往[5]、歯の移動様式[6]ならびに遺伝要因[7]などが報告されているが、明確な原因は未だ解明されていない。歯科矯正治療中に移動中の歯が長期にわたり断続的に動揺するジグリング[8, 9]もその一因子であると考えられている。しかしながら、重度歯根吸収の発生におけるジグリング力の関与について、詳細なメカニズムは未だ不明である。

そこで本研究ではジグリング力における歯根吸収および炎症性サイトカイン発現動態を比較し、歯根吸収に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. *in vivo* 研究

1) 実験動物および歯の移動方法

本動物実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理に関する指針 (承認番号 第 AP13MD003 号) に準じて行った。実験には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット (350 ± 10 g) を合計 50 頭用い、飼育管理を日本大学松戸歯学部実験動物センターにて SPF クリーンラック内で行い、固形飼料、飲料水、床敷ならびにケージは全て滅菌したものを使用した。装置の装着および調整は、ペントバルビタールナトリウム (35 mg/kg body weight) で腹腔内注射を施し、全身麻酔下で実施した。

上顎両側第一臼歯の移動を行うために、歯牙移動装置 (直径 : 0.012inch, ステンレススチール線, Tomy International Inc. Tokyo, Japan) を作製し、上顎両側第一臼歯とステンレススチールの結紮線 (太さ: 0.008 inch, Tomy International Inc. Tokyo, Japan) で結紮、上顎両側切歯にスーパーボンド® (Sun Medical Co, Shiga, JAPAN) を用い固定した[10] (Fig. 2)。対照 (以下, Cont) 群, 至適矯正力 (以下, Optimal force; OF) 群, 強い矯正力 (以下, Heavy force; HF) 群, ジグリング力 (以下, Jiggling force; JF) 群の計 4 群に分け、ラットに負荷する矯正力の強さは OF および JF 群で 10 g, HF 群で 50 g とした。力の方向については、OF および HF 群では舌側方向へ、JF 群では舌側、頬側と 7 日間毎に方向転換を行った (Fig.

3)。

2) 標本作製および観察部位

当該期間を経過したラットは、ペントバルビタールナトリウムで深麻酔した後、生理食塩水と 10 % 中性ホルマリン溶液で灌流固定した。さらに上顎骨を摘出して、10 % 中性ホルマリン溶液にて 4°C で 24 時間浸漬固定後、試料を 10 % EDTA 溶液 (pH 7.4) にて 4 週間脱灰処理を行った。脱灰した試料は、流水洗浄し、通法に従ってパラフィン包埋ブロックを作製後、前頭方向に厚さ 4 μm で連続的に薄切し、各種染色法を施行した。観察部位は Yamamoto ら[11]の方法を参考にし、上顎左側第一臼歯の遠心口蓋根を観察、口蓋側歯槽頂から 300 μm 根尖側までを「A 領域」、根間中隔歯槽頂の根尖側 150 μm から 300 μm 根尖側までを「B 領域」とした (Fig. 4)。これは、OF および HF 群において「A 領域」は圧迫側となる一方、「B 領域」は牽引側となる。JF 群において 7 日目は OF 群と同様であるが、14 日目および 21 日目においては圧迫側と牽引側が転換する。

3) 病理組織染色法および免疫組織化学染色法

ヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下、HE 染色) は、試料の脱パラフィン後、通法に従い施行した。

免疫組織化学染色は、試料の脱パラフィン後、通法に従い施行した。各切片は、脱パラフィン後 3% 過酸化水素メタノール溶液に室温で 15 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ反応の除去を行った。一次抗体には、抗 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA; dilution 1:100 rabbit, polyclonal), 抗カテプシン K 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA; dilution 1:100, goat, polyclonal), 抗 matrix metalloproteinase (MMP) -9 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:50, goat, polyclonal), 抗 interleukin (IL) -6 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:100 goat, polyclonal), monoclonal 抗 cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) 抗体 (American Research Products, Inc., MA, USA; dilution 1:50 rabbit, polyclonal), 抗 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:100 goat, polyclonal) and 抗 osteoprotegerin (OPG) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:100 goat, polyclonal) を用いた。各切片は、Tris-buffered saline (TBS) で洗浄し、前述の一次抗体を室温で 1 時間反応させた。一次抗体反応後、二次抗体として Histofine Simple Stain MAX-Po (R) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を使用し、TRAP および CINC-1 を、Histofine Simple Stain MAX-Po (G) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を使用し、カテプシン K, MMP-9, IL-6, RANKL ならびに OPG をプロトコールに従い行った。各切片は TBS で洗浄し、3, 3'-diaminobenzidine

tetrahydrochloride (DAB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にて発色後、マイヤーヘマトキシリン液を用いて対比染色を行い、アルコール・キシレン系列にて脱水および透徹を行い、マリノールにて封入を行った。なお, positive control として炎症性ラット歯周組織を用い, negative control として, 一次抗体の代わりに TBS を用いた。

各陽性細胞の測定は 21 日目における各領域 (高さ : 300 μm \times 幅 : 225 μm) を光学顕微鏡下 400 倍にて任意のホットスポットの 4 視野を撮影し, 茶褐色に染色された細胞を陽性とし, 陽性細胞の各群平均値を算出した。

2. 統計解析

各陽性細胞数は各群平均値と標準偏差を求めた。陽性細胞数の差の検定は, Kruscal Wallis test を用いた ($P < 0.05$ および $P < 0.01$)。

結果

1. 実験中のラットの体重変化

矯正装置装着により一時的に体重の減少が認められたが、その後回復し、各群間で体重の変化に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

2. 病理組織化学的所見 (HE 染色)

1) Cont 群 (0 g)

7~21 日目の「A, B 領域」において、歯根表面のセメント質から歯槽骨に向かって水平方向に走行する線維性結合組織と線維芽細胞が認められた。歯根表面のセメント質は比較的平滑な面を呈していた (Fig. 5-a~f)。

2) OF 群 (10 g)

矯正力適用後 7~21 日目の「A, B 領域」において線維性結合組織と線維芽細胞の走行は不規則であったが、歯根表面のセメント質に多核破骨 (歯) 細胞を含む歯根吸収窩は認められなかった (Fig. 5-g~l)。

3) HF 群 (50 g)

矯正力適用後 7 日目の「A 領域」において、歯根表面に多核破骨 (歯) 細胞と

歯根吸収窩が認められ (Fig. 5-m), 14 日目 (Fig. 5-n) では徐々に増加, 21 日目ではさらに多核破骨 (歯) 細胞を含む象牙質まで達する歯根吸収窩が多数認められた (Fig. 5-o)。「B 領域」において 14 および 21 日目では散見された (Fig. 5-q, r)。

4) JF 群 (10 g)

矯正力適用後 7 日目の「A, B 領域」において, OF 群と同様に線維性結合組織および線維芽細胞の走行は不規則であったが, 歯根表面のセメント質に多核破骨 (歯) 細胞を含む歯根吸収窩は認められなかった (Fig. 5-s, v)。14 日目においては多核破骨 (歯) 細胞を含む歯根吸収窩が認められ (Fig. 5-t, w), 21 日目において多数認められた (Fig. 5-u, x)。

3. 免疫組織化学的所見

1) TRAP, カテプシン K ならびに MMP-9 の発現動態

Cont および OF 群において, TRAP およびカテプシン K 陽性多核破骨 (歯) 細胞は 7~21 日目を通して「A, B 領域」の歯根表面に認められなかった (Fig. 6~7-a~l) が, MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞は 21 日目の「A 領域」において認められた (Fig. 8-i)。HF 群では 7 日目の「A 領域」の歯根表面に TRAP, カテプシン K ならびに MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞が認められ (Fig. 6~8-m), 14 およ

よび 21 日目ではさらなる増加が認められた (Fig. 6~8-n, o)。HF 群の「B 領域」において、TRAP 陽性多核破骨 (歯) 細胞は 14 および 21 日目に認められ (Fig. 6-q, r), カテプシン K およびに MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞は 21 日目に認められた (Fig. 7, 8-r)。JF 群の 7 日目において、TRAP, カテプシン K ならびに MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞は、「A, B 領域」で歯根表面に認められなかった (Fig. 6~8-s, v) が、14 日目の「A, B 領域」において陽性多核破骨 (歯) 細胞が認められた (Fig. 6~8-t, w)。さらに 21 日目の「A, B 領域」において、TRAP, カテプシン K ならびに MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞が多数認められた (Fig. 6~8-u, x)。

2) IL-6, CINC-1, RANKL ならびに OPG の発現動態

Cont および OF 群の「A, B 領域」において、IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞は 7~21 日目を通してほぼ認められなかった (Fig. 9~11-a~l)。HF 群において、IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞は 7 日目の「A 領域」で認められ、14 および 21 日目において増加が認められた (Fig. 9~11-m~o)。HF 群の「B 領域」において CINC-1 陽性細胞は、7~21 日目に認められたのに対し、7 日目では IL-6 陽性細胞は 21 日目に認められ、RANKL 陽性細胞は 14 および 21 日目で認められた (Fig. 9~11-p~r)。JF 群では IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞は、「A, B 領域」において 14 および 21 日目に増加が認められた。しかし、7 日目におい

て IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞は, Cont および OF 群と同様に認められなかった (Fig. 9~11-s~x)。

また, OPG 陽性細胞は OF 群 21 日目の「B 領域」, 14 および 21 日目の HF 群「A 領域」および JF 群「A, B 領域」において認められた (Fig. 12- l, n, o, t, u, w, x)。

3) 各陽性細胞の定量的評価

TRAP, カテプシン K ならびに MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞数は, 21 日目の HF および JF 群において, Cont 群と比較し, 「A, B 領域」で有意な増加を認め (Fig. 13-a~c) (Kruscal Wallis test, $P < 0.01$), さらに TRAP 陽性多核破骨 (歯) 細胞数は 21 日目「B 領域」の JF 群において, カテプシン K および MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞数は 21 日目「A, B 領域」の JF 群において HF 群と比較し, 有意な増加が認められた (Fig. 13-c) (Kruscal Wallis test, $P < 0.01$)。また, TRAP, カテプシン K ならびに MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞数は Cont および OF 群の間においては「A, B 領域」に有意な差は認められなかった (Fig. 13-a~c)。IL-6, CINC-1 ならびに RANKL の陽性細胞数は, 21 日目の HF および JF 群の「A, B 領域」において, Cont 群と比較し有意な増加を認め, 中でも IL-6 「B 領域」, CINC-1 「A, B 領域」, RANKL 「B 領域」において JF 群は HF 群に対し有意な増加を認めた (Kruscal Wallis test, $P < 0.01$) (Fig. 14-a-c)。また, IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞

数は 21 日目の JF 群「A 領域」は「B 領域」と比較し有意な増加が認められた (Fig. 14-a~c) (Kruskal Wallis test, $P < 0.01$)。

考 察

本研究では強い矯正力とジグリング力の炎症性サイトカイン発現動態の比較検討を行った。各群間における実験中のラットの体重変化について有意な差を認められなかったことから、装置はラットの成長に影響を与えなかったと考えられる (Fig. 1)。過去の研究において、ラットの上顎臼歯の至適矯正力は 10 g 未満とし、歯科矯正治療における歯根吸収は矯正力の大きさが関係していることを報告している[3, 12, 13]。

また、一方向の矯正力における歯根吸収の研究は多く報告されているが、ジグリング力の研究はほとんど行われていない。近年、Matsuda ら[14]は、ラットにおける上顎第一臼歯の反復移動モデルを確立した。本研究では、この装置および方法を参考にし、ラットの臼歯においてジグリング力を再現した。以前の研究[3, 15]では強い矯正力は弱い矯正力と比較し、多くの歯根吸収および多核破骨 (歯) 細胞が認められたことを報告した。今回の結果もそれと同様に、圧迫側において 7 日目の 10 g と比較し、50 g において多くの多核破骨 (歯) 細胞が認められた。また、JF 群の 21 日目の「A, B 領域」において、HF 群と比較し多核破骨 (歯) 細胞の増加が認められ、JF 群の「B 領域」では、14 および 21 日目において多核破骨 (歯) 細胞が認められた (Fig. 5)。各陽性細胞数の定量化においても、HF 群 (50 g) と比較し、至適矯正力 (10 g) のジグリング力において多核破骨 (歯) 細胞数が

有意な増加を示した (Fig. 13-b, c)。この結果から、ジグリング力は強い矯正力と比較し、歯根吸収を増悪する可能性がある。一方、Eross ら[16]は、ヒトにおいて強い矯正力 (225 g) と強いジグリング力 (225 g) の間には歯根吸収において有意差に差がないことを報告した。この結果の不一致は、矯正力の大きさや装置の調整の間隔、ヒトとラットの種の違いに起因している可能性があると考えられることから、ジグリングの力の強さと歯根吸収の関係性を解明するためには更なる研究が必要である。

重度歯根吸収が発生する一因として、圧迫側での硝子様変性組織の形成が考えられている[17-19]。歯根膜の硝子様変性の吸収に TRAP 陽性多核破骨 (歯) 細胞が関与していることを報告した[20]。ジグリング力 JF 群の歯根膜組織は、7 日毎に圧迫側が転換するため、硝子様変性組織の形成は広領域に及ぶことが推察される。従って、歯根膜組織の回復前に、それまで負荷していた矯正力と異なる方向の力を加えることは、広範囲の硝子様変性の形成を誘導し、結果的に歯根吸収を増悪することが考えられる。Eross ら[16]も、短期間で多方向に矯正力が負荷されるジグリング力において重度歯根吸収を惹起すると報告している。

カタプシン K および MMP-9 陽性多核破骨 (歯) 細胞については、「A 領域」において、HF および OF 群と比較し、21 日目の JF 群で多く認められた (Fig. 7, 8-t, u)。また、「B 領域」では、14 および 21 日目の HF および OF 群と比較し JF 群で多く

認められた (Fig. 7, 8-w, x)。カテプシン K を含むプロテアーゼおよびマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、多核破骨 (歯) 細胞においてこれらのタンパク質分解酵素を分泌することで硬組織における有機質の分解に関与している。特にカテプシン K および MMP-9 の発現は、多核破骨 (歯) 細胞[21, 22]において特徴的である。Tsuchiya ら[23]は、ラットにおける歯の移動時の歯根吸収において多核破骨細胞と多核破歯細胞のカテプシン K と MMP-9 の発現が近似していることを報告した。従って、これらの結果と本研究の結果より、ジグリング力が歯の移動において破骨 (歯) 細胞形成を誘導することが示唆された。

重度歯根吸収と炎症性サイトカインとの関係性は、*in vivo* において多く報告されている。従来の研究において、強い矯正力 (50 g) は IL-6, IL-8, RANKL ならびに OPG 産生を介して、重度歯根吸収を誘発する[24-26]ことを示唆しており、これは本研究での 21 日目の HF 群「A, B 領域」にて IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞数が Cont 群と比較し有意な差があったことと同様である。また、IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞数は、21 日目の JF 群「A 領域」において、JF 群「B 領域」と比較し有意な差が認められた (Fig. 14-a~c)。今後、ジグリング力による炎症性サイトカインの増強のメカニズムを解明するためには、*in vitro* においても検討する必要がある。過去の *in vitro* での研究[24-26]において、圧迫力は炎症性サイトカインである IL-6, IL-8 ならびに RANKL の産生を誘導すること

を報告している。本研究の結果において、矯正力を負荷した歯根膜組織は、圧迫側だけでなく牽引側においてもこれらの炎症性サイトカインを誘導している。従って、ジグリング力は、圧迫と牽引の異なる性質の矯正力を加えることにより、一方向の矯正力と比較し、炎症性サイトカインは増加することを示唆した。「A、B領域」の差異については、JF群の21日目において「B領域」と比較し、「A領域」においてIL-6、CINC-1ならびにRANKLの陽性細胞数の増加が認められた(Fig. 14-a~c)。Garletら[27]は牽引側と比較し、圧迫側においてRANKL陽性細胞の発現増加を報告した。これらの差異を推察すると、本研究において「B領域」の歯根膜線維芽細胞は1回の圧迫力と2回の牽引力を受けるのに対し、「A領域」の歯根膜線維芽細胞は、2回の圧迫力と1回と牽引力を受けることになる。従って、「A領域」における圧迫回数が多いことが、「B領域」と比較し各陽性細胞が増加した原因と推察される。

結 論

JF群における炎症性サイトカイン発現動態をHF群と比較し、歯根吸収に及ぼす影響について検討した結果、以下の結論を得た。

1. TRAP, カテプシン K ならびに MMP-9 の陽性細胞である破骨 (歯) 細胞は, 21 日目において JF 群の「A, B 領域」で HF 群と比べ, 有意な増加が認められた。
2. IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞は, 21 日目において HF 群と比較し JF 群で有意な増加が認められた。
3. IL-6, CINC-1 ならびに RANKL 陽性細胞は, 21 日目において JF 群「A 領域」で HF および JF 群「B 領域」より有意な増加が認められた。

以上のことから、ラットにおけるジグリング力は強い矯正力と比較し、至適矯正力でも歯根吸収を増悪させる可能性が示唆された。

参考文献

1. Henrikson T, Ekberg E, Nilner M. Can orthodontic treatment improve mastication? A controlled, prospective and longitudinal study. *Swed Dent J* 33:59-65, 2009.
2. Kaley J, Phillips C. Factors related to root resorption in edgewise practice. *Angle Orthod* 61: 125-132, 1991.
3. Chan E, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: part 5. Volumetric analysis of root resorption craters after application of light and heavy orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 127: 186-195, 2005.
4. Levander E, Malmgren O, Stenback K. Apical root resorption during orthodontic treatment of patients with multiple aplasia: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod*, 1998; 20: 427-434.
5. Malmgren O, Goldson L, Hill C, Orwin A, Petrini L, Lundberg M. Root resorption after orthodontic treatment of traumatized teeth. *Am J Orthod* 82: 487-491, 1982.
6. Linge BO, Linge L. Apical root resorption in upper anterior teeth. *Eur J Orthod* 5: 173-183, 1983.
7. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK Jr, Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, Macri JV, Roberts WE. Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients: linkage of chromosome-18 marker. *J Dent Res*, 2003; 82:

356-360.

8. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 103: 138-146,1993.
9. Mirabella AD, Artun J. Risk factors for apical root resorption of maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 108: 48-55, 1995.
10. Hayashi A, Hayashi H, Kawata T. Prevention of root resorption in hypofunctional teeth by occlusal function recovery. *Angle Orthod* in press.
11. Yamamoto S. Regional changes in the periodontal ligament during the orthodontic tipping movement of rat molars. *Tsurumi Univ dent J* 35: 21-30, 2008.
12. Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N. Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod* 78: 502-509, 2008.
13. Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H, Soma K. Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthod* 29: 129-135, 2002.
14. Matsuda Y, Motokawa M, Kaku M, Kawata T, Fujita T, Ohtani J, Terao A, Tanimoto K, Tanne K. Influences of jiggling forces on the onset of root resorption in rats. *The*

71st annual meeting of the Japanese orthodontic society Supple 79, p157, 2012.

15. Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. *Eur J Orthod* 33: 335-343, 2011.
16. Eross E, Turk T, Elekdag-Turk S, Cakmak F, Jones AS, Végh A, Papadopoulou AK, Darendeliler MA.. Physical properties of root cementum: Part 25. Extent of root resorption after the application of light and heavy buccopalatal jigging forces for 12 weeks: A microcomputed tomography study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 147: 738-746, 2015.
17. Kurol J, Owman-Moll P. Hyalinization and root resorption during early orthodontic tooth movement in adolescents. *Angle Orthod* 68: 161-165, 1998.
18. Kvam E. Scanning electron microscopy of tissue changes on the pressure surface of human premolars following tooth movement. *Scand J Dent Res* 80: 357-368, 1972.
19. Rygh P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol Scand* 30: 575-593, 1972.
20. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod* 28: 221-240, 2006.

21. Wucherpfennig AL, Li YP, Stetler-Stevenson WG, Rosenberg AE, Stashenko P. Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts. *J Bone Miner Res* 9: 549-556,1994.
22. Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ, Sasaki T. Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec* 264: 305-311, 2001.
23. Tsuchiya M, Akiba Y, Takahashi I, Sasano Y, Kashiwazaki J, Tsuchiya S, Watanabe M. Comparison of expression patterns of cathepsin K and MMP-9 in odontoclasts and osteoclasts in physiological root resorption in the rat molar. *Arch Histol Cytol* 71: 89-100, 2008.
24. Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. *Oral Dis* 17: 489-498, 2011.
25. Hayashi N, Yamaguchi M, Nakajima R, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. T-helper 17 cells mediate the osteo/odontoclastogenesis induced by excessive orthodontic forces. *Oral Dis* 18: 375-388, 2012.
26. Kikuta J, Yamaguchi M, Shimizu M, Yoshino T, Kasai K. Notch signaling induces

root resorption via RANKL and IL-6 from hPDL cells. *J Dent Res* 94: 140-147, 2015.

27. Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine* 42: 330-335, 2008.

図および表

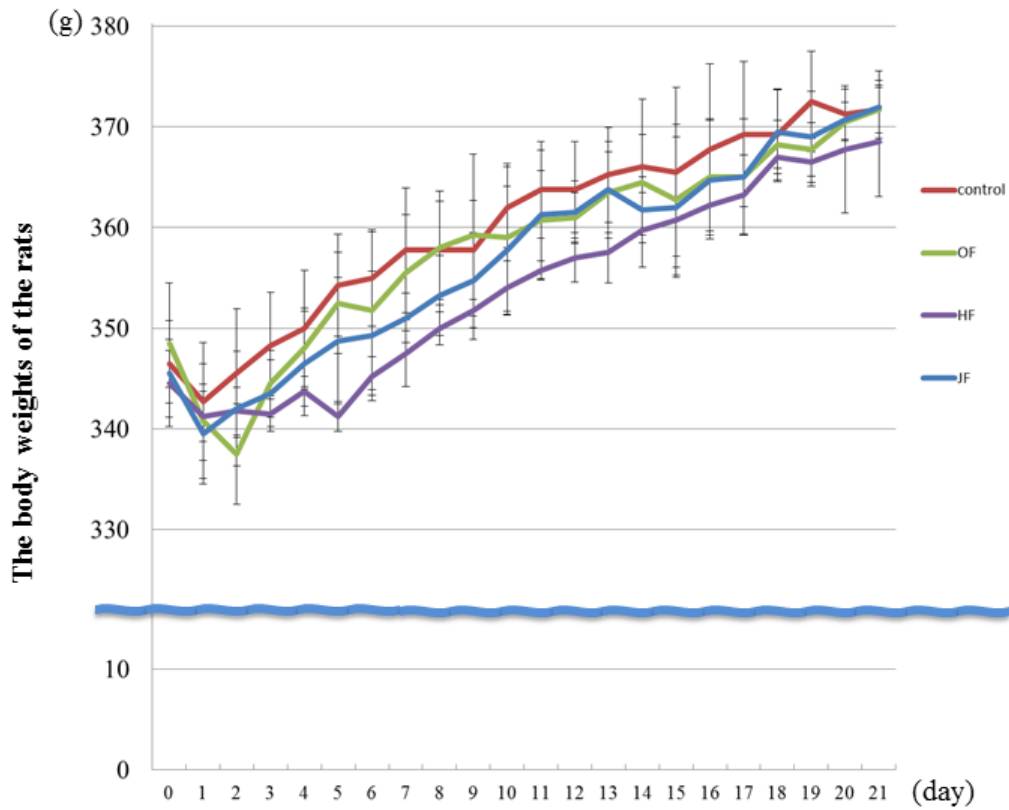


Fig.1

Fig. 1. Body weights during the experimental period.

The body weights of the rats in the experiment group decreased transiently on day 2 after the application of the orthodontic devices and then recovered.

No significant differences between the four groups were observed.

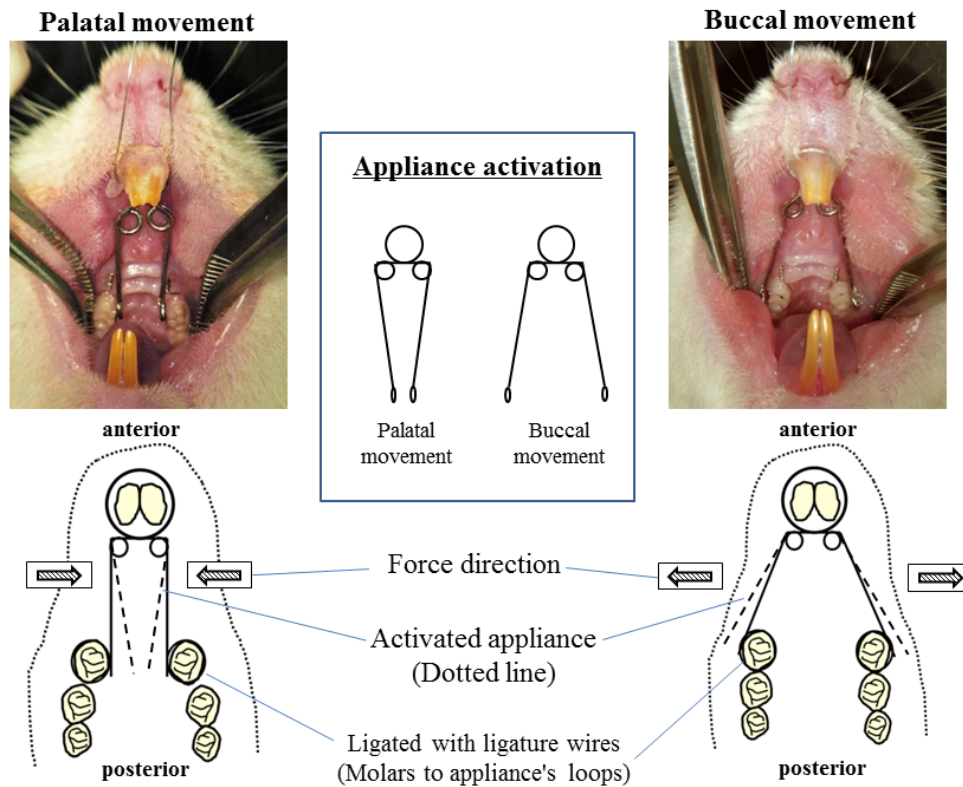


Fig. 2

Fig. 2. Experimental tooth movement.

Experimental tooth movement was induced with the design of the appliance (diameter: 0.012 inch, Stainless steel wire) ligated to the maxillary first molar cleat by a 0.008 inch stainless steel ligature wire. The upper first molar was moved palatally or buccally using the appliance with a force of 10 or 50 g. The appliances were attached to the rats after activation in each direction.

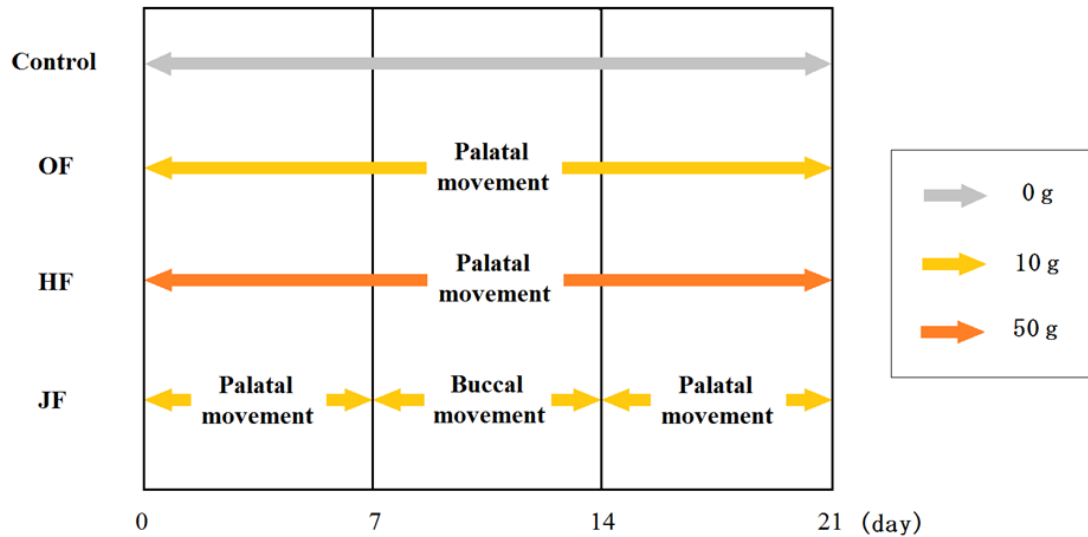


Fig. 3

Fig. 3. Experimental schedule for each group.

The rats were randomly assigned to four groups: control group, no appliances; optimal force (OF) group, treatment with 10 g of compression; heavy force (HF) group, treatment with 50 g of compression; and jiggling force (JF) group, 10 g compression on day 7, 10 g tension on day 14 and 10 g compression (“A” area) and 10 g tension on day 7, 10 g compression on day 14 and 10 g tension (“B” area) on day 21.

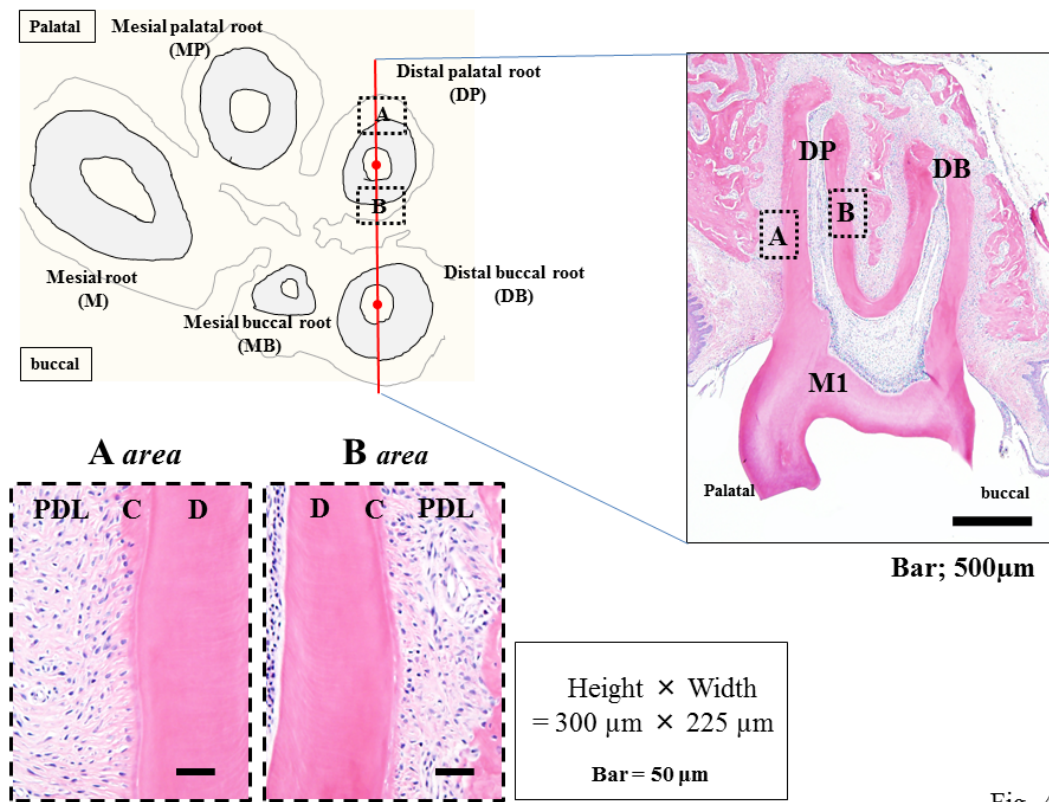


Fig. 4

Fig. 4. Schematic illustration showing the area of investigation (box) in the palatal aspect of the distal palatal root of the first molar.

DP: distal palatal root, DB: distal buccal root, bar; 500 µm

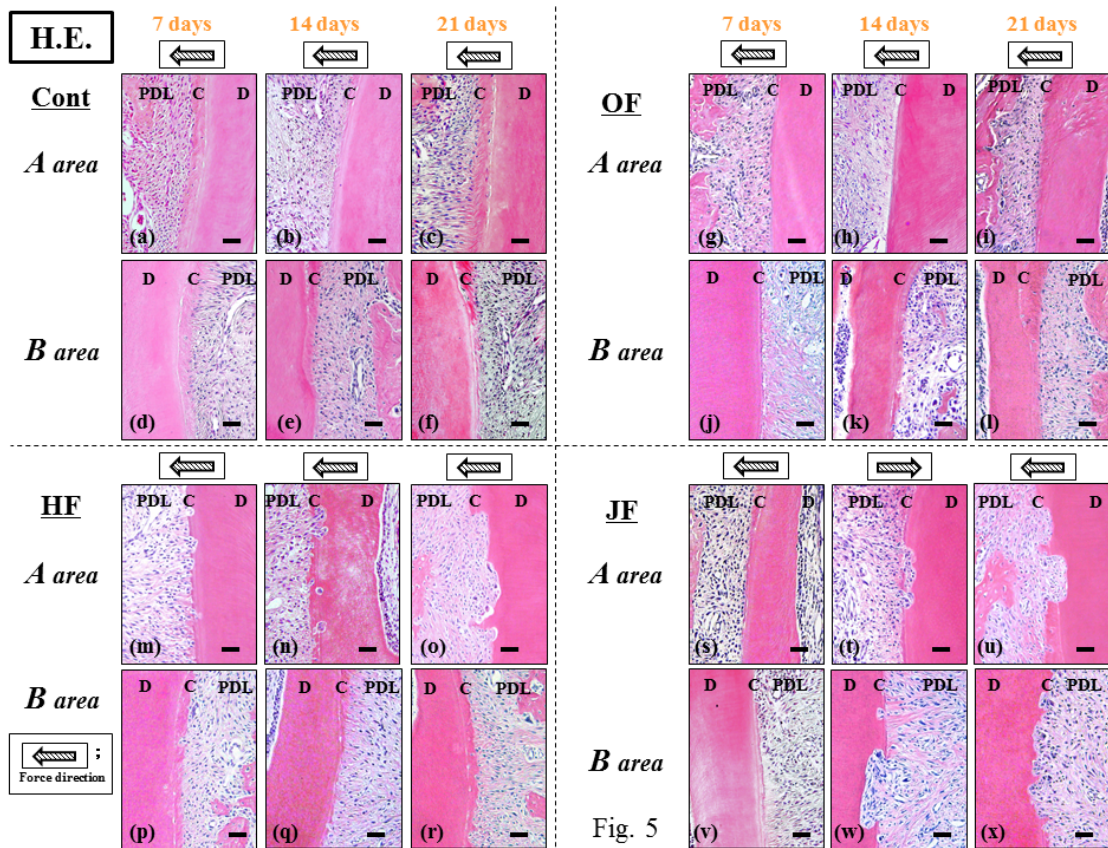


Fig. 5. Light macroscopic images showing the effects of different orthodontic forces on multinucleated osteoclasts (hematoxylin and eosin: original magnification $\times 400$).

The expression of odontoclasts (small arrow) on the cementum in the JF group (u) was higher than that in the HF (o) and OF groups (i) on day 21. PDL: periodontal ligament, C: cementum and D: dentine; bar = 50 μm . The direction of the applied force is indicated by the large arrow.

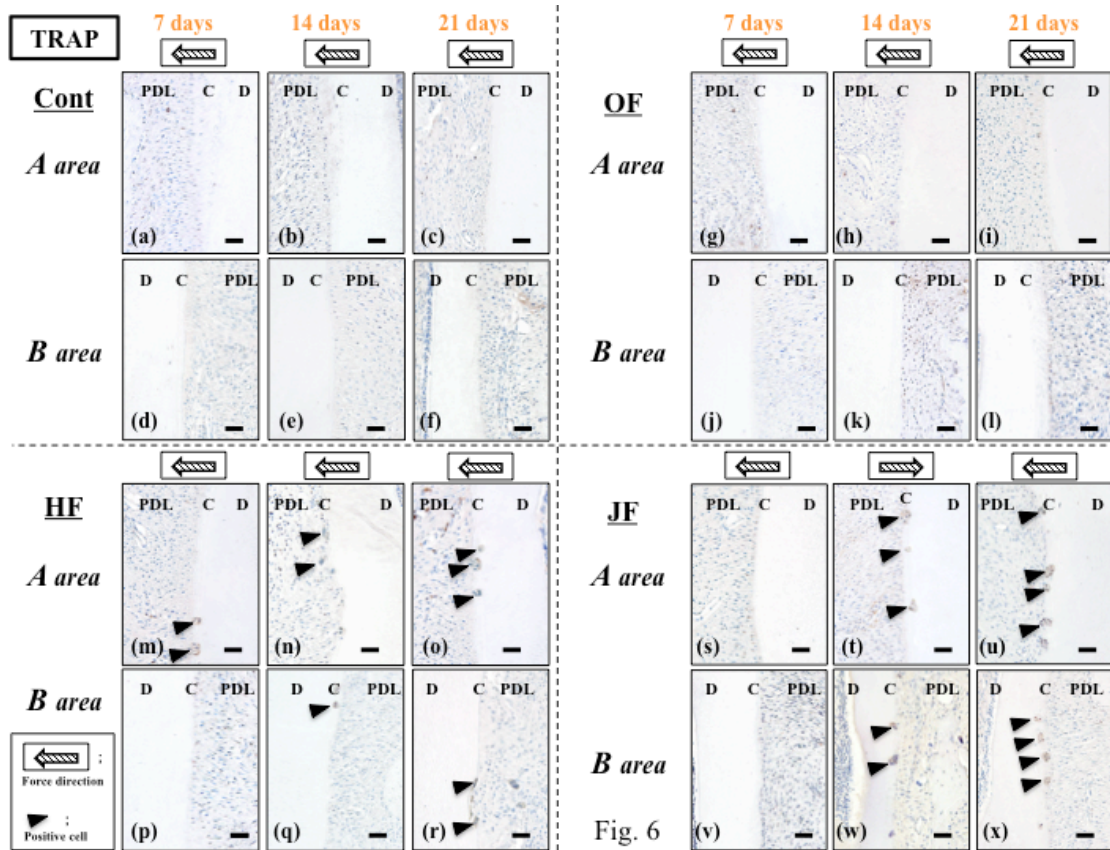


Fig. 6. Effects of the different orthodontic forces on the expression of Tartrate-resistant Acid phosphatase (TRAP)-positive odontoclasts (original magnification $\times 400$). bar = 50 μm .

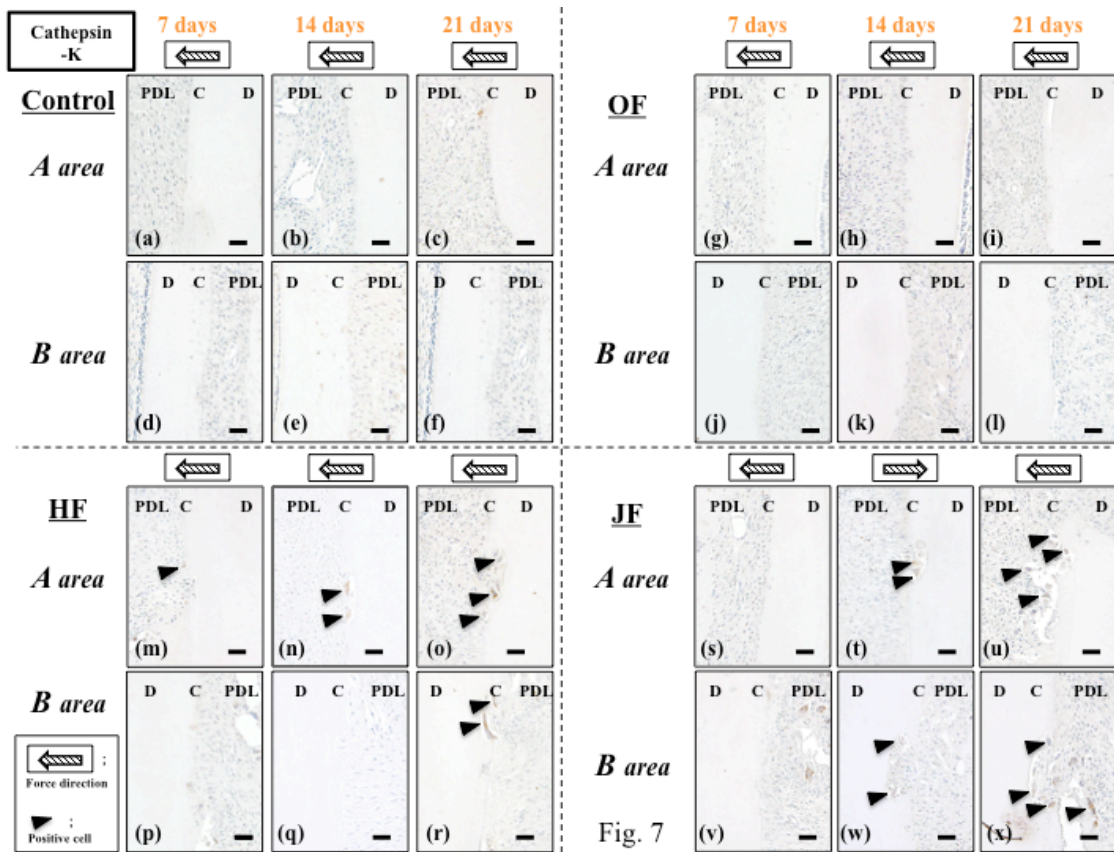


Fig. 7. Effects of the different orthodontic forces on the expression of cathepsin

K-positive odontoclasts (original magnification $\times 400$). bar = 50 μm .

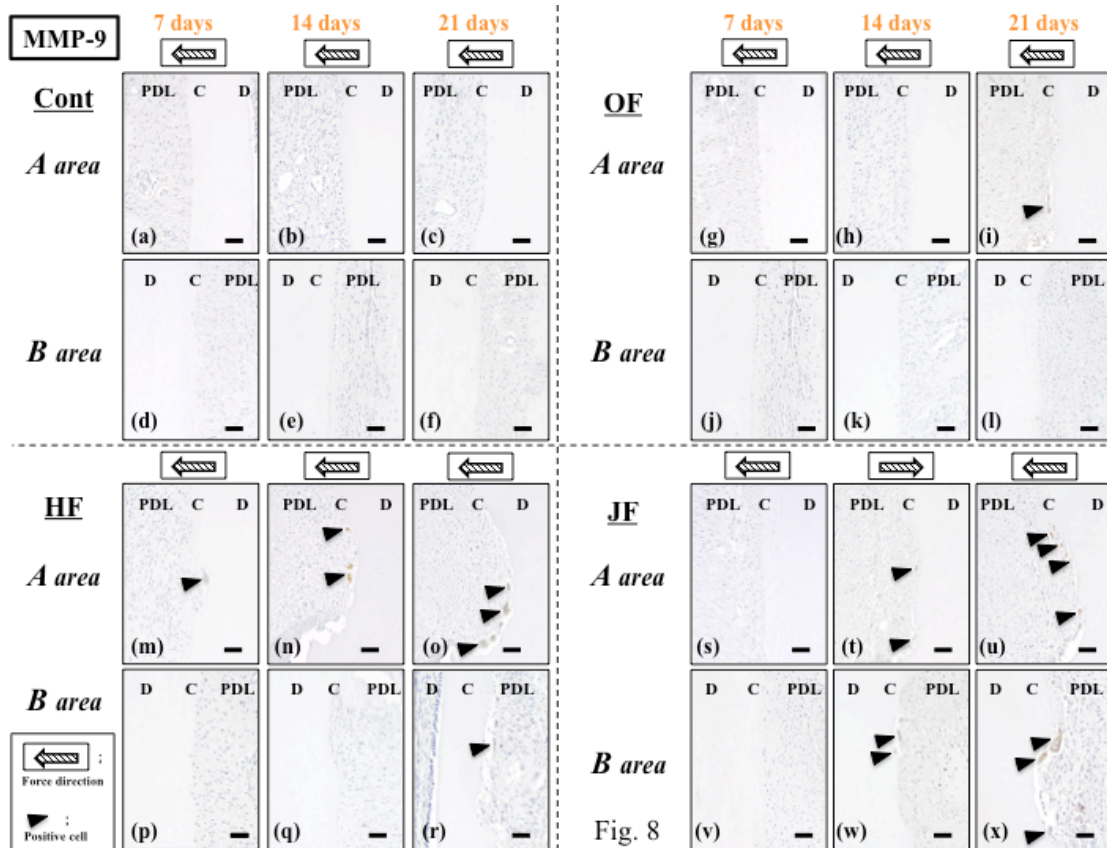


Fig. 8. Effects of the different orthodontic forces on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-9-positive odontoclasts. (original magnification $\times 400$). bar = 50 μm .

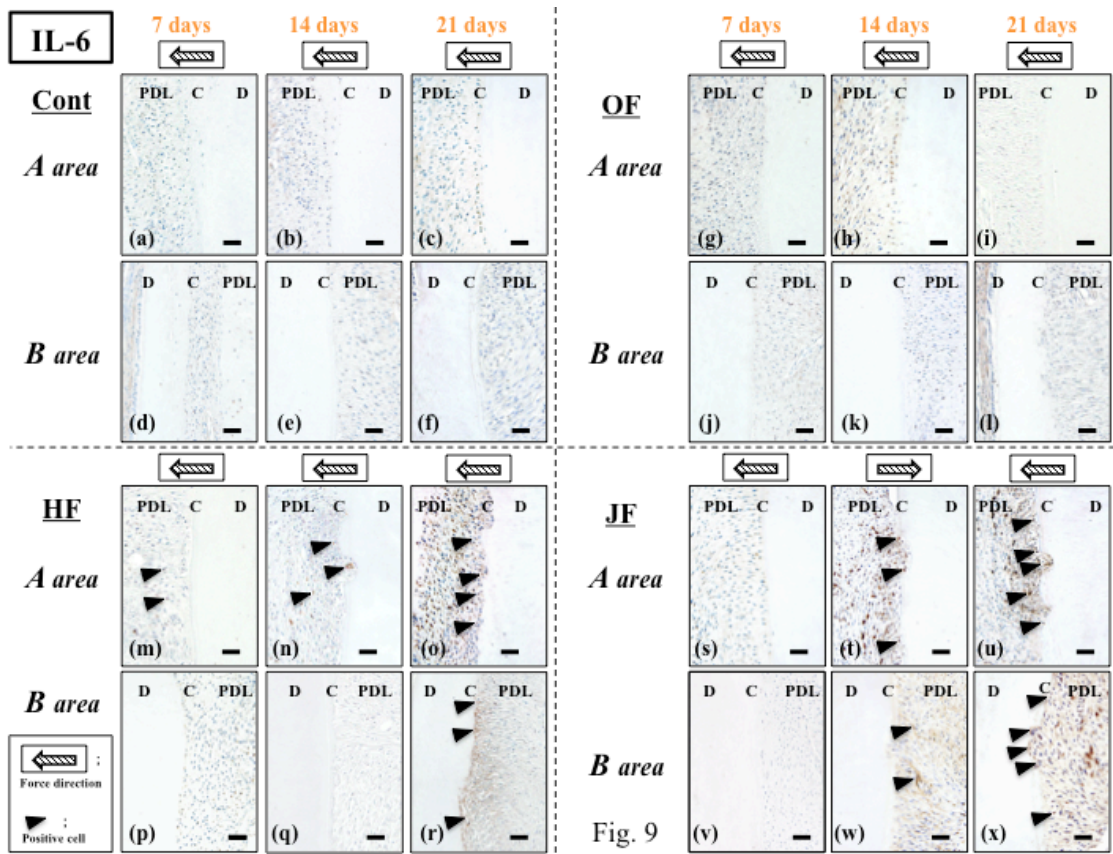


Fig. 9. Effects of the different orthodontic forces on the expression of interleukin (IL)

-6-positive odontoclasts. (original magnification $\times 400$). bar = 50 μ m.

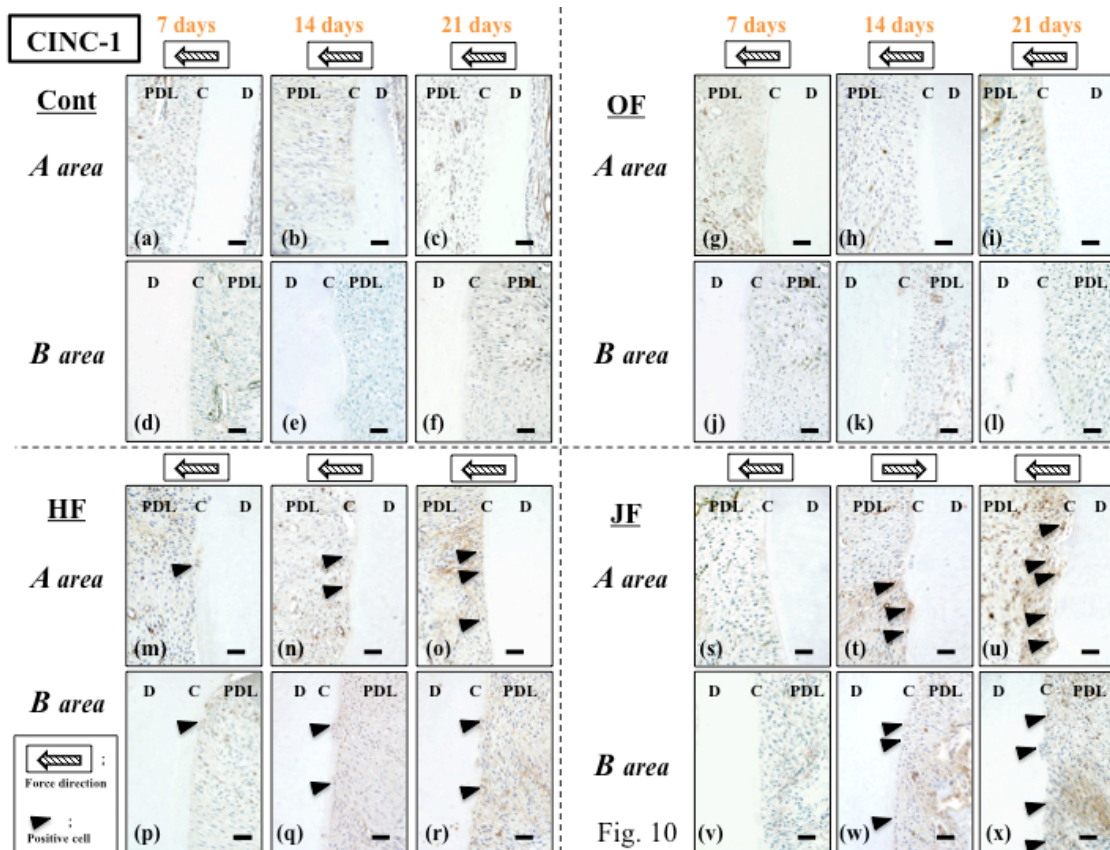


Fig. 10

Fig. 10. Effects of the different orthodontic forces on the expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) -positive odontoclasts.

(original magnification $\times 400$). bar = 50 μm .

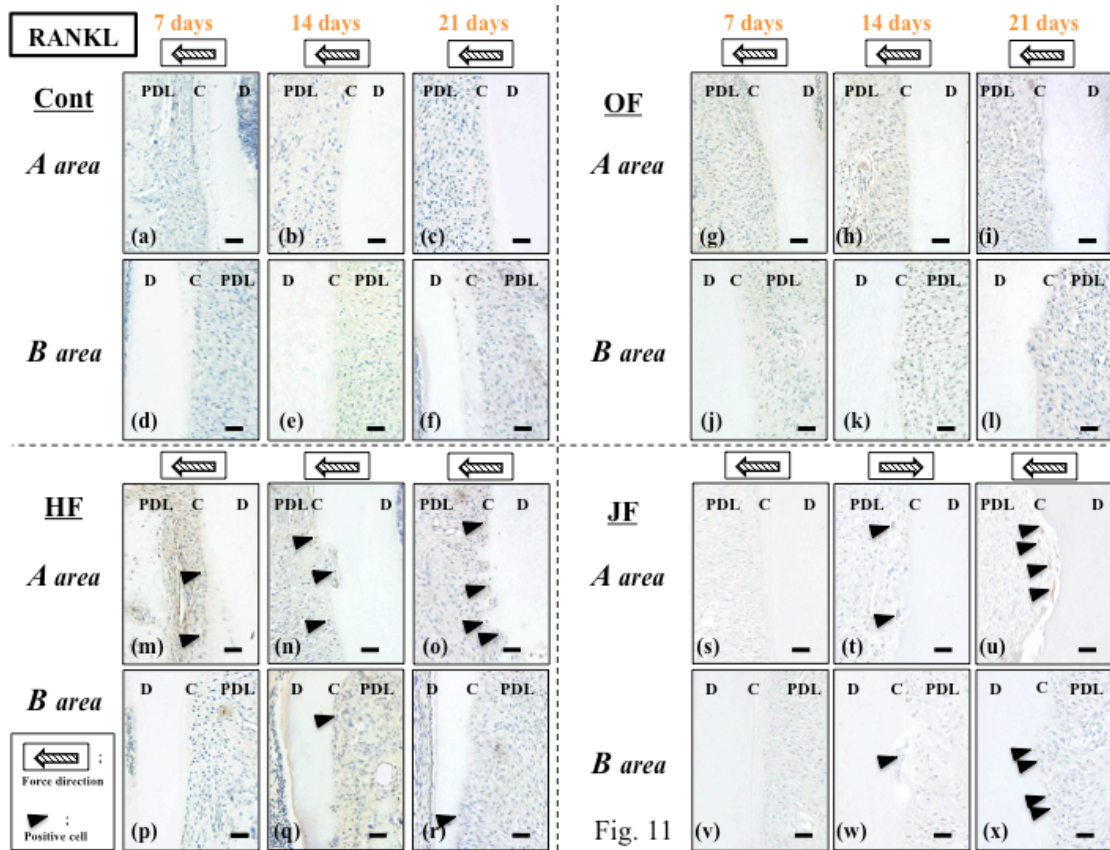


Fig. 11. Effects of the different orthodontic forces on the expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) -positive odontoclasts. (original magnification $\times 400$). bar = 50 μ m.

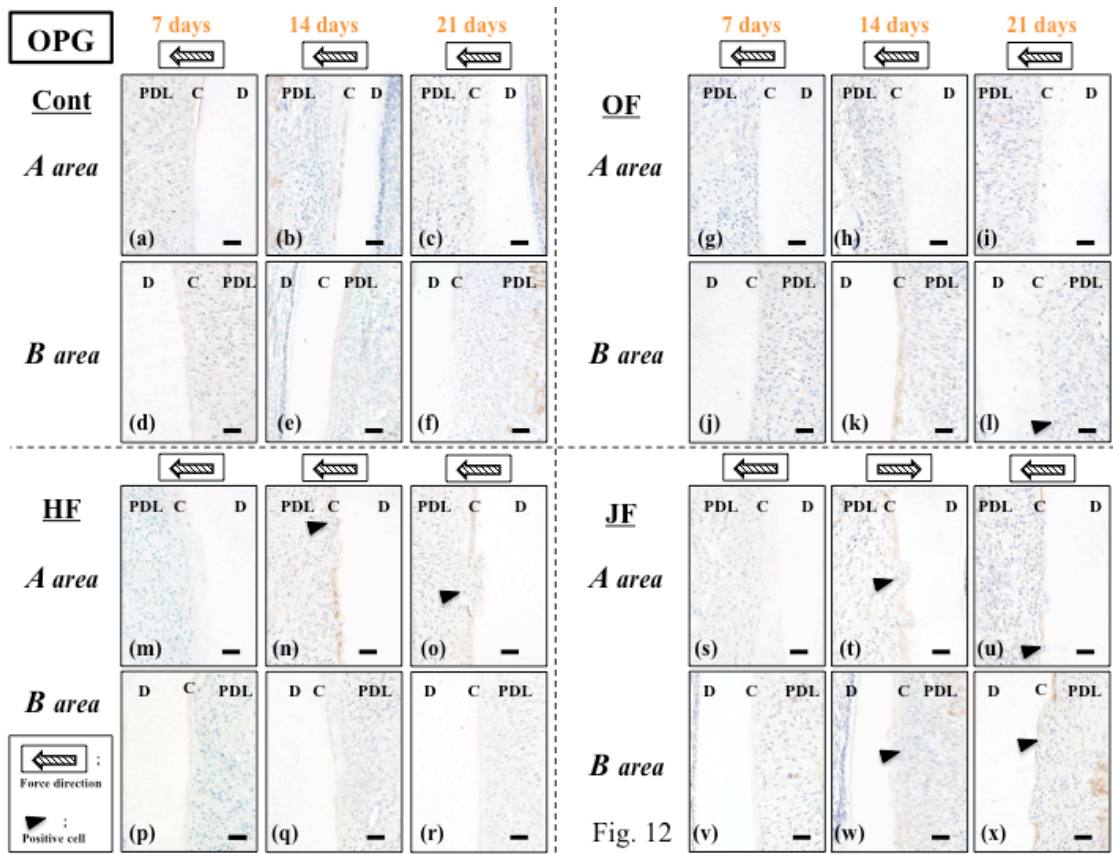


Fig. 12

Fig. 12. Effects of different orthodontic forces on the expression of osteoprotegerin (OPG)-positive odontoclasts. (original magnification $\times 400$). bar = 50 μ m.

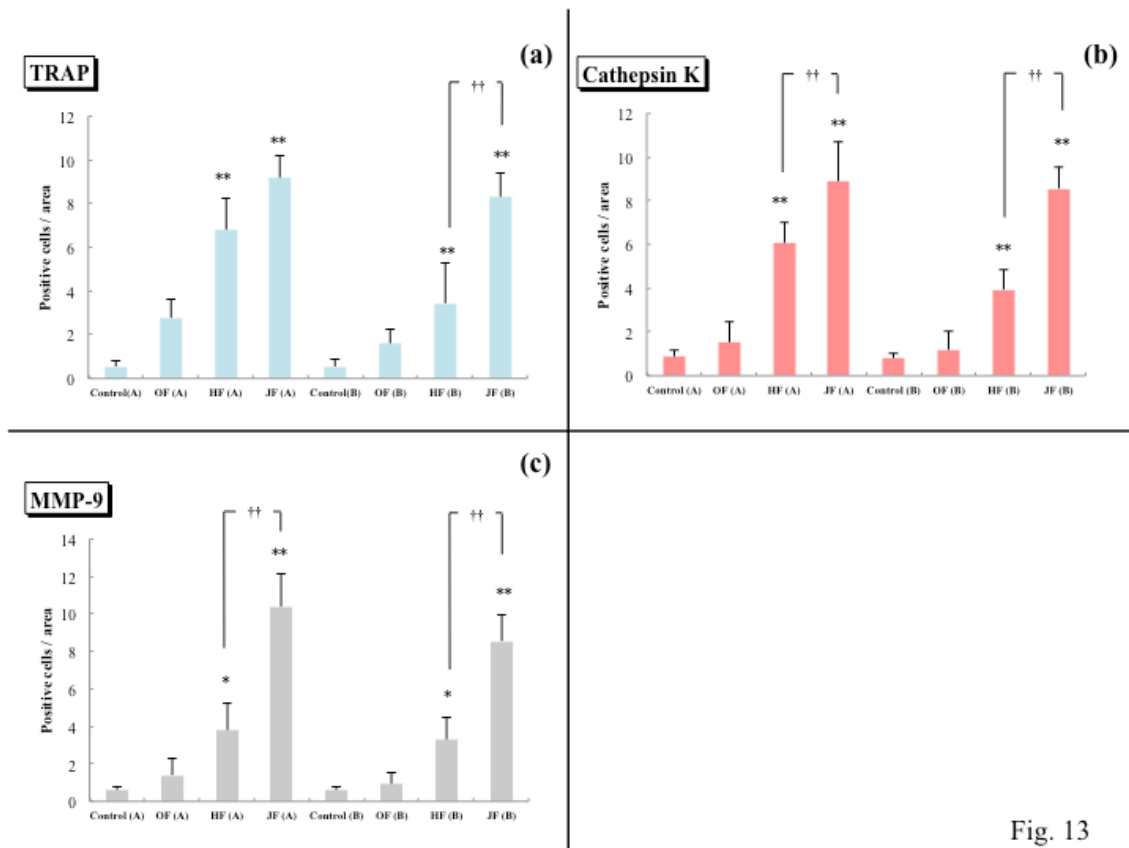


Fig. 13

Fig. 13. Statistical diagram depicting the quantitative assessment of immunohistochemistry of TRAP-, cathepsin K- and MMP-9 positive cells on day 21.

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, Significantly different from the corresponding control; †: $P < 0.05$, †† : $P < 0.01$, Significantly different from the corresponding HF group.

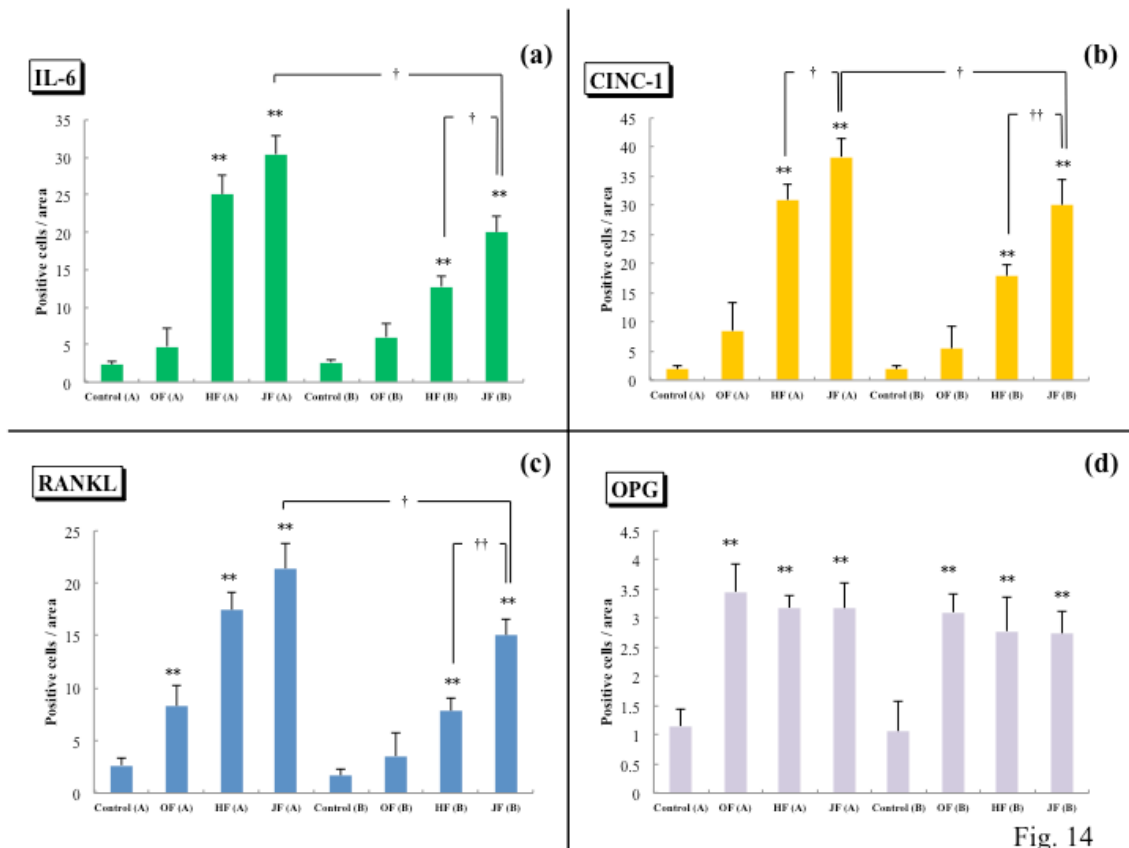


Fig. 14

Fig. 14. Statistical diagram depicting the quantitative assessment of immunohistochemistry of IL-6-, CINC-1-, RANKL - and OPG positive cells on day 21.

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, Significantly different from the corresponding control; † : $P < 0.05$, †† : $P < 0.01$, Significantly different from the corresponding HF group.