

論文の内容の要旨

氏名:中山 瑛加

博士の専攻分野の名称:博士 (歯 学)

論文題名:実験的歯の移動後の後戻りに対する daidzein の抑制効果

矯正歯科治療において、装置除去後保定装置を用いるが、歯の後戻りは少なからずみられ、その原因は明らかではない。歯の移動後の歯根膜 (periodontal ligament ; PDL) の伸展は、後戻りに関連する因子の1つであると考えられる。イソフラボンの1つである daidzein は大豆から抽出された化合物であり、皮膚のコラーゲン代謝促進に関与する。しかしながら、後戻りに対する daidzein の効果は不明な点が多い。Hirate らは過去に、女性ホルモンの1つである relaxin がコラーゲン代謝を促進し、後戻りを抑制したと報告している。このことから、daidzein も PDL のコラーゲン代謝を促進し、矯正治療後の後戻りを抑制する可能性が示唆された。

本研究は、実験的歯の移動後の後戻りに対する daidzein の効果を検討するために、*in vivo* ではラットの実験的歯の移動後に daidzein を歯根膜注射し、後戻り抑制効果について調べた。さらにコラーゲンI型 (Collagen type I ; COL-I)、マトリックスメタロプロテイナーゼ (Matrix metalloproteinase ; MMP) 1 ならびに増殖細胞核抗原 (PCNA) に対する免疫組織化学的所見について観察した。*In vitro* では、伸展したヒト歯根膜 (human periodontal ligament ; hPDL) 細胞のコラーゲン代謝活性に daidzein が及ぼす影響を検討するために、COL-I および MMP1 のタンパク質産生量および遺伝子発現について調べた。

In vivo では、上顎右側第一臼歯の近心移動を行うために、コイルスプリング (太さ: 0.005 inch, 直径: 1/12 inch, Accurate Sales Co. Chiba, Japan) と上顎右側第一臼歯をステンレススチールの結紮線 (太さ: 0.008 inch, Tomy International Inc. Tokyo, Japan) で結び、コイルスプリングの他方を前歯と結んだ。矯正力は 10 g とし、歯の移動は、合計 14 日間行った。その後、装置を除去し、第一臼歯の周囲 4 か所に 15 μ l ずつ歯根膜注射を毎日 7 日間施した。また、同期間に phosphate-buffered saline (PBS) の歯根膜注射を施したものをコントロールとした。後戻り距離は、マイクロコンピュータ断層撮影 (マイクロ CT) によって測定した。さらに、ヘマトキシリン・エオシン (H.E.) 染色を用いて病理組織学的特徴を調べ、COL-I, MMP 1 および PCNA を用いて免疫組織化学的所見について観察した。対照群および実験群は、以下の 4 群に分類した。

1. tooth movement (TM) + PBS 群 ; 歯の移動後に PBS 注射した群 (n=6)
2. TM + daidzein 50 ng/ml 群 ; 歯の移動後に daidzein 50 ng/ml 注射をした群 (n=6)
3. TM + daidzein 500 ng/ml 群 ; 歯の移動後に daidzein 500 ng/ml 注射をした群 (n=6)

4. 歯の移動開始（0day）群；歯の移動なしかつ注射を行わない（n=3）

In vitro では, STREX チャンバーを用いて hPDL 細胞に 10 %伸展力を 12 時間かけ, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ daidzein で 48 時間処理した。COL-I および MMP1 のタンパク質産生量および遺伝子発現を, enzyme-linked immunosorbent assays（ELISA）および real-time polymerase chain reaction（real-time RT-PCR）を用いて調べた。対照群および実験群は, 以下の 3 群に分類した。

1.tension force（TF）群；伸展力を加えた群

2.daidzein 群；daidzein 添加を与えた群

3.daidzein+TF 群；伸展力を加え daidzein 添加を与えた群

その結果, 7 日目の TM+daidzein 50 ng/ml 群および TM+daidzein 500 ng/ml 群の後戻り距離比率は, それぞれ 24.7%および 24.9%であった。一方, コントロールとした TM+PBS 群の後戻り距離比率は 59.0%であり, 後戻り距離比率は PBS 群と比較して, daidzein 群では有意に低かった。病理組織学的所見では, 7 日目の TM+daidzein50 ng/ml 群は, PDL 中にエオジン好性の比較的明瞭なコラーゲン線維が波状に走行していた。歯の移動開始時（0day）と TM+PBS 群では, 歯根膜に幼若なコラーゲン線維束を認めた。免疫組織化学染色では, 7 日目の TM+daidzein50 ng/ml 群では, PDL 牽引側のコラーゲン線維束に COL- I および MMP1 の陽性所見を認めた。PCNA 陽性細胞は, 全群において牽引側 PDL に認められ, PCNA 陽性率は, 7 日目で TM+PBS 群と TM+daidzein50 ng/ml 群とを比較し, TM+daidzein50 ng/ml 群は有意に高かった。7 日目の daidzein 群の PCNA 陽性率は, 31.4%であり, PBS 群（19.6%）と比較して 1.5 倍であった。

Daidzein の PDL コラーゲン代謝に及ぼす影響を調べるために, まず静置培養において COL-I および MMP1 の遺伝子発現量を検討した。daidzein 濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで濃度依存的に有意な増加を認め, それ以上の濃度ではプラトーに達した。伸展培養における非添加群の COL-I および MMP1 のタンパク質産生量は経時的に調査した 48 時間まで緩やかに上昇した。一方で, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ daidzein 添加群では, 非添加群よりも 48 時間を通じ, 両タンパク質発現は高い値で推移した。また, 細胞の伸展培養と静置培養による daidzein 効果を比較するために daidzein 非添加群に対する daidzein 添加群での COL-I および MMP1 の遺伝子発現量の割合を調査した結果, 伸展培養および静置培養に関わらず daidzein を添加した方が両遺伝子発現量を上回り, 経時的に 24 時間後に最高値を示し, その後減少した。加えて, いずれの時間においても伸展培養したほうが静置培養した細胞よりも COL-I, MMP1 の遺伝子発現量は高値であった。これらの知見から, daidzein は hPDL の細胞増殖を活発化し, それに伴いコラーゲン代謝を促進させることで, 矯正歯科治療後の後戻りの一因と考えられる PDL の伸展を抑制するのに有用であると結論付けている。