

実験的歯の移動後の後戻りに対する daidzein の抑制効果

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

中山 瑛加

(指導：葛西 一貴 教授)

本稿は2つの参考文献で構成されています。主となる参考文献“Daidzein inhibits relapse after rat experimental tooth movement”. (American Journal of orthodontics&Dentofacial Orthopaedics に投稿中) および副となる参考文献“Effects of daidzein on the production of type I collagen and matrix metalloproteinase-1 by stretched human periodontal ligament cells”. (Orthodontic waves に投稿中) をまとめたものである。

## Abstract

**Objectives:** Relapse of teeth after removing fix appliance devices occurs considerably, although retainer is used. The causes of relapse are not clear. The tension of the periodontal ligament ( PDL ) after orthodontic tooth movement ( TM ) is thought to be one of the important factor associated with tooth relapse. Daidzein is a compound including one isoflavone. It is extracted from soybeans and involved in collagen turnover of skin. However, little is known about the effects of daidzein on the collagen metabolism of human PDL ( hPDL ) by orthodontic tooth movement. The purpose of this study is to investigate the effects of daidzein on relapse after orthodontic tooth movement by *in vitro* and *in vivo* studies.

**Materials and Methods:** The 6-week-old male Wistar strain rats were randomly assigned to 4 groups as follows ; control ( n=3 ) , TM + phosphate-buffered saline ( PBS ) injection group ( n=6 ) , TM+ daidzein 50 ng/ml injection group ( n=6 ) , and TM+daidzein 500 ng/ml injection group ( n=6 ) , which comes to total 21 animals. After TM with 10 g force, the appliance was removed, and then the experimental groups were injected with daidzein or with PBS as a control every day for a 1 week. The distance of relapse was measured by micro-computed tomography ( micro-CT ) . In addition, hematoxylin and eosin ( H.E. ) staining and the immunohistochemical staining using

collagen type I ( COL-I ) , matrix metalloproteinase ( MMP ) 1, and proliferating cell nuclear antigen ( PCNA ) were performed.

*In vitro* study, the hPDL cells were subjected to 10% tension using cell stretch-chambers. After 12 hour - incubation, the cells were treated with daidzein ( 50 µg/ml ) for 48 h. On COL-I and MMP1, the gene expressions in stretched hPDL cells and the protein expressions in cell culture after treatment of daidzein were examined by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assays ( ELISA ) .

**Results:** *In vivo* study, the distances and ratio of relapse in the daidzein-treated group were significantly lower than control group. Immunohistochemistry showed marked positive staining of COL-I and MMP1 in the daidzein group. The ratio of PCNA-positive cells in the daidzein group increased at day 7. *In vitro* study, in daidzein-treated stretched hPDL cells enhanced their gene expressions of COL-I and MMP1, and their proteins in culture medium in a time-dependent manner.

**Conclusion:** The daidzein may enhance the collagen metabolism in the hPDL, suggesting that it may be useful for preventing orthodontic relapse after orthodontic treatment.

## 緒 言

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[1]。Yoshida ら[2]は、ラット臼歯に対しエラスティックゴムを用いて 21 日間歯の移動を行うと、歯根膜（PDL）が伸展し、ヒト歯根膜（hPDL）細胞の配列が不規則になることを示し、これは PDL の急速なリモデリングによると報告している。George ら[3]は、ヒトの捻転歯の後戻りは、初期段階で歯周靭帯の主線維が引き伸ばされた状態で生じ、PDL によって引き起こされる機械的伸展力に対する生理学的応答であると報告している。このことから歯の移動後の PDL の伸展が、後戻りに関連する重要な因子の 1 つであると考えられる。

PDL はマトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）によって分解されるコラーゲン I 型と III 型（Collagen type I, III ; COL-I, III）で構成されている[4]。コラーゲン遺伝子に関連した MMP の遺伝子の調節は、その調節不全が病理学的事象につながる可能性があるため、組織修復およびホメオスタシスにとって重要である[5]。さらに COL-I および MMP1 は、矯正学的歯の移動時の牽引側および圧迫側の両方で増加すると報告されている[6]。したがって、PDL のコラーゲン代謝を促進しリモデリングを促すことは、後戻りの一つの抑制力になると考えられる。

Daidzein はイソフラボンの 1 つで、大豆から抽出された化合物である。構造は女性ホルモンであるエストロゲンに似ており、美容分野では、抗皺治療に適用されている。Daidzein は、*in vitro* で TGF- $\beta$ / smad シグナル伝達経路を介して皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成を促進することが示されている[7]。当講座では以前、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[8, 9]。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ことができると考えた。

本研究は、実験的歯の移動後の後戻りに対する daidzein の抑制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 1（MMP1）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、daidzein が伸展した hPDL 細胞のコラーゲン代謝活性に及ぼす影響を検討するために、COL-I および MMP1 の産生量および遺伝子発現について調べた。

## 材料および方法

### *In vivo*

#### 実験動物および飼育条件

実験には、6週齢の Wistar 系雄性ラット（体重  $139.8 \pm 9.8$ g, 三共ラボサービス株式会社, 東京）を合計 21 匹用いた。ラットの飼育は、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、固形と粉末飼料、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。全ての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 AP15MD017 号）に従って行った。対照群および実験群は、以下の 4 群に分類した（Fig. 1）。

- ① Tooth movement（TM）+PBS 群；歯の移動後に PBS 注射した群  
（ n=6 ）
- ② TM+daidzein50 ng/ml 群；歯の移動後に daidzein 50 ng/ml 注射をした群  
（ n=6 ）
- ③ TM +daidzein500 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 ）

## 歯の移動方法および daidzein 投与

全ての行程は、三種混合麻酔薬（塩酸メデトミジン 0.15mg/kg、ミダゾラム 2mg/kg、酒石酸ブトルフェール 2.5mg/kg、生理食塩水 1.8625mg/kg）を腹腔内注射し、全身麻酔下で実施した。上顎右側第一臼歯の近心移動は Asano ら [10]の方法に従って行い、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（Fig.2A）。矯正力は Nakano ら [11]の方法に従い 10g とし（Fig.2A）、歯の移動を 14 日間行った（Fig. 1）。その後、装置を除去し、Hirate ら [8]の方法に従い、第一臼歯の周囲 4 か所に 15 $\mu$ 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（Fig.2B）。

## マイクロコンピュータ断層撮影（Micro-computed tomography；micro-CT）

### による歯の移動量の測定方法

3 種混合麻酔薬（0.15 mg/kg）でラットを全身麻酔後、各ラットをステージ上に置き、撮影条件は管電圧 90 kv、管電流 88  $\mu$ A、17 秒 360 度回転として画

像化を行った。歯の移動量の測定は micro-CT system ( Rigaku-micro-CT<sup>®</sup>, Tokyo, Japan ) を用いて、移動歯エナメル質の最遠心点と第二臼歯の最近心点を結ぶ直線距離として測定した。

## 標本作製

全てのラットは3種混合麻酔薬にて全身麻酔後、生理食塩水と10%中性緩衝ホルマリンで灌流固定し、直ちに上顎骨を剔出した。さらに10%中性緩衝ホルマリンにて4℃で24時間浸漬固定後、試料を10%EDTA溶液(pH7.4)中に室温にて4週間脱灰処理を行った。脱灰した試料は、通法に従ってパラフィン包埋ブロックを作製後、4μmで連続的に薄切し(1枚目;HE染色,2-6枚目;PCNA染色,7-16枚目;COL-I;7-11枚目,MMP1;12-16枚目)、各種染色法を施行した。観察部位はKikutaら[12]の方法に従い、近心根中心と遠心頬側根中心とを結んだ線、それに直行する線とでなす領域の遠心部1/4を牽引側とした(Fig.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・エオシン重染色(H-E)は、試料の脱パラフィン後、通法に従った。

免疫組織化学染色は, Hirate ら [10] の方法に従い行った。最初に, 脱パラフィン後, 0.5 % 過酸化水素メタノール溶液に室温で 30 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。次いで, 切片をクエン酸バッファーにて 500W の電子レンジで 15 分間加熱し徐冷した。1 次抗体は, COL-I ( Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA, 1 : 250 ) , MMP1 ( Abnova Co, CA, USA, 1 : 100 ) , PCNA ( Dako, Glostrup, Denmark, 1 : 100 ) を用い 1 時間処理した。1 次抗体反応後, Histofine Simple Stain MAX-Po ( Multi ) kit ( Nichirei, Co., Tokyo, Japan ) を使用し, プロトコールに従い染色した。各切片は tris-buffered saline ( TBS ) で洗浄し, DAB 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った。またネガティブコントロールとして, 1 次抗体の代わりに TBS を用いた。PCNA 陽性率は, 観察部位から無作為に強拡大で 5 視野を撮影し, 全紡錐形細胞数と陽性細胞数を測定し, Sato ら [13] の方法を用い以下の式で計算した。 陽性率=陽性細胞/全紡錐形細胞×100 ( % )

### ***In vitro***

#### **細胞培養**

患者または保護者からインフォームドコンセントを得たのち, 付属歯科病院に来院した矯正患者から抜歯をした小臼歯より hPDL 細胞を採取した。hPDL

細胞は, Somerman ら [14] の方法に従い分離培養し, Takano ら [15] の方法に従い, 継代 6~9 の細胞を実験に供した。なお, 本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会規定 ( 承認番号 第 EC15-002 号 ) に基づき承認を得て実施した。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

#### 静置培養における daidzein 添加

hPDL 細胞を静置培養し, daidzein ( 0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Wako, Osaka, Japan ) を添加後 48 時間培養した ( Fig. 8 ) 。

#### 伸展培養における daidzein 添加

Takano ら [15] の方法に従い, hPDL 細胞は STREX チャンバー ( STREX, Osaka, Japan ) 内で培養を行い ( Fig. 9 ) , 10%の伸展力を 12 時間 [16] をかけたのち, daidzein ( 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) を加え, さらに 48 時間培養した ( Fig. 10 ) 。

## ELISA

ヒトコラーゲン I 型 ELISA kit ( Applied Cell Biotechnologies, Kanagawa, Japan ) および MMP1 ELISA kit ( R&D system, Minneapolis, MN, USA ) を用いて、培養上清中の COL-I および MMP1 タンパク質産生量を測定した。

## Real-time polymerase chain reaction ( real-time PCR )

細胞からの RNA 抽出は、RNeasy Mini-kit ( Qiagen Co., Tokyo, Japan ) を用いて行った。逆転写反応後に、Takano ら[15] の方法で サーマルサイクラー ( TP-800 Thermal Cycler Dice; Takara ) 内で SYBR Premix Ex Taq ( Takara Co. ) を用いて real-time PCR を行った。プライマー配列は、Takano ら[15] に従った (Table 1) 。

## 統計解析

統計分析は JMP ( SAS, Inc., Cary, NC, U.S.A. ) を用い、多重比較検定および Mann Whitney-U test を用いた。

## 結 果

### *In vivo*

#### Daidzein 注射による後戻り距離比率

矯正装置除去後 7 日目での臼歯間の距離は, TM+PBS 群, TM+Daidzein 50 ng/ml 群および TM+Daidzein 500 ng/ml 群の全ての群で減少し後戻りが認められた。14 日間の矯正装置による歯の移動距離には, 個体差が認められるため, 歯の移動後の矯正装置を除去した時点の移動距離を基準にして, 後戻り距離比率を計算した。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 ( Fig.4 )。

#### 病理組織学的所見

Daidzein 注射濃度は, 50 ng/ml と 500 ng/ml では後戻り距離比率が同程度であったため, 病理組織学的染色および免疫組織的観察では 50 ng/ml 群に対してのみ施した。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, 幼若なコラーゲン線維束を認めた ( Fig.5 )。

## 免疫組織化学的所見

7日目の TM+daidzein50.0 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 ( Fig.6A, B )。

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 陽性細胞率は, 31.4% であり, PBS (19.6%) と比較して 1.5 倍であった ( Fig.7B )。

## *In vitro*

### Daidzein の PDL コラーゲン代謝に及ぼす影響

hPDL に対する daidzein 濃度の影響を検証するために, 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。その結果, 遺伝子発現量は共に daidzein 濃度 50  $\mu$ g/ 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ため ( Fig.8 ), 伸展培養実験では 50  $\mu$ g/ ml の Daidzein 濃度を実験に供することとした。

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  $\mu$ g/ 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

( Fig.10 )。また、細胞の伸展培養と静止培養による 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、伸展培養および静止培養に関わらず 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止培養した細胞よりも COL-1, MMP1 の遺伝子発現量は高値であった ( Fig.11 )。

## 考 察

本研究では, *in vivo* にてラットの実験的歯の移動後の daidzein の後戻り抑制効果を検討するために、歯を移動したのちに daidzein を注射する群としない群に分け、micro-CT を用いて後戻り距離比率を比較した。その結果, daidzein 注射群では非投与群に比べ、後戻りの比率が有意に低かった。これらの知見は、daidzein が歯の移動後の後戻りを抑制することを示すものであった。Han ら[17] は、ラットの実験的歯の移動後の後戻りは、蓄積された歯根膜の応力やひずみが解放された時に生じるものであると報告している。さらに、彼らはその後戻り量は装置除去から間もない期間で最も大きく、総距離のほぼ半分を占めたとしている。彼らの報告は、本研究の結果を裏付けるものである。

また本研究において、後戻りにおける PCNA 陽性率を daidzein の注射の有無で検討した結果、daidzein 注射群での PCNA 陽性率は、コントロール群と比較して有意に増加した。Yoshimatsu ら[18]は、PDL におけるコラーゲンのリモデリングは、矯正学的歯の移動中では主に牽引側で起こることを報告している。さらに、Mabuchi ら[19]は、歯根膜細胞はメカニカルストレスを加えると、細胞増殖が活発になり、PDL の再構築と関連していることを PCNA 陽性率が増加することで証明している。以上のことから、daidzein 注射による後戻り抑制効果は、daidzein による PDL 増殖能の亢進と、それに伴うコラーゲン代謝の活性化に起因する可能性が推察された。

我々の行った *in vitro* 実験では、矯正治療後に捻転歯の歯根膜が伸展されている状態を想定し、牽引力（伸長力 10%）をかけた hPDL 細胞モデルを使用した。この伸長力 10%の根拠は、Long[16]らに従い、炎症を引き起こさない最適な力として選択した。

この実験系において、daidzein 添加により hPDL 細胞における COL-I および MMP1 の遺伝子発現が経時的に有意に増加した。Zhao ら[7]の報告においても、daidzein 処理（0.5~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）により、ヒト皮膚線維芽細胞において I 型プロコラーゲンの遺伝子発現を有意に増加させることを示しており、細胞の種類は異なるものの我々と同様の実験結果となった。

また本研究では静置培養に対して伸展培養では, COL-Iおよび MMP1 遺伝子の発現量は共に増加している。Zhao ら[7]の報告によると, マウス皮膚線維芽細胞における I 型プロコラーゲンの遺伝子発現を daidzein が増加させる一方で, MMP1 および MMP2 の遺伝子発現は有意に阻害されることを報告している。また, Gopaul ら[20]は, daidzein 代謝物であるエクオールが, ヒト皮膚線維芽細胞における COL-Iの遺伝子発現を有意に増加させる一方で, MMP は有意に減少することを報告している。これらの報告は共に daidzein の MMP1 遺伝子発現について, 本研究結果と相反する内容である。この理由としてコラーゲンの分布場所の違いによる生物学的半減期の差異が関与しているかもしれない。すなわち, 歯根膜のコラーゲン代謝は生体内でも最も早く, 生物学的半減期はおよそ 1 日であり, それに対して皮膚のコラーゲンはおよそ 10 日である。この代謝速度の違いにより歯根膜細胞におけるコラーゲン代謝速度は極めて高く, 合成と分解の時間差がほぼなくなるためと推定された。加えて, タンパク産生量を観察すると COL-Iおよび MMP1 の増加が共に認められることから, daidzein は歯根膜に対して短期間でコラーゲン代謝を活性化していることを裏づけているものと推察された。

PDL は, COL-Iおよび COL-III, を主体とし, さらにV, VI, XII および XIV など様々なタイプのコラーゲンで構成されており, 実験的な歯の移動は, これら

すべてのタイプのコラーゲン遺伝子の発現を亢進するとの報告がある[21-22]。一方で、それらを分解する MMP1 は、TIMP ( Tissue Inhibitor of Metalloproteinase ) により阻害を受けることが知られており、コラーゲン代謝において重要な役割を果たす。最近の研究では, daidzein が, TIMP-1 の遺伝子発現を抑制していると報告[23]されていることから, daidzein が MMP1 の活性化を低下させることなくコラーゲンの代謝をより活発にさせることが示唆される。したがって今後, 他のタイプのコラーゲンおよび MMP / TIMP 複合体の調節に対する daidzein の影響を調べるために, さらなる研究が必要である。

## 結 論

Daidzein による後戻り抑制効果を検討したところ, 以下の結論を得た。

1. Daidzein 注射により後戻りは減少した。
2. Daidzein 注射により PDL の細胞増殖能が高まり, COL- I および MMP1 発現量が遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで増加した。
3. 伸展力がかかっている歯根膜細胞では, COL- I および MMP1 発現量に対する daidzein 効果がより強くなることが示唆された。

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, 矯正治療後の後戻りの抑制に有用である可能性が示唆された。

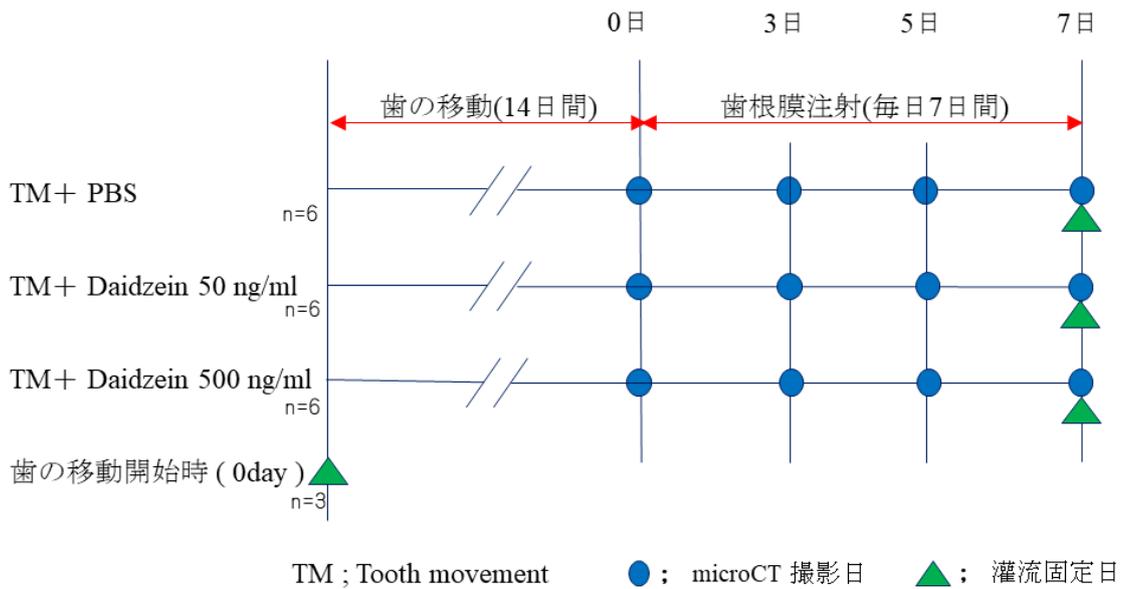
## 参考文献

1. Sadowsky C, Schneider BJ, BeGole EA, Tahir E. Long-term stability after orthodontic treatment: nonextraction with prolonged retention. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1994;106:243-9.
2. Yoshida Y, Sasaki T, Yokoya K, Hiraide T, Shibasaki Y. Cellular roles in relapse processes of experimentally-moved rat molars. *J Electron Microsc.* 1999;48:147-57
3. Parker GR, Parker. Transseptal fibers and relapse following bodily retraction of teeth: a histologic study. *Am J Orthod.* 1972;61:331-44.
4. Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y, Mitani H. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic toothmovement. *J Mol Histol.* 2006 ;37:333-42.
5. Hinz B. Matrix mechanics and regulation of the fibroblast phenotype. *Periodontol* 2000. 2013;63:14-28.
6. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:355-62.
7. Zhao D, Shi Y, Dang Y, Zhai Y, Ye X. Daidzein stimulates collagen synthesis by activating the TGF- $\beta$ /smad signal pathway. *Australas J Dermatol.* 2015; 56:7-14.
8. Hirate Y, Yamaguchi M, Kasai K. Effects of relaxin on relapse and periodontal tissue remodeling after experimental tooth movement in rats. *Connect Tissue Res.* 2012;53:207-19.
9. Yurie Hirate, Masaru Yamaguchi, Tadahiko Utsunomiya, Hirotsugu Yamamoto, Kazutaka Kasai. Effects of relaxin on relapse after experimental tooth movement in rats. *Int J Oral-Med.*2011;10:200-10.

10. 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.* 2011;17:489-98.
11. 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.* 2011;33:335-43.
12. 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.* 2015;94:140-7.
13. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis.* 2010;16:263-8.
14. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988;67:66-70.
15. Takano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Kojima T, Kasai K. Effects of relaxin on collagen type I released by stretched human periodontal ligament cells. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:282-8
16. Long P, Hu J, Piesco N, Buckley M, Agarwal S. Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1 $\beta$ -dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of I1-10 in human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res* 2001; 80: 1416-20.
17. Han G, Chen Y, Hou J, Liu C, Chen C, Zhuang J, Meng W. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138:550.1-7

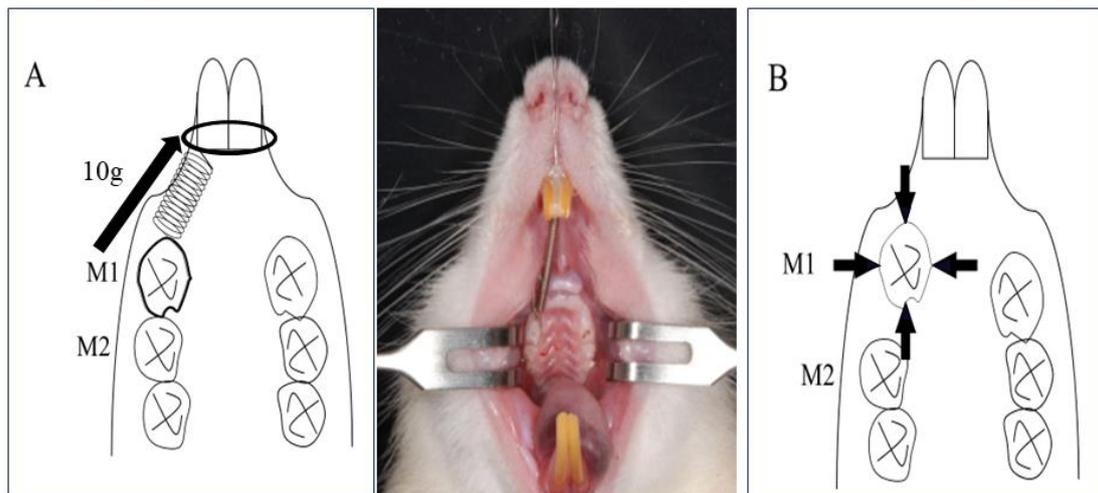
18. Yoshimatsu M, Uehara M, Yoshida N. Expression of heat shock protein 47 in the periodontal ligament during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2008;53:890-5.
19. Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodontal Res.* 2002;37:118-24.
20. Gopaul R, Knaggs HE, Lephart ED. Biochemical investigation and gene analysis of equol: a plant and soy-derived isoflavonoid with antiaging and antioxidant properties with potential human skin applications. *Biofactors.* 2012;38:44-52.
21. Karimbux NY, Nishimura I. Temporal and spatial expressions of type XII collagen in the remodeling periodontal ligament during experimental tooth movement. *J Dent Res* 1995;74:313-8.
22. Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 1997;19:29-37.
23. Liu YF, Bai YQ, Qi M. Daidzein attenuates abdominal aortic aneurysm through NF- $\kappa$ B, p38MAPK and TGF- $\beta$ 1 pathways. *Mol Med Rep.* 2016;14:955-62.

## 図および表



**Figure 1.** 本研究のタイムスケジュール

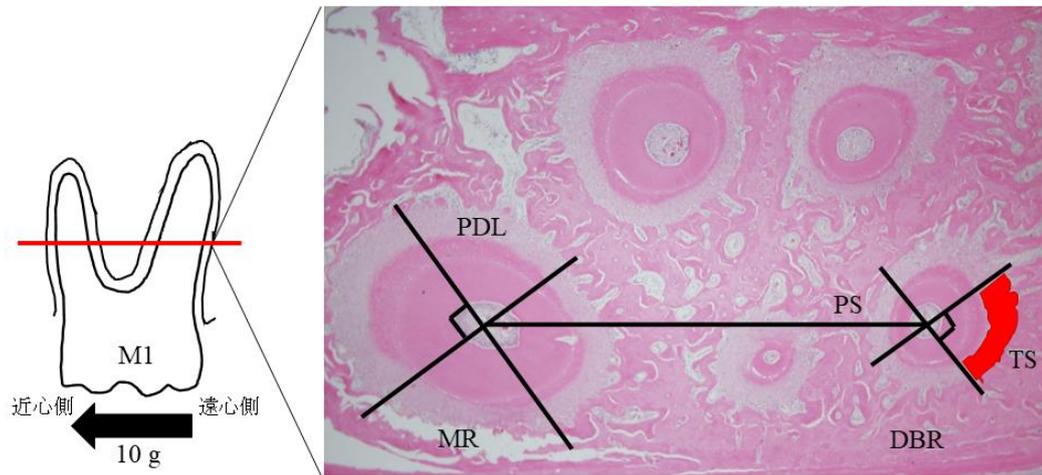
実験は、歯の移動（14日間）後に7日間毎日歯根膜注射を行った。



**Figure 2.** 歯の移動モデルと注射方法

A : 実験的な歯の動きに使用される装置の概略図。上顎右側第一臼歯は、10g の力を有する閉鎖コイルにより近心方向に動かした。

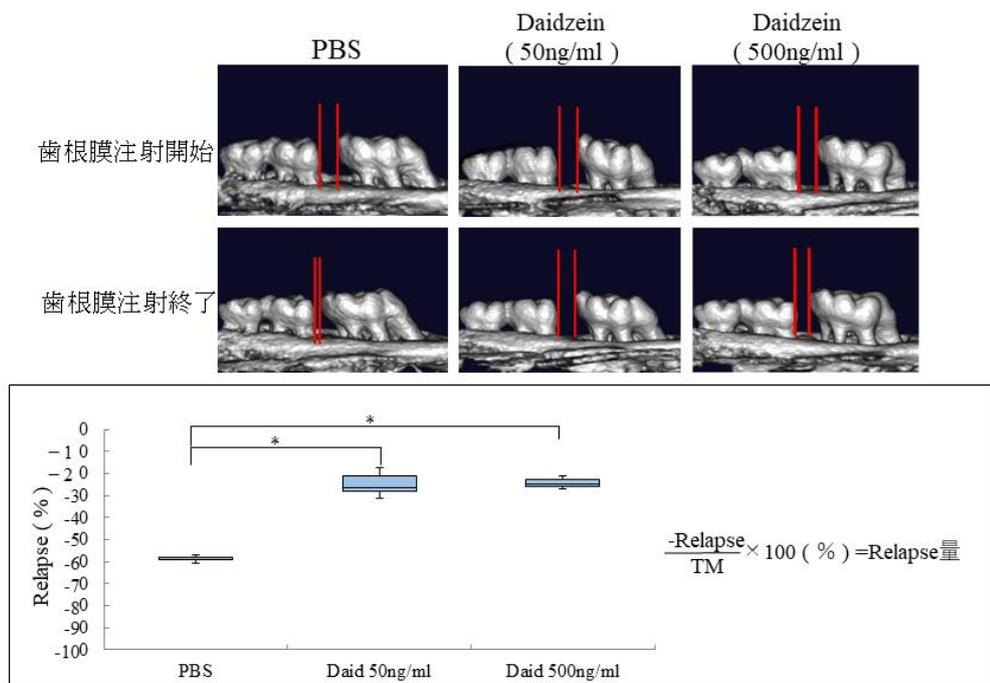
B : 黒い矢印は歯根膜への注入点。 daidzein の局所投与は、上顎右側第一臼歯の歯根膜の近心、遠心、頬側および口蓋側に行った。



観察部位; 上顎右側第一臼歯遠心頬側根  
MR; 近心根, DBR; 遠心口蓋根, PDL; 歯根膜, PS; 圧迫側, TS; 牽引側

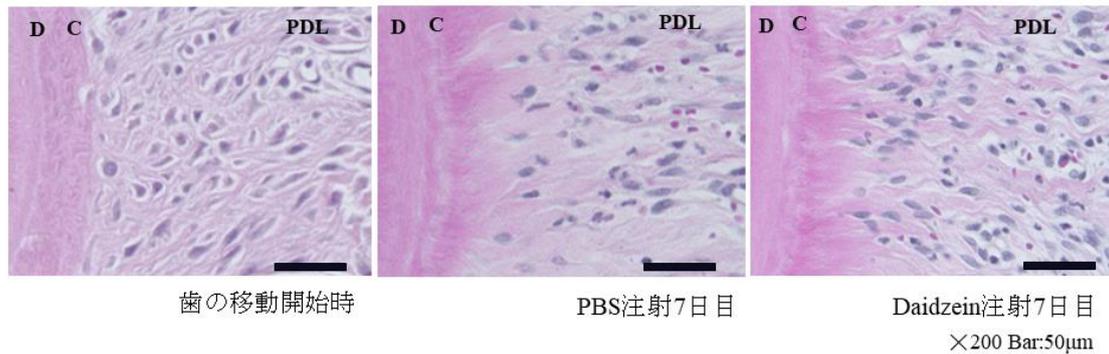
**Figure 3. 観察部位**

PCNA, COL-IおよびMMP1に対する免疫組織学的所見は頬側遠心根の遠心領域の牽引側 1/4 において観察及び計測した。矢印; 牽引方向, MR; 近心根, DBR; 頬側遠心根, PDL; 歯根膜, PS; 圧力側, TS; 牽引側



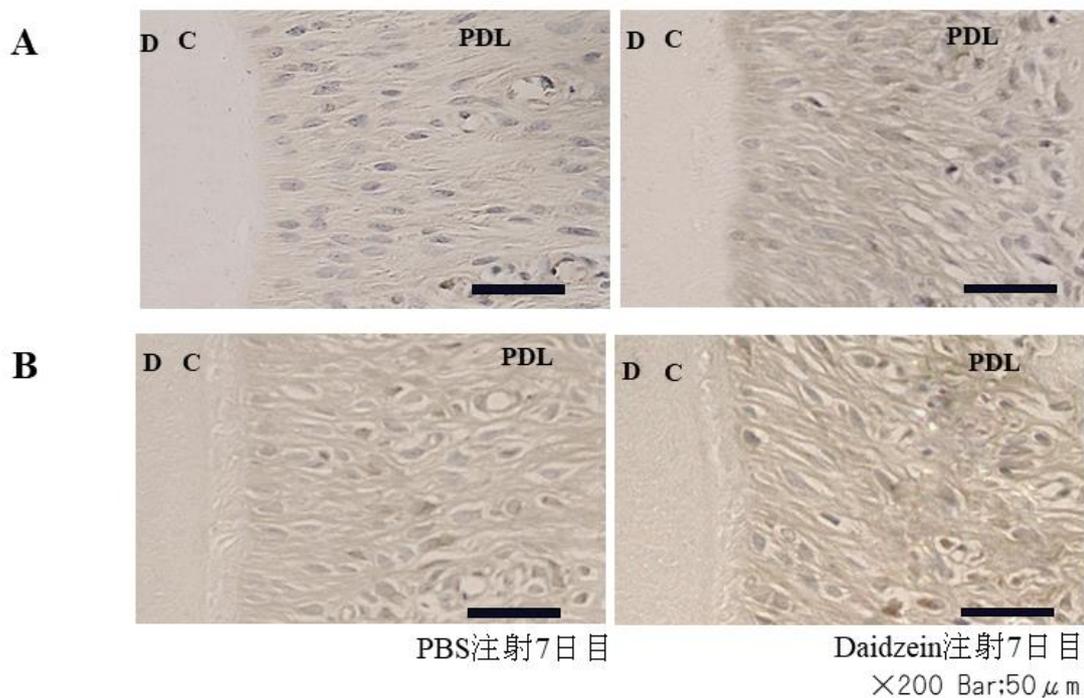
**Figure 4. daidzein 注射による後戻り距離比率**

7日目に daidzein 群の後戻り比率は PBS 群より有意に低かった (\*  $p < 0.05$ )。



**Figure 5.** 病理組織学的染色結果 ( H.E.染色, ×200)

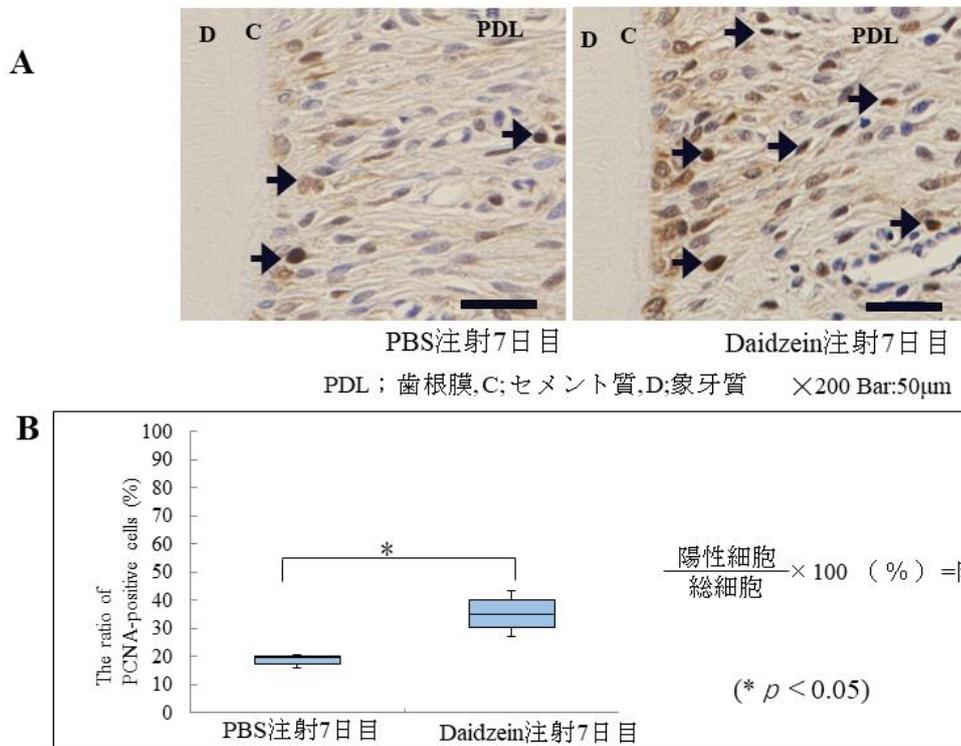
歯の移動における牽引側の歯周組織の組織学的変化を観察した。daidzein 群は、PDL 中にエオジン好性の比較的明瞭なコラーゲン線維が波状に走行していた。PDL；歯根膜, C；セメント質, D；象牙質



**Figure 6.** 免疫組織化学的染色結果 ( A；COL-I, B；MMP1, ×200 )

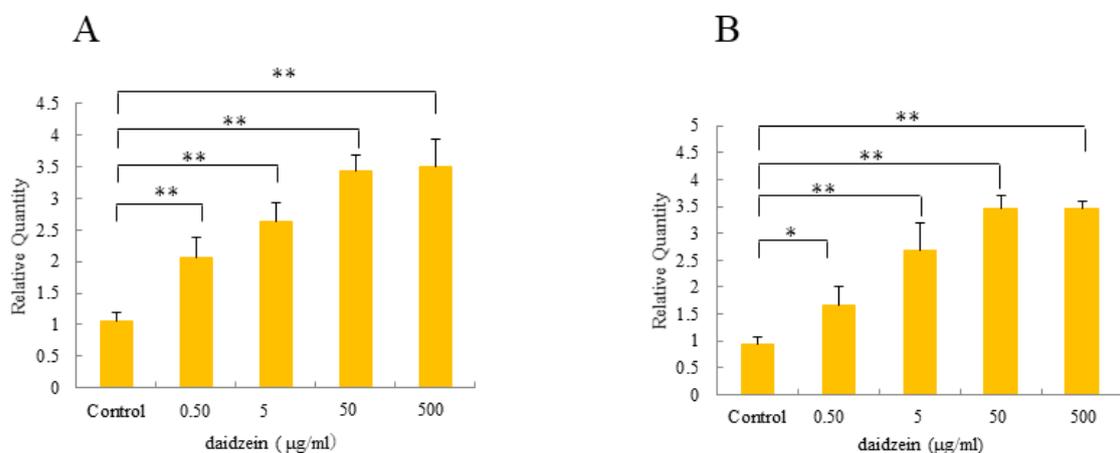
daidzein 群は、PDL のコラーゲン線維束に COL-Iおよび MMP1 の陽性染色を認めた。

PDL；歯根膜, C；セメント質, D；象牙質



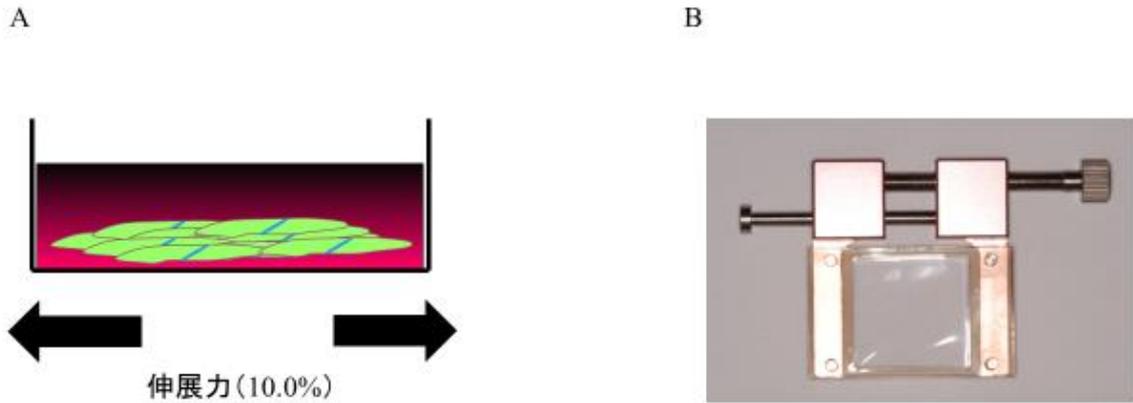
**Figure 7.** 免疫組織化学的染色結果 ( PCNA, ×200 )

A: daidzein 注射群は, PBS 群と比較して多数の PCNA 陽性細胞を認めた。  
 B : PCNA 陽性細胞率は, daidzein 群では PBS 群と比較し有意な差を示した (\*  $p < 0.05$ )。 PDL ; 歯根膜, C ; セメント質, D ; 象牙質



**Figure 8.** hPDL 細胞の daidzein 濃度の影響 ( A ; COL-I, B ; MMP1 )

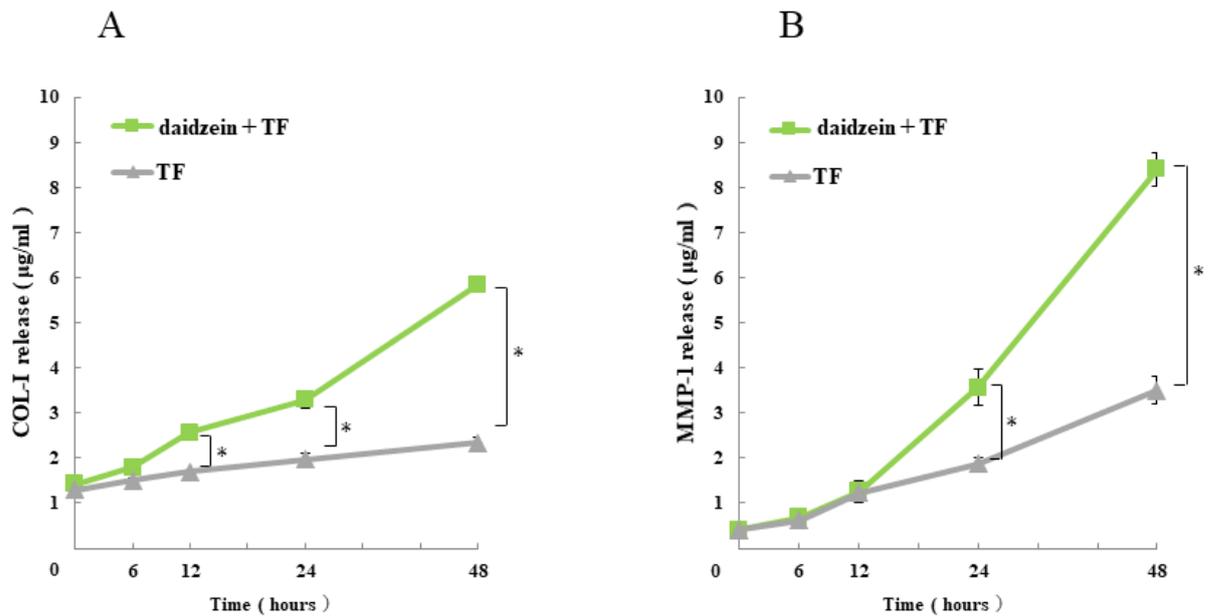
Daidzein 群における COL-I および MMP1 の mRNA 発現は, 0~50 μg/ml の範囲で濃度依存的に増加した (\*  $p < 0.05$  および \*\*  $p < 0.01$ )。



**Figure 9.** 伸展力モデルと伸展方法

A：伸展力を加えた hPDL 細胞モデルの概略図であり，黒い矢印は伸展方向である。

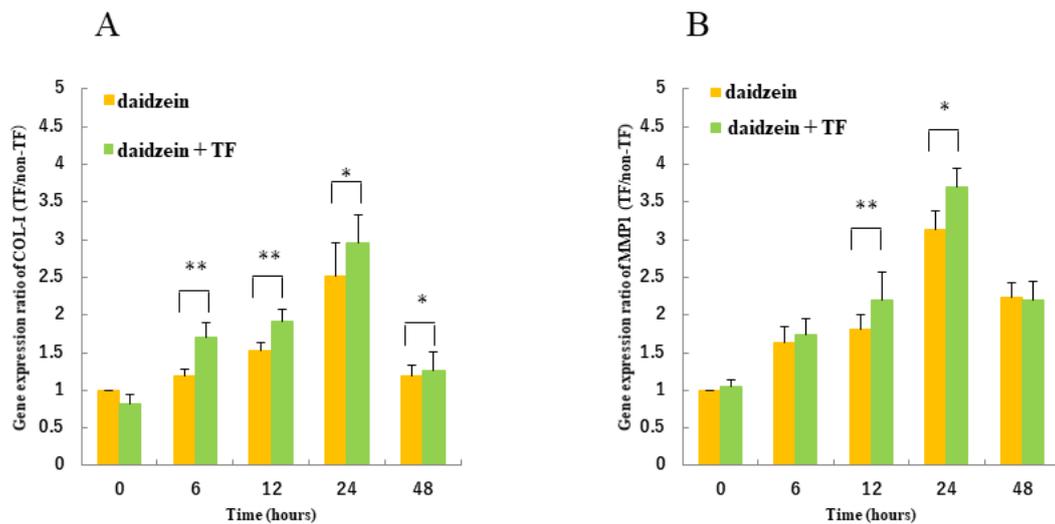
B：STREX チャンバーの概略図である。STREX チャンバーは, 10%の大きさで伸展するように設計されている。



**Figure 10.** 伸展した hPDL 細胞における daidzein 添加におけるタンパク質産生量に対する時間経過 ( A ; COL-I, B ; MMP1 )

daidzein+ TF 群の COL-I および MMP1 産生量は, TF 群 ( $*p < 0.05$ ) と比較して 48 時間まで有意に増加した。

daidzein+ TF : daidzein+伸展力, TF : 伸展力のみ。



**Figure 11.** 静置培養と伸展培養での daidzein の効果の影響 ( A ; COL-I, B ; MMP1 )

daidzein 群の比率は, daidzein 投与/daidzein 投与なしの相対的 mRNA 量であらわした。 daidzein+ TF 群の比率は, daidzein 投与+ TF /daidzein 投与の相対的 mRNA 量であらわした。 daidzein+ TF 群は TF 群と比較して, 24 時間で有意に増加した (\* $p < 0.05$  および \*\* $p < 0.01$ )。 daidzein+ TF : daidzein+伸展力, TF : 伸展力のみ。

### 1. TABLE LEGEND

COL-I	Fw: 5'-CCCGGGTTTCAGAGACAACTTC-3'
	Rv: 5'TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'
MMP1	Fw: 5'-ACAACTGCCAAATGGGCTTGA-3'
	Rv: 5'-CTGTCCCTGAACAGCCCAGTACTTA-3'
GAPDH	Fw: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	Rv: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

Table 1. COL-I, MMP1 および GAPDH のプライマー配列 Takano ら[15]に従って設計した。