

ラットの実験的歯の移動後の骨代謝に daidzein が与える影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

鹿野 瑞貴

(指導: 葛西 一貴 教授)

本稿は、主となる参考論文 Daidzein の骨形成能および矯正歯科治療後の後戻り抑制効果の検討 (Orthodontic Waves-Japanese Edition 共著 掲載予定) および副となる参考論文 ラットの実験的歯の移動後の骨吸収の抑制に daidzein が与える影響 (日大口腔科学 共著 掲載予定) をまとめたものである。

Abstract

Objectives: In orthodontic treatment, relapse of tooth after active treatment occurs considerably. Alveolar bone resorption after orthodontic tooth movement is thought to be one of the important factor associated with tooth relapse. Daidzein, a one of the major isoflavone found in soybean, inhibits the osteoclast differentiation and promote the bone formation. The purpose of this study was to investigate the effects of daidzein on relapse after orthodontic tooth movement (TM) .

Materials and Methods: The 6-week-old male Wistar strain rats were randomly assigned to 2 groups as follow; control group and daidzein group. After upper the right first molar moved by Waldo method for 7 days in both groups, the first molars and the second molars were fixed by resin from 7 day to 14 day. During the retention period, daidzein (10 mg/kg of body weight) was given to the daidzein group, phosphatase buffered saline (PBS) was given to the control group by intraperitoneal injection on daily bases. After removing the composite resin, the distance of TM was measured by micro-computed tomography before the TM and on 7, 14 and 21 day, and calculated the ratio of relapse. In addition, hematoxylin and eosin (H.E.) staining and the immunohistochemical staining using stretch side, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) , alkaline phosphatase (ALP) , osteopontin (OPN) , tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP) , receptor activator of

nuclear factor kappa B ligand (RANKL) , osteoprotegerin (OPG) , caspase 3 were performed for observation.

Results: The ratio of relapse in the daidzein group was significantly lower than that in control group. In the pressure side, a greater number of multinucleated osteoclasts were observed in alveolar bone of surface on 7 day by H.E. staining. Then, the ratio of multinucleated osteoclasts decreased on 14 day in both groups. The ratio of TRAP- and RANKL-positive cells in the daidzein group decreased. On the other hands, the ratio of OPG- and caspase3-positive cells increased on 14 day. In the stretch side, the ratios of PCNA-, ALP- and OPN-positive cells were significantly higher in the daidzein group than in the control group on 14 day.

Conclusion: The daidzein may inhibit bone resorption and enhance bone formation in shorten the retention period after active treatment.

緒言

矯正歯科臨床において治療後に生じる歯列の後戻りは患者及び矯正歯科医にとって好ましくない現象であり、再治療を行う場合もある。そのため、動的矯正治療後には、後戻りを防止する保定装置を用いるが、保定装置の種類や装着時間などにより後戻りが少なからず生じる¹⁾。後戻りの原因として、歯の移動後の歯根膜線維の応力の残存や歯槽骨のリモデリングの破綻などが考えられている^{2~4)}が、詳細は未だ明らかではない。

当講座では daidzein に着目し、daidzein の投与により間葉系細胞（以下、歯根膜細胞と記す）の細胞増殖を活発化することでコラーゲン代謝を促進し、歯の後戻りを抑制することを明らかにした⁵⁾。Daidzein はマメ科の植物に多く含まれ、イソフラボンの一種であり、女性ホルモンの一つであるエストロゲンと構造が類似しており、大豆イソフラボンは体内に入ると破骨細胞に存在するエストロゲン受容体を介し、アポトーシスに参与する Fas リガンドを誘導し、破骨細胞の寿命を短縮させるとともに、破骨細胞の形成を低下させ骨吸収を抑制することが報告されている^{6,7)}。Daidzein は骨粗鬆症の抑制や予防するためのサプリメントなどとして用いられており、骨粗鬆症などの疾患では daidzein を摂取することで骨からのカルシウムの流出を抑え、骨形成の促進と骨密度の増加を促す作用がある⁸⁾。また Rassi ら⁹⁾ は、daidzein により破骨細胞分化が抑制され、骨吸収が軽減すると報告している。このことから daidzein は矯正治療後の

骨吸収を抑制し後戻りを防止する可能性がある。

歯根膜は歯槽骨とセメント質の間に介在する線維性結合組織であり、その中には線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞、セメント芽細胞など様々な細胞（歯根膜細胞）が存在している^{10, 11)}。また歯根膜は様々なメカニカルストレスに応答し、線維芽細胞または骨芽細胞に分化の振り分けが行われ、その恒常性を維持している¹²⁾。さらにエストロゲンはエストロゲン受容体を介して歯根膜細胞の増殖と骨芽細胞分化を促進することが報告されている¹³⁾が、**daidzein**による歯根膜に存在する未分化間葉細胞の骨芽細胞への分化については不明である。

そこで本研究では、ラットの実験的歯の移動終了後の保定期間中に **daidzein** を腹腔内投与することにより、牽引側の歯根膜細胞の骨形成作用、および圧迫側の骨吸収作用について検討を行った。さらに、**daidzein** の骨吸収抑制と骨形成促進作用を明らかにすることは、後戻りの抑制を行うだけでなく、保定期間の短縮化を行うことができると考える。

材料および方法

実験動物

本実験では、6週齢の Wistar 系雄性ラット（体重 120 ± 10 g，三協ラボサービス（株），東京）を合計 48 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、飲料水ならびにゲージは全て滅菌したものを使用した。なお、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に従って行った (承認番号 AP18MAS012-1)。

歯の移動方法および daidzein 投与

すべての行程は、3 種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 1.875 mg/kg, ミダゾラム 2 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg /kg, 生理食塩水 1.8625 mg/kg) を腹腔内注射し、全身麻酔下にて実施した。実験的歯の移動は、Waldo ら¹⁴⁾ の方法に従って行い、厚さ 1.2 mm のセパレーティングモジュール (Tomy International, Inc., Tokyo, Japan) を上顎右側第一臼歯と第二臼歯との間に挿入し、7 日間歯の移動を行った (Fig. 1)。歯の移動後、セパレーティングモジュールを除去し、離開された上顎右側第一臼歯と第二臼歯間を光重合型レジン (Transbond™ XT, 3M Japan Company, Tokyo, Japan) にて 7 日間固定し保定期間とした (Fig. 2)。保定期間中に、Bae ら¹⁵⁾ の方法に従って、control 群には phosphatase buffered saline (PBS) を、daidzein 群には daidzein (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Inc., Osaka, Japan) を 10 mg/kg, 7 日間腹腔内投与を行った。その後、固定に用いた光重合型レジンを除去し、自然保定を 7 日間行った (Fig. 3)。

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

よる歯の移動量および後戻り量の測定

実験開始 0, 7, 14, 21 日目に、全身麻酔後、Nakayama ら⁵⁾の方法によりラットを固定し、micro-CT (Rigaku-micro-CT®, Tokyo, Japan) を用い撮影した。撮影条件は、管電圧 90 kv, 管電流 88 μ A, 17 秒 360 度回転とした。歯の移動および後戻り量の測定は、Sugimori ら¹⁶⁾の方法により、0, 7, 14, 21 日目の各段階において第一臼歯の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。また、7 日間の歯の移動距離は個々の動物の個体差が認められるため、歯の移動後に矯正装置を除去した時点の移動距離を基準とし、下記の計算式を用いて後戻り率を算出した。

$$\text{後戻り率 (\%)} = \text{後戻り距離 (mm)} / \text{歯の移動距離 (mm)} \times 100$$

標本作製

全身深麻酔後、生理食塩水と 10%中性緩衝ホルマリンにて灌流固定し、直ちにラットの上顎骨を摘出した。さらに 10%中性緩衝ホルマリンにて 4°C で 24 時間浸漬固定後、試料を 10%EDTA 溶液 (pH7.4) 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、水平方向に厚さ 4 μ m で連続的に薄切し、病理組織学的および免疫組織化学的染色に供

した。

病理組織染色法および免疫組織化学染色法

病理組織学的観察は試料の脱パラフィン後、通法に従い hematoxylin and eosin (H.E.) 染色を行った。免疫組織化学的染色は、各切片を 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後、Tris-Buffered Saline (TBS) で洗浄した。その後、切片を DAKO Proteinase K (Agilent Technology, Inc., USA) にて抗原の賦活化処理を行った。ブロッキングから染色までの過程は、PCNA, ALP, OPN, Caspase 3 は Stain MAX-PO (Multi) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を、また TRAP, RANKL, OPG は Stain MAX-PO (G) kit (Nichirei, Co., Tokyo, Japan) を使用し、プロトコールに従い行った。一次抗体には、抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA, PC10, 1:100, Cell Signal Technology, Inc. Tokyo, Japan) 抗体, 抗 alkaline phosphatase (ALP, 1:500, Abcam, Cambridge, UK) 抗体, 抗 osteopontin (OPN, 1:100, Abcam, Cambridge, UK) 抗体, 抗 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) 抗体, 抗 receptor activator of nuclear-factor kappaB ligand (RANKL, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) 抗体, 抗 osteoprotegerin (OPG, TR1BK1, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) 抗体, 抗 caspase 3 (1:300, Cell Signal Technology,

Inc., MA, USA) 抗体を用い、室温で1時間作用させた。各切片はTBSで洗浄し、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB: Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にて発色後、マイヤーのヘマトキシリン液を用いて対比染色を行った。また、negative control として一次抗体の代わりにTBSを用いた。観察部位はKikutaら¹⁷⁾の方法を参考にし、上顎右側第一臼歯の近心根の中心と遠心頬側根の中心とを結んだ線と直行する線とでなす領域の遠心部4分の1の牽引された歯周組織(200×300 μm)を牽引側とし、近心部4分の1の圧迫された歯周組織(200×300 μm)を圧迫側として、光学顕微鏡下200倍にて茶褐色に染色された細胞を陽性細胞とした。薄切部位は、上顎第一臼歯を側面から見て根分岐部から300 μmの範囲とした。牽引側でのPCNA, ALP, OPNの陽性率はSatoら¹⁸⁾の方法に従い、以下の式で算出した。

$$\text{陽性細胞率 (\%)} = (\text{陽性細胞数} / \text{全紡錘形細胞数}) \times 100$$

圧迫側での陽性細胞数は、TRAPでは歯槽骨表面、RANKL, OPG, caspase 3では歯槽骨表面および歯根膜の領域内の各群の平均値を算出した (Fig. 4)。

統計解析

陽性細胞率および陽性細胞数は各群の平均値と標準偏差を求めた。daidzein群とcontrol群との間の差の検定は、Mann-WhitneyのU検定を用いた。有意水準は

$p < 0.05$ および $p < 0.01$ とした。

結 果

ラットの体重変化

セパレーティングモジュールの装着により両群ともに一時的な体重の減少が認められたが、その後回復し、体重の変化に daidzein 群と control 群の間に有意な差は認めなかった (Fig. 5)。

Daidzein 投与による後戻り距離比率

矯正装置除去後 14 日目 (実験開始 21 日目) での臼歯間の距離は, control 群, daidzein 群ともに減少し, 後戻りが認められたが, daidzein 群は control 群と比較して後戻り量が少ない傾向にあった (Fig. 6d, h, Fig. 7)。

21 日目の後戻り率は control 群で 86.6%, daidzein 群で 23.1%であり, daidzein 群は control 群と比較して, 有意に低い値を示した (Fig. 8)。

病理組織学的所見 (H.E.染色)

1) 牽引側における形態変化

実験開始前では両群ともに, 歯根膜のコラーゲン線維は比較的, 規則的に走

行していた (Fig. 9-a, e)。

7 日目では両群ともに、コラーゲン線維は、束状に不規則に蛇行し、コラーゲン線維の伸展傾向が認められた (Fig. 9-b, f)。

14 日目の control 群でコラーゲン線維は、歯槽骨寄りでは蛇行し、セメント質寄りでは伸展が認められた (Fig. 9-c)。さらに daidzein 群では、歯槽骨表面において不整な新生骨の形成を認めた (Fig. 9-g)。

21 日目では、control 群では、コラーゲン線維は蛇行する部位と伸展された部位が混在していた (Fig. 9-d)。daidzein 群ではコラーゲン線維の伸展は弱まり、大部分は密に蛇行し、新生骨の形成が観察された (Fig. 9-h)。

2) 圧迫側における形態変化

実験開始前において両群ともに、歯根膜のコラーゲン線維は比較的、規則的に走行していた (Fig. 10-a, e)。

7 日目の control 群において歯槽骨表面では、不規則な吸収窩に沿って多数の破骨細胞が、セメント質表面では破歯細胞を認めた。間質には軽度の浮腫を背景に、やや幼若な主線維、リンパ球の浸潤、小型の線維形細胞の増生を認めた (Fig. 10-b)。daidzein 群において歯槽骨表面では、不規則な吸収窩に沿って多数の破骨細胞を認めた。間質には軽度の浮腫を背景に、やや幼若な主線維、紡錘形細胞

の増生, 中等度の好中球浸潤を認めた (Fig. 10-f)。

14 日目の control 群において歯槽骨表面では, 不規則な吸収窩に沿って多数の破骨細胞が, セメント質表面では破歯細胞を認めた。間質には, 脈管の拡張, 紡錘形細胞が不規則に配列され, 細線維の形成を認めた (Fig. 10-c)。daidzein 群において歯槽骨表面では, 不規則な吸収窩に沿って多数の破骨細胞を認めた。間質には浮腫性の結合組織, 脈管の拡張, 軽度のリンパ球の浸潤, 不規則に配列された紡錘形細胞を認めた (Fig. 10-g)。

21 日目の control 群において歯槽骨表面に吸収窩を認め, 間質には腫大傾向の紡錘形細胞, および線維性結合組織の束状の増生が観察された (Fig. 10-d)。daidzein 群において歯槽骨表面に認めた破骨細胞は消失し, 歯槽骨の吸収窩は認めなかった。間質には脈管の軽度の拡張, 腫大した紡錘形細胞, 細線維の増生を認めた (Fig. 10-h)。

免疫組織化学的所見

1) 牽引側での形態変化

PCNA 陽性細胞は, 7 日目より PCNA 陽性細胞の発現を認め (Fig. 11A-b, f), 14 日目において control 群と比較し, daidzein 群での PCNA 陽性細胞の統計学的有意な増加を認めた (Fig. 11B)。

ALP 陽性細胞は, 14 日目において control 群と比較し, daidzein 群での ALP 陽性細胞の統計学的有意な増加を認めた (Fig. 12A-c, g, Fig. 12B)。

OPN 陽性細胞は, 14 日目において両群で発現が認められ (Fig. 13A-c, g), control 群と比較し, daidzein 群での OPN 陽性細胞の統計学的有意な増加を認めた (Fig. 13B)。

2) 圧迫側での形態変化

TRAP 陽性細胞数は実験開始前, 7 日目において両群ともに歯槽骨表面の不規則な吸収窩に沿って TRAP 陽性細胞を認めた (Fig. 14A-b, f)。

14 日目において両群ともに歯槽骨表面の不規則な吸収窩に沿って TRAP 陽性細胞を認めたが, daidzein 群と比べ control 群の方が TRAP 陽性細胞数は多数発現し, 統計学的有意差を認めた (Fig. 14A-c, g, Fig. 14B)。21 日目において, TRAP 陽性細胞は control 群では散見され (Fig.14A-d), daidzein 群では認めなかった (Fig. 14A-h)。

RANKL 陽性細胞数は 7 日目において両群ともに歯根膜内に茶褐色に染色された紡錘形の RANKL 陽性細胞を認め, 両群での有意差は認めなかった (Fig. 15 A-b, f)。14 日目において両群ともに歯根膜内に RANKL 陽性細胞を認めた。daidzein 群に比べ control 群の方が歯槽骨寄りの RANKL 陽性細胞は多数発現し,

統計学的有意差を認めた (Fig. 15A-c, g, Fig. 15B) 。 21 日目において, RANKL 陽性細胞は control 群で散見され (Fig. 15A-d), daidzein 群ではほとんど認めなかった (Fig. 15A-h) 。

OPG 陽性細胞は, 14 日目において両群ともに歯根膜内に OPG 陽性細胞を認めた。 control 群に比べ daidzein 群の方が歯槽骨に接した OPG 陽性細胞は多数発現し, 統計学的有意差を認めた (Fig. 16A-c, g, Fig. 16B) 。 21 日目において両群ともに OPG 陽性細胞をやや認めた (Fig. 16A-d, h) 。

Caspase 3 陽性細胞は, 14 日目において両群ともに歯根膜内に caspase 3 陽性細胞を認めた。 Control 群に比べ daidzein 群の方が歯槽骨に接した caspase 3 陽性細胞は多数発現し, 統計学的有意差を認めた (Fig. 17A-c, g, Fig. 17B) 。 21 日目において両群ともに caspase 3 陽性細胞を認め, control 群に比べ daidzein 群の方が多数発現した (Fig. 17A-d, h) 。

考 察

歯に矯正力となる刺激が加わると, 牽引側の歯根膜にはコラーゲン線維の伸展や歯槽骨の添加が生じ, 圧迫側では組織の圧迫と歯槽骨の吸収が起こることが知られているが, この歯槽骨のリモデリングも後戻りの原因の一つであると考えられている⁴⁾。近年, 骨形成を促進するために薬剤を局所的, 全身的に投与

することにより骨形成の促進と骨吸収の抑制を行い、後戻りを防止する^{4, 19, 20}との報告がされている。

Daidzein は大豆から発見された代表的なイソフラボンで、骨粗鬆症の治療薬としても使用されており、骨芽細胞において増殖や分化を促進する一方、破骨細胞に対しては分化を抑制し、骨吸収を減少させることが明らかになっている⁸⁾。また骨粗鬆症などの疾患で、**daidzein** を摂取することで骨からのカルシウムの流出を抑え、骨形成の促進と骨密度の増加を促す作用もあると報告されている⁸⁾。また、歯根膜細胞に対しても、エストロゲン受容体を介して骨芽細胞分化を促進することが報告されている¹⁰⁾。

そこで本研究では、矯正歯科治療後の歯槽骨のリモデリング時の骨形成を促進することで後戻りを抑制できると考え、ラットの実験的歯の移動後に **daidzein** を腹腔内投与し、牽引側での骨形成促進と圧迫側での骨吸収抑制作用について検討した。

その結果、**micro-CT** を用いた後戻りの距離比率の計測では **daidzein** 群は **control** 群と比べ、有意に低下したことから、**daidzein** が歯の後戻りを抑制したことを示している。**Han** ら⁴⁾ は、歯の後戻りは歯根膜線維の応力の残存やひずみの蓄積によって生じ、装置除去後から間もない期間で顕著に生じることを報告した。今回 **daidzein** の投与方法として臨床応用することを考え、腹腔内投与を行ったが、先

行研究の歯根膜注射による局所投与を行った Nakayama ら⁵⁾と同様の結果が得られた。投与方法が異なるにも関わらず同様の結果を得られたのは、腹腔内投与では投与された薬剤の一部は腹膜から速やかに吸収されて全身循環に入るため肝臓で代謝されないことから薬物が体循環に入る濃度が高くなり、かつ吸収も早いためと考えた。このことから daidzein の腹腔内投与のような全身投与においても後戻りの抑制に daidzein が有効であると考えられ、経口投与による臨床応用が可能であるといえる。

H.E. 染色では、牽引側の 21 日目の control 群においてコラーゲン線維の蛇行する部位と、伸展された部位が混在されていたが、daidzein 群ではコラーゲン線維の伸展は弱まり、大部分は束状に蛇行していた。これらの所見は Nakayama ら⁵⁾の報告と同様であり、daidzein がコラーゲン代謝を亢進していることが考えられる。

また、圧迫側の 7 日目では、両群ともに歯槽骨表面に多数の破骨細胞を認められた。14 日目では両群共に破骨細胞数は減少し daidzein を投与した群では control 群と比較して破骨細胞数がより少なかった。21 日目では実験開始前と同様の状態に戻った。このことから、7 日目では矯正力の負荷により圧迫側で破骨細胞が増加し骨吸収が促進され、14 日目は daidzein の効果により破骨細胞が抑制された可能性があり、Han ら⁴⁾の報告と同様の結果であった。

また免疫組織化学染色において、牽引側では PCNA, ALP, OPN を選択した。

PCNA は増殖細胞核抗原とされ、細胞周期に関連する核タンパク質であり、細胞増殖活性の評価に有用な方法²¹⁾である。ALP, OPN は骨形成因子であり、daidzein 投与による歯根膜細胞の骨芽細胞分化を検討するため用いた。

PCNA 陽性細胞は両群ともに 7 日目で増加し、14 日目において daidzein 群ではさらに増加した。Mabuchi ら²²⁾は歯根膜細胞に矯正力を負荷することで PCNA 陽性率が増加し、細胞増殖が活発になることを示しているため、本研究においても矯正力を負荷したことにより、7 日目の組織像で陽性細胞が増加したと考えられる。さらに、14 日目の daidzein 投与群で陽性細胞が増加したことは、daidzein が歯根膜の細胞増殖能亢進に関与した可能性が推察された。

ALP は骨誘導に関与するマーカーであり、細胞増殖された状態では、線維芽細胞は骨芽細胞と同様の ALP 活性を持ち^{23, 24)}、Kawase ら²⁵⁾は歯根膜が有する ALP は、骨芽細胞のものと類似していることを報告した。ALP は骨、肝臓、腎臓、線維芽細胞などの広範囲の組織、細胞で発現しており、歯や骨などの硬組織形成に関与していることが知られている。また、ALP と同じ骨分化マーカーである OPN は RGD 配列を介して骨芽細胞に結合する細胞外基質である²⁶⁾。骨芽細胞分化は、各分化段階でタンパク質発現パターンが変化していくのが特徴であり、骨芽細胞の分化前・中期には ALP と OPN の発現量が増加する²⁷⁾。さら

に、矯正歯の移動時の牽引側歯根膜細胞においても ALP, OPN の発現が増加し、骨形成が開始されることが報告されている²⁸⁾。

ALP 陽性細胞は実験開始前および 7 日目ともに両群間に差は見られなかったが、14 日目において daidzein 群では ALP 陽性細胞の増加が認められた。また OPN 陽性細胞も ALP と同様に実験開始前および 7 日目ともに両群間に差は見られなかったが、14 日目において daidzein 群では OPN 陽性細胞の増加が認められた。21 日目では OPN 陽性細胞の発現は減少した。

以上より、歯の移動後の牽引側歯根膜細胞で daidzein の効果により、保定期間である 14 日目より骨芽細胞への分化が control 群と比較して強く発現し、骨形成を促進している可能性が考えられる。また OPN には破骨細胞を促進する作用もあるとされているが、本研究ではその発現部位が歯根膜細胞中に多く認められたこと、daidzein は破骨細胞の分化を抑制するとの報告から骨芽細胞分化の促進に作用したと考えた。

また圧迫側では、TRAP, RANKL, OPG, caspase 3 抗体を選択した。RANKL は破骨細胞の産生を誘導する因子である。また、OPG は RANK と競合し、RANKL に結合することで破骨細胞形成を阻害する²⁹⁾。RANKL が増加すると骨吸収が優位になるが、対照的に OPG が増加すると骨吸収が抑制されることにより骨形成が優位となる。今回の結果では 7 日目に RANKL 陽性細胞数が両群共に増加し骨吸収が優位

であったが、14日目の daidzein 群では control 群と比較して RANKL 陽性細胞数が減少、OPG 陽性細胞数が増加し骨形成が促進された。これは OPG が daidzein により産生が促進されたためと考える。これらは Liang ら¹³⁾ の報告と一致しておりエストロゲンだけでなく daidzein にも同様の作用があり骨吸収を抑制したと考える。

また daidzein にはアポトーシスを誘導し破骨細胞の分化を抑制する作用があることが報告されている^{6,7)} ため、アポトーシス関連因子である caspase 3 の発現について検討を行った。アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、実行に関わるのは、caspase 3 と呼ばれるタンパク質分解酵素である。Caspase はアポトーシスによる細胞死過程の調節要素であり、その引き金となるシグナル伝達経路において重要な役割を果たす。

本研究では Rassi らの daidzein が caspase 3 を介して破骨細胞の分化、活性を抑制するとの報告⁹⁾ により、caspase 3 について検討を行った結果、caspase 3 陽性細胞は、14日目の daidzein 群では control 群と比較して多く発現が認められたことから、破骨細胞の分化抑制によりアポトーシスが誘発されている可能性があると考えられる。しかしながら大豆イソフラボンがアポトーシスに関与する Fas リガンドを誘導し、破骨細胞の寿命を短縮させるとの報告^{6,7)} もあることから分化を抑制するだけでなく破骨細胞自体をアポトーシスに誘導する可能性もあるため今後 caspase 8 などの因子についてもさらなる検討が必要である。

本研究ではより臨床に近づけるためレジンによる保定期間を設けたが、保定を行わない場合での比較をしていないため、今後 daidzein による保定効果を検討するため比較することが必要であると考え。また、臨床応用することを考え、daidzein を腹腔内投与する方法を用いたが、経口投与による効果が確認されれば、サプリメントなどの簡便な方法で後戻りを抑制することができる。さらには、保定期間の短縮を行うことも可能となりそれに伴う患者、歯科医師双方の負担を軽減できると考える。

結 論

本研究の結果から、daidzein は牽引側の歯根膜細胞の増殖を促し、骨芽細胞への分化を誘導し骨形成を促進させることが明らかとなった。また、圧迫側の歯根膜細胞では OPG の発現を増加させるとともに、caspase 3 の発現を増加させアポトーシスに誘導していることから、破骨細胞の分化誘導を阻害し骨吸収を抑制する可能性が示唆された。

参考文献

1. Sadowsky C, Schneider BJ, BeGole EA, et al. Long-term stability after orthodontic treatment: Nonextraction with prolonged retention. Am J Orthod, 1994; 106: 243-249.

2. Yoshida Y, Sasaki T, Yokoya K, et al. Cellular roles in relapse processes of experimentally moved rat molars. *J Electron Microsc*, 1999; 48: 147-57.
3. Parker GR. Transseptal fibers and relapse following bodily retraction of teeth: a histologic study. *Am J Orthod*, 1972; 61: 331-344.
4. Han G, Chen Y, Hou J, et al. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2010; 138: 1-7.
5. Nakayama E, Yamaguchi M, Kikuta J, et al. Daidzein inhibits relapse after rat experimental tooth movement. *Int J Oral-Med Sci*, 2018; 17: 18-26.
6. 宮内智美, 海老沢秀道. 大豆イソフラボンによる骨量維持作用機序解明に関する研究-アポトーシス関連遺伝子発現調節への影響. *学苑*, 2006; 794: 21-26.
7. 喜多村啓介, 島本義也, 阿部純 ら. 大豆イソフラボンの骨代謝調整作用; 大豆のすべて, サイエンスフォーラム. 東京, 2010; 第1版: 270.
8. Hu B, Yu B, Tang D, et al. Daidzein promotes osteoblast proliferation and differentiation in OCT1 cells through stimulating the activation of BMP-2/Smads pathway. *Genet Mol Res*, 2016; 15: 1-10.
9. Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, et al. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Miner Res*, 2002; 17: 630-638.

10. Beertsen W, McCulloch AG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology*, 1997; 13: 20-40.
11. 山村 辰二. 培養ヒト歯根膜由来線維芽細胞の石灰化能に対するエストロゲンの作用に関する研究. *広大歯誌*, 1995; 27:26-37.
12. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, et al. Regulatory Mechanisms of Periodontal Regeneration. *Microsc Res Tech*, 2003; 60: 491-502.
13. Liang L, Yu JF, Wang Y et al. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *J Periodontol*, 2008; 79: 1745-1751.
14. Waldo CM. Method for the study of tissue response to tooth movement. *J dent Res*, 1953; 32: 690-691.
15. Bae SH, Ha MH, Choi EY, et al. Effects of daidzein on alveolar bone loss and internal microstructures of bone in a rat model of experimental periodontitis: a study using micro-computed tomography. *J Periodont Res*, 2016; 51: 250-256.
16. Sugimori T, Yamaguchi M, Shimizu M, et al. Micro-osteoperforations accelerate orthodontic tooth movement by stimulating periodontal ligament cell cycles. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2018 ;154 :788-796.
17. Kikuta J, Yamaguchi M, Shimizu M, et al. Notch signaling induces root resorption via

- RANKL and IL-6 from hPDL cells. *J Dent Res*, 2015; 94: 140-147.
18. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, et al. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis*, 2010; 16: 263-268.
19. Wu X, Wang X, Ren X, et al. Effects of psoralen, a traditional Chinese medicine, on Relapse and bone remodeling after orthodontic tooth movement in rats. *Int J Clin Exp Med*, 2018; 11: 3587-3595.
20. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, et al. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, 2004; 83: 920-925.
21. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of Low-Energy Laser Irradiation on Bone Remodeling During Experimental Tooth Movement in Rats. *Lassers Surg Med*, 2000; 26: 282-291.
22. Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligament during orthodontic tooth movement. *J Periodontal Res*, 2002; 37: 118-124.
23. Wlodarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int*, 1986; 39: 382-385.
24. Lilja E, Lindskog S, Hammarström L. Alkaline phosphatase activity and tetracycline incorporation during initial orthodontic tooth movement in rats. *Acta Odontol Scand*, 1984; 42: 1-11.

25. Kawase T, Nakajima M, Matsumoto T, et al. Characterization of alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells in vitro. Bull. of Kanagawa dent. Col, 1987; 15: 65-69.
26. 松本歯科大学大学院硬組織研究グループ. 硬組織のタンパク質と機能, Hard Tissue 硬組織研究ハンドブック, 第 1 版, 長野: 松本歯科大学出版会, 2005; 68-69.
27. 岡藤 範正. 歯科矯正における骨形成分化誘導のダイナミクス. 日本顎咬合学会誌 2014; 34: 95-102.
28. Liping J, Zhen T. Expression and regulation of the ERK 1/2 and p38 MARK signaling pathways in periodontal tissue remodeling of orthodontic tooth movement. Mol Med Rep, 2018; 17: 1499-1506.
29. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, et al. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. Orthod Craniofac Res, 2008; 11:143-155.

図および表

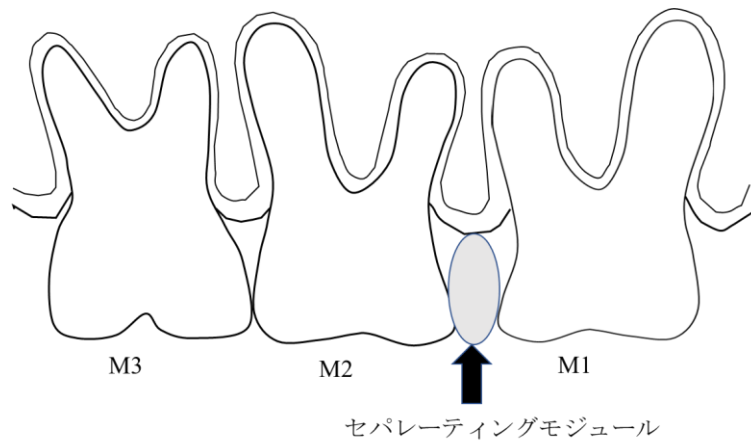


Fig. 1 歯の移動モデル

実験的歯の移動は, Waldo らの方法に従い, 厚さ 1.2 mm のセパレーティングモジュールを上顎右側第一臼歯と第二臼歯との間に挿入した。

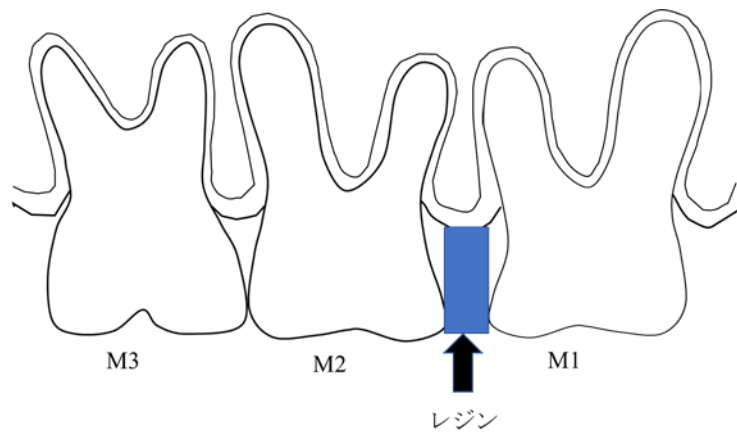


Fig. 2 歯の保定モデル

歯の移動後, セパレーティングモジュールを除去し, 離開された上顎右側第一臼歯と第二臼歯間をレジンにて固定した。

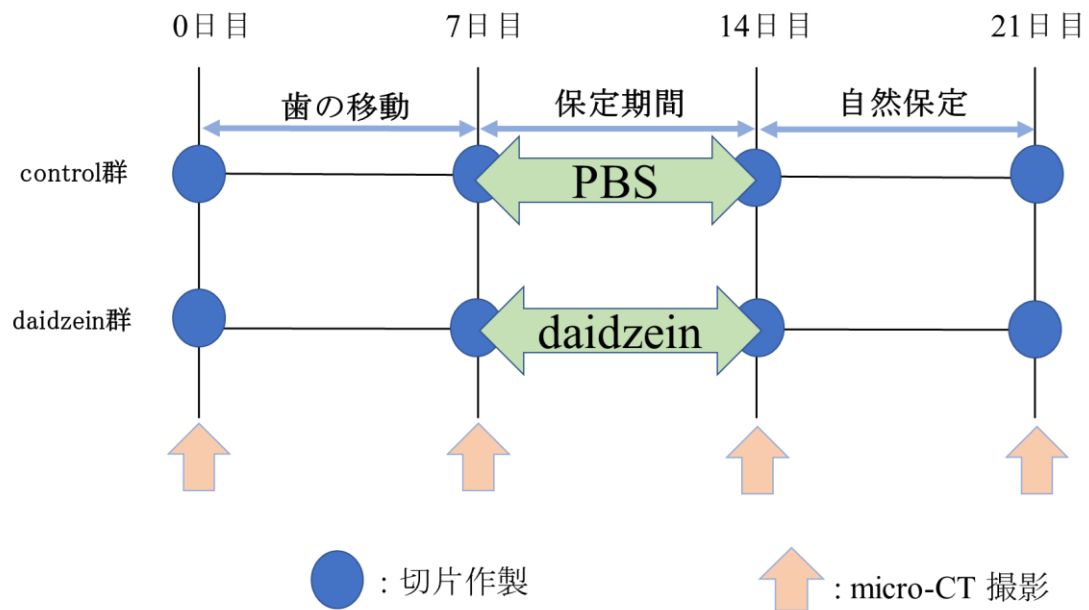


Fig. 3 実験スケジュール

実験は control 群, daidzein 群の 2 群に分類し, 実験開始 0~7 日目を歯の移動期間, 7~14 日目保定期間, 14~21 目を自然的保定期間とした。保定期間中に control 群には PBS を, daidzein 群には daidzein を, 10 mg/kg ずつ腹腔内投与を行った。実験開始 0, 7, 14, 21 日目において組織切片作製, micro-CT 撮影を行った。

。

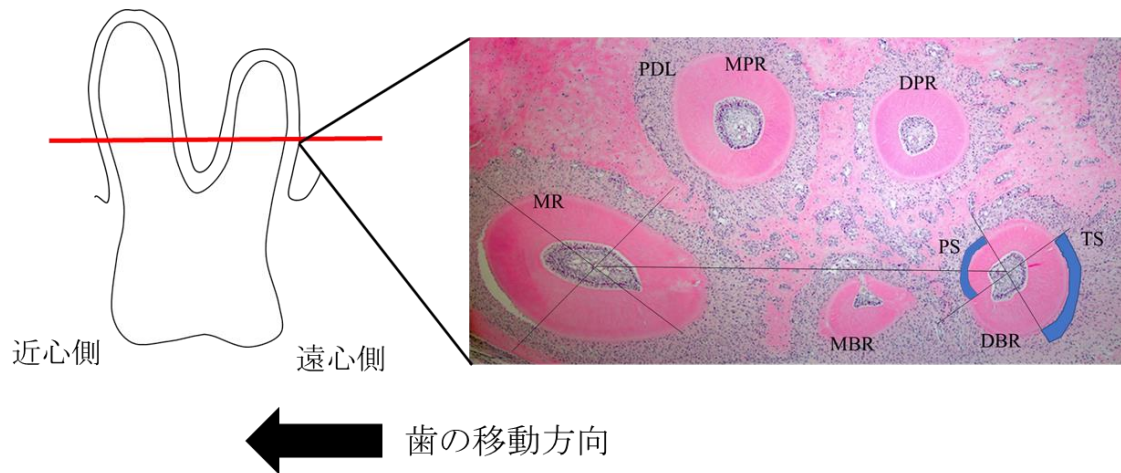


Fig. 4 観察部位

上顎右側第一臼歯の近心根の中心と遠心頬側根の中心とを結んだ線と直行する線とでなす領域の遠心部 4 分の 1 の牽引された歯周組織を牽引側とし、近心部 4 分の 1 の圧迫された歯周組織を圧迫側とした。

MR; 近心根, DBR; 遠心頬側根, MPR; 近心口蓋根, DPR; 遠心口蓋根, MBR; 近心頬側根, PDL; 歯根膜, PS; 圧迫側, TS; 牽引側

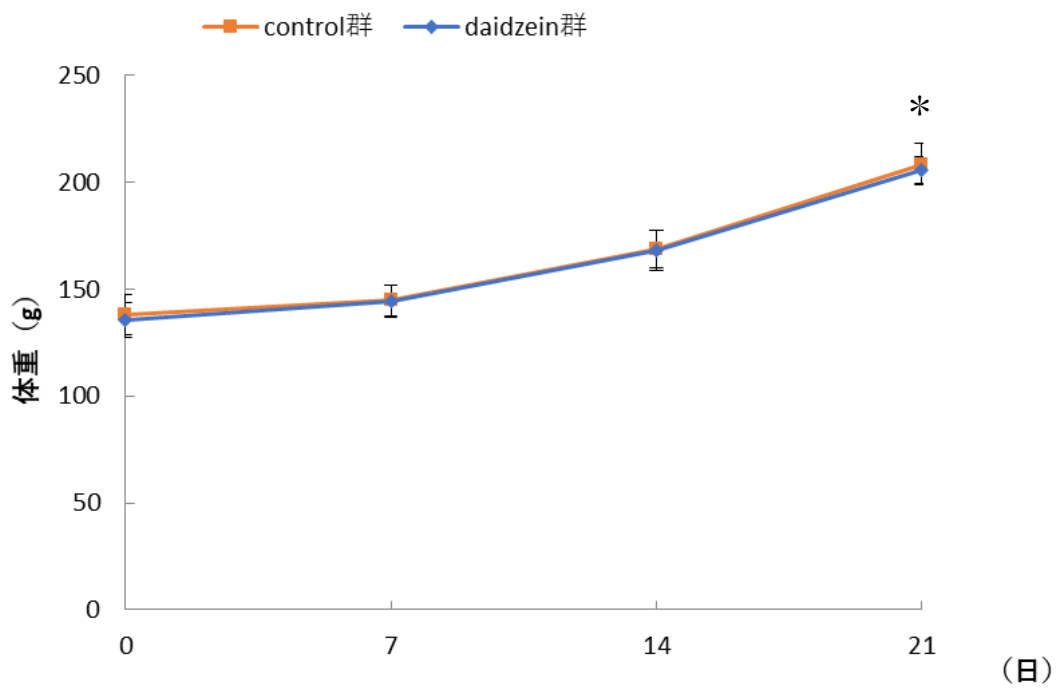


Fig. 5 実験期間中のラットの体重変化

セパレーティングモジュールの装着により一時的に体重の減少が認められたが、その後回復し両群間で体重の変化に有意な差は認めなかった。* $p < 0.01$

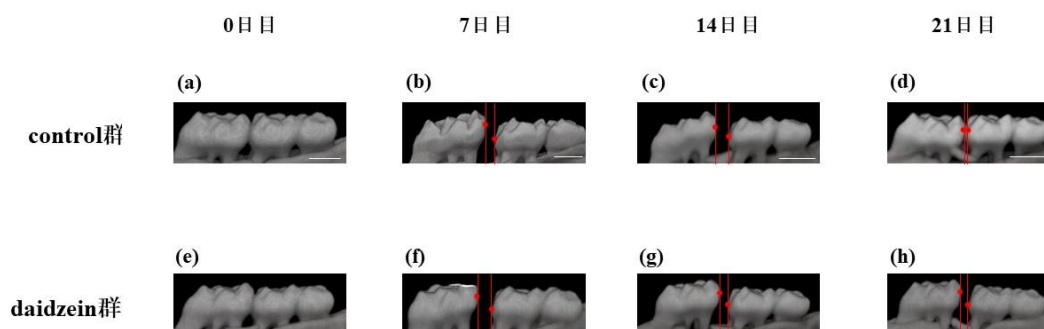


Fig. 6 micro-CT 撮影による歯の移動量の変化

7日目で両群ともに第一臼歯は近心に移動し 14日目は両群ともに歯の移動距離は保持されており, 21日目で control 群は元の状態に戻ったが, daidzein 群では多少の後戻りはみられたが歯の移動距離は保持されていた。

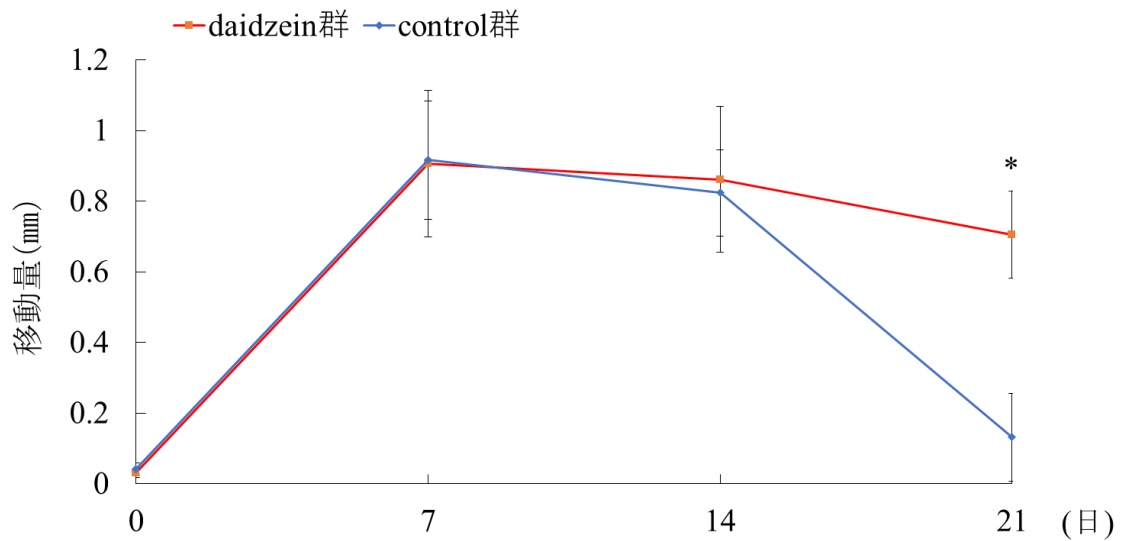


Fig. 7 歯の移動距離の測定

実験開始 14 日目までは両群で大きな差はみられなかったが, 14 日目以降 control 群において有意な差を認めた。* $p < 0.01$

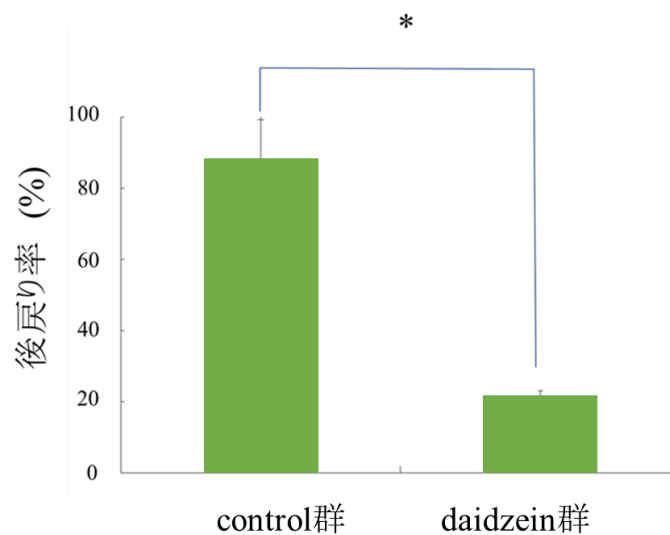


Fig. 8 歯の後戻り率の測定

21 日目の後戻り率は control 群で 86.6%, daidzein 群で 23.1%であり, daidzein 群は control 群と比較して, 有意に低い値を示した。* $p < 0.01$

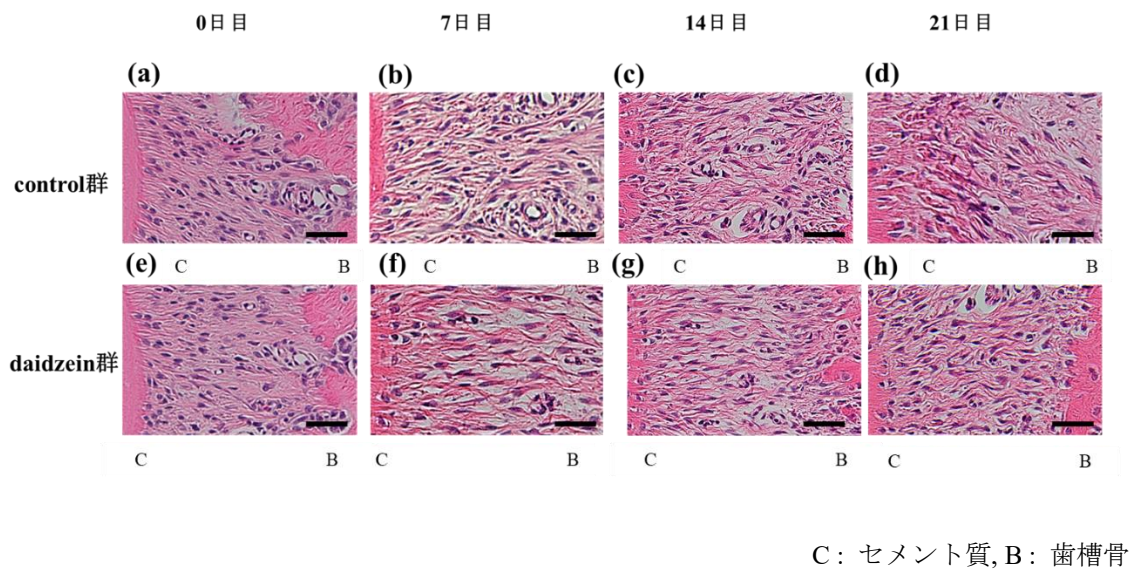


Fig. 9 牽引側歯根膜における組織形態学的変化 (H. E. ×400)

Daidzein 群の 14, 21 日目では, 比較的明瞭なコラーゲン線維が波状に走行していた (g, h)。

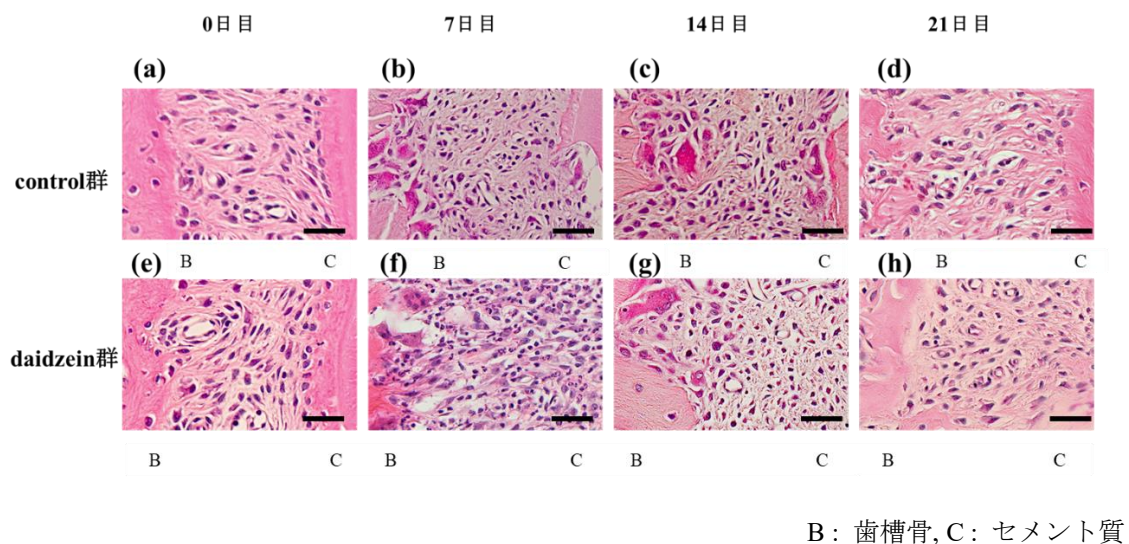
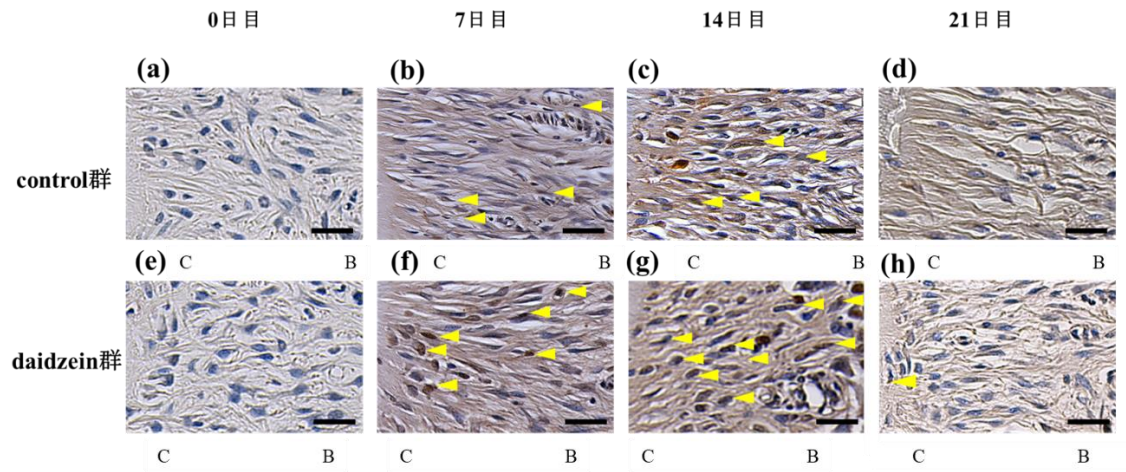


Fig. 10 圧迫側歯根膜における組織形態学的変化 (H. E. ×400)

Daidzein 群の 7 日目では, 歯槽骨表面において, 不規則な吸収窩に沿って多数の破骨細胞を認め, その後減少した (f, g, h)。

A.



C: セメント質, B: 歯槽骨

B.

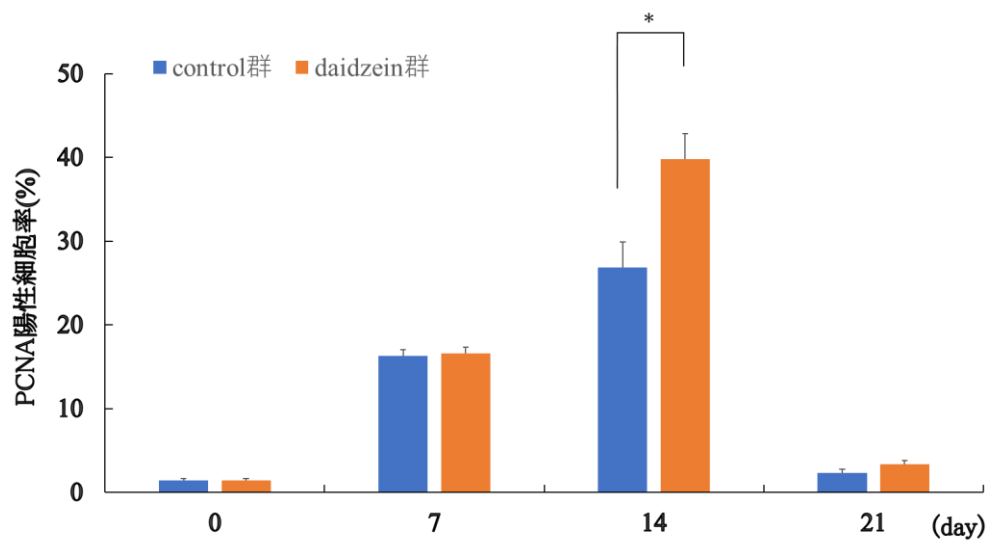
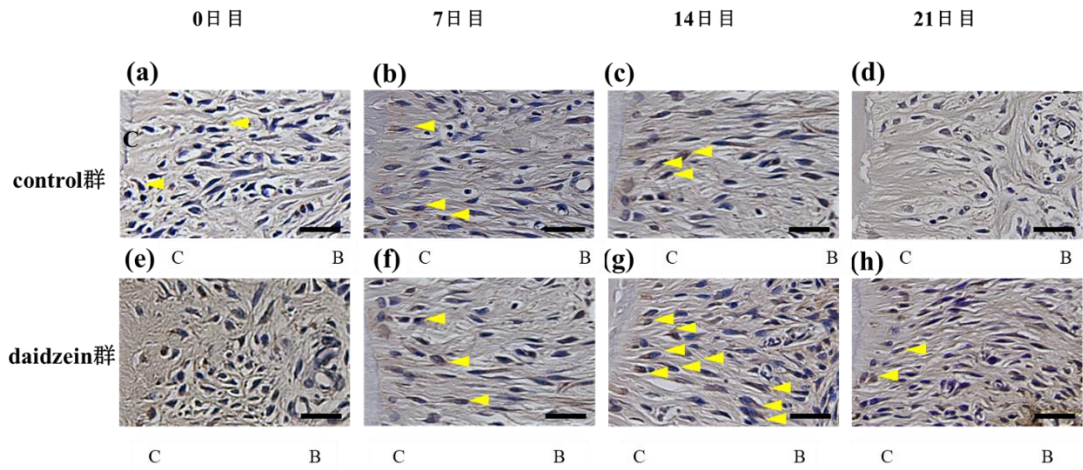


Fig.11 PCNA 免疫組織染色 (A) と陽性細胞率 ($\times 400$; B)

両群ともに 7, 14 日目で歯根膜中に PCNA 陽性細胞の発現を認めた (Fig. 11A-b, c, f, g)。14 日目において daidzein 群で PCNA 陽性細胞の有意な増加を認めた (Fig. 11B)。* $p < 0.05$

A.



C: セメント質, B: 歯槽骨

B.

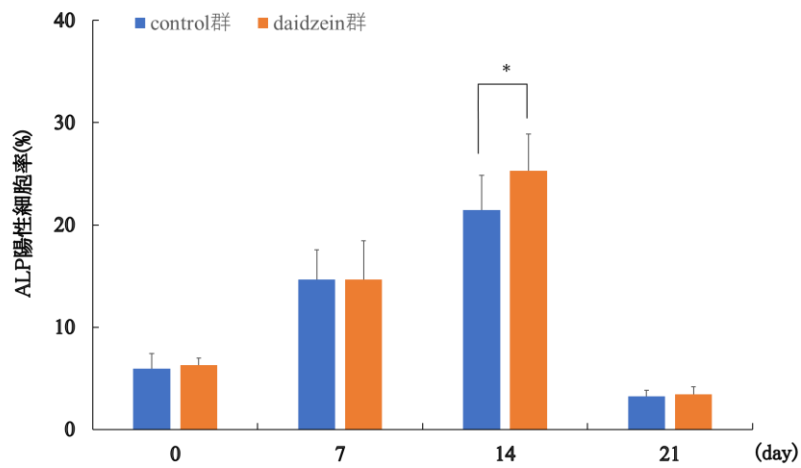
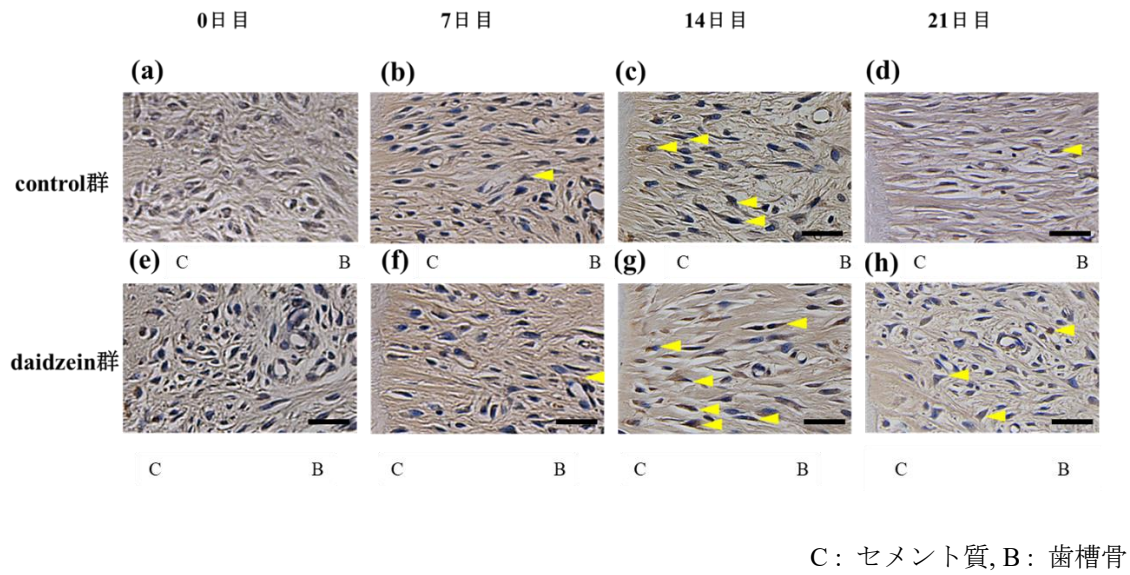


Fig.12 ALP 免疫組織染色 (A)と陽性細胞率 (×400; B)

両群ともに7, 14日目で歯根膜中にALP陽性細胞の発現を認めた (Fig. 12A-b, c, f, g)。14日目において daidzein 群でのALP陽性細胞の有意な増加を認めた (Fig. 12B)。* $p < 0.05$

A.



B.

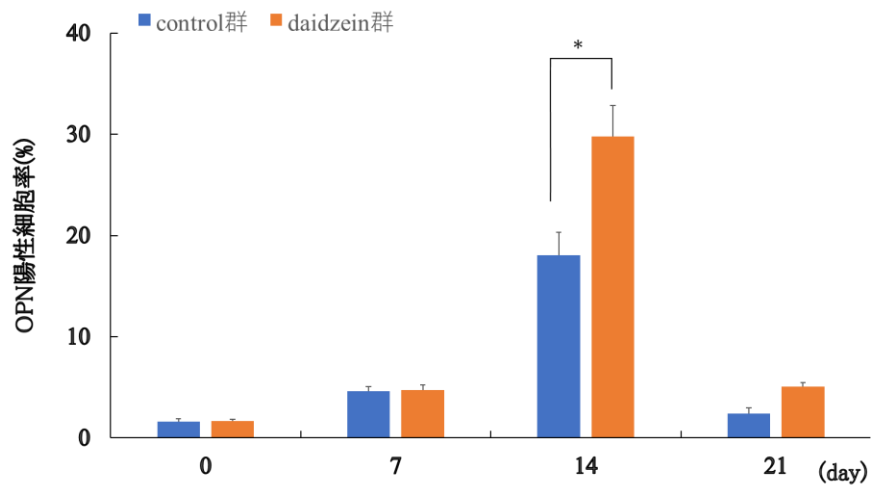
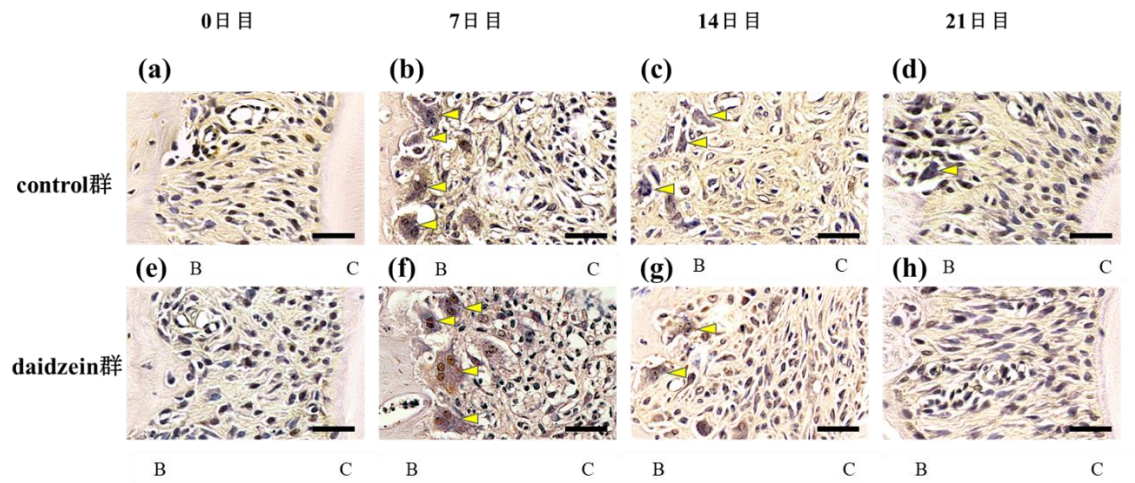


Fig.13 OPN 免疫組織染色 (A)と陽性細胞率 ($\times 400$; B)

両群ともに7, 14日目で歯根膜中に OPN 陽性細胞の発現を認めた (Fig. 13A-b, c, f, g)。14日目において daidzein 群での OPN 陽性細胞の有意な増加を認めた (Fig. 13B)。* $p < 0.05$

A.



B: 歯槽骨, C: セメント質

B.

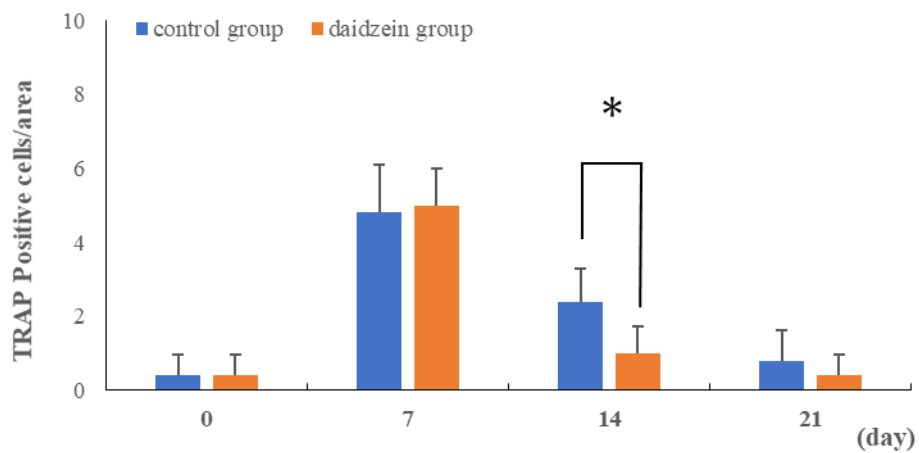
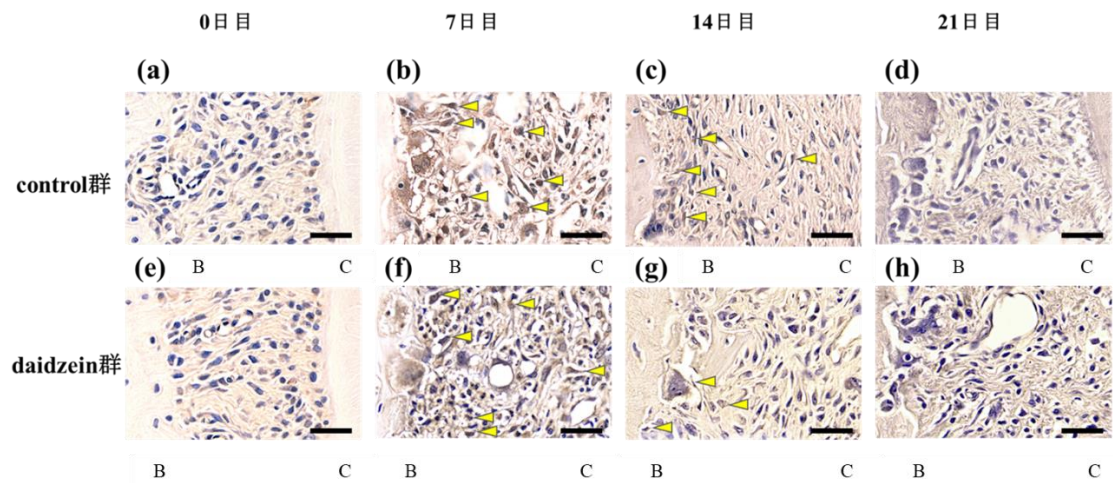


Fig.14 TRAP 免疫組織染色 (A)と陽性細胞数 ($\times 400$; B)

両群ともに7, 14日目で歯槽骨表面にTRAP陽性細胞の発現を認めた (Fig. 14A-b, c, f, g)。14日目においてcontrol群でのTRAP陽性細胞の有意な増加を認めた (Fig. 14B)。* $p < 0.05$

A.



B: 歯槽骨, C: セメント質

B.

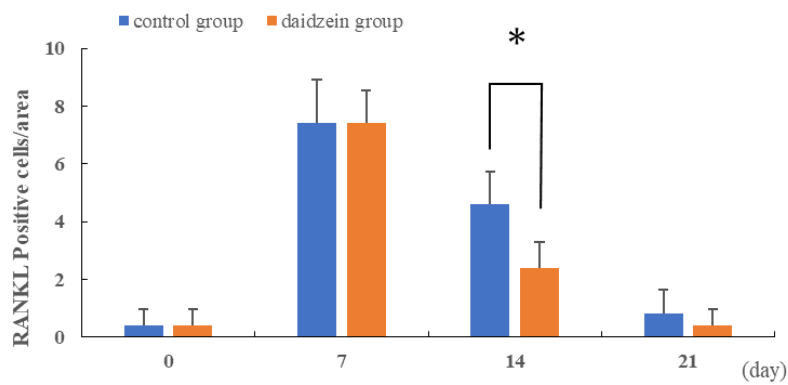
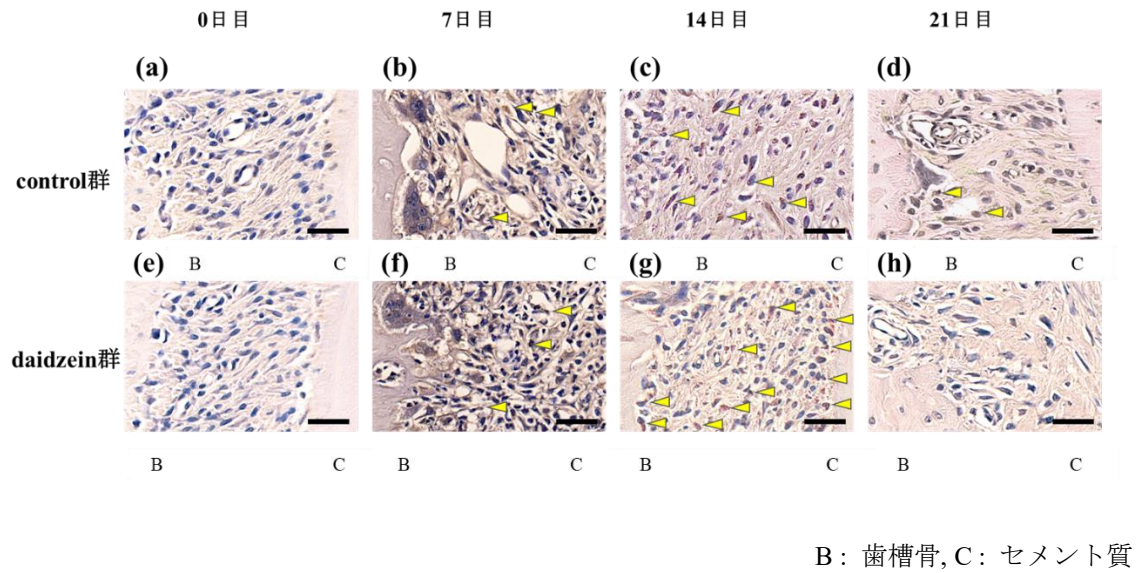


Fig.15 RANKL 免疫組織染色 (A)と陽性細胞数 (×400: B)

両群ともに7, 14日目で歯槽骨表面および歯根膜中に RANKL 陽性細胞の発現を認めた (Fig. 15A-b, c, f, g)。14日目において control 群での RANKL 陽性細胞の有意な増加を認めた (Fig. 15B)。* $p < 0.05$

A.



B.

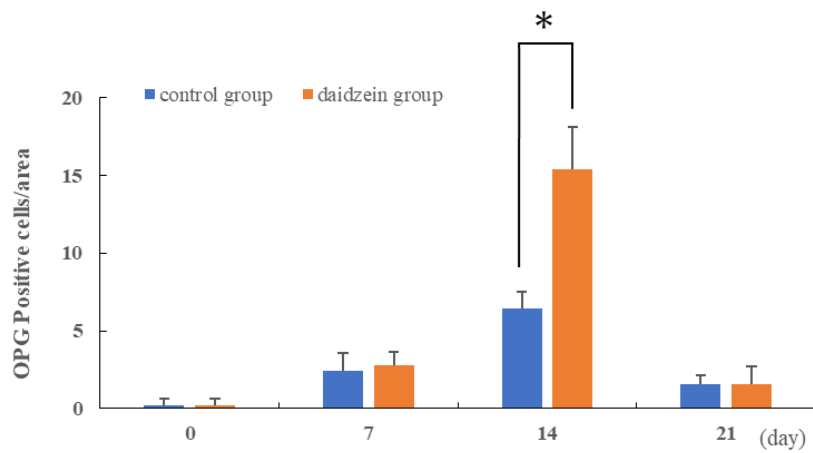
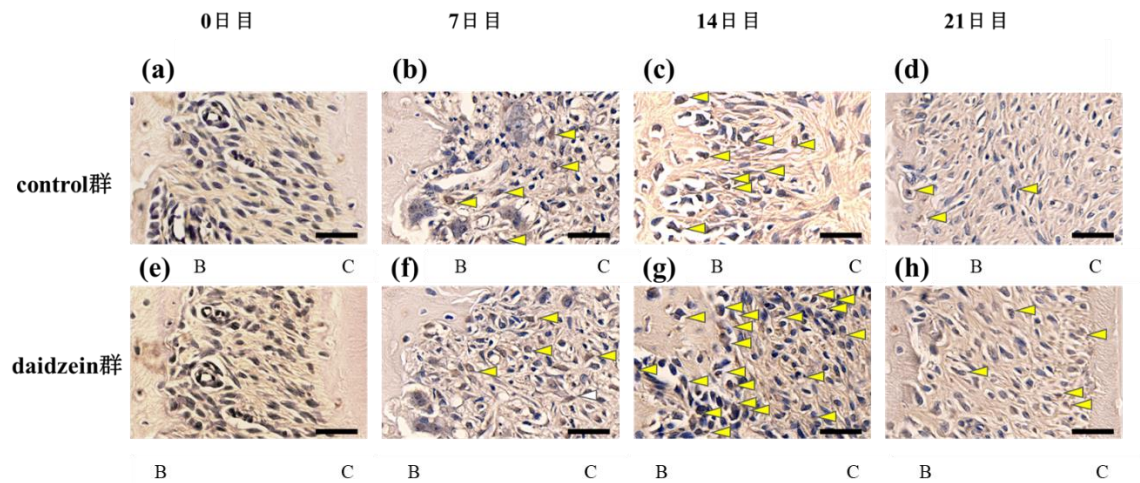


Fig.16 OPG 免疫組織染色 (A)と陽性細胞数 ($\times 400$; B)

両群ともに 7, 14 日目で歯槽骨表面および歯根膜中に OPG 陽性細胞の発現を認めた (Fig. 16A-b, c, f, g)。14 日目において daidzein 群での OPG 陽性細胞の有意な増加を認めた (Fig. 16B)。* $p < 0.05$

A.



B: 歯槽骨, C: セメント質

B.

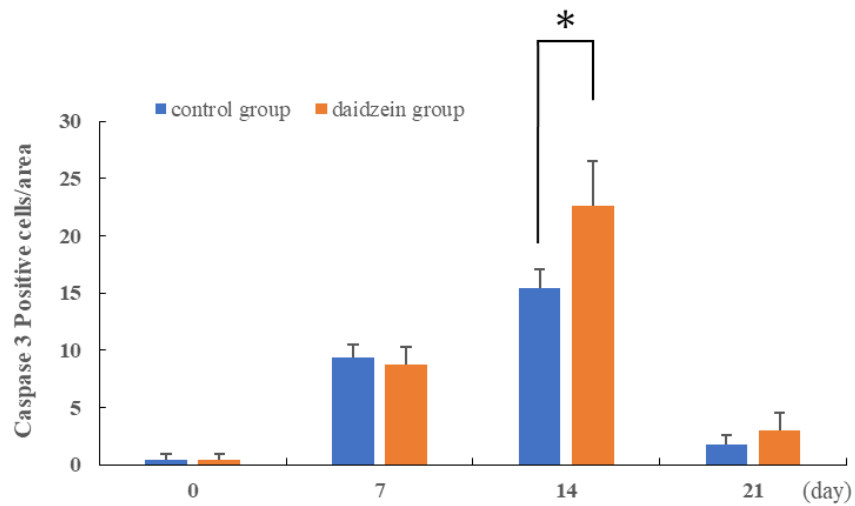


Fig.17 caspase 3 免疫組織染色 (A)と陽性細胞数 (×400; B)

両群ともに7, 14日目で歯槽骨表面および歯根膜中に caspase 3 陽性細胞の発現を認めた (Fig. 17A-b, c, f, g)。14日目において daidzein 群での caspase 3 陽性細胞の有意な増加を認めた (Fig. 17B)。* $p < 0.05$