

Vibration 刺激が歯科矯正学的歯の移動に及ぼす影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

堀籠 百合恵

(指導：葛西 一貴 教授)

本稿は、主となる参考論文 Vibration stimuli accelerate orthodontic tooth movement by TNF- α and activating cell cycles of PDL (*International Journal of Oral-Medical Sciences* 掲載予定 共著) および副となる参考論文 微振動刺激はヒト歯根膜細胞の TNF- α , PCNA, caspase 3 遺伝子発現を促進する (日大口腔科学 掲載予定 共著) をまとめたものである。

Abstract:

Introduction: The purpose of this study was to investigate the mechanism how vibration (VB) stimulus accelerate tooth movement.

Methods: Eleven-week-old male Wistar rats were divided into 2 groups: 10 g orthodontic force applied to the maxillary first molar (tooth movement : TM), force application plus applying VB stimulus (TM + VB). Both of groups, the first molars were moved mesially using spring force for 3 weeks. In the TM + VB group, the VB stimulus was applied occlusally applied for 8 minutes at the same time as force application. *In vivo* experiments were performed to determine investigate tooth movement and bone mineral density (BMD) of surrounding bone and the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis on the pressure side of the periodontal ligament (PDL) during experimental tooth movement with VB in rats, using an immunohistochemical analysis and the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method. Furthermore, under a continuous compression force (CF) with VB stimulus of human PDL (hPDL) cells *in vitro*, the gene expressions of TNF- α , PCNA, and caspase 3 were investigated in this study. CF was applied to cultured hPDL cells for the pressure condition during orthodontic tooth movement. CF with VB stimulus was defined as the CF + VB group. After incubation, cells were

collected at 0, 1, 3, 6, 9, 12, and 24 hours, extracted their RNAs, and subjected to quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in the CF and CF+VB group.

Cells without CF were treated as a control.

Results: The TM + VB group had increased tooth movement with decreased BMD around the first molars compared with the TM group on days 17 and 21. The ratios of TNF- α positive cells in the TM + VB group were increased on days 10, 14, 17 and 21 compared with the TM group. The ratios of PCNA positive cells in the TM + VB group were increased on days 14, 17 and 21 compared with the TM group, and the ratios of TUNEL positive cells in the TM + VB group were increased on days 17 and 21 compared with the TM group.

TNF- α and PCNA gene expressions peaked at 6 and 12 hours, respectively. Caspase 3 gene increased time-dependently. The gene expressions of TNF- α , PCNA and caspase 3 indicated higher levels in the CF + VB group compared to the CF group.

Conclusions: These findings suggest that VB stimulus during orthodontic tooth movement may cause inflammation, cell proliferation and apoptosis in PDL, and may be effective in accelerating orthodontic tooth movement and reducing the traditional orthodontic treatment time.

Key words: Vibration, Orthodontic tooth movement, Periodontal ligament, Cell proliferation, Apoptosis

緒言

歯科矯正学の進歩ならびに外科的矯正治療の普及により、歯列や顎の不正を矯正しようとする成人の患者数が増加している。矯正歯科治療は、審美性、口腔機能の改善および心理障害を改善することで、歯列不正の患者の生活の質を向上させることができる。しかしながら、成人患者は顎骨の成長・発育のコントロールに適切な時期が完了しており、矯正歯科治療単独では歯槽内部の歯の移動に限局されるため、治療目標の設定が制限される傾向がある。

さらに、成人の歯槽骨は若年者に比べて厚く、海綿骨が少なく、血液供給量が少ない。このため、歯の移動速度が緩慢になり、治療期間が長期化する [1] などの問題がある。矯正装置を長期に渡り装着することで齲蝕や歯周疾患のリスクも高くなり、治療中には痛みや不快感も生じる [2, 3]。歯科矯正学的歯の移動速度を促進し、治療期間の短縮が可能であれば、患者の不快感だけでなく、矯正歯科治療により引き起こされる歯や歯周組織の疾患を軽減することができる。

歯科矯正学的歯の移動は、歯根膜 (periodontal ligament : PDL)、歯肉、歯槽骨の改造現象によってもたらされる。これらの組織は咬合力によって引き起こされ

る荷重 (compression force : CF) という環境に常にさらされている。しかし、歯科矯正学的歯の移動は生理的歯の移動や萌出現象とは異なり、負荷した力の方向で PDL の反応により、歯槽骨の中を移動していく。PDL および歯槽骨は、歯冠に加えられた矯正力による抵抗中心を軸とした回転運動によって圧迫側と牽引側に分けられる。PDL は、圧迫と伸展を繰り返しつつその厚みを保ち、矯正歯科治療中の歯周組織の恒常性の維持に重要な役割を担っている。

Alikhani ら [4] は矯正歯科治療時に、歯に持続的な微振動 (vibration : VB) 刺激を与えることにより、炎症性サイトカイン発現の増強を介して破骨細胞形成が活発になり、骨密度 (bone mineral density : BMD) を減少させ、歯の移動速度が促進すると報告した。従って VB 刺激は、矯正歯科治療と組み合わせて適用できる非侵襲的な方法のひとつとして近年注目されているが、その生化学的なメカニズムについては未だ十分に解明されていない。歯の移動速度を促進させる他の方法として、微小骨穿孔術 (micro-osteoperforations : MOPs) が報告 [5,6] されている。Sugimori ら [6] は、MOPs が PDL において、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF) - α の発現を誘導し、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen : PCNA) の増加、およびアポトーシスの活性化を介し歯科矯正学的歯の移動速度を促進することを報告した。

本研究は矯正歯科治療中の VB 刺激が MOPs 同様, PDL において TNF- α の発現と増加, および細胞増殖とアポトーシスの活性化を介し歯科矯正学的歯の移動速度を促進させると仮説し, *in vivo* においてラットの実験的歯の移動時に VB 刺激を施し, 牽引歯の移動距離の測定と BMD の解析を行い, さらに圧迫側 PDL において病理組織染色にて形態観察と, 免疫組織化学的染色にて炎症性サイトカインと増殖細胞核抗原, およアポトーシス細胞の発現を検討した。また, *in vitro* においては CF を負荷したヒト PDL (hPDL) 細胞に VB 刺激を与え, TNF- α , PCNA およびアポトーシス関連因子である caspase 3 の遺伝子発現を quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法にて検討した。

資料および方法

In vivo

実験動物および飼育条件

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 AP17MD009-2 号) に準じて行った。実験には 11 週齢の Wistar 系雄性ラット (300 \pm 30 g) を合計 70 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。実験動物は無作為に tooth movement (TM) 時に VB 刺激を施した TM + VB 群と, VB 刺激を施さないコントロール群 (TM 群) の 2 群に分類した。矯正装置の装着および VB 刺激は, 三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.15 mg/kg, ミダゾラム 2 mg/kg, 酒石酸ブトルフェール 2.5 mg/kg, 生理食塩水 1.8625 mg/kg) を腹腔内注射し, 全身麻酔下で実施した。上顎左側第一臼歯の近心移動は Asano ら [7] の方法に従い, コイルスプリング (太さ : 0.005 inch, 直径 : 1/12 inch, Accurate Sales Co. Chiba, Japan) と上顎左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で行った。矯正力は Nakano ら [8] に従い 10 g とした。VB 刺激は Nishimura ら [9] の方法に従い, 上顎左側第一臼歯の咬合面に対して垂直方向から 60 Hz, 10 m/s² の VB 刺激を 8 分間, 牽引直後, および牽引 1, 4, 7, 10, 14, 17, 21 日後に行った。振動装置の先端は接着材でラットの第一臼歯に固定し作用させた。実験的歯の移動は合計 21 日間行った (Figs. 1-3B)。

歯の移動距離測定と BMD

牽引開始 1, 4, 7, 10, 14, 21 日後に *in vivo* micro-computed tomography (μ -CT) system (Rigaku- μ CT®, Tokyo, Japan) にて μ -CT 撮影を行った。撮影条件は管電圧 90 kv, 管電流 160 μ A, 17 秒 360 度回転とした。撮影した μ -CT 画像 (ボクセル解

像度 $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}$) にて牽引歯の移動距離測定を行った。移動距離は、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た。また、撮像された $\mu\text{-CT}$ 画像より、三次元骨梁構造計測ソフト TRI/3D-BON (Ratoc System engineering, Japan) を用いて、牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BMD (mg/cm^3) を計測した。関心領域 (region of interest : ROI) は、Cheung ら [10] の方法に従い、牽引歯の歯根周囲 1 mm 以内の歯槽骨とした。

標本作製

当該期間を経過したラットは、三種混合麻酔薬で深麻酔した後、生理食塩水と 10% 中性緩衝ホルマリンで灌流固定した。さらに上顎骨を剔出して、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、当該臼歯を横断方向厚さ $4 \mu\text{m}$ の薄切切片を作製し、各染色法を行った。染色された各陽性細胞の観察は Gonzales ら [11] の報告に従い、上顎第一臼歯遠心頬側の根分岐部より根尖へ $300 \mu\text{m}$ の圧迫側で行った。観察領域は Kawasaki ら [12] の報告に準拠し上顎第一臼歯遠心頬側根、根分岐部より近心根中心と遠心頬側根中心とを結んだ線と直行する線とでなす領域の近心部 1/4 の PDL とした (Fig. 4)。

病理組織染色法および免疫組織化学的染色法

ヘマトキシリン・エオジン重 (hematoxylin and eosin : H. E.) 染色は、試料の脱パラフィン後、通法に従った。免疫組織化学的染色は、試料の脱パラフィン後、通法に従い施行した。一次抗体には、抗 polyclonal TNF- α 抗体 (1:100, R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA), 抗 monoclonal PCNA 抗体 (PC10, 1:100, Cell Signal Technology, Inc. Tokyo, Japan) を用いた。各切片は、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。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。抗 TNF- α 抗体反応後に二次抗体として Histofine Simple Stain MAX-Po (G) kit (Nichirei, Co. Tokyo, Japan) を、抗 PCNA 抗体反応後に二次抗体として Histofine Simple Stain MAX-Po (Multi) kit (Nichirei, Co. Tokyo, Japan) を使用し、プロトコールに従い二次抗体反応を行った。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。

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法

アポトーシス細胞検出のための TUNEL 法は、試料の脱パラフィン後、TACS 2TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) を用いてプロトコールに従い染色を行った。

切片は脱パラフィン後、プロテナーゼ K を含む TBS 溶液中で 37°C にて 15 分間、3% 過酸化水素で 5 分間インキュベーションした後、蒸留水で洗浄した。この切片を terminal deoxynucleotide transferase (TdT)、ビオチン化 dUTP にて 37°C にて 1 時間インキュベーションした後、streptavidin-horseradish peroxidase (Strep-HRP) にて処理し、DAB にてアポトーシス細胞を発色後、1% methyl green にて対比染色を行った。

細胞陽性率

染色された切片の PDL 圧迫側観察部位範囲から無作為に強拡大で 5 視野撮映し、全紡錘形細胞数と各陽性細胞数を計測した。Sato ら [13] の方法に従い以下の式で陽性率を算出した:

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

In vitro

細胞培養

日本大学松戸歯学部附属病院の矯正歯科に来院した患者 (女性3人, 男性3人, 16-20歳) の抜去した小臼歯より PDL (n=6) を採取した。hPDL を, Somerman ら [14] の方法に従い分離培養し, Takano ら [15] の方法を用いて α -MEM (Wako, Osaka, Japan) に 10% ウシ胎児血清 (FBS; Cell Culture Laboratories, OH, USA), 100 μ g/ml ペニシリン-G (Sigma Chemical Co, MO, USA), 0.3 μ g/ml アムホテリシン B (Flow Laboratories, OH, USA) および 50 μ g/ml の硫酸ゲンタマイシン (Sigma) を混合した培地で 5-7 代目まで継代した。培養は, 大気 95%, 二酸化炭素 5% の存在下, 加湿インキュベーター (Forma CO2 incubator MIP-3326; Sanyo Electric Medical System Co, Tokyo, Japan) にて 37°C で行った。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 EC18-026 号) に基づき承認を得て, インフォームドコンセントを得た患者に実施した。

持続的圧迫力の適用と VB 刺激モデル

歯科矯正学的歯の移動時の至適矯正力圧迫側条件を再現するために, 本研究では Yamaguch ら [16] の方法にて培養細胞に持続的な圧迫力を加えた。まず,

hPDL 細胞を 100 mm 細胞培養皿に播種し, 37°C, 5% 二酸化炭素の存在下にて, 10% FBS を含む α -MEM 中で培養した。一晚インキュベーションした後, 細胞がコンフルエントに達したことを確認し, 10% FBS から 1% FBS を含有する α -MEM 培地に変更した。hPDL 細胞上に, 直径 80 mm マイクロカバーガラス (Matsunami Glass Ind. Ltd, Osaka, Japan) を乗せ, さらに分銅を用い, 1.0 g/cm² の CF を負荷したものを至適矯正力圧迫側モデルとした。CF に加え, VB 刺激を与えた群を CF + VB 群とした。VB 刺激は, Zhang ら [17] の方法に従い, GJX-5 (Beijing Sending Technology, Beijing, China) を用いて, 加速度 0.3 g, 周波数 60 Hz の振動を 20 分間, CF の負荷と同時に与えた (Fig. 5)。また, CF を負荷せずカバーガラスのみ乗せたものを対照群 (control 群) とした。CF 群, CF + VB 群, および control 群の各群を 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間インキュベーション後に細胞を回収した。

qRT-PCR

RNeasy® Mini kit (QIAGEN Co. Maryland, USA) を用いて RNA を hPDL 細胞から抽出し, 逆転写反応した後, qRT-PCR を実施した。Prime Script RT Reagent Kit (Takara Co, Shiga, Japan) と SYBER Premix Ex Taq (Takara Co.) を用いてサーマルサイクラー (TP-800 Thermal Cycler Dice; Takara) にて qRT-PCR を行った [15]。

使用したプライマーを Table 1 に示す。

統計処理

移動距離, BMD および細胞陽性率は, 各群平均値と標準偏差を求めた。GAPDH 遺伝子発現量に対する TNF- α , PCNA, caspase 3 の遺伝子発現量の割合は, それぞれ Relative Quantity として算出した。移動距離, BMD, 細胞陽性率および, 遺伝子発現量の差の統計分析は, 解析ソフトである JMP® (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い, Mann-Whitney U 検定を用いて行った。有意水準は $P < 0.05$ および $P < 0.01$ とした。

結果

In vivo

歯の移動距離

牽引歯の移動距離は TM 群と比較し TM + VB 群では, いずれの計測日においても大きい傾向にあり, 牽引 17, 21 日後では有意な差として認められた (Fig. 6)。

BMD

BMD は TM 群および TM + VB 群共に、牽引後 10 日まで低下し、それ以降の低下量は緩慢となった。TM + VB 群の牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BMD は TM 群と比較し、いずれの計測日においても低い傾向にあり、牽引 10 日以降では有意差を認めた (Fig. 7)。

病理組織所見 (H. E. 染色)

牽引後 1 日目、両群とも線維性結合組織と線維芽細胞の不規則な走行が認められ、また TM + VB 群においては破骨細胞とそれに伴う骨吸収窩も認められた。7 日目以降、TM 群にも骨吸収窩を認めたが、TM + VB 群に比べわずかな吸収が観察された。また、TM + VB 群は TM 群と比較し、14, 21 日目に多数の骨吸収窩が認められた (Fig. 8)。

免疫組織化学的所見

圧迫側 PDL における TNF- α 陽性細胞は、TM 群において時間依存的に減少傾向を示し、TM + VB 群では時間依存的に増加傾向を示した。TM + VB 群は、TM 群と比較し 10, 14, 17, 21 日目に有意に高値であった (Fig. 9)。PCNA 陽性細胞は、TM 群において牽引後 10 日目にピークを示し、その後減少したが、TM + VB

群では 21 日目まで増加傾向を示した。また, TM + VB 群は, TM 群に比べ 14, 17, 21 日目に有意に高値であった (Fig. 10)。アポトーシス細胞は, TM + VB 群, TM 群共に時間依存的に増加したが, TM + VB 群は, TM 群と比較し 17, 21 日目に有意に高値であった (Fig. 11)。

In vitro

CF 群および CF + VB 群の TNF- α 遺伝子発現量は, 共に 12 時間でピークを示した。また, CF + VB 群は CF 群と比較し 1, 6, 9, 12 時間後に有意な増加を認めた (Fig. 12)。

PCNA の遺伝子発現量は, CF + VB 群が CF 群と比較し 6, 9, 12 時間後に有意に増加し, 遺伝子発現量のピークは 6 時間であった (Fig. 13)。

Caspase 3 の遺伝子発現量は, CF + VB 群が CF 群と比較し, 6, 9, 12, 24 時間後に有意に増加し, 遺伝子発現量は 24 時間後まで増加した (Fig. 14)。Control 群では TNF- α , PCNA および caspase 3 の mRNA 発現に大きな変化は認められなかった (Figs. 12-14)。

考 察

Phusuntornsakul ら [18] は、圧迫力を加えた hPDL 細胞において VB 刺激が cyclooxygenase (COX) 経路を介し、炎症性サイトカインである interleukin (IL) -6, IL-8 を増加させると報告している。また、Benjakul ら [19] は *in vitro* において hPDL 細胞が VB 刺激によって産生される炎症性サイトカインを介し、破骨細胞の形成が促進され、骨吸収が活性化することを報告している。また、TNF- α 受容体が欠損したノックアウトマウスでは歯の移動速度が低下したと報告 [20] されている。本研究でも、VB 刺激により *in vivo* でのラット実験モデルの PDL において TNF- α 陽性細胞の増加と歯根周囲歯槽骨の骨密度の減少が認められ、また *in vitro* での圧迫モデルの hPDL においても TNF- α 遺伝子発現量の増加が認められた。これらのことから、圧迫力が加えられた PDL は VB 刺激により炎症反応が活性化され、炎症性ケミカルメディエーターを介して骨吸収が活発になる可能性が考えられた。TNF- α は、炎症反応において早期に発現し、IL-6 や IL-8 等、他の炎症性サイトカインを誘発する。Krishnan ら [21] は、矯正力を加えた直後 PDL が圧縮され、歯の移動速度は急速に促進するが、その後緩慢になり、PDL が硝子化し、基質化が完了すると歯の移動速度は再度促進することを報告している。本研究において、TNF- α 遺伝子発現量は 1 時間後に急速に増加しているが、その後 12 時間後まで緩慢に増加している。CF および VB 刺激を施した

hPDL 細胞は炎症反応として TNF- α を急速に増加させ、その後歯科矯正学的歯牙移動時と同じメカニズムで緩慢に増加した可能性が考えられた。

McCulloch ら [22] は、PDL 細胞は細胞増殖と細胞死の平衡を保つことによって、恒常性を維持していると報告し、Mabuchi ら [23] は、PDL 細胞はメカニカルストレスを加えると、細胞増殖は活発になり、その後アポトーシスによる細胞死も活発になると報告した。また、Oue ら [24] は PCNA が細胞周期における G1 期および S 期に上昇する細胞周期関連タンパク質であり、細胞増殖マーカーとして有用であると報告している。*In vitro* の結果において、PCNA 遺伝子発現量は、6 時間後にピークに達し、アポトーシス関連遺伝子である caspase 3 は 6 時間以降に有意に増加を認めた。本研究において、PCNA 遺伝子発現量は 6 時間をピークに減少しているが、PDL 細胞における細胞増殖と細胞死の平衡性を保つため、細胞周期の活性には他の因子が複数関与していると考えられる。Funakoshi ら [25] は PDL 細胞に持続的な圧迫力を加えると細胞周期が活発化することを報告している。さらに、Thammasitboon ら [26] は、PDL 細胞において、炎症反応時に TNF- α を介して、アポトーシスを誘発させると報告している。これらのことから、歯科矯正学的歯の移動は、PDL 細胞のアポトーシスと同時に PDL 細胞増殖を亢進することで PDL のターンオーバーを活性化することが重要であると考えられる。*In vivo* においても、ラットの歯の移動時に MOPs を併用することで PDL の

アポトーシスと細胞増殖はさらに活性化され、歯科矯正学的歯の移動速度が促進すると報告 [6] されている。本研究の結果から、ラット実験モデルの PDL において VB 刺激によりアポトーシス細胞と細胞増殖に関連する PCNA 陽性細胞の有意な増加が、また圧迫モデルの hPDL においても VB 刺激によりアポトーシスに関連する caspase 3 の遺伝子発現と、細胞増殖に関する PCNA 遺伝子発現が共に有意に増加されることがわかった。以上の結果から、VB 刺激は MOPs 同様に炎症反応を増強させ歯根膜細胞の増殖とアポトーシスを亢進することでターンオーバーを促し、歯科矯正学的歯の移動速度を促進することが示唆された。実際に VB 刺激による歯科矯正学的歯の移動速度の促進を臨床応用するためには、さらなるメカニズムの解明と、歯根吸収およびその他の偶発症のリスクについての検討が必要である。

結 論

歯科矯正学的歯の移動時における VB 刺激を検討した結果、以下の結論を得た。

1. 歯の移動距離はいずれの計測日においても大きい傾向にあり、牽引 17 および 21 日後に TM + VB 群では TM 群と比較し有意差を認めた。

2. 牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BMD において TM + VB 群は TM 群と比較し、いずれの計測日においても低い傾向にあり、牽引 10 日以降に有意に低値であった。

3. 圧迫側 PDL における TNF- α 陽性細胞は、TM+VB 群は TM 群に比べ、牽引 10 日以降に有意に高値であり、21 日目まで増加傾向を示した。PCNA 陽性細胞は、TM+VB 群は TM 群と比較し牽引 14 日以降に有意に高値であり、21 日後まで増加傾向を示した。アポトーシス陽性細胞では、TM+VB 群および TM 群共に時間依存的に増加したが、TM + VB 群は TM 群と比較し牽引 17 日以降に有意に高値であった。

4. CF を負荷した hPDL 細胞において、TNF- α 遺伝子発現量は、CF + VB 群では CF 群と比較し、CF および VB 刺激後 1, 6, 9 ならびに 12 時間で有意に高値であった。PCNA の遺伝子発現量は、CF + VB 群では CF 群と比較し、6, 9 ならびに 12 時間後に有意に高値であった。Caspase 3 の遺伝子発現は、CF + VB 群では CF 群と比較し、6, 9, 12 ならびに 24 時間後に有意に高値であった。

以上のことより、歯科矯正学的歯の移動時における VB 刺激は、PDL における炎症反応を増強させ、アポトーシスと細胞増殖を共に亢進することでターンオーバーを促し、歯の移動距離を増大させた。従って、VB 刺激を歯科矯正装置と併用することで矯正歯科治療の期間を短縮する可能性があることが示唆された。

参考文献

1. Alfawal AM, Hajeer MY, Ajaj MA, et al.: Effectiveness of minimally invasive surgical procedures in the acceleration of tooth movement: a systematic review and meta-analysis. *Prog Orthod*, 17: 33-35, 2016.
2. Jones M, Chan C: The pain and discomfort experienced during orthodontic treatment: a randomized controlled clinical trial of two initial aligning arch wires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 102: 373-381, 1992.
3. Fujiyoshi Y, Yamashiro T, Deguchi T, et al.: The difference in temporal distribution of c-Fos immunoreactive neurons between the medullary dorsal horn and the trigeminal subnucleus oralis in the rat following experimental tooth movement. *Neurosci Lett*, 283: 205-208, 2000.
4. Alikhani M, Alansari S, Hamidaddin MA, et al.: Vibration paradox in orthodontics: Anabolic and catabolic effects. *PLoS One*, 13: 13-31, 2018.
5. Alikhani M, Raptis M, Zoldan B, et al.: Effect of micro-osteoperforations on the rate of tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 144: 639-648, 2013.
6. 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*, 154: 788-796, 2018.

7. Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, et al.: IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. *Oral Dis*, 17: 489-498, 2011.
8. Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, et al.: 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.
9. Nishimura M, Chiba M, Ohasi M, et al.: Periodontal tissue activation by vibration: Intermittent stimulation by resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 133: 572-583, 2008.
10. Cheung T, Park J, Lee D, et al.: Ability of mini-implant-facilitated microosteoperforations to accelerate tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 150: 958-967, 2016.
11. Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, et al.: Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod*, 78: 502-509, 2008.
12. Kawasaki K, Shimizu N: Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med*, 26: 282-291, 2000.

13. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, et al.: Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis*, 16: 263-268, 2010.
14. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, et al.: A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J Dent Res*, 67: 66-70, 1988.
15. Takano M, Yamaguchi M, Nakajima R, et al.: Effects of relaxin on collagen type I released by stretched human periodontal ligament cells. *Orthod Craniofac Res*, 12: 282-288, 2009.
16. Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, et al.: RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res*, 85: 751-756, 2006.
17. Zhang C, Li J, Zhang L, et al.: Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells, *Arch Oral Biol*, 57: 1395-1407, 2012.
18. Phusuntornsakul P, Jitpukdeebodindra S, Pavasant P, et al.: Vibration enhances PGE₂, IL-6, and IL-8 expression in compressed hPDL cells via cyclooxygenase pathway. *J Periodontol*, 89: 1131-1141, 2018.

19. Benjakul S, Jitpukdeebodindra S, Leethanakul C: Effects of lowmagnitude high frequency mechanical vibration combined withcompressive force on human periodontal ligament cells *in vitro*. Eur J Orthod, 40: 356-363, 2018.
20. Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, et al.: Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. J Bone Miner Metab, 24: 20-27, 2006.
21. Krishnan V, Davidovitch Z: Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 129: 469, 2006.
22. McCulloch CA, Barghava U, Melcher AH: Cell death and the regulation of populations of cells in the periodontal ligament. Cell Tissue Res, 255: 129-138, 1989.
23. Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M: Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. J Periodontal Res, 37: 118- 124, 2002.
24. Oue T, Fukuzawa M, Kamata S, et al.: Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen expression in human neuroblastoma. J Pediatr Surg, 30: 528-532, 1995.

25. Funakoshi M, Yamaguchi M, Asano M, et al.: Effect of compression force on apoptosis in human periodontal ligament cells. *J Hard Tissue Biol*, 22: 41-50, 2013.
26. Thammasitboon K, Goldring SR, Boch JA: Role of macrophages in LPS-induced osteoblast and PDL cell apoptosis. *Bone*, 38: 845-852, 2006.

Table

Table 1 プライマーの塩基配列

TNF- α : Forward: 5'-GACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTA-3' Reverse: 5'-CAGCCTTGGCCCTTGAAGA-3'
PCNA : Forward: 5'-GGCCGAAGATAACGCGGATAC-3' Reverse: 5'-ACCACTTAAACGTGCATATACGG-3'
Caspase 3 : Forward: 5'-AAGGCAGAGCCATGGACCAC-3' Reverse: 5'-CTGGCAGCATCATCATCCACACATAC-3'
GAPDH : Forward: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' Reverse: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

TNF- α , PCNA, caspase 3 および GAPDH のプライマーの塩基配列を Takano ら [15] に従って設計した。

Figures

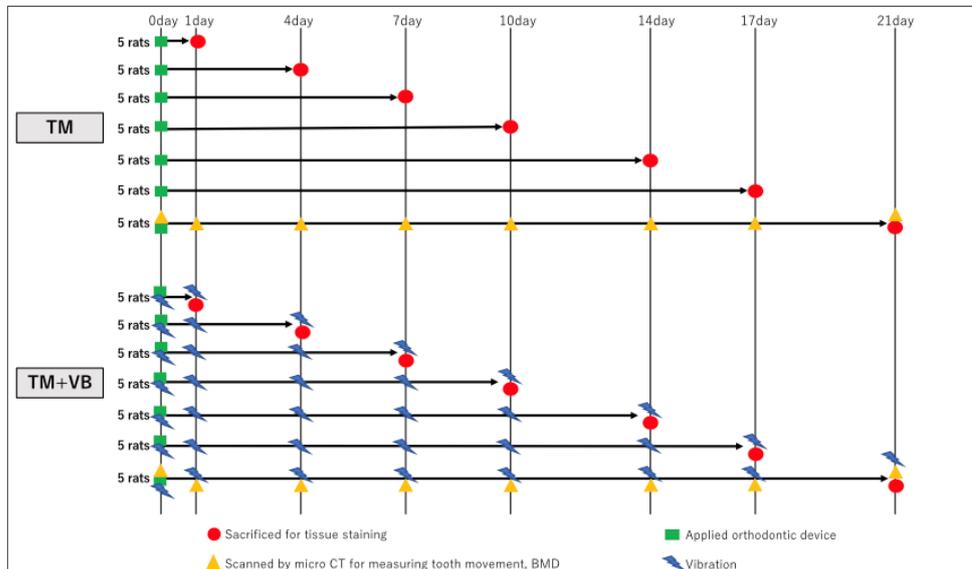
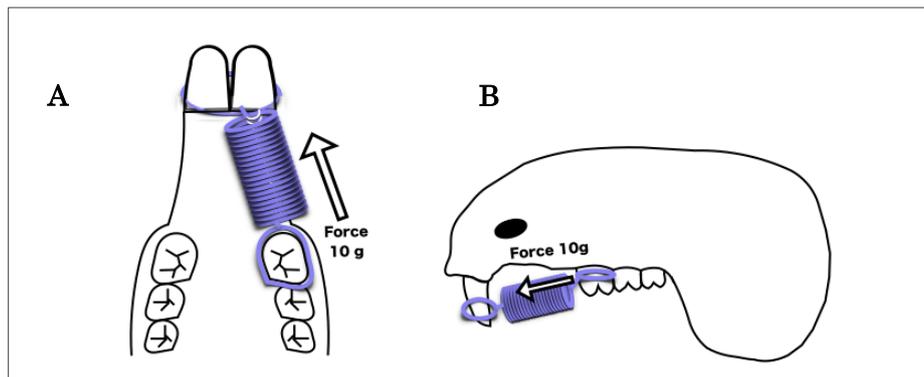


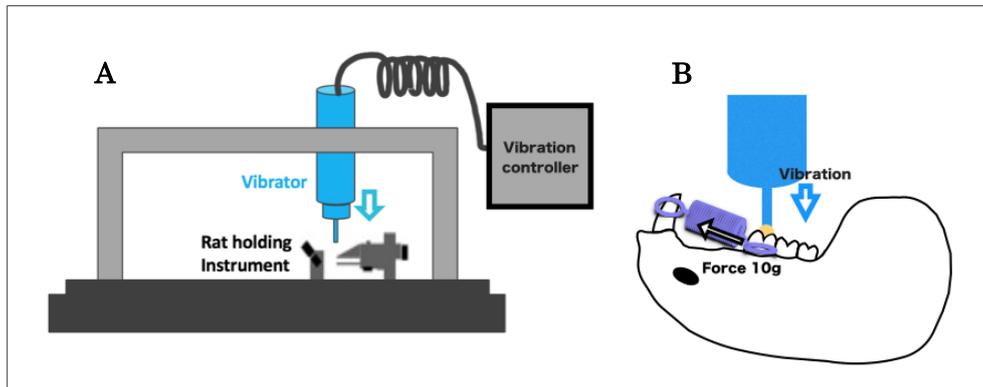
Fig. 1 *In vivo* 実験スケジュール

実験動物は無作為に tooth movement (TM) 群と vibration (VB) 刺激を施した TM + VB 群に分類した。牽引開始 1, 4, 7, 10, 14, 21 日後に *in vivo* micro-computed tomography (μ -CT) system (Rigaku- μ CT®, Tokyo, Japan) にて μ -CT 撮影を行い、上顎骨を剔出した。



Figs. 2 コイルスプリング装着および実験的歯の移動 (A: 水平断, B: 矢状断)

上顎左側第一臼歯をコイルスプリングと上顎左側第一臼歯をステンレススチールの結紮線で結び、コイルスプリングの他方を前歯と結び、10 g の矯正力で近心移動を行った。



Figs. 3

A: *In vivo* における VB 刺激装置

B: *In vivo* における VB 刺激モデル

上顎左側第一臼歯の咬合面に対して垂直方向から 60 Hz, 10 m/s² の VB 刺激を 8 分間, 牽引直後, および牽引 1, 4, 7, 10, 14, 17, 21 日後に作用した。その際, 振動装置の先端を接着材にてラットの第一臼歯に固定し作用させた。

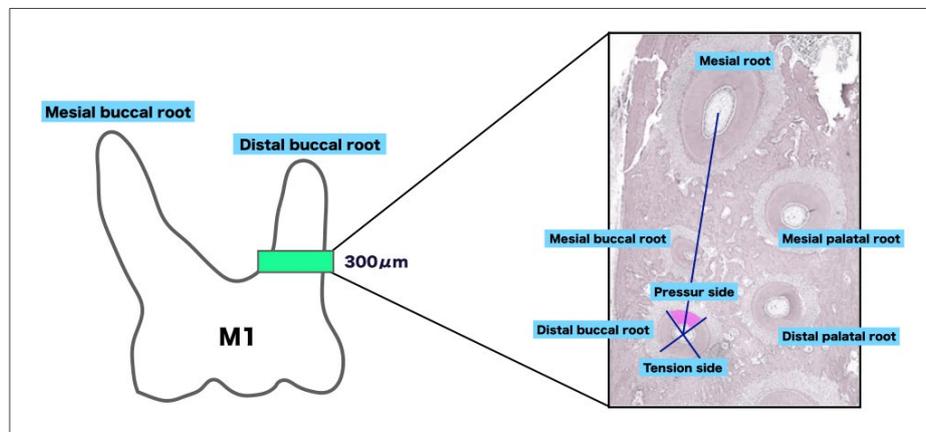


Fig. 4 標本作成と観察領域

パラフィン包埋ブロックを作製後,横断方向厚さ 4 μm の薄切切片を作製し, 各染色法を行った。染色された各陽性細胞の観察は, 上顎第一臼歯遠心頬側の根分岐部より根尖へ 300 μm の圧迫側で行った。観察領域は上顎第一臼歯遠心頬側根、根分岐部より近心根中心と遠心頬側根中心とを結んだ線と直行する線とでなす領域の近心部 1/4 の歯根膜 (periodontal ligament : PDL) とした。

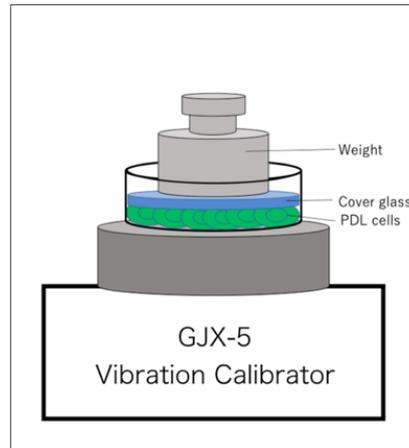


Fig. 5 *In vitro* における VB 刺激装置および荷重 (CF : compression force) + VB 刺激モデル

ヒト PDL (human PDL : hPDL) 細胞上に、直径 80 mm マイクロカバーガラス (Matsunami Glass Ind. Ltd, Osaka, Japan) を乗せ、さらに分銅を用い、 1.0 g/cm^2 CF を負荷し、さらに GJX-5 (Beijing Sending Technology, Beijing, China) を用いて、加速度 0.3 g 、周波数 60 Hz の振動を 20 分間の VB 刺激を同時に与えた。

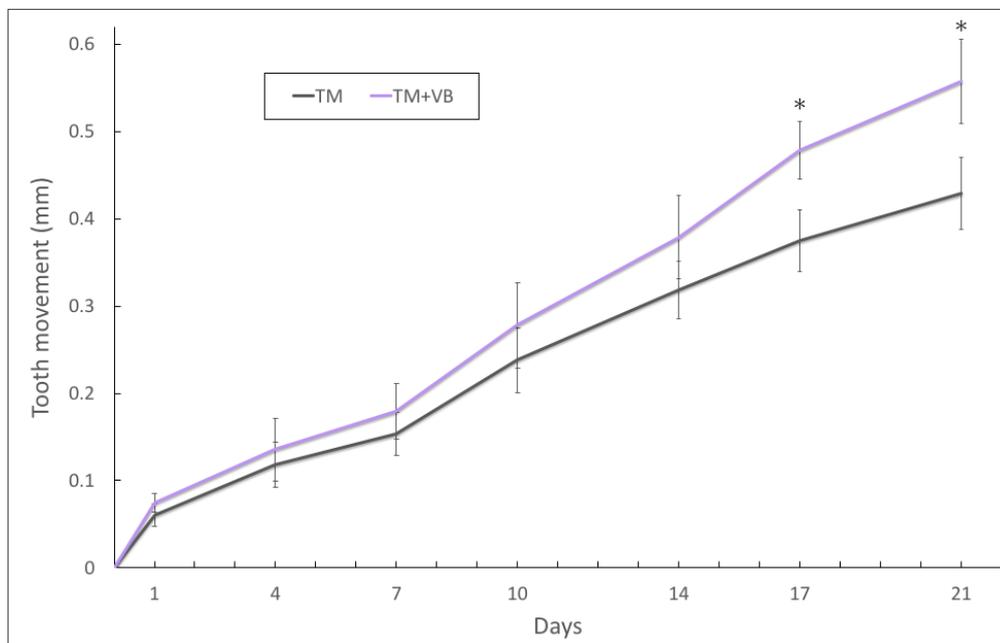


Fig. 6 歯の移動距離の経時的変化

牽引歯の移動距離は TM+VB 群では TM 群と比較し、いずれの計測日においても高値であり、牽引 17, 21 日後に有意に高値であった。* $P < 0.01$

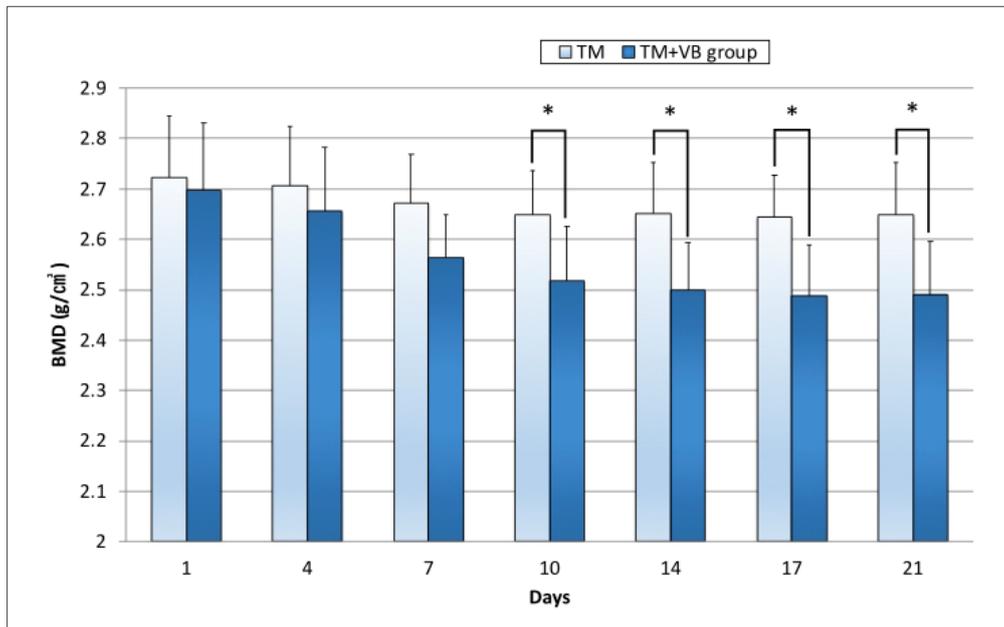


Fig. 7 骨密度 (BMD : bone mineral density) の経時的変化

TM + VB 群の牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BMD は TM 群と比較し、牽引 10, 14, 17, 21 日後に有意差を認めた。* $P < 0.05$

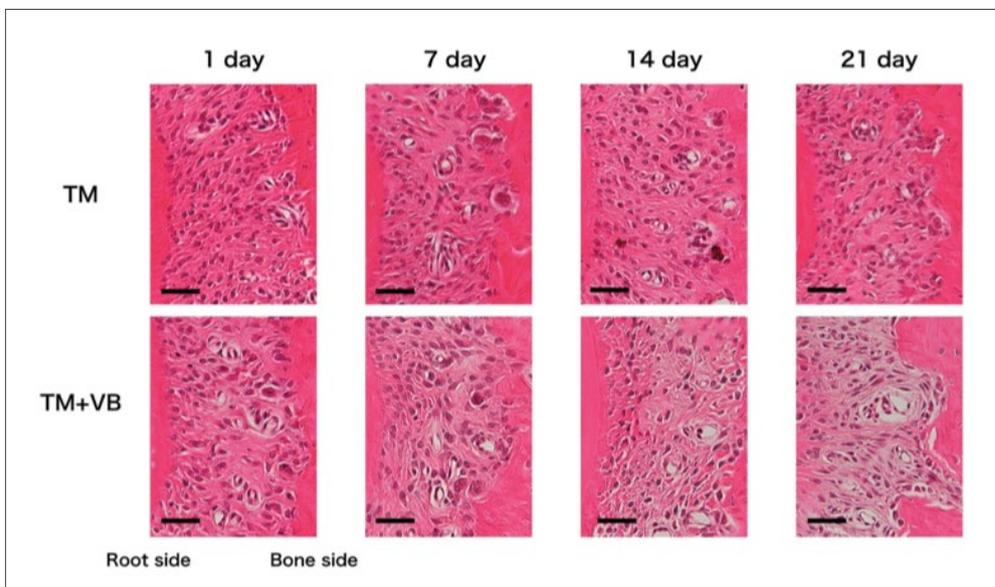


Fig. 8 病理組織染色像の経時的変化 (H. E. 染色, $\times 200$, $50 \mu\text{m}$)

歯の移動における圧迫側の歯周組織の組織学的変化を観察しました。TM + VB 群は TM 群と比較し、14, 21 日目に多数の骨吸収窩が認められた。

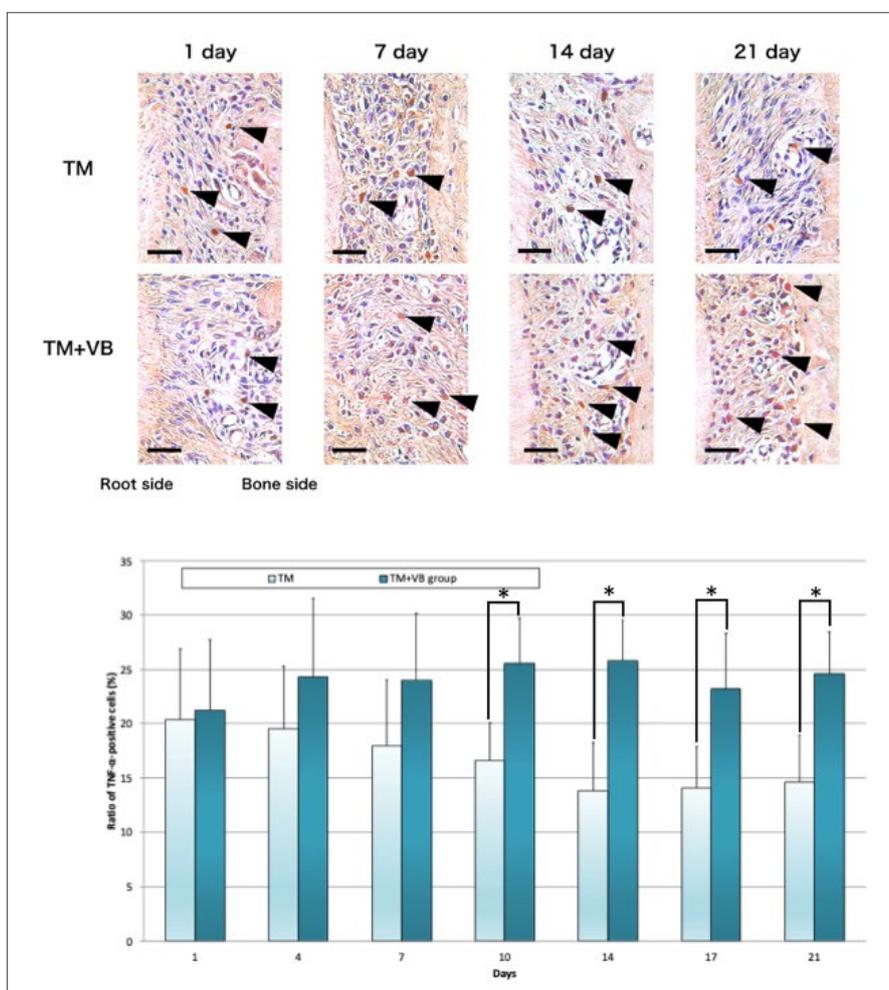


Fig. 9 免疫組織化学的染色の経時的変化 (Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), $\times 200$, bar : 50 μm)

圧迫側 PDL における TNF- α 陽性細胞は, TM + VB 群は, TM 群と比較し 10, 14, 17, 21 日目に有意に高値であった。* $P < 0.05$.

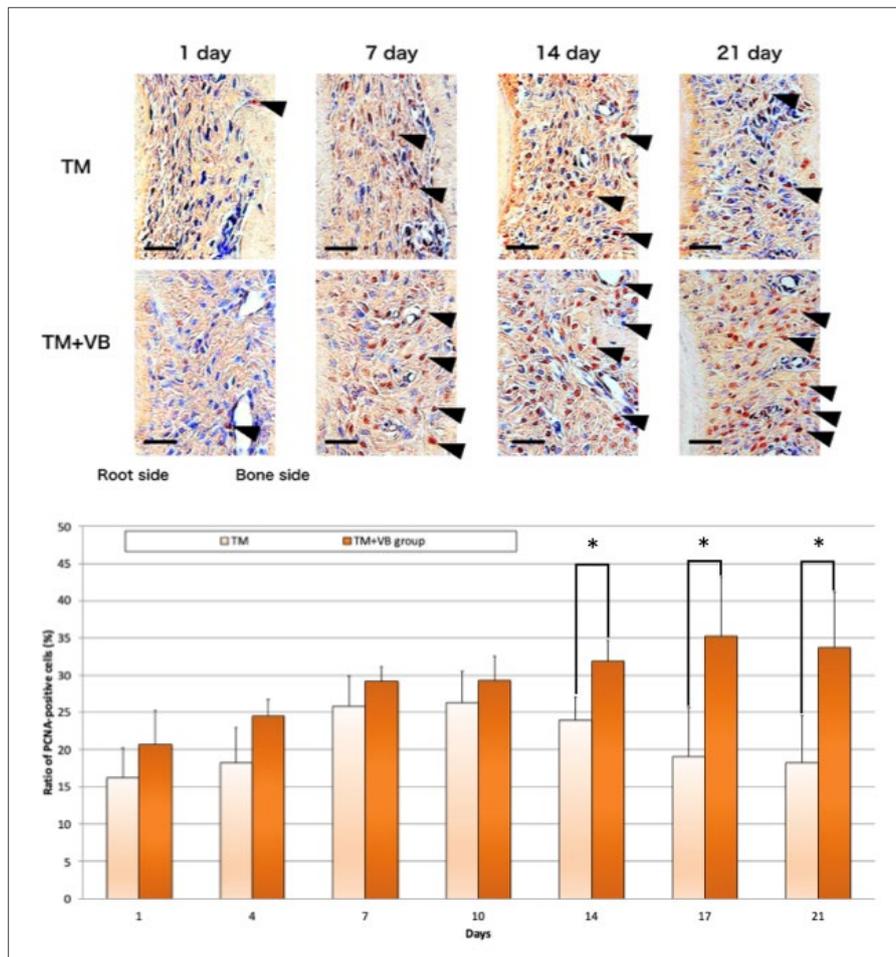


Fig. 10 免疫組織化学的染色を経時的変化 (Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), $\times 200$, bar : 50 μm)

PCNA 陽性細胞は, TM + VB 群は, TM 群に比べ 14, 17, 21 日目に有意に高値であった。* $P < 0.01$.

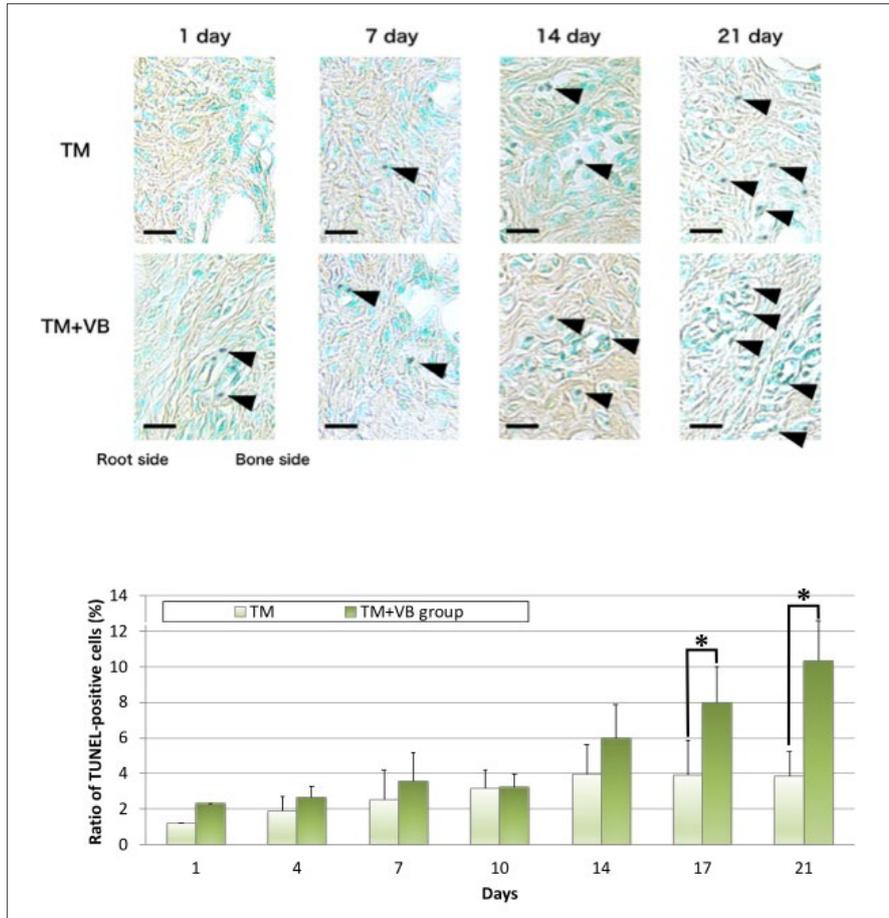


Fig. 11 免疫組織化学的染色を経時的変化 (TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), $\times 200$, bar : 50 μm)

アポトーシス細胞は, TM+VB 群, TM 群共に時間依存的に増加したが, TM+VB 群は, TM 群と比較し 17, 21 日目に有意に高値であった。* $P < 0.05$.

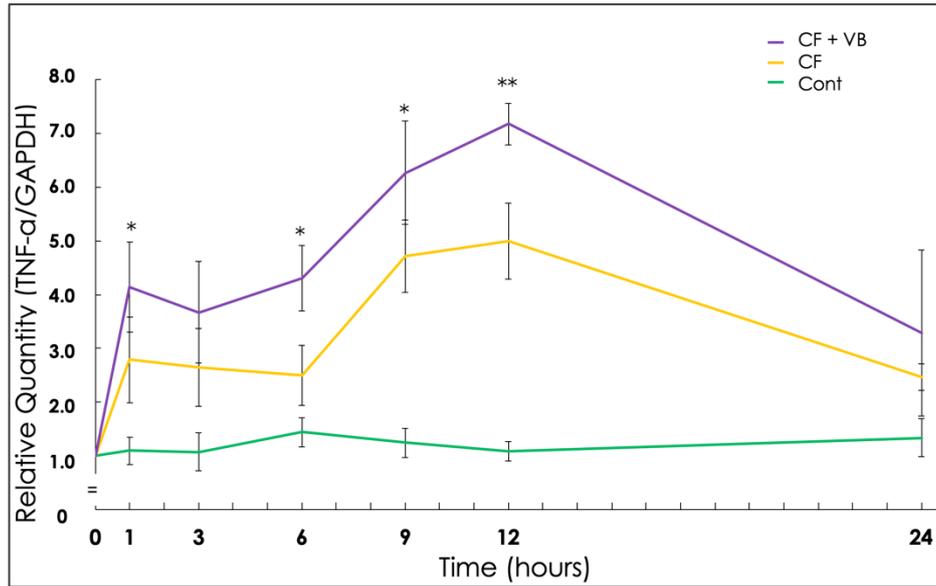


Fig. 12 TNF- α 遺伝子発現量 (h PDL 細胞)

CF + VB 群は CF 群と比較し 1, 6, 9, 12 時間後に有意な増加を認め、遺伝子発現量のピークは 12 時間後であった。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

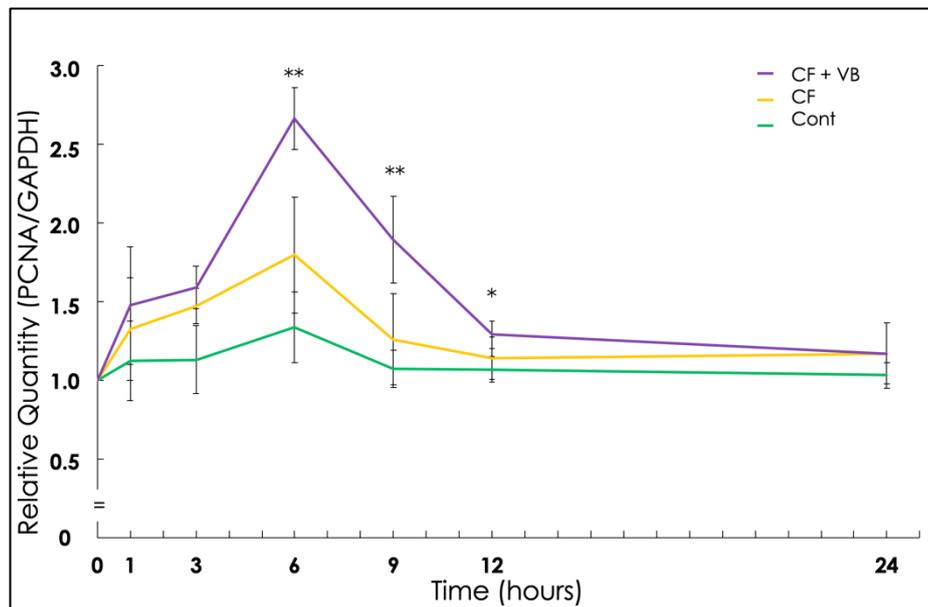


Fig. 13 PCNA 遺伝子発現量 (hPDL 細胞)

CF + VB 群は CF 群と比較し 6, 9, 12 時間後に有意に増加し、遺伝子発現量のピークは 6 時間後であった。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

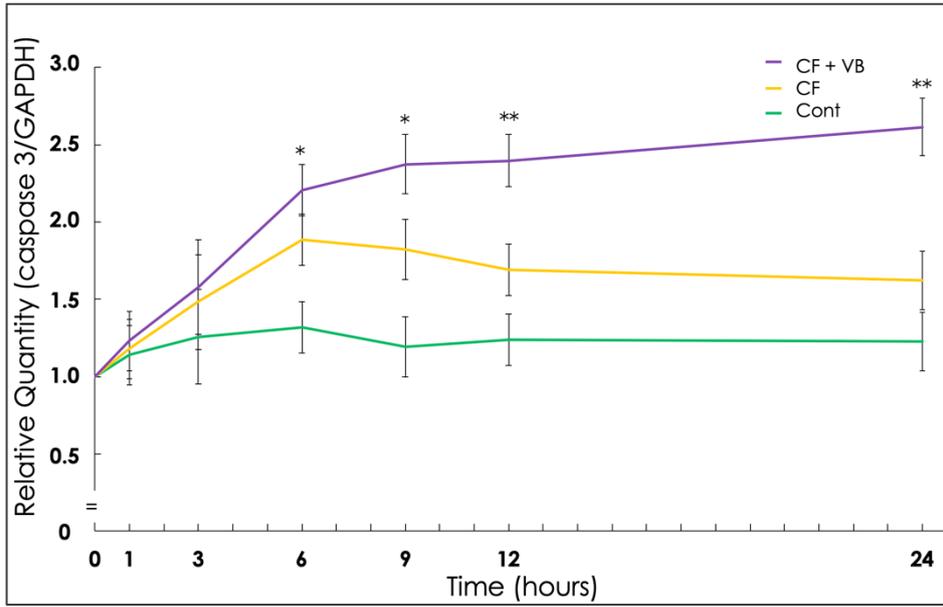


Fig. 14 Caspase 3 遺伝子発現量 (hPDL 細胞)

CF + VB 群は CF 群と比較し, 6, 9, 12, 24 時間後に有意に増加し, 遺伝子発現量は 24 時間後まで増加した。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.