

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 草深 彩恵
論文題目 グルココルチコイドは 歯の移動の日内変動を制御する	

I. 緒言

矯正歯科治療とは不正な咬合状態を適切な咬合状態へと変化させる歯科治療である。様々な矯正装置が選択される中、可撤式装置使用の際は夜間就寝時を含む1日12時間以上の使用を推奨している。患者自身を取り外しを行う可撤式装置は患者の協力が必要不可欠である。不快感を軽減し効率よく歯の移動を行う方法の確立は矯正歯科治療にとって極めて有益であると考えられる。

近年、歯の移動に日内変動が見られることが報告されている。Igarashiら、Miyoshiらによる上顎第一大臼歯間にオープンコイルを装着し実験的歯の移動(Experimental tooth movement : ETM)を行った研究において、ラットでは昼間(休息期)に上顎側方拡大力を適応する方が、夜間(活動期)に適応するより効果的であることが示された。また、Baiらはヒトに急速拡大装置を装着し0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21時に矯正力を適応する8群に分類した結果、21時に矯正力を適応する群の拡大量が最も大きかったと報告した。このように歯の移動に日内変動がみられる理由として生体概日リズムの影響が考えられるが、その詳細なメカニズムは今なお不明である。

生体概日リズムとは、生物に備わっている約24時間周期で変動する生理現象で、1日の明暗サイクルと密接に関係している。自律神経活動、血中ホルモン分泌、骨代謝にも概日リズムが認められ、生理的恒常性の維持に関与している。概日リズムの中枢は脳視床下部に位置する視交叉上核に存在し、光刺激によりコントロールされている。そして、中枢の時間情報は交感神経活動やグルココルチコイドを介して、全身の末梢組織に伝達すると考えられている。グルココルチコイドは肝臓での糖新生促進作用により、血糖値を上昇させる副腎皮質ホルモンであるが、活動期の開始時(ヒトでは明け方、マウスでは夕方)に分泌がピークとなることが知られている。また先の研究では、グルココルチコイドが中枢からの時間情報を骨組織に伝達する因子である可能性も示されている。Fujiharaらは、マウスに副腎摘出(Adrenalectomy : ADX)を行うことで骨代謝の日内変動が失われること、そしてADXマウスにグルココルチコイドであるデキサメタゾン(Dexamethasone : DEX)を投与することで再度日内変動が形成されることを報告している。これらの結果より、グルココルチコイドが破骨細胞活性の日内変動を調節することにより骨代謝の概日リズムを制御するのではないかと考えた。また、骨代謝の概日リズムは歯の移動にも影響を与える可能性が予想されるが、ETMの日内変動とグルココルチコイドの関与については未だ調べられていない。

RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)は破骨細胞の分化と骨吸収に関与する分子として知られており、歯の移動の際に圧迫側で増加することが報告されている。また、RANKLのmRNA発現が骨組織において概日リズムを示すこと、第一大臼歯と第二大臼歯の間に矯正用エラスティックを挿入しETMを行うWaldo法による歯の移動に、交感神経系が関与することが報告されている。これらの結果から歯の移動に日内変動が生じることが推察されるが、Waldo法による歯の移動に日内変動がみられるかどうかは未だ解析されていない。本研究では、Waldo法によるETMが日内変動を示すかどうかの検討を行い、またETMに対するADXの影響とDEX投与の影響を調べ、ETMの日内変動にグルココルチコイドが関与していることを示した。

II. 対象および方法

1. 動物

C57BL/6J マウス (Japan SLC、浜松、日本) を使用した。愛知学院大学歯学部動物実験ガイドラインに従って実施した。室温 23 ± 1 °C、湿度 $50 \pm 10\%$ 下、標準飼料と飲料水を自由に摂取できる環境で飼育した。

2. 実験的歯の移動 (experimental tooth movement : ETM)

7 または 8 週齢のマウスを体重別に無作為に次の 3 つのグループに分けた。矯正力を 48 時間継続して加えた終日群 (Whole-day group : WDG)、7:00-19:00 の明期に矯正力を加えた明期群 (Light period group : LPG)、19:00-7:00 の暗期に矯正力を加えた暗期群 (Dark period group : DPG) に分けた。一週間以上、環境に順応させた後、0.375 mg / kg のメドトミジン (メドトミン、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本)、2.0 mg / kg のミダゾラム (ドルミカム、アステラス製薬、東京、日本)、2.5 mg / kg のブトルファノール (ベトルファール、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本) の 3 種混合麻酔薬にてマウスに全身麻酔を行い、Waldo 法に則り上顎右側第一大臼歯および第二大臼歯 (M1 および M2) の間に矯正用エラスティック (Gray 1/4 インチ、3M Unitek、Saint Paul、USA) を挿入した。矯正用エラスティックを挿入した後、アチパメゾール (メパチア、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本) を投与し、マウスを麻酔状態から回復させた。実験の終わりには、二酸化炭素吸入によりマウスを屠殺した。ETM の間、マウスの体重は FY-3000 (株式会社エー・アンド・デイ、東京、日本) を用いて記録した。

3. 副腎除去手術 (adrenalectomy : ADX)

5 週齢のマウスを上述の 3 種混合麻酔にて麻酔後、背側を切開し両側副腎を摘出した。ADX マウスには、低ナトリウム血症を防ぐために 0.9% NaCl を与え、ETM 前の 2 週間、7:00 点灯、19:00 消灯の 12 時間毎の明暗サイクルに順応させた。

4. マイクロ CT 解析

ETM による歯の移動距離は、マイクロ CT (動物実験用三次元マイクロ X 線 CT R-mCT、株式会社リガク、東京、日本) および TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング株式会社、東京、日本) ソフトウェアを用いて評価を行った。上顎骨は、90keV、88 μ A の X 線エネルギー、および 10 μ m の等方性ボクセルサイズを用いてスキャンした。ETM による歯の移動距離を測定するために、頬側面観の画像を用いて M1 と M2 の間の最短距離が表示されるように調整した。

5. 骨組織解析

マウスから摘出した上顎骨の右側を、4% パラホルムアルデヒドで固定した。次いで 20% エチレンジアミン四酢酸 (EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid) で 2 週間脱灰した後、5 μ m の厚さの矢状断脱灰切片を作製した。切片は根分岐部から 50 μ m ~ 125 μ m のものを使用した。破骨細胞は酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP : tartrate resistant acid phosphatase) で赤色に染色し、歯根周囲歯槽骨の破骨細胞数 (osteoclast number/bone surface : Oc.N/BS) (圧迫側) および歯根周囲歯槽骨の破骨細胞面 (osteoclast surface/bone surface : Oc.S/BS) (圧迫

側)を計測した。また、骨芽細胞は、ヘマトキシリン・エオジンにて染色し、歯根周囲歯槽骨の骨芽細胞数(osteoblast number/bone surface : Ob.N/BS) (牽引側)を計測した。免疫組織染色では、抗原不活化処理を90°Cで40分間行い、組織切片を一次抗体とインキュベートした。一次抗体としてRANKL(receptor activator of nuclear factor- κ B)マウスモノクローナル抗体(ab45039、Abcam Plc、Cambridge、UK)を100倍に希釈し、4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体として単純染色マウスMAX-P0(414322、ニチレイ、東京、日本)を用いて室温で10分間インキュベートした。ネガティブコントロールはマウスIgG1抗体(X0931、Agilent、Santa Clara、USA)を100倍に希釈し、4°Cで一晩インキュベートした。圧迫側のRANKL陽性細胞の数をカウントし、細胞の総数の%として表した。

6. 統計処理

得られた実験結果は、GraphPad Prismバージョン6.0 for Windows(GraphPad Software、San Diego、USA)を用いてStudent's t-test 或いはanalysis of variance(ANOVA)により統計解析した。データは平均値±標準誤差(体重については平均値±標準偏差)で示し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

III. 結果

1. Waldo 法による ETM

歯の移動距離は、マイクロCTを使用して測定した。M1とM2の間の歯の移動距離は、WDGで $185.1 \pm 7.0 \mu\text{m}$ 、LPGで $186.0 \pm 6.6 \mu\text{m}$ 、DPGで $152.7 \pm 9.9 \mu\text{m}$ であった。DPGの歯の移動距離はWDGより17.5%、LPGより17.9%少なかった。歯の移動の日内変動における破骨細胞の役割を調べるために、破骨細胞パラメーターとしてOc.N/BSおよびOc.S/BSを測定した。Oc.N/BSは、WDGで 3.2 ± 0.4 数/mm、LPGで 4.4 ± 0.5 数/mm、DPGで 1.2 ± 0.5 数/mmであった。DPGのOc.N/BSは、WDGより62.5%、LPGより72.7%低かった。Oc.S/BSは、WDGで $10.8 \pm 0.9\%$ 、LPGで $16.0 \pm 1.2\%$ 、DPGで $4.2 \pm 1.6\%$ であった。DPGのOc.S/BSは、WDGより61.2%、LPGより73.7%低かった。Ob.N/BSは、WDGで 3.0 ± 0.5 数/mm、LPGで 4.9 ± 1.0 数/mm、DPGで 5.3 ± 0.6 数/mmであった。免疫組織染色では、WDGで $14.4 \pm 0.7\%$ 、LPGで $14.9 \pm 0.8\%$ 、DPGで $7.7 \pm 0.7\%$ のRANKL陽性細胞が認められた。DPGのRANKL陽性細胞の数は、WDGより46.5%、LPGより48.3%低かった。

ETMにより、LPGとDPGの体重が減少した。WPGの平均体重は、LPGおよびDPGのマウスの平均体重よりも高かった。LPGとDPGの間で体重に有意差はなかった。

この結果はマウスにおけるWaldo法によるETMは夜間より昼間の方が効果的である事を示している。

2. ADX マウスにおける ETM

歯の移動の日内変動に対するグルココルチコイドの影響を解明するため、実験開始2週間前にADXを行い、12時間毎の明暗サイクルに順応させ、その後ETMを行った。

歯の移動距離は、マイクロCTを使用して測定した。M1とM2の間の歯の移動距離は、WDGで $141.0 \pm 3.6 \mu\text{m}$ 、LPGで $149.4 \pm 4.6 \mu\text{m}$ 、DPGで $158.7 \pm 6.2 \mu\text{m}$ であった。Oc.N/BSは、WDGで 2.1 ± 0.3 数/mm、LPGで 3.3 ± 0.5 数/mm、DPGで 3.2 ± 0.7 数/mmであった。Oc.S/BSは、WDGで 10.4

±1.1%、LPGで13.1±1.0%、DPGで12.9±1.1%であった。Ob. N/BSは、WDGで4.8±0.4数/mm、LPGで4.1±1.0数/mm、DPGで4.1±0.4数/mmであった。RANKL陽性細胞の数は、WDGで5.8±0.4%、LPGで5.8±0.3%、DPGで5.7±0.5%であった。ETMにより、LPGの体重が減少した。グループ間の体重に有意差は認められなかった。

この結果はADXマウスにおけるETMの日内変動が消失したことを示している。

3. DEX投与を行ったADXマウスにおけるETM

副腎は、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、および性ステロイドホルモンを分泌している。したがって、ADXマウスにグルココルチコイドであるDEXを投与すると、歯の移動距離の日内変動がどう変化するかを調べた。ADXマウスを12時間毎の明暗サイクルに順応させ、DEX投与を開始し、ETMを行った。DEX(3.0mg/kg/day)は、ETM間毎日19:00に投与した。

歯の移動距離は、マイクロCTを使用して測定した。歯の移動距離は、LPGで191.8±10.3μm、DPGで144.9±8.3μmであった。LPGよりDPGで24.5%低かった。Oc. N/BSは、LPGで5.0±0.4数/mm、DPGでは3.6±0.5数/mmであった。Oc. S/BSは、LPGで15.8±1.0%、DPGで10.5±0.8%であった。DPGでは、Oc. S/BSおよびOc. N/BSは、LPGよりもそれぞれ33.5%および28.0%低くなった。Ob. N/BSは、LPGで4.1±0.2数/mm、DPGで3.7±0.1数/mmであった。RANKL陽性細胞は、LPGで8.4±0.7%、DPGで4.0±0.6%であった。LPGよりもDPGで52.4%低かった。ETMにより、LPGの体重が減少した。グループ間の体重に有意差は認められなかった。

この結果は、ADXマウスにDEXを投与するとETMの日内変動が再び形成されたことを示している。

IV. 考察

本研究により、1)歯の移動距離および破骨細胞パラメーターに日内変動が認められた。2)ADXにより歯の移動距離および破骨細胞パラメーターの日内変動が消失した。3)ADXマウスにDEX投与を行うと歯の移動距離および破骨細胞パラメーターの日内変動が再度形成された。4)RANKL免疫反応性の変化は、破骨細胞パラメーターの結果と一致していた。これらの結果は、グルココルチコイドが破骨細胞活性、RANKL免疫反応性の日内変動に影響を与え、その結果、歯の移動の日内変動が生じる可能性を示している。

本研究において、Waldo法を用いた歯の移動距離に日内変動が存在することを初めて示した。歯の移動距離は、LPGの方がDPGよりも大きく、これは以前の研究の結果と一致している。マウスは夜行性のため、この結果は休息期にETMを行う方が活動期に行うよりも効果的であることを示唆している。体重変化については、ETM前後で減少していたが、LPGとDPG間に有意差はなく、歯の移動距離の差に体重の影響は関与していなかったと考えられる。さらに、ETM後のマウスの平均体重は、LPGとDPGの方がWDGよりも低かったが、これは麻酔薬の総投与回数と実験期間の違いが原因である可能性がある。組織学的評価では、Oc. S/BSやOc. N/BSなどの破骨細胞パラメーターがDPGよりもLPGで大きな値を示しており、歯の移動距離のデータと一致している。このことから、破骨細胞活性および、または破骨細胞形成の増加が原因で歯の移動に日内変動が生じたと考えられる。以前から、骨吸収とカルシウム放出は日内変動を示し、動物の休息期に最も活発になることは知られていたが、本研究によりこのような破骨細胞活性および、または破骨細胞

形成の日内変動が、歯の移動の日内変動に関与していることがより強く示唆された。

Miyoshi らは、断続的な力が持続的な力よりも効果的に歯が移動すると報告した。本実験結果では、WDG と LPG に有意差はなかったが、WDG と LPG の間で Oc. S/BS に有意差が認められた。これは、断続的な力が持続的な力よりも Oc. S/BS を増加させることを示している。Miyoshi らとの実験結果の部分的な不一致は、使用された動物の種類と矯正装置の違いが原因である可能性があるが、これについてさらに検討する必要がある。また、Miyoshi らは7日目に DPG よりも LPG で大きな骨吸収が見られたように骨形成もより大きく見られたと報告しているが、本実験結果では、骨芽細胞のパラメーターに違いは見られなかった。Waldo 法を使用した ETM では、72 時間の歯の移動によって引き起こされる骨形成には影響を与えないという報告があることから、これらは実験期間が短かったためと考えられる。

Fujihara らは、グルココルチコイドが中枢からの時間情報を骨組織に伝達する因子であることを報告した。グルココルチコイドは副腎から分泌されるため、ADX が ETM の日内変動に影響を与えるかどうかを検討した。その結果、ADX により、破骨細胞パラメーター、RANKL 免疫反応性、LPG と DPG 間の歯の移動距離の差が消失することがわかった。次に ADX によりグルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、性ステロイドが失われるため、DEX 投与が ADX マウスの歯の移動距離の日内変動に影響を与えるかどうかを調べた。ADX マウスでは、DEX 投与により破骨細胞パラメーター、RANKL 免疫反応性、LPG と DPG 間の歯の移動距離の差が回復した。これらの結果は、グルココルチコイドが中枢からの時間情報を末梢の破骨細胞に伝達し、それが ETM によって誘発される歯の移動距離の日内変動をもたらすことを示唆している。さらに、グルココルチコイドが骨芽細胞や骨細胞などの RANKL を生成する細胞にも概日リズムを伝達することを示している。まとめると、これらの結果は、循環しているグルココルチコイドが破骨細胞活性、RANKL 免疫反応性の日内変動に影響を与え、その結果、歯の移動の日内変動が生じる可能性を示している。

今回は 48 時間という短期間での結果であるが、Igarashi ら、Miyoshi らの結果と同様に休息期に ETM を行う方が活動期に行うよりも効果的であることが示された。これをヒトに置き換えると夜間に装置を使用する方が昼間に使用するより効果的であるということになる。また、終日装置を装着するよりも夜間のみ装着した場合の方が僅かではあるが効果的であった。矯正歯科治療には様々な装置が使用され、様々な矯正力があるため、全ての装置が今回の結果と同様となるかは検討が必要である。また矯正治療後の保定治療についても検討が必要である。しかし、今回の結果が効率よく歯の移動を行う方法の確立への第一歩となったと考える。

V. 結論

本研究では Waldo 法による ETM が日内変動を示すかどうかの検討を行った。さらに、ADX の ETM への影響、ADX マウスにおける DEX 投与の ETM への影響を検討した。歯の移動距離、破骨細胞パラメーター、骨芽細胞パラメーターについて調べ、以下のような結果を得た。

1. Waldo 法による ETM に日内変動が認められた。
2. ADX マウスにおいて ETM の日内変動が消失した。
3. ADX マウスに DEX を投与すると ETM の日内変動が再び形成された。

これらの結果より、グルココルチコイドが中枢からの時間情報を末梢の破骨細胞に伝達し、破骨細胞活性の日内変動に影響を与え、その結果、歯の移動に日内変動が生じる可能性が示された。

(学位論文の内容を要約したもの)

No.6.....

愛知学院大学

概日リズムを考慮した効率的な歯列矯正法、またストレスや不規則な生活習慣による概日リズムの乱れが、歯列矯正に影響を与える可能性が示唆された。