

緒言

矯正歯科治療は、正常咬合を獲得するための有効な方法であり、近年、小児から成人までその適応は幅広いものとなっている。しかしながら、矯正力による人為的な歯の移動は、根尖部の歯根吸収を引き起こす可能性があり(Killiany, 1999)、Sandstedt ら(1904)によって初めて矯正歯科治療中の歯根吸収についての報告がなされてから 100 年以上が経過した。矯正歯科治療を行った患者の 86.4% に何らかの歯根吸収が認められる(Masseler and Malone, 1954)。歯根吸収の発症初期には臨床症状を伴わないために、X 線写真上で初めて発見されることが多いが、その多くは、歯根表層あるいは歯根尖に局限した微細な吸収であり、セメント芽細胞による修復機転により、臨床上は大きな障害にはならないものが多い。しかしながら、歯根吸収量がセメント芽細胞による吸収窩の修復能力を大きく超えた場合には、吸収窩は広範囲に波及し、最終的には、象牙質の露出をも呈して重症化する(Abass and Hartsfield, 2007; Hartsfield, 2009)。その場合は、歯根吸収の停止が確認されるまでの治療の中断や、治療計画の見直しを余儀なくされる(Abass and Hartsfield, 2007)。

歯根吸収は、歯の移動時に圧迫側歯根膜に出現する吸収系細胞により引き起こされる(Rygh, 1977; Brudvik and Rygh, 1993)。なかでも破歯細胞は、造血幹細胞由来の多核細胞で、波状縁を有し、エナメル質、セメント質、象牙質を溶解・

吸収する。破歯細胞は、歯の硬組織の吸収窩の形成過程において、形態学および酵素細胞化学的に破骨細胞とほぼ同様の生物学的特性を呈することから、歯根吸収機構は、破骨細胞による骨吸収とほぼ同様であると考えられている (Matsumoto, 1994; Sahara *et al.*, 1998; Linsuwanont *et al.*, 2002; Sasaki, 2003)。さらに、破骨細胞と同様、receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)の刺激により分化、活性化すること、その増殖、融合促進、生存にはマクロファージ・コロニー刺激因子(M-CSF)が、その抑制には osteoprotegerin (OPG)が関与していることなどが明らかにされている(Oshiro *et al.*, 2001; Takada *et al.*, 2004; Wang and McCauley, 2011)。

現在、矯正歯科治療中に歯根吸収の発現を完全に回避することは困難であり、過度な矯正力がかからぬよう注意するとともに、重度の歯根吸収に至らぬよう、定期的に X 線写真撮影を行い、注意深く検査することにより対応しているのが現状である。近年、歯肉溝滲出液中の RANKL 等の破骨細胞分化誘導因子を検出することにより、歯根吸収のリスクを検査する方法が報告されている(Balducci *et al.*, 2007; Kereschanan *et al.*, 2008)。しかしながら、本法の精度については更なる検討が必要であり、現段階では臨床応用は困難である。また、歯根吸収の発症関連因子については、これまでも Ketcham (1927)をはじめ、多くの研究者、臨床家により検討され、骨代謝疾患や栄養状態などの全身的要因(Smith, 1978;

Linge and Linge, 1983)、歯の移動のための力系(Linge and Linge, 1983; Beck and Harris, 1994; Alexander, 1996)、矯正歯科治療期間(Levander and Malmgren, 1988; Levander *et al.*, 1998; Brin *et al.*, 2003; 笹本ら, 2011)、年齢(Reitan, 1974; Linge and Linge, 1983; Brezniak and Wasserstein, 1993; 松田ら, 2011)、歯根形態(Hall, 1978; Levander and Malmgren, 1988; Mirabella and Artun, 1995; 松田ら, 2011; 寺尾ら, 2012)、歯槽骨の骨密度(Malmgren *et al.*, 1982; Goldie and King, 1984; Odenrick and Brattstrom, 1985; Brezniak and Wasserstein, 1993)、舌癖や咬爪癖などの口腔習癖(Odenrick and Brattstrom, 1983, 1985; Linge and Linge, 1991; Sameshima and Sinclair, 2004)、不正咬合の種類(Harris and Butler, 1992; Taner *et al.*, 1999; Sameshima and Sinclair, 2001; 松田ら, 2011; 寺尾ら, 2012)など、様々な要因が挙げられているものの、明確な原因は特定されていない。

矯正力により、移動歯における歯髓の血流の循環障害が惹起され、その程度は矯正力の大きさに依存することが報告されている(Seltzer *et al.*, 1990)。その極端な例として、Spector ら(1974)は矯正歯科治療中に歯髓壊死が認められた症例を報告している。矯正歯科治療により歯根吸収を生じた歯は歯髓腔の狭窄が見られる場合があり、これは外傷歯の反応と類似している(Kayhan *et al.*, 2000)。歯は外傷を受けると、根尖部で炎症反応が生じ、破歯細胞により根尖部歯槽骨、歯根表面、および歯根内面が吸収される。その結果、根尖孔が拡大し、歯髓腔

内の毛細血管の増殖が生じ、その後、炎症が消退すると、歯髓腔内に硬組織が添加される。

一方、歯根吸収は、歯根が歯槽骨に接触することにより生じる歯根外側部の吸収が主体であると多くの研究者が結論づけている。しかしながら、矯正歯科治療中における、歯内療法処置歯の歯根吸収は、有髄歯に比べて極めて少ないことが報告されている(Remington and Joondeph, 1989; Spurrier, 1990)。生活歯において、歯内治療が施された歯と比較して有意に大きい歯根吸収が認められたことから(Spurrier, 1990)、歯内療法処置の有無と歯の移動に伴う歯根吸収量の大きさには関連性があると考えられる。また、歯内治療を行った歯は生活歯に比べ、重篤な歯根吸収を起こしにくいことも報告されている(Bender *et al.*, 1997)。しかしながら、以上の報告はいずれも臨床研究であり、歯内療法歯において、矯正歯科治療中の歯根吸収を生じにくいメカニクスの解明はなされていない。

根尖部歯周組織には数多くの免疫担当細胞が存在し、根尖部に細菌的、化学的、あるいは物理的刺激が加わると、抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージがリンパ球に作用し、抗体の産生が促進される。さらに、血管透過性の亢進と炎症性細胞の浸潤が生じ、Interleukin-1 β (IL-1 β)や腫瘍壊死因子(TNF- α)などの炎症性サイトカインが産生される。IL-1 β および TNF- α は、いずれも骨吸収促進因子であり、RANK-RANKL 系を介さず破骨前駆細胞から破骨細胞への分化

を誘導することにより、炎症性骨吸収に関与する(Azuma *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000)。

以上のことから、我々は歯の移動時に根尖部歯髓組織に過剰な負荷が加わる
ことにより、これらの吸収性因子が誘導され、根尖部の歯根吸収の進行に何ら
かの影響を及ぼすのではないかと仮説を立てた。

そこで、本研究では、培養ヒト歯髓由来細胞への周期的伸展刺激が IL-1 β 、
TNF- α 、RANKL、 および M-CSF の発現に及ぼす影響を検討した。また、その
メカニズムについて解明するために、細胞膜の伸展により活性化される S-A チ
ャネルの阻害因子であるガドリニウムの添加が、各因子の発現に及ぼす影響を
検討した。さらに、ラットを用いて歯髓組織の有無が実験的歯の移動に伴う歯
根吸収へ及ぼす影響を検討することを目的とした。

試料と方法

1. 周期的伸展刺激が培養ヒト歯髄由来細胞における IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の遺伝子とタンパク発現に及ぼす影響の検討

1) 細胞の単離・培養

Hamada ら(2009)の方法を参考に、矯正歯科治療のため抜去した小臼歯より歯髄組織を摘出し(図 1, 2)、メスにて約 1 mm³ の大きさに細切した後、10%牛胎児血清(FBS ; Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel)、32 U/ml ペニシリン G (明治製菓, 東京)、250 μ g/ml アンホテリシン B (ナカライテスク, 京都)、60 μ g/ml カナマイシン(明治製菓)を含有するダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; 日水製薬, 東京)を用い、37°C、5%CO₂ 気相条件下で培養を行った(図 3)。



図 1 抜去歯

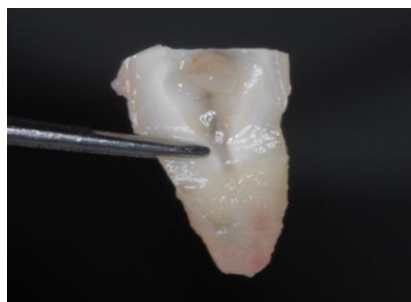


図 2 歯髄組織



図 3 細胞培養

細胞は 100 mm デッシュ(CORNING, New York, NY, USA)に細胞密度 3.0×10^5 cell/cm² となるように播種し、培養液は一週間に 3 回交換した。増殖した細胞がコンフルエントに到達した後、0.1%トリプシン(DIFCO, Detroit, MI, USA)と EDTA(和光純薬工業, 大阪)を含むリン酸緩衝液(phosphate buffered saline: PBS, 日水製薬)により 10 分間処置して細胞を剥離・分離した後、継代培養し、4 から 6 代目を実験に供した。

2) 周期的伸展刺激の負荷

周期的伸展刺激の負荷には、Flexercell Strain Unit FX-2000 (Flexercell International, McKeesport, PA, USA)を使用した(図 4)。Flexercell Strain Unit とは、弾性シリコン膜の基底面を有する BioFlex plate 上で培養を行い、伸展力の大きさや周期を制御するシステムコントローラーを介した周期的陰圧により機械的伸展力を細胞に負荷する装置である。なお、周期的伸展刺激の負荷実験中は培養液として 1%FBS 含有 DMEM を用いた。また、周期的伸展力として、10 kPa の陰圧を 30 サイクル/分の周期で 12、24 および 48 時間負荷した。さらに、1、3、5、10 および 15 kPa の陰圧を 30 サイクル/分の周期で 48 時間負荷した。

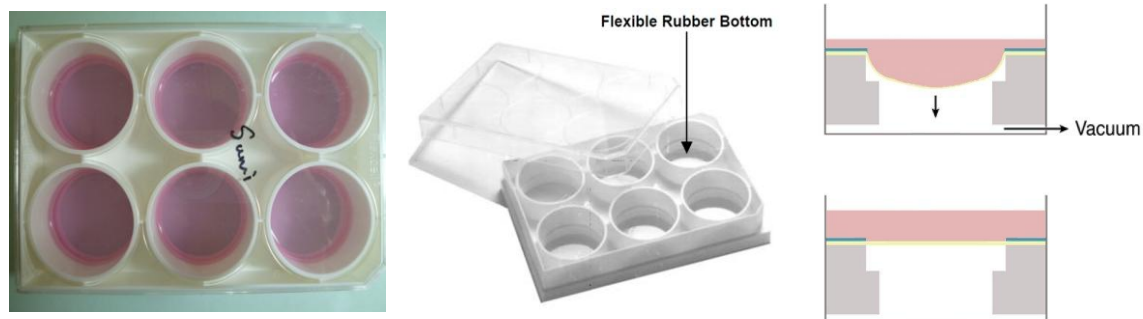


図 4 Flexercell Strain Unit FX-2000

3) S-A チャネル阻害

周期的伸展刺激開始 30 分前に、10 および 100 μM のガドリニウム(和光純薬工業)を添加した 1%FBS 含有 DMEM 中にて細胞培養を開始した。その後、10 kPa の陰圧を 30 サイクル/分の周期で、48 時間負荷した。

4) Total RNA の分離と cDNA の合成

Total RNA の分離・精製には illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare, Chalfont, UK)を使用し、cDNA の合成は、total RNA 1 μg から Rever Tra Ace (Toyobo, 大阪)を使用して行った。

5) プライマー

IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の特異的プライマーを用い、G3PDH をコントロールプライマーとして使用した(表 1)。

表 1 PCR プライマー塩基配列

Gene	Sequence(5'→3')
G3PDH	Forward TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT
	Reverse CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC
IL-1 β	Forward CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAA
	Reverse GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG
TNF- α	Forward CCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGT
	Reverse GGAGACGGCGATGCGGCTGATGGTG
RANKL	Forward TCAGAAGATGGCACTCACTG
	Reverse AACATCTCCCACTGGCTGTA
M-CSF	Forward GGCCATGAGAGGCAGTCCGAGGG
	Reverse CACTGGCAGTTCCACCTGTCTGTC

6) 定量 PCR 解析

定量 PCR 解析には、QuantiTect SYBR Green PCR(キアゲン, 東京)、および Light Cycler システム(Roche Diagnostics, 東京)を使用した。PCR の条件は 94°C15 秒での熱変性後、60°C30 秒のアニーリング及び 72°C22 秒の伸張反応を 1 サイクルに設定し、45 サイクル行った。各実験試料について PCR 解析を 3 回以上行い、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL、M-CSF シグナルを G3PDH シグナルで補正して用いた。

7) ELISA 法によるタンパク濃度の測定

回収した培養上清を Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)を用いて濃縮操作を行った後、Quantikine Human IL-1 β Immunoassay kit、Quantikine Human TNF- α Immunoassay kit、Quantikine Human M-CSF Immunoassay kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)と BI-20452 ampli sRANKL human Immunoassay kit (BIOMEDICA GRUPPE, Vienna, Austria)を使用し、プロトコールに従いタンパク濃度の測定を行った。光学密度の測定は VERSA max (モレキュラーデバイス ジャパン, 東京)により IL-1 β 、TNF- α 、M-CSF は 450 nm、RANKL は 490 nm の波長で測定し、Standard curve が規定通りに得られることを確認した。各実験試料の回収は 3 回以上行い、ELISA 分析はそれぞれ 2 回以上行った。

8) 統計処理

Statview® (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA)を使用して分散分析を行った後、多重比較検定(fisher)により有意差の有無を評価した。

2. 実験的歯の移動に伴う歯根吸収に対する歯髄組織の影響

1) 実験動物の上顎右側第一臼歯の抜髄と実験的歯の移動

実験には7週齢 Wistar 系雄性ラット(日本チャールズ・リバー, 横浜)を用いた。

全ての実験は、10%ペントバルビタールナトリウム(1.0 ml/100 g B.W., 共立製薬, 東京)による全身麻酔下で施行された。また、12 時間ごとに明暗条件を切り換え、飼育を行った。なお、すべての実験動物は、広島大学歯学部倫理委員会の倫理規定に準拠して行った。

#1/2 ラウンドバーにて上顎右側第一臼歯の髓室開拡を行い(図 5)、#8~25K ファイル(マニー, 栃木)にて近心根、中央口蓋側根、遠心頬側根の抜髄を行った(図 6)。抜髄終了後、次亜塩素酸ナトリウム(日本歯科薬品, 山口)を用いて根管洗浄を行い(図 7)、#25 滅菌ペーパーポイント(Zipperer, Munich, Germany)にて根管内を乾燥させた(図 8)。その後、#25 ガッタパーチャーポイント(デンツプライ三金, 東京)とキャナルス(松風, 京都)にて根管充填を行った(図 9)。右側の根管充填終了後、0.009×0.030 インチ ELGILOY closed coil spring (ロッキーマウンテンモリタ, 東京)を用いて上顎両側第一臼歯の近心移動を行った(図 10)。牽引力は丸型バネ式テンションゲージ(大場計器, 東京)により約 10g、50g となるように調整した。また、装置の脱落を防止するため、粉末飼料(CE-2, 日本クレア, 東

京)による飼育を行い、適宜水分補給ができる状態とした。



図 5 髄質開拡



図 6 抜髄



図 7 根管洗浄



図 8 根管内乾燥



図 9 根管充填



図 10 近心移動装置装着

2) 組織標本の作製

歯の移動開始 1 ヶ月経過後、ジエチルエーテル(ナカライテスク)全身麻酔下にてラットの灌流固定を行った。その後、上顎骨を摘出し、pH7.4 の 4%パラホルムアルデヒドにて固定を行い、14%エチレンジアミン 4 酢酸 4 ナトリウム(EDTA, 和光純薬工業)にて 6 週間脱灰を行った。その後、パラフィン包埋を作成し、ロータリーミクロトーム(Microm315, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて厚さ 5 μm の矢状断連続切片を作製した。

3) 組織学的検討

ラット第一臼歯歯根 5 本のうち、近心根を対象とし、歯冠、歯根、歯髄、歯槽骨を全て含む切片を各計測に用いた。

4) 歯の移動距離の計測

各群における第一臼歯遠心から第二臼歯近心までの距離を第一臼歯の移動距離とし、矯正用ノギス(デンテック, 東京)を用いて計測した(図 11)。

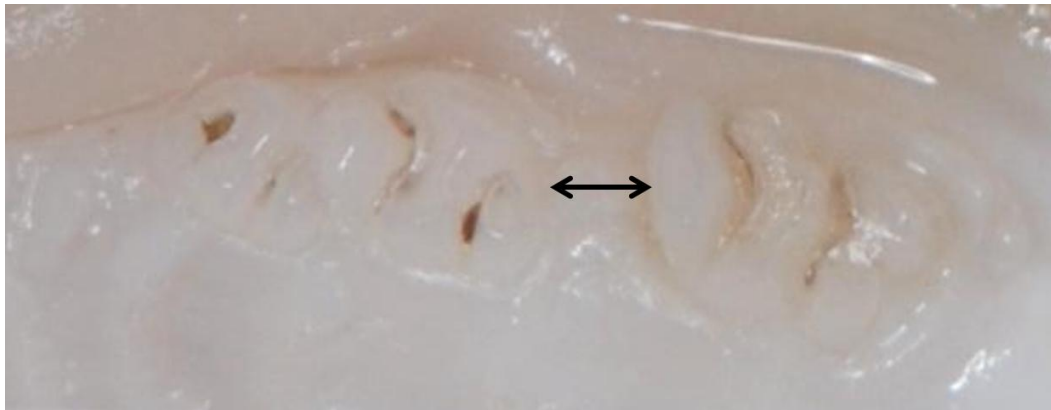


図 11 第一臼歯移動距離の計測

5) 歯根内部吸収量の算出

歯髄に面している歯根表面の吸収窩を内部吸収とし、光学顕微鏡(BH2-RFCA, オリンパス, 東京)を用いて歯根内部吸収窩を観察するとともに、画像解析ソフト Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて根尖側 1/3 ($400 \times 800 \mu\text{m}^2$)の内部吸収窩面積の定量を行った(図 12, 13)。

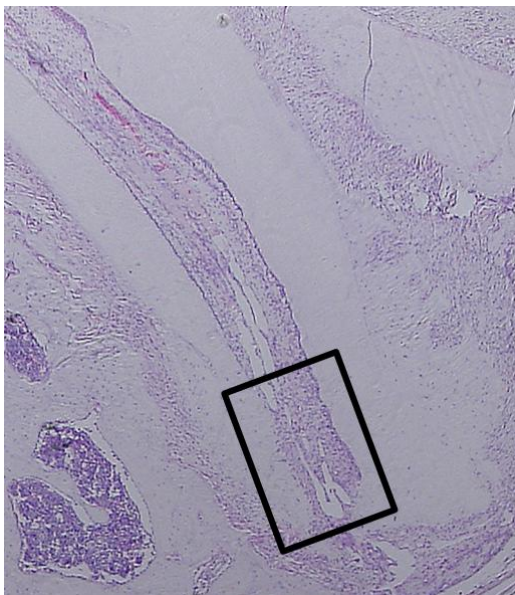


図 12 歯根内部吸収量の計測範囲



図 13 歯根内部吸収窩

6) 破歯細胞数の算定

光学顕微鏡(BH2-RFCA, オリンパス)を用いて歯周組織像の観察を行うとともに、根尖側 1/3 ($600 \times 1200 \mu\text{m}^2$)に存在する酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP)陽性の多核細胞を破歯細胞とし、破歯細胞数を算定した。TRAP 染色は、TRAP/ALP 染色キット(和光純薬工業)を用い、ヘマトキシリンによる対比染色を行った。

7) 免疫組織学的観察

歯根吸収関連因子の発現を検討するため、各実験期間におけるラット第一臼歯歯根の組織標本を対象とし、免疫染色を行った。各切片を 10%ウシ血清アルブミンと 20 分間反応させて非特異的な抗体の吸着を阻止した後、一次抗体として抗 IL-1 β ウサギポリクローナル抗体(abcam, 東京; 0.01M PBS で 1/50 に希釈)、抗 TNF- α ヤギポリクローナル抗体(R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA ; 0.01M PBS で 1/50 に希釈)、抗 RANKL ウサギポリクローナル抗体(abcam, 東京; 0.01M PBS で 1/100 に希釈)、抗 M-CSF ヤギポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA ; 0.01M PBS で 1/50 に希釈)をそれぞれ反応させた。一次抗体との反応後、切片を PBS で洗浄し、二次抗体として TNF- α と M-CSF の局在観察にはヤギ抗ウサギ IgG(ヒストファイン シンプルステインラ

ット MAX-PO (R), ニチレイ, 東京)、IL-1 β と RANKL にはウサギ抗ヤギ IgG(ヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO (G), ニチレイ, 東京)を用いた。以上の反応過程は、すべて簡易の湿潤箱内で行った。免疫組織像を観察するために、ヒストファイン SAB-PO kit (ニチレイ)を用いて、3,3'-diaminobenzidine (DAB)による発色を行った。免疫染色後、ヘマトキシリンによる対比染色を行い、光学顕微鏡(BH2-RFCA, オリンパス)を用いて観察した。

8) 統計処理

各群の歯根内部吸収量、破歯細胞数の平均と標準偏差を算出し、Student's *t*-test により有意差の有無を評価した。

結果

1. 周期的伸展刺激が培養ヒト歯髄由来細胞における IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の遺伝子とタンパク発現に及ぼす影響についての検討

1) 周期的伸展刺激負荷時間が培養ヒト歯髄由来細胞における各因子の遺伝子とタンパク発現に及ぼす影響

IL-1 β 遺伝子発現量は、10 kPa の伸展刺激負荷開始から 12 および 24 時間後にコントロール群と比較してそれぞれ 1.1、1.4 倍を示し、48 時間後には 5.1 倍に増加し、12 および 48 時間後と、24 および 48 時間後との間に有意差が認められた(図 14)。TNF- α 遺伝子発現量は、コントロール群と比較して、伸展刺激開始から経時的にそれぞれ 1.1、2.3、3.1 倍と増加を示し、12 時間後と 24 時間後、および 12 時間後と 48 時間後との間に有意差が認められた。RANKL 遺伝子発現量は、コントロール群と比較してそれぞれ 1.6、1.7、2.0 倍を示した。M-CSF 遺伝子発現量は、コントロール群と比較してそれぞれ 1.8、2.7、3.3 倍を示し、伸展刺激開始 12 時間後と 48 時間後との間に有意差が認められた。

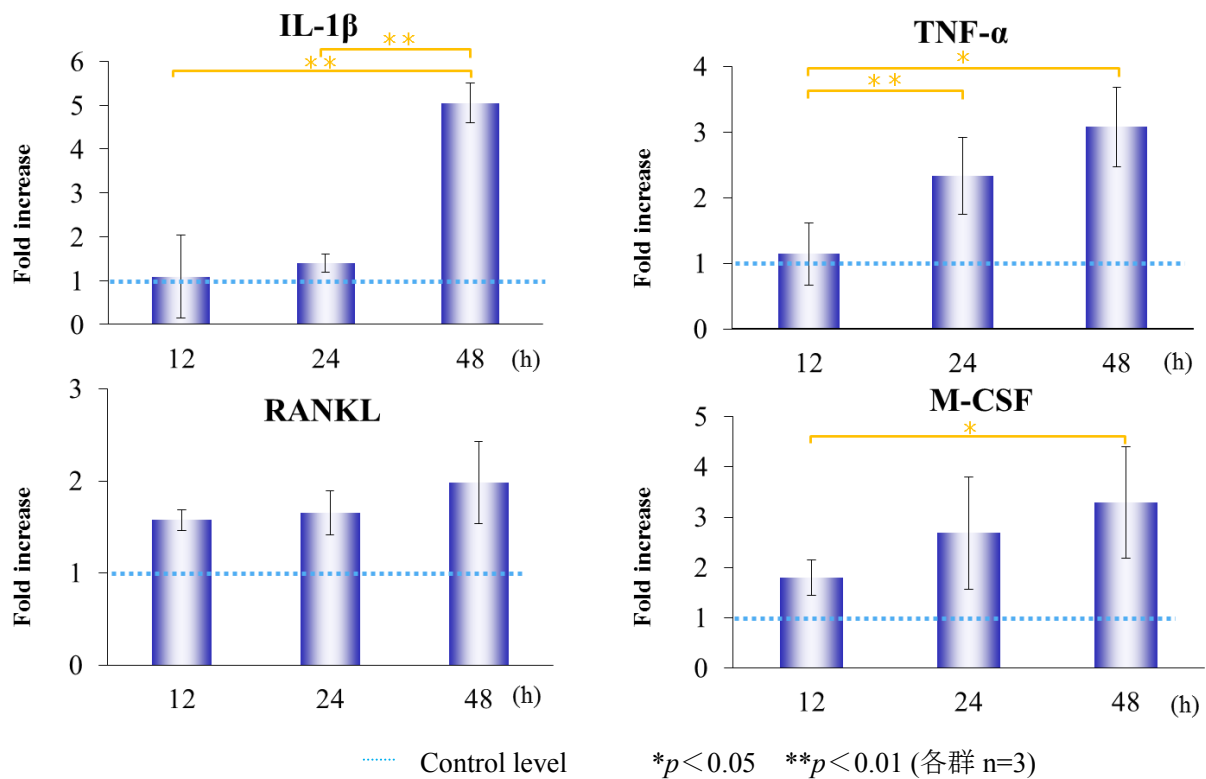
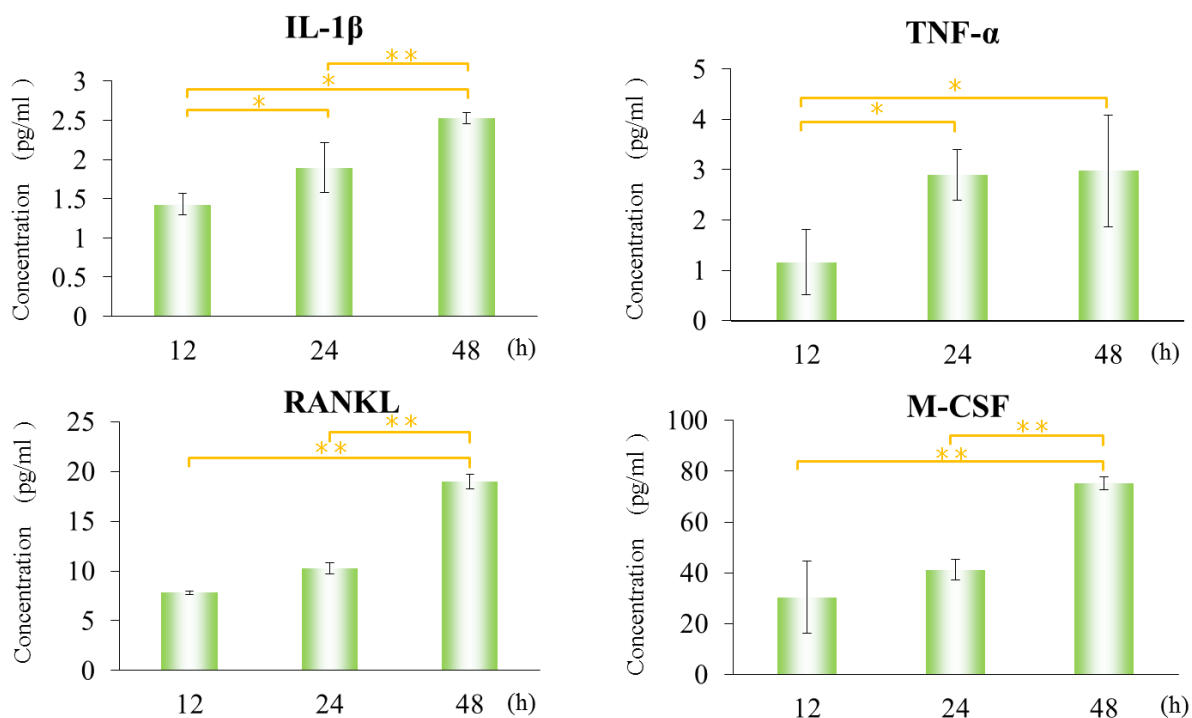


図 14 周期的伸展刺激の負荷時間が培養ヒト歯髄由来細胞における各因子の遺伝子発現に及ぼす影響

IL-1 β タンパク発現量は、伸展刺激負荷開始から 12、24、48 時間後にはそれぞれ 1.4、1.9、2.5 pg/ml に増加し、各群との間に有意差が認められた(図 15)。また、TNF- α タンパク発現量は、それぞれ 1.2、2.9、3.0 pg/ml に増加し、12 時間と 24 時間、12 時間と 48 時間の値との間に有意差が認められた。RANKL タンパク発現量は、それぞれ 7.8、10.3、19.0 pg/ml に増加し、12 時間と 48 時間、24 時間と 48 時間の値との間に有意差が認められた。M-CSF タンパク発現量は、それぞれ 30.4、41.2、75.3 pg/ml に増加し、RANKL と 同様に、12 時間と 48 時間、

24 時間と 48 時間の値との間に有意差が認められた。



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (各群 $n=3$)

図 15 周期的伸展刺激の負荷時間が培養ヒト歯髄由来細胞における
各因子のタンパク発現に及ぼす影響

2) 周期的伸展刺激の大きさが培養ヒト歯髄由来細胞における各因子の遺伝子とタンパク発現に及ぼす影響

実験 1-1)の結果より、刺激時間を各因子の遺伝子、タンパク発現ともに最大の影響を示した 48 時間に設定し、1、3、5、10 および 15 kPa の伸展刺激を 30 サイクル/分の周期で負荷した。

その結果、IL-1 β 遺伝子発現量は、コントロール群と比較してそれぞれ 1.9、1.5、2.8、5.1、0.9 倍を示し、10 kPa の伸展刺激を加えた群が他の群と比較して有意に大きな値を示した(図 16)。TNF- α 遺伝子発現量は、コントロール群と比較してそれぞれ 1.6、1.8、1.7、3.1、2.1 倍を示し、10 kPa の伸展刺激を加えた群は、それ以下の強さの伸展刺激を加えた群と比較して、有意に大きい値を示した。RANKL 遺伝子発現量は、コントロール群と比較して、それぞれ 1.5、1.6、1.7、2.0、0.8 倍を示した。M-CSF 遺伝子発現量は、コントロール群と比較して、それぞれ 1.1、1.5、2.8、3.3、0.8 倍を示し、RANKL、M-CSF とともに 10 kPa の伸展刺激を加えた群が、他の群と比較して有意に大きい値を示した。

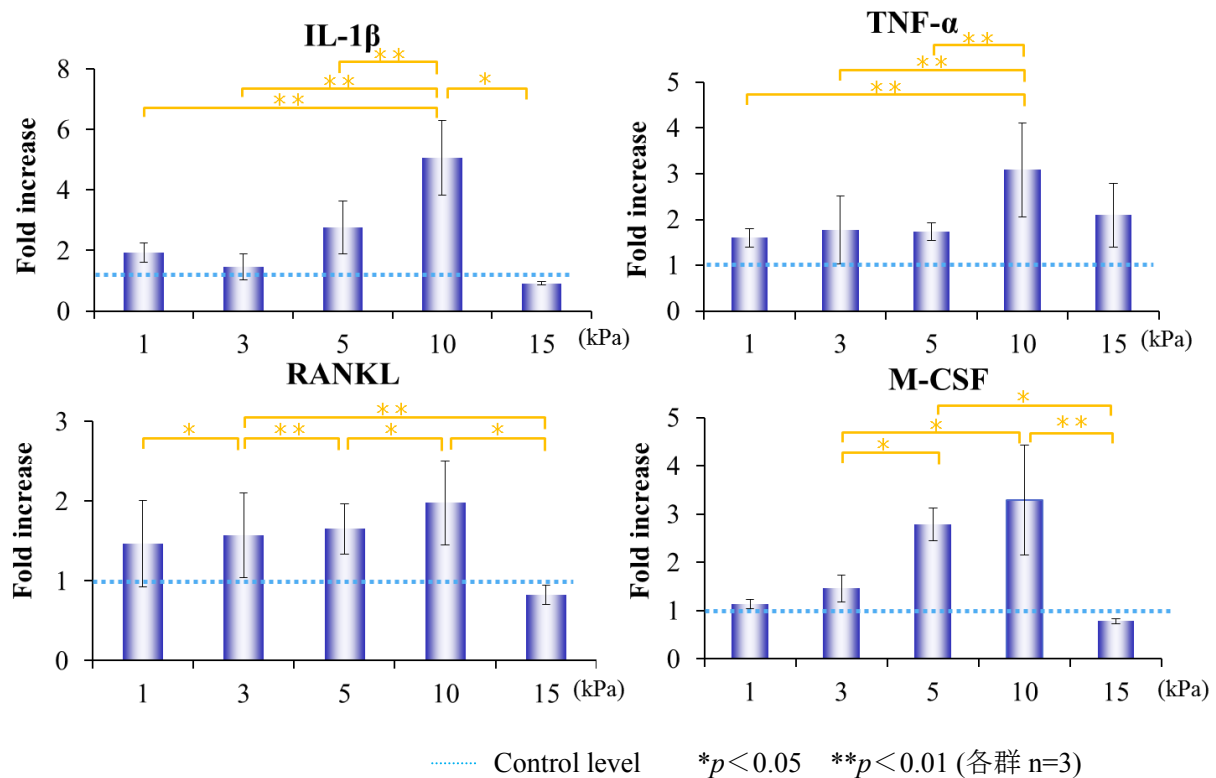
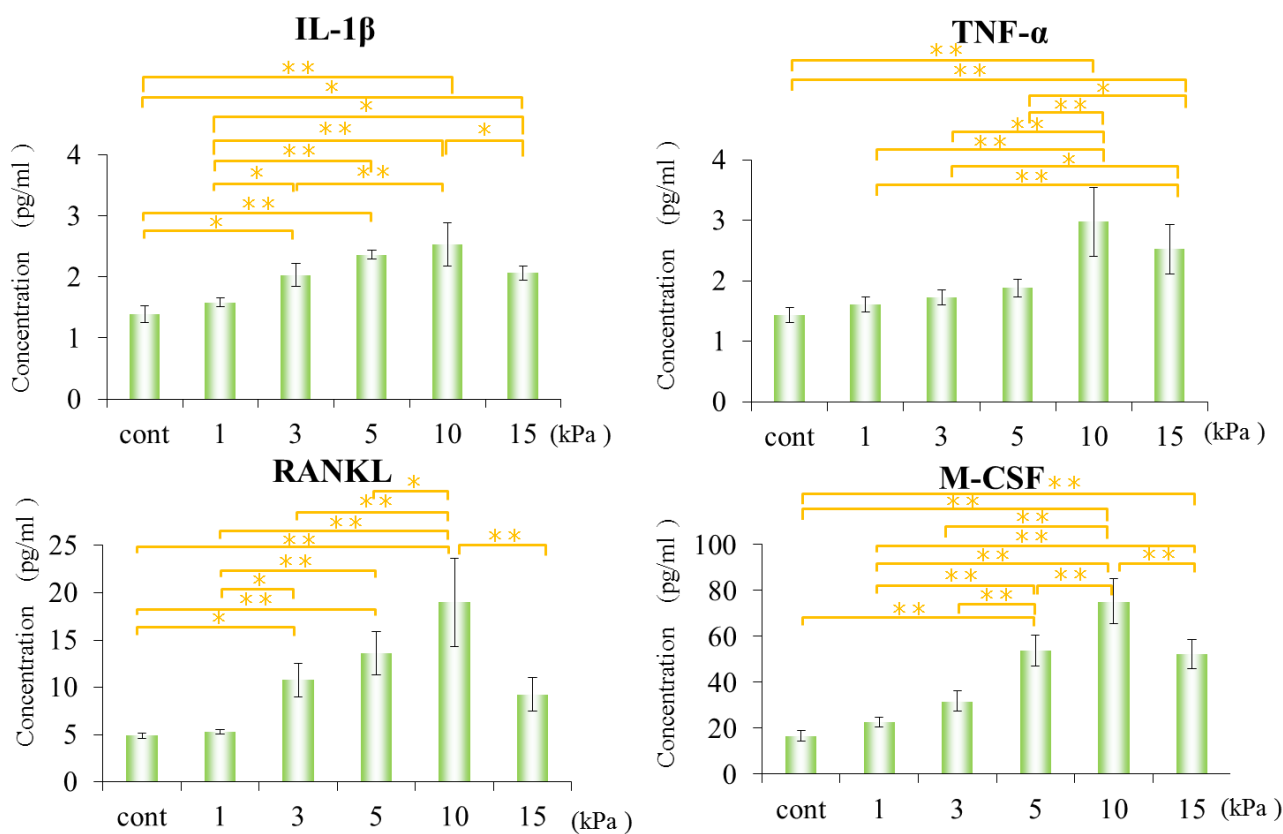


図 16 周期的伸展刺激の大きさが培養ヒト歯髄由来細胞における各因子の遺伝子発現に及ぼす影響

IL-1 β タンパク発現量は、1、3、5、10 および 15 kPa の伸展刺激負荷後にはそれぞれ 1.6、2.0、2.4、2.5、2.1 pg/ml となり、1.3 pg/ml を示したコントロール群に比較して、いずれも大きな値であった(図 17)。さらに、10 kPa の伸展刺激を加えた群では、他の群と比較して有意に大きな値を示した。また、TNF- α タンパク発現量は、それぞれ 1.6、1.7、1.9、3.0、2.5 pg/ml であり、IL-1 β と同様に 1.4 pg/ml 示したコントロール群よりいずれも大きな値となり、10 kPa の伸展刺激を加えた群では、1、3 および 5 kPa 群と比較して有意に大きな値を示した。

RANKL タンパク発現量は、それぞれ 5.2、10.7、13.6、19.0、9.2 pg/ml となり、

4.9 pg/ml のコントロール群よりいずれも大きな値であった。1 kPa と 3 kPa 、 3 kPa と 5 kPa、 5 kPa と 10 kPa、 10 kPa と 15 kPa および 3 kPa と 15 kPa において有意な差が認められた。M-CSF タンパク発現量は、コントロール群では 16.6 pg/ml であったが、伸展刺激を負荷した場合、それぞれ 22.8、31.7、53.8、72.3、52.2 pg/ml となり、1 kPa と 5 kPa 、1 kPa と 10 kPa、5 kPa と 15 kPa および 10 kPa と 15 kPa において有意な差が認められた。



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (各群 $n=3$)

図 17 周期的伸展刺激の大きさが培養ヒト歯髄由来細胞における各因子のタンパク発現に及ぼす影響

3) ガドリニウムの添加が培養ヒト歯髄由来細胞における各因子の遺伝子とタンパク発現に及ぼす影響

10 kPa の周期的伸展刺激を 48 時間負荷した培養ヒト歯髄由来細胞において、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の遺伝子発現量は、10 μ M ガドリニウムの添加により有意に抑制された(図 18)。

タンパク発現量も遺伝子発現量同様、すべての因子において 10 μ M ガドリニウムの添加により有意に抑制された(図 19)。

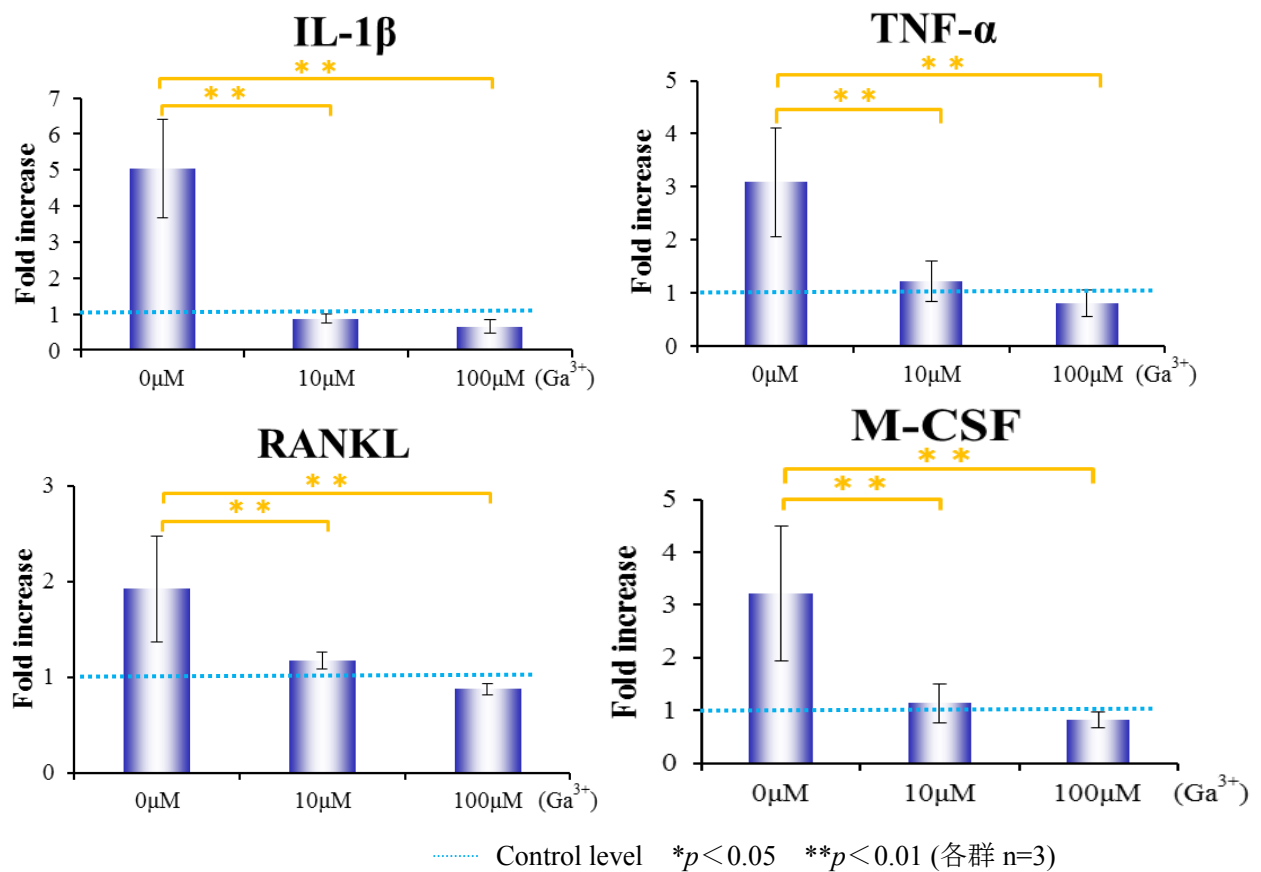
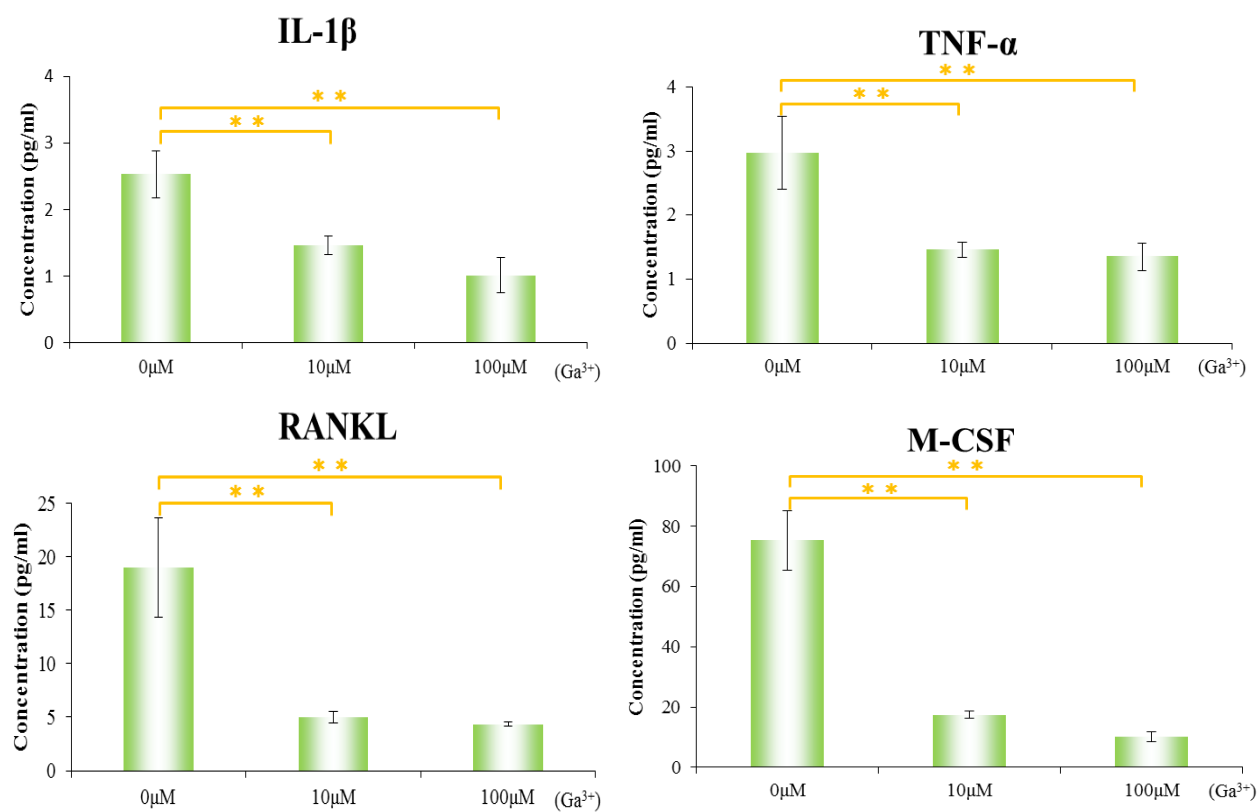


図 18 ガドリニウムの添加が培養ヒト歯髄由来細胞における各因子の遺伝子発現に及ぼす影響 (10 kPa, 48h)



**** $p < 0.01$ (各群 n=3)**

図 19 ガドリニウムの添加が培養ヒト歯髄由来細胞における
各因子のタンパク発現に及ぼす影響 (10 kPa, 48h)

2. 実験的歯の移動に伴う歯根吸収への歯髄組織の影響

1) 歯の移動距離

10g、50g の各矯正力による歯の牽引を行ったところ、いずれも、歯の移動距離において、有髄群と歯内療法処置群との間に有意差は認められなかった(図 20)。

また、有髄群、歯内療法処置群ともに牽引力の差による移動量の差は認められなかった。

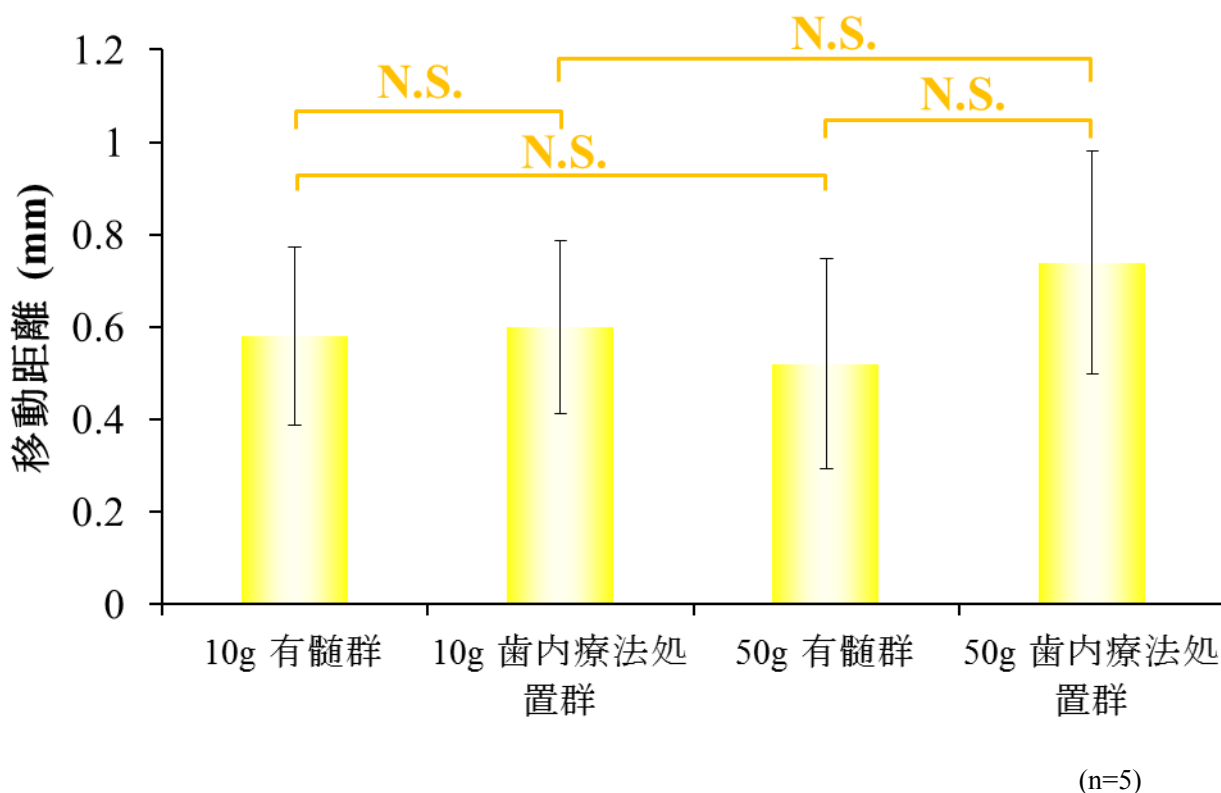


図 20 第一臼歯の移動距離

2) 有髄歯と歯内療法処置歯における歯根内部吸収量の比較

組織像観察の結果、実験的歯の移動開始から 1 ヶ月経過後の有髄群の歯根内部には顕著な吸収窩が認められたのに対し、歯内療法処置群では、歯根内部吸収窩はほとんど認められなかった(図 21A, B)。

また、歯根内部吸収量を計測した結果、10g、50g いずれの牽引力においても歯内療法処置群と比較して、有髄群の方が有意に大きな歯根内部吸収量を示した(図 22A, B)。

牽引力の差による歯根内部吸収量の比較では、有髄群では 10g 群と比較して 50g 群において有意に大きな歯根内部吸収量を示したのに対して、歯内療法処置群では牽引力による差は認められなかった(図 22C, D)。

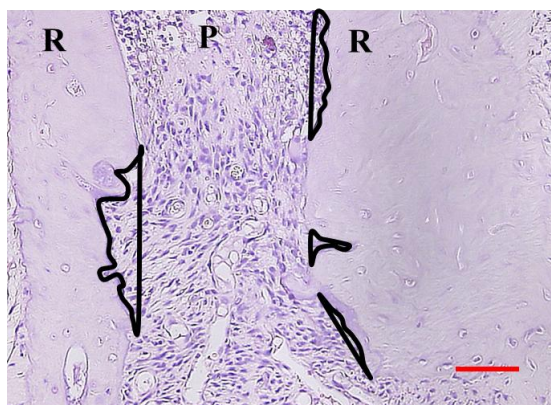


図 21A 有髄群

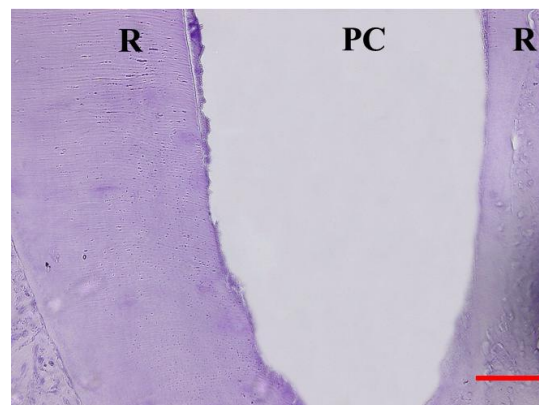
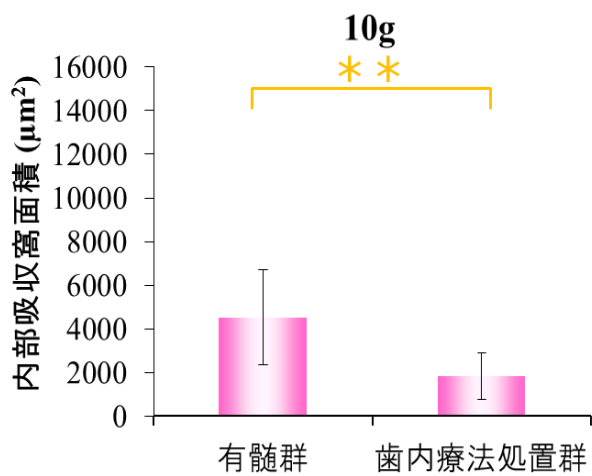


図 21B 歯内療法処置群

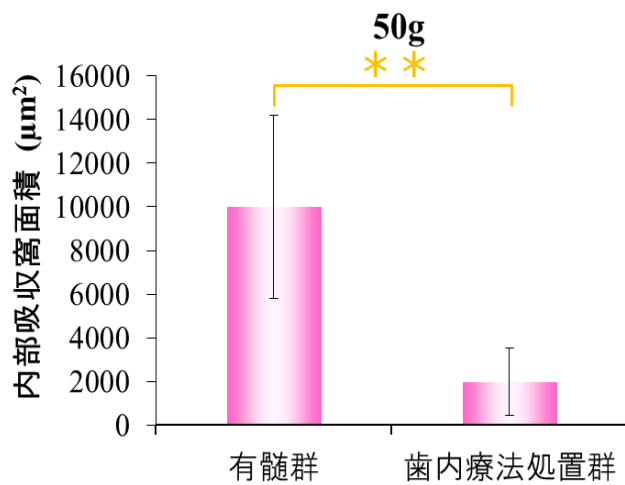
R:歯根, PC:歯髄腔, P:歯髄

— 300 μ m



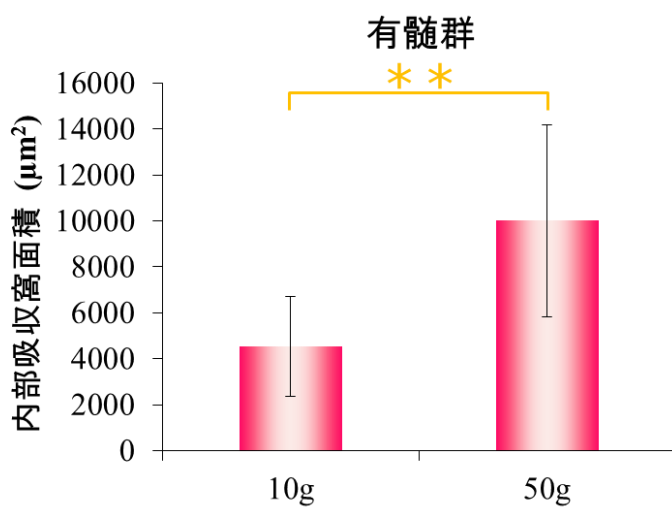
**** $p < 0.01$ (n=4)**

図 22A 牽引力 10g 群における
歯根内部吸収量



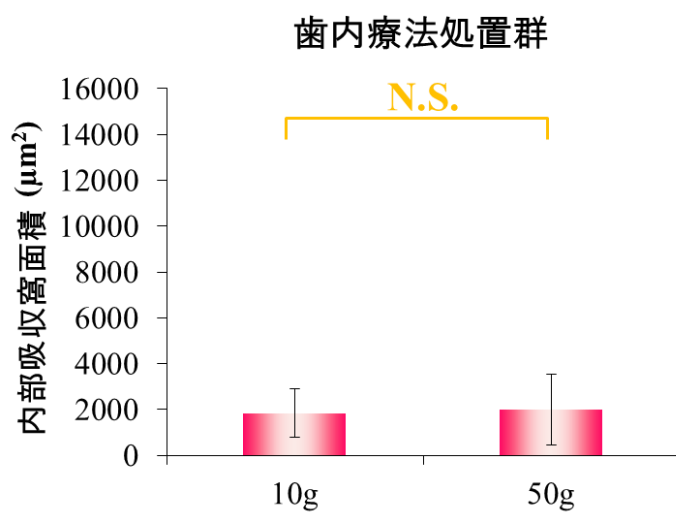
**** $p < 0.01$ (n=4)**

図 22B 牽引力 50g 群における
歯根内部吸収量



**** $p < 0.01$ (n=4)**

図 22C 有髄群における
歯根内部吸収量



(n=4)

図 22D 歯内療法群処置群に
おける歯根内部吸収量

3) 破歯細胞数の算定

実験的歯の移動開始から 1 ヶ月経過後において、各群で歯根表面に破歯細胞が出現し、歯根内部に吸収窩が認められた(図 23A, B, C, D)。また、牽引力 50g における有髄群では、牽引力 10g 群と比較して破歯細胞の増加が認められた。

出現した破歯細胞数については、いずれの牽引力を負荷した場合においても歯内療法処置歯と比較して、有髄歯の方が有意に大きな値を示した(図 24A, B)。

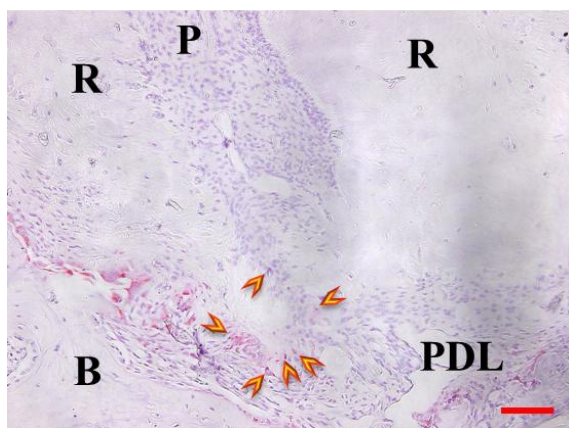


図 23A 牽引力 10g、有髄群の TRAP 染色像

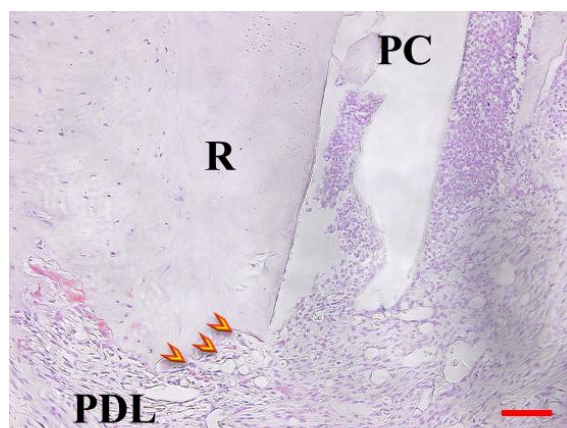


図 23B 牽引力 10g、歯内療法処置群の TRAP 染色像

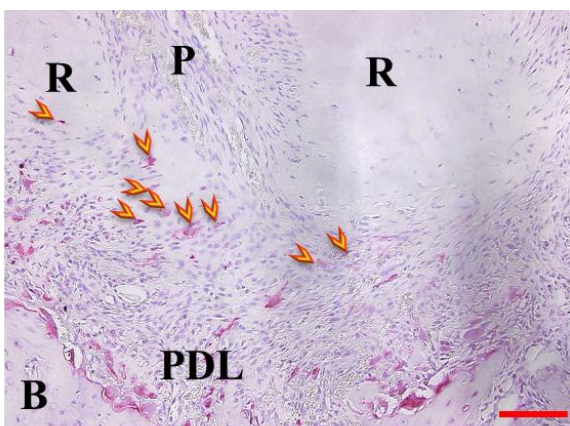


図 23C 牽引力 50g、有髄群の TRAP 染色像

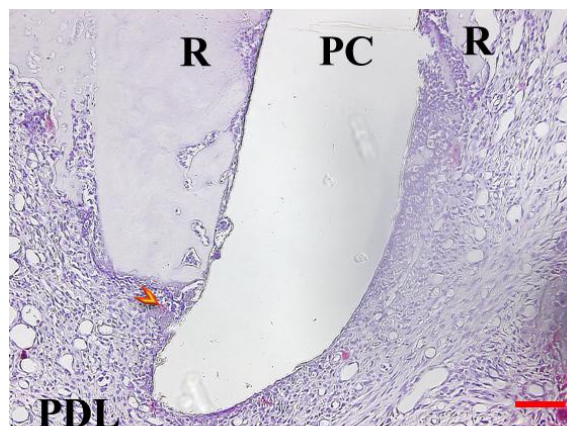
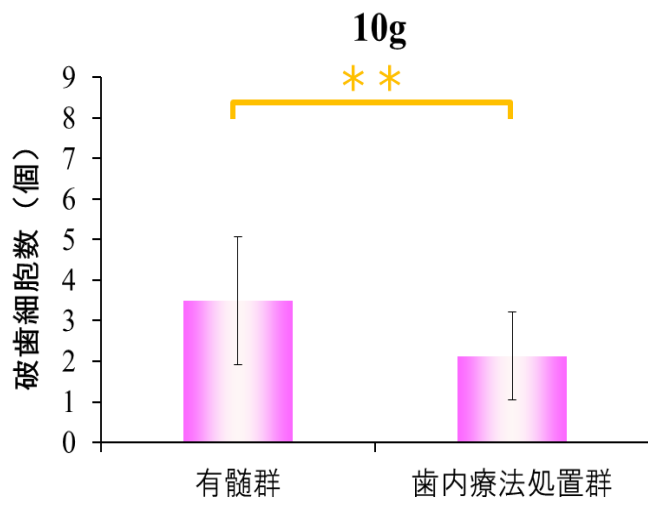


図 23D 牽引力 50g、歯内療法処置群の TRAP 染色像

R:歯根, PDL:歯根膜, PC:歯髓腔, P:歯髓

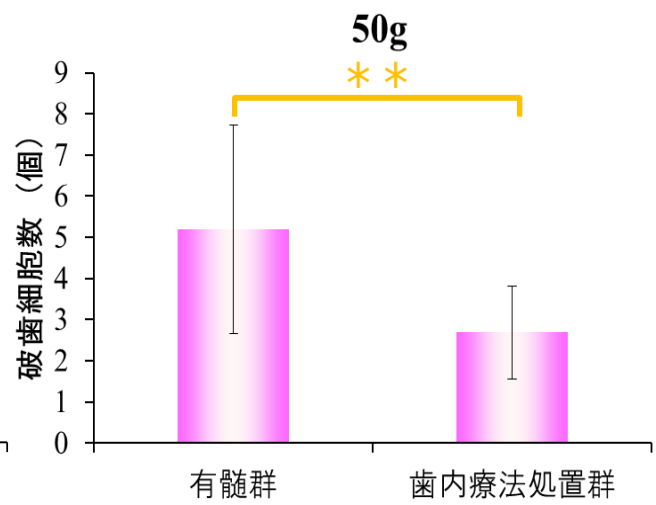
➤ 破歯細胞

— 100 μm



** $p < 0.01$ (n=4)

図 24A 牽引力 10g 群における
破菌細胞数



** $p < 0.01$ (n=4)

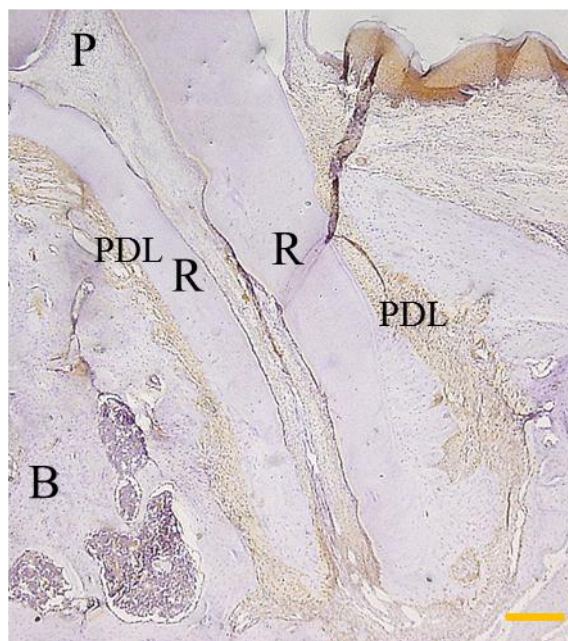
図 24B 牽引力 50g 群における
破菌細胞数

4) 免疫組織学的観察

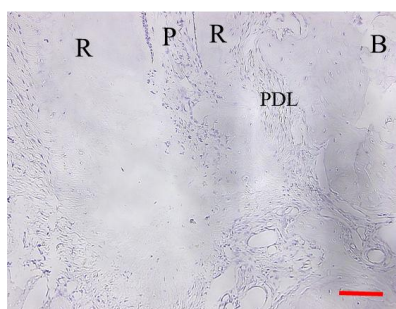
IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の免疫染色を行ったところ、10g、50g 牽引群ともに、根尖部周囲にそれぞれの発現が認められたのに対し、歯根中央部および歯冠部の歯髄組織では、いずれの発現も認められなかった(図 25-28)。

実験的歯の移動を行った群では、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF を発現している細胞が認められたが、非移動群には認められなかった。

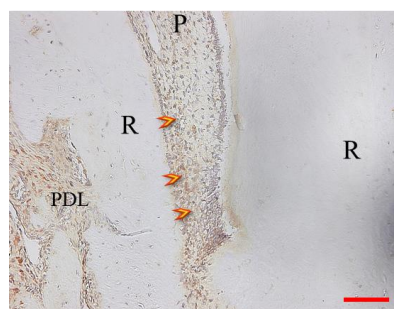
10g 群においては、根尖部においてもあまり発現が認められなかったが、50g 群では多数の IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の陽性細胞の発現が根尖部歯髄組織に認められた。



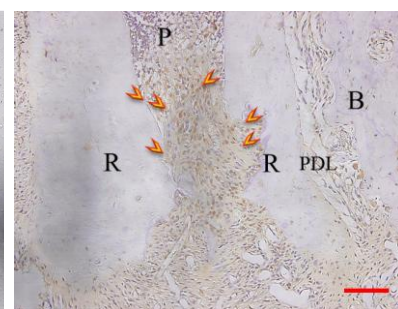
B:歯槽骨
R:歯根
P:歯髓
PDL:歯根膜
—:100 μm
—:300 μm
◀:IL-1β



非移動群

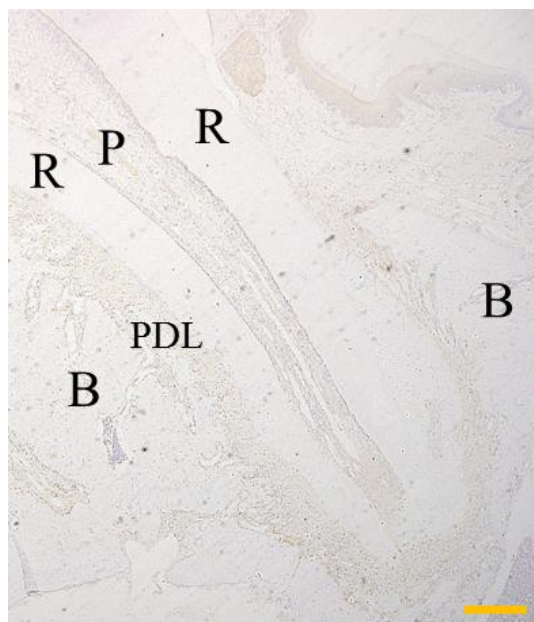


10g 群

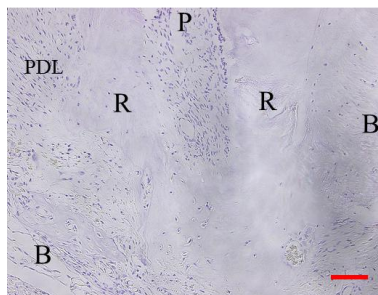


50g 群

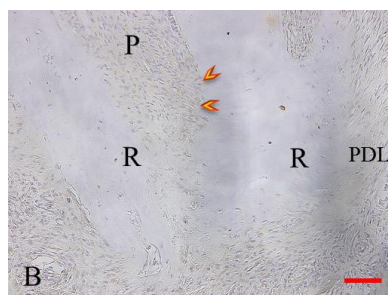
図 25 IL-1β 免疫組織学像



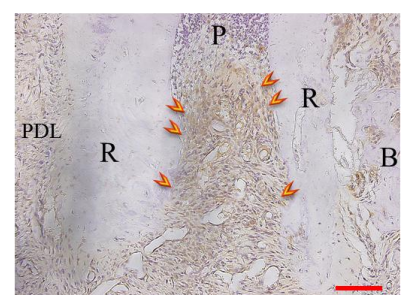
B: 歯槽骨
R: 歯根
P: 歯髄
PDL: 歯根膜
—: 100 μ m
—: 300 μ m
<: TNF- α



非移動群

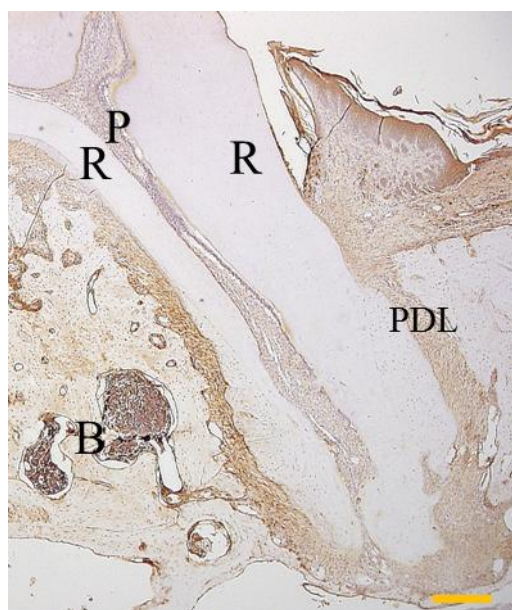


10g 群

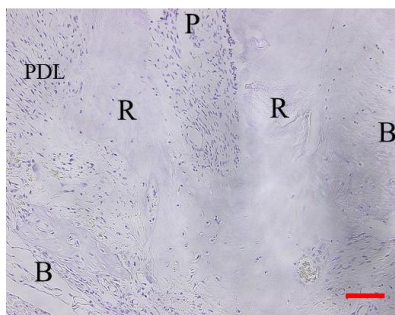


50g 群

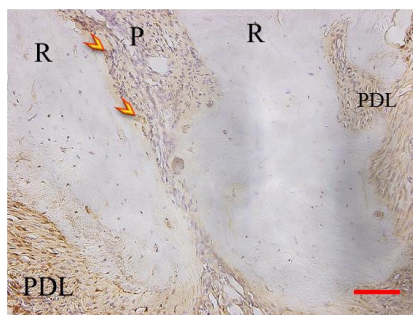
図 26 TNF- α 免疫組織学像



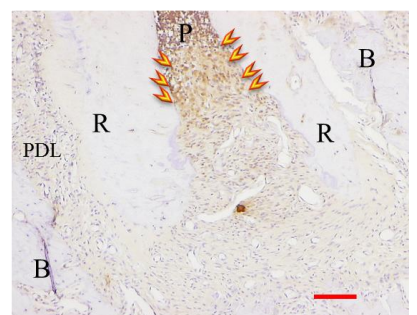
B: 齒槽骨
 R: 齒根
 P: 齒髓
 PDL: 齒根膜
 —: 100 μ m
 —: 300 μ m
 <: RANKL



非移動群

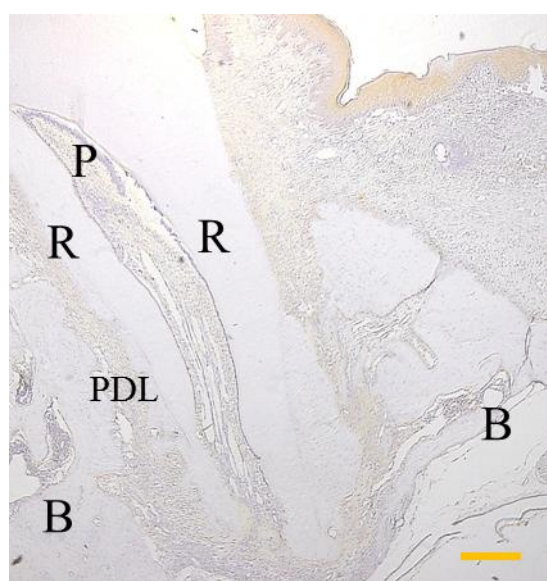


10g 群

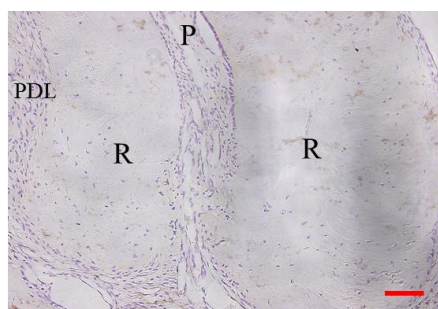


50g 群

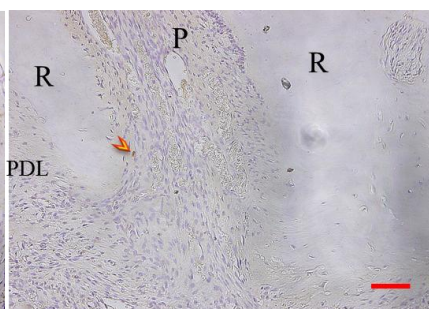
図 27 RANKL 免疫組織学像



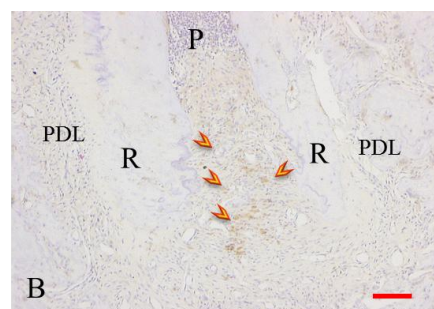
B: 歯槽骨
R: 歯根
P: 歯髄
PDL: 歯根膜
—: 100 μ m
—: 300 μ m
◀: M-CSF



非移動群



10g 群



50g 群

図 28 M-CSF 免疫組織学像

考察

1. 培養ヒト歯髄由来細胞について

歯髄は表層部を除いて、ほぼ均質性の構造を示し、基質の中に歯髄細胞と若干の円形細胞、組織球、未分化間葉細胞などが見られる。本実験では、ヒト歯髄組織を培養したため、単一の細胞によって構成されておらず、上記のような細胞集団を使用した。ヒト歯髄組織から外生した細胞の多くは、線維芽細胞に特徴的な紡錘形を呈し、長い細胞突起を有していた。また、本実験に用いた 3 例の細胞間において、顕著な形態的差異は認められなかった。

2. サイトカインについて

炎症や感染部位において、主に活性化マクロファージから産生されるサイトカインのうち IL-1 β および TNF- α は著明な破骨細胞性骨吸収促進作用を有し、骨吸収性サイトカインとも呼ばれる。IL-1 β には単独での破骨細胞誘導能はなく、成熟破骨細胞の活性化作用が強い。さらに、骨芽細胞や骨髄間質細胞に作用してプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生を誘導し、RANKL 発現を亢進させるため、炎症性骨欠損を引き起こす強力な因子の一つと考えられている(高柳, 2001)。

一方、TNF- α は、様々な病原体あるいはエンドトキシン等の関連物質の刺激により、単球、マクロファージあるいは T 細胞などから産生されるサイトカイ

ンであり、近年、免疫系だけでなく骨代謝においても重要な役割を果たしていることが明らかにされた。TNF- α は、破骨細胞を誘導して骨破壊を生じさせるとともに、骨芽細胞の分化抑制およびアポトーシスを誘導すると考えられている(北浦, 2011)。M-CSF は、骨芽細胞や骨髄間質細胞によって産生され、単球、マクロファージ系細胞の増殖と分化を促進するサイトカインである。大理石骨病マウス(*op/op*)における破骨細胞の欠損は、M-CSF の遺伝子異常が原因であることが報告され(Felix *et al.*, 1990)、さらに Kodama ら(1991)により *op/op* マウスに遺伝子組換え型ヒト M-CSF を投与すると、大理石骨病が治癒することが示された。これらの報告から、M-CSF は、破骨細胞の増殖と分化に重要な役割を果たしていることが実証された。また、M-CSF は破骨細胞と同様、破歯前駆細胞の増殖と分化の促進、および成熟破歯細胞への融合と延命に関与すること報告されている(中村ら, 2006)。一方、破歯前駆細胞は骨芽細胞や骨髄間質細胞との接触を介してRANKLを認識し、M-CSF の存在下で破骨細胞に分化することから、骨芽細胞は骨形成能に加えて、破骨細胞の分化誘導の促進作用を有していることが知られている(Udagawa *et al.*, 1991)。機械的刺激の受容により、骨芽細胞の細胞膜上に RANKL が発現誘導されるとともに、破骨・破歯前駆細胞において RANKL の受容体である receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)が発現することにより、破歯前駆細胞が破骨細胞へと分化、融合し、さらには、成熟破

骨細胞の遊走および吸収能が活性化される (Teitelbaum, 2000; Boyle *et al.*, 2003)。

以上の背景より、我々は根尖部における歯根内部吸収を亢進させる重要な因子として、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF に焦点を絞り、検討を行った。

3. 伸展力の大きさと負荷時間について

一般に、矯正歯科治療において上顎犬歯を遠心移動する際には、約 60g の矯正力を負荷するが(Proffit, 1999)、これを犬歯遠心面に生じた圧縮応力に換算すると 13 kPa に相当する(Iwasaki *et al.*, 2000)。本研究において、培養ヒト歯髓由来細胞に負荷した応力は伸展刺激であるが、Iwasaki らの報告した圧縮応力を参考に 10 kPa の伸展刺激を負荷した。その結果、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の遺伝子およびタンパク発現量が有意に亢進したことから、歯髓組織が歯の移動時に発生する応力相当の何らかの機械的刺激を受容すると、上記のサイトカインを発現することが示唆された。

また、本研究では各因子の遺伝子およびタンパク発現量は経時的に増加を示し、48 時間で最大となった。この結果は、ヒト歯根膜細胞に 15% elongation の周期的伸展刺激を 0.5、1.5、6、24、48 および 72 時間負荷した結果、RANKL の遺伝子発現量が経時的に増加したという報告と類似している(Kanzaki *et al.*, 2006)。さらに、ヒト歯根膜細胞に 9%あるいは 18% elongation の周期的伸展刺激

を 1、3 あるいは 5 日間負荷した結果、いずれの日数においても IL-1 β の産生量は 18% elongation の伸展刺激を負荷した場合に最大の値を示し、伸展力が強いほど IL-1 β の産生量が多くなることが報告されている(Shimizu *et al.*, 1994)。本研究においても、1 kPa から 10 kPa の伸展力までは力が大きくなるにつれ、IL-1 β の遺伝子およびタンパク発現量が増加した。これらの結果から、培養ヒト歯髓由来細胞においても培養ヒト歯根膜細胞と同様に、伸展刺激により炎症性サイトカインや吸収性因子を発現することが明らかとなり、根尖部における歯根内部に関与する可能性が示唆された。

4. S-A チャネルによる伸展刺激の受容とシグナル伝達について

歯周組織構成細胞に対する周期的伸展刺激によるサイトカインの発現については、マウス骨芽細胞様細胞に周期的伸展刺激を負荷し、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と M-CSF の遺伝子およびタンパク発現を認めた Motokawa ら(1994)の報告や、歯根膜細胞に周期的伸展刺激を負荷し、RANKL の発現を認めた Kanzaki ら(1999)の報告がある。しかしながら、培養ヒト歯髓由来細胞においてはこれまでに報告がなく、伸展刺激に対する反応は全く不明であった。

細胞膜の伸展に反応するイオンチャネルである S-A チャネルは、トリの骨格筋細胞において発見され(Guharay *et al.*, 1984)、次いで骨芽細胞にも存在している

ことが報告された(Duncan *et al.*, 1989)。Naruse ら(1993)はシリコン膜上で培養したヒト臍帯内皮細胞に機械的伸展刺激を負荷すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度は上昇したが、S-A チャネルの阻害剤であるガドリニウムの添加や、 Ca^{2+} を含有していない培養液中では、細胞内 Ca^{2+} 濃度に変化が生じないことを明らかにした(Naruse *et al.*, 1993, 1998)。このことから、細胞への伸展刺激は、ヒト臍帯内皮細胞の細胞膜上にある Ca^{2+} 透過性 S-A チャネルを介して細胞内に情報伝達されていることが示唆された。本研究では、10 μM および 100 μM のガドリニウムを添加し、周期的伸展刺激による IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF 発現について検討を行った。その結果、ガドリニウムの添加により、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の遺伝子とタンパク発現は有意に抑制された。この結果から、ヒト歯髓細胞において、周期的伸展刺激の情報は S-A チャネルを介して細胞内に伝達され、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の発現が亢進することが強く示唆された。

5. 歯髓組織の有無が歯の移動距離に及ぼす影響について

一般的に、歯に矯正力を負荷すると、歯は以下に示すような三つの移動様相を示す(溝口, 2005)。

1. 歯根膜および歯槽骨の粘弾性変形による初期の移動

2. 硝子様変性組織の出現による歯の移動の停滞

3. 変性組織の消失と骨改造に伴う歯の移動

弱い矯正力が作用した場合には、変性組織はほとんど形成されず、歯槽骨壁では直接性の骨吸収が進行し、歯は停滞期のほとんどない直線的で緩やかな移動様相を示す。一方、過大な矯正力によって広範な硝子様変性が出現し、その吸収機転が遅延した場合には、歯の移動の停滞期は長期化し、効率的な歯の移動が行われなくなる。

今回、ラット第一臼歯を近心移動させた結果、有髄群と歯内療法処置歯群間に有意差は認められなかった。このことから、歯髄組織の有無は歯の移動に顕著な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

6. 牽引力の大きさが歯根吸収に及ぼす影響について

ヒト犬歯の至適矯正力は、約 60 g であるとされているが、この値は歯根表面積により変わるため、臼歯ではさらに大きな値となる(Proffit, 1999)。ラット第一臼歯に対する矯正力をヒトの矯正力に換算すると、犬歯で約 10 倍、第一大臼歯で約 20 倍になるとされているため(Kameyama *et al.*, 2003)、ラット臼歯の至適矯正力は 10g となる。実際に、ラットの第一臼歯に 10 g の矯正力を負荷した場合、歯根吸収窩はわずかしら認められず、かつ歯の移動距離は最大となったとの報

告があることから(Gonzales *et al.*, 2008)、本研究では 10 g の牽引力をラット臼歯の近心移動に至適条件として用いた。

一方、ラット臼歯に過度な矯正力である 50 g の矯正力を負荷した場合、歯根吸収率が増大することは過去にも報告されている(Reitan, 1974; Darendeliler *et al.*, 2004; Chan and Darendeliler, 2005; Harris *et al.*, 2006; Gonzales *et al.*, 2008)が、これらは、歯根膜に接している歯根表面の吸収率(歯根外部吸収率)を計測したものである。本研究では、10 g あるいは 50 g の牽引力を負荷した 2 群の比較において、50 g 群の歯根内部吸収率が有意に高い値を示した。これは、50g の過度な矯正力により根尖部歯髓組織における、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の発現が上昇したことにより、より大きな歯根内部吸収が惹起されたものと考えられる。

7. 歯の移動後に根尖部歯髓組織に発現するサイトカインについて

本研究では、根尖部歯髓内における観察を行った結果、移動群では IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF 陽性細胞の発現が認められたのに対し、非移動群では発現が認められなかった。本結果から、歯の移動時における歯根内部吸収の発現には、これらの因子が関与することが示された。また、実験群において 10 g 群よりも 50 g 群において IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF 陽性細

胞の発現が多くみられたことは、*in vitro* の結果と一致した。歯根吸収は、圧迫側の外部吸収が主たる要因であることは周知の事実であるが、歯の移動、とりわけ歯根尖の移動に伴って周囲組織が伸展、圧迫され、結果的に根尖部歯髓組織に過度な機械的負荷が生じたと想定すると、根尖部歯髓組織からの各因子の発現が亢進し、破歯細胞が分化、誘導された結果、根尖部における内部吸収が進行するという機序が推察される。しかしながら、歯髓反応による根尖部の内部吸収や、歯髓組織から産生されたサイトカインが歯根吸収全体に及ぼす影響は不明であり、今後の検討課題である。

8. 本研究の臨床的示唆

現在のところ、歯根吸収を確実に防止する方法は確立されていない。しかしながら、歯根吸収が認められた場合、治療を一時的に休止することで吸収が抑制されたという報告や(Cheng *et al.*, 2010)、近年の矯正歯科材料の進歩に伴い60g 以下の弱い矯正力でも効率的な歯の遠心移動が可能となったという報告があることから(Iwasaki *et al.*, 2000)、治療初期からレントゲン撮影を定期的に行い、歯根吸収が認められたら、速やかに治療の休止や矯正力を減じる等の対応を行う必要があると考えられる。

総括

1. ヒト歯髄細胞に周期的伸展刺激を加えることにより IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の遺伝子とタンパク発現量は経時的に増加を示し、48 時間で最大となった。

また、伸展刺激の大きさによる比較では、10 kPa で最大値を示した。

2. IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF の遺伝子、タンパク発現量ともにガドリニウムを添加することで、その発現が抑制され、その効果は濃度依存的であった。

3. 有髄群における歯根内部吸収量は歯内療法処置群と比較して有意に大きく、その値は牽引力 10 g と比較して 50 g の群において有意に大きかった。

また、有髄群の移動歯の根尖付近には、IL-1 β 、TNF- α 、RANKL および M-CSF を発現している細胞が多く認められた。

以上の結果より、歯の移動時に根尖部歯髄細胞に対し何らかの機械的伸展刺激が生じ、S-A チャネルを介して、炎症性サイトカインが産生されることが明らかとなり、これにより、破歯細胞が誘導され、歯根内部吸収が惹起される可

能性が強く示唆された。

有髄歯では、歯根膜圧迫側の外部吸収と、歯髄組織が産生する炎症性サイトカインや破骨細胞分化誘導因子により、内部吸収が引き起こされる。一方、歯内療法処置歯では根尖部歯髄によるサイトカインの産生が生じず、根管内部での破骨細胞はほとんど誘導されないため、根尖部内部吸収量は少なくなるものと考えられる。

参考文献

- Abass S, Hartsfield J (2007). Orthodontics and external apical root resorption. *Semin Orthod* 13(4):246-256.
- Alexander SA (1996). Levels of root resorption associated with continuous arch and sectional arch mechanics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 110(3):321-324.
- Azuma Y, Kaji k, Katogi R (2000). TNF- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 275:4858-2864.
- Balducci L, Ramachandran A, Hao J, Narayanan K, Evans C, George A (2007). Biological markers for evaluation of root resorption. *Arch Oral Biol* 52(3):203-208.
- Beck BW, Harris EF (1994). Apical root resorption in orthodontically treated subjects: analysis of edgewise and light wire mechaics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 105(4):350-361.
- Bender IB, Byers MR, Mori K (1997). Periapical replacement resorption of permanent, vital, endodontically treated incisors after orthodontic movement: report of two cases. *J Endod* 23(12):768-73..
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937):337-342.
- Brezniak N, Wasserstein A (1993). Root resorption after orthodontic treatment: Part2. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 103(2):138-146.
- Brin I, Tulloch JF, Koroluk L Philips C (2003). External apical root resorption in Class II malocclusion : a retrospective review of 1- versus 2-phase treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 124(2):151-156.
- Brudvik p, Rygh P (1993). The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. *Eur J Orthod* 15(4): 249-263.

Chan E, Darendeliler MA (2005). Physical properties of root cementum: Part 5. Volumetric analysis of root resorption craters after application of light and heavy orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 127(2):186-195.

Cheng LL, Türk T, Elekdağ-Türk S, Jones AS, Yu Y, Darendeliler MA (2010). Repair of root resorption 4 and 8 weeks after application of continuous light and heavy forces on premolars for 4 weeks: a histology study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 138(6):727-734.

Darendeliler MA, Kharbanda OP, Chan E, Srivicharnkul P, Rex T, Swain MV *et al.* (2004). Root resorption and its association with alterations in physical properties, mineral contents and resorption craters in human premolars following application of light and heavy controlled orthodontic forces. *Orthod Craniofac Res* 7(2):79-97.

Duncan R, Misler S (1989). Voltage-activated and stretch-activated Ba^{2+} conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106). *FEBS Lett* 251 17-21.

Felix R, Cecchini MG, Fleisch H (1990). Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 127(5):2592-2594.

Goldie RS, King GJ (1984). Root resorption and tooth movement in orthodontically treated, calcium-deficient, and lactating rats. *Am J Orthod* 85(5):424-430.

Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N (2008). Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod* 78(3):502-509.

Guharay F, Sachs F (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* 352:685-701.

Hall AM (1978). Upper incisor root resorption during stage II of the Begg technique: two case reports. *Br J Orthod* 5(1):47-50.

Hamada K, Yamaguchi S, Abe S, Ichinose S, Abe T, Yamashita Y, Amagasa T (2009). In Vivo Bone Formation by Human Dental Pulp Cells Cultured without Cell Sorting and Osteogenic Differentiation Induction. *J Oral Tissue Engin* 7(1):15-25.

Harris DA, Jones AS, Darendeliler MA (2006). Physical properties of root cementum: Part 8. Volumetric analysis of root resorption craters after application of controlled intrusive light and heavy orthodontic forces: a microcomputed tomography scan study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130(5):639-647.

Harris EF, Butler ML (1992). Patterns of incisor root resorption before and after orthodontic correction in case with anterior open bite. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 101(2):112-119.1.

Hartsfield JK, Jr. (2009). Pathways in external apical root resorption associated with orthodontia. *Orthod Craniofac Res* 12(3):236-242

Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Morton J (2009). Human tooth movement in response to continuous stress of low magnitude. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 117(2):175-183.

Kameyama T, Matsumoto Y, Warita H, Soma K (2003). Inactivated periods of constancy orthodontic forces related to desirable tooth movement in rats. *J Orthod* 30(1):31-37.

Kanzaki H, Chiba M, Sato A, Miyagawa A, Arai K, Nukatsuka S *et al.* (2006). Cyclical Tensile Forces on Periodontal Ligament Cells Inhibits Osteoclastogenesis through OPG Induction. *J Dent Res* 85(5):457-462.

Kanzaki M, Nagasawa N, Kojima I, Sato C, Naruse K, Sokabe M, Iida H (1999). Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel. *Science* 285, 882-886.

Kayhan F, Küçükkeleş N, Demirel D (2000). A histologic and histomorphometric evaluation of pulpal reactions following rapid palatal expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 117(4):465-73.

Kereshanan S, Stephenson P, Waddington R (2008). Identification of dentine sialoprotein in gingival crevicular fluid during physiological root resorption and orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 30(3):307-314.

Ketcham A (1927). A preliminary report of an investigation of apical root resorption permanent teeth. *Intl J Orthodontia* 13:97-99.

Killiany DM (1999). Root resorption caused by orthodontic treatment: an evidence-based review of literature. *Semin Orthod* 5(2):128-133.

北浦 英樹 (2011). TNF- α の骨代謝作用. 骨粗鬆症治療 10(11):10-14.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E (2000). TNF- α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J EXP Med* 191:257-285.

Kodama H, Yamasaki, A, Nose M, Niida S, Ohgame Y, Abe M, *et al.* (1991). Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (*op/op*) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 173:269-272.

Levander E, Malmgren O (1988). Evaluation of the risk of root resorption during orthodontic treatment: a study of upper incisors. *Eur J Orthod* 10(1):30-38.

Levander E, Malmgren O, Stenback K (1998). Apical root resorption during orthodontic treatment of patients with multiple aplasia: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod* 20(4):427-434.

Linge BO, Linge L (1983). Apical root resorption in upper anterior teeth. *Eur J Orthod* 5(3):173-183.

Linge L, Linge BO (1991). Patient characteristics and treatment variables associated with apical root resorption during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 99(1):35-43.

Linsuwanont B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H (2002). Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduous tooth resorption in bovine odontoclasts. *Bone* 31(4):472-478.

Malmgren O, Goldson L, Hill C, Orwin A, Petrini L, Lundberg M (1982). Root resorption after orthodontic treatment of traumatized teeth. *Am J Orthod* 82(6):487-491.

Massler M, Malone AJ. (1954). Root resorption in human permanent teeth: a roentgenographic study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 40:619-633.

松田 弥生, 本川 雅英, 加来 真人, 河田 俊嗣, 山本 浄子, 柄 なつみ, 他 (2011). 矯正歯科治療に伴う歯根吸収と宿主要因との関連性に関する臨床調査. *Orthod Waves Japanese Edition* 70(1):21-31.

Matsumoto Y (1994). Morphological and functional properties of odontoclasts on dentine resorption. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 61:123-143.

Mirabella AD, Årtun J (1995). Risk factors for apical root resorption of maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 108(1):48-55.

溝口 到 (2005). 矯正力と生体反応. 矯正歯科治療に伴う生体反応. 葛西 一貴, 亀田 晃, 川本 達雄, 後藤 滋巳, 相馬 邦道, 丹羽 金一郎編. 第 4 版 歯科矯正学:172-182, 医歯薬出版, 東京

Motokawa M, Kaku M, Tohma Y, Kawata T, Fijita T, Kohno S, Tsutsui K, Ohtani J, Tenjo K, Shigekawa M, Kamada H, Tanne K (2005). Effects of Cyclic Tensile Forces on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Macrophage-colony-stimulating Factor (M-CSF) in Murine Osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Dent Res* 84, 422-427.

中村 美どり, 中村 浩志, 宮沢 浩夫, 宇田川 信之, 松坂 賢一 (2006). 4 章 骨のリモデリングⅡ. 分子生物学的視点から. 下野 正基, 前田 健康, 溝口 到 編. 歯の移動の臨床バイオメカニクス. 60-86. 医歯薬出版, 東京

Naruse K, Sokabe M (1993). Involvement of stretch-activated ion channels in Ca^{2+} mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol* 264, C1037-C1044.

Naruse K, Yamada T, Sokabe M (1998). Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *Am J Physiol* 274, H1532-H1538.

Odenrick L, Brattstrom V (1983). The effect of nailbiting on root resorption during orthodontic treatment. *Eur J Orthod* 5(3):185-188.

Odenrick L, Brattstrom V (1985). Nailbiting: frequency and association with root resorption during orthodontic treatment. *Br J Orthod* 12(2):78-81.

Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ Sasaki T (2001). Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Res* 264(3):305-311.

Proffit WR (1999). Contemporary orthodontics. Mosby. (プロフィット WR. 高田 健治 (訳)(2004). 新版プロフィットの現代歯科矯正学. 300-307. クインテッセンス出版)

Reitan K (1974). Initial tissue behavior during apical root resorption. *Angle Orthod* 44(1):68-82.

Remington DN, Joondeph DR, Artun J, Riedel RA, Chapko MK. (1989). Long-term evaluation of root resorption occurring during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 96:43-46.

Rygh P (1977). Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. *Angle Orthod* 47(1):1-16.

Sahara N, Ashizawa Y, Nakamura K, Deguti T, Suzuki K (1998). Ultrastructural features of odontoclasts that resorb enamel in human deciduous teeth prior to shedding. *Anat Res* 252(2):215-228.

Sameshima GT, Sinclair PM (2001). Predicting and preventing root resorption: Part II. Treatment factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 119(5):511-515.

Sameshima GT, Sinclair PM (2004). Characteristics of patients with severe root resorption. *Orthod Craniofac Res* 7(2):108-114.

Sandstedt C (1904). Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung. *Nord Tandl*

Tidskr 5:236-256.

Sasaki T (2003). Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech* 61(6):483-495.

笹本 智子, 本川 雅英, 松田 弥生, 加来 真人, 河田 俊嗣, 尾崎 徳継, 他 (2011). 矯正歯科治療において認められる歯根吸収の危険因子に関する臨床調査. 広大歯誌 43(2):113-123.

Seltzer S, Bender IB (1984). The dental pulp. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott 210.

Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Ozawa Y, Saito K, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y (1994). Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 beta production by human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 29(5):328-333.

Smith NH (1978). Monostotic Paget's disease of the mandible presenting with progressive resorption of the teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46(2):246-253.

Spector JK, Rothenhaus B, Herman RI (1974). Pulpal necrosis following orthodontic therapy. Report of two cases. *NY State Dent J* 40(1):30-2.

Spurrier SW, Hall SH, Joondeph DR, Shapiro PA, Reidel RA (1990). A comparison of apical root resorption during orthodontic treatment in endodontically treated and vital teeth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 97:130-134.

Takada K, Kajiya H, Fukushima H, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K (2004). Calcitonin in human odontoclasts regulates root resorption activity via protein kinase A. *J bone Miner Metab* 22(1):12-18.

Taner T, Ciger S, Sencift Y (1999). Evaluation of apical root resorption following extraction therapy in subjects with Class I and Class II malocclusions. *Eur J Orthod* 21(5):491-496.

Teitelbaum SL (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289(5484):1504-1508.

寺尾 明子, 本川 雅英, 加来 真人, 河田 俊嗣, 笹本 智子, 尾崎 徳継, 他

(2012). 開咬症例における歯根形態異常および矯正歯科治療による歯の位置変化が歯根吸収発現に及ぼす影響. *Orthod Waves Japanese Edition* 71(3):178-186.

高柳 広 (2001). サイトカインと RANKL による破骨細胞分化抑制. *実験医学* 19(10):1203-1209.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 25(5):517-523.

Wang Z, McCauley LK (2011). Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis* 17(2):129-142.

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御教示、御支援ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科応用生命科学部門（歯科矯正学）谷本幸太郎教授、丹根 一夫名誉教授に心より感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり、御助言、御校閲いただきました同研究科応用生命科学部門（歯周病態学）栗原 英見教授、同研究科基礎生命科学部門（口腔顎顔面病理病態学）高田 隆教授、ならびに同研究科統合健康科学部門（生体構造・機能修復学）里田 隆博教授に深く感謝申し上げます。

本研究の計画、遂行において貴重な御助言を頂くと共に、直接ご指導を賜りました神奈川歯科大学歯科矯正学講座 河田 俊嗣教授、広島大学大学院医歯薬学総合研究科応用生命科学部門（歯科矯正学）加来 真人講師、本川 雅英助教、貴重な御助言を頂きました同講座 藤田 正助教、松田 弥生博士、寺尾明子博士、また、本研究の遂行にご理解御協力を頂いた顎口腔頸部医科学講座歯科矯正学の皆様ならびに関係者各位に厚く御礼申し上げます。最後に、勉学、研究の機会を与えるとともに、これまで常に私を支えてくれた家族、友人に心から感謝いたします。