OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	歯の実験的移動に及ぼす活性型ビタミンD3（1,25（OH）2D3）局所投与の影響
Author(s)	川上, 正良
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/37084
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

歯の実験的移動に及ぼす活性型ビタミンD_3（$1,25(OH)_2D_3$）局所投与の影響

川上正良

（平成２年　月　日受付）

緒言

活性型ビタミンD_3（$1,25(OH)_2D_3$）は、カルシウム調節ホルモンの一つとして知られてきたが、骨の吸収、添加という骨代謝のメカニズムにおいて、近年、重要な役割を果していることが明らかとなってきた。

Raiszら[1]は、骨の器官培養を用いた研究により、$1,25(OH)_2D_3$が骨吸収を惹起することを報告し、強力な骨吸収因子であることを示した。Abeら[2]は、肺胞マクロファージを用いた研究により、$1,25(OH)_2D_3$が細胞の分化誘導能を持つことを発見し、Roodmanら[3]は、骨髄培

養細胞に1,25$(OH)_2D_3$を作用させると破骨細胞の形成が促進されることを報告した。こうして、1,25$(OH)_2D_3$は、骨髄系の細胞に作用して破骨細胞の分化を誘導することが示唆されている。

一方、Rodanら[4]は、1,25$(OH)_2D_3$が骨芽細胞の分化を促進することを示唆し、Larssonら[5]は、ラットに1,25$(OH)_2D_3$を投与すると骨量を増加させることを報告した。そこで、1,25$(OH)_2D_3$は、骨吸収だけでなく骨形成にも影響を及ぼすことが明らかとなってきた。

矯正力による歯の移動に伴い、圧迫側では骨吸収が、牽引側では骨添加が起こることはよく知られており、こうした歯の移動に伴う歯槽骨の改造機転に、骨を標的器官とする1,25$(OH)_2D_3$がどのような影響を及ぼすかを検討することは、極めて興味深い。しかしながら、この点に関して詳細に検討した報告はほとんど見あたらない。1989年に、本研究と相前後してCollinsら[6]が、猫の犬歯を実験的に

移動させ、同時に歯根膜腔内に1,25$(OH)_2D_3$を投与すると、歯の移動量が増加することを報告した。しかし、歯の移動に伴う組織変化に関して詳細な検討はなされていない。

そこで、本研究は、ラットを用いて歯の実験的移動を行い、同時に1,25$(OH)_2D_3$を直接骨に作用させるために、歯槽骨への局所投与を行なうことにより、歯槽骨の組織学的変化および歯の移動量に及ぼす影響について検討したものである。

材料と方法

1. 歯の実験的移動に伴う破骨細胞の出現数の変化について

1)1,25$(OH)_2D_3$の投与濃度による影響

実験に用いた動物は、ウィスター系ラット（体重180～200g、雄性、日本クレア、東京）112匹である。各ラットは、可及的に同一条件下で飼育し、飼料（オリエンタル固形飼料M.F）および水（水道水）は、それぞれ自由摂取させた。

歯の実験的な移動には、Waldo[7]の方法（図1）を適用した。すなわち、urethane（500 mg/kg, i.p.）とsodium pentobarbital（13 mg/kg, i.p.）の混合麻酔下で、両側の上顎第1臼歯と第2臼歯の歯間部に矯正用ゴム片（厚さ0.5mm 1/4 light elastic、Unitek、U.S.A.）を挿入した。

1,25$(OH)_2D_3$（サンスター株式会社,大阪、日本ロシュ株式会社,東京より供与）は、あら

かじめ10^{-4}Mの濃度に純エタノール（和光純薬、大阪）で希釈、これを生理的食塩水（以下salineと記す）により、10^{-12}～10^{-7}Mの濃度に調製した。この溶液20μlを、マイクロシリンジ（Hamilton Company Reno、U.S.A.）により、上顎右側第1臼歯の歯根分岐部へ向けて、口蓋粘膜下に投与し、反対側には同量のsalineを投与した（注射針30G）。ゴム挿入直後、翌日、翌々日の3日間毎日1回投与した。対照群は、歯の移動を行わず投与のみとした。

実験終了後、屠殺して上顎骨を摘出した。10%中性ホルマリンで固定、Plank-Rychloの脱灰液により2日間脱灰後、上昇アルコール系列により脱水して、kushidaら[8]の方法に従って、Quetol-523M（日新EM社、東京）で樹脂包埋した。各試料は、頬側の近遠心根を含む厚さ3μmの連続切片とし、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し検鏡した。

組織学的観察は、上顎第1臼歯の頬側根の歯根中隔を中心とした部位について行った。

観察・計測にあたっては、計測誤差を少なくし、かつ再現性を得るため、上顎第一臼歯の頬側から舌側へと薄切を進め、図1に示すような頬側近遠心根が根尖まで観察される切片を作製した。それらの切片について、縦1050μm、横700μmの長さで囲まれた長方形の中にある破骨細胞の数を算定した。その際、破骨細胞の平均的な大きさを考慮して、少なくとも30μm間隔を離れた切片を5枚、各個体について抽出して算定した。なお、破骨細胞に対する判定は、井上[9]の示す基準にしたがって、エオジン好染性の多核の巨細胞でかつ吸収窩を有するものを破骨細胞として算定した。

2) 破骨細胞の出現数の経時的変化について

ウイスター系ラット80匹を用いて、1)と同様にWaldoの方法に準じて、歯の実験的移動を行った上顎第1臼歯根分岐部に、10^{-10}Mの$1,25(OH)_2D_3$を1回投与した後、1,2,3,5,7,10,15日目の上顎第1臼歯歯根中隔（図1と同

部位）に出現する破骨細胞の数を算定した。また、歯の移動を行わず前述と同じ方法で$1,25(OH)_2D_3$あるいはsalineの投与のみ行った群を設け、対照とした。

2．歯の移動量の測定と全身的影響について

実験には，成長による歯列弓幅径の変化[10]を除外して考えるために、ウイスター系成熟ラット（28週令、体重約400g、雄性、日本クレア、東京）を36匹用いた。

実験的に歯を移動する装置は、図2に示すようなReitanとKvam[11]の方法に改良を加えたものを用いた。すなわち、実験前にあらかじめラット上顎歯列の印象を採得して、作業模型を作製し、その模型上で図2のように螺旋状のスプリングを曲げ込んだ矯正用線（.016” エルジロイラウンドワイヤー、Rocky Mountain、U.S.A.）を作製した。これを上顎切歯に装着し、上顎右側第1臼歯の舌側に力を加え、同歯の頬側への移動を行った。

上顎切歯への装着には、矯正用接着性レジン（オルソマイトスーパーボンド、サンメディカル、京都）を使用した。なお、歯に加える荷重は、過去の報告[10-14]を参考に約20gとした。

予備検討として、このスプリングによって上顎第1臼歯に加えられる頬側方向への力の大きさを推定するために、スプリングの変位量と荷重の関係について計測を行った。計測には、ポイントデジタイザー（本体部：Roland D.G社製 CAMM-3、センサー部：レニショー社製タッチプローブセンサー）を用いた。

すなわち、この装置を鉛直面に取り付け、上顎切歯部を固定点とする片持ち梁と仮定し、上顎第1臼歯部に接する点におもりを釣り下げ、鉛直方向への変位量をポイントデジタイザーで読み取り、応力-歪み曲線を求めた。

その結果、荷重をy(g) 変位量を$x(\mu m)$として回帰曲線の式を求めると、

$$y=0.01+1.03x$$

の関係が得られた。したがって、上顎第1臼歯の頬舌的幅径（平均2.03mm）だけ歪ませて活性化させた場合の初期荷重は、23.6gと推定される。

ラットの口腔内に歯の移動装置を装着する際には、麻酔下で装置を口腔内に適合させ、その適合性やスプリングの位置の調整を行った。次に、スプリングを上顎第1臼歯の頬舌的歯冠幅径だけ活性化した時、スプリングの荷重が約20gとなるようにダイヤルテンションゲージ（TECLOK、東京）を用いて調節した。ついで、10^{-10}Mの濃度の1,25$(OH)_2D_3$各々20μlを、上顎右側第1臼歯の歯根分岐部に向かって、口蓋粘膜より局所的に、実験開始より3日おきに投与した。また、実験期間中、毎日装置の装着状態を観察し、3日おきに、スプリングの荷重が約20gとなるよう調節した。

なお、歯の実験的移動とsalineの投与とを行った群、歯の移動を行わず1,25$(OH)_2D_3$あるい

はsalineを投与した群を設け、比較対照とした。

実験開始後、3日おきに、麻酔下で、各動物の上顎歯列の印象をシリコン印象材（Colto-flax, Coltex、Coltene Inc. Switzerland）を用いて採得した。これに歯科用超硬石膏（New Fujirock、而至歯科工業）を注入し、得られた模型上で、左右上顎第1臼歯近心小窩間の距離を、小数点第2位まで測定可能なデジタルキャリパス（digimatic caliper,三豊、東京）を用いて計測し、実験初日の距離との差を歯の移動距離とした。

実験20日目には、10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$を最終投与した4時間後、腹腔大静脈より採血し、3000×Gで20分間遠沈し、得られた血清を用いてカルシウム（Ca:mEq/l）、リン（P:mg/ml）、アルカリフォスファターゼ（ALP:K.A.単位）について測定した。なお、その測定値は、Student t-testにより統計処理した（有意水準5%以下）。

3．歯の移動と歯槽骨の石灰化速度について

ラット（体重180～200g、雄性、20匹）の上顎第1臼歯をWaldoの方法により近心移動させ、同時に歯根分岐部に向かって、口蓋粘膜下に10^{-10}Mの$1,25(OH)_2D_3$を局所投与した群とsaline投与とを行った群、また歯の移動を行わず$1,25(OH)_2D_3$あるいはsalineを投与した群の総計4群に分け、実験を行った。各ラットには、新生骨の形成の様相を見るために、下記の2種類の硬組織ラベリング剤を腹腔内投与した。

①カルセイン［Calcein(片山化学工業、大阪)］

本剤を0.05NのKOH水溶液に溶解し、この溶液を生理的食塩水を用いて動物の体重1kgあたり8mgとなるように調製した。なお、組織標本上では緑色にラベルされる。

②テトラサイクリン［Tetracycline hydrochloride(Sigma、U.S.A.)］

本剤を生理的食塩水に溶解し、骨形成障害の発生等[15]を考慮して、動物の体重1kgあたり20mgとなるよう調製した。なお、組織標本上では黄色にラベルされる。

上記のラベリング剤の投与は、図3に示すように実験開始の前日にカルセインを、6日目にテトラサイクリンを投与し、その翌日エーテル麻酔下で屠殺した。上顎骨を摘出した後、10%中性ホルマリンで固定し、非脱灰のまま、上昇アルコール系列により脱水した。ついで、フタル酸ジn-ブチル、メチルメタクリレート（和光純薬、大阪）により樹脂包埋した。各試料から、rotary cutting machine（ブロンウィル・ギリングス社、U.S.A.）を用いて約100μmの薄切研磨片を作製し、さらに用手砥石研磨[16]より、20μmまで研磨した。この薄切研磨標本を、UV励起落射型蛍光顕微鏡（オリンパス光学 BH-2型、東京）で観察した。図4に示す観察部位中、カルセイン、テトラサイクリンの二重標識が、認められる部位で、

この二重標識間の平均距離を求めた。次に、高橋[17]の方法に準じて、下記に示す骨形成の指標である石灰化速度（Mineral Apposition Rate：μm/day）を算出した：

$$\text{石灰化速度} = \frac{\text{二重標識間の距離（}\mu\text{m）}}{1/2\times\text{投与日数}+\text{interval}\text{の日数}}$$

なお、統計検定には、Student t-test（有意水準5%以下）を用いて行った。

結果

1．歯の実験的移動に伴う破骨細胞の出現数

1）$1,25(OH)_2D_3$の濃度による影響

(1)歯の実験的移動を行わなかった場合の$1,25(OH)_2D_3$局所投与の影響

Salineのみ投与した対照群では、観察される破骨細胞数はごくわずかであった。ところが、$1,25(OH)_2D_3$の局所投与を行った群では、破骨細胞の出現数が濃度依存性に増加し、10^{-10}Mでは、対照群に比べ2.5倍の増加が認められた（図５－Ａ）。

予備実験として、本実験で用いたラットtibiaのmetaphysisにおいて平均破骨細胞数を算定したところ、6.42/mm^{2}となり、同週令のラットにおけるWronskyら[18]の報告（5.7±0.8/mm^2）と同様な値が得られ、本研究における破骨細胞の判定基準が他の報告[19、20]と同様であることを確認した。

(2) 歯の実験的移動に伴う1,25$(OH)_2D_3$局所投与の影響

歯の移動のみの群では、破骨細胞の数は平均8個認められ、機械的刺激を受けた局所の破骨細胞の増大がみられた。ついで、歯の移動を行うとともに、1,25$(OH)_2D_3$を局所投与すると破骨細胞の出現数が増加し、10^{-10}Mでは平均16個認められ、歯の移動を行わずsalineのみ投与した対照群に比べ約10倍、歯の移動のみの群に比べ約2倍に増加した。しかし、濃度が高くなるとその効果は減少した（図5－B）。

また、歯の移動のみの群および図5－Aに示す10^{-10}～10^{-8}Mの1,25$(OH)_2D_3$投与群における破骨細胞の出現数に比べ、歯の移動に伴って1,25$(OH)_2D_3$を投与した群では相乗的に破骨細胞の出現数が、増加することが明らかとなった。

組織学的所見（図6）では、10^{-10}Mの1,25$(OH)_2D_3$を局所投与した群で、破骨細胞の出現

（矢印）が観察された（Ｂ）。歯の移動を行うとともにsalineを投与した群では、歯根膜が圧縮され、一部に変性した部分が観察された。変性した歯根膜に接する歯槽骨では、破骨細胞による骨吸収像がみられた（Ｃ）。一方、歯の移動とともに$1,25(OH)_2D_3$投与群では、破骨細胞の著明な増加（矢印）がみられ、骨梁の著しい減少とともに、骨吸収の促進が認められた（Ｄ）。

2）経時的な破骨細胞の出現数

歯の実験的移動を行わず$1,25(OH)_2D_3$を投与した群では、投与後1日目に最も破骨細胞数が増加するが、その後は減少して対照群と差が認められなくなった（図７－Ａ）。

歯の移動を行うと、Waldoの報告[7]にみられるように、破骨細胞数の増加は3日目で最大に達したが、その後は経時的に減少し、10日目で対照群とほぼ同じ値に戻った（図７－Ｂ）。

一方、歯の移動とともに$1,25(OH)_2D_3$を投与

すると、さらに大きな破骨細胞数の増加が認められ、3日目において歯の移動のみの群に比べ約1.5倍に増加した。その後、徐々に減少し、15日目ではほとんど差が認められなくなった（図７－Ｂ）。

組織学的所見では（図８）、実験１日目において、歯の移動とともに$1,25(OH)_2D_3$を投与した群（Ｂ）で、破骨細胞の出現（矢印）が観察され、３日目になると歯の移動とともにsalineを投与した群（Ｃ）に比べ、Ｄでは破骨細胞の著明な増加と著しい骨吸収が認められた。５日目でも、Ｆでは破骨細胞の出現（矢印）が認められるが、Ｅ、Ｆともに観察される破骨細胞は減少した。７日目では、Ｈにおいて骨芽細胞（▲）が、歯槽骨表面に並んでいる像が認められた。

以上の結果、歯の移動に伴って$1,25(OH)_2D_3$を局所投与すると、破骨細胞の著明な増加と著しい骨吸収像が見られ、それが10^{-10}Mの$1,25(OH)_2D_3$で破骨細胞数は、3日目に最大に

達することが明らかとなった。

2. 歯の移動量の影響について

1の結果に基づいて、10^{-10}Mの$1,25(OH)_2D_3$ 20μlを上顎右側第1臼歯の歯根分岐部に3日おきに投与し、同時に加わる荷重を約20gに調節した。各動物の左右上顎第1臼歯近心小窩間の距離を計測し、実験初日の距離との差を歯の移動距離とした。

1)実験動物の体重の変動

4群（歯の移動を行わずsalineあるいは10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$を投与した群、歯の移動とsaline投与とを行った群、歯の移動と10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$の投与とを行った群）のラットの実験期間中における体重の変動を図9に示す。

いずれの群も、実験開始14日までは体重の減少がみられたが、その後はほとんど変化なく、実験期間を通じて各群にほとんど差は認められなかった。

2)経日的な歯の移動量

歯の移動と10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$の投与とを行った群では、歯の移動とsalineの投与とを行った群に比べ、実験3日目から歯の移動量の増加が認められた。実験20日目において、前者の移動量は約1.27mmとなり、後者の移動量約0.57mmに比べほぼ2倍の増加が認められた（図11）。

歯の移動を行わずに1,25$(OH)_2D_3$あるいはsalineを投与した群では、いずれも移動量が認められなかった。

3. 血液生化学的検査結果について

前述2の実験において、実験20日目の各個体から採血した血清を用いて血液生化学的検査を行った。

1,25$(OH)_2D_3$を全身投与した場合、血液中の1,25$(OH)_2D_3$濃度は、投与後2～4時間で最高値に達することが報告されている[21]。そこで、Hockらの方法[22]に準じて、1,25$(OH)_2D_3$を最

終投与した3時間後に、腹腔大静脈より採血した。得られた血清を用いて、Ca、P、ALPについて測定した。

その結果、表1に示すようにいずれの群においても血清Ca、P、ALPの値について有意の差は認められなかった。

4. 歯の移動と歯槽骨の石灰化速度への影響

$1,25(OH)_2D_3$は、骨吸収[23]のみならず骨形成[24]にも重要な役割を果たすことが知られている[25]。また、すでに歯の移動促進効果が知られているプロスタグランジン（PGE_2）は、歯の移動後の歯槽骨形成を遅延させることが報告されている[26]。

そこで、$1,25(OH)_2D_3$の局所投与と歯の移動に伴う骨添加への影響について検討した。

図12に示すように、対照群では、上顎第1臼歯の生理的な遠心移動により、同歯の歯根中隔の遠心側が牽引側、近心側が圧迫側にあたるため、石灰化速度も遠心側がやや高く、

近心側が低い値を示していた。

これにWaldoの方法により、上顎第1臼歯を近心移動させると、遠心側が圧迫側、近心側が牽引側と逆転し、石灰化速度も遠心側が低く、近心側が高い値を示すようになった。

このグラフより、圧迫側では、いずれの群においても石灰化速度の低下傾向が認められた。一方、牽引側では、対照群に比べて歯の移動とともにsalineを投与した群で、石灰化速度の低下傾向が認められたが、$1,25(OH)_2D_3$投与群、歯の移動とともに$1,25(OH)_2D_3$を投与した群では、認められなかった。

予備実験として、対照群のtibia metaphysisでの石灰化速度を計測した。その結果、1.37±0.52μm/dayとなり、同週令のラットにおいてすでに報告されている値[27-29]（1.4±0.1μm/day）とほぼ一致していることを確認した。

考察

1. 実験方法について

動物実験を行なうに当たっては、遺伝的要因による個体差が少なく、刺激による反応の変動の少ない動物を利用することが重要である。そのため歯の移動に関する研究[30-32]には、従来よりラットがしばしば用いられてきた。また多くの動物を用いて、実験的に歯を移動させるには、力を加える方法ができるだけ簡便で、再現性の高い実験系を組むことが重要である。そこで本研究における1、3の実験では、代表的な歯の移動方法であるWaldoの方法を用いた。

Waldoの方法の長所として、①動物の系統が画一化でき、遺伝的要因による個体差が最小限にとどめられること、②したがって、実験結果の再現性が高く、歯の移動の組織反応における代謝系の研究等にも有用であること、③操作が容易であることなどが挙げられてお

り、主に組織変化を検索するための方法として、多くの研究者[33-36]によって実験が行われてきた。

この方法によると、ゴムを挿入した初期における力はかなり強く（200g前後）、歯の移動に伴い減衰するという、比較的強い一過性の力が発現していると報告[34]されている。また、挿入されたゴムの劣化により、歯に加えられる力のコントロールが困難であるとの指摘[37]もある。

一方、RaitanとKvamら[12]のスプリングによる歯の移動法は、矯正用ワイヤーにより上顎右側第1臼歯の口蓋側歯面に水平的な力が、持続的に加えられるようにしたもので、同歯の傾斜移動を起こす方法である（図2）。この方法は、矯正力の強弱を明確に調節でき、経日的な歯の移動量の測定に適しているものと考えられる。そこで、2の実験では、この方法を用いて$1,25(OH)_2D_3$と歯の移動量について検討した。

2. 活性型ビタミンD_3と歯の移動について

活性型ビタミンD_3（$1,25(OH)_2D_3$）は、1971年DeLuca、Kodiceckら[38、39]によって、ビタミンDの最終的な活性代謝産物として、構造決定がなされ、それ以後ビタミンDの代謝経路を始め、多岐にわたる生理作用も近年逐次明らかにされてきた。

このうち、Raiszらは$1,25(OH)_2D_3$が、骨吸収を惹起することを初めて明らかにし、Heflyら[40]は、ラットの胎仔骨を器官培養した研究により、$1,25(OH)_2D_3$で処理すると、破骨細胞の数が著しく増加することを見いだした。また、Abeら[2]は、マウス肺胞マクロファージの培養系に$1,25(OH)_2D_3$を添加すると、多核巨細胞の形成がみられることを報告し、$1,25(OH)_2D_3$が直接、CFU-GM（colny forming unit in granulocyte-macrophages：将来、顆粒球とマクロファージに分化する未分化細胞の集団）から単球・マクロファージ系への細

胞分化を促し、これらをさらに融合させて、破骨細胞様の多核細胞の形成を促すことを示唆した。

このように、1,25$(OH)_2D_3$は、骨髄細胞の分化誘導を促進し、破骨細胞の形成に大きく関与していることが明らかとなっている[41]。

一方、骨形成と1,25$(OH)_2D_3$の関連について、Larssonら[5]は、ラットに低濃度の1,25$(OH)_2D_3$を投与すると、骨量が増加することを報告し、Marieら[42]も1,25$(OH)_2D_3$を持続注入するとラットの骨形成が促進されることを報告している。こうして1,25$(OH)_2D_3$は、骨吸収だけでなく骨形成にも作用をおよぼすbiphase effectを持つホルモンであることが明らかとなってきた。

ところが、歯科矯正学の分野では、歯の移動を伴う歯槽骨の改造機転と1,25$(OH)_2D_3$の作用についての研究は、これまでほとんどその報告がなく、いまだ十分に解明されていない。

山崎[37]は、歯の移動を行ったビタミンD欠

乏ラットでは、破骨細胞の出現数が減少しているが、食餌としてビタミンDを与えるとその数が増加することを報告している。しかし、その理由としてビタミンDの最終活性代謝産物である$1,25(OH)_2D_3$が直接骨に作用し骨吸収を発現しているのではないかと推察しているにすぎない。

近年、Collinsら[6]は、猫の犬歯を実験的に移動させ、$1,25(OH)_2D_3$を歯根膜腔内に局所投与すると、歯の移動量が増加することを報告した。しかし、歯の移動に伴う歯槽骨の改造機転と$1,25(OH)_2D_3$の作用について、骨吸収および骨形成の両面から組織学的に詳細に検討されていない。本研究では、歯の移動による歯槽骨の変化に対する$1,25(OH)_2D_3$の影響を明らかにする目的から、ラットの歯の実験的移動を行い、同時に$1,25(OH)_2D_3$を局所投与して、出現する破骨細胞数の変化、骨形成の指標とされている石灰化速度の検討、さらに、歯の移動量の変化と全身的影響について検討した。

3．　1,25$(OH)_2D_3$の局所投与による破骨細胞の出現について

破骨細胞の同定について、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRACP）は、破骨細胞のマーカー的酵素であることが知られている[43、44]。しかし、Biancoら[45]は、TRACPがin vivoで、骨芽細胞にも骨細胞にも活性が存在していることを報告し、TRACPは、必ずしも破骨細胞の特異的な染色法ではないと述べている。また、Nakamuraら[46]も、ラットにおいてTRACPを破骨細胞のマーカーとするには、検討の余地があると報告している。したがって、本研究では、井上[9]の示す形態学的特徴を中心に破骨細胞を算定した。

その結果、　図５－Ａに示すように1,25$(OH)_2D_3$の局所投与により濃度依存性に破骨細胞数の増加が認められ、10^{-10}M以上で最大に達することが明らかとなった。

Reynoldら[23]は、1,25$(OH)_2D_3$による骨吸収

について、マウスに1,25$(OH)_2D_3$を投与し、頭蓋骨からの^{45}Caの溶出量を測定し、1,25$(OH)_2D_3$による骨吸収は10^{-10}M以上で濃度依存性に認められることを述べている。Raiszら[1]は、in vitroの実験系において、10^{-10}M～10^{-8}Mの1,25$(OH)_2D_3$を添加すると培養液中に溶出してくる^{45}Caが濃度依存性に増加することを、MacDonaldら[47]も、培養骨髄細胞に10^{-10}M～10^{-8}Mの1,25$(OH)_2D_3$を添加すると、多核の細胞の形成が見られ、10^{-8}Mで最大に達したと報告している。

このように、in vitro系で活性型ビタミンDの作用は、10^{-8}M～10^{-10}Mの濃度範囲での報告がみられるが、至適濃度は実験条件によって変動がみられることが指摘されている[48]。本研究のようなin vivoにおける1,25$(OH)_2D_3$の影響について、in vitro系での結果と単純に比較することは難しく、in vivoにおいては破骨細胞の出現には、骨に存在する他の細胞や別の骨代謝調節因子が、関連しているもの

と思われる。

1,25(OH)$_2$D$_3$による破骨細胞の形成機序について、須田ら[25]は、1,25(OH)$_2$D$_3$は、破骨細胞の前駆細胞に作用して、破骨細胞の形成融合が促進されると述べている。一方で、McSheehyとChambers[49,50]は、単離した破骨細胞を骨切片上で培養すると吸収窩を形成するが、1,25(OH)$_2$D$_3$やPTHを直接培養液に添加しても、吸収窩の形成は増加せず、骨芽細胞を共存させ、これらのホルモンを添加すると吸収窩の形成が著しく増加することを報告し、破骨細胞活性化因子の存在を示唆した。

1,25(OH)$_2$D$_3$やPTHのレセプターは、破骨細胞に存在せず骨芽細胞に存在すること[51]が、明らかとなっており、1,25(OH)$_2$D$_3$による破骨細胞の形成や機能の発現に骨芽細胞も関与していることが考えられる。

ところで、歯の移動が惹起される際、歯槽骨の圧迫側には破骨細胞が出現し、著明な骨吸収が観察される。そこで、破骨細胞の出現

に関与している1,25$(OH)_2D_3$と、歯の移動に伴う骨吸収の様相の関連について検討した。

歯の移動に伴って1,25$(OH)_2D_3$を局所投与すると、さらに破骨細胞の出現数が増加し、10^{-10}Mで最大に達することが明らかとなった（図５－Ｂ）。

歯の移動を行った歯槽骨の反応について、歯の移動局所には、chemical mediatorとして様々なcytokineが、産生されていることが報告[52、53]されている。山崎ら[54-56]は、chemical mediatorの一つとして考えられているプロスタグランジンを局所投与することにより、破骨細胞の出現数の増加と歯の移動促進効果を報告している。今回、歯の移動とともに1,25$(OH)_2D_3$を投与すると、歯の移動とsalineの投与とを行った群に比べ、さらに大きな破骨細胞の増加がみられたのは、1,25$(OH)_2D_3$の骨吸収促進作用に加えて、PGE[57]あるいはIL-2等の様々なcytokine[58、59]との相互作用によるものと思われる。

以上のことから考えて、1,25$(OH)_2D_3$による破骨細胞の増加は、破骨細胞の前駆細胞に1,25$(OH)_2D_3$が作用して、破骨細胞の融合が促進される一方で、歯の移動による機械的刺激によって産生された何らかの因子によって相乗的に破骨細胞の出現数が増大したためと考えられる。

ところで、歯の移動に伴う骨吸収の経時的な様相について、Macapanpanら[35]は、Waldoの方法を用いた研究で実験開始後1～3日でラット臼歯の圧迫側歯槽骨表面に穿下性の骨吸収が開始され、2～5日目で破骨細胞による骨吸収が著明になったと述べ、Zakiら[60]も実験開始6時間後から圧迫側の歯槽骨表面に穿下性の骨吸収の兆しがみられ、3日目において多数の破骨細胞が認められたと述べている。

古賀[34]は、ゴム挿入後1～3日で破骨細胞が出現して骨吸収を開始し、3～7日で穿下性骨吸収が著明になるが、7～21日に至っては歯槽骨内の吸収窩に骨芽細胞が存在していたと述

べている。

本研究においても、図７－Ｂに示すように歯の移動のみの群では、1日目から破骨細胞の出現数が増加し、3日目にそれが最大に達し、以降減少する結果が得られ、これまでの報告[7]を確認した。

ところが、歯の移動とともに$1,25(OH)_2D_3$を投与すると、歯の移動のみの群に比べ、1日目から破骨細胞のより大きな増加が認められ、3日目では約2倍の増加が認められた。

この1日目の破骨細胞の増加が、$1,25(OH)_2D_3$によるものかどうか明らかにする目的で、歯の移動を行わずにラットの左側第1臼歯部に対照として生理的食塩水を、右側には10^{-10}Mの$1,25(OH)_2D_3$を投与して、出現する破骨細胞数の変化について検討した。

その結果、図７－Ａに示すように$1,25(OH)_2D_3$を投与した群では、1日目に破骨細胞数の増加が認められたが、その後減少し、対照群と同じレベルに戻った。

したがって、図７－Ｂでみられた1日目の歯の移動に伴って1,25$(OH)_2D_3$を投与した群の破骨細胞の増加は、1,25$(OH)_2D_3$による影響であると考えられる。しかも、2,3日目においてはこの影響に加えて、歯の移動に伴って産生される何らかの因子との相互作用により、破骨細胞の相乗的な増加が認められたと思われる。

Waldoの方法を用いた歯の移動5日目以降の組織変化について、前述の古賀[34]は、ゴム片挿入後3～7日目の圧迫側では、破骨細胞による骨吸収を認めながらも、歯根膜が新生血管結合織に置換されている所見を述べている。

落合[26]も、salineを局所投与した対照群では、1～3日目の歯槽骨表面に破骨細胞の出現により、複雑な凹凸を示すハウシップ窩が観察されたが、5日目以降になるとハウシップ窩内に新生骨の形成が認められたと述べている。

本研究では、歯の移動とともに1,25$(OH)_2D_3$を投与した群、あるいはsaline投与した群ともに5日目以降、破骨細胞数が減少し、15日

目では、両者に有意差が認められなくなった。これは、両群ともに歯の移動を行った5日目以降、骨吸収から骨添加に転じているものと思われる。

4．歯の移動と歯槽骨の石灰化速度との関連について

歯の移動に伴う歯槽骨の骨形成について、大内[61]は、テトラサイクリンとカルセインを用いて、市之川[62]は、酢酸鉛を用いて歯槽骨に時刻描記し、歯の移動に伴う骨形成の様相について組織学的に観察した。また、組織化学的な手法を用いて出口[36]は、歯の移動に伴う酸性フォスファターゼおよびアルカリフォスファターゼ活性の変化について報告した。

しかし、これらはいずれも組織学的な観察に留まり、それを定量化して評価するまでには至っていない。

Frost[63]、高橋[17]は、ラベリングされた骨の非脱灰標本から、骨の組織学的動態を定量

化する方法すなわち骨形態計測（Bone Morphometry）を打ち立て、整形外科の分野で、骨の病態の解明や薬剤の治療効果の判定[9、64]に広く用いられている。

そこで、本研究では、骨形態計測的な手法を用いて、歯の移動と$1,25(OH)_2D_3$局所投与の影響について検討した。

ラットには生理的な臼歯の遠心移動[65]があり、石灰化速度においても遠心側が大きく、近心側が小さい傾向を示した。Waldoの方法により近心へ移動させると、その傾向が逆転するが、近心側、遠心側ともに石灰化速度の低下傾向を認めた（図１２）。

牽引側における骨形成の様相について、Reitan[66]は、牽引側に骨吸収があるならば、その吸収が造骨性の変化に反転するまでに4～5日かかると述べている。前述の大内[61]は、犬を用いた研究から、生理的な歯の移動に逆らって移動させた場合、牽引側の骨の添加の活発化は遅く、添加骨量も少ないことを述べ

ている。したがって、歯の移動を行った群で、牽引側である近心側でも石灰化速度に低下傾向がみられたのは、Waldo法によりラットの生理的な遠心移動に逆らって、近心へ移動させたために、牽引側となった近心側で骨形成が遅れたためと考えられる。

$1,25(OH)_2D_3$の骨形成に対する作用について、Larssonら[5]は、低濃度の$1,25(OH)_2D_3$を投与すると骨量が増加することを報告し、Marieら[42]は、$1,25(OH)_2D_3$を投与したマウスではmineral apposition rate（石灰化速度）の増加が認められ、$1,25(OH)_2D_3$は、骨のturn over（代謝回転）を促進すると述べている。松本[67]は、骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1を用いた研究により、$1,25(OH)_2D_3$の石灰化促進作用を報告している。また、Lempertら[68]は、海綿骨量が減少する代謝性骨疾患のモデルとして用いられているinflammation mediated osteopeniaのラットに$1,25(OH)_2D_3$を投与すると骨の石灰化速度が回復されることを報告し

ており、今回得られた結果、すなわち歯の移動による歯槽骨の石灰化速度の低下傾向を回復させたことは、$1,25(OH)_2D_3$による骨形成促進作用によるものであると考えられる。

しかし、Gunnes-Heyら[69]は、$1,25(OH)_2D_3$単独投与でもPTHと併用して投与した場合でも、ラットの骨量は増加しなかったと報告しており、$1,25(OH)_2D_3$の骨形成のメカニズムについては、不明な点も少なくない。しかも、本研究のような機械的刺激下における骨形成に対する$1,25(OH)_2D_3$の詳細な生理作用については、今後解明すべき重要な課題であろう。

5．歯の移動量に及ぼす$1,25(OH)_2D_3$の局所投与の影響について

前述のColinsら[6]は、猫の犬歯を実験的に移動させ、同時に$1,25(OH)_2D_3$を、本研究で得られた至適濃度（$10^{-10}M$）とほぼ同じ濃度で、1週間おきに歯根膜腔内に注射すると、歯の移動量が増加することを報告した。本研究で

は、歯の実験的移動に伴って、10^{-10}Mの1,25$(OH)_2D_3$の局所投与により破骨細胞数の増加が3日目に最大に達する結果を考慮して、1,25$(OH)_2D_3$を3日おきに局所投与して実験的な歯の移動を行い、歯の移動量を計測した（図11）。

一般に、歯を移動させた場合について、Reitan[12、70、71]は、次のように述べている。まず、①歯根膜の粘弾性範囲内での移動が起こり、②歯根膜の硝子様変性による移動停止期が現れ、③歯槽骨の穿下性吸収により急激な歯の移動が行われるとしている。

市川[31]、岡田ら[14]は、ラットの歯をコイルスプリングを用いて近心移動させ、本研究と同様に歯に加える力を3日おきに調節して、歯の移動距離を測定した。その結果、15gと30gの力を用いた場合、歯の移動が、Reitanの述べるように2相性に行われたと述べている。20gの力を用いた本研究でも、対照群において上記のような移動様相を確認した。

ところが、　この歯の移動にともなって10^{-10}Mの1,25$(OH)_2D_3$を局所投与すると、salineを投与した対照群に比べ、実験3日目より移動量の増加が認められ、20日目では約2倍の歯の移動量の増加を示すとともに、歯の移動の2相性が表れにくくなっていた。これは、1の実験で1,25$(OH)_2D_3$を局所投与すると破骨細胞の著明な増加と著しい骨吸収を認めたことに起因するものと考えられる。

以上のことから、歯の移動は、圧迫側の骨吸収によって起こるものとされており、そこに1,25$(OH)_2D_3$を投与すると、相乗的に骨吸収が促進され、破骨細胞の増加と歯の移動量の増大は深い関係にあることが示唆された。

6．1,25$(OH)_2D_3$局所投与による全身的影響について

薬物を局所に応用する際、その薬剤の局所における効果とその全身的影響については、注意すべき点である。

予備実験として上顎右側第1臼歯歯根分岐部に向かって、20μlのX線造影剤（イソベーク440、鳥居薬品、東京）を局所投与した。投与直後には、同歯周辺歯槽骨に浸潤していることが、X線写真上で確認されたが、投与後30分経過するとその像はほぼ消失していた。

また、1-2)の実験では歯の移動を行わないラットの上顎右側第1臼歯に$1,25(OH)_2D_3$を、反対側にはsalineを投与した。すると、$1,25(OH)_2D_3$を投与した側では、1日目に破骨細胞数の増加が認められたが、以降減少し、反対側ではほとんど変化が認められなかった（図7－A）。

したがって、本研究で用いた投与方法では、$1,25(OH)_2D_3$の局所滞留時間は、比較的短時間であるものの、確実に局所に作用していることが示唆された。しかし、$1,25(OH)_2D_3$が局所から拡散した場合、その後、全身的にはいかなる作用を及ぼすか検討する必要がある。

$1,25(OH)_2D_3$を全身的に投与した場合、小腸

からのＣａの取り込みを促進して、血中Ｃａ濃度を上昇させる働きが知られている[72]。

そこで、２の実験では、ラットから得られた血清を用いて血液生化学的検索を行った。

全身的影響については、今回行った血液生化学的検索の他、尿や腎臓所見等の結果を総合して判断すべきであるが、表１に示すように血清Ｃａ、Ｐ、ALP値に他の群と有意差が認められなかったことより、本研究で用いた投与方法では、全身的影響が少ないものと考えられる。

最近、ビタミンＤの血清カルシウム上昇作用と分化誘導作用の分離を目指して、ビタミンＤの新規誘導体の合成が、試みられている[73]。将来、そうした誘導体が合成され、歯科矯正臨床にも応用される時、本研究で得られた結果が基礎になると思われる。

結論

歯の実験的移動に伴う$1,25(OH)_2D_3$の局所投与の影響について、ラットを用いて検討し、以下の結論を得た。

1）$1,25(OH)_2D_3$を口蓋粘膜から局所投与すると、出現する破骨細胞数は、濃度依存性に増加し、10^{-10}Mでほぼプラトーに達した。

Waldo法を用いた歯の実験的移動に伴って$1,25(OH)_2D_3$を投与すると、歯の移動のみの群に比べ、著しい骨吸収が観察されるとともに、破骨細胞数がさらに増大し、10^{-10}Mで最大に達した。

2）10^{-10}Mの$1,25(OH)_2D_3$を局所投与し、出現する破骨細胞数の経時的変化を検討した。

$1,25(OH)_2D_3$単独投与の場合、投与後1日目に破骨細胞の増加が認められた。Salineを投与してWaldo法による歯の移動を行うと、出現する破骨細胞数は、3日目で最大に達し、その後減少した。しかし、歯の移動とともに1,25

$(OH)_2D_3$を投与すると、歯の移動のみの群に比べ、さらに大きな破骨細胞数の増加が認められ、その効果は3日目に最大に達し、以降減少した。

３）ReitanとKvamの方法に準じて、ラットの上顎第１臼歯を20日間頬側移動させ、3日おきに10^{-10}Mの$1,25(OH)_2D_3$を局所投与して、歯の移動量について検討した。その結果、$1,25(OH)_2D_3$の局所投与により歯の移動が、さらに促進されることが明らかとなった。

４）Waldo法による歯の移動と$1,25(OH)_2D_3$の骨形成への影響を検討するために、カルセインとテトラサイクリンを用いて、歯槽骨の石灰化速度を計測した。圧迫側では、いずれの群においても石灰化速度の低下傾向が認められた。一方、牽引側では、対照群に比べて歯の実験的移動を行った群で石灰化速度の低下傾向が認められたが、歯の移動を行わず$1,25(OH)_2D_3$を投与した群および歯の実験的移動とともに$1,25(OH)_2D_3$を投与した群では、その傾

向は認められなかった。

５）1,25$(OH)_2D_3$の全身的影響を検討するために、局所投与3時間後のラットについて血液生化学的検査を行った。10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$の局所投与では、血清Ｃａ、Ｐ、ALP値に対照群と比較して、有意の差は認められなかった。

以上の結果より、歯の実験的移動に伴って、1,25$(OH)_2D_3$を局所投与すると、破骨細胞数の増加と著しい骨吸収像が観察され、相乗的に骨吸収が促進されることが明らかとなった。歯の移動とともに1,25$(OH)_2D_3$を局所投与すると歯の移動量の増加が認められたことから、歯の移動量の増大は、破骨細胞の増加と深く関連していると考えられた。また、歯の移動に伴う骨添加についても、1,25$(OH)_2D_3$は促進的に働き、全身的影響も軽微であることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜った歯科矯正学講座作田　守教授に謹んで感謝の意を表します。

また、研究の細部にわたり終始熱心な御教示を頂いた歯科矯正学教室山本照子博士に心から謝意を表します。

最後に、種々の面にわたり貴重な御援助、御助言、御協力を頂いた歯科矯正学教室の諸先生方に深謝いたします。

Effects of local application of $1,25(OH)_2D_3$ on experimental tooth movement in rats.

Masayoshi Kawakami

Department of Orthodontics
Osaka University Faculty of Dentistry
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka, Japan

Key words: 1,25-dihydroxycholecalciferol • osteoclasts • experimental tooth movement • mineral apposition rate • local application

The purpose of the present study was to explore the effect of local application with Vitamin D metabolite, 1,25-dihydroxycholecalciferol ($1,25(OH)_2D_3$) on experimental tooth movement in rats.

1. According to Waldo's method, a piece of orthodontic elastic band was inserted between the upper first and second molars of Wister male rats weighting 200g. The amount of 20μ l of $1,25(OH)_2D_3$($10^{-12}\sim 10^{-7}$M) was injected locally in the submucosal palatal area of the root bifurcation of the right first molar. The left side was injected with vehicle. The number of osteoclasts was counted in a 700× 1050μ m^2 area of the inter-radicular septum. The number of osteoclasts was dose-dependently increased 2 fold at 10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$ compared to that in the vehicle-injected side. The maximal increase of osteoclasts number was 3 days after local injection of 10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$ on experimental tooth movement.

2. The upper first molar of Wister male rats was moved in a buccal direction by a helical spring. The amount of 20μ l of the local administration of 10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$ was repeated every 3 days until sacrifice at day 20. The tooth movement in the $1,25(OH)_2D_3$-treated rats was accelerated about 2 fold compared to that in the control rats.

3. The effect of bone formation in the rats receiving experimental tooth movement was examined by fluoresent labeling and quantitive histology. Thus, the local application of 10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$ tend to prevent the decrease of the mineral apposition rate of the alveolar bone following orthodontic tooth movement.

4. Serum samples of these $1,25(OH)_2D_3$-treated rats were obtained from abdominal aorta 3 hours after the final injection. Serious effects were not found in the values for parameters such as calcium, phosphorus and alkaline phosphatase.

These findings suggested that the local use of $1,25(OH)_2D_3$ on experimental tooth movement in the rats caused increase in osteoclasts number and accelarated tooth movement. However, no obvious side effects were noted. $1,25(OH)_2D_3$ was expected to stimulate mineral apposition rate of alveolar bone on the tension side.

参考文献

1) Raisz, L. G., Trummel, C. L., Holik, M. F. and DeLuca, H. F.(1972): 1,25-Dihydroxycholecalciferol: A potent stimulator of bone resorption in tissue culture. Science, 175,768-769.

2) Abe, E., Miyaura, C., Tanaka, H., Shiina, Y., Kuribayashi, T., Suda, S., Nishii, Y., DeLuca, H. F. and Suda, T. (1983): 1α,25-Dihydroxyvitamin D_3 promotes fusion of mouse alveolar macrophages both by a direct mechanism and by a spleen cell-mediated indirect mechanism. Pro. Natl. Acad. Sci. USA ,80, 5583-5587

3) Roodman, G. D., Ibbotson, K. J., MacDonald, B. R., Kuehl, T. J. and Mundy, G. R.(1985): 1,25-Dihydroxy-vitaminD$_3$ causes formation of multi-

nucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. Pro. Natl. Acad. Sci. USA., 82,8213-8217

4) Majeska, R. J. and Rodan, G. A. (1982): The effect of $1,25(OH)_2D_3$ on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. J. Biol. Chem., 257,3362-3365

5) Larsson, S. E., Lorentzon, R. and Boquist, L.(1977): Low doses of 1,25-dihydroxycholecalciferol increase mature bone mass in adult normal rats. Clin. Orthop. Rel. Res., 127,228-235

6) Collins, M. K. and Sinclair, P. M. (1988): The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod. Dentfac. Orthop., 94,278-284.

7) Waldo, C. M. and Rothblatt, J. M.

(1940): Histologic response to tooth movement in the laboratory rat. Procedure and preliminary observations. J. Dent. Res., 33,481-486.

８) Kushida, T., Nagato, Y., Kushida, H. (1981): New method of embedding with GMA, Quetol-523 and methyl methacrylate for light and electron microscopic observation of semi-thin sections. Okajimas Folia Anat. Jpn., 58(1),55-68.

９) 井上旬二(1983): 薬剤効果判定に用いられる組織学的骨形態計測のparameter.; 骨形態計測ハンドブック(高橋栄明編).1版、西村書店、新潟、90-100、昭和58

１０) 山内恵美(1983):ラットの歯の移動における週令差の影響について、日大口腔科学、9,317-332、昭和58

１１) 奥村英治(1982):硝子様変性組織の吸収過程に出現する多核性巨細胞の光学顕微鏡および電子顕微鏡的研究、日矯歯誌、41,531-

555、昭和57

12) Reitan, K. and Kvam, E.(1971): Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. Angle Orthod., 41,1-14.

13) Narbaitz, R., Stumpf, W. E., Sar, M., Hunang, S. and DeLuca, H. F. (1983): Autoradiographic localization of target cells for 1α,25-Dihydroxyvitamin D_3 in bones from fetal rats. Calcif. Tissue Int., 35,177-182.

14) 岡田卓也、岩澤忠正、平井五郎(1981):歯の移動実験における歯周組織の添加新生骨に関する研究、日大口腔科学、7,90-109、昭和56

15) 高橋　学、川口哲郎、中島早苗、浅野安生、龍口基雄(1979):石灰化組織の多色ラベリングのためのラベリング剤と投与方法について、歯学、67,53-66、昭和54

16) 片桐正隆(1973):研磨片の作製法;歯

の研究法（須賀昭一、田熊庄三郎、佐々木哲編）、医歯薬出版、東京、42-54、昭和48

17）高橋栄明(1983):骨の組織学的形態計測パラメーター；骨形態計測ハンドブック（高橋栄明編）.1版、西村書店、新潟、71-79、昭和58

18）Wronski, T. J., Halloran, B. P., Bikle, D. D., Globus, R. K. and Morey-holton. E. R.(1986): Chronic administration of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 : increased bone but impaired mineralization. Endocrinology, 119,2580-2585

19）Pfeilschifter, J., Wüster, C., Vogel, M., Enderes, B, Ziegler, R. and Minne, H. W. (1987): Inflammation-mediated Osteopenia (IMO) during acute inflammation in rats is due to a transient inhibition of bone formation. Calcif. Tissue Int.,41,321-325

20）Ornoy, A., Goodwin, D., Noff, D.,

and Edelstein, S. (1978): 24,25-Dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation. Nature, 276,517-519

２１）富澤宏樹、佐藤　香、斉藤広子、市原成泰、立石　満(1984)：ラットにおけるCalcitriolの体内動態に関する研究（第１報）^{3}H-Calcitriol経口投与後の吸収、血中濃度推移、体内分布および尿、糞、胆汁中排泄、応用薬理、27,737-753

２２）Hock, J. M., Gunnes-Hey, M., Poser, J., Olson, H. Bell, N. H. and Raisz,L. G.(1986): Stimulation of under-mineralized matrix formation by 1,25 dihydroxy-vitamin D_3 in long bones of rats. Calcif. Tissue Int.,38, 79-86.

２３）Reynolds, J. J., Holik, M. F. and DeLuca, H. F.(1973): The role of vitamin D metabolites in bone resorption. Calc. Tiss. Res., 12,295-301

２４）栗原徳善、羽毛田慈之、久米川正好(1987)：ビタミンＤの骨形成への作用、代謝、24(1):53-60、昭和61

２５）須田立雄(1986)：骨と活性型ビタミンＤ；カルシウム代謝と活性型ビタミンＤ（藤田拓男監修）、中外製薬（株）、東京、30-35、昭和61

２６）落合　均(1987):歯の実験的移動に対するプロスタグランジンE_2（PGE_2）の効果に関する組織学的研究、日矯歯誌、46,500-516、昭和62

２７）Wronski, T. J., Schenck, P. A., Cintrón, M. and Walshi, C. C.(1987): Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. Calcif. Tissue Int., 40,155-159

２８）Schaffer, M. B., Li, X. J., Jee, W. S. S., Ho. S. W. W. and Stern, P. J. (1988): Skeletal tissue responses to thermal injury ; An experimental study.

Bone, 9, 397-406

２９）Chan, Y. L., Alfrey, A. C., Posen, S., Lissner, D., Hills, E, D., Dunstan, C. R. and Evans, R. A.(1983): Effect of aluminum on normal and uremic rats ; Tissue distribution vitamin D metabolites and quantative bone histology. Calcif. Tissue Int., 35,344-351

３０）中村芳樹(1981):歯の往復運動を行なった際に圧迫側歯槽骨表面に出現する細胞の電子顕微鏡的研究、鶴見歯学、8(1),95-123、昭和56

３１）市川充男(1982):保定効果に関する実験的研究、日矯歯誌、41,217-233、昭和57

３２）佐藤俊仁(1986):ラット上顎臼歯の圧下時にみられる歯周組織変化の非脱灰標本による観察（第２報）、日矯歯誌、45,601-617、昭和61

３３）昼間登喜男(1973):実験的な歯牙移動後、その力を除去した場合の歯周組織の変化につ

いて、 歯学、 60,636-667、 昭和48

３４）古賀正忠(1974)：人為的歯牙移動時の組織変化に関する研究、光学顕微鏡及び電子顕微鏡による観察、 歯科学報、 73(3),498-557、昭和49

３５）Macapanpan, L. C., Weinmann, J. P. and Brodie, A. G.(1954): Early tissue changes follwing tooth movement in rats. Angle Orthod., 24,79-95.

３６）出口敏雄(1969)：歯の移動に伴う歯周組織の変化に関する組織化学的研究、日矯歯誌、 28(1),1-7、昭和44

３７）山崎健一(1976)：人為的歯の移動に及ぼすビタミンDの作用に関する研究、口病誌43,41-63、昭和51

３８）Lawson, D. E. M., Fraser, D. R., Kodicek, E., Morris, H. R. and Williams, D. H.(1971): Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism.

Nature 230,228-230

３９）Holik, M. F., Schnoes, H. K., DeLuca, H. F., Suda, T. and Cousins, R. J.(1971): Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitemin D active in intestine. Biochem.,10,2799-2804

４０）Hefley, T. J. and Stern, P. H. (1982): Isolation of osteoclasts from fetal rat long bones. Calcif. Tissue Int., 34,480-487.

４１）高橋直之、須田立雄(1987)：破骨細胞の形成とビタミンD、実験医学、5(8),724-728、昭和62

４２）Marie, P. J. and Travers, R.(1983): Continuous infusion of 1,25-dihydroxy-vitamin D_3 stimulates bone turnover in the normal young mouse. Calcif. Tissue Int., 35,418-425

４３）Baron, R., Neff, L., Tran Van P.,

Nefussi, J. R. and Vignery, A.(1986): Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. Am. J. Pathol., 122,363-378

44) Van de Wijingaert, F. P., Burger, E. H.(1986): Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in undecalcified, glycolmetacrylate-embedded mouse bone: a possible marker for (pre)osteoclast identification. J. Histochem. Cytochem., 34,1317-1323

45) Bianco, P., Ballanti, P. and Bonucci, E.(1988): Tartrate-resistant acid phosphatase activity in rat osteoblasts and osteocytes. Calcif. Tissue Int., 43,167-171.

46) Nakamura, Y., Yamaguchi, A., and Yoshiki, S. (1989): Distribution of

tartrate-resistant acid phosphatase positive cells in bone and other tissues J. Dent. Res., 68(4),667 (abstract)

４７）MacDonald, B. R., Takahashi, N., McManus, L. M., Holahan, J., Mundy, G. R. and Roodman, G. D.(1987): Formation of mutinucleated cells that respond to osteotropic hormones in long term human bone marrow cultures. Endocrinolgy., 120,2326-2333

４８）阿部悦子(1988)：カルシウム代謝とその調節ホルモン －ビタミンＤ－ ；整形外科MOOK、No.52、代謝性骨疾患（伊丹康人、西尾篤人、真角昭吾編）．金原出版、東京、1-14、昭和63

４９）McSheehy, P. M. J. and Chambers, T. J.(1986): Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. Endocrinology, 118,824-828

50) McSheehy, P. M. J. and Chambers, T. J.(1987): 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 stimulates rat osteoblastic cells to release a soluble factor that increases osteoclastic bone resorption. J. Clin. Invest. 80,425-429

51) Merke, J., Klaus, G., Hügel, U., Waldherr, R. and Ritz, E.(1986): No 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 receptors on osteoclasts of calcium-deficient chiken despite demonstrable receptors on circulating monocytes. J. Clin. Invest., 77,312-314

52) King, G. J. and Thiems, S.(1979): Chemical mediation of bone resorption induced by tooth movement in the rat. Archs Oral Biol. 24,811-815

53) Shanfeld, J., Jones, J., Laster, L. and Davidovitch, Z.(1986): Biochemical aspects of orthodontic tooth move-

ment I.Cyclic nucleotide and prostaglandin concentrations in tissues surrounding orthodontically treated teeth in vivo. Am. J. Orthod. Dentfac. Orthop., 90,139-148

５４）山崎健一、三浦不二夫、須田立雄(1978)：歯科矯正力に伴う骨吸収に対するchemical mediatorとしてのプロスタグランジンの役割について、骨代謝、11(1),300-305、昭和53

５５）山崎健一、柴崎好伸、福原達郎(1983)：プロスタグランジンを用いた矯正治療－その基礎から臨床まで－、歯界展望、62,480-492、昭和58

５６）Yamazaki, K., Shibata, Y. and Fukuhara, T.(1982):The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (Macacafustata). J. Dent. Res., 61(12),1444-1446.

５７）Yeh, C. K. and Rodan, G. A.(1984):

Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. Calcif. Tissue Int. 36,S67-S71

58) Binderman, I., Shimshoni, Z. and Somjen, D.(1984): Biochemical pathways involved in the translation of physical stimulus into biological message. Calcif. Tissue Int. 36,S82-S85

59) Seymour, G. J., Cole, K. L., Powell, R. N., Lewins, E., Cripps, A. W. and Clancy, R. L.(1985): Interleukin-2 production and bone-resorption activity in vitro by unstimulated lymphocytes extracted from chronically-inflammed human periodontal tissues. Archs Oral Biol.,30,481-484

60) Zaki, A. E. and Van Huysen, G. (1963): Histology of the periodontium follwing tooth movement. J. Dent. Res.

42,1373-1379

６１）大内邦彦(1974)：実験的歯牙移動時の歯槽骨変化のラベリング法とマイクロラジオグラフィによる研究、歯学、61,1072-1119、昭和49

６２）市之川正孝(1975)：人為的歯牙移動時の組織変化に関する研究－酢酸鉛時刻描記法による光顕および電顕的観察－、歯科学報、75,1435-1472、昭和50

６３）Frost, H. M.(1969): Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. Calc. Tiss. Res., 3,211-237

６４）松井清明、七川歓次(1983):卵摘老齢ラットの皮質骨に及ぼす1,25$(OH)_2D_3$の影響、骨代謝、1(2),123-128, 昭和58

６５）Sicher, H. and Weinmann, J. P. (1944): Bone growth and physiologic tooth movement. Amer. J. Orthod. and Oral Surg., 30,109-132.

６６）Reitan, K.(1969): Biomechanical

principles and reactions,; in Current orthodontic concepts and techniques (Graber, T. M., editor). W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1, 56-159

６７）松本俊夫(1987)：石灰化とビタミンD、実験医学、5(8):729-731、昭和62

６８）Lempert, U. G., Minne, H. W., Albrecht, B., Scharla, S. H., Matthes, F. and Ziegler, R.(1989):1,25-Dihydroxy-vitamin D_3 prevents the decrease of bone minelal appositional rate in rats with inflammation-mediated osteopenia (IMO). Bone and Mineral.,7,149-158

６９）Gunnes-Hey, M., Gera, I., Fonseca, J., Raisz, L. G. and Hock, J. M.(1988): 1,25 Dihydroxyvitamin D_3 alone or in combination with parathyroid hormone does not increase bone mass in young rats. Calcif. Tissue Int., 43,284-288

７０）Reitan, K.(1962): Bone formation

and resorption during reserved tooth movement; in Vistas in Orthodontics (Kraus, B. S. and Riedel, R. A.,editors) Lea & Febiger, Philadelphia, 69-84

７１）Reitan, K.(1967): Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. Amer. J. Orthod., 53,721-745.

７２）須田立雄(1986)：小腸と活性型ビタミンD；カルシウム代謝と活性型ビタミンD（藤田拓男監修）、中外製薬（株）、東京、24-29、昭和61

７３）須田立雄(1988)：1α,25$(OH)_2D_3$ 以外のビタミンD誘導体、日骨代謝誌、6(4),12-32、昭和63

脚注

大阪大学歯学部歯科矯正学講座（主任：作田　守教授）

本論文の要旨は、第４６回日本矯正歯科学会大会（昭和６２年１０月、徳島）、第４７回日本矯正歯科学会大会（昭和６３年１０月、横浜）、第４８回日本矯正歯科学会大会（平成元年１０月、金沢）、第３７回国際歯科研究学会日本部会（ＪＡＤＲ）総会（平成元年１２月、東京）において発表した。

図および表の説明

図の説明

図1　歯の実験的移動方法（Waldoによる）および組織学的観察部位

E：ゴム片（厚さ0.5mm）、M_1：上顎第1臼歯、M_2：上顎第2臼歯、M_3：上顎第3臼歯、矢印は、歯の実験的移動方向を示す。
上顎第1臼歯の歯槽中隔遠心側（縦700×横1050μmの範囲）に出現する破骨細胞の数を算定した。
破骨細胞に対する判定は、井上[9]の示す基準にしたがって、エオジン好染性の多核の巨細胞でかつ吸収窩を有するものを破骨細胞とした。

図2　ReitanとKvamによる歯の実験的移動方法

図３　ラベリング注射のタイムスケジュール

実験開始の前日にカルセイン（8mg/kg,i.p.）を、実験6日目にテトラサイクリン（20mg/kg,i.p.）を投与した。実験日には、Waldoの方法に準じて上顎第１臼歯を近心移動させ、同時に10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$を局所投与した。

図４　歯槽骨の石灰化速度の観察部位

図１に示した遠心側の観察部位に加えて、近心側も観察部位とした。これらの観察部位におけるテトラサイクリンとカルセインの二重標識間の平均距離を測定し、石灰化速度を算定した。

図５　図１に示した観察部位に出現する破骨細胞の数に及ぼす$1,25(OH)_2D_3$局所投与の影響（投与濃度の検討）

A： 歯の実験的移動を行わなかった場合

B： Waldo法による歯の実験的移動を行った場合

図中の各群の値は、 n=4～5における平均値±標準誤差である。

図６　図１の観察部位における組織所見（拡大像）

A： 対照群（saline投与群）

B： 10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$投与群、 破骨細胞（矢印）の出現が観察される。

C： Waldo法による歯の実験的移動とともにsalineを投与した群

D： Waldo法による歯の実験的移動とともに10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$を局所投与した群、 出現する破骨細胞（矢印）の著明な増加と著しい骨吸収像が観察される。

（H. E. 染色、 ―― は、 50μmを示す。）

図７　図１に示した観察部位に出現する破骨細胞の数に及ぼす$1,25(OH)_2D_3$局所投与の影響（破骨細胞数の経時的変化）

A

■：saline投与群、▨：10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$投与群

B

▩：Waldo法による歯の実験的移動とともにsalineを投与した群、□：Waldo法による歯の実験的移動とともに10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$を局所投与した群

図中の各群の値は、n=4～6における平均値±標準誤差である。

図８　Waldo法による歯の実験的移動を行った上顎第１臼歯の歯槽中隔の組織所見（拡大像）

歯の移動とsalineの投与とを行った群

A：　1日目、　C：3日目、　E：5日目、

G：　7日目

歯の移動と10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$の投与とを行った群

B：　1日目、　D：3日目、　F：5日目、

H：　7日目

（H.　E.染色、　——は、　50μmを示す。）

図9　実験期間中のラットの体重変化

（実験3）

歯の移動を行わずsalineを投与した群（□）と10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$を投与した群（■）、歯の移動とsalineの投与とを行った群（○）、歯の移動と10^{-10}M 1,25$(OH)_2D_3$の投与とを行った群（●）

図中の各群の値は、n=5における平均値±標準偏差である。

図10　実験20日目のラットの口腔内写真

A： 歯の移動とsaline投与とを行った群

B： 歯の移動と10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$投与とを行った群

Aと比較して、Bの歯の移動量の増加が認められる。

図11 上顎右側第1臼歯の移動距離の経日的な変化

歯の移動を行わずsalineを投与した群（□）と10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$を投与した群（■）、歯の移動とsalineの投与とを行った群（○）、歯の移動と10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$の投与とを行った群（●）

図中矢印は、10^{-10}M $1,25(OH)_2D_3$投与群またはsaline投与群において、3日おきに投与を行い、同時に歯の移動を行った群では歯に加える荷重を20gに調節したことを示す。

図中の各群の値は、n=5における平均値±標

準偏差である。

図１２　歯の移動と1,25$(OH)_2D_3$の局所投与による歯槽骨の石灰化への影響

遠心側：▩、近心側：▨、　牽引側：Ｔ、圧迫側：Ｐ

図中の各群の値は、n=6～9における平均値±標準誤差である。

＊：対照群の圧迫側（Ｐ）との間に有意差が存在することを示す。（$p<0.01$）

＊＊：対照群の牽引側（Ｔ）との間に有意差が存在することを示す。（$p<0.05$）

図１３　図３の観察部位中の蛍光顕微鏡写真

遠心側

Ａ：対照群、Ｃ：1,25$(OH)_2D_3$投与群、Ｅ：歯の移動とsaline投与を行った群、Ｇ：歯の移動と1,25$(OH)_2D_3$投与を行った群

近心側

B：対照群、D：1,25$(OH)_2D_3$投与群、F：歯の移動とsaline投与を行った群、H：歯の移動と1,25$(OH)_2D_3$投与を行った群

（ ——は、20μmを示す。）

表の説明

表1　血液生化学的検査結果

数値は、各群n=5における平均値±標準偏差を示す。

いずれの群においても対照群（saline投与群）との間に有意差が認められなかった。

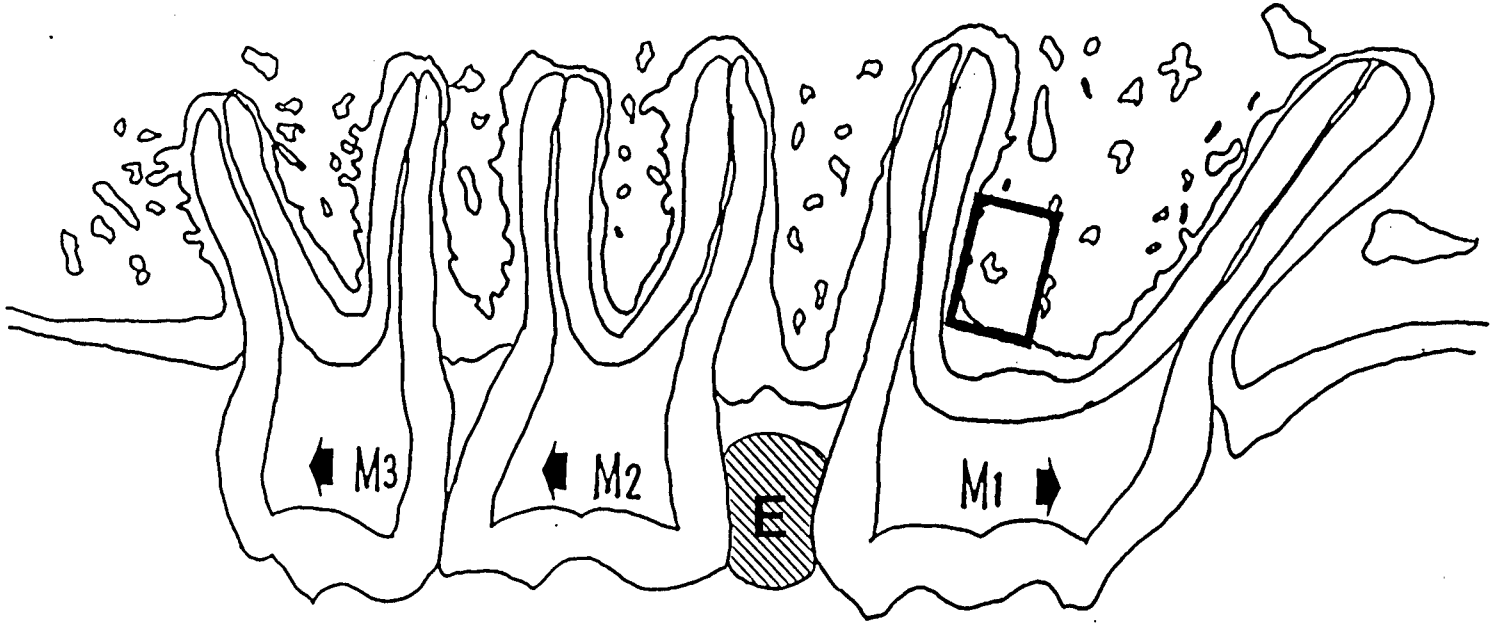


図 1

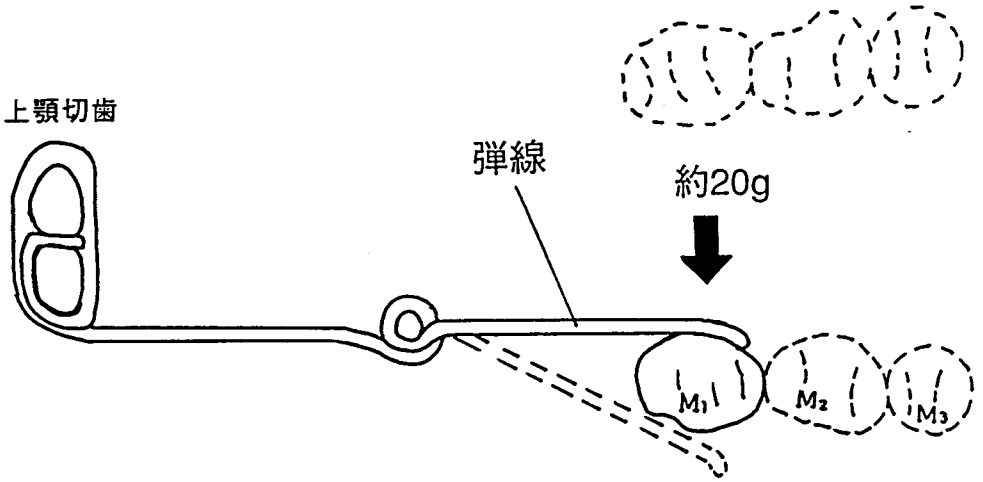
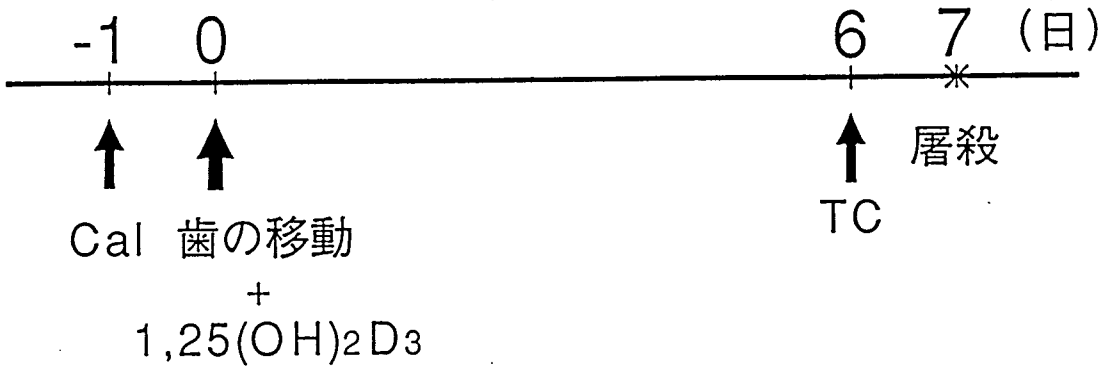


図 2



Cal:カルセイン(8mg/kg), TC:テトラサイクリン(20mg/kg)

図 3

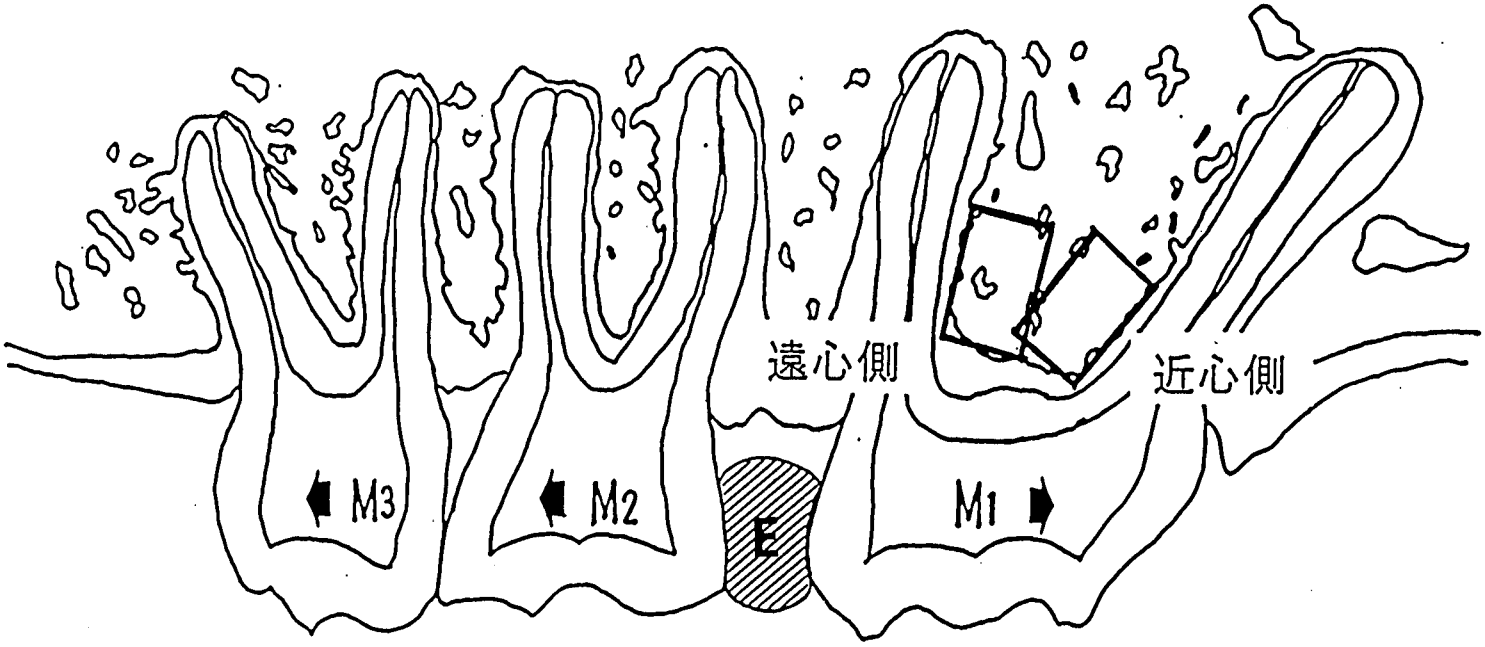


図 4

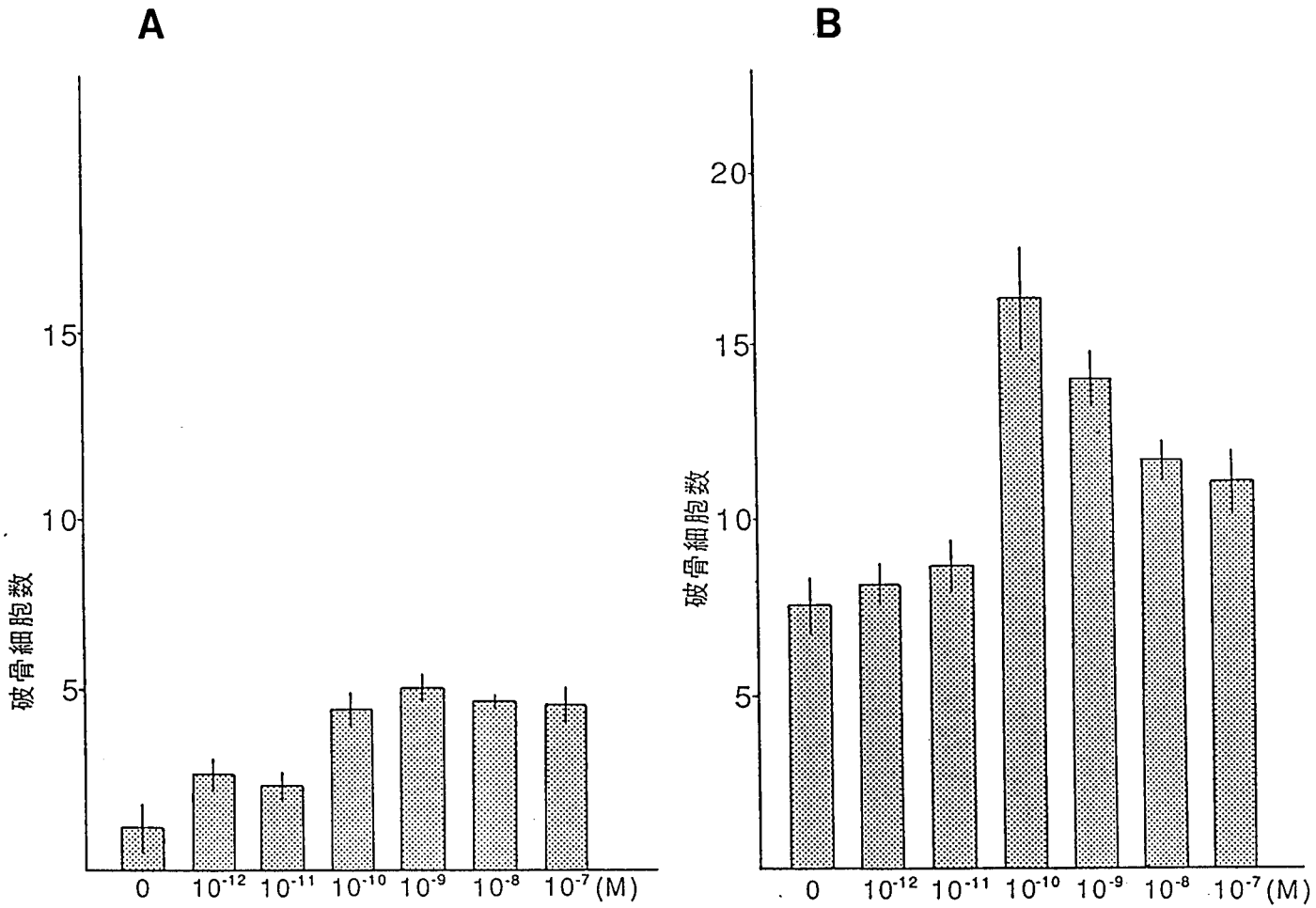


図 5

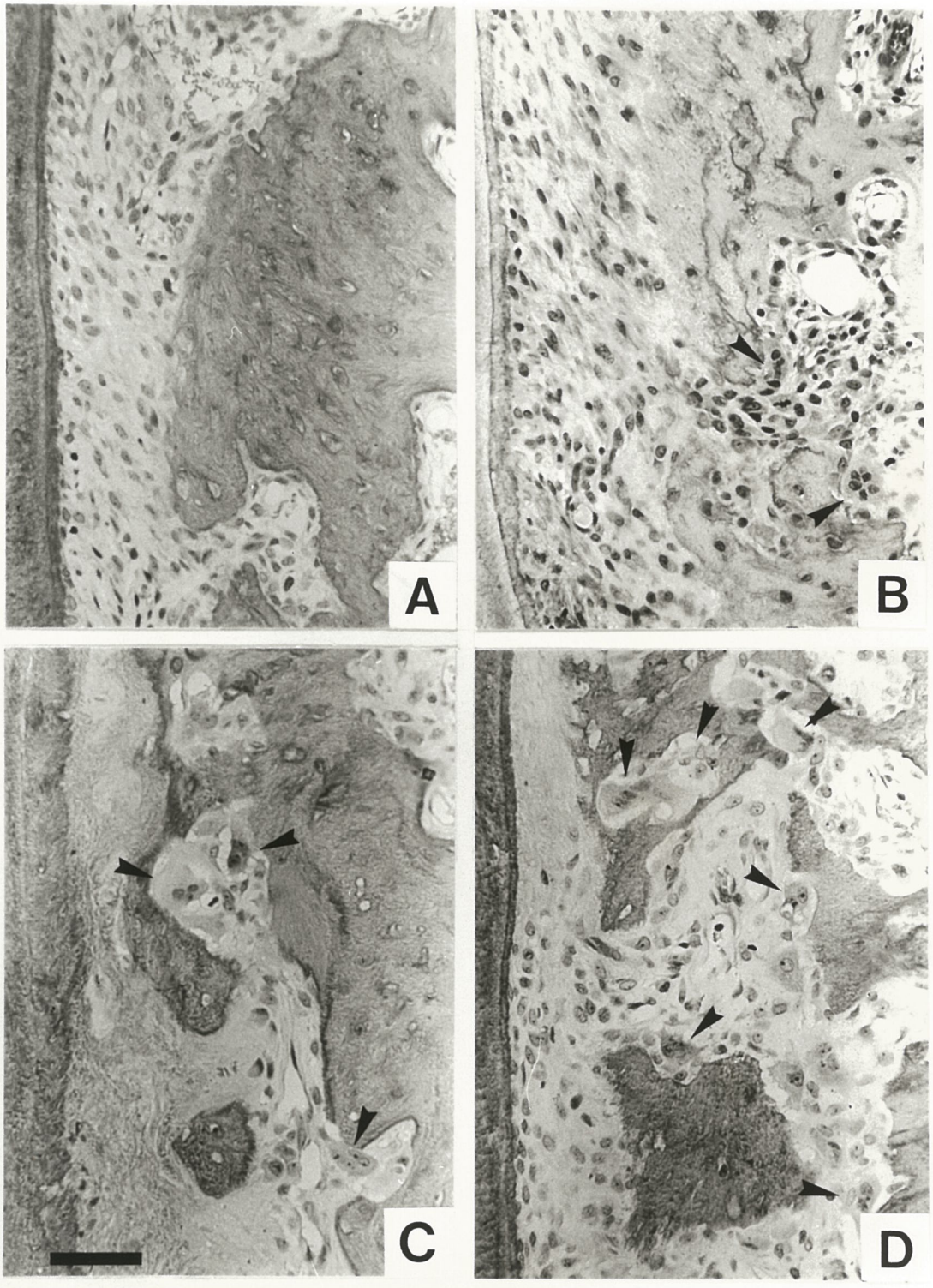


図 6

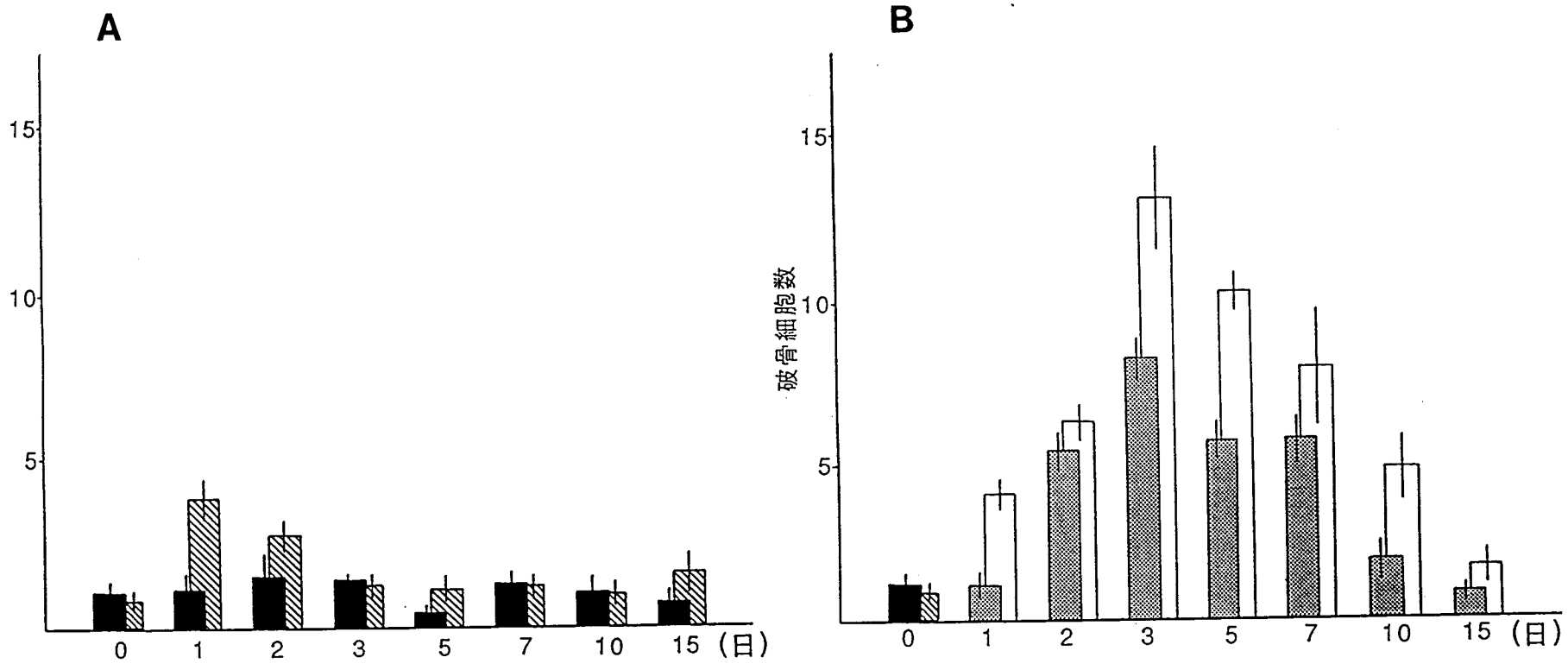


図 7

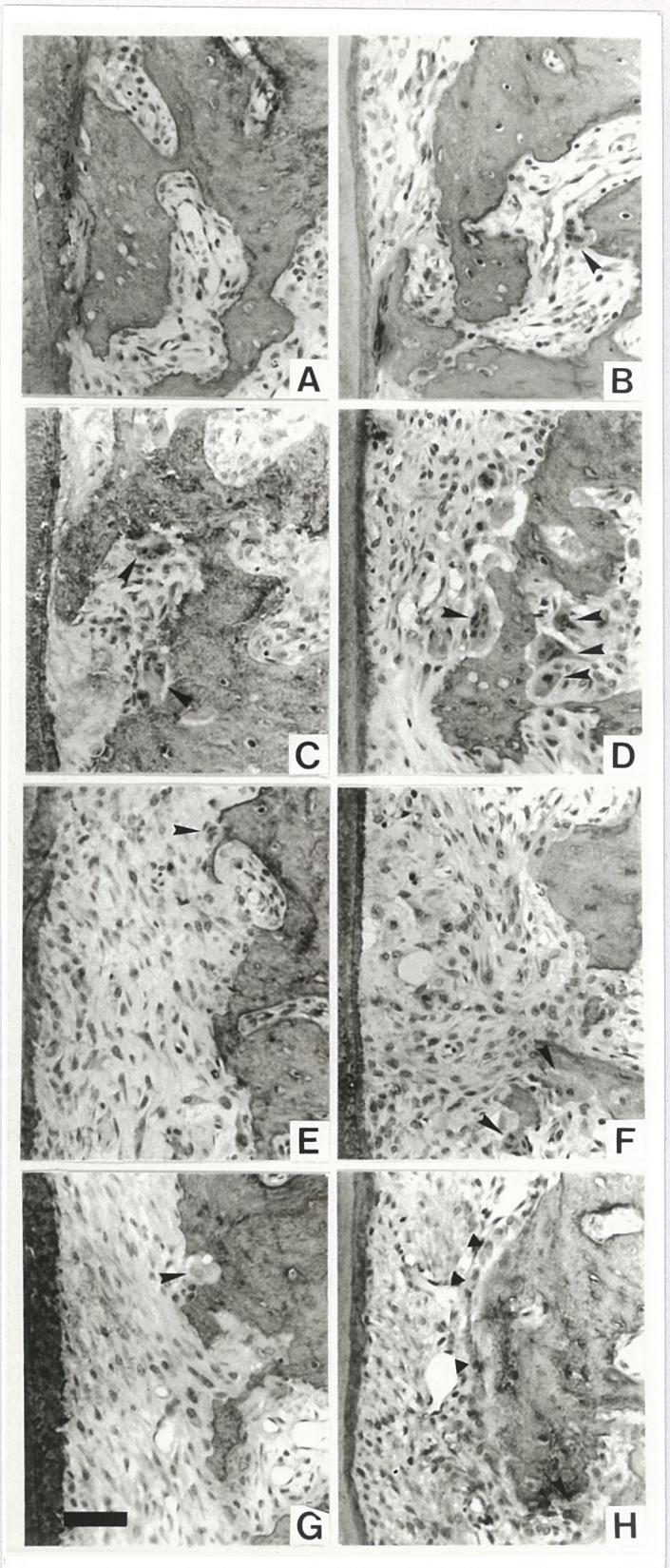


図 8

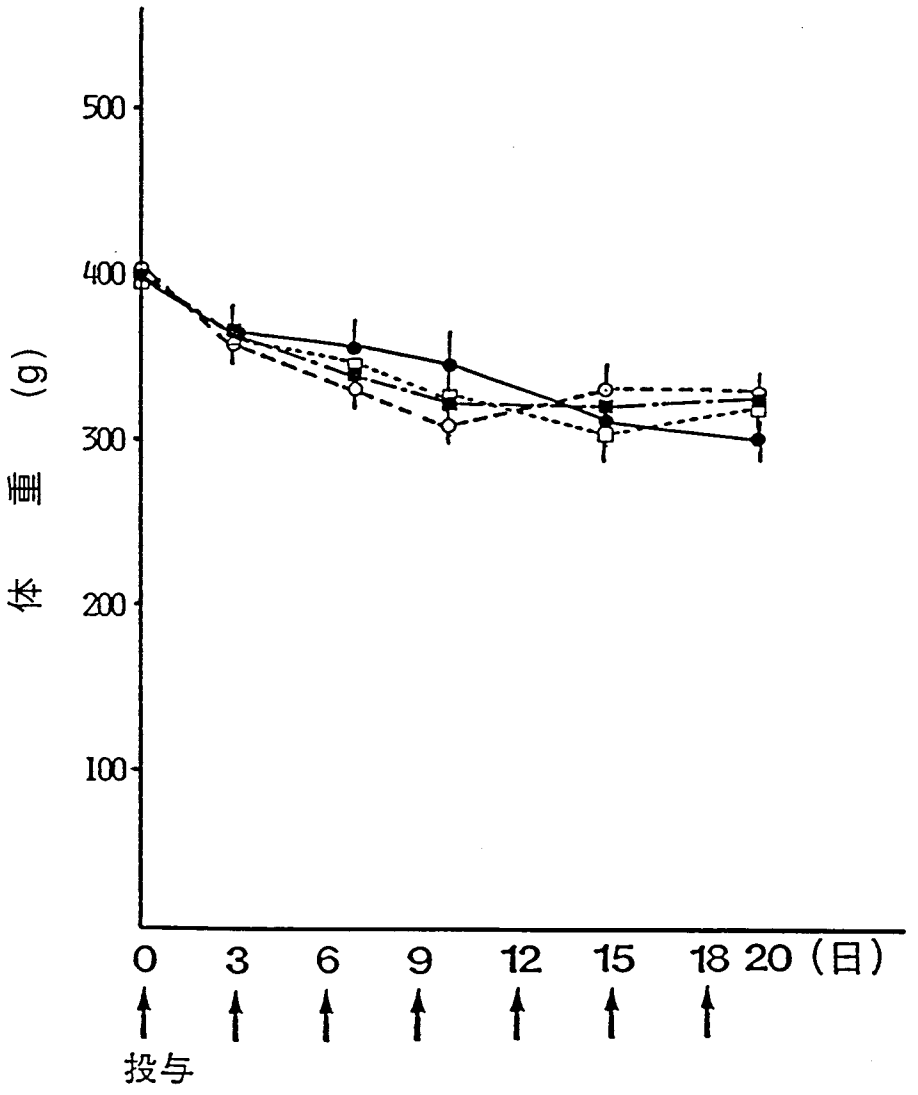


図 9

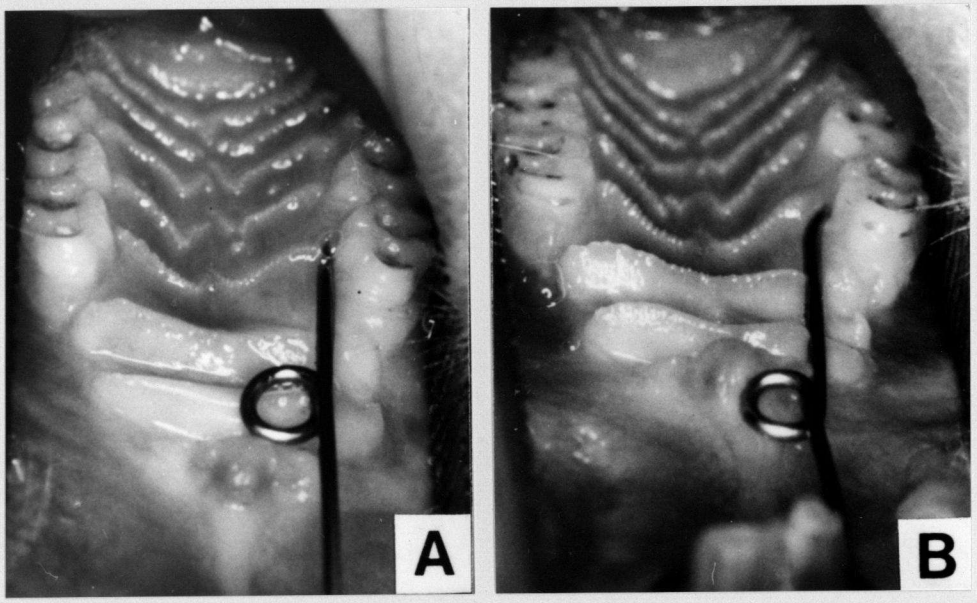


図 10

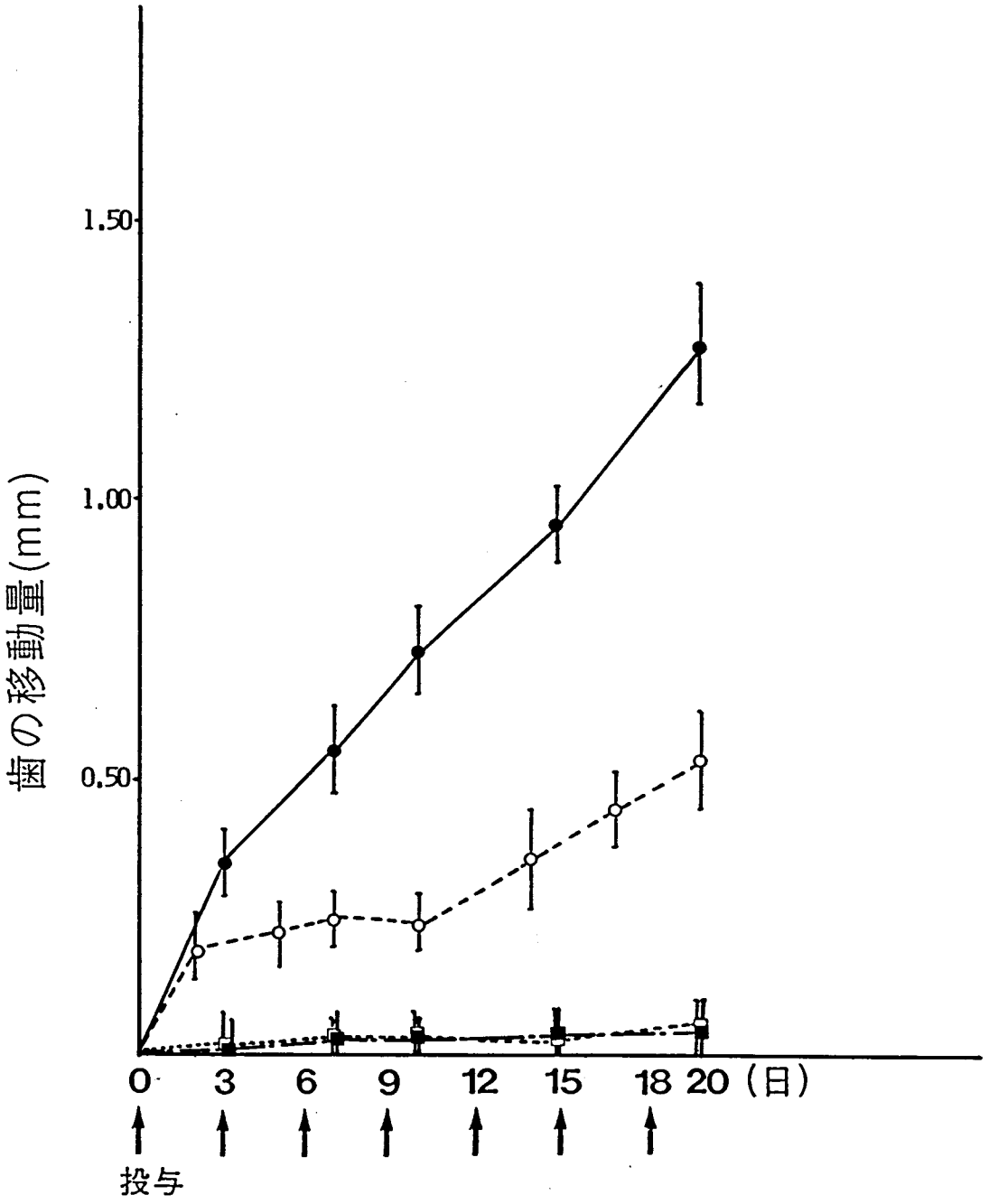


図 11

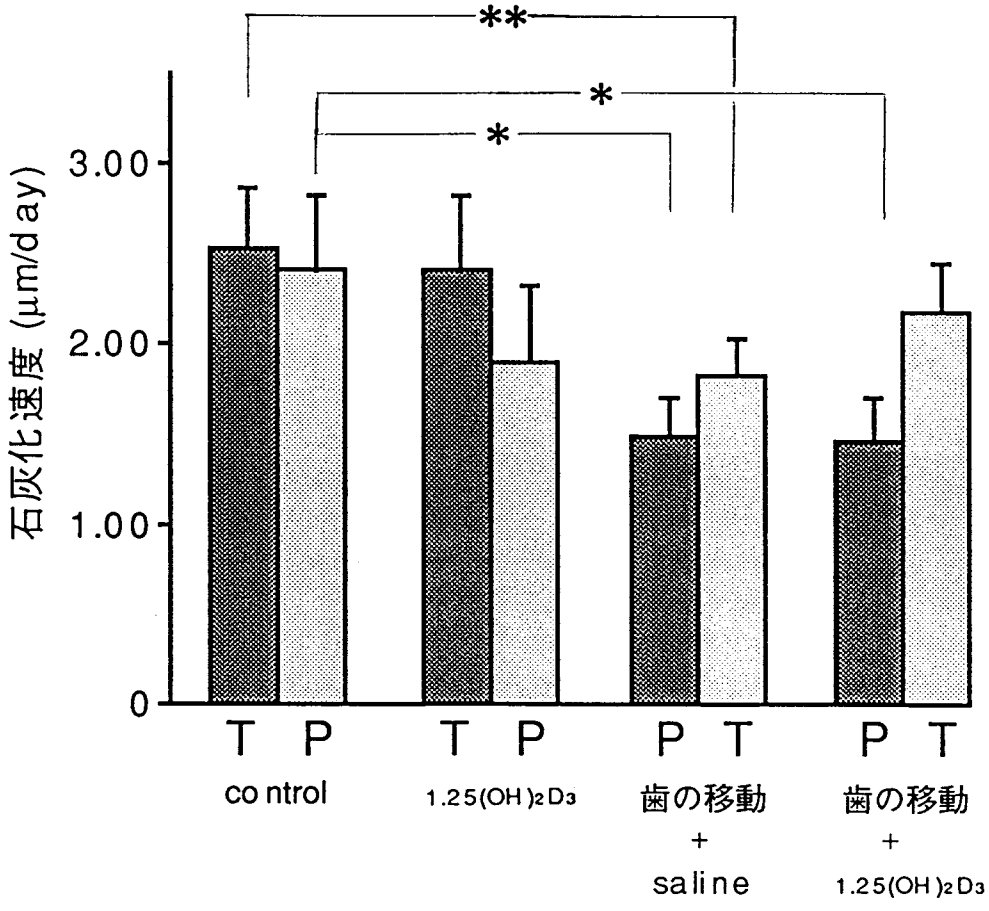

**
*
*
石灰化速度 (μm/day)
3.00
2.00
1.00
0
T P
T P
P T
P T
control
1.25(OH)2D3
歯の移動
+
saline
歯の移動
+
1.25(OH)2D3

図 12

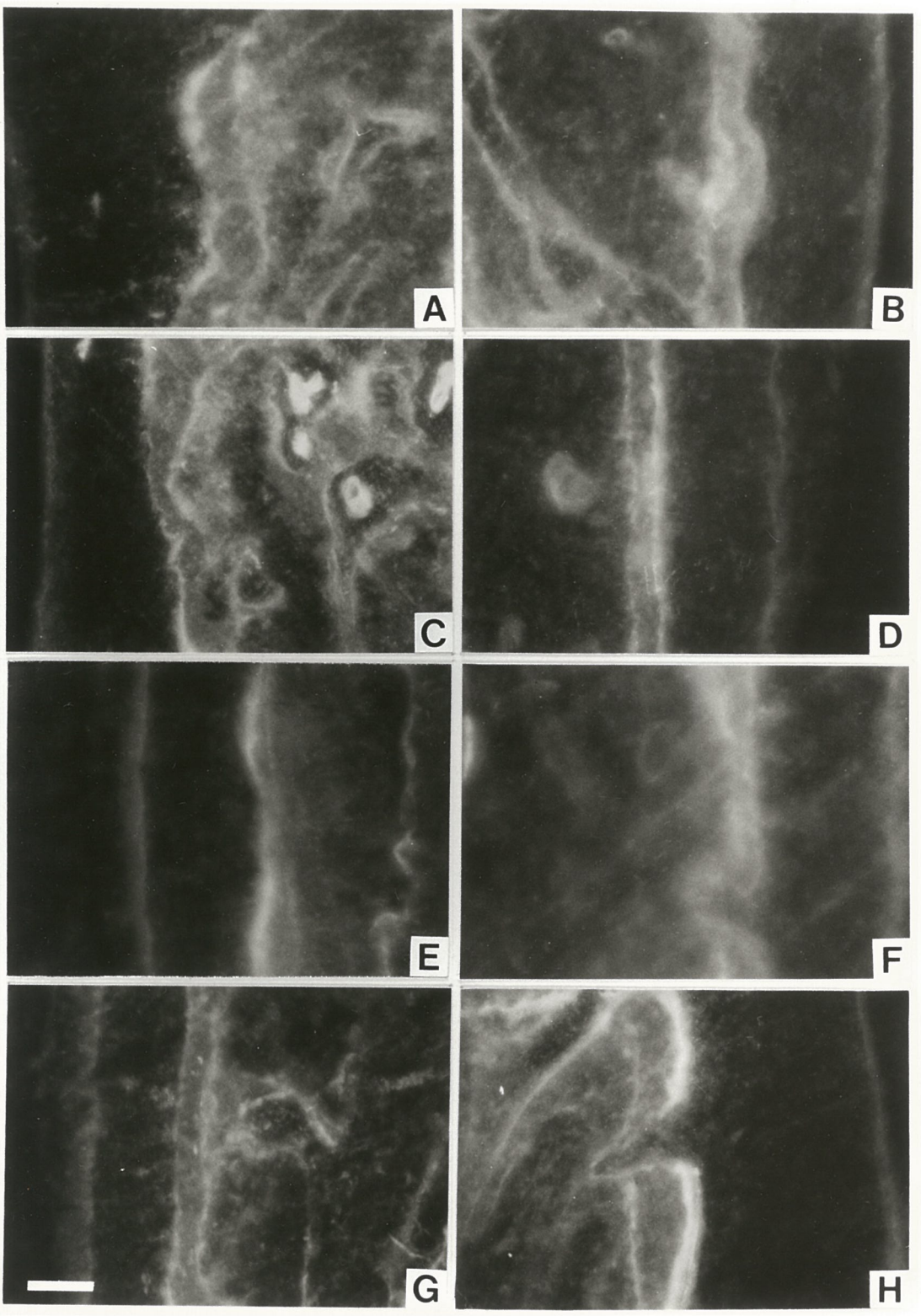


図 13

	Ca (mEq/l)	P (mg/dl)	ALP (K.A.Unit)
歯の移動＋1,25$(OH)_2D_3$(10^{-10}M)投与群	5.78±0.68	8.10±0.40	17.20±10.18
歯の移動＋saline投与群	5.23±0.28	6.77±0.73	19.87± 4.02
1,25$(OH)_2D_3$(10^{-10}M)投与群	5.57±0.59	8.73±1.06	31.85±12.20
saline投与群	5.24±0.40	6.98±0.99	21.34± 7.24

n=5における平均±標準偏差

表 1