



Title	矯正的歯の移動に伴うヒト歯肉溝滲出液中のサイトカインの動態 : Interleukin(IL)-1 β , Tumor Necrosis Factor- α , IL-6, Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor- β 1について
Author(s)	上松, 節子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3132616
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

矯正的歯の移動に伴うヒト歯肉溝滲出液中のサイトカインの動態

—Interleukin (IL)-1 β , Tumor Necrosis Factor- α , IL-6, Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor- β 1 について—

上松節子

Interleukin (IL)-1 β , Tumor Necrosis Factor- α , IL-6, Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- β 1 levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement.

Setsuko UEMATSU

緒言

歯科矯正学の分野では, *in vitro* あるいは *in vivo* において, 器械的刺激を加えることによって, 種々の細胞の生化学的反応ならびに細胞構造の変化が引き起こされるとされている. 矯正的歯の移動の早期には, 歯周組織での血管拡張と歯根膜の毛細血管からの白血球の遊走による急性の炎症反応が認められる¹⁾. 引き続いて起こる骨吸収のメカニズムは, 骨細胞 (bone cell) と相互に影響を及ぼすプロスタグランдинEやInterleukin(IL)-1 β の生成と同様に, 炎症性のメディエーターの放出とも関連している. 現時点では未解明であるが, 白血球によって分泌されるサイトカインは, 骨細胞 (bone cell) に直接作用するか, あるいはモノサイトやマクロファージ, リンパ球, 線維芽細胞といった周辺細胞がサイトカインや種々の成長因子を生成する過程に, 間接的に作用することが考えられる. これまで, 骨細胞 (bone cell) に関連するサイトカインとしてIL-1 β , tumor necrosis factor (TNF) - α , 同様の作用をもつ成長因子としてepidermal growth factor (EGF) が報告されている. これらのサイトカインおよび成長因子は, 個々に多様な生理活性をもち²⁾, 骨のリモデリングや吸収, あるいは新生骨の形成と関連している^{3,4)}. 現在では, 骨芽細胞様細胞が, 存在する破骨細胞の活性を調節し, サイトカインの放出によって新たに破骨細胞を形成することが証明されている⁵⁾. 個々のサイトカインの生理的役割としては, IL-1 β は骨吸収を促進し, 破骨細胞の増殖を促す中心的役割を担っている⁶⁾. そしてこのサイトカインはIL-6, TNF- α , EGFとオーバーラップする活性をもって

いる。さらに、IL-1 β は TNF- α と相乗的に作用することが知られている⁷⁾。TNF- α は骨吸収と骨細胞 (bone cell) の増殖を促進する^{8,9)}。また、IL-1 は IL-6 の産生を強力に促進するといわれている^{10,11)}。EGF は新生マウスの切歯の萌出を促進することが知られており¹²⁾、線維芽細胞やのちに破骨細胞の前駆体として報告された間質細胞から産生される¹³⁾。さらに、骨細胞 (bone cell) から産生される β 2-microglobulin (β 2-MG) も、骨細胞 (bone cell) に接着している insulin growth factor (IGF)-I の結合を増強し、それによって IGF-I の生理活性を増大させる結果、骨が形成される¹⁴⁾。以上のことから骨のリモデリングにおけるこれらのサイトカインの生理活性についてさらに解明することは、矯正的歯の移動との関連性を考えるうえで大いに意義がある。

しかし、ヒトにおける矯正的歯の移動に伴う、これらの調節因子の産生についての知見はほとんどない。近年、矯正的歯の移動に伴う歯周組織の変化や、periodontal ligament (PDL) 内の細胞による生理活性物質の産生量の変化が、歯肉溝滲出液 gingival crevicular fluid (GCF) 中に反映する可能性を示す報告がなされている。Last ら¹⁵⁾は、矯正力による移動を行った歯から採取した GCF 中のグリコサアミノグリカン (GAG) を分析し、歯の移動方向の歯面から採取した滲出液中のコンドロイチン硫酸のレベルが高度に上昇することを明らかにしている。彼らの結果は、GCF 中の GAG の様相ならびにレベルは、矯正装置によって歯槽骨内を歯根が移動することによるものも含めて、深部の歯周組織の変化を正確に反映することを示唆している。さらに、Grieve ら¹⁶⁾は、矯正的移動を

行っている歯の GCF 中のプロスタグランдин E(PGE)と IL-1 β のレベルが、経時に統計的有意差をもって上昇することを報告した。Davidovitch¹⁷⁾も IL-1 や神経内分泌性因子ならびに成長因子が、歯牙移動の反応で重要な特異的骨吸収における局所的な因子となる可能性があると述べた。これらの研究から、歯に器械的な力を加えた結果、PDL 内の細胞が生理活性を担うに十分な量の調節因子を産生し、それが GCF 中に反映することが予想され、GCF 中のサイトカインや成長因子の量が、矯正的歯の移動に伴って増加することが考えられる。しかも GCF 中の生理活性物質を定量することにより、歯周組織内のそれらの産生の動態を把握することが可能である、有用な *in vivo* での非感染性モデルを確立することが期待できる^{16,18)}。

本研究は矯正治療開始後 0, 1, 24, 168 時間後に採取した GCF 中のサイトカイン、IL-1 β , IL-6, TNF- α , EGF, Transforming Growth Factor (TGF)- β 1, さらにサイトカイン以外のメディエーターとして β 2-MG のレベルを、高感度の EIA 法を用いて調べ、その結果、矯正力を加えてから 24 時間後に GCF 中のサイトカインが急激に上昇することを明らかにした。これによって、ヒトでの矯正的歯の移動に伴い、骨のリモデリングに関与すると考えられているサイトカインの動態が、GCF 中に反映することが確認された。

実験方法

実験対象

研究に対する同意を得た歯科矯正治療患者 12 名を被験者として選択した。選択基準は、以下のとおりである。 (1) 全身状態が良好であること。 (2) GCF 採取以前 6 か月以内に抗生物質の投与を受けていないこと。 (3) GCF 採取以前 1 ヶ月以内に抗炎症薬の投与を受けていないこと。 (4) 臨床的に歯周組織の状態が良好であり、歯周ポケットの深さは 2mm 以下で、レントゲン写真上で歯槽骨の吸収が認められないこと。 (5) 矯正治療の治療方針として、上下顎第一小白歯の抜去が必要であること。

各被験者の上下顎左右第一小白歯抜歯後、上顎にマルチブラケット装置を装着し、レベリング後、チェーンエラスティクスを用いて 250g の荷重で片側の上顎犬歯の遠心移動を開始した。歯の移動量はデジタルキャリパスで測定した。実験歯ならびに対照歯の遠心面については、以下に示す診査にもとづいて歯周組織の状態を調べた。すなわち、歯周ポケットの深さ、プラークの有無、プロービング時の出血である。遠心移動を行う上顎犬歯を実験歯、反対側の犬歯ならびに実験歯と同側の下顎犬歯を対照歯として、移動開始直後、同 1 時間後、同 24 時間後、さらに 168 時間後に、各犬歯の遠心側より GCF をペーパーストリップスにて採取した。

GCF の採取

採取方法は Offenbacher らの方法¹⁹⁾にのっとって行った。実験歯と対照歯をスリーウェイシリングでゆるやかに洗浄した後、簡易防湿下で、ペーパーストリップス（ペリオペーパー[®], Harco 社, Tustin, CA, USA）を注意深く歯肉溝に 1mm の深さで 30 秒間挿入し、1 分後に 2 枚目のペリオペーパーを 30 秒間挿入した（図 1）。ペーパーストリップスの挿入に際しては、器械的刺激を歯周組織に与えないように注意して行った。採取された GCF 量をペリオトロン[®]（Harco 社, Tustin, CA, USA）で測定した後、エッペンドルフチューブにペーパーストリップスを入れて-30℃で凍結保存した。

IL-1 β , IL-6, TNF- α , EGF, TGF- β 1, β 2-MG, タンパク量の測定

タンパク分解酵素阻害剤を加えた 50mM phosphate buffer (pH 7.2, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin, pepstatin, antipain 各 50 μ g/ml) を加えて、ペリオペーパーから GCF を抽出した。まず、buffer 100 μ l を各ペーパーストリップスに加えて 15000 回転で 5 分間遠心操作を行い、さらに 100 μ l を加えて遠心操作を行った。2 枚のペーパーストリップスから求めた GCF の全抽出液 200 μ l を、-30℃で凍結保存した。予備試験として、既知のウシ血清アルブミン (BSA) を用いてこの方法による回収率を求めた結果、83~91% であった。抽出液の一部を用いて Bradford らの方法²⁰⁾により、BSA を標準値としてタンパク定量を行った。

GCF と各唾液腺由来の唾液との二次元電気泳動像^{21,22)}の比較検討を行った結果、GCF が唾液と異なる独自のパターンを示したことから、この採取方法によ

って GCF 中に唾液のコンタミネーションはないことが確認された (図 2) .

IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 は ELISA kit (Cayman Chemical Co., USA, R&D System Inc., USA) で^{23,24)}, EGF は two-site ELISA 法で²⁵⁾, TNF- α , β 2-MG は, 抗体でコーティングされたポリスチレンビーズと β -D-ガラクトシダーゼでラベルされた抗体から構成される sandwich EIA 法で^{26,27)}定量した. データは平均土標準誤差で表し, 実験群と対照群について Student の *t* 検定で有意差を検定した. 二次元ゲル電気泳動法, 銀染色法, およびウェスタンプロット法は既法に従い行った^{21,22,28)}.

結果

168 時間後の実験歯の移動量は, 平均 $1.1 \pm 0.1 \text{ mm}$ であった. 一方, 対照歯はいずれも移動しなかった. GCF 量は, 歯周組織の炎症と相関があるとされている²⁹⁾. そこで, 矯正的歯の移動に伴う GCF 量について, 24 時間後の実験歯における GCF 量の平均を求めた結果, $0.41 \pm 0.03 \mu\text{l}/2 \text{ ペリオペーパー}$ で, 24 時間後の両対照歯の平均 ($0.35 \pm 0.05 \mu\text{l}/2 \text{ ペリオペーパー}$) よりもわずかに上昇していたが, 統計的に有意の差は認められなかった. さらに, 実験歯から採取された GCF 量は, 臨床的に健康と判断される歯肉から採取された値 ($0.37 \pm 0.05 \mu\text{l}/2 \text{ ペリオペーパー}$) と近い値であり, かつ統計的に有意の差は認められなかった. 実験期間中をとおして, すべての歯において視診下でプラーク

の沈着は認められなかった。さらに、歯肉の状態は良好で出血は認められず、歯周ポケットの深さは 2mm 以下であった。

GCF 中の IL-1 β , TNF- α , IL-6, EGF, TGF- β 1, β 2-MG 量

矯正力を加えた後、実験歯と対照歯について求めたすべてのサイトカイン量において統計的に有意の差を認めた。遠心移動を行っている実験歯を experimental site (以下 Exp. site)、反対側の上顎犬歯を contralateral site (以下 Cont. site)、実験歯と同側の下顎犬歯を antagonistic site (以下 Ant. site) とした。Exp. site の 24 時間後の IL-1 β 量 (0.88 ± 0.11 pg / μ g) は移動開始直後の Exp. site の IL-1 β 量 (0.38 ± 0.07 pg / μ g, $p=0.0077$) ならびに 24 時間後の Cont. site の IL-1 β 量 (0.32 ± 0.08 pg / μ g, $p=0.0034$) に比べて統計学的に有意に上昇した (図 3a)。これらの結果はこれまでに報告されたものと一致する¹⁶⁾。Exp. site の 24 時間後の TNF- α 量 (1.13 ± 0.06 pg / μ g) は移動開始直後の Exp. site の TNF- α 量 (0.43 ± 0.14 pg / μ g, $p=0.006$)、168 時間後の Exp. site の TNF- α 量 (0.29 ± 0.03 pg / μ g, $p=0.0133$) ならびに 24 時間後の Ant. site の TNF- α 量 (0.41 ± 0.14 pg / μ g, $p=0.0193$) に比べて有意に上昇した (図 3b)。Exp. site の 24 時間後の IL-6 量 (0.063 ± 0.004 pg / μ g) は移動開始直後の Exp. site の IL-6 量 (0.020 ± 0.007 pg / μ g, $p=0.0077$)、168 時間後の Exp. site の IL-6 量 (0.009 ± 0.006 pg / μ g, $p=0.0147$) ならびに 24 時間後の Ant. site の IL-6 量 (0.016 ± 0.006 pg / μ g, $p=0.0193$) に比べて有意に上

昇した (図 3c) . Exp. site の 24 時間後の EGF 量 ($0.82 \pm 0.11 \text{ pg} / \mu\text{g}$) は移動開始直後の Exp. site の EGF 量 ($0.18 \pm 0.13 \text{ pg} / \mu\text{g}$, $p=0.0076$) ならびに 24 時間後の Ant. site の EGF 量 ($0.30 \pm 0.12 \text{ pg} / \mu\text{g}$, $p=0.0471$) に比べて有意に上昇した (図 3d) . Exp. site の 24 時間の TGF- β 1 量 ($0.89 \pm 0.18 \text{ pg} / \mu\text{g}$) は移動開始直後の Exp. site の TGF- β 1 量 ($0.43 \pm 0.14 \text{ pg} / \mu\text{g}$, $p=0.0198$) ならびに 24 時間後の Ant. site の TGF- β 1 量 ($0.21 \pm 0.06 \text{ pg} / \mu\text{g}$, $p=0.0233$) に比べて有意に上昇した (図 3e) . Exp. site の 24 時間後の β 2-MG 量 ($8.9 \pm 3.2 \text{ pg} / \mu\text{g}$) は移動開始直後の Exp. site の β 2-MG 量 ($0.68 \pm 0.21 \text{ pg} / \mu\text{g}$, $p=0.0393$) , 1 時間後の Exp. site の β 2-MG 量 ($0.24 \pm 0.14 \text{ pg} / \mu\text{g}$, $p=0.0279$) , ならびに 24 時間後の Ant. site の β 2-MG 量 ($0.50 \pm 0.23 \text{ pg} / \mu\text{g}$, $p=0.0307$) に比べて有意に上昇した (図 3f) . 168 時間後の Exp. site の β 2-MG 量はさらに上昇傾向を示したが, 移動開始直後の β 2-MG 量との間に統計学的有意差は認められなかった. 対照歯において, 測定したすべてのサイトカインについて, Cont. site から採取された GCF 中のサイトカイン量は, Ant. site から採取されたそれよりもわずかに高い値を示した. 測定したサイトカインが, Exp. site. で 24 時間後に有意に上昇したにもかかわらず, タンパク量は統計的有意差は認められなかった (図 3g) . Exp. site での 24 時間後のタンパク量 ($43.3 \pm 15.9 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) は, 移動開始直後の Exp. site ($23.5 \pm 7.4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$, $p=0.0881$) ならびに 24 時間後の Ant. sit のタンパク量 ($16.0 \pm 6.4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$, $p=0.0836$) と比べて統計的有意差は認められなかった. よって, 矯正的歯の移動期間中のタンパク量の変化は, サ

イトカイン量の変化と明らかに異なっていた。さらに GCF 中のタンパク質、ペプチドの二次元電気泳動パターンでは、時間に伴うパターン変化は顕著には認められなかった（図 4）。また、Exp. site から採取された GCF について求めたウェスタンプロット法によって、24 時間後と 168 時間後に TGF- β 1 が検出された。

以上のことより、矯正的歯の移動に伴い、測定したサイトカインは、GCF 中で特異な一過性の上昇を示すことを明らかにした。

考察

実験モデルについて

Grieve らは、片側で矯正用ワイヤーを用いることによって、対照歯である反対側の側切歯に力を加えることなく、実験歯を頬側あるいは唇側へ傾斜移動させたと報告している¹⁶⁾。片側のワイヤーによって実験歯となる側切歯に矯正力を加えたとしているが、この方法では反対側の側切歯も何らかの矯正力の影響を受けていると考えられる。よって、本研究では、実験歯と同側の下顎犬歯を矯正力を加えない歯として対照歯に加えた。遠心移動を行っているすべての歯は、チェーンエラスティクスによって矯正力を加え、Cont. site の歯には矯正力を加えなかった。Ant. site の歯には、装置は装着せず何ら矯正力を加えなかつた。図 2 に示したように、Cont. site の GCF 中のいくつかのサイトカインのレベルが、Ant. site でのレベルと比較してわずかに高くなっていることから、この実験モデルは本研究に適したものと評価した。

矯正的歯の移動に伴う GCF 中のサイトカイン

Davidvitch ら¹¹は、傾斜移動の力を加えたネコ犬歯の歯周組織内に IL-1 が存在することを、免疫組織化学的検討により明らかにした。彼らの報告は、矯正治療に伴う骨のリモデリングの何らかの過程をサイトカインが調節していることを、初めて示唆するものであった。そこで、この種の実験としては初めての *in vivo* の実験である本研究では、ヒトでの器械的刺激に対する反応に関連するサイトカインに焦点を当てて、矯正的歯の移動に伴い、GCF 中に幾つかのサイトカインが存在しあつ上昇することを確認した。しかもすべてのサイトカインと β 2-MG は、器械的刺激を加えた後、24 時間後に統計的に有意の差をもって、一過性の上昇を示した（図 2）。矯正移動を行っている歯の GCF 中のサイトカイン量と β 2-MG 量の増加は、矯正力によって、歯周組織内の細胞がサイトカインと β 2-MG を産生しており、しかもこれらのメディエーターが GCF 中から非感染性に認められたことを示唆するものである。

本研究では、GCF 中の全タンパク量あたりのサイトカイン量 (pg / μ g) として報告した。これは以下の理由で重要である。すなわち、（1）GCF 量はサンプルによってばらつきがある。 （2）24 時間後の GCF 中の全タンパク量 (μ g) 当たりのすべてのサイトカイン量は、同時刻の対照歯ならびに移動開始直後の実験歯のそれと比較して、一過性の上昇を示したことから、歯の移動に伴うサイトカインの産生が確かめられた。 （3）タンパク量は、168 時間後まで上昇傾

向を示したにも関わらず、サイトカイン量は 168 時間後にもとのレベルまで減少したのは、器械的刺激を加えられた歯で 24 時間後に、サイトカインの特異的な上昇があったことを示唆するものである。

さらにチェーンエラスティクスを用いた本研究の矯正装置では、初期の歯の移動後、持続的な矯正力は加わらないので、168 時間後に測定したすべてのサイトカイン量が上昇しなかった理由としては、矯正力がほとんど加わっていないかったことで説明される。

これらのサイトカインの由来について詳細な検討は行われていないが、歯根膜や歯槽骨内の例えば線維芽細胞、マクロファージ、骨芽細胞、破骨細胞といった細胞によって産生されていると推測される。器械的に変形した骨芽細胞と歯根膜細胞は広い範囲で分子レベルの変化を示し、骨吸収を引き起こすものがあるといわれている³⁰⁾。事実、移動初期、例えば 12、24 時間後にネコ犬歯の歯根膜内に IL-1 β の存在が確認されている¹⁾。また、ヒト歯根膜内の IL-6 の産生が証明されている³¹⁾。これらの最近の組織化学的検討による結果と、24 時間後に IL-1 β 、IL-6 量が上昇することは一致する。矯正的歯の移動に伴い各サイトカインの果たす役割については、本実験では明確にはできないが、器械的に変形した組織による GCF 中へのサイトカインの産生は、矯正的歯の移動に伴う多くの細胞の作用として説明することができる。矯正力すなわち器械的刺激によって、*in vivo* で多種の細胞において、生化学的反応が励起されると考えられる。矯正治療初期には一種の急性炎症を伴い、白血球も炎症反応のメディエーター

としていくつかのサイトカインを生成していると考えられる。これらのサイトカイン、特に IL-1 β , TNF- α , IL-6 は骨吸収過程に関係しているといわれている^{8,32-35)}。骨芽細胞様細胞は、IL-1 β や IL-6 といったいくつかのサイトカインを産生し³⁶⁻³⁸⁾、これらのサイトカインは、骨吸収を行う破骨細胞の増殖を促進する。また、TGF- β 1 は、線維芽細胞や骨芽細胞といったいくつかの細胞由来であることが解明されつつある³⁹⁻⁴¹⁾。本来骨芽細胞に作用して骨形成を促進する因子といわれているが⁴²⁾、一方でマウス破骨細胞形成に対する作用は二相性で、低濃度では促進、高濃度では抑制するとの報告もあり、議論の分かれることろである。本研究結果において、他のサイトカインと同様の一過性の亢進が認められた理由としては、次の 2 点が推察される。ひとつは免疫応答としての TGF- β 1 の作用で、PDL 内での一過性に亢進した免疫応答に対する負のフィードバックの役割を担っている可能性である。IL-1 β , TNF- α といった炎症性因子となるサイトカインと拮抗し、IL-1 β に対する受容体の発現を抑制する⁴³⁾。もうひとつは、TGF- β 1 の骨のリモデリングにおける bone-coupling factor としての作用である⁴⁴⁾。破骨細胞の分化、ならびに破骨細胞による骨吸収を抑制し、骨芽細胞による骨形成を促進することで、骨のリモデリングとそれに伴う歯の移動を促進すると考えられる。 β 2-MG は腫瘍組織適合抗原の Class- I のサブユニットであり免疫応答に関わると考えられている。よって、本研究では、 β 2-MG は、炎症反応に対する免疫応答を示すサイトカイン以外の指標として測定した。 β 2-MG 量の上昇は、器械的刺激による急性炎症反応によるものと推測される。

炎症反応によって生成されたこれらのサイトカインは、骨芽細胞、破骨細胞の産生を促進し、骨吸収と骨形成によって骨のリモデリングが起こり、その結果、歯が移動すると考察される。

以上のことより、本研究では、骨吸収や骨形成に関与するサイトカインとそれらと相乗的に作用するとされているサイトカインが同様の一過性の上昇を示したことから、矯正的歯の移動に伴う骨代謝に関与すると考えられているサイトカインの動態が、ヒト GCF 中に反映することを確認した。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ、かつ御懇篤なるご指導とご校閲を賜りました松本歯科大学歯科矯正学講座出口敏雄教授、ならびに大阪大学歯学部歯科矯正学講座高田健治教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたりご指導とご教示くださいました愛知学院大学歯学部薬理学講座茂木眞希雄先生に心より感謝の意を表します。さらに本研究の円滑な進展のため特別のご配慮をいただきました松本歯科大学歯科矯正学講座、口腔生化学講座ならびに大阪大学歯学部歯科矯正学講座の教室員の皆様に厚くお礼を申し上げます。

本研究の一部は平成 7 年度および 8 年度の文部省科学研究費補助金奨励研究(A)を用いて行ったものであることを付記し、謝意を表します。

Interleukin (IL)-1 β , Tumor Necrosis Factor- α , IL-6, Epidermal Growth Factor, and Transforming Growth Factor- β 1 levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement

Setsuko UEMATSU

Department of Orthodontics, Matsumoto Dental College, Shiojiri, Nagano 399-07, Japan.

Key words : IL-1 β , TNF- α , IL-6, EGF, TGF- β 1, GCF, orthodontic tooth movement.

Bone remodeling is a complex process regulated by several mediators. Recent work has revealed that cytokines and growth factors have significant effects on bone cell metabolism. However, little information is available concerning the production of cytokines during orthodontic tooth movement in human subjects, and there is no non-invasive model for determining the production of cytokines. Therefore, the purpose of this study was to identify and quantify the various cytokines in human

gingival crevicular fluid (GCF), and to investigate the changes in their levels during orthodontic tooth movement. Twelve patients (mean age, 14.4 years) were used as subjects. An upper canine of each patient having one treatment for distal movements served as the experimental tooth, whereas the contralateral and antagonistic canines were used as controls. The GCF around the experimental and the two control teeth was taken from each subject immediately before activation, and at 1, 24, and 168 hr after the initiation of tooth movement. Cytokine levels were determined by ELISAs. The concentrations of interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α , IL-6, epidermal growth factor, and transforming growth factor- β 1 were significantly higher in the experimental group than in the controls at 24 hr after the experiment was initiated. All the cytokines remained at baseline levels throughout the experiment for the two control groups. In contrast to cytokine alteration, the amount of total protein in the GCF exhibited a gradual increase, but no significant difference was observed between the control and experimental groups. Since all cytokines in GCF play an important role in the bone remodeling processes *in vitro*, the present results indicate that the changes in cytokines in GCF are associated with orthodontic tooth movement.

引用文献

- 1) Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL (1988). Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am* 32:411-435.
- 2) Sternberg EM (1989). Monokines, lymphokines, and the brain. *Year Immunol* 1989 5: 205-217.
- 3) Canalis E, McCarthy T, Centrella M (1988). Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 81:277-281.
- 4) Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S (1993). Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8:S565-S572.
- 5) Horowitz MC, Coleman DL, Flood PM, Kupper TS, Jilka RL (1989). Parathyroid hormone and lipopolysaccharide induce murine osteoblast-like cells to secrete a cytokine indistinguishable from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest* 83:149-157
- 6) Gowen M, Wood DD, Russell RG (1985). Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity. *J Clin Invest* 75:1223-1229.
- 7) Dinarello CA (1989). Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 44:153-205.
- 8) Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR (1986). Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by

human tumour necrosis factors. *Nature* 319:516-518.

- 9) Canalis E (1987). Effects of tumor necrosis factor on bone formation *in vitro*. *Endocrinology* 121:1596-1604.
- 10) Van Damme J, Opdenakker G, Simpson RJ, Rubira MR, Cayphas S, Vink A, *et al.* (1987). Identification of the human 26-kD protein, interferon beta-2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/ plasmacytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 165:914-919.
- 11) Linkhart TA, Linkhart SG, MacCharles DC, Long DL, Strong DD (1991). Interleukin-6 messenger RNA expression and interleukin-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone: regulation by interleukin-1. *J Bone Miner Re* 6:1285-1294.
- 12) Cohen S (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562.
- 13) Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, *et al.* (1990). Origin of osteoclastsMature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7260-7264.
- 14) Centrella M, McCarthy TL, Canalis E (1989). β 2-Microglobulin enhances insulin-like growth factor I receptor levels and synthesis in bone cell cultures. *J Biol Chem* 264:18268-18271.

15) Last KS, Donkin C, Embrey G (1988). Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid during orthodontic movement. *Arch Oral Biol* 33:907-912.

16) Grieve WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM (1994). Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 105: 369-374.

17) Davidovitch Z (1991). Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med* 2: 411-450.

18) Samuels RHA, Pender N, Last KS (1993). The effects of orthodontic tooth movement on the glycosaminoglycan components of gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 20: 371-377.

19) Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE (1986) The use of crevicular fluid PGE₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodont Res* 21:101-112.

20) Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

21) Mogi M., Hiraoka B.Y., Fukasawa K., Harada M., Kage T. and Chino T. (1986a) Two-dimensional electrophoresis in the analysis of a mixture of human sublingual and submandibular salivary proteins. *Archs Oral Biol.* 31, 119-125.

22) Mogi M, Hiraoka B.Y., Harada M, Kage T. and Chino T. (1986b) Analysis and identification of human parotid salivary proteins by micro two-dimensional electrophoresis and western-blot techniques. *Archs Oral Biol.* 31, 337-339.

23) Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, et al. (1994). Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 180:147-150.

24) Mogi M., Harada M., Kondo T., Narabayashi H. Riederer P. and Nagatsu T. (1995) Transforming growth factor- β 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 193, 129-132.

25) Katsuura M, Tanaka S (1989). Topographic analysis of human epidermal growth factor by monospecific antibodies and synthetic peptides. *J Biochem* 106:87-92.

26) Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T (1994a). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 165: 208-210.

27) Mogi M, Harada M, Kojima K, Adachi T, Narabayashi H, Fujita K, et al. (1989). β 2-microglobulin decrease in cerebrospinal fluid from parkinsonian

patients. *Neurosci Lett* 104: 241-246.

28) Mogi M., Harada M., Kage T., Chino T. and Yoshitake K. (1993) Two-dimensional electrophoresis of human salivary proteins from patients with sialoadenopathy. *Archs Oral Biol.* 38, 1135-1139.

29) Cimasoni G (1983). Crevicular fluid updated. *Monographs in oral sciences* 12:24-28 and 104-123.

30) Sandy JR, Meghji S, Scutt AM, Harvey W, Harris M, Meikle MC (1989). Murine osteoblasts release bone-resorbing factors of high and low molecular weights: stimulation by mechanical deformation. *Bone Min* 5: 155-168.

31) Shimizu N, Ogura N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Abiko Y, et al. (1992). Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 37:743-748.

32) Dewhirst FE, Ago JM, Peros WJ, Stashenko P (1987) Synergism between parathyroid hormone and interleukin-1 in stimulating bone resorption in organ culture. *J Bone Miner Res* 2:127-134.

33) Tashjian AH Jr, Voelkel EF, Lazzaro M, Goad D, Bosma T, Levine L (1987). Tumor necrosis factor- α (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology* 120:2029-2036.

34) Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD (1989). Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of osteoclastlike cells in vitro. *J Bone Miner Res* 4:113-118.

35) Kurihara N, Civin C, Roodman GD (1991). Osteotropic factor responsiveness of highly purified populations of early and late precursors for human multinucleated cells expressing the osteoclast phenotype. *J Bone Miner Res* 6:257-261.

36) Hanazawa S, Ohmori Y, Amano S, Miyoshi T, Kumegawa M, Kitano S (1985). Spontaneous production of interleukin-1-like cytokine from a mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1). *Biochem Biophys Res Commun* 131:774-779.

37) Feyen JHM, Elford P, Padova FE, Trechsel U (1989). Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 4:633-638.

38) Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 145:3297-3303.

39) Lawrence D.A., Pircher R., Kryceve-Martinerie C. and Jullien P. (1984) Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J. Cell. Physiol.* 121, 184-188.

40) Gehron-Robey P., Young M.F., Flanders K. C., Roche N.S., Kondaiah P., Reddi A.H., Termine J.D., Sporn M.B. and Roberts A.B. (1987) Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) *in vitro*. *J. Cell Biol.* 105, 457-463.

41) Gerwin B.I., Lechner J.F., Reddel R.R., Roberts A.B., Robins

K.C., Gabrielson E.W. and Harris C.C. (1987) Comparison of production of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines. *Cancer Res.* 47, 6180-6184.

42) Bonewald L.F. and Mundy G.R. (1990) Role of transforming growth factor- β in bone remodeling. *Clin. Orthop.* 250, 261-276.

43) Wahl S.M. (1992) Transforming growth factor β (TGF- β) in inflammation: a cause and a cure. *J. Clin. Immunol.* 12, 61-74.

44) Mundy G.R. (1992) The effects of TGF- β on bone. In 1991 *Clinical Application of TGF- β* . (Ciba Foundation Symposium 157), pp137-151. Wiley, Chichester.

45) Lowney J.J., Norton L.A., Shafer D.M. and Rossomando E.F. (1995) Orthodontic forces increase tumor necrosis factor α in the human gingival sulcus. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 108, 519-524.

46) Roberts A.B. and Sporn M.B. (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors*, 8, 1-9.

47) Robey P.G., Young M.F., Flanders K.C., Roche N.S., Kondaiah P., Reddi A.H., Termine J.D., Sporn M.B. and Roberts A.B. (1987) Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type b (TGF- β) *in vitro*. *J. Cell Biol.* 105, 457-463.

48) Sodek J. and Overall, C.M. (1992) Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodeling. *Matrix Suppl.* 1, 352-362.

49) Uematsu S. Mogi M. and Deguchi, T. (1996) Interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , epidermal growth factor, and β 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J. dent. Res.* 75, 562-567.

付図の説明

図 1 GCF 採取時の口腔内写真

実験歯ならびに対照歯の遠心面から採取しているところを示す。

A : Experimental site, B : Contralateral site

図 2 GCF と唾液の二次元電気泳動像を示す。

一次元めに変性剤を用いないアンフォラインを含んだ 5% ゲルによる等電点電気泳動を行い、その後ゲルを取り出し、二次元めに同じく変性剤を含まない 10% アクリルアミドによる電気泳動を行った。タンパク質の検出は銀染色法 (silver stain kit, Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) により行った。

(a) : 移動開始直後の実験歯から採取された GCF, (b) : 耳下腺由来の唾液, (c) : 舌下腺と顎下腺由来の唾液

図 3 GCF 中のサイトカインならびにタンパク量の変化を示す

グラフ中のデータは平均土標準誤差で表す

Exp.site : Experimental site, Cont.site : Contralateral site,

Ant.site : Antagonistic site

p : 危険率

- (a) IL-1 β ,
- (b) TNF- α ,
- (c) IL-6,
- (d) EGF,
- (e) TGF- β 1,
- (f) β 2-MG,
- (g) タンパク量

図4 実験歯について求めた GCF の二次元電気泳動像を示す

二次元電気泳動法は図2に同じ

A : 移動開始直後, B : 1 時間後, C : 24 時間後, D : 168 時間後



A



B

図1

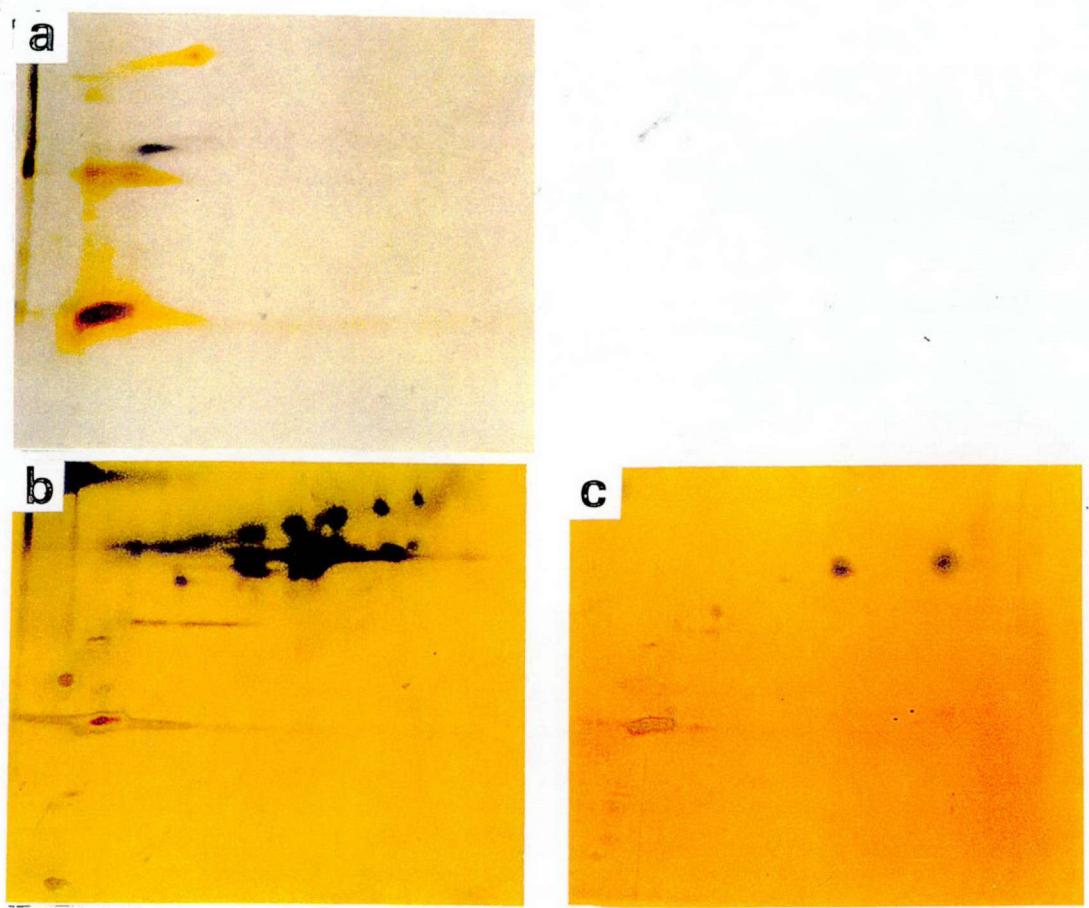


図2

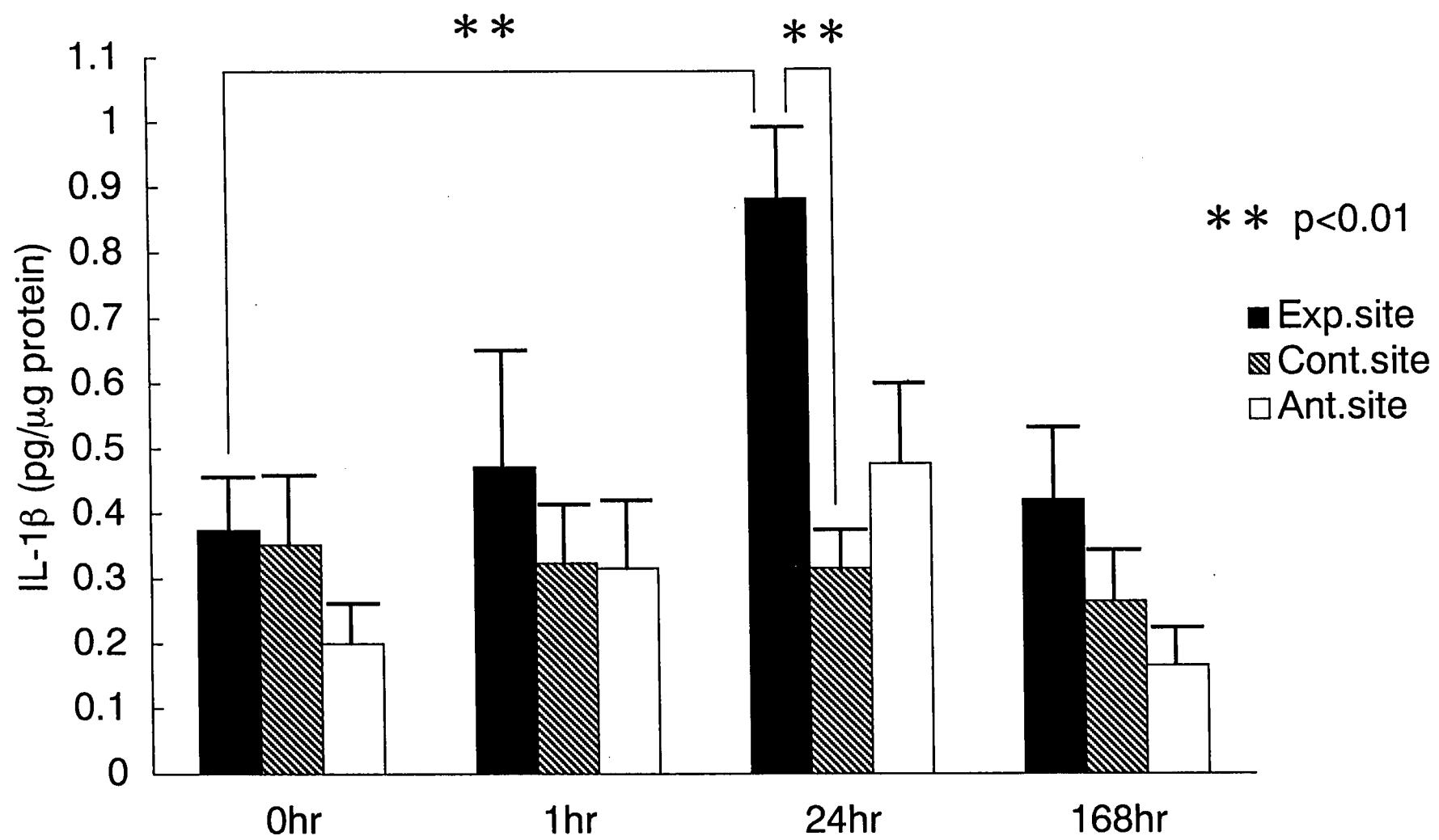


図3(a)

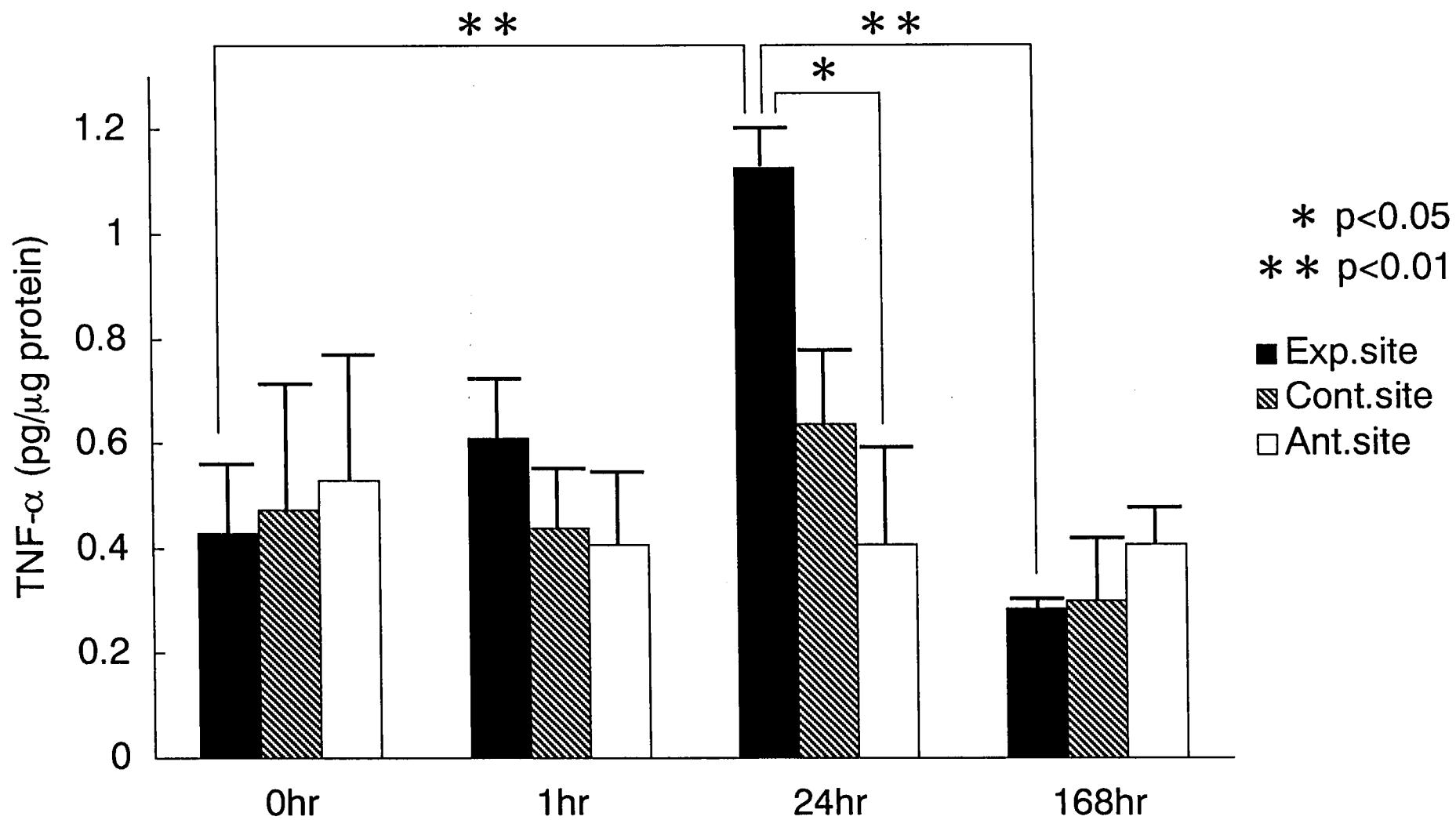


図3(b)

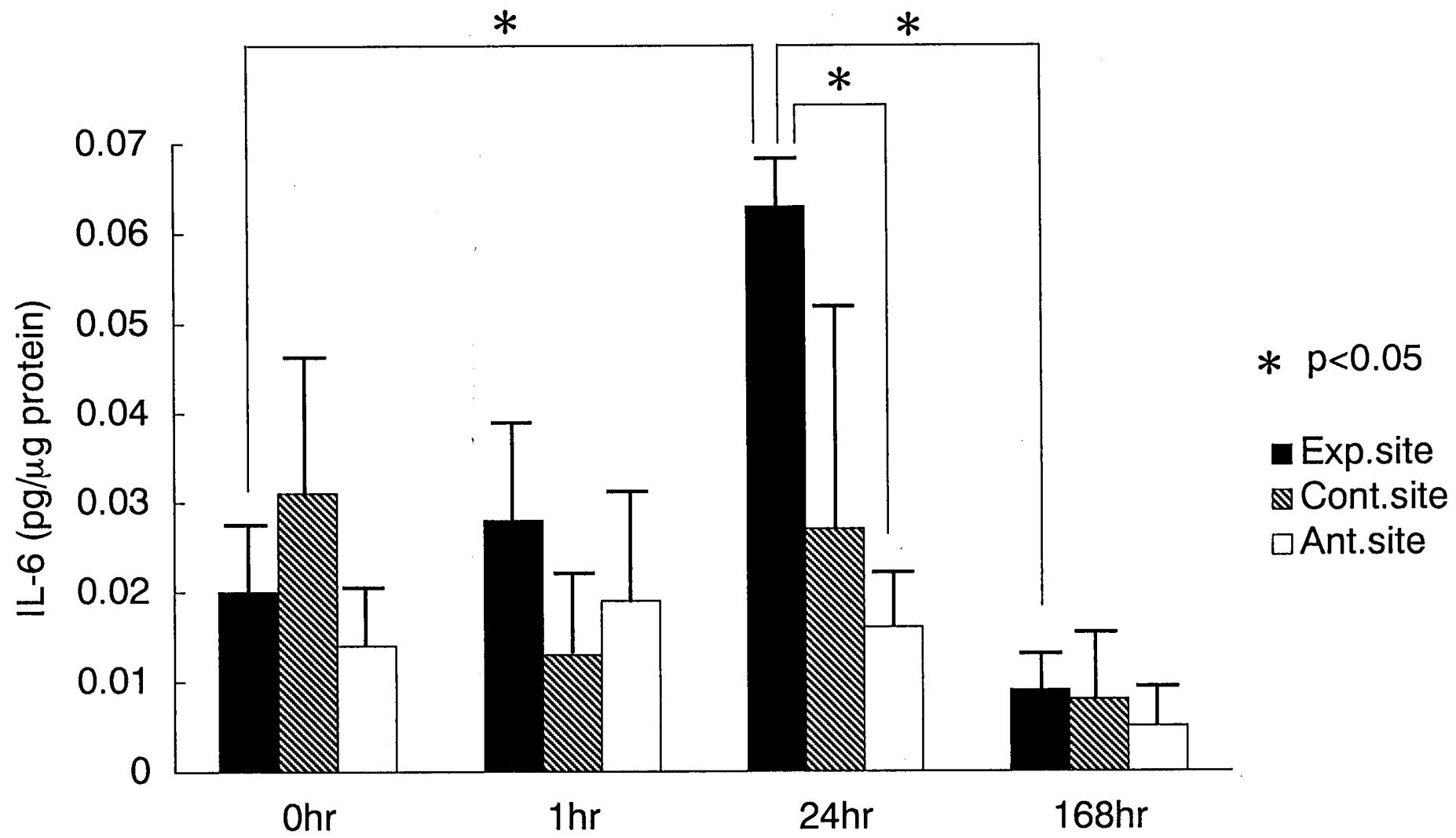


図3(c)

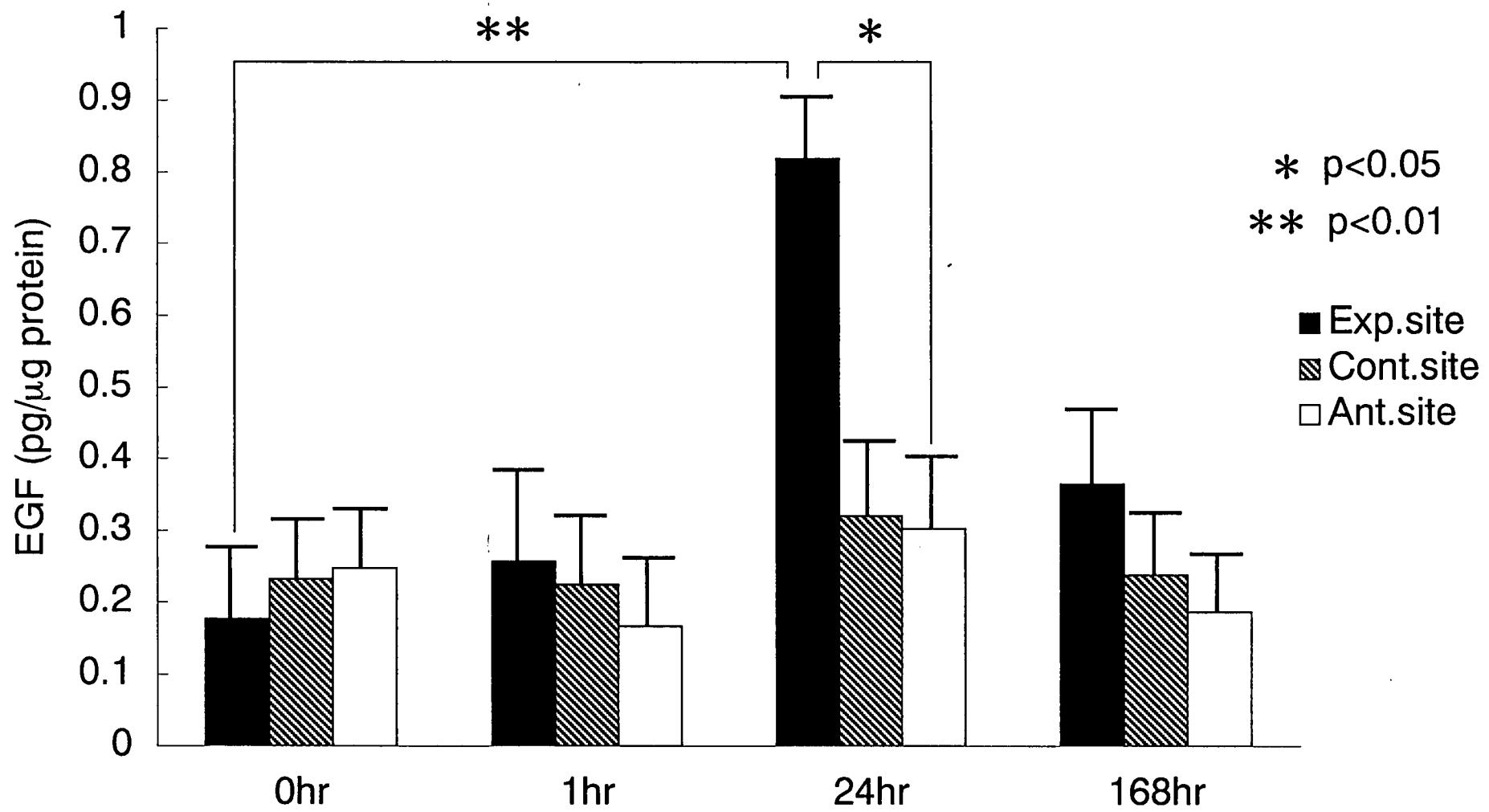


図3(d)

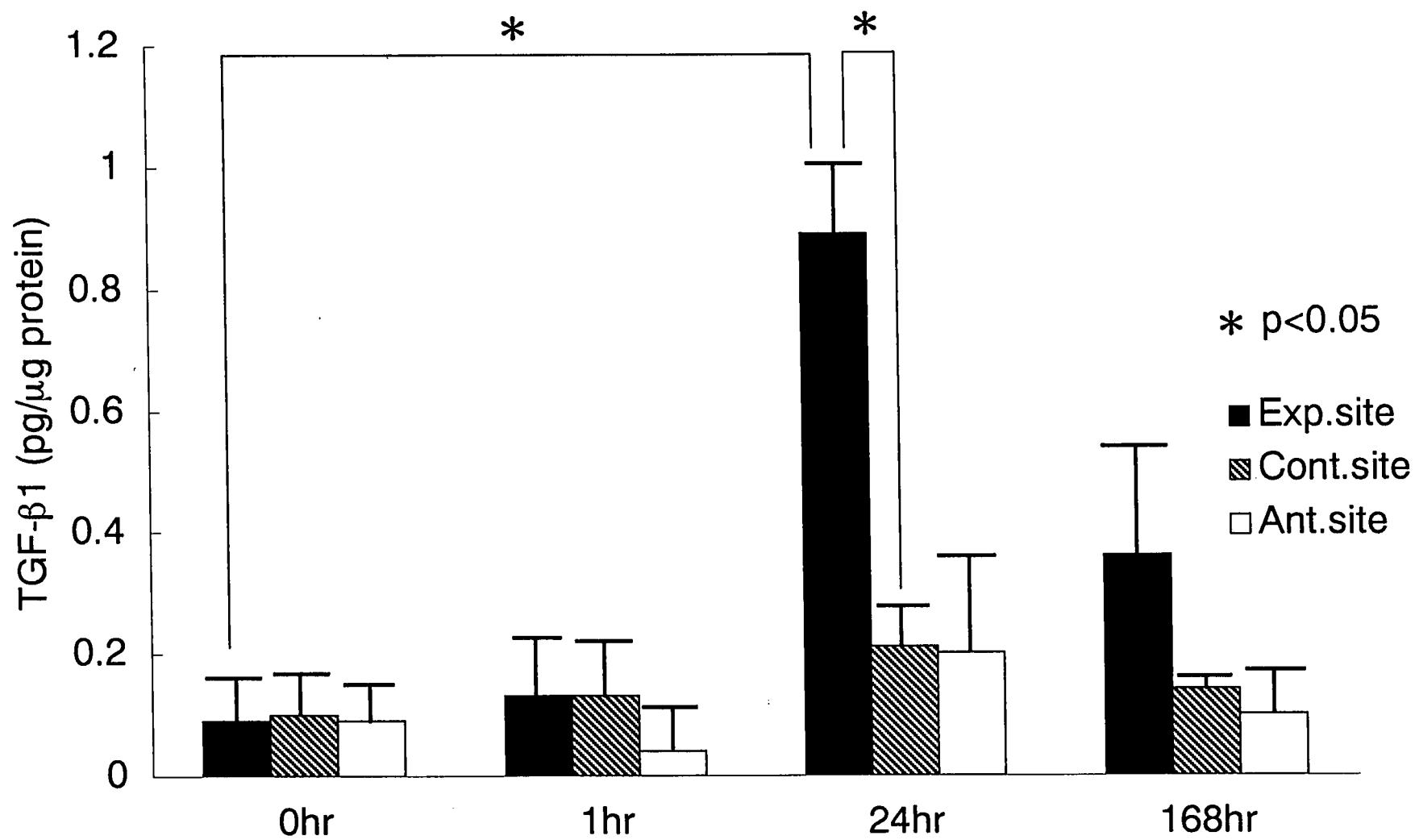


図3(e)

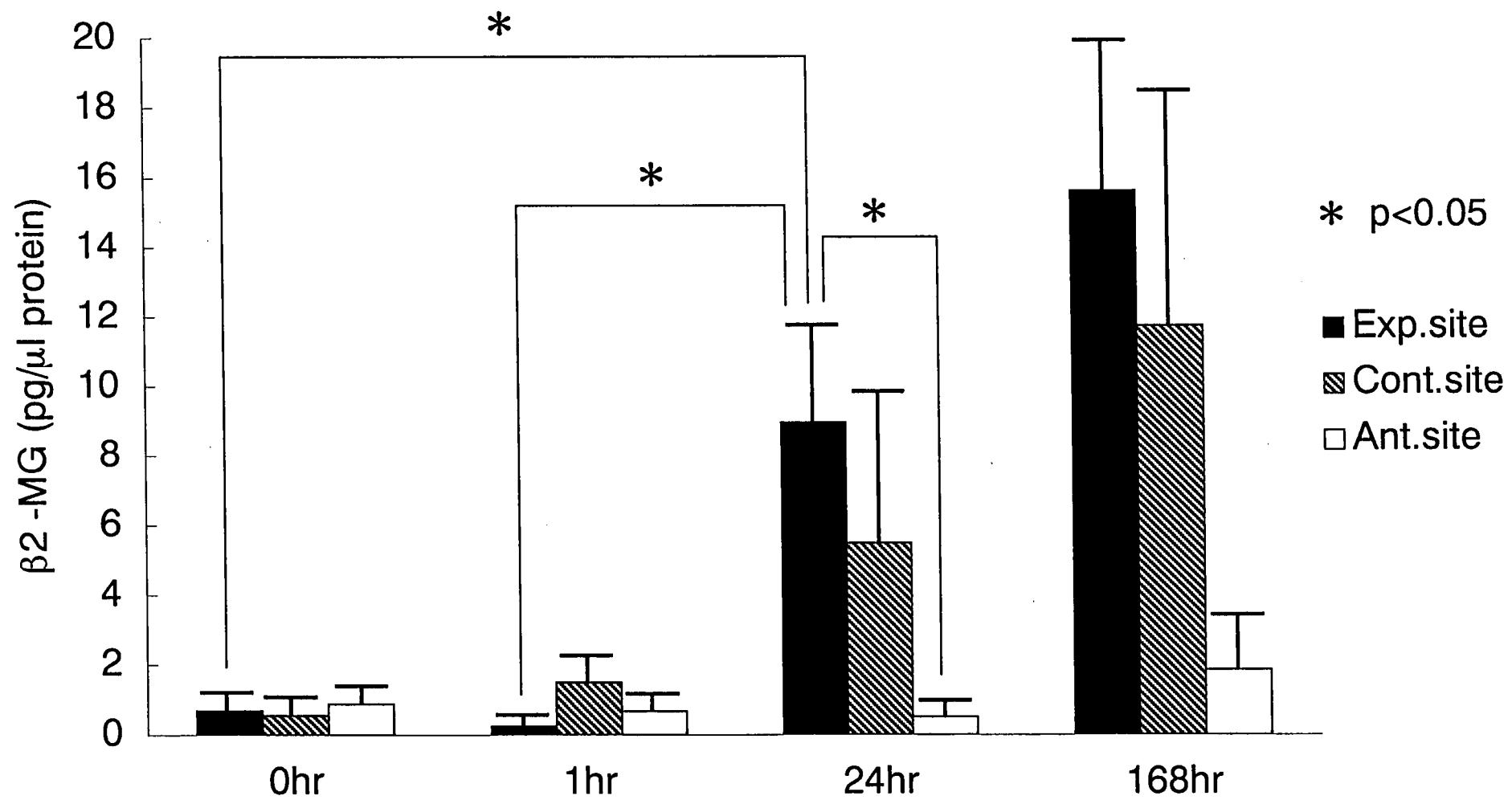


図3(f)

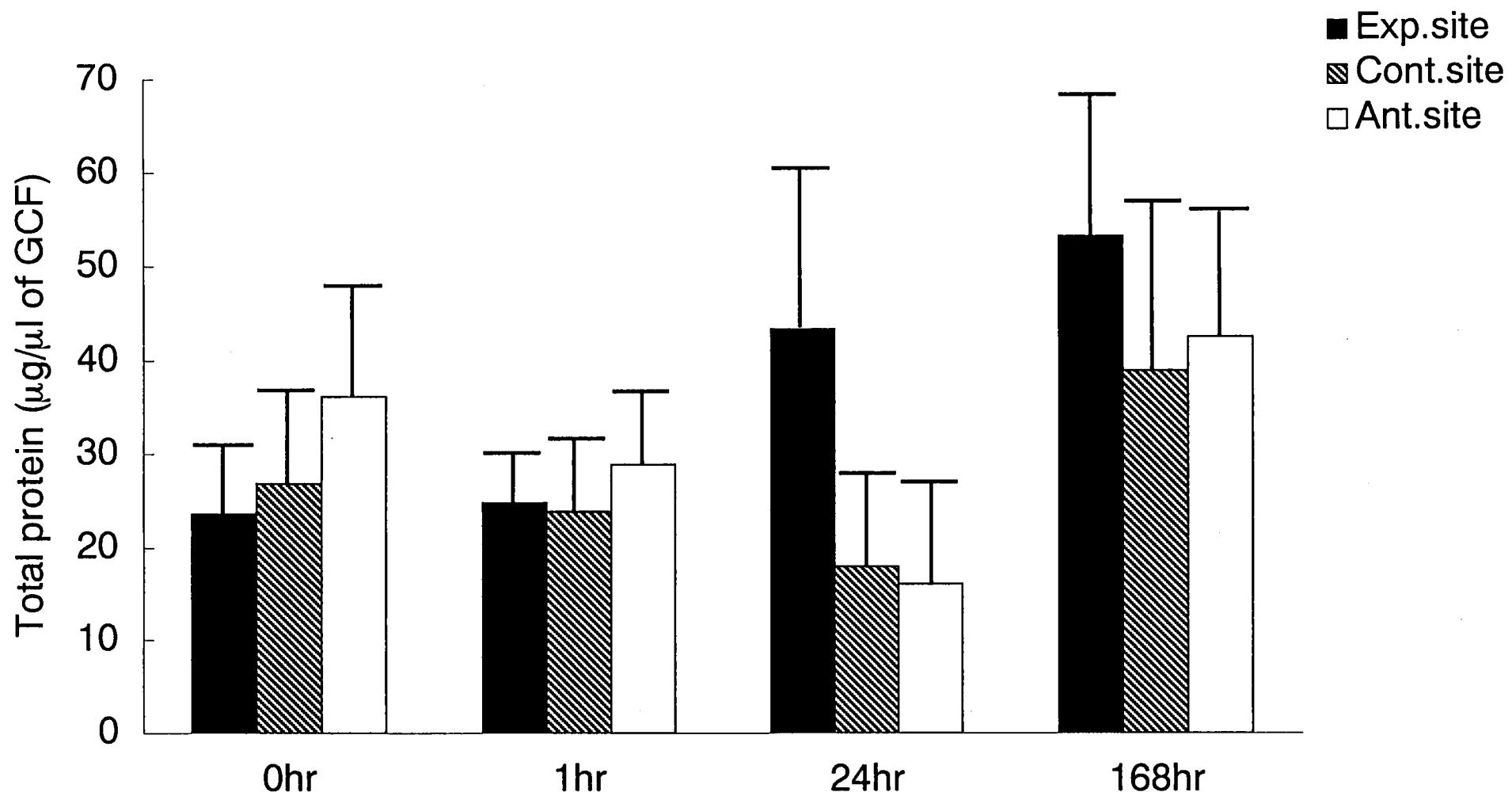
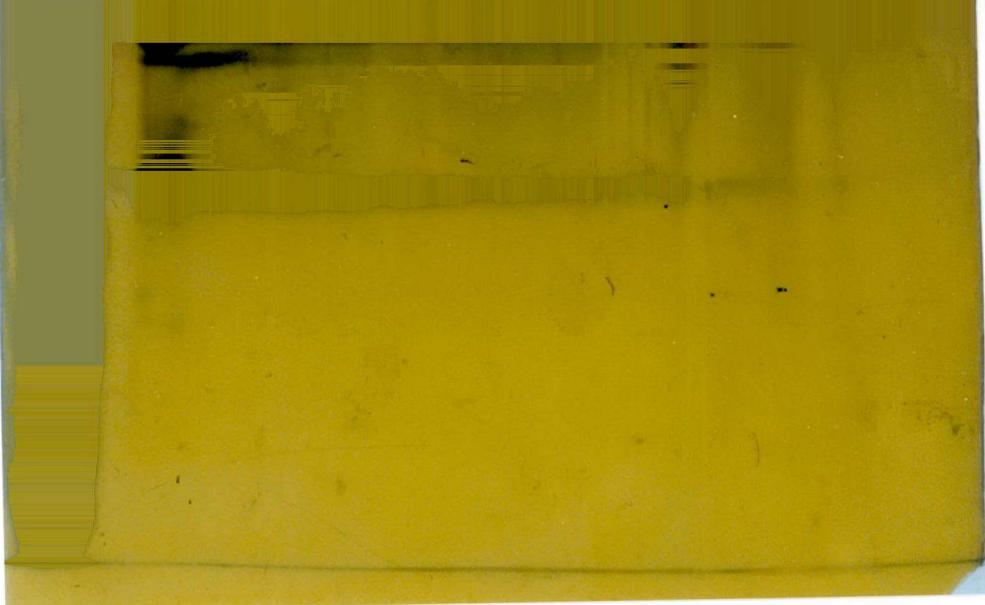


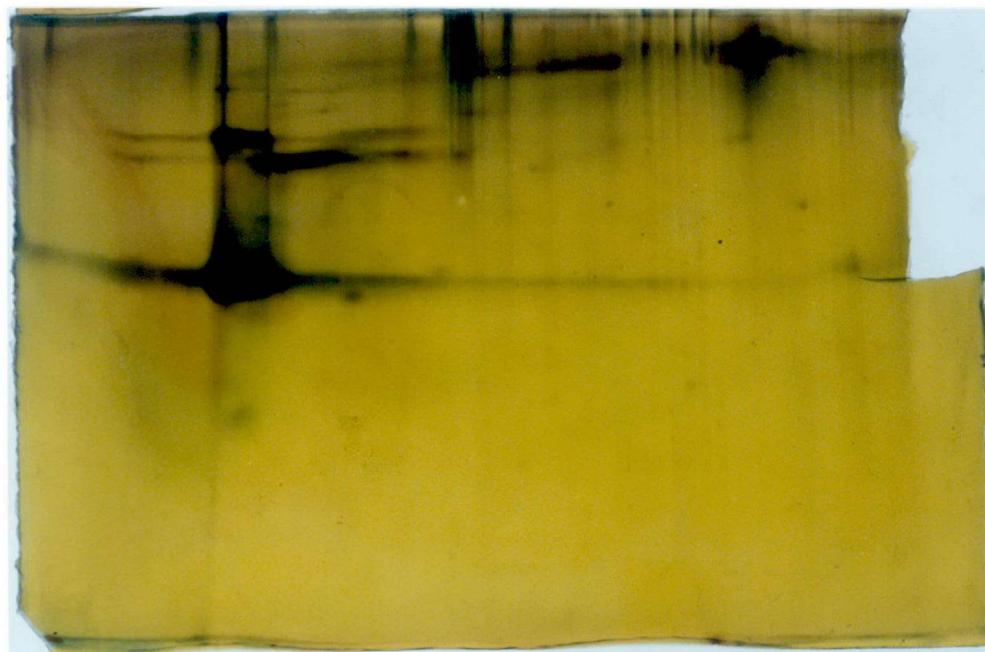
図3(g)



A

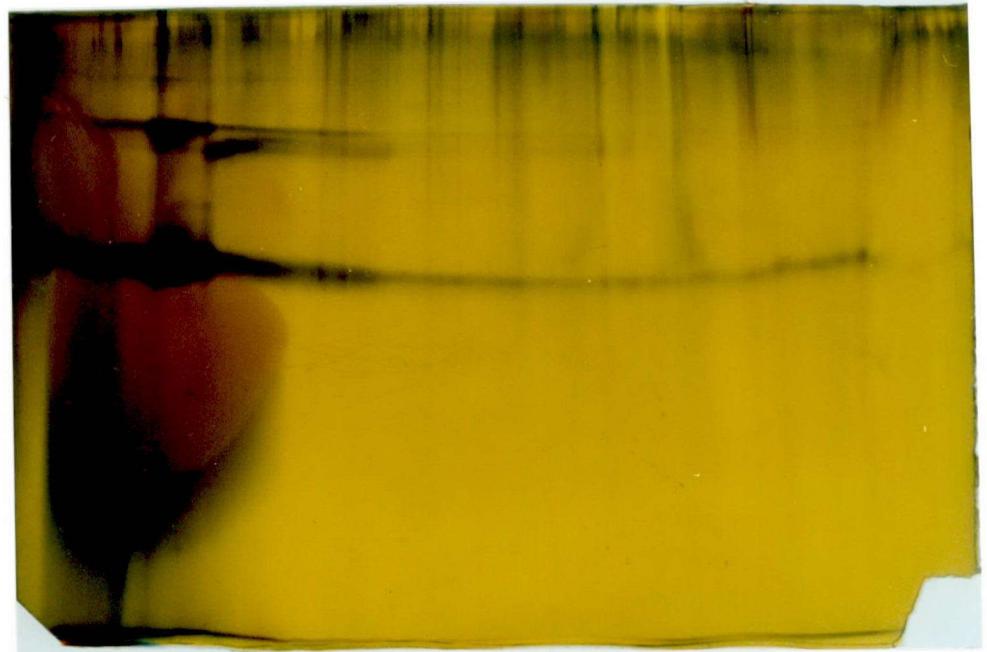


B



C

図4



D