

## 実験的歯の移動に伴うラット歯根膜における 塩基性線維芽細胞成長因子の影響

三條 敏也

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任：石川 富士郎 教授)

(受付：1997年 2月 17日)

(受理：1997年 3月 21日)

**Abstract :** Basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes dermal wound healing, bone fracture healing, and angiogenesis *in vivo*. However, the effects of bFGF local administration on the periodontal ligaments after experimental tooth movement remain to be fully elucidated. The present study was carried out to determine the effects of bFGF on the periodontal ligaments from the viewpoint of cell kinetics. Wistar strain male rats were used, and tooth movements were performed under ether anesthesia according to the technique of Waldo. Orthodontic elastics were inserted between both the upper 1st and 2nd molars for 3, 7, and 14 days. Each animal in the experimental group (n=15) was injected with a single dose of bFGF (10  $\mu$ g / 50  $\mu$ l) into the palatal submucosa of the interradicular septa of both 1st molars 0, 4, 7, and 11 days from the beginning of the tooth movement. Saline solution was administered to the control group (n=15). A dose of 74 kBq/g of  $^3$ H-proline was injected interperitoneally into the animals of both groups 20 minutes before sacrifice. After the experiments, paraffin sections of the specimens were examined histomorphometrically by means of a silver stain (which reacted with the argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs)-associated protein) and an autoradiographic technique. These results suggested that bFGF enhanced the cell proliferative activity and collagen synthetic activity of periodontal ligament predominantly on the tension side. Consequently, bFGF seems to be valuable for retention following tooth movement.

**Key Words :** basic fibroblast growth factor (bFGF), autoradiography, argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs), tooth movement, periodontal ligament

### 緒 言

矯正治療による歯の移動によって、歯根膜には圧迫帯と牽引帯が形成され、それに伴って歯根膜線維は圧偏あるいは伸張される。このように変化した歯根膜線維に残留する張力の作用が、臨床問題となる後戻りを引き起こす原因のひとつとされる。したがって、矯正臨床では

動的処置後、ただちに自然的保定に入る場合は少なく、ほとんどの症例で後戻りを防ぐために、長期間の器械的保定を必要とする。このことから効率的な歯の移動を行うことと、動的処置後の速やかな安定が得られることは、治療期間の短縮にかかわる重要な課題とされてきた。

矯正力に反応した歯周組織の改造の過程では、サイトカインなどの局所的生理活性物質が

Effect of basic fibroblast growth factor on rat periodontal ligaments following experimental tooth movement.

Toshiya SANJO

(Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 22 : 26 - 35, 1997

Table 1. Time schedule of experiment.

Period	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	days
3-day group				↓	×											
7-day group					↓			↓	×							
14-day group					↓			↓				↓			↓	×

↓, <sup>3</sup>H-proline injection ; ▼, bFGF or saline injection ; ×, sacrifice ;  
 --, period of tooth movement.

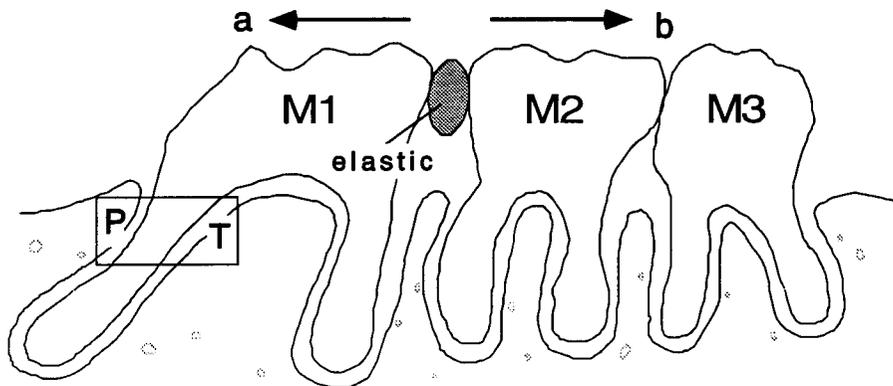


Fig.1. Diagram of mesiodistally sectioned maxillary molars. The periodontal ligaments were examined at the point of P and T. Arrows indicate the direction of the force loaded. a, mesial direction ; b, distal direction ; P, pressure side ; T, tension side ; M1, 1st molar ; M2, 2nd molar ; M3, 3rd molar.

細胞の増殖・分化や基質形成の調節などに関与している<sup>1)</sup>。サイトカインの中でも塩基性線維芽細胞成長因子 basic fibroblast growth factor (bFGF) は、1974年にウシ脳抽出液中に線維芽細胞の増殖を強く刺激する因子として、Gospodarowiczら<sup>2)</sup>により見出された蛋白質である。その後の研究により bFGF は線維芽細胞の他に血管内皮細胞の増殖・新生<sup>3,4)</sup>、軟骨細胞の増殖<sup>5)</sup>、さらに創傷治癒の促進<sup>6)</sup>など中胚葉由来の細胞で、細胞増殖活性を有することが知られている。また、bFGF は骨芽細胞の増殖促進<sup>7)</sup>や骨折の治癒促進<sup>8)</sup>など骨形成にも

関与していることが明らかとなってきた。歯科領域では、ラット上顎骨側方拡大後の正中口蓋縫合の修復<sup>9)</sup>、イヌ再植歯の歯周組織の修復<sup>10)</sup>、イヌ根分岐部病変の歯周組織の再生<sup>11)</sup>、そして家兎口腔粘膜潰瘍の治癒<sup>12)</sup>などに対し、bFGF は促進的に作用するとの報告がみられる。しかし、歯科矯正学分野での報告はほとんどみられない。そこで、実験的歯の移動を行うとともに bFGF を局所投与し、動的処置後の歯の安定と密接な関係にある歯根膜細胞に及ぼす bFGF の影響を細胞増殖活性および代謝活性の観点から検討した。

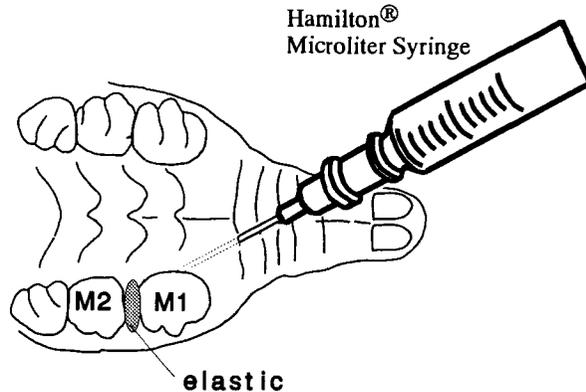


Fig.2. Diagram of the method of local administration.  
M1, maxillary 1st molar ; M2, maxillary 2nd molar.

## 材料と方法

### 1. 実験動物

実験動物としては、生後7週齢から10週齢、体重200gから300gのWistar系雄性ラットを用いた。ラット（日本クレア）は岩手医科大学歯学部動物舎（室温：23±2℃，湿度：55±5%）にて飼育し、飼育用の固形飼料（オリエンタル酵母工業）と水を自由に摂取させた。

### 2. 歯の移動方法および移動期間

ラットの歯の移動はWaldo法<sup>13)</sup>に準じてエーテル麻酔下で、上顎第一臼歯（M1）と上顎第二臼歯（M2）の歯間部に矯正用ゴム（¼ light elastic, Unitek）を装着した。歯の移動期間は3日、7日、14日間に設定した（Table 1, Fig.1）。

### 3. bFGFの投与

ラットを実験群と対照群に分け、歯の移動期間ごとに5匹ずつ用いた。実験群には歯の移動開始から0、4、7、11日目にbFGF溶液（科研製薬）を10µg/50µl投与した。対照群には同量の注射用生理食塩水（大塚製薬）を投与した（Table 1）。

局所投与の方法はマイクロシリンジ（Hamilton Company Reno）を用い、M1の口蓋側口蓋粘膜より注射針を刺入し、歯根分岐部付近まで挿入、針の先端が歯槽骨に接したとこ

ろで薬液を注入した（Fig.2）。

### 4. 標本の作製

実験終了後、エーテル吸入麻酔下で屠殺し、4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行い、上顎臼歯部を含む上顎骨を摘出し、さらに同固定液にて10日間の浸漬固定を行った。固定終了後、10% 蟻酸・クエン酸ナトリウム脱灰液にて3週間脱灰し、通法に従って上昇アルコール系列で脱水、パラフィン包埋を行った。そして実験部位を中心に近遠心的連続切片（4µm）を作製した。

### 5. 観察方法

#### (1) 組織学的観察

作製した切片にヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色を施し、光学顕微鏡による組織学的観察を行った。観察部位は、上顎M1近心根中央より上方の近心側歯根膜領域を圧迫側の観察領域とし、近心根遠心側歯根膜領域を牽引側の観察領域とした（Fig.1）。

#### (2) Argyrophilic nucleolar organizer regions associated protein (AgNORs) 染色法

切片を脱パラフィン後、HowellとBlack<sup>14)</sup>の原法を一部改変した武井ら<sup>15)</sup>の方法に従い、暗室中で2%ゼラチン・1%蟻酸水溶液と50%硝酸銀水溶液を1:2の割合で混合した溶液の中で25分間反応させた。次に蒸留水で1分間水洗し、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液に5秒間

浸漬して定着させた。その後、蒸留水で15分間水洗し、通法によりアルコール系列で脱水、封入した。

AgNORs 数の算出には、各試料の連続切片より 24 μm 間隔で 3 枚の切片を選び、対物 100 倍の油浸レンズを用いて観察し、各群ともに歯根膜細胞 1,200 個について AgNORs 数を数え、細胞核 1 個あたりの平均 AgNORs 数を算出した。

(3) オートラジオグラフィ

<sup>3</sup>H-proline (specific activity : 55Ci/m mol. Moravek Biochemicals, Inc.) をラット 1 匹あたり 74 kBq/g 体重を屠殺の 20 分前に腹腔内に注射した。エーテル麻酔下にて屠殺し、前述した標本の作製の通り固定、脱灰、脱水を経てパラフィン包埋を行い連続切片を作製した。

脱パラフィンした切片を乾燥後、dipping 法<sup>6)</sup>にてオートラジオグラフ用乳剤 NR-M2 (コニカ) に浸漬し、4℃で2週間露出させた。次に 20℃ に調整した現像液 (D-19) で5分間現像し、スーパーフジフィックス (フジ写真フィルム) で5分間定着後、水洗し H・E 染色を施し、通法によりアルコール系列で脱水、封入した。

銀粒子数の算出には、連続切片より 24 μm 間隔で 3 枚の切片を選び、対物 100 倍の油浸レンズと接眼方眼ミクロメーターを用いて観察し、単位面積 (40 × 70 = 2800 μm<sup>2</sup>) あたりの銀粒子数を算出した。バックグラウンドの補正は、細胞が含まれていない象牙質の単位面積当りの銀粒子数を数え、その数を減じて行った。

(4) 統計処理

算出した結果について正規性を確認した上で、F 検定により各群の平均値間の有意差を検討し、両側 5% の危険率で有意差を検定した。

結 果

1. 組織学的所見

(1) 対照群

移動 3 日目の牽引側では、歯根膜線維は牽引方向に伸張し、線維芽細胞は細長い紡錘形をな

していた。移動 7 日目では 3 日目に比べて歯根膜線維の伸張は強まり、線維は牽引方向にほぼ平行に走行していた。線維芽細胞は緊張し長径を増して、より細長い紡錘形を示していた。移動 14 日目では 7 日目に比べて歯根膜線維の伸張は弱まり、線維には牽引方向と異なった斜めの走行も混じるようになった。

移動 3 日目の圧迫側では、歯根膜線維は加圧され波状を呈し走行の乱れを生じていた。線維芽細胞は細長い紡錘形を示していた。移動 7 日目では 3 日目に比べて加圧による歯根膜線維の走行の乱れや集束は強まっていた。さらに多くの線維芽細胞が長径を減じ、不定な形を示していた。移動 14 日目では 7 日目に比べて歯根膜線維の走行の乱れは回復し、線維の再配列を思わせる組織像であった。

(2) 実験群 (bFGF 投与群)

対照群との比較では、移動 3, 7, 14 日目の H・E 染色所見からは牽引側、圧迫側ともに特記すべき相違が認められず、実験群の組織像は各移動期間で対照群とほぼ同様に観察された。

以上の組織学的所見は、歯の移動に伴う歯根膜の変化を観察した過去の報告と同様であったので figure は省いた。

2. AgNORs 染色所見

AgNORs は歯根膜細胞の核内に点状、茶褐色に染色された。各移動期間ごとに牽引側と圧迫側に分けて、対照群と実験群の AgNORs 数を算出した。

(1) 牽引側の AgNORs 数

移動 3 日目の AgNORs 数は対照群で 2.49 ± 0.11, 実験群では 3.01 ± 0.14, 移動 7 日目の AgNORs 数は対照群で 2.53 ± 0.07, 実験群では 2.61 ± 0.10, 移動 14 日目の AgNORs 数は対照群で 2.45 ± 0.07, 実験群では 2.79 ± 0.12 であり、いずれの移動期間でも牽引側では実験群の方が対照群より多く、その差は移動 3 日目 が顕著で、対照群との間に有意差が認められた (Table 2)。

経日的には、対照群の AgNORs 数は移動 3 日目から移動 14 日目にかけて横ばいに推移す

**Table 2.** Effect of bFGF on cell proliferative activity.

Area examined	Treatment	Number of AgNORs / cell			
		Period of tooth movement (Days)			
		3	7	14	
Tension side	control	2.49 ± 0.11	} * }	2.53 ± 0.07	2.45 ± 0.07
Tension side	bFGF	3.01 ± 0.14		2.61 ± 0.10	2.79 ± 0.12
Pressure side	control	1.97 ± 0.09		1.92 ± 0.08	1.91 ± 0.10
Pressure side	bFGF	2.21 ± 0.10		1.92 ± 0.08	2.02 ± 0.11

Mean numbers of AgNORs per periodontal cell (mean ± SD). The statistical significance between the groups was determined by applying F-test (\*p < 0.05). AgNORs, Argyrophilic nucleolar organizer regions.

る傾向がみられた。一方、実験群の AgNORs 数は移動 3 日目が最も多く移動 7 日目にはいったん減少した後、移動 14 日目にかけて増加傾向がみられた。

#### (2) 圧迫側の AgNORs 数

移動 3 日目の AgNORs 数は対照群で 1.97 ± 0.09, 実験群では 2.21 ± 0.10 であり、実験群の方が対照群より多いが、移動 7 日目、移動 14 日目では実験群と対照群との間に大きな差異は認められなかった (Table 2)。

経日的には、対照群の AgNORs 数の変化は各移動群で少なく横ばいに推移する傾向がみられた。一方、実験群の AgNORs 数は、移動 3 日目の 2.21 ± 0.10 から移動 7 日目には 1.92 ± 0.08 へと減少し、移動 14 日目では 2.02 ± 0.11 へと増加した。このように圧迫側では、実験群の AgNORs 数は移動 3 日目で最も多く移動 7 日目にいったん減少した後、移動 14 日目にかけて増加傾向がみられたが、大きな差異は認められなかった。

全体として実験群、対照群ともに AgNORs 数は圧迫側に比べて牽引側で多く、牽引側、圧迫側ともに対照群に比較して実験群では多い傾向が認められた。経日的に実験群の AgNORs 数は、移動 3 日目の牽引側と圧迫側で多く、移

動 7 日目には減少するが移動 14 日目には AgNORs 数が増加する傾向がみられた。

### 3. <sup>3</sup>H-proline の取り込みに関する所見

#### (1) 牽引側の <sup>3</sup>H-proline の取り込み

移動 3 日目の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは、対照群で 167.17 ± 22.95, 実験群では 183.42 ± 40.17 であり実験群の方が多いが有意差は認められなかった (p < 0.05)。移動 7 日目の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは、対照群で 285.25 ± 26.53, 実験群では 359.67 ± 40.42 であり、移動 14 日目の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは対照群で 268.50 ± 9.61, 実験群では 299.75 ± 32.49 であり、移動 7 日、14 日目ともに実験群の方が対照群より有意に多く (p < 0.05), その差は移動 7 日目で顕著だった (Table 3)。

経日的には、対照群の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは、移動 3 日目の 167.17 ± 22.95 から移動 7 日目の 285.25 ± 26.53 へと有意に増加した (p < 0.05)。さらに移動 7 日目と有意差はみられなかったが、移動 14 日目の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは 268.50 ± 9.61 へと平行状態がみられた。コラーゲン合成能は移動 3 日目が最も少なく、移動 7 日、14 日目にかけて増加傾向が認められた。一方、実験群の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは、移動 3 日目の 183.42 ± 40.17 から移動 7 日目の

Table 3. Effect of bFGF on collagen synthetic activity.

Area examined	Treatment	Number of grains / 2800 $\mu\text{m}^2$		
		Period of tooth movement (Days)		
		3	7	14
Tension side	control	167.17 ± 22.95	285.25 ± 26.53	268.50 ± 9.61
Tension side	bFGF	183.42 ± 40.17	359.67 ± 40.42	299.75 ± 32.49
Pressure side	control	211.3 ± 43.91	251.08 ± 29.13	201.42 ± 17.93
Pressure side	bFGF	198.92 ± 44.27	315.50 ± 41.11	196.83 ± 16.24

Mean numbers of <sup>3</sup>H-proline autoradiographic grains (mean ± SD) per unit area.  
 The statistical significance between the groups was determined by applying F-test (\*p < 0.05).

359.67 ± 40.42 へと有意に増加し (p < 0.05), 移動 14 日目には 299.75 ± 32.49 へと有意に減少した (p < 0.05)。コラーゲン合成能は移動 3 日目が最少で移動 7 日目にかけて著明に増加し最多となった後, 移動 14 日目にかけて減少し, 対照群と同様の傾向が示された。各実験群ともに対照群と比較して, コラーゲン合成能の増加がみられた。

(2) 圧迫側の <sup>3</sup>H-proline の取り込み

移動 3 日目の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは, 対照群で 211.33 ± 43.91, 実験群では 198.92 ± 44.27 であり有意差はみられなかった。移動 7 日目の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは, 対照群で 251.08 ± 29.13, 実験群では 315.50 ± 41.11 であり実験群の方が対照群より有意に多く (p < 0.05), 移動 14 日目の <sup>3</sup>H-proline 取り込みは, 対照群で 201.42 ± 17.93, 実験群では 196.83 ± 16.24 であり対照群の方が多いが有意差は認められなかった。このように移動 3 日, 14 日目では, <sup>3</sup>H-proline の取り込みは対照群と実験群の間で有意差はみられなかったが, 移動 7 日目では有意差が認められた (Table 3)。

経日的には, 対照群の <sup>3</sup>H-proline 取り込み

は移動 3 日目の 211.33 ± 43.91 から移動 7 日目の 251.08 ± 29.13 へと有意に増加し (p < 0.05), 移動 14 日目には 201.42 ± 17.93 へと有意に減少した (p < 0.05)。一方, 実験群の <sup>3</sup>H-proline の取り込みは移動 3 日目の 198.92 ± 44.27 から移動 7 日目の 315.50 ± 41.11 へと有意に増加し (p < 0.05), 移動 14 日目には 196.83 ± 16.24 へと有意に減少した (p < 0.05)。このように対照群, 実験群ともにコラーゲン合成能は, 移動 7 日目にかけて増加し, その傾向は実験群で著明であり, 移動 14 日目にかけてコラーゲン合成能は対照群, 実験群ともに移動 3 日目のレベルに減少した。

考 察

線維芽細胞成長因子 (FGF) には, FGF ファミリーとよばれるアミノ酸配列の似た分子が 9 種類あり, 細胞から分泌するのに必要なシグナル配列の有無が確認されている<sup>17)</sup>。しかし bFGF はシグナル配列をもたず<sup>18,19)</sup>, いまだに bFGF の分泌機構は不明であるが, 細胞が傷害されたときに bFGF が放出されて組織修復の役目を果たすといわれている。特に創傷治癒過

程では、内因性の bFGF の積極的な関与が示唆されている<sup>20,21)</sup>。bFGF の生物活性は多様であり標的とする細胞は多いが、骨形成<sup>22,23)</sup>や骨折治癒<sup>24)</sup>の促進にも関与する。

本研究では、歯根膜細胞の増殖活性に対する bFGF 局所投与の影響を AgNORs 染色法によって検討した。核小体は蛋白合成の場であるリボゾームの合成に関与しており、リボゾームは 4 種類の ribosomal RNA (rRNA) からなるが、そのうち 3 種の rRNA は核小体内に存在する ribosomal DNA (rDNA) から RNA ポリメラーゼ I により転写される。この rDNA のループを形成している構造は、核小体形成領域 (nucleolar organizer regions, NORs) とよばれて、その数、大きさが細胞の代謝、増殖、分化などと深く関係している<sup>24)</sup>。

近年、Howell と Black<sup>14)</sup> によって銀コロイド染色法が報告されて以来、核小体関連蛋白 (AgNORs) を簡便に染色することが可能となり、この AgNORs 数が bromodeoxyuridine (BrdU) 標識率<sup>25)</sup>や DNA フローサイトメトリーによる S 期細胞数<sup>26)</sup>と、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性率<sup>27)</sup>とはよく相関することから細胞増殖能を示す一つの指標として用いられるようになってきた。著者はラットを用い人為的に歯の移動を行い、さらに bFGF を局所投与し AgNORs 数を指標に歯根膜における bFGF の影響について検討した結果、牽引側では実験群の方が対照群よりも AgNORs 数が多く、特に実験群の移動 3 日目でその差が著明であり、対照群との間には有意差が認められた。経日的には実験群、対照群ともに AgNORs 数に大きな変化はみられなかった。牽引側と圧迫側の AgNORs 数を比較すると、実験群、対照群ともに牽引側の方が圧迫側より多く、この結果は<sup>3</sup>H-thymidine を用いて細胞増殖活性を検討した須賀<sup>28)</sup>の報告や圧迫側歯根膜では<sup>3</sup>H-thymidine 取り込みが少ないことを認めた Baumrind と Buck<sup>30)</sup>、出口<sup>31)</sup>の報告を反映しているものと考えられる。また、牽引側、圧迫側ともに対照群との比較では実験群

の AgNORs 数の増加傾向が認められた。このことは下田<sup>10)</sup>のイヌ再殖歯に bFGF を局所投与した実験において、再殖 3 日目の歯根膜修復過程では PCNA 陽性細胞数の有意な増加が認められ歯根膜線維の再生が早くなること、また、内田ら<sup>29)</sup>のラット皮弁に bFGF を局所投与した実験では、DNA 合成期細胞の有意な増加が認められたという報告から、本実験でも bFGF の作用により歯根膜細胞の増殖活性が促進されたものと考えられる。

歯根膜細胞の代謝活性に対する bFGF 局所投与の影響については、他の多くの研究でコラーゲン合成能の指標とされている<sup>3</sup>H-proline をトレーサーとするオートラジオグラフィによって検討した。

その結果、牽引側では移動 7 日、14 日目の<sup>3</sup>H-proline 取り込みは対照群と比べて実験群の方が有意に多く ( $p < 0.05$ )、その差は移動 7 日目が著明だった。また、経日的に<sup>3</sup>H-proline 取り込みは牽引側の対照群で移動 3 日目から 7 日目にかけて有意に増加するが ( $p < 0.05$ )、その後は横ばいないしは減少傾向を示した。このような変化は牽引側歯根中央部における歯の移動初期の<sup>3</sup>H-proline 取り込みの急増と、その後の緩やかな増加を観察した松浦<sup>32)</sup>や島田<sup>33)</sup>、Boisson ら<sup>34)</sup>の報告と一致するものである。

Waldo<sup>13)</sup>の方法による歯の移動はゴムの力に依存しており、その作用は移動 5 日目位で減衰するので移動 5 日目以降は保定期間として考えられている<sup>35,36)</sup>。したがって本実験の移動 3 日目は移動期間で、移動 7 日、14 日目は保定期間とみなされる。鬼木<sup>9)</sup>は bFGF の局所投与によりラット上顎骨側方拡大後の正中口蓋縫合の保定期間における修復促進効果を認め、市村<sup>37)</sup>は bFGF, transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の局所投与により剝離した歯肉創傷部および再生上皮下に強い fibronectin 反応を免疫組織化学的に観察し、その作用は bFGF に比べ TGF- $\beta$  の方が強いと報告している。また、Kawaguchi ら<sup>8)</sup>、Nakamura ら<sup>20)</sup>は bFGF 投与により骨形成が促進されるとともに TGF- $\beta$

が増加することを認め、さらに Varga ら<sup>30)</sup>は TGF- $\beta$  が線維芽細胞のコラーゲン合成、fibronectin 合成を促進させることを報告している。これらの報告は、TGF- $\beta$  が基質形成の調節に大きな役割を果していることを示すものであり、このように bFGF の作用は少なくとも一部においては TGF- $\beta$  によって仲介されることが示唆される。したがって、本研究で示した牽引側における実験群の <sup>3</sup>H-proline 取り込みの増加と、特に圧迫側の移動 7 日目における実験群の <sup>3</sup>H-proline 取り込みの増加は、bFGF および TGF- $\beta$  の相互作用によってもたらされた可能性が考えられる。

実験群における移動 7 日目では、牽引側と圧迫側の AgNORs 数が減少するのに対し、<sup>3</sup>H-proline 取り込みの著明な増加が認められた。好田<sup>30)</sup>はラット矢状縫合部を拡大後に保定し、その結果を生化学的に分析したところ保定後の総蛋白量と DNA 量は経日的に減少するが、ヒドロキシプロリン量は経日的に増加することを報告している。今回、応用した Waldo 法の応力の及ぶ期間は 5 日間位が限度であり<sup>25,36)</sup>、本実験の移動 7 日目は保定期に相当すると考えられるので、実験群の移動 7 日目の AgNORs 数の減少と <sup>3</sup>H-proline 取り込みの増加は好田<sup>30)</sup>の報告と一致するものであり、コラーゲン合成能の増加は bFGF によりさらに促進されて圧迫側にも影響を与えたものと考えられる。AgNORs 数が示す細胞増殖活性は、コラーゲン性蛋白質の合成能を反映するというよりも、総蛋白質の合成能を反映しているのかもしれない。しかし、本実験では総蛋白質について検索していないので現在のところは不明である。

矯正治療の期間には個人差があり、患者の年齢、不正咬合の種類や原因、治療処置の内容などで異なる。なかでも動的処置における効率的な歯の移動と、その後の保定における速やかな安定は治療期間の短縮にもかかわる重要な課題とされてきた。本研究では bFGF を局所投与した結果、歯の移動に伴って応答する歯根膜細胞の増殖活性と代謝活性の増加が主に牽引側で促

進されることが示された。この影響は <sup>3</sup>H-proline 取り込みによく表れ、保定期と考えられる移動 7 日目以降の牽引側で明瞭だった。今回の研究結果は、bFGF の局所投与を器械的保定の補助的手段として応用した場合、保定期間が短縮される可能性を示唆するものと考えられる。

## 結 論

bFGF の局所投与が歯の移動に伴う歯根膜細胞の増殖活性および代謝活性に与える影響を検討した結果、以下の結論が得られた。

1. bFGF の投与により牽引側の AgNORs 数が増加し、細胞増殖活性の増加が認められた。
2. bFGF の投与により牽引側の移動 7 日、14 日目において <sup>3</sup>H-proline の取り込みが有意に多くなり、このことは圧迫側の移動 7 日目でも認められた。

したがって、bFGF の投与により歯根膜細胞の増殖活性および代謝活性の増加が主に牽引側で促進されることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なご指導、ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座石川富士郎教授、ならびに本学口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授に深甚なる謝意を捧げます。また、統計解析に関し有益なご教示を頂きました本学教養部数学科一戸孝七教授に衷心より謝意を捧げます。本研究にご協力を頂きました歯科矯正学講座の諸先生方に深謝致します。bFGF の供与をご快諾頂きました科研製薬株式会社石田春朗様ならびにプロジェクトチームの皆様に深謝致します。

本論文の要旨は、岩手医科大学歯学会第 22 回総会（平成 8 年 11 月 30 日）において発表された。

## 文 献

- 1) 河田照茂：骨芽細胞、破骨細胞および骨細胞にお

- ける相互作用, 日矯歯誌, 53 : 367-375, 1994.
- 2) Gospodarowicz, D. : Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249 : 123-127, 1974.
  - 3) Folkman, J., and Klagsbrun, M. : Angiogenic Factors. *Science* 235 : 442-447, 1987.
  - 4) Montesano, R., Vassalli, J. D., Baird, A., Guillemin, R., and Orci, L. : Fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83 : 7297-7301, 1986.
  - 5) 鈴木不二男 : 軟骨から骨への変換における成長分化因子, 蛋白質核酸酵素, 40 : 506-519, 1995.
  - 6) Sprugel, K. H., McPherson, J. M., Clowes, A. W., and Ross, R. : Effects of growth factors *in vivo*. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am. J. Pathol.* 129 : 601-613, 1987.
  - 7) Canalis, E., Centrella, M., and McCarthy, T. : Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*. *J. clin. Invest.* 81 : 1572-1577, 1988.
  - 8) Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Hanada, K., Hiyama, Y., Tamura, M., Ogata, E., and Matsumoto, T. : Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozocine-diabetic rats. *Endocrinology* 135 : 774-781, 1994.
  - 9) 鬼木泰久 : 上顎側方拡大後の正中口蓋縫合の修復過程における Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) の効果, 福岡歯大誌, 22 : 269-288, 1995.
  - 10) 下田哲也 : 再植歯の整備・固定後の修復過程および歯の移動に対する b-FGF の影響に関する病理組織学的研究, 福岡歯大誌, 23 : 407-425, 1996.
  - 11) 三木靖夫, 島袋善夫, 北村正博, 高山真一, 小郷秀司, 柳光漢, 山崎彰久, 寺島昭夫, 浅野泰司, 岡田宏 : 分岐部病変に対する塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の局所応用, 日歯保誌, 39 : 89, 1996.
  - 12) 藤澤健司, 鴨田保彦, 林英司, 力丸浩一, 永山勝 : 細胞成長因子を用いた難治性口腔粘膜疾患治療法の開発に関する研究 - 第 2 報口腔粘膜疾患モデル (顎下腺摘出家兎) における hEGF, bFGF の影響 -, 日口外誌, 39 : 1468, 1993.
  - 13) Waldo, C. M., and Rothblatt, J. M. : Histologic response to tooth movement in the laboratory rat. *J. Dent. Res.* 33 : 481-486, 1954.
  - 14) Howell, W. M., and Black, D. A. : Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer : a 1-step method. *Experientia* 36 : 1014-1015, 1980.
  - 15) 武井則之, 安東基善, 長谷川博雅, 川上敏行, 枝重夫 : 核小体形成体のための鍍銀染色法の検討, 松本歯学, 20 : 172-179, 1994.
  - 16) 永田哲士 : ラジオオートグラフ多量作製簡便法, 細胞, 14 : 40-45, 1982.
  - 17) 西川克三, 吉竹佳乃 : FGF ファミリー, 黒木登志夫 編集 : 細胞増殖因子, 第 1 版, メディカルビュー社, 東京, 44-55, 1995.
  - 18) Abraham, J. A., Mergia, A., Whang, J. L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K. A., Gospodarowicz, D., and Fiddes, J. C. : Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233 : 545-548, 1986.
  - 19) Abraham, J. A., Whang, J. L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D., and Fiddes, J. C. : Human basic fibroblast growth factor : nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.* 5 : 2523-2528, 1986.
  - 20) 石倉直敬, 荒井正雄, 吉竹佳乃 : ヒト肉芽組織および癒痕組織中の線維芽細胞増殖因子様の増殖因子について, 日形会誌, 8 : 657-665, 1988.
  - 21) 富永和也 : 抜歯創治癒過程における basic fibroblast growth factor, 歯基礎誌, 37 : 19-27, 1995.
  - 22) Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibayoshi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S., and Matsumoto, T. : Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* 136 : 1276-1284, 1995.
  - 23) Cuevas, P., Burgos, J., and Baird, A. : Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156 : 611-618, 1988.
  - 24) 笹野公伸, 宮崎修吉, 伊達文子, 佐藤郁郎 : Ag-NORs-病理組織診断への応用, 病理と臨床, 9 : 890-893, 1991.
  - 25) 佐々木功典, 村上和之, 小野貞英, 菅井有 : フローサイトメトリーによる DNA ヒストグラムと免疫染色による増殖細胞抗原陽性率との比較 - その臨床的意義, 病理と臨床, 9 : 894-901, 1991.
  - 26) Crocker, J., Macartney, J. C., and Smith, P. J. : Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J. Pathol.* 154 : 151-156, 1988.
  - 27) 村井正彦 : 口腔異形成病変における Ag-NORs 染色, PCNA 染色, MIB-1 免疫組織化学染色を用いた細胞増殖能の研究, 日大口腔科学, 20 : 169-182, 1994.
  - 28) 須賀功二郎 : 歯の移動時における歯根膜細胞数と細胞増殖活性の経時的変化, 鶴見歯学, 22 : 143-160, 1996.
  - 29) 内田彰子, 添田周吾, 中山凱夫 : 線維芽細胞増殖因子がラット皮弁に及ぼす影響, 形成外科, 34 : 771-778, 1991.
  - 30) Baumrind, S., and Buck, D. L. : Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement. *Am. J. Orthod.* 57 : 109-131, 1970.
  - 31) 出口敏夫 : 歯の移動により誘発される細胞増殖について Tritiated thymidine の取り込み, 日矯歯誌, 29 : 168-172, 1970.
  - 32) 松浦久 : 歯の移動に伴う歯周組織の代謝活性の

- 経時的变化, 鶴見歯学, 11 : 171-194, 1985.
- 33) 島田達雄 : 歯の移動に伴う歯根膜細胞の応答性, 鶴見歯学, 17 : 169-185, 1991.
- 34) Boisson, M., and Gianelly, A. A. : Collagen synthesis in rat gingiva during tooth movement. *Am. J. Orthod.* 80 : 289-299, 1981.
- 35) Azuma, M. : Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 17 : 149-178, 1970.
- 36) 山口和憲, 小畑雅彦, 沢田義勝, 河田照茂 : 歯牙移動により張力の加わった歯根膜, 歯肉の組織学および組織学化学的变化について, 日矯歯誌, 44 : 88-102, 1985.
- 37) 市村光 : ラット歯周組織の創傷治癒過程における fibronectin と laminin の局在性の変化 - 特に bFGF, PDGF, および TGF- $\beta$  局所投与による影響 -, 日歯周誌, 33 : 280-296, 1991.
- 38) Varga, J., Rosenbloom, J., and Jimenez, S. A. : Transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem. J.* 247 : 597-604, 1987.
- 39) 好田春樹 : ラット矢状縫合のコラーゲンに及ぼす拡大力の影響, 日矯歯誌, 51 : 31-39, 1992.