

エストロゲン欠乏ラットにおける象牙芽細胞の機能の解析

井出 祐樹

明海大学大学院歯学研究科

歯学専攻

(指導：横瀬 敏志 教授)

Study of Odontoblasts Function in Estrogen-Deficient Rats

Yuki IDE

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor : Prof. Satoshi YOKOSE)

## 抄録

目的：エストロゲンは骨組織のリモデリングに大きな影響を与えるホルモンとして、古くから知られている。その受容体は骨芽細胞や破骨細胞において確認されているが、近年では象牙芽細胞においてもその存在が確認されている。しかし、象牙芽細胞のエストロゲン受容体の機能については不明な点が多く、明確にされているとは言い難い。そこで今回、ラットエストロゲン欠乏モデルを作製し、エストロゲンが象牙芽細胞の機能に及ぼす影響を組織化学的に検討した。

材料と方法：実験は 10 週齢の雌 SD ラット 96 匹を用いた。卵巢を摘出したものを OVX (Ovariectomized rats)群、開腹のみ行ったものを Sham 群、OVX 手術の翌日から、エストラジオール( $E_2$ )を投与したものを OVX+ $E_2$  群とした。全群とも 4 週間飼育し日毎の体重変化の測定を行った。その後、修復象牙質形成を誘導するため、下顎両側第一臼歯に直径 1.0 mm の窩洞形成を行い、光重合型コンポジットレジンで充填した。術後 3, 7, 14 日間飼育した後、歯牙を摘出し試料とした。同時に血液および大腿骨を採取し、血中  $E_2$  濃度測定と二重エネルギー X 線吸収法 (DEXA) にて骨密度測定を行った。各試料は H-E (Hematoxylin-Eosin)染色を行い、14 日の群では、Alcian blue 染色および ER (Estrogen Receptor)  $\alpha$ ,  $\beta$  に対する免疫組織化学染色も行った。一方、第二象牙質の形成量を比較するため、窩洞形成を行っていない各群に対し、3 日間隔で

Calcein の投与を行い，蛍光顕微鏡にて観察した．

結果：OVX 群は，Sham 群，OVX+E<sub>2</sub> 群と比較して，体重の増加と血中 E<sub>2</sub> 濃度の低下を示した．また，DEXA および H-E 染色の結果から，骨密度および骨梁の減少が認められ，骨粗鬆症の病態を呈していることが示された．免疫組織化学染色の結果から，ER $\alpha$ ， $\beta$  が象牙芽細胞に局在することが示された．窩洞形成後にみられる修復象牙質の形成量は，Sham 群と比較して OVX 群が最も低くなり，E<sub>2</sub> の投与により，その形成量の減少が抑制された．第二象牙質の形成量においても同様の傾向が認められた．

結論：OVX 群は骨粗鬆症の症状を呈し，修復象牙質および第二象牙質の形成量が抑制されることが示された．OVX+E<sub>2</sub> 群では，そのような病態を示さず，各象牙質形成量の減少が抑制された．以上の結果から，エストロゲンが象牙芽細胞の機能に関与することが示唆された．

キーワード：エストロゲン欠乏ラット，骨粗鬆症，象牙芽細胞，象牙質形成

## 緒言

我が国においては、人口の急速な高齢化に伴い、人口の 20%以上が 65 歳以上の高齢者であるという。そこで、高齢になっても日常動作を維持して自立した生活を送ることが、個人にとっても社会にとっても極めて重要である。骨粗鬆症は、自立した健康的生活を抑制する大きな原因とされているが、患者数は年々増加しており、1990 年代では、その患者数が 400～500 万人と報告されていたのに対し、現在では 1,300 万人を超えると推定されている<sup>1)</sup>。主症状は、脊椎、上腕骨頸部、大腿骨近位部(頸部)など海綿骨の多い長管骨の骨折、骨痛であるが、口腔内でも下顎骨の骨梁減少や下顎皮質骨の吸収、骨粗鬆症性歯周炎などが挙げられている<sup>2)</sup>。骨粗鬆症は、閉経に伴うエストロゲンの低下に起因する閉経後骨粗鬆症を含む原発性骨粗鬆症と骨代謝に影響を与える疾患や薬剤の使用で併発する続発性骨粗鬆症が存在し、特に原発性骨粗鬆症に包含される閉経後骨粗鬆症が広く知られている。

エストロゲンは主として卵巣の顆粒細胞でコレステロールから合成される C-18 ステロイドである<sup>3)</sup>。エストロゲンの中で最も強い活性を有するのは 17  $\beta$ -エストラジオール(以下、 $E_2$ )であり、閉経前女性における主たるエストロゲンである<sup>4)</sup>。エストロゲンは骨代謝に大きな影響を与えるホルモンとして、古くからよく知られている<sup>5)</sup>。閉経や卵巣摘出手術などに伴い、エストロゲンの欠乏が開始すると、加速度的な骨吸収と骨形成とが同時に進行する高骨代謝回

転が生じ、その結果として骨量減少が認められる<sup>5-8)</sup>と報告されている。一方で、閉経後骨粗鬆症患者にエストロゲンを投与すると、骨代謝回転が正常化し、骨吸収が低下するとともに骨密度の減少を抑制し、骨粗鬆症に起因する骨折を防止することが知られており、骨吸収亢進や骨密度低下に対し拮抗的に働くとされている<sup>3,9)</sup>。

エストロゲン受容体は、骨芽細胞<sup>10-13)</sup>や破骨細胞<sup>14)</sup>に存在することが確認されているが、近年では免疫組織化学染色により歯髓組織中の象牙芽細胞においても、その存在が確認されている<sup>15-17)</sup>。事実、Yokoseら<sup>18)</sup>は、エストロゲンの欠乏が、象牙芽細胞におけるプロテオグリカンの産生や、そのガラクトシル化やグリコシル化に関与することを報告している。さらに、象牙芽細胞の機能について、基質形成能や石灰化能は骨芽細胞と類似するものであり<sup>19,20)</sup>、骨細胞に発現するメカノセンサーとして知られている *sclerostin* の発現が象牙芽細胞にも認められている<sup>19)</sup>。他にも、エストロゲンやアンドロゲンなどの性ホルモンが象牙芽細胞に与えるいくつかの反応は、骨芽細胞と同様のものとなる可能性を有すると報告されている<sup>15,21-23)</sup>。これらの背景からも、エストロゲンが骨芽細胞や破骨細胞と同様に、象牙芽細胞に対しても何らかの生理的作用を及ぼすことが十分に考えられる。しかしながら、エストロゲンの欠乏状態を呈する閉経後骨粗鬆症患者における象牙質の切削や咬耗・摩耗などの歯の損傷が、その後の修復象牙質の形成や象牙芽細胞に与える影響に対し、健常者と比較検討された報告は見当たらない。歯科治療に際して、可能な限り歯髓の生活性を

維持し，歯髓の保存を図る Vital pulp therapy を推進していくためにもエストロゲンが象牙芽細胞に与える影響について解析を行うことは歯科保存領域の治療においても重要である．

そこで，本研究では，骨粗鬆症モデル<sup>6,24)</sup>として使用されている卵巣摘出ラットを作製し，エストロゲンの欠乏に伴う身体や骨代謝の変化とともに，その象牙質形成と象牙芽細胞の機能に及ぼす影響を組織レベルで明らかにすることを目的として，その検討を試みた．

## 材料および方法

### 1. 実験動物および飼育方法

実験動物として 10 週齢の雌 SD ラット (Sprague Dawley rat) 96 匹を (株) 日本クレアから購入して使用し, 明海大学動物倫理委員会の承認 (A1526) を得てガイドラインに従って実験を行った. 動物は恒温恒湿 (室温  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 10\%$ ) に保たれた飼育室にて飼育し, 普通食の市販固形飼料 (MF, オリエンタル酵母) および飲料水 (蒸留水) を自由に摂取させ, 照明条件は 8:00 点灯, 20:00 消灯とした.

### 2. 実験動物群の作製

10 週齢の雌 SD ラット 64 匹に, 卵巣摘出手術を行った. イソフルラン (エスカイン, ファイザー, USA) を吸引させて前麻酔し, 次に, ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル, 共立製薬) の腹腔内投与 ( $5.0 \times 10^{-2} \text{ mg/体重 g}$ ) による全身麻酔を施した. 麻酔発現後, 後背部腰椎周辺部を剃毛し 70% エタノールにて消毒を行った. 皮膚を一ヶ所切開し, 内部の両腎臓部周辺の筋肉を左右二ヶ所小さく切開し, それぞれ卵巣を脂肪ごと引き出した後, 子宮との接合部をモスキート鉗子で留め結紮後, 切断して取り出し, 子宮は内部に戻した. 筋層および皮膚の切開部は縫合を行い, 70% のエタノールで再度消毒を行った. 卵巣摘出手術を行った 64 匹のラットの内, 32 匹を OVX 群とし, 残りの 32 匹を OVX+E<sub>2</sub> 群とした.

OVX+E<sub>2</sub>群では、OVX手術翌日から毎日9時を定時として1日1回エストラジオール( $\beta$ -エストラジオール, 和光純薬) 20  $\mu$ g/kgの皮下投与を行った。

Sham (Sham-operated rats)群としては、ラット32匹を用い、上記同様皮膚を切開後、卵巣を摘出することなく縫合を行った。

全群ともに同様の環境下で4週間飼育し、毎日9時を定時として体重測定を行い、経時的な体重変化の検討を行った。

### 3. 窩洞形成

手術から4週間飼育後、各群のラットそれぞれ24匹にイソフルランおよびペントバルビタールにて上記同様麻酔を施した。修復象牙質の形成を誘導する目的で、下顎両側第一臼歯にステンレススチール製ラウンドバー( $\phi$  1.0 mm)を5倍速マイクロモーターハンドピース(S7 200MI, ヨシダ)に接続し、16,000 rpmの回転数で、バーの先端が埋まるまで注水下にて窩洞形成を行った。その後、拡大鏡および探針にて、窩底部に一層の健全象牙質が存在することを確認した。そして、1ステップボンディング材(G-BOND PLUS, GC)を用いて、指示通りに歯面処理を行い、光重合型コンポジットレジン(UNIFIL FLOW, GC)にて窩洞を充填した。

### 4. 血中 E<sub>2</sub> 濃度測定, 骨密度測定および H-E 染色

窩洞形成後14日目のOVX群, Sham群, OVX+E<sub>2</sub>群のラット屠殺時に、腹大静脈より10 mLの採血を行い、遠心分離後、血清のみをピペットにて抽出しセラムチューブ内で冷蔵保管した。その後、化学発光免疫測定



(Chemiluminescent Immunoassay : CLIA) 法を用い、抗 E<sub>2</sub> マウスモノクローナル抗体固相化磁性粒子と検体中の E<sub>2</sub> とを反応させ、アクリジニウム標識 E<sub>2</sub> にて標識後、発光を行い、その発光強度を測定することで、血中 E<sub>2</sub> 濃度の測定を行った。なお、本研究で用いた雌 SD ラットの性周期は 4~5 日と推察されるが<sup>25)</sup>、本研究では Sham 群の採血を行うに際し、特別な条件付けは行わず、実験当初の手術から屠殺までの時系列に準じて、採血および屠殺を行った。それとは別に、大腿骨の摘出も行い、デジタル X 線画像処理装置(コンピュレイ、ヨシダ)を用い、管電流が 2 mA、管電圧が 60 kV の条件で撮影を行った。それと併行して、骨塩量測定装置(DCS-600EX-1 型、アロカ)を用い、DEXA 法にて、管電流が 0.8 mA、管電圧が 35/65 kV の条件で骨密度の測定を行った。また、一部の大腿骨は通法に従いパラフィン包埋後、長軸方向に厚さ 4 μm の連続切片を作製し、通法に従い H-E 染色を行い<sup>26)</sup>、光学顕微鏡にて組織学的に観察を行った。

## 5. 組織学的観察

### 1) H-E 染色および Alcian blue 染色

窩洞形成後、3、7、14 日目に試料として観察を行った。それぞれの観察期間が終了したラットは、イソフルラン吸引によって安楽死させ、下顎骨を摘出した。摘出した標本は、10%中性緩衝ホルマリン液(pH7.4、和光純薬)による固定を行い、EDTA (脱灰液 B, 0.5 mol/L, 和光純薬)を使用し 4℃の低温室中でローター(Intelli-Mixer RM-2M, ELMI)にて攪拌を行いながら、24 時間毎に脱

灰液を交換し, 4 週間脱灰した後, 通法に従いパラフィン包埋を行った. その後, 近遠心方向に厚さ 4  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製し, 通法に従い H-E 染色を行い, 光学顕微鏡にて組織学的に観察した. また, 14 日目の群では, H-E 染色とは別に Alcian blue 染色(アルシアンブルー液, pH2.5, 和光純薬)を通法通り行い<sup>26)</sup>, 同様に観察を行った. 原生象牙質との象牙細管の走行, 数, 分布, 染色性の差異を指標として, 画像処理ソフトウェア(ImageJ, National Institutes of Health (NIH), USA)を用いて, 窩洞形成面直下の 10 か所における修復象牙質の厚みを計測し, その平均値を求めた.

## 2) 免疫組織化学染色

窩洞形成後 14 日目の OVX 群と Sham 群の連続切片試料に対し, ER $\alpha$ ,  $\beta$  の局在を調べるために免疫組織化学染色を行った. キシレンにて脱パラフィンを行いエタノール系列で親水後, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した. 次に PBS (Phosphate buffered saline)で洗浄後 10%正常ヤギ血清(Histofine kit, ニチレイ)にて切片を 10 分間前処理した後, 一次抗体を反応させた. 抗体として, 抗 ER $\alpha$  抗体(ER $\alpha$  (H-80), Santa Cruz, USA)および抗 ER $\beta$  抗体(ER $\beta$  (H-150), Santa Cruz)をそれぞれ使用し, PBS にて 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調整し, 室温にて 2 時間反応をさせた. 試料を PBS で 3 回洗浄した後, ビオチン標識二次抗体(抗ウサギ IgG, Histofine kit)を室温で 10 分間反応させた. 再度 PBS で洗浄後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Histofine kit)を室温にて 10 分間反応させ, DAB 発色液(pH7.5 の 0.1 mol/L Tris-HCl buffer に 0.01%

hydrogen peroxidase および 0.005% diaminobenzidine tetrahydrochloride を溶解したもの、Histofine kit)にて発色させた。その後、光学顕微鏡にて観察を行った。陰性対照として一次抗体を省略して染色を行い、非特異的な反応がないことを確認した。

### 3) 第二象牙質形成量測定

象牙質の石灰化の程度を数値化するために、蛍光物質である Calcein の投与を行い非脱灰切片上で計測を行った。4 週間飼育後、窩洞形成群とは別の各群のラットそれぞれ 8 匹に対し、イソフルランを吸引させ、吸入麻酔を施した。その後、ラット背部の皮下に石灰化標識剤(Calcein, 和光純薬) 10 mg/kg の投与を 3 日間隔で 2 回行った。2 回目の投与から 3 日後に、イソフルラン吸引によって安楽死させ、顎骨ごと第一臼歯を摘出した。摘出した標本は、10%中性緩衝ホルマリン液(pH7.4)による固定を行い、アセトンにて十分な脱水を行った後、試料包埋樹脂(Technovit8100, Kulzer, Germany)を使用し、4°Cの低温室中で浸漬操作を 8 時間行った。その後、同様に 4°Cの低温室中で重合を 3 時間行い、標本作製した。その後、近遠心方向に厚さ 6  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製し、蛍光顕微鏡にて観察した。そして、画像処理ソフトウェア(ImageJ)を用いて、天蓋中央部を含む 1.0 mm の幅におけるカルセインのラベリング間の距離(2 重標識幅)を等間隔の 10 か所( $W_{1\sim 10}$ )で計測し、平均値( $W$ )を求めた。この平均値をカルセインを投与した日数( $T_d$ )で除し、第二象牙質形成量( $M_0 = W/T$ )とした。

## 6. 統計解析

各群の体重，血中  $E_2$  濃度，骨密度，修復象牙質形成量および第二象牙質形成量の比較において，二群間の比較には Mann-Whitney U-test を，三群間の比較には Kruskal-Wallis H-test 後，多重比較にボンフェローニ補正 Mann-Whitney U-test 用いた．結果は平均±標準偏差で表示し，有意水準は 5% に設定した．

## 結果

### 1. 経時的な体重変化

Sham 群, OVX 群, OVX+E<sub>2</sub> 群における, OVX および Sham 手術当日から 4 週間経過後までの経時的な体重変化の測定結果を Fig. 1 に示す.

手術当日における各群の体重差に有意な差を認めないことを確認し( $p > 0.05$ ), 処置を行った. 手術当日, Sham 群は体重が  $215.0 \pm 9.51$  g であったが, 4 週経過後では  $286.2 \pm 16.48$  g となった. 同様に, OVX 群では,  $227.0 \pm 10.37$  g であったものが  $370.1 \pm 12.04$  g となり, OVX+E<sub>2</sub> 群では,  $215.0 \pm 9.98$  g であったものが  $261.7 \pm 13.92$  g となった. 4 週経過後の Sham 群と OVX 群の体重差の平均は  $83.9$  g となり有意な差を認めた( $p < 0.05$ ). OVX+E<sub>2</sub> 群に関しては, 全群の中で最も緩やかな体重の増加を示したが, 一貫して Sham 群とほぼ同様の緩やかな右肩上がりの体重増加を示し, その体重差に有意差は認められなかった( $p > 0.05$ ).

### 2. 血中 E<sub>2</sub> 濃度測定, 骨密度測定および H-E 染色

#### 1) 血中 E<sub>2</sub> 濃度測定

窩洞形成後 14 日目の Sham 群, OVX 群, OVX+E<sub>2</sub> 群における屠殺時の血中 E<sub>2</sub> 濃度測定結果を Fig. 2 に示す.

Sham 群における血中 E<sub>2</sub> 濃度は  $16.2 \pm 2.03$  pg/mL であり, OVX 群は  $9.2 \pm 1.60$  pg/mL, OVX+E<sub>2</sub> 群は  $36.7 \pm 1.11$  pg/mL であった. Sham 群と OVX 群,

OVX+E<sub>2</sub> 群と OVX 群, Sham 群と OVX+E<sub>2</sub> 群との間で有意差が認められ( $p < 0.05$ ), OVX 群では全群の中で顕著に低い値を示した.

## 2) 骨密度測定および H-E 染色

Sham 群, OVX 群, OVX+E<sub>2</sub> 群の, 大腿骨における DEXA 法を用いた骨密度測定結果, デジタル X 線写真および H-E 染色を Fig. 3~5 に示す.

Sham 群の大腿骨における骨密度は  $137.8 \pm 1.55 \text{ mg/cm}^2$  であり, OVX 群は  $115.4 \pm 5.12 \text{ mg/cm}^2$ , OVX+E<sub>2</sub> 群は  $138.3 \pm 2.80 \text{ mg/cm}^2$  であった. Sham 群と OVX 群, OVX+E<sub>2</sub> 群と OVX 群の間で有意差が認められたが ( $p < 0.05$ ), Sham 群と OVX+E<sub>2</sub> 群との間では有意差を認めなかった. デジタル X 線写真の結果より, OVX 群では, 海綿骨を構成している骨梁構造の減少を認め, 骨粗鬆症の病態を呈していた. それに対し, Sham 群ではそのような状態を示さず, OVX+E<sub>2</sub> 群では, OVX 群で認められた骨梁構造の減少が抑制された. H-E 染色の結果では, デジタル X 線写真の結果と同様に, OVX 群では, 海綿骨を構成している骨梁構造の減少を認め, 粗造であり, その骨梁自体の連続性も乏しかった. それに対し, Sham 群ではそのような病態を示さず, OVX+E<sub>2</sub> 群では, Sham 群と同様の骨梁構造が認められた.

## 3. 組織学的観察

### 1) 免疫組織化学染色

窩洞形成後 14 日目の Sham 群と OVX 群の試料に対する ER $\alpha$ ,  $\beta$  の免疫組織化学染色を Fig. 6 に示す.

両群とも ER  $\alpha$ ,  $\beta$  が, 歯髄腔の周囲, すなわち象牙芽細胞が配列をしている部位に陽性の染色を認めた. 高倍率で観察すると, 象牙芽細胞の核および細胞突起部にその局在が認められた.

## 2) H-E 染色および Alcian blue 染色

窩洞形成後 3, 7, 14 日目の第一臼歯の H-E 染色を Fig. 7(矢印は窩洞形成部)に示す. また, 窩洞形成後 14 日目の第一臼歯の Alcian blue 染色を Fig. 8 に示す.

3, 7, 14 日目のどの試料においても, 窩洞形成面直下に, 原生象牙質と象牙細管の走行, 数, 分布, 染色性の異なる修復象牙質の形成を認めた. Alcian blue 染色では, 上記の指標を参考として, 原生象牙質と修復象牙質の境界を確認し, その部位を点線および黒矢印で示し, 窩洞形成部は青矢印で示した. 14 日目の Sham 群, OVX 群, OVX+E<sub>2</sub> 群に対し, 窩洞形成面直下の修復象牙質の形成量を測定した結果を Fig. 9 に示す. 各群の形成量の測定結果は, 窩洞形成後 14 日間における合計の形成量および 1 日あたりの形成量に換算した両者を示す.

Sham 群における修復象牙質形成量は  $121.1 \pm 8.81 \mu\text{m}$  ( $8.7 \pm 0.63 \mu\text{m/day}$ ) であり, OVX 群は  $79.7 \pm 8.61 \mu\text{m}$  ( $5.7 \pm 0.62 \mu\text{m/day}$ ), OVX+E<sub>2</sub> 群は  $101.1 \pm 7.43 \mu\text{m}$  ( $7.2 \pm 0.53 \mu\text{m/day}$ ) であった. Sham 群と OVX 群, OVX 群と OVX+E<sub>2</sub> 群との間で有意差が認められた ( $p < 0.05$ ). しかし, Sham 群と OVX+E<sub>2</sub> 群との間では有意差を認めなかった ( $p > 0.05$ ).

## 3) 第二象牙質形成量測定

OVX および Sham 手術から 4 週間経過後の Sham 群, OVX 群, OVX+E<sub>2</sub> 群  
に対し, 窩洞形成を施さず Calcein の投与を行った試料の蛍光顕微鏡像を Fig.  
10 に示す.

全群とも, 歯髄腔周囲の象牙質に Calcein による蛍光標識が観察され, その  
二重標識幅の厚みに差異を認めた. また, 象牙細管に対し垂直に走行する太い  
ラベリング線と, 蛍光色素が拡散したような平行に走行する細いラベリング線  
とが認められた<sup>27,28)</sup>. これは, 象牙細管周囲の管間基質に相当するのではない  
かと推察され, 石灰化標識剤投与時に, 既に石灰化が開始されていた部位への  
蛍光色素の浸透によるものである. その二重標識幅に対して Calcein を投与し  
た日数で除し, 第二象牙質の形成量を測定した結果を Fig. 11 に示す.

Sham 群における第二象牙質形成量は  $2.8 \pm 0.14 \mu\text{m/day}$  であり, OVX 群は  
 $1.4 \pm 0.07 \mu\text{m/day}$ , OVX+E<sub>2</sub> 群は  $4.1 \pm 0.21 \mu\text{m/day}$  であった. Sham 群と OVX  
群, Sham 群と OVX+E<sub>2</sub> 群との間で有意差が認められ, OVX 群では全群の中で  
有意に低い値を示した ( $p < 0.05$ ).



## 考察

近年、骨粗鬆症に対する社会的関心が高まりつつあり、骨粗鬆症は単なる老化現象ではなく、骨の疾患として認識され、合併症に対する予防的治療が必要とされている<sup>1)</sup>。歯科の分野においても、インプラント治療や歯周病治療に際して、患者個人の骨粗鬆症リスクやエストロゲンの欠乏状態を精密に診査したうえで治療計画を立案していく必要がある<sup>1)</sup>。保存治療における歯の切削や咬耗・摩耗などによる歯の損傷は、象牙質歯髄複合体という概念のもと、常に歯髄組織の損傷を考慮する必要がある。さらに、象牙芽細胞にエストロゲン受容体が存在することから<sup>15-17)</sup>、修復処置後に期待される修復象牙質の形成量や質に関しても骨粗鬆症のリスクを認識しておくべきであると考えられる。

本研究では、象牙芽細胞の機能に対し、エストロゲンがどのような影響を与えるのかを検索するために OVX および OVX+E<sub>2</sub> ラットを用いて、窩洞形成後にみられる象牙質形成能を形態学的に検討し、得られた結果に対して以下の考察を行った。

### 1. 体重変化および血中 E<sub>2</sub> 濃度

OVX 群および OVX+E<sub>2</sub> 群のラットは生後 10 週齢で卵巣を摘出され、その 2 日後までは体重の増加は認められなかった。しかし、3 日目以後では Sham 群、OVX 群、OVX+E<sub>2</sub> 群の全ての群で体重の増加傾向を示した。OVX 群は、特に高い体重の増加傾向を示し、卵巣摘出後 2 週目から他の群との間に有意な差を

認めるようになった。この結果は、卵巣摘出ラットが Sham 群よりも体重増加を示すという過去の報告に一致している<sup>29,30)</sup>。OVX 群では、卵巣摘出に伴うエストロゲンの分泌低下が各種ホルモンの代謝に影響を及ぼし、特に脂肪合成の抑制が十分に機能しなくなるということからも、脂肪が蓄積し体重の増加を示したものと考えられる<sup>31,32)</sup>。一方、OVX+E<sub>2</sub> 群の体重は、計測期間を通し Sham 群と比較して若干低い値で推移していたが、その傾向は同様であり、緩やかな右肩上がりの体重増加を示し、Sham 群との間に有意な差は認められなかった。

CLIA 法<sup>31)</sup>を用いた Sham 群、OVX 群、OVX+E<sub>2</sub> 群の血中 E<sub>2</sub> 濃度測定結果では、OVX 群の値が Sham 群および OVX+E<sub>2</sub> 群と比較して有意に低く、エストロゲン欠乏状態を示していた。また、OVX+E<sub>2</sub> 群が最も高い値を示した。OVX ラットに対する E<sub>2</sub> の投与量に関しては、様々な投与量が報告されているが<sup>8,34-36)</sup>、今回の投与量(20 μg/kg)では、OVX 群の体重増加を有意に抑制し、Sham 群と同様の体重変化を認めたことから E<sub>2</sub> の作用が十分に認められていたと考えられる。

## 2. 大腿骨における骨密度と H-E 染色所見

ラット大腿骨における DEXA 法を用いた骨密度の計測結果は、同様に行われた過去の実験報告結果<sup>8,18,20,37)</sup>と類似しており、本実験における OVX 群が骨粗鬆症の病態にあったことを確認することができる。卵巣摘出手術を受けた OVX ラットでは、早期に骨芽細胞の活性化による骨形成と破骨細胞の活性化による骨吸収とが同時に起こる高骨代謝回転が生じるといわれている<sup>38,39)</sup>。その後、

骨吸収優位の負のバランス状態となり、海綿骨の減少を生じ、骨の脆弱化が認められるようになるという<sup>38,39)</sup>。今回の OVX 群も大腿骨におけるデジタル X 線写真と H-E 染色による組織観察から、海綿骨の骨梁構造の減少が認められ、さらに骨梁自体の連続性の消失が観察された。エストロゲンの分泌低下により海綿骨における骨梁構造の減少が誘引され、骨粗鬆症の状態を呈している。一方、OVX+E<sub>2</sub>群では、デジタル X 線写真、H-E 染色ともに海綿骨の骨梁構造の減少などは認められず、Sham 群と同程度であった。このことは E<sub>2</sub>の投与により、正常な骨代謝が行われていたことを示している。

### 3. 免疫組織化学染色

象牙芽細胞における ER $\alpha$ 、 $\beta$ の免疫組織化学染色を行った結果、ER $\alpha$ 、 $\beta$ ともに、象牙芽細胞の核および細胞突起部に陽性の染色が認められた。象牙芽細胞の核および細胞突起部にエストロゲン受容体が存在することは、これまでも報告されている<sup>15-17)</sup>。これらの結果から、象牙芽細胞の機能にエストロゲンが重要な役割を果たしていることが十分に考えられ、さらに、その作用はエストロゲンの直接的な作用によるものだと考えられる。事実、エストロゲンの欠乏状態において、その象牙芽細胞の象牙質形成能に変化が認められることが報告されているが<sup>15)</sup>、そこにエストロゲンの投与を行い、その象牙芽細胞の機能について検討を行っている研究は、筆者が知る限りでは本研究が初めてのものである。

### 4. 窩洞形成後の修復象牙質の形成量および第二象牙質形成量

卵巣摘出後、活発な骨吸収のピークは 14 日から 21 日頃であるとの報告がある<sup>40)</sup>。今回、卵巣摘出手術から 4 週経過後に窩洞形成を行った。この時期は、骨粗鬆症の病態として安定した時期であるとともに、出生から 100 日齢程度経過しており、成獣ラットとしても安定した時期と考えている<sup>41)</sup>。

窩洞形成後 14 日目の H-E 染色および Alcian blue 染色の結果、修復象牙質の形成量は Sham 群および OVX+E<sub>2</sub> 群と比較して、OVX 群が有意に低かった (Fig.8)。原生象牙質と第二象牙質の組織学的な識別は、原生象牙質と第二象牙質との間の分解線(demarcation line)やわずかな染色性の違い、象牙細管の走行の不規則性によって識別される<sup>42)</sup>。一方、窩洞形成により形成された修復象牙質は、その刺激に反応した特定の部位に形成され、その象牙質の形成速度は第二象牙質の形成速度と比較して速くなる。そのため、細管の走行は湾曲し、形成中のコラーゲン形成は減少し、象牙前質には非コラーゲン性タンパク質の産生促進が認められる<sup>42)</sup>。本実験の結果でも、Sham 群、OVX 群および OVX+E<sub>2</sub> 群の H-E 染色における組織像の一部に、湾曲を示すラインを境界とする明らかに染色性の異なる象牙質が認められた。そこで本研究では、酸性ムコ多糖類を染色する Alcian blue 染色<sup>43)</sup>を行った結果、Sham 群と OVX 群では、修復象牙質と考えられる部位に染色性の差異が認められ、修復象牙質の境界を明瞭に観察できた。修復象牙質では、その象牙質が急速に形成されることにより、各種タンパク質成分の減少や、酸性ムコ多糖であるプロテオグリカンの含有率が低くなっていると考えられ、Alcian blue による染色性に差異が生じたと考えられ

る. Alcian blue 染色の結果から, Sham 群の修復象牙質形成量は  $8.7 \pm 0.63$   $\mu\text{m}/\text{day}$  であり, OVX 群では  $5.7 \pm 0.62$   $\mu\text{m}/\text{day}$  と有意に減少していた. さらに  $E_2$  を投与することによって, エストロゲン欠乏状態下にある象牙芽細胞の象牙質形成能が  $7.2 \pm 0.53$   $\mu\text{m}/\text{day}$  と回復し, Sham 群との有意差を認めなくなった. これらの結果は, エストロゲンの受容体を有する象牙芽細胞において, エストロゲンが dentinogenesis に対して重要な役割を果たしていることを示している. 実際,  $E_2$  をヒト歯髄細胞に作用させると, BMP2 や LEF1 の遺伝子発現を増強させることが報告されている<sup>17)</sup>が, これらの因子は象牙芽細胞において石灰化や象牙質形成を亢進する因子<sup>44)</sup>であることからエストロゲンが dentinogenesis における key factor の 1 つであることが明らかとなった.

一方, 生理的な象牙質形成を示す第二象牙質形成能に対するエストロゲンの作用をみると, 修復象牙質と同様に Sham 群では  $2.8 \pm 0.14$   $\mu\text{m}/\text{day}$  であるのに対して, エストロゲン欠乏状態下では  $1.4 \pm 0.07$   $\mu\text{m}/\text{day}$  と象牙質形成能が抑制されていた. これは生理的な第二象牙質形成能と修復象牙質形成能の両者に対してエストロゲンが同様の役割を果たしていることを示唆している. しかしながら,  $E_2$  を投与した OVX+ $E_2$  群においては  $4.1 \pm 0.21$   $\mu\text{m}/\text{day}$  となり, Sham 群に対して有意に第二象牙質形成量が亢進していた. OVX+ $E_2$  群の血中  $E_2$  濃度が Sham 群の値に対して, ほぼ 2 倍の値を示していることから考えると, 修復象牙質の形成よりも第二象牙質の形成に対して,  $E_2$  の作用がより強く作用している可能性が認められた. これは, 修復象牙質と第二象牙質の形成に対してエ

ストロゲンが重要な役割を果たしていることは同じであるが、その作用機序には異なるメカニズムが存在することが考えられ、今後さらなる研究が必要と考える。

## 結論

OVX 群は卵巣摘出 4 週間後の測定において、体重の増加や血中  $E_2$  濃度の減少を認めた。また、H-E 染色および DEXA の結果から、骨密度および骨梁の減少が認められ、骨粗鬆症の症状を呈し、そのときの修復象牙質および第二象牙質の形成は Sham 群と比較して抑制されることが示された。その一方で、OVX+ $E_2$  群では、骨粗鬆症の病態を示さず、修復象牙質および第二象牙質の形成が OVX 群と比較して、その形成量の減少が抑制された。以上の結果から、エストロゲンが dentinogenesis に関与し、Vital pulp therapy 開発の基礎的な知見となることが示唆された。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，御懇篤なる御指導，御校閲を賜りました明海大学大学院歯学研究科機能系病態機能研究群歯内療法学 横瀬敏志教授に深甚なる謝意を表します．また，御指導，御校閲を賜りました機能系正常機能研究群口腔生化学 友村 明人教授，機能系薬理研究群歯科薬理学 坂上 宏教授，理工系歯材応用研究群歯科矯正学 須田 直人教授に深く感謝の意を表します．また，本研究を遂行するにあたり，温かい御支援，御協力を頂きました歯内療法学分野の諸先生方に深く感謝いたします．



## 文献

- 1) 折茂 肇, 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会編. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 年版. ライフサイエンス出版: 東京; 2011.
- 2) 黒須康成, 稲垣幸司, 吉成伸夫, 佐藤連造, 夫馬大介, 板野雅洋, 杉石 泰, 岩田武久, 深田淳一郎, 高木善寛, 野口俊英, 内藤宗孝, 有地榮一郎, 田口 明. 定量的コンピューター断層撮影法(QCT 法)を用いた下顎骨骨密度と腰椎骨密度との関係. 日歯周誌 2004; 46: 202-208.
- 3) Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004; 25: 389-425.
- 4) 田中 栄. 骨と成長因子. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中 栄, 中村浩彰, 森 諭史. 新骨の科学. 1 版. 医歯薬出版: 東京; 2012. 185-191.
- 5) Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23:279-302.
- 6) Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 179-183.
- 7) Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1989; 10: 295-301.

- 8) Yokose S, Ishizuya T, Ikeda T, Nakamura T, Tsurukami H, Kawasaki K, Suda T, Yoshiki S, Yamaguchi A. An estrogen deficiency caused by ovariectomy increases plasma levels of systemic factors that stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts in rats. *Endocrinology* 1996; 137: 469-478.
- 9) Bilezikian JP. Sex steroids, mice, and men: when androgens and estrogens get very close to each other. *J Bone Miner Res* 2002; 17:563-566.
- 10) Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241: 84-86.
- 11) Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 1989; 125: 825-833.
- 12) Ohashi T, Kusuhara S, Ishida K. Estrogen target cells during the early stage of medullary bone osteogenesis: Immunohistochemical detection of estrogen receptors in osteogenic cells of estrogen-treated male Japanese quail. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 124-127.
- 13) Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Mizuno Y, Nakamura T, Ouchi Y, Orimo H. Immunohistochemical detection and Northern blot analysis of estrogen

receptor in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 1103-1109.

14) Pensler JM, Radosevich JA, Higbee R, Langman CB. Osteoclasts isolated from membranous bone in children exhibit nuclear estrogen and progesterone receptors. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 797-802.

15) Hietala EL, Larmas M, Salo T. Localization of estrogen-receptor-related antigen in human odontoblasts. *J Dent Res* 1998; 77: 1384-1387.

16) Jukic S, Prpic-Mehicic G, Talan-Hranilovic J, Miletic I, Segovic S, Anic I. Estrogen receptors in human pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 340-344.

17) Inaba T, Kobayashi T, Tsutsui TW, Ogawa M, Uchida M, Tsutsui T. Expression status of mRNA for sex hormone receptors in human dental pulp cells and the response to sex hormones in the cells. *Arch Oral Biol* 2013; 58: 943-950.

18) Yokose S, Zhungfeng C, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Katayama T. The effects of estrogen deficiency on glycosylation of odontoblasts in rats. *J Endod* 1998; 24: 645-647.

19) Naka T, Yokose S. Spatiotemporal expression of sclerostin in odontoblasts during embryonic mouse tooth morphogenesis. *J Endod* 2011; 37: 340-345.

20) Hietala EL, Larmas M. The effect of ovariectomy on dentin formation

and caries in adult rats. *Acta Odontol Scand* 1992; 50: 337-343.

21) Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res* 1987; 2: 115-122.

22) Dale JB, Sarich SL, Bretz TM, Hatton JF, Zachow RJ. Hormonal regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in human tooth pulp. *J Dent Res* 2002; 81: 360-365.

23) Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, Baylink D. Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1322-1329.

24) Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 2007; 13: 791-801.

25) Ishii M, Yamauchi T, Matsumoto K, Watanabe G, Taya K, Chatani F. Maternal age and reproductive function in female Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Sci* 2012; 37: 631-638.

26) Scott JE, Quintarelli G, Dellovo MC. The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. I. The mechanisms of Alcian Blue staining. *Histochemie* 1964; 4: 73-85.

27) 西川哲成, 富永和也, 尹 聖澤, 上村 学, 好川正孝, 戸田忠夫, 田中昭

男. ラット歯槽骨および象牙質の共焦点レーザー走査顕微鏡的観察. 日歯周誌  
1996 ; 38 : 272-281.

28) 大野康亮. テトラサイクリンによる形成期硬組織のラベリング像に及ぼす  
諸条件について. 歯基礎誌 1978 ; 20 : 252-269.

29) 中田浩史, 鈴木静夏, 渡辺丈紘, 寒河江 登志朗, 谷本安浩, 河相安彦.  
低ミネラル食を摂取させた卵巣摘出ラットの大腿骨骨幹端部における骨変化.  
日補綴会誌 2012 ; 4 : 76-84.

30) Miron RJ, Wei L, Yang S, Caluseru OM, Sculean A, Zhang Y. Effect of  
enamel matrix derivative on periodontal wound healing and regeneration in  
an osteoporotic model. J periodontol 2014; 85: 1603-1611.

31) 清水弘行. 女性肥満の成因, 特に性ホルモンと肥満の基礎的検討. 肥満研  
究 2002 ; 8 : 254-258.

32) Yamaguchi M, Katoh S, Morimoto C, Sakayama K, Shiosaka T, Masuno H,  
Okuda H. The hormonal responses of lipoprotein lipase activity and lipolysis  
in adipose tissue differ depending on the stage of the estrous cycle in female  
rats. Int J Obes Relat Metab Disord 2002; 26: 610-617.

33) 関口昌江, 高田 剛, 高見澤文江, 今泉和子, 梶田幸夫. 化学発光免疫測  
定法(CLIA 法)による血中および尿中コルチゾール測定試薬「アーキテクト・コ  
ルチゾール」の基礎的検討. 医学と薬学 2013 ; 69 : 985-991.

34) 伊藤意作, 角田左武郎, 大田和正, 南雲正男. ビスホスホネート投与卵巣

摘出ラットの顎骨骨塩量と骨芽細胞からの Interleukin-6 の産生. 口科誌 2006;  
55 : 10-16.

35) Kim ID, Ahn KH, Lee S, Hong SC, Kim SH, Kim T. Effect of ovariectomy, 17-beta estradiol, and progesterone on histology and estrogen receptors of bladder in female partial bladder outlet obstruction rat model. J Obstet Gynaecol Res 2013; 39: 1259-1267.

36) Hata M, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Yukitatsu Y, Nakasho K, Okamura H, Terada N. Estrogen decreases the expression of claudin-5 in vascular endothelial cells in the murine uterus. Endocr J 2014; 61: 705-715.

37) 和田康弘, 門倉弘志, 西村 翼, 山崎崇秀, 菊井徹哉, 横瀬敏志. 骨粗鬆症モデル動物における炭酸ガスレーザーの組織学的観察. 日歯保存誌 2013 ;  
56 : 468-476.

38) 森 諭史. 骨粗鬆症. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中 栄, 中村浩彰, 森 諭史. 新骨の科学. 1 版. 医歯薬出版 : 東京 ; 2012. 279-286.

39) 石原 昇. 卵巣摘出ラットにおける上顎骨, 下顎骨および大腿骨の構造変化に関する比較組織学的研究. 補綴誌 1997 ; 41 : 934-944.

40) Emerton KB, Hu B, Woo AA, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska RJ, Jepsen KJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis and control of Bone resorption following ovariectomy in mice. Bone 2010; 46: 577-583.

41) Kawagishi E, Nakakura-Ohshima K, Nomura S, Ohshima H. Pulpal

responses to cavity preparation in aged rat molars. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 111-122.

42) Antonio N. 川崎堅三. *Ten Cate 口腔組織学*. 6版. 医歯薬出版: 東京; 2006. 180-223.

43) 安達 仁. 骨補填材の骨誘導に炭酸ガスレーザーが及ぼす影響. *奥羽大歯学誌* 2011; 38: 77-88.

44) Yokose S, Naka T. Lymphocyte enhancer-binding factor 1: an essential factor in odontoblastic differentiation of dental pulp cells enzymatically isolated from rat incisors. *J Bone Miner Metab* 2010; 28: 650-658.

## Abstract

Purpose: Estrogen has long been known as a hormone that affects the remodeling of bone tissue. Recently, its receptors were identified in odontoblasts in addition to osteoblasts and osteoclasts. However, little is known about the receptor functions of odontoblasts. Therefore, in this study, the effect of estrogen on dentinogenesis was examined histochemically using estrogen-deficient rat models.

Materials and methods: Ninety six 10-week-old female SD rats were used for this experiment. They were equally divided into three groups (32 each): the OVX (Ovariectomized rats) group, the Sham group with laparotomy alone, and the OVX+E<sub>2</sub> group, which was administered with 20µg/kg/day estradiol (E<sub>2</sub>) daily from the next day of ovariectomization. All groups were bred for four weeks, and their body weights were measured daily. Thereafter, to induce reparative dentin formation, 1.0 mm-diameter cavity preparation filled with light-cured resin composites were given to the first molars in the lower jaws on each side. Tooth samples were taken on Days 3, 7, and 14, while blood and femur samples were collected at the same time to measure estradiol levels and bone density by DEXA. Each sample was subjected to H-E staining. On Day 14, Alcian blue staining and immunohistochemical



staining were performed for ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ . Meanwhile, in order to compare the formation of secondary dentin, calcein was administered at 3-day intervals to the groups that were not subjected to cavity formation, and the groups were monitored by fluorescence microscopy.

Results: The OVX group showed weight gain and a decrease of estradiol levels compared to the Sham and OVX+E<sub>2</sub> groups. The results of DEXA and H-E staining revealed decreased bone density, presenting osteoporosis. The results of immunohistochemical staining indicated that ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  localized at the nucleus of odontoblasts. The amounts of the reparative dentin formation were the most in the Sham group, then the OVX+E<sub>2</sub> and OVX groups, respectively. The OVX+E<sub>2</sub> group showed the highest formation of secondary dentin, then the Sham and OVX groups, respectively.

Conclusion: The OVX group manifested osteoporosis, and the formation of reparative dentin and secondary dentin was suppressed. The OVX+E<sub>2</sub> group showed no trace of osteoporosis, and the recovery was observed in the dentin formation amount. From the above results, estrogen has been suggested to be involved in dentinogenesis.

Key words: estrogen-deficient rat, osteoporosis, odontoblast, dentinogenesis

## Figure Legends

### Fig.1

#### Weight changes

Temporal changes in weight of Sham, OVX, and OVX+E<sub>2</sub> were monitored from the day of surgery and thereafter for 4 weeks. There was a significant difference between two groups after four week: the Sham and OVX groups ( $p<0.05$ ); the OVX and OVX+E<sub>2</sub> groups ( $p<0.05$ ). However, there was no significant difference between the Sham and OVX+E<sub>2</sub> groups ( $p>0.05$ ).

### Fig.2

#### E<sub>2</sub> level

The E<sub>2</sub> level in the blood was measured at Day 14. The OVX group showed a decrease in blood E<sub>2</sub> level. There was a significant difference between the Sham and the OVX groups, and between the OVX+E<sub>2</sub> and the OVX groups, and between the Sham and the OVX+E<sub>2</sub> groups ( $p<0.05$ ).

### Fig.3

#### Bone density of the femurs

The bone density in the femur was measured with the DEXA method at Day

14. There was a significant difference between the Sham and the OVX groups, and between the OVX+E<sub>2</sub> and the OVX groups ( $p<0.05$ ).

Fig.4

Digital X-ray images of the femurs

In the OVX group, a decrease of density was observed in the trabecular tissues which construct cancellous, while no such image was found in the Sham and OVX+E<sub>2</sub> groups.

Fig.5

Sections of H-E stained femurs

In the OVX group at Day 14, a decrease in the trabecular structure where construct cancellous bones were observed, and the structure was coarse and had poor continuity. In the Sham and OVX+E<sub>2</sub> groups, no such pathological change was found.

Fig.6

Sections of Immunohistochemical staining for ER- $\alpha$  and  $\beta$ .

These are sections of immunohistochemical staining for ER- $\alpha$  and  $\beta$  of the first molars' odontoblasts of the Sham and OVX groups at Day 14. Both

groups were stained positively for ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  along the odontoblasts. Within high-power field, localizations of positive staining were observed in the nucleus as well as areas that correspond to cell processes of the odontoblasts.

#### Fig.7

Sections of H-E stained first molars

These are the images of H-E stained first molars after cavity filling at Days 3, 7, and 14. Underneath the cavity forming areas, reparative dentin different from primary dentin in form, number, distribution, and the chromatics of dentinal tubules from primary dentin were observed.

#### Fig.8

Sections of Alcian blue stained first molars

These are the sections of first molars at Day 14 stained in Alcian blue. Chromatic differences were observed in areas underneath the cavity preparation, which correspond to reparative dentin formation in each group (a part of dotted line). Also shows the boundary between primary and reparative dentin by the black arrow. However, in the OVX+E<sub>2</sub> group, no clear difference was observed in stain concentrations in the demarcation line

of primary and reparative dentin as compared Sham and OVX groups.

Fig.9

The amount of reparative dentin formation

We measured the amount of reparative dentin formation of the first molars of each group at Day 14. The results show that there was a significant difference between two groups: the Sham and OVX groups ( $p < 0.05$ ), and the OVX and OVX+E<sub>2</sub> groups ( $p < 0.05$ ). However, there was no significant difference between the Sham and OVX+E<sub>2</sub> groups ( $p > 0.05$ ).

Fig.10

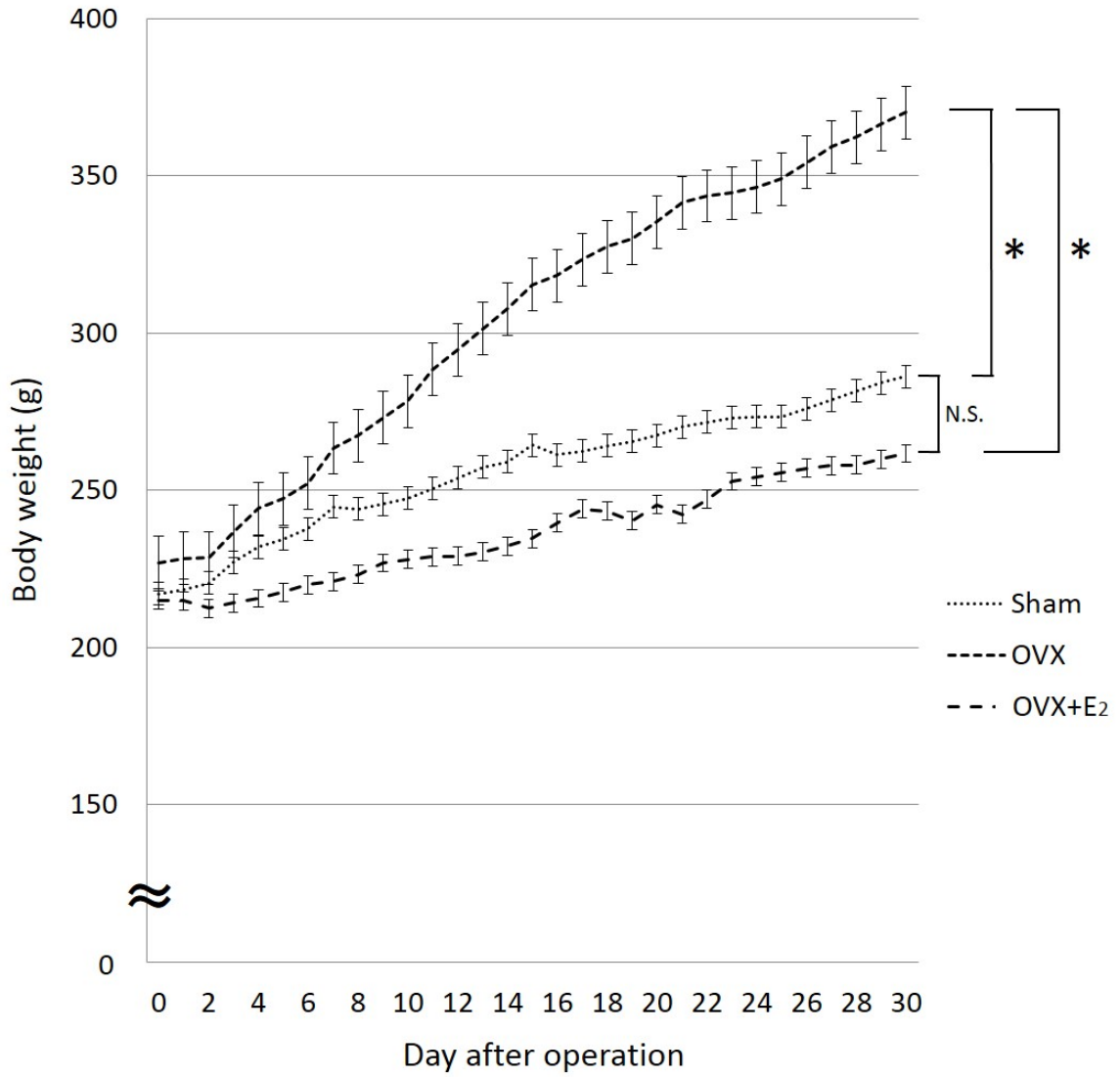
Fluorescence microscope images after double labeling with calcein

These are fluorescence microscopy images of first molars, which are not subjected to cavity formation after double labeling using calcein. Administration was twice every three days. In each group, the double labeling of calcein to dentin surrounding pulp cavity was observed, revealing a difference in the double-labeled widths.

Fig.11

The amount of secondary dentin formation

For the first molars of each group, which were not subjected to cavity preparation, the amount of secondary dentin formation was measured. The results showed a significant difference between the Sham and OVX groups, as well as between the Sham and OVX+E<sub>2</sub> groups ( $p < 0.05$ ).



\* $p < 0.05$

Fig.1  
天  
井出祐樹  
地

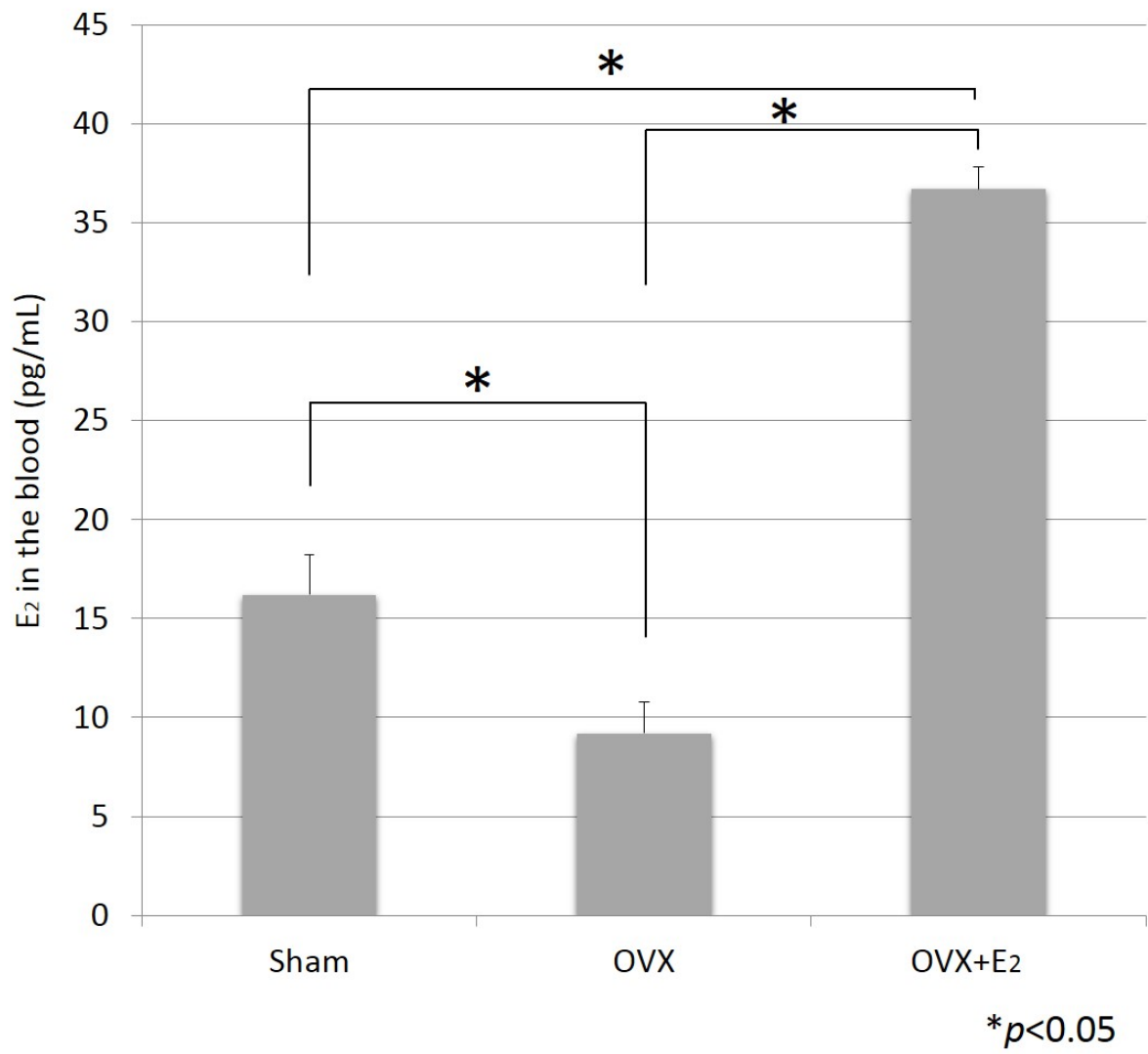


Fig.2

天

井出祐樹

地



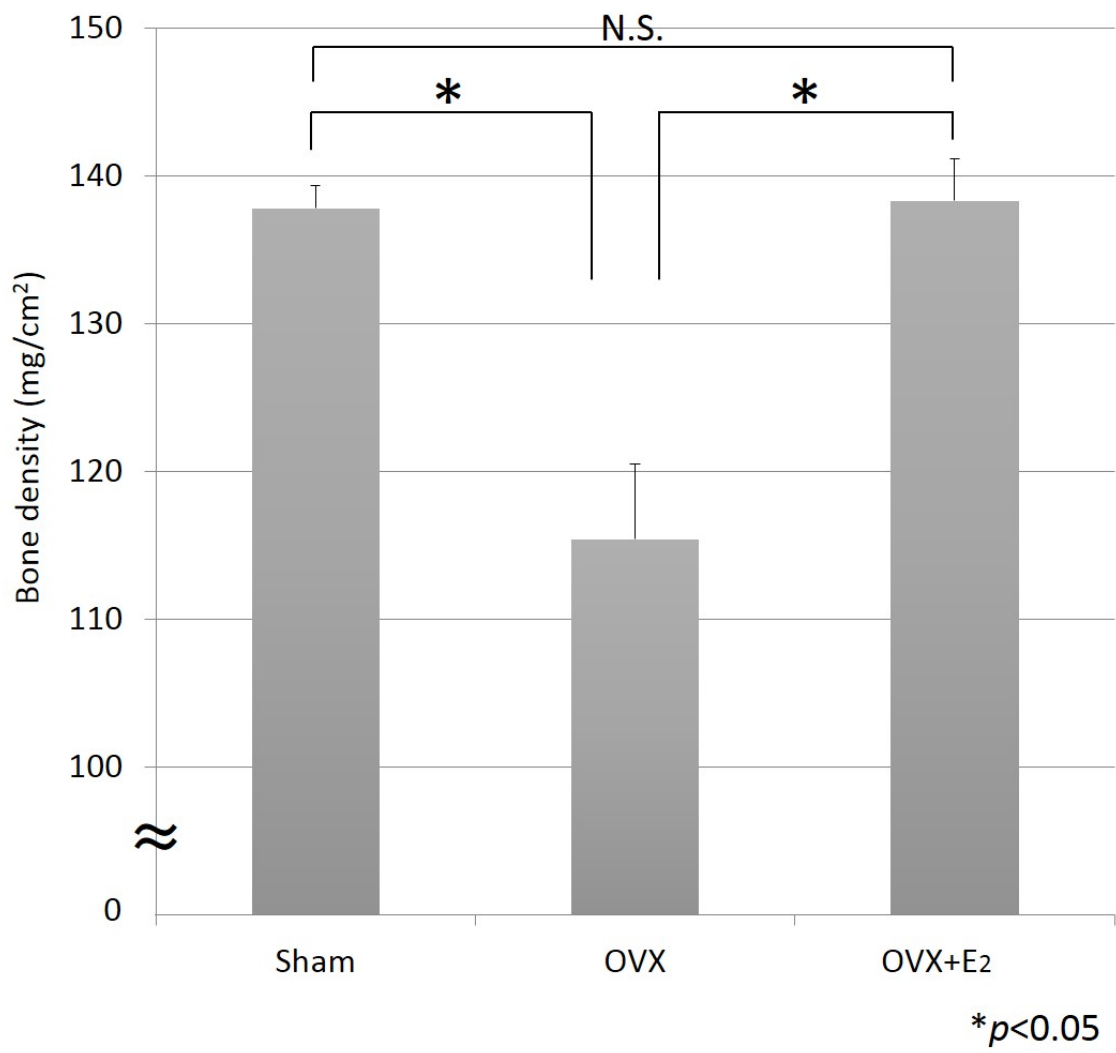
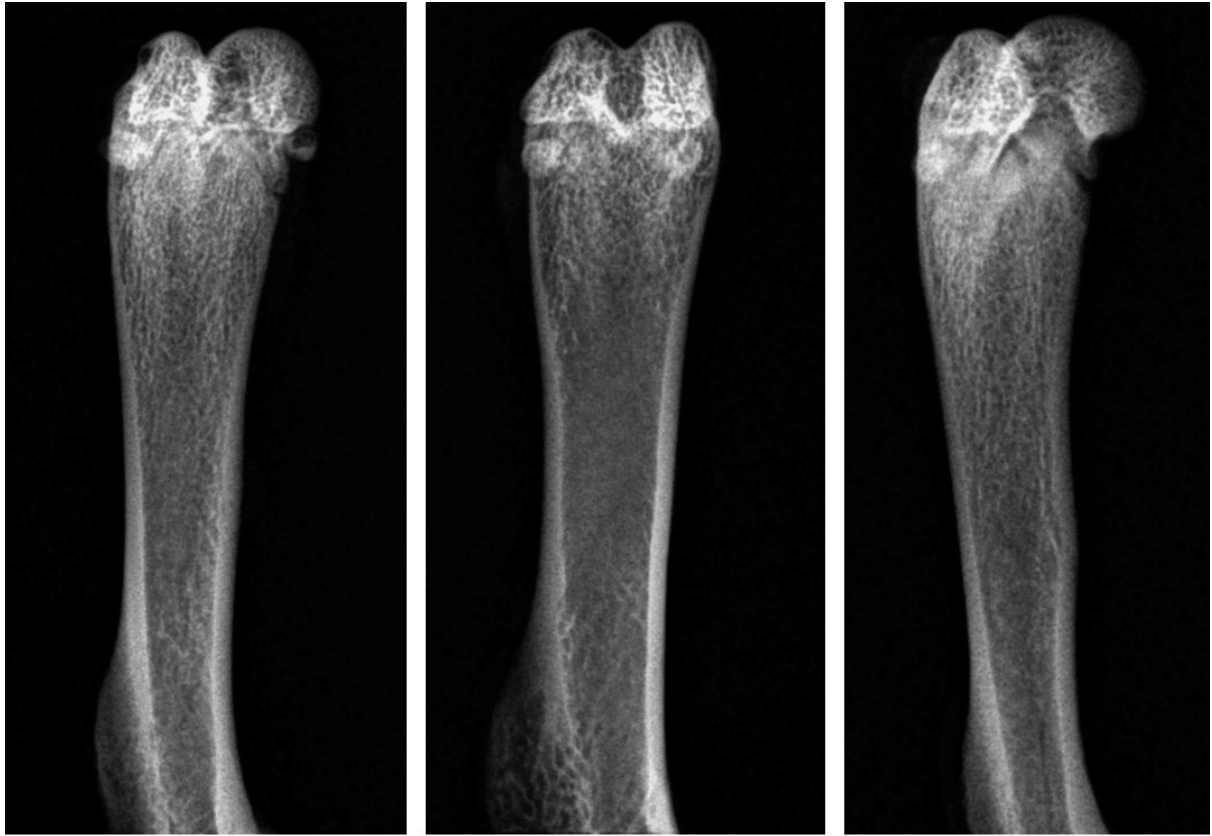


Fig.3

天

井出祐樹

地



Sham

OVX

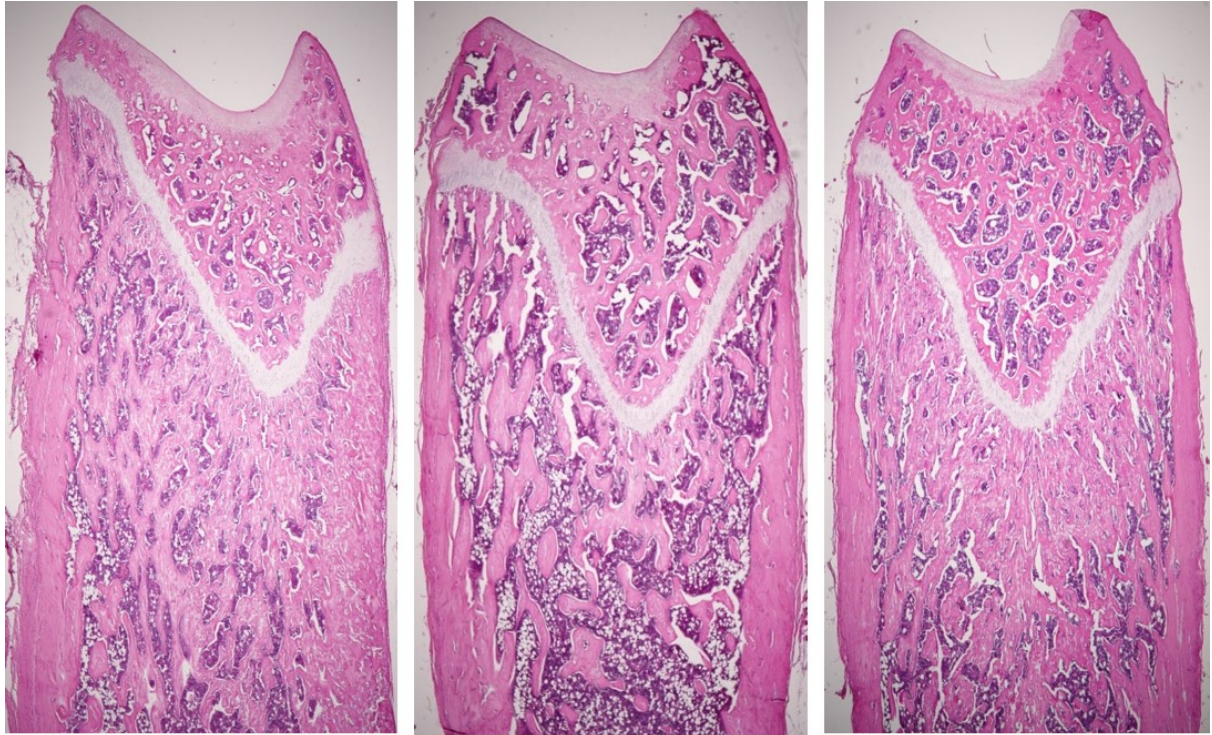
OVX + E<sub>2</sub>

Fig.4

天

井出祐樹

地



Sham

OVX

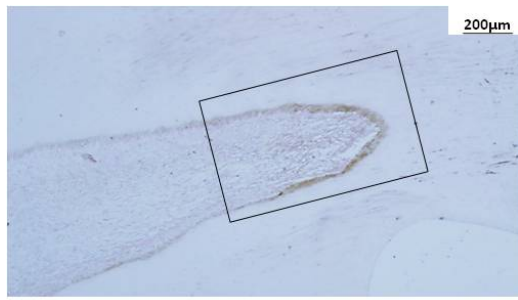
OVX+E<sub>2</sub>

Fig.5

天

井出祐樹

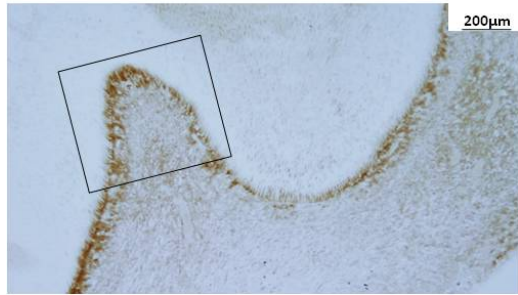
地



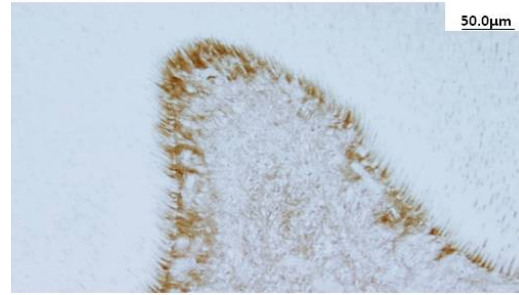
ERα Sham



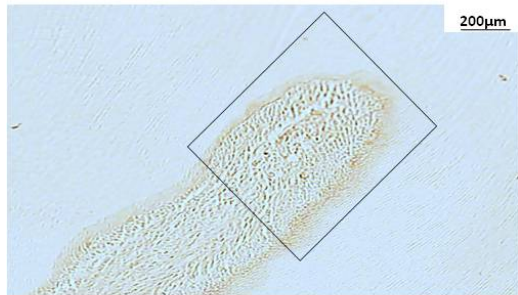
High magnification



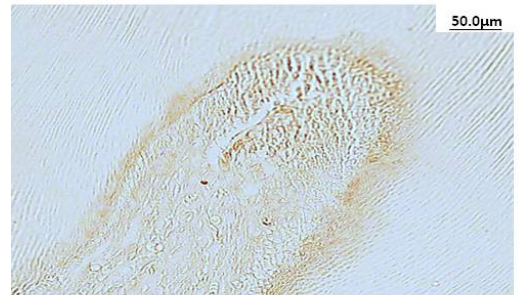
ERβ Sham



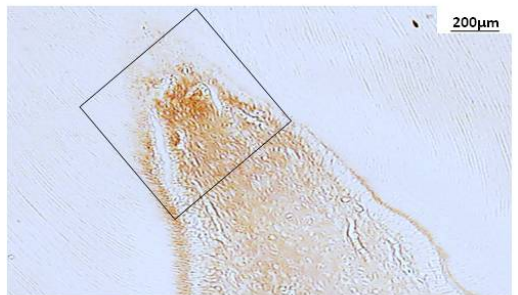
High magnification



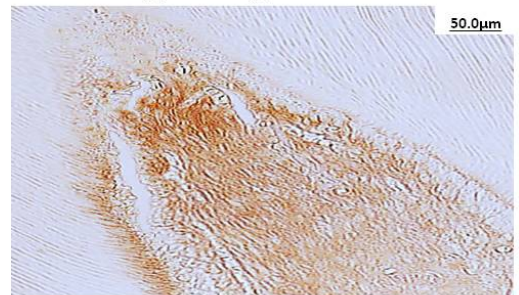
ERα OVX



High magnification



ERβ OVX



High magnification

Fig.6

天

井出祐樹

地

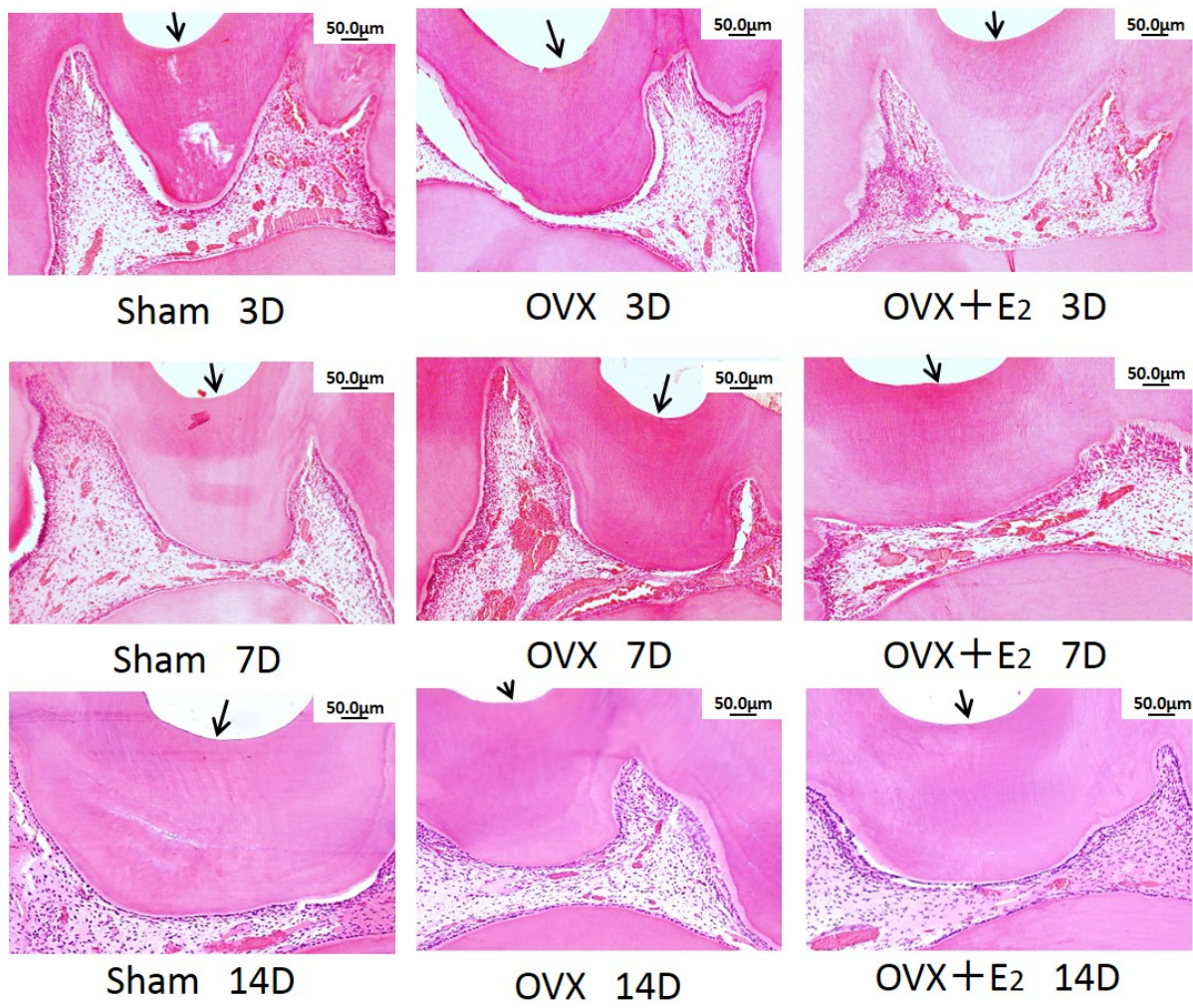
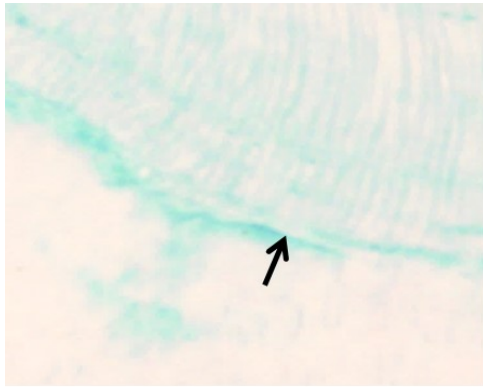


Fig.7

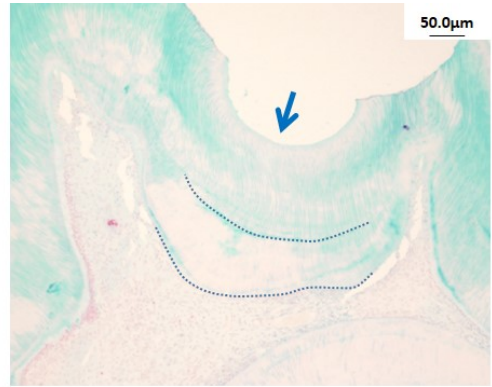
天

井出祐樹

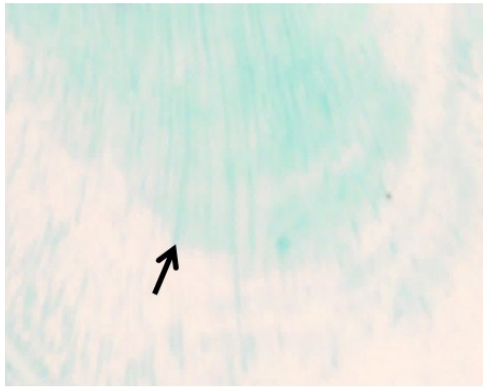
地



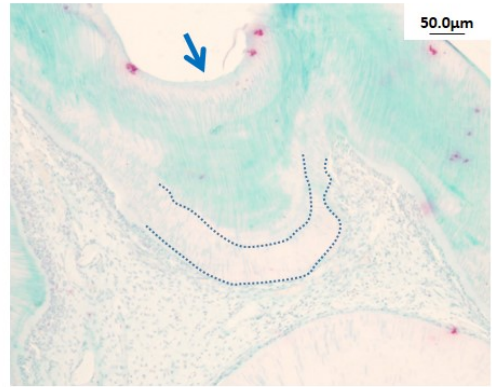
Sham



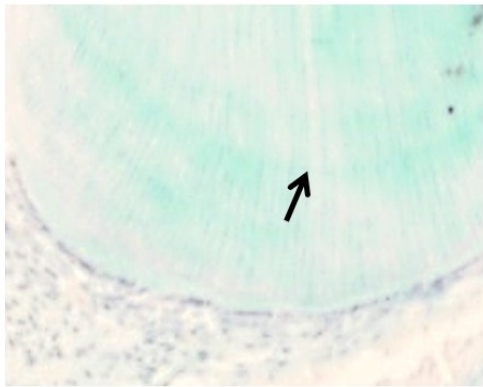
Sham



OVX



OVX



OVX+E2

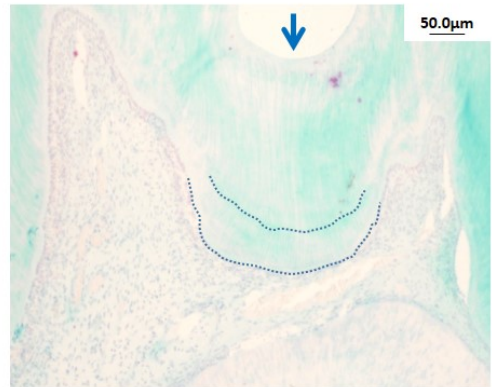


Fig.8

天

井出祐樹

地

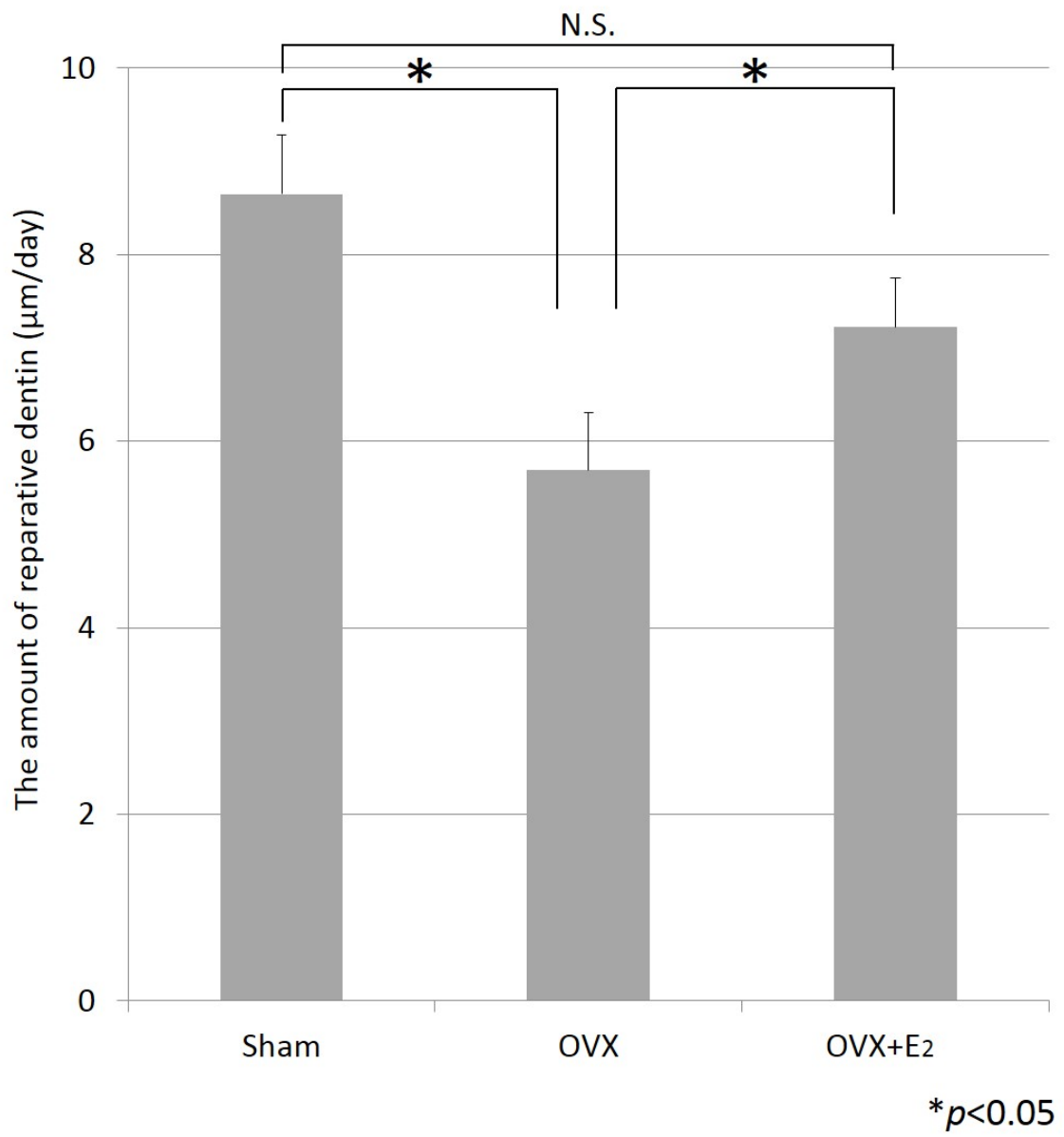
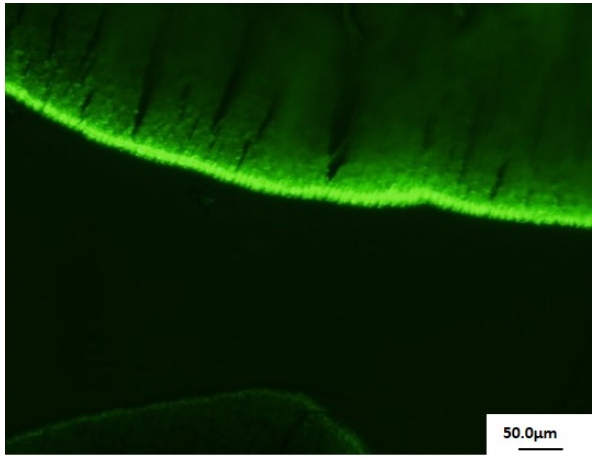


Fig.9

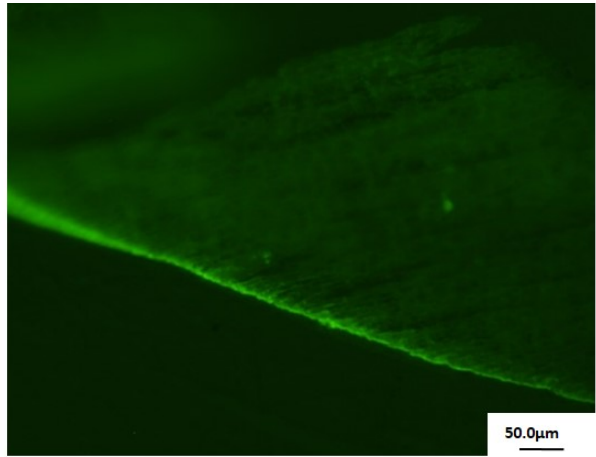
天

井出祐樹

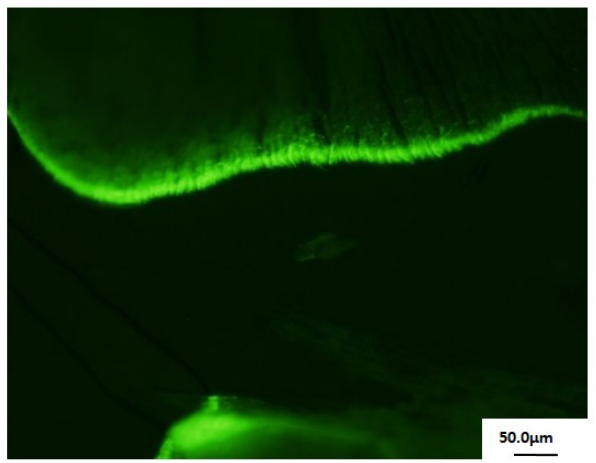
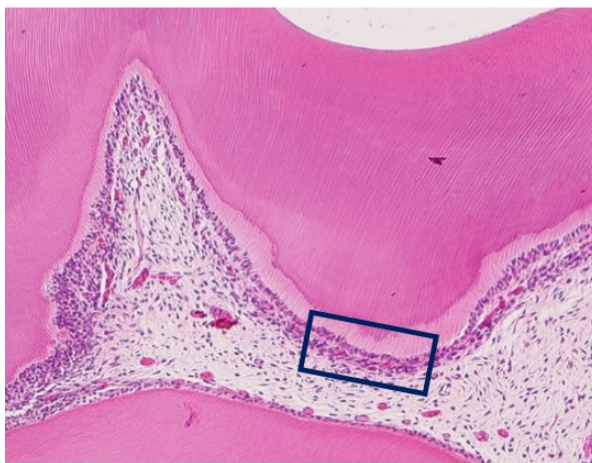
地



Sham



OVX



OVX + E<sub>2</sub>

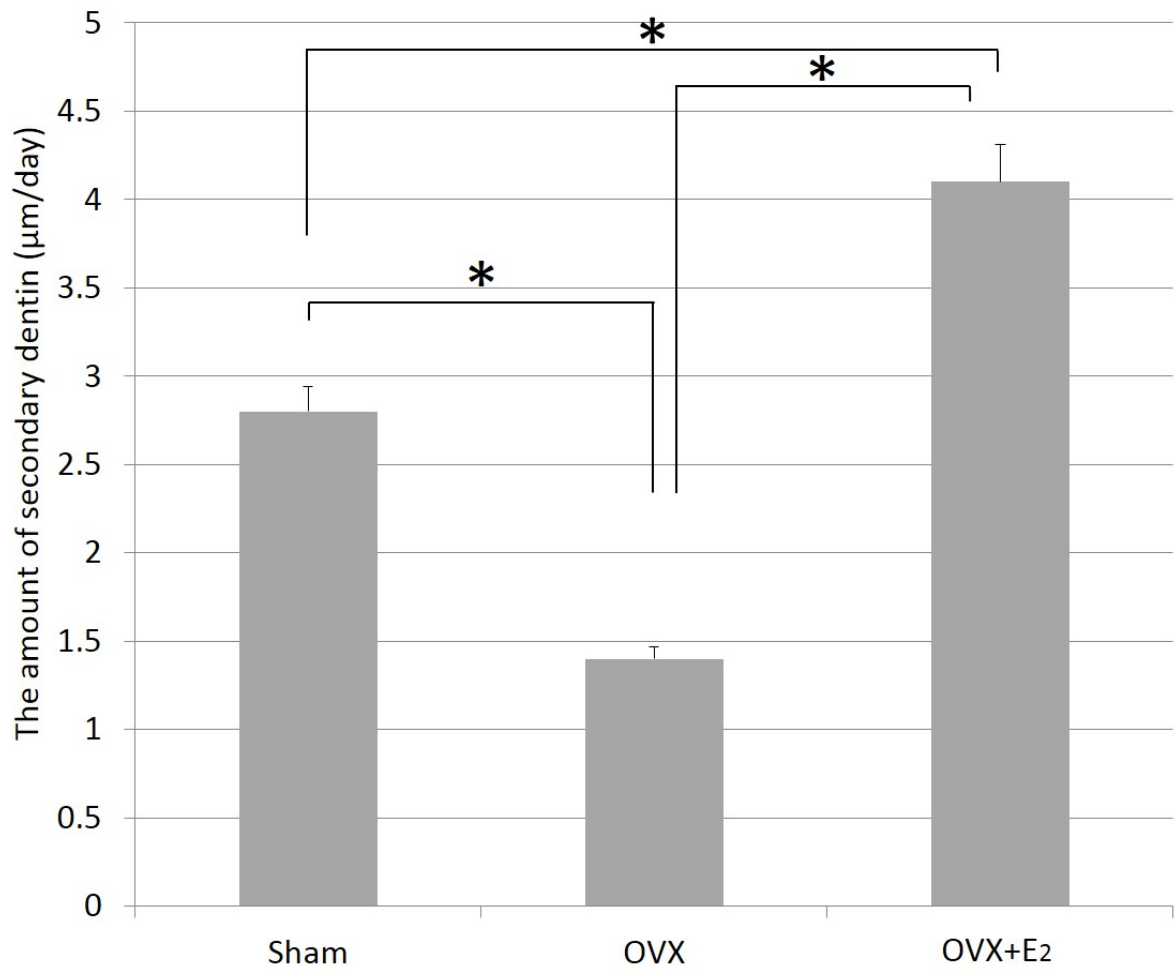
Fig.10

天

井出祐樹

地





\* $p < 0.05$

Fig.11

天

井出祐樹

地