

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

加古 駿輔

論文題目

破骨細胞特異的抑制剤（リベロマイシン A）の局所  
注射が歯牙移動に及ぼす影響について

## I. 緒言

歯科矯正治療において、目的とする歯を移動させる際、固定源となる歯も移動してしまうことが多く認められる。そのため良好な治療結果を得るためには、固定源の確保は不可欠である。歯の移動時には、圧迫側歯槽骨では主に破骨細胞による骨吸収が、牽引側歯槽骨では主に骨芽細胞による骨形成・骨添加が活発になり、モデリングとリモデリングが局所的、選択的に生じている。

近年、破骨細胞活性を選択的に抑制する化合物として、リベロマイシン A (以下 RMA ) が報告されている。RMA は、もともと放線菌の培養液から発見された酸性ポリケチド化合物で通常の細胞には取り込まれにくいですが、酸を分泌して骨をとかす活性化破骨細胞には、酸性環境に依存して選択的に取り込まれる特徴を持ちあわせている。近年の基礎的研究では、薬剤を用いて骨代謝を抑制または促進させることで、マウスにおける歯牙移動のコントロールが可能であるのか検討されている。しかし、荷重負荷の初期における反応を観察している研究が多く、14 日間以上の長期間にわたる歯の移動の報告はほとんど認められない。一般的には、矯正歯科治療では数年間という期間での歯の移動を行い、その通院間隔は術者の経験則より約 3 ～ 4 週間と設定されている。そのため、約 3 週間 (21 日間) 以上の長期間にわたる歯の移動の観察が行えるモデルマウスが作製可能であれば、きわめて臨床に近い形での歯の移動の観察を行うのに有用であると考えられる。

また、薬物の投与方法についても検討する必要がある。Lloydらは、破骨細胞分化因子である RANKL をマウスの腹腔内投与したところ、骨代謝回転を有意に増加させ骨量、石灰化および強度を減少させたと述べているが、副作用として骨粗鬆症のような全身症状を引き起こす可能性も報告されている。一方、RANKL を口腔内局所注射にて投与したところ、破骨細胞活性を局所的に高め、全身的副作用を引き起こすことなく、歯の移動速度を加速させたことが報告がされている。そのため、RMA においても同様に、腹腔内投与を行った場合、全身に薬物が循環されることで目的とする組織以外においても破骨細胞活性が抑制される可能性が考えられる。

そこで今回は、今後の臨床応用を考慮し、正常な骨代謝状態である WT マウスを用いて、21 日間の実験的歯牙移動モデルマウスの作製を行い、RMA の口腔内局所注射を行うことで局所的に破骨細胞活性を抑制し歯牙移動をコントロールできるかどうかを検討することを目的とした。

## II. 実験材料および方法

本研究の実験動物には、生後 8 週齢の雄性 WT マウスを使用した。

三種混合麻酔薬(塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール)の腹腔内投与による全身麻酔下にて、上顎切歯と左側第一臼歯間に 10gf の Ni-Ti closed coil spring を装着することで左側第一臼歯の近心移動を引き起こし (loaded 側)、実験的歯牙移動モデルマウスの作製 (n=6) を行った。反対側である右側第一臼歯部は非牽引側 (unloaded 側) とした。

(1) 歯牙移動モデルマウス作製実験においては歯の移動 3 日後、7 日後、14 日後、21 日後に上顎骨を摘出し、マイクロ CT 撮影を行い、上顎第一臼歯の移動距離計測、傾斜角度の計測を行った。マイクロ CT 撮影後、通法に従って固定、脱灰、パラフィン包埋を行い、 $5\mu\text{m}$  の水平断方向の連続組織切片の作製を行った。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE 染色)、酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行い、光学顕微鏡下で歯周組織を観察した。根間中隔の骨量計測に関しては、Sprogar らの方法に準じて行った。また TRAP 染色を施した後の破骨細胞数計測に関しては、上顎第一臼歯遠心口蓋根 (M1DP) 周囲の歯槽骨表面の距離を計測し、その歯槽骨表面の破骨細胞数を計測した。

(2) RMA 投与実験においては、8 週齢の WT マウス ( $n=6$ ) を用い、RMA 非投与群として生理食塩水を 14 日連続投与する群 (以下 14days RMA-)、21 日連続投与する群 (21days RMA-) と RMA (1.0mg/kg of weight) を 14 日連続投与する群 (14days RMA+)、21 日連続投与する群 (21days RMA+) の 4 群に対し、10gf の Ni-Ti closed coil spring 装着 3 日前より 1 日 2 回の頻度で上顎左側第一臼歯部頬側粘膜に局所注射した。投与濃度、前投与期間については、Tanaka らの論文を参考に行った。歯の移動 14 日後、21 日後に上顎骨と右側脛骨頸部を摘出し、マイクロ CT 撮影を行い上顎第一臼歯の移動距離計測、右側脛骨頸部の骨体積/組織体積 (BV/TV) と骨梁間隔 (Tb. Sp) の計測を行った。その後、歯牙移動モデルマウス作製実験同様に HE 染色、TRAP 染色を行

い、骨量計測および破骨細胞数計測を行った。また屠殺後に血液を採取し、血清 ALP 値および血中 TRAP 値の測定を行った。

### III. 結果

以下に本実験結果を示す。

#### 1. 実験的歯牙移動モデルマウス作製実験について

1) 歯の実験的移動 3 日後には、わずかな歯の移動を認め、その後 14 日後までは有意な差をもつての移動は認められなかった。さらに、14 日後から 21 日後までの間には移動距離が大きくなり、21 日後では 14 日後と比較して移動距離が約 3 倍となった。

2) 歯の傾斜角度、破骨細胞数においては、歯の実験的移動 3 日後、7 日後、14 日後の間では有意な差は認められなかったが、21 日後は 14 日後と比較し、有意な差をもつて歯の傾斜角度は大きくなり、破骨細胞数は多い所見が認められた。

#### 2. リベロマイシン A (RMA) 局所投与実験について

1) 歯の実験的移動 21 日後において RMA+群は RMA-群と比較し、有意な差をもつて根間中隔の骨量が多く、破骨細胞数は減少し、移動距離は減少した。

2) 実験的移動 14 日後および 21 日後ともに RMA+群、RMA-群間において脛骨近位骨端における、骨量、骨梁間隔に有意な差が認められなかった。また、血中 TRAP、血清 ALP に有意な差が認められなかった。

#### IV. 考察

##### 1. 本研究での実験デザインについて

今回用いた超弾性コイルスプリングによる歯の実験的移動モデルでは、マウスの歯に対して一定の力を持続的にかけることができ、数日から数週間にわたって観察できることより、長期間の観察を望む実験モデルに有効であると考えられる。一般的に、歯に矯正力を負荷すると、①歯根膜および歯槽骨の粘弾性特性による初期移動、②硝子様変性組織の出現による歯の移動の停滞、③変性組織の消失と骨改造に伴う歯の再移動、の順に移動様相を示すと言われている。本実験では、歯の移動 3 日後において、わずかな歯の移動を認め、その後 14 日後までは有意な差をもつての移動は認められなかった。その後、歯の移動 14 日後から 21 日後までの間には移動距離が急激に大きくなり、歯の移動 21 日後では 14 日後と比較して移動距離が約 3 倍と大きく移動した。つまり、歯の移動 14 日後から 21 日後にかけて、歯の移動の停滞が終了し、再び歯の移動が行われたと考えられた。それゆえ、21 日間の歯の移動の観察は、歯の移動 14 日以降に起こる新たな移動様相を確認するのに有意義なものであると考えられた。

##### 2. ビスフォスフォネートとリベロマイシン A について

骨代謝をコントロールする薬剤は多数存在するが、代表的な薬剤として、ビスフォスフォネート (BP) 製剤があり、破骨細胞へ直接作用して、破骨細胞の骨吸収を強力に抑制すると報告されている。また近年、BP の経口投与

は、骨粗鬆症性骨折のリスクを軽減するのに効果的であるが、顎骨壊死のリスク増加、非定型大腿骨骨折、心房細動などの副作用が懸念されている。そこで我々は骨代謝をコントロールする薬剤として BP にかわり、RMA に注目した。RMA は破骨細胞活性の抑制を通じて骨転移の抑制に有効であり、また、卵巣摘出マウスやカルシウム欠乏食で飼育したマウスでは、RMA を投与することで、骨粗鬆症の治療効果を示している。さらに、RMA は、経口投与では胃酸により分解され効果がないとされていること、また半減期が約 1 時間と著しく短いことから、口腔領域への局所的に高濃度の投与を行ったとしても、全身的な副作用について配慮する必要がないことは大きな利点であると考えられる。

### 3. RMA 局所投与が骨代謝に及ぼす影響

今回の実験において、歯の実験的移動 21 日後においては、RMA 局所注射により破骨細胞数は有意に減少し、根間中隔の骨量が高い割合で維持され、歯の移動距離に関しても有意に減少していた。また血液検査および脛骨近位骨端における、骨量、骨梁間隔では、実験的歯の移動 14 日後および 21 日後ともに RMA+群、RMA-群間において有意な差が認められなかったことより、RMA 局所注射は全身的な骨芽細胞、破骨細胞に影響は与えないことが考えられた。また反対側である unloaded 側においても RMA 局所注射の影響は認められなかった。以上のことから、今後より詳細な検討は必要であるが RMA 局所注射は、局所における破骨細胞活性をコントロールすることで、全

身的副作用なく歯の移動のコントロールができる可能性が示唆された。

## V. まとめ

正常な骨代謝状態の WT マウスにおいて、超弾性コイルスプリングを用いることで、歯の移動 14 日後から 21 日後の間において大きな歯の移動がおこることが初めて観察され、さらに RMA 口腔内局所注射は全身的副作用なく、歯の移動のコントロールが行える薬剤及び投与方法である可能性が示唆された。