学位論文題名

ラットの実験的歯周炎における骨吸収に対する
ビスフォスフォネート(インカドロネート)投与による影響

Influence of Bisphosphonate (Incadronate) administration
on bone resorption in experimental periodontitis in rats.

学位論文内容の要旨

【目的】

歯周治療においては、歯肉の炎症や歯周ポケット、咬合性外傷を除去し、歯槽骨の吸収を抑制することが重要と考えられている。しかし、歯周病患者の中には高齢や全身疾患などのため歯周外科手術が適応できないなど、骨吸収を抑制するのが難しい症例が存在する。近年、骨吸収抑制作用を有する薬剤としてビスフォスフォネート製剤が開発され、骨粗鬆症やPaget病など骨代謝の改善治療に臨床応用されている。その中でも、ビスフォスフォネート第三世代に属するインカドロネートは、選択的かつ強力な骨吸収抑制作用を発揮し、しかも骨の石灰化障害といった生体への副作用が少ない薬剤として注目されている。そこでインカドロネート投与による、歯槽骨吸収の抑制作用や周囲の歯周組織の変化を明らかに出来れば、歯周病進行抑制は無論のこと治療においても有効であり、特にリスクファクターの高い有病者や高齢者にも応用することが可能となり、社会的にも意義が大きいと考えられる。そこで本研究の目的は、ラットに細菌性因子と外傷性因子により実験的歯周炎を惹起させ、ビスフォスフォネート(インカドロネート)が歯槽骨とその周囲の歯周組織にどのように影響するかを検討することである。

【材料および方法】

本研究は、「北海道大学大学院歯学研究科動物実験に関する指針」に沿って行った。実験動物として10週齢Wistar系雄性ラット53匹を用い、正常群(N群)5匹、ワイヤー結紮群(P群)24匹、ワイヤー結紮+インカドロネート投与群(PB群)24匹に分けた。P群、PB群は、ラットを全身麻酔後、上顎両側第一、第二臼歯歯間部にligature wire(直径0.25mm)を接触点を囲むように挿入結紮し、歯周炎を惹起させた。さらにPB群は、

wire挿入結紮時からインカドロネート（インカドロン酸二ナトリウム〔YM175〕：山之内製薬提供）溶液を24時間毎に腹腔内投与した(1.0mg/kg/day)。実験開始より，N群はwire挿入結紮直前（0日），P群，PB群はwire挿入結紮後1，2，3，5，7日目に屠殺し，通法に従い10%中性緩衝ホルマリン液固定，10%EDTA液脱灰後，5 μ m厚の近遠心的パラフィン連続切片を作製し，H-E染色とTRAP染色を施して，歯間部歯槽骨吸収，破骨細胞の出現状態を病理組織学的及び組織計測学的に検討した。なお組織計測項目は，以下の6項目とした。

- (1)歯根長：この計測は，ラットの歯根が形態的に複雑であり，組織標本が歯軸方向に適切に薄切されているかを確認するために行った。歯根長として，第一臼歯遠心面のCEJから遠心根根尖部までの距離を計測した。
- (2)CEJ～骨頂間距離：第一臼歯遠心面と第二臼歯近心面のCEJを結んだ直線から歯間部歯槽骨頂部までの歯軸方向に平行な距離を計測した。
- (3)残存歯槽骨量：第一臼歯遠心面と第二臼歯近心面のCEJから根尖側へ2mmまでを計測範囲とし，範囲内の歯槽骨面積を計測した。
- (4)破骨細胞数：(3)で述べた計測範囲内において，歯間部歯槽骨表面付近に存在する，破骨細胞の特徴を有する細胞数を計測した。
- (5)破骨細胞数／残存歯槽骨量比：(3)で述べた計測範囲内において，破骨細胞数を残存歯槽骨量で除して求めた。
- (6)破骨細胞数／残存歯槽骨外周長比：(3)で述べた計測範囲内において，破骨細胞数を残存歯槽骨の外周の長さで除して求めた。

統計学的処理は，(1)歯根長に関してKruskal-Wallis検定，また(1)～(6)の全計測項目に関してMann-Whitney *U* 検定にて行った。

【結果】

全実験期間中，各ラットの体重はほとんど変化なく，全身状態は良好に経過した。

○病理組織学的観察—N群では，生理的なりモデリングの起こっている正常な歯周組織が観察された。P群，PB群両群とも，wire挿入結紮後1日目には炎症性細胞浸潤や骨吸収が開始していたが，破骨細胞の出現は少なかった。2～3日目には，P群は炎症が強まり，破骨細胞の出現が増加して急激に骨吸収が進行していたが，PB群は歯間乳頭部に炎症が認められるものの，破骨細胞の出現は少なく，骨吸収も少ない傾向にあった。5～7日目になると，PB群はP群に比較して破骨細胞の出現や炎症が経時的に弱まっており，骨吸収やアタッチメントロスも少ない傾向にあった。

破骨細胞の形態的特徴は，PB群はP群に比較して刷子縁(brush-border)の消失，核の数の増加および変性が経時的に進み，活性が低下したと思われる細胞も観察された。ま

た全実験期間を通して、PB群の骨細胞や骨芽細胞には形態の変化などの悪影響が観察されなかった。

○組織学的計測—歯根長は、全群間で各観察期間毎において両検定を用いても統計学的有意差は認められず、各標本の薄切方向はほぼ一定と思われた。CEJ～骨頂間距離はPB群7日目でP群7日目に比較して有意に小さく、残存歯槽骨量は有意に多かった。また破骨細胞数は、PB群はP群に比較して1日目から有意に少なかったが、7日目には逆にPB群はP群に比較して多かった。しかし破骨細胞数/残存歯槽骨量比、破骨細胞数/残存歯槽骨外周長比は、PB群はP群に比較して7日目を含めて全実験期間を通して有意に小さかった。

【考察および結論】

本研究では、wire挿入結紮後1～3日目にはP群、PB群とも歯槽骨吸収が進み、PB群ではP群に比較して骨吸収が少ない傾向にあり、両群間で有意差はなかったが、破骨細胞数はPB群で有意に減少していた。これらの所見から、急速に進行する歯周炎にインカドロネート投与した場合、薬物投与初期には、骨芽細胞系細胞の影響で前駆細胞から成熟破骨細胞への分化が抑制される作用により、細胞数が減少したと思われる。しかし、破骨細胞の形態や核数の変化は一部に見られたのみであったことから、破骨細胞の活性には影響が少なく、骨吸収抑制作用が十分に発現していなかったと考えられる。一方wire挿入結紮後5～7日目には、P群では残存する骨量が激減しアタッチメントロスが進んでいたのに対し、PB群ではP群に比較して7日目に骨吸収が有意に少なく、アタッチメントロスや歯肉の炎症性反応も少ない傾向にあった。さらに破骨細胞数と残存骨量、残存骨の外周の長さとの比率を求めると、5～7日目にはPB群はP群に比較して両者とも有意に小さく、核数の異常増加など活性低下したと思われる破骨細胞が数多く観察された。これらの結果は、PB群では5～7日間比較的高濃度で継続的にインカドロネート投与を行ったことから、残存骨の表面での成熟破骨細胞への分化が抑制される作用と、さらに破骨細胞の退行性変化を促進する作用により、骨吸収抑制効果が顕著に現れたためと考えられる。

以上のことから、歯周炎に対してインカドロネートを投与することにより、破骨細胞の出現と活性を減少させ、歯槽骨吸収を抑制できる可能性が示唆された。

インカドロネートの歯周治療への臨床応用を考えると、急性に進行している歯周炎の骨破壊を抑制したい場合、さらにはリスクファクターの高い有病者や高齢者などで歯周外科手術といった積極的な治療を行うのが困難な場合などへの応用が考えられ、歯槽骨吸収抑制効果が期待できると思われる。また、インカドロネートは副作用が比較的少ないと報告されているが、臨床応用するにあたって可能な限り副作用の出現を

少なくするために、薬物の至適濃度および局所投与方法などについて検討し、投与量を可及的に少なくすることが必要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

ラットの実験的歯周炎における骨吸収に対する ビスフォスフォネート（インカドロネート）投与による影響

Influence of Bisphosphonate (Incadronate) administration
on bone resorption in experimental periodontitis in rats.

審査は主査、副査が一同に会して論文提出者に対し口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

歯周治療においては、歯肉の炎症や歯周ポケット、咬合性外傷を除去し、歯槽骨の吸収を抑制することが重要と考えられている。しかし、歯周病患者の中には高齢や全身疾患などのため歯周外科手術が適応できないなど、骨吸収を抑制するのが難しい症例が存在する。一方、ビスフォスフォネート第三世代のインカドロネートは、選択的かつ強力な骨吸収抑制作用を発揮し、骨の石灰化障害など副作用が少ない薬剤として注目されている。そこで本研究の目的は、ラットに細菌性因子と外傷性因子により急速に進行する実験的歯周炎を惹起させ、インカドロネートが歯槽骨とその周囲の歯周組織にどのように影響するかを検討することである。

【材料および方法】

実験動物として10週齢Wistar系雄性ラット53匹を用い、正常群（N群）5匹、ワイヤー結紮群（P群）24匹、ワイヤー結紮+インカドロネート投与群（PB群）24匹に分けた。P群、PB群は、ラットの上顎両側第一、第二臼歯歯間部にligature wire（直径0.25mm）を接触点を囲むように挿入結紮し、歯周炎を惹起させた。さらにPB群は、wire挿入結紮時からインカドロネート（YM175：山之内製薬提供）溶液を24時間毎に腹腔内投与した(1.0mg/kg/day)。N群はwire挿入結紮直前（0日）、P群、PB群はwire挿入結紮後1、2、

3, 5, 7日目に屠殺し、通法に従い5 μ m厚の近遠心的パラフィン連続切片を作製し、H-E染色とTRAP染色により、歯間部歯槽骨吸収、破骨細胞の出現状態を病理組織学および組織計測学的に検討した。なお組織計測項目は、(1)歯根長、(2)CEJ～骨頂間距離、(3)残存歯槽骨量、(4)破骨細胞数、(5)破骨細胞数/残存歯槽骨量比、(6)破骨細胞数/残存歯槽骨外周長比の6項目とし、統計学的分析を行った。

【結果】

実験開始後1日目には、P群、PB群両群とも炎症性細胞浸潤や骨吸収が開始していたが、破骨細胞の出現は少なかった。2～3日目には、P群は炎症が強まり、破骨細胞の出現が増加して急激に骨吸収が進行していたが、PB群は破骨細胞の出現や骨吸収が少なかった。5～7日目になると、PB群はP群に比較して炎症と破骨細胞の出現が弱まり、骨吸収やアタッチメントロスも少なかった。なおN群は、正常な歯周組織が観察された。一方PB群の破骨細胞は、P群に比較して刷子縁の消失、核の数の増加および変性といった退行性変化が進み、PB群の骨細胞や骨芽細胞には悪影響が観察されなかった。

組織計測では、歯根長は全群間で有意差はなかった。CEJ～骨頂間距離は7日目にPB群でP群に比較して有意に小さく、残存歯槽骨量は有意に多かった。破骨細胞数は、PB群はP群に比較して1日目から有意に少なかったが、7日目には逆にPB群はP群に比較して多かった。しかし破骨細胞数/残存歯槽骨量比、残存歯槽骨外周長比は、PB群はP群に比較して7日目を含めて全実験期間を通して有意に小さかった。

【考察および結論】

インカドロネートの作用機序は、骨基質に極めて強い親和性を有していることから、骨基質を介して分化した破骨細胞に取り込まれて、その退行性変化を促進することにより骨吸収を抑制する作用と、骨芽細胞系の細胞を介して破骨細胞の前駆細胞の分化を減少させることにより骨吸収を抑制する作用の二つが一般的に考えられている。本研究では、実験開始後1～3日目には骨吸収はP群、PB群両群で差は少なかったが、破骨細胞数はPB群で有意に少なかった。これらの所見から、インカドロネート投与の初期には後者の作用機序により破骨細胞数が減少したと考えられるが、破骨細胞の形態変化への影響は少なく、前者の作用機序が十分に発現していなかったと思われる。一方7日目には、PB群ではP群に比較して骨吸収が有意に少なく、破骨細胞数と残存骨量および残存骨の外周の長さとの比率が有意に小さく、退行性変化を逃げた破骨細胞も数多く観察された。これらの結果は、PB群で比較的高濃度のインカドロネートの継続投与を行ったことから、前者と後者の作用機序により骨吸収抑制効果が顕著に現れたためと考えられる。

以上のことから、歯周炎に対してインカドロネートの投与により、破骨細胞の出現と活性を減少させ、歯槽骨吸収を抑制できる可能性が示唆された。

引き続き審査担当者と申請者との間で、論文内容および関連事項について質疑応答がなされた。これらの質問に対して、申請者は本研究から得られた知見と参考文献を引用して明確かつ適切な回答を行った。特に本研究では、臨床的にも重要な細菌性因子と外傷性因子により急速に進行する実験的歯周炎モデルを用いて、インカドロネートを投与した場合の歯槽骨吸収への影響に対して検討を行いその有効性を明らかにし、臨床応用の可能性が高いことを示唆した点で高い評価を受けた。以上のことから、本研究は歯科医学の発展に貢献するものと考え、博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。