

学 位 論 文 題 名

ラット抜歯創治癒過程におよぼす Bisphosphonate の
全身ならびに局所投与による影響について

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、Bisphosphonates (BPs) は強力な骨吸収抑制剤として、骨粗鬆症、Paget's Diseaseや悪性腫瘍における高カルシウム血症の治療薬として臨床的に使用されている。歯科領域においては、実験的歯根吸収抑制に関する報告や、実験的歯周炎による骨吸収の抑制に関する報告などの基礎的研究がなされている。しかしながら、それらの研究のほとんどが、全身投与による実験であり、局所の骨吸収の抑制のみならず、全身の骨吸収の抑制や副作用などのリスクを伴うものである。口腔領域における歯周疾患などによる局所的な骨吸収に対してBPsの局所投与による有効性について明らかにすることは、その適応範囲の拡大にもつながり臨床的にも意義のあることと思われる。

一方、抜歯創はその治癒過程の比較的初期に活発な破骨細胞性骨吸収が起こることが知られており、BPsの骨組織への基本的な影響を検索する場合、抜歯創は有用な検索部位であると考えられるが、そのような検索はほとんどみられない。

そこで本実験では、BPsを全身的ならびに、局所的に投与し、ラットの抜歯創治癒過程におけるBPsの基本的な影響を明らかにする目的で、脛骨および抜歯創治癒過程を病理組織学的、組織計量学的、免疫組織化学的および電顕的に検索した。

【材料と方法】

生後約6週齢、体重120～130gのWistar系雄性ラットを用い、以下の3群にわけた。

- (1) 生理食塩水を投与した対照群 (C群)
- (2) BPs全身投与群 (G群)
- (3) BPs局所投与群 (L群)

各群5匹用い、エーテル麻酔下で以下の処置を行った。G群には背部皮下へBPsを1.25mg/kgB.W.を0.5ml投与した。L群には、ラット上顎左側口蓋粘膜下に、BPs (896 μ mol/l) を30 μ l局所注射した。C群には上顎左側口蓋粘膜下に生理食塩水を30 μ l投与した。各群とも投与48時間後に、エーテル麻酔下にて、上顎左側第1臼歯を抜去した。

通法に従いパラフィン包埋した標本は、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE)、アザン・マロリー染色 (AM) および酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色 (TRACP)、抗5-bromo-2' deoxyuridine 免疫染色 (BrdU) を施した。

1. 病理組織学的検索：抜歯後1, 3, 5, 7, 14日後に各5匹ずつ、エーテルの吸入により安楽死させた。各群とも、上顎骨、脛骨を取り出し、抜歯窩の治癒過程に

における骨組織の動態と脛骨の経時的変化を病理組織学的に検索した。

2. 組織計量学的検索：抜歯窩の形態学的変化を定量的に把握するため、抜歯後14日目までの、脛骨骨幹部破骨細胞数、抜歯窩内破骨細胞数、破骨細胞核数、抜歯窩底部骨新生量および抜歯窩外側の骨膜性骨新生量を計測した。

3. 免疫組織化学的検索：抜歯窩底部および外側の骨膜性骨新生部のBrdU陽性細胞数の計測をした。

4. 電顕的検索：ラットを3群とも、組織学的検索と同様にBPs投与、抜歯を行い経時的に安楽死させ、抜歯窩を含む上顎骨を摘出し、中隔歯槽骨表面に出現した破骨細胞を中心に電顕的に観察した。

【結果と考察】

脛骨骨幹部においてC、L群は、破骨細胞数に有意差は認められなかった。一方、G群は3、5日目ではC、L群に比べて有意に多くの破骨細胞がみられたが、破骨細胞は全般に小型で不整形あるいは扁平なものが多くみられた。本実験で行った口蓋粘膜下へのBPsの局所投与は、口腔内の投与部位以外には強い影響を与えないものと考えられた。

抜歯創においてG群の抜歯後3日目では、TRACP陽性を示す破骨細胞がみられたが、C群に比べ大型で不整形、扁平になる傾向が認められた。抜歯後3日目の中隔歯槽骨にみられた破骨細胞は、電顕的にもruffled borderの発達はC群に比べ、全般に不良で、細胞に占める割合が少なく、指状突起は短く、突起間の空隙は狭く平板状を呈していた。また、ほとんどruffled borderの突起がみられずに骨に密着した破骨細胞もみられた。破骨細胞数はC群に比べ有意に少なかった。また核数も増加する傾向を示した。抜歯窩底部の梁状の新生骨の形成はほとんどみられなかった。抜歯窩外側の骨膜はC群と同様に広範囲に肥厚し、頬側および窩底部では梁状の新生骨が認められ、頬側根抜歯窩底部の新生骨量は、G、L両群では、経時的に増加する傾向を示すものの、その値はC群に比し小さく、抜歯後5日目の新生骨面積は、G、L両群でC群の約30%であり、有意差が認められた。抜歯窩底部および外側の骨膜性新生骨周囲にBrdU陽性細胞がみられたが、C、L群に有意差はみられなかった。局所投与群（L群）でもG群とはほぼ同様の所見がみられた。抜歯窩内では骨新生に先立ち、抜歯により損傷された歯槽骨の骨質の吸収除去が行われることにより、骨芽細胞による骨新生が進むと考えられ、BPs投与群では、抜歯創の治癒過程の早期にみられるBPsによるruffled borderを中心とする微細構造の変化に基づく個々の破骨細胞の機能障害に起因する破骨細胞性骨吸収の阻害により、その後の、骨新生が遅延したと考えられた。

抜歯窩外側の骨膜性骨新生部において、新生骨量は、C、G、Lの3群とも経時的に同様の増加傾向を示し、有意差はみられなかった。抜歯窩外側の骨膜部では破骨細胞による骨吸収に依存しない骨新生が生ずるものと考えられた。

抜歯窩底部および外側の新生骨部のBrdU陽性細胞において窩底部の新生骨周囲のBrdU陽性細胞数は、G、L群においてはC群と比較してBrdU陽性細胞数に有意な差が認められなかった。また、抜歯窩外側の骨膜性骨新生部における新生骨周囲のBrdU陽性細胞は組織学的所見から骨芽細胞と思われるが、その数はG、L群においてC群と比較して有意な差が認められなかった。このような所見は、BPsの全身投与および局所投与による抜歯窩底部の骨新生部および抜歯窩外側の骨膜性骨新生部に出現する細胞の増殖能に及ぼす直接的影響は少ないことを示唆しているものと思われた。

【結語】

BPsの抜歯創治癒過程における骨組織への影響を明らかにする目的で、全身的ならびに局所的にBPsを投与したラットの抜歯創治癒過程における骨の吸収、新

生を中心に、組織学的、組織計量学的、免疫組織化学的、および電顕的に検索し、その結果を検討したところ、以下の結論を得た。

1. BPs投与群では、全身投与群、局所投与群とも、抜歯創の治癒過程に遅延が認められた。
2. 脛骨骨幹部の破骨細胞においてBPs全身投与群では、形態的变化がみられたが、BPs局所投与群では、変化はみられなかった。
3. BPs投与群では、治癒過程における抜歯窩中隔歯槽骨の破骨細胞性骨吸収が減少する傾向を示し、抜歯窩底部の骨新生の障害が認められたが、抜歯窩外側の骨膜性骨新生の障害は認められなかった。
4. 組織計量学的にも、BPs投与群では対照群に比べ、中隔歯槽骨部の破骨細胞数は減少し、抜歯窩底部の骨新生量は減少していたが、抜歯窩外側の骨膜性骨新生量には変化がみられなかった。
5. 電顕的には、BPs投与群の抜歯窩中隔歯槽骨の破骨細胞は対照群に比し、ruffled borderの発達が不良で、骨吸収機転の障害が認められた。

以上、BPsを全身的ならびに局所的に投与した場合、抜歯窩の治癒は遅延することが明らかになったが、治癒の遅延には、BPsによる破骨細胞の微細構造的変化に基づく骨吸収の障害が大きな要因となっていることを示唆するものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 畑 昇

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

ラット抜歯創治癒過程におよぼす Bisphosphonate の 全身ならびに局所投与による影響について

審査は、提出論文とそれに関連した学科目について、申請者に対して各審査委員が口頭試問により行い、各審査委員の報告を元に主査がその結果をまとめた。

近年、Bisphosphonates (BPs) は強力な骨吸収抑制剤であり、臨床でも使用されている。しかし、全身投与でしか使用されておらず、局所の骨吸収の抑制のみならず、全身の骨吸収の抑制や副作用などのリスクを伴うものである。口腔領域における歯周疾患などによる局所的な骨吸収に対してBPsの局所投与による有効性について明らかにすることは、その適応範囲の拡大にもつながり臨床的にも意義のあることと思われる。本研究では、BPsを全身的ならびに、局所的に投与し、ラットの抜歯創治癒過程におけるBPsの基本的な影響を明らかにする目的で、脛骨および抜歯創治癒過程を病理組織学的、組織計量学的、免疫組織化学的および電顕的に検索した。

【材料と方法】

生後約6週齢のWistar系雄性ラットを用い、以下の3群にわけた。

- (1) 生理食塩水を投与した対照群 (C群)
- (2) BPs全身投与群 (G群)
- (3) BPs局所投与群 (L群)

各群5匹用い、エーテル麻酔下で以下の処置を行った。G群には背部皮下へBPsを1.25mg/kgB.W.を0.5ml投与した。L群には、ラット上顎左側口蓋粘膜下に、BPs (896mmol/l) を30ml局所注射した。C群には上顎左側口蓋粘膜下に生理食塩水を30ml投与した。各群とも投与48時間後に、エーテル麻酔下にて、上顎左側第1臼歯を抜去した。

通法に従いパラフィン包埋した標本は、H-E染色、アザン・マロリー染色および酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色 (TRACP)、抗5-bromo-2' deoxyuridine免疫染色 (BrdU) を施した。

1. 病理組織学的検索：抜歯後1、3、5、7、14日後に各5匹ずつ、エーテルの吸入により安楽死させた。各群とも、上顎骨、脛骨を取り出し、抜歯窩の治癒過程における骨組織の動態と脛骨の経時的变化を病理組織学的に検索した。
2. 組織計量学的検索：抜歯窩の形態学的変化を定量的に把握するため、抜歯後14日目までの、脛骨骨幹部破骨細胞数、抜歯窩内破骨細胞数、破骨細胞核数、抜歯窩底部骨新生量および抜歯窩外側の骨膜性骨新生量を計測した。

3. 免疫組織化学的検索：抜歯窩底部および外側の骨膜性骨新生部のBrdU陽性細胞数の計測をした。

4. 電顕的検索：組織学的検索と同様に、抜歯窩を含む上顎骨を摘出し、中隔歯槽骨表面に出現した破骨細胞を中心に電顕的に観察した。

【結果と考察】

脛骨骨幹部においてC、L群は、破骨細胞数に有意差は認められなかった。一方、G群は3、5日目ではC、L群に比べて有意に多くの破骨細胞がみられたが、破骨細胞は全般に小型で不整形あるいは扁平なものが多くみられた。本実験で行った口蓋粘膜下へのBPsの局所投与は、口腔内の投与部位以外には強い影響を与えないものと考えられた。

抜歯創においてG群の抜歯後3日目では、TRACP陽性を示す破骨細胞がみられたが、C群に比べ大型で不整形、扁平になる傾向が認められた。抜歯後3日目の中隔歯槽骨にみられた破骨細胞は、電顕的にもruffled borderの発達にC群に比べ、全般に不良で、細胞に占める割合が少なく、指状突起は短く、突起間の空隙は狭く平板状を呈していた。破骨細胞数はC群に比べ有意に少なかった。また核数も増加する傾向を示した。抜歯窩底部の梁状の新生骨の形成はほとんどみられなかった。抜歯窩外側の骨膜はC群と同様に広範囲に肥厚し、頬側および窩底部では梁状の新生骨が認められ、頬側根抜歯窩底部の新生骨量は、G、L両群では、経時的に増加する傾向を示すものの、その値はC群に比し小さく、抜歯後5日目の新生骨面積は、G、L両群でC群の約30%であり、有意差が認められた。抜歯窩底部および外側の骨膜性新生骨周囲にBrdU陽性細胞がみられたが、C、G群に有意差はみられなかった。L群でもG群とほぼ同様の所見がみられた。抜歯窩内では骨新生に先立ち、抜歯により損傷された歯槽骨の骨質の吸収除去が行われることにより、骨芽細胞による骨新生が進むと考えられ、BPs投与群では、抜歯創の治癒過程の早期にみられるBPsによるruffled borderを中心とする微細構造の変化に基づく個々の破骨細胞の機能障害に起因する破骨細胞性骨吸収の阻害により、その後の、骨新生が遅延したと考えられた。

抜歯窩外側の骨膜性骨新生部において、新生骨量は、C、G、Lの3群とも経時的に同様の増加傾向を示し、有意差はみられなかった。抜歯窩外側の骨膜部では破骨細胞による骨吸収に依存しない骨新生が生ずるものと考えられた。

抜歯窩底部および外側の新生骨部のBrdU陽性細胞において窩底部の新生骨周囲のBrdU陽性細胞数は、G、L群においてはC群と比較してBrdU陽性細胞数に有意な差が認められなかった。また、抜歯窩外側の骨膜性骨新生部における新生骨周囲のBrdU陽性細胞の数はG、L群においてC群と比較して有意な差が認められなかった。このような所見は、BPsの全身および局所投与による抜歯窩底部および抜歯窩外側の骨新生部に出現する細胞の増殖能におよぼす直接的影響は少ないことを示唆するものと思われた。

【結語】

BPsを全身的ならびに局所的に投与した場合、抜歯窩の治癒は遅延することが明らかになったが、治癒の遅延には、BPsによる破骨細胞の微細構造的変化に基づく骨吸収の障害が大きな要因となっていることを示唆するものと思われた。

各審査委員が行った主な質問事項は以下の通りである。

- 1) BPsはどのように破骨細胞の活性を抑制するのか。
- 2) BPsの作用機序はどういうものか。
- 3) BPs投与群で破骨細胞の核数が増加するのはなぜか。
- 4) 抜歯後14日目で抜歯窩底部の骨新生量が同じになるのはどうしてか。
- 5) 破骨前駆細胞、単核や多核の破骨細胞では、BPsの作用が違うのか。
- 6) BPs投与前と投与後に出現した破骨細胞ではBPsの作用は違うか。
- 7) 局所投与でBPsはどのくらいの範囲に拡散しているのか。
- 8) 抗BrdU免疫染色は、なにを検索するためにおこなったのか。

- 9) BPs投与を抜歯48時間前に設定したのはどうしてか。
- 10) 本研究結果の臨床応用への展望について

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答ならびに説明が得られ、さらに今後の研究についても明確な方向性をもっていると判定した。

審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。