

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

青木 勇樹

論文題目

歯の後戻りに対する破骨細胞特異的抑制剤  
(リベロマイシン A) の効果について

## I. 緒言

矯正歯科治療後のリスクとして知られている後戻りは、多くの矯正医が悩まされる大きな問題であり古くから議論がなされている。临床上、後戻りが起こると機能障害や審美障害が発生し、程度が大きい場合は再治療が必要になる場合もある。新たな保定の方法として、骨のリモデリングを阻止することで後戻りを防ぐことを目的とした生物学的研究が行われている。

矯正治療における歯槽骨のリモデリングを調整する主な因子は RANK / RANKL / OPG である。これらの因子により破骨細胞の分化・成熟・機能が調節され石灰化した骨組織の破壊、吸収が行われる。骨の恒常性の維持にも欠かすことができないこれらの因子を生物学的製剤や薬剤でコントロールすることで後戻りが抑制する報告もある。

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 は標的分子であるイソロイシル転移 RNA (tRNA) 合成酵素の活性を抑制する。破骨細胞の生存に必要なイソロイシルの蛋白質合成を阻害することで、破骨細胞をアポトーシスへと導き骨吸収を阻害する。 *in vivo* では骨粗鬆症の抑制や癌の骨転移の抑制、歯周病の抑制や歯牙移動の抑制効果が示されている。

本研究では、正常な骨代謝機構を有するマウスを用いて 21 日間の実験的歯牙移動マウスの作成を行い、7 日間の保定を行った後、14 日間の後戻り

を観察した。持続的矯正力を加え歯の移動を行った後、歯の後戻りのコントロールがRMAを投与することで可能か、つまり、破骨細胞活性を抑制することで歯の後戻りの抑制が可能か考察し、後戻りに関する骨代謝機構を解明することを目的とした。

## II. 実験材料および方法

### 1. 動物

本研究の実験動物には、生後8週齢の雄性マウス(C57BL/6J)を使用した。これらのマウスは、CLEA Japanより購入し、愛知学院大学歯学部動物実験室にて飼育した。飼育環境は、室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、照明時間を12時間サイクルで一定にした。飼料はCE-2型粉末飼料とし、また飲料水は水道水を用い、共に自由摂取とした。

### 2. 本実験のタイムスケジュールと実験方法

全身麻酔下にて口腔内に歯牙移動装置の装着を行い、上顎左側第一臼歯の近心移動を開始した。上顎左側第一臼歯の近心移動を引き起こし、実験的歯牙移動を開始するマウスの作成(n=10)を行った。21日間の歯牙移動終了後、全身麻酔下にて口腔内の歯牙移動装置の撤去を行い、印象を採得し、実体顕微鏡で撮影を行った。また、上顎左側第一臼歯、第二臼歯の咬合面に歯科用エッチング剤を塗布し接着処理を行った後、コンポジットレジン

を築盛し器械的保定を 7 日間行った。器械的保定終了後、コンポジットレジン<sup>®</sup>の撤去を行い、上顎の印象を採得し、実体顕微鏡で撮影を行った。器械的保定を除去し、後戻り開始時、後戻り開始後 3 日目、7 日目、14 日目に全身麻酔下にて上顎の印象を採得し、実体顕微鏡で撮影を行い歯の後戻りの経時的な変化の観察を行った。

### 3. リベロマイシン A (RMA) 投与

21 日間の歯牙移動の後に 7 日間の器械的保定が成功したマウス (n=10) を、RMA 非投与群 (以下 RMA-群) と RMA 投与群 (以下 RMA+群) の 2 群 (各 n=5) に無作為に分けた。RMA-群は生理食塩水を後戻り観察開始前 3 日前より 17 日間連続投与、RMA+群は RMA (1.0mg/kg of weight) を後戻り観察開始前 3 日前より 17 日間連続投与を行った。生理食塩水と RMA は 1 日 2 回の頻度で皮下投与を行った。

### 4. 距離計測

親水性ビニルシリコーン印象材にて上顎の印象を採得し、実体顕微鏡で撮影を行った。上顎の印象面の第一臼歯遠心歯頸部と第二臼歯近心歯頸部の最狭窄部を ImageJ にて距離計測を行った。

### 5. マイクロ CT 撮影

後戻りの観察が終了した後、上顎骨を採取し、マイクロ CT にて撮影を行った。根間中隔の骨量計測の解析は TRI/3D-BON で行った。

## 6. 病理組織学的観察

採取した上顎骨を、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。次に、10%EDTA (pH7.2) で約4週間、4°Cの条件下で脱灰し、パラフィン包埋を行い、5 $\mu$ mの水平断方向の連続組織切片を作製した。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ACID PHOSPHATASE、LEUKOCYTE KITを用いて行い、光学顕微鏡下で歯周組織を観察した。

## 7. 統計的処理

得られた実験データは平均値と標準誤差で示し、Shapiro-Wilk testにてデータの正規性を確認し、統計的な有意差検定は一元配置分散分析を用いた。全ての統計解析は、Graph Pad Prism v. 7を用いて行った。P<0.05を統計学的有意差ありと判断した。

## III. 結果

### 1. 実験的歯牙移動と後戻り

#### 1) 移動距離

21日間の実験的歯牙移動と7日間の器械的保定が終了したマウスの上顎第一臼歯と上顎第二臼歯の間の距離は254.3( $\pm$ 20.6) $\mu$ mであった。また実験的歯牙移動終了時と器械的保定終了時において、上顎第一臼歯と上顎第

二臼歯の間の距離に有意な差を認めなかった。実験的歯牙移動を終了したマウスを無作為に RMA+群と RMA-群の 2 群に分け後戻りの観察を行った。後戻り観察開始時の距離は RMA+群は  $255.6(\pm 42.5) \mu\text{m}$  であり RMA-群は  $253.0(\pm 10.4) \mu\text{m}$  であった。RMA+群と RMA-群 2 群間に、後戻り観察開始時の距離に有意な差を認めなかった。

RMA+群と RMA-群共に上顎第一臼歯と上顎第二臼歯の間の距離の減少がすべてのマウスで観察された。RMA-群と RMA+群において後戻り観察開始時と後戻り観察終了時の距離を比較し、上顎第一臼歯と上顎第二臼歯の間の距離は有意な減少を認めた。3 日間で後戻りした量は RMA+群が  $34.4(\pm 6.9) \mu\text{m}$ 、RMA-群が  $71.4(\pm 11.7) \mu\text{m}$  であり、RMA+群は RMA-群と比較して有意な減少を認めた。7 日間で後戻りした量は RMA+群が  $71.8(\pm 12.3) \mu\text{m}$ 、RMA-群が  $99.8(\pm 10.1) \mu\text{m}$  であり、RMA+群は RMA-群と比較して有意な差を認めなかった。14 日間で後戻りした量は RMA+群が  $94.2(\pm 18.6) \mu\text{m}$ 、RMA-群が  $141.8(\pm 3.6) \mu\text{m}$  であり、RMA+群は RMA-群と比較して有意な減少を認めた。

## 2) 骨量(BV/TV)計測

後戻り観察終了時において上顎左側第一臼歯歯根の根間中隔の CT における BV/TV は RMA+群が  $59.4(\pm 2.8)\%$ 、RMA-群が  $47.9(\pm 4.2)\%$  であった。RMA+群は RMA-群と比較し、有意な差をもって BV/TV が大きい値を示し、根間中隔の骨量が維持された。

### 3) 歯周組織の HE 染色組織所見

後戻り観察終了時において上顎左側第一臼歯歯根の根間中隔の HE 染色における BV/TV は RMA+群が  $60.1(\pm 3.5)\%$ 、RMA-群が  $46.1(\pm 1.4)\%$ であった。RMA+群は RMA-群と比較し、有意な差をもって BV/TV が大きい値を示し、根間中隔の骨量が維持された。

### 4) 破骨細胞数の計測

後戻り観察終了時における上顎左側第一臼歯遠心口蓋根遠心側の破骨細胞は RMA+群が  $0.85(\pm 0.23)$  個/mm、RMA-群が  $1.94(\pm 0.10)$  個/mm であった。RMA+群は RMA-群と比較し、有意な差をもって破骨細胞数が少ない所見が認められた。

## IV. 考察

歯牙移動の生物学的メカニズムを解明するため、現在までに動物実験が盛んに行われてきた。口腔内に装置を装着する外科手術は大型動物の方が行いやすいため、矯正分野で行われる基礎研究においてはマウスを用いた動物実験は少ない。後戻りの観察を行うには歯牙移動距離が大きい方が保定時における歯の移動の変化の観察に有利であると考えられた。今回の研究においては第一臼歯歯冠幅径の約 15~20%である  $254.3(\pm 20.6) \mu\text{m}$  という大きな歯の移動を観察することができた。21 日間という長期にわたり安

定した歯牙移動を観察できた理由として、第一臼歯の固定を矯正用結紮線で歯頸部にクローズドコイルを固定したこと、3.0mm から 15.0mm まで伸展させても 10gf の力がかかり続ける特殊な Ni-Ti closed coil spring を用いたこと、Ni-Ti closed coil spring の固定源を穿通した上顎骨にすることで反作用を防止し強固な固定を行うことができたことが考えられた。

RMA により 14 日間の後戻り観察中の初期の後戻りを抑制していることが観察できた。in vivo において、後戻りは装置の撤去後に急速に引き起こされることが多く報告されているため、本実験において特に歯牙の位置が大きく変化する後戻り観察開始後 3 日間の後戻りを抑制できたことは、後戻りをした全体の距離を減少することができたと考えられた。臨床においては動的治療が数年であるのに対し、保定治療開始後数ヶ月で後戻りが発生すると言われているため保定治療の初期の後戻りの抑制は非常に重要である。器械的な保定装置の使用と RMA の投与を併用し後戻りを抑制することは今後の保定治療の治療戦略の一つとなる可能性がある。

現在までに解明されている後戻りに関与する因子は歯槽骨と歯根膜線維のリモデリングであると言われている。歯の後戻りが観察される際も、後戻りする方向に破骨細胞が認められることが報告されている。本実験では RMA により破骨細胞活性を抑制することで後戻りの抑制が可能であるか検討を行った。RMA はトリカルボン酸を有する酸性物質であるため、酸を分泌して



骨を溶かす活性型破骨細胞に対して、酸性環境に依存して選択的に細胞内に取り込まれアポトーシスを誘発する化合物である。CT 所見と HE 所見においては RMA により骨量を維持する結果を得ることができ、TRAP 染色による組織学的所見においては後戻りを起こす方向の歯根周囲の破骨細胞の減少を認め後戻りが抑制された。これまでにビスフォスフォネートや OPG タンパク質や抗 c-Fms 抗体により破骨細胞活性を抑制し後戻りを抑制したという報告がされてきたが、今回の我々の結果はこれらの報告を支持するものとなった。歯根膜線維のリモデリングも後戻りに対する一つの因子であると報告もあるが詳細については不明な点が多い。本実験では破骨細胞活性の抑制による後戻りの抑制に焦点を当てて報告を行ったが、今後歯根膜線維や骨芽細胞による後戻りの抑制などにも着目し、より詳細な研究を行っていく必要があると考えられる。

## V. 結論

後戻り観察モデルマウスを作成することでマウスの実験的歯牙移動後の後戻りを観察することができ、RMA の投与により破骨細胞活性を抑制し歯槽骨骨量を維持することで後戻りを抑制したと考えられた。また矯正治療後の後戻りに破骨細胞活性が関与している可能性が示唆され、RMA は後戻りの抑制に有益な効果がある治療薬となる可能性が示唆された。