

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

浅野 雄一郎

論文題目

破骨細胞特異的抑制剤（リベロマイシン A）の局所軟膏塗布が歯槽骨吸収に及ぼす影響について

I. 緒言

近年、矯正歯科治療を希望する患者に、成人患者が増加している。成人患者は、処置歯や補綴歯、または欠損歯を有することから治療メカニクスが複雑になることが多く、さらには、歯周病により歯周組織が脆弱化していたり、骨粗鬆症などの全身疾患を有していることが少なくない。

通常、歯周組織において、歯槽骨の恒常性は、骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞により保たれているが、骨粗鬆症のような全身疾患や歯周病を有する患者は、骨の恒常性が破綻し、歯周組織が脆弱化し著しい骨吸収を起こす可能性がある。破骨細胞の分化・成熟・機能は、骨芽細胞あるいは骨髄間質細胞の細胞膜上に発現する RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) によって調節されている。破骨細胞とその前駆細胞はこの RANKL を認識し、成熟破骨細胞に分化する。一方、骨芽細胞が産生する Osteoprotegerin (OPG) は、RANKL のデコイレセプターとして破骨細胞形成を抑制している。この OPG の遺伝子を欠損しているマウス (OPG KO マウス) は、成長に伴い破骨細胞活性が亢進するため、病態が類似している骨粗鬆症や歯周病により歯周組織が脆弱した患者の歯槽骨を調べる上で非常に有用と考えられている。

現在、歯周病の進行抑制としては、機械的清掃の他、抗菌薬による原因菌の除去や抗炎症薬による炎症の軽減を目的とした局所の薬物投与が行われている。一方、最近の歯周病研究の一つとして、炎症のみならず骨吸収

の制御に焦点を合わせて病態を把握し治療法を考えることが重要であると指摘されている。そこで本研究では、近年開発された、破骨細胞特異的抑制剤であるリベロマイシン A(以下 RMA)に着目した。RMA は、半減期が短く、骨吸収能を有する活性型破骨細胞に選択的に取り込まれ、アポトーシスへと導くことで骨吸収を阻害することが報告されている。

我々はこれまでに、実験的に歯周病を誘発させた OPG KO マウスに RMA を腹腔内投与したところ歯槽骨の吸収の抑制が可能であることを発見した。そこで本研究では、将来的な臨床応用を見据え、非観血的に、口腔内に局所投与するために新規軟膏を作成し、実験的歯周病モデルマウスにおいて、破骨細胞活性を抑制し歯槽骨の吸収の抑制ができるかどうかを検討した。

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 マウスおよび OPG KO マウスを使用した。試薬は 1%Indigo Carmine(青色 2 号)配合シリコーン系軟膏及び、RMA 含有シリコーン系軟膏を用いた。

(1) 8 週齢のマウス (n=10) に対し、1%Indigo Carmine 配合軟膏をマウスの上顎左側第一臼歯周囲に塗布し、色素含有軟膏の口腔内への残存率を経時的に確認した。この際、マウスが軟膏を舐めないよう、舌先端 1/3 を水平的に舌深部まで搔皮した群を舌運動制御群とし、何もしていない群との比較を行った。

(2) 次に、三種混合麻酔薬 (塩酸メデトミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトル

ファノール) を腹腔内投与し、上顎左側第一臼歯、第二臼歯間のコンタクトポイントを囲むように 0.1mm 径のステンレススチールワイヤーを結紮することで、フードインパクションを引き起こし実験的歯周病モデルマウスの作成を行った。8週齢のマウス (n=8) に対し、結紮線を結紮後、1日に3回の頻度で1%RMA含有軟膏を結紮部周囲に局所塗布し、対照群には同量のRMA未配合である基材のみの軟膏を塗布した。この時、WTおよびOPG KOマウスそれぞれにおいて、結紮もRMA投与も行っていない群(WT control、OPG KO control)、結紮をしてRMA投与を行っていない群(WT RMA⁻、OPG KO RMA⁻)、結紮をしてRMA投与を行った群(WT RMA⁺、OPG KO RMA⁺)に分類した。

結紮線装着から8週間後、上顎骨を採取しマイクロCTにて撮影を行い、Parkらの方法を一部改変し、上顎第一臼歯と第二臼歯間の計測範囲内の歯槽骨残存部分の体積を計測し、全体積に占める割合を歯槽骨残存率とした。

摘出した上顎骨は、通法に従って固定、脱灰、パラフィン包埋を行い、5 μ mの近遠心方向の連続組織切片を作製した。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、第一臼歯遠心面のアタッチメントレベルの割合を計測した。また、TRAP染色を行い、上顎第一臼歯と第二臼歯間の歯槽中隔部の歯槽突起部表面の破骨細胞数(N.Oc/BS)を計測した。さらにTNF- α 、IL-1 β 、IL-6による免疫染色を行い、Rogersらの方法に準じて染色強度を判定した。屠殺時に血液を採取し、血中TRAP値および血清ALP値の測定を行った。

統計的処理として、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 (Turkey' s multiple comparison test) を用いた。全ての統計解析は、Graph Pad Prism v. 7 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) 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

以下に本実験結果を示す。

1. RMA 含有軟膏の薬剤徐放性および色素含有軟膏残存評価

RMA 含有軟膏の薬剤徐放性としては、16 時間で 27%、44 時間で 60% の徐放を示し、徐々に RMA が徐放している様相がみられた。軟膏の残存率について、舌運動制御群はコントロール群に比較し、軟膏が長く残存し、塗布後 4 時間後まで残存している所見を認めた。

2. 歯槽骨残存率、アタッチメントレベルの割合、破骨細胞数および免疫

染色におけるスコアの比較

結紮を施した WT RMA- と OPG KO RMA- は、非結紮群に比較してともに有意な差をもって歯槽骨残存率の減少、アタッチメントレベルの割合の増加、破骨細胞数の増加および TNF- α 、IL-1 β における染色スコアの増加が認められた。また、WT RMA+ と OPG KO RMA+ は、WT RMA- と OPG KO RMA- に比較し有意な差をもって、歯槽骨残存率の増加、アタッチメントレベルの割合の減少、破骨細胞数の減少および TNF- α 、IL-1 β における染色スコアの減少

が認められた。

3. 血清骨代謝マーカーの測定

RMA 含有軟膏の経口投与群、RMA 非含有軟膏の局所塗布群および RMA 含有軟膏の局所塗布群は、すべて WT マウス、OPG KO マウスともに軟膏非投与群と比較して血中 TRAP 値、血清 ALP 値ともに有意な差は認められなかった。

IV. 考察

1. 本研究での実験デザインについて

歯周病の治療に関しては、歯肉溝あるいは歯周ポケット内の細菌をコントロールすることが歯周病治療の目標であるといわれている。その方法の主流はブラッシング、スケーリングルートプレーニングなどのメカニカルアプローチの他に、Local drug delivery system の形で、抗菌製剤や抗生物質を局所に配送し、直接歯周病原性細菌にアプローチする手法が報告されており、歯周病治療薬としては、ミノサイクリン塩酸塩軟膏のような軟膏製剤が主に用いられている。その他の様々な歯周病治療薬についても研究されているが、それらは薬剤の効果のみを検討しており、実際の臨床においてどのような形状で投与するかは、特に確立されていない。そこで、本実験では将来的な臨床応用を見据え、投与方法が簡便で局所投与が可能な「軟膏」を用いることとした。

2. RMA 含有軟膏の投与が骨代謝に及ぼす影響

本実験では RMA 含有軟膏の局所投与を行ったところ、OPG KO マウスのみ

ならず WT マウスにおいても、非投与群に比較して、歯槽骨吸収の抑制、破骨細胞数の減少、免疫染色による炎症部位の染色スコアの減少が認められた。OPG KO マウスに対して RMA 含有軟膏が効果を示したことは、歯周病により歯周組織が脆弱化した患者や高回転型骨粗鬆症患者の治療に有効となる可能性が考えられるが、WT マウスにおいても骨吸収が抑制された結果が示されたことは、骨粗鬆症患者のみならず、健常者の歯周病予防にも有効である可能性が考えられる。

3. RMA と他の骨吸収抑制剤について

最近の歯周病研究の一つとして、炎症のみならず骨吸収の制御に焦点を合わせて病態を把握し治療法を考えることが重要であると指摘されているが、RMA と同様に骨吸収抑制効果を有し、また現在使用されている薬剤には「作用」だけでなく「副作用」の存在が考えられる。骨粗鬆症治療薬としてヒトに対してすでに使用されているビスフォスフォネートやデノスマブは、顎骨壊死が発生することが報告されている。一方で、RMA は半減期が約 1 時間と著しく短く、RMA の経口投与における薬効については、消化管において吸収されず効果がないとされている。本研究では、血液検査の結果より、経口投与、軟膏の口腔内への局所塗布ともに全身の破骨細胞活性および骨芽細胞活性に影響を及ぼさなかったことが示された。今後詳細な検討が必要ではあるが、RMA を含有した軟膏の口腔内局所塗布は、全身的には大きな影響を与えていないことから、炎症部位に限局して破骨細胞の活性を

抑制し歯槽骨の吸収を抑制することが考えられ、新たな歯周病治療薬となる可能性が示唆される。

V. まとめ

破骨細胞特異的抑制剤である RMA 含有軟膏の口腔内局所投与は、全身的な副作用を心配することなく、局所に限局して歯槽骨吸収を抑制し、新たな歯周病治療薬となりうる可能性が示唆された。