

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 757 号	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	

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

浅 野 雄 一 郎

愛知学院大学大学院歯学研究科 歯科臨床系（歯科矯正学）

指導：後藤 滋巳教授

愛知学院大学大学院歯学研究科博士（歯学）学位申請論文

Effect of Local Ointment Application of Reveromycin A
on Alveolar Bone Loss

YUICHIRO ASANO

Graduate School of Dentistry, Aichi Gakuin University

Clinical Dentistry（Orthodontics）

Supervisor : Prof. Shigemi Goto

The thesis submitted to the Graduate School of Dentistry,
Aichi Gakuin University for Ph.D. degree

本論文の基盤論文は、次のような論文です。

タイトル：新規軟膏（リペロマイシン A）の口腔内局所投与における
有用性の検討

掲載誌名：愛知学院大学歯学会誌（投稿中）

著 者：浅野 雄一郎¹⁾、宮澤 健¹⁾、田渕 雅子¹⁾、
加古 駿輔¹⁾、木村 文香¹⁾、川谷 誠²⁾、
長田 裕之²⁾、前田 初彦³⁾、後藤 滋巳¹⁾

所 属：¹⁾ 愛知学院大学歯学部歯科矯正学講座
（〒464-8651 愛知県名古屋市千種区末盛通 2-11）
²⁾ 国立研究開発法人理化学研究所
環境資源科学研究センター
ケミカルバイオロジー研究グループ
（〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1）
³⁾ 愛知学院大学歯学部口腔病理学講座
（〒464-8650 愛知県名古屋市千種区楠元町 1-100）

目 次

I. 緒 言	1
II. 実験材料および方法	1
1. 動物および試薬	1
2. Indigo Carmine 配合軟膏を用いた軟膏残存実験	2
3. RMA 含有軟膏の徐放性および軟膏塗布実験	2
4. マイクロ CT 撮影	3
5. 病理組織学的観察	4
6. 血清骨代謝マーカーの測定	4
7. 統計的処理	4
III. 結 果	4
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	4
1) RMA 含有軟膏の薬剤徐放性	
2) マウス口腔内での軟膏残存率	
3) マウス体重の変化	
2. マイクロ CT 画像における歯槽骨残存率の比較	4
3. 歯周組織の H.E 染色画像におけるアタッチメントレベルの割合	5
4. 破骨細胞数の計測	5
5. 免疫染色におけるスコアの比較	5
1) TNF- α 、IL-1 β におけるスコアの比較	
2) IL-6 におけるスコアの比較	
6. 血清骨代謝マーカーの測定	5
IV. 考 察	12
1. 本研究での実験デザインについて	12
2. RMA 含有軟膏の投与が骨代謝に及ぼす影響	12
3. RMA と他の骨吸収抑制剤について	13
V. ま と め	13
謝 辞	14
文 献	14

I. 緒 言

近年、矯正歯科治療を希望する患者は、成長期の小児患者だけでなく成人患者も増加している^{1,2)}。成人患者の矯正治療は、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ある。さらに成人や高齢者の患者は、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³⁾。

通常の歯周組織において、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おり、そのいずれに障害が生じても骨の恒常性は破綻する。矯正歯科治療時にメカニカルストレスが歯に付与されると、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・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⁴⁾。しかし、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^{5,6)}。また歯周組織に炎症がある場合、矯正治療を行うと著しい骨吸収を惹起するなどの報告がある^{7,8)}。

骨の恒常性の維持に重要な因子となる破骨細胞は、石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞であり、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) によって厳格に調節されている⁹⁾。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。また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する¹⁰⁾。OPG は RANKL と RANK の相互作用を強力に抑制することで、破骨細胞の分化と機能発現を抑制しており、In vivo においては、マウスに OPG を過剰発現させると骨吸収が抑制された重篤な大理石骨病を呈すると報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。一方、OPG 遺伝子欠損マウス (OPG KO マウス) では、出生時において骨は正常であるが、成長に伴い破骨細胞活性が亢進していき、成長後は骨梁が疎で骨密度が低く重篤な高回転型骨粗鬆症を呈している^{15,16)}。このように、OPG KO マウスは、骨粗鬆症や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効なマウスである^{17,18)}。

歯周病は、歯周病原性細菌の歯周組織への感染によって起こる炎症性疾患であり、歯周組織内での炎症が慢性化すると、細菌由来の因子や抗原によって誘導された過剰な宿主免疫応答が持続し、歯槽骨吸収が惹起される。現在、歯周病の進行抑制としては、ブラッシングやスケー

リング・ルートプレーニングなどによる機械的清掃の他、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¹⁹⁻²¹⁾。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²²⁾。

近年、破骨細胞特異的抑制剤としてリベロマイシン A (以下 RMA) が開発された。RMA は、放線菌から単離された酸性のポリケチド化合物であるため、通常の細胞には取り込まれないが、酸性環境において選択的に取り込まれる性質を有している^{23,24)}。そのため、酸を分泌して骨を溶解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²⁵⁾。

我々は、これまでに、高回転型骨粗鬆症モデルマウスである OPG KO マウスを用いて実験的に歯周病を誘発させたモデルマウスを作成し、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²⁶⁾。そこで今回、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、その軟膏がマウス口腔内にどれだけ残存するか確認し、また RMA を含有した軟膏が、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することを目的とした。

II. 実験材料および方法

1. 動物および試薬

本研究の実験動物には、生後 8 週齢の雄性 WT マウス (C57BL/6J) および OPG KO マウスを使用した。これらのマウスは、CLEA Japan (Tokyo, 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。飲料水は水道水とし、試料には CE-2 型固形及び粉末試料 (CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用い、共に自由摂取とした。なお、実験動物の管理ならびに研究方法については、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認の下 (承認番号 AGUD331 号)、動物実験指針に従った。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 (理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループより供与) を用いた。

2. Indigo Carmine 配合軟膏を用いた軟膏残存実験

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 1、2、3、4、5、6 時間毎に経時的に確認した（図1-A, B, C, D, E）。画像解析は Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて行った。また塗布した軟膏を過剰に舐めてしまわないようマウスの舌先端 1/3 の部位を針で搔皮した舌運動制御群と、何も行っていないコントロール群の 2 群で、軟膏の残存時間の確認を行った。その際、舌運動制御に対する全身への影響を観察するため、舌運動制御後の体重変化を観察した。

3. RMA 含有軟膏の徐放性および軟膏塗布実験

RMA 含有軟膏の徐放率を確認するため、1%RMA 製

剤 0.1g を、ガラス製スクリー管の底に均一に塗布し、薄めたマッキルベイン緩衝液（ph8）を 5ml 加え、38℃ の静置下において、経過時間ごとに 40 μ l サンプルングし、吸収極大波長（240nm）を測定することで徐放された RMA 量を定量した。

実験的歯周病モデルマウスの作成は、三種混合麻酔薬：塩酸メデトミジン（Meiji Seika Pharma CO.,Ltd., Tokyo, Japan）、ミダゾラム（Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan）、酒石酸ブトルファノール（Meiji Seika Pharma CO.,Ltd.²⁷⁾）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（THE NILACO CORPORATION, Tokyo, Japan）を結紮することでフードインパクションを引き起こし、実験的歯周病の作成を行った（図2-A, B, C）²⁸⁾。8 週齢のマウス

基盤論文参照 愛知学院大学歯学会誌 第57巻第1号

図 1

- A. マウス口腔内への軟膏塗布（全体写真 a :Indigo Carmine 色素配合軟膏を入れたシリンジ）
- B. マウス口腔内への軟膏塗布（拡大写真 a :Indigo Carmine 色素配合軟膏を入れたシリンジ）
- C. マウス口腔内における軟膏塗布部位（模式図）
（M1：上顎第一臼歯、M2：上顎第二臼歯、M3：上顎第三臼歯）
- D. マウス口腔内における軟膏塗布部位（拡大図）
（a：上顎左側第一臼歯、b・b'：観察部位の軟組織上に残存している色素、c：上顎左側第一臼歯上に残存している色素）
- E. 軟組織上に残存している色素の割合の計測方法（%）

(n=8) に対し、結紮線を結紮後、1日に3回の頻度で1% RMA 含有軟膏を上顎左側第一臼歯および第二臼歯歯冠部周囲に局所塗布 (図2-D) 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。

4. マイクロ CT 撮影

結紮線装着後8週間後に上顎骨を採取し、マイクロ CT (Rigaku, Tokyo, Japan) にて撮影を行った。撮影条件として、管電圧 90kV、感電流 150 μ A、撮影時間 2 分、画素サイズは、20 \times 20 \times 20 μ m で行った。その後、歯槽骨残存量の計測と解析は、ソフト TRI/3D-BON (RATOC SYSTEM ENGINEERING CO, LTD, Tokyo, Japan) にて行った。歯槽骨残存量を計測するにあたり、Park ら²⁹⁾の方法を一部改変し、図2-E で示すように、上顎第一臼歯と上顎第二臼歯間の歯冠接触点から各々の

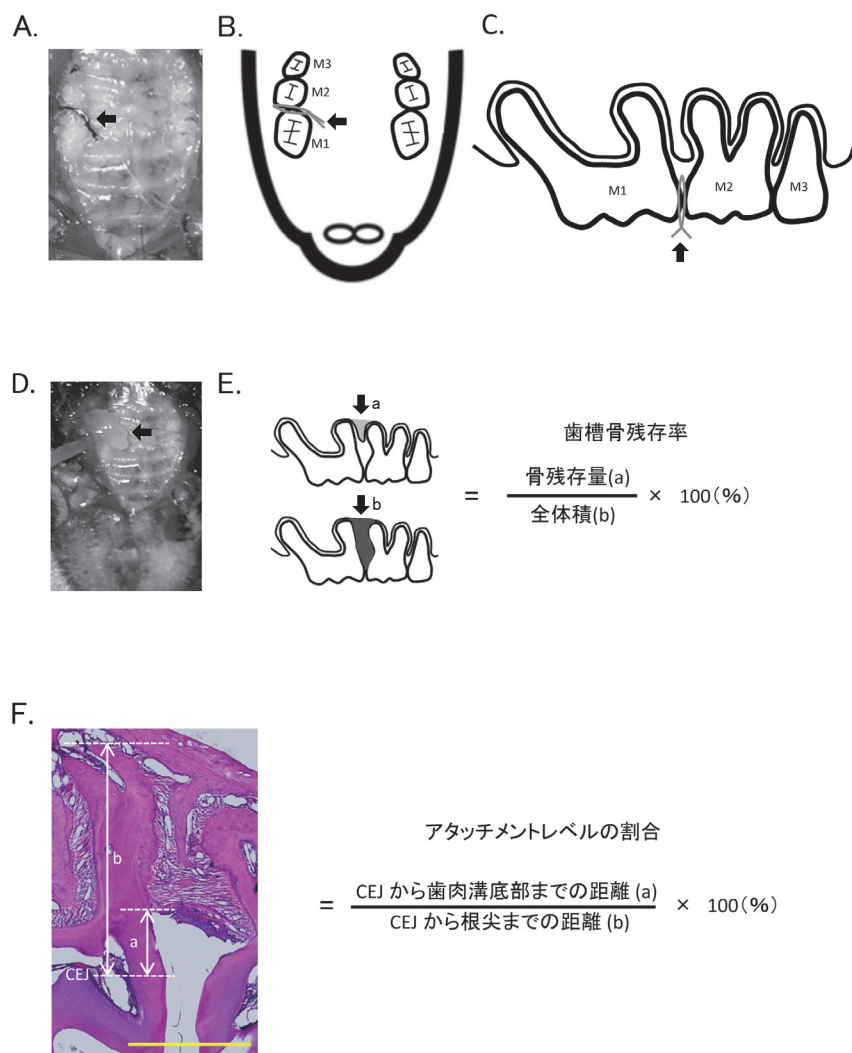


図 2

- A. 上顎第一臼歯、上顎第二臼歯間のコンタクトポイントに結紮された結紮線 (➡: 結紮線)
 B. 咬合面から見たワイヤー結紮部位 (➡: 結紮線、M1: 上顎第一臼歯、M2: 上顎第二臼歯、M3: 上顎第三臼歯)
 C. 頬側面から見たワイヤー結紮部位 (➡: 結紮線、M1: 上顎第一臼歯、M2: 上顎第二臼歯、M3: 上顎第三臼歯)
 D. マウス口腔内への軟膏塗布 (➡: RMA 含有軟膏)
 E. 上顎第一臼歯、上顎第二臼歯間歯槽骨残存率計測部位 (a: 計測された歯槽骨残存量, b: 全体積, c: 歯槽骨残存率)
 F. 上顎第一臼歯遠心面アタッチメントレベルの割合の計測部位 (a: CEJ から根尖までの距離, b: CEJ から歯肉溝底部までの距離)

根尖までの歯槽骨残存量を計測し、同部位の全体積に占める割合を歯槽骨残存率とした（図2-E）。

5. 病理組織学的観察

上顎骨を結紮線装着日から8週間後に摘出し、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℃の条件下で脱灰し、通法に従って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。組織観察部位は臼歯部の根が全て観察可能な部位とした。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色（HE 染色）を行い、第一臼歯遠心面のセメントエナメルジャンクション（CEJ）から根尖までの距離に対する、CEJ から歯肉溝底部までの距離の割合を、アタッチメントレベルの割合として計測した（図2-F）。また TRAP 染色（酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色）を ACID PHOSPHATASE、LEUKOCYTE KIT (SIGMA Diagnostic, St.Louis, MO, USA) を用いて行い、破骨細胞数計測に関しては、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 による免疫染色を施行した。免疫染色はヒストファインシンブルステインマウス MAX-PO (R) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan) と、ヒストファインシンブルステイン DAB 溶液 (Nichirei Bioscience Inc.) を用いて行い、TNF- α 抗体は Anti-TNF alpha antibody (ab6671, TNF- α :1/200, Abcam Inc., Tokyo, Japan)、IL-1 β 抗体は ANTI IL-1 β (H-153)、HUMAN, RABBIT POLY (SC-7884, IL-1 β :1/150, SCB Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA) を用い、IL-6 抗体は Anti-IL6 antibody (ab83339, IL-6:1/250, Abcam Inc.) を用いた。免疫染色における染色強度の判定は Rogers らの方法³⁰⁾ に準じ、第一臼歯、第二臼歯間の歯槽中隔の染色された部位を 0~20%、21~40%、41~60%、61%~ の 4 グループに分類し、それぞれ 1~4 のスコアを割り付け、各群スコアによって比較を行った。

6. 血清骨代謝マーカーの測定

WT マウス及び OPG KO マウスに RMA 含有軟膏を経口投与及び局所塗布を行い、投与後の血液を採取した。血中 TRAP 濃度は ELISA キット (Immunodiagnostic Systems Ltd, Ontario, Canada) を用いて行った。血清アルカリフォスファターゼ活性の測定は、リキテック ALP (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) を用いて行った。

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 (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

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

1) RMA 含有軟膏の薬剤徐放性

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%、91 時間では 77% の徐放を示し、徐々に RMA が徐放している様相がみられた。（図3）

2) マウス口腔内での軟膏残存率

軟膏の残存率について、舌先端 1/3 を搔皮した舌運動制御群とコントロール群の比較を行った。その結果、舌運動制御群、コントロール群ともに経時的に軟膏の残存率は減少した。コントロール群においては軟膏塗布後 3 時間後まで軟膏の残存を認め、4 時間以降は認められなかった。一方、舌運動制御群においては 4 時間後まで軟膏は残存し、5 時間以降の残存は認められなかった。舌運動制御群はコントロール群に比較し、軟膏塗布後 2~4 時間の間で有意な差をもって軟膏残存率が高い所見を認めた。（図4-A, B）

3) マウス体重の変化

舌先端 1/3 を搔皮した舌運動制御群は、コントロール群に比較し、搔皮後 2 日目には有意な差をもって一時的に体重の減少が認められたが、その後体重は回復し両群の体重に差は認められなかった。（図4-C）

2. μ CT 画像における歯槽骨残存率の比較

実験開始から8週間後の WT control と OPG KO control において、OPG KO control の方が骨量は粗であったが、歯槽骨残存率に有意な差は認められなかった。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が認められた。また OPG KO RMA- は WT RMA- と比較して、有意に歯槽骨残存率が小さい値を示した。一方、WT RMA+ と OPG KO RMA+ は、ともに WT RMA- と

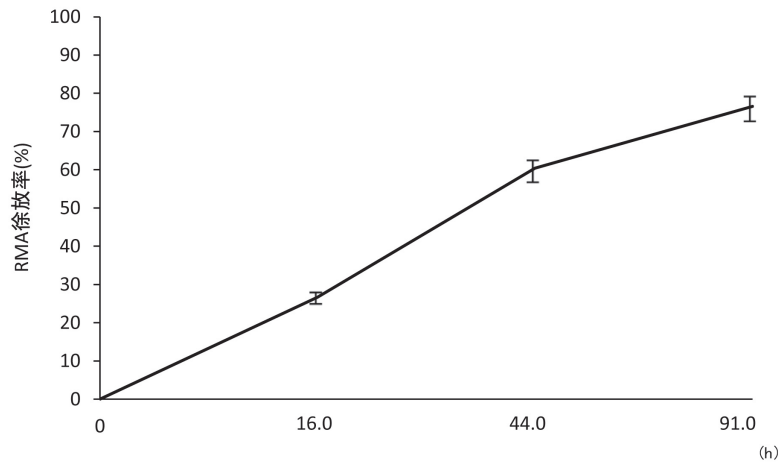


図3

RMA 含有軟膏の薬剤徐放性 (%)

OPG KO RMA- に比較し歯槽骨残存率が有意に高い値を示した。(図5-A, B)

3. 歯周組織の H. E 染色画像におけるアタッチメントレベルの割合

実験開始から8週間後の WT control と OPG KO control において、アタッチメントレベルの割合に有意な差は認められないが、OPG KO control は WT control に比較して歯槽骨の骨梁が疎であった。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アタッチメントレベルの割合の増加が認められた。また OPG KO RMA- は WT RMA- と比較して、有意にアタッチメントレベルの割合が大きい値を示した。一方、WT RMA+ と OPG KO RMA+ は、ともに WT RMA- と OPG KO RMA- に比較しアタッチメントレベルの割合が有意に小さい値を示した。(図6-A, B)

4. 破骨細胞数の計測

実験開始から8週間後の OPG KO control は WT control に比較して、有意な差をもって破骨細胞数の増加が認められた。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破骨細胞数の増加が認められた。また OPG KO RMA- は WT RMA- と比較して、有意に破骨細胞数が大きい値を示した。一方、WT RMA+ と OPG KO RMA+ は、ともに WT RMA- と OPG KO RMA- に比較し破骨細胞数が有意に小さい値を示した。(図7-A, B)

5. 免疫染色におけるスコアの比較

1) TNF- α 、IL-1 β におけるスコアの比較

実験開始から8週間後の WT control と OPG KO control において、染色スコアに有意な差は認められなかった。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染色スコアの増加が認められた。また OPG KO RMA- は WT RMA- と比較して、有意に染色スコアが大きい値を示した。一方、WT RMA+ と OPG KO RMA+ は、ともに WT RMA- と OPG KO RMA- に比較し染色スコアが有意に小さい値を示した。(図8-A, B)

2) IL-6 におけるスコアの比較

実験開始から8週間後の WT RMA- と OPG KO RMA- において、非結紮群に比較すると、染色スコアが増加する傾向が認められたが有意な差は認められなかった。また WT RMA+ と OPG KO RMA+ においても同様に、RMA の投与により染色スコアが減少する傾向は認められたものの有意な差は認められなかった。(図8-C)

6. 血清骨代謝マーカーの測定

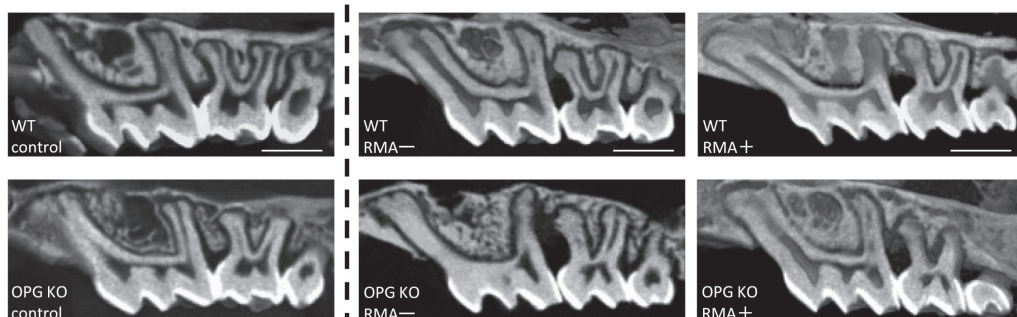
軟膏非投与群において、OPG KO は WT に比較して、有意な差をもって血中 TRAP 値、血清 ALP 値ともに高値であった。RMA 含有軟膏の経口投与群、RMA 非含有軟膏の局所塗布群および RMA 含有軟膏の局所塗布群は、すべて WT マウス、OPG KO マウスともに軟膏非投与群と比較して血中 TRAP 値、血清 ALP 値ともに有意な差は認められなかった。(図9-A, B)

基盤論文参照
愛知学院大学歯学会誌 第57巻第1号

図 4

- A. 色素含有軟膏塗布後の経過時間毎の代表的な口腔内写真
B. 軟組織上に残存している色素の割合の計測 (%) n.s. : not significant, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$
C. 舌運動制御後のマウス体重変化 (g), * : $p < 0.05$

A.



B.

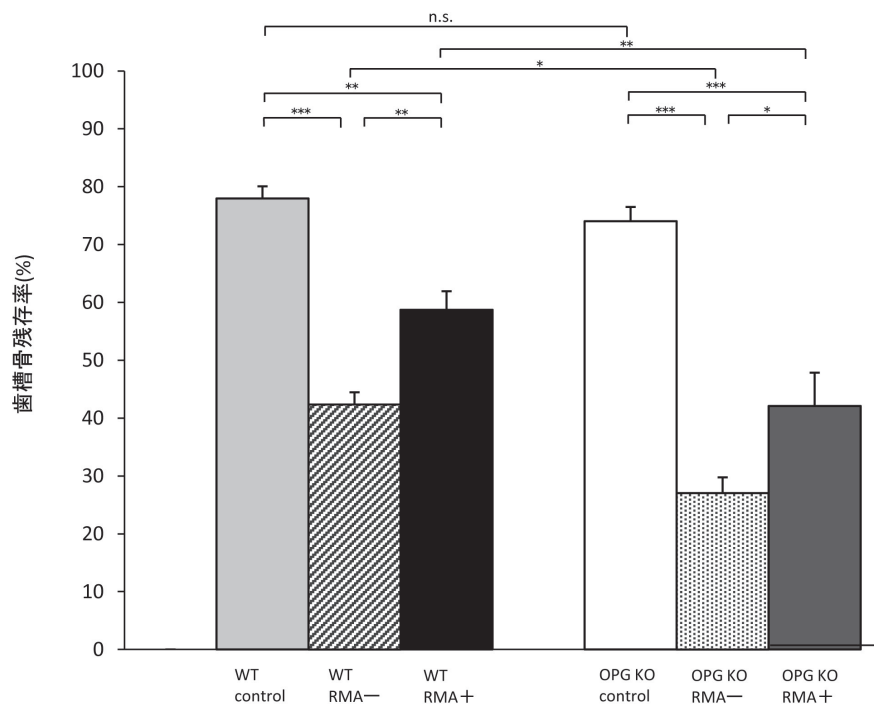
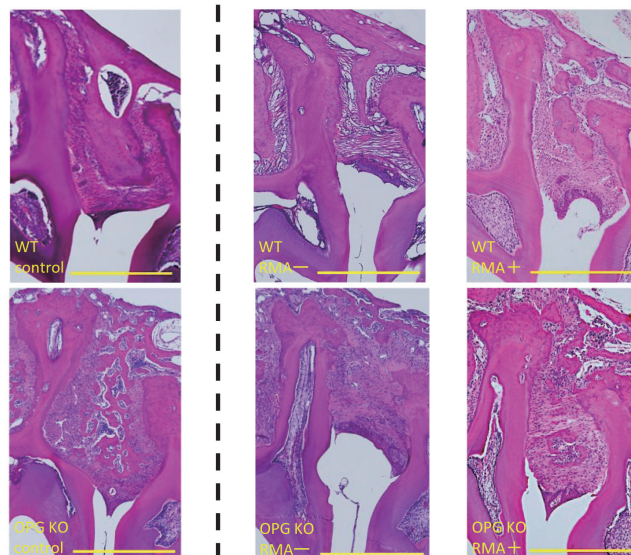


図5

- A. 結紮線装着日から8週間後におけるマイクロCT画像、スケールバーは1000 μ mを示す。
 (WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群、WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群、WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群、OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群)
- B. 第一臼歯、第二臼歯間歯槽骨残存率 (%) n.s.: not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$
 (WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群、WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群、WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群、OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群)

A.



B.

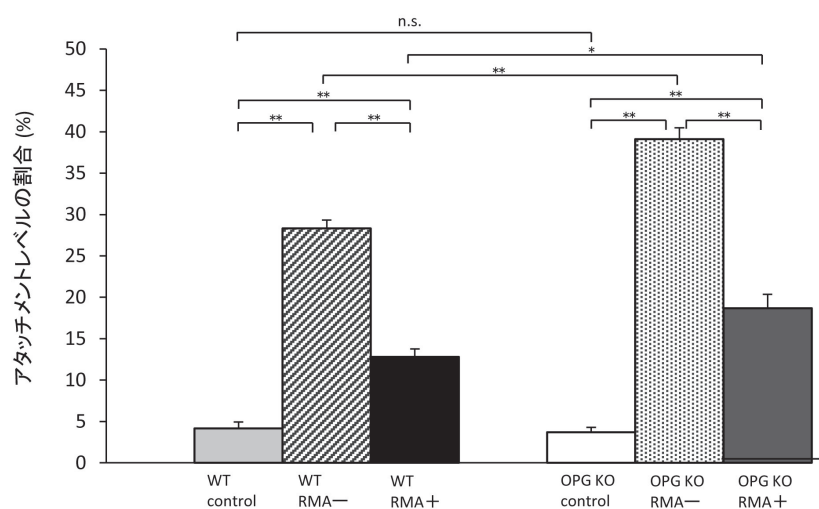
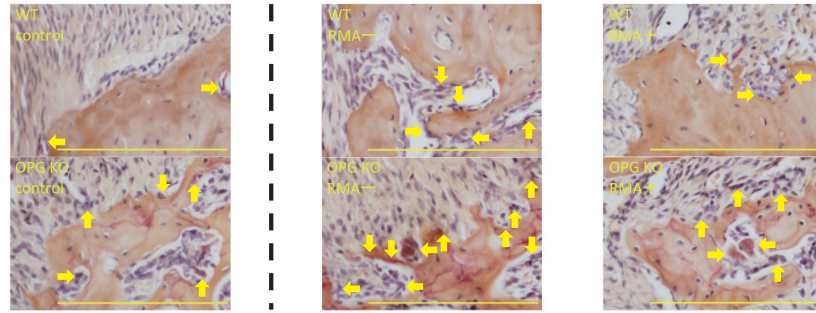


図 6

- A. 結紮線装着日から8週間後における歯周組織のHE染色組織所見（第一臼歯、第二臼歯間歯槽突起部）スケールバーは500 μ mを示す。倍率100倍（WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群、WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群、WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群、OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群）
- B. アタッチメントレベルの割合（第一臼歯遠心面のセメントエナメルジャンクションから根尖までの距離に対する、セメントエナメルジャンクションから歯肉溝底部までの距離の割合）（%）n.s.: not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ （WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群、WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群、WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群、OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群）

A.



B.

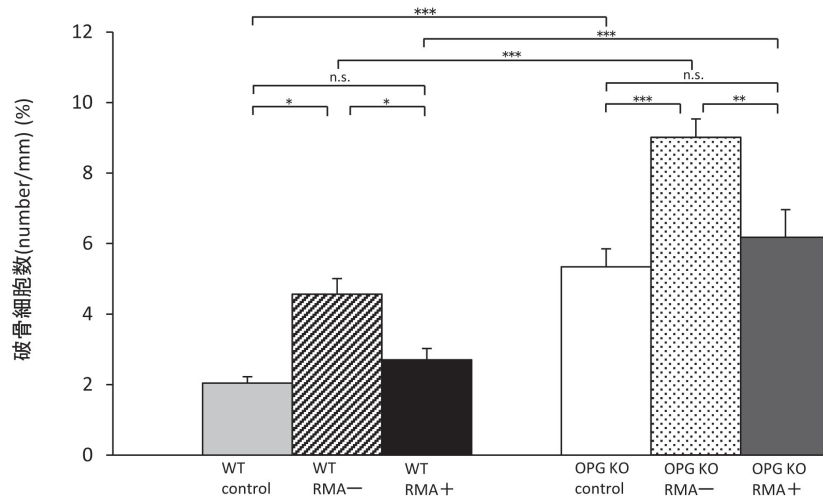
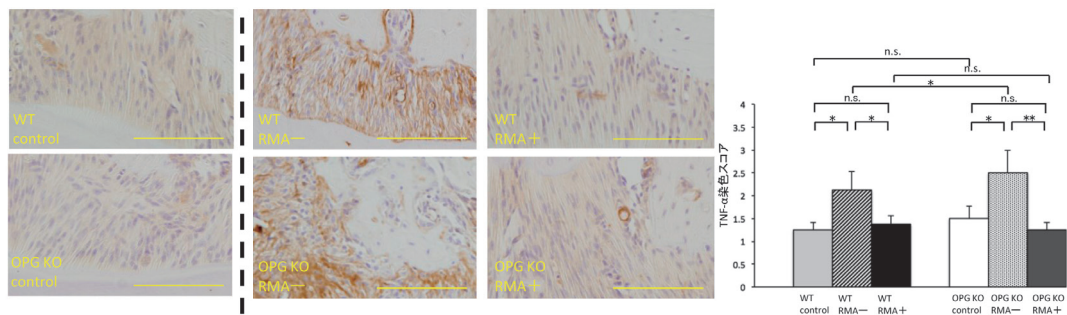


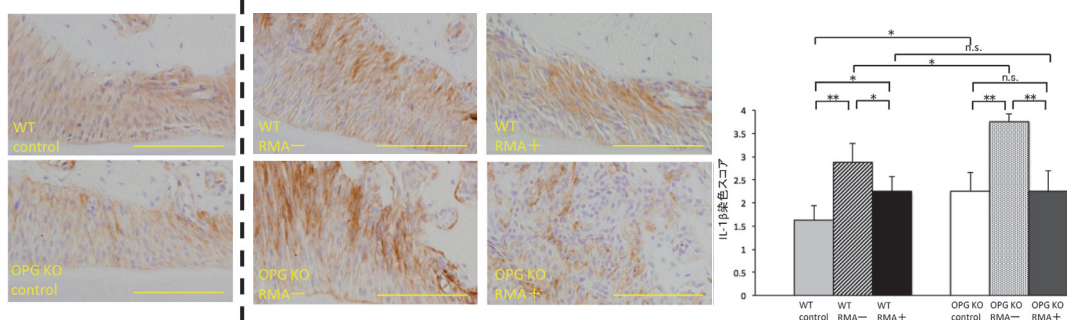
図 7

- A. 結紮線装着日から8週間後における歯周組織のTRAP染色組織所見(第一臼歯、第二臼歯間歯槽突起部)スケールバーは200 μ mを示す。倍率400倍(WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群、WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群、WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群、OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群、➡: 破骨細胞)
- B. 破骨細胞数(number/mm) (%) n.s.: not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群、WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群、WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群、OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群、OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群)

A.TNF- α



B.IL-1 β



C.IL-6

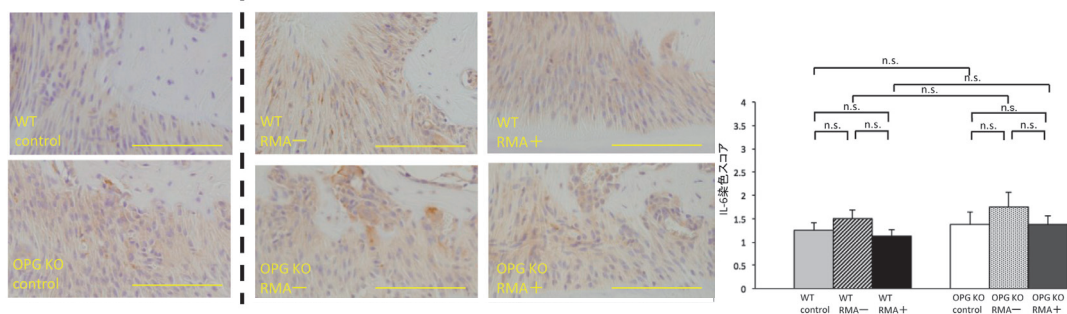


図 8

- A. TNF- α による免疫染色画像および染色スコア スケールバーは100 μ mを示す。倍率400倍 n.s.: not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群, WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群, WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群, OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群, OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群, OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群)
- B. IL-1 β による免疫染色画像および染色スコア スケールバーは100 μ mを示す。倍率400倍 n.s.: not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群, WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群, WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群, OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群, OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群, OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群)
- C. IL-6 による免疫染色画像および染色スコア スケールバーは100 μ mを示す。倍率400倍 n.s.: not significant (WT control: 結紮もRMA投与も行っていないWTマウス群, WT RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないWTマウス群, WT RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったWTマウス群, OPG KO control: 結紮もRMA投与も行っていないOPG KOマウス群, OPG KO RMA-: 結紮をしてRMA投与を行っていないOPG KOマウス群, OPG KO RMA+: 結紮をしてRMA投与を行ったOPG KOマウス群)

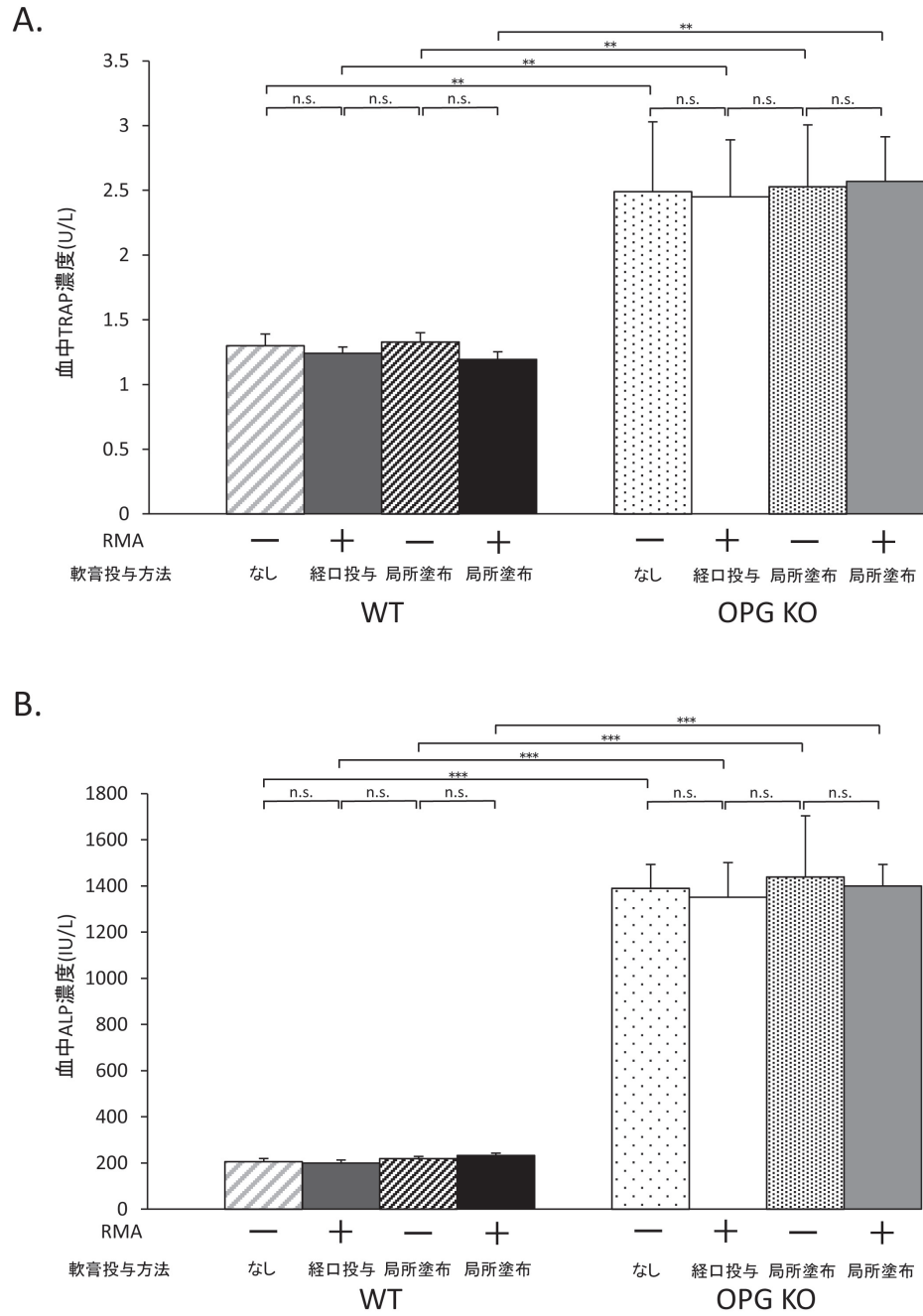


図 9

- A. 血中 TRAP 濃度 (U/L) n.s. : not significant, ** : $p < 0.01$
 (WT : ワイルドタイプマウス、OPG KO: OPG 遺伝子欠損マウス、RMA : リベロマイシン A)
- B. 血中 ALP 濃度 (IU/L) n.s. : not significant, *** : $p < 0.001$
 (WT : ワイルドタイプマウス、OPG KO: OPG 遺伝子欠損マウス、RMA : リベロマイシン A)

IV. 考 察

1. 本研究での実験デザインについて

歯周病は、歯周病原性細菌の歯周組織への感染によって引き起こされる慢性の炎症性疾患であり、その進行過程には細菌に対する生体の感受性に加え遺伝的因子や環境的因子などが大きく関与し、生活習慣病の一つともされている³¹⁾。歯周病の存在は、全身的にも悪影響を及ぼし、逆に全身の健康状態も歯周組織の健康維持に密接に関与していることが明らかにされ、Periodontal Medicineとして確立されてきた³²⁾。その中でも、歯周病に起因する局所の歯槽骨吸収と骨粗鬆症に起因する全身の骨量減少の関連について、Inagakiら³⁾は両者の関係を評価したシステマティックレビューから、歯周病と骨粗鬆症について関連があると報告している³³⁾。

今回実験に用いた OPG KO マウスは、遺伝的に OPG が欠損しているため、成長に伴い骨粗鬆症による著しい破骨細胞活性を示し、WT マウスと比較し、皮質骨や骨小柱の多孔性を示すため、骨密度が低いと報告されており¹⁴⁻¹⁶⁾、歯周病モデルとして有効なマウスと考えられている^{17,18)}。

また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が深く関与していることが明らかになってきており、それ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³⁴⁾。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、その場で徐放させ、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¹⁹⁻²¹⁾、現在は、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³⁵⁻³⁹⁾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。一般的に、軟膏を用いた皮膚透過実験^{40,41)}には、薬剤の皮膚透過性及び吸収率が高いと報告されているヘアレスマウス^{42,43)}が使用されることが多い。しかし本実験では皮膚ではなく口腔内の粘膜への局所投与を想定していることから、通常のマウス（C57BL/6J）を用い、また塗布した軟膏を過剰に舐めてしまう可能性があることから舌先端 1/3 を搔皮した舌運動制御群を作成し実験を行った。また唾液の自浄作用により軟膏が流れてしまうこと

を考慮し、唾液の減少を引き起こす薬剤^{44,45)}を投与することも考慮したが、それらの薬剤によって軟膏の効能に影響を与える可能性も考えられることから使用しなかった。

以上の実験デザインを鑑みて実験を行った結果、舌運動制御群における色素含有軟膏塗布実験モデルでは塗布後 4 時間までの軟膏の残存が認められたことより、本軟膏を用いる際には、4 時間に 1 度軟膏を塗布する必要があると考えられた。

2. RMA 含有軟膏の投与が骨代謝に及ぼす影響

OPG KO RMA- は、WT RMA- と比較し有意に歯槽骨残存率の減少や破骨細胞数の増加が認められたことは、OPG KO マウスが先天的に骨組織が脆弱であることに加え、結紮線を結紮した歯槽骨吸収を惹起しやすい環境下において更に破骨細胞活性が亢進し、骨代謝のバランスが崩壊したことが考えられる。このことから、歯周病を有する患者と骨粗鬆症を有する患者は密接に双方が関連していることが考えられる。本実験では、歯周病の重症度を示す指標としてアタッチメントレベルを用い、アタッチメントレベルの割合が大きいことは、骨吸収が進行していることを示す⁴⁶⁾。WT RMA+ と OPG KO RMA+ は、ともに WT RMA- と OPG KO RMA- に比較しアタッチメントレベルの割合が有意に小さい値を示したことから、RMA 含有軟膏の塗布により、歯槽骨吸収を抑制し歯周病の重症化を軽減できたと考えられた。また、免疫染色による炎症性サイトカインのスコアの比較では、TNF- α および IL-1 β において RMA 含有軟膏の塗布により有意な差を持って染色スコアの減少を認め、局所において炎症が抑制されたものと考えられた。実際に実験的歯周病を発症させた動物モデルに対し、TNF- α と IL-1 β の中和抗体を投与すると炎症性細胞浸潤が 8 割減、骨吸収が 6 割減となったとの報告もある⁴⁷⁾。さらには、TNF- α および IL-1 β に関しては、TNF- α は炎症が生じてから 1 時間から 24 時間で^{48,49)}、IL-1 β は 1 分から 1 時間でどちらも早期に増加するとの報告もある^{50,51)}。Kapoor ら⁵²⁾ は、矯正歯の移動時における歯肉溝滲出液内の指標となるサイトカインについて、TNF- α と IL-1 β が関与していると報告しており、TNF- α と IL-1 β の産生を抑制することは歯周組織破壊の抑制につながることが考えられた。以上のように、炎症性サイトカインの減少により歯槽骨吸収が抑制されたという報告がある一方で、骨吸収の抑制により局所の炎症が抑制されたという報告は見受けられない。本実験結果は、RMA を歯

周病モデルマウスに腹腔内投与した Mizuno ら²⁶⁾の実験結果同様、破骨細胞特異的抑制剤である RMA を投与することにより、同程度に歯槽骨吸収の抑制や破骨細胞数の減少が認められ、さらには局所の炎症も抑制される結果となったが、これが果たして骨吸収を抑制した結果なのか、もしくはそもそも RMA が抗炎症作用を有しているのか、今後、より詳細な検討が必要であると考えられる。

以上より、今回の実験で 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示された。このことは、Williams ら³²⁾の Periodontal Medicine にも挙げられる、糖尿病、冠動脈及び脳血管疾患、早産及び低出生体重児出産などを未然に防ぐための歯周病リスクの軽減にも繋がる可能性が示唆された。

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²²⁾、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ものにはビスフォスフォネート (BP) 製剤があり、作用機序としては BP が骨表面に吸着し破骨細胞の機能障害及びアポトーシスを誘導することで破骨細胞を減少させ骨吸収を抑制する。しかし、顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw, BRONJ) が発生することが 2003 年に報告され⁵³⁾、現在の発生頻度は BP 系薬剤投与例全体で 0.05 ~ 0.1% だが、悪性腫瘍患者や、投与中の抜歯施行例では頻度が高くなると報告されている⁵⁴⁾。また人種差があり、日本では欧米よりも発生率は高いとする報告もある⁵⁵⁾。このような状況下で新たな骨粗鬆症治療薬として、デノスマブが用いられるようになった。デノスマブは、RANKL を標的としたヒト型 IgG2 モノクローナル抗体製剤で、RANKL に結合して破骨前駆細胞の破骨細胞分

化を抑制する⁵⁶⁾。また、デノスマブは BP と比較し、半減期が 1 カ月前後と短く、BP のように骨に沈着残留せず、破骨細胞にアポトーシスを誘導しないなどの違いがあることから⁵⁷⁾、投与患者に顎骨壊死は発生しないと期待された。しかしながら、これらの予想に反して、デノスマブによる治療を受けている患者にも BRONJ と同様の顎骨壊死 (Denosumab-Related Osteonecrosis of the Jaw, DRONJ) がほぼ同じ頻度で発生することが報告された⁵⁸⁾。そこで、歯周病治療薬として応用する際には、副作用を極力及ぼさないように注意することが必要と考えられ、我々は新薬である破骨細胞の活性を特異的に抑制する RMA に着目した。

RMA は放線菌から単離された酸性のポリケチド化合物であり、未熟な前駆細胞や骨吸収能を持たない不活性型破骨細胞に対しては薬効を示さず²⁴⁾、骨吸収活性を持つ活性型破骨細胞に対しては特異的にアポトーシスを誘発する。また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る。また、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²⁴⁾。本研究では、血液検査の結果より、経口投与、軟膏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、RMA を腹腔内投与した Mizuno ら²⁶⁾と比較し、非観血的に臨床応用することができる新たな歯周病治療薬となる可能性が示唆された。

V. まとめ

本実験は、将来的な臨床応用を見据え、外科的侵襲を極力除去し、口腔内に局所投与するための RMA を含有した軟膏を作成し、マウス口腔内における軟膏の残存率と歯槽骨吸収抑制の効果を確認する事を目的とし、以下の結果を得た。

1. RMA 含有軟膏の薬剤徐放性および色素含有軟膏塗布における軟膏残存評価

RMA 含有軟膏の薬剤徐放性としては、4 時間時において約 10% の徐放を示した。マウス口腔内における軟膏の残存率は、コントロール群では塗布後 3 時間まで、

舌運動制御群においては4時間後まで軟膏の残存が認められた。

2. RMA 含有軟膏塗布におけるマウスへの影響

1) RMA 非投与の OPG KO マウスと WT マウスについて

OPG KO マウスは WT マウスに比較し、歯槽骨残存率が低く、歯槽中隔部歯槽骨における破骨細胞数が多かった。

2) RMA 含有軟膏を投与した OPG KO マウスと WT マウスについて

RMA 含有軟膏の塗布により、OPG KO マウス WT マウスともに、歯槽骨吸収の抑制、破骨細胞数の減少、免疫染色における炎症性サイトカインのスコアの減少が認められた。

3) 全身的な影響について

血清骨代謝マーカーである血中 TRAP 値および血清 ALP 値を測定した結果、OPG KO マウス WT マウスともに、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、軟膏非投与群と比較して有意な差は認められなかった。

以上の結果より、RMA 含有軟膏の口腔内局所投与は、高回転型骨粗しょう症患者や歯周組織が著しく脆弱化した患者のみならず、健常者の歯周病予防にも有効である可能性が示された。また血液検査の結果より、RMA 含有軟膏の塗布が全身的には大きな影響を与えていないことから、炎症部位に局限して破骨細胞の活性を抑制し歯槽骨の吸収を抑制する可能性が示唆された。よって、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、局所に局限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。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました歯科矯正学講座、恩師後藤滋巳教授ならびに宮澤健特殊診療科教授に深く感謝の意を表すと共に、日頃から格別な御指導と御校閲を賜りました本学口腔病理学講座、前田初彦教授に深謝いたします。また、本実験の薬剤（リペロマイシン A）を御供与頂きました国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループ 長田裕之先生、川

谷誠先生に感謝の意を表します。さらに、本研究に際し終始熱心な御指導、御協力を頂きました本学歯科矯正学講座、田淵雅子准教授に謹んで感謝の意を表します。加えて、本研究にあたり御協力を頂きました本学口腔病理学講座の皆様、ならびに本学歯科矯正学講座の皆様に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Saito N, Miyazawa K, Sakai N, Nawa H, Sekiya T, Sato T, Kawaguchi M, Goto S: Survey of Outpatients Who Visited the Department of Orthodontics at Aichi Gakuin University Dental Hospital in the Past 10 Years. *Aichi Gakuin J. Dent. Sci*, **56** (1):65-75, 2018.
- 2) Moriyama N, Miyazawa K, Nawa H, Goto S: Trends of orthodontic patients in Aichi-Gakuin University Dental Hospital. *Orthodont Waves*, **69** (1): 44-50, 2010.
- 3) Inagaki K, Nagasaka T, Yamamoto G, Noguchi T: Interrelationships between systemic osteoporosis and periodontal disease. *THE BONE*, **25** (4):449-460, 2011.
- 4) Takano YT, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S: Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem*, **42** (7):885-896, 1994.
- 5) Yoshihara A, Hayashi Y, Miyazaki H: Relationships among bone turnover, renal function and periodontal disease in elderly Japanese. *J,periodont Res*, **46** (4):491-496, 2011.
- 6) Inagaki K, Kurosu Y, Yoshinari N, Noguchi T, Krall EA, Garcia RI: Efficacy of periodontal disease and tooth loss to screen for low bone mineral density in Japanese women. *Calcif Tissue*, **77** (1):9-14, 2005.
- 7) Jan LW, Jan L, Flemming S, Birgit T: Some periodontal tissue reactions to orthodontic tooth movement in monkeys. *J clin Periodontol*, **14** (3):121-129, 1987.
- 8) Ericsson I, Thilander B, Lindhe J, Okamoto H: The effect of orthodontic tilting movements on the periodontal tissues of infected and non-

- infected dentitions in dogs. *J Clin Periodontol*, **4** (4):278-293, 1977.
- 9) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, **20** (3):345-357, 1999.
- 10) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** (7):3597-3602, 1998.
- 11) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM: OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, **397** (6717):315-323, 1999.
- 12) Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J: RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*, **13** (18):2412-2424, 1999.
- 13) Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ: RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97** (4):1566-1571, 2000.
- 14) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, **89** (2):309-319, 1997.
- 15) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: Osteoprotegerin-Deficient Mice Develop Early Onset Osteoporosis and Arterial Calcification. *Genes Dev*, **12** (9):1260-1268, 1998.
- 16) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H: Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*, **247** (3):610-615, 1998.
- 17) Tanaka M, Miyazawa K, Tabuchi M, Yabumoto T, Kadota M, Yoshizako M, Yamane C, Kawatani M, Osada H, Maeda H, Goto S: Effect of Reveromycin A on experimental tooth movement in OPG-/- mice. *J Dent Res*, **91** (8):771-776, 2012.
- 18) Yabumoto T, Miyazawa K, Tabuchi M, Shoji S, Tanaka M, Kadota M, Yoshizako M, Kawatani M, Osada H, Maeda H, Goto S: Stabilization of tooth movement by administration of Reveromycin A to osteoprotegerin-deficient knockout mice. *Am J Ortho Dentofacial Orthop*, **144** (3):368-380, 2013.
- 19) Noguchi T, Asai A, Koide M, Sakai H, Morita Y, Mori A, Takada T, Murase M, Ueda N, Kuroyanagi T, Nishiyama S, Ishikawa K, Ishihara Y, Yoshinari N, Inagaki K, Amano K, Fukuda M, Yamada S, Nakagawa T, Ohshima M, Kitamura H: Studies on Clinical and Microbiological Evaluation of Minocycline Hydrochloride with a Local Drug Delivery System in the Acute Phase of Adult Periodontitis. *JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY*, **37** (4):725-736, 1995.
- 20) Murayama Y, Nomura Y, Yamaoka A, Ueda M, Hori T, Minabe M, Umemoto T, Ishikawa I, Uraguchi R, Ueno K, Watanabe K, Ogawa N: Local Administration of Minocycline for Periodontitis Double Blind Comparative Study of

- LS-007. JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY, **30** (1) : 206-222, 1998.
- 21) Tokumoto K, Tsuchida K, Kawamura M, Nakamura M, Hasegawa K, Iwamoto Y : Effects of Local Application of Tetracycline with Hydrophilic Base on Subgingival Microflora. JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY, **27** (4) : 923-930, 1985.
- 22) Cochran DL: Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol, **79**:1569-1576, 2008.
- 23) Osada H, Koshino H, Isono K, Takahashi H, Kawanishi G: Reveromycin A, a new antibiotic which inhibits the mitogenic activity of epidermal growth factor. J Antibiot (Tokyo), **44** (2) :259-261, 1991.
- 24) Woo JT, Kawatani M, Kato M, Shinki T, Yonezawa T, Kanoh N, Nakagawa H, Takami M, Lee KH, Stern PH, Nagai K, Osada H: Reveromycin A, an agent for osteoporosis, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts. Proc Natl Acad Sci USA, **103** (12) : 4729-4734, 2006.
- 25) Muguruma H, Yano S, Kakiuchi S, Uehara H, Kawatani M, Osada H, Sone S: Reveromycin A inhibits osteolytic bone metastasis of small-cell lung cancer cells, SBC-5, through an antiosteoclastic activity. Clin Cancer Res, **11** (24 Pt1) :8822-8828, 2005.
- 26) Mizuno M, Miyazawa K, Tabuchi M, Tanaka M, Yoshizako M, Minamoto C, Torii Y, Tamaoka Y, Kawatani M, Osada H, Maeda H, Goto S: Reveromycin A Administration Prevents Alveolar Bone Loss in Osteoprotegerin Knockout Mice with Periodontal Disease. Sci Rep **5**, Article number:16510, 2015.
- 27) Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T: Effect of Three Types of Mixed Anesthetic Agents Alternate to Ketamine in Mice. Exp Anim, **60**:481-487, 2011.
- 28) Mizuno M, Miyazawa K, Tabuchi M, Tanaka M, Yoshizako M, Minamoto C, Torii Y, Maeda H, Goto S : A New Experimental Mouse Model of Periodontitis Using an Orthodontic Ligature Wire. Journal of Hard Tissue Biology, **23** (2) : 255-260, 2014.
- 29) Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein SA, Giannobile WV: Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. J Periodontol, **78** (2) : 273-281, 2007.
- 30) Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa Jr.C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile JM, Kirkwood KL: Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. J Periodontol, **78** (3) : 550-558, 2007.
- 31) Murayama Y, Nishimura F, Iwamoto Y, Takashiba S: Periodontitis and Systemic Disease. Journal of the Japanese Society of Periodontology, **45** (4) : 325-348, 2003.
- 32) Williams RC, Offenbacher S : Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periody. Periodontology 2000, **23** : 9-12, 2000.
- 33) Martínez-Maestre MA, González-Cejudo C, MacHuca G, Torrejón R, Castelo-Branco C : Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. Climacteric, **13** : 523-529, 2010.
- 34) Gomi K: Potentiality of Periodontal Pharmacotherapy. JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY, **56** (4) : 367-374, 2014.
- 35) Ishihara Y, Kamei H, Kamiya Y, Izawa A, Mizutani H, Suzuki M, Noguchi T, Mitani A: The potentiality of the IL-1 family and the IL-1 receptors as a disease marker and a therapeutic agent for periodontal disease. JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY, **56** (3) : 272-280, 2014.
- 36) Nakamura T, Ukai T, Yoshinaga Y, Ozaki Y, Kaneko T, Shiraishi T, Kishimoto M, Onoyama M, Abe Y, Abe T, Yoshimura A, Hara Y: Glycyrrhetinic Acid Inhibits Lipopolysaccharide-induced Bone Resorption. JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY, **51** (3) : 323-330, 2008.
- 37) Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP, Penninger JM : Functional human T-cell immunity and

- osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest*, **106** (6) : 59-67, 2000.
- 38) Qiming J, Joni AC, Chan HP, James VS, Mario TJ, Paul JK, William VG : RANKL Inhibition Through Osteoprotegerin Blocks Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Periodontol*, **78**(7) : 1300-1308, 2007.
- 39) Wada C, Tokunaga K, Seto H, Sakamoto E, Hiroshima Y, Kido J, Nagata T : Topical injection of osteoprotegerin prevents alveolar bone loss in rat experimental periodontitis. *JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY*, **54** (2) : 167-174, 2012.
- 40) Ohtani M: Effect of the Admixture of Commercially Available Corticosteroid Ointments and/or Creams on their Efficacy and Side Effects. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci*, **29** (1) : 1-10, 2003.
- 41) Ohtani M, Kotani H, Kariya S, Uchino K, Iga T: Evaluation of the Permeability of Corticosteroid in Hairless Mouse and Hairless Micro Pig Skin from Admixture of Commercially Available Corticosteroid Ointments and/or Creams. *YAKUGAKU ZASSHI*, **122** (8) : 589-594, 2002.
- 42) John RB, Brian WB : Hairless Mouse Skin is Limited as a Model for Assessing the Effects of Penetration Enhancers in Human Skin. *J. Invest. Derm*, **90** (6) : 810-813, 1988.
- 43) Paul C, David RF : Transdermal delivery of levonorgestrel. VIII. Effect of enhancers on rat skin, hairless mouse skin, hairless guinea pig skin, and human skin. *Int.J.Pharmaceut*, **58** (2) : 93-102, 1990.
- 44) Takasaki H, Koshino H, Hirai T, Ishijima T, Nakano K:Influence of Saliva Secretion on Masticatory Efficiency. *J Jpn Prosthodont Soc*, **47** (3) : 526-534, 2003.
- 45) Murai S, Saito H, Kikuchi Y, Murakami H, Ito T: Antisialagogic effect of an antidepressant, imipramine, on sympathetic and parasympathetic salivation in mice. *J Jpn Oral Biol*, **26** (1) : 226-231, 1984.
- 46) Tomofuji T, Azuma T, Kusano H, Yamamoto T, Tada T, Morita M, Watanabe T : Role of Measurements of Probing Depth and Attachment Level in Periodontal Patients. *JAPANESE SOCIETY OF PERIODONTOLOGY*, **46** (4) : 253-258, 2004.
- 47) Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT: IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*, **160** (1) : 403-409, 1998.
- 48) Ren Y, Hazemeijer H, De Haan B, Qu N, De Vos P. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol* ; **78** (3) :453-58, 2007.
- 49) Karacay S, Saygun I, Bengi AO, Serdar M. Tumor necrosis factor-alpha levels during two different canine distalization techniques. *Angle Orthod.*; **77** (1) :142-47, 2007.
- 50) Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci.*; **114** (5) :416-22, 2006.
- 51) Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. **125** (2) :168-77, 2004.
- 52) Kapoor P, Kharbanda OP, Monga N, Miglani R, Kapila S. Effects of orthodontic force on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid ; a systematic review. *Prog Orthod*, **15** (1) :65, 2014.
- 53) Marx RE : Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* **61**:1115- 1117, 2003.
- 54) Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A : Nature and Frequency of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg*, **65** (3) : 415-423, 2007.
- 55) Urade M, Tanaka N, Furusawa K, Shimada J, Shibata T, Kirita T, Yamamoto T, Ikebe T, Kitagawa Y, Fukuta J. Nationwide survey for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in Japan. *J Oral Maxillofac Surg*, **69** (11) : 364-

- 371, 2011.
- 56) Takami M: Development and pharmacological effects of anti-RANKL monoclonal antibody drug Denosumab. *Jpn. J. Clin. Immunol.*, **36** (3) : 162-169, 2013.
- 57) Baron R, Ferrari S, Russell RG : Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone* **48** (4) :677-692, 2011.
- 58) Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, Diel IJ, Takahashi S, Shore N, Henry DH, Barrios CH, Facon T, Senecal F, Fizazi K, Zhou L, Daniels A, Carrière P, Dansey R. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol* **23**:1341-1347, 2012.

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会
(名古屋市千種区楠元町 1-100)