

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 号	論文提出者 加古 駿輔
論文題目 破骨細胞特異的抑制剤（リベロマイシン A）の局所注射が歯牙移動に及ぼす影響について	

I. 緒言

歯科矯正治療において、目的とする歯を移動させる際、固定源となる歯も移動してしまうことが多く認められる。そのため良好な治療結果を得るためには、固定源の確保は不可欠である。従来、固定源の確保のため、ヘッドギア等の顎外固定装置の使用を行ってきたが、この方法の成否は、患者の協力度に依存するところが大きかった。近年、歯科矯正治療の固定源として開発された歯科矯正用アンカースクリューは、矯正治療中の絶対的な固定源として頻繁に利用されるようになってきている。2012年7月には日本において歯科矯正用アンカースクリューが薬事承認され、新たな矯正治療法の確立への道が広がった。しかし歯科矯正用アンカースクリューは外科的侵襲があること、また脱落の可能性があることが難点として挙げられる。歯科矯正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・骨添加が活発になり、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。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・機能は破骨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)によって厳格に調整されている。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。

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、もともと放線菌の培養液から発見された酸性ポリケチド化合物で通常の細胞には取り込まれにくい、酸を分泌して骨をとく活性化破骨細胞には、酸性環境に依存して選択的に取り込まれる。これは破骨前駆細胞では観察されず、骨吸収能を有する活性化破骨細胞のみ顕著に取り込まれ、標的分子であるイソロイシル tRNA 合成酵素の活性を抑制し、蛋白質合成を阻害し、アポトーシスへと導き、骨吸収を阻害することが明らかになっている。また、既存の骨吸収抑制剤と比較し、半減期が短いという特徴を持ちあわせている。近年、基礎的研究では、薬剤を用いて骨代謝を抑制または促進させることで、マウスにおける歯牙移動のコントロールが可能であるのか検討されている。しかし、荷重負荷の初期における反応を観察している研究が多く、14日間以上の長期間にわたる歯の移動の報告はほとんど認められない。一般的には、矯正歯科治療では数年間という期間での歯の移動を行い、その通院間隔は術者の経験則より約3～4週間と設定されている。そのため、約3週間(21日間)以上の長期間にわたる歯の移動の観察が行えるモデルマウスが作成可能であれば、きわめて臨床に近い形での歯の移動の観察を行うのに有用であると考えられる。また、薬物の投与方法についても検討する必要がある。Lloyd らは、破骨細胞分化因子である RANKL をマウスの腹腔内投与したところ、骨代謝回転および皮質骨の骨吸収を有意に増加させ骨量、石灰化および強度を減少させたと述べているが、Yasuda らは、副作用として骨粗鬆症のような全身症状を引き起こす可能性を報告している。一方、マウスの歯の移動実験において RANKL を口腔内局所注射にて投与したところ、破骨細胞活性を局所的に高め、全身的副作用を引き起こすことなく、歯の移動速度を加速させたことが報告されている。そのため、RMA においても同様に、腹腔内投与を行った場合、全身に薬物が循環されることで目的とする組織以外においても破骨細胞活性が抑制される可能性が考えられる。そこで今回は、今後の臨床応用を考慮し、正常な骨代謝状態である WT マウスを用いて、21日間の実験的歯牙移動モデルマウスの作成を行い、RMA の口腔内局所注射を行うことで局所的に破骨細胞活性を抑制し歯牙移動をコントロールできるかどうかを検討することを目的とした。あわせて歯

牙移動を行った際の歯周組織変化の観察、また局所注射が全身に及ぼす影響についても検討することとした。

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 WT マウス(C57BL/6J)を使用した。これらのマウスは、CLEA Japan(Tokyo)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(CLEA Japan, Tokyo)とし、また飲料水は水道水を用い、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 AGUD359 号)、動物実験指針に従った。

2. 実験的歯牙移動モデルマウス

三種混合麻酔薬：塩酸メデトミジン(Meiji Seika Pharma CO.,Ltd.,Tokyo)、ミダゾラム(Astellas Pharma Inc.,Tokyo)、酒石酸ブトルファノール(Meiji Seika Pharma CO.,Ltd.)の腹腔内投与による全身麻酔下にて、上顎切歯と左側第一臼歯間に 10gf の Ni-Ti closed coil spring を装着することで左側第一臼歯の近心移動を引き起こし(loaded 側)、実験的歯牙移動モデルマウスの作成(n=6)を行った。反対側である右側第一臼歯部はコントロール(unloaded 側)とした。

3. リベロマイシン A(RMA)局所投与

8 週齢の WT マウス (n=6) を用い、RMA(Reveromycin A 3Na salt)非投与群として生理食塩水を 14 日連続投与する群(以下 14days RMA-)、21 日連続投与する群(21days RMA-)と RMA(1.0mg/kg of weight)を 14 日連続投与する群(14days RMA+)、21 日連続投与する群(21days RMA+)の 4 群に対し、10gf の Ni-Ti closed coil spring 装着 3 日前より 1 日 2 回の頻度で上顎左側第一臼歯部頬側粘膜に局所注射した。投与濃度、前投与期間については、Tanaka らの論文を参考に行った。

4. マイクロ CT 撮影

歯牙移動モデルマウス作成実験においては、歯の移動 3 日後、7 日後、14 日後、21 日後に上顎骨の採取を行い、RMA 投与実験においては、歯の移動 14 日後、21 日後に上顎骨と右側脛骨頸部を採取した後、マイクロ CT (Rigaku, Tokyo)にて撮影を行った。撮影条件は、管電圧 90kV、管電流 $88 \mu\text{A}$ 、撮影時間 2 分、画素サイズは、 $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ である。移動距離計測の解析は、ソフト TRI/3D-BON(RATOC SYSTEM ENGINEERING CO.,LTD,Tokyo)で行った。上顎骨の歯の移動距離計測は、矢状断と水平断にて最狭窄部が観察できるよう調節し、計測を行った。また、移動様式を確認するため、上顎骨の第一臼歯の傾斜角度の計測を行い、上顎第一臼歯遠心口蓋根(M 1 DP)と上顎第二臼歯、第三臼歯による咬合平面との間の角度を傾斜角度とし、計測を行った。右側脛骨頸部はスライス厚 $50 \mu\text{m}$ 、連続 100 スライスの範囲で分析した。皮質骨の輪郭を半自動式に描出し、除去した後、骨体積/組織体積(BV/TV)と骨梁間隔(Tb.Sp)を算出した。

5. 病理組織学的観察

歯牙移動モデルマウス作成実験においては、上顎骨を歯の移動3日後、7日後、14日後、21日後に摘出し、RMA投与実験においては、上顎骨を歯の移動14日後、21日後に摘出を行い、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、通法に従ってパラフィン包埋を行い、5 μ mの水平断方向の連続組織切片を作製した。組織観察部位は根分岐部から根尖までを3等分した根分岐部より1/3部位を観察した。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 (SIGMA Diagnostic, St.Louis, MO,USA)を用いて行い、光学顕微鏡下で歯周組織を観察した。根間中隔の骨量計測に関しては、Sprogarらの方法に準じて行った。またTRAP染色を施した後の破骨細胞数計測に関しては、上顎第一臼歯遠心口蓋根(M1DP)周囲の歯槽骨表面の距離を計測し、その歯槽骨表面の破骨細胞数を計測した。

6. 血清骨代謝マーカーの測定

WTマウスにRMA局所注射を行い、投与後の血液を採取した。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)を用いて行った。血中TRAP濃度はELISAキット(Immunodiagnostic Systems Ltd, Ontario, Canada)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. 歯牙移動モデルマウス作成実験

1) 移動距離

矯正力を加えていないUnloaded側ではM1とM2との間に距離は認められない。歯の実験的移動3日後、7日後の間では移動距離に有意な差は認められなかった。また、7日後から14日後にかけて移動距離が大きくなる傾向を認めたが、有意な差は認められなかった。一方、21日後においては、3日後、7日後、14日後と比較して移動距離が有意な差をもって増加している所見が認められた。

2) 傾斜角度

歯の実験的移動3日後、7日後の間では上顎第一臼歯遠心口蓋根傾斜角度に有意な差は認められなかった。また、7日後から14日後にかけて傾斜角度が大きくなる傾向を認めたが、有意な差は認められなかった。一方、21日後においては、3日後、7日後、14日後と比較して傾斜角度が有意な差をもって増加している所見が認められた。

3) 歯周組織の HE 染色組織所見

圧迫側では、3日後に歯根膜空隙の著明な狭窄が認められ、7日後には歯根膜組織の硝子化が認められた。14日後では硝子様変性部は少なくなり、歯槽骨表面には破骨細胞が認められた。21日後には歯根膜の幅が回復している所見が認められた。牽引側では、3日後、7日後では歯根膜の幅は拡大し、歯根膜繊維の緊張、繊維芽細胞の伸展が認められた。14日後では歯根膜繊維の緊張は消失しており、21日後には歯根膜の幅は回復し、繊維束が歯槽骨からセメント質方向に配列している所見が認められた。

4) 破骨細胞数の計測

歯の実験的移動3日後、7日後、14日後、21日後すべてにおいて歯根周囲歯槽骨に破骨細胞が多数認められた。歯の実験的移動3日後、7日後、14日後の間では破骨細胞数に有意な差は認められなかった。一方、21日後は14日後と比較し、有意な差をもって破骨細胞数が多い所見が認められた。

2. リベロマイシン A(RMA)局所投与実験

1) 移動距離

矯正力を加えていない Unloaded 側では M1 と M2 との間に距離は認められなかった。RMA 非投与群(RMA-群)においては、歯の実験的移動14日後と比較して21日後では移動距離が有意な差をもって増加している所見が認められた。歯の実験的移動14日後において RMA 投与群(RMA+群)は RMA-群と比較し、有意差を認めなかったが、歯の移動距離が抑えられている傾向があった。一方、歯の実験的移動21日後において、RMA+群は RMA-群と比較し有意に移動距離が減少し、14日後 RMA-群に近似した値を示した。

2) 歯周組織の HE 染色組織所見および骨量(BV/TV)計測

Unloaded 側において、RMA-群の歯の実験的移動14日後と21日後の BV/TV の間に、有意な差は認められなかった。また、歯の実験的移動14日後 RMA+群、21日後 RMA+群ともに、RMA-群と比較して、BV/TV の値に有意な差は認められなかった。一方、矯正力を加えた Loaded 側においては、RMA-群の歯の実験的移動14日後と比較して21日後では BV/TV の値に有意差は認めなかったが、小さい傾向を示した。さらに、歯の実験的移動14日後において RMA+群は RMA-群と比較し、有意な差を認めなかったが、BV/TV の値が大きい傾向を認めた。また、歯の実験的移動21日後において 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) 破骨細胞数の計測

RMA-群において、歯の実験的移動14日後、21日後ともに歯根周囲歯槽骨に破骨細胞が多数認められた。21日後 RMA-群は14日後 RMA-群と比較し、有意な差をもって破骨細胞数の増加が認められた。歯の実験的移動14日後において RMA+群は RMA-群と比較し、有意差は認めなかったが、破骨細胞数が少ない傾向を示した。一方、歯の実験的移動21日後では RMA+群は RMA-群と比較し、有意な差をもって破骨細胞数は減少し、歯の実験的移動14日後 RMA-群と近似した数まで抑えら

れていた。

4) 脛骨頸部海綿骨構造の解析

RMA-群において、歯の実験的移動 14 日後と 21 日後の骨量 (BV/TV)、骨梁間隔 (Tb. sp) に、有意な差は認められなかった。また、歯の実験的移動 14 日後 RMA+群、歯の実験的移動 21 日後 RMA+群ともに、RMA-群と比較して、BV/TV、Tb. sp ともに有意な差は認められなかった。

5) 血清骨代謝マーカーの測定

RMA-群において、歯の実験的移動 14 日後と 21 日後の血中 TRAP 値、血清 ALP 値に有意な差は認められなかった。また、歯の実験的移動 14 日後 RMA+群、歯の実験的移動 21 日後 RMA+群ともに、RMA-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

現在までに、矯正学的歯の移動のメカニズムを解明するため、イヌ、ラット、マウスなどの動物を用いて多くの歯の移動に関する基礎研究が行われてきた。それらの中でも、マウスに対する歯の移動実験方法では、エラスティックを第一臼歯、第二臼歯間に挿入する方法 (Waldo 法) や超弾性コイルスプリングを用いる方法などが報告されている。Waldo 法は歯の移動を行うことが可能であるが、欠点として、エラスティック装着の際、一時的に強い力がかかること、正確な矯正力を付与することが困難であること、歯が移動するとエラスティックが 5 日間ほどで脱落してしまうことなどがあげられる。一方、今回用いた超弾性コイルスプリングによる歯の実験的移動モデルでは、マウスの歯に対して一定の力を持続的にかけることができ、数日から数週間と長期にわたって観察できる。そのため、装置が脱落することなく、長期間一定の力を歯に加えられ、Waldo 法と比較して長期観察を望む実験モデルに有効であると考えられる。Tanaka らは、Osteoprotegerin 遺伝子欠損マウス (以下 OPG KO マウス) に Ni-Ti coil spring にて 14 日間の実験的歯の移動を行い、RMA の腹腔内への連続投与したところ、歯槽骨の吸収を抑制させ、歯の移動距離を抑制したと報告した。しかし正常な骨代謝の WT マウスでは、歯槽骨吸収の抑制や歯の移動量の抑制は認められなかったと報告している。このように、超弾性コイルスプリングを用いた歯の移動実験においても、荷重負荷の初期における反応を観察している研究が多く、14 日間以上の歯の移動の報告はほとんど認められない。

一般的に、歯に矯正力を負荷すると、①歯根膜および歯槽骨の粘弾性特性による初期移動、②硝子様変性組織の出現による歯の移動の停滞、③変性組織の消失と骨改造に伴う歯の再移動、の順に移動様相を示すと言われている。今回の実験において、歯の移動 3 日後において、わずかな歯の移動を認め、その後 14 日後までは有意な差をもつての移動は認められなかった。その後、歯の移動 14 日後から 21 日後までの間には移動距離が大きくなり、歯の移動 21 日後では 14 日後と比較して移動距離が約 3 倍と大きく移動した。病理組織学的には、圧迫側の歯周組織において、歯の移動 3 日後で歯根膜空隙の狭窄を認め、7 日後には歯根膜組織の硝子化が認められた。歯の移動 14 日後では硝子様

変性部は残存していたが、21 日後には消失している所見が認められた。また、破骨細胞数、歯の傾斜角度においても歯の移動 3 日後、7 日後、14 日後の間では有意な差は認められなかったが、21 日後は 14 日後と比較し、有意な差をもって大きくなる所見が認められた。つまり、歯の移動 14 日後から 21 日後にかけて、歯の移動の停滞が終了し、ダイナミックな歯の移動が行われたと考えられた。それゆえ、21 日間の歯の移動の観察は、歯の移動 14 日以降に起こる新たな移動様相を確認するのに有意義なものであると考えられた。

2. ビスフォスフォネートとリベロマイシン A について

骨代謝をコントロールする薬剤は多数存在するが、代表的な薬剤として、ビスフォスフォネート (BP) 製剤があり、現在骨粗鬆症の第一選択薬として用いられている。Shoji らは OPG KO マウスに waldo 法にて歯の実験的移動を行い、BP を投与することにより、歯槽骨の吸収や歯の移動距離を正常化したと報告した。BP は合成ピロリン酸類似体で、破骨細胞へ直接作用して、破骨細胞の骨吸収を強力に抑制するといわれているが、骨芽細胞にも作用するとの報告もある。BP は骨に対して強力に作用するという利点がある一方、骨内に沈着し、半減期が著しく長く、約 10 年前後の長期にわたり骨に残存するという報告もされている。また近年、BP の経口投与は、骨粗鬆症性骨折のリスクを軽減するのに効果的であるが、顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw、BRONJ) のリスク増加、非定型大腿骨骨折、心房細動などの副作用が懸念されている。現在、顎骨壊死の発生頻度は、BP 系薬剤投与症例全体の 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。また、BRONJ の病因は完全には解明されていないため、診断および管理が困難であると報告されている。そこで我々は骨代謝をコントロールする薬剤として BP にかわり、RMA に注目した。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、特異的にアポトーシスを誘発する。そのため、RMA は破骨細胞活性の抑制を通じて骨転移の抑制に有効であり、また、卵巣摘出マウスやカルシウム欠乏食で飼育したマウスでは、RMA を投与することで、骨粗鬆症の治療効果を示している。さらに、RMA は、経口投与では胃酸により分解され効果がないとされていること、また半減期が約 1 時間と著しく短いことから、口腔領域への局所的に高濃度の投与を行ったとしても、全身的な副作用について配慮する必要がないことは大きな利点であると考えられる。

3. RMA 局所投与が骨代謝に及ぼす影響

今回の実験において、RMA 非投与群において、歯の実験的移動 21 日後は 14 日後と比較して、著しい歯の移動を引き起こした。病理組織学的には、有意に破骨細胞数が増加し、根間中隔では骨量が少なくなる傾向が認められた。Tanaka らは WT マウスにおいて同様の Ni-Ti coil spring を用いて 14 日間の歯の移動を行い、RMA の腹腔内への連続投与を行ったところ破骨細胞数の減少は認めたが、骨量、歯の移動距離に有意な差は認めなかったと報告している。今回の実験では歯の実験的移動 14 日後では Tanaka らとほぼ

同様の結果が確認されたが、歯の実験的移動 21 日後においては、RMA 局所注射により破骨細胞数は有意に減少し、根間中隔の骨量が高い割合で維持され、歯の移動距離に関しても有意に減少していた。これらより 21 日間の長期間の歯の移動により、RMA 投与の効果により明確に確認することができたと考えられる。

また本実験では RMA 局所注射の全身的副作用の評価を行った。まず遠隔組織への影響を評価するために、血液検査および、脛骨頸部における、骨量、骨梁間隔の計測を行った。血液検査では、実験的歯の移動 14 日後および 21 日後ともに RMA 投与群、非投与群間において血中 TRAP、血清 ALP に有意な差が認められなかったことより、RMA 局所注射は全身的な骨芽細胞、破骨細胞に影響は与えないことが考えられた。さらに、実験的歯の移動 14 日後および 21 日後ともに RMA 投与群、非投与群間において脛骨近位骨端における、骨量、骨梁間隔に有意な差が認められなかったことより、遠隔組織に影響は与えない可能性が考えられた。また隣在組織への影響の評価のため、unloaded 側の根間中隔の骨量、破骨細胞数の計測を行ったところ、RMA 投与群、非投与群間において根間中隔の骨量、破骨細胞数に有意な差は認められなかった。Yamashiro らはラットにおいて、右側口蓋粘膜にロピバカインを局所注射したところ、反対側である左側口蓋粘膜では最大濃度時において注射側の 6%のみ検出されたことを報告しており、口腔内局所注射の薬物動態としては、主に薬物は注射側に限局するものと考えられる。また、Kimi らはラットにおいて、右側臼歯部の口蓋粘膜にロピバカインを局所注射したところ、同側切歯骨部においてロピバカインはほとんど検出されなかったと報告しており、口腔内局所注射は左右的のみならず、近遠心的にも限局して作用することが考えられた。一方、マウスを用いた歯牙移動実験においては上顎臼歯部粘膜へ OPG を局所注射したところ、臼歯の歯牙移動を抑制するが、薬剤濃度によっては切歯の歯牙移動も妨げるという報告もあり、薬剤の局所注射を用いて、限局した部位における歯牙移動抑制を行うためには、今後注射時の適正濃度などの検討が必要であると考えられた。

以上のことより、今後より詳細な検討は必要であるが RMA 局所注射は、局所における破骨細胞活性をコントロールすることで、全身的副作用なく歯の移動のコントロールができる可能性が示唆された。

V. 結論

本研究は WT マウスを用いて、長期間における実験的歯牙移動モデルマウスの作成を行い、さらに RMA 口腔内局所注射を行うことで局所的に破骨細胞活性を抑制し歯牙移動をコントロールできるかどうかを検討することを目的とした。あわせて歯牙移動を行った際の歯周組織変化の観察、また局所注射が全身に及ぼす影響についても検討することとし、以下の結果を得た。

1. 実験的歯牙移動モデルマウス作成実験について

- 1) 超弾性コイルスプリングをマウスの第一臼歯に装着したところ、歯の移動 3 日後には、わずかな歯の移動を認め、その後 14 日後までは有意な差をもつての移動は認められなかった。さらに、歯の移動 14 日後から 21 日後までの間には移動距離が大

きくなり、歯の移動 21 日後では 14 日後と比較して移動距離が約 3 倍となった。

- 2) 歯の傾斜角度と破骨細胞数においては、歯の移動 3 日後、7 日後、14 日後の間では有意な差は認められなかったが、21 日後は 14 日後と比較し、有意な差をもって大きくなる所見が認められた。

2. リベロマイシン A(RMA)局所投与実験について

- 1) 歯の実験的移動 21 日後において、RMA+群は RMA-群と比較し有意に移動距離が減少した。
- 2) 歯の実験的移動 21 日後において 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、高い割合で根間中隔の骨量が維持された。
- 3) 歯の実験的移動 21 日後では RMA+群は RMA-群と比較し、有意な差をもって破骨細胞数は減少した。
- 4) 実験的移動 14 日後および 21 日後ともに RMA 投与群、非投与群間において脛骨近位骨端における、骨量、骨梁間隔に有意な差が認められなかった。
- 5) 実験的歯の移動 14 日後および 21 日後ともに RMA 投与群、非投与群間において血中 TRAP、血清 ALP に有意な差が認められなかった。

以上の結果より、正常な骨代謝状態の WT マウスにおいて、超弾性コイルスプリングを用いることで、歯の移動 14 日から 21 日の間においてダイナミックな歯の移動が初めて観察され、RMA 口腔内局所注射は全身的副作用なく、歯の移動のコントロールが行える薬剤及び投与方法である可能性が示唆された。