

比を測定した。その後、下顎骨と大腿骨を取り出し、軟X線写真撮影から、各々の相対的平均骨塩量指数を算定した。また、各群の2匹については、薄切切片を作成し、顕微鏡にて観察した。

本研究において、申請者はまず、加齢、咬合支持、栄養が全身持久性に及ぼす影響について検討し、遊泳運動時間と血中諸指標から、高齢期における咬合支持の喪失とカルシウムおよびビタミンD摂取の不足が全身運動機能を低下させる大きな因子となりうることを確認した。次に、下顎骨と大腿骨の骨塩量を算出し、75週齢の低Ca・VD欠乏臼歯切除群におけるそれは、すべての群に比して、有意に減少したことを確認し、さらに、顕微鏡による

組織学的所見からも、これらの変化を確認した。なお、本研究は、対照群および各実験群の設定や軟X線写真を用いる骨塩量の測定における至適撮影条件の設定などから、実験が周到な計画のもとに遂行されたことが伺える。

以上の結果から、生理的加齢変化に加えて、歯の喪失、飼育飼料の粉末化、栄養不良が骨の粗鬆化を進行させる要因の一つであること、さらに、全身の活動性に大きな影響を及ぼすことが確認され、高齢期における咬合・咀嚼機能の維持と適正な栄養摂取の重要性が示唆された。

本研究によって得られたこれらの結果は歯科補綴学ならびに関連諸学科の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、本論文は学位授与に値すると判定した。

### 最終試験（学力の確認）の要旨

論文発表会ならびに審査委員会における各種の試問、とくに、学位論文に関する試問に対し、適切な回答を行った。

以上の結果、博士（歯学）の学位を授与するに十分な学力を有するものと判定する。

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 安念 勇人 (北海道)                                     |
| 学位の種類   | 博士 (歯学)   |
| 学位記番号   | 甲 第43号  |
| 学位授与の日付 | 平成9年3月21日                                       |
| 学位授与の要旨 | 学位規則第5条1項該当 (課程博士)                              |
| 学位論文題目  | <b>Bisphosphonate (YM-175) 局所投与の実験的歯の移動への影響</b> |
| 論文審査委員  | 主査 教授 石井 英司<br>副査 教授 賀来 亨<br>副査 教授 小鷲 悠典        |

### 論文内容の要旨

#### I. 緒 言

歯の移動を効率的に行うためにPGE<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, 活性型VD<sub>3</sub>などの薬物応用が試みられてきたが、副作用として歯根吸収が増大することが報告されている。一方、歯の移動を抑制し、固定源の強化をはかる薬物投与も行われてきている。これは「薬理的固定」といわれ、その代表的薬物としてbisphosphonatesが用いられてきている。

Bisphosphonatesにはこれまで多数のアナログが報告されてきており、初期の第一世代のものから、改良が加えられ、現在まで第三世代のものまであり、最も強い骨吸収抑制効果を示している。YM-175は第三世代に属し、実験的に骨粗鬆症の治療、歯周炎における歯槽骨吸収抑制などに試みられてきているが、歯の移動の固定源の強化を目的として用いられた報告はみられない。

また、他のbisphosphonatesの骨吸収抑制作用の作用

機序として破骨細胞へのアポトーシスの関与が示唆されているが、不明な点が少なくない。

本研究では、ラットの実験的歯の移動を行い、(1)YM-175局投与による歯の移動の抑制効果の有無、(2)同部の組織学的観察、(3)TUNEL法による破骨細胞の細胞死の観察、(4)YM-175全身投与による破骨細胞の細胞死の細胞死の光顕的および電顕的観察を行い、YM-175の薬理学的固定の有用性およびその薬理作用に破骨細胞のアポトーシス誘発作用が関与しているか否かについて考察することを目的とした。

## II. 材料および方法

### 1. 実験動物

実験動物には体重200~230 gの雄性Wistar系ラット9週齢を用いた。

### 2. 実験的歯の移動方法

Igarashiらの方法に従い、加工硬化型ニッケルチタンワイヤー-BIO-FLEX (直径0.012インチ)(ロッキーマウンテンモリタ)を用い、左右第一臼歯を頰側に移動させた。なお移動期間は21日間とした。

**3. 薬物投与方法** 上顎左側を実験側、上顎右側を対照側とし、実験側には実験開始3日前より、0.04% YM-175 (山之内製薬より供与) 25 $\mu$ lを上顎第一臼歯部口蓋粘膜下に投与し、以後3日毎に投与した。また対照側の右側には0.9% NaCl 25 $\mu$ lを同様の方法で投与した。また、YM-175の全身投与による影響を検索するために、1 mg/kg YM-175を腹腔内投与し、1日後に屠殺後、大腿骨および脛骨を摘出し、光顕および電顕にて同部の破骨細胞を観察した。

**4. 歯牙移動の計測方法** 0, 3, 9, 15, 21日目にシリコーン印象材で採得後、超硬石膏にて上顎の歯列模型を作成した。万能投影機にて10倍に拡大後、臼歯部をトレースし、第二臼歯および第三臼歯を基準として第一臼歯近心舌側溝間の点を計測点としてレジタイサー(KL4300, GRAFTEC)を用いてパーソナルコンピューター(PC-9801 VM, NEC)に入力し、左右の計測点の移動距離を算出した。

なお、データ処理のコンピュータープログラムはN88 BASICにて作成した。

実験側および対照側の計測値は、Student-t testにより統計的に比較検討した。

**5. 光顕的観察** 0, 3, 9, 15, 21日目に屠殺し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定を行い、14.5%EDTAにて2週間脱灰後、通法にしたがってパラフィン包埋し、第一臼歯近心頰側根根分岐部から4 $\mu$ mの連続切片を作成し、ヘマトキシリンエオシン(HE)染色、酒石酸耐性酸

性ホルファターゼ(TRAP)染色を施した。

さらにアポトーシスの指標の一つといわれているDNAの断片化の有無を認識するin situ DNA nick end labelingをGavrieliらの方法に従ったTUNEL法により行った。これらの染色は7切片ごとに行い1個体から各10枚ずつの標本を作成し、第1臼歯近心頰側根周囲の破骨細胞のTUNEL陽性数およびTRAP陽性数を求めた。

**6. 電顕的観察** 大腿骨および脛骨を摘出し、変法Karnovsky固定液にて固定を行い、14.5%EDTAにて2週間脱灰後、通法にしたがって、Epon 812に包埋し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

## III. 結 果

**1. 歯の移動距離** 実験側は対照側と比較し、経時的に移動距離の抑制がみられ、9, 15, 21日目にそれぞれ有意差が認められた( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。

**2. 光顕的観察** 実験期間中、実験側および対照側は、いずれにおいても、急性炎症を思わせる著明な炎症所見は観察されなかった。歯の移動開始3日目においては両側とも多数の破骨細胞が観察され、両者を統計的に比較検討すると、3日目では実験側のほうが有意に破骨細胞数が多かったものの( $P < 0.01$ )、15日目では逆に実験側の方が有意に少ない値を示していた( $P < 0.05$ )。

TUNEL陽性を示した破骨細胞は3日目の対照側では観察されず、実験側でも僅かではあったが、9, 15, 21日目と経時的に増加しており、いずれにおいても対照側より有意に多い数値を示した( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ )。

**3. 電顕的観察** YM-175による破骨細胞のアポトーシスを電顕的に観察するために、YM-175の全身投与後に、生理的に破骨細胞がより多く観察される大腿骨および脛骨を観察した。破骨細胞の波状縁は消失傾向にあり、骨面から遊離しているものが認められた。また核の半円形の濃染を示すものもみられ、アポトーシスの形態を呈していた。

## IV. 考 察

Bisphosphonatesはこれまでに、主に代謝性骨疾患の治療薬として用いられてきたが、歯科領域への応用として、歯石形成の予防、歯周炎モデルの歯槽骨吸収抑制作用が報告されており、最近では、矯正歯の移動時の固定源の強化や後戻りの防止、歯根吸収の抑制作用が報告されている。そのなかで、YM-175を用いた報告は歯周炎モデルでの歯槽骨吸収抑制作用のみが報告されており、矯正歯の移動時の固定源の強化についての報告はない。本実験結果からYM-175は、矯正歯の移動時の固定

原の強化に有用であり、薬理的固定が可能であることが示唆された。

また、その作用機序として、破骨細胞の分化の抑制、成熟破骨細胞の活性の抑制、骨芽細胞を介しての破骨細胞の抑制などの報告があるが、最近になり、他のbispho-

phonatesから破骨細胞のアポトーシスの誘発が報告され、注目されている。本実験結果からYM-175においても破骨細胞のアポトーシスが誘発されることが実証され、bisphosphonatesの骨吸収抑制作用に関与していることが示唆された。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

矯正的に歯を移動する際に、圧迫側での歯槽骨の骨吸収と牽引側での骨添加がその主な作用であることは疑う余地のないことである。歯の移動を促進する手段の一つとして薬物により骨吸収の促進を図る方法が種々試みられている。しかしまた一方、圧迫側における骨吸収の過程を薬物により阻害することにより相対的に歯の移動の促進を図る試みが行われ、薬理的固定と名付けられている。このための薬物として種々のものが試みられているが、従来よりosteoporosis等の治療に用いられているbisphosphonatesが最近注目されている。矯正的な歯の移動の際に本薬物を投与したところ、著しい歯の移動の抑制があることが報告されているがその原因については不明である。

以上の点に着目し、本研究ではbisphosphonateの局所投与下で歯の移動の抑制を起こさせた上で、破骨細胞の細胞内変化に局限してその原因因子を探ることを目的とした。比較的若いWistar系ratの上顎歯列に側方拡大装置を装着することにより比較的弱い矯正力を左右臼歯部に均等にかけることとした。左側を実験側、右側を対照

側として、実験側には最新のbisphosphonateであるYM-175を局所投与した。

研究結果は要旨に述べられている如くであり、YM-175を局所投与した部位では歯の移動距離が著しく減少し、さらに破骨細胞数の減少が著明であった。組織学的検索において、実験側、対照側の両方でアポトーシスに陥った破骨細胞が確認されたが、実験側が対照側に比べて統計的に有意に多かった。またYM-175全身投与下で大腿骨および脛骨部の観察からアポトーシスに陥った破骨細胞が電顕的および光顕的に確認されたがこれらの細胞は局所投与下で観察されたものと同一種であると考えられた。

これらより、薬理的固定の手段として、YM-175が有効であることが確認され、その原因因子としてアポトーシスに関与していることが示唆された。

以上の結果から、本論文は、矯正歯科学の進歩発展に寄与するところが大きであり、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

## 最終試験（学力の確認）の要旨

論文発表会ならびに審査委員会における各種の試問、とくに、学位論文に関する試問に対し、適切な回答を行った。

以上の結果、博士（歯学）の学位を授与するに十分な学力を有するものと判定する。