

〔原 著〕

Bisphosphonate (YM-175) 局所投与による  
実験的歯の移動への影響について  
—破骨細胞のapoptosis誘発について—

安念 勇人, 安彦 善裕\*, 中出 修\*, 桑原 幹夫, 賀来 亨\*

北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座  
\*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 溝口 到教授)  
\*(主任: 賀来 亨教授)

Effect of topical administration of a bisphosphonate  
(YM-175) on experimental tooth movement  
—induction of apoptosis in osteoclasts—

Hayato ANNEN, Yoshihiro ABIKO\*, Osamu NAKADE\*,  
Mikio KUWABARA and Tohru KAKU\*

Department of Orthodontics, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido  
\*Department of Oral Pathology, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Itaru MIZOGUCHI)  
\*(Chief: Prof. Tohru KAKU)

**Abstract**

The present study examines whether YM-175 inhibits the tooth movement and induces osteoclast apoptosis by topical administration in rats. To better understand the effects of 25 $\mu$ l of 0.04% YM-175 solution, it was injected into the palatal submucosal area adjacent to the right upper first molar (experimental side) 3 days prior to use of the appliance. The left upper first molar served as a control with an injection of 25 $\mu$ l of 0.9% NaCl solution into the corresponding area (control side). Topical administrations made a total of nine times, every 3 days. Experimental tooth movement was performed over a period of 21 days. The measurement of tooth movement was performed with a stone model of the upper jaw made by taking an impression with silicone materials on days 0, 3, 9, 15, and 21 after the appliance was set. Animals were sacrificed at each experimental day. Hematoxylin-eosin and tartrate-resistant

acid phosphatase staining and the TUNEL method were used for histological studies, identification of osteoclasts and identification of apoptosis, respectively.

The results were as follows :

1. Tooth movement on the experimental side was significantly smaller than on the control side.
2. The number of osteoclasts on the experimental side was significantly larger than on the control side on day 3, but significantly smaller than on the control side on day 15.
3. There were apoptotic osteoclasts on both the experimental and the control sides, and the number of apoptotic osteoclasts on the experimental side was significantly larger than on the control side at each time the experiments started.

These results suggested that YM-175 may be a useful agent for the pharmacological anchorage of orthodontic tooth movement and induction of osteoclast apoptosis may be the main mechanism with which YM-175 inhibits bone resorption.

**Key words :** Bisphosphonate, YM-175, Osteoclasts, Apoptosis, Tooth movement

## I. 緒 言

矯正歯の移動の促進を試みるために、これまで実験的にPGE<sub>1</sub>, E<sub>2</sub><sup>1-3)</sup>, 活性型VD<sub>3</sub><sup>4-6)</sup>の応用が行われてきたが、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<sup>7)</sup>。一方、固定源を強化することにより、相対的に移動歯の移動を促進しようとする「薬理的固定」<sup>8)</sup>という概念が唱えられてきており、歯の移動抑制のために、非ステロイド系消炎鎮痛剤のIndomethacin<sup>9)</sup>やFlurbiprofen<sup>10)</sup>の投与が試みられてきた。また最近、骨吸収抑制剤のBisphosphonates (以下BPsと略す)が、薬理的固定に有用であるとの報告がなされており、臨床応用への可能性が示唆されている<sup>11-13)</sup>。

BPsは生体内に存在する無機ピロリン酸のP-O-P構造をP-C-P構造に変換した合成物質で、骨などの硬組織に対し高い親和性をもち、酵素による分解を受けず生体内で安定な物質である。その薬理作用として骨吸収抑制作用および異所性石灰化抑制作用を有するため、骨粗鬆症<sup>14)</sup>や骨Paget病<sup>15)</sup>, 癌などによる高Ca

血症<sup>16,17)</sup>などの代謝性骨疾患の治療に応用され、さらに、より強力な骨吸収抑制作用をもつアナログが次々と開発されている<sup>18)</sup>。そのなかで、これまでに矯正歯の移動への影響について報告されたものには、HEBP, alendronate, risedronateがあり、いずれも薬理的固定への有用性が示唆されてきている<sup>11-13)</sup>。最近開発された第3世代のBPsのひとつであるdisodium dihydrogen methylene-1, 1-bisphosphonic acid (以下YM-175と略す) は上記のものと同等あるいはそれ以上の高い骨吸収抑制効果が期待されているが<sup>19)</sup>, この薬剤を用いた矯正歯の移動への影響についての報告はいまだ行われていない。また、BPsの作用機序として、破骨細胞の分化の抑制<sup>20-22)</sup>や成熟破骨細胞の活性の抑制<sup>23-25)</sup>, 破骨細胞への障害作用<sup>26,27)</sup>あるいは骨芽細胞を介しての破骨細胞の抑制<sup>28)</sup>など、さまざまな説が唱えられてきているが、いまだ不明な点が多い。これに加えて最近になり、一部のBPsに破骨細胞のアポトーシス誘発作用が報告され、BPsの骨吸収抑制効果への直接的な関与が示唆されている<sup>29)</sup>。

そこで、本研究では、ラットの上顎第一臼歯に実験的歯の移動を行い、1)YM-175局所投与による歯の移動の抑制効果の有無、2)同部の顕微鏡的観察、3)TUNEL法による破骨細胞の細胞死の観察を行い、YM-175の薬理的固定応用への有用性およびその骨吸収抑制作用の作用機序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週齢を合計38匹用い、Bisphosphonate(以下BPと略す)YM-175局所投与による歯の移動の距離計測に13匹、光学顕微鏡による観察に25匹用いた。実験動物は、本学動物実験センターにて飼育し、通常のラット用固形試料(オリエンタル酵母工業)と水道水を自由摂取させた。

### 2. 使用薬剤

骨吸収抑制剤であるBPのうち、YM-175(Fig.1)を用いた。なお、YM-175は山之内製薬から供与された。

### 3. 薬物投与方法

YM-175の局所投与による影響を比較検討できるように、同じ動物の上顎左側臼歯部を実験側、上顎右側臼歯部を対照側とした。Fig.2は実験側にトルイジン・メチレンブルー染色液を同じ方法で局所投与したものを示しており、反対側まで薬物が浸透していないことを示している。投与方法としては、10%ペントバルビタール(ネンブタール, Dainabot)の腹腔内投与による全身麻酔後、実験側には0.04%YM-175溶液を、対照側には0.9%NaCl溶液をそれぞれ25 $\mu$ lずつハミルトンガスタイトシリンジ(Hamilton)を

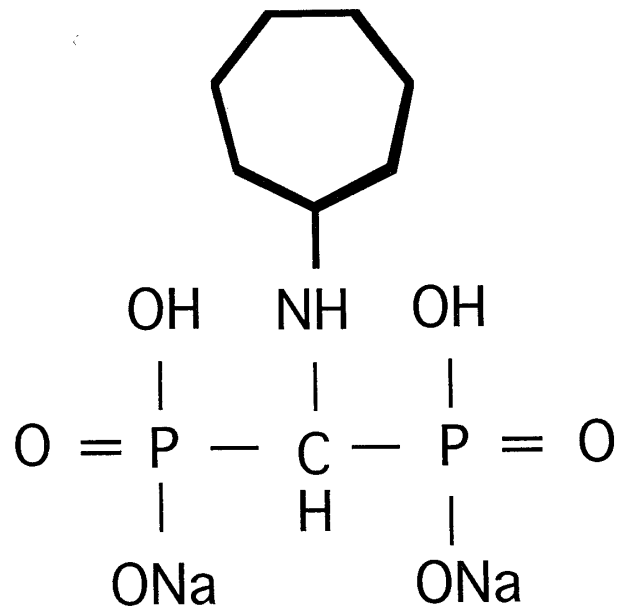


Fig. 1 Chemical structure of YM-175 (disodium dihydrogen methylene-1, 1-bisphosphonic acid).

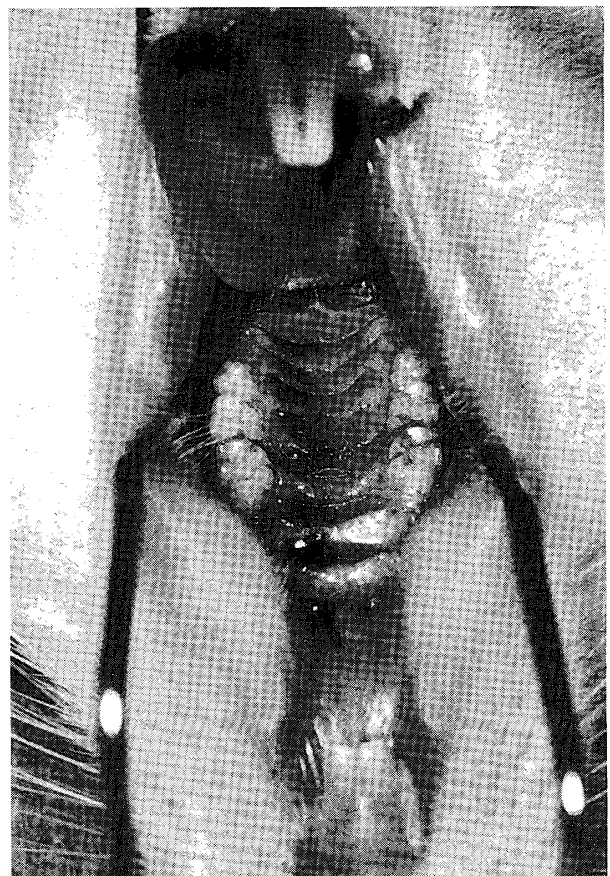


Fig. 2 The extent of diffusion of toluidine-methylene blue dye at topical administration. The pigment of toluidine-methylene blue dye was not diffused at reverse side.

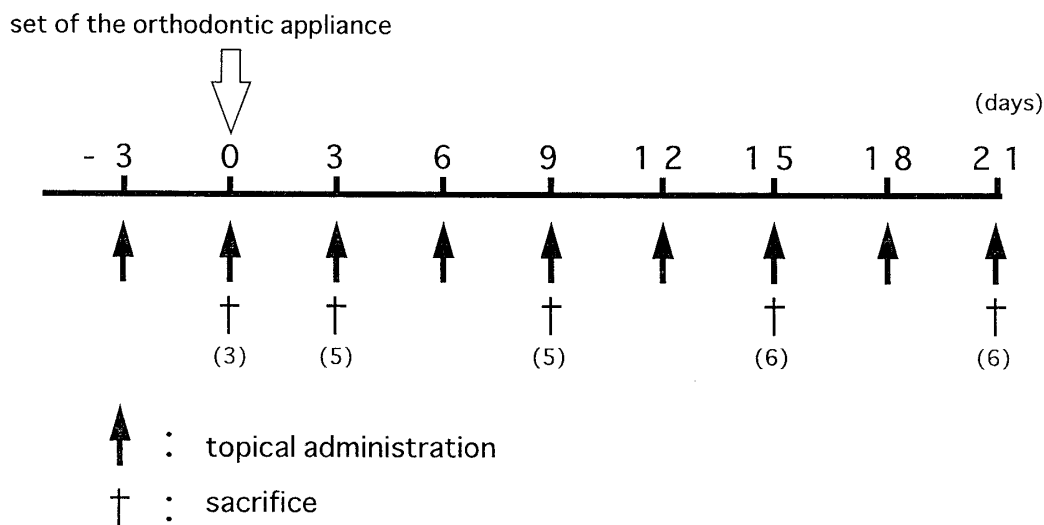


Fig. 3 The experimental protocol at topical administration of YM-175.

用いて上顎臼歯部口蓋粘膜下に局所投与した。投与は実験開始3日前より行い、以後3日毎に投与し、合計9回投与した (Fig.3)。

#### 4. 実験的歯の移動方法

Igarashiら<sup>11)</sup>の方法に従って、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)を用いてFig.4のように規格化した拡大装置を作成した。この装置の両端を両側上顎第一臼歯と第二臼歯間に装着し21日間頰側方向に拡大した。本実験での初期のワイヤーの拡大量は平均1.3mmとなり、矯正力は約18.5gである。矯正力は、オートグラフ (DSS-5000, 島津製作所) で圧縮試験を行うことにより計測した (Fig.5)。なお、荷重の測定は、上方部に備え付けられたロードセルで行い、クロスヘッドスピード: 0.5mm/min, フルスケール: 50gfとした。

#### 5. 歯の移動の計測方法

0, 3, 9, 15, 21日目にシリコン印象材 (Dent Silicone Aqua regular type, 松風) で印象採得後、超硬石膏 (Noritake Super Rock, モリタ) にて歯列模型を作成した。これを、万

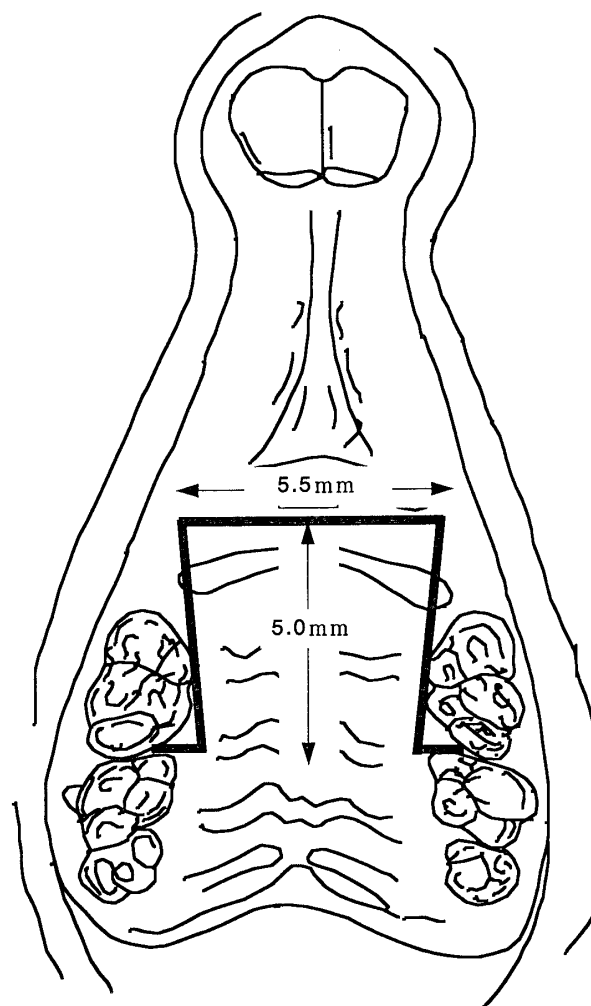


Fig. 4 Orthodontic expansion appliance set between right and left upper first molars in rats.

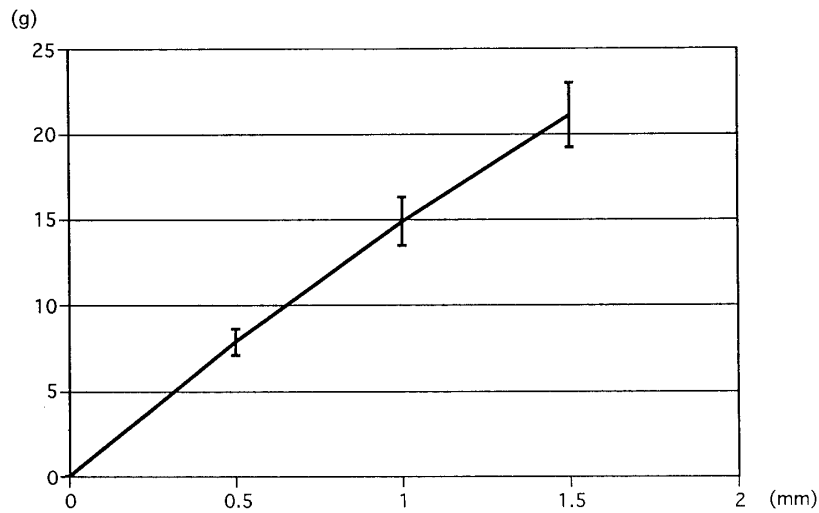


Fig. 5 Force-deflection curve used for the present study.

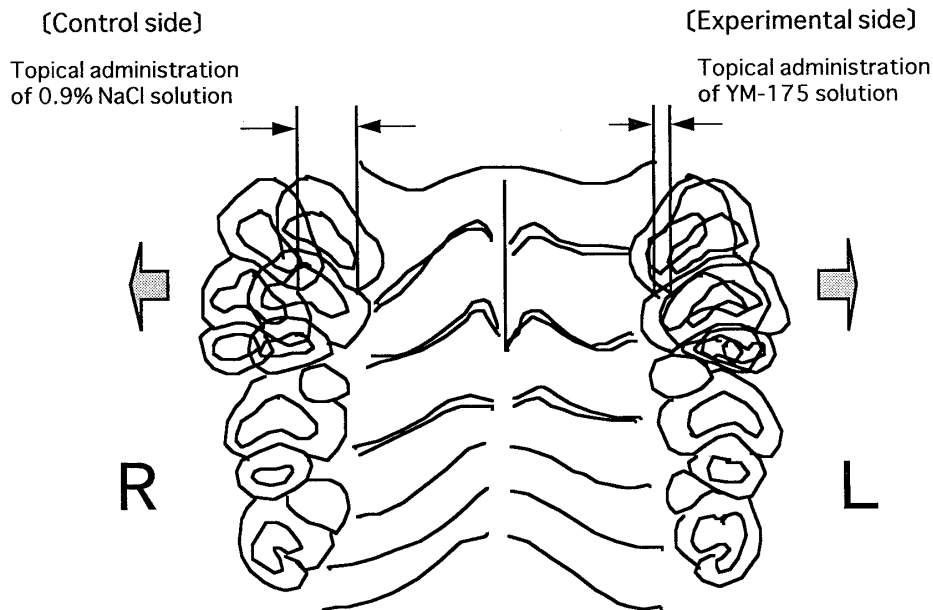


Fig. 6 The superimposed figure of molars in rats.

能投影機 (V-16D, Nikon) にて10倍に拡大後、ラット臼歯部をトレースした。各時期のトレースを第二臼歯および第三臼歯を基準として重ね合せ、左右それぞれの第一臼歯近心舌側溝間の点を計測点としてデジタイザー (KL4300, Graftec) を用いてパーソナルコンピューター (PC-9801VM, NEC) に入力し、左右の計測点の移動距離を算出した (Fig.6)。

なお、データ処理のコンピュータープログラムはN88BASIC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。さらに、経時的抑制効果を評価するために、 $\{1 - (\text{実験側の移動距離} / \text{対照側の移動距離})\} \times 100$ を歯の移動の抑制率 (%) として算出し、比較検討した。

#### 6. 光学顕微鏡 (光顕) による観察

0, 3, 9, 15, 21日目にジエチルエーテル過剰吸引による屠殺後、直ちに上顎骨を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定し、24

時間室温固定した。その後, 14.5%EDTAにて2週間脱灰し, 通法に従い脱水, 透徹後, パラフィンに包埋した。そして, 第一臼歯近心頬側根根分岐部から4 $\mu$ mの連続切片を作成し, 組織学的検索のためにHematoxylin-eosin (HE)染色を, アポトーシスの検索のためにTerminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (以下TUNELと略す)法を, 破骨細胞の同定のために酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (以下TRAPと略す)染色を7切片毎に各10枚ずつ行った。

TUNEL法はGavrieliら<sup>30)</sup>の原法に従って行った。概略を示すと, 切片を脱パラフィン, 脱キシレン, 水洗後, 20 $\mu$ g/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim)含有10mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4)による蛋白分解酵素処理を行った。そして, 2%過酸化水素水による内因性ペルオキシターゼの除去後, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) buffer (pH 7.2, 0.5M sodium cacodylate, 10mM CoCl<sub>2</sub>, 1mM DTT) (Gibco BRL)とbiotin標識-16-2'-deoxyuridin-5'-triphosphate (UTP) (0.04 nmol/ $\mu$ l) (Gibco BRL)によりDNAの断片化をビオチンにより標識した後, TB buffer (3 $\mu$ M sodium citrate, 30 $\mu$ M sodium chloride)中に浸漬した。その後, 蒸留水にて洗浄し, ビオチンにより標識されたDNAに対して, ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ)を反応させ, 最後にペルオキシターゼ発色をヒストファイン (ニチレイ)にて検出した。TRAP染色は, アゾ色素法をBurstoneの方法<sup>31)</sup>に従って行った。概略を示すと脱パラフィン, 脱キシレン, 水洗後, 15分間0.1M酢酸緩衝液に浸漬後, 基質としてnaphtol AS-MX phosphate (Sigma)を, 発色剤としてfast red LB salt (Sigma)を用い, 50mM L(+)酒石酸ナトリウム (Sigma)を含有した0.1M酢酸緩衝液 (pH5.2)を反応液として用い, 切片に反応液を

添加後, 37°C, 15分間反応させた。そして, 染色後各切片を光学顕微鏡 (BH-2, Olympus)にて観察した。

### 7. TRAP陽性数, TUNEL陽性数および破骨細胞細胞死率の評価

実験側および対照側の破骨細胞数を評価するために, 0, 3, 9, 15, 21日目の各切片におけるTUNEL陽性多核細胞, TRAP陽性多核細胞数を算定し, 各時期の破骨細胞細胞死率を求めた。なお, 破骨細胞細胞死率(%)は(TUNEL陽性多核巨細胞/TRAP陽性多核巨細胞) $\times$ 100で評価した。

## III. 結 果

### 1. YM-175局所投与における歯の移動距離について

歯の移動開始から3日後では, 実験側に移動距離の抑制傾向がみられたが有意差を示さなかった。9日目以降両側間の移動量に差がみられ, 9, 15, 21日目では, 実験側のほうが対照側に比べ有意に大きな移動距離の抑制が認められた (Fig.7)。また, 対照側の移動量に対する実験側の移動量を歯の移動の抑制率として算出すると抑制率は経時的に増加し, 約15%から35%の移動量の減少がみられた (Fig.8)。

### 2. YM-175局所投与における光学顕微鏡 (光顕) 的観察

対照側, 実験側の第一臼歯根分岐部からの連続切片を作成し, 0, 3, 9, 15, 21日目の近心頬側根の周囲をHE染色にて観察した。

#### 1) 対照側

3日目の対照側の圧迫側では, 歯根膜は圧平され, 歯根膜腔が狭くなっており, 一部では硝子化したところも観察された。また, 同部に隣接して, 多数の多核巨細胞とハウシッポ窩が観察された。9日目以降, 経時的に観察していく

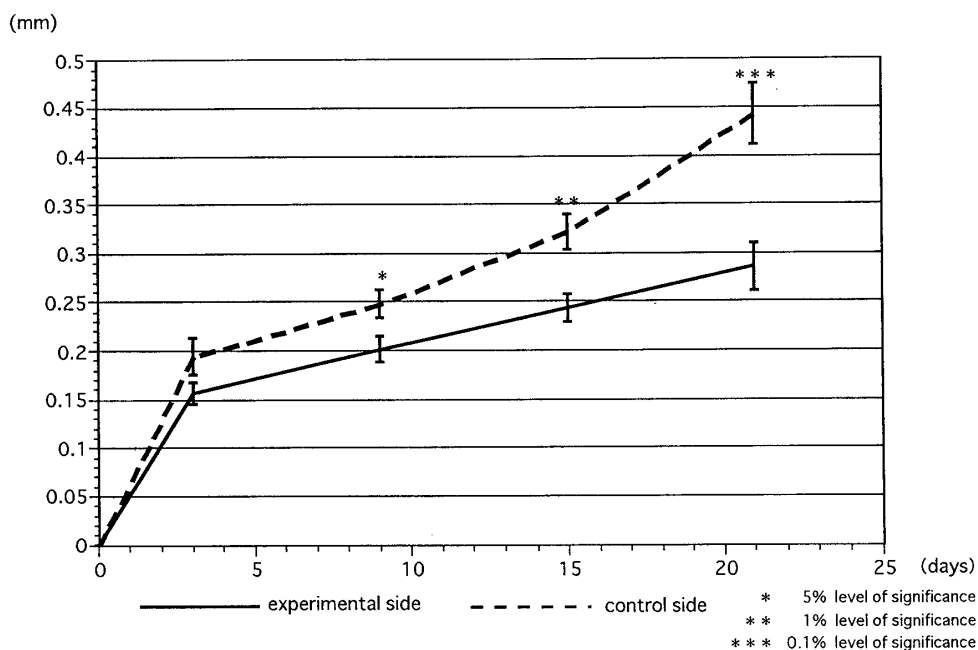


Fig. 7 Time course of distance of tooth movement (mean±SD).

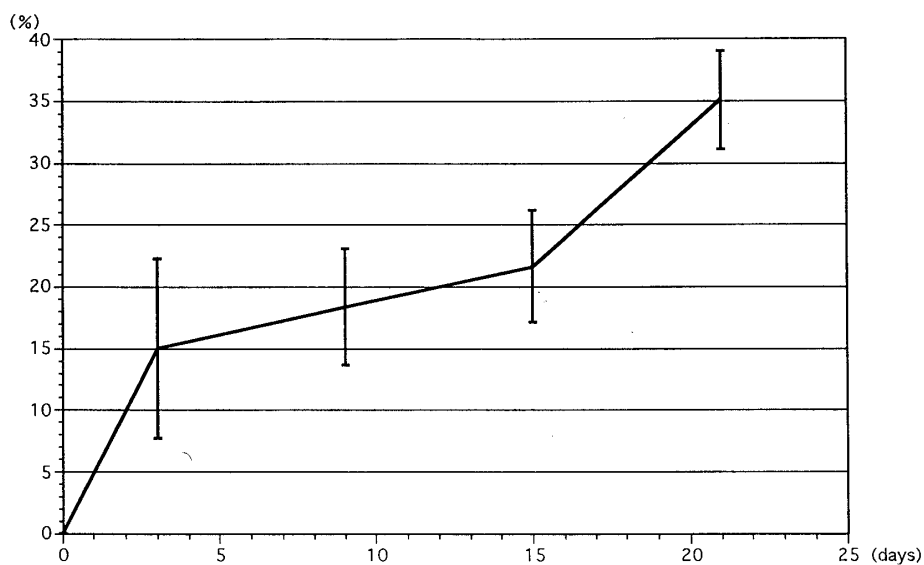
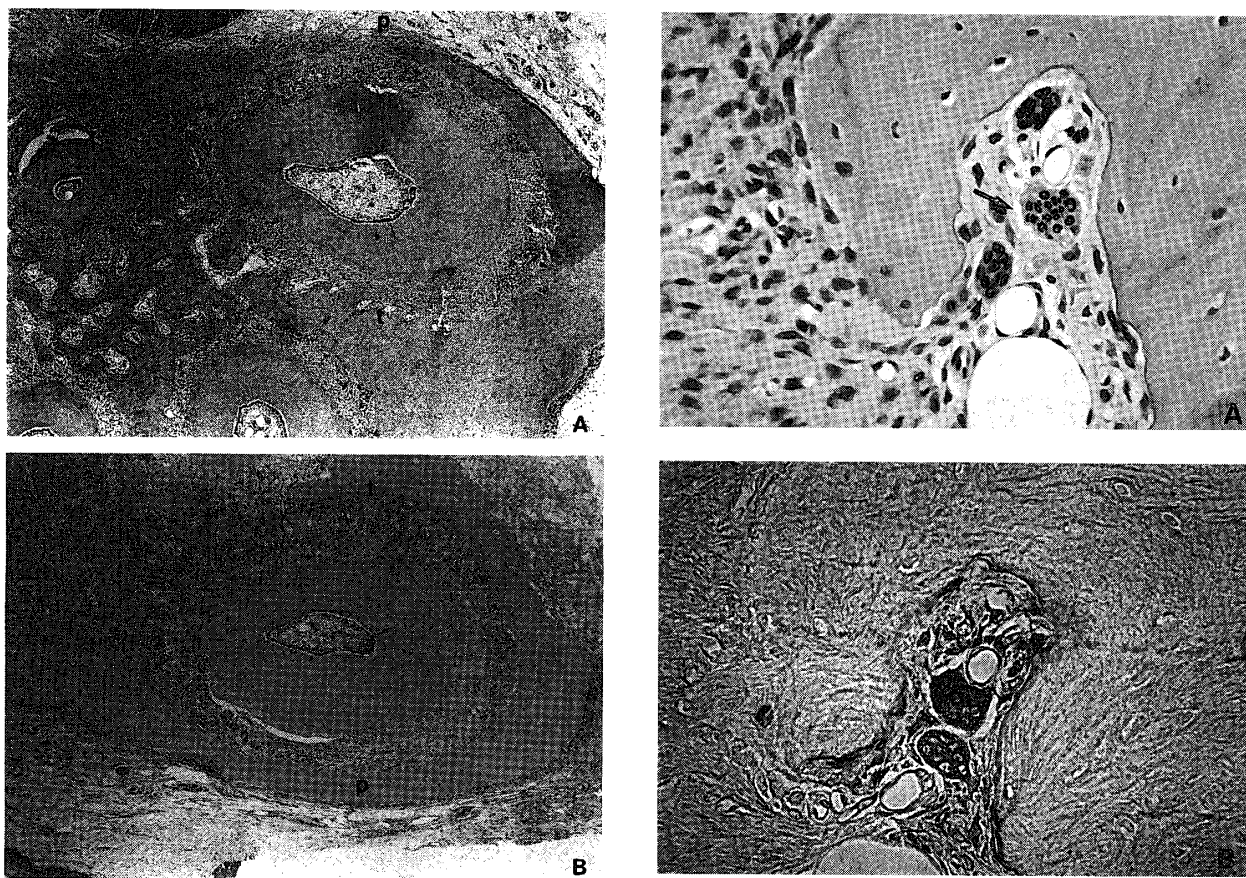


Fig. 8 Time course of percent inhibition of distance of tooth movement (mean±SEM).  
 The percent inhibition (%) expresses  $\{1-(b/a) \times 100\}$ .  
 a: distance of tooth movement at experimental side.  
 b: distance of tooth movement at control side.

と15日目,21日目では,歯根膜腔の幅はほぼもとと同じ幅に回復しており,歯の移動したことがうかがわれた。牽引側では,同様に3日目では歯根膜腔の拡大および歯根膜の著明な伸展がみられたが,経時的に圧迫側と同様に歯根膜腔の幅がもとの状態に戻る傾向にあった (Fig.9A)。

2) 実験側

3日目の実験側の圧迫側では,対照側とほぼ同様の所見が観察されたが,15日目,21日目では,歯根膜腔の幅はもどる傾向にあったが対照側に比べ,依然狭い状態を呈していた (Fig.9 B)。



**Fig. 9** Cross section of mesio Buccal root of first molar on 21 days after application of orthodontic force. 【HE stain】

A: The width of the periodontal ligament presented the regular width for the most part in both the pressure side and the tension side.

t: tension side

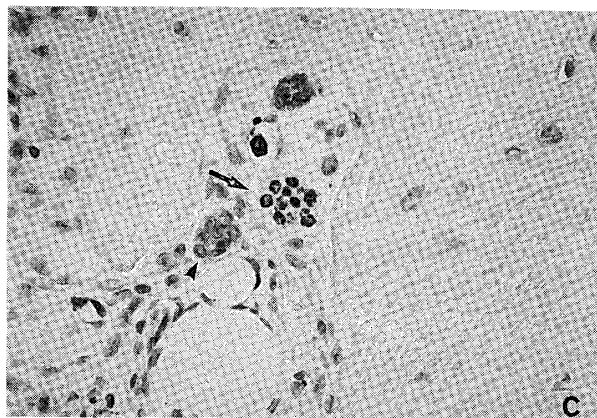
p: pressure side

B: The width of the periodontal ligament of pressure side was narrower than that of tension side. It presented hyalinization.

t: tension side

p: pressure side

また、一部には細胞質が収縮し、骨梁から離れて存在する多核巨細胞が認められたが、これは実験側において比較的多く観察され、対照側においてはごくわずかであった。これらを強拡大で観察すると、核の一部は濃染しており、三日月状を呈したものがみられ、アポトーシスに陥った細胞と考えられる所見を示していた (Fig.10A)。この細胞がアポトーシスに陥った破骨細胞であることを確認するために、連続切



**Fig.10** Osteoclasts apoptosis at experimental side on day 15.

A: Apoptotic (arrow) and viable (arrowhead) osteoclasts are seen in the periodontal ligament-space. 【HE stain】

B: TRAP stain shows strong red cytoplasmic staining of osteoclasts. 【TRAP stain】

C: A strong signal is seen in the condensed nuclear fragments of an osteoclasts (arrow). No signal is the nuclei of viable osteoclasts (arrowhead). 【TUNEL stain】



片を用いて、破骨細胞のマーカであるTRAP染色およびアポトーシスのマーカのひとつであるDNAの断片化を認識するTUNEL法を応用した。これらの多核巨細胞はTRAP陽性を示し、濃縮した核にTUNEL陽性反応がみられたことより、アポトーシスに陥った破骨細胞であると考えられた (Fig.10B)。

### 3. TRAP陽性細胞数, TUNEL陽性細胞数および破骨細胞細胞死率

TRAP陽性細胞を破骨細胞とみなし1切片あたりの第一臼歯近心頬側根周囲の破骨細胞数を経時的に算出したところ、3日目では、対照側よりも、実験側のほうが有意に多い値を示したが、逆に15日目では、対照側よりも実験側の

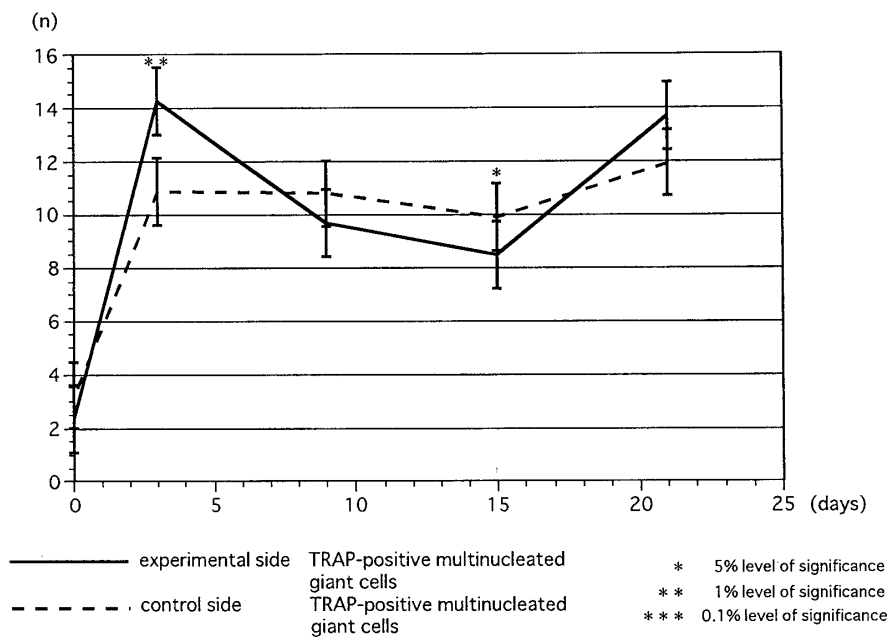


Fig.11 Time course of number of TRAP-positive multinucleated giant cells (mean±SEM).

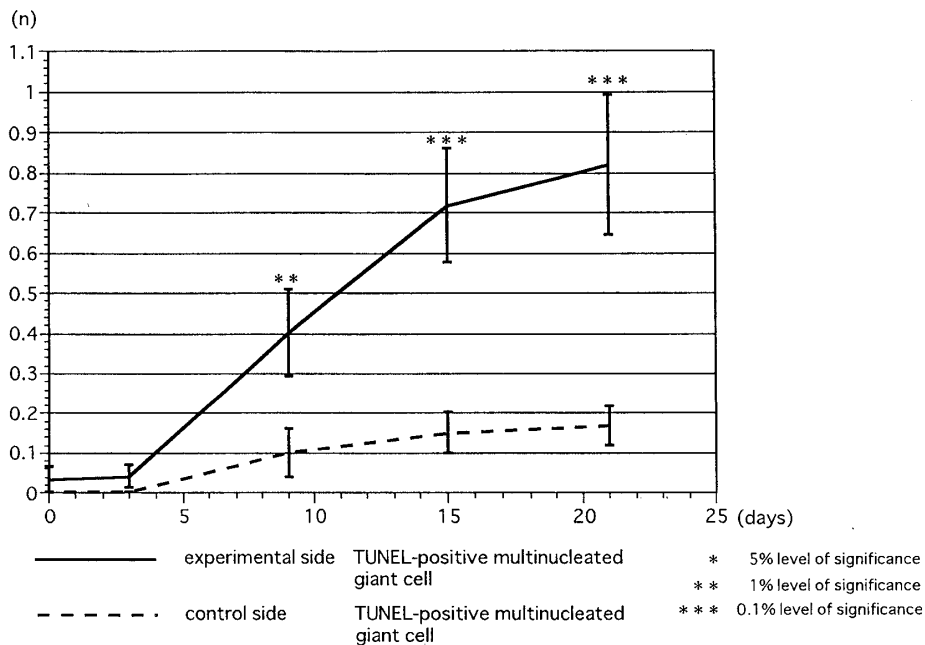


Fig.12 Time course of number of TUNEL-positive multinucleated giant cells (mean±SEM).

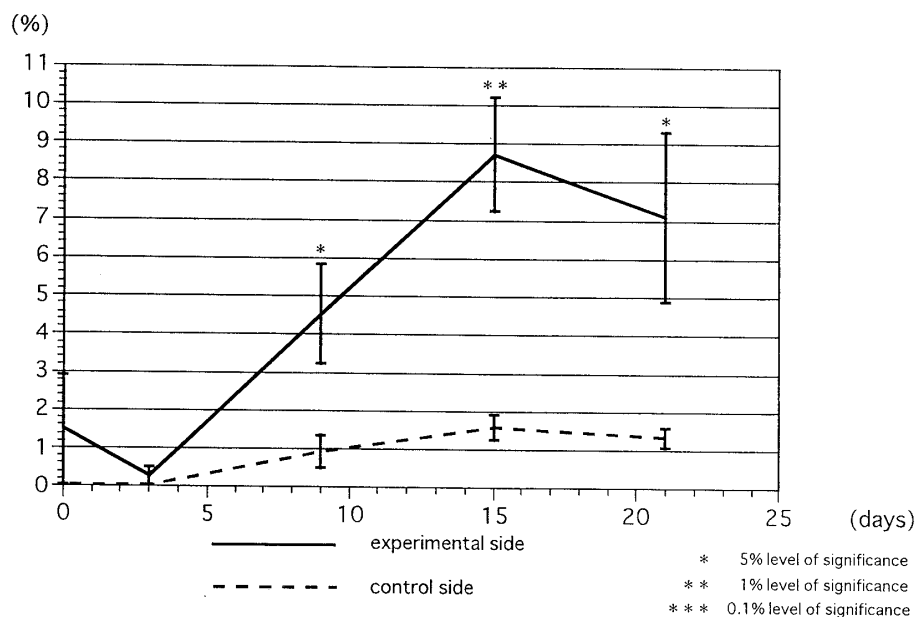


Fig.13 Time course of a rate of cell death of osteoclasts (b/a×100) (%).  
 a: TRAP-positive multinucleated giant cells.  
 b: TUNEL-positive multinucleated giant cells.

ほうが有意に少ない値となっていた (Fig.11)。TUNEL陽性細胞を数え経時的に算出したところ、3日目の対照側ではTUNEL陽性細胞は観察されなかったが、実験側では1切片あたり平均0.04の値を示し、僅かながらTUNEL陽性細胞が観察された。この値は、その後9日目、15日目、21日目と経時的に増加しており、対照側に比べいずれにおいても有意に大きい値を示していた (Fig.12)。また、破骨細胞の細胞死率を経時的に算出したところ3日目の対照側では0%であったが、実験側では、0.24%と少ない比率であったが、その後徐々に増大し、15日目には最大となり8.17%を示した (Fig.13)。

#### IV. 考 察

##### 1. 矯正的歯の移動におけるYM-175の有効性および組織学的変化について

BPは骨吸収抑制作用をもつ薬剤として近年注目されている。側鎖につく化学基により、直鎖型炭化水素置換基を側鎖にもつ第一世代、側鎖の端 (1位の炭素原子に最も遠い位置) に窒

素原子をもつ第二世代、環状の側鎖をもつ第三世代に分類され、一般に、世代が進むに従って、骨吸収抑制力が増大するといわれている<sup>19)</sup>。本実験に用いたYM-175は第三世代に属し、初代のBPであるHEBPに比べ、約5000倍の骨吸収抑制力があるといわれている<sup>19)</sup>。

BPはこれまでに、主に代謝性骨疾患の治療薬として骨粗鬆症<sup>14)</sup>や骨Paget病<sup>15)</sup>、癌などによる高Ca血症<sup>16,17)</sup>、人工心臓弁の石灰化防止<sup>32)</sup>などに対して臨床応用が試みられてきた。そのなかでYM-175は、ラットの前肢神経切除<sup>33,34)</sup>による骨粗鬆症モデルを用いた実験において骨量・骨強度をあげ、骨粗鬆症の治療に有用であることが実証されている。

BPの歯科領域への応用として、歯石形成の予防<sup>35~39)</sup>、歯周炎モデルでの歯槽骨吸収抑制作用<sup>40~42)</sup>が報告されており、最近では、矯正的歯の移動時の固定源の強化<sup>11~13)</sup>や後戻りの防止<sup>11,12)</sup>、歯根吸収の抑制作用<sup>43)</sup>が報告されている。そのなかで、YM-175を用いた報告としては岡本ら<sup>40)</sup>が行ったハムスターに実験的に歯周炎

を惹起させ、その後、YM-175を全身投与し、骨吸収を抑制することにより歯周炎の進行を阻止したとの報告があり、口腔領域でもYM-175の骨吸収抑制作用が有効であることを強調している。

薬理的固定の可能性を検討するために矯正歯の移動時にBPsを応用したものには、HEBPを用いたもの<sup>13)</sup>、alendronateを用いたもの<sup>11)</sup>、risedronateを用いた報告があり<sup>12)</sup>、いずれも局所投与による骨吸収抑制作用により歯の移動抑制効果を認めている。これらの報告の投与量<sup>11~13)</sup>は、HEBPを用いた場合では他のBPを用いた場合に比較し、約200から1000倍以上の量を投与している。このことはHEBPが第一世代のBPで、alendronate、risedronateが第3世代であり世代が進むにしたがって骨吸収抑制力が強化されていることを反映しているものと考えられる。本研究に用いたBPsのひとつであるYM-175は、risedronateとほぼ同様の濃度を投与し、同じような歯の移動抑制作用が認められた。

BPs投与による矯正歯の移動時の組織学的変化について、Igarashiら<sup>11)</sup>は破骨細胞の波状縁の消失や極性の消失、核濃縮などの形態的变化や著明な破骨細胞の減少がみられたと報告している。本実験では、破骨細胞の形態的变化はIgarashiら<sup>11)</sup>の報告と同様であったが、破骨細胞数は3日目においては対照側に比較し実験側のほうが有意に大きい値を示したが、その後15日目には逆に実験側のほうが有意に少ない値を示した。これは用いたBPsによる違いと考えられる。

以上のことからYM-175は他の第3世代のBPsと並び、矯正歯の移動時の薬理的固定に有効であり、同部の組織所見において破骨細胞の形態的变化と細胞数の減少が骨吸収抑制に関与していると考えられた。

## 2. YM-175の骨吸収抑制作用の作用機序について—特にアポトーシスの関与について—

BPsは、リン酸カルシウムの沈殿を抑制し<sup>44)</sup>、リン酸カルシウム結晶の凝集を阻害することから<sup>45)</sup>、リン酸カルシウムに対する強い親和性があると考えられたため、当初、BPsの骨吸収に対する作用は、結晶溶解の阻害作用に基づくものであると考えられた。しかし、in vivoにおける骨吸収抑制作用とin vitroにおけるハイドロキシアパタイトの結晶化阻害作用との間に必ずしも対応がないことから<sup>46)</sup>、この説を疑問視する意見がだされ、最近では、BPsの細胞への作用に関する報告が多い。すなわち、破骨細胞の分化抑制<sup>20~22)</sup>、成熟した破骨細胞の活性抑制作用<sup>23~25)</sup>、破骨細胞への障害作用<sup>26,27)</sup>、骨芽細胞を介しての破骨細胞の抑制<sup>28)</sup>などが報告され、これらにより破骨細胞数の減少<sup>20~28,47,48)</sup>をもたらすとの報告がある。この破骨細胞数の減少について、Hugesら<sup>29)</sup>は、マウスに3種類のBps (clodronate, pamidronate, risedronate) を全身投与し、破骨細胞にだけアポトーシスが誘発され、その割合は全破骨細胞の約4~26%に達することを報告し、破骨細胞の減少はアポトーシスの誘発のため起きることを示唆している。本研究では、実験側においてアポトーシス率は最大8.69%に達し、また破骨細胞数は、YM-175投与3日目には破骨細胞数に差がなかったものの、15日目には著しい細胞数の減少がみられたため、この原因に、破骨細胞のアポトーシスが関与しているものと推測し、破骨細胞のアポトーシス同定のための実験を行った。

アポトーシスは、壊死(ネクローシス)とは違った細胞死の概念として、Kerrら<sup>49)</sup>によって最初に報告され、当初プログラム細胞死の特徴的な形態としてあつかわれていた。その後、様々な薬剤でもアポトーシスを引き起こすことがわかってきており、現在では、細胞内情報伝達系などを介して、ある種の遺伝子情報が引き起こ

す細胞死として扱われている<sup>50)</sup>。アポトーシスの同定のために、生化学的にはDNA ladder patternの検出が行われているが、in vivoにおける同定には形態的観察、とくに電顕による観察が有用となる。しかしながら、細胞数が少ないなどの理由から電顕的観察が困難な場合は、光顕的に主に核の形態的变化とGavrieliら<sup>30)</sup>によって報告されたDNAの断片化を認識するTUNEL法がアポトーシス同定のための有用な方法として用いられてきている。

本研究では、光顕における一切片上で観察し、光顕における核の形態的变化とTUNEL法からアポトーシスの同定を行い、さらにTUNEL陽性細胞数を算定した。その結果、対照側、実験側の両者においてアポトーシスに陥った細胞を同定できたが、その数は各時期において実験側で有意に多い値を示しており、YM-175が破骨細胞のアポトーシスを誘発することが示唆された。この点に関してHugesら<sup>29)</sup>は破骨細胞のアポトーシスに先がけて波状縁の消失がみられるものと示唆しており、それらの細胞もアポトーシスへと移行していくものと思われた。

破骨細胞の分化過程<sup>51~53)</sup>は明らかになってきているが、その後の運命については不明な点が多い。最近になり、破骨細胞の生理的な消失過程にアポトーシスが関与していることが示唆され<sup>54)</sup>、本研究の対照側における破骨細胞のアポトーシスはこの報告を裏付ける結果となっているが、対照側への薬剤の影響も否定できないため今後の検討課題としたい。

### 3. 矯正歯の移動時のBPsの臨床応用の可能性について

現代の歯科矯正治療におけるマルチブラケット法は、歯にブラケットあるいはチューブを装着しメカニカルストレスを矯正力として用いて歯の移動を行ってきた。そのとき、主に臼歯を固定源にし、前歯の後退をはかるが、その反作

用として臼歯の近心移動がおこるため固定源の強化をはかる種々の方法が考案されており、tip back bend<sup>55)</sup>やKloehn<sup>56)</sup>のHead gearによる顎外固定装置などは、日常の臨床に多く用いられている。しかし、現在の矯正治療は、メカニカルストレスのみを矯正力として用いているが、薬物による歯の移動の促進<sup>1~6)</sup>やインプラントを応用した方法<sup>57)</sup>も研究され、一部は臨床に应用されているものもある<sup>3,57)</sup>。一方、固定源の強化を目的にした薬物応用も実験的に行われており、その中のひとつであるBPsはさまざまな代謝性骨疾患の治療薬としてだけでなく歯科矯正治療への応用が示唆されてきている<sup>11~13)</sup>。

本実験においてもBPsのひとつであるYM-175は固定源の強化に有効であることが実証され、矯正治療への薬理的固定の概念による薬物応用が可能であることを示唆した。また、Igarashiら<sup>11)</sup>およびAdachiら<sup>12)</sup>は、歯の移動後にBPsを投与し、歯の後戻りが抑制されたことを示しており、BPsによる薬理的保定も可能と考えられる。

## V. 結 語

BPsのひとつであるYM-175の矯正歯の移動時の薬理的固定応用への有用性、およびその骨吸収抑制の作用機序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を検索するために、ラットの上顎第一臼歯の実験的歯の移動過程にYM-175を投与し、以下に示す結果を得た。

1. YM-175を局所投与したラットの実験側においては、対照側に比較し歯の移動距離が有意に減少した。
2. 実験開始3日目ではYM-175を局所投与したラットの実験側において、対照側に比較し破骨細胞数が有意に増加したが、15日目では、逆に実験側において、対照側に比較し破骨細胞数が有意に減少した。

3. YM-175を局所投与したラットの実験側および対照側ともにアポトーシスに陥った破骨細胞が確認されたが、実験開始後いずれの日においてもその数は実験側で対照側に比べて有意に多かった。

以上の結果から、YM-175は矯正歯の移動時の薬理的固定に有効な薬剤であり、その骨吸収抑制作用に破骨細胞のアポトーシスが関与していることが示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるに臨み、貴重なご助言を賜った本学歯学部歯科保存学第一講座小鷺悠典教授に感謝の意を表します。さらに、TRAP染色についてご指導を賜りました本学歯学部口腔解剖学第一講座坂倉康則助教授にこの場をかりて心より感謝いたします。また、快く薬品および材料を提供していただいた山之内製薬株式会社、ロッキーマウンテン モリタ株式会社、松風株式会社に対し深く感謝いたします。最後に本研究に際し、種々のご援助を頂きました矯正歯科学講座、口腔病理学講座の諸先生方に心からお礼申し上げます。

## IV. 文 献

1. Yamasaki, K., Miura, F. and Suda, T.: Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats, *J Dent Res*, 59:1635-1642, 1980.
2. Yamasaki, K., Shibata, Y. and Fukuhara, T.: The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fasciata*), *J Dent Res*, 61:1444-1446, 1982.
3. Yamasaki, K., Shibata, Y., Imai, S. et al.: Clinical application of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) upon orthodontic tooth movement, *Am J Orthod*, 85:508-518, 1984.
4. Collins, M. K. and Sinclair, P. M.: The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement, *Am J Orthod Dentifacial Orthop*, 94:278-284, 1988.
5. 川上正良: 歯の実験的移動に及ぼす活性型ビタミンD<sub>3</sub> (1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)の局所投与の影響, 阪大歯学誌, 35:128-146, 1990.
6. 山本照子, 川上正良, 小林 裕, 他: 実験的歯の移動に及ぼす活性型ビタミンD<sub>3</sub>局所投与の影響—ラット週齢による差—, 歯基礎誌, 34:25-34, 1992.
7. Brudvik, P. and Ryph, P.: Root resorption after local injection of prostaglandin E<sub>2</sub> during experimental tooth movement, *Eur J Orthod*, 13:255-263, 1991.
8. 栗原三郎, 山崎健一: 矯正臨床における薬物応用 II—研究の現状と問題点—[特集・対談] 矯正臨床の未来を展望する最前線トーク, *J Orthod Practice*, 61:11-32, 1990.
9. Chumbley, A. B. and Tuncay, O. C.: The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement, *Am J Orthod*, 85:508-518, 1984.
10. Sandy, J. R. and Harris, M.: Prostaglandins and tooth movement, *Eur J Orthod*, 6:175-182, 1984.
11. Igarashi, K., Mitani, H., Adachi, H., et al.: Anchorage and retentive effect of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats, *Am J Orthod Dentifacial Orthop*, 106:279-289, 1994.
12. Adachi, H., Igarashi, K. and Shinoda, H.: Effect of topical administration of a bisphosphonate (residronate) on orthodontic tooth movements in rats, *J Dent Res*, 73:1478-1484, 1994.
13. 割田博之, 桐野靖子, 栗原三郎, 他: 実験的歯の移動に対すbisphosphonate (HEBP) 局所投与の影響, 日矯歯誌, 51:292-301, 1992.
14. Storm, T., Thamsborg, G., Steiniche, T., et al.: Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis, *N Engl J Med*, 322:1265-1271, 1990.
15. 鳥塚莞爾, 古川洋太郎, 吉川靖三: 骨Paget病に対するEHDP(Etidronate Disodium)の臨床効果, 基礎と臨床, 23:1375-1385, 1989.
16. 松本俊夫, 藤田拓男, 森井浩世, 他: 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症患者におけるPamidronate disodium (AHP rBP)の用量設定試験,

- 臨床医薬, 8: 605-629, 1992.
17. Martodam, R. R., Thomson, K. S., Sica, D. A., et al.: The effect of dichloromethylene diphosphonate on hypercalcemia and of malignancy in the rat Leydig cell tumor, *Calcif Tissue Int*, 35: 512-519, 1983.
  18. Muhlbaer, R. C., Bauss, F., Schenk, R., et al.: BM21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption, *J Bone Miner Res*, 6: 1003-1011, 1991.
  19. 篠田 寿: Bisphosphonate とは, *THE BONE* 7: 31-42, 1993.
  20. Lowik, C. W. G. M., van der Pluijm, G., van der Wee-Pals L. J. A., et al.: Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclast: the effect of a bisphosphonate, *J Bone Miner Res*, 3: 185-192, 1988.
  21. Hughes, D. E., MacDonald, B. R., Russell, R. G. G., et al.: Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow, *J Clin Invest*, 83: 1930-1935, 1989.
  22. Nagao, Y., Ishitobi, Y., Kinoshita, H., et al.: YM-175 inhibits osteoclast differentiation and bone resorbing action of mature osteoclasts, *J Bone Miner Res*, 5 (Suppl.2): S159, 1990.
  23. Boonekamp, P. M., Van der Wee-Plas L. J. A., Van Wijk-Van-Lennep, M. M. L., et al.: Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix, *Bone and Mineral*, 1: 27-39, 1986.
  24. Flanagan, A. M. and Chambers, T. J.: Dichloromethylene-bisphosphonate (Cl<sub>2</sub>MBP) inhibits bone resorption through injury to osteoclasts that resorb Cl<sub>2</sub>MBP-coated bone, *Bone and Mineral*, 6: 33-43, 1989.
  25. Kodama, H., Yamasaki, A., Abe, M., et al.: Transient recruitment of osteoclasts and expression of their function in osteopetrotic (op/op) mice by a single injection of macrophage colony-stimulating factor, *J Bone Miner Res*, 8: 45-50, 1993.
  26. Sato, M. and Grasser, W.: Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclast as examined by reflected light microscopy, *J Bone Miner Res*, 5: 31-40, 1990.
  27. Sato, M., Grasser, W., Endo, N., et al.: Bisphosphonate action alendronate localization in rat bone and effect osteoclast ultrastructure, *J Clin Invest*, 88: 2095-2105, 1991.
  28. Sahni, M., Guenther, H. L., Fleisch, H., et al.: Bisphosphonate act on rat bone resorption through the mediation of osteoblast, *J Clin Invest*, 91: 2004-2011, 1993.
  29. Hughes, D. E., Wright, K. R., Uy, H. L., et al.: Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo, *J Bone Miner Res*, 10: 1478-1487, 1995.
  30. Gavrieli, Y., Shyman, Y. and BenSasson, S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol*, 119: 493-501, 1992.
  31. Burstone, M. S.: Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates, *J Natl Cancer Inst*, 21: 523-539, 1958.
  32. Levy, R. J., Wolfrum, J., Schoen, F. J., et al.: Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled-release diphosphonate, *Science*, 228: 190-192, 1985.
  33. 川向康生, 阿部哲士, 工藤雅文, 他: 骨粗鬆症モデルにおけるYM-175の効果, 基礎と臨床, 5: 132-137, 1990.
  34. 川向康生, 工藤雅文, 尾内直人, 他: 新規bisphosphonate, YM-175の薬理作用, 基礎と臨床, 6: 69-73, 1991.
  35. Briner, W. W., Francis, M. D. and Widder, J. S.: The control of dental calculus in experimental animals, *Int Dent J*, 21: 61-73, 1971.
  36. 野口俊英, 福田光男, 鈴木知香子, 他: EHDP (1-Hydroxyethane-1, 1-diphosphonate)の初期歯石形成に及ぼす影響について, 日歯周誌, 25: 371-377, 1983.
  37. 福田光男, 野口俊英, 石川 烈, 他: HEBP溶液およびヘキサメタクリン酸溶液含嗽による初期歯石形成の抑制, 日歯周誌, 28: 744-751, 1986.
  38. 篠田 寿: 歯石の抑制—Diphosphonatesの歯科的応用—, 歯界展望, 61: 271-277, 1983.
  39. 篠田 寿, 瀬戸尚子: EHDPによる実験的歯石形成の抑制, 骨代謝, 14: 35-44, 1981.

40. 岡本公彰, 長谷川直樹, 前田伸子, 他: ハムスター実験的歯周炎モデルにおけるビスホスフォネート(YM-175)の歯槽骨吸収に及ぼす影響, 歯基礎誌, 36: 510-519, 1994.
41. 小林 誠, 野口俊英, 木下四郎: EHDP(Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate)によるラット歯槽骨吸収の抑制について, 歯基礎誌, 29: 629-639, 1984.
42. 小林 誠: Bisphosphonatesによるラット歯槽骨の吸収抑制に関する研究, 日歯周誌, 27: 51-64, 1985.
43. Engstrom, C.: Root resorptions during orthodontic tooth movement and bone remodelling dynamics during hypocalcaemia and treatment with biphosphonate. Davidovitch, Z., Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption, *EBSCO Medica*, 1988, 391-397.
44. Fleisch, H., Rusell, R. G. G., Bisaz, S., et al.: The inhibition effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo, *Eur J Clin Invest*, 1: 12-18, 1970.
45. Fleisch, H., Rusell, R. G. G. and Francis M. D.: Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo, *Science*, 165: 1262-1264, 1969.
46. Shinoda, H., Adamek, G., Felix, R., et al.: Structure-activity relationship of various bisphosphonates, *Calcif Tissue Int*, 35: 87-99, 1983.
47. Chappard, D., Alexandre, C., Palle, S., et al.: Effect of a bisphosphonate (1-hydroxy ethylidene-1, 1-bisphosphonic acid) on osteoclast number during prolonged bed rest in healthy humans, *Metabolism*, 38: 822-825, 1989.
48. Steinine, T., Hasiling, C., Charles, P., et al.: The effect of etidronate on trabecular bone remodeling in postmenopausal spinal osteoporosis: a randomized study comparing intermittent treatment and an ADFR regime, *Bone*, 12: 155-163, 1991.
49. Kerr, J. F. R., Willie, A. H. and Currie, A. A. R.: Apoptosis is a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
50. 田沼靖一: 老化・寿命のメカニズムとアポトーシス, アポビオーシス, *Molecular Medicine*, 33: 206-211, 1996.
51. Rifkin, B. R., Brand, J. S., Cushing, J. E., et al.: Fine structure of fetal rat calvarium: provisional identification of preosteoclasts, *Calcif Tissue Int*, 31: 21-28, 1980.
52. Ejiri, S.: The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast: ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone, *Arch Histo Jap*, 46: 533-557, 1983.
53. Tanaka, T. and Tanaka, M.: Cytological and functional studies of preosteoclasts and osteoclasts in the alveolar bones from neonatal rats using microperoxidase as a tracer, *Calcif Tissue Int*, 42: 267-272, 1988.
54. 入江一元, 小澤英浩: 骨吸収の停止と破骨細胞の死, 三羽信比古, 細胞死の生物学, 東京書籍, 1993, 202-203.
55. Merrifield, L. L.: The sequential directional force Edgewise technique, Johnston, L. E., new Vistas Orthodontics, *Lea&Febiger*, 1985, 184-208.
56. Kloehn, S. J.: Guiding alveolar growth and eruption of reduce treatment time and produce a more balanced denture and face, *Angle Orthod*, 17: 10-33, 1947.
57. Roberts, E. B. W., Marshall, K. J. and Mozsary, P. G.: Rigid endosseous implant utilized as anchorage to protract molars and close an atrophic extraction site, *Angle Orthod*, 60: 135-152, 1991.