

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 27 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592618

研究課題名（和文） 特異的破骨細胞抑制剤を用いた効率的歯の移動と
歯周病予防システムの開発研究課題名（英文） The development of effective tooth movement using the specific
osteoclast inhibitor and the system of prevention on periodontal disease.

研究代表者 後藤 滋巳

(GOTO SHIGEMI)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：60142577

研究成果の概要（和文）：

本研究では、骨代謝のコントロールによる歯の移動実験と歯周病の予防実験を行い、骨代謝の解明ならびに歯周病予防システムの開発を行う事を目的としている。本研究の結果、ビスホスホネートと同様にリベロマイシンAによっても、歯の移動をコントロールできることが確認された。また、歯周病予防実験については、OPG 遺伝子欠損（OPG^{-/-}）マウスとWTマウス両群において歯周病モデルの作製は可能となった。今後、さらなる研究を続け、骨代謝のコントロールによる歯周病予防が可能となるのかを調査する予定である。

研究成果の概要（英文）：

We examined the periodontal tissue reaction course of OPG^{-/-} mice using the Waldo method, and we investigated the effect of administering Bisphosphonate (BP) and Reveromycin A (RM-A) on the periodontal tissue. BP and RM-A treatment results in normalization of bone metabolism and loss of alveolar bone during experimental tooth movement in OPG^{-/-} mice. Moreover, the model of the periodontal disease in mouse was established using wire ligature. Further studies are necessary to investigate and development the system of prevention on periodontal disease by control of the bone metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯学、矯正学、歯周病予防、破骨細胞、病理学

1. 研究開始当初の背景

一般的に、歯科矯正治療において、『固定』の概念は非常に重要であり、移動が必要な歯だけではなく、移動してはいけない歯までもが動いてしまうことは少なくない。

これまでの研究経過としては、平成13年より、破骨細胞の活性が亢進しているOPG遺伝子欠損マウスに部分精製の骨形成因子（BMPs）を移植し、形成された新生骨の観察を行った。また、破骨細胞の活性を抑制する薬剤の一つであるビスホスホネートを、OPG遺伝子欠損マウスに投与することによる新生骨形成の影響についても実験してきた。その結果、骨吸収関連蛋白質や薬剤の投与によって骨代謝のコントロールが可能であるという結果を得ることができた。また、新生骨形成量と新生骨誘導の代謝回転を決定する因子として破骨細胞が非常に重要な関わりを持っていることが示唆された。

そこで、本実験では、骨代謝自体をコントロールする事で、歯の移動量や移動速度ならびに移動方向が制御可能になるのではないかと考え、矯正学的歯の移動時における骨代謝の解明ならびに、骨代謝のコントロールによる歯の移動実験を行うこととした。また、この骨代謝コントロールが、歯周病予防にもつながると考えた。

2. 研究の目的

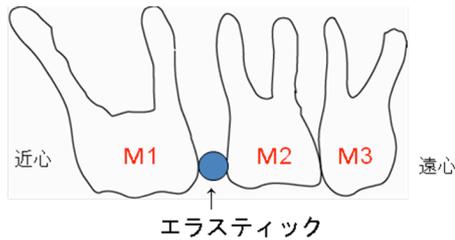
本研究の大きな目的は、骨代謝をコントロールすることにより歯の移動を制御すること。また、歯周病罹患歯の骨吸収の進行抑制をおこなうことである。具体的には、骨代謝に重要な関わりを持っていると考えられる破骨細胞に注目し、破骨細胞の活性を抑制させる

ことで、歯の移動速度や移動量をコントロールすることを目的とし、まず、ビスホスホネートを用いた歯の移動実験を行うこととした。しかし、ビスホスホネートは、我々の過去の実験から骨基質に長期にわたり沈着してしまう欠点が考えられ、一度骨組織に沈着させると、再び移動させたいときに困難になってしまうと考えられる。現実的に、矯正歯科臨床においては、同一歯においても、固定しておきたい時には歯の移動を抑制し、その後移動させたいときには歯の移動を促進させることが必要である。そこで、上記の研究に引き続き、近年、破骨細胞のみに特異的に作用し、骨基質に沈着せず、薬効の期間のみ破骨細胞に作用するという利点を備えた、破骨細胞活性の抑制剤であるリベロマイシンAに着目して、それを実験的歯の移動のツールとして用い、また歯周病予防実験に用いることとした。

つまり、特異的な破骨細胞機能の抑制によって、歯の移動の自由なコントロールはもちろんのこと、歯周病罹患歯において、破骨細胞による骨吸収を抑制することができるシステムの構築を目指している。この発想は極めて独創的であり、現在までのところ、このようなリベロマイシンAをもちいた歯の移動実験や歯周病予防実験について国内外の研究発表、論文発表は行われていない。骨代謝のコントロールによる歯の移動と歯周病の制御が可能となれば、新しい矯正治療法の確立のみならず、歯周病治療の確立にもつながるものと考え、本実験の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯の移動実験



(図1)

本研究の実験動物には、生後8週齢の雄性 OPG^{-/-}マウスおよび対照群として WT マウス (C57BL/6J) を使用した。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指針に従った。歯の実験的移動は Watanabe らの方法に準じてマウスにペントバルビタールの腹腔内投与によって麻酔を行なった後、上顎右側第1臼歯(M1)、第2臼歯(M2)間に矯正用エラスティック(3M Unitek, Tokyo, Japan)を挿入し M1 の矯正学的移動実験を行った。

ビスホスホネート (BP) は、アレンドロネート (Teijin Pharma, Tokyo, Japan) を用いた。8週齢の OPG^{-/-}マウスならびに WT マウスに、BP (1.25mg/kg of weight) を Waldo 法施術5日前より1日に1回腹腔内投与し、対照群には同量の生理食塩水を投与した。一方、RM-A (15mg/kg of weight) は、

Waldo 法施術3日前より1日に2回腹腔内投与し、対照群には同量の生理食塩水を投与した。

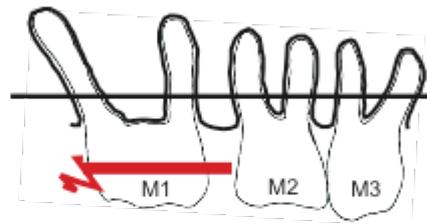
歯の実験的移動前(0日)、1日後、3日後に上顎骨を採取し、マイクロ

CT(SMX-225CT-SV2, Shimazu, Kyoto, Japan)にて検体を撮影後、移動距離計測を解析ソフト TRI/3D-BON(RATOC SYSTEM ENGINEERING CO., LTD, Tokyo, Japan)で行った。移動距離計測は 360° 回転させ、最狭窄部を咬合面観から観察できるよう調

節した後に咬合面観で行った。さらに、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(H-E染色)などの各種染色を行い、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。

得られた実験データは平均値と標準誤差で示し、統計的な有意差検定は Student の t 検定を用いた。

(2) 歯周病予防実験



(図2)

8週齢の WT マウス、OPG^{-/-}マウスの上顎左側第一臼歯の歯冠周囲を SS0.1mm 径のワイヤーにて結紮した。歯周病予防手術施行4週間後、8週間後に上顎骨を採取し、マイクロ CT(SMX-225CT-SV2, Shimazu, Kyoto, Japan)にて検体を撮影後、歯槽骨吸収率を解析ソフト TRI/3D-BON(RATOC SYSTEM ENGINEERING CO., LTD, Tokyo, Japan)を用いて計測することとした。

4. 研究成果

(1) 歯の移動実験

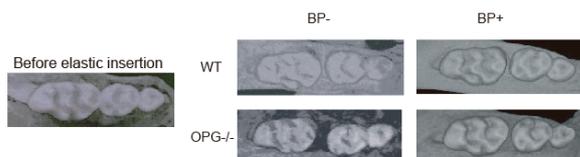
① ビスホスホネートによる歯の移動実験

《移動距離の計測》(図3, 4)

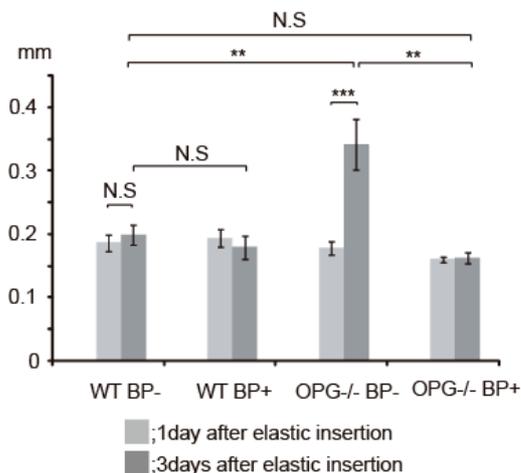
歯の実験的移動1日後では、WT BP

非投与群(以下 BP-)群、OPG-/- BP-群間では移動距離に有意な差は認められなかった。3日後においては、WT BP-群は1日後と移動距離に大きな変化が認められなかったのに対し、OPG-/- BP-群では1日後と3日後で移動距離の有意な上昇が認められた。その結果 OPG-/- BP-群は WT BP-群と比較し、3日後で大きな移動距離を示した。

また、BP 投与を行うと、歯の実験的移動1日後において WT 群、OPG-/-群ともに BP 投与群(以下 BP+)と BP-間に有意な差は認められなかった。一方、実験的歯の移動3日後において OPG-/- BP+群は OPG-/- BP-群と比較し有意に移動距離が減少し、WT BP-群と近似した値となり、有意な差が認められなくなった。



(図3) 歯の実験的移動3日後におけるマイクロCT画像(咬合面観)



(図4) 歯の移動距離

(N.S.:not significant. ** :p<0.01; *** :p<0.001)

《骨量の計測》(表1)

BV/TV(%)	-5Days	0Days	1Day	3Days
WT BP-	60.5±2.9	62.7±7.8	64.2±3.9	60.0±2.4
WT BP+	61.7±0.3	59.7±5.0	57.3±9.8	58.0±7.0
OPG-/- BP-	40.1±2.1	36.8±1.7	39.7±1.8	25.8±1.2
OPG-/- BP+	40.1±2.8	48.0±2.0	49.0±2.0	35.0±1.2

(表1)骨量計測値

(N.S.:not significant. * :p<0.05; ** :p<0.01; *** :p<0.001)

歯の実験的移動0日において OPG-/- BP-群は WT BP-群と比較し、歯根周囲の歯槽骨梁は網目状を呈し疎であった。WT BP-群において歯の実験的移動0日に比較し1日後、3日後において歯根膜腔の牽引側での拡大や、圧迫側での狭小が認められた。しかし、0日、1日後、3日後の間に周囲歯槽骨量の減少は認められなかった。OPG-/- BP-群では1日後において WT BP-群と同様に歯根膜腔の牽引側での拡大や、圧迫側での狭小が認められ、根間中隔の骨梁は保たれていた。しかし、3日後においては 25.8±1.2%と、著明な根間中隔の骨量減少が認められた。

歯の実験的移動0日後、1日後および3日後において OPG-/- BP-群と比較し OPG-/- BP+群では有意に骨量が増加していた。実験的歯の移動3日後において OPG-/- BP-群で認められた根間中隔の骨吸収が OPG-/- BP+群では抑制され、OPG-/- BP- -5日群と有意な差がなくなり、根間中隔の骨量が 35.0±1.2%と維持されていた。

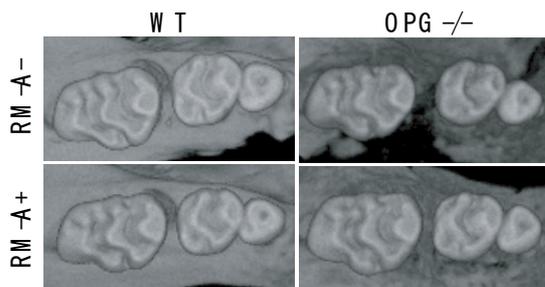
② RM-A による歯の移動実験

《移動距離の計測》(図5, 6)

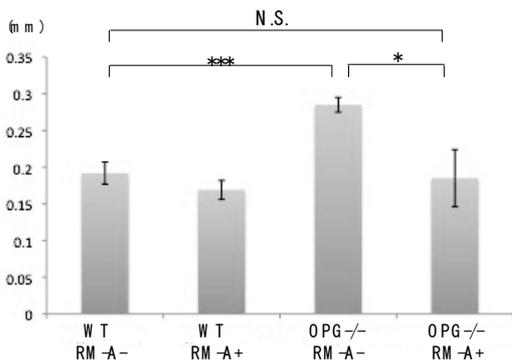
歯の実験的移動3日後、OPG-/-マウス・リベロマイシンA非投与群(以下 OPG-/- RM-A-群)は有意な差をもって著しく移動距

離が増加し、WT RM-A-群と OPG^{-/-} RM-A-群間で移動距離に有意な差が認められた。

また、リベロマイシン A 投与が OPG^{-/-}マウスに及ぼす効果として、歯の実験的歯の移動3日後、OPG^{-/-}マウス・RM-A 投与群(以下 OPG^{-/-} RM-A+群)は OPG^{-/-} RM-A-群と比較し有意に移動距離が減少し、WT RM-A-群と近似した値となり。有意な差が認められなくなった。

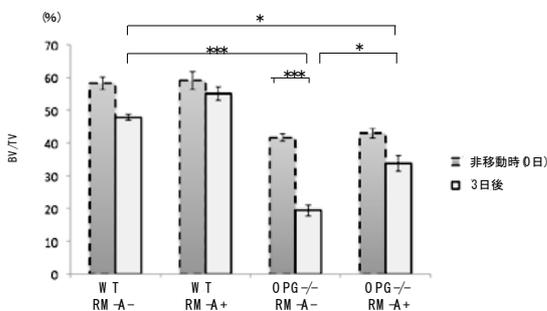


(図5) 歯の実験的移動3日後におけるマイクロCT画像(咬合面観)



(図6) 歯の実験的移動3日後における移動距離 (N.S.:not significant. * :p<0.05; *** :p<0.001)

《骨量の計測》(図7)



(図7) 骨量計測値 (N.S.:not significant. * :p<0.05; *** :p<0.001)

WT RM-A-群の歯の実験的移動3日後において、歯根膜腔の牽引側での拡大や、圧迫側での狭小が認められ、若干ではあるが歯槽骨吸収が認められたが、骨梁に大きな変化は認められなかった。一方0日後において、OPG^{-/-} RM-A-群はWT RM-A-群と比較し、歯根周囲の歯槽骨梁は網目状を呈し疎であった。そしてOPG^{-/-} RM-A-群の実験的歯の移動3日後において、著明な骨梁の変化が認められ、根間中隔歯槽骨の骨量減少が認められ、歯根膜の走行も失っていた。一方、リベロマイシン A 投与によって、実験的歯の移動3日後においてOPG^{-/-} RM-A-群で認められた根間中隔の骨吸収が OPG^{-/-} RM-A+群では抑制され、0日と比較して根間中隔の骨梁に大きな変化は認められず、歯槽骨の骨量が維持されていた。

以上の結果から、ビスホスホネートと同様にリベロマイシンAによっても、歯の移動をコントロールできることが確認された。

(2) 歯周病予防実験

歯周病モデルの確立として、8週齢の WT マウス、OPG^{-/-}マウスの上顎左側第一臼歯の歯冠周囲をSS0.1mm径のワイヤーにて結紮した。歯周病予防手術施行4週間後、8週間後に上顎骨を採取し、マイクロCTにて歯槽骨吸収率計測した。その結果、Wild type マウスにおいても、経時的に歯槽骨が吸収してきている傾向が認められた。今後は、歯槽骨吸収量を定量し、さらに、RM-Aの投与による歯槽骨吸収量の抑制を行う事ができるのか確認を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- (1) 藪本貴洋、宮澤健、田渕雅子、
庄司さつき、田中美由紀、門田愛実、
吉廻守、川谷誠、長田裕之、
後藤滋巳。破骨細胞特異的薬剂（リ
ベロマイシンA）投与が実験的歯の
移動に及ぼす影響、愛院大学歯学会
誌、査読有、49巻、2011、29-35.
- (2) Shoji S, Tabuchi M, Miyazawa K,
Yabumoto T, Tanaka M, Kadota M,
Maeda H, Goto S. Bisphosphonate
inhibits bone turnover in OPG(-/-)
mice via a depressive effect on
both osteoclasts and osteoblasts.
Calcified Tissue International.
査読有、Vol187、2010、pp.181-192.

[学会発表] (計2件)

- (1) 田中美由紀、宮澤 健、田渕雅子、
藪本貴洋、門田愛実、吉廻守、
山根千里、川谷 誠、長田裕之、
後藤滋巳。持続的矯正力による歯の
移動に対する破骨細胞特異的薬剂
(リベロマイシンA)の効果。第70回
日本矯正歯科学会大会。
2011.9.17-20. 名古屋
- (2) 庄司さつき、田渕雅子、藪本貴洋、
田中美由紀、宮澤健、後藤滋巳。破
骨細胞活性が実験的歯の移動に及ぼ
す影響。第68回日本矯正歯科学会大
会。2009.11.16-18. 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 滋巳 (GOTO SHIGEMI)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：60142577

(2) 研究分担者

宮澤 健 (MIYAZAWA KEN)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：60301636

田渕 雅子 (TABUCHI MASAKO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：30418925