

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593133

研究課題名(和文) 卵巣摘出歯周病サルを用いた高齢女性の歯槽骨喪失メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigating the Alveolar Bone-Loss Mechanism in Elderly Women, using Ovariectomized Monkey Subjects with Ligature-Induced Periodontitis.

研究代表者

江尻 貞一 (Ejiri, Sadakazu)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40160361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵巣摘出サルの臼歯に絹糸を結紮し歯周病を誘発するモデルを作成し、高齢女性の歯槽骨喪失メカニズムにおいて骨粗鬆症と歯周病がどのように係わり合っているかを検索するとともに、カテプシンKに対する阻害剤の投与効果を検索した。その結果、高齢女性の歯槽骨では歯周病による局所の炎症とエストロゲン欠乏という全身性のホルモン動態変化が、歯槽骨の骨吸収活性を相乗的に亢進させている可能性が示された。またカテプシンKに対する阻害剤は歯槽骨の骨吸収を抑制し、骨形成を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the relationship between post-menopausal osteoporosis and periodontitis, as involved in the mechanism of alveolar bone loss in elderly women, our study investigated microstructural alveolar bone changes occurring in ovariectomized monkeys with and without ligature-induced periodontitis, and also examined the effects of Cathepsin K inhibitor as an anti-bone loss agent in these animals. Our findings suggest that the local inflammation induced by periodontitis, together with systemic hormonal changes such as estrogen deficiency, may synergistically accelerate alveolar bone loss in elderly women. Furthermore, the results suggest that Cathepsin K inhibitor may also be useful for suppressing bone loss and accelerating alveolar bone formation in elderly women.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：骨粗鬆症 卵巣摘出モデル 歯槽骨 歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯の喪失が認知症と関連していること等が報告され、歯が脳や全身の状態に深く関わっていることが明らかとなってきた。一方、骨粗鬆症は、罹患率の高い疾患であり、骨折や寝たきりが深刻な社会問題となっている。米国の疫学調査では、骨粗鬆症と歯の喪失が関連していることを示唆する結果が導かれた(Gur A, *et al.* J Bone Miner Metab 21: 43-7. 2003)。すなわち、閉経後骨粗鬆症患者に対してエストロゲン補充を行ったところ、歯の喪失が抑制された。これはエストロゲン欠乏が歯の喪失に少なからず影響を与えていることを示唆している。しかし、歯槽骨の骨量減少メカニズムを明らかにするには、エストロゲン欠乏単独の影響だけでなく、そこに歯周病による炎症性の骨破壊がオーバーラップしていることも考慮しなければならない。また将来的に、歯槽骨の喪失を予防し、高齢者の認知症や全身状態の悪化を抑制できるようにするためにも、エストロゲン欠乏といった全身的な影響と、歯周病による炎症性骨吸収が、それぞれどのように高齢女性の歯槽骨喪失メカニズムに関与しているのかを明らかにすることは必須である。

## 2. 研究の目的

本研究では、高齢女性の歯槽骨喪失メカニズムをエストロゲン欠乏に起因する骨粗鬆症と歯周病による炎症性骨破壊の両方の観点から解明する。そこでヒトに最も近い動物であるサルを用い、高齢女性の歯槽骨喪失メカニズムにおいて骨粗鬆症と歯周病がどのように係わり合っているか、またそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに破骨細胞が分泌する骨基質消化酵素カテプシンKの阻害剤により歯槽骨喪失を抑制できるかどうかを検証することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵巣摘出サル歯周病モデル動物作成

ヒトの中年以上に相当する年齢である18歳以上のカニクイザル8匹を用い、動物を無作為に2群に分け、全身麻酔下、1群には卵巣摘出術(ovariectomy:OVX)を行い、残りの群には卵巣摘出の疑似手術(Sham operation)を行った。

術後4ヶ月経過時点で、歯周炎を生じさせる目的で、各群ともに下顎右側の大白歯の歯頸部に絹糸を結紮。絹糸結紮後4ヶ月目に、動物に苦痛を与えないよう配慮した上、全身麻酔下にて屠殺した。下顎骨を摘出後、各群とも下顎骨大白歯部歯槽骨について左側(コントロール群)と右側(絹糸結紮側)を比較した(図1)。

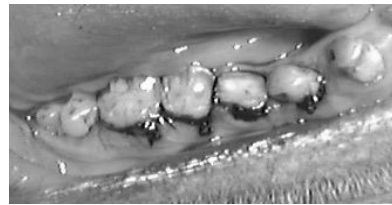


図1：絹糸を結紮された大白歯部

### (2) 歯周組織検査

日常歯科臨床で行っている歯周病診断にもとづき、ポケット深度測定、歯肉付着喪失度(LA)検査を行った。各群の値について一元配置分散分析(ANOVA)にて優位性の検定を行った。

### (3) 微細骨梁構造、骨梁骨密度の解析

高解像度マイクロCT(Elscan:日鉄エレクトクス社製)を用いて3次的に微細骨梁構造構築し骨梁構造を観察するとともに、歯槽骨高さの減少度を測定した。

### (4) カテプシンKに対する阻害剤(NC-2300)の投与効果

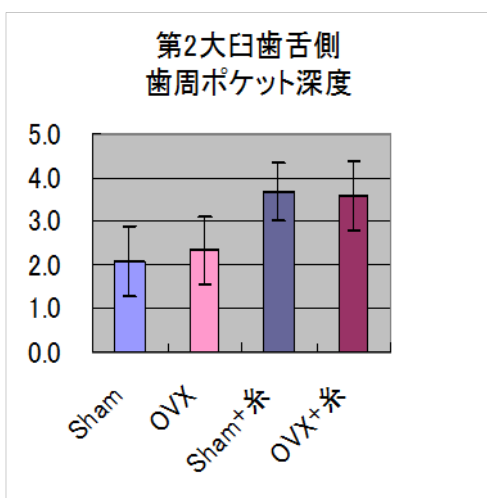
Sham 溶媒群、OVX 溶媒群、OVX 低用量(3mg/Kg)群、OVX 高用量(10mg/Kg)群の4群を設定し、16ヶ月(64週間)経口投与し

た。4, 8, 12ヶ月および解剖時に血清・尿を採取し、(尿中 CTx 値)(尿中 NTx 値)(血清中 NTx 値)を測定した。

#### 4. 研究成果

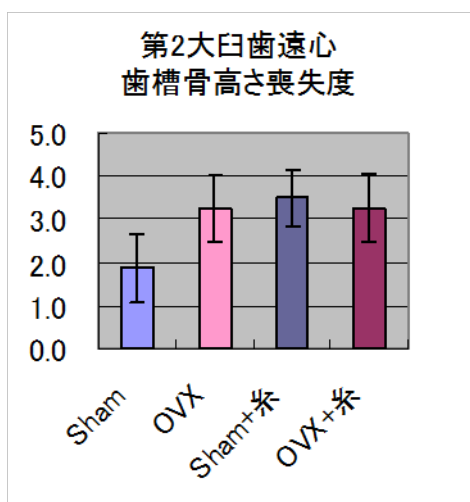
##### (1) 歯周組織検査の結果

第2大臼歯について、歯科臨床で一般的に行われている歯周組織検査を行った結果(図2)



第2大臼歯のポケット深度については、Sham群とOVX群での有意差は認められず、それぞれ群において、糸を巻いた歯周病誘発群において有意にポケットが深化していた。

一方、X線写真で測定した第2大臼歯遠心歯



間部の骨吸収度(CEJから骨頂までの距離)では、OVX群の値がSham群よりも有意に高かった。

##### (2) 微細骨梁構造の観察結果

Sham群、OVX群ともに歯周病を誘発することで、歯間部の歯槽骨高さが減少した。また歯頸部に絹糸を結紮した歯周病誘発群においては、歯石の付着が認められた(図3:矢印)

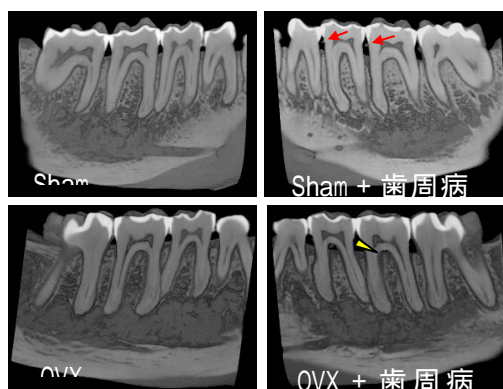
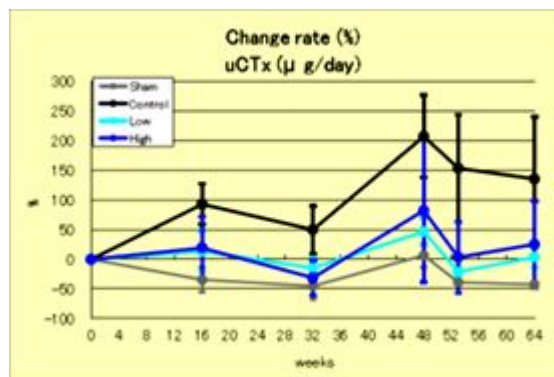


図3 マイクロCTによる3D再構築画像各群の大臼歯部矢状断面

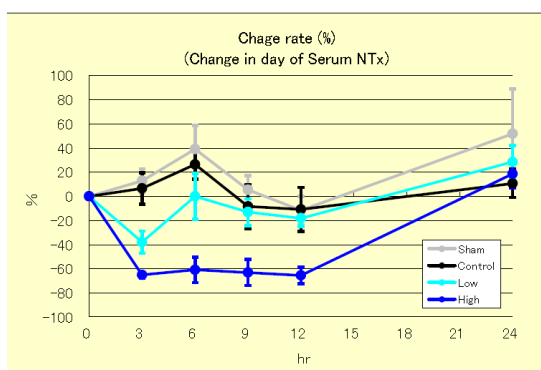
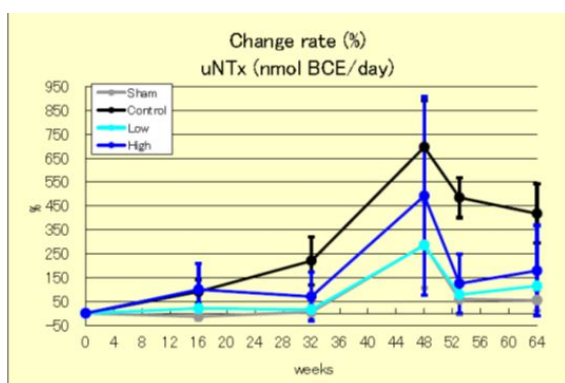
歯槽骨内部の骨梁構造を観察した結果、Sham群においては、歯周病誘発するしないに関わらず、Sham群よりもOVX群において根分岐部における骨量の減少が認められ、骨梁の連結性の喪失が認められた。また、OVX群では、根分岐部の病変が重篤化している個体も認められた(矢頭)。

##### (3) NC-2300投与効果

(尿中 CTx 値) OVX 対照群で卵巣摘出による骨吸収の亢進が継続してみられた。NC-2300投与群においても8カ月目に比して増加がみられたが、OVX 対照群より低値を示し特にNC-2300の10mg/kg投与群ではSham群レベルまでuCTx排泄は抑制された。



(尿中 NTx 値) Sham 群を含む全群で増加が認められたが、1日排泄量について Pre 値からの増加率をみると NC-2300 の 3mg/kg 投与群では OVX 対照群に比して低い傾向を示した。(血清中 NTx 値) NC-2300 投与群で明らかな増加が認められたが、NC-2300 投与後 24 時間目では骨吸収抑制作用が減弱すると考えられる。以上の結果より、OVX 群では骨密度、骨代謝への影響、特に骨吸収の亢進が生じていたが、NC-2300 は骨吸収を抑制し、骨形成を促進していたと考えられる。



本研究では、絹糸を結紮して歯周病を誘発することで、有意な歯周ポケットの深化と、有意な歯槽骨の高さ減少が認められた。このことから、歯頸への絹糸の結紮は、歯周病を誘発するモデルとして有効であることが改めて示された。

また、卵巣摘出、すなわちエストロゲン欠乏の影響は、歯周病の影響に比べて顕著ではなかったものの、X線写真による骨吸収度計測においては、OVX 群の歯槽骨が Sham 群よりも有意に吸収していることが明らかとなった。また、OVX 群の絹糸結紮側では、

根分岐部における歯槽骨の吸収が著明であり、ヒトで高頻度に認められる歯周病による根分岐部病変と同様の骨吸収動態を呈する個体が認められた。これにより、局所の歯周病による炎症とエストロゲン欠乏という全身のホルモン動態の変化が、歯槽骨の骨吸収活性を相加的に亢進させた可能性が考えられ、特に根分岐部については、注意深く検索する必要があると考えられる。また、今回の研究結果から、高齢者の女性の歯槽骨ではエストロゲン欠乏と歯周病による炎症の相乗効果で骨吸収の亢進が生じていることが示唆されたが、カテプシン K に対する阻害剤 (NC-2300) の投与は歯槽骨の骨吸収を抑制し、骨形成を促進する可能性が示された。

## 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 3 件)

- (1) Yamashita-Mikami E, Tanaka M, Sakurai N, Yamada K, Ohshima H, Nomura S, Ejiri S: Microstructural observation with microCT and histological analysis of human alveolar bone biopsy from a planned implant site: A case report. *Open Dent J*, 17(7):47-54, 2013.
- (2) Yamashita-Mikami E, Tanaka M, Sakurai N, Arai Y, Matsuo A, Ohshima H, Nomura S, Ejiri S: Correlations between alveolar bone microstructure and bone turnover markers in pre- and post-menopausal women.: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 115 (4): e12-19, 2013. doi: 10.1016/j
- (3) Kogaya Y, Watanabe R, Moribe J, Satoh K, Kubo K, Ejiri S: Differences in the ultra-structural localization of sulfated glycoconjugates between dentine and bone in the ganoid scales of *Polypterus senegalus*.: *Journal of Oral Biosciences*, 55 (4): 200-207, 2013.

〔学会発表〕(計 3件)

(1)三上絵美、田中みか子、櫻井直樹、芳澤享子、山田一穂、船山照典、三上俊彦、野村修一、江尻貞一：ヒト抜歯窩治癒過程における歯槽骨の骨梁構造・骨塩量の変化、第33回日本骨形態計測学会、2013年7月5日、浜松市、日本骨形態計測学会雑誌 23(1), S93.2013

(2)Watanabe R, Aoki K, Fujiwara A, Yano W, Satoh K, Kogaya Y, Kitai N, Ejiri S.: Changes in sclerostin localization in alveolar bones during tooth displacement. 2013.5.28 Kobe, 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research..

(3)渡邊竜太、青木啓太、藤原敦、矢航、佐藤和彦、小萱康徳、北井則行、江尻貞一：メカニカルストレスによって歯槽骨に生じる応力分布と sclerostin 免疫局在の変化について、2013年9月21日、岡山、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

江尻 貞一 (EJIRI SADAKAZU)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号：40160361

### (2)研究分担者

田中 みか子 (TANAKA MIKAKO)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：20361909  
渋谷 俊昭 (SIBUTANI TOSHIAKI)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号：40206149  
小萱 康徳 (KOGAYA YASUTOKU)  
研究者番号：30076046  
朝日大学・歯学部・准教授  
佐藤 和彦 (SATOU KAZUHIKO)  
朝日大学・歯学部・講師  
研究者番号：20340078  
渡邊 竜太 (WATANABE RYUUTA)  
朝日大学・歯学部・助教

### (3) 連携研究者

三上 絵美 (MIKAMI EMI)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号 20149328