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

小林 誠 野口 俊英 木下 四郎

1) 東京医科歯科大学歯学部第二歯科保存学教室
(主任教授：木下四郎教授)

篠田 寿

2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 実験薬理学部門

[受付：昭和59年3月20日]

Inhibitory effects of EHDP (Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate) on the resorption of alveolar bone in rats

Makoto Kobayashi, Toshihide Noguchi, Shiro Kinoshita

1) *Department of Periodontology, School of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113*
(Chief Prof. Shiro Kinoshita)

Hisashi Shinoda

2) *Department of Experimental Pharmacology
Medical Research Institute
Tokyo Medical and Dental University
2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-Ku, Tokyo 101*

[Accepted for publication: March 20, 1984]

Key words: EHDP / alveolar bone resorption / rubber ligature / blocking agent / rat

Abstract: The insertion of a rubber ligature in the interdental area between the first and the second mandibular molar in rats resulted in an acute vertical alveolar bone resorption which reached the apical region of the molars within 9 days of experimental period.

The result of measurements of vertical bone resorption on the dry skull showed that daily administration of Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) during the experimental period (8 mg/kg/day, s.c.) potentially interfered with bone response to the ligature insertion, i.e., EHDP decreased in the degree of vertical bone resorption and suppressed the decrease in the alveolar bone mass. The above results were confirmed by the histological and microradiographycal observations. Furthermore, 3 days of pre-administration of EHDP before the ligature insertion tended to enhance the inhibitory effect.

It is expected that EHDP, as well as other diphosphonates, may provide an useful tool for elucidating the mechanism of periodontal diseases in which excessive bone resorption is a prominent feature.

1) 〒 113 文京区湯島 1-5-45

2) 〒 101 千代田区神田駿河台 2-3-10

緒 言

正常な骨組織では 不断に骨の形成と吸収が行なわれており、その動的な平衡状態を介して血液中のカルシウム濃度の恒常性が保たれ、同時に骨格系の形成と形態の維持がなされている。この様な骨組織の形成や吸収過程に関与する全身的な因子としては、活性型ビタミン D₃、パラサイロドホルモン、カルチトニン等、種々のホルモンが明らかにされており、又上記のホルモン以外にも局所での骨吸収を惹起する因子として、プロスタグランジン、破骨細胞活性化因子(OAF)、上皮成長因子等が知られている¹⁾。

一方、歯周炎の進行に伴ない歯槽骨に吸収がおこる事は周知の事実であるが、こうした歯槽骨の吸収も基本的には、骨組織の改造機転のバランスがくずれ何らかの原因により骨吸収の活性が異常に亢進したり、骨形成が減少し相対的に骨吸収が優位となった結果おこるものと考えられる。

又、実験動物において骨の代謝系に影響を与える薬物を用いて骨吸収の過程を抑制したり、その機序を検討する多くの試みがなされている。今回の実験に用いた EHDP (Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate) も骨の代謝回転 (turn over) に大きな影響を与える数少ない薬物の 1 つで、その薬理作用に関しても近年多くの研究がおこなわれている^{2,3)}。この EHDP はピロリン酸の P-O-P 結合に対して、P-C-P の結合様式をもつ一連の diphosphonate 化合物の一つであり、Fig. 1 に示

す如く R₁ の位置に 水酸基、R₂ の位置にメチル基を持つピロリン酸類似化合物である。

EHDP を含む diphosphonate 化合物の原型となるピロリン酸は *in vitro* において様々なリン酸カルシウム結晶の形成やその成長を抑制し、又形成されたハイドロキシアパタイトの結晶表面に吸着してその溶解を抑制する事がよく知られている^{4,7)}。又、生体内においては硬組織の形成や吸収の過程を調節し、軟組織が石灰化する事を防ぐ生理的な因子の 1 つとみなされている^{3,8)}。EHDP も基本的にはこのピロリン酸とほぼ同様の薬理効果を持つことが確認されており^{9,10)}、生体内でピロリン酸の如く酵素的な分解をうけて活性を失うことがないため、現在 Paget 病をはじめとする様々な代謝性骨疾患に対して臨床的な使用が開始されている^{2,3)}。しかしながら、その骨吸収抑制の機序についてはなお不明な点も多く、又 EHDP が *in vivo* において歯槽骨の吸収を抑制し得るか否かについても十分な検討がなされていない。

今回我々は、ゴム ligature を用いラットの下顎歯槽骨部に一定の垂直性骨吸収をおこすような実験モデルを設定し、この *in vivo* の実験系において EHDP がどのような骨吸収抑制効果を示すかについて基礎的な検討を加えた。

実験材料および方法

実験 I

実験には平均体重 202g の雄性 Wistar 系ラット 60 匹を用いた。ラットは 3 匹ずつ金属ケージに入れ、オリエンタル社製固型飼料と水道水にて 1 週間予備飼育した。すべてのラットは実験開始時において Nembutal 麻酔下で、横田らの方法¹¹⁾に準じ、下顎右側臼歯歯間部にゴム ligature を装着させた。実験部位は下顎両側 M₁, M₂ 歯間部とし、右側を実験側、左側を対照側とした。ラットをコルク板に鉤と絹糸を用いて固定したのち、実験側では歯間部歯槽骨辺縁に持続的な圧迫刺激を加える目的で歯科用ラバーシートを約 1 mm の幅に切って作ったゴム ligature を M₁, M₂ 歯間部に接触点を越えて嵌入させ、骨面にそわせて前庭ならびに口腔腔へ通し、垂直下方へ約 100g の荷重が加わる様に牽引した。さらにこの ligature を顎

Fig. 1 Formulae of pyrophosphate and EHDP.

Fig. 2 (a) Schematic representation of the insertion of rubber ligature in the interdental area between the first and the second mandibular molar in the rat.

Fig. 2 (b) Rubber ligature was tied up through a seruroid stopper in the submandibular area.

下部体表にセルロイドストッパーを介して結紮し、シアノアクリレートで固定した (Fig. 2a, Fig. 2b)。又、対照側には ligature を装着する直前までの手順のみをふんだ擬手術 (Sham operation) をほどこした。次に実験に使用したラット

60匹を30匹ずつ2群に分けた。一方の群のラットには ligature を装着させた日から EHDP を毎日プロキロ 8 mg ずつ皮下注射し、これを EHDP 投与群とした。尚、EHDP の投与量の決定に際しては比較的少量の場合には骨吸収が抑制され、大量に用いた場合にはむしろ骨の形成が抑制されるとした Gasser ら¹²⁾ の報告を参考にした。又、もう一方の群には 0.9% NaCl を同様に投与し、これを NaCl 投与群とした (Fig. 3)。EHDP 投与群、NaCl 投与群共に、ligature 装着日、3日目、6日目、9日目にラットを屠殺し、ただちにその両側下顎骨を摘出した後、軟組織除去を容易にするためオートクレーブで処理して、それらの dry skull を作製した。ついで顕微鏡下において、その骨吸収の程度を以下の方法により定量的に計測した。計測部位は実験側、対照側共に、M₁、M₂ 歯間部の舌側歯槽骨辺縁部とした。まず初めにプレパラート上に乗せたユーティリティーワックスの上に下顎骨を置き、歯槽骨の吸収面が対物レンズと平行になる様に顕微鏡下に設置し、M₁ の遠心隅角部、M₂ の近心隅角部の Cement-Enamel Junction (それぞれ A 点、B 点) と骨吸収の最も進んでいる点 (C 点) の 3 点が同時にピン트가合うような位置で固定した (Fig. 4)。ついでこれら 3 点を含む骨面をオリンパス 社製顕微鏡描画装置を用いて顕微鏡のかたわらに置いた紙面上に実長の 36 倍に拡大した像として投影した。この投影図上において C 点から、A 点と B 点を結んだ直線上

Fig. 3 Experimental protocol.

■ : Experimental period in which EHDP was given to the animal (8 mg/kg/day, s.c.).
 ▨ : Experimental period in which 0.9% NaCl was given to the animal.

Fig. 4 Measurement of vertical resorption of alveolar bone in the rat. The distance between point C and D was measured microscopically.

に垂線をおろし、この垂線 (CD) の長さを歯槽骨の垂直性骨吸収量とした。以上の方法により、ligature 装着日、3日目、6日目、9日目における骨吸収量を計測した。

実験 II

実験動物は平均体重172gの雄性 Wistar 系ラット 120 匹を用いた。実験 I 同様、これらのラット

を60匹ずつ2群に分け、一方を NaCl 投与群、もう一方を EHDP 投与群とした。この実験 II が実験 I と異なる点は、実験 I では ligature を装着した日より薬物の投与を開始したのに対し、実験 II では ligature を装着する3日前より薬物の投与を開始した点にある (Fig. 3)。薬物の投与量、動物の屠殺日、骨吸収量の計測方法についてはいずれも実験 I と同様におこなった。又、実験 II で用いた動物のうち NaCl 投与群30匹、EHDP 投与群30匹のラットについては、摘出した下顎骨をカルノスキーのグルタルアルデヒド溶液で固定した後、Softex 社製 C-SM 型装置を用いて軟X線撮影を行った。次いで各顎骨を水洗した後ブランクリチェロの迅速脱灰液で48時間脱灰し、上昇アルコール系列で脱水後、通法に従ってパラフィンに包埋した。ついでそれらの標本について M₁, M₂ 歯間部顎骨の頬舌断切片を作製した。各切片にはヘマトキシリン、エオジン染色を施した後、ligature による歯槽骨吸収の経時的变化を把握する目的でオリンパス社製顕微鏡描画装置を用いて歯槽頂部骨質のトレース像を各個体ごとに作成した。又、

(Exp. I.)

(Exp. II.)

Fig. 5 Growth curves of rats given EHDP (8 mg/kg/day, s.c.) or 0.9% NaCl.

Fig. 6 Microradiographs of mandibulae in rats after the wearing rubber ligature for 0, 3, 6 and 9 days. The daily administration of EHDP (8 mg/kg/day, s.c.) or 0.9% NaCl to the animal was begun 3 days before the insertion of rubber ligature.

実験Ⅱで用いた動物のうち残りの NaCl 投与群30匹, EHDP 投与群 30 匹は実験Ⅰと同様に dry skull により歯槽骨の垂直性骨吸収量を計測した。

実験結果

体重変化

Fig. 5 に実験期間中に見られた動物の体重増加曲線を示した。実験Ⅰ, 実験Ⅱ共に ligature 装着日から2～3日間にわたって体重の減少又は増加の鈍化が認められ, この傾向は EHDP を投与した群においてやや強いと思われた。しかし手術後3日目以降においては NaCl 投与群, EHDP 投与群共に, ほぼ同様の体重増加傾向を示した。又,

薬物の投与を ligature 装着日より開始した実験Ⅰと ligature を装着する3日前より開始した実験Ⅱとの間にも体重増加の点で目立った差は認められなかった。

下顎骨軟X線撮影像

Fig. 6 には実験Ⅱのラットの ligature を装着させた実験側について NaCl 投与群と EHDP 投与群の下顎骨軟X線像の典型的な例をおのおの1例ずつ示してある。この図から明らかなように, 実験側では NaCl 投与群および EHDP 投与群ともに, ligature 装着後3日目においてすでに M_1 , M_2 歯間部に明らかな歯槽骨吸収が認められた。しかしながらこの時期では, EHDP 投与による骨吸収の抑制効果はわずかに認められたものの

Fig. 7 Vertical resorption of alveolar bone in rats after the wearing rubber ligature for 9 days.

A: The rat given 0.9% NaCl.

B: The rat given EHDP (8mg/kg/day, s.c.).

NaCl 投与群との間に大きな差を認めることができなかった (Fig. 6)。ligature 装着部に生じたこの垂直性の歯槽骨吸収は経時的に急速に増大する傾向を示し、特に NaCl 投与群では ligature 装着後 9 日目においてその骨吸収が M_1 , M_2 の根尖近くまで達する例も数多く観察された。さらに吸収の近遠心的な範囲も拡大し、ほとんどの例において ligature がかかっていた M_1 , M_2 歯間部を中心とした歯槽骨部に著しく軟 X 線の透過性が亢進した像が認められた。一方 EHDP 投与群について見るとその骨吸収の程度は ligature 装着後 6 日目、9 日目共に NaCl 投与群に比べて少なく、根尖方向への吸収程度、 M_1 , M_2 歯間部を中心とした吸収像の近遠心的な広がり共に、NaCl 投与群との差は明瞭であり、これは dry skull における肉眼的所見とも一致した (Fig. 7)。

Fig. 8 Schematic representation of alveolar bone of mandibular. Contour of the microscopic image of the alveolar bone was traced with a tracing device for the bucco-lingual cross sections obtained from the interdental area between the first and the second mandibular molar.

B: buccal, L: lingual, I: incisor.

歯槽頂骨質部のトレース像

ligature を装着した実験側より得られた下顎骨組織切片について Fig. 8 に示した様に顕微鏡描画装置を用いて歯槽頂部骨質のトレース像を作製した。Fig. 9 にはこの様にして作製した NaCl 投与群と EHDP 投与群の各屠殺日における骨質トレース像の典型的な例をおのおの 2 例ずつ示してある。

NaCl 投与群について見ると ligature を装着した後、その歯槽頂部に強度の骨吸収が生じており、時間の経過と共に、歯槽骨頂部において急速な骨質量の減少が生じている事が確認された。これに対して EHDP を投与したラットでは、骨吸収の程度が強く抑制されており、歯槽骨頂部における骨質量の減少の程度が少なく、NaCl 投与群との差は 3 日目においてもすでに認める事ができた。6 日目における歯槽骨頂部の吸収の程度は NaCl 投与群と比べると明らかに低くおさえられており、その差は顕著であった。一方頰側骨壁は NaCl 投与群、EHDP 投与群共に、ligature による骨吸収が少なく、実験期間中いずれの個体においても残存する傾向を示した。

下顎骨 dry skull における計測所見

実験 I

Fig. 10 には実験 I で用いたラットの下顎骨 dry

Fig. 9 Schematic representation of alveolar bone in the mandibula after the wearing rubber ligature. The daily administration of EHDP (8 mg/kg/day, s.c.) or 0.9% NaCl to the animal was begun 3 days before the insertion of rubber ligature. The animals were sacrificed on day 0, 3 and 6 (see Fig. 8).

skull 上において垂直性骨吸収量を測定した結果をグラフに示してある。まず ligature を装着した実験側についてみると、太い実線で示した NaCl 投与群では経時的な垂直性骨吸収量の増加が見られ、特に3日目以降においてその傾向は顕著であった。これに対して太い点線で示した EHDP 投与群では同様に経時的な骨吸収量の増加が認められたものの、その値は NaCl 投与群に比較して低く押えられており、両群における骨吸収量の差は6日目、9日目において NaCl 投与群と比較して統計学的に有意であった（6日目 $p < 0.02$, 9日

目 $p < 0.02$ ）。一方 ligature を装着しなかった左側においては、EHDP 投与群と NaCl 投与群の間に実験期間中を通してその値に差は認められなかった。

実験Ⅱ

Fig. 11 は EHDP あるいは NaCl を前投与した実験Ⅱのラットについて同様に垂直性骨吸収量を計測した値をグラフにしたものである。この図からも明らかな様に、実験期間を通して実験Ⅰとほぼ同様な EHDP による骨吸収の抑制効果が認められ、両群における骨吸収量の差は NaCl 投与

Fig. 10 Exp. I Vertical resorption of alveolar bone in the mandibula with or without rubber ligature. The animals were given EHDP (8 mg/kg/day, s.c.) or 0.9% NaCl for 0, 3, 6 and 9 days.

群と比較して統計学的にも有意であった（6日目 $p < 0.01$, 9日目 $p < 0.01$ ）。さらに NaCl 投与群に対する9日目の抑制率は実験 I において 20.1%であったのに対し、実験 II においては 25.7%とやや大きな値を示した。

考 察

今回の実験において EHDP の骨吸収抑制効果を検討するにあたり考慮した重要な点の1つは、再現性のある比較的バラツキの少ない歯槽骨吸収を確実に起こすことができる様な実験モデルを設定することであった。我々はそのための手段の1つとしてゴム ligature をラットの下顎 M_1 , M_2 歯間部に嵌入させる横田らの方法¹¹⁾を用い、これにいくつかの修飾を加えた。即ち、薬物による骨吸収抑制効果を感度よく検出するためには、実験期間中に得られる骨吸収量をできるだけ大きくする事が必要であると考え、このためにゴム ligature により加える力を原法よりも強くし（約 100g）、又歯槽骨頂部に加わる力が個体間でばらつかない

Fig. 11 Exp. II Vertical resorption of alveolar bone in the mandibula with or without rubber ligature. The daily administration of EHDP (8 mg/kg/day, s.c.) or 0.9% NaCl to the animal was begun 3 days before the insertion of rubber ligature. The animals were sacrificed on day 0, 3, 6 and 9.

ようにするため ligature を結紮した顎下部においてバネばかりを用いてその張力を測定し、加える力をできる限り規格化した。その結果、9日間という比較的短い実験期間中に歯槽骨から臼歯根尖部におよぶ、再現性のある大きな垂直性骨吸収を出現させる事ができた。又、歯槽骨吸収の程度を定量的に計測するための一つの試みとして dry skull を用いる方法を使用した。この方法は Fig. 4 に示した如く、歯槽頂部より下顎底に向けて起こる楔状の垂直性骨吸収を舌側部のみにについて骨表面から観察するという方法であるが、楔状の吸収窩の先端が本来の歯槽頂からどの程度の距離にあるかは、吸収窩全体の大きさとする種の比例関係にある事が考えられる。特に臨床的に起こる複雑な骨吸収像と異なり、今回用いた様な歯間部歯槽頂に加わる力と方向が一定している様な比較的単純な実験系においては、それによって起こる骨吸収像もほぼ同じである事が考えられるためこの

種の定量化が充分意味を持つと思われる。又、この方法は顕微鏡下で比較的容易に歯槽骨の吸収程度を計測できる事、さらに組織切片の作製等に要する時間を省略できる等の利点があるので、今後歯槽骨の吸収実験や、それに与える薬物の効果等を比較的簡単にスクリーニングするための簡便法として広く使用し得る可能性があると思われる。

今回用いた実験系において、EHDP は強力な歯槽骨吸収抑制因子として作用し得る事が確認された。dry skull 上での計測結果によるとその抑制効果は ligature を装着した後 3 日目以降において特に NaCl 投与群との差が明瞭であった。即ち Fig. 10 および Fig. 11 に見られる様に NaCl 投与群において 3 日目から 6 日目にかけて見られた吸収曲線の急激な立ちあがり、EHDP を投与した群では明らかに低くおさえられていた。この結果は歯槽骨頂部の骨質部をトレースした Fig. 9 や軟 X 線写真像 (Fig. 6) から得られた結果ともよく一致している。又 EHDP によるこの様な歯槽骨吸収の抑制効果は、EHDP を ligature を装着する前からあらかじめ投与した実験 II において、より大きくなる傾向が示された (Fig. 11)。この事実は ligature を装着することによって起こる炎症性刺激等に対する骨改変系の反応性が、EHDP を前投与する事によってすでに低下しているためと思われる。

一方 EHDP がどのような作用機序によって歯槽骨の吸収を抑制したかは、今回の実験のみからでは明らかでない。従来 EHDP は骨の主成分であるハイドロキシアパタイトの表面に吸着されその結晶を安定化する事^{3,7)}、*in vivo* において特に osteoclast や chondroclast に形態的な変化を与える事^{14,15)}、又骨細胞 (bone cells) の培養系において glucose の取り込みと乳酸産生を減少させ¹⁶⁻¹⁸⁾、acid phosphatase や arylsulfatase 等の lysosomal enzyme の活性を抑制する事¹⁹⁾、さらに prostaglandins の合成も抑制する²⁰⁾ 等従来骨吸収に関与すると考えられている多くの因子がこの薬物によって阻害される事から、今回用いた実験系においても、EHDP のこれらの作用が何らかの形で関与している事が考えられる。しかし、rice rat に実験的な歯周疾患を起こし、EHDP と

dichloromethane diphosphonate (Cl_2MDP) の歯槽骨吸収抑制効果を検討した Leonardi ら²¹⁾は我々が用いた $1/2$ の用量 (4 mg/kg) の EHDP を 10 日間にわたり投与した群で、対照群との有意差を認めなかった事を報告している。いずれにしても従来機械的な圧迫刺激によって惹起される歯槽骨吸収に対して、確実な抑制効果を持つ薬物はほとんど報告されておらず、わずかに indomethacin 等の抗炎症薬が炎症性の歯槽骨吸収を抑制する事が知られているのみである^{22,23)}。

したがって今回得られた EHDP による歯槽骨吸収抑制効果についてその機序を更に検索する事は、歯科領域で見られる多くの骨吸収現象の理解に役立つのみならず、その機序を検索するための有力な研究手段を提供するものと考えられる。

結 論

1. ラットの下顎 M_1 , M_2 歯間部にゴム ligature を用いて一定の垂直性圧迫刺激を加え、その歯槽骨部に一定の骨吸収を惹起するような実験モデルを設定した。

2. dry skull を用いた垂直性骨吸収量の計測、組織学的検索および、軟 X 線撮影像の観察結果によると、ligature 装着後経時的に垂直性骨吸収量の増加が認められ、9 日目にはその骨吸収は M_1 , M_2 根尖部付近にまで及んだ。

3. 体重 1 kg あたり 8 mg の Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) を毎日皮下注射したラットでは、対照として NaCl を投与したラットに比べて歯槽骨の吸収の程度および骨量の減少が強く抑制されており、その抑制効果は ligature 装着後 3 日目以降において特に顕著であった。

4. EHDP を ligature を装着する 3 日前より投与したラットでは、ligature 装着日から投与を開始したラットに比べて骨吸収抑制効果が大きくなる傾向を示した。

5. ligature 装着による機械的な圧迫刺激によって生ずる歯槽骨の吸収を確実に抑制し得る薬物は従来ほとんど報告されておらず、この意味で今回その効果が確認された EHDP は他の diphosphonate と併せ、歯周疾患により惹起される種

々の骨吸収やその機構を検索するための有力な研究手段と成り得る事が示唆された。

謝辞：本研究の実施に当り貴重な御助言と論文の御校

閲を頂きました東京医科歯科大学歯学部薬理学教室小椋秀亮教授に深く感謝致します。尚、本論文の要旨の一部は、第79回日本歯科保存学会（昭和58年10月6日）に於いて発表した。

抄録：diphosphonate は indomethacin や calcitonin と並んで骨吸収に対する強力な抑制因子であり、現在、人に対しては EHDP (Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate) を初めとする数種の diphosphonate が Paget 病等の代謝性骨疾患に対し臨床的に使用されている。今回我々は歯槽骨吸収抑制機構を解明するための一環として、ラットの歯槽骨部に一定の垂直性骨吸収をおこす様な実験モデルを設定し、この実験モデルを用いて EHDP がこの実験系においてどのような抑制効果を示すかを検討した。実験には雄性 Wistar 系ラット180匹を用いた。これらすべてのラットは実験開始時において下顎右側 M₁, M₂ 歯間部にゴム ligature を装着し、左側同部位には Sham operation をほどこした。このうち60匹のラットには実験開始時より、残りの120匹のラットには実験開始3日前より、EHDP 8 mg/kg/day (s.c.) あるいは対照として0.9% NaCl (s.c.) を投与した。実験開始日、3日目、6日目、9日目にラットを屠殺し、両側下顎骨を摘出し、その骨吸収の程度を dry skull により定量的に測定し、併せて軟X線撮影像の観察および組織学的な検討を加えた。その結果 NaCl 投与群のラットでは ligature 装着後9日目において根尖部付近にまで達する大きな垂直性の歯槽骨吸収が認められたのに対して、EHDP 投与群においては歯槽骨吸収の程度および骨量の減少が強く抑制されており、その抑制効果は ligature 装着後3日目以降において特に顕著であった。又、EHDP を ligature 装着3日前から与えたラットでは、ligature を装着した日からこの薬物を与えたラットと比較して、その骨吸収抑制効果が大きくなる傾向を示した。これらの結果から、EHDP は歯槽骨吸収に対して有効な抑制因子として作用し得る事が今回の実験により確認された。従来、機械的な圧迫刺激により惹き起こされる歯槽骨の吸収に対してこれを確実に抑制し得る薬物は報告されておらず、この点で今回その効果が確認された EHDP は、他の diphosphonate とともに併せ歯槽骨吸収の作用機序を検索するための有用な研究手段に成り得ることが示唆された。

文 献

- 1) Vaughan, J. M.: The Physiology of Bone. Third ed., Oxford University Press, New York, 1975.
- 2) Fleisch, H.: Bisphosphonates: Mechanisms of action and clinical applications, Bone and Mineral Res. 319-357, 1983.
- 3) Fleisch, H.: Diphosphonates: development and mechanisms of action. Etidronate: Proceedings of the 1st International Symposium on Diphosphonate in Therapy. ed.: Caniggia, A., Roma, 1979.
- 4) Fleisch, H. and Newman, W. F.: Mechanisms of calcification: role of collagen, pyrophosphate and phosphatase, Am. J. Physiol. 200 : 1296-1300, 1961.
- 5) Fleisch, H. and Bisaz, S.: Mechanisms of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. Nature 195 : 911, 1962.
- 6) Fleisch, H., Maerki, J. and Russell, R. G. G.: Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. Proceedings of the Soc. Exp. Biol. Med. 122 : 317-320, 1966.
- 7) Jung, A., Bisaz, S. and Fleisch, H.: The binding of pyrophosphate and two diphosphonates on hydroxyapatite crystals. Calcif. Tiss. Res. 11 : 269-280, 1973.
- 8) Russell, R. G. G., Bisaz, S., Donath, A., Morgan, D. B. and Fleisch, H.: Inorganic pyrophosphate in plasma in normal persons and in patients with hypophosphatasia, osteogenesis imperfecta and other disorders of bone. J. Clin. Invest. 50 : 961-969, 1971.
- 9) Francis, M. D., Russell, R. G. G. and Fleisch, H.: Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals *in vitro* and pathological calcification *in vivo*, Science 165 : 1264-1266, 1969.
- 10) Fleisch, H., Russell, 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.
- 11) 横田 誠：ラットの実験的歯周炎における病理組織学的研究。日歯周誌 17 : 14-28, 1975.
- 12) Gasser, A. B., Morgan, D. B., Fleisch, H.

- and Richelle, L. J.: The influence of two diphosphonates on calcium metabolism in the rat. *Clin. Sci.* **43**: 31-45, 1972.
- 13) Evans, J. R., Robertson, W. G., Morgan, D. B. and Fleisch, H.: Effects of pyrophosphate and diphosphonates on the dissolution of hydroxyapatites using a flow system. *Calcif. Tiss. Int.* **31**: 153-159, 1980.
- 14) Plasmans, C. M. T., Jap, P. H. K. and Slooff, T. J. J. H.: Influence of a diphosphonate on the cellular aspect of young bone tissue. *Calcif. Tiss. Int.* **32**: 247-256, 1980.
- 15) Schenk, R. and Merz, W. A.: Effect of Ethan-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) and Dichlormethylene diphosphonate (Cl₂MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibia epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif. Tiss. Res.* **11**: 196-214, 1973.
- 16) Fast, D. K., Felix, R., Neuman, W. F., Fleisch, H.: The effects of diphosphonates on the growth and glycolysis of connective-tissue cells in culture. *Biochem. J.* **172**: 97-107, 1978.
- 17) Ende, J. J.: Some effects of EHDP and Cl₂MDP on the metabolism of isolated bone cells. *Proc. Kon. A. Kad. wet. C-81*: 252-264, 1978.
- 18) Shinoda, H., Adamek, G., Felix, R., Fleisch, H. and Schenk, R.: Structure-activity relationships of various bisphosphonates, *Calcif. Tiss. Int.* **35**: 87-99, 1983.
- 19) Felix, R., Russell, R. G. G. and Fleisch, H.: The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **429**: 429-438, 1976.
- 20) Felix, R., Bettex, J. D. and Fleisch, H.: Effect of diphosphonates on the synthesis of prostaglandins in cultured calvaria cells. *Calcif. Tiss. Int.* **33**: 548-552, 1981.
- 21) Leonard, E. P., Resse, W. V. and Mandel, E. T.: Comparison of the effects of Ethan-1-hydroxy-1,1-diphosphonate and Dichlormethylene diphosphonate upon periodontal bone resorption in rice rats. *Archs. Oral. Biol.* **24**: 707-708, 1979.
- 22) Weeks-Dybvig, M., Savani, F., Zander, H. and Rifkin, R.: The effects of indomethacin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J. Periodont. Res.* **17**: 90-100, 1982.
- 23) Nyman, S., Schroeder, H. E., Lindhe, J.: Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J. Periodontol.* **50**: 450-461, 1979.