原 著

ハムスター実験的歯周疾患におけるビスホスフォネート (シマドロネート) による破骨細胞の変化

長谷川 直 樹

鶴見大学歯学部口腔病理学教室 (主任：菅原信一教授)

[受付：平成 8 年 5 月 30 日, 受理：平成 8 年 12 月 2 日]

Effects bisphosphonate (cimadronate)
on osteoclasts in experimental periodontitis in hamsters

Naoki Hasegawa

Department of Oral Pathology, School of Dental Medicine, Tsurumi University

(Chief : Prof. Nobukazu Sugawara)

2-1-3, Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230, Japan

[Received on May 30, 1996 ; Accepted on December 2, 1996]

Key words : bisphosphonate / alveolar bone loss / osteoclast / ruffled border / experimental periodontitis

Abstract : A new bisphosphonate, disodium dihydrogen (cycloheptylamino)-methylene-1, 1-bisphosphonate (cimadronate, YM175) inhibits alveolar bone loss in experimental periodontitis in hamsters. The purpose effects of cimadronate on the morphology and the function of osteoclasts were examined. Hamsters were fed a powdered high-carbohydrate diet, and ligated with silk sutures at the lower first molar (M1) to induce periodontitis. The alveolar bone loss was estimated by measurement of the area between the cemento-enamel junction and the crest of alveolar bone at the M1 by radiograph. Animals were administered cimadronate subcutaneously at the dose of 0 (control), 0.03, 0.1 and 0.3 mg/kg $\times$ 2 times/week. The amount of the alveolar bone loss in the above groups (at the 4th week) was, 1.05 ± 0.31 , 0.95 ± 0.25 , 0.59 ± 0.14 and 0.68 ± 0.14 mm², respectively. The number of osteoclasts 3-fold was higher in the 0.1 and 0.3 mg/kg cimadronate administered groups ($p < 0.01$), than the control at the 4th day after the ligation with silk suture. Electronmicroscopic examinations, of the osteoclasts revealed the deficiency in ruffled border formation in the cimadronate-administered groups. These findings suggest that cimadronate affects the function of osteoclasts.

In conclusion, the inhibition of alveolar bone loss by cimadronate might be due to the dysfunction of osteoclasts, although they increased in number.

抄録 : ビスホスフォネート新誘導体 disodium dihydrogen (cycloheptylamino)-methylene-1, 1-bisphosphonate (cimadronate, YM175) はハムスター実験的歯周疾患において強い歯槽骨吸収抑制作用を示す。本実験は cimadronate が破骨細胞の機能および形態に及ぼす影響を調べることを目的とする。ハムスターは蔗糖含有粉末飼料で飼育するとともに、下顎第 1 臼歯 (M1) 歯頸部を手術用縫合糸で結紮し、歯周疾患を起こさせた。歯

槽骨吸収量は、M1 のエナメル-セメント境と歯槽骨頂の間の面積を軟X線撮影により算定した。cimadronate を 0 (対照), 0.03, 0.1 および 0.3 mg/kg, 週 2 回皮下注射した。その結果, 結紮後 4 週目における各群の歯槽骨吸収量はそれぞれ 1.05 ± 0.31 , 0.95 ± 0.25 , 0.59 ± 0.14 および $0.68 \pm 0.14 \text{ mm}^2$ を示し, cimadronate 投与により顕著に骨吸収が抑制された。絹糸結紮 4 日後における cimadronate 0.1 および 0.3 mg/kg 投与群の破骨細胞数は, 対照群に比較して約 3 倍に増加した後, 徐々に減少した。電子顕微鏡による破骨細胞の観察では, 波状縁 (ruffled border) の不十分な形成が観察され, cimadronate が破骨細胞の機能を障害することが示唆された。

以上の結果から, cimadronate は破骨細胞数を増加させる一方で, 本細胞の機能を障害し, 結果的に骨吸収を抑制するものと考えられた。

理組織学的に詳細に検討した。

緒 言

ビスホスフォネートはピロリン酸の類似化合物で, その骨格に P-C-P 結合を持ち, ホスファターゼによる水解を受けにくい性質を示す。骨ハイドロキシアパタイトの吸収を抑制することから骨粗鬆症を始めとする種々の骨疾患に応用され, すでにその一部は臨床で用いられている。近年, より有効な臨床効果をめざし, 種々のビスホスフォネート化合物が, 開発されているが¹⁻⁴⁾, 骨吸収抑制の作用機序はいまだ明確ではない。近年開発されたビスホスフォネートは初期のタイプのもの (1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonic acid, etidronate) と比較し 1000~10000 分の 1 の投与量で効果を示すものもあり, 単にハイドロキシアパタイトの水解を抑制することのみでは骨吸収作用の機序を説明しきれず, ビスホスフォネートが破骨細胞に作用して骨吸収を抑制する可能性が示唆されている⁵⁻⁸⁾。

第 3 世代のビスホスフォネートの 1 つとして近年開発されている disodium dihydrogen (cycloheptylamino)-methylene-1, 1-bisphosphonate (cimadronate, YM175) は, アミノ基の水素原子の一方をシクロヘプタン環に置換したアミノメタンビスホスフォネートであり, 実験動物を用いた癌骨転移における骨吸収⁹⁾や骨粗鬆症モデル¹⁰⁾などに対して強い骨吸収抑制効果を発揮することが報告されている。この第 3 世代のビスホスフォネートはまた, 硬組織の石灰化阻害作用が強い etidronate^{11,12)} に比べて, 石灰化阻害作用が少ない。近年, これらを用いた歯槽骨吸収抑制作用の研究が歯学領域でもなされている¹³⁻¹⁵⁾。岡本および筆者ら¹⁵⁾は蔗糖含有粉末飼料を用いたハムスター実験的歯周疾患において, cimadronate が歯槽骨吸収抑制作用を示すことを報告している。本実験は, cimadronate の歯槽骨吸収に及ぼす影響を調べる目的で, ハムスターを蔗糖含有粉末飼料で飼育し, さらに下顎第 1 臼歯 (M1) の歯頸部に絹糸を結紮し, 高度の炎症を引き起こした実験的歯周疾患モデルを用い, 歯槽骨周辺の破骨細胞の変化について病

材料と方法

1. 実験動物

実験には生後 6 週齢 (平均体重 90 g) の雄性ゴールデンハムスター (日生研, 長野) を使用した。ハムスターは金網の底敷を入れたプラスチック製ケージで飼育し, 水および飼料は自由摂取させ, 温度は 23°C, 湿度 53~65% を保ち, 明暗 12 時間サイクルの環境下で飼育した。

2. 実験的歯周疾患の作成法

生後 8 週齢時のハムスターにベントバルビタールナトリウム (ネンプタール, 大日本製薬, 大阪) 20 mg/kg を腹腔内注射し, 補助的にジエチルエーテルを吸入させて麻酔し, M1 の歯頸部に滅菌済みの手術用縫合絹糸 No. 4 (秋山製作所, 東京) を結紮した (Fig. 1)。Keyes の処方した Diet#2000 の蔗糖含有量を 56% から 30% に減少させ, 減少分をコーンスターチで置き換えた粉末飼料 (日本クレア, 東京) で飼育した (以下, 便宜的に D2000 と略す)。

3. 薬物の投与量および投与方法

Cimadronate は山之内製薬 (東京) より供与された。実験 1 は 20 匹のハムスターを 4 群 (n=5) に分け, 生後 8 週齢より D 2000 で飼育すると同時に絹糸を M1 に結紮した。同時に第 1 群は生理食塩液のみ, 第 2, 3 および 4 群は生理食塩液に溶解した cimadronate を 0.03, 0.1 および 0.3 mg/kg を背部皮下に週 2 回注射した。結紮後 4 週目にネンプタール麻酔下で, 0.1M カコジル酸緩衝液で調整した 2.5% グルタルアルデヒド溶液 (pH7.4) を用い, 約 20 分間灌流固定した後, 下顎両側を摘出し, 歯槽骨吸収量を測定した。

実験 2 は 36 匹のハムスターを 3 群 (n=3) に分け, 生後 8 週齢より D2000 で飼育すると同時に縫合糸を M1 に結紮した。第 1 群は生理食塩液のみ, 第 2 および 3 群

は生理食塩液に溶解した cimadronate を 0.1 および 0.3 mg/kg, ハムスターの背部皮下に週 2 回注射した。結紮後 2 日および 4 日目, 1 週および 2 週目に各群 3 匹ずつネブタール麻酔下で実験 1 同様に灌流固定し, 下顎両側を摘出し, 歯槽骨吸収量の測定, および病理組織学的観察を行った。

4. 歯槽骨吸収量の評価

摘出した下顎は 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 4°C で再固定後, 軟 X 線撮影をした。撮影装置は Softex CSM-2 (ソフテックス, 東京) を用い, 撮影条件は二次電圧 90 kV, 3 mA, 7 秒間露出した。用いたフィルムは Softex film FR (富士フィルム), Rendol (富士フィルム) にて 20°C, 4 分間現像し, Fuji fix (富士フィルム) にて 20°C, 6 分間定着し, 水洗, 乾燥した。軟 X 線写真はイメージカメラ (HQ-1000M, Nikon, 東京) を用いて画像処理装置 (LUZEX3, Nikon, 東京) に画像を取り込み, Figure 1 に示すように, M1 近心のエナメルセメント境と歯槽骨頂間の面積を計測し, 歯槽骨吸収量とした。

Fig. 1 Measurement of the area for alveolar bone loss at the lower first molar.

CE : cemento-enamel junction, AC : crest of alveolar bone, M1 : lower first molar, M : medial, D : distal

5. 病理組織学的観察

1) 光学顕微鏡的観察

摘出した下顎は, 2.5% グルタルアルデヒド溶液にて 4°C で再固定した。次いで 10% EDTA-2Na (pH7.4) を用いて 4°C で脱灰し, パラフィン包埋後, M1 近心根根尖を含むように, 近遠心方向に切り出し, 厚さ 3 μ m の連続切片を作成し, ヘマトキシリン-エオジン染色 (H. E. 染色) した。また, 破骨細胞を観察するために, アゾ色素法¹⁶⁻¹⁸⁾による酸性ホスファターゼ染色を施し, 光学顕微鏡観察に供した。酸性ホスファターゼ染色は 100 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中に基質として 1.25 mg/ml の naphthol AS-BI phosphonic acid (Sigma, U. S. A.) および発色剤として 2 μ g/ml パラロザニリン (Sigma, U. S. A.) を含む液中で約 15 分間反応させ発色させた。

破骨細胞数は Figure 2 に示すように, 歯根を通る M1 近遠心面で 1.8 $\times$ 2.5 mm² の範囲で面積を限定し, 顕微鏡下で計数した。

2) 電子顕微鏡的観察

脱灰した組織は, M1 の近心根根尖を含むように, 近

Fig. 2 Measurement of the area for counting of the number of osteoclast at the lower first molar.

A : alveolar bone, M : medial, D : distal.

遠心方向に切り出し、さらに歯頸部、歯根中央部、根尖部に3分割した後、2.0%オスミウム酸で後固定し、通法に従って脱水、置換、Epon812に包埋した。3分割した組織は光学顕微鏡の観察により、特に破骨細胞の増加していた歯槽骨骨頂部位をウルトラミクロトーム (ULTRACUT N, 日製産業, 東京) を用い、超薄切片を作成した。超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX II, 日本電子, 東京) にて観察した。

6. 統計学的考察

対照群および実験各群における歯槽骨吸収量および破骨細胞数の平均値の差の検定は student's t-test を用いた。

結 果

1. Cimadronate 投与後の歯槽骨吸収抑制作用

Figure 3 は実験 1 における M1 周辺部の結紮後 4 週目の軟 X 線撮影像を示す。生理食塩液のみを投与した対照群では、歯頸部結紮部位および根分岐部に到る強い骨吸収が認められた (Fig. 3a)。一方、cimadronate の投与により歯槽骨吸収は抑制された。その吸収量は投与量を増加するに従い、用量依存的に抑制された (Figs. 3b~d)。cimadronate を 0.1 mg/kg 投与した群 (Fig. 3c) では、0.3 mg/kg 投与群 (Fig. 3d) とほぼ同等の強い抑制効果が認められ、対照群と両群との差は統計学的に有意であった ($p < 0.01$) (Fig. 4)。

Figure 5 は実験 2 における結紮後 1 週および 2 週目の骨吸収量を示す。cimadronate の投与群の骨吸収は結紮後 1 週目は用量依存的に抑制され、骨吸収の進行を阻止した。結紮後、2 週目の cimadronate 0.1 および 0.3 mg/kg 投与群では、ほぼ同程度の強い骨吸収抑制効果が認められ、対照群と比較し、その差は統計学的に有意であった ($p < 0.05$)。

2. Cimadronate 投与後の歯周組織像

手術用縫合糸結紮後 4 日目の対照群では糸に細菌が多数付着し、その周囲および歯肉に多数の好中球が浸潤し、歯肉内縁上皮には潰瘍形成がみられた。潰瘍面下の粘膜固有層には好中球を主とした炎症細胞の浸潤と毛細血管の増殖、線維性組織の破壊がみられた (Fig. 6a)。cimadronate 0.3 mg/kg 投与群では潰瘍形成は減少し、歯肉内縁上皮は一部修復されたが、炎症程度は対照群とほぼ同じであった。上皮下の好中球などの炎症細胞浸潤

は少なく、毛細血管の増殖がみられ、糸結紮による歯肉縁の後退がみられた (Fig. 6b)。

糸結紮後 2 週目の対照群では近心側および遠心側の歯肉内縁上皮は、一部修復されているが、上皮内は空腔変性がみられ、好中球が浸潤していた。粘膜固有層では少量の好中球浸潤が上皮直下に限局し、軽度の結合組織線維配列の乱れと毛細血管の増殖がみられたが、炎症細胞の歯間水平線維への波及は認められなかった (Fig. 6c)。cimadronate 0.1 および 0.3 mg/kg 投与した群では、いずれも軟組織の結合組織線維配列の乱れがみられるが、対照群に比べて歯槽骨吸収の程度は軽度であった (Fig. 4d)。

3. 破骨細胞染色像および破骨細胞数

糸結紮後 4 日目の酸性ホスファターゼ染色による破骨細胞の所見は、対照群で歯槽骨頂周辺に多いのに対し (Fig. 7a)、cimadronate 0.1 および 0.3 mg/kg 投与群では歯槽骨表面全体にみられた (Figs. 7b, c)。

対照群の Figure 2 に示す単位面積あたりの破骨細胞数は、Figure 8 に示すごとく糸結紮後徐々に増加し、4 日目に 1 mm^2 当たり 11.9 個と最高値を示した。以後 7 日、14 日と徐々に減少した。cimadronate 0.1 および 0.3 mg/kg 投与群の破骨細胞数は、糸結紮 4 日後に最高値を示し、その数は両群ともに 30.6 個と対照群の約 3 倍に増加し、対照群との差は統計学的に有意 ($p < 0.01$) であった。その後 7 日および 14 日目には急速に減少し、対照群とほぼ同数であった。

4. 電子顕微鏡的観察

対照群では大部分の破骨細胞が、均質無構造の明帯 (clear zone) で骨質と強固に接着し、微細環境を形成していた。表面が窪んだ吸収窩に面して不規則な細胞突起 (微絨毛) をもつ発達した波状縁を有しており、骨吸収が進行していることを示唆している (Fig. 9a)。

Cimadronate 0.3 mg/kg 投与群では、対照群と同様に骨質との接着は認められるが、明帯の形態は、対照群と比較してやや薄く、もしくは存在がはっきりせず、骨質との強固な接着はみられなかった。波状縁は消失し、吸収窩はほとんどみられなかった (Figs. 9b, c)。また細胞質内の空腔は対照群と比較して、数が多かった。一部の破骨細胞は、骨から遊離しており、細胞質全体に空腔が散在していた (Fig. 9d)。核の多くはほぼ円形ないし楕円形を示していたが、対照群同様に変形しているものも認められた。粗面小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置などの細胞内小器官は対照群と同様で、数や形態の特異的

Fig. 3 Radiograms of the alveolar bone at the lower first molar in hamsters. Hamsters were received cimadronate at the dose of 0 (a), 0.03 (b), 0.1 (c), and 0.3 (d) mg/kg, 2 times a week, at the 4th week after ligation.

Fig. 4 Inhibitory effect of cimadronate on the alveolar bone loss at the 4th week after ligation. The alveolar bone losses in the cimadronate administered groups (except 0.03 mg/kg) were significantly inhibited ($p < 0.01$), as compared with the control. ($n=5$, mean $\pm$ S. D.)

変化は認められなかった (Figs. 9b~9d)。

考 察

実験的歯周炎は、齧歯類をはじめとして、イヌ、サル等の動物が多く使用されている。齧歯類、特にゴールデンハムスターは頬袋を有するなどの特別な口腔環境を有し、歯周炎に罹患しやすく、広く実験的歯周炎のモデルに使用されている。

Keyes ら¹⁹⁾はハムスターを蔗糖含有粉末飼料 (D# 2000) で飼育することにより、歯周炎を起こすことを報告している。また、絹糸あるいはナイロン糸、ゴムなどを歯頸部に結紮することにより齧歯類の歯周炎を起こす実験が以前より多数報告されている。例えば、Johnson²⁰⁾は絹糸をラット下顎臼歯部に結紮した結果、早期から潰瘍の形成、好中球の上皮下への浸潤を観察し、実験開始後 27 日目には軽度の骨吸収がみられたが、それ以上の進行はしないことを報告している。吉成は²¹⁾、ラットの上顎臼歯歯間部にナイロン糸を挿入した歯周炎モデルでは軽度の炎症細胞浸潤が認められ、7 週以降に歯間水平線維の軽度の乱れを観察し、歯槽骨の吸収が経時的に進むこ

Fig. 5 Inhibitory effect of cimadronate on the alveolar bone loss at the first and second weeks after ligation. The alveolar bone losses at the 2nd weeks after ligation in the 0.1 and 0.3 mg/kg of cimadronate administered groups were significantly inhibited ($p < 0.01$). ($n=3$, mean $\pm$ S. D.)

とを報告している。下野ら²²⁾は無菌ラットと普通飼育ラットを用いて、矯正用ゴムを歯間部に挿入して歯周炎を作り、機械的な刺激と、プラークによる刺激が歯周炎の進行に寄与するかを調べた。その結果、無菌ラット群では、炎症は表層に局限し、機械的刺激のみでは骨吸収は認められないことを報告している。色川²³⁾も同様に歯周炎惹起には歯の移動などの機械的刺激とともに細菌感染が必要であることを報告している。

今回の実験は、D2000 飼育と結紮を併用することにより、粘膜固有層には好中球を主とした炎症細胞の浸潤と毛細血管の増殖、線維性組織の破壊がみられ、当教室が従来用いた D2000 飼育のみの実験的歯周炎¹⁵⁾より高度の炎症が惹起され、1 週～4 週にわたり骨吸収が観察された。このような実験条件下で cimadronate の歯槽骨吸収に及ぼす効果を軟 X 線撮影により調べると、実験 1 および 2 で観察されたように、結紮後 1 週で既に骨吸収抑制効果が現れ、2 週および 4 週目には、統計学的に有意の差を示して抑制していた (Figs. 4, 5)。cimadronate 0.3

Fig. 6 Hematoxylin-Eosin stainings of the sagittal section of the lower first molar in hamsters.

Hamsters were received cimadronate at the dose of 0 (a, c), and 0.3 (b, d) mg/kg, at the 4th day (a, b) and the 2nd week (c, d) after ligation.

A : alveolar bone, D : dentine

mg/kg 投与群では骨の露出がみられた (Figs. 6b, d)。このことは、cimadronate が骨吸収に対して効果的に働くが、軟組織の炎症とそれに引き続いて起こる軟組織の破壊に対しては効果を示さないことを示唆している。逆に言うと、強い炎症が起きているにもかかわらず cimadronate が骨吸収を抑制するものと考えられる。

ビスホスフォネートは破骨細胞数を増加あるいは減少させるという相反する報告がある。Kodama ら⁷⁾は、遺伝的に破骨細胞形成不全のみられる大理石骨病 (op/op) マウスを用い、M-CSF を投与し、破骨細胞の誘導を脛骨において観察した。M-CSF 投与後4日以降に cimadronate を投与した場合、破骨細胞は減少したが、M-CSF 投与3日以内の cimadronate 投与では破骨細胞の減少はみられないことを報告している。すなわち cimadronate は前破骨細胞から破骨細胞への形成を抑制することなく、成熟した破骨細胞に殺細胞的に働き、その結

果、破骨細胞が減少することを考察している。一方、Endo ら⁶⁾は、マウスを用いた実験で、alendronate がヒスチジン脱炭酸酵素活性を誘導し、ヒスタミンを増加させ、その結果マクロファージ、単核細胞および破骨細胞の形成を促進することを報告している。Aida ら²⁴⁾は、*in vitro* の実験で、etidronate がマクロファージなどからの IL-1 遊離を促進することを報告しており、*in vivo* でもビスホスフォネートが免疫担当細胞などに作用し、サイトカイン等を介して前破骨細胞に作用し、破骨細胞への分化を誘導する可能性が考えられる。

本実験では、cimadronate 投与により結紮後4日目に破骨細胞数が最高値となり対照群に比べて約3倍に増加したが、その後対照群と同様に減少した (Figs. 7, 8)。このことは、他のビスホスフォネートと同様、前破骨細胞から破骨細胞への分化成熟過程を cimadronate が促進し、破骨細胞数を増加させたものと考えられる。その後

Fig. 7 Acid-phosphatase stainings of the sagittal section of the lower first molars. Hamsters were received cimadronate at the dose of 0 (a), 0.1 (b), and 0.3 (c) mg/kg, at the 4th day after ligation. A : alveolar bone, arrow head : osteoclast

Fig. 8 Effect of cimadronate on the number of the osteoclast. The number of osteoclast in the cimadronate administered groups (0.1 and 0.3 mg/kg) increased 3-fold ($p < 0.01$) as compared to the control at the 4th day after ligation. ($n=3$, mean $\pm$ S. D.)

ビスホスフォネートの長期的な作用により、アポトーシスの誘導など破骨細胞に対し殺細胞的に働き^{25,26}、細胞数は次第に減少したことが考えられる。このことは薬物の投与期間と関連し、筆者らが以前 D2000 のみを用いた実験的歯周炎で得られた cimadronate によって破骨細胞が減少した結果¹⁵と、今回 1 週～4 週で観察された結果は一致するものと考えられる。

対照群における破骨細胞の分布は、歯槽骨骨頂部に多く観察されたが、これは結紮に伴う炎症部位に近いことによるものと考えられる。一方、実験群では、薬物の影響が、炎症による破骨細胞の増加よりも多いため、その結果、歯槽骨全体に破骨細胞が分布したと考えられる。

ビスホスフォネートは、歯槽骨のみではなく、全身的に骨の吸収および添加の起る部位で作用すると考えられ、破骨細胞の形態の変化も歯槽骨同様に起っているものと考えられる。

前骨芽細胞と破骨細胞は融合することが知られており、両細胞の間に骨形成あるいは骨吸収に関する密接な情報の交換が行われていると考えられる²⁷。Sahni ら²⁸はビスホスフォネートが骨芽細胞に作用し、何らかの作用物質を介して破骨細胞の骨吸収作用を抑制することを *in vitro* の実験で報告している。

骨吸収が効率良く行われるように破骨細胞の明帯は外界を遮断し、微細環境を形成する。波状縁の微絨毛表面

Fig. 9 Effect of cimadronate on the ultrastructure of osteoclast. Upon electron microscopic examinations, the osteoclasts were deficient in ruffled border formation (b and c), and some osteoclast was dissociated from bone (d), in the 0.3 mg/kg cimadronate administered groups, which were not observed in the control (a). RB : ruffled border, CZ : clear zone, N : nuclei, A : alveolar bone

で働くプロトンポンプにより微細環境は酸性化し、ハイドロキシアパタイトを溶解するとともにリソソーム酵素を活性化して骨吸収を行うものと考えられている^{29,30)}。

本実験において、cimadronate 投与群の破骨細胞の形態は明帯が明瞭でなく、さらに波状縁が消失あるいは変形していた。このことが破骨細胞が薬物作用により成熟できず、発達した波状縁をもたないことによるのか、薬物を波状縁から吸収した後にその形態を変化させたことによるのかは明らかではない。しかし、吸収窩が少なく、また、一部の破骨細胞は骨質から遊離しているものもみられた。これは本薬剤が破骨細胞の機能を低下させたため、十分な酸性条件の微細環境を形成できなかった可能性が考えられる。また、細胞質全体に空胞が観察されたことは、アポトーシスのような細胞死に至る前兆であることも示唆された。

Sato ら^{31,32)}は、*in vitro* の実験で、3種のビスホスフォネート (etidronate, alendronate および pamidronate) が破骨細胞の細胞骨格に影響すること、さらに破骨細胞のカルシウムその他のイオンに対する波状縁の膜の透過性を変化させることを報告している。すなわち、破骨細胞の波状縁は、その形態を維持することができなくなり、破骨細胞と骨との間で微細環境を形成できず、その結果骨吸収を阻止すると考察している。Sato ら³²⁾はさらに、ラットにパラサイロイドホルモンを投与して破骨細胞を活性化し、同時に 0.4 mg/kg の alendronate を皮下投与し、破骨細胞の超微細構造を観察した結果、明帯は明瞭であったにも関わらず、波状縁は消失していたことを報告している。このように波状縁を変化させ、骨吸収抑制を示す薬物としてカルシトニンが報告されている³³⁾。

以上のことから、歯周組織において cimadronate は破骨細胞数を増加させるが、他のビスホスフォネートやカルシトニンと同様に破骨細胞の波状縁を変化させ、細胞機能を低下させ、骨吸収を抑制するものと考えられた。

結 論

1. 手術用縫合絹糸結紮および D2000 によって引き起こされた高度の歯周炎モデルにおいて、cimadronate 投与により歯槽骨吸収は抑制され、歯周疾患の進行は遅延した。

2. 対照群の破骨細胞数は、絹糸結紮後4日目に最高になり、その後徐々に減少した。cimadronate 投与群の破骨細胞数は、絹糸結紮後4日目に対照群と比較し、約3倍に増加したが、その後は対照群と同様に、徐々に減少した。

3. 破骨細胞の超微細構造は cimadronate 投与群では波状縁の不十分な形成が観察され、破骨細胞の機能低下が示唆された。

謝辞：稿を終えるに臨み、本研究に対して終始ご懇篤なるご指導ならびに本論文のご校閲を賜りました恩師本学歯学部口腔病理学教室 菅原信一教授に深甚なる謝意を表します。また、懇切なるご校閲を賜りました本学歯学部細菌学教室 藤田 浩教授ならびに本学歯学部第二歯科保存学教室 新井 高教授に心より深謝いたします。さらに本研究遂行にあたり多大なご指導、ご教示を賜りました本学歯学部細菌学教室 岡本公彰講師、また、終始ご指導、ご助言下さいました本学歯学部細菌学教室 前田伸子助教授に厚く感謝いたします。最後に、ご援助、ご助言をいただいた本学中央電顕室 島貫芳雄先生ならびに本学細菌学教室、本学口腔病理学教室の皆様のご協力に謝意を表します。なお、薬物をご供与下さいました山之内製薬株式会社に厚くお礼を申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第37回秋期日本歯周病学会学術大会(1994年10月7日、大阪)、第36回歯科基礎医学会総会(1994年10月18日、大阪)および第73回国際歯科研究学会(IADR; 1995年6月28日、シンガポール)において発表した。

文 献

- 1) Fleisch, H.: Bisphosphonates-History and experimental basis. *Bone* 8: 23~28, 1987.
- 2) Fleisch, H.: Bisphosphonates pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 42: 919~944, 1991.
- 3) Geddes, A. D., D'Souza, S. M., Ebetino, F. H. and Ibbotson, K. J.: Bisphosphonates: structure-activity relationships and therapeutic implications. *Bone Miner. Res.* 8: 265~306, 1994.
- 4) Shinoda, H., Adamek, G., Felix, R., Schenk, R. and Hagan, P.: Structure-activity relationships of various bisphosphonates. *Calcif. Tissue. Int.* 35: 87~99, 1983.
- 5) Miller, S. C. and Jee, W. S. S.: The comparative effect of dichloromethylene diphosphonate (CL₂ MDP) and ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on growth and modeling of the rat tibia. *Calcif. Tiss. Res.* 23: 207~214, 1977.
- 6) Endo, Y., Nakamura, M., Kikuchi, T., Shinoda, H., Takeda, Y., Nitta, Y. and Kumagai, K.: Aminoalkyl-bisphosphonates, potent inhibitors of bone resorption, induced a prolonged stimulation

- of histamine synthesis and increase macrophages, granulocytes, and osteoclasts *in vivo*. *Calcif. Tissue. Int.* **52** : 248~254, 1993.
- 7) Kodama, H., Yamasaki, A., Abe, M., Niida, S., Hakeda, Y. and Kawashima, H. : 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.
- 8) Flanagan, A. M. and Chambers, T. J. : Dichloromethylene-bisphosphonate (Cl₂MBP) inhibits bone resorption through injury to osteoclasts that resorb Cl₂MBP-coated bone. *Bone Mineral.* **6** : 33~43, 1989.
- 9) Nemoto, R., Nishijima, Y., Uchida, K. and Koiso, K. : Inhibition by a new bisphosphonate (YM175) of bone resorption induced by the MBT-2 tumour of mice. *Br. J. Cancer* **67** : 893~897, 1993.
- 10) Kawashima, H. : Mechanism and clinical evaluation of bisphosphonate. *Clinical Calcium* **3** : 1324~1326, 1993.
- 11) Fouda, N., Caracatsanis, M., Alatlikut, I. and Hammarstrom, L. : Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. *J. Biol. Buccale* **19** : 106~115, 1991.
- 12) 田谷雄二, 須賀昭一 : HEBP の長期経口投与によるエナメル質形成異常. *歯基礎誌* **31** : 560~594, 1992.
- 13) Brunsvold, M. A., Chaves, E. S., Kornman, K. S., Aufdemorte, T. B. and Wood, R. : Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J. Periodontol.* **63** : 825~830, 1992.
- 14) Reddy, M. S., Weatherford, III, T. W., Smith, C. A., West, B. D., Jeffcoat, M. K. and Jacks, M. : Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J. Periodontol.* **6** : 211~217, 1995.
- 15) 岡本公彰, 長谷川直樹, 前田伸子, 菅原信一, 藤田浩 : 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 (YM175) の歯槽骨吸収に及ぼす影響. *歯基礎誌* **36** : 510~519, 1994.
- 16) Katayama, I. and Yang, J. P. S. : Reassessment of a cytochemical test for differential diagnosis of leukemic reticuloendotheliosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **68** : 268~272, 1977.
- 17) Burstone, M. S. : Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *J. Histochem. Cytochem.* **7** : 39~41, 1959.
- 18) Koide, M., Suda, S., Saitoh, S., Ofuji, Y., Suzuki, T., Yoshie, H., Takai, M., Ono, Y., Taniguchi, Y. and Hara, K. : *In vivo* administration of IL-1 β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *J. Oral. Pathol. Med.* **24** : 420~434, 1995.
- 19) Keyes, P. H. and Jordan, H. V. : Periodontal lesions in the syrian hamster-III, Findings related to an infectious and transmissible component. *Archs. Oral. Biol.* **9** : 377~400, 1964.
- 20) Johnson, I. H. : Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J. Periodont. Res.* **10** : 322~345, 1975.
- 21) 吉成伸夫 : ラットの実験的歯周病変におよぼす長期間のメソトレキセート投与による好中球減少の影響. *愛院大歯誌* **28** : 345~366, 1990.
- 22) 下野正基, 浜田義信, 井上 孝, 山村武夫, 古賀正忠 : 咬合性外傷による歯周組織の変化. *The Quintessence* **5** : 1044~1055, 1986.
- 23) 色川俊則 : 無菌および普通飼育ラットを用いた歯周組織の損傷と修復に関する研究. *日歯周誌* **20** : 233~248, 1980.
- 24) Aida, Y., Toda, Y., Shimakoshi, Y., Yamada, K. and Aono, M. : Effects of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on interleukin 1 production by macrophages. *Microbiol. Immunol.* **30** : 1199~1206, 1986.
- 25) Hughes, D. E., Wright, K. r., UY, H. L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G. D., Mundy, G. R. and Boyce, B. F. : Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J. Bone Miner. Res.* **10** : 1478~1487, 1995.
- 26) Kameda, T., Ishikawa, H. and Tsutsui, T. : Detection and characterization of apoptosis in osteoclasts *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res.* **207** : 753~760, 1995.
- 27) Hanaoka, H. : The origin of the osteoclast. *Clin. Orthop.* **145** : 252~263, 1979.
- 28) Sahni, M., Guenther, H. L., Flisch, H., Collin, P. and Martin, T. J. : Bisphosphonates act rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J. Clin. Invest.* **91** : 2004~2011, 1993.
- 29) Marks Jr., S. C. and Popoff, S. N. : Bone cell biology : The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* **183** : 1~44, 1988.
- 30) 小澤英浩, 江尻貞一, 中村浩彰 : 骨吸収の細胞生物学. *蛋白質 核酸 酵素* **40** : 492~505, 1995.
- 31) Sato, M. and Grasser, W. : Effects of bisphos-

- phonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. J. Bone Miner. Res. 5 : 31~40, 1990.
- 32) Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D. D., Golub, E. and Rodan, A. : Bisphosphonate action alendronate localization in rat bone and effects osteoclast ultrastructure. J. Clin. Invest. 88 : 2095~2105, 1991.
- 33) Chambers, T. J. and Magnus, C. J. : Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. J. Pathol. 136 : 27~39, 1982.