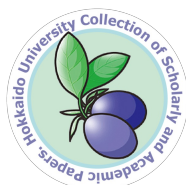




HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット歯牙および歯槽骨に対するビスフォスフォネート投与の影響
Author(s)	高橋, 智美; 飯塚, 正
Citation	北海道歯学雑誌, 46, 36-43
Issue Date	2025-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96135
Type	journal article
File Information	46_07.pdf



原 著

ラット歯牙および歯槽骨に対するビスフォスフォネート投与の影響

高橋 智美¹⁾ 飯塚 正¹⁾

抄 録： ビスフォスフォネート製剤は骨粗鬆症をはじめとした様々な骨代謝疾患に使用される骨吸収阻害剤である。ゾレドロン酸は第三世代のビスフォスフォネート製剤で、強力な骨吸収阻害効果を示す。今回、ゾレドロン酸の全身投与による脛骨、歯牙および歯槽骨への影響を明らかにする目的で、動物実験モデルを用いて検索を行った。

生後5週齢のWistar系ラットにゾレドロン酸水和物を腹腔内注射し、一部のラットには下顎右側第一臼歯の抜去処置を行い、3週間後に脛骨と上顎骨を摘出した。摘出組織は通法に従いパラフィン包埋後、連続切片標本を作製し、HE染色、TRAP染色、アザンマロリー染色にて病理組織学的に検索を行った。

ゾレドロン酸注射処置を行ったラットでは、脛骨の骨幹部は骨髓腔が狭く多量の幼弱な骨組織で満たされ、TRAP陽性を示す破骨細胞は大型で核数が多かった。上顎第一臼歯遠心口蓋側根の遠心部では、歯槽骨表面が不規則な凹凸を呈し鋸状を示していた。また、歯根膜組織は線維が不規則な配列を示していた。歯根の象牙質組織に類円形状の吸収窩がみられ、吸収窩部分にはTRAP陽性を示す破骨細胞が入り込んでいた。注射時に下顎右側臼歯の抜去を行った実験では、Zol投与群と比べ非咬合側で吸収窩が少なかった。

以上、ゾレドロン酸の投与は、脛骨と歯槽骨および歯根膜に構造異常を誘発し、上顎臼歯では歯根吸収が観察されることが明らかとなった。また、このような歯根吸収には咬合力が関与していることが示唆された。

キーワード： ビスフォスフォネート、ゾレドロン酸、歯根吸収、破骨細胞

諸 言

ビスフォスホネート製剤は、骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨転移、多発性骨髓腫など、さまざまな治療に広く使用されている骨吸収阻害剤である。ハイドロキシアパタイトとの親和性が高く、骨基質に結合したビスフォスフォネートが破骨細胞に取り込まれるとアポトーシスが誘導され、骨吸収の抑制効果を示す¹⁻³⁾と考えられる。ビスフォスフォネートは構造的に、側鎖に窒素を含まない第一世代、窒素を含む第二世代、窒素を含む側鎖が環状構造を有する第三世代に分類され、第三世代のビスフォスフォネートは第一世代に比べ1000倍以上の骨吸収抑制効果を有すると言われている⁴⁾。

ゾレドロン酸は側鎖に窒素を2個含有する環状構造をもつ第三世代のビスフォスフォネートであり、最も強力な骨吸収阻害剤の1つとして用いられている。

これまでもゾレドロン酸による骨組織の変化については、動物実験を含めたさまざまな研究が行われており、骨量および骨密度の増加^{5, 6)}、骨髓腔の狭窄⁷⁾などが報告されている。しかしながら、これらは主に四肢の骨を対象としているものが多く、頭部骨組織への影響について、詳細に検索しているものは少ない。ゾレドロン酸の投与による抜

歯後の治癒不全^{8, 9)}や頭頂骨の変形¹⁰⁾などがわずかに報告されているが、ラットの歯牙およびその周囲歯槽骨の組織学的な変化についての報告はみられず、萌出後の歯牙への影響については不明である。

そこで今回、ゾレドロン酸による脛骨、歯牙および歯槽骨への影響、また咬合の関与を明らかにする目的で、ラットへのゾレドロン酸全身投与の動物実験モデルを用いて、病理組織学的に検索を行った。

材料と方法

1. 動物実験

実験には生後5週齢の雄Wistar系ラット15匹を使用した。生理食塩水もしくは400 µg/kg量のゾレドロン酸水和物(Zoledronic Acid Monohydrate, 東京化成工業)を腹腔内注射した。またゾレドロン酸水和物を注射したラットから一部ランダムに抽出し、下顎右側第一臼歯の抜去を行った。ラットは、生理食塩水を注射したグループを生食投与群、ゾレドロン酸水和物を注射したグループをZol投与群とし、Zol投与群の中で抜歯処置をしたものをZol投与-抜歯群とした。各群5匹ずつ処置を行い、注射3週間後に脛骨およ

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究院 学術支援部

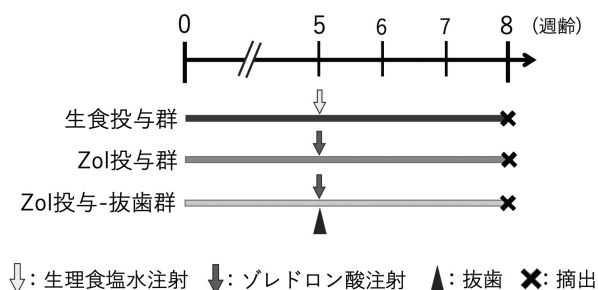


図1 実験スケジュール

生後5週齢のラットに処置を施し、3週間後に脛骨および上顎骨を摘出した。

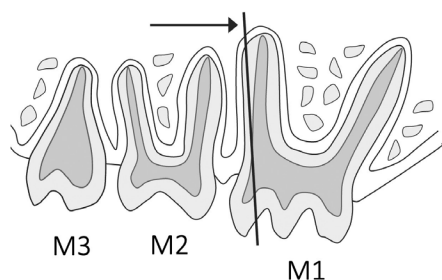


図2 上顎骨標本作製法

遠心から薄切し、第一臼歯遠心口蓋側根の遠心部を含む前頭断の切片標本作製した。

び上顎骨を摘出した(図1)。実験期間中に死亡した個体はいなかった。実験条件については、骨組織の変化が顕著であった先行研究^{6,7)}を参考にゾレドロン酸水和物の投与量および観察期間を設定した。

本実験は北海道大学動物実験委員会による承認を受け(動物実験計画承認番号:第22-0069号)、動物の飼育管理および実験処置は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づき実施した。

2. 病理組織学的検索

摘出した組織は10%緩衝ホルマリンにて浸漬固定後、脛骨は軟エックス線発生装置(SOFTEX CSM-2型)による撮影(40 kVp, 3.4 mA, 30秒照射)を行った。

脛骨および上顎骨は10%EDTA溶液(pH=7.4)で脱灰し、通法に従いパラフィン包埋を行った。脛骨は骨端軟骨部を含む長軸面で厚さ4μmの連続切片標本作製した。上顎骨は第一臼歯遠心口蓋側根の遠心部を含む前頭断の平面を観察するため、後方(遠心側)から薄切し、連続切片標本作製した(図2)。各標本はヘマトキシリン・エオジン染色(以下HE染色)、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色(以下TRAP染色)、アザンマロリー染色(以下AM染色)を施した。脛骨標本では骨幹部を中心に、上顎骨標本では歯槽骨および歯根を中心に病理組織学的に検索した。下顎右側第一臼歯を抜去したZol投与-抜歯群においては、咬合

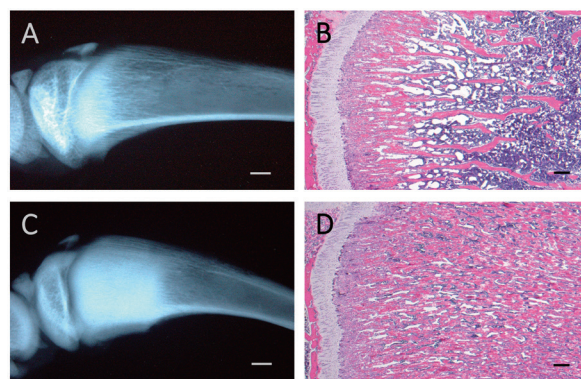


図3 脛骨 軟X線写真および組織像(HE染色)

A) 生食投与群 軟X線写真, B) 生食投与群 組織像, C) Zol投与群 軟X線写真, D) Zol投与群 組織像

Zol投与群の骨幹部に不透過領域が広範にみられ、その部位は骨髓腔が狭く、軟骨を含む多量の幼弱な骨組織で満たされている。

A, C: bar=1 mm B, D: bar=100 μm

の関与についてZol投与群との比較検討を行った。

さらに生食投与群およびZol投与群の標本を用いて、脛骨、上顎歯槽骨、歯根部で観察された破骨細胞と破歯細胞について組織計量学的検索を行った。細胞の大きさおよび核数を計測し、Mann-WhitneyのU検定にて有意差検定を行った。

結 果

1. 脛骨について

軟エックス線発生装置による撮影画像では、生食投与群に比べてZol投与群において脛骨骨幹部に不透過性が亢進している領域が広範にみられた(図3A, C)。

HE染色標本の組織像において、生食投与群では、骨幹部に広い骨髓腔と骨髄組織が認められた。骨端軟骨は、骨の長軸方向に規則的に配列し、骨化がみられた(図3B)。TRAP染色標本では、骨化部および骨髓腔に面した骨梁に接してTRAP陽性を示す多核の破骨細胞が観察された(図4A, B)。

Zol投与群の脛骨では、骨幹部は骨髓腔が狭く多量の幼弱な骨組織で満たされ、骨端軟骨から伸びる骨梁に軟骨の残存が認められた(図3D)。またTRAP陽性を示す破骨細胞は生食投与群に比べて多数みられ、大型・不整形で核数も多い傾向がみられ(図4C, D)、骨幹部において、生食投与群とZol投与群の破骨細胞では大きさおよび核数に有意差が認められた(図4E, F)。さらに核が濃縮したアポトーシス様の像を示すTRAP陽性の多核の細胞が観察された(図5)。

2. 上顎歯槽骨および歯根膜について

生食投与群の歯根周囲の歯槽骨は、緻密な骨組織から成っており、骨表面は平滑であった。また、歯根膜線維の走行は規則的で、歯根膜線維芽細胞の密な配列が認められた

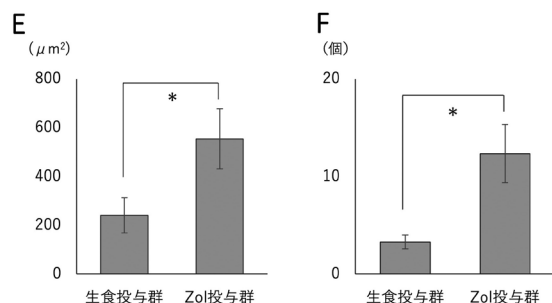
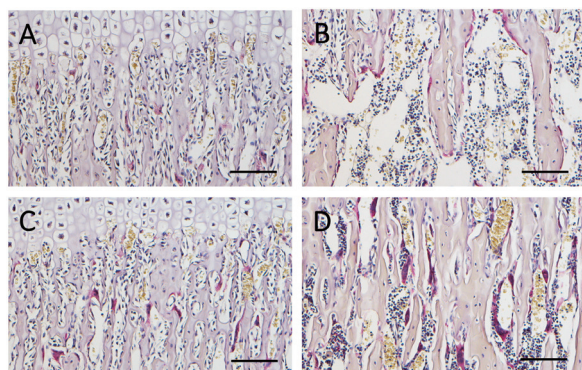


図4 脛骨組織像 (TRAP染色), ならびに破骨細胞の面積および核数

A) 生食投与群 軟骨部, B) 生食投与群 骨幹部, C) Zol投与群 軟骨部, D) Zol投与群 骨幹部, E) 脛骨破骨細胞の面積
F) 脛骨破骨細胞の核数

Zol投与群では生食投与群に比べて大型・不整形で核数が多い破骨細胞がみられ, 有意差が認められた.

bar = 100 μm * : P<0.05

(図6A, C).

Zol投与群の歯槽骨は, 表面が不規則な凹凸を示し, 鋸状を呈していた. 鋸状の骨組織は根尖側歯根部付近で顕著であり, 遊離した骨片状を示すものもみられた. またAM染色による観察では, 歯根膜線維芽細胞は不規則な配列を示していた (図6B, D).

下顎右側第一臼歯を抜去したZol投与-抜歯群では, 歯槽骨の変化に加えて非咬合側において歯根膜腔の狭窄がみられた (図7E, F).

3. 歯牙について

生食投与群の上顎第一臼歯遠心口蓋側根の遠心部では, 歯根表面を薄いセメント質に覆われた象牙質がみられた (図7A, B). また, 歯根表面にTRAP陽性を示す破歯細胞はほとんどみられなかった (図8A, B).

Zol投与群の上顎第一臼歯遠心口蓋側根の遠心部では, 象牙質に類円形の吸収窩がみられた (図7C, D). 吸収窩は根尖側歯根部付近で多くみられ, 吸収窩部分にはTRAP陽性を示す破歯細胞が入り込んでいた (図8C, D). 一方, 下顎右側第一臼歯を抜去したZol投与-抜歯群においては, Zol投与群と比較して非咬合側で吸収窩が少なく, 破歯細胞

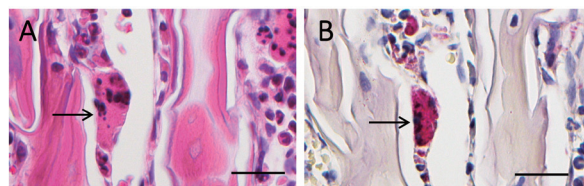


図5 Zol投与群 脛骨破骨細胞の組織像

A) HE染色, B) TRAP染色

核が濃縮したアポトーシス様を呈するTRAP陽性の多核巨細胞がみられる (矢印).

bar = 25 μm

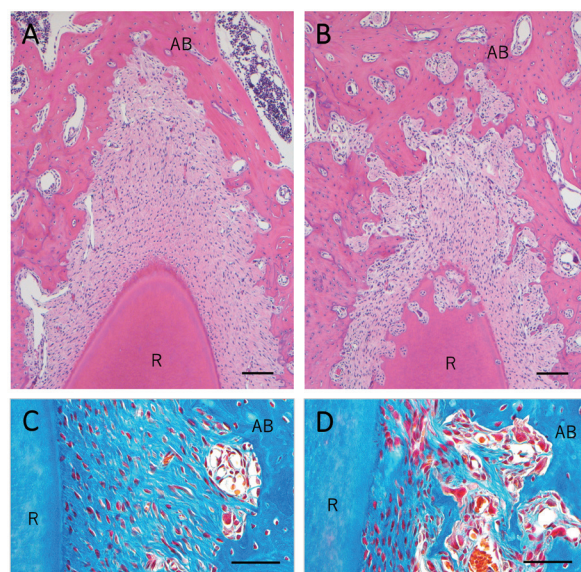


図6 歯根およびその周囲組織像

A, C) 生食投与群, B, D) Zol投与群

A, B) HE染色, C, D) AM染色

Zol投与群では歯根周囲の歯槽骨は不規則な凹凸を示し, 歯根膜線維の不規則な配列が認められる.

AB: 歯槽骨 R: 歯根 A, B: bar = 100 μm C, D: bar = 50 μm

胞はほとんど観察されなかった (図7E, F, 図8E, F). また, 吸収窩内部にみられた破歯細胞は, 脛骨および歯槽骨でみられた破歯細胞に比べて小型で核数も少なく, 大きさと核数において有意差が認められた (図9).

なお脛骨, 歯槽骨および歯根膜, 歯牙の組織学的変化については, 各群のすべての個体で同様の結果が得られた.

考 察

本研究は, ビスフォスフォネートの全身投与による脛骨, 歯牙および歯槽骨への影響を明らかにする目的で, 動物実験モデルを用い, 破骨細胞性骨吸収について検索を行った.

脛骨は活発な骨代謝が起こっている部位であり, ゴレドロン酸の骨組織および破骨細胞への影響を観察する部位として適当であると考えられる. 歯根の観察部位については,

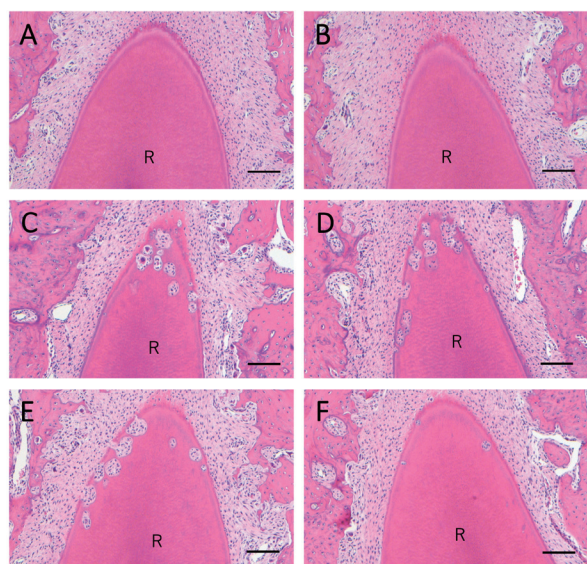


図7 上顎歯根部組織像 (HE染色)

A) 生食投与群 左側, B) 生食投与群 右側, C) Zol投与群 左側, D) Zol投与群 右側, E) Zol投与-抜歯群 咬合側, F) Zol投与-抜歯群 非咬合側

Zol投与群およびZol投与-抜歯群咬合側の根尖側歯根部に類円形の吸収窩がみられる。Zol投与-抜歯群の非咬合側では吸収窩は少ない。

R: 歯根 bar = 100 μ m

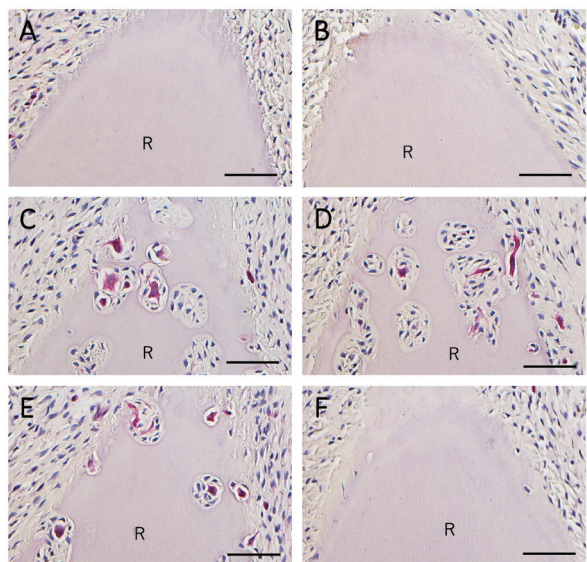


図8 上顎歯根部組織像 (TRAP染色)

A) 生食投与群 左側, B) 生食投与群 右側, C) Zol投与群 左側, D) Zol投与群 右側, E) Zol投与-抜歯群 咬合側, F) Zol投与-抜歯群 非咬合側

Zol投与群およびZol投与-抜歯群の吸収窩にTRAP陽性を示す破歯細胞がみられる。Zol投与-抜歯群の非咬合側では吸収窩は少なく、破歯細胞もみられない。

R: 歯根 bar = 50 μ m

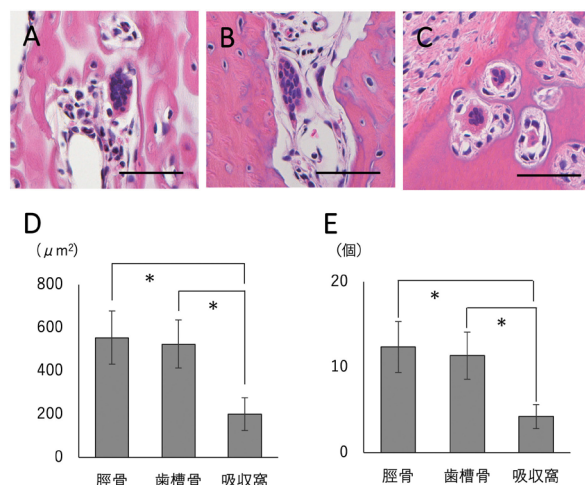


図9 Zol投与群 破骨細胞および破歯細胞 (HE染色), ならびにそれらの面積および核数

A) 脛骨 破骨細胞, B) 歯槽骨 破骨細胞, C) 歯根吸収窩 破歯細胞, D) 破骨細胞および破歯細胞の面積, E) 破骨細胞および破歯細胞の核数

歯根吸収窩で観察された破歯細胞は、脛骨および歯槽骨に比べて小型で核数も少なく有意差が認められた。

bar = 50 μ m * : P < 0.05

上顎第一臼歯遠心根は標本作製時の再現性が高いという利点があり、また、上顎第二臼歯では歯根の生理的な根吸収がみられる¹¹⁾ため、上顎第一臼歯遠心根を中心に病理組織学的検索を行った。

脛骨の軟エックス線撮影画像では、Zol投与群で骨幹部に不透過像の領域が広範にみられ、その部位は軟骨を含む多量の幼弱な骨組織で満たされていた。また、TRAP染色標本においては、核数が多い大型の破骨細胞が観察されたが、骨髓腔に面した骨梁には、アポトーシス様の濃縮した核をもつ多核のTRAP陽性細胞も認められた。

ビスフォスフォネートの骨代謝への作用については、これまでも動物実験を含めてさまざまな研究が行われている。ビスフォスフォネートを全身投与すると、脛骨および大腿骨の骨量や骨密度が増加すること^{5, 6)}、抜歯窩や骨欠損部の治癒過程が遅延すること^{8, 9, 12)}などが報告されており、これらは破骨細胞の機能低下によるものと考察されている。ハイドロキシアパタイトと結合したビスフォスフォネートが、破骨細胞の食作用によって細胞内に取り込まれると、細胞内の酵素活性を阻害しアポトーシスが誘導されると考えられている¹⁻³⁾。また、破骨細胞前駆細胞の多核化を促進させ^{13, 14)}、破骨細胞数の増加をもたらし¹⁵⁾が、波状縁の形成障害があり^{16, 17)}、そのような破骨細胞は骨吸収能を失うと考えられている。以上のことから、本実験においても、多数の大型・多核化したTRAP陽性を示す破骨細胞が確認されたにも関わらず、骨吸収能の障害により、脛骨には多くの軟骨を含む骨梁が残ったものと考えられた。

このようなビスフォスフォネートの作用による骨吸収能の低下は、口腔領域においても歯槽骨の不規則な形状の要因となると考えられる。これまでに、出生直後のマウスにビスフォスフォネートを投与すると歯牙と歯槽骨の癒着がみられるという報告¹⁰⁾や、歯根の形成が遅延するという報告¹⁸⁾があり、歯牙と歯槽骨の形成に関与していることが示されている。本実験においても、Zol投与群では、歯槽骨において脛骨と同様に大型で多核の破骨細胞が観察され、歯根周囲の歯槽骨は表面が不規則な凹凸の鋸状を呈し、骨片状を呈するものも観察された。また歯根膜線維は不規則な配列を示していた。これはゾレドロン酸の作用による破骨細胞の機能障害により、歯槽骨の改造の異常がみられたことによるものと考えられる。さらに、歯槽骨の骨梁が部分的に残存したことで、歯根膜線維の機能的配列の障害もたらされたものと推察された。このことは、ゾレドロン酸による骨吸収の障害が、正常な顎骨の形成のみならず、歯周組織の機能的構造の形成や維持にも影響を及ぼすことを示唆している。

また、ビスフォスフォネートの硬組織への沈着には組織特異性があり^{19, 20)}、歯槽骨に比べてセメント質への沈着が少ないと言われている²¹⁾。すなわち、本実験において歯根表面に存在する破骨細胞はゾレドロン酸の影響が少ないため吸収能が保たれていると推測され、歯根吸収窩で観察された破骨細胞は、脛骨および歯槽骨に比べて小型でありながら、活発な歯根吸収を行ったものと思われた。

歯槽骨や歯根の吸収の主な原因として外傷や歯列矯正などがあり、歯および歯周組織へのメカニカルストレスが吸収に関与していると考えられている。実験的に外傷性咬合を引き起こし過剰な咬合力を加えた動物実験では、歯根周囲に多数の破骨細胞が誘導され²²⁾、根尖部に歯根吸収がみられる²³⁾と報告されている。また、矯正装置を使用したラットの研究においても、歯の移動に際し圧迫側で歯根吸収がみられ、矯正力が大きくなるほど吸収の範囲は広く深くなるとの報告²⁴⁾がある。本実験で、Zol投与-抜歯群において対合歯の抜去により歯根吸収が軽減したことは、歯根吸収と咬合力および負荷の強さとの関連を示唆している。前述のように、歯槽骨および歯根膜組織の構造異常により、歯根に対する咬合力がより強い負荷となった可能性が考えられた。すなわち、破骨細胞の骨吸収障害により歯根膜腔に歯槽骨の骨梁の一部が残存していることで、その部位に近接している歯根に局所的な強い力が加わり、その結果、上顎第一臼歯遠心口蓋側根において、顕著な歯根吸収像が観察されたものと思われた。

口腔領域において、ビスフォスフォネート製剤使用時の副作用として代表的なものに薬剤関連顎骨壊死があり、誘発因子として外科的処置や細菌感染との関連が言われている。本研究ではゾレドロン酸の投与のみで歯槽骨の吸収不全による形態異常ならびに歯根吸収がみられることが明ら

かとなり、咬合力の関与も推察された。このことは、ゾレドロン酸の投与自体が歯根およびその周囲組織の障害のリスクファクターとなりうることを示唆している。しかしながら、ビスフォスフォネートの作用については、その濃度や投与期間など、実験条件によって様々な報告がみられる。Gouら²⁵⁾はゾレドロン酸の濃度が高くなるほど破骨細胞の数が減少すると報告しているが、一方では濃度の違いによる破骨細胞数の変化はみられないという報告もある^{18, 26)}。また、歯周組織への影響についても、骨髄炎や歯肉炎など薬剤関連顎骨壊死様の変化がおこる時期について異なる結果が報告されている^{26, 27)}。そのため歯牙への影響についても、今後は投与開始の時期や観察期間を含め、さらなる検討が必要であると考えられた。

結 論

ゾレドロン酸の脛骨、歯牙および歯槽骨への影響を明らかにする目的で、全身投与の動物実験モデルを用いて病理組織学的に検索を行った結果、Zol投与群では、脛骨と歯槽骨および歯根膜において構造異常が観察され、上顎第一臼歯遠心口蓋側根では顕著な歯根吸収がみられることが明らかになった。また歯根吸収が対合歯の抜去により軽減したことから、このような歯根吸収には咬合力が関与していることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monkkonen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RGG: Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Bone* 24:73S-79S, 1999.
- 2) Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA: Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem* 274:34967-34973, 1999.
- 3) Vargas-Franco JW, Castaneda B, Redini F, Gomez DF, Heymann D, Lezot F: Paradoxical side effects of bisphosphonates on the skeleton: What do we know and what can we do? *J Cell Physiol* 233:5696-5715, 2018.
- 4) Beek ERv, Cohen LH, Leroy IM, Ebetino FH, Lowik CWGM, Papapoulos SE: Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone* 33:805-811, 2003.
- 5) Kuroshima S, Go VA, Yamashita J: Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term

- zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology* 153: 17-28, 2012.
- 6) Vermeer J, Renders G, van Duin MA, Jansen I, Bakker LF, Kroon SA, de Vries TJ, Everts V: Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Dis* 23:126-133, 2017.
- 7) Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, da Silva Santos PS, Cestari TM, Garlet GP, Duarte MAH, Imada TSN, Lambrichts I, Rubira-Bullen IRF: Zoledronic Acid Induces Site-Specific Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone. *J Oral Maxillofac Surg* 76:1893-1901, 2018.
- 8) 佐伯典彦, 飯塚 正, 會田英紀, 向後隆男, 大畑 昇: ラット抜歯窩治癒過程におよぼすBisphosphonateの全身ならびに局所投与による影響について. *北海道歯誌*, 22: 185-201, 2001.
- 9) Ersan N, van Ruijven LJ, Bronckers AL, Olgac V, Ilguy D, Everts V: Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model. *Dentomaxillofac Radiol* 43:20130144, 2014.
- 10) Lezot F, Chesneau J, Battaglia S, Brion R, Castaneda B, Farges JC, Heymann D, Redini F: Preclinical evidence of potential craniofacial adverse effect of zoledronic acid in pediatric patients with bone malignancies. *Bone* 68:146-152, 2014.
- 11) 柏崎 潤, 土谷昌広, 金田一 孝二, 笹野泰之, 加賀山 学: 生理的歯根吸収に関する形態計測学的研究. *東北歯誌*, 22:112-121, 2003.
- 12) Lim SS, Lee B, Kim IS, Hwang SJ: Differential modulation of zoledronate and etidronate in osseous healing of an extracted socket and tibia defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 123:8-19, 2017.
- 13) Grier RL, Wise GE: Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res* 77:8-15, 1998.
- 14) Ralte S, Khatri K, Nagar M: Short-term effects of zoledronate on the histomorphology of osteoclast in young albino rats. *Ann Anat* 193:509-515, 2011.
- 15) Endo Y, Nakamura M, Kikuchi T, Shinoda H, Takeda Y, Nitta Y, Kumagai K: Aminoalkylbisphosphonates, Potent Inhibitors of Bone Resorption, Induce a Prolonged Stimulation of Histamine Synthesis and Increase Macrophages, Granulocytes, and Osteoclasts In Vivo. *Calcif Tissue Int* 52:248-254, 1993.
- 16) Mayahara M, Sasaki T: Cellular mechanism of inhibition of osteoclastic resorption of bone and calcified cartilage by long-term pamidronate administration in ovariectomized mature rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 274:817-826, 2003.
- 17) Hongo H, Sasaki M, Kobayashi S, Hasegawa T, Yamamoto T, Tsuboi K, Tsuchiya E, Nagai T, Khadiza N, Abe M, Kudo A, Oda K, Henrique Luiz de Freitas P, Li M, Yurimoto H, Amizuka N: Localization of Minodronate in Mouse Femora Through Isotope Microscopy. *J Histochem Cytochem* 64:601-622, 2016.
- 18) Isawa M, Karakawa A, Sakai N, Nishina S, Kuritani M, Chatani M, Negishi-Koga T, Sato M, Inoue M, Shimada Y, Takami M: Biological Effects of Anti-RANKL Antibody and Zoledronic Acid on Growth and Tooth Eruption in Growing Mice. *Sci Rep* 9: 19895, 2019.
- 19) Gong X, Yu W, Zhao H, Su J, Sheng Q: Skeletal Site-specific Effects of Zoledronate on in vivo Bone Remodeling and in vitro BMSCs Osteogenic Activity. *Sci Rep* 7:36129, 2017.
- 20) Wang JY, Huo L, Yu RQ, Rao NJ, Lu WW, Zheng LW: Skeletal Site-Specific Response of Jawbones and Long Bones to Surgical Interventions in Rats Treated with Zoledronic Acid. *BioMed Res Int* 1-11, 2019.
- 21) Kozloff KM, Volakis LI, Marini JC, Caird MS: Near-infrared fluorescent probe traces bisphosphonate delivery and retention in vivo. *J Bone Miner Res* 25: 1748-1758, 2010.
- 22) Tsuzuki T, Kajiya H, T-Goto K, Tsutsumi T, Nemoto T, Okabe K, Takahashi Y: Hyperocclusion stimulates the expression of collagen type XII in periodontal ligament. *Arch Oral Biol* 66:86-91, 2016.
- 23) Walker CG, Ito Y, Dangaria S, Luan X, Diekwisch TG: RANKL, osteopontin, and osteoclast homeostasis in a hyperocclusion mouse model. *Eur J Oral Sci* 116: 312-318, 2008.
- 24) Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N: Force Magnitude and Duration Effects on Amount of Tooth Movement and Root Resorption in the Rat Molar. *Angle Orthod* 78:502-509, 2008.
- 25) Gou W, Wang X, Peng J, Lu Q, Wang Y, Wang A, Guo Q, Gao X, Xu W, Lu S: Controlled delivery of zoledronate improved bone formation locally in vivo. *PLOS One* 9:e91317, 2014.
- 26) Messer JG, Jiron JM, Mendieta Calle JL, Castillo EJ, Israel R, Phillips EG, Yarrow JF, Poznak VC, Kesavalu L, Kimmel DB, Aguirre JI: Zoledronate treatment duration is linked to bisphosphonate-related

- osteonecrosis of the jaw prevalence in rice rats with generalized periodontitis. Oral Dis 25:1116-1135, 2019.
- 27) Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, Gunhan O: Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 109:385-391, 2010.

ORIGINAL

Effect of bisphosphonates treatment on teeth and alveolar bone in rat

Tomomi Takahashi¹⁾ and Tadashi Iizuka¹⁾

ABSTRACT :

Bisphosphonates are prescribed for osteoporosis and other metabolic bone diseases. Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, induces osteoclast apoptosis and potently inhibits bone resorption. The objective of this study was to investigate the effects of zoledronic acid on the tibia, teeth, and alveolar bone.

Wistar rats were injected intraperitoneally with zoledronic acid, and the right mandibular first molar of some rats were extracted. The rats were euthanized 3 weeks after surgery. The tibia and maxilla were histopathologically analyzed after staining with hematoxylin and eosin or tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and Azan-Mallory (AZAN) staining.

In the zoledronic acid group, osteoclasts in the tibia and alveolar bone were large and had numerous nuclei, but these cells had reduced ability to resorb bone. Root resorption was observed in the apical dentin of the maxillary first molar, and odontoclasts within the resorption cavities were TRAP-positive. In an experiment involving tooth extraction, the non-occlusal side in the maxilla exhibited fewer resorption cavities than the occlusal side.

These findings show that zoledronic acid induced structural disorders in the tibia, teeth, alveolar bone, and periodontal membrane. Additionally, the induction of root resorption was related to mechanical occlusal stress.

Key Words : bisphosphonate, root resorption, odontoclast

¹⁾ Support Section for Education and Research, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine
N13 W7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan