

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20545

研究課題名(和文)骨粗鬆症治療薬を用いた新しい歯科治療

研究課題名(英文)New dental treatment using osteoporosis treatment drug

研究代表者

津徳 亮成 (TSUNORI, Katsuyoshi)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：40772736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成促進薬であるPTHを骨粗鬆症モデルラット(OVXラット)に使用し、骨再生、骨増生およびインプラント周囲骨への効果を検証した。卵巣を摘出したOVXラットを用いて、ラット頭頂骨に作成した骨欠損に対する骨再生および骨増生の検証を行った。その結果、OVXラットにおいて、骨再生および骨外側方向への骨増生が健康ラットと比較して抑制されることが示された。また、OVXラットに対してPTHの投与を行うことにより、骨増生が健康ラットと比較し、有意に促進することが実証された。インプラント周囲骨は、PTHの投与によりOVXラットにおいてもオッセオインテグレーションの確立を示唆した。

研究成果の概要(英文)：PTH, a bone formation promoting agent, was used in osteoporosis model rats (OVX rats) to examine the effect on bone regeneration, bone augmentation and surrounding bone of the implant. Bone regeneration and bone augmentation for bone loss created in rat parietal bone were examined using OVX rats with ovaries removed. As a result, in OVX rats, it was shown that bone regeneration and bone augmentation in the extraosseous direction are inhibited compared to healthy rats. In addition, it was demonstrated that administration of PTH to OVX rat significantly promotes bone hyperplasia compared to healthy rats. Implant surrounding bone suggested the establishment of osseointegration in OVX rats by administration of PTH.

研究分野：歯周病学、インプラント学

キーワード：インプラント 骨再生 骨粗鬆症 PTH

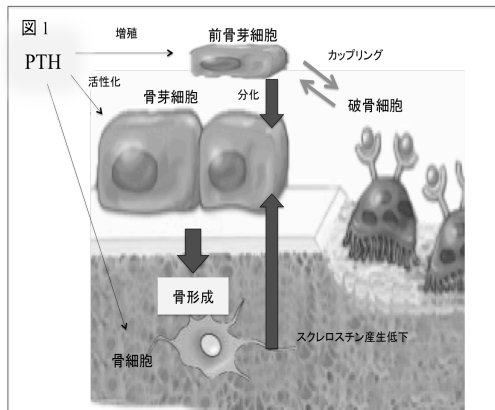
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国内で1300万人以上罹患していると言われている骨粗鬆症は、歯科インプラント治療において危険因子と考えられており、インプラント治療が適応となっても骨粗鬆症患者における骨量減少と骨強度の低下はインプラント治療の成否に大きく影響する。骨粗鬆症治療薬としてこれまで破骨細胞抑制剤であるビスフォスフォネート製剤が多く用いられている。しかしながら、歯科治療による顎骨壊死との関与が多数報告されており、破骨細胞に直接作用する働きによって骨代謝のリモデリングに対する影響は十分検証されていないため、ビスフォスフォネート製剤服用者に対する骨再生治療およびインプラント治療は現在適応となっていない。

インプラント治療は、埋入初期のオッセオインテグレーションの確立がインプラント治療の長期的な予後に影響する。骨粗鬆症により骨代謝の長期的な低回転化によるインプラントへの影響はいまだ分からないことから、早期に骨質改善を行う治療薬もしくはインプラント周囲骨を改善し、安全な治療薬の開発が現在急務である。

PTH の投与による骨粗鬆症治療薬は、ビスフォスフォネート製剤とは異なり、前骨芽細胞の増殖を促進、骨芽細胞に直接作用することで骨芽細胞を活性化し、Wnt シグナルを遮断することで骨形成に負の調節因子となるスクレロステチンを抑制することで骨形成が促進され、骨質改善および骨量増加を促す (図 1)。

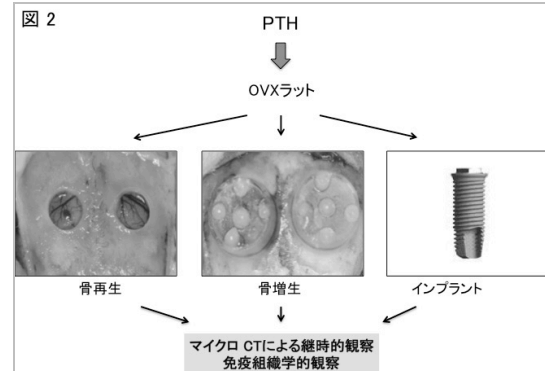


よって、本研究は骨粗鬆症モデルラットを使用し、PTHを用いた骨再生、骨増生への効果を検証し、インプラント周囲骨への影響の研究を企図した。

### 2. 研究の目的

本研究は、骨粗鬆症患者に対するインプラント治療に、PTHの投与がどのような影響をもたらすか解明することである。実験モデルとして、卵巣を摘出したOVXラットを用いて、顎骨と発生由来が同様のラット頭頂骨を利用し、(1)頭頂骨に作成した骨欠

損に対する骨再生の検証、(2)頭頂骨に作成した溝に嵌合させたキャップ内に作った空間に対する骨増生の検証を行う。さらにその結果に基づいて、(3)OVXラット第二臼歯抜去後、インプラントを埋入し、その周囲骨及びインプラント体のオッセオインテグレーションの検証を行う。そして、骨再生および骨増生への影響を形態学および組織学的に検証し、インプラントモデルについては形態学的、組織学および免疫学的に検証を行い、PTHの投与の影響を検討する(図2)。



### 3. 研究の方法

(1) OVXラットに対するPTHを用いた骨再生および骨増生の検討

#### ①OVXラットの作製

8週齢のラットに吸入麻酔装置を用いて前麻酔を行い、腹腔内麻酔を行う。次いで背部を剃毛したのち、ヨードチンキにて消毒を行い腎臓に相当する部分のやや下方を10mm程度に切開し、広背筋から胸腰筋の部分より腹腔内に達すると即座に内臓脂肪をピンセットで除き、これに附着した卵巣を摘出する。そののち、筋層と皮膚を縫合する。なお、偽手術群は皮膚を切開したのち、卵巣を摘出することなく縫合し、OVX群および偽手術群ともに通常の餌を与えて通常飼育を行う。

#### ②骨再生モデルの作製

OVX-PTH投与群(OVX-PTH)、OVXラット-非投与群(OVX-Saline)、偽手術群(Sham)にそれぞれ分け、全身麻酔を施し、頭頂部に局所浸潤麻酔を行う。次いで、頭頂部の矢状縫合に沿って皮膚切開を加え、筋層と骨膜とを剥離し、生理食塩水注水下で頭頂骨の左右側に直径5.0mmのトレファインバーを用いて臨界骨欠損を形成する。その後、骨膜に減張切開を施して骨膜で骨欠損部を可能な限り被覆し、筋層および皮膚を復位して骨欠損部を完全に被覆する。実験期間は28日とする。

#### ③骨増生モデルの作製

骨再生モデル同様に群に分け、全身麻酔を施し、頭頂部に局所浸潤麻酔を行う。次いで、頭頂部の矢状縫合に沿って皮膚切開を加え、筋層と骨膜とを剥離し、生理食塩水注水下で頭頂骨の左右側に直径5.0mmのト

レファイナバーを用いて、正中縫合を中心に左右対称に円形の溝を作成し、骨髄穿通を行う。さらに、直径 5.0mm、高さ 4.0mm のプラスチック製キャップを溝に沿って左右対称に設置し、②と同様に完全に被覆する。実験期間は 90 日とする。

PTH 投与群にはラット腹腔内に手術直後より 35 $\mu$ g/kg を週 3 回投与し、非投与群には同量の生理食塩水を投与する。

#### ④動物実験用マイクロ CT による形態学的検証

形態学的評価として、手術直後、およびその後 1 週間ごとに全身麻酔下にてマイクロ CT 撮影を行い、骨欠損内およびキャップ内の様相を定性的に評価し、骨体積計測ソフトを用いた定量的評価も合わせて行う。

#### ⑤脱灰標本における組織学的検証

骨欠損モデル群は手術後 28 日目、骨増生モデル群は手術後 90 日目に各群安楽死を行う。ラットを灌流固定および浸漬固定したのち、ラット頭頂骨実験部位をそれぞれ一塊として採取する。10% EDTA 溶液で 2 週間脱灰を行い、パラフィン包埋する。厚さ 5 $\mu$ m の連続切片を作製し、得られた組織標本をそれぞれ HE 染色、TRAP 染色、免疫染色（アルカリフォスファターゼ染色ならびにオステオカルシン）を行い組織学的検証を行う。

#### (2) OVX ラットに対する PTH を用いたインプラント周囲骨への検討

##### ①OVX ラットの作製

OVX ラットの作製を前年度と同様に作製を行う。

##### ②インプラント埋入モデルの作製

OVX ラット-PTH 投与群、OVX ラット-非投与群、偽手術群にそれぞれ分け、全身麻酔を施し、上顎第二臼歯周囲に局所浸潤麻酔を行う。麻酔施行後、抜去を行い、抜歯窩治癒を 40 日待つ。麻酔下にて抜歯部を切開・剥離し、専用ロケターを用いてドリリングを行った後、ラット実験用インプラント体(JMR 株式会社)を埋入する。その後、アバットメント(JMR 株式会社)を締結し、縫合を行う。

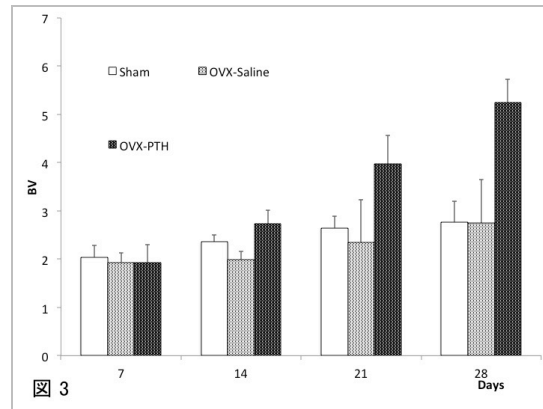
##### ③形態学的検証

動物実験用マイクロ CT を用いた形態学的評価を、手術直後および週 1 回おきに全身麻酔下にて行い、前年度と同様に定量的評価をインプラント周囲骨に対して行う。

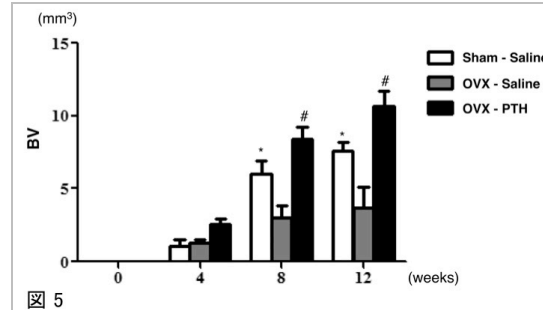
## 4. 研究成果

### (1) OVX ラットに対する PTH を用いた骨再生および骨増生の検討

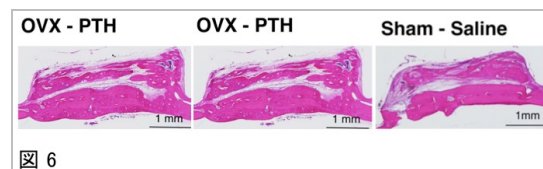
骨再生モデルでの実験において、マイクロ CT の観察結果から術後 21 日目より、OVX-PTH 群は Sham 群と比較し、骨再生を有意に認めた。(図 3)



骨増生モデルでの実験において、マイクロ CT の観察より、新生骨様組織が術後 8-12 週において OVX-PTH 群に有意な増加を示した。体積は、術後 8-12 週において OVX 群が他 2 群と比較し有意に低く、OVX-PTH 群は、術後 8-12 週において、他 2 群と比較し有意な増加を認めた。(図 4, 5)



組織学的観察より HE 染色において OVX 群は、新生骨周囲に多くのコラーゲン線維様の構造物を認め、骨の連続性が分断されていた。(図 6)



免疫染色による定量では、OVX-PTH 群において RUNX2 陽性細胞および TRAP 陽性細胞が 2 群と比較し、有意に認められ、骨のリモデリングが活発に行われていることが示唆された。(図 7)

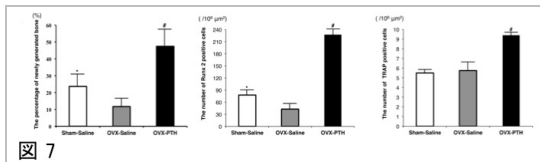


図 7

(2) OVX ラットに対する PTH を用いたインプラント周囲骨への検討  
 インプラント周囲への影響を検討するため、ラットの上顎骨における動物モデルの作成を行った。モデルの作成の定着が非常に難しかったため、現在定量化の検証までは行われていないが、マイクロ CT の結果より、OVX-PTH 群のインプラント周囲に十分な骨と思われる不透過像が認められ、PTH の優位性が示唆された。

(3) 今回の実験において、エストロゲンの枯渇は、頭頂骨における骨増生を抑制し、PTH を投与することで健常ラット以上に骨再生、骨増生が増強されることが示唆された。また、インプラント周囲に対して PTH の投与はオッセオインテグレーションに寄与する可能性が示唆された。

## 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 1 件)

① Kubota T, Hasuike A, Naito M, Tsunori K, Min S, Sato S. Enhancement of Bone Augmentation in Osteoporotic Conditions by the Intermittent Parathyroid hormone : An Animal Study in the Calvarium of Ovariectomized Rat. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implant. 2018 (in press) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Tsunori K, Tsukune N, Kubota T, Hasuike A, Sato S. Regenerative ability of augmented bone in rat calvarial guided bone augmentation model. 26th European Association for Osseointegration, 2017

② Tsunori K, Hasuike A, Yamada Y, Kubota T, Ozawa Y, Masuda H, Mizumura Y, Sato S. Bone augmentation using bone graft material derived from a rat GBA model. 102th American Academy of Periodontology, 2016

③ 津徳 亮成, 蓮池 聡, 山田 豊, 久保田 達也, 沼崎 光, 佐藤 秀一. ラット GBAモデルにおいて増生した新生組織の移植骨としての効果. 第144回日本歯科保存学会 2016/6/9 (日本、栃木)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津徳 亮成 (TSUNORI, Katsuyoshi)  
 日本大学・歯学部・専修医

研究者番号 : 40772736