

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390504

研究課題名（和文） インプラント予知診断のための顎骨骨膜分析法の開発

研究課題名（英文） Analysis of jaw bone periosteum for prognosis of dental implant outcome

研究代表者

松浦 尚志（MATSUURA TAKASHI）

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60330966

研究成果の概要（和文）：インプラント治療の成功には骨膜の細胞が分泌して形成される皮質骨の基質が少なくとも影響する。本研究では、下顎骨の皮質骨幅が異なるモデルマウスの骨基質の相違を明らかにするためにコラーゲンの生化学的分析を行い、さらにヒト献体を用いて四肢骨と比較した下顎骨皮質骨の骨基質の特異性を調べることにより、下顎骨の骨基質の様相を探求した。老年性骨粗鬆症モデルマウス（SAMP6）はそのコントロールマウス（SAMR1）に比べ下顎骨の皮質骨が細いのみならず組織学的に骨基質が疎な状態を呈した。また、骨基質中に占めるコラーゲン量が少なく、コラーゲンのリジン残基の水酸化の程度が大きく、同時にコラーゲン線維が細くなっていた。さらにはコラーゲンの分子間架橋数が少ない状態であった。以上より、下顎骨の皮質骨量が少ないSAMP6では、骨基質の主成分であるコラーゲンが量的に少なく、質的にも劣っていることが判明した。ヒト献体の下顎骨では、上腕骨と大腿骨と比べてミネラル量、コラーゲン量がともに多く、コラーゲンのリジン残基の水酸化の程度は少なかったことから、ヒトの皮質骨は四肢骨に比べ下顎骨において骨基質が質的に良好な傾向にある可能性が考えられた。また、これらの数値には大きな個人差があることも判明した。総括すると、下顎骨の皮質骨の骨基質には多様性があり、骨膜細胞の産物である皮質骨のコラーゲン分析を主体とする骨基質分析はその多様な性状を分析でき、将来インプラントの予知診断として有益となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Success of dental implant treatment at least depends on cortical bone matrix secreted by periosteal cells. To explore the aspect of cortical matrix of mandibular bone, this study performed biochemical analysis of collagen using two mouse models with different cortical width of mandibular bone, and compared cortical bone matrix of the mandible with that of the limbs in human cadavers. The mandibular cortical bone of senile osteoporotic mice (SAMP6), with comparison of their control mice (SAMR1), showed not only smaller cortical thickness but also less packed matrix histologically. Furthermore, SAMP6 exhibited lower content of collagen and higher extent of lysine hydroxylation of collagen, coincided with smaller diameter of collagen fibrils. As well, smaller amount of intermolecular cross-links of collagen was seen in SAMP6. These findings indicate that the mandibular cortical bone of SAMP6 with smaller bone volume of the cortex possesses less quantity and quality of the most abundant matrix protein, collagen. In human cadavers, the mandibular cortical bones showed higher contents of mineral and collagen but lower extent of lysine hydroxylation of collagen than the humeral and femoral cortical bones, suggesting better quality of bone matrix in the mandible compared with the limbs. In fact, values of the three indices varied among individuals. Thus, the cortical bone of the mandible exhibits inter-individual variation in matrix composition. The results of this study suggest that the analysis of cortical bone matrix, primarily collagen, which is the final product by periosteal cells, can disclose the various property of bone matrix and could be available for prognosis of dental implant outcome in future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：コラーゲン，下顎骨，皮質骨，骨基質，コラーゲン架橋，リジン残基の水酸化

### 1. 研究開始当初の背景

インプラント治療にとって予期できない経年的なインプラント体周囲の骨吸収は厄介な問題である。骨の吸収は破骨細胞によってのみ営まれるが、破骨細胞は通常皮質骨の外側表面には存在せず、皮質骨中のオステオンの中あるいは皮質骨内側表面に位置して骨吸収活動を行っている。従って、歯槽骨吸収は破骨細胞が皮質骨外側表面に達する必要がある、そうなるにはおそらく骨膜や皮質骨外側にマイクロクラックが生じて、マイクロクラックからのシグナルによってオステオン中の破骨細胞が骨を溶かしながら皮質骨外側表面に誘導されるものと推測される。そうであれば、破骨細胞の誘導のしにくさとしやすさが歯槽骨の吸収のしにくさとしやすさに関連することとなる。破骨細胞の誘導に関連するのは、骨基質がマイクロクラックをきたしやすいかどうか、あるいは破骨細胞によって溶かされやすいかどうかにあるものと推測される。そこで、我々は、破骨細胞の誘導に大きく寄与するのは骨膜細胞によって形成された皮質骨の骨基質の性状によるものと推測し、皮質骨の骨基質の性状の個人差によって歯槽骨、すなわちインプラント体周囲の骨の吸収の程度やスピードが決定されるという仮説を立てるに至り、まず下顎骨皮質骨の骨基質の様相を調べる必要性に迫られた。

### 2. 研究の目的

まず、下顎骨の皮質骨の厚みが異なるモデルマウスを用いて、骨基質中最も量の多いタンパクであるコラーゲンの生化学的分析を行い、皮質骨の骨量とコラーゲンの量的・質的性状との関係を調べた。次に、ヒト献体を用いて、下顎骨皮質骨の骨基質の四肢骨と比較した特異性を明らかにした。以上の2つの研究結果から、下顎骨皮質骨の骨基質の様相を明らかにするとともに、コラーゲン生化学

的分析が皮質骨の骨基質分析に適しているかを判別した。

### 3. 研究の方法

(1) 老年性骨粗鬆症モデルマウス (SAMP6) を用いた下顎骨皮質骨のコラーゲン生化学的分析 (コントロールマウス SAMR1 との比較)

① 偏光顕微鏡による骨基質の観察：組織切片をピクロシリウス・レッド染色し、偏光顕微鏡下で観察し、その色調からコラーゲンのパッキング状態を推測した。

② 透過型電子顕微鏡によるコラーゲン線維の観察：組織切片を透過型電子顕微鏡下で観察し、コラーゲン線維の直径を計測し、コラーゲン線維幅とその均一性を調べた。

③ アミノ酸分析によるコラーゲン量とコラーゲンリジン残基の水酸化の程度の定量：乾燥骨試料を作製して、液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたアミノ酸分析を行い、ヒドロキシプロリン量から乾燥骨試料 1 mg 当たりのコラーゲン量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) を算出し、またコラーゲン 1 モル当たりのヒドロキシリジン量をリジン残基の水酸化の程度 (mole/mole collagen) と表した。

④ コラーゲン架橋分析による架橋数とアルデヒド数の定量：HPLCを用いたコラーゲンの架橋分析を行い、コラーゲン 1 分子当たりの架橋前駆体であるアルデヒド、未熟架橋および成熟架橋数 (mole/mole) を定量し、さらに総架橋数と総アルデヒド数 (mole/mole) も算出した。

⑤ 統計学的分析：全てのデータは Student の  $t$  検定を用いて比較し、有意差の判定は  $p < 0.05$  の条件とした。

(2) ヒト献体を用いた下顎骨皮質骨のコラーゲン生化学的分析とその特異性 (四肢骨との比較)

① 乾燥骨試料の作製：ヒト献体 49 体 (男

性28体:平均年齢76.7歳,女性21体:平均年齢83.9歳)のうち,下顎骨オトガイ部皮質骨48個,上腕骨近位骨端頸部皮質骨48個,および大腿骨近位骨端頸部皮質骨46個の乾燥骨試料を作製し,以下の実験に供した.

② ミネラル量の定量:10mgの乾燥骨試料を700°C,6時間加熱処理し,10mgに対する残った骨灰重量の割合をミネラル量(%)と表した.

③ アミノ酸分析によるコラーゲン量とコラーゲンリジン残基の水酸化の程度の定量:乾燥骨試料を用いて,HPLCを用いたアミノ酸分析を行い,ヒドロキシプロリン量から乾燥骨試料1mg当たりのコラーゲン量( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )を算出し,またリジンとヒドロキシリジンの総量に対するヒドロキシリジン量の割合をリジン残基の水酸化の程度(%)と表した.

④ 統計学的分析:3つのデータ間の比較はone-way ANOVA (Newman-Keulsの多重比較テスト)を用い,2つのデータ間の比較はStudentの*t*検定を用いた.また,相関の検定にはPearsonの相関係数による検定法を用いた.有意差の判定は $p < 0.05$ の条件とした.

#### 4. 研究成果

(1) 老年性骨粗鬆症モデルマウス(SAMP6)の下顎骨皮質骨のコラーゲン生化学的性状

① 偏光顕微鏡下での皮質骨の色調は,SAMR1では黄色やオレンジ色を呈したが,SAMP6では緑色や黄色を呈していた.このことから,SAMP6ではSAMR1と比べ,あまりパッキングされていない,細いコラーゲン線維から構成されている可能性が推測された.

② 透過型電子顕微鏡下での観察により,コラーゲン線維の直径は,SAMR1で平均 $43.71 \pm 6.89\text{nm}$ ,最大 $62\text{nm}$ ,最小 $24\text{nm}$ で,SAMP6では平均 $35.77 \pm 6.99$ ,最大 $59\text{nm}$ ,最小 $18\text{nm}$ で,直径の分布は同程度であった.単位面積当たりのコラーゲン線維数は同じであった.SAMP6ではコラーゲン線維数は変わらないものの,その幅が有意に細くなっていることが判明した.

③ コラーゲン量はSAMR1で $149.5 \pm 10.3\mu\text{g}/\text{mg}$ ,SAMP6で $126.4 \pm 9.7\mu\text{g}/\text{mg}$ であり,リジン残基の水酸化の程度はSAMR1で $38.5 \pm 2.6$ (mole/mole),SAMP6で $43.8 \pm 2.1$ (mole/mole)であった.リジン残基の水酸化は多くなるとコラーゲン線維が細くなることから,SAMP6のコラーゲンはリジン残基の水酸化が有意に多く,少なからず水

酸化の亢進が影響してコラーゲン線維が細くなっている可能性が推測された.また,線維の細かい分だけ有意にコラーゲン量が減少している可能性も示唆された.リジン残基の水酸化の亢進は,おそらくリジルヒドロキシラーゼの発現の亢進か,酵素の活性化が影響している可能性が考えられた.

④ 架橋前駆体であるアルデヒド数と成熟架橋数は両マウス間で有意な相違がなかったが,未熟架橋数はSAMR1( $1.30 \pm 0.01\text{mole/mole}$ )に比べSAMP6( $1.16 \pm 0.06\text{mole/mole}$ )で有意に少なかった.未熟架橋数の差がそのまま総架橋数と総アルデヒド数に影響し,いずれもSAMR1(総架橋数 $1.79 \pm 0.02\text{mole/mole}$ ,総アルデヒド数 $2.29 \pm 0.02\text{mole/mole}$ )に比べSAMP6(総架橋数 $1.64 \pm 0.08\text{mole/mole}$ ,総アルデヒド数 $2.11 \pm 0.11\text{mole/mole}$ )で有意に少ない数値となった.このことから,SAMP6ではSAMR1に比べ未熟架橋数が少ないために総架橋数が少なく,おそらくリジルオキシダーゼの発現が抑制されているか,酵素活性が抑制されている可能性が考えられた.

以上より,皮質骨量の少ないSAMP6では,SAMR1に比べてコラーゲンが量的に少なく,かつ質的にも低下しており,特にコラーゲンの質的低下にはリジルヒドロキシラーゼやリジルオキシダーゼの酵素の動態が関与している可能性が推測された.

(2) ヒトの下顎骨皮質骨のコラーゲン生化学的性状とその特異性

① ミネラル量は,上腕骨( $60.1 \pm 1.9\%$ )および大腿骨( $59.7 \pm 3.9\%$ )と比べ,下顎骨( $62.9 \pm 1.9\%$ )で有意に高い数値を示した.また,3骨ともにミネラル量にかなりの個人差が認められた.

② コラーゲン量も,上腕骨( $146.4 \pm 23.0\mu\text{g}/\text{mg}$ )および大腿骨( $139.5 \pm 25.1\mu\text{g}/\text{mg}$ )と比べ,下顎骨( $165.2 \pm 35.6\mu\text{g}/\text{mg}$ )で有意に高い数値を示した.また,3骨ともにコラーゲン量にかなりの個人差が認められた.コラーゲンリジン残基の水酸化の程度は,上腕骨( $14.2 \pm 3.5\%$ )および大腿骨( $14.1 \pm 2.2\%$ )と比べ,下顎骨( $11.9 \pm 0.9\%$ )で有意に低い数値を示した.上腕骨と大腿骨での数値の個人差に比べて,下顎骨では比較的少ない個人差であった.

以上より,ヒト下顎骨の皮質骨では四肢骨のそれと比較して,ミネラル量,コラーゲン量がともに多く,コラーゲンリジン残基の水酸化の程度が少ないことから,骨基質が質的に良好な傾向にあることが示唆された.しか

しながら、それらの量には個人差があることも明らかとなった。

### (3) まとめ

下顎骨の皮質骨の骨基質には多様性があり、かつ四肢骨とは異なった様相を呈しており、コラーゲン生化学的分析を主体とする骨基質分析は下顎骨特有の骨基質の多様性を具体化できることが示された。インプラント予知診断の確立には現在までに全く分析できていない骨基質の性状の分析が必須であり、本研究に示された骨基質分析がインプラント周囲骨の予知できない経年的な骨吸収のメカニズムを解き明かす一助となるよう、さらなる研究を進める予定である。

### 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4件)

- ① Sasaki M, Matsuura T, Katafuchi M, Tokutomi K, Sato H. Higher contents of mineral and collagen but lower of hydroxylysine of collagen in mandibular bone compared with those of humeral and femoral bones in human. *Journal of Hard Tissue Biology*, 19:175-180, 2010, 査読有
- ② 松浦尚志, 片渕三千綱, 徳富健太郎. コラーゲン架橋(酵素架橋)と骨質. *The Bone*, 24:235-240, 2010, 査読無
- ③ Tokutomi K, Matsuura T, Atsawasuan P, Sato H, Yamauchi M. Characterization of mandibular bones in senile osteoporotic mice. *Connective Tissue Research*, 49:361-366, 2008, 査読有
- ④ Matsuura T, Katafuchi M, Tokutomi K, Sato H. Lysine hydroxylation of collagen: an important posttranslational modification for physiological and pathophysiological conditions of general and oral connective tissues. *Journal of Fukuoka Dental College*, 33:133-145, 2007, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 松浦尚志 コラーゲンと骨質. 日本補綴歯科学会九州支部学術大会, 2010年11月27日, 熊本.
- ② Matsuura T. Quantity and quality of collagen are altered in mandibular bones in senile osteoporotic mice. *Academy of Osseointegration*, February 26, 2009, San Diego, CA, USA.
- ③ 松浦尚志 老年性骨粗鬆症モデルマウス

の下顎骨のコラーゲン線維形態と分子間架橋. 日本骨代謝学会学術集会, 2008年10月29日, 大阪.

- ④ Tokutomi K. Histological and biochemical characterization of mandibular bones in senile osteoporotic mice. *American Society for Bone and Mineral Research*, September 18, 2007, Honolulu, Hawaii, USA.

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

松浦 尚志 (MATSUURA TAKASHI)  
福岡歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 60330966

#### (2) 研究分担者

佐藤 博信 (SATO HIRONOBU)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00145955

松永 興昌 (MATSUNAGA TATSUAKI)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 50389409

片渕 三千綱 (KATAFUCHI MICHITSUNA)  
福岡歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 90454933

都築 尊 (TSUZUKI TAKASHI)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 70330967

後藤 加寿子 (GOTO KAZUKO)  
福岡歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 60389468  
(H19~H21)

#### (3) 連携研究者

山内 三男 (YAMAUCHI MITSUO)  
ノースカロライナ大学・歯学部・教授

徳富 健太郎 (TOKUTOMI KENTARO)  
福岡歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 20508981  
(H21~H22)

佐々木美智子 (SASAKI MICHIKO)  
福岡歯科大学・歯学部・大学院生  
(H21~22)