

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791476

研究課題名 (和文)

インプラント術前診断法開発における顎骨性状の解析

研究課題名 (英文)

Analysis of jaw bone quality for preoperative assessment of implant therapy

研究代表者

大郷 友規 (DAIGO YUKI)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70435121

研究成果の概要：

インプラント治療の成功を左右する顎骨性状つまり骨質を組織学的、遺伝学的に解析を行った。老化促進マウスを用いた解析において老年性骨粗鬆症 (SAMP6) では海綿骨の骨量減少および骨梁の断片化それに伴う骨の脆弱化を呈し、変形性顎関節症 (SAMP8) では皮質骨の肥厚と骨リモデリングの低下により古い骨基質を反映している結果となった。この研究が将来的にインプラント治療やそれに伴う歯周外科治療に対する術前診断や予知性の診査への応用が可能になると考える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000		1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	270,000	2,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、補綴理工系歯学

キーワード：歯科インプラント学 老化促進マウス 老年性骨粗鬆症 変形性顎関節症

下顎骨 骨性状 骨形態計測

1. 研究開始当初の背景

欠損歯列に対する歯科補綴治療においてインプラント治療の要求が高まり、さらに歯科医療の進歩や患者の多様な価値観などにより患者の求める治療のゴールが高くなったことから、インプラント治療は欠損補綴の包括的な治療方針を考える上でなくてはならないものとなってきている。ここまで治療方針の一部として組み込まれてきた背景には、インプラント治療の高い臨床成績がある

と考えられる。それを国内の論文のデータから統合してみると、オッセオインテグレーション獲得率が 94.7% と高い成功率という報告があるが、その反面失敗もある。オッセオインテグレーション獲得失敗の因子として喫煙、糖尿病などがよく言われているが、最近では顎骨の質的因子つまり骨質が大いにかかわっていると報告 (Klinger; 1998 et al) されている。

2. 研究の目的

歯科臨床において顎骨というのは、加齢的変化や咬合によるストレスにともなう骨の反応がすごく多様性に富んでいる。有歯顎者において、咬合の過度なストレスにより歯槽骨の吸収が進み、さらに歯肉が下がるヒトもいれば、逆に下顎隆起といった外骨症のような骨膜性の骨形成を呈するヒトもいる。また無歯顎者においても、歯槽骨の吸収が著しく進み、顎骨自体も薄くなるヒトもいれば、同じように歯牙をすべて失って長期経過しているにもかかわらず骨吸収がほとんど進まず骨の形態を維持するヒトもいるというようにさまざまな臨床的症状を呈する。このように歯周疾患と歯槽骨吸収の進行や状態は患者間で相違が大きいと考えられ、顎骨の性状は、骨粗鬆症や変形性顎関節症患者において少なからず異なっている可能性がある。このことからインプラント治療を行うに当りレントゲンやCT診断による顎骨の量的因子だけでなく骨性状といった質的因子についても診査しなければならないと考える。そこで骨質が異なると思われる代表的な老年性骨疾患のうち一般的な骨の加齢変化と比較して皮質骨と海綿骨の骨量が減少する骨粗鬆症と皮質骨が増大する変形性関節症と対照的な骨組織形態を示す老年性骨疾患に着目した (Dequeker J; 1996)。そこで京都大学胸部結核研により開発された老化促進マウスのうち老年性骨粗鬆症モデルマウスである SAMP6 と変形性顎関節症を自然発症する SAMP8 を用い、これらにおける疾患特異的な顎骨特異的な骨組織形態の変化の有無を明らかにすることを目的として、大腿骨と下顎骨の骨形態計測学的特徴および遺伝子学的特徴を比較検討することである。

3. 研究の方法

動物；老化促進マウス (SAM)

SAMP6：老年性骨粗鬆症モデルマウス

SAMP8：変形性顎関節症自然発症マウス

SAMR1：コントロールマウス

これまでの SAM の報告として大腿骨骨量は生後 4~5 ヶ月齢でピークに達しその後漸減することから、骨成長ピークを 4 ヶ月齢とし、その前後の 2 および 6 ヶ月齢を含めて検討を行った。

性別；オス

月齢；2, 4 および 6 ヶ月齢

匹数；各月齢・系統とも 6 匹

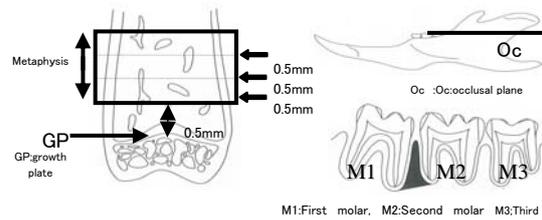
(1) 下顎骨における骨形態計測学的解析

①各月齢、系統のマウスをエーテル麻酔下で頸椎脱臼法にて屠殺し、大腿骨と下顎骨を採取。

②骨脱灰組織切片作製。

大腿骨：膝関節の遠位骨幹端部を前頭断方向に薄切。

下顎骨：下顎枝部を水平断方向に、歯槽骨部を矢状断方向に薄切。(Fig. 1)



③計測箇所；

大腿骨：皮質骨および海綿骨

遠位骨幹端部の成長板から 0.5mm 上方~2.0mm の枠内を計測。

下顎骨：

皮質骨検証；咬合平面高さにおける下顎枝の頬舌的幅径での皮質骨の計測。

海面骨検証；第一臼歯と第二臼歯の間の歯槽中隔部での海綿骨の計測。

④計測項目；

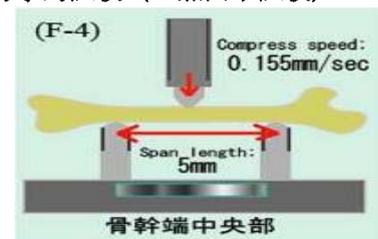
皮質骨：皮質骨幅比 (CTI；皮質骨/骨幹幅比)

海綿骨：骨量；B. Ar/T. Ar (%)、骨梁幅；Tb. Wi (μm)、骨梁数；Tb. N (/mm)、骨梁間距離；Tb. Sp (μm)、骨芽細胞密度；N. Ob/B. Pm (/mm) および破骨細胞密度；N. Oc/B. Pm (/mm)

⑤組織切片の観察、分析；

骨形態計測学的特徴のためにデジタルマイクロスコープにて観察し、画像解析ソフト (Scion Image) を用いて計測する。

(2) 力学的試験 (3点曲げ試験)



対照；6 ヶ月齢の各系統マウス

部位；大腿骨骨体中央部

大腿骨骨体中央部にジグを置き速度 0.155mm/sec で圧を掛ける。そのときの骨体破折時の硬さ N/mm を計測する。

(3) 骨リモデリング二重標識法

(カルセイン法)

類骨へのミネラル沈着 (石灰化) 時に、カルシウムをキレートする作用のあるカルセインを投与して骨標識を行う。リモデリングの速さを比較検討する。

組織切片を観察、分析。蛍光顕微鏡にて観察し、画像解析ソフトを用いて計測する。

測定箇所；上述と同じ

(4) 遺伝子発現の定量分析

①骨芽細胞様細胞を選択的に培養
各月齢、系統のマウスから大腿骨と下顎骨を骨髄採取し、骨芽細胞様細胞を誘導する。

②骨芽細胞様細胞の選択的培養の確認
培養細胞から RNA を抽出し、Reverse Transcription(RT)により cDNA に逆転写する。この cDNA を骨芽細胞のマーカーである Cbfa1、オステオカルシン、アルカリフォスファターゼをプライマーとして PCR 反応を行い、さらにクローニング、シーケンスにて塩基配列を確認する。→一致していれば骨芽細胞様細胞と断定できる。

③骨芽細胞様細胞の石灰化期の決定
培養プレート上にアリザリンレッド染色液を滴下。→染色の状態により石灰化期の細胞であるかを決定。

④骨コラーゲン架橋構造に寄与する酵素の遺伝子定量
骨芽細胞様細胞が分泌する骨コラーゲン架橋構造に寄与する酵素の遺伝子発現の定量を行い比較検討する。

ターゲット分子：

- a、Lysine hydroxylation(LH)-1/2b；架橋構造の種類に寄与する酵素
- b、Lysyl oxidase-like proteins(Lox)-1～4；架橋構造の数に寄与する酵素
→骨組織の足場となる骨コラーゲンの状態を解析することにより骨の性状つまり骨質を明らかにすることへつながる。

4. 研究成果

(1) 骨形態計測学的解析

および大腿骨力学的試験 (3点曲げ試験)

対照群である SAMR1 と比較して SAMP6 では大腿骨および下顎骨の皮質骨における CTI に有意差はなかった。海綿骨ではすべての月齢で両骨ともに骨量の有意な減少 (6ヶ月齢、大腿骨;69.7%減、下顎骨;18.3%減) を認め、さらに大腿骨では骨梁幅、骨梁数および骨梁間距離の数値より骨梁の断片化を呈することが分かった。さらに細胞密度の計測において、大腿骨ではこれまでの報告同様骨髄間質細胞からの分化に関わる遺伝子発現の低下により骨芽細胞密度の有意な減少 (6ヶ月齢、15.6%減) を呈したが下顎骨では認めなかった。しかし下顎骨における破骨細胞密度は有意に高値を示した (表 1、2)。3点曲げ試験においては SAMP6 で有意に低値 (18.9%減) を呈した(表 3)。

次に SAMP8 では大腿骨および下顎骨の両骨ともに皮質骨における CTI は有意に高値 (6ヶ月齢、大腿骨;51%増、下顎骨;18.7%増) を呈した。しかし海綿骨において生後 4ヶ月以降で大腿骨では骨量の減少 (6ヶ月齢、71.1%減) を呈したが下顎骨では逆に増加(6

ヶ月齢、12.6%増)を呈した。細胞密度に関しては下顎骨で低値 (6ヶ月齢、23.2%減) を呈した (表 4、5)。3点曲げ試験においては SAMP8 で有意に高値(13.3%増)を呈した(表 6)。

大腿骨	2ヶ月齢		4ヶ月齢		6ヶ月齢	
	R1	P6	R1	P6	R1	P6
CTI	16.8	17.4	16.4	13.9	10	11.3
B. Ar/T. Ar	14.7	10	8.9	5.1	9	2.72
N. Ob/B. Pm	34.6	31.9	41.5	30.8	33.9	28.6
N. Oc/B. Pm	4.29	4.25	3.52	3.06	4.1	3.83

表 1 SAMR1/P6 大腿骨の形態計測学的解析

下顎骨	2ヶ月齢		4ヶ月齢		6ヶ月齢	
	R1	P6	R1	P6	R1	P6
CTI	21.8	22	22.9	19.5	21.9	20.1
B. Ar/T. Ar	75.6	62.2	74.1	63.6	77	62.9
N. Ob/B. Pm	43.1	42.4	36.6	39.4	31.3	34.9
N. Oc/B. Pm	8.69	9.25	5.72	6.27	4.51	5.68

表 2 SAMR1/P6 下顎骨の形態計測学的解析

大腿骨	R1	P6
Yeild load(N)	18.3	14.1
Energy to yeild(Nmm)	0.894	0.654
Fractuer load(N)	34.8	23.3
Energy to fractuer(Nmm)	8.15	3.83
Stiffness(N/mm)	192	155.7

表 3 6ヶ月齢 SAMR1/P6 大腿骨力学的解析

大腿骨	2ヶ月齢		4ヶ月齢		6ヶ月齢	
	R1	P6	R1	P6	R1	P6
CTI	16.8	24.4	16.4	14.6	10	15.1
B. Ar/T. Ar	14.7	12.9	8.9	10.1	9	2.6
N. Ob/B. Pm	34.6	37.4	41.5	37.9	33.9	30.3
N. Oc/B. Pm	4.29	4	3.52	3.59	4.1	4.27

表 4 SAMR1/P8 大腿骨の形態計測学的解析

下顎骨	2ヶ月齢		4ヶ月齢		6ヶ月齢	
	R1	P6	R1	P6	R1	P6
CTI	21.8	24.7	22.9	25.9	21.9	26
B. Ar/T. Ar	75.6	83.8	74.1	77.4	77	86.7
N. Ob/B. Pm	43.1	34.3	36.6	41.5	31.3	29.9
N. Oc/B. Pm	8.69	5.34	5.72	4.06	4.51	3.46

表 5 SAMR1/P8 下顎骨の形態計測学的解析

大腿骨	R1	P8
Yeild load(N)	18.3	19.8
Energy to yeild(Nmm)	0.894	0.931
Fractuer load(N)	34.8	37.9
Energy to fractuer(Nmm)	8.15	6.39
Stiffness(N/mm)	192	217.6

表 6 6ヶ月齢 SAMR1/P8 大腿骨力学的解析

赤字；有意に R1 より低値
青字；有意に R1 より高値

(2) 骨リモデリング二重標識法

(カルセイン法)

骨リモデリング解析においてSAMR1と比較してSAMP6の大腿骨および下顎骨では骨髄側からの骨形成が遅いつまりリモデリングが遅れていると言える。この結果は海綿骨の骨量の減少と骨梁の断片化という形態計測の結果および骨芽細胞密度の減少とリンクしているデータであると考えられる。一方、SAMP8において骨幹部ではリモデリングが遅いことを認めた。

(3) 遺伝子発現の定量分析

採取骨髄から骨芽細胞様細胞の選択的培養および石灰化期への誘導はシークエンスおよびシークエンスによる確認はできた。しかし骨芽細胞が産生する骨コラーゲン架橋構造に寄与する Lysine hydroxylation (LH)-1/2b、Lysyl oxidase-like protein (Lox) 1～4の酵素の遺伝子発現の定量分析に関しては、再現性に疑問があり分析が不十分であったと考える。それはこれらの酵素が骨芽細胞から分泌される液成分なので cDNAの精製が困難でありデータにばらつきがあったためと考察する。

考察

老年性骨粗鬆症は全身同様に下顎骨においても骨量の減少、力学的試験の結果からも下顎骨も脆弱な傾向を示すと考えられるが、骨梁の断片化および骨芽細胞数の減少までは示さなかった。これは大腿骨より下顎骨の方がメカニカルストレスが大きいためと思われる。

変形性顎関節症では皮質骨の肥厚を認めるにも関わらず、海綿骨において大腿骨の骨梁の断片化を呈するのに対して下顎骨では骨量の増加と骨リモデリングの遅延を認めた。以上より下顎骨は破骨細胞数の減少により骨髄側からの骨吸収が遅れその結果皮質骨が厚くなったと考え、さらに骨髄腔でも骨梁で満たされたことからこの疾患における骨組織は古い骨基質を反映していると思われる。しかし予備実験では関節部の軟骨下骨では逆にリモデリングが速いという結果となった。この現象は関節組織の崩壊を回避するために過剰な負荷に対する抵抗的な反応と考えられる。

今後も組織学的、遺伝的および生化学的解析をさらに進めていき骨性状つまり骨質の解明を続けることが、将来インプラント治療やそれに伴う歯周外科治療に対する術前診断や予知性の診査への応用が可能になると考える。

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)

[学会発表] (計 2件)

①第20回日本顎関節学会

(平成19年7月15日) 仙台

変形性顎関節症を自然発症する老化促進マウス(SAMP8)の下顎骨における骨および軟骨の形態計測学的な解析

②第21回日本顎関節学会

(平成20年7月26日) 大阪

老化促進マウス(SAM)の関節周囲の骨・軟骨組織における組織学的および力学的変化

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大郷 友規(DAIGO YUKI)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70435121