

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11170

研究課題名(和文) 骨質劣化マーカーを基軸としたインプラント術前診断の分子医学的イノベーション

研究課題名(英文) Molecular biological innovation for preoperative diagnosis in implant treatment by bone quality deterioration marker

研究代表者

正木 千尋 (Masaki, Chihiro)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60397940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、実験的にAGE架橋の増加がみられる高ホモシステイン血症動物モデルを用いて、非生理的コラーゲン架橋が骨の脆性破壊強度に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。大腿骨の3点曲げ試験の結果、メチオニン投与により、最大荷重と破断力において実験群の方が対照群よりも有意に高い値を示した。また下顎骨のナノインデンテーション試験の結果、高メチオニン食群の方が通常食群に比べて貯蔵弾性率が低い傾向を示し、また応力の低下を示した。非酵素的コラーゲン架橋が増加したことにより、骨の物性が変化し、微小破壊(マイクロクラック)が生じやすくなった可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to clarify the loss of bone toughening mechanism with aging processes mainly associated with AGEs by means of multi-scale mechanical testing, such as three-point bending and nanoindentation tests. A three-point bending test revealed a greater reduction in femoral fracture resistance in methionine-rich diet rabbits despite the higher maximum and breaking forces than those of normal diet rabbits. The strain-dependent stiffening was likely associated with strain-energy transfer to the superior normal diet cross-linked bone matrix network, while the reduction in the enzymatic crosslinking matrix in bone samples from the methionine-rich diet rabbits likely diminished the intrinsic bone toughening mechanism.

研究分野：医歯薬学

キーワード：コラーゲン架橋 骨質 ナノインデンテーション インプラント

1. 研究開始当初の背景

骨密度と骨質から規定される骨強度はインプラント治療において極めて重要な因子と考えられているが、術前 CT 検査でのハンスフィールド値だけで評価することは難しく、その客観的評価方法は未だ確立されていない。近年、骨折しやすい骨としにくい骨の違いを明らかにする研究が進み、骨強度に影響を及ぼす因子として骨の微細構造とともに、コラーゲン架橋が注目されている。コラーゲン架橋は形成機序や機能の差により「生理的架橋」と酵素反応を介さずに形成される「非生理的架橋」の二つに分類される。非生理的架橋は老化や糖尿病などに関わりのある AGEs (Advanced glycation end products) と呼ばれるものであり、中でもペントシジンは代表的な AGEs である。これまでの研究から「生理的架橋」はコラーゲン線維の強度を高める「善玉架橋」であるのに対し AGEs 架橋はコラーゲン線維を脆弱化させる「悪玉架橋」と考えられるようになってきた。また、骨内ペントシジン含有量は血液中の濃度と正相関し、閉経後の 2 型糖尿病患者では血中ペントシジン高値が独立した骨折リスクとなることを報告している。これらのことから、血中もしくは尿中ペントシジン測定は、骨密度だけでは評価できない易骨折性を予測できる骨質劣化マーカーとなる可能性が高いと考えられるが、顎骨の骨質にどのような影響を及ぼしているかについては全く分かっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究は、実験的に AGE 架橋の増加がみられる高ホモシス테인血症動物モデルを用いて、非生理的コラーゲン架橋が骨の脆性破壊強度に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

17-18 週齢ニュージーランド白色種雌性ウサギを用いて、高ホモシス테인血症モデルの作成を行った。全身麻酔下にて卵巣摘出手術を行った後、1%-メチオニン混合固形試料を 1 日あたり 100g、16 週間給餌させ、高ホモシス테인血症を誘発した。一方、対照群には実験動物用固形試料を給餌した。16 週経過後に右側大腿骨を採取し、骨強度測定装置を用いて 3 点曲げ試験を行った。骨強度計 (MZ-500S, 株式会社マルトー, 東京都) を用いて 3 点曲げ試験 (支点間距離: 80 mm, 計測速度: 5 mm/min) により左右大腿骨の骨幹部 (骨中央) における骨強度 (最大荷重, 剛性及び破断エネルギー) を測定した。加えられた力に抗して変形する領域を弾性領域、抗することなく変形する領域を可塑性領域、弾性領域から可塑性領域への変換点を降伏点 (0.02% オフセット) とした。破断までに加えられた力の最大値を最大荷重 (N), 直線部分 (弾性領域) の傾きを剛性 (N/mm), 破断するまでに加えられた力の積分値 (mJ) を破断エネルギー、降伏点までの破断エネ

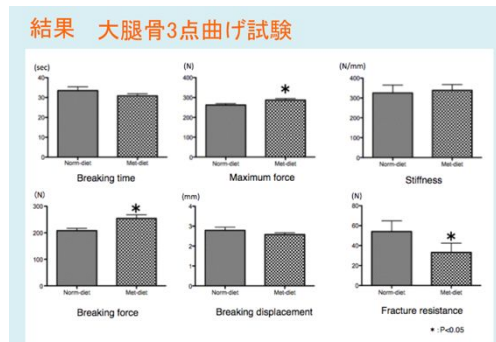
ギーを弾性領域のエネルギー、降伏点以降の破断エネルギーを可塑性領域のエネルギーとした。統計学的解析には Students t-test を用いて検定を行った ($P < 0.05$)。

また 17-18 週齢ニュージーランド白色種雌性ウサギを用いて、高ホモシス테인血症モデルを作製後、下顎骨の脆性破壊強度の検討を行った。大腿骨とは違い、試料が小さく 3 点曲げ試験を用いることができないため、ナノインデンテーション試験を用いて評価を行った。三角錐状のダイヤモンドの微小圧子を用いて皮質骨表面で荷重-除荷試験を行い、ナノスケールの圧痕から準静的に硬さと弾性係数を評価した。動的試験として試料表面に最大荷重 500 μ N インデンテーションを行い、ホールディングしながら 0.1, 1, 10Hz の振動を与えることで、ひずみ速度 (単位時間あたりの変形量) に対する物性変化を測定し、貯蔵弾性率および粘弾性を検討した。また、準静的試験として、圧子の先端が試料表面より深さ 200 nm に到達するまでに 20 nm/s, 40 nm/s と異なる速さでインデントした後 60 秒間の時間経過に対するエネルギー吸収を測定した。粘弾性材料では、一定の変形量を維持するための荷重が時間とともに減少する応力緩和が起こるかどうかを検討した。

さらに研究に同意の得られたインプラント埋入予定患者 28 名 (男性 15 名, 女性 13 名) に対し、骨質劣化マーカーと考えられる血中ペントシジン量およびホモシス테인量の測定を行った。その後、術中にインプラント埋入部から得られる骨生検試料の脆性破壊強度を測定した。

4. 研究成果

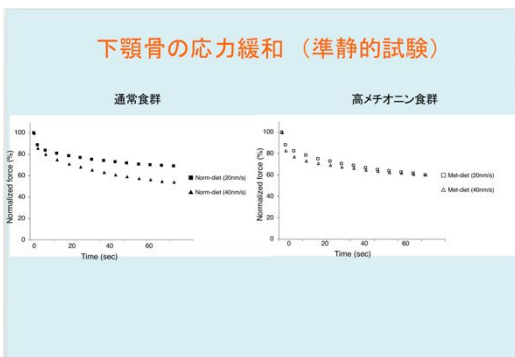
(1) メチオニン投与により、最大荷重と破断力において実験群 (287.26 ± 24.10 N, 254.09 ± 43.88 N) の方が対照群 (262.23 ± 22.8 N, 208.11 ± 27.74 N) よりも有意に高い値を示した。一方、破断時間、破断変形はやや低い傾向を、Stiffness、破断エネルギーに関してはやや高値の傾向を示したが、有意な差は認めなかった。



(2) 下顎骨の脆性破壊強度を検討した。最大荷重 500 μ N を周期的に皮質骨に対して加えることで、下顎骨の貯蔵弾性率を比較したところ、通常食群は周波数を変化した際に貯蔵弾性率の上昇を認めたのに対して、高メチオニン食群は周波数を変化させても貯蔵弾性

率の上昇は起こらず、さらに 1Hz, 10Hz 測定時に両群間で有意な差を認めた。また、0.1Hz ~ 10Hz までの各周波数における動的粘弾性の大きさ $Tan \delta$ を検討したところ、通常食群が高メチオニン食群よりも有意に高い値を示した。さらに下顎骨の応力緩和を検討するため、静的試験としてインデントを 200nm の深さで変位をコントロールして圧子に生じる応力の減少を測定したところ、通常食群は 40nm/s で深さ方向にインデントした際に 20nm/s よりも応力の変化を生じたのに対して、高メチオニン食群は深さ方向への速度を変化させても応力の変化を生じなかった。つまり、高メチオニン食群の方が通常食群に比べて貯蔵弾性率が低い傾向を示し、また、インデントを 200nm の深さで変位をコントロールして圧子に生じる応力の減少を測定した結果、高メチオニン食群のほうが通常食群に比べて応力の低下を示した。

以上より、非酵素的コラーゲン架橋が増加したことにより、骨の物性が変化し、微小破壊(マイクロクラック)が生じやすくなり、コントロール側の骨に比べてインデンテーションにより変形が生じたため、応力の低下を示した可能性が示唆された。



(3) ホモシステイン量に関しては男性が平均 11.6 nmol/ml であったのに対し、女性は平均 8.1 nmol/ml であった。一方、ペントシジン量に関しては男性が平均 29.5 pmol/ml であったのに対し、女性は平均 27.1 pmol/ml であった。いずれも女性の方が若干低い値を示したものの、両群間で有意な差は認められなかった。インプラント埋入時に直径 3mm のトレフィンバーを用いて骨試料を採取後、レジン包埋しナノインデンテーション検査を行ったところ、ペントシジン量が高値を示した被験者の試料では準静的試験におけるクリーブ率が高い傾向が認められた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Masaki C, Mukaibo T, Kondo Y, Terada M,

Murakami T, Takahashi A, Hosokawa R. A 9-year retrospective study of immediate loading implants in the fully edentulous maxilla. The 24th EAO (EUROPEAN ASSOCIATION FOR OSSEointegration) ANNUAL SCIENTIFIC MEETING. Stockholm. 2015/9/24-26.

我如古清太, 正木千尋, 柴田陽, 向坊太郎, 近藤祐介, 中本哲自, 宮崎隆, 細川隆司. 低出力超音波パルスは歯肉創傷治癒モデルの創閉鎖を促進する. 第 124 回日本補綴歯科学会学術大会. 大宮. 2015/5/29-31.

野代知孝, 人見涼露, 正木千尋, 小野堅太郎, 細川隆司: 口腔内潰瘍モデルにおける病態と遺伝子変化 第 125 回公益社団法人日本補綴歯科学会学術大会 金沢 平成 28 年 7 月 8-10 日

Masaki C, Kondo Y, Aonuma F, Tamura A, Tsuka S, Mukaibo T, Hosokawa R. A 10-year retrospective multi-center study of immediate loading implants in the fully edentulous maxilla in Japanese population. 2017 BIENNIAL JOINT CONGRESS OF CPS-JPS-KAP. 2017/10/19-10/21. Wenzhou, China.

近藤祐介, 正木千尋, 金田和彦, 高橋啓, 村上貴也, 伊丹宏之, 大森有樹, 細川隆司. 上顎無歯顎に対する即時荷重インプラント治療の多施設 10 年間後ろ向き臨床研究. 第 47 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会. 2017/9/24. 仙台市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正木 千尋 (MASAKI, Chihiro)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：60397940

(2) 研究分担者

近藤 祐介 (KONDO, Yusuke)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00611287

向坊 太郎 (MUKAIBO, Taro)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：50635117

細川 隆司 (HOSOKAWA, Ryuji)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：60211546

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()