

令和 2 年 8 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06309・19K21396

研究課題名（和文）インプラント治療のための新規骨質評価方法と骨質コントロール

研究課題名（英文）Development of novel method for assessing and controlling of bone quality around dental implant

研究代表者

吉岡 洋祐 (Yoshioka, Yohsuke)

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：00827933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：副甲状腺ホルモン製剤の間歇投与は新生骨の微細構造を向上させる一方で、顕微ラマン分光装置を用いることで下顎新生骨のアパタイトの成熟を妨げ、コラーゲン構造を脆弱化させることが明らかとなった。そのメカニズムとして抗酸化力の低下に伴う酸化の亢進が終末糖化産物の産生、その受容体の発現を促進させたことに起因する可能性が示唆された。本研究にて、副甲状腺ホルモン製剤使用時に酸化ストレスを制御することでより良好な骨質の獲得、インプラント治療の成績向上が期待できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症治療薬である副甲状腺ホルモン製剤は下顎新生骨の微細構造を向上させる一方で微小領域におけるアパタイトの成熟を妨げ、コラーゲン構造を脆弱化させることを明らかにした。また、アパタイト成熟度の低下、コラーゲン構造脆弱化の原因が抗酸化力の低下に伴う酸化の亢進に起因していることが示唆された。副甲状腺ホルモン製剤使用時の酸化の防止法を見出すことができれば、微細構造を向上させつつ、微小領域のアパタイト構造、コラーゲン構造を向上させることが可能となり、インプラント治療をはじめとした骨強度が重要視される治療において有効な治療法となりうる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：While intermittent administration of PTH promoted the healing of newly formed mandibular bone by improving the microstructure and increasing bone mass, it also promoted oxidation and increased receptor of advanced glycation endproducts, which depreciates the quality of bone minerals and bone collagen. We suggest that preventing oxidation stress during PTH treatment may gain better bone quality and results for dental implant treatment.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨質 ラマン分光法 下顎骨 酸化ストレス 抗酸化ストレス インプラント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療に際して、良好な骨質の確保はインプラント治療適応の拡大や治療成績に直結する。しかし、高齢者や糖尿病の既往などにより骨質が不良である場合が多く、インプラント治療成功のための決定的な要素の1つであるオッセオインテグレーション(OI)の獲得が見込めずインプラント治療が適応できない症例が多い。インプラント治療時の骨質はCT値の利用やインプラント体埋入窩形成時の手指感覚により把握されている。しかし、それらでは骨の剛性、靱性を正確に把握することはできず、確実性および正確性に乏しい。したがって、良質なOIの獲得およびインプラント治療適応の拡大のために新しい骨質評価方法とその骨質のコントロール方法が求められている。

2. 研究の目的

骨質の解析方法の1つに顕微ラマン分光装置による解析があげられる。非接触、非破壊的、ラベルフリーかつ前処置が少なく、特定の分子を包括的に解析可能であり、空間分解能は1 μ mを有する。顕微ラマン分光装置を骨質の解析に適応すると、剛性に関わる骨ミネラルの質、靱性に関わる骨コラーゲンの質を定性・定量的に可視化・計測することで、骨質を多角的に評価することが可能である。また、副甲状腺ホルモン製剤(PTH)やビスフォスフォネート製剤等の骨粗鬆症治療薬は骨質の変化を引き起こすことが知られている。本研究では、骨質コントロールを的確に行うために顕微ラマン分光装置および骨粗鬆症治療薬をインプラント治療に応用することで、良好な骨質、OIの獲得を目指す。本研究の目的はインプラント治療において新たな骨質評価ツールとなりうる顕微ラマン分光装置の応用および骨粗鬆症治療薬を用いた骨質のコントロールに向けて基盤となるデータを蓄積することにある。

3. 研究の方法

8週齢 Wistar 雌性ラットに卵巣摘出を施し、下顎枝に貫通孔を作製した。貫通孔作製1日後より PTH 群および OVX 群に分け、副甲状腺ホルモン製剤 30 μ g/kg または生理食塩水を連日1日1回皮下投与した。初回薬剤投与21日後に血液、下顎骨、大腿骨を採取した。採取した検体は下記の測定、解析を行った。

(1) 大腿骨の微細構造解析

microCT (Scan Xmate-A080, Comscan Tecno Co. Ltd. Yokohama, Japan) にて撮影を行った。撮影にて得られたデータは骨解析ソフトウェア(TRI/3D-BON, Ratoc System Engineering Co. Ltd. Tokyo, Japan) にて解析し、3次元構築および骨形態計測を行った。骨形態計測では、右大腿骨遠位骨端部成長線から1.5mm近位部から3.5mm近位部までを測定範囲とし、以下の4つの海綿骨パラメータ、bone volume / tissue volume (BV/TV; %), trabecular thickness (Tb. Th; μ m), trabecular number (Tb. N; 1/mm), trabecular separation (Tb. Sp; μ m)を計測した。pQCT (Norland/Stratec XCT Research SA+; Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany)を用いて解析を行い、bone mineral density(BMD; mg/cm^3)を計測した。右側大腿骨遠位骨端部成長線部より1, 2, 3, 12mm近位部の4ポイントをRegion1, Region2, Region3, Region4とそれぞれ定義し各ポイントにおけるBMDを計測した。

(2) 下顎新生骨の微細構造解析

microCTにて撮影を行った。撮影にて得られたデータは骨解析ソフトウェア(TRI/3D-BON,

Ratoc System Engineering Co. Ltd. Tokyo, Japan) にて解析し、貫通穴残存部を中心とした 800 μm ×800 μm の骨形態計測を行った。また、pQCT を用いて新生骨の BMD を計測した。貫通孔残存部を中心に 1.3mm 内の新生骨の BMD を計測した。microCT にて得られたデータから、貫通孔残存部面積が最小となる画像を抽出し、解析ソフトウェア(Axio Vision® 3.1, Carl Zeiss Co. Ltd, Munich, Germany)を用いてその面積を計測した。

(3) 下顎新生骨の組織学的解析

ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を行い、組織学的解析を行った。また、抗 receptor of advanced glycation endproducts (RAGE) 抗体を用いて免疫組織染色を行った。RAGE 発現状態の比較のため、貫通孔残存部周囲骨端から 800 μm 内の下顎新生骨上の RAGE 発現陽性細胞数をカウントした。

(4) 下顎新生骨微小領域における骨質因子の分子解析

顕微ラマン分光装置にて解析を行った。骨欠損部から 300 μm ×120 μm の範囲内における骨質パラメータのマッピング画像を構築した。また、骨欠損部外周より 90 μm 地点から 1 検体につきランダムに 4 箇所選択しラマンスペクトルを取得し骨質パラメータを算出した。下記の 4 つの骨質パラメータ 1.Mineral/matrix ratio ,2.Crystallinity ,3.B-type carbonate substitution , 4.Collagen structural integrity を計測した。

(5) 酸化・抗酸化バランスの測定

血清を用いて d-ROMs テスト ,BAP テストを行い、酸化力、抗酸化力を解析した。次いで上記の二つのテスト結果より算出される酸化・抗酸化バランスを示す酸化指数を解析した。

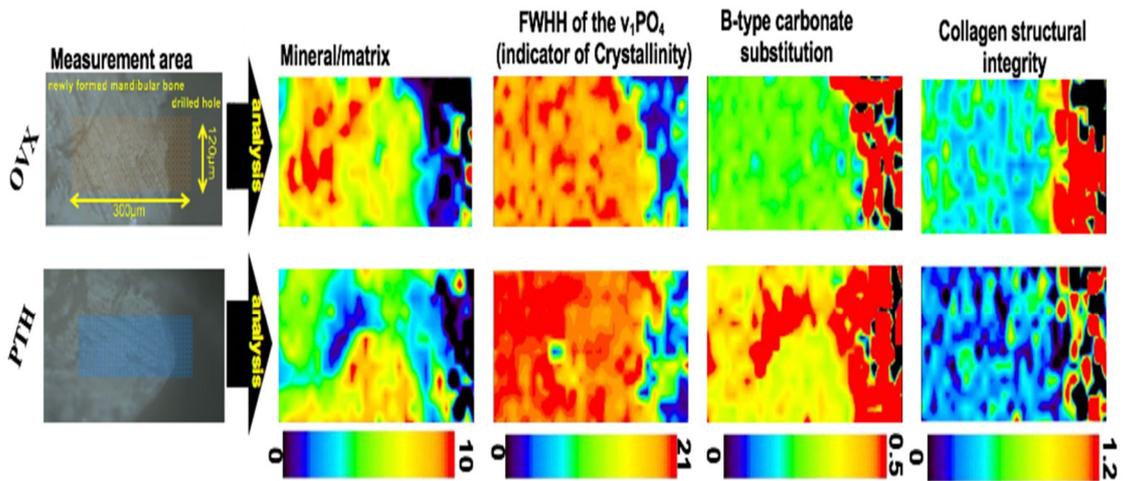
(6) 統計学的検討

結果より得られたデータは、危険率を 5%とし t-test を用いて有意差検定を行った。統計解析には解析ソフトウェア(JMP® version 13.3.0, SAS institute Inc. Cray, NC, USA)を用いた。

4. 研究成果

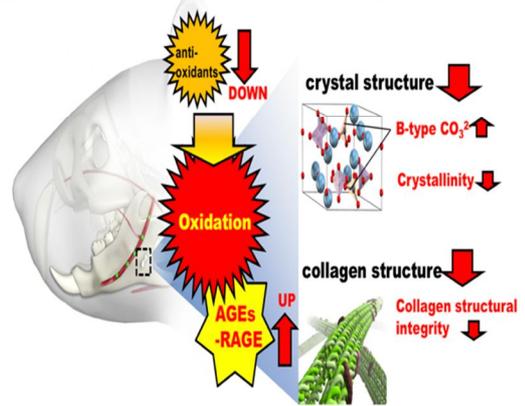
PTH 群の大腿骨では OVX 群と比較し骨密度、骨量、骨梁幅、骨梁数の増加、骨梁間隙の低下を認めた。Region1 ,Region2 ,Region3 ,Region4 の全てのポイントにおいて BMD の有意な増加を認めた。PTH 群の血清では酸化力に有意差を認めなかったが、抗酸化力の有意な低下、酸化指数の有意な増加を認めた。PTH 群の下顎新生骨では OVX 群と比較し骨梁数、骨梁間隙、BMD に有意差を認めなかったが、骨量、骨梁幅の有意な増加を認めた。PTH 群の貫通孔残存部面積は OVX 群と比較し有意に低下した。組織学的解析にて HE 染色では明らかな差を認めなかったが、抗 RAGE 抗体を使用した免疫組織染色では、PTH 群の新生骨に RAGE の発現を顕著に認めた。貫通孔残存部周囲骨端から 800 μm 内の RAGE 発現細胞数は PTH 群で有意に増加した。顕微ラマン分光装置にて下顎新生骨の骨質パラメータをマッピング化したところ、PTH 群では OVX 群と比較し Mineral/matrix ratio , Crystallinity , Collagen structural integrity の低下、B-type carbonate substitution の増加を示した。算出した骨質パラメータは PTH 群において Mineral/matrix ratio , Crystallinity , Collagen structural integrity の有意な低下、B-type carbonate substitution の有意な増加を示し、マッピング画像と一致した結果を認めた。

【骨質パラメータのマッピング画像】



以上の結果から、PTHの間歇投与は下顎新生骨のアパタイトの成熟を助け、コラーゲン構造を脆弱化させることが明らかとなった。そのメカニズムとして抗酸化力の低下に伴う酸化の亢進がAGEsの産生、RAGEの発現を促進させたことに起因する可能性が示唆された(右図参照)。本研究にて、PTH使用時に酸化ストレスを制御することでより良好な骨質の獲得、インプラント治療の成績向上が期待できることが明らかとなった。

【本研究にて提唱されたメカニズム】



PTH投与は抗酸化物質の低下に伴い酸化を亢進させ、AGEs-RAGEの作用を増強し、結晶構造およびコラーゲン構造を脆弱化させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshioka Yohsuke, Yamachika Eiki, Nakanishi Makoto, Ninomiya Tadashi, Akashi Sho, Kondo Sei, Moritani Norifumi, Kobayashi Yasuhiro, Fujii Tatsuo, Iida Seiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Intermittent parathyroid hormone 1-34 induces oxidation and deterioration of mineral and collagen quality in newly formed mandibular bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-44389-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉岡洋祐, 山近英樹, 明石翔, 森谷徳文, 飯田征二
2. 発表標題 PTH間歇投与による酸化・抗酸化バランスおよび骨アパタイト/コラーゲン複合構造の変化
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡洋祐 山近英樹 明石翔 徳善英紀 松原正和 森谷徳文 飯田征二
2. 発表標題 PTH間歇投与による酸化・抗酸化バランスの変化と下顎新生骨における骨質変化
3. 学会等名 第63回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡洋祐 山近英樹 森谷徳文 飯田征二
2. 発表標題 iPTH投与による酸化・抗酸化バランスおよび下顎新生骨における骨質変化
3. 学会等名 第73回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----