



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Evaluation of cortical bone remodeling in canines treated with daily and weekly administrations of teriparatide by establishing AI-driven morphometric analyses and GIS-based spatial mapping [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	沼端, 麻里絵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15937号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92190
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Marie_Numahata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 沼端 麻里絵

学位論文題名

Evaluation of cortical bone remodeling in canines treated with daily and weekly administrations of teriparatide by establishing AI-driven morphometric analyses and GIS-based spatial mapping

（ AI 駆動型形態計測と GIS を用いた空間マッピング法の確立による
テリパラチドを連日または週 1 回投与したイヌ皮質骨リモデリングの評価 ）

キーワード（5つ）テリパラチド（TPTD）、皮質骨、ハバース管、Artificial Intelligence（AI）、Geographical information system（GIS）

骨粗鬆症は、進行すると腰椎や大腿骨頸部など、体幹の支持に関わる重要な部位にも骨折を引き起こすため、要介護人口増加の主な要因となっている。したがって、骨代謝、骨粗鬆症やその治療薬による効果を詳細に解明することは、非常に重要な課題である。

骨粗鬆症による骨折の多くは弱く薄くなった皮質骨の部位で起こる。したがって骨粗鬆症治療薬の効果を検討する上で、皮質骨への薬理効果の評価は非常に重要である。しかし、これまでの動物試験では海綿骨における評価が中心で、皮質骨における微細構造の解析および骨粗鬆症治療薬の効果の検討は十分ではなかった。これは、最もよく使われる実験動物であるマウスやラットでは、ヒトの皮質骨に特徴的なハバース管を中心とした骨層板構造であるオステオン構造を持たないため、皮質骨のリモデリングがほとんど観察されず、これらの小型実験動物の皮質骨における評価を単純にヒトへ外挿することが困難であったためである。

骨粗鬆症治療薬であるテリパラチド（以下、TPTD）は、ヒト副甲状腺ホルモン（PTH）の活性断片であり、骨形成と骨吸収の両方を刺激し骨代謝を促進する薬として臨床的に使用されている。また、TPTD は、連日投与、週 1 回投与、週 2 回投与、と 3 種類の異なる投与方法が臨床的に使用可能であり、これらは臨床効果や薬理作用の点において違いがあることが知られている。連日投与では骨形成と骨吸収の両方のマーカーに顕著な増加をもたらすが、週 1 回投与、週 2 回投与では骨吸収への刺激が少ないことが分かっている。臨

床的に、TPTD の連日投与では皮質骨内に大きな吸収窩を形成しいわゆる多孔化が生じる場合があることが懸念されている。ラット椎体やウサギ脛骨を用いた動物実験でも、TPTD の高頻度投与では低頻度投与と比較して、皮質骨の多孔化が増加することが報告されている。このような TPTD 投与による皮質骨の多孔化は骨の機械的強度および衝撃吸収能力の低下を導く可能性がある。しかしながら、TPTD の連日投与によって皮質骨に多孔化が生じるメカニズムは不明な点が多い。そこで、本研究ではヒトと同様に皮質骨にオステオン構造を持ち骨代謝回転も近いイヌをモデル動物とし、異なる投与頻度で TPTD を長期投与して、その皮質骨リモデリングの変化を詳細に解析することを目的とした。

8~9 カ月齢の雄ビーグル犬に TPTD を、連日低用量 (0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$: DL 群) および高用量 (2.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$: DH 群)、週 1 回低用量 (4.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$: WL 群) および高用量 (19.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$: WH 群) で投与し、連日 Vehicle 投与 (CNT 群) と比較した。なお、投与頻度による影響を検証するため、週 1 回投与群には連日投与群の 7 日分となるよう投与量を設定し、9 カ月間反復投与した。各群から採取した肋骨より横断非脱灰切片を作成し Villanueva 骨染色を施した後、微分干渉・蛍光顕微鏡を用いて、明視野画像および蛍光画像を網羅的に撮像した。皮質骨では、神経血管束の通り道であるハバース管を中心に骨のリモデリングが起こるため、ハバース管を対象とした形態計測・定量化を行った。形態計測は、Artificial Intelligence (以下、AI) による深層機械学習の手法を用いてハバース管の特徴を学習させ、半自動的に認識させて解析を行った。最初に皮質骨全体の網羅的な解析を行ったところ、全ハバース管の一部が TPTD に応答し拡大していることが観察された。これらの部位では、皮質骨の活発なリモデリングが起きていると考えられた。

次に、各標本の皮質骨内に 6 か所の関心領域 (Regions of Interest、ROI) を設定し、解析を行った。解析の結果、ハバース管の数は群間で有意差を認めなかった。一方、ハバース管の平均面積は CNT 群と比較して DH 群において、有意に大きい値を示し、ハバース管総面積も有意に最も大きい値を示した。結果として、皮質骨における骨量/組織量 (Bone volume/Tissue volume、以下 BV/TV) は DH 群で CNT 群と比較し低い値を示した。蛍光画像の解析によって得られたこれらの結果を確認するために、同部位の明視野画像を用いて同様に AI 駆動型形態計測を行った。これらの結果は、いずれも蛍光画像から得られた結果と同じ傾向を示し、DH 群においてハバース管総面積が拡大し、結果として BV/TV が減少することが確認できた。

ハバース管周囲のリモデリング亢進を検討するため、各群の骨形成のパラメーターとして類骨パラメーターを算出した。なお、類骨は石灰化前の骨基質であり、類骨量の上昇は、骨形成の亢進を示す。類骨パラメーターは CNT 群と比較して、DL 群、DH 群、WH 群で高い値を示し、特に DH 群では、類骨量/組織量、平均類骨長、類骨長/ハバース管周長の全てにおいて有意に高い値を示した。以上の結果から、DH 群では、ハバース管周囲の骨形成の亢進が起きていると考えられた。さらに、ハバース管周囲の骨吸収の亢進を示すパラメーターとして隣接するオステオンのセメントラインを侵食する吸収孔 (Eroded Pore、以下

E.Po) を定義し、計測結果を統計的に比較した。その結果、E.Po の平均面積は群間で有意差を示さなかったが、DH 群における E.Po の数と総面積は、WH 群と比較して有意に高いスコアを示した。また、この値は CNT 群、DL 群および WL 群と比較しても、有意では無いが高い値を示した。これらの解析から、DH 群では WH 群と TPTD の 1 週間あたりの総投与量は同じにもかかわらず、統計的に比較すると、活発な皮質骨のリモデリングが生じ、周囲のオステオンに浸食する吸収孔 (E.Po)、すなわち吸収期オステオン形成が有意に増大しているという非常に興味深い結果が得られた。

E.Po の数の増加は、個々のハバース管の拡大のみならず複数のハバース管の融合が原因となっている可能性を考えた。このことを確認するため、組織切片全体のハバース管を AI 駆動型形態計測で認識した物に、Geographic Information System (地理情報システム、以下 GIS) を適用し、全組織切片のハバース管密度とハバース管面積比を空間的にマッピングした。この空間マッピングの結果から、ハバース管密度が減少した領域はハバース管が拡大した領域と一致する傾向にあることが示され、これは DH 群から得られた標本で最も明確であった。したがって、DH 群における E.Po の有意な増加は、吸収期オステオンの形成亢進によるハバース管の拡大と拡大したハバース管の融合が原因であることが示唆された。

これらの解析結果から、TPTD の皮質骨への薬理学的影響は、そのリモデリングを亢進し、特に高用量・高頻度投与では吸収期オステオンの形成とハバース管の融合を誘導して皮質骨の多孔化を生じることが明らかになった。また、DH 群と WH 群では 1 週間あたりの投与量が等しいにもかかわらず、骨代謝回転へ与える影響が異なっていることが示された。さらに、本研究の解析手法は、AI 駆動型形態計測法と GIS による空間マッピングの方法を応用し、観察者バイアスを極力排除した、より客観的な形態計測法として有用であると考えられた。