

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21408

研究課題名(和文)チタン顆粒オステオライシスによるインプラント周囲骨吸収メカニズムの解析

研究課題名(英文) Peri-implant bone loss initiated by titanium particle Osteolysis

研究代表者

蓮池 聡 (HASUIKE, Akira)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60636413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲骨吸収メカニズムにおけるチタン顆粒の関与を検証した。まず、現在の科学的知見を把握し、質を評価した。結果、チタン顆粒の影響を論じた臨床的なエビデンスは皆無であることが示された。また、インプラント周囲炎に関するシステマティック・レビューによる報告の質は低いことが示された。次にラット上顎骨において、チタン顆粒をインプラント-アバットメント界面周囲に散布し、磨耗が生じたのと同様な状況を想定し、周囲骨の変化を解析した。その結果、チタン顆粒の影響によりインプラント周囲骨吸収が起こることが示された。培養細胞を用いたメカニズムの解析を試みたが、これを指し示す結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Effects of titanium granules in the peri-implant bone loss was examined in the present research. First, we overviewed the current scientific knowledge and evaluated the quality of reports. As a result, there was no clinical evidence discussing the influence of titanium granules. In addition, it was shown that the quality of reporting by systematic review on peri-implant inflammation is low. Next, in the rat maxilla, titanium granules were scattered around the implant-abutment interface, and the change of the surrounding bone was analyzed assuming the same situation as the wear occurred. As a result, it was shown that the effect of titanium granules causes peri-implant bone resorption. Though we tried to analyze the mechanism using cultured cells, but we could not obtain the result indicating this.

研究分野：歯科インプラント学

キーワード：インプラント周囲炎

## 1. 研究開始当初の背景

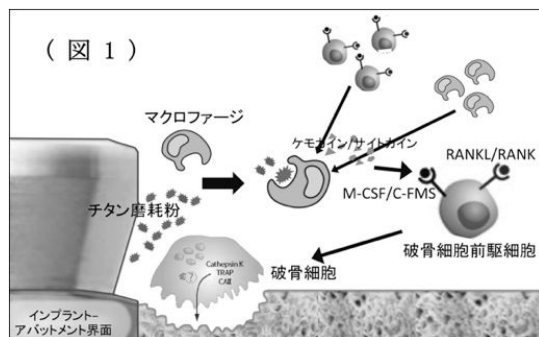
近年、歯科インプラント治療の価値は広く認知されるようになった。その半面、インプラント周囲骨吸収によって重大な問題に直面するケースが多く報告され、その予防法や対処法に注目が集まっている。インプラント周囲骨吸収に対するアプローチを考えるうえで、そのメカニズムを解明することは必要不可欠である。

本研究ではそのメカニズムとして整形外科領域で注目されている骨溶解現象(オステオライシス)に着目する。オステオライシスとは、人工関節置換術後に関節周囲骨が溶解し、人工関節の固定性が失われる現象である。その機序はチタンなどの人工関節材料の磨耗粉が宿主マクロファージに貪食され、生体異物反応を引き起こすこととされている。これまで、チタン顆粒に対するマクロファージの細胞性反応研究や人工関節摘出時に得られる肉芽組織・再生関節包を用いた検討が整形外科領域にて盛んに行われてきた。

歯科領域のインプラント周囲炎においては、歯周病同様な細菌感染が主にクローズアップされ、生体異物反応に関する検証はほとんど行われてこなかった。このことはチタンが不動態をまとい、高い生物学的安定性を有することに起因する。

しかしながら、「インプラント-アバットメント界面において、チタン磨耗粉が発生する。」(Stimmelmayer M et al. Dent Mater, 2012)、「インプラント周囲炎罹患軟組織においてチタン成分が高頻度で検出される。」(Wilson TG Jr et al. J Periodontol, 2015)といった報告が近年なされ、チタン磨耗粉に対する生体異物反応とインプラント周囲炎の関連が注目されてきている。磨耗により細かい顆粒状となったチタンがマクロファージの貪食を受け、オステオライシスを引き起こし、インプラント周囲骨吸収を惹起する可能性は高い(図1)。

以上のことから、インプラント周囲骨吸収メカニズムにおけるチタン顆粒の関与に関する研究を企図した。



(図1) 概念模式図

## 2. 研究の目的

(1) 本研究はインプラント周囲炎の病因因子

ならびにそれに対する治療法に関する新たな知見も導くものである。歯科インプラント治療の歴史は短く、インプラント周囲炎は2000年代になって注目されるようになった疾患である。現在得られている科学的知見を把握し、その質を評価する。特に臨床判断において高い重要性を有するシステムティック・レビューを俯瞰し、その報告の質を評価することを目的とする。

(2) インプラント周囲組織のチタン顆粒に対する反応を検証するため、ラット動物モデルを用いる。咀嚼・咬合により、インプラント-アバットメント界面にひずみが生じ、アバットメントとインプラント体が擦れ、チタン磨耗粉が生成される。しかしながら、ラット口腔内に埋入したインプラントにおいて、適正な咬合を付与することは不可能である。ゆえに、本研究では代替手段としてチタン顆粒をインプラント-アバットメント界面周囲に散布し、磨耗が生じたのと同様な状況を想定する。周囲骨の変化を解析することを目的とする。

(3) 動物モデルにおける現象面の評価に加え、細胞を用いて、分子生物学的にメカニズムの検証を行なう。培養細胞にチタン顆粒を滴下し、分子生物学的な変化を解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 現時点のインプラント周囲骨吸収に関するエビデンスの現状把握を行なうため、既存のシステムティック・レビューの網羅的検索および評価をおこなった。3種類の電子データベース(MEDLINE, EMBASE, Web of Science)を用いて網羅的検索をおこなった。インプラント周囲炎は比較的新しい疾患であるため、2010年以降に報告されたシステムティック・レビューのみを検索することとした。

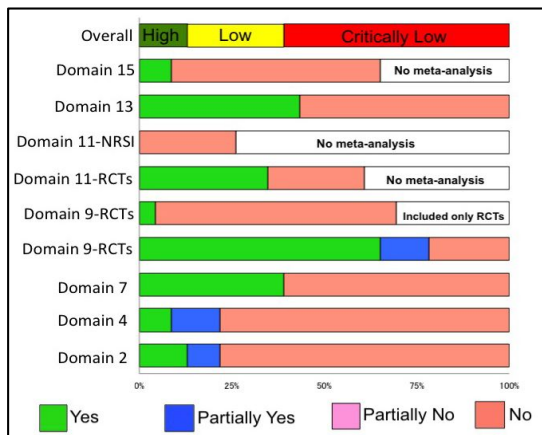
(2) Fischer ラットの上顎両側第一臼歯をヘモスタットモスキートを用いて抜去し、4週の抜歯窩治癒を待った後、ラット実験用インプラントを埋入する。ラットの上顎骨に用いるインプラントとして動物実験用極小インプラントシステム(JMR株式会社)を用いる。実験側ではインプラント周囲にチタン顆粒(TILOP45 $\mu$ m)を散布し、縫合する。インプラント埋入日を0日とし、1週おきに動物用マイクロCT(R<sub>m</sub>CT, 理学メカトロニクス, 東京)にて生きたままの状態を経時的に周囲骨の状態の観察を行なう。8週後に炭酸ガスによる安楽死を施行し、通常通りにパラフィン包埋切片とレジン埋切片を作製し、組織学的な観察を行い、動物用マイクロCT画像との比較検討を行った。本動物実験は日本大学歯学部動物実験委員会により実験計画が承認された(AP16D011)。

(3) 分子生化学的なメカニズムを解明を行

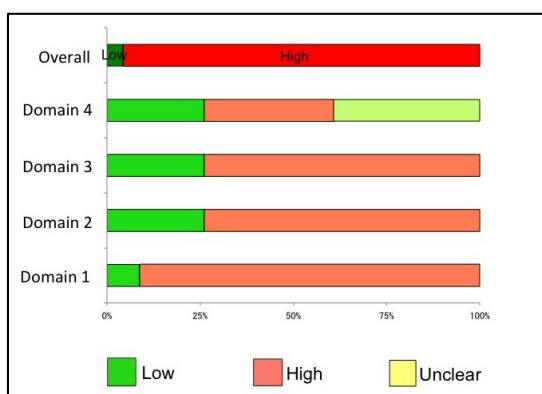
なうにあたり、口腔扁平上皮癌由来細胞を培養する。細胞は HSC-2, HSC-3, HSC-4 を用い、24 穴培養プレートに  $1 \times 10^5$  個培養し 培養液量を 1.0ml となるように調整する。細胞培養液においてチタン微小顆粒濃度が 0.1mg/ml となるように調整し、細胞に滴下後、IL-8 タンパクの発現を経時的に評価を行なう。

#### 4. 研究成果

(1) エビデンスの網羅的検索の結果、23 件のシステマティック・レビューが検索された。検索されたシステマティック・レビューにおいてチタン顆粒の影響やこれに対する治療法について記載されたものは見当たらなかった。また、これらのエビデンスの質評価を AMSTAR2 と ROBIS を用いておこなったところ、すべてのシステマティック・レビューの質は低いことが判明し、バイアスのリスクが高いことが判明した(図 2) (図 3)。



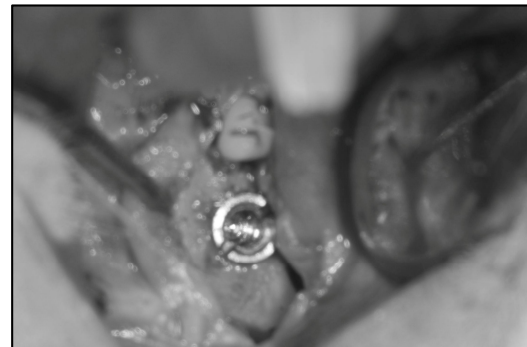
(図 2) AMSTAR2 評価結果



(図 3) ROBIS 評価結果

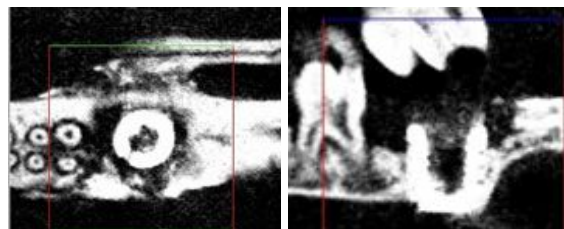
(2) チタン顆粒のインプラント周囲骨吸収への影響を動物実験モデルにおいて検証に先立ち、ラットの上顎骨における動物モデルの作成を行った。ラット上顎臼歯は小さく、根形態が複雑であるため、残根を生じることなく抜歯するのは非常に困難であった。比較的大きな個体を用い、探針およびヘモスタットモスキートを抜歯挺子および抜歯鉗子と

して用いることで抜歯を行なうことができた。4 週間の治癒を待った後、ラット実験用インプラントを治療部に埋入した。ラット上顎骨は骨高さ、骨幅ともに小さく、また用いたインプラントシステムはフィクスチャーや直径 1.5mm、長さ 2.0mm と極めて小さかった。埋入は非常に困難であり、インプラントを鼻腔に落とすリスクが非常に大きかった。インプラントスターティングドリルおよび専用ドリルを用いて浅めに埋入窩を形成し、手用ドリルにて埋入することで失敗が回避された。このような動物モデルの確立に初年度の半分以上が費やされた(図 4)。



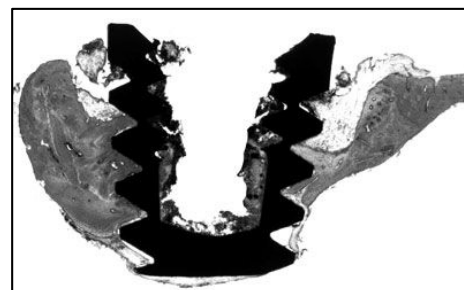
(図 4) ラット上顎インプラント埋入

ラット 10 頭において左右上顎第一臼歯部にインプラントが埋入された。術後、特に合併症などに問題は起きなかった。チタン顆粒を散布した側では術直後から 3 週後までマイクロ CT 像において、インプラント周囲にチタン顆粒による不透過像が確認された。術後 5 週頃からチタン顆粒散布側においてインプラント周囲骨吸収像が明瞭となった(図 5)。



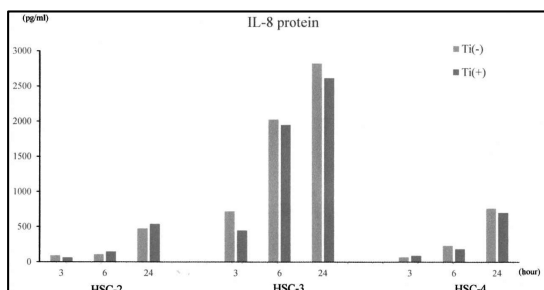
(図 5) 術後 6 週マイクロ CT 像

術後 8 週において組織切片を作成した。レジン切片においてはラット実験用インプラント辺縁骨吸収像が確認され(図 6)、パラフィン包埋切片においてはインプラントプラットフォーム周囲骨吸収部に炎症性細胞浸潤を確認した。



(図 6) 術後 8 週レジン切片像

(3) 3 時間後、6 時間、24 時間後、HSC-2、HSC-3、HSC-4 において IL-8 タンパク発現量はチタン滴下群、無滴下群で同様な傾向を示し、統計的有意差は確認されなかった(図 7)。ゆえに本実験の限りにおいて上皮細胞の役割は小さいと考えられる。異物貪食に関する単球・マクロファージに関する研究が行われるべきであろう。



(図 7) 上皮細胞における IL-8 の発現量

以上の研究より、「(1) 現時点においてインプラント周囲骨吸収に関して、チタン顆粒の影響を論じた臨床的なエビデンスは皆無であること。」、「(2) ラット動物モデルにおいてチタン顆粒の影響によりインプラント周囲骨吸収が起こること。」、「(3) このメカニズムとして上皮細胞が関与している可能性は低いこと。」の 3 点が示された。

#### 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 4 件)

Yamamoto T, Hasuike A, Koshi R, Ozawa Y, Ozaki M, Kubota T, Sato S. Influences of mechanical barrier permeability on guided bone augmentation in the rat calvarium. *Journal of Oral Sciences*. 2018 (in press). 査読有

Kubota T, Hasuike A, Naito M, Tsunori K, Min S, Sato S. Enhancement of Bone Augmentation in Osteoporotic Conditions by the Intermittent Parathyroid hormone: An Animal Study in the Calvarium of Ovariectomized Rat. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implant*. 2018 (in press) 査読有

Kubota T, Hasuike A, Tsukune N, Ozawa Y, Yamamoto T, Min S, Naito M, Sato S. Influence of estrogen deficiency on guided bone augmentation: investigation of rat calvarial model and osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *European Journal of Oral Sciences* 2018.

doi: 10.1111/eos.12415. 査読有

蓮池 聡, 萩原 芳幸. チタンは口腔上皮における DNA 損傷応答経路を活性化させる: パイロットスタディ. *Quintessence DENTAL Implantology*, 査読無、2018、25/ 2、132-135.

[学会発表](計 3 件)

蓮池 聡, 佐藤 秀一. 自家骨移植と吸収性コラーゲンメンブレンを用いて GTR 法を行なった一症例. 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 2017.

Hasuike A, Kubota T, Tsunori K, Naito M, Sato S. Effects of the Intermittent Administration of PTH on Guided Bone Augmentation in the Calvarium of Ovariectomized Rat. 27th annual scientific meeting of the european association for osseointegration, 2017.

Hasuike A, Kubota T, Nagashima H, Takanobu Y, Tsunori K, Sato S. Regenerative ability of augmented bone in rat calvarial guided bone augmentation mode. NATIONAL SYMPOSIUM OSTEOLOGY JAPAN. 2017.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮池 聡 (HASUIKE, Akira)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 60636413