

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19086

研究課題名(和文)インプラント周囲顎骨の形成・吸収を制御する骨細胞とローカルストレス閾値の解明

研究課題名(英文)Effect of local mechanical stress threshold on peri-implant osteocyte related to bone resorption and formation

研究代表者

豊嶋 悠輔 (Toyoshima, Yusuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60779065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、局所的な歪みがインプラント周囲の歯槽骨の骨細胞活性に及ぼす影響の検討である。我々は、荷重実験を行ったマウスから得た組織切片像と有限要素モデルから得た歪み分布図を重ね合わせ、歪み値と骨細胞活性を分析した。その結果、MARと同義である石灰化前線と蛍光ラベルの距離は、歪みが $100\mu$ 以上の領域ではそれ以下の領域より有意に大きく、大きな歪みが骨形成活性を局所的に増強することが示唆された。さらに、同様の方法で天然歯周囲の応力と骨の反応を分析した結果、骨形成活性を示すアリザリンラベル率の増減は引張り応力の増減と連動し、引張り応力が天然歯周囲の歯槽骨の骨形成活性を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント治療を行う際、埋入位置や上部構造の設計の違いが周囲の歯槽骨の応力・歪み分布に影響を及ぼすことが明らかとなっている。現在、咬合負荷時における患者個々の顎骨の応力・歪み分布はCTデータから算出できる。しかし、算出された応力・歪み値が局所のインプラント周囲の歯槽骨の骨吸収・骨形成に与える影響は不明であり、インプラント治療の診断と設計に応用することができなかった。本研究の結果は応力・歪み値をインプラント治療の診断に応用するための基盤的な情報を提供するものであり、術前の治療シミュレーションにより長期予後を見込めるようなインプラント治療を可能にし、多くの患者に恩恵をもたらすことができる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the effect of local stress and strain on bone cell activity of peri-implant bone. We analyzed the relationship between strain and osteocyte by overlaid strain distribution images obtained from finite element models and histology images obtained from mice. As a result, the distance between the calcified front and calcein label as a parameter representing the mineral apposition rate was significantly greater in the areas with strain intensity  $>100\mu$  than in the area with strain intensity  $<100\mu$ , suggesting that the bone formation activity was locally enhanced by a higher mechanical strain. We also analyzed the relationship between the local stress and bony cell activity around the alveolar bone proper. The result showed that the alizarin label ratio representing the bone formation activity was linked to the tensile stress, suggesting that the local tensile stress regulates the bone formation activity around the alveolar bone proper.

研究分野：生体力学

キーワード：機械的歪み 有限要素解析 骨細胞 歯槽骨 骨形態計測

## 1. 研究開始当初の背景

歯牙の欠損部補綴を考える上で、インプラント補綴治療は重要な選択肢の一つである。骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成からなる生理的な骨リモデリングにより、その形態と骨質を維持することが知られている。これは断続的な咬合圧のかかる口腔内環境においても、口腔内インプラントの長期維持に必要な不可欠なメカニズムであると考えられる。

咬合力に起因する機械的刺激が歯槽骨に負荷されると、歯槽骨には均一ではなく部位によって異なる大きさの引張り応力と圧縮応力が発生することが示されている。一方で、機械的刺激に対する骨の細胞の反応については、引張り荷重による骨芽細胞増殖の促進や、破骨細胞前駆細胞増殖の促進が報告されている。さらに先行研究から、マウスの上顎骨において局所の応力/歪みの大きさが破骨細胞数および骨形成に影響を与えることが報告されている。このように、機械的刺激によって生じる局所的な応力/歪みが歯槽骨の骨吸収と骨形成に密接に関連していることから、インプラント周囲の歯槽骨においても咬合力に起因する応力/歪みの影響を受けることが予想される。しかしインプラント周囲の歯槽骨において、局所的な応力/歪みが機械的刺激の伝達に関与する骨関連の細胞活性に及ぼす影響について、十分に解明されていない。さらに、インプラントおよび天然歯のそれぞれの周囲歯槽骨に対する両者の機械的刺激の伝達機能の違いも明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、インプラントを介してマウス顎骨に実験的荷重を付与するモデルを用いて、インプラント周囲の骨組織像と同一個体の応力/歪み分布図を重ね合わせることで、インプラント周囲の歯槽骨において局所の骨形成と骨吸収のスイッチを入れる応力/歪みの閾値を明らかにすることである。さらに同様の方法を用いて天然歯周囲の歯槽骨における応力/歪みと骨関連の細胞活性を調査し、インプラントおよび天然歯のそれぞれの周囲歯槽骨に対する両者の機械的刺激の伝達機能の違いを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1)インプラントに荷重を付与した実験

麻酔下にて4週齢の雄性マウス(C57BL6/J)の上顎左側第一臼歯を抜歯し、13週齢で抜歯窩にチタン製インプラント(直径0.8×長さ1.5mm)を埋入した。16週齢でマウスをランダムに4群に分け、インプラントに1日1回30分の荷重を7日間与えた。荷重量は0N、0.15N、0.3N、0.6Nとした。荷重4日目に有限要素モデルの構築のために *in vivo*  $\mu$ CT を撮影した。屠殺後マウス頭部の非脱灰研磨切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて組織観察を行った。一方、*in vivo*  $\mu$ CT データを STL データに変換後、不要な部分を除去して得た三次元モデルを有限要素解析ソフトウェアにインポートし、動物実験を模した固定条件および荷重を付与して有限要素解析を行った。歯槽骨モデル内部の相当歪みを算出し、組織断面の画像と一致する位置と角度の歪み分布図を得た。各個体の組織像と歪み分布図を重ね合わせ、歪みの大きさを0-20 $\mu$ 、20-60 $\mu$ 、60-100 $\mu$ 、100 $\mu$ 以上の4つのレベルの領域に分け、それぞれの歪みレベルにおける骨関連細胞の挙動を調べるため骨形態計測を行った。関心領域はインプラント周囲の頬側歯頸部の歯槽骨に設定した。計測項目は相当歪み、石灰化前線と蛍光色素カルセインとのラベリング間距離(Calcified Distance)、骨小腔数(N.of lacuna per bone area)および平均骨小腔面積(Average lacuna area)とした。なお、Calcified Distanceは石灰化速度(MAR)と同義である。

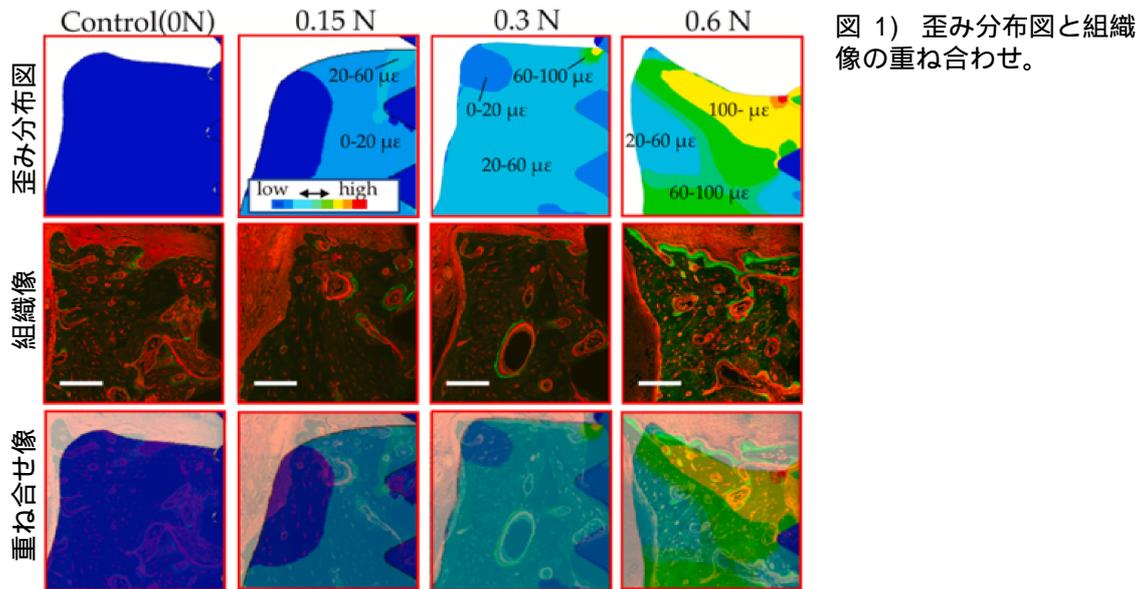
### (2)天然歯に荷重を付与した実験

実験的荷重以外の機械的刺激が上顎左側第一臼歯に加わることを防ぐために、麻酔下にて5週齢の雄性マウスの下顎左側第一、二臼歯を抜歯した。その後、13週齢マウスの上顎左側第一臼歯の近心窩に1日1回継続して30分間の荷重(0.9N)を8日または15日間与えたマウスと、荷重を与えないこと以外は荷重を与えたマウスと同様の処置を行ったマウスをコントロールとして用意した。すべてのマウスに対して、蛍光色素であるカルセインおよびアリザリンを安楽殺8日前および2日前にそれぞれ投与し、安楽殺5日前に *in vivo*  $\mu$ CT を撮影し、インプラントに荷重を付与した実験と同様の方法で各マウスの有限要素モデルを構築した。最終荷重翌日に安楽殺を行い、上顎左側第一臼歯の根分岐部から250 $\mu$ mの位置で咬合平面に平行な断面の組織切片を作成し、TRAP染色を行った。また、構築した有限要素モデルから最大主応力および最小主応力を算出し、組織断面の画像と一致する位置と角度の応力分布図を得た。組織像と応力分布図を重ね合わせ、口蓋根周囲に12点プロットし、2点間の各部位における応力分布と骨形態計測の結果を比較した。計測項目は最大および最小主応力、von Mises 応力、破骨細胞数、アリザリンラベル率(ALR)とした。ALRは口蓋根周囲に沈着したアリザリンラベルの長さを口蓋根周囲長で割り100分率として算出した値であり、荷重期間後期の骨形成活性を示す。

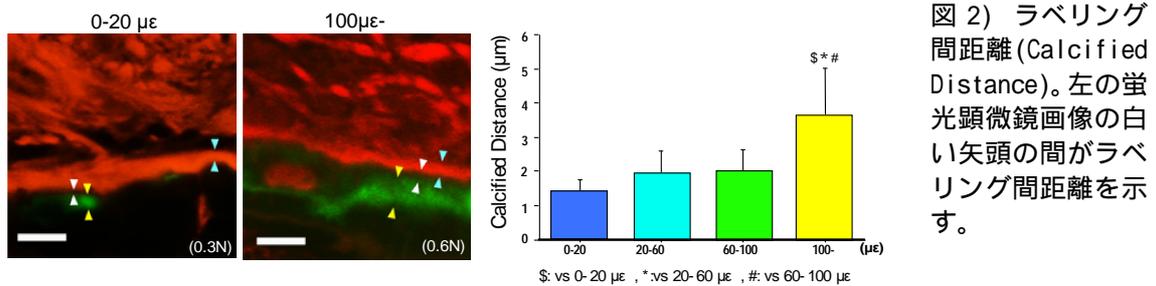
#### 4. 研究成果

##### (1) 相当歪みの大きさに対するインプラント周囲の歯槽骨における骨関連細胞の反応

荷重が大きくなるに従い、インプラント周囲の頬側歯頸部の歯槽骨に生じる相当歪みは大きくなり、特に 0.6N の荷重をかけた場合 100 $\mu$  以上の相当歪みが生じた(図 1)。



石灰化速度 (MAR) と同義である、石灰化前線と蛍光色素カルセインのラベリング間距離 (Calcified Distance) は、100 $\mu$  以上の歪み領域では他の 3 つの領域に比べて有意な高値を示した(図 2)ことから、骨芽細胞による骨形成活性は歪みの大きな箇所で局所的に活発となること が示された。



100 $\mu$  以上の歪み領域は、ほかの 3 つの領域に比べて骨小腔数(N.of lacuna per bone area)が増加した一方で、1 つあたりの骨小腔の大きさには歪みレベルによる変化はなかった(図 3)。これらの結果から、100 $\mu$  以上の歪み領域では、骨形成の促進により骨芽細胞から骨細胞となって骨へ埋め込まれる骨細胞数が増加したことが示唆された。

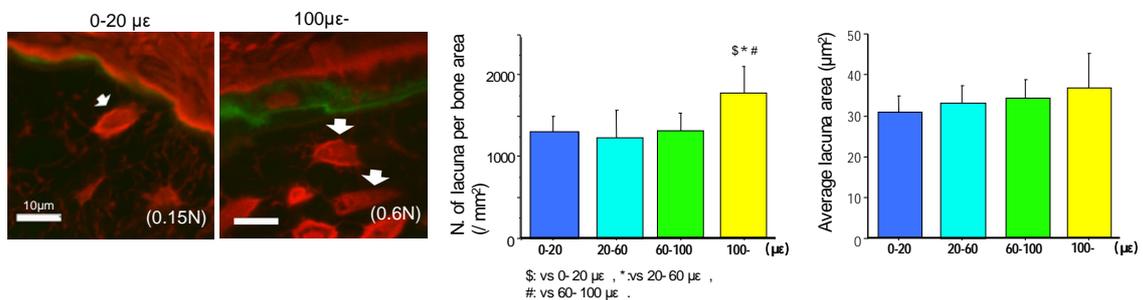


図 3) 骨小腔数(N.of lacuna per bone area)および平均骨小腔面積(Average lacuna area)。左の蛍光顕微鏡画像の白い矢印が骨小腔を示す。

(2) 引張りおよび圧縮応力に対する天然歯周囲の歯槽骨の反応

口蓋根周囲の von Mises 応力は、遠心部(点 2-4)と近心口蓋部(点 7-9)で高値を示し、口蓋部(点 5-7)で低値を示した(図 4)。

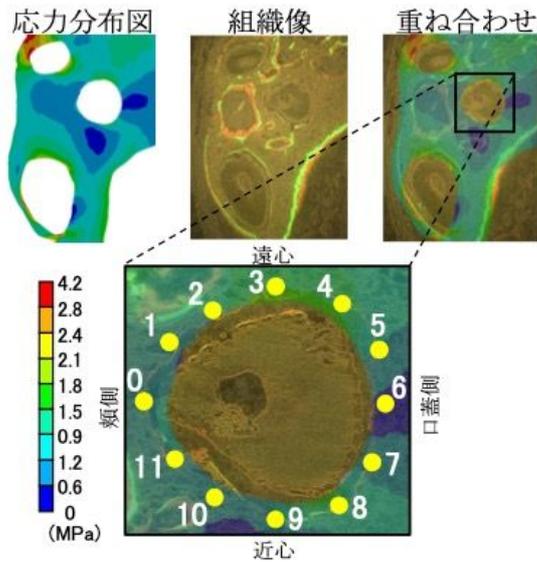


図 4) マウス上顎左側臼歯周囲の歯槽骨における応力分布図(von Mises 応力)と組織像の重ね合わせ図。口蓋根周囲に 12 点プロットした。

口蓋根周囲の歯槽骨各部位における主応力分布について、引張り応力は遠心部(点 2-4)および近心口蓋部(点 7-9)でピークを示し、圧縮応力は遠心口蓋部(点 3-6)部でピークを示した(図 5a)。破骨細胞数は、引張り応力のピーク部位を含む近心側で荷重群は非荷重群に比べ高値を示し、遠心部(点 2-4)においても有意差はないものの平均値は非荷重群に比べ荷重群で大きかった(図 5b)。骨形成活性を示すアリザリンラベル率(ALR)は、引張り応力のピーク部位である遠心部および近心口蓋部で荷重群の平均値は非荷重群に比べ高値を示し(図 5c)、荷重による ALR の増加比は引張り応力の増減とほぼ一致した(図 5a, オレンジ線)。これらの結果から、荷重によって生じた引張りおよび圧縮の応力は、局所の破骨細胞の出現および骨形成に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

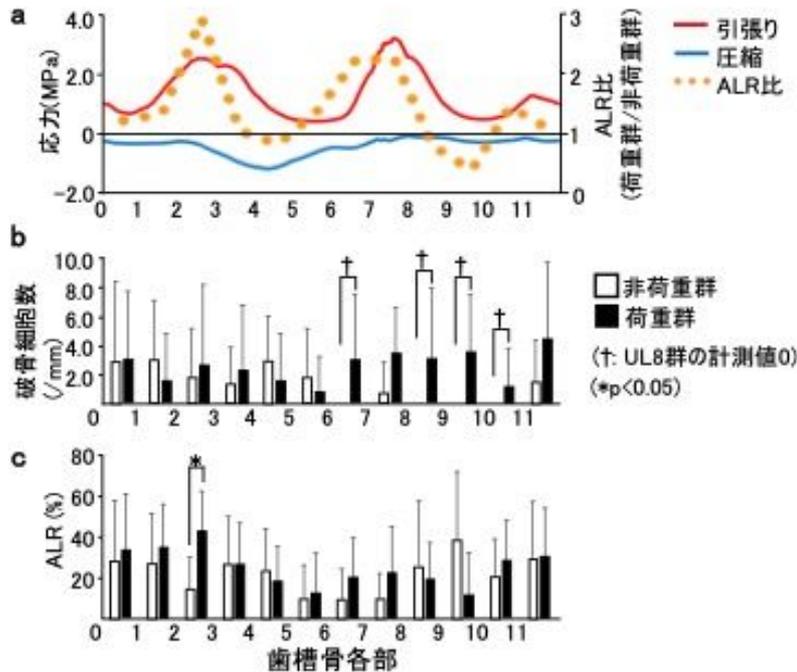


図 5) 口蓋根周囲の歯槽骨の各部位における主応力(a)、破骨細胞数(b)、アリザリンラベル率(ALR)(c)。横軸は歯槽骨各部位の位置(図 4 下図)を示す。

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 0件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Hitomi Matsuno, Bin Li, Hisami Okawara, Yusuke Toyoshima, Cangyou Xie, Masud Khan, Natsuko Murakami, Kazuhiro Aoki, Noriyuki Wakabayashi | 4. 巻<br>138     |
| 2. 論文標題<br>Effect of tension and compression on dynamic alveolar histomorphometry  | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jmbbm.2023.105666   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>H. Saito, T. Ueno, K. Isoshima, Y. Toyoshima, P. Chen, T. Hanawa, N. Wakabayashi.                        |
| 2. 発表標題<br>The change of surface charge by lithium ion coating increases osteoblastic cell activith on titanium .   |
| 3. 学会等名<br>8th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues 2019.12.15 Waikoloa beach, HI, USA |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松野 瞳, 李 彬, 大河原久実, 豊嶋悠輔, 村上奈津子, 若林則幸 |
| 2. 発表標題<br>歯槽骨の組織形態は局所の引張り・圧縮ストレスに制御される        |
| 3. 学会等名<br>令和4年度 公益社団法人日本補綴歯科学会 東京支部学術大会       |
| 4. 発表年<br>2022年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|