

平成 年 月 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791431  
 研究課題名 (和文) 抜歯窩壁の骨吸収抑制はオッセオインテグレーションを促進するか？  
 研究課題名 (英文) CAN THE SUPPRESSION OF BONE RESORPTION AT EXTRACTION SOCKET STIMULATE OSSEOINTEGRATION?  
 研究代表者  
 荻野 洋一郎 (OGINO YOICHIRO)  
 九州大学・大学病院・助教  
 研究者番号：50380431

研究成果の概要 (和文)：本研究は、インプラント埋入時の骨吸収抑制とオッセオインテグレーションの獲得との関連を検討することを目的としている。骨吸収抑制因子のInterleukin-1 Receptor抗体(IL-1RA)は、In vitroでは、濃度依存性に破骨細胞様細胞の形成を抑制した。動物実験では、ラット脛骨にインプラントを埋入したところ、IL-1RAの投与により骨形成の促進、皮質骨の肥厚などの効果が確認された。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of the present study was to evaluate the relationship between the suppression of bone resorption around the implant bone and osseointegration. As a bone resorption inhibitory factor, Interleukin-1 receptor antibody (IL-1RA) inhibited the formation of osteoclast like cells in a dose-dependent manner in vitro. In the animal study, IL-1RA stimulated the peri-implant bone formation and cortical bone thickness.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：再生医学、細胞・組織、歯学、動物

## 1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント治療の課題の一つとして治療期間の短縮が挙げられる。この課題に対

する取り組みとして抜歯後即時にインプラントを埋入する方法が挙げられるが、抜歯による外科的侵襲や歯の喪失による廃用委縮

によって骨吸収が引き起こされる。これにより、オッセオインテグレーションの達成がままならないことも臨床では時に見受けられる。また、通法に従った埋入でも、菲薄な骨はその形態を維持することができず、骨吸収を引き起こすこともある。また、抜歯即時インプラントの多くの症例に認められるのが、インプラントと周囲骨との間にギャップ（図1）が生じることであり、このギャップと菲薄な骨が骨吸収の要因となることも考えられる。

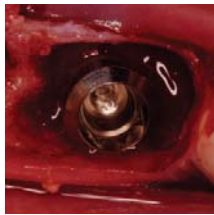


図1 抜歯即時埋入時のギャップ

これらのインプラント埋入術の失敗が、インプラント周囲骨の吸収によって引き起こされるのであれば、この骨吸収を抑制することが、前述の失敗の抑制、回避に寄与できるのではないかと考えた。また、近年、成長因子に代表されるリコンビナントタンパクが医科、歯科の領域において臨床応用されるようになってきた。歯科で臨床応用されているタンパクは、骨形成促進作用を有するものがほとんどであり、これまで、骨吸収抑制作用のタンパクの応用はされておらず、骨吸収抑制の観点からオッセオインテグレーションに関する検討もこれまで報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、抜歯窩を模倣したインプラント周囲と周囲骨との間にギャップを形成したラット脛骨モデルを用いて、骨吸収抑制作用を有するリコンビナントタンパクを応用し、オッセオインテグレーションをはじめとするインプラント周囲骨の変化について、組織学的に評価を行うこととした。これにより、骨吸収抑制作用を有したリコンビナントタンパクの応用が、抜歯即時埋入のようなモデ

ル（インプラントと周囲骨との間にギャップが存在）に有効か否かを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 骨吸収抑制リコンビナントタンパク  
本研究では、骨吸収抑制リコンビナントタンパク質として、interleukin-1 receptor antibody (IL-1 RA, R&D System) を用いた。

(2) IL-1 RA の骨吸収抑制作用の検討  
本研究では、骨吸収抑制作用を有するものを破骨細胞の形成抑制因子として考えた。IL-1 RA の骨吸収抑制作用を検討するために、ラット骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系へ添加し、破骨細胞様細胞の形成に対する効果について、in vitro で検討を行った。

4週齢の Sprague-Dawley (SD) ラットのオスの脛骨より骨髄細胞を採取し、遠心分離後、細胞数を  $2.0 \times 10^6$  cells/ml として、15% ウシ胎児血清 (FBS, GIBCO)、 $10^{-8}$ M ビタミン D3 を含んだ  $\alpha$  MEM で24穴の細胞培養プレートで5日間培養した。なお、培養3日目に同様の成分を含む培地交換を行った。この培養における実験群は IL-1RA 1mg/ml を0.5、5.0、10、20  $\mu$ l、それぞれを各ウェルに添加したものであり、IL-1 RA を添加していないものをコントロール群とした。

破骨細胞様細胞の同定は、培養後に酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色 (TRAP 染色用キット、SIGMA) を行い、TRAP 陽性で3核以上を有する細胞

(TRAP 陽性多核細胞)

(図2) とした。

同細胞数を顕微鏡下にてカウントし、各群の比較を行った。

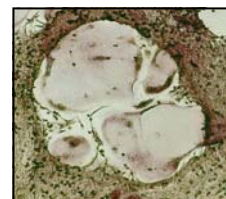


図2 破骨細胞様細胞

(3) ラット脛骨モデルでの組織学的検討  
 抜歯即時埋入時に起こりうるインプラント  
 と周囲骨との間にギャップを生じさせるモ  
 デルには、ラットの脛骨を用いた。SD ラット  
 の 10 週齢のオスを全身麻酔下で脛骨の内側  
 を露出させ、同部位に直径 1mm、長さ 5mm の  
 チタン製のインプラントを埋入した。埋入に  
 当たり、骨幹に約 3mm の骨欠損 (図 3) を作  
 製した。これにより、インプラント周囲に骨  
 欠損を生じ、周囲骨とのギャップが生じてい  
 る。実験群には、1mg/ml の IL-1 RA を含んだ  
 メチルセルロースゲルをインプラント周囲  
 に注入し、何も注入しない群をコントロール  
 群とした。インプラント埋入後は、4-0 の絹  
 糸で縫合した。



図 3 インプラント埋入時の図と写真

2 週間の治癒期間を待って、ラットを安楽死  
 させ、通法に従い、研磨標本を作製、トルイ  
 ジンブルー染色を行い、観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) IL-1 RA による破骨細胞様細胞の形成抑制作用

ラット骨髄細胞を用いた破骨細胞様細胞の  
 拡大写真を図 4 に示す。コントロール群では  
 TRAP 陽性多核細胞が多数形成されている  
 のに対し (図 4-1)、IL-1 RA の添加した実験  
 群では、その形成が抑制されている傾向が認  
 められた (図 4-2)。また、この抑制は、濃度  
 依存性である傾向が認められた。また、この  
 TRAP 陽性多核細胞の数をカウントした結果  
 を図 4-3 に示す。IL-1 RA を添加した実験群  
 4 群のうち、3 群において添加していないコ  
 ントロール群と比較して有意な抑制が認め  
 ら

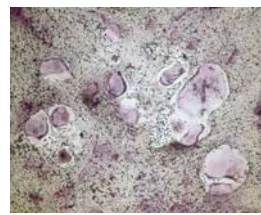


図 4-1

ラット骨髄細胞よ  
 り形成された TRAP  
 陽性多核細胞  
 (コントロール群)

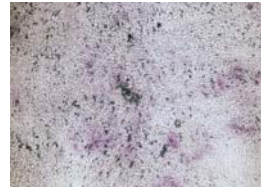


図 4-2

ラット骨髄細胞に  
 IL-1 RA を添加した  
 実験群

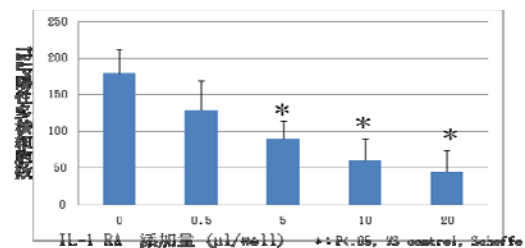


図 4-3

ラット骨髄細胞より形成された TRAP 陽性多  
 核細胞数の比較。0 μl : コントロール群、  
 ANOVA、Scheffe

骨髄細胞を用いた培養系においても、内因性  
 の IL-1 が破骨細胞様細胞の形成 (TRAP 陽性  
 や多核化) に関与していることが示された。  
 また、この IL-1 の作用を抑制することによ  
 り破骨細胞の形成を抑制することが考えら  
 れ、これが骨吸収抑制にかかわっていること  
 が示唆された。

本研究の結果を過去の報告と比較してみ  
 ると、Lee ら (Bone 2006) の報告でも破骨細胞  
 前駆細胞に RANKL と M-CSF を添加した培養系  
 で IL-1 RA を添加したところ、同様の結果を  
 示している。また、この内因性の IL-1 の発  
 現は RANKL の濃度に依存し、また、日数を追  
 うごとにその濃度は高くなっていることか  
 ら、破骨細胞前駆細胞自体が分泌しているこ  
 と、また、RANKL 刺激によってこれが促進さ  
 れていることが示されている。今回の実験系  
 では、IL-1 を産生している細胞を多く含む全

骨髓細胞の培養系であり、IL-1 RA の破骨細胞様細胞の形成に対しての効果が明確に示されたと考えた。

以上より、IL-1 RA は破骨細胞の形成を抑制すると考えられるため、骨吸収抑制に関与できる可能性を示唆した。

## (2) ラット脛骨におけるインプラント周囲のギャップへの IL-1 RA 投与の効果

ラット脛骨に埋入されたインプラントの周囲に作製されたギャップの肉眼的所見を図 5 に示す。IL-1 RA を添加していないコントロール群において、インプラント周囲のギャップのうち、完全に消失していた群とギャップが残存している群の双方が認められた。これに対し、IL-1 RA を投与した群では、すべての被験体においてギャップは消失していた。

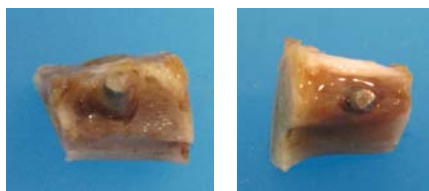


図 5 ラット脛骨に埋入されたインプラントの 2 週間後の写真。

左側：コントロール群。インプラント周囲にギャップが残存している。

右側：実験群。インプラント周囲に骨形成が認められる。

同部位の組織標本を作製し、トルイジンブルーで染色した結果を図 6 に示す。

コントロール群では、ギャップが消失していない部分を標本として示すが、ギャップを作製した部分の皮質骨の連続性が断裂している部分が認められた (図 6-1)。これに対し、IL-1 RA 投与群では、インプラント周囲のギャップは消失していた。また、ギャップ (骨欠損) を作製した、すなわち、IL-1 RA を投与した部における皮質骨の厚みは厚くなっ

ていた。(図 6-2)

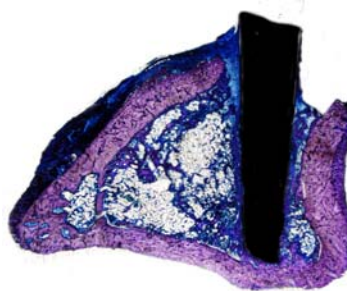


図 6-1 コントロール群のトルイジンブルー染色。

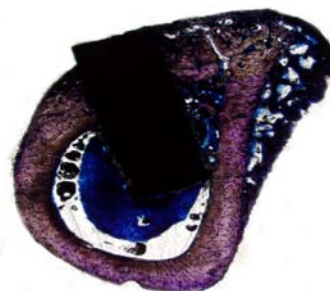


図 6-2 実験群 (IL-1 RA 投与群) のトルイジンブルー染色。

骨髓内に埋められたインプラント周囲の骨形成においては両群において明らかな差は認められなかった。これは、外科処置 (インプラント埋入) に伴う反応性の骨形成でもあり、双方に差が認められなかったとかがえられた。

今回の研究結果を踏まえると、IL-1 は骨吸収を促進する因子 (破骨細胞形成促進因子) として、周知されているが、この作用を抑制する IL-1 RA を添加することで、骨吸収を抑制し、骨形成を一部、促進する可能性が示された。しかし、骨吸収を抑制しやすい条件 (薄い骨壁) における検討としては不十分であり、また、IL-1 RA の添加により骨形成が促進されるかどうか、すなわち、骨吸収抑制が骨形成促進につながるのか否か、さらに細胞レベルでの検討と分子生物学的アプローチが必要であると考えられた。

また、今回、上記の骨吸収が起りやすい状況を模倣するために、イヌ（ビーグル犬）を用いた実験系も行ったが、これまで当研究室で行ってきたイヌの実験系とは異なったインプラント（Replace Tapered® NP 10mm、Nobel Biocore 社製）を用いたこと、また、下顎の臼歯を抜歯し、即時埋入をおこなったが、上顎の抜歯を行わずに経過を見ていたため、即時負荷の状態となり、オッセオインテグレーションの獲得ができなかった被験体が多くみられたことより、本実験での評価は困難であったことを書き加えておく。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荻野 洋一郎 (OGINO YOICHIRO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50380431