

機関番号：32667

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791935

研究課題名（和文） インプラント-骨界面の生物学的安定性の検証

研究課題名（英文） A histological investigation of biological stability of the bone surrounding a titanium implant

研究代表者

羽下 麻衣子 (HAGA MAIKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号：60535219

研究成果の概要（和文）：歯科インプラントの成功は周囲骨質と密接に関わり、その骨基質の維持・調節には骨細胞の関与が知られている。本研究では、ラット上顎骨に植立したインプラント周囲骨の骨改造と骨細胞に着目して、組織化学的検索を行い、周囲骨は一時的に活発な骨改造を受けるが、経時的に緻密骨へと置換されることで、骨細胞の配列・機能も回復することを明らかとした。インプラント周囲骨細胞の配列と機能は、インプラント周囲骨の機能維持に重要であると推測された。

研究成果の概要（英文）：The osteocytic function appears to be associated with bone remodeling. We have already reported histological aspects of bone remodeling around implants, which showed a chronological replacement of damaged immature bone into compact one. Based on these previous reports, this study aimed to examine histological alternation of osteocytes around implants during bone remodeling by using rats as model animals. The bone remodeling gradually replaced the irregular distribution of osteocytes in the immature bone at the early stage into the regular arrangement in the compact bone by 3 months after implantation. The results of this study on osteocytes and their molecules indicate that osteocytes would serve as a local regulator of bone remodeling around implants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：インプラント，骨結合，細胞・組織，歯学

1. 研究開始当初の背景

欠損補綴の選択肢として歯科インプラントは不可欠となっている。しかしながら、臨床的に理想の結合様式とされている“Osseointegration（骨結合）”獲得後の生体反応には不明な点が残されているため、研

究代表者は本研究開始以前から、インプラント周囲骨の長期的検索を行っている。これまで、窩洞形成により変性した骨細胞を含む骨（傷害を受けた骨）の骨結合後の動態に着目し、インプラント植立16ヶ月後まで観察した結果、骨結合獲得後も存在していた傷害を

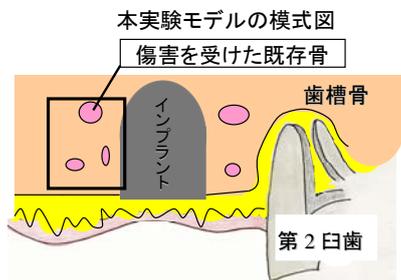
受けた既存骨は完全に消失し、さらに恒常的に行われる骨改造によって、インプラント周囲骨は緻密化・成熟化が進行していくことを明らかにした (Haga et al., 2009)。本研究において、周囲骨の骨細胞の変化を観察することで、これまで我々が明らかにしたインプラント周囲骨の長期的変化に新たな意義を加えることが可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インプラント-骨界面の生物学的安定性を、免疫組織化学的手法などにより、傷害を受けた骨が残存している骨結合後まで、詳細に検証することである。

3. 研究の方法

実験モデル (下図) を以下のように作製した。



(1) 4週齢雄性ウイスター系ラットの上顎第1臼歯を抜歯 (2) 4週後 (抜歯窩治癒)、エンジンリーマー#90 (φ0.9 mm)、ピーソリーマー#3 (φ1.1 mm) にて窩洞形成 (3) インプラント (φ1.1 mm の純チタン棒を長さ約2-3 mmに切断、加工したもの) 埋入 (4) 植立3日後 (D) -16ヶ月後 (M)、灌流固定し、脱灰後、切片作製 (一部非脱灰試料)

骨質 (骨細胞) の観察: パラフィン切片を用いて、H-E染色、Dentin Matrix Protein-1 (DMP1) に対する免疫染色および鍍銀染色 (Bodian染色) を行い、骨細胞とその分布、骨小腔・骨細管の局在を可視化した。Sclerostin、Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) に対する免疫染色による骨細胞の観察も行った。加えて、パラフィン切片にTUNEL染色し、骨細胞のアポトーシスを観察した。

骨質変化の観察: これまでの研究代表者による骨質変化に関する所見を裏付けるため、パラフィン切片にアザン染色、骨基質タンパク (Osteopontin・Bone Sialoprotein・Osteocalcin・Osteonectin・Type III Collagen・Type I Collagen) に対する免疫染色を施し、観察した。さらに、樹脂包埋した非脱灰試料に対するEPMAによる骨元素マッピング (Ca・P・Mg) を分析し、ミネラル濃度変化を確認した。

リモデリングの観察: パラフィン切片を用いて、アルカリフォスファターゼ (ALP)・酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 2重染色を行い、陽性細胞数を経時的に比較した。さらに、非脱灰凍結試料を用い、骨ラベリングによる骨形成ラインを観察した。

ストレス反応の観察: パラフィン切片を用いて、熱ストレスなどにより誘発されるHeat Shock Protein 27 (HSP27) に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 主な成果

骨質 (骨細胞) の観察:

植立1ヶ月後以前のインプラント周囲骨では、窩洞形成により傷害を受け、骨細胞が失われた空の骨小腔が存在した (図1a: 矢頭) が、傷害を受けた骨は経時的に減少し、最終的に3ヶ月後以降には認められなくなった (図1b)。また、インプラント周囲骨中の傷害を受けた部位や幼若な新生骨は骨細胞や骨細管の配列が不規則であった (図1a) が、傷害を受けた骨が新生骨に置換し緻密化してくると、骨細胞の配列は規則的になった (図1b)。また、植立5日後のインプラント周囲骨では、インプラント-骨界面および周囲骨内部の一部の骨細胞にTUNEL陽性反応がみられた (論文①)。

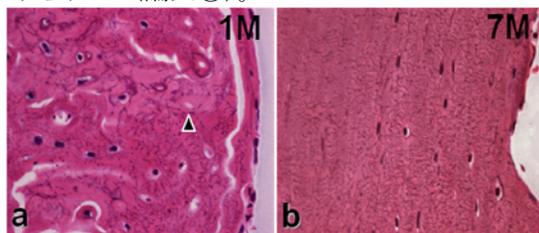


図1. インプラント周囲骨の鍍銀染色像 (論文①から改編、右: インプラント側)

DMP1の反応は全段階で、インプラント周囲骨全体の骨細胞、骨小腔に認められたのに対し、Sclerostinに対しては植立10日後までは弱い反応であり (図2a)、20日後から2ヶ月後において強陽性反応を示した (図2b, c)。植立2.5ヶ月後 Sclerostinの反応は落ち着き (図2d)、以降は弱い反応となった。

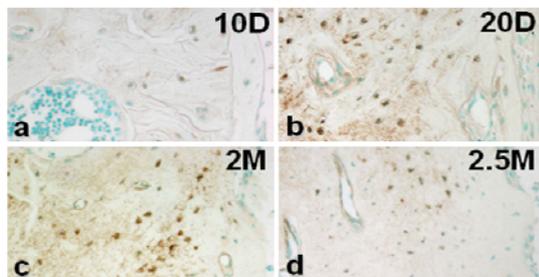


図2. インプラント周囲骨のSclerostinに対する免疫染色像 (論文①から改編、右: インプラント側)

一方、傷害を受けた骨や幼若な新生骨と思われる比較的不規則な配列をした骨細胞での FGF23 陽性反応は弱かったが、規則的な配列をする骨細胞では強い反応がみられた (論文①)。

骨質変化の観察：

植立 5 日後から 2 ヶ月後までのインプラント周囲骨において、一部の骨細胞の消失や核濃縮が認められた (図 3a：矢頭)。また、植立 10 日後から 1 ヶ月後までの植立後早期段階のインプラント周囲骨では、線維成分を多く含んだ新生骨 (図 3a：矢印) が存在していたが、骨細胞の変化した傷害を受けた骨の減少とともに、骨基質は組織学的に線維性骨から骨細胞の配列が規則的な緻密骨に置換され、傷害を受けた骨が消失した後のインプラント植立 3 ヶ月後以降の周囲骨は線維性骨がほとんど認められず、緻密骨の様相を呈していた (図 3b)。

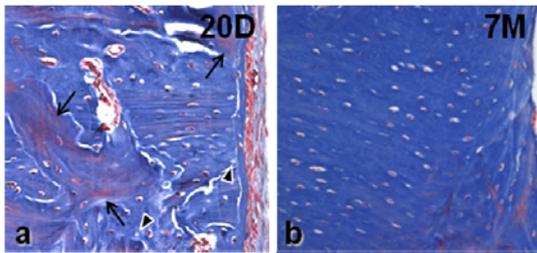


図 3. インプラント周囲骨のアザン染色像 (論文①から改編、右：インプラント側)

また、植立 20 日後のインプラント周囲骨は、すべての骨基質タンパクに対して、強い免疫陽性反応を示していたが、植立 3 ヶ月後では、20 日後と比較し、全ての染色において、その免疫陽性反応は減弱していた。

インプラント周囲骨の Mg は顕著な変化は認められなかったが、Ca、P は段階的に上昇した。植立 1 ヶ月後のインプラント周囲骨 (特に傷害を受けたと思われる部位と幼若な新生骨) の Ca、P は既存骨と比較して低くなっていたが、2.5 ヶ月後では傷害を受けた骨は減少し、新生骨と既存骨はほぼ均一な濃度となった。Ca、P ともにその後、さらに濃度が上昇した。

全段階において、インプラント周囲に 2 本の明瞭なカルセイン標識が観察され、恒常的な骨改造の進行が確認できた (図 4)。

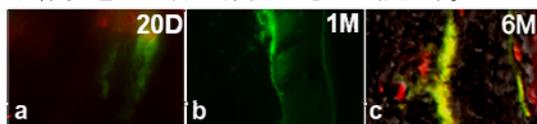


図 4. カルセインによるインプラント周囲骨ラベリング像 (右：インプラント側)

植立 5 日後のインプラント周囲骨では、多数の TRAP 陽性破骨細胞が認められた。また、植立 10、20 日後には多くの立方体を呈する ALP 陽性骨芽細胞が存在した。植立 1 ヶ月後まで ALP 陽性骨芽細胞と TRAP 陽性破骨細胞は多数新生骨付近に近接して並んでおり、両細胞による活発な骨改造の誘導が窺われたが、これらの細胞は毛細血管の減少とともに経時的に減少していた。植立 3 ヶ月後以降は、骨髓腔にのみわずかに認められるようになった (論文①)。グラフに示す様に両陽性細胞数の変化は光学顕微鏡の所見を裏付けていた (図 5)。

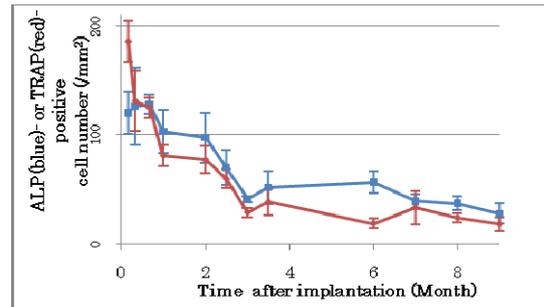
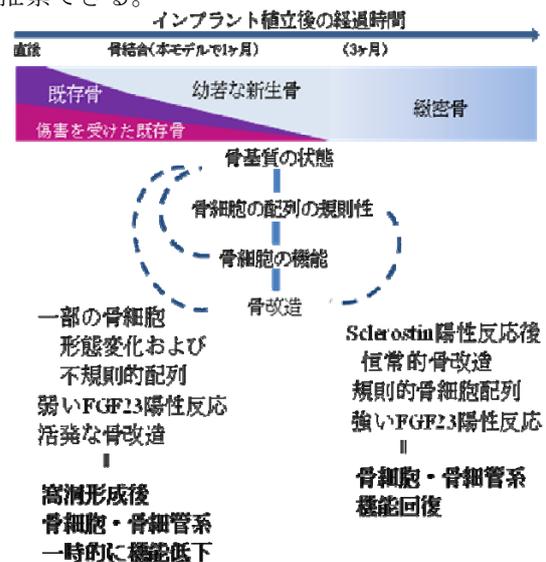


図 5. インプラント周囲骨の ALP 陽性骨芽細胞数と TRAP 陽性破骨細胞数の変化 (論文①から引用)

ストレス反応の観察：

本研究において、HSP27 に対する免疫染色で、強陽性反応は認められなかった。

以上より、インプラント周囲の骨は一時的に活発な骨改造を受けた後、緻密骨へと置換され、骨細胞の配列および機能も回復することが示唆された。インプラント周囲骨における骨細胞の配列と機能には深い関連があり、骨細胞・骨細管系の幾何学的構築がインプラント周囲骨の機能維持に重要であることが推察できる。



(2) 本研究の位置付けと今後の展望

本研究結果は傷害を受けた骨を含む骨結合獲得時の周囲骨が完全な生物学的安定状態とは言い切れないことを示しており、これまで研究代表者が明らかにしたインプラント周囲骨の長期的変化に新たな意義を加えた。インプラントへの負荷や、サポートセラピーの視点からも大変有用な情報であると考えられる。

本実験モデルでの結果を臨床に単純に当てはめることはできないが、ヒトにおいても骨が成熟するためには、かなり長い期間が必要ということが推測できる。この結果を治療計画に生かすことで、更なる長期予後獲得につながられると期待している。また、骨窩洞形成を伴う他分野などにも参考になると考えている。

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1件)

- ① Maiko Haga, Kayoko Nozawa-Inoue, Minqi Li, Kimimitsu Oda, Sumio Yoshie, Norio Amizuka, Takeyasu Maeda : A morphological analysis on the osteocytic lacunar canalicular system in bone surrounding dental implants, The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 査読有, 印刷中, 2011.

[学会発表] (計6件)

- ① 羽下麻衣子, 野澤-井上佳世子, 李敏啓, 吉江紀夫, 網塚憲生, 前田健康 : Histological alternation of osteocytes around dental implants, 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 2011年3月29日予定であったが、震災により Journal of Physiological Sciences誌による誌上開催に変更。
- ② Maiko Haga, Kayoko Nozawa-Inoue, Minqi Li, Sumio Yoshie, Norio Amizuka, Takeyasu Maeda: Long-term response of the bone to the titanium implant in the rat maxilla. The 6th Congress of the Asian Academy of Osseointegration, 2010年11月13-14日, Seoul, Republic of Korea.
- ③ 羽下麻衣子, 野澤-井上佳世子, 李敏啓, 吉江紀夫, 網塚憲生, 前田健康 : 歯科インプラント周囲における骨細胞・骨細管系の組織化学的变化, 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2010年9月21日, タワーホール船堀, 船堀。

- ④ 羽下麻衣子, 李敏啓, 吉江紀夫 : 歯科インプラント周囲骨の骨改造と骨細胞における組織化学的検索, 第28回日本骨代謝学会学術集会, 2010年7月21-23日, 京王プラザホテル, 東京。

- ⑤ Maiko Haga, Kayoko Nozawa-Inoue, Sumio Yoshie, Takeyasu Maeda : Property of Injured Bone around Implants Caused by Cavity Preparation, 88th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research, 2010年7月16日, Barcelona, Spain.

- ⑥ 羽下麻衣子, 野澤-井上佳世子, 吉江紀夫, 前田健康 : 骨窩洞形成により傷害を受けた骨の性質, 2010年3月30日, 第115回日本解剖学会総会・全国学術大会, 岩手県民会館, 岩手。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽下 麻衣子 (HAGA MAIKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号 : 60535219