

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792221

研究課題名(和文) インプラント 骨界面に発現する細胞外蛋白の三次元的局在と機能解析

研究課題名(英文) An expression style of the protein out of cell and three-dimensional analysis in the implant bone interface

研究代表者

玉田 宜之 (TAMADA, YOSHIYUKI)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：90509499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント治療には、オッセオインテグレーションの形成が望ましいとされてきた。本研究では種々の細胞外蛋白の結合によりオッセオインテグレーションの機械的特性の低下を防止しているという仮説を立て、これについて検討することを目的とした。インプラントを回転させる時期によっては、トルク値および骨接触率が上昇したことから、必ずしもオッセオインテグレーション獲得の過程でインプラントの回転が生じたとしても悪影響があるわけではなく、オッセオインテグレーション獲得を促進もしくは強化できる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：For implant treatment, it was said to be desirable the formation of osseointegration.

The aim of this study is to evaluate the bond of the protein out of various kinds of cells prevents the fall of the mechanical characteristic of osseointegration. Torque value and the bonesetting most moving passage rate rose when they turned an implant in a certain time. Even if the turn of the implant occurred by a process of the integration acquisition, it may promote or reinforce the osseointegration.

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：歯科補綴学一般 冠橋義歯補綴学

1. 研究開始当初の背景

インプラント - 骨界面においては、インプラント体が中間組織を介在することなく骨組織と直接結合するオッセオインテグレーションの形成が望ましいとされてきた。しかし、電顕的観察ではチタンと骨組織との間には約 50nm の無定形構造層の存在が観察されているとともに、オステオカルシン、オステオポンチンあるいはオステオネクチンなどの細胞外蛋白による結合が存在すると考えられている (Lingstgarten et al., J Dental Res 71: 364-371, 1992)。すなわち、この無定形構造層では、チタン表面に存在する酸化チタンの酸素分子がカルシウムと細胞外蛋白を介して骨組織と結合すると考えられている。また、その際、骨芽細胞の存在下ではインテグリンを介してあるいは骨芽細胞が存在しない場合にはインテグリンを介さず骨組織と直接結合していると推察されている。

細胞外蛋白は骨芽細胞の分化の過程で産出されるものであり、前駆細胞の段階より型コラーゲン、アルカリフォスファターゼあるいはオステオネクチンが産生され、幼弱骨芽細胞まで分化するとオステオポンチンを産生し始め、その後成熟細胞に分化する過程で骨シアロタンパク、オステオカルシンが産出される (Komori, Bone 12: 49-59, 1998)。これらのうちのインプラントと骨組織の接着に関与していると考えられているオステオネクチン、オステオポンチンおよびオステオカルシンなどの細胞外蛋白に着目し、その細胞外蛋白の発現様式と骨接触率との関連性、あるいはインプラント - 骨界面における細胞外蛋白の発現の局在性に関する部位特異性および細胞外蛋白の発現時期について検討を加える必要があると考えた。

2. 研究の目的

インプラント治療において、オッセオインテグレーションの獲得には不可欠とされてきた治癒期間も症例によっては即時・早期負荷を適用することが可能となり、その治療期間の短縮が可能となってきた。しかしながら、上部構造装着後に生じるネック部の骨吸収のみならず、オーバーロードに起因すると思われる骨吸収に対しては咬合調整によるアプローチが行われているのみである。一方、ラットの脛骨を対象として埋入したインプラント体に負荷を加えた場合、骨接触率はその負荷に対する時期依存性を示すものの、オッセオインテグレーションの機械的特性は影響を受けないとの予備実験の結果から、本研究では骨接触率の低下に対してオステオポンチン、オステオカルシン、オステオネクチンなどの細胞外蛋白による結合が発現・増強し、これによりオッセオインテグレーションの機械的特性の低下を防止しているという仮説を立て、これについて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

ラットの脛骨を対象としてインプラント体を埋入し、そのインプラント体に即時あるいは早期負荷を想定したメカニカルストレスを加え、これによってオッセオインテグレーションの機械的特性あるいは骨接触率が影響を受けるかどうかについて検討を加える。また、骨接触率の低下をオステオポンチン、オステオカルシン、オステオネクチンなどの細胞外蛋白による結合がオッセオインテグレーションの機械的特性の低下を補正しているという仮説を検討するための組織切片の作成を行う予定である。

(1) 実験動物

実験動物には15週齢のWistar系雄性ラット (210匹) を用い、これらをインプラント体に負荷するメカニカルストレスの時期によって7実験群に分ける。なお、インプラント体は

両側の脛骨を対象部位として埋入する。

(2) インプラント体の埋入

インプラントには既製のチタンポスト(RTP post titanium® Dentech)を用い、その埋入部位は左右の脛骨近心側1/4の部位とし、外科用エンジンを用いて、ツイストドリルを使用し、直径約1.7mmの埋入窩を4の生理食塩水による注水下において行う。

(3) メカニカルストレスの負荷

実験動物の両側の脛骨に埋入したインプラント体に即時・早期負荷を想定したメカニカルストレスを負荷する。負荷時期はインプラント体埋入直後およびその2, 4, 8, 12および20週後とし、その時期にIvanoffらの方法を応用して右側に埋入したインプラントを対象として、メカニカルストレスを負荷するとともにオッセオインテグレーションの定量的評価を行う。なお、実験群のうちの1群はメカニカルストレスを負荷せずに対照群とする。

(4) オッセオインテグレーションの機械的特性の評価

インプラント体埋入およびメカニカルストレス負荷終了後の2, 4, 8, 12および20週後の観察期間にリバーストルクテストを用いてオッセオインテグレーションの機械的特性の評価をトルクゲージを用いて行う。

(5) 標本の作製

各設定時期に脛骨に埋入したインプラント体をその周囲骨とともに摘出する。連続非脱灰研磨標本および脱灰標本作製する。

(6) 骨接触率の計測

連続非脱灰研磨標本を対象として通法に従って画像解析ソフトを用いて骨接触率を計測する。

(7) 免疫染色ならびにin situ hybridization

細胞外蛋白の局在の検索のために、作成した連続脱灰標本を対象として、in situ hybridization法と免疫染色を行う。なお免疫

染色についてはPAP法とABC法の両者を行う。

(8) 細胞外蛋白の局在様相と三次元構築

HE染色、免疫染色およびin situ hybridizationを行った連続切片をデジタル顕微鏡を用いて光顕的観察および撮影を行う。得られたデジタル画像から細胞外蛋白の局在についての三次元構築像を作成する。

4. 研究成果

トルク値は、対照群において埋入後の時間経過とともに有意に増加した。実験群も類似した増加傾向が認められた。インプラント埋入後の4週間後に、2w群のトルク値は対照群と比較して有意に高かったが、埋入の8週間後以降は、全ての群においてトルク値に有意な差は認められなかった。埋入後の早い時期において、インプラント自体を回転させるとトルク値を上昇させる何らかの要因が働くが、長期的にみるとその回転による歪はトルク値に影響を与えないことが示された。

骨接触率は、対照群において、埋入後の時間経過とともに増加傾向を示した。埋入以降は4w群を除くすべての実験群(2w群、8w群および12w群)で骨接触率の増加が認められず、埋入の16週間後では、対照群と比較して骨接触率は有意に低かった。一方、4週間群は埋入8週間後に62.9%という骨接触率を示し、この値は対照群の42.1%と比較して有意な差は認められないが高い値を示した。4週間群もほかの実験群と同様に、埋入8週間後から16週間後まで、値の増加が認められなかったが、埋入8週間後の高い値を維持しているため、埋入の16週間後においても対照群の72.0%と比較して有意な差を認めない61.1%を示した。これらの結果から、実験群のなかで4週間群は、他の2週間群、8週間群および12週間群とは異なり高い骨接触率を獲得および維持することが示された。

蛋白の局在は、インプラントを回転させた

時期による差を認めなかったが、部位による差を認めた。オステオネクチンは、全ての群で観察期間を通じて局在を認めなかった。オステオポンチンは、対照群、実験群ともにインプラントと骨の境界面で海面骨の部分において局在を認めた。皮質骨の部分では、実験群において局在が認められたが、対照群では局在が認められなかった。既存の皮質骨の表面では、全ての群で局在を認めなかった。オステオカルシンは全ての群で既存の皮質骨表面、インプラントと骨の境界面ともに局在を認めた。

インプラントを回転させる時期によっては、トルク値および骨接触率が上昇したことから、必ずしもオッセオインテグレーション獲得の過程でインプラントの回転が生じたとしても悪影響があるわけではなく、オッセオインテグレーション獲得を促進もしくは強化できる可能性も示唆された。また、インプラントの回転は、トルク値および蛋白の局在から判断するとオッセオインテグレーションの維持には影響を与えないことが示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

玉田宜之、長岡紀幸、武田宏明、吉原久美子、入江正郎、西川悟郎、丸尾幸憲、吉田靖弘、鳥井康弘、松本卓也、皆木省吾：口カテック処理したジルコニア表面の断面 TEM 観察，平成 25 年度春期第 61 回日本歯科理工学会学術講演会，2013 年 4 月 14 日，東京

玉田宜之、長岡紀幸、早川 聡、入江正郎、西川悟郎、丸尾幸憲、吉田靖弘、松本卓也、尾坂明義、皆木省吾：ジルコニアに対するリン酸モノマーの吸着特性，平成 24 年度秋期第 60 回日本歯科理工学会学術講演会，2012 年 10 月 14 日，福岡
玉田宜之、長岡紀幸、早川 聡、入江正郎、西川悟郎、丸尾幸憲、吉田靖弘、松本卓也、尾坂明義、皆木省吾：ジルコニア表面のリン酸モノマーによる有機化の

検討，平成 24 年度春期第 59 回日本歯科理工学会学術講演会，2012 年 4 月 15 日，徳島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉田 宜之 (TAMADA YOSHIYUKI)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90509499