

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659893

研究課題名(和文)咬合に起因する微小動揺によるオッセオインテグレーション阻害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanism on obstruction of osseointegration caused by micro movement by occlusion

研究代表者

横山 敦郎 (Atsuro, Yokoyama)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20210627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：咬合に起因する微小動揺がオッセオインテグレーションに与える影響を明らかにすることを目的に、ラット上顎臼歯を抜歯後、チタンスクリーを即時埋入し、1週間後に咬合接触を付与し、咬合接触を与えないラットを対照群とし、組織化学的検索を行うとともに、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の比較を行った。咬合接触を付与したラットにおいてはスクリースレッド間の骨梁幅は有意に太くなり、スクレロスチン陽性骨細胞率は低下していた。遺伝子発現については、骨形成やBMP調整に関する遺伝子が発現していた。これらの結果から、抜歯後即時埋入早期に与える適度の咬合負荷は、オッセオインテグレーションを早めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate effects of micro movement by occlusion on osseointegration. Left first molars of maxillae in rats were extracted, and then, titanium screws were immediately inserted into the sockets. After 1 week of the implantation, occlusal loading was provided for 1 or 2 weeks in the experimental groups. Histochemical and histomorphometric assessment and analysis of gene expression by microarray were carried out. Trabecular thickness of the experimental group was thicker than the control group. The index of sclerostin-positive osteocytes located close to the implants bearing 2 weeks' loading was significantly attenuated compared with the control group, indicating undisturbed activities of osteoblasts. Microarray analysis showed that gene expression for bone formation and BMP were higher in the experimental group. It was suggested that the early occlusal loading for immediate implant accelerate osseointegration.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：オッセオインテグレーション インプラント 咬合負荷 即時埋入 組織化学 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

オッセオインテグレーションの早期獲得を目的とした研究はこれまでの数多く行われている。しかし、臨床において重要なオッセオインテグレーションの成立を阻害するメカニズムについての研究はなされていなかった。我々は、このメカニズムを明らかにすることにより、オッセオインテグレーションを確実に獲得することができ、安心、安全かつ確実なインプラント治療を確立できるのではないかと考え、特に、オッセオインテグレーションを阻害する因子として埋入後の微小動揺に着目し、微小動揺を埋入早期の咬合負荷により行う実験モデルを考案した。

2. 研究の目的

オッセオインテグレーション成立を阻害する因子を明らかにするため、本研究においては、埋入早期の咬合負荷による微小動揺がオッセオインテグレーション成立に与える影響を、組織化学的検索、組織計量学的検索を行うとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現の解析を行うことにより検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物ならびにインプラント埋入方法

生後 4 週齢の雄性 Wistar 系ラットを実験動物として用い、ジエチルエーテルの吸入とペントバルビタールの腹腔内注射による全身麻酔下で上顎左側第一臼歯を全身麻酔下で抜歯し、チタンスクリュー(直径 1.7mm 長さ 3mm, universal titan bone screw[®], Striker Japan Ltd. Tokyo, Japan 以下、インプラント体)を即時埋入した。(図 1)

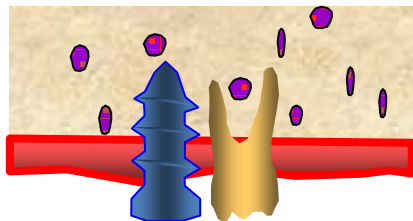


図 1 インプラント埋入のシエーマ

実験群では、インプラント埋入後 1 週間でインプラント体上部に歯科用接着性レジン (Super-Bond C&B[®], Sun Medical, Co. Ltd., Moriyama, Japan) を添加することで咬合負荷を与えた。対照群においては、咬合負荷を与えなかった。

尚、本実験は北海道大学動物実験委員会の承認 (承認番号 11-0105) を得て行った。

(2) 検索方法について

① 組織化学的および組織計量学的検索

実験群においては 1 及び 2 週間の咬合負荷を与え、対照群においては同等の期間咬合負荷を与えず飼育した。これらのラットを 4% パラホルムアルデヒド灌流固定後、上顎骨を

摘出、10%EDTA にて 3 か月間脱灰した後、可及的慎重にインプラント体を除去し、5µm パラフィン切片を作製した。それらの切片に、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)、RANKL、オステオカルシン(OCN)、オステオポンチン(OPN)、スクレロステチンの免疫組織化学を行った。さらに、画像解析ソフト ImageProPlus6.2 を用いて、インプラント骨接触率(BIC)、骨量(BV/TV)、骨梁幅(tb.th)、TRAP 陽性破骨細胞数、ALP 陽性面積率、スクレロステチン陽性骨細胞率を計測し、マンホイットニーU検定を用いて統計学的解析を行った。

② DNA マイクロアレイ検索

・ total RNA 用組織の摘出

埋入 1 週後にインプラントに 1 週間咬合負荷を与えた実験群 4 匹と咬合負荷を与えない対照群 4 匹からインプラント周囲組織を取り出し、インプラント体および周囲の骨髄組織を回収した。回収した組織は、DNA マイクロアレイ解析に用いた。

・ total RNA の抽出

RNeasy mini Kit(QIAGEN 社製)を用いて、インプラント周囲組織から TRI[®] reagent(SIGMA-ALDRICH)を用いて抽出したそれぞれの RNA 画分から total RNA を精製した。total RNA を Agilent 2100Bioanalyzer series II (Agilent Technologies)、ND-1000 分光光度計(Nano Drop 社製)を用いてサンプルの精度、濃度を確認した。各群内 4 サンプルのうちで純度、濃度の良好な 2 サンプルを選択し、蛍光標識 cRNA の調製をした。

・ DNA マイクロアレイ解析

それぞれの cRNA を、Whole Rat Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4×44K) (Agilent Technologies) に対してハイブリダイズし、蛍光スキャナーにより蛍光強度の測定を行った。得られた結果を Gene Spring GX13 (Agilent Technologies) を用いて、オッセオインテグレーション獲得後および過重負荷初期に発現する遺伝子について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 結果および考察

① 組織化学的および組織計量学的検索について

咬合負荷を 1 週間付与した実験群では、対照群と比較して、インプラントのスレッド間に太い骨梁が形成される傾向が認められたが、統計学的に骨接触率、骨量、骨梁幅において有意差は認められなかった(図 2~5)。咬合負荷を 2 週間与えた実験群では、骨接触率と骨量について有意差が得られなかったが、骨梁幅は、実験群が 49.28 ± 15.60、対照群が

32.09 ± 8.57,であり、実験群は、対照群よりも有意に高い値を示した(p<0.05)。また、実験群の骨梁は、インプラントの長軸方向に平行に走行する傾向がみられた。尚、全ての群のインプラント周囲の骨組織において、炎症性細胞の浸潤や咬合性外傷と思われる組織異常は観察されなかった。

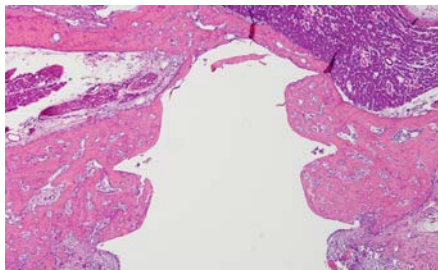


図2 対照群 1週 (弱拡大)

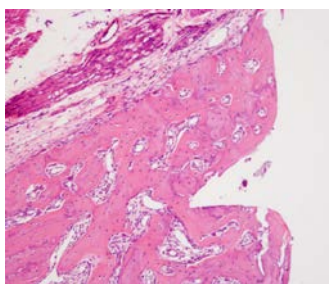


図3 対照群 1週 (強拡大)

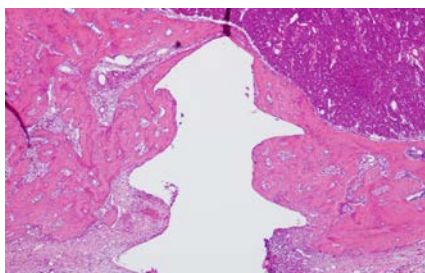


図4 実験群 1週 (弱拡大)

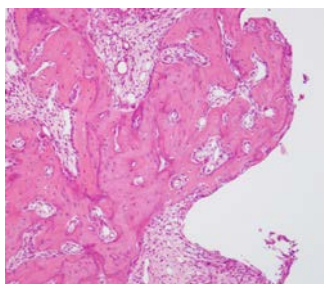
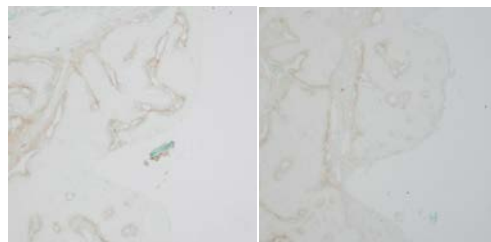


図5 実験群 1週 (強拡大)

ALP陽性面積率およびTRAP陽性破骨細胞数を統計学的に解析したところ、咬合負荷1週間、2週間ともに対照群と実験群の間に有意差は認められなかった。しかし、対照群では、インプラント表面あるいは近傍においてTRAP陽性破骨細胞が集積する像が観察され、そのような箇所一致してALP陽性骨芽細胞系細胞も集積する傾向が認められた。実験群では、インプラント表面には一層の骨基質が

取り巻いており、インプラント表面または近傍で破骨細胞や骨芽細胞系細胞が集積する像はほとんど認められなかった。(図6) また、実験群は、対照群と比較してインプラント周囲においてやや弱いRANKL免疫反応を示め



す傾向が認められた。

図6 ALP染色 1週

(左：実験群 右：対照群)

OPNおよびOCNの局在について、対照群は、複雑に走行する太い鋸歯状のOPN/OCN陽性セメントラインを示したのに対して、実験群は、細く滑らかな走行を示すOPN/OCN陽性セメントラインを示した。(図7)

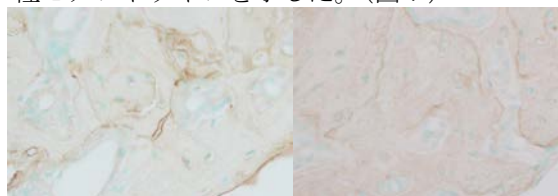


図7 オステオカルシン(OCN)染色 1週

左側：対照群 右側：実験群

スクレロスチンの局在については、検索領域として、インプラントのスレッド表面から50 μmまで離れた領域とスレッド表面から50~150 μm離れた領域を選定し、対照群と実験群とで比較した。その結果、スクレロスチン陽性骨細胞率は、咬合負荷2週間後の実験群のスレッド表面から50 μmの領域において、対照群と比較して有意に低い値を示した(図8)。

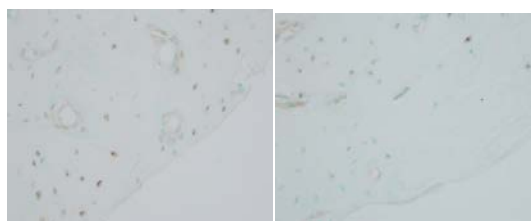


図8 Sclerostin染色 2週

左：対照群 右：実験群

以上の結果から、実験群では、対照群と比べて、骨基質の改造はやや緩やかになっていること、また、骨基質は密接な接着を示すことが推測された。

ラット上顎骨を用いた本実験系では、インプラントの抜歯即時埋入および即時の機能的負荷は、骨量増加ではなく、インプラントが骨に与える力に沿って骨梁を形成させて

ゆくことが示唆された。また、そのような力学的環境において、骨改造はやや緩徐になり、骨基質の接合も密着化することが推測された。その細胞学的作用として、骨細胞が咬合力などのメカニカルストレスを感知し、スクレロスチンなどをはじめとする様々なシグナルを伝えることが想定されるが、今後さらに詳細に検討を加える必要がある。

②DNA マイクロアレイ検索

マイクロアレイ解析から、インプラント周囲に見られる 3 万個あまり (30507) の遺伝子が確認された (図 9)。

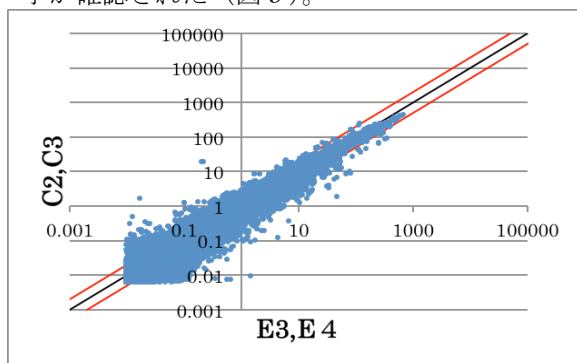


図 9 遺伝子の散布図 C2、C3：対照群、E3、E4：実験群

実験群と対照群のシグナル強度がともにバックグラウンドより明らかに強く、信頼性の高い遺伝子が18268個得られた。図 10 に示すように、実験群および対照群それぞれの経時的にみた遺伝子発現パターンは異なっていた。そのうち、実験群に見られる遺伝子の中で、対照群に対し2倍以上の高発現が見られる遺伝子は782個、0.5倍以下に低い発現を示す遺伝子は 507個であった。

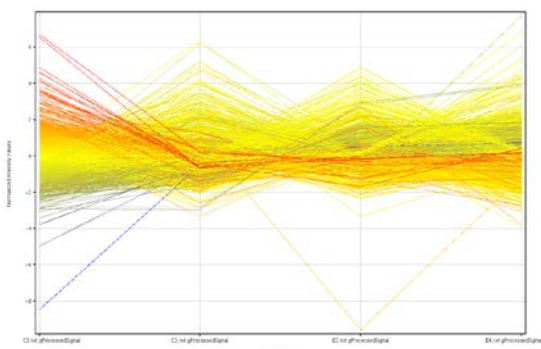


図 10 各群の Normalized 値分布

この中で、特に骨形成に関する遺伝子に着目すると、荷重群においてregulation of ossification、regulation of BMP などに関するものが特徴的に認められた。

これとは反対に対照群が実験群に対し 2 倍

以上の高発現が見られる遺伝子は、469 個であり、**Gremlin1**、**BMP receptor 1b** など骨形成調節に関する遺伝子、**Gremlin1** および 2 など **BMP** 調節に関する遺伝子に関する遺伝子が高い発現をしていた。

(2) 研究の総括と今後の展望について

本研究の予備実験として、実験系の確立とともに、埋入後に咬合負荷を与える時期について検討した。その結果、埋入 3 日後に咬合負荷を与えた場合、すべての例においてインプラントは脱落していた。5 日後においては多くのインプラントが脱落していたが、1 週間後では脱落しているものは少なかったため、埋入 1 週後に 1 週間咬合負荷し、インプラント体に微小動揺を与えることとした。しかし、本研究結果が示す様に、ラット上顎抜歯即時埋入インプラントにおいては、埋入 1 週後の時点での咬合負荷による微小動揺は、オッセオインテグレーション成立を阻害するのではなく、むしろ骨細胞を介して骨梁を太くし、インプラントに対して骨改造に有利に働くことが明らかとなった。本研究の成果からはスクレロスチンがオッセオインテグレーション阻害に関連する可能性が示唆されたが、今後は本研究でその一部が示されたオッセオインテグレーションの促進に関連する遺伝子も含めて、研究を進めていきたい。

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 4 件)

- ① 池田欣希、長谷川智香、山内貴紀子、網塚憲生、横山敦郎、ラット上顎の抜歯即時埋入後に早期荷重を行ったチタンインプラント周囲骨の組織化学的検索、第 124 回日本補綴歯科学会、2015 年 5 月 30~31 日、大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)
- ② 池田欣希、山内貴紀子、横山敦郎、抜歯即時埋入後の早期荷重がチタンインプラント周囲骨組織に与える影響、第 44 回日本口腔インプラント学会、2014 年 9 月 13~14 日、東京国際フォーラム (東京都・千代田区)
- ③ Ikeda Y, Hasegawa T, Amizuka N, Yokoyama A. Biologic effects of early occlusal loading on bone tissue around titanium implants immediately placed into extraction sockets. The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration 2014 年 7 月 4~5 日、札幌市教育文化会館 (北海道・札幌市)
- ④ 池田欣希、長谷川智香、網塚憲生、横山敦郎、咬合負荷が抜歯即時埋入チタンインプラント周囲の骨組織に与える影響に

ついて、歯科基礎医学会、2013年9月20
～22日、岡山市コンベンションセンター
(岡山県・岡山市)
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 敦郎 (YOKOYAMA, Atsuro)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20210627

(2) 研究分担者

安田 元昭 (YASUDA Motoaki)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：90239765

山本 悟 (YAMAMOTO Satoru)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10344524

網塚 憲生 (AMIZUKA Norio)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30242431