

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K11226

研究課題名(和文)インプラント周囲骨組織の生物学的治癒機転の新たな検証

研究課題名(英文)Biological stability of the tissue after implantation

研究代表者

辻村 麻衣子(羽下麻衣子)(Tsujiura, Maiko)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：60535219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント埋入と抜歯はともに代表的な口腔の外科的処置である。インプラント埋入前に行われることも多い抜歯とインプラント埋入による組織の変化を比較検討することは、インプラント治療に関して有用な情報を与えると考えられる。そこで、抜歯後インプラントを埋入したモデルと抜歯のみ行ったモデルを対象として、組織学的手法とマイクロCTによる解析を行った。その結果、インプラント埋入後と抜歯後の経時的な組織の変化が観察された。今回の研究からは、インプラント周囲は抜歯窩より緩やかに治癒が進むと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラント治療は、臨床的に絶えず改良が試みられ、欠損補綴の選択肢として不可欠なものとなっている。しかしながら、活発な臨床応用に対し、基礎的な裏付けとなる研究は十分ではない。本研究では、インプラント治療に関わる抜歯とインプラント埋入による変化に関して、組織形態計測やマイクロCTなどを用いた比較検討を行うことで、インプラント治療における組織の治癒を新たな観点から検証することができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Dental implant placement often follows tooth extraction and both procedures are closely related. The comparison of tissues after these two procedures must give an important information for the biological stability of the tissue after implantation. This study examined alteration in tissue after implantation following tooth extraction by comparing with that after simply extraction. In male Wistar rats, the upper first molars were extracted bilaterally, where titanium implants were inserted after 1-month post-extraction in some of them. Samples were harvested at several periods after implantation or after extraction without implantation, and assessed by means of histology and micro-CT. The tissue within the extraction socket dramatically changed. Surrounding tissue around the implant chronologically became mature bone as decreasing soft tissue. Within its limitations, the present study suggested healing after implantation gradually proceeded compared with that after extraction.

研究分野：口腔組織学

キーワード：インプラント 抜歯 骨組織 三叉神経節 歯学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲骨組織の状態は歯科インプラント治療の成否に影響する。近年、感覚神経が骨代謝に非常に重要な働きを持つことが明らかにされた¹。インプラントは、神経を多く含む歯根膜を欠いているため、インプラント周囲骨の感覚神経は重要な機能を持つと推測される。このような背景から、神経の観察などの新たな角度からインプラント周囲骨の治癒をとらえることは、インプラント周囲骨の生物学的安定性を考える上で重要ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インプラント周囲骨の治癒過程における神経の変化を明らかにし、インプラント周囲組織が生物学的に安定するメカニズムを検証することである。

3. 研究の方法

本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理審査委員会の審査を受け、承認されている(承認番号 94)。実験には4-5週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。

(1) 両側の上顎第一臼歯を抜去し、抜歯1か月後以降に、リーマーなどを用いて窩洞形成を行った。窩洞にインプラント(純チタン棒)を埋入し、一定の治癒期間(7日、1か月、3か月)後、安楽死させた(インプラント埋入モデル)。インプラント周囲組織をブロックとして採取し、浸漬固定した。採取した試料はマイクロ CT を用いて撮影し、一部は樹脂包埋後、研磨切片にした。染色(toluidine blue combined with basic fuchsin)した切片を観察し、一部を用いて組織形態計測を行った。既に作製済みの同モデルの試料も解析に用いた。また比較として、両側の上顎第一臼歯を抜去し、一定の治癒期間(7日、14日、1か月、3か月)後、採取した試料に対しても同様の解析を実施した(抜歯モデル)。組織形態計測では、一定の範囲内の組織を、濃いピンクに染まる新生骨組織()、それ以外の骨組織()、骨組織以外の組織()に分け、その割合を調べた。計測は、インプラントに接する組織の表面または抜歯窩の窩壁(相当部)から 0-100 μm 、100-250 μm 、250-500 μm の周囲骨の中心部 500 μm の長方形の範囲で行った。抜歯モデルでは、窩壁(相当部)から内側に 100 μm の周囲骨の中心部 500 μm の範囲も計測した。

(2) 上顎右側の第一臼歯を抜去し、上顎左側同名歯は抜去せず、左側をコントロールとして用いるモデルを作製した。抜歯7日後と1か月後に、上顎骨と三叉神経節を採取した。さらに、上顎右側のすべての臼歯を抜去し、上顎左側臼歯は抜去せず、左側をコントロールとするモデルを作製し、抜歯後3日、7日および1か月で上顎骨と三叉神経節を採取した。抜歯窩をマイクロ CT により撮影し、その治癒を観察した。三叉神経節は総タンパク質量の測定後、歯槽骨吸収の抑制に関わると報告されている TRPV1²に着目し、抗 TRPV1 抗体と抗リン酸化 TRPV1 抗体を用いたウエスタンブロットングによるタンパク質の検出を試みた。また、右側すべての臼歯を抜去したモデルでの抗 TRPV1 抗体を用いたウエスタンブロットングにおいて、TRPV1の分子量周辺のタンパク質の LC/MS 解析を行った。

4. 研究成果

(1) インプラントモデルのマイクロ CT 画像と組織像(図1)から、インプラント周囲骨の経時的な治癒が観察された。マイクロ CT 画像では、インプラント埋入7日後に、インプラントと骨の間に透過像がしばしば観察され、軟組織などの骨組織以外の組織が存在していることが推察された。その後、インプラントは骨と結合し、周囲には骨が一様にみられるようになった。組織学的観察では、7日後のインプラント周囲に軟組織が取り巻いている部分が多く認められ、濃いピンクに染まる新生骨も存在していた。窩洞の形成面が明確に確認できる場所もあり、その形成面がインプラントと接している様子がわずかに

みられた。1か月後のインプラント周囲には新生骨が多くみられ、インプラントに近接した部位に骨が形成されたことが確認された。3か月後のインプラント周囲骨にも濃いピンクに染まる新生骨組織は存在しているが、成熟した骨組織が広くみられるようになっていた。また、しばしばインプラントと組織の間にわずかな間隙がみられた。その中に組織学的な構造物が存在しておらず、インプラントと周囲組織の表面の形態が類似していることからアーティファクトと考えたが、早期に比較的多く観察されたことを考慮すると、インプラントと周囲組織との結合状態を反映している可能性もある。

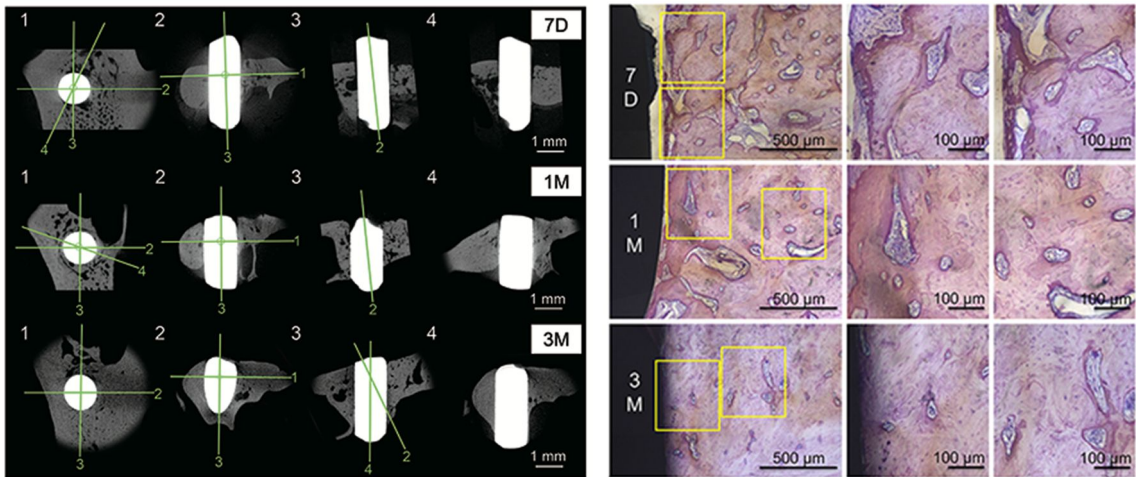


図1 インプラント埋入モデルのマイクロCT画像(左)と組織像(右)

抜歯モデルのマイクロCT画像と組織像(図2)から抜歯後の骨の治癒が観察された。マイクロCT画像において、抜歯窩は1か月後までに大きく変化し、1か月後には根尖に相当するあたりに透過像が認められる以外、全体が一様な骨としてみられるようになった。抜歯窩と周囲との差はほとんど認められなかった。3か月後の試料は撮影に失敗し、確認できなかった。組織学的観察において、7日後の抜歯窩内は、濃いピンクに染まる新生骨や軟組織で満たされていたが、その後、経時的に骨組織が増加した。根尖相当部周辺には大きめの軟組織が存在し続けていたが、抜歯窩全体としては、1か月後で周囲との境界は不明瞭となり、3か月後には成熟した骨組織が広く観察された。抜歯窩の周囲はいずれの段階でも成熟した骨組織を認め、抜歯窩から離れた組織と大きな違いはみられなかった。

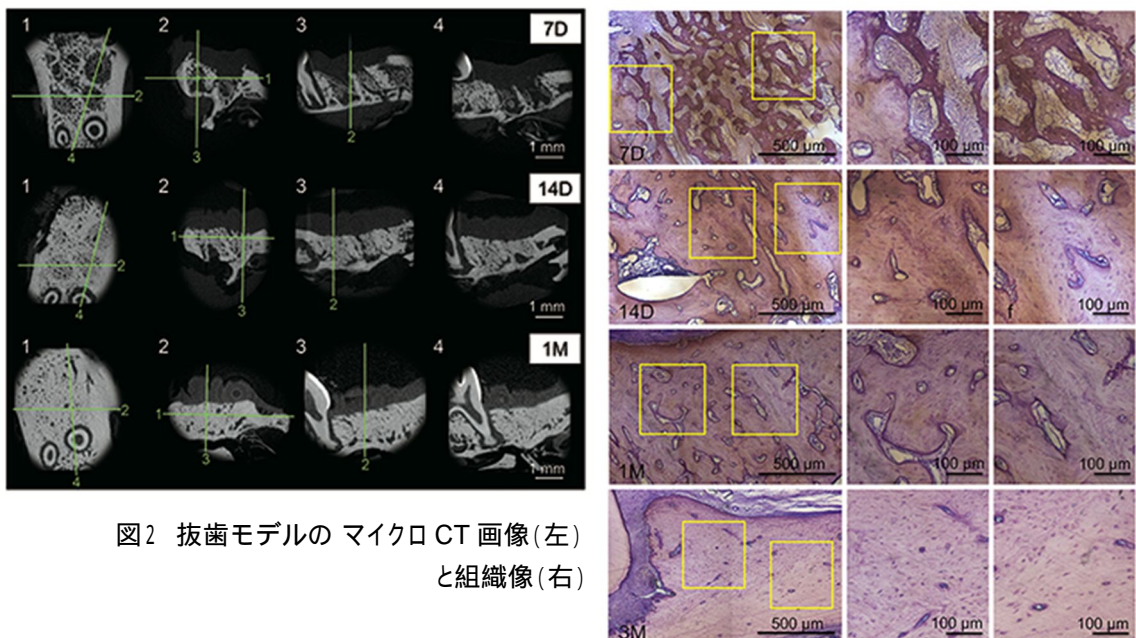


図2 抜歯モデルのマイクロCT画像(左)と組織像(右)

組織形態計測の結果(図3)では、インプラント周囲のすべての範囲で経時的に骨組織が増加していた。1か月後までは 100 μm 以内の範囲で、他の範囲より、切片上で濃いピンクに染まる新生骨組織()や骨組織以外の組織()が多く、 以外の骨組織()が少なかったが、3か月後には部位的

な差は小さくなった。

抜歯窩内の組織は経時的に大きく変化した。7日後には抜歯窩は他の部位と大きく異なる組織構造であったが、1か月後には抜歯窩内部も周囲と大差はなくなった。抜歯窩周囲では窩壁から近い部位においても、インプラント周囲に比べ、骨組織が多く、経時変化は小さかった。

以上のように、今回の結果では、インプラント埋入後は抜歯後と比較して、治癒経過が遅いようであった。

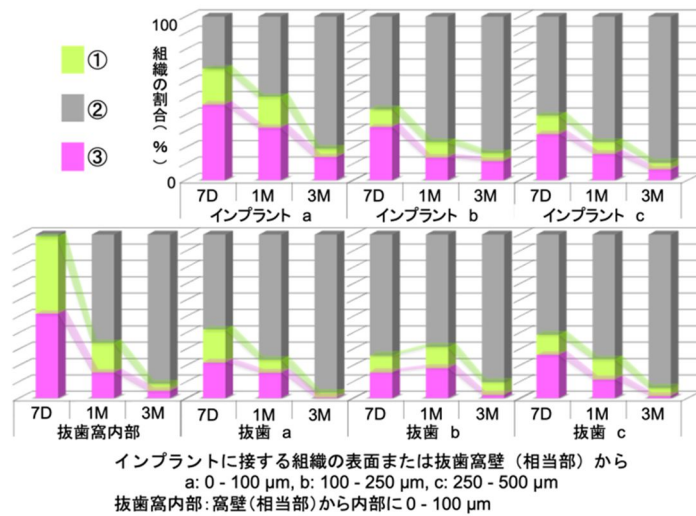


図3 インプラント埋入モデルと抜歯モデルの組織形態計測

(2) 抜歯後の三叉神経節の変化を明らかにするため、ラット上顎右側第一臼歯を抜去するモデルを製作し、抜歯窩周囲をマイクロ CT により撮影した結果、抜歯窩の中心に向かって骨が形成され、1か月でほぼ治癒している様子が確認できた。三叉神経節を生化学的に解析した結果、試料の総タンパク質量にばらつきがあり、抜歯側とコントロールとした非抜歯側の違いが不明瞭であった。そこで、コントロールとの比較をより明瞭にするために、右側すべての臼歯を抜去するモデルを解析したところ、このモデルのマイクロ CT による観察(図4)においても、抜歯窩の治癒は速やかに進んでいることが確認された。3日後、7日後には抜歯窩と周囲組織との境界は明瞭であったが、1か月後には治癒が進み、根尖相当部周辺に透過像が認められる以外、抜歯窩全体が骨で満たされ、周囲との差は顕著ではなくなっていた。生化学的解析において、すべての治癒期間で、抜歯側と非抜歯側の総タンパク質量に有意差はなかった。さらに、抗 TRPV1 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、TRPV1と同程度の分子量の位置にバンドを認めた。しかしながら、その分子量周辺のタンパク質を LC/MS 解析に供した結果、TRPV1 の検出には至らなかった。この結果から、抗 TRPV1 抗体と免疫交差する TRPV1 様タンパク質の存在が示唆された。7日後以降の抜歯側でこのタンパク質の発現上昇がみられたが、定量には至っていない。同様に抗リン酸化 TRPV1 抗体を用いたウエスタンブロッティングにおいても陽性反応がみられたが、タンパク質の特定、定量はできなかった。このように、本研究では明確な結果を得ることができず、抜歯による TRPV1 の変化の有無や抜歯窩治癒における TRPV1 の役割を結論づけることは難しい。抜歯後の三叉神経節の変化と抜歯窩治癒との関連性を明らかにするためには、さらに検討を続けていく必要があると考えられる。

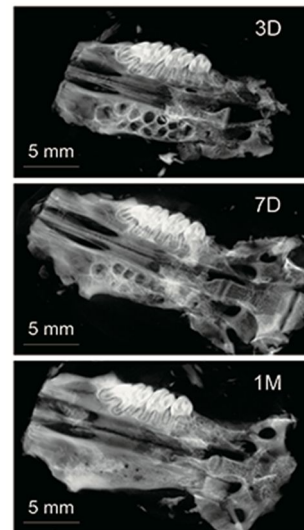


図4 上顎右側のすべての臼歯を抜去したモデルのマイクロ CT 画像

抜歯は、インプラント埋入と同様、治癒に骨が関わる代表的な口腔の外科的処置であり、インプラント埋入前に行われることも多いため、インプラント治療と密接な関連がある。したがって、抜歯について、その治癒経過を明らかにすることは本課題に有用な情報を与えると考えられる。また、患者^{3,4}や動物⁵における抜歯とインプラント埋入の比較の報告は散見されたが、本研究のようにマイクロCTや組織形態計測

などを行った比較の研究はみつけることができなかった。そのため、抜歯後インプラントを埋入したモデルと抜歯のみ行ったモデルを解析し、インプラント周囲の治癒は抜歯窩の治癒よりも緩やかに進む可能性があることを示した本研究結果は意義深いといえるが、解析試料数が少なく、手術の手技や解析の方法による影響も考えられたため、今後さらなる検証が必要である。また今回、三叉神経節の生化学的解析で明確な結果を示すことはできなかったが、実験モデルや解析の問題点を踏まえて実験を進めることで、抜歯後の神経の変化の解明につながる結果を得ることができると期待している。

研究開始当初は神経に焦点を当てた内容であったが、実験の遂行をしていく過程で、インプラント治療に関わる外科的処置として抜歯に注目し、新たな角度からインプラント治療による組織の変化を観察することができた。新たな観点からインプラント治療における組織の治癒をとらえるという点においては、研究目的をある程度達成したと考えている。

(引用文献)

1. Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, Shibata S, Yoshida Y, Gu Z, Kimura A, Ma C, Xu C, Bando W, Fujita K, Shinomiya K, Hirai T, Asou Y, Enomoto M, Okano H, Okawa A, Itoh H. Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. *Nature* (2013);497:490-3.
2. Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, de Jong PR, Bertin S, Tabet K, Yamazaki K. Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by suppressing osteoclastogenesis via CGRP. *Sci Rep* (2016);6:29294.
3. Reissmann DR, Pouloupoulos G, Durham J. Patient perceived burden of implant placement compared to surgical tooth removal and apicectomy. *J Dent* (2015);43:1456-61.
4. Yao J, Lee KK, McGrath C, Wu YN, Li KY, Mattheos N. Comparison of patient-centered outcomes after routine implant placement, teeth extraction, and periodontal surgical procedures. *Clin Oral Implants Res* (2017);28:373-80.
5. Ohta Y. Comparative changes in microvasculature and bone during healing of implant and extraction sites. *J Oral Implantol* (1993);19:184-98.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 辻村麻衣子, 中原 賢, 前田健康, 吉江紀夫
2. 発表標題 ラットモデルにおけるインプラント周囲骨組織の治癒経過
3. 学会等名 第57回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 辻村麻衣子, 澤田幸作, 中原 賢
2. 発表標題 口腔領域の外科的処置による骨組織変化
3. 学会等名 第61回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Haga-Tsujimura M, Nakahara K, Sawada K, Maeda T
2. 発表標題 Different bone formation after tooth extraction with and without implantation
3. 学会等名 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻村麻衣子, 中原 賢, 五十嵐健輔, 今井あかね
2. 発表標題 ラット上顎臼歯抜去後の三叉神経節におけるTRPV1発現の検索
3. 学会等名 第51回歯科衛生研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中原 賢 (Nakahara Ken) (20610257)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究 分担者	今井 あかね (Imai Akane) (60180080)	日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・教授 (43107)	