

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17126

研究課題名(和文) 骨質を基盤としたインプラント周囲炎の発症と進行メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism clarification of peri-implantitis based on bone quality

研究代表者

加藤 初実 (KATO, Hatsumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・研究協力員

研究者番号：30613608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント治療は、失われた歯を回復する良い治療方法ですが、長期的に観察すると、多くの患者さんが、インプラント周囲炎やそれに近い状態となることが分かっています。インプラント周囲炎はその原因がよくわかっていないため、確定的な治療法がありません。そこで私たちは、インプラント周囲炎が細菌感染と力によってもたらされると仮説を立て、実験を行いました。その結果、インプラント周囲炎を引き起こす動物モデルの開発に成功し、その状態を詳細に観察することができるようになりました。このことは、インプラント周囲炎の病因解明に大きな貢献ができると考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント治療が多く行われるようになってきた昨今ですが、インプラント周囲炎は治療法がないにもかかわらず多くの患者さんが罹患するため、現在大きな問題となっています。この研究では、ラットを用いて新しいインプラント周囲炎モデルを確立したことから、学術的な価値があるといえます。また、インプラント周囲炎の原因を究明する基盤構築研究であり、インプラント周囲炎の治療法開発に寄与できる可能性が高いことが社会的意義であるといえます。

研究成果の概要(英文)：Implant treatment is useful option to restore missing teeth. However, many patients have received periimplantitis as previously described clinical reports. No definitive treatment methods have been developed due to unknown mechanisms of periimplantitis. Thus, we hypothesized that bacterial and mechanical loads are required to induce periimplantitis. We created periimplantitis rat model in this study. Moreover, histopathological and immunopathological conditions in periimplantitis were clearly analyzed with this model. Our findings may contribute to the exploration of pathogenesis of periimplantitis.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：インプラント周囲炎 荷重 細菌感染 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は予知性の高い欠損補綴治療であるが、長期経過するとインプラント周囲炎のリスクが高まり、報告では半数近く患者でインプラント周囲炎に罹患することも報告されている。インプラント周囲炎の病因は現在でも不明であることから確定的な治療法は存在せず、多くの臨床家が、効果が不明な対症療法を行っているのが現状で、インプラント周囲炎の病因の解明は喫緊の課題である。

これまでインプラント周囲炎の病態を明らかにするために、多くの動物実験、細胞および分子レベルで、細菌学的アプローチによる研究が積み重ねられてきた (Salvi GE et al. *J Dent Res.* 2017, Shwarz F et al. *Periodontol* 2000. 2015)。しかしながら患者の口腔内においては、インプラントは常に機能、非機能を含めた力学的負荷に曝されており、その環境下でインプラント周囲炎が発症して進行する。したがって、細菌感染と力学的負荷の両者を加味したインプラント周囲炎動物実験モデルでの病態解明が希求されているが、そのようなモデルは存在しない。さらに、作成した動物実験モデルからインプラント周囲炎の病態を解明するには、従来法に加え、新たな切り口が必要不可欠である。

これまで申請者を含む当教室では、インプラント周囲骨組織のコラーゲン線維 / 生体アパタイト結晶の配向性と骨細胞ネットワークが荷重応答性に適応変化することを突き止め、骨の質的な解析を可能としてきた (Kuroshima S et al. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015, Sasaki M et al. *J Biomech.* 2015, Kuroshima S et al. *Acta Biomater.* 2017, Kato H et al. *J Oral Implantol.* 2018)。これら解析法は、本研究課題における力学的負荷を加味したインプラント周囲炎モデルに対して良好な解析法となりうる。

## 2. 研究の目的

【本研究の目的】本研究では以下の2点を研究目的とした。

- (1) ラットにおけるLPS - 荷重誘導型インプラント周囲炎モデルを開発すること。
- (2) インプラント周囲骨のコラーゲン線維 / 生体アパタイト結晶の配向性と骨関連細胞の分子生物学的解析により、インプラント周囲炎組織破壊における骨質変化を解明すること。

## 3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するため、下記のように研究を計画した。

### (1) LPS - 荷重誘導型インプラント周囲炎モデルの開発

ラット用インプラントと荷重試験装置

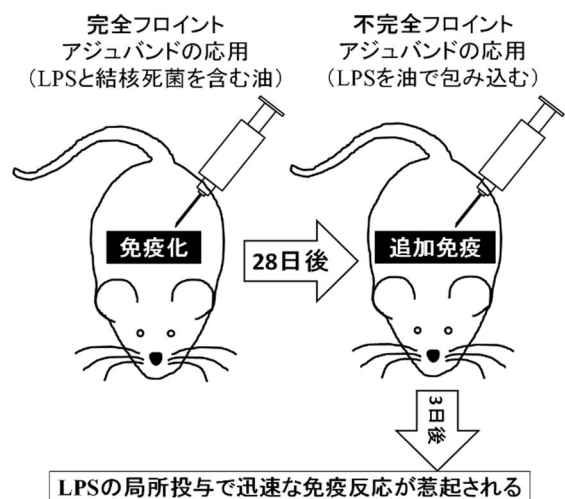
LPS - 荷重誘導型インプラント周囲炎モデルの作成には、開発済みのラット用インプラント (Uto et al. *PLoS One.* 2017) と荷重試験装置を使用する。今回、LPS を利用したラットインプラント周囲炎モデルを初めて作成するため、本大学歯周病学分野が作成したインプラント周囲ラットモデルの作成プロトコルを参考に行う (Takamori Y et al. *Clin Oral Implants Res.* 2017)。

完全・不完全フロイントアジュバンドを応用した免疫応答機構の迅速誘導

本研究では LPS による免疫応答の安定誘導に、完全と不完全フロイントアジュバンドを利用する (Gor DO et al. *Infect Immun.* 2002) (右図)。

なお、原理は以下の通りである。

- i) LPS と結核死菌を含む油の混和溶液を腹腔内投与すると、生体内には LPS (150 $\mu$ g/1回) がゆっくりと放出されて長時間持続する免疫応答が促進される。
- ii) 約1か月後、LPS (150 $\mu$ g/1回) と油の混和溶液を追加投与すると免疫応答が増強され、その後の LPS 局所刺激に対して確実な免疫応答が迅速に誘導されるという原理であり、本研究ではこの原理を応用してインプラント周囲炎モデルを作成する。



LPS - 荷重誘導型インプラント周囲炎モデルの作成

ラット上顎第1大臼歯を抜歯して4週間後にインプラントの埋入とフロイントアジュバンド活性を利用したLPS (口腔細菌由来) 腹腔内投与による免疫化を行う。追加免疫はその4週間後に行い、さらに3日後からインプラント周囲粘膜溝内にLPS (150 $\mu$ g/1回) を毎日注入してLPS誘

発型インプラント周囲炎モデルを作製する(Takamori Y et al. *Clin Oral Implants Res.* 2017). 一方, LPS の口腔内投与と規則的な繰り返し荷重(10N, 3Hz, 1800回/1週間に2回)を付与し, LPS - 荷重誘発型インプラント周囲炎モデルを作成する. なお荷重条件は, インプラント周囲の骨質が適応変化する当講座の過去の報告(Uto Y et al. *PLoS One.* 2017)に従う. インプラント周囲炎モデルでは, LPS の口腔内投与3日後には骨吸収が認められるようになることから(Takamori Y et al. *Clin Oral Implants Res.* 2017), LPS 投与を行った当日, 1週, 2週, 3週, ならびに4週間後にラットを屠殺する.

対照群, LPS 誘発型インプラント周囲炎モデル, ならびに LPS - 荷重誘発型インプラント周囲炎モデルの3群について多面的に各種解析を行い, それらを比較検討して骨質変化の相違と, 炎症に惹起された骨質の変化に関連する分子の探索と同定を試みる.

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

#### LPS 誘発性ラットインプラント周囲炎モデルの作成

まず初めに LPS 誘発性ラットインプラント周囲炎モデルの作成を行った. 本実験では, インプラント埋入後, LPS 滴下とは無関係の感染などによる骨頂レベルの低下(インプラント周囲骨吸収)が起こると, その後の LPS 誘発性炎症による骨吸収との区別がつかなくなるため, 術中・術後に可能な限り感染が起こらないようにして, 骨頂レベルが維持されている必要がある.

最初に用いたラット用インプラントでは, インプラント埋入後に口腔粘膜がインプラント上部へ内翻しやすく, 歯槽骨頂のレベルがわずかに落ちてしまうことが判明した. このことは, LPS により誘発される骨吸収が大きいと錯覚させる可能性がある. そこで埋入深度を調整することで対応しようと試みたが, インプラントの形状と手術手技の問題で不可能であることが判明した.

以上より, インプラント埋入後も口腔粘膜が翻転しない形状のインプラントを開発する必要があることが分かった. そこでインプラントを新しくデザインし, 粘膜貫通部分の形状を修正・改良すると, 粘膜がインプラント側に内翻せず, 初期段階においてインプラント周囲骨頂レベルが維持されることが明らかとなった.

そこで, 新規に作成された本研究用のラットインプラントを用いて, LPS 誘発性ラットインプラント周囲炎モデルを作成し, 3 次元的構造解析, 組織形態学的解析, ならびに免疫組織化学的解析を中心に LPS 誘発性インプラント周囲炎モデルの病態解析を行い, 下記の研究成果を得た.

- ・インプラント周囲粘膜では,
  - \* 毛細血管形成の亢進が起こっていた.
  - \* 多形核白血球の浸潤が起こり, 強い炎症状態を呈していた.
  - \* 炎症性マクロファージの集積が増大していた.
  - \* 上皮の連続性が一部破壊されている部分が認められた.
- ・インプラント周囲硬組織では,
  - \* 軟組織との境界部分の骨表面では破骨細胞の著しい増大が認められた.
  - \* 破骨細胞の吸収窩は有意に大きく, これはインプラント近傍ほど顕著に起こっていた.
  - \* インプラントから離れていくにしたがって破骨細胞数は減少した.
  - \* 骨芽細胞数に変化は認められなかった.
  - \* 空の骨小腔を有する壊死骨が認められることはなかった.
  - \* コラーゲンの種類の比率が変化していた.
  - \* 配向性が乱れることが分かった.

#### LPS - 荷重誘発型インプラント周囲炎モデルの作成

で作成した LPS 誘発性ラットインプラント周囲炎モデルに荷重付与を組み合わせさせた結果, 以下の結果を得た.

- ・インプラント周囲粘膜では,
  - \* 荷重を付与すると, 炎症状態が悪化しており,
    - ・多形核白血球がより多く浸潤していた.
    - ・炎症性マクロファージがより多く浸潤していた.
    - ・コラーゲンがより多く破壊されていた.
    - ・上皮の連続性が破壊されている部分が認められた.
- ・インプラント周囲硬組織では,
  - \* 荷重を付与すると, 骨吸収がより大きくなることが分かった.
  - \* インプラントに沿って垂直性の骨吸収が認められた.
  - \* 材料の形態に沿っていたコラーゲンの配向が無秩序な配列をしていた.

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、LPS に誘発されるインプラント周囲炎モデルを作成し、さらに口腔内により近い荷重を加えることでその周囲炎がどのように変化するかを検討しているが、国内外においてこのような研究は現時点までに存在しないことから、インプラント周囲炎の病因・病態解明研究としては重要な知見が得られるモデルが作成され、そのインパクトは大きいと思われる。

(3)今後の展望

現在論文作成中であるが、本研究を足掛かりとして今後はインプラント周囲炎の病因論を追求し、治療法開発のためのモデルとしても応用する計画を立てている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 鈴江正義, 澤瀬 隆
2. 発表標題 ラット上顎骨に埋入したインプラントへの繰り返し荷重がインプラント周囲骨組織のリモデリングに与える影響
3. 学会等名 第49回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 右藤友督, 黒嶋伸一郎, 内田悠介, 叶井里歩, 鈴江正義, 澤瀬 隆
2. 発表標題 規則的な繰り返し荷重は顎骨に埋入されたインプラント周囲骨組織の荷重応答性適応変化を誘導する
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uto Y, Kuroshima S, Uchida Y, Kanai R, Suzue M, Sawase T
2. 発表標題 Mechanical repetitive loads regulate bone related cells around the osseointegrated implants in rat maxillae
3. 学会等名 29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	右藤 友督  (UTO Yusuke)		