

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659919

研究課題名(和文)インプラント予後の診断に用いる無被曝検査法の開発

研究課題名(英文)Development of the evaluation method without radiation for peri-implantitis

研究代表者

牧平 清超 (MAKIHIRA, SEICHO)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80304450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲炎の評価法を確立することは非常に重要である。本実験でラットに極小のインプラント体を埋入しPorphyromonas gingivalis 由来のLPS(P.g.-LPS)を用いて擬似的にインプラント周囲炎を発症させた。歯肉組織および歯肉溝から分離したサンプルを用いて破骨細胞分化誘導因子であるRANKLとそのおとり受容体であるOPGの発現について解析した。P.g.-LPSは、インプラント周囲の歯肉組織におけるRANKLの発現を、LPSを投与していない歯肉組織中のRANKLと比較して有意に増加させOPGの発現を減少させた。

研究成果の概要(英文)：It was important to develop the evaluation method for peri-implantitis. Mini pure titanium implants (mini-implant) were placed into palatine bone of rats, followed by that lipopolysaccharide derived from Porphyromonas gingivalis (P.g.-LPS) was intermittently injected into the gingival tissues around mini-implant. Inflamed tissues by P.g.-LPS (P.g.-LPS samples) were collected from around mini-implant. The expression patterns of RANKL and OPG in the tissues, which were known as the markers of bone resorption, were examined. P.g.-LPS enhanced the expressions of RANKL in the tissues around mini-implant, as compared with those of control samples without P.g.-LPS. On the other hand, the expressions of OPG in the P.g.-LPS samples were decreased.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：インプラント インプラント周囲炎 インプラント予後 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

インプラント治療がクラウン・ブリッジ・可撤式義歯につづく画期的治療法であることは言うまでもなく、臨床的に非常に高い成功率を示している。しかしながら従来の歯科補綴治療と同様にトラブルも報告されている。骨吸収を伴うインプラント周囲炎はインプラント脱落に至ることがある。インプラント周囲炎の原因として、メカニカルストレス、細菌感染、リンパ球の浸潤などが明らかにされている。また申請者は、インプラント体表面性状の影響も示唆している。以上の結果より、骨吸収を促進する因子である RANKL 分子が関与した歯周病と類似の骨吸収に至って、インプラント周囲の骨吸収やインプラント脱落を招いている可能性が示唆されている。

インプラントは補綴処置後に定期的に検査を行い、リスクを早期に探知することによって、患者再教育を行い、時には病変の進行を遅らせるために外科的処置を行う。その早期リスクを診断するには、レントゲン撮影が現在、広く行われている。生物学的に問題のない被曝量ではあるが、定期的な撮影を必要とするため可及的に被曝量を最小限にとどめる必要がある。このためレントゲンに依存しない、無被曝のインプラントの予後を検査するための検査法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

インプラント周囲炎は、インプラント周囲粘膜炎から支持骨吸収を伴うインプラント周囲炎へと悪化するような経過不良をたどる場合がある。これらの病変は細菌感染を主な原因とし、それぞれ歯肉炎や歯周炎に類似した病態を呈するが、インプラント周囲には歯根膜はなく、またインプラント体材料として生体材料が使用されていることから病態は正確には異なる。しかしながら、これまでに歯肉炎や歯周炎に関する研究で蓄積された手法を応用することは、インプラント周囲粘膜炎やインプラント周囲炎のメカニズム解明に非常に有益と考えられる。そこで我々は、ラット口蓋骨に極小のインプラント体を埋入し、インプラント周囲組織に歯周炎を誘発させることが知られ、またインプラント周囲円周状歯肉溝からも検出されている *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS (以下 Pg-LPS) を試料として炎症を誘発し、歯肉炎や歯周炎モデルを参考に擬似的にインプラント周囲炎を発症させた。このラットを用いて、インプラント周囲歯肉溝および組織中における炎症または骨吸収に関連した分子の動態について解析を行った。

### 3. 研究の方法

初年度は、極小のインプラント体をラットに埋入し、インプラント周囲炎をシミュレートするモデル動物の作製を試みる。実験用ラットの口蓋部に極小インプラント体を埋入し、オッセオインテグレーションの獲得まで維持管理、そして継続的観察を行う。次に、オッセオインテグレーションが獲得されたラットのインプラント体周囲に Pg-LPS を添加する。これによって、インプラント周囲炎を人為的に誘導する。周囲に LPS を添加しないインプラント体をコントロール群とする。誘導後、継続的にインプラント周囲を観察する。動物実験は九州大学動物倫理委員会の規程に従って行う。

これらの手順による方法でインプラント周囲炎をシミュレートするモデル動物作製が可能かどうかを組織学的に検証する。具体的にはインプラントを埋入したラットを安楽死させた後に Pg-LPS で誘導したインプラント周囲炎を発症したインプラント体周囲の歯肉を回収し、組織切片を作製する。同様に、コントロール群の歯肉を回収する。これらの実験群とコントロール群から回収した歯肉より作製した切片を用いて、骨吸収に関連した分子に対する特異的な抗体または染色液を用いて組織染色を行い、インプラント周囲炎の有無を確認する。同時にリンパ球の浸潤等についても解析する。

2 年目は、被曝のない検査法の開発のために 1 年目に確立したインプラント周囲炎モデルラットを用いて、インプラント周囲からの浸出液の回収方法について検討する。回収効率がよく、また臨床に应用可能な簡易的、均質的、経済的な回収方法であるかという点に着目して検討する。具体的には、インプラント周囲歯肉溝からペーパーポイントを用いて単位時間あたりの浸出液を回収し、リン酸バッファー中で保存する方法である。

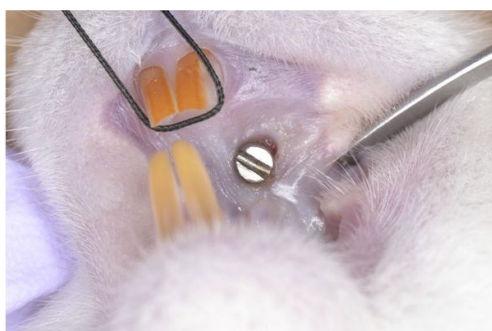
つづいて、回収した浸出液中のバイオマーカーの解析を行う。ELISA 法を用いて回収したインプラント体周囲の浸出液中に含まれる炎症、骨吸収に関連したタンパク質の濃度を測定する。炎症のマーカーである各種インターロイキン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、および骨吸収に深く関連した RANKL、OPG 分子等をバイオマーカーの候補分子とし解析する。また、初年度に得られたデータを基に、インプラント周囲炎の進行度を CT および組織学的に分類する。

3 年目は 2 年目の実験を継続して行う。さらに、3 年間で得られたバイオマーカーの変動と骨吸収の程度を比較検討する。これらの結果より、レントゲン撮影の結果と相関して、骨の吸収程度を代表する分子があるかどうかを解析する。以上の研究成果によって、従

来からのレントゲン撮影方法ではなく、無被爆でインプラント周囲の骨吸収の程度を把握できる検査方法を確立するための基礎データを収集する。

#### 4. 研究成果

現在のところ、インプラント周囲炎のリスクを早期に探知する方法として、動揺度検査、いわゆる歯周病などに類似したポケット検査、レントゲン検査、咬合検査、細菌検査などが一般に考えられる。プラットフォームスイッチングなどの新しいコンセプトが導入されはじめているため、あらゆる施設で同一基準のポケット深度の測定等を実施することは不可能である。また、繰り返し行うレントゲン検査には被爆という大きな短所がある。インプラント周囲炎に関連して、インプラント周囲からの浸出液中に含まれるバイオマーカーの変動を調べることは、患者に対して非侵襲性であり、また被爆のリスクは全くない。初年度は、九州大学動物実験倫理委員会です承された”インプラント周囲炎をシミュレートするモデルラットの作製とその診断、予防、治療法の開発”の実験計画に従って、極小のインプラント体をラットに埋入し、インプラント周囲炎をシミュレートするモデル動物の作成を試みた。具体的には、実験用ラットの口蓋部に極小インプラント体を埋入し、オッセオインテグレーションの獲得まで維持管理、そして継続的観察を行った。次に、オッセオインテグレーションが獲得されたラットのインプラント体周囲にPg-LPSを添加した。これによって、インプラント周囲炎を作為的に誘導した。周囲にLPSを添加しないインプラント体をコントロール群とした。誘導後、継続的にインプラン



ト周囲を観察した。

インプラント周囲の歯肉を回収し、その歯肉組織からRNAを分離しreal time RT-PCRを用いて、破骨細胞分化誘導因子であるRANKLとそのおとり受容体であるOPGの発現について解析した。また、組織免疫染色法を用いて分離した歯肉組織内でRANKLを発現している細胞について検討した。real time RT-PCRの結果より、P.g-LPSは、インプラント周囲の歯肉組織におけるRANKL mRNAの発

現を、LPSを投与していない歯肉組織中のRANKL mRNAと比較して有意に増加させた。一方、P.g-LPSはOPG mRNAの発現を減少させた。免疫組織染色法の結果、P.g-LPSを投与した歯肉組織中において、抗CD3抗体で染色された細胞は、同時に抗RANKL抗体で染色された。P.g-LPSはインプラント周囲において破骨細胞分化誘導因子であるRANKLの発現を誘導し、そのRANKLの一部はT細胞が供給している可能性が示唆された。このモデルラットのインプラント周囲歯肉溝からペーパーポイント法で滲出液を回収し、バイオマーカーの動態について解析を試みた。しかしながら、検出できたバイオマーカーはなかった。このことは、実験動物の滲出液の量が予想より遙かに微量であったと考えている。用いたペーパーポイント法に工夫が必要であることが明らかとなった。しかしながら、インプラント周囲に炎症を誘発することができる単純なラットモデルを開発することが出来たことは、今後のさらなる無被爆検査法の開発、確立に役立つものと期待できる。

#### 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 6件)

1) Mikihito Kajiya, Hitoshi Komatsuzawa, Annatoula Papantonakis, Makoto Seki, Seicho Makihiro, Kazuhisa Ouhara, Yutaka Kusumoto, Shinya Murakami, Martin A. Taubman, Toshihisa Kawai. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Omp29 is associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-actin rearrangement. PLoS One. Apr 29;6(4):e18287, 2011

2) Seicho Makihiro, Hiroki Nikawa, Takahiro Shuto, Masahiro Nishimura, Yuichi Mine, Koichiro Tsuji, Keishi Okamoto, Yuhiko Sakai, Masanori Sakai, Naoya Imari, Satoshi Iwata, Mika Takeda, Fumio Suehiro Evaluation of trabecular bone formation in a canine model surrounding a dental implant fixture immobilized with an antimicrobial peptide derived from histatin. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 22, 2765-2772, 2011

3) Seicho Makihiro, Hiroki Nikawa; Mikihito Kajiya; Toshihisa Kawai; Yuichi Mine; Eduardo Kosaka; Marcelo J Silva; Kei Tobiume; Yoshihiro Terada. Blocking of sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase-alpha1 with ouabain and vanadate suppresses cell-cell

fusion during RANKL-mediated osteoclastogenesis. *European Journal of Pharmacology*, 30;670(2-3):409-148, 2011

4) 峯 裕一, 牧平清超, 杉山 勝, 鎌田伸之, 岡崎昌太, 二川浩樹 脱落した口腔インプラント体の表面および付着物の解析 広島大学歯学雑誌 43, 106-112, 2011

5) Yuichi Mine, Tatsuyuki Nakatani, Keishi Okamoto, Seicho Makihira, Satoshi Iwata, Hiroki Nikawa Biomimetic diamond-like carbon coated titanium inhibits RANKL-dependent osteoclast differentiation *in vitro* *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 25(4), 523-528, 2012

6) 峯裕一, 牧平清超, 今利直也, 首藤崇裕, 二川浩樹 市販洗口剤と歯磨剤がチタンの表面性状に与える影響 日本口腔インプラント学会誌 25(1), 22-30, 2012

〔学会発表〕(計 22 件)

1) 牧平清超, 二川浩樹, 峯 裕一, 首藤崇裕, 杉山 勝, 鎌田伸之, 寺田善博 脱落した口腔インプラント表面の付着物が歯肉上皮細胞と骨芽細胞に与える影響第 28 回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会 2011.1.22-23 (鹿児島)

2) 坂井将典, 竹田美佳, 牧平清超, 西村正宏, 坂井裕大, 首藤崇裕, 峯 裕一, 岩田慧, 今利直也, 末廣史雄, 二川浩樹, 辻 紘一郎 口腔インプラントに固定化した新規塩基性抗菌ペプチド(JH8194)の大型イヌでの骨結合促進効果 第 58 回日本実験動物学会総会 2011.5.25-27 (東京)

3) 岡崎昌太, 牧平清超, 峯 裕一, 首藤崇裕, 諸井亮司, 寺田善博, 二川浩樹 メカニカルストレスに対する破骨細胞の反応にカルシウムの流入が関与している 日本補綴歯科学会第 120 回記念学術大会 2011.5.20-22 (広島)

4) 牧平清超, 二川浩樹, 峯 裕一, 諸井亮司, 寺田善博 メカニカルストレスによる顎堤の骨吸収に関する研究 ---周期性伸展刺激が骨芽細胞と破骨細胞に与える影響 ---- 日本老年歯科医学会第 22 回学術大会 2011.6.17 (東京)

5) 峯 裕一, 牧平清超, 二川浩樹 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE10)は破骨細胞前駆細胞の融合に関与している 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 2011.7.28-30 (大阪)

6) 首藤崇裕, 牧平清超, 峯裕一, 二川浩樹 寺田善博 抗 NHE モノクローナル抗体を固定化したチタンが破骨細胞と骨芽細胞の分化に与える影響 第 33 回日本歯科技工学会学術大会 2011.10.1-2 (東京)

7) 峯 裕一, 牧平清超, 河原和子, 田地

豪, 里田隆博, 村山 長, 二川浩樹 広島大学歯学部口腔保健学科における組織培養実習 3 年間の報告 第 33 回日本歯科技工学会学術大会 2011.10.1-2 (東京)

8) 峯 裕一, 中谷達行, 岡本圭司, 牧平清超, 岩田 慧, 二川浩樹: 骨吸収を制御する口腔インプラント開発における DLC 薄膜コーティングの応用 The 29<sup>th</sup> International Conference of Photopolymer Science and Technology 2012.6.2 (千葉)

9) Yuichi Mine, Yu Yamaguchi, Seicho Makihira, Hideki Tanaka, Miho Kusuda Furue, Hiroki Nikawa Direct and indirect effects of Interleukin-33 on osteoclast differentiation *in vitro* 2012 World Congress of In vitro Biology 2012.6.3-7 (Bellevue, USA)

10) 首藤崇裕, 牧平清超, 和智貴紀, 峯裕一 二川浩樹, 寺田善博 金属イオンは骨芽細胞における RANKL/OPG 比に影響を与える 平成 24 年度日本歯科理工学会九州支部夏期セミナー 2012.8.17-18 (長崎)

11) 首藤崇裕, 牧平清超, 峯裕一, 寺田善博, 二川浩樹 市販洗口剤と歯磨剤がチタンの表面性状に与える影響 第 42 回日本口腔インプラント学会・学術大会 2012.9.21-23 (大阪)

12) 首藤崇裕, 牧平清超, 峯裕一, 和智貴紀, 二川浩樹, 寺田善博 抗 NHE10 モノクローナル抗体を固定化したチタンが破骨細胞と骨芽細胞の分化に与える影響 平成 24 年度秋期第 60 回日本歯科理工学会学術講演会(創立 30 周年記念大会) 2012.10.13-14 (福岡)

13) 牧平清超 Immune cell-mediated bone resorption in periodontitis and periimplantitis *JADR* 2012.12.15 (新潟)

14) 峯 裕一, 牧平清超, 田地 豪, 二川浩樹 歯槽骨吸収に関する基礎的研究 -Interleukin-33 が骨芽細胞の RANKL 発現に与える影響- 日本老年歯科医学会第 24 回学術大会 2013.6.4-6 (大阪)

15) Yuichi Mine, Seicho Makihira, Takahiro Shuto, Hiroki Nikawa A Synthetic Peptide Derived from TRAF1 Inhibits Osteoclastogenesis and Bone Erosion 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research 2013. 6.28 (Kobe)

16) Takahiro Shuto, Takanori Wachi, Yuichi Mine, Ryoji Moroi, Yoshinari Matono, Hiroki Nikawa, Yoshihiro Terada, Seicho Makihira RANKL Expression in the Tissues around Implant Injected with LPS 2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2013.

8.21-23 (Bangkok, Thailand)  
17) Yuichi Mine, Seicho Makihira, Hiroki Nikawa, Toshihisa Kawai T, Masaru Ohara, Kazuko Kawahara, Koji Ohta, Takahiro Shuto, Toshio Kukita, Yoshihiro Terada Inhibition of Cellular Fusion during RANKL-Dependent Osteoclastogenesis by NHE10-specific Monoclonal Antibody 2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2013.  
8.21-23 (Bangkok, Thailand)  
18) 和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 栗田賢一, 牧平清超 チタンイオンと LPS が歯周組織に与える影響 日本補綴歯科学会九州支部学術大会 2013.8.24-25 (佐賀)  
19) 和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超 チタンイオン存在下で LPS が歯周組織に与える影響 日本歯科理工学会九州夏期セミナー 2013.8.30-31 (長崎)  
20) 首藤崇裕, 和智貴紀, 篠原義憲, 的野良就, 牧平清超 インプラント周囲炎に罹患した組織における RANKL 発現様式 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会 (第 31 回日本口腔インプラント学会九州支部総会・学術大会併催) 2013.9.13-15 (福岡)  
21) Yuichi Mine, Seicho Makihira, Hiroki Nikawa Inhibition of cell-cell fusion during osteoclastogenesis by NHE10-specific monoclonal antibody 5<sup>th</sup> Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry 2013.10.12-13 (Hiroshima)  
22) 首藤崇裕, 和智貴紀, 牧平清超 LPS に対するチタン製インプラント周囲組織の反応 平成 25 年度秋期第 62 回日本歯科理工学会学術講演会 2013.10.19-20 (新潟)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO)  
研究者番号：80304450  
(2) 研究分担者  
寺田 善博 (TERADA YOSHIHIRO)  
研究者番号：30038898  
(3) 連携研究者  
篠原 義憲 (SHINOHARA YOSHINORI)  
研究者番号：00423533