

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23792298

研究課題名(和文)インプラント周囲骨の生物学的安定性に関する3次元検証

研究課題名(英文)Three-dimensional examination of biological stability of the bone surrounding dental implants

研究代表者

辻村 麻衣子(羽下麻衣子)(TSUJIMURA, Maiko)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：60535219

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): 歯科インプラント治療の成否はインプラント周囲骨組織の状態と密接に関わっている。したがって、インプラント周囲の骨基質や骨中の細胞活動性に関する情報は、インプラントの臨床適応を判定するために重要である。そこで本研究では、インプラント周囲骨の細胞とリモデリングに着目して、組織学的手法を中心に、インプラント植立後のインプラント周囲骨組織の治癒過程を観察した。その結果、インプラント周囲に存在する骨細胞を主体とした細胞は、周囲骨のリモデリングと周囲骨組織の治癒変化に深く関わっていることが裏付けられた。

研究成果の概要(英文): Since the surrounding bone around an implant should be a crucial component for satisfactory implantation, this study aimed to examine a histological alteration of the bone tissue around titanium implants in rats. We investigated the bone around the implants by using micro-CT imaging, bone labeling, and immunostaining for certain molecules that were associated with the mineralization and bone remodeling. The bone remodeling influenced the healing of the bone around the implant judging from the micro-CT images and three-dimensional images of the labeled bone using confocal laser-scanning microscopy. Moreover, the immunohistochemical data indicated that the condition of the bone matrix around the implants had a close relation with osteocytes in the surrounding bone. The osteocytes seem to play an important role in the healing process of the bone around the implants as a local regulator of bone remodeling, which supports the prognosis of the dental implantation.

研究分野：医歯薬学(口腔組織学)

キーワード：インプラント 歯学 細胞・組織 骨細胞 リモデリング

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントは、重要な欠損補綴の選択肢である。そのために、歯科インプラント治療では、現在も新しい治療法やインプラント体の開発など、間断なく改良が試みられており、臨床応用を裏付ける基礎的な研究がますます必要とされている。歯科インプラント治療の成功はインプラント周囲骨の状態と密接に関わるため、研究代表者(辻村)は、インプラント周囲骨組織に注目した基礎的な研究を行っている。

インプラント周囲には窩洞形成により傷害を受けた骨が長期間にわたって残存するが、この傷害を受けた既存骨はやがてリモデリングにより吸収され消失し、インプラント周囲骨は成熟していく(Fujii et al., 1998, Haga et al., 2009, 2011)。このことから、歯科インプラント周囲骨組織の状態とインプラント治療の成功は関連しているといえる。

一方、骨細胞は骨細管に突起を伸ばし、骨細管を骨内に張りめぐらせて形成した骨細胞ネットワークを介して、骨のリモデリングや骨質の調整を行っている(Knothe et al., 2004)。研究代表者は骨細胞産生因子をマーカーとした免疫組織化学的観察を行い、骨細胞ネットワークとインプラント治療との関連を調べた。その結果、治癒過程において、インプラント周囲骨の骨細胞配列の規則性と機能に関わる抗体への反応性に変化が認められ、骨細胞ネットワークの幾何学的構築とインプラント周囲骨の機能維持の関連性が推察された(Haga et al., 2011)。インプラント周囲骨の骨細胞など、周囲骨に存在する細胞は骨基質の制御を行っていると考えられているため、インプラント周囲骨中の細胞に関する情報は、インプラントの臨床において非常に重要なものとなる。

インプラント周囲骨において、骨基質および骨細胞の動態を解明することは、生物学的安定性を考える上で不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インプラント周囲骨の細胞と骨基質改造との関連に着目して、インプラント治療過程でのインプラント周囲骨組織を2次元的小および3次元的小に解析し、インプラント周囲骨の生物学的安定性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動物実験倫理委員会の承認を受けて行った。実験モデルは、以下のように作製した。

(1) 4週齢雄性ウイスター系ラットの上顎両側第一臼歯を抜歯した。

(2) 抜歯窩が治癒する抜歯4週後、エンジンリーマー#90(φ0.9 mm)とピーソリーマー#3(φ1.1 mm)にて窩洞形成し、インプラント(φ1.1 mm、長さ2~3 mmの純チタン棒)を埋入した。一部はエンジンリーマー#90(φ0.9 mm)とゲーツドリル#3(φ1.2 mm)にて窩洞形成し、インプラント(φ1.2 mm、長さ2~3 mmの純チタン棒)を埋入した。

(3) 一定の治癒期間後、観察方法に合わせた試料作製を進めた。治癒期間は、本研究と同様のモデルを用いたインプラント周囲骨組織変化をもとに設定した。

インプラント周囲骨の特性を検証するために、以下のような①~③の観察方法を用いて検索を行った。

①インプラント周囲骨の3次元的小の観察

一部の試料は10%中性ホルマリン固定液による浸漬固定後、マイクロCT撮影し、周囲骨の骨結合の状態などを観察した。

②骨ラベリングによる3次元的小の観察

モデルラットの一部に2種類の蛍光剤(アリザリンレッドとカルセイン)による骨ラベリングを施した。アリザリンレッドは安楽死させる3週間前、カルセインは1週間前に投与した。(治癒期間7日のラットはカルセインのみ投与した。)試料を採取し、マイクロCT撮影後、脱灰せずに樹脂に包埋し、研磨切片を作製した。樹脂包埋切片において骨ラベリング像が観察可能であることを確認し、インプラント周囲骨を共焦点レーザー顕微鏡(LSM 710, Carl Zeiss)により、2次元的小および3次元的小に撮影した。

③インプラント周囲骨の組織学的観察

・インプラント周囲骨組織全体の観察

研磨切片を用いて骨ラベリング像を撮影した後、同切片をトルイジンブルー・塩基性フクシンにより染色し、タイリング画像取得システムによって、インプラント周囲骨組織を広範囲に撮影した。

・インプラント周囲骨細胞の免疫組織化学的検討

4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定した後、脱灰した試料を凍結包埋し、切片を作製した。この切片において骨細胞の機能と関連した以下の2種類の抗体を用いて免疫組織化学的観察を行った。骨の石灰化に関与するdentin matrix protein (DMP) 1に対する蛍光免疫染色を行い、3次元的小に観察した。また、DMP1と骨形成の抑制に関わるsclerostinの蛍光二重染色を行い、染色を施した切片を共焦点レーザー顕微鏡で2次元的小および3次元的小に観察した。

・Matrix metalloproteinases (MMPs) と tissue inhibitor of metalloproteinase の

免疫染色

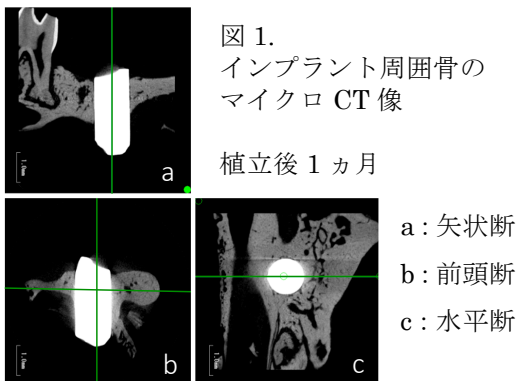
4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定した後、脱灰した試料をパラフィン包埋および凍結包埋し、それぞれの薄切切片を作製した。組織のリモデリングに重要な働きをする matrix metalloproteinase (MMP) -2、MMP-9、MMP-13、MMP を阻害する tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -1 の免疫染色を施し、光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。また、パラフィン切片および凍結切片を用いて MMP-2 と MMP-9、MMP-13 と TIMP-1 の蛍光二重免疫染色を施した切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

主な成果

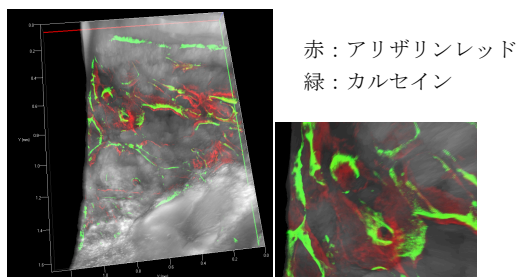
以上の実験を行い、(1) - (4) の成果を得た。

(1) 組織学的観察により、インプラントを植立した直後のインプラント周囲骨には窩洞形成面が明瞭に認められた。インプラント周囲骨組織の変化とともに、マイクロ CT 像からは経時的なインプラント周囲骨の治癒が観察された (図 1)。



(2) 2 種類の骨ラベリング剤により、時期を異にして形成された新生骨が確認された。蛍光標識された新生骨は、インプラント周囲骨、とくにインプラント-骨界面にみられた (図 2)。

図 2. 骨ラベリング像
共焦点レーザー顕微鏡による 3D 画像
(右: 拡大) インプラント植立後 1 ヶ月



(3) 基質の石灰化に関与する DMP1 の蛍光免疫染色により、すべての骨小腔がインプラ

ント周囲骨全体に明示され、DAPI による核染色とともに観察することにより、インプラント植立後早期の周囲骨に、骨細胞の変性・消失した骨小腔が存在することが 2 次元および 3 次元的に確認された (図 3)。DMP1 と sclerostin の蛍光二重免疫染色の結果、インプラント周囲骨がリモデリングにより新生骨に置換される過程で、DMP1 と sclerostin のいずれにも陽性反応を示す骨細胞が多く存在することが明らかになった (図 4)。

図 3. DMP1 の蛍光免疫染色像 (DAPI 核染色)
インプラント植立後 7 日
共焦点レーザー顕微鏡による 3D 画像
*: インプラント窩洞 矢頭: 空虚な骨小腔

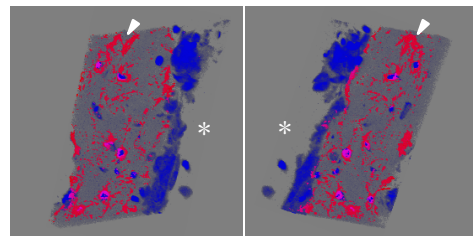
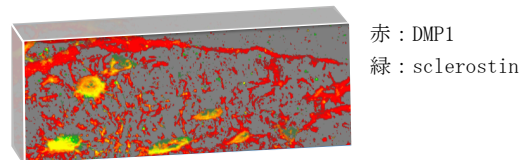


図 4. DMP1 と sclerostin の蛍光二重染色像
インプラント植立後 25 日
共焦点レーザー顕微鏡による 3D 画像



(4) 組織リモデリングに関わる MMP-2、MMP-9、MMP-13、MMP を阻害する TIMP-1 の免疫染色の結果、いずれもインプラント周囲骨組織、とくにリモデリングが活発に行われている治癒過程の周囲骨細胞などに陽性反応がみられた (図 5-8)。また、MMP-2 と MMP-9、MMP-13 と TIMP-1 の蛍光二重染色を施した切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、いずれも活発なリモデリングが行われている段階において、インプラント周囲骨に共陽性反応が認められた。

図 5. MMP-2 の免疫染色像
インプラント植立後 10 日 (10D) および 20 日 (20D) * : インプラント窩洞

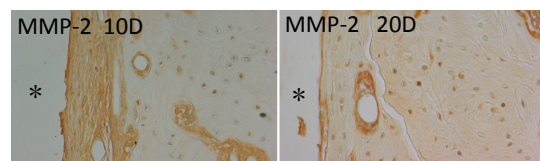


図 6. MMP-9 の免疫染色像
インプラント植立後 10 日 (10D) および 20 日 (20D) * : インプラント窩洞

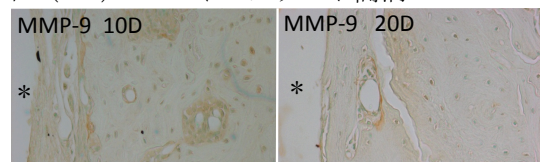


図7. MMP-13の免疫染色像
インプラント植立後10日(10D)および1ヵ月(1M) * : インプラント窩洞

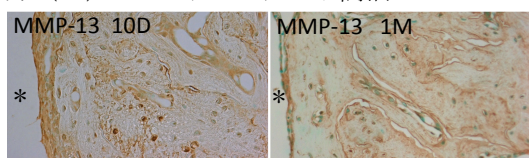
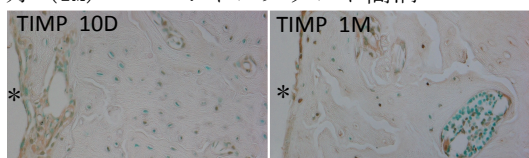


図8. TIMP-1の免疫染色像
インプラント植立後10日(10D)および1ヵ月(1M) * : インプラント窩洞



(1)より、インプラント周囲骨の全体的な治癒過程を3次元的に確認することができた。

(2)より、治癒過程のインプラント周囲骨組織における活発な骨リモデリングが、2次元および3次元的に確認された。また、インプラント周囲を広い範囲に観察することで、インプラント周囲の治癒変化が観察され、治癒への骨リモデリングの役割が裏付けられた。

(3)より、インプラント植立後早期に空虚な骨小腔がみられたことにより、窩洞形成が周囲骨細胞に影響を与えることが強く示唆された。インプラント周囲骨において、骨細胞を中心とした骨内の細胞が窩洞形成やその後の骨リモデリングと関連して変化すること、これらの細胞がインプラント周囲骨の治癒に影響する可能性があることが示された。

(4)より、インプラント周囲骨の細胞は骨基質の合成と分解にも関わり、骨リモデリングを局所的に調整している可能性が示された。

(3)(4)より、インプラント周囲骨において、骨細胞などの骨中の細胞は、窩洞形成後の骨リモデリングに深く関与し、インプラント植立後の治癒に関連していることが推察された。

本研究により、インプラント周囲組織が経時的に変化することが確認され、骨細胞をはじめとしたインプラント周囲骨中の細胞は窩洞形成の影響を受けるとともに、インプラント植立後の周囲組織の治癒、すなわちインプラントの成功に深く関与することが推測された。

得られた成果の位置づけと今後の展望

本研究において、インプラント植立後の治癒変化を3次元的に観察することで、生物学

的安定にいたる骨組織の詳細な変化の一部を明らかにできたと考えている。臨床でのインプラントの脱落と骨の状態の関連を考える上でも、本研究は有用な情報を与えると思われる。

今後は、インプラント周囲の吸収変化や組織変化を定量化するために、マイクロCTによる解析や、組織形態計測などを試みたい。また、本研究で用いた蛍光ラベリング法や組織染色法において、インプラント周囲の広い範囲に対して、さらに詳細な検索を深めていきたい。それにより、インプラント周囲組織の治癒に関わる範囲、周囲組織が変化する重要時期など、臨床に寄与する情報が得られると考えている。

今後さらに、インプラント周囲骨の傷害から治癒する経時的変化と生物学的安定性獲得にいたるメカニズムの検証を進める予定である。

〈引用文献〉

① Noritaka Fujii, Haruka Kusakari, Takeyasu Maeda. A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction. J Periodontol 69:485-495. 1998.

② Maiko Haga, Noritaka Fujii, Kayoko Nozawa-Inoue, Shuichi Nomura, Kimimitsu Oda, Katsumi Uoshima, Takeyasu Maeda. Detailed process of bone remodeling after achievement of osseointegration in a rat implantation model. Anat Rec (Hoboken) 292:38-47. 2009.

③ Maiko Haga, Kayoko Nozawa-Inoue, Minqi Li, Kimimitsu Oda, Sumio Yoshie, Norio Amizuka, Takeyasu Maeda. A morphological analysis on the osteocytic lacunar canalicular system in bone surrounding dental implants. Anat Rec (Hoboken) 294:1074-1082. 2011.

④ Melissa L Knothe Tate, Josée R Adamson, Andrea E Tami, Thomas W Bauer. The osteocyte. Int J Biochem Cell Biol 36:1-8. 2004.

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1件)

Ken Nakahara, Maiko Tsujimura, Tateyuki Iizuka, Nikola Saulacic. Periosteum-induced bone formation by distraction osteogenesis: histologic and micro-CT analysis. Int J Oral Maxillofac Implants, 査読有, 印刷中.

〔学会発表〕（計3件）

① 辻村 麻衣子、中原 賢、吉江 紀夫、骨改造を制御するインプラント周囲細胞の免疫組織化学的検討、第44回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会、2014年9月13日、14日、東京国際フォーラム（東京都千代田区）。

② Maiko Tsujimura, Takeyasu Maeda, Sumio Yoshie: Biological Stability of the Bone Surrounding the Dental Implant, Joint meeting of the American academy of maxillofacial prosthetics and International society for maxillofacial rehabilitation,ハリケーンによる集会中止（2012年10月27-30日）のため、AAMP-ISMR Program Book-WEBのみの発表。

③ 羽下-辻村 麻衣子、網塚 憲生、前田 健康、吉江 紀夫、インプラント周囲骨細胞の免疫組織化学的検索、第54回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012年9月14日、15日、奥羽大学記念講堂（福島県郡山市）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻村 麻衣子（羽下 麻衣子）

(TSUJIMURA, Maiko (HAGA, Maiko))

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：60535219