

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593127

研究課題名(和文) 歯周組織およびインプラント周囲組織の破壊機序解明に関する実験病理学的研究

研究課題名(英文) An experimental study of mechanism of periodontal and peri-implant tissue destruction.

研究代表者

原 宜興 (HARA, Yoshitaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：60159100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々の実験的歯周炎モデルをインプラントに応用し、歯周組織とインプラント周囲組織における組織破壊の相違を比較した。

ラットの臼歯を抜歯後インプラント埋入、反対側は天然歯のままとした。LPSによる感作群と、感作をしない群に分けた。一方歯肉溝およびインプラント周囲溝へLPSを滴下した群と、PBSを滴下した群を作製した。またインプラント埋入のみを行った群を対照とした。3日目の滴下後に屠殺し、病理学的検索を行った。天然歯側ではアタッチメントロスは認めなかった。一方インプラント側の感作LPS滴下群では、他の4群と比較して有意なインプラント接合上皮の下方伸長、炎症性細胞浸潤、顕著な骨吸収を確認した。

研究成果の概要(英文)：We applied our experimental periodontitis model to the peri-implant tissues and compared periimplant destruction to periodontitis without using a ligature.

Rats were divided into five groups. Implantation was performed after extraction of right first molars in rats. The left first molars were left untreated to be examined as natural teeth. The immunized group consisted of rats that had received intraperitoneal LPS, whereas the non immunized group received only PBS. The untreated baseline group received only implantation. After booster injection, half of each group received topical application of LPS in the palatal gingival sulcus daily for 3 days. The other half of the groups received PBS. Histopathological and histometrical findings were observed. Peri-implant tissue destruction was greater in the immunized and LPS-applied groups than in the other groups. No periodontal destruction was observed. Antigen-induced peri-implant tissue destruction occurs faster than periodontal tissue

研究分野：歯周病学

キーワード：インプラント周囲炎 歯周炎 免疫複合体 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント治療は欠損補綴における重要な役割をもっている。主流となっている骨接合型インプラントの10年生存率は上顎であれば96%とされている。(Clin Oral Implants Res 2008 Jung RE J.)しかし、口腔内で4-5年機能したインプラントの約半数がインプラント周囲炎に罹患しているとの報告もある。(J Clin Periodontol.2008 Zitzmann) 歯周炎、インプラント周囲病変はそのいずれもプラーク細菌により発症し、臨床的には軟組織の炎症、放射線診断では骨の減少を認める。また、プロビング時の出血や排膿など非常に近似した病態を示す。しかし、歯周炎とインプラント周囲は臨床所見が似ていても病理学的所見は大きな違いがあるように思われる。

歯周炎は歯肉溝上皮内の細菌、産生される外毒素などが接合上皮を透過して結合組織内に炎症を引き起こす。しかし、歯周炎では炎症が起こっても、その骨周囲は炎症のない結合組織で隔絶されている。一方、インプラント周囲炎もインプラント体周囲に付着した細菌、産生される外毒素などがインプラント接合上皮を透過し結合組織内に炎症を引き起こすが、その後すぐに骨まで炎症が波及するとされている。(Clin Oral Implants Res. 1992 Lindhe J) 骨までの炎症波及がインプラント周囲組織で速く、広範囲に及ぶのは歯牙 歯肉とインプラント体 軟組織の接着形態の違いによるシール機能の弱さや、周囲組織の血管の少なさによる免疫系防御の弱さ、結合組織のコラーゲン線維走行が一方的で少ないなどの物理的な抗原物質の透過性の違いなどが考えられ、天然歯周組織と比較しインプラント周囲組織は細菌やその外毒素に弱いと考えられている。しかし、その理由をはっきり検証報告したものはない。

これまで、歯周炎とインプラント周囲炎の臨床的違いを報告したものは多いが、組織学

的比較を行ったものは少なく、その多くは実験動物と結紮系を用いてそれぞれの病態を再現しようとした。歯もしくはインプラントへ絹もしくは綿の結紮系を巻くことによって、プラークの蓄積が増進される、結果、歯周炎もしくはインプラント周囲炎が引き起こされる。結紮系そのものは組織破壊を誘導するわけではないが、これには結紮系の歯肉溝への押し込みによる組織障害が起きる。それは、口腔内で自然に起こる病態を再現しているとはいいがたい。また、それを防ぐために屠殺前に結紮系を除去し、自然な状態に近づけようとしたモデルも存在するが(J. Periodontol. July, 1978 Lindhe) そうすると、歯周炎は休止期に入ってしまう炎症が消退し組織破壊が見られなくなる。一方、インプラント周囲炎は表面性状により進行度合いは変わるものの、結紮系除去後も炎症が継続し組織破壊が進行してしまう。これでは、両疾患を純粋に比較することはできないと考えられず、これら結紮系を用いた実験的モデルは疾患の進行を解明するには不適切なモデルだと報告した。(J Clin Periodontol. 2011 Berglundh).

2. 研究の目的

我々は以前、細菌菌体成分である *Escherichia coli* LPS (LPS) で腹腔免疫しておいたラットの歯肉溝に LPS を滴下し、免疫複合体が形成され歯周ポケット形成(アタッチメントロス)と歯槽骨吸収が誘導される実験的歯周炎モデルを確立している。これをインプラント埋入ラットに応用することによって結紮系によらない歯周炎とインプラント周囲炎の病理組織学的比較を行いたいと考えた。

3. 研究の方法

Experimental design

5週齢のルイス系雄性ラット 25匹の口腔内、左側を歯周炎群として天然歯のままとし、

右側は抜歯後インプラント埋入側とした。インプラント埋入は抜歯後即位埋入し4週間静置した。左右による歯周炎群とインプラント群を感作 LPS 滴下群・非感作 LPS 滴下群・感作 PBS 滴下群・非感作 PBS 群・全くの無処置の各 6 匹のグループに分けた。

免疫感作を行う群には *Escherichia coli* LPS (O111: B4; Sigma, St Louis, MO, USA) 150 μ m をコンプリートアジュバントとリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で懸濁し、0.3ml を腹腔内に注入した。28 日後にブースター投与として LPS を PBS で希釈しインコンプリートアジュバントで懸濁し腹腔内に投与した。

非感作群には各アジュバントと PBS を 0.3ml 同様のスケジュールにて投与した。

ブースター投与後 2 日の抗 LPS 血清抗体価上昇を待って LPS 滴下 (50 μ g/ μ l) もしくは PBS 滴下を開始した。滴下は 24 時間おきに 3 回行った。3 回目の滴下 1 時間後に屠殺を行った。

Implants

過去に使用が報告されている (Biomaterials 2005 Atsuta) Ti-6Al-4V スクリュータイプインプラント (スカイブルー、福岡、日本) を使用。直径 2mm 長さ 4.5mm のものを使用し、使用前に 100% アセトンと蒸留水で処理し、70% エタノールに浸漬し消毒を行った。

Oral implantation

過去に池田らが報告したものに準じ (J Periodontol. 2000 Ikeda) ラット口腔内へのインプラント埋入は、5 週齢のラットをイソフルラン吸入にて全身麻酔し、上顎右側大白歯を抜歯、インプラント埋入窩は K-リーマー (#20-120 MANI, INC. Tochigi Japan) にて空けたインプラントホールへ埋入した、ラットは覚醒前にブプレノルフィン (0.05mg/kg 心臓内投与 レパタン 大塚製薬 東京 日本) を鎮痛のため投与した。そ

の後 4 週の定着を待った。

全てのラットはチャールズリバージャパン (東京、日本) から購入され、先導生命科学研究所 (長崎大学、長崎、日本) にて、特定病原体除去の状態に維持された。動物の世話や実験操作は長崎大学の動物実験のためのガイドラインに従い、動物実験委員会の承認を得ている。

Preparation of tissues

各ラット屠殺後、上顎骨を摘出、4% PFA/PBS にて 10 時間 4 にて固定した後、10% EDTA で 3 週間灰し、AMEX 法 (acetone, methyl benzoate and xylene) を用いてパラフィン包埋 (*Am J Pathol* 1986 Sato) を行った。インプラント側は包埋直前にインプラント体を除去した。切片は第一臼歯の頬舌断を中央にて 4 μ m で連続切片とした。インプラント側は頬舌的に直径が一番大きくなった部分から 4 μ m の連続切片を作製した。

ELISA

二回目の感作直前から眼窩下静脈叢から血液を採取、滴下開始時、屠殺前に計 3 回の血液サンプルを採取。血液は遠心分離にて血清を取り出した。血清中の抗 LPS 血清 IgG レベル測定は 96well のプレートに感作に使用した LPS を炭酸緩衝液 (pH9.6) で 2.5 μ m/ml に溶解し、100 μ l/well に散布し 4 16 時間インキュベートした。0.05% Tween/PBS (PBST) で洗浄した後、0.1% ウシ血清アルブミン/PBS でブロッキングし、PBST でさらに洗浄した。1000 倍希釈した血清を 100 μ l を一時間インキュベートして、PBST にて洗浄、ゴータラット抗 IgG を 4000 倍希釈し一時間インキュベートした。PBST で洗浄後 3,3',5,5'-テトラメチルベンジン溶液であるサブストレート (R&D) を添加し、反応停止のために 1M H₂SO₄ 25 μ ml を添加しマイクロプレートリーダーにて 450nm で吸光度を読み取った。

TRAP 染色

破骨細胞の同定には作製した連続切片を酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色 (Cancer 1972 katayama) した。染色溶液には Naphtol AS-BI 5mg を蒸留水 4ml と 0.1M 酢酸緩衝液 5ml に溶解し、pararosanilin 溶液 0.5ml (蒸留水 20ml と濃塩酸 5ml に pararosanilin 1g) を混合し、1MNaOH で pH5 に調整し蒸留水で 10ml したものをろ過し L-(+)-酒石酸溶液 0.445ml を混和した。上記染色液をキシレンで脱パラフィンした切片に、37℃ で反応させヘマトキシリンにて核染しマリノール封入し光学顕微鏡にて観察した。歯槽骨面上の 300 μ m 幅の部位中の TRAP 陽性細胞数が数えられた。

炎症性細胞数計測

接合上皮に近接した結合組織内の 3 つのユニット区画 (50 μ m \times 50 μ m) 中の炎症性細胞数をカウント、平均化し結合組織内の炎症性細胞の総数/mm² を光学顕微鏡 400 倍下でカウントした。

C1qB の免疫組織学的染色

免疫複合体検出のため、C1qB が免疫組織学的に染色された。各切片は脱パラフィンされ、内因性ペルオキシダーゼ活性が 30 分間 0.3% 過酸化水素水メタノール液で遮断され、その後室温で 30 分間正常 (ヤギ) 血清で恒温放置された。これら切片は (ウサギポリクロナル) 抗 C1qB 抗体 (AVIVA Systems Biology, San Diego, CA USA) で一晩浸漬された。

その後、切片は (ビオチン標識ヤギ抗ウサギポリクロナルイミュノグロブリン) (Dako, Glostrup, Denmark) で 30 分間、それからペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DaKo) で 30 分間、ジアミノベンゼンテトラオキサイド溶液で恒温放置され、ヘマトキシリンで対比染色された。

統計解析

データは statmate software program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を用いて解析された。

4. 研究成果

血清中の抗 LPS IgG 血清レベル

抗 LPS IgG 血清レベルは LPS による免疫感作を行った群では、感作初日から滴下開始時、滴下三日目にかけて経時的に上昇を認めた。一方、腹腔に PBS を投与した非感作群ではどの個体も感作群と比較し有意な血清抗体価の上昇を認めなかった。

病理組織学的所見

各ラットから作製した試料から連続切片を作製し 10 枚置きに 5 つ切片をヘマトキシリン-エオジンで染色して光学顕微鏡で観察した。左側の天然歯群では感作、非感作にかかわらず滴下 3 日では LPS 滴下、PBS 滴下共に歯周ポケット底はセメントエナメル境 (CEJ) に位置していた。感作 LPS 滴下群では接合上皮 (JE) および結合組織 (CT) にわずかに好中球を主体とした炎症性細胞浸潤を認めるが、そのほかの群では無処置と比較して変化を認めなかった。インプラント側の無処置群では炎症性細胞浸潤を認めなかったが、感作 LPS 滴下群では結合組織内に多くの炎症性細胞浸潤を認め、接合上皮は下方に伸長し、歯槽骨の吸収を認めた。

組織計測学的計測

ヘマトキシリン・エオジンで染色した切片を画像解析ソフト (imageJ) にて計測を行った結果、天然歯群では CEJ と歯周ポケット底は感作、非感作、滴下物に関わらずいずれも有意な変化がなかった。一方、インプラント側では無処置のもの、感作、非感作にかかわらずインプラント周囲辺縁粘膜歯冠側頂からインプラント体第一スレッド痕底部までの距離は全ての群でその長さに有意差はなかった。しかし、インプラント周囲辺縁粘膜歯冠側頂から歯槽骨頂までの距離は感作 LPS 滴下を行ったものは、無処置、非感作、

感作 PBS 滴下と比較し有意に長くなった。無処置、非感作、感作 PBS 滴下群間では有意差を認めなかった。また、インプラント周囲辺縁粘膜歯冠側頂からインプラント接合上皮最下端までの距離も同様の結果が得られ感作 LPS 滴下を行ったもののみ有意にその長さを増していた。

TRAP 陽性破骨細胞

天然歯群では感作、非感作各個体はまったく破骨細胞の出現を認めなかった。一方、インプラント群の LPS 感作 LPS 滴下群ではインプラント界面に沿って多数の TRAP 陽性破骨細胞の出現を認めた。一方、他の群ではほとんど TRAP 陽性細胞の出現は認められなかった。

炎症性細胞数

インプラント側の炎症性細胞数は各群間に有意差を認めなかった。

C1qB の免疫組織学的所見

感作 LPS 滴下群には接合上皮直下結合組織に C1qB の局在が認められた。

まとめ

以上の結果より、インプラント周囲組織は天然歯周組織に比べ組織破壊が早いことが示唆された。

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)

(1) Histopathological comparison of the onset of peri-implantitis and periodontitis in rats. T Takamori, Atsuta I, Nakamura H, Sawase T and Hara Y. Clinical Oral Implants Research, 査読あり 27 巻 2016

[学会発表](計4件)

1) Takamori Y, Takamori A, Yoshinaga Y, Ukai T, Ozaki Y, Shiraishi C, Izumi S, Kobayashi H, Nakamura H, Yoshimura A and Hara Y: Histopathological Comparison of destruction between peri-implant and periodontal tissue in

rats. 11th APSP meeting, 8th and 9th October 2015, Bali, Indonesia,

- 2) ラット実験的歯周炎モデルを用いた歯周炎とインプラント周囲炎の病理組織学的比較, 高森雄三他. 日本歯科保存学会 2015年度秋季学術大会(第143回), 平成 27年11月12, 13日, 文京シビックホール (文京区, 東京都)
- 3) ラットにおけるインプラント周囲炎と歯周炎発症の病理組織学的比較, 高森雄三他. 日本歯周病学会秋季学術大会(第57回), 平成26年10月18日, 19日, 神戸国際会議場(神戸市),
- 4) 高森雄三他インプラント周囲炎発症メカニズム研究 - 実験的インプラント周囲炎モデルの確立 -, 高森雄三他. 平成26年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会, 平成26年11月16日, アクロス福岡(福岡市)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 宜興 (HARA, Yoshitaka)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号: 60159100

(2) 研究分担者

吉村篤利 (YOSHIMURA, Atsutoshi)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号: 70253680

鷓飼 孝 (UKAI, Takashi)

長崎大学病院(歯学系)・講師

研究者番号: 20295091

金子高士 (KANEKO, Takashi)

福岡歯科大学歯学部・教授

研究者番号: 10284697

吉永泰周 (YOSHINAGA, Yasunori)

福岡歯科大学歯学部・准教授

研究者番号: 60452869

(3) 連携研究者

なし

