

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792067

研究課題名(和文)咬合力によるインプラント周囲の骨吸収に関与する分子同定

研究課題名(英文)Molecular identification of resorbed bone around loaded implants

研究代表者

長澤 麻沙子(Nagasawa, Masako)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40612239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：将来の臨床的な骨吸収対策確立の端緒とするため、研究代表者が先に確立したラットインプラント咬合モデルを用いて、インプラントに加わる咬合力によって起こる骨吸収のメカニズムに関与する蛋白質を検索することを目的とした。咬合力を付与するために用いたインプラント上部構造は2種類あり、カンチレバータイプではインプラント周囲の骨吸収が活発となり、オッセオインテグレーションの崩壊に繋がった。一方、咬合面が円形タイプのもものでは骨吸収はほとんど観察されなかった。異なる咬合力を付与した場合、インプラント周囲骨では組織学的に異なる所見を観察することができ、さらに咬合力に特異的ないくつかの蛋白質を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the proteins related to bone resorption around implants caused by occlusal force, the rat implant occlusion model which the author developed before was used as the first step to prevent clinical bone resorption in future. Two kinds of implant abutment were used. One was cantilever type which caused bone resorption that eventually resulted in destruction of osseointegration. The other was round shape type which did not caused bone resorption around the implants. Under these two different types of occlusion, the bone around implant displayed different histological reactions and some proteins which might cause the bone resorption under occlusal force were detected.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯科補綴学一般

1. 研究開始当初の背景

臨床においてインプラントに過大な力が加わると、インプラント周囲の骨に吸収が生じる可能性がある事は知られている。例えば、インプラントを矯正の際のアンカーとして用いた場合や不適合な補綴物を装着した場合などにインプラント周囲の骨吸収を経験することが多い。これらの骨吸収は炎症を伴わないこともあり、力による骨吸収であると考えられるものの、そのメカニズムの詳細はわかっていない。

力による骨吸収に関する検索をする場合、2種類の力、すなわち動的な力(咬合力)と静的な力とを分けて考える必要がある。上記は静的な力による骨吸収であるが、我々の臨床にとってより重要なのは、動的な力によるものと思われるインプラント周囲の骨吸収である。機能開始後、すなわちオッセオインテグレーション成立後のインプラント脱落の原因はその90%が過大咬合にあると言われており、発生率は下顎よりも骨密度が低い上顎で3倍多いと言われている。また、インプラント埋入後比較的早く咬合力を加える早期荷重や即時荷重の場合には、十分な治癒期間経過後の荷重に比較して失敗率が高い。以上のことから、咬合力によるインプラント周囲の骨吸収は、感染や炎症の存在とは関係なく、場合によっては骨強度に応じて起こることが推察される。臨床的にこれを防止するためには、まずこのような骨吸収のメカニズムを知ることが重要である。

咬合力による骨吸収のメカニズムを検索するに当たって問題となるのは、実験モデルが構築できるか否かである。静的な力による骨吸収動物実験モデルが比較的容易に構築できるのに対し、臨床的に重要であると思われる動的な力による骨吸収モデルは、その構築が困難で、動物を対象とした実験モデルは、過去に適切なものが提示されていなかった。実際にインプラントが埋入できる大型動物では、インプラント周囲に骨吸収を惹起するに足る咬合力を付与することが難しいからである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が先に確立したラットインプラント咬合モデルを用いて、インプラントに加わる咬合力によって起こる骨吸収のメカニズムに関与するたんぱく質を免疫組織化学的に検索し、将来の臨床的な骨吸収対策確立の端緒とすることである。近年デンタルインプラントの成功率は臨床的に満足できるレベルにあると考えられるが、依然として脱落・失敗に至るインプラントも存在する。これら失敗のうち、十分な治癒期間を経て、オッセオインテグレーションを獲得した後の脱落は、その原因の90%が咬合力によるものであると言われており、咬合力による骨吸収のメカニズムについてはその詳細がわかっていない。

3. 研究の方法

(1)咬合力による骨吸収が生じる条件で実験(研究代表者が大学院在籍中に確立したラットインプラント咬合モデルを使用)

4週齢雄性ウイスター系ラットの両側上顎第一、第二臼歯を抜歯する。

抜歯窩治癒期間(4週間)後に片側の粘膜骨膜弁を剥離し、注水下にピーソリマーにてインプラント窩を形成して特注により製作した純チタン製インプラント(スクリュータイプ)を骨同縁に植立し、初期固定を確認する。

4週間後に再度インプラント体を露出して、動揺していないこと、すなわちオッセオインテグレーションが獲得されていることを確認する。同時に咬合面が長方形でカンチレバータイプの上部構造をインプラント体にスクリュ固定し、ラット閉口時に上部構造が下顎臼歯部と強く接触することを確認する。

上部構造装着後、5、10、15日後に4%パラホルムアルデヒドにて還流固定し、10%EDTA溶液にて脱灰する。

通法に従って脱灰標本を作製し、パラフィン包埋後に薄切する。この実験条件では、上部構造装着15日までにインプラント周囲の骨吸収が活発に起こり、オッセオインテグレーションが崩壊することが分かっている。

切片に対し、既知のメカノレセプター候補たんぱく質に対する免疫組織化学染色を施し、インプラント周囲組織での発現を詳細に検索する。

検索対象たんぱく質:SA(stretch-activated channel)チャンネル(カルシウムチャンネル)、エストロジェンレセプター、OPN、RANK、RANKL、OPG

(2)骨吸収モデルと非吸収モデルとの比較

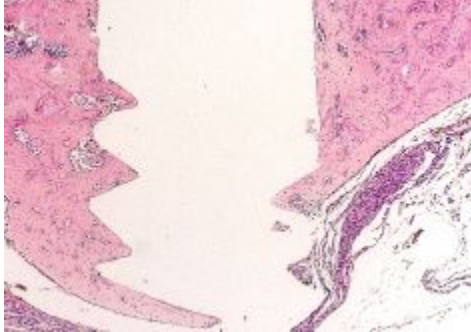
埋入したインプラントにスクリュ固定するアバットメントには2種類あり、円形タイプの上部構造を装着する個体の組織切片をも作製し、カンチレバータイプ装着の時と同様のメカノレセプターに対する免疫組織染色を施し、それらの発現を検索する。これら2条件の実験結果を比較することにより、咬合力によって起こる骨吸収の際に特異的に起こるメカノレセプターの発現パターンを同定する。また、卵巣摘出ラット(OVXラット)とコントロールラット(sham)を用いることで咬合力に関与するたんぱく質の発現の違いを同様に観察する。

(3)in vitroにおける各種たんぱく質発現検索

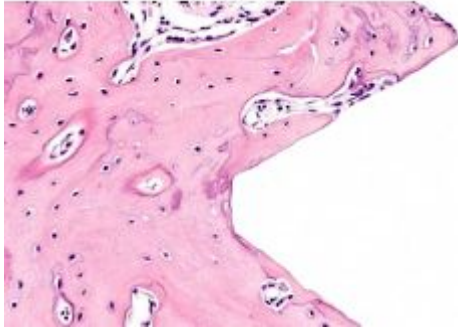
3次元培養系を用いてラット頭蓋骨より採取した骨細胞および骨芽細胞を培養し、各種条件で圧縮刺激を加える。一定時間経過後に培養細胞よりRNAを抽出し、上記動物実験で検索対象としたメカノレセプターや破骨細胞関連の遺伝子発現を、RT-PCR(Real Time PCR)を用いて検索する。

4. 研究成果

(1)咬合力による骨吸収が生じる条件で実験
コントロールの組織像
(インプラント埋入後、咬合力を付与してい
ないもの)
【インプラント埋入 4 週後】

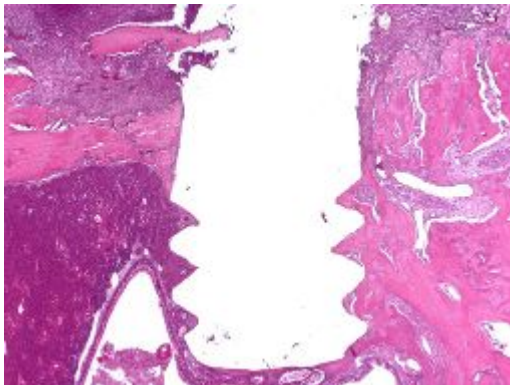


×25: インプラント周囲に新生骨が認められ、
広範囲でオッセオインテグレーションが成
立している。

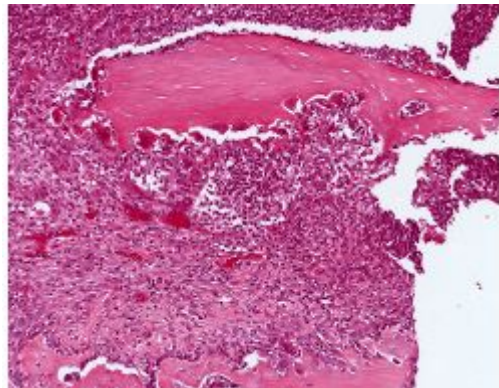


×100: オッセオインテグレーションがより
広い面積で成立し、骨密度が高くなるとも
に、骨形成が観察される部位が少なくなっ
ている。

インプラント埋入 4 週間後、カンチレバ
ータイプの上部構造を使用した場合
【咬合付与 15 日後】



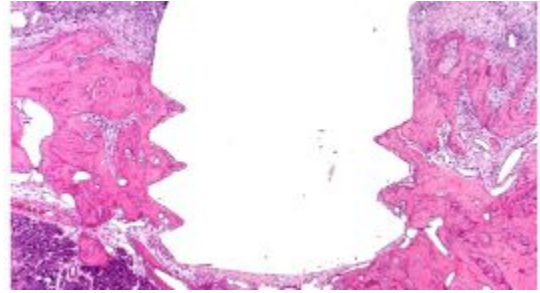
×25: 骨とインプラントとの界面からやや離れた
領域での骨吸収が観察されるのが特徴的。



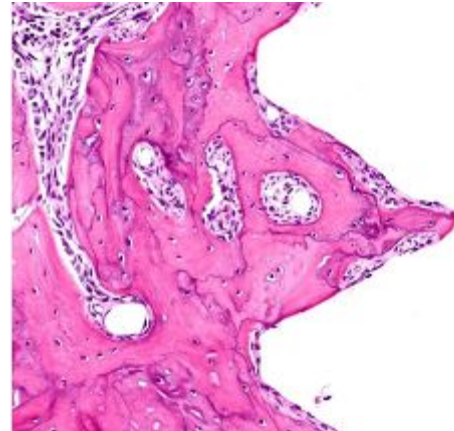
×100: 破骨細胞による活発な骨吸収が認め
られる。

オッセオインテグレーションが十分に確
立した後も、負担過重によってこのような
骨吸収が起こりうることは、インプラント喪
失の可能性を示唆していると言える。

(2) 骨吸収モデルと非吸収モデルとの比較
インプラント埋入 4 週間後、円形タイプ
の上部構造を使用した場合
【咬合付与 15 日後】



×25: 広い範囲でオッセオインテグレーシ
ョンが成立している。

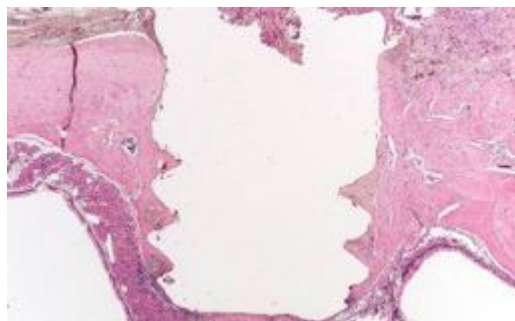


×100: インプラント周囲の全体的な骨量
が多く、骨の密度も高くなっている。

カンチレバータイプのものは、その装着
によってインプラント周囲の骨吸収が活発
となり、オッセオインテグレーションの崩
壊に繋がる。一方、咬合面が円形タイプ
のものは、インプラントに咬合力が加わ
ることが確認されているものの、インプラ
ント周囲の骨吸収はほとんど観察されな
い。

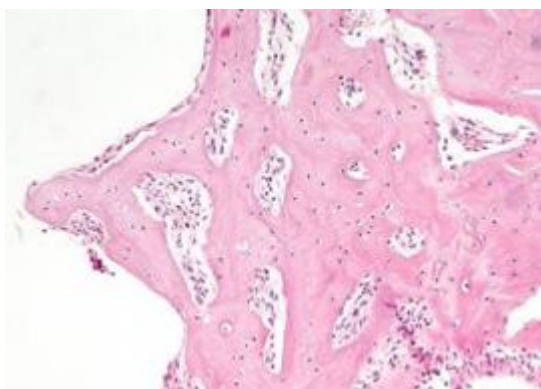
卵巣摘出 (OVX) ラットにおいてインプラ
ント埋入後、円形タイプの上部構造を装
着した場合

【OVX ラットで咬合を付与していない場合】

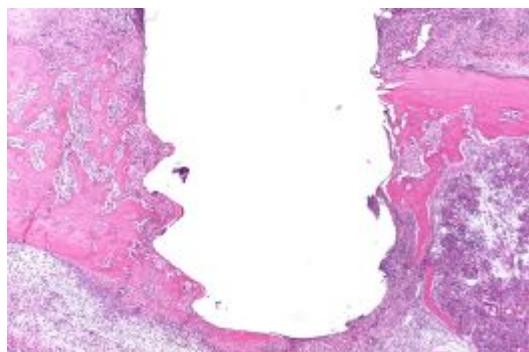


×25: 埋入後 6 週目。広い範囲でオッセオ

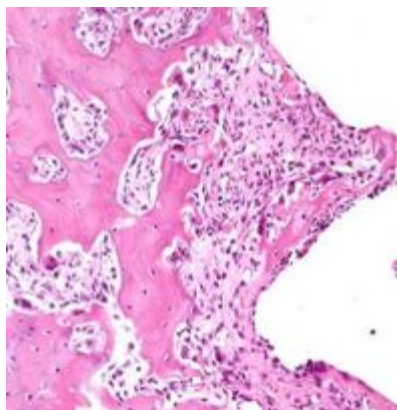
ンテグレーションが成立しているように見えるが、インプラント周囲骨に存在する骨髓様領域がやや多い。



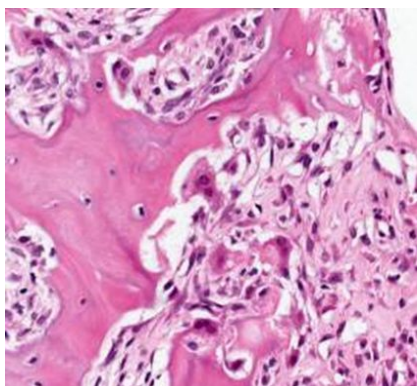
×100: インプラントと骨の界面には細胞が存在する部分が多く観察される。
【OVX ラットで円形タイプの上部構造を使用し。15 日間咬合を付与した場合】



×25: 領域によってはオッセオインテグレーションがほとんど失われている。



×100: 破骨細胞様細胞による活発な骨吸収が観察される。



×200: 多くの破骨細胞様細胞による活発な骨吸収が観察される。

OVX ラットとコントロールラット(sham)の比較において、sham ラットではいくつかの ER ポジティブな細胞が認められたのに対し、OVX ラットにおいては認められなかった。OPG ポジティブな細胞、あるいはエリアは OVX ラットに認められるのに対し、sham ラットでは認められなかった。

(3)問題点と今後の展望

通常のラットを使用しインプラントに力を加えることにより、明らかな組織像の変化を観察することはできたが、試みたすべての免疫染色で結果を得ることはできなかった。しかし、ER ポジティブな細胞が認められたため、OVX ラットと比較することで、ER が関与していることが示唆された。今後は OVX ラットを用いて、咬合力を付与する期間及び程度を変化させ、さらなる検索を進めていきたい。また、in vitro の実験に関しては行ったものの、十分な結果を出すことが出来なかったため、in vivo で結果の得られたタンパク質について焦点を絞り、引き続き RNA およびタンパク質の同定を行っていきたい。

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) Nagasawa M, Takano R, Maeda T, Uoshima K: Observation of the bone surrounding an overloaded implant in a novel rat model. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 28(1): 109-116, 2013. 査読有, DOI:10.11607/jomi.2388

〔学会発表〕(計2件)

(1) Nagasawa M, Takano R, Uoshima K: Histological investigation of bone tissue surrounding occluded implants in ovariectomized rats. The 8th Biennial Meeting of Asian Academy of Prothodontics, Chennai, India, December 5-9, 2012.

(2) 長澤麻沙子, 高野遼平, 前田健康, 魚島勝美: 卵巣摘出ラットにおける荷重下インプラント周囲骨の組織学的観察. 第121回学術大会, 神奈川県民ホール(神奈川県, 横浜市, 2012年5月26-27日).

6. 研究組織

(1)研究代表者

長澤 麻沙子 (NAGASAWA MASAKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 40612239

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし