

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：34401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26893305

研究課題名(和文) 歯科インプラント埋入歯槽骨の新規診断法の開発(非脱灰凍結セロテープ法の応用)

研究課題名(英文) The innovative evaluation of the alveolar ridge at the site of dental implant placement.

研究代表者

加納 みわ (Kano, Miwa)

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：60738269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント埋入骨評価は、デジタルX線撮影の普及により、ある程度の正確な情報を得ることが可能となっている。しかしCTを含むX線画像のみでは正確な評価は困難である。報告者は、非脱灰凍結切片作製法を用いた歯槽骨の新規診断法の開発を目的に、インプラント埋入患者の歯槽堤より埋入部位の骨を採取し、非脱灰凍結切片作製法により切片作成を行い、トルイジンブルー染色、von Kossa染色を施し光学顕微鏡により40歯槽骨を観察した。その結果、すべての切片において皮質骨、骨髄骨、骨関連細胞、骨髄内の線維性組織、血管などが明瞭に観察され非脱灰凍結切片作製法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The evaluation of bone quality at the site of the alveolar bone for a dental implant is very important. This study presents an easy technique for direct evaluation of alveolar bone quality using nondecalcified cryofilm frozen sections on human alveolar ridge bone core samples. The forty core samples harvested from alveolar bone were immediately frozen in cooled hexanen and slowly cut using a disposable tungsten carbide blade the sliced sections were collected with adhesive cryofilms. Staining was performed using toluidine blue and von Kossa for microscopic observations. All core samples clearly showed bone structure components of cortical bone, trabecular bone, bone marrow, blood vessels and bone-related cells. The rate of hard tissue in the whole area of the core samples were able to be measured by computer image analyzed system. These results suggest the efficacy of a nondecalcified cryofilm frozen section technique for histological observation of surgical implant sites.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯科インプラント 歯槽骨 組織 非脱灰凍結切片作製法

### 1. 研究開始当初の背景

インプラント埋入のための埋入部位の骨評価は、デジタルX線撮影の普及により、ある程度の正確な情報を得ることが可能となっている。しかし抜歯後の骨修復途中の歯槽骨やサイナスリフトに人工骨を使用した症例などでは、CTを含むX線画像のみでは正確な評価は困難である。X線画像では、骨も人工骨も不透過性を持つ像として映し出され、人工骨が良好に周囲骨と結合しているのか、または人工骨が線維性組織で覆われ、ただそこに石灰化物としてあるのみなのかの判別に苦慮するからである。人工骨を用いた骨造成においては、周囲から形成された自家骨と人工骨が良好に結合し、骨結合型 (= Osseointegration) インプラント表面と結合することが不可欠である。つまり骨造成術の評価を適切に行うためには、骨組織を顕微鏡下に組織学的観察し、人工骨周囲に新生骨が良好に形成されていることを診断する必要がある。こうした理由から、インプラント治療の予見性を高めるためには、骨造成術部位の簡便で再現性の高い組織学的評価法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

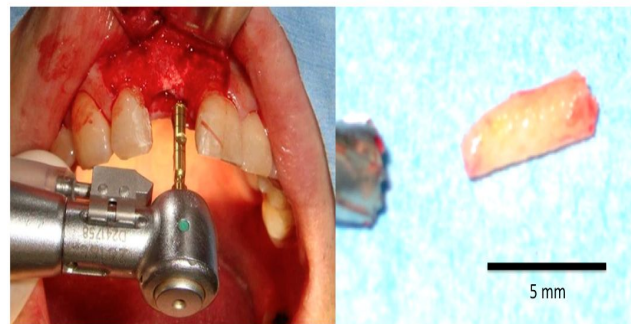
通常の EDTA などの脱灰溶液を用いたパラフィン包埋法では観察可能な状態になるまで長期的な時間を要すること、脱灰操作中に人工骨が消失してしまい人工骨と骨との正確な位置関係の判定が困難となること、また樹脂包埋による非脱灰研磨法では研磨切片作成の行程に多大な労力・経験を要することなどから積極的な評価法の実施はなされていない。一方 Kawamoto らが考案したセロテープ法 (文献 1) は硬組織でさえも凍結後、マイクロトームで薄切切片作成することができ、非脱灰で短時間に染色・観察することができる。申請者は、このセロテープ法の簡便性に着目して、インプラ

ント手術の際に採取される埋入部位の歯槽骨を組織学的に評価することの検証を研究目的とした。

文献 1: Kawamoto, T., Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. Arch Histol Cytol, 66(2), 123-143, 2003

### 3. 研究の方法

歯槽骨から採取した骨サンプルを非脱灰迅速評価法による組織観察を行い、形成骨の状態を観察し、インプラント埋入部位の新規組織評価法として有用か否かの検証をした。目標の骨サンプル数は、上顎 20、下顎 20 個とした。

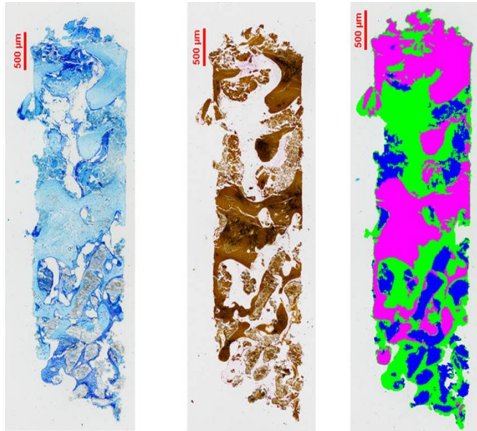


最小のトレフィンバーにて埋入部の歯槽骨を採取する。右は円柱状に採取された骨サンプル

### セロテープ法による非脱灰切片作成法

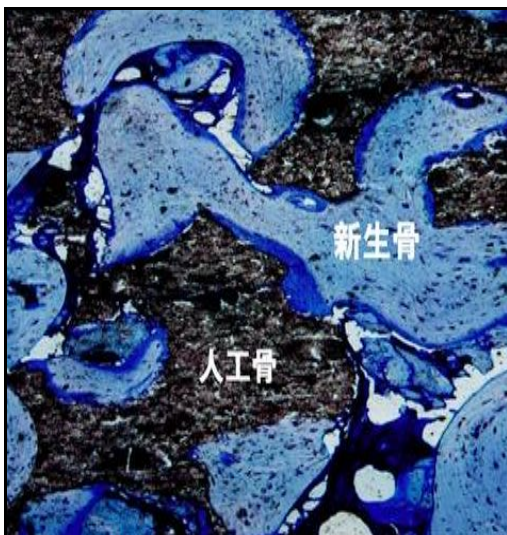
切片は 4% carboxymethyl cellulose (CMC) gel (Finetec, Japan)、n-hexen(-75)を使って凍結切片ブロックを作製した。作製された凍結切片は、クライオスタット (Leica CM1900) を用いて -25 で作業を行った。面出し後に、Polyvinylidene chloride film (Cryogluce Type2C, Finetec) にて表面を覆い、5 μm の非脱灰切片をタングステンカーバイドバー (Jung TC-65; Leica, Germany) で作製した。セロテープに接着した切片を洗浄し染色液 (トルイジンブルー液) で染色して顕微鏡観察した。

### 4. 研究成果



採取した切片を染色した組織写真：左より、トルイジンブルー染色、von Kossa 染色、画像解析ソフトにより骨(ピンク)・人工骨(ブルー)・軟組織(グリーン)3値化した画像。

40 検体から、非脱灰凍結切片作製法により歯槽堤から骨を採取した。採取された骨組織は、トルイジンブルー染色、von Kossa 染色を行った結果、いずれも皮質骨、骨髄、骨関連細胞、骨髄内の線維芽細胞、血管が観察された。また画像解析により定量化が可能であった。



切片の強拡大の写真：人工骨周囲に新生骨が観察される。骨細胞や軟組織の血管が観察される。

今後は、研究成果を、日本口腔外科学会、日本口腔インプラント学会、日本口腔科学会などで発表予定である。また成果の一部を専門

雑誌にて報告予定である。

## 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 2 件)

1) Yuichi Ito, Hiroshi Fujita, Miwa Kanou, Yasuko Takahashi-Nakagawa, Yoichiro Nakajima, Akihiro Sunano, Yasuhiro Kimura, Takaaki Ueno. Rapid and easy histological evaluation of alveolar human bone quality at dental implant sites using a nondecalcified frozen cryofilm section technique: A Technical Report. *Implant Dentistry*, 査読有り (in press 2015).

2) Nozomu Fukui, Takaaki Ueno, Yuichi Ito, Yasuko Takahashi, Yoshihiro Kimura, Yoichiro Nakajima, Shin Kasuya, Miwa Kanou, Kimiko Takubo, Kayoko Yamamoto, Yoshihiro Suwa, Akihiro Sunano, Norihiro Hashiguchi. Quantification of Growth Factors in Platelet-Rich Fibrin: A Preliminary Study. *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有り 2014, 12(2), pp80-84. <http://doi.org/10.11223/jarde.12.80>

〔学会発表〕(計 1 件)

1) PRF 由来の TGFβ-1、VEGF 濃度に関する研究. 木村吉宏、諏訪吉史、加須屋真、福居希、加納みわ、植野高章. 第69回日本口腔科学会総会(大阪)2015年5月13～15日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

大阪医科大学口腔外科学教室ホームページ [www.osaka-med.ac.jp/deps/ora/](http://www.osaka-med.ac.jp/deps/ora/) に、研究成果の一部を掲示。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 みわ (Kanou Miwa)  
大阪医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：60738269

(2)研究協力者

植野 高章 (Takaaki Ueno)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60252996