

教室におけるインプラント補綴学に関連した生物学的研究の展開

古谷野 潔

Development and achievement of biologic researches on implant prosthodontics in our section

Kiyoshi Koyano, DDS, PhD

抄 録

本学会に学術賞が新設され、その第1回の受賞者として表彰される榮譽に浴した。この機に本会誌への総説論文執筆のご下命をいただいたので、当教室で行ってきた研究を紹介したい。

私は下顎運動、顎機能関連の研究から研究者としてキャリアをスタートしたが、教授就任以後インプラント関連の研究も進めてきた。今回は、教室におけるインプラントに関連する生物学的研究の展開とその成果の一端を紹介する。具体的には、1. インプラント周囲軟組織に関する研究、2. スタチン系脂質異常症治療薬の骨および軟組織に対する効果に関する研究、3. 人工骨補填材に関する研究、4. 間葉系幹細胞に関する研究について紹介する。

キーワード

インプラント、インプラント周囲軟組織、スタチン、未分化間葉系幹細胞、人工骨補填材

I. はじめに

今般、補綴学の教室を主宰して21年目にあたる2018年に日本補綴歯科学会学術賞という大変名誉な賞を受賞させていただいた。これまでに直接御指導いただいた多くの先生方や文献を通して知見を深めてくれた世界中の研究者、さらには研究を支えてくれた教室員に感謝の意を表するとともに、これを機に当教室で行ってきた研究について振り返ってみたい。

1971年に九州大学歯学部歯科補綴学第二講座初代教授として末次恒夫先生が着任された。末次先生は東京医科歯科大学・石原寿郎先生門下であったこともあり、当初の教室の研究の軸は顎機能、特に顎運動解析であった。私は1983年に大学院歯学研究科に入学し、末次先生の指導の下、顎運動解析システムの構築やコンピュータによる解析手法の開発を行い、補綴誌に論文「後方運動時の下顎の三次元動態」を投稿して歯学博士の学位を取得した¹⁾。それ以降も現在まで教

室の研究の主軸の一つは顎運動・顎機能解析であり、現在までに約100名の大学院生の学位指導を行ってきたが、そのうち約30名は、顎運動・顎機能解析をテーマとした研究であった。これらの研究は主に補綴誌、あるいは補綴関連の国際誌に掲載された（ページの制限もあり文献は省略する）。中でも2006年にJournal of Oral Rehabilitationに掲載された論文では、スタビライゼーションスプリント、咬合に変化を与えないパラタルスプリントのいずれもがブラキシズム低減効果を有し、またいずれの装置を用いても効果は長期間持続しないことを報告した。本論文は76回の引用を数え、当教室の顎機能関連原著論文で最も多く引用されている²⁾。これらの研究の蓄積により、2013年にFrank Lobbezooらによるブラキシズムの定義とグレードシステムに関する国際コンセンサス論文に名を連ねることとなった³⁾。本論文は320回の被引用回数を数え、Clarivate Analytics社のWeb of ScienceにおいてClinical Medicine分野の高被引用文献（分野の上位1%にランクされる被引用回数が対

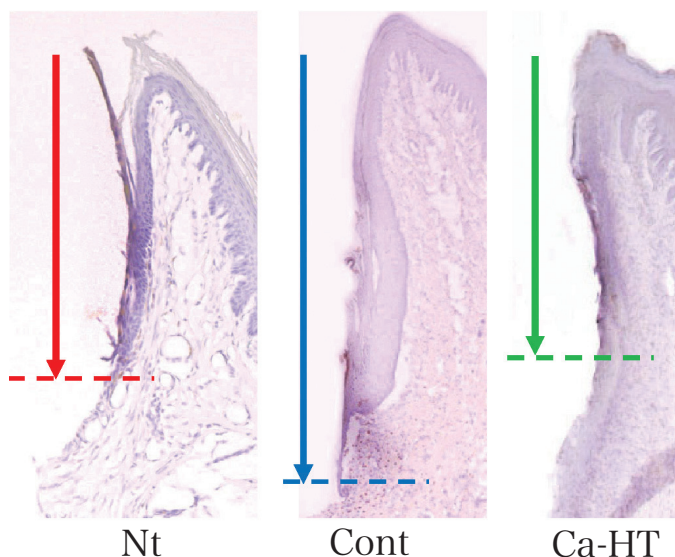


図1 塩化カルシウム存在下で水熱処理したチタンインプラントをラット口腔内に埋入し、horseradish peroxidase (HRP) をインプラント周囲溝に滴下し、浸透度を可視化した(矢印)。天然歯 (Nt) と比較して未処理インプラント (Cont) では HRP をインプラント周囲軟組織深部まで透過させてしまうが、カルシウム水熱処理インプラント (Ca-HT) では天然歯と同レベルまで HRP の浸透を阻止している。

象) に認定されている。近年では、顎機能では特に偏咀嚼に注目し、研究を進めている^{4,5)}。

教授就任後は顎機能解析に加えて、インプラントの臨床研究および臨床に直結した *in vitro*・*in silico* 研究およびバイオリジカルな手法を用いた研究を主なテーマとして研究活動を行ってきた。前者はインプラントに纏わる力学的事象を模型実験、あるいは有限要素解析を用いて解明する研究であり⁶⁻⁸⁾、近年ではさらに動物実験を加えて力学的事象の解明を試みている^{9,10)}。バイオリジカル研究は、インプラントを中心に、骨および軟組織に関する臨床的ニーズや疑問を解明していく姿勢で研究を構築している。本稿では、当教室におけるバイオリジカル研究を主に紹介する。

II. インプラント周囲軟組織に関する研究

インプラント周囲と天然歯周囲の歯肉について、特にエナメル質とチタンに対する軟組織の付着様式の相違や、それぞれの軟組織封鎖能についてはほとんど知られていなかった。われわれのグループでは、九州大学大学院歯学研究院 (以下、本研究院) の解剖学教室と協同して 1996 年にラット上顎歯槽部にチタンインプラントを埋入するモデルを構築し、歯肉とチタンインプラントの関係についての検討を開始した。その結果、チタンインプラントと歯肉上皮の間には基底膜が形成され、ヘミデスモゾーム結合が構築されるものの、天然歯と異なり上皮付着の最深部に限られること、イ

ンプラント周囲歯肉は天然歯と比較して軟組織封鎖性が著しく劣り、外来物質を歯周ポケットから容易に歯肉結合組織へ透過させることを報告した^{11,12)}。インプラント周囲に基底膜やヘミデスモゾームが形成されることを透過型電子顕微鏡を用いて明確に示したのは本論文が世界で初めてであり、現在では歯科衛生士教育課程で使用される教科書にも掲載されている。

この研究結果を踏まえて、インプラントに対する軟組織封鎖性を向上させればインプラントの予知性向上に寄与できると考え、種々の検討を行った。その結果、インプラント周囲上皮のチタンへの接着に PI3 キナーゼ/Akt シグナル伝達系が重要な役割を果たしていること¹³⁾、PI3 キナーゼと共役するインシュリン様成長因子 I がインプラント周囲上皮のチタンに対する接着能をエナメル質に対する接着と同レベルまで向上させることを明らかにした¹⁴⁾。

その後、本研究院の生体材料学教室との共同研究で、塩化カルシウム水溶液でチタンを 24 時間、200℃で水熱処理するとチタンの骨伝導能が飛躍的に高まることを報告した¹⁵⁾。このことより、チタン表面の二価陽イオンがチタンと歯肉の接着性や外来物質に対する封鎖能を向上させる可能性があると考え、研究を開始した。その結果、同処理がインプラント周囲歯肉の接着能や封鎖性を向上させることや¹⁶⁾、塩化マグネシウムを用いても同様の効果が得られること¹⁷⁾を細胞実験や動物実験にて証明した (図 1)。

その他、この分野の知見の蓄積として、プラット

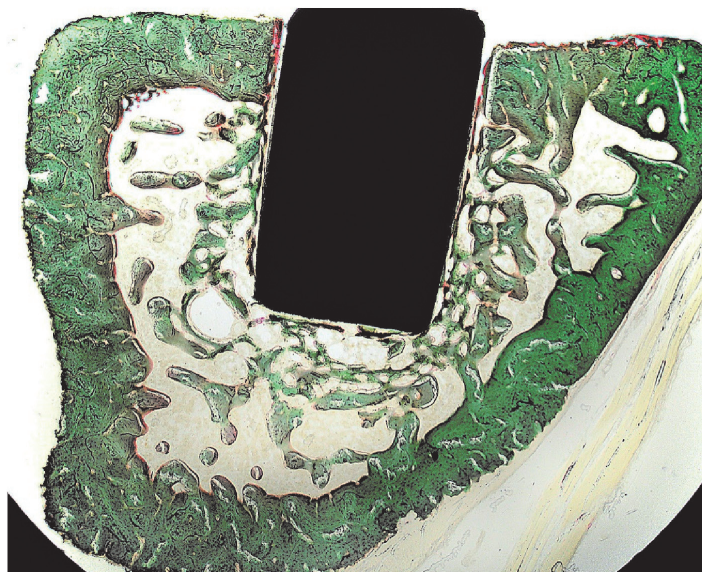


図2 ラット脛骨にチタンインプラントを埋入し、スタチンを投与した。この部位の骨髓腔には通常海綿骨は存在しないが、スタチン投与によってインプラント周囲に多量の骨が形成されている。

フォームスイッチした歯肉貫通部形状をもつインプラントの方がインプラント周囲上皮のダウングロスを阻止し外来因子の侵入を防ぐこと¹⁸⁾やサンドブラスト&酸処理面より機械研磨面の方が軟組織接着性や封鎖性が高く、細胞のアポトーシスを誘導しにくい¹⁹⁾が、マイクログループ形状は線維芽細胞をグループに沿って整列させることによって細胞密度を高める効果があること²⁰⁾を報告し、これまでの所見を総説としてまとめ、*Journal of Prosthodontic Research* 誌に報告した²¹⁾。最近では、歯肉貫通部材料として用いられるようになってきたジルコニアの軟組織接着性、封鎖性について検討し、ジルコニアの方がチタンより上皮付着が弱く、培養上皮細胞における接着関連タンパクの発現も低いことを報告した²²⁾。

III. スタチン系脂質異常症治療薬の骨および軟組織に対する効果に関する研究

1999年にスタチン系脂質異常症治療薬の骨形成促進効果が報告され、当教室ではこれをインプラント周囲骨形成促進に用いる可能性について検討することとし、2004年に最初の論文が*Clinical Oral Implants Research*に掲載された²³⁾。この論文ではラット脛骨にチタンインプラントを埋入し、シンバスタチンを腹腔内に毎日注射することによってインプラント周囲に大量の骨を形成させることができたが、骨形成を誘導するにはラットにヒト成人の一日量を毎日投与する必要があったため、適切なドラッグデリバリーシステム

(DDS)を用いて薬剤の減量を図ることとした。その結果、体重換算でヒトに投与する一日量と同じ量を、しかも単回投与で骨形成させることに成功した²⁴⁻²⁶⁾(図2)。また、インプラント治療において難易度が高い垂直的骨造成に着目し、スタチンによる非侵襲的な垂直的骨造成の可能性を検討した。その結果、適切なDDSを用いて、切開や骨補填材の移植等を一切行わずに注射のみで骨の厚みを増大させることにラットで成功した²⁷⁾。

次に、スタチンの多様な生態に対する効果に鑑み、抜歯窩の治癒機転に対するスタチンの影響に関する研究を行った。その結果、スタチンは抜歯窩の骨形成を促進するのみならず、上皮細胞、線維芽細胞の増殖や移動を促進することが明らかになり²⁸⁾、スタチンのポケットプリザベーションへの応用の可能性が示唆された。

スタチン関連では、この他骨補填材との併用²⁹⁾(後述)や、吸収性GBR膜との併用効果の検討を行っている³⁰⁾。

IV. 人工骨補填材に関する研究

本研究院生体材料学教室の石川邦夫教授が実施された炭酸アパタイト(COAp)製骨補填材の開発に一部関与した^{31,32)}。この材料に対する薬機法の認可を取得するための治験にも参加し、「国内初のインプラント適用が認められた骨補填材」としてサイトランスグラ

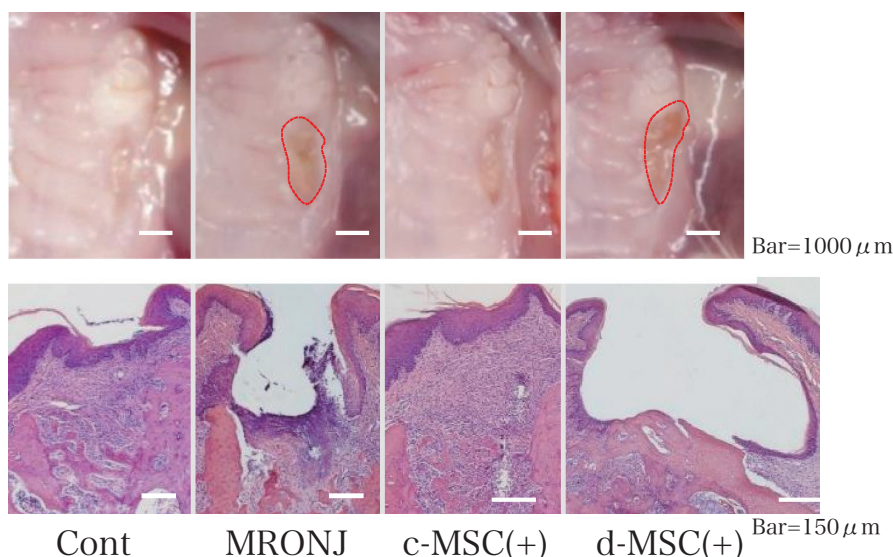


図3 マウス臼歯抜去 14 日後の抜歯窩。非 MRONJ 群 (Cont) では上皮の連続性が完全に回復しているが、MRONJ モデルでは上皮の連続性は回復せず、壊死した骨や炎症細胞の浸潤が見られる。MRONJ 発症後健全マウスから採取した MSC を静脈投与した群 (c-MSC(+)) では、上皮の連続性が完全に回復しているが、MRONJ マウスから採取した MSC を投与しても (d-MSC(+))、上皮の連続性は回復せず、骨の露出を認める。(Matsuura Y, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Kondo R, Takahashi A et al. Therapeutic interactions between mesenchymal stem cells for healing medication-related osteonecrosis of the jaw. Stem Cell Res Ther 2016; 7: 119. (published by BioMed Central Ltd.) より引用)

ニュールという名称で株式会社ジーシーから発売された。本研究室では、COAp とスタチンの併用効果について研究し、スタチン含有 COAp が COAp 単体、スタチン含有ハイドロキシアパタイト (HA)、HA 単体より抜歯窩の治癒を促進することを 2018 年に報告した²⁹⁾。

また、九州大学応用力学研究所との協同研究で、骨補填材候補材料としての多孔質ポリ乳酸-HA 複合体の試作と骨組織に対する良好な反応について報告した³³⁾。

V. 間葉系幹細胞に関する研究

教室の熱田生 (現、本研究院歯科先端医療評価・開発学講座准教授) が米国留学中に得た幹細胞研究のノウハウを基盤として、当教室でも 2011 年から未分化間葉系幹細胞 (MSC) の研究を開始した。MSC 研究はそれまでも解剖学教室に出向した大学院生による、MSC 投与によるアジュバント関節炎の治療の研究があり³⁴⁾、当教室で進める MSC 研究も再生ではなく治療にターゲットを絞ったものとした。まず、当教室で確立していたラット口腔インプラントモデルを用いて、インプラント周囲軟組織の封鎖性に対する MSC の効果を検証した。その結果、MSC の全身投与

によってインプラント周囲軟組織の封鎖性が向上することが明らかになった³⁵⁾。同様のモデルでも、MSC の局所投与では注射箇所からインプラント周囲に効果的に MSC が移動しがたいことも明らかになった³⁶⁾。

次に、現在歯科分野で最大の問題の一つとなっている薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) に対する MSC 投与の効果の研究に着手した。その結果として、MSC を MRONJ 発症マウスの尾静脈から全身投与することによって、MRONJ 症状を治癒しうること、その過程で障害を受けている宿主 MSC と投与した健全な MSC 間で細胞内小器官の交換が起こっており、これが MSC の治癒効果を高めていることを示した³⁷⁾ (図 3)。

VI. 最後に

以上に紹介した研究以外にも、当教室では多血小板血漿に関する基礎的・臨床的研究、インプラントに関連した細菌学的研究、さらには欠損補綴治療に関わる臨床研究などを行っているが、与えていただいた字数内では、残念ながら紹介しきれない。今回紹介した研究を主導してくれた鮎川保則准教授をはじめ、これまでの研究活動に協力していただいた歴代の教室員ならびに関係諸氏にあらためて感謝するとともに、今後も

歯科補綴学の発展に資する研究活動を進めていきたいと考えている。

文 献

- 古谷野 潔. 後方運動時の下顎の三次元動態. 補綴誌 1987; 31: 805-818.
- Harada T, Ichiki R, Tsukiyama Y, Koyano K. The effect of oral splint devices on sleep bruxism: a 6-week observation with an ambulatory electromyographic recording device. *J Oral Rehabil* 2006; 33: 482-488.
- Lobbezoo F, Ahlberg J, Glaros AG, Kato T, Koyano K, Lavigne GJ et al. Bruxism defined and graded: an international consensus. *J Oral Rehabil* 2013; 40: 2-4.
- Yamasaki Y, Kuwatsuru R, Tsukiyama Y, Matsumoto H, Oki K, Koyano K. Objective assessment of actual chewing side by measurement of bilateral masseter muscle electromyography. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 1756-1762.
- Iwashita H, Tsukiyama Y, Kori H, Kuwatsuru R, Yamasaki Y, Koyano K. Comparative cross-sectional study of masticatory performance and mastication predominance for patients with missing posterior teeth. *J Prosthodont Res* 2014; 58: 223-229.
- Matsuzaki M, Ayukawa Y, Sakai N, Matsuzaki T, Matsushita Y, Koyano K. A comparison of the peri-implant bone stress generated by the preload with screw tightening between 'bonded' and 'contact' model. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 2017; 20: 393-402.
- Gao J, Matsushita Y, Esaki D, Matsuzaki T, Koyano K. Comparative stress analysis of delayed and immediate loading of a single implant in an edentulous maxilla model. *J Dent Biomech* 2014; 5: 1758736014533982.
- 都留朋子, 江崎大輔, 松崎達哉, 松下恭之, 築山能大, 古谷野 潔. 下顎インプラントオーバーデンチャーのAttachmentsの違いが粘膜部応力に与える力学的影響. 日口腔インプラント誌 2017; 30: 278-286.
- Esaki D, Matsushita Y, Ayukawa Y, Sakai N, Sawae Y, Koyano K. Relationship between magnitude of immediate loading and peri-implant osteogenesis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 1290-1296.
- Matsuzaki T, Ayukawa Y, Matsushita Y, Sakai N, Matsuzaki M, Matsuzaki T et al. Effect of post-osseointegration loading magnitude on the dynamics of peri-implant bone: a finite element analysis and in vivo study. *J Prosthodont Res* 2019; in press.
- Ikeda H, Shiraiwa M, Yamaza T, Yoshinari M, Kido MA, Ayukawa Y et al. Difference in penetration of horseradish peroxidase tracer as a foreign substance into the peri-implant or junctional epithelium of rat gingivae. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13: 243-251.
- Ikeda H, Yamaza T, Yoshinari M, Ohsaki Y, Ayukawa Y, Kido MA et al. Ultrastructural and immunoelectron microscopic studies of the peri-implant epithelium-implant (Ti-6Al-4V) interface of rat maxilla. *J Periodontol* 2000; 71: 961-973.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Furuhashi A, Koyano K. The role of phosphoinositide 3-kinase in adhesion of oral epithelial cells to titanium. *Arch Oral Biol* 2013; 58: 1696-1708.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Furuhashi A, Yamaza T, Tsukiyama Y, Koyano K. Promotive effect of insulin-like growth factor-1 for epithelial sealing to titanium implants. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101A: 2896-2904.
- Zhang L, Ayukawa Y, Legeros RZ, Matsuya S, Koyano K, Ishikawa K. Tissue-response to calcium-bonded titanium surface. *J Biomed Mater Res A* 2010; 95A: 33-39.
- Oshiro W, Ayukawa Y, Atsuta I, Furuhashi A, Yamazoe J, Kondo R et al. Effects of CaCl₂ hydrothermal treatment of titanium implant surfaces on early epithelial sealing. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015; 131: 141-147.
- Okawachi H, Ayukawa Y, Atsuta I, Furuhashi A, Sakaguchi M, Yamane K et al. Effect of titanium surface calcium and magnesium on adhesive activity of epithelial-like cells and fibroblasts. *Biointerphases* 2012; 7: 27.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Jinno Y, Koyano K. Evaluations of epithelial sealing and peri-implant epithelial down-growth around "step-type" implants. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 459-466.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Furuhashi A, Ogino Y, Moriyama Y, Tsukiyama Y et al. In vivo and in vitro studies of epithelial cell behavior around titanium implants with machined and rough surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014; 16: 772-781.
- Furuhashi A, Ayukawa Y, Atsuta I, Okawachi H, Koyano K. The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics. *Odontology* 2012; 100: 199-205.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Oshiro W, Matsuura Y, Furuhashi A et al. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *J Prosthodont Res* 2016; 60: 3-11.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Furuhashi A, Narimatsu I, Kondo R, Oshiro W et al. Epithelial sealing effectiveness against titanium or zirconia implants surface. *J Biomed Mater Res A* 2019; 107A: 1379-1385.
- Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 346-350.
- Moriyama Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Koyano K. Topical application of statin affects bone healing around implants. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 600-605.
- Masuzaki T, Ayukawa Y, Moriyama Y, Jinno Y, Atsuta I, Ogino Y et al. The effect of a single remote injection of statin-impregnated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres on osteogenesis around titanium implants in rat tibia. *Biomaterials* 2010; 31: 3327-3334.
- Moriyama Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Todo M, Takao Y et al. Local application of fluvastatin

- improves peri-implant bone quantity and mechanical properties: a rodent study. *Acta Biomater* 2010; 6: 1610-1618.
- 27) Jinno Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Tsukiyama Y, Koyano K. Vertical bone augmentation with fluvastatin in an injectable delivery system: a rat study. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 756-760.
- 28) Yasunami N, Ayukawa Y, Furuhashi A, Atsuta I, Rakhmatia YD, Moriyama Y et al. Acceleration of hard and soft tissue healing in the oral cavity by a single transmucosal injection of fluvastatin-impregnated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. An in vitro and rodent in vivo study. *Biomed Mater* 2015; 11: 015001.
- 29) Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Carbonate Apatite Containing Statin Enhances Bone Formation in Healing Incisal Extraction Sockets in Rats. *Materials (Basel)* 2018; 11: 1201.
- 30) Zhang H, Moriyama Y, Ayukawa Y, Rakhmatia YD, Tomita Y, Yasunami N et al. Generation and histomorphometric evaluation of a novel fluvastatin-containing poly(lactic-co-glycolic acid) membrane for guided bone regeneration. *Odontology* 2019; 107: 37-45.
- 31) Suzuki Y, Matsuya S, Udoh K, Nakagawa M, Tsukiyama Y, Koyano K et al. Fabrication of hydroxyapatite block from gypsum block based on $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ treatment. *Dent Mater J* 2005; 24: 515-521.
- 32) Ayukawa Y, Suzuki Y, Tsuru K, Koyano K, Ishikawa K. Histological Comparison in Rats between Carbonate Apatite Fabricated from Gypsum and Sintered Hydroxyapatite on Bone Remodeling. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 579541.
- 33) Shimizu H, Jinno Y, Ayukawa Y, Atsuta I, Arahira T, Todo M et al. Tissue Reaction to a Novel Bone Substitute Material Fabricated With Biodegradable Polymer-Calcium Phosphate Nanoparticle Composite. *Implant Dent* 2016; 25: 567-574.
- 34) Takano T, Li YJ, Kukita A, Yamaza T, Ayukawa Y, Moriyama K et al. Mesenchymal stem cells markedly suppress inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. *Lab Invest* 2014; 94: 286-296.
- 35) Kondo R, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Matsuura Y, Furuhashi A et al. Therapeutic interaction of systemically-administered mesenchymal stem cells with peri-implant mucosa. *PLoS One* 2014; 9: e90681.
- 36) Kanazawa M, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Kondo R, Matsuura Y et al. The influence of systemically or locally administered mesenchymal stem cells on tissue repair in a rat oral implantation model. *Int J Implant Dent* 2018; 4: 2.
- 37) Matsuura Y, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Kondo R, Takahashi A et al. Therapeutic interactions between mesenchymal stem cells for healing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 119.

著者連絡先：古谷野 潔

〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

Tel: 092-642-6441

Fax: 092-642-6380

E-mail: koyano@dent.kyushu-u.ac.jp