

Osseointegration 獲得後のチタンインプラント周囲の 骨組織に及ぼす streptozotocin 誘発糖尿病の影響

学位論文内容の要旨

〔緒言〕

オッセオインテグレートッド・インプラントについては多くの研究がなされており、良好な予後が報告されている。オッセオインテグレーションの獲得には母床骨の状態が影響し、骨の状態に影響する全身疾患として、骨粗鬆症や糖尿病などが、中でも糖尿病は中高年者に多いといわれている。オッセオインテグレーション成立過程における高血糖の影響については、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いて幾つかの基礎的研究がなされており、骨とインプラントの接触率は、高血糖の状態では低いと報告されている。中高年者がインプラント治療後に糖尿病に罹患する危険性は高いと考えられるが、このような状況を想定した動物実験はなされていない。そこで本研究においては、糖尿病がオッセオインテグレーション獲得後のチタンインプラント周囲の骨組織に与える影響を明らかにすることを目的に、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いてインプラント周囲の骨組織の動態を病理組織学および組織計量学的に検索した。

〔材料と方法〕

実験動物として、生後 13 週齢、体重約 380 g の雄性 Wistar 系ラット 15 匹を用いた。直径 1 mm のチタン線（純度 99.9%）を長さ 5 mm に調整後（以下 インプラント体）、全身麻酔下にてラット左側大腿骨に 5 mm 間隔で 2 本埋入した。インプラント体を埋入したラットについては以下の 3 群に区分した。インプラント体埋入 8 週後、streptozotocin（以下 STZ）を体重 1 kg あたり 50 mg を腹腔内より投与し、2 日後に血糖値が 300 mg/dl 以上を示したラットを DM4 週群とし STZ 投与 4 週後に屠殺した。対照として、インプラント体埋入 8 週後に屠殺したラットを 8 週群、12 週後に屠殺したラットを 12 週群とした。また実験期間中、硬組織を標識する目的で、インプラント体埋入 8 週後に、カルセイン（以下 CAL）および 12 週後に、テトラサイクリン（以下 TC）を腹腔内に投与した。

屠殺後、インプラント体を含む大腿骨および右側大腿骨を摘出し、固定後、脱灰標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。また、臍臓組織についてもパラフィン包埋を行い、Azan-Mallory 染色を施した。一部のインプラント体を含む試料については Villanueva Bone 染色を施し、非脱灰研磨標本作製した。

新生骨を定量的に観察するために、非脱灰研磨標本をパーソナルコンピュータに取り込み画像解析ソフトを用いて、骨髓腔領域における骨-インプラント体の接触率およびインプラント体周囲に接触している新生骨量を計測した。

各群の組織計量で求めた値については、Mann-Whitney の U 検定を用い、有意差検定を行った。

〔結果〕

8 週群および 12 週群では体重が増加し、DM4 週群では糖尿病誘発後減少した。一方、血糖値の変化は、8 週群および 12 週群ともに実験期間を通じて一定の値を示し、DM4 週群は STZ 投与後、高血糖が確認された。膵臓ランゲルハンス島は、DM4 週群では、12 週群と比較し、著しく萎縮していた。また、右側大腿骨は、DM4 週群では 12 週群と比較して、皮質骨の厚さはやや薄く、骨髓中の脂肪組織は少なく、び慢性の出血が骨髓腔内に観察された。

研磨標本の観察において、いずれの群においても新生骨が線維性結合組織を介さず、インプラント体に直接接触しており、オッセオインテグレーションの状態を呈していた。

蛍光顕微鏡による研磨標本観察において、8 週群では、骨髓組織に面している新生骨の表層には、CAL の線状のラベリングが認められた。一方、インプラント体に直接接触している骨組織の表面に、CAL のラベリングは観察されなかった。12 週群では、新生骨中には CAL の線状のラベリング、および新生骨表層に TC の線状のラベリングが認められたが、インプラント体に直接接触している骨組織表面には CAL や TC のラベリングは観察されなかった。DM4 週群では、新生骨中に CAL の線状のラベリングがみられ、新生骨表層には TC のび慢性的のラベリングが認められたが、CAL と TC のラベリングの間隔は狭く、一部では TC のラベリング濃度が低い部分も認められた。また、12 週群と同様にインプラント体に直接接触している骨組織表面には CAL や TC のラベリングは観察されなかった。

脱灰標本の観察において、いずれの群においてもインプラント体は軟組織を介さずに直接骨に接しており、オッセオインテグレーションを示していた。8 週群および 12 週群では骨髓組織に面する新生骨表層に立方形を呈する骨芽細胞が観察された。12 週群では 8 週群と比較して、新生骨は肥厚しており層板構造も明瞭であった。一方、DM4 週群では、やや小型で扁平な形を呈する骨芽細胞が骨髓組織に面する骨表層に観察され、新生骨の厚さも 12 週群と比較して有意に薄く観察された。

組織計量結果から各群の平均接触率は、3 群とも 60～70% を示し、各群間において有意差は認められなかった。インプラント体埋入 8 週から 12 週にかけて、新生骨量は増加を示したが、8 週群と 12 週群の間に有意差は認められなかった。DM4 週群の新生骨量は 12 週群の新生骨量と比較して有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

〔考察〕

本研究では、獲得されたオッセオインテグレーションに糖尿病が与える影響を明らかにすることを目的に、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いて、病理組織学的および組織計量学的に検索を行った。実験期間の設定については、本研究ではインプラント体埋入 8 週後で、約 60% のオッセオインテグレーションが成立し、文献的にも同様の報告が多く、インプラント体埋入から糖尿病誘発までの 8 週間という期間の設定は妥当であると考えられた。また、DM4 週群では、膵臓ランゲルハンス島が萎縮し、文献的にも 4 週間の高血糖で骨芽細胞の機能低下が報告されていることから、高血糖期間の設定は妥当であると考えられた。

DM4 週群において、骨髓側に面したインプラント体周囲骨組織の表層では、骨芽細胞

の扁平化および小型化が認められた。これは骨芽細胞が高血糖の影響を受けたためと推測され、文献的にも高血糖状態では、骨芽細胞内にソルビトールが蓄積され、骨芽細胞の機能低下を引き起こすことが報告されている。骨芽細胞の基質形成能の低下により、骨形成量が低下し、CAL と TC のラベリングの間隔が狭くなったものと考えられる。また、TC のラベリング濃度の低下は、高血糖状態において形成された骨組織の石灰化の程度が低いことを示しており、この結果も骨芽細胞機能低下を示唆している。一方、インプラント体に直接接触している骨組織表面では CAL および TC のラベリングが観察されないことから、骨改造が生じていないことが示唆され、4 週間の高血糖状態はオッセオインテグレーションに影響を与えないものと考えられた。以上のことから、オッセオインテグレーション獲得後に高血糖状態を 4 週間維持した場合、骨髓組織に面したインプラント体周囲骨組織は、高血糖の影響を受けるが、インプラント体に直接接触している骨組織の表面は高血糖の影響を受けず獲得されたオッセオインテグレーションに変化がないことが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

Osseointegration 獲得後のチタンインプラント周囲の 骨組織に及ぼす streptozotocin 誘発糖尿病の影響

審査は向後、脇田および川崎審査委員全員が出席のもとに、論文提出者に対し提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文提出者は、健常者がインプラント治療後、糖尿病に罹患した状況を想定し、糖尿病が osseointegration 獲得後のチタンインプラント周囲の骨組織に与える影響を明らかにすることを目的に、streptozotocin 誘発糖尿病ラットを用いてインプラント周囲の骨組織の動態を病理組織学および組織計量学的に検索した。

実験動物には、生後 13 週齢、体重約 380 g の雄性 Wistar 系ラット 15 匹を用いた。直径 1 mm のチタン線（純度 99.9%）を長さ 5 mm に調整後（以下 インプラント体）、全身麻酔下にてラット左側大腿骨に 5 mm 間隔で 2 本埋入した。インプラント体を埋入したラットについては以下の 3 群に区分した。インプラント体埋入 8 週後、streptozotocin（以下 STZ）体重 1 kg あたり 50mg を腹腔内より投与し、2 日後に血糖値が 300mg/dl 以上を示したラットを DM4 週群とし STZ 投与 4 週後に屠殺した。対照として、インプラント体埋入 8 週後に屠殺したラットを 8 週群、12 週後に屠殺したラットを 12 週群とした。また実験期間中、硬組織を標識する目的で、インプラント体埋入 8 週後に、カルセイン（以下 CAL）および 12 週後に、テトラサイクリン（以下 TC）を腹腔内に投与した。屠殺後、インプラント体を含む大腿骨および右側大腿骨を摘出し、固定後、脱灰標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。また、脾臓組織についてもパラフィン包埋を行い、Azan-Mallory 染色を施した。一部のインプラント体を含む試料については Villanueva Bone 染色を施し、非脱灰研磨標本作製した。新生骨を定量的に観察するために、非脱灰研磨標本をパーソナルコンピュータに取り込み画像解析ソフトを用いて、骨髓腔領域における骨 インプラント体の接触率およびインプラント体周囲に接触している新生骨量を計測した。各群の組織計量で求めた値については、Mann-Whitney の U 検定を用い、有意差検定を行った。

以上の方法により得られた結果および結論は以下の通りである。血糖値の変化は、8 週群およ

び12週群ともに実験期間を通じて一定の値を示し、DM4週群はSTZ投与後、高血糖が確認された。脾臓ランゲルハンス島は、DM4週群では、12週群と比較し、著しく萎縮していた。また、右側大腿骨は、DM4週群では12週群と比較して、皮質骨の厚さはやや薄く、骨髓中の脂肪組織は少なく、び漫性の出血が骨髓腔内に観察された。研磨標本の観察において、いずれの群においても新生骨が線維性結合組織を介さず、インプラント体に直接接触しており、オッセオインテグレーションの状態を呈していた。蛍光顕微鏡による研磨標本観察において、8週群では、骨髓組織に面している新生骨の表層には、CALの線状のラベリングが認められた。一方、インプラント体に直接接触している骨組織の表面に、CALのラベリングは観察されなかった。12週群では、新生骨中にはCALの線状のラベリング、および新生骨表層にTCの線状のラベリングが認められたが、インプラント体に直接接触している骨組織表面にはCALやTCのラベリングは観察されなかった。DM4週群では、新生骨中にCALの線状のラベリングがみられ、新生骨表層にはTCのラベリングが認められたが、CALとTCのラベリングの間隔は狭く、一部ではTCのラベリング濃度が低い部分も認められた。また、12週群と同様にインプラント体に直接接触している骨組織表面にはCALやTCのラベリングは観察されなかった。脱灰標本の観察において、いずれの群においてもインプラント体は軟組織を介さずに直接骨に接しており、オッセオインテグレーションを示していた。8週群および12週群では骨髓組織に面する新生骨表層に立方形を呈する骨芽細胞が観察された。12週群では8週群と比較して、新生骨は肥厚しており層板構造も明瞭であった。一方、DM4週群では、やや小型で扁平な形を呈する骨芽細胞が骨髓組織に面する骨表層に観察され、新生骨の厚さも12週群と比較して有意に薄く観察された。組織計量結果から各群の平均接触率は、3群とも60~70%を示し、各群間において有意差は認められなかった。インプラント体埋入8週から12週にかけて、新生骨量は増加を示したが、8週群と12週群の間に有意差は認められなかった。DM4週群の新生骨量は12週群の新生骨量と比較して有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

これらの結果より以下の様にまとめている。

- 1) オッセオインテグレーション獲得後に高血糖状態を4週間維持した場合、骨髓組織に面したインプラント体周囲骨組織は、高血糖の影響を受けることが示された。
- 2) インプラント体に直接接触している骨組織の表面は、高血糖の影響を受けず獲得されたオッセオインテグレーションに変化がないことが明らかとなった。

次いで、本論文提出者に対して本論文の内容に関連のある質問が行われたが、これらの質問に対してそれぞれ適切な回答が得られた。また、本研究は、実験的糖尿病ラットを用いてインプラント周囲骨の組織反応を追究した研究であり、臨床病理学的観点から興味深い成果を得ている。さらに、本論文提出者は、獲得された osseointegration に対する長期間の糖尿病の影響およびインスリンによる血糖値のコントロールとの関係の実験を進めており、将来の展望も評価された。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。