

光学顕微鏡と二次電子・反射電子像を使った走査型電子顕微鏡による インプラント-周囲組織の観察手法の評価

伊藤 範 明¹⁾ 高木 宏 太¹⁾ 藤井 秀 朋²⁾
堀田 康 明³⁾ 田辺 俊一郎⁴⁾ 山田 尚 子⁴⁾
山口 健 一⁴⁾ 松田 成 彦⁵⁾ 永原 國 央⁴⁾

Evaluation of Methodology for the Observation of Soft Tissue Surrounding Implant by Light and Scanning Electron Microscope Utilized Backscattered Electron and Secondary Electron Image

ITO NORIAKI¹⁾, TAKAGI KOHTA¹⁾, FUJII SHUHO²⁾,
HOTTA YASUAKI³⁾, TANABE TOSHIICHIRO⁴⁾, YAMADA NAOKO⁴⁾,
YAMAGUCHI KEN-ICHI⁴⁾, MATSUDA NARIHIKO⁵⁾, NAGAHARA KUNITERU⁴⁾

歯科インプラントに関する基礎研究では、大型動物を用い、臨床に即した実験系を構築し、種々の方法で分析し検討される。実験標本は粘膜上皮、結合組織、骨そしてインプラント体を同時に、生体内の状態をそのままに観察することが要求される。

本研究では、非脱灰研磨切片(UDGS)を作成し、同一切片を光学顕微鏡(LM)と走査型電子顕微鏡(SEM)で観察する手技を考案し若干の知見を得た。

成犬下顎前臼歯を抜歯し、ステリオスインプラント埋入マニュアルに従いインプラント埋入手術および二次手術を行い、12ヵ月後に屠殺し、UDGSを作成した。LMで観察後、同切片を脱樹脂しSEM観察標本とした。SEM観察には、二次電子像(SE)と反射電子像(BSE)を用いた。

結果、BSEを用いたことで、SEではその区別ができなかった骨組織と軟組織、Hydroxyapatite(HA)層の区別が容易であった。

今回、本研究により大型動物を用い同一切片にてインプラント体-周囲組織をLMおよびSEMで観察するための一手技を考案し、その有用性が確認された。

キーワード：走査型電子顕微鏡、インプラント-組織界面、反射電子像、二次電子像、歯科インプラント

Basic studies of dental implant treatment involve experimental studies using relatively large animals and various analytical methods, considering clinical cases. It is necessary to observe exact condition in the body, in which mucomembranous, connective, and bone tissues are present.

in this study, to observe the tissue surrounding implant bodies, we developed a non-decalcified specimen production system to observe sections using both light and scanning electron microscopes, and evaluated the results.

Key words : Scanning electron microscope, Implant-tissue interface, Backscattered electron image, Secondary electron image, Dental implants

¹⁾朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科補綴学分野

²⁾朝日大学歯学部口腔科学共同研究所

⁴⁾朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔外科学分野
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

²⁾河津歯科医院

⁵⁾松田歯科医院

¹⁾Department of Prothodontology, Division of Functional Science and Rehabilitation, ³⁾Central Research Laboratories and ⁴⁾Department of

Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control

Asahi University School of Dentistry
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

²⁾Kawazu Dental Clinic

⁵⁾Matsuda Dental Clinic

(平成17年2月28日 受理)

緒 言

歯科インプラントに関する基礎研究では、臨床に即した実験系を構築し、種々の方法で分析し検討される。その手法には、大きく分け、*in vivo*と*in vitro*による実験系がある。実験結果を直接臨床応用できるのは*in vivo*での実験系で、それも大型動物を用いたものである。その検索方法の主体は組織学的検索である。そこには、粘膜上皮、粘膜下結合組織、骨組織そしてインプラント体が存在し、これらを同時に、できうる限り生体内での状態をそのままに観察することが要求される^{1,2)}。

その組織学的検索方法には大きく分け、光学顕微鏡的観察、電子顕微鏡的観察がある。また、その組織試料作成法には脱灰法と非脱灰法がある。脱灰法では観察用薄切片がより薄くできることで、詳細な組織構造の観察が容易である反面、インプラント体と周囲組織とを観察用薄切片として作成できないため、あらかじめインプラント体を除去する必要があることや、脱灰手技が必要であり、その過程においてインプラント体と周囲組織間および軟組織・硬組織などにアーティファクトが発生しやすく、インプラント体と周囲組織を生体内の状態そのままに観察できていないという欠点がある。一方非脱灰法では、脱灰操作を必要としないため、インプラント体の除去に伴うインプラント体と周囲組織間でのアーティファクトおよび脱灰に伴う軟組織・硬組織などの変化が現れにくいという利点がある反面、観察用薄切片の厚さには限度があり、詳細な組織構造の観察が不可能であるという欠点がある。

今回、我々は、インプラント体およびそれを取り囲んでいる種々の組織を同時に、できうる限り生体内での状態をそのままに保存して観察することを目的として、非脱灰研磨切片(UDGS)を作製し、同一切片で光学顕微鏡(LM)および走査型電子顕微鏡(SEM)による観察手技を考案し、その有用性について評価した。

材料と方法

雑種成犬を用い、塩酸ケタミン(ケタラール[®], 50, 三共エール薬品) 25mg/kg筋肉内注射後、ペントバルビタールナトリウム(Nembutal[®], Abbott Laboratories, USA) 25mg/kgを静脈内投与し全身麻酔を行い、局所麻酔にはエプレナミン1/8万倍含有塩酸リドカイン(キシロカインカートリッジ[®], 藤沢薬品工業)を使い、下顎前臼歯を3本抜歯し、3ヶ月後に前回と同様の全身麻酔、局所麻酔を行い、抜歯部にφ3.25mm×10mmのチタンスレッドインプラント(STERI-OSS社製)とHAコーティングインプラント(STERI-OSS社製)を10

mm間隔で、同社のマニュアルに従い埋入した。埋入手術後3ヶ月目に、全身麻酔および局所麻酔の併用下で5mmのヒーリングアバットメントの連結すなわち二次手術を行い、12ヶ月後に全身麻酔下にて頸動脈から2%グルタルアルデヒド(0.1M phosphate buffer, pH7.4)にて灌流固定を行い、下顎骨体および周囲軟組織を一塊として摘出し、試料とした。

摘出試料は、2%グルタルアルデヒドに4℃7日間浸漬固定した。その後通法に従い脱水し、メチルメタクリレート樹脂(和光純薬)に包埋後、インプラント体の中心部にてDiamond Cutting Disc(マルトー社製)を用い縦断し、約30μmの研磨切片を作製した。

LM観察切片として通法に従い、トルイジンブルー染色を施し観察した。

SEM観察切片には、LM観察切片と同一の切片を用いた。切片表面の脱樹脂を行い、上昇アルコール系列で脱水し、臨界点乾燥後にオスミウムコーティングを施して観察した。

観察は、二次電子(Secondary Electron: SE)像および反射電子(Backscattered Electron: BSE)像³⁾を用いた。SEの観察では加速電圧1kV、BSEでは15kVにて行った。

結 果

1. LM観察

1) Tiインプラント

図1, 2に示す如く、インプラント頸部、体部においてインプラント体、歯肉粘膜、粘膜下結合組織、骨組織が確認できた。組織の損傷および樹脂包埋による気泡の混入等は認めなかった。

2) HAコーティングインプラント

図2, 4に示す如く、インプラント頸部、体部においてインプラント体、歯肉粘膜、粘膜下結合組織、骨組織およびHAコーティング層が確認できた。組織の損傷および樹脂包埋による気泡の混入等を認めなかった。

2. SEM鏡観察

1) Tiインプラント(図5, 6, 7, 8, 9, 10)

SEでは、インプラント体、骨組織、軟組織、粘膜上皮と粘膜下結合組織の区別は十分に可能であった。特に、インプラント体と周囲組織との間のアーティファクトにて出現したと思われるひび割れが確認できた。また、組織内にもいくつかのひび割れが確認された。

BSEでは、インプラント体と骨組織の界面が明瞭であった。また、骨組織の軟組織の境界も明瞭で骨組織内のハーバース管、骨小腔などの微細構造の確認が容易であった。しかし、粘膜上皮と粘膜下結合組織との

区別は困難であった。

2) HAコーティングインプラント(図11, 12, 13, 14, 15, 16)

SEでは, インプラント体, 骨組織, 軟組織, 粘膜上皮と粘膜下結合組織の区別は容易であった。

BSEでは, インプラント体と骨組織の界面が明瞭であった。また, 骨組織の軟組織の境界も明瞭で骨組織内のハーバース管, 骨小腔などの微細構造の確認が容易であった。また, HAのコーティング層は, インプラント体および周囲の骨組織との区別が容易であった。しかし, 粘膜上皮と粘膜下結合組織との区別が困難な状態であった。

表1は, 非脱灰研磨標本(UDGS)における観察方法別で, 個々の組織の観察が容易であったかを検討した結果を表したものである。

LMでは観察倍率が10から100倍であり, すべての組織の観察が可能であった。

SEでは観察倍率が50から1000倍であり, 粘膜上皮と結合組織の区別が容易であったが, 骨組織およびインプラント体表面のHAコーティング層の観察は困難であった。

BSEでは, 粘膜上皮と結合組織の区別は不可能であったが, 骨組織およびHAコーティング層の観察は容易であった。



図1 チタンスレッドインプラント頸部の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色, ×50) Ti-I: チタンスレッドインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織。

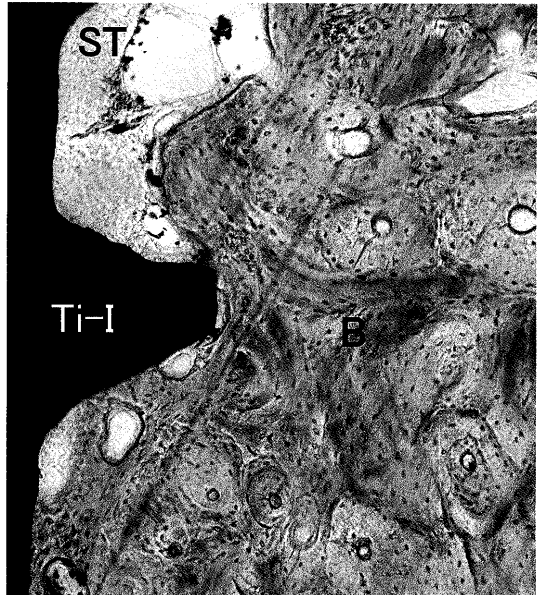


図2 チタンスレッドインプラント体部の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色, ×50) Ti-I: チタンスレッドインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織。

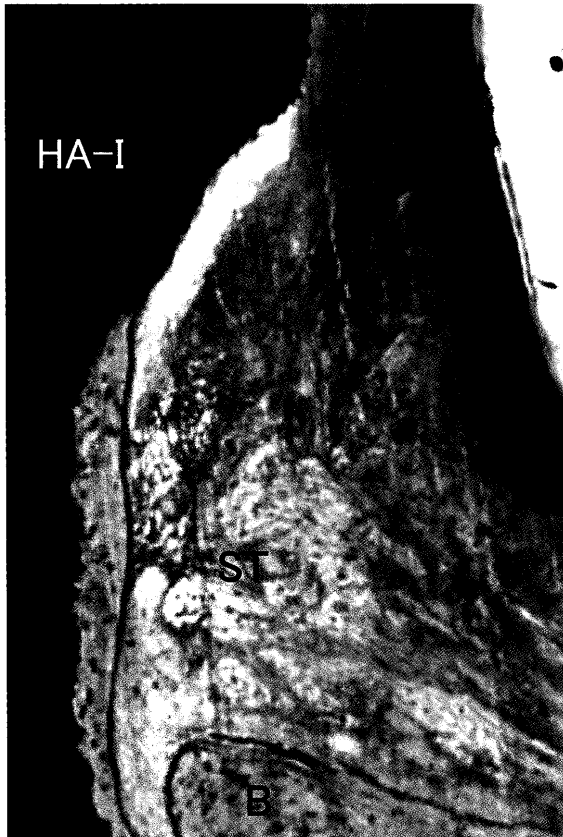


図3 HAコーティングインプラント頸部の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色, ×50)HA-I: HAコーティングインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

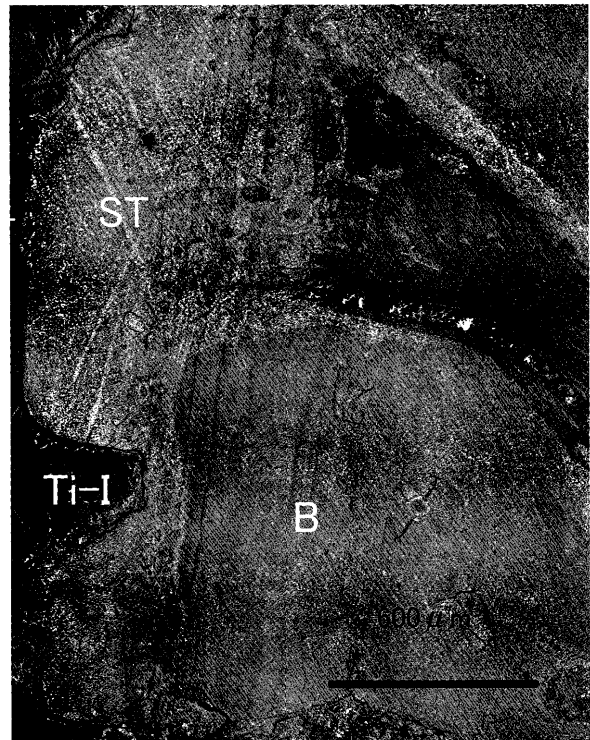


図5 チタンスレッドインプラント頸部の走査型電子顕微鏡二次電子像所見Ti-I: チタンスレッドインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

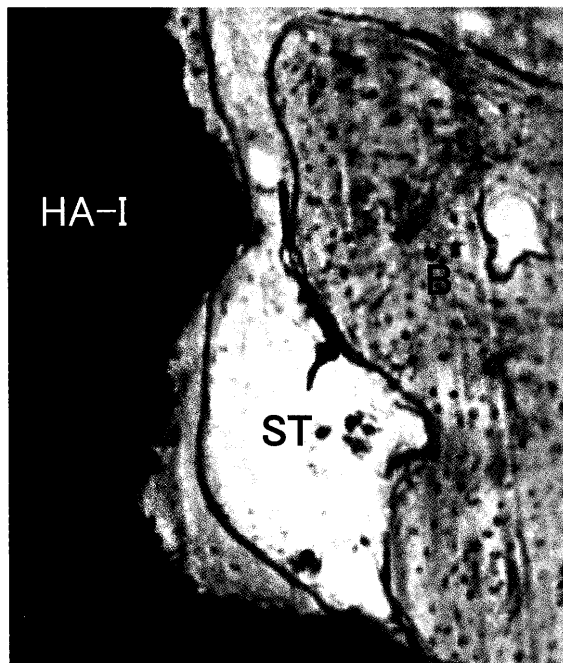


図4 HAコーティングインプラント体部の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色, ×50)HA-I: HAコーティングインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

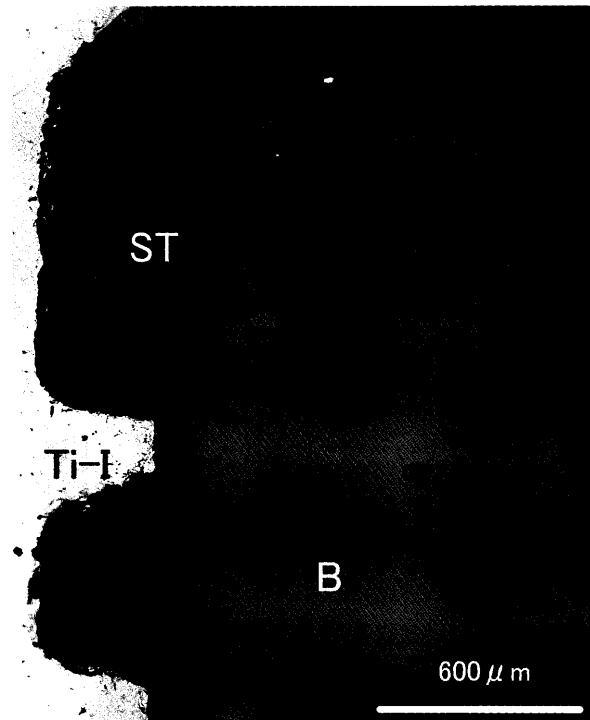


図6 チタンスレッドインプラント頸部の走査型電子顕微鏡反射電子像所見Ti-I: チタンスレッドインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

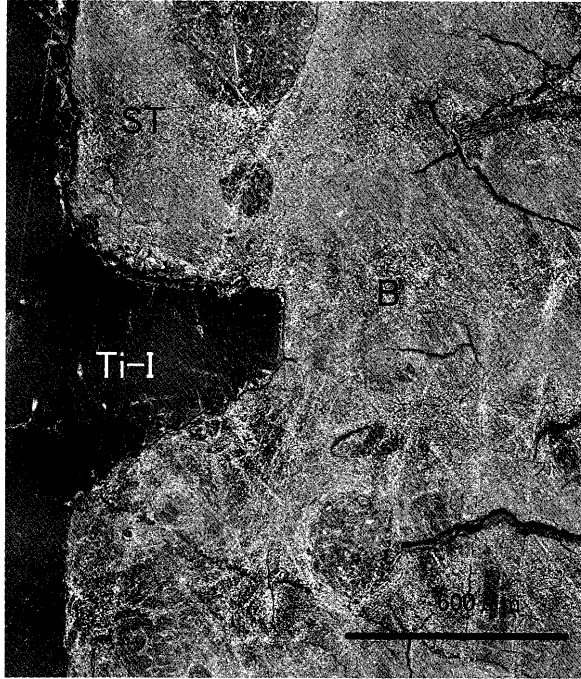


図7 チタンスレッドインプラント体部の走査型電子顕微鏡二次電子像所見Ti-I:チタンスレッドインプラント, ST:軟組織, B:骨組織.

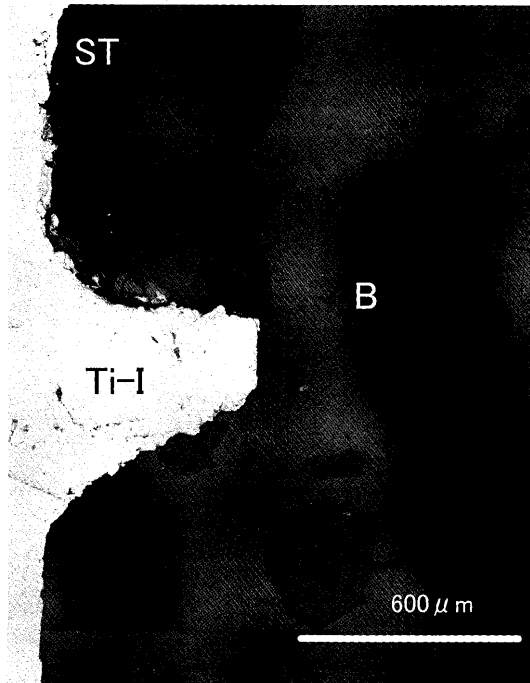


図8 チタンスレッドインプラント体部の走査型電子顕微鏡反射電子像所見Ti-I:チタンスレッドインプラント, ST:軟組織, B:骨組織.



図9 チタンスレッドインプラント底部の走査型電子顕微鏡二次電子像所見Ti-I:チタンスレッドインプラント, ST:軟組織, B:骨組織.

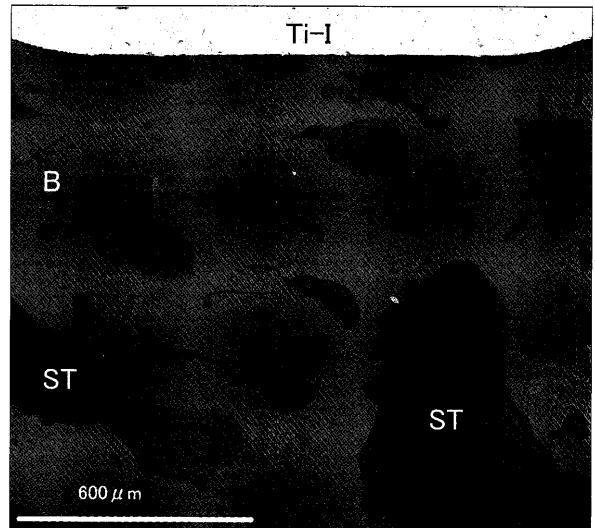


図10 チタンスレッドインプラント底部の走査型電子顕微鏡反射電子像所見Ti-I:チタンスレッドインプラント, ST:軟組織, B:骨組織.



図11 HAコーティングインプラント頸部の走査型電子顕微鏡二次電子像所見HA-I: HAコーティングインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

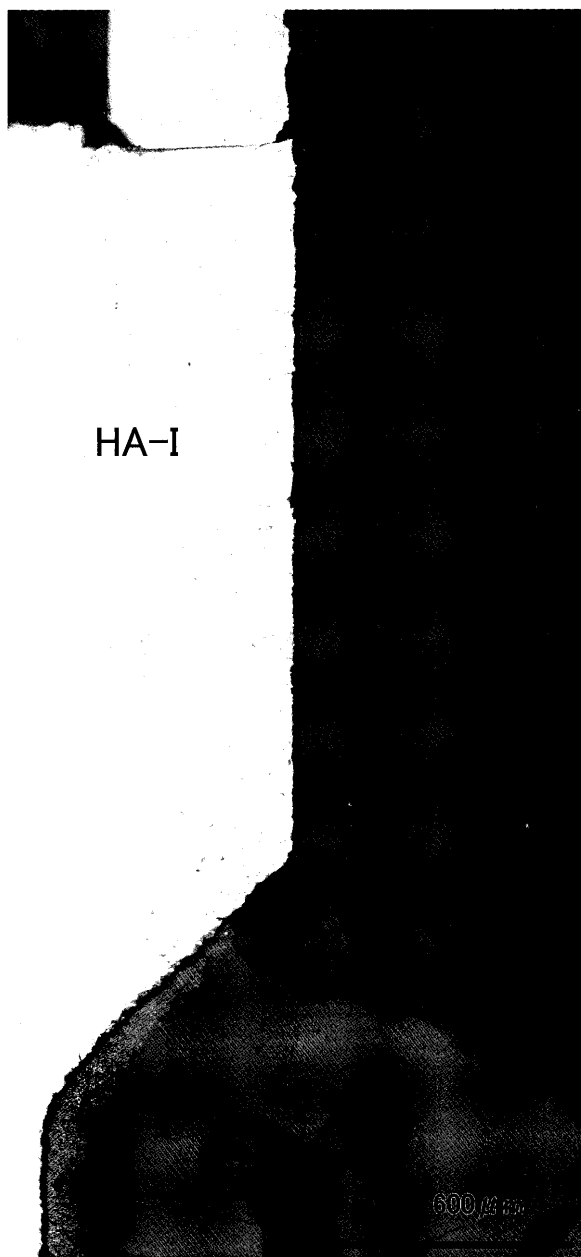


図12 HAコーティングインプラント頸部の走査型電子顕微鏡反射電子像所見HA-I: HAコーティングインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

考 察

インプラントの基礎的実験系において、動物実験、特に大型動物を用いた実験系では、インプラント体を含めた周囲組織を標本とした検索が臨床的に大きな意味を持つ。現在、臨床的に注目を浴びている即時加重、抜歯後即時埋入など^{4,5)}に関しても、大型動物でのインプラント体周囲の組織反応を検索することは、臨床応用への糸口を探る上で重要である。

このような実験系において、組織標本の作成方法、観察方法は、検索結果を左右し、研究の成果に大きな影響を与える^{1,2,6)}。しかし、その標本の中には、インプラント体、粘膜上皮、粘膜下結合組織、骨組織が含まれている。これらの異なった観察対象物を、ひとつの標本として作り上げることは困難であり、組織の固定方法、包埋材料の選択には苦慮するところである。

本実験では、そのような問題点を克服し、詳細な実験結果を得ることを目的として、どのような標本作り

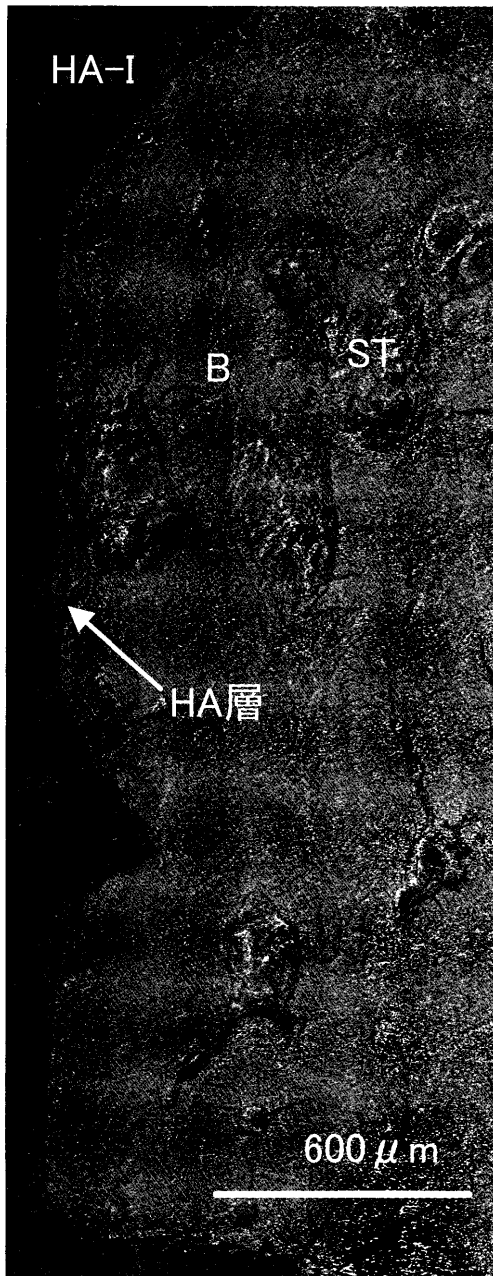


図13 HAコーティングインプラント体部の走査型電子顕微鏡二次電子像所見HA-I: HAコーティングインプラント, HA層: HAコーティング層, ST: 軟組織, B: 骨組織.

を行い、どのような観察方法を行うことが有用であるかを考える上で、UDGSでのLMおよびSEMによる観察方法を提案し、その有用性を評価した。

本検索に用いた、UDGSは一般的にインプラント体の除去を必要とせず、脱灰操作が不要であることで組織の変化を最小限に止め、生体内に近い状態での観察を容易にする、という利点がある。しかし、その反面、

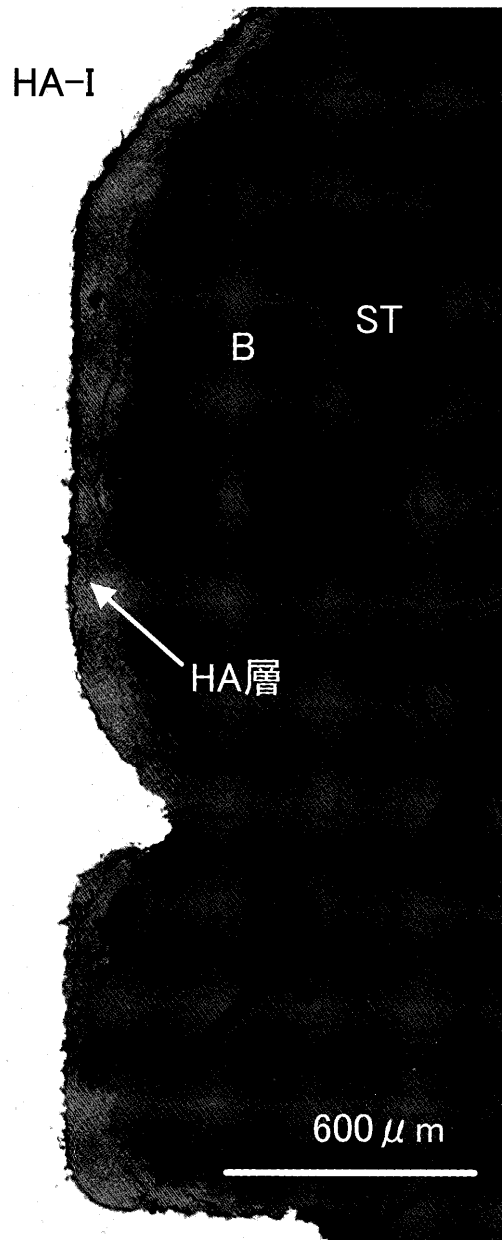


図14 HAコーティングインプラント体部の走査型電子顕微鏡反射電子像所見HA-I: HAコーティングインプラント, HA層: HAコーティング層, ST: 軟組織, B: 骨組織.

切片の薄さに限度があり、LMでの解像力が低下し、インプラント体と周囲組織との詳細を観察するのは困難であるという欠点がある。この欠点を打開するため、LM観察を行った切片をSEM用切片にすることを試みた。これは、LMによる所見と、SEMによる観察を行うことで、UDGSの観察による欠点を補うことを目的としている。また、BSEを併用して観察することでSE像の所見と併せ、各組織の区別が容易になり多くの所見が得られることが示唆された。すなわち、LMで粘膜

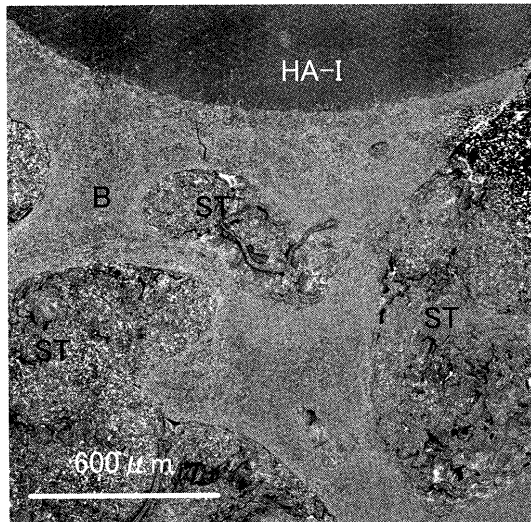


図15 HAコーティングインプラント底部の走査型電子顕微鏡二次電子像所見HA-I: HAコーティングインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

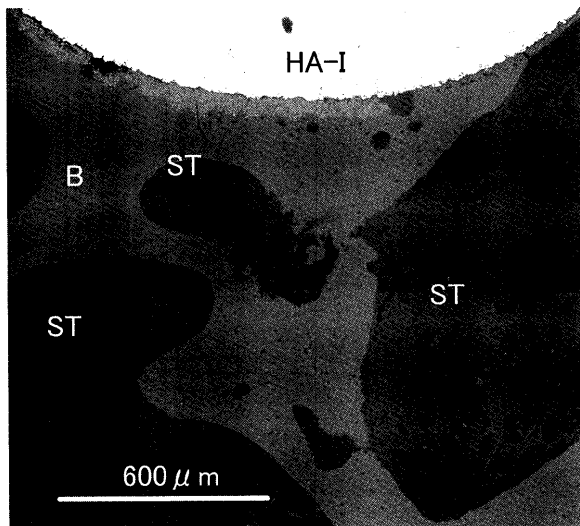


図16 HAコーティングインプラント底部の走査型電子顕微鏡反射電子像所見HA-I: HAコーティングインプラント, ST: 軟組織, B: 骨組織.

上皮, 結合組織, 骨組織という区別が容易であるが, それらの組織とインプラント体表面との詳細な所見はLMレベルでは乏しい。しかし, その切片における同一部位をSEMで観察することで, 500倍から1000倍に拡大し, その問題を回避できると考える。さらに今回BSEを用いたことで, SEではその区別が困難であった骨組織と軟組織がはっきりと区別でき, さらには, HAコーティング層の区別が容易であったとともに骨組織との区別も容易であった。

本研究により大型動物を用いた実験系において, インプラント体と周囲組織を含めたUDGSを作製し, LM,

表1 観察方法別の観察状況の一覧(+ : 観察容易, - : 観察困難, LM: 光学顕微鏡, SE: 走査型電子顕微鏡二次電子, BSE: 走査型電子顕微鏡反射電子)

観察組織 観察方法 可能倍率	歯肉粘膜上皮	粘膜下結合組織	骨組織	HA コーティング層
LM 10~100倍	+	+	+	+
SE 50~1000倍	+	+	-	-
BSE 50~1000倍	-	-	+	+

SEMにて組織学的観察を行う一手技が確立され, その有用性が評価された。

文 献

- 1) Stefflik, D. E., McKinney, R. V., Sisk, A. L., Parr, G. R. and Koth, D. L. : Scanning electron microscopic studies of the oral tissue responses to dental implants. *Scanning Microsc.*, 4 : 1021~1037, 1990.
- 2) Weber, H. P., Buser, D., Donath, K., Fiorellini, J. P., Doppalapudi, V. and Williams, R. C. : Comparison of healed tissues adjacent to submerged and non-submerged unloaded titanium dental implants. A histometric study in beagle dogs. *Clin. Oral Implants Res.*, 7 : 11~19, 1996.
- 3) Manzanares, M. C., Franch, J., Carvalho, P., Belmonte, A. M., Tusell, J., Franch, B., Fernandez, J. M., Cleries, I. and Morenza, J. I. : BS-SEM evaluation of the tissular interactions between cortical bone and calcium-phosphate covered titanium implants. *Bull Group Int. Rech. Sci. Stomatol.*, 43 : 100~108, 2001.
- 4) Chen, S. T., Wilson, T. G. Jr. and Hammerle, C. H. : Immediate or early placement of implants following tooth extraction : review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 19 : 12~25, 2004.
- 5) Hammerle, C. H., Chen, S. T. and Wilson, T. G. Jr. : Consensus statements and recommended clinical procedures regarding the placement of implants in extraction sockets. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 19 : 26~28, 2004.
- 6) Drummond, J. F., Dominici J. T., Sammon, P. J., Okazaki, K., Geissier, R., Lifland, M. I., Anderson, S. A. and Renshaw, W. : A light and scanning electron microscopic evaluation of electron-discharge-compacted porous titanium implants in rabbit tibia. *J. Oral Implantol.*, 21 : 295~303, 1995.