

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 1/30 (2006.01)	G 0 1 N 1/30	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P 2 G 0 5 2
A 6 1 C 19/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	R 4 C 0 5 2
	A 6 1 C 19/04	Z

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全9頁)

(21)出願番号 特願2009-149300(P2009-149300)  
 (22)出願日 平成21年6月24日(2009.6.24)  
 (31)優先権主張番号 特願2008-166676(P2008-166676)  
 (32)優先日 平成20年6月26日(2008.6.26)  
 (33)優先権主張国 日本国(JP)

(71)出願人 504147243  
 国立大学法人 岡山大学  
 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号  
 (74)代理人 100088904  
 弁理士 庄司 隆  
 (74)代理人 100124453  
 弁理士 資延 由利子  
 (74)代理人 100135208  
 弁理士 大杉 卓也  
 (74)代理人 100152319  
 弁理士 曾我 亜紀  
 (72)発明者 植野 高章  
 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号  
 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合  
 研究科内

最終頁に続く

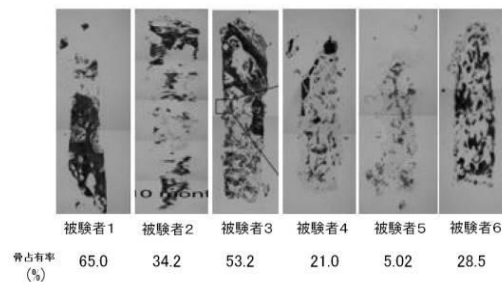
(54) 【発明の名称】 顎顔面インプラント治療のための骨質検査方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、顎顔面インプラント治療のための、新規な骨質検査方法を提供することを課題し、骨質検査方法に使用する検査用キットを提供することを課題とする。

【解決手段】顎顔面インプラント治療のために採取した骨組織から組織切片を作製し、von Kossa染色し、染色面積を測定することにより、より正確な骨質が検査可能である。本発明のキットには、組織切片をのせるためのプレパラート用ストリップと、染色剤が含まれる。

【選択図】 図4



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

採取された顎顔面由来骨組織を von Kossa 染色することを特徴とする顎顔面インプラント治療のための骨質検査方法。

## 【請求項 2】

以下の 1) ~ 5) の工程を含む、請求項 1 に記載の骨質検査方法：

- 1) 採取された顎顔面由来骨組織を固定し、包埋ブロックを作製する工程；
- 2) 上記 1) の包埋ブロックから切片を作製する工程；
- 3) 上記 2) の組織切片をプレパレート用ストリップにのせる工程；
- 4) ストリップ上の組織切片を染色する工程；
- 5) ストリップ上の組織切片内の染色組織面積比率を計測する工程。

10

## 【請求項 3】

採取された顎顔面由来骨組織をのせるためのプレパレート用ストリップと、硝酸銀水溶液を含むことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の骨質検査方法に使用する検査用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、顎顔面インプラント治療のための骨質検査方法に関し、さらには骨質検査方法に使用する検査用キットに関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

インプラントとは、欠損あるいは外傷を受けた部位に埋め込むために、人工的に作製した器官・組織の代替物またはそれを埋め込むことをいい、人工関節、義歯、腱、血管などが挙げられる。特に顎、顔面インプラントは、例えば歯周病、外傷やその他の重篤な疾病等によって不幸にも喪失した歯の代わりに用いられ、例えばチタン性の人工歯根を顎骨に埋入することで、人工歯根（インプラント）と骨の強力な結合をなし、その上に人工の歯を作製して歯を再建するものがあげられる。インプラントの治療方法は、歯の咬合や咀嚼機能を回復する最新の歯科治療で、現在急速に普及しつつある。また、近年ではミニインプラントと呼ばれるインプラントを顎の骨に埋め込み、入れ歯を安定化させたり、歯列矯正のために用いられる場合もある。

30

## 【0003】

インプラント技術で重要なことは、顎骨内の骨とインプラントが確実に結合することであり、この結合には顎骨の骨質が深く関与することがすでに報告されている（非特許文献 1）。このような顎骨の骨質は、従来では歯科用パノラマ X 線写真や CT (Computed tomography) 写真を撮影して検査し、判断を行ってきた（非特許文献 2, 3）。

## 【0004】

従来行われてきた歯科用パノラマ X 線写真や CT 写真による検査では、顎骨骨量の把握は可能であるが、その内部の骨質についての評価は不十分であった。特に萎縮した顎骨に、自家骨移植や人工骨を用いた骨造成手術後のような複雑な骨質を持つ顎骨の精密な術前診断は、インプラント治療を成功させるためには不可欠である。また、骨質の状態は、インプラント埋入手術後、骨とインプラント表面の十分な結合までの期間、すなわち治療期間を決定するのにもっとも重要な要素であるが、インプラント埋入される骨質の正確な診断はいまだ確立されていない。

40

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

【非特許文献 1】 Friberg. et al., Int J Oral Maxillofac Imp 6 (1991)

【非特許文献 2】 Fernandez et al., Int J Oral Maxillofac Imp 22 (2007)

【非特許文献 3】 Gattane et al., Int J Oral Maxillofac Imp 22 (2007)

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 6 】

本発明は、顎顔面インプラント治療のための、新規な骨質検査方法を提供することを課題とする。さらには、骨質検査方法に使用する検査用キットを提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 7 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、顎顔面インプラント治療のために採取した骨組織をvon Kossa染色し、染色面積を測定することにより、より正確な骨質が検査可能であることを見出し、本発明を完成した。 10

## 【 0 0 0 8 】

すなわち本発明は、以下よりなる。

1. 採取された顎顔面由来骨組織をvon Kossa染色することを特徴とする顎顔面インプラント治療のための骨質検査方法。
2. 以下の1)～5)の工程を含む、前項1に記載の骨質検査方法：
  - 1) 採取された顎顔面由来骨組織を固定し、包埋ブロックを作製する工程；
  - 2) 上記1)の包埋ブロックから切片を作製する工程；
  - 3) 上記2)の組織切片をプレパラート用ストリップにのせる工程；
  - 4) ストリップ上の組織切片を染色する工程； 20
  - 5) ストリップ上の組織切片内の染色組織面積比率を計測する工程。
4. 採取された顎顔面由来骨組織をのせるためのプレパラート用ストリップと、硝酸銀水溶液を含むことを特徴とする、前項1または2に記載の骨質検査方法に使用する検査用キット。

## 【発明の効果】

## 【 0 0 0 9 】

従来の歯科用パノラマX線写真やCT写真による検査では、骨量の全体評価はなされており、骨の量を把握するには有効であるが、骨の硬さやインプラント体を埋入させる海綿骨の骨梁構造を評価するには効果的ではなかった。一方、本発明の検査方法では、インプラント体が埋入される顎骨の骨質が数値化され、評価が容易となる。従来では治癒期間（骨とインプラント表面の十分な結合までの期間）を決定するための評価基準が曖昧であったが、本発明の検査方法で検査することにより、治癒期間を客観的に判断することが可能となり、時間的・経済的に最も効果的な治療スケジュールを選択することができる。そして、患者に対して、時間的かつ精神的に最も負担の少ない方法でインプラント技術を提供することができ、その後の効果も持続させることができる。 30

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 1 0 】

【図1】本発明のインプラントの一例を示す図である。また、インプラント体が埋入されたときのインプラント周囲の顎骨の微細骨梁組織を模式的に示した図である。

【図2】インプラント埋入直前に採取した骨組織試料から組織切片を含むプレパラート作製の概念を模式的に示した図である。 40

【図3】トルイジンブルー染色（比較例1）およびvon Kossa染色（実施例1）で染色したときの骨組織の染色パターンを示す図である。

【図4】6名の被験者から得た骨組織試料をvon Kossa染色したときの染色パターンと、骨占有率を示す図である。（実施例2）

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【 0 0 1 1 】

本発明の顎顔面インプラント治療のための骨質検査方法は、採取された顎顔面由来骨組織を染色することによる。本発明の顎顔面インプラント治療とは、顎顔面の骨組織に埋入可能なあらゆるインプラント治療をいい、例えば入れ歯や歯列矯正に用いられるような 50

わゆるミニプラントを含んでいても良い。一方、本発明のインプラントは、顎顔面以外の部位のインプラント治療、例えば膝などの関節再建に使用されるようなインプラント治療は除かれる。本発明の検査に用いられる顎顔面由来骨組織は、顎顔面における治療を目的とする部位のいずれの部位から採取しても良い。例えば、本発明のインプラントの一例を図1に示す。インプラント本体を顎骨に埋入させる際に、骨組織を一部取り除く必要があるが、そのときに採取した骨組織を本発明の採取された顎顔面由来骨組織とし、試料とすることができる。

#### 【 0 0 1 2 】

本発明の検査方法は、より詳しくは以下の1)～5)の工程を含む。

- 1) 採取された顎顔面由来骨組織を固定し、包埋ブロックを作製する工程；
- 2) 上記1)の包埋ブロックから切片を作製する工程；
- 3) 上記2)の組織切片をプレパラート用ストリップにのせる工程；
- 4) ストリップ上の組織切片を染色する工程；
- 5) ストリップ上の組織切片内の染色組織面積比率を計測する工程。

10

#### 【 0 0 1 3 】

上記工程の概念図を図2に示す。上記において採取した顎顔面骨組織の固定方法は、自体公知の方法を採用することができ、特に限定されない。本発明の骨組織は、光学顕微鏡下で観察可能であることから、エタノール、メタノール、酢酸、ホルマリン、ホルムアルデヒド、ピクリン酸などを固定液として用いることができ、特に好適にはホルマリンやホルムアルデヒドを用いることができる。使用する液の濃度は、適宜決定することができ、特に限定されない。また、固定した組織から包埋ブロックを作製する方法も、自体公知の方法を採用することができ、特に限定されない。包埋ブロックの作製方法としては、パラフィン包埋のほか、凍結法やゼラチン包埋、カーボワックス包埋などの方法を用いることができる。光学顕微鏡用としてパラフィンが一般的に用いられてきたが、これらに限定することなく、今後開発されるあらゆる包埋剤を用いる方法を採用することもできる。

20

#### 【 0 0 1 4 】

包埋ブロックから切片を作製する方法も、自体公知の方法を用いることができる。ここで、包埋試料には骨組織が含まれているため、骨組織専用のナイフ、例えばカーバイドナイフを用いることが好適であるが、特に限定されない。切片の厚さも染色後の組織が光学顕微鏡下で観察可能であればよく、特に限定されないが、例えば6～50 $\mu\text{m}$ 、好ましくは6～30 $\mu\text{m}$ 、もっとも好適には約6 $\mu\text{m}$ である。切片作製時の温度は、包埋材料が固形の状態であれば良く、特に限定されないが、例えば凍結切片などが一般的に作製される。凍結切片の作製温度は、例えば-20～-80、好ましくは-30～-50、もっとも好適には約-36である。

30

#### 【 0 0 1 5 】

本発明の染色方法は、骨組織、特にカルシウム沈着部位を染色可能な方法であれば良く、特に限定されないが、具体的にカルシウム沈着部位を染色可能な方法として、硝酸銀染色が挙げられる。特に切片試料中の骨組織とその他の組織を明確に区別して判断するための染色方法としては、具体的にはVon Kossa染色が挙げられる。Von Kossa染色は、組織中のリン酸カルシウムに作用させると、カルシウムは本来の結合から切り離されて、その部分は重金属陽イオンに置換される。過剰の重金属塩を水洗、その他の操作で除去し、ついでこの硝酸銀に現像液を作用させ、濃黒褐色を呈する金属銀に還元発色させることにより染色される。染色工程では、必要に応じて、水洗処理等の工程を適宜加えることができる。

40

#### 【 0 0 1 6 】

本発明の検査方法において、ストリップ上の組織切片内の染色組織面積を計測することで達成される。染色組織面積は、目視または顕微鏡下での観察による目視にて判断しても良いが、好適には染色部位を計測可能な測定器を用いるのが好ましい。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明の骨質検査方法は、上記のほか必要な工程をさらに加えても良い。例えば、染色

50

前には、脱固定剤処理、具体的には脱パラフィン処理を行うことができる。さらに、染色した組織切片は、適切な封入剤によってカバーガラスの下に封じるための処理を行っても良い。

【 0 0 1 8 】

本発明は、上記の骨質検査を行うためのキットにも及ぶ。キットに含まれる構成物としては、組織切片をのせるためのプレパラート用ストリップと、染色剤を少なくとも含んでいることが必要である。本発明の骨組織は、歯科治療等に用いるものであるので、通常の光学顕微鏡観察用のプレパラート用ストリップに比べて、小さい面積のものとする事ができる。組織切片の大きさは、5 × 15 mm以下の大きさが殆どであるから、そのような組織切片が乗せられるものであれば良く、特に限定されない。特に、ストリップの取り扱いを容易にするために、ストリップに取手を設けるなどの工夫をしても良い。ストリップの素材は、染色液等に対して耐性があり、組織の観察可能な材料であれば良く、特に限定されない。

10

【 0 0 1 9 】

本発明のキットに含まれる染色剤として硝酸銀水溶液を含むことが好適である。硝酸銀水溶液は、用時1～5%の濃度で用いられる。キットには、その他の試薬として、例えばチオ硫酸ナトリウム水溶液などの還元発色剤などを含むことができる。

【 実施例 】

【 0 0 2 0 】

以下に実施例を示して説明するが、本実施例は発明の内容をより理解するためのものであって、本発明は本実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

20

【 0 0 2 1 】

( 実施例 1 ) Von Kossa 染色

インプラント治療を行う前の患者の顎骨組織から、長さ7mm、直径2mmのシリンダ状のトレフィンを用いてインプラント埋入のために骨組織をくり抜き、採取したものを試料とした。該試料を、4%で10%の中性ホルマリンに直ちに浸した。その後、リン酸緩衝液で組織を洗浄した。その後試料を、-75度のn-ヘキセンにさらし、急速凍結した。凍結試料を4%のカルボキシメチルセルロース(CMC)ゲル(Fintec社)で満たしたステンレス製のコンテナに浸し、さらにコンテナを冷たいn-ヘキセン中に置き、CMCを凍結した。凍結ブロックを、チャンバー内の温度が-25度のマイクロトーム(CM3500、LEICA社製)を用いて凍結切片を作製した。凍結切片を3-5時間、-25度のチャンバー内で凍結乾燥させ、切片試料を作製した。

30

【 0 0 2 2 】

凍結包埋した試料を、以下の手順に従いVon Kossa染色した。

- 1) 水洗処理
- 2) 5%硝酸銀水溶液で、60ワットの白熱光の下で1時間染色
- 3) 蒸留水を用いて3度洗浄
- 4) 5%チオ硫酸ナトリウム水溶液に5分間浸した後、水道水および蒸留水で洗浄
- 5) ケルンエヒトロート液に5分間浸した後、軽く水洗し、脱水、封入

【 0 0 2 3 】

( 比較例 1 ) トルイジンプルー染色

切片試料について、Von Kossa染色のかわりにトルイジンプルーにより組織染色を行った以外は、実施例1と同様の処理を行った。トルイジンプルー染色は、以下の要領で行った。

40

- 1) 水洗処理
- 2) 0.5%トルイジンプルー液を用いて30分間染色
- 3) ろ紙で水分を除くために軽く押さえたのち、純アルコールで脱水処理を2回
- 4) キシレンにて透徹後封入

【 0 0 2 4 】

( 結果 )

50

上記の結果、実施例 1 および比較例 1 の手法により染色された切片試料について、比較例 1 では染色された骨組織と他の組織との鑑別は困難であったが、実施例 1 の V o n K o s s a 染色で染色したものは骨組織が茶色に染色され、他の組織と容易に識別できた ( 図 3 ) 。

【 0 0 2 5 】

( 実施例 2 ) 顎骨組織の検査

インプラント治療を行う前の被験者 6 名の顎骨組織から、実施例 1 に記載の方法と同手法により試料を得、切片試料を作製した。作製した切片試料を、実施例 1 と同手法にて V o n K o s s a 染色で染色した。染色された切片の染色面積を、画像処理装置 ( Mac S c o p e 、 三谷商事 ) を用いて計測し、試料における骨占有率を計測した。

10

【 0 0 2 6 】

その結果、各被験者の骨占有率は、各々 6 5 . 0 % 、 3 4 . 2 % 、 5 3 . 2 % 、 2 1 . 0 % 、 5 . 0 2 % および 2 8 . 5 % であった ( 図 4 ) 。この結果をもとに、骨占有率の高いほうが骨密度が高いと評価することができ、従来では検査ができなかった骨質を客観的に評価できることが確認された。

【 0 0 2 7 】

( 実施例 3 ) 顎骨組織の検査 2

インプラント治療を行う前の被験者 3 0 名の顎骨組織から、実施例 1 に記載の方法と同手法により試料を得、切片試料を作製した。作製した切片試料を、実施例 1 と同手法にて V o n K o s s a 染色で染色した。染色された切片の染色面積を、画像処理装置 ( Mac 20 S c o p e 、 三谷商事 ) を用いて計測し、試料における骨占有率を計測した。

【 0 0 2 8 】

各被験者の骨占有率を表 1 に示した。この結果に見られるように骨占有率は、骨の部位によってさまざまであり、この結果をもとに、骨占有率の高いほうが骨密度 ( 骨質 ) が高いと評価することができ、インプラント体が埋入される骨の状態が、従来では検査ができなかった骨質を客観的に評価できることが確認された。

短期的な観察により、骨占有率が 1 0 % 以下の症例では成功率が極端に低下する印象が得られた。

【 0 0 2 9 】

【表 1】

Sample No.	骨占有率(%)
1	4.7
2	32.7
3	51.5
4	2.3
5	30.7
6	58.3
7	0.9
8	21.2
9	20.7
10	29.3
11	58.9
12	11.9
13	4.8
14	2.6
15	1.2
16	8.9
17	24.7
18	8.2
19	5.2
20	22.5
21	52.3
22	1.5
23	30.7
24	65.3
25	2.5
26	9.5
27	18.6
28	59.2
29	21.4
30	19.7
平均	23
Max	65.3
Min	0.9

10

20

## 【産業上の利用可能性】

## 【0030】

以上詳述したように、本発明の顎顔面由来骨組織を von Kossa 染色したものについて、骨占有率の高いほうが骨密度が高いと評価することができ、従来では検査ができなかった骨質について評価できることが確認された。得られた数字をもとに、従来ではインプラント体を埋入してから咬合機能に耐えうる骨結合が得られるまでの期間を、国際的に認知されておるプロトコール、即ち上顎で6ヶ月、下顎で3ヶ月とするプロトコールがほぼ一律に実行されていたのに対し、各個人の骨質により咬合機能に耐えうる骨結合が得られるまでの期間を客観的に判断できることとなった。

30

## 【0031】

これにより、最も合理的な治療期間を選択することができ、各患者に対して時間的、精神的負担を軽減化することが可能となる。また、事前の検査により、インプラントが明らかに不向きな場合も判断することができ、患者にとっての負担が軽減化される。特に疾病や事故など、何らかの原因で顎顔面の骨が欠失したり萎縮した場合に、自家骨移植や人工骨を用いた骨造成手術後のような複雑な骨質を持つ顎骨においてインプラント治療を行う場合も、新たな骨組織の質をあらかじめ評価することで、もっとも効果的な治療計画を選択することができる。

40

【 図 1 】

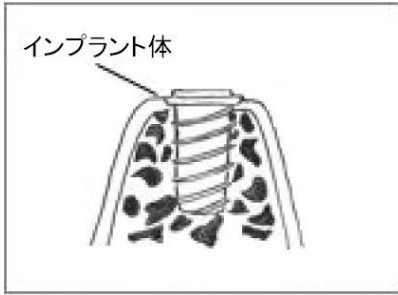
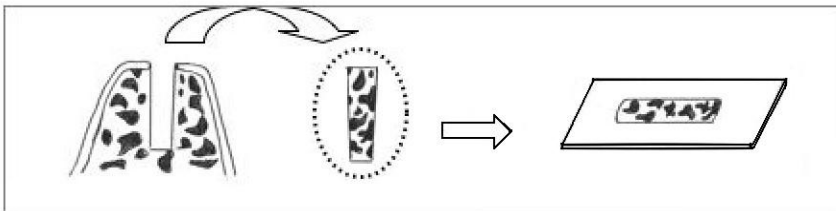


図1 インプラント周囲の顎骨の微細骨梁構造

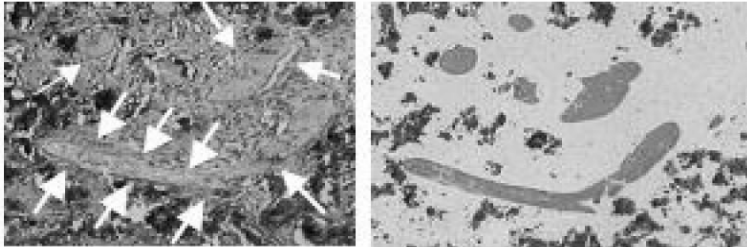
【 図 2 】



インプラント体埋入直前に骨採取

採取した組織を包埋し、包埋組織から組織切片を作製

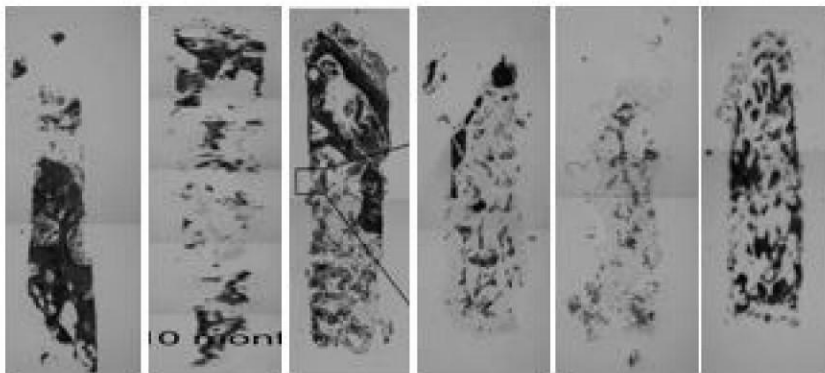
【 図 3 】



(比較例1)

(実施例1)

【 図 4 】



被験者1    被験者2    被験者3    被験者4    被験者5    被験者6

骨占有率 (%)	65.0	34.2	53.2	21.0	5.02	28.5
----------	------	------	------	------	------	------



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 AA24 BA14 BB22 BB24 BB46 CB01 CB13 FA16 FB11 GB01  
GC12 JA01  
2G052 AA28 AD12 AD32 AD52 BA15 DA05 EC02 FA09 GA32  
4C052 NN01 NN05 NN15