

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 田 昌 守(千葉県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 乙 第 254 号
学位授与年月日 平成 26 年 5 月 15 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目 Bone Augmentation of Interconnected Porous Calcium Phosphates using Periosteum Elevation Model on Rat Calvaria
(ラット頭蓋骨骨膜挙上モデルにおけるリン酸カルシウム連通多孔体の骨造成に関する研究)
日本口腔インプラント学会誌 第 26 卷 第 3 号 29-433 頁～ 39-443 頁 平成 25 年 9 月 30 日発行
論文審査委員 主査 教授 大久保力廣
副査 教授 早 川 徹 副査 教授 濱 田 良 樹

内容の要旨

【緒 言】

現在、骨造成における最も予知性の高い材料は自家骨であるとされているが、採骨部への外科的侵襲を伴うことや採骨量の制限などの問題がある。そのため、代替材料として他家骨・異種骨・人工材料等の骨補填材が研究・開発され、実際の臨床にも取り入れられてきたが、その中でも、リン酸カルシウム系セラミックスにおける生体親和性及骨伝導能の観点からの有用性に関する報告が最も多い。とくに最近製品化された連通多孔体ハイドロキシアパタイトは、非吸収性ながら優れた生体親和性と生体組織が侵入しやすい多孔体構造を有し、その気孔は互いに連通孔で連絡している。そのため、骨欠損部に埋入後、生体組織が容易に侵入し、新生骨の形成が促進されると報告されている。一方、 β -TCP 連通多孔体は、新生骨に置換されるかたちで吸収されていくため、骨欠損部への骨補填材として整形外科領域では日常的に臨床応用されている。歯科においても、同様の目的で臨床応用されてきた経緯がある。

これまで、両材料とも、主に骨欠損部の骨補填材としての有用性について検討されており、実験動物モデルでは骨に人工的に欠損部を作成し、その欠損部における新生骨の形成状態を評価したものが多い。しかし、このようなモデルでは、元來生体が有する骨修復(治癒)機能も働いており、骨補填材そのものの骨伝導能という観点での評価は難しい。また、非吸収性の連通多孔体ハイドロキシアパタイトと吸収性の β -TCP 多孔体の骨形成に与える影響を同一条件下で比較した報告も数少ない。

そこで本研究では、ラット頭蓋骨の骨膜下に非吸収性の連通多孔体ハイドロキシアパタイトと吸収性の β -TCP 連通多孔体を埋入し、骨の治癒機能の影響を受けない環境下で両者の骨形成能を比較することにした。

【材料と方法】

実験では、連通多孔体ハイドロキシアパタイトとしてネオボーン[®](NB:気孔率72-78%)、 β -TCP 連通多孔体としてオスフェリオン[®](OS:気孔率75%)を使用した。両試料はそれぞれ、直径4 mm、厚さ2 mmの円柱形とし、表面形状を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察した。また、両試料の結晶性をX線解析法(XRD)を用いて観察した。

実験動物はSparaque-Dawley系ラット(9週齢、雄、体重275～290 g)を使用した。動物実験は鶴見大学歯学部動物実験委員会の承認を得て行った。(承認番号:110074)

3%イソフルランによる吸入麻酔後、塩酸リドカイン1 mlにて局所麻酔を行い、頭頂部を剃毛後に表皮と骨膜を約10 mm切開し骨膜を剥離した。その後、頭蓋骨と骨膜の間の骨膜下ポケットの中央に位置するように、NBまたはOSを1匹に1個ずつ埋入し、創部の骨膜と表皮を各々縫合した。観察期間を4週と8週とし、実験群を4つのグループ(NB4週、OS4週、

NB8週、OS8週：各n = 4）に分けた。屠殺1週間前にカルセインを皮下注射することで蛍光標識を施し、4週ならびに8週で頭頂骨と骨膜を含めた周囲の組織とともに試料をブロック状に摘出した。その後、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定をおこない、埋入したNBとOSを含む組織をエタノールにより段階的に脱水し、メチルメタクリレートにて包埋した。包埋後、カッティング・グライディングシステム（EXAKT）を使用して非脱灰薄切研磨標本を作製した。

作製した標本を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、凡用画像処理・計測ソフト（WinRoof, Visual System Division）を用いてカルセインによる蛍光標識長を計測した。その後、切片に塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を施し、光学顕微鏡により組織学的観察を行った。NBとOSの気孔内部での骨形成率を画像解析ソフトを用いて測定した。

統計処理には、ANOVAとMann-Whitney U-testを用い、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

【結 果】

SEMで観察されたNBの表面には、直径100～200 μm の大きな気孔と小さな気孔が混在していた。OSでは、NBより気孔の数は少なく表面は粗造であった。XRDでは、NBにハイドロキシアパタイトを示すピークを認め、OSには β -TCPを示すピークを認めた。

共焦点レーザー顕微鏡所見としては、すべての検体で頭蓋骨—骨膜空隙の中央部付近にカルセインによる蛍光標識が見られた。また、骨形成は頭蓋骨表面から生じており、埋入後4週、8週ともNBとOSの間でカルセインによる蛍光標識長に有意差はなかった。

組織学的観察においても、新生骨の形成は頭蓋骨表面から生じていることが確認できた。術後4週では、NB、OSともに新生骨の形成は少なく部分的で、両者間における骨形成率に有意差はなかった。一方、術後8週においては、NB、OSとも連通孔の内部に成熟した骨形成が確認でき、術後4週に比べ骨形成率は有意に多かった。術後4週における骨形成率は、NBとOSに差はなかったが、術後8週では、NBに比較してOSの骨形成率が有意に大きかった。また、埋入期間中にNBの試料に形態変化は見られなかったが、OSの試料では一部に亀裂が確認でき、試料の高さが約8～9%減少していた。

【考 察】

本研究の結果、NB、OSとも挙上した骨膜側からの骨形成は見られず、頭蓋骨側からの形成のみ認められた。これは、挙上された骨膜が骨基質と接触することができず、骨膜内の細胞の骨芽細胞への分化が阻害されたことによると考えられた。

埋入後4週では、NB、OSともわずかな骨形成しか認められなかったが、8週目には気孔内部にまで骨の新生が認められた。しかし、骨形成率はOSの方が有意に大きかった。これは、OSの吸収に伴い周囲組織内のカルシウムイオン濃度が上昇することで、骨芽細胞が活性化されたものと考えられた。

一方、OSの試料は経時的に高さが減じることが確認された。これは、OSの吸収性と挙上伸展された骨膜の張力によるものと考えられるが、今回の実験のような骨造成を目的とした場合には予知性を低下させる要因となる。

結論として、NB、OSの両試料とも、ラット頭蓋骨の骨造成モデルにおいて頭蓋骨側からの新生骨の形成を認めた。また、OSの方は吸収されながらも、NBよりも早いペースで骨形成が起こることが示唆された。

審査の結果の要旨

インプラント治療や顎骨再建外科領域では骨造成が頻繁に行われており、自家骨だけでなく、他家骨、異種骨、人工材料等の骨補填材が実際に使用され、臨床的な有用性が報告されている。本研究は、非吸収性の連通多孔体ハイドロキシアパタイトと吸収性の β -トリリン酸カルシウム（ β -TCP）をラット頭蓋骨の骨膜下に埋入し、骨の治癒機転の影響を受けない環境下で骨造成の観察を行い、両者の骨形成能を比較したものである。

連通多孔体構造を有するハイドロキシアパタイトのネオボーン（NB）と β -TCPのオスフェリオン（OS）を用いて、直径4mm、厚さ2mmの円柱形試料を作製した。両試料の表面形状をまずSEMにより観察し、結晶性をX線回析法により測定した後に、試料をラットの頭蓋骨と骨膜の空隙に埋入した。カルセインにより蛍光標識を施し、4週および8週で試料を摘出、包埋して非脱灰薄切研磨標本を作製した。共焦点レーザー顕微鏡により蛍光標識長を計測するとともに、光学顕微鏡により組織学的観察を行った。

SEM所見から、NBは直径100～200 μm の均一な球状の微小気孔を有していたが、OSは不均一な球状であり、その数もNBより少ないことが確認された。またX線回折パターンから、両者とも純度の高いハイドロキシアパタイトと β -TCPであることが確認された。すべての検体で頭蓋骨と骨膜の空隙にカルセインの蛍光標識が認められ、組織学的観察結果からも両材料ともに骨の誘導はラットの頭蓋骨表面から起こっており、骨膜側からは生じないことが判明した。また、術後4週

では新生骨形成はNB, OSともに非常に少なく, 明らかな差も認められなかったが, 術後8週では両材料ともに有意な新生骨の増加が認められた. 特にNBに比較してOSの骨形成率が有意に大きいことが確認できた. さらにOSでは埋入期間中に試材の吸収が生じたため, 約8~9%試料の高さの減少が認められた.

以上, 本研究はラット骨膜挙上モデルを使用して, 非吸収性多孔リン酸カルシウムと吸収性多孔体リン酸カルシウムの骨造成の相違を明らかにし, 体積は減少するものの連通多孔の吸収性がより多くの骨造成に関与することを確認した. 骨造成を必要とするインプラント埋入手術や顎骨再建術に多大なる有益な示唆を与える研究であり, 今後の歯科臨床に大いに寄与するものと考えられる. よって, 本論文は博士(歯学)の学位請求論文として十分な価値を有すると判定した.