

論文の内容の要旨

氏名：佐藤 暢 亮

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ラット頭頂骨 GBA モデルにおける骨髄穿通孔の大きさが骨増生および血管新生に及ぼす影響

歯周病や外傷が原因で抜歯とされた部位にインプラントを埋入する場合、骨再生誘導（GBR: guided bone regeneration）法を用いた骨再生が必要となる症例が多い。しかし、GBR 法を行っても骨外側方向に常に十分な骨量と良好な骨質を獲得することは難しい。そこで、guided bone augmentation (GBA) 動物モデルを用いて骨外側方向への効果的な骨増生を検討するために、組織再生に必要な細胞、足場および成長因子を変化させての検討が行われてきた。骨髄穿通は既存骨をラウンドバーで穿通し、骨髄から細胞や成長因子などを溢出することによって骨外側方向の骨増生を促進させる。また、骨髄穿通時の実験母地に対する穿通孔の面積の割合（骨髄穿通率）を同一にすると、穿通孔を大きくした方が早期に骨増生量が増加することが報告されている。

骨再生には、細胞や栄養の供給を担うための血管新生が必要であり、再生骨は血管からの細胞や栄養供給によって形成する。さらに、骨再生時の血管新生は骨増生量や骨再生の骨質を調節している可能性が示されている。しかし、骨外側方向の骨増生時の血管新生の動態は不明であり、骨外側方向の骨増生のメカニズムを解明するためには骨増生時の血管新生の動態観察が必要である。そこで本研究では、ラット頭頂骨 GBA モデルを用いて骨髄穿通率を同一にし、穿通孔の大きさの違いが骨外側方向への骨増生および血管新生に及ぼす影響をエックス線学的および組織学的に検討した。

実験には、Fischer ラット 40 頭（雄性 8 週齢、体重 170-200 g、日本クレア）を用いた。ラットは、恒温恒湿で 12 時間明暗サイクルの飼育室において 2 週間予備飼育した。なお、飼育期間中は飼料と水道水を自由に摂取させた。ラットにイソフルランによる吸入麻酔後、3 種混合麻酔薬（塩酸メドミジン 0.15 mg/kg, ミダゾラム 2.0 mg/kg, 酒石酸ブトルファンール 2.5 mg/kg）を腹腔内投与し、全身麻酔を行った。手術野の頭頂部を剃毛し、塩酸リドカイン（1/80,000 エピネフリン含有 2% キシロカイン、デンツプライ三金）0.5 ml を局所麻酔した。矢状縫合に沿って切開し、筋層および骨膜を剥離した。その後、頭頂骨を露出し、トレファインバー（直径 5.0 mm, マイロック）を用いて滅菌生理食塩水で洗浄しながら正中縫合を避け左右対称に外周溝を形成し、それぞれを実験母地とした。実験母地の一方は、トレファインバー（直径 2.7 mm, マイロック）にて中央に 1 孔、他方はラウンドバー（#2, 直径 1.0 mm, マニー）にて小孔 7 孔の骨髄穿通を行った。骨髄穿通率はともにおよそ 29% とし、それぞれを 1S 群と 7M 群とした。さらに、円柱状のプラスチックキャップ（ハイコレックススリムハウジングパターン 4031 用、ニッシン：高さ 1.5 mm 内径 4.4 mm）を外周溝に嵌合させ、キャップ上部には光重合型コンポジットレジジン（エステライトフロックイック、トクヤマデンタル）を用いてマイクロ CT 撮像時の参照点とした。その後、骨膜でキャップを可能な限り被覆して、筋膜および皮膚を復位した。

マイクロ CT 撮像は、ラットに前述と同様の方法で全身麻酔を行い、0, 14 および 28 日に実験動物用 3D マイクロ CT（マイクロ CT, R_mCT, リガク）を用いてラット頭部を撮像した。造影マイクロ CT はラットに全身麻酔を行い、Udagawa らの方法に準じて、術後 14 および 28 日に環流固定に準じた方法により脱血した。固定後、自動注入器（シリンジポンプ, アズワン）を用いて造影剤イオパミドール（イオパミロン 370, バイエル薬品）を 2ml/min で 20 ml を心臓から注入し造影マイクロ CT にて撮像した。血管新生と骨増生は i-VIEW（モリタ）を用いて 3 軸方向を観察した。関心領域内の増生骨量と新生血管量はオリジナルソフト（北千住ラジスト歯科）を用いて定量した。新生血管量は血管造影前後の CT データ（差分）をもとに、関心領域の新生血管量の割合（%）を算出した。また、増生骨量は断層撮影像から得られたヒストグラムから周囲軟組織および既存骨の放射線吸収度のピーク値を求め、その中間値を増生骨の放射線吸収度の下限とした。この値をリファレンスとして、各群の関心領域の増生骨量を測定した。

術後 14 日および 28 日の血管造影後、キャップを含む頭頂骨を周囲組織とともに一塊として取り出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液に 3 週間浸漬した。その後、Morse の脱灰液で 24 時間脱灰後、通法に従いパラフィンに包埋し、厚さ 5 μm で矢状縫合に平行に切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、キャップ内の組織像を 600 dpi のデジタル画像として得た。組織像に基づく形態計測では、光学顕微鏡 (AHI BS-514, オリンパス) 下で、画像解析ソフト (Adobe Photoshop Elements 8.0, アドビシステム) の自動選択ツールを用いて、組織学的な形態や色調を指標として増生骨のピクセル数を測定し、キャップ内の増生骨の割合 (%) を求めた。また、新生組織中の毛細血管断面像は倍率 400 倍の条件で標本中の全ての断面像をカウントした。計測は 1 標本 3 回行い、その平均値をもってその標本の値とした。また、術後 14 および 28 日の 1S 群と 7M 群の血管新生量および骨増生量の比較には Wilcoxon signed-rank test を用いて、それぞれ危険率 5% で統計処理を行った。

増生骨は術後 14 日では両群ともほとんど観察されなかった。術後 28 日の 1S 群では線状の増生骨が観察されたが、7M 群の増生骨はわずかであった。

造影マイクロ CT によって観察された血管は、両群ともに脳動脈から分岐し、骨髄穿通部に達し、骨外側方向に分布領域が拡大していた。また 1S 群は 7M 群と比較してプラスチックキャップ内で血管がより広範囲に分布していた。

術後 14 日の両群で穿通部から増生した血管を含んだ結合組織が観察されたが、増生骨はほとんど認められなかった。術後 28 日になると両群ともに増生骨が認められたが、1S 群の方が 7M 群に比較して骨増生が顕著であった。

増生骨量は術後 14 日では有意差が認められなかったが、術後 28 日では有意差が認められた。一方、マイクロ CT で定量したキャップ内の血管占有率は術後 14 日において 1S 群で 7M 群と比較して有意に増加した。しかし、術後 28 日では有意差が認められなかった。

組織標本による評価では、増生骨面積割合は術後 28 日において 1S 群で有意に増加した。一方、結合組織中の血管断面出現数は術後 14 日で 1S 群で有意に増加していたが、術後 28 日では有意差は認められなかった。

ラット頭頂骨 GBA モデルを用いて骨髄穿通率を同一にし、穿通孔の大きさを変えて骨外側方向への骨増生時の血管新生に及ぼす影響をエックス線学的小および組織学的に観察した結果、以下の結論を得た。

ラット GBA モデルにおける両群の骨外側方向の骨増生時の血管新生は、脳動脈から分岐し骨髄穿通部に達し、そこから骨外側方向に分布領域が拡大していた。

骨髄穿通率が同じ場合、1S 群は 7M 群に比較して術後 14 日で血管新生量が有意に増加し、術後 28 日で増生骨量が有意に増加した。