

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

佐藤 暢亮

(指導：佐藤 秀一 教授)

## 要 旨

ラット頭頂骨 guided bone augmentation (GBA) モデルを用いて、骨髄穿通孔の大きさ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。ラットの頭頂骨を露出し、トレファインバーを用いて左右対称に外周溝を形成した。骨髄穿通孔は、大きな孔 1 ヶ所の 1S 群と小さい孔 7 ヶ所の 7M 群（両群とも骨髄穿通率：およそ 29%）とし、規格化したプラスチックキャップを外周溝に嵌合させ固定した。キャップ内の血管新生と骨増生を、術後 14 と 28 日にマイクロ CT および組織切片を用いて解析した。血管新生は両群ともに、骨髄穿通部から骨外側方向に分布領域が広がっていた。術後 14 日において、1S 群は 7M 群と比較し新生血管量が有意に増加した。術後 28 日の 1S 群は、7M 群と比較して増生骨量が有意に増加した。以上のことから骨髄穿通率を同一にし、骨髄穿通孔を大きくすると早期により多くの新生血管が形成され、その後、骨外側方向の骨増生が促進することが示された。

キーワード：ラット頭頂骨，骨髄穿通，血管新生，骨増生

ランニングタイトル：GBA モデルにおける骨髄穿通孔の影響

## 緒 言

歯周病や外傷が原因で抜歯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<sup>1)</sup>。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<sup>2,3)</sup>。そこで著者が所属する講座では、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<sup>4,7)</sup>。

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<sup>5,8)</sup>。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<sup>9)</sup>。

骨再生には、細胞や栄養供給を担うために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<sup>10-13)</sup>。さらに、骨再生時の血管新生は骨再生量や再生骨の骨質を調節している可能性が示されている<sup>14)</sup>。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小および組織学的に検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

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（ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ， $55 \pm 5\%$ ），午前 7 時点灯，12 時間明暗サイクルの飼育室で飼育した。また，実験に先立って前述の条件下で 2 週間予備飼育した。飼育期間中，ラット・マウス用 MF 固形飼料（オリエンタル酵母工業）と水道水を自由に摂取させた。実験プロトコールは，日本大学動物実験委員会の承認（AP12D011）の下で，動物実験指針に従って行うとともに，動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

### 2. ラット GBA モデル作製

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（塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg，ミタゾラム 2.0 mg/kg，酒石酸ブトルファノール 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）を用いて中央に 1 孔，他方はラウンドバー（#2，直径 1.0 mm，マニー）を用いて小孔 7 孔の骨髄穿通を行った。骨髄穿通

率<sup>9)</sup>は両群ともにおよそ 29% とし、それぞれを 1S 群と 7M 群とした(第 1A 図)。

さらに、円柱状のプラスチックキャップ(ハイコフ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(第 1B 図), キャップの上部には光重合型コンポジットレジン(エステライトフロークイック, 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(第 1B 図)。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。

### 3. マイクロ CT 撮像

前述と同様の方法でラットに全身麻酔を行い, 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。撮像条件は, 管電圧 90 kV, 管電流 88  $\mu$ A, 照射時間 17 秒, voxel size 30  $\times$  30  $\times$  30  $\mu$ m とした。撮像時はキャップ底面が基準平面(水平面)と平行になるように, ラット頭部の固定方向を調整した。

### 4. 造影マイクロ CT

ラットに全身麻酔を行い, Udagawa ら<sup>14)</sup>の方法に準じて, 術後 14 および 28 日に還流固定に準じた方法で脱血した。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(イオミパロン 370, バイエル薬品)を 2 ml/min で 20 ml を心臓から注入しマイクロ CT を前述の方法と同様に撮像した。

### 5. マイクロ CT 断層像の観察と解析

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 (第 2 図)。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。

## 6. 組織標本の作製と解析

術後 14 および 28 日の血管造影後、キャップを含む頭頂骨を周囲軟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  $\mu\text{m}$  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) 染色を行い、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標本の値とした。

## 7. 統計学的分析

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。

## 結 果

### 1. マイクロ CT 所見

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（第 3 図）。

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（第 4 図）。

### 2. 組織学的所見

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 群と比較して骨増生が顕著であった（第 5 図）。

### 3. 定量的評価

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 日で有意差が認められた（第 6 図）。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（第 7 図）。

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（第 8 図）。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（第 9 図）。

## 考 察

ラット頭頂骨 GBA モデルを用いて骨髄穿通率を同一とし、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小および組織学的に観察した。その結果、骨外側方向の骨増生時における血管新生は骨髄穿通部から骨外側方向に分布していた。また、穿通孔の大きさをより大きくすると多量の血管新生が早く起こり、その後、骨増生が促進することが示された。

血管新生は脳動脈から骨髄穿通部に進展し、そこから骨外側方向に分布領域が拡大していた。ラット頭頂骨の骨再生は膜性骨化によって生じるため、骨再生時の血管新生は周囲組織の既存血管から始まると考えられている<sup>15)</sup>。Udagawa ら<sup>14)</sup>は、本研究と同様の方法を用いて内側性骨欠損に対する骨再生時の血管新生の動態を観察した。その結果、新生血管が脳動脈から既存骨辺縁部に向かって進展し、さらに、骨欠損部で骨再生とともに広がることを報告した。ウサギ頭頂骨の GBA モデルを用いた組織学的観察でも、血管は骨髄穿通部から骨外側方向に進展していることが観察されている<sup>16-18)</sup>。



Schwarz ら<sup>19)</sup>は、イヌの裂開状骨欠損に物質透過性の異なる遮断膜を用いて骨再生量を評価した結果、物質透過性の低い遮断膜は物質透過性の高い遮断膜と比較して再生骨量が減少したと報告した。このことから、骨外側方向の骨増生を促進させるためには物質透過性の高い遮断膜を使用し、骨膜や周囲組織から血管新生を促すことが有効な方法であると考えられた。

両群の増生骨は、術後 14 日ではほとんど観察されなかったが、術後 28 日になると観察されるようになった。このことから、骨外側方向の骨増生では骨内欠損における骨再生と同様に<sup>14)</sup>、骨増生に先行して血管新生が生じる<sup>17,18)</sup>ことが確認された。

増生骨量は、術後 28 日で 1S 群の方が 7M 群よりも有意に増加したが、術後 14 日では両群で有意差は認められなかった。

新生血管量は両群で、術後 14 日で 1S 群の方が 7M 群よりも有意に増加した。両群の骨髄穿通率は同一に設定されているところから、穿通孔を大きくすると、新生血管が早期に多く形成されることが示された。また、この理由としては、穿通孔を大きくすると穿通部から血管新生に必要な細胞や栄養成分が流入しやすくなるためと考えられた。したがって、骨外側方向の骨増生では、穿通孔を大きくすると早期に血管新生が増加し、その後、増生骨が増加することが判明した。

## 結 論

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よび組織学的に観察した結果、以下の結論を得た。

1. 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。
2. 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。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました、日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座 佐藤秀一教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また、研究を通じ多大なるご協力とご助言をいただきました、日本大学特任教授新井嘉則教授ならびに歯科保存学第Ⅲ講座の皆様深く感謝します。

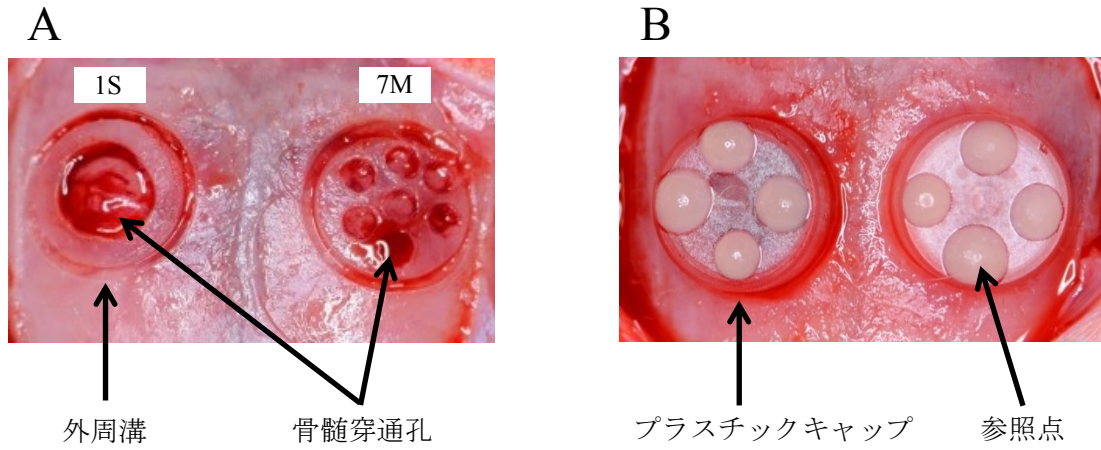
## 文 献

- 1) Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P (2009) Interventions for replacing missing teeth: horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 7, CD003607.
- 2) Bernstein S, Cooke J, Fotek P, Wang HL (2006) Vertical bone augmentation: where are we now?. *Implant Dent* 15, 219–228.
- 3) Rocchietta I, Fontana F, Simion M (2008) Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: A systematic review. *J Clin Periodontol* 35, 203–215.
- 4) Murai M, Sato S, Fukase Y, Yamada Y, Komiyama K, Ito K (2006) Effects of different sizes of  $\beta$ -tricalcium phosphate particles on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Dent Mater J* 25, 87–96.
- 5) Min S, Sato S, Murai M, Okuno K, Fujisaki Y, Yamada Y, Ito K (2007) Effects of marrow penetration on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *J Periodontol* 78, 1978–1984.
- 6) Kochi G, Sato S, Ebihara H, Hirano J, Arai Y, Ito K (2010) A comparative study of microfocus CT and histomorphometry in the evaluation of bone augmentation in rat calvarium. *J Oral Sci* 52, 203–211.

- 7) Tsuchiya N, Sato S, Kigami R, Kawano E, Takane M, Arai Y, Ito K, Ogiso B (2014) Effects of a chitosan sponge with platelet-derived growth factor on bone augmentation beyond the skeletal envelope in rat calvarium. *J Oral Sci* 56, 23–28.
- 8) Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K (2004) Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone augmentation. *Clin Oral Implants Res* 15, 293–300.
- 9) 浅野幸弘 (2011) ラット頭頂骨における骨髄穿通率および穿通孔の大きさが骨外側方向への骨増生に及ぼす影響. *日大歯学* 35, 133–138.
- 10) Kanczler JM, Oreffo ROC (2008) Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur Cells Mater* 15, 100–114.
- 11) Das A, Botchwey E (2011) Evaluation of angiogenesis and osteogenesis. *Tissue Eng Part B Rev* 17, 403–414.
- 12) Percival CJ, Richtsmeie JT (2013) Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn* 242, 909–922.
- 13) Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S (2014) Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys* 1, 109–117.
- 14) Udagawa A, Sato S, Hasuike A, Kishida M, Arai Y, Ito K (2013) Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 24, 787–792.

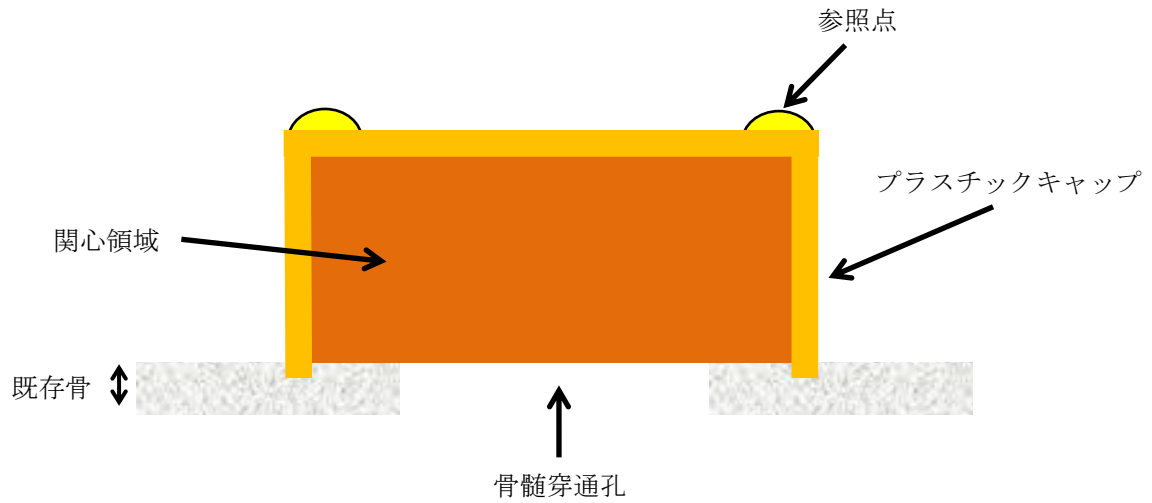
- 15) Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM (2010) Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 19, 329–344.
- 16) Winet H (1996) The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone* 19, 39S–57S.
- 17) Schmid J, Wallkamm B, Hämmerle CHF, Gogolewski S, Lang NP (1997) The significance of angiogenesis in guided bone regeneration: A case report of rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 8, 244–248.
- 18) Yamada Y, Tamura T, Hariyu K, Asano Y, Sato S, Ito K (2008) Angiogenesis in newly augmented bone observed in rabbit calvarium using a titanium cap. *Clin Oral Implants Res* 19, 1003–1009.
- 19) Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wüstefeld M, Sager M, Ferrari D, Becker J (2008) Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 19, 402–415.



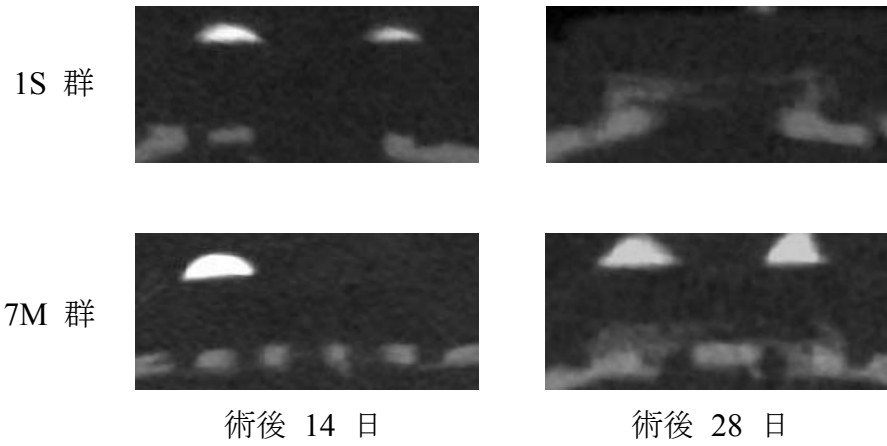


第 1 図 ラット頭頂骨 GBA モデル

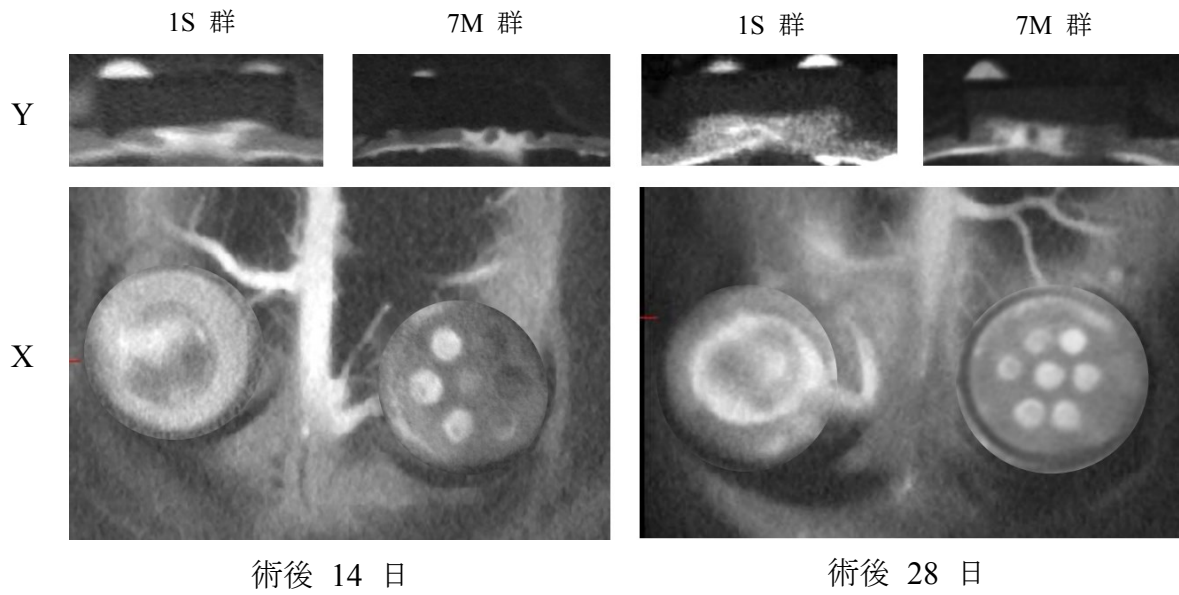
A : 1S 群は実験母地の中央に大きな穿孔孔 1 孔, 7S 群では小さな穿孔孔を 7 孔形成した B : 外周溝にプラスチックキャップを嵌合させ固定した



第 2 図 マイクロ CT 解析における関心領域の模式図



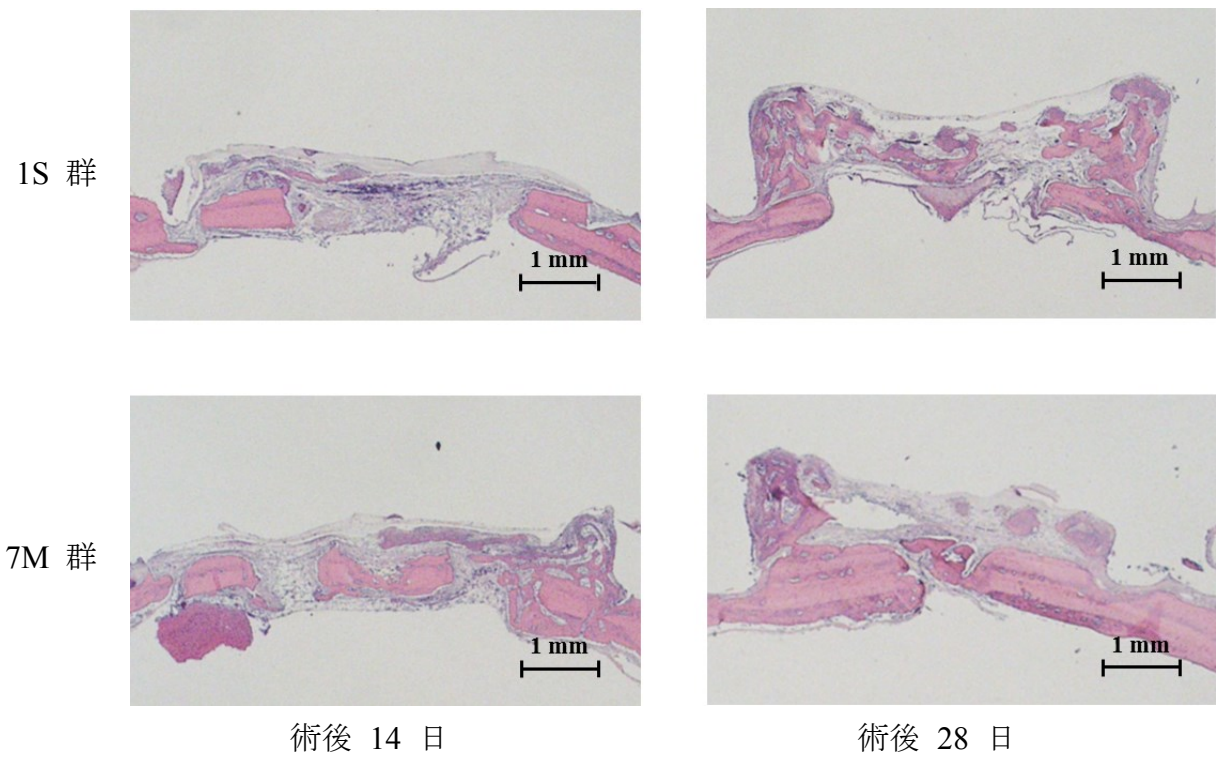
第 3 図 マイクロ CT 像による増生骨の観察像



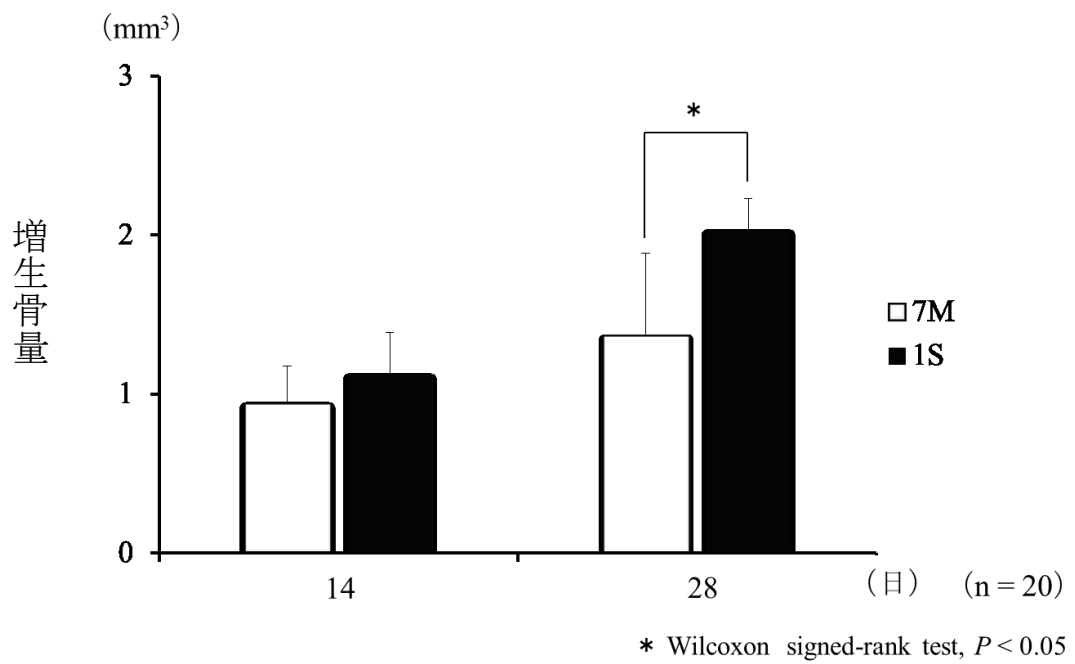
第 4 図 造影マイクロ CT による新生血管の観察像

Y : 血管撮像後の矢状断画像, X : 血管撮像後の水平断画像

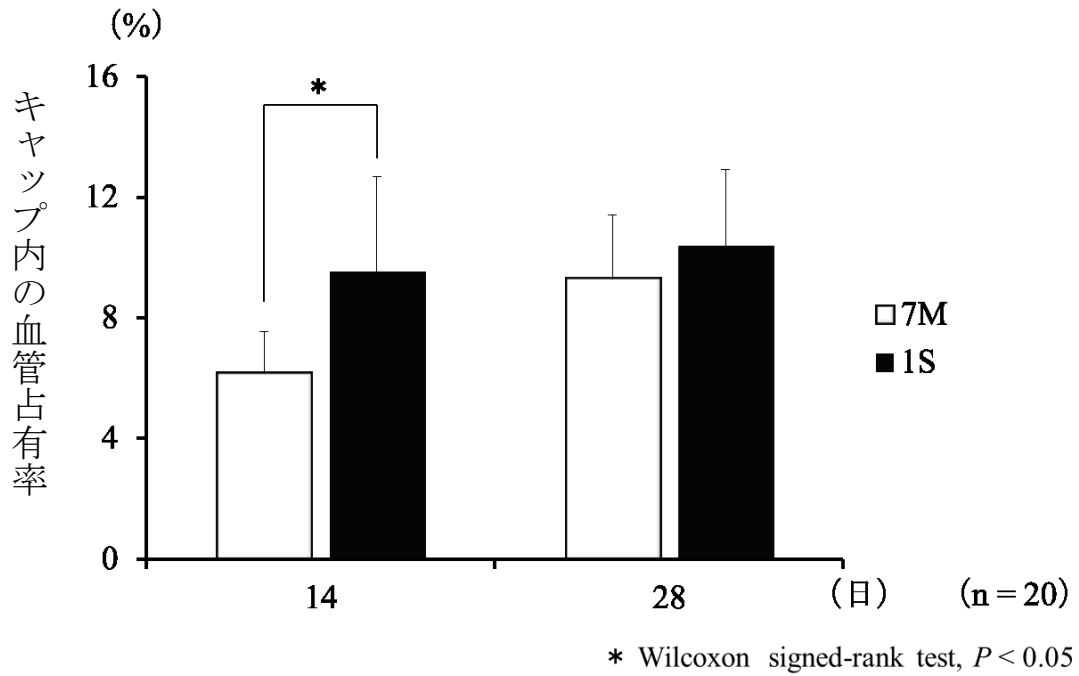




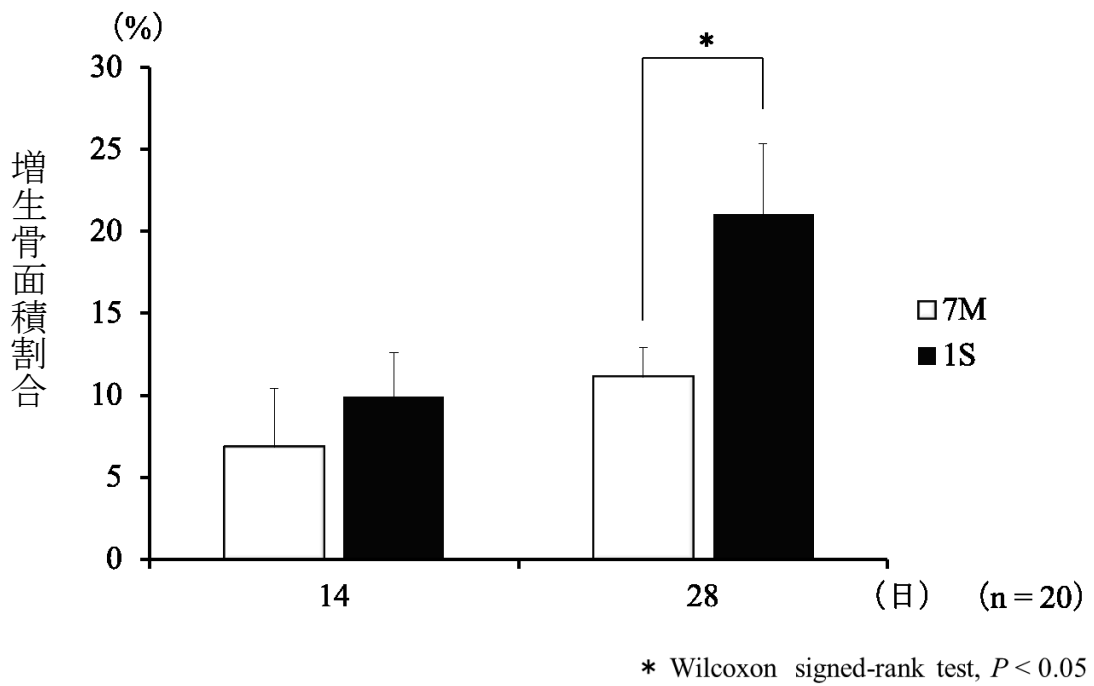
第 5 図 組織学的観察標本



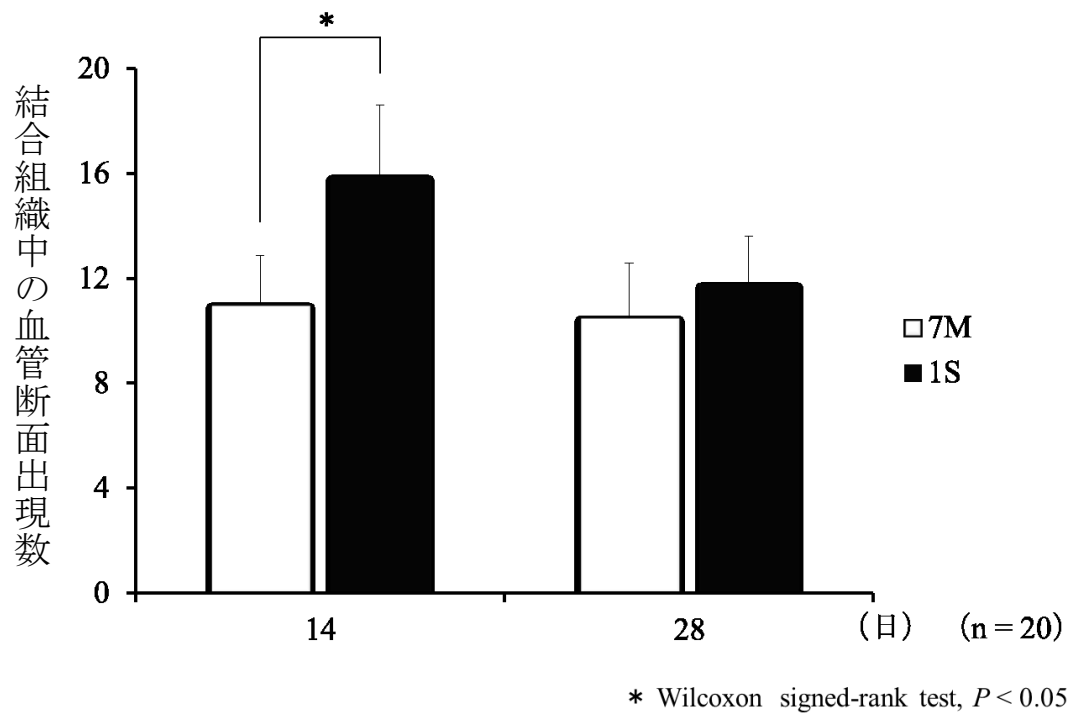
第 6 図 マイクロ CT 像による増生骨量の定量的評価



第 7 図 造影マイクロ CT 像による血管新生量の定量的評価



第 8 図 組織形態計測における増生骨の面積の割合



第 9 図 組織形態計測による結合組織中の血管断面出現数