

論文の内容の要旨

氏名：篠 弘 道

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ラット頭頂骨における骨外側方向への骨増生に対するメラトニンの影響

骨再生誘導（guided bone regeneration：GBR）法は、歯周病や外傷によって骨量が不足した部位に対してインプラントを埋入するために行われている。しかし、GBR法によって増生される骨量には限界があり、増生骨の骨質が既存骨と異なることも問題点として挙げられている。著者が所属するグループのこれまでの研究では、規格化されたチタンやプラスチックキャップを使用して、このキャップ内における骨外側方向への骨増生について検討してきた。その過程で、常に十分な骨量と良好な骨質を伴った骨を獲得することが困難であると判明し、骨外側方向へ骨増生を効果的に行うためのさらなる検討が必要と考えられた。

メラトニンは、松果体から産生されるホルモンとして発見され、概日リズムの調節作用を持つことで知られている。最近では、硬組織に対するメラトニンの作用が注目され、*in vitro*においてメラトニンは骨芽細胞の分化や石灰化を促進することが報告されている。また、*in vivo*において骨欠損部での骨再生や骨折部の治癒の促進、インプラント周囲の骨形成あるいはオッセオインテグレーションを促進させることなども報告されている。しかし、骨外側方向への骨増生に対する影響についての検討はなされていない。

そこで本研究では、メラトニンの骨外側方向への骨増生に対する有効性について、ラット頭頂骨における guided bone augmentation (GBA) モデルによってエックス線学的および組織学的に検討した。具体的には、雄性 Fischer ラット（9 週齢、18 頭、250～300 g）を 12 時間の明暗サイクルおよび恒温、恒湿の環境下で、固形飼料と水道水を自由に摂取させて飼育した。そして、2 週間の予備飼育後、実験に用いた。

ラットに吸入麻酔（イソフルラン 2%）の導入後、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）の腹腔内投与による全身麻酔を行った。次いで、頭頂部を剃毛して、同部に塩酸リドカイン（1/80,000 エプネフリン含有 2% キシロカイン）約 0.2 ml の局所麻酔下で手術を行った。ラット頭頂部に矢状方向の切開を加え、骨膜を剥離翻転し、頭頂骨を露出させた。さらに、生理食塩水注水下で矢状縫合に対し左右対称に直径 5.0 mm のトレファインバーで円形の外周溝を形成し実験母地とした。実験母地には、# 2 ラウンドバーを用いて穿孔孔を 5 つ形成した。規格化された円筒状プラスチックキャップ（高さ 1.5 mm、直径 4.4 mm）を、両側の溝に嵌合させ、キャップの上部には光重合型コンポジットレジンをを用いてマイクロ CT 撮影時のリファレンスとした。なお、右側のキャップにはメラトニン粉末を 10 mg 填塞しこれをメラトニン群として、左側のキャップ内には何も填塞することなく対照群とした。その後、骨膜に減張切開を施してキャップを骨膜で可能な限りキャップを被覆し、筋膜および皮膚を復位した。実験期間は 12 週間とし、予備飼育と同様の環境下でラットを飼育した。骨増生の経日的な変化は、施術直後（0 週）から 12 週まで、2 週毎に実験動物用 3D マイクロ CT を用いて撮影した。撮影条件は、管電圧 90 kV、管電流 88 μ A、照射時間 17 秒、voxel size 30 \times 30 \times 30 μ m とした。マイクロ CT 断層像の観察と解析は、i-VIEW を用いて 3 軸方向で行い、術後の骨増生を定性的に評価するとともに、骨体積計測ソフトを用いた定量的評価を行った。定量的評価では、断層像から得られたヒストグラムから、周囲の軟組織および既存骨それぞれの放射線吸収のピーク値を求め、その中間値を術後増生した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、各群とも断層像についてキャップ内の関心領域における増生骨量（mm³）を測定した。

術後 4 および 12 週の CT 撮影後、前述の方法でラットに全身麻酔を施し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて灌流固定を行った。その後、キャップ部と周囲組織を含む頭頂部組織を採取し、10% EDTA

を用いて 2 ヶ月間脱灰を行った。その後、通法に従ってパラフィン包埋し、キャップの中央部を通る厚さ約 5 μm の前頭方向の切片を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。また、術後 4 週においては、前述と同様の方法で組織切片を作製し、抗カテプシン K 抗体による免疫染色を施した。組織形態計測では、光学顕微鏡を用いて撮影した組織像で行った。各群の HE 染色標本中のキャップ内組織を 600 dpi のデジタル画像とし、キャップ内部における増生骨の占有率 (%) およびキャップの高さに対する増生骨の高さの割合 (%) を計測した。さらに、増生骨の組織標本を光学顕微鏡下で観察し、毛細血管断面像と骨芽細胞様細胞を計測した。また、同様の方法で術後 4 週の抗カテプシン K 陽性の破骨細胞数を計測した。各群の比較には Wilcoxon signed-rank test を用いて行い、危険率を 5% とした。

マイクロ CT の観察の結果、メラトニン群における骨増生は術後 4 週から既存骨辺縁から認められ、術後 12 週でキャップのほぼ頂上部に達した。一方、対照群では術後 12 週でキャップの高さの約 1/3 までしか達しなかった。組織学的観察の結果、術後 12 週の HE 染色標本では、メラトニン群は毛細血管を含んだ厚みのある層板状の増生骨が確認でき、増生骨の高さはキャップの頂上部に達した。マイクロ CT による定量的評価の結果、メラトニン群は対照群と比較して術後 4 週目以降の増生骨量が有意に増加した。組織形態計測の結果、術後 4, 12 週において、メラトニン群ではキャップ内に形成された増生骨の面積の割合および増生骨の高さが対照群より有意に高値であった。さらに、術後 4, 12 週における増生骨中の毛細血管数および骨芽細胞様細胞数はメラトニン群で有意に多かった。しかし、術後 4 週における破骨細胞数に有意差は認められなかった。

以上のように、本研究の結果から、メラトニンはラット頭頂骨における骨外側方向への骨増生を促進させることが示された。