

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15750

研究課題名(和文) 抜歯後の骨量の減少を防ぎ、増量を図る

研究課題名(英文) Prevent decrease on bone mass after tooth extraction and increase bone mass

研究代表者

西川 哲成 (NISHIKAWA, Tetsunari)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70140209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯を失った症例では、顎の骨量が減少するため、義歯の維持やインプラントの適応が困難となる。そこで、骨量の減少を防ぎ、さらには骨量の増加を目的とした抜歯後の処置として、抜歯後のガーゼによる圧迫止血、サンゴの骨補填材埋入が骨量に与える影響を検討した。ビーグル犬の下顎骨の左側臼歯を抜去した直後、ガーゼによって圧迫、サンゴ埋入を実験群、圧迫を行わない右側臼歯を対照とした。埋入後、下顎骨を摘出した。下顎骨はX線で骨密度を測定するとともに共焦点レーザー走査顕微鏡で新生骨形成の組織学的観察を行った。今回ガーゼによる骨量への影響は認められなかったが、サンゴによる骨補填剤を用いることにより骨増生の効果があった。

研究成果の概要(英文)：In cases where teeth are lost, maintenance of the denture and adaptation of the implant becomes difficult because the bone mass of the jaw decreases. Therefore, as a treatment after tooth extraction aiming at preventing reduction of bone mass, and also to increase bone mass, we investigated the effects of compression hemostasis by gauze after extraction and coral filling material implantation on bone. Immediately after removing the left molar of the mandibular bone of the Beagle dog, it was compressed by gauze, coral implantation was used as an experimental group, and right molar that was not pressed was used as a control. After implantation, the mandible was removed. Mandibular bone was measured bone density with X-ray and histological observation of new bone formation by confocal laser scanning microscope. Although there was no effect of compression by gauze on bone mass on this time, using bone filling agent by coral had the effect of bone augmentation.

研究分野：口腔病理学

キーワード：抜歯 歯槽骨 サンゴ 骨増生 CAD/CAM

1. 研究開始当初の背景

う蝕、歯周疾患、嚢胞、そして腫瘍などで歯を失った症例では、顎の骨量が減少し、義歯の維持やインプラントの適応が困難となる。そのため顎骨量の減少を防ぐだけでなく、骨量の増加（増生）が求められる。臨床では抜歯後の止血目的でガーゼを噛み圧迫することが多い。抜歯後の血餅の量はその後の骨量と密接な関係があるため、この圧迫は血餅の量の減少すなわち骨量の減少になるのではないかと考えられる。骨量の減少を防ぎ、さらには骨量の増加を目的とした抜歯後の処置として、抜歯後のガーゼによる圧迫止血が骨量に与える影響を検討した。

顎骨の再生さらには骨増生において最良の骨補填材は自家骨であるが、患者の侵襲や採集骨量の制限など問題点も多い。そのため、TCP やハイドロキシアパタイトなどの人工骨の開発が進められている。この骨補填材には一般の生体材料に求められる非刺激性や生体親和性などの具備条件に加え、生体吸収性で、骨量の増量を目的とした場合周囲組織からの圧力に耐えられる圧縮強度を有することが望ましい。しかし、生体吸収性と物理的強度とは相反する性質であり、その両方を兼ね備えた材料は少ない。炭酸カルシウムのアラゴナイトからなるサンゴの外骨格は物理的強度を有し生体吸収性であることが知られている。なかでも沖縄近海で採取できるエダコモンサンゴは多孔性かつ連通性で外骨格の表面構造は細胞が付着するのに有利な粗造である。

これまでの研究でサンゴブロックを骨欠損部埋入した場合、術後12週でサンゴは消失し、多孔性の腔内に沿って新生骨が形成され、24週後では最終的にサンゴは完全に新生骨と置き換わることが認められた。そして、イヌ大腿骨の実験的欠損部へサンゴブロックを埋入した実験では、サンゴ外骨格の形状に近似した新生骨が形成されるため、新生骨の骨量と形状が設計できる可能性が示唆された。そこで今回、抜歯後の骨量の減少を防ぎ、増生を図る目的で骨補填材としてのサンゴに焦点を当てた。

2. 研究の目的

抜歯後において骨量の減少を防ぎ、さらには骨量の増加を目的とした術式および骨補填材としてのサンゴの開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 抜歯後のガーゼによる圧迫が骨量に与える影響

全身麻酔下でビーグル犬の下顎骨の左側臼歯（5と6番目の歯）を抜去した直後、ガーゼによって圧迫し、圧迫を行わない右側臼歯を対照とした。そして犠牲にする7日前にカルシウムと結合する蛍光色素カルセイン、3日前にアリザリンレッドを腹腔投与し、埋入後、4週、8週、12週において安楽死さ

せ、下顎骨を摘出した。下顎骨の骨量はX線で観察し、 μ -CTで立体像、下顎骨における蛍光色素で標識された新生骨の石灰化は共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

(2) 生体材料としてのサンゴの組織親和性 *in vitro*

琉球大学理学部より提供の受けたエダコモンサンゴを次亜塩素酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウムで除タンパク処理し、顆粒状に粉碎した後オートクレーブで滅菌し、生理食塩水中で保存した。

ヒト線維芽細胞とヒト血管内皮細胞の共培養にサンゴ粒子を添加し、1週後サンゴ周囲の培養細胞をDapi染色、抗Factor-抗体を用い、共焦点レーザー走査顕微鏡で細胞増殖および毛細血管への分化誘導を調べた。

(3) 骨補填材としてのサンゴ外骨格の抜歯窩への応用 *in vivo*

抜歯窩へのブロック状サンゴ外骨格の埋入 *in vivo*

ビーグル犬の下顎骨の左側臼歯（5と6番目の歯）を抜去した直後、ブロック状の除タンパク処理したサンゴ外骨格を埋入し縫合した。術後4週、8週、12週において、埋入補填材の残存および骨量をX線像で観察した。そして犠牲にする7日前にカルセイン、3日前にアリザリンレッドを腹腔投与し、犠牲にした。摘出した下顎骨における新生骨の石灰化は共焦点レーザー走査顕微鏡で組織学的に、また抜歯周囲の顎骨のサンゴの吸収と新生骨の形成は μ -CTで立体的に観察した。抜歯後未埋入の右側臼歯（5と6番目の歯）を対照とした。

歯槽骨の実験的欠損部への円柱状サンゴの埋入 *in vivo*

サンゴは琉球大学理学部より提供を受けたミドリイシサンゴを用い除タンパク処理した。インプラント用のドリルと同じ形態（直径4mm、長径10mm）のらせん状の溝を付与した円柱状サンゴブロックをCAD/CAM技術を用いて作製した。

ビーグル犬の下顎骨の左側臼歯（5と6番目の歯）を抜去した直後、インプラント用のドリル（直径4mm、深さ10mm）を用い実験的骨欠損を作製し、ドリルと同じ形態のサンゴ外骨格を埋入し縫合した。術後1週、2週、4週、8週、12週における、埋入補填材の残存および骨量をX線で観察した。そして犠牲にする7日前にカルセイン、3日前にアリザリンレッドを腹腔投与し、犠牲後摘出した下顎骨の新生骨の石灰化を共焦点レーザー走査顕微鏡で組織学的に観察し、骨形成の立体像は μ -CTで観察した。抜歯後未埋入の右側臼歯（5と6番目の歯）を対照とした。

抜歯窩への歯根状サンゴ外骨格の埋入 *in vivo*

除タンパク処理したミドリイシサンゴを用いた。以前に抜歯したビーグル犬の下顎骨

の左側臼歯（5と6番目の歯）と同じ形態（90%の縮小）となるようにサンゴをCAD/CAM 技術を用いて造形および形成した。

全身麻酔下で、ビーグル犬の下顎骨の左側臼歯（5と6番目の歯）を抜去した直後、歯根と同じ形態のサンゴ外骨格を埋入し縫合した。術後1週、2週、4週、8週、12週において、埋入補填材の残存および骨量をX線で観察した。そして犠牲にする前に7日前にカルセイン、3日前にアリザリンレッドを腹腔投与し、蛍光色素で標識された新生骨の石灰化を共焦点レーザー走査顕微鏡で組織学的に、新生骨の形成は μ -CTを用い立体的に観察した。抜歯後未埋入の右側臼歯（5と6番目の歯）を対照とした。

4. 研究成果

(1) 抜歯後のガーゼによる圧迫が骨量に与える影響

抜歯後12週でガーゼ圧迫の実験群における骨量の減少は非圧迫の対照群と比較し、X線像および μ CT像において差は認められなかった。

(2) 生体材料としてのサンゴの組織親和性 *in vitro*

添加したサンゴ粒子表面やその周辺で線維芽細胞および血管内皮細胞のDapi陽性の核を持つ細胞が、対照群のそれらと比較し増加しており細胞増殖が観察された。また、添加したサンゴ粒子表面やその周辺、さらには腔内でFactor陽性の線状や網状の毛細血管が多く観察され、対照群のそれらと比較し血管内皮細胞の分化誘導が認められた。

(3) 骨補填材としてのサンゴ外骨格の抜歯窩への応用 *in vivo*

抜歯窩へのブロック状サンゴ外骨格の埋入 *in vivo*

抜歯窩にブロック状のサンゴを埋入した場合、抜歯後4週でサンゴは生体吸収され、12週までにはサンゴは新生骨と置き換わり、非埋入の対照と比較し、骨量が減少する例は少なく、さらに骨増生を認める例が多かった。また、リンパ球を中心とする炎症細胞の浸潤はほとんど認められなかった。一方、サンゴが抜歯窩で固定されず動揺している場合、上皮の再生が遅れサンゴが露出し、縫合を繰り返し行われた例があった。そして、この場合サンゴの生体吸収や新生骨の形成は遅延した。

歯槽骨の実験的欠損部への円柱状サンゴの埋入 *in vivo*

ドリルによる実験的欠損部に埋入した円柱状のサンゴと骨欠損部のスペースは少なく、サンゴ周囲の出血は短時間で凝血し、固定や縫合は容易であった。そして、肉眼的に1週目から抜歯窩は上皮によって被覆されていた。エックス線学的評価ではサンゴ外骨

格に1週目から透過像が認められた。12週にかけて周囲骨との境界は不明瞭な不透過像が見られた。骨計測評価では実験群は対照群と比較して骨体制並びに骨密度が有意に高かった。病理組織学的評価では12週目においてサンゴ外骨格の腔内にカルシウムの沈着した新生骨が観察された。また、リンパ球を中心とする炎症細胞の浸潤はほとんど認められなかった。

抜歯窩への歯根状サンゴ外骨格の埋入 *in vivo*

抜歯窩に埋入した歯根状のサンゴと骨欠損部のスペースは少なく、サンゴ周囲の出血は短時間で凝血し、固定や縫合は容易であった。肉眼的に術後1週で一部発赤は見られるものの抜歯窩の上皮は完全に再生され、2週では発赤は消失し正常粘膜色であった。エックス線学的評価ではサンゴ外骨格に1週目から透過像が認められた。2週では周囲骨との境界は不明瞭な不透過像が見られた。8週における骨計測評価では実験群は対照群と比較して骨体制並びに骨密度が有意に高かった。

以上のことから、抜歯する前に歯根形態に形成したサンゴ骨格を抜歯窩に埋入した場合、サンゴの生体吸収と新生骨の形成が促進され、抜歯後の骨量の減少を防ぎ、さらに骨増生が期待できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計8件)

1) Okamura T, Uemura N, Baba S, Yasuda N, Yamashiro H, Imai K, Nishikawa T, Shimizu H, Shida M, Tominaga K, Tanaka A. Montipora digitata exoskeleton derived aragonite particles are useful scaffold for tissue engineered vascular graft *in vitro*. *Nano Biomedicine*, 9(2), 105-111, 2017. 査読有

2) Imai K, Kumabe S, Ono Y, Matsumoto H, Nishikawa T. Study of ES cell differentiation using three-dimensional culture with silica fiber. *Nano Biomedicine*, 9(2), 55-60, 2017. 査読有

3) Imai K, Shirai T, Zennnyu M, Yoshida T, Nishikawa T. An attempt on the cell survival and cell differentiation by fine fragments of tungsten carbide and steel cutting bars. *Nano Biomedicine*, 9(1), 3-8, 2017. 査読有

4) Okamura T, Takeuchi T, Honda S, Tominaga K, Naruse K, Morita S, Imai K, Masuno K, Ono Y, Nishikawa T, Tanaka A. Effects of montipora digitata exoskeleton-derived aragonite particles on human fibroblasts

for cell proliferation and collagen production in vitro. Journal of Oral Tissue Engineering, 15(1), 41-48, 2017. 査読有

5) Nishikawa T, Okamura T, Masuno K, Matsumoto H, Hirose M, Uemura N, Yasuda N, Hidaka M, Baba S, Imai K, Tanaka A. Comparative Study of Physical and Morphological Characteristics of Cultured and Natural Coral as a Bone Augmentation Scaffold. J Oral Tissue Engin. 14, 107-113, 2016. 査読有

6) Imai K, Oshima H, Hashimoto Y, Akiyama M, Zennyu M, Yoshida T, Nishikawa T, Masuno K, Matsumoto H. Prediction of Embryotoxicity by Four Kids of Fluorine Compounds Based on Embryonic Stem Cell Test (EST) Protocol. J Oral Tissue Engin, 14, 91-97, 2016. 査読有

7) Nishikawa T, Okamura T, Tominaga K, Wato M, Kurioka K, Morita S, Imai K, Tanaka A. Tissue affinity and bioabsorption to fine calcium carbonate particles. Nano Biomedicine, 7(1), 21-27, 2015. 査読有

8) 岡村友玄、西川哲成、和唐雅博、富永和也、大草亘孝、田中昭男. in vitro における共培養された正常皮膚線維芽細胞および正常臍帯静脈内皮細胞のミトコンドリア活性に各種歯の貯蔵液に添加した 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid が与える影響. 日本外傷歯学会雑誌, 11(1), 36-45, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 岡村友玄、富永和也、大草亘孝、西川哲成、田中昭男. 脱落歯保存における注射用セフェム系抗菌薬および抗真菌薬添加総合アミノ酸輸液の有効性. 第 17 回日本外傷歯学会総会・学術大会. 2017 年 7 月 9 日

2) Nishikawa T, Tanaka A. Coral as a scaffold inducing bone augmentation and bioabsorption on rat skulls. The 18 ICOT Asia-Pacific Section Congress (国際学会) 2015 年 11 月 15 日

3) 岡村友玄、西川哲成、和唐雅博、富永和也、今井弘一、田中昭男. 3 種類の多孔性材料を足場として三次元培養したヒト毛細血管の長期観察. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015 年 9 月 14 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 異種骨補填材
発明者: 西川哲成他 6 名
権利者: 大阪歯科大学
種類: 特許
番号: 特願 2018-37336
出願年月日: 2018 年
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者
西川 哲成 (NISHIKAWA, Tetsunari)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70140209