

機関番号：33902

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592316

研究課題名 (和文) 歯質リサイクル型骨補填材料の開発

研究課題名 (英文) Development of bone graft material recycling extracted teeth

研究代表者

尾澤 昌悟 (OZAWA SHOGO)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：50323720

研究成果の概要：歯周組織や顎堤部における少量の骨再生が、臨床上重要な効果をもたらすと考えられる。本研究は抜歯後捨てられてしまう歯を利用して、骨補填材として利用可能かどうか、まずは動物実験を用いて検討したものである。ラット切歯を抜歯後に粉碎し、基材であるヒドロキシプロピルセルロースと混和して使用した。補填材は抜歯窩と頭蓋骨の骨欠損部に填入した。マイクロCTと組織学的観察の結果、今回用いた粉碎歯は填入後もその部位に残留し、骨形成の核となることを見出され、本材料の有用性が示唆された。

Abstract : It is clinically important for periodontal and alveolar ridge to regain small amount of bone regeneration. This study focused on extracted teeth which used is discarded to reuse as a bone filling material. In this experimental animal study rat incisor was milled after extraction, and mixed with hydroxyl propyl cellulose as a base material. This material was injected to the extraction socket and critical sized defect on carvalial bone. Analyses of micro CT based bone morphometry and histological observation revealed that this material served as bone regeneration core, suggesting an availability of the milled tooth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：骨補填材，骨再生，マイクロCT，3次元計測，抜歯

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨再生のためには、骨形成を担う骨芽細胞とそれを支持する基質や血流などの母体の環境が整うことが不可欠とされている。我々が治療を行う口腔は、特殊な場合を除き大掛かりな骨再生を必要とすることは少なく、歯周病や顎堤吸収による比較的少量の骨増生や欠損部の補填・骨再生が求められるこ

とが多い。その様な環境には既に骨芽細胞は近傍に存在し、栄養分の供給もされる環境にあるが、ただ人工材料を詰めるという発想だけでは効果が低いとされてきた。

(2) コラーゲンをはじめとする多くのマトリックス蛋白を含んだ象牙質は、そのまま凍結粉碎することで生体活性を保ち、抜歯窩に戻すとの骨形成を促進することが我々のこ

れまでの研究で明らかになった。また、材料の操作性を向上させるための基材として、既に食品などに利用されて安全性の高いヒドロキシプロピルセルロースを利用した。この材料はこれまでの抜歯窩に注入する研究により、骨形成にも補助的な効果があることが示されている。しかし、抜歯窩は元々骨再生能が高い部位であり、粉碎した歯を用いた補填材の骨形成能は、より条件の厳しい頭蓋冠の欠損モデルを用いて検索する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、粉碎歯の補填材としての利用を念頭に、本材料の骨再生能を頭蓋冠の大きな骨欠損モデルを使用して検討する。また、粉碎歯が抜歯窩の治癒過程において如何なる機序で作用しているのか、粉碎歯の粒子の大きさによる骨再生への影響もまだ確認する必要がある。そこで、粉碎歯の動態を調べる為に免疫組織学的検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 填入材料の作製および動物実験

Wistar 系雄性ラットの切歯を抜歯して、凍結粉碎機フリーザーミル 6750 (スペック社製) により粉状に粉碎した。粒子の直径は $10\mu\text{m}$ から $50\mu\text{m}$ であった。抜歯窩に骨移植材料を填入する際の基材として、高い粘性を有し化学的に不活性で他物質と反応しにくい性質であるヒドロキシプロピルセルロース

(HPC) を用いた。HPC と粉碎歯片は、約 2 : 1 の体積比にて混和し、プラスチックシリンジを用いて、頭蓋冠に形成した直径 4mm の円盤状の骨欠損部に填入した。骨欠損は左右側に作製し、片方を実験側として、もう片方には何も転入せず、対照側とした。填入する試料は、粉碎歯に HPC を加えたもの他に、骨補填材料として市販されている、 β -TCP と HPC および HCP のみの群を設定して、3 群での比較を行った。

(2) μ CT による経時的観察

填入手術後、2 週、4 週、12 週のラットを麻酔下にて、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT にて撮影し、骨形成状態の観察を行った。すなわち、マイクロ CT により得たスライス画像から三次元立体構築ソフト (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング社) を用いて、頭蓋骨の欠損部内にある新生骨生成部分を抽出し、その体積を算出した。その後、それぞれのコントロール側を基準として新生骨増加率を求めた。

(3) 組織切片の作製

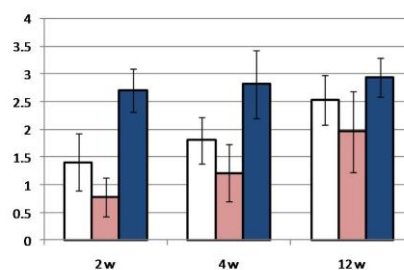
填入 4 週後の下顎骨および 12 週後の頭蓋骨をホルマリンにて灌流固定し、試料を摘出した。その後 20% プランクリュクロにて 4 日間脱灰を行った。その後、液体窒素と冷媒となるイソペンタン中で、包埋材である SCMM を

用いて凍結包埋した。作製した凍結ブロックは、SCMM ゲルで試料ホルダーに凍着し、凍結ミクロトームに取り付けた。薄切では、粘着フィルムを凍結切片支持材として用い、タングステンカーバイドの一本刀で厚さ $5\mu\text{m}$ の切片を作製した。これらは川本の方法^{*}を参考に行った。これらの切片に、HE 染色および DMP-1 を用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 骨形態計測

骨形態計測により欠損部の骨様硬組織の体積を割り出し、各個体の対照群を基準に、硬組織体積増加率を算出した。棒グラフの左側が粉碎歯群、中央が基材群、右側が β -TCP 群である。



硬組織の体積増加率は、基材群と粉碎歯群との比較において、各週とも粉碎歯群が高い値を示した。 β -TCP 群は各週とも群間内では最も高い値を示したが、観察期間の経過によっても硬組織の増加率にあまり変化が認められなかった。

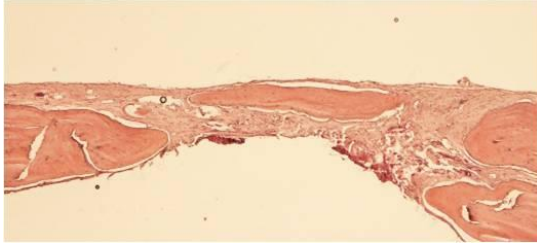
(2) 組織学的観察

抜歯窩へ填入した粉碎歯の免疫組織学的観察の結果、填入後 4 週において、粉碎歯が抜歯窩に存在していることが確認できた。粉碎歯の粒子が小さい場合、酵素抗体法より、抜歯窩内の結合組織に DMP-1 陽性に染色された組織像が確認できた。また、蛍光抗体法よりマクロファージ様細胞に取り込まれている組織像が観察された。粒子が大きい場合は、粉碎歯の周囲で骨再生が起こっている組織像が観察された。

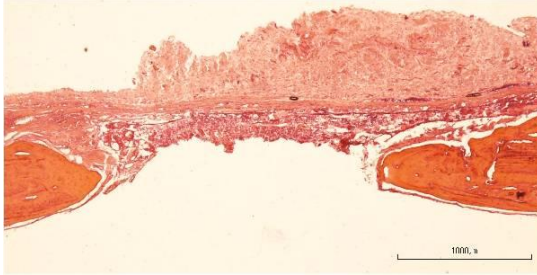
粉碎歯を骨移植材として填入した場合、象牙質に含まれる I 型コラーゲンや骨形成タンパク質 (BMP) や歯髄に含まれる細胞、血液成分などにより骨形成効果があると考えられる。また、填入した粉碎歯は吸収され、骨に置換されると考えられてたが、今回、粉碎歯の粒子の大きさの違いにより、骨再生の核となるか、あるいは貪食されることにより二次的骨形成に関与するという、二つの様相があることが示唆された。

頭蓋骨に填入された粉碎歯は、骨形成の核となり、欠損部中央部に島状の骨が形成されていることが、マイクロ CT と組織学的観察

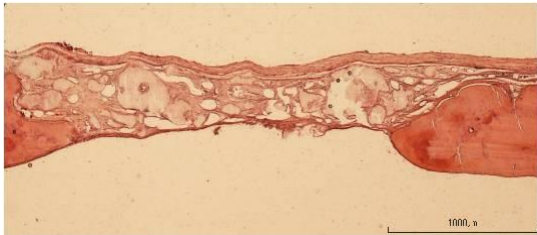
の結果明らかとなった。



填入後 12 週の粉碎歯群。既存骨から離れて、欠損中央部から骨形成が行われている。



填入後 12 週の基材群。周囲からの骨形成は行われているが、欠損中央部には硬組織は存在しない。



填入後 12 週の β -TCP 群。欠損部に填入した顆粒が残存しているが、その周囲には新生骨が認められない。

(3) 考察

今回の実験では、抜歯窩という骨形成が旺盛に行われている場所において、填入された粉碎歯は長期間残留し、骨形成の核となっていることが明らかになった。口腔内の骨欠損に抜歯した歯を利用した補填材を利用することは有用であると考えられる。

一方で、頭蓋骨の欠損部はどの群とも完全に閉鎖されなかったが、新生骨の体積増加率は、基材群と粉碎歯群との比較において、各週とも粉碎歯群が高い値を示していた。

また、組織学的観察では、粉碎歯群の骨が島状に形成されている像が観察されたのに対し、 β -TCP 群では、顆粒が吸収されずに残存している像が観察された。以上より、ラット頭蓋骨欠損モデルにおいても、粉碎歯の補填材としての有用性が示唆された。

しかし、本研究に用いた材料では大きい骨欠損の骨再生には不十分であり、スキヤフオールドに加えて growth factor や幹細胞等

の組み合わせも今後検討する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① Miyata Y, Ozawa S, Kojima N, et al. An experimental study of bone graft material using rat milled tooth. Int J Oral Max Imp, 査読有, in press.
- ② Yoshioka F, Ozawa S, Okazaki S, Tanaka Y. Fabrication of an Orbital Prosthesis Using a Noncontact Three-Dimensional Digitizer and Rapid-Prototyping System. J Prosthodont, 査読有, 19 598-600, 2010.
- ③ Kondo H, Amizuka N, Kihara H, Kuroda S, Ozawa S, Ohya K, Kasugai S. The Target Cells of Parathyroid Hormone (PTH) Anabolic Effect in Bone Are Immature Cells of Osteoblastic Lineage. Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有, 7(1):2-14, 2009
- ④ Kojima N, Ozawa S, Miyata Y, et al. High through put gene expression analysis in bone healing around titanium implants by DNA microarray. Clin Oral Imp Res, 査読有, 19: 173-181, 2008.
- ⑤ Hasegawa H, Ozawa S, Hashimoto K, et al. Type II diabetes (non-insulin dependent adult-onset diabetes mellitus) impairs implant osseointegration capacity. Int J Oral Maxillo Imp, 査読有, 23: 237-246, 2008.
- ⑥ Naitoh M, Katsumata A et al. Can mandibular depiction be improved by changing the thickness of double-oblique computed tomography images? Implant Dent, 査読有, 17: 271-277, 2008.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 松川良平, 近藤ゆかり, 尾澤昌悟, 他. ラット下顎切歯抜歯窩に骨補填材として用いた粉碎歯の動態 東京, 第 10 回日本再生医療学会 2011 年 3 月 1, 2 日
- ② Ozawa S, Miyata Y, Matsukawa R, et al. Experimental Study for Application of Milled Tooth to Bone Defects. 9th International Congress on Maxillofacial Rehabilitation, Sestri Levante, Italy, May 19, 2010
- ③ Ozawa S, Miyata Y, Kondo Y, et al. Development of Bone Graft Material

Composed of Milled Tooth. A Preliminary Study. Academy of Osseointegration Annual Meeting, February 26-28, 2009 San Deigo CA.

- ④ 松川良平, 宮田也寸紘, 尾澤昌悟, 他. 抜歯窩に用いる骨移植材料に関する研究. 第 51 回日本口腔科学会中部地方部会, 名古屋, 2008 年 10 月 11 日

[図書] (計 3 件)

- ① 尾澤昌悟, 田中貴信. スタンダード部分床義歯補綴学 第 2 版 藍稔 五十嵐順正編, 第 23 章その他の義歯 p 239-245, 学建書院 2010 年 9 月発行.
- ② 尾澤昌悟, 田中貴信. 無歯顎補綴治療学 第 2 版. 細井紀雄, 平井敏博, 大川周治, 市川哲雄編. 顎義歯による治療, p294-301, 医歯薬出版, 2009 年 2 月発行.
- ③ 尾澤昌悟 知っておきたい知識・術式 [インプラント治療編] 野口俊英編 第 2 章診査・診断 P39-48, 第一歯科出版 2008 年 7 月発行.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾澤 昌悟 (OZAWA SHOGO)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 50323720

(2) 研究分担者

内藤 宗孝 (NAITO MUNETAKA)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 20167539