

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893173

研究課題名(和文) 矯正力荷重下における炭酸アパタイト骨置換材の病理組織学的解析

研究課題名(英文) Histopathologic analysis of carbonate apatite under loading with orthodontic force

研究代表者

野村 俊介 (Nomura, Shunsuke)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：60710994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨欠損を伴う顎骨の歯列矯正治療においては、骨再建が必要である。本研究では実験動物の顎骨に形成した骨欠損を炭酸アパタイト(CO3Ap)骨補填材で再建し、周囲の歯牙に矯正力を負荷した場合の歯および骨補填材の反応を組織学的に検討した。

ラット上顎第一臼歯の口蓋側に形成した骨欠損部にCO3Ap顆粒を埋入し、治癒期間後、歯牙の移動を行った。CO3Ap埋入部へ移動した歯には過度の歯根吸収を認めず、また歯根膜に接触している補填材が吸収されている像が確認された。以上より骨欠損部への歯の移動はCO3Ap骨補填材で再建することで可能になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For orthodontic treatment of teeth while bone defect exists in the jaw, reconstruction of the defect for tooth movement is necessary. In this study, reconstruction of the bone defect in animal model with carbonate apatite (CO3Ap) bone substitute was performed. Reaction of the teeth and bone substitute when orthodontic force was loaded on the surrounding teeth was evaluated histologically.

CO3Ap granules were implanted into the bone defect created on the palate side of the maxillary first molar of rat. After the healing period, the teeth were loaded with orthodontic force. It was confirmed that no excessive root resorption occurred on the teeth that had moved to the CO3Ap implant site. In addition, the CO3Ap that was in contact with the periodontal ligament had been adsorbed. Based on the result, it was suggested that tooth movement to the bone defect is possible by reconstruction with CO3Ap bone substitute.

研究分野：生体材料

キーワード：炭酸アパタイト骨置換材 矯正力 生体吸収性

### 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療において、歯に矯正力を加えると、力を加えられた側の歯根膜に骨吸収を起こす破骨細胞が生じ、反対側では骨形成を起こす骨芽細胞が生じ、歯を支える歯槽骨の吸収と添加を繰り返すことで歯は目的の場所へ動く(図1)。すなわち歯の矯正には骨が必須であり、骨欠損部を伴う顎骨において歯を矯正するためには骨再建が必要となる。

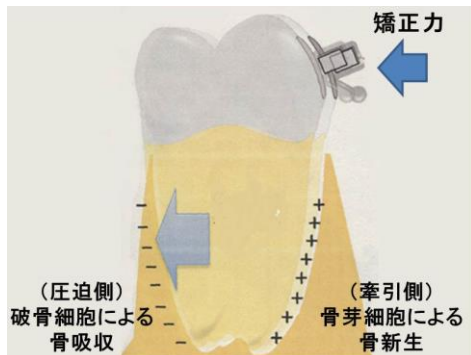


図1 矯正力による歯の移動形態

骨欠損再建の第一選択は、自家骨移植であるが、自家骨採取に伴う健常部位への侵襲が不可避である。また、採取可能な骨量や骨形態に制限があることから、十分な歯槽骨や歯周組織を得ることも困難であり、さらに感染のリスク、疼痛や機能障害の問題も指摘されている。500人に1人の割合で生まれる口唇口蓋裂患者は、当国において毎年2000人以上生まれてきており、7-9歳頃といった幼少期に自家腸骨移植を行い、骨欠損部の再建を行う必要がある(図2)。患者への負担を考えると、低侵襲、短時間の手術が望ましく、自家骨移植に代わる人工骨補填材が必要とされている。

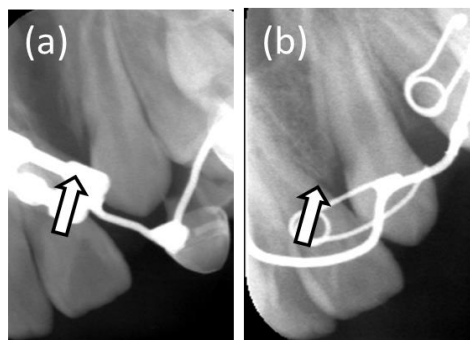


図2 腸骨移植を行った顎裂部  
(a)移植前 (b)移植後

現在、人工骨補填材の中ではハイドロキシアパタイト(以下、水酸アパタイト)焼結体が広く臨床応用されている。水酸アパタイトは骨と線維性結合組織を介さずに結合する優れた骨伝導性を示すものの、生体内でほとんど吸収されずに長期に残存するという問題点がある。すなわち、骨欠損部を水酸アパタイトで再建した場合、水酸アパタイトは破骨細胞による吸収を受けないため、骨中に半永久的に残存する。そのため、矯正歯科治療

において水酸アパタイトで再建した部位へ歯を動かすことは不可能である。

申請者らは骨の無機組成が水酸アパタイトではなく炭酸アパタイトであることに着目し、前駆体を用いた溶解析出反応による炭酸アパタイトの調製法を確立した。また、炭酸アパタイトは水酸アパタイトとは異なり、破骨細胞に吸収されること、新生骨に置換されることも明らかにしてきた。すなわち、炭酸アパタイトは自家骨と同様に破骨細胞によって吸収され、骨リモデリングに調和し、骨に置換されるため、歯列矯正治療に理想的な人工骨置換材であると考えられるが、これまでに歯列矯正治療のように応力が負荷される部位における骨置換挙動は検討されていない。そこで本研究においては、実験動物に形成した骨欠損を炭酸アパタイト骨置換材で再建し、矯正力を負荷した場合の炭酸アパタイト骨置換材の骨への置換性を検討することとした。

### 2. 研究の目的

これまでは頭蓋骨などの応力が負荷されない部位の骨欠損を炭酸アパタイトで再建し、炭酸アパタイトが骨に置換されることを病理組織学的に明らかにしてきた。

本研究では歯列矯正による応力が炭酸アパタイト骨補填材に負荷される条件下で、炭酸アパタイト骨置換材の骨置換速度などを病理組織学的に検索することを目的とした。また、炭酸アパタイト以外にも水酸アパタイト、 $\beta$ 型リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)を用いて骨欠損部を再建し、骨補填材の種類が歯の移動に及ぼす影響を比較検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1)炭酸アパタイト顆粒及び対照試料の作製及び分析

#### ①炭酸アパタイト顆粒の調製

まず炭酸アパタイト顆粒の前駆体となる炭酸カルシウム顆粒を調製した。水酸カルシウム圧粉体を調製し、二酸化炭素反応チャンバー(相対湿度100%)で炭酸化し、炭酸カルシウムブロックを調製した。炭酸カルシウムブロックを粉碎し、ふるいで分級し、100-212 $\mu$ mの炭酸カルシウム顆粒を調製した。

次に、炭酸カルシウム顆粒をリン酸化し炭酸アパタイト顆粒を調製した。炭酸アパタイト顆粒は炭酸カルシウムを前駆体とする溶解-析出反応で調製を行った。炭酸カルシウム顆粒を0.8mol/Lのリン酸水素ナトリウム水溶液中に浸漬し、40 $^{\circ}$ Cの乾熱オーブンにてリン酸化を行った。またリン酸化の時間を調整し、炭酸カルシウムから炭酸アパタイトへの組成変化と反応時間との関係を調査した。

#### ②水酸アパタイト顆粒の調製

対照群として水酸アパタイト顆粒の調製

を行った。炭酸カルシウムとリン酸二水素カルシウムを水酸アパタイト Ca/P モル比である 1.67 となるように混合し、圧粉体を 900°C で仮焼した。粉碎圧粉後、1250°C で焼結し、水酸アパタイトブロック体を作製した。水酸アパタイトブロックを粉碎、ふるいで分球し、100-212  $\mu\text{m}$  の水酸アパタイト顆粒を調製した。

### ③ $\beta$ -TCP 顆粒の調製

対照群として  $\beta$ -TCP 顆粒を調製した。炭酸カルシウムとリン酸二水素カルシウムを  $\beta$ -TCP の Ca/P モル比である 1.5 となるように混合し、圧粉体を 900°C で仮焼した。粉碎圧粉後、1100°C で焼結し、 $\beta$ -TCP ブロックを作製した。 $\beta$ -TCP ブロックを粉碎、ふるいで分球し、100-212  $\mu\text{m}$  の  $\beta$ -TCP 顆粒を調製した。

### ④ 調製した骨補填材の分析

調製した骨補填材の組成分析を粉末 X 線回折装置および赤外分光分析を用いて行った。微細構造に関しては走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察を行った。

### (2) 骨補填材埋入部への歯の移動における in vivo 評価

作製した骨補填材の歯科矯正治療における有用性を in vivo にて評価した。本研究では、ラット上顎第一臼歯の移動にて埋入した補填材の吸収程度、新生骨のリモデリング、歯根への影響を組織学的に評価した。

#### ① 骨欠損の作製及び骨補填材の埋入

9 週齢 SD ラットを 3% 抱水クロラール水溶液にて全身麻酔を行い、口蓋粘膜及び骨膜を剥離し、口蓋骨を露出させ。骨欠損はラット上顎第一臼歯口蓋側に歯科用エンジン及びラウンドバーを用いて、直径 1×1mm、深さ 0.8mm の半球状の骨欠損を形成した (図 3)。骨欠損部に炭酸アパタイト顆粒、対照試料として水酸アパタイト顆粒、 $\beta$ -TCP 顆粒をそれぞれ埋入し、創を閉じた。術後 1 週間は、患部をイソジンで消毒し、ゲンタマイシンの投与 (4mg/kg) を 1 日 1 回 3 日おきに術後約 1 週間投与した。

#### ② 骨補填材埋入部位への歯の移動

一定の治癒期間経過後、歯の移動を開始した。上顎第一臼歯間に直径 0.012 インチコバルトクロム製ワイヤーを屈曲して設置した (図 3)。長期持続的な矯正力が加わるように、最初に 7 ミリ幅のワイヤーをセットし、その後一週間おきに 0.5 ミリずつワイヤー幅を縮めていくことで上顎第一臼歯を口蓋側に移動させた。歯の移動の様子、補填材の状態の確認に  $\mu\text{CT}$  を用いた。

#### ③ 組織標本の作製及び評価

荷重期間終了後、組織標本を作製した。ラットを安楽死させた後、速やかに開胸して左心室より大動脈、右心房より大静脈に留置針

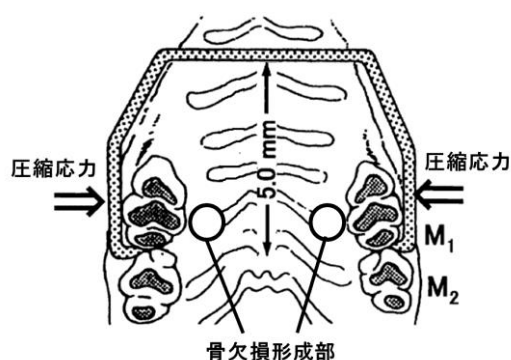


図 3 ラット上顎口蓋骨における骨欠損形成部及び歯の移動方法

を挿入して、固定液 (10% 中性緩衝ホルマリン液) を用いて灌流固定を行い、上顎第一臼歯及び試料周辺の組織を取り出し、組織標本作製した。標本は一般組織染色 (H&E 染色) を行い、補填材の吸収程度、新生骨のリモデリング、歯根吸収の有無を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 炭酸アパタイト及び対象試料群の分析結果

炭酸カルシウム顆粒から 40°C-14 日の条件下で 0.8mol/L リン酸水素ナトリウム水溶液に浸漬することで 100% 組成変化した炭酸アパタイト顆粒が調製されることが分かった。また、リン酸化の時間による炭酸カルシウムから炭酸アパタイトへの組成変化の違いを調査したところ、反応時間 45 分で 10%、3 時間 40 分で 30% 炭酸カルシウムから炭酸アパタイトへ組成変化することが分かった (図 4)。

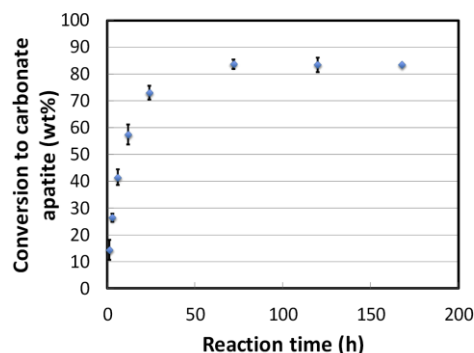


図 4 炭酸カルシウムから炭酸アパタイトへの組成変化率と反応時間との関係

また、サンプル表面を SEM で観察したところ、10%、30%、100% とリン酸化が進むにつれ表面が滑沢になり炭酸アパタイトが形成されている像が確認できた (図 5)。また破断面では、炭酸アパタイトが析出している表面と比較し、炭酸カルシウムが残存しており、粗造な大小顆粒状の表面を呈していた。反応時間が長くなるにつれて、表面の滑沢な炭酸アパタイト層が厚くなり、内部にも粗造な炭酸カルシウムの表面に炭酸アパタイトが析出

している像が確認できた。

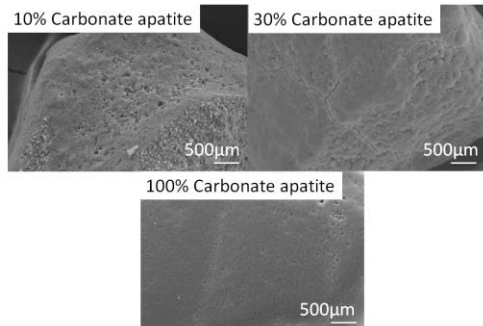


図 5 調製した炭酸アパタイトの表面の SEM 像

対照試料群である水酸アパタイト顆粒及びβ-TCP 顆粒を炭酸カルシウムとリン酸二水素カルシウムを用いて調製したが、粉末X線回折装置および赤外分光分析による組成分析によって作製した試料が目的の試料であることが確認できた。

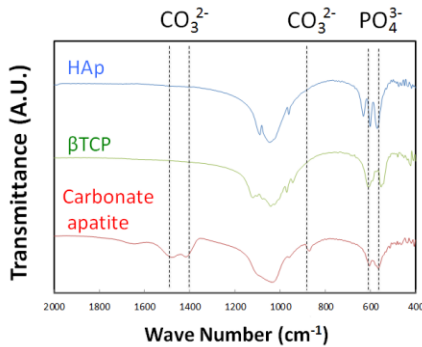


図 6 赤外分光分析の結果

(2) 骨補填材埋入後の埋入部及び歯の移動の分析

矯正力を加えて歯を動かすためには、骨欠損部に新生骨が形成される必要があり、また矯正力による補填材の影響も検討する必要性もあったため、補填材が完全に吸収されず、かつ新生骨が形成される治癒期間の検討を行った。埋入後 0~4 週経過まで 2 週毎にμCTにて埋入部を確認した所、埋入 4 週経過後に前述の 3 種の補填材周囲には新生骨が形成され、かつ大部分の補填材がまだ吸収されていない(図 7)。

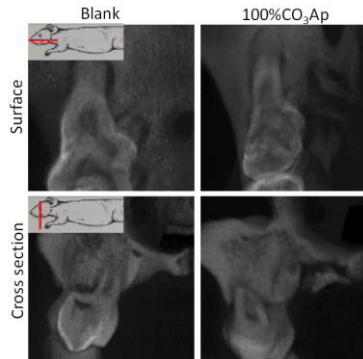


図 7 埋入 4 週間後の骨欠損及び炭酸アパタイト埋入部のμCT像

よって治癒期間を 4 週間に設定し、歯の移動を開始した。歯の移動開始後 0~4 週経過まで 1 週毎にμCT撮影を行った(図 8)。歯の移動は第一臼歯の口蓋側への傾斜移動を全てのラットで認め、4 週経過後に十分に材料埋入部まで上顎第一臼歯の近心口蓋根が接触している事を確認した。歯冠移動量に関してラット間で有意差は認めなかった。

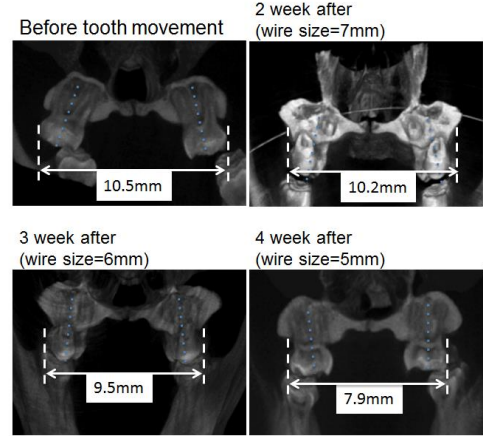


図 8 矯正力負荷後の歯の移動の様子

(3) 矯正力負荷後の補填材及び歯の組織学的評価

矯正力荷重開始 4 週間後、灌流固定を行い、歯及び試料周辺の組織を取り出した。組織標本の作製及び H&E 染色を行い、各補填材間の変化の差を観察した。CO<sub>3</sub>Ap と β-TCP は材料の吸収を認めたが、HAp は吸収を認めなかった。また HAp 埋入群は他群と比較した際、圧迫側に過度の歯根吸収を認めた。CO<sub>3</sub>Ap 埋入群には過度の歯根吸収は認められず、また歯根膜に接触している補填材が吸収されている像が確認された。

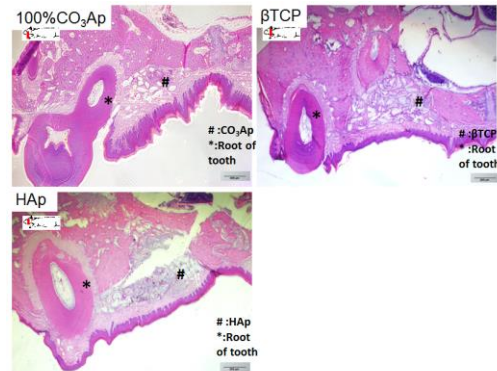


図 9 各補填材埋入部の組織像

以上より CO<sub>3</sub>Ap 骨補填材を埋入した骨欠損には過度の歯根吸収を起さずに歯の移動が可能であり、また矯正力を負荷した際に CO<sub>3</sub>Ap 骨補填材の周囲に新生骨が形成され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1件）

Shunsuke NOMURA, Kanji TSURU, Michito MARUTA, Shigeki MATSUYA, Ichiro TAKAHASHI, Kunio ISHIKAWA, Fabrication of carbonate apatite blocks from set gypsum based on dissolution-precipitation reaction in phosphate-carbonate mixed solution, Dent Mater J. 2014;33(2):166-72.  
査読有

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野村 俊介 (NOMURA, Shunsuke)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：60710994

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：