

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月23日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20497

研究課題名(和文)脱灰象牙質を用いた骨再生とその界面組織の3次元的微細構造解析

研究課題名(英文) Three-dimensional ultrastructural analysis of the interface between an implanted demineralised dentin matrix and the surrounding newly formed bone

研究代表者

田上 隆一郎 (Tanoue, Ryuichiro)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40597457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：移植した脱灰象牙質(demineralized dentin matrix 以下; DDM)周囲の新生骨の骨細胞はそれぞれの細胞突起を介してネットワークを形成していた。興味深いことに、骨細胞の細胞突起の一部は象牙細管の中に向かって伸展しており、DDM表面の象牙細管内には微細な骨細管を伴う骨組織が陥入していることも確認できた。また、エネルギー分散型X線分光法にてDDM基質はカルシウムおよびリンが多く存在することを証明した。本知見は、象牙細管の存在がDDMを使用することの重要な利点であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植した脱灰象牙質(demineralized dentin matrix 以下; DDM)が骨形成を促すことを報告しin vivo研究は過去に多くあるが、象牙細管が骨形成にどのように寄与しているかというメカニズムはDDM移植治療においていまだ不明である。今回我々は、DDMがDDM周囲に形成された新生骨とどのようにコンタクトしているかFIB/SEM (focused ion-beam slicing and scanning electron microscopy)を用いてその境界面を三次元的に調査した。本研究は骨再生医療の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：The osteocytes of new bone tissue surrounding the transplanted DDM had the network through the intermediary of each cellular processes and formed the bone tissue. Interestingly, their cellular processes of osteocytes also was extended into the dental tubule and the bone tissue with canaliculi was formed and filled in it of the DDM surface was revealed. Additionally, the energy-dispersive X-ray spectroscopy approach revealed higher levels of Ca and P in the dentinal tubules than in the matrix. The finding suggests that the existence of dentinal tubules is an important advantage of using the DDM.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 DDM 象牙質 FIB/SEM

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨欠損部に対してその修復や増骨を目的とした治療法には自家骨移植や人工材料を用いた補填療法が主流である。しかし、自家骨移植は患者のリスクなども大きく、負担を伴う。また、近年注目されている BMP-2(bone morphogenetic protein)などのサイトカイン療法は副作用と経済面からその普及に時間を要している。患者自身の間葉系幹細胞を用いる細胞治療法の研究も進んでいるがこちらも経済的な理由と安全性の問題からまだまだ課題はある。

近年、顎顔面領域において抜去歯牙を用いた新たな骨再生療法が行われている。骨形成タンパクである BMP は Urist によって発見され、彼らは脱灰骨および脱灰象牙質の周囲未分化組織への骨誘導能の存在を明らかにした。人の歯牙象牙質には重量比で約 20%の有機物が含まれており、その多くは骨と同様に型コラーゲンである。象牙質の骨誘導能を証明した実験は小型から大型までのほ乳類で行われている。Murataらは人の抜去歯牙から採取した象牙質を用いて脱灰処理後にヌードラット背側皮下に移植し、脱灰象牙質単体で骨ができたことを証明している。

当科でも外来患者を対象に、患者自身の抜去歯牙を利用し、顆粒状に脱灰象牙質を作製し、骨補填材として用いている。申請者は同移植片を生検し、光学顕微鏡レベルで骨が形成されるまでを確認している。現在のところ感染等もなく、骨形成においてその経過は良好である。しかしながら、その形成骨の機能性や形態について、脱灰象牙質との相互関係における組織構築の空間的な検討は進んでいない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ラット頭蓋骨欠損モデル等の造骨の評価に適した動物モデルに脱灰した象牙質を移植後、次世代走査型顕微鏡 (Focused-ion beam; FIB/SEM)を用いて、象牙質とその周囲に形成される骨組織との境界面を 3 次元的微細構造レベルで観察し、それらの相互関係の組織構築を超微形態レベルで形態学的に解析し、より効率的な骨再生療法を追究することを目的とする。

本装置および画像解析の手法を用いて、移植脱灰象牙質と周囲に形成される骨組織の境界面および周囲組織を 3D再構築することで、その超微形態を Dynamic に観察することが可能になり、骨形成に関与する細胞および組織の規則性について詳細に検証できると考える。

### 3. 研究の方法

DDM はヒトの智歯を採取後、エナメル質を除去し、専用粉砕器にて DDM 顆粒を作製した。

212~500  $\mu\text{m}$  サイズの顆粒を選択後、2% 硝酸にて 3h 脱灰したものを使用した。

実験 ;トレフィンバーを用いて 6mm 大のラット頭蓋骨欠損モデルを作製し、DDM 移植群と非移植群を対照群として、 $\mu\text{CT}$  にて12週間経時的に評価した。

実験 ;DDM-周囲新生骨付着部の形態解析のため、動物を固定後、目的組織を摘出し、FIB/SEM 観察用試料を作成した。収束 Ga イオンビームにより試料表面を連続切削し、画像取得を繰り返すことで必要な界面空間を再構築し、Avizo 8.1<sup>®</sup> ソフトウェアを用いて可視化した。また象牙細管内組織についても電子顕微鏡やエネルギー分散型 X 線分光法(EDS)を用いて検証した。

### 4. 研究成果

移植された DDM 顆粒において、新生骨周囲と連続する DDM 表層の象牙細管内は移植前の

DDM 象牙細管内と比較し、電子密度の高い組織が存在することが明らかになった。

また、同組織や DDM 基質は EDS 分析にて P や Ca が多く存在することから、移植後の DDM は DDM 基質自体の石灰化に加え、象牙細管内に骨組織が形成されていると評価できる。

骨欠損部に DDM を移植すると、DDM から徐放される微量な BMP によって、未分化細胞や周囲母骨由来の細胞が誘導され、骨細胞に分化する。骨細胞の細胞突起は DDM 周囲でネットワークを形成する一方、一部は象牙細管内に伸展し、細胞外マトリックスを形成することが示唆された。DDM は象牙細管という特有の空間を有している。本研究は、移植 DDM 周囲に形成される新生骨は、この象牙細管を介して DDM 表面および象牙細管内部に直接形成され、その形態とし

ては嵌合を呈することを明らかにした。本研究成果は骨再生医療の一助になると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tanoue R, Ohta K, Miyazono Y, Iwanaga J, Koba A, Natori T, Iwamoto O, Nakamura K, Kusukawa J, Three-dimensional ultrastructural analysis of the interface between an implanted demineralised dentin matrix and the surrounding newly formed bone, Sci Rep, 査読有, 12;8(1), 2018, 2858, doi: 10.1038/s41598-018-21291-3

〔学会発表〕(計3件)

田上隆一郎 他, 脱灰象牙質を用いた骨再生研究～FIB/SEM トモグラフィー法による移植脱灰象牙質-周囲新生骨界面の3次元的微細構造解析～, 第71回口腔科学会学術集会, 2017

田上隆一郎 他, 脱灰象牙質移植後の骨形成における象牙細管の意義～3次元再構築法からのアプローチ～, 第62回口腔外科学会学術集会, 2017

田上隆一郎 他, FIB/SEM トモグラフィーによる移植脱灰象牙質-新生骨の界面における超微三次元形態解析, 第61回口腔外科学会学術集会, 2016

〔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：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。