

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791410  
 研究課題名（和文）  
 生体活性ガラスを用いたラット歯根端切除部の治癒機転に関する病理組織学的研究  
 研究課題名（英文） Pathohistological study of the healing process in the rat root apical area using bioactive glass after apicoectomy  
 研究代表者  
 榮田 太郎 (EIDA TARO)  
 福岡歯科大学・歯学部・助教  
 研究者番号：60425246

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、ラット上顎第一臼歯近心根を用いて、歯根端切除を行い、同部に、平均粒子径  $20\mu\text{m}$  の BAG の填入を行ったもの、平均粒子径  $45\mu\text{m}$  の BAG の填入を行ったもの、および BAG の填入を行わなかったものの試料をそれぞれ作製した。その結果、BAG ことにやや粒子の大きな B-BAG は歯根端切除術において高い骨伝導能を有する有能な生体材料であることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, after apicoectomy of the rat maxillary first molar mesial tooth roots, BAG granules with the mean diameter of  $20\mu\text{m}$  or  $45\mu\text{m}$  were filled in the apicoectomy area. It has been suggested that BAG, especially, B-BAG with a slightly large particle size, is a useful biomaterial with high bone conductivity in the apicoectomy.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療学

キーワード：生体活性ガラス・骨補填材・歯根端切除術

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯科臨床において凍結乾燥自家骨、ハイドロキシアパタイト、チタンなど様々な生

体材料が開発され、積極的に導入されている。生体材料は生体と直接接触して用いる材料であり、生体に為害作用を及ぼさないもので

なければならない。生体材料の生体適合性や生体親和性について、国際標準化機構 (ISO) では好ましくない副作用を生じることなく、特定の生体環境に受け入れられる性質、あるいは適用された宿主から特定の使用目的に適う応答を伴ってその機能を果たす材料の性質と定義されている。また、顎骨やその他の骨に応用する生体材料においては、骨組織誘導能に優れていることも重要な要素である。この点において、自家骨は優れた材料とされている。しかしながら、自家骨は骨採取のための手術の必要性や採取できる骨量あるいは必要な骨の形態などに種々の制限を受けることが多いことから、これに代わるより良い生体材料も試作されている。そのような生体材料としては、水酸化カルシウム系材料やリン酸カルシウム系材料があり、1971年に Hench らによって開発されたガラスセラミックである生体活性ガラス(Bioactive glass, 以下 BAG)は、ハイドロキシアパタイト (以下 HAP) と同様リン酸カルシウム系材料の一つである。この BAG が開発されて以来、様々な基礎的および臨床的な研究がなされている。in vitro の研究において、BAG は HAP やチタンに比べて骨芽細胞の活性を高めることや、破骨細胞の増加を抑制するとの報告があり、良好な骨形成を誘導する効果が期待できる。しかしながら、これまで BAG に関しては骨補填剤、人工歯根のコーティング材としての臨床応用の検討や、露髄部への BAG の填入による歯髄反応をみた実験的研究などがみられるものの、BAG を骨代用材料として顎骨内の骨欠損部に応用し、骨形成への影響をその周囲組織を含めて検索した基礎的研究は少ない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨欠損部に BAG を応用することにより良好な治癒効果が期待できる

と考え、歯根端切除部に BAG を応用した際の治癒過程を病理組織学的に検索した。試作した BAG 粒子には平均粒子径が  $45\mu\text{m}$  の大きい粒子と平均粒子径が  $20\mu\text{m}$  の小さい粒子とがある。HAP では、粒子気孔径の大きさや構造によって骨伝導性が変化することが報告されていることから、BAG 粒子の大きさや形状が骨誘導にも影響するか否かも興味ある点であり、大きさの異なる 2 種類の試作 BAG を使用して治癒過程の相違についても合わせて比較検討した。

## 3. 研究の方法

### 1. 実験動物

生後 7 週齢、体重約 180 g 雄 Sprague-Dawley 系ラット 60 匹(光顕検索 48 匹、電顕検索 12 匹)を用い、根端切除実験では解剖学的形状や位置ならびに作業の効率を考慮して上顎第一臼歯近心根を用いた。

### 2. 実験材料ならびに方法

#### 1) 歯根端切除実験

ラットは、実験直前に気道分泌抑制のため硫酸アトロピン 0.01% 溶液 (0.5ml/100g; タナベ社製) を前投与後、ネンブタール 70 mg/kg (大日本製薬社製) 腹腔内全身麻酔を施し、ラット用開口器を用いて開口状態を保持した。手術部を希ヨードチンキで消毒後、左右上顎第一臼歯近心根を中心に 1/80000 アドレナリン添加歯科用キシロカイン (アストラゼネカ社製) 0.25ml にて浸潤麻酔した。頬側歯槽粘膜に切開を加え、歯肉骨膜弁を形成し、上顎歯槽骨を露出させた。次にラウンドバー # 1 ( $\phi 0.8\text{mm}$ ) を用いて左右上顎第一臼歯の近心根尖相当部を切除した。なお、術中は切削熱を抑制し、切削片を除去する目的で生理食塩水を注水した。滅菌綿球を用いて圧迫を行い切除創からの止血を確認後、滅菌生理食塩水と混和した S-BAG, B-BAG 粒子をそれぞれ骨創腔内に満たすように填入し、歯肉

骨膜弁を復位し3針縫合した。根端切除部位に何も填入しないものをコントロール群とした。なお、正常群として7週齢の健康ラットの上顎第一臼歯近心根を用いた。

#### a. 光顕試料作製

術後1週、2週および3週後、ネンブタール腹腔内麻酔下に2.5%グルタルアルデヒド液(cacodylate bufferでpH7.4に調整)にて灌流固定を行い、直ちに左右上顎骨を摘出、さらに同固定液で浸漬固定を行った。固定試料は、10%EDTA脱灰液にて4週間脱灰した。脱灰後通法に従いパラフィン包埋を行い4~6 $\mu$ mの連続切片標本を作製し、hematoxylin-eosin(H-E)染色を施し観察した。

#### b. 透過型電顕試料作製

光顕観察の結果とくに骨組織形成が著明であったB-BAG群については術後1週および3週について透過電顕による観察を行うために試料を作製した。すなわちラットを2.5%グルタルアルデヒド液にて灌流固定後、ただちに左右上顎骨を摘出し、cacodylate bufferで洗浄後、1%osmium tetroxideで2時間後固定を行った。10%EDTAにて脱灰後、上顎第一臼歯部を細切し、通法に従いエタノール系列で脱水、エポン樹脂にて包埋した。包埋した試料は電顕観察部位確認のため1~2 $\mu$ mの厚切り切片を作製し、0.1%トリジンブルー染色にてトリミングを行った。次いでダイヤモンドナイフを装着したウルトラミクロトームMT-II Bを用いて超薄切片を作製し、Reynold's氏法による酢酸ウラニル・鉛二重染色を施し、JEM-1200EX透過型電子顕微鏡(JEOL社製)にて観察した。

なお、本研究は「福岡歯科大学動物実験指針」に従って行った。

### 4. 研究成果

#### 1. 光顕所見

<正常群>

ラット上顎第一臼歯の歯髄および歯周組織には、炎症性反応や象牙芽細胞の配列の乱れ、消失、その他の異常所見は認められなかった。近心根は根尖側約2/5が有細胞セメント質で覆われており、それより歯冠側では無細胞セメント質によって覆われていた。歯根膜腔はほぼ一定の幅を示しており、歯根膜線維には機能的配列がみられた。根尖孔付近では歯根膜線維は他の部位の歯根膜線維に比べ疎な組織像を呈していた。

#### 1) 根端切除後1週経過例

<コントロール群>

根端切除部の創腔内は血餅の器質化が進み、肉芽組織の形成が認められたが、新生骨の形成はまだみられなかった。近心根の断端部歯髄は象牙質削片で一部閉鎖されており、断端部付近の歯髄腔では修復象牙質の添加がみられた。根管歯髄は正常群と同様の生活歯髄の状態を示しており、修復象牙質添加部よりも歯冠側歯髄では象牙芽細胞が整然と配列していた。根管歯髄の状態は歯根端切除後2週、3週経過例においてもほぼ同様の生活歯髄の状態がみられた。

<S-BAG群>

根端切除部の創腔内はS-BAG粒子で満たされており、粒子間や周囲組織は紡錘形の線維芽細胞が増殖し、肉芽組織の形成が開始されていた。骨創腔の底部および骨創腔を覆う歯肉部の粘膜下組織には多数のリンパ球などの炎症性細胞浸潤を認め、その中に多核の異物巨細胞の出現も伴っていた。近心根の断端部歯髄は象牙質削片周囲に修復象牙質が添加され、ほぼ閉鎖した状態が生じていた。根管歯髄はコントロール群と同様の生活歯髄の状態を呈し、術後2週、3週経過例においてもとくに変化はみられなかった。

<B-BAG群>

根端切除部の創腔内のB-BAG粒子間には

多数の細胞成分から成る肉芽組織が侵入増生しており、とくに **B-BAG** 粒子周囲には濃染する核を有し胞体の大きな立方形の細胞が配列している所見を認め、一部では **B-BAG** 粒子間に骨基質の形成も認められた。創腔の表面を覆う歯肉部の粘膜下組織には **S-BAG** 群と同様、多核の異物巨細胞を少数伴う肉芽組織が形成されていた(図. 1)。歯根断端部の歯髄は象牙質削片に修復象牙質が添加され、閉鎖されつつあった。根管歯髄はコントロール群、**S-BAG** 群と同様の生活歯髄の状態を示し、術後2週および3週経過例においてもとくに変化はみられなかった。

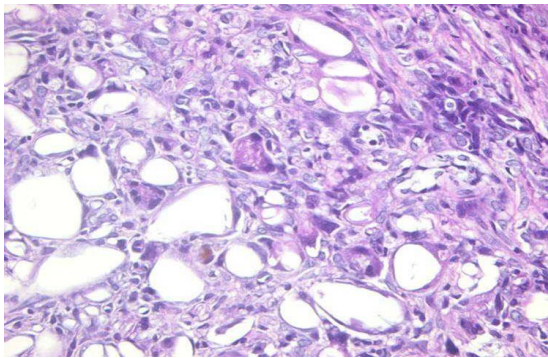


図. 1 術後1週経過 **B-BAG** ×400

## 2) 根端切除後2週経過例

### <コントロール群>

根端切除部の創腔内はさらに器質化が進み、全体的に肉芽組織で置換されるとともに、とくに根端切除部の近心歯槽骨断端部位には骨の新生も認められた。歯根断端部歯髄は修復象牙質が肥厚しており、根管はほぼ閉鎖した状態を呈していた。

### <**S-BAG** 群>

根端切除部の創腔および創腔を覆う歯肉部の粘膜下組織には、全体的にリンパ球を主体とする強い炎症性細胞浸潤を伴う肉芽組織が形成され、**S-BAG** 粒子と混在していた。**S-BAG** 粒子周囲には骨の形成は認められなかった。歯根断端部は、象牙質削片に修復象

牙質が添加されほぼ閉鎖していた。このような所見は根端切除後3週経過例でも同様であった。

### <**B-BAG** 群>

根端切除部の創腔内には填入した **B-BAG** 粒子を起点として、粒子周囲に新生した骨組織が著明に形成されており、創腔は新生骨が約1/2以上を占められており、肉芽組織はやや線維化がみられた。歯肉部の粘膜下組織では **B-BAG** 周囲には少数の異物巨細胞を認めた。しかし炎症性細胞浸潤はほとんどみられなくなっていた。歯根断端部の歯髄は象牙質削片と修復象牙質の添加により、ほぼ完全に閉鎖されていた(図. 2)。

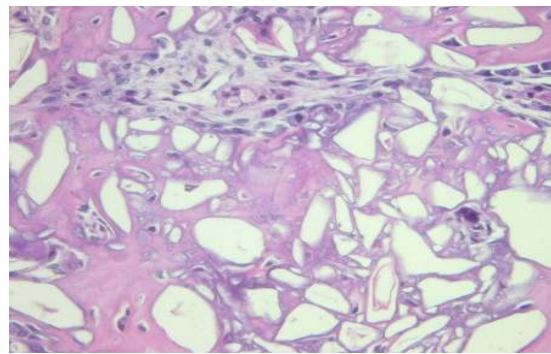


図. 2 術後2週経過 **B-BAG** ×400

## 3) 根端切除後3週経過例

### <コントロール群>

根端切除部の創腔内はほぼ周囲の骨より伸展してきた新生骨梁で満たされており、歯根断端部では歯根膜の再生とセメント質の添加が認められた。一部では歯根と周囲歯槽骨との骨性癒着を生じていた。根管内歯髄では根管壁が修復象牙質の添加により肥厚し、根管は根尖側で閉鎖していた。

### <**B-BAG** 群>

根端切除部の創腔内は大部分が新生された骨組織で満たされ、**B-BAG** 粒子は骨基質中に封入された状態でみられた。骨基質内に封入された骨細胞はコントロール群と比較

しても胞体の大きな細胞であった。さらに B-BAG 群はコントロール群と比較すると、より緻密な新生骨が形成されており、骨面には核や胞体が大きな骨芽細胞が密に配列していた(図. 3)。さらに創腔を覆う歯肉部の粘膜下組織には B-BAG 粒子周囲に少数の異物巨細胞を認めた。

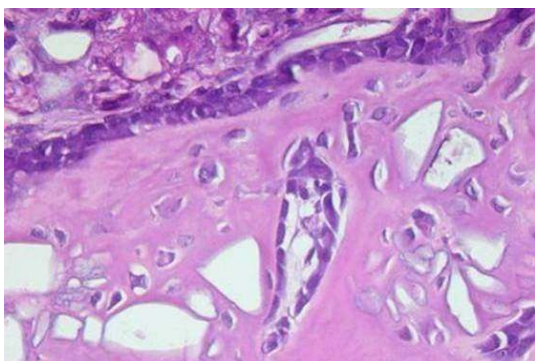


図. 3 術後 3 週経過 B-BAG ×400

### 3. B-BAG 群の透過型電顕所見

根端切除部に B-BAG を填入後 1 週間経過例のものでは、B-BAG 周囲に接して円形～卵円形の核を有する立方形の細胞が多数みられ、これらの細胞間や細胞と B-BAG 間にはコラーゲン線維が密に析出していた。またコラーゲン線維が規則的に配列し線維束を呈しているものもみられた(図.4)。

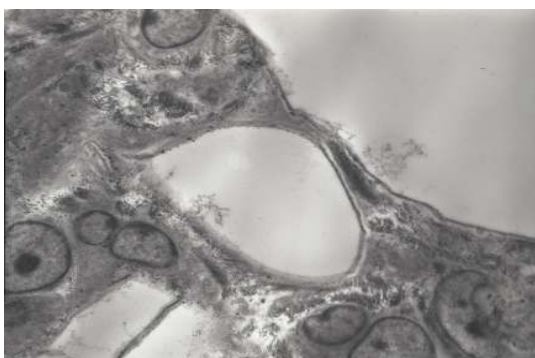


図.4 術後 1 週経過 B-BAG ×3200

術後 3 週間経過例のものでは、B-BAG 粒子間にコラーゲン線維が密に配列していた。この時期の特徴として B-BAG 粒子の周囲には、

B-BAG 粒子が溶解したと思われる 0.5～1  $\mu$ m の幅の帯状の amorphous な層が認められた。さらに B-BAG とコラーゲン線維との接触部の拡大像では、B-BAG 周囲の amorphous な帯状層にもコラーゲン線維の析出が認められ、さらにコラーゲン線維上および BAG 粒子との境界部にはやや density の高い微細な顆粒状物が無数に認められた(図. 5)。



図. 5 術後 3 週経過 B-BAG ×9000

〈結 論〉ラット上顎第一臼歯近心根の歯根端切除部に S-BAG および B-BAG を填入し、その治癒過程を病理組織学および電顕的に検索し、以下の結論を得た。

- ①術後 1 週以降、根端切除部の断端部歯髄は修復象牙質の添加による閉鎖がみられ、根端切除部への BAG 填入による歯髄の障害変化は認められなかった。
- ②根端切除部の創腔内への B-BAG 填入による治癒過程では、速やかな新生骨の形成がみられ、濃染する核を有する胞体の大きい骨芽細胞の密な配列がみられた。
- ③S-BAG と B-BAG の新生骨の形成状態の違いから、骨形成能は BAG 粒子の大きさや、表面形状あるいは粒子間隙の大きさなどの影響をうける可能性が窺われた。
- ④透過電顕による観察では、術後 3 週 B-BAG 周囲には amorphous な帯状層が出現し、析出したコラーゲン線維と B-BAG との境界部

には、無数の density の高い顆粒状物質の出現がみられた。

以上のことから、BAG ことにやや粒子の大きな B-BAG は高い骨伝導能を有する有能な生体材料であることが推察された。

#### 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)

① Hisashi Anan, Hiroshi Matsura, Masahiro Yoneda, Shigeki Matsuya, Toshio Izumi, Kazuhiko Yamada, Takao Hirofujii, Noriyoshi Matsumoto, Taro Eida, Akie Fukushima, Chieko Shigeyama: Expression of TGF- $\beta$ 1 during the healing process of rat periapical lesions. J Fukuoka Dent Coll 34, 133-146, 2008.

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 福島晶絵、加治屋浩、泉利雄、片山知子、茂山千英子、榮田太郎、松本典祥、岡部幸司、阿南壽：ヒト歯根膜細胞における炎症性サイトカインによる SOCS の発現；第 35 回福岡歯科大学学会学術大会、福岡
- ② 茂山千英子、泉利雄、松本典祥、榮田太郎、小松晶絵、國本利雄、久原裕子、阿南壽：口腔乾燥症患者における唾液中コルチゾルおよびクロモグラニン A の評価；第 131 回日本歯科保存学会、仙台

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

榮田 太郎 (EIDA TARO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60425246