

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

上野大輔

論文題目

EXTERNAL BONE AUGMENTATION USING
HYDROXYAPATITE-COATED TITANIUM FIBER
WEB IN RABBIT MANDIBLE: USE OF
MOLECULAR PRECURSOR METHOD

I. 緒言

インプラント治療にあたり顎堤に著しい骨吸収を認める場合、母床骨に対し垂直的、水平的に外側性の骨移植が必要となることがある。外側性の骨移植は移植部位への骨形成細胞の獲得や血流確保の点で、骨再生が困難とされている。

長年にわたり、自家骨、他家骨、異種骨が外側性の骨移植に用いられてきた。自家骨移植は骨形成にとって有用な骨由来細胞や骨成長因子などを含有するため、現在においてもゴールドスタンダードである。しかし、移植量によっては需要側とは別に供給側を求める必要があり、外科的侵襲が高くなる。さらに、自家骨移植後、長期にわたって骨吸収が持続するとの報告もある。移植材の維持安定性はインプラント治療における審美性、機能性に重要な役割を果たす。そのため、近年では移植後のボリュームを維持する目的でハイドロキシアパタイト (HA) など溶解性、吸収性の低い材料を併用するという工夫がなされている。しかし、セラミックス系の骨補填材は脆性材料であり金属に比べ機械特性が低く、成形加工性に劣るという欠点がある。

近年、優れた生体親和性と機械特性を併せ持つ骨移植材として非吸収性のチタンファイバーウェブ (TW) スカホールドが注目されている。TW は極細のチタンファイバーを焼結し網状に成形したもので、力学的特性および加工性に優れ、屈曲性があるため母床骨への形状適合性が優れ、形状を維

持しやすという利点を持つ。

この高い機械的性質を持つ TW に、優れた骨伝導能を有する HA をコーティングする試みがなされている。これまでに複数の物理的成膜法が紹介されてきた。プラズマスプレー法は歯科用インプラント体のコーティングに広く用いられてきた。しかし、HA 層が厚膜になりやすく、HA 層の溶解や剥離などを引き起こした結果、骨結合が破壊されたという報告がある。また、RF マグネトロンスパッタリング法は HA 薄膜をコーティングできる手法として注目されているが、複雑な 3 次元構造を有する TW スカホルドの内部まで、均一にアパタイト薄膜をコーティングすることが困難であった。これらの問題を解決するために、早川らは化学的成膜法の 1 つとして分子プレカーサー法を開発した。分子プレカーサー法は溶液法であり、TW の内部まで均一に、かつ簡便に HA 薄膜をコーティングできる。

この技術を用いた HA 薄膜コーティングチタンファイバーウェブ (HA-TW) は *in vitro*、*in vivo* で骨形成を促進することが報告されている。しかし、過去の報告は小動物のみで、頭頂骨に形成した骨欠損モデルが一般的であった。また難易度の高い平坦な顎骨骨面上において垂直性に移植した報告はない。そこで本研究では、ウサギ顎骨の外側性骨移植モデルを応用し、HA-TW の骨形成能について評価したので報告を行った。

II. 実験材料と方法

TW スカホルドの製作

直径20 μm のチタン製ファイバーを平均内部気孔率87%に設定し、ドーナツ状に成形、焼結した。スカホルドの大きさは外径8.0mm、内径3.7mm、厚さ1.5mmと外径8.0mm、内径3.7mm、厚さ3.0mmの2種類を作製した。

HA-TWスカホルドの製作

TWスカホルドに分子プレカーサー法を用いてHA薄膜コーティングを施した。分子プレカーサー溶液はEDTA-Ca錯体のアルコール溶液とメタリン酸ジブチルアンモニウム塩をCa/P=1.67で調整して作製した。TWスカホルドを超音波洗浄後、分子プレカーサー溶液に20分間浸漬した。60°Cで20分間乾燥させた後、600°Cで2時間加熱処理を行なった。

走査型電子顕微鏡(SEM) および電子線マイクロアナライザ(EPMA) による評価

TW及びHA-TWの内部構造を10 kVの電圧でSEMにて観察した。また、HA-TWはエポキシ樹脂に包埋後、中心部を切断し、EPMAにてTW内部のCaとPの分布を評価した。

動物実験

先ず、ニュージーランドウサギ(n=2)の下顎骨体部側方に外径8.0mm、内径3.7mm、厚さ1.5mmのTWを外側性に移植し、術後8週での骨形成について病理組織学的評価を行った。同様にニュージーランドウサギ(n=6)の下顎骨体部側方に外径8.0mm、内径3.7mm、厚さ3.0mmのHA-TWもしくはTWを左右ランダムに外側性に移植し、術後12週での骨形成について病理組織学的評

価および組織学的定量評価を行った。

手術は吸入全身麻酔下で術野を浸潤麻酔後、電気メスを用いて下顎下縁に沿って皮膚、筋層を切開剥離後、骨膜を剥離し下顎骨を明示した。通法に従い直径3.5mm、深さ5mmのインプラント床を形成した。長さ8mm×直径4.1mmのインプラント体にドーナツ状のTWもしくはHA-TWスカホールドを回転させながら装着した。TWスカホールドを装着したインプラント体をインプラント床に埋入し、ヒーリングアバットメントをスクリューチャンネルに装着後、創部を閉創した。

病理組織学的評価および組織学的定量評価

まず、厚さ1.5mmのTWを使用した個体は術後8週で試料を摘出し、非脱灰薄切研磨標本作製し、新生骨の形成状態を病理組織学的に観察した。また、また厚さ3.0mmのTWを使用した個体は新生骨を継時的に観察するために術後8週、10週でカルセイン、アリザリンレッドをそれぞれ皮下投与し、術後12週で試料を摘出し、厚み約70 μ mの非脱灰薄切研磨標本作製した。蛍光顕微鏡にて観察後、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を行い、新生骨の形成状態を病理組織学的に観察した。また、スカホールド内の新生骨形成率(新生骨の面積/TWスカホールド内の総面積-TWの面積)及び垂直的骨形成率[TWスカホールドの最根尖側点から新生骨の最歯冠側点の距離/TWの厚み]についても画像評価システムを用い評価した。なおTWスカホールドの最根尖側点から新生骨の最歯冠側点の距離とTWスカホー

ルドの厚みは、埋入されたインプラント体の長軸に平行に計測した。計測データは平均及び標準偏差を算出し、2群の有意差検定は paired t-test を用いた。有意水準は 0.05 とした。

III. 結果

SEM、EPMA による評価

SEM 画像にて TW、HA-TW スカホールド内部に網状構造を観察することができた。分子プレカーサー法による HA コーティングは薄膜であるため、1000 倍での観察においても TW と HA-TW に差を認めなかった。一方で EPMA 分析の結果、Ca と P が検出されたため、分子プレカーサー法による HA コーティングは TW スカホールド内部まで均一にアパタイト薄膜が形成されていると考えられた。

病理組織学的評価および組織学的定量評価

術後 8 週で採取した試料では TW スカホールド内の骨形成は限定的であった。術後 12 週で採取した試料では、骨リモデリングは蛍光顕微鏡下でカルセイン（緑）とアリザリンレッド（赤）による標識で評価した。緑線は赤線によって囲まれており、埋入後 12 週経過時において骨形成は進行中であることが示唆された。

光学顕微鏡下では TW、HA-TW スカホールド内に成熟骨の形成を認めたが、HA-TW は TW に比べより多くの新生骨形成を確認することができた。また、

新生骨はいずれも母床骨側から形成されていた。組織学的定量評価では HA-TW が TW に対し統計学的に有意に高い新生骨形成率を認めた (8.33 ± 1.21 vs. $3.43 \pm 0.45\%$, $p < 0.05$)。また、垂直的骨形成率についても HA-TW は TW に対し統計学的に有意に高値を示した (63 ± 15 vs. $33 \pm 8\%$, $p < 0.05$)。

IV. 考察

今回、分子プレカーサー法を用いた HA コーティングは外側性の移植において、TW スカホルド内の骨形成率、垂直的骨形成率を促進することができた。

一般的に外側性の骨移植は内側性に比べ難しいことが知られている。これは、移植部位周囲の粘膜や筋からの外圧が大きいというだけではなく、母床骨と移植材の接触面積率が低くなるため、母床骨からの血流や骨形成原細胞の供給が制限されるためであると考えられる。そのため、移植材料により高い骨伝導能が求められる。優れた骨伝導能を有する HA の生物活性には主に 2 つのメカニズムがあると考えられている。HA は細胞接着タンパクや成長因子の吸着を増加させ、骨細胞の接着や分化を促進することが報告されている。また、コーティング層からの Ca^{2+} の溶解はミネラル層の沈着後、表層を過飽和状態にすることにより、骨形成を促進すると考えられている。

今回の研究では HA コーティングは外側性の移植において、TW スカホル

ド内の垂直的骨形成率を促進することができた。一方で骨形成率、垂直的骨形成率ともに臨床応用するには十分でないと考えられ、さらに骨形成率を増加させるためには骨誘導能を有するシグナル分子との併用が有用であると推測される。

TW の利点は金属として大きな剛性を有する一方、柔軟な賦形性を有するため、欠損部に対して容易に適合を得ることができる。また、セラミックス系の骨補填材やポリマーに比べ機械的性質が優れており、今回の研究においても 3 次元的形態を維持することができた。外側性に位置した移植材は軟組織や筋による圧力の影響を受けるため、TW の形体保持性は有用であると考えられる。しかし、今回の研究では顎骨の側方に移植しているため、臨床の実際とは異なる環境である。外圧による影響とその適応については今後さらなる検討が必要である。

V. 結論

分子プレカーサー法を用いた HA コーティングはウサギ下顎骨体部側方に外側性に移植した TW スカホルド内の骨形成を促進することができた。臨床応用するにはさらに骨形成率を増加させる必要があり、さらなる検討を要すると考えられた。