

氏 名	加 須 屋 真
(ふりがな)	(かすや しん)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成30年1月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Evaluation of guided bone regeneration using the bone substitute Bio-Oss® and a collagen membrane in a rat cranial bone defect model (ラット頭蓋骨骨欠損モデルに対して代用骨 Bio-Oss® と Collagen 膜を使用した骨再生誘導法の評価)
論文審査委員	(主) 教授 根 尾 昌 志 教授 上 田 晃 一 教授 寺 井 陽 彦

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《緒言》

歯科インプラント治療予定部位に十分な骨が存在しない場合、自家骨や代用骨などを使用した骨造成法が行われている。その中でも、骨欠損または骨不足部位に遮蔽膜によるスペースメイキングを行い、自家骨や代用骨を使用して骨欠損部に骨再生を促す骨再生誘導法 (Guided bone regeneration, 以下 GBR 法) が注目を浴びている。代用骨の一つである Bio-Oss® (以下 BO) は、生物学的組成が骨に類似し骨伝導能が高いことから骨欠損部における有効な骨修復材料として期待されている。遮蔽膜は GBR 法において歯肉上皮や歯肉結合組織の骨欠損部への侵入を防ぐことによって歯槽骨再生を促すとされている。しかしながら、GBR 法に BO を用いた際の骨形成能に関する研究は十分になされていない。この

研究では、GBR 法に Collagen 膜を遮蔽膜として使用し、BO の骨形成過程を微細構造 X 線学および組織学的に観察を行い、興味深い知見を得たので報告する。

#### 《材料と方法》

動物： 15 週齢雄性 Sprague-Dawley ラット 30 匹を使用した。

手術方法：イソフルランを用いた吸入麻酔下にて、頭部皮膚を十分に消毒し局所麻酔を行った。メスで頭部に骨膜下に至る切開を加え、頭蓋骨表面を露出した。次に Tissue Punch にて左側頭蓋骨に 5mm の円状マーキングを行い、同マーキングに沿って歯科用スチールバーを用い脳硬膜に至る円柱状骨欠損を作製した。欠損部の処置を以下の 3 群に分けて行なった。

- 1) Group A: 無処理群
- 2) Group B: BO 充填群
- 3) Group C: BO +Collagen 膜使用群

処置後欠損部を 4-0 バイクリル プラス® にて骨膜縫合し、3-0 絹糸にて皮膚縫合を行い以下の観察を行なった。

X 線学的観察方法：術後 4 週と 8 週に実験動物用 X 線 CT Latheta LCT-200 (Hitachi-Aloka Medical Systems, Tokyo, Japan, 以下 micro-CT)を用い、撮影条件を管電圧 50kV、管電流 0.5mA、解像度  $80 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ 、 $80 \mu\text{m}/\text{voxel}$  とした。得られたデータから観察領域の不透過像の体積を計測した。また微細構造 X 線学的観察のため、VG studio MAX を用いて 3D 画像構築を行い骨修復状態を観察した。

組織学的観察方法：術後 4 週と 8 週に摘出した組織から、非脱灰凍結切片作製法である川本法を用い切片を作製した。Toluidine blue 染色、von Kossa 染色、Hematoxylin and Eosin 染色を行い、光学顕微鏡で組織学的観察を行なった。

#### 《結果》

micro-CT 画像では、Group A 術後 4 週および 8 週において骨欠損部の周囲から欠損を

埋めるように、不透過像を観察した。Group B および Group C において、Group A と同様に骨欠損部の周囲からの不透過像を観察した。骨欠損部は、顆粒状不透過像に満たされていた。Group C は Group B と比較し、不透過像の厚みが大きい傾向にあった。代用骨と新生骨の透過性の違いは観察できなかった。骨欠損部における不透過像領域の体積は、Group C の方が Group B より高い傾向にあった。

組織学的観察では、Group A 術後 4 週と 8 週において骨欠損部に硬組織形成は観察できなかった。Group B と Group C 術後 4 週と 8 週では、頭蓋骨断端に近接する BO 周囲に、新生骨とみられる組織が見られた。新生骨の一部に、骨芽細胞様の細胞を観察した。骨欠損部中央の BO 周囲の新生骨形成は、Group B では観察できなかったが、Group C でのみ観察された。さらに、Group C 術後 8 週では Collagen 膜に近接した BO 周囲においても新生骨形成が見られた。各週とも Group C の方が Group B より BO の量が多く、BO 周囲の新生骨形成も多い傾向があり、骨欠損部の組織の厚みが大きかった。

#### 《考察》

今回、ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおいて、BO を充填した場合、組織学的に欠損部の頭蓋骨断端に近接した BO 周囲に新生骨形成を観察した。使用した BO は、生物学的組成が骨に類似しており代用骨として有効であるとされている。これまでは、周囲の新生骨形成における知見が不十分であることからインプラント手術への使用に関する国内承認が得られていない。今回の結果で、Group B と C いずれも、組織学的に BO 周囲に新生骨が観察できたことから、インプラント手術においても有用である可能性が示唆された。

さらに Collagen 膜を併用することにより、Group C においては Group B に観察されなかった骨欠損中央の Collagen 膜に近接した BO 周囲にも新生骨を観察することができた。統計学的な有意差は認められなかったものの、Collagen 膜を使用することが BO の脱落を防ぎ、上皮や結合組織の骨欠損部への侵入を確実に防いだ結果であると考えられる。このことは BO を使用するだけでなく Collagen 膜の併用が、多くの新生骨を獲得できる方法である可能性を示唆している。

今回の研究は、顎骨と同じ膜性骨化である頭蓋骨に欠損を作成したモデルで行った。成熟期のラットを使用し、脳硬膜上まで頭蓋骨を除去した、骨形成が困難な条件であった。この条件下で新生骨形成を観察できたことから、今後このモデルを用いて、より詳細な骨形成、骨修復を評価し、臨床応用に役立てたい。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

骨再生誘導法 (Guided bone regeneration、以下 GBR 法) は、歯科インプラント治療予定部位の既存骨が不足している場合に行われる手法である。しかし、GBR 法を行なった部位の骨修復評価に関する報告は少なく、術式及び使用材料において未だ確立されていないのが実状である。申請者は、代用骨の一つである Bio-Oss® (以下 BO) と吸収性遮蔽膜である Collagen 膜を使用した GBR 法をラット頭蓋骨骨欠損モデルに用い、微細構造 X 線学的小および組織学的に、新生骨形成を観察した。

BO は、その生物学的組成が骨と類似し骨伝導能が高いことから、骨欠損部における骨修復材料として有効であるとされている。そのため、臨床的に多く使用されているが、歯科インプラントにおける国内承認はなく、骨修復の評価報告は極めて少ない。また、GBR 法の際に用いられる吸収性遮蔽膜である Collagen 膜の有効性の報告も十分ではない。

申請者は、ラット頭蓋骨骨欠損部における BO 周囲の新生骨獲得を微細構造 X 線画像解析と非脱灰凍結切片法により確認し、BO の有用性を証明するとともに、Collagen 膜の併用が有利か否か観察した。その結果、統計学的な有意差は認められなかったものの、Collagen 膜を併用した Group C においてのみ、骨欠損中央の Collagen 膜に近接した BO 周囲にも新生骨を観察した。このことは BO を使用するだけでなく Collagen 膜の併用が、多くの新生骨を獲得できる方法である可能性を示唆している。これは、今後の骨欠損を有する患者に対する、歯科インプラント治療への Bio-Oss® の使用承認など臨床への貢献を考えると、意義深い研究結果である。

以上により、本論文は本学大学院学則大 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of hard tissue biology 27(1): 79-84, 2018