

I. 緒言

近年、硬組織再生療法が飛躍的に発展を遂げてきた背景には様々な生体材料の開発が挙げられる。歯槽骨や顎骨といった口腔領域における骨欠損は口腔系機能回復の観点から硬組織再生を必要とすることが多く、局所骨再生は歯科領域の大きな課題になっている。骨増生には、骨移植という生物学的手法やリン酸カルシウム系セラミックなどの無細胞性生体材料を使用した工学的的手法、それらの融合法が用いられてきた。その一方で臨床現場において、移植に使用する板状緻密骨は穿孔後、新鮮穿孔自家骨の即時移植が一般的である。その際生体材料として最も安全で有効な移植材料である自家骨を加工することにより骨増生をさらに促すような加工法が期待される。そこで穿孔移植骨の迅速な脱灰と骨内部へさらなる加工処理として超音波併用脱灰に着目した。

本実験では、成体ラット頭頂骨由来板状緻密骨に物理化学的加工、すなわち機械的穿孔と超音波併用硝酸脱灰による処理を施し、4種の加工処理骨（FBP、DFBP、UFBP、UDFBP）を走査型電子顕微鏡で超微細構造を観察するとともにラット背部皮下組織内における4週後の骨・軟骨誘導現象を光学顕微鏡で観察することを目的とした。将来、無細胞性生体材料であるヒト象牙質への加工応用を視野に入れており、本実験は凍結保存後の板状緻密骨への加工処理を試みることにした。

II. 方法

1. 実験：ラット加工処理骨による背部皮下骨誘導実験

Wistar系ラット（雌性、12週齢、体重：約250g）を屠殺し、骨膜を除去した頭頂骨を摘出した。頭頂骨を板状（ $5 \times 5 \times 0.5 \text{ mm}^3$ ）に切断加工し、蒸留水で30分間攪拌洗浄し -80°C で凍結保存した。凍結穿孔骨（Frozen bone with perforations: FBP）は頭頂骨内外側板にダイヤモンドバー（直径0.6mm）を用いて注水下穿孔を5か所加え -80°C で凍結保存した。脱灰凍結穿孔骨（Demineralized frozen bone with perforations: DFBP）はFBPに攪拌脱灰処理（2%硝酸、500rpm、 20°C 、90分間）を加え蒸留水で攪拌洗浄（500rpm、30分間）し -80°C で凍結保存した。超音波凍結穿孔骨（Ultrasonic frozen bone with perforations: UFBP）はFBPに超音波処理（蒸留水、40kHz、220W、 20°C 、90分間）加え -80°C で凍結保存した。超音波脱灰凍結穿孔骨（Ultrasonic demineralized frozen bone with perforations: UDFBP）はFBPに超音波処理（2%硝酸、40kHz、220W、 20°C 、90分間）加え蒸留水で攪拌洗浄（500rpm、30分間）し -80°C で凍結保存した4群を設定した。MDCTで各群の加工処理前後のCT値比較と走査電子顕微鏡（SEM）による表面観察を行った。埋植前にImageJを用

いて、単位表面積当たりの亀裂面積が占める割合を計測した。Wistar ラット（雄性、4 週齢）を使用し背部皮下に埋植した。4 週後ペントバルビタール Na を用いて屠殺し、試料を周囲軟組織ごと一塊として摘出した。その後、通法に従ってヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色を施し、光学顕微鏡を用いて組織学的観察を行った。

III. 結果と考察

SEM による埋植前表面観察において DFBP と UDFBP で酸不溶性コラーゲンとみられる線維状の構造物を認めた。さらに表面に存在する P, Ca 元素に着目すると、DFBP と UDFBP は FBP と UFBP の約 1/10 以下に減少していた。移植骨骨厚さでは埋入前と埋入 4 週後において DFBP が最も小さい値であることから、脱灰により HAp などのミネラル成分が除去され酸不溶性コラーゲンに付着した BMPs の徐放が増加したと考えられる。本実験 SEM 観察から、FBP 表面は平滑で UFBP 表面は滑沢で亀裂を認めた。一方、DFBP と UDFBP の表面にはコラーゲン線維の露出を認めた。加えて、UDFBP の亀裂面積の割合は FBP に比べて約 14.3 倍であった。埋入前 HE 染色では UFBP 外側板表面に亀裂と思われる陥凹を多数認め、骨髓腔相当部では骨改造線を境に骨基質の断裂を認めた。UDFBP では骨髓腔相当部の辺縁は凹凸のある辺縁不正で骨改造線を境とした骨基質の断裂を認めた。埋入 4 週後の HE 染色では UFBP で外側板表面に亀裂と骨髓腔相当部骨基質は柵状の断片化を認めた。UDFBP では外側板表面に亀裂と骨髓腔相当部がモザイク状を呈していた。UDFBP のみで骨誘導を認めたことから、緻密骨の表面と内部構造がミネラル溶出と亀裂発生で変化し、内部に骨芽細胞と軟骨様細胞の分化促進環境提供を示唆している。UDFBP は骨髓腔から外側板にかけてモザイク状構造を認め、骨外表面亀裂と板間層骨基質亀裂の複合化が示唆された。さらに加工処理骨表面亀裂が FBP, DFBP, UFBP, UDFBP の順に拡大を認めたことから、複合化亀裂は既存亀裂が脱灰処理で拡大したことと同様に（半場ら, 2017）、超音波処理による板間層骨基質亀裂が骨誘導に最適な 300-400 μ m (Tsuruga et al., 1997) に満たないものの脱灰処理によって亀裂拡大や亀裂間隙の不均一、血管侵入の偏在が考えられた。つまり板間層骨基質は超音波による浸透作用と複合化亀裂によって骨基質内部へ脱灰液が浸透し骨基質内部の BMP 濃度上昇し、亀裂間隙が広く血管豊富な部位は骨芽細胞分化による骨誘導が起こり、亀裂間隙が狭く血管の乏しい部位では軟骨様細胞を認めたことが示唆された。

IV. 結論

穿孔板状緻密骨への加工処理（超音波硝酸脱灰処理）は、骨基質内部への亀裂形成と拡大により細胞・血管侵入を可能な構造変化をもたらし、この構造変化が脱灰された内部空間の骨誘導に貢献したと考えられる。