

〔原著〕

骨・歯に由来する加工移植材の創成とラット生体内での特性評価

横関 健治¹⁾, 根津 尚史²⁾, 志茂 剛³⁾, 村田 勝⁴⁾

- 1) 北海道医療大学口腔機能修復・再建学系咬合再建補綴学分野
 2) 北海道医療大学口腔機能修復・再建学系生体材料工学分野
 3) 北海道医療大学生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野
 4) 北海道医療大学口腔機能・病態学系口腔再生医学分野

Creation of bone- and tooth-derived graft materials and their characteristic evaluation in rats

Kenji YOKOZEKI¹⁾, Takashi NEZU²⁾, Tsuyoshi SHIMO³⁾, Masaru MURATA⁴⁾

- 1) Division of Occlusion and Removable Prosthodontics, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
 2) Division of Biomaterials and Bioengineering Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
 3) Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
 4) Division of Oral Regenerative Medicine, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Perforation, Ultrasonic Demineralized, surface area

Abstract

Bone defects in the oral region such as the alveolar bone and jawbone often require hard tissue regeneration from the viewpoint of oral system function recovery, and local bone regeneration is a major issue in the dental field. In clinical practice, it is common for compact bone plate to be used for transplantation to be immediately transplanted with freshly perforated autogenous bone. Therefore, we focused on ultrasonic demineralization as a rapid demineralization of perforated bone and further processing inside the bone. In this experiment, adult rat parietal bone-derived compact bone was subjected to physicochemical processing, that is, treatment with mechanical perforation and ultrasonic demineralization by 2% nitric acid. The purpose of this experiment is to observe the ultrastructure of four types of processed bones (FBP group, DFBP group, UFBP group,

UDFBP group) with a scanning electron microscope and to observe bone and cartilage induction phenomena in the subcutaneous tissue of the back of the rat after 4 weeks. Observation of the surface before implantation by SEM revealed a fibrous structure that appeared to be acid-insoluble collagen in DFBP and UDFBP. Focusing on the P and Ca elements present on the surface, DFBP and UDFBP were reduced to about 1/10 or less of FBP and UFBP. The processing of perforated plate-shaped compact bone (ultrasonic nitric acid demineralization) results in a structural change that allows cells and blood vessels to penetrate by the formation and expansion of cracks in the bone matrix. This is thought to have contributed to the osteoinduction of the space.

緒 言

口腔領域において、歯周疾患による歯槽骨の吸収や歯の喪失後の高度顎堤萎縮、顎骨内の嚢胞や腫瘍摘出による骨欠損あるいは顎裂部などは、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。近年、硬組織再生の基本要素は骨を作る細胞（骨芽細胞／幹細胞）、骨が形成される足場：担体、増殖と分化を誘導する細胞増殖因子を3要素としており（澤，2018）、それらに加え体液供給やメカニカルストレス影響も示唆されている（Banno & Yoder, 2018; Yuan et al., 2016）。

欠損部の補填材としては自家骨のほか、リン酸カルシウム系セラミック（Murata et al., 2007）やハイドロキシアパタイト（hydroxyapatite：HAp）（赤澤&村田，2007）が検討されている。HApは組織親和性に優れ骨伝導能を有することから、骨補填材として広く用いられている（John et al., 1981; 黒田，1983; 落合，1992）。骨補填材による骨造成では、骨補填材量が残存し骨補填材と母骨の結合によりなされる。一方、真の骨再生とは、欠損部の骨補填材が吸収され、骨補填部が母骨へと完全置換されることである。高温焼結HApは非吸収性のため、生体内で永久に残存して真の再生を阻害することやHAp単独利用では予知性の高い骨増生を望めないことが指摘されている（Ono et al., 1992）。一方、自家骨移植は正常組織への手術的侵襲や感染、疼痛、神経麻痺などの合併症を引き起こす可能性、採取する骨量や形態に制限があることなど問題もあるが、生体親和性に優れ母骨と一体化する生体材料として最も有効な移植材料であり（Ahmad et al., 2014）、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。

超音波は様々な分野で応用されており、超音波脱灰装置が硬組織標本作製時間を短縮する目的で使用され、医療においては器具洗浄や非侵襲性検査法など、歯科臨床では根管治療や歯周治療、骨外科手術などで使用される簡便な処理法である。超音波とは可聴範囲である15-20 KHzを超えた音で、応用範囲は動的超音波エネルギーを利用した洗浄や切削加工分野、情報分野（魚群探知機、診断装置）などに大別される。超音波洗浄は超音波によって生み出されるキャビテーション（空洞現象）エネルギーの衝撃波を利用して汚れを落とす目的で開発され、キャビテーション効果と機械的浸盪作用がある（前田，1988; 上羽，1991）。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。本研究において、onlay graftとして臨床

応用されている板状緻密骨を対象に酸性電解水による超音波部分脱灰処理板状骨の骨誘導実験の結果、骨誘導超音波脱灰緻密骨表面のみに加工処理後2週で骨誘導を認めた（Shakya et al., 2018）。

本研究では凍結処理により、細胞成分を失活させ免疫による拒絶反応を低減させ、穿孔により、超音波脱灰の作用を骨表面のみではなく内部まで作用させる。超音波処理により、骨表面及び内部に微細な亀裂を生じさせる。さらに、脱灰処理により微細な亀裂を拡大させ、骨基質に内包された有機成分の除去とBone Morphogenetic Proteinsの徐放性向上が期待される。しかしながら、加工処理による骨形成促進は明らかとなっていない。

そこで、超音波脱灰により骨誘導が促進されるメカニズムを解明し、より有効な加工処理を検討するために成体ラット頭頂骨由来板状緻密骨に穿孔と超音波併用脱灰による処理を施し、4種の加工処理骨（FBP群、DFBP群、UFBP群、UDFBP群）を作製した。これらの微細構造を走査型電子顕微鏡で観察するとともにラット背部皮下組織内に移植し4週後の骨誘導を組織学的に検討した。本研究では、将来、無細胞性生体材料であるヒト象牙質での応用を考え、本研究は凍結保存後の穿孔板状緻密骨への加工処理を試みることにした。

方 法

1. 板状頭頂骨

Wistar系ラット（雌性，12週齢，体重：約250 g）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）群は頭頂骨内外側板にダイヤモンドバー（直径0.6 mm，歯科用ダイヤモンドバー，BR-48F[®]，マニー，栃木）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）群はFBP群に攪拌脱灰処理（2%硝酸，500 rpm，20℃，90分間）を加え蒸留水で攪拌洗浄（500 rpm，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）群はFBP群に超音波処理（蒸留水，40 kHz，220 W，20℃，90分間，超音波洗浄機，Powersonic 603[®]，Kleentec，米国）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）群はFBP群に超音波処理（2%硝酸，40 kHz，220 W，20℃，90分間，超音波洗浄機，Powersonic 603[®]，Kleentec，米国）を加え蒸留水で攪拌洗浄

(500 rpm, 30分間) し, -80°C で凍結保存した 4 群を設定した (図 1)。

2. 加工処理によるCT値変化

加工処理前後のCT値を全身用X線CT装置 (MDCT, Pro Speed FII[®], GEヘルスケア・ジャパン, 東京) で測定した。測定部位は試料につき非穿孔部の四隅 (4点)

を計測した (N = 6)。加工処理前後CT値の平均値の比較にはMann-Whitney検定を行った。なお, 統計解析にはIBM SPSS Statistics バージョン29.0.0.0 (241) を使用した。

3. 加工処理骨表面におけるP, Ca含有量

加工処理骨を埋植前に, 表面元素分析 (P, Ca) を

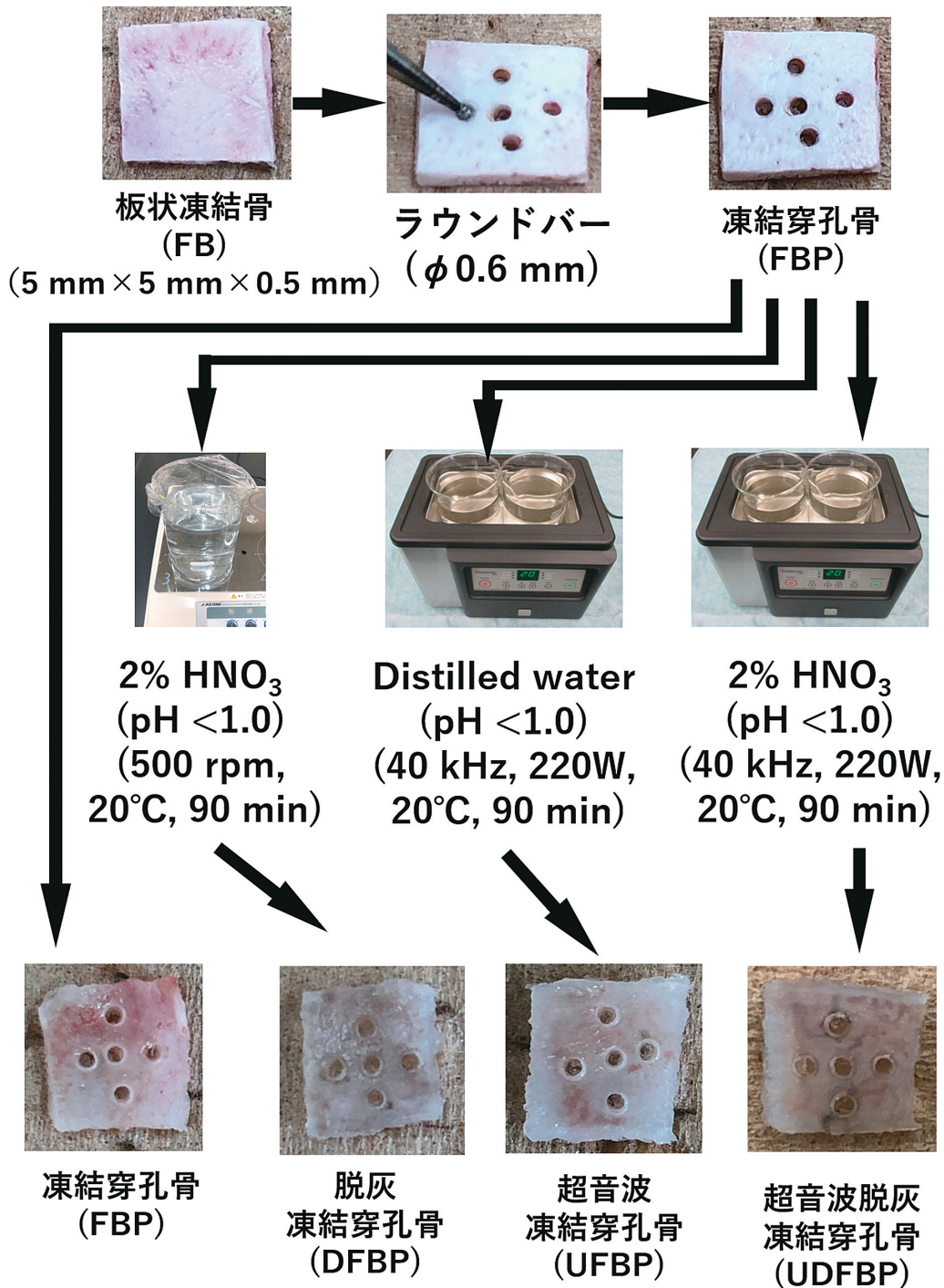


図 1 : 頭頂骨の調整

Wistar系ラット頭頂骨から凍結穿孔骨 (FBP) 群, 脱灰凍結穿孔骨 (DFBP) 群, 超音波凍結穿孔骨 (UFBP) 群, 超音波脱灰凍結穿孔骨 (UDFBP) 群の 4 群を作製し, 比較検討した。穿孔は注水下ダイヤモンドバー (直径0.6 mm) で行い, 脱灰液は 2% 硝酸を使用した。

行った。走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-6610LA[®], 日本電子, 東京) を用いて単位面積 (1250 μm × 940 μm) あたりの元素分析結果を比較した。

4. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による加工処理骨表面

試料は処置後直ちに2%グルタルアルデヒド溶液に1時間浸漬固定を行った。エタノールによる脱水後, t-Butyl Alcohol (2-Methyl-2-propanol) に包埋し凍結乾燥機 (Free dryer, FDU-035[®], EYELA, 東京) で凍結乾燥した。通法に従って表面処理を施し, 走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-6610LA[®], 日本電子, 東京) を用いて微細構造の観察を行った。

5. 表面積における亀裂部分の割合

埋植前加工処理骨の表面積あたりの亀裂面積が占める割合の計測を行った。走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-6610LA[®], 日本電子, 東京) を用いて単位面積 (1250 × 940 μm²) あたりの亀裂割合を比較した。面積計測はImageJ (ImageJ 1.46r, developed by the National Institutes of Health (NIH) of the United States of America) を使用した (N = 6)。

6. 実験: ラット加工処理骨による背部皮下骨誘導実験 1) 実験動物

実験動物はWistar系ラット (雌性, 4週齢, 体重: 約80 g) を使用した。1週間の検疫期間をおき, 異常のないことを確認した後, 以下の実験に用いた。なお, 実験動物は室温平均24℃, 明暗12時間周期の下で固形飼料と水を自由に与えて飼育した。また, 実験に際しては, 北海道医療大学動物実験室動物取り扱い規約に従い行った。

2) 埋植前と埋植4週後ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色による組織学的評価

加工処理骨をラットの背部皮下に埋植した。4週後にペントバルビタールNaを用いて屠殺し, 試料は周囲軟組織を一塊として切除した。埋植前試料と4週後切除試料は処置後直ちに10%中性緩衝ホルマリン液で24時間浸漬固定を行った。10%蟻酸溶液で1週間脱灰を行い, 通法に従いエタノールにより脱水後パラフィン包埋しマイクロトームを用いて厚さ3 μmの連続切片を作製した。通法に従ってH-E染色を施し, 光学顕微鏡 (正立顕微鏡, ECLIPSE 80i[®], ニコンインステック, 東京) を用いて組織学的観察を行った。

3) 埋植前と埋植4週後ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色による形態計測

(1) 骨髄相当部に占める誘導骨の割合

骨髄腔相当部面積に対する骨の占める割合を計測した。面積計測はImageJを用い, 穿孔部を除いた骨髄腔面積を100%とし, 穿孔面積の占める割合を計測した (N = 6)。

本研究は北海道医療大学倫理審査委員会の承認 (北海道医療大学倫理審査委員会承認番号第034号) を得て行った。

結 果

1. 加工処理前後のCT値変化

加工処理前のFBP群は952.6 ± 236.7 HU, DFBP群は1060.1 ± 116.5 HU, UFBP群は961.2 ± 246.6 HU, UDFBP群は1012.9 ± 165.1 HUであった。DFBP群とUDFBP群は加工処理前後でCT値平均値の有意差を認め (表1)。

2. 加工処理骨表面におけるP, Ca含有量

CaはFBP群と比較するとUFBP群が僅かに大きく, DFBP群, UDFBP群の順で小さくなった。

PはFBP群と比較すると, UFBP群で僅かに大きく, DFBP群, UDFBP群の順で小さくなった (図2)。

3. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による加工処理骨表面 1) 凍結穿孔骨 (FBP) 群

切断加工断端は平滑で, 外側板と内側板の形態保持を認めた (図3a)。穿孔 (直径約690 μm) 形状は正円形を保ち, 穿孔部辺縁および穿孔部内壁も平滑であった (図3b)。

表面は平滑でわずかに亀裂 (大きさ約10 μm) を認めた (図3c)。

2) 脱灰凍結穿孔骨 (DFBP) 群

外側板の一部に線維を認めた (図3d)。穿孔 (直径約690 μm) 形状は正円形を保ち, 穿孔部辺縁および穿孔部内壁に一部線維と断片化を認めた。断片は扁平で母骨と連続していた (図3e)。

表1: 加工処理によるCT値変化 [HU] (N = 6)

加工処理前後のCT値がFBP群とUFBP群は同程度であったのに対し, DFBP群とUDFBP群では有意差を認めた (N = 6)。

CT値(HU) \ 群	FBP	DFBP	UFBP	UDFBP
加工処理前	952.6 ± 236.7	1060.1 ± 116.5	961.2 ± 246.6	1012.9 ± 165.1
加工処理後	898.1 ± 197.2	197.8 ± 112.5	896.3 ± 191.7	228.3 ± 128.7
加工処理前後の有意差		※		※

※: p < 0.01

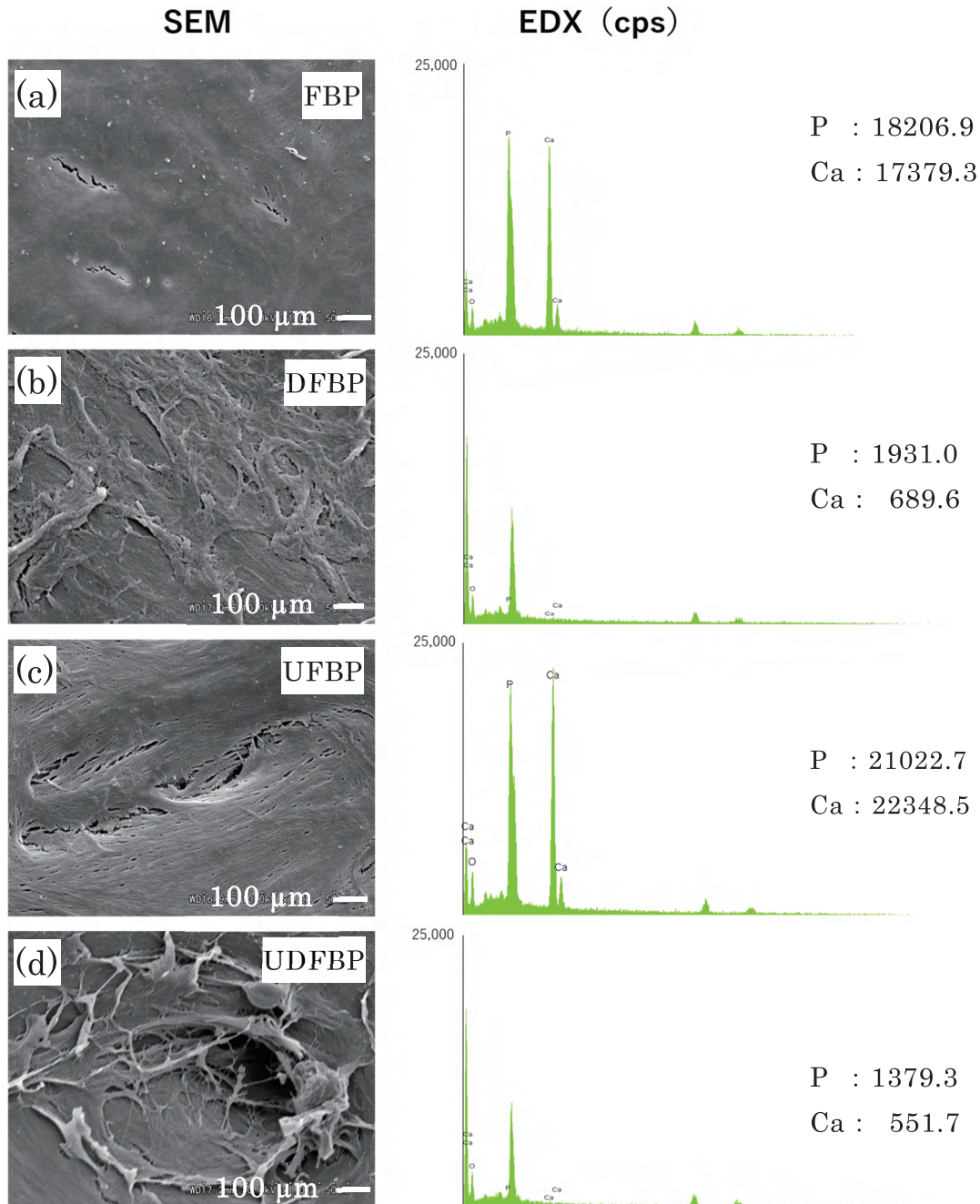


図2：加工処理骨表面におけるP, Ca含有量

(a)：FBP群 (b)：DFBP群
(c)：UFBP群 (d)：UDFBP群

P, Ca含有量はUFBP群が最も多く、FBP群、DFBP群、UDFBP群の順で含有量は小さくなった。

表面に線維状構造物と亀裂（大きさ約10 μm）を認めた（図3f）。

3) 超音波凍結穿孔骨（UFBP）群

外側板と内側板の形態保持と亀裂を認めた（図3g）。穿孔（穿孔径約690 μm）形状は正円形を保ち、穿孔部辺縁に連続した亀裂を認めた。穿孔内部には亀裂と断裂しつつある断片を認めた（図3h）。

表面は平滑で凹凸を呈し、亀裂（大きさ約15 - 20 μm）を認めた（図3i）。

4) 超音波脱灰凍結穿孔骨（UDFBP）群

外側板と内側板の断端部の線維状構造物の著明な露出と亀裂を認めた（図3j）。穿孔（穿孔径約700 × 830 μm²）形状は楕円形で、穿孔部辺縁および穿孔部内壁に亀裂と線維を認めた。穿孔内部には断片を認めなかった（図3k）。

表面に多数の亀裂（大きさ約20 - 30 μm）と線維状構造物の露出を認めた（図3l）。

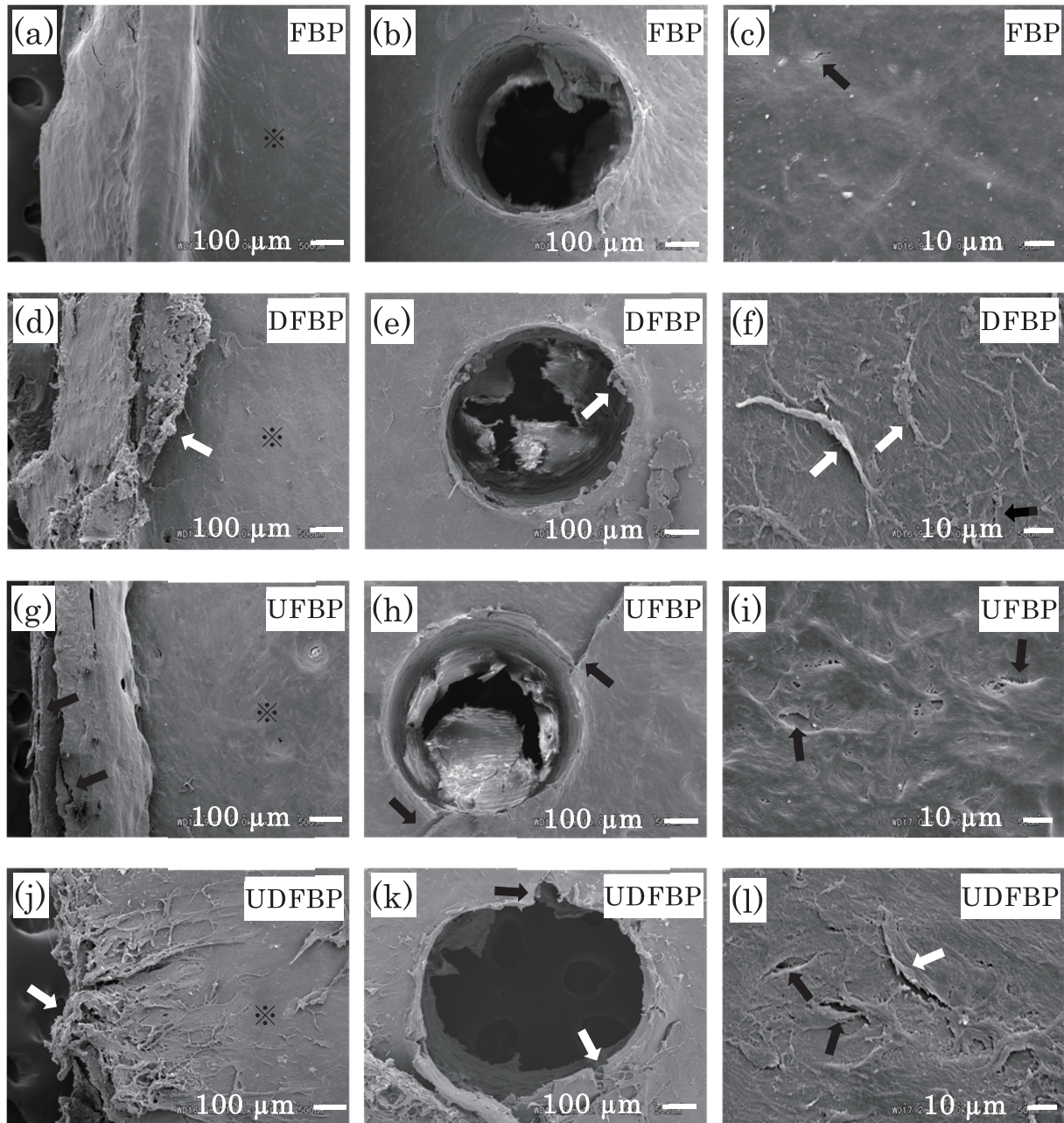


図3：走査型電子顕微鏡（SEM）による加工処理骨表面
 (a, d, g, j)：切断加工断端 (b, e, h, k)：穿孔部 (c, f, i, l)：外側板表面
 ←：亀裂 ⇐：線維状構造物 ※：外側板
 (a-c)：FBP群は表面平滑で亀裂（大きさ約10 μm）を認めた。
 (d-f)：DFBP群は外側板の一部線維を認めた。
 (g-i)：UFBP群は穿孔部辺縁に連続した亀裂を認めた。
 (j-l)：UDFBP群は線維状構造物の露出と亀裂（大きさ約20-30 μm）を認めた。

4. 表面積における亀裂部分の割合

FBP群は $1.2 \pm 0.4\%$ 、DFBP群は $6.7 \pm 2.3\%$ 、UFBP群は $9.0 \pm 4.2\%$ 、UDFBP群は $17.1 \pm 7.4\%$ でFBP群の14.3倍であった（表2）(N=6)。

表2：表面積における亀裂部分の割合 [%](N=6)

UFBP群はFBP群の約7.5倍に増加し、UDFBP群は約14.3倍の増加を認めた。

	FBP群	DFBP群	UFBP群	UDFBP群
表面積における亀裂割合 [%]	1.2 ± 0.4	6.7 ± 2.3	9.0 ± 4.2	17.1 ± 7.4

5. 実験：ラット加工処理骨による背部皮下骨誘導実験

1) 埋植前のHE染色による組織学的所見

(1) 凍結穿孔骨（FBP）群

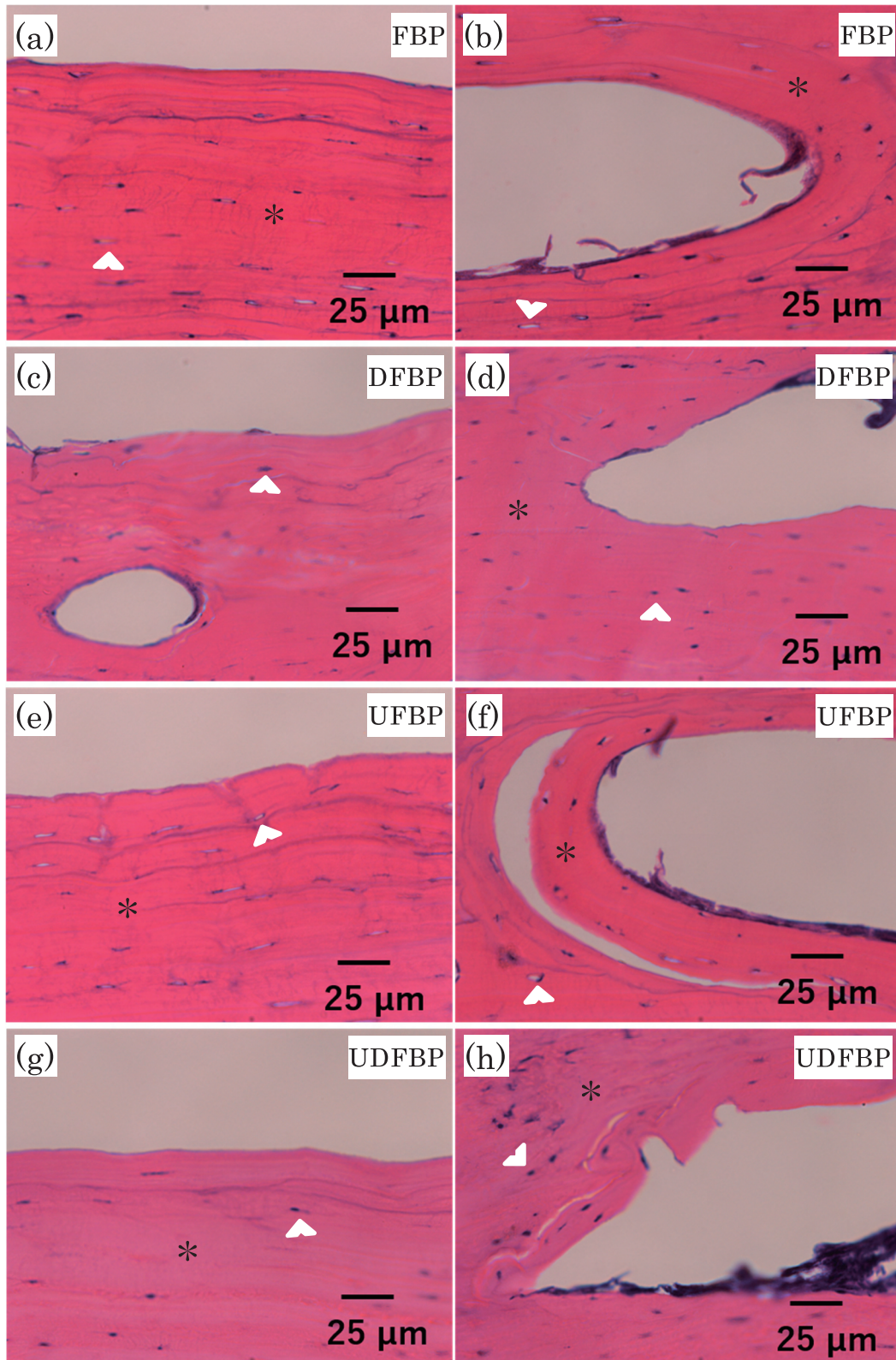


図4：埋入前移植骨片のHE染色
 (a, c, e, g) 外側板表面 (b, d, f, h) 骨髓腔
 *：骨基質 ▷：骨小腔
 (a, b)：埋入前のFBP群
 (c, d)：埋入前のDFBP群.
 (e, f)：埋入前のUFBP群.
 (g, h)：埋入前のUDFBP群.

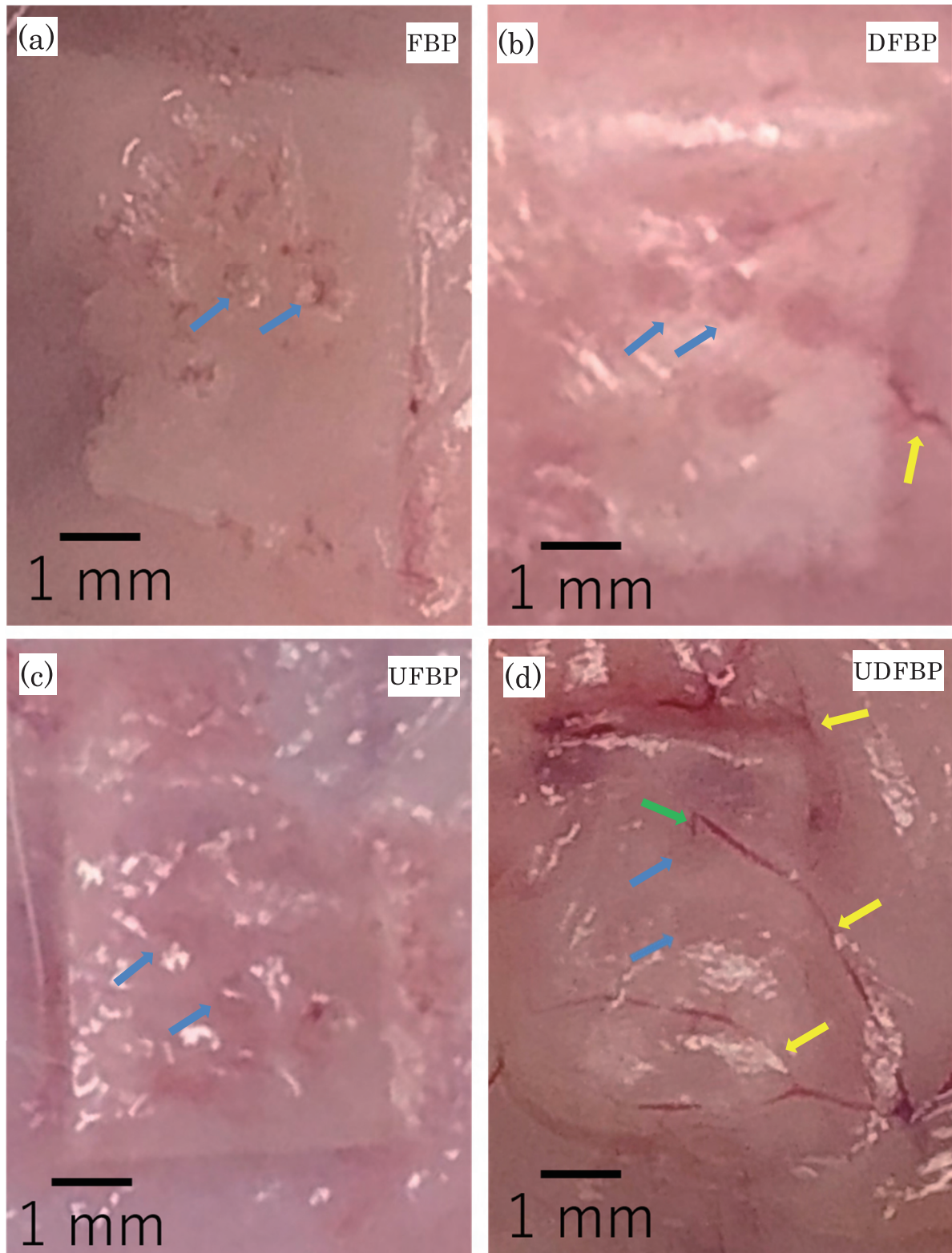


図5：埋入4週後移植骨片の肉眼写真

(a)：凍結穿孔骨 (FBP) 群 (b)：脱灰凍結穿孔骨 (DFBP) 群

(c)：超音波凍結穿孔骨 (UFBP) 群 (d)：超音波脱灰凍結穿孔骨 (UDFBP) 群

→：穿孔部 →：新生血管 →：穿孔部への侵入血管

FBP群とUFBP群の穿孔部は辺縁不正で、DFBP群とUDFBP群の穿孔部は円形であった。UDFBP群には穿孔部への血管侵入を認めた。

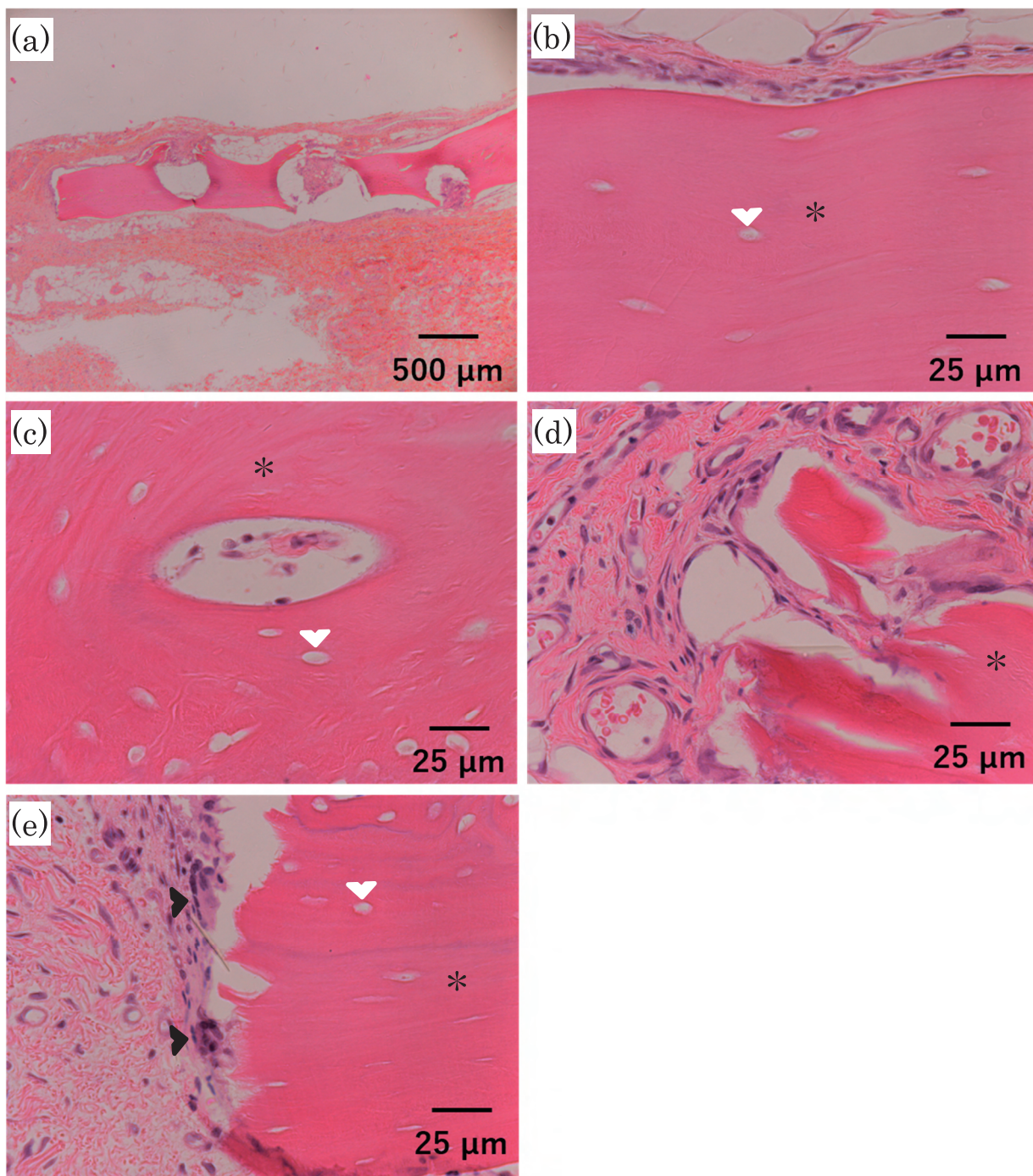


図6：凍結穿孔骨（FBP）群の埋入4週後HE染色

- (a) 全体像
- (b) 外側板表面
- (c) 骨髓腔
- (d) 穿孔部断端
- (e) 切断加工断端

*：骨基質 ▶：多核巨細胞 ▽：骨小腔

加工処理骨は形状を保持していた（図6 a）. 加工処理骨周囲には線維芽細胞による被包化を認めた（図6 b）. 骨髓腔辺縁は円形であった（図6 c）. 穿孔部断端は断片化と結合組織を認めた（図6 d）. 切断加工断端表面は粗造で、一部多核巨細胞を認めた（図6 e）.

外側板と内側板の外形保持を認めた. 穿孔部と島状骨髓腔の点在を認め、骨小腔と横走る骨改造線を認めた. 外側板外側表面は平滑であった. 骨髓腔辺縁は円形で骨髓腔内に細胞は認めず、FBP群は骨小腔に骨細胞の封入を認めた（図4 a, b）.

（2）脱灰凍結穿孔骨（DFBP）群

移植骨に穿孔部と島状骨髓腔の点在を認めた. 外側板表面性状は平滑であった. 骨髓腔辺縁は楕円形で、骨髓腔相当部に細胞は認めなかった（図4 c, d）.

（3）超音波凍結穿孔骨（UFBP）群

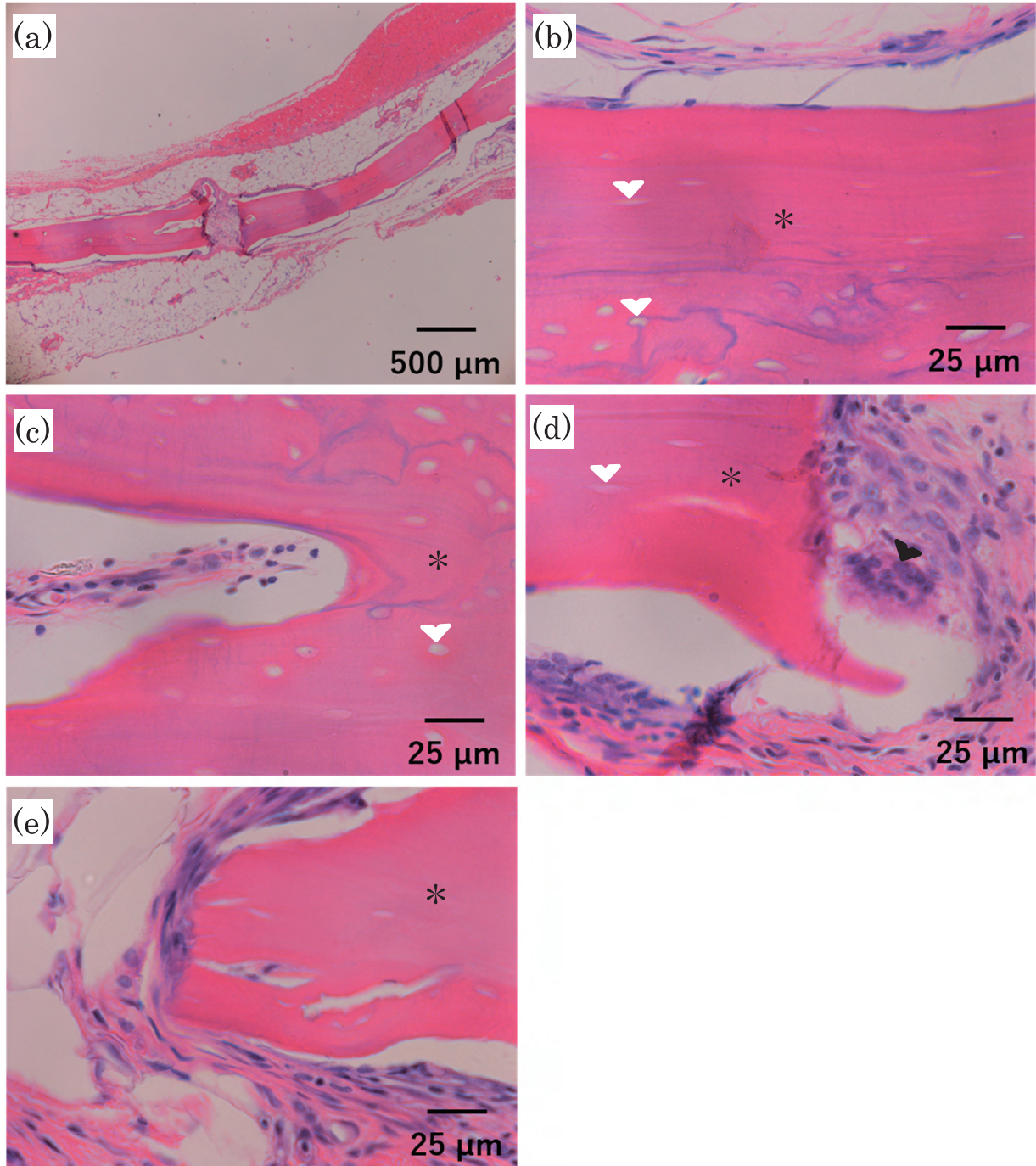


図7：脱灰凍結穿孔骨（DFBP）群の埋入4週後HE染色

- (a) 全体像 (b) 外側板表面
(c) 骨髓腔 (d) 穿孔部断端
(e) 切断加工断端

*：骨基質 ▶：多核巨細胞 ▷：骨小腔

加工処理骨は形状を保持していた（図7a）．外側板表面性状は平滑で紡錘形間葉系細胞の付着を認め、骨基質に空の骨小腔を認めた（図7b）．骨髓腔周囲は空の骨小腔とヘマトキシリン好染性の骨改造線を認めた（図7c）．穿孔部断端と切断加工断端周囲に多核巨細胞を認めた（図7d, e）．

外側板および内側板の形状保持を認めた．陥凹周囲の骨小腔は骨細胞を認めなかった．骨髓腔辺縁は円形を呈したものの、骨髓腔周囲の板間層に間隙を認めた（図4e, f）．

（4）超音波脱灰凍結穿孔骨（UDFBP）群

外側板表面は平滑で一部骨小腔の空胞化を認めた．骨髓腔辺縁は凹凸のある辺縁不正であり、骨髓腔周囲の板間層に間隙を認めた（図4g, h）．

6．埋植4週後の肉眼的所見

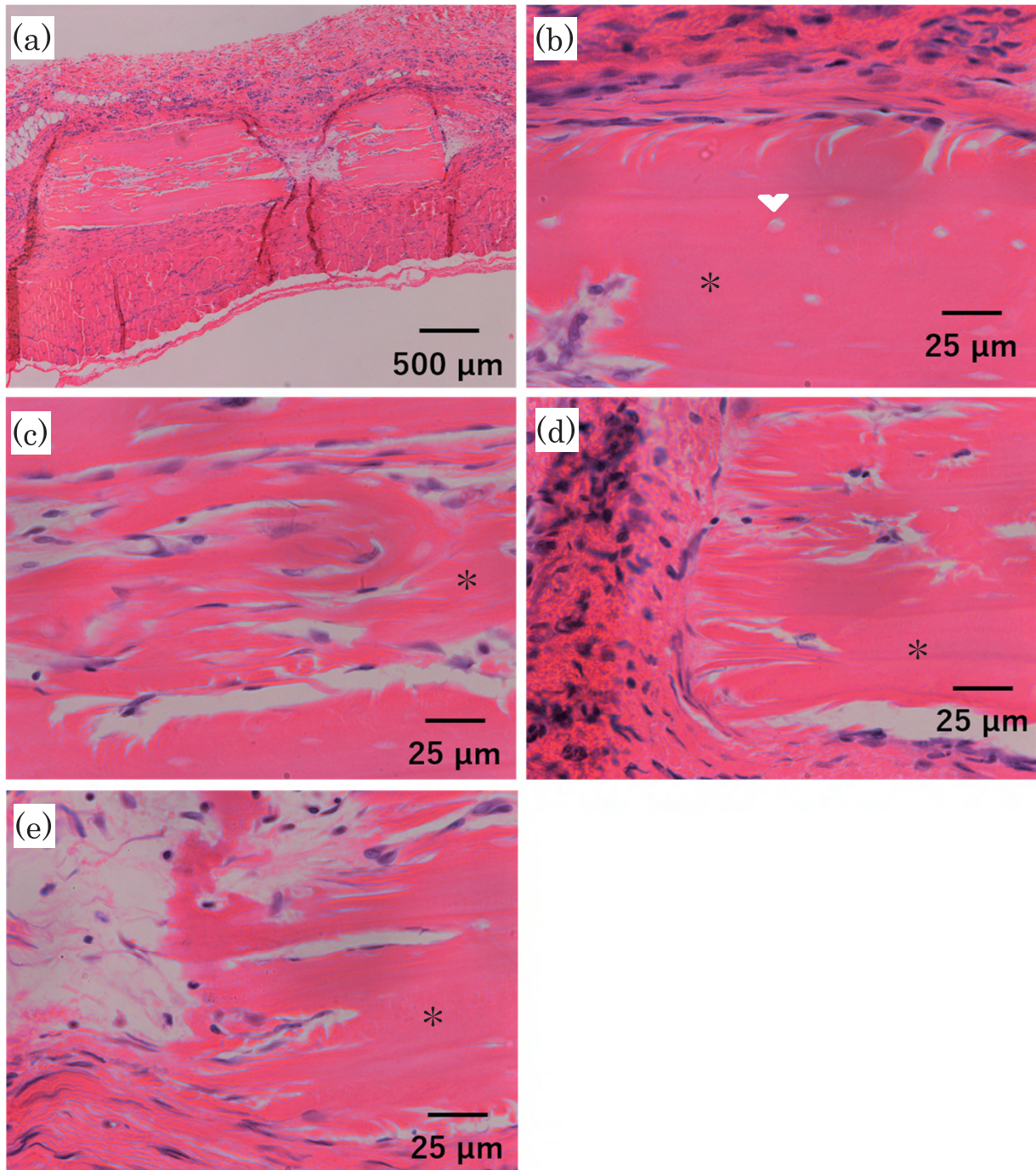


図8：超音波凍結穿孔骨（UFBP）群の埋入4週後HE染色

- (a) 全体像
- (b) 外側板表面
- (c) 骨髓腔
- (d) 穿孔部断端
- (e) 切断加工断端

*：骨基質 ▷：骨小腔

加工処理骨は形状を保持していた。(図8 a). 最外層骨表面に亀裂を複数認めた(図8 b). 板間層骨基質は複数亀裂と亀裂間隙に紡錘形間葉系細胞の侵入を認めた(図8 c). 穿孔部断端表面に生じた亀裂の内部に円形間葉系細胞の侵入を認めた(図8 d). 切断加工断端表面の断片化と亀裂を認めた(図8 e).

(1) 凍結穿孔骨（FBP）群

粘膜色は正常であり，移植骨穿孔部は中央部のみ辺縁不正な赤色を呈していた．穿孔部（大きさ約0.7 mm）は辺縁不正であった（図5 a）．

(2) 脱灰凍結穿孔骨（DFBP）群

穿孔部（青矢印）全体が赤色を呈し辺縁は穿孔部と一致した円形（大きさ約1.1 mm）を呈した．移植骨周囲に血管を認めた（図5 b）．

(3) 超音波凍結穿孔骨（UFBP）群

移植骨穿孔部（青矢印）は中央部のみ辺縁不正な赤色

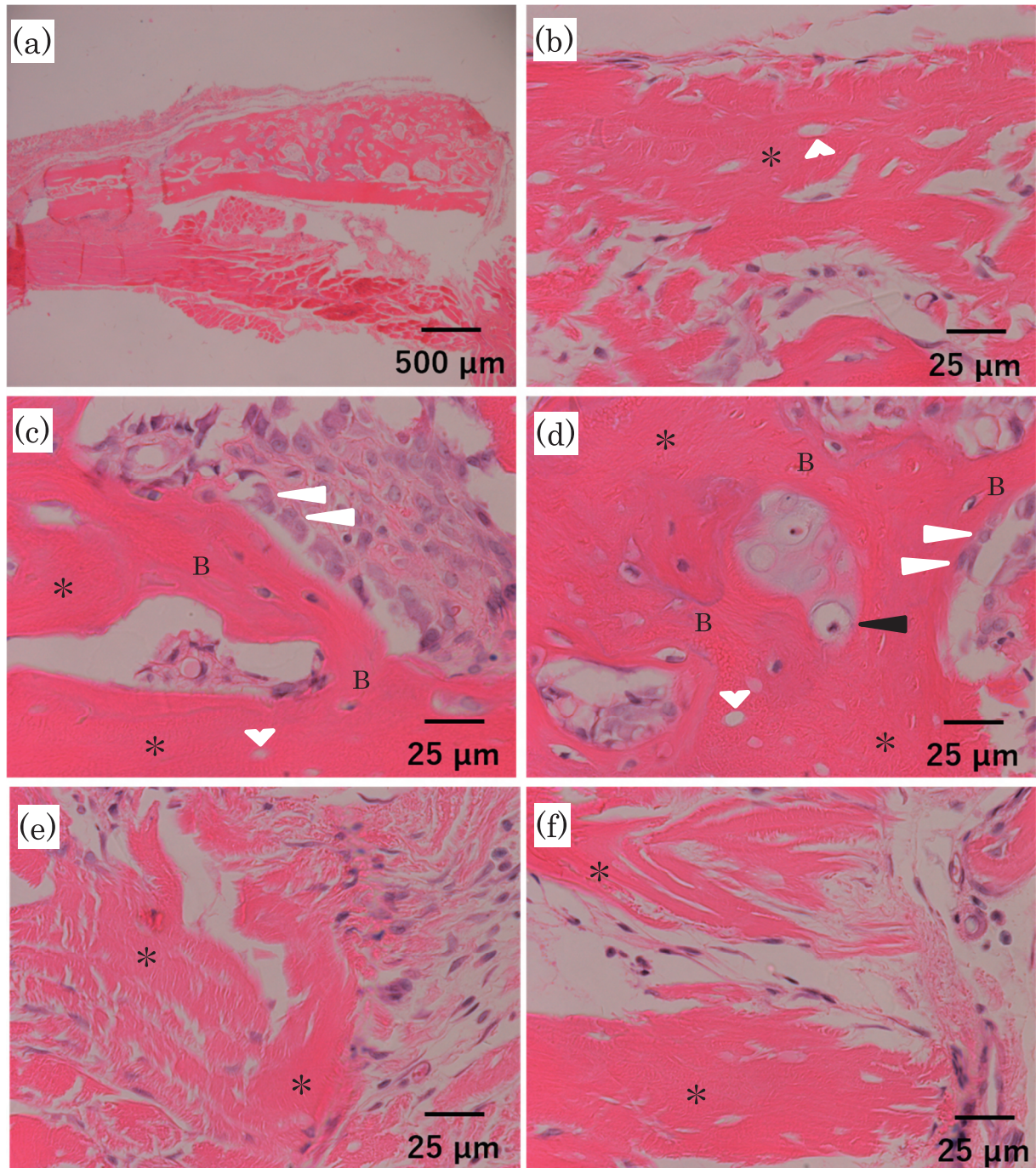


図9：超音波脱灰凍結穿孔骨（UDFBP）群の埋入4週後HE染色

(a) 全体像 (b) 外側板表面
(c) 骨髓腔 (d) 骨髓腔
(e) 穿孔部断端 (f) 切断加工断端

*：骨基質 B：誘導骨

◁：骨芽細胞 ◼：軟骨様細胞 ▷：骨小腔

移植骨外側板の一部が骨梁状を呈し骨髓腔および内側板の連続性を認めた（図9 a）。骨表面付近の骨改造線は不明瞭で亀裂と一部断片化した骨基質を認めた（図9 b）。骨髓腔辺縁は亀裂と断片化が複合し辺縁不正で周囲は骨細胞を含む誘導骨と空の骨小腔を持つ既存骨がモザイク状を呈していた。一部軟骨様細胞とヘマトキシリンに染まる基質を認めた。誘導骨表面にはヘマトキシリン好染性で豊かな細胞体の骨芽細胞の配列を認めた（図9 c, d）。穿孔部断端に波状亀裂と亀裂拡大を認めた（図9 e, f）。

表3：移植骨埋入前後における形態学的評価 (N = 6)

骨髓腔における誘導骨の割合：

誘導骨はUDFBP群でのみ認め、誘導骨は骨髓腔の約1/4を占めた (N = 6)。

	FBP群	DFBP群	UFBP群	UDFBP群
骨髓腔における誘導骨割合 [%]	0	0	0	26.6 ± 10.4

を呈していた。穿孔部 (大きさ約0.7 mm) は辺縁不正であった (図5c)。

(4) 超音波脱灰凍結穿孔骨 (UDFBP) 群

穿孔部全体が赤色を呈し辺縁は穿孔部と一致した円形を呈していた。穿孔部 (大きさ約1.1 mm) へ侵入した血管の存在と移植骨周囲に血管の存在を認めた (図5d)。

7. 埋植4週後のHE染色による組織学的所見

(1) 凍結穿孔骨 (FBP) 群

移植骨長径は5 mmであり、穿孔部と島状骨髓腔の点在を認めた (図6a)。外側板と内側板の外形保持を認め、骨小腔と横走する骨改造線を認めた。加工断端周囲に新生血管 (直径約12 μm) を認めた。骨基質表面に紡錘形間葉系細胞を認め、周囲には線維芽細胞による被包化と新生血管 (直径約29.5 μm) を認めた (図6b)。骨髓腔辺縁は円形で、周囲は骨基質で骨小腔は大小不同であった (図6c)。穿孔部断端は断片化を認め、穿孔部は新生血管 (直径約25 μm) の侵入を複数認めた。穿孔部内部は新生血管の間隙を線維芽細胞と線維の充満を認めた (図6d)。切断加工断端表面は粗造であり、偏在した多核の多核巨細胞 (大きさ約25 μm) と新生血管 (直径約10 μm) を認めた (図6e)。

(2) 脱灰凍結穿孔骨 (DFBP) 群

移植骨に穿孔部と島状骨髓腔の点在を認めた。外側板と内側板は外形保持を認めた (図7a)。外側板表面性状は平滑で多核巨細胞の付着を認めた。骨基質外層の骨小腔は紡錘形を呈した (図7b)。骨髓腔辺縁は楕円形であった。骨髓腔周囲は壊死骨でヘマトキシリン好染性の骨改造線を認めた (図7c)。穿孔部断端は断片化し周囲に多核巨細胞 (直径約55 μm) を認めた (図7d)。切断加工断端表面は平滑であり、周囲に新生血管 (直径約12 μm) を認めた (図7e)。

(3) 超音波凍結穿孔骨 (UFBP) 群

板間層骨基質が亀裂拡大を呈した (図8a)。最外層骨表面に亀裂 (深さ約25 μm) を複数認め、周囲間葉系細胞の亀裂内部への侵入は認めなかった (図8b)。板間層骨基質は複数亀裂と亀裂間隙に紡錘形間葉系細胞の侵入

を認めたが、誘導骨は認めなかった (図8c)。穿孔部断端表面に亀裂 (深さ約30 μm) を認めた。穿孔部断端表面に紡錘形間葉系細胞を認め、亀裂内部に円形間葉系細胞の侵入を認めた (図8d)。切断加工断端表面の断片化と亀裂 (深さ約45-140 μm) を認めた。亀裂内部は紡錘形間葉系細胞の侵入を認めた (図8e)。

(4) 超音波脱灰凍結穿孔骨 (UDFBP) 群

移植骨外側板の一部が骨梁状を呈し骨髓腔および内側板の連続性を認めた (図9a)。骨改造線は不明瞭で大きめの骨小腔を認めた。周囲に紡錘形間葉系細胞を認め、表面に亀裂 (深さ約10-25 μm) と一部板間層骨基質の断片化を認めた。骨髓腔辺縁は亀裂と断片化が複合し辺縁不正であった (図9b)。骨髓腔部に誘導骨領域を認めた。誘導骨領域では骨基質を橋渡しする誘導骨を認めた。誘導骨は骨小腔に骨細胞を内包し、表面にヘマトキシリン好染性で豊かな細胞体の骨芽細胞 (大きさ約10 μm) の配列を認めた (図9c)。一部で軟骨様細胞 (直径約15 μm) とヘマトキシリン好染性の軟骨様基質の存在を認めた。周囲に骨芽細胞の配列と誘導骨の存在を認めた (図9d)。穿孔部断端に波状亀裂と亀裂拡大を認め、亀裂へ紡錘形間葉系細胞の侵入を認めた (図9e)。切断加工断端は断片化と亀裂 (約45-175 μm) を認め、表面は粗造化を呈した。亀裂内部は紡錘形間葉系細胞の侵入を認め、骨小腔は不明瞭であった (図9f)。

8. 埋植前と埋植4週後ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色による形態計測

1) 骨髓相当部に占める誘導骨の割合

誘導骨はUDFBP群のみに認め、誘導骨は骨髓腔の約1/4を占めていた (表3) (N = 6)。

考 察

本研究においてUDFBP群のみに4週後著明な誘導骨を認め、脱灰処理と超音波処理の併用が骨誘導に有効な環境を作り出す加工処理であることが示唆された。

すべての群で凍結処理をしており、細胞成分を除去し細胞に適切な間隙を有する加工骨となっている。しかしながら、加工骨内の骨小腔内に核酸成分が残存しており、この間隙は内包された閉鎖の間隙である。骨新生促進には75 μmの連通構造が必要 (高島ら, 2019) であり、凍結処理による間隙を連通構造にするためにも酸処理や超音波処理が骨誘導促進に寄与すると考えられる。

UDFBP群とUFBP群のSEMと組織像から、超音波は周囲に大きな圧力を及ぼすキャビテーション効果 (空洞崩壊) によって骨表面と層板間に亀裂を生じさせたことが

示唆された。さらに、超音波処理によって生じた亀裂と超音波が有する浸透作用との相乗効果でUDFBP群基質内への脱灰液の浸透性が向上したと考えられる。つまり骨基質内部にまで発生した亀裂によって増大した表面積全体が脱灰液にさらされることでHApなどのミネラルが除去されBMP徐放性が向上したと考えられる。骨基質内部の亀裂は脱灰により拡大し（半場ら, 2017）、血管と細胞が侵入可能となり、骨基質内部に侵入した細胞が周囲骨基質から放出されたBMPによって骨芽細胞に分化した（Murata et al., 1998; Groeneveld & Burger, 2000）と考えられる。このような骨芽細胞への分化と骨芽細胞による骨形成が亀裂間隙の複数箇所で行ったことにより、埋植4週後の組織像にみられるような骨小腔に骨細胞を内包した誘導骨領域と空の骨小腔がみられる既存骨領域がモザイク状の骨梁を形成していたことが示唆された。誘導骨領域は、表面にヘマトキシリン好染性で豊かな細胞体の骨芽細胞（大きさ約10 μm）の配列と骨改造線を認め、活発な骨形成と骨改造が示唆された。移植片周囲に血管が豊富に局在したことはこれらの骨形成が活発なことと一致する。超音波脱灰処理時間の短いShakyaらの研究では骨表面の亀裂にのみ誘導骨を認め、本研究のUDFBP群のような骨基質内部にモザイク状の骨梁を形成することはなかった。このことは本研究のUDFBP群での穿孔と超音波脱灰処理時間が骨基質内部への亀裂を形成するとともに骨基質内部の脱灰を促進し、骨誘導に適した300–400 μm（Tsuruga et al., 1997）と類似した亀裂間隙を骨基質内部に形成させたと考えられる。一部の骨基質内部に認めた軟骨様細胞は、骨基質内部の亀裂間隙が狭いことを示唆した。

本研究ではUDFBP群でのみ骨誘導を認め、脱灰骨移植片であるDFBP群では認めなかった。どちらもSEMによる骨表面では線維状構造物であるコラーゲン線維を認め、骨表面のP, Ca元素分布は同程度であり、加工処理前後CT値変化はDFBP群とUDFBP群でともに有意差を認めたことからUDFBP群とDFBP群の骨表面における脱灰程度は同程度と考えられる。これはUDFBP群が超音波によって形成された骨基質内部の亀裂によって骨基質内部まで脱灰が進んだのに対し、DFBP群では亀裂が形成されず脱灰が骨表面のみにとどまったことによる差であると推察する。このことは、Akazawaらの報告と同様に超音波脱灰により骨の脱灰が迅速に進むことを示している（弘中ら, 1991; Akazawa et al., 2012）。そのため、DFBP群はBMP徐放が骨芽細胞の分化を誘導し骨形成するに至らなかったことが示唆された。

結 論

穿孔板状緻密骨への加工処理（超音波脱灰処理）は、骨基質内部への亀裂形成と拡大により細胞・血管侵入が可能な構造変化をもたらす、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。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、興味深い研究テーマをお示し下さり、終始懇切なる直接的御指導、ご教示、御校閲を賜りました村田 勝博士（本学歯学部口腔再生医学分野教授）に心より感謝の意を表します。また、適切な御指導、御校閲を賜りました赤澤 敏之博士（北海道立総合研究機構産業技術研究本部 専門研究主幹）、入江 一元博士（本学歯学部組織学分野 教授）に心より感謝の意を表します。さらに、本研究全般にわたり多大な御助言、御協力を頂きました諸先生に心より深く御礼申し上げます。

文 献

- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A & Maffulli N. Bone regenerative medicine : classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 9 ; 1749–1799, 2014.
- Akazawa T, Murata M, Hino J, Nagano F, Shigyo T, Nomura T, Inano H, Itabashi K, Yamagishi T, Nakamura K, Takahashi T, Iida S & Kashiwazaki H. Surface structure and biocompatibility of demineralized dentin matrix granules soaked in a stimulated body fluid. *Applied Surface Science* 262 : 51–55, 2012.
- 赤澤 敏之, 村田 勝. 医療セラミックス材料の歴史と問題点. 骨と歯の再生医療—生物学的原理・問題点とその指針—学際企画 : 83–96, 2007.
- Banno K & Yoder MC. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells : promising cells for vascular repair. *Pediatr Res.* 83 : 283–290, 2017.
- Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 142 : 9–21, 2000.
- 半場 秀典, 中村 圭喜, 二階堂 徹, 村松 敬, 古澤 成博, 田上 順次. ヒト小白歯における脱灰とマイクロクラックの進行の検討. *日本歯科保存学雑誌* 60巻 : 89–95, 2017.
- 弘中 亮治, 佐野 和生, 井口 次夫. 超音波併用脱灰処理骨の即時再植に関する実験的研究. *日本口腔外科学会雑誌* 37巻 : 1–7, 1991.

- John R.A, Doran E.R & Karl A.M. Tlie autogenous particulate cancellous bone marrow graft in alveolar clefts. *Oral Surg* 51 : 588-591, 1981.
- 黒田 雅仁：下顎骨欠損への骨髄を含む海綿骨梁移植における骨新生と骨再構築機転に関する実験的研究。歯科学報 83 : 683-711, 1983.
- 前田 一雄. 超音波の安全性. *BME Vol 2* : 322-327, 1988.
- Murata M, Akazawa T, Tazaki J, Ito K, Sasaki T, Yamamoto M, Tabata Y & Arisue M. Blood permeability of a novel ceramic scaffold for bone morphogenetic protein-2, *J Biomed Mater Res*, 81B : 469-475, 2007.
- Murata M, Inoue M, Arisue M, Kuboki Y & Nagai N. Carrier-dependency of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein (BMP) in ectopic sites, *Int.J. Oral Maxillofac. Surg.* 27 : 391-396, 1998.
- Ono L, Ohura T, Murata M, Yamaguchi H, Ohnuma Y & Kuboki Y. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg* 90 : 870-879, 1992.
- 落合 栄樹. 自家新鮮海綿骨および同種脱脂凍結乾燥海綿骨の筋膜下移植における新鮮遊離骨膜・脱脂凍結乾燥骨膜の被包効果に関する実験的研究. *日本口腔外科学会雑誌*38巻 : 1041-1054, 1992.
- 澤 芳樹. 治験・臨床研究—患者の医療アクセスの改善, 被験者保護と臨床研究開発の推進—. *医療と社会* 28巻 : 93-102, 2018.
- Shakya M, Yokozeki K, Akazawa T & Murata M. Rapid Bone Induction of Cortical Bone Treated with Ultrasonic Demineralization in Acidic Electrolyzed Water. *Journal of Hard Tissue Biology.* 27 : 269-271, 2018.
- 高島 清文, 辻極 秀次, 浜田 芽衣, 河合 穂高, 吉田 沙織, 大森 悠加, 中野 敬介, 長塚 仁. ハニカムTCPの幾何学構造による血管新生を介した選択的骨・軟骨組織形成制御. *日本口腔科学会雑誌* 68巻 : 179, 2019.
- Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y & Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem.* 121 : 317-324, 1997.
- 上羽 貞行. 医用強力超音波. *EBM* 5巻 : 24-28, 1991.
- Yuan Y, Zhang L, Tong X, Zhang M, Zhao Y, Guo J, Lei L, Chen X, Tickner J, Xu J & Zou J. Mechanical Stress Regulates Bone Metabolism Through MicroRNAs. *J Cell Physiol.* 232 : 1239-1245, 2017.



横関 健治

北海道医療大学歯学部

2016年3月 北海道医療大学 歯学部 卒業

2020年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 卒業

2020年4月 北海道医療大学歯科クリニック 任期制助手

2022年5月 北海道医療大学 歯学部 咬合再建補綴学分野 助教

現在に至る