

学 位 論 文 題 名

バイドロキシアパタイト移植による骨形成に
及ぼす微小電流刺激の影響

学位論文内容の要旨

歯牙喪失後、咬合・咀嚼機能の回復を目的として、従来より有床義歯、また、近年では歯科インプラントによる欠損補綴が行われている。しかし、顎堤吸収が高度な場合には、いずれの方法も困難であることが多く、高齢化社会の進行とともに、このような困難な症例はますます多くなるものと思われ、適切な顎堤形態の確保が必要であると考えられる。絶対的顎堤形成術に用いられるハイドロキシアパタイト（以下、HA）は、優れた組織親和性を有しているが、操作性、賦形性にやや難点がある。このため、初期の固定不良をおこし、材料の移動や漏出、また、粘膜の穿孔などにより、予後不良となる症例も報告されている。一方、整形外科領域においては、1953年、保田が骨に電流を流すと仮骨が生じることを報告して以来、国内・外で骨と電気の関係について多くの研究が行われ、偽関節の治療に微小電流が応用されている。そこで今回、歯科臨床における顎堤形成を想定し、無処置の頭蓋骨骨膜に微小電流刺激を与えた場合（実験1）、さらに頭蓋骨骨膜下HA移植部に、微小電流刺激を与えた場合（実験2）の骨増生の可能性について検討した。

【材料と方法】

＜実験1＞実験動物として9～10週齢、雄性Wistar系ラットを用いた。通電装置は定電流回路とし、約 $10\mu\text{A}$ の刺激電流とした。通電群においては、頭蓋部の皮膚を切開して頭蓋骨を露出、頭蓋骨骨膜上に電極部を縫合、固定し、電源部は背部皮下に埋入した。非通電群は無通電の装置を埋入した群、無処置群は外科的処置を全く加えない群とした。実験開始後5日目、1、2、4、6週目に屠殺し、HE染色を施した脱灰標本と

Villanueva bone染色を施した非脱灰標本を作製し、骨の新生過程について病理組織学的、組織計量学的に観察した。

＜実験2＞実験動物として7～8週齢、雄性Wistar系ラットを用いた。多孔質HAペレット（旭光学社製）は、直径5mm、厚さ2mm、平均気孔率55%、マイクロポアの平均気孔径 $2\ \mu\text{m}$ 、マクロポアの平均気孔径 $300\ \mu\text{m}$ 、焼成温度 1200°C とした。通電群では頭蓋骨骨膜下にHAペレットを埋入2週後、HAペレット相当部の骨膜上に電極部を縫合、固定、電源部は背部皮下に埋入した。非通電群は無通電の装置を埋入した群、無処置群はHA埋入後は無処置の群とした。通電後1、2、4週目に屠殺し、実験1と同様に標本を作製した。

実験1、2ともに、実験期間中、硬組織をラベルするために、経時的にテトラサイクリン 20mg/kg 、ならびにカルセイン 8mg/kg を投与した。また、細胞動態を観察するために、屠殺24時間前より5-bromo-2'-deoxyuridine(以下、BrdU) 25mg/kg を8時間ごとに3回投与し、BrdU免疫染色を行った。

【結果】

＜実験1＞組織学的所見：5日目では通電群において、凹凸不整の新生骨が頭蓋骨骨膜側に形成され、その周囲には類円形の骨芽細胞が密に配列していた。非通電群、無処置群においては、実験期間を通じて、通電群の様な著明な骨新生は見られなかった。1週目では、通電群において、梁状の新生骨が、特に筋付着部付近で量を増していた。新生骨には、広範囲に1週までに投与したテトラサイクリンの瀰慢性ラベリングが見られたのに対し、他群には、一定の間隔の線状のラベリングが見られた。2週目では、通電群において、新生骨は1週目に比し、緻密化しており、新生骨中には多数のreversal lineが見られた。骨表面に配列する骨芽細胞は、他群同様、扁平な形態を呈していた。4週目では通電群において、新生骨は2週目に比し、その表面はさらに平坦となっており、一部、層板構造がみられた。6週目では、通電群において、新生骨は母床骨と同等な緻密骨となり、その境界は不明瞭であった。

組織計量学的所見：通電群の新生骨量は他群に比し、多く、特に1、2、4週においては有意に高い値を示した。また、4週から6週にかけて通電群の新生骨量の増加率が鈍化した。6週においても新生骨量は多い

傾向を示した。

BrdU免疫染色所見：通電群において、梁状の新生骨表面に、他群に比し、多くのBrdU陽性細胞が観察された。頭蓋骨骨膜における通電群のBrdU陽性細胞率は、1、2週において、他群に比し、有意に高い値を示した。

＜実験2＞組織学的所見：1週目では通電群の新生骨はペレットのほぼ1/2の高さまで、また他群の新生骨はペレットのほぼ1/3の高さまで達していた。通電群における新生骨にはreversal lineがみられ、他群に比し、骨梁が太かった。また、通電群において、ペレット上端の骨膜下に孤立して新生骨が認められた。2週目では通電群の新生骨は他群に比し、やや多い傾向を示し、造血細胞で充たされた骨髓様組織が形成されていた。4週目では、各群とも新生骨はペレットの2/3の高さまで達していたが、通電群の新生骨量がやや多い傾向を示した。また、通電群の新生骨に形成された骨髓腔は他群に比し大きく、一部に脂肪髓がみられた。

組織計量学的所見：HAペレット内における通電群の新生骨量は、他群に比し、通電後1、2、4週において多い傾向を示し、特に1週においては有意に高い値を示した。

BrdU免疫染色所見：主に新生骨周囲の線維芽細胞様細胞に、BrdUを取り込むものが見られ、通電群においてより多くの陽性細胞が認められた。HAペレット内における通電群のBrdU陽性細胞率は、他群に比し、高い傾向を示し、特に1週では有意に高い値を示した。

【考察】

実験1では、通電群において骨膜の肥厚、活発な骨芽細胞の増加、梁状の新生骨形成が見られ、電気刺激が造骨系の細胞の分化・増殖能を高め、骨形成を促進したものと考えられる。通電群の新生骨の増加率は、4週から6週にかけて鈍化傾向を示した。これは、骨の改造現象や長期間の通電により、造骨系細胞の電気刺激に対する閾値が上昇し、電気刺激効果が低下したことが原因と考えられる。

実験2では、通電群の新生骨量は、1週において他群に比し有意に多かったが、2週以降は他群と同様な増加率を示した。骨形成促進効果が、実験1より短期間であったのは、HAが骨伝導能を有することや電流密度の違いが原因と考えられる。また、1週において骨膜下に孤立して新生骨

形成が見られたが、これは電気刺激により、骨膜中の骨原性細胞が、骨芽細胞へと分化したために骨が形成されたものと考えられる。

【結論】

- 1.無処置のラット頭蓋骨骨膜部、ならびに頭蓋骨骨膜下HA移植部に微小電流刺激を与えた場合、特に早期において、通電群の新生骨量は、他群に比し、有意に高い値を示した。
- 2.通電群の新生骨には、層板構造や骨髓腔の形成が見られ、特にHAペレット内の新生骨では、他群に比し、この様な所見が早期に認められた。
- 3.骨膜ならびにHAペレット内における通電群のBrdU陽性細胞率は、他群に比し、有意に高い値を示した。

以上より、微小電流刺激は特に早期において、頭蓋骨ならびに頭蓋骨骨膜下HA移植部における骨形成を促進することが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 雨 宮 瑋

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

バイドロキシアパタイト移植による骨形成に

及ぼす微小電流刺激の影響

審査は雨宮、脇田および川崎審査委員全員が出席のもとに論文提出者に対し、提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問によって行われた。

以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

歯牙喪失後、咬合・咀嚼機能の回復を目的として従来より有床義歯あるいは歯科インプラントによる欠損補綴が行われている。しかし、顎堤吸収が高度な場合にはいずれの方法も困難であることが多く、高齢化社会の進行とともにこの様な困難な症例はますます多くなるものと思われ、適切な顎堤形態の確保が必要であると考えられる。顎堤形成術に用いられるハイドロキシアパタイト（以下、Ha）は優れた組織親和性を有しているが、操作性および賦形性にやや難点があるため、初期の固定不良をおこし、材料の移動、漏出により予後不良となる症例も報告されている。一方、整形外科領域においては、微小電流による骨形成促進効果について多くの研究が行われ、偽関節の治療に臨床応用されている。

以上の状況より、本論文提出者は歯科臨床における顎堤形成を想定し、頭蓋骨に微小電流刺激を加えた場合（実験1）、さらに頭蓋骨骨膜下にHAを移植した部に微小電流刺激を加えた場合（実験2）の骨増生の可能性について検討している。

実験1では、雄性wistar系ラットを用い、通電群において頭蓋骨骨膜上に電極部を縫合、固定し、約 $10\mu\text{a}$ の直流電流を加え、微小電流刺激が骨形成に与える影響について病理組織学的、組織計量学的、免疫組織化学的に検討した。実験2では、通電群においてHaペレッ

トをラット頭蓋骨骨膜下に埋入した2週後、Haペレット相当部の骨膜上に電極部を縫合、固定し、微小電流を加え、微小電流刺激がHA移植部の骨形成に与える影響について実験1同様、検討した。本研究では実験1, 2ともに、対照群として通電群同様の外科的処置のみとし通電を行わない群と外科的処置を加えない群を設定した。実験期間中、硬組織をラベルするために経時的にテトラサイクリンならびにカルセインを投与した。また、細胞動態を観察するために屠殺24時間前より5-bromo-2'-deoxyuridine (以下、brdu) を投与し、brdu免疫染色を行っている。

以上の方法によって得られた結果ならび考察は次のとおりである。

実験1では病理組織学的に通電群の1~2週において骨膜の肥厚、活発な骨芽細胞の増加、梁状の新生骨形成が見られ、これは電気刺激が骨膜中の骨原性細胞を骨芽細胞へと分化・増殖させたために骨形成が促進されたものと考察している。4週以降、通電群の新生骨は緻密化し、6週で母床骨との境界は不明瞭となっていた。また、組織計量学的に通電群の新生骨量は対照群に比し、1~4週において有意に高い値を示したが、6週では有意な差は見られなかった。これについては、長期間の通電により造骨系細胞の電気刺激に対する閾値が上昇し電気刺激の骨形成促進効果が低下したことやモデリングの影響が原因と考えている。また、免疫組織化学的に通電群においては、梁状の新生骨表面に、他群に比し、多くのBr d U標識細胞を観察している。実験2において、病理組織学的に1週目において通電群では対照群に比し、骨梁が太く、ペレット上端の骨膜下に孤立して新生骨形成が見られ、この異所性骨形成は電気刺激が骨膜中の骨原性細胞を骨芽細胞へと分化させたために生じたものと考察している。また、4週目において通電群で大きな骨髓腔形成、一部、脂肪髄が観察された。組織計量学的に通電群の新生骨量は他群に比し多かったが、1週のみで有意な差を示し、2週以降では有意な差は見られなかった。これは電流密度の違いや新生骨量の計測部位の違いが原因と考えている。免疫組織化学的に主に新生骨周囲の線維芽細胞様の細胞にbrduを取り込むものが見られ、通電群において多くの標識細胞を観察している。

次いで本論文提出者に対して、本論文の内容に関連のある質問が行われたが、これらの質問に関してそれぞれ適切な回答が得られた。本研究は、微小電流刺激が早期において、無処置の頭蓋骨ならびに頭蓋骨骨膜下HA移植部における骨形成を促進することを明らかにし、微小電流刺激の顎堤形成術への応用の可能性を示したことが評価された。また、本論文提出者は骨形成促進効果をさらに持続する方法についても実験系を考えており、将来の展望も評価された。よって、学位

申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。