

学位論文題名

Effect of calcium carbonate on bone formation on
4-META/MMA-TBB resin

(炭酸カルシウムが4-META/MMA-TBB レジン上への骨形成に与える影響)

学位論文内容の要旨

【緒言】

4-META/MMA-TBB レジンは歯質に対する優れた接着性を有し、生体親和性もきわめて高いことから、歯根端切除術や再植術時の root-end sealing, 垂直歯根破折の接着治療、髄床底穿孔部の封鎖などに応用され、良好な成績が報告されている。しかし、その治癒形態は硬化したレジン上を軟組織が被覆するものであり、セメント質の形成は認められていない。一方、ラット頭蓋骨に4-META/MMA-TBBレジンを接着させた研究では、長期的には硬化したレジン表面にも周囲から新生骨が増生し、直接硬組織が接していたことから、セメント質が形成できる可能性が示唆されている。そこで、硬化した 4-META/MMA-TBB レジン表面にセメント質や骨などの硬組織を形成させ、強く結合をさせるために、炭酸カルシウムを添加することが有効ではないかと考えた。本研究では、炭酸カルシウムの濃度を変えて 4-META/MMA-TBB レジンに添加し、大腿骨骨髓腔内に移植して骨増生への影響や新生骨との結合状態などを評価した。

【材料・方法】

移植試料の作製:4-META/MMA-TBBレジン(スーパーボンドC&B[®]クリア, サンメディカル社)のポリマーに粒子サイズ 5~10 μ m の炭酸カルシウム(和光純薬)を 0,30,60%の重量比で混和し, 0%群, 30%群, 60%群とした。炭酸カルシウムを混和したポリマー粉末を 3/4 カップ, モノマー4 滴, キャタリスト 1 滴の割合で混和し, 内径 1mm のポリプロピレンチューブに填入, 24 時間硬化させた後に取り出し, 長さ 5mm に破断して円柱形試料とした。

移植試料の SEM 観察:各炭酸カルシウム濃度の円柱形試料を, 乾燥, 白金パラジウム蒸着後, 走査型電子顕微鏡 (SEM:S-4000, 日立ハイテクフィールドイニング)で試料破断面を観察した。

移植方法:10 週齢 Wistar 系雄性ラット 13 匹を使用し, ジエチルエーテルおよびペントバルビタールナトリウム(ソモノペンチル注射液[®], 共立製薬)を用いて全身麻酔を施した後, 左右の大腿骨中央部を露出して, 直径 1mm で皮質骨穿孔を 2 か所行なった。試料破断面が骨髓腔内に位置するように移植し, 切開部を縫合した。

光学顕微鏡観察および組織学的計測:観察期間は 2 週, 8 週とし, 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定を行った。アセトンに浸漬してスーパーボンド C&B[®]を溶解し, 5%ギ酸で脱灰, 通法に従いパラフィン包埋して薄切標本作製した。計測は試料破断面を評価部位として, 試料破断面の長さ L(μ m), 新生骨基質の長さ BL(μ m), 破断面と新生骨基質間の面積 ST(μ m²), 破断面と新生骨基質が直接接している長さ C(μ m)を計測し, 骨基質形成率(BL/L $\times$ 100)(%), 破断面と新生骨基質間の平均距離(ST/BL) (μ m), 試料と新生骨基質の接触率(C/L $\times$ 100)(%)を求めた。計測

結果は二元配置分散分析および Scheffe の多重比較検討を行った。

走査型電子顕微鏡観察:60%群の一部は、8週後に 10%中性緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定後、試料中央部で切断、脱水、乾燥、白金パラジウム蒸着後、SEM で試料破断面と新生骨との界面を観察した。

【結果】

試料破断面の SEM 観察結果:試料破断面は3群とも粗造で、炭酸カルシウムを添加した試料では立方体の炭酸カルシウム粒子が露出しており、60%群は 30%群と比較して、破断面に露出している炭酸カルシウムが多かった。

術後 2 週光学顕微鏡観察結果: 0%群では移植試料は軟組織に被包され、軟組織の外側に新生骨の形成がみられた。新生骨は薄く梁状で、骨の周囲には類円形の細胞が認められた。30%群では 0%群と同様に移植試料は軟組織で被包され、その外側に新生骨がみられた。新生骨の構造は 0%群と同様に、薄く幼弱な梁状構造をしていた。60%群では移植試料に近接した部位に新生骨が形成されており、緻密な構造であった。破断面と新生骨基質間には数層の扁平な細胞が介在していた。

術後 8 週光学顕微鏡観察結果:すべての群において炎症性細胞の浸潤は認められなかった。0%群は、術後 2 週と比べると新生骨が緻密化して破断面と近接していたが、破断面と新生骨基質の間には数層の扁平な細胞が介在していた。30%群も術後 2 週と比べると新生骨は緻密化して破断面と近接していた。破断面と新生骨基質の間には数層の細胞が介在していたが、破断面と骨基質が直接接している部分もわずかに認められた。60%群では、破断面と新生骨基質が直接接している部分が多く観察され、接していない部分でもわずかに細胞が散在しているのみであった。

組織学的計測結果: 2 週後の骨基質形成率は 0%群が $69.7 \pm 24.1\%$ ($n=8$)、30%群が $72.1 \pm 31.6\%$ ($n=7$)、60%群が $78.9 \pm 20.4\%$ ($n=7$)、8 週後はそれぞれ $86.7 \pm 7.6\%$ ($n=8$)、 $75.0 \pm 14.6\%$ ($n=7$)、 $92.7 \pm 5.2\%$ ($n=7$) であった。いずれの観察期間も 3 群間に有意差は認められず、各群の 2 週後と 8 週後の間にも有意差はなかった。

2 週後の破断面と新生骨基質間の平均距離は、0%群が $40.5 \pm 27.0\mu\text{m}$ 、30%群が $19.2 \pm 5.0\mu\text{m}$ 、60%群が $10.2 \pm 6.1\mu\text{m}$ で、60%群は 0%群に比較して有意に小さかった。8 週後はそれぞれ $10.8 \pm 8.5\mu\text{m}$ 、 $5.2 \pm 2.3\mu\text{m}$ 、 $3.3 \pm 0.9\mu\text{m}$ で、3 群間に有意差はなかった。2 週後と 8 週後を比較すると、0%群と 30%群では有意に減少していた。

2 週後の試料と新生骨基質の接触率は 0%群、30%群では 0%、60%群では $0.6 \pm 1.5\%$ であった、8 週後は 0%群が 0%、30%群が $6.6 \pm 6.5\%$ 、60%群が $18.3 \pm 8.9\%$ で、60%群は 0%群に対して有意に高かった。2 週後と 8 週後を比較すると 60%群は有意に増加していた。

試料と骨基質の接合部位の SEM 観察結果:8 週 60%群の試料と新生骨基質の接合部位では、レジン表面は凹凸状を呈しており、その表面に新生骨が増生していた。レジンと新生骨の間には間隙を認めなかった。

【考察】

炭酸カルシウムを添加した移植試料では、周囲組織にカルシウムイオンが溶出し、とくに炭酸カルシウムの混和濃度が高くなると溶出量も多くなり、試料近傍に高濃度で存在することによって、新生骨の形成が促進され、早期から骨が試料に近接、直接試料に接する範囲も増加したと考えられた。また、SEM 観察で、露出した炭酸カルシウム表面だけでなく、レジン表面にも間隙なく新生骨が形成されている部分がみられ、レジンの陥凹部にも骨基質が増生して間隙なくレジンと嵌合していたことから、レジンと新生骨の強固な結合が得られる可能性があると考えられた。

【結論】

4-META/MMA-TBB レジンに炭酸カルシウムを添加すると、レジンと骨の直接接触を高め、硬組織との結合を促進させる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 土 門 卓 文
副 査 教 授 網 塚 憲 生

学 位 論 文 題 名

Effect of calcium carbonate on bone formation on 4-META/MMA-TBB resin

(炭酸カルシウムが4-META/MMA-TBB レジン上への骨形成に与える影響)

4-META/MMA-TBB レジンは歯質に対する優れた接着性を有し、生体親和性もきわめて高いことが知られ、歯根端切除術や再植術時の root-end sealing、垂直歯根破折の接着治療、髄床底穿孔部の封鎖に応用されてきたが、その治癒形態はレジンが軟組織で被覆されており、硬化したレジン上にセメント質の形成は認められていない。一方、ラット頭蓋骨に 4-META/MMA-TBB レジンを接着させた研究では、硬化したレジン表面への硬組織形成の可能性が示されている。そこで、4-META/MMA-TBB レジン表面にセメント質を形成させ強い結合をさせるために、硬組織形成を促進し、直接硬組織と結合する材料を添加することが有効ではないかと考えた。本研究では炭酸カルシウムの濃度を変えて 4-META/MMA-TBB レジンに添加し、骨増生への影響や新生骨との結合状態などを評価した。

4-META/MMA-TBB レジンに炭酸カルシウムを 0,30,60%の重量比で混和させ、移植試料を作製し、10 週齢 Wistar 系雄性ラットの大腿骨骨髓腔に試料破断面が骨髓腔内に位置するように移植した。炭酸カルシウムを混和した濃度により、0%群(n=16)、30%群(n=14)、60%群(n=16)とした。観察期間は 2 週と 8 週として薄切標本を作製し、HE 染色を行い、組織学的観察および、骨基質形成率、破断面と新生骨基質間の平均距離、試料と新生骨基質の接触率について組織学的計測および統計学的処理を行った。

術後2週では、0%群は移植試料は厚い軟組織に被包され、その外側に新生骨が形成がされた。新生骨は薄く梁状であった。30%群でも移植試料は厚い軟組織で被包され、その外側に新生骨が形成された。新生骨の構造も、0%群と同様に幼弱な梁状構造をしていた。破断面と新生骨基質間の軟組織は 0%群と比べるとやや薄かった。60%群では移植試料に近接した部位で新生骨が形成されており、緻密な構造が観察された。術後8週では、0%群は、術後 2 週と比べると、新生骨は緻密化し、破断面と近接した部位で観察された。破断面と新生骨基質間には数層の細胞が介在していた。30%群も術後 2 週と比べると、新生骨は緻密化しており、破断面と近接した部位で観察された。破断面と骨基質が直接接している部分もわずかに認められた。60%群では、破断面と新生骨基質が直接接している部分が多く観察された。

骨基質形成率は 2 週後 0%群は $69.7 \pm 24.1\%$ 、30%群は $72.1 \pm 31.6\%$ 、60%群は $78.9 \pm 20.4\%$ であった。8 週後はそれぞれ $86.7 \pm 7.6\%$ 、 $75.0 \pm 14.6\%$ 、 $92.7 \pm 5.2\%$ であった。どちらの観察期間も、3 群間に有意差は認めず、2 週後と 8 週後の同じ群を比較しても有意差は認めなかった。破断面と新生骨基質間の平均距離は、2 週後、0%群は $40.5 \pm$

27.0 μ m, 30%群は 19.2 $\pm$ 5.0 μ m, 60%群は 10.2 $\pm$ 6.1 μ m であった。60%群は 0%群に比較して有意に小さい値であった。8 週後はそれぞれ 10.8 $\pm$ 8.5 μ m, 5.2 $\pm$ 2.3 μ m, 3.3 $\pm$ 0.9 μ m であった。3 群間に有意差は認めなかった。2 週後と 8 週後を比較すると、0%群, 30%群では有意に減少していた。試料と新生骨基質の接触率は、2 週後では、すべての群で直接接している部分は見られなかったが、8 週後では、30%群では 6.6 $\pm$ 6.5%, 60%群では 18.3 $\pm$ 8.9%で、60%群は 0%群に対して有意に高かった。2 週後と 8 週後を比較すると 60%群では有意に増加していた。8 週 60%群を SEM で観察すると、新生骨が、間隙なくレジンと嵌合している部分が観察された。

4-META/MMA-TBB レジンに炭酸カルシウムを添加すると、レジンと骨の直接接触を高め、硬組織との結合を促進させる可能性が示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。主な質問内容は以下のとおりである。

- (1) 炭酸カルシウムを選択した理由
- (2) 皮質骨表面に 4-META/MMA-TBB レジンは長期にわたって接着するのか
- (3) 新生骨が移植試料に経時的に近接する現象についてどう考えるか
- (4) 移植後初期の観察をする必要性について
- (5) 移植試料と新生骨間に介在する細胞についてどう考えるか
- (6) 連続切片にして観察した場合に考えられる組織所見について
- (7) 今後の研究の展開と将来の展望

これらの質問に対して、申請者はいずれにも適切かつ明快な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は 4-META/MMA-TBB レジンに炭酸カルシウムを添加すると、レジンと骨の直接接触を高め、硬組織との結合を促進させる可能性を示唆し、レジンのさらなる臨床応用への可能性を示したことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。