ワルファリンカリウム投与ラットの抜歯窩 治癒過程に関する研究

郷 真奈武

Healing process of tooth extraction wound in warfarin-treated rats

Manabu Go

Abstract: Warfarin which antagonizes vitamin K is clinically used as a anticoagulant agent. However, the effect of warfarin on bone remodeling is still unclear.

The present study was to investigate the effect of warfarin on the healing process of tooth extraction wounds. Sprague-Dawley male rats were injected with warfarin according to the maintenance protocol by Price as the experimental group. Rats without the injection were used as the control group. The upper first molars of rats were extracted in both groups. These rats were killed on days 1, 2, 4, 7, and 10 and on weeks 2, 3, 4, and 6 postoperatively. Serial histological sections were stained with hematoxylin and eosin for light microscopy. And the osseous healing process was observed on day 4 and on weeks 1, 2, 3, 4, and 6 after extraction by microradiography.

The results obtained were as follows:

1. Warfarin-treated rats demonstrated that the number of mesenchymal cells and new capillaries were less than that of the control in the early stage after extraction.
2. New bone formation in the sockets of control rats initiated on day 4 after operation, however, new bone formation in experimental rats was delayed and the number of osteoblasts were less than that of the control. In both groups, the new bone occupied the middle 2/3 of the socket on week 1, lower 4/5 on day 10, and whole socket on week 2, respectively. No significant difference was found in the location of new bone between the control and experimental groups. However, the thickness and volume of new bone were statistically different between the groups.
3. The control group showed that osteoclasts appeared in the socket wall and fundus on day 1. They increased and reached a maximum number on day 2, and disappeared after day 4. In contrast, the experimental group demonstrated that osteoclasts appeared within on day 2, and reached a maximum number on day 4 and dispersed on day 10.
4. 6 weeks after extraction, there were almost no remarkable differences between the experimental group and the control group.

These results prove that warfarin delayed the healing process of soft tissue and the new bone formation in the early stage of wound healing, suggesting that warfarin affected the proliferation and the metabolism of mesenchymal cells, osteoblasts and osteoclasts.

Key words: warfarin (ワルファリン), tooth extraction wound (抜歯創), bone formation (骨形成)

緒 言

ワルファリンは、心筋梗塞、脳梗塞、肺塞栓症および腎疾患などの治療に抗凝血薬として広く用いられている。これは、ワルファリンに血液凝固第Ⅱ、Ⅶ、ⅨおよびⅩ因子やプロテインC、Sなどの生合成をビタミンKと拮抗して阻害し、血栓形成を抑制する働きがあるためである。硬組織中にはビタミンK依存性の蛋白質、オステオカルシンがあることから、硬組織への影響も考えられる。

Price ら¹⁾は、ラットにワルファリンとビタミンKを投与してビタミンK欠乏の動物モデルを作り、8か月間連日投与を行った場合に脛骨骨端軟骨に石灰化異常が起ったと報告している。しかし、一方ではワルファリンを投与したラットの橈骨を骨折させても、その治癒に大きな影響はないという結果も報告²⁾されている。また、抜歯創に関しては Vinckier ら³⁾がワルファリンを投与したウサギの抜歯創の閉鎖が遅れたことを報告しているに過ぎない。このように、ワルファリンの石灰化や抜歯創に対する影響についてはまだあきらかにされていない。

そこで著者は、ワルファリンが抜歯窩の治癒にどのような影響を与えるかを検討する目的で、ラットを使って実験を行った。

実験方法

1. 実験動物

Sprague-Dawley 系ラットを交配させ、出生したラットを実験に用いた。実験期間中は標準固形飼料 MF (オリエンタル酵母) および水道水により飼育した。

2. 投与方法

Price ら²⁾の方法に従って生後1日目から仔にワルファリンカリウム (ワルファリン®, エーザイ) 7.7 mg/

100 g、ビタミンK₁ (ケーワン®, エーザイ) 1.5 mg/100 g を連日背部皮下に投与した。ただしケーワン®は21日目からは 0.8 mg/100 g、50日以降は 0.4 mg/100 g に減らした。母獣には 3.0 mg/100 g (仔の平均体重) のケーワン®を与えた (図1)。投与は抜歯の3日前から中止し、術後翌日から再開した。なお無投与のものを対照として用いた。

3. 抜歯

6週齢になった雄性ラットの上顎第1臼歯をエーテル麻酔後、探針で抜去した。抜歯創はナイロン糸により縫合し、可及的に閉鎖した。

4. 観察方法

1) 組織学的観察

術後1, 2, 4, 7, 10日, 2, 3, 4週および6週に各群3匹をエーテル麻酔下で大腿動脈を切断して脱血死させ、上顎骨を採取した。10%中性ホルマリン液で固定後、蟻酸・クエン酸ナトリウム混合溶液で脱灰し、パラフィン包埋を行った。

次いで厚さ 5 μm の前額断切片を作製し、通法に従いヘマトキシリン-エオジン染色を施し鏡検した。

2) マイクロラジオグラムによる観察

術後4日, 1, 2, 3, 4週および6週に各群3匹を組織標本と同様の方法で標本を採取後、10%中性ホルマリン液で固定し、通法に従いポリエステル樹脂に包埋して厚さ 50 μm の前額断研磨標本を作製した。マイクロラジオグラムの撮影には Softex CMR 型(日本ソフテックス社)を使用した。撮影条件は焦点-被写体間距離40 mm, 管電圧 7.5 kV, 管電流 3 mA, 露出時間35分で、フィルムは Type SO-343 (Eastman Kodak 社) を使用した。

結 果

1. 組織学的観察

1) 対照群

写真 1 対照群：抜歯後 1 日

窩内は赤血球と線維素網で満たされていた。窩壁および窩底部では窩内に向かって増殖する未分化間葉細胞と多数の新生血管が認められた。

写真 2 対照群：抜歯後 1 日

窩壁に接して好酸性の細胞質を有し、数個の核をもった破骨細胞が散在していた。

(1) 抜歯後 1 日 (写真 1)

抜歯窩内は赤血球と線維素網で満たされ、口蓋側の窩縁部には炎症性細胞が多数認められた。窩壁には断裂した歯根膜が残存し、窩壁および窩底部から窩内に向かう未分化間葉細胞の増殖と多数の新生血管が認められた。また、窩壁に接して好酸性の細胞質を有し、数個の核をもった破骨細胞が散在していた (写真 2)。一方、抜歯窩に隣接する骨髓腔には破骨細胞が多数認められた。

(2) 抜歯後 2 日

窩口部から窩中央部にかけては赤血球および線維素網

写真 3 対照群：抜歯後 4 日

窩壁付近には好酸性の新生骨基質が認められた。

写真 4 対照群：抜歯後 4 日

新生骨基質の周囲には、好塩基性の細胞質を有する橢円形の骨芽細胞が単層に配列していた。

で満たされ、窩壁には歯根膜が残存していた。口蓋側の窩縁部には炎症性細胞がみられ、窩壁および窩底部から窩中央部に向かって未分化間葉細胞が線維素網に入り込んで増殖し、多数の新生血管がみられた。また、窩壁や隣接する骨髓腔には多数の破骨細胞がみられた。

(3) 抜歯後 4 日 (写真 3)

窩口部の窩壁には歯根膜の残存が認められ、窩口部には炎症性細胞と血餅がみられた。窩壁および窩底部から窩中央部にかけて、未分化間葉細胞が旺盛に増殖していた。窩壁付近には好酸性の新生骨基質を認め、その周囲には好塩基性の細胞質を有する橢円形の骨芽細胞が単層に配列していた (写真 4)。また、窩内の新生血管の数

写真 5 対照群：抜歯後1週

梁状の新生骨が抜歯窩の中 2/3 を満たしていた。この新生骨は互いに連絡して網目を作っていた。

写真 6 対照群：抜歯後10日

窩底を除き、梁状に形成された新生骨は厚みを増して抜歯窩の約 4/5 の高さまで達していた。

は減じていた。窩壁には破骨細胞がわずかに認められたが、隣接する骨髓腔にはほとんどみられなかった。

(4) 抜歯後1週(写真5)

窩口部では線維素網や炎症性細胞は消失し、未分化間葉細胞が多数みられた。そして、梁状の新生骨は互いに連絡して網目を作り、抜歯窩の中 2/3 を満たしていた。この網目のなかには幼若な結合組織と太い血管とがみられ、新生骨面には紡錘形の骨芽細胞が単層に配列していた。窩壁や隣接する骨髓腔では破骨細胞はほとんどみられなかった。また、窩底部では線維性結合組織のなかに太い血管が認められた。

(5) 抜歯後10日(写真6)

窩口部の新生骨は窩縁部よりも陥凹し、その窩口部を覆う外骨膜が認められた。窩底部を除き、梁状に形成された新生骨はその厚みを増して抜歯窩の約 4/5 の高さまで達し、そのおのおのが連絡して網目を作っていた。その網目のなかには線維性結合組織がみられ、血管は太くなり洞様血管となっていた。新生骨面には紡錘形の骨芽細胞が単層に密に配列していたが(写真7)、破骨細胞はほとんど認められなかった。

(6) 抜歯後2週(写真8)

窩口部の新生骨表面には外骨膜が認められた。新生骨は厚みを増し、その骨と骨との間の空隙は狭くなり、抜歯窩はほぼ新生骨で満たされていた。抜歯窩の口蓋側では窩壁が吸収と新生骨の添加で連続性を失い、隣接する骨髓腔と交通していた。そして、新生した骨と骨との間

写真 7 対照群：抜歯後10日

新生骨面には、紡錘形の骨芽細胞が単層に密に配列していた。

には骨髓組織が認められた。また、窩底部では線維性結合組織がみられ、周囲骨に接して扁平な骨芽細胞が単層にまばらに配列していた。

(7) 抜歯後3週(写真9)

窩口部は窩縁部よりも陥凹し、窩内は厚みを増した新生骨で満たされていた。新生した骨と骨との間の空隙は狭くなり、なかには細い新生血管と骨髓組織が認められた。口蓋側の窩壁では新生骨との境界が不明瞭となり、隣接する骨髓腔と交通していた。窩底部には線維性結合組織が残存していたが、その範囲は縮小していた。

写真 8 対照群：抜歯後2週

抜歯窩は、窩底部を除きほぼ新生骨で満たされていた。

写真 10 対照群：抜歯後4週

抜歯窩は新生骨で密に満たされ、骨髓腔はきわめて狭くなっていた。

写真 9 対照群：抜歯後3週

窩内は厚みを増した新生骨で満たされ、新生した骨と骨との間には骨髓組織が認められた。

(8) 抜歯後4週(写真10)

窩口部の新生骨はわずかに窩底側に陥凹し、窩縁部は丸みを帯び、既存骨と新生骨との境界は頰側の窩壁では明瞭であるが、口蓋側の窩壁では吸収と新生骨の添加の

ため不明瞭となっていた。抜歯窩は新生骨で密に満たされ、骨は厚みを増して骨髓腔はきわめて狭くなり、新生骨内には骨細胞が多数みられた。新生した骨と骨の間には骨髓組織が認められたが、窩底部では線維性結合組織が残存し、周囲の骨に接して扁平な骨芽細胞が認められた。

(9) 抜歯後6週(写真11)

窩口部の新生骨表面は平坦となり、頰側窩縁部は吸収されて新生骨と既存骨とは自然移行していた。窩口部では新生骨はさらに厚みを増し、窩中央部では骨髓腔が拡大して新生骨は細くなっていた。また、窩底部に残存していた線維性結合組織はほとんどみられなくなっていた。

2) 実験群

(1) 抜歯後1日(写真12)

抜歯窩内は赤血球と線維素網で満たされ、窩口部には炎症性細胞が多数みられた。窩壁および窩底部にはところどころ歯根膜が残存し、窩壁の小孔の近くと窩底部の骨面の一部のみ未分化間葉細胞の増殖と血管の新生がみられた。窩壁には破骨細胞は認められなかったが、抜歯窩に隣接する骨髓腔には好酸性の細胞質を有し、数個の核をもった破骨細胞が多数認められた。

(2) 抜歯後2日

窩口部には線維素網や炎症性細胞の浸潤が認められた。窩壁には歯根膜が残存し、窩中央部には血餅がみられた。この血餅に向かい窩底部から未分化間葉細胞が増殖していたが、窩口部ではみられず、また血管の新生も

写真 11 対照群：抜歯後 6 週

窩中央部では新生骨は細くなり、骨髓腔が拡大していた。

写真 13 実験群：抜歯後 4 日

新生骨基質の形成は認められなかった。

写真 12 実験群：抜歯後 1 日

窩内は赤血球と線維素網で満たされていた。窩壁の小孔の近くと窩底部の骨面の一部にのみ未分化間葉細胞の増殖と血管の新生がみられた。

写真 14 実験群：抜歯後 4 日

未分化間葉細胞や楕円形の細胞がみられたが、その数は少なかった。

窩口部では炎症性細胞がほとんど消失し、窩口部から窩中央部にかけては線維素網が残存し、窩中央部には血餅がみられた。この血餅に向かい窩底部および窩壁から窩中央部にかけて紡錘形の未分化間葉細胞や楕円形の細胞がみられたがその数は少なく、新生血管もわずかであった（写真14）。また、窩壁や窩底部および抜歯窩に隣接する骨髓腔では破骨細胞が散見された。

(4) 抜歯後 1 週（写真15）

窩口部の線維素網は消失していたが、窩中央部にはわずかに赤血球が残存していた。口蓋側の窩壁は吸収を受け、窩壁からは梁状の新生骨が抜歯窩の約 2/3 の高さま

少なかった。破骨細胞は窩壁に接して点在し、抜歯窩に隣接する骨髓腔では散見された。

(3) 抜歯後 4 日（写真13）

写真 15 実験群：抜歯後1週

梁状の新生骨形成はみられるが、窩中央部には赤血球が残存していた。

写真 16 実験群：抜歯後10日

抜歯窩の約4/5の高さまで梁状の新生骨が形成されていた。

で形成されているものや、窩中央部に達していないものなどさまざまであった。新生骨面には紡錘形の骨芽細胞が単層に配列し、新生した骨と骨との間には幼若な結合組織がみられたが、新生血管はまばらであった。また、窩壁や窩内に形成された新生骨面には数個の核をもった破骨細胞が点在していたが、隣接する骨髓腔にはみられなかった。窩底部では線維性結合組織が残存していた。

(5) 抜歯後10日 (写真16)

窩口部では新生骨の表面に接して線維性結合組織が認められた。抜歯窩の約4/5の高さまで梁状の新生骨が形成され、新生骨面には紡錘形の核を有する扁平な骨芽細胞がみられた。また、新生骨面に破骨細胞が認められるところもあった。口蓋側の窩壁では隣接する骨髓腔と交通するところがあり、骨髓組織は窩内に入って新生した骨と骨との間を埋め、骨髓組織と線維性結合組織とが混在しているところもあった (写真17)。窩底部に残存している線維性結合組織中にも、骨髓組織が一部にみられた。

(6) 抜歯後2週 (写真18)

窩口部では新生骨は陥凹し、その表面には外骨膜が認められた。窩底部に残存している線維性結合組織の占める範囲は縮小し、細胞の数も減少していた。新生骨は厚みを増し、抜歯窩はほとんど新生骨で満たされていた。新生した骨と骨との間には骨髓組織が認められたが、窩内には破骨細胞はみられなかった。

(7) 抜歯後3週 (写真19)

窩口部の新生骨表面は平滑で、窩縁部の骨は吸収され

写真 17 実験群：抜歯後10日

新生した骨と骨の間には骨髓組織と線維性結合組織とが混在しているところもみられた。

て丸みを帯び、窩壁の一部は吸収されて骨髓腔と交通して新生骨と既存骨との境界は不明瞭となっていた。線維性結合組織のみられる窩底部を除き、窩内は新生骨で満たされて、新生した骨と骨の間には骨髓組織が認められた。

(8) 抜歯後4週 (写真20)

窩中央部の骨髓腔は拡大し、窩内では新生骨は細くなっていた。新生骨内には骨細胞が認められ、新生した骨と骨の間は骨髓組織で満たされていたが、窩底部には線維性結合組織が残存していた。

(9) 抜歯後6週 (写真21)

写真 18 実験群：抜歯後 2 週

抜歯窩は窩底部を除き、厚さを増した新生骨で満たされていた。

写真 20 実験群：抜歯後 4 週

窩内では新生骨は細くなっていた。

写真 19 実験群：抜歯後 3 週

窩内は新生骨で満たされ、新生骨と既存骨とは不明瞭となっていた。

写真 21 実験群：抜歯後 6 週

窩中央部は骨髓腔で満たされていた。

窩口部の新生骨は厚みを増し、既存骨のそれとほぼ同じになっていた。窩中央部では新生した骨と骨との間は拡大し、骨髓組織で満たされていたが、窩底部には線維性結合組織がわずかに残存していた。

2. マイクロラジオグラムによる観察

1) 対照群

(1) 抜歯後 4 日

抜歯窩内に新生骨の形成は認められなかった。

(2) 抜歯後 1 週 (写真22)

抜歯窩には窩壁から斜めに窩口部に向かう石灰化度の

写真 22 対照群：抜歯後1週

窩壁から斜めに窩口部に向かって新生骨が形成されていた。

写真 24 対照群：抜歯後3週

新生骨は太い梁状となり、新生した骨と骨との間は狭くなっていた。

写真 23 対照群：抜歯後2週

新生骨は石灰化度を増し、梁状となっていた。

写真 25 対照群：抜歯後4週

梁状の新生骨は太くなり、一部では既存骨との差が不明瞭となっていた。

低い杆状の細い新生骨がみられ、窩口部側 1/4がこの新生骨で覆われていた。窩底部および窩中央部にはまだ新生骨の形成はみられなかった。

(3) 抜歯後2週(写真23)

新生骨は石灰化度を増して梁状となり、その骨面は凹凸不整であった。骨小腔は既存骨のものに比べて大きく、その形態はさまざまであった。また、窩底部には新生骨の形成はみられなかった。

(4) 抜歯後3週(写真24)

抜歯窩は窩底部の一部を除き、新生骨で満たされてい

た。新生骨は太い梁状となり、互いに連絡して新生した骨と骨との間は狭くなっていた。新生骨は既存骨との境界が一部で不明瞭となっていた。新生骨内の骨小腔は既存骨のものに比べて大きいものが多く、その形態は円形や長楕円形など不整であったが、その配列は既存骨のものと同様となっていた。

(5) 抜歯後4週(写真25)

写真 26 対照群：抜歯後 6 週

新生骨は石灰化度を増し、既存骨と連続して境界は消失していた。

写真 28 実験群：抜歯後 2 週

新生骨には塊状、多角形状あるいは梁状のものがみられた。

写真 27 実験群：抜歯後 1 週

石灰化度の低い新生骨が形成されていたが、窩中央部には達していなかった。

抜歯窩は新生骨で満たされていた。梁状の新生骨は太く、その石灰化度を増して一部では既存骨との差が不明瞭となっていた。そして、新生骨内の骨小腔の大きさや形態は既存骨のものとはほぼ同程度となっていた。

(6) 抜歯後 6 週 (写真26)

窩口部では新生骨は厚みと石灰化度を増し、既存骨と連続して境界が消失していた。そして、新生骨内の骨小腔は既存骨のものと大きさや形態が同様であった。窩中

央部および窩底部ではごく少数の太い梁状の新生骨がみられ、骨髓腔が形成されていた。

2) 実験群

(1) 抜歯後 4 日

抜歯窩内に新生骨の形成は認められなかった。

(2) 抜歯後 1 週 (写真27)

窩壁から斜めに窩口部に向かう石灰化度の低い多角形あるいは棍棒状の新生骨が形成されていたが、窩中央部には達していなかった。また、窩口部および窩底部には新生骨の形成はみられなかった。

(3) 抜歯後 2 週 (写真28)

新生骨は窩口部側 1/3 を覆い、窩内では塊状、多角形状あるいは梁状のものがみられたが、その石灰化度は既存骨に比べて低かった。新生骨面は凹凸不整で骨小腔の形態もさまざまで、既存骨のものに比べて大きいものが多かった。また、窩底部には新生骨の形成はみられなかった。

(4) 抜歯後 3 週 (写真29)

太い梁状の新生骨で抜歯窩は満たされていたが、窩底部には骨の形成はみられなかった。新生骨は石灰化度を増し、新生骨と既存骨との境界は不明瞭となっていた。新生骨内の骨小腔の大きさは小さくさまざまで、既存骨のものよりも大きいものも多く、配列も一定していなかった。また、窩底部でも既存骨に接する部分では新生骨の添加がみられた。

(5) 抜歯後 4 週 (写真30)

新生骨の石灰化が進み、厚みを増して既存骨との差がほとんどなくなっていた。また、新生骨内の骨小腔の大

写真 29 実験群：抜歯後3週
新生骨は太い梁状となっていた。

写真 30 実験群：抜歯後4週
新生骨の石灰化が進み、既存骨との差がほとんどなくなっていた。

きさもほぼ既存のものに近くなっていた。窩中央部および窩底部には太い梁状の新生骨が散在していた。

(6) 抜歯後6週 (写真31)

窩口部では新生骨は厚みと石灰化度を増し、既存骨と連続していた。新生骨内の骨小腔は、既存のものと大きさや形態は同様であった。窩中央部および窩底部では少数の太い梁状の新生骨がみられ、骨髓腔は拡大していた。

写真 31 実験群：抜歯後6週
窩口部の新生骨は厚みを増して、既存骨と連続していた。

考 察

1. ワルファリン投与ラットの抜歯窩の治癒過程

1) 軟組織の治癒について

Vinckier ら³⁾は、ワルファリン投与時における抜歯後の治癒過程を観察するために、ウサギにワルファリンを投与してプロトンビン時間を60~90秒に保った状態で上下前歯を抜去した。その結果、対照群では5日から8日で抜歯創が閉鎖されたのに対して、ワルファリン投与群では8日から15日を要したと述べている。またDodds ら⁴⁾は、ワルファリンと同じクマリン系の薬剤でビタミンKと拮抗作用のあるジクマロールをラットに投与し、中足骨を骨折させる実験を行った。そして、ビタミンKが欠乏するために骨折部ではグルコース6-リン酸脱水素酵素の活性が低下し、ペントースリン酸経路のNADPH(還元型ニコチンアミドジヌクレオチドリン酸)合成が阻害されるために、細胞の代謝や石灰化に影響を及ぼすと報告している。

本実験において対照群では、血餅が抜歯直後から窩全体を満たし、4日では窩口部にわずかに認められるのみとなり、1週では消失していた。また、未分化間葉細胞や新生血管は抜歯後1日より窩壁および窩底部から窩中央部に向かって旺盛に増殖し、4日では窩全体に認められた。これに対して実験群では、血餅が1週になってもまだ窩中央部に残存し、未分化間葉細胞や新生血管は対照群に比べて抜歯直後から数が少なく、この傾向は術後3週においてもみられた。本実験では抜歯窩を閉鎖創としたため、上皮の治癒を比較することはできなかったが、実験群では未分化間葉細胞の増生が遅れ、それに続く血

管新生も遅延していた。これは Dodds らが述べているように、細胞の代謝が低下したためと考えられる。さらに、ワルファリンの影響により血液凝固が延長して血餅の形成が遅れ、しかも抜歯窩内に血餅が長く残存したために器質化が遅れたのではないかと考えられる。

2) 硬組織の治癒について

(1) 新生骨形成への影響

Price ら¹⁾はワルファリンを8か月間ラットに投与し続けると、脛骨骨端軟骨に石灰化異常が生じて骨の成長が10%抑制されたと報告している。武藤⁵⁾は、ラットにビタミンK欠乏食を与え、さらにワルファリン 0.5 mg/kg の隔日投与を行っても、長骨にはX線学的、組織学および生体力学的に異常を認めなかったと述べている。また、Price ら²⁾はワルファリンをラットに投与して橈骨を骨折させ、骨折部をX線学的に調べた結果では、対照群との間に大きな差を認めなかったと報告している。一方、Dodds ら⁴⁾はジクマロールを投与したラットの中足骨を骨折させた実験で、骨折部の仮骨の大きさには差はみられなかったが、仮骨部分での骨の形成量が少なく、術後12日には正常群では骨折部位に線維性軟骨様組織が形成されていたが、実験群では同部には線維性組織が存在し、石灰化の時期が著明に遅れたと報告している。また、妊娠中にワルファリンを妊婦が服用した場合、新生児の軟骨に石灰化異常が起こることが報告されている⁶⁾。このことはラットを用いた実験⁷⁾でも示されている。

硬組織中にはビタミンKに依存し、骨芽細胞で合成されるオステオカルシン^{8,9)}と呼ばれる蛋白質が含まれている。オステオカルシンは Ca^{2+} やハイドロキシapatite と結合するために、骨形成に関与していると考えられている。動物をビタミンK欠乏状態にすると、ビタミンK依存性血液凝固因子が欠乏して出血傾向が現れ、実験が困難となる。そこでこの問題を解決するために、Price らは高濃度のワルファリンを投与すると同時に必要最少量のビタミンKを与えて出血を防ぎ、しかも骨中のオステオカルシンの低下を観察できる実験系を開発した^{2,10)}。この場合、骨中のオステオカルシン合成が37日で正常の約8%、3か月では約2%に抑えられたとPrice ら²⁾は報告している。本実験ではPrice らの方法に従ってワルファリン投与を行ったため、抜歯を行った6週以降でもラットのオステオカルシウム合成量は減少していると考えられる。

抜歯窩治癒過程に関する研究で、松下¹¹⁾はWistar系ラットを用いて本実験と同じ部位で抜歯を行い、抜歯後3日に新生骨形成がみられ、1週で抜歯窩の2/3の高さまで新生骨が形成され、10日では3/4まで満たすようになり、2週になると抜歯窩内をほぼ満たしたと報告している。斉藤¹²⁾は、Wistar系ラットの抜歯窩をマイクロラジオグラムを用いて観察したところ、術後3日では明

瞭な新生骨形成はみられなかったと述べている。本実験のマイクロラジオグラムの所見でも、両群とも抜歯後4日では明瞭な新生骨の形成はみられなかった。しかし組織学的所見においては、対照群の4日に好酸性の骨基質が認められ、その周囲には楕円形の核をもった骨芽細胞が出現していたのに対して、実験群では楕円形の細胞がみられたが、その数はまばらで新生骨の形成も認められなかった。1週では両群とも抜歯窩の中2/3の部分に新生骨が形成され、紡錘形の骨芽細胞が新生骨面に認められていたが、実験群では新生骨は細く、骨と骨との間の結合組織中にみられる細胞数も少なかった。10日では両群ともに新生骨が抜歯窩の高さの4/5まで満たしていたが、新生骨面にみられる骨芽細胞は実験群の方が少なく、また実験群では、新生した骨と骨との間に骨髓組織が認められた。2週以降は次第に実験群でも新生骨が厚みを増してきたが、梁状の新生骨は実験群の方が細く、3週になると両群の間の差は少なくなり、6週では両群の間にはほとんど差はみられなくなった。

前述したように、ワルファリン投与により細胞の代謝が低下したために、未分化間葉細胞だけでなく骨芽細胞も実験群では数が少なかったと考えられる。また、オステオカルシンの合成が抑制されたことも新生骨形成に影響を及ぼしたものと思われる。

(2) 破骨細胞への影響

オステオカルシンは、破骨細胞前駆体と考えられている単球に対して走化活性を有すること¹³⁻¹⁵⁾、また活性型ビタミンDによって合成量が増大すること^{16,17)}、さらにワルファリン投与を行ったラットの長骨を移植した実験¹⁸⁻²¹⁾では移植骨が吸収されにくく、破骨細胞の数が少なかったことなどから、骨吸収にも関与していると考えられている。

進藤²²⁾、飯塚²³⁾、細川²⁴⁾らは、Wistar系ラットを用いて、上顎第1臼歯の抜歯後における遠心中隔歯槽骨にみられる破骨細胞数を測定し、2.5~3日にかけて破骨細胞数は最も多くなると報告している。また、何²⁵⁾はWistar系ラットの下顎第2臼歯を抜去し、術後3日で窩内の破骨細胞数は最も多くなると述べている。また三木²⁶⁾はSD系ラットの下顎第1臼歯を抜去し、術後3日ですぐ破骨細胞数はピークとなり、その後減少して、10日頃から再び増加しはじめて、21日に細胞数がもう一度ピークに達したと報告している。

本実験において破骨細胞は、対照群では抜歯後1日に窩壁に認められ、2日に最も多く、4日以降はほとんどみられなかった。これに対して実験群では、抜歯後1日にはみられず、2日より点在しはじめ、4日には散在し、10日においてもわずかに認められた。

本実験の対照群においては他の研究結果と同様、2~4日頃に破骨細胞の出現が多数観察されたが、実験群では破骨細胞の数は対照群よりも少なく、また4日以降

10日においても破骨細胞が認められた。両者の間には形態的な大きな違いはみられなかったが、出現時期と数に差が認められ、ワルファリン投与によりオステオカルシンの合成が抑制されたことが破骨細胞に影響したのではないかと考えられた。

2. ワルファリン投与患者への留意点

ワルファリンには抗血栓作用があり、通常、抜歯などの外科処置に関しては術前に投与を中止したり、あるいは減量するなどの対策を講じなければならない。しかし、式守²⁷⁾は経口抗凝固薬物療法の患者の抜歯を施行する場合、局所止血を十分に考慮すれば経口抗凝固薬物療法を中断したり減量する必要がないと報告している。

今回の実験では、術前にワルファリン投与を中止して抜歯を行ったため止血に問題は生じなかった。本実験結果よりワルファリンを投与したラットの抜歯窩において、新生骨の形成は対照群とほぼ同じ範囲にみられたが、形成された新生骨は対照群に比べ細かった。しかし、術後6週では対照群との間に差はなく、臨床的に問題はないと考えられた。ただ抜歯初期において軟組織の治癒や新生骨の形成時期に遅延がみられ、術後の早期における感染に対して注意が必要と思われる。

今回の実験では、ワルファリン投与により骨芽細胞や破骨細胞などへの影響が示唆された。しかし、ワルファリンの薬理作用は多岐にわたっており、今後さらに電顕的あるいは酵素組織化学的な検索が必要であると思われる。

結 語

ラットにワルファリンを投与し、抜歯窩の治癒過程に対する影響を検討し、以下の結果を得た。

1. 抜歯後初期の未分化間葉細胞や新生血管の数はワルファリン投与群の方が対照群よりも少なかった。

2. 新生骨は、対照群では抜歯後4日に形成されたが、実験群では形成が遅れ、骨芽細胞の数も少なかった。両群とも1週になると新生骨は抜歯窩の中2/3に形成され、10日では抜歯窩の4/5の高さまで達し、2週で抜歯窩全体をほぼ満たしていた。実験群と対照群との間では、新生骨の形成される部位に大きな差はみられなかったが、梁状に形成された新生骨の厚みは実験群の方が細く、形成量には差が認められた。

3. 破骨細胞は、対照群では抜歯後1日に窩壁および窩底部に認められ、2日に最も多く、4日以降はほとんどみられなかった。これに対して、実験群では抜歯後1日にはみられず、2日より点在しはじめ、4日には散在し、10日においても少数認められた。

4. 6週では両群の間に大きな差は認められなかった。

以上の結果から、ワルファリンの投与により創傷治癒

の初期において軟組織の治癒や新生骨の形成が遅れることが判明し、未分化間葉細胞、骨芽細胞および破骨細胞の増殖や代謝に影響を与えることが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った大阪歯科大学口腔外科学第2講座恩師岡野博郎教授に深謝いたしますとともに、ご指導、ご援助をいただきました大阪歯科大学口腔外科学第2講座中嶋正博助手ならびに非常勤講師志水秀郎博士に深く感謝いたします。さらに本研究の遂行にご協力いただいた大阪歯科大学口腔外科学第2講座教室員各位に謝意を表します。

また、ワーファリン®およびケーワン®をご提供いただいたエーザイ㈱に謝意を表します。

なお、本研究の一部は平成3年度大阪歯科大学学術研究奨励助成金およびエーザイ㈱の援助金により行われた。

本論文の要旨は、第36回日本口腔外科学会総会(平成3年10月2日、吹田市)において発表した。

引用文献

- 1) Price, P.A., Williamson, M.K., et al.: Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7734-7738 1982.
- 2) Price, P.A. and Williamson, M.K.: Effects of warfarin on bone. Studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone. *J Biol Chem* 256: 12754-12759 1981.
- 3) Vinckier, F. and Vermynen, J.: Wound healing following dental extractions in rabbits: effects of tranexamic acid, warfarin anti-coagulation, and socket packing. *J Dent Res* 63: 646-649 1984.
- 4) Dodds, R.A., Catterall, A., et al.: Effects on fracture healing of an antagonist of the vitamin K cycle. *Calcif Tissue Int* 36: 233-238 1984.
- 5) 武藤芳照: ビタミンKと骨代謝—ビタミンK欠乏の影響と γ -カルボキシグルタミン酸について—, *日整会誌* 54: 1733-1743 1980.
- 6) Hall, J.G., Pauli, R.M., et al.: Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy. *Am J Med* 68: 122-140 1980.
- 7) Feteih, R., Tassinari, M.S., et al.: Effect of sodium warfarin on vitamin K-dependent proteins and skeletal development in the rat fetus. *J Bone Miner Res* 5: 885-894 1990.
- 8) Hauschka, P.V., Lian, J.B., et al.: Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized ti-

- ssue. Proc Natl Acad Sci USA 72: 3925-3929 1975.
- 9) Price, P.A., Otsuka, A.S., et al.: Characterization of a γ -carboxyglutamic acid containing protein from bone. Proc Natl Acad Sci USA 73: 1447-1451 1976.
 - 10) Price, P.A.: Vitamin K-dependent formation of bone Gla protein (osteocalcin) and its function. Vitamin Horm 42: 65-108 1985.
 - 11) 松下尚生: 抜歯創への脱灰凍結乾燥骨移植における微細血管構築について. 日口外誌 37: 566-577 1991.
 - 12) 斉藤俊夫: 抜歯窩治癒過程に及ぼす活性型ビタミン D_3 ならびにタンパク同化ステロイドの影響—Microradiogram, ^{45}Ca autoradiogram による観察—. 歯学 69: 864-897 1982.
 - 13) Mundy, G.R., Varani, J., et al.: Resorbing bone is chemotactic for monocytes. Nature 275: 132-135 1978.
 - 14) Malone, J.D., Teitelbaum, S.L., et al.: Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. J Cell Biol 92: 227-230 1982.
 - 15) Mundy, G.R. and Poster, J.W.: Chemotactic activity of the γ -carboxyglutamic acid containing protein in bone. Calcif Tissue Int 35: 164-168 1988.
 - 16) Price, P.A. and Baukol, S.A.: 1,25-dihydroxyvitamin D_3 increases serum levels of the vitamin K-dependent bone protein. Biochem Biophys Res Commun 99: 928-935 1981.
 - 17) Fraser, J.D., Otawara, Y., et al.: 1,25-dihydroxyvitamin D_3 stimulates the synthesis of matrix γ -carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. J Biol Chem 263: 911-916 1988.
 - 18) Lian, J.B., Tassinari, M., et al.: Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats. J Clin Invest 73: 1223-1226 1984.
 - 19) 原 久仁子, 秋山康博, 他: 骨蛋白質移植による骨形成に対するワーファリンの影響. 日骨代謝 3: 60-65 1985.
 - 20) Glowacki, J. and Lian, J.B.: Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. Cell Differentiation 21: 247-254 1987.
 - 21) DeFranco, D.J., Glowacki J., et al.: Normal bone particles are preferentially resorbed in the presence of osteocalcin-deficient bone particles *in vivo*. Calcif Tissue Int 49: 43-50 1991.
 - 22) 進藤正信: Osteolathyrisim ラットの抜歯創の破骨細胞性骨吸収に関する形態学的研究. 歯基礎誌 24: 668-705 1982.
 - 23) 飯塚 正: 放射線照射ラットの抜歯創治癒過程に関する形態学的研究. 歯基礎誌 26: 745-785 1984.
 - 24) 細川洋一郎: 放射線全身照射ラットの抜歯創治癒過程に関する形態学的研究. 歯基礎誌 33: 203-244 1991.
 - 25) 何 達人: ラット抜歯窩への内毒素 (LPS) 接種後の生体反応に関する研究. 九州歯会誌 38: 831-847 1984.
 - 26) 三木 知: 低カルシウム・ビタミン D 欠乏食および低カルシウム食で飼育したラット抜歯創治癒過程における組織学的ならびに骨形態計測的研究. 昭歯誌 10: 105-123 1990.
 - 27) 式守道夫: 経口抗凝薬療法患者の口腔観血処置に関する臨床的ならびに凝血学的研究—特に維持量投与下での抜歯について—. 日口外誌 28: 1629-1642 1982.