原 著 論 文

α -TCP-コラーゲン材を用いた歯槽骨形成に関する実験的研究

村岡 正規

Experimental Studies on Alveolar Bone Formation with α -TCP-Collagen Material

Masanori Muraoka

Abstract : This experimental study was conducted to investigate bone tissue reaction of apatite-collagen conjugated sponge in the healing process of bone. The bone formation in relation with microvascular construction was observed with a scanning electron microscope.

Absorbable α -tricalcium phosphate-(α -TCP), α -TCP-collagen conjugated sponge having hydration activity with type I collagen gel in a short time under physiological condition and α -TCP processed with tannic acid were employed as experimental materials, and Japanese monkeys were employed as experimental animals. Artificial bone defects were made in bilateral lower premolar and molar region of the animals, and the experimental materials were inserted therein. The animals were sacrificed 2, 4 and 8 weeks after operation. Acryl plastic was injected via the common carotid arteries, utilizing the plastic injection method to prepare a microcast around the experimental region. The injected material was coated with gold for the employment of a scanning electron microscope.

α -TCP processed with tannic acid promoted dense capillaries and markedly enhanced bone healing. The results indicated that the application of this material in bone defects can be useful for promoting alveolar bone formation.

Key words : α -tricalcium phosphate, tannic acid, collagen, bone formation

I. 緒 言

歯周病や齲蝕のために歯を喪失し、これに加齢的变化が加わると歯槽骨が大きく吸収することがある。このような症例では義歯補綴治療が困難であるため、顎堤形成や骨移植などによって義歯の安定を図る方法がとられてきた。しかし、これらの方法は生体への侵襲、移植骨の採取技術の困難さ、骨の供給の制約、移植骨の吸収など種々の問題がある^{1,2)}。そこで現在では、人工的な生体材料を用いて骨を増生する方法が注目されている。なかでも、リン酸カルシウム系統結晶性アパタイトであるハイドロキシアパタイト

(以下、HA と略す) は、生体親和性が高く、優れた骨伝導能をもつため³⁾日常臨床で最もよく利用されている。しかし、生体の骨の無機成分は炭酸イオンなど種々のイオンを含んだ結晶性の低い溶解しやすいアパタイト結晶からなっている⁴⁾が、HA は焼結性で結晶度が高いために溶解性が低く、骨伝導能はあるものの、治癒後も吸収されることなく骨内に封入されたままの状態となるため、生理的な骨改造が期待できない⁵⁻⁷⁾ことが問題となっている。

これら従来の方法や材料の欠点を補うために、本研究では吸収性で骨伝導能を有する α 型リン酸三カルシウム (以下 α -TCP と略す) と、骨の有機成分でもあるコラーゲンを複合化させた α -TCP-コラーゲンスポンジを作製した。これを骨欠損部に応用すれば、その部の骨形成の促進ならびに軟組織の陥入防止によって、骨が陥凹しないために治癒後の顎堤吸収が抑制でき、その後の補綴治療に有利になると考えた。そこで、ニホンザルの歯槽骨に人工的に形成した骨欠損にこの α -TCP-コラーゲンスポンジを

大阪歯科大学大学院歯学研究科歯科補綴学専攻
大阪歯科大学歯科補綴学第一講座
Graduate School of Dentistry (Prosthodontics), Osaka Dental University
First Department of Prosthodontics, Osaka Dental University
平成 11 年 9 月 24 日受付

填入し、骨欠損部の治癒過程への応用における影響を、微細血管の動態と骨形成の様相の観点からアクリル樹脂微細血管鑄型法⁸⁾を用いて、走査電顕によって検索した。

II. 研究方法

1. 実験材料

実験動物には、ヒトに近い顎骨形態と食性および咀嚼様式を持ち、口腔内に異常がなく、永久歯列の完成した成ニホンザル（体重 5～8 kg）6 頭を用いた。

実験材料には、Type I コラーゲンと生体活性が高く骨伝導能を有する α -TCP を複合化させた α -TCP-コラーゲンスポンジ（以下、AS と略す）と、この材料のコラーゲンを 2% タンニン酸水溶液を用いて架橋させたタンニン酸架橋 α -TCP-コラーゲンスポンジ（以下、T-AS と略す）の 2 種類を用いた。

AS の作製方法は次の通りである。1% コラーゲン溶液と 5 倍濃度リン酸緩衝液を混和し、4°C に保ち、その溶液中にコラーゲンの乾燥質量と α -TCP の質量比が 1:4 になるように計量した α -TCP 粉末を混和する。その後、この混和溶液を 5 日間恒温槽で 37°C に保ってゲル化させ、これを凍結乾燥して作製した（図 1）。

また、T-AS の作製方法は、AS と同様であるが、ゲル化したものを 2% タンニン酸水溶液（日本薬局方タンニン酸 AL）に入れ、室温下で 2 日振盪し、以後 AS と同様に作製した（図 2）。

2. 実験方法

実験動物にペントバルビタールナトリウム（Nembutal[®]、大日本製薬（株）、大阪）0.4 ml/kg の腹腔内注射で全身麻酔を施した後、下顎臼歯部頰側歯肉粘膜を全層弁で剥離翻転し、P 3, M 1, M 2 相当部の槽間中隔部歯槽骨壁で歯槽骨上縁から 12 mm の位置に、IMZ インプラントシステムの外科用インスツルメントを用いて直径 4 mm の骨髓に達する深さの皮質骨を片側で 2 カ所ずつ除去し、人工的骨欠損を形成した。

実験動物を 3 頭ずつ 2 群に分け、1 群は AS 群、もう 1 群は T-AS 群とした。各群とも片側の骨欠損部で出血を確認後、直ちに欠損部に AS あるいは T-AS を、血液を十分浸透させながら填入、歯肉粘膜弁を戻し粘膜縫合して実験側とした。また、人工的骨欠損のみで材料を填入しないものを対照側とした。術後 7 日間は手術部位に咀嚼圧が加わることを避けるために成分栄養剤（Elental[®]、味の素（株）、東京）を経鼻挿管により与え、さらに術後 8～11 日間は軟性の飼料を与えた。また、感染防止のため抗生物質（ペニシリン G カリウム 2000 単位/kg[®]、明治製薬（株）、東京）を筋肉内注射と 0.2% クロルヘキシジン水溶液による口腔内洗浄を行った。その後は、サル用固形飼料（オリ

図 1 α -TCP-collagen sponge (SEM image)
 α -TCP-コラーゲンスポンジ (SEM 像)

図 2 α -TCP-collagen sponge processed with tannic acid (SEM image)
タンニン酸架橋 α -TCP-コラーゲンスポンジ (SEM 像)

エンタル酵母社製）および約 2 cm 角のさつまいもと十分な水を与え、一定の環境下で飼育を行った。

それぞれの群において術後 2, 4, 8 週に達した実験動物を塩酸ケタミン（Ketalar[®]、三共エール（株）、東京）15 mg/kg の筋肉内注射による全身麻酔下で大腿静脈から血液凝固阻止剤ヘパリン 5 ml を投与し、20 分後に大腿動脈から脱血して安楽死させた。その後、直ちに両側総頸動脈に挿入した金属カニューレから、アクリル樹脂微細血管注入法⁹⁾に従ってアクリル樹脂を注入した。樹脂硬化後、実験部位を一塊のブロックとしてダイヤモンドバンドソー（BS 3000, EXAKT）にて切り出し、さらに、術部を中心に近遠心的中央で切断し、5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で軟組織を溶解除去後、水洗乾燥し、骨・微細血管鑄型標本とした。これにイオンスパッター（IB-5, Eiko）によって金蒸着を施して走査型電子顕微鏡（S-4000, HITACHI）で観察した。

III. 実験結果

1. 術後2週 (図3)

1) AS 群

母床骨の骨髓腔から、やや直径の太い血管が骨欠損部中央と口部に向かって伸展していた。骨欠損部口部の血管網は、歯肉粘膜部分の血管網を押し上げるように表層に向かっていたが、歯肉粘膜部分の血管網との吻合は認められなかった。また、骨形成は認められなかった。

2) T-AS 群

骨欠損部は、母床骨の骨髓腔から骨欠損部中央や口部に向かう非常に密な細かい新生毛細血管で満たされていた。この新生毛細血管網は互いに細かく連絡していたが、緻密骨に隣接する骨欠損部には新生血管の伸展は認められなかった。骨欠損部口部の血管網は、歯肉粘膜部分の血管網を押し上げるように表層に向かっていたが、歯肉粘膜部分の血管網との吻合は認められず、独立した血管網であった。なお、AS 群と同様新生骨形成は認められなかった。

3) 対照群

母床骨の骨髓腔から、T-AS 群で観察された血管よりも直径の太い血管が骨欠損部中央部もしくは口部に向かって伸展していた。また、骨欠損部底部に近いところでは新生骨小柱の形成が認められたが、骨欠損部最表層では粗な血管網の形成だけであった。

2. 術後4週 (図4)

1) AS 群

骨欠損部の深側 3/4 に密な新生骨小柱が形成されていたが、既存緻密骨との連続性はみられなかった。浅側 1/4 は、歯肉粘膜および新生骨小柱間の骨髓腔から伸びる新生毛細血管網で満たされていた。この血管網の血管はやや太く、また、骨膜血管網と吻合しているものもみられた。

2) T-AS 群

骨欠損部の深側 1/2 は、既存海綿骨から伸展して骨欠損部口部に向かう新生骨小柱で満たされ、浅側 1/2 は、密で細かい新生骨小柱間の骨髓腔から伸びる新生毛細血管の血管網で満たされていた。この血管網は AS で観察された血管よりも細く、また、一部は骨膜血管網と吻合し始めていた。

3) 対照群

骨欠損部をほぼ満たすように新生骨小柱が形成され、一部は既存緻密骨と連続していた。骨欠損部口部の中央では新生骨小柱は認められず、AS 群および T-AS 群に比べ粗で太い血管で満たされていた。底部の新生骨小柱はやや太くなり、骨髓腔が粗くなり、リモデリングが始まりつつあった。

3. 術後8週 (図5)

1) AS 群

骨欠損部口部には陥凹が認められるものの骨欠損部の新生骨は整理され、骨小柱間の髓腔が大きくなり、骨のリモデリングが始まっていた。また、既存緻密骨との連続性も

図3 Two weeks after operation. General view of the experimental region (SEM image), Bar=1 mm

a: α -TCP-collagen site, b: α -TCP-collagen sponge processed with tannic acid, c: Control site

術後2週、骨欠損部全体像 (SEM 像)

a: α -TCP-コラーゲン, b: タンニン酸架橋 α -TCP-コラーゲン, c: 対照

図 4 Four weeks after operation. General view of the experimental region (SEM image), Bar=1 mm
 a : α -TCP-collagen site, b : α -TCP-collagen sponge processed with tannic acid, c : Control site
 術後 4 週, 骨欠損部全体像 (SEM 像)
 a : α -TCP-コラーゲン, b : タンニン酸架橋 α -TCP-コラーゲン, c : 対照

図 5 Eight weeks after operation. General view of the experimental region (SEM image), Bar=1 mm
 a : α -TCP-collagen site, b : α -TCP-collagen sponge processed with tannic acid, c : Control site
 術後 8 週, 骨欠損部全体像 (SEM 像)
 a : α -TCP-コラーゲン, b : タンニン酸架橋 α -TCP-コラーゲン, c : 対照

認められた。歯肉血管網もほぼ正常形態になり、骨膜血管網が新生骨中の血管と吻合していた。

2) T-AS 群

骨欠損部全体が太い新生骨小柱で満たされており、口部でも陥凹は認められずほぼ平坦に骨が形成されていた。さらに、既存緻密骨とも連続し、底部ではリモデリングが始まっていた。また、骨欠損部の血管網も整理され、歯肉粘

膜部の血管網もほぼ正常形態になっていた。

3) 対照群

骨欠損部は整理され始めた新生骨で満たされている。浅部は密な骨小柱であったが、骨欠損部口部には陥凹が認められた。また、実験群と同様に骨膜血管網は新生骨中の血管と吻合していた。

IV. 考 察

1. AS群について

従来、人工骨補填材として用いられてきたハイドロキシアパタイト (HA) は、優れた骨伝導能を有し、機械的強さも大きい³⁾とされるが、吸収されることなく骨内に封入されたまま取り残された状態で存在するため、生理的骨改造が期待できない⁵⁻⁷⁾。これに比べ、今回の実験に用いた非結晶性のアパタイトである α 型リン酸三カルシウム α -tricalcium phosphate : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (α -TCP) は、生体内での反応性が高く、生体内に填入した後、結晶相が骨のそれに類似した炭酸アパタイトにすみやかに転化し⁹⁾、機械的強度が強く、最終的に骨が形成される領域が広がることが報告されている¹⁰⁾。

また、動物の組織から抽出した生体内可溶性の Type I コラーゲンは、骨伝導能はないが生体内に填入しても抗原性が低く、生体分解・吸収性であることから、骨の形成に伴って生体内のコラーゲナーゼによって分解、吸収される。さらに、宿主細胞の接着増殖を支持して組織再生を促進し、血小板凝集能を有するなど、生体材料に適した特徴を数多く備えている¹¹⁻¹⁵⁾。そして、このコラーゲンに線維構造を与えると、骨形成細胞の進展のための足場¹⁶⁾や骨細胞の成長、移動、分化、石灰化のための微小環境を提供¹⁷⁾し、複雑に絡み合った線維がしっかりと出血面に接着して出血を押さえることができ、そのうえで安定な血栓を形成する¹⁸⁾ことなどの利点がある。

そこで本実験では、手術時の操作性や膜下部のスペース確保に有用であるとされるスポンジ状のものに α -TCP を複合化したもの^{19,20)}を用い、コラーゲンと α -TCP の両方の効果を期待して骨欠損に用いることによって骨形成が促進されると考えた。

AS 群の実験結果から、術後 2 週では歯肉粘膜から伸びる血管網と骨欠損部口部の血管網との吻合は認められなかったが、術後 4 週では吻合がみられはじめ、術後 8 週では、骨欠損部口部での新生骨小柱の間から伸びる血管との吻合がみられた。このとき、新生骨の表面には陥凹が少し認められた。これは、術後 4 週から 8 週の間骨欠損部で軟組織に接する AS が吸収されて骨形成の場の確保が弱まり、歯肉粘膜から欠損部への軟組織の陥入が起こったためと思われる。しかし、対照群に比べると、術後 8 週での骨欠損口部での陥凹は軽減されており、AS を骨欠損部に填入することによって軟組織の陥入を防ぐ傾向があることが示唆された。戸田ら¹⁹⁾も、 α -TCP-コラーゲンスポンジを抜歯窩に填入した場合、窩縁部での上皮の down growth も認められず、歯槽骨形成の場を確保したと推測している。

さらに戸田ら¹⁹⁾は、術後 8 週では新生骨はほぼ正常な海

綿骨になり、全体として通常の抜歯窩よりも治癒が早かったと報告している。本研究でも、AS 群では 8 週で骨のリモデリングが始まって海綿骨様を呈し、対照群に比べて治癒が早かったことがうかがえる。これは、骨欠損部に填入した α -TCP-コラーゲンスポンジが多孔性を有するため、新生毛細血管と骨髄細胞がスポンジ内部に早期に侵入し、コラーゲン線維 (スポンジマトリックス) を足場にして添加し、複合化した α -TCP を骨形成の核として骨新生を促進したと考えられる。

2. T-AS 群について

コラーゲンは、生体内でコラーゲナーゼによって吸収されていくが、吸収速度が速すぎると骨形成の場の確保が困難となり、骨形成または骨増生のための良好な結果が期待しにくい。また、血液を吸収したコラーゲンは止血効果が得られるものの、脆くなり、骨欠損部に填入する際や、填入後粘膜縫合の際に熟練を必要とする。その欠点を補うために、 α -TCP-コラーゲンスポンジにタンニン酸処理を施したものを使用した。

タンニン酸処理を施したコラーゲンは架橋構造が増強され、抗酵素性が上昇し、引張破壊強度や引張破壊伸び、引張弾性率などの機械的強度が増加し、さらに、柔軟性も向上すると報告されている²¹⁾。本群の 4 週では、他群よりも新生骨小柱の形成がやや遅れていたものの、術後 8 週では骨欠損部口部での陥凹も認められず、新生骨が緻密化していた。

骨損傷部の骨形成には、機械的に安定した創面と豊かな血液供給が絶対条件として要求される²²⁾。 α -TCP-コラーゲンスポンジにタンニン酸処理を施すことによって、機械的強度が増加し、止血効果も向上し、安定した創面を形成することになる。一方、コラーゲンの架橋構造が増強されスポンジの空隙がより狭くなると、そこにより細くて密な毛細血管が侵入し、密なコラーゲン線維を足場として、より密な骨が新生される。また、タンニン酸処理による架橋構造の強化はコラーゲンの吸収を遅らせ、骨形成の場の確保を確実なものとしたと考えられる。このことが、粘膜骨膜からの軟組織の伸展や陥入を遮断し、骨形成が骨欠損部口部にまで達する結果を得たと考察する。このように、骨欠損部に α -TCP-コラーゲンスポンジにタンニン酸処理を施したものを応用することによって、1 回の観血的処置で歯槽骨の形成障害を除去することができることが示唆された。

V. 結 論

α -TCP-コラーゲンスポンジを人工的骨欠損に応用した結果、通常よりも骨欠損部の治癒を早め、骨吸収を抑制した。特に、タンニン酸処理を施した α -TCP-コラーゲン

スポンジは、骨への填入時の操作性もよく、止血効果も高く、骨欠損部の骨形成を促進し、優れた骨補填材料としての臨床応用の可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました歯科補綴学第一講座権田悦通教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に際し、終始ご教示ご指導をいただきました解剖学講座諏訪文彦教授ならびに戸田伊紀助手に深謝いたします。あわせて種々ご助言、ご協力いただきました歯科補綴学第一講座岡崎定司講師をはじめとした講座員、大学院生、ならびに解剖学講座各位に謝意を表します。また、実験材料の人工骨移植材を提供いただきました(株)新田ゼラチン生物化学研究所杉原富人氏、萬代佳宣氏に感謝いたします。

本研究は大阪歯科大学中央歯学研究所の動物施設、形態系研究施設、画像処理施設を使用して行った。

文 献

- 1) Wang JH, Waite DE, Steinhäuser E. Ridge augmentation : an evaluation and follow-up report. *J Oral Surg* 34 : 600-602, 1976.
- 2) 高橋庄二郎. 歯槽堤形成術の考え方と主な術式. *日歯医師会誌* 27 : 463-470, 1974.
- 3) 栗原由起夫, 中島信也, 原田 康ほか. 骨代用材としての Hydroxyapatite (HAP) 顆粒および Tricalcium phosphate (TCP) 顆粒の物理化学的特性について. *歯科学報* 87 : 83-93, 1987.
- 4) Robert MB, Edmund DP. The nature of bone carbonate. *Clin Orthop* 129 : 279-292, 1977.
- 5) 永原国央. Tricalcium phosphate (TCP) 及び hydroxyapatite (HAP) による骨形成とコラーゲン分子種の変化. *歯基礎誌* 29 : 131-155, 1987.
- 6) Holmes R, Hagler H. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in maxillary augmentation : An histometric study. *J Craniomaxillofac Surg* 16 : 199-205, 1988.
- 7) Salyer KE, Hall CD. Porous hydroxyapatite as an onlay bone-graft substitute for maxillofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 84 : 236-244, 1989.
- 8) Ohta Y, Okuda H, Suwa F et al. Plastic injection method for preparing microvascular corrosion casts for SEM and its practical application. *Okajimas Folia Anat* 66 : 301-312, 1990.
- 9) Ban S, Jinde T, Hasegawa J. Phase transformation of octacalcium phosphate in vivo and in vitro. *Dent Mater J* 11 : 130-140, 1992.
- 10) 栗原由起夫. 家兎下顎骨欠損部への Hydroxyapatite (HAP) 顆粒および Tricalcium phosphate (TCP) 顆粒移植後治癒過程に関する実験. *歯科学報* 87 : 1099-1139, 1987.
- 11) Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 54 : 626-637, 1972.
- 12) Stenzel K, Miyata T, Rubin A. Collagen as a biomaterial. *Ann Rev Biophys Bioeng* 3 : 231-253, 1974.
- 13) Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *J Cell Sci* 41 : 159-175, 1980.
- 14) Yang J, Nandi S. Growth of cultured cells using collagen as substrate. *Int Rev Cytol* 81 : 249-286, 1983.
- 15) Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231 : 397-400, 1986.
- 16) Blumenthal N, Sabet T, Barrington E. Healing responses to grafting of combined collagen-decalcified bone in periodontal defects in dogs. *J Periodontol* 57 : 84-90, 1986.
- 17) Silbermann M, Reddi H. Collagen sponge promotes in vitro bone formation and mineralization. In : Ornoy A, Harell A, Sela J, editors, *Current advances in skeletogenesis* 7-13, Amsterdam : Elsevier Science Publishers, BV, 1985.
- 18) 夏目 徹, 清水慶彦. バイオマテリアルとしてのコラーゲン. *生体材料* 10 : 335-343, 1992.
- 19) 戸田伊紀, 北山展弘, 杉原富人ほか. 抜歯窩治癒過程における α -TCP-コラーゲン・スポンジの効果. *生体材料* 14 : 112-116, 1996.
- 20) 高橋 賢. 骨補填材としての生体内吸収性リン酸カルシウム添加コラーゲン材料の効果について. *歯科学報* 97 : 509-536, 1997.
- 21) Koide T, Daito M. Effects of various collagen crosslinking techniques on mechanical properties of collagen films. *Dent Mater J* 16 : 1-9, 1997.
- 22) 北山展弘. アパタイト複合コラーゲン材を用いた骨形成に関する実験的研究. *補綴誌* 41 : 86-93, 1997.

著者連絡先：村岡 正規

〒573-1121 大阪府枚方市楠葉花園町 8-1

TEL : 072-864-3074

FAX : 072-864-3174