

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍)	来 田 悠 生 (大阪府)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 425 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Promotion of Bone Formation around Alendronate-Immobilized Screw-Type Titanium Implants after Implantation into Rat Molar Tooth Sockets (ラット抜歯窩に埋入したアレンドロネート固定化スクリュー型インプラントに対する骨形成の促進) The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants impress
論 文 審 査 委 員	主査 教授 大久保力廣 副査 教授 早川 徹 副査 教授 小林 馨

内 容 の 要 旨

<緒言>

ビスフォスフォネートはハイドロキシアパタイトに強い親和性を有し、生体内で代謝されにくく、骨吸収抑制作用を示すことが知られており、臨床では骨粗鬆症薬として広く用いられている。また、骨形成の促進効果があるとも報告されている。今までにビスフォスフォネートをチタンインプラントに固定化して、ラット脛骨に埋入してその効果を調べた報告はあるが、顎骨に埋入して、顎骨の骨形成状態を調べた報告はほとんどない。本研究では、チタンインプラントへのビスフォスフォネート(アレンドロネート)の固定化を試み、ラット抜歯モデルを使用してアレンドロネート固定化チタンインプラントをラット上顎骨第一臼歯部に即時埋入し、顎骨の新生骨の形成状態について評価した。

<材料および方法>

まず、EDTA-Ca 錯体/アミンエタノール溶液にリン酸塩を $\text{Ca/P}=1.7$ となるように加えて、分子プレカーサー溶液を調整した。インプラント体としては、スクリュータ型チタンインプラント(直径 1.5mm、長さ 3.0mm)を使用した。無処理チタン (Ti)、炭酸含有アパタイト (CA) 薄膜コーティングチタン (HA)、アレンドロネート固定化チタン (Ald) インプラント群の 3 群を実験に使用した。HA インプラントは、Ti インプラントを分子プレカーサー溶液に 20 分間浸漬した後、酸素雰囲気下 600°C で 2 時間加熱処理して作製した。Ald インプラントは、HA インプラントをアレンドロネート水溶液 (10^{-2}M) に 37°C で 24 時間浸漬して作製した。

それぞれの試料の平均表面粗さ (Ra) を Handysurf E-30A により測定し、表面形状は SEM (JSM-5600LV) にて観察した。また、分子プレカーサー溶液を用いた CA 薄膜コーティングの確認は電子線マイクロアナライザー (EPMA, JXA-8900R) にて、カルシウムとリンのマッピングにより行った。アレンドロネートの固定化は X 線光電子分光法 (XPS, ESCA-3400) 測定にてアレンドロネ

ート含有窒素の N1s のピークの存在により確認した。埋入実験前に全てのインプラント体はオートクレーブで滅菌処置を施した。

動物埋入実験は鶴見大学歯学部動物実験委員会の指針に従い行った（承認番号:12042）。実験動物としては、Wistar 系雄性ラット 6 週齢を 18 匹使用した。搬入後 1 週間は通常飼育を行い、異常がないことを確認した。ケタミン（47 mg/kg）を腹腔内注射し全身麻酔を施し、局所麻酔としてドミツール（0.4 mg/kg）を使用した。第一臼歯部付近粘膜を骨膜剥離子にてフラップを行い抜歯し、歯科用リーマー（#90～#140）を用いて近心根を順次拡大し、Ti, HA, Ald インプラント体 3 種類をそれぞれ埋入した。縫合後、術後の感染を予防するために、ペニシリン系抗生物質製剤（1.0ml, ペニシリン G（3,000,000 U/kg）を皮下投与、アンチセダン（0.83 mg/kg）を腹腔内へ投与してラットの覚醒を確認した。

インプラント摘出 2 週間前にアリザリンを、摘出 1 週間前にカルセインを皮下注射し、新生骨の蛍光ラベリングを行った。インプラント体埋入 3 週間後と 9 週間後にラットを屠殺して、上顎骨と周囲組織を含めてインプラント体を摘出した。中性緩衝ホルマリンによる固定、アルコール系列による脱水後、メチルメタクリレート樹脂にて包埋した。続いて、厚み約 70 μm の非脱灰薄切研磨標本作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて新生骨への蛍光ラベリング状態を観察した。その後、塩基性フクシンとメチレンブルーによる重染色を行い、新生骨の形成状態を光学顕微鏡にて病理組織学的に観察した。また、画像解析ソフトを用いて蛍光ラベリング長、骨-インプラント接触率(BIC)および骨量(BM)算出し、定量的評価を行った。統計は StatView 5.0 を用いて行い、一元配置分散分析における検定後、Bonferroni Post hoc test を行い、危険率 5%にて有意差を調べた。

(結果)

3 種類のインプラント体、Ti, HA, Ald インプラント間で平均表面粗さ (Ra) に統計学的な有意差は認められなかった。SEM 観察においても顕著な表面形状の違いは認められなかった。

アリザリンによる蛍光ラベリングに関しては、蛍光標識が明瞭に観察できなかったため、カルセインによる蛍光ラベリングを観察した結果、埋入 3 週間後では Ald インプラント周囲に、他のインプラントと比較して、より明瞭に蛍光ラベリングが観察された。埋入 9 週後では、3 種のインプラント間での蛍光ラベリングの様相はほとんど同様であった。蛍光ラベリング長 (calcein labeling) を測定した結果、埋入 3 週後では Ald インプラントが有意に高い値となった ($p<0.05$)。埋入 9 週後では、3 種のインプラント間で統計学的に有意差は認められなかった ($p>0.05$)。また、9 週後のラベリング長はいずれのインプラント体でも 3 週後よりも有意に低下していた ($p<0.05$)。

新生骨の形成状態の光学顕微鏡観察では、埋入 3 週後では Ald 周囲で、より多くの新生骨形成が認められた。埋入 9 週後では、3 種のインプラント間での骨形成状態の違いは認められなかった。骨-インプラント接触率 (BIC) および骨量 (BM) を測定した結果、埋入 3 週後では Ald インプラントが有意に高い BIC, BM 値を示した ($p<0.05$)。埋入 9 週後では BIC 値は 3 種類のインプラント間で有意差は認められなかった ($p>0.05$) が、BM 値は Ald インプラントが統計学的に有意に高くなった ($p<0.05$)。また、埋入 9 週後の Ald インプラントの BM 値は埋入 3 週後よりも有意に向上していた ($p>0.05$)。

(考察)

本研究では、アレンドロネート固定化チタンインプラントをラット上顎骨第一臼歯部に即時埋入し、顎骨の新生骨の形成状態について評価した。その結果、アレンドロネート固定化により骨形成が促進されることは判明した。これは固定化されたアレンドロネートが破骨細胞による骨吸収を抑制したと

同時に、骨芽細胞の分化を促進した可能性も考えられる。

ビスフォスフォネート投与による顎骨壊死が臨床的に問題となっているが、本研究では顎骨に対する副作用などは確認されなかった。これはアレンドロネートが固定化されたために、局所でアレンドロネートが作用したため、および、アレンドロネートの局所濃度が低いためと思われる。

カルセインによる蛍光ラベリングおよび病理組織学的観察結果から、アレンドロネート固定化チタンインプラントの骨形成はインプラント埋入後の比較的初期の段階で起こっている事が推定される。また、本研究では、分子プレカーサー法を用いて CA 薄膜コーティングを形成したが、分子プレカーサー法は3.次元的に複雑な形状にもアパタイト薄膜コーティングできる手法であり、本研究でもその有効性が確認された。さらに、本実験で用いたラット臼歯モデルの有用性が確認され、今後のインプラントの実験への適応が期待できる。

以上の結果から、チタンインプラントにアレンドロネートを固定化することにより顎骨の新生骨形成が促進されることが判明した。