

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名（本籍） 川 本 孔 明（神奈川県）
博士の専攻分野 博 士（歯 学）
学 位 記 番 号 乙 第 272 号
学位授与年月日 令和3年11月18日
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目 A Study of Bone Formation around Titanium Implants Using Frozen Sections
(凍結切片を用いたチタン埋入組織の骨形成過程の研究)
Journal of Hard Tissue Biology 第30巻 第2号 165頁～174頁掲載 令和3年4月15日発行
論文審査委員 主査 教授 早 川 徹
副査 教授 下 田 信 治 副査 教授 五 味 一 博

内 容 の 要 旨

【緒 言】

チタンは骨親和性、強度が優れていることから広くインプラント材料として利用されている。埋入チタン周囲の骨形成は、マイクロCTによる3次元観察、樹脂包埋試料から作製した切断片の断面観察により行われている。しかし、それらの方法では組織学的染色、組織化学的染色、酵素組織化学的染色等の制限、分解能的な問題からチタン埋入後に形成されるチタン周囲の組織変化や骨組織の形成過程を詳細に明らかにする事は困難である。更に免疫組織化学的研究や発現遺伝子の解析等が出来ない問題があり、チタンへの骨形成過程の詳細は明らかにされていない。

本研究は、これらの問題を解決するためにチタン埋入組織から凍結切片を作製する方法の開発を試み、作製された凍結切片を用いてチタン埋入後のチタン周囲に形成される組織の初期変化とチタン周囲に骨が形成されるまでの過程を明らかにする事を目的として行った。

【材料と方法】

実験動物として10週齢雄性Wistar系ラットを用いた。まず予備実験として麻酔下でラット大腿骨にダイヤモンドディスクで開口部（幅約1mm、長さ9mm）を作り、その開口部に厚さの異なるチタン箔（厚さ：10 μ m, 30 μ m, 50 μ m）を挿入した。埋入5日後に麻酔下で屠殺し、大腿骨を摘出し、浸漬固定後、凍結包埋し、タングステンカーバイド製ナイフを装着した凍結マイクロトームにより粘着テープを用いて凍結切片を作製した。この結果、厚さ30 μ mのチタン箔が開口部へ確実に挿入でき、しかもほぼ完全な凍結切片が安定して作製できることから本実験に厚さ30 μ mのチタン箔を使用した。

本実験には10週齢雄性Wistar系ラット21匹を使用し、3匹ずつのグループに分け、予備実験と同様の手順で各ラットの大腿骨開口部にチタン箔（厚さ：30 μ m、大きさ：6mm×3mm）を挿入した。チタン箔の挿入後、1日、3日、5日、7日、10日、15日、30日後に麻酔下で屠殺し、大腿骨を摘出し、同様の手順で凍結切片を作製した。作製した切片は、組織学的観察用としてH-E染色とマッソントリクローム染色を行った。チタン箔周囲の新生細胞の同定には、ALP活性染色とTRAP活性染色を行った。更に免疫組織化学的にオステオポンチン、オステオカルシン、コラーゲンタイプIの検出を行った。チタン周囲に形成される新生骨の形成状態は、アリザリンレッドS染色とEPMAによるカルシウムの分布像により評価した。チタン箔埋入部位に増殖する新生細胞の分布状態は、DAPI染色切片の核を計数する事により行い、計測はチタン箔近傍、骨髓側、両者の移行部について行い、単位面積当たりの細胞数を求めた。

【結 果】

厚さ 30 μm のチタン箔を利用する事によりチタンを埋入したラット大腿骨試料から厚さ 3 μm の凍結切片を作製する事ができた。チタン箔は切削中にカーリング現象で切片から離れてしまうが、チタン箔周囲の硬組織を含む全ての組織はほぼ完全に切片中に保持され、各細胞や新生骨を明瞭に観察できた。その切片は、組織学的研究、酵素組織化学的研究、免疫組織化学的研究、カルシウムの分布の研究に利用できる事が確認できた。

チタン箔埋入後 1 日目のチタン箔周囲はチタン箔挿入時に出血した血液で取り囲まれていた。埋入 3 日目には血液は血餅となり、骨髓と接している血餅中に新生細胞が観察され、免疫染色の結果、それらの細胞はオステオポンチン、オステオカルシン、コラーゲンタイプ I に陽性であった。また、ALP 活性に陽性であった。しかし、チタン箔近傍は血餅で満たされ、そのような新生細胞は観察されなかった。埋入 5 日目には新生細胞の周囲にマッソントリクローム染色で青色に強く染まる線維が観察され、その青色に染まる線維の一部にアリザリンレッド S で赤色に染まる沈着物が観察され、EPMA によりその部位からカルシウムが検出された。チタン箔近傍は 3 日目と同様に血餅で覆われていた。7 日目にはアリザリンレッドで染まる領域が広がり骨様構造となっているが、チタン箔周囲は 3 日目と同様に血餅で覆われていた。10 日目にはチタン箔周囲の血餅は全て吸収され、血餅領域は全て骨組織に置き換わっていた。骨髓側の新生骨に TRAP 活性陽性細胞が多数観察され、15 日後にその領域の新生骨の大部分が吸収され骨髄組織となっていた。30 日後にはその領域の骨吸収が更に進み、新生骨はチタン箔周囲のみとなった。

【考 察】

本実験は厚さ 30 μm のチタン箔、タングステンカーバイド製ナイフ、粘着テープを使用することによりチタン埋入組織から凍結切片を作製できる事を示した。本研究で示しているようにチタン埋入試料から非脱灰の状態で連続凍結切片を作製できる事から、連続切片を用いて、組織学的、組織化学的、酵素組織化学的、免疫組織化学的に染色を行ってチタン周囲に形成される骨組織の形成過程を詳細に研究する事が可能となった。さらに本研究の切片は凍結切片であることから、チタン埋入後の発現遺伝子の解析、MALDI-MSI（質量顕微鏡）による特定分子量の分布状態の解析に利用する事が可能となり、チタン周囲への骨形成過程をより多角的に研究できる事が示された。

チタン箔埋入 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30 日後のチタン周囲の組織変化を観察した結果、新生細胞はチタン埋入 3 日後にチタン周囲に形成された血餅の骨髓側の表層に現れ、5 日後に新生細胞の周囲に形成された線維上に初期のカルシウム沈着が現れ、7 日後にはカルシウム沈着部位は骨様組織となり、10 日後には血餅領域全体が新生骨で満たされる事が明らかになった。その後、血餅領域全体に形成された新生骨はチタン周囲の骨組織を除いて吸収され、最終的にチタン周囲の骨組織のみとなる事を示すことができた。これらの所見は、凍結切片はチタン埋入組織の研究に極めて有効な方法である事を示していると思われる。

【結 論】

骨組織を含むチタン埋入組織試料から凍結切片を安定して作製することが可能になったことから、組織学的、組織化学的、酵素組織化学的、免疫組織化学的、遺伝子組織化学的な研究、さらに LMD を用いた局所的な発現遺伝子の研究、MALDI-IMS 等によりチタン周囲への骨組織の形成過程を詳細に研究に利用できると考えられる。

凍結切片を用いてチタン埋入組織の初期変化を観察した結果、チタン周囲の骨は、チタン挿入時に出血した血液が血餅となり、その血餅中にオステオポンチン、オステオカルシン、コラーゲンタイプ I 陽性な新生細胞が増殖し、その細胞がコラーゲン線維を合成分泌し、その線維上にカルシウムが沈着し、新生骨が血餅領域全体に形成され、次いでチタン箔近傍以外の新生骨が吸収されてチタン周囲の骨組織が形成されるオステオインテグレーションの所見を詳細に示すことが出来た。

審査の結果の要旨

チタンインプラントの骨形成に関する研究は多くがマイクロ CT による 3 次元観察や樹脂包埋試料から作製した切片観察により行われている。しかしながら、これらの方法では、チタン周囲の組織変化や骨組織の形成過程を詳細に明らかにする事は困難である。本研究では、チタン埋入組織から凍結切片を作製する方法の開発を試み、作製された凍結切片を用いてチタン埋入後のチタン周囲に形成される組織の初期変化とチタン周囲に骨が形成されるまでの過程を明らかにする事を目的として行った。

10 週齢雄性 Wistar 系ラットの大腿骨開口部にチタン箔（厚さ：30 μm 、大きさ：6 mm $\times$ 3 mm）を挿入した。チタン箔の挿入後、所定期間後に大腿骨を摘出し、浸漬固定後、凍結包埋し、タングステンカーバイド製ナイフを装着した凍結ミク

ロトームにより粘着テープを用いて凍結切片を作製した。作製した切片を用いて、組織学的観察、チタン箔周囲の新生細胞の同定、免疫組織化学的な検討、チタン箔周囲に形成される新生骨の形成状態の評価、およびチタン箔埋入部位に増殖する新生細胞の分布状態の観察も行った。

その結果、チタン箔埋入後1日目のチタン箔周囲はチタン箔挿入時に出血した血液で取り囲まれていた。埋入3日目には血液は血餅となり、骨髓と接している血餅中に新生細胞が観察され、免疫染色の結果、それらの細胞はオステオポンチン、オステオカルシン、コラーゲンタイプ1に陽性であった。また、ALP活性に陽性であった。埋入5日目には新生細胞の周囲にマッソントリクローム染色で青色に強く染まる線維が観察され、一部にアリザリンレッドSで赤色に染まる沈着物が観察され、EPMAによりその部位からカルシウムが検出された。7日目にはアリザリンレッドで染まる領域が広がり骨様構造となっていた。10日目にはチタン箔周囲の血餅は全て吸収され、血餅領域は全て骨組織に置き換わっていた。骨髓側の新生骨にTRAP活性陽性細胞が多数観察され、15日後にその領域の新生骨の大部分が吸収され骨髓組織となっていた。30日後にはその領域の骨吸収が更に進み、新生骨はチタン箔周囲のみとなった。

以上、本実験ではチタン箔を用いることにより凍結切片が作製できた。この手法を用いた解析からチタン周囲に骨組織が形成される過程を詳細に解明することができ、今後のインプラント治療に大いに寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有すると判定した。