

ラット歯槽骨欠損における移植脱灰自家骨周囲の 超微形態について

河口 浩之, 小川 哲次, Hossain, M. R.
吉野 美穂, 藤谷 百合, 加納 利文
朱 正浩, 平川 正彦, 白川 正治
岡本 莫

Ultrastructural Study on Osseous Regeneration around Decalcified Autogenous Bone Grafted in Periodontal Defects in Rat

Hiroyuki Kawaguchi, Tetsuji Ogawa, Muhammed R. Hossain, Miho Yoshino,
Yuri Fujitani, Toshifumi Kanou, Masahiro Shu, Masahiko Hirakawa,
Masaharu Shirakawa and Hiroshi Okamoto

(平成5年9月30日受付)

緒 言

歯周病により失われた歯槽骨の再建を目的として人工骨材料の開発や臨床応用が進んでいるが、生体親和性や骨形成能に優れているという観点からすれば、自家骨に勝るものはない¹⁾。自家骨移植では、高い骨形成能を有する海綿骨や骨髄を移植材料として大量に入手するには限界があり、骨整形に伴って得られた皮質骨片が用いられるのが一般的である。

一方、塩酸脱灰を施した骨基質中には、骨形成因子が含まれており、これが高い骨誘導能を有すること²⁻⁴⁾、さらに、*in vivo* においても塩酸により表層または完全脱灰を施した骨基質によって著しい骨形成が認められたことが報告されている⁵⁻⁸⁾。さらに、脱灰骨基質移植では非脱灰の新鮮自家骨移植の場合とは異なり、直接骨芽細胞が分化誘導され、大食細胞はみられるものの骨再生あるいは骨改造に関する破骨細胞の出現は少ないと報告されている⁵⁻⁸⁾。しかし、脱灰骨基質周囲の細胞動態や界面構造についての超微形態学的研究はほとんどみられない。また、塩酸脱灰凍結乾燥骨を用いた歯槽骨再生に関する基礎研究⁹⁻¹¹⁾や臨床応

用^{12,13)}はいくつか行われているが、移植骨の塩酸処理やその前後の洗浄、脱水・脱脂にかなりの時間が必要であり、手術時に採取した自家骨片の同時使用には、その処理では適用できない。

本研究では、歯周外科手術時に骨整形に伴って得られる骨片が脱灰骨基質移植材料として有用か否かを明らかにするために、塩酸処理自家骨片を実験的に形成した歯槽骨欠損部へ移植し、その移植脱灰骨周囲の細胞動態および新生骨との界面構造について超微形態的に検討した。

材料および方法

実験には、8週齢のウイスター系雄性ラット10匹を用いた。ネプタール[®] 麻酔下にて上顎第1臼歯近心から口蓋側へ第2臼歯近心まで内斜切開し、歯肉剝離後、近心根口蓋面に約1×1×1 mmの3壁性骨欠損を形成した。移植骨材料については、上顎第1臼歯と切歯間の骨頂部より、チゼルを用いて皮質骨片を採取し、1 mm以下の細片として用いた(図1)。これらの骨細片を0.6 N塩酸で15分間脱灰し、十分洗浄を行った後に同欠損内に填塞し、次いで、歯肉弁をもとの位置に戻して縫合した。一方、反対側に同規格の骨欠損を形成し、前述と同様に採取した皮質骨片を塩酸脱灰処理を行わずに移植し、対照とした。

移植後12および21日目に half Karnovsky 液にて灌流

広島大学歯学部歯科保存学第二講座(主任:岡本莫教授)本研究の要旨は、平成2年11月第33回日本歯周病学会秋季総会において発表した。

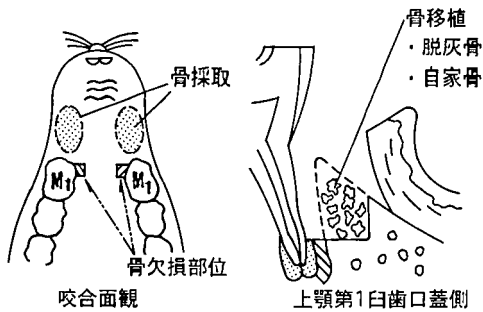


図1 移植実験の概略図

固定を行い、歯を含めて移植部を摘出した。次いで、試料を同液にて浸漬固定し、EDTA 脱灰後、通法に従って Epon に包埋した。試料は、トルイジンプール染色による光顕観察後、超薄切片とし、酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を行い JEM 100S 透過型電子顕微鏡（日本電子社製、東京、加速電圧 80 kv）にて観察を行った。

結 果

術後12日

非脱灰骨移植群の光顕像では、骨欠損内の非脱灰骨（矢印）は骨小腔が空虚であるが、染色性が比較的既存の歯槽骨に類似していた。これらの周囲の慢性炎症細胞浸潤は比較的少なく、修復性の肉芽組織がみられた（図2）。また、骨欠損壁に近い非脱灰骨周囲には一部に類骨基質がみられたものの、多くの場合多核細胞が接していた（図3）。超微形態では、非脱灰骨表面は骨基質のコラーゲン線維が露出し、表面不正となっていた。これらの非脱灰骨表面には多くの場合多核巨細胞が接しており、その細胞内空胞および細胞突起間に骨基質の小片が観察された（図4）。また、骨芽細胞様細胞が近接する非脱灰骨表面には豊富な新生骨基質コラーゲンが形成され、移植骨基質コラーゲンとこれらの新生コラーゲン線維とは連続していた（図5）。

脱灰骨移植後12日の光顕像では、3壁性の骨欠損部に移植された骨片は既存の歯槽骨とはやや染色性が異なり、脱灰骨の骨小腔は空虚になっていた（図6）。脱灰骨周囲の炎症細胞浸潤は少なかった。また、脱灰骨周囲では多核細胞の出現も非脱灰骨移植群に比べて少なく、骨欠損壁に近いところでは、脱灰骨に直接新生骨が形成されていた（図7）。これらの新生骨と脱灰骨の境界部には、多くの場合トルイジンプールに濃染する一層の界面構造が存在していた。同部の超微所見では、光顕所見に一致して、脱灰骨と新生骨基質間にはコラーゲン線維を含まない電子密度の高い顆粒状

構造物が認められた（図8）。また、ときおりこれらの脱灰骨の一方で新生骨が形成され、他側で ruffled border と clear zone を有する多核巨細胞による吸収像がみられた（図9）。

術後21日

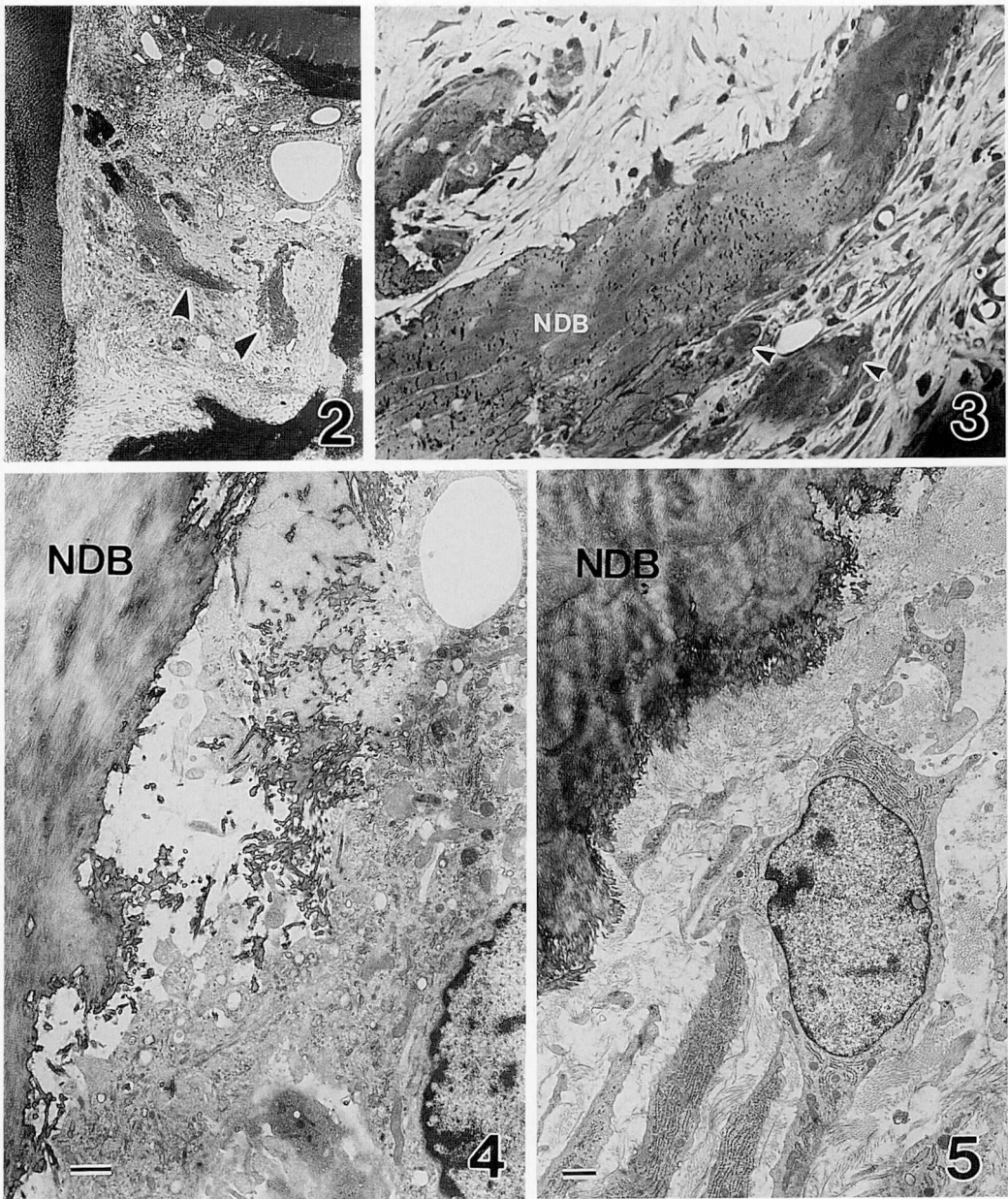
非脱灰骨移植の光顕像では、脱灰骨移植同様に欠損部の多くは新生骨と移植骨で満たされていた（図10）。新生骨と非脱灰骨との境界には cement line 様構造が観察された（図11）。一方、超微所見においても非脱灰骨と新生骨の間には光顕でみられる cement line 様構造に一致して電子密度の高い層がみられた（図12）。この界面構造はしばしば顆粒状を呈し、移植骨基質と新生骨基質コラーゲン線維が互いに結合していた（図13）。

脱灰骨移植の光顕像では、骨欠損部のほとんどは再生骨と移植された脱灰骨によって占められていた（図14）。脱灰骨表面に新生骨が直接結合しており、新生骨との境界はやや不明瞭であったが、非脱灰骨移植でみられた cement line 様構造よりも幅の狭い界面構造がしばしば観察された（図15）。超微所見では、脱灰骨と新生骨との界面には明瞭な電子密度の高い顆粒状構造物が介在した。この顆粒状構造内にはコラーゲン線維はみられず、従って両基質コラーゲン線維間の結合や嵌合も認められなかった（図16, 17）。

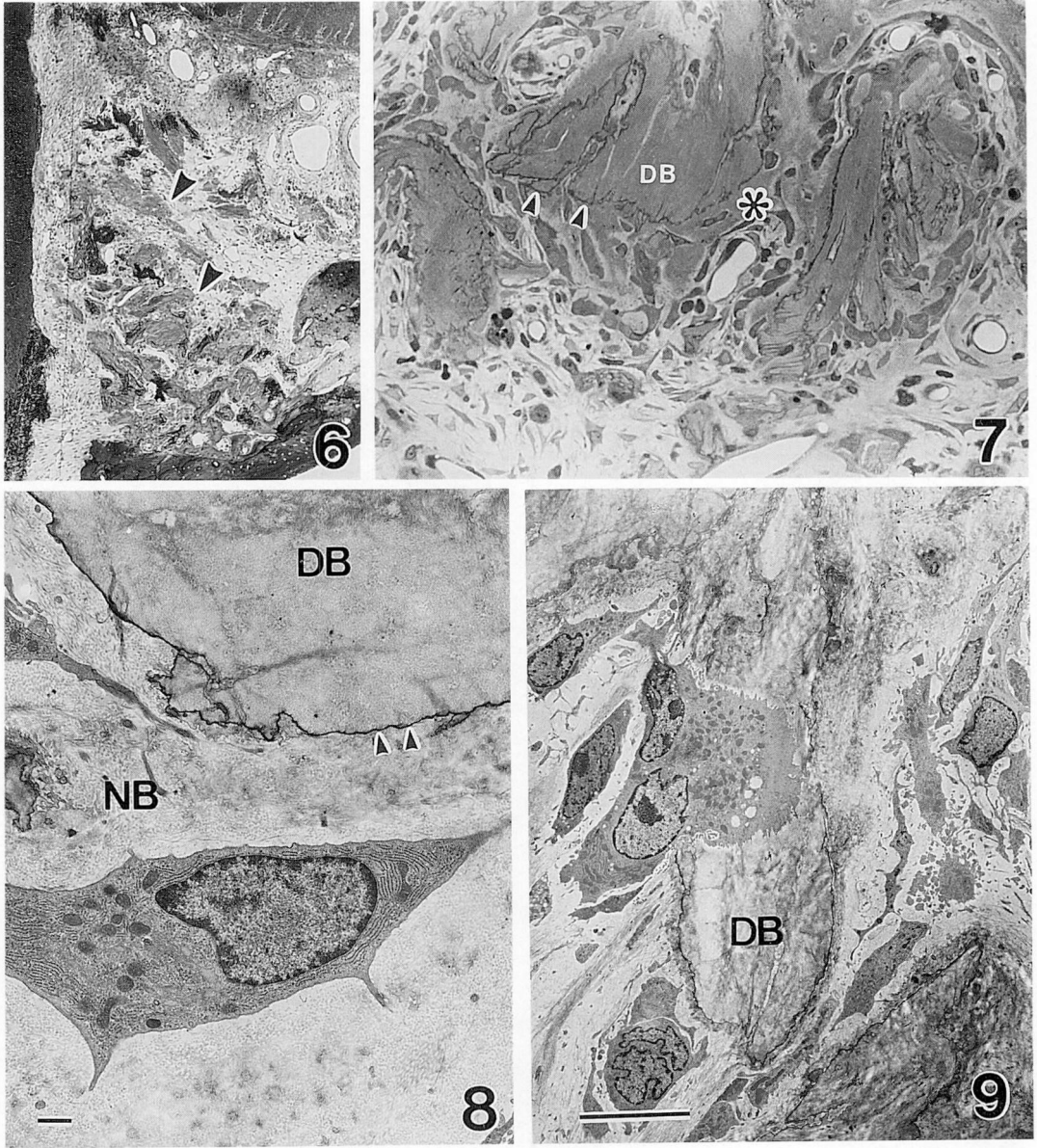
考 察

一般に、移植自家骨周囲の骨再生機序は、骨再生や骨改造における同様に、まず、破骨細胞により骨が吸収され、それにより溶出した骨形成因子により骨芽細胞が誘導されて新生骨の形成が生じる^{20,21)}。一方、脱灰骨基質移植においては、皮下組織や筋肉内では異所性に直接硬組織形成が起こり¹⁴⁻¹⁹⁾、歯槽骨欠損部では、脱灰骨基質が直接骨芽細胞を誘導する可能性が示唆されている⁹⁻¹¹⁾。従来の塩酸脱灰骨移植の研究では、移植材料に凍結乾燥粉碎骨を用い、0.6 N 塩酸にて1時間もしくはそれ以上の時間で完全脱灰し、脱水、脱脂などの処理を施している。本研究では、Register ら²²⁾の象牙質削片の短時間塩酸処理や著者らの歯根窩洞および裸出象牙質面における塩酸処理の研究結果²³⁻²⁵⁾から、骨整形時に得られる皮質骨片の塩酸処理を15分とし、脱灰骨基質の移植材としての有用性について検討した。

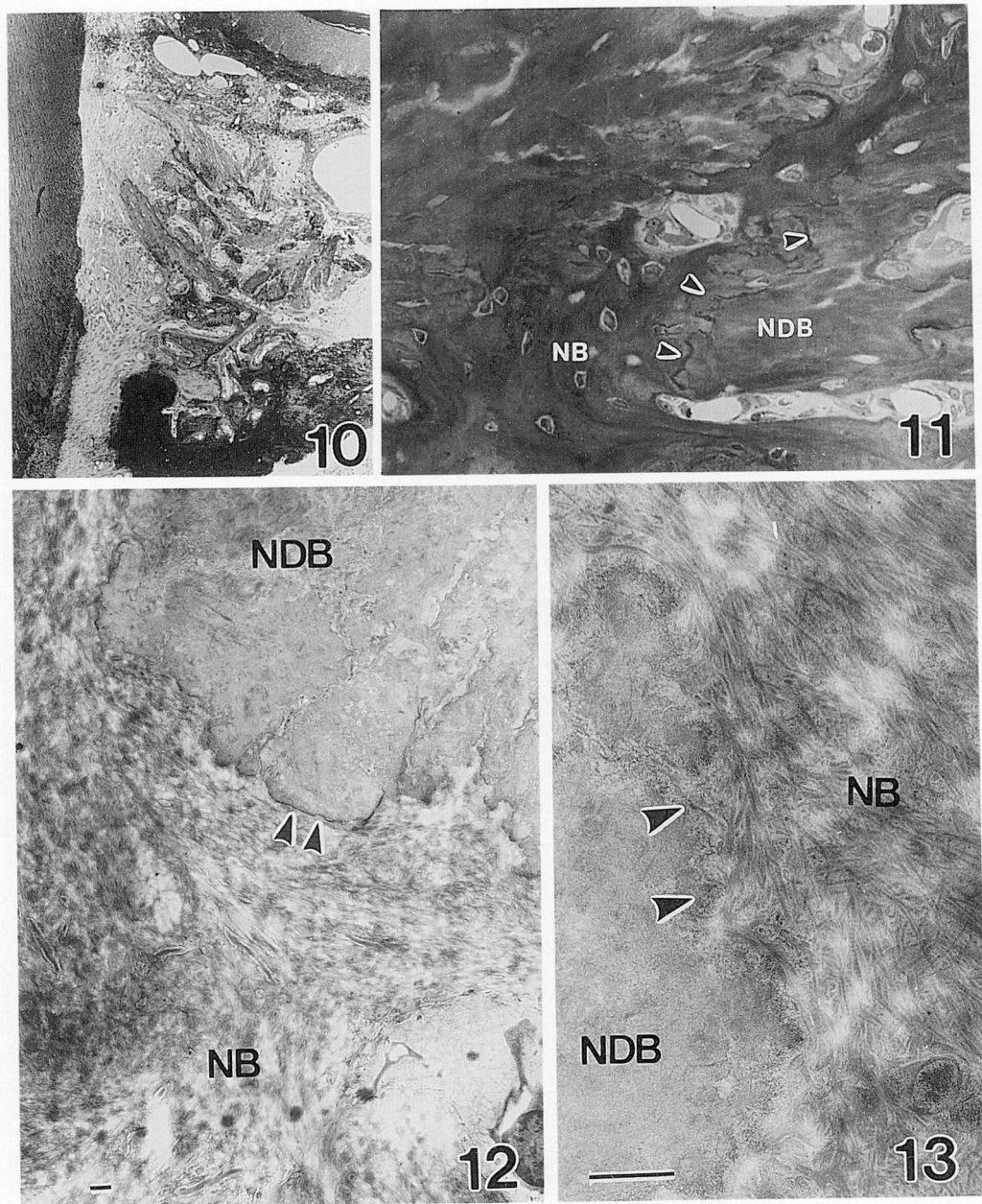
骨形成や骨再生に関与する骨芽細胞は、骨髄組織に由来し、歯槽骨欠損への骨移植にはこれらの組織を含む骨髄あるいは海綿骨が移植材として適している^{1,20,21)}。また、骨髄を含む組織を入手できない場合



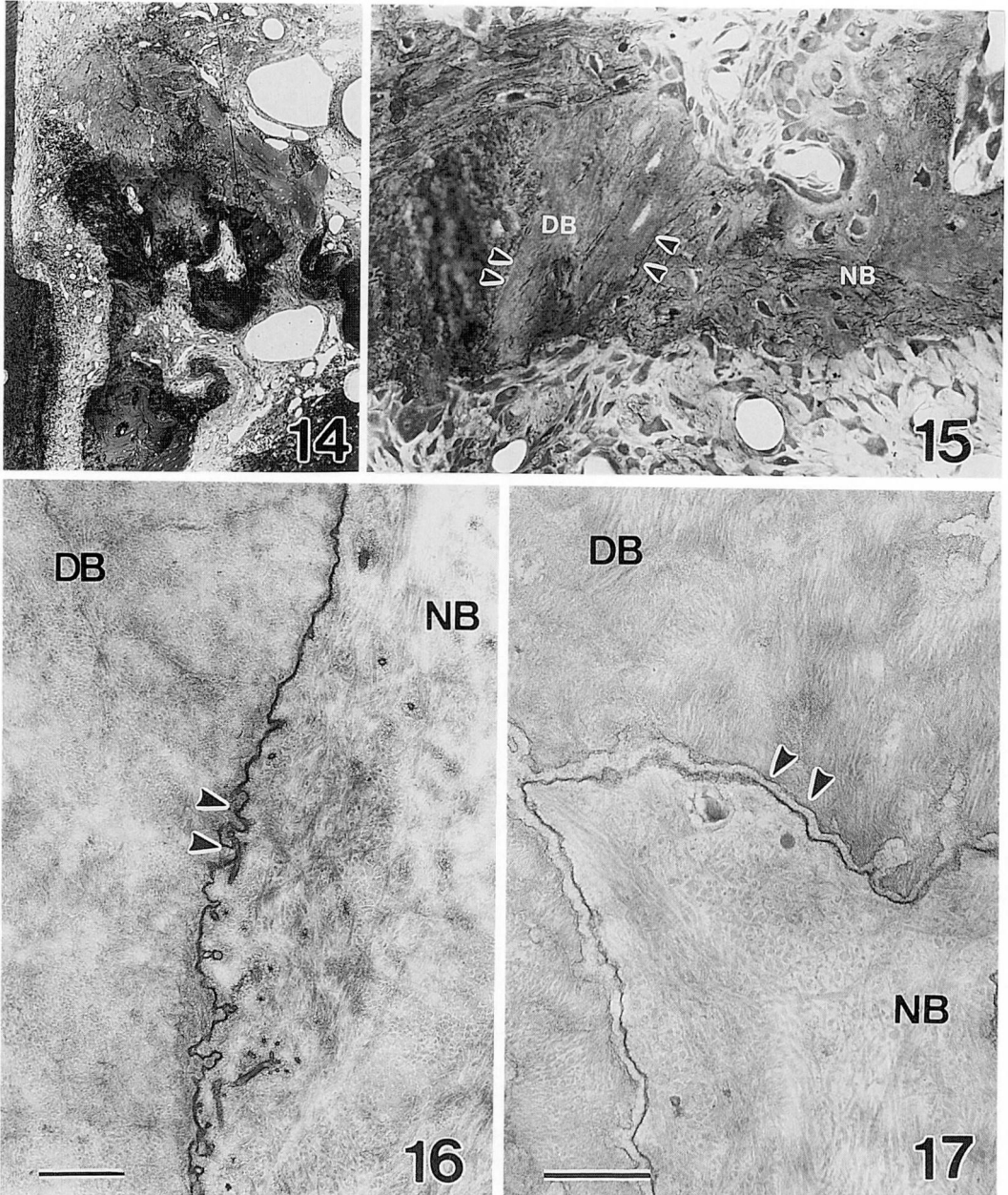
- 図2 非脱灰骨移植術後12日の光顕像。骨欠損内の移植非脱灰骨（矢頭）は骨小腔が空虚であるが、染色性が比較的既存の歯槽骨に類似している。これらの周囲の慢性炎症細胞浸潤は比較的少なく、修復性の肉芽組織がみられる。×45
- 図3 同群術後12日の拡大像。移植非脱灰骨（NDB）周りにはしばしば多核細胞（矢頭）が接している。×290
- 図4 同群術後12日の電顕像。非脱灰骨基質（NDB）に面に接する多核巨細胞の細胞内空胞および細胞突起間に骨基質の小片が観察される。—；1 μ m，×6,000
- 図5 同群術後12日の電顕像。非脱灰骨基質（NDB）に面する骨芽細胞様細胞周囲に豊富なコラーゲンが形成され、骨基質コラーゲンとこれらの新生コラーゲン線維とは連続している。—；1 μ m，×4,500



- 図6 脱灰骨移植群術後12日の光顕像。骨欠損部に移植された脱灰骨片(矢頭)は既存の歯槽骨とやや染色性が異なり、脱灰骨の骨小腔は空虚になっている。これらの脱灰骨周囲の炎症細胞浸潤は少ない。×45
- 図7 同群術後12日の拡大像。骨欠損壁に近い脱灰骨周囲(DB)に新生骨(*)が形成され、両者間には染色性の異なる層(矢頭)が介在している。×290
- 図8 同群術後12日の電顕像。脱灰骨基質(DB)表面には新生骨基質(NB)の形成が認められ、豊富な細胞内小器官を有する骨芽細胞が観察される。また、脱灰骨表面には、電子密度の高い層(矢頭)が存在している。—; 1 μ m, ×4,500
- 図9 同群術後12日の電顕像。脱灰骨の一方で新生骨が形成され、他側で ruffled border と clear zone を有する多核巨細胞による吸収像がしばしばみられる。—; 10 μ m, ×1,500



- 図10 非脱灰骨移植群術後21日の光顕像。脱灰骨移植同様に欠損部の多くは新生骨と移植骨で満たされている。
×45
- 図11 同群術後21日の拡大像。新生骨 (NB) と移植非脱灰骨 (NDB) との境界には cement line (矢頭) 様構造が観察される。×290
- 図12 同群術後21日の電顕像。非脱灰骨基質 (NDB) 周囲には新生骨基質 (NB) が形成され、両者の間には光顕でみられる cement line 様構造に一致して電子密度の高い層 (矢頭) がみられる。—; $1\mu\text{m}$, ×3,000
- 図13 同図12の拡大像。新生骨基質 (NB) と非脱灰骨基質 (NDB) 界面の構造はしばしば顆粒状を呈し (矢頭), 移植骨基質と新生骨基質のコラーゲン線維が互いに結合している。—; $1\mu\text{m}$, ×12,000



- 図14 脱灰骨移植群術後21日の光顕像. 骨欠損部のほとんどは新生骨と移植脱灰骨によって占められている。
×45
- 図15 同群術後21日の拡大像. 脱灰骨表 (DB) 面に新生骨 (NB) が直接結合している。両基質間には非脱灰骨移植群の cement line 様構造よりも幅が狭い層 (矢頭) が介在している。×290
- 図16 同群術後21日の電顕像. 脱灰骨基質 (DB) と新生骨基質 (NB) との界面には、明瞭な電子密度の高い層 (矢頭) が介在し、両基質コラーゲン線維間の結合はみられない。—; $1\mu\text{m}$, $\times 12,000$
- 図17 同群術後21日の電顕像. 新生骨 (NB) と脱灰骨 (DB) との界面構造はしばしば3層構造 (矢頭) を呈しており、これにも両基質コラーゲン線維間の結合や嵌合はみられない。—; $1\mu\text{m}$, $\times 15,000$

には、人工骨移植や骨再生術を行うことが多いが、これらの方法では骨髄由来細胞を欠損内へ導くための骨髄への穿孔が必須となる¹⁾。一方、塩酸脱灰骨基質による骨誘導では、まず、軟骨が形成され、次いで、骨の形成が始まるといわれているが、歯槽骨欠損内に塩酸脱灰骨基質を移植した場合には骨基質に直接新生骨が形成される⁹⁻¹¹⁾。本研究においては、塩酸脱灰骨周囲には軟骨形成はみられず、従来の塩酸による表層脱灰骨移植の研究結果と一致していた。これは、完全に脱灰されていない歯槽骨自体の性状による影響や3壁性欠損という周囲を骨組織に取り囲まれた場の支配によるものと考えられる。

脱灰骨移植後の骨再生機序では、大食細胞の出現はみられるものの、破骨細胞はほとんどみられない^{7-9,14-19)}。このことは、塩酸脱灰により破骨細胞の骨吸収過程が省略されたと考えられ、本研究においてもほぼ一致した所見が得られた。通常骨再生では、骨表面が破骨細胞によって溶解されて骨形成因子が溶出する。それによって骨芽細胞が誘導され、新生骨が形成される。また、同時に露出コラーゲン線維により誘導された線維芽細胞が基質線維を形成する。脱灰骨と非脱灰骨とは明らかにその形成機序が異なっており、脱灰骨基質そのものの影響により骨が誘導形成された可能性があるものと考えられる。さらに、脱灰基質の経時的変化については、Hagenら(1992)²³⁾は脱灰骨片移植後の長期観察を行い、周囲に新生骨が形成された後に脱灰骨に対しても再石灰化が起こると述べていることから、この後の骨改造現象に伴って脱灰骨も吸収代謝されると推察される。

さて、非脱灰骨と新生骨との間にはコラーゲン線維を含む顆粒層が、一方、脱灰骨と新生骨との境界部にはコラーゲン線維が介在していない電子密度の高い層状構造が存在した。このような骨修復や骨改造時の骨吸収面と新生骨との境界部にみられる cement line^{26,27)}は、破骨細胞および骨芽細胞によって形成される酸性フォスファターゼ陽性の複合糖質およびコラーゲンを含む層である。前者は、同様にコラーゲン線維を含み、本研究での光顕および超微構造がこの cement line と極めて類似している。また、この層の形成には破骨細胞様の多核細胞や骨芽細胞が関与すると推定されること、新生骨の形成過程が一般の骨再生や骨改造におけると同様の経過を辿っていること、さらにこの層が形態的に多様性を示すことなどから、cement line^{26,27)}の1つの表現型であると推測される。一方、後者では、cement line と類似の前者と異なりコラーゲン線維を欠いた層状という構造とともに、光顕所見においては厚さや染色性などの点でかなりの相違があ

る。むしろ、このような界面の層状構造は、裸出象牙質面と新生セメント質境界部²⁸⁾と塩酸脱灰象牙質面と新生セメント質との境界部²⁵⁾にそれぞれみられる層状構造と極めて類似している。また、このような界面構造は人工骨材料であるハイドロキシアパタイト周囲においても新生骨との界面にも認められる²⁹⁾。著者らは、組織化学的な検討を行い、この界面構造は複合糖質を含むと一種の接着のりとしての役割を演じているのではないかと考察している²⁸⁻³¹⁾。一方、この界面構造については、休止期の骨芽細胞の接する骨表面に存在する顆粒状構造の lamina limitans との類似性が示唆されているが、この両者を広義の cement line とする見解もあり、未だ確証されるに至っていない。いずれにしても、両者ともに骨新生や骨再生に深く関わっているものと考えられる。

最近、異種凍結乾燥骨を表面脱灰し、それを歯槽骨欠損へ移植する試みが行われているが、臨床的にはあまり良好な結果は得られていない^{12,13)}。本研究では、脱灰骨移植後の骨再生量の変化については検討しなかったため、他の処置法との優劣の判断は困難である。しかし、通常骨再生機序とは異なって破骨細胞による骨吸収が省略されることから、骨の形成時期は早まる可能性があり、臨床応用に向けて、さらに詳細な検討が求められる。

総 括

本研究では、ラット歯槽骨欠損に対し、0.6N 塩酸に15分脱灰処理した自家骨を移植し、移植12および21日後の周囲組織の超微形態を観察した。

1. 非脱灰骨移植群においては、移植骨片周囲の骨再生は、まず、多核巨細胞による吸収の後に骨芽細胞により新生骨が形成され、両者の界面には cement line 様構造が認められた。この界面の超微所見では、コラーゲン線維を含む顆粒状構造を呈し、これを介して脱灰骨および新生骨基質線維が互いに結合していた。

2. 脱灰骨移植群においては、脱灰骨周囲には破骨細胞の出現は少なく、直接骨芽細胞により新生骨が形成されていた。脱灰骨基質と新生骨との間の界面には、コラーゲン線維を欠く電子密度の高い顆粒状構造がみられた。

本研究結果から、塩酸脱灰処理自家骨は、非脱灰骨とは異なる機序で骨再生が起こることが明らかとなった。この脱灰骨移植では、異物反応も少なく、良好な修復像を示したことから、骨整形時に得られる骨片の表層塩酸脱灰処理が骨再生に有効である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Lindhe, J.: Textbook of Periontology. 2nd, Munksgaard, Copenhagen, 410-432, 1984.
- 2) Urist, M.R.: Formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899, 1965.
- 3) Urist, M.R., Huo, Y.K., Brownell, A.G., Hohl, W.M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M. and DeLANGE, R.J.: Purification of bovine morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 373-375, 1984.
- 4) Takaoka, K., Yoshikawa, H., Shimizu, N., Ono, K., Amitani, K. and Nakata, Y.: Partial purification of bone-inducing substances from a murin Osteosarcoma. *Clin. Orthop.* 164, 265-270, 1982.
- 5) Dubac, F.L. and Urist, M.R.: The accessibility of the bone induction principle in surface-decalcified bone implants. *Clin. Orthop.* 55, 217-223, 1967.
- 6) Urist, M.R.: Surface-decalcified allogenic bone (SDAB) implants. *Clin. Orthop.* 56, 37-50, 1968.
- 7) 長岡成孝: 脱灰骨基質の骨形成能に関する基礎的研究. 日歯周誌 20, 165-174, 1978.
- 8) Firschein, M. and Urist, M.R.: Enzyme induction, accumulation of collagen, and calcification in implants of bone matrix. *Clin. Orthop.* 84, 263-275, 1972.
- 9) 関谷 栄: イヌ歯槽骨欠損部への粉碎脱灰骨基質移植に関する実験病理学的研究. 日歯周誌 29, 749-775, 1987.
- 10) 関本恵一: 粉碎脱灰骨基質の歯周外科の応用に関する基礎的研究. 日歯周誌 26, 179-200, 1984.
- 11) 山之内一也: イヌ歯槽骨欠損部への混合移植(新鮮自家骨と粉碎脱灰骨基質)による創傷治癒に関する実験病理組織学的研究. 日歯周誌 29, 706-747, 1987.
- 12) Mellonig, J.T.: Decalcified freeze-dried bone allograft as implant material in human periodontal defects. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 4 (6): 40, 1984.
- 13) Libin, B.M., Ward, H.L. and Fishman, L.: Decalcified, Lyophilized Bone Allografts for use in human periodontal defects. *J. Periodontol.* 46, 51-56, 1975.
- 14) 前田昌穂: 脱灰骨粉末移植による骨誘導過程に関する電子顕微鏡的研究. 神戸大医紀要 42, 471-488, 1980.
- 15) 寺延 治, 住谷幸雄, 島田桂吉, 杉山武敏: 脱灰骨基質による骨形成過程の組織学的研究. 整形外科学 4, 73-78, 1977.
- 16) 荒井孝和, 磯部 鏡, 森田正之, 塩野正喜: 脱灰凍結乾燥骨の腹腔筋内移植にみられる Calcification の電顕的検討. 骨代謝 6, 90-94, 1973.
- 17) 矢作 茂: 脱灰処理象牙質移植による軟骨および骨形成能に関する実験的研究. 歯科学報 85, 15-45, 1985.
- 18) 磯部 鏡, 荒井孝和: 骨誘導実験における骨芽細胞の由来と石灰化. 骨代謝 10, 21-26, 1977.
- 19) 磯部 鏡, 荒井孝和, 富松 隆, 塩野正喜: 脱灰凍結乾燥骨の筋肉内移植実験における基質吸収と骨形成. 骨代謝 11, 275-279, 1978.
- 20) Ellegaard, B., Nielsen, I.M. and Karring, T.: Composite jaw and iliac cancellous bone grafts in intrabony defects in monkey. *J. Periodont. Res.* 11, 299-310, 1976.
- 21) 築瀬一彦: ラット歯槽骨欠損への新鮮自家骨および凍結乾燥骨移植に関する実験病理学的研究. 日歯周誌 26, 466-509, 1984.
- 22) Register, A.A. and Burdick, F.: Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. I. Optimal range. *J. Periodontol.* 46, 646-655, 1975.
- 23) 加納利文, 小川哲次, 藤谷百合, 廣島英雄, 河口浩之, 吉野美穂, Hossain, M.R., 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本 莫: 塩酸脱灰象牙質面の新生セメント質形成について. 広歯誌 24, 70-78, 1992.
- 24) 藤谷百合, 小川哲次, 廣島英雄, 河口浩之, 吉野美穂, 加納利文, 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本莫: フラップ手術後の塩酸脱灰処理歯根面に対する結合組織性再付着について. 日歯周誌 34, 446-455, 1992.
- 25) 小川哲次, 藤谷百合, 加納利文, 廣島英雄, 河口浩之, 吉野美穂, 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本莫: フラップ手術後の塩酸脱灰象牙質基質に対する結合組織性再付着の超微形態について. 日歯周誌 34, 846-856, 1992.
- 26) Oguro, I. and Ozawa, H.: Cytochemical studies of the cellular events sequence in bone remodeling: Cytological evidence for a coupling mechanism. *J.B.M.M.* 7, 30-36, 1989.
- 27) Nakamura, H. and Ozawa, H.: Characteristic localization of carbohydrates in osteoclast by lectin cytochemistry. *Bone* 13, 411-416, 1992.
- 28) 小川哲次: 歯周病罹患歯根周囲組織の再形成過程に関する実験病理学的研究 2. 歯肉剥離掻爬術後の再生結合組織性付着の光顕ならびに電顕による観察. 広歯誌 21, 126-146, 1989.
- 29) 河口浩之: ラット歯槽骨欠損におけるハイドロキシアパタイトセラミックス周囲の骨再生に関する超微形態学的研究. 広歯誌 22, 29-50, 1990.
- 30) Kawaguchi, H., Ogawa, T., Shirakawa, M., Okamoto, H. and Akisaka, T.: Ultrastructural and ultracytochemical characteristics of multinucleated cells after hydroxyapatite implantation into rat periodontal tissue. *J. Periodont. Res.* 27, 48-54, 1992.