

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論文提出者	岩田 晃司
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 玉置 幸道 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 中本 哲自
論文題目	
炭酸含有アパタイトを用いた卵巣摘出骨粗鬆症ラットの骨欠損修復	
<p>本研究では以下の内容について審査した。骨粗鬆症は高齢者の脆弱性病的骨折を引き起こすことが多く、特に高齢女性の閉経後骨粗鬆症では、脊椎の圧迫性骨折による円背や四肢骨の骨折による生活に支障を来す場合が多い。その病態は卵巣から分泌されるホルモンのエストロゲン低下に伴う高回転型の破骨細胞性骨吸収促進による骨梁の減少であることが知られており、骨粗鬆症患者の歯科領域ではビスホスホネート系をはじめとする骨粗鬆症薬による薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) を回避するためのポジショニングペーパーが発表されていて観血的処置に対する注意が呼び掛けられている。一方でこのような骨粗鬆症下においても骨形成能については維持されていることもわかっている。そこでインプラントを含む補綴系における骨補填や外科系治療において、積極的な骨芽細胞の骨伝導活性により治癒を促進する生体親和性材料が求められているが、材料が吸収される前に骨基質ができると、それ以上吸収しないことが懸念される。すなわち、骨伝導を促進しながら材料の吸収の両面を具備する骨補填材が求められている。土井らは、これまでに焼結温度を 750°C に調整して高度な吸収性を有した炭酸含有アパタイト (carbonated apatite, CAP) を開発している。そこで卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットを確立し、大腿骨に生じさせた骨欠損部に CAP を充填して実験的骨粗鬆症下における骨補填材の伝導性骨修復能を検証した。</p> <p>本研究では、8週齢の Wistar 系ラット雌 8 匹に対して、4 匹の非 OVX 正常群 (Sham) と 4 匹の両側卵巣摘出群 (ovary extracted, OVX) の 2 群に分け、さらに 12 週齢まで 4 週間飼育し、その後、各群のラット右大腿骨中央からやや近心骨端側の平坦部の骨膜を剥離し、トレフィンバー (外径 2.7 mm) で骨髄に達する円筒型骨欠損を形成し、750°C で焼結した CAP (300 μm ~ 500 μm メッシュ通過済) を充填した (Sham-CAP, OVX-CAP)。同ラットの左大腿骨に骨欠損のみ加えて対照とした (Sham-Cont, OVX-Cont)。皮膚縫合と抗菌薬投与による処置後 1 週, 2 週, 4 週, 8 週後にイソフルレンと酸素混合麻酔下で開胸し、安楽死直前の左心室から 4% 中性緩衝パラホルムアルデヒド導入による還流固定後に大腿骨と脛骨を含む下肢を摘出、さらに一晩固定後に、マイクロ CT 撮影を行い、10% EDTA 中性脱灰後にパラフィン包埋し、骨幹に垂直となるように 4 μm 厚のパラフィン切片を作製した。OVX 骨粗鬆症ラットは Sham ラットの処置後 4 週の脛骨を用いてマイクロ CT 撮影と β catenin 免疫染色で確認した。骨形成については、骨芽細胞転写因子マーカー (Runx2, OSX) と骨細胞マーカー (DMP1) について免疫染色を行った。</p>	

その結果, OVX 処置後 4 週のラット脛骨はマイクロ CT で骨端側海綿骨の骨梁の大幅な減少がみられ, 高回転型骨粗鬆症病態を示した. 一方, Sham, OVX のいずれの海綿骨でも骨髄細胞や骨芽細胞において β catenin の発現がみられたことから骨形成能を有していた. 骨欠損を与えた骨修復について, マイクロ CT による Sham-Cont, OVX-Cont では, 処置後 2 週後から骨欠損部に石灰化の低い未熟な海綿骨梁がみられ, 4 週後では欠損部を覆い周囲の皮質骨と同レベルに達する一層の薄い骨がみられ, 8 週後では骨表面レベルに達する海綿骨梁と皮質骨が見られたが, OVX-Cont では疎な海綿骨梁と薄い皮質骨の為に骨欠損中央部に陥没がみられた. 一方, Sham-CAP, OVX-CAP では, 処置後 2 週から CAP 粒子の吸収が始まり, 4 週後では小さな CAP 粒子間を埋めるようにエックス線不透過成分が皮質骨表面レベルまで達していた. 組織学的には, 処置後 4 週の Sham-Cont では, 既存骨の表面まで新生骨の形成と Runx2, OSX, DMP1 の陽性細胞を認めたが, OVX-CAP では CAP 周囲に伝導骨による取り囲みがみられ, Rynx2 は陽性細胞が少ないあるいは陰性であった. しかし OSX や骨細胞マーカーの DMP1 は Sham-Cont と同等の発現であった.

以上の結果から本研究内容を考察すると, 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの大腿骨に生じさせた骨欠損部に CAP による骨補填材の伝導性骨修復で, OVX による骨粗鬆症確立の期間は OVX によるホルモン性骨粗鬆症を惹起させた 12 週齢の雌ラット処置後 4 週で骨粗鬆症の病態を再現していると考えられる. また, 骨欠損の大きさについて自然治癒できない critical bone defect の付与を考慮する意味で頭頂骨が最適とされていたが, ラットの場合, 薄い皮質骨で直下の脳硬膜への損傷から炎症性浮腫による欠損部の押し上げ等, 実験的骨欠損手技に困難を伴うだけでなく, 補填材骨修復に骨の幹細胞供給源として骨膜が必要であること, また海綿骨と皮質骨が明瞭なため, 大腿骨を対象として 2.7 mm の骨欠損を適用した. 骨補填材の吸収と伝導骨について, CAP 結晶の焼結温度を 750 °C, 粒子を 300~500 μ m の篩を通過したものを材料の異物反応が低く, 吸収性の高さから採用した. 骨欠損部に埋入させた CAP 粒子は処置後 2 週から吸収が始まり, 4 週後では小さな CAP 粒子間を埋めるような伝導骨による骨増生がみられたことから, CAP は骨伝導性を有しながら効果的な吸収を示すことが示唆される. 臨床的関連については, 実際の臨床では加齢による変化と女性の場合には閉経後エストロゲン欠乏による骨粗鬆症患者である場合が多く, これらの患者の多くは骨吸収抑制や骨増生促進の投薬を受けている場合や, さらには乳がん患者や前立腺がん患者の骨転移による脊椎カリエス防止のためのビスホスホネート, 関節リウマチ等の自己免疫性疾患に対するメトトレキサート等の免疫抑制剤の投与を受けている場合が多い. これらの点を踏まえ, 加齢や投薬等の影響を排除して, ホルモン性骨粗鬆症を OVX ラットの骨欠損で検討した. マイクロ CT と組織学的観察から, OVX-CAP では Sham に比べて RUNX2 や OSX のような骨芽細胞マーカーや DMP1 にみる成熟骨基質マーカーの陽性局在が遅れている点は治療期間が長くなるが骨補填材として有用と考える.

審査では, 本研究の材料吸収速度の起因について, 使用した卵巣摘出ラットモデルの年齢設定と一般に閉経後骨粗鬆症との関係, 実験方法で critical bone defect の直径 6 mm の頭蓋冠を用いずに両足大腿骨の直径 2.7 mm を採用した理由, 用いた自家製の CAP が早期で吸収した点の考察を焼成後の結晶に基づく検証の必要性等を含めて副査から質問とこれに対する協議を行い, 材料の調整方法をさらに検討することで, より適切な形で骨造成と材料の吸収が達成できる材料を提供できる可能性があることで, 今後の検討課題とした上で審査委員は本論文を博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した.