



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	α -TCP複合化4-META/MMA-TBBレジン上へのrhBMP-2による骨増生
Author(s)	猪股, 慶久; 菅谷, 勉; 川浪, 雅光
Citation	北海道歯学雑誌, 37(2), 124-132
Issue Date	2017-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65477
Type	journal article
File Information	37-02_03_inomata.pdf



原 著

α -TCP 複合化 4-META/MMA-TBB レジン上への rhBMP-2 による骨増生

猪股 慶久 菅谷 勉 川浪 雅光

抄 録: 4-META/MMA-TBBレジンには優れた接着性と生体親和性を有し、歯根端切除術や垂直歯根破折などの接着治療に応用されている。さらに、4-META/MMA-TBBレジンには骨にも接着し、 α -TCPを複合化すると硬化したレジン表面への骨の増生や新生骨基質とレジンとの接触が増加することが示唆されている。そこで、本研究では4-META/MMA-TBBレジンに α -TCPを複合化することが、レジン上への骨増生に有効であるか、さらにBMP-2で骨を誘導し、レジン上への骨増生やレジンと増生骨との接触が得られるかを検討することである。

α -TCPを0wt%または60wt%で複合化したスーパーボンドのポリマー粉末1カップ、モノマー液4滴、キャタリスト1滴の割合で混和して頭蓋骨上に塗布した。さらに、rhBMP-2を含浸したコラーゲンスポンジでレジン上を被覆した群と、しない群を作製した。術後4, 8週で脱灰薄切標本を作製して、レジン上部への骨形成状態を光学顕微鏡で観察し、レジンと母床骨との接触率、増生骨によるレジン被覆率、レジンと増生骨の接触率を計測した。

その結果、 α -TCPを複合化するとレジン上への骨増生が増加し、レジンと増生骨との接触率も向上したが、レジン上の骨増生は14.2 (6.0-23.5) % (中央値, 四分位範囲) と低い値であった。一方、BMPでレジン上に骨誘導するとレジン全面を骨で被覆することが可能であり、レジンと新生骨との接触率も高くなった。以上より、4-META/MMA-TBBレジンに α -TCPを複合化させ、さらにBMPでレジン表面を被覆すると、レジン全面が骨に被覆され、レジンと骨との接触率が高まることが示唆された。

キーワード: 4-META/MMA-TBBレジン, α -TCP, BMP, 骨-レジン接触

緒 言

4-Methacryloxyethyl trimellitate anhydride/methyl methacrylate-tri-n-butyl borane (4-META/MMA-TBB) レジンは歯質に対する優れた接着性を有し^{1, 2)}、矯正用ブラケットの接着や動揺歯の固定、修復物の接着^{3, 4)}などに広く用いられている。さらに生体親和性も高いことが明らかにされ^{5, 6)}、直接覆髄^{7, 8)}、歯根端切除術や再植術時のroot-end sealing⁹⁻¹²⁾、垂直歯根破折の接着治療¹³⁻¹⁷⁾、髄床底穿孔部の封鎖^{18, 19)}にも応用されている。また、骨に接着させた研究^{20, 21)}では、象牙質の樹脂含浸層と同様の構造で接着し、引張試験では骨の凝集破壊が生じるなど高い接着力を示している²²⁾。また、1年間の観察期間後もレジンと骨の間の樹脂含浸層の構造に変化はなく、骨細胞への影響も外科的侵襲や乾燥による影響のみと考えられ、活発なモデリングはみられていない²⁰⁾。これらの結果から、4-META/MMA-TBBレジンには骨セメントとしても応用可能と考えられる。

しかし、サブマージした歯科用インプラント^{23, 24)}や皮

下に移植したシリコンプロテーゼが時間の経過とともに上皮を穿孔して露出する症例^{25, 26)}があるように、とくに歯肉や皮膚が薄い部位では、骨欠損部をレジンで修復するだけではレジンが露出する危険性がある。したがって、露出を防ぐにはレジン表面に骨を形成し、レジンが骨の中に埋没された状態になることが有効と思われる。ラットと頭蓋骨に4-META/MMA-TBBレジンを接着した実験では、硬化したレジン上に周囲の母床骨から骨が増生し、レジンと骨との間が結合組織の介在なく接触していることも観察されている²⁰⁾。しかし、硬化したレジン上への骨形成は遅く、その量も少なかったことから、臨床応用への課題の一つとしてレジン上への骨形成を向上させることが必要と考えられる。

レジン上への硬組織形成を促進する方法として、レジンからカルシウムイオンの放出が試みられている²⁷⁻²⁹⁾。Mineral trioxide aggregate (MTA) を4-META/MMA-TBBレジンに複合化した研究²⁷⁾では、カルシウムイオンの溶出はあるもののレジン上への硬組織形成は認められていない。一方、4-META/MMA-TBBレジンを骨髓腔に移

植した実験では、炭酸カルシウムやリン酸三カルシウム (TCP) を混和すると、レジン表面に形成された骨は細胞や結合組織を介在せずに直接レジンの接触している部位が増加したと報告されている²⁸⁻³⁰⁾。一方、骨形成タンパク bone morphogenetic protein (BMP) は優れた骨誘導能を持っている³¹⁻³³⁾ が、4-META/MMA-TBB レジンに混和して筋に移植した実験では、レジン表面への硬組織形成は認められていない³⁴⁾。そこで、骨欠損部に 4-META/MMA-TBB レジンを接着して形態を回復し、さらにレジン表面に BMP で骨を誘導する方法が有効ではないかと考えた。しかし、レジンが完全硬化する前に BMP でレジンを被覆すると、レジン表面の重合率が低下し、未重合モノマーが BMP の機能を低下させたり、レジンが BMP の担体とグラフト重合して³⁵⁾ 骨誘導が生じなくなる可能性がある。

そこで本研究の目的は、4-META/MMA-TBB レジンに α-TCP を複合化することが、頭蓋骨に接着させたレジン上への骨増生に有効であるかを評価すること、さらに骨に接着させたレジン上に BMP-2 で骨を誘導し、レジン上への骨増生状態、レジンと増生骨との接触状態などを検討することである。

材料と方法

移植方法

10週齢 Wistar 系雄性ラット 28 匹 54 部位をジエチルエーテルおよびペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル注射液、共立製薬[®]) を用いて全身麻酔を施した後、頭蓋部皮膚を半円弧状に切開し、頭蓋骨の骨膜を全層弁にて剥離、骨膜はすべて除去した。10% クエン酸 3% 塩化第二鉄溶液 (表面処理材 グリーン、サンメディカル) を 10 倍希釈して頭蓋骨面 2 か所を 5 秒間処理し、生理食塩水で洗浄、乾燥後、以下の 4 群の処置を行った。SB 群 (4 週 $n=6$, 8 週 $n=7$) : スーパーボンドクリア (サンメディカル) のポリマー粉末 1 カップ、モノマー液 4 滴、カタリスト 1 滴の割合で混和し、骨面に直径約 3mm で塗布した (図 1)。TCP 群 (4 週 $n=8$, 8 週 $n=8$) : α-TCP を

60wt% でスーパーボンドクリアのポリマー粉末に混和したもの 1 カップ、モノマー液 4 滴、カタリスト 1 滴の割合で混和し、骨面に塗布した。SB-BMP 群 (4 週 $n=6$, 8 週 $n=6$) : SB 群の処置後、ただちにメーカー指示に従って rhBMP-2 溶液 (1.5mg/ml) (INFUSE[®] Bone Graft, Medtronic) を含浸した $5 \times 5 \times 1$ mm のコラーゲンスポンジ (INFUSE[®] Bone Graft, Medtronic) でレジン上を被覆した。TCP-BMP 群 (4 週 $n=6$, 8 週 $n=7$) : TCP 群の処置後、ただちに SB-BMP 群と同様に INFUSE[®] Bone Graft でレジン上を被覆した。各処置後、皮弁を縫合した。

なお本研究は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認 (13-0195) を受け、同指針に従って行った。

光学顕微鏡観察および計測

観察期間は 4, 8 週とし、観察期間終了後、ジエチルエーテル吸引にて安楽死させ、頭蓋骨を採取、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定を行った。アセトンでレジンを溶解させた後、5% ギ酸で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋して、厚さ $5 \mu\text{m}$ の薄切標本を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン重染色し、光学顕微鏡観察および組織学的計測を行った。計測は試料の中央部およびその前後 $200 \mu\text{m}$ の 3 か所の標本で行った。

計測項目はレジン上縁の長さ (L1) (mm)、レジン下縁の長さ (L2) (mm)、レジン上に増生した新生骨基質の長さ (L3) (mm)、レジンとレジン上に増生した新生骨基質とが接触している長さ (C) (mm)、レジンと母床骨とが直接接触している長さ (D) (mm) とし (図 2)、レジンと母床骨との直接接合率 ($D/L2 \times 100$) (%), 増生骨によるレジン被覆率 ($L3/L1 \times 100$) (%), レジンと増生骨の直接接合率 ($C/L1 \times 100$) (%) を求めた。なお、骨基質とレジンの界面に軟組織や細胞の介在が観察されない部位を直接接合とした。

計測は画像解析ソフト (Image J 1.41, National Institutes of Health) を用いた。統計処理は SPSS10.0J[®] (日本 IBM) を用い、Kruskal-Wallis 検定, Mann-whitney U 検定を行った。

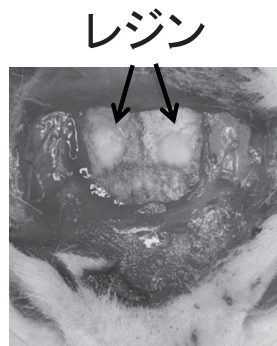


図 1 骨面へのレジン塗布方法

頭頂骨矢状縫合と冠状縫合を避けて頭頂骨左右の 2 か所に、直径約 3mm でレジンを塗布した。

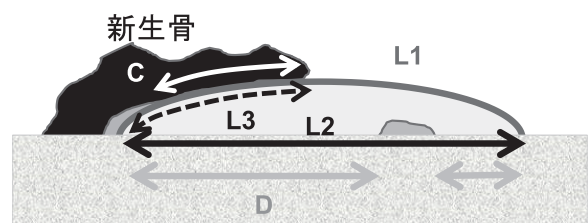


図 2 組織計測方法

- L1 : レジン上縁長さ (mm)
- L2 : 新生骨被覆部長さ (mm)
- L3 : レジンと母床骨接合長さ (mm)
- C : レジンと新生骨直接接合長さ (mm)
- D : レジンと母床骨直接接合長さ (mm)

結 果

1) 4 週後

SB群では、レジン上の大部分は結合組織によって被覆されており（図3-A）、レジン上への新生骨形成は一部の標本でごくわずかに認められたのみであった。新生骨は薄く緻密であったが、新生骨とレジンとの直接接触はほとんどみられず、界面には数層の細胞がみられた（図3-B）。

TCP群ではSB群と同様にレジン上への骨形成は一部の標本でのみ見られた（図4-A）。新生骨はSB群と同様に薄い緻密骨で、新生骨とレジンとの界面は、直接骨基質がレジンに接している部分と細胞が数層配列している部分がみられた。（図4-B）。

SB-BMP群ではレジンのほぼ全面が新生骨で被覆されており（図5-A）、新生骨は梁状であった。新生骨とレジンが直接接している部分は少なく、レジンとの界面には数層の細胞がみられた（図5-B）。

TCP-BMP群ではSB-BMP群と同様に、新生骨がレジン全面を被覆しており（図6-A）、新生骨基質の走向は不整であった。新生骨とレジンが直接接している部分は少なく、1～数層の細胞が介在していた（図6-B）。

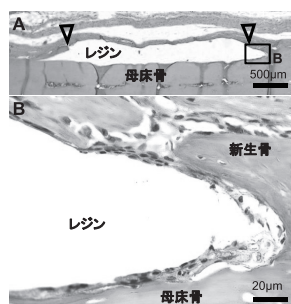


図3 SB群 4 週後のHE染色像

A：レジン上面の大部分は結合組織によって覆われている。

▽：増生骨端

B：Aの拡大像。新生骨は薄く緻密で、レジンと新生骨との界面には数層の細胞がみられる。

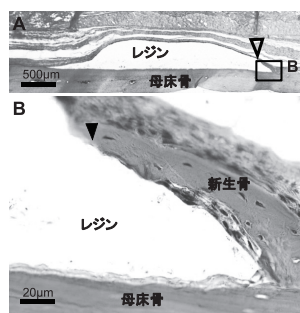


図4 TCP群 4 週後のHE染色像

A：レジン上面の大部分は結合組織によって覆われている。

▽：増生骨端

B：Aの拡大像。薄い緻密骨で、新生骨とレジンとの界面は、直接骨基質がレジンに接している部分（▼）と細胞が数層配列している部分がみられた。

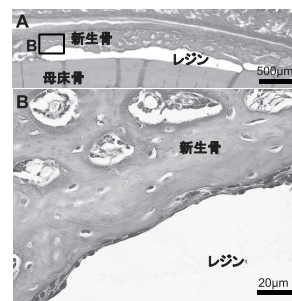


図5 SB-BMP群 4 週後

A：レジン上面のほぼ全面が新生骨で被覆されている。

B：Aの拡大像。新生骨は梁状であった。新生骨とレジンが直接接している部分は少なく（▼）、レジンとの界面には数層の細胞がみられた。

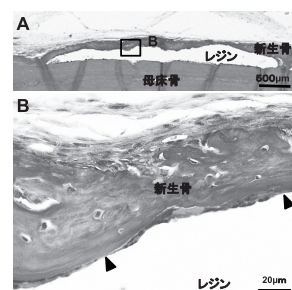


図6 TCP-BMP群 4 週後

A：新生骨がレジン全面を被覆している。

B：Aの拡大像。新生骨基質の走向は不整であった。新生骨とレジンが直接接している部分は少なく（▼）、1～数層の細胞が介在していた。

2) 8 週後

SB群は4週後とはほぼ同様の所見で、レジン上に増生した新生骨はわずかであった（図7-A）。直接接触している部位はみられず、新生骨とレジンとの界面には1～数層の細胞が配列していた（図7-B）。レジンと母床骨の界面にはヘマトキシリンに淡染する数μmの無構造な層が介在していた。母床骨の骨細胞には委縮や消失がみられたが、その深さは表層から100μm程度であった（図7-C）。

TCP群は、レジン上に増生した新生骨が4週後よりやや増加し（図8-A）、新生骨は薄く緻密で、骨基質とレジンが直接接触している部分もみられた。新生骨とレジンとの界面に細胞が介在している部分でも、その厚みは1層程度に薄くなっていた。（図8-B）。

SB-BMP群ではレジン上を厚い新生骨が全面被覆していた（図9-A）。新生骨は緻密化していたが走向は規則的であった。新生骨とレジンとの界面は直接接触している部分が多くなっており、接触していない部分でも細胞が散在しているのみであった（図9-B）。

TCP-BMP群もレジン全面を4週より厚く新生骨で被覆し（図10-A）、新生骨は骨小腔がみられ、走向は規則的であった。レジンと新生骨が直接接触している部分は多くな

り、接していない部分では骨基質とレジンの距離は極めて近く、細胞が散在している程度であった（図10-B）。

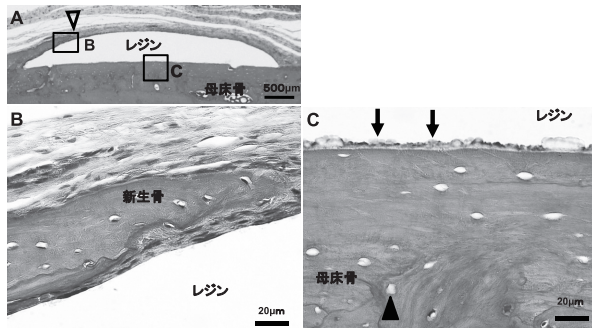


図7 SB群 8週後

- A：レジン上面の新生骨はわずかである。▽：増生骨端
B：Aの拡大像。新生骨は薄く緻密で、レジンと新生骨の間は、直接接している部位はみられなく、1～数層の細胞が配列していた。
C：Aの拡大像。レジンと母床骨の界面にはヘマトキシリンに淡染する層がみられた（↓）。母床骨の表層から100μm程度に骨細胞の委縮や消失がみられた（▼）。

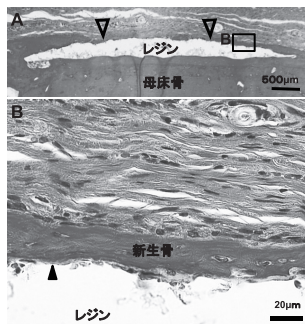


図8 TCP群 8週後

- A：レジン上に薄い骨の増生がみられる。▽：生骨端
B：Aの拡大像。新生骨は薄く緻密な構造で、新生骨とレジンが直接接触している部位（▼）がわずかにみられ、接触していない部分でも細胞の介在は1層程度であった。

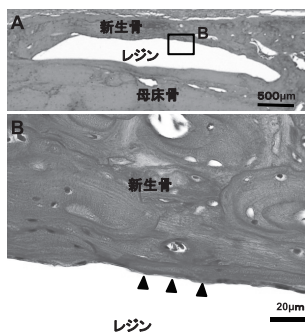


図9 SB-BMP群 8週後

- A：レジン全面が4週より厚く新生骨で被覆されている。
B：Aの拡大像。新生骨は緻密化していたが走向は規則的であった。新生骨とレジンとの界面は直接接触している部分（▼）が多くなっており、接触していない部分でも細胞が散在しているのみであった。

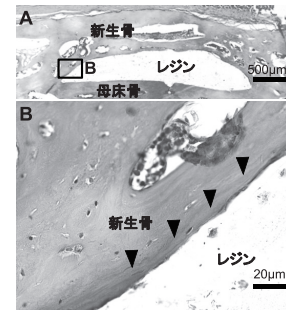


図10 TCP-BMP群 8週後

- A：レジン全面を4週より厚く新生骨で被覆されている。
B：Aの拡大像。新生骨は骨小腔がみられ、走向は規則的であった。レジンと新生骨が直接接触している部分（▼）は多くなり、接していない部分では骨基質とレジンの距離は極めて近く、細胞が散在している程度であった。

3) 組織学的計測結果

①レジンと母床骨の直接接合率

4, 8週後とも、すべての群でレジンのほぼ全面が骨と直接接触しており、各群間に有意差はなかった。

表1 レジンと母床骨の直接接合率

	4週後	8週後
SB群	97.0(96.0-97.5) (n=6)	97(95.5-97.5) (n=7)
TCP群	94.7(90.9-97.8) (n=8)	99.5(93.5-100) (n=8)
SB-BMP群	99.0(97.3-100) (n=6)	97.5(95.5-98.7) (n=6)
TCP-BMP群	99.3(97.9-100) (n=6)	94.7(85.5-98.7) (n=7)

中央値, 四分位範囲(%)

各群の4, 8週とも4群間に有意差なし。

②増生骨によるレジン被覆率

4週後の中央値（四分位範囲）は、SB群（n=6）が0（0-4.1）、TCP群（n=8）が0（0-5.8）、SB-BMP群（n=6）が97.9（92.2-100）、TCP-BMP群（n=6）が97.2（95.9-98.5）であった。SB-BMP群はSB群に比べ、TCP-BMP群はTCP群に比べて有意に高かった（ $p<0.05$ ）。

8週後はSB群（n=7）が0（0-0）、TCP群（n=8）が14.2（6.0-23.5）、SB-BMP群（n=6）が100（100-100）、TCP-BMP群（n=7）が100（100-100）であった。TCP群はSB群に比べて有意に高く（ $p<0.05$ ）、SB-BMP群はSB群より、TCP-BMP群はTCP群より有意に高かった（ $p<0.05$ ）。4, 8週で比較するとTCP-BMP群では8週後で有意に高い値を示した（ $P<0.05$ ）。

表2 増生骨によるレジン被覆率

	4週後	8週後
SB群	0(0-4.1)	0(0-0)
TCP群	0(0-5.8)	14.2(6.0-23.5)
SB-BMP群	97.9(92.2-100)	100(100-100)
TCP-BMP群	97.2(95.9-98.5)	100(100-100)

中央値, 四分位範囲(%)

*: $p<0.05$ Kruskal-Wallis検定, Mann-Whitney U検定

③レジンと増生骨との直接接合率

4 週後のSB群 (n=6) が0 (0.0-3), TCP群 (n=8) が0 (0.0-1.0), SB-BMP群 (n=6) が5.5 (1.2-8.5), TCP-BMP群 (n=6) が6.2 (4.4-8.1) で, TCP-BMP群がSB群とTCP群より比較し有意に高かった ($p<0.05$).

8 週後はSB群 (n=7) が0 (0.0), TCP群 (n=8) が2.5 (1.1-4.2), SB-BMP群 (n=6) が14.3 (10.9-16.8), TCP-BMP群 (n=7) が16.7 (12.9-34.5) で, TCP群とSB-BMP群はSB群より, TCP-BMP群はSB群とTCP群より有意に高かった ($p<0.05$).

各群の4, 8 週後を比較すると, SB-BMP群とTCP-BMP群は8 週後が有意に高かった ($p<0.05$).

表3 レジンと増生骨との直接接合率

	4 週後	8 週後
SB群	0(0.0-3)	0(0.0)
TCP群	0(0.0-1.0)	2.5(1.1-4.2)
SB-BMP群	5.5(1.2-8.5)	14.3(10.9-16.8)
TCP-BMP群	6.2(4.4-8.1)	16.7(12.9-34.5)

中央値, 四分位範囲 (%)

*: $p<0.05$ Kruskal-Wallis検定, Mann-Whitney U検定

考 察

本研究は4-META/MMA-TBBレジンに α -TCPを複合化, さらにBMPを併用して, レジン上への骨形成やレジンと骨との接触状態を評価した.

α -TCPの濃度を60%としたが, これ以上濃度を高くすると硬化時間が長くなるとともに強度が低下して実用が難しくなり, さらにレジンの重合率が低下して炎症が生じる危険性が考えられたためである. 本実験の結果, TCP群の4, 8 週とも, レジン上に骨が増生して直接接合または近接していたことから, α -TCPを60%複合化しても十分な重合率が得られていたと思われる.

骨増生率と接合率は8 週後で, TCP群がSB群より高い値を示した. これは, α -TCPを4-META/MMA-TBBレジンに複合化して骨髄腔に埋植すると, 骨とレジンの直接接合率が向上したという柳澤らの報告³⁰⁾と一致する結果であった. 柳澤らはこの報告で, α -TCPを複合化した4-META/MMA-TBBレジンに水を浸漬するとカルシウムイオンが溶出することを報告しており, 生体内でも溶出したカルシウムやリンが骨基質の形成を向上させるのに効果があったのではないかと考察している. 本研究でもTCP群がSB群より高い骨増生率と接合率を示したのは同様の効果であったと思われる.

しかし8 週後の骨増生率は, 臨床的には有効性が期待できる量ではなかった. そこで, BMPを併用してレジン上への骨誘導を行った. 一般にレジンの重合は酸素や水で障害を受けるが³⁶⁾, スーパーボンドはtri-n-butylborane

(TBB)を重合開始剤としているため, 水分があっても比較的高い重合率が得られるとされている³⁷⁾. また, スーパーボンドを血液中や結合組織内で重合させると, 空気中で重合した場合よりも親和性は高くなると報告^{38, 39)}されているが, 次亜塩素酸ナトリウムで洗浄した根管壁では, 酸素の残存によって重合率が低下するため接着力が低下するとも言われている^{40, 41)}. さらに, レジン表面が止血剤に触れた状態で重合すると, 止血剤吸収後の炎症状態が止血剤の種類によって異なることも報告されている⁴²⁾. したがって, スーパーボンドの重合時に表面にどのような物質が接しているかは重合状態に影響すると考えられ, レジンに接しているBMPが重合率を低下させて, BMPによる骨形成やレジンと骨との接触が阻害されないかを検討することが必要であった. また, 現在市販されているBMP製剤はコラーゲンスポンジを担体としているが, 4-META/MMA-TBBレジンにコラーゲンとグラフト重合することが報告されており³⁵⁾, レジンと担体が重合してBMPが骨誘導能を発揮できなくなる可能性もあった. しかし, 本研究の結果, SB-BMP群とTCP-BMP群では, 4 週より8 週で骨の成熟がみられ, レジンと骨との接触率も高くなったことから, BMPがレジンの重合を障害し, その結果未重合レジンが溶出してBMPの機能が阻害されることはなかったと考えられた.

SB-BMP群とTCP-BMP群の両群とも, 術後4 週はレジンと増生骨との間に多数の細胞を含む軟組織が認められ, レジンと骨との接触率は低かった. しかし, 術後8 週ではこれらの細胞は減少または消失して, 骨がレジンに直接接合している部分が多くなった. このように, 軟組織を介してレジン上を新生骨が早期の段階で形成され, 時間の経過とともに軟組織量が減少して, レジンと骨基質の距離が減少し, 直接接合が増加するという骨形成過程は, スーパーボンドを骨髄腔に埋植して骨形成状態を調べた逸見ら²⁸⁾, 洲崎ら²⁹⁾, 柳澤ら³⁰⁾の調査と同様であった. 人工材料表面への骨の形成については, 骨芽細胞が材料上に増殖, 分化して骨基質が形成される接触骨形成と, 材料上の細胞は骨を形成することなく, 材料周囲の骨が増殖して材料表面まで骨が形成される遠隔骨形成の2つの様式が考えられている⁴³⁾. 本研究でも, レジンと新生骨の間に軟組織が介在している部位では, レジン上面に骨基質の形成は見られなかったことから, 遠隔骨形成と同様の様式で新生骨がレジン側に増殖することで, 新生骨とレジンとの接触率が経時的に増加したと思われる. また, 遠隔骨形成では材料表面の細胞は死滅すると考えられており, 本実験でもレジン上面の細胞が, 死滅, 消失し, そこに新生骨基質が増生してレジンとの接触が増加したのではないかとと思われる.

一方, レジン上に新生骨が増生してレジンに被覆していても, レジンと新生骨との間に厚い軟組織が介在し, レジン上面の新生骨が薄く, レジン周囲の母床骨と狭い範囲で

しか結合していない場合には、周囲結合組織が動いたときにレジン上面の新生骨が結合組織とともに動いてしまい、レジンと新生骨の間隙が広がったり、物理的刺激が加わって新生骨が減少したり失われる危険性がある。したがって、新生骨とレジンの間に介在していた細胞が死滅して、接触率が高くなることは、細胞が生存している場合よりもレジンの生体親和性が低下している結果であったとしても、臨床的には新生骨との接触率が向上した方が利点はあると思われる。しかし、新生骨とレジンが接触することや、どの程度接触率が得られれば有効であるかは今後検討する必要がある。

また、BMPは強力な骨誘導能を有するが³¹⁻³³⁾、高濃度で用いると骨芽細胞より破骨細胞の活性が高くなって周囲硬組織の吸収が生じたり^{44, 45)}、多量のBMPは悪性腫瘍の発生リスクを高める危険性が指摘されている^{46, 47)}。本研究結果から、大きな骨形態の回復が必要な場合に、大部分をレジンで回復させレジン表面を新生骨で被覆することで、BMPの使用量を著しく減少させることが可能になると考えられ、新たな骨形態回復方法として発展が期待される。さらに4-META/MMA-TBB レジンは金属やセラミックにも接着することから、これらの人工材料を併用することも容易であり、大きな負荷が加わる場合の機能回復にも有効と思われる。また、現在の再生療法では期待した形態に骨を再生することは難しいが、レジンで形態を回復してその表面に薄い骨を誘導する場合には、ほぼ計画通りの形態を回復することが可能と考えられ、ブリッジのポンティック部の歯槽堤形成や顎顔面領域の欠損回復など、審美的な要求が伴う場合には優れた治療法になると考えられる。とくに骨壁が薄く移植材量をスクリューで固定することが難しい部位では、骨に接着するレジン是有用性が高いと思われる。

母床骨とレジンの界面には数 μm のヘマトキシリンに染色する無構造な層がすべての標本でみられた。4-META/MMA-TBBレジンと骨を接着させその界面の状態を検索した中塚らの報告²⁰⁾では、脱灰薄切標本でみられたレジンと母床骨間の数 μm のヘマトキシリン好性の層は、SEMやTEMで観察した結果、樹脂含浸層であったと報告されている。このことから、本実験でみられたこのヘマトキシリン好性の層も同様に樹脂含浸層であったと思われる。一方、硬化したレジン表面に新生骨が増生した場合には、母床骨との界面にみられたようなヘマトキシリン好性の層はみられなかった。中塚らは、脱灰薄切標本では骨基質とレジンが直接接しているように見える部位でも、塩酸と次亜塩素酸ナトリウムで処理してSEM観察すると間隙がみられたと報告²⁰⁾しており、本研究でも同様に、硬化したレジン上面に増生した新生骨基質とレジンの界面の構造は、母床骨とレジンの界面の構造とは大きく異なるものと思われる。

また、レジン直下の母床骨100 μm では骨細胞が萎縮や消失していた。この層は腐骨が分離するように穿下性に吸収されて分離することも考えられたが、そのような所見はなく、本実験の8週のすべての群で母床骨とレジンの接触率が高い値を示していたことから、その危険性は低いと思われた。これは中塚らの報告²⁰⁾と一致するものであった。しかし、骨のリモデリングが樹脂含浸層直下で生じた場合には、レジンと骨基質がどのような接触状態になるかは未知であり、今後の大きな課題である。

結 論

本研究では4-META/MMA-TBBレジンに α -TCPを複合化させ、さらにBMPでレジン表面を被覆した結果、次の結論を得た。

- ① α -TCPを複合化するとレジン上の骨増生が増加し、レジンと増生骨との接触率が向上した。
- ②BMPでレジン上に骨誘導するとレジン全面を骨が被覆し、レジンと骨との接触率も向上した。

参 考 文 献

- 1) 竹山守男, 樫淵信郎, 中林宣夫, 増原英一: 歯科用即硬性レジンに関する研究 (第17報) 歯質および歯科用合金に接着するレジン. 歯理工誌, 19: 179-184, 1978.
- 2) 中林宣夫: 接着界面の象牙質側に生成した樹脂含浸象牙質について. 歯材器, 1: 78-81, 1982.
- 3) Miura F, Nakagawa K, Masuhara E: New direct bonding system for plastic brackets. Am J Orthod, 59: 350-361, 1971.
- 4) Chang JC, Hurst TL, Hart DA, Estey AW: 4-META use in dentistry: A literature review. J Prosthet Dent, 87: 216-224, 2002.
- 5) 諸星裕夫, 井上 孝, 下野正基, 市村賢二, 真坂信夫: 歯髄保存療法に有効な4-META/MMA-TBB系接着性レジン その2 細胞反応に関する実験的検索. 接着歯学, 10: 235-239, 1992.
- 6) 野口裕之, 菅谷 勉, 加藤 熙: 縦破折した歯根の接着による治療法 第1報 培養歯根膜を用いた接着性レジンセメントの毒性の検討. 日歯保存誌, 40: 1445-1452, 1997.
- 7) 細谷由美子, 一瀬暢宏, 井上 孝, 福本 敏, 後藤譲治: 4-META/MMA-TBBレジンによる直接歯髄覆罩後の歯髄の病理組織学的変化 (第1報). 小児歯誌, 35: 401-409, 1997.
- 8) Morohoshi Y, Inoue T, Shimono M: Influences of 4-META/MMA-TBB adhesive resin on osteodentinogenesis. Rabbit dental pulp in vivo immunohistochemical and electronmicroscopic studies. Bull Tokyo dent Coll, 40: 129-138, 1999.

- 9) 菅谷 勉, 野口裕史, 長谷川有紀子, 田中裕子, 川浪雅光: 歯根端切除時に4-META/MMA-TBBレジンを用いた場合の臨床成績. 日歯保存誌, 45: 62-67, 2002.
- 10) 長谷川有紀子, 菅谷 勉, 川浪雅光: 根尖性歯周炎の治療に対する4-META/MMA-TBBレジンによるroot-end-sealingの有効性. 日歯保存誌, 47: 622-632, 2004.
- 11) 大谷香織, 菅谷 勉, 川浪雅光: 根尖切除術における切除面の封鎖法の違いが実験的根尖性歯周炎の長期治療に及ぼす影響. 日歯保存誌, 51: 648-658, 2008.
- 12) Ohtani K, Sugaya T, Miyaji H, Tomita M, Hasegawa Y, Motoki Y, Takanawa Y, Tanaka S, Kawanami M: Healing of experimental apical periodontitis after apicoectomy using different sealing methods on resected root end. Dent Mater J, 30: 485-492, 2011.
- 13) 野口裕之, 菅谷 勉, 加藤 熙: 縦破折した歯根の接着による治療法 第2報 接着性レジンセメントで接着・再植した場合の組織学的検討. 日歯保存誌, 40: 1453-1460, 1997.
- 14) 眞坂信夫, 小幡宏一: 破折歯への対応 (その1). 垂直破折歯に対する接着保存法. 日歯医師会誌, 50: 6-13, 1998.
- 15) Sugaya T, Kawanami M, Noguchi H, Kato H, Masaka N: Periodontal healing after bonding treatment of vertical root fracture. Dent Traumatol, 17: 174-179, 2001.
- 16) 富田真仁, 菅谷 勉, 川浪雅光: 垂直歯根破折に口腔内接着と口腔外接着・再植を行った場合の歯周組織の治療. 日歯保存誌, 45: 787-796, 2002.
- 17) Hayashi M, Kinomoto Y, Takeshige F, Ebisu S: Prognosis of intentional replantation of vertically fractured roots reconstructed with dentin-bonded resin. J Endod, 30: 145-148, 2004.
- 18) 山本俊樹, 菅谷 勉, 加藤 熙: 髄床底穿孔の処置に4-META/MMA-TBBレジンを用いた場合の歯周組織反応に関する病理学的検討. 日歯保存誌, 43: 1239-1248, 2000.
- 19) 山本俊樹, 菅谷 勉, 川浪雅光: 髄床底穿孔の処置に4-META/MMA-TBBレジンを用いた場合の臨床成績. 日歯保存誌, 47: 733-742, 2005.
- 20) 中塚 愛, 川村直人, 菅谷 勉, 川浪雅光: 4-META/MMA-TBBレジンと骨との長期安定性. 歯材器, 27: 455-465, 2008.
- 21) Morishita T, Sugaya T, Nakatsuka M, Sunosaki M, Kawanami M: Connective tissue reaction and bone-cement contact after implantation of PMMA resin cements. J Oral Tissue Engin, 10: 1-12, 2012.
- 22) 工藤 愛, 鷲巣太郎, 中谷充宣, 菅谷 勉: 表面処理材の濃度の違いによる4-META/MMA-TBBレジンと骨との接着強さの比較検討. 接着歯学, 32: 185, 2014.
- 23) Cehreli MC, Kökat AM, Uysal S, Akca K: Spontaneous early exposure and marginal bone loss around conventionally and early-placed submerged implants: a double-blind study. Cline Oral Implant, Res, 21: 1327-1333, 2010.
- 24) 高橋美穂, 上松隆司, 堂東亮輔, 杉野紀幸, 吉成伸夫: 上顎前歯部インプラント埋入後に歯肉退縮を起こした1症例. 松本歯科, 38: 131-139, 2012.
- 25) 大原國章: 皮膚病変の裏に潜むもの 頭頸部編 鼻プロテーゼの露出. Visual Dermatology, 6: 626-629, 2004.
- 26) 花垣博史: 人工真皮と耳介軟骨移植を用いたシリコン露出外鼻 (鼻背部) の治療経験. 日本美容外科学会会報, 26: 78-82, 2004.
- 27) Kaul R, Farooq R, Kaul V, Malik AH, Purra AR, Ahmad: Evaluation of biological, physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate mixed with 4-META/MMA-TBB. Indian J Dent Res, 24: 418-422, 2013.
- 28) 逸見 優, 菅谷 勉, 中塚 愛, 川浪雅光: 炭酸カルシウムが4-META/MMA-TBBレジン上への骨形成に与える影響. 北海道歯誌, 32: 114-123, 2012.
- 29) 洲崎真希, 菅谷 勉, 川浪雅光: 4-META/MMA-TBBレジンの硬化条件がレジン表面上への骨形成に及ぼす影響. 北海道歯誌, 34: 65-76, 2014.
- 30) 柳澤 剛, 菅谷 勉, 川浪雅光: 炭酸カルシウムまたは α -TCPを複合化した4-META/MMA-TBBレジン上への新生骨の接触. 北海道歯誌, 36: 54-62, 2016.
- 31) de Groot K, Deshmukh A: The subcutaneous implantation of xenogeneic decalcified teeth. J Periodontol, 46: 78-81, 1975.
- 32) Urist MR, Mikulski A, Contreas CN: Reversible extinction of the morphogen in bone matrix by reduction and oxidation of disulfide bonds. Calcif Tissue Res, 19: 73-83, 1975.
- 33) Butler WT, Mikulski A, Urist MR, Bridges G, Uyeno S: Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. J Dent Res, 56: 228-232, 1977.
- 34) 井上 孝, 松坂賢一, 村上 聡, 小池吉彦, 宮越照一, 下野正基: BMP含有4-META/MMA-TBB接着性レジンの骨形成能に関する実験的研究. 日歯保存誌, 45: 434-440, 2002.
- 35) 山本隆司, 中林宣男: MMA-TBB系レジンの象牙質への接着とモデルタンパクへのグラフト重合の関係 (第2報). 機能性モノマーの効果, 歯材器: 8, 567-571,

- 1989.
- 36) 関文 久, 戸井田哲也, 中林宣男: 粉成分に吸着された酸素と水がアクリル床用材料に与える影響. 歯材器, 14 : 691-696, 1995.
- 37) Taira Y, Imai Y : Review of methyl methacrylate (MMA)/tributylborane (TBB)-initiated resin adhesive to dentin. Dent Mater J, 33 : 291-304, 2014.
- 38) 野口裕史, 菅谷 勉, 田中佐織, 宮治裕史, 加藤 熙: スーパーボンドによる逆根充直後に血液が接触した場合の表面性状. 日歯保存誌, 43 : 97, 2000.
- 39) 川村直人, 菅谷 勉, 宮治裕史, 川浪雅光: 4META/MMA-TBBレジンの硬化条件が組織反応に及ぼす影響. 日歯保存誌, 46 : 853-859, 2003.
- 40) 片岡博樹, 吉岡隆知, 須田英明, 今井備二: 4META/MMA-TBBレジンの象牙質接着に及ぼす次亜塩素酸ナトリウムの影響. 日歯保存誌, 42 : 241-247, 1999.
- 41) Soeno K, Taira Y, Matsumura H, Atsuta M, Suzuki S : Adhesion of 4META/MMA-TBB resin to collagen-depleted dentin-effect of conditioner with ascorbic acid/ferri c chloride. Dent Mater J, 23 : 100-105, 2004.
- 42) 高輪泰弘, 川村直人, 菅谷 勉, 川浪雅光: 4-META/MMA-TBBレジんに止血剤を併用した場合の組織反応. 北海道歯誌, 31: 35-43, 2010.
- 43) 下野正基: 新編 治療の病理. 342-348, 医歯薬出版, 東京, 2011.
- 44) Miyaji H, Sugaya T, Kato K, Kawamura N, Tsuji H, Kawanami M : Dentin resorpti on and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. J Periodontal Res, 41 : 311-315, 2006.
- 45) Pobloth AM, Duda GN, Giesecke MT, Dienelt A, Schwabe P : High-dose recombin ant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model. J Tissue Eng Regen Med doi : 10.1002/term. 2049, 2015.
- 46) Simmonds MC, Brown JV, Heirs MK, Higgins JP, Mannion RJ, Rodgers MA, Stewart LA : Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protei n-2 for spinal fusion : a meta-analysis of individual-participant data. Ann Intern Med, 158 : 877-889, 2013.
- 47) Fu R, Selph S, McDonagh M, Peterson K, Tiwari A, Chou R, Helfand M : Effective ness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion : a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med, 158 : 890-902, 2013.

ORIGINAL

Bone formation by rh-BMP-2 on 4META/MMA-TBB resin containing α -TCP

Yoshihisa Inomata, Tsutomu Sugaya and Masamitsu Kawanami

ABSTRACT : It is the case that 4-META/MMA-TBB resin (Super-Bond, Sun Medical) has been used for root-end sealing following apico-ectomy and the bonding treatment of vertical root fractures because of the high adhesive property and biocompatibility. Furthermore, 4-META/MMA-TBB resin containing α -TCP was covered with augmentation of bone during the healing of a bone marrow defect and showed partially direct contact with new bone. In this study, we evaluated bone formation ratio and the direct contact ratio following BMP application on 4-META/MMA-TBB resin containing α -TCP on skulls of rats.

The skin flap was elevated and periosteum was peeled out of the skull parietal bone of rats. One cup of polymer powder containing 0wt% or 60wt% α -TCP of Super-Bond was mixed with four drops of a monomer liquid and one drop of an initiator, and was applied to the bone. Two groups were prepared : one in which the resin was covered with a collagen sponge infused with rhBMP-2, and one in which it was not. Histological specimens were prepared at 4 and 8 weeks post-operation, and the sections were stained with H-E. New bone formation and histological measurements were histologically observed in bone coverage ratio over the resin and the direct contact ratio with new bone and the resin itself.

As a result, bone coverage ratio and the direct contact ratio were significantly higher in the case of the resin containing α -TCP more than in case of the resin only. Bone coverage ratio in case of the resin containing α -TCP was 14.2(6.0-23.5)%. On the other hand, entire bone coverage was induced by application of BMP on the resin containing α -TCP or the resin only. The direct contact ratio in case of BMP application on the resin containing α -TCP was significantly higher than that in case of BMP application on resin only. In summary, it was suggested that the BMP application on the resin containing α -TCP, can induce bone growth covering the entire surface of the resin and increase the direct contact ratio between the resin and new bone.

Key Words : 4-META/MMA-TBB resin, α -TCP, BMP, bone-resin contact