HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | ラット頭蓋骨欠損部に埋入したウシ脱灰象牙質由来コラーゲン移植材周囲における骨形成の検討 |
| Author(s) | 安永, 賢史 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(歯学) |
| Dissertation Number | 甲第15968号 |
| Issue Date | 2024-03-25 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k15968 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/97160 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Yoshifumi_Yasunaga.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

# ラット頭蓋骨欠損部に埋入したウシ脱灰象牙質由来コラーゲン移植材周囲における骨形成の検討

令和6年3月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

安永賢史

# Ⅰ. 緒　　言

インプラント治療は、高い治療効果[1]と予知性[2,3]から、欠損補綴治療の一選択肢として広く臨床応用されている。しかしながら、抜歯後の歯槽骨は垂直方向で約 11~22%、および水平方向で約 29~63%減少するという報告があり[4]、インプラント体埋入に十分に骨量が確保できないことは、インプラント臨床の大きな問題の一つとなっている。インプラント埋入に際して骨量が不十分な場合には、骨造成処置[5,6]が行われることが多く、自家骨や異種骨、人工骨などの様々な骨補填材が使用されている[7]。理想的な骨補填材としては優れた生体適合性や骨伝導能を有することが望まれ、これらの条件を満たすものとして自家骨が挙げられるが、自家骨の採取には採取量に制限があり健常組織に対する侵襲が大きいという欠点がある。異種骨や人工骨の場合には炎症反応を惹起すること[8]や、インプラント周囲炎に罹患した際には、その吸収量が大きいこと[9]などの問題点が報告されている。これらの問題を解決すべく、近年、炭酸アパタイト顆粒[10]やリン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体[11]が開発され、歯周組織再生療法[12]や骨造成処置[13,14]において良好な成績が報告されている。

象牙質は自家骨に近似する性質を有しており、骨補填材としての臨床応用もなされている[15]。象牙質は、多孔質構造である象牙細管を有することから細胞増殖の足場として有効であること、Ⅰ型コラーゲン量が骨と同等であること、さらに骨形成タンパク質（Bone Morphogenetic Protein : BMP）を含有していること[16,17]が報告されている。また、象牙質や皮質骨などの高度に石灰化した組織は、ハイドロキシアパタイトの結晶構造が BMP などの成長因子の放出を抑制するため、脱灰象牙質の方が骨形成に優れていることも報告されている[18,19]。Kabir らはヒト脱灰象牙質を羊の腸骨稜に臨界骨欠損を形成後に埋入し、マイクロ CT および組織形態学的に解析し、脱灰象牙質表面における新生骨

の形成と脱灰象牙質との癒合することを報告した[20]。また、ヒト脱灰象牙質による骨造成処置に関する臨床報告もなされている[21–24]。しかし、自家由来象牙質は埋伏智歯や矯正治療における便宜抜歯からのみ採取が可能であり、自家骨以上に採取量が制限される。この問題に対して、異種の脱灰象牙質が着目され、均質かつ大量の象牙質が採取可能なウシからの脱灰象牙質由来コラーゲン移植材（Bovine Demineralized Dentin Matrix 以下 BDDM）の開発が進められている[25]。BDDM を骨補填材としての使用を目的とした骨形成能を評価した報告は少ない[26]。本研究ではラット頭蓋骨に自然治癒が生じない大きさの骨欠損部を形成して BDDM を埋入し、組織反応と骨形成を観察することにより、BDDM の骨補填材としての可能性を検討することを目的とした。

## Ⅱ． 材料と方法

### 1.実験材料

ウシ下顎歯を抜歯し、エナメル質の削除により歯に付着した夾雑物を除去後、粉砕機にて粉砕し、300μmと1040μmの篩の間の砕片を分取した。付着している歯肉等のタンパク質と脂質を分解除去するために砕片を1％炭酸ナトリウムにて一定の温度条件下で2時間アルカリ処理を行った後に、1M リン酸・60％エタノール水溶液にて6時間脱灰処理を行った。その後、凍結乾燥処理を行い、ガンマ線滅菌を施し埋入用試料（BDDM）とした。これまでに臨床にて使用されている自家脱灰象牙質の製造、処理方法[27]とは異なるが、特許申請の関係から試料の製作方法と組成等の詳細については記載を避ける。試料は有機質（ほぼコラーゲン）20％、無機質 80％から構成されている。試料については走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行なった。

### 2.動物埋入試験

実験動物として、雄性 12 週齢 Wistar 系ラットを 1 週間の予備飼育後に健康状態に異常のないものを 39 匹使用した。イソフルランによる全身麻酔下においてラット頭頂部を剃毛後、皮膚骨膜弁を形成し、外径9mm のトレフィンバーを使用して、骨欠損部を形成した[28–30]。操作しやすいよう生理食塩水を含ませた BDDM を骨欠損部が十分に満たされるように埋入（約 100mg）後、縫合した（図1）。骨欠損形成後に何も入れず骨欠損の状態のままとしたものと炭酸アパタイト（ジーシー　サイトランスグラニュール M, 株式会社ジーシー）を埋入したものを対照群とし、それぞれコントロール群、炭酸アパタイト群とした。埋入4週および 12 週後に4％パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い、試料とともに頭蓋骨を一塊として摘出し、直ちに4％パラホルムアルデヒド溶液にて浸漬固定した。

なお本研究は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に基づき行った。（北海道大学動物実験承認番号 21-0114）

3.検索方法

1)組織学的検索

EDTA にて通法に従い脱灰し、パラフィン包埋を行い、ミクロトームにて4μm で薄切した。ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色ならびに酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色を施し、光学顕微鏡にて材料周囲の組織反応、骨形成について組織学的に観察した。

2）超微細構造学的検索

一部の BDDM の試料については、透過型電子顕微鏡(TEM)による観察を行った。

3）組織計量学的検索

埋入 12 週後の HE 染色を施した標本を使用し、各群4匹から1検体を無作為に抽出し、骨欠損部における新生骨

の面積をニコン DS カメラコントロールユニット DS-L3 にて計測した。計測した新生骨の総量を骨欠損部の直径で除し、骨欠損部一定長さ当たりの骨面積を算出し（図2）、クラスカルウォリス検定を行い、$p<0.05$ を有意差ありとした。

## Ⅲ. 結　　果

1. BDDM の構造について（図3）

SEM 像を図に示す。BDDM は 300～1000μm の削片状の形態を呈しており、表面には、横断、縦断された象牙細管が認められた。象牙細管周囲ならびに細管内部にはコラーゲン線維の線維状構造が観察された。

2. 組織学的的所見

1） コントロール群

（1）埋入4週後（図4）

骨欠損部の多くの部分は線維性結合組織で満たされていたが、既存骨から連続して新生骨が観察された。新生骨は、細胞成分を多く含む幼弱な骨組織であり、表面に骨芽細胞が認められた。

（2）埋入 12 週後（図5）

骨欠損部の多くの部位で線維性結合組織が観察されたが、既存骨とは離れた部位にも新生骨が認められた。新生骨は4週後に比較し、成熟し、骨髄腔は狭小化し、細胞成分も減少していた。骨欠損部には TRAP 陽性を示す細胞は新生骨表面には認められず、一部の骨髄腔辺縁にのみ観察された。

2） 炭酸アパタイト群

（1）埋入4週後（図6）

骨欠損部には、炭酸アパタイト顆粒と顆粒を囲む線維性結合組織が観察された。欠損部辺縁の脳硬膜側の炭酸アパタイト顆粒は、既存骨に連続して形成された新生骨で被覆されていた。欠損部中央と皮膚側の顆粒は線維芽細胞、間葉系細胞、毛細血管を含む線維性結合組織に被包され、一部の顆粒表面には多核巨細胞が観察された。

（2）埋入 12 週後（図7）

脳硬膜側においては炭酸アパタイト顆粒周囲に新生骨の形成が観察され、4週に比較して顆粒周囲の新生骨は成熟し、一部には層板構造も認められた。脳硬膜側では既存骨から離れた部位にも新生骨が形成されていた。皮膚側の炭酸アパタイト顆粒は4週に比較して太い線維からなる線維性結合組織で被包され、炎症所見はほとんど認められなかった。線維性結合組織で被包されている炭酸アパタイト表面には多くの異物巨細胞が観察された。

3） BDDM 群

（1）埋入4週後（図8）

骨欠損部の BDDM 間には炎症性細胞や毛細血管を伴う線維性結合組織が観察された。BDDM には、象牙細管様の構造が認められた。脳硬膜側には既存骨に連続して新生骨が形成され、BDDM に接している部分が観察された。脳硬膜側の一部の BDDM 表面には一層の幼弱な新生骨が観察され、新生骨表面には骨芽細胞が認められた。欠損部皮膚側の BDDM 表面には多核巨細胞やマクロファージが多数観察された。

（2）埋入 12 週後（図9）

BDDM 周囲の結合組織の炎症性変化は4週に比較して軽快していた。脳硬膜側では、既存骨からの新生骨は4週に比較して増加し、一部は BDDM に直接接していた。既存骨から離れた BDDM にも表面に一層の新生骨が認められた。また、一部に BDDM と新生骨の境界線が不明瞭になっている部分も観察された。脳硬膜側の新生骨に接する BDDM 表面には、TRAP 陽性細胞が認められ、BDDM の吸収と骨組織への置換を示唆する像も観察された。一方、新生骨を認めない部位では TRAP 陰性の多核巨細胞が BDDM 表面に観察された。

3. 透過型電子顕微鏡所見（図 10）

埋入4週後では新生骨が認められない BDDM 表面には多核の巨細胞が観察された。BDDM のコラーゲン線維間に細胞突起が入り込み、象牙質との境界は不明瞭となっていた。さらに、マクロファージ様細胞に接している BDDM からのコラーゲン線維の逸脱が観察され、貪食が示唆された。埋入 12 週後では、BDDM に接して新生された骨組織のコラーゲン線維と BDDM のコラーゲン線維が接し、境界が不明瞭となっている像が観察された。

4. 組織形態計測（表1、図 11）

新生骨の面積／長さの平均値は、対照群では 0.082±0.020、炭酸アパタイト群では 0.202±0.045、BDDM 群では 0.264±0.065 であった。対照群に比較して炭酸アパタイト群および BDDM 群では大きい傾向を示し、BDDM 群は炭酸アパタイト群に比較しやや大きい傾向を示したが、クラスカルウォリス検定では、いずれの群間において

も有意差は認められなかった。

## Ⅳ. 考　　察

ヒト脱灰象牙質の骨形成に関する報告は臨床応用を含めてなされている[31,32]が、異種であるウシ由来脱灰象牙質に関する骨形成を評価した報告はほとんどない[26]。本研究では、ウシ歯から BDDM を開発することを目的として、従来のヒト脱灰象牙質の処理方法[27]とは異なった処理方法にて作製した BDDM をラット頭蓋骨に形成した骨欠損部に埋入し、骨形成過程と BDDM の吸収について組織学的に検討した。

### 1. BDDM 群に認められた炎症所見について

4週（図8）では対照群に比較して多くの炎症性細胞を伴う線維性結合組織が多く観察された。脱灰象牙質移植に関する免疫反応の報告は少なく[33]、Copelli らは EDTA 溶液で脱灰後に凍結乾燥処理とガンマ線滅菌を施したヒト凍結乾燥脱灰象牙質をラット皮下組織に埋入し、歯内療法で用いられる Mineral Trioxide Aggregate(MTA)セメントを埋入した群と何も入れない対照群とで組織反応を評価したところ、ヒト凍結乾燥脱灰象牙質埋入群と MTA 埋入群では1週後に中等度の炎症を認め、4週後には全群で炎症が軽度となったとし、ヒト凍結乾燥脱灰象牙質は他の生体材料と比較して同程度の生体適合性を有すると報告した[34]。一方、Schwartz らは同種他家由来脱灰象牙質の細胞質膜、象牙芽細胞突起、セメント質細胞膜が抗原となり炎症を起こす可能性を報告しており[35]、コラーゲン線維のテロペプチド部分は異種間で構造が異なり抗原性があると報

告されている[36]。そのため臨床で使用されているウシの真皮由来の生体材料（テルダーミス®）はプロテアーゼ処理を行い、テロペプチド部分を分解・除去（アテロ化）し、抗原性を減じている[37]。本研究に用いた BDDM はアルカリ処理を行っているがコラーゲン線維のアテロ化はしていないため、リンパ球の浸潤を伴う炎症が生じたものと推察される[38]。

2. 骨形成過程について

（1）コントロール群

図5に示すように、12 週において欠損部には、既存骨に連続した少量の新生骨が観察され、ほとんどは線維性結合組織で満たされていた。Niwa らは雄性8週齢 Wistar 系ラットの頭蓋骨に直径 4.3mm の骨欠損を形成し、β-TCP と炭酸カルシウムを埋入し、骨補填材を入れないものを対照群として骨形成過程を組織学的に評価し、対照群において骨形成は埋入4週後に鈍化し、8週には終了したと報告している[39]。また Xu らは、外径8mmのトレフィンバーにて形成した骨欠損部の修復は8週で終了していることを報告している[40]。本研究においても 12 週では新生骨表面に層板構造を認め、TRAP 染色所見においても新生骨周囲に陽性を示す細胞は存在しなかったことから、12 週時点で骨による修復はほぼ終了していると考えられる。

（2）炭酸アパタイト群

4週（図6）では脳硬膜側の骨欠損部辺縁の既存骨に連続して新生骨が形成され、12 週（図7）では脳硬膜側における新生骨形成が進み、骨欠損部中央部付近にも骨組織が観察されたが、皮膚側での骨形成は認められなかった。炭酸アパタイトは骨の主な無機質成分であり、質量比6-9%の炭酸塩を含み、酸性環境下で溶解しや

すい特性から破骨細胞による吸収が起こりやすく、さらには骨芽細胞の分化を促進し[41]、優れた骨伝導能を有することが報告されている[42]。本研究においても、既存骨断端および脳硬膜側由来と推測される間葉系細胞や骨芽細胞により脳硬膜側の炭酸アパタイト顆粒周囲での骨形成が生じたが、皮膚側では、骨形成はほとんど認められなかった。これは、線維芽細胞による炭酸アパタイト顆粒の被包が術後早期に生じたためと考えられる。Chimedtseren ら[43]は、ラット頭蓋骨に直径5mm の骨欠損部を形成して炭酸アパタイトを埋入し、皮膚側に比較して脳硬膜側の新生骨量が多いことを報告している。本研究では、外径9mm のトレフィンバーを使用して大きな骨欠損部を形成したため、炭酸アパタイト顆粒の固定が十分ではなかったことも皮膚側での骨形成が生じなかったことに関係しているとも考えられる。

（3）BDDM 群

4週（図8）では、脳硬膜側の一部の BDDM 表面には幼弱な新生骨が観察され、新生骨表面には骨芽細胞が認められた。図9（B）に示す BDDM 表面の一層の骨形成には、SEM 像（図3）に示す BDDM 表面のコラーゲン線維に血小板が接着することで血小板に含まれる多様な成長因子（FGF, VEGF, EGF,IGF など）やマトリックスメタロプロテアーゼが放出され、骨形成に関する細胞の遊走が促進されたことも関係していると推測される[44]。さらに、象牙質に含まれる BMP やオステオカルシンなどの非コラーゲン性タンパク質（NCP）の影響も考えられる[45]が、本研究で用いた BDDM はアルカリ加熱処理をしており、BMP については熱耐性の報告[46]があるものの、NCP が BDDM の骨形成に関与しているかはさらなる検討が必要である。

3. 材料の吸収について

（1）炭酸アパタイト群

骨補填材の生体での吸収は、主に破骨細胞などの多核巨細胞による細胞貪食を介して行われると報告されている[47]が、本研究においても図7（D、F）に示すように新生骨形成が認められる炭酸アパタイト表面に TRAP 陽性を示す巨細胞が観察された。炭酸アパタイトはハイドロキシアパタイト結晶に比較して破骨細胞の発現が高く、吸収が早いことが報告されており[48]、破骨細胞による吸収が生じたものと考えられる。しかし、骨形成の認められない線維性結合組織で被包された顆粒表面には TRAP 陰性の多核巨細胞が観察されたことから異物巨細胞の関与も考えられる。Dersot らはハイドロキシアパタイト結晶は吸収されず多核巨細胞の非特異的エステラーゼで吸収されると報告している[49]。

（2）BDDM 群

図9-C に示すように新生骨形成を認める BDDM 表面には TRAP 陽性を示す巨細胞が観察され、破骨細胞による吸収が示唆された。一方、TEM 所見（図 10）において、4週において多核巨細胞の細胞突起が BDDM 内に入り込んでおり、マクロファージの貪食像も観察されたことから、骨形成が認められない部位では、異物巨細胞、マクロファージによる貪食が生じていることが明らかとなった。生体材料の吸収機構には細胞による貪食[47–49]と酵素による消化[50]が存在するが、Murata らは脱灰象牙質とハイドロキシアパタイト結晶における多核巨細胞を計量した結果、脱灰象牙質表面に出現する多核巨細胞の数が有意に少なかったことを報告しておりハイドロキシアパタイト結晶の吸収機構は主に細胞貪食であるのに対して脱灰象牙質の吸収機構は酵素による消化も主体となっている可能性を示唆している[51]。一方、図9（D）に示すように新生骨に囲まれた BDDM では新生骨との境界が不明瞭になっており、BDDM の吸収と骨組織への置換を示唆する像も観察された。TEM 観察においても BDDM のコラーゲン線維と骨組織のコラーゲン線維

が直接接している部分もあることから、今後 BDDM の吸収と骨組織への置換のメカニズムについて検討を行う必要がある。

## Ⅴ. 結　　論

本研究では、ラット頭蓋骨欠損部に BDDM を埋入し、骨形成過程と BDDM の吸収を組織形態学的に検討し、以下の結論を得た。

埋入早期である4週では BDDM 周囲には炎症性細胞を伴う線維性結合組織が観察されたが、12 週において炎症は軽快していた。また、BDDM に直接接して新生骨の形成が認められ、埋入後 12 週の骨欠損部における新生骨量は、炭酸アパタイト顆粒埋入時と同程度であり、破骨細胞による吸収、新生骨との置換が示唆された。以上から、ウシ脱灰象牙質（BDDM）の骨補填材としての可能性が示された。

## 文 献

1. Gonçalves TMSV, Campos CH, Gonçalves GM, De Moraes M, Rodrigues Garcia RCM. Mastication Improvement After Partial Implant-supported Prosthesis Use. J Dent Res. 2013;92:189S-194S.

2. Howe M-S, Keys W, Richards D. Long-term (10-year) dental implant survival: A systematic review and sensitivity meta-analysis. J Dent. 2019;84:9–21.

3. Roccuzzo A, Imber J, Marruganti C, Salvi GE, Ramieri G, Roccuzzo M. Clinical outcomes of dental implants in patients with and without history of periodontitis: A 20-year prospective study. J Clin Periodontol. 2022;49:1346–56.

4. Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, Lang NP. A systematic review of post-extractional alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. Clin Oral Implants Res. 2012;23:1–21.

5. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. Eur J Oral Sci. 2017;125:315–37.

6. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. Clin Oral Implants Res. 2010;21:567–76.

7. Santos PL, Gulinelli JL, Telles CDS, Betoni Júnior W, Okamoto R, Chiacchio Buchignani V, et al. Bone Substitutes for Peri-Implant Defects of Postextraction Implants. Int J Biomater. 2013;1–7.

8. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. J Orthop Surg. 2014;9:18.

9. Carcuac O, Abrahamsson I, Derks J, Petzold M, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-

implantitis in augmented and pristine bone: A pre-clinical in vivo study. Clin Oral Implants Res. 2020;31:192–200.

10. Egashira Y, Atsuta I, Narimatsu I, Zhang X, Takahashi R, Koyano K, et al. Effect of carbonate apatite as a bone substitute on oral mucosal healing in a rat extraction socket: in vitro and in vivo analyses using carbonate apatite. Int J Implant Dent. 2022;8:11.

11. Kamakura S, Sasaki K, Homma T, Honda Y, Anada T, Echigo S, et al. The primacy of octacalcium phosphate collagen composites in bone regeneration. J Biomed Mater Res A. 2007;83A:725–33.

12. Kitamura M, Yamashita M, Miki K, Ikegami K, Takedachi M, Kashiwagi Y, et al. An exploratory clinical trial to evaluate the safety and efficacy of combination therapy of REGROTH® and Cytrans® granules for severe periodontitis with intrabony defects. Regen Ther. 2022;21:104–13.

13. Kawai T, Kamakura S, Matsui K, Fukuda M, Takano H, Iino M, et al. Clinical study of octacalcium phosphate and collagen composite in oral and maxillofacial surgery. J Tissue Eng. 2020;11:204173141989644.

14. Ogino Y, Ayukawa Y, Tachikawa N, Shimogishi M, Miyamoto Y, Kudoh K, et al. Staged Sinus Floor Elevation Using Novel Low-Crystalline Carbonate Apatite Granules: Prospective Results after 3-Year Functional Loading. Materials. 2021;14:5760.

15. Murata M, Nezu T, Takebe H, Hirose Y, Okubo N, Saito T, et al. Human dentin materials for minimally invasive bone regeneration: Animal studies and clinical cases. J Oral Biosci. 2023;65:13–8.

16. De Oliveira G, Miziara M, Silva ED, Ferreira E, Biulchi A, Alves J. Enhanced bone formation during healing process of tooth sockets filled with demineralized human dentine matrix. Aust Dent J. 2013;58:326–32.

17. Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human Dentin-matrix-derived Bone Morphogenetic Protein. J Dent Res. 1991;70:171–5.

18. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. Arch Oral Biol. 1967 Aug;12(8):999-1008.

19. Huggins C, Wiseman S, Reddi AH. Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. J Exp Med. 1970 Dec 1;132(6):1250-8.

20. Kabir MdA, Murata M, Akazawa T, Kusano K, Yamada K, Ito M. Evaluation of perforated demineralized dentin scaffold on bone regeneration in critical-size sheep iliac defects. Clin Oral Implants Res. 2017;28227-235

21. Kim Y-K, Lee J, Um I-W, Kim K-W, Murata M, Akazawa T, et al. Tooth-derived bone graft material. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2013;39:103.

22. Kim Y-K, Bang K-M, Murata M, Mitsugi M, Um I-W. Retrospective Clinical Study of Allogenic Demineralized Dentin Matrix for Alveolar Bone Repair. J Hard Tissue Biol. 2017;26:95–102.

23. Okubo N, Ishikawa M, Shakya M, Hosono H, Maehara O, Ohkawara T, et al. Autograft of Demineralized Dentin Matrix Prepared Immediately after Extraction for Horizontal Bone Augmentation of the Anterior Atrophic Maxilla: A First Case of Non-Vital Tooth-Derived Dentin. J Hard Tissue Biol. 2022;31:47–54.

24. Matsuzawa Y, Okubo N, Tanaka S, Kashiwazaki H, Kitagawa Y, Ohiro Y, et al. Primary Teeth-Derived Demineralized Dentin Matrix Autograft for Unilateral Maxillary Alveolar Cleft during Mixed Dentition. J Funct Biomater. 2022;13:153.

25. 大久保直登.動物の歯を利用した脱灰象牙質由来コラーゲン顆粒骨再生材料の研究開発.国立研究開発法人(AMED),2022;課題管理番号:22ym0126033h0002(https://amedfind.amed.go.jp/amed/search/task_search_details.html).

26. Togari K, Miyazawa K, Yagihashi K, Tabuchi M, Maeda H, Kawai T, et al. Bone Regeneration by Demineralized Dentin Matrix in Skull Defects of Rats. J Hard Tissue Biol. 2012;21:25–34.

27. Murata M, Akazawa T, Takahata M, Ito M, Tazaki J, Hino J, et al. Bone induction of human tooth and bone crushed by newly developed automatic mill. J Ceram Soc Jpn. 2010;118:434–7.

28. Kamakura S, Nakajo S, Suzuki O, Sasano Y. New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. J Biomed Mater Res A. 2004;71A:299–307.

29. Kamakura S, Sasaki K, Honda Y, Anada T, Suzuki O. Octacalcium phosphate combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006;79B:210–7.

30. Martino MM, Tortelli F, Mochizuki M, Traub S, Ben-David D, Kuhn GA, et al. Engineering the Growth Factor Microenvironment with Fibronectin Domains to Promote Wound and Bone Tissue Healing. Sci Transl Med.2011;3:100-89

31. Lee K-H, Kim Y-K, Cho W-J, Um I-W, Murata M, Mitsugi M. Autogenous tooth bone graft block for sinus augmentation with simultaneous implant installation: a technical note. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2015;41:284.

32. Memè L, Strappa EM, Monterubbianesi R, Bambini F, Mummolo S. SEM and FT-MIR Analysis of Human Demineralized Dentin Matrix: An In Vitro Study. Appl Sci. 2022;12:1480.

33. Wang T, Guo Y. The Host Response to Autogenous, Allogeneic, and Xenogeneic Treated Dentin Matrix/Demineralized Dentin Matrix-Oriented Tissue Regeneration. Tissue Eng Part B Rev. 2023

34. Copelli FA, Lima AASD, Santos CCDO, Carneiro E, Cavenago BC. Biological response to lyophilized demineralized dentin matrix implanted in the subcutaneous tissues of rats. Saudi Dent J. 2021;33:441–7.

35. Schwartz O. Cell-mediated and humoral alloimmunreactions after subperiostal implantation of allogenic demineralized dentin in humans. Int J Oral Surg. 1983;12:95–105.

36. 村田勝:医療用コラーゲン性マテリアルの現状と近未来;北医療大誌2008;27:7-14.

37. 松井 理佐子:人工真皮テルダーミス・抜歯創用保護材テルプラグの開発(総説).日本再生歯科医学会誌 2008; 6巻:9-20.

38. Cadili A, Kneteman N. The Role of Macrophages in Xenograft Rejection. Transplant Proc. 2008;40:3289–93.

39. Niwa Y, Nagahara K, Nagayama M, Takeuchi H, Tsukahara T, Nakazawa J, et al. Immunohistochemical study of rat parietal bone defect repair with β-tricalcium phosphate and carbonate apatite. Oral Med Pathol. 2009;13:127–33.

40. Xu Y, Hirata E, Iizumi Y, Ushijima N, Kubota K, Kimura S, et al. Single-Walled Carbon Nanotube Membranes Accelerate Active Osteogenesis in Bone Defects: Potential of Guided Bone Regeneration Membranes. ACS Biomater Sci Eng. 2022;8:1667–75.

41. Fujioka-Kobayashi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Satomi T, Schaller B. Osteoclast behaviors on the surface of deproteinized bovine bone mineral and carbonate apatite substitutes in vitro. J Biomed Mater Res A. 2022;110:1524–32.

42. Ishikawa K, Hayashi K. Carbonate apatite artificial bone. Sci Technol Adv Mater. 2021;22:683–94.

43. Chimedtseren I, Yamahara S, Akiyama Y, Ito M, Arai Y, Gantugs AE, et al. Collagen type I-based recombinant peptide promotes bone regeneration in rat critical-size calvarial defects by enhancing osteoclast activity at late stages of healing. Regen Ther. 2023;24:515–27.

44. Kuchler U, Rybaczek T, Dobask T, Heimel P, Tangl S, Klehm J, et al. Bone-conditioned medium modulates the osteoconductive properties of collagen membranes in a rat calvaria defect model. Clin Oral Implants Res. 2018;29:381–8.

45. Ritchie HH, Ritchie DG, Wang L. Six decades of dentinogenesis research: Historical and prospective views on phosphophoryn and dentin sialoprotein. Eur J Oral Sci. 1998;106:211–20.

46. Yano K, Hoshino M, Ohta Y, Manaka T, Naka Y, Imai Y, et al. Osteoinductive capacity and heat stability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced by Escherichia coli and dimerized by biochemical processing. J Bone Miner Metab. 2009;27:355–63.

47. Yuasa T, Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Nagayama M, Suzuki K. In vitro resorption of three apatite cements with osteoclasts. J Biomed Mater Res. 2001;54:344–50.

48. Ayukawa Y, Suzuki Y, Tsuru K, Koyano K, Ishikawa K. Histological Comparison in Rats between Carbonate Apatite Fabricated from Gypsum and Sintered Hydroxyapatite on Bone Remodeling. BioMed Res Int. 2015;1–7.

49. Dersot JM, Colombier ML, Lafont J, Baroukh B, Septier D, Saffar JL. Multinucleated giant cells elicited around hydroxyapatite particles implanted in craniotomy defects are not osteoclasts. Anat Rec. 1995;242:166–76.

50. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen Degradation by Host-derived

Enzymes during Aging. J Dent Res. 2004;83:216–21.

51. Murata M, Akazawa T, Hino J, Tazaki J, Ito K, Fujii M, et al. Multinucleated Giant Cells for Biomaterials -

Ceramics and Dentin Collagen -. Key Eng Mater. 2011;493–494:310–4.

# 付　図　説　明

表1　各群の骨欠損部の長さと新生骨形成面積

図1　動物埋入実験

A：皮膚骨膜弁の翻転, B：骨欠損部の形成, C：BDDM の埋入

図2　単位長さあたりの新生骨量

新生骨総面積を骨欠損部の直径で除し算出した。

図3　BDDM の SEM 像

A：粒径 300~1040μm の削片状を呈している。

B：横断（◯）,縦断（□）された象牙細管が露出している。

C：象牙細管口（→）が BDDM 表面に露出している。

D：象牙細管内部にコラーゲンの線維状構造（→）が観察される。

図4　コントロール群（埋入4週後）

A：既存骨（a）から連続して新生骨（＊）が形成されているが,多くは線維性結合組織（→）で満たされている（組写真）。

B：幼若な新生骨（＊）表面に骨芽細胞（→）が観察される。

図5　コントロール群（埋入12週後）

A：骨欠損部の多くは線維性結合組織で満たされており,既存骨から離れた部位に新生骨（＊）が観察される。

B：既存骨（a）に連続した形成された新生骨（＊）の骨髄腔は狭小している。

C：骨髄腔辺縁に TRAP 陽性細胞（▲）を認める。

D：新生骨（＊）表面に TRAP 陽性細胞は認められない。

図6　炭酸アパタイト群（埋入4週後）

A：炭酸アパタイト（c）を囲む線維性結合組織と新生骨（＊）が観察される。（組写真）

B：欠損部辺縁の炭酸アパタイト（c）は幼若な新生骨（＊）に覆われている。

C：欠損部中央の炭酸アパタイト（c）は線維性結合組織（☆）で覆われている。

図7　炭酸アパタイト群（埋入12週後）

A：既存骨に連続して形成された新生骨（＊）とは別に既存骨から離れて形成された新生骨（☆）も観察される（組写真）。

B：脳硬膜側の炭酸アパタイト（c）表面には、層板構造を呈する新生骨（＊）が観察される。

C：皮膚側の骨形成が認められない炭酸アパタイト（c）表面に多核巨細胞（→）が観察される。

D：新生骨（＊）が形成された炭酸アパタイト（c）表面には TRAP 陽性細胞（→）が観察される。

E：骨形成が認められない炭酸アパタイト（c）には TRAP 陽性を示さない異物巨細胞（→）が観察される。

F：炭酸アパタイト（c）周囲に形成された新生骨（＊）と TRAP 陽性を示す多核細胞（→）。

図8　BDDM 群（埋入4週後）

A：BDDM（b）周囲には、線維性結合組織と新生骨（＊）が観察される（組写真）。

B：脳硬膜側の BDDM（b）に接して新生骨（＊）が認められる。

C：欠損部中央の BDDM（b）は炎症性細胞を含む線維性結合組織に囲まれ、BDDM 表面には多核巨細胞（→）が観

察されるが、一部の BDDM 表面には新生骨（＊）観察される。

図9　BDDM 群（埋入12週後）

A：4週後に比較して新生骨（＊）が増加しているが、皮膚側の BDDM（☆）は線維性結合組織に被包されている（組写真）。

B：BDDM（b）を囲むように形成された新生骨（＊）と BDDM との境界は不明瞭な部分も認められる。既存骨から離れた BDDM 表面にも一層の新生骨（▲）が形成されている。

C：新生骨（＊）に接する BDDM（b）表面に TRAP 陽性細胞（→）が観察される。

D：新生骨（＊）に囲まれた BDDM（b）に接して TRAP 陽性の細胞（→）が観察される。

E：新生骨を認めない BDDM（b）表面に TRAP 陽性を示さない多核巨細胞（→）が観察される。

図 10　BDDM 群の TEM 像

A：BDDM（b）に接して多核巨細胞（＊）が観察される。埋入4週後

B：A の拡大像。多核巨細胞は BDDM(b)中の象牙細管に接している。

C：B の拡大像。巨細胞の細胞突起が BDDM(b)内に入り込み BDDM との境界（→）が不明瞭になっている。

D：BDDM（b）表面のマクロファージ様細胞（☆）埋入4週後。

E：D の拡大像。BDDM（b）からコラーゲンが逸脱（→）している。マクロファージ（☆）内には多数の食胞が観察される。

F：BDDM（b）と新生骨組織（a）が直接接している。埋入 12 週後。

G：F の拡大像。BDDM のコラーゲン線維（黒→）と新生骨組織のコラーゲン線維（白→）が直接接しているが境界は不明瞭。BDDM のコラーゲン線維同士の間隔は開いている。

図 11　各群の新生骨量の比較

付　図

| | 欠損部長さ(mm) (a) | 新生骨面積(mm²) (b) | (b) / (a) |
|---|---|---|---|
| コントロール群１ | 7.35 | 0.68 | 0.0927 |
| コントロール群２ | 5.33 | 0.46 | 0.0871 |
| コントロール群３ | 5.12 | 0.27 | 0.0528 |
| コントロール群４ | 7.09 | 0.67 | 0.0942 |
| 炭酸アパタイト群１ | 6.82 | 1.34 | 0.1958 |
| 炭酸アパタイト群２ | 6.37 | 1.49 | 0.2341 |
| 炭酸アパタイト群３ | 6.86 | 0.97 | 0.1418 |
| 炭酸アパタイト群４ | 7.50 | 1.79 | 0.2380 |
| BDDM群1 | 6.34 | 2.27 | 0.3586 |
| BDDM群２ | 6.18 | 1.46 | 0.2356 |
| BDDM群３ | 6.60 | 1.41 | 0.2137 |
| BDDM群４ | 7.08 | 1.76 | 0.2484 |

| | コントロール群 | 炭酸アパタイト群 | BDDM群 |
|---|---|---|---|
| 平均値＋標準偏差 | 0.082＋0.020 | 0.202＋0.045 | 0.264＋0.065 |

表1　各群の骨欠損部の長さと新生骨形成面積

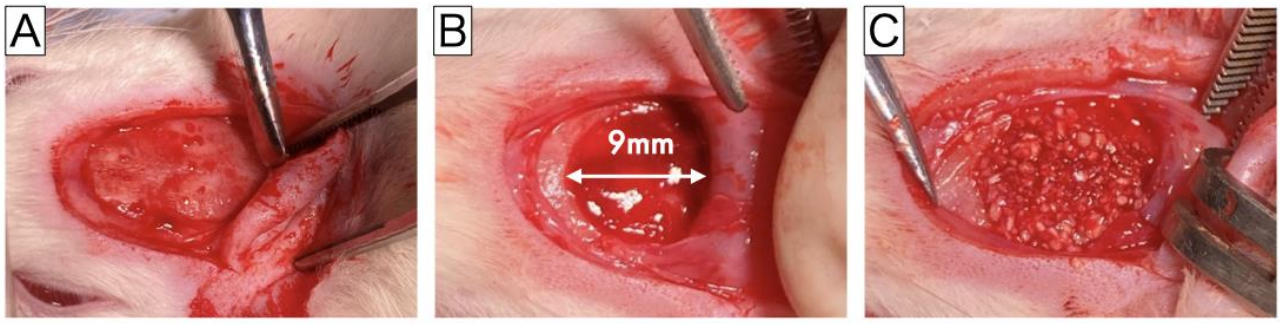


図1　動物埋入実験

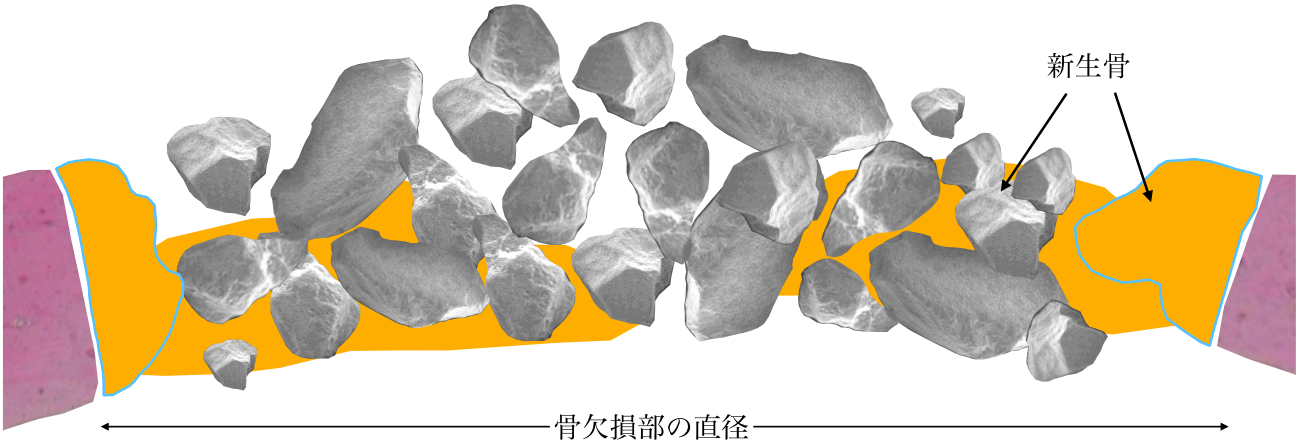


図2　単位長さあたりの新生骨量

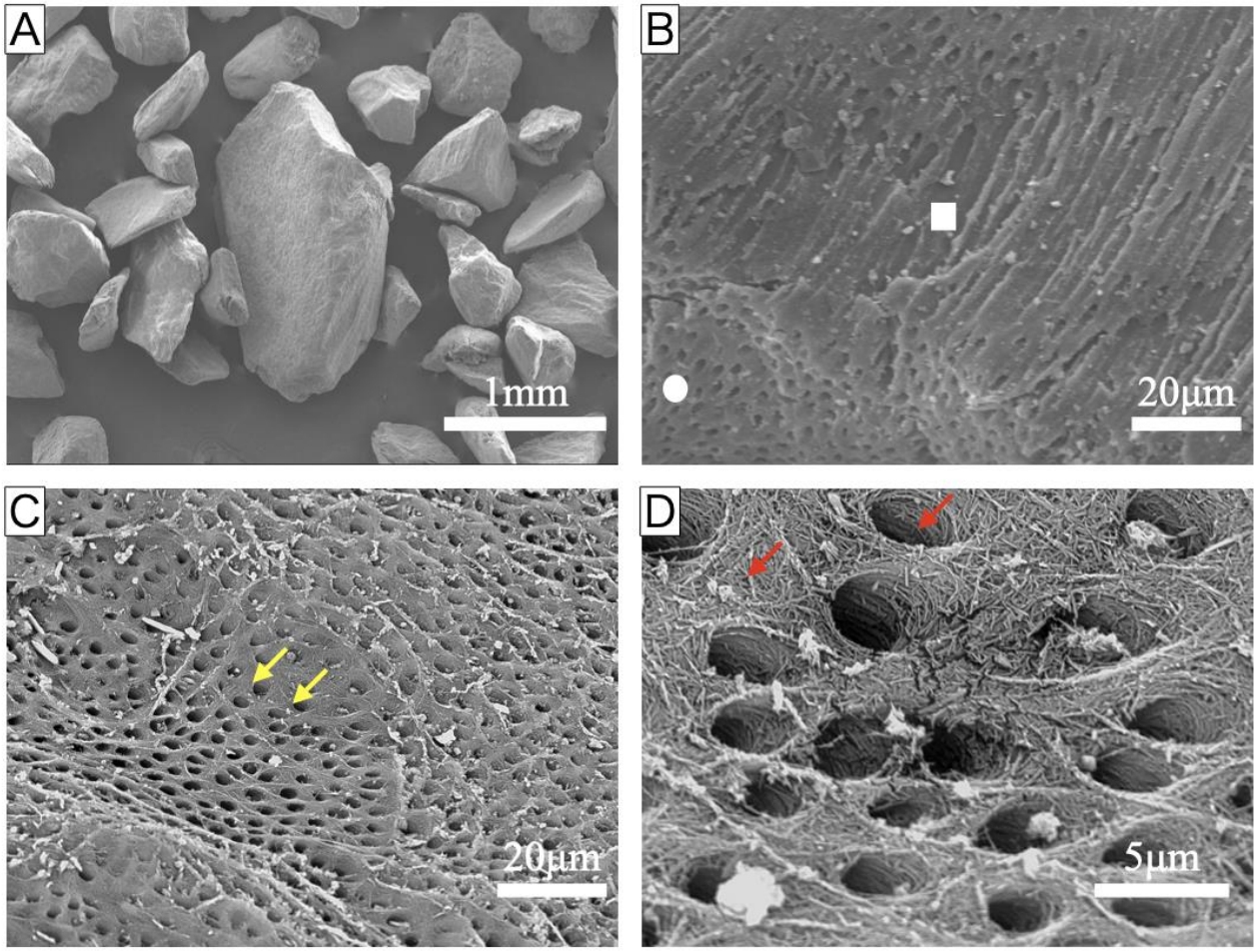


図3　BDDM の SEM 像

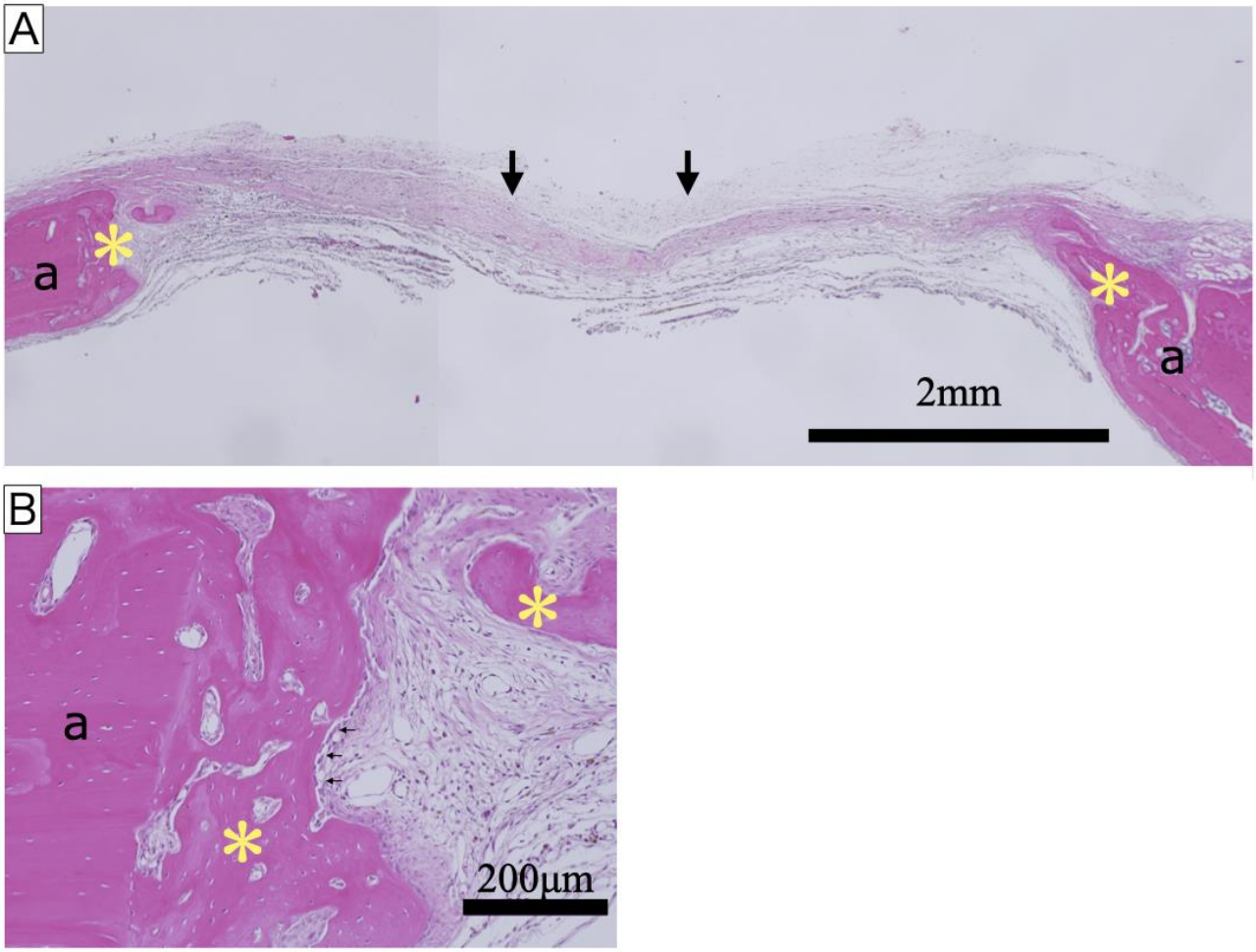


図4　コントロール群（埋入4週後）

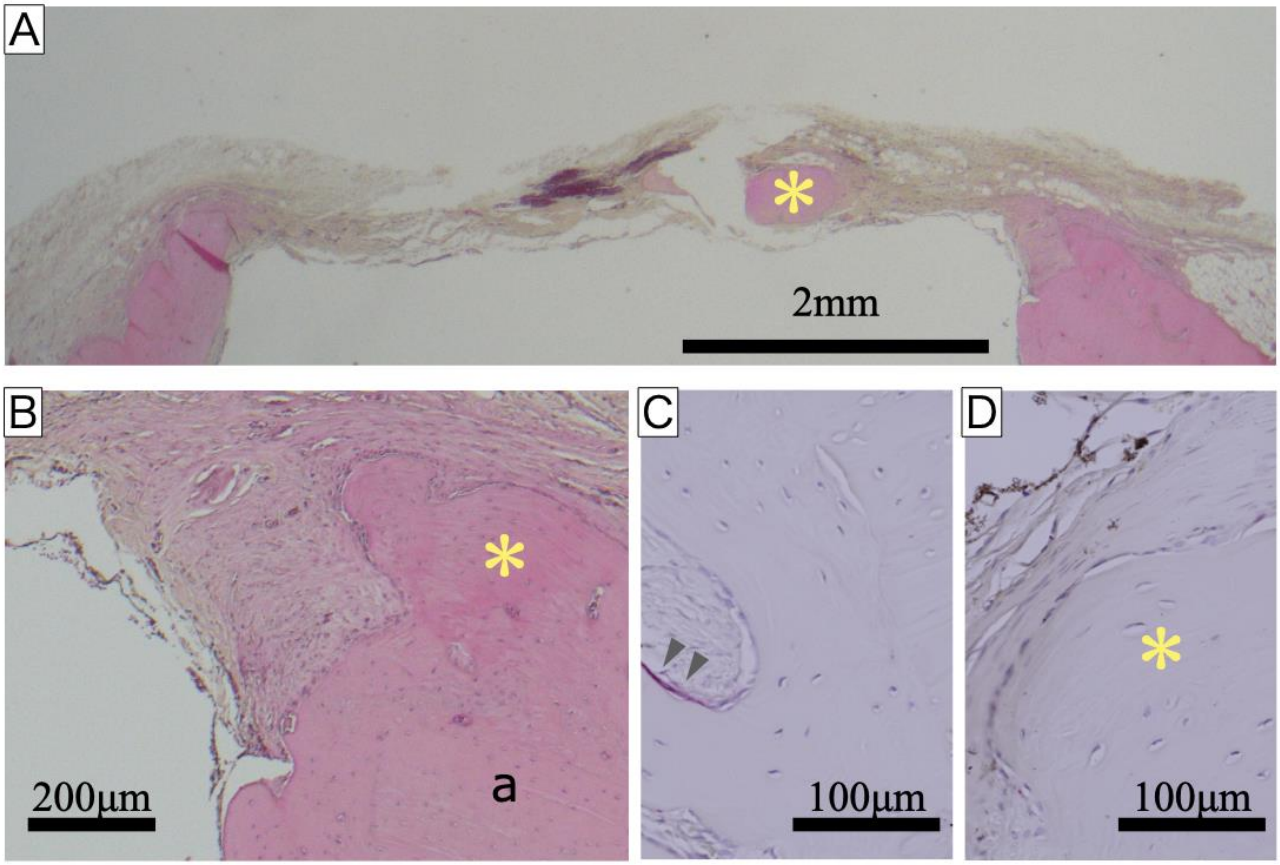


図5　コントロール群（埋入 12 週後）

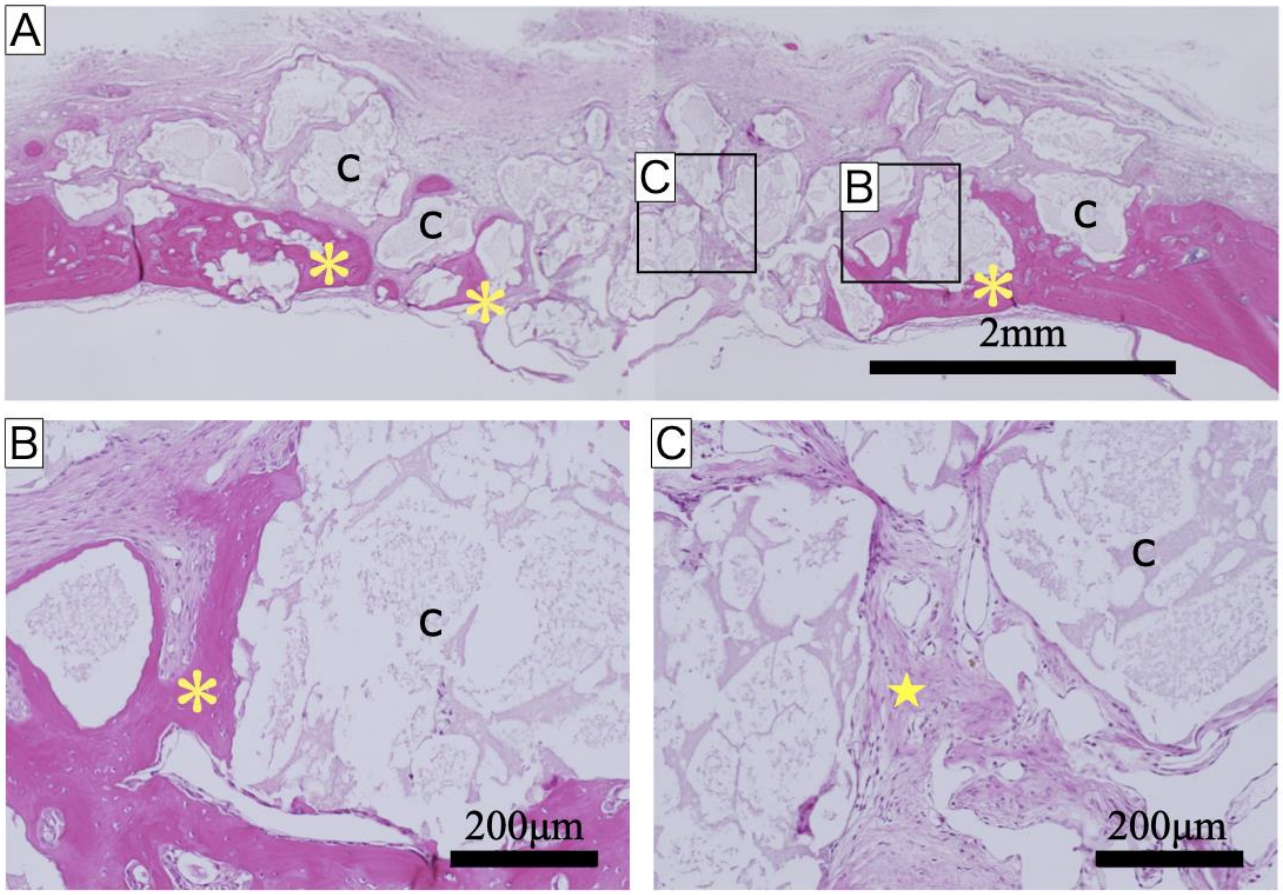


図6　炭酸アパタイト群（埋入4週後）

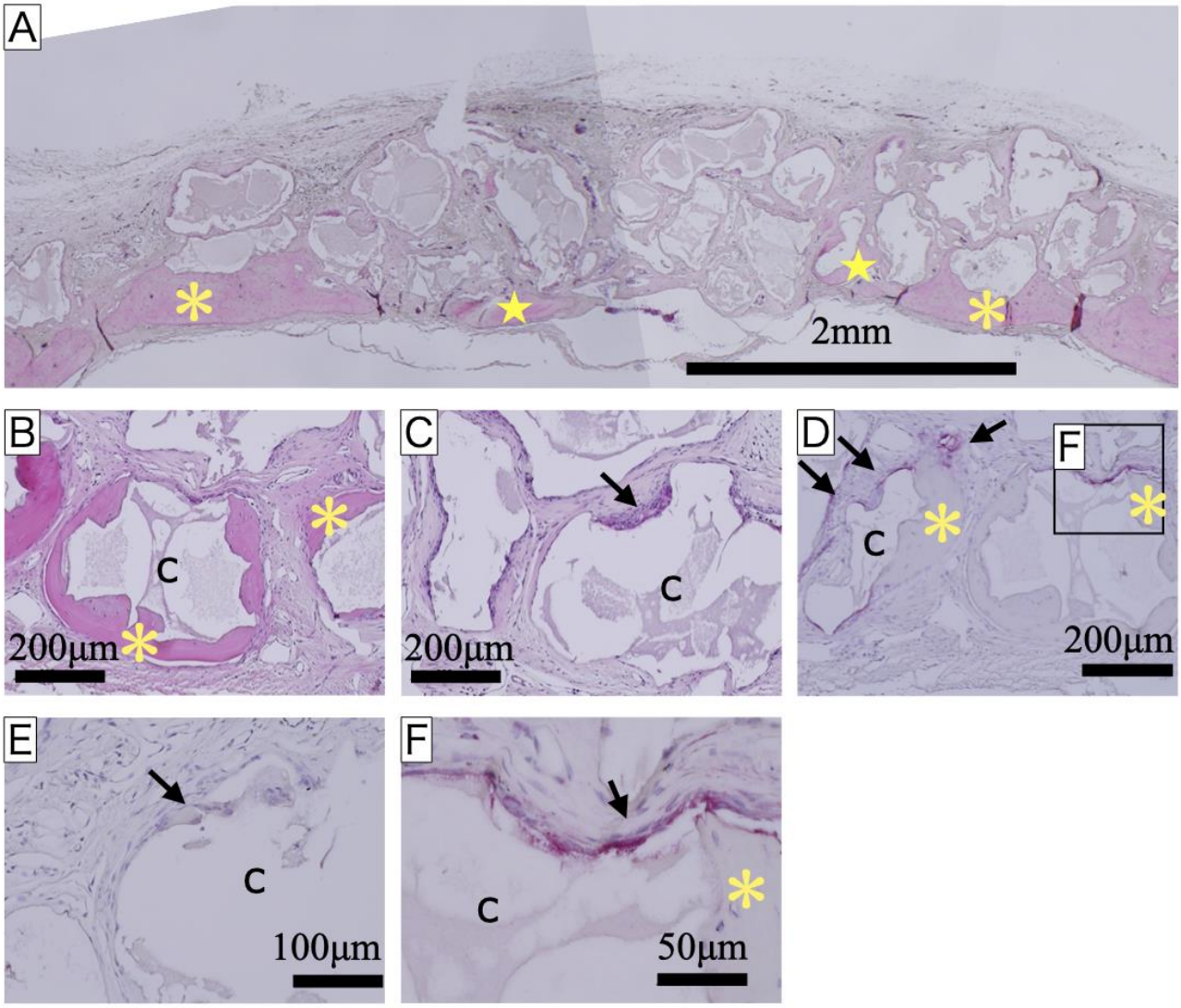


図7　炭酸アパタイト群（埋入 12 週後）

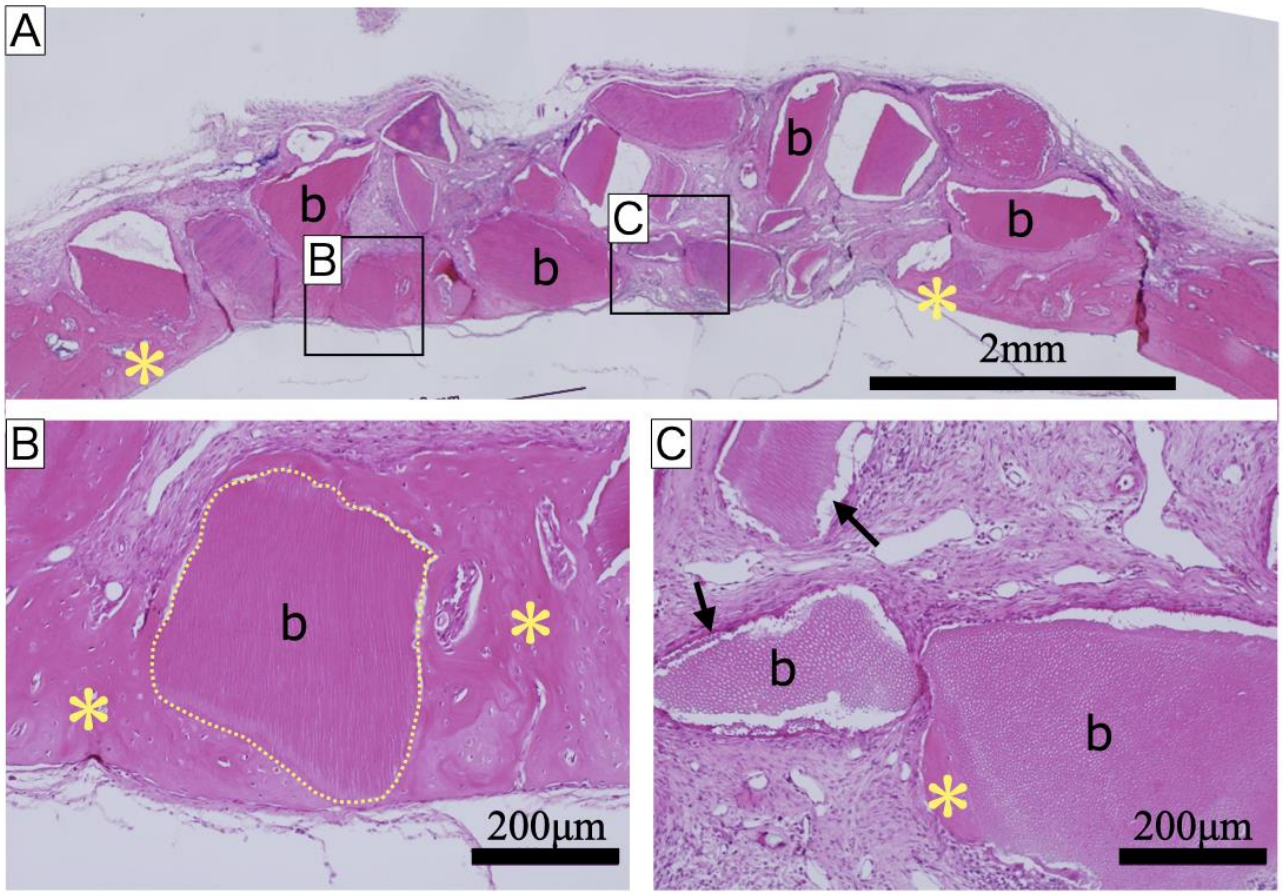


図8　BDDM 群（埋入4週後）

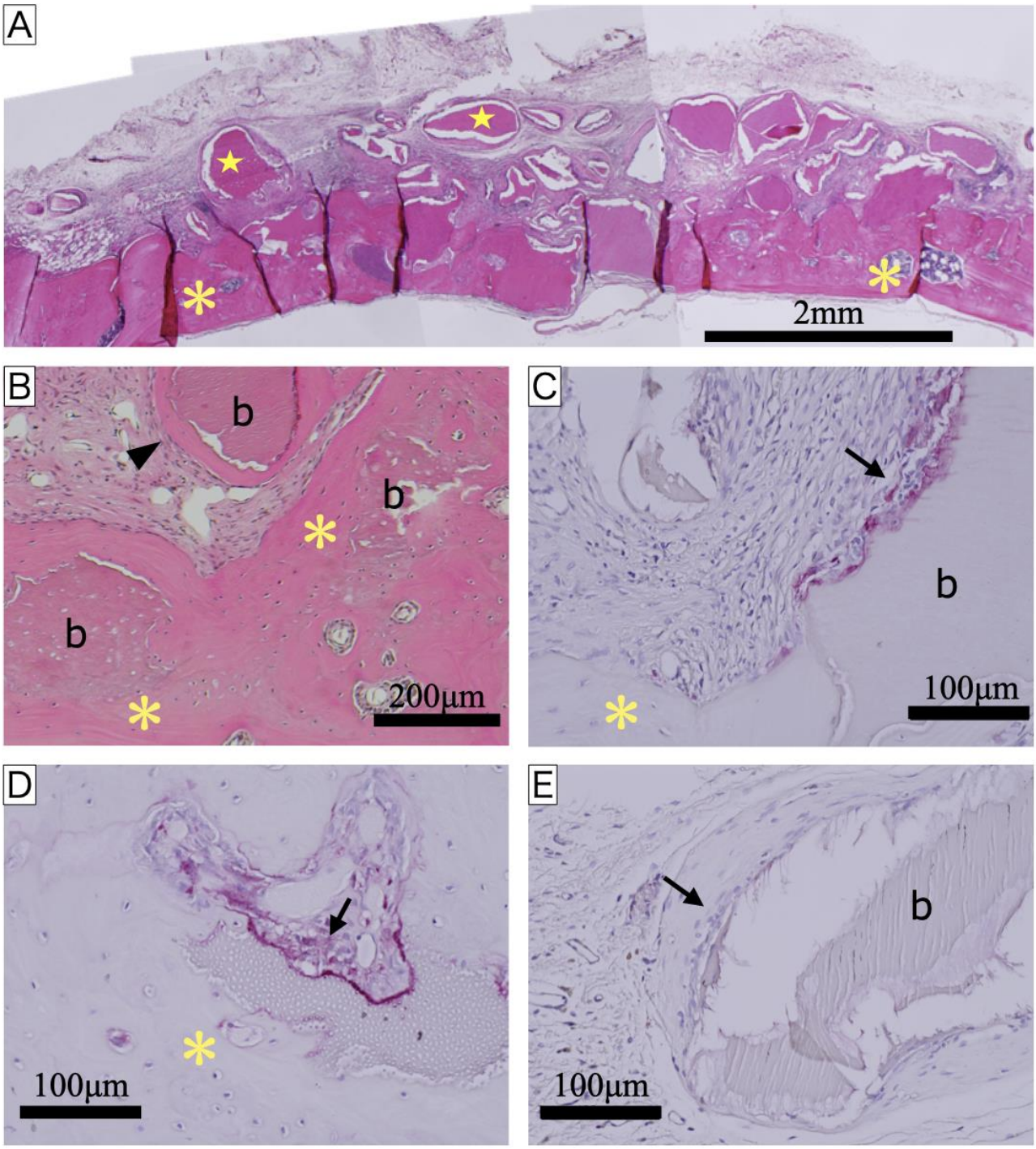


図9　BDDM 群（埋入 12 週後）

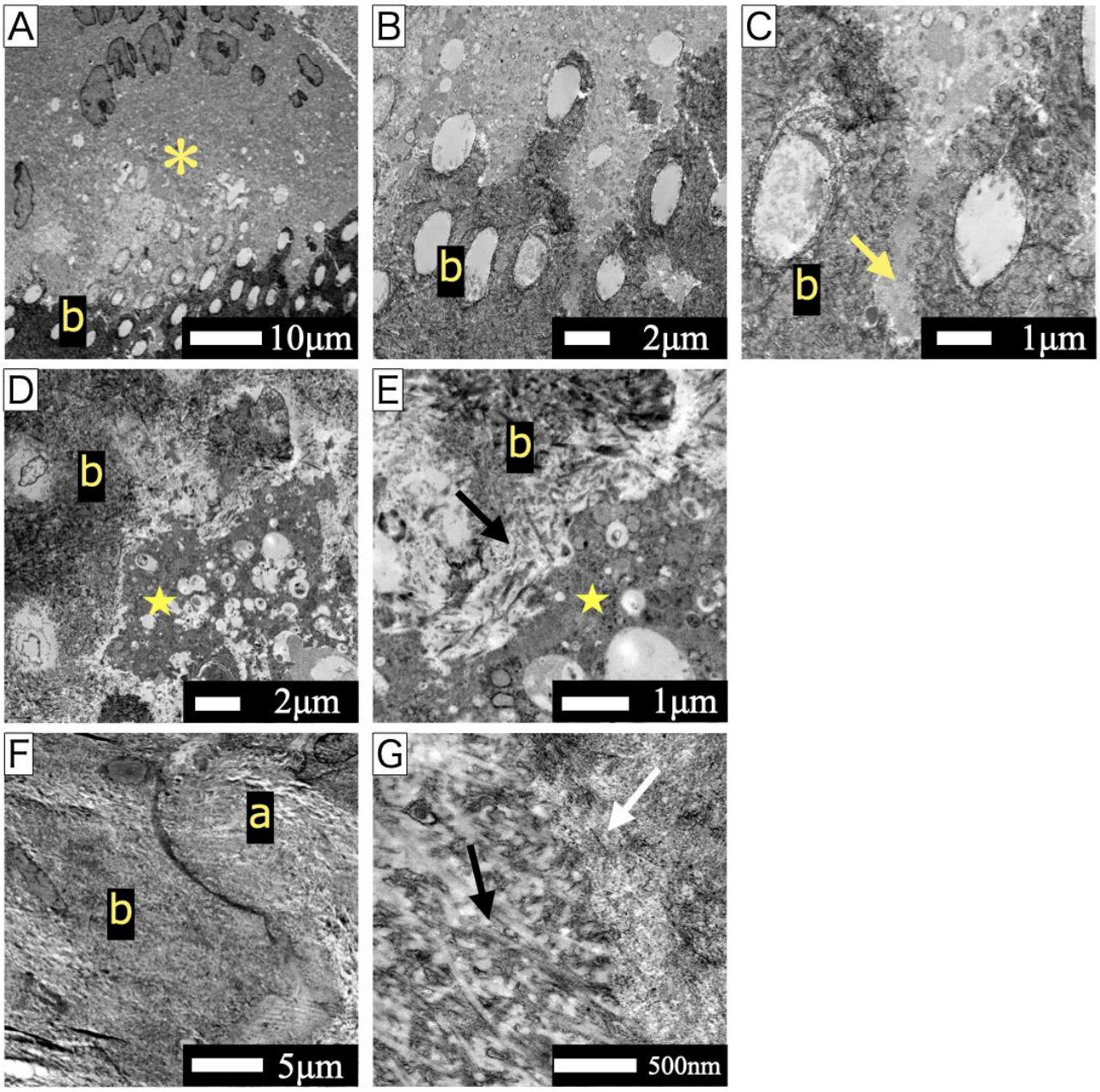


図 10　BDDM 群の TEM 像

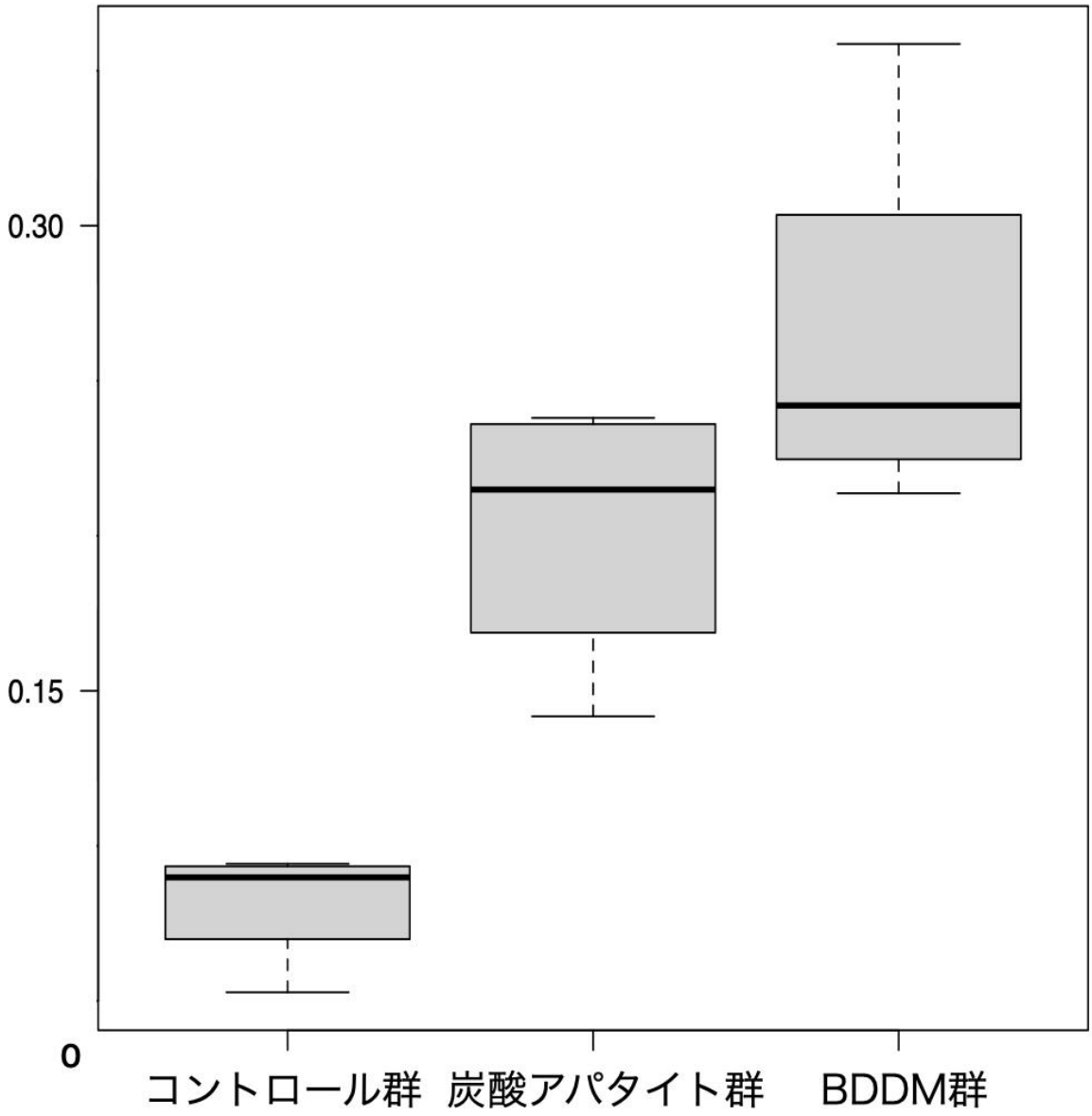


図 11　各群の新生骨量の比較