

β-リン酸三カルシウムがラット頭蓋骨に設置した
チタンキャップ内の垂直的骨増大に及ぼす効果

奥羽大学大学院歯学研究科歯内・歯周療法学専攻

森田 聡

(指導教員：高橋 慶壮 教授)

Effects of β -TCP on Vertical Guided Bone Augmentation
within a Titanium Cap in Rat Calvaria

Department of Endodontics and Periodontics,
Ozu University, Graduate School of Dentistry

Satoru Morita

(Director: Prof. Keiso Takahashi)

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on vertical guided bone regeneration (GBR) in rat calvaria. Forty 10-week old male Sprague-Dawley rats were used. In the all animals, the calvaria were exposed, and 2 circular grooves (5.5 mm in diameter) were prepared bilaterally. Two titanium caps were randomly allocated from four groups: (1) β -TCP, (2) calcium sulfates (CaSO_4), (3) β -TCP+ CaSO_4 , (4) gelatin sponge (negative control) and placed on the parietal bone. At 8 weeks after surgery, the animals were euthanized and the skulls were removed to obtain sections for histology, histomorphometry and immunohistochemistry. The amount of the newly generated tissue and newly formed bone within the caps were microscopically observed and quantitated using image analyzer. In addition, sclerostin (SOST) positive cells were immunochemically stained. In the β -TCP group, new bone formation in close contact with the surface of β -TCP was observed and the newly generated tissue consisted of mineralized bone and marrow spaces. High magnification showed osteoblast-like cells and osteocytes, while few osteoclasts. There was no additive effect of β -TCP and CaSO_4 . Osteocytes into newly generated bone

were strongly stained with anti-SOST antibody, while osteocytes close to the interface between β -TCP and newly generated bone were weakly or negatively stained. The amount of newly generated tissue of the β -TCP groups was significantly higher than that of control groups. There was no additive effect of both β -TCP and CaSO_4 . This study indicates that β -TCP is superior material compared with CaSO_4 to enhance vertical bone augmentation.

Key words: vertical bone augmentation, rat calvaria, β -TCP, osteocytes, sclerostin

和文抄録

ラット頭蓋骨上の垂直 GBR モデルにおいて β -TCP が垂直的骨増大に及ぼす効果を調べることを目的とした。40 匹の 10 週齢の雄 Sprague-Dawley ラットを実験に供した。頭蓋骨を露出し、直径 5.5 mm の輪状溝を頭蓋の左右側に 1 つずつ形成した。(1) β -TCP, (2) CaSO_4 , (3) β -TCP + CaSO_4 , (4) スポンゼル (陰性対照) のいずれかを入れたチタンキャップから 2 つ選んで頭蓋骨上の溝に設置した。実験の 8 週後に動物を安楽死させ、組織学的、組織計測学的小および免疫組織化学的検討を行なった。キャップ内に新生された組織と新生骨量はイメージ解析ソフトを用いて定量した。sclerostin(SOST)陽性骨細胞を免疫組織化学的に検出した。 β -TCP 群では、 β -TCP 顆粒の周囲を新生骨が取り囲み、骨芽細胞および骨細胞を認めたが、破骨細胞はほとんど見られなかった。骨細胞の SOST 染色性は部位によって異なり、新生骨内方の骨細胞が強陽性であった。一方、 β -TCP と新生骨との境界領域に散在する骨細胞は弱陽性か陰性であった。 β -TCP 添加群では対照群に比較して新生組織量の占める割合が有意に高かった ($p < 0.05$)。 β -TCP と CaSO_4 の相加効果はみられなかった。本研究は β -TCP が CaSO_4 に比較して垂直的骨増大を促進するための優れた基材であることを示した。

諸 言

歯周組織再生療法および口腔インプラント治療の普及に伴い，顎骨や歯槽骨の再生が基礎的および臨床的に研究されている。骨増大を目的とした骨移植材は自家骨が最適であるが，採取する骨量が制限されることと生体に余分な侵襲を加えることが欠点になる^{1, 2)}。自家骨以外の移植材料には同種他家骨である凍結乾燥骨，異種骨およびハイドロキシアパタイトが用いられているが，未知の感染症のリスクや移植材料の残留が指摘されており，安全性の面で不確実性が残る。

実験動物を用いた垂直的骨誘導法（guided bone regeneration 以下 GBR）モデル研究において数種類の人工生体材料の効果が検討されている。すなわち， β -リン酸三カルシウム（beta-tricalcium phosphate 以下 β -TCP）^{3, 4)}，牛骨ミネラル（BiO-OSS®）⁵⁻⁷⁾あるいはリン酸カルシウムセメント⁸⁾をチタンシリンダーあるいはチタンキャップ内部に添入した際の骨新生の様態や有用性が検討されている。 β -TCPは生体親和性と骨伝導性に優れた生体材料で，移植後は完全に骨に置換される生体吸収性の骨補填材として開発され，整形外科領域や歯科領域で人工骨補填材として臨床応用されている⁹⁾。リン酸カルシウムはリン酸（ H_3PO_4 ）とカルシウムとが化学的に結合した物質で，骨基質の主成分である。そのため， β -TCPは骨内において経時的に吸収されて骨に置換

され，最終的に全て骨へ置換される。

硫酸カルシウム (CaSO_4) は高い生体親和性，骨伝導能および生体内での良好な吸収性と安全性により 100 年以上前から骨補填材料として使用されてきた^{11), 12)}。 CaSO_4 は安価で生産が容易であり，多血小板血漿と併用することでサイナスリフト¹³⁾ やソケットブリザベーション後の新生骨量を有意に増加することが報告されている¹⁴⁾。また，歯周組織再生療法¹⁵⁾ や外科的歯内療法¹⁶⁾ にも臨床応用されている。さらに，生体内で炎症反応を惹起せずに短期間に生体内で吸収されるため，スタチンやサイトカインを局所で徐放性に作用させる基材としての効果が検討されている¹⁷⁾。しかし，現在まで GBR の動物実験モデルにおいて CaSO_4 の骨増大効果は検討されてはいない。また， β -TCP と CaSO_4 を混合して使用した場合の効果についても報告はない。

骨新生時における骨細胞の役割が近年注目されている¹⁸⁾。骨細胞は骨組織内の細胞の 90～95% を占め，骨芽細胞や破骨細胞に比較して数の上では圧倒的に多い。また骨表面に存在する骨芽細胞や破骨細胞とは異なり石灰化した骨基質内部に埋没して一定間隔に規則正しく細胞が配列しているという特徴がある。ウサギ頭蓋骨上における新生骨量が頭蓋骨の厚みと正の相関を示すという報告¹⁹⁾ では骨の新生に骨膜が関与していないため，頭蓋骨中の骨細胞が頭蓋骨上の骨新生に重要な役割を果たしてい

る可能性が考えられる。

骨細胞に特異的に発現する遺伝子として *sclerostin*(SOST)^{20, 21)} がある。*sclerostin* は骨芽細胞による骨形成を促進する *Wingless+int-1*(Wnt) や *bone morphogenetic proteins* (BMPs) などの骨形成促進シグナルに拮抗して骨形成を抑制する分子であり、骨代謝の負の制御に関わっていることが示唆されており^{22, 23)}、骨細胞の成熟度を示すマーカーになり得る。垂直 GBR モデルで頭蓋骨とキャップ内新生骨梁における骨細胞の *sclerostin* 発現様態を調べることで骨細胞の成熟度を評価することが可能である。したがって、骨増大の実験系において新生骨の様態を評価する際には、組織学的検討に加えて骨細胞の成熟度を検討することにより骨新生における骨細胞の働きをより詳細に考察できる。

本研究では、ラット頭蓋冠上に設置した垂直的骨増大術の実験モデルにおいて、 β -TCP および CaSO_4 の骨増大効果を、組織学的、組織計測学的および免疫組織化学的に解析した。

材料および方法

1. 実験動物

10 週齢で体重 320～400g の雄性 Sprague-Dawley 系ラット（日本クレア社，東京）40 匹を用いた。実験開始に先立ち 1～2 週間予備飼育し、ラットが健康であることを確認して実験に使用した。飼育期間

中には固形飼料（オリエンタル酵母工業，東京）および水を与え，奥羽大学動物実験研究施設（室温 23℃，湿度 65%）で飼育した。本研究は奥羽大学動物実験委員会の承認（受付 No. 42）を得て奥羽大学動物実験規定を遵守して行った。

2. チタン合金キャップ

実験に使用したチタン合金キャップ（以下チタンキャップ）（図 1）は日本メディカルマテリアル株式会社（以下 JMM，大阪）と共同で開発した。すなわち，チタン合金（アルミ 6%，バナジウム 4%を含む JMM 社製の歯科インプラント用）を加工して作製した 0.25mm の肉厚のチタンキャップ（重量 140mg）を機械研磨して実験に供した。

3. 生体材料

β -TCP（オスフェリオン® G1-1 粒径 500～1,500 μ m，気孔率 75%，気孔径 100～400 μ m オリンパステルモバイオマテリアル株式会社，東京）30mg を生理食塩水に浸漬した後にチタンキャップ内に添入した（ β -TCP 群）。硫酸カルシウムは，医療用 bioabsorbable $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （Wako，大阪）を生理食塩水に溶解し，ペースト状にしたものをチタンキャップ内に添入して使用した（ CaSO_4 群）。また， β -TCP とペースト状にした CaSO_4 とを体積比として等量混和した混和物をチタンキャップ内に添入したものを β -TCP + CaSO_4 群とし，止血用ゼラチンスポンジ（スポンゼル R，Astellas 製薬，東京）をチタンキ

ヤップ内に添入したものを陰性対照（スポンゼル群）とした。

4. チタンキャップの設置

Murai らの方法⁴⁾を参考にチタンキャップを設置した。すなわち，ラット腹腔にペントバルビタールナトリウム（Somnopentyl[®] 共立製薬，東京）をラット体重 1kg あたり 50mg 投与し全身麻酔を行なった。さらにエピネフリン 1 / 80,000 添加 2% 塩酸リドカイン（歯科用キシロカイン[®]カートリッジ，昭和薬品化工業株式会社，東京）を用いて局所麻酔を行った。次いで #15c 替刃式外科用メスを用いて両耳を結ぶように皮膚を切開し，骨膜を剥離した（図 2 a）。中央の縫合線を挟んで左右の頭頂骨部に滅菌生理食塩水（大塚製薬，東京）による注水下で直径 4.8mm（内径）のトレフィンバー（GC 社，東京）を用いて頭蓋骨上に輪状の溝を 2 個形成した（図 2 b）。次に β -TCP， CaSO_4 ， β -TCP + CaSO_4 またはスポンゼルのいずれかを上述したチタンキャップ内に入れ，それらチタンキャップからラット 1 匹あたり 2 個を無作為に選び，頭蓋骨上に形成した輪状の溝に設置した（図 2 c）。設置後にチタンキャップが動かないように先ず手術用縫合糸（D8106 エチコン J&J, USA）を用いて骨膜縫合し（図 2 d），その後に手術用縫合糸（789G エチコン J&J）を用いて皮膚縫合した（図 2 e）。また，術後の感染予防としてペニシリン G(60,000IE/0.02ml，明治製菓，東京) 1ml を皮下注射した。

5. 組織学的研究

チタンキャップ設置の 8 週間後に，実験動物をジ

エチルエーテル吸引により苦痛なく死亡させた後、直ちに頭蓋冠と周囲組織を一塊として摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後10% EDTA (ethylenediamine tetra acetic acid) 溶液に浸漬して脱灰(4℃)し、チタンキャップを除去後に通法に従ってパラフィン包埋した。厚さ5 μ mの前頭断切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下 H・E 染色)を行い、光学顕微鏡観察した。

6. TRAP 染色

破骨細胞の存在を確認するために酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色(以下 TRAP 染色)を行った。すなわち、脱パラフィン後の切片を50mM 酒石酸水溶液に浸漬して、次に10mM リン酸緩衝生理食塩水(以下 PBS)に浸漬した後、ナフトール AS-MX phosphate (Sigma, USA)を基質として0.2M 酢酸緩衝液で TRAP 染色を行った²⁴⁾。切片を水洗後にマイヤーのヘマトキシリン液に3分間浸漬し、乾燥、キシレン透徹・封入後に TRAP 陽性細胞を観察した。

7. 免疫組織化学染色

免疫染色はパラフィン切片を用いて酵素標識ポリマー間接法²⁵⁾により行った。切片を脱パラフィン後に抗原賦活化液(pH6.1, ダコ・ジャパン, 東京)に浸漬して90℃で60分間加熱した。内因性ペルオキシダーゼ除去後に、切片に一次抗体としてヤギ抗マウス sclerostin (SOST)抗体(1:15, R&D systems, USA)を室温で60分反応させた。PBSによる洗浄

後，二次抗体としてペルオキシダーゼ標識アミノ酸ポリマーを結合した抗ヤギ抗体（ニチレイバイオサイエンス，東京）を室温で30分反応させてからDAB基質キット（ニチレイバイオサイエンス，東京）を用いて発色を行った。ヘマトキシリンで細胞核を染色した。その後通法により切片処理を行ない光学顕微鏡を用いて観察した。一次抗体に換えてPBSと反応させた切片を陰性対照とし，陽性反応が全く見られないことを確認した。

8．形態計測による分析

チタンカップ内部の新生組織面積および新生骨面積の定量は，H・E染色を行った組織切片の画像について，画像解析ソフト（WinRoof，三谷商事，福井）²⁶⁾を用いて計測範囲ROI(Region of Interest)を確定し，新生組織面積および新生組織面積に対する新生骨面積の割合(%)を算出した。

9．統計処理

各実験群の有意差検定はANOVAによって行い， $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

1．組織学的観察

β -TCP 群では新生組織中に β -TCP顆粒が残存しており，新生骨が β -TCP顆粒を取り囲んでいた（図3a，e）。 CaSO_4 群では CaSO_4 の残存は見られず，新生組織中に新生骨，骨髄および線維性結合組織を認

めた（図 3 b, f）。

β -TCP + CaSO_4 群では β -TCP 群と同様に新生組織中に β -TCP 顆粒が残存しており，新生骨が β -TCP 顆粒を取り囲み，新生骨中には骨細胞が観察された（図 3 c, g）。 β -TCP 群に比較して β -TCP + CaSO_4 群では骨髓組織の占める割合が高い傾向が見られた。

スポンゼル（陰性対照）群では新生組織中に骨新生が見られたが，骨髓および線維性結合組織の割合が高い傾向にあった（図 3 d, h）。

β -TCP 群および β -TCP + CaSO_4 群では， β -TCP 顆粒外側に好塩基性領域が観察された（図 4 a～c）。 β -TCP 群で， β -TCP 周囲に多核巨細胞は見られず， β -TCP + CaSO_4 群でも β -TCP 群と同様に β -TCP 周囲に多核巨細胞は認められなかった（図 4 c, d）。

2. TRAP 染色

いずれの実験群でも TRAP 陽性細胞は母床骨に散在したが（図 5 a, b），新生骨中に観察されたのは稀であった（図 5 c, d）。

3. 免疫組織化学的所見

いずれの群でも母床頭蓋骨中の骨細胞は *sclerostin* 強陽性であった（図 6 a, b）。新生骨中にも同様に *sclerostin* 強陽性骨細胞を多数認めたが， β -TCP 群および β -TCP + CaSO_4 群では，新生骨表面付近の骨細胞は *sclerostin* 陰性あるいは弱陽性であっ

た（図 6 c, d）。sclerostin の染色性には局在が見られ，新生骨内部に sclerostin 強陽性の骨細胞を認めた（図 6 c, d）。

4. 組織学的計測結果

β -TCP 群ではスポンゼル群（対照群）と比較して新生組織量が有意に高かった（ $p<0.05$ ）（図 7）。逆に， β -TCP 群ではスポンゼル群（対照群）と比較して新生骨面積/新生組織面積（%）が有意に低かった（ $p<0.05$ ）（図 8）。 β -TCP と CaSO_4 を併用することによる骨新生の相加効果は認められなかった。

考 察

垂直的骨増大術のラット実験モデルにおいて， β -TCP は垂直的な新生組織形成を有意に促進した。一方， CaSO_4 による有意な新生組織形成作用は見られなかった。また， β -TCP と CaSO_4 を混合したことによる骨新生の相加的な促進効果も認めなかった。本研究から骨新生における「足場」として β -TCP は CaSO_4 より有効であることが示唆された。

Wada ら²⁷⁾は巨核細胞によって β -TCP が貪食されると報告している。本研究では TRAP 陽性細胞（破骨細胞）は新生骨周辺にはあまり見られなかったが，追加実験において β -TCP 周辺に CD68 陽性多核細胞を認めた（未発表）ことから β -TCP 顆粒が生体内で多核細胞による貪食作用をある程度は受けている

可能性はある。一方， β -TCP 顆粒周囲が隙間なく新生骨に囲まれていることから（図 4）， β -TCP 顆粒自体が分解されて周囲のカルシウム濃度を高め，未分化骨芽細胞の活性化および骨細胞への分化を促進している可能性が考えられる。

Suba ら²⁸⁾はビーグル犬の抜歯窩に β -TCP 顆粒を移植して骨形成能を評価し， β -TCP の骨形成能は骨伝導能であると報告した。小澤ら²⁹⁾はウサギ大腿骨の骨欠損部に β -TCP 顆粒を移植した 6 週間後にはすべて骨と置換することを報告した。しかし，この研究では平均粒径 $750\mu\text{m}$ の β -TCP 顆粒で porous type と dense type の重量比が 3:2 の材料が使用されており，骨欠損部周囲が骨に囲まれており，骨形成細胞の侵入が容易な環境における骨形成と解釈できるため，本研究のように頭蓋骨とチタンキャップとで形成された空間において誘導された骨新生とは実験条件が大きく異なっている。

β -TCP 顆粒の粒径と微細構造も骨新生に大きく影響を及ぼすと考えられる。Murai ら⁴⁾は β -TCP 顆粒の粒径の違いにより骨増大効果が異なり， $100\sim 250\mu\text{m}$ の小さい顆粒よりも $250\sim 500\mu\text{m}$ 粒径の顆粒のほうが骨新生量が高いことを報告した。高岡の報告³⁾では β -TCP 顆粒の粒径は $250\sim 500\mu\text{m}$ であったが実験開始 3 カ月後にも β -TCP 顆粒が残存している。一方，本研究では粒径 $500\sim 1,500\mu\text{m}$ の β -TCP 顆粒を使用しており，8 週間後にも β -TCP 顆粒が残存して

いた本研究結果と高岡の結果とは矛盾しない。また β -TCP 顆粒の外側周辺には特徴的な好塩基性領域が見られた (図 4 a, b, c)。この結果は Fujita らの報告³⁰⁾と同様の所見であった。組織学的には β -TCP 顆粒が分解していると推察され、 β -TCP 顆粒の足場効果の他に分解速度と局所的に生じる Ca^{2+} と PO_4^{3-} 濃度の上昇が骨新生を促進している可能性が考えられる。しかし、 β -TCP 顆粒の分解・吸収機序の詳細はまだ不明で、今後の研究が必要である。

β -TCP 群では CaSO_4 群よりも新生組織量が多かった (図 7) ことから β -TCP 顆粒が CaSO_4 よりも垂直骨増大における足場として優れていると解釈できる。一方、 β -TCP 群は 8 週後の (新生骨量 / 新生組織量 (%)) がコントロール群に比較して有意に低かった (図 8)。本研究で定量に使用した Win Roof システムでは β -TCP 顆粒と骨髄の色を判別できなかったため、残存する β -TCP 顆粒量を測定出来ていないが、8 週後の新生組織中には β -TCP 顆粒がかなり残存しており (図 3, 4), β -TCP 顆粒周辺で骨への置換が観察されたことを勘案すれば、 β -TCP 顆粒が完全に新生骨へと置換された時点では β -TCP 群の骨新生量が今回の実験群の中で最も多くなると予測される。一方、本実験条件下において CaSO_4 は早期に吸収されるため、骨伝導能を有するものの「足場」としての役割を十分に発揮出来ていないのかもしれない。垂直的な骨増大においては、骨伝導能に加えて足場としての役割が骨新生に大きく影響すると考えられる。

β -TCP 顆粒と新生骨の境界で骨細胞が多様な形態変化を起こしていることが報告³⁰⁾されている。これは、骨芽細胞が骨細胞へと分化し、新生骨中に定着する過程が急速に進んでいる可能性を示唆する。本研究ではこの骨細胞の分化を評価するマーカーとして *sclerostin* に注目し免疫組織化学的検討を行った。免疫染色の結果から、新生骨梁中の骨細胞における *sclerostin* 染色性の強弱には部位による違いが見られた（図 6）。すなわち、新生骨辺縁部には *sclerostin* 陰性あるいは弱陽性骨細胞を認め、新生骨内部には *sclerostin* 強陽性骨細胞が観察された（図 6）。このことは、 β -TCP による骨形成でも、骨細胞の成熟過程が順調になされているとみなされる。 β -TCP が骨形成を促進する機序にインスリン様増殖因子受容体遺伝子発現およびそのリン酸化の促進作用の関与が示唆されており³¹⁾、 β -TCP による骨新生の促進効果は今後はシグナル伝達レベルから解析が進められるであろう。

結 論

ラット頭蓋冠上にチタンキャップを設置した骨増大モデルにおいて β -TCP は CaSO_4 よりも骨増大効果に優れるとみなされた。また β -TCP により形成された新生骨梁の内部における骨細胞は *sclerostin* 強陽性であることから骨細胞の成熟が確認された。

本論文の一部は，第55回秋季日本歯周病学会学術大会（平成24年9月23日，つくば市）および第55回奥羽大学歯学会（平成25年6月15日，郡山市）にて発表した。

文 献

- 1) Buser, D., Hoffmann, B., Bernard, J.P., Lussi, A., Mettler, D., Schenk, R.K.: Evaluation of filling materials in membrane -protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. Clin. Oral Implants Res. 9 ; 137-150 1998.
- 2) von Arx, T., Cochran, D.L., Hermann, J.S., Schenk, R.K., Buser, D.: Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. Clin. Oral Implants Res. 12 ; 260-269 2001.
- 3) 高岡克典： ウサギ頭頂骨に設置したチタンキャップ内の骨増生に及ぼす β -リン酸三カルシウムの影響 日歯保存誌 44 ; 115-123 2001.
- 4) Murai, M., Sato, S., Fukase, Y., Yamada, Y., Komiyama, K., Ito, K.: Effect of Different Sizes β -TCP on Bone Augmentation within a Titanium Cap in Rabbit Calvarium. Dent. Mater. J. 25 ; 87-96 2006.

- 5) Slotte, C., Lundgren, D.: Augmentation of calvarial tissue using non-permeable silicone domes and bovine bone mineral. An experimental study in the rat. Clin. Oral Implants Res. **10** ; 468-476 1999.
- 6) Hämmerle, C.H., Olah AJ, Schmid J, Flückiger L, Gogolewski S, Winkler JR, Lang NP.: The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. Clin. Oral Implants Res. **8** ; 198-207 1997.
- 7) 難波 幸一： ウサギ頭頂骨に設置したチタンキャップ内の骨増生に及ぼす骨補填材(BIO-OSS®)の影響 日大歯学 **73** ; 480-487 1999.
- 8) 田村隆典， 深瀬康公， 村井正和， 岸田 衛， 山田 豊， 奥野健二， 小嶋大郎， 佐藤秀一， 西山 實， 伊藤公一： ウサギ頭頂骨に設置したチタンキャップ内に充填したリン酸カルシウムセメントの動態 日大歯学 **79** ; 5-11 2005.
- 9) 本多浩三， 植野高章， 坂田吉郎， 脇本真理， 加納みわ， 沢木聖子， 太田晃子， 白数信明， 菅原利夫： インプラント治療における β -TCP (Tricalcium phosphate)を用いた顎骨増量術の臨床的検討 岡山歯誌 **26** ; 37-41 2007.
- 10) 成田哲也： β -tricalcium phosphate を併用した顎骨骨折の治療 東京膝関節学会会誌 **14** ; 44-48 1993.

- 11) Thomas, M.V., Puleo, D.A.: Calcium sulfate: Properties and clinical applications. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. **88** ; 597-610 2009.
- 12) Toloue, S.M., Chesnoiu-Matei, I., Blanchard, S.B.: A clinical and histomorphometric study of calcium sulfate compared with freeze-dried bone allograft for alveolar ridge preservation. J. Periodontol. **83** ; 847-855 2012.
- 13) Iezzi, G., Fiera, E., Scarano, A., Pecora, G., Piattelli, A.: Histologic evaluation of a provisional implant retrieved from man 7 months after placement in a sinus augmented with calcium sulphate: a case report. J. Oral Implantol. **33** ; 89-95 2007.
- 14) Kutkut A, Andreana S, Kim HL, Monaco E Jr.: Extraction socket preservation graft before implant placement with calcium sulfate hemihydrate and platelet-rich plasma: a clinical and histomorphometric study in humans. J. Periodontol. **83** ; 401-409 2012.
- 15) Sculean, A., Nikolidakis, D., Schwarz, F.: Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. J. Clin. Periodontol. **35** ; 106-116 2008.

- 16) Apaydin, E.S., Torabinejad, M.: The effect of calcium sulfate on hard-tissue healing after periradicular surgery. J. Endod. **30** ; 17-20 2004.
- 17) Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S.: Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. J. Pharmacol. Sci. **104** ; 384-386 2007.
- 18) Bonewald, L.F.: The amazing osteocyte. J. Bone Miner. Res. **26**; 229-238 2011.
- 19) Yamada, Y., Sato, S., Yagi, H., Ujiie, H., Ezawa, S., Ito, K.: Correlation in the densities of augmented and existing bone in guided bone augmentation. Clin. Oral Implants Res. **23** ; 837-845 2012.
- 20) Winkler, D.G., Sutherland, M.K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J.E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B.R., Staehling-Hampton, K., Appleby, M., Brunkow, M.E., Latham, J.A.: Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. EMBO J. **22** ; 6267-6276 2003.
- 21) Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., Wu, D.: Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. J.

- Biol. Chem. **280** ; 19883-19887 2005.
- 22) Galli, C., Passeri, G., Macaluso, G.M.:
Osteocytes and WNT: the mechanical control of
bone formation. J. Dent. Res. **89** ; 331-343 2010.
- 23) Bonewald, L.F, Johnson, M.L.: Osteocytes,
mechanosensing and Wnt signaling. Bone **42** ;
606-615 2008.
- 24) 河原 元 硬組織標本作製法 検査と技術
29 ; 1169-1179 2001.
- 25) 和泉伸一, 伊藤 仁, 梅村しのぶ, 長村義之,
嶋志田伸吾, 川井健司, 芹澤昭彦, 堤 寛, 名倉
宏 : 5 . 超高感度法 . 渡辺・中根 酵素抗体法 (名
倉 宏, 長村義之, 堤 寛 編) 改訂四版 ; 147-150
学際企画 東京 2002.
- 26) Ekuni, D., Tomofuji, T., Sanbe, T., Irie, K.,
Azuma, T., Maruyama, T., Tamaki, N., Murakami, J.,
Kokeguchi, S., Yamamoto, T.: Periodontitis-
induced lipid peroxidation in rat descending aorta
is involved in the initiation of atherosclerosis. J.
Periodontal Res. **44** ; 434-442 2009.
- 27) Wada, T., Hara, K., Ozawa, H.: Ultrastructural
and histochemical study of beta-tricalcium
phosphate resorbing cells in periodontium of dogs.
J. Periodontal Res. **24** ; 391-401 1989.
- 28) Suba, Z., Takács, D., Gyulai-Gaál, S., Kovács,
K.: Facilitation of beta-tricalcium phosphate-

induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. Int. J. Oral Maxillofac. Implants **19** ; 832-838 2004.

29) 小澤正宏：高純度 β -TCPの骨形成能と溶解性に関する実験的研究．生体材料 **13** ; 167-175 1995.

30) Fujita R, Yokoyama A, Kawasaki T, Kohgo T. Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate blocks. J. Oral Maxillofac. Surg. **61** ; 1045-1053 2003.

31) Takahashi, T., Bhawal, U.K., Mizukami, T., Watanabe, T., Takahashi, T., Abiko, Y.: Stimulation of insulin-like growth factor receptor 1 expression and its phosphorylation in dog mandibles by β -TCP. 日口腔インプラント誌 **25** ; 9-16 2012.

図表の解説

図 1 本実験に使用したチタンキャップ

a チタンキャップの設計図 外径 5.5mm, 内径 5.0mm で最小肉厚が 0.25mm b 本実験に使用したチタンキャップの内面

図 2 チタンキャップの設置方法

a 皮膚および骨膜の切開および剥離 b 輪状の溝形成 c キャップ設置 d 骨膜縫合 e 皮膚縫合

図 3 H-E 染色の光学顕微鏡像

a β -TCP 群の新生組織前頭断面。頭蓋骨上にキャップに沿って骨新生を伴う新生組織が形成されている。 β -TCP 顆粒が残存しており、 β -TCP 顆粒周囲に新生骨を認めた。また、骨髓組織が見られた（低倍率像）。

b CaSO_4 群の新生組織前頭断面。新生骨、骨髓および線維性結合組織が観察された（低倍率像）。

c β -TCP + CaSO_4 群の新生組織前頭断面。頭蓋骨上にキャップに沿って骨新生を伴う新生組織が形成されている。 β -TCP 顆粒が残存しており、 β -TCP 顆粒周囲に新生骨を認めた（低倍率像）。また、骨髓組織が見られた（低倍率像）

d スポンゼル群の新生組織前頭断面。頭蓋骨上にキャップに沿って骨形成を伴う新生組織および骨新生が形成されている。上方は線維性結合組織で

満たされており，骨新生はやや不十分であった（低倍率像）。

e a の高倍率像

f b の高倍率像

g c の高倍率像

h d の高倍率像

NB；新生骨，BM；骨髓，CO；線維性結合組織，BT； β -TCP 顆粒

図 4 H-E 染色の光学顕微鏡像

β -TCP 群（a, b）および β -TCP + CaSO_4 群（c）では，残存する β -TCP 顆粒辺縁部に好塩基性領域が観察された（矢印）。 β -TCP 顆粒周囲に新生骨を認め，新生骨には骨細胞が存在した（b, d；矢頭）（a～d；高倍率像）。

NB；新生骨，BM；骨髓，CO；線維性結合組織，BT； β -TCP 顆粒

図 5 TRAP 染色の光学顕微鏡像

TRAP 陽性細胞は母床骨に散在し（矢印），新生骨にはほとんど観察できなかった（a, b）。稀に新生骨梁周囲に TRAP 陽性細胞を認めた（矢頭）（c）。（a, c；中倍率像；b；高倍率像）

B；母床骨，NB；新生骨，BM；骨髓

図 6 SOST 陽性細胞

4 群ともに SOST 陽性細胞が観察された。新生骨中の骨細胞は、頭蓋骨内のそれと同様に SOST 陽性反応を示した(a, b CaSO_4 群)(矢印)(中倍率像)。新生骨内方の骨細胞は、SOST 抗体に対し強陽性反応を示した。(c, d β -TCP 群)(矢印)(c 中倍率像、d 高倍率像)。

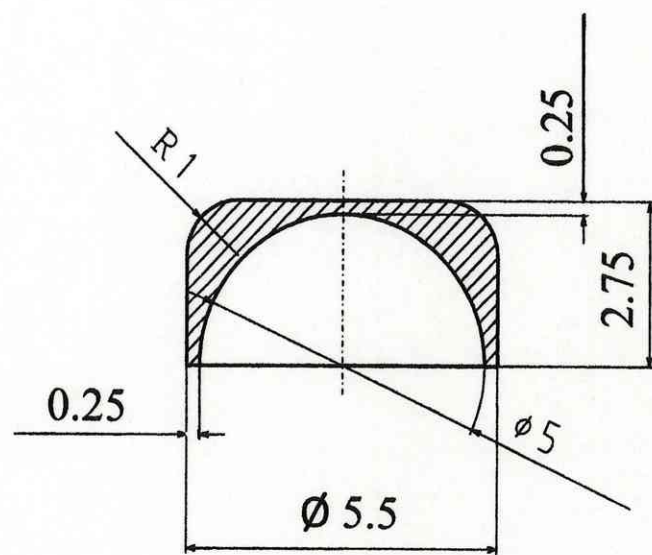
B ; 母床骨 , NB ; 新生骨 , BM ; 骨髓

図 7 4 つの実験群間の新生組織の占める面積の比較 (ROI 値)

β -TCP 群はスポンゼル群 (対照) に比較して有意に新生組織が占める面積が大であった。* : $p < 0.05$

図 8 4 実験群間の新生骨量/新生組織量 (%) の比較

β -TCP 群はスポンゼル群 (対照) に比較して有意に新生骨量/新生組織量 (%) が低かった。* : $p < 0.05$
有意差は無かったが、 β -TCP + CaSO_4 群と CaSO_4 群もスポンゼル群に比べて低い傾向を示した



a

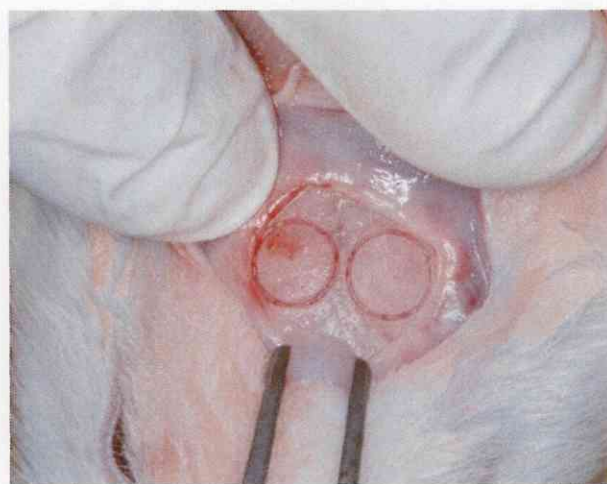


b

图 1



a



b



c

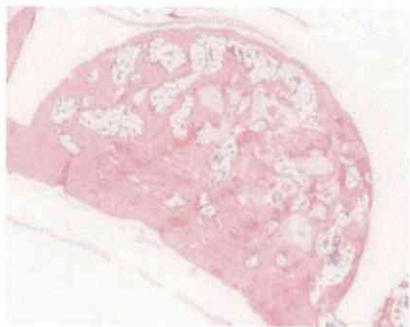


d



e

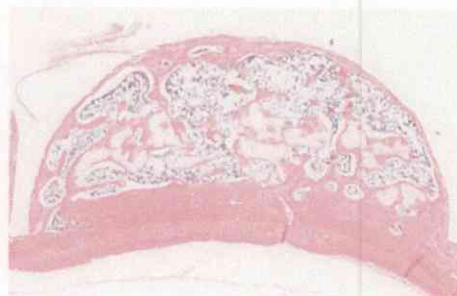
图 2



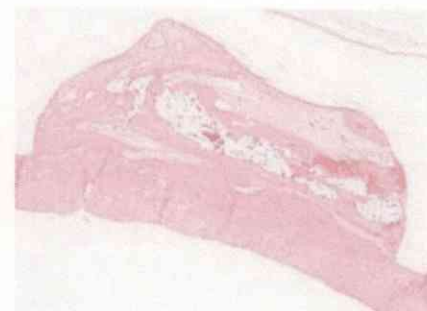
a



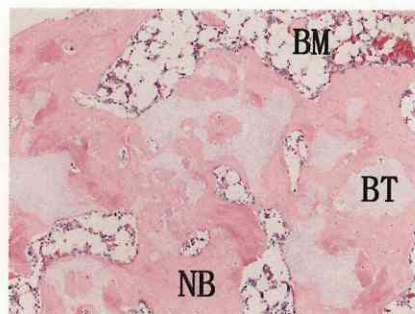
b



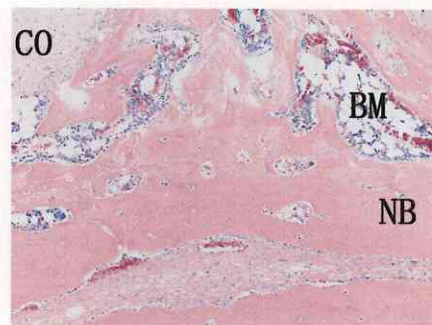
c



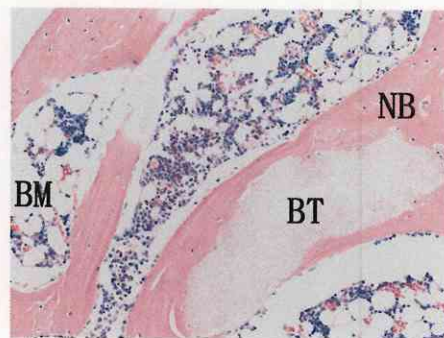
d



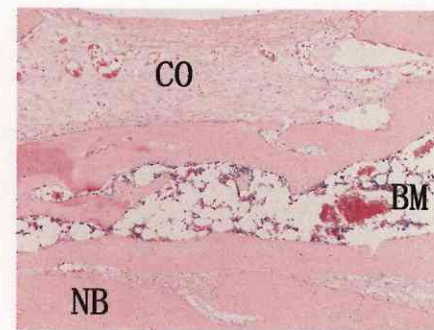
e



f

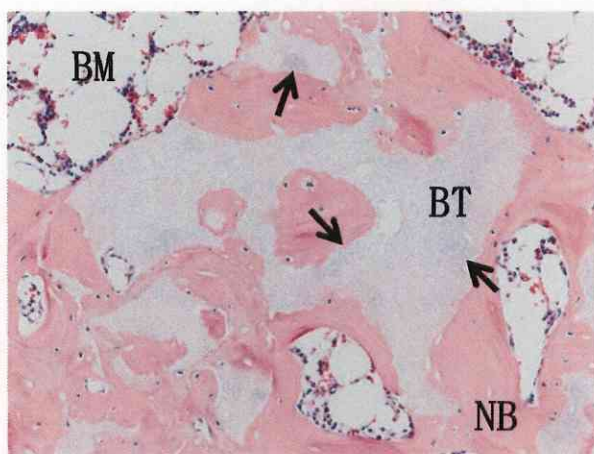


g

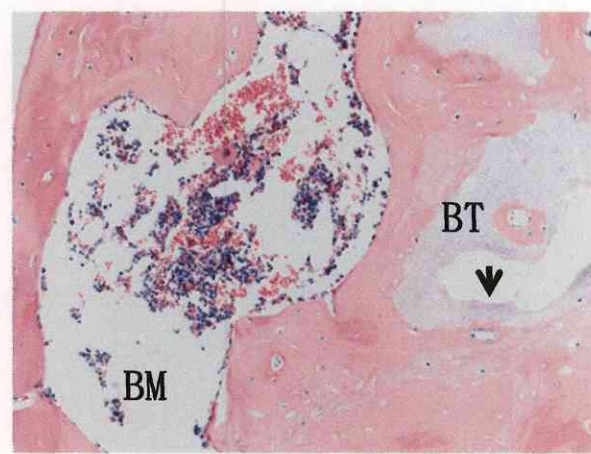


h

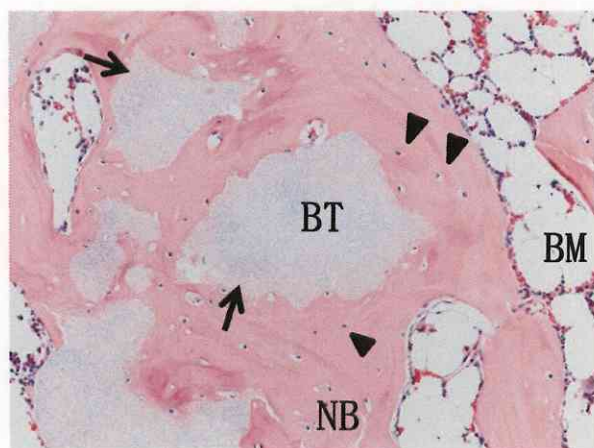
图 3



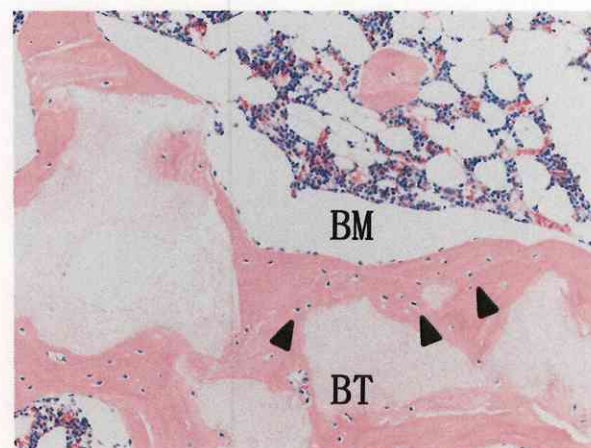
a



c

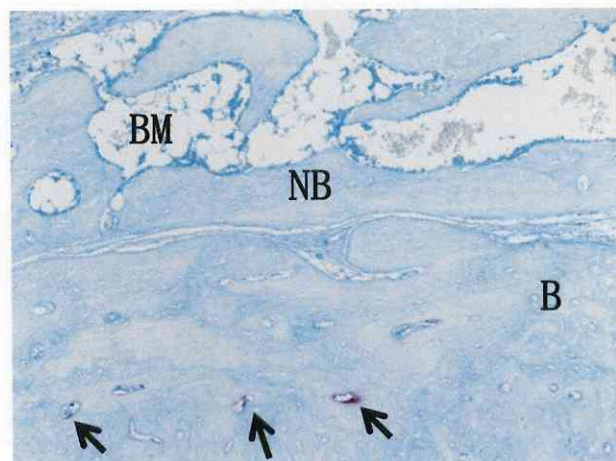


b

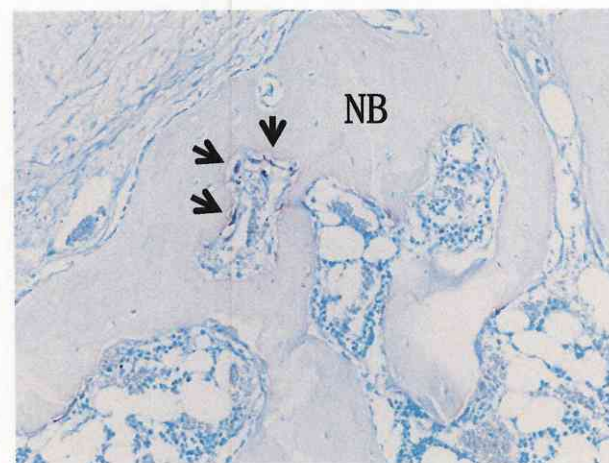


d

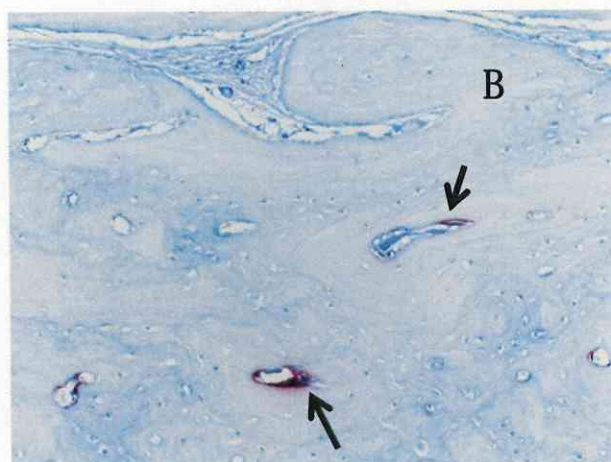
图 4



a

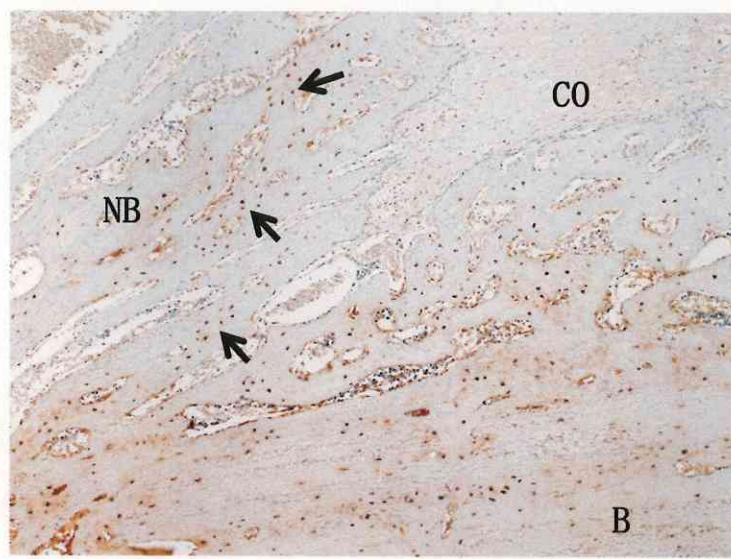


c

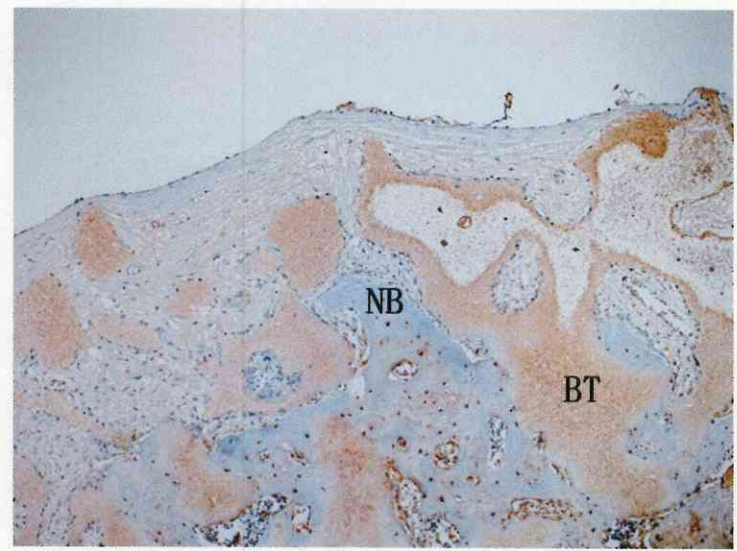


b

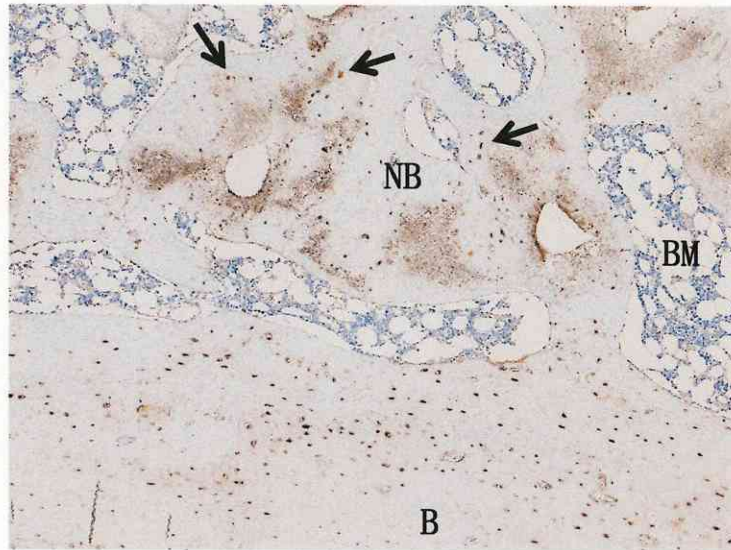
图 5



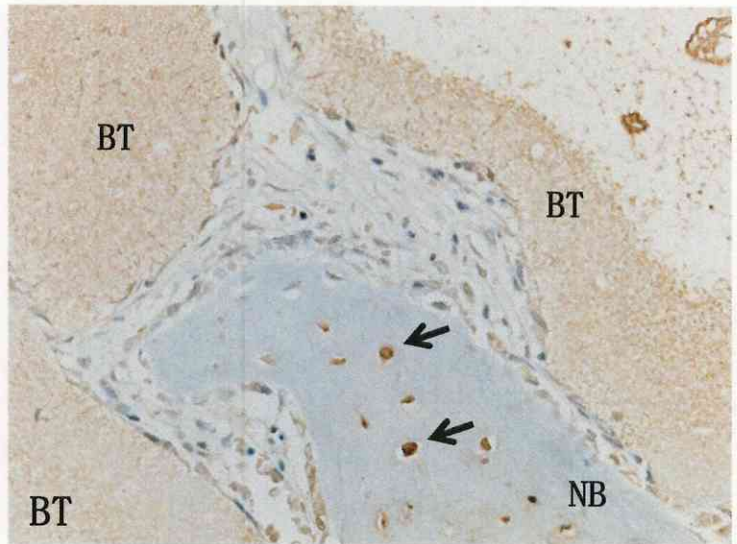
a



c



b



d

图 6

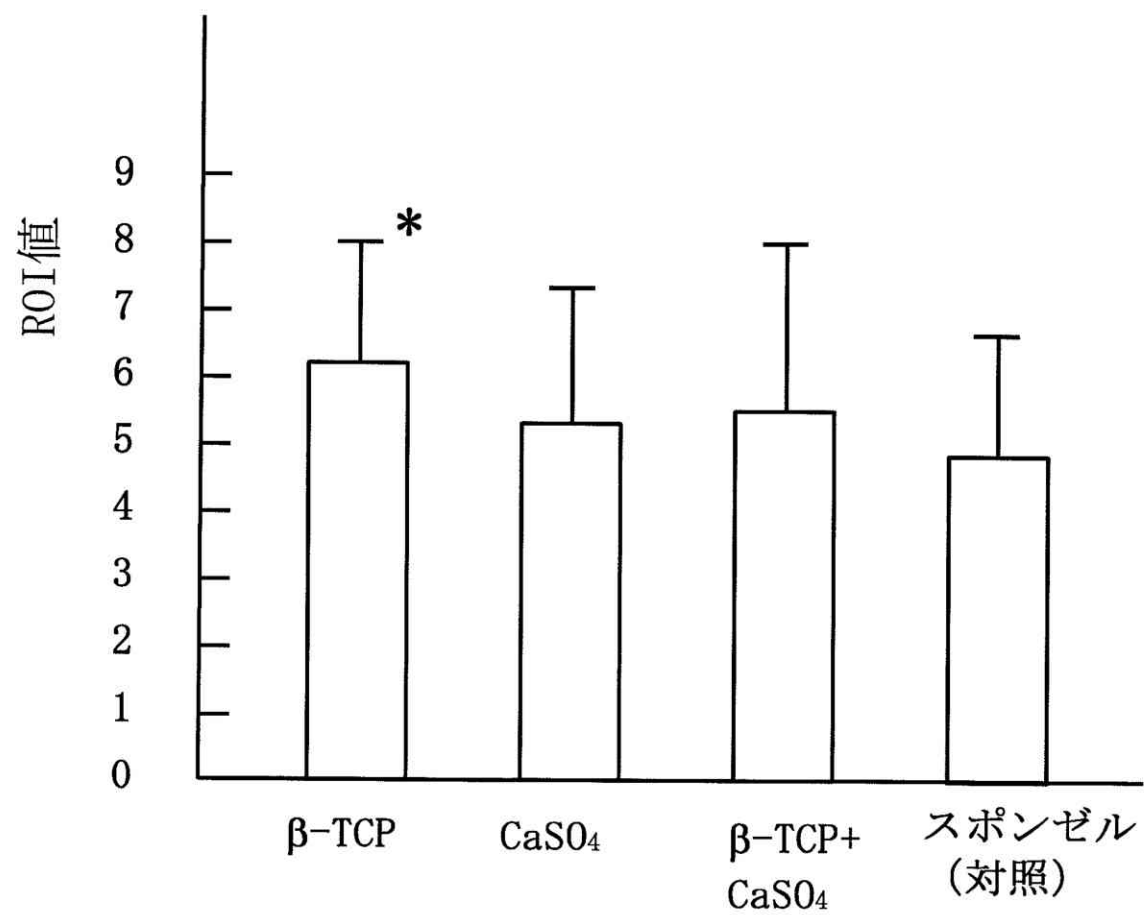


図 7

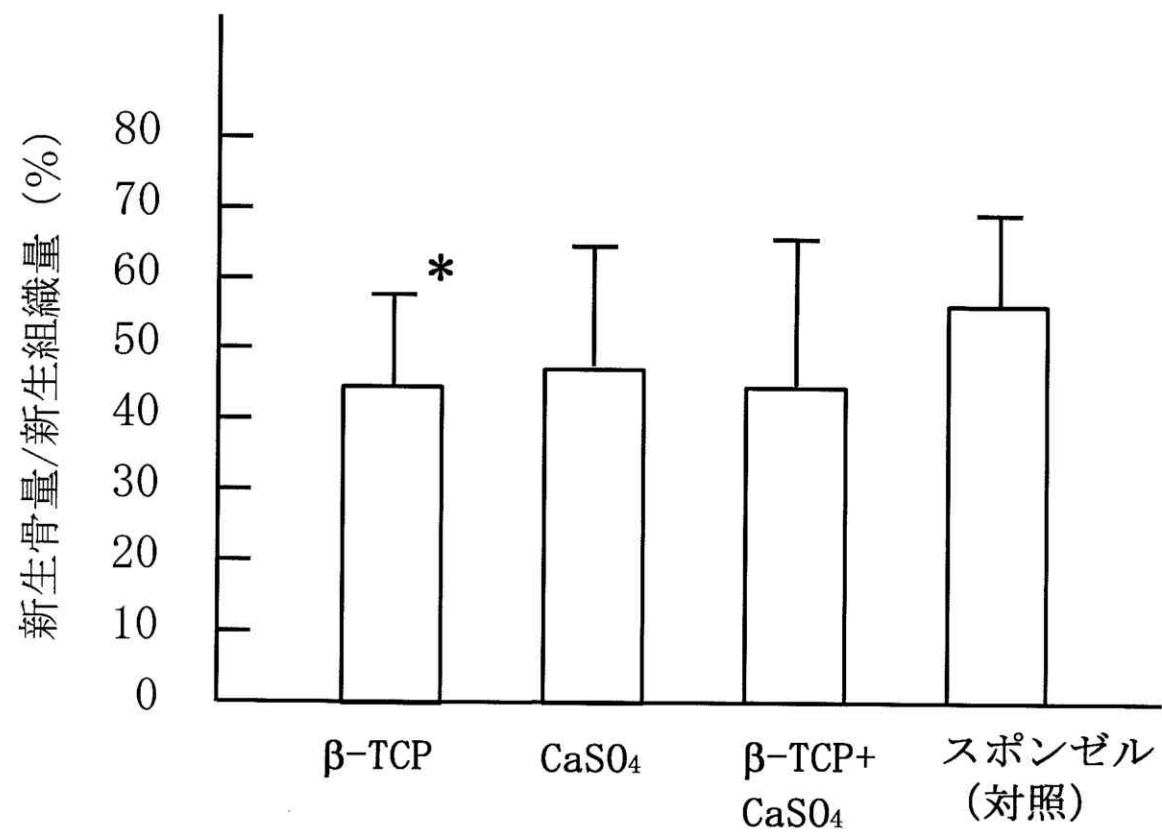


図 8