

サイナスリフトの動物実験において
ヒト凍結乾燥脱灰骨に異物反応をおこした実験動物の1例

池田哲哉、渡辺孝夫、浅井澄人、清水治彦、岩野清史、日高豊彦

(社)日本歯科先端技術研究所
市川総合歯科インプラント研究所

日本歯科先端技術研究所学会誌 Vol.5 No.4

平成11年10月31日

抜 刷

サイナスリフトの動物実験において ヒト凍結乾燥脱灰骨に異物反応をおこした実験動物の1例

池田 哲哉、渡辺 孝夫、浅井 澄人、清水 治彦、岩野 清史、日高 豊彦

(社)日本歯科先端技術研究所
市川総合歯科インプラント研究所

緒言

洞粘膜を保存しつつ、洞底部の骨造成を図るサイナスリフト術はTATUMにより最初の臨床報告がなされた^{1, 2, 3)}。通常、上顎洞粘膜を除去するとその後に形成された再生洞粘膜は形態学的にも変化するといわれる^{4, 5)}。この点、本術式は洞粘膜を操作するものの、粘膜自体は保存されることから洞粘膜機能に与える影響を少なくできる利点がある。一方、挙上した洞粘膜下空隙に入れる補填材は骨造成の促進、空隙容量の維持、形成された新生骨の吸収遅延などへ影響すると考えられる。過去には自家骨^{1, 2, 8, 6-14)}、吸収性ハイドロキシアパタイト^{2, 15, 16)}、非吸収性ハイドロキシアパタイト^{2, 16-18)}、TCP^{1, 2, 17, 19)}、凍結乾燥ヒト脱灰骨^{2, 15, 17, 19, 20, 21)}、ヒトガンマー線照射骨^{2, 17)}、牛焼成骨^{2, 17, 22, 23, 24)}、サンゴ顆粒^{2, 17)}、軟骨^{2, 17)}、ポリマー^{2, 17)}などさまざまな材料が単身、あるいは混合されて用いられた。自家骨は骨形成性、骨誘導性および骨伝導性を有することから、補填材としては最も優れていると言われる。しかし、採取量に限界があること、手術創が増えることなどの問題もある。その点、人工補填材は豊富に使える、別の手術創を必要としないなど臨床的に使いやすい。しかしながら、多数供給されている補填材のなかで、骨造成に最も有利に働く材料、あるいは組み合わせはどれか、これらの点は、まだ、十分に研究されていない。われわれはこの点を明らかにすべく、各種人工骨補填材のサイナスリフトへの影響を調べるため一連の動物実験を行っている。今回、この実験のなかで、市販されているヒト凍結乾燥脱灰骨を用いたところ、異物反応を引き起こした症例を経験した。ヒト凍結乾燥脱灰骨は骨誘導能を持つとされ、骨造成に有利に働くと考えられている材料であるが、本症例は逆の結果を示した。今後の臨床応用へ示唆をあたえるものと思われるので報告する。

材料および方法

実験動物：体重約10kgの雑種成犬、1匹を用いた。

実験部位：犬、左右前頭洞。

補填材：ヒト凍結乾燥脱灰骨、海綿骨顆粒〔1.3mm径、Dembone™、Ultimatics社、USA〕(図1、図2)を左側前頭洞の挙上洞粘膜下空隙の中に填塞した。一方、吸収性ハイドロキシアパタイト顆粒(300-400 μ 径、OsteoGen™、Impladent社製、USA)(図3)を右側前頭洞の空隙に填塞した。

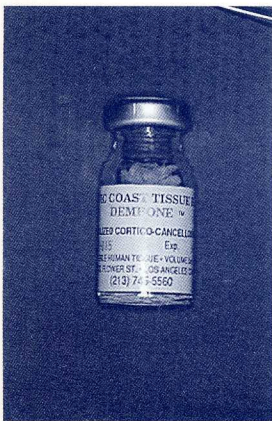


図1

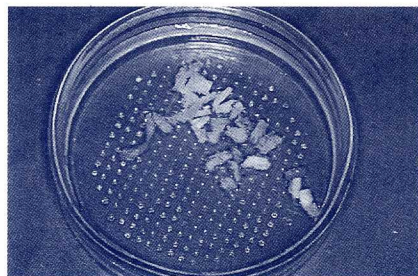


図2



図3

手術方法：塩酸ケタミン（ケタラール™、三共）筋注、ペントバルビタールナトリウム（ネンプタール™、大日本製薬）静注による全身麻酔下で前頭部剃毛、塩酸キシロカイン（キシロカイン™、藤沢）局麻下前頭部に横方向に約5 cm皮膚切開、骨膜を剥離し前頭骨を露出した。左右前頭洞相当部の骨面にそれぞれ15×7 mm大、長方形の骨溝を形成し、周囲骨と切り離し開窓した後、洞粘膜を剥離、その骨片とともに洞内に移動し空隙を形成した。次いで、開窓部より約5 mm離れた側壁に空隙の容量確保のため純チタンインプラント（BioCare implant、Nobel BioCare社製、Sweden）を植立した（図4）。このようにしてつくられた挙上洞粘膜下空隙にヒト凍結乾燥脱灰骨顆粒を填塞し、空隙全体を満たした（図5）。右側では左側と同様の処置をした後、吸収性ハイドロキシアパタイト（Osteogen™）を填塞した（図6）。図7は補填材填塞後の左右前頭洞開窓部を示したものである。このあと骨膜、皮膚を縫合し、手術を終了した（図8）。

観察期間：術後1ヶ月にて屠殺した。図9は術後1ヶ月目の手術創を示したものである。治癒は良好で、不快所見はみられなかった。

光学顕微鏡用資料の作製：塩酸ケタミン（ケタラール™、三共）5 mlを下肢に筋注後、上肢内側静脈にペントバルビタールナトリウム（ネンプタール™、大日本製薬）5 mlを徐々に静注、全身麻酔下に頸部を剃毛し、外科用メスにて気道上の皮膚を切開、鈍的剥離を行いながら、気管の左右側辺にある左右頸動脈を確保した。つぎに一方の頸動脈を結紮後、そのやや

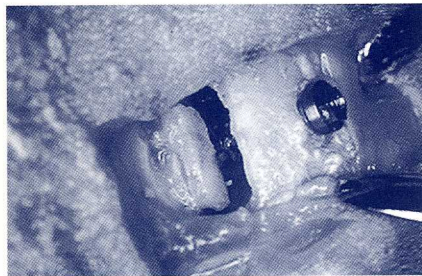


図4

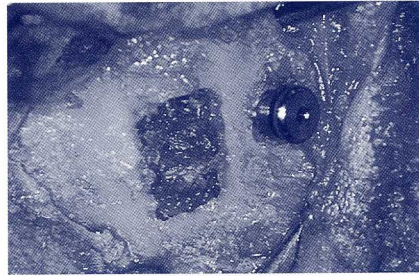


図5



図6

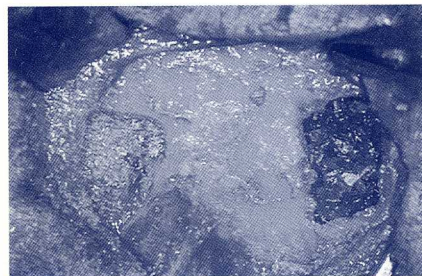


図7

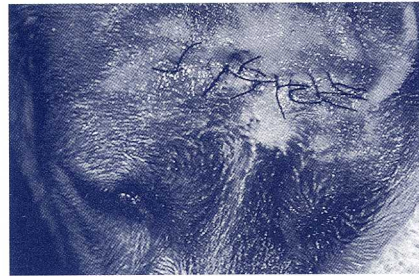


図8

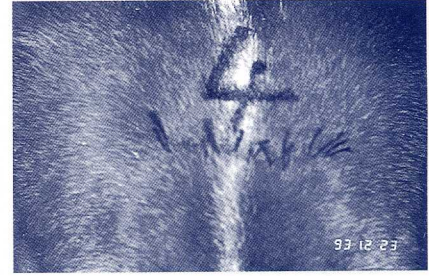


図9

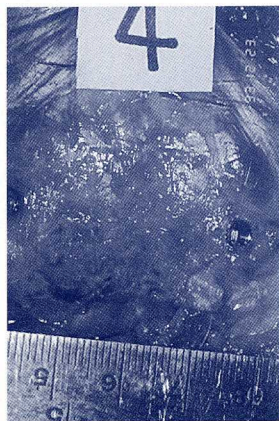


図10

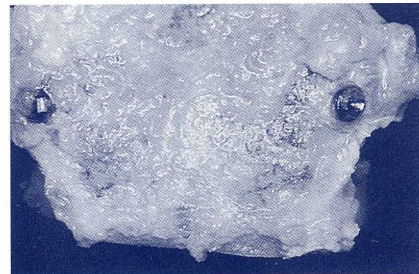


図11

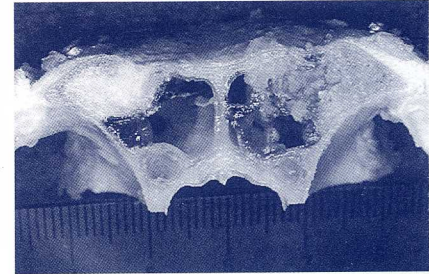


図12

上方で点滴瓶につながった留置針を頭部方向に刺入、針先を血管上から結紮、固定、他方の頸動脈も同様の処置を施した。ついで鼠頸動脈を切断、脱血させながら生理食塩水500mlを点滴、前灌流、その後、10%中性ホルマリン液700mlを約2時間かけて灌流固定した。固定状態を硬さと肉色で確認した後、左右前頭洞を含む頭骨をブロック状に切り出した。図10はこの際、手術創の頭皮を、骨膜を含めて剥離した所見である。左右のインプラントがみえる。左右開窓部は充実性の組織で占められ、膿瘍や肉芽などの炎症所見や欠損腔はみられない。10%中性ホルマリン液に浸漬、最低2週間以上固定した。図11は固定完了した前頭洞ブロックである。ついで、このブロックをインプラントの前後で約8mm幅に前額断し、小ブロックを作製した。図12はこのインプラントを含む小ブロックで、前頭断を正面よりみたものである。図の右側は左側前頭洞を、左側は右側前頭洞を示す。これらの操作で得られた小ブロックのうちインプラントを含む小ブロックを比脱灰研磨標本用の、更に、その前後の2個のインプラントを含まない前頭洞ブロックを脱灰標本用の資料にした。

1) 脱灰標本の作製：脱灰標本用の資料は塩化アルミニウム、蟻酸、塩酸を用いた迅速脱灰液に24時間浸漬、脱灰後5%硫酸ナトリウム水溶液に12時間浸漬中和し、その後、アルコールにて脱水、ベンゼンにて脱アルコール、パラフィン包埋、薄切した。染色はヘマトキシリンエオジン重染色（以下HE染色）、アザンマロリー染色（以下AZAN染色）を施した。

2) 非脱灰研磨標本の作製：インプラントを含む小ブロックはホルマリン固定後、通法に従い脱水、脱脂、TECHNOVIT7200VLC樹脂包埋、試料をアクリル板に接着、EXACT社製MG3,000およびMG4000にて薄切、研磨し、染色、封入後、光学顕微鏡にて観察した²⁵⁾。染色は塩基性フクシン・メチレンブルー染色およびトルイジンブルー染色を行った。

観察方法：肉眼所見は切り出し時の前額断面を観察した。組織学的所見は代表として選定した組織標本を光学顕微鏡にて13.2倍、33倍、132倍の倍率で検鏡した。

結果

1. 左側前頭洞：ヒト凍結乾燥脱灰骨（DemboneTM）補填。

肉眼所見：前頭洞内腔の大部分は空隙内構造物で占められていた（図13）。空隙部は洞壁既存骨に接して、肉芽組織が増殖、その中心部から表層にかけて弾力性に富む顆粒状のスポンジ様構造物で占められていた。スポンジ様構造物は作業中、容易に剥奪したため、写真の段階ではすでに表層の組織の一部が欠損していた。

組織学的所見：図14は脱灰、H・E重染色標本、前頭洞の全体像。造成部の表層が粘膜を含め欠損していた。開窓部は線維性結合組織性で占められ、新生骨による骨閉鎖はみられなかった。図15は洞標本の弱拡大像。洞壁、既存骨表面に増殖する線維性結合組織には数個の顆粒が散在していた。新生骨は既存骨表面にごく僅かにみられるに過ぎなかった。顆粒は粗造で、周囲には多数の組織球が集合し（図16）、顆粒を盛んに貪食していた（図17）。図18は表層に近い顆粒を示す。洞粘膜は一部欠損し、結合組織が露出していた。造成部の大部分は盛んに貪食される顆粒を含む線維性結合組織からなり、好中球は少なく、化膿性炎症を示す所見は少なかった。図19は研磨標本、トルイジンブルー染色標本。造成部内に新性骨は殆どみられなかった。図20は同標本のインプラント頸部の拡大像で、僅かにみられた新生骨の部分。新生骨骨梁が洞壁既存骨表面に増殖しているがインプラント界面の骨結合は得られていない。他の大部分の洞壁既存骨表面には殆ど新生骨はみられなかった（図21）。

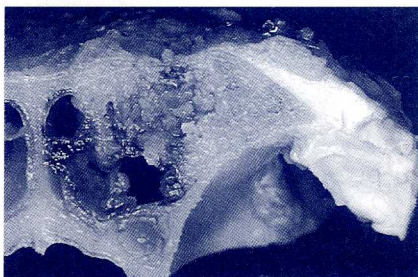


図13

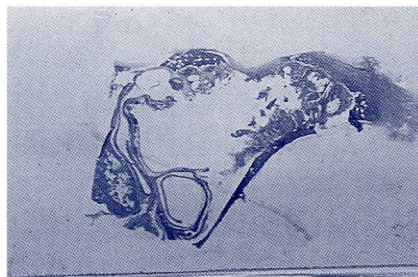


図14

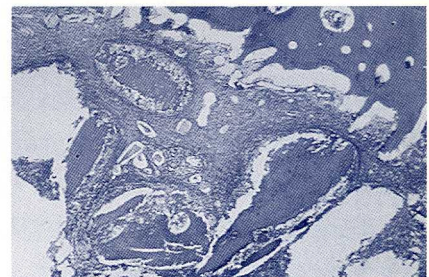


図15



図16

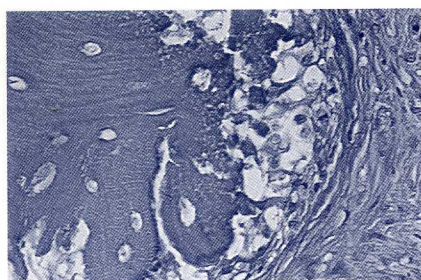


図17

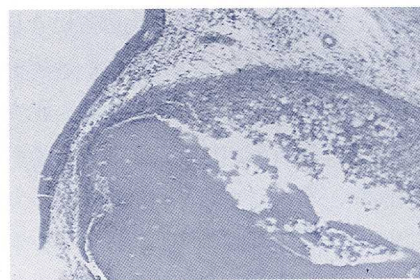


図18

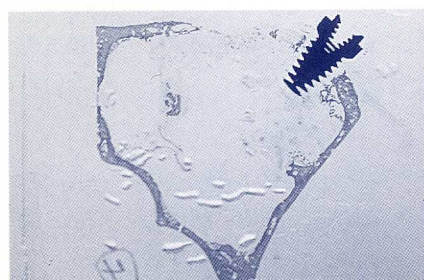


図19

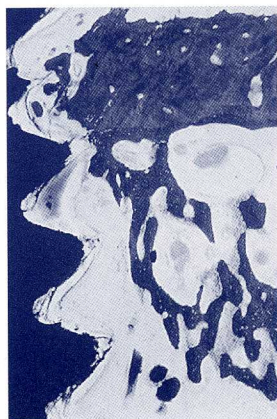


図20

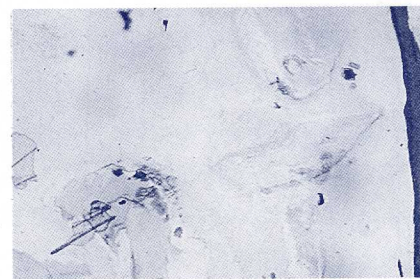


図21

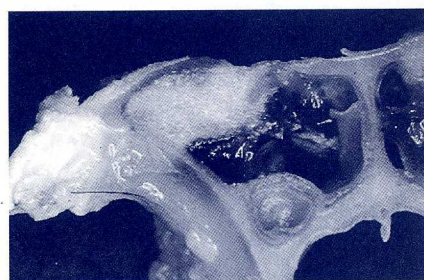


図22

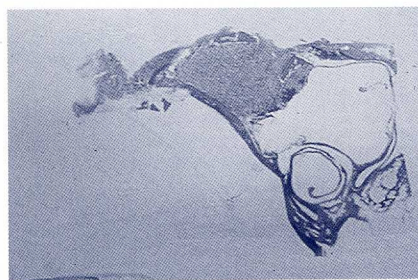


図23

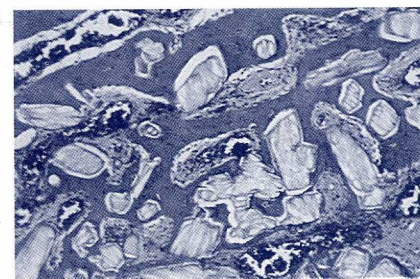


図24

2. 右側前頭洞：吸収性ハイドロキシアパタイト (OsteoGen™) 填塞。

肉眼所見：空隙部の断面は灰白色の顆粒が密在した骨様硬の組織からなっていた (図22)。粘膜表面は凹凸不整で、内部の顆粒構造物が透過していた。

組織学的所見：図23は脱灰、H・E重染色標本、前頭洞全体を示す。空隙部の断面は灰白色顆粒が充満、強拡大図 (24) では主に洞壁既存骨より増殖する新生骨が多量みられた。新生骨は顆粒に直接し、それを内包する部分も観察された。洞内に挙上洞粘膜とともに移動した開窓部の骨片からも新生骨が増殖していたが、洞粘膜より増殖する新生骨はみられなかった。図25は研磨標本、トルイジンブルー染色。顆粒は黒褐色、新生骨は青に染まるため、モノクロの写真では空隙全体に顆粒が充満しているように見える。図26はインプラント表面の強拡大。洞壁既存骨から新生骨が増殖していた。しかし、インプラント界面での骨結合はみられなかった。図27は洞壁既存骨より増殖した表層の新生骨。新生骨が顆粒に直接、あるいは内包した部分が観察された。図28は図27付近のCMR (コンタクトマイクロX線写真)、明るく光る顆粒の周囲に骨小腔のみられる新生骨梁が観察された。

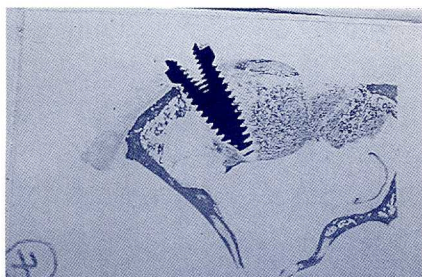


図25

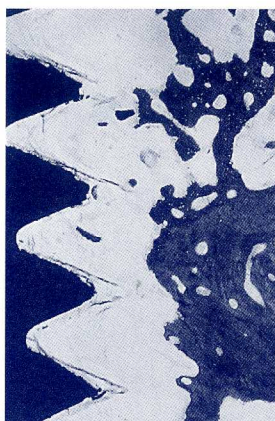


図26

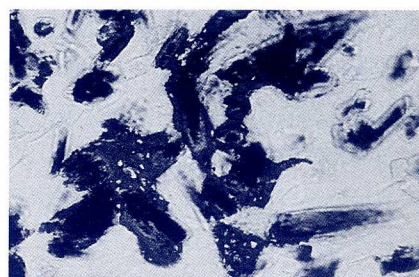


図27



図28

考察

1. 犬前頭洞を実験の場として選んだ理由

犬前頭洞は、大きさが高さで約15mmあり、日本人の上顎洞の垂直径28mm²⁶⁾には及ばないもののサイナスリフト術の施術には十分の大きさであること、その洞粘膜はヒト状顎洞粘膜と同じく一層の多列線毛円柱上皮からなり、洞壁の骨組織表面の骨膜につながっていることから、今回の実験の場として採用した。

2. ヒト凍結乾燥脱灰骨の骨形成に対する作用

ヒト凍結乾燥脱灰骨は凍結乾燥することで抗原性を減じ、骨のミネラル成分を除去することで内部のコラーゲンや骨成長因子 (BMP) の作用を発現しやすくする、など骨造成に有利な特徴を有する²¹⁾。しかし、骨形成性はないので、自家骨から比較すると骨造成までの時間が長く、また、造成量も少ないと言われる²⁷⁾。Scher¹⁹⁾ は凍結乾燥脱灰骨とTCPを混ぜた補填材をサイナスリフト術に使用した1例について、トルフィンバーで採取した骨片を組織学的に成熟した骨組織を確認、この補填材は骨形成を促進したと報告した。

CHANAVAL¹⁹⁾ は凍結乾燥脱灰骨単身を24例、それにTCPを混ぜたものを6例に使用し、同じくトルフィンバーで採取した骨片を組織学的に観察し、補填した部分に90%の骨組織を確認した。定永²⁸⁾ はOsteoGenTM とDemboneTM混用症例について組織学的に検索し、Demboneにより誘導された骨がOsteoGenTM顆粒を内包している像を観察した。Vlassis²⁹⁾ は同じく吸収性HA顆粒 (OsteoGenTM) とヒト凍結乾燥脱灰骨 (GraftonTM) を混用した1例について組織学的に検索し、吸収性顆粒に新生骨が直接して形成されている所見を確認、これはヒト凍結乾燥脱灰骨の骨誘導能と吸収性HA顆粒の骨伝導能が機能した結果と解釈した。梨本³⁰⁾ はDemboneTM とOsteoGenTMの混材をベースにOsteograftTMとの3材混合材とInterporeTMとの3材混合材をサイナスリフトの臨床に応用し、それらの生検を組織学的に観察、比較した結果、いずれも新生骨が形成され、臨床的にも有用であると報告した。一方、小長井³¹⁾ はOsteoGenTM とDemboneTM混用した1例について組織学的に検索し、ヒト凍結乾燥脱灰骨および吸収性HA顆粒の大半は吸収され、線維性結合組織に置換され、骨の新生も乏しかったことを観察した。これらのことからヒト凍結乾燥脱灰骨を単独で移植材料として用いるには限界があると、臨床応用には否定的な報告をしている。このようにヒト凍結乾燥脱灰骨は1990年前後よりサイナスリフト術の補填材として広く用いられてきた。しかしながら、その評価については一定の見解がなく、良いとするもの、否とするもの様々であった。前述の報告は臨床例の骨造成部からトルフィンバーにて採取された骨組織片を資料にした病理組織像を根拠にしたものが多い。しかしながら、小さな組織片からの限られた情報から全体像を評価することは限界がある。このことがヒト凍結乾燥脱灰骨にたいする評価にパラツキがみられた一つの理由と考えられる。今回、われわれの行った動物実験は、造成部の全体像から骨補填材の反応が観察できる。この結果、今回報告した症例は術後1ヶ月という短期間のものであるが、ヒト凍結乾燥脱灰骨に対して、明らかな異物反応を示した。更に、反対側のOsteoGenTMを補填した造成部に比較すると明らかに骨新生は抑制されていた。

3. 異物反応を起こした原因と今後の臨床応用

今回の症例のヒト凍結乾燥脱灰骨を補填した造成部をみると、好中球などの化膿性炎症を示す所見は少なかった。また、肉眼的にも瘻孔や膿瘍の形成などが見られなかつたことから細菌感染などは考えづらい。ヒト凍結乾燥脱灰骨顆粒は劣化し、その周囲に多数の組織球が集族し、活発な吸収像を示していた。これは顆粒そのものに起因する異物反応と考えられる。ヒト凍結乾燥脱灰骨は犬にとっては異種動物にあたる。化学処理および脱灰処理することで抗原性を減じてあるとしても、完全な抗原性の消失は困難であろう。ヒト凍結乾燥脱灰骨のもつ抗原性も異物反応の原因として考えられる。更に、今回のヒト凍結乾燥脱灰骨は市販されているDembone™を使用した。本品は脱灰後の骨コラーゲンを含む有機成分である。熱や湿気などによる保管あるいは運送中の変質も考えられる。いずれにしろ、1例のみであるがヒト凍結乾燥脱灰骨により生体に対して為害作用がみられたことは、本症例は本材の臨床応用に対しての警鐘として捕らえるべきものと思われた。

結論

犬前頭洞を使ったサイナスリフト術の動物実験でヒト凍結乾燥脱灰骨に対して異物反応をおこした1症例を経験した。本症例はヒト凍結乾燥脱灰骨の今後の臨床応用に警鐘を示すものとして重要であると思われた。

参考文献

- 1) TATUM, O. H., LEBOWITZ, M. S., TATUM, C. A. AND BORGNER, R.A.: Sinus augmentation ; New York State Dent. J., 43-48, 1993.
- 2) CHANAVAZ, M.: Maxillary sinus: anatomy, physiology, surgery, and bone grafting related to implantology-eleven years of surgical experience (1979 - 1990) ; J. Oral Impl., 16, 199-209, 1990.
- 3) MISCH, C. E.: Maxillary sinus augmentation for endosteal implants : Organized alternative treatment plans; Int. J. Oral Implantol., 4, 49-58, 1987.
- 4) BENNIGER, M. S., SEBEK, B. A. AND LEVINE, H. L.: Mucosal regeneration of the maxillary sinus after surgery; Otolaryngol. Head Neck Surg., 101, 33-37, 1989.
- 5) BENNIGER, M. S., SCHMIDT, J., CRISSMAN, D. and GOTTLIEB, C.: Mucociliary function following sinus mucosal regeneration; Otolaryngol. Head Neck Surg., 105, 641-648, 1991.
- 6) WOOD, R. M. AND MOORE, D.L.: Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement ; Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 3, 209-214, 1988.
- 7) ADELL, R., LEKHORM, U., GRONDAHL, K., BRANEMARK, P. I., LINDSTROM, J. AND JACOBSSON, M.: Reconstruction of severely edentulous maxillae using osseointegrated fixtures in immediate autogenous bone grafts; Int. J. Oral Maxillofac. implants, 5, 233-246, 1990.
- 8) ISAKSSON, S.: Evaluation of the bone grafting techniques for severely resorbed maxillae in conjunction with immediate endosseous implants; Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 9, 679-688, 1994.
- 9) 香月武、後藤昌昭、内田雄基、豊田純一郎：上顎洞底骨移植術； Quintessence Dent. Implantol.、2、290-295、1995.
- 10) BOYNE, P. J. and JAMES, R.A.: Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone; J Oral Surg., 38, 613-616, 1980.
- 11) 西村賢二、伊東隆利、伊藤泰蔵、和久田哲生、上村孝徳、渡辺諭、村上慶、野井倉武憲：上顎洞底挙上術を行った3症例；日口腔インプラント誌、10、69-75、1997.
- 12) 澤井俊宏、新美敦、山田陽一、渡邊和代、小関健司、中井英貴、本田雅規、藤本雄大、野坂泰弘、上田実：上顎洞骨移植術とインプラントによる咬合再建を行った2例；日口腔インプラント誌、9、97-101、1996.
- 13) MISCH, C. M., MISCH, C. E., RESNIK, R. R. AND ISMAIL, Y. H.: Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants : a preliminary procedural report; Int. J. Oral Maxillofac Implants, 7, 360-366, 1992.
- 14) TATUM, O. H.: Maxillary and sinus implant reconstructions ; Dent. Clin. North America, 30, 207-229, 1986.

- 15) 川俣明敏、根岸邦雄、中川健三、岡延綱、磯貝昌彦、藤下雅己：上顎洞挙上法症例の画像的検討；日口腔インプラント誌、9、328—335、1996.
- 16) SMILER, D. G. and HOLMES, R. E.: Sinus lift procedure using porous hydroxyapatite: A preliminary clinical report ; J. Oral Implant., 23, 239-253, 1987.
- 17) CHANAVAZ, M.: Sinus grafting related to implantology. statistical analysis of 15 years of surgical experience (1979-1994); J. Oral Implant., 22, 119-130, 1996.
- 18) HURZELER, M. B., KIRSCH, A., ACKERMANN, K. L. AND QUINONES, C. R.: Reconstruction of the severely resorbed maxilla with dental implants in the augmented maxillary sinus: a 5-year clinical investigation; Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 11, 466-475, 1996.
- 19) Scher, E. L. C., Day, R.B. and Speight, P. M.; New bone formation after a sinus lift procedure using demineralized freeze-dried bone and tricalcium phosphate; Implant Dentistry, 8, 49-53, 1999)
- 20) TONG, D. C., KIM, R., DRANGSHOLT, M. AND BEIRNE, O. R.: A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis; Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 13, 91-99, 1998.
- 21) Garg, A.K.: Augmentation Grafting of the maxillary sinus for placement of dental implants: Anatomy, physiology, and procedures; Implant Dent, 8, 36-46, 1999.
- 22) Wallace, S. S., Froum, S. J. and Tarnow, D. P.: Histologic evaluation of the sinus elevation procedure: A clinical report; Int J Periodontal Rest Dent, 16 : 47-51, 1996.
- 23) Smiler, D. G.: The sinus lift graft, Basic techniques and variations; Pract Periodontal Aesthet Dent, 8 : 885-893, 1997.
- 24) Rosenlicht, J. L.: Sinus lift procedure-subantral augmentation : Implants; Clin Rev in Dent, 1 : 1-8, 1992.
- 25) 仙波伊知郎；第四章 手術硬組織材料のマクロ非脱灰研磨標本の作製法と解析；骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際、永井教之、学際企画、83-98、1991、東京
- 26) 三浦真一、矢野武：上顎洞、特に上顎洞底の形態との関係に関する知見補遺；日本耳鼻咽喉会報、56、633-644、1953.
- 27) Misch, C. E. and Dietsh, F.: Bone-grafting materials in implant dentistry; Implant Dent, 2 : 158-167, 1993.
- 28) 定永健男、渡辺孝夫：上顎洞底挙上と同時にインプラントを行った症例、第1報、OsteoGen™とDembone™混用症例の組織像；日インプラント誌、6 : 231-236, 1993.
- 29) Vlassis, J. m., Hurzeler, m. B. and Quinones, C. R.: Sinus lift augmentation to facilitate ; lacement of nonsubmerged implants : A clinical and histological report ; PP&G, 5 : 15-23, 1992.
- 30) 梨本正憲、津末台、小林博：上顎洞挙上術に用いた骨補填材の臨床および病理組織学的検討；日インプラント誌、11、393-403, 1998.
- 31) 小長井洋一、佐藤光、又賀泉、片桐正隆：上顎洞挙上に関する臨床病理組織学的研究；歯学、86 : 131-149, 1998.