超音波併用脱灰処理骨の即時再植に関する実験的研究

弘中亮治・佐野和生・井口次夫

Experimental studies on ultrasonic decalcification of bone implants

Ryouji HIRONAKA · Kazuo SANO · Tsugio INOKUCHI

Abstract: Decalcification of the bone implant has been performed to accelerate bone induction. Ultrasound applied to rapid decalcification was investigated for immediate reimplantation of the resected jaw bone.

Atomic absorption analysis of the amount of calcium dissolved into the solution of 0.6 N HCl from the bone subjected to decalcification revealed that ultrasonic application markedly shortened decalcification time.

Observation of ultrasonically decalcified bone matrix using scanning electron microscopy showed deeply perforated bone cavities and smoothly scrubbed bone surfaces, suggesting ultrasonic action to the bone in the decalcification solution.

Histological findings of decalcified bone matrix implanted in the abdominal wall muscles of rabbits indicated that ultrasonic decalcification preserves the bone induction property of the implant.

Key words: ultrasonic decalcification (超音波併用脱灰), decalcified bone implantation (脱灰骨移植), immediate reimplantation of bone (即時再植)

緒 言

顎骨腫瘍病変に対する手術により、下顎骨の連続性が失われることが少なくない。その後の顎骨の再建のために摘出自家骨の再植を行うことは、解剖学的に最良の形態を回復することができると同時に身体他部へ侵襲を加えることがないため優れた方法と思われる。しかし、この場合摘出骨内の腫瘍細胞に対する殺細胞処理が必要となる¹⁻⁶⁾

一方、腫瘍手術、特に悪性腫瘍手術の場合には周囲軟組織の切除を伴うため、骨移植の母床としては良好な状態とはいえない。したがって再植に際し、上記のような殺細胞処理を行った移植骨片に、さらに脱灰処理を加えることによって骨誘導能を高めることは、良好な骨治癒のために有意義なことと思われる⁷⁾

脱灰骨の臨床応用に際して、脱灰による骨の機械的強度の低下が問題となるが脱灰を表面にとどめることにより、内部未脱灰部による機械的強度の保存と表面脱灰部による骨誘導能の促進とが可能となる⁸⁻¹⁰⁾。この脱灰処理を摘出自家骨の即時再植に応用するためには、脱灰処理の迅速化が必要となる。

今回われわれは、病理組織標本の作製に応用されている超音波の併用による硬組織の脱灰促進作用に着目し¹¹⁻¹³⁾、超音波併用塩酸脱灰法により作製した脱灰骨の即時移植に関する基礎的検討を行った。

方 法

1. 脱灰骨の作製と観察

10週齢メスの家兎より摘出した上腕骨、前腕骨、大腿骨、および脛骨の骨髄および周囲軟組織を除去したのち、約12×10 mmの骨片とした。Uristらの方法^{9,14)}、およびReddiらの方法^{15,16)}をもとに計画したスケジュールに従って以下の処理を行った。上昇アルコール(70, 80, 90, 100%)にて脱水、100%エーテルにて脱脂した後、骨1 g 当り0.6規定塩酸 200 ml を用いて脱灰した。脱灰に際し、超音波を併用したものを超音波併用脱灰

長崎大学歯学部口腔外科学第2講座

(主任: 井口次夫教授)

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nagasaki University School of Dentistry (Chief: Prof. Tsugio Inokuchi)

受付日: 平成2年8月29日

図1 家兎長管骨脱灰時のCa溶出量

群, また, 超音波を使用せずスターラーによる塩酸の攪拌のみを行ったものを対照群とした. 脱灰液中へのカルシウム溶出量を脱灰開始後30分, 1, 2, 12, 24時間において, 原子吸光法(日立原子吸光測定器偏光ゼーマン180-80型)により測定した.

また, 脱灰処理による骨の経時変化を軟エックス線写真, コンタクトマイクロラジオグラフィー, 走査電子顕微鏡により観察した.

超音波発生装置は, ブランソン社製超音波洗浄装置ブランソニック221型(47,000Hz)を用い, 超音波による温度上昇を制御するため流水による還流を行って脱灰液温を18~22°Cに維持した. スターラーによる攪拌時の液温は18~20°Cであった.

2. 家兎腹直筋下移植実験

上記の方法により作製した超音波併用脱灰群と, 対照群のおのおの1, 2, 12, 24時間脱灰処理骨を, 70%アルコール洗浄につづき, 生理食塩水による洗浄後, 10週齢メスの家兎腹直筋下に移植した. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14週後に屠殺し, 移植骨を周囲軟組織を含めて摘出し, 10%ホルマリン固定, ブランクリュクロ液¹⁷⁾にて約100時間脱灰後, 通法によりパラフィン切片を作製し, Hematoxylin-Eosin 染色を行った.

結 果

1. 脱灰骨の作製と観察

1) 家兎長管骨脱灰時のCa溶出量

脱灰液中へのCa溶出量を測定し, その溶出曲線を示した(図1).

超音波併用脱灰群の1時間値224mgに対し, 対照群では117mgを示した. 両群ともその後2時間まで溶出量の急激な上昇を認めた. その後Ca溶出量の上昇は鈍

写真1 家兎長管骨脱灰処理後の軟エックス線写真

A: スターラー併用1時間脱灰骨

B: スターラー併用2時間脱灰骨

C: 超音波併用1時間脱灰骨

D: 超音波併用2時間脱灰骨

化し, 12時間以後ではほぼプラトーとなった. すなわち, Caの溶出は0~2時間にピークがあると思われた. 超音波併用脱灰群と対照群の間には30分値, 1時間値, 2時間値において, 統計学的有意差(Wilcoxon検定, $P < 0.01$)を認めた.

2) 脱灰処理骨の軟エックス線写真所見

脱灰処理開始後の軟エックス線写真では両群とも経時的なエックス線透過性の上昇がみられた. 特に12時間後, 24時間後の脱灰骨では著明な脱灰の進行を認めた. また, 1時間, 2時間脱灰骨では, 部分的な疎状構造が多くみられたが, 形態的には脱灰の程度, および様相において, 超音波併用群, 対照群間の差は認められなかった. 写真には1時間, 2時間脱灰後の軟エックス線像を示す(写真1).

3) 脱灰処理骨のコンタクトマイクロラジオグラフィー(以下CMRと略す)

超音波併用1時間脱灰骨のCMRでは, 中央の未脱灰部と, 顆粒状の未脱灰部を含む表層の脱灰部が観察された(写真2).

4) 脱灰処理骨の走査電顕所見

未処理骨では全体的に粗造な面を呈し, 表面には顆粒状物が多数存在し, 小孔の散在が認められた(写真3).

写真 2 超音波併用 1 時間脱灰骨の CMR 像

A : 未脱灰部

B : 顆粒状の未脱灰部を含む表層脱灰部

写真 3 走査電顕像 未処理骨 (×500)

写真 4 走査電顕像

超音波併用 1 時間脱灰骨 (×500)

写真 5 走査電顕像

スターラー併用 1 時間脱灰骨 (×500)

超音波併用 1 時間脱灰骨では、表面は平滑で小顆粒状物質が点在している。小孔辺縁では数層に及ぶ層板状の構造がみられ、小孔深部における空洞の拡大が認められた (写真 4)。

対照群 1 時間脱灰骨では、全体に小孔の数が増加し小孔のみられない部分では平滑化が、小孔の周辺部では微細な梁状構造が認められた (写真 5)。

超音波併用 24 時間脱灰骨では表面は滑らかで、小孔深部にいたる空洞への移行も滑らかであった (写真 6)。

対照群 24 時間脱灰骨では鋭い辺縁を有する大小の付着物が重積しているような凹凸不整の面観を呈していた (写真 7)。

2. 家兔腹直筋下脱灰骨移植実験

術後 1, 2 週では超音波併用脱灰群と対照群の相違はほとんどみられなかった。術後 1 週では、移植骨の骨小腔にはほとんど細胞を認めず空洞化しており、移植骨と隣接する紡錘形の線維細胞および骨周囲に組織球、線維芽細胞などを認め、また軽度の炎症性細胞浸潤が認めら

写真 6 走査電顕像
超音波併用24時間脱灰骨 (×500)

写真 7 走査電顕像
スターラー併用24時間脱灰骨 (×500)

れた (写真8, 9)。

術後2週では周囲軟組織中に異物巨細胞を認めた (写真10)。

術後4週では、両群において移植骨基質の空隙は残存しているが、骨細胞を有する新生骨の増生がみられ、その周囲には骨芽細胞類似の細胞の柵状配列とともに破骨細胞を認めた。また、新生血管の拡張がみられた (写真11, 12)。

超音波併用2時間脱灰群、対照群2時間脱灰群ともに、1時間脱灰群と同様の所見に加え骨髄を思わせる線維性結合組織を認めた (写真13, 14)。

術後8週の超音波併用1時間脱灰群では新生骨、幼若

写真 8 移植1週後の組織像
超音波併用1時間脱灰骨 (×20)

写真 9 移植1週後の組織像
スターラー併用1時間脱灰骨 (×20)

写真 10 移植2週後の組織像
超音波併用1時間脱灰骨 (×20)

な血管、骨芽細胞の柵状配列、骨髓様組織を認めるものの赤色骨髓にはいたっていないと思われた (写真15)。対照群1時間脱灰群では上記の所見に加えて細胞成分に富んだ赤色骨髓の形成を認めた (写真16)。

超音波併用2時間脱灰群、対照群2時間脱灰群では、成熟した骨髓像を呈していた (写真17, 18)。

術後10週では、両群において赤色骨髓と脂肪組織の豊

写真 11 移植 4 週後の組織像
超音波併用 1 時間脱灰骨 (×50)

写真 14 移植 4 週後の組織像
スターラー併用 2 時間脱灰骨 (×50)

写真 12 移植 4 週後の組織像
スターラー併用 1 時間脱灰骨 (×50)

写真 15 移植 8 週後の組織像
超音波併用 1 時間脱灰骨 (×50)

写真 13 移植 4 週後の組織像
超音波併用 2 時間脱灰骨 (×50)

写真 16 移植 8 週後の組織像
スターラー併用 1 時間脱灰骨 (×50)

富な黄色骨髓の混在がみられ、術後14週では、両群とも広汎な黄色骨髓と少量の移植残存骨、新生層板骨を認めた(写真19, 20)。

考 察

1. 超音波併用脱灰骨の作製

超音波発生装置を病理組織標本作製時の脱灰処理に応用した報告^{11~13)}のなかで Thorpeら¹¹⁾は、骨組織の超音

写真 17 移植 8 週後の組織像
超音波併用 2 時間脱灰骨 (×50)

写真 19 移植 14 週後の組織像
超音波併用 1 時間脱灰骨 (×10)

写真 20 移植 14 週後の組織像
スターラー併用 1 時間脱灰骨 (×10)

写真 18 移植 8 週後の組織像
スターラー併用 2 時間脱灰骨 (×50)

波併用脱灰処理を液温 56°C で行い、脱灰時間が 1/6～1/10 に短縮したと述べている。本実験でも脱灰液への Ca 溶出量の経時的測定において、超音波併用による脱灰時間の著明な短縮が認められた。

Morris ら¹²⁾は脱灰液攪拌の効果として、1. 脱灰表面の気泡の集積の防止、2. 骨から溶出した無機質の骨周囲での停滞の防止、3. 脱灰液の均等化をあげている。超音波の応用は上記に加えてキャビテーション¹³⁾の発生と破壊による衝撃の関与により、骨表面のかきとり現象、骨小孔部での深達性を得られる。また、軟組織では衝撃の吸収により超音波の影響は小さいと考えられている。本実験における、超音波併用脱灰骨の走査電顕像での超音波による脱灰液の深達性を示唆する所見および、

骨表面の成分の剝離を示す所見は超音波併用による脱灰時間の短縮を裏づけるものと考えられる。

2. 家兎脱灰骨移植

移植後の経時的組織変化では、超音波併用群、スターラー併用群ともに、1 週間後に炎症性細胞浸潤、線維芽細胞、2 週間後に異物巨細胞、4 週間後に部分的な移植骨の吸収と骨新生、8 週間後に赤色骨髓形成、10 週間後に黄色骨髓化を認めた。

Urist ら¹⁶⁾は 0.6 規定塩酸 100 ml/g (骨) 24 時間脱灰および凍結乾燥処理を行った家兎長管骨の移植後の経時的組織変化について報告しているが、本実験での超音波併用脱灰群と対照群も、ほぼ同様の経時的組織変化を示した。

Urist ら¹⁶⁾は超音波処理により骨組織は著しく縮小すると述べている。さらに超音波併用脱灰骨移植例においては、骨誘導能がみられたのは 50% に過ぎず、またその骨誘導能も著しく減少していたと報告している。これに対し、本実験の組織学的所見では超音波併用脱灰群とはほぼ同様の良好な骨形成を認めた。

緒言で述べたように脱灰骨の臨床応用に際して、脱灰

による機械的強度の低下が問題となるが表面脱灰処理骨⁸⁻¹⁰⁾の使用により、内部の未脱灰部による機械的強度の保存と表面の脱灰部による骨誘導能の促進が可能となり、以上の問題点は解決できる。本実験で作製した超音波併用1時間脱灰骨はCMRの観察結果より表面の脱灰部と内部の未脱灰部とを認め、表面脱灰処理骨であることが確認された。

Dubuc ら⁸⁾は、1～2時間の表面脱灰処理骨を用いた家兎腹直筋下移植実験で、骨誘導能を完全脱灰処理骨移植例と比較した結果、表面脱灰処理骨移植例は完全脱灰処理骨移植例とほぼ同等な良好な骨誘導能を示したと述べている。本実験では、超音波併用表面脱灰処理骨が良好な骨誘導能を有していることを組織学的に確認することができた。

以上より即時再植を目的とする超音波併用による迅速骨脱灰法の有用性が示された。

結 語

超音波併用脱灰処理骨の家兎腹直筋下部への移植実験を行い、以下の結果を得た。

1. 超音波の併用により、骨の脱灰時間を短縮することが可能となった。
2. 家兎腹直筋下脱灰骨移植において、超音波併用脱灰群はスターラー併用脱灰群と同様な骨誘導能を示した。
3. 即時骨再植に際して、骨の表面脱灰処理に超音波を併用することは、脱灰時間を短縮できる点で有用であると思われた。

本研究の一部は、第50回日本口腔外科学会九州地方部会において発表した。(文部省科学研究費第61771685号によった)

原子吸光法に関し、種々御教示いただいた本学歯科薬理学講座加藤有三教授および教室員の皆様に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Weaver, A.W. and Smith, D.B.: Frozen autogenous mandibular stent-graft for immediate reconstruction in oral cancer surgery. *Am J Surg* 126: 505-506 1973.
- 2) Marciani, R.D. and Bowden, C.M.: Reimplantation of freeze-treated mandibular bone. *J Oral Surg* 33: 261-267 1975.

- 3) Cummings, C.W.: Experimental observation of canine mandibular regeneration following segmental removal, freezing, and reimplantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (Suppl 54) 87: 1-11 1978.
- 4) 小村 健, 武宮三三: 煮沸骨再植による下顎骨再建. *日口外誌* 30: 1360-1368 1984.
- 5) Rolf, E. and Konrad, W.: The autoclaved autogenous reimplant, an immediately replaced, mineral frame. *J Max-Fac Surg* 14: 138-142 1986.
- 6) Konrad, W. and Rolf, E.: The autoclaved autogenous bone graft as a reimplant. *J Max-Fac Surg* 14: 132-137 1986.
- 7) Urist, M.R.: Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899 1965.
- 8) Dubuc, F.L. and Urist, M.R.: The accessivity of the bone induction principle in surface-decalcified bone implants. *Clin Orth and Related Research* 55: 217-223 1967.
- 9) Urist, M.R.: Surface-decalcified allogeneic bone (SDAB) implants. *Clin Orth and Related Research* 56: 37-50 1968.
- 10) Jones, J.C., Lilly, G.E., et al.: Mandibular bone grafts with surface decalcified bone. *J Oral Surg* 30: 269-276 1972.
- 11) Thorpe, E.J., Bellomy, B.B., et al.: Ultrasonic decalcification of bone. *J Bone and Joint Surg* 45: 1257-1259 1963.
- 12) Morris, R.E. and Benton, R.S.: Studies on demineralization of bone. *Am J Clin Path* 26: 579-595 1956.
- 13) Poston, F.: Bone decalcification expedited by ultra sound. *Am J Med Technol* 33: 263-268 1967.
- 14) Urist, M.R., Dowell, T.A., et al.: Inductive substrates for bone formation. *Clin Orth and Related Research* 56: 59-96 1968.
- 15) Reddi, A.H. and Huggins, C.B.: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Nat Acad Sci USA* 69: 1601-1605 1972.
- 16) Reddi, A.H. and Huggins, C.B.: Influence of geometry of transplanted tooth and bone on transformation of fibroblasts. *Proc Soc Exp Biol Med* 143: 634-637 1973.
- 17) 日本病理学会編: 病理組織標本作製技術. 上巻, 医歯薬出版, 東京, 1982, 54-59頁.
- 18) Urist, M.R., Silverman, B.F., et al.: The bone inductive principle. *Clin Orth and Related Research* 53: 243-283 1967.