原 著 論 文

圧電性高分子シート微小電気刺激の 骨再生に関する病理組織学的研究

千葉 昌一

The Effect of Piezoelectric Film on the Bone Regeneration in Rats

Shoichi Chiba

Abstract : This study was designed to investigate the effect of piezoelectric film as irregular current source on the bone regeneration in rats. An electrical current with irregularity in both amplitude and frequency produced by a sheet of piezoelectric film was used. The subjects included sixty Wistar-strain male rats with an average age of 13 to 15 weeks, which were then randomly divided into 3 test groups. Under general anaesthesia, a hole of 2.0 mm in diameter was drilled in the right femoral diaphysis of each rat in all three groups. In the control group, the hole remained uncovered. In Group A, non-poling VDF/TrFE film (10×5 mm) covered over the hole. In Group B, the hole was covered by piezoelectric film (poling VDF/TrFE film, 10×5 mm), which generated a maximum average voltage of +1,531~-1,612 mV when the rat moved freely. Time sequence of observation were 1st, 2nd, 3rd and 4th week with Tetracycline and Calcein bone labelling. Microscopic histopathological observations were made under three conditions : normal light and fluorescent light, and contact microradiograph.

The results were as follows ;

1. During first week, the outline of femur had been rapidly repaired to normal in Group A, yet by the later stage the mineralization of the bone in Group A was delayed more than the control group.
2. In Group B, however by the first week, it was observed that the outline of femur had not only been repaired fastest, but the bone had also mineralized more rapidly than the other two groups.
3. By the early stage, cancellous bone and osteoid formation were observed under VDF/TrFE film in Group. B, whereas in the other groups there was a delay in the formation of cancellous bone.

From the above results, it appeared that piezoelectric film behaved nearly as same as the SGP current, and effected bone formation. It can be stated that the poling VDF/TrFE film accelerated new bone formation both qualitatively and quantitatively, and that this film might serve as an effective method for the dental implants as well as it might also be applied for periodontal and/or surgical bone defect.

Key words : piezoelectric film, electrical stimulation, bone regeneration, SGP-shaped current

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座 (指導: 田中久敏教授)

Dept. of Removable Prosthodontics, Iwate Medical Univ., School of Dentistry (Director : Prof. Hisatoshi Tanaka)

平成3年11月12日受付

I. 結 言

近年、歯科インプラント法は歯の喪失による咀嚼機能障害を回復するためのあらたな補綴法として臨床応用されつつあり¹⁻³⁾、なかでも骨内インプラント法の発展が著しい。しかし、骨内インプラントにおいては予後⁴⁾や適応⁵⁾がそれを支持する歯槽骨の幅や高さによって大きく左右されているのが現状である。最近では、これらの問題を解決するために、Nyman ら⁶⁾、Gottlow ら⁷⁾によって実験的にまた臨床的に報告された歯周組織誘導再生法 (Guided Tissue Regeneration Technique) を応用し、埋植したインプラント周囲から骨を誘導再生しようとする試みがなされている⁸⁻¹¹⁾。しかしこの方法では、骨周囲に存在する結合組織をはじめとする軟組織の陥入を遮断するために使用される生物的バリアーとしての膜材料自体には組織誘導を活性化する因子がなく、またこれらの埋入期間による異物反応や感染などの問題もいまだ存在している。

一方、骨組織に微小電流を通電することによって骨形成が促進されることが明らかにされてきた¹²⁻¹⁵⁾。当講座の守屋^{16,17)}は、骨内インプラント埋植後の初期固定をより確実なものとするために、微小電流をインプラント体を介し通電させ、骨形成が促進されインプラント周囲骨の緻密化がなされたことを報告した。したがって生物的バリアーとしての膜材料を応用しさらに骨組織に対してこのような微小電流刺激をくわえ積極的に骨形成を促進することが可能であれば、埋植したインプラント周囲から骨を誘導再生しようとする試みとしてより有効な方法となることが考えられる。

そこで今回、組織誘導再生法における膜材料としての性質を有し、また圧の変化によって変動する電位を発生し、骨に対して微小電気刺激を与える可能性を有している圧電性高分子シート(フッ化ビニリデン/トリフルオロエチレン共重合体、以下 VDF/TrFE シートと略す)が骨再生過程にどのような影響を及ぼすかについて病理組織学的に検討を行った。

II. 研究方法

1. 実験材料

実験材料として、VDF/TrFE 共重合体シート(株)ダイキン工業)を使用した(図 1)。実験には分極処理を行っていない VDF/TrFE 共重合体シート (以下ノン

ポーリングシートと略す)と分極処理を施した VDF/TrFE 共重合体シート(以下圧電シートと略す)の 2 種類を 10×5 mm として使用した。なお圧電シートの電気的特性は基礎の実験において、ラットの大腿部に埋入し自由運動させた場合、生体内で骨組織に歪みが生ずることによって発生する Stress Generated Potential (以下 SGP と略す)の波形に近似した最大 +1,531~-1,612 mV の電位を発生することが確認されたものである¹⁸⁾。

2. 実験動物

Wistar 系雄性ラット(13~15 週齢、体重 250 g 前後、株)日本 SLC) 60 匹を使用した。なお実験期間中は恒温恒湿の飼育室において飼育し、オリエンタル標準固形飼料 MF と水道水を自由摂取させた。

3. 実験方法

1) 骨欠損作成法と VDF/TrFE 共重合体シート埋入方法

右大腿骨骨幹中央付近を実験部位とした。エーテルによる吸入麻酔の後、体重測定を行い pentobarbital 38 mg/kg 腹腔内注射による全身麻酔を施した。ラットは伏臥位に固定し剃毛して、手術野を 70% エタノールで消毒した。外科用ステンレス製替刃メスにて皮膚切開後、大腿直筋と半腱様筋の間に切開し、大腿骨骨幹中央を露出した。次いで被検部位の骨膜を剝離除去後、歯科用電気エンジンに装着した直径 2.0 mm の歯科用ラウンドバーを用い、滅菌生理食塩水の注水下で低速回転(800 r.p.m 以下)にて皮質骨を穿孔した。滅菌生理食塩水で骨削片を洗浄し、穿孔部を完全に覆うように VDF/TrFE 共重合体シートを密着させ大腿骨に囲繞結紮を行い、その外周を筋組織で覆った。その後筋層と皮膚をそれぞれ縫合した。実験群を 2 群にわ

図 1 フッ化ビニリデン/トリフルオロエチレン共重合体シート
2 F/3 F=25 mol%/70 mol%

図2 対照群・実験群の模式図
骨穿孔部: 直径 2 mm

け、実験A群はノンポーリングシートを使用し、実験B群は圧電シートを使用した。また対照群は皮質骨穿孔だけを行ったものとした(図2)。

2) 観察期間

骨欠損部に対する VDF/TrFE 共重合体シートによる微小電気刺激の効果を観察するために、術後1, 2, 3および4週においてエーテルの過剰吸収によって屠殺し標本作製した。また2, 3, 4週目においてはそれぞれの期間内における骨動態を観察する目的で、塩酸テトラサイクリン(以下 TC, 体重あたり 30 mg/kg)を1%水溶液として、またカルセイン(以下 CL, 体重あたり 8 mg/kg)を3%水溶液として表1に示すタイムスケジュールで背部皮下に注射し骨標識を行った。

3) 標本作製方法及び検索方法

各実験動物を屠殺した後、ただちに大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨は石灰化の程度、骨組織の性状などを検索する目的で次の方法によって標本作製、観察を行った。

まず大腿骨は塊状のまま Villanueva bone stain 溶液中で固定と染色を行い、リゴラック樹脂に包埋後、大腿骨の円周軸方向でかつ骨穿孔部中央が観察できるように細切した。各標本は 100 μ m まで研磨した後、contact microradiograph (以下 CMR と略す) の撮影後、さらに 80 μ m まで再研磨を行い光頭的また蛍光顕微鏡的に観察を行った。CMR の撮影には軟X線撮影装置を使用し、Spectroscopic film (Kodak 社製 type 649-0)を用いて、加速電圧 17 kV、管電圧 3 mA、露出時間 20 分の条件で行った。骨の性状に関する観察は石灰化の程度から類骨、低石灰化骨、石灰化骨に分

表1 骨標識タイムスケジュール

OPE			
1W	7 days	TC : Tetracycline	
	SC	CL : Calcein	
		SC : Sacrifice	
2W	7	14 days	
	TC	CL	SC
3W	7	14	21 days
	TC	CL	SC
4W		14	21
		TC	CL
			28 days
			SC

類した。これらに対して光学顕微鏡下ではそれぞれ緑色、茶色、薄橙色、また蛍光顕微鏡下ではそれぞれ赤橙色、橙色、緑色に対応するものとして判定した。

III. 実験結果

1. 肉眼所見

実験部位とした大腿部縫合創は、術後5日目までに痂皮化治癒が完了し、その後の経過にも異常は認められなかった。

大腿骨採取時、穿孔部また VDF/TrFE シート埋入部周囲の筋組織中に術後1週目までは凝血塊がみられたが、2週目以降は切開部の筋組織は線維性に癒着しており、炎症所見は認められなかった。

2. 病理組織学的所見

1) 術後1週目

(1) 対照群

穿孔部の内骨膜側には、細い梁状の類骨ならびに低石灰化骨が認められ、また外骨膜側には肉芽組織が認められた(図3-a)。CMRにおいては、細い梁状の骨組織が穿孔部内骨膜側にわずかに散見されたが、穿孔部中央は未だ大きく陥凹していた(図3-b)。穿孔部を拡大すると細い梁状の類骨と低石灰化骨、ならびに細胞成分に富んだ肉芽組織が認められた(図3-c)。蛍光顕微鏡での観察においても、同部は低石灰化骨また類骨からなっていた(図3-d)。

(2) 実験A群

ノンポーリングシート直下に肉芽組織と細い梁状の類骨と低石灰化骨とが認められ、中央部は対照群と同様に陥凹していた(図4-a)。CMRにおいても穿孔部内骨膜側において骨梁が認められ、中央部は陥凹して

いた(図 4-b)。穿孔部には対照群と同様に細い梁状の類骨と低石灰化骨、ならびに細胞成分に富んだ肉芽組織が認められた(図 4-c)。同部を蛍光顕微鏡によって観察すると、少量の低石灰化骨と多くの類骨からなっていた(図 4-d)。

(3) 実験 B 群

穿孔部全体は細い梁状の類骨と低石灰化骨で満たされ、特に圧電シート下の穿孔部内骨膜側に形成されていた。さらに圧電シート端の皮質骨外骨膜側にも類骨ならびに低石灰化骨が多く認められ、対照群や実験 A 群とは異なった所見を呈していた(図 5-a)。また、CMR では細い梁状骨が穿孔部全体に形成されているのが明らかであった(図 5-b)。穿孔部には類骨と低石灰化骨からなる骨梁が充満していた(図 5-c)。同部を蛍光顕微鏡で観察すると、多くは類骨と低石灰化骨であったが、一部には石灰化骨が散見された(図 5-d)。

2) 術後 2 週目

(1) 対照群

穿孔部全体に、細い骨梁が多く認められた(図 6-a)。CMR においても、穿孔部全体に同様の細い梁状の骨が多数確認できた(図 6-b)。拡大像において、細い骨梁とその周囲に類骨が認められた(図 6-c)。蛍光顕微鏡で観察すると術直後に投与した黄色の TC と術後 1 週目に投与した黄緑色の CL が骨梁全体にび漫性に標識されていた。またその周囲には類骨が認められた(図 6-d)。

(2) 実験 A 群

穿孔部のノンポーリングシート側では、梁状骨が散見された。なお骨梁の数は対照群よりやや少ないものの、その幅は対照群より大きくなっていた(図 7-a)。CMR において観察すると、骨梁は対照群に比較し幅は広いが、内骨膜側では粗な状態を呈していた(図 7-b)。穿孔部を拡大すると、対照群と同様に細い骨梁とその周囲に類骨が認められた(図 7-c)。同部を蛍光顕微鏡で観察すると CL が骨梁全体にび漫性に標識され、わずかに術直後に投与した TC が散見された。またその周囲には類骨が認められた(図 7-d)。しかし実験 A 群では、対照群に比較し骨梁数が少ないものの、骨梁の幅また類骨の幅は広い状態を呈していた。

(3) 実験 B 群

術後 1 週目に認められた穿孔部の類骨はすべて低石灰化骨に置換し、また骨梁の幅も増加が認められた(図 8-a)。CMR においても、対照群や実験 A 群に比較し穿孔部全体で骨梁の幅が広く、比較的規則的な配列が認

められた。また外骨膜側ではすでに層板構造を呈するようになっていた(図 8-b)。シート直下を拡大し観察すると CMR で認められたように幅の広い骨梁が認められ、低石灰化骨と石灰化骨が混在していた。さらにその外側に類骨が認められた(図 8-c)。蛍光顕微鏡で観察すると、TC と CL が骨梁全体にび漫性に標識されていた。またその周囲には類骨が認められた(図 8-d)。

3) 術後 3 週目

(1) 対照群

低石灰化骨が穿孔部全体に認められた。穿孔部外側では層板構造を形成しつつあるが、内骨膜側では低石灰化骨よりなる骨梁が未だ粗な状態を呈していた(図 9-a)。CMR においても、同様に穿孔部外骨膜側で骨梁が密であったが、内骨膜側では粗となっていた(図 9-b)。穿孔部を拡大すると、骨梁は低石灰化骨によって構成されその周囲に類骨が認められた。また術後 2 週目に比較し、骨梁の幅の増加が認められた(図 9-c)。同部を蛍光顕微鏡によって観察すると、術後 1 週目に投与した TC が骨梁中央にび漫性に標識され、また術後 2 週目に投与した CL がその外側に線状に標識されていた。さらにその外側に類骨が認められた(図 9-d)。

(2) 実験 A 群

低石灰化骨と石灰化骨が穿孔部ノンポーリングシート直下に認められた。穿孔部シート側では層板構造を形成しつつあった。しかし対照群と同様に穿孔部内骨膜側では骨梁が粗な状態を呈していた(図 10-a)。CMR を観察すると、穿孔部は骨梁が外骨膜側において密で、内骨膜側では粗になっていた。しかし骨梁の幅は術後 2 週目より増加していた(図 10-b)。穿孔部の拡大像では石灰化骨と低石灰化骨が混在した骨梁、および対照群に比較し幅の狭い類骨が認められた(図 10-c)。同部を蛍光顕微鏡で観察すると、対照群と同様に骨梁の中心に術後 1 週目に投与した TC が標識され、その外側に術後 2 週目に投与した CL が線状に標識されていた(図 10-d)。

(3) 実験 B 群

低石灰化骨と石灰化骨が、穿孔部全体とその周囲の既存骨外骨膜側に認められた(図 11-a)。また CMR でも穿孔部全体に骨梁が多数存在し対照群や実験 A 群に比較して内骨膜側においても密な状態であった(図 11-b)。穿孔部骨梁は、石灰化骨とその周囲の低石灰化骨によって構成され、さらにその外側に類骨が認められた(図 11-c)。この部位を蛍光顕微鏡によって観察す

図 3 術後1週間目, 対照群
 a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
 b : Contact microradiograph $\times 3$
 c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
 d : 蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 4 術後1週間目, 実験A群
 a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
 b : Contact microradiograph $\times 3$
 c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
 d : 蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 5 術後 1 週間目, 実験 B 群
a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
b : Contact microradiograph $\times 3$
c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
d : 螢光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 6 術後 2 週間目, 対照群
a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
b : Contact microradiograph $\times 3$
c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
d : 螢光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 7 術後2週間目，実験A群
 a：光学顕微鏡所見，Villanueva bone stain $\times 3$
 b：Contact microradiograph $\times 3$
 c：光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
 d：蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 8 術後2週間目，実験B群
 a：光学顕微鏡所見，Villanueva bone stain $\times 3$
 b：Contact microradiograph $\times 3$
 c：光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
 d：蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 9 術後3週間目, 対照群

- a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
- b : Contact microradiograph $\times 3$
- c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
- d : 蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 10 術後3週間目, 実験A群

- a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
- b : Contact microradiograph $\times 3$
- c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
- d : 蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 11 術後3週間目, 実験B群

- a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
- b : Contact microradiograph $\times 3$
- c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
- d : 蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 12 術後4週間目, 対照群

- a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$
- b : Contact microradiograph $\times 3$
- c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$
- d : 蛍光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 13 術後4週間目, 実験A群

a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$

b : Contact microradiograph $\times 3$

c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$

d : 螢光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

図 14 術後4週間目, 実験B群

a : 光学顕微鏡所見, Villanueva bone stain $\times 3$

b : Contact microradiograph $\times 3$

c : 光学顕微鏡強拡大像 $\times 25$

d : 螢光顕微鏡強拡大像 $\times 30$

ると、骨梁の中央には石灰化骨が存在し術後1週目に投与したTCとその外側に術後2週目に投与したCLが線状に標識されていた。またCLの外側には対照群に比較し幅の広い類骨層が認められた(図11-d)。

4) 術後4週目

(1) 対照群

穿孔部には石灰化骨の中に低石灰化骨が散見された。また既存骨の外骨膜側でも骨の新生が進行していた。しかし内骨膜側では骨梁が粗な状態であり、骨髓腔の拡大する傾向が認められた(図12-a)。またCMRにおいて観察すると、石灰化骨の多くは層板構造を呈し、穿孔部周囲の皮質骨は反応性外築性に新生していた(図12-b)。穿孔部を拡大すると新生骨は層板構造を呈し、その内側に低石灰化骨が散見された(図12-c)。蛍光顕微鏡で観察すると、術後2週目に投与したTCの太い線と術後3週目に投与したCLの線が認められ、その外側には術後3週目と同程度の幅を持つ類骨が認められた(図12-d)。

(2) 実験A群

穿孔部には石灰化骨と低石灰化骨が混在している所見が認められた(図13-a)。またCMRにおいて観察すると、対照群に比較し外骨膜側、特にノンボーリングシート直下でやや粗な状態を呈していたが、ノンボーリングシートに沿って広い範囲にわたって骨が形成されていた(図13-b)。拡大像ではノンボーリングシートに接して類骨が形成されていた。穿孔部内側では石灰化骨と低石灰化骨が認められたが、シート直下では類骨が多かった(図13-c)。同部を蛍光顕微鏡で観察すると、内側では術後2週目に投与したTCと術後3週目に投与したCLに標識された石灰化骨と低石灰化骨が認められるのに対して、シート直下では類骨が多くみられた(図13-d)。

(3) 実験B群

圧電シート直下に接して石灰化骨が形成され、内部においても同様の石灰化骨が認められた。なお圧電シート付近の新生骨は低石灰化骨と石灰化骨が混在していた(図14-a)。CMRで観察すると、穿孔部は対照群や実験A群に比較し、内骨膜側において骨梁が密な状態を呈していた(図14-b)。拡大像では、外骨膜側に新生した骨の層板構造が術後3週目に比較し、より明瞭となっていた(図14-c)。新生骨の周囲に術後2週目に投与したTCとその外側に術後3週目に投与したCLが線状に標識されていた。さらにその外側に類骨がみられたが、その量は対照群や実験A群に比較し減

少していた(図14-d)。

III. 考 察

本実験はGTR法に応用される膜材料とほぼ同じ組成で、かつ微小電気刺激効果を有する可能性のある圧電性VDF/TrFEシートに着目し、その微小電気刺激が骨に及ぼす影響を検討するために、ラット大腿骨の穿孔部に応用してその病理組織学的所見を検索した。

1. 圧電シート電気特性について

圧電シートは、フッ化ビニリデン75mol%、トリフルオロエチレン25mol%のシートで、上下方向への発生電位が最も大きいものを使用した²³⁾。この圧電シートをラット大腿部に埋入して活動時の発生電位を測定した基礎的実験の結果、特に歩行時には70.4mV、走行時には139.9mV、最大+1,512~-1,631mVの電位を発生し、平均約0.5Vの電位を平均50Hzで発生が可能であった¹⁸⁾。

微小電気刺激法には、定電圧刺激¹²⁻¹⁴⁾、定電流刺激¹⁵⁻¹⁷⁾、パルス波刺激²⁰⁾、交流刺激²¹⁾、容量刺激²²⁾、誘導刺激²³⁾があげられる。これらの中で容量刺激と誘導刺激を除き、実験的にまた臨床的に骨組織に直接電気刺激を与える場合の電圧はほぼ1.1~1.5Vの範囲にあるといわれている¹²⁻²¹⁾。本実験に使用した圧電シートより発生する電位はこれらの値より低いと考えられた。しかし、生体内で活動によって骨組成に歪みが生じて発生するSGPの数mVオーダーの電位^{24,25)}よりはるかに大きい電位を加えていたと考えられる。

またLevy²⁶⁾は、SGP類似波形のパルス波刺激を加えて骨形成量について検討し、その骨形成量はパルス波のfiring rateと刺激時間に相関する可能性があるとし唆している。さらにそのパルスの周期が0.7Hzで最大効果を生ずるとしている。これに対して圧電シートはラットの活動時にのみ電位を発生することから、圧電シートのパルスは圧電シート自体の電気特性とラットの活動によって影響されていると考えられる。そこでラットの活動について検討してみると、遠藤²⁷⁾はthree-load cell支持法を用いてWistar系ラットの30分間毎の運動量であるSpontaneous motor activityを算出し実験開始直後に75~110 pointsと高く、以後漸減し30~80 pointsを示すと報告している。

この報告から推定すると圧電シートを埋入した場合には、自発活動が低い時でも1分間に一度の頻度で電

位の発生があると予想される。さらに、ラット大腿部において圧電シートは 1 秒間内で約 50 Hz のパルスが発生しているのが基礎の実験において確認されていることから、1 分間に約 50 のパルスが発生していると考えられた。また Levy が電気刺激効果を認めたとするパルス周期 0.7 Hz は、1 分間に 42 のパルスが発生すると考えられる。このことから、圧電シートをラット大腿骨に埋入した際には時間あたりのパルスの密度がちがうものの、Levy の報告とほぼ一致したパルス波刺激を与えることが可能であると考えられた。

実験的に SGP に近似した微小電気刺激をくわえた場合の骨形成について検討を試みた研究において Treharne ら²⁸⁾は培養ラット新生児脛骨に対し直流電流、矩形波パルス電流、SGP 類似パルス波電流を刺激として加え、すべての群で対照群に比較し皮質骨の厚みが増加したと報告している。また、Klapper ら²⁹⁾はラット頭蓋骨に直流パルス電流と非対称性交流パルス電流を加え両群を比較したところ、非対称性交流パルス電流で骨形成が有意に増加していたと報告している。これらの実験では SGP に近似させた電気刺激を与えるために非対称性の断続的パルス波を用いている。

これに対して、圧電シートの発生電位は 10 msec 以内で急激な立ち上がりと急激な減衰を示す非対称性の波形を示し、数ミリ秒から数秒であるとされている SGP の電位変化^{24,25,30)}にきわめて類似していた。したがって本実験に使用した圧電シートを用いることによって、従来行われてきたパルス波刺激より、生体の発生する SGP により近似した、より生理的な電気刺激を加えることが可能であると考えられた。

2. 実験方法について

本実験では、圧電シート微小電気刺激の骨穿孔部の治癒過程に与える影響を病理組織学的に検討することを目的とし、急速な成長がほぼ終了した³¹⁾13~15 週齢 Wistar 系雄性ラットの大腿骨を被検部位とした。

一方、骨欠損部の大きさと骨膜の有無による治癒過程に関する研究において、Mulholland and Prithard ら³²⁾は、ラットを使用した実験で骨膜切除した連続離断骨欠損の修復可能な距離は腓骨では 1 mm、肋骨で 2 mm、骨膜を保存すれば肋骨では 8 mm の骨欠損でも骨性に治癒したと述べている。したがって、本実験においてラットの大腿骨骨幹部中央に骨折を起こしえなとえられる直径 2 mm の骨欠損を作製した。

また骨欠損部における軟組織の影響について Narang ら^{33~35)}は、ラットの腓骨に欠損を作り、その欠損部の間隔が 4~5 mm の場合には 8 週間、6 mm の場合には 1 週間にわたってそれぞれの治癒経過を観察したが、いずれの場合にも骨性癒合しなかった。しかし骨欠損部にポリエチレンインプラントを挿入することによって 12 週で欠損部は骨性癒合したと述べている。さらに唐木ら³⁶⁾は実験的に、骨再生における抑制因子の 1 つが骨周囲の結合組織の陥入であることを明らかにし、骨再生を促進するためには、これを遮断して骨形成の場を確保することが必要であると述べている。したがって骨外周の筋やこれに接する結合組織の陥入を遮断する効果について検討するために、本実験では分極処理を行っていないノンポーリングシートを応用したものを実験 A 群とした。また実験 B 群では軟組織の遮断効果とシートが発生可能な微小電気刺激の効果を検討するため、分極処理を行った圧電シートを使用した。

なお、本実験での標本の染色には同一標本で通常の光学顕微鏡および蛍光顕微鏡において観察できる Villanueva bone stain^{37,38)}を用いた。また各期間において骨形成の方向および石灰化の時期について検索するために TC と CL による 2 回骨標識を行った。さらに実際の石灰化状態を把握するために CMR による観察を行った。

3. 実験結果について

実験 A 群と対照群を比較してみると、実験 A 群は、対照群と同様に内骨膜側から新生した細い梁状の類骨または低石灰化骨とわずかな肉芽組織が混在してノンポーリングシートの直下にまで認められた。骨欠損部の形態回復は対照群では術後 2 週目においてもわずかに陥入が認められたのに対して、実験 A 群では術後 2 週目では外表が完全な形態に回復していた。また蛍光所見の術後 2 週目を比較すると、術直後に投与した TC と術後 1 週目に投与した CL とが骨梁全体にび漫性に沈着していた対照群に対して、実験 A 群では術直後に投与した TC がほとんど認められず、術後 1 週目に投与した CL のみによって標識されていた。これは実験 A 群では類骨の新生が盛んになされたものの、石灰化は対照群ほど進行しなかったことを示している。さらに術後 2 週目から術後 4 週目でも、対照群に比較し実験 A 群では骨の成熟が遅れていた。この結果は犬下顎骨において人工的骨欠損の治癒過程を観察し、テフロン板で覆った群が骨膜を保存した群に比較して骨

の成熟が遅れていたものの欠損部の形態回復には有効であったと報告した織家³⁹⁾の結果と一致していた。したがって、骨欠損治癒過程で物理的バリアーによって軟組織の侵入を遮断することは、治癒の初期においては骨組織の新生と骨形態の回復を障害しないが、長期的には骨の成熟が遅れることを示唆している。

実験A群の穿孔部での骨新生はノンポーリングシート直下付近に限局し、内骨膜側での新生骨梁は少なかった。本実験に用いたノンポーリングシートは一軸方向に延伸加工がなされており、同様の加工がなされている Cardiovascular Patch における骨再生を報告した長尾⁴⁰⁾の所見と一致していた。したがって、この所見は材料の構造が影響を与えていると考えられた。

一方、実験B群では対照群や実験A群と異なり、術後1週目においてすでに圧電シート直下にまで細い梁状の類骨または低石灰化骨が多量に新生され、また一部には石灰化骨も認められた。術後2週目においては骨梁の幅がより広くその数も他の群に比較して多かった。また外表形態の回復も良好であった。さらに蛍光所見においては、術直後に投与した TC が部分的に認められ、術後1週目に投与した CL と一部に石灰化骨も認められた。また、術後3週目においては骨梁の中心部に石灰化の進行した新生骨が存在し、その周辺に TC と CL が線状に標識されていた。さらに術後4週目では他群に比較して実験B群では類骨の量的な減少が認められ、このことは新生骨組織の成熟がより進行していることを示唆していた。以上の所見を総合すると実験B群では、初期の段階から骨の新生と成熟が促進されていたと考えられた。

さらに本実験で得られた骨穿孔部の治癒過程について、この生体電位の観点から骨折時の状態を説明した Janssen ら⁴¹⁾の仮説と骨形成の場によって考察すると、穿孔部では骨欠損部の側縁および骨髓腔側は(-)に荷電し皮質骨外側面では(+)に荷電していると仮定される。したがって、対照群の穿孔部内外では、ある一定の電位勾配が生じていたと考えられる。これに対して、実験A群ではノンポーリングシートによる遮断のために対照群に比較し小さい電位勾配しか生じなかったと考えられる。実験A群はノンポーリングシートによって結合組織の陥入を抑制し、骨形成の場を確保していたため、初期では対照群に比較し骨形態の回復は良好であったものの、電位勾配が小さいために対照群に比較し骨の成熟が遅れたものと推察される。

また、実験B群では圧電シートの遮断によって穿孔

部内外の電位勾配が実験A群と同様に対照群より小さいものの、ラットの活動によって本来の電位勾配よりはるかに大きい電位勾配あるいは電位の変動が生じていたものと考えられた。したがって実験B群では圧電シートによって骨形成の場が確保されるとともに、電位変化を与えられたため急速な骨新生と骨の成熟がなされたものと推察された。

4. 圧電シートの口腔領域への応用とその臨床的有効性について

狭小な口腔内において微小電気刺激を顎骨に通電することが可能な装置で、かつ最も効果的な骨新生を期待するにはどのような方法が適するであろうか。生体電気刺激において保田らをはじめ多くの研究者が直流電気刺激について検討している¹²⁻¹⁷⁾。Noda ら⁴²⁾は、漿尿膜上培養骨を用いて直流、交流とによる骨形成量を比較し、直流実験群では電極周囲に著明な骨形成が観察されたのに対して、交流実験群では対照群に比較しわずかな骨の増大しか認められなかったとしている。また Treharne²⁸⁾は直流刺激に比較しパルス波刺激では骨形成量が劣っていると報告している。したがって、直流電気刺激は骨組織に直接通電する方法としてはもっとも著明な効果を期待できるものと考えられる。しかし、守屋¹⁶⁾は微小電気刺激の電極をインプラント体と一体化し、犬下顎骨に埋植してそのインプラント体周囲の骨形成について検討した結果、陰極においては骨形成と石灰化が促進していたのに対して、陽極においては骨形成が促進されず、骨とインプラント体との間に線維性結合組織が介在していたと報告している。直流電流刺激において同様の所見が、多くの研究者たちによって報告されている^{12-17,43)}。以上のように、直流定電流では陰極側で骨形成が著しく促進するものの陽極における骨形成抑制の問題がのこる。

また、口腔という狭小で審美的な要求が高い部位に現在まで使用されてきた微小電気刺激装置をそのまま臨床応用するには難点がある。一方、歯科臨床において歯周病によって破壊された歯周組織の再生やインプラント周囲への骨誘導再生を目的として GTR 法に関する報告¹¹⁾がなされてきたが、そこでは Gore-Tex 膜⁶⁻¹¹⁾、PLA 膜⁴⁴⁾などが物理的バリアーとして利用されてきた。これらの膜材料は口腔という狭小な部位に応用するには大きさという点で有用であると考えられる。しかし膜材料自体は骨形成を活性化する因子を有していない。

したがって物理的バリアーとしての効果に加え、同時に骨形成を促進する微小電気刺激を与えることが可能であれば、膜の装着期間を短縮することが可能で、また感染の機会や異物として生体内に存在する期間を短縮できる利点があると考えられる。

以上のことから本実験に使用した圧電シートは極性がシート上面と下面で反転し、直流定電流刺激における陰極側のような著明な効果を与えることができないものの、極性の問題がない微小電気刺激を与えることができ、骨の再生を短期間に期待することが可能であると考えられる。また、圧電シートは成形が容易で Gore-Tex 膜に類似したフッ素系高分子シートであることから、形状を人為的に変えることによってある程度骨形成をコントロールし、骨形態を変化させることが可能であると考えられる。したがって圧電シートは狭小な口腔での臨床応用に有効であると考えられた。

IV. 結 論

ラット大腿骨の人工的欠損部にノンポーリングシートと圧電シートを応用し、その治癒過程に及ぼす影響について病理組織学的に検討し、以下の結論を得た。

1. 対照群では初期において骨外周の筋やこれに接する線維性結合組織の陥入によって外表形態の回復が遅れたが、骨新生が盛んになると完全に回復し外骨膜側に骨が形成された。しかし内骨膜側では骨髓腔が拡大する傾向にあった。

2. ノンポーリングシートでは線維性結合組織の陥入を遮断したため、骨の外表形態の回復は対照群より早かったが、骨の成熟は遅延する傾向にあった。

3. 圧電シートは治癒の初期から骨の新生とその成熟を促進し、他群と異なり穿孔部内骨膜側に多くの骨梁が形成されていた。

4. 圧電シートは筋や線維性結合組織の陥入を遮断し骨形成の場を確保するとともに、生体の発生する Stress Generated Potential に近似したより生理的な微小電気刺激を与えることが可能と考えられた。

以上の結果から、インプラント周囲における骨の誘導再生など、歯科領域における骨の再生に圧電性高分子シートの応用の可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました恩師田中久敏教授に深甚なる謝意を表するとともに、本研究にたいして数多くのご助言を頂いた口腔病理学講座鈴木鐘美教

授ならびに口腔解剖学第一講座野坂洋一郎教授に衷心より謝意を捧げます。また、本研究にあたってご教示を頂いた口腔病理学講座武田泰典講師ならびに歯科補綴学第一講座虫本栄子助教授、遠藤 実講師、守屋光孝博士に深く感謝の意を表します。また種々のご協力をいただきました歯科補綴学第一講座教室員各位と大学院生各位に心より感謝いたします。さらに本実験の遂行にあたって多大なるご協力をいただきましたダイキン工業㈱化学事業部開発部の皆様に心から感謝いたします。そして最後に、実験動物たちに深く感謝の意を表します。

なお本論文要旨は、第 86 回日本補綴歯科学会学術大会(平成 3 年 9 月 21 日、広島)において発表した。

文 献

- 1) Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. et al : A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw, *Int J Oral Surg*, 10 : 387~441, 1981.
- 2) 小木曾誠, 金田浩之, 塩田 真ほか : Apatite 2-piece Implant, 第 3 報, 臨床治験について, 補綴誌, 32 : 523~533, 1988.
- 3) 添島義和 : ITI インプラント法(一回法)の適応と思われる臨床ケース, オーラル・マキシロフェイシャル・インプラント, 2 : 381~388, 1989.
- 4) Bränemark, P.-I., Zarb, G.A. and Albrektsson, T. (関根 弘, 小宮山 彌太郎, 吉田 浩一) : Tissue-Integrated Prostheses Osseointegration in Clinical Dentistry (ティッシュインテグレーション補綴療法, 233~240, クインテッセンス出版, 東京, 1990), 1985.
- 5) Bränemark, P.-I., Zarb, G.A. and Albrektsson, T. (関根 弘, 小宮山 彌太郎, 吉田 浩一) : Tissue-Integrated Prostheses Osseointegration in Clinical Dentistry (ティッシュインテグレーション補綴療法, 241~282, クインテッセンス出版, 東京, 1990), 1985.
- 6) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. et al : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, *J Clin Period*, 9 : 290~296, 1982.
- 7) Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. et al : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration, *J Clin Period*, 11 : 494~503, 1984.
- 8) Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U. et al : Generation of New Bone Around Titanium Implants Using a Membrane Technique : An Experimental Study in Rabbits, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 4 : 19~25, 1989.
- 9) 中村社綱 : チタン・インプラントにおける GTR 法の応用 第 1 報, *The Quintessence*, 9 : 1659~1665, 1990.
- 10) 中村社綱, 阿部成善 : チタン・骨内インプラントにおける GTR 法の応用 第 2 報, *The Quintessence*, 10 : 867~875, 1991.
- 11) Zablotsky, M., Meffert, R., Caudill, R. et al : Histological and Clinical Comparisons of Guided Tissue Regeneration on Dehiscent Hydroxylapatite-Coated and

- Titanium Endosseous Implant Surface, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 6 : 294~303, 1991.
- 12) 保田岩夫, 野口和彦, 飯田 隆 : 電気的仮骨の応用, 日整会誌, 31 : 351~353, 1955.
- 13) 野口和彦 : 力学的仮骨並びに電気的仮骨の研究, 日整会誌, 31 : 619~664, 1958.
- 14) Bassett, C.A.L., Pawluk, R.J. and Becker, R.O. : Effect of electric currents on bone *in vivo*, *Nature*, 204 : 652~654, 1964.
- 15) Frideberg, Z.B., Andrews, E.T., Smolenski, B.I. et al : Bone reaction to varying amounts of direct current, *Surg. Gynecol Obstet*, 131 : 894~899, 1970.
- 16) 守屋光孝 : 微小電気刺激に関する実験的研究—歯科インプラント法への応用—, 岩医大歯誌, 14 : 249~264, 1989.
- 17) 守屋光孝, 田中久敏 : 歯科骨内インプラント法への微小電流の応用, 第1報 微小電流刺激装置および電極の試作, 補綴誌, 34 : 309~317, 1990.
- 18) 田中久敏, 千葉昌一, 虫本栄子ほか : 圧電性高分子シートによる骨形成の実験的研究—微小電気刺激の電流値—, 補綴誌, 36, 487~495, 1992.
- 19) 八木俊治, 東畑好秀 : フッ素系高分子の圧電・焦電性, 高分子加工, 32 : 410~416, 1983.
- 20) 古沢 寛 : 歯の圧下に際してパルス波微小電流 (矩形波) が下顎骨の Remodeling に及ぼす影響に関する実験的研究, 新潟歯誌, 9 : 57~79, 1979.
- 21) 湯川佳宣, 真野 淳, 津田欣徳ほか : 交流電気刺激による電気的仮骨の病理組織学的特徴について, 整形・災害外科, 25 : 1079~1090, 1982.
- 22) 林川貴志 : 電場刺激法による歯周組織再生の実験的研究, 九州歯会誌, 44 : 172~194, 1990.
- 23) Bassett, C.A.L., Metchell, S.N and Gaston, S.R. : Treatment of Ununited Tibia Deaphyseal Fractures with Pulsing Electromagnetic Fields, *J Bone Joint Surg [Am]*, 63-A : 511~523, 1981.
- 24) 出口修一郎 : オトガイ部に外力を加えた際のサル湿潤下顎骨表面に生じる電位変化に関する研究, 日矯歯誌, 48 : 304~321, 1989.
- 25) Zengo, A.N., Bassett, C.A.L., Pawluk, R.J. et al : *In vivo* bioelectric potentials in the dentoalveolar complex, *Am J Orthod*, 66 : 130~139, 1974.
- 26) Levy, D.D. : A pulsed electrical stimulation technique for inducing bone growth, *Ann New York Acad of Sci*, 238 : 478~490, 1974.
- 27) 遠藤任彦 : 動物行動の解析とその計量化による実験的研究, 日薬理誌, 70 : 175~192, 1974.
- 28) Treharne, R.W., Brighton, C.T., Korostoff, E. et al : Application of tibial, pulsed and SGP-shaped currents to *in vitro* rat tibiae, edited by Brighton, C.T., Black, J. and Pollack, S.R., *Electrical Properties of Bone and Callilage : Experimental and clinical Applications*. 169~180, Grune & Stratton, New York, 1979.
- 29) Klapper, L. and Stallard, R.E. : Mechanism of electrical stimulation of bone formation, *Ann New York Acad Sci*, 238 : 530~542, 1974.
- 30) Pollack, S.R., Salzstein, R. and Pienkowski, D. : The electrical double layer in bone and its influence of stress-generated potentials, *Calcif Tissue Int*, 36 : 77~81, 1984.
- 31) Fukuda, S. and Matsuoka, O. : Comparative Studies on Maturation Process of Secondary Ossification Centers of Long Bones in the Mouse, Rat, Dog and Monkey, *Exp Anim*, 29 : 317~326, 1980.
- 32) Mulholland, M.C. and Pritchard, J.J. : The fracture gap, *J Anat*, 95 : 590, 1959.
- 33) Narang, R., Lloyd, W. and Wells, H. : Grafts of Decalcified Allogeneic Bone Matrix Promote the Healing of Fibular Fracture Gaps in Rats, *Clin Orthop*, 80 : 174~180, 1971.
- 34) Narang, R., Wells, H. and Lloyd, W. : Demineralization of bone transplants *in vivo*, *Oral Surg*, 36 : 219~303, 1973.
- 35) Narang, R. and Wells, H. : Osteogenesis within polyethylene implants at fracture gaps, *Oral Surg*, 11 : 203~209, 1975.
- 36) 唐木良一, 久保田浩三, 日高理智ほか : 歯肉弁の位置が歯槽骨骨形成に及ぼす影響, 日歯周誌, 26 : 516~522, 1984.
- 37) Villanueva, A.R. : A Bone stain for osteoid seams in fresh, unembedded, mineralized bone, *Stain Technol*, 49 : 1~8, 1974.
- 38) 今野俊幸, 高橋栄明 : 非脱灰骨標本の作成法, 高橋栄明編, 骨形態計測ハンドブック, 28~33, 西村書店, 新潟, 1983.
- 39) 織家 茂 : 下顎骨骨欠損部の骨再生に関する実験的研究—特に骨膜の影響について—, 日口外誌, 31 : 438~454, 1985.
- 40) 長尾 徹 : 延伸ポリフッ化エチレン Expanded Polytetrafluoroethylene (Gore-Tex®) の骨再生に関する実験的研究, 日口外誌, 36 : 504~513, 1990.
- 41) Janssen, L.W.M., Roelofs, J.M.M., Visser, W.J. et al : Hypothesis of bone remodeling and fracture healing by electrostimulation, edited by Burny, F., Herbst, E and Hinsenkamp, M., *Electrical Stimulation of Bone Growth and Repair*, 61~67, Springer-Verlag, Berlin, 1978.
- 42) Noda, M. and Sato, A. : Appearance of Osteoclast and Osteoblasts in Electrically Stimulated Bones Cultured on Chorioallantoic Membranes, *Clin Orthop*, 193 : 281~298, 1985.
- 43) Zengo, A.N., Bassett, C.A.L., Proutzoz, G. et al : *In vivo* Effect of Direct Current in the Mandible, *J Dent Res*, 55 : 385~390, 1976.
- 44) 久保田浩三, 越智玲子, 拓殖優三ほか : 生体吸収性膜使用による歯周組織再生に関する実験的研究, 日歯周誌, 31 : 870~881, 1989.