原 著 論 文

生体吸収性ポリ乳酸圧電膜を用いた GBR 法の骨再生促進効果

大塚 英幸 田中 久敏 虫本 栄子 千葉 昌一
高橋 元 千葉 晃 猪苗代盛昭

Effectiveness of Absorbable Electrified Poly-L-lactic Acid Membrane for Bone Regeneration in Rats

Hideyuki Ohtsuka, Hisatoshi Tanaka, Eiko Mushimoto, Shoichi Chiba,
Gen Takahashi, Akira Chiba and Moriaki Inawashiro

歯科補綴学的意義

本研究は、骨誘導再生法に用いられている遮蔽膜の欠点を解決することを目的として、圧電性を有する生体吸収性ポリ乳酸膜に着目し、本フィルムの特性と微小電気刺激が骨再生に及ぼす効果を病理組織学的に検索したものである。実験結果から、ポリ乳酸圧電膜は除去のための二次手術を必要とせず骨再生を促進する膜として有用であることが示され、歯科インプラントの適応範囲の拡大への可能性を示唆した。

抄 録

目的：本研究は、生体吸収性で圧電性を有するポリ乳酸膜 (poly-L-lactic acid, 以下, PLLA) を用いた骨誘導再生法が人工的骨欠損部の再生に及ぼす効果を病理組織学的に検索し, Gore-Tex Augmentation material (GTAM®) および圧電性を有しないポリ乳酸膜 (polylactic acid, 以下, PLA) の効果と比較検討することを目的とした。

方法：実験には、生後 13~15 週齢の Wistar 系雄性ラットを使用し、直径 2.0 mm の骨窩洞を右大腿骨に形成した。骨窩洞は、実験 A 群では GTAM®, B 群では圧電性を有しない PLA, C 群では圧電性を有する PLLA (分子量 10 万), D 群では圧電性を有する PLLA (分子量 30 万) で被覆して囲繞結紮した後、軟組織で覆い縫合した。実験期間は 2 週, 4 週とし、屠殺後、硬組織研磨標本により病理組織学的観察を行った。

結果：C, D 群は A 群に比較して早期より骨形成と成熟化が促進されていた。特に、D 群で新生骨の形成が窩洞全体に著明にみられ皮質骨全体の厚みを増し、成熟度も高く、既存皮質骨と同化していた。A 群の骨再生は B 群と同程度であり、各実験期間で C, D 群より劣っていた。また PLLA は皮質骨の上に望ましい形態を得るための賦形性に優れていた。

結論：PLLA は GTAM® に比較して骨再生促進効果に優れ、骨誘導再生法により有用であることが示された。

和文キーワード

ポリ-L-乳酸膜, 微小電気刺激, GTAM®, 人工的骨欠損, 骨再生

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)

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

受付: 2000 年 6 月 26 日/受理: 2000 年 10 月 23 日

Received on June 26, 2000/Accepted on October 23, 2000

I. 緒 言

組織誘導再生法 guided tissue regeneration は、遮蔽膜を用いて歯周疾患が原因で失われた歯周組織の再生を可能にする方法として系統的研究が行われてきた¹⁻³⁾。e-PTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 膜は、組織誘導再生法を可能にする有用な膜で、Nyman ら¹⁾の研究報告以来、歯科インプラントにも応用され、インプラント頸部の上皮の内方成長を阻止し^{4,5)}、インプラント周囲の骨欠損の改善⁶⁾や、歯槽骨の Bone volume の増大における骨誘導再生法 guided bone regeneration に有用であること⁷⁾が報告されている。

一般的に遮蔽膜には、非吸収性の e-PTFE 膜や、コラーゲン膜、ポリ乳酸膜 (polylactic acid, 以下、PLA と略す) などの生体吸収性膜が用いられている。しかし、これらの膜は bioinert で、膜の使用は治癒期間が長期に及ぶことや効果に限界があることなど、膜の有効性を疑問視する報告もみられる^{8,9)}。近年ではこれらの問題を解決するために、種々の成長刺激因子の併用法などが実験的に報告されている¹⁰⁻¹²⁾。

一方、力学的刺激や電氣的刺激などの物理的因子は、骨の成長や修復過程に深く関与することが明らかになっている。現在、米国では骨折未癒合の治療は全症例の約 3 分の 1 が電磁気の作用によって施されており、電気刺激法が骨損傷部の治癒を促進することが基礎的にも臨床的にも明らかにされている¹³⁾。しかし歯科領域においては、歯周組織の再生やインプラント周囲の骨再生の促進を目的とした基礎的研究がわずかに散見されるのみである。久保田¹⁴⁾、吉村ら¹⁵⁾は直流電気刺激法や Capacitively coupled electric field (CCEF) 法の応用について、また松本ら¹⁶⁾はパルス電磁場刺激法の応用について実験的研究を報告している。しかし、口腔は全身のほかの部位に比べて特殊な環境であるため、四肢の骨折治療に使用される電気刺激法をそのまま口腔に適用させることは困難であると考えられ、未だ臨床応用はなされていない。

当講座では、微小電気刺激を歯科インプラントの骨誘導再生法に応用することを目的として、生体内への埋入が可能な非吸収性高分子圧電フィルム (Vinylidene Fluoride-Trifluoroethylene copoly-

mers; VDF/TrFE 共重合体シート、(株)ダイキン工業、大阪 (以下、VDF/TrFE と略す)) に関して動物実験で系統的研究を行ってきた¹⁷⁻²²⁾。この圧電フィルムは極性のない電位を発生させ、かつ口腔内への応用が可能な厚さ 50 μm の被膜で、骨組織に機械的応力が加わるときに生じる電位 (stress generated potential) に類似した微小電気刺激を与えることができる^{17,18)}。このフィルムは、骨誘導再生法の遮蔽膜としての作用を有し¹⁸⁾、骨欠損部の治癒を促進すること^{18,19,22)}、さらに e-PTFE 膜が骨欠損部の骨再生を促進しないのに対して、インプラントとの骨結合を促進して骨再生を量的かつ質的に促進することを明らかにした²¹⁾。しかし、この圧電フィルムは非吸収性であるため膜の除去手術が必要なことや、材質が固く賦形性に乏しいことなど臨床応用上の問題があった。

本研究は、延伸処理を施すことによってズリ応力が加わると微小電位を発生し^{23,24)}、生体吸収性で、かつ生体親和性に優れるポリ乳酸膜 (poly-L-lactic acid, (株)タキロン、大阪、(以下、PLLA と略す)) による骨誘導再生法の確立を目的とした。本実験では、この膜を用いた骨誘導再生法が人工的骨欠損部の初期の骨再生に及ぼす効果を、e-PTFE および PLA 膜を用いた場合の効果と病理組織学的に比較検討した。さらに、PLLA 膜の分子量の違いが骨再生に及ぼす影響についても検索した。

II. 研究方法

1. 実験材料

実験には、延伸処理を施し圧電性を有する PLLA と、未延伸で圧電性を有しない PLA を用いた。PLLA の圧電性は、膜を 4 倍に延伸し、かつ延伸配向が 45° のときに最大となることが報告されている²³⁾。本研究では、この条件を満たした膜で、厚みが 100 μm 、分子量が 10 万と 30 万の 2 種類を使用した。また PLA は分子量が 10 万で厚みが 100 μm のものを対照として使用した。さらに e-PTFE (Gore-Tex Augmentation material Oval-6, W.L. Gore and Associates, Inc. Flagstaff, AZ (以下、GTAM[®] と略す)) も同様に対照として用いた。

なお、PLLA については予備実験で実験室内において、水温 35°C の生理食塩水中に浸漬し、膨潤なら

びに吸収を観察し、膨潤は認められないこと、吸収は6カ月以上かかること、また発生電位は浸漬1週目より減弱し4週目では1/4~1/10になることを確認した。この変化が組織に及ぼす影響については次報で述べることとする。

2. 実験動物

実験動物は、13~15週齢のWistar系雄性ラット(体重300g前後)を24匹使用した。なお実験期間中はラット用固形飼料(オリエンタル酵母社製)と十分な水を与え、自由運動が可能な環境下で飼育を行った。

3. 実験方法

1) ラット大腿骨人工的骨欠損部の形成方法

膜が骨欠損部の骨再生に及ぼす影響を観察するために、ラット右側大腿骨骨幹中央後側に人工的骨窩洞を形成した。ラットはpentobarbital 38 mg/kg (Nembutal®, (株)大日本製薬, 大阪)で腹腔内麻酔を行った後、伏臥位に固定し右側大腿部周辺を剃毛、消毒した。皮膚切開の後、大腿直筋と半腱様筋の筋膜を切開し、大腿骨を露出させた。骨膜は骨膜剝離子を用いて剝離した。次に滅菌生理食塩水の注水下で、直径2.0 mmの歯科用ラウンドバー(マイジンガーインスツルメント IL/020, (株)バイエル日本歯科, 大阪)を低速回転(800 r.p.m. 以下)させ、皮質骨を骨髓まで穿孔し、直径2 mmの人工的骨欠損を形成した。周囲の骨削片は滅菌生理食塩水で洗浄した。次に皮質骨の穿孔部が完全に覆われるように、各実験膜を5×7 mmの大きさにして大腿骨に密着させ、絹糸で圍繞結紮を行った。実験膜は、A群はGTAM®, B群はPLA, C群はPLLA分子量10万, D群はPLLA分子量30万とした(図1)。その後、周囲筋組織を復位させ、筋層と皮膚をそれぞれ縫合した。観察期間は、骨再生過程における初期の骨形成を観察するため術後2週、4週とした。

2) 組織標本作製と病理組織学的観察

実験動物は、実験終了後にエーテルの過麻酔によって屠殺し、ただちに大腿骨を採取した。試料は10%中性緩衝ホルマリンで固定後、Villanueva bone stainでブロック染色を施し、上昇アルコール系列による脱水後、アセトン浸漬を行いMMA樹脂に包埋

図1 Application of membranes to bone defect
Barrier membranes: 1. GTAM®, 2. PLA, 3. PLLA (Mw: 10×10^4), 4. PLLA (Mw: 30×10^4)
(Thickness of PLA and PLLA are 100 μ m)
骨欠損部への遮蔽膜の適用方法
遮蔽膜: 1. GTAM®, 2. PLA, 3. PLLA (分子量10万), 4. PLLA (分子量30万)

した。包埋したブロックを大腿骨遠位端から近位方向へ厚さ約200 μ mずつに薄切し、約50 μ mまで研磨した後、contact microradiograph (以下CMRと略す)を撮影した。その後、さらに30 μ mまで研磨し、光学顕微鏡を用いて病理組織学的観察を行った。

III. 実験結果

1. 肉眼所見

術後の観察期間中、すべての実験部位において周囲組織は正常な治癒状態にあり、炎症症状や感染は認められなかった。また屠殺直後の創部の周囲組織に炎症像や感染は認められず、各実験群で膜の露出や脱離、裂開、膜の破折等の所見は認められなかった。

2. 病理組織学的所見

人工的骨欠損部における骨再生を観察するために、大腿骨横断面のVillanueva bone stain像(図2-a~d)と、同部のCMR像(図3-a~d)を対比させ、各群で比較した。

1) 術後2週目

光顕像の観察では、各群とも骨欠損部は膜で被覆され、骨欠損部内に周囲軟組織の進入を認めず、新生骨の形成を認めた。実験B, C, D群では膜の吸収や膨潤などの著明な形態的变化や、周囲軟組織の炎症所見を認めなかった(図2-a~d)。

新生骨の形成量は、光顕像とCMR像を対比させて

図 3 Bone growth —after 2 weeks— CMR (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA : Mw=10×10⁴, d. PLLA : Mw=30×10⁴

術後2週目の骨再生 CMR (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA (分子量 10 万), d. PLLA (分子量 30 万)

観察すると、A群はB群より多かったが、A群に比較してCとD群ではさらに著しい量の新生骨を認めた(図3-a~d)。

新生骨の形成部位は、AとB群では主に骨窩洞断端部と膜直下および骨内膜付近で、骨梁が骨窩洞内方に向かうように形成されていた。しかし、骨窩洞の中央部では新生骨が少なく疎な様相を呈していた。これに対して、CとD群では新生骨は骨窩洞内に広範囲に形成され、特にD群では骨窩洞全体に密に形成されていた。また骨梁の配列方向は、骨窩洞内に渦を巻くように形成され、微小電気刺激の影響を受けた様相が認められた。

次に、新生骨の成熟度について、Villanueva bone stain を施した標本で観察すると、成熟した骨は茶色に、未成熟な骨は緑色に染め分けられたが、A群では未成熟な骨が多く、CMR像で対比すると新生骨は

点状に認められ、骨梁は低石灰化骨が多かった(図3-a)。B群では骨梁はさらに細く幼若で、A群と同様に石灰化骨よりも低石灰化骨が多かった(図3-b)。これに対して、CとD群では、顕像で茶色に染色された骨梁が多く、個々の骨梁は太く、互いに癒合して長径を増した石灰化骨が多く認められた。またCMR像と対比すると低石灰化骨よりも石灰化骨が多かった(図3-c, d)。さらに、D群では骨窩洞断端部および膜直下付近の骨梁のなかに骨髓を含む像も認められ、C群に比較しても成熟度が増していた(図3-d)。このことから、分子量の大きいD群(分子量30万)で骨形成は有意に優れていた。

2) 術後4週目

Villanueva bone stain 像を顕像で観察すると、骨欠損部に周囲軟組織の進入を認めず、窩洞内に新生骨が形成されていた。また実験B, C, D群では膜の

図 5 Bone growth —after 4 weeks— CMR (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA : Mw=10×10⁴, d. PLLA : Mw=30×10⁴

術後4週目の骨再生 CMR (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA (分子量 10 万), d. PLLA (分子量 30 万)

吸収や膨潤などの形態的变化や周囲組織の炎症所見を認めなかった。

新生骨の形成量は、光顕像と CMR 像を対比させて観察すると、術後2週目に比較して各群とも増大を認めたが、A、B 群に比較して C と D 群では新生骨の形成がより著明であった (図 4-a~d)。

新生骨の形成部位は、A 群では骨窩洞全体であったが、特に膜直下と骨窩洞断端部に多く、膜直下の骨梁は連続して、骨欠損部の外周を形成した (図 4-a)。B 群では新生骨が特に膜直下に多く認められ、窩洞中央部や骨髄側では新生骨が少なく疎な様相を呈していた (図 4-b)。A、B 群では、既存の皮質骨と新生骨の境界は明瞭であった。これに対して C、D 群では新生骨が骨窩洞部全域と、さらに既存骨上方の広範囲に、膜を上方に押し上げた形で形成された (図 4-c, d)。特に D 群では新生骨は大腿骨周囲全体

にわたって形成され、皮質骨の幅は既存骨の約 2 倍の太さになっていた (図 4-d, 5-d)。また、既存の皮質骨と新生骨の境界は不明瞭で、石灰化程度は同程度であった。

次に、新生骨の成熟度について観察すると、個々の骨梁の太さは、各群とも術後2週目に比較して増大していたが、A、B 群では骨梁の癒合は少なく、CMR 像で観察すると新生骨は大部分が未だ幼若であった (図 5-a, b)。特に B 群では、骨窩洞の断端部および膜直下と骨髄側では骨梁の成長度が異なり、膜直下の新生骨の一部には骨髄が含まれ成長していたものの、骨窩洞中央から骨髄側にかけての大部分は幼若であった (図 5-b)。これに対して、C、D 群では骨梁が互いに癒合し太さを増していた (図 5-c, d)。さらに D 群では新生骨の大部分に骨髄腔を認め、より成熟度が増していた。また既存骨外基礎層板を境にして外周に

図 6 Characteristic of newly-formed bone after 4 weeks
— PLLA (Mw: 30×10^4) —
PLLA 群の術後 4 週目の骨形成の特徴
(図 5-d 参照)

形成された新生骨は緻密になり、フォルクマン管に富む明瞭な管腔構造を呈していた (図 5-d)。新生骨の石灰化程度は、CMR 像で観察すると D 群で高く、他群に比較して既存骨の石灰化程度との差が小さくなっていた。C, D 群の術後 2 週目の骨再生は、量的、質的にみると A, B 群の術後 4 週目に相当していた。

3) PLLA 適用群における骨再生の特徴

D 群の術後 4 週目における骨再生の様相の典型例を模式図で示す (図 6)。人工的骨欠損部には、層板構造を呈した新生骨が形成され、新生骨の一部は一次骨単位を認め、成熟度の高い骨組織であった。既存皮質骨の周囲は新生骨が取り囲み、既存骨は全体的に約 2 倍の厚みとなっていた。さらに新生骨は石灰化が進み既存骨と新生骨の境界が不明瞭であった。

IV. 考 察

1. 生体吸収性微小電気刺激膜の骨誘導再生法への応用について

種々の電気刺激法は、難治性骨折や偽関節の治療に一般的に応用されている¹³⁾。歯科領域においては、歯周組織の再生やインプラント周囲骨欠損部の骨再生、およびインプラント埋入予定部位の骨増生への応用方法の確立が望まれている。しかし、電気刺激法の歯科領域への応用に関する報告は少なく、基礎的研究がわずかに散見されるのみで¹⁴⁻¹⁶⁾、未だ臨床応用の報告はみられない。直流電気刺激法は totally invasive 法あるいは semi-invasive 法で、感染や陽極酸化による

骨吸収、発生電位の大きさなどが問題となる。当講座の守屋ら^{25,26)}は、骨内インプラント埋入後の初期固定をより確実なものとするために、イヌの顎骨を用いて微小直流電流 ($10 \mu\text{A}$) をインプラント体を介し通電させた結果、インプラント体周囲の骨形成の促進および緻密化が陰極ではなされるが、陽極では酸化による骨吸収や装置の設置が問題となることを報告している。交流電気刺激法やパルス電磁場刺激法、Capacitively coupled electric field (CCEF) 法などは non-invasive 法であるが、装置の大きさや適用時間、発生電位の問題が未解決である¹⁴⁻¹⁶⁾。

当講座で系統的研究を行ってきた圧電フィルム VDF/TrFE は¹⁷⁻²²⁾、厚さが $50 \mu\text{m}$ の薄膜で創部を閉鎖創とすることができることから、臨床応用が可能であることが示唆された。また咀嚼や嚥下など機能運動時に生じる圧力は、フィルムにズリ応力として作用することにより、パルス波刺激装置として極性を有しない微小電位 (ラット大腿部で平均約 0.5 V) の発生が可能で、陽極酸化の問題を解決した有用な膜と考えられた^{17,18)}。しかし、この圧電フィルムは非吸収性であるため膜の除去手術が必要なことや、材質が固く賦形性に乏しいため創面への適切なスペースメーカー効果が得られず、臨床応用上の問題があった。これに対して、PLLA は、生体吸収性で二次手術の必要がなく、かつ生体親和性と賦形性に優れているため、VDF/TrFE の欠点を解決する膜として有用であると考えられた。

今回は、PLLA を用いた骨誘導再生法が人工的骨欠損部の初期の治癒過程に及ぼす効果を、GTAM[®] および PLA の効果と病理組織学的に比較検討した。特に PLLA の分子量の違いが、人工的骨欠損部の治癒過程にどのような影響を及ぼすか検索することを主眼としたため、PLLA の吸収過程における発生電位の変化や周囲組織への影響に関しては次報で述べることにした。

2. 実験結果について

遮蔽膜が骨再生の促進効果に及ぼす影響について考察すると、A および B 群では、各観察期間においてそれぞれ遮蔽膜によって周囲軟組織の進入が遮断され、外表形態は膜に沿ってほぼ回復されたことから、膜の効果を認めた。しかし、骨の形成部位は主に膜直

下や骨窩洞断端部に近接した部位で、骨窩洞中央付近の骨梁はすう疎な状態を呈していた。当講座の千葉¹⁸⁾は、ラット大腿骨骨欠損部に非圧電性 VDF/TrFE を遮蔽膜として使用し、膜を使用しなかったコントロール群と比較して骨再生が遅延することを報告している。このことについて生体電位の観点から、遮蔽膜が穿孔部内と皮質骨外側面での電位勾配を小さくしたため、コントロール群に比べて骨損傷部の治癒が遅延したと推測している。また当講座の高橋²²⁾は、骨窩洞の血管構築を観察し、対照群では骨膜側の新生血管が骨窩洞内に進展し、骨髓側の新生血管と吻合を行い、骨窩洞内の血液供給が 2 つの血管系によって達成されること、一方、非圧電性 VDF/TrFE を用いた群では、骨膜側の新生血管は遮蔽膜によって遮断されるため、骨髓側のみの新生血管によって占有されたことを示し、その結果、遮蔽膜は骨窩洞内の血管新生に影響を及ぼしたため骨再生が遅延したと述べている。骨誘導再生法の原理は、増殖能の高い非骨原性組織や上皮が骨再生部分を占有するのを防ぎ、成長の遅い骨原性細胞組織の増殖を許容する⁴⁾という考えから、遮蔽膜の使用が有効であると考えられ、口腔インプラント周囲の骨再生を図る場合、GTAM[®]をはじめとする各種遮蔽膜を用いて、骨再生に有効であったとする報告は多数存在する¹⁻⁷⁾。しかしながら、本実験結果とあわせて考えると、遮蔽膜は口腔インプラントの初期固定など骨再生を早期に達成させるには不利であると推察された。

一方、本実験で PLLA を用いた群では、遮蔽膜の使用にもかかわらず、分子量 10 万、30 万の両群とも新生骨が早期より形成され、4 週目では窩洞内全体が新生骨で満たされ、新生骨の成熟も早く、緻密化も進んでいた。藤沢¹⁹⁾は、VDF/TrFE による微小電気刺激が、術後早期の間葉細胞の増殖や骨芽細胞への分化を促進したこと、また高橋²²⁾は VDF/TrFE 用いた群で、血液供給が骨髓側の新生血管のみで行われるものの、血管径が太く増大し、血流量が多く認められたことから、微小電気刺激が血管新生に対して促進的に作用したことを報告した。これらの報告をふまえて考察すると、PLLA による微小電気刺激の効果が遮蔽膜の骨再生の抑制作用に打ち勝ち、造骨系細胞の分化促進と血液供給の早期完成によって、骨再生が早期に促進されたものと考えられた。

次に、膜の多孔性構造と無孔性構造の違いを検討するために、PLA 群と GTAM[®]群を比較すると、各時期において PLA 群では骨梁が細く幼若で、骨形成量も少なく GTAM[®]群より治癒がさらに遅延する傾向にあった。Zellin らは²⁷⁾、膜の有孔構造について、孔径が大きいほど組織液や栄養素の循環が優れ、骨形成細胞が早期に遮蔽膜下のスペースを満たすことを報告している。GTAM[®]は多孔性構造であるのに対して、PLA は無孔性構造であるため、骨欠損部周囲の電気勾配の変化や組織液の循環の抑制程度が異なったため、GTAM[®]と PLA の組織再生に違いが生じたものと推測された。

次に骨形成量について考察すると、各実験期間において分子量 10 万の膜より 30 万の膜を用いた群で骨形成量は著明に認められた。PLLA の電位発生の機序は、延伸処理によって極性をもった乳酸分子が一定の配向方向を有し、膜にズリ応力が加わると分子の配向が変化するため微小電位を生じることが明らかにされている^{23,24)}。したがって分子量の大きさや加わるズリ応力の大きさによって、発生電位が異なると推測され、分子量の大きさは膜の硬さや変形のしやすさとも関連する。本実験結果から、分子量 30 万の膜のほうが骨再生により有利な電気刺激効果を有していたと考えられた。

また、骨形成部位について考察すると、A と B 群では、新生骨は主に骨窩洞断端部と膜直下および骨内膜付近に多くみられ、骨窩洞中央付近の骨梁はすう疎であった。これに対して、C、D 群では術後 2 週目より新生骨は骨窩洞内に広範囲に形成され、術後 4 週目では既存骨上方の広範囲に、膜を上方に押し上げた形で形成され、特に D 群では新生骨は大腿骨周囲全体に形成されて皮質骨の幅は既存骨の約 2 倍の太さになっていた。筆者²¹⁾は、ビーグル犬下顎骨で即時インプラント頰側頸部の骨欠損部に対して VDF/TrFE による微小電気刺激を応用し、骨欠損部における早期の骨再生とともに、歯槽骨頂部から舌側歯槽骨外側への広範囲の新生骨の添加と、それによる歯槽骨幅の著明な増大を認め、下顎骨の広範囲に電気刺激の影響が及び、既存骨周囲の未分化間葉細胞の造骨系細胞への分化を促進したためと推測している。本実験において、PLLA の微小電気刺激は骨欠損部のみならず既存皮質骨の広範囲に作用して骨形成を促進したことから、残存歯槽

堤の解剖学的形態が不利な場合の骨修復への応用も可能であると考えられた。

新生骨の骨梁の配列方向は、GTAM[®]、PLA を用いた群では骨梁は膜直下付近に重畳状に形成されたのに対して、PLLA を用いた群では、骨梁は骨欠損部内で渦を巻くように形成されていた。骨折に対する皮質骨、梁状骨の構築やその反応の規則性は、機械的環境と生物学的反応との関係にあるとされている²⁸⁾。また高橋²²⁾は、VDF/TrFE を用いた群で、骨髄側新生血管の骨窩洞上方への垂直的な伸展を認め、これが新生骨の形成方向に影響を与えたと述べている。微小電気刺激効果は骨窩洞内の流動電位や電位勾配の変化を生じ、さらに血管新生や電場によるコラーゲン線維の伸展に影響を及ぼしたため、新生骨の骨梁の配列方向が他群と異なっていたと推測した。

次に骨形成の成熟度について考察すると、A、B 群では術後 4 週目においても骨梁は幼若で、石灰化骨よりも低石灰化骨が多かったが、これに対して、C と D 群では、術後 2 週目で個々の骨梁の成長が進み、特に D 群で新生骨の一部は骨髄を含んでおり、C 群に比較して成熟度が増していた。また術後 4 週目では D 群でさらに成熟度が増し、新生骨の大部分に骨髄腔を認め、既存骨外基礎層板を境にして外周に形成された新生骨は緻密で、他群に比較して既存骨の石灰化程度との差が小さく、境界は不明瞭になっていた。したがって、PLLA は骨再生量を増加させ、かつ再生した骨の成熟をも促進させることが示された。

3. 生体吸収性膜の骨誘導再生法への応用について

本実験の遂行に先立ち、PLLA については予備実験を行い、実験室内において水温 35°C の生理食塩水中に浸漬し、膨潤ならびに吸収を観察し、膨潤は認められないこと、吸収は 6 カ月以上かかること、また発生電位は浸漬直後より減弱することを確認した。中村ら^{29,30)}、Laitinen ら³¹⁾は、ポリ乳酸は生体内埋入と同時に加水分解が生じるため、分子量や曲げ強度が急激に減少することを報告している。さらに、Matsusue ら³²⁾は、ポリ乳酸の分子量の違いによって加水分解による物理化学的性状の変化が異なり、低分子量のポリ乳酸ほど加水分解が早く、酵素や食細胞の影響を強く受けることを述べ、このとき出現する酵素や食細胞が周囲組織に悪影響を及ぼすとしている。これらの膜は

非圧電性 PLA であり、本実験で使用した PLLA と単純に比較することは困難であるが、生体内埋入に伴う物理的变化は、遮蔽膜としての効果や発生電位に影響を及ぼすことが予測された。泰永ら³³⁾は、分子量 3 万の PLLA を家兎橈骨の骨欠損部に適用し、16 週目ではフィルムの形状が温存されており、周囲に炎症細胞を認めなかったものの、膜表面の一部にはクラックが生じたことを報告している。今回の観察において、PLLA は骨再生に必要な期間は膜としての作用を有し、また微小電気刺激効果を有すること、さらに周囲の軟組織に対する影響も有しないことが示されたが、吸収後期にフィルムの破損や、破片による粘膜の裂開なども予測されることから、今後は吸収時期や分解産物が周囲組織に及ぼす影響も含めた基礎的検討を行う必要があると考えられた。

V. 結 論

ラット大腿骨の人工的骨欠損部に GTAM[®] と分子量の異なる 2 種類の PLLA (分子量 10 万, 30 万)、および PLA の 4 種類の barrier membrane を用いて骨誘導再生法を試み、各膜が骨欠損部の骨再生に及ぼす影響を比較検討し、以下の結果を得た。

1. PLLA 群では GTAM[®] 群および PLA 群に比較して、早期より著明な骨形成と骨組織の成熟化を認めた。

2. PLLA の分子量は 10 万の群より 30 万の群で、骨形成は量的に、かつ質的に著明に促進されていた。

3. GTAM[®] 群では、各実験期間で骨再生は PLA 群と同程度であり、GTAM[®] の骨再生効果は PLLA 群より劣っていた。

4. PLLA は皮質骨上に望ましい形態のスペースを作る賦形性に優れていた。

5. PLLA は吸収性であるものの、骨損傷部の初期の骨形成や骨の成熟化には影響を与えなかった。

以上のことから、PLLA は二次手術を必要とせず骨再生を促進する膜として有用であることが示された。

なお本論文要旨は、第 95 回日本補綴歯科学会学術大会 (平成 8 年 5 月 31 日, 広島) において発表した。また The 6th International Symposium on Periodontics & Restorative

Dentistry (平成9年6月5～8日, ポストン) ポスターコンペティション部で best award を獲得した。本研究の一部は平成10, 11年度の文部省科学研究補助費基盤研究(B) 08457532号「生体内吸収性圧電フィルムによるインプラント周囲骨再生促進効果の機序について」の補助金および文部省私立大学ハイテク・リサーチ・センター事業補助金で行った。

文 献

- 1) Nyman S, Linde J, Karring T et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9 : 290-296, 1982.
- 2) Gottlow J, Nyman S, Karring T et al. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 11 : 494-503, 1984.
- 3) Schenk RK, Buser D, Hardwick WR et al. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects : A histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 9 : 13-29, 1994.
- 4) Dahlin C, Linde A, Gottlow J et al. Healing of bone defects by guided bone regeneration. *Plast Reconstr Surg* 81 : 672-676, 1988.
- 5) 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.
- 6) Becker W, Becker B. Bone formation at dehiscencedental implant sites treated with implant augmentation material : A pilot study in dogs. *Int J Periodont Rest Dent* 10 : 93-101, 1990.
- 7) Buser D, Brägger U, Lang NP et al. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Imp Res* 1 : 22-32, 1990.
- 8) Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes : an experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 51 : 1106-1114, 1993.
- 9) Grevstad HJ. Effect of subperiosteally implanted polytetrafluoroethylene (e-PTFE) material on alveolar bone in the rat. *Scand J Dent Res* 101 : 224-228, 1993.
- 10) Cochran DL, Schenk R, Buser D et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol* 70 : 139-150, 1999.
- 11) Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K et al. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol* 70 : 1026-1031, 1999.
- 12) Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM et al. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J Periodontol* 71 : 8-13, 2000.
- 13) 井上四郎. 電気刺激療法の種類と適応. 津山直一, 深田栄一編, 電気刺激による骨・軟部組織の修復の促進 30-36, 東京 : 文光堂出版, 1993.
- 14) 久保田浩三. 歯槽骨の人工的骨欠損に及ぼす微小電流の影響に関する実験的研究. 九州歯会誌 36 : 64-81, 1982.
- 15) 吉村直規, 久保田浩三, 森本 秀ほか. 電場刺激による歯周組織再生の実験的研究 GTR 法への応用. 日歯周誌 33 : 64, 1991.
- 16) 松本弘幸, 坂口邦彦, 越智守生. パルス電磁場刺激の家兎大腿骨インプラント埋入モデルへの応用. 補綴誌 40 : 1171-1182, 1996.
- 17) 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 : 387-395, 1992.
- 18) 千葉昌一. 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. 補綴誌 36 : 419-433, 1992.
- 19) 藤沢 毅. 微小電気刺激が骨再生の初期過程に及ぼす影響. 補綴誌 37 : 1139-1151, 1993.
- 20) 田中久敏, 虫本栄子, 菅原光孝ほか. 圧電フィルムの微小電気刺激による GTR 法の促進効果. 日本生体電気刺激研究会誌 8 : 27-31, 1994.
- 21) 大塚英幸. 組織再生誘導法による即時インプラント周囲組織の治癒過程—e-PTFE 膜と VDF/TrFE 圧電膜の比較—. 補綴誌 40 : 400-412, 1996.
- 22) 高橋 元. 微小電気刺激による骨再生促進効果の機序に関する研究—血管構築の動態—. 補綴誌 42 : 497-509, 1998.
- 23) Fukada E. Piezoelectric properties of poly-L-lactic acid. *Reports on Progress in Polymer Physics in Japan* 34 : 269-272, 1991.
- 24) 下野哲朗, 酒匂 崇, 松永俊二ほか. ポリ乳酸圧電フィルムによる骨形成の経時的観察. 日本生体電気刺激研究会誌 8 : 37-40, 1994.
- 25) 守屋光孝. 微小電流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.
- 26) 守屋光孝, 田中久敏. 歯槽骨内インプラント法への微小電流刺激の応用 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.
- 27) Zellin G, Linde A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials* 17 : 695-702, 1996.
- 28) Stanford CM, Brand RA. Toward an understanding of implant occlusion and strain adaptive bone modeling and remodeling. *J Prosthet Dent* 81 : 553-61, 1999.
- 29) Nakamura T, Hitomi S, Watanabe S et al. Bioabsorption of polylactides with different molecular properties. *J Biomed Mater Res* 23 : 1115-1130, 1989.
- 30) 中村達雄, 清水慶彦. ポリ乳酸類による生体内吸収性外科用埋植材料の開発. 病態生理 9 : 478-488, 1990.

- 31) Laitinen O, Tormala P, Taurio R et al. Mechanical properties of biodegradable ligament augmentation device of poly (L-lactide) in vitro and in vivo. *Biomaterials* 13 : 1012-1016, 1992.
- 32) Matsusue Y, Yamamuro T, Oka M et al. In vitro and in vivo studies on bioabsorbable ultra-high-strength poly (L-lactide) rods. *J Biomed Mater Res* 26 : 1553-1567, 1992.
- 33) 泰永 募, 松末吉隆, 古川泰三ほか. ポリ乳酸フィルム

被覆の骨伝導性：家兔橈骨骨幹部骨欠損モデルによる研究. *日整会誌* 71 : 1748, 1997.

著者連絡先：大塚 英幸

〒020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

TEL : 019-651-5111 内 4112

FAX : 019-652-4131

E-mail : momo-@nyc.odn.ne.jp

—図 の 説 明—

図 2 Bone growth —after 2 weeks— Villanueva bone stain (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA : Mw=10×10⁴, d. PLLA : Mw=30×10⁴
術後 2 週目の骨再生 Villanueva bone stain (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA (分子量 10 万), d. PLLA (分子量 30 万)

図 4 Bone growth —after 4 weeks— Villanueva bone stain (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA : Mw=10×10⁴, d. PLLA : Mw=30×10⁴
術後 4 週目の骨再生 Villanueva bone stain (×5)

a. GTAM®, b. PLA, c. PLLA (分子量 10 万), d. PLLA (分子量 30 万)

図 2

図 4

Effectiveness of Absorbable Electrified Poly-L-lactic Acid Membrane for Bone Regeneration in Rats

Hideyuki Ohtsuka, Hisatoshi Tanaka, Eiko Mushimoto, Shoichi Chiba,
Gen Takahashi, Akira Chiba and Moriaki Inawashiro

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

J Jpn Prosthodont Soc 45 : 202-213, 2001

ABSTRACT

Purpose : The purpose of this study was to investigate the effectiveness of bone regeneration around bone defects, using absorbable electrified poly-L-lactic acid (PLLA) membrane, and to compare the effectiveness of membrane to Gore-Tex Augmentation material (GTAM®) and non-electrified polylactic acid (PLA) membrane.

Methods : Wistar-strain male rats, of ages 13 to 15 weeks, were used. A hole, 2.0 mm in diameter, was drilled in the femoral diaphysis. Group A's experimental site was covered with GTAM®; Group B's was covered with non-electrified PLA; and Groups C's and D's were covered with PLLA membrane ($M_w=10 \times 10^4$ or 30×10^4). The experimental periods were 2 and 4 weeks. Bone specimens were stained with Villanueva bone stain. Microscopic histopathological observations were made.

Results : The PLLA groups showed more accelerated bone growth and bone maturity than did the GTAM® groups in the early stages, especially in the 30×10^4 Mw group, where a greater amount of bone tissue and increase of maturity was observed. Results of the GTAM® groups were almost the same as the control PLA group, and inferior to the PLLA groups, through all experimental periods. PLLA is easily shaped to fit bone surface to maintain desired space.

Conclusion : PLLA membrane might therefore be used to obtain a better result in clinical application for guided bone regeneration than PLA and/or GTAM®.

Key words

poly-L-lactic acid membrane, electrical stimulation, GTAM®, bone defect, bone regeneration