九州歯会誌 47 (6) : 590 ~ 606, 1993.

電場刺激法による歯周組織再生に関する実験的研究

— 吸収性膜使用による GTR 法との併用 —

吉 村 直 規

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学第2専攻 (指導: 横田 誠教授)

平成5年10月26日受理

Effects of Electrical Stimulation on Periodontal Tissue Regeneration in Dogs

— Application of Biodegradable Membrane in GTR Method —

Naoki Yoshimura

Department of Periodontics and Endodontics (Director: Prof. Makoto Yokota)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Use of electrical stimulation to promote the regeneration of periodontal tissue is effective in periodontal studies, but the volume of periodontal tissue regeneration by electrical stimulation was insufficient. Therefore, It was decided to use the technique of guided tissue regeneration (GTR) method for keeping the space of periodontal regeneration by use of poly (D, L-lactic acid-co-glycolic acid); (D, L-LA content : 76 mole%) with electrical stimulation for periodontal tissue regeneration. For the electrical stimulation method, the capacitively coupled electrical field (CCEF) method, which can be applied non-invasively was selected.

The purpose of this study was to compare to the effectiveness of the GTR method with electrical stimulation to the GTR method alone, in periodontal regeneration to class III furcation involvement.

As experimental periodontitis was induced bilaterally in mandibular third premolars in dogs, flap surgery was performed and all defects were covered with poly (D, L-lactic acid-co-glycolic acid); (D, L-LA content : 76 mole%), so as to prevent soft tissue from proliferating into the defects. After 8 weeks, CCEF signal (sine wave, 60 kHz, 5 V peak to peak) was applied laterally for 4 weeks. Calcein bone labelling compounds were administered to mark new bone and cementum formation.

After the application of CCEF signal, the dogs were sacrificed. Decalcified and non-decalcified sections were prepared for histological observation, and the following parameters were measured : the percentage of the length of new bone crest height to defect height (BC); the percentage of the distance of new cementum to the distance around the notch to notch (cC); the percentage of the area of new bone to that of the defect (BF); the length from the top of the soft tissue to the top of the furcation fornix (GM).

The results were as follows :

- 1) BC was higher in value in the stimulated site than in the control site (stimulated site : $65.68 \pm 17.84\%$; control site : $50.39 \pm 14.24\%$).
- 2) BF was markedly higher in value in the stimulated site than in the control site (stimulated site : $46.53 \pm 20.21\%$; control site : $26.75 \pm 10.61\%$).
- 3) cC and GM did not show identical tendencies.
- 4) If the epithelium invaded into the defect at the stimulated site, new bone were formed actively.
- 5) According to the these results, it was suggested that the treatment method of combining the CCEF method with GTR method is useful as a reconstructive periodontal therapy in class III furcation involvement.

Key words : Capacitively coupled electrical field / Guided tissue regeneration / Space for periodontal tissue regeneration / Biodegradable membrane / Histomorphometry / Dog

緒 言

歯周治療の最終的な目的は、失われた歯周組織の完全な再生を図ることである。今日まで歯周組織の再生を図るため様々な臨床的・基礎的アプローチがなされている¹⁻³⁾。このような再生療法として、現在のところ組織誘導再生法 (guided tissue regeneration method; 以下 GTR 法と略す) が露出根面に対する新付着獲得に関する予知性の高い術式として確立してきた。しかしながら、たとえ GTR 法を用いたとしても歯槽骨の再生に関しては未だ問題を残していることが多くの研究者の一致した見解となっている。そこで著者は、このような GTR 法の欠点を補う目的で吸収性膜による GTR 法と電気刺激の併用を考えた。

電気刺激の利用に関しては、整形外科の分野で骨折受傷後の骨形成を促進させるため電氣的刺激を加える治療法が、数多く報告されている^{4,5)}。

歯科領域において電気刺激法を応用した歯周組織再生に関するアプローチは、鈴木 (1976)⁶⁾ がヒト乾燥下顎骨における圧電現象を検出し微小電流刺激による仮骨形成の可能性を示唆して以来、この分野の研究が始まった。また、Jacobs & Norton (1976)⁷⁾ はイヌの歯槽骨の骨欠損部に応用し骨内膜性の仮骨形成の促進を報告している。さらに、唐木 (1979)⁸⁾ は、電気刺激による下顎骨の反応を観察し、下顎骨における internal remodeling の活発化と共に仮骨形成の促進を認め、歯槽骨再生の可能性を示唆した。その後、久保田 (1982)⁹⁾ は、

歯槽骨形成の促進と共に、セメント質の形成及び形成速度の促進を報告している。歯周炎罹患歯牙については林川 (1990)¹⁰⁾ が非侵襲的方法である容量結合型電場刺激法を用いて、仮骨形成の促進、セメント質形成の促進、さらに上皮の深行増殖の抑制を報告している。

しかしながらこれらの電気刺激による歯周組織再生の実験においても完全な再生は残念ながら得られていない。そこでより多くの歯周組織再生を得るための方法として“歯周組織再生の場”の確保^{11,12)}のために GTR 法と電場刺激法との併用を考えた。

本実験では、より多くの歯周組織再生を得るために電場刺激法とともに歯周組織再生の場を確保するために吸収性膜を使用する GTR 法を併用した。メンブレンには、GTR 法の目的を達成することが可能でかつ、通電を阻害しないような吸収性材料として乳酸グリコール酸共重合体膜を使用した。これら吸収性膜の有用性に加え、電場刺激法の併用の有用性についても組織形態計測に加えて病理組織学的に検索を行った。

実験材料及び方法

実験動物は、健康で口腔内に異常所見の認められない雄雑種成犬 7 頭 (10 ~ 14 kg) を使用した。(図 1)

I. 実験的歯周炎の作製

イヌ歯周組織への実験的歯周炎の作製に際し、実験動物を pentobarbital sodium (NEMBUTAL, ダイナボット) にて静脈内注射による全身麻酔下におき、左右両側とも第 2 前臼歯中央部から第 4 前臼歯中央部にいた

図1 Time schedule

る粘膜骨膜弁を形成し、剥離することにより骨表面を露出させた。左右両側の第3前臼歯の分岐部に、近遠心的には歯牙幅で深さ5mm、頬舌的にはthrough and throughの骨欠損を作製した(図2)。その後骨形成を抑制させる目的で、直径0.25mmの矯正用ワイヤーを第3前臼歯歯頸部に結紮し、欠損部には軟化させたテンボラリーストッピング(松風)を過不足なく充填した状態で放置した。2週間後にこれらを除去し、歯根面の汚染及びプラーク停滞を目的として、デンタルフロスを歯頸部に結紮し、1週間放置下に置き実験的歯周炎を惹起させ

図2 骨欠損作製時の口腔内写真
実験開始時に左右第3前臼歯のCEJから分岐部に達する深さ5mm、頬舌的にはthrough and throughの骨欠損を作製。

た。

II. 歯周組織再生のための場の確保

実験的歯周炎を惹起させた左右両側の第3前臼歯部の粘膜骨膜弁を剥離し、ルートプレーニングした後、骨欠損底部に一致する歯根面にノッチを賦与した。その後、歯肉弁からの軟組織の侵入を防ぐために生体吸収性膜が欠損部を充分覆うようにメンブレンを整形した。吸収性膜は、ポリ-D, L-乳酸-グリコール酸共重合体(Poly(D, L-lactic acid-co-glycolic acid)), D, L-乳酸含量76 mole% (D, L-LGA (76:24 mole%)) (多木化学) (以下PLGAと略す)を使用した。その膜のポリマーの数平均分子量(Mn)は 35.9×10^4 , ガラス転移温度 47.4°C で、厚さ $120\mu\text{m}$, 孔径約 $5\mu\text{m}$ の多孔質構造を有している。

また、メンブレンの歯牙への初期固定及び保持、さらに歯牙とメンブレンとの間隙を完全に埋めうる目的で、生体吸収性のゴム状ポリ乳酸(ポリ乳酸エラストマー, 多木化学)¹³⁾を使用した。このゴム状ポリ乳酸は、数平均分子量 4.47×10^4 , 重量平均分子量 7.23×10^4 , ガラス転移温度が 51.0°C , の物性をもち、ポリ-D, L-乳酸とクエン酸トリエチルを複合させゴム状としたものである。操作方法は、適切な大きさに切断し、ドライヤー等で加温・軟化し曳糸性を示すガムの状態でメンブレンへ付着させた。このゴム状ポリ乳酸は、膨潤性も非常に小さく7日後で1.04倍、30日後で1.10倍の膨潤率である。

PLGA膜は整形後、ゴム状ポリ乳酸を併用し吸収性縫合糸(コーテッドバイクリル, ジョンソン・エンド・ジョンソンメディカル)にてメンブレンが骨欠損部を充分覆うように縫合し(図3), その後、粘膜骨膜弁を

図3 吸収性膜(PLGA)によるGTR法応用時の口腔内写真

懸垂縫合にて縫合した。

Ⅲ. 電場刺激法

歯周組織に侵襲を与えない non-invasive な方法で通電を行うにあたっては、林川の方法¹⁰⁾に準じて、Brighton ら¹⁴⁾の考案した容量結合型電場法 (capacitively coupled electrical field method; 以下 CCEF 法と略す) である CCEF 刺激装置 (Orthopak™, Zimmer) を用いた。この装置は、骨折治療を目的として開発された装置であり、周波数が 60 kHz、ピーク間電圧が 5 V という正弦交流波を用いて、身体を一種のコンデンサーとみなして体内に電場を作り電気刺激を加える方法である。

メンブレン装着 8 週後の通電開始 1 週間前に、下顎両側犬歯及び第一後臼歯に歯肉縁上 1 mm をマージンとしたフルクラウウンの支台歯形成をし、上下顎の印象採得を行った。模型上でリングルバーの維持部として矯正用半円管 (サンブラチナ矯正用チューブ, 三金工業) を使用したフルクラウンをワックスアップし、鑄造した。さらに模型上で、縦 4 mm、横 5 mm の頬舌側一対の金合金性プレート電極を左右両側に作製し、その後、電極を適切な位置に配置させるために、電極固定用の Ni-Cr 合金製リングルバーを作製した。また、骨欠損相当部の頬舌側歯肉粘膜面に適合するように金合金性電極を調整し、リングルバーにその電極を矯正用レジンにて固定した。この電極部を左右両側に作製し、実験側のみ首輪に固定した battery pack と接続した (図 4, 5)。これにより、実験側のみ骨欠損部に電場を発生させ、反対側は通電は行わずにコントロール側とした。なお、装置の破壊、シールドの断線を防ぐために、頭頸部周囲にドッグカラー (BUSTER, JORGEN KRAUUSE) を装着した。

通電は 1 日 14 時間の夜間通電とし 4 週間通電を行った。バッテリーの交換と通電量のモニタリングを毎日 2

回行った。通電結果は、平均電圧は 5.5 V、平均電流 7.0 mA であった。

実験終了後 pentobarbital sodium の麻酔下で電極部を撤去し、総頸動脈より 10% 中性ホルマリン液で頭頸部の灌流固定を行い、下顎骨を摘出した。採取した下顎骨はさらに同固定液で 1 週間以上浸漬固定を行った。

Ⅳ. 術後管理

吸収性膜使用後抜糸までの 1 週間は、膜の崩壊及び治癒遅延を避けるために口腔清掃は行わず、抜糸時より週 3 回クロロヘキシジングルコネートにより化学的プラークコントロールを行った。

Ⅴ. 組織標本作製

実験に用いた 7 頭中 4 頭は非脱灰切片とし、硬組織ラベリングのために、屠殺前 12 日目、11 日目および 2 日目、1 日目の計 2 回カルセイン (和光純薬) を用いて皮下注射 (10 mg/kg 体重) を行った。

非脱灰標本は、上昇アルコール系列で脱水後、ポリエステル樹脂 (Rigolac, 日新 EM) にて包埋し、硬組織用カッティングマシーン (バンドソー BS-3000, Exakt) を用いて近遠心方向に約 120 μ の厚さに薄切した。その後、組織学的観察を行うために 1 枚おきに methyleneblue-fuchsin 重染色 (以下 M・F 染色と略す) を施した後、約 50 μ m の厚さに研磨した。未染色標本は蛍光観察用に約 100 μ m の厚さに調整し、観察・計測した。

また、残りの 3 頭は脱灰切片とし、10% 中性ホルマリンによる固定後、10% ギ酸にて脱灰を行い、エタノール系列脱水後、通法通りにセロイジン包埋を行って、近遠心方向に 15 μ m の厚さに連続切片標本作製した。各切片は 5 枚おきにヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 H・E 染色と略す) ならびにアザン・マロリー染色 (以

図 4 模型上での電極固定用装置
右側歯列が刺激側、左側歯列をコントロール側

図 5 電極装着後の口腔内写真

TF ; top of furcation fornix
 BC ; bone crest
 mN ; mesial notch
 dN ; distal notch
 mcC ; coronal margin of new cementum (mesial)
 dcC ; coronal margin of new cementum (distal)
 GM ; gingival margin

図6 組織形態計測に用いるパラメーターの基準点

下 A・M 染色と略す) を施し、観察および計測を行った。

VI. 組織形態計測

形態計測を行った標本は、非脱灰標本では、各実験歯

牙の分岐部中央部付近の7枚、脱灰標本では、同じく分岐部中央部付近の14枚の染色標本を抽出し、組織形態計測に用いた。計測に際しては、パーソナルコンピューター (PC 9801, NEC) とデジタイザー OSCON (SQ-3100 R 2, フォトロン) を利用した独自に開発した画像解析装置を用いた。また歯周組織の再生状態を検索するため、図6に示す切片内の基準点から以下に示すパラメーターを設定して、組織形態計測とともに統計学的に処理した。

A. 歯槽骨頂縁回復の割合 [BC (%)]

近遠心側ノッチを結んだ直線 (以下 mN-dN とする) から分岐部円蓋最歯冠側部 (以下 TF とする) への垂線の距離に対する、新生骨頂縁部 (以下 BC とする) から mN-dN への垂線の距離の割合を 100 分率にて表示した。

B. セメント質再生の割合 [cC (%)]

近心側ノッチ (以下 mN とする) -TF 間距離と遠心側ノッチ (以下 dN とする) -TF 間距離を加えたものに対する、近心側再生セメント質上端部 (以下 mcC とする) -mN 間距離と遠心側再生セメント質上端部 (以下 dcC とする) -dN 間距離を加えたものの割合を 100 分率にて表示した。

C. 歯槽骨再生の割合 [BF (%)]

mN-dN と歯根で囲まれた部分の総面積に対する、mN-dN を底辺とする新生仮骨の総面積の割合を 100 分

表1 組織形態計測の結果

DOG	BC (%)		cC (%)		BF (%)		GM (mm)	
	stim	cont	stim	cont	stim	cont	stim	cont
1	58.72	46.29	60.28	62.15	36.91	27.58	0.44	0.43
2	58.47	**46.82	61.57	63.36	42.15	40.51	0.33	0.35
3	52.88	41.80	46.69	**66.64	43.21	**22.77	0.83	**0.55
4	45.60	**33.80	74.95	74.01	16.61	**10.23	0.01	*0.06
5	65.45	50.73	56.34	**83.23	43.66	**19.73	0.89	**0.07
6	81.47	*54.21	99.09	**97.13	62.44	**27.58	0.00	0.00
7	97.19	79.09	98.91	97.42	80.76	**38.85	0.00	0.00
mean	65.68	50.39	71.55	77.71	46.53	26.75	0.36	0.21
s.d.	17.84	14.24	20.23	15.17	20.21	10.61	0.39	0.23
max.	97.19	79.09	99.09	97.42	80.76	40.51	0.89	0.55
min.	45.60	33.80	49.69	62.15	16.61	10.23	0.00	0.00

有意差：同一個体における刺激側とコントロール側の比較 (t-検定)

**p<0.01, *p<0.05

率で表示した。

D. 辺縁歯肉の位置 [GC (mm)]

TF から分岐部内に侵入した歯肉頂部までの距離を表示した。

結 果

I. 組織形態計測の結果 (表 1)

A. 歯槽骨頂縁回復の割合 [BC (%)] (図 7)

全例の平均は、刺激側が $65.68 \pm 17.84\%$ で、コントロール側が $50.39 \pm 14.24\%$ であり、刺激側が全例において高い値を示した。実験を行った 7 例中 4 例 (2 例が $p < 0.01$, 2 例が $p < 0.05$) で刺激側が有意な差をもって高い値を示した。

B. セメント質再生の割合 [cC (%)] (図 8)

全例の平均は、刺激側が $71.55 \pm 20.23\%$ 、コントロール側が $77.71 \pm 15.17\%$ であった。3 例で刺激側が高い値を示し、4 例でコントロール側が高い値を示した。そのうち、刺激側で 1 例 ($p < 0.01$)、コントロール側で 2 例 ($p < 0.01$) が統計的に有意な差が認められた。

C. 歯槽骨再生の割合 [BF (%)] (図 9)

全例の平均は、刺激側が $46.53 \pm 20.21\%$ 、コントロール側が $26.75 \pm 10.61\%$ であり、刺激側が全例において高い値を示した。7 例中 5 例 (5 例とも $p < 0.01$) で刺激側が有意に高い値を示した。

D. 辺縁歯肉の位置 [GC (mm)] (図 10)

全例の平均は、刺激側が 0.36 ± 0.39 mm, コントロール側が 0.21 ± 0.23 mm であった。7 例中 3 例で刺激側が高い値を示し、そのうち 2 例 ($p < 0.01$) で統計的に有意な差が認められた。7 例中 2 例でコントロール側が高い値を示しそのうち 1 例 ($p < 0.05$) では統計的に有意な差が認められた。また、7 例中 2 例においては、刺激側・コントロール側ともに分岐部頂部から歯肉頂部までの距離が 0 mm であった。

II. 病理組織学的観察

刺激側、コントロール側とも骨削除の後の歯周炎惹起による吸収のため、新生した骨の根尖側は凹凸面が認められる (図 11)。また両側ともに新生した骨は、骨梁が細く A・M 染色では、濃青色に染色されている (図 12)。

分岐部内への上皮の進行を完全に阻止できなかったものが 14 例中 7 例 (刺激側 4 例, コントロール側 3 例) で認められた (図 11 A・B, 12 A)。それらの最上層は上皮で覆われている。その下層には歯肉弁由来の既存の緻密な結合組織固有層が覆っている。またその結合組織固有層では緻密なコラーゲン線維が観察される。刺激側では、上皮層および既存の結合組織固有層の直下にまで骨が再生している像が観察されるが、コントロール側では上皮と結合組織固有層の下層は術後の線維性結合組織層が観察される (図 11, 12)。また上皮が認められる全

図 7 歯槽骨頂縁回復の割合 [BC (%)]

図 8 セメント質再生の割合 [cC (%)]

図 9 歯槽骨再生の割合 [BF (%)]

図 10 辺縁歯肉の位置 [GC (mm)]

図11 仮骨形成量の違いが顕著な例。(H・E 染色×6)

A: 刺激側 B: コントロール側

両側ともに、最表層は上皮が覆いその下層は結合組織固有層が存在する。刺激側においては、その直下にまで旺盛な仮骨形成が認められるが、コントロール側では、新生仮骨も少なくかなり広い線維性結合組織層が認められる。

図12 刺激側では上皮の排除に失敗しているがその仮骨形成量は大きい。(A・M 染色×6)

A: 刺激側 B: コントロール側

刺激側では、上皮・結合組織固有層が認められ、その直下にまで活発な仮骨形成がみられる。新生した骨梁は濃染され骨梁の幅は希薄である。コントロール側では、上皮は認められないが仮骨形成量は少ない。

図13 上皮付着部位拡大像。(A・M染色×20)
上皮付着部位から根尖側方向へはセメント質の形成が観察される。

例で、上皮の歯根面への付着部位から根尖側では、セメント質が再生している (図13)。なお、刺激側・コントロール側両側に線維性結合組織中に細胞の存在しない空隙が観察された。

刺激側・コントロール側とも分岐部内への上皮の抑制に成功したと思われるものでは、上皮は認められず、新生セメント質が分岐部内歯根面全層を覆っている (図14, 15)。

セメント質の再生が観察される部位では、セメント質の再生に先立って、歯根面に吸収窩が認められ (図16)、上皮の付着部位より上方では、歯根面の吸収窩は観察できなかった (図13)。

新生セメント質と新生骨との間隙にみられた結合組織線維は、一端をセメント質内に埋入し、新生骨へ向けて歯冠側方向へ斜走し、他端は新生骨表面に埋入していた (図13)。

刺激側において、骨欠損底部から歯冠側方向に欠損内のほぼ全域にわたって旺盛な骨形成が認められ、新生骨が欠損部内を完全に埋めているものが14例中2例で観察された。その2例のコントロール側では、形成された新生骨の量は少なく疎であった (図14)。

アンキロシスは、14例中2例の刺激側で認められ、1例では歯根面全域にわたり広範囲に観察されたが (図

17)、他の1例ではノッチの部分にわずかに観察された。

考 察

本研究は、歯周病罹患部位における治療法として、電場刺激法と GTR 法とを併用した際の露出歯根面への新付着および歯槽骨再生に対する有効性を調べる目的で行った。

現在、歯周組織再生法として注目されている GTR 法は、臨床に応用されているセメント質形成とコラーゲン線維の歯根面への埋入をもたらす確立の高い新付着獲得法^{1,2,15-17)}として認められている。従来より著者らは、組織誘導再生法への吸収性膜応用の可能性を報告¹⁸⁻²⁰⁾してきたが、PTFE 膜 (polytetrafluoroethylene; Gore-tex) を用いた GTR 法と同様に吸収性膜によっても新付着は得られたが、骨の再生に関しては充分ではなかったことを動物実験を通して報告してきた。本研究では、骨の再生を求めて、整形外科分野で骨折治療等の骨誘導法として応用されている電気刺激法を併用することによりより高い骨の再生を図り、吸収性膜と電場刺激法の併用療法の有用性を検索した。

I. 実験方法について

まず、メンブレン挿入による通電に及ぼす影響を調べる目的で、場の確保のための PLGA 膜の使用後、通電を行いテストメーター (Orthopak testmeter, Zimmer) を用いて、通電状況を経時的に計測した。その結果、術直後から術後3週までは、通電が認められるものや通電されないものなどばらつきがあったが、術後4週以降は電流値は一定の値を示し、メンブレンの影響が減少し、術後の組織も安定し、確実に通電が行われていた。術後の反応性の炎症症状もこの時期には消退した。よって PLGA 膜が手術部位で安定する時期として、PLGA 膜による場の確保の手術後4週以降の電場刺激が望まれた。

実験期間の設定にあたっては、場の確保のための手術の後、通電を開始するまでの期間を4週間とした実験を行い報告した²¹⁾。外科手術終了後通電開始までの期間が4週間では術後の治癒期間が短く通電のための装置の装着により炎症が誘発されてしまう可能性が考えられた。そのため今回の実験では、通電開始までの術後の治癒期間を8週とした。

現在 GTR 法に使用されているメンブレンについて考えると、PTFE 膜を使用した GTR 法は術式そのものが難しく、その PTFE 膜は非吸収性で本研究においては通電阻止が考えられる。また、歯肉縁部でのメンブレン

図14 上皮の排除に成功した例。(M・F 染色×8)

A: 刺激側 B: コントロール側

両側ともに上皮の侵入は認められず、セメント質もほぼ全域にわたり再生している。刺激側では歯冠側方向に本来の位置にまで仮骨形成が認められるが、コントロール側では、わずかしが形成されていない。

図15 セメント質再生。(蛍光×8)

A: 刺激側 B: コントロール側

両側ともに、ノッチから歯根面に沿ってセメント質形成が観察される。刺激側では、歯冠側方向へ新生骨梁が認められるが、コントロール側ではその量はわずかである。

図16 露出象牙質表面の吸収高。(M・F 染色×20)
分岐部頂部にまでセメント質の形成が観察される。セメント質が形成された部位では、歯根面に吸収高が認められる。

の配置により炎症を起こす可能性があることや、非吸収性であるために2回目の外科処置でそれを取り除かねばならないこと、メンブレンは歯肉弁への栄養供給を部分的に弱めていることなど問題点が示唆されている^{22, 23)}。そこで、電場刺激が可能になるための理想的なメンブレンとしては、生体親和性があり新付着形成を阻害せず、組織修復が満足できる状態に達した後、吸収される物質の使用が望まれる。吸収性のメンブレンを応用しての近年の GTR 法の研究^{18, 24, 25)}では、吸収性膜としてコラーゲン膜、ポリ乳酸膜、乳酸グリコール酸共重合体膜などがおもに用いられている。コラーゲン膜は生体親和性に優れかつ吸収性の素材であることより注目を集めた素材であるが、①免疫学的問題②性状に関連して吸収時期の調節性、剛性および操作性の問題が示唆されている²²⁾。ポリ乳酸膜では、吸収されるまでの時間が長く、同様の問題が指摘されている。それらの中で乳酸グリコール酸共重合体膜は組成・分子量により吸収時期が調節可能であり、剛性の確保が可能であるといった特徴を備えている¹⁸⁾。そこで本研究では、「歯周組織再生の場合」を確保し、その後に行う電場刺激へ影響のないよう吸収される材料として PLGA 膜を使用した。実験に先立って、本

図17 アンキローシス。
A. 分岐部内全体にアンキローシスが観察される。(M・F 染色×8)
B. 一部拡大像 (M・F 染色×20)
露出象牙質と新生仮骨との癒着が観察される。

実験で使用した PLGA 膜のイヌ歯周組織への影響を観察した結果、PLGA 膜挿入後 8 週ではメンブレンの残存は確認されたが、12 週以後時間の経過とともに、表面から吸収されていたが、16 週の時期で異物処理の持続する所見は認められた。しかしこの期間、どの時期においても進行性の炎症は観察されなかった。in vitro の加水分解試験においても、30 日以降では分子量の低下は観察されるが 90 日に至るまで PLGA 膜の残存は観察された。今回実験に使用した PLGA 膜は、本実験期間中は“場を確保”するだけの物性をもち、歯周組織との親和性も有する材料であると考えられる。

II. 電場刺激法について

電気刺激法は、整形外科分野で偽関節などの難治性骨折の治療に用いられ有効性が示されている^{26,27)}。電気刺激の方法として応用部位への侵襲の程度から totally invasive 法, semi-invasive 法, non-invasive 法に分類される²⁸⁾。

totally invasive 法は、小型電源及び電極等装置全体を埋め込むタイプのもので直流電気刺激を応用している。この方法では、感染の危険性¹²⁾、陽極酸化にともなう電極部周囲組織の傷害⁹⁾、通電量の経時的低下⁶⁾が指摘されている。semi-invasive 法は、電源部は体外におき、電極の一部もしくは全部を体内に刺入するタイプで、直流電気刺激及び交流電気刺激を応用するものである。装置を全て体外に設置し、手術を必要としない non-invasive 法としては、パルス電磁場刺激や CCEF 法があげられる。

歯周組織再生のための電気刺激は、応用する部位が口腔内という特殊な環境であり、部位的に内部環境と外部環境の交わるところで、感染の危険性が極めて高いことより手術を要しない non-invasive 法が最も有効であると考えられる。

non-invasive 法の中で、口腔内にパルス電磁場を用いた実験では装置の口腔内装着の煩雑さが報告されている^{29,30)}。本実験に使用した CCEF 法は、Brighton (1981)¹⁴⁾ が発表した方法で、骨折部をはさんで皮膚に電極を貼付し、この間に 60 kHz で 2.5 ~ 10 V (peak to peak) の正弦交流波を与える方法である。高周波であるため身体を一種のコンデンサーとして、体内に電場を作り刺激する方法である。この方法の特長は、①非侵襲型で感染の可能性がない②感染部の刺激可能③皮膚電極の設置は厳密でなくて良い④電極は軽量、小型⑤骨萎縮の予防、回復が図れる⑥人体の諸臓器に無害である、などがあげられ³¹⁾、ポータブルで、なおかつ使用法が煩雑でないこ

とから現在普及しつつある方法である。また、口腔内に CCEF 法を応用した林川 (1990)¹⁰⁾ は、この有用性を報告している。歯周炎惹起下での環境を考えた場合、口腔内部の装置がこれまでの他の電気刺激法よりも小型で患者の負担も少なく、通電時間・電流値・電圧値をモニタリングできるこの CCEF 法は、口腔内に応用するには最適であろうと考える。

一方、目的とする骨組織以外の細胞や組織に対する電気刺激に関しては、各種電極を使用しての直流微小電流をラット骨髄炎部に応用し、電気刺激の細菌増殖抑制効果³²⁾が報告されており、骨内感染症への有効性³³⁾も報告されている。したがって、本実験もこれらの電気刺激の範囲内にあり、歯周炎惹起下であっても、本装置により静菌・抗菌作用も期待できると考えられる。実際、本実験においても、実験側・コントロール側ともに感染に伴う重篤な炎症は認められなかった。これは、吸収性膜による GTR 法を行った後、術後の治療期間として、化学的プラークコントロールを行う期間を 8 週間設定したこともあわせて、適度な電気刺激として作用したものと考える。

III. “歯周組織再生の場”の確保の重要性について

本実験において、電場刺激をより有効に作用させるために、電場刺激に先だって歯周組織再生のための場を確保した。この場を確保するという考え方は、唐木ら (1984)¹¹⁾ が歯肉弁に由来する軟組織が歯槽骨再生の障害要因ではないかと考えて、歯肉剥離搔爬手術時に gold mesh を用いて歯肉弁を骨面からもち上げ、歯周組織再生の場を確保しその部位に血餅を保持することの重要性を強調し、歯槽骨再生を促進するためには周囲軟組織の排除すなわち歯周組織再生の場を確保し、そこに血餅を保持する必要性を述べたことに始まる。久保田ら (1987)¹²⁾ はこの考えに基づいて人工的骨充填材 (Tricalcium phosphate) を骨欠損部に填塞し歯周組織再生の場を確保し、直流電気刺激を行うことにより仮骨形成の増加を認めたものの吸収性骨充填材での場の確保、すなわち骨充填材がどのように作用したかを明らかにすることはできなかった。

唐木らの考え方は、臨床的に新付着獲得法として報告されている GTR 法の現在における考え方と全く一致している。初期の GTR 法が、歯根膜由来細胞のみを選択して歯周組織の再生を促すといったものであった^{1,15)} のに対し、現在における GTR 法は、メンブレン使用により、上皮の進行阻止と歯周組織再生のためのスペースを確保するテクニックとしての重要性^{16-18,34)}が注目されて

いる。

GTR 法が生み出された根拠となっているが、Melcher³⁵⁾ は、歯周外科処置後の歯根面に付着する細胞の種類によりその治癒形式が決定されると述べている。すなわち、上皮細胞、骨由来細胞、歯肉結合組織由来細胞が歯根面へ到達した場合は、長い接合上皮形成・根吸収やアンキローシスが起これ、歯根膜由来細胞により結合組織性の付着が得られると報告している。

その後、1980 年代初期に、新付着形成時に歯周組織内のそれぞれの組織が果たす役割を評価する目的で一連の研究³⁶⁻³⁹⁾が行われた。これらの実験結果より、歯肉結合組織や上皮組織を排除し、歯根膜細胞の移動を可能にするようなメンブレンを置くことにより、新付着が達成されうるという GTR 法が確立された。これを受けて、Nyman ら¹⁾は、Millipore filter を用いて、上皮細胞、歯肉結合組織由来細胞の根面への到達を阻止し、歯根膜由来細胞の歯冠側方向への増殖可能なスペースを造りだし、新付着の獲得を報告した。しかし、この方法は新付着を獲得することは可能としたものの、骨の形成に関しては高いレベルでの再生を誘導する方法であるとはいえないようである。特に、最近、歯周組織の再生には“歯根膜細胞の選択的誘導”というより、“歯周組織再生のための場の確保および欠損部における血餅の保持”の重要性が強調されている⁴⁰⁾。本実験において、電気刺激を行う前に刺激側・コントロール側に吸収性膜を使用して GTR 法を行っている。実験結果 (表 1) から過去の実験^{19, 20)}のコントロール側と比較すると、本実験の両側では高い程度で新付着形成が認められる。つまり新付着形成に関しては本実験において GTR 法はその効果をあげているといえる。

一方、本研究において、GTR 法による場の確保が不成功に終わった症例が、刺激側で見られた (図 11 A, 図 12 A)。これは歯肉の退縮が認められ、分岐部内に軟組織特に上皮組織が侵入し歯周組織再生の場を確保し得なかったといえる。特に、この 2 例では分岐部頂から辺縁歯肉までの距離が刺激側において有意に大きくなっていた。同時に、GTR 法が失敗するということは、新付着獲得の失敗ということがいえる。また、新生セメント質の形成の割合においてもコントロール側において有意に大きな値を示している。以上の所見は、GTR 法が臨床的に新付着獲得可能な方法であるとの報告と一致している。同時に歯周病罹患部位において完全な歯周組織の再生を考えた場合、新付着獲得のためには GTR 法は有効な方法ということがいえる。

一壁性の骨欠損を有する実験的歯周炎惹起部位へ電場刺激 (CCEF 法) のみを応用した林川 (1990)¹⁰⁾の研究で、セメント質再生の割合を比較すると本実験では刺激側で 49.7-99.1% と高い値を示している。すなわち新付着形成に関してはより有利な条件であったのではないかと考えられる。仮骨頂縁回復の割合を比較しても、本実験では 45.6-97.2% (平均 65.7%) とかなり高い値を示している。したがって本研究において GTR 法は、新付着のみではなく、電場刺激による骨形成に有利な環境を造りそれを維持させることができたものと考ええる。

また本実験で場の確保をより確実にすること、膜を歯牙に強固に保持し上皮の進行を抑えることを目的として、ガム状ポリ乳酸¹³⁾を使用した。効果に関しては、同じタイプの欠損に吸収性膜のみを使用した著者らの実験^{19, 20)}と比較すると、分岐部内への上皮の侵入すなわち、分岐部円蓋最歯冠側部と辺縁歯肉までの距離を見ると、ガム状ポリ乳酸を使用したものは平均距離は 0.21 ± 0.23 mm でかなりのレベルで軟組織の侵入を抑えることが示されるので、メンブレンテクニックにおける補助的なテクニックとして、有効な方法であるといえる。

IV. 骨欠損形態と歯周組織再生

本実験は、最も歯周組織が再生しにくい環境である分岐部の class III の骨欠損を有した歯周炎惹起部位に対する歯周組織再生能を比較している。

臨床的に、class III の根分岐部病変を治療したものととしては、Pontoriero ら (1987)¹⁶⁾ が、下顎大臼歯における class II および class III の根分岐部病変の歯を左右対称の両側に有する患者 37 人に、実験群として GTR 法を反対側にはフラップ手術のみを行い比較検討した。class II を治療した結果は、実験群 (GTR 群) は 21 部位中 14 部位が完全に閉鎖し、残りの 7 部位に関しても部分的に閉鎖した。対照群では 21 部位中 2 部位で完全閉鎖、19 部位で部分的な閉鎖であった。class III を治療した結果は、16 部位中 4 部位で完全に閉鎖したが、3 部位では閉鎖が生じなかった。対照群では、完全に閉鎖した部位は認められていない。また、Becker ら (1988)¹⁷⁾ が比較的大きい骨欠損部位に (分岐部中央部から歯槽骨頂部までの距離が平均 6.5 mm) GTR 法を行っている。その報告によると、11 症例で歯槽骨頂の回復が平均で 0.7 mm 認められたが、特に歯槽骨に関して完全な再生は得られなかったと結論づけている。同時に行った class II の分岐部病変へ GTR 法を応用した結果は、臨床的にはかなりの改善が認められ、6 例で平均 0.7 mm の歯槽骨頂の回復を認めたが、一律的な結果にはならな

かったと述べている。いずれにしても両実験とも、class II に比べ class III の根分岐部病変では、成功率がかなり低いことが報告されている。また、Quintero ら (1982)⁴¹⁾ は、凍結脱灰骨移植を行った症例を検討して、骨再生の度合いは、欠損部の形態特に回りを囲む骨壁の数に大きく影響を受けると報告している。また、凍結脱灰骨移植と GTR 法を併用した実験では、class II の分岐部病変は水平的改善が全ての症例に認められたが、class III では骨の改善が余り認められなかったと報告している³⁾。

class III の根分岐部病変部位における再生のためには、分化能を有する細胞を豊富に含む血餅を分岐部頂部に近い部位、つまり欠損の歯冠側部において確実に保持する必要がある、そのために GTR 法を応用している。しかしながら、class III の分岐部病変においては、その欠損形態から、分岐部頂部付近において血餅を保持することは非常に困難であるためこのような結果がでたと思われる。また、GTR 法の術式が困難で上皮の侵入を確実に抑えきれなかったことも原因であろう。

歯周組織再生特に、歯槽骨の再生はその欠損形態、及びその大きさによるところが大きいという報告がある^{42, 43)}。小林 (1971)⁴²⁾ の行った実験によると、3 壁性の骨欠損部位では術後 4 週で骨削除部位はほとんど新生骨で置き換えられ、2 壁性骨欠損の場合術後 4 週以降骨新生は著明に認められ 8 週後には骨頂部は骨断端よりも歯冠側に位置し、また水平性の骨欠損例では術後 6 週以降骨の新生添加により骨頂部が削除面よりやや歯冠側に位置していると述べている。また、骨欠損部の外科的治療に関して、Yokota ら (1988)⁴³⁾ はイヌの歯根面に達する種々の大きさの実験的骨欠損を作製し、その治療過程を調べた。2 × 2 mm は常に完全な再生が認められたが、4 × 4 mm から完全な再生はみられなくなり、6 × 6 mm では再生は望めないことを示した。閉鎖された環境下での実験において、骨の再生は軟組織により影響されていること、骨による再生能に限界のあることが示唆される。

本研究のような class III の分岐部病変といった欠損形態で、特に骨欠損量の多い場合、歯周組織再生に関しては非常に困難な条件であるといえる。本実験では、刺激側・コントロール側ともに吸収性膜 (PLGA) による GTR 法を行っているにもかかわらず、軟組織の侵入・新付着獲得にはある程度のばらつきが認められた。これは、イヌによる個体差の影響も考えられるが、class III の分岐部病変という歯周組織再生にとって困難な形態で

あることを反映していると思われる。また、吸収性膜による GTR 法のみを応用したコントロール側において、新付着はかなり高いレベルで獲得できているにもかかわらず、この実験結果においても骨の再生に関しては完全に再生されず何らかの骨誘導法が必要といわざるを得ない。

V. 電気刺激の作用機序について

電気刺激の作用機序に関しては、現在のところ組織内の局所環境を変化させる間接作用と細胞への直接作用が考えられている⁴⁴⁾。間接作用としては、局所 pH の上昇、酸素分圧の低下、血流の増加、PGE₂ を介する変化といった微小環境を変化させて骨形成に働くものや、c-AMP、やカルシウムイオン、IGF-II などの局所成長因子が電気刺激の伝達因子となっていると考えられる。また、電気刺激の細胞への直接作用としては、骨芽細胞への分化・増殖を ALP の活性を測定して観察した報告によると、電気刺激によってその活性は増加し、中止すると活性は低下したことが報告されている⁴⁵⁾。

電気刺激の作用は、条件によっていくつかの方向から進み、それらの作用が重なりあって骨形成へと向かうと思われる。つまり、細胞の種類、密度、刺激条件によって伝達因子及び細胞の分化機能発現への作用が異なる可能性が考えられている。しかし、現在のところこの作用機序について全てが明らかにされているわけではない。

一方、本研究で使用した電気刺激法である CCEF 法の作用機序として、Star ら (1984)⁴⁶⁾ は、生後 2-8 週のウシ骨端成長軟骨から単離した細胞に CCEF 法を応用し、細胞内 DNA 産生の促進及び細胞増殖の活性化を認めた。また、電場刺激による骨細胞の増殖は、有糸分裂活性に依存し、その有糸分裂活性には、IGF-II が関与していることが報告されている^{47, 48)}。

また、ラット頭蓋冠細胞に CCEF 法を応用し、通電開始後 30 分以内に細胞内 c-AMP の上昇、及び通電中止後 30 分以内に PTH への非特異的な感度の低下を認め、CCEF 法は PTH 依存性骨吸収を抑制する効果を有するという報告もある⁴⁹⁾。

CCEF 法の作用機序としては、直接細胞に働きその分化・増殖を活性化する方向と間接的に周囲環境 (ホルモン、c-nucleotide) を骨形成に有利にしていく方向が考えられる。おそらくこれらが重なりあって骨形成を促進するのであろう。本実験において、外科手術後 8 週という創傷の治癒が安定する時期から電気刺激を行ったにもかかわらず歯槽骨形成がコントロール側に比べ促進されたことは、直接的作用が大いに働いた可能性が考えられ

いる。

GTR 法が生み出された根拠となっているが、Melcher³⁵⁾ は、歯周外科処置後の歯根面に付着する細胞の種類によりその治癒形式が決定されると述べている。すなわち、上皮細胞、骨由来細胞、歯肉結合組織由来細胞が歯根面へ到達した場合は、長い接合上皮形成・根吸収やアンキロシスが起こり、歯根膜由来細胞により結合組織性の付着が得られると報告している。

その後、1980 年代初期に、新付着形成時に歯周組織内のそれぞれの組織が果たす役割を評価する目的で一連の研究³⁶⁻³⁹⁾が行われた。これらの実験結果より、歯肉結合組織や上皮組織を排除し、歯根膜細胞の移動を可能にするようなメンブレンを置くことにより、新付着が達成されうるという GTR 法が確立された。これを受けて、Nyman ら¹⁾は、Millipore filter を用いて、上皮細胞、歯肉結合組織由来細胞の根面への到達を阻止し、歯根膜由来細胞の歯冠側方向への増殖可能なスペースを造りだし、新付着の獲得を報告した。しかし、この方法は新付着を獲得することは可能としたものの、骨の形成に関しては高いレベルでの再生を誘導する方法であるとはいえないようである。特に、最近、歯周組織の再生には“歯根膜細胞の選択的誘導”というより、“歯周組織再生のための場の確保および欠損部における血餅の保持”の重要性が強調されている⁴⁰⁾。本実験において、電気刺激を行う前に刺激側・コントロール側に吸収性膜を使用して GTR 法を行っている。実験結果 (表 1) から過去の実験^{19,20)}のコントロール側と比較すると、本実験の両側では高い程度で新付着形成が認められる。つまり新付着形成に関しては本実験において GTR 法はその効果をあげているといえる。

一方、本研究において、GTR 法による場の確保が不成功に終わった症例が、刺激側で見られた (図 11 A, 図 12 A)。これは歯肉の退縮が認められ、分岐部内に軟組織特に上皮組織が侵入し歯周組織再生の場を確保し得なかったといえる。特に、この 2 例では分岐部頂から辺縁歯肉までの距離が刺激側において有意に大きくなっていた。同時に、GTR 法が失敗するということは、新付着獲得の失敗ということがいえる。また、新生セメント質の形成の割合においてもコントロール側において有意に大きな値を示している。以上の所見は、GTR 法が臨床的に新付着獲得可能な方法であるとの報告と一致している。同時に歯周病罹患部位において完全な歯周組織の再生を考えた場合、新付着獲得のためには GTR 法は有効な方法ということがいえる。

一壁性の骨欠損を有する実験的歯周炎惹起部位へ電場刺激 (CCEF 法) のみを応用した林川 (1990)¹⁰⁾ の研究で、セメント質再生の割合を比較すると本実験では刺激側で 49.7-99.1% と高い値を示している。すなわち新付着形成に関してはより有利な条件であったのではないかと考えられる。仮骨頂縁回復の割合を比較しても、本実験では 45.6-97.2% (平均 65.7%) とかなり高い値を示している。したがって本研究において GTR 法は、新付着のみではなく、電場刺激による骨形成に有利な環境を造りそれを維持させることができたものと考ええる。

また本実験で場の確保をより確実にすること、膜を歯牙に強固に保持し上皮の進行を抑えることを目的として、ガム状ポリ乳酸¹³⁾を使用した。効果に関しては、同じタイプの欠損に吸収性膜のみを使用した著者らの実験^{19,20)}と比較すると、分岐部内への上皮の侵入すなわち、分岐部円蓋最歯冠側部と辺縁歯肉までの距離を見ると、ガム状ポリ乳酸を使用したものは平均距離は 0.21 ± 0.23 mm でかなりのレベルで軟組織の侵入を抑えることが示されるので、メンブレンテクニックにおける補助的なテクニックとして、有効な方法であるといえる。

IV. 骨欠損形態と歯周組織再生

本実験は、最も歯周組織が再生しにくい環境である分岐部の class III の骨欠損を有した歯周炎惹起部位に対する歯周組織再生能を比較している。

臨床的に、class III の根分岐部病変を治療したものととしては、Pontoriero ら (1987)¹⁶⁾ が、下顎大臼歯における class II および class III の根分岐部病変の歯を左右対称の両側に有する患者 37 人に、実験群として GTR 法を反対側にはフラップ手術のみを行い比較検討した。class II を治療した結果は、実験群 (GTR 群) は 21 部位中 14 部位が完全に閉鎖し、残りの 7 部位に関しても部分的に閉鎖した。対照群では 21 部位中 2 部位で完全閉鎖、19 部位で部分的な閉鎖であった。class III を治療した結果は、16 部位中 4 部位で完全に閉鎖したが、3 部位では閉鎖が生じなかった。対照群では、完全に閉鎖した部位は認められていない。また、Becker ら (1988)¹⁷⁾ が比較的大きい骨欠損部位に (分岐部中央部から歯槽骨頂部までの距離が平均 6.5 mm) GTR 法を行っている。その報告によると、11 症例で歯槽骨頂の回復が平均で 0.7 mm 認められたが、特に歯槽骨に関して完全な再生は得られなかったと結論づけている。同時に行った class II の分岐部病変へ GTR 法を応用した結果は、臨床的にはかなりの改善が認められ、6 例で平均 0.7 mm の歯槽骨頂の回復を認めたが、一律的な結果にはならな

かったと述べている。いずれにしても両実験とも、class II に比べ class III の根分岐部病変では、成功率がかなり低いことが報告されている。また、Quintero ら (1982)⁴¹⁾ は、凍結脱灰骨移植を行った症例を検討して、骨再生の度合いは、欠損部の形態特に回りを囲む骨壁の数に大きく影響を受けると報告している。また、凍結脱灰骨移植と GTR 法を併用した実験では、class II の分岐部病変は水平的改善が全ての症例に認められたが、class III では骨の改善が余り認められなかったと報告している³⁾。

class III の根分岐部病変部位における再生のためには、分化能を有する細胞を豊富に含む血餅を分岐部頂部に近い部位、つまり欠損の歯冠側部において確実に保持する必要がある、そのために GTR 法を応用している。しかしながら、class III の分岐部病変においては、その欠損形態から、分岐部頂部付近において血餅を保持することは非常に困難であるためこのような結果がでたと思われる。また、GTR 法の術式が困難で上皮の侵入を確実に抑えきれなかったことも原因であろう。

歯周組織再生特に、歯槽骨の再生はその欠損形態、及びその大きさによるところが大きいという報告がある^{42, 43)}。小林 (1971)⁴²⁾ の行った実験によると、3 壁性の骨欠損部位では術後 4 週で骨削除部位はほとんど新生骨で置き換えられ、2 壁性骨欠損の場合術後 4 週以降骨新生は著明に認められ 8 週後には骨頂部は骨断端よりも歯冠側に位置し、また水平性の骨欠損例では術後 6 週以降骨の新生添加により骨頂部が削除面よりやや歯冠側に位置していると述べている。また、骨欠損部の外科的治療に関して、Yokota ら (1988)⁴³⁾ はイヌの歯根面に達する種々の大きさの実験的骨欠損を作製し、その治療過程を調べた。2 × 2 mm は常に完全な再生が認められたが、4 × 4 mm から完全な再生はみられなくなり、6 × 6 mm では再生は望めないことを示した。閉鎖された環境下での実験において、骨の再生は軟組織により影響されていること、骨による再生能に限界のあることが示唆される。

本研究のような class III の分岐部病変といった欠損形態で、特に骨欠損量の多い場合、歯周組織再生に関しては非常に困難な条件であるといえる。本実験では、刺激側・コントロール側ともに吸収性膜 (PLGA) による GTR 法を行っているにもかかわらず、軟組織の侵入・新付着獲得にはある程度のばらつきが認められた。これは、イヌによる個体差の影響も考えられるが、class III の分岐部病変という歯周組織再生にとって困難な形態で

あることを反映していると思われる。また、吸収性膜による GTR 法のみを応用したコントロール側において、新付着はかなり高いレベルで獲得できているにもかかわらず、この実験結果においても骨の再生に関しては完全に再生されず何らかの骨誘導法が必要といわざるを得ない。

V. 電気刺激の作用機序について

電気刺激の作用機序に関しては、現在のところ組織内の局所環境を変化させる間接作用と細胞への直接作用が考えられている⁴⁴⁾。間接作用としては、局所 pH の上昇、酸素分圧の低下、血流の増加、PGE₂ を介する変化といった微小環境を変化させて骨形成に働くものや、c-AMP、やカルシウムイオン、IGF-II などの局所成長因子が電気刺激の伝達因子となっていると考えられる。また、電気刺激の細胞への直接作用としては、骨芽細胞への分化・増殖を ALP の活性を測定して観察した報告によると、電気刺激によってその活性は増加し、中止すると活性は低下したことが報告されている⁴⁵⁾。

電気刺激の作用は、条件によっていくつかの方向から進み、それらの作用が重なりあって骨形成へと向かうと思われる。つまり、細胞の種類、密度、刺激条件によって伝達因子及び細胞の分化機能発現への作用が異なる可能性が考えられている。しかし、現在のところこの作用機序について全てが明らかにされているわけではない。

一方、本研究で使用した電気刺激法である CCEF 法の作用機序として、Star ら (1984)⁴⁶⁾ は、生後 2-8 週のウシ骨端成長軟骨から単離した細胞に CCEF 法を応用し、細胞内 DNA 産生の促進及び細胞増殖の活性化を認めた。また、電場刺激による骨細胞の増殖は、有糸分裂活性に依存し、その有糸分裂活性には、IGF-II が関与していることが報告されている^{47, 48)}。

また、ラット頭蓋冠細胞に CCEF 法を応用し、通電開始後 30 分以内に細胞内 c-AMP の上昇、及び通電中止後 30 分以内に PTH への非特異的な感度の低下を認め、CCEF 法は PTH 依存性骨吸収を抑制する効果を有するという報告もある⁴⁹⁾。

CCEF 法の作用機序としては、直接細胞に働きその分化・増殖を活性化する方向と間接的に周囲環境 (ホルモン、c-nucleotide) を骨形成に有利にしていく方向が考えられる。おそらくこれらが重なりあって骨形成を促進するのであろう。本実験において、外科手術後 8 週という創傷の治癒が安定する時期から電気刺激を行ったにもかかわらず歯槽骨形成がコントロール側に比べ促進されたことは、直接的作用が大いに働いた可能性が考えられ

る。しかしながら詳細な作用機序およびその流れは今後の研究課題である。

VI. 電場刺激による歯周組織再生

歯槽骨再生の非常に困難な環境と思われる classⅢの分岐部病変で、特に歯槽骨の再生を意図して電気刺激法を応用して歯周組織再生に取り組んだ。

前述した場の確保が不成功に終わった例 (図 11, 12) の組織所見によると、分岐部内に上皮の侵入が認められ、分岐部頂部と上皮間の距離も大きい。しかしながら、刺激側では、上皮の直下にまで骨の再生が認められていたのに比べ、コントロール側では (図 12 B) 上皮下に幅の広い結合組織層が存在し、その下に骨が再生していた。すなわち、GTR 法応用後の肉芽組織の層に電気刺激が作用しそこに存在する未分化間葉細胞を骨芽細胞に誘導したか、もしくは骨形成の速度を促進させたと考えられる。また、上皮の侵入が認められず場の確保が成功した例 (図 14, 15) でも、刺激側においてほぼ完全な歯槽骨の再生が認められるが、コントロール側では、セメント質形成は認められるものの歯槽骨の形成は明らかに低いレベルにあった。これは、GTR 法のみでは、十分な歯槽骨の形成を促進するものではなく何らかの骨誘導法が必要であるとの見解を支持している。歯槽骨形成の促進は、メンブレン使用により場が確保され新付着が成功し、さらに電場刺激が作用したことによる相乗効果と考えられる。

さらに、セメント質形成に対する電気刺激の影響に関しては、過去の電気刺激を歯周組織に応用した研究ではセメント質形成の促進が報告されている^{9, 10, 50)}が、今回の実験においては、電場刺激そのものの影響よりも、GTR 法の成否がその鍵を握っていたといえる。

場の確保が成功した例 (図 11 B, 14 A・B, 15 A・B)、つまり分岐部内へ上皮の侵入がほとんど認められなかったものの組織所見では、通電の有無に関わらずセメント質形成が旺盛であり、分岐部内を全て新生セメント質が覆っているものも認められた。つまり今回の実験では、セメント質形成に関して電気刺激の影響よりも GTR 法の成否が大きく影響を与えたことを示唆している。

また場の確保が不成功に終わった例 (図 11 A, 12 A・B) では、セメント質の形成もレベルの低いものになっている。つまり上皮の侵入が認められるものは、歯周組織が再生するための場に上皮由来の細胞が増殖し、セメント質および歯槽骨形成の場を奪い、その結果セメント質・歯槽骨が形成されるべき場がなくなったということ

であろう。

今回の実験結果から著者は、歯周組織再生が獲得しにくいとされている欠損形態でも、しっかりとした場の確保と上皮の排除がなされていれば、新付着の獲得は十分に可能であると考ええる。

電気刺激法 (CCEF) による歯槽骨再生及び、より完全な歯周組織の再生のためには、場の確保が成功し新付着が獲得されることが必要であることが示された。

今回の実験で、CCEF 法を応用すれば、確実な場の確保を条件として新付着は高いレベルで獲得でき歯槽骨の再生も促進することが示された。

今後、新付着の獲得と吸収性膜の生体内吸収との間の適正な時期を決定し、さらに、電場刺激を加える時期を見つかることで完全な歯周組織の再生は実現可能であると思われる。

結 論

イヌ下顎第 3 前臼歯分岐部に classⅢ の分岐部病変となる実験的歯周炎を惹起させ、歯周組織再生のための場を確保するために生体吸収性膜を応用しての GTR 法を行い、その後、刺激側には CCEF 法を用いて電場刺激を行い、組織学的に観察・計測を行い以下の結論を得た。

1. 分岐部における歯槽骨頂縁回復の割合は、刺激側が平均 $65.68 \pm 17.84\%$ 、コントロール側が平均 $50.39 \pm 14.24\%$ であり、全例ともに刺激側の方が高値を示し、そのうち 4 例 (2 例が $p < 0.01$, 2 例が $p < 0.05$) で統計的に有意差を認めた。

2. 分岐部における歯槽骨再生の割合は、刺激側が平均 $46.53 \pm 20.21\%$ で、コントロール側が平均 $26.75 \pm 10.61\%$ であった。全例ともに刺激側で高値を示し、そのうち 5 例 (5 例とも $p < 0.01$) で統計的に有意差を認めた。

3. 分岐部露出歯根面におけるセメント質形成の割合は、刺激側が平均で $71.55 \pm 20.23\%$ で、コントロール側が平均で $77.71 \pm 15.17\%$ であった。また、分岐部頂部から歯肉頂部までの距離は、刺激側が平均で 0.36 ± 0.39 mm、コントロール側が平均で 0.21 ± 0.23 mm であった。両パラメーターとも一定の傾向は認められなかった。

4. 上皮が侵入した部位においても、電気刺激を行った刺激側では、歯槽骨の再生が旺盛であった。

5. classⅢ の分岐部病変の治療法として、吸収性膜を応用しての GTR 法と CCEF 法を用いた電場刺激法の

併用療法が効果的であることが示唆された。

謝 辞

稿を終わるにあたり、御親切なる御指導および御校閲を賜りました歯科保存学第 2 講座横田誠教授に深謝いたします。また、研究に際して、御教示を賜りました口腔病理学講座福山宏教授に深謝いたします。また本研究に対して数多くの御教示、御指導を賜った久保田浩三博士、日高理智博士、林川貴志博士に心より謝意を捧げます。また、本研究の機会を与えていただいた故山本博武前教授に感謝の意を表します。

あわせて、本研究に御協力頂きました歯科保存学第 2 講座の皆様にも心より感謝します。最後に、本実験の遂行にあたって多大なるご協力を頂きました株式会社多木化学に心から感謝いたします。

なお、本研究の一部は、平成 4 年度九州歯科大学後援会研究援助費によって行われ、本論文の要旨は、平成 3 年 9 月 19 日、第 34 回日本歯周病学会秋期総会（千葉）において発表した。

引用文献

- 1) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 9: 290-296, 1982.
- 2) Pontoriero, R., Lindhe, J., Nyman, S., Karring, T., Rosenberg, E. and Sanavi, F.: Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. *J. Clin. Periodontol.* 15: 247-254, 1988.
- 3) Anderegg, C. R., Martin, S. J., Gray, J. L., Mellonig, J. T. and Gher, M. E.: Clinical evaluation of the use of decalcified freeze-dried bone allograft with guided tissue regeneration in the treatment of molar furcation invasions. *J. Periodontol.* 62: 264-268, 1991.
- 4) Bassett, C. A. L., Mitchell, S. N. and Gaston, S. T.: Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J. Bone Joint Surg.* 63-A: 511-523, 1981.
- 5) Brighton, C. T. and Pollack, S. R.: Treatment of recalcitrant non-union with a capacitively coupled electrical field. A preliminary report. *J. Bone Joint Surg.* 67-A: 577-585, 1985.
- 6) 鈴木弘之: 微小電流による骨誘導に関する実験的研究. 九州歯会誌 29 (5): 399-416, 1976.
- 7) Jacobs, J. D. and Norton, L. A.: Electrical stimulation of osteogenesis in pathological osseous defects. *J. Periodontol.* 47: 311-319, 1976.
- 8) 唐木良一: 微小電流による下顎骨の皮質骨内改築・仮骨形成に関する実験的研究. 九州歯会誌 32 (5): 590-608, 1979.
- 9) 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 (1): 64-81, 1982.
- 10) 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 (1): 172-194, 1990.
- 11) 唐木良一, 久保田浩三, 日高理智, 山地誠治, 片岡良司, 山本博武: 歯肉弁の位置が歯槽骨形成に及ぼす影響. 日歯周誌 26 (3): 516-522, 1984.
- 12) 久保田浩三, 日高理智, 安元和雄, 林川貴志, 梅崎伸一, 唐木良一, 宗洋一郎, 山本博武: 微小電流刺激による歯槽骨形成の実験的研究 — 人工的骨欠損部への Tricalcium phosphate の応用 —. 九州歯会誌 41 (5): 985-993, 1987.
- 13) 森本秀, 久保田浩三, 吉村直規, 岩川 忠, 森田初穂, 田代芳之, 日高理智, 横田誠, 岡田隆雄: 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 (第 4 報) Gum Seal Method の応用. 日歯周誌 34 (春期特別号): 53, 1992.
- 14) Brighton, C. T., Pollack, S. R. and Windsor, R. E.: Acceleration of fracture healing in the rabbit fibula by a capacitively coupled electric field. *BRAGS.* 1: 36, 1981.
- 15) Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J.: New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.* 11: 494-503, 1984.
- 16) Pontoriero, R., Nyman, S., Lindhe, J., Rosenberg, E. and Sanavi, F.: Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J. Clin. Periodontol.* 14: 618-620, 1987.
- 17) Becker, W., Becker, B., Berg, L., Prichard, J., Caffesse, R. and Rosenberg, E.: New attachment after treatment with root isolation procedures. Report for treated class III and class II furcations and vertical osseous defects. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* 8: 9-23, 1988.
- 18) 久保田浩三, 越智玲子, 柘植優三, 内藤 徹, 林川貴志, 日高理智, 宗洋一郎, 山本博武: 生体内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 (3): 859-870, 1989.
- 19) 吉村直規, 久保田浩三, 林川貴志, 森本 秀, 日高理智, 横田 誠, 岡田隆雄: 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 — 根分岐部欠損への応用 —. 日歯周誌 32 (秋期特別号): 45, 1990.
- 20) 久保田浩三, 吉村直規, 森本 秀, 森田初穂, 田代芳之, 日高理智, 横田 誠, 岡田隆雄: 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 (第 3 報) Porous Membrane の応用. 日歯周誌 33 (秋期特別号): 65, 1991.
- 21) 吉村直規, 久保田浩三, 森本 秀, 岩川 忠, 田原準郎,

- 日高理智, 横田 誠, 岡田隆雄: 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 (秋期特別号): 64, 1991.
- 22) Ben-Yehuda, A., Machtei, E. E. and Goultschin, J.: The regeneration potential of the periodontium: A review. *J. West. Soc. Periodont./Periodont. Abstr.* 37: 5-11, 1989.
 - 23) Minabe, M.: A critical review of the biologic rationale for guided tissue regeneration. *J. Periodontol.* 62: 171-179, 1991.
 - 24) Pitaru, S., Tal, H., Soldering, M., Azar-Avidan, O. and Noff, M.: Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. *J. Periodont. Res.* 22: 331-333, 1987.
 - 25) Magnusson, I., Batich, C. and Collins, R.: New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J. Periodontol.* 59: 1-6, 1988.
 - 26) Friedenber, Z. B., Harlow, M. C. and Brighton, C. T.: Healing of nonunion of the medial malleolus by means of direct current: A case report. *J. Trauma.* 11: 883-885, 1971.
 - 27) Lavine, L. S., Lustrin, I., Shamos, M. H., Rinaldi, R. A. and Liboff, A. R.: Electric Enhancement of Bone Healing. *Science* 175: 1118-1121, 1972.
 - 28) 井上四郎: 電気刺激法の種類と適応. 電気刺激による骨・軟部組織修復の促進 —その基礎と応用— (生体電気刺激研究会編). 文光堂, 東京, 1993, 30-36.
 - 29) van der Kuij, P., Vingerling, P. A., de Groot, K. and Sillevs Smitt, P. A. E.: Electromagnetic reduction of resorption rate of extraction wounds. In: *Electrical Properties of Bone and Cartilage* (eds. by Brighton, C. T. et al.). Grune & Stratton, New York, 1979, 333-340.
 - 30) Vingerling, P. A., van der Kuij, P., de Groot, K. and Sillevs Smitt, P. A. E.: Non-invasive treatment of alveolar wounds. In: *Electrical Properties of Bone and Cartilage* (eds. by Brighton, C. T. et al.). Grune & Stratton, New York, 1979, 341-346.
 - 31) 井上四郎, 大橋俊郎, 梶川 究, 茨木和博, 多田道彦, 荒井毅, 千葉正敏, 太田万郷, 大東美生: 直流電気刺激法と CCEF 法の適応について. 生体電気刺激研究会誌 3: 73-77, 1989.
 - 32) 上園春仁, 酒匂 崇, 小田 鮎: 微弱電流の細菌に及ぼす効果について. 生体電気刺激研究会誌 2: 19-21, 1988.
 - 33) Spadaro, J. A.: Bone formation and bacterial inhibition with silver and other electrodes. *Reconstr. Surg. Traum.* 19: 40-50, 1985.
 - 34) Magnusson, I., Stenberg, W. V., Batich, C. and Egelberg, J.: Connective tissue repair in circumferential periodontal defects in dogs following use of a biodegradable membrane. *J. Clin. Periodontol.* 17: 243-248, 1990.
 - 35) Melcher, A. H.: On the repair potential of periodontal tissue. *J. Periodontol.* 47: 256-260, 1976.
 - 36) Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J.: Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J. Clin. Periodontol.* 7: 96-105, 1980.
 - 37) Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Planten, S.: Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.* 7: 394-401, 1980.
 - 38) Nyman, S., Gottolow, J., Karring, T. and Lindhe, J.: The regenerative potential of periodontal ligament. *J. Clin. Periodontol.* 9: 257-265, 1982.
 - 39) Isidor, F., Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J.: New attachment-reattachment following reconstructive periodontal surgery. *J. Clin. Periodontol.* 12: 728-735, 1985.
 - 40) Wikesjö, U. M. E. and Nilvéus, R.: Periodontal repair in dogs: Effect of wound stabilization on healing. *J. Periodontol.* 61: 719-724, 1990.
 - 41) Quintero, G., Mellonig, J. T., Gambill, V. M. and Pelleu, G. B.: A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. *J. Periodontol.* 53: 726-730, 1982.
 - 42) 小林英和: サルの歯槽骨にいろいろな欠損を与えた場合の修復過程について. 口病誌 38: 404-423, 1971.
 - 43) Yokota, M., Kuroki, K., Uchida, H. and Sueda, T.: Healing responses of different sized surgical denudations. *Recent advances in clinical periodontology* (eds. by J. Ishikawa. et al.). EXCERPTA MEDICA, Amsterdam-New York-Oxford, 1988, 633-636.
 - 44) 遠藤直人, 高橋栄明: 骨と電気刺激. *THE BONE* 7: 49-54, 1993.
 - 45) 松永俊二, 酒匂崇, 吉国長利, 井尻幸成, Msutafa Amir Ali: 微弱直流電気刺激による髓内仮骨—電気仮骨部アルカリフォスファターゼ活性値の経時的変化について—. 生体電気刺激研究会誌 2: 67-71, 1988.
 - 46) Star, A. M., Brighton, C. T. and Armstrong, P. F.: Increased DNA synthesis in bovine epiphyseal plate chondrocytes in response to a capacitively coupled electric field. *4th Annual BRAGS.*: 13, 1984.
 - 47) Fitzsimmons, R. J., Farley, J. R., Adey, W. R. and Baylink, D. J.: Frequency dependence of increased cell proliferation, in vitro, in exposures to a low-amplitude, low-frequency electric field: Evidence for dependence on increased mitogen activity released into culture medium. *J. Cell. Physiol.* 139: 586-591, 1989.
 - 48) Fitzsimmons, R. J., Farley, J. R., Adey, W. R. and Baylink, D. J.: Low-amplitude, low-frequency electric field-stimulated bone cell proliferation may in

- part be mediated by increased IGF-II release. J. Cell. Physiol. 150 : 84 - 89, 1992.
- 49) Brighton, C. T. and McCluskey, W. P. : The early response of bone cells in culture to a capacitively coupled electric field. 3rd Annual BRAGS. : 10, 1983.
- 50) 唐木良一, 久保田浩三, 日高理智, 山地誠治, 山本博武 : 微小電流が骨欠損治癒時のセメント質形成に及ぼす影響についての実験的研究. 九州歯会誌 23 (4) : 598 - 609, 1981.