Guided Bone Regeneration (GBR) 法における 膜の撤去時期が骨形成に及ぼす影響

長 忍

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科補綴学第2専攻（指導：内田康也教授）

平成9年12月25日受理

Influence of Membrane-applying Period on Bone Formation in Guided Bone Regeneration (GBR) Technique.

Shinobu Cho

Second Department of Prosthetic Dentistry (Director: Prof. Yasunari Uchida)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Guided Bone Regeneration (GBR) is being used increasingly by dental practitioners to repair bony defects associated with teeth. This procedure involves application of a membrane to prevent invasion of the defect by gingival epithelium so that bone eventually can grow into and fill the defect. The effects on GBR of the duration of application of membrane have not been determined.

In the present study, the artificial bone defects were formed on the mandibles of dogs and the polypropylene membranes, with the pore size $0.6\mu\text{m}$, were applied. All dogs were sacrificed 24 weeks after membrane application with the three different removal time of membrane, which were 8, 16 and 24 weeks after membrane application.

The histological observation was done to determine which one is the best for bone formation.

The results were as follows:

1. In the control groups, without applying the membranes, new bone tissue grew to form a hollow shape.

2. In the group in which the membranes were removed 8 weeks after application, new bone tissue grew discontinuously and also formed a hollow shape.

For the reason of the invasion of soft connective tissue, the surface contour of cortical bone did not recover even in the proliferative stage of new bone formation.

3. In the group in which the membranes were removed 16 weeks after application, new bone tissue did not grow to form a hollow shape. The tendency of recovering the surface contour of cortical bone was also observed but it was incomplete in the proliferative stage of new bone formation.

4. In the group in which the membranes were retained for 24 weeks, the surface contour of cortical bone almost recovered. Bone formation keep active and new bone tissue showed

on immature trabeculae even when the observing time was over.

5. It is clear that the replacement of periosteum was intercepted by GBR membrane and it effects the maturity of new bone. In 8 weeks-group I, 16 weeks-group I and 24 weeks-group, the new bone showed an immature form conversely, in the control group, the mature form. The maturity of bone depended upon the replacement time of periosteum obviously.

Key words: Guided Bone Regeneration / Bone formation / Membrane-applying period / Dog

緒 言

近年、歯科インプラント法において、より安全で予知性の高い成功をもたらすことを目的とした様々な方法が模索されている。その1つとして Guided Bone Regeneration (GBR) 法は骨の再生のための有効な手段として臨床に用いられている。従来、残存顎堤の幅が狭い症例や高さが不足した症例では、インプラントによる治療はほとんど不可能であった。しかし、GBR 法を用いることで、インプラントによる治療計画に変革をもたらした。

GBR 法の概念は、骨形成を期待する部位を物理的手段を用いて封鎖し、他の組織、特に軟組織が骨の形成を障害するのを防止すると同時に、骨の生成を誘導することである。すなわち、骨欠損が組織適合性と浸透通気性をもつ遮蔽膜により、骨再生のためのスペースを作り出すことで、競合する非骨性組織の侵入を防ぎ、周囲骨組織に由来する細胞群を増殖させ、骨組織を新生させることである¹⁾。その手法は、インプラントの一部が骨面より露出した場合や抜歯直後のインプラント埋入、インプラント埋入前にあらかじめ行う歯槽堤の増生などにも試みられている²⁻¹⁶⁾。

現在、GBR 法に最も多く用いられている遮蔽膜は expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) であるが、最近では分解性高分子材料も数多く用いられてきている。分解性高分子材料は生体吸収性を有し、二次手術による遮蔽膜の撤去の不要と、新生された骨組織を損傷する危険性を伴わない点で注目されており、ポリ乳酸膜¹⁷⁻¹⁹⁾、コラーゲン膜(脳硬膜)²⁰⁻²⁷⁾、酸化セルロース膜²⁸⁾などが用いられている。しかしながら、これら分解性高分子膜は分解する時期が一定でなく、また分解過程で機械的な強さを失い断片化されるため、骨形成に効果的な影響を与える遮蔽膜の留置期間を明確に選択することができない。また、分解産物の物理的な性質と量は局所の組織応答に明らかな影響を及ぼし骨吸収を誘導する²⁹⁾と

言われている。

GBR 法が成功するための重要な因子として、遮蔽膜の生体親和性、細胞遮断性、組織統合性、スペースメイキングなどを挙げることができる¹⁾。しかし、遮蔽膜の留置期間の長さについては临床上重要な因子であるにもかかわらず、従来明確に示された実験的研究はみあたらない。

そこで本実験では、実験期間を最長 24 週と設定し、イヌ下顎骨に形成した骨欠損に気孔径 $0.6\mu\text{m}$ のポリプロピレンフィルターを用いて、遮蔽膜の留置期間を 8, 16, 24 週と設定し、どれくらいの期間遮蔽膜を留置すれば骨形成が促進されるかと、膜撤去後骨膜を復位した場合の骨の成熟度の変化について比較検討することを目的とした。

材料並びに方法

I. 実験材料

GBR 用の遮蔽膜はポリプロピレンフィルター (Millipore) で、膜厚 $100.0\mu\text{m}$ 、気孔径 $0.6\mu\text{m}$ を使用した。

II. 実験動物

実験動物は体重 10~15 kg の健康な雑種成犬 5 頭を用いた。

III. 実験方法

実験 1 と実験 2 に分け実験を行った。実験 1 は 8 週まで遮蔽膜を留置したもの (8 週群 I)、16 週まで遮蔽膜を留置したもの (16 週群 I)、24 週まで遮蔽膜を留置したもの (24 週群) を設定し、遮蔽膜の留置期間が骨形成に及ぼす影響の観察を行った。また、実験 2 は 8 週で遮蔽膜を撤去し、8 週骨膜を被覆したもの (8 週群 II)、8 週で遮蔽膜を撤去し、16 週骨膜を被覆したもの (8 週群 III)、16 週で遮蔽膜を撤去し、8 週骨膜を被覆したもの (16 週群 II)、膜の被覆を行わなかったもの (対照群) を設定し、遮蔽膜を撤去した後の骨膜における影響の観察を行った。

実験に先立ち、キシラジン酸塩酸 (セラクター[®]、

写真1 イヌ下顎骨に骨欠損を形成した状態

Bayer), 硫酸アトロピン (タナベ) による鎮静後, ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®], 大日本製薬, 25 mg/kg) 静脈内投与による全身麻酔を施し, 下顎両側の第2～第4前臼歯および第1後臼歯を抜歯した。抜歯より約3カ月経過した時点で抜歯窩の治癒をレントゲン写真で確認後, 同様に全身麻酔を施し, 舌側粘膜に近遠心的に遮蔽膜被覆部を避けるような切開を加え, 粘

膜骨膜弁を剥離し骨面を露出させた。次に4℃滅菌生理食塩水の注水下でラウンドバーを用いて, 毎分約800回転で骨欠損を形成した。なお骨欠損の大きさは直径6.0 mm, 幅3.5 mm, 深さ4.0 mmの長円形とした(写真1)。

対照群について, 骨欠損形成後遮蔽膜を被覆せず, 欠損部のマーカーとしてチタンピンを舌側に1カ所用いた。ついで, 剥離翻転した粘膜骨膜弁を元に戻し縫合した。

8週群I, 16週群I, 24週群について, 骨欠損形成後遮蔽膜を用い被覆を行った。なお, 遮蔽膜の固定を確実にするため自家製チタンピンを頬舌側2カ所に用いた。ついで, 剥離翻転した粘膜骨膜弁を元に戻し縫合した。その後, それぞれ8, 16, 24週まで遮蔽膜を留置した。

8週群II, 8週群IIIについて, 骨欠損形成後遮蔽膜を用い被覆を行った。なお, 遮蔽膜の固定を確実にするため自家製チタンピンを頬舌側2カ所に用いた。ついで, 剥離翻転した粘膜骨膜弁を元に戻し縫合した。

その後, 8週目に同様に全身麻酔を施した後, 遮蔽膜を被覆した部位に切開線を加え粘膜骨膜弁を剥離し, 遮蔽膜と頬側のチタンピンを撤去した。その後粘膜骨膜弁

実験1

□ 膜被覆なし
■ 膜被覆あり

実験2

図1 ラベリング剤投与のtime table

Tc: オキシテトラサイクリン

Al: アリザリン コンプレクソン

Cal: カルセイン

を元に戻して縫合を行い、それぞれ8、16週の観察期間をもって終了した。

16週群Ⅱについて、骨欠損形成後遮蔽膜を用い被覆を行った。なお、遮蔽膜の固定を確実にするため自家製チタンピンを頬舌側2カ所に用いた。ついで、剥離翻転した粘膜骨膜弁を元に戻し縫合した。

その後、16週目に同様に全身麻酔を施した後、遮蔽膜を被覆した部位に切開線を加え粘膜骨膜弁を剥離し、遮蔽膜と頬側のチタンピンを撤去した。その後粘膜骨膜弁を元に戻して縫合を行い、8週の観察期間をもって終了した。

なお、各術後5日間は感染防止のために抗生物質セファリンナトリウム 20 mg/kg (セファトレキシル[®], ブリストル・マイヤーズ) を投与した。また、抜歯を含めた実験期間中は、実験部位に外力が加わらないように軟性飼料を与えた。

IV. 実験期間及びラベリング剤の投与方法

観察期間を通じて、骨の形成時期を時刻描記するためにオキシテトラサイクリン (Tc), アリザリン コンプレクソン (Al), カルセイン (Cal) の3種のラベリング剤を図1に示す要領で投与した。各々の投与量と蛍光色は以下に示す通りである。

オキシテトラサイクリン 25 mg/kg (黄色, ファイザー製薬)

アリザリン コンプレクソン 30 mg/kg (赤色, SIGMA)

カルセイン 10 mg/kg (緑色, SIGMA)

V. 非脱灰標本の作製

観察期間終了後、前述の麻酔剤投与にて深麻酔下に置き、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2週間以上同固定液で浸漬固定を行った。その後、軟X線撮影装置 (CSM-2, 日本ソフテックス) を用いて軟X線撮影を行い、実験部位を確認したうえで、各実験部位ごとに切断した。ついで、嶋村ら (1971)³⁰⁾ の方法にしたがってリゴラック樹脂に包埋し、硬組織薄切装置 (CT-1, 小坂) により約150~200 μ m の厚さで薄切した。さらに研磨を加え約120 μ m に調整した非脱灰切片を作製した。その切片は、落射型蛍光顕微鏡 (ニコン) を使用し、骨ラベリング像を観察した後、Kihara ら (1989)³¹⁾ の方法に準じて60~80 μ m の厚さに再度研磨調整し、pH 7.3 リン酸緩衝1.0%トルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡 (YF-21, ニコン) により組織学的観察を行った。

なお、以上の動物実験は「九州歯科大学における動物実験に関する指針」に従って行った。

結 果

実験1

I. 8週群Ⅰ

ラベリング所見では、新生骨全体がTcにラベルされており、陥凹部中央に向かってAlに蛍光した骨が線状に、さらにその内側にはCalに蛍光した骨が層状に観察される。AlとCalとの距離は粘膜側より、骨髓側の方が幅が広がっている (写真9)。

染色所見では、既存骨よりトルイジンブルーに濃染した新生骨は、陥凹した状態を呈しており、Calに蛍光した部位には類骨様組織が観察される。また、陥凹内部は網様状の線維性結合組織で満たされ、連続性を欠いた状態で形成されている (写真2)。

II. 16週群Ⅰ

ラベリング所見では、新生骨全体はTcにラベルされており、新生骨中央内部の骨髓側に特にCalに蛍光した骨が認められ、一部粘膜側にも認められる (写真10)。

染色所見では、既存骨よりトルイジンブルーに濃染した新生骨は皮質骨外縁の形態を回復する傾向が見られ、遮蔽膜方向に伸びるように形成されており、部分的に類骨様組織が観察される。さらにその粘膜側には網様状の線維性結合組織が存在している (写真3)。

III. 24週群

ラベリング所見では、Tcにラベルされた骨の外側に、部分的ではあるがAl, Calにラベルされた骨が粘膜側および骨髓側に層状に存在している (写真11)。

染色所見では、既存骨より染色性の高い新生骨は膜の下面に沿って形成されて、陥凹した状態はなく、ほぼ皮質骨外縁まで形態を回復している。また、新生骨表層に既存骨よりトルイジンブルーに濃染した類骨様組織が遮蔽膜方向に向かって伸びるように形成されているのが観察される (写真4-a, b, c)。

実験2

I. 対照群

ラベリング所見では、新生骨の全体がTcでラベルされており、特に欠損部中央において高い蛍光が認められる。そして、Calでラベルされた骨が、新生骨中央の一部に観察される (写真12)。

染色所見では、既存骨とはほぼ同程度の染色性を示す成熟した骨が連続して欠損部に形成されているが、陥凹した状態を呈している (写真5)。

II. 8 週群 II

ラベリング所見では、新生骨の全体が Tc でラベルされており、陥凹部中央に向かって Al の蛍光が層状に観察される。Cal の蛍光は陥凹部の底部の粘膜側に層状に観察され、一部、新生骨辺縁の骨髓側に観察される (写真 13)。

染色所見では、既存骨よりもわずかに高い染色性を示す新生骨は陥凹した状態である。しかし、8 週群 I と比較すると連続性が増してきており、陥凹内部の下部は網様状の線維性結合組織で満たされているが、粘膜側より新生骨と平行に走向した線維性結合組織が侵入してきている (写真 6)。

III. 8 週群 III

ラベリング所見では、新生骨の全体が Tc でラベルされており、その粘膜側と骨髓側の両側に Al にラベルされた骨が線状に観察される。さらに、Cal でラベルされた骨が新生骨中央の粘膜側の一部に認められる (写真 14)。

染色所見では、既存骨よりわずかに高い染色性を示す新生骨が連続して欠損部に形成されているが、対照群と同様に陥凹した状態を呈している (写真 7)。

IV. 16 週群 II

ラベリング所見では、新生骨の全体が Tc でラベルされており、新生骨中央と辺縁の骨髓側に Al にラベルされた骨が線状に存在している。さらに Cal にラベルされた骨が骨髓側表層と粘膜側の一部に観察される (写真 15)。

染色所見では、既存骨よりトルイジンブルーにやや濃染した新生骨は、皮質骨外縁の形態を回復する傾向が見られる。同部位の拡大所見では、骨髓側に Cal に蛍光した部位に既存骨よりトルイジンブルーに濃染した類骨様組織の存在が認められる (写真 8-a, b)。

考 察

I. 本実験の意義、目的について

歯周治療の新しい概念として Nyman ら (1982)³²⁾ が提唱した Guided Tissue Regeneration (GTR) 法は、その後、骨欠損に対して遮蔽膜を用い、骨の再生を計る GBR 法にも応用され、今日では口腔インプラント領域において広く応用されるようになった。

GBR 法は、Hurley ら (1959)³³⁾ により実験的に脊髄の癒合を治療する目的で考案された。そして、微小孔のセルロースアセテート膜を用いて実験的に Basset ら (1961)³⁴⁾ が長骨における皮質骨の欠損の治癒、Boyne

(1964)³⁵⁾ が顔面骨の再建の目的で行ったことに始まる。

その後、Nyman ら (1982)³²⁾ は歯周疾患が原因で失われた歯周組織の再生を目的とし、ミリポア膜を用いた GTR 法の実験の中で、骨の再生も可能であることを示唆した。このような研究に基づいて、Dahlin ら (1988)²⁾ はラットの下顎骨骨体に骨欠損を形成し、e-PTFE 膜で被覆を行った結果、実験側では線維性結合組織細胞の骨欠損内への成長を機械的に阻止し、ほぼ完全な骨の再建を得られたと報告している。さらに Dahlin ら (1989)³⁾ はウサギを使用し、骨内インプラントに GTR 法を適応した実験を試みた。インプラント周囲に骨欠損を形成し、GTR 法により骨の誘導をはかった結果、対照群で 40~90 %, 実験群で 95~100 % の骨の回復が認められた。

その後、臨床への応用として、Lazzara (1989)⁴⁾ は抜歯直後の抜歯窩に即時にインプラントを埋入し、それらの部位を e-PTFE 膜で覆うという概念を最初に報告した。抜歯窩にインプラントを植立した場合の遮蔽膜の臨床応用は、Nyman ら (1990)⁷⁾、Becker ら (1990)⁹⁾ らによっても同様な結果が見いだされており、遮蔽膜は様々な臨床に適応されてきた。

GBR 法に用いられる遮蔽膜の必要条件は生体親和性を備えた材質であること、骨再生が起こるための十分なスペースを与えること、スペース内への線維性結合組織の侵入を遮断することとされている。

GBR 法における重要な因子の 1 つとして治癒期間の長さを挙げることができる。遮蔽膜を併用してインプラント周囲の骨欠損の再生を計るための期間は、個体差があるものの骨形成と成熟のために、ヒトは最低 6 カ月必要であると言われている¹⁾。

そこで本実験は、イヌ下顎骨に形成した骨欠損に気孔径 0.6 μ m のポリプロピレンフィルターを用い、実験 1 では遮蔽膜の留置期間を 8, 16, 24 週と設定し、どの期間まで遮蔽膜を留置すると骨形成にとって効果的な影響を与えるかについて比較検討することを目的とした。また、実験 2 では遮蔽膜撤去後、骨膜を復位した場合、新生骨の成熟度に対する骨膜の影響を比較検討することを目的とした。なお、分解性高分子材料では、吸収時期のコントロールや遮蔽膜の撤去の不確かさ、遮蔽膜の吸収に伴う炎症反応をいかに抑制するかといった問題点があるため、目的以外の骨形成に影響を及ぼすと思われる因子を除外する目的で、不活性高分子材料であるポリプロピレンフィルターを使用した。

II. 実験方法について

本実験では実験動物として雑種成犬5頭を使用した。実験部位を下顎骨とし、環境を口腔内とすることで、より臨床に近い状況下を想定して実験を行った。顎堤の幅と骨欠損の大きさを配慮し、骨欠損の数は片側2つまでとした。また、実験群は部位による格差をなくすため遮蔽膜の被覆は任意に設定した。

遮蔽膜の気孔径に関して、Squier ら (1981)³⁶⁾ の実験によると、ブタの皮下組織にミリポア膜を移植した場合、細胞は $3.0\mu\text{m}$ 以上の気孔内には侵入するが、 $1.0\mu\text{m}$ の気孔内にはわずかに観察されるのみで、それ以下の気孔内には全く侵入しなかったと報告されている。また、三浦 (1994)³⁷⁾ の異なった気孔径のポリプロピレンフィルターを用いた実験によると、気孔径 $30.0\mu\text{m}$ の遮蔽膜内部には線維成分の侵入や血管の形成、気孔径 $5.0\mu\text{m}$ の遮蔽膜内部には細胞の侵入が認められたが、気孔径 $0.6\mu\text{m}$ の遮蔽膜内部には細胞や線維成分の侵入はほとんど認められず、また新生骨は皮質骨外縁の形態を回復していたと報告している。したがって、 $1.0\mu\text{m}$ 以下の気孔径では細胞や線維成分の侵入はほとんど認められないと推察され、本実験で用いた気孔径 $0.6\mu\text{m}$ の遮蔽膜は適した材料であると推察された。

また、GBR 法が成功するためにスペースメイキングは重要な点である。骨欠損周囲にサポートする骨が充分にある場合は問題はないが、骨欠損が大きい場合、骨増生のためのスペースを確保することが難しい。そのため、遮蔽膜の形態保持を目的として、ミニスクリュー⁸⁾を用いたり、骨欠損内に非吸収性のハイドロキシアパタイト^{12, 38)}や自家骨^{39, 40)}、凍結脱灰乾燥骨^{41, 42)}などの生体材料を填入する方法が考案された。本実験では遮蔽膜の固定とスペースメイキングには、自家製のチタンピンを用いた。

イヌを用いた GTR 法の実験で、Becker ら (1990, 1991)^{6, 13)} は術後 18 週でよく分化した層板骨が観察されたと報告している。また、Caudill ら (1991)¹⁴⁾、Zablotzky ら (1991)¹⁵⁾ は術後 8～9 週には新生骨の増生を認めている。さらに、Roberts ら (1988, 1989)^{43, 44)} はイヌにおける治癒、リモデリング、骨修復と再生の成熟化は 6 カ月間必要であることを示している。

そこで、本実験の実験 1 では、新生骨の増生が認められる 8 週、新生骨の増生がほぼ終了すると思われる 16 週、自然治癒における新生骨の修復と成熟が終了すると思われる 24 週まで遮蔽膜の留置を行い、観察した。また、実験 2 では、遮蔽膜撤去後の新生骨の骨膜の影響に

おける経時的変化の傾向を観察するため、8 週の遮蔽膜撤去後 8 週、16 週骨膜を復位したものと 16 週の遮蔽膜撤去後 8 週骨膜を復位したものの観察を行った。

骨の形成時期を同定するために実験期間を通じて骨ラベリング法による時刻描記を行った。長期の実験期間において同色のラベリング剤を 2 回以上投与すると、骨組織は改造機転が活発なため、ラベリング像と投与時期との関連づけには非常に困難を来す場合が多い。そのため、本実験では 3 種の薬剤を使用して、多色ラベリングを行った^{45, 46)}。薬剤としては、全身障害や硬組織の形成障害が少なく、蛍光色が鮮明な Tc, Al, Cal を用いた。

III. 実験結果について

1. ポリプロピレン膜の特性について

GBR 法に応用される遮蔽膜の条件として、生体親和性が挙げられる。臨床で最も良く用いられている遮蔽膜は e-PTFE 膜である。これは特殊な構造的形態をしており、生理学的条件下では化学的には分解されず、安全性は臨床医学においては長い歴史をもっている⁴⁷⁾。

今回、実験に用いたポリプロピレンフィルターに関しては、Chen ら (1993)⁴⁸⁾ がネズミを用いた動脈の吻合術の実験で、10-0 ナイロン縫合糸と 10-0 ポリプロピレン縫合糸とを比較した結果、後者の方がより良好な生体親和性を示したと報告している。また、Apple ら (1984)⁴⁹⁾ は眼内レンズの生体親和性の実験で、ポリプロピレンは比較的の不活性な材料で非常に効果的であると述べている。さらに、三浦 (1994)³⁷⁾ がイヌの下顎骨に異なった気孔径の遮蔽膜を用いた実験でも、ポリプロピレンフィルターが用いられており、良好な結果をもたらしている。

したがって、ポリプロピレンフィルターにおいても生体親和性を有すると考えられ、本実験ではこれらの結果を参考にポリプロピレンフィルターを用いた。

また、遮蔽膜の材質と表面構造について、Dahlin ら (1991)³⁹⁾ はラット頭蓋骨を用いた実験で、生物学的に不活性な e-PTFE 膜には、薄い類骨を層状に引き付けるという骨伝導能があることを示唆している。遮蔽膜の骨伝導能については他にも鈴木ら (1991)²⁷⁾、Kahnberg (1979)⁵⁰⁾、Nyman ら (1982, 1987)^{32, 51)} など、多くの研究者が報告している。

本実験においても、16 週群 I と 24 週群では、遮蔽膜方向に伸びるように類骨様組織が形成されているのが観察され、ポリプロピレンフィルターにも骨伝導能があるものと推察された。

2. 遮蔽膜の留置期間が骨形成に及ぼす影響について

GBR 法が成功するための重要な因子として、遮蔽膜の生体親和性、細胞遮断性、組織統合性、スペースメイキングなどが挙げることができ¹⁾、様々な研究がなされてきた。遮蔽膜の撤去時期に関しては、臨床では Buser ら (1992)¹⁾ は遮蔽膜を併用してインプラント周囲の骨欠損の再生を図るための最短時間は個体差により違いがあるが、骨形成と成熟のために必要な期間は 6～9 カ月間が必要であると述べている。一方、中村 (1995)⁵²⁾ は治癒期間の設定は、抜歯後即時インプラントの場合は 3 カ月程度で十分であり、骨内欠損の場合は 6 カ月程度、大きな骨欠損の場合には 9 カ月程度を目安とすると述べている。

そこで実験 1 では、遮蔽膜の留置期間を 8、16、24 週と 3 グループに分けて行った。その結果、8 週群 I では骨欠損部は陥凹した状態を呈しており、16 週群 I では骨欠損部は皮質骨外縁の形態を回復する傾向にあった。24 週群では新生骨は皮質骨外縁の形態をほぼ回復していた。これは、遮蔽膜により骨膜が遮断されたため、新生骨は骨欠損断端面と骨髓側方向から増生したと推察される。そのために 8 週群 I では陥凹した状態をしているが、観察期間終了時において陥凹底部は活発な骨形成が行われており、16 週群 I、24 週群につれ陥凹した状態がなくなり、粘膜側への増生が起こり皮質骨の外縁まで形態が回復したと推察される。したがって、本実験期間では、24 週膜を留置すると骨の形態の回復に効果的な影響を与えると推察された。

3. 骨膜の遮断による影響について

骨成熟度に関して、実験 1 の膜を留置したままで骨膜の影響がなかったものでは、新生骨は未熟な様相を呈していた。一方、対照群や遮蔽膜撤去後、骨膜を復位した期間を設けた実験 2 では、骨膜が影響を与えている期間の長いものほど新生骨の成熟度は高くなる傾向を示していた。

骨膜の骨形成への影響については現在まで数多くの研究者により報告されているが、統一した見解は得られていない。Dahlin ら (1991)³⁹⁾ はラット頭蓋に貫通型骨欠損を作り e-PTFE 膜を骨欠損の外側 (頭蓋骨と骨膜の間) と内側 (頭蓋骨と脳硬膜の間) に被覆した結果新生骨の再生が認められ、骨膜や脳硬膜の骨形成能によるものではないと述べている。

一方、Oklund ら (1986)⁵³⁾ はイヌの頭蓋骨を用いた実験で骨欠損の修復は主に骨髓内の血管と内骨膜から起こることを報告しており、千葉 (1992)⁵⁴⁾ はラットの大腿骨を用いて圧電膜高分子シートが骨再生過程にどのよ

うな影響を及ぼすか検討した結果、対照群に比べて実験群の骨の外表形態の回復は早い骨成熟は遅延する傾向にあり、骨欠損の治癒過程で、遮蔽膜により軟組織の侵入を遮断する事は、長期的には骨の成熟を遅らせると述べている。また、織家 (1985)⁵⁵⁾ はイヌ下顎骨において、テフロン板で骨欠損部を被覆した骨膜遮断群と被覆を行わなかった骨膜保存群を比較した実験で、骨膜遮断群は骨再生が著しく遅延したことから、骨膜の骨形成における骨膜の重要性を示唆した。

その他に、インプラント埋入時に遮蔽膜を併用した増井 (1993)¹⁹⁾ の実験では、膜を用いることにより上皮組織の影響を排除することができ、その結果、骨欠損部に保持される血餅の量を増加させることによって、より多くの骨形成が期待できる。しかし、その一方で骨膜が遮断されることにより正常な骨再生が阻害されたと報告している。さらに、三浦 (1994)³⁷⁾ は遮蔽膜の気孔径が骨形成に及ぼす影響について検討した結果、気孔径 $0.6\mu\text{m}$ の遮蔽膜で被覆した場合には、新生骨の形成は促進されるが、骨の成熟度は遅延する傾向にあったと述べている。したがって、これらの実験においても、骨膜の骨形成における骨膜の重要性を示唆された。

本実験においても、遮蔽膜を留置したままの実験 1 では新生骨は周囲骨組織よりトルイジンブルーに濃染されていることより、骨成熟度が低い様相を呈していると推察される。一方、実験 2 の 8 週群 II、8 週群 III、16 週群 II や対照群においては、骨膜が骨欠損部に接触している期間が長いほど骨の成熟度は高い様相を示しており、骨膜が骨成熟度に影響を及ぼしていると推察された。

長束 (1980)⁵⁶⁾ は骨膜には骨を誘導する能力のある細胞が存在するのではなく、骨芽細胞に分化する能力を有する前駆細胞が存在すると報告している。さらに、前駆細胞は刺激により分裂増殖しかつ未分化間葉細胞へ脱分化しうる細胞であり、誘導因子により骨芽細胞や軟骨芽細胞へと分化する能力を有するものであると述べている。

このことから本実験では、骨膜から分裂増殖してきた未分化間葉系細胞が、誘導因子である既存骨と接触する期間が長かった対照群、8 週群 III、8 週群 II と 16 週群 II の順で骨成熟度は高い様相を示しており、接触する期間を持たなかった実験 1 では新生骨は未熟な様相を呈していたと推察される。

以上のことから、骨増生のための手段として GBR 法を適応する場合、本実験期間のうちでは 24 週間遮蔽膜を被覆すると新生骨は成熟度が遅延するものの皮質骨外

縁まで形態を回復し、期待する効果が得られることが示唆された。しかし、GBR 法において長期間遮蔽膜を留置させることは、遮蔽膜の形態保持や遮蔽膜の露出が問題となる。これらの問題を解決するには、遮蔽膜の形態保持として、自家骨や生体材料などを填入することや遮蔽膜の設置の際の術式、遮蔽膜が露出した際の適切な処置¹⁾が必要である。それには、どのような填入材料が治癒促進に有利であるか、また早期に遮蔽膜が露出した際、どのような時期まで遮蔽膜を留置すべきかを検討することが必要であると思われる。さらに、圧電膜を用いることで新生骨の形成を促進させ、遮蔽膜の留置期間の短縮を計る⁵⁷⁻⁶⁰⁾など、今後検討していかなければならない問題と思われる。

結 論

イヌ下顎骨に骨欠損を形成し、気孔径 $0.6\mu\text{m}$ のポリプロピレン膜を被覆した。遮蔽膜の留置期間を 8, 16, 24 週と設定し、どの時期まで遮蔽膜を留置することが最も骨形成に効果的な影響を与えるかと膜撤去後骨膜を復位した場合の骨の成熟度の変化について組織学的な検索を行い、以下の結論を得た。

1. 遮蔽膜を使用していない対照群では、新生骨は陥凹した状態で欠損部に形成されていた。

2. 8 週遮蔽膜を留置すると、新生骨は陥凹した状態で連続性を欠き、皮質骨外縁の形態は回復しておらず、周囲軟組織の侵入により形態を回復するには至らなかった。

3. 16 週遮蔽膜を留置すると、欠損部をほぼ満たすような新生骨の増生が認められ、皮質骨外縁を回復する傾向にあった。しかし、完全な骨形態を回復するまでには至らなかった。

4. 24 週遮蔽膜を留置すると、新生骨は成熟度が遅延するものの、ほぼ皮質骨外縁まで形態を回復していた。なお、実験期間終了時点においても持続した活発な骨形成が認められ、新生骨自体は未熟な様相を呈していた。

5. 骨膜が遮断されたことに影響され、8 週群 I, 16 週群 II, 24 週群は新生骨は未熟な様相を呈していた。また、遮蔽膜撤去後、骨膜を復位した期間が長いほど新生骨は成熟する傾向にあり、対照群の新生骨は成熟した様相を呈していた。

したがって、本実験から膜を長期間留置すると新生骨は成熟度が遅延するものの、ほぼ皮質骨外縁まで形態を回復し、新生骨形成に効果的な影響を与えることが示唆された。

稿を終わるにあたり終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師内田康也教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、本研究にたいして数多くの御助言をいただきました歯科補綴学第 2 講座小城辰郎講師に深甚なる謝意の意を表します。また、種々の御協力をいただきました歯科補綴学第 2 講座の諸兄の皆さまに心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Buser, D., Dahlin, C., Schenk, K. R.: 中村社綱, 末田武, 井上 孝, 小宮山彌太郎訳: GBR の歯科インプラントへの応用 クインテッセンス出版, 東京, 1995, 77-78: Guided bone regeneration in implant dentistry. Quintessence Publishing Co., USA, 1992.
- 2) Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. and Nyman, S.: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* 81: 672-676, 1988.
- 3) Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A. and Nyman, S.: 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.
- 4) Lazzara, R.: Immediate implant placement into extraction sites: Surgical and restorative advantages. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* 9: 333-343, 1989.
- 5) Dahlin, C., Gottlow, J., Linde, A. and Nyman, S.: Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys, *Second. J. Plast. Reconstr. Hand. Surg.* 24: 13-19, 1990.
- 6) Becker, W., Becker, B. E., Handlesman, M., Celletti, R., Ochsenbein, C., Hardwick, R. and Langer, B.: Bone formation at dehiscence dental implant sites treated with implant augmentation material: A pilot study in dogs. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* 10: 93-101, 1990.
- 7) Nyman, S., Lang, N. P., Buser, D. and Brägger, U.: Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration. A report of two cases. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 5: 9-14, 1990.
- 8) Buser, D., Brägger, U., Lang, N. P. and Nyman, S.: Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin. Oral. Impl. Res.* 1: 22-32, 1990.
- 9) Becker, W. and Becker, B. E.: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* 10: 377-391, 1990.
- 10) 中村社綱: チタン・骨内インプラントにおける GTR 法の

- 応用: 第1報. *The Quintessence* 9: 1659-1666, 1990.
- 11) 中村社綱: 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(5): 867-875, 1991.
 - 12) Wachtel, H. C., Langford, A., Bernimoulin, J. P. and Reichart, P.: Guided bone regeneration next to osseointegrated implants in humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 6: 127-135, 1991.
 - 13) Backer, W., Becker, B. E., Handelsman, M., Ochsenbein, C. and Albrektsson, T.: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: A study in dogs. *J. Periodontol.* 62: 703-709, 1991.
 - 14) Caudill, R. F. and Meffert, R. M.: Histologic analysis of the osseointegration of endosseous implants in simulated extraction sockets with and without e-PTFE barriers. Part 1. Preliminary findings. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* 11: 206-215, 1991.
 - 15) Zablotsky, M., Meffert, R., Coudill, R. and Evans, G.: Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehisced hydroxyapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces: A pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 6: 294-303, 1991.
 - 16) 中村社綱, Buser, D.: 骨内インプラントのための GTR 法: Staggered approach と Simultaneous approach. *The Quintessence* 11: 693-703, 1992.
 - 17) Magnusson, I., Batich, C. and Collins, B. R.: New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J. Periodontol.* 59: 1-6, 1988.
 - 18) 久保田浩三, 越智玲子, 柘上優三, 内藤 徹, 林川貴志, 日高理智, 宗 洋一郎, 山本博武, 岡田隆雄: 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: 870-881, 1989.
 - 19) 増井 聡: 生体内吸収性膜を用いた組織誘導再生法のブレード・インプラントへの応用. *九州歯会誌* 47: 45-61, 1993.
 - 20) Aukhil, I., Pettersson, E. and Suggs, C.: Guided tissue regeneration. An experimental procedure in beagle dogs. *J. Periodontol.* 57: 727-734, 1986.
 - 21) Pitaru, S., Tal, H., Seldinger, M., Grosskopf, A. and Noff, M.: Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. *J. Periodontol.* 59: 380-386, 1988.
 - 22) 児玉利朗, 三辺正人, 堀 俊雄, 渡部是久, 高橋常男: 各種コラーゲンの性状がフラップ手術後の歯周組織治療に及ぼす影響について. *歯科ジャーナル* 28: 173-179, 1988.
 - 23) 沼部幸博, 鴨井久一: アテロコラーゲン膜による歯肉上皮の増殖抑制および上皮細胞動態について. *歯科ジャーナル* 28: 181-186, 1988.
 - 24) Card, S. J., Caffesse, R. G., Smith, B. A. and Nasjleti, C. E.: New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* 9 (1): 58-69, 1989.
 - 25) 児玉利朗: Atelocollagen 膜を用いた歯周組織再生誘導法に関する病理組織学的研究. *日歯周誌* 32: 1-25, 1990.
 - 26) 三辺正人, 児玉利朗, 占郷辰二: 生体内吸収性膜を用いた歯周組織再建法, その臨床的考察. *The Quintessence* 9: 1265-1277, 1991.
 - 27) 鈴木明夫, 山口進也, 松代美代子: 歯周組織再生誘導膜を利用した治癒モデルにおける組織修復について. *日歯周誌* 33: 479-491, 1991.
 - 28) Galgut, P. N.: Oxidized cellulose mesh used as a biodegradable barrier membrane in the technique of guided tissue regeneration. A case report. *J. Periodontol.* 61: 766-768, 1990.
 - 29) Böstman, O. M.: Intense granulomatous inflammatory lesions associated with absorbable internal fixation devices made of polyglycolide in ankle fractures. *Clin. Orthop.* 278: 193-199, 1992.
 - 30) 嶋村昭辰, 藤 英俊, 内田康也: 硬組織薄切装置による歯とその周囲組織の非脱灰の切片調整法. *歯基礎誌* 13: 62-69, 1971.
 - 31) Kihara, A., Morimoto, K. and Suetsugu, T.: An improved method using a bubble-free adhesion technique for the preparation of semi-serial undecalcified histologic sections containing dental implants. *J. Oral Implantol.* 15: 87-94, 1989.
 - 32) 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.
 - 33) Hurley, A. L., Stinchfield, F. E., Bassett, C. A. L., and Lyon, W. H.: The role of soft tissues in osteogenesis. *J. Bone Joint Surg.* 41: 1243, 1959.
 - 34) Bassett, C. A. L., Creighton, D. K. and Stinchfield F. E.: Contributions of endosteum, cortex and soft tissues to osteogenesis. *Surg. Gynecol Obstet.* 112: 145-152, 1961.
 - 35) Boyne, P. J.: Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. *J. Dent. Res.* 43: 827, 1964.
 - 36) Squire, C. A. and Collins, P.: The relationship between soft tissue attachment, epithelial downgrowth and surface porosity. *J. Periodont. Res.* 16: 434-440, 1981.
 - 37) 三浦留貴: 組織誘導再生法における膜の孔径が骨形成に及ぼす影響. *九州歯会誌* 48: 716-734, 1994.
 - 38) Claffey, N., Motsinger, S., Ambruster, J. and Egelberg, J.: Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs. *L. Clin. Periodontol.* 16: 12-16, 1989.
 - 39) Dahlin, C., Alberius, P. and Linde, A.: Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J. Neurosurg.* 74: 487-491, 1991.

- 40) Alberius, P., Dahlin, C. and Linde, A.: Role of osteo-promotion in experimental bone grafting to the skull: A study in adult rats using a membrane technique. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 50: 829-834, 1992.
- 41) Sinclair, G.: A comparison of two techniques of bone regeneration: Bone grafting alone, and bone grafting with guided tissue regeneration in the successful replacement of two fractured teeth by dental implants. *J. N. Z. Soc. Periodontol.* 71: 6-11, 1991.
- 42) Anderegg, C. R., Martin, S., Gray, J. and Mellonig, J.: 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.
- 43) Roberts, E. W., Garetto, L. P. and DeCastro, R. A.: Remodeling of devitalized bone threatens periosteal margin integrity of endosseous titanium implants with threaded or smooth surfaces. *J. Indiana. Dent. Assoc.* 68: 19-24, 1989.
- 44) Roberts, E. W.: Bone tissue interface. *J. Dent. Educ.* 52: 804-809; 1988.
- 45) 須賀昭一: 硬組織と Tetracycline. *歯学* 53: 137-143, 1965.
- 46) 高橋 学, 川口哲朗, 中島早苗, 浅野安生, 龍口基雄: 石灰化組織の多色ラベリングのためのラベリング剤と投与方法について. *歯学* 67 (1): 53-66, 1979.
- 47) Boyce, B.: Physical characteristics of expanded polytetrafluoroethylene grafts. In: Stanley J. C. (ed). *Biologic & Synthetic Vascular Prostheses*. Philadelphia: Grune & Stratton, 33, 1982.
- 48) Chen, L. E., Seaber, A. V. and Urbaniak, Jr. A.: Comparison of 10-0 polypropylene and 10-0 nylon sutures in rat arterial anastomosis. *Microsurg.* 14: 328-33, 1993.
- 49) Apple, D. J., Mamalis, N., Brady, S. E., Loftfield, K., Kavka-Van, N. D. and Olson, R. J.: Biocompatibility of implant materials: a review and scanning electron microscopic study. *J. Am. Intraocul. Implant. Soc.* 10: 53-66, 1984.
- 50) Kahnberg, K. E.: Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon[®] mantle leaf. *Int. J. Oral Surg.* 8: 449-456, 1979.
- 51) Nyman, S., Gottlow, J., Lindhe, J., Karring, T. and Wennstrom, J.: New attachment formation by guided tissue regeneration. *J. Periodont. Res.* 22: 252-254, 1987.
- 52) 中村社綱: GBR の適応症と術上の注意. *Dental Implantology* 2: 54-61, 1995.
- 53) Oklund, S. A., Prolo, D. J., Gutierrez, R. V. and King, S. E.: Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin. Orthop.* 205: 269-291, 1986.
- 54) 千葉昌一: 電圧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 (2): 419-433, 1992.
- 55) 織家 茂: 下顎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.
- 56) 長束三千雄: 骨再生に関する実験的研究, 特に上・下顎骨骨膜の変化について. *歯科学報* 80: 1769-1789, 1980.
- 57) 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刺激の応用. 第一報 微小電流刺激装置および電極の試作. *補綴誌* 34: 309-317, 1990.
- 58) 田中久敏, 千葉昌一, 虫本栄子, 川崎 敏: 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一. *補綴誌* 36: 387-395, 1992.
- 59) 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.
- 60) 大西秀機, 小城辰郎, 三浦留貴, 竹上広一, 安藤浩伸, 増井 聡, 内田康也: 多孔性圧電膜の骨再生に関する研究. *日口腔インプラント誌* 7: 91, 1994.

写真2 8週群Iの光顕像(×3)

写真3 16週群Iの光顕像(×3)

写真4-a 24週群の光顕像(×3)

写真4-b 24週群の光顕像(×6)

写真4-c 24週群の光顕像(×12)

写真5 対照群の光顕像 (×3)

写真6 8週群IIの光顕像 (×3)

写真7 8週群IIIの光顕像 (×3)

写真8-a 16週群IIの光顕像 (×3)

写真8-b 16週群IIの光顕像 (×6)

写真9 8週群Ⅰのラベリング像（×6）

写真10 16週群Ⅰのラベリング像（×6）

写真11 24週群Ⅰのラベリング像（×6）

写真12 対照群のラベリング像（×6）

写真13 8週群Ⅱのラベリング像（×6）

写真14 8週群Ⅲのラベリング像（×6）

写真15 16週群Ⅱのラベリング像（×6）