原	著
---	---

生体吸収性有機/無機複合体膜を利用した下顎骨再建に関する基礎的研究

小山 富久

東京医科歯科大学生体材料工学研究所システム研究部門機械分野 (主任・指導：宮入裕夫教授)

(1999 年 12 月 10 日受付)

Study on Regeneration of Mandibular Bone with Bioabsorbable Organic/Inorganic Composite Membrane

Yoshihisa Koyama

Department of Biomechanical Engineering, Institute of Biomaterials and Bioengineering,
Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. Hiroo Miyairi)

Guided bone regeneration (GBR) has attracted much attention as a means to treat bone defects and congenital malformation. However, presently available materials are not ideal and further improvements are necessary. Hence we have been developing a novel bioabsorbable composite material β -TCP/CPLA for the GBR technique. The polymeric matrix is a copolymer of poly-L-lactide acid and fatty polyester (CPLA) that is biodegradable by hydrolysis, and the ceramic filler is β -tricalcium phosphate (β -TCP) that is bioabsorbable and has good osteoconductivity. The materials were evaluated by *in vivo* and *in vitro* experiments. Furthermore, animal experiments with mandibular bones defects in dogs were carried out. Good bone regeneration was observed in the case of the treatment with β -TCP/CPLA membrane whereas almost no bone regenerated in the cases without the membrane. β -TCP/CPLA membranes were suggested to have promising properties for bone defect treatment.

I. 緒 言

歯周病や腫瘍などさまざまな疾患により、歯槽骨や顎骨の吸収や欠損が生じる。このような症例の治療で骨移植を必要とする場合があるが、骨再生誘導法(GBR法)¹⁻³⁾の利用が可能であれば、より侵襲を小さくでき有利である。この GBR 法は、遮断膜により欠損部を覆い肉芽組織が骨再建部位に侵入することを物理的に阻止し、骨芽細胞に分化しうる未分化間葉系細胞が増殖できる空間を確保し、骨再建を行うものである。

現在 GBR に使用されている膜には、非吸収性および吸収性の両者がある。非吸収性膜としては、expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) の不織布より構成されたものがあり、チタン棒を膜内部に置くことにより形態を保持させている。非吸収性であることから、膜を撤去するために二次的な手術を余儀なくされることが問題である。吸収性膜にはポリ乳酸を主成分とするものが多く、ポリ乳酸にカプロラクトンなどを配合し、軟性にし

て操作性を向上するとともに早期の分解吸収を意図しているものもある。しかし早期に強度が失われるため、咀嚼時の咬合力によって破壊され、目的とする形態の骨形成ができないことがある。またポリ乳酸は X 線透過性であることから生体内における膜を確認することも不可能である。このように現在使用されている膜には多くの問題点が残されており、また膜の強度や骨形態の制御法についても不明の点が多い。

そこで本研究では、生体吸収性材料のうち、脆性ではあるが生体適合性に優れたベータリン酸三カルシウム(β -TCP)と、弾性であり熱可塑性による賦形性をも有しているポリ乳酸系コポリマー(CPLA)よりなる有機/無機複合体⁴⁻⁷⁾を開発した。そして、 β -TCP/CPLA の *in vitro* および *in vivo* における機械的強度を測定するとともに、成犬下顎骨に設けた実験的骨欠損部に β -TCP/CPLA 膜を適用して骨再建への有効性について検討した。

II. 材料および方法

本実験に使用した有機/無機複合材料の無機成分には、800℃で焼成した β -TCPのブロック体を125 μ m以下になるまで粉碎した β -TCPの微粉末を用いた。また有機成分には、ポリ乳酸と脂肪族ポリエステルとを共重合させて合成したCPLAを用いた。そして β -TCP 50 gとCPLA 50 gを、180℃に設定した練和機(Laboplastomil, 東洋精機)にて練和して複合材料を得た。

1. 実験1 機械的強度の測定

材料の機械的強度を測定するための試験片には、縦3 mm, 横5 mm, 長さ20 mmに成型した β -TCP/CPLAとCPLA試験片を用いた。*in vitro*での強度を測定するためには、20本の試験片を1 lの生理食塩水中に浸漬し、37℃に維持した。実験期間は0, 2, 4, 8週間(各n=5)とした。*in vivo*における機械的強度を測定するためには、獣医師が健康と認めた成犬(ビーグル犬, 雄性, 4頭, 平均体重11.5 kg)の背部皮下に試験片を埋入した。実験期間は0, 2, 4, 8週間(各n=5)とし、実験終了後に試料を回収した。なお実験動物の手術および管理は、すべて獣医師および動物看護師の指導の下に行った。

実験終了後の試験片を用いて材料試験機(オートグラフ, 島津製作所)により3点曲げ試験を行い、最大曲げ応力を求めて経時的強度変化を求めた。試験時の支点間距離は15 mm, クロスヘッドスピードは0.5 mm/sとした。

2. 実験2 骨組織再生誘導法による下顎骨再建

骨再建に使用する試料には、 β -TCP/CPLAの塊を180℃に加熱し、加圧によって厚さ200 μ mとした膜を用いた。実験動物には、獣医師が健康と認めた成犬(ジャーマン・シェパード犬, 雄性, 2頭, 平均体重23.8 kg, およびビーグル犬, 雄性, 4頭, 平均体重11.5 kg)を用い

た。再建実験を開始する6カ月前に下顎両側のすべての小白歯の抜歯を行い、抜歯窩を十分に回復させた。

β -TCP/CPLA膜の移植に際しては、歯肉を全層切開し骨膜を剥離除去した。そして骨鋸などで10×10×10 mmの骨欠損を下顎骨両側の小白歯部に形成した(図1)。 β -TCP/CPLA膜には約50℃の温水中で顎堤に適合する形態を賦与した。右側欠損部は、欠損内部が血餅で満たされるように留意して β -TCP/CPLA膜で完全に覆い(図2, 3), 張力がかからないように歯肉弁を復位、縫合した。左側は対照であり、欠損部に β -TCP/CPLA膜を適用せずに歯肉弁を復位し、縫合した。

実験期間は4週(1頭), 8週(1頭), 12週(4頭)とした。実験期間中は4, 8, 12週にX線観察を行った。実験終了後、4, 8週の実験においては移植部のみを摘出し、12週の実験においては周囲組織とともに移植部を摘出した。なお実験動物の手術および管理はすべて獣医師および動物看護師の指導の下に行った。

摘出した試料は70%エタノールにて固定した後、上昇

図1 イヌ下顎骨に設けた実験的骨欠損

図2 β -TCP/CPLA膜で覆われた骨欠損部

図3 移植直後のX線所見

脱水過程を行い通法に従って非脱灰組織標本を作製し、Villanueva Bone 染色を行った。一部の試料については、10%中性緩衝ホルマリン固定の後、脱灰組織標本を作製し、Hematoxyline-Eosine 染色を行った。各試料について光学顕微鏡観察を行った。また X 線写真をスキャナーによりコンピューターに取り込み、画像解析を行って石灰化領域の面積を算出した。

III. 結 果

1. 実験 1 機械的強度の測定

1) *in vitro* の結果

水中浸漬された β -TCP/CPLA 試験片は、実験開始から 2 週までの間に最大曲げ応力が初期値の約 1/2 まで減少し、その後その強度を実験終了まで維持した。CPLA 試験片は埋入後 4 週まではほぼ初期強度を維持したが、埋入後 4 週から 8 週にかけて β -TCP/CPLA 試験片と同様な強度の低下傾向がみられた (図 4)。

2) *in vivo* の結果

皮下埋入された β -TCP/CPLA 試験片は、水中浸漬の

図 4 β -TCP/CPLA の機械的強度
(◆: β -TCP/CPLA (水中), ■: β -TCP/CPLA (皮下), ▲: CPLA (水中), ●: CPLA (皮下))

図 5 移植後 12 週の肉眼所見 (歯肉剥離後)

場合と同様に実験開始から 2 週までの間に最大曲げ応力が初期値の約 1/2 まで減少した。2 週から 4 週までの間は強度に変化は認められなかったが、4 週から 8 週までの間においてさらに強度が低下していく傾向が認められた。一方、CPLA 試験片においては、若干の変動はあるものの実験期間中はほぼ初期強度を維持し、強度低下は観察されなかった (図 4)。

2. 実験 2 骨組織再生誘導法による顎骨再建

1) 肉眼観察所見

実験期間中 β -TCP/CPLA 膜は露出することがなかった。移植後 4, 8 週における摘出試料の肉眼所見では、歯肉内面に若干の炎症組織と思われる組織が存在していた。しかし、移植後 12 週では健康な歯肉内面と同様の所見であった (図 5)。

2) X 線観察所見

移植 4 週後の X 線所見では、欠損部の骨壁より石灰化が開始しており、欠損部内に形成された石灰化組織の面積は約 50%であった (図 6, 7)。また β -TCP/CPLA 膜は X 線写真上で確認することができず、この時点で膜に含まれる β -TCP は吸収されているようであった。8 週後の X 線所見では、幼弱かつ欠損部中央がややくぼんではいるものの骨の再生が進行し、周囲の皮質骨の骨頂と同等の高さまで骨の形成が認められた。この際の骨形成面積は欠損部内の約 75%まで石灰化組織が形成されていた (図 6, 8)。さらに 12 週後では皮質骨の成熟化と骨梁の増加が認められ、隣接する歯槽骨頂よりややくぼんではいるものの欠損部内の約 95%の面積を石灰化組織が占めていた (図 6, 9)。

一方、同様の欠損部で膜を適用しなかった対照群では、12 週経過した時点で骨欠損部の周囲骨壁に沿って若干の骨が形成されているものの、欠損部は大きく凹状にくぼんだ状態にとどまっていた。また形成された石灰化組織の辺縁部が高度に石灰化していた。欠損部内に形成された石灰化組織の面積は、約 25%にとどまっていた (図 6, 10)。

図 6 骨欠損部内の石灰化組織面積

3) 組織所見

移植後 4 週の試料では、周囲の骨に沿って幼若な石灰化組織が認められた(図 11)。さらに移植後 8 週の試料では骨欠損部を満たす石灰化組織が形成されていた(図 12)。なお本実験における 4, 8 週の摘出試料には周囲組織を含めなかったため、 β -TCP/CPLA 膜の存在の有無については組織学的な検討ができなかった。12 週試料の所見では骨が骨欠損部に形成されていたが、形成された組織は本来の下顎骨の解剖学的な構造とは異なるものであり、皮質骨や海綿骨は形成されておらず、出血性に形成された骨組織に類似していた(図 13)。またこのときに β -TCP/CPLA 膜は確認されなかった。

IV. 考 察

生体吸収性材料のなかでは、無機材料の β -TCP は生体適合性に優れ、また吸収されることにより骨形成を促す可能性も示唆されていることから、さまざまな形で臨床応用されている。しかしこの材料は脆性材料であるた

めに、そのままでは膜に成形加工して GBR 法へ応用することはできない。一方、生体吸収性ポリマーのポリ乳酸は、一定の生体適合性を持ち、優れた力学的特性を備えるとともに、膜状に成形すればその熱可塑性を利用して、任意の形態を付与することが可能である。しかし X 線観察ができないために経過の追跡が困難であること、大きな試料では分解吸収に長期間を要すること、生体内での分解時に pH 低下が危惧されること¹²⁾、ポリ乳酸の微小結晶の生体為害性が危惧されることなどの問題^{9~11)}も指摘されている。そこで本研究では生体適合性、生体吸収性、機械的特性、形態付与性を兼ね備えた理想的な GBR 用膜材料を開発するために、 β -TCP と CPLA の複合体を開発し、その特性を調べた。

1. 実験方法について

本研究では、下顎骨の実験的欠損部に有機/無機複合体膜を応用し、骨の再建状況を調べた。骨欠損の治療はこれまで Hydroxyapatite などの充填が主であったが、最近では GBR 法を用いる機会が多くなってきている。今回

図 7 移植後 4 週の X 線所見

図 8 移植後 8 週の X 線所見

図 9 移植後 12 週の X 線所見

図 10 移植後 12 週の X 線所見 (対照側)

採用した欠損様式は、近遠心方向 10 mm、深さ 10 mm、頬側から舌側に至るという大きな骨欠損である。この大きさは、埋伏歯や嚢胞などを摘出した際に生じる骨欠損に匹敵することから、臨床的に遭遇する可能性が高い。しかしこれまでに、GBR 法をこのような大きさの骨欠損に応用した例は少なく、安定した結果も得られていない。したがって本実験方法によれば、臨床応用への可能性を評価できるものと考えられる。

2. β -TCP/CPLA について

玄ら⁸⁾は水酸アパタイト多孔体とポリ乳酸を用いた複合体を作製し、骨伝導能などに優れていることを示した。その後もリン酸カルシウムとポリ乳酸の複合材料がいくつか開発されたが、リン酸カルシウムの含有量は重量比で約 30%程度であり、リン酸カルシウムの特性を十分に発揮することは難しい。今回開発した β -TCP/CPLA では、これは β -TCP の水酸基と CPLA の有機官能基とが強固に結合するために β -TCP を最大 80%まで配合できると報告されている^{4,6)}。

図 11 移植後 4 週の組織所見 (Villanueva×40)

図 12 移植後 8 週の組織所見 (Villanueva×40)

3. β -TCP/CPLA の X 線不透過性について

ポリ乳酸単体の膜による骨再建では、ポリ乳酸が X 線透過性であることから術後の位置確認などが困難である。しかし、 β -TCP/CPLA 膜は β -TCP を配合したことにより、X 線不透過性となっていることから、このような点で臨床的に都合がよいものと考えられる。

4. β -TCP/CPLA の賦形性について

熱可塑性を利用した賦形はチェアサイドで可能であることから、再建したい骨形状に合わせての即時の賦形が可能になりメリットが大きい。 β -TCP/CPLA の賦形性については、約 45℃付近で軟化を始め、自在に賦形できる温度は約 50℃であったと報告されている。またこのとき CPLA の分子量は若干低下しているものの、大きな変化は生じていない。したがって骨欠損部に β -TCP/CPLA 膜を適用した場合、 β -TCP/CPLA 膜が体温で変形することはなく、初期強度は材料の吸収が開始されるまで維持されると考えられる。

5. β -TCP/CPLA の機械的強度について

歯周組織再生誘導法に e-PTFE 膜を使用した場合には、術後 4 週を目処に膜を除去している。したがって GBR 法においても、4 週程度までは膜の機械的強度が保たれたほうが、再建される骨の形状制御に都合がよいものと考えられる。本研究での *in vitro* および *in vivo* の機械的強度測定実験において、実験開始後 2 週までの間に β -TCP/CPLA 試験片の強度が初期強度の約 1/2 にまで低下しているのは、CPLA が加水分解されて β -TCP が露出し、加速度的な溶解が進行したためではないかと思われる。下顎骨再建実験においても、 β -TCP 膜が移植後 4 週で確認できなかったことから、早い時期に β -TCP が溶出し強度が低下したはずである。しかし本実験で骨再建が良好であったことから、骨再生には十分な強度が保たれていたと思われる。材料の形状特に厚さは強

図 13 移植後 12 週の組織所見 (Villanueva×40)

度低下に大きく影響し、また欠損部の大きさや形状により咬合力の影響も異なることから、種々の骨欠損に適用するには、より詳細な研究が必要であると考えられる。

6. β -TCP/CPLA の生体適合性について

培養細胞を用いての β -TCP/CPLA の毒性試験では、 β -TCP/CPLA に為害作用は認められないと報告されている^{6,7)}。本下顎骨再建実験においても、膜の露出などは生じず、材料による急性炎症所見も認められなかった。また β -TCP/CPLA 膜が吸収し続けている間にも、歯肉に顕著な炎症所見は認められなかった。したがって β -TCP/CPLA は生体適合性に優れた生体吸収性材料と思われる。

7. β -TCP/CPLA 膜の分解吸収について

ポリ乳酸の分解吸収時に乳酸が生じることから、吸収時の pH 低下による生体為害性が危惧される⁹⁻¹¹⁾。現在歯科領域で組織再生誘導法に応用されているポリ乳酸共重合体においては、pH によって骨再生が阻害された報告はないが、GBR 法ではより強固な膜を使用せざるをえないことから、問題が生じる可能性がある。本実験で使用する β -TCP/CPLA については、材料を生理食塩水中に浸漬し pH の変化を測定した実験が報告されている¹³⁾。実験開始約 2 週以降で pH が 5~6 で推移しており、 β -TCP を複合したことにより、材料分解時の pH が比較的中性に近く保たれている。また本研究における下顎骨再建実験においても、顕著な炎症などは観察されていないことから、 β -TCP/CPLA 膜では分解吸収時に為害性が問題となるほどの pH が低下しないものと考えられる。

8. 骨形成について

直径 3 mm の β -TCP/CPLA 試料をイヌ脛骨に移植する実験系において、移植後 8 週の時点で β -TCP/CPLA 周囲に明瞭な新生骨が形成され、形成された骨と β -TCP/CPLA との界面には空隙が認められなかったと報告されている¹⁴⁾。このことは、 β -TCP/CPLA の成分のうち、 β -TCP によって新生骨の形成が促されたとも考えられるが、本実験においては膜に沿った骨形成は生じていない。松坂ら^{15,16)}は、GBR における骨再生では膜内部に血餅を形成し、それを保持することによって欠損部を満たす骨が再生されると報告している。本実験における骨形成でも、骨壁より骨形成が開始していることから、欠損内の血餅に周囲の骨壁からの未分化細胞が侵入し骨芽細胞に分化することにより骨が再生されたと考えられる。

V. 結 言

本研究における実験結果によれば、10 mm 程度の下顎骨欠損は試作した β -TCP/CPLA 膜を利用した GBR

法の適用により 8 週でほとんど再建されており、きわめて急速な骨形成が実現していることがわかった。このことから、 β -TCP/CPLA 膜は GBR 法による下顎骨再建に有効な材料であることが示唆された。

このような急速な骨再建がどのようにして生じているのか、その詳細についてはさらに検討を進めている。また試作した膜による GBR 法できわめて良好な結果が得られたことから、下顎骨以外の骨再建の応用も含めて詳細な検討を進めている。

謝 辞

稿を終えるにあたりご指導を賜りました東京医科歯科大学生体材料工学研究所システム研究部門機械分野・宮入裕夫教授に深謝いたします。また本研究の遂行にあたり懇切なるご指導、ご校閲を賜りました東京医科歯科大学生体材料工学研究所システム研究部門機械分野・高久田和夫助教授ならびに多大なるご協力、ご援助を賜りました科学技術庁無機材質研究所第 10 グループ・田中順三総合研究官、菊池正紀研究官に心より感謝の意を表します。そして本研究にあたり協力を賜りました東京医科歯科大学生体材料工学研究所システム研究部門機械分野の諸先生方、無機材質研究所第 10 グループの研究員、獣医学関係者に御礼申し上げます。

なお、本研究の要旨の一部は第 29 回日本歯科理工学会学術講演会(1997 年 4 月、東京)、第 5 回顎顔面バイオメカニクス学会学術講演会(1997 年 11 月、大阪)、Veterinary Dental Forum (Nov. 1997, Denver)、日中歯科医学大会(1999 年 6 月、北京)において発表した。

文 献

- 1) Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. and Nyman, S.: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic Reconstr. Surg.* 81: 672-676, 1988.
- 2) Buser, D., Bragger, U., Lang, N. P. and Nyman, S.: Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin. Oral Implants Res.* 1: 22-32, 1990.
- 3) 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. *Scand. J. Plastic Reconstr. Surg. Hand Surg.* 24: 13-19, 1990.
- 4) Kikuchi, M., Suetsugu, Y., Tanaka, J. and Akao, M.: Preparation of calcium phosphate-CPLA composite. *Bioceramics* 9: 395-398, 1996.
- 5) Kikuchi, M., Suetsugu, Y., Tanaka, J. and Akao, M.: Preparation and mechanical properties of calcium phosphate/copoly-L-lactide composite. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 8: 361-364, 1997.
- 6) 菊池正紀, 趙 晟伯, 田中順三, 小山富久, 小林孝之, 高久田和夫, 赤尾 勝: β -リン酸三カルシウム/ポリ乳酸共重合体複合体の作製と生体親和性. 粉体および粉末冶金 45: 36-40, 1998.
- 7) Kikuchi, M., Cho, S. B., Suetsugu, Y., Tanaka, J., Kobayashi, T., Akao, M., Koyama, Y. and Takakuda,

- K. : in vitro and in vivo test of newly developed TCP/CPLA composites. *Bioceramics* 10 : 407-410, 1997.
- 8) 玄 丞然, Jamashidi, K., 筏 義人, 東正一郎, 角谷慶明, 山室隆夫 : ポリ乳酸-アパタイト複合体の骨充填. 高分子論文集 42 : 771-776, 1985.
 - 9) Bergsma, J. E., de Bruijn, W. C., Rozema, F. R., Bos, R. R. M. and Boering, G. : Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 16 : 25-31, 1995.
 - 10) Matsusue, Y., Hanafusa, S., Yamamura, T., Shikunami, Y. and Ikeda, Y. : Tissue Reaction of Bioabsorbable Ultra High Strength poly (L-lactide) Rod. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 317 : 246-253, 1995.
 - 11) Suganuma, J. and Alexander, H. : Biological Response of Intramedullary Bone to Poly-L-Lactic Acid. *J. Appl. Biomaterials* 4 : 13-27, 1993.
 - 12) Choueka, J., Charvet, J. L., Koval, K. J., Alexander, H., James, K. S., Hooper, K. A. and Kohn, J. : Canine bone response to tyrosine-derived polycarbonates and poly (L-lactic acid). *J. Biomed. Mat. Res.* 31 : 35-41, 1996.
 - 13) Kikuchi, M., Sato, K., Suetsugu, Y., Tanaka, J., Koyama, Y. and Takakuda, K. : Changes in mechanical properties and GBR application of TCP/CPLA. *Bioceramics* 11 : 153-156, 1998.
 - 14) 小林孝之, 赤尾 勝, 小山富久, 高久田和夫, 宮入裕夫, 菊池正紀, 田中順三 : β -TCP/CPLA 複合体の骨欠損における応用. 第 124 回日本獣医科学会学術講演集, 1997.
 - 15) 松坂賢一, 井上 孝, 天野高宏, 吉 英介, 中村社綱, 下野正基 : GBR により形成される初期骨組織に関する実験的研究, 特に PCNA 細胞動態に関する検討. *日口腔インプラント誌* 9 : 1-7, 1996.
 - 16) 松坂賢一, 井上 孝, 天野高宏, 浅香 充, 中村社綱, 下野正基 : GBR により形成される初期骨組織に関する実験的研究. 共焦点レーザー顕微鏡による石灰化の検討. *日口腔インプラント誌* 10 : 62-66, 1997.