



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	家兔下顎骨空洞の治癒過程におけるPLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュの有用性の検討
Author(s)	野呂, 洋輔; 大廣, 洋一; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 31(2), 62-69
Issue Date	2010-12-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/45800
Type	journal article
File Information	04_noro.pdf



原 著

家兎下顎骨骨空洞の治癒過程における PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュの有用性の検討

野呂 洋輔¹ 大廣 洋一¹ 鄭 漢忠¹ 吉村 善隆²
出山 義昭² 飯塚 正³ 鈴木 邦明² 戸塚 靖則¹

抄 録：顎骨含む悪性腫瘍の治療においては、欠損に対し骨移植を行うこともあるが、新たな手術侵襲を患者に与えるため、生体材料の応用が試みられている。本研究では、生体内で溶解かつ吸収される特徴を持つ poly (DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) とコラーゲンのハイブリッドメッシュの骨再生における有用性を明らかにすることを目的に、雄の成熟家兎の下顎骨体部頰側に外骨膜ごと切除した骨空洞を形成し、ハイブリッドメッシュで骨空洞を被覆した際に骨形態の回復が得られるかを形態学的に検索した。さらに、in vitro においてハイブリッドメッシュの培養細胞への影響を検討した。

- 1) 骨空洞形成から10日目に、対照群では切除された骨膜外側の軟組織の侵入が著明であるのに対し、ハイブリッドメッシュ使用群では軟組織の侵入を防ぎ、舌側皮質骨からの新生骨の形成を認めた。ただし、ハイブリッドメッシュと接する軟組織中には炎症細胞の浸潤を認めた。30日目には、対照群では顎骨内に軟組織が残存し陥凹した形態であったのに対し、ハイブリッドメッシュ使用群では顎骨形態が回復していた。60日目には、ハイブリッドメッシュ使用群ではハイブリッドメッシュの溶解ならびに食食細胞による吸収を認めた。
- 2) ハイブリッドメッシュを C57BL/6マウスの背部皮下に移植し、14日目まで観察したが、ハイブリッドメッシュと接する軟組織中に炎症細胞の浸潤は認めなかった。
- 3) C57BL/6マウス由来の培養骨芽細胞である MC3T3-E1細胞とハイブリッドメッシュを共培養したところ、ハイブリッドメッシュの有無にかかわらず細胞は増殖可能であった。しかし、25日以上長期培養の結果、PLGAの加水分解による培養液の pH の低下に伴い細胞は増殖不可能であった。

以上より、PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュは生体においては、種特異的な炎症反応を惹起する可能性があるものの、顎骨の形態を保持しながら骨を形成するには有用であること、ならびに短期間の培養であれば細胞増殖に影響を与えないことが示唆された。

キーワード：骨再生、生体材料、外骨膜、PLGA

緒 言

口腔顎顔面領域の疾患のなかでも先天・後天異常、外傷、炎症、嚢胞ならびに腫瘍においては、治療後に顎骨形態異常をきたすことがある。口腔では形態と機能は密接な関係を持っており、形態異常はすなわち機能異常につながり、咀嚼、発音などに多大な影響を及ぼす。顎骨ならびに長管骨の形態回復には、外骨膜が重要な役割をはたしていることが報告されており¹⁻³⁾、外骨膜を病変とともに切除せざるをえない悪性腫瘍の治療においては、患者固有の顎骨形態を回復するのは困難を極める。現在、顎骨欠損を伴う悪

性腫瘍の治療には、一般にチタン性金属材料と自家骨移植の併用、または合成高分子等の人工材料を用いることが多い。自家骨移植には、古くから応用されている骨組織を他部位から採取する遊離自家骨移植、または骨組織を移植部位近傍から採取する有茎骨移植、さらには近年、血管吻合技術の進歩に伴い、血管柄付き遊離骨移植がある。特に、血管柄付き遊離骨移植は採取骨の血流が術直後から保証されていることから、放射線治療などにより血流障害のある移植床の骨の状態に左右されないため、臨床で使用されることが多くなってきている^{4,5)}。しかし、いずれの自家骨移植も自家骨採取部位への二次的な手術侵襲や採取部位で

¹⁻³〒060-8586 北海道札幌市北区北13条西7丁目

¹北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学教室 (主任：戸塚靖則 教授)

²北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座細胞分子薬理学教室 (主任：鈴木邦明 教授)

³北海道大学大学院歯学研究科学術支援部 (主任：川浪雅光 教授)

の感染などの合併症を引き起こす可能性があること、骨採取量に限界があること、さらには採取骨と移植床の顎骨形態の不一致から顎骨の形態ならびに口腔の機能回復に満足 of いく結果が得られていないのが現状である。

一方で、自家骨移植のリスクを軽減するために古くから合成高分子化合物を用いた生体吸収性人工材料とおもに腸骨から採取した遊離自家骨移植を併用した顎骨再建法が臨床でも応用されており^{6,7)}、症例によっては良好な結果が得られている。現在、Food and Drug Administration (FDA) に承認されている合成高分子の人工材料は、polyglycolic acid (PGA)、polylactic acid (PLA) ならびに本研究で用いた poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) である。これら合成高分子化合物は scaffolds として骨形成の場を提供することは可能であるが、疎水性であることから細胞接着の足場にはなり得ないため、骨芽細胞との共培養により骨形成性能を持たせた合成高分子-細胞複合材料という将来性に欠けることが問題点としてあげられる⁸⁾。

今回、われわれは、scaffolds としての機械的強度を PLGA に、また、細胞接着性をコラーゲンに依存するべく開発された PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュ⁹⁾を用いて、成熟家兎の下顎骨における骨形成への影響ならびに培養株化細胞に対する影響について検討した。

材 料 と 方 法

1. PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュ

PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュ⁹⁾は、独立行政法人物質・材料研究機構生体材料研究センター 陳国平博士の御厚意により供与された。

2. 実験動物

骨空洞形成の実験には、月齢約18か月、平均体重約3.0kgの健康な雄の成熟家兎（日本白色種）を用いた。実験期間中は家兎専用の金属製飼育箱に1匹ずつ入れ、十分な固形飼料と水道水を与えて飼育した。

動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に従って行った。

3. 下顎骨空洞の形成方法

Ahmed¹⁰⁾、村上¹¹⁾らの方法に従った。塩酸ケタミン（第一三共社製、東京）5 mg/kg、塩酸メデトミジン（ファーマス社製、フィンランド）100 µg/kg を筋注して家兎を鎮静させた後、左側下顎骨体部の剃毛を行った。同部の皮膚に2%ポビドンヨード（明治製菓社製、東京）を用いて消毒した後、8万分の1エビネフリン含有2%塩酸リドカイン（アストラゼネカ社製、大阪）約2 mlを用いて、オトガイ正中部から左顎下部にかけて局所麻酔を行った。

次いで、両側顎下腺を避け、オトガイ下部正中から左下顎角部にかけて皮膚を切開し左下顎骨下縁部の外骨膜を露

出させ同部外骨膜を切開した後、頬側外骨膜を周囲軟組織とともに鈍的に剥離し臼歯部に相当する骨体部皮質骨を露出させた。滅菌した生理食塩水の注水下に、第二小臼歯および第一大臼歯に相当する骨体部の頬側皮質骨を、近遠心距離12mm、高さ10mmの長方形に削除し、舌側皮質骨に達するまで深さ平均4 mmの骨空洞を形成した。骨空洞内と周囲軟組織を十分に洗浄した後、骨空洞に相対する部位の骨膜を切除し、対照群ではそのまま軟組織で被覆し、実験群では骨空洞をハイブリッドメッシュで被覆した後に閉鎖創とした（図1）。

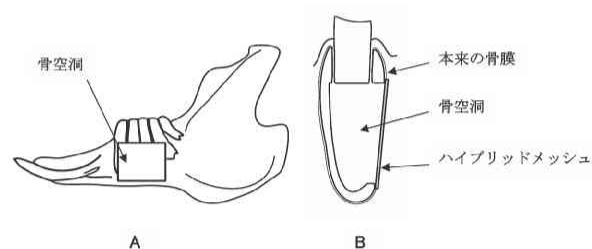


図1 下顎骨空洞形成の模式図（A：側面，B：前額断面）

4. 組織標本作製

骨空洞形成10日、30日、60日後に各群3匹ずつの家兎を屠殺し、周囲軟組織を含めて下顎骨を摘出した。なお屠殺は、塩酸ケタミンならびに塩酸メデトミジンの過剰投与と心臓穿刺による空気塞栓法により行った。下顎骨を摘出した後、通法に従い10%中性ホルマリンにて固定後、蟻酸クエン酸溶液（10%クエン酸Na（w/v）、20%蟻酸（v/v））にて14日間脱灰を行い、パラフィン包埋し5 µmの切片を作成した。その後、ハマトキシリン・エオジン染色を行った。

5. 細胞培養ならびに細胞数計測

マウス C57BL/6由来である骨芽細胞様（MC3T3-E1）細胞を使用した。細胞は10%牛胎仔血清（Roche Diagnostic Corp., Castle Hill, Australia）を添加した α -minimum essential medium (α -MEM), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) -N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)（いずれも和光純薬工業社製、大阪）を用い、 5×10^4 細胞/ml と 2×10^4 細胞/ml の MC3T3-E1 をそれぞれ50 µl ずつ96well プレートに分注し5% CO₂-95% 空気、37℃ 気相下にて培養した。細胞数の測定は、培養開始から24時間ごとに7日目まで行った。

Vialight Plus Cell Proliferation And Cytotoxicity Bio Assay Kit (LONZA, USA) のプロトコールに従い、細胞数はATP量で表した。すなわち、培養プレート室温で5分間放置したのち、50 µl の Cell Lysis Reagent を各々の穴に加えて、10分間放置し細胞を溶解した。その後、細胞可溶化物の50 µl を NUNCTM 96well プレートに移し Cell

Assay Buffer を加え、マルチラベルカウンタ (Wallac 1420 ARVOsx) (パーキンエルマーライフサイエンスジャパン社製, 東京) を用いて相対発光量 (Relative Light Units, RLU) を測定し, ATP 量とした。

6. 統計学的検討

統計学的検定には Student's *t*-test を用い, $p < 0.05$ 以下を統計学的に有意差があるものとした。

結 果

1. 家兎の骨空洞の治癒経過

骨空洞形成 7~10 日目にかけて対照群では, 手術部位は正常組織に被覆されており, 下顎骨周囲に腫脹ならびに肉芽組織の形成を認めなかった (図 2 A)。一方, ハイブリッドメッシュ使用群では手術部位に腫脹を認め, 皮膚ならび

に周囲軟組織を除去した後の摘出した下顎骨外側部には肉芽組織を認めた (図 2 B)。組織学的には, 骨空洞形成から 10 日目に, 対照群では切除された骨膜外側からの軟組織の侵入が著明であった (図 3 A)。拡大像では, 線維化の傾向を示す肉芽組織を認めた (図 3 B)。一方, ハイブリッ

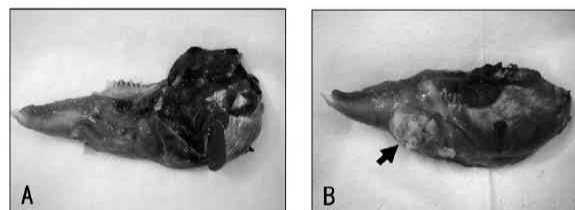
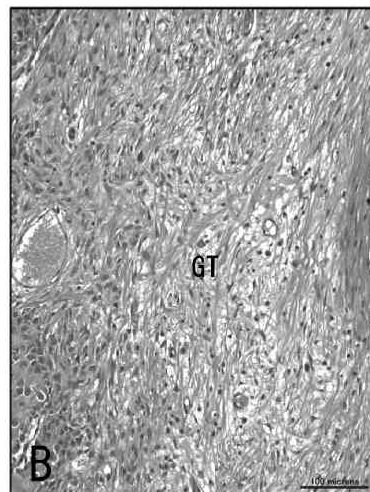
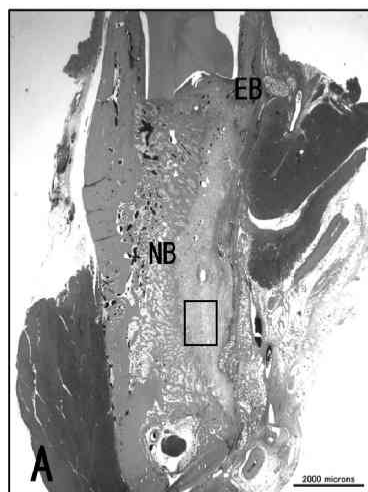


図 2 骨空洞形成後 7 日目の摘出標本

A は対照群。

B は骨空洞を形成しハイブリッドメッシュを移植した下顎, 肉芽組織を認める (矢印)。

PLGA-hybrid
mesh(-)



PLGA-hybrid
mesh(+)

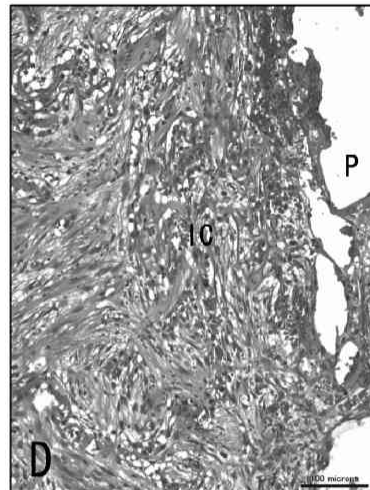
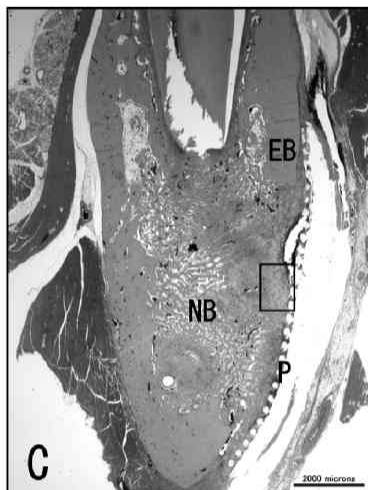


図 3 骨空洞形成後, 10 日目の組織像

P はハイブリッドメッシュ, NB は新生骨, IC は炎症性細胞, GT は肉芽組織を示す。

A は対照群。

B は A (□部) の拡大像。線維化の傾向を示す肉芽組織がみられる。

C はハイブリッドメッシュを移植した下顎骨。

D は C (□部) の拡大像。膜の内側で軽度の炎症性細胞浸潤を伴う肉芽組織がみられる。

ドメッシュ使用群ではハイブリッドメッシュが軟組織の侵入を防ぎ、本来の下顎骨の外形を保持していた(図3 C)。拡大像では、ハイブリッドメッシュに接する肉芽組織中には炎症細胞浸潤は軽度であった(図3 D)。

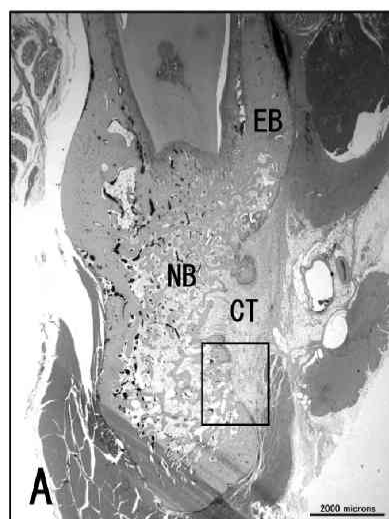
骨空洞形成から30日目には、対照群、ハイブリッドメッシュ使用群ともに骨形成が進行していた。対照群では骨空洞内への周囲軟組織の侵入により陥凹した形態で骨新生が行われており(図4 A)、拡大像でも新生骨の形成と多くの結合組織が混在していた(図4 B)。ハイブリッドメッシュ使用群では、下顎骨の形態が保持されたまま治癒が進んでおり(図4 C)、拡大像ではハイブリッドメッシュに接する部位に、炎症細胞浸潤の消退と骨新生を認めた(図4 D)。

骨空洞形成から60日目には骨改造を認め、ハイブリッドメッシュに接する部位では皮質骨化しており、中央部では骨髓形態の回復も認めた(図5 A)。また、ハイブリッドメッシュは連続性を欠いており、その周囲には巨細胞が存在していた(図5 B, C)。

2. ハイブリッドメッシュの培養細胞に対する影響

ハイブリッドメッシュが株化培養細胞の増殖能に影響を与えるか検討した。ハイブリッドメッシュとc57/BL6マウス由来の株化骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1とを共培養したところ、MC3T3-E1細胞はハイブリッドメッシュの存在下でも、細胞単独で培養しているときと同程度の増殖能を保っていた(図6)。

PLGA-hybrid
mesh(-)



PLGA-hybrid
mesh(+)

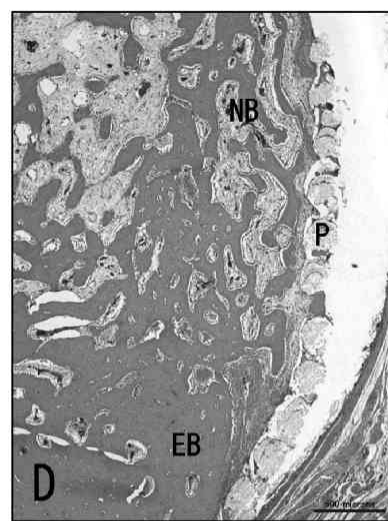
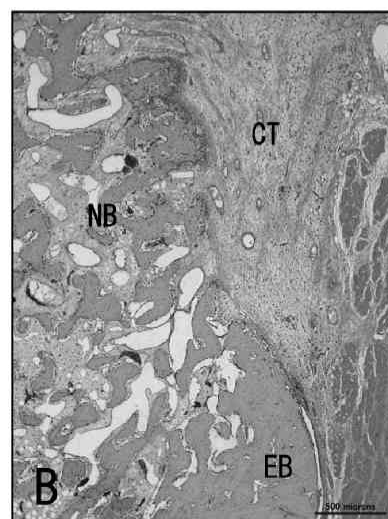
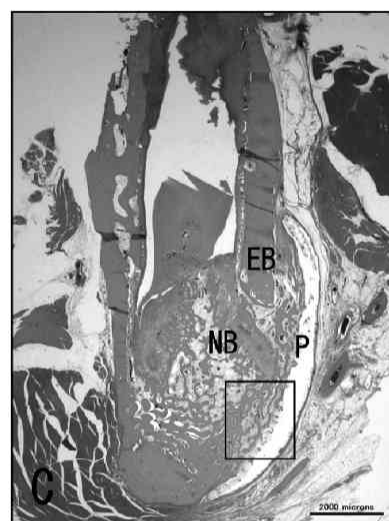


図4 骨空洞形成後、30日目の組織像

Pはハイブリッドメッシュ、NBは新生骨、CTは結合組織、EBは既存骨を示す。

Aは対照群。

BはA(□部)の拡大像。空洞内に新生骨の形成はみられるが結合組織もみられ、外形の回復はみられない。

Cはハイブリッドメッシュを移植した下顎骨。

DはC(□部)の拡大像。既存骨の断端から連続して新生骨の形成がハイブリッドメッシュに沿ってみられ、外形が回復されている。

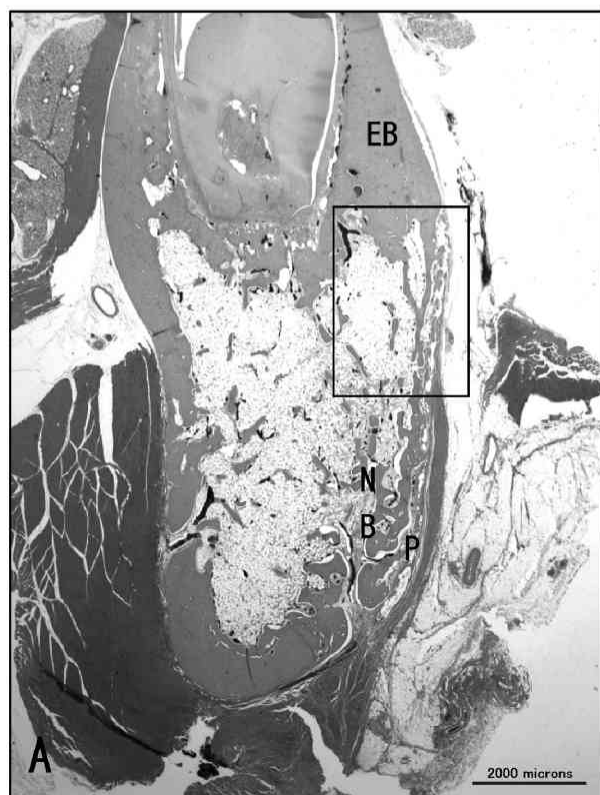


図5 骨空洞形成後、60日目の組織像

Pはハイブリッドメッシュ、EBは既存骨、NBは新生骨、矢印は巨細胞を示す。

Aはハイブリッドメッシュを移植した下顎骨。

BはA (□部)の拡大像。膜に沿って緻密な骨組織がみられる。

CはB (□部)の拡大像。多核巨細胞がみられ、膜の分解が進み構造が不明瞭になっている。

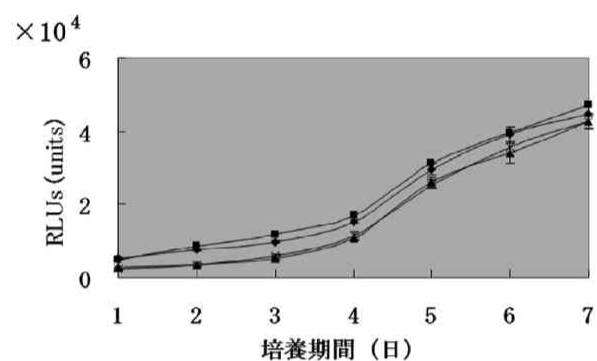
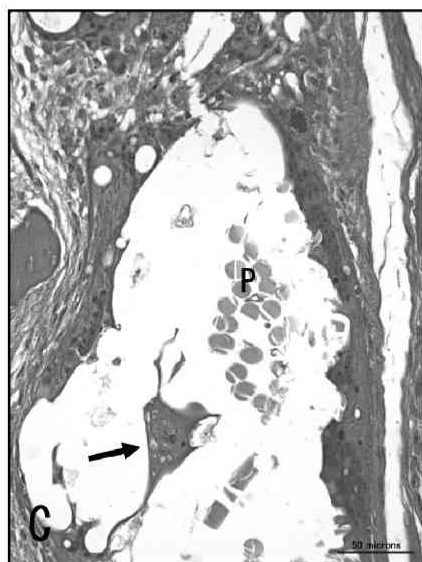
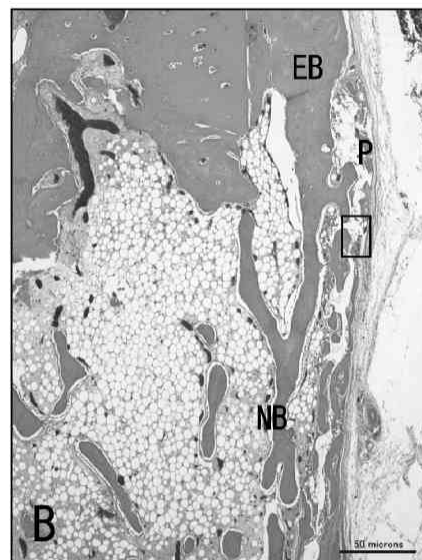


図6 MC3T3-E1細胞の増殖に対するハイブリッドメッシュの影響

■は 5×10^4 細胞/ml をハイブリッドメッシュ上で培養、◆は 5×10^4 細胞/ml のみを培養、×は 2×10^4 細胞/ml をハイブリッドメッシュ上で培養、▲は 2×10^4 細胞/ml のみを培養。測定は、培養開始から24時間ごとに7日目まで行った、それぞれ有意差は見られない。

考 察

本研究で、PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュは骨空洞モデルにおいて、外骨膜様に機能し骨形態の回復に有用であることが示された。これまでにPLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュは、動物モデルで軟骨形成、その他の再生医療に有用であることが示されている¹²⁾が、より臨床的な骨空洞モデルでの骨形成を実験的に示したのはこの研究が初めてである。骨空洞モデルを用いて治療過程の動態を形態学的に検討した研究には村上の報告¹¹⁾がある。この研究で、村上は骨空洞の治療過程において温存された外骨膜が周囲軟組織の骨空洞内への侵入防止、新生骨形成の誘導を介して下顎骨の形態の回復と皮質骨の形成とに重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかし、顎骨内の良性腫瘍における治療では外骨膜は温存されるが、悪性腫瘍では外骨膜は病変とともに切除される場合

がほとんどである。今回の検討でハイブリッドメッシュが外骨膜と同様に形態保持の機能を果たしていることが示唆されたのは臨床応用を考える際に有用であると考えられる。

今回の研究で、外骨膜が欠損している状態にもかかわらず骨空洞形成60日目の標本でハイブリッドメッシュの直下に緻密骨の形成を認めた。家兎の下顎骨骨折モデルにおいても、外骨膜における骨新生が骨折治癒に重要な役割を果たしていること¹⁾、同じく家兎を用いた下腿の仮骨延長術においても、とりわけ成熟家兎では外骨膜が欠失すると仮骨が形成不全に陥ることが示唆されている³⁾。われわれの骨空洞モデルで観察された緻密骨の形成は、ハイブリッドメッシュが軟組織陥入防止により形態保持に役立つのみならず、骨再生に質的影響を与えている可能性も考えられた。今後、細胞接着に重要な役割を果たしているハイブリッドメッシュの構成成分であるコラーゲンが骨再生における緻密骨の形成に関与しているか否か PLGA 単独メッシュと比較し今後検討の余地があると思われた。

生体材料の具備すべき要件の一つに、可能であれば組織再生ののち、吸収・分解される性質を持つことがあげられるが、今回用いたハイブリッドメッシュは、骨空洞形成後60日目の組織標本で観察されたように、吸収・分解されていることが明らかになった。材料の特性から PLGA においては加水分解が起こっていると思われるが、ハイブリッドメッシュ周囲に多核巨細胞が出現していることからコラーゲンに対してはマクロファージなどによる貪食・吸収も同時に行われている可能性が示唆された。また、この時期においてはハイブリッドメッシュ直下には緻密な骨の形成を認めることから、吸収の時期が適切であること、さらには炎症細胞の浸潤を強く認めないことから、ハイブリッドメッシュの吸収・分解には炎症反応を伴わないという骨再生にとって有利な結果が得られた。

培養系における、ハイブリッドメッシュの特性を検討するために、培養株化骨芽細胞 MC3T3-E1細胞とハイブリッドメッシュとを共培養したところ、培養液のみの通常培養を行った対象群と比較して約1週間の観察では、ハイブリッドメッシュは細胞株の増殖能に影響を与えないことが明らかになった。

現在、臨床では骨欠損を補うために、遊離骨移植、血管枝付き遊離骨移植などが行われている。これらの確立された治療法により移植骨の生着率は良好であるが、形態再現の限界、新たな手術侵襲を患者に与えるなど不利な点もある。今回用いた PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュなどの生体材料開発の進歩により、再建顎骨に自由な形態を付与する可能性、さらには患者への多大な手術侵襲を回避する可能性がある。そのためには、より臨床に即した完全に下顎骨の連続性を絶つ区域切除による欠損モデルの確立が重要であると考えられた。

結 論

本研究により、PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュは、炎症反応を惹起する可能性があるものの、骨空洞という欠損に対して顎骨の形態を保持しながら骨を形成させることに有用であること、ならびに培養細胞に対して増殖能に影響を与えない可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、快く材料の提供ならびに技術的な助言をいただきました独立行政法人物質・材料研究機構生体材料研究センター 陳 国平博士に深謝しますとともに、本研究に数々の御援助、御協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学教室ならびに口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の教室員各位、および北海道大学大学院歯学研究科学術支援部の高橋智美技術職員に心よりお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 金子正行, 金子和子: 顎骨の骨折治癒過程に関する放射線学的ならびに電子顕微鏡的研究. 口科誌, 39: 158-168, 1990.
- 2) 永田見生: 長管骨再生に関する実験的, 臨床的研究(骨膜の骨形成能について). 久留米医学会雑誌, 43: 1107-1137, 1980.
- 3) 立川勝司: 仮骨延長法についての実験的研究—特に年齢因子と骨膜, 骨髄の役割に関して. 広大医誌, 40: 389-403, 1992.
- 4) 関口順輔, 小林誠一郎, 高田裕子, 秋月種高: 血管柄付肩甲骨移植術の術式適応について. 形成外科, 35: 391-398, 1992.
- 5) 田原真也, 中原 実, 天津睦郎, 牧野邦彦: 肩甲骨皮弁, 腓骨皮弁による下顎再建. 頭頸部腫瘍, 26: 441-445, 2000.
- 6) Louis P, Holmes J, Fernandes R: Resorbable mesh as a containment system in reconstruction of the atrophic mandible fracture. J Oral Maxillofac Surg 62: 719-723, 2004.
- 7) Matsuo A, Chiba H, Takahashi H, Toyoda J, Abukawa H: Clinical application of a custom-made bioresorbable raw particulate hydroxyapatite/poly-L-lactide mesh tray for mandibular reconstruction. Odontology 98: 85-88, 2010.
- 8) Chen G, Ushida T, Tateishi T: A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. J Biomed Mater Res 51: 273-279, 2000.
- 9) Chen G, Sato T, Ohgushi H, Ushida T, Tateishi T and Tanaka J: Culturing of skin fibroblasts in a thin

- PLGA-collagen hybrid mesh. *Biomaterials* 26 : 2559-2566, 2005.
- 10) Mohiuddin Ahmed: Role of periosteum in healing process of bony cavities in rabbit mandibles. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 5 : 65-81, 1993.
- 11) 村上有二：成熟家兎下顎骨骨空洞の治癒過程における骨再生機序に関する病理組織学的研究. 北海道歯誌, 15 : 161-184, 1994.
- 12) Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Shirasaki Y, Ochiai N, Tateishi T : The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J Biomed Mater Res A* 67 : 1170-1180, 2003.

ORIGINAL

Evaluation of PLGA-collagen hybrid mesh in the healing process of bony cavities in rabbit mandibles.

Yousuke Noro¹, Yoichi Ohiro¹, Kanchu Tei¹, Yoshitaka Yoshimura²,
Yoshiaki Deyama², Tadashi Iizuka³, Kuniaki Suzuki² and Yasunori Totsuka¹

ABSTRACT : In the treatment of oral malignant tumors including mandibles, free- or none-vascularized bone grafts have come to be widely employed. Recently, many types of biomaterials are applied to protect the patients from the disadvantages of reconstructive surgery brought on by induced invasive stress. This study evaluated the efficacy of a biodegradable hybrid mesh of synthetic poly (DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-collagen mesh in the healing process of bony cavities in rabbit mandibles. Further, the influence of the PLGA-collagen hybrid mesh (hybrid mesh) on a cultured cell line was examined. A bony cavity was prepared in the mandibles of rabbits and the rabbits were divided into two groups (control and experimental). In both groups, the periosteum of the cavity area was completely resected before the cavity preparation. In group 1 (control), the cavity was covered directly with the soft tissue without the periosteum. In group 2 (experimental), the cavity was covered with the hybrid mesh before the closure of the surgical site. The histological investigation demonstrated that the bony cavities were regenerated completely with the pre-resected cortical outline in the experimental group, 30 days after the surgery. In the experimental group, inflammatory cell invasion around the hybrid mesh were observed 10 days after the surgery. Biodegradation and absorption by multinuclear giant cell was observed 60 days after the surgery. There were no differences in a growth ability after one week when co-cultivation mouse-derived MCW3T3-E1 cells with or without the hybrid mesh. These results indicate the PLGA-collagen hybrid mesh can be a useful material in the treatment of defects of the mandible.

Key Words : Bone healing, Biomaterial, Periosteum, PLGA-collagen, Tissue engineering

¹⁻³Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

¹Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Patho-biological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief: Prof. Yasunori Totsuka)

²Molecular Cell Pharmacology, Department of Oral Patho-biological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief: Prof. Kuniaki Suzuki)

³Support Section for Education and Research, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief: Prof. Masamitsu Kawanami)