

ポリグリコール酸(PGA)縫合糸の分解吸収に伴う ラット顎二腹筋の組織変化

菅野勝也

Histopathological Changes of Rat Digastric Muscle Induced by Degradation and Absorption of Polyglycolic Acid (PGA) Sutures

Katsuya KANNO

The purpose of this study was to analyze morphological changes of skeletal muscles induced by degradation and absorption of PGA synthetic absorbable sutures implanted in digastric muscles of male Wistar rats. Rats were grouped in terms of suture types into PGA group, non-absorbable suture group and pierced group. On days 3-112 after the implantation and transfixion, the frozen sections were stained for enzymatic and immunohistological examination, and the thickness of the muscle fiber was measured. The duration of appearance of myogenin positive nuclei and MHC-developmental positive cells were similar among the 3 groups, and the morphology of the muscle tissue after the absorption of the sutures was not different from that of normal muscle tissue. However, more ACP positive cells appeared in PGA group during degradation and absorption. In addition, the muscle fibers were thinner and more Type 2C fibers were observed in this group.

Key words : PGA, muscle, myogenin, MHC-developmental, AM-ATPase

緒 言

ポリグリコール酸 (Polyglycolic acid 以下PGA) は、生体内で加水分解するという特性から筋肉などの縫合に使用するPGA合成吸収糸(以下PGA糸)の主成分である。さらにPGAは分解吸収し消失する利点と分解吸収に伴う生体への安全性が確認されているため、縫合糸だけでなく神経や骨・軟骨再生の足場¹⁻³⁾としても利用されている。PGA糸は、合成非吸収糸と比較すると分解による抗張力の減少や強い組織反応など欠点が報告されている⁴⁻⁶⁾。これに対し、吸収糸は成分や形状、太さや伸張性が改良されたため吸収糸

の抗張力や結紮力は非吸収糸のそれらと遜色はないという報告もある⁷⁻¹⁰⁾。Georgeら⁹⁾はモノフィラメント形状のPGA合成吸収糸と非吸収糸を比較した結果、結紮力や組織反応において両者に違いはなかったと述べ、またShinoharaら⁸⁾はPGA糸と非吸収糸を用いた口唇形成術患者に対して、それぞれの縫合糸による縫合後の治癒過程を術後の創閉鎖や審美的な面から比較検討したところ両者に違いはなかったと報告している。

一方、PGAは生体内で補体活性化回路を刺激し炎症反応を起こし¹¹⁾、また、PGAはサイトカイン産生を増加させて組織再生を抑制することも報告されている¹²⁾。これらの他にPGA糸は様々な視点から検

受付：平成24年11月28日，受理：平成25年2月5日
奥羽大学大学院歯学研究科顎口腔外科学専攻
(指導：高田 訓教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ohu
University, Graduate School of Dentistry
(Director : Prof. Satoshi TAKADA)

討され、George ら¹³⁾や Angela ら¹⁴⁾は合成吸収糸の抗張力や結紮力、細菌の浸潤などについて、Molea ら¹⁵⁾は合成吸収糸の組織内での分解過程と縫合糸周囲に浸潤する細胞について、Sönmez ら¹⁶⁾は合成吸収糸間での創部の治癒や炎症反応の比較についてそれぞれ報告している。しかし、筋肉縫合に用いるPGA糸が筋組織内で分解吸収され、消失するまでの間に、周囲の筋線維にどのような組織変化が起こるかについては詳細に検索されていない。

骨格筋はアクトミオシンアデノシントリホスファターゼ（以下AM-ATPase）に対する酵素組織化学的染色により生理学的特徴と相関するいくつかの筋線維タイプに識別することができる¹⁷⁾。中でも未分化で生理学的特徴を持たない筋線維をType2C線維として区別することができ、胎生期や出生後間もない時期の骨格筋線維や再生筋線維、または神経支配を失い生理的に未分化となった筋線維にType2C線維が見いだされる¹⁷⁾。これまでに、滝沢¹⁸⁾は物理的侵襲が加わった骨格筋が治癒する際に新たな環境や機能に順応して筋線維が再生すること、また、金¹⁹⁾は筋組織内で新たな神経筋接合が生じると筋線維のタイプや機能が変化することを、いずれもAM-ATPase染色を用いて明らかにしている。しかしながら、骨格筋組織内ではPGA糸の分解吸収において、AM-ATPase染色で識別されるType2C線維がどのように出現するかについては解明されていない。

損傷を受けた骨格筋筋線維は、筋線維と基底膜との間に存在する筋衛星細胞が分化して生じた筋芽細胞が、互いに融合することにより形成される筋線維として再生する¹⁷⁾。myogeninは筋線維の筋分化調節因子の一つであり、筋衛星細胞が筋芽細胞に分化するまでの過程で、それらの細胞の核に発現するといわれている^{20,21)}。また、骨格筋線維の筋原線維を構成しているミオシン重鎖のアイソフォームとしてMHC-developmentalがある。このミオシン重鎖アイソフォームは胎生期や新生児期に見られる発展途中のミオシン重鎖であり、成長した個体では成熟筋線維には見られず、再生筋線維に特異的に観察される²²⁻²⁴⁾。MyogeninおよびMHC-developmentalはいずれも再生骨格筋細胞の指標として研究に用いられているが、骨

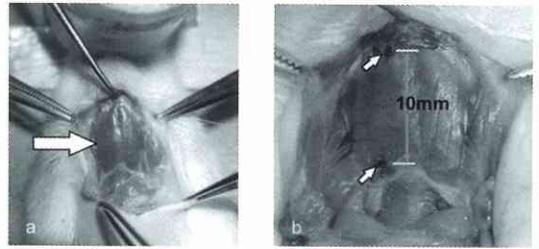


図1 実験部位

- a : ラット顎二腹筋前腹
矢印: ラット顎二腹筋前腹
- b : 縫合糸を筋束に平行に埋没した。
矢印: 埋没した縫合糸の両端
10mm: 糸を埋没した長さ

格筋組織内でのPGAの分解吸収過程においてmyogeninおよびMHC-developmentalの発現状況を検索した報告はない。

そこで本研究においては、ラット顎二腹筋前腹内にPGA糸を埋没し、その分解吸収過程におけるPGA糸周囲筋組織のタイプ変化を酵素組織化学的に解明し、分解吸収されるPGA糸の周囲における筋線維の再生状況を免疫組織化学的に検索することにより、PGA糸の分解吸収が骨格筋組織へ及ぼす影響を検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験動物には8~10週齢、体重260~330gの雄性Wistar系ラット（日本クレア社）を用いた。購入後、水道水と実験動物用固形飼料（オリエンタル社）を1週間以上自由に与え、奥羽大学動物実験研究施設（室温23℃、湿度65%）で飼育した。なお、実験は奥羽大学動物実験委員会の承認を得て奥羽大学実験動物指針を遵守して行った（動物実験許可番号：平成24年度第2012-36号）。

2. 実験方法および実験材料

実験は、ジエチルエーテルおよびハロタンフロセン®全身麻酔下に行った。オトガイ下部から舌骨部まで剃毛し、ポピドンヨードによる消毒後、剃毛部の皮下にエピネフリン1/80,000含有2%キシロカイン®0.5mlの局所麻酔を行ってから、正中線に沿って皮膚を切開した。皮下組織を神経や血管に損傷を与えないよう鈍的かつ丁寧に

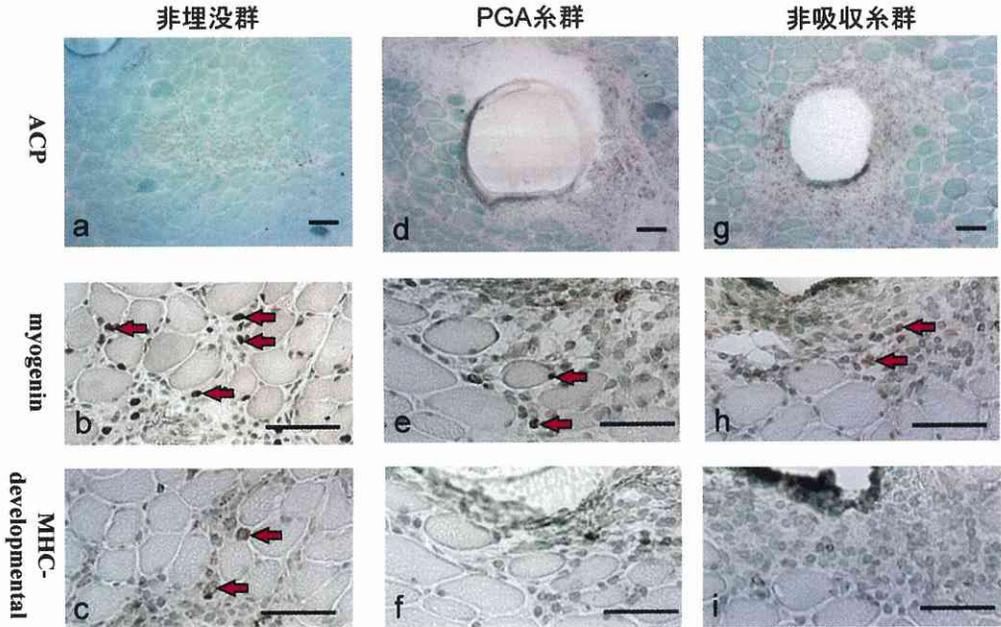


図2 実験後3日

a：非埋没群ACP染色

b：非埋没群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

c：非埋没群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

d：PGA糸群ACP染色

e：PGA糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

f：PGA糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

g：非吸収糸群ACP染色

h：非吸収糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

i：非吸収糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

a, d, g：ACP陽性細胞は非埋没群に比べてPGA糸群および非吸収糸群に広い範囲で認めた。

b, e, h：矢印で示す陽性核を認めた。

c：矢印で示す陽性細胞を認めた。

スケールバー=50 μ m

剥離し、顎二腹筋前腹を明示した(図1 a)。縫合糸埋没操作は長さ19mm 直径0.50mmの縫合用直針(丸針)で行った。80mmの長さとした縫合糸の一端に結び目を付けた後、結び目から60mmの部分で縫合針弾機孔に装着し、弾機孔からの返しを15mmに設定した。筋肉の走行と平行に末梢側から中枢側へ縫合針と縫合糸を通した。筋肉内に埋没する縫合糸の長さは10mmとし、刺入点に結び目が位置するように縫合針を牽引したのち、刺出点に結び目を作り縫合糸の脱落を防いだ(図1 b)。埋没操作後皮下組織と皮膚を縫合し、完全閉鎖創として処置を終了した。

PGA糸にはコビディエンジャパン社のモノフィラメント合成吸収性縫合糸であるバイオシン®を用い、PGA糸を埋没したラットをPGA糸群とした。非吸収糸として同じくコビディエンジャパン社のモノフィラメント合成非吸収糸であるサージプロ®を用い、この非吸収糸を埋没したラットを非吸収糸群とした。縫合糸の太さはいずれも5-0号とした。また、縫合針とPGA糸を筋肉内に通過させ縫合糸を埋没しなかったラットを非埋没群とし、各群を比較検討した。

3. 観察方法

実験後3, 5, 7, 14, 28, 56, 84, 112日を経

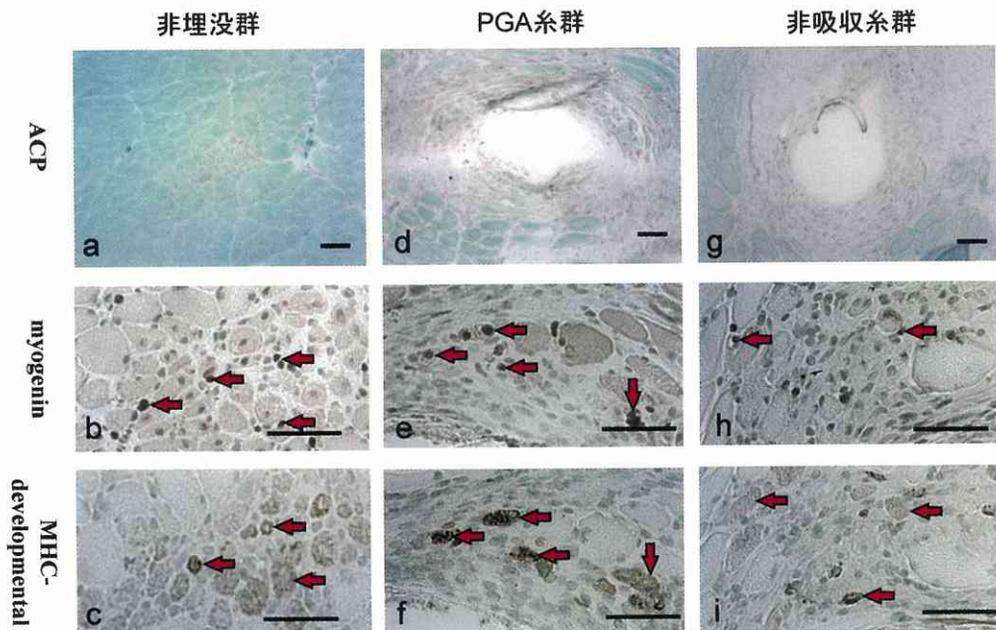


図3 実験後5日

a: 非埋没群ACP染色

b: 非埋没群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

c: 非埋没群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

d: PGA系群ACP染色

e: PGA系群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

f: PGA系群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

g: 非吸収系群ACP染色

h: 非吸収系群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

i: 非吸収系群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

a, d, g: 非埋没群ではACP陽性細胞はわずかで、PGA系群および非吸収系群では糸周囲の広い範囲にACP陽性細胞を認めた。

b, e, h: 矢印で示す陽性核を認めた。

c, f, i: 矢印で示す陽性細胞を認めた。

スケールバー=50 μ m

過したラット各5匹、および対照群としての未実験のラットの顎二腹筋前腹を摘出し検索した。顎二腹筋前腹を起始部から停止部にわたって採取し、水練和したトラガカントゴム（和光純薬）によりコルク栓（径15mm、厚さ5mm）上に筋線維が垂直になるように植立し、液体窒素で冷却したイソペンタン（和光純薬）を用い20～30秒で急速凍結固定した。標本は -25°C に設定したクリオスタット（Cryostat1720, Leitz）を使用し、厚さ8 μ m、顎二腹筋前腹中央部の横断面連続切片を作成した。

1) 酵素組織化学的検索

縫糸周囲の組織反応を伴う有機質溶解やリン酸分解成分を標識するために酸性ホスファターゼ（以下ACP）染色を行った。染色は埜中¹⁷⁾の方法に準じて行った。切片はメタノール・アセトン緩衝液で10分間固定後、流水化で水洗した。N, N'ジメチルホルムアミド（和光純薬）とナフトールAS-BIリン酸（和光純薬）を基質液とし、4%パラローズアニリン（和光純薬）と4%硝酸ナトリウム（和光純薬）を含む反応液（pH4.7～5.0）と切片を 37°C 、60分間反応し、ACPの局在部位

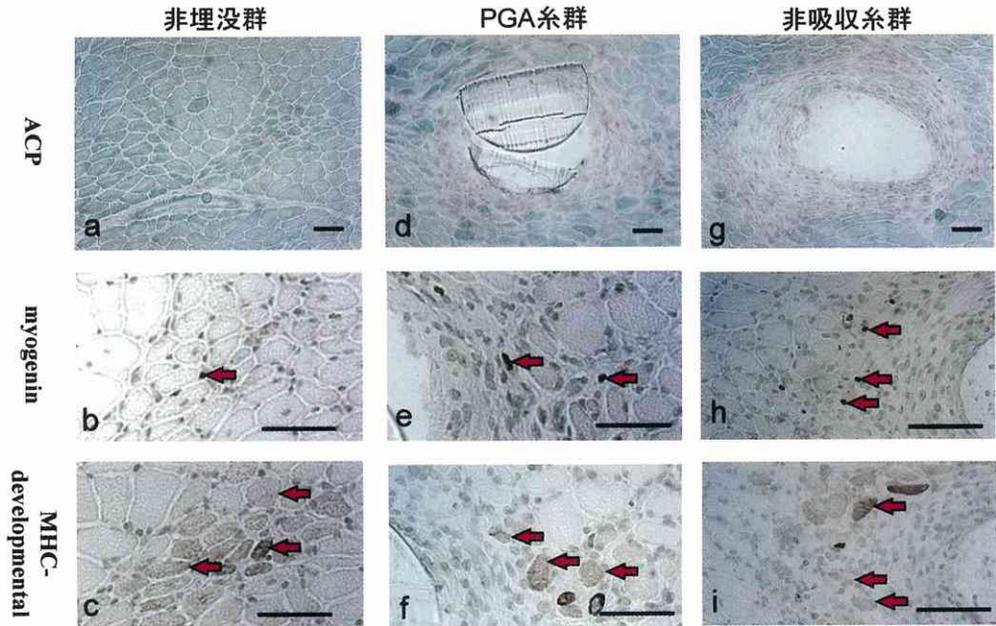


図4 実験後7日

- a : 非埋没群ACP染色
 - b : 非埋没群myogenin抗体による免疫組織化学的染色
 - c : 非埋没群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色
 - d : PGA糸群ACP染色
 - e : PGA糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色
 - f : PGA糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色
 - g : 非吸収糸群ACP染色
 - h : 非吸収糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色
 - i : 非吸収糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色
- a, d, g : 非埋没群ではACP陽性細胞はみられなかった。
 b, e, h : 矢印で示す陽性核を認めた。
 c, f, i : 矢印で示す陽性細胞を認めた。
 スケールバー=50 μm

を赤く発色させた。その後、メチルグリーンで核染色してから観察を行った。

未分化な筋細胞を検索するためにAM-ATPase染色を行った。今回行ったAM-ATPase染色ではアルカリ性 (pH10.1~11.1) と酸性 (pH4.2) のいずれの前処置でも活性を失わず黒く染色されるType2C線維を検索するものである。染色は桙中¹⁷⁾の方法に準じて行った。AM-ATPase染色では各実験動物ごとに20枚の連続切片を用いた。20枚の切片のうち10枚はアルカリ性前処理として、酢酸ナトリウム (和光純薬) と塩化カルシウム (和光純薬) を混合してpH10.1~11.1に調

節した前処理液に室温で15分浸漬した。他の10枚の切片には酸性前処理として、まず酢酸ナトリウムとバルビタールナトリウム (和光純薬)、塩酸 (和光純薬) を混合してpH4.0~4.9に調整した前処理液に室温で5分間浸漬し、続けて酢酸ナトリウムと塩化カルシウムを混合させた前処理液 (pH9.7) で室温で1分間反応させた。以上のアルカリ性または酸性前処理後、酢酸ナトリウムと塩化カルシウム、アデノシン5'-三リン酸二ナトリウム (和光純薬) を混合しpH9.7に調整した反応液に室温で45分間浸漬した。その後1%塩化カルシウム溶液で10分間洗浄し、2%塩化コバル

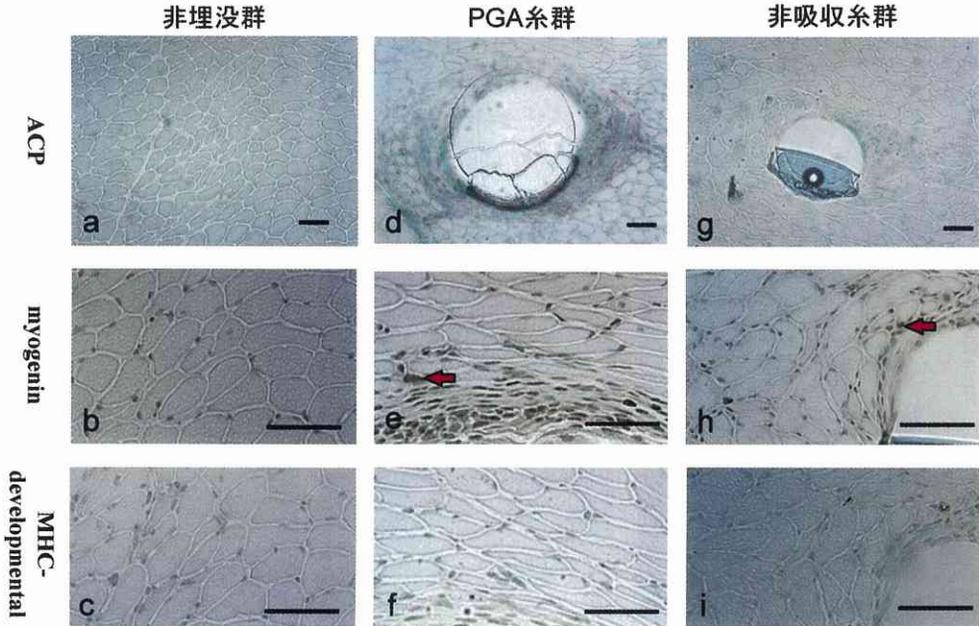


図5 実験後14日

a: 非埋没群ACP染色

b: 非埋没群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

c: 非埋没群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

d: PGA糸群ACP染色

e: PGA糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

f: PGA糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

g: 非吸収糸群ACP染色

h: 非吸収糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色

i: 非吸収糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色

a, d, g: PGA糸群は非吸収糸群に比べ、広い範囲でACP陽性細胞が認められた。

e, h: 矢印で示す陽性核を認めた。

スケールバー=50 μ m

ト(和光純薬)溶液に3分間浸漬し、さらに0.01M 酢酸ナトリウム溶液で洗浄を行ってから1%黄色硫化アンモニウム溶液(関東化学)で発色させたのち観察を行った。

2) 免疫組織学的検索

筋分化調節因子である myogenin を同定するために抗 myogenin 抗体(以下 myogenin)を、再生筋細胞に発現する幼若な骨格筋ミオシン重鎖を標識する抗 MHC-developmental 抗体(以下 MHC-developmental)を用いて免疫組織化学的染色を行った。切片はアセトンで10分間固定後、内因性ペルオキシターゼの除去のため3%過酸化水素水(H_2O_2)を室温で15分間作用させた。500

倍希釈したウサギ抗 myogenin ポリクロナール抗体(M-225; IgG, SANTA CRUZ)と、100倍希釈したマウス抗 MHC-developmental モノクロナール抗体(RNMy2/9D2; IgG, SANVIO B.V)をそれぞれ一次抗体として室温で12時間反応させた。次に、シンプルステインラット MAX-PO (MULTI)(ヒストファイン, ニチレイ)を室温で30分反応させ、ジアミノベンチジン(DAB 基質セット, ニチレイ)を用いて抗 myogenin 抗体の局在部位および抗 MHC-developmental 抗体の局在部位を茶色に発色させた。メチルグリーンで核染色後、観察を行った。

3) 組織形態計測

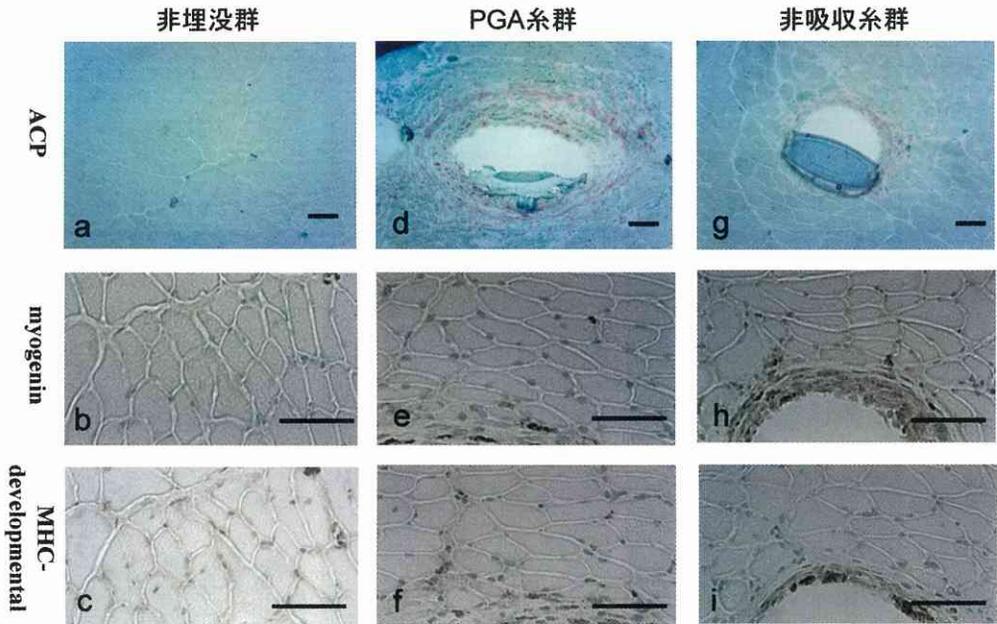


図6 実験後28日
 a：非埋没群ACP染色
 b：非埋没群myogenin抗体による免疫組織化学的染色
 c：非埋没群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色
 d：PGA糸群ACP染色
 e：PGA糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色
 f：PGA糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色
 g：非吸収糸群ACP染色
 h：非吸収糸群myogenin抗体による免疫組織化学的染色
 i：非吸収糸群MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色
 a, d, g：ACP陽性細胞はPGA糸群，非吸収糸群に認めた。
 d, c, e, f, h, i：いずれの染色でも陽性反応を認めない。
 スケールバー=50 μ m

各群の経時的な変化を以下の方法で検索した。
 (1) 縫合糸断面を中心とする1.37mm²あたりのmyogenin染色陽性核数およびMHC-developmental陽性細胞数を計測した。
 (2) 縫合糸周囲の筋線維の太さを評価するために、デジタルマイクロスコープ解析ソフトMotic Image Plus2.2S (SHIMAZU)を用いて分析した。筋線維の太さは、縫合糸断面を中心とする1.37mm²あたりの筋組織の面積を、同じ領域における筋線維数で割り、筋線維一本あたりの太さを算出し、正常筋線維の太さと比較した。
 (3) AM-ATPase染色標本上の、縫合糸を中心とする1.37mm²あたりのType2C筋線維数と総筋

線維数を計測し、Type2C線維の出現率を算定した。
 (4) 統計学的解析として、各実験群間のmyogenin染色陽性核数およびMHC-developmental陽性細胞数、Type2C線維の出現率はそれぞれMann-Whitney U-testを用いて比較検討した。また、縫合糸周囲の筋線維の太さは正常筋線維の太さを対照値とし、Friedman's χ^2 -testを用いて比較検討した。

結 果

1. 酵素組織化学的および免疫組織化学的観察
 実験後3日では非埋没群，PGA糸群，非吸収糸群いずれも筋線維の破壊像とACP陽性細胞が

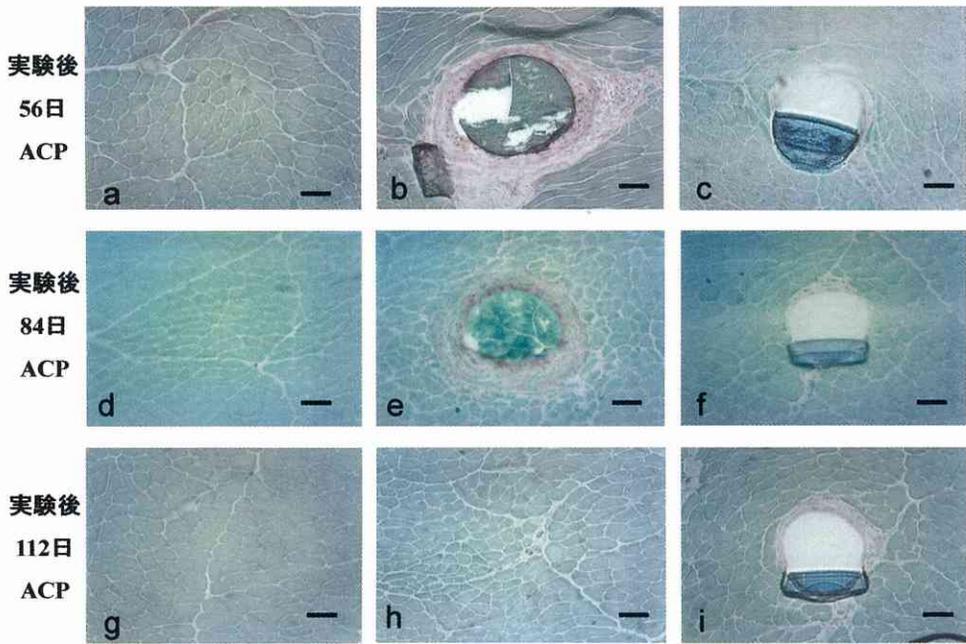


図7 ACP染色

a : 実験後56日非埋没群

b : 実験後56日PGA糸群

c : 実験後56日非吸収糸群

d : 実験後84日非埋没群

e : 実験後84日PGA糸群

f : 実験後84日非吸収糸群

g : 実験後112日非埋没群

h : 実験後112日PGA糸群

i : 実験後112日非吸収糸群

a~c : ACP陽性細胞は非埋没群では認められなかった。PGA糸群では広い範囲にみられ非吸収糸群では糸周囲にわずかに認めた。

d~f : ACP陽性細胞は非埋没群では認められなかった。PGA糸群では縫合糸、ACP陽性細胞ともにわずかに減少し、非吸収糸群ではACP陽性細胞を糸周囲にわずかに認めた。

g~i : ACP陽性細胞は非埋没群では認められなかった。PGA糸群では縫合糸が消失しACP陽性細胞も認められなかった。非吸収糸群では糸周囲にACP陽性細胞がわずかに認められた。

スケールバー=50 μ m

みられた。ACP陽性細胞は非埋没群に比べてPGA糸群と非吸収糸群ではより広い範囲で認められた(図2 a, d, g)。筋分化調節因子であるmyogenin抗体による免疫組織化学的染色では非埋没群、PGA糸群、非吸収糸群に陽性核が多数観察できた(図2 b, e, h)。MHC-developmental抗体による免疫組織化学的染色では陽性細胞が非埋没群にわずかにみられたが、PGA糸群と非吸収糸群には認められなかった(図2 c, f, i)。

実験後5日の非埋没群ではACP陽性細胞は少なく、PGA糸群と非吸収糸群では糸周囲の広い範囲にACP陽性細胞を認めた(図3 a, d, g)。myogenin抗体およびMHC-developmental抗体による染色ではすべての群で陽性反応がみられた(図3 b, c, e, f, h, i)。

実験後7日の非埋没群ではACP陽性細胞はほとんどみられなかった。PGA糸群と非吸収糸群に同程度の範囲でACP陽性細胞がみられた(図

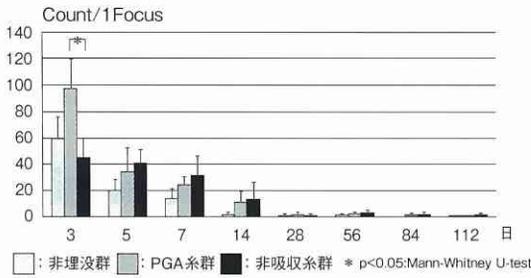


図8 抗myogenin抗体染色陽性核数

すべての群において実験後3日をピークに出現して、以降減少傾向を示し、28日以降ほとんど見られなかった。実験後3日ではPGA糸群の陽性反応数は非吸収糸群より多く有意差をみとめた。

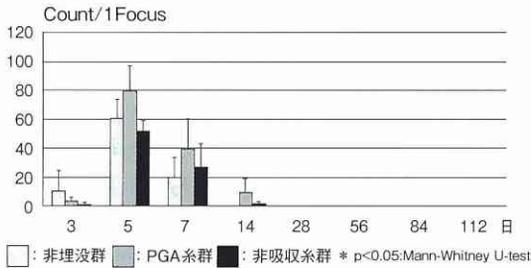


図9 抗MHC-developmental抗体染色陽性細胞数

実験後5日をピークに出現して以降減少傾向を示し、28日以降は認められなかった。

4 a, d, g)。myogenin および MHC-developmental のいずれの免疫組織化学的染色でも、すべての群で陽性反応が見られた (図 4 b, c, e, f, h, i)。

実験後14日では非埋没群に ACP 陽性細胞は認められなかったが、PGA 糸群と非吸収糸群には ACP 陽性細胞がみられ、非吸収糸群に比べ、PGA 糸群で広い範囲に認められた (図 5 a, d, g)。myogenin および MHC-developmental 抗体による染色においても、PGA 糸群と非吸収糸群に陽性反応に認められたが、非埋没群にはみられなかった (図 5 b, c, e, f, h, i)。

実験後28日では、非埋没群に ACP 陽性細胞はみられず、針の通過部分は通過していない部分とほとんど同様の組織像を示していた。ACP 陽性細胞は PGA 糸群、非吸収糸群ともに認めた (図 6 a, d, g)が、myogenin および MHC-developmental

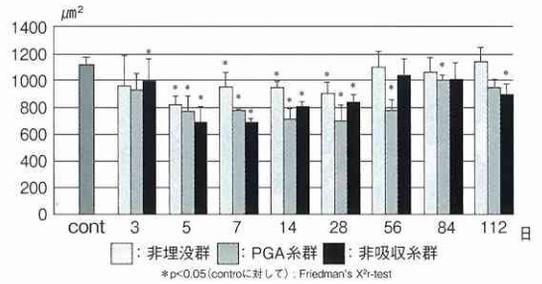


図10 筋線維の太さ

PGA糸群は実験後84日においても有意に筋線維の太さが細い傾向があった。

の陽性反応はすべての群でみられなかった (図 6 b, c, e, f, h, i)。なお、実験後56日から112日までの期間では myogenin および MHC-developmental に対する陽性反応はいずれの群でも認められなかった。

実験後56日では ACP 陽性細胞は非埋没群では認められなかった。PGA 糸群では ACP 陽性細胞が糸周囲の広い範囲にみられ、非吸収糸群では ACP 陽性細胞を糸周囲にわずかに認めた (図 7 a-c)。

実験後84日では ACP 陽性細胞は非埋没群では認められなかった。PGA 糸群では ACP 陽性細胞数が実験後56日と比べわずかに減少し、非吸収糸群では ACP 陽性細胞を糸周囲に少数認めた。なお、84日後の PGA 糸の直径は56日後のそれと比べわずかに減少していた (図 7 d-f)。

実験後112日では ACP 陽性細胞は非埋没群では認められなかった。PGA 糸群では縫合糸が消失し、ACP 陽性細胞も認められなかった。非吸収糸群では糸周囲に ACP 陽性細胞がわずかに認められた (図 7 g-i)。

2. 組織形態計測

1) 抗 myogenin 抗体陽性核数 (図 8)

すべての群において陽性核数は、実験後3日をピークに出現し、実験後5日以降は減少傾向を示し、実験後28日以降では myogenin 陽性核はほとんどみられなかった。実験後3日では PGA 糸群の陽性核数は非吸収糸群の陽性核数より有意に多かった。

2) 抗 MHC-developmental 抗体陽性細胞数

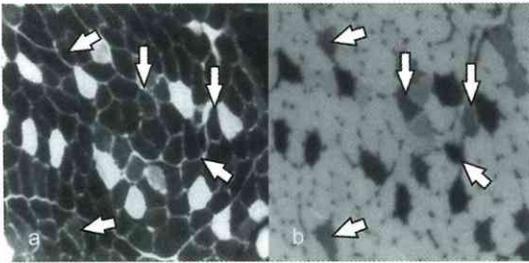


図11 AM-ATPase染色

a: アルカリ性前処理による染色

b: pH4.2前処理による染色

矢印: アルカリ性前処理およびpH4.2前処理でも陽性に染色されるType2C線維

(図9)

実験後5日が出現数のピークであり、以降減少傾向を示し、抗 myogenin 抗体陽性核数と同様、実験後28日以降 MHC-developmental 染色陽性細胞は認められなかった。実験後5日から14日まで、PGA 糸群は他の群と比べて陽性細胞数が多い傾向にあったが有意差はなかった。

3) 筋線維の太さ (図10)

非埋没群では実験後5日、PGA 糸群では実験後28日、非吸収糸群では実験後7日において、筋線維が最も細くなっていた。すべての群で筋線維の太さは徐々に回復し、非埋没群と非吸収糸群は実験後56日には正常筋線維とほぼ同じ太さであった。しかし、PGA 糸群のみ、実験後84日においても他の群に比べ細い傾向があった。

4) AM-ATPase 染色 Type2C 線維出現率 (図11, 12)

2種の前処理のいずれでも AM-ATPase 染色陽性を示した筋線維を Type2C とみなした (図11)。Type2C 出現率は非埋没群では実験後7日、PGA 糸群では実験後14日、非吸収糸群では実験後5日に出現率が高くなっていた。実験期間を通じて、PGA 糸群の Type2C 線維の出現率は他の群に比べて高い傾向があり、実験後28日には有意差を認めた (図12)。

考 察

1. PGA 糸の組織反応について

実験に用いた PGA 糸は Terpolymer とよばれ

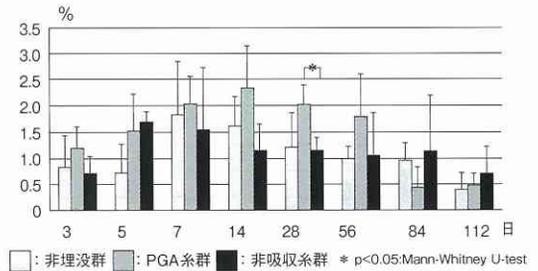


図12 AM-ATPase染色Type2C線維出現率

PGA糸群のType2C線維の出現率は他の群に比べて多い傾向があり、実験後28日には有意差を認めた。

るグリコライド、トリメチレンカーボネート、ジオキサノンからなり主成分であるグリコライドはPGAの共重合体であり、もっぱら糸自体の加水分解によりグリコール酸や二酸化炭素などに変化する^{13,14)}。PGA糸の吸収過程では、天然吸収糸の吸収過程でみられる様々な酵素に関わり、周囲組織破壊を伴う強力な分解反応はわずかしか生じない^{25,26)}。PGA糸分解産物のグリコール酸は、マクロファージの酵素や細胞内の解糖系回路により水と二酸化炭素に分解され吸収される。Jamesら²⁶⁾は、PGAポリマー埋没後の組織反応は好中球やリンパ球による異物に対する炎症反応、ポリマーの分解反応に対するマクロファージの酸放出や貪食作用による炎症反応、および残存した分解産物に対する線維組織や肉芽組織を形成する炎症反応の3段階でおこると報告している。PGA糸も同様の組織反応をおこすが、組織内に残存する非吸収性の縫合糸に比べ分解吸収し消失する利点と、分解吸収反応の生体への安全性が確認されているため、臨床の場で幅広く用いられてきた^{7-10, 13-16, 25-27)}。

酸性ホスファターゼ (ACP) は、酸性環境 (pH 5~6) で活性を持つ加水分解酵素である。本実験では、PGA糸が分解吸収する過程で広範囲にACP陽性細胞を確認した。これはPGA糸分解吸収や分解産物のグリコール酸に対する組織反応として、ACPがマクロファージ細胞内に蓄積したことによると考えられ、Jamesら²⁶⁾の報告と矛盾しない。ACP陽性細胞はPGA糸の吸収とともに減少し、PGA糸が完全に吸収消失するとACP陽性細胞は消失し、筋組織内には線維組織や肉芽

組織の残存もなく、正常筋組織と同様の状態を示した。したがって、組織内に残存する非吸収糸に比べ、吸収糸は形態変化をおこしにくいと考えられる。一方、今回設定した実験術式における筋組織への物理的な侵襲は非埋没群、非吸収糸群、PGA糸群ともにほぼ同じであるが、ACP陽性細胞はPGA糸群に広い範囲で多く出現していた。これはPGA糸の分解吸収時に出現するPGA分解産物であるグリコール酸の影響と推察され、PGA糸群におけるグリコール酸は細胞内に取り込まれ代謝されるまでの間は、異物として組織反応を生じていると考えられる。

2. 筋線維の変化について

Rotterら¹¹⁾やCeonzoら¹²⁾は、PGAに伴うサイトカインの増加は組織再生の抑制因子となると述べていることから、筋肉縫合に用いたPGA糸が分解吸収される過程で筋線維の再生に影響を及ぼすことが推察される。長坂ら²⁷⁾は家兎の背筋に合成吸収糸を埋没した結果、筋線維に変性がみられたと報告している。しかし、病理組織学的な変化だけでは筋線維の再生や筋機能への影響は捉えきれない。筋組織は筋細胞が単独で機能を果たすのではなく、神経支配を得た筋線維がそれぞれの機能に応じて分化し筋束を形成し、筋機能を発揮する。特に口腔領域の筋や一部の咀嚼筋は筋束が細く、走行が複雑で繊細な機能を有するとともに形態を維持する役割もある。そのため口腔領域の筋や一部の咀嚼筋の縫合に伴う筋組織のわずかな組織変化によって、口腔機能や審美的形態に大きな影響を与える²⁸⁾。そこで本研究では筋組織機能への影響を確認するために筋細胞の再生、筋線維への分化、筋線維の太さについて検索を行った。

myogeninは筋衛星細胞が筋芽細胞に分化し、それら筋芽細胞が融合して筋管細胞となる過程で核に発現する筋分化調節タンパク質である^{20, 21)}。有糸分裂による増殖を終了した筋衛星細胞が筋芽細胞に分化し、細胞が融合して筋管細胞となる過程で核に発現する。宋ら²⁹⁾はラットの腓腹筋に肉離れ損傷を起こし、損傷後の筋再生過程を実験後1日および3日において免疫組織学的に検索したところ、myogeninは実験後3日に出現したと報告している。Tokugawaら³⁰⁾はプピバカインを用

いて筋線維を損傷させ、筋線維の治癒過程を損傷形成直後から14日間検討し、免疫組織化学的にはmyogeninの発現が筋線維損傷後4日、6日および10日で観察されたと報告している。今回の実験では非埋入糸群、非吸収糸群、PGA糸群の全てにおいて抗myogenin抗体陽性核は実験後3日をピークとして出現し、その後14日まで出現した。前述の研究^{29, 30)}と本研究、それぞれ骨格筋損傷の方法は異なるが、いずれの研究においてもmyogeninは筋損傷後のほぼ同じ時期に出現していると言える。

MHC-developmentalは再生後間もない骨格筋筋線維にみられる幼若なミオシン重鎖であり、胚や胎生期の骨格筋における場合と同様に、神経支配を受けることで成熟したミオシン重鎖に変化し消失する^{22~24, 31, 32)}。抗MHC-developmental抗体を用いた免疫組織化学的染色では骨格筋細胞の細胞質に発現するため細胞質に陽性反応を示す^{31~34)}。Smithら³³⁾はトレッドミルを用いた運動後のラット骨格筋についてMHC-developmentalの発現と形態学的に検索し、MHC-developmentalは運動後4日と7日で有意に多く発現したと報告している。またStephanieら³⁴⁾は、プピバカインにより破壊したラット骨格筋の筋再生過程において、MHC-developmentalは筋破壊後3日以降に出現し、7日をピークとして、14日まで出現したと報告している。今回の実験では非埋入糸群、非吸収糸群、PGA糸群の全ての実験群において、抗MHC-developmental抗体陽性細胞は実験後5日をピークに出現して実験後14日まで出現した。前述の報告^{33, 34)}と本研究の結果を合わせ考えると、発達途上のミオシン重鎖を持つ再生筋細胞の出現時期は縫合糸の素材や損傷の種類に関わりなくほぼ同じであると考えられる。

すなわちPGA糸に特有の組織変化所見はなく、PGA残存という刺激やPGAの分解産物は再生筋線維の発現時期や発現期間には影響を及ぼさないことが示唆された。また、PGA糸の分解吸収や非吸収糸の残存という継続した筋組織への刺激があるにもかかわらず、実験後28日以降はmyogeninおよびMHC-developmentalの発現がいずれも観察されなかったという本研究結果は興

味深いものである。

骨格筋損傷後の筋線維の太さの回復について Robert ら³²⁾ は実験後28日, Akiyama ら³⁵⁾ は実験後約1か月で正常筋線維と同じ太さまで回復し, 浜田ら³⁶⁾ は実験後3週で損傷前の約90%の太さまで回復したと報告している。いずれの報告でもラットにおいて筋組織損傷後の筋線維が太さを回復する時期は4~5週頃であると思われる。本実験では非埋没群と非吸収糸群の筋線維面積の回復が実験後56日であったのに対しPGA糸群の筋線維面積が回復したのは実験後112日で, 明らかな有意差が認められた。若田ら³⁷⁾ はラットに3か月の運動負荷を与え, AM-ATPase 染色におけるType 1 および Type 2B 線維の増大を認めている。原田ら³⁸⁾ は運動負荷を与えることにより筋束の直径が増加すると述べている。このように筋線維の直径は運動負荷により変化し, また神経支配を失うと筋伸縮がなくなるため, 筋線維直径は細くなる^{19,39)}。本研究ではPGA糸群に出現するグリコール酸の筋組織による代謝やグリコール酸がアセチルコリンエステラーゼ活性や支配神経の伝達経路を阻害し, 筋線維太さの回復に要する期間に差が生じたと推測する。

3. Type 2C 線維の出現率について

AM-ATPase 染色により検出される Type2C 線維は速筋や遅筋と異なり, 生理学的特徴を持たない未分化な骨格筋筋線維である。胎生期や出生直後の骨格筋組織, 再生間もない筋線維, さらに Type 変化の過程にある筋線維に観察される。根本⁴⁰⁾ はラットの顎二腹筋前腹に生後4週まで Type2C 線維を確認している。滝沢¹⁸⁾ は筋組織に侵襲が加わり, 筋機能が変化する過程では Type2C 線維が常に認められると報告している^{17,41)}。また, 神経支配を失った筋線維が再神経支配を受けた場合, 筋線維が再生し筋機能が確定するまでの間に Type2C 線維は出現し続け, 機能変化が大きい程 Type2C 線維の出現率は多いとされている^{19,42)}。

今回の研究では, PGA糸群における Type2C 線維の出現率は, 実験後7日から56日までの間非埋没群や非吸収糸群に比べ高い。特に実験後28日では, 他の群に比べ Type2C 線維出現率は有意に高かった。これはPGA糸群では他群より

も強い刺激が筋組織で生じ, 縫合糸埋没後の機能変化がPGA糸群では大きいことを示唆する所見である。また, Type2C 線維の出現率が高かった期間と myogenin や MHC-developmental の陽性反応を認めた期間は一致しなかった。このことは, 再生筋線維において myogenin と MHC-developmental の陽性反応を認めた実験後3日~14日の期間に出現した Type2C 線維は, 物理的な侵襲により壊死筋線維が生じた後に再生した筋線維であることを意味しているのかもしれない。他方, myogenin や MHC-developmental の陽性反応がみられなくなった実験後28日以降に出現した Type2C 線維は, 筋線維内の支配神経の置換や神経筋接合部の変化に伴い筋線維 Type が変化, あるいは機能変化が生じる過程で再分化する筋線維である可能性が高い。PGA糸群における実験後28日以降の Type2C 線維の出現率はPGA残存中に高く, PGAの消失に伴い減少する傾向があった。これは, 筋線維への物理的侵襲に伴う筋線維への影響とは別に, PGAは自身の分解吸収反応によるマクロファージなどの免疫応答やPGA分解産物であるグリコール酸などの影響により筋線維の生理的分化を遅らせたり, 生理的性質の変化を起こしやすい未分化な筋線維を出現させることを示唆するものである。

結 論

1. 筋組織内に埋没したPGA糸が分解吸収する経過中のPGA糸周囲の筋線維組織には, ACP陽性細胞が多くみられ筋線維が細くなる傾向を示した。しかし, PGA糸の吸収消失に伴い筋線維の形態や太さは, 正常筋線維と同程度まで回復した。

2. myogenin 抗体および MHC-developmental 抗体陽性細胞の出現期間は非埋没群, 非吸収糸群, PGA糸群ともに同じであったが, PGA糸群の Type2C 線維の出現率は, PGA糸が残存している間は他の群に比べて高く, PGA糸の吸収消失とともに他の群に比べ低くなった。

以上のことから, 筋組織内のPGA糸は再生する筋線維の発現時期や発現期間には影響を及ぼさないと考えられた。しかし, PGA糸の分解吸収

に伴い筋線維が細くなり、PGAの残存中はType変化を起こしやすい未分化な筋線維が多くなる傾向が認められた。

謝 辞

稿を終わるに臨み、終始直接御指導、御校閲を賜った奥羽大学歯学部口腔外科学講座主任高田訓教授に深謝するとともに、御指導、御鞭撻を頂いた奥羽大学歯学部口腔外科学講座大野敬教授に衷心より謝意を表します。また、数々の御協力を頂いた奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野、口腔病態解析制御学講座口腔病理学分野、口腔外科学講座口腔外科学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第56回社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会（平成23年10月23日 大阪）、第53回奥羽大学歯学会（平成24年6月16日 郡山）、第57回社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会（平成24年10月19日 横浜）において発表した。

文 献

- 1) 伊藤忠雄, 中村達雄, 高木 剛, 萩原明於, 山岸久一, 清水慶彦: 人工神経ガイドチューブの腹腔内における分解・吸収性に関する検討. *Inflammation Regenerat.* **23**; 275-276 2003.
- 2) Kamelger, F. S., Marksteiner, R., Margreiter, E., Klima, G., Wechselberger, G., Hering, S. and Piza, H.: A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model. *Biomaterials* **25**; 1649-1655 2004.
- 3) 森 廣政: ヒト耳介形状軟骨の再生誘導におけるPGA-P(LA-CL)ポリマーの有用性. *近畿大医誌* **32**; 233-241 2007.
- 4) 小林寛伊: 胸部外科と縫合糸. *臨床胸部外科* **7**; 501-504 1987.
- 5) 内尾祐司: 筋, 筋膜, 腱の縫合. *臨外* **64**; 39-43 2009.
- 6) Knut, A. S., Guy, R. B., Knut, N. L. and Ulf, M. E. W.: Oral tissue reactions to suture materials. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* **18**; 475-487 1998.
- 7) Daniel, H. R., Camillo, T. D. and Ronald, M. M.: Comparison of polyglactic and polyglycolic acid sutures in reproductive tissue. *Fertil. Steril.* **28**; 1220-1225 1977.
- 8) Shinohara, H., Matsuo, K. and Kikuchi, N.: Absorbable and nonabsorbable buried sutures for primary cleft lip repair. *Ann. Plast. Surg.* **36**; 44-46 1996.
- 9) George, T., Rodeheaver, L. S., Salopek, C. W., G., Pamela, A. F., Freeman, S., Jeffrey, G. N. and Richard, F. E.: Effectiveness of glycomer 631 monofilament sutures in closing musculo-aponeurotic incisions. *J. Long Term Eff. Med. Implants* **8**; 225-231 1998.
- 10) Daniel, C. S., James, B. U., Debi, M. and Jack, F. P.: Mechanical performance of knots using braided and monofilament absorbable sutures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **187**; 1438-1442 2002.
- 11) Nicole, R., Feodor, U., Amit, K. R., Martin, V., Roland, D. E., Charles, A. V. and Lawrence, J. B.: Role of interleukin 1 α in the inhibition of chondrogenesis in autologous implants using polyglycolic acid-polylactic acid scaffolds. *Tissue Eng.* **11**; 192-200 2005.
- 12) Kathleen, C., Anne, G., Lisa, S., Kojima, K., Charles, A. V. and Gregory, L. S.: Polyglycolic acid induced inflammation: Role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue Eng.* **12**; 301-308 2006.
- 13) George, T. R., Kenneth, A. B., Colleen, W. G., Brent, C. F., Brendon, M. S., Gerald, W. S., Helge, T., Gerald, M. F., Harvey, C. B. and Richard, F. E.: Biomechanical and Clinical Performance of a New Synthetic Monofilament Absorbable Suture. *J. Long Term Eff. Implants* **6**; 181-198 1996.
- 14) Angela, P. F., David, B. D., Pamela, A. R., Denorah, L. M., Richard, F. E. and George, T. R.: CAPROSYN, another major advance in synthetic monofilament absorbable suture. *J. Long Term Eff. Implants* **14**; 359-368 2004.
- 15) Molea, G. F. S., Bifulco, G. and D'Angelo D.: Comparative study on biocompatibility and absorption times of three absorbable monofilament suture materials (Polydioxanone, poligle-caprone 25, Glycomer 631). *Br. J. Plast. Surg.* **53**; 137-141 2000.
- 16) Sönmez, K., Bahar, B., Karabulut, R., Gülbarhar, O., Poyraz, A., Turkyilmaz, Z., Sancak, B. and Başaklar, A. C.: Effect of different suture materials on wound healing and infection in subcutaneous closure techniques. *B-ENT* **5**; 149-152 2009
- 17) 埜中征哉: 臨床のための筋病理 第2版; 2-44 日本医事新報社 東京 2011.
- 18) 滝沢知由: ラット咬筋剥離後の回復経過に関する実験的研究. *奥羽大歯学誌* **24**; 161-173 1997.
- 19) 金 秀樹: 除神経筋への神経移植後の治癒経過に関する実験的研究. *奥羽大歯学誌* **27**; 237-250 2000.
- 20) Sophie, B. P, Chargé. and Michael, A, Rudnicki.: Cellular and molecular regulation of

- muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 2004 **84** ; 209-238 2004.
- 21) Olson, E. N. and Klein, W. H. : bHLH factors in muscle development : dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* **8** ; 1-8 1994.
- 22) Marion, E. P., Mark, H. and Wendy, B. : Myosin heavy chain expression in human muscle cocultured with mouse spinal cord. *J. Neurol. Sci.* **90** ; 167-177 1989.
- 23) Marion, E. P., Mark, H. and Wendy, B. : Immunocytochemical demonstration of myosin heavy chain expression in human muscle. *J. Neurol. Sci.* **91** ; 71-78 1989.
- 24) Christine, E. D., John, B. H. and Louise, V. B. N. : Myosin isoform transitions and physiological properties of regenerated and re-innervated soleus muscles of the rat. *Neuromuscul Disord.* **6** ; 411-421 1991.
- 25) Fournier, E., Passirani, C., Montero, M. C. N. and Benoit, J. P. : Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers : focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* **24** ; 3311-3331 2003.
- 26) James, M. A. and Matthew, S. S. : Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **28** ; 5-24 1997.
- 27) 長坂保則, 笠井 浩, 中村仁志, 奥原 信 : 合成吸収性縫合糸 (PGA-36) の家兎筋肉内埋没試験. 基礎と臨床 **21** ; 147-152 1987.
- 28) 高田 訓, 箱村 卓, 大野朝也, 原 久永, 和田 健, 佐藤耕一 : 鼻咽腔閉鎖機能と口蓋帆挙筋の組織化学的所見との検討. 日口蓋誌 **24** ; 61-69 1999.
- 29) 宋 洪善, 中嶋寛之, 中里浩一 : 単回の伸張性収縮により誘発された肉離れ損傷モデルにおける筋転写因子の発現. 日体大体育研誌 **30** ; 9-14 2005.
- 30) Tokugawa, S., Sakuma, K., Fujiwara, H., Hirata, M., Oda, R., Morisaki, S., Yasuhara, M. and Kubo, T. : The expression pattern of PKC θ in satellite cells of normal and regenerating muscle in the rat. *Neuropathology* **29** ; 211-218 2009.
- 31) Stefan, M., Ghiabe, H. G. and Basil, J. P. : Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287** ; R961-R968 2004.
- 32) Robert, G. W., John, B. H., Gillian, S. B. and Sanjay, S. : Expression of myosin isoform during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev. Biol.* **141** ; 24-40 1990.
- 33) Smith, H. K., Plyey, M. J., Rodgers, C. D. and Mckee, N. H. : Expression of developmental myosin and morphological characteristics in adult rat skeletal muscle following exercise-induced injury. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **80** ; 84-91 1999.
- 34) Stéphanie, D., Marie, C. L. B., Dominique G., Léonard, F. and Damien, F. : Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* **285** ; E206-E215 2003.
- 35) Akiyama, C., Kobayashi, S. and Nonaka, I. : Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride- induced myonecrosis. *Acta Neuropathol.* **83** ; 584-589 1992.
- 36) 浜田智弘, 高田 訓, 小坂橋 勉, 金 秀樹, 中江次郎, 馬庭暁人, 大野 敬, 千葉 卓, 三科正見 : ラットを用いた神経血管柄付遊離筋肉移植実験における移植後筋組織の変化. 日口蓋誌 **19** ; 240-245 2006.
- 37) 若田宣雄, 河村裕子, 小林雅子 : 持続的運動負荷によるラット骨格筋の変化. 臨床神経学 **25** ; 202-208 1985.
- 38) 原田 孝, 茂手木三男, 島本司孝, 筒井俊行, 櫛方暢晴, 坂本美喜, 古市照人 : 運動負荷によるラット骨格筋の筋内深度別組織化学的所見. 総合リハビリテーション **22** ; 669-673 1994.
- 39) 田中賢治 : 実験的骨格筋萎縮の研究. 昭和医学会雑誌 **42** ; 783-796 1982.
- 40) 根本隆一 : ラット開閉口筋の発育・分化経過と神経支配に関する研究. 奥羽大歯学誌 **26** ; 287-299 1999.
- 41) 市川 亨 : 骨格筋の修復に関する実験的研究一切断・縫合後の修復についての組織学・科学的観察一. 日整会誌 **66** ; 931-948 1992.
- 42) 高田 訓 : 凍結乾燥同種神経移植後の移植神経ならびに末梢筋組織の修復過程に関する実験的研究. 奥羽大歯学誌 **19** ; 332-351 1992.
- 著者への連絡先 : 菅野勝也, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔外科学講座口腔外科学分野
Reprint requests : Katsuya KANNO, Department of Oral Surgery, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan