

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10131

研究課題名（和文）生体活性形状記憶樹脂によるダイナミックフレーム装置を用いた新たな顎骨再建法の開発

研究課題名（英文）Development for innovative jaw reconstruction system using dynamic frame bioactive device of shape memory material

研究代表者

山内 健介（Yamauchi, Kensuke）

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：10364150

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は静的・動的特性を有したDFDを製作し、既存骨から新たな形態を誘導させる形態変化を実証させ、最終的には任意の血管柄周囲にDFDを設置させ、新たな血管柄付き骨弁の検証を行った。ラット大腿骨を用いたDFDによる骨膜伸展刺激に対する反応はDFD直下ではなく、その周囲骨での骨新生を確認でき、さらにその骨形成量は周囲血流環境に影響を受けることが判明した。以上よりDFDによる骨膜伸展骨形成法での顎骨再建では、目的とする形態の全容を模写した形状ではなく、その梁構造となるフレームをデザインした形状で行うことが有用であることが分かり、今後の次世代型DFD顎骨再建法開発への実現性が高まったものといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞培養による再生医療ではなく、生体自らが持つ創傷治癒能力を応用した再生誘導療法の一つであり、従来の骨移植などとも異なり、骨採取によるドナーサイトへの侵襲の回避や生体材料の不使用による異種骨の感染回避などの利点を有した方法といえる。また、広範囲にわたる骨欠損に対する血管柄付き骨弁による再建においても、レシピエントで求められる形態を事前に付与することで、顎骨であれば咬合再建を考慮した形態を付与した骨移植が可能となることから、手術回数の低減や咬合回復期間の短期化が計られることで、患者の早期社会復帰や咬合咀嚼能率の早期回復による健康増進に寄与するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study fabricated a DFD with static and dynamic characteristics, demonstrated morphological modification to induce a new morphology from existing bone, and finally placed the DFD around an arbitrary vascular pedicle to verify a new osteocutaneous free flap. The response to periosteal expansion stimulation by DFD in rat femurs showed osteogenesis in the surrounding bone, but not directly under the DFD, and the amount of osteogenesis was influenced by the surrounding blood flow environment. These results indicate that the jawbone reconstruction using DFD is useful not only in the form of a full-scale model of the target morphology, but also in the form of a frame designed as the beam structure, which increases the feasibility of developing next-generation DFD jawbone reconstruction methods.

研究分野：口腔外科学分野、口腔インプラント学分野

キーワード：骨造成 骨延長 骨膜伸展骨形成法 ポリエチレンテレフタレート 再生誘導療法

## 1. 研究開始当初の背景

歯槽骨および顎骨に対する再建治療は、さまざまな研究や臨床応用がなされているものの骨移植に代わりうる治療法は少ないのが現状である。培養技術を応用した組織再生による方法も研究されているが、外的応力がかからず、細菌にも曝露されにくい内臓組織とは異なり、口腔内細菌に触れ、咬合・摂食嚥下などの機能応力が働く口腔環境での応用は克服すべき課題が山積している。顎骨欠損に対する最良の治療として血管柄付き遊離骨弁による再建が挙げられるが、腓骨、腸骨、肩甲骨などの代表的な採取部位に対する侵襲と再建骨が口腔機能再建に必ずしも理想的な形態ではないことが課題として挙げられる。一般的に用いられる腓骨では、十分な長さを確保できるものの、インプラントを用いた咬合再建では、骨高不足が欠点として挙げられる。また、移植治療を適応せずに、顎顔面領域で骨再生できる方法として骨延長法が挙げられ、約20年間臨床応用もされてきた。骨延長法は骨造成量に制限がなく、周囲軟組織も同時に増生される優れた方法ではあるものの、延長するためには移動骨片の形成が必要であり、骨切り操作と断続的な延長操作を必要とし、治療期間の長期化、複数回手術の必要性の問題点も挙げられるようになった。さらに延長器の延長方向のみの骨増生が出来ないことから3次元的な理想型での造成は不可能であるという問題を有していた。

## 2. 研究の目的

生体活性型形状記憶樹脂による動的な境界素材としてのダイナミックフレーム装置 (Dynamic frame device; DFD) を応用して、機能・形態的な要件を具備する顎骨再建法を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) <DFDの製作と細胞・組織環境評価>

**DFDの作製**: PETを基材とし、100 $\mu$ mのPET板を作製し、直径8X12mmの楕円形に成形する。動物実験で使用するラット大腿骨周囲に配置できるように、断面をいれ、直径を4mmまで収縮できるように調整する。

**裏面リン酸カルシウムコーティング処理**: 骨膜伸展に伴う骨新生は母骨側から認めることから、PET裏面(母骨/血管側)は骨新生を促進させる目的でゼラチンとリン酸カルシウムコーティング処理を施し、裏面から誘導される細胞成分の生着を促す。

**検証実験**: 厚みの異なるメンブレンの3点曲げ試験を行い、繰り返し荷重による弾性変化及び表面性状変化について検証し、裏面コーティング処理の骨誘導表面形成の最適条件を見出すとともに、至適形態回復力を生み出すメンブレンの厚みと表面形状を決定する。

### (2) <ラット大腿骨での骨膜伸展骨形成法>

ラット大腿骨周囲に、厚みの異なるDFDを装着し、生体吸収性系と非吸収性系で縫合収縮させ、骨面とDFDを密着させる(図1)。非吸収性系で縫合したものを対象群、吸収性系で縫合したものを実験群とし、埋入手術後3、5、8週でのデバイス周囲の骨新生を評価する。ラット: 30匹 (DFD: 厚み; 100 $\mu$ m、吸収性系: 4-0: 各群X5羽)

### 評価方法:

#### 放射線学的評価

マイクロCT(コムスキャンテクノ株式会社、横浜、日本)(65 $\mu$ A、80kV)を用いて、骨形成の程度を3次元的に評価した。新生骨の断面積は、Osirix MD 13.0.2 software (Manufacturer: Pixmeo SARL - 266 Rue de Bernex - CH1233 Bernex - Switzerland)を用いて計

測した。

大腿骨の断面を、骨長軸に対して垂直に、骨幹部に沿って近位から遠位まで約 1mm 間隔で合計 16 か所の断面積を計測した。DFD を埋入した部位を中央として、近位、中央および遠位の合計 3 領域に分類し、それぞれの部位での新生骨量の平均値を算出した。新生骨量(NBV: New Bone Volume)、既存皮質骨量(CBV: Cortical Bone Volume)をそれぞれ計測し、その比率を求めた(NBV/NBV+CBV)。

#### 組織学的評価

すべての標本は、10%ホルムアルデヒド水溶液で固定を行い、10% (w/v) のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を加えたリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で室温において 60 日間脱灰した後、エタノールで脱水し、キシレンで脱アルコール処理を行い、パラフィンに包埋した。マイクロトームを用いて厚さ 5  $\mu$ m の矢状切片を作成し、スライドガラスにマウントした。ヘマトキシリン・エオジン染色を切片に施し、新生骨の組織学的評価を行った。

#### 統計分析

対応のない Welch の t 検定を使用して、新生骨の面積(NBV:New Bone Volume)、既存皮質骨量(CBV:Cortical Bone Volume)、NBV / NBV+ CBV 比を比較した。P 値<0.05 の場合に、統計的有意であるとした。

### 4 . 研究成果

実験期間を通して、全てのラットの手術部位に創の哆開や感染所見は認めなかった。また、飼育中の体重減少は認めず、術後の経過は良好であった。放射線学的評価としてマイクロ CT を用いた大腿骨の形態観察および新生骨量の計測を行ったところ、形態観察では、全ての実験群において DFD により進展された骨膜と大腿骨の間に新生骨が観察された。新生骨の形成は DFD を挿入した大腿骨中央部よりも、その近位と遠位で顕著であり、また、新生骨は既存骨を取り囲むように増殖し、放射線不透過性の違いから境界は明瞭に観察することができた。次に全てのラットの新生骨量を計測し、平均値を算出し比較したところ、新生骨量の平均値は、対象群において、近位は 0.30(mm<sup>2</sup>)、中央は 0.18(mm<sup>2</sup>)、遠位は 0.82(mm<sup>2</sup>)であった。実験群において、近位は 1.05(mm<sup>2</sup>)、中央は 0.27(mm<sup>2</sup>)、遠位は 0.84(mm<sup>2</sup>)であり、実験群の方が新生骨量は多く、近位においては新生骨量に有意差を認めた。また、ラットの大腿骨断面積における待機期間別の新生骨量の割合を評価したところ、3 週および 5 週の近位において、実験群と対称群の新生骨量に有意差を認めた (p < 0.05)。近位の骨形成量は 3 週から 5 週にかけて増大傾向を示したが、8 週ではやや減少傾向を示した。遠位においては、新生骨量は実験群と対称群で差がみられなかった。

組織学的評価としては、実験群の全ての部位において皮質骨表面に一層の新生骨形成を認めた。いずれも炎症性細胞浸潤はほとんど認めず、過剰な線維結合組織の増殖も認めなかった。各部位の解剖学的特徴に関しては、近位では中心部に骨髓腔を認め、周囲は層板構造を有する厚い骨皮質で覆われていた。また骨皮質中には多数の骨細胞および脈管構造の発達を認めた。中央部も近位と同様に、中心部に骨髓構造を有し、周囲は骨皮質で覆われていたが、近位と比べると骨細胞の数や脈管構造の発達はやや減少しており、遠位は比較的疎な骨梁の間隙に骨髓成分が混在した像を呈し、他部位と比較すると海綿骨に近い組織像を呈していた。次に、最も新生骨形成が活発にみられた大腿骨近位における組織学的所見の経時的変化を確認すると、術後 3 週および 5 週では、対照群に比べ実験群で新生骨の形成面積は大きかった。また、実験群では新生骨中の脈管構造の発達が顕著であり、内部には豊富な細胞成分や血液成分が観察された。しかし術後 8 週において、対照群と実験群の新生骨量に明らかな差はなく、新生骨の組織学的な違いも明らかではなかった。

今回の結果から DFD としての長管骨での応用は装置直下での骨新生は乏しく、その周囲での骨膜伸展形成間隙での骨新生が期待できることが判明した。特に近位端周囲の血流が良好な部

位での骨新生が顕著であり、これは骨 骨膜環境の血管流入状態が骨新生に寄与することが考えられるため、DFD の具備すべき要件としては、PET を基剤とした装置であったとしても、周囲血管からの血液供給が計られる構造を付与した上で、動的伸展が得られるものを開発する必要があると考えられた。将来的には 3 次元的な形態をデザインし、既存骨から伸展することで目的形態に変位するような時限的変態性の DFD 開発が必要であることが示唆された。

1. Imoto K, Hoshi K, Odashima K, Nogami S, Unuma H, Yamauchi K. Static and dynamic guided bone regeneration using a shape-memory polyethylene terephthalate membrane: A experimental study in rabbit mandible. Clin Implant Dent Relat Res, in press, 2024
2. Kouketsu A, Kaneuji T, Yamaguma Y, Yamauchi K, Sugiura T, Takahashi T, Ito H, Yamashita Y. Microvascular reconstruction for oral cancer in older adult patients: the impact of age on surgical outcomes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 137:6-11, 2024
3. Kouketsu A, Saito H, Kuroda K, Miyashita H, Yamauchi K, Sugiura T, Takahashi T, Kumamoto H. Myeloid-derived suppressor cells and plasmacytoid dendritic cells are associated with oncogenesis of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 52:9-19, 2023
4. Yamauchi K, Imoto K, Odajima K, Morishima H, Shimizu Y, Nogami S, Takahashi T. A collagen membrane for periosteal expansion osteogenesis using a timed-release system in rabbit calvaria. Int J Dent 8 (1): 9-9 2022.
5. Imoto K, Yamauchi K, Odashima K, Nogami S, Shimizu Y, Kessler P, Lethaus B, Unuma H, Takahashi T. Periosteal expansion osteogenesis using an innovative, shape-memory polyethylene terephthalate membrane: An experimental study in rabbits. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials 109(9): 1327-1333 2021.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamauchi K, Imoto K, Odajima K, Morishima H, Shimizu Y, Nogami S, Takahashi T	4. 巻 8
2. 論文標題 A collagen membrane for periosteal expansion osteogenesis using a timed-release system in rabbit calvaria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Interantional Journal of Implant Dentistry	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40729-022-00407-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 山内健介	4. 巻 40/41
2. 論文標題 骨膜界面の移動による静的・動的骨再生誘導法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 東北大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imoto K, Yamauchi K, Odashima K, Nogami S, Shimizu Y, Kessler P, Lethaus B, Unuma H, Takahashi T	4. 巻 109
2. 論文標題 Periosteal expansion osteogenesis using an innovative shape-memory polyethylene terephthalate (PET) membrane: An experimental study in rabbits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Material Research part B	6. 最初と最後の頁 1327-1333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamauchi K, Imoto K, Odajima K, Morishima H, Shimizu Y, Nogami S, Takahashi T.	4. 巻 4
2. 論文標題 A collagen membrane for periosteal expansion osteogenesis using a timed-released system in rabbit calvaria.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40729-022-00407-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内健介
2. 発表標題 骨再建を伴うデンタルインプラント治療
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内健介
2. 発表標題 骨治癒過程を応用した静的・動的骨再生誘導療法
3. 学会等名 第24回顎顔面手術手技研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takahashi T, Yamauchi K	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Wiley-Blackwell	5. 総ページ数 608
3. 書名 Essential techniques of alveolar bone augmentation in implant dentistry, a surgical manual.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鷓沼 英郎  (Unuma Hidero)  (30273303)	山形大学・大学院理工学研究科・教授   (11501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 良央  (SHimizu Yoshinaka)  (30302152)	東北大学・医学研究科・非常勤講師    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関