

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592973

研究課題名(和文)人工骨補填材を用いた生体内での血管柄付骨組織再生に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study on vascularized bone regeneration in vivo using artificial bone supplementation material

研究代表者

山下 善弘 (Yamashita, Yoshihiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：30254634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は生体吸収性のセラミックb-TCPブロックをビーグル犬の広背筋筋膜部に埋入し、これを足場とする血管柄付骨組織の作成を試みた。b-TCPと共に自己血を埋入した群およびコントロール群とした。半年後chamberを回収し、組織学的に検索をした。コントロール群では、全てに骨の形成は認められなかった。一方、b-TCP+自己血群では骨の形成が確認された。骨組織の周囲や骨髄内には微小血管が散見され、これら微小血管は免疫組織化学により確認した。今回の結果から、炎症反応や異物反応なく血管柄付骨組織の作成に成功した。しかし骨組織の形成量は少量であり、より良い再生骨を得るためのアプローチが必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)： This study is a bioresorbable ceramic b-TCP block embedded in the latissimus dorsi muscle film portion of the beagle dog, which was an attempt to create a blood vessel pattern with bone tissue to a scaffold. Was a self-blood implanted beneath group and the control group, along with the b-TCP. The chamber after six months were collected and histologically search. In the control group, the formation of bone tissue in all was not observed. On the other hand, bone formation was observed in the b-TCP + autologous blood group. Is in and around the bone marrow of the bone tissue is scattered microvascular, these microvessels was confirmed by immunohistochemistry. Our results were successfully created in the inflammatory response and foreign body reaction without vascularized with bone tissue. However formation of bone tissue is small, it was considered necessary approach for obtaining better reproduction bone.

研究分野：口腔外科

キーワード：顎骨再建 血管柄付骨 骨再生

1. 研究開始当初の背景

近年、ES 細胞を用いた組織工学(tissue engineering)にて骨・軟骨・皮膚・筋肉・血管さらには心臓などの各種臓器の再構築を目的とする研究が積極的に行われている。しかしながら、実際の臨床応用に関しては神経、血管などの一部の単一組織のみがようやく臨床応用をはじめたばかりである。一方、口腔および顎顔面領域において腫瘍性疾患、外傷などの様々な手術後には顎顔面領域の組織欠損を生じる。この組織欠損に対し、1980年代より microsurgery の進歩により各種の遊離組織移植が頭頸部領域の組織欠損に対して導入されはじめ、現在の顎顔面領域の組織欠損における再建方法の主流になっている。軟組織欠損においては前腕皮弁、腹直筋皮弁、広背筋皮弁、前外側大腿皮弁などが主に用いられて上下顎の顎骨欠損に対する再建においては古くから金属プレートあるいは遊離腸骨などを用いた再建方法が行われていたが術後の顔勝の変形や咀嚼障害などのおおきな問題がある。また、血管柄付遊離組織移植なども顎骨再建において行われるようになり、血管柄付腸骨、血管柄付肩甲骨、腓骨などが用いられ、その有用性が報告されている(図1-3)。しかしながら本方法におけるドナー側での骨欠損に対する機能障害や手術侵襲の問題も大きく、また、手技的にも煩雑であるため広く行われているわけではないのが現状である。

近年、ES 細胞を用いた組織工学(tissue engineering)にて骨・軟骨・皮膚・筋肉・血管さらには心臓などの各種臓器の再構築を目的とする研究が積極的に行われている。しかしながら、実際の臨床応用に関しては神経、血管などの一部の単一組織のみがようやく臨床応用をはじめたばかりである。一方、口腔および顎顔面領域において腫瘍性疾患、外傷などの様々な手術後には顎顔面領域の組織欠損を生じる。この組織欠損に対し、1980年代より microsurgery の進歩により各種の遊離組織移植が頭頸部領域の組織欠損に対して導入されはじめ、現在の顎顔面領域の組織欠損における再建方法の主流になって

いる。軟組織欠損においては前腕皮弁、腹直筋皮弁、広背筋皮弁、前外側大腿皮弁などが主に用いられて上下顎の顎骨欠損に対する再建においては古くから金属プレートあるいは遊離腸骨などを用いた再建方法が行われていたが術後の顔勝の変形や咀嚼障害などのおおきな問題がある。また、血管柄付遊離組織移植なども顎骨再建において行われるようになり、血管柄付腸骨、血管柄付肩甲骨、腓骨などが用いられ、その有用性が報告されている。しかしながら本方法におけるドナー側での骨欠損に対する機能障害や手術侵襲の問題も大きく、また、手技的にも煩雑であるため広く行われているわけではないのが現状である。

一方、現在再建外科の分野では生体内で栄養血管を有する組織を再生し、その後移植する人工的に再生された軟組織皮弁(Prefabrication engineered skin flap)に関する報告がなされている。しかし再生組織に独自の栄養血管を有しているものは報告されていない。これは血管の再構築と同時に組織の形成を行うという技術的な問題がまだ解決されていないからである。このため現在のところ既存の血管を利用し、様々な人工細胞外マトリックスと細胞を組み合わせる人工的に栄養血管を有する組織を再生する方法が最も現実的な方法とされ、私はこれまでに顎骨再建などに用いられる血管柄を有した人工的に再生された骨組織に関する検討を行ってきた。それにより骨が形成される足場(コラーゲンや合成高分子材料など)、骨芽細胞の増殖と分化を誘導する生理活性物質あるいはその遺伝子を欠損の大きさによって単独または併用して局所に組み込み、生体本来の組織修復能を活用して、骨再生を図ることが犬を用いた実験系にて可能であり、生体吸収性のセラミック -TCP を細胞の足場としてビーグル犬の広背筋部に移植し、少量の血管柄付骨組織の再生に成功した。

しかしながら本方法では顎骨欠損などの大きな骨欠損ではコラーゲンなどの細胞外マトリックスでは骨の再生に長時間を有し、現実的ではないと思われる。

生体吸収性のセラミック -TCP は近年、整形外科領域などで大きな骨欠損に -TCP ブロックとしてそのまま用いられ、経年的に骨に置換することが報告されている。しかし、

骨置換に要する時間は長期を必要としている。生体内で既存の骨組織の周囲にはいずれの部位の骨にしても筋組織および筋膜に覆われている。このことは古くから生体内の骨組織においてその形態維持には筋、筋膜からの作用が必要と考えられている。

そこで今回、生体内での生体吸収性のセラミック -TCP ブロックを犬の胸背動静脈を栄養血管とする広背筋周囲に埋入し、血管柄付骨組織再生に関する実験的研究を立案した。

参考文献

- 1) Sung K.: Prefabricated engineered skin flaps using a vascular bundle as vascular carrier in rabbits. J. Jpn. Plast. Reconst. Surg. 22: 440-448, 2002.
- 2) Fu S., Hibino Y., Niimi A., Honda M., Okazaki Y., Hata K., Yoshikawa T., Ueda M.: Experimental study of cultured artificial bone using the bioabsorbable ceramic β -TCP as a scaffold. Jpn. J. Oral and Maxillofacial Surg. 47: 1-7, 2001.
- 3) Yamashita Y., Kurokawa H., Takeda S, Fukuyama H., Takahashi T.: Preoperative histologic assessment of head and neck lesions using cutting needle biopsy. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 93: 528-533, 2002.
- 4) Aigner RM, Schultes G, Wolf G, Yamashita Y, Sorantin E, Karcher H: 18F-FDG PET: early postoperative period of oro-maxill-facial flaps. Nuklearmedizin 42: 210-214, 2003

また、マイクロサージェリーを用いた顎骨再生についてこれまでに私は以下のような臨床研究実績があり、マイクロサージェリーの技術をよび実験手技もほぼ確立されており、本研究にて血管柄付骨組織も移植を十分に可能であった。

2. 研究の目的

口腔および顎顔面領域において腫瘍性疾患、外傷などの様々な手術後には顎顔面領域の組織欠損を生じる。この組織欠損に対し、1980年代より microsurgery の進歩により各種の遊離組織移植が頭頸部領域の組織欠損

に対して導入されはじめ、現在の顎顔面領域の組織欠損における再建方法の主流になっている。軟組織欠損においては前腕皮弁、腹直筋皮弁、広背筋皮弁、前外側大腿皮弁などが主に用いられ、また、顎骨再建においては血管柄付腸骨、血管柄付肩甲骨、腓骨などが用いられ、その有用性が報告されている。しかしながら、その採取部位での犠牲は大きく、また多くの合併症も見受けられる。そこで、生体内の犠牲の少ない部位での骨代用物を用いた顎骨の生成について動物を用いて実験的研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は次の4つの研究により構成される。

1. ビーグル犬の広背動静脈にAV shunt loop 形成し、生体吸収性のセラミック -TCP ブロックを広背筋筋膜部に埋入し、これを足場とする血管柄付骨組織を作成(平成23,24年度)
2. 再生骨の解析(平成25年度)
3. 血管柄付き再生骨を用いて同種下顎骨への移植(平成26年度)
4. 同種下顎骨への移植での機能評価および下顎部摘出後の再生骨の解析

広背動静脈のAV shunt loopを用いて -TCP ブロックを足場とする血管柄付き再生骨の作成(平成23,24年度)

実験材料

成犬ビーグル犬、オス 16 頭を実験に供する。(動物の飼育および手術は九州歯科大学動物実験規定に基づいて行う)。-TCP を埋入させる chamber (研究代表者作成)

実験方法

実験動物を血管柄付き再生骨を作成し、摘出し、再生骨を観察する群：8 頭とその再生骨を用いて顎骨再生を行う群 8 頭に分ける。また、再生骨を観察する群：8 頭のうち PRP 投与群：4 頭と非投与群：4 頭にする。さらに、再生骨を用いて顎骨再生を行う群 8 頭においても PRP 投与群と非投与群に同様にわけると。麻酔：ミダゾラム；0.3 mg/kg、硫酸アトロピン；0.04 mg/kg、塩酸ケタミン 20 mg/kg を筋肉内投与し、十分な鎮静が得られた後、経鼻マスクから 100%酸素、2%セボフルレンにて全身麻酔を行う。

手術手技：

a. ビーグル犬両側の広背筋下にて肩甲下動静脈を約10cm剖出し、動静脈先端部にてshuntの形成を行う。

b. 6gの b-TCPを埋入させたchamber内に血管孔を通してshuntの形成された胸背動静脈を埋入する。

c. 同ビーグル犬より採血した血液を用いて遠心分離を行いPlate rich plazma(PRP)を作成し、5頭において b-TCPを埋入させたchamber内に投与する。Chamberのwing部を利用し、広背筋下に縫合固定し、閉創。

2. 再生骨の解析(平成25年度)

1. 8頭において6か月後に安楽死させ両側の広背筋下よりchamberを摘出する、この時、肩甲下動静脈を腋動静脈まで剥離し、chamberとともに摘出する。

2. chamber摘出と同時に胸背動静脈の切断端よりカテーテルを挿入し、血管造影剤(5%ゼラチン含有60%硫酸バリウム、ウログラフィン)を投与し、軟エックス線撮影にて再生骨内の血管新生を確認。

3. 軟エックス線撮影後、同検体を脱灰H-E染色標本、Masson,s trichrome染色、Von Willeband Factor(VWF)の染色を行い組織学的検索を行う。

4. 再生骨組織の体積測定:血管束と直角方向に2mm間隔で連続切片を作成し、各再生骨の面積(A1~An)までをVideo Pro32 color image analysis soft ware (Watcom C386 and 386/ASM)で測定し、再生骨組織量(V)を面積の総和(A1+A2+・・・)にて算出する。

5. 再生骨内の新生血管の面積および再生骨組織量(V)をPRP投与群および非投与群にて比較検討する。

3. 血管柄付き再生骨を用いて同種下顎骨への移植(平成26年度)

a. 麻酔:ミダゾラム;0.3 mg/kg,硫酸アトロピン;0.04 mg/kg,塩酸ケタミン 20 mg/kgを筋肉内投与し、十分な鎮静が得られた後、経鼻マスクから 100%酸素,2%セボフルレンに

て全身麻酔を行う。手術手技:a. 同手術3か月前に片側の下顎小臼歯から大臼歯の抜歯を行い閉鎖創としておく。

b. Chamber埋入後6か月目に肩甲下動静脈を腋動静脈まで剥離し、再生骨を含んだchamberとともに摘出する。同時に抜歯された下顎の骨を口腔外より区域切除を行う。

c. chamberから再生された血管柄付き再生骨と血管柄を取り出し、区域切除された下顎の欠損部に適合させワイヤー固定を行い、同側の顔面動静脈と再生骨の栄養血管である肩甲下動静脈とを血管縫合し、創を閉鎖する。

4. 同種下顎骨への移植での機能評価および下顎部摘出後の再生骨の解析(平成27年度) 再生骨の解析方法

1. 移植後3か月目にて移植したイヌを安楽死させ、移植部を含めた下顎骨を切除摘出する。この時、血管縫合を行った顔面血管を含めてせつじよする。

2. 顔面動静脈の切断端よりカテーテルを挿入し、血管造影剤(5%ゼラチン含有60%硫酸バリウム、ウログラフィン)を投与し、軟エックス線撮影を行い、移植骨の生着を観察する。

3. 軟エックス線撮影後、同検体を脱灰H-E染色標本、Masson,s trichrome染色、Von Willeband Factor(VWF)の染色を行い組織学的検索を行う。

4. 上記にて染色された脱灰標本を観察し生着状況および骨接合部での加骨状況をPRP投与群と非投与群で比較検討する

4. 研究成果

b-TCPを入れた群では13頭中7匹で骨形成が見られた。

b-TCPの量で比較すると0.3g入れた群では1/4(25%)、0.5g入れた群では4/7(57%)、0.7g入れた群では2/2(100%)であった。

組織学的にはb-TCPを入れた群では骨の形成が見られ、その周囲や骨内で微小血管が確認された。これらの微小血管からの栄養によ

り骨の成長が助けられた可能性が示唆された。

これら微小血管は免疫染色(SMA , Masson trichrome)により確認された。

骨の周辺に存在する顆粒状物はおそらく骨になりきれなかったであろう b-TCP と考える。

周囲を観察する限り、強い炎症細胞浸潤や異物反応はない。

今回の研究ではビーグル犬 16 頭を使用し、生体吸収性のセラミック b-TCP ブロックを広背筋筋膜部に埋入し、これを足場とする血管柄付骨組織の作成を試みた。

16 頭のうち、13 頭に b-TCP と共に自己血を埋入し、3 頭については自己血のみを埋入し、コントロール群とした。半年後 chamber を回収し、組織学的に検索をした。

コントロール群では、3 頭すべてにおいて骨の形成は確認できなかった。一方、b-TCP+自己血群では 13 頭中 8 匹で骨の形成が確認された。骨周囲に見られる顆粒状物はおそらく骨に成りきれなかった b-TCP であろう。骨が形成された検体ではその骨形成量は様々であり、脂肪組織に置換されている検体も散見された。骨組織の周囲や骨髄内には微小血管が散見され、これら微小血管は免疫組織化学(SMA, Masson trichrome)により確認した。これら血管からの栄養が骨の成長をサポートしている可能性が示唆された。また、骨組織の周囲には炎症細胞浸潤や異物反応に伴う巨細胞の存在は見られなかった。

b-TCP の量で比較すると 0.3g 入れた群では 1/4(25%)、0.5g 入れた群では 5/7(72%)、0.7g 入れた群では 2/2(100%)であり、検体数は少ないものの、b-TCP の用量依存的に骨形成を認める検体が増加傾向にあった。

今回の結果から、炎症反応や異物反応なく血管柄付骨組織の作成に成功した。

しかし、chanber に対しての骨組織の形成量は少量であり、また骨に成りきれなかった b-TCP や骨組織内への脂肪組織の侵入など

が見られることから、より良い再生骨を得るためのアプローチが必要と考えられ、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 善弘 (YAMASHITA YOSHIHIRO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：30254634

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：