

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593063

研究課題名(和文)再生骨の経時的変化に対する画像評価法の確立

研究課題名(英文)Establishment of radiological evaluation method for the regenerated bone

研究代表者

米原 啓之 (YONEHARA, Yoshiyuki)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00251299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨膜からの骨再生過程観察により、骨膜が骨形成能を有し、その骨再生量は約4～6週間で最高値になることが示された。また、骨欠損部への移植材料として骨膜からの再生骨が自家骨以上に有用であることも示された。テトラポッド状人工骨(TB)の骨膜下移植による骨造成では、TB移植による骨造成で良好な形状安定性と力学的強度が認められ、TBは他の人工移植材料や自家骨と比較しても骨造成材料として有用であった。骨欠損修復では、micro-CT解析によってTB単独移植群および対照群と比べTBとコラーゲン併用移植群において形成される骨量の増加が認められ、TBとコラーゲンの併用移植が骨欠損治療に有効な方法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The observation of the bone regenerative process from periosteum suggest that the periosteum has osteogenic capacity and the peak of bone regeneration from the periosteum occurs around 4 to 6 weeks. The evaluation of the usefulness of regenerative bone from periosteum as a new graft material for the repair of bone defects indicate that the regenerative bone from periosteum is a useful reconstructive material. The results of tetrapod-shaped granular artificial bone(TB) implantation suggest that TB presented good shape stability and mechanical strength. TB might be useful for bone augmentation of flat bone area as compared with other currently used artificial graft materials and autogenous bone. The results of bone defect repair study showed higher volumes of the newly formed bones in the TB and collagen implantation group than in the TB group or control group. The combinatorial use of TB and collagen would be an effective strategy for the treatment of bone defect.

研究分野：口腔外科、顎顔面再建外科、形成外科、再生医療

キーワード：骨再生 骨造成 人工骨 画像評価

1. 研究開始当初の背景

顎顔面外科領域における腫瘍切除や外傷および先天的欠損などによる骨欠損や加齢や抜歯にともなう骨吸収による骨減量による咬合不全症例に対して、義歯装着や歯科インプラント埋入による治療を目的として、自家骨や人工骨の移植による硬組織再建や骨造成が行われている。しかし、顎骨骨量の不足や移植後の骨吸収のために予後不良となる症例も多く、安定した結果が得られていない。一方、悪性腫瘍に対する治療成績の向上により患者の5年生存率も向上し、また外傷においてもその救命率は向上してきており、人口の高齢化とともに加齢による歯の欠損症例の増加も含め患者のQOLの改善のために咬合再建治療が行われる機会が増加している。

現在行われている自家骨移植においても、移植後の骨吸収や力学的強度の不足が生じる症例はしばしば見られる。良好な機能を再建するには吸収に強く力学的に安定した再建材料を用いることが必要であるが、移植後の骨組織の変化については不明な部分も多くさらなる研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究においては、現在行われている硬組織再建のための骨移植術により得られる再建骨や将来臨床応用される可能性のある再生医療技術により得られる再生骨が良好な咬合再建の基盤となり、義歯装着やインプラント埋入が確実に行えるようになることを目指している。このため、骨膜からの再生過程の検討、再生骨および α -TCPからテトラポッド状に形成された人工骨 TetraBone (TB) を用いて移植実験および骨造成実験を行い、それぞれの移植後の骨性状、強度、維持安定性についての検討を行うとともにCT画像による骨形成過程についての検討も行った。

3. 研究の方法

(1) 【骨膜からの骨再生】6週齢Wistar系雄性ラット（計20匹）の腓骨を外科的に摘出し、血流を温存した状態の骨膜維持(PP)群と骨膜除去(PR)群における骨の再生過程を比較・検討した。術直前、術後0, 3, 5日, 1, 2, 4, 6, 8週でmicro-CTによる撮影を行い、画像再構成ソフトを用いた定性的および形態計測的観察を、またデータ解析ソフトを用いた定量的な評価も行った。次に術後5日, 1, 2, 4, 6, 8週の再生骨を摘出し、組織学的な評価を行った。

(2) 【再生骨ブロック状移植】Wistar系ラット（計24匹）を用い、骨膜によって再生された骨を下顎骨欠損部へ移植する実験を行った。ラットはドナーラット（計8匹）とレシピエントラット（計16匹）の2群にわけた。ドナーラットは第1章と同様の手技によって腓骨を除去し、血流を温存した骨膜から形成された再生骨を術後1週(RB1), 4週(RB4), 8週(RB8)に採取し、 $0.5 \times 1 \times 5$ mm大にトリミングした。また、対照群として、ドナーラットから採取した非再生腓骨(NF)を同様にトリミングした。移植骨はレシピエントラットの左側下顎骨下縁に作製した $0.5 \times 1 \times 5$ mm大の骨欠損に埋め込み、それぞれをRB1群, RB4群, RB8群, NF群とした。術後0, 2および4週にmicro-CT撮影を行い、定性的および形態計測的評価、さらにデータ解析ソフトを用いた定量的評価を行った。また、術後4週目に下顎骨を摘出し、組織学的評価を行った。

(3) 【再生骨細片状移植】7週齢Wistarラットの腓骨を、骨膜を温存しながら引き抜くよう除去し、骨膜弁を作製。そこから再生された1週目の再生骨を使用した。再生骨の採取と同時に、左側下顎骨に臨界骨欠損である直径4mmの全層骨欠損を作製。約 $0.5 \times 1 \times 15$ mm大にトリミングした再生骨を粉碎した後、顎骨欠損部へ移植した(再生骨移植群)。対照として非移植群、通常の腓骨を粉碎し移植した群(自家骨移植群)を作製した。移植直後、2, 4週目に

micro-CTを用いて撮影し、放射線学的観察を行った。移植後4週目の試料を用いてHE染色による組織学的検討、TRAP染色および抗Runx2抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

(4) 【骨欠損への人工骨移植】9週齢の雄性Wistarラットの頭蓋骨にダイヤモンドバー（直径8 mm）を用いて、直径8 mmの円柱状骨欠損を作製した。骨欠損部はTB単体（TB群）、コラーゲン単体（コラーゲン群）、およびTBとコラーゲンの混合物（併用群）で充填した。未充填のものをコントロール群として設定した。下顎骨欠損モデルでは、ダイヤモンドバー（直径2 mm）で直径2 mmの円柱状骨欠損を下顎骨に作製した。骨欠損部はTB単体（TB群）を充填し、未充填のものをコントロール群として設定した。micro-CT撮影を頭蓋骨欠損モデルでは術直後、術後1, 4, 8週で、下顎骨欠損モデルは術後1, 4, 8, 12週で行い、骨形成量の定量的解析を行った。頭蓋骨欠損モデルでは術後1, 4, 8週で、下顎骨欠損モデルは術後12週で頭蓋骨ないし下顎骨を切除し、パラフィン切片を作製した。TRAP染色およびRunx2, TGF- β の局在について免疫組織学的検討を行った。

(5) 【人工骨による骨造成】6週齢のWistar系雄性ラットの左側脛骨外側面を露出させ骨膜を剥離し、骨膜下に設けたスペースにTB、ハイドロキシアパタイト顆粒（HA）およびリン酸三カルシウムペースト（P α ）をそれぞれ移植した。また自家骨移植モデルとしてベニアグラフト群（以下VN）を作製するため、ラット右側脛骨から皮質骨片（2.0×8.0mm）を採取し、皮質骨片を同一ラットの左側脛骨骨膜下スペースに移植した。各ラットの左側脛骨はmicro-CTを使用して観察した。手術直後および術後4, 8および12週に撮影し、画像再構成ソフトを用いてこれらの画像を構築した。骨造成部位の最大幅径の骨断面をCT画像上で手術直後と術後12週で測定した。測定した各区間におけるデータの12w/0wを計算し

骨造成量の割合として比較した。機械的試験において万能試験機 Type 5567 を用いて術後4, 8 および 12 週で屠殺したラットの左側脛骨の移植部位に2mmのチタン製ロッド(1 kN, 3mm/分)で負荷をかけ、試料の破壊を避けるために0.35ミリメートルの深さに達したときに停止した。得られた力 - 変位曲線の直線領域の傾きから機械的強度(MPa)を算出した。組織学的観察は術後4, 8, および12週の機械的試験終了後HE染色を行った。

4. 研究成果

(1) 【骨膜からの骨再生】PP群における再生骨は術後5日目の骨幹部において見られ、その形態は太く短かったが、その後、徐々に骨端部の方向へ細長い形態に変化をする傾向を認めた。定量的、組織学的解析により、この再生骨は1週目で骨量が最も多かったが、骨密度は低く、骨内部でのリモデリングが認められ、未熟な網状骨であることが確認された。4週目では骨量は減少したが、骨密度は高くなり、骨内部および骨表面でリモデリングが認められ、層板骨へと変化した。8週目では骨表面でのみリモデリングが認められ、より成熟した層板骨へと変化した。なお、PR群においては骨の再生は全く認められなかった。

(2) 【再生骨ブロック状移植】移植骨はどの群においても感染や拒絶反応を起こすことなく生着し、欠損部が修復されたが、移植骨の採取時期によって修復過程に違いがみられた。CT画像においてRB1群では移植骨の吸収は少なかったが、RB4, RB8, NF群の移植骨は生着後に吸収が認められた。形態計測的評価において、移植部位の下顎骨の高さおよび幅は、RB1群がNF群と比べて有意に高いことが示された。一方、RB4群はNF群と同等の高さ、幅であったが、RB8群では高さがNF群と比べて有意に低いことが示された。骨密度はRB1群がNF群と比べて有意に低かったが、RB4, RB8群はNF群と同等であった。組織学的にはRB1

群は NF 群と比べて骨髓腔が広く，RB4，RB8 群の組織像は，NF 群と類似した組織像を認めた。また，RB8 群では，下顎骨下縁の骨表面における TRAP 陽性の破骨細胞が他群より多く認められ，骨吸収傾向が高いと考えられた。

(3) 【再生骨細片状移植】再生骨移植群では欠損部の完全な修復が認められ，修復された骨内部は既存骨と類似した緻密な層板骨であった。骨表面の TRAP 陽性反応は軽度で，Runx2 陽性反応が多く見られ，骨増加傾向が見られた。一方，自家骨移植群では欠損部の修復が行われているが，骨の性状は若干疎であり，一部には移植した自家骨の形態が残存していた。骨表面において，Runx2 陽性反応と比較し，TRAP 陽性反応が多く見られたことから吸収が起こりやすいという傾向が見られた。これらは移植骨に存在する細胞成分が関係していると考えられる。今回使用した自家骨である腓骨は骨髓組織が少なく細胞成分の疎な成熟した皮質骨であった。一方，再生初期の幼若な再生骨は骨髓様組織が多く見られる細胞成分に富んだ海綿骨であった。そのため，両者の間には移植後の生着度，骨修復度に違いが出たものと考えている。

(4) 【骨欠損への人工骨移植】定量的解析では，併用群は術後8週において TB 群と比較して約2倍の骨形成量を示した。また，コラーゲン群と比較し同等の骨形成量を示した。組織学的検討では，TB 群は既存骨端と TB 表面間に連続する骨形成を認め，コラーゲン群では欠損内に散在性に骨形成を認めた。併用群は TB 群，コラーゲン群の両者の特徴を持つ骨形成を示していた。免疫組織化学的検討では，TB およびコラーゲンの表面に，TGF- β 陽性の細胞を認め，この TGF- β の局在は，TRAP 陽性の破骨細胞と Runx2 陽性の骨芽細胞に一致していた。以上のことから，TB とコラーゲンの併用は骨形成の足場として機能し，広範な骨形成を促進することが示唆され，骨欠損に対する有用な移植材となり得ると考えられた。

(5) 【人工骨による骨造成】骨膜下の平坦な骨表面に移植した TB は，生体適合性および骨伝導能を示し，骨造成を促した。骨造成において TB は，同程度の骨造成量を示す HA よりも優れた形態安定性と高い剛性を有した。TB は VN と同程度の機械的強度を有し，負担荷重の大きい部位での骨造成にも適すると考えられた。TB では，P α や VN でみられた早期骨吸収は生じず，その造成骨量は長期にわたり維持された。したがって，本研究では，他の骨代替材料や自家骨と比較して，TB が優れた骨造成能を有し，また，長期にわたって良好な骨伝導能を維持できる骨造成材料であることを明らかにした。

本研究の結果より，再生骨は移植材料として従来用いられている自家骨以上に有効であった。骨造成を比較した結果では，人工骨による骨造成骨において吸収が少なく，また力学的強度測定でも，人工骨による造成骨は自家骨による骨造成と比較して同等以上の力学的強度を有しており，人工骨による骨造成の有効性が示された。画像評価では，CT 画像は組織標本に近似した形態を示しており，CT 画像の評価により骨再生過程の評価が十分に行えることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Uryu T, Matsumoto N, Namaki S, Mashimo T, Tamagawa T, Yasumitsu T, Okudera M, Komiyama K, Ung-il Chung, Honda K, Arai Y, Yonehara Y. Histochemical and radiological study of bone regeneration by the combinatorial use of tetrapod-shaped artificial bone and collagen. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有, 24, 2015, 199-210, <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jthb/-char/ja/>
- ② Iwata J, Namaki S, Mashimo T, Ung-il

Chung, Honda K, Yonehara Y.
Augmentation of flat bone area using
tetrapod-shaped artificial bone in
rats. Journal of Hard Tissue Biology,
査読有, 24, 2015, 69-76, [https://
www.jstage.jst.go.jp/browse/jthb/
-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jthb/-char/ja/)

- ③ Mashimo T, Saito T, Shiratsuchi H, Iwata J, Uryu T, Tamagawa T, Yasumitsu T, Namaki S, Matsumoto K, Mori Y, Arai Y, Honda K, Yonehara Y. A new graft material for mandibular bone defect repair using regenerative bone from periosteum. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有, 23, 2014, 45-54, <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jthb/-char/ja/>
- ④ Mashimo T, Saito T, Shiratsuchi H, Iwata J, Uryu T, Tamagawa T, Namaki S, Matsumoto K, Kawashima S, Mori Y, Arai Y, Honda K, Yonehara Y. Assessment of the Bone Regenerative Process from Fibular Periosteum by in vivo Micro Computed Tomography. Journal of Hard Tissue Biology, 査読有, 22, 2013, 391-400, <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jthb/-char/ja/>

[学会発表] (計 12 件)

- ① 真下貴之, 瓜生 豪, 安光智洋, 岩田 潤, 斎藤忠仁, 生木俊輔, 米原啓之 骨膜由来再生骨を用いた顎骨再建方法の検討 第14回日本再生医療学会総会 2015年3月19日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- ② 瓜生 豪, 松本直行, 上原浩之, 白土博司, 斎藤忠仁, 生木俊輔, 真下貴之, 玉川崇皓, 安光智洋, 小宮山一雄, 本田和也, 新井嘉則, 鄭 雄一, 米原啓之 ラット下顎骨欠損におけるテトラポッド形状人工骨移植の組織学的放射線学的検討

第59回日本口腔外科学会総会・学術大会
2014年10月18日 幕張メッセ国際会議場 千葉県千葉市

- ③ Uryu T, Matsumoto N, Uehara H, Shiratsuchi H, Saito T, Namaki S, Mashimo T, Tamagawa T, Komiyama K, Honda K, Arai Y, Shimohata N, Chung Ung-il, Yonehara Y. Histochemical and radiological study of bone regeneration by the combinatorial use of tetrapod shape artificial bone and collagen. 36th Asia Pacific Dental Congress. 2014年6月17日 Dubai (UAE)
- ④ 瓜生 豪, 松本直行, 上原浩之, 白土博司, 斎藤忠仁, 生木俊輔, 真下貴之, 玉川崇皓, 安光智洋, 小宮山一雄, 本田和也, 新井嘉則, 鄭 雄一, 米原啓之 テトラポッド形状人工骨とコラーゲンの併用移植による骨再生の組織学的放射線学的検討, 第68回日本口腔科学会総会・学術大会 2014年5月9日 京王プラザホテル 東京都新宿区
- ⑤ 岩田潤, 生木俊輔, 真下貴之, 瓜生豪, 斎藤忠仁, 白土博司, 玉川崇皓, 安光智洋, 本田和也, 新井嘉則, 鄭雄一, 米原啓之 テトラポッド型人工骨埋入による骨造成過程の観察と力学的評価 第13回日本再生医療学会総会 2014年3月4日 国立京都国際会館 京都府京都市
- ⑥ Yonehara Y, Uryu T, Uehara H, Shiratsuchi H, Saito T, Namaki S, Mashimo T, Tamagawa T, Matsumoto N, Komiyama K, Honda K, Arai Y, Shimohata N, Chung Ung-il. A comparative study of micro-CT images and histological specimen in rats parietal bone defect repair process. 19th International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology. 2013年6月25日 Bergen (Norway)

- ⑦ 瓜生豪, 松本直行, 上原浩之, 白土博司, 生木俊輔, 齋藤忠仁, 岩田潤, 真下貴之, 玉川崇皓, 小宮山一雄, 新井嘉則, 鄭雄一, 米原啓之 ラット頭頂骨におけるテトラポッド型人工骨を用いた欠損修復の観察 第 65 回日本大学歯学会学術大会 2013 年 5 月 19 日 日本大学歯学部 東京都千代田区
- ⑧ 岩田潤, 真下貴之, 瓜生豪, 玉川崇皓, 齋藤忠仁, 白土博司, 生木俊輔, 本田和也, 掛谷昌宏, 米山隆之, 新井嘉則, 鄭雄一, 米原啓之 テトラポッド型人工骨を用いた骨造成過程の観察 第 65 回日本大学歯学会学術大会 2013 年 5 月 19 日 日本大学歯学部 東京都千代田区
- ⑨ 岩田潤, 生木俊輔, 真下貴之, 齋藤忠仁, 白土博司, 玉川崇皓, 本田和也, 新井嘉則, 下畑宣行, 鄭雄一, 米原啓之 テトラポッド型人工骨を用いた骨造成と各種人工骨との比較 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 23 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- ⑩ 瓜生豪, 上原浩之, 生木俊輔, 白土博司, 齋藤忠仁, 真下貴之, 玉川崇皓, 松本直行, 小宮山一雄, 本田和也, 新井嘉則, 鄭雄一, 下畑宣行, 米原啓之 ラット頭頂骨欠損修復過程における micro-CT 画像および組織標本の比較検討 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- ⑪ 瓜生 豪, 上原浩之, 生木俊輔, 真下貴之, 玉川崇皓, 松本直行, 小宮山一雄, 本田和也, 新井嘉則, 鄭雄一, 米原啓之 ラット頭頂骨におけるテトラポッド型人工骨を用いた欠損修復の観察 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術集会 2012 年 10 月 19 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- ⑫ 岩田 潤, 生木俊輔, 真下貴之, 齋藤忠仁, 白土博司, 玉川崇皓, 本田和也, 新

井嘉則, 鄭 雄一, 米原啓之 テトラポッド型人工骨を用いた骨造成の検討 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術集会 2012 年 10 月 19 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米原 啓之 (YONEHARA, Yoshiyuki)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00251299

(2) 研究分担者

堤 定美 (TSUTSUMI, Sadami)

金沢工業大学・先端電子技術応用研究所・

客員教授

研究者番号：00028739

本田 和也 (HONDA, Kazuya)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：30199567

生木 俊輔 (NAMAHI, Shunsuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：70386077

大木 秀郎 (OOKI, Hiderou)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：80147628

上原 浩之 (UEHARA, Hiroyuki)

日本大学・歯学部・非常勤医員

研究者番号：90409102

(3) 研究協力者

真下 貴之 (MASHIMO, Takayuki)

岩田 潤 (IWATA, Jun)

瓜生 豪 (URYU, Takeshi)