

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861673

研究課題名(和文) 磁場による成長因子・細胞局所注入法と超音波照射を併用する骨膜伸展骨形成法の開発

研究課題名(英文) Development of periosteal extension bone formation method used in combination with growth factor-cell local injection method and ultrasonic irradiation by the magnetic field.

研究代表者

樋口 雅俊 (HIGUCHI, Masatoshi)

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70436856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨膜伸展骨形成法において、その骨増生効果を低侵襲かつ最大限に引き出すための研究を行った。磁場を応用して局所注入した成長因子や細胞を定着させることが最大限の目的だが、これまでに骨増生効果が確実とされてきた超音波照射も併用した。イヌの実験に先んじて、ウサギでの超音波照射の実験系の確立から開始した。ウサギの鼻骨に骨欠損部を形成し、そこに2種類のチタンメッシュと、吸収性のメンブレンを留置し、穴の多いチタンメッシュが最も骨形成能が高いことが判明した。今後は、予備実験を終了し、本研究の本題である、成長因子と細胞の局所注入を開始する予定である。

研究成果の概要(英文)：In the periosteal extension bone formation method, we conducted a study to draw out the bone augmentation effect in minimally invasive and maximum. Its objective of maximizing possible to fix the growth factor or cells localized injection by applying a magnetic field, but bone augmentation effect also in combination ultrasonic irradiation which has been ensured so far. Ahead of the dogs of the experiment, it was started from the establishment of experimental system of ultrasonic irradiation in the rabbit. The nasal bone of the rabbit to form the bone defect, and the two types of titanium mesh there, indwelling the absorbability of the membrane, it is high often titanium mesh is the most bone-forming ability of the hole has been found. In the future, to end the preliminary experiment, which is the main subject of this study, which is scheduled to begin a local injection of growth factors and cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨膜伸展骨形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨延長法は、手術侵襲が低いにも関わらず、確実に骨形成が期待できる骨増生法である。しかし、母床骨の骨切りが必須であり、その母床骨が貧弱な場合には満足 of いく骨増生は得られていなかった。そこで、本研究において、母床骨が貧弱な場合であっても骨の増生が期待できる骨膜伸展骨形成法において、骨の増生を促進させる生理活性物質を磁場を利用した Drug and Cell Delivery System にて定着させるとともに、骨形成をより促進させる手法として従来から導入されている超音波照射による治癒促進能を応用し、最も効果的な骨増生効果を得るための条件や手法を検討し、骨膜伸展骨形成法をより確実な骨増生法として確立させることを考えた。

(2) 骨延長法は、顎顔面領域における骨の変形の修正や骨欠損部の再建、デンタルインプラント埋入のための前処置に際して新しい治療法として確立されつつある。その手法は、母床骨を骨切りし、徐々に目的の位置まで骨を延長した後にそのスペースを固定しておく、延長スペースに骨新生が生じるというものである。この方法は従来の一期的手術に比べて侵襲が少なく、骨新生・骨再生という観点ではきわめて再現性が高いことからすでに臨床的にも繁用され、その成果が報告されてきた。しかし骨欠損部を骨延長で修復しようとした場合、骨欠損部断端を骨切りしてトランスポートセグメントとすることが必須であり、母床骨を骨切りするという外科的侵襲をどうしても加えることになる。また母床骨のボリュームが乏しく、トランスポートセグメントのボリュームが確保できないと、延長を行っても十分な骨形成が得られない場合もある。特にデンタルインプラントの移植床となる歯槽骨は頬(唇)舌幅が薄く、その幅を拡張するための骨延長を実施するためには、薄い歯槽骨をさらに骨切り分割する必要がある。これは手技的に難易度が高いばかりではなく、骨切りされたトランスポートセグメントが薄いために延長中に吸収・消失してしまうことも多い。さらに、骨延長法は治療期間が長期に及ぶため、延長装置を介した感染からもトランスポートセグメントの吸収や壊死を生じるリスクを

はらんでいる。われわれはこれまでに、この治療期間が長期に及ぶという骨延長法の欠点を改善すべく、骨形成因子を骨延長部に応用する研究をウサギの下顎骨を用いて行ってきた。その結果、骨形成因子によって骨延長部の骨形成は確かに促進されるという成果を報告するに至った。しかし、骨延長部の骨形成は促進されても、トランスポートセグメントに代わるものは無く、母床骨が細い・薄いなどの不利な条件の場合の骨増生がわれわれの懸案事項となっていた。一方、骨切りを要さず、骨延長と同様に骨膜下スペースを徐々に拡張してそのスペースに骨を形成させる骨膜伸展骨形成法 (Periosteal Expansion Osteogenesis) の手法が近年考案され、実験結果が報告されている。最近ではこの Periosteal Expansion Osteogenesis と β -TCP などの生体材料との併用による骨膜下骨形成の実験結果等が報告されているが、 β -TCP などの生体材料自体には骨形成活性が無いため必ずしも臨床的に満足 of いく結果は得られていない。骨形成活性の無い生体材料に骨形成活性を持たせるためには、われわれも研究成果を挙げている骨形成因子等の growth factor を応用した移植実験、および、骨髄幹細胞を *in vitro* で生体材料に播種・細胞移入した後に移植に供する実験などが報告されているが、これらを骨膜伸展骨形成に応用した報告は未だに発表されていない。そこで、非侵襲的に成長因子を骨膜下のスペースに望ましい量だけ繰り返し集積させ描着させる手法として、磁場を利用した Drug and Cell Delivery System を応用するとともに、従来から硬組織の治癒促進効果が明らかとなっている超音波照射療法も併用することで、より骨形成能を高めるために、骨膜伸展骨形成法 (Periosteal Expansion Osteogenesis) の開発において磁場を利用した Drug and Cell Delivery System と超音波照射療法の応用を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) われわれはこれまでに、骨形成因子をはじめとする各種 growth factor の骨形成に及ぼす基礎的な研

究を行い、さらにこれらをウサギ下顎骨の骨延長に応用して骨形成が促進される結果を得てきた。本研究ではその成果を骨膜伸展骨形成に応用すると同時に、磁場を利用した Drug and Cell Delivery System と超音波照射療法を併用することによって、低侵襲であるにも関わらず、より高い骨形成能を得て、より臨床応用に即した結果を判明させようとするものであった。

(2) 本研究では、単純な骨膜伸展骨形成法のみによって実際にどの程度の骨形成が期待できるかを検証し、その上で磁場を利用した Drug and Cell Delivery System を応用した骨形成能を有する成長因子を使用した骨膜伸展骨形成法での骨形成の評価を行い、形成された骨に関しては、恒常性があるのか否か、さらには形成された骨を機能させた場合に、その骨の恒常性に变化が生じるか否かについても検討することを計画した。次いで、超音波照射群と非照射群においても同一の検証を行う方針とした。本研究でこれらが実践できることが立証できれば、骨膜を剥離伸展するのみという極めて低侵襲な外科処置だけで骨形成を獲得し、そこに骨形成活性を有する成長因子や移植細胞が定着するよう磁力で維持をさせる点。それらを望ましい量だけ繰り返し集積させることで、より確実・早期の骨増生を得ようとする点が従来に無い独創的な点であり、さらに、これに加えて超音波照射療法を併用し、より高い骨形成結果を得ることが可能となれば、本法は、近未来的に人体応用が可能な顎骨再建および歯槽骨増生法になり得ると同時に、本手法が確立すれば、従来骨再建・骨増生が不可能あるいはハイリスク症例においても、顎骨再建やデンタルインプラントの植立が可能になるため、患者に対する利

益・貢献度は絶大であると考えられた。また骨膜伸展骨形成は未だ人体応用されていない未知の骨増生法であることに加え、そこに磁場を利用した Drug and Cell Delivery System にて生理活性物質、あるいは幹細胞を移入させる点、超音波照射の手法を加味する点が斬新であると同時に、研究推進の途上での失敗や発見から得られる結果は、新たな骨増生法を考案する基盤になるものと考えた。

3. 研究の方法

(1) 平成 26 年度内に、イヌの下顎骨を用いた単純骨膜伸展骨形成法の実験系を確立し、その上で磁場を応用した Drug and Cell Delivery System による成長因子の注入を応用した骨膜伸展骨形成実験を行うことを目標とした。平成 27 年度以降では、まず平成 26 年度終盤に実施した実験結果の再現性を検証し、さらに細胞移入によって骨形成活性を付与した場合についての骨膜伸展骨形成実験を行う計画とした。各実験系において超音波照射群と非照射群を設定し、磁場を利用した Drug and Cell Delivery System ばかりではなく、超音波照射の有無によつての骨形成能の違いについても検討を行い、また、これらの結果、高い骨形成能を有していることが検証できれば、将来的には、サルにおける実験系を確立し、最終的には人体応用の可能性を検討することも計画していた。

(2) 当初、26 年度の計画は下記の如く計画した。

イヌの下顎大臼歯を抜歯し治癒させた後、その頬側歯肉骨膜下にチタンメ

ッシュを挿入する。チタンスクリウ2本を舌側の歯肉上から頬側へ貫通するように挿入し、このスクリウを回転することによって頬側のチタンメッシュを外側へ移動させる。このチタンメッシュの移動に伴い、骨膜下スペースが頬側へ徐々に拡大することによって、同部の骨新生を期待する(図1)。

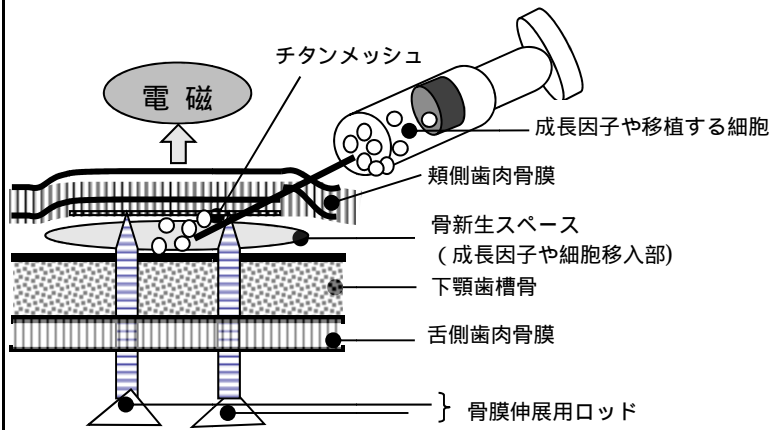
で得られた標本を経時的に軟X線写真撮影、およびCT撮影し、骨膜伸展によって形成された新生骨の骨質・骨量を画像評価する。また、同時に組織切片を作製して組織学的観察を行う。

で得られた結果を参考に、各種条件(治療期間や伸展ペース等)を変えて同様の実験を行い、イヌの単純骨膜伸展骨形成法における骨形成の至適条件を決定する。至適条件が決まったら、磁場を利用したDrug and Cell Delivery Systemを応用して成長因子を注入、集積させて、同様の実験を行う。

注入する成長因子の種類や反復投与するタイミングや量、回数等の条件を変えて、実験を行う。

で得られる標本を経時的に軟X線写真撮影、およびCT撮影し、磁場を利用したDrug and Cell Delivery Systemを応用して成長因子を注入した骨膜伸展によって得られる骨の骨質・骨量を画像評価する。

(図1)



(3) 27年度の計画は上記に引き続き、下記の如く計画していた。

上記 ~ の実験を数匹のイヌに対して実施し、結果の再現性を検証する。

骨形成活性を付与するもう一つの手段として、イヌの骨髓より細胞を採取・培養し、これを骨芽細胞系へ分化誘導を行った上でナノサイズの磁気ビーズを移植細胞に貪食させ、磁場を応用した Drug and Cell Delivery System を応用して細胞移入を施す。細胞を骨膜下のスペースに注入・集積させた後に、骨膜伸展骨形成実験に供する。

で得られる標本を経時的に軟X線写真撮影、およびCT撮影し、細胞移植を併用した骨膜伸展によって得られる骨の骨質・骨量を画像評価する。また、同時に組織学的観察を行う。

単純骨膜伸展骨形成群、磁場を利用した Drug and Cell Delivery System 併用群において、超音波の照射と非照射によっての骨形成能を比較検討する。

サルにおいてもチタンメッシュでの単純骨膜伸展骨形成実験を行う。

で得られる標本を経時的に軟X線

写真撮影、およびCT撮影し、サルにおける骨膜伸展骨形成によって得られる骨の骨質・骨量を画像評価する。また、同時に組織学的観察を行う。

で得られた結果を参考に、各種条件(治癒期間や伸展ペース、伸展後固定期間)を変えて同様の実験を行い、サルにおける単純骨膜伸展骨形成法における骨形成の至適条件を決定する。

において至適条件が決まったら、磁場を利用した Drug and Cell Delivery System を応用して成長因子を注入、集積させて、同様の実験を行う。

の手法をサルにも応用し、磁場を応用した Drug and Cell Delivery System を応用して細胞移入を施したサルの骨膜伸展骨形成実験を行う。

この間、採取されたサルの標本を経時的に軟X線写真撮影、およびCT撮影し、サルにおける骨膜伸展によって得られる骨の骨質・骨量を画像評価すると同時に、組織学的観察を行う。

これまでの実験結果を詳細に検討の上、被験者同意の下に人体応用を試みる。

(4)実験に際しては、イヌに先行し、ウサギでの予備実験を行うことから開始した。磁場を応用した Drug and Cell Delivery System を応用して細胞移入をするには、大きな磁力も必要となるため、まずは超音波照射による骨増生効果の至適条件の検討を行うこととなった。

4・研究成果

(1)ウサギの鼻骨に骨欠損部を4か所形成し、同部に目の数が異なる2種のチタンメッシュプレートと吸収性のメンブレンを設置し、残りの1か所には何も設置せず、コントロールとした。同部に超音波照射骨折治療器による超音波照射を行い、1週・2週・8週の3群での骨増生効果を比較検討した。

(2)ウサギの鼻骨は小さいため、骨欠損部の形成や超音波照射の規格化に難渋したものの、実験系の確立は成功し、1・2週群では超音波照射による骨増生効果が明らかとなったが、8週群では骨増生効果に有意な差は見出せなかった。特に穴の多いチタンメッシュを使用した欠損部で良好な骨形成が観察された。

(3)以上の結果より、骨膜伸展骨形成法の実験を進めるのに際して、実験開始直後に超音波照射を併用するのは、手術後2週までの早期の時期に限定し、以後は細胞や成長因子の局所注入と磁場を応用させることを反復すると、最も骨増生効果が得られる可能性が浮上した。

(4)実験系の確立や予備実験に難渋したため、骨膜伸展の十分な実践にまでは至っていないが、超音波照射の実践に関しての結果は明らかとなったため、国際学会で成果報告を行った。また、今後は磁場を応用した骨膜伸展骨形成の研究を行い、得られた知見を学会や論文として発表する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕〔計1件〕

Masatoshi Higuchi, Asami Hotta,
Takamitsu Tsutsui, Yuriko Saida,
Hiroumi Ikawa, Ran Iguchi,
Akihiko Kosaka, Akinori Moroi,
Kunio Yoshizawa, Koichiro Ueki,

Comparison in bone regeneration
induced by low intensity pulsed
ultrasound (LIPUS) between the
different titanium meshes with
different number of porous and
polytetrafluoroethylene (ePTFE)
membrane in rabbit nasal bone.

International Conference on Oral
and Maxillofacial surgery.

メルボルン（オーストラリア）

2015年10月27～31日

〔その他〕

ホームページ等

[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A
_Dispinfo.Scholar/3_80/92459A8C
C4CB0B57.html](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Dispinfo.Scholar/3_80/92459A8C_C4CB0B57.html)

6 . 研究組織

研究代表者

樋口 雅俊（HIGUCHI, Masatoshi）

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70436856