

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18592169

研究課題名（和文） 下顎骨延長術の治療期間を短縮する

研究課題名（英文） Acceleration of bone formation on mandibular distraction osteogenesis

研究代表者

小林 正治（KOBAYASHI TADAHARU）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80195792

研究成果の概要：

ラット下顎骨延長モデルを用いて PTH 間歇投与の骨形成促進効果について検討を行った。PTH 投与群 12 匹では PTH60 μ g/kg を術直後より週 3 日皮下に投与し、対照群 12 匹では同量の基剤を投与してマイクロ CT データを比較検討したところ、PTH 投与群では対照群と比較して有意に骨形成が促進していた。

さらに、アルギン酸カルシウムゲルと生分解性ポリエステル製多孔質材料を担体とした b-FGF の徐放実験を行ったところ、6 日間にわたり bFGF の徐放が確認された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1) 下顎骨延長 (2) 骨形成促進 (3) PTH (4) 薬物徐放材料
(5) 塩基性線維芽細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

下顎骨延長術は 1992 年に顎変形症患者に対する応用が初めて報告され、近年広く用いられるようになった治療法である。この方法は、骨そのものを延長して形態を整えるほかに、付随する軟部組織を拡張する効果があり、顔面半側萎縮症や小下顎症における下顎骨延長以外にも、口腔癌の再建顎の再形成等に

応用可能な画期的な方法である。しかしながら、軟骨内骨化により形成される長管骨とは異なり、膜性骨である下顎骨の骨延長時に生じる骨再生過程の詳細なメカニズムはまだ十分に解明されているとは言えない。また、骨形成までの治療期間が長期に及ぶという欠点も指摘されており、骨再生期間の短縮する方法として、骨延長部の骨形成を促進する

ための手法の検討が行われている。

近年、骨形成促進剤として副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇的投与の有効性が報告され、欧米では骨粗鬆症の治療として本剤の間歇的投与が開始されている。PTH 間歇的投与については、骨代謝回転や石灰化、コラーゲンの成熟度など骨質に対する効果の解析が進み、骨形成シグナルの研究の進展とともに骨形成促進機序も徐々に明らかとなってきている。しかし、骨延長法に対する PTH 間歇的投与の骨形成促進効果に関する研究は、国内外ともまだ始まったばかりであり、下顎骨延長モデルを用いた研究の報告はない。

また、骨形成促進剤として骨形成を促進するサイトカインの生体応用が注目されているが、より効果的に生体に作用させるためには徐放型の薬物送達システムを開発する必要があると指摘されている。一方、熱誘起相分離法により作成される生分解性ポリエステル多孔質体は、生体内で分解・吸収される徐放型の薬物送達システムの基材として応用が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、下顎骨延長術における骨延長部の骨形成を促進して治療期間を短縮するための手法を開発することを目的として研究を開始した。

われわれは、骨形成促進効果が期待できる薬剤として副甲状腺ホルモン(PTH(1-34))と塩基性線維芽細胞増殖因子 b-FGF に注目した。PTH(1-34)は間歇的に投与することによって強力な骨形成促進効果があると報告されていることから、動物実験モデルを用いて下顎骨延長における PTH(1-34)の骨形成促進効果を検討することとした。また、b-FGF をより効果的に生体に作用させるためには徐放型の薬物送達システムを開発する必要があると考え、生分解性ポリエステル多孔質体を基材とした徐放型薬物送達システムの開発をおこなうこととした。

3. 研究の方法

(1) ラット下顎骨延長モデルにおける PTH(1-34)の骨形成促進効果について

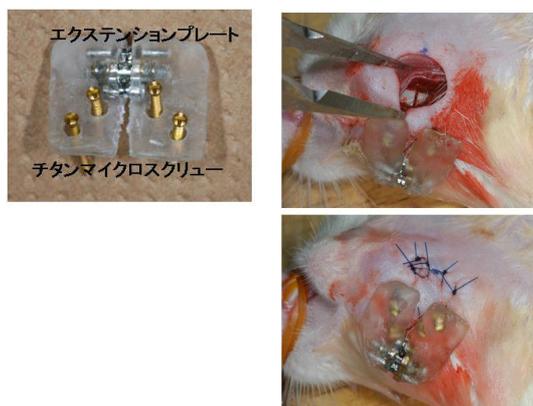
ラットを用いた下顎骨延長実験モデルにおける PTH(1-34)間歇投与の骨形成促進効果について検討を行った。

実験動物には、生後 12 週、体重 400 g 前後のウイスター系雄ラット 24 匹を用いた。骨延長装置は、チタンマイクロスクリューと矯正用エクステンションプレートを用いて自作したものを用いた。セボフルンで麻酔導入後、ペントバルビタールを腹腔内投与して麻酔を施し、1%キシロカイン 0.2ml にて局所麻酔後に右側顎下部に切開を加え、下顎骨を露出させた。右側下顎骨の第 2 臼歯と第

3 臼歯間に骨切り部を設定し、下顎骨に延長装置を装着した。ダイヤモンドディスクを用いて皮質骨全周にわたる骨切りを行い、延長装置を延長して人工的に骨折させ、骨延長装置の拡大によって骨が離開する事を確認して縫合した(写真 1)。

写真 1. ラット下顎骨延長モデル

A: 骨延長装置 B: 下顎骨骨切りと延長装置の装着



5 日間の待機期間の後、1 回 0.2mm、1 日 2 回、10 日間かけて合計 4mm の牽引延長を行った。ラットは PTH(1-34)投与群 12 匹と対照群 12 匹の 2 群に分けて行った。PTH(1-34)投与群では PTH(1-34)60µg/kg を術直後より週 3 日皮下に投与(最大 11 回)し、対照群では同量の基剤を投与した。延長開始時(術後 5 日、PTH(1-34)術直後と術後 3 日の 2 回投与)、延長終了時(術後 15 日、PTH(1-34)7 回投与)、延長終了後 1 週目(術後 22 日、PTH(1-34)11 回投与)ならびに 3 週目(術後 36 日、PTH11 回投与)でそれぞれ 3 匹づつ屠殺した(図 1)。

図 1. 下顎骨延長プロトコール

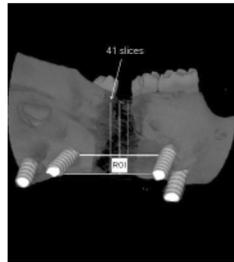


骨量の評価にはマイクロCT((株)日鉄エレクトックス製X線 3 DCT装置マイクロフォーカス)を用い、非脱灰のまま小X線源照射を行った。スキミングにより得られたデータから三次元画像を作製して新生骨の微細骨梁構造を観察した。さらに、3D 画像解析ソフトを用いて下顎骨下縁部にROI (Resion of Interest) 9.79 mm³を設定し(図2)、同部の

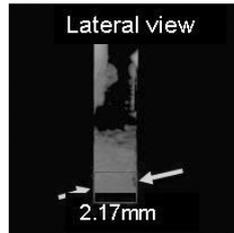
Bone volumeを算出して新生骨骨量の定量化を行うことにより、PTH(1-34) 間歇的局所投与の骨形成促進効果を検討した。

図2. マイクロ CT 画像の ROI 設定

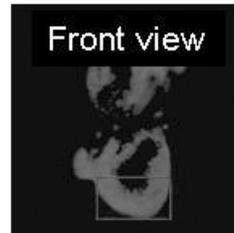
A: 3D 画像の下顎骨下縁が水平で下顎枝が垂直となるように設定し、骨切り部に隣接したスクリーンの中点を骨延長部の中点とした。



B: この中点を通り、水平面ならびに矢状面に垂直な平面から前後に 20 スライス計 41 スライス（幅 2.17 mm）を切り取った。



C: 次に、下顎骨下縁から 40 スライスを切り取った。



D: 最終的に Bone volume を測定する ROI の体積は 9.79 mm³とした。



(2) 薬物徐放材料の開発

薬物徐放担体にはアルギン酸カルシウムゲルと生分解性ポリエステル製多孔質材料との複合材料を用いた。この複合材料では負の荷電をもつアルギン酸が正の荷電をもつ b-FGF の担持し、生分解性ポリエステル多孔質体が材料の強度を高める機能を担う。いずれの材料も生体吸収性であるため、組織再生後に薬物徐放担体を除去する必要がない。また、コラーゲンなどの動物由来の材料を用いていないため、動物由来感染症（人獣共通感染症）の危険性がないという利点もある。生分解性ポリエステルとしては主としてポリカプロラクトンを用いた。薬物徐放材料作製時にはアルギン酸ナトリウムを含浸させた生分解性ポリエステル製多孔質体に b-FGF を吸着後、塩化カルシウム溶液でアルギン酸をゲル化した。作製した材料を用い、リン酸緩衝生理食塩水中にて b-FGF の徐放実験を

行った。b-FGF の検出には ELISA キットを用いた。

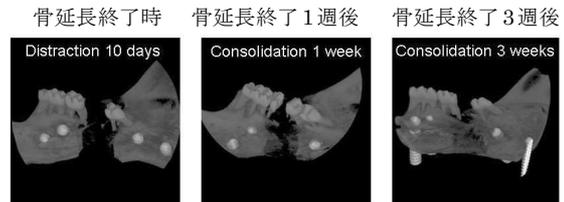
4. 研究成果

(1) ラット下顎骨延長モデルにおける PTH(1-34)の骨形成促進効果について

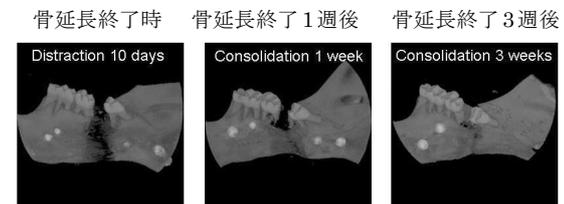
マイクロ CT データから三次元画像を作製して新生骨の微細骨梁構造を観察したところ、骨延長終了時の対照群では骨延長部に骨新生が認められなかったが、PTH(1-34)投与群では骨切り部から延長部の中心方向に向かって骨新生が始まっていることが確認できた。さらに、骨延長終了 1 週間後、3 週間後でも、ともに対照群に比較して PTH(1-34)投与群では良好な骨新生が認められ、骨延長終了 3 週間後の対照群ではまだ骨の連続性が不十分であったが、PTH(1-34)投与群では骨の連続性が確認できた（図 3）。

図3. 骨延長部のマイクロ CT 画像

A: 対照群

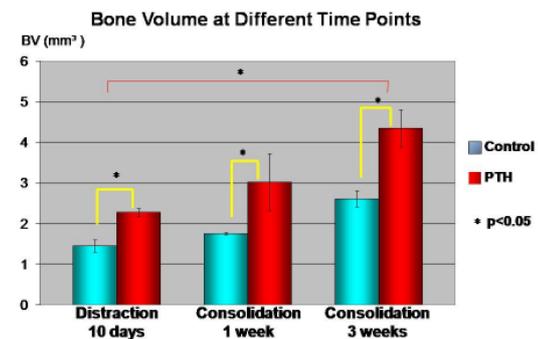


B: PTH(1-34)投与群



下顎骨下縁部の ROI (9.79 mm³) の Bone volume を算出し、対照群と PTH(1-34)投与群の値を二元配置分散分析ならびに Tukey 法による多重比較を行ったところ、時間の経過とともに Bone volume は増大し、PTH(1-34)投与群では対照群と比較して各時期とも有意に高値を示した（図 4）。

図4. 骨延長部の Bone volume



以上の結果より、PTH(1-34)投与群では対照群と比較して統計的に有意に骨形成が促進しており、ラット下顎骨延長モデルにおけるPTH(1-34)の骨形成促進効果が確認された。

(2) 薬物徐放材料の開発

アルギン酸カルシウムゲルと生分解性ポリエステル製多孔質材料との複合材料を用いて作製した b-FGF 徐放材料を用い、リン酸緩衝生理食塩水中における b-FGF の徐放実験を行ったところ、7x7x4 mm の材料から6日間にわたり 5 ng/day 程度の bFGF が徐放されることが確認された。以上の結果から、開発した b-FGF 徐放材料を下顎骨延長術に応用した場合には、初期の組織再生促進に効果が期待される。

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 1 件)

① Mir nowazesh ALI Rajib, Sadakazu EJIRI, Tadaharu KOBAYASHI, Anwar RB, Kimimitsu ODA, Hayato OHSHIMA, Chikara SAITO: Histologic study of the cellular events during rat mandibular distraction osteogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. Oral Radiol Endod 107: 325-335, 2009.

[学会発表] (計 5 件)

① Mir nowazesh ALI Rajib, Sadakazu EJIRI, Tadaharu KOBAYASHI, Anwar RB, Hayato OHSHIMA, Chikara SAITO: Effects of Parathyroid Hormone on Newly Regenerated Bone during Rat Mandibular Distraction Osteogenesis. 8th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Bangkok, 2008.11.4-7

② Mir Nowazesh ALI, Tadaharu KOBAYASHI, Sadakazu EJIRI, Rezwana Binte ANWAR, Mikako TANAKA, Hayato OHSHIMA, Chikara SAITO: Intermittent parathyroid hormone therapy to increase bone formation during rat mandibular distraction osteogenesis. 平成 20 年度 新潟歯学会 第 2 回例会、新潟、2008.11.8

③ Mir Nowazesh Ali, Sadakazu Ejiri, Tadaharu Kobayashi, Kimimitsu Oda, Hayato Ohshima, Chikara Saito: Histological study of the cellular events during rat mandibular distraction osteogenesis. 第 112 回日本解剖学会総会・全

国学会、大阪、2007.3.27-29

④ Mir Nowazesh Ali, Sadakazu Ejiri, Tadaharu Kobayashi, Kimimitsu Oda, Hayato Ohshima, Chikara Saito: Histological analysis of a rat model of mandibular distraction osteogenesis. 7th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong, 2006.11.6-9

⑤ Mir Nowazesh Ali, Sadakazu Ejiri, Tadaharu Kobayashi, Kimimitsu Oda, Hayato Ohshima, Chikara Saito: Histological analysis of a rat model of mandibular distraction osteogenesis. 平成 18 年度新潟歯学会第 2 回例会、新潟、平成 18 年 11 月 11 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正治 (KOBAYASHI TADAHARU)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80195792

(2) 研究分担者

田中 孝明 (TAKA AKI TANAKA)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00217043

泉 直也 A (NAOYA IZUMI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：10361908

(3) 連携研究者

江尻 貞一 (SADAKAZU EJIRI)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40160361