

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659826

研究課題名(和文) 唇顎口蓋裂治療における再生医学～機能性 Scaffold を応用した顎裂再建

研究課題名(英文) Controlled release of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) enhances osteoconductive and biodegradable properties of beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) in a rat calvarial defect model

研究代表者

小山 明彦 (OYAMA, Akihiko)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70374486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：局所投与された granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) が、生体吸収性バイオセラミックスである beta-tricalcium phosphate (β-TCP) の骨伝導能を高める作用が認められるか検証した。ゼラチンハイドロゲルを用いて 5 μg の G-CSF を徐放化した場合、β-TCP の骨伝導能、生体吸収性の双方を促進する結果が得られた。この徐放化 G-CSF と β-TCP を組み合わせた骨再生法は、頭蓋顎顔面領域の骨欠損治療に対する応用の可能性を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A total of 27 calvarial defects were randomly divided into nine treatment groups. One set of defects was filled with a beta-TCP disc containing normal saline alone (group-A, control) or 1 (group-B), 5 (group-C), or 20 ug of G-CSF saline solution (group-D). Another set of defects was filled with a beta-TCP disc with an overlaid gelatin hydrogel sheet incorporating normal saline alone (group-E), or 1 (group-F), 5 (group-G), or 20 ug of G-CSF solution (group-H). The last set of defects was left untreated (group-I). Histologic and histomorphometric analyses were performed at eight weeks postoperatively. In groups F and G, values of newly formed bone were significantly higher compared to group A. The percentage of remaining beta-TCP in group G was significantly lower compared to group A.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，形成外科学

キーワード：唇顎口蓋裂 再生医療 G-CSF 徐放化 β-TCP

### 1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂の治療体系の中で、口唇、口蓋形成と同様に顎裂の再建も重要な課題である。顎裂再建の目的は、単なる顎裂の閉鎖のみならず、将来の歯牙移動・誘導のために歯槽堤の作製までを意図しなければならない。Boyne ら (1972) によって確立された、二次的顎裂部骨移植術 (Secondary Bone Graft : SBG) は、顎裂部閉鎖術式の主流となっている。

二次的顎裂部骨移植術は、幼～小児期に腸骨海綿骨を用いて行われる場合が多い。小児の腸骨では外板と内板、板間層ともに薄いため広い範囲から海綿骨を採取する必要があるが、海綿骨質は赤色骨髄に富んでいるため出血量が多くなりやすく、また、十分な量の移植骨が採取できない場合や、あるいは術後に吸収される例も少なくない。これらの問題点を解決するため、より低侵襲な手術法として再生医療が注目されつつある。

近年、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) が骨増殖促進作用や難治性骨折の骨癒合促進作用を有する複数の報告が存在する。

### 2. 研究の目的

生体吸収性天然高分子であり、かつ薬物の徐放性のコントロールの容易なゼラチンからなる機能性 scaffold を作製し、局所投与された G-CSF が、生体吸収性バイオセラミックスである beta-tricalcium phosphate (β-TCP) の骨伝導能を高める作用が認められるか検証する。

### 3. 研究の方法

Wistar rat の左右頭頂骨に直径 5 mm の骨欠損を作成する。合計 27 の骨欠損を無作為に 9 群の治療群に振り分けた。β-TCP disc に水溶液として薬剤付加を行った群として；生理的食塩液のみ (グループ A, コントロール), 1 μg (グループ B), 5 μg (グループ C), あるいは 20 μg の G-CSF 含有生理的食塩液付加投与群 (グループ D), β-TCP disc に薬剤含浸ゼラチンハイドロゲルを付加した徐放化群として；生理的食塩液のみ (グ

ループ E), 1 μg (グループ F), 5 μg (グループ G), あるいは 20 μg の G-CSF 付加群 (グループ H)。最後の群は自発的骨再生を観察するために骨欠損作成のみで無治療とした (グループ I)。手術後 8 週で動物の安楽死を規定に則り行い、骨組織を採取した (図 1, 2)。ヘマトキシリン - エオジン染色による組織観察およびアニリンブルー染色標本と画像解析ソフトを使用した再生骨量、残存バイオセラミック量の分析を実施した。

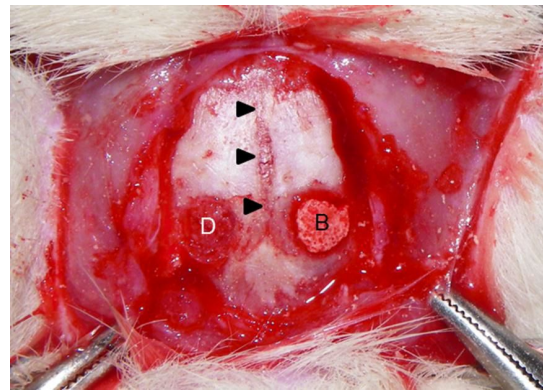


図 1. 骨欠損の作成と薬剤の投与

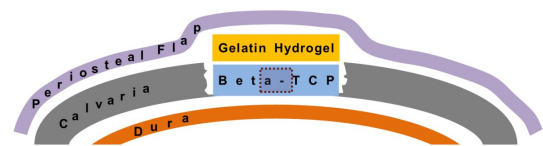


図 2. 実験のシェーマ

### 4. 研究成果

各頭蓋冠欠損の正中線に沿って HE で染色した脱灰標本の低倍率画像を示す (図 3)。グループ A に、新たに形成された骨梁が限局的に認められた。グループ B から E では新たに形成された骨梁が観察可能であったが、欠損を埋めることができなかった。グループ F に、新たに形成された骨組織は、ほぼ、頭蓋骨の欠損を占め、グループ G は欠損のほとんどは、新たに形成された骨組織で占められた。アニリンブルー染色では残留した β-TCP が均質な白色粒子として観察された (図 4)。新生骨量の検討を行った結果、グループ F および G では、グループ A と比較して有意に高値を示した。残存 β-TCP 量の検討では、グループ G はグループ A と比較し、有意に低値を示した (図 5)。

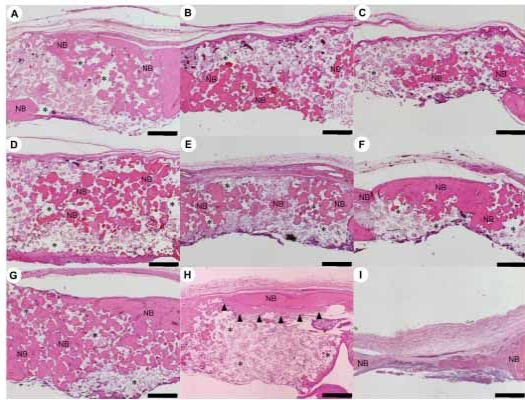


図 3. 各頭蓋欠損の HE 染色標本

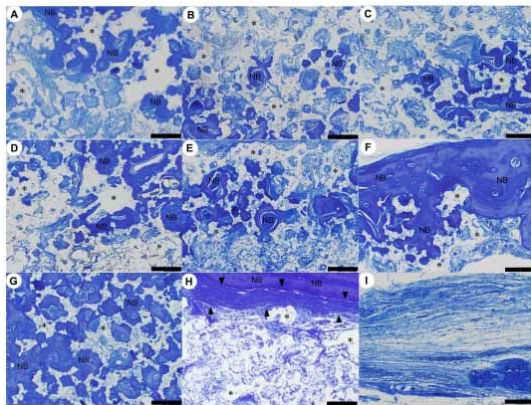


図 4. 各頭蓋冠欠損のアニリンブルー染色標本

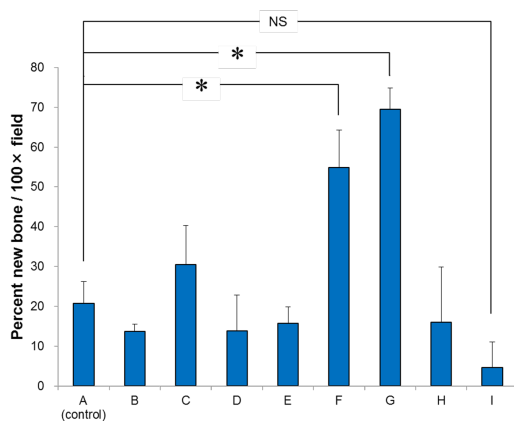


図 5. 新生骨量の比較

ゼラチンハイドロゲルを用いて 5  $\mu$ g の G-CSF を徐放化した場合， $\beta$ -TCP の骨伝導能，生体吸収性の双方を促進する結果が得られた。この徐放化 G-CSF と  $\beta$ -TCP を組み合わせた骨再生法は，頭蓋顎顔面領域の骨欠損治療に対する応用の可能性を有していると考えられる。従って本研究が，顎裂患者に対する，低侵襲な新しい治療法となり，患者の将来的な歯牙移動・誘導のための歯槽堤を獲得することを可能にする基礎となると考え

られる。

## 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)

Minagawa.T, Tabata.Y, Oyama.A, Furukawa.H, Yamao.T, Yamamoto.Y, Controlled Release of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Enhances Osteoconductive and Biodegradable Properties of Beta-Tricalcium Phosphate in a Rat Calvarial Defect Model, Int J Biomat. Volume 2014, p11, 2014, 査読有

[学会発表](計 2 件)

皆川知広, 田畑泰彦, 小山明彦, 古川洋志, 山尾健, 山本有平, Controlled release of G-CSF enhances osteoconductive and biodegradable properties of beta-TCP in a rat calvarial defect model, 第 22 回日本形成外科基礎学術集会, 2013 年 11 月 7-8 日, 朱鷺メッセ(新潟市)

皆川知広, 田畑泰彦, 小山明彦, 古川洋志, 山尾健, 山本有平, 唇顎口蓋裂治療における再生医学～機能性 scaffold を応用した顎裂再建, 第 23 回 北大形成外科アカデミー, 2011 年 12 月 10 日, 京王プラザホテル(札幌市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：70374486

(2)研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70271674

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：00399924

舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10533630

林 利彦 (HAYASHI TOSHIKHIKO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：00432146

齋藤 亮 (SAITO AKIRA)  
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究  
員  
研究者番号：70507574

(3)連携研究者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：50211371