

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791594

研究課題名（和文） 骨形成蛋白（BMP）を用いた中耳再建の研究

研究課題名（英文） Study of the middle ear reconstruction with bone morphogenetic protein

研究代表者

杉本 晃 (SUGIMOTO AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50436432

研究成果の概要（和文）：

鼓室形成術や乳突削開術後の側頭骨欠損部の再建にたいして、骨の再建法は確立されていない。現在、組織工学的手法をもちいた骨組織の再建が注目されてきている。今回の研究で、骨再生を観察するのに動物用 micro CT は極めて有効であることが確認できた。また、正常骨を形成させることができる骨形成因子のうち BMP-2 が PDGF、 β -TCP より優れていることが確認できた。BMP-2 は側頭骨での骨組織の再建能が高いことが確認でき、含気腔に形成して行くことが初めて確認でき

研究成果の概要（英文）：

There is currently no established method for reconstructing temporal bone defects after tympanoplasty or mastoidectomy. Bone tissue reconstruction using tissue engineering techniques is currently receiving attention. This study demonstrated that micro CT devices for animals are very effective for observing bone regeneration. Moreover, of the bone morphogenetic proteins that are capable of forming normal bone, BMP-2 was more efficient at bone formation than PDGF and β -TCP. BMP-2 was shown to have a strong ability to reconstruct bone tissue in temporal bone, and construction of a pneumatic space was confirmed for the first time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、耳鼻咽喉科学

キーワード：側頭骨再生、骨形成蛋白（BMP）、マイクロCT、鼓室形成術、乳突削開術、含気化

1. 研究開始当初の背景

(1) 鼓室形成術、乳突削開術を施行する際、中耳病変による骨破壊のため、あるいは手術

による骨削開のためしばしば乳突皮質骨や外耳道後壁に骨欠損が残り、さらには耳小骨の侵食、欠損も認め難聴きたすことも多い。

従来、側頭骨欠損部に対しては何ら処置せず放置してきたが、乳突皮膚質骨の欠損は術後の耳後部皮膚陥没を惹起して醜形を残し、また乳突腔が外部に露出するため術後長期間にわたり、cavity problems といわれる合併症に苦慮することが多い。この cavity problems とは、中耳腔内の易感染性による耳漏の持続や多量耳垢の産生であり、そのため中耳手術後は耳鼻咽喉科での定期的処置を一生必要となることも多い。

(2)このような問題を解決するには中耳の手術において、清掃を終えた後に外耳道後壁の骨欠損部と、耳小骨連鎖を何らかの方法で再建する必要がある。しかし外耳道後壁に対しては軟骨や骨パテを用いた再建の報告はあるが、いずれも採取量に限界があり、必ずしも全例で実施できるわけではない。また、人工物（ハイドロキシアパタイト等）や、自家軟骨が使われていることが多いが、しかしこれらの人工物を用いた場合、異物反応を惹起し人工耳小骨が自然排出されることが多々見られる。また軟骨使用の場合、硬度の低さに起因する伝音効率の不十分さのため術後十分な聴力を獲得できないことも多い。

(3)これらのような問題点があり、現在側頭骨における骨再建法は確立されていない。またこれらの再建法では、骨組織の骨化、吸収というリモデリング能を有する生理的な正常骨にはならない。もし骨リモデリング能を有する生理的な骨組織で再建できれば、問題点も解決され理想的といえる。

2. 研究の目的

現在、組織工学的手法をもちいた、骨組織の再建が注目されてきている。骨形成を期待できるものとして以下のものがある。

(1), 骨形成を担うタンパク性因子である BMP (Bone morphogenetic protein)。

(2), 間葉系細胞の遊走, 増殖に関与する増殖因子であり、多血小板血漿由来の PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)。

(3), 人工生体材料で骨親和性と生体内での吸収性を有する β -TCP (β -Tricalcium Phosphate)。

今回これらの骨形成物質を用い研究をし、新時代の中耳側頭骨の手術方法開発の基礎を作る。

3. 研究の方法

(1)動物での処置方法

動物はハートレイ系白色オスのモルモットで、6週齢, 400~450g, 鼓膜正常のものを4匹使用した。担体はI型アテロコラーゲンをもちいた。投与薬物として BMP, PDGF, β -TCP, コントロールとして生理食塩水を各々の動物に用いた。BMP は約20種類あるなかで、最も骨形成能の高い BMP-2 を用いた。BMP-2

の濃度は以前の研究から最適濃度である 1.5mg/cm³ で使用。PDGF は 0.3mg/cm³ で使用。 β -TCP は直径 0.25-1mm のものを使用。すべて担体とともに体積を 50 μ l にした。動物をペントバルビタールの腹腔内投与にて麻酔し、直径 4.0 mm のダイヤモンドバーで片側の側頭骨中耳骨包に削開孔を作成する。担体に投与薬物を浸透させ埋め込み閉創し飼育場所に戻す。処置一定期間後 CT にて評価する。CT 測定中はイソフルレンの吸入麻酔を行う。

(2)CT STUDY

使用した CT は動物用のマイクロ CT で、この特徴を説明する。

- ① 動物が生きているまま評価可能。
- ② 同一個体において経時的に評価可能。
- ③ 使用したものは ALOCA 社製 LCT-200 で 24 μ m ピクセルサイズで繊細に撮影できる。
- ④ 3D ソフトにて解析し任意の断面にて評価可能。
- ⑤ 骨塩量を直接測定可能。
- ⑥ 骨組織の組成解析が可能。

4. 研究成果

(1)処置後 2 週におけるマイクロ CT 像にて検討する。

①BMP-2 投与したもののみが骨再生を認め、1 週目より増加している (図 1)。

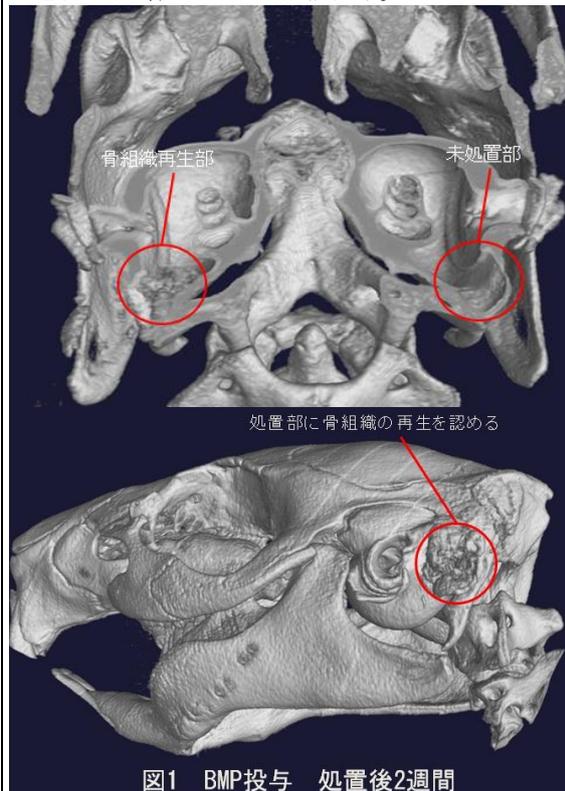


図1 BMP投与 処置後2週間

②PDGF 投与したものでは、側頭骨で骨再生を認めなかった。

③ β -TCP 投与したものでは、 β -TCP 自体の顆粒は認めるが骨組織の再生は認めなかつ

た。

④生理食塩水を用いたコントロールでは側頭骨で骨再生を認めなかった。

以上の結果から、BMP-2 が他の骨成長因子よりも優れた骨形成能を有すると考えられ、BMP-2 による骨再生の過程を同一個体において経時的に観察を行った。

(2) BMP-2 投与したもので処置後継時的に観察する。

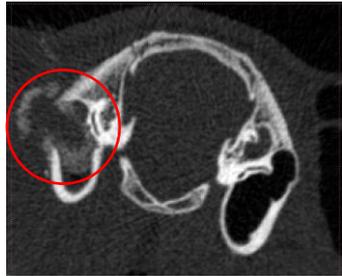


図 2 :
処置後 2 週における C T 軸位断像
赤丸は骨再生部分

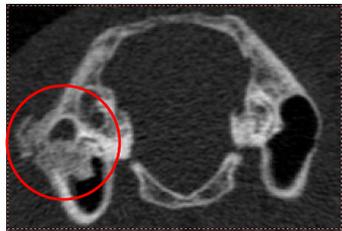


図 3 :
処置後 1 か月における C T 軸位断像
骨塩量が著名に増加し、CT 値が上昇。

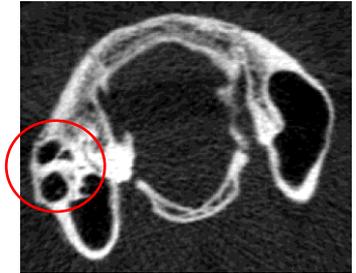


図 4 :
処置後 6 か月における C T 軸位断像
含気化を認め始める。



図 5 :
処置後 12 か月における C T 軸位断像
含気化がさらに進む。

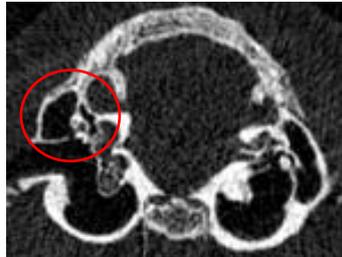


図 6 :
処置後 18 か月における C T 軸位断像
ほぼ正常に近い含気腔を形成した。

図 2～図 6 : 徐々に骨形成がすすみ骨組織の成熟していくのが確認できた。側頭骨内腔に含気腔が形成されてきていることが確認で

き、処置後 18 か月のものではほぼ正常に近い含気腔を形成した。

(3) BMP-2 による骨再生を経時的に観察を行い骨再生部位の骨塩量の増加を CT にて測定しグラフに示す。

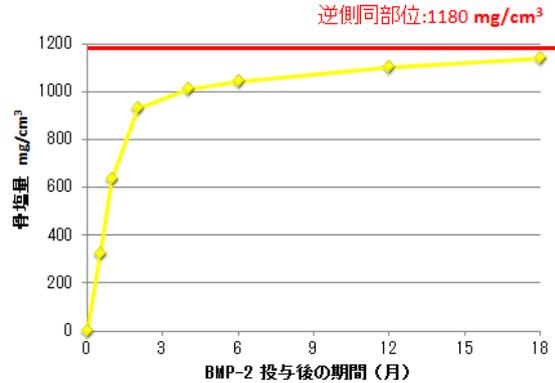


表1 骨再生部位の骨塩量の増加

時間経過とともに骨塩量が徐々に増加していくのがわかる。未処置の逆側部位では 1180mg/cm³ で、これに近づいていると考えられた。

(4) 側頭骨は形態的な分類として、内部に含気洞を有する含気骨に分類されたくさんの空洞、蜂巢を有し特殊な構造を呈している。その中耳腔内面では皮膚や筋組織と接しないため、未分化間葉系細胞の遊走が困難で、BMP-2 の作用による骨形成には不利と考えられる。この側頭骨での BMP の効果はほとんど報告がなく解明されていない。

以前の我々の報告では動物を殺したあと軟線レントゲン撮影による測定のため、測定値に実験間誤差、個体間誤差が生じた。今回動物用 micro CT を用いることにより、実験間誤差、個体間誤差をなくすことができた。

また、正常骨を形成させることができる骨形成因子のうち BMP-2 が PDGF、 β -TCP より優れていることが確認できた。

さらに、この BMP-2 を側頭骨という内部に感覚器を有する含気腔で使用し、削開後、骨を再形成させることにより、再び含気腔となっていくことを世界ではじめて報告した。

これらのことより、耳科手術における BMP-2 の有用性が確認できた。

(5) 骨再生を観察するのに動物用 micro CT は極めて有効であることが確認できた。

BMP-2 は側頭骨での骨組織の再建能が高いことが確認でき、含気腔に形成していくことが初めて確認できた。

耳科手術での BMP-2 をもちいた臨床応用への可能性が示唆された。

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9件)

1) Sugimoto A, Okamoto Y

Reconstruction of the temporal bone with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)
The 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery, in press

2) 杉本晃 岡本美孝

骨形成蛋白 (BMP) を用いた動物側頭骨の再生
日本耳鼻咽喉科学会 2012;115 (4) : 468-468
査読無し

3) 杉本晃 山本陸三朗 岡本美孝

骨形成蛋白 (BMP) を用いた側頭骨の再建 ～ micro CT での検討～
Otology Japan 2011;21 (4) : 574-574 査読無し

4) 杉本晃 堀口茂俊 岡本美孝.

骨形成蛋白 (BMP) を用いたモルモット側頭骨欠損部の再建.
日本耳鼻咽喉科学会 2011;114 (4) : 425-425
査読無し

5) 杉本晃 堀口茂俊 岡本美孝.

モルモット側頭骨欠損部の再建に対し骨形成蛋白を用いた検討.
Otology Japan 2010;20 (4) : 620-602 査読無し

6) 杉本晃 堀口茂俊 岡本美孝.

嗅覚刺激による無難聴性耳鳴治療の試み.
Otology Japan 2009;19 (4) : 346-346 査読無し

[学会発表] (計6件)

1) Sugimoto A

Reconstruction of the temporal bone with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)
The 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery, June 5th 2012, Nagasaki, Japan

2) 杉本晃

骨形成蛋白 (BMP) を用いた動物側頭骨の再生
第113回 日本耳鼻咽喉科学会 2012年5月11日、新潟市

3) 杉本晃

骨形成蛋白 (BMP) を用いた側頭骨の再建 ～ micro CT での検討～

第21回 日本耳科学会 2011年11月25日、那覇市

4) 杉本晃

骨形成蛋白 (BMP) を用いたモルモット側頭骨欠損部の再建
第112回 日本耳鼻咽喉科学会 2011年5月20日、京都市

5) 杉本晃

モルモット側頭骨欠損部の再建に対し骨形成蛋白を用いた検討
第20回 日本耳科学会学術講演会 2010年10月9日、松山市

6) 杉本晃

嗅覚刺激による無難聴性耳鳴治療の試み
第19回 日本耳科学会総会・学術講演会 2009年10月8日、東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 晃 (SUGIMOTO AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 50436432

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :