

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：23792332

研究課題名(和文)下顎骨区域切除後の下歯槽神経再生法

研究課題名(英文) Inferior alveolar nerve regeneration after missing bone segments

研究代表者

磯村 恵美子 (Isomura, Emiko)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70397701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：仮骨延長の中でも移動骨片を1個作製し全欠損長を移動させるbifocal distraction osteogenesisは、下顎骨の区域切除後の顎欠損に対し有用であるが、その際の下歯槽神経の再生についての報告はない。本研究では、イヌの下顎骨仮骨延長術を用い、下歯槽神経再生の可能性について検討を行った。ビーグル犬12頭を用い、左側下顎骨骨体部に近遠心径10mmの幅の下歯槽神経を含めた欠損を作製し、仮骨延長を行った。延長後、電気生理学的・免疫組織化学的検索を行い、再生した神経について検討した。結果、下歯槽神経の再生が機能的・形態的に確認された。課題はあるが、ヒトへの応用も将来的には可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：Bifocal distraction osteogenesis has been shown to be a reliable method for reconstructing missing bone segments. However, there are no reports regarding inferior alveolar nerve regeneration during that. We assumed that the nerve could regenerate with the bone regeneration during bifocal distraction, if the nerve was saved at a mesial site of the transport disc. In the present study, we investigated the possibility of that in dogs. Using a bifocal distraction osteogenesis method, we produced a 10-mm mandibular defect including the nerve defect and distracted the transport disc at a rate of 1 mm/day in 12 dogs. The regenerated nerve was evaluated histologically and electrophysiologically. Our results indicate that inferior alveolar nerve regeneration after bifocal distraction osteogenesis was successful in dogs. Although our research is still at the stage of animal experiments, future application in humans is considered to be possible.

研究分野：口腔外科

キーワード：神経再生 仮骨延長

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域における下顎骨欠損は先天性のほか、外傷、感染、腫瘍の切除によって生じ、これに対して、従来は金属プレート、骨移植、または仮骨延長による骨の再建が行われてきた。一方、下顎骨は骨内に下歯槽神経血管束を内在する構造を有している。このため下歯槽神経は下顎骨区域切除に伴い切除される。下顎骨の再建にプレート再建や骨移植と合わせて神経移植を行った場合でも、本来の構造と同様に歯槽骨、歯肉の感覚を含めて回復させるのは極めて困難である。

通常、下顎骨再建後はインプラントや義歯を用いて咬合、咀嚼機能の回復を目指す。患者のQOLを考えた時、口腔内感覚の回復程度も重要になってくる。

そこで本実験では仮骨延長術による骨再建時の組織再生に着目した。他の再建方法とは異なり、骨組織だけではなく周囲の軟組織も同時に延長することが可能な仮骨延長術は1950年代にロシアのIlizarovによって提唱され、主に四肢の長管骨に皮質骨骨切りを行い、断端間を延長する術式が一般的であるが、それ以外にも、Ilizarovは外傷や腫瘍切除後に生じた中間欠損部を新生骨に置き換える術式も開発している。その中でも欠損部に隣接した一方の骨端部を分割し移動骨片を作製し、延長器を用いて全欠損部を移動させることによって骨を再生させる方法をbifocal distraction osteogenesis (以下BDO)という。これを用いれば骨組織や歯肉、皮膚などの軟組織に加え下歯槽神経をも延長できる可能性がある。

下顎骨欠損に対するBDOによる再建の報告はイヌを用いた実験でも行われ、現在はヒトでの臨床報告もされているが、下顎骨欠損に対してBDOによる再建後の神経の再生についての検索はない。

2. 研究の目的

本研究では、イヌの下顎骨に下歯槽神経血管束を含めた区域切除を行い、BDOにて欠損部を再建後、再建した骨内の下歯槽神経の機能と形態について、電気生理学的、組織学的に評価し、神経再生の可能性について検討した。

3. 研究の方法

実験には9~14月齢、体重8.0~10.8kgのビーグル犬(THO ビーグル:オリエンタル酵母工業株式会社)11頭を用いた。実験では左側下顎を実験側、右側下顎を対照側とした。

全ての手術はメドトミジン(0.02 mg/kg、ドミツール®:日本全薬工業株式会社)とミダゾラム(0.3 mg/kg、ドルミカム®:アステラス製薬株式会社)の筋肉内注射を行い、その15分後にペントバルビタールナトリウム(5 mg/kg、ネンプタール®注射液:大日本住友製薬)の腹腔内投与を行う全身麻酔下にて行った。また局所麻酔は1%リドカイン(キ

シロカイン®注射液「1%」:アストラゼネカ株式会社)による浸潤麻酔法を用いた。

全身麻酔下にてイヌを仰臥位にて固定し、メスにて皮膚切開を行った後に、下顎犬歯部から下顎第二大臼歯部の下顎下縁の骨膜に切開を加え、頬側の骨膜のみを歯槽頂まで剥離した。なお、移動骨への血液供給を保つため舌側骨膜の剥離は行わなかった。最大のオトガイ孔である中オトガイ孔より15mm近位に近遠心径10mmの下顎骨区域切除部を、さらにその近位に近遠心径10mmの移動骨片を設定し、8穴チタン製再建プレート

(ThreadLock System®:KLS Martin)及び仮骨延長器(ThreadLock Transport

Distractor®:KLS Martin)のメッシュ部を

下顎骨体に沿って下顎骨面に適合させた。仮骨延長器は再建プレートの下方に固定し、前後2ヶ所のメッシュ部の内、前方を移動骨片に、後方を移動骨片の近位の下顎骨(近位骨)

に固定し、その間に骨切り線が位置するように配置した。また、再建プレートは区域切除部、移動骨片を挟んで、遠位骨と近位骨を固定するように配置した。この際、プレート固定に使用したスクリューは、全て下歯槽管を

障害しないように位置と方向を調節した。固定した再建プレート及び仮骨延長器を一旦

下顎骨より外し、区域切除部の骨切り線(中オトガイ孔から15mm後方及び25mm後方の2

か所)にレシプロケーティングソーにて骨切りを行った。区域切除部の下歯槽動静脈は骨

切り線部にて結紮、切断、下歯槽神経は同部にてメスで鋭利に切断し、骨切り線間の下顎

骨を除去した。移動骨片と近位骨間の骨切り線にはレシプロケーティングソーにて皮質

骨のみ骨切りを行い、骨切り線よりエレバトリウムにて海綿骨の分割を行い、分割部の下

歯槽管を保存しつつ、移動骨片を作製した。再建プレートと仮骨延長器を再度下顎骨に

固定し、オトガイ下部左側後方に皮膚切開を加えて、仮骨延長器のactivator先端を口腔

外に露出させた。頬側骨膜に減張切開を加えて再建プレート及び仮骨延長器を骨膜で覆

うように縫合閉鎖した。顎下部にペンローズドレーンを設置した後、筋層、皮下、皮膚表面に縫合を行い閉鎖した。術直後から延長器

除去までの期間には仮骨延長器の破損防止のため、頸部にエリザベスカラーを装着した。ペンローズドレーンは術後3日目に除去した。

術後7日目から1mm/回/日の速度で移動骨片を前方へ移動し仮骨延長を行った。移動骨片が欠損部を超え、遠位部の骨に接触するまで約10日間の延長を行った。

延長終了後4週間の固定期間をおき、全身麻酔下にて再建プレート及び仮骨延長器を除去し、新たな再建プレート(ThreadLock System®:KLS Martin)にて遠位骨と近位骨間の固定を行った。この際、実験に用いたイヌの全ての個体において移動骨片より近位に仮骨の形成を認めた。

評価方法

評価は術後3ヶ月(6例)、及び6ヶ月(5例)を経たものに分けて行った。

評価法には 開口反射の有無の観察、オトガイ孔部電気刺激による下顎孔部での活動電位の計測、オトガイ孔部へのHRP (horseradish peroxidase; SIGMA ALDRICH; 以下 HRP と記す) 浸漬による三叉神経節一次求心性神経細胞体の標識、摘出下顎骨の免疫組織化学染色、を用い再生した下歯槽神経の機能と形態について検討した。

開口反射の有無の観察

仮骨延長終了日より1回/日の頻度で実験側下歯槽神経支配領域である下顎左側犬歯部遠心頬側歯肉に20G注射針(テルモ注射針20G 38mm; テルモ株式会社, 東京)にて侵害刺激を加え、開口反射の有無を観察した。

オトガイ孔部電気刺激による下顎孔部での活動電位の計測

全身麻酔下にて行った。イヌを仰臥位にて固定した後、舌骨骨体部から下顎骨正中縫合部にかけてのオトガイ下から顎下部正中に切開を加え、対照側は下顎下縁より頬側に骨膜下の剥離を行い中オトガイ孔部にてオトガイ神経血管束を確認した。実験側は固定プレートを除去し、同様に中オトガイ孔部にてオトガイ神経血管束を剖出した。両側とも下顎枝内面を剖出し、下顎孔部で下顎神経血管束を確認した。オトガイ孔部を挟んで刺激電極を刺入し、下顎孔部の下顎神経に沿うように記録電極を配置した。接地電極は下顎正中の軟組織に刺入した。

電気刺激装置 (SEN-8203: 日本光電) アイソレーター (SS-102J: 日本光電) を用いてオトガイ孔部刺激電極より電気刺激を行った。刺激は持続時間 100 μ sec の矩形波電気刺激を刺激間隔 250msec にて20回加えた。出力はオトガイ筋に軽度の収縮を起こす4mAとした。記録電極より得られた電気活動は記録装置 (LEG-1000: 日本光電) にて記録し、パーソナルコンピュータと専用ソフトウェア (LEG-1000 QP-100H: 日本光電) を用いて表示、解析を行った。記録時の設定は感度 10 μ m、掃引速度 1ms、帯域フィルターは 100~2000Hz とした。活動電位の計測は対照側と実験側の両側に対して行った。

オトガイ孔部への HRP 浸漬による三叉神経節一次求心性神経細胞体の標識

本評価法は の活動電位の計測に続けて行った。オトガイ孔より約5mm末梢側にてオトガイ神経を切断し、HRPが周囲組織へ漏出しないよう中枢側断端部を生理食塩水で満たしたチューブで吸引を行い、生理食塩水を15%HRP溶液と空気で置換し神経断端部にHRPの浸漬を行った。HRPの浸漬を1.5時間行った後、生理食塩水にて十分に洗浄を行い、創を閉鎖した。なお、オトガイ孔部に明らかな神経束が見られなかった個体(3ヶ月

群3例、及び6ヶ月群2例)はオトガイ孔上の軟組織に対して上記と同じ方法でHRPの浸漬を行った。HRPの浸漬は対照側と実験側の両側に行った。

HRPの浸漬の3日後に全身麻酔下にて4%パラホルムアルデヒドと0.5%グルタルアルデヒドを含む0.1M PB (pH7.4)にて灌流固定を行い、下顎神経を下顎孔より5mm中枢側にて切断した後下顎骨の摘出を行った。三叉神経節は中枢側を橋から頭蓋底へ出たところで切断し、末梢側の眼神経と上顎神経を分枝後5mm末梢、下顎神経を他の枝と区別するために分岐部から20mm末梢で切断し摘出した。

次に、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (以下 TMB と記す) による HRP の可視化を行った。摘出した三叉神経節を1%パラホルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒドを含む0.1M PB (pH7.4) 中へ浸漬し12時間固定を行った。固定後、三叉神経節より3mm末梢側にて眼神経、上顎神経、下顎神経を切断し、3mm中枢側にて三叉神経節上部部の神経を切断し、トリミングを行った。その後、20%スクロース、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M PB (pH7.4) 中に2日間浸漬させた。次いで30%スクロースを含む0.1M PB (pH7.4) 中に24時間浸漬した。なお、浸漬の期間は全て4のフリーザー中にて保管した。凍結ミクロトームにて厚さ50 μ mの水平断凍結切片を作製し、0.1M PB (pH7.4) 中に貯留した。室温下にて切片を蒸留水で洗浄し、TMB基質液200ml中に浸漬し20分間作用させた。その後、30%過酸化水素水20 μ lをTMB基質液に加え20分間作用させ反応を停止させ、低温下にて5%酢酸緩衝液(注2を5倍希釈したもの)にて洗浄した。蒸留水にての洗浄、TMB基質液による反応及び酢酸緩衝液による洗浄は遮光下にて行った。反応後、浮遊切片はMASコートスライドガラス(松浪硝子、大阪)に貼付し、4にて1昼夜乾燥後、上昇エタノール系列で脱水、キシレンにて透徹後、MOUNT-QUICK(大道産業株式会社、埼玉)にて封入し光学顕微鏡にて観察した。なお、HRP標識細胞の検索においてHRP反応産物を均一に含むもの、または不均一ながらも小胞内に取り込みが見られるものを陽性細胞とした。

摘出下顎骨の免疫組織化学染色

の過程で摘出した下顎骨より軟組織を除去した後、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M PB (pH7.4) で1週間固定を行い、その後15%EDTAを含む0.1M PB (pH7.4) 中に60日間脱灰を行った。脱灰開始30日目に下顎骨をオトガイ孔部前縁、仮骨形成部後端より5mm近位にて下顎骨体部を離断し、トリミングを行った。観察は移動骨片と遠位骨片の接合部より遠位部から仮骨形成部を対象とした。脱灰液は3日毎に交換した。脱灰終了後、パラフィン(Tissue Prep2: 株式会社ファルマ)にて包埋し、ミクロトームにて

下顎骨の頬側面と平行に厚さ 8 μm の切片を作製し、切片を MAS コートスライドガラス(松浪硝子、大阪) に貼付した。

免疫組織化学染色はスライドガラス上にて ABC (avidin-biotin peroxide complex) 法にて行った。キシレンにて脱パラフィンを行い、下降エタノール系および蒸留水にて水和を行った後、タンパク質分解酵素(プロテイナーゼ K : 和光純薬工業株式会社) にて抗原の賦活化を行った。1% ポリオキシエチレン(20) ソルピタンモノラウレート含有 0.01M リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS , pH7.4) (以下 1% tween20 含 0.01MPBS と記す) にて 15 分間洗浄後、0.6% 過酸化水素水を含むメタノールで 15 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。1% tween20 含 0.01MPBS にて 15 分間洗浄後、ブロッキング液 (3% ウシ血清アルブミンを含む 0.01M PBS) にてブロッキング処理を 30 分間行い、軸索のマーカースとして Neurofilament マウスモノクローナル抗体 (1:50 ; Dako) を、シュワン細胞のマーカースとして S-100 ウサギポリクローナル抗体 (1:400 ; Dako) を用い、4 にて 12~16 時間反応させた。その後 1% tween20 含 0.01MPBS にて 1 時間洗浄を行い、Neurofilament マウスモノクローナル抗体に対してはビオチン標識抗マウス IgG (1:200 ; Vector)、S-100 ウサギポリクローナル抗体に対してはビオチン標識法ウサギ IgG (1:200 ; Vector) を室温で 30 分間作用させた。1% tween20 含 0.01MPBS にて 1 時間洗浄後、ABC complex (Vector) を室温にて 30 分間反応させた。0.01M PBS にて 1 時間洗浄を行い、DAB (SIGMAFAST™3,3' -Diaminobenzidine tablets : SIGMA-ALDRICH) 溶液を室温下にて 3 分間作用させ、可視化した。10 分間流水にて洗浄後、蒸留水にて 5 分間の洗浄を行い、ヘマトキシリン液 (Mayer ' s hemalum solution : MERK) を 10 秒間作用させて対比染色を行い、30 分間流水にて洗浄後、上昇エタノール系列で脱水、キシレンにて透徹後、MOUNT-QUICK (大道産業株式会社、埼玉) にて封入し光学顕微鏡にて観察した。観察は下顎骨内の下歯槽神経を対象とした。また、同組織に対して HE (Haematoxylin-Eosin) 染色も行った。

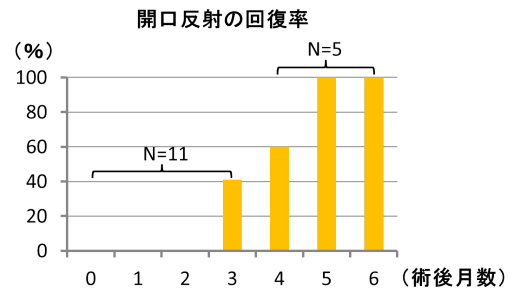
4. 研究成果

実験に用いたイヌの全ての個体において仮骨延長は異常なく行われ、術後の仮骨の骨化状態は良好であった。

3 ヶ月群の個体では移動骨片と遠位骨との接合部にギャップが見られたが、6 ヶ月群の個体では消失していた。また咬合法 X 線像では、それぞれの群で同部に皮質骨の増生が見られたが、6 ヶ月群では骨中央部の不透過像が低減し、皮質骨は骨辺縁に局限していた。

開口反射の有無の観察

開口反射は、3 ヶ月群のうち灌流固定を行うまでに回復を示さなかった 2 例以外全ての個体で回復が見られた。回復率は 2 ヶ月時で 0% (N = 11) であったが、3 ヶ月時で 41% (N = 11)、4 か月時で 60% (N = 5) と継続的に回復し 5 ヶ月時、6 ヶ月時で全例 (N = 5) に回復が見られた。回復までに要した平均期間は 104.6 ± 21.1 日であった (下図)。

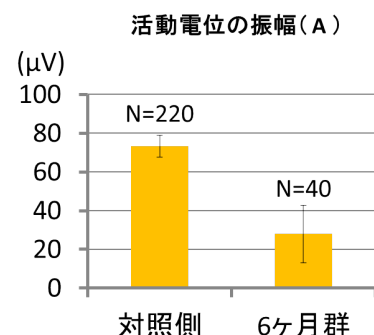
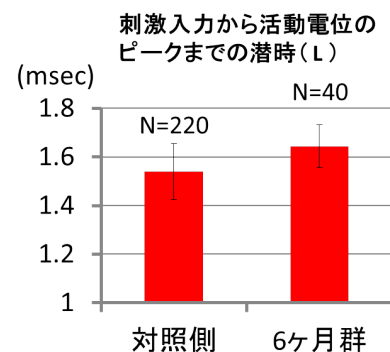


オトガイ孔部電気刺激による下顎孔部での活動電位の計測

オトガイ孔部での電気刺激による下歯槽神経の順行性活動電位の誘発は 3 ヶ月群の個体には全く見られず、6 ヶ月群の 2 個体に見られた。

活動電位の波形より、刺激入力から活動電位のピークまでの潜時、活動電位の振幅を計測し、活動電位の見られた 6 ヶ月群の 2 個体よりそれぞれの平均を求め、対照側との比較を行った。

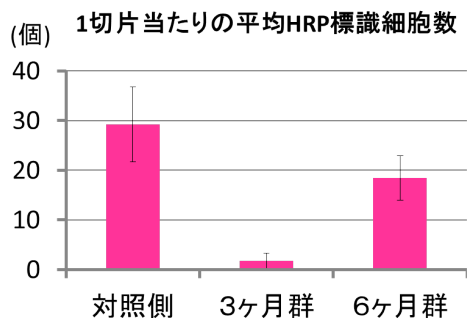
結果は刺激入力から活動電位のピークまでの潜時は、対照側と比較し軽度の延長がみられ、活動電位の振幅は対照側の約 37% まで回復していた (下図)。



オトガイ孔部への HRP 浸漬による三叉神経節一次求心性神経細胞体の標識

HRP の取り込みは対照側三叉神経節の神経細胞体および、3ヶ月群の2個体、6ヶ月群の1個体の実験側三叉神経節の神経細胞体に見られた。

HRP 標識神経細胞体は対照側、実験側ともに、三叉神経節内の下顎神経が分枝する基部から後外側にかけて帯状に分布していた。3ヶ月群ではごく少数の HRP 標識細胞しか観察されなかったが、6ヶ月群では対照側と比較し少ないものの、より多くの HRP 標識細胞が確認された(下図)。



HRP 標識細胞が見られた個体の任意の10切片中の HRP 標識細胞数をより1切片当たりの HRP 標識細胞数を求め、それぞれ群において平均を算出し、対照側との比較を行った。また、HRP 標識細胞が見られた3ヶ月群の2個体、6ヶ月群の1個体、及び対照側について、標識細胞体の直径の比較を行った。3ヶ月群の任意の10切片(1個体5切片ずつ)、6ヶ月群の任意の5切片、及び対照側の任意の10切片より HRP 標識細胞体の直径を計測した。細胞体の直径は細胞の長径とその中点からの垂線が通る部分の細胞の直径の平均とした。

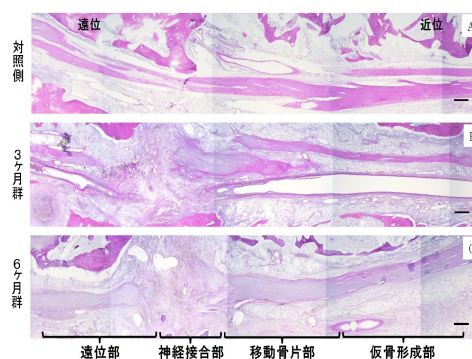
結果は、1切片当たりの HRP 標識細胞数は3ヶ月群では数個であったが、6ヶ月群では対照側の60%程度の数まで増加している傾向が見られた。また、HRP 標識細胞体の直径の比較において、対照側では直径19~77 μ mの標識細胞(N=246)が見られ、直径37~52 μ mの細胞が多数を占めていた。一方、3ヶ月群では直径26~65 μ mの標識細胞(N=20)が見られ直径21~36 μ mの細胞が多数を占めていた。また、6ヶ月群では直径19~68 μ mの標識細胞(N=95)が見られ、3ヶ月群と同様に直径21~36 μ mの細胞が多数を占めていた。

摘出下顎骨の免疫組織化学染色

実験側の観察部位を切片の遠位から近位にかけて、神経接合部より遠位の「遠位部」、移動骨片と遠位骨の接合部で中枢側下歯槽神経断端と末梢側下歯槽神経断端の接合がみられた「神経接合部」、仮骨延長時の移動骨片に相当する「移動骨片部」、仮骨延長によって仮骨が形成された部位である「仮骨形成部」に分類し(下図)比較検討した。骨

組織に関しては3ヶ月群、6ヶ月群のどちらも遠位部から仮骨形成部にかけて口腔側、下顎下縁側の皮質骨には連続性が見られた。

HE染色において、実験側では切片の遠位から近位にかけて下顎骨内に連続した下歯槽神経を認め、その接合部でコブ状を呈していた(図B、C)。強拡大では、3ヶ月群、6ヶ月群のどちらにも遠位部で神経周膜に包まれた神経線維束が見られ、神経接合部で下歯槽神経の線維束構造は消失して多数の毛細血管を伴う線維性結合組織が見られ、その内部には神経再生時に見られる小区画化された再生小神経線維束が観察された。また同部では、6ヶ月群は3ヶ月群よりも毛細血管数が減少し、再生小神経束数の増加が見られた。3ヶ月群、6ヶ月群のどちらも仮骨形成部、移動骨片部の下歯槽神経は対照側と同様に形態的な相違点は見られなかった。



軸索のマーカである Neurofilament に對する免疫染色では、対照側では切片の遠位から近位にかけて下歯槽神経内の神経線維に沿って発現が見られ、その発現は切片の遠位部、中央部、近位部において同程度であった。実験側では、遠位部および神経接合部に3ヶ月群、6ヶ月群それぞれで発現が見られたが、6ヶ月群の方が発現の程度が大きい傾向が見られ、神経接合部では小区画された再生小神経線維束中に発現が見られた。また、3ヶ月群、6ヶ月群のどちらも仮骨形成部、移動骨片部の下歯槽神経には対照側と同程度の発現が見られた。

シュワン細胞のマーカである S-100 に對する免疫染色では、対照側では切片の近位から遠位にかけて下歯槽神経内の神経線維に沿って発現が見られ、その発現は切片の遠位部、中央部、近位部において同程度であった。実験側では、遠位部で3ヶ月群、6ヶ月群それぞれに発現が見られた。神経接合部では3ヶ月群では発現はほとんど見られなかったのに対し、6ヶ月群では小区画された再生小神経線維束中に発現が見られた。3ヶ月群、6ヶ月群のどちらも仮骨形成部、移動骨片部の下歯槽神経には対照側と同程度の発現が見られた。

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3件)

1. Emiko Tanaka Isomura, Yosuke Shogen, Munehiro Hamaguchi, Takeshi Hrada, Noriaki Tanaka, Mikihiko Kogo; Inferior alveolar nerve regeneration after bifocal distractin osteogenesis in dogs. J Oral Maxillofac Surg. 65, e1-11. (2013)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2013.04.037>
2. Emiko T. Isomura, Yosuke Shogen, Munehiro Hamaguchi, Mikihiko Kogo; Electrophysiologic evaluation of inferior alveolar nerve n regenerated by bifocal distraction osteogenesis in dogs. PRSJ. 132(4), 877-82. (2013).
doi:10.1097/PRS.0b013e31829fe49a
3. Shogen Y, Isomura ET, Kogo M; Evaluation of inferior alveolar nerve regeneration by bifocal distraction osteogenesis with retrograde transportation of horseradish peroxidase in dogs. PLoS ONE. 9(4), e94365. (2014).
doi:10.1371/journal.pone.009465.

〔学会発表〕(計2件)

1. 正元洋介、磯村恵美子、古郷幹彦. イヌにおける仮骨延長術を用いた下顎骨区域切除後の下歯槽神経再生について. 第66回口腔科学会総会. 2012年5月17日. 広島国際会議場
2. 正元洋介、磯村恵美子、古郷幹彦. イヌにおける仮骨延長術を用いた下顎骨区域切除後の下歯槽神経再生について. 第18回口腔顔面神経機能学会. 2014年3月1日. 鹿児島県歯科医師会館

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯村 恵美子 (Emiko Tanaka Isomura)
大阪大学医学部附属病院・歯科治療室・
助教
研究者番号：70397701

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

正元洋介 (Yosuke Shogen)
大阪大学歯学部附属病院・口腔外科
(制御系)・医員