

令和元年6月14日現在

機関番号：32643
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2018
 課題番号：25462627
 研究課題名(和文) 骨形成蛋白(rhBMP-2)を用いた側頭骨の研究

研究課題名(英文) Experiment of temporal bone by using rhBMP-2

研究代表者

杉本 晃(SUGIMOTO, AKIRA)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：50436432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳突部を含む側頭骨は含気骨に分類され、内部に蜂巢状空洞や感覚器等を有し、解剖学的構造の特殊性がある。骨形成蛋白(rhBMP-2)は、骨再生を高度に促進する成長因子の一つであり、臨床応用が始まっている。現在のところこの解剖学的構造の特殊性もあり、側頭骨でrhBMP-2がどのように働くかについては十分に分かっていない。我々は、動物(モルモット)側頭骨の含気モデルを作ることに世界ではじめて成功した。側頭骨の含気化のシステムを解明すべく、含気化因子の実験にとりくんだ。まず含気化した側頭骨を任意に作成することができるようになり、また、そのように含気化させる因子を解明し、良好な結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中耳手術後には、乳突皮質骨や外耳道後壁の骨欠損が残り、さらには耳小骨の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、乳突腔が外部に露出するため術後長期間にわたり慢性耳漏や難聴等の合併症に苦慮することが多い。これを解決するには中耳手術において、清掃を終えた後に乳突腔の骨欠損部と、耳小骨連鎖を再建する必要がある。rhBMP-2を用い側頭骨での骨欠損部位に任意の大きさや形の骨再生が可能になり、さらに含気化した正常側頭骨に再生できれば、今後の中耳手術が根本から改良され、極めて有用でないかと考える。今回の研究により新時代の新しい中耳手術への大きな道筋ができた。

研究成果の概要(英文)：No method for reconstruction of temporal bone defects after tympanoplasty or mastoidectomy has yet been established. We have previously provided the first description of using recombinant bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) on the mastoid cortex of temporal bone. Several reports have since reported animal mastoid obliteration. However, the efficacy of rhBMP-2 in the pneumatic space of temporal bone has not been reported.

In this study rhBMP-2 was injected to the animal temporal bone. Bone mineral density was measured using a micro CT device for animals for 12 months after the injection. Significant increase in bone mineral density was measured by CT scan in rhBMP-2 model compared with control, and it was approaching the density of the untreated side. Development of pneumatization is apparent in the center of the bone regeneration site. This study demonstrated that potential utility of rhBMP-2 for bone regeneration that could contribute to clinical use in otological surgeries.

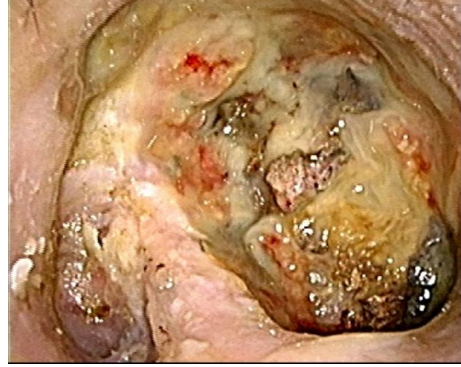
研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：側頭骨再生 骨形成蛋白(rhBMP-2) 側頭骨の含気 マイクロCT 鼓室形成術

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 (図1) 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。そのため、このような外耳道後壁削除・乳突開放型鼓室形成術で終えるのではなく、外耳道後壁の再建や乳突腔充填術が行われることが多くなっている。これらの再建には、自家軟骨、自家骨、骨パテ、軟性再建、人工物(ハイドロキシアパタイト等)が用いられているが、長所、欠点があり必ずしも方法が確立されているとは言い難い。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、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。

図1



- (2) 骨形成タンパク(BMP:bone morphogenetic protein)は骨再生を促進する成長因子の一つであり、1965年、Urist(文献1)により発見され、1988年Wozneyら(文献2)はこれを合成することに成功した。現在骨形成能が最も強い rhBMP-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2)について一部の国々では市販され、主に整形領域で使用され、臨床応用が始まっている。そこで我々は、rhBMP-2 を用いれば乳突皮質骨欠損部の再建、耳小骨の再生、耳小骨連鎖の再建が容易に行えるのではないかと着想した。乳突部を含む側頭骨は扁平骨に分類され、内部に蜂巢状空洞や感覚器等を有しているが、いままでは、解剖学的構造の特殊性もあり乳突部で rhBMP-2 がどのように働くかについては不明であった。そこで我々はまず、動物実験において乳突皮質骨を対象として骨欠損部修復における rhBMP-2 の役割を組織学的に検討し、軟線X線撮影や骨密度測定などの方法で再生骨の検討を行うことに成功した(文献3)。さらに実験を進め micro CTにより骨再生過程を同一個体で長期的な観察を行い骨塩量を非侵襲的に測定することに成功した(文献4)。また、側頭骨の再生の過程で側頭骨の含気化していくことを世界ではじめて確認した(文献4)。

2. 研究の目的

Wullstein が鼓室形成術を 1953 年に報告して以来、急速に耳科手術は発展してきた。鼓室形成術、乳突削開術は、真珠腫などの中耳病巣を郭清して耳小骨連鎖を再建する術式で、現在広く行われている手術である。しかし術後の合併症として、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といった、いわゆる cavity problems がしばしば認められる場合も多い。また、鼓室形成術を行う際、耳小骨連鎖の再建マテリアルとして自家軟骨や人工耳小骨を用いられることが多い。しかしこれらは、硬度の低さに起因する伝音効率の不十分さや、体内での異物反応による自然排出されてしまうといった問題点がある。これらの問題点を改善し中耳の手術方法における新時代の new method の確立を目指す。

3. 研究の方法

- (1) モルモットを用いた動物実験を行う。今後の中耳、側頭骨での骨新生を任意に誘導する技術を開発するために、BMP:bone morphogenetic protein ファミリーの中で最も骨形成能の高い rhBMP-2 を用いて研究する。ハートレイ系白色モルモット約 6 週齢で、鼓膜正常のものを使用する。
- (2) 削開する中耳、側頭骨での再現性を高めるため、メルクマールを決め一定の部位で実験できるようにする。rhBMP-2(0.5mg/cm³ :約 0.1mg)と局所保持可能な担体の I 型アテロコラーゲン(10mg)を使用。十分麻酔を行い、中耳や側頭骨を露出する。中耳や側頭骨にドリル、のみ等で骨組織の削開を行なう。側頭骨全体を大きく削開をするモデルも作成。側頭骨内の含気をみるため耳管機能を処置したモデルも作成。薬物の投与経路は、前述の担体に、rhBMP-2 を浸潤させたものを削開部に埋め込む方法である。
- (3) 一旦閉創し、一定期間経過観察をする。10 週後、20 週後、40 週後、実際の骨新生を評価し確認する。CT 撮影、骨塩量の測定、実験最終週において組織学的検討を行うことにより評価する。ABR でも聴力評価する。

4. 研究成果

(1) 我々はまず、動物実験において乳突皮質骨を対象として骨欠損部修復におけるrhBMP-2の役割安定して施行できるように実験した。さらに組織学的に検討し、成功した。さらにmicro CTにより骨再生過程を同一個体で長期的な観察を行い骨塩量を非侵襲的に測定し安定したデータを得られるようになった(グラフ1)。また、側頭骨の再生の過程で側頭骨の含気化していくことを検討していった。(図2,3,4,5)。

グラフ 1 骨再生部位の骨塩量の増加

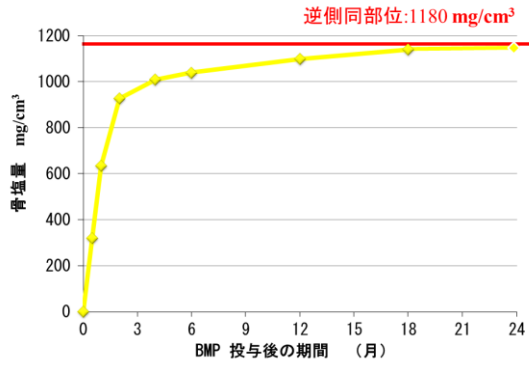
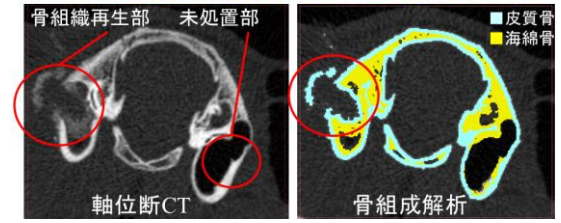
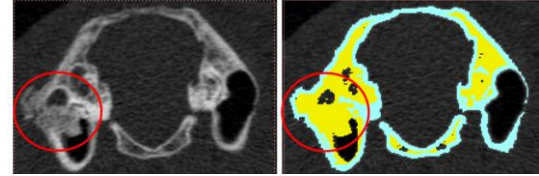


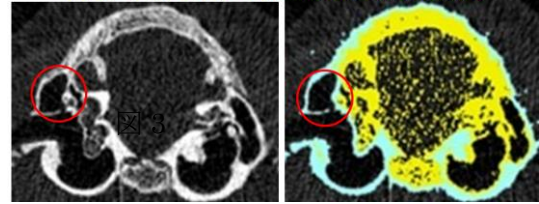
図 2 BMP投与後2週間で急速な骨再生の開始を確認



BMP投与後1か月で側頭骨の骨組織の成熟確認



BMP投与後18カ月で側頭骨の含気化を確認



BMP投与後2週間で側頭骨全体の再生の開始を確認

図 3



図 4

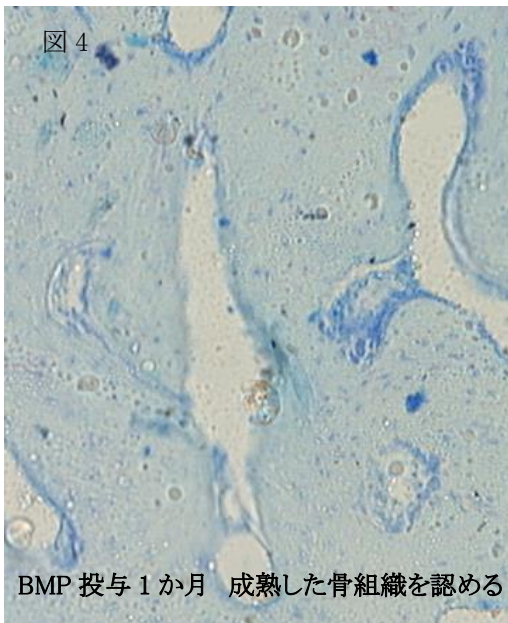
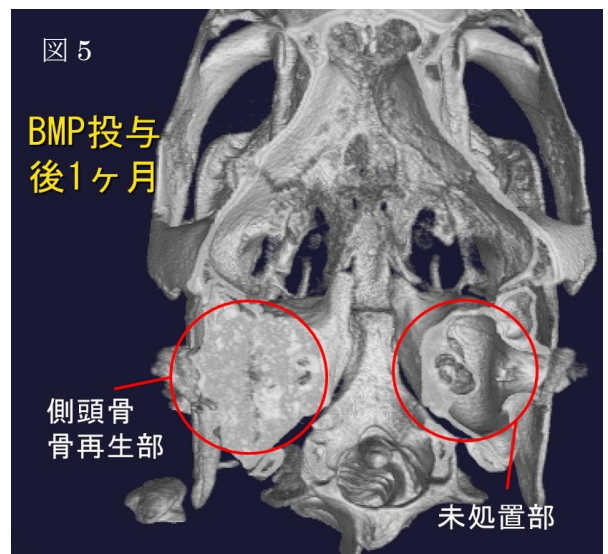


図 5

BMP投与後1ヶ月

側頭骨骨再生部

未処置部



(2) 我々は、次に、含気化するメカニズムの解明に着手した。下記、図6、7の部分において、骨形成タンパク rhBMP-2 を使用し実験を行った。

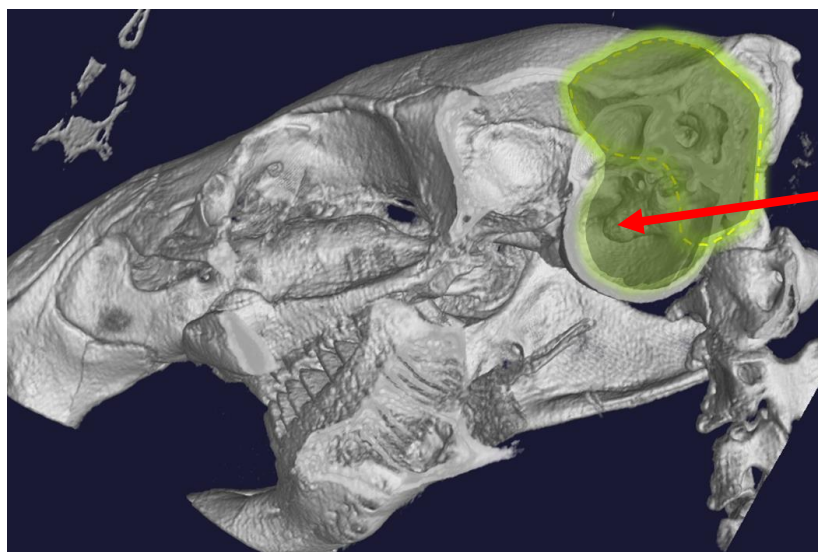
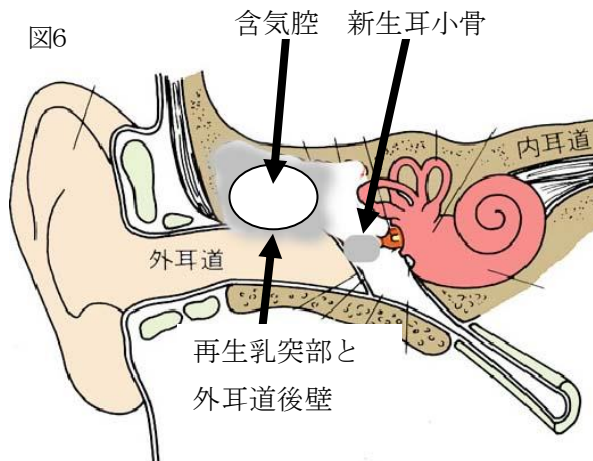
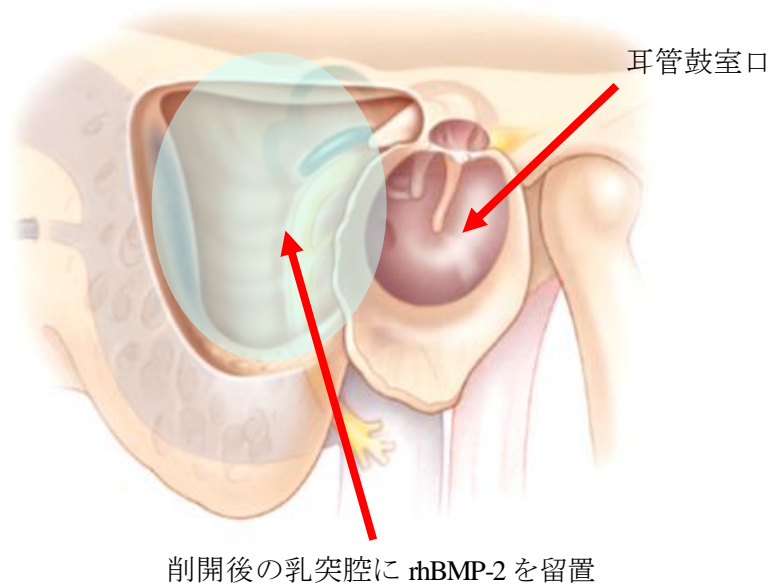


図7

下記図8のように、耳管鼓室口が関与していることを解明した。
耳管鼓室口の骨製閉鎖が含気化に大きく関与していると考えられた。

図8



下図9のように、耳管鼓室口の骨性閉鎖により、含気化が妨げられることは分かった。
また図10のとおり、ABR(聴性脳幹反応)にて、側頭骨再建後、聴力障害がないことを確認した。

図9

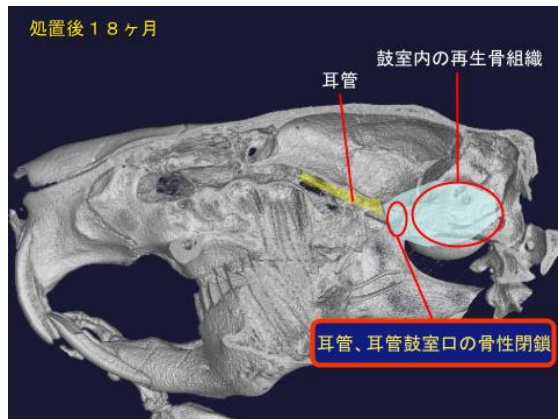
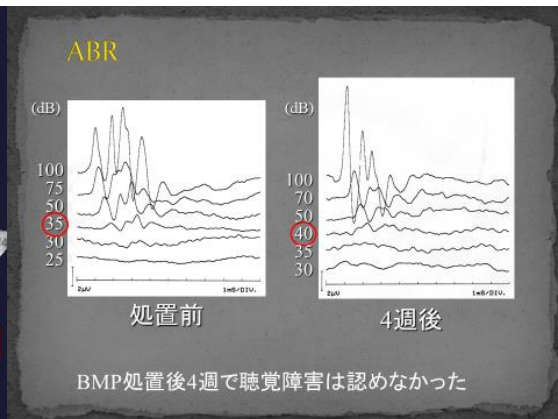


図10



我々のグループは、動物(モルモット)側頭骨の含気モデルを作ることに世界ではじめて成功し、側頭骨の含気化のシステムを解明すべく、含気化の因子の実験にとりくんだ。まずを解明し、良好な結果が得られて、今後の側頭骨の再建、聴力改善、および臨床応用への大きな道筋ができた。国際学会、国内学会に発表し、今までの結果をまとめたものを有力英文雑誌に投稿した。

この研究を行うことに含気化した側頭骨を任意に作成することができるようになり、また、そのように含気化させる因子より、将来rhBMP-2を使用する中耳手術法が一般化し、標準的手術治療方法になることが期待される。その結果、中耳手術後の聴力の改善、さらにはcavity problemsも防ぐことができ、多くの中耳疾患の有効治療につながる事が期待される。

(文献1) Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science 1965; 150: 893- 9.

(文献2) Wozney JM. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 1988;242:1528- 34.

(文献3) Akira Sugimoto, Nobuhiro Hakuba, Kiyohumi Gyo. Reconstruction of mastoid cortex defect using bone morphogenetic protein: an experimental study in the guinea pig . Acta Otolaryngol 2004; 124: 253-257.

(文献4) Akira Sugimoto, Yoshitaka Okamoto, et al. Reconstruction of the temporal bone with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). The 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery 2012 : 272-272.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

- ① Sugimoto A, Suzuki M: Reconstruction of the animal temporal bone with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) . Otol Neurotol, submitted 2019 .査読有
- ② Suzuki M, Furukawa T, Sugimoto A, Kotani R, Hosogaya R. Comparison of diagnostic reliability of out-of-center sleep tests for obstructive sleep apnea between adults and children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2017; 94: 54-58. 査読有
- ③ Suzuki M, Kotani R, Shimizu R, Sugimoto A, Ichinose A, Yamazaki K: Multifocal deposits of amyloidosis in the upper airway with cervical nodes showing repeated recurrence. J J Clin Case Rep 2(3): 034, 2016査読有
- ④ 原 彩佳, 樋口 佳則, 堀口 健太郎, 杉本 晃, 岡本 美孝, 佐伯 直勝, 治療戦略と戦術を中心

とした症例報告 難治性頭痛を呈した側頭骨嚢胞性病変(解説), 脳神経外科ジャーナル (0917-950X)25巻11号 Page938-943(2016.11) 査読有

- ⑤ 茶藪英明 杉本 晃 最新の唾液腺腫瘍の診断方法と現状 日本医事新報社 週刊日本医事新報 2016/9/3 No.4819 p59-60 査読有
- ⑥ 杉本 晃 副鼻腔炎の概念および治療指針日本医事新報社 週刊日本医事新報 2016/6/11 No.4807 p58-59 査読有
- ⑦ 鈴木雅明 杉本 晃 小児の睡眠無呼吸症の取り扱い 術前PSG・術後モニタリングの是非 小児耳鼻 2015;36(3):235-239 査読有
- ⑧ Suzuki M, Furukawa T, Sugimoto A, Katada K, Kotani R, Yoshizawa T: Relationship between oral flow patterns, nasal obstruction, and respiratory events during sleep. J Clin Sleep Med. 11(8): 855-860, 2015査読有
- ⑨ Sugimoto A, Sakamoto N, Matsushima K, Kikkawa N, Yamamoto H, Kobayashi K, Okamoto Y : Reconstruction of the temporal bone with bonemorphogenetic protein 2(BMP-2) Cholesteatoma and Ear Surgery - An Update :Kugler Publications/Amsterdam/The Netherlands :P302-308. 2013 July 12 査読無

[学会発表](計 7 件)

- ① 2019/1/13 杉本 晃 痙攣性発声障害に対するボツリヌス療法 第94回 日本耳鼻咽喉科学会千葉県地方部会学術講演会 千葉市
- ② 2019/1/9 Akira Sugimoto, The Experiment on the animal temporal bone by using osteogenic substance, 14th Asia-Oceania ORL-HNS Congress, Hyderabad India
- ③ 2018/2/23 Akira Sugimoto, The utility of bone-forming substances for regeneration in guinea pig temporal bone.,31st Politzer Society Meeting & 2nd Global Otology Research Forum ラスパルマス スペイン
- ④ 2016.3.14 杉本 晃 アレルギー疾患と副鼻腔疾患 招待講演 千葉市中央区
- ⑤ 2016.1.21 杉本 晃 組織工学的手法を用いた側頭骨再生の試み 第6回房総耳鼻咽喉科研究会 千葉県 市原市
- ⑥ 2014.10.17 杉本 晃 中耳根本術後の感染、腐骨化に対する治療経験 第24回 日本耳科学会 新潟市
- ⑦ 2013.11.26 杉本 晃 骨形成蛋白 (BMP-2: bone morphogenetic protein-2) を用いた動物における側頭骨の再生 第23回 日本耳科学会 宮崎市

[図書](計 2 件)

- ① 杉本 晃、岡本 美孝他 ナースのためのやさしくわかる耳鼻咽喉科ケア ナツメ社 (2016/03 発売) p42-47 慢性中耳炎 p69-75 顔面神経
- ② 杉本 晃 岡本美孝他 耳鼻咽喉科・頭頸部外科Q&A—日常診療の疑問を解決 初版20130515 中外医学社 (2013/05) 全299ページ P92-94 「鼓室形成術での再建材料が改良されています。特徴も含め教えてください。」

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし (2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。