

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861924

研究課題名(和文)顎変形症術後の力学刺激による治癒促進効果の検討

研究課題名(英文)An examination about the effect of promotion in healing after orthognathic surgery by mechanical stimulation

研究代表者

丸川 浩平(MARUKAWA, Kohei)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：50444203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低出力超音波パルスによる外的力学刺激が顎骨治癒再生および顎関節の適応に関してどのように作用するか解明し、顎変形症手術における治癒促進効果を検討することを目的に、家兔顔面骨を用いた実験的研究を行った。その結果、低出力超音波パルス刺激は骨治癒や関節軟骨の修復を特に術後早期に促進することで、術後治癒期間の短縮に寄与しうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This experimental study was carried out using facial bone of rabbit, in order to examine about the effect of promotion in bone healing and in adaptation of temporomandibular joint, by mechanical stimulation using low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) after orthognathic surgery. Consequently, the result suggested that LIPUS promote the bone healing and the restoration of articular cartilage, particularly at postoperative early time. Therefore, it was thought that it was possible to shorten postoperative healing period.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎顔面外科 顎顔面骨 顎変形症 顎矯正手術 力学刺激 骨再生

1. 研究開始当初の背景

顎矯正手術は骨切り後の骨治癒と顎関節の適応を両立する必要がある。この手術は骨切り後に骨片同士の固定を行うが、従来骨片間隙はできるだけ近づけ接触させる方法がとられてきた。つまり骨折の一次治癒による骨修復を期待するものである。しかし顎関節への影響を考慮し、下顎頭を含む骨片の位置を生理的な状態に維持するため、多少は骨片間隙を保った方がいいとの考え方がある。また形態的にも、間隙を開けて固定することで下顎骨の輪郭是正が可能となる場合もある。間隙は術後、時間とともに新生骨で満たされるが、間隙が大きいほど骨治癒が遅延または不完全となる恐れが増すと考えられる。骨治癒を補うために間隙内に骨移植する方法が考えられるが、自家骨の用いると採取のために手術侵襲が大きくなってしまふ欠点がある。といて骨代替(人工)材料を使用すると、間隙が大きすぎたり固定が不安定になったりすると感染の危険性も増大する。

電気刺激、低周波刺激などの力学的刺激は近年、骨粗鬆症や難治性骨折の治癒のために応用されてきたが、この方法は患者への侵襲がなく感染などの副作用なしに骨治癒を促進する方法として、今後も応用の広がり期待されている。また関節に対しても軟骨形成促進の効果が示唆されており、顎関節においても同様の効果が期待される。具体的には低出力超音波パルス(LIPUS)は骨芽細胞への効果としてCOX-2産生やRunx2産生をLIPUSが刺激し迅速な反応を示すと報告されている。またLIPUS照射はオステオポンチン、オステオネクチンなどの基質蛋白産生をも刺激し、骨芽細胞の分化を広く促進させる効果を持つと考えられている。また生体材料が存在した時の骨形成に関して、*in vitro* 研究ではTCP上で骨髄細胞を骨芽細胞に分化させる際にLIPUSが分化の促進、骨基質の産生を誘導する可能性が示唆されており、動物実験では骨折モデルなどを用いLIPUSの治癒促進効果が認められている。

この方法を顎矯正手術後の骨治癒および顎関節適応促進のために応用できないかと考えたことが本研究着想のきっかけであり、この手術のみならず顎口腔という特殊な環境下でのあらゆる骨手術への力学的刺激の有用性を検証することが急務と考えられる。

2. 研究の目的

上記の研究モデルの多くは長官骨を用いたものであり、顎骨を用いた報告は少ない。特に顎矯正手術を想定したモデルにおける報告は認められない。顎骨はその形態の複雑さの他、歯牙の存在という特殊環境下にある。さらに手術後にチタンや吸収性材料による固定が行われることが多い。顎矯正手術はじめ顎骨の手術患者に対してもLIPUSが骨再生治癒を効果的に促進するか否かを検証する

こと、また顎関節に対してもリモデリング、特に軟骨形成促進の効果を示すか否かを調査することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)手術：日本白色種家兔(12-16週齢、体重2.5-3.0kg)合計32羽(各群5羽)使用。ペントバルビタールナトリウム25mg/kgを耳静脈より投与し全身麻酔のち鼻背部を剃毛、局所麻酔後に鼻背部皮膚を弧状に切開し、皮下組織および骨膜を剥離、鼻背部の骨面を露出させた。前頭鼻骨縫合正中(鼻骨間縫合との交点)より約8mm前方、正中(鼻骨間縫合)より約5mm側方において、マイクロターピンを用い、両側の鼻骨表面に直径約5mmの骨孔を開け鼻腔粘膜を露出させた(計64個の骨孔を作製)。

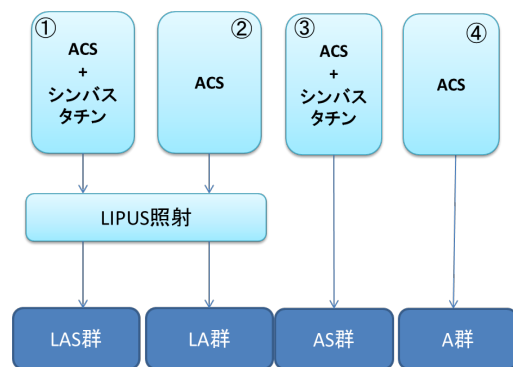


図1

骨孔に充填する材料を2種(後述)に分け、それぞれにLIPUSを照射するか否かにより図1の如く4群に分ける。各群4孔×4観察時点(後述)=16孔を振り分け、4群で64孔となる。シンバスタチンは骨再生促進効果がありわれわれの顎骨における過去の研究でも確認されているが、最も効率の良いと考えられた0.5mg溶液をキャリアとしてACS(アテロコラーゲンスポンジ;テルプラグ®、Terumo Co., Tokyo Japan)にしみ込ませたもの、ACS単味の2種を骨孔に充填した。充填後、骨膜弁を復元し吸収系(Vicryl 4.0, Ethicon Co.)で縫合、次いで皮膚縫合を行い手術終了とした。

(2)LIPUS照射：照射器(BR-sonic, ITO Co., Tokyo, Japan)を用い、手術翌日から20分/日、出力240mW/cm²、周波数3MHzで最長2週間、骨孔相当部に連日照射した(図2)。



図2

(3)標本作製：術後1、2、4、8週を観察時点とし、屠殺後施術部位を切り出し10%ホルマリン固定後、14%EDTAにて4週間脱灰処理を行い、通法に従い厚さ5μmのパラフィン切片を作製した。HE染色ならびに抗BMP-2抗体を用いた免疫組織化学的染色を施し以下の

観察に供した。

(4) 観察：

組織学的・組織形態学的検討；画像解析ソフト(Image-J)を用い、骨孔に充填したスペース(図3の包囲部)およびその中の骨組織の面積を計測し、後者の占める率を算出した。

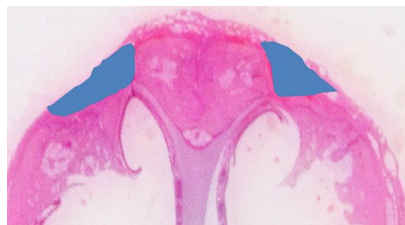


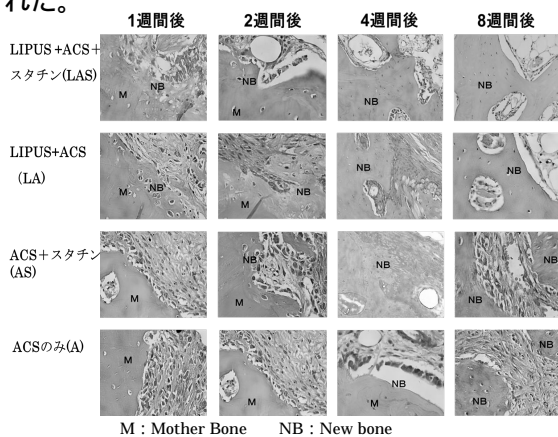
図3

免疫組織化学的検討；通法に従い、100倍希釈の抗BMP-2モノクローナル抗体(DAKO Japan)を一次抗体として、ピオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体を二次抗体として免疫染色を行い、各充填部位においてx400の画像上で、褐色に核染色された細胞をBMP-2陽性細胞として、細胞1000個あたりの陽性細胞数を算定した。

(5) 統計処理：すべての計測結果は統計処理ソフト(Stat View 4.5, ABACUS Concepts, Berkeley, USA)を用いて検討した。有意差検定は、経時的变化をANOVAにて、各時点における群間比較をScheffe's F testにて行った。すべての結果は危険率5%以下をもって有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 組織学的所見(図4)：経時的に骨孔内に骨組織の新生が進行していくのが確認された。特に1、2週の比較的早期ではLIPUS照射した2群の骨新生が盛んな印象であった。骨組織周囲には常に多くの骨芽細胞がみられた。



M : Mother Bone NB : New bone

図4

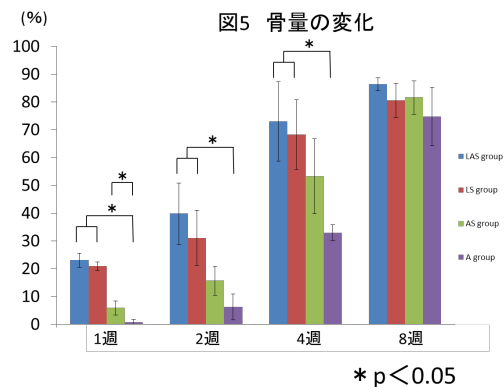
(2) 組織形態学的検討(図5)：

・LAS群・LA群の骨量をA群と比較すると1、2、4週間後に有意に大きい LIPUS照射により術後比較的早期で新生骨形成を促進されたことが示唆される。

・AS群はA群に比べ1週間後に有意に大きな

値となった シンバスタチン投与で早期の新生骨形成は促進されることが示唆される。

・すべての群において8週間後に差は認められなくなった LIPUS照射、シンバスタチン投与のいずれも長期的には自然治癒での骨形成と大差なくなる。



* p<0.05

(3) 免疫組織化学的検討(図6、7)：期間を通して多数のBMP-2陽性細胞が観察された。

・LAS群・LA群は、AS群・A群よりも1週間後に有意に大きい値となった 1週間後にLIPUSの効果が発作用したものと考えられる。

・AS群は1週間後でA群との差は認めなかったが2週間後にAS群はA群より有意に大きな値となった シンバスタチンの作用が2週間後以降に作用したと考えられる。

・しかしLAS群とLA群の間にどの時点でも有意差はなかった LIPUSとシンバスタチンに相乗効果はないものと示唆された。

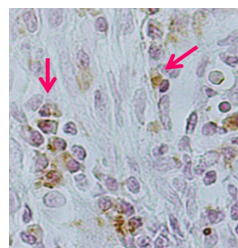
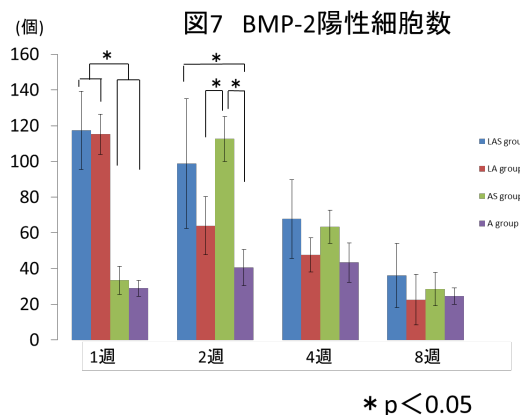


図6 BMP-2陽性細胞(矢印)



* p<0.05

(4) まとめ：

以上の結果より下記が示唆された。

顎骨手術後にLIPUS照射を行うと比較的早

期に骨再生促進作用が強く表れること

しかし中長期的には非照射の場合と比較し差はなくなる傾向にあること、すなわち最終的には照射しなくても骨再生治癒のレベルは同等に達すること

LIPUS 照射とシンバスタチン添加の効果を比較すると、LIPUS 照射のほうが早期に骨再生を促す傾向にあること

LIPUS 照射とシンバスタチン添加の相乗効果は認められないこと

要するに LIPUS は骨治癒を術後早期に促進することで治癒期間の短縮に寄与しうるが、最終的に骨密度を高めるなど結果としての骨質そのものを向上させる力はないと考えられる。ただ顎矯正手術患者をはじめとした口腔外科手術後の患者は、術後ある程度の期間、顎間固定・牽引等による日常生活上の制限その他審美的・機能的な忍耐を強いられることが多いため、術後 1~2 週程度 LIPUS 照射を行うことでそのような状態を短縮できれば患者に福音をもたらすことになりうると思われ。

しかし LIPUS を術後毎日、一定時間照射することは患者の負担を増すことになりかねないため、さらに短時間・短期間でより効率の良い照射方法を検討する必要がある。この点、シンバスタチン添加の方が術後の処置不要のため優れているかもしれない。

なお本研究では、新生骨の骨質そのものの力学的評価や、分子レベルでの評価については行っていないため、今後これらについても説明が待たれる。

なお以上の実験に並行して、または引き続き、下記の実験を行い、一定の知見を得た。

顎矯正手術においては骨片に接合にチタン製あるいはポリ L 乳酸性（吸収性）プレートならびにスクリューを多用するが、これらの材料が骨再生に寄与するか、またはその差異について動物実験を行い検証した。その結果、両者はともに骨の新たな形成を促進させるが、両者間に有意差はなかった。このことから、両者各々に LIPUS 照射を行った場合、骨再生治癒上の差異はないであろうことが示唆された。

顎矯正手術後の顎関節の適応（リモデリング）に関連し、機械的に損傷させた顎関節における LIPUS による軟骨修復促進効果について同様に動物実験にて検討した。その結果、特に損傷後早期において LIPUS は有意に軟骨修復を促進させることが示唆された。

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 4 件)

Moroi A, Ishihara Y, Sotobori M, Iguchi

R, Kosaka A, Ikawa H, Yoshizawa K, Marukawa K, Ueki K. Changes in occlusal function after orthognathic surgery in mandibular prognathism with and without asymmetry. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 44(8): 971-6, 2015. doi: 10.1016/j.ijom.2015.03.015. 査読あり

Sotobori M, Ueki K, Ishihara Y, Moroi A, Marukawa K, Nakazawa R, Higuchi M, Iguchi R, Ikawa H, Kosaka A. Bone regeneration by periosteal elevation using conventional orthodontic wire and uHA/PLLA mesh. *J Craniomaxillofac Surg* 42(8): 1742-7, 2014. doi: 10.1016/j.jcms.2014.06.009. 査読あり

Ishihara Y, Ueki K, Sotobori M, Marukawa K, Moroi A. Bone regeneration by statin and low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in rabbit nasal bone. *J Craniomaxillofac Surg* 42(3): 185-93, 2014. doi: 10.1016/j.jcms.2013.05.002. 査読あり

Moroi A, Ueki K, Okabe K, Marukawa K, Sotobori M, Mukozawa A, Miyazakia M. . Comparison between unsintered hydroxyapatite/poly-L-lactic acid mesh and titanium mesh in bone regeneration of rabbit mandible. *Implant Dent* 22(3): 255-62, 2013. doi: 10.1097/ID.0b013e31828336be. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

石原由梨、井川浩海、井口蘭、河阪明彦、外堀恵、諸井明德、吉澤邦夫、丸川浩平、上木耕一郎 .CT 画像による下顎枝矢状分割術後の異なる固定法での骨性治癒の検討 . 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 26 年 10 月 17-19 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）

Moroi A, Ishihara Y, Sotobori M, Iguchi R, Kosaka A, Ikawa H, Nakazawa R, Higuchi M, Marukawa K. Changes in occlusal function after orthognathic surgery in mandibular prognathism with and without asymmetry. XXII congress of the European association for cranio-maxillofacial surgery. 23-26 September, 2014, Prague, Czech Republic

Kohei Marukawa, Akinori Moroi, Megumi Sotobori , Yuri Ishihara, Akihiko Kosaka, Ran Iguchi, Hiroumi Ikawa, Masatoshi Higuchi, Koichiro Ueki. Clinical study of the cases of surgically treated jaw deformity with molar defects combined with dental implant treatment. AAOMS 96th Annual meeting, scientific sessions & exhibition in conjunction with the Japanese society and Korean association of oral and maxillofacial surgeons. September 8-14,

2014, Honolulu, USA.

中澤隆一、諸井明德、石原由梨、外堀恵、井川浩海、井口蘭、河阪明彦、樋口雅俊、丸川浩平、上木耕一郎。下顎頭軟骨修復における LIPUS の影響に関する実験的研究。第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、平成 26 年 5 月 8、9 日、京王プラザホテル（東京都）

Yuri Ishihara, Koichiro Ueki, Kohei Marukawa, Akinori Moroi, Megumi Sotobori, Ran Iguchi, Akihiko Kosaka, Yoshio Nakano, Masatoshi Higuchi, Ryuichi Nakazawa, Hiroumi, Ikawa. Regeneration by statin and low-intensity pulsed ultrasound. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. 21- 24 October, 2013, Barcelona, Spain

中澤龍一、諸井明德、石原由梨、外堀恵、井口蘭、河阪明彦、樋口雅俊、中野佳央、丸川浩平、上木耕一郎。下顎骨軟骨修復における LIPUS の影響に関する実験的研究。第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 25 年 10 月 11～13 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

諸井明德、井口蘭、河阪明彦、石原由梨、外堀恵、中澤龍一、樋口雅俊、中野佳央、丸川浩平、上木耕一郎。異種材料メッシュにおける下顎骨欠損部位での骨再生の比較検討。第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 25 年 10 月 11～13 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸川 浩平 (MARUKAWA Kohei)
山梨大学・総合研究部・医学研究員
研究者番号：50444203

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし