骨形成因子によるイヌ人工的顎裂部骨架橋形成に関する実験的研究 ——骨架橋形成過程の組織学的検討——

熊谷正浩*・千葉雅俊・成田憲司

越後成志・手島貞一

Bone bridge formation of maxillary alveolar clefts induced by bovine bone morphogenetic protein (BMP) in dogs

——Histological study of bone bridge formation——

Masahiro KUMAGAI*・Masatoshi CHIBA・Kenji NARITA

Seishi ECHIGO・Teiichi TESHIMA

Abstract : This experimental study was designed investigate the process of bone bridge formation after the implantation of BMP to the maxillary alveolar clefts. Crude BMP obtained from bovine bone matrix was implanted into the artificial alveolar clefts of mongrel dogs, and postoperative bone formation was examined histologically. The results were as follows : (1) Two months after implantation, new bone formation was observed and the area of implantation was filled with undifferentiated mesenchymal type cells. (2) Four months after implantation, bone bridge formation was observed and new bone formation was continued. (3) Most of the bone bridges were suggested to have been formed by intramembranous ossification. (4) The area of new bone formation was limited to areas where BMP had been implanted. These results indicate that BMP is useful for treatment of alveolar clefts.

Key words : bone morphogenetic protein (BMP) (骨形成因子), alveolar cleft (顎裂), bone bridge (骨架橋)

緒 言

口唇口蓋裂患者の顎裂部に対して新鮮自家腸骨海綿骨移植が行われ良好な成績が納められている^{1~4)}。しかし、自家骨移植には骨採取部に手術侵襲を加えるなどの問題点がある^{5~7)}。そこでわれわれは顎裂部の再建法として、骨形成因子 (Bone morphogenetic protein) の有用性を検討するため、前報でイヌ人工的顎裂部にウシ骨由来骨形成因子粗精製物を移植し、X線写真上

移植後3か月で骨架橋の形成が認められたことを報告した⁸⁾。

本研究では前報と同様の実験系を用いて、X線写真上で旺盛に骨形成が認められた移植後2か月の時点、および骨架橋の形成が認められた移植後4か月の時点における顎裂部の脱灰標本を作製し、骨架橋形成過程を組織学的に検討した。

実 験 方 法

1. BMP の部分精製

Urist らの方法に準じて⁹⁾ 4℃下でウシ長管骨から凍結乾燥脱灰骨基質を作製し、4M 塩酸グアニジンで48時間抽出を行った。可溶画分を7倍量の脱イオン水で透析し、この不溶画分を遠心分離し、これを凍結乾燥して長径10mm程度のペレットとし、これをBMP画分 (以下、BMP) とした。BMPは酸化エチレングスにて滅菌して実験に供した。BMPの活性は4週齢ウィスター系ラット頭頂骨骨膜上にペレットを移植

東北大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：手島貞一教授)

* 東北公済病院歯科

(主任：猪俣宏史部長)

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tohoku University School of Dentistry (Chief : Prof. Teiichi Teshima)

* Department of Dentistry, Tohoku Kosai Hospital, Sendai (Chief : Dr. Hiroshi Inomata)

受付日：平成6年2月8日

写真 1 コラーゲン移植群移植後 2 か月 (×3.3)

写真 2 コラーゲン移植群移植後 2 か月 (×50)

写真 3 コラーゲン移植群移植後 4 か月
文献 8) と同一標本 (×3.3)

写真 4 コラーゲン移植群移植後 4 か月 (×50)

し、2週間後に軟骨内骨化による骨形成を組織学的に観察することにより確認した。

2. 実験動物

実験動物は雑種成犬 16 頭を雌雄の別なく用いた。

3. 人工的顎裂の形成^{9,10)}

ペントバルビタール (ネンプタール[®]、大日本製薬製) 0.3 ml/kg で静脈麻酔を行い、右上顎第 2 切歯、第 3 切歯を抜歯した。次に同側の第 1 切歯遠心から犬歯近心にかけての歯槽骨を両側 1~2 mm ずつ残して口蓋裂 (fissura palatina) まで削除して人工的顎裂とした。骨の削除に先立ち、鼻腔側粘膜を剝離し、口腔鼻腔瘻を生じないように保存した。顎裂形成後 2 か月間以上飼育し、移植実験に供した。

4. 移植手術⁸⁾

移植手術はペントバルビタールによる静脈麻酔下で行った。

上顎右側犬歯頬側歯頸部から歯肉頬移行部へ、遠心に向かう縦切開および歯槽頂、顎裂中央部を通り右第 1 切歯までの歯頸線に沿った切開を加えた。次に切開部から粘膜骨膜弁の剝離を行い顎裂部の近遠心断端を明らかにし移植床とした。顎裂部が十分満たされるよ

うに、実験群に BMP、コントロール群にウシ真皮由来線維性アテロコラーゲンを、それぞれおよそ 500 mg 可及的に填塞し一次閉鎖した。

顎裂形成時、および移植手術時には術中から感染予防の目的で、セフゾナムナトリウム (コスモシン[®]、武田薬品工業株式会社製) 500 mg、術後の浮腫予防の目的でメチル・プレドニゾロン (ソル・メドロール[®]、日本アップジョン株式会社製) 250 mg を静脈内投与した。また、術後疼痛の抑制の目的でケトプロフェン (メナミン[®]、中外製薬株式会社製) 50 mg を筋注した。術後は 5 日間、セファクロル (ケフラール[®]、塩野義製薬株式会社製) 500 mg を経口投与した。

5. 組織学的観察

移植後 2 か月で各群 3 頭、4 か月で各群 5 頭を屠殺し、上顎部を標本として摘出した。標本は、20% 中性ホルマリン液にて固定し、Plank-Rychlo 液で脱灰し、水平断で約 3 μm の切片として、ヘマトキシリン・エオジン染色で観察した。

写真 5 BMP 移植群移植後 2 か月 (×3.3)

写真 6 BMP 移植群移植後 2 か月 (×10)

写真 7 BMP 移植群移植後 2 か月 (×50)

写真 8 BMP 移植群移植後 4 か月
文献 8) と同一標本 (×3.3)

写真 9 BMP 移植群移植後 4 か月 (×10)

写真 10 BMP 移植群移植後 4 か月 (×50)

結 果

1. コラーゲン移植群

移植後 2 か月：移植床は細胞成分の乏しい結合組織で満たされ，その中に散在的に異物巨細胞が認められた。また，母床骨断端から移植床に向かってわずかに

骨形成が認められた(写真 1)。形成された骨は母床骨に比較して細胞成分，線維成分に富み，その表面には骨芽細胞が lining していた(写真 2)。

移植後 4 か月：母床骨断端から突起状に骨が形成されるにとどまり，骨架橋の形成は認められなかった(写真 3)。母床骨断端表面に骨芽細胞の lining は認められなかった(写真 4)。

表 組織学的所見（所見の認められた個体数／実験群総数）

	移植後 2 か月		移植後 4 か月	
	コラーゲン移植群	BMP 移植群	コラーゲン移植群	BMP 移植群
軟骨形成	0/3	0/3	0/5	0/5
骨形成	3/3	3/3	5/5	5/5
骨架橋形成	0/3	0/3	0/5	4/5

2. BMP 移植群

移植後 2 か月：母床骨から連続して線維骨（woven bone）が旺盛に形成されており，その先端は移植床中央部にまで達していたが，骨架橋形成にはいたらなかった。母床骨の骨梁周囲にも線維骨が形成されていた。また，母床骨断端の皮質骨^{8,10)}は不明瞭となり，母床骨の骨髓腔と形成された骨の骨髓腔が連続していた。軟骨は認められなかった(写真 5)。形成された骨は骨細胞および線維成分に非常に富んでおり，その表面には骨芽細胞の密な lining が認められた。また骨芽細胞の周囲には多数の未分化間葉系細胞が認められた。なお，異物反応は認められなかった(写真 6，7)。

移植後 4 か月：移植部に骨架橋が形成されていた。近遠心の母床骨に近い骨架橋の辺縁部では骨改造が進み骨髓腔が大きく，骨梁の層板構造が明らかだった。骨架橋中央部では骨髓腔側に破骨細胞と骨芽細胞が認められ，骨改造 (remodeling) が生じていた (写真 8，9)。また，骨架橋の外側部では骨形成が継続していたが，吸収している所見は認められなかった (写真 10)。

なお，以上の所見を表にまとめた (表)。

考 察

近年，自家骨移植の問題点を解決するために口腔外科領域においてもハイドロキシアパタイト（以下，HA）やリン酸三カルシウム（以下，TCP）など生体親和性に優れた人工骨を利用する試みがなされている¹¹⁾。しかしこうした人工骨には骨誘導能はなく骨伝導能を有するにすぎないため，多孔体として移植してもその内部に形成される骨量にはおのずと限界がある。Cullum ら¹²⁾は，イヌの人工的顎裂部に HA を移植して臨床的，ならびに組織学的に観察し，HA の有用性を述べているが，その骨形成は自家骨に比べ明らかに劣るものであった。さらに，顎裂部は，骨架橋部に隣接した未萌出歯の誘導や，萌出した歯の矯正学的移動を行うという特殊性がある。Feinberg ら¹³⁾はネコに HA を移植して歯の萌出が障害されることを報告している。したがって，HA などの非吸収性の人工骨は顎裂部に移植するのには適さないと考えられる。骨に置換する骨代用材の開発も試みられているが，イヌ

やサルなどの大型の動物の実験においては必ずしもその有用性は明らかではない。Urist ら¹⁴⁾は，イヌの頭蓋骨骨欠損に BMP を結合させた TCP を移植し良好な骨形成を認めているが，この中で TCP 単独では吸収性が不良で，骨への置換も不十分だったと述べている。また，Ripamonti¹⁵⁾らは BMP の担体として吸収性の HA を用い，ヒヒ頭蓋骨骨欠損に移植しているが，骨への置換は認められなかったと述べている。

以上のことをふまえて，本研究では，移植材として BMP，および，HA 同様に骨伝導能を有するとされる線維性アテロコラーゲン¹⁶⁾を移植材として用い，組織学的に比較検討した。この結果，BMP 移植群にコントロール群と比較して良好な骨形成が認められた。この骨形成の程度の差は BMP の骨誘導能によるものと考えられた。

従来，BMP による骨形成は軟骨内骨化で生じているとされているが，これは主としてマウス，ラットを用いた実験に基づいており^{17,18)}，イヌやサルなど大型の動物の骨形成過程に関する報告は少なく，その詳細は必ずしも明らかにはなっていない。Nilsson ら¹⁹⁾はイヌ尺骨骨欠損部に BMP を移植し，移植後 3 か月で骨架橋を認め，骨架橋部の骨基質中に軟骨が残存していたことから，BMP 移植後の骨形成の機序は軟骨内骨化であるとしている。Ferguson ら²⁰⁾は，サル頭蓋骨骨欠損部に BMP を移植して，移植部に軟骨を観察したと述べているが，経時的組織学的な観察は行っていない。Toriumi ら²¹⁾はイヌ下顎骨骨欠損部に BMP を移植し，移植後 3 か月で組織学的に骨架橋形成を確認しているが，骨形成の過程は観察していない。Ripamonti ら¹⁵⁾はヒヒ頭蓋骨骨欠損部に BMP を吸着させた HA を移植し移植後 30 日で線維骨の形成を認めたとしているが，その骨形成の機序については述べていない。

本研究においてイヌの人工的顎裂部の骨架橋形成の全過程が軟骨内骨化で行われるとすれば骨形成が継続中である移植後 2 か月の時点で図-Aのごとく骨形成の先端部には軟骨が観察されと考えられる。しかし実際には移植部に軟骨は認められず，図-Bのごとく，母床骨断端から移植床中央部に向かって線維骨が形成され，周囲の未分化間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化していると考えられた (図)。

本研究では移植後 1 か月以内の観察は行っていないため，BMP 移植後の初期の時点で軟骨内骨化による骨形成が生じている可能性は否定できない。しかし，本研究の結果から，骨架橋の大部分は膜性骨化 (intramembranous ossification) の機序で行われているものと考えられた。

骨における BMP の標的細胞としては骨髓中および骨膜中の未分化間葉系細胞が考えられている^{22,23)}。しかし本研究の所見では，骨膜側からの骨形成は明らか

図 (A)：顎裂の骨架橋形成が軟骨内骨化で行われたと想定した場合の模式図。骨に先立ち形成された軟骨 (C) が周囲から骨 (b) に置換されていく。(B) は母床骨。
(B)：BMP 移植後の骨架橋形成の模式図。移植部に母床骨 (B) と連続して線維骨 (b) が形成される。線維骨の周囲には未分化間葉系細胞 (M) が認められる。

ではなく、母床骨の骨髓腔の骨梁周囲に骨形成があること、母床骨の皮質骨が多孔性となり、母床骨と線維骨の骨髓腔の連続性が観察されたことから、BMP の標的細胞は主として母床骨の骨髓中の細胞ではないかと考えられた。

人工的顎裂部は BMP 移植後、移植床におおむね一致した範囲で正常な骨からなる骨架橋が形成されていた。本研究で観察した期間中、形成された骨架橋部の内部では骨改造が生じ成熟した骨となり、またその外側では骨形成が継続しているものの、骨架橋の吸収を示唆する所見は認められなかった。しかし形成された骨架橋が長期的に安定するのか否かについては検討が必要と考えられ、現在観察中である。

結 論

イヌ人工的顎裂モデルにウシ骨由来骨形成因子 (BMP) の移植を行い、移植後 2 か月、および 4 か月の組織学的所見を観察した。

1. 移植後 2 か月で移植部に著明な骨の形成を認めた。移植後 4 か月では、骨架橋が形成され、骨改造は継続していた。

2. 骨架橋の大部分は膜性骨化の機序で形成されていると考えられた。

3. 骨の形成の範囲はおおむね BMP を移植した部位に一致していた。

以上の結果から顎裂部に BMP を移植した場合、移植部に局限して骨架橋形成が期待できることが示唆された。

この研究は、1987 年 1 月に発行のアメリカの実験動物学会雑誌、特別号に掲載されている「倫理的基準に基づいたヒト以外の動物種を用いた生物医学実験の分類」(Consensus Recommendations on Effective Institu-

tional Animal Care and Use Committees, Laboratory Animal Science, January 1987, Special Issue) による Category C として東北大学医学部動物実験委員会の承認を受けたものである。

本研究の一部は、昭和 63 年度文部省科学研究補助金 (63870077) によった。

本研究の一部は第 45 回日本口腔科学会総会 (平成 3 年 5 月、京都) において発表した。

引 用 文 献

- 1) 越後成志, 幸地省子, 他: 顎裂部に対する自家腸骨海綿骨細片移植—第一報 手術手技について—, 日口外誌 32: 1442-1446 1986.
- 2) 幸地省子, 越後成志, 他: 顎裂部に対する自家腸骨海綿骨細片移植—第二報 骨架橋形成について—, 日口外誌 33: 2152-2158 1987.
- 3) 幸地省子, 東福寺直道, 他: 顎裂への新鮮自家腸骨海綿骨細片移植—一歯槽堤の高さの評価—, 日口外誌 39: 735-741 1993.
- 4) 幸地省子, 松井桂子, 他: 顎裂への新鮮自家腸骨海綿骨細片移植—垂直的な骨架橋幅の評価—, 日口外誌 39: 972-983 1993.
- 5) 真角昭吾: 骨移植術の基本知識と注意点, 整形外科 40: 817-824 1989.
- 6) 大森清弘, 野間弘康, 他: 腸骨骨髓および海綿骨骨梁採取の 1 方法, 日口外誌 25: 699-703 1979.
- 7) 大森清弘, 野間弘康, 他: 顎顔面骨骨欠損に対する Particulate cancellous bone and marrow (PCBM) graft, 日口外誌 25: 1563-1574 1979.
- 8) 熊谷正浩: 骨形成因子によるイヌ人工的顎裂部骨架橋形成に関する実験的研究, 日口外誌 35: 1606-1616 1992.
- 9) Urist, M. R., Iwata, H., et al.: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. Proc Natl Acad Sci USA 70: 3511-

- 3515 1973.
- 10) 猪狩俊郎：イヌ人工的顎裂部への自家腸骨移植による骨架橋形成に関する実験的研究—ブロック骨と海綿骨細片の比較—, 日口外誌 36 : 1838-1850 1990.
 - 11) 高橋庄二郎, 斉藤 力, 他：口腔外科領域におけるハイドロオキシアパタイトセラミック Alveograft の臨床評価—多施設における共同研究, 日口外誌 32 : 92-107 1986.
 - 12) Cullum, P. E., Frost, D. E., et al. : Evaluation of hydroxylapatite particles in repair of alveolar clefts in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 46 : 290-296 1988.
 - 13) Feinberg, S. E. and Vitt, M. : Effect of calcium phosphate ceramic implants on tooth eruption. *J Oral Maxillofac Surg* 46 : 124-127 1988.
 - 14) Urist, M. R., Nilsson, O., et al. : Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop* 214 : 295-304 1987.
 - 15) Ripamonti, U., Ma, S., et al. : Osteogenin, a bone morphogenetic protein, absorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates. *Plast Reconstr Surg* 90 : 382-393 1992.
 - 16) Deporter, D. A., Komori, N., et al. : Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria. *Calcif Tissue Int* 42 : 321-325 1988.
 - 17) Reddi, A. H. and Cunningham, S. : Bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins. *Biomater* 11 : 33-34 1990.
 - 18) Yasuko, A. W., Lane, J. M., et al. : The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg* 74-A : 659-670 1992.
 - 19) Nilsson, O. S., Urist, M. R., et al. : Bone repair induced by Bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg* 68-B : 635-642 1986.
 - 20) Ferguson, D., Davis, W. L., et al. : Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin Orthop* 219 : 251-258 1987.
 - 21) Toriumi, D. M., Kotler, H. S. et al. : Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117 : 1101-1112 1991.
 - 22) Chiba, M., Shigihara, T., et al. : Histological study of effect of bone morphogenetic protein derived from bovine tooth on periosteum in rats. *J Bone Mineral Metab* 8 : 148-153 1990.
 - 23) Kubler, N. and Urist, M. R. : Bone morphogenetic protein-mediated interaction of periosteum and diaphysis. *Clin Orthop* 258 : 279-294 1990.