骨形成因子によるイヌ顎裂部の骨架橋形成

——骨架橋の長期的観察——

千葉雅俊・熊谷正浩*・幸地省子**

越後成志・手島貞一

Bone bridge formation of the alveolar cleft by bone morphogenetic protein in dogs

——Long-term observation of bone bridges——

Masatoshi CHIBA・Masahiro KUMAGAI*・Shoko KOCHI**

Seishi ECHIGO・Teiichi TESHIMA

Abstract: The purpose of this study was to determine if bone morphogenetic protein (BMP) can adequately bridge alveolar clefts. Alveolar clefts were surgically created in adult dogs. After healing, they were implanted with atelocollagen or BMP. Bone bridge formation was evaluated radiographically at 1, 2, 3, 6, 9, and 12 months. At 12 months, dogs were killed, and the specimens were examined histologically. The atelocollagen-implant cleft appeared radiolucent, with minimal new bone formation along the cleft margins, and bone bridges were not formed. The BMP-implant specimens showed almost complete filling of the clefts with bone as early as 1 month after implantation. Bone bridge formation at the clefts was completed within 3 months. The bone bridge remained stable for up to 12 months, and there was no evidence of bone resorption. The bone bridge was composed of well-mineralized lamellar bone identical to the surrounding alveolar bone. These results provide evidence that BMP can induce rapid and stable bone bridge formation in the alveolar clefts of adult dogs. The bone bridge can be expected to accommodate passive tooth eruption or orthodontic tooth movement.

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

緒 言

口唇口蓋裂患者の顎裂に対して行われる二次的骨移植術は、顎裂部への歯の矯正移動や萌出誘導、鼻口腔瘻の閉鎖、歯槽堤の改善ならびに鼻翼基部の陥凹の改

善などを目的に行われる。骨移植の材料としては、新鮮自家腸骨海綿骨細片が用いられ、良好な成績が納められている^{1, 2)}。しかし自家骨移植は、骨採取のために新たな手術侵襲を加える必要があり、それに伴う合併症の可能性があること、また採取できる骨量に制限

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：山下恵子医長)

**東北大学歯学部附属病院顎口腔機能治療部

(主任：手島貞一教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

II, Tohoku University School of Dentistry

(Chief: Prof. Teiichi Teshima)

*Department of Dentistry, Tohoku Kosai Hospital, Sendai (Chief: Dr. Keiko Yamashita)

**Clinics for Oral and Maxillofacial Disorders, Tohoku University School of Dentistry (Chief: Prof. Teiichi Teshima)

受付日：平成7年3月20日

があるなどの問題がある。これまで自家海綿骨に代わりうる移植材料として、同種骨や各種の人工骨が基礎的および臨床的に検討されてきたが、十分な骨形成が得られず、その目的を達成するにはいたっていない³⁻⁵⁾。そこでわれわれは、骨誘導能の本体である骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein 以下 BMP と略す) を顎裂部の再建に用いることは出来ないかと考え、イヌの人工的顎裂部にウシ骨由来 BMP を移植し、移植後4か月までの経過をX線学的および組織学的に検討した。その結果、BMP移植後3か月で骨架橋が形成されたこと、骨架橋の大部分は膜性骨化の機序で形成されたこと、移植後4か月でも骨改造が継続していたことを報告した^{6, 7)}。

顎裂部骨移植術の目的を達成するためには、形成された骨架橋が吸収されることなく、安定して存続する必要がある。しかし、これまでBMPによって誘導された骨を長期に観察した研究はない。そこで本研究は、前報と同様の実験系を用い、BMP移植後12か月時まで経時的に咬合X線写真を撮影し、さらに12か月の骨架橋を組織学的に観察し、BMPによって形成される骨架橋の安定性について検討することを目的とした。

実験材料と方法

1. BMPの部分精製

Uristらの方法⁸⁾に準じてウシ大腿骨骨幹から凍結乾燥脱灰骨を作成し、4M塩酸グアニジンで48時間抽出した。可溶画分を7倍量の脱イオン水で透析し、不溶画分を遠心分離後、凍結乾燥して直径10mm程度のペレットとした。このペレットをBMP画分とし、酸化エチレンガス滅菌し、実験に供した。

BMPの活性は、4週齢のウイスター系ラットの大腿部筋肉内にBMP10mgを移植して、2週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

体重10kg前後のイヌ9頭を雌雄の別なく用いた。

3. 人工的顎裂の作成

塩酸ケタミン (ケタラル®、三共株式会社製) 5mg/kg、硫酸アトロピン (田辺製薬社製) 0.4mg/kgを筋注した後、ペントバルビタール (ネンブタール®, 大日本製薬製) 0.3ml/kgで静脈麻酔を行い、さらに手術部位に2%キシロカインで局所麻酔した。猪狩の方法⁹⁾に準じ、右側上顎第2切歯、第3切歯を抜歯し、右側第1切歯遠心から犬歯近心の歯槽骨を1~2mm残して口蓋裂 (fissula palatina) まで削除して人工的顎裂とした。顎裂形成後2か月以上飼育し、咬合X線写真で顎裂断端の皮質骨化を確認し、移植実験に供した。

4. 移植手術

移植術は、人工的顎裂形成と同様に静脈麻酔および局所麻酔を行い、ヒトの顎裂部腸骨海綿骨細片移植術¹⁾に準じて施行した。すなわち右側第1切歯唇側歯頸部から顎裂中央部、犬歯唇側歯頸部から歯肉頬移行部にいたる切開を加え、歯肉側粘膜を骨膜下で剥離し、顎裂の近遠心断端を十分に露出させ、移植床とした。コントロール群イヌ3匹にウシ真皮由来アテロコラーゲン (高研社製) を、実験群イヌ6匹にBMPをそれぞれ500mgずつ顎裂に密に充填し、頬側粘膜弁の骨膜に減張切開を入れ、近心に移動して閉鎖した。

顎裂形成時および移植手術時、生理食塩水で静脈を確保し、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) 1g、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) 250mgを静注した。また術後疼痛抑制を目的でケトプロフェン (メナミン®, 中外製薬株式会社製) 50mgを筋注した。術後5日間、セフテラムピボキシル (トミロン®, 富山製薬株式会社製) 300mgを経口投与した。

5. 咬合X線写真

移植前および移植後1, 2, 3, 6, 9, 12か月に移植部を肉眼的に観察した後、咬合X線写真を撮影した。さらに移植後12か月の時点でペントバルビタールを静脈内に大量投与して屠殺し、上顎前方部を摘出し、20%中性ホルマリンで固定した。顎裂相当部を厚さ4mmで水平に切断して軟X線写真を撮影した。フィルムは、Fuji X-Ray Film FR (富士写真フィルム (株) 製) を用い、撮影条件は管電圧40kVp、管電流5mA、露出時間60秒とした。

6. 組織学的観察

標本をPlank-Rychlo法で脱灰した後、パラフィン包埋し、水平断で4μmの切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

結 果

アテロコラーゲン移植群、BMP移植群おのおの1匹ずつ移植部に下顎犬歯が接触して粘膜に潰瘍を形成し、術後感染を生じたため、研究対象から除外した。

1. アテロコラーゲン移植群

2匹とも移植後3か月までに顎裂断端側から僅かに骨形成を生じ、顎裂幅が少し狭くなったが、以後明らかな骨形成は認められず、骨架橋は形成されなかった。移植後12か月の標本では、顎裂部に向かって唇側粘膜が著明に陥入し、残存した顎裂部は細胞成分に乏しい密な線維性結合組織で満たされていた。顎裂断端は層板構造を有する皮質骨であった (写真1, 2)。

2. BMP移植群

5匹中4匹で骨架橋が形成された。観察期間中、移

写真1 アテロコラーゲン移植群

- A 移植前の咬合 X 線写真.
- B 移植 3 か月後の咬合 X 線写真. 顎裂断端からわずかに骨が形成されている.
- C 移植 12 か月後の咬合 X 線写真. 骨架橋は認められない.
- D 移植 12 か月後の軟 X 線写真.

写真2 アテロコラーゲン移植後 12 か月の組織像 (H-E 染色 33 倍). 顎裂断端は皮質骨からなり, 顎裂は線維性結合組織で占められている.

植部に炎症などの異常は認められなかった. 移植後 1 か月では周囲の歯槽骨に比べて移植部の X 線透過性は高いものの, 移植床の形態にはほぼ一致して骨形成を生じた. 骨形成の進行とともに X 線透過性は低下し, 移植後 3 か月で骨架橋が形成された. 骨架橋は経時的に骨改造を受け, 周囲の歯槽骨と同様の骨梁構造となり, その境界は不明瞭となった. 骨架橋は移植後 12 か月まで吸収されることなく, その形態が維持された (写真 3 A~E). 肉眼的にも歯槽部の形態は良好であった. 骨架橋の形態, 骨梁密度および石灰化は反対側歯槽骨とほぼ同じであった (写真 3 F).

組織学的には, 骨架橋の外側は皮質骨から成り, その内側に海綿骨を有し, いずれも層板構造を有していた. 骨表面には骨芽細胞が単層扁平細胞様に配列していたが, 破骨細胞はほとんど認められなかった (写真 4). 骨髓腔は脂肪髄で占められていた. なお骨架橋形成にいたらなかった 1 匹は, 顎裂断端から顎裂のほぼ全体に骨が形成されたものの, 中央部に一層結合組織が介在し, 骨形成が継続していた.

考 察

顎裂部に対する新鮮自家腸骨海綿骨細片移植術は,

写真3 BMP移植群

- A 移植前の咬合 X 線写真.
 B 移植 1 か月後の咬合 X 線写真. 顎裂全体に骨形成が認められる.
 C 移植 3 か月後の咬合 X 線写真. 骨架橋が認められる.
 D 移植 6 か月後の咬合 X 線写真. 骨架橋に骨梁構造が認められ, 周囲の歯槽骨との境界が不明瞭になってきている.
 E 移植 12 か月後の咬合 X 線写真. 骨架橋に吸収は認められない.
 F 移植 12 か月後の軟 X 線写真. 骨架橋の形態, 骨梁の密度, 石灰化は反対側の歯槽骨に類似している.

口唇口蓋裂患者の咬合形成を行う上で重要な位置を占めている。すなわち本手術により骨架橋を形成することにより、顎裂に隣在する歯を萌出誘導または矯正移動し、欠損補綴に頼ることなく、咬合形成を行うことが可能となる^{1, 2)}。しかし自家骨移植は、骨採取のために新たな手術侵襲を加える必要があり、それに伴う合併症の可能性があること、また採取できる骨量に制限があるなどの問題がある。

顎裂部骨移植の自家骨に代わりうる骨移植代用材として同種骨を実際、臨床で使用し、良好な結果が得ら

れたとする Nique ら¹⁰⁾の報告がある。しかし、イヌの人工的顎裂に凍結乾燥同種骨を移植した Marx ら³⁾は、その骨形成は自家骨に比べて劣り、さらに骨形成に時間が掛かる、などの欠点があり、歯の萌出誘導や移動には不十分である、と述べている。本邦では同種骨の入手が困難である上に、同種骨には抗原性と肝炎や AIDS などの感染症の問題もあり、その安全性には疑問が残る。

一方、生体親和性が優れ、骨伝導能を有する人工骨を利用する試みがある。Cullum ら⁴⁾はイヌ人工的顎

写真4 BMP移植後12か月の骨架橋の組織像(H-E染色13倍)。骨架橋は、明瞭な層板構造を有する成熟した骨で構成されている。

裂に、Horswellら⁵⁾はサル人工的顎裂に、それぞれハイドロキシアパタイト(以下、HAと略す)を移植し、その有効性を報告している。しかし、HA周囲に形成された骨は自家骨に比べて明らかに少なく、骨形成に時間が掛かり、さらにHAは骨に置換することなく残存するため、歯の萌出誘導や矯正移動の障害になることが予測され¹¹⁾、顎裂部の移植に適しているとはいえない。そこでわれわれは、吸収性の骨移植代用材として、アテロコラーゲンとBMPを選択して、実験を行ってきた^{6,7)}。

コントロールとして用いたアテロコラーゲンは、生体親和性に優れ、ラットやウサギの骨欠損に移植すると、骨形成を促進するとの報告^{12,13)}がある。その骨形成は、主に骨伝導能によるものと考えられるが、本研究においては、顎裂断端から僅かに骨形成を認めたに過ぎなかった。これは、1)本実験で設定した骨欠損が骨伝導能で修復するには、大きいため、2)骨形成よりも前にアテロコラーゲンが吸収され、軟組織が移植床に陥入し、骨形成の場を提供出来なかったこと、などが考えられた。したがってアテロコラーゲンの骨伝導能だけでは、顎裂部の骨架橋形成は不可能であり、骨誘導能を利用する必要があると考えられた。

前報^{6,7)}でBMPを顎裂に移植した組織学的検討から、移植後2か月で母床骨から線維骨が形成され、4か月では骨架橋は層板構造を有する太い骨梁から成り、骨改造が継続していた。今回の実験においても、わずか1か月で顎裂のほぼ全体に骨形成を生じ、3か月で骨架橋となった。この骨架橋は経時的に骨改造を受け、

周囲の歯槽骨と一体となり、12か月時までその形態が維持された。組織学的にも骨架橋は層板構造を有する骨から成り、骨芽細胞による活発な骨形成がない反面、骨が吸収している所見も認められないことから、この骨架橋が安定して存在していると考えられた。この骨誘導能によって形成された骨架橋のX線所見および組織所見は、猪狩⁹⁾が報告したイヌの顎裂に自家腸骨海綿骨を移植して形成された骨架橋と比較して遜色の無いものと思われた。したがってBMPによって速やかに形成される骨架橋は、十分な幅を有し、かつ長期に安定して維持されていることから、同部への歯の萌出誘導や矯正移動は、十分可能であろうと推察された。

近年、Wang, Wozneyら^{14,15)}によって遺伝子工学的にヒトBMPの合成に成功している。今後、適切なBMPの担体の開発^{16~18)}や成長期におけるBMPの安全性など解決しなければならない課題があるものの、その臨床応用は現実のものとなりつつある。近い将来、BMPは自家海綿骨に代わる骨移植代用材となり、骨採取の必要性を、そして骨採取に伴う合併症をなくし、患者の負担の少ない、安全性の高い顎裂部の再建を可能にすることが期待される。

結 語

イヌ人工的顎裂モデルにアテロコラーゲンまたはウシ骨由来BMPを移植し、移植後12か月まで骨架橋の形成過程を観察した。

1. アテロコラーゲン移植群は、顎裂断端から僅かに骨形成が認められたが、骨架橋は形成されなかった。

2. BMP移植群は、移植後1か月で顎裂のほぼ全体に骨形成を生じ、移植後3か月で骨架橋となった。この骨架橋は経時的にリモデリングによって周囲の歯槽骨と一体化し、移植後12か月まで吸収されることなく、その形態が維持された。

3. BMP移植群の移植後12か月時の骨架橋は、層板構造を有する成熟した骨で構成されていた。

以上の結果からBMPは顎裂部に速やかに、そして安定した骨架橋を形成することが明らかとなった。

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、特別号に掲載された「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 Institutional 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年文部省科学研究補助金(63870077)によった。

本研究の一部は第 39 回日本口腔外科学会総会（平成 6 年 11 月，名古屋）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移植細片移植—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移植細片移植—第二報 骨架橋形成について—. 日口外誌 33: 2152-2158 1987.
- 3) Marx, R.E., Miller, R.I., et al.: A comparison of particulate allogenic and particulate autogenous bone grafts into maxillary alveolar clefts in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 42: 3-9 1984.
- 4) 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.
- 5) Horswell, B.B. and Deeb, E.L. M.: Nonporous hydroxylapatite in the repair of alveolar clefts in a primate model. *J Oral Maxillofac Surg* 47: 946-952 1989.
- 6) 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.
- 7) 熊谷正浩, 千葉雅俊, 他: 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—. 日口外誌 40: 756-761 1994.
- 8) Urist, M.R., Iwata, H., et al.: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3511-3515 1973.
- 9) 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 38: 1838-1850 1990.
- 10) Nique, T., Fonseca, R.J., et al.: Particulate allogeneic bone grafts into maxillary alveolar clefts in humans: A preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 45: 386-392 1987.
- 11) Feinberg, E.S. and Vitt, M.: Effect of calcium phosphate ceramic implants on tooth eruption. *J Oral Maxillofac Surg* 46: 124-127 1988.
- 12) 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.
- 13) 上田 実, 大久保肇, 他: スポンジ状アテロコラーゲンの骨欠損治療に及ぼす影響. 口科誌 43: 363-368 1994.
- 14) Wang, E.A., Rosen, V., et al.: Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9484-9488 1988.
- 15) Wozney, J.M., Rosen, V., et al.: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534 1988.
- 16) Ono, I., Ohura, T., et al.: A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. *Plast. Reconstr. Surg* 90: 870-879 1992.
- 17) Rapamonti, U., Ma, S.S., et al.: Induction of bone in composites of osteogenin and porous hydroxyapatite in Baboons. *Plast. Reconstr. Surg* 89: 731-739 1992.
- 18) Miki, T., Harada, K., et al.: Effect of freeze-dried poly-L-lactic acid discs mixed with bone morphogenetic protein on the healing of rat skull defects. *J Oral Maxillofac Surg* 52: 387-391 1994.