血管柄付き異所性骨片への仮骨延長法の応用に関する実験的研究

北郷明成・久保諠修・堀内 薫・白数力也

Experimental study of distraction osteogenesis for ectopically prefabricated vascularized bone

Akishige HOKUGO・Yoshinobu KUBO

Kaoru HORIUCHI・Rikiya SHIRASU

Abstract: Autogenous bone remains the most suitable material for bone grafts used to repair oral and maxillofacial bone defects. However, there are restrictions on the use of autogenous bone grafts at donor sites. In a previous study, we produced a prefabricated bone graft with the use of autologous vessels and auto-cancellous bone. In this study, we examined the usefulness of distraction osteogenesis for increasing bone associated with prefabricated bone grafts.

We placed ectopic bone grafts in the limbs of rats and fixed an originally designed distraction device to the ectopic bone after 9 weeks. Distraction was started 3 days after the second operation. After 1, 2, 3, and 6 weeks of distraction, radiographic and histological analyses were performed to observe osteogenesis. As control, undistracted ectopic bones in rats of the same age were similarly studied.

Our results show that distraction osteogenesis is useful for quantitatively increasing bone associated with grafts.

Key words: prefabricated vascularized bone (二次的血管柄付き骨片), distraction osteogenesis (仮骨延長法), bone graft (骨移植)

諸 言

口腔顎顔面領域の疾患の処置後の骨欠損部に対して、骨移植を行う機会はきわめて多い。そのため、骨移植に関する研究は現在まで実験的、臨床的に数多く報告されている¹⁻⁷⁾。そのなかでも、顎骨欠損部への骨移植材料として骨誘導能、骨伝導能および抗原性等の点から最も適している移植材料は自家骨であることは異論のないところである。しかし、実際には自家骨は採取部、供給量などに制限があり、量的あるいは形態的に十分な自家骨が得られないことを経験する。

そこで本研究では、移植骨の量的問題を克服することを目的として、わたしたちが作製した e-PTFE 膜、自家血管束および自家海綿骨を用いた移植骨片⁷⁾に仮骨延長法を応用することにより異所性骨の量的増加の可能性について検討したので報告する。

実 験 材 料

1. 実験動物

生後 8 週齢、体重 200-250g の雄性ウイスターラット（日本クレア、東京）を用いた。実験群は仮骨延長を行った群、対照群は仮骨延長を行わなかった群とした。各群 5 匹ずつ、合計 40 匹を用いた。飼育は大阪歯科大学中央歯学研究所動物施設の恒温室（21±0.5℃）で行い、飼料は、オリエンタル固形飼料 MF（オリエンタル酵母工業、東京）を与えた。なお、実験動物の取り扱いに関しては、「大阪歯科大学動物実験に関する指針」を遵守して行った。

2. 自作延長装置

延長装置は MICRO EXPANSION SCREW（LEWENTAL, GERMANY）と、ナチュラルオーソドンティックレジン（ニッシン、京都）を用いて作製した（写真 1）。

実 験 方 法

1. 一次手術方法

一次手術は Horiuchi⁷⁾の方法に準じた。ペントバルビタール（ネンブタール®、大日本製薬、大阪）の腹腔投与に

大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座
（主任：白数力也教授）

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Osaka Dental University (Chief: Prof. Rikiya Shirasu)

受付日：2001年12月17日

採択日：2002年6月25日

写真1 自作延長装置

写真3 二次手術の写真(骨切り後)
作製した異所性骨に骨切りを行い、両骨片にピンを植立
矢印: 骨切り線

写真2 一次手術の写真
矢印: 大腿動・静脈周囲にPCBMを填入しロール状に
縫合したe-PTFE膜

写真4 二次手術の写真(延長装置装着後)
ピンと自作延長装置を装着

よる全身麻酔下にて左側腓脛部から膝関節部にかけて皮膚切開を加え、大腿動・静脈(以下、血管束と略す)の露出および剥離を行った。血管束に8×10mmのe-PTFE膜(TECHNOGRAFT®, 住友工業, 東京)(長軸8mm, 円周10mm)をロール状に巻き、そのなかに自家脛骨から採取した骨髓海綿骨細片(以下PCBMと略す)を60mg填入した(写真2)。

2. 二次手術方法

一次手術から9週後に、作製した骨片の中央部を、ダイヤモンドディスクにて血管束を損傷しないように慎重に骨切りを行い、両骨片にフィッシャーバーにて穿孔し、ピンを植立した後(写真3)、自作延長装置を装着した(写真4)。装着後、皮下組織ならびに皮膚縫合を行った。

3. 仮骨延長方法

二次手術後3日目から延長を開始した。延長速度は1日0.7mm、延長期間は5日間とした。なお、延長中5日間

は感染予防として毎日、体重100gあたり5mgのホスホマイシン(ホスミン®, 明治製菓, 東京)を腹腔投与した。

4. 観察方法

延長終了後1, 2, 3および6週後に以下の検索を行った(図1)。

(1) X線学的検索

全身麻酔下に腹大動脈にカテーテルを挿入し、末梢側をヘパリン加生理食塩水にて灌流後、10%中性緩衝ホルマリンで灌流固定を行い、移植片を摘出した。摘出した移植骨片を軟X線発生装置CBM-2(Softex, 東京)を使用しFuji X-RAY FILM FR(富士写真フイルム, 東京)にて撮影した。なお、撮影条件は、25Kv, 3mA, 45sec.で行った。

(2) 組織学的検索

移植骨片を同固定液にて、さらに7日間浸漬固定後、10%硝酸による脱灰を10日間行い、移植骨片の長軸方向に厚さ3μmのパラフィン切片を作成した。切片はH-E染色を

写真5 軟X線写真

実験群(延長終了後)

a: 1週 b: 2週 c: 3週 d: 6週

対照群(延長していない群)

e: aと同週齢 f: bと同週齢 g: cと同週齢 h: dと同週齢

図1 実験の過程

施し顕鏡した。

対照群としては同週齢の延長していない異所性骨を使用し同様の検索を行った。

(3) 量的増加に対する検索

実験群延長終了後6週と、同週齢の対照群の組織切片を各3切片用いて、骨組織の長軸方向の最長端部の長さを測定し、両群の平均値の比較を行った。また、同時に、組織切片を顕微鏡入力装置AX80T(オリンパス、東京)と画像入力ソフトOHD-200(オリンパス、東京)にてPower Mac G3(Apple Computer, USA)に取り込み、NIH imageを用いて、それぞれの長軸方向の断面の骨組織面積を算出し、両群の移植骨組織の面積平均値の相対的比較を行った。なお、面積の算出は同解像度で行い、有意差検定はt検定を使用した。

結 果

(1) X線学的所見

実験群は、延長終了後1週において延長部にX線不透過像は認められなかったが(写真5a)、3週では延長部辺縁に若干のX線不透過像が確認された(写真5b, c)。さらに6週では延長部辺縁のX線不透過像が増加していた(写真5d)。

一方、対照群ではX線不透過像には大きな変化がなかった(写真5e, f, g, h)。

(2) 組織学的所見

実験群は、延長終了後1週において延長部辺縁に幼若な新生骨様組織が点在していたが、延長部を連結するには至らなかった。延長部の中央部には線維性組織が存在し、新生骨は確認できなかった(写真6a, b)。

3週には延長部辺縁を連結する新生骨が観察され、その新生骨の周囲にはbone lining cellが観察された。一方、中心は旺盛な骨髓様組織の形成が確認された(写真7a, b)。

6週では延長部辺縁に骨組織は薄い明らかに骨形成が認められた。また、ピン周囲には骨組織の増加が観察された(写真8a, b)。

一方、対照群では週齢が増すに従い、膜腔内の骨組織は減少しているのに対して、骨髓様組織が増加していた(写真9a, b)。

(3) 量的増加に対する検索

2群間の骨組織の長軸方向の長さは、実験群において対照群に比べて有意に長くなっていることが確認された(図2)。また、2群間の長軸方向の断面の骨組織面積を比較す

写真6 実験群延長終了後1週におけるH-E染色像

a: 弱拡大 (bar=1.0mm)

b: 延長部の強拡大 (bar=0.5mm)

矢印間: 延長された領域 B: 骨組織

*: 新生骨様組織 eP: e-PTFE膜

写真7 実験群延長終了後3週におけるH-E染色像

a: 弱拡大 (bar=1.0mm)

b: 延長部の強拡大 (bar=0.5mm)

矢印間: 延長された領域 B: 骨組織

BM: 骨髄様組織 eP: e-PTFE膜

ると実験群の方が対照群に比べて有意に大きいことが確認された(図3)。

考 察

1. 実験立案について

口腔外科領域において、腫瘍の外科的切除や外傷などによる顎骨欠損に対して、骨移植を行う機会はきわめて多い。これら骨移植における骨移植材料として、骨誘導能、骨伝導能および抗原性等の点から最も適しているのは自家骨であることは異論のないところである。しかし、一般に自家骨移植術は、他部位に外科的侵襲を与えること、移植を必要とする部位に比較して採取量が不十分となる可能性を有している。このような欠点を克服できる方法として、最近ではrhBMP-2と人工材料を組み合わせた新たな移植骨作製の実験的研究が多々試みられ⁸⁻¹⁰⁾、ラットやイヌにおいてはBMP単独で確実に骨欠損は修復されると報告されている。しかし、サルでは再現性に乏しく、またFleetら¹⁰⁾はラットを用いた実験においても、加齢によるBMPへの応答性の低下を報告している。このようなことからBMPは現在のところ臨床に应用されるには、いまだ問題を残して

いる。一方、人工材料としては、ヒドロキシアパタイトのような人工骨は臨床応用されつつあるが、これらは骨伝導能はあっても骨誘導能はなく、またこの人工骨はその伝導能の作用で周囲骨の外骨膜、内骨膜反応による軟骨・骨組織と結合するが、単に骨性の組織に被包された状態で力学的にも弱いと考えられ、この状態では病理学的には骨性組織による異物反応として扱われるとしている¹¹⁾。したがって、移植材料としては不十分で、やはり生理的骨改造により母床骨に置換されるものが望ましいとされている。近年、さらに新しい試みとして組織工学的な手法で骨膜、骨髄細胞および未分化間葉系細胞などを用いた新たな移植骨作製の実験的研究が試みられており¹²⁻¹⁷⁾、Horiuchi⁷⁾は人工血管(e-PTFE膜)、自家血管束および自家海綿骨を用いて新しい移植骨の作製を行い組織工学的な手法の有用性を示唆した。この手法は現在移植臨床に用いられている自家海綿骨にe-PTFE膜と自家血管束を併用することによって良好な血行を保持した二次的血管柄付き移植骨片を得ることができるというものである。しかし、この手法は広範囲な顎骨欠損への移植を想定した場合、自家海綿骨の採取量に限界があると考えられる。

一方、広範囲な顎骨欠損症例の再建方法として、生体の

写真8 実験群延長終了後6週におけるH-E染色像

a: 弱拡大 (bar=1.0mm)

b: 延長部の強拡大 (bar=0.5mm)

矢印間: 延長された領域 B: 骨組織

BM: 骨髓様組織 eP: e-PTFE膜

写真9 対照群のH-E染色像

a: 実験群延長終了後1週と同週齢の延長を行ってない異所性骨

b: 実験群延長終了後3週と同週齢の延長を行ってない異所性骨

c: 実験群延長終了後6週と同週齢の延長を行ってない異所性骨

B: 骨組織 BM: 骨髓様組織 eP: e-PTFE

すべて bar=1.0mm

骨形成反応を利用したいわゆる仮骨延長法が口腔顎顔面外科領域において最近、普及しつつある^{18, 19)}。この仮骨延長法はもともと、整形外科領域で四肢短縮型低身長に対する脚延長法として1905年にCodivilla²⁰⁾によって最初に報告されたが、さまざまな合併症を伴ったため普及するには至らなかった。しかし、1960年代にWagner²¹⁾, Ilizarovら²²⁾の方法により再び注目されるようになった。さらに、1973年にSnyder²³⁾がイヌを用いて下顎骨骨延長を行い、骨延長法が長管骨以外にも適用できることを示唆し、1992年には、McCarthyら²⁴⁾によって種々の顎変形症患者に対して初めて臨床応用され、その後、さまざまな臨床報告がなされてきたことから、仮骨延長術は骨の量的増加に有用な手法であると考えられている。

そこでわたくしたちは、二次的に作製した異所性骨の量的な増加を求めるためこの仮骨延長法を併用することによって、広範囲な顎骨欠損部を満たす量の移植骨の作製を可能とすることを目的として、本研究を立案した。

2. 実験結果について

本実験で用いた移植骨片は二次的に作製した異所性骨であり、既存骨に類似した解剖学的構造はあるものの、骨膜を有していない。ゆえに本実験における異所性骨と、従来報告されている仮骨延長術における骨形成過程を単に比較

図2 移植骨片の長軸方向の長さ

図3 移植骨片の長軸方向の断面の骨組織面積

できるとは限らないが、若干の考察を加える。

仮骨延長法における骨形成機序に関してはさまざまな報告がなされているが、Ilizarov²⁵⁾は成熟犬脛骨における仮骨延長実験を行い、骨髓内血行を温存した群において軟骨形成が少なく、早期に多量の骨形成を認めることから、膜性骨化が主な役割を果たすと報告している。一方、Kojimoto²⁶⁾は成長期家兎脛腓骨を用いた実験で、軟骨から骨への移行領域における軟骨細胞の柱状配列を重視し、外骨膜から補給される細胞によって主として内軟骨性骨化が行われていると述べている。またYasui²⁷⁾は、ラット大腿骨を用いた実験にてin situ ハイブリダイゼーション法ならびに免疫組織学的検索の結果、通常の内軟骨性骨化と異なる骨形成を観察し、これを軟骨と骨の中間的な組織、すなわち類軟骨が形成される類軟骨性骨化という第3の骨化を提唱している。本実験における組織学的所見では、延長部に軟骨細胞は確認されず、骨膜組織が存在しない状況下であったにもかかわらず、直接骨形成が行われた。ゆえに本実験における骨形成は、膜性骨化であったと考えられる。

また仮骨延長における骨形成の骨膜・骨髓の役割においてKojimoto²⁶⁾は幼若家兎後肢を用いた実験で、骨膜を除去した群と骨髓を除去した群を作製し、骨膜除去群で著明に骨形成が障害されていることから、骨髓血行よりも骨膜温存の重要性を示している。また、Ozerdem²⁸⁾も家兎中足骨を摘出し骨膜を残した群と骨膜を除去した群を作製し、延長器を装着し腰部にて仮骨延長を行い両者の骨形成の比較を行った。その結果、骨膜を残した群の骨形成が良好であり、骨膜の重要性を述べている。さらにOzerdem²⁹⁾は血管柄付きの中足骨にて同様の実験を行い、やはり骨膜温存の重要性を述べている。しかし本実験において延長部は周囲の軟組織からのバリアとなる骨膜にかわる構造

がないにもかかわらず、良好な骨形成が行われた。この理由として、本実験に用いた異所性骨片は、内部に良好な血行が保持されており、さらに骨髓様組織が存在したため、仮骨延長による旺盛な骨形成が行われたと推測できる。これは、十分な新生骨形成を得るためには骨髓血行の温存が重要であるというIlizarov^{25, 30)}の考察と一致する。また本実験で用いた異所性骨は内部に中心血管束として大腿動・静脈が通っており、これは下顎骨内部の下歯槽動・静脈と解剖学的形態と類似したものとなっている。川嶋ら³¹⁾はイヌ下顎骨を用いた実験において、下顎骨は髓質中に固有の神経血管系を有するため、仮骨形成がより良好になるという推定をしている。本実験は下顎骨と類似した異所性骨の実験であるが、彼らの推定と賛同しうものと考えられる。

本実験の結果から、血管柄付き異所性骨を仮骨延長することによって、骨内に十分な血行を保持していることで、骨膜組織が存在しない状況下においても、量的な増加を獲得することができ、仮骨延長法が移植材料の量的増加に対して有用であることが分かった。これにより自家組織による骨移植を予定した場合において、量的な問題を回避できる一方法であると考えられた。今後、さらに長期的な観察を行い、また移植実験も行い、臨床応用の可能性を究明していきたいと考えている。

結 語

本研究で、自家組織による骨移植の限界を克服すべく、e-PTFE膜、自家血管束ならびに自家海綿骨を用いた二次的血管柄付き移植骨片を作製し、さらに仮骨延長法を応用することによって量的な増加を得ることができた。これは臨床における有用な移植骨となる可能性を示した。

本論文の要旨は第45回日本口腔外科学会総会(2000年10月12日, 千葉)にて発表した。

引用文献

- 1) 杉岡洋一: 骨移植の歴史と展望. 形成外科 35: 119-124 1992.
- 2) Marx, R.E.: Mandibular reconstruction. J Oral Maxillofac Surg 51: 466-479 1993.
- 3) Tong, L. and Buchman, S.R.: Facial bone grafts: contemporary science and thought. J Craniomaxillofac Trauma 6: 31-41 2000.
- 4) 寺本昌司: 下顎骨欠損部への二次的血管柄付き遊離骨移植における微細形態および微細血管構築の変化について. 歯科医学 57: 116-128 1994.
- 5) 杉本圭介: 血管柄付骨膜とアテロコラーゲンをを用いた prefabricated vascularized bone graft 作製に関する実験的研究. 日口外誌 44: 111-125 1998.
- 6) 堀内 薫: 同種異系骨と自家血管束を用いた Prefabricated Vascularized Bone Graft の実験的研究. 日口外誌 45: 473-481 1999.
- 7) Horiuchi, K.: Induction of new ectopic bone by auto-osteogenesis factors with artificial vessel (e-PTFE membrane) and autologous vessel bundles. J Osaka Dent Univ 34: 39-45 2000.
- 8) Takaoka, K.: Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. Clin Orthop 234: 250-254 1998.
- 9) 朝比奈 泉: 骨再生の分子機構と骨形成蛋白質(BMP)を用いた骨欠損修復への応用. 臨床科学 34: 1261-1268 1998.
- 10) Fleet, J.C. and Cashman, K.: The effects of aging on the bone inductive of recombinant human bone morphogenetic protein-2. Endocrinology 137: 4605-4610 1996.
- 11) 井上 孝, 山村武夫: 移植骨の運命と治癒転機. 歯科ジャーナル 25: 147-157 1987.
- 12) Goshima, J., Goldberg, V.M., et al.: Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. Biomaterials 12: 253-258 1991.
- 13) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., et al.: Human marrow cells-derived cultured bone in porous ceramics. Biomed Mater Eng 8: 311-320 1998.
- 14) Bruder, S.P., Jaiswal, N., et al.: Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. Clin Orthop 355: S247-256 1998.
- 15) Anselme, K., Noel, B., et al.: Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. Bone 25: 51S-54S 1999.
- 16) Bruder, S.P., Kurth, A.A., et al.: Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res 16: 155-162 1998.
- 17) 吉川隆章: 培養骨移植による骨再生培養骨髓細胞によるティッシュエンジニアリング. 蛋白核酸酵素 45: 2289-2296 2000.
- 18) 澤木佳弘, 荻野浩子, 他: 下顎骨区域欠損を仮骨延長法により再建した1例. 日口外誌 43: 564-566 1997.
- 19) 澤木佳弘: 仮骨延長法の顎顔面領域への応用. 医学のあゆみ 182: 430-431 1997.
- 20) Codivilla, A.: On the means of lengthening in the lower limb, the muscles and tissues which are shortened through deformity. Am J Orthop Surg 2: 353-369 1905.
- 21) Wagner, H.: Operative Beinverlängerung. Chirurg 42: 260-266 1971.
- 22) Ilizarov, G.A., Lediov, V.L., et al.: The course of compact bone reparative regeneration in distraction osteosynthesis under different conditions of bone fragment fixation and experimental study. Exp Khir Anesteziol 14: 3-12 1969.
- 23) Snyder, C.C., Levine, G.A., et al.: Mandibular lengthening by gradual distraction: preliminary report. Plast Reconstr Surg 51: 506-508 1973.
- 24) McCarthy, J.G., Schreiber, J., et al.: Lengthening the human mandible by gradual distraction. Plast Reconstr Surg 89: 1-8 1992.
- 25) Ilizarov, G.A.: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues; part I: the influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. Clin Orthop 238: 249-281 1989.
- 26) Kojimoto, H., Yasui, N., et al.: Bone lengthening in rabbits by callus distraction: the role of periosteum and endosteum. J Bone Joint Surg 70-B: 543-549 1988.
- 27) Yasui, N., Sato, M., et al.: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. J Bone Joint Surg 79-B: 824-830 1997.
- 28) Ozerdem, OR, Kivanc, O., et al.: Callotaxis in nonvascularized periosteal bone grafts and the role of periosteum: a new contribution to the concept of distraction osteogenesis. Ann Plast Surg 41: 148-155 1998.
- 29) Ozerdem, OR., Yavuz, M., et al.: Callotaxis in a fasciosteal flap model in rabbits: part II a new contribution to the concept of distraction osteogenesis. Ann Plast Surg 42: 76-82 1999.
- 30) Ilizarov, G.A.: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues; part II: the influence of the rate and frequency of distraction. Clin Orthop 239: 263-285 1989.
- 31) 川嶋邦祐, 杉原平樹, 他: イヌ下顎骨における仮骨延長の実験的研究. 形成外科 42: 1115-1123 1999.