原	著
---	---

骨形成たんぱく質 (BMP) を応用した血管柄付移植骨の作製

織 田 光 夫

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学系 口腔機能再建学講座 口腔機能再建学分野
(主任・指導：榎本昭二教授)

(2000 年 12 月 8 日受付)

Prefabrication of Vascularized Bone Flap using Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Mitsuo Oda

Oral Surgery, Department of Oral Restitution, Division of Oral Health Science,
Tokyo Medical and Dental University, Graduate School
(Chief and Director: Prof. Shoji Enomoto)

The purpose of this study was to produce newly vascularized bone, and to form the bone into the desired shape. Silicone molds given the shape of a cylinder were used to deliver collagen sheets impregnated with or without rhBMP-2. The superficial inferior epigastric neurovascular bundle in a Wistar rat was identified and sandwiched between the silicone molds. The molds containing collagen sheets impregnated with 10 μ g of rhBMP-2 were used for the experimental purpose, and those without rhBMP-2 were used as a control. In some of the experimental molds, the neurovascular bundle was ligated at both proximal and distal sites of the molds. After 2 and 4 weeks operation, bone formation was detected macroscopically, radiologically, and histologically.

As a result, newly formed bone was observed in all experimental sites without the ligation, and the shape of the bone was exactly the same shape as the silicone mold. Newly formed bone was supplied by the superficial inferior epigastric artery, whereas newly formed bone was not observed in the control and the ligated flaps.

Newly vascularized and shaped bone was created by applying an osteoinductive factor to a neurovascular bundle. This study demonstrates that this experimental model could be a therapeutically potential approach for effective bone reconstruction.

I. 結 言

顎骨切除後の再建は顎顔面外科領域において重要な課題であり、数多くの臨床報告がなされている。しかし、その多くは欠損部の補填や顎骨の連続性を確保することが主たる目的であり、発音や咀嚼等の機能回復については必ずしも満足すべき結果は得られていない。顎骨再建方法としては遊離腸骨移植、腸骨海綿骨移植、あるいは人工骨を用いた方法が行われているが、血管柄付骨移植が骨の生着率の高さ、感染に対する抵抗力の強さから最も高い信頼性が得られている^{1,2)}。また、血管柄付骨移植により再建された顎骨に人工歯根を埋入することで、顎骨切除後に装着される義歯の安定性を増すことも可能になった。しかし、血管柄付骨移植は採取手技の複雑さ、

採取部位への侵襲の大きさといった問題点の他に、採取骨が腸骨、腓骨、肩甲骨等であるため、いかに形成しても本来の顎骨の形態を再現することが難しく、望ましい長さの人工歯根を補綴学的に理想の位置に埋入することが困難であるという問題点がある^{2,3)}。この点が、血管柄付骨移植を用いた顎骨再建後に作製される義歯による咀嚼機能の回復を不十分なものとする要因となっている。したがって、顎切除後の機能的再建方法では人工歯根の埋入に必要とされる形態を有する骨を再現すること、すなわち自由に賦形できる顎骨の再建法が必要であると考えた。

骨形成たんぱく質 bone morphogenetic protein (BMP) は未分化間葉系細胞に作用して異所性に骨を誘導する^{4,5)}。そこで著者らは recombinant human BMP

2(rhBMP-2)が筋組織中に存在する未分化間葉系細胞を骨芽細胞に誘導することを想定し、賦形性を有する血管柄付移植骨を作成することを試みた。すなわちrhBMP-2を含浸させたコラーゲンを充填したシリコン製の鋳型のなかに、血管柄のついた小筋体(muscle vascularized pedicle, MVP)を挿入するという方法を開発し、ラットを用いた実験で鋳型と同じ形態で血管柄のついた移植骨の形成に成功した⁶⁾。しかし、この方法では再建する骨欠損部の大きさに近い筋組織が必要になるという問題点があり、臨床応用に際してはいまだ制約が大きいと考えられる。そこで、今回著者は再建に際して組織の犠牲を最小限にする目的で、神経血管束とその周囲のわずかな結合組織のみをrhBMP-2で被覆することにより、賦形性を有する血管柄付移植骨の作成を試みたので報告する。

II. 実験材料および方法

1. シリコン鋳型の作成

形成する骨の形態の鋳型として、液体の攪拌に用いる円筒形をしたプラスチック製の回転子(直径4 mm, 長さ8 mm, スターラーバー)を、シリコン系歯科用印象材(エグザフレックス®GC社製)で包み込み歯状に成型した。シリコン印象材の厚さは約2 mmとなるようにした。硬化後、メスを用いて歯状の鋳型を半割し、回転子を取り出した後、長軸に沿って神経血管束の出入りに幅2 mmの溝を作成した(図1)。

2. シリコン鋳型内へのrhBMP-2の充填

二分割された鋳型の内腔に、大きさ約8×4×2 mmに成型したコラーゲンスポンジ(ヘリスタット® COLLA-TEC社)を充填した。実験群は、5 μ gのrhBMP-2(Genetic Institute社より提供)をLF 6緩衝液(5 mM グルタミン酸ソーダ, 2.5%グリシン, 0.5%ショ糖, 0.01% Tween 80)20 μ lに溶解したものを、手術直前に半割した鋳型のそれぞれに滴下した。rhBMP-2は1個の

鋳型につき計10 μ g使用した。対照群はコラーゲンスポンジに、同容量のrhBMP-2を含まない、LF 6のみを滴下した(図2)。

3. 実験動物と術式

実験動物は8週齢、体重250から300 gのWistar系雄性ラット8匹を使用した。エーテルによる導入の後、ペントバルビタール(ネンプタール®ダイナボット社)5.0 mg/100 gの腹腔内投与による全身麻酔下に、鼠径部を剃毛し、同部に皮切を加えた。大腿動静脈から鼠径部皮膚へ向かう浅下腹壁動静脈を同定し、伴走する神経とともにわずかな結合組織をつけた長さ約20 mm, 太さ約2 mmの神経血管束を剥離挙上した(図3)。大腿部筋肉と鼠径部皮膚の間に剥離挙上した神経血管束を、コラーゲンで満たされたシリコンの鋳型でサンドイッチ状に挟み込み(図4)、これを2カ所8-0ナイロン糸で縫合固定した。浅下腹壁動静脈が開通しているのを、2本の摂子を用いた開存試験で確認した後、5-0ナイロン糸を用いて閉創した。ここで、rhBMP-2を含浸させた鋳型を用いる実験群のうち、血流の影響を調べるために浅下腹壁動静脈を鋳型の中核側と末梢側とで8-0ナイロン糸で結紮し、これを実験群2とした。これに対し血管に処理を加えないものを実験群1とした。表1に示すごとく一側に実験群1, 反対側に対照群を移植したものを4匹、同様に一側に実験群1, 反対側に実験群2を移植したものを4匹使用し2, 4週後に検体の摘出を行った。

4. 検体の摘出および標本の作製

術後2週, 4週に浅下腹壁動静脈の開存の有無を、血管の開存試験で確認した。その後、それぞれ4匹ずつから左右計8個の検体を摘出した。実験群1の2検体には、摘出前に血行状態を調べるために、大腿動脈から70% w/vのバリウムを5 ml注入した。すべての実験動物はペントバルビタールの過量投与で薬殺した。検体は軟X線撮影(SRO-M 50, ソフロン社 撮影条件: 30 kVp,

図1 回転子を包み込んだシリコン鋳型(A)と半割した残りのシリコン鋳型(B)

図2 rhBMP-2を含浸させたコラーゲンシートを填入したシリコン鋳型

図3 剥離挙上されたラットの浅下腹壁
神経血管束（動静脈を含む）

図4 シリコン鑄型に挟み込まれる神経血
管束

図5a 実験群1（術後4週）
形成された血管柄付移植骨。
シリコン鑄型の形態に賦形さ
れている。

図5b 実験群2（術後4週）
鑄型の両端で結紮された組織。コラーゲ
ンシートが分離している。

図5c 対照群（術後4週）
鑄型内に形成された線維性組織。
神経血管束は切断してある。

3 mA, 2 分間露出)の後, 10%緩衝ホルマリン固定を行った。固定後, プランクリクロ液 (塩化アルミニウム 7 g 塩酸 37% 8.5 ml 蟻酸 5 ml に蒸留水を加えて全量 100 ml とする)を用いて, 通法に従い脱灰し, 厚さ 4 μ m のパラフィン包埋標本を作成した。ヘマトキシリン-エオジン染色を施し, 光学顕微鏡下に観察した。

III. 結 果

1. 肉眼的所見

浅下腹壁動静脈は, 血管を結紮された検体以外は, すべて中枢, 末梢側いずれも開通していた。鑄型はいずれも薄い線維性の被膜に包まれており, 鑄型を除去すると, 神経血管束の周囲に円筒状の組織が認められた。実験群1の検体は, 術後2週のもの, 4例全例で骨様の硬い組織が表面を覆っていたが, 一部軟らかい部分が残存していた。また, 術後4週でも, 4例全例で骨様に硬い円筒形の組織が鑄型内を充満して形成されていた (図5a)。これに対して対照群, および実験群2は, いずれも硬組織

様組織の形成はみられなかった。対照群の検体は神経血管束の周囲に円筒形の軟組織が強固に付着していた (図5b)が, 血管を結紮した実験群2の検体はコラーゲンが残留し, 新生組織の形成が乏しかった (図5c)。

2. 軟X線所見

術後2週の実験群では, モールドにより賦形された外形のなかに不透過性の強い部分が散在しているのみであるが (図6a), 術後4週では不透過性が増しており, 鑄型と同じ形態の不透過像を認めた。また血管造影を行った検体では新生された骨の中央を走行する下腹壁動静脈と新生骨内の小血管が造影されているのが観察された (図6b)。

3. 組織学的観察

標本の作成は円筒の長軸に垂直な面であつ円筒中央部で行い, 円形の断面を標本として観察した。

術後2週の実験群1においては, BMPの担体として用いたコラーゲンは完全に吸収されており, 中央部の神経血管束を取り囲むように上下2つに分かれた骨組織が

観察された。骨組織は骨髓様組織を豊富に含み、小血管もきわめて多く観察された (図 7 a)。形成された骨内には骨細胞と思われる細胞も多数認められた (図 7 b)。術後 4 週の実験群 1 では、鋳型に沿って辺縁部の骨に連続性がみられた (図 8 a)。その骨組織は、術後 2 週のものに比べより成熟しており、梁状の骨組織が発達し、多数の血管を伴う脂肪髄を形成していた (図 8 b)。神経血管束と新生骨の中間部の組織には、多数の小血管が観察された (図 8 a)。また、大腿動脈から注入したバリウムは術後 2 週、4 週ともに、骨内の小動脈と思われる血管と骨

髄内に褐色の組織として観察された。神経血管束周囲の血管内と下腹壁動静脈内にもバリウムが観察された (図 8 a,b)。一方、対照群では神経血管束の周囲を線維性組織が取り囲んでいるが骨組織は認められなかった (図 9)。実験群 2 でも骨組織は観察されず神経血管側周囲の組織は壊死しており、rhBMP-2 の担体であるコラーゲンが吸収されずに残留していた (図 10)。

IV. 考 察

血管柄付移植骨を人工的に作成する試みについては、多くの報告がなされている^{7,8)}。それらの基本的な方法は、骨膜を介した不確実な血行支配を避け、血管柄が移植骨を直接支配することを目的としている。具体的には、既存の骨に MVP や血管束を移植し、骨髓内の血管系がその移植した血管により支配された後に、必要な形に骨を切り出して二次的に移植するというものである。しかし、現在臨床に用いられている腸骨や腓骨の血管柄付移植骨と比べても、賦型性が十分であるとは言い難い。一方、BMP を応用した移植骨作製の試みもなされており、Khouri ら⁹⁾は osteogenin をラット大腿骨の形に成形したシリコン鋳型に填塞し、皮下組織に移植することによって大腿骨の形態をもった移植骨の作製が可能であることを示した。しかし、この移植骨は血管柄を持たない骨であった。また、最近 Kusumoto ら¹⁰⁾はラットの後背筋弁でコラーゲンを担体とした rhBMP-2 を包み込むことによって、血管柄付筋骨弁を作成することに成功した。しかし、この方法では骨への血流は筋組織を介しているので、骨組織に十分な血流が得られていない可能性がある。これに対し著者らは、rhBMP-2 を含む鋳型で MVP を包むことにより任意の形態の移植骨を形成することに

図 6 a 実験群 1 (術後 2 週) シリコン鋳型により賦形された外形のなかに散在する強い不透過像。

図 6 b 実験群 1 (術後 4 週、血管造影)

シリコン鋳型と同じ形態の不透過像。術後 2 週のものに比べて不透過性が増している。新生された骨の中央を走る浅下腹壁動静脈と新生骨内の小血管が造影されている。

図 7 a 実験群 1 (術後 2 週 H.E. 染色×6.3)

中央の浅下腹壁動静脈を囲むように上下に形成された新生骨。骨髓組織、小血管を豊富に含んでいる。

図 7 b 実験群 1 (術後 2 週 H.E. 染色×36)

図 7 a の強拡大。新生された骨内に骨細胞と思われる細胞が多数認められた。

図 8 a 実験群 1 (術後 4 週 H.E. 染色×6.3)

鋳型に沿って辺縁部の骨に連続性がみられた。術後 2 週のものに比べより成熟しており、梁状の骨組織が発達していた。多数の血管を含む脂肪髄が形成されている。大腿動脈から注入されたバリウムは骨内の小血管と浅下腹壁動静脈内に褐色の組織として観察された。

図 8 b 実験群 1 (術後 4 週 H.E. 染色×36)

図 8 a の強拡大。術後 2 週のものより成熟した骨。組織と脂肪髄のなかの小血管に褐色の組織としてバリウムが観察される。

図 9 対照群 (術後 4 週 H.E. 染色×6.3)

神経血管束の周囲を線維性組織が取り囲んでいる。骨組織は認められない。

図 10 実験群 2 (術後 4 週 H.E. 染色×6.3)

神経血管束周囲の組織は壊死している(↑)。骨組織は認められない。rhBMP-2 の担体であるコラーゲン (↑↑) が吸収されずに残存している。

成功した。この方法はドナーとして骨組織が不要であり、形成された骨には血管柄から直接血流が供給されている。すなわち、この方法は血管柄付骨移植の利点である感染への強さと生着率の高さを備え、かつ欠点である賦形性の乏しさを補った方法であるといえる。しかし、この方法には形成される骨とほぼ同じ大きさの筋組織を犠牲にしなければならないという欠点がある。本研究で著者が考案した今回の方法では、神経血管束とその周囲の結合組織のみを用い、非常に侵襲が小さいという利点がある。

本研究は BMP の骨誘導能を応用して骨を新生させたが、rhBMP-2 は各種組織内に存在する未分化間葉系細胞を、骨芽細胞への分化を誘導することが知られている。また rhBMP-2 の骨誘導能は移植する組織の種類により

優劣があり、筋肉内が最も優れており、以下筋束間、脂肪内、皮下組織内の順であり、これは各組織の血流量の多寡に一致すると報告されている¹¹⁾。今回の実験においては、周囲の疎性結合組織を含む神経血管束由来の細胞が rhBMP-2 と反応したものと推測される。最近、胚由来の細胞以外にも成体の骨髄組織中に多分化能をもった間葉系細胞が存在することが明らかにされた¹²⁾。また、血中に間葉系細胞が存在することが報告されている¹³⁾。したがって、本実験においても rhBMP-2 の作用により血中の間葉系幹細胞が移住した可能性がある。一方、Kourie らの実験ではシリコン製鋳型の周囲から細胞が侵入し骨組織を形成している。しかし、本研究においては、血管を結紮した際には骨組織の形成は認められなかった。したがって、シリコン鋳型の周囲から侵入した細胞が

BMP に応答した可能性は否定的である。さらに, Mori ら¹⁴⁾は血管新生阻害剤が rhBMP-2 による骨誘導を阻害することを示し, 血管新生が rhBMP-2 の骨誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。したがって, 本実験において神経血管束からの直接の血管新生が, rhBMP-2 による骨形成に対し有効な役割を果たしたものであると思われる。BMP ファミリーの一つである Growth/Differentiation Factor-5 (GDF-5) は血管新生を誘導するものの rhBMP-2 には血管新生作用がないことが Yamashita ら¹⁵⁾によって報告された。しかし, 最近 rhBMP-2 が骨芽細胞の血管内皮細胞成長因子 (VEGF) の産生を促進することを介して, 血管新生を刺激しているという発表がなされた¹⁶⁾, 本研究においても, rhBMP-2 が間接的作用にしろ血管新生を誘導し, 骨形成を促進した可能性が考えられる。新生された骨内の血管は血管束周囲の結合組織の小血管, もしくは血管系の栄養血管から派生したものと思われるが, 本実験においては大腿動脈から注入したバリウムが新生骨内の小血管内に認められたことで, 新生骨が血管束本管の血流により栄養されていることが示された。神経血管束周囲に新生される骨の量は, 血管新生が惹起される範囲と密接な関係にある可能性があり, 今後は鋳型を大きくすることにより骨新生をどの範囲まで形成できるのか検索する必要があるものと思われる。

著者らはすでに MVP を用いた実験で, ラット下顎骨の形態が再現可能であることを示した。本実験では, 組織供給側として MVP に比べより侵襲の小さい神経血管束を用いることによって, 骨組織の形成が可能であるか検討することを主眼としたため, 形成する骨の鋳型として単純な円筒形を用いた。しかし, 今後さらに検討を進め, 神経血管束を用いても MVP を用いた場合と同様に, 複雑な形態を再現可能であるか検討する必要がある。臨床応用に際して CT 画像から再現された術前の三次元模型を利用して鋳型を作成することが考えられる。鋳型を作成する素材としては一定の強度を備え, 形態の賦与が容易であり, さらに生体為害性がないことが望まれる。本研究で用いたシリコンはすでに臨床応用されているが, 長期間の埋入による為害作用が懸念されている。しかし, 本研究における方法では, シリコン等の材料は一定の期間のみ生体に埋入するものであり, 為害作用は回避されるものと思われる。また, ポリ乳酸に代表される, 吸収性有機ポリマーの応用も期待できる。

本実験では実験動物としてラットを用いた。rhBMP-2 はラットや家兎などの小動物では再現性良く骨誘導がなされるが, イヌやサルなどの大型実験動物を用いた場合には, その骨誘導能が低下することが知られている¹⁷⁾。さらに, 加齢によっても BMP に対する応答性が低下す

る¹⁸⁾。顎骨の再建を要する患者は高齢者が多いことを考えると, 臨床応用に至るにはサルなどの大型動物による実験が必要であると思われる。

V. 結 語

rhBMP-2 を含浸したコラーゲンを充填したシリコン製の鋳型で, ラットの浅下腹壁神経血管束を包み込んだところ, 鋳型内部に神経血管束を中心とした新生骨が形成された。新生骨は鋳型内の空間を充満するように形成されており, 血管からのバリウムの注入により同血管により栄養されていることが明らかになった。これは, 骨の賦形性や骨量の不足のために, 人工歯根等の応用に限界が生じ, 十分な咀嚼や発音の機能回復が得られなかった従来の顎骨再建の欠点を補うことの可能性を示唆するものである。さらに, 悪性腫瘍などで広範囲に切除された顎骨の新しい再建法として発展させることが可能であるものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたりご懇切なるご指導, ご校閲を賜りました榎本昭二教授に深甚なる謝意を表します。また, 本研究に多大なご協力をいただきました朝比奈泉講師に厚く御礼申し上げます。なお, 本研究は日本学術振興会未来開拓事業「再生医学プロジェクト」(96 I 00205) の助成により行われた。

本研究の要旨は第 4 回日本顎顔面インプラント学会 (平成 12 年 10 月 28 日, 鶴見) において発表した。

文 献

- 1) Taylor, G. I.: The current status of vascularized bone grafts. Clin. Plast. Surg. 10 : 185, 1993.
- 2) Weiland, A. J., Philips, T. W. and Randolph, M. A.: Bone graft: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts and free vascularized bone grafts. Plast. Reconstr. Surg. 74 : 368, 1984.
- 3) DeLuca, L., Raszewski, R., Tresser, N. and Guiron, B.: The fate of preserved autogeneous bone graft. Plast. Reconstr. Surg. 99 : 1324, 1997.
- 4) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozny, J. M. and Rosen, V.: The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C 3 H 10 T 1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. Biochem. Biophys. Res. commun. 172 : 295, 1990.
- 5) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujiwara-Sehara, A. and Suda, T.: Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C 2 C 12 myoblasts into the osteoblast lineage. J. Cell Biol. 127 : 1755, 1994.
- 6) Md. I. Alam, Asahina, I., Seto, I., Oda, M. and Enomoto, S.: Prefabricated vascularized bone flap: a tissue transformation technique for bone reconstruc-

- tion. *Plast. Reconstr. Surg.* (In press)
- 7) 新富芳尚, 野平久仁彦: Muscle Vascularized Pedicle bone. 骨移植 最近の進歩, 東京, 克誠堂出版, 1995.
 - 8) Yao, S. T.: Experimental study of tissue graft vascular implantation and subcutaneous burying. *Plast. Reconstr. Surg.* 73 : 403-410, 1984.
 - 9) Khouri, R. K., Koudi, B. and Reddi, H.: Tissue transformation into bone in vivo. A potential practical application. *J. Am. Med. Assoc.* 266 : 1953, 1998.
 - 10) Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Akioka, J., Ogawa, Y. and Iizuka, T.: Prefabricated muscle flap including bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2: an experimental study of ectopic osteoinduction in a rat latissimus dorsi muscle flap. *Br. J. Plast. Surg.* 51 : 275, 1998.
 - 11) Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Kenji, K., Ogawa, Y. and Iizuka, T.: Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramucular intermusclar subcutaneous and intrafatty sites. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 29 : 62-66, 2000.
 - 12) Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Moska, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 2 April : 143-147, 1999.
 - 13) Erices, A., Conget, P. and Minguell, J. J.: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* 109 : 235-242, 2000.
 - 14) Mori, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Ueda, T., Funai, H., Kato, M. and Takaoka, K.: Antiangiogenic agent (TNP-470) inhibition of ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *Bone* 22 : 99-105, 1998.
 - 15) Yamashita, H., Simizu, A., Kato, M., Nihito, H., Ichijo, H., Hanyu, A., Morita, I., Kimura, M., Makishima, F. and Miyazono, K.: Growth/Differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo. *Experimental Cell Research* 235 : 218-226, 1997.
 - 16) Deckers, M., Bezooijen, R. van, Hoogendam, J., Papapoulos, S. and Lowik, C.: BMPs stimulate angiogenesis through osteoblast-derived VEGF-A. *Journal of Bone and Mineral Research.* 15 suppl 1 : S 204, 2000.
 - 17) Miyamoto, S., Takaoka, K. and Ono, K.: Bone induction in monkeys by bone morphogenetic protein. *J. Bone Joint Surgery.* 75-B : 107-110, 1993.
 - 18) Fleet, J. C., Casman, K., Cox, K. and Rosen, V.: The effect of aging on the bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 137, 4605-4610, 2000.