

骨延長法による顎骨再建に関する実験的研究

(課題番号 10671858)

平成 10 年度～平成 12 年度科学研究費補助金(基盤研究 (C) (2))

(研究成果報告書 8)

平成 13 年 1 月

研究代表者 竹川 政範

(旭川医科大学医学部助手)

平成 10 年度～平成 12 年度科学研究費補助金研究成果報告書

(基盤研究 (C) (2))

骨延長法による顎骨再建に関する実験的研究

(課題番号 10671858)

平成 13 年 1 月

研究代表者 竹川 政範

(旭川医科大学医学部助手)

はしがき

平成 10 年度～平成 12 年度科学研究費補助金によって表記のような研究を行ったのでその
成果を報告する。

研究組織

研究代表者： 竹川政範 (旭川医科大学医学部助手)

研究分担者： 松田光悦 (旭川医科大学医学部講師)

研究経費

平成 10 年度	1,000 千円
平成 11 年度	500 千円
平成 12 年度	600 千円
合計	2,100 千円

研究発表

(1) 学会誌など

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

序

顎骨欠損は従来自家骨移植および各種移植材料により再建がなされていた。しかし、移植骨採取手術による障害、移植材料の脱落、吸収など満足する結果が得られていなかった。さらに、口腔悪性腫瘍では手術前に放射線治療を行っているため、創の治癒遅延、骨癒合不全のため顎骨再建の失敗例が多い。

最近、骨欠損部周囲の残存骨が有する骨形成能力を賦活して骨再建をはかろうとする骨延長法が臨床的に試みられている。しかし膜性骨である顔面骨の延長条件と骨形成の関係を調べた研究は少なく、骨延長による組織変化に関しても現在研究がなされているところである。本研究では、骨延長刺激による骨、骨膜、骨周囲組織の反応に関して組織学的、免疫組織化学的、超微細構造学的さらに分子生物学的検討を行うことを目標とした。本研究を始める上で手術後から延長開始までの時間、骨延長速度についての検討を行いラットの下顎骨延長モデルを確立した。さらにその研究を展開して、放射線照射を受けた組織での骨延長を検討し骨延長法が放射線照射後の顎骨再建に利用可能かを検討した。

実験動物と実験方法

1. 実験動物

本研究には、生後 8 週齢の SD 系ラット、雄を使用した。

2. 骨延長装置

a. 創外型骨延長装置 Rowe(1998)の方法に準じ歯科矯正用エキスパンジョンス

クリューを使用して創外延長器を作成した(写真1)。装置の固定は歯科用スク

リューを使用した。

b. 創内型骨延長装置

① 形成医科工業社製エクステンション・プレートを使用した。

② ①は、下顎骨の固定が悪く装置の脱落があったため、形成医科工業社により

改良を加えた装置を作成し本研究に使用した(写真2)。

③ ②を改良し自家製骨延長装置を作成し本研究に使用した(写真3)。

3. 放射線照射方法

^{60}Co を線源とする照射装置はエネルギーが低く線量分布から下顎骨には十分な

線量が照射できないため、旭川医科大学附属病院所有の 10MEV のリニアックを使

用した。照射線量およびスケジュールは、1回 5.6Gy、1週間4回、合計4回、総

線量 22.4Gy とした。これは、1回 2Gy、1週間4回、総線量 40Gy を照射する、口

腔領域悪性腫瘍の術前治療で使用する線量と同等の効果の得られる TDF61.0 にな

るように計算して設定した。

4.手術時期

骨延長器の装着手術は、放射線照射後 2 週目、4 週目に行った。

放射線非照射例を対照とした。

5.骨延長方法

骨延長操作を行う際、ジメチルエーテルによる吸入麻酔を行った。

a. 創外型延長装置

骨延長器装着後 1 週目から、1 日 0.4mm、7 日間延長を行い総延長距離 2.8mm

とした。

b. 創内型延長装置

骨延長器装着後 1 週目から、1 日 0.4mm、7 日間延長を行い総延長距離 2.8mm

とした。

6. 実験方法

本研究では実験部位を左下顎骨とした。骨延長を行った部位を片側下顎骨とした理由は、骨延長器の安定性が悪く両側の下顎骨の延長を行うと感染、骨癒合不全、栄養不良によるラットの死亡例が多くなったためである。

延長装置の装着手術に先立ちペントバルビタール腹腔内麻酔を行った。下顎下縁切開後、下顎骨を骨膜下で露出し最後臼歯部遠心に骨切りを行って骨折後、骨延長装置を装着した(写真4)。骨延長装置装着後、一度延長側に回転させ骨延長がなされること、器具のゆるみがないことを確認した後骨切り断端が接合する点まで延長期を逆回転させた。骨膜および皮膚縫合を行い、大腿部に抗生物質の筋肉注射を行った。

手術後1週間の Latency period(待機期間)を設定し、術後1週目から骨延長を開始した。骨延長速度は、1日0.4mmで1回の延長を7日間行い、下顎骨の総延長距離は2.8mmとした。骨延長終了後1,2,4週目に評価を行った。

7. 評価方法：

光学顕微鏡観察のため、4%パラホルムアルデヒドを使用して灌流固定を行った。固定後骨延長部位を含めた下顎骨を摘出し10%EDTAを使用して14日間脱灰を行った。通法によりエタノール脱水後、水溶性包埋剤(JB-4、Polyscience INC. Warrington, USA)およびパラフィンにより包埋を行い5 μ mの薄切を行った。切片はヘマトキシリン-エオジン染色を行い光学顕微鏡で観察を行った。

血管鑄型法

血管のレジジン灌流法のため、ラットにペントバルビタール(40mg/Kg)による腹腔内麻酔を行い、大動脈にカニューレーションを行った。生理食塩水 50ml で灌流後、メルコックスレジン(CL-2R, Dai-Nippon Ink Co.Ltd., Japan) を手圧で注入した。10%次亜塩素酸ナトリウムで脱有機処理を行った後、1%四酸化オスミウム溶液で後固定した。通法によりエタノールで脱水を行った後、凍結乾燥機(ID-2, Eiko Engineering Co.Ltd., Mito, Japan)で 12 時間乾燥を行った。真空下に金・白金蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡(S4100, Hitachi Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用して舌側の観察を行った。

結 果

実験期間中に実験動物の栄養不良および創感染による死亡、骨延長装置の露出ならびに脱落が創外延長器を装着した群および1日0.5mm以上延長した創内装置群にみられた。

そのため、今回の骨延長条件は創内骨延長器を使用し1日0.4mmの骨延長を連日7日間行って下顎骨を2.8mm前方延長行うこととした。下顎骨の前方延長により下顎骨正中は右方に扁位し上下顎反対咬合となった(写真5)。

対照

骨延長1週目では、肉眼的には骨延長部に骨性結合があり下顎骨は連続していた。走査電子顕微鏡観察では、舌側において骨延長部に新生骨が近遠心の骨膜側より入り込むようにみられた(写真6a)。骨延長部の一部に近遠心の骨が新生骨により結合している部分のみられた。強拡大では骨延長部の新生骨表面から若草が発芽するように新生血管が骨延長間隙に向かって突出していた(写真6b)。新生骨表面は膜性骨形成初期の形態に類似していた。光学顕微鏡観察では、骨延長間隙は間葉系細胞が密に集合し血管に富んだ組織であり近遠心の骨に連続性はなかった。新生骨は舌側骨膜側にみられ、骨梁はすう粗で骨形成様式は膜性骨化の像を示した(写真7)。舌側の新生骨形成部に軟骨の形成をみとめた。

骨延長2週目では、肉眼的には近遠心の下顎骨は連続していた。走査電子顕微鏡観察では、骨延長部は新生骨により近遠心的に連絡しており骨延長間隙は豊富な血管により満たされていた(写真8)。強拡大では骨延長部の新生骨表面は骨形成面と骨吸収面が混在して

いた。光学顕微鏡観察では、近遠心の下顎骨両端は新生骨によって連絡していた。新生骨の形態は緻密な骨梁であった(写真9)。

骨延長 4 週目では、肉眼的には近遠心の下顎骨は連続していた。走査電子顕微鏡観察では、骨延長部は新生骨で被覆され近遠心の下顎骨は骨性に連続していた(写真10)。血管は2週目と比較して減少し、形態も蛇行の少ない均一な太さとなっていた。拡大像では新生骨表面は成熟骨の形態を示していた。光学顕微鏡観察では、骨延長間隙は緻密な新生骨で満たされ近遠心の下顎骨は新生骨により連続していた(写真11)。

放射線照射後 2 週目骨延長群

骨延長後 1 週目では、脱有機処理のため近遠心の下顎骨は離れていた。走査電子顕微鏡観察では近遠心の下顎骨は遠心骨の一部が新生骨で被覆されていたが、骨延長部は母骨表面が露出し新生骨形成はみられなかった(写真12)。骨延長部の血管は少なく、新生骨形成表面にのみみられた。光学顕微鏡観察では、新生骨は母骨表面の舌側にわずかに認められるのみであり近遠心の下顎骨は新生骨により連絡していなかった(写真13)。骨延長間隙は細胞成分および血管は対照と比較して少なかった。

骨延長後 2 週目では、脱有機後には近遠心の骨は結合していなかった。走査電子型顕微鏡観察では、新生骨は近遠心の下顎骨面を被覆し骨延長間隙を満たすように形成していたが、近遠心の下顎骨は骨性連絡をしていなかった(写真14)。新生骨面および骨延長間隙の

血管は対照と比較して著しく少なかった。新生骨表面の拡大像では、骨形成と骨吸収の混在した像がみられた。光学顕微鏡観察では、新生骨は舌側骨膜から骨延長間隙に入り込むようにみえた(写真15)。骨延長間隙は、未分化間葉系細胞によって満たされていたが血管は対照と比較して少なかった。新生骨形成部に先端の一部に軟骨を認めた。

骨延長後4週目では脱有機処理により近遠心の骨は離れていた。走査型電子顕微鏡観察では、新生骨は下顎骨表面を被覆し骨延長間隙を満たすように形成されていたが未だ両者が結合するに至らなかった(写真16)。骨延長間隙には密な毛細血管がみられた。新生骨表面の拡大像は成熟骨の表面形態を示していた。光学顕微鏡観察では近遠心の下顎骨は新生骨により連続していなかった。新生骨骨梁は対照と同様に緻密であった(写真17)。

放射線照射後4週目骨延長群

骨延長後1週目では脱有機処理により近遠心の骨性癒合はみられなかった。走査型電子顕微鏡観察では新生骨は下顎骨表面を被覆するように形成していたが対照に比較して被覆範囲が狭く新生骨形成が低下していた(写真18)。血管は対照と比較して少ないが、新生骨形成部でみられた樹木が発芽するような血管形成が骨延長間隙に向かってみられた。新生骨形成表面の拡大像は、対照でみられた膜性骨形成の初期の形態と類似していた。光学顕微鏡観察では下顎骨の近遠心端には新生骨による骨性連絡はなかった。新生骨は舌側骨表面、骨延長間隙内にもみられ、新生骨梁はすう粗で対照のそれと類似していた(写真19)。骨延長間隙には対照と同様に未分化間葉系細胞と血管が豊富にみられた。

骨延長 2 週目では近遠心の骨端部は脱有機処理後結合していた。走査型電子顕微鏡観察では新生骨は近遠心下顎骨表面を広く覆い、骨延長間隙に入り込むように形成され照射後 2 週目骨延長群と比較して間隙は狭かった(写真 2 0)。血管は対照と比較して少なかったが骨延長間隙内で血管樹脂は連続していた(写真 2 1)。新生骨表面の拡大像では骨新生と骨吸収が混在する形態を示していた。光学顕微鏡観察では下顎骨はすう粗な新生骨により連続していた。骨延長間隙は対照と比較してすう粗な骨梁の新生骨および豊富な未分化間様系細胞により満たされていた(写真 2 2)。骨延長間隙内の一部に軟骨組織が新生骨に連続してみられた(写真 2 3)。

骨延長 4 週目では脱有機処理後も下顎骨は近遠心的に結合していた。走査型電子顕微鏡観察では母骨表面は新生骨によって被覆され、近遠心の下顎骨は新生骨により部分的にはあるが連続していた(写真 2 4)。骨延長間隙内には蛇行が少なく均一の太さの血管が豊富にみられた。新生骨表面の強拡大像は、成熟骨の表面形態に類似していた。光学顕微鏡観察では下顎骨は緻密な新生骨により連続していた(写真 2 5)。骨延長間隙の一部に新生骨に連続した軟骨組織を認めた(写真 2 6)。

考 察

放射線照射後の下顎骨骨延長は、骨形成の遅延もしくは形成不全により骨延長部の骨性癒合不全が生じることが明らかとなった。特に放射線照射後早期に骨延長を行うとその傾向は顕著であった。放射線照射 2 週目骨延長群の骨延長後 4 週目では骨癒合が生じていなかった。しかし、骨延長間隙には多量の未分化間葉系細胞が存在しており骨形成が継続している可能性があり、骨形成不全よりもむしろ骨形成の遅延による骨癒合不全であると考えられる。今後骨延長後長期の観察を行う必要がある。Gantous(1994)らは犬を使用した研究で放射線照射後に骨延長を行った場合にも十分良好な骨癒合を得られるため臨床応用可能であるとしている。放射線照射後早期に顎骨再建のため骨延長を行う場合には延長後の固定期間を長く設定するなどの配慮が必要である。さらに骨形成を促進する骨誘導蛋白などの使用も検討する必要がある。

下顎骨の骨延長による骨形成様式の主体は膜性骨化であった。対照では骨延長間隙の新生骨形成様式は膜性骨化が主体に行われるが、骨延長後 1 週目の一部に内軟骨性骨化がみられた。放射線照射後骨延長群では延長後 2 週目から 4 週目においても軟骨組織が残存していたことから類軟骨性骨化および内軟骨性骨化が生じた可能性がある。このことから、放射線照射は骨延長時の骨形成様式へ影響していることが予測される。Yasui(1997)、Sato(1999)らは分子生物学的手法により大腿骨延長後の骨形成様式の研究を行っている。その結果、骨延長初期には内軟骨性骨化が生じその後、類軟骨性骨化、膜性骨化が生じると

している。今回照射後4週目に骨延長を行った例では、膜性骨化が主体であるが内軟骨性骨化、類軟骨性骨化が分化過程の順序に従い配列していた。放射線照射により骨形成に遅延が生じたためかもしくは未分化間葉系細胞に何らかの影響があったと思われる。今後分子生物学的研究等によってこのメカニズムの解明が急がれる。

今後の展開

本研究により放射線照射後に骨延長を行う上での留意点が明確になった。放射線照射後早期に骨延長を行うことは骨の癒合不全を引き起こすことが明らかとなった。そのため、早期に骨延長手術を行う場合、骨延長後の固定期間を長くするなどの配慮が必要であると考えられる。これは照射2週目骨延長群で、骨延長後4週目においても未だ骨癒合が得られていなかったが、骨延長間隙には豊富な未分化間葉系細胞がみられ骨を形成する能力を有していると考えられるからである。さらに、現在研究が進められている BMP などの骨形成タンパク質を骨延長後に利用することで骨癒合不全を回避することができる可能性がある。また骨形成蛋白の注入ではなく細胞に骨形成蛋白レセプターを遺伝子導入により発現させ組織中に含まれている骨形成蛋白を利用して骨形成をはかることも可能となろう。そのためには、骨延長の場で生じている細胞間の情報伝達、遺伝子発現に関して研究を行う必要がある。現在研究代表者は骨延長の場における遺伝子発現について研究を行っているが安定した結果が得られておらず、今回の結果に含めることができなかった。今後上述した課題に関して研究を進める予定である。

ま と め

1. ラット下顎骨延長モデルを確立し本研究に使用した。
2. ラットの下顎骨骨延長には創外型延長期は脱落するため不適切であった。それにた
いて、創内型延長器は脱落・感染が少なかった。
3. 対照では骨延長後2週目に下顎骨の骨性連絡がみられた。放射線照射後4週目骨延
長群では延長後4週目に骨性連絡がみられ骨形成が遅延していることが明らかとな
った。放射線照射後2週目骨延長群では骨延長後4週目になっても骨延長部は新生
骨による連絡はなく骨延長が低下していることがわかった。
4. 下顎骨の骨延長による骨形成様式は対照では骨膜性骨化であった。
5. 照射後4週目骨延長群では、骨延長間隙の一部に新生骨形成部に連続した軟骨組織
を認めた。照射後4週目骨延長群では骨膜性骨化が主体に骨形成をするが一部では
類骨骨化が生じていることが示唆され、対照と比較して放射線照射後に骨延長を行
った際の骨形成の様式が異なることが予測された。

最後に、本研究に多大なるご指導と助言をいただきました旭川医科大学歯科口腔外科学

講座 北進一教授および歯科口腔外科 島崎善徳技官に感謝いたします。



写真1 創外型骨延長装置

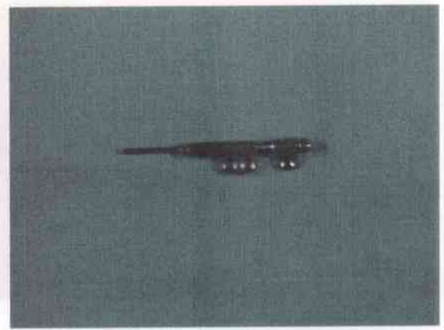


写真2 創内型骨延長装置

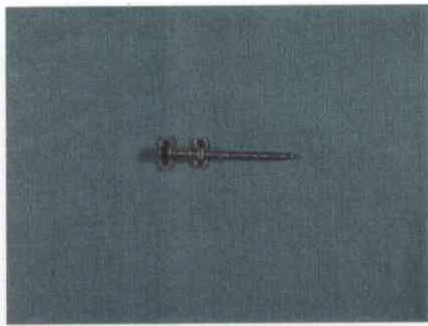


写真3 自家製骨延長装置

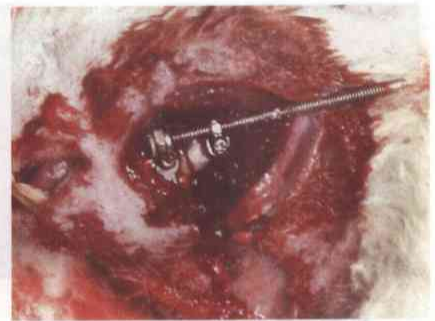


写真4 手術所見

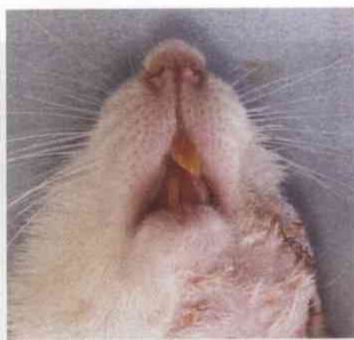


写真5 骨延長後咬合状態



写真6a 対照延長後1週目
Nは新生骨を示す

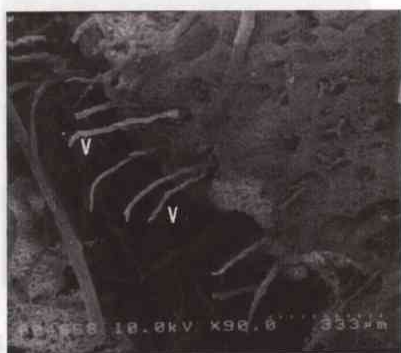


写真6b 対照延長後1週目
拡大像 Vは血管を示す

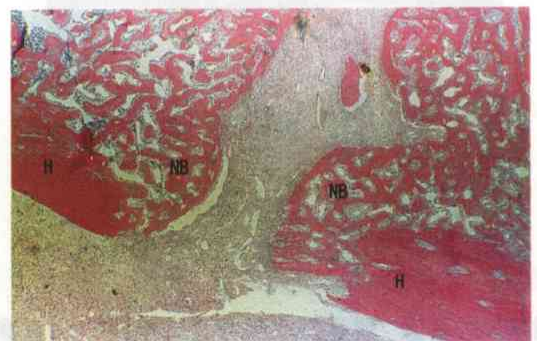


写真7 対照延長後1週目
Hは母骨、Nは新生骨を示す X20

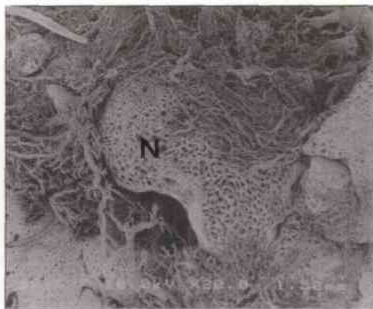


写真8 对照骨延長2週目
骨結合は Nは新生骨を示す

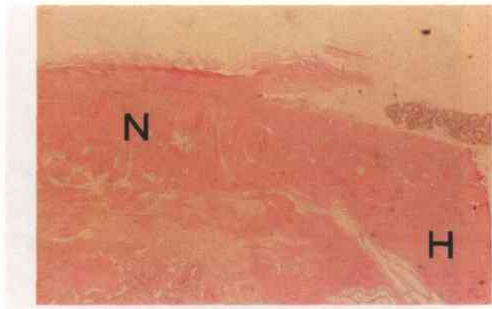


写真9 对照骨延長2週目
Hは母骨、Nは新生骨を示す X20

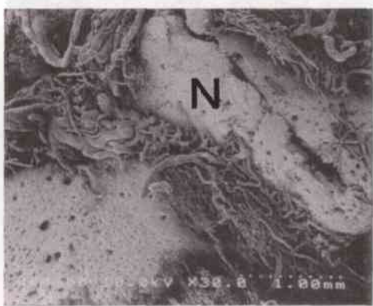


写真10 对照骨延長4週目
骨延長間隙はNで示す新生骨でみたまされている。

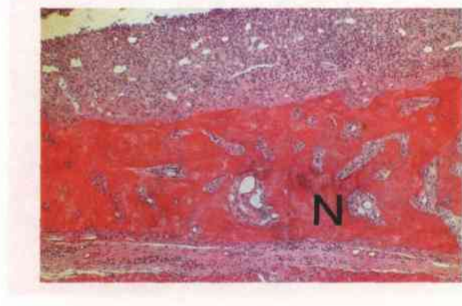


写真11 对照骨延長4週目
骨延長間隙はNで示す新生骨でみたまされている。 X20



写真12 照射後2週目骨延長群 延長後1週目
骨結合は見られない Hは母骨を示す

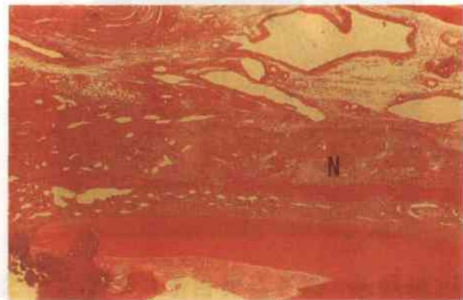


写真13 照射後2週目骨延長群 延長後1週目
N は新生骨を示す X20

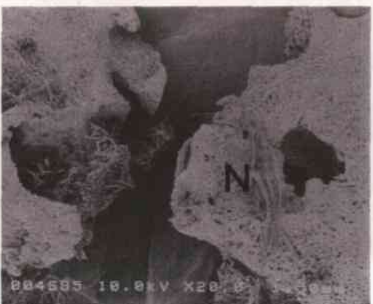


写真14 照射後2週目骨延長群 延長後2週目
骨結合は見られない Nは新生骨を示す



写真15 照射後2週目骨延長群 延長後2週目
骨結合は見られない Nは新生骨を示す X20

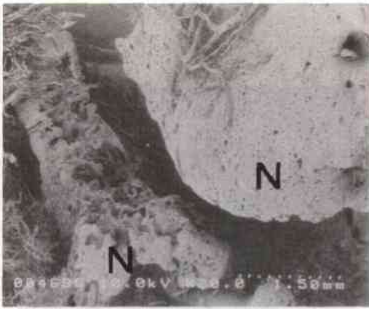


写真16 照射後2週目骨延長群 延長後4週目
骨結合は見られない Nは新生骨を示す

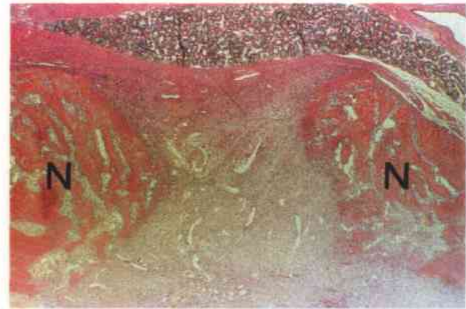


写真17 照射後2週目骨延長群 延長後4週目
骨結合は見られない Nは新生骨を示す X20

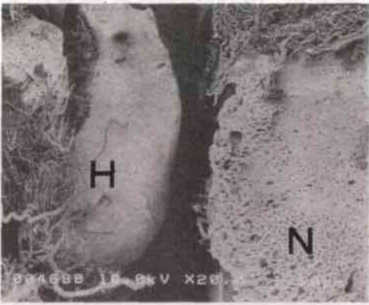


写真18 照射後4週目骨延長群 延長後1週目
骨結合は見られない Hは母骨、Nは新生骨を示す

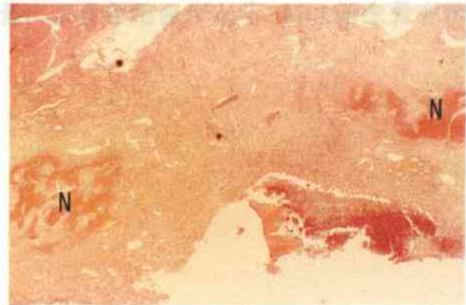


写真19 照射後4週目骨延長群 延長後1週目
骨結合は見られない Nは新生骨を示す X20

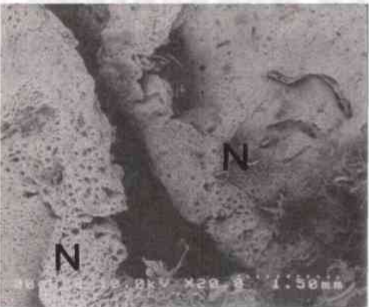


写真20 照射後4週目骨延長群 延長後2週目
骨結合は見られない Nは新生骨を示す

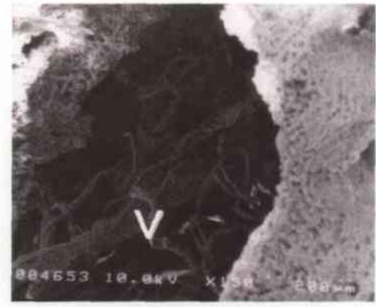


写真21 照射後4週目骨延長群 延長後2週目
Vで示す血管は連続している

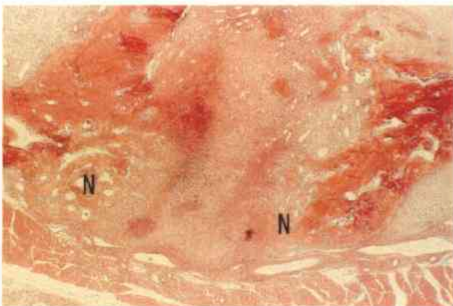


写真22 照射後4週目骨延長群 延長後2週目
Nは新生骨を示す X20

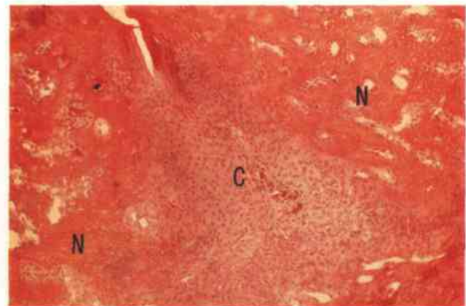


写真23 照射後4週目骨延長群 延長後2週目 拡大像
軟骨を介して新生骨は連続している
Nは新生骨、Cは軟骨を示す X50

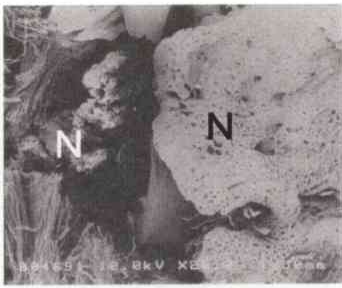


写真24 照射後4週目骨延長群 延長後4週目
新生骨による骨結合がみられる Nは新生骨を示す



写真25 照射後4週目骨延長群 延長後4週目
新生骨による骨結合がある Nは新生骨を示す X20

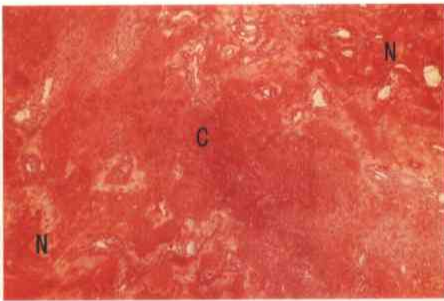


写真26 照射後4週目骨延長群 延長後4週目
新生骨内(N)に軟骨(C)をみとめる X50