

家兎を用いた下顎骨延長に関する実験的研究 特にBMP発現とその意義について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4528

家兎を用いた下顎骨延長に関する実験的研究

—特にBMP発現とその意義について—

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞浸潤学
(旧講座名: 歯科口腔外科学)
(主任: 山本悦秀教授)

丸 川 浩 平

骨延長法 (distraction osteogenesis) は顎顔面領域において近年、盛んに応用されるようになってきた。そこで家兎の下顎骨を用い、顎顔面骨延長後の骨形成過程における経時的变化を肉眼的、X線学的、組織学的ならびに免疫組織化学的に観察した。これらの観察結果から、下顎骨延長における骨形成の進行状態と骨形成関連因子 (bone morphogenetic protein, BMP) の関与について考察した。実験には日本白色種家兎を使用し、下顎骨体部に骨切り、延長装置を装着し1日1mmで10日間、計10mmの延長を行った。延長終了後1, 3, 7, 14, 28日目に屠殺し、これらをそれぞれ実験群とし経時的变化を検討した。肉眼的に延長部は、延長後1日目では母骨と異なる軟らかい組織で満たされていたが、3日目からは両側断端から硬い新生骨が順次伸び、28日目では表面滑沢で母骨に近い状態となった。なお下顎骨体部長測定により全ての群において同程度の実延長量が得られていることを確認した ($P < 0.05$)。X線学的には延長後1日目では延長部のほとんどが透過像を示していたが、3日目以降は時間の経過に伴い両側断端から仮骨が伸長、不透過性も亢進していき母骨と近い状態になっていった。組織学的にはHE染色を行い観察したところ、延長後早期では線維組織が主で骨の形成は乏しいが、時間の経過とともに骨増生が進行し延長部は新生骨の骨梁で満たされていき、母骨との境界は不明瞭となる傾向にあった。なお延長後1日目より7日目にかけて盛んな膜性骨化および軟骨性骨化を示す所見が認められた。免疫組織化学的にはBMP-2および増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) について精査し、いずれも延長後1日目より7日目にかけて骨新生先端部に発現し、同部位では高い陽性細胞率を示したが、14日目以降は漸次消失傾向にあり陽性細胞率も急速に減少した ($P < 0.05$)。以上のことから、家兎下顎骨延長において、BMP-2は延長早期より特異的に発現し、延長部に骨形成が誘導されるために重要な役割を持つことが示唆された。

Key words distraction osteogenesis, bone morphogenetic protein, rabbit mandible, maxillofacial skeleton

1960年代にロシア (旧・ソ連) のIlizarov^{1~3)}によって確立されたとされる骨延長法 (distraction osteogenesis) は、その内容が西側諸国にも広く知られるところとなった1980年代より急速に広まり、短縮した四肢骨の再建術あるいは偽関節の治療法として整形外科領域では広く普及し用いられてきた方法である。

顎顔面領域においてはSnyderら⁴⁾によるイス下顎骨の延長実験以後、本法がこの領域においても応用可能であることを示す研究がなされ、McCarthyら⁵⁾による下顎骨延長の報告を皮切りに臨床応用が開始された。以来、主として顎顔面骨の形態異常に対する新しい治療法として広く応用されるようになった。現在、術式や装置の急速な開発と相まって、より広い範囲で多くの患者がその恩恵に浴することが可能となりつつある。

しかしその反面、顎顔面骨延長におけるメカニズムにはいまだ不明な点が多い。元来四肢の長管骨とは成長様式の異なる顎

顎面の骨を延長した場合、四肢骨の場合と比較し同様の機転をたどるのか、あるいは特異な所見を呈するのかといった点など、解明すべき点は多い。一方、骨代謝に関与するサイトカインとされる骨誘導タンパク (bone morphogenetic protein, BMP) に関して、ウサギやラットなどの下肢骨を使用した実験では延長部の骨形成に対する密接な関連が示唆されており^{6~10)}、顎顔面骨においても同様に考えられるがこの領域におけるBMP発現について精査した報告は少なく¹¹⁾、いまだ詳細には検討されていないのが現状である。

そこで本研究では、顎顔面骨延長後の骨形成過程における経時的变化を観察する目的で、家兎の下顎骨延長を行い、肉眼的ならびにX線学的観察とともに、組織学的・免疫組織化学的手法を用いた延長部の観察、評価を行った。その結果をもとに下顎骨延長における骨形成の進行状態と骨形成関連因子としてのBMP-2の関与について考察した。

平成14年9月11日受付、平成14年11月14日受理

Abbreviations : BMP, bone morphogenetic protein; PCNA, proliferating cell nuclear antigen

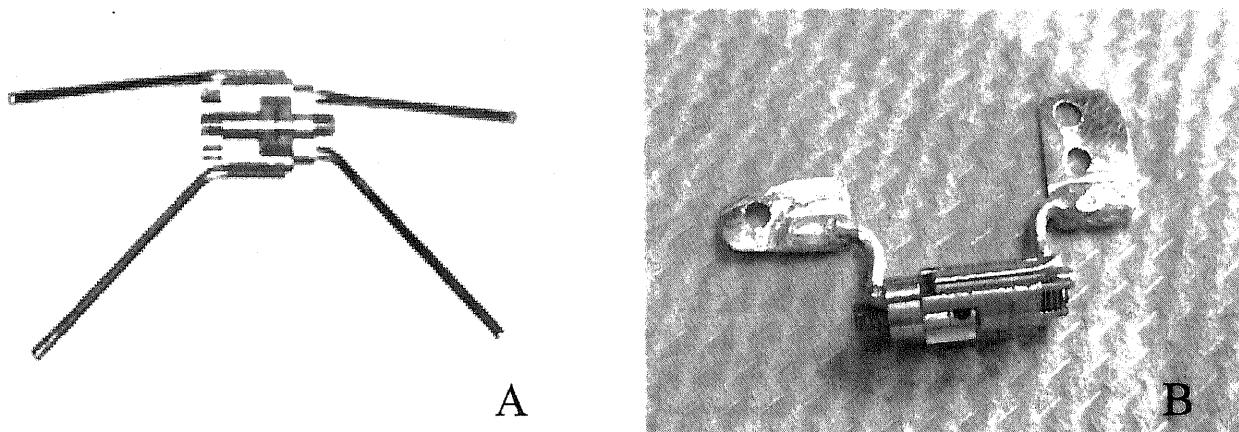


Fig. 1. Photographs of distraction device. (A) Hirax-type expansion screw. (B) Originally designed device after bending and soldering to metal plates.

材料および方法

動物実験については金沢大学宝町地区動物実験委員会の承認を得た(承認番号: 第011191号)。

I. 実験材料

実験には生後約6か月、体重3.0-3.5kgの日本白色種家兎(白石実験動物飼育所、東京)、雄24羽を使用した。

購入後、飼育は金沢大学医学部附属動物実験施設にて行い、飼育環境は室温22°C±3°C、湿度55%±10%、餌は固形飼料(船橋農場、千葉)を与えた。水道水を自由摂取とした。家兎は購入後1週間の予備飼育の後、全身的に異常がなく健康であることを確認したうえで実験に供した。

家兎は延長終了1, 3, 7, 14, 28日後の各時点で4羽ずつ観察した。これらをそれぞれ実験群とし、また無処置の4羽を対照群として設定した。なお、処置はすべての個体で下顎骨左側を行った。

骨延長装置としては、上顎用Hyrax型エクスパンションスクリュー(三金工業、東京)を家兎下顎骨に適合するよう改良して作製した創外型装置を使用した(図1)。また装置の下顎骨への装着にはチタン製の顎間固定用スクリュー(日本ストライカ、東京)を1装置につき3本使用した。

II. 実験方法(図2)

1. 手術および延長方法

まず25mg/kgのペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®、大日本製薬、大阪)を耳静脈より緩徐に投与して全身麻酔を行い、術野の左側オトガイ部から下顎枝にかけてバリカンにて剃毛、同部を10%ボビドンヨード(イソジン®液、明治製薬、東京)にて消毒の後、1:80,000エピネフリン含有2%塩酸リドカイン(キシロカイン®カートリッジ、藤沢薬品工業、東京)を計1.8ml、局所の除痛と止血目的に使用した。

充分に無動化が得られていることを確認した後、下顎下縁に沿って皮膚を長さ25mm程度、尖刃刀にて切開し、筋層を鈍的に剥離、骨膜上で骨面に達する切開を加え、筋骨膜弁を剥離しオトガイ部から下顎枝にかけての骨面を露出した。

骨切り部位は下顎骨体部(左側オトガイ孔と第一臼歯との間)であり、まず骨延長装置を骨面にあてがい各個体の下顎骨形態

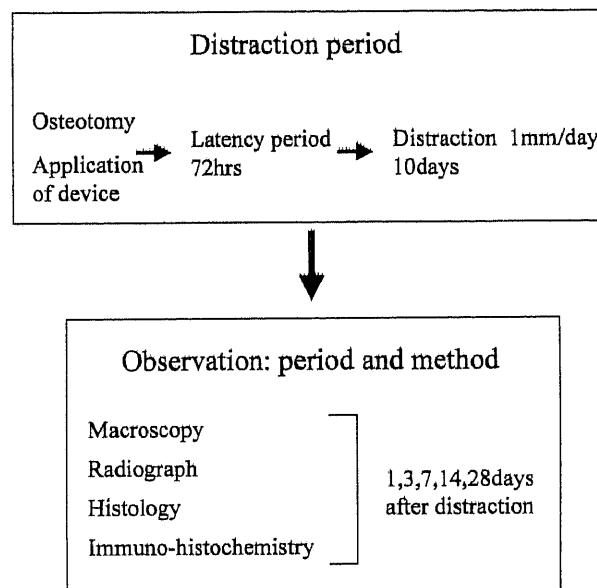


Fig. 2. Time table of this experiment.

に適合するよう微調整を行った後、スクリュー固定のための穴をドリルで開けて板のスクリュー止めを行った。その状態で、マイクロターピンを用い生理食塩水注水下に#699フィッシュヤーバーで皮質骨切開を行ったのち、一旦骨延長装置を外し徒手的に骨折させた。再度骨延長装置をスクリュー止めし、術野を洗浄しつつ剥離した筋骨膜弁を復位し、死腔を残さないように合成吸収性縫合糸(Echicon Inc.、東京)を用いて縫合し、最後に皮膚縫合を行い手術終了とした(図3)。なお手術前後に感染予防のためCFPM(マキシビーム®、プリストル製薬、東京)30mg/kgの投与を耳静脈より行った。

術後は、術前と同様の環境で飼育を続けた。延長操作は、手術終了後72時間の待機期間を設け、感染の兆候や全身的な著しい異常が見られないことを確認した後開始し、朝晩0.5mmずつほぼ12時間おきとなるように行い、1日1mm、10日間で合計10mmの総延長量となるよう行った(図4)。

手術後、屠殺までに創部に感染がみられた個体や著しく体重

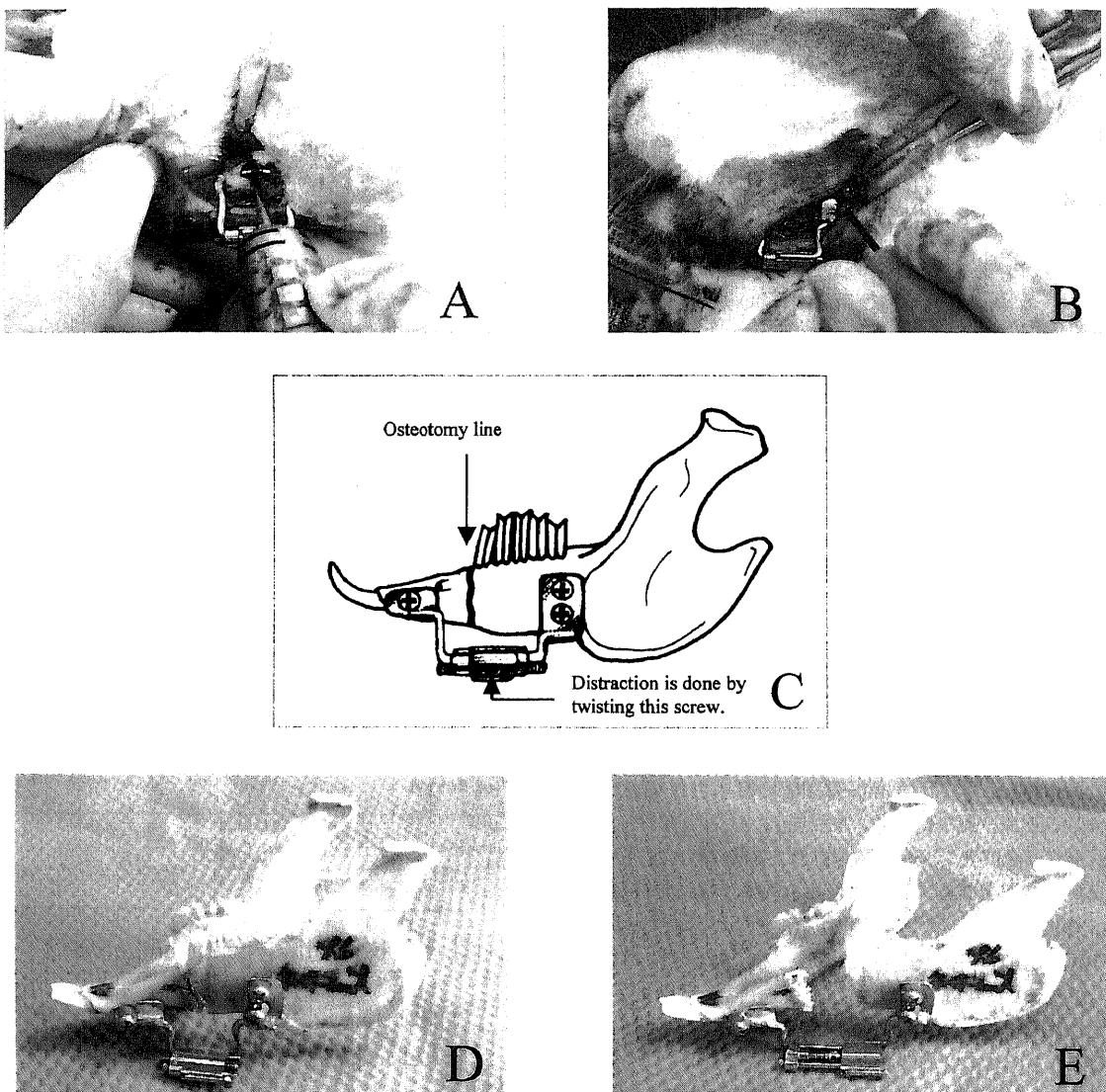


Fig. 3. Intraoperative findings. (A) Mandibular vertical body osteotomy using microturbin. (B) Fixation of the device with titanium screws. (C) Schematic illustration of the device after osteotomy. (D) Placement of the device to mandible; before distraction. (E) After distraction.

が減少した個体、延長装置の破損や脱落あるいは装置固定の不備等により実延長量が著しく少ない(下顎骨体部長測定により、延長側と非延長側との差が総延長量の50%に満たない)個体は除外し、同数を補充した。また延長後、切歯は著明な交叉咬合を呈したが、餌は圆形飼料を摂取可能であった(図5)。

2. 観察方法

家兎の屠殺は、延長終了1, 3, 7, 14, 28日後の各時点および対照群において、ペントバルビタールナトリウム40mg/kgを投与した後開胸術を施し、左心室にカニューレ挿入後右心房を切開開放し、生理食塩水(大塚製薬、東京)約200mlで還流、寫血した。この状態で周囲の皮膚、筋肉等軟組織を除去して下顎骨を摘出し、観察用標本とした(図6)。

1) 肉眼的観察

摘出した下顎骨に付着した筋や骨膜を可及的に除去し、延長部組織の性状および母骨との相違などにつき観察を行い、各時点で比較した。

さらに下顎骨体部長の測定を、下顎角最突出部(gonion)か

ら下顎舌側歯槽突起正中(infradentale)までの距離を求めるこ^とにより行い、すべての実験群において充分な実延長量が得られていることを確認した¹²⁾(図7)。

2) X線学的観察

歯科用X線撮影装置(モリタ製作所、京都)を用いて軟X線撮影を行った。各下顎骨標本を正中部で分割し、延長側の標本を遮光したX線フィルム(富士写真フィルム社、東京)上に直接下顎骨外側面が隙間なく接着するように置き、管電圧60kvp、管電流10mA、照射時間0.4秒の条件下で撮影し、すべてのフィルムを同条件下に現像した。

得られたX線写真を、スキャナー(セイコーエプソン、東京)を用いて600×600 d.p.i.の解像度にてパソコンコンピュータ(日本電気、東京)に取り込み、bmp形式として保存後、X線透過性の差異を強調させ読影を容易化する目的でSCION image(SCION Corporation, Frederick, Maryland, USA)を用い、ヒストグラム平均化処理をすべての写真に行った¹³⁾。得られた画像上で延長部の透性および周辺骨との相違、境界の明瞭度などに

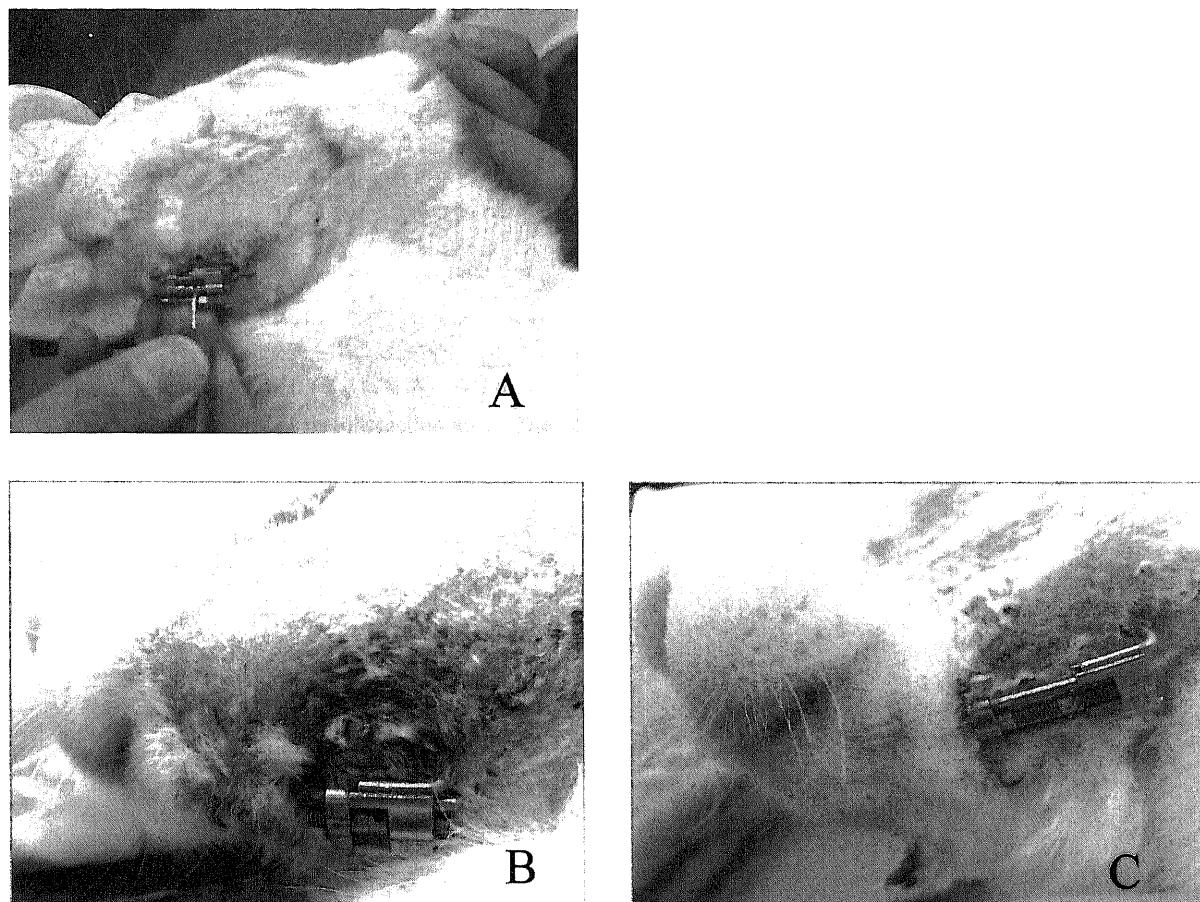


Fig. 4. Photographs during the distraction period. (A) Distraction using a twister. (B) Before distraction. (C) After distraction.



Fig. 5. A photograph of frontal view of occlusion with severe crossbite after distraction.

Fig. 6. A photograph of superior view of mandible with severe asymmetry after distraction. The arrows indicate lengthened site.

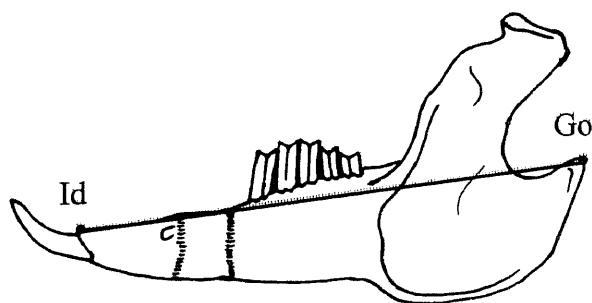


Fig. 7. Anatomical landmark points of mandible and the method of measurement. Id: infradentale, Go: gonion.

つき変化を観察し、またCopeら¹⁴⁾の方法を参考に以下のようなスコアを作成し各標本を評価した(図8)。

- i. 延長部に仮骨の形成は認めない、またはわずかである：1点
 - ii. 延長部には両側の母骨より仮骨の伸長を認めるが、連続していない：2点
 - iii. 両側からの仮骨が連続するが、不透過性は低く母骨との境界は明瞭である：3点
 - iv. 延長部は両側の母骨と同等の不透過性を有し境界は不明瞭である：4点
 - v. ivの所見に加え、皮質骨の形成が確認される：5点
- 3) 紹介学的観察
摘出した下顎骨標本を10%中性緩衝ホルマリン液(武藤化

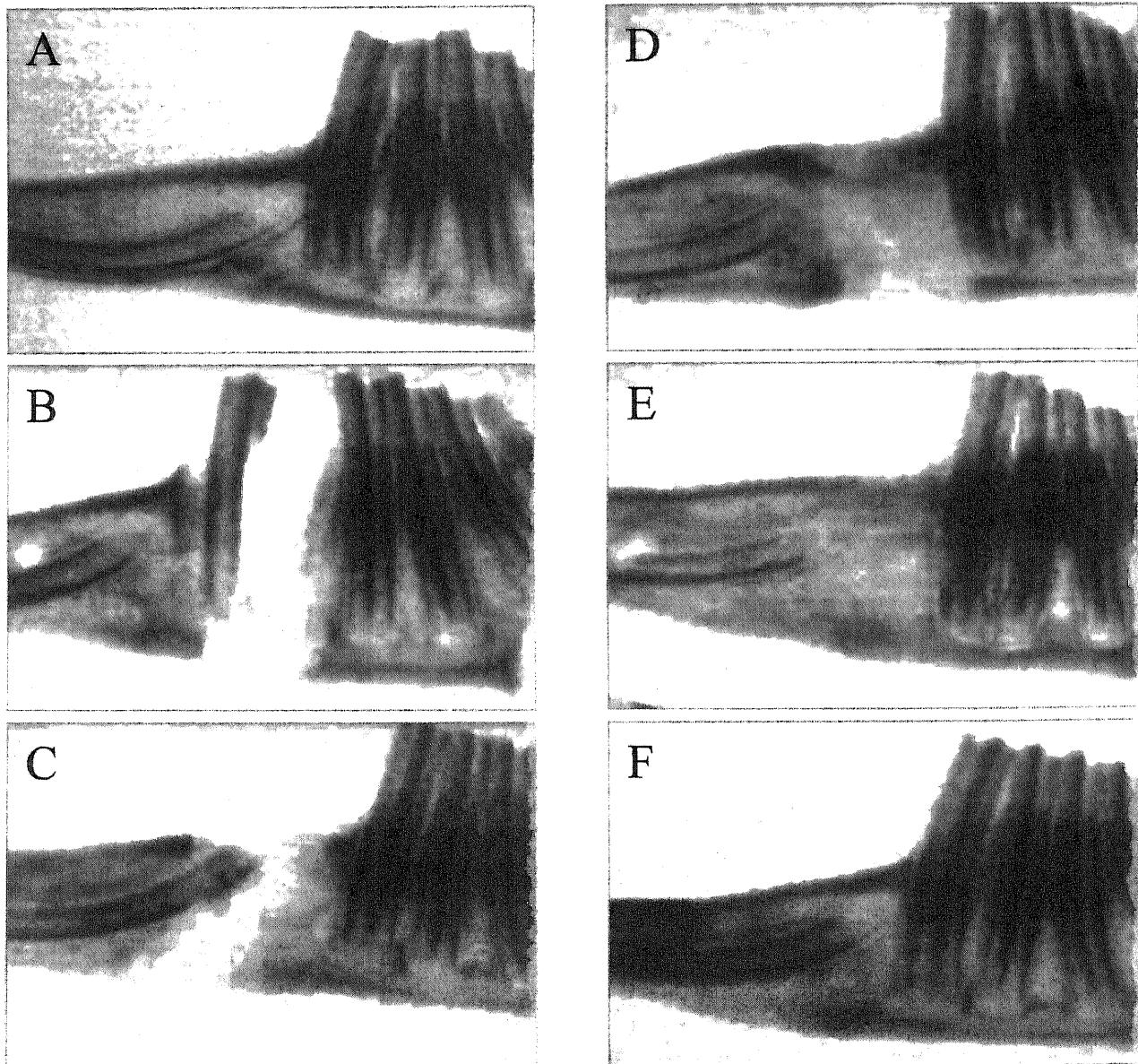


Fig. 8. The definition of score on the digitalized radiographs. (A) Normal mandible. (B) Distraction gap was radiolucent. This was defined as point 1. (C) Although newly formed bone showed, it was not connected. This was defined as point 2. (D) The continuity of new bone formation was found, but its radiopacity was still low. This was defined as point 3. (E) Radiopacity of regenerated bone became similar to the original bone. This was defined as point 4 (F) Cortical bone was clearly observed. This was defined as point 5.

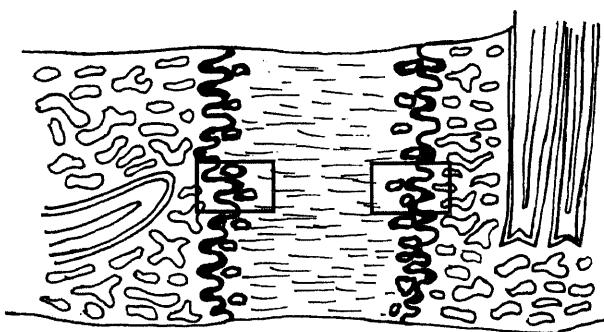


Fig. 9. The schematic drawing of the distraction area. The square indicates the area of immuno-histochemical observation. This area was located at the center of the edge of anterior and posterior segments.

学、東京)に3日間浸漬して固定し、左側延長部のブロックを両側の母骨を5mm程度含めた状態で切り出し、0.5M EDTA液(和光純薬工業、大阪)にて4週間脱灰処理を行った。充分に脱灰され軟化していることを確認後、通法に従いパラフィン包埋し、ミクロトーム(MICROM GmbH, Heidelberg, Germany)を用いて矢状断面厚さ5 μ mの切片を作製し、脱パラフィン、HE染色を行い、光学顕微鏡(日本光学工業、東京)下に組織学的観察を行った。

4) 免疫組織化学的観察

免疫組織化学的染色については、一次抗体として抗BMP-2モノクローナル抗体(山之内製薬より供与)を用い、さらに延長部における細胞の増殖能を観察する目的でマウス抗増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)モノクローナル抗体(ダコ・ジャパン、京都)を用いた。方法はLSAB(labelled streptavidin biotin)法に基づいてダコLSABキット(ダコ・ジャパン、京都)を用いて行った。ホルマリン固定、脱灰、パラフィン包埋した標本より矢状断面厚さ5 μ mの切片を作製

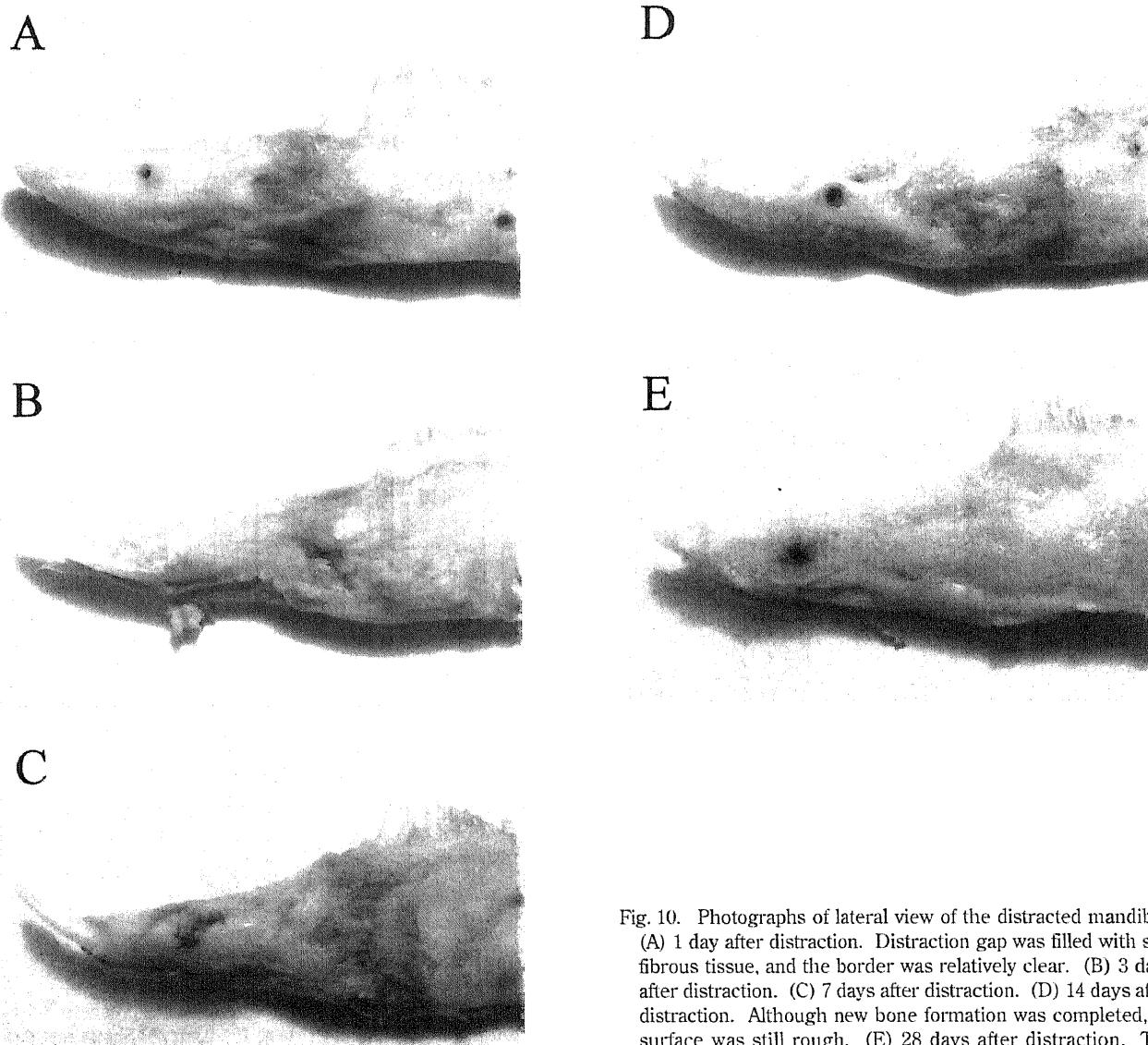


Fig. 10. Photographs of lateral view of the distracted mandible. (A) 1 day after distraction. Distraction gap was filled with soft fibrous tissue, and the border was relatively clear. (B) 3 days after distraction. (C) 7 days after distraction. (D) 14 days after distraction. Although new bone formation was completed, its surface was still rough. (E) 28 days after distraction. The surface of the new bone was as smooth as the original bone.

し、通法に従い脱パラフィン、脱キシレンした後、0.1%トリプシンと0.1%無水塩化カルシウムとを用いて抗原賦活処理を37°Cで約40分間行い、0.3%H₂O₂で内因性ペルオキシダーゼの不活性化を10分間行った。さらに10%正常ヤギ血清にて非特異的反応を阻止後、50倍希釈とした抗BMP-2抗体および200倍希釈とした抗PCNA抗体を4°Cで一昼夜反応させた。二次抗体にはビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体を用い室温で30分間反応させた。発色は0.1%ジアミノベンチジンテトラハイドロクロライド(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)(和光純薬、大阪)を行い、マイヤーヘマトキシリン核染色を薄く行ったのち、延長部における染色状況を光学顕微鏡下に観察した。観察は骨増生先端部の上下に中央付近の任意部位において行い、DABにより褐色に核染色された細胞をBMP-2およびPCNA陽性細胞として、細胞1000個あたりの陽性細胞数を算定、それぞれの陽性細胞率を算出し各群で比較した(図9)。

III. 統計学的検討

すべての計測結果は統計処理ソフト(Stat View 4.5, ABACUS Concepts, Berkeley, USA)を用いて検討した。肉眼的、免疫組織化学的観察結果の有意差検定にはマン・ホイットニー検定(Mann-Whitney's U test)を、またX線学的観察におけるスコアの経時的变化の有意差検定には一元配置分散分析法(one factor ANOVA)を用い、危険率5%以下をもって有意差ありとした。

成績

I. 肉眼的所見

肉眼的に延長部の経時的な変化は以下のとくであった。延長終了後1日目群では延長部は半透明で薄い灰色の軟らかい線維性組織で満たされており、両側の母骨との境界は比較的

明瞭であった。時間の経過に伴い両側断端より白色で比較的硬い新生骨が伸び、境界は不明瞭となる傾向にあった。3日目群、7日目群となるにつれ線維性組織の幅が狭くなってしまい14日目群ではほぼ新生骨が連続していた。この時期までは新生骨の表面性状はやや粗造で、成熟骨に比べ軟らかく典型的な幼若骨の状態であるものが多かったが、28日目群になると表面はより滑沢となり、硬さも触診上は成熟骨に近い状態で母骨との境界はほとんど分からなくなつた(図10)。

また各群における下顎骨体部長を測定した結果、有意に延長側が対照側より長く($P < 0.05$)、いずれも平均7mm前後の骨延長が得られていることが確認された(図11)。

II. X線学的所見

各標本のX線写真における観察より、延長部には経時に新生骨が形成され、成熟していくことが確認された(図12)。

延長終了後1日目群では延長部には仮骨の形成は少なく、両側断端からの仮骨は連続せず完全な透過域で介され、また仮骨の不透過性は低く断端は明瞭であった。スコア上は1点または2点に該当した。以後時間の経過に伴い仮骨が伸長ていき、3日目群では2点が主体であるが3点と評価されるものが現れた。7日目群では3点が主体となり両側からの仮骨はほぼ連続した。14日目群になると仮骨の成熟が進み、不透過性が充進し両側の母骨と同等となるもの、スコア上では4点に該当するものが主体となった。28日目群では延長部の不透過性がさらに増し、皮質骨の形成も確認され、すべてが5点と評価された。またANOVA分析の結果、有意に経時的变化が認められた($P < 0.05$)。

III. 組織学的所見

各標本の組織学的観察より、延長部における骨増生の経時的

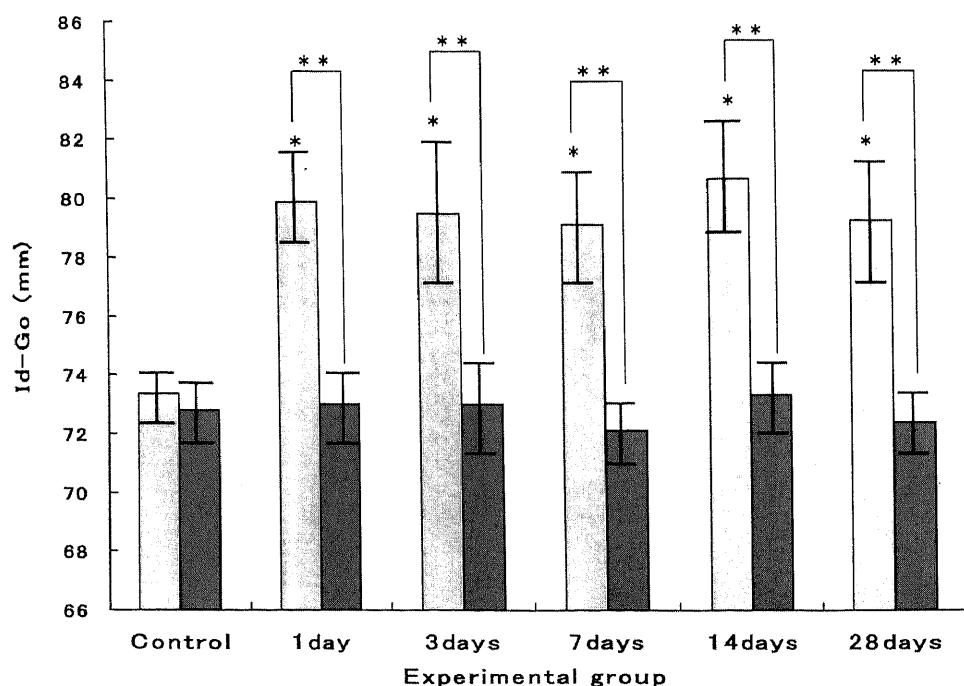


Fig. 11. Id-G₀ measurement of both distracted (left) side (■) and non-distracted (right) side (■). Each value represents $\bar{X} \pm SD$. * Shows significant difference between the control and the treated group using Mann-Whitney's U test, $P < 0.05$. ** Shows significant difference between right and left side using Mann-Whitney's U test, $P < 0.05$.

な進行が確認された。

延長終了後1日目群では、延長部は牽引方向に一致して走行する密な線維組織で満たされており(図13)，断端部から伸びる新生骨はわずかな量ではあったが，盛んな骨増生を示す所見を呈した。時間の経過とともに牽引方向に骨増生が進行し，3日目群，7日目群においても旺盛な新生骨の形成と線維組織の幅の減少が確認された。14日目群では骨増生はやや停滞する傾向にあったが，延長部中央に一部線維組織を残していた。28日目群では延長部は新生骨の骨梁で満たされ，周囲の母骨との境界は不明瞭となった。また新生骨は延長部中央寄りでは幼若な線維骨であったが，母骨寄りでは成熟が進み層板構造を呈しており両者はゆるやかに移行していた(図14)。

また骨化様式は，一貫して膜性骨化が主体であり，新生骨骨梁の周囲に多数の骨芽細胞を認めるが，延長終了後1日目群，3日目群，7日目群では軟骨性骨化を示す部位が混在し，双方ともに盛んな骨増生を思わせる所見を呈していた(図15)。しかし14日目群になると膜性骨化は依然盛んではあるものの，軟骨性骨化を示す部位が減少しており，さらに28日目群では軟骨細胞はほとんど見られなくなり，また骨芽細胞も減少し，骨増生の停滞を示す所見を呈した。

IV. 免疫組織化学的所見

抗BMP-2抗体を用いた染色では，延長直後より断端部付近で幼若な骨稜が形成されている部位の骨髓腔が濃染されており，早期からの同部位への特異的な発現が示唆された(図16)。また延長部線維組織も薄染されていた。さらに，断端に近く骨増生が盛んな部位では多くの陽性細胞が認められた(図17)。膜性骨化を示す部位，軟骨性骨化を示す部位のいずれにおいても，骨芽細胞様細胞や軟骨細胞様細胞には陽性細胞は比較的小なく，その近傍で線維芽細胞様細胞や前2者への分化途上と思われる中間的な細胞のほうが多く陽性であった。断端から遠い場所では陽性細胞はほとんど認められなかった。

骨髓腔が濃染される部位は常に骨増生の先端に近い部位であり，この部位では陽性細胞率も高値を示した。これは延長終了後早期より7日目群まで同様であり，このような所見のみられる部位は経過に伴い延長部中央へ向け移動していく。陽性細胞率は1日目群 $21.73 \pm 5.98\%$ ，3日目群 $24.58 \pm 10.57\%$ で，7

日目群において $25.98 \pm 7.97\%$ とピークを迎えるが，14日目群になると狭くなった線維組織および骨髓腔が薄染されるのみとなり，陽性細胞率も $6.48 \pm 2.07\%$ と著しく低下した。28日目群では延長部の線維組織は消失し，骨髓腔もきわめて薄く染色されるにすぎず，陽性細胞率も $1.20 \pm 0.65\%$ となり，対照群との明らかな差は認められなかった(図18)。統計学的に陽性細胞率は延長後1，3，7，14日目群では対照群に比較して有意に高値を示したが，28日目群では有意差は認められなかったことから($P < 0.05$)，延長部において骨増生が盛んな時期にはBMP-2は多量に発現し多くの細胞が陽性となるが，新生骨の完成が近くなると急速に消失していくことが示唆された。

また抗PCNA抗体を用いた染色でもBMP-2と同様に，成熟した骨芽細胞や軟骨細胞様の細胞よりも，比較的幼若と思われる細胞のほうにより多くの陽性細胞が認められた(図19)。陽性細胞率は延長終了後1日目群から $14.03 \pm 3.05\%$ と比較的高値を示し，3日目群において $15.40 \pm 4.28\%$ とピークを迎え，7日目群においても $12.80 \pm 3.51\%$ と高値を保っていた。しかし14日目群では $4.10 \pm 1.31\%$ と急激に低下し，同28日目群においては $1.95 \pm 0.71\%$ と対照群と大差ない程度まで低下した($P < 0.05$) (図20)。このようなPCNAの発現状況より，細胞の分裂・増殖は骨増生が盛んな時期に一致して旺盛となり，延長部が新生骨で満たされる頃になると急速に停滞することが示唆された。

V. 各種所見の相関性(表1)

延長後の骨形成過程において，肉眼的，X線学的および組織学的にはほぼ一致した所見を呈した。すなわち，延長後早期では延長部に新生骨の形成は乏しいが，時間の経過と共に断端部より新生骨が伸長，ついには連続し，引き続いて新生骨が成熟化し母骨と見分けがつかなくなるという点で，これらはほぼ同様の所見を示していた。

組織学的には延長後1日目群から7日目群まではきわめて盛んな骨増生が観察されたが，14，28日目群では骨増生の停滞を示す所見を呈した。一方免疫組織化学的にも，BMP-2およびPCNAは延長後1日目群から7日目群まで高い陽性細胞率を示すが14，28日目群では低下しており，これらは骨増生の盛んな時期に全く一致して発現していることが示された。しかし陽

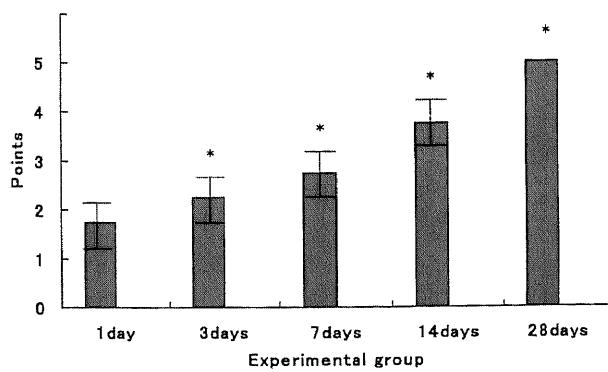


Fig. 12. Radiographic score of each group. Each value represents $\bar{X} \pm SD$. *Shows significant difference at $P < 0.05$ with one factor ANOVA.

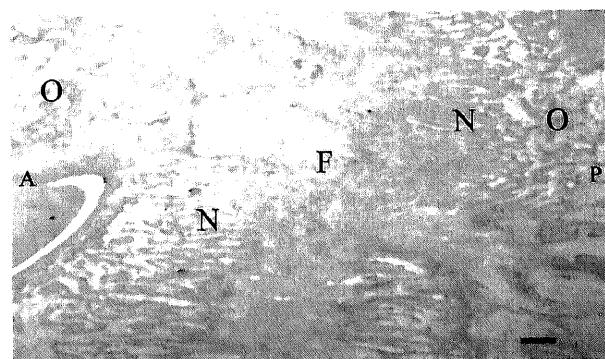


Fig. 13. Histological finding at the sagittal section in distraction area (1 day after distraction). O, original bone; N, newly formed bone; F, fibrous tissue; A, anterior; P, posterior. HE stain, $\times 10$. Scale bar indicates 1mm.

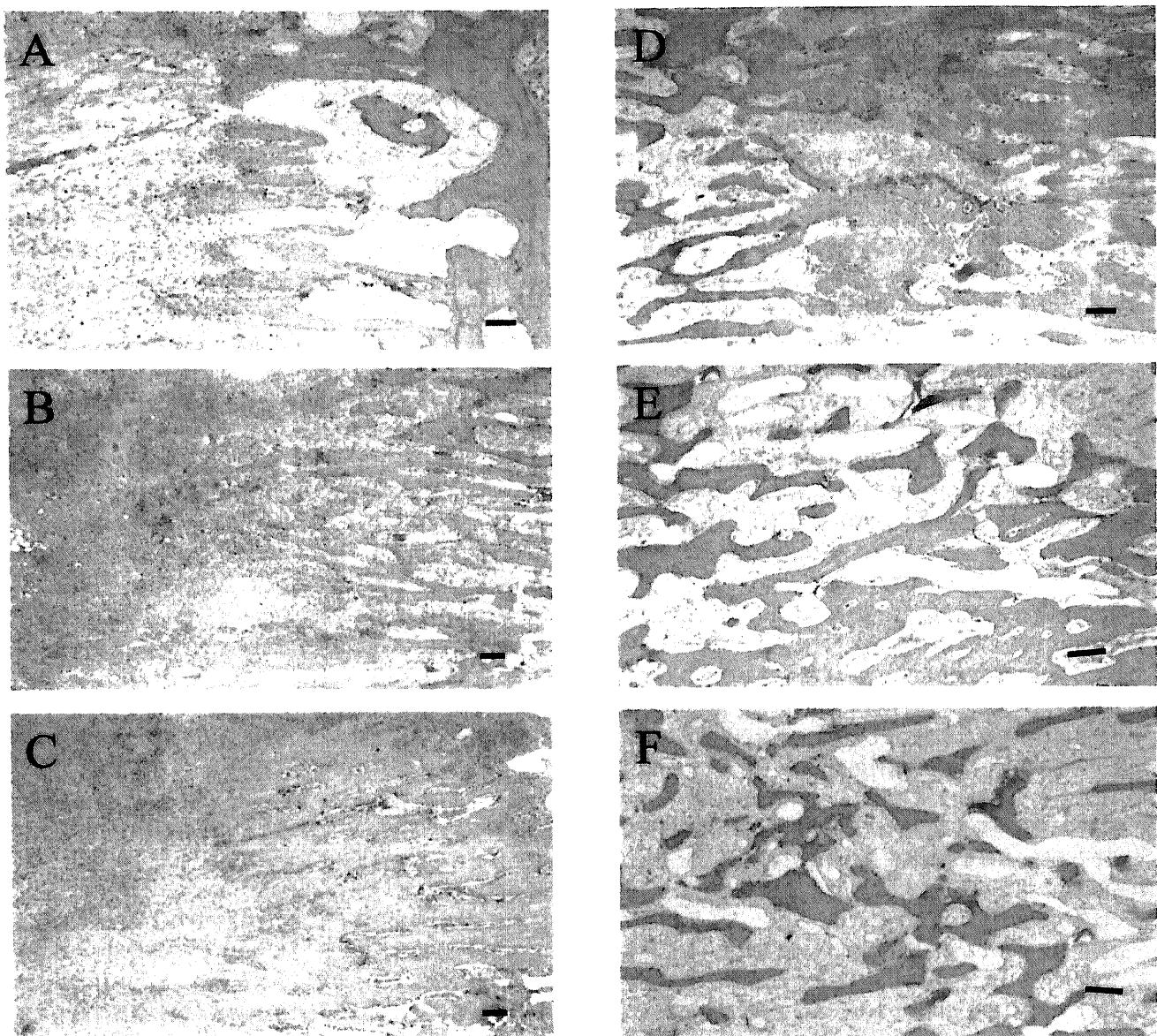


Fig. 14. Photomicrographs of distraction area. (A) 1 day after distraction. Distraction gap was filled with fibrous tissue, and new bone formation was very active. (B) 3 days after distraction. (C) 7 days after distraction. (D) 14 days after distraction. The gap was filled with new bone and little fibrous tissue remained. (E) 28 days after disrtraction. The gap completely disappeared. (F) Control. HE stain, $\times 40$. Scale bar indicates $200\mu\text{m}$.

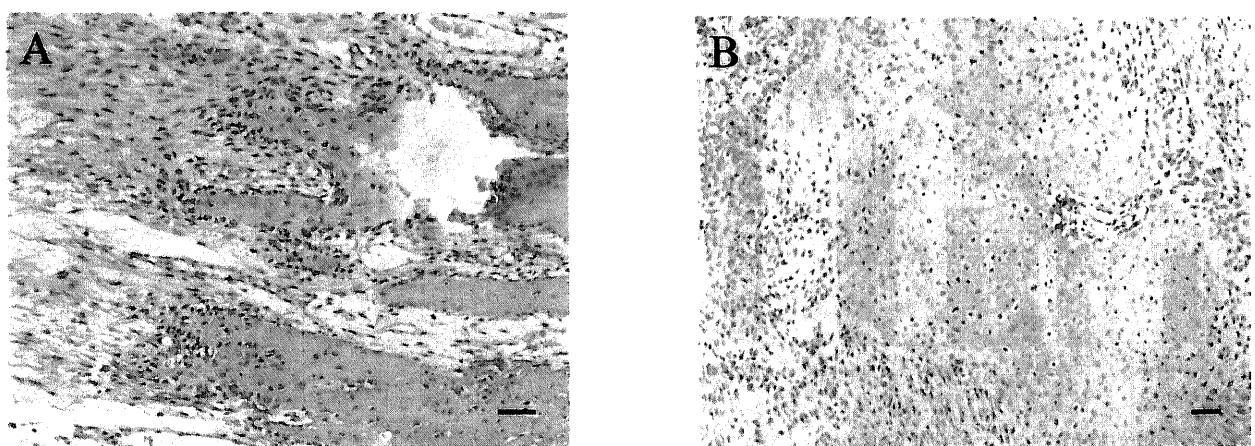


Fig. 15. High-magnification photomicrographs of distraction area (3 days after distraction). (A) Intramembranous ossification. Many osteoblast-like cells concentrating around the newly formed bone were observed. (B) Endochondral ossification. The masses of chondrocyte-like cells dispersed near the edge of osteogenesis. HE stain, $\times 100$. Scale bar indicates $50\mu\text{m}$.

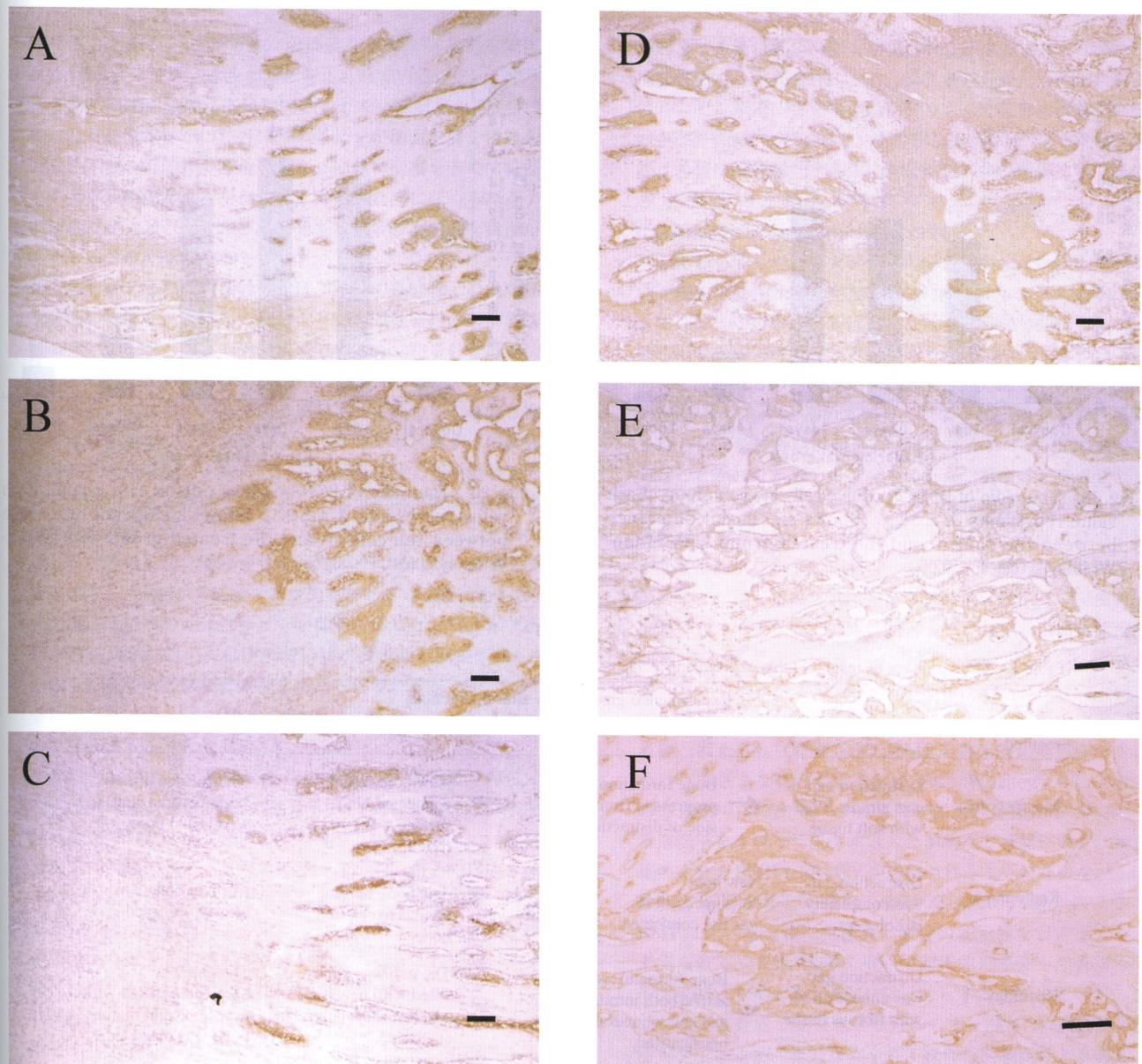


Fig. 16. Photomicrograph of distraction area stained with BMP-2. (A) 1 day after distraction. At the edge of osteogenesis, bone marrow was strongly stained. (B) 3 days after distraction. (C) 7 days after distraction. (D) 14 days after distraction. Remained fibrous tissue was stained slightly. (E) 28 days after distraction. Strongly-stained areas were not found. (F) Control. BMP-2 immuno-histochemical stain, $\times 40$. Scale bar indicates $200\mu\text{m}$.

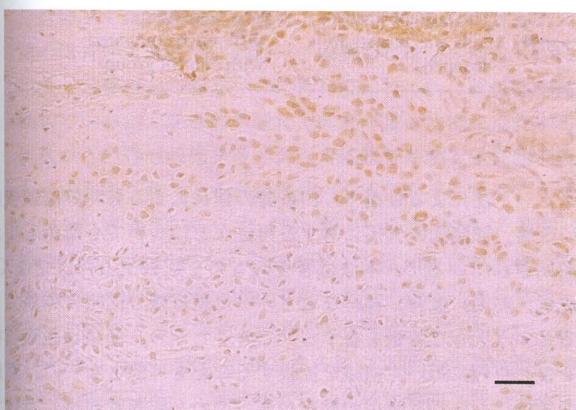


Fig. 17. High-magnification photomicrograph of distraction area (3 days after distraction), stained with BMP-2. Many BMP-2-positive cells were observed near the osteogenesis site. BMP-2 immuno-histochemical stain, $\times 100$. Scale bar indicates $50\mu\text{m}$.

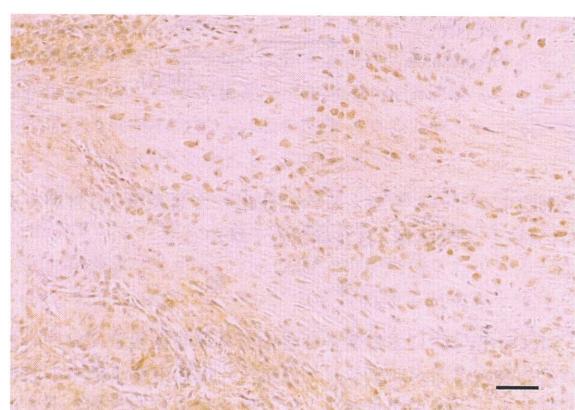


Fig. 19. High-magnification photomicrograph of distraction area (3 days after distraction), stained with PCNA. Many PCNA-positive cells were observed near the osteogenesis site. PCNA immuno-histochemical stain, $\times 100$. Scale bar indicates $50\mu\text{m}$.

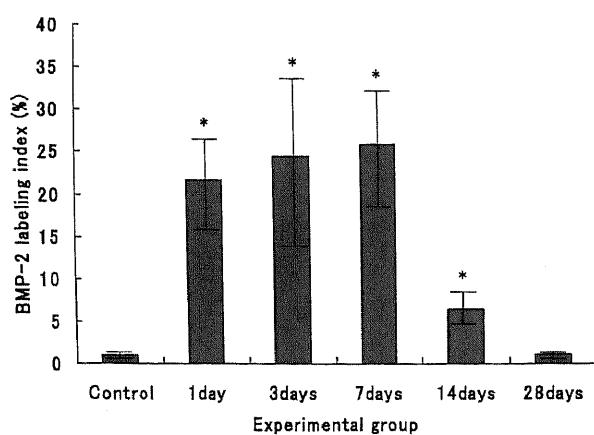


Fig. 18. The ratio of BMP-2 positive cells in each group. Each value represents $\bar{X} \pm SD$. *Shows significant difference between the control and the treated group with Mann-Whitney'U test, $P < 0.05$.

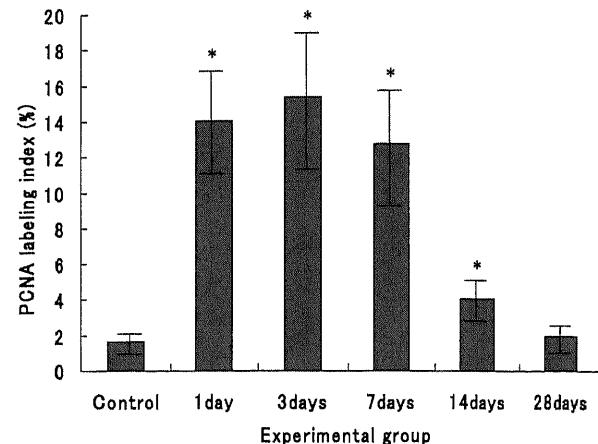


Fig. 20. The ratio of PCNA-positive cells in each group. Each value represents $\bar{X} \pm SD$. *Shows significant difference between the control and the treated group with Mann-Whitney'U test, $P < 0.05$.

Table 1. The summary of results of this experiment

Observation method	Experimental group (days after distraction)				
	1	3	7	14	28
Macroscopy	Distraction gap was almost filled with soft tissue.	← Bone formation progressed from bilateral side of distraction gap.	→	New bone was connected but its surface was still rough.	The surface of new bone became similar to original bone.
Radiograph	Distraction gap was completely radiolucent.	New bone developed, but it was not connected.	New bone was connected, but its radiopacity was still low.	Radiopacity of new bone became similar to original bone.	Cortical bone was clearly observed.
Histology	Distraction gap was almost filled with fibrous tissue.	← Bone formation was very active (both intramembranous and endochondral ossification).	→	The gap was almost filled with new bone, and bone formation stagnated.	The gap was completely filled with new bone, and mature bone was observed.
BMP-2 expression	← Bone marrow was strongly stained at the edge of osteogenesis, and the ratio of positive cells was high (the peak was 7days).	→	Only remained fibrous tissue was stained slightly, and the ratio of positive cells was remarkably dropped.	There were no difference compared with control group.	
PCNA expression	← The ratio of positive cells was high (the peak was 3days).	→	The ratio of positive cells was remarkably dropped.	The were no difference compared with control group.	

性細胞率がピークを迎えるのはBMP-2が延長後7日目群であるのに対し、PCNAは3日目群と若干早かった。

考 察

McCarthyら⁹⁾による報告を皮切りに顎頬面領域における骨延長法の臨床応用が開始されて以来、片側顎面矮小症や小下顎症をはじめ、口唇・口蓋裂による上顎低形成などに対しても幅広く応用されるようになってきた。また最近ではインプラント植立のための歯槽骨増大法としての応用も盛んとなりつつある。さらに腫瘍切除や口蓋裂などに伴う顎骨欠損に対する骨トラン

スポート法による修復や、口蓋骨の延長による鼻咽腔閉鎖機能の改善、頸関節の欠損に対する再建などについても臨床応用が開始されている¹⁰⁾。本法は骨そのものを延長するだけでなく、皮膚、筋肉、血管、神経などといった軟組織も同時に伸展できるという大きな特徴を有する。このことから、従来は組織移植を要した例に用いて組織を拡張することも可能となった。顎頬面領域においては応用の歴史が浅いため、周囲軟組織に及ぼす影響についての詳細には不明な点が多いが¹⁰⁾、現在のところ臨床的に重篤な合併症は報告されていない。また従来より行われてきた遊離骨移植に比べ、周囲軟組織の過度の緊張を生じ

させることがないことなどから後戻りが少ないとする報告もあり^{17)~19)}、本法の大きな利点と考えられている。

また、顎頬面領域に応用が開始された当初は創外固定装置、すなわち装置本体が口腔外に露出しピンが顎面皮膚を貫通しているタイプのものが多く用いられ、同部に瘢痕をきたすことなどが大きな問題となつたが、最近では口腔内に収められる小型の装置や埋入型の装置が多く開発され患者の心理的な負担を軽減することが可能となっている。

下顎骨はじめ顎頬面領域の骨は、四肢の長管骨とは異なり三次元的に複雑な形態をしていることや周囲軟組織の解剖学的特徴の違いなどから、整形外科領域で行われている骨延長方法をそのまま応用することはできない。単に硬い骨ができればよいというものではなく、あくまで周囲組織に調和した運動と機能を有する形態をつくる必要がある。そのために数多くの研究がなされ、近年顎頬面領域における骨延長法は、方法論としてはかなり理想に近い状態まで発展し、応用範囲が飛躍的に広まつたと言える。

しかしその反面、顎頬面骨延長のメカニズムにはいまだ不明な点が多く、技術や方法論のみが先走りしている観は否めない。骨代謝には種々のサイトカインが関与することは明らかであるが、顎頬面骨においては四肢骨に比べ骨延長の歴史が浅い分、それらに関する詳細な研究はまだ乏しいといえる。そこで今回、それらのサイトカインのうちBMP-2に着目し、その存在について精査することとした。

今回の実験では、手術終了後72時間の待機期間ののち、朝晩0.5mmずつで1日1mmの延長を10日間行った。これまでに待機期間^{1)20)~22)}、延長速度および頻度¹⁾²⁾²³⁾²⁴⁾、あるいは延長後の保定期間等につき、きわめて多くの実験的あるいは臨床的報告がなされているが、今回はそれらを鑑みつつ、家兎に対してはごく標準的と思われる設定とした。結果として肉眼的にはほぼ問題なく新生骨が形成され、組織学的にもこれまでの多くの報告に準じた経過が得られた。

組織学的には延長終了後早期より両側断端付近において盛んな骨増生が観察され、経時的に新生骨が伸長し延長終了後28日目群では延長部は骨梁で満たされ周囲の母骨と大差ない程度まで進行していた。これは肉眼的所見およびX線所見ともほぼ一致するものであった。

骨増生が盛んな部位すなわち新生骨の先端部は延長終了後7日目群までは組織学的に類似した所見を呈した。具体的には両側の母骨から延長部に向かって線維骨が伸び、ゆるやかに線維組織へと移行しており、この移行部は経時的に延長部中央へ移動していった。すなわち延長方向に一致して密に走行する線維組織から、膠原線維を多く含んだ線維骨が順次延長部中央に向かって形成されていき、海綿骨への成熟がそれを追いかけるという所見が認められた。骨の形成様式は膜性骨化(intramembranous ossification)が主体であるが、軟骨性骨化(endochondral ossification)を示す部位も多く認められた。これは顎骨延長における過去の報告^{25)~27)}と同様であった。延長終了後14日目群、28日目群となるにつれ新生骨の形成は停滞していく傾向を示し、特に軟骨性骨化は比較的早期に停滞する傾向にあった。

通常、成長過程における骨の形成様式は顎骨のような不規則形の骨と大腿骨など四肢の長管骨とでは異なるとされているが²⁷⁾、骨延長の場合、長管骨においても延長部の骨形成様式は膜

性骨化と軟骨性骨化の両方がみられるとされており²⁸⁾²⁹⁾、これは顎骨においても基本的には同様と考えられた。いずれの様式においても結局、骨芽細胞の存在なくして骨形成は起こり得ないが³⁰⁾、Yasuiら²⁸⁾はラット大腿骨の延長時に、これら2種類の様式の他に軟骨細胞が直接、骨と軟骨の中間的構造物をまず形成するという第3の様式が見られるとして、これをtranschondroid bone formationと呼称した。

またLiら³¹⁾もウサギ大腿骨において、部位によっては軟骨が骨芽細胞を介在せずに直接骨小柱に変化することがあると報告している。このように骨延長法では、通常生体にはみられない独特の骨形成過程をたどる考え方もあり、顎骨においても同様と思われるが今後詳細な検討が必要であると考えられる。

BMPはUrist³²⁾が初めて報告したように、強力な骨誘導活性を持ち、異所性骨誘導能を有するサイトカイン(成長因子)であることが知られている。発生の過程で将来骨が形成される領域において発現がみられることや、骨折の修復過程における発現も確認されていることから³³⁾、BMPは骨組織の新生や再生が必要な部位に特異的に発現し、骨形成の誘導に深く関与していることが強く示唆されている。具体的には全身の発生および再生において走化性、細胞増殖および分化の各段階を調節するとされている³⁴⁾。

これらの事実から、骨の欠損や損傷の生じた部位において、BMPを使用すれば骨の再生を惹起あるいは促進させることができると考えられ、精製されたBMPを臨床的に局部応用するためにさまざまな試みがなされてきた。Wozney³⁵⁾らによって初めてBMPの構造が明らかにされて以来、各種BMPをコードする遺伝子をクローニングすることが次々と可能になり、複数の組換えヒトBMP(rhBMP)が作製されるようになった。これらは臨床応用を考えた場合、動物から抽出、部分精製されたBMPに比べ安全性や生産性、成分の安定性などの面で有利と考えられる。またBMPを用いて臨床的に安定した骨形成を効率よく得るために、BMPを目的とする局所にとどめ、なおかつ適当な速度で拡散させるためのキャリア(担体)の存在が不可欠であるが、充分な安全性、操作性、強度などを備えたものを開発すべく多くの研究がなされ、成果を上げてきている。

このようにBMPは臨床応用に向けて着々と歩を進めており、特に骨折部および骨欠損部の修復、再生を必要とする歯科・口腔外科、整形外科の領域ではその可能性が大いに注目を集めている。これらの領域で盛んに行われるようになった骨延長法は人為的に骨折、骨欠損を作製する方法であるが、本法においても骨再生のプロセスにおいてBMPが密接に関連していると考えられ、将来的に局所応用も期待されることから今回、骨延長法におけるBMP発現について観察を行った。

BMPは現在までに多くの種類が単離されており、各々のrhBMPはそれぞれに固有の活性を持つが、中でもrhBMP-2は最も骨誘導活性が強く³⁶⁾、臨床応用が期待されていることから特に今回はBMP-2についての免疫組織学的検索を行うこととした。その結果、形態的、X線学的あるいは組織学的にみて骨増生が盛んな時期にほぼ一致してBMP-2の多量の発現が確認され、陽性細胞も多く存在し、逆に骨増生が停滞する時期にはBMP-2も消退傾向を示す所見が得られた。また、成熟した細胞には陽性細胞は比較的少なく、比較的幼若で分化度が低いとみられる細胞のほうが多く陽性であった。

前述のようにBMPは異所性の骨誘導活性を有し、骨の発生

部位や骨折部位において発現がみられることは知られているが、骨延長法においてもこれまでに下肢骨で特異的発現が確認されている^{6)~10)}。Rauchら⁹⁾は家兎径骨において、BMP-2, -4, および-7は骨延長の期間を通して、成熟した骨芽細胞よりも骨芽細胞や軟骨細胞の前駆的細胞あるいは線維芽細胞様細胞等、分化度の低い細胞に特異的に認められる傾向にあるとしている。また分子生物学的には、Liら⁶⁾は同じく家兎径骨において、BMP-4のmRNAは低分化の細胞に多く認められ、完全に分化した骨芽細胞にはみられないとして、さらにSatoら⁷⁾も家兎大腿骨においてBMP-2および-4のmRNAについても同様の結果を報告している。BMPは未分化な間葉系細胞を骨芽細胞や軟骨細胞へ分化させる分化誘導・促進因子であると考えられている²⁷⁾、これらの報告はこの仮説に矛盾しない。そもそもBMPは皮下や筋組織などに移植した場合、骨形成細胞が存在しないにもかかわらず骨を誘導するが³²⁾、この事実はBMPの標的細胞が骨形成細胞ではなく、これに分化しうる前駆的細胞であることを示唆している。また骨髄や骨膜には骨芽細胞様の前駆細胞が存在することや^{38)~40)}、延長部の線維組織には骨形成細胞に分化される未分化細胞が存在すること⁴¹⁾⁴²⁾が明らかであることから、骨延長においては速やかにこれらの細胞が分化し、骨形成が開始されると考えられる。

今回下顎骨延長においても特異的な発現が認められ、特に比較的低分化とみられる細胞が多く陽性であったことから、下顎骨においても四肢長管骨と同様に、延長部に骨形成が誘導されるためにはBMP-2の存在が不可欠であり、当初は骨形成細胞の乏しい延長部において、BMP-2は骨芽細胞や軟骨細胞を誘導し、骨形成を促進する上で重要な役割をもつであろうと推察される。

すなわち、元来骨基質中に存在するBMP-2は、延長中・延長後を通して骨増生が盛んな時期に、その先端部において濃縮されて発現し、母骨の骨髄等に存在する未分化な前駆的細胞がこれを取り込み、骨形成細胞つまり骨芽細胞や軟骨細胞への分化が盛んに誘導・促進されるのであろう。よって分化途上の幼若な細胞あるいは若い骨形成細胞の多くがBMP-2陽性を示すが、次第に誘導が抑制されていくため新たな細胞数が減少し比較的古い、成熟した細胞のみが残るため陽性率も低下していくと考えられる。

以上のように、もともと生体中に存在するBMP-2が延長部における骨形成を誘導・促進する働きを持つのであれば、他分野と同様にBMP-2を何らかの担体を介して延長部に適用することで骨形成細胞への分化が人為的に促進され、骨形成の活発化が得られる可能性も高いと考えられる。実際、Liら⁴³⁾は家兎径骨において、BMP-2を延長部に埋入し明らかな効果があったとしており、顎面骨においてもKimら⁴⁴⁾がイヌ下顎骨の延長部に適用し著明な効果が得られたとしている。将来、臨床的に治療期間の短縮、患者の負担軽減が得られることも考えられ、骨延長法の、ひいては歯科・口腔外科治療法の発展に資するところが大きいと期待される。

今回の実験では骨形成細胞の増殖能を観察する目的でPCNAに対する免疫染色も行った。PCNAは近年、悪性腫瘍組織の増殖能を客観的に評価する目的を中心に広く応用されており、骨についても骨折後の修復過程において特異的に発現することなどが知られている⁴⁵⁾。これはDNA合成酵素であるDNAポリメラーゼδ活性発現を司る蛋白であり、細胞周期のG₁期にはほ

とんど認められないが、G₁後期に核小体を中心に発現し、S期には核全体に認められ、それ以降は消失すると報告されている⁴⁶⁾。

Choiら⁴⁷⁾はラット径骨において延長中、延長後を通して検索を行った結果、PCNA陽性細胞率は延長開始直後が最も高く、ごく早期より未分化細胞が盛んに分裂・増殖し始めることを示唆している。本実験では、延長終了後1日目群から高い陽性細胞率を示し、3日目群でピークを迎える7日目群までは比較的高値を示したが、14日目群になると著しく低下した。また多く陽性であったのは分化度が比較的低いと思われる細胞であった。今回、延長中の検索は行っていないが、早期に陽性細胞率が高いという点で同様の結果が得られた。この結果より、骨増生の先端部においては早期より骨形成細胞の前駆的細胞が旺盛な増殖能を有し活発に分裂・増殖するが、延長部が新生骨で満たされてきて新たな骨増生が不要になってくると細胞の増殖が急速に抑えられると推察された。

BMP-2は細胞の分化だけではなく、細胞増殖の調節能をも有すると考えられている³⁴⁾。すなわちBMP-2は、骨形成の必要な部位において骨形成細胞への分化を誘導・促進するのみならず、未分化細胞の増殖を促進するという役割を持つと考えられ、本実験でもPCNAの発現は時期的におおむねBMP-2の発現状況に類似していたことから、延長部における細胞の増殖能についてBMP-2が密接に関与していることが十分考えられた。しかし詳細に見ると、陽性細胞率がピークを迎えるのはBMP-2が延長後7日目群であるのに対し、PCNAは3日目群と一足早かった。すなわちBMP-2発現のピークは細胞増殖の最盛期よりもやや遅れて発現するということであり、これはBMP-2が未分化細胞の増殖を誘導する段階よりも、その後の段階すなわちそれらの骨形成細胞への分化を誘導する際に多く必要とされることを示唆している。骨延長においては成長や骨折の治癒過程における骨形成とは異なり、もともと存在する骨形成細胞が乏しいと思われ、未分化な細胞を骨芽細胞などに分化させることができが急務と考えされることから、このことが骨延長におけるBMP-2の最も重要な役割であると考えられた。

結論

顎面骨延長後の骨形成過程における経時的变化を観察する目的で、家兎の下顎骨延長を行い肉眼的、X線学的ならびに組織学的、免疫組織化学的に観察した結果、以下の所見が得られた。

1. 肉眼的には、延長後1日目では延長部は周囲の母骨とは明らかに異なる軟らかい組織で満たされているが、3日目以降は時間の経過に伴い両側断端から硬い白色の新生骨が伸び14日目でほぼ連続、28日目になると表面は滑沢で母骨に近い状態となった。なお実測により、全ての群において7mm前後の延長量が得られていることを確認した。

2. X線学的には、骨透過性や母骨との相違などに基づいて1~5点のスコアを作成し評価した。延長後1日目では延長部のほとんどが透過像を示しておりスコア上は1点または2点であったが、3日目では両側断端より仮骨の伸長が確認され2点あるいは3点となった。7日目で仮骨はほぼ連続し3点、14日目になると不透過性が亢進し母骨とほぼ同等となり4点と評価されるものが主体となった。28日目では皮質骨も確認され、すべてが5点と評価され延長部は両側の母骨とほとんど見分けがつかない状態となっていた。

かなくなつた。

3. 組織学的には、延長部には早期より牽引方向に一致して密に線維組織が走行しており、延長後1日目では新生骨は乏しいが、3日目以降は時間の経過とともに断端部より同方向に骨増生が進行し、28日目では延長部は新生骨の骨梁で満たされ周囲骨との境界は不明瞭となった。また延長後7日目までは膜性骨化と軟骨性骨化とともに盛んであったが、14日目以降では軟骨性骨化が先に停滞する傾向にあった。

4. 免疫組織化学的には、BMP-2は延長後早期より延長部、特に断端部付近の骨髓腔への発現がみられた。濃染される部位は常に骨増生の先端部であり経過に伴い延長部中央へ向け移動していくが、延長後14日目になるとこのような部位はみられなくなった。陽性細胞率は延長後1日目より20%以上の高値を示し、7日目で $25.98 \pm 7.97\%$ とピークに達するが、14日目以降は急速に低下し、新生骨の完成にともないBMP-2は漸次消失傾向にあることが示唆された。またPCNAについても延長後1日目より高い陽性細胞率を示し3日目で $15.40 \pm 4.28\%$ とピークに達するが、14日目以降になると急速に低下し、骨形成が進むにつれ細胞の増殖も停滞傾向にあることが示唆された。

以上の結果から、家兎下顎骨延長においてBMP-2は延長早期より特異的に発現し、延長部に骨形成が誘導されるためにきわめて重要な役割を持つことが示唆された。すなわち、延長部付近に存在する未分化な細胞が増殖し、なおかつこれらが骨芽細胞や軟骨細胞といった骨形成細胞へ分化するためにはBMP-2によって誘導されることが不可欠であり、また肉眼的あるいはX線学的、組織学的に骨形成が進行するに従い、BMP-2は消退に向かい新たな細胞の分化・増殖が抑えられ骨形成が収束していくものと考えられた。

謝 詞

稿を終えるあたり、終始御懇意なる御指導、御校閲を賜りました恩師山本悦秀教授に深甚の謝意を捧げるとともに、直接御指導を頂きました当講座の中川清昌助教授、上木耕一郎博士に厚く御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり多大な御協力を頂きました当講座の高橋大輔博士はじめ医局員各位に感謝の意を表します。さらに抗BMP-2モノクローナル抗体を御提供下さいました山之内製薬株式会社に感謝致します。

本研究の一部は第46回日本口腔外科学会総会(2001年10月、鹿児島)において発表した。

文 献

- 1) Ilizarov GA. 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
- 2) Ilizarov GA. 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
- 3) Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop* 250: 8-26, 1990
- 4) Snyder CC, Levin GA, Swanson HM, Brown Jr EZ. Mandibular lengthening by gradual distraction: Preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 51: 506-508, 19735
- 5) McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH. Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 89: 1-8, 1992
- 6) Li G, Berven S, Simpson H, Triffitt JT. Expression of BMP-4 mRNA during distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop Scand* 69: 420-425, 1998
- 7) Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Yasui N. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 14: 1084-1095, 1999
- 8) Nomura S, Takano-Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19: 91-96, 2000
- 9) Rauch F, Lauzier D, Croteau S, Travers R, Glorieux FH, Hamdy R. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 26: 611-617, 2000
- 10) Radomisli TE, Moore DC, Barrach HJ, Keeping HS, Ehrlich MG. Weight-bearing alters the expression of collagen types I and II, BMP 2/4 and osteocalcin in the early stages of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 19: 1049-1056, 2001
- 11) Yates KE, Troulis MJ, Kaban LB, Glowacki J. IGF-I, TGF-beta, and BMP-4 are expressed during distraction osteogenesis of the pig mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31: 173-178, 2002
- 12) 小室裕造, 高戸毅, 波利井清紀, 米原啓之. 顎面骨骨延長に関する実験的研究: 第1報 形態学的および組織学的検討. *日形会誌* 13: 19-28, 1993
- 13) 高倉公朋, 土肥健純監修. 外科手術のためのNIH Image -3次元医用画像処理入門-. 第1刷, 中山書店, 東京, 1996
- 14) Cope JB, Samchukov ML. Mineralization dynamics of regenerate bone during mandibular osteodistraction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30: 234-242, 2001
- 15) 高戸毅, 江口智明. 仮骨延長法の顎顔面領域への応用. 顎骨延長術の臨床応用(伊藤学而, 上田実, 高戸毅編), 第1版, 16-24頁, ケインテッセンス出版, 東京, 1999
- 16) 萩野浩子. 仮骨延長が関連組織に及ぼす影響. 顎骨延長術の臨床応用(伊藤学而, 上田実, 高戸毅編), 第1版, 47-50頁, ケインテッセンス出版, 東京, 1999
- 17) Molina F, Monasterio FO. Mandibular elongation and remodeling by distraction: A farewell to major osteotomies. *Plast Reconstr Surg* 96: 825-840, 1995
- 18) Rachmiel A, Jackson IT, Potparic Z, Laufer D. Midface advancement in sheep by gradual distraction: A 1-year follow-up study. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 525-529, 1995
- 19) Betts NJ, Vanarsdall RL, Barber HD, Higgins-Barber K, Fonseca RJ. Diagnosis and treatment of transverse maxillary deficiency. *Int J Adult Orthodont Orthognath Surg* 10: 75-96, 1995
- 20) Tavakoli K, Walsh WR, Bonar F, Smart R, Wulf S, Poole MD. The role of latency in mandibular osteodistraction. *J Craniomaxillofac Surg* 26: 209-219, 1998
- 21) White SH, Kenwright J. The timing of distraction of an osteotomy. *J Bone Joint Surg Br* 72: 356-361, 1990(22) White SH, Kenwright J. The importance of delay in distraction of osteotomies. *Ortho Clin North Am* 22: 569-579, 1991
- 23) Stewart KJ, Lvoff GO, White SA, Bonar SF, Walsh WR, Smart RC, Poole MD. Mandibular distraction osteogenesis: a comparison of distraction rates in the rabbit model. *J Craniomaxillofac Surg* 26: 43-49, 1998

- 24) Al Ruhaimi KA. Comparison of different distraction rates in the mandible: an experimental investigation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30: 220-227, 2001
- 25) Komuro Y, Takato T, Harii K, Yonehara Y. The histological analysis of distraction osteogenesis of the mandible in rabbits. *Plast Reconstr Surg* 94: 152-159, 1994
- 26) Sawaki Y, Ohkubo H, Hibi H, Ueda M. Mandibular lengthening by intraoral distraction using osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11: 186-193, 1996
- 27) Yamamoto H, Sawaki Y, Ohkubo H, Ueda M. Maxillary advancement by distraction osteogenesis using osseointegrated implants. *J Craniomaxillofac Surg* 25: 186-191, 1997
- 28) Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg* 79B: 824-830, 1997
- 29) Jazrawi LM, Majeska RJ, Klein ML, Kagel E, Stromberg L, Einhorn TA. Bone and cartilage formation in an experimental model of distraction osteogenesis. *J Orthop Trauma* 12: 111-116, 1998
- 30) 藤田尚男, 藤田恒夫. 標準組織学総論, 第3版, 173-176頁, 医学書院, 東京, 1993
- 31) Li G, Simpson AH, Triffitt JT. The role of chondrocytes in intramembranous and endochondral ossification during distraction osteogenesis in the rabbit. *Calcif Tissue Int* 64: 310-317, 1999
- 32) Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965
- 33) Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9: 651-659, 1993
- 34) Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotech* 16: 247-252, 1998
- 35) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534, 1988
- 36) Wozney JM. The Bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32: 160-167, 1992
- 37) 片桐岳信, 山口 朗, 田中晴雄, 大村 智, 須田立雄. 骨形成と BMP. 蛋白質核酸酵素 38: 37-49, 1993
- 38) Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BL. Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 106: 441-450, 1988
- 39) Weinreb M, Shinar D, Rodan GA. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 5: 831-842, 1990
- 40) Ikeda T, Nomura S, Yamaguchi A, Suda T, Yoshiki S. In situ hybridization of bone matrix proteins in undecalcified adult rat bone sections. *J Histochem Cytochem* 40: 1079-1088, 1992
- 41) Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S. Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J Bone Joint Surg* 70B: 543-549, 1988
- 42) Delloye C, Delefortie G, Courtelier, Vincent A. Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clin Orthop* 250: 43-42, 1990
- 43) Li G, Bouxsein ML, Luppen C, Li XJ, Wood M, Seeherman HJ, Wozney JM, Simpson H. Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 20: 779-788, 2002
- 44) Kim IS, Park JW, Kwon IC, Baik BS, Cho BC. Role of BMP, beta1g-h3, and chitosan in early bony consolidation in distraction osteogenesis in a dog model. *Plast Reconstr Surg* 109: 1966-1977, 2002
- 45) Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H, Imamura Y, Fukuda M. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *Eur J Histochem* 44: 269-278, 2000
- 46) Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 154: 1899-1909, 1981
- 47) Choi IH, Shim JS, Seong SC, Lee MC, Song KY, Park SC, Chung CY, Cho TJ, Lee DY. Effect of the distraction rate on the activity of the osteoblast lineage in distraction osteogenesis of rat's tibia. *Bull Hosp Jt Dis* 56: 34-40, 1997

Experimental study of mandibular distraction osteogenesis in rabbits ; the relation between osteogenesis and the expression of bone morphogenetic protein Kohei Marukawa, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 111, 240 — 255 (2002)

Key words distraction osteogenesis, bone morphogenetic protein, rabbit mandible, maxillofacial skeleton

Abstract

Recently, distraction osteogenesis is becoming a widely applied maxillofacial treatment. The purpose of this study was to observe what changes after distraction of the rabbit mandible, and to examine the relation between the process of osteogenesis and the appearance of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). Japanese white rabbits were used in this study. An original design device was fixed on the mandible after osteotomy, distraction was performed at a rate of 1mm per day, for 10 days. Experimental groups were sacrificed at 1, 3, 7, 14, and 28 days after the distraction finished, to give different consolidation periods. The gap between the anterior and posterior segments was filled with a soft tissue differing from original bone immediately after distraction. This gap was gradually replaced by regenerated bone, and finally the surface of this area became as smooth as the original bone after 28 days. In all groups, a similar amount of lengthening was obtained and there was also significant difference in the mandibular length between the right and left (operated) side ($P<0.05$). Radiographically, the distraction gap was radiolucent immediately after distraction. However, radio-opaque areas started to be found after 3 days, and finally the border between the original bone and the newly formed bone could not be identified after 28 days. Histological sections were stained with H-E. In the early period after distraction, the distraction gap was occupied with a fibrous tissue. New bone formation progressed and the fibrous tissue was gradually replaced by regenerated bone. Finally, the gap could not be recognized at all after 28 days. In addition, intramembranous ossification and endochondral ossification were both observed after 1, 3, and 7 days. Immuno-histochemical sections were stained with BMP-2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and the ratio of positively stained cells was calculated. Both BMP-2 and PCNA appeared specifically at the edge of the osteogenesis site in the early period after distraction, but they tended to disappear after 14 days. At 1, 3, 7, and 14 days after distraction, the ratio of positively stained cells was significantly higher than that of control group, but after that dropped to almost same extent as that of control group ($P<0.05$). This result suggests that BMP-2 plays an important role in the induction of bone formation following the process of distraction osteogenesis of the mandible.