

学位論文題名

歯周治療への Bone Morphogenetic Protein (BMP)  
の応用に関する研究

—リコンビナント BMP 配合コラーゲン膜による骨形成の観察—

学位論文内容の要旨

緒言

歯周炎により失われた組織を再生回復することは歯周治療学の大きな目標であり、近年 guided tissue regeneration 法 (GTR 法) などの再生療法が試みられるようになってきている。しかし、これらは 2、3 壁性の骨欠損や軽度の根分岐部病変など狭い範囲の骨欠損に適応症が限られ、1 壁性や水平性など広範囲な骨吸収では、有効な治療法は確立されていない。

このため当講座では、骨基質中に微量に存在し、未分化間葉細胞に作用し骨組織を誘導する成長分化因子である bone morphogenetic protein (BMP) を、高度な骨欠損の治療に応用するため研究を行ってきた。しかしこれまで研究に用いてきた BMP は、ウシ骨基質より抽出し部分精製したものであり、安全性や供給性の点で問題があると考えられる。そこで筆者は、最近作製が可能となったリコンビナントヒト BMP (rhBMP) に着目し、これを歯周治療に応用することを考えた。この rhBMP は、遺伝子工学的に合成された単一のヒト BMP であり、部分精製 BMP に比較し、安全性や成分の安定性の点でも優れ、多くの研究者の注目を集めている。中でも rhBMP-2 は、*in vivo* において他の rhBMP-4 や rhBMP-5 に比べ高い骨誘導活性を持つことより、臨床応用性が高いと思われる。

一方 BMP により骨を再生させるには、BMP を目的の部位にとどめ、なおかつ適当な速さで拡散させる担体が必要である。現在、

rhBMP-2の担体として骨不溶性基質(IBM)が報告されているが、IBMは異種や同種の骨基質を材料とするため、安全性や供給性に問題がある上、顆粒状であるため1壁性や水平性の骨欠損への移植操作が難しい。そこでIBMにかわる歯周治療に適した新しい担体として、当講座と本学生化学講座がGTR法に応用する目的で開発した強化コラーゲン線維膜(FCM)を改良して用いることを考えた。

本研究は、歯周病により破壊された1壁性や水平性などの高度な骨欠損の再生療法に、安全性や供給性に優れたrhBMP-2を応用する目的で、担体としてFCMを用いた場合の有効性を検討するために、成体ラットに移植実験を行い、病理組織学な観察を行った。

## 実験 I

歯周病が成人に多いことから、実験動物は成熟した12週令ウィスター系の雄性ラット(平均体重390g)20匹を用い、実験部位は、従来BMPの骨誘導活性の検定に用いてきた背部皮下と、臨床での使用条件に近い口蓋部骨膜下の2部位とした。FCMはウシ真皮由来のテロペプチドを除去したコラーゲンを材料とし、従来の調製方法をもとに新たに操作性を向上させたものを作製し、FCM3と名付けて用いた。実験には、このFCM3を0.5mm×4.0mm(平均重量150 $\mu$ g)の大きさに裁断し、山之内製薬株式会社より提供をうけたrhBMP-2を0.5、1.0、2.0 $\mu$ g配合して用いた。観察期間は、3週間と6週間とした。実験期間終了後、通法に従い固定、パラフィン包埋を行った後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン重染色後、光学顕微鏡による観察を行った。

その結果、背部皮下では移植後3週でいずれの濃度でも骨の形成は観察されなかった。一方口蓋部では、移植後3週でrhBMP-2を1.0 $\mu$ g配合した群で骨形成が観察された。2.0 $\mu$ g配合群では、担体であるコラーゲン膜を囲み母骨と連続した骨の形成が観察された。さらに両者とも、一部に担体であるFCM3のコラーゲン線維を基質として直接骨が形成されていると思われる所見が観察された。移植後6週では1.0 $\mu$ g、2.0 $\mu$ gの両者ともさらに骨の形成が著明となった。担体であるコラーゲン膜は中央部に少量残存していたが、周

囲は厚い緻密な骨により囲まれていた。炎症反応は非常に少なかった。また軟骨の形成は全ての標本で観察されなかった。

## 実験 II

次に口蓋部における rhBMP-2 による骨形成の経時変化を知る目的で、硬組織ラベル法による観察を行った。

実験動物には実験 1 と同様の 12 週令 ウィスター系雄性ラットを 5 匹用い、観察期間は 3 週間とした。ラベリングは、移植 1 週目にテトラサイクリン塩酸塩 (Tc)、3 週目にカルセイン (CaI) を腹腔内に投与して行った。実験期間終了後、通報に従い非脱灰標本を作製し、落射型蛍光顕微鏡を用いて観察した。

その結果、rhBMP-2 配合群では、担体は母骨と連続した新生骨により覆われ、Tc による黄色の蛍光が同新生骨の粘膜側に多量に観察された。CaI による蛍光は、直接担体に接する部分や、担体の内部で観察されたが、その量は Tc に比べ少なかった。このことより、rhBMP-2 の作用による骨形成は移植後 1 週目頃より活発となること、3 週目までには担体は新生骨に覆われるが、この期間の骨形成は主に担体外部でおこり、その後は担体内部へと進んでゆくことが示唆された。

## 考察

今回、移植 3 週後に、背部では骨形成がみられなかったが、口蓋部では rhBMP-2 を  $1.0 \mu\text{g}$  以上配合した群で骨の形成が観察された。骨形成を起こすためには、背部皮下ではまず未分化な間葉細胞を骨芽細胞に誘導する必要があるが、口蓋部では移植体の周囲に存在する骨芽細胞やその前駆細胞に rhBMP-2 が直接作用し、骨を形成させたと考えられる。実際の臨床で BMP を応用する場合、背部皮下のような異所的な部位ではなく、歯周病により生じた歯槽骨欠損部が対象となる。本実験においてこれに類似した成体ラットの口蓋部で、早期より担体周囲に骨が形成され、その後担体内部も骨形成が進み全体が骨と一体化すること、さらに実験中、強い炎症反応や異常な反応がみられなかったことから、rhBMP-2 と FCM3 の組み合わせは、

歯周病による水平性骨吸収や1壁性骨吸収部の骨の再生に有効である可能性が高いと考えられる。

また、FCM3を担体とした本実験では、軟骨の形成が観察されず、担体であるFCM3と母骨が接する部分では担体のコラーゲン線維を基質として直接骨が形成されているような所見が得られた。これまでrhBMP-2の担体にIBMを用いた場合、軟骨性の骨化がおけると報告されているが、本実験の観察結果からrhBMP-2が誘導する骨化の過程は、用いる担体に大きく影響されることが示唆された。

### 結論

今回、歯周組織の再生療法にrhBMP-2を応用することを目的として、FCM3を担体として成体ラットの背部皮下と口蓋部骨膜下に移植し、病理組織学的に観察した。その結果、

- 1) 背部皮下では、移植後3週で骨の形成が観察されなかった。
- 2) 口蓋部では、移植後3週でFCM3 (平均重量150  $\mu$ g) にrhBMP-2を1.0  $\mu$ gと2.0  $\mu$ gの濃度で配合した群で骨の形成が観察された。またその過程は、移植後1週目頃より膜の周囲に母骨と連続して新生骨が形成され、3週で担体を覆い、6週では担体内部も骨化し母骨とほぼ一体化していた。
- 3) 実験中、強い炎症反応や異常な反応がみられず、rhBMP-2とFCM3の安全性は高いと思われた。

以上の結果と、実際の歯周治療では背部皮下のように異所的な環境ではなく、口蓋部のように付近に骨組織が存在する環境でBMPを用いることから、1壁性や水平性など広範囲な骨欠損を伴う歯周疾患の治療に、FCM3を担体としてrhBMP-2を応用できる可能性が高いと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙  
副 査 教 授 雨 宮 璋  
副 査 教 授 久 保 木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

## 歯周治療への Bone Morphogenetic Protein (BMP) の応用に関する研究

—リコンビナント BMP 配合コラーゲン膜による骨形成の観察—

審査は、主査および副査全員の出席のもとに、論文提出者に対し、口頭試問により論文の内容と関連した学科について行われた。

歯周炎により失われた組織を再生することは歯周治療の大きな目標であり、近年guided tissue regeneration法(GTR法)が試みられるようになってきている。しかし、これらは2、3壁性の骨欠損や軽度の根分岐部病変など狭い範囲の骨欠損に適応が限られ、1壁性や水平性など広範囲な骨吸収では、有効な治療法は確立されていない。このため、骨基質中に微量に存在し未分化間葉細胞に作用し骨組織を誘導する成長分化因子であるbone morphogenetic protein (BMP)を応用することを考えた。しかしこれまで研究に用いられたBMPは、ウシ骨基質より抽出し部分精製したもので、安全性や供給性の点で問題があることから、リコンビナントヒトBMP(rhBMP)に着目し、これを歯周治療に応用することを考えた。

一方BMPにより骨を再生させるには、BMPを目的の部位にとどめ、なおかつ適当な速さで拡散させる担体が必要である。現在、rhBMP-2の担体として骨不溶性基質(IBM)が報告されているが、IBMは異種や同種の骨基質を材料とするため、安全性や供給性に問

題がある上、顆粒状であるため1壁性や水平性の骨欠損への移植操作が難しい。

そこで本研究では、IBMにかわる歯周治療に適した新しい担体として、GTR法に応用する目的で開発した強化コラーゲン線維膜(FCM3)に着目し、その有効性を検討するため、成体ラットに移植実験を行い、病理組織学的な観察を行った。

実験動物には、12週令Wistar系雄性ラットを用い、ウシ真皮より抽出しテロペプチドを除去したコラーゲンより作製したFCM3を担体として、山之内製薬(株)より提供をうけたrhBMP-2を含浸させ移植を行った。

実験1として、背部皮下および口蓋部骨膜下にrhBMP-2を0.5、1.0、2.0 $\mu$ gを配合したFCMを移植し、3、6週間後に観察を行った。

実験2としてrhBMP-2を2.0 $\mu$ gを配合したFCM3を口蓋部に移植後、1週目にテトラサイクリン(Tc)、3週目にカルセイン(Cal)による硬組織ラベルを行い、3週後に観察を行った。

その結果、移植3週後、背部皮下では、どの濃度においても骨の形成は観察されなかった。一方口蓋部では、rhBMP-2を1.0 $\mu$ g配合したものに骨の形成が観察され、2.0 $\mu$ g配合のものでは、母床骨と連続し残存するコラーゲン膜を囲むような骨形成が観察された。また担体のコラーゲン線維と連続して骨が形成されている像も観察された。6週後には、新生骨が残存するコラーゲン膜を囲み、より緻密になり母骨とほぼ一体化していた。炎症反応は非常に少なかった。硬組織ラベル法による経時的な観察では、担体周囲に形成された骨の外側、特に口蓋粘膜側にTcによる蛍光が多く、内側すなわちコラーゲン膜側にCalによる蛍光が観察された。

骨形成を起こすためには、背部皮下ではまず未分化な間葉細胞を骨芽細胞に誘導する必要があるが、口蓋部骨膜下には骨芽細胞やその前駆細胞にrhBMP-2が直接作用し、骨が多く形成されたと考えられる。実際の臨床でBMPを応用する場合、歯周病により生じた水平性の骨欠損部などが対象となる。本実験においてこれに類似した成体ラットの口蓋部で、早期より担体周囲に骨が形成され、その後担体内部にも骨形成が進み全体が骨と一体化すること、さらに実験中、強い炎症反応や異常な反応がみ

られなかったことから、rhBMP-2とFCM3の組み合わせは、歯周病による水平性骨吸収や1壁性骨吸収部の骨の再生に有効である可能性が高いと考えられた。

また、これまでrhBMP-2の担体にIBMを用いた場合、軟骨性の骨化がおこると報告されているが、本実験では軟骨の形成が観察されず、担体であるFCM3と母骨が接する部分では担体のコラーゲン線維上に直接骨が形成されているような所見が得られたことから、rhBMP-2が誘導する骨化の過程は、用いる担体に大きく影響されることも示唆された。

本論文に対して、主査ならびに副査から本論文提出者に対しその概要について説明を求め、次いで本研究の内容ならびに関連のある質問が行われた。これらの試問に関して適切な回答が得られ、また、将来における本研究の発展の可能性についても明確な展望が得られた。本研究は、rhBMP-2の担体としてIBM以外のものを用いて、*in vivo*で骨の形成に成功した最初の研究である点も高く評価され、また歯科医学の発展に十分貢献するものであり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。