

学位論文題名

Bone Morphogenetic Protein (BMP) による
水平性骨欠損部の再生療法の研究

学位論文内容の要旨

緒言

歯周炎により破壊された歯周組織の再生療法として、GTR法が行われてきている。しかし現在行われているGTR法は全ての症例に有効なわけではなく、水平性骨欠損の場合、歯周組織の再生、なかでも歯槽骨の再生はほとんど期待できないのが現状である。

Uristが1965年に骨を誘導形成する成長分化因子であるBMP(bone morphogenetic protein)を発見して以来、臨床応用を目指し研究が行われてきている。BMPを応用する場合、局所でBMPを効率良く作用させるための担体が必要である。当教室ではBMPを歯周治療に応用する場合の担体としてアテロコラーゲンを膜状に加工したコラーゲン膜(FCM)を研究してきている。しかしこれまで松本、伊藤らが用いたFCM1は移植時に血液などを吸収すると軟化し、移植操作が行いずらくなり、骨形成量にばらつきが生じ、安定した成果が得られない欠点があった。そこでBMPの担体としてより優れたコラーゲン膜の開発が必要であると考えられた。

一方、BMPの研究にはラットが用いられてきたが、ラットの歯と歯周組織は小さく骨欠損の作製やBMPにより誘導された新生骨と歯根との間にどのような付着形式が生じるかを正確に評価することが困難と思われる。そこで、より大型動物を用いて水平性骨欠損部を作製しBMPへの移植実験を行い、BMPにより新生された骨と根面との間の付着の様相を明確にする必要があると考えられる。

本研究は、BMPを水平性骨欠損をともなう歯周組織破壊の再生療法に応用することを大きな目的として、まず担体の改良を試みるとともに、ネコに水平性骨欠損を作製し、BMP配合コラーゲン膜を移植し病理組織学的な観察を行った。

実験1：改良FCM1の作製とBMPの担体としての有効性の検討

コラーゲン膜の作製は熱田らの方法に従い、手術時の操作性を向上させるため中性透析外液の緩衝液を塩酸トリス緩衝液から、リン酸緩衝液に変更した。その結果、移植操作時に血液等を吸収して軟化する欠点は改善された。そこでこれを改良FCM1と呼び、BMPの担体としての有効性を検討した。実験動物には5週齢ウィスター系雄性ラット3匹を用い、移植部位は背部皮下4部位、計12部位としこれを実験群、比較群、対照群の3群に区分した。BMPはKubokiらの方法を用いてS300BMPを精製し、実験群は改良FCM1(平均重量0.5mg)にBMPを0.1、0.3、0.5、0.7mg配合し移植した。比較群はIBM(不溶性骨基質)にS300BMPを0.3mg配合し移植し、対照群はBMPを含まない改良FCM1を移植した。移植2週後に移植材を一塊として摘出し、軟X線写真を撮影し比較検討した。

その結果、対照群ではX線不透過性の高い部分は見られなかった。一方、実験群と比較群では全てに不透過性の高い部分が見られ、異所性骨形成が生じていると判定された。

実験2：ネコ犬歯頬側の水平性骨欠損部への移植実験

ネコにBMPを移植して骨を誘導する場合、ラットに比べ多量のBMPを必要と考えられるが、実験1で用いたS300BMPはBMP以外の蛋白質も多く含み、担体であるコラーゲン膜0.2mgに1.5mg以上配合できなかった。そこでBMP精製時に高濃度化を行い、これを高濃度BMPと呼び実験に用いることとした。実験動物には雄性成ネコ2匹(4.3、4.7Kg)を用い、実験部位は上下顎犬歯の頬側(8部位)とした。これを3群に分け、実験群は改良FCM1(2mm×4mm)にS300BMPを0.5、1.5mgおよび高濃度BMPを0.5、1.0mg配合し移植し、対照群はBMPを含まない改良FCM1を移植し、非

移植群は移植せず手術のみを行った。骨欠損の作製は、犬歯頰側の歯肉骨膜弁を翻転し、頰側の歯槽骨を垂直方向には骨頂より根尖方向に4mm、近遠心方向には前歯隣在歯と前臼歯の隣接面に及ぶ幅4mmを削除して犬歯頰側に水平性の骨欠損を作製した。根面のセメント質を除去した後、欠損底部の根面にノッチを付与した。長さ4mm幅2mmの移植材を頰側の中央に置き、近遠心側は隣接面の歯槽骨から各々1mm離し、根尖側は移植材が残存歯槽骨面を2mm覆い、歯冠側は露出根面に2mm接触するようにした。移植後、歯肉弁が移植材を完全に覆うように復位し縫合した。移植5週後に、通法に従い病理標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。

その結果、非移植群と対照群では、歯槽骨およびセメント質の再生はみられなかった。実験群のS300BMP移植部および高濃度BMP0.5mg移植部でも歯槽骨再生はなかった、しかしセメント質の再生が膜に対応する根面にみられた。一方、高濃度BMP1.0mg移植部では、新生骨がほぼ移植材の形態と一致して形成されており、ノッチ下縁から歯冠側に約2mm、根尖側は残存歯槽骨の頰側面上に約2mmみとめられた。根面ノッチ部ではセメント質が再生し、歯面と垂直に線維の走行が見られ新生骨との間に歯根膜が再生し、ノッチより歯冠側ではセメント質は形成されず新生骨が歯根表面と癒着していた。一方骨欠損の近遠心側約1mmの範囲では、骨およびセメント質の新生はみられなかった。

考察

実験1では実験群全てに骨の形成がみとめられた。これは松本がFCM1を担体として同様にS300BMPを移植した実験結果よりも成績が良く、改良FCM1はS300BMPの担体として十分有効であることが確認された。

実験2では、S300BMPおよび高濃度BMPの0.5mgを配合して移植した場合、新生骨はみられなかったが、高濃度BMPの1.0mgを配合して移植した場合には、移植した改良FCM1の形態にほぼ一致して新生骨の形成がみとめられた。これは適切な濃度と量のBMPを配合した改良FCM1を移植すれば、骨の再生が従来ほとんど期待できなかった水平性骨欠損でも、歯冠側方向への骨新生が可能であることを示唆していると考えられる。

新生骨と露出根面との付着形式を観察すると、根面のノッチ部では、セメント質が新生し新生骨との間に線維が垂直に走行しているのがみられ、新生骨と歯根の間に歯根膜が再生していた。これは移植時に移植材と根面との間にスペースが生じていたためと思われる。一方、ノッチより歯冠側では、新生骨と歯根面との癒着が生じていた。これは移植時、移植材と根面が直接接触していたためと思われる。このことから移植材と根面との間に適度なスペースを確保して移植すれば、歯槽骨、セメント質および歯根膜の再生が可能であると考えられた。

今回の実験により、適切な高濃度BMPを改良FCM1に配合して移植すれば、大型動物の水平性骨欠損部でも、骨が誘導形成される可能性が高いこと、移植材と根面との間にスペースを作るとセメント質を含む歯根膜も再生する可能性があると考えられた。

結論

本研究は水平性骨欠損の再生療法にBMPを応用する方法を検討する目的で、2つの実験を行った。実験1では、改良FCM1を試作しBMPの担体としての有効性を検討した。実験2では、ネコに水平性骨欠損を作製し、BMPの濃度と量を変えて配合した改良FCM1を移植し、病理組織学的に観察した。その結果、

1. 改良FCM1は、BMPの担体として十分有効であると判定した。
2. ネコの水平性骨欠損に、高濃度BMPの1.0 mgを改良FCM1に配合して移植した結果、新生骨が移植材とほぼ同じ形態に形成した。
3. 新生骨と露出根面および残存歯槽骨との付着形式は、残存歯槽骨の頬側面では、新生骨が母骨と連続していた。根面ノッチ部は、移植時に根面と移植材との間にスペースが生じており、新生骨との間に歯根膜が再生していた。ノッチより歯冠側部分では、移植時に移植材と根面が直接接触しており、新生骨と根面との癒着が生じていた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙
副 査 教 授 久保木 芳 徳
副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Bone Morphogenetic Protein (BMP) による 水平性骨欠損部の再生療法の研究

審査は、担当者全員の出席のもと、論文提出者に対し口頭試問により論文の内容と関連分野について行われた。

歯周炎により破壊された歯周組織を再生させることは、歯周治療の大きな目標の一つである。しかし、水平性骨欠損の場合、現在行われている再生療法では歯周組織の再生、特に歯槽骨の再生が困難である。そこでこのような症例の歯周組織の再生をはかるために、骨誘導能のあるbone morphogenetic protein(BMP)を応用することが有効ではないかと考えた。BMPを用いる場合、適切な担体が必要であり、松本、伊藤らは、コラーゲン膜(FCM1)を担体として用いたが、移植時に血液などを吸収して軟化し、臨床的には操作が困難だったと報告している。そこでBMPの担体としてより優れたコラーゲン膜の開発が必要であると考えた。一方、従来BMPの研究にはラットが用いられてきたが、ラットの歯と歯周組織は小さいため、骨欠損を正確に作製するのが難しく、歯周組織の再生を詳細に評価することが困難であった。さらに大型動物ではBMPに対する組織反応が異なる可能性があり、ヒトに応用するためにはラットより大型動物でBMPの移植実験を行う必要があると考えられる。本研究は、BMPを水平性骨欠損をともなう歯周組織破壊の再生療法に応用することを目的として、まず担体の改良を試みるとともに、ネコに水平性骨欠損を作製し、BMP配合コラーゲン膜を移植し病理組織学的な観察を行った。

実験1：改良FCM1の作製とBMPの担体としての有効性の検討

コラーゲン膜の作製は、手術時の操作性を向上させるため、従来の作製法の一部を変更した。すなわち中性透析外液の緩衝液を塩酸トリス緩衝液から、リン酸緩衝液に変更した。その結果、移植時に吸湿軟化する欠点が改善された。そこでこれを改良FCM1と呼び、BMPの担体としての有効性を検討した。改良FCM1(0.5mg)に部分精製BMP(S300BMP)を0.1,0.3,0.5,0.7mg配合し、ラット背部皮下に移植し、移植2週後に軟X線写真撮影を行い検討した結果、全てに骨が形成されていた。これは松本がFCM1を担体として行った実験結果よりも成績が良く、改良FCM1はS300BMPの担体として十分有効であることが確認された。

実験2：ネコの水平性骨欠損部への移植実験

成ネコの犬歯頰側(8部位)の歯槽骨を骨頂より根尖方向に4mm削除して水平性の骨欠損を作製し、根面のセメント質を除去した後、欠損底部の根面にノッチを付与した。実験群は改良FCM1(2mm×4mm)にS300BMPを0.5,1.5mgおよび高濃度BMPを0.5,1.0mg配合し、対照群はBMPを含まない改良FCM1を骨欠損中央の露出根面から残存歯槽骨面上に移植した。なお非移植群は移植せず手術のみを行った。移植5週後にト殺し、病理組織観察を行った結果、

非移植群、対照群、S300BMP0.5,1.5mgおよび高濃度BMP0.5mgを移植した部位には、骨の新生はみられなかった。しかし、高濃度BMP1.0mg移植部位には、移植材とほぼ同じ形態に新生骨が形成されていた。これは適切な濃度と量のBMPを配合した改良FCM1を移植すれば、水平性骨欠損でも、歯冠側方向への骨新生が可能であることを示唆していると考えられる。

新生骨と露出根面との付着状態を詳細に観察すると、根面のノッチ部では、セメント質が新生し新生骨との間に線維が垂直に走行し、新生骨と歯根の間に歯根膜が再生していた。これは移植時に移植材と根面との間にスペースが生じていたためと思われる。一方、ノッチより歯冠側で移植材を根面に直接接触させた部分では、新生骨と歯根面とが癒着していた。このことから移植材と根面との間に適度なスペースを確保して移植すれば、歯槽骨、セメント質および歯根膜の再生が可能であると考えられた。

非移植群と対照群では、歯槽骨とセメント質の再生はみられなかった。一方、実験群のS300BMP0.5,1.5mg移植部および高濃度BMP0.5mg移植部では、骨の新生はみられなかったが、移植材に対応する根面にセメント質の再生が観察された。このことは、BMPがセメント質の再生にも影響する可能性があることを示唆するものと考えられる。

主査ならびに副査は本論文提出者に対し論文の概要の説明を求め、次に本研究の内容ならびに関連のある質問を行った。これらの試問に関して学位申請者から適切な回答が得られた。本研究は、歯周組織の再生が最も困難とされる水平性骨欠損部でも、BMPを応用することにより歯槽骨が再生される可能性を示唆し、さらに移植手術時に、移植材と根面との間に適切なスペースを作ることによりセメント質を含む歯根膜を再生できる可能性を示唆した点、さらにBMPはセメント質形成にも影響する可能性があることを示唆した点が高く評価された。これらのことは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。