

## 学 位 論 文 題 名

## リコンビナントヒト BMP-2 と多孔性ヒドロキシアパタイト

## 複合体の抜歯窩内骨形成に与える影響

## 学位論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

本研究は、歯の喪失後に生じる歯槽骨吸収を防ぎ、その形態と機能を保持する方法を研究開発する目的で、ウサギの小白歯を抜歯し、多孔性顆粒状アパタイト (PPHAP) を担体として rhBMP-2 と組み合わせて、抜歯窩に移植実験を行い、抜歯窩内骨形成に与える影響を病理組織学的に観察するとともに、骨形成について組織計測学的観察を行った。

## 〔 材料と方法 〕

実験動物は、日本家兎（雄性、体重 2.5 kg 前後）9 羽を用いた。移植材料は、rhBMP-2 は山之内製薬会社より提供を受けたものを用いた。担体として多孔性顆粒状アパタイト (PPHAP) は、日本製鋼所室蘭研究所より提供を受けたものを用いた。PPHAP は、焼成温度 1200℃、粒径 0.3 ~ 0.5 mm、内部貫通性気孔があり（気孔径 100 ~ 200  $\mu$  m、平均気孔径 150  $\mu$  m、気孔率 70%）、非吸収性、球状型で、使用前に洗浄後乾熱滅菌（160℃、30 分）して用いた。実験部位は小白歯とし、Pentobarbital Sodium (0.5 mg/kg) の静脈麻酔および 2 % 塩酸リドカインによる局所麻酔併用下にて、周囲軟組織、歯槽骨にできるだけ損傷を加えないように十分注意して小白歯を 2 本抜去した (N=18)。実験群の分類は、3 群に分け、非移植群は抜歯後何も移植せず、PPHAP 単独群は PPHAP 200 mg に PBS 160  $\mu$  l 滴下して、移植した。rhBMP-

2/PPHAP群はPPHAP200mgに、rhBMP-2/PBSの混合溶液160 $\mu$ l (rhBMP-2: 50 $\mu$ g 含有)を滴下含浸して、移植した。移植後、各群とも創口を縫合し、2週目および4週目に屠殺した。観察方法は、1) 病理組織学的観察は屠殺後ただちに顎骨を摘出し、10%中性ホルマリンにて固定後、Plank-Rychlo法で脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、近遠心的に6 $\mu$ mで連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン重染色とアザン・マロリー染色を施し、光顕下で病理組織学的観察を行った。2) 組織計測学的観察は上記の方法で作成した病理組織標本から抜歯窩の中央部の標本を18 $\mu$ m間隔で5枚抽出した。各標本とも5倍拡大の顕微鏡写真を作製し、抜歯窩の新生骨組織の面積をPIAS, LA-525(PIAS社製)を用いて計測し、各部位の総面積で除して新生骨量(%)を求めた。各計測値の統計学的分析には、Student's t-test検定を用いた。

## [結果]

### 1. 病理組織学的所見

1) 非移植群：抜歯後2週では、新生骨は、抜歯窩の窩底と窩壁より抜歯窩の中央に向けて形成された。窩口部では、新生骨がみられず、線維性結合組織が満たされた。中央部の中心部には新生骨はみられず結合組織がほとんどであった。窩底部では、新生骨の形成がさかんで著しい骨形成がみられた。4週では、新生骨は抜歯窩の約2/3の高さに達していた。新生骨の大部分は骨改造機転を受け、層板状構造を呈していた。窩口部の中心部では、新生骨が形成されず窩底側に向かって陥凹し、窩壁両側既存骨頂部の骨が吸収されているのが認められた。中央部と窩底部では、新生骨梁は改造され厚みを減じ、骨髄が多くなった。

2) PPHAP単独群：移植後2週では、新生骨の形成が抜歯窩の窩底部と窩壁から少量みられた。窩口部ではPPHAPが多量に存在したが、骨の形成はほとんど認められなかったが、窩口部の陥凹はなかった。4週では、新生骨が2週より増加する

がみられた。その新生骨の一部はH A P 顆粒の表面に接していた、ごく一部のH A P 顆粒の気孔内外に新生骨の形成がみられたが、抜歯窩の中心部にはH A P が多量に残存しており新生骨の形成はきわめて少ない傾向を示した。

3) r hBMP-2/PPHAP群：移植後2週では、抜歯窩のほぼ全域に、新生骨が形成された。窩口部では、HAPをとり囲むように新生骨が多量に形成されており、抜歯窩の陥凹は観察されなかった。中央部と窩底では、新生骨のはさかんで形成された。4週後では、新生骨の幅と量は非移植群とPPHAP単独群より著しく多くなった。窩口部では、緻密な新生骨がPPHAP顆粒よりもさらに表層の歯肉上皮直下までみられ、盛り上っている状態となっており、歯槽骨頂の吸収は見られなかった。なお窩底部では骨の改造現象により層板状骨がみられたが、骨髓組織は少なかった。

## 2. 組織計測学的所見

抜歯窩の新生骨量は、各群間で比較すると、rhBMP-2/PPHAP群が非移植群とPPHAP単独群に比べてに多く、とくに術後4週では非移植群に危険率1%で、PPHAP単独群に危険率5%で有意差が認められた。同群間で2週と4週を比較すると、rhBMP-2/PPHAP群とPPHAP単独群とも、2週から4週にかけて新生骨量が大幅に増加し、各々の危険率5%で有意差が認められた。非移植群は2週から4週にかけて新生骨の増加は少なく、有意差が認められなかった。

### [考察]

非移植群では、新生骨が抜歯窩底部および窩壁から形成されたが、窩口部の中心部ではほとんど骨形成がみられず線維性結合組織で満たされ、窩口中心部は窩底側に向かって陥凹し、新生骨が窩口頂部まで形成されず、さらに窩底部には骨改造が出現され、歯槽骨頂は吸収されて歯槽骨の本来の高さは減少すると考えられた。

PPHAP単独群では、非移植群と同様に新生骨の形成が抜歯窩底部および窩壁から形成され、抜歯窩の中心部では新生骨の形成が少なくなかった。PPHAP単独を用いた時、生体親和性が良く、骨伝導性があるが、骨誘導能、骨形成能はないので、主に母床骨組織から骨組織がアパタイト顆粒の周囲に増殖侵入する方式で骨欠損を修復するのみであり、骨形成の速度が遅く、窩口中心部の顆粒は骨が伝導されてくる前に歯肉結合組織由来の軟組織に被覆されてしまい、窩口部ではむしろ新生骨が窩口頂部まで形成されるのを阻害する可能性が高いと考えられた。アパタイト単独移植の場合は、抜歯窩の修復と骨形成の効果が不十分で、抜歯後の歯槽骨（顎堤）の保持の効果が得られないと思われた。

rhBMP-2/HAP群では窩底部と窩側壁の母床骨から新生骨形成が生じるのみでなく、中央部および窩口部で母床骨からかなり離れた部位でも、新生骨の形成が早期に生じ、抜歯窩全体に新生骨が多量に認められた。4週後には新生骨の幅と量は非移植群とPPHAP単独群より著しく多くなった。とくに窩口部では緻密な新生骨が歯肉直下までみられ、盛り上っている状態となっており、歯槽骨頂の吸収は見られなかった。これはrhBMP-2による骨誘導形成の効果であると考えられる。rhBMP-2/PPHAP複合体は、抜歯窩全体にわたり骨を誘導形成し、本来の歯槽骨の高さを保持させ、抜歯後の歯槽骨吸収を防止する可能性が高いと考えられた。

#### [結論]

rhBMP-2/PPHAP複合体の抜歯窩内移植は、抜歯窩の窩口部の新生骨の形成をうながし、辺縁骨頂部の吸収を防ぎ、歯槽堤の形態を保持する方法として有効であることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 久保木 芳 徳  
副 査 教 授 加 藤 熙  
副 査 教 授 向 後 隆 男

## 学 位 論 文 題 名

### リコンビナントヒト BMP-2 と多孔性ヒドロキシアパタイト 複合体の抜歯窩内骨形成に与える影響

本研究は、歯の喪失後に生じる歯槽骨吸収を防ぎ、その形態と機能を保持する方法を研究開発する目的で、多孔性顆粒状アパタイト (PPHAP) を担体として rhBMP-2 と組み合わせて、抜歯窩に移植実験を行い、抜歯窩内の骨形成を病理組織学的観察を行った。

実験動物は、日本家兎9羽を用い、実験部位は小臼歯とした (N=18)。移植材料は、rhBMP-2 は山之内製薬会社より提供を受けたものを用いた。担体として多孔性顆粒状アパタイト (PPHAP) は、日本製鋼所室蘭研究所より提供を受けたものを用いた。実験群の分類は、3群に分け、非移植群は抜歯後何も移植せず、PPHAP 単独群は PPHAP 200 mg に PBS 160  $\mu$  l 滴下して、移植した。rhBMP-2/PPHAP 群は PPHAP 200 mg に、rhBMP-2/PBS の混合溶液 160  $\mu$  l (rhBMP-2 : 50  $\mu$  g 含有) を滴下含浸して、移植した。移植後、各群とも創口を縫合し、2 週目および 4 週目に屠殺した。屠殺後ただちには顎骨を摘出し、固定、脱灰、包埋し、近遠心的に 6  $\mu$  m で連続切片を作成し、H-E 重染色とアザン・マロリー染色を施し、光顕下で病理組織学的観察を行ったと共に抜歯窩の中央部の標本を 18  $\mu$  m 間隔で 5 枚抽出し、各標本とも 5 倍拡大の顕微鏡写真を作製し、抜歯窩の新生骨組

織の面積をPIAS, LA-525(PIAS社製)を用いて計測し, 各部位の総面積で除して新生骨量(%)を求めた. 各計測値の統計学的分析には, 新生骨量(%)を求めた. 各計測値の統計学的分析には, Student's t-test検定を用いた.

病理組織学的に観察した結果では, 非移植群の新生骨は, 抜歯窩の窩底と窩壁より抜歯窩の中央に向けて形成され, 窩口部の中心部では, 新生骨が形成されず窩底側に向かって陥凹し, 窩壁両側既存骨頂部の骨が吸収されているのが認められ, 中央部と窩底部では, 新生骨梁は改造され厚みを減じ, 骨髓が多くなった. PPHAP単独群は, 新生骨の形成が抜歯窩の窩底部と窩壁からみられ, その新生骨の一部はHAP顆粒の表面に接していた, ごく一部のHAP顆粒の気孔内外に新生骨の形成がみられたが, 抜歯窩の中心部にはHAPが多量に残存しており新生骨の形成はきわめて少ない傾向を示した.

rhBMP-2/PPHAP群は, 抜歯窩のほぼ全域に, 新生骨が形成され, 新生骨の幅と量は非移植群とPPHAP単独群より著しく多くなった. 窩口部では, 緻密な新生骨がPPHAP顆粒よりもさらに表層の歯肉上皮直下までみられ, 盛り上っている状態となっており, 歯槽骨頂の吸収は見られなかった. 窩底部では骨の改造現象により層板状骨がみられたが, 骨髓組織は少なかった.

組織計測学的所見では, 抜歯窩の新生骨量は, 各群間で比較すると, rhBMP-2/PPHAP群が非移植群とPPHAP単独群に比べてに多く, とくに術後4週では非移植群に危険率1%で, PPHAP単独群に危険率5%で有意差が認められた. 同群間で2週と4週を比較すると, rhBMP-2/PPHAP群とPPHAP単独群とも, 2週から4週にかけて新生骨量が大幅に増加し, 各々の危険率5%で有意差が認められた. 非移植群は2週から4週にかけて新生骨の増加は少なく, 有意差が認められなかった.

以上結果より，非移植群では，4週までに抜歯窩口部と中央部では，新生骨が窩口頂部まで形成されず，さらに窩底部には骨改造が出現され，歯槽骨の本来の高さは減少すると考えられた．PPHAP単独群では，骨形成の速度が遅く，窩口中心部の顆粒は骨が伝導されてくる前に歯肉結合組織由来の軟組織に被覆されてしまい，窩口部ではむしろ新生骨が窩口頂部まで形成されるのを阻害する可能性が高いと考えられた．rhBMP-2/HAP群では，窩底部と窩側壁の母床骨から新生骨形成が生じるのみでなく，抜歯窩口部で母床骨からかなり離れた部位でも，新生骨の形成が早期に生じ，抜歯窩全体に新生骨が多量に認められた．とくに窩口部では緻密な新生骨が歯肉直下までみられ，盛り上っている状態となっており，歯槽骨頂の吸収は見られなかった．これはrhBMP-2による骨誘導形成の効果であると考えられる．rhBMP-2/PPHAP複合体は，抜歯窩全体にわたり骨を誘導形成し，本来の歯槽骨の高さを保持させ，抜歯後の歯槽骨吸収を防止する可能性が高いと考えられた．

論文の審査は，審査員全員により口頭で行われた後，主査久保木芳徳教授による論述試験が行なわれた．口頭試問では論文提出者による要旨の説明の後，論文の内容および関連知識について質問がなされたが，いずれに質問にもほぼ満足すべき回答が得られた．論述試験においても概ね的確な解答がなされた．

本研究は歯の喪失後に生じる歯槽骨吸収を防ぎ，その形態と機能を保持する目的で，多孔性顆粒状アパタイトを担体としてrhBMP-2と組み合わせて，抜歯窩に移植実験を行い，抜歯窩内骨形成に与える影響について，病理組織学的観察に加えて組織計測学的な手法を駆使して詳細に検討しており，その成果は臨床的に歯の喪失後に生じる歯槽骨吸収を防ぎ，歯槽骨の形態と機能を保持するために重要な方法が示唆された．

本研究業績は，歯科基礎医学の分野はもとより，歯科臨床医学など広く

関連領域にも裨益するところ大であり，博士（歯学）の学位を授与するに  
価するものと認定した．