

学位論文題名

ポリ乳酸グリコール酸共重合体/ゼラチンスポンジ
複合体を担体として用いた場合の rhBMP-2 による
セメント質と歯根膜および歯槽骨の
誘導再生に関する研究

— イヌ開窓状歯槽骨欠損モデルを用いた検討 —

学位論文内容の要旨

【緒言】

現在まで、Bone Morphogenetic Protein(BMP)は骨形成能のあるタンパク質として、治療法への応用の研究が進められ、歯周病学の領域では、とくに歯槽骨の再生に有効であると考えられている。また、最近では骨誘導因子であるBMPは歯槽骨の誘導のほかに、セメント質と歯根膜を誘導する可能性があることが報告されている。しかし、そのほとんどは健全歯周組織に人工的に骨欠損を作製して行った実験であり、辺縁性歯周炎に罹患し組織活性の低下した部位での研究報告はきわめて少なく、歯周組織再生にあたって、歯槽骨の再生とともにきわめて重要な役割をするセメント質と歯根膜の再生能および歯根吸収と骨性癒着の危険性についての明確な結論はされていない。

そこで本研究は免疫学的に問題が少なく臨床応用の可能性が高いBMPおよび担体として、rhBMP-2とポリ乳酸グリコール酸共重合体/ゼラチンスポンジ複合体(PGS)を移植して歯周組織の再生をはかった場合に、歯槽骨とともにセメント質と歯根膜がどのように再生するかを明らかにするとともに、歯根吸収と骨性癒着の発現の危険性を知る目的で、イヌの犬歯、前臼歯および後臼歯に、開窓状歯槽骨欠損を作製し、さらに慢性辺縁性歯周炎を想定して骨欠損周囲のセメント質と歯根膜に電気的な損傷を与え、初期の組織修復が起こりにくい環境にした実験モデルを用いて、病理組織学的観察および組織学的計測を行い比較検討した。

【材料と方法】

実験動物には、成ビーグル犬2頭を用いた。実験部位は、上下顎両側の犬歯、上顎第4前臼歯と下顎第1後臼歯近・遠心根の頰側歯根部とし、合計24部位を用いた。BMPにはrhBMP-2を用い、担体にはポリ乳酸グリコール酸共重合体/ゼラチンスポンジ複合体(PGS、5×5×2mm、重量約7mg)を用いた。rhBMP-2の担体への配合

量は、 $0.4 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ (rhBMP-2/PGS) とした。

実験モデルには、実験部位に $5 \times 5\text{mm}$ の大きさで開窓状歯槽骨欠損を作製した後、欠損部の各辺縁の歯根膜とセメント質を出力 0.3mA に設定した電気メスを用いて壊死させたモデルを用いた。実験部位は、実験群と対照群で12部位ずつに分け、実験群にはrhBMP-2配合PGSを、対照群にはPGSのみを移植した。観察期間は13～16週とした。術後7日間隔で臨床的観察を行い、観察期間終了時に灌流固定法にて屠殺した。通法に従いパラフィン包埋後、厚さ $6 \mu\text{m}$ の頬舌縦断連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行って、病理組織学的観察と組織学的計測を行った。病理組織学的観察は、各実験部位のすべての切片について行い、組織学的計測は、各実験部位ごとに、骨欠損の近遠心的最中央部に位置する切片、およびそれから近遠心方向に $360 \mu\text{m}$ 間隔で離れた切片を2枚ずつ合計5枚の標本を選択して行った。なお、実験部位の中で、骨欠損作製が適切でなかった1部位と術後局所感染の疑われた2部位（両者とも対照群）は観察対象から除外した。計測項目は、骨欠損の大きさ、歯槽骨再生率、セメント質再生率、根吸収率、骨性癒着率とし、各組織計測値の統計学的な分析には、Mann-WhitneyのU検定を用いた。

【結 果】

臨床的観察

術後1週には、両群ともわずかに歯肉の発赤と腫脹が認められたが、術後2、3週には消退し、その後は良好に経過した。

病理組織学的観察

骨の再生は、対照群および実験群とも生じており、新生した骨は歯冠側と根尖側に存在する既存骨から連続して形成されているものが多くみられた。担体の残存と骨性癒着はすべての実験部位でみられなかった。新生セメント質も既存セメント質と連続して形成されているものが多くみられ、両群ともに有細胞性の構造を示すものが多く、無細胞性の構造を示すものは少なかった。新生骨が形成された部位では根面の新生セメント質あるいは露出象牙質との間に線維と血管に豊かな歯根膜様の結合組織（以後、歯根膜様軟組織と呼ぶ）が形成されていた。また、骨の新生がない部位では結合組織性付着が観察された。根表面には、浅い歯根吸収窩がかなり高頻度に観察され、実験群に比べ対照群の方が高い傾向が見られた。

対照群と実験群を比べると、対照群では、歯槽骨が骨欠損内を完全に覆う再生が生じたのは9部位中2部位であり、歯根膜様軟組織も9部位中2部位には完全な再生がみられた。しかし、セメント質は完全な再生が生じた部位は認められなかった。歯根吸収は9部位全部に観察された。一方、実験群は対照群に比べて骨再生量が多く、骨欠損内を完全に覆う再生が生じたのは12部位中9部位であり、歯根膜様軟組織も同様に9部位は完全に再生していた。セメント質が完全に再生していたのは12部位中2部位で、対照群に比べると多く認められたが、骨の再生に比べると少なかった。歯根吸収は12部位中9部位に観察された。

病理組織学的計測と統計学的分析

開窓状歯槽骨欠損部の大きさは、対照群は約4.7 mm、実験群は約4.6mmで両群間に有意差はなかった。

歯槽骨の再生率は、対照群は約81%で、実験群は約97%で、実験群が対照群より危険率5%で有意に大きかった。セメント質の再生率は、対照群は約44%、実験群は約54%で、統計学的に有意差認められなかったが、実験群が対照群より多い傾向を示した。歯根吸収率も、対照群は約41%、実験群は約29%で、統計学的に有意差は認められなかったが、対照群が実験群より多い傾向を示した。

【考察ならびに結論】

本研究の結果、骨の再生は、対照群と実験群ともに生じていたが、その再生量は実験群が対照群に比べ有意に大きかった。また、骨の再生した部位に一致して新生骨と象牙質面との間に歯根膜様軟組織が観察され、骨性癒着は全く観察されなかった。これは、担体として用いたPGSがスポンジ状の多孔性の構造で、血管および周囲の軟組織細胞が侵入し易いためではないかと考えられる。すなわち根面に沿って歯根膜様軟組織の増殖が歯槽骨の再生より優先して生じ、骨と根面が直接接触するのが回避されたためではないかと考えられる。

セメント質の再生は、実験群が対照群より多い傾向を示したが、統計学的な有意差はみられなかった。両群のセメント質形成量は、歯槽骨と歯根膜様軟組織の形成量に比べて少なく、歯槽骨と歯根膜様軟組織が再生した根面にも形成されていない部位がみられた。これは、rhBMP-2のセメント質形成能は骨形成能に比べると低いことや、セメント質形成に要する時間が歯槽骨形成に比べて長期のためではないかと推察された。しかし、本実験の結果のみでは、rhBMP-2がセメント質を誘導する能力がどの程度であるかは明確にできなかった。

歯根吸収率は、統計学的な有意差はみられなかったが、実験群が対照群よりも低い傾向を示した。また、今回観察された歯根吸収は、実験群と対照群ともにAndreassenの歯根吸収の分類のうち、表面吸収型すなわち根表面の穏やかな吸収がみられるタイプであり、歯根吸収が継続して進行する置換性吸収型と炎症性吸収型はまったくみられず、将来セメント質が添加する可能性が高いと思われる組織所見も多くみられたことから、臨床的には問題ないと思われた。

以上の結果から、初期の組織修復活性の低下した開窓状歯槽骨欠損モデルにおいても、ポリ乳酸グリコール酸共重合体/ゼラチンスポンジ複合体を担体としてrhBMP-2を根面に移植すると、担体のみの移植に比べ歯槽骨と歯根膜様軟組織の再生は明らかに多くなり、セメント質の再生も多くなる傾向を示し、骨性癒着は生じないことから、rhBMP-2は生体の組織再生能に有効に働いて歯周組織を誘導再生する可能性が高いことが示唆された。

今後さらに、歯槽骨欠損を作製しルートプレーニングした根面上に歯根膜由来の細胞が遊走するのを完全に遮断できる実験モデルを開発し、rhBMP-2によるセメン

ト質誘導再生能のメカニズムをより明確にすることによって、臨床的により治療効果の高い歯周組織再生療法が確立されると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙
副 査 教 授 久 保 木 芳 徳
副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

ポリ乳酸グリコール酸共重合体／ゼラチンスポンジ 複合体を担体として用いた場合の rhBMP-2 による セメント質と歯根膜および歯槽骨の 誘導再生に関する研究

－イヌ開窓状歯槽骨欠損モデルを用いた検討－

審査は主査、副査が一同に会して論文提出者に対し口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

現在まで、Bone Morphogenetic Protein(BMP)は骨形成能のあるタンパク質として、治療法への応用の研究が進められ、最近では歯槽骨の誘導形成のほかに、セメント質と歯根膜も誘導する可能性があることが報告されている。

そこで本研究は免疫学的に問題が少なく臨床応用の可能性が高いBMPおよび担体として、rhBMP-2とポリ乳酸グリコール酸共重合体/ゼラチンスポンジ複合体(PGS)を移植して歯周組織の再生をはかった場合に、歯槽骨とともにセメント質と歯根膜がどのように再生するかを明らかにするとともに、歯根吸収と骨性癒着の発現の危険性を知る目的で、イヌの犬歯、前臼歯および後臼歯に、開窓状歯槽骨欠損を作製し、さらに慢性辺縁性歯周炎を想定して骨欠損周囲のセメント質と歯根膜に電氣的な損傷を与え、初期の組織修復が起こりにくい環境にした実験モデルを用いて、病理組織学的観察および組織学的計測を行い比較検討した。

[材料と方法]

実験動物には、成ビーグル犬2頭を用いた。実験部位は、上下顎の犬歯、および上顎第4前臼歯と下顎第1後臼歯の近・遠心根とし、合計24部位を用いた。各実験部位を実験群と対照群に分け、両群とも頬側歯根中央部に5×5mmの大きさの開窓状歯槽骨欠損を作製し、さらに根面を手用スケーラーでスケーリング・ルートプレーニングして象牙質を露出させた後、出力0.3 mAに設定した電気メスを用いて欠損部

の辺縁の歯根膜とセメント質を壊死させた。実験群 (n=12) にはrhBMP-2配合PGSを、対照群 (n=12) にはPGSのみを移植した。なお、rhBMP-2のPGS (5×5×2mm、重量約7mg) への配合量は、 $0.4\mu\text{g}/\text{mm}^3$ (rhBMP-2/PGS) とした。観察期間は13~16週とし、術後7日間隔で臨床的観察を行い、観察期間終了時に灌流法に従いパラフィン包埋後、厚さ6 μm の頬舌縦断連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行って、病理組織学的観察と組織学的計測を行った。病理組織学的観察は、各実験部位のすべての切片について行い、組織学的計測は、各実験部位ごとに合計5枚の標本を選択して行った。

[結 果]

病理組織学的観察では、骨再生は、対照群および実験群とも生じており、新生した骨は歯冠側と根尖側に存在する既存骨から連続して形成されているものが多くみられ、新生セメント質も既存セメント質と連続して形成されているものが多くみられた。新生骨が形成された部位では根面の新生セメント質あるいは露出象牙質との間に線維と血管に豊んだ歯根膜様の結合組織（以後、歯根膜様軟組織と呼ぶ）が形成されていた。根表面には、浅い歯根吸収窩が多く観察された。対照群と実験群を比べると、対照群では、歯槽骨が骨欠損内を完全に覆う再生が生じたのは9例中2例であり、歯根膜様軟組織も9例中2例には完全な再生がみられた。しかし、セメント質は完全な再生が生じた部位は認められなかった。歯根吸収は9例すべてに観察されたが、表面吸収型であった。一方、実験群は対照群に比べて骨再生量が多く、骨欠損内を完全に覆う再生が生じたのは12例中9例であり、歯根膜様軟組織も同様に9例は完全に再生していた。セメント質が完全に再生していたのは12例中2例で、対照群に比べ多かったが、骨の再生に比べると少なかった。歯根吸収は12例中9例に観察された。

病理組織学的計測および統計学的分析では、歯槽骨の再生率は、対照群は約81%、実験群は約97%で、実験群が対照群より危険率5%で有意に大きかった。セメント質の再生率は、対照群は約44%、実験群は約54%で、統計学的に有意差は認められなかった。歯根吸収率は、対照群は約41%、実験群は約29%で、統計学的に有意差は認められなかった。

[考察ならびに結論]

本研究では、骨の再生は対照群と実験群ともに生じたが、再生量は実験群が対照群に比べ有意に大きかった。また、骨の再生した部位に一致して新生骨と象牙質面との間に歯根膜様軟組織が観察され、骨性癒着は全く観察されなかった。これは、担体として用いたPGSがスポンジ状の多孔性の構造で、血管および周囲の軟組織細胞が侵入し易いためではないかと考えられる。すなわち根面に沿って歯根膜様軟組織の増殖が歯槽骨の再生より優先して生じ、骨と根面が直接接触するのが回避されたためではないかと考えられた。

セメント質の形成量は両群とも、歯槽骨と歯根膜様軟組織の形成量に比べて少なく、歯槽骨と歯根膜様軟組織が再生した根面にも形成されていない部位がみられた。これは、rhBMP-2のセメント質形成能は骨形成能に比べると低いことや、セメント質形成に要する時間が歯槽骨形成に比べて長期のためではないかと推察された。

本研究で観察された歯根吸収は、両群とも表面吸収型すなわち根表面の穏やかな吸収のみが生じるタイプであり、置換性吸収型と炎症性吸収型はまったくみられず、将来セメント質が添加する可能性が高いと思われる組織所見も多くみられた。

これらの結果から、PGSを担体に用いてrhBMP-2を根面に移植する方法は、初期の組織修復活性の低下させた開窓状の慢性辺縁性歯周炎モデルにおいても、歯周組織の再生に有効であり、歯根吸収は表面吸収型のみが生じ、その量はrhBMP-2を応用した場合の方が少なく、骨性癒着が生じる危険性は非常に低い可能性であることが示唆された。

引き続き審査担当者と申請者との間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされたが、これらの質問に関して申請者は本研究から得た知見と文献を引用して明解かつ適切な回答を行った。本研究は、歯周病罹患を想定して初期の組織修復活性の低下した開窓状歯槽骨欠損モデルを作製し、免疫学的に問題の少ないPGSを担体としてrhBMP-2を移植した場合の有効性について検討し、rhBMP-2の移植は歯槽骨と歯根膜様軟組織およびセメント質の再生に有効であり、骨性癒着が生じない可能性を明らかにして、臨床応用の可能性が高い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判断した。