学位論文題名

リコンビナントヒト BMP-2 を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に配合して
ラット口蓋部骨膜下に移植した場合の
骨形成に対する加齢の影響

学位論文内容の要旨

【緒言】

当講座ではBMPの骨誘導能に着目し、BMPを歯周治療へ応用するための基礎的研究を行ってきた。最近ヒトに対する免疫原性が少ないリコンビナントヒトBMP-2 (rhBMP-2) と、その担体として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) を用いた研究が試みられ、歯周組織再生における有効性を報告している。しかし従来のBMPの研究は骨代謝の活発な若い動物を用いた研究がほとんどであり、歯周病の罹患率が中高齢者で高いことを考えると、中高齢の動物でBMPの効果を検討する必要がある。一方、BMP移植と加齢に関する研究はこれまで数例報告されているが、それらは皮下や筋肉内などにおける異所性骨形成の研究であり、歯周組織あるいは歯周組織と類似した部位における骨形成の研究は行われていない。そこで本研究は、歯周組織再生療法としてrhBMP-2をPGSに配合し移植した場合の骨形成に及ぼす加齢の影響を知る目的で、週齢の異なるラットを実験動物として選び歯周組織ときわめて類似した口蓋部骨膜下を実験部位として比較検討した。

【材料と方法】

実験動物はウイスター系雄性ラット10週齢14匹、30週齢11匹、70週齢15匹総計40匹を使用した。実験部位は口蓋部骨膜下の左右の口蓋溝 (総計80部位) とした。移植材料は、担体として厚さ1.0mmのPGSを4.0mm×0.5mm (体積2.0mm³、平均重量250 μ g) に裁断したものと、これにrhBMP-2を4.0 μ g配合したものを使用した。実験部位の左側口蓋溝は実験群 (E群) としてrhBMP-2配合PGS (4.0 μ g/2.0mm³) を移植し、右側は対照群 (C群) とし、何も移植しない群 (CN群)、PGSのみを移植した群 (CI群) とに分けた。ラットにペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による全身麻酔と口蓋部に塩酸リドカインによる局所麻酔を行った後、口蓋粘膜を全層剥離し、ナイロンの単線維を既存骨と新生骨を区

別するマーカーとして骨面上に置き、その上に移植材を口蓋溝に適合させるように置き骨を復位縫合した。6週間の観察期間終了後、ジエチルエーテル吸引にて屠殺し、組織摘出、固定、脱灰、パラフィン包埋を行った。その後、前頭面方向に厚さ5 μ mの連続切片を作製し、HE染色を行い光学顕微鏡にて病理組織学的観察と組織学的計測を行った。組織学的計測は、移植部位の中央部の標本を100 μ m間隔で5枚抽出し、ナイロン線維から口腔側の骨を新生骨の厚さとして計測しその平均値を求めて骨新生量とした。統計解析は、Mann-Whitney検定、Wilcoxon検定、Kruskal-Wallis検定を行った。

【結果】

実験動物は、術後感染が生じた4匹のラットを評価から除外して合計36匹（10週齢12匹、30週齢11匹、70週齢13匹）、実験部位は合計72部位で評価した。

・体重の変化：10週齢ラットは移植時311 $\pm$ 15gから観察期間終了時421 $\pm$ 24gで有意に増加し（ $P<0.01$ ）、30週齢は517 $\pm$ 24gから529 $\pm$ 26gに有意に増加した（ $P<0.05$ ）。70週齢は610 $\pm$ 60gから612 $\pm$ 64gにわずかに増加し有意差はなかった。

・病理組織学的観察：全ての週齢のCN群、CI群、E群とも、新生骨の形成が観察され既存骨とほとんど完全に連続していた。また移植材の残存および軟骨の形成は観察されなかった。10週齢ラットではいずれの群も、新生骨と既存骨とも層板構造が不明瞭であり多数の骨細胞が観察された。30週齢、70週齢ラットでは既存骨は層板構造が明瞭であり何層にも層状の構造が観察されたのに対し、新生骨は層板構造が不明瞭であった。新生骨の厚さは、いずれの週齢もE群の方がCN群およびCI群に比べ厚く、CN群とCI群の間には大きな差異はなかった。

・組織学的計測および統計学的分析：骨新生量は10週齢のC群111 $\pm$ 81 μ m（CN群97 $\pm$ 91 μ m、CI群125 $\pm$ 76 μ m）、E群220 $\pm$ 101 μ mであり、30週齢はC群46 $\pm$ 28 μ m（CN群52 $\pm$ 34 μ m、CI群40 $\pm$ 24 μ m）、E群124 $\pm$ 74 μ m、70週齢はC群17 $\pm$ 21 μ m（CN群18 $\pm$ 24 μ m、CI群16 $\pm$ 20 μ m）、E群61 $\pm$ 54 μ mであった。Wilcoxon検定では、全ての週齢でE群の方がC群より有意に多かった（ $P<0.01$ ）。また各週齢間で比較すると、C群、E群とも10週齢が最も多く、次いで30週齢、70週齢の順で、Kruskal-Wallis検定で有意に減少した（ $P<0.01$ ）。Mann-Whitney検定では10週齢と30週齢の間（ $P<0.05$ ）、30週齢と70週齢の間（ $P<0.05$ ）、10週齢と70週齢の間で有意差が認められた（ $P<0.01$ ）。C群の中でCN群とCI群の間は、いずれの週齢も有意差はなかった。同一個体ラットのE群とC群の骨新生量の差を求めると、10週齢109 $\pm$ 70 μ m、30週齢79 $\pm$ 49 μ m、70週齢44 $\pm$ 48 μ mとなりKruskal-Wallis検定で有意差が認められた（ $P<0.05$ ）。Mann-Whitney検定では10週齢と70週齢の間は有意差が認められたが（ $P<0.05$ ）、10週齢と30週齢の間、30週齢と70週齢の間では有意差はなかった。

【考察および結論】

本実験では、年齢が正確に把握でき個体数が充分確保できる実験動物としてラットを用いた。ラットは9～14週齢で生殖可能な成体となり60週齢頃まで生殖可能であることから、10週齢、30週齢、70週齢のラットはそれぞれヒトの10歳代前半、20歳代、50～60歳代に相当すると考えられる。体重の変化から10週齢ラットは成長期、70週齢ラットは成長が停止していると考えられた。実験部位は口蓋部骨膜下としたが、これはラットの辺縁歯肉部は狭く小さいため、実験部位が広く実験操作が確実にでき歯周組織ときわめて類似した組織であることから選択した。骨の形成状態を評価する方法は、生化学的方法と病理組織学的に組織計測して評価する方法が考えられるが、新生骨が既存骨と連続して一体化する場合、両者を正確に分離摘出できないため組織計測の方法を用いた。さらに組織計測上、新生骨と既存骨を客観的に区別する必要があり、既存骨面上にナイロンの単線維を置きその上に移植材を置くことにより既存骨と新生骨を区別するマーカーとすることを考えた。

E群とC群の骨新生量を比較すると、E群は全ての週齢で有意に多かった。このことは、BMPの移植により、若年齢だけでなく中高齢においても、骨形成が促進されることを示していると考えられる。

週齢間の比較では、E群とC群とも加齢に伴って減少していた。これは骨新生を促進する因子である成長、骨膜剥離、BMPなどに対して反応し骨を形成する能力が加齢に伴って低下するためと考えられる。

C群の中でCN群とCI群とを比較すると、両者の間にはいずれの週齢でも骨新生量に有意差がなく、病理組織学的所見もほとんど違いがみられなかったことから、移植したPGSは新生骨の形成の阻害も促進もしないと思われた。E群の骨新生量にはBMP移植以外に、成長や骨膜剥離によって生じた骨新生量も含まれていると考えられ、それらを計算上で除き、BMP移植による骨新生量を算出した。その結果、10週齢と70週齢との間には有意差が認められたが ($P < 0.05$)、10週齢と30週齢の間、30週齢と70週齢の間には有意差はみられなかったことから、BMPによって誘導される骨形成反応は、加齢に伴う低下が比較的少ないと思われた。

以上の結果から、rhBMP-2をPGSに配合してラット口蓋部骨膜下に移植すると、加齢に伴って新生骨の量は減少するが、若齢ラットだけでなく高齢ラットにおいても骨形成が明らかに促進されたことから、rhBMP-2配合PGSは中高齢者の歯周治療に応用できる可能性が示唆された。今後さらに大型動物を用いてBMPによる歯周組織再生に対する加齢の影響について検討し、中高齢者の歯周組織の再生を高める治療法の開発が必要と考えられる。

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

リコンビナントヒト BMP-2 を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に配合して ラット口蓋部骨膜下に移植した場合の 骨形成に対する加齢の影響

審査は主査と副査一人ずつの二回に分けて、論文提出者に対し口頭で行われた。いずれも、はじめに申請者に対し提出論文の内容について論述させた。

当講座ではBMPの骨誘導能に着目し、BMPを歯周治療へ応用するための基礎的研究を行ってきた。最近ヒトに対する免疫原性が少ないリコンビナントヒトBMP-2 (rhBMP-2) と、その担体として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) を用いた研究が試みられ、歯周組織再生における有効性を報告している。しかし従来のBMPの研究は骨代謝の活発な若い動物を用いた研究がほとんどであり、歯周病の罹患率が中高齢者で高いことを考えると、中高齢の動物でBMPの効果を検討する必要がある。一方、BMP移植と加齢に関する研究はこれまで数例報告されているが、それらは皮下や筋肉内などにおける異所性骨形成の研究であり、歯周組織あるいは歯周組織と類似した部位における骨形成の研究は行われていない。そこで本研究は、歯周組織再生療法としてrhBMP-2をPGSに配合し移植した場合の骨形成に及ぼす加齢の影響を知る目的で、週齢の異なるラットを実験動物として選び歯周組織ときわめて類似した口蓋部骨膜下を実験部位として比較検討した。

【材料と方法】

実験動物は、10週齢、30週齢、70週齢のウイスター系雄性ラットを使用し、実験部位は口蓋部骨膜下の左右の口蓋溝とした。移植材料は、担体のPGSを4.0mm×0.5mm×

1.0mm (体積2.0mm³、平均重量250 μ g) に裁断したものと、これにrhBMP-2を4.0 μ g配合したものを使用した。口蓋粘膜を全層剥離した後、実験群 (E群) はrhBMP-2配合PGS (4.0 μ g/2.0mm³) を移植した。一方対照群 (C群) はBMPを移植しない群とし、PGSのみを移植した群 (CI群) と何も移植しない群 (CN群) に分けた。6週間の観察期間終了後に屠殺し、組織摘出、固定、脱灰、パラフィン包埋を行い、前頭面方向に厚さ5 μ mの連続切片を作製し、HE染色を行い光学顕微鏡にて病理組織学的観察と組織学的計測を行った。組織学的計測は、移植部位の中央部の標本を100 μ m間隔で5枚抽出し、新生骨の厚さを計測し平均値を求めて骨新生量とした。統計解析は、Mann-Whitney検定、Wilcoxon検定、Kruskal-Wallis検定を行った。

【結果】

平均体重は、10週齢ラットでは移植時311gから観察期間終了時421gと著しく増加し ($P < 0.01$)、30週齢では517gから529gに有意に増加し ($P < 0.05$)、70週齢は610gから612gにわずかに増加し有意差はなかった。

病理組織学的観察では、全ての週齢のいずれの群も、新生骨が形成され既存骨とほとんど完全に連続し、移植材の残存と軟骨の形成は観察されなかった。10週齢の各群は新生骨と既存骨とも層板構造が不明瞭であった。一方30週齢、70週齢ラットでは既存骨は層板構造が明瞭であったが新生骨は不明瞭であった。新生骨の厚さはいずれの週齢ともE群がCN群とCI群よりも厚く、CN群とCI群の間には大きな差異はなかった。

組織学的計測および統計学的分析では、骨新生量は各群間で比較すると、各週齢ともE群がC群より有意に多かった ($P < 0.01$)。週齢間で比較すると、各群とも10週齢が最も多く、次いで30週齢、70週齢の順で有意に減少し、10週齢と30週齢の間 ($P < 0.05$)、30週齢と70週齢の間 ($P < 0.05$)、10週齢と70週齢の間で有意差が認められた ($P < 0.01$)。CN群とCI群の間には、各週齢とも有意差はなかった。同一個体のE群とC群の骨新生量の差を求めると、10週齢と70週齢の間には有意差が認められたが ($P < 0.05$)、10週齢と30週齢の間、30週齢と70週齢の間には有意差はなかった。

【考察および結論】

ラットは9~14週齢で生殖可能な成体となり60週齢頃まで生殖可能であることから、10週齢、30週齢、70週齢のラットはそれぞれヒトの10歳代前半、20歳代、50~60歳代に相当すると考えられる。E群とC群の骨新生量を比較すると、E群は全ての週齢で有意に多かった。このことは、BMPの移植により、若年齢だけでなく中高齢におい

でも、骨形成が促進されることを示していると考えられる。週齢間の比較では、E群とC群とも加齢に伴って減少した。これは骨新生を促進する因子である成長、骨膜剥離、BMPなどに反応し骨を形成する能力が加齢に伴って低下するためと考えられる。

CN群とCI群を比較すると、骨新生量に有意差がなく病理組織学的所見もほとんど違いがみられなかったことから、移植したPGSは新生骨の形成を促進も阻害もしないと思われた。E群の骨新生量にはBMP移植以外に、成長や骨膜剥離による骨新生量も含まれていることと個体差を考慮して、同一個体のE群の骨新生量からC群の骨新生量を差し引き、計算上BMP移植による骨新生量を算出した結果、10週齢と70週齢との間には有意差が認められたが ($P < 0.05$)、10週齢と30週齢、30週齢と70週齢の間には有意差はみられなかった。このことは、BMPによる骨形成能は、骨膜剥離などの刺激による骨形成能よりも加齢に伴って低下するのが比較的少ないと思われた。

以上の結果から、rhBMP-2をPGSに配合してラット口蓋部骨膜下に移植すると、加齢に伴って新生骨の量は減少するが、若齢ラットだけでなく高齢ラットにおいても骨形成が明らかに促進されたことから、rhBMP-2配合PGSは中高齢者の歯周治療に応用できる可能性が高いことが示唆された。今後さらに大型動物を用いてBMPによる歯周組織再生に対する加齢の影響について検討し、中高齢者の歯周組織の再生を高める治療法の開発が必要と考えられる。

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適切な回答を行った。本研究は、rhBMP-2配合PGSを移植することにより若齢ラットのみならず骨代謝が低下した高齢ラットにおいても、既存骨と連続して新生骨が著しく添加増生したことから、rhBMP-2は中高齢者の歯周治療に応用できる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された。