学位論文題名

Favorable healing following space creation
in rhBMP-2-induced periodontal regeneration
of horizontal circumferential defects in dogs
with experimental periodontitis

(実験的歯周炎モデルにスパーサー法を用いて
rhBMP-2 を移植した場合の歯周組織再生)

学位論文内容の要旨

緒言

歯科臨床における歯周組織再生の必要性が増加するなか、これまで様々な歯周組織再生療法が開発、応用されてきているが、臨床で最もよくみられる水平性骨欠損や1、2壁性の骨欠損症例などを適応とする再生療法が、いまだないのが現状である。recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) は、水平性骨欠損部においても、歯周組織再生を誘導する可能性をもつと考えられているが、一方で根吸収や骨性癒着が生じたとする報告もある。我々は、この根吸収や骨性癒着の原因は、BMPを配合した担体を直接根面に移植する移植法にあるのではないかと考え、スパーサー法を考案して、まず部分精製したBMPを外科的に作成した根分岐部Ⅲ級モデルに移植を行って良好な結果を得た。次に、臨床では歯周炎罹患歯への応用を考えているので、臨床に準じた歯周炎モデルを用いて検討する必要がある。本研究の目的は、犬の水平性骨欠損を伴う実験的歯周炎モデルを用いて、罹患根面にrhBMP-2をスパーサー法で移植した際の歯周組織再生におけるスパーサーの影響を検索することである。

材料および方法

本研究には成ビーグル犬(オス、1歳、平均体重11kg)4頭を用い、上下顎前臼歯36歯を実験部位とした。週2回ブラッシングおよび0.5%クロルヘキシジンによる清掃を行って、臨床的に健康な歯周組織を予め確立した後、セメント-エナメル境(CEJ)から根尖側4mmの水平性骨欠損を外科的に作成し、露出した根面周囲に幅3mmの帯状のメタルストリップスを被覆した。その後ソフトフードを与えて、実験的歯周炎を誘発した。

8週後にメタルストリップスを除去し、罹患根面をルートプレーニングした後、以下の3群に分けて各根面の頬側および舌側に移植を行った。B群は3×3×2mmに裁断したpolymer-coated gelatin sponge (PGS)に、rhBM

P-2 (7.2 μ g/7.2 μ l) を滴下した移植材を露出根面に直接接するように移植した。PB群は生理食塩水 (3.6 μ l) を含浸したPGS (3×3×1mm) を露出根面に直接接するように移植して、その外側にB群と同様に調整したrhBMP-2配合PGSを重ねて移植した。P群は生理食塩水 (7.2 μ l) を含浸したPGS (3×3×2mm) を露出根面に直接接するように移植した。なお、各群の移植材は、移植部位による影響がないように均等配置した。移植12週後に通法に従って病理標本を作成後、頬舌的に厚さ4~8 μ mで連続切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡にて病理組織学的観察および組織計測を行った。計測項目は、1. 骨欠損の高さ、2. 上皮の深部増殖量、3. 新生骨の高さ、4. 新生セメント質の長さ、5. 根吸収の長さ、6. 骨性癒着の長さの計6項目とした。統計学的分析にはMann-Whitney U検定を用いた。

結果

すべての実験部位は臨床的に、観察期間を通して治癒不全や強い炎症は認められず、順調に経過した。

病理組織学的観察

歯髄露出のため、P群で4部位、PB群で2部位を除外した。3群ともに、辺縁歯肉直下の歯肉結合組織に炎症性細胞浸潤はほとんど観察されず、PGSの残存は認められなかった。

P群では、付着上皮がルートプレーニング面の中央付近を超えて、根尖側に認められた。上皮底部より根尖側のルートプレーニング面には、浅い根吸収が比較的多く認められて、根表面には結合組織の線維が大部分平行に走行しており、新生セメント質の形成は根尖側にわずかに認められた。また、新生骨の形成は、ほとんど認められなかった。

rhBMP-2を移植したB群およびスパーサー法により移植したPB群は、ともに上皮の根尖側への増殖はわずかであった。上皮底部より根尖側のルートプレーニング面には、線維が封入された新生セメント質様硬組織がP群よりも顕著に認められた。新生セメント質様硬組織と新生骨の間には、既存の歯根膜線維に類似した走行の線維が認められた。新生骨の形成は、ともにP群に比べて著しく多かったが、PB群はB群に比べて骨形成量の少ない部位が多く観察された。骨性癒着は、B群の24標本中に1例のみに認められた。

組織計測および統計学的分析

骨欠損の高さは、3群間に有意差は認められなかった。上皮の深部増殖量は、B群とPB群の2群はP群に比べて、危険率1%未満で有意に少なかった。新生骨の高さは、B群とPB群の2群がP群に比べて危険率1%未満で有意に高い値を示した。B群とPB群の間では、B群がPB群より危険率5%未満で有意に高い値を示した。新生セメント質の長さは、B群とPB群ともにP群に比べて危険率1%未満で有意に高く、B群とPB群の間に有意差は認められなかった。根吸収はB群およびPB群が、P群に比べて危険率1%未満で有意に根吸収が抑制されており、B群とPB群の間に有意差は認められなかった。

考察

本研究よりrhBMP-2は、根面に直接接して移植を行っても、スパーサー

を介在させても、ともに結合組織性付着を増加させる効果があることが示された。結合組織性付着の増加には、r h BMP-2 に対する歯根膜細胞の走化性と遊走増殖促進作用が影響していると考えられる。さらにこの効果は、スぺーサーの介在によって損なわれることがなく、BMP/担体を1 mm 程度なら根面から離しても効果が変わらないことが明らかにされた。

新生骨量はr h BMP-2 によって増加することが示されたが、スぺーサー法では、根面に直接接触して移植した場合よりも骨形成量が少なかった。この原因のひとつとして、既存歯根膜からの増殖細胞が、r h BMP-2 が高濃度であるBMP/担体への接触をスぺーサーによって阻止され、歯根膜由来細胞中のr h BMP-2 標的細胞が、骨芽細胞への分化を誘導されないことが影響している可能性が考えられる。

本研究のr h BMP-2 を直接根面に接して移植したB群の新生骨量は、他の同様の移植法を用いた研究に比べて少ないが、これには実験的歯周炎の惹起によって歯肉粘膜弁内面の骨膜が喪失したため、骨膜由来r h BMP-2 標的細胞による骨形成が誘導されないことが影響していると考えられる。また移植後に復位する歯肉弁内面の骨膜、特にその歯冠側は、r h BMP-2 が高濃度であるBMP/担体と根面とに直接接触することによって、骨性癒着の発生原因になると推測されるが、これもB群では実験的歯周炎によって歯冠側の骨膜が消失したため、骨性癒着の発生率が他の報告よりも少なかったと考えられる。さらに、スぺーサー法を行ったPB群の場合、スぺーサーの介在によりr h BMP-2/担体が根面から離れたため、そこで誘導された骨芽細胞が根面へ到達できず、根尖側から遊走、増殖してきた歯根膜細胞が、ルートプレーニング面を被覆しやすくなったため、骨性癒着がまったく観察されなかったと考えられる。

本研究の結果、スぺーサー法を用いてr h BMP-2 を水平性骨欠損部へ移植すると、骨性癒着や根吸収が抑制され、歯槽骨、セメント質及び結合組織性付着を含む歯周組織の再生が獲得できる可能性が示唆された。さらに骨形成量をはじめ歯周組織再生量がより多く誘導することが可能となれば、より優れた歯周組織再生療法として今後臨床応用されるのではないかと考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 川浪雅光
副査 教授 鈴木邦明
副査 教授 田村正人

学位論文題名

Favorable healing following space creation in rhBMP-2-induced periodontal regeneration of horizontal circumferential defects in dogs with experimental periodontitis

(実験的歯周炎モデルにスパーサー法を用いて
rhBMP-2 を移植した場合の歯周組織再生)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。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。

新しい歯周組織再生療法としてBMPに関する研究が行われ、現在、BMPによって新生骨と結合組織性付着の獲得は可能であるが、根面の一部に骨性癒着が生じる場合があると考えられている。当教室では骨性癒着の発生抑止を目的として、スパーサー法を考案し、外科的に骨欠損を作成したモデルを用いて検索を行ってその有効性を報告してきた。BMPの臨床応用にあたっては、実際の臨床に準じた歯周炎モデルを用いてBMPの効果とこの移植法の有効性を検討する必要がある。本研究の目的は、成人性歯周炎の大部分を占める水平性骨欠損の実験的歯周炎モデルを用いて、rhBMP-2をスパーサー法で移植した場合の歯周組織再生について検討することである。実験には成ビーグル犬(♂、平均体重11kg)4頭の上顎前臼歯の計36歯を用いた。移植に先立ち、CEJから根尖側4mmの水平性骨欠損を作成し、根面をメタルストリップスで被覆して、全層弁を復位し、ソフトフードを与え実験的歯周炎を惹起させた。8週後にメタルストリップスを除去し、罹患根面をルートプレーニングした後、以下の3群に分けて各根面の頬側および舌側に移植を行った。B群は3×3×2mmに裁断したpolymer-coated gelatin sponge (PGS)に、rhBMP-2 (7.2 μg/7.2 μl)を滴下した移植材を露出根面に直接接するように移植した。PB群は生理食塩水(3.6 μl)を含浸したPGS (3×3×1mm)を露出根面に直接接するように移植して、その外側にB群と同様に調整したrhBMP-2配合PGSを重ねて移植した。P群は生理食塩水(7.2 μl)を含浸したPGS (3×3×2mm)を露出根面に直接接するように移植した。なお、各群の移植材は、移植部位による影響がないように均等配置した。移植12週後に通法に従って病理標本を作成後、頬舌的に厚さ4

～8 μm で連続切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡にて病理組織学的観察および組織計測を行った。計測項目は、1. 骨欠損の高さ、2. 上皮の深部増殖量、3. 新生骨の高さ、4. 新生セメント質の長さ、5. 根吸収の長さ、6. 骨性癒着の長さの計6項目とした。統計学的分析には Mann-Whitney U 検定を用いた。

その結果、実験的歯周炎を惹起させた部位に rhBMP-2/PGS を直接根面に接して移植すると上皮のダウングロースが抑制され、新生骨と結合組織性付着の形成が増加したが、アンキローシスが24例中1例認められた。それに対し、スぺーサー法を用いた場合、新生骨量の増加は、スぺーサーを用いない場合に比べて少なかったが、上皮のダウングロースの抑制、結合組織性付着の形成量は同等で、さらにアンキローシスは全例で認められなかった。以上の結果より、成人性歯周炎の大部分を占める水平性骨欠損の再生療法として rhBMP-2 が有効であること、さらにスぺーサー法を用いることで骨性癒着が抑制できる可能性が示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で論文内容及び関連事項について質疑応答が行われた。主な質問事項として、

1. 外科的骨欠損と実験的歯周炎の違い及び本研究で実験的歯周炎を惹起させたモデルを用いた理由について
2. セメント質の形成を担当した細胞について
3. rhBMP-2によってセメント質の形成が促進された理由について
4. 徐放した rhBMP-2 が根面に一定期間とどまっていた可能性について
5. スぺーサー法で骨再生量が減少した理由について
6. BMPを配合していない PGS 担体のみの移植による歯周組織再生への影響について
7. スぺーサーの厚みが及ぼす歯周組織再生への影響について
8. 今回用いた BMP の濃度について

などであった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心として専門分野はもとより、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。

本研究では rhBMP-2 が、現在歯周組織再生療法として適応のない水平性骨欠損を伴う歯周炎に有効であるということ、およびその移植法として骨性癒着や根吸収などを防止できるスぺーサー法が有効であるということを病理組織学的に明らかにし、rhBMP-2 を臨床応用する上で重要な指針を与えたことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた。