

博士（歯学）伊部敬介

学位論文題名

BMP-2 の歯根象牙質表面への塗布による歯周組織再生

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周組織再生療法では根面にセメント質と歯根膜が再生されることが重要であるが、現在臨床応用されている歯周組織再生療法では十分な再生が困難な場合が多い。根面にセメント質を形成するためには、根面に付着増殖した細胞の硬組織形成能を上昇させることが必要であるが、そのためには成長因子を根面に局在させることができることが有効と思われる。これまでに BMP-2 を塗布した象牙質片に播種、培養した細胞の石灰化能が上昇することや、象牙質表面に BMP-2 を塗布してラット口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面に硬組織が形成されることが報告されており、象牙質表面に BMP-2 を塗布することによって、硬組織形成能の低い歯肉結合組織が根面に増殖した場合でも、セメント質を再生させることができると考えられる。しかし、歯根周囲には歯肉結合組織だけでなく上皮や歯根膜、歯槽骨なども存在しており、これらの組織が象牙質表面への硬組織形成にどのような影響を及ぼすかは不明である。そこで本研究の目的はイヌ歯周組織に外科的欠損を作製して、象牙質表面に BMP-2 を塗布し、歯周組織再生に与える影響を検討することである。

【材料と方法】

実験にはビーグル犬 6 頭の前臼歯 80 歯根を使用した。まず頬側歯肉を部分層弁で剥離し、骨膜を除去後、裂開状骨欠損を作製した。骨欠損の大きさは、幅が歯根の近遠心幅径、高さが 6mm とした。根面をルートプレーニング後、露出した象牙質の最根尖側と CEJ にノッチを付与し、象牙質表面処理を次の 5 群に分けて行った。未処理群では処理を行わず、0 群、100 群、400 群、1000 群では 24% EDTA で 3 分間脱灰後、水洗、乾燥して、それぞれ 0、100、400、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した BMP-2 を塗布した。象牙質表面処理後、各群とも歯肉弁を復位縫合した。4, 8 週の観察期間終了後、通法に従い標本を作製し、ヘマトキシリソ・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。組織学的計測は、①欠損の大きさ ②セメント質新生率 ③骨性癒着率 ④歯槽骨新生率 ⑤接合上皮新生率について行った。各組織学的計測値の統計学的分析には Mann-Whitney U 検定を用いた。

【結果】

1 臨床的観察結果

術後1～2週はすべての観察部位でわずかな歯肉の発赤腫脹が認められたが、その後消退し、観察期間終了まで炎症所見は認められなかった。

2 病理組織学的観察結果

- 1) 未処理群：4週は接合上皮の深部増殖が多く、セメント質と歯槽骨の新生は根尖側ノッチ付近にわずかに観察されたのみで、骨性癒着はなかった。8週は4週とほぼ同様の所見であった。
- 2) 0群：4週は接合上皮の深部増殖は少なく、セメント質と骨の新生が根尖側ノッチのやや歯冠側まで観察された。新生セメント質はすべて既存のセメント質と連続していた。骨性癒着は骨頂部付近でわずかに観察された。8週は4週とほぼ同様の所見であった。
- 3) 100群：4週は接合上皮の深部増殖が0群同様少なく、新生セメント質および新生骨の形成はやや増加していた。象牙質表面に新生した硬組織は、既存のセメント質と連続せず無細胞性で厚みの薄いものも見られた。このようなセメント質様硬組織は8例中2例に観察された。8週も4週とほぼ同様な所見であったが、既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織は8例中4例に観察された。骨性癒着は骨頂部付近にわずかに認められた。
- 4) 400群：4週は接合上皮の深部増殖やセメント質および骨の新生は100群と同様の所見であった。既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織も8例中2例に観察された。骨性癒着は8例中6例の骨頂部付近に認められた。8週も4週とほぼ同様の所見で、既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織が8例中4例に観察された。骨性癒着は8例中4例で骨頂部付近にわずかに見られた。
- 5) 1000群：4週は新生セメント質および新生骨の形成が多く認められ、既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織が8例中5例に観察された。骨性癒着は8例中2例の骨頂部でわずかに見られた。8週は4週とほぼ同様の所見で、既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織が8例中6例に観察された。骨性癒着は8例中3例にわずかに見られた。

3. 組織学的計測結果

- 1) 欠損の大きさ：5群間に有意差は認められなかった。
- 2) セメント質新生率：4週では未処理群9.1%に比べ、他の4群では30.7～49.2%を示し有意に高い値であった。8週も同様の傾向で、未処理群21.4%に比較して他の4群では39.6～62.6%であり有意差が認められた。また1000群は4および8週後において0群と比較して有意に高い値であった。
- 3) 骨性癒着率：4週では400群が11.6%で未処理群および0群、100群より有意に高かった。8週では0～8%で5群間に有意差は認められなかった。
- 4) 歯槽骨新生率：4週では100群、400群、1000群は43.5～58.7%で未処理群23.3%、0群23.5%と比較して有意に大きい値を示した。8週では400

群 59.4%、1000 群 62.4%で未処理群 21.3%、0 群 39.7%より有意に大きかった。

5) 接合上皮深部増殖率：4 週では未処理群が 44.8%で他の 4 群の 4.5~18.5% に比較して有意に大きかった。8 週では 0 群が 20.6%で 400 群 7.2%、1000 群 7.8%と比べ有意に大きい値を示した。

【考察】

本研究の結果、1000 群の新生セメント質は 0 群より有意に多く形成されたことから、高濃度の BMP-2 を塗布すると象牙質表面に新生セメント質の形成が促進されることが明らかとなった。BMP-2 を塗布した群では、新生セメント質は既存のセメント質と連続して形成されたものと、既存のセメント質とは連続性がなく歯冠側に形成されたものの 2 種類が観察された。既存のセメント質と連続して形成された新生セメント質は、塗布した BMP-2 が象牙質周囲に除放され、歯根膜中の未分化間葉系細胞のセメント芽細胞への分化を促進したためと考えられた。また既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織は、象牙質表面に付着増殖した歯肉結合組織の細胞が、BMP-2 により硬組織形成能の高い状態へ分化して、根表面に硬組織を形成した可能性が考えられた。

新生骨形成率は 0 群と比較して 400 群、1000 群が有意に大きく、根面に BMP-2 を塗布することにより、歯槽骨の新生にも有効であることが示された。形成された新生骨はすべて既存骨と連続していたことから、骨形成の促進も象牙質から除放された BMP-2 が歯槽骨部に存在する未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化させたためと考えられた。

骨性癒着は 400 群と 1000 群で観察され、とくに新生骨形成量が大きい標本の骨頂部付近に多く認められた。これは、骨頂部付近では歯根膜細胞が根面に到達する前に歯槽骨由来細胞が増殖したためと考えられた。骨性癒着量はわずかであり、経時的に増加する傾向はなかった。また、このような部分的な骨性癒着はヒトでは 3~5 年で消失する可能性が高いと考えられており、臨床的には大きな問題は生じないとと思われるが、更なる検討が必要であると思われる。

接合上皮深部増殖率は 400 群、1000 群は 0 群と比較して有意に小さく、象牙質に塗布した BMP-2 の効果により上皮の深部増殖が抑制されたと考えられた。

本研究の結果、象牙質表面に BMP-2 を塗布した場合、わずかな骨性癒着は見られたが、上皮の深部増殖が抑制され新生セメント質や新生骨の形成が促進されたことから、歯周組織再生に有効であることが示された。とくに、歯肉結合組織により象牙質表面に硬組織が形成された可能性が考えられたことから、セメント質再生を促進させる方法として効果が高いことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 川浪雅光
副査 教授 向後隆男
副査 教授 田村正人

学位論文題名

BMP-2 の歯根象牙質表面への塗布による歯周組織再生

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概要の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

現在臨床で応用されている歯周組織再生療法において重度歯周炎罹患歯では十分な再生が得られない場合が多いと考えられている。歯周組織再生療法では、セメント質再生能を有する歯根膜細胞が根面に増殖し、セメント質が再生されることが重要であるが、重度歯周炎では、歯根膜の喪失が著しいため、根面への増殖が不十分であるためと考えられる。

一方、重度歯周炎の周囲では歯根膜は減少しているが歯肉結合組織は多く存在しており、一般に歯肉結合組織の細胞は硬組織形成能が歯根膜に比べ低いため歯槽骨やセメント質の再生は困難であるとされている。

これまでに象牙質表面をクエン酸などで脱灰すると、象牙質表面に付着した細胞の ALP 活性が増加することが報告されており、象牙質の表面性状が細胞の石灰化能に影響することが知られている。このことから、象牙質表面を脱灰処理後、さらに細胞の硬組織形成能を上昇させる BMP-2 を根面に塗布すれば硬組織形成能の低い歯肉結合組織の細胞が根面に付着した場合でも根表面にセメント質様硬組織を形成することが可能ではないかと考え、当教室ではこれまでに脱灰処理後、BMP-2 を塗布した象牙質表面に播種、培養した歯肉結合組織の細胞の石灰化能が上昇することや、BMP-2 を塗布した象牙質片をラット口蓋結合組織内に移植した場合、象牙質表面に硬組織が形成されることを報告してきた。

しかし、この方法を歯周組織再生療法に応用する場合、歯根周囲には歯肉結合組織だけでなく、多種類の組織が存在しており、これらの組織が象牙質表面への硬組織再生にどのような影響を及ぼすか不明である。そこで本研究の目的は、BMP-2 を歯根象牙質表面に塗布することによる歯周組織再生に与える影響を検討することである。

実験方法はイヌ上下顎前臼歯歯根頬側部を部分層弁剥離して骨膜を除去した後、裂開状骨欠損を作成して歯根膜、セメント質を除去した。象牙質表面を処理しないものを未処理群、象牙質表面を 24% EDTA で脱灰処理後、さらに 0,100,400,1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整した BMP-2 を塗布したものをそれぞれ 0 群、100 群、400 群、1000 群とし、4、8 週後に病理組織学的観察と組織学的計測を行った。

その結果、セメント質新生率は8週の1000群が $62.6\pm15.0\%$ で0群の $39.6\pm13.7\%$ と比較して有意に大きい値を示した。またBMP-2を塗布した群では既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織が観察された。骨性癒着率は4週の400群、1000群でわずかに観察された。また、8週の骨性癒着はごくわずかで、すべての群間に有意差は認められなかった。新生骨はすべて既存の歯槽骨と連続して形成され、8週後の400群と1000群の歯槽骨新生率はそれぞれ $59.4\pm15.7\%$ 、 $62.4\pm11.1\%$ で未処理群 $21.3\pm16.8\%$ 、0群 $39.7\pm16.1\%$ と比較して有意に大きかった。接合上皮深部増殖率は、8週において400群と1000群が0群と比較して有意に小さかった。

これらの結果から①象牙質表面へのBMP-2塗布およびEDTA処理は、上皮の深部増殖を抑制し、セメント質の再生を促進させること、②高濃度のBMP-2を塗布すると、セメント質と歯槽骨の再生量が増加すること、③BMP-2を根面に塗布しても骨性癒着はわずかであったこと、が明らかにされ、歯根象牙質表面にBMP-2を塗布することは歯周組織の再生に有効であることが示唆された。

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の質疑応答がなされた。主な質問事項として、

- (1) BMP-2の歯根表面への塗布の術式について
- (2) BMP-2を使用した群における術後の創傷治癒について
- (3) BMP-2を使用した群に認められた既存のセメント質と連続しないセメント質様硬組織について
- (4) 24%EDTAを使用した理由及び根面脱灰の効果について
- (5) BMP-2を使用した400、1000群に認められた骨性癒着について

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た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。本研究は歯周組織において人工的骨欠損を作成し、歯根表面にBMP-2の塗布を行った場合の歯周組織の再生を明らかにしたことにより、臨床における歯周組織再生療法への応用に対して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）の学位を授与するのに値するものと認めた。