

学 位 論 文 題 名

象牙質表面処理剤の違いが BMP-2 による
硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

【緒言】

BMP-2は歯根膜、歯槽骨などに存在する未分化の間葉系幹細胞に対して作用し、歯周組織、すなわち歯槽骨やセメント質、歯根膜を再生させると考えられている。これまでに歯根象牙質を EDTA にて脱灰後、BMP を塗布し、結合組織内に移植すると象牙質表面に吸収や硬組織形成が観察されることが報告されてきた。しかし、象牙質を脱灰した場合、露出したコラーゲンは BMP の担体として機能している可能性があり、また、BMP は担体の種類や形状によって再生の効果が異なってくることが報告されていることから、象牙質表面処理液が異なると象牙質表面への硬組織形成や象牙質吸収に影響を及ぼす可能性がある。本研究の目的は、象牙質面に BMP-2 処理する前の脱灰方法の違いが、培養細胞の ALP 活性、および結合組織内での象牙質表面への硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響を検討することである。

【材料・方法】

- ① 実験 1: 牛下顎切歯歯根より象牙質片 216 個を作製し、EDTA 群、塩酸テトラサイクリン群、クエン酸群の 3 群に分けて、象牙質片をそれぞれ 24%EDTA(pH7.0)、200mg/ml 塩酸テトラサイクリン(pH2.0)、飽和クエン酸(pH1.0)に 3 分間浸漬脱灰後 PBS にて数回洗浄し、濃度 0、5 あるいは 10 μ g/ml の rhBMP-2 溶液に 10 分間浸漬し、処理した象牙質片上に歯根膜由来培養細胞を播種、培養し、1,3,5 日後に ALP 活性を測定した。各計測値の統計学的有意差検定には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。
- ② 実験 2: ラットより採取した切歯歯根から象牙質片を 144 個作製し、EDTA 群、塩酸テトラサイクリン群、クエン酸群、非脱灰群の 4 群に分けて、象牙質片をそれぞれ 24%EDTA(pH7.0)、200mg/ml 塩酸テトラサイクリン(pH2.0)、飽和クエン酸(pH1.0)、リン酸緩衝液(PBS)に 3 分間浸漬した後、PBS にて数回洗浄し、濃度 0、100 あるいは 400 μ g/ml の rhBMP-2 溶液に 10 分間浸漬した。その後、象牙質片をラット口蓋結合組織に移植した。2、4 週の観察期間終了後に移植象牙質片と周辺組織を一塊として摘出し、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液(pH7.4)にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、前頭面断で厚さ 5 μ m の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。さらに以下の項目については組織学的計測により求めた。

(1)硬組織形成率:象牙質面上に形成された硬組織の長さを象牙質片全体の長さで除したものの

(2)象牙質吸収率:象牙質吸収部の面積を計測し、これを元の面積で除したものの。各組織学的計測値の統計学的分析には、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。

【結果】

実験 1

BMP-2 が $10\mu\text{g/ml}$ の場合に EDTA 群の ALP 活性が他の2群と比較して有意に高かった。BMP-2 濃度の違いで ALP 活性を比較すると、EDTA 群は BMP-2 の濃度が高いほど ALP 活性を上昇させたが、塩酸テトラサイクリン群とクエン酸群では BMP-2 濃度の影響は明確ではなかった。

実験 2(組織学的結果)

1)BMP0 $\mu\text{g/ml}$ ではいずれの群においても硬組織形成は確認されず、わずかな吸収窩と破骨細胞様細胞がみられた。

2)BMP100 $\mu\text{g/ml}$ では EDTA 群で象牙質表面がわずかに吸収されその上に細胞を封入した硬組織が薄く一層形成されていた。塩酸テトラサイクリン群では、2週で象牙質表面に広範囲に深い吸収窩がみられ、吸収窩には破骨細胞様細胞が観察され、硬組織は吸収窩上に観察され、厚みがあり不整形で、周囲には骨芽細胞様細胞が観察された。クエン酸群では、BMP-2 濃度に関らず象牙質片周囲が表層から $20\sim 30\mu\text{m}$ 程度脱灰され、象牙質表面には広範囲で深い吸収が観察され、吸収窩には破骨細胞様細胞が観察された。また、象牙質面に硬組織が形成されたが、吸収窩上ではなく一層脱灰された象牙質上に直接形成されているものが多く、厚みは薄かった。

3)BMP400 $\mu\text{g/ml}$ では BMP100 $\mu\text{g/ml}$ と同様の傾向が観察された。

(組織学的計測結果)

1. 硬組織形成率

2週、4週ともに非脱灰群では硬組織形成は見られなかった。EDTA 群では BMP-2 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ の場合に 0、 $400\mu\text{g/ml}$ に比べて有意に硬組織形成率が高かった。塩酸テトラサイクリン群、クエン酸群では、BMP-2 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ と $400\mu\text{g/ml}$ が $0\mu\text{g/ml}$ に対し有意に硬組織を形成したが、BMP-2 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ と $400\mu\text{g/ml}$ の間には有意差が見られなかった。4群間で比較すると4週で BMP-2 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ の EDTA 群が他の全ての群に対し有意に高い値を示した。

2. 象牙質吸収率

2週、4週ともに非脱灰群では BMP-2 の濃度の異なる群間に有意な差は見られなかった。EDTA 群では BMP-2 濃度が $400\mu\text{g/ml}$ の場合は $0\mu\text{g/ml}$ に比べて有意に吸収が見られたが、 $100\mu\text{g/ml}$ と $400\mu\text{g/ml}$ の間には有意な差は見られなかった。塩酸テトラサイクリン群では2週では BMP-2 濃度 100 、 $400\mu\text{g/ml}$ が $0\mu\text{g/ml}$ と比べて有意に吸収していた。BMP100 $\mu\text{g/ml}$ と $400\mu\text{g/ml}$ の間では2週では有意な差は見られなかったが、4週では有意差が認められた。クエン酸群では2週では BMP-2 濃度 $400\mu\text{g/ml}$ が 0 、 $100\mu\text{g/ml}$ に対して有意に高い値を示していたが、4週では有意差は認められなかった。

4群間で象牙質吸収率を比較すると BMP-2 濃度が $0\ \mu\text{g/ml}$ の場合には 2,4 週ともに 4 群間に有意差は認められなかった。BMP-2 濃度が $100\ \mu\text{g/ml}$ では、4 週で塩酸テトラサイクリン群が非脱灰群、EDTA 群と比較して有意に大きな吸収を示した。BMP-2 濃度が $400\ \mu\text{g/ml}$ では、4 週で塩酸テトラサイクリン群が他の 3 群に比較して有意に大きな吸収を示した。

【考察】

脱灰し BMP 処理した象牙質面に付着した細胞の ALP 活性は EDTA 群が塩酸テトラサイクリン群とクエン酸群に比較して有意に高かった。脱灰して BMP $100\ \mu\text{g/ml}$ で処理した象牙質片を歯肉結合組織内に移植した実験 2 でも、EDTA 群は他の群と比較して硬組織形成率が有意に高かった。これは、脱灰液の違いによるコラーゲン線維の変性の程度や脱灰の程度が、付着した BMP-2 及び付着した細胞の活性や BMP-2 の付着量に影響したのではないかと考えられた。EDTA の pH は中性のため象牙質コラーゲンが変性しなかったこと、またクエン酸、塩酸テトラサイクリンは酸性脱灰液のためコラーゲンを変性させたと考えられる。さらに塩酸テトラサイクリンは象牙質のカルシウムと結合して根面に残ることや、塩酸テトラサイクリンで根面を脱灰後に線維芽細胞を培養すると細胞形態が変化することや細胞の付着増殖には他の脱灰液に比較して不利であることが報告されており、本研究でも根面に残存した塩酸テトラサイクリンが BMP-2 の活性に影響した可能性が考えられた。

象牙質吸収率は脱灰処理した群では EDTA 群が最も低く、塩酸テトラサイクリン群が最も大きな値を示した。これは、硬組織形成と同様に、脱灰液の違いによりコラーゲンの変性程度が異なること、塩酸テトラサイクリンが象牙質面に残存して BMP-2 の付着程度や BMP-2 の破骨細胞活性化作用に影響するためではないかと思われた。また、BMP-2 の濃度が高いほど成熟破骨細胞を集積し、破骨細胞性骨吸収を誘発することが報告されており、本研究でも EDTA 群や塩酸テトラサイクリン群では、BMP 濃度が高くなると象牙質吸収率が高い値を示した。

本研究の結果、象牙質に BMP-2 を塗布する際の脱灰液が異なると、根面に付着した細胞の ALP 活性に影響を及ぼすことが明らかとなった。また口蓋部結合組織内では象牙質面におけるセメント質様硬組織の形成と象牙質吸収に影響を及ぼすことが明らかとなり、今回選択した脱灰液の中では EDTA が最も吸収が少なく形成量が大きく、BMP-2 の根面への塗布によるセメント質様硬組織形成には最適であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光

副 査 教 授 脇 田 稔

副 査 教 授 佐 野 英 彦

学 位 論 文 題 名

象牙質表面処理剤の違いが BMP-2 による 硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響

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て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、歯周組織再生療法ではセメント質を再生させ、機能的な付着を確立することが重要であると考えられているが、一般に歯周外科治療直後では、根面は歯肉結合組織と接触することが多い一方で、歯肉結合組織は硬組織形成能が低く、セメント質を再生しないと考えられている。そのため、セメント質を再生させるためには歯根膜由来の細胞が必要であることから、近年 GTR 法が臨床応用されてきたが、その適応は 2-3 壁性骨欠損に限定され、歯周炎に多く認められる水平性骨欠損ではまだ十分な効果が得られていない。そこで、新たな歯周組織再生療法が必要と考えられ、当教室では象牙質表面を EDTA で表面処理し、そこに細胞の硬組織形成能を上昇させる成長因子である BMP2 を塗布することにより、根面に付着した硬組織形成能の低い歯肉結合組織からでも根面にセメント質を再生できるのではないかと研究を行ってきた。これまでに象牙質根面を EDTA によって処理後、骨形成蛋白(BMP)を塗布し、歯肉線維芽細胞由来培養細胞を播種した場合、ALP 活性が上昇すること、歯周組織において EDTA で表面処理した歯根象牙質表面に BMP2 を塗布すると歯冠側においてもセメント質様硬組織が形成したことを報告してきた。このことから歯根象牙質に BMP を塗布すると硬組織形成能の低い歯肉結合組織からでも根面に硬組織を形成できることを明らかにしてきた。

一方で、根面の処理方法の違いが象牙質に付着する細胞の石灰化能に影響を与えることが明らかにされている。また、BMP は担体の種類や形状によって効果が異なってくることが報告されている。BMP を塗布した場合、露出した象牙質は BMP の担体として機能している可能性があり、象牙質表面処理が異なると細胞の ALP 活性や象牙質表面への硬組織形成や象牙質吸収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 を塗布する前の象牙質の表面処理液の違いにより、付着する細胞の ALP 活性及び、象牙質表面への硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響を検討することである。

実験 1 ではウシ象牙質片を 3 群に分け、EDTA (pH7.0)、塩酸テトラサイクリン (pH2.0)あるいはクエン酸 (pH1.0)に 3 分間浸漬脱灰後、さらに rhBMP-2 濃度 0, 5 あるいは 10 μ g/ml に 10 分間浸漬し、ラット歯根膜細胞を播種、培養し、象牙質片に付着した細胞の 1,3,5 日後の ALP 活性を測定した。実験 2 では、ラット象牙質片を 4 群に分け、それぞれ EDTA、塩酸テトラサイクリン、クエン酸、PBS で 3 分間浸漬処理後、rhBMP-2 濃度 0、100 ある

いは 400 μ g/ml に 10 分間浸漬した。その後、ラット口蓋部結合組織内に移植し、2、4 週後、通法に従って組織標本を作製し、象牙質片上に形成された硬組織形成部位と吸収面積を計測し、象牙質片の長さに対する割合を算出して統計学的分析を行った。

実験 1 の結果、BMP-2 濃度 10 μ g/ml の場合、EDTA 群の ALP 活性は 3 日目、5 日目で大きく上昇し、他の 2 群と比較して有意差が認められた。また、EDTA 群は BMP-2 の濃度が高いほど ALP 活性が上昇したが、クエン酸群とテトラサイクリン群では rhBMP-2 濃度の影響は明確でなかった。実験 2 の結果、硬組織形成量は 2、4 週後ともに、BMP-2 濃度が 100 μ g/ml の場合に EDTA 群が他のすべての群と比較して有意に多かった($p<0.05$)。BMP-2 濃度 0 μ g/ml ではいずれの群においても硬組織の形成は認められなかった。象牙質吸収率は 4 週において BMP-2 濃度 400 μ g/ml ではテトラサイクリン群で他のすべての群と比較して有意に多かった($p<0.05$)。EDTA 群とクエン酸群の間に有意差はなかった。一方、BMP-2 の濃度が高いほど象牙質吸収量も大きくなる傾向にあった。非脱灰群では BMP-2 の濃度の違いによる象牙質吸収及び硬組織形成に有意差は認められなかった。

以上の結果から、根面に BMP-2 を塗布する前の象牙質表面処理液が異なると、根面に付着した細胞の ALP 活性に影響を及ぼすことが明らかとなった。また口蓋粘膜結合組織内では象牙質面におけるセメント質様硬組織の形成と象牙質吸収に影響を及ぼすことが明らかとなり、今回選択した脱灰液の中では EDTA が最も吸収が少なく形成量が大きく、BMP-2 の根面への塗布によるセメント質形成には最適であると考えられた。

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なされた。主な質問事項として、

- (1) 今回 EDTA、塩酸テトラサイクリン、クエン酸を脱灰液として選択した理由について
- (2) 各種脱灰液が洗浄して残存している可能性と、その影響及び BMP の付着の仕方について
- (3) 象牙質試料の測定の仕方と吸収のされ方について
- (4) BMP-2 が硬組織形成と象牙質吸収にどのように関与しているかについて
- (5) 硬組織形成率が EDTA では高い BMP 濃度で減少するのに対し、塩酸テトラサイクリン、クエン酸では濃度依存性があることについて
- (6) 組織写真の撮影法について

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 BMP-2 を塗布する前の象牙質の表面処理液の違いが細胞に及ぼす影響と結合組織の反応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。