

学位論文題名

BMP-2とコラーゲンハイドロゲルの  
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

BMP-2は歯周組織すなわち歯根膜や歯槽骨に作用し、硬組織再生を促進することが報告されている。一般にBMP-2は担体を用いて生体内に移植される。しかし当教室では、EDTAで脱灰した象牙質にBMP-2を塗布するとBMP-2が保持され、付着した細胞のALP活性と石灰化物形成能が上昇することを報告している。また伊部らはイヌ歯根象牙質表面にBMP-2を塗布することで、セメント質や歯根膜、歯槽骨の再生も促進されることを報告しており、根面に保持されたBMPが創傷治癒過程で徐放され、残存する歯根膜や歯槽骨などの歯周組織に影響を与えている可能性を示唆している。

また銅-アスコルビン酸架橋によるコラーゲンハイドロゲルは、より高い細胞誘導性と生体吸収性を示し、細胞伸展の足場となって創傷治癒を促進することが報告されている。当教室ではイヌの裂開状骨欠損部の露出根面に、このコラーゲンハイドロゲルを塗布すると、根表面に骨芽細胞や歯根膜様細胞の著明な増殖が観察され、上皮の根尖側移動が抑制し、セメント質と歯槽骨の再生量が増加したことを報告している。このコラーゲンハイドロゲルが骨芽細胞や歯根膜細胞のスキヤホールドとして、また歯肉上皮や歯肉結合組織のバリアーとしても有効である可能性が考えられる。

したがってBMP-2を根面に塗布する方法にコラーゲンハイドロゲルを同時に応用することで、根面に硬組織形成能の高い歯根膜細胞や骨芽細胞を選択的に増殖させ、歯周組織再生をさらに高めることができる可能性がある。そこで本研究の目的は、BMP-2を塗布した歯根象牙質にさらにコラーゲンハイドロゲルを塗布することによって、歯周組織再生に与える影響を検討することである。

材料および方法

実験動物にはビーグル犬(雄11~12ヶ月齢)8頭を使用し、被験部位は上下顎前臼歯歯根(128部位)とした。頬側歯肉粘膜を部分層弁で剥離し、骨膜を除去した後、歯根の近心隅角から遠心隅角に及ぶ高さ6mmの裂開状骨欠損を作製し、ルートプレーニングしてセメント質を除去した。次に歯根象牙質表面を24%EDTAにて3分間脱灰して4群に分け、BMP-Gel群ではrhBMP-2溶液(1000 $\mu$ g/ml、アステラス製薬)を歯根象牙質表面に塗布後さらにコラーゲンハイドロゲルを塗布、BMP群ではrhBMP-2のみを塗布、Gel群ではコラーゲンハイドロゲルのみを塗布、未塗布群では何も塗布せずに歯肉弁を復位縫合した。1、2、4、8週後、通法に従って厚さ6 $\mu$ mの脱灰薄切標本作製、HE重染色を行い、組織学的観察及び4、8週の標本については以下の組織学的計測を行った。①歯槽骨新生率、②セメント質新生率、③接合上皮深部増殖率、④骨性癒着率。

統計学的分析には Mann-Whitney U 検定を用いた。

## 結果

### 1. 病理組織学的観察

#### 1) 術後1週

未塗布群では歯根表面と歯肉粘膜弁との間に炎症性細胞浸潤や血餅、フィブリン網が観察されたのに対し、Gel 群では欠損部にコラーゲンゲルの残存が観察され、根面とゲルとの間には線維芽細胞様細胞や血管新生が観察された。

BMP 群では、根尖側ノッチ付近に血餅の残存が認められ、また骨芽細胞様細胞が歯槽骨頂部で観察された。

BMP-Gel 群では、Gel 群同様に欠損部に一部コラーゲンゲルが残存し、根表面には、多くの線維芽細胞様細胞が観察され、歯槽骨頂部には骨芽細胞様細胞や血管新生が観察された。

#### 2) 術後2週

未塗布群では、歯根表面は新生結合組織によって被覆されていた。一方 Gel 群では、コラーゲンゲルは完全に消失していたが、欠損部の根表面には線維芽細胞様細胞、新生血管を多く含む結合組織で満たされていた。BMP 群では、根尖側ノッチを越えて、骨梁の細い新生骨と新生セメント質が認められ、新生骨周辺に骨芽細胞様細胞が観察された。

BMP-Gel 群では、Gel 群と同様にコラーゲンハイドロゲルが完全に消失し、新生骨や新生セメント質が既存の組織と連続して根尖側ノッチを越えて観察され、ノッチ間中間部まで観察される標本も見られた。新生骨周囲には多量の骨芽細胞様細胞が観察された。

#### 3) 術後4週

未塗布群では、新生骨と新生セメント質は根尖側ノッチ部に局限してわずかに観察された。

Gel 群では、新生骨と新生セメント質は、ノッチ間中間部近くまで形成されているのが観察された。

BMP 群及び BMP-Gel 群では、新生骨と新生セメント質の形成がノッチ間中間部を超えて観察された。新生骨は2週と比較して骨梁が発達したが、骨髓腔が多く観察された。BMP 群と BMP-Gel 群は接合上皮の深部増殖が少なかった。

#### 4) 術後8週

未塗布群、Gel 群では4週とほぼ同様の所見であったが、Gel 群の新生骨は4週と比較して骨梁が太くて緻密になっていた。

BMP 群も4週とほぼ同様の所見が観察され、BMP-Gel 群の新生骨は4週と比べて緻密であり、歯冠側ノッチ付近まで再生されていた。骨性癒着した部位は骨頂部で多く観察された。

### 2. 組織学的計測結果

8週後の歯槽骨新生率は、BMP-Gel 群:87%、BMP 群:65%、Gel 群:41%、未塗布群:29%であり、BMP-Gel 群は未塗布群、Gel 群、BMP 群と比較して有意に大きかった。また BMP-Gel 群の8週は4週と比較しても有意に大きかった。セメント質新生率は BMP-Gel 群:45%、BMP 群:48%、Gel 群:39%、未塗布群:29%であり、BMP-Gel 群は未塗布群と比較して有意に大きかった。上皮深部増殖率は BMP-Gel 群:0.3%で未塗布群:22%と比較して有意に少なかった。また、骨性癒着率は BMP-Gel 群:6%、BMP 群:9%、Gel 群:0%、未塗布群:0%でいずれも少なかった。

## 考察

本研究の結果、4, 8 週の新生骨形成率とセメント質新生率は、BMP-Gel 群、BMP 群ともに未塗布群と比較して有意に高かった。根表面から徐放された BMP-2 が歯槽骨や歯根膜の未分化間葉系細胞に作用して骨芽細胞やセメント芽細胞への分化を促進させ、歯槽骨やセメント質が再生したものと考えられた。また BMP-Gel 群が、BMP 群より長期に骨新生が継続していた。このことから創傷治癒初期にコラーゲンハイドロゲルが歯肉結合組織や上皮のバリアーとなり、コラーゲンゲル中のコラーゲンやアスコルビン酸による歯根膜細胞や骨芽細胞の増殖や分化を促進した可能性やコラーゲンゲル自体が、根面から徐放された BMP を保持し、BMP-2 の骨芽細胞への分化や骨誘導作用を促進した可能性が考えられた。

以上の結果から、BMP-Gel 群は、わずかな骨性癒着は見られるものの、新生骨や新生セメント質の形成が促進され、上皮の深部増殖が抑制されたことから、根面に BMP-2 を塗布してコラーゲンハイドロゲルを塗布することは、歯周組織再生に有効な方法である可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光  
副 査 教 授 田 村 正 人  
副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

## BMP-2とコラーゲンハイドロゲルの 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、歯根膜由来細胞を歯周組織欠損部に増殖させることを目的とした組織誘導再生法やエナメル基質タンパクを主成分とするエムドゲインを用いた再生療法が臨床応用されている。しかし、多くの歯周病に見られる水平性骨欠損や一壁性骨欠損症例では十分な再生が得られない場合が多く、新たな歯周組織再生療法の開発が必要と考えられている。これまで当教室では、BMP-2 を歯根象牙質に塗布することで歯槽骨やセメント質の再生を増加させること、また銅-アスコルビン酸で架橋したコラーゲンハイドロゲルが、骨芽細胞や歯根膜細胞のスキヤホールドとなり、歯根象牙質に塗布すると歯周組織再生を促進することを報告してきた。この BMP-2 とコラーゲンハイドロゲルを同時に歯周組織へ応用することにより、根面に硬組織形成能の高い歯根膜細胞や骨芽細胞を選択的に増殖させ、歯周組織再生をさらに高めることができる可能性がある。そこで本研究では、BMP-2 を塗布した歯根象牙質にさらにコラーゲンハイドロゲルを塗布することによって歯周組織再生に与える影響を検討した。

実験動物にはビーグル犬(雄 11～12 ヶ月齢)8 頭を使用し、被験部位は上下顎前臼歯歯根(128 部位)とした。頬側歯肉粘膜を部分層弁で剥離し、骨膜を除去した後、歯根の近心隅角から遠心隅角に及ぶ高さ 6 mm の裂開状骨欠損を作製し、ルートプレーニングしてセメント質を除去した。次に歯根象牙質表面を 24%EDTA にて 3 分間脱灰して 4 群に分け、BMP-Gel 群では rhBMP-2 溶液(1000  $\mu$  g/ml、アステラス製薬)を歯根象牙質表面に塗布後、さらにコラーゲンハイドロゲルを塗布、BMP 群では rhBMP-2 のみを塗布、Gel 群ではコラーゲンハイドロゲルのみを塗布、未塗布群では何も塗布せずに歯肉弁を復位縫合した。1、2、4、8 週後、通法に従い厚さ 6  $\mu$  m の脱灰薄切標本を作製、HE 重染色を行い、組織学的観察及び 4、8 週の標本については以下の組織学的計測を行った。①歯槽骨新生率、②セメント質新生率、③接合上皮深部増殖率、④骨性癒着率、⑤歯根吸収率。統計学的分析には Mann-Whitney U 検定を用いた。

1 週後の BMP-Gel 群では、欠損部に一部ゲルが残存し、根表面には多くの線維芽細胞様細胞が観察された。歯槽骨頂部には骨芽細胞様細胞と血管新生が観察された。2 週後、ゲルは完全に消失して、欠損部には線維芽細胞様細胞や骨芽細胞様細胞、血管新生を多く含む結合組織で満たされていた。

8 週後の歯槽骨新生率は、BMP-Gel 群:87%、BMP 群:65%、Gel 群:41%、未塗布群:29%であり、BMP-Gel 群は未塗布群、Gel 群、BMP 群と比較して有意に大きかった。セメント質新生率は、BMP-Gel 群:45%、BMP 群:48%、Gel 群:39%、未塗布群:29%であり、BMP-Gel 群は未塗布群と比較して有意に大きかった。上皮深部増殖率は、BMP-Gel 群:0.3%で未塗布群:22%と比較して有意に少なかった。また骨性癒着率は、BMP-Gel 群:6%、BMP 群:9%、Gel 群:0%、未塗布群:0%でいずれも少なかった。

以上、歯根象牙質に BMP-2 を直接塗布し、さらにコラーゲンハイドロゲルを塗布した場合の歯周組織再生に及ぼす影響を検討した結果、BMP-Gel 群はわずかな骨性癒着は見られるものの、新生骨や新生セメント質の形成が促進され、上皮の深部増殖が抑制されたことから、根面に BMP-2 を塗布してコラーゲンハイドロゲルを塗布することは、歯周組織再生に有効な方法であ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なされた。主な質問事項として、

- (1) コラーゲンハイドロゲルの調整法について
- (2) コラーゲンハイドロゲルを BMP の担体として用いた場合について
- (3) コラーゲンハイドロゲルの吸収過程について
- (4) アンキローシスが生じた理由について
- (5) アンキローシスの臨床的診断法について
- (6) 今後の臨床応用について

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。本研究は歯根象牙質表面に BMP-2 とコラーゲンハイドロゲルを塗布することで、歯周組織再生に有効であり、特に歯槽骨の再生を高める効果を示したことにより、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。