

# 1 壁性骨欠損における歯根象牙質表面への BMP-2塗布による歯周組織再生効果

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

これまでに 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すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されたことが報告されている。このことから、BMP-2 を根面に塗布する方法により、硬組織形成能が低い歯肉結合組織が根面に増殖してもセメント質が再生できる可能性が示唆された。さらに、BMP-2 を根面に塗布する方法をイヌ裂開状骨欠損に応用した研究では、接合上皮の深部増殖が抑制され、根面にセメント質様硬組織が形成されただけでなく、同時に歯根膜や歯槽骨の再生も高められたことが報告されている。そこで本研究では、臨床応用に向けて、裂開状骨欠損に比べて周囲に残存している歯周組織が少なく、再生が困難な欠損形態である 1 壁性骨欠損において、歯根象牙質表面に BMP-2 を塗布することが歯周組織再生に及ぼす効果を病理組織学的に評価した。

### 【材料と方法】

実験動物にはビーグル犬(雌, 12~16 ヶ月齢) 7 頭を使用し、被験部位は下顎第二前臼歯近心根と遠心根、および第四前臼歯近心根の計 42 部位とした。前準備として下顎第一前臼歯と第三前臼歯の抜歯を行った。抜歯後 7 週よりスクレーリングとブラッシングによる機械的清掃と、0.2% グルクロン酸クロルヘキシジンによる化学的清掃を行い、臨床的に健康な歯周組織を確立した。

抜歯から 8 週経過時に、全身麻酔下で被験部位の頬側および舌側の歯肉歯槽粘膜を部分層弁で剥離して骨膜を除去し、セメントエナメル境から高さ 5mm, 近遠心幅 3mm, 歯根の頬, 舌側が歯根中央部まで露出する 1 壁性骨欠損を作製した。露出した根面の歯根膜とセメント質を除去し、最根尖側とセメントエナメル境にノッチを付与した。その後、24%EDTA で根面を 3 分間脱灰し、生理食塩水で根面の洗浄を行った。次に BMP 群では BMP-2 (1000 $\mu$ g/ml, アステラス製薬) を根面に塗布し、未塗布群では BMP-2 の塗布を行わずに歯肉歯槽粘膜弁を復位縫合した。

手術後 3 日間アンピシリンナトリウム (300mg/kg) を 1 日 1 回投与し、術後 7 日目に抜糸を行った。その後、1 週間に 2 回の割合でブラッシングによる機械的清掃と 0.2% グルクロン酸クロルヘキシジンによる化学的清掃を行い、必要に応じてスクレーリングを行った。

4 週および 8 週の観察期間終了後に観察部位を摘出し、10%ギ酸クエン酸ナトリウム溶液で 8 週間脱灰し、厚さ約 6 $\mu$ m の近遠心的縦断連続切片を作製した。その後ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡を用いて病理組織学的観察と組織学的計測を行った。組織学的計測で

は、各部位の歯根中央部の切片と中央部から頬舌方向にそれぞれ 180 $\mu$ m 離れた切片の計 3 枚を選択して計測を行った。組織学的計測項目は、歯槽骨新生率、セメント質新生率、接合上皮深部増殖率、骨性癒着率とし、統計学的分析には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

## 【結果】

### 1. 病理組織学的観察結果

#### 1) 未塗布群 4 週

骨欠損部の大部分は結合組織によって満たされており、新生骨と新生セメント質が既存の歯槽骨とセメント質に連続して、ごくわずかに根尖側ノッチ付近に形成されているのが観察された。接合上皮の深部増殖は歯冠側ノッチを越えていたものが多かった。

#### 2) BMP 群 4 週

骨が根面に沿って歯冠側方向に伸びており、欠損の半分程度まで新生骨の形成が認められた。新生骨は幼弱な線維骨であり、骨梁間に多数の骨髓形成が観察された。また、既存のセメント質と連続した新生セメント質形成が認められ、歯冠側の一部には既存のセメント質とは連続しないセメント質様硬組織の形成が認められた。骨性癒着は骨頂部で一部観察された。

#### 3) 未塗布群 8 週

骨欠損底部で骨形成が認められたものの、多くの部分は結合組織によって満たされていた。歯冠側ノッチ部では、接合上皮の深部増殖を認めた。

#### 4) BMP 群 8 週

新生骨が骨欠損底部だけでなく、さらに厚みの薄い骨が根面に沿って歯冠側ノッチ付近まで形成されているのが観察された。また、BMP 群 4 週に比べて骨梁の緻密化が認められた。新生セメント質は、BMP 群 4 週と比較して厚さが増大しており、歯冠側では既存のセメント質とは連続しないセメント質様硬組織が一部に認められた。接合上皮の深部増殖は少なく、骨性癒着は BMP 群 4 週と同様に主に骨頂部で観察された。歯根吸収はほとんど認められなかった。

### 2. 組織学的計測結果

歯槽骨新生率は、4 週では未塗布群  $17.0 \pm 6.0\%$ 、BMP 群  $62.0 \pm 15.2\%$ 、8 週では未塗布群  $32.2 \pm 15.1\%$ 、BMP 群  $70.0 \pm 12.9\%$  で、BMP 群は有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。セメント質新生率は、4 週では未塗布群  $7.0 \pm 5.4\%$ 、BMP 群  $32.7 \pm 14.4\%$ 、8 週では未塗布群  $13.4 \pm 10.6\%$ 、BMP 群  $45.4 \pm 10.0\%$  で、BMP 群は有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。また、接合上皮深部増殖率は、4 週では未塗布群： $19.7 \pm 19.0\%$ 、BMP 群： $4.3 \pm 6.2\%$  で、両群間に有意差は認められず ( $p > 0.05$ )、8 週では未塗布群  $8.4 \pm 10.0\%$ 、BMP 群  $1.3 \pm 3.1\%$  で、BMP 群は有意に小さかった ( $p < 0.05$ )。骨性癒着率は、4 週では未塗布群  $0\%$ 、BMP 群  $11.6 \pm 18.3\%$  で、BMP 群は有意に大きく ( $p < 0.05$ )、8 週では未塗布群  $0\%$ 、BMP 群  $13.1 \pm 10.0\%$  で、BMP 群は有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。

## 【考察】

BMP 群では未塗布群と比較して有意に多くの歯槽骨再生が認められ、また再生した歯槽骨の形態は、両群で大きな差異が観察された。未塗布群では骨欠損部の大部分は結合組織によって満たされ、新生骨は既存骨から連続してわずかに形成されていたのに対し、BMP 群では新生骨が既存骨から連続して形成されていただけでなく、さらに歯冠側へ歯根に沿った薄い骨が形成されていた。この歯根に沿った骨新生は、根面から徐放された BMP-2 が根面付近で高い濃度を維持

して新生骨形成に作用したためと考えられた。

セメント質新生率において、BMP 群は未塗布群と比べて有意に大きかったことから、BMP-2 を根面に塗布することは、1 壁性骨欠損においてもセメント質形成を促進することが明らかになった。BMP 群の新生セメント質の多くは既存のセメント質から連続して形成されていたが、既存のセメント質とは連続しないセメント質様硬組織も歯冠側の一部に認められた。これは根面に付着増殖した歯肉結合組織の硬組織形成能が BMP-2 によって上昇したことにより、既存のセメント質とは連続しないセメント質様硬組織が形成されたものと考えられた。

BMP-2 を根面に塗布することで接合上皮の深部増殖が抑制された。これまでに BMP-2 を歯周組織再生に応用した多くの研究においても、接合上皮の深部増殖抑制が報告されている。本研究の歯周組織再生には、接合上皮の深部増殖抑制も重要な役割を果たしていると考えられた。

以上より、根面に BMP-2 を塗布する方法は、1 壁性骨欠損においても歯周組織再生に有効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

### 1 壁性骨欠損における歯根象牙質表面への BMP-2塗布による歯周組織再生効果

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。

これまでに 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すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されたことが報告されている。このことから、BMP-2 を根面に塗布する方法により、硬組織形成能が低い歯肉結合組織が根面に増殖してもセメント質が再生できる可能性が示唆された。さらに、BMP-2 を根面に塗布する方法をイヌ裂開状骨欠損に応用した研究では、接合上皮の深部増殖が抑制され、根面にセメント質様硬組織が形成されただけでなく、同時に歯根膜や歯槽骨の再生も高められたことが報告されている。そこで本研究では、臨床応用に向けて、裂開状骨欠損に比べて周囲に残存している歯周組織が少なく、再生が困難な欠損形態である 1 壁性骨欠損において、歯根象牙質表面に BMP-2 を塗布することが歯周組織再生に及ぼす効果を病理組織学的に評価した。

実験動物にはビーグル犬（雌、12～16 ヶ月齢）7 頭を使用し、被験部位は下顎第二前臼歯近心根と遠心根、および第四前臼歯近心根の計 42 部位とした。前準備として下顎第一前臼歯と第三前臼歯の抜歯を行った。抜歯から 8 週経過時に、被験部位の頬側および舌側の歯肉歯槽粘膜を部分層弁で剥離して骨膜を除去し、セメントエナメル境から高さ 5mm、近遠心幅 3mm、歯根の頬、舌側が歯根中央部まで露出する 1 壁性骨欠損を作製した。露出した根面の歯根膜とセメント質を除去し、最根尖側とセメントエナメル境にノッチを付与した後、24%EDTA で根面を 3 分間脱灰し、生理食塩水で洗浄を行った。次に BMP 群では BMP-2 (1000 $\mu$ g/ml, アステラス製薬) を根面に塗布し、歯肉歯槽粘膜弁の復位縫合を行った。未塗布群では根面の脱灰後 BMP-2 を塗布せずに縫合を行った。4 週および 8 週の観察期間終了後、観察部位を摘出し、通法に従い厚さ約 6 $\mu$ m の近遠心的縦断連続切片を作製、HE 染色を行い、病理組織学的観察と組織学的計測を行った。組織学

的計測項目は、歯槽骨新生率、セメント質新生率、接合上皮深部増殖率、骨性癒着率とし、統計学的分析には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

未塗布群では、骨欠損部の大部分は結合組織によって満たされ、新生骨は骨欠損底部に形成されていた。BMP 群では、骨欠損部に新生骨が観察され、根面に沿った薄い骨が歯冠側ノッチ付近まで形成されていた。また、新生セメント質が多く認められ、一部に既存のセメント質とは連続しないセメント質様硬組織も観察された。

歯槽骨新生率は、4 週では未塗布群  $17.0 \pm 6.0\%$ 、BMP 群  $62.0 \pm 15.2\%$ 、8 週では未塗布群  $32.2 \pm 15.1\%$ 、BMP 群  $70.0 \pm 12.9\%$  で、BMP 群は有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。セメント質新生率は、4 週では未塗布群  $7.0 \pm 5.4\%$ 、BMP 群  $32.7 \pm 14.4\%$ 、8 週では未塗布群  $13.4 \pm 10.6\%$ 、BMP 群  $45.4 \pm 10.0\%$  で、BMP 群は有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。また、接合上皮深部増殖率は、8 週では未塗布群  $8.4 \pm 10.0\%$ 、BMP 群  $1.3 \pm 3.1\%$  で、BMP 群は有意に小さかった ( $p < 0.05$ )。骨性癒着率は、4 週では未塗布群  $0\%$ 、BMP 群  $11.6 \pm 18.3\%$  で、BMP 群は有意に大きく ( $p < 0.05$ )、8 週では未塗布群  $0\%$ 、BMP 群  $13.1 \pm 10.0\%$  で、BMP 群は有意に大きかった ( $p < 0.01$ )。

以上より、本研究のような歯周組織欠損の大きい 1 壁性骨欠損においても BMP-2 を根面に塗布することが、新生骨や新生セメント質の形成を促進し、接合上皮の深部増殖を抑制することが明らかとなり、歯周組織再生に有効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) 従来の歯周治療後の 1 壁性骨欠損の治癒形態について
- (2) 観察期間を 4 週、8 週に設定した理由について
- (3) 未塗布群の欠損部を満たしている結合組織中の細胞成分が少ないことについて
- (4) BMP 群の新生セメント質周囲にセメント芽細胞がみられないことについて
- (5) BMP 群の根面と新生骨の間の疎な結合組織について
- (6) BMP-2 と bFGF、BMP-2 とコラーゲンスポンジの併用法について

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。本研究は再生が難しいとされている 1 壁性骨欠損において、歯根象牙質表面に BMP-2 を塗布する方法が、歯周組織再生に有効であることを示し、今後の歯周組織再生療法におい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。