

博 士 (歯 学) 原 橋 宏 幸

学 位 論 文 題 名

An immunohistochemical study of the periodontal attachment on surgically-denuded root dentin after periodontal surgery

(歯周外科後に生じた歯周組織と既存象牙質との
接合に関する免疫組織化学的研究)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周治療の最終目標は、破壊された歯周組織を再生して機能と形態を回復させることにある。これには露出根面上への新たなセメント質形成が必要である。現在まで、歯根表面上のセメント質再生を狙ったさまざまな歯周組織再生療法が臨床応用されている。それらの組織学的研究で、新生セメント質が歯根表面から剥離している報告がある。一方、通常セメント質が組織標本作成過程で剥離することはほとんど無く、歯周外科手術後に生じた新生セメント質と象牙質の接着様式は、通常発生過程で生じたものとは異なる可能性がある。

ヒトおよびラットのセメント質の有機質には、コラーゲン線維以外に酸性糖蛋白である BSP と OPN が存在し、特にセメント象牙境に集積していることが明らかにされている。また、セメント象牙境に集積した BSP と OPN はセメント質の初期石灰化に関与するとともに、セメント象牙境の接着にも関与すると報告されている。また、術後に生じるセメント質と象牙質の接合は根面の EDTA 処理によるエッチングや、ブタの歯胚から抽出・精製された EMD の塗布によって影響を受ける可能性がある。

本研究は、歯周組織の治癒と再生、特に新生セメント質と象牙質の付着が、異なる根面処理によりどのような影響を受けるのかを明らかにすることを目的とし、病理組織学および免疫組織化学的に観察するとともに組織計測し、分析項目の算出および統計分析を行い、それぞれの術式の効果について考察した。

【材料および方法】

実験動物として成ニホンザル 2 匹を用い、上顎歯頬側根面の計 36 部位を実験部位とした。実験部位の頬側歯肉粘膜弁を全層弁剥離して歯槽骨を露出させ、CEJ を基準点として象牙質表面をラウンドバーで削除し、根尖方向へ幅 0.5mm、長さ 4mm の裂開状欠損を作成した。術式の違いにより 3 群に分け、欠損作成のみの群を Fop 群、24%EDTA で 15 秒間エッチング処理した群を Etc 群、エッチング処理後にエムドゲインゲルを塗布した群を EMD 群とした。各群ともに処置後、歯肉弁を復位、縫合した。観察期間は 3 ヶ月間とし、観察期間終了後、試料をホルマリン固定し、10%EDTA で脱灰して厚さ 6 μ m の連続横断切片を作成した。

各実験部位の欠損の歯冠側端から根尖側端の間の中央部の切片を 1 枚選択し、中央部と歯冠側端の中間部を歯冠側中間部、中央部と根尖側端の中間部を根尖側中間部としてそれぞれ 1 枚ずつ選択した。各実験部位につき計 3 枚を H-E 染色し、歯周組織再生に関する病理組織観察を行った。3 枚の H-E 染色切片のそれぞれ

れの歯冠側直近の 1 枚と根尖側直近の 1 枚の切片を選び、歯冠側切片には BSP の、根尖側切片には OPN の免疫染色を施した。免疫染色方法については一次抗体として、抗ヒト BSP・ウサギポリクローナル抗体、あるいは抗マウス OPN・ウサギポリクローナル抗体を反応させ、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ・ブタポリクローナル抗体を反応させ、3,3'-diaminobenzidine によって発色を行った。

組織計測を倍率 100 倍の光学顕微鏡を用いて行った。同一組織標本内で BSP と OPN の反応状況が類似していたので、BSP 染色切片のみで計測した。計測項目は、欠損象牙質表面全体の長さを欠損距離 (DL)、新生セメント質に覆われた欠損象牙質表面の長さをセメント質距離 (CL)、新生セメント質が剥離していない欠損象牙質表面の長さを形態学的接合距離 (CDF)、BSP 反応が認められる欠損象牙質表面の長さを免疫組織化学的接合距離 (CDA)、およびセメント質面積 (CA) とした。分析項目は、DL に対する CL の割合をセメント質再生率、DL に対する CDF の総和の割合を形態学的接合率、DL に対する CDA の総和の割合を免疫組織化学的接合率とした。3 群間の統計学的有意差検定には Kruskal-Wallis 検定を用い、2 群間の比較に Mann-Whitney の U 検定を用いた。

【結果】

1) 病理組織観察

いずれの群でも新生セメント質は欠損象牙質表面の大部分を覆っていた。歯周外科後に生じた新生セメント質は有細胞性セメント質であった。歯周外科後に生じた新生セメント質と象牙質の接合部には剥離がみられ、その剥離は欠損最深部よりも欠損側壁部で多く観察された。免疫染色では、3 群ともに歯周外科後に生じた新生セメント質と象牙質の接合部の大部分にも、本来のセメント象牙境と同等な BSP と OPN の発現がみられた。また、新生セメント質に隣接している部分で線維性組織が付着している象牙質表面に BSP と OPN の強い発現がみられる部分が多かった。

2) 免疫組織化学的計測および統計学的分析

欠損距離 (DL) とセメント質再生率ともに 3 群間に有意差はなかった。セメント質面積 (CA) に関しては、Etc 群に対して EMD 群は危険率 1%、Fop 群は危険率 5% で有意に大きかった。形態学的接合率については、Fop 群に対して Etc 群と EMD 群とは危険率 1% で、有意に高かった。免疫組織化学的接合率は 3 群間に有意差はなかった。

【考察】

本研究では、新生セメント質と既存象牙質との接合についての統計学的分析項目として、一般的に用いられているセメント質再生率の他に、形態学的接合率、免疫組織化学的接合率を算出した。形態学的接合率は、組織学的試料作製過程によって剥離しない象牙質とセメント質との強固な接着の指標とした。さらに、通常のセメント象牙境は BSP と OPN に富み、両基質は接着因子であり、BSP と OPN は初期セメント質の石灰化に関わるとされ、象牙質表面の接着因子の集積の指標として、免疫組織化学的接合率を算出した。

セメント質再生率に関して、3 群それぞれが 70% 以上の高い割合を示し、3 群間に有意な差が認められなかった。このことはエッチング処理と EMD 塗布のいずれもセメント質の再生距離に影響しないことを示している。しかしながらセメント質面積に関しては Etc 群が最も低い値を示した。欠損幅が狭いことによりエッチング処理が周囲の骨や歯根膜および歯肉粘膜弁などの周囲組織にも障害を与えたと思われる。一方、EMD 群にも同様なエッチング処理を行ったがセメント質面積は Etc 群よりも大きかった。おそらく EMD による効果により、エッチング剤の周囲組織への影響がマスクされたと思われる。

形態学的接合率に関して、Fop 群の新生セメント質と象牙質との接合強度は他の 2 群よりも弱く、この違いは根面のエッチング処理の有無によって生じたと思われる。エッチング処理の効果として、象牙質面上のスマ層が除去され内部の基質線維が露出し、この基質線維と新生セメント質線維とが交織することで接合強度が増した可能性が考えられる。

免疫組織化学的接合率に関しては3群間で有意差は認められなかった。この事は、エッチング処理やEMD塗布は付着因子であるBSPとOPNの集積には影響を及ぼさない事を示している。また、新生セメント質に隣接している部分で線維性組織が付着している象牙質表面にも、3群に共通してBSPとOPNの集積がみられたことは、光学顕微鏡では観察されにくい微細なセメント質の存在の可能性や、将来的な新生セメント質が形成される部分である可能性が考えられる。

【結論】

歯周外科後に生じた新生セメント質と象牙質、および線維性組織と象牙質との接合にはBSPとOPNが関与しており、エッチング処理は周囲歯周組織に為害作用を及ぼす可能性はあるものの、新生セメント質と象牙質の接合強度を高めることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 土 門 卓 文
副 査 教 授 網 塚 憲 生
副 査 准教授 山 本 恒 之

学 位 論 文 題 名

An immunohistochemical study of the periodontal attachment on surgically-denuded root dentin after periodontal surgery

(歯周外科後に生じた歯周組織と既存象牙質との
接合に関する免疫組織化学的研究)

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。

本研究は、術式の異なる歯周外科後に生じた歯周組織の治癒と再生を検索した。特に、新生セメント質と象牙質の接合部を、組織学および免疫組織化学的に解析する一方で、分析項目の算出および統計分析を行い、それぞれの術式の効果について考察した。

成獣期のニホンザル 2 匹における上顎歯頬側根面の計 36 部位を実験部位とし、同部位に裂開状欠損を作成した。歯周外科的な術式として、欠損作成のみの群を Fop 群、24%EDTA で 15 秒間処理した群を Etc 群、エッチング処理後にエムドゲインゲルを塗布した群を EMD 群の 3 群に分けた。3 ヶ月間の観察期間終了後、厚さ $6\mu\text{m}$ の連続横断切片を作成した。各実験部位につき 3 枚を選択して H-E 染色を行うとともに、その連続切片において骨シアロ蛋白 (bone sialoprotein: BSP) とオステオポンチン (osteopontin: OPN) の免疫染色を施した。組織計測を倍率 100 倍の光学顕微鏡を用いて行い、BSP 染色切片で計測した。計測項目は、欠損表面の長さを欠損距離 (DL)、新生セメント質に覆われた欠損表面の長さをセメント質距離 (CL)、新生セメント質が剥離していない欠損表面の長さを形態学的接合距離 (CDF)、BSP 反応が認められる欠損表面の長さを免疫組織化学的接合距離 (CDA)、およびセメント質面積 (CA) とした。分析項目は、 $CL/DL \times 100$ をセメント質再生率、 $CDF/DL \times 100$ を形態学的接合率、 $CDA/DL \times 100$ を免疫組織化学的接合率とした。

いずれの群でも、有細胞性セメント質で構成される新生セメント質が欠損表面の大部分を覆っていた。新生セメント質と象牙質の接合部の一部分に剥離が生じ、それは欠損最深部よりも欠損側壁部で多く観察された。免疫染色を行うと、本来のセメント象牙境と同様に、全群の新生セメント質と象牙質の接合部には、線状の BSP および OPN 陽性反応がみられた。また、線維性組織が付着している象牙質表面にも BSP と OPN 強陽性反応を示す部位を認めた。統計学

的分析では、欠損距離(DL)とセメント質再生率ともに3群間において有意差はなかった。セメント質面積(CA)に関しては、Etc群に対してEMD群は危険率1%、Fop群は危険率5%で有意に高い値を示した。形態学的接合率については、Fop群に対してEtc群とEMD群とは危険率1%で、有意に高値を示した。免疫組織化学的接合率は3群共に90%以上で、3群間に有意差はなかった。

本研究では、統計学的分析項目として、セメント質再生率の他に、形態学的接合率、免疫組織化学的接合率を算出した。形態学的接合率は、組織学的試料作製過程によって剥離しない象牙質とセメント質との強固な接着の指標とした。さらに、本来のセメント象牙境の接着因子であるBSPとOPNを象牙質表面の接着因子の集積の指標として、免疫組織化学的接合率を算出した。セメント質再生率に関して、3群間に有意な差が得られなかったことは、エッチング処理とEMD塗布がセメント質の再生距離に影響しないことを示唆している。形態学的接合率に関しては、Fop群の新生セメント質と象牙質との接合強度が他の2群よりも低く、この違いは根面のエッチング処理の有無によって生じたと思われる。従って、エッチング処理の効果として、象牙質面上のスマエ層が除去されることで接合強度が増した可能性が考えられる。3群間で免疫組織化学的接合率の有意差が認められなかったことから、エッチング処理やEMD塗布はBSPとOPNの集積には影響を及ぼさないと推測された。また、3群に共通して線維性組織が付着している象牙質表面にもBSPとOPNの集積がみられたことは、光学顕微鏡では観察されにくい微細なセメント質の存在の可能性や、将来的な新生セメント質が形成される部分である可能性が推察される。

以上のことから、歯周外科後に生じた新生セメント質と象牙質、および線維性組織と象牙質の接合にはBSPとOPNが関与し、接合の強さはエッチング処理によって高ま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質疑応答がなされた。主な質問事項は、

- (1) 根面処理に使用したエッチング剤の濃度・作用機序について
 - (2) 新生セメント質の定量評価に対して、今回設定した分析項目の有用性・意義について
 - (3) 新生セメント質を形成する細胞由来とその分化について
 - (4) OPN, BSPの基質間接着作用のメカニズムについて
- 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。本研究は歯周外科後に生じた歯周組織と既存象牙質との接合部について組織学的および免疫組織化学的に観察するとともに組織計測し、統計学的な検討をし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。