

学位論文題名

Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs

(イヌ根分岐部class II 骨欠損におけるコラーゲンハイドロゲル／スポンジスキャフォールドによる歯周組織再生)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周治療において、歯根膜細胞や骨系細胞の再生の場への遊走増殖促進が、機能的歯周組織再生を引き起こすと考えられている。そのために近年、細胞の定着や組織の3次元骨格のためのスキャフォールドを開発する研究がすすめられている。コラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドは、優れた細胞誘導効果を有するコラーゲンハイドロゲルと、機械的強度と生体親和性の高いコラーゲンスポンジで構成された3次元スキャフォールドである。本研究では、コラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドをイヌ根分岐部 class II 骨欠損へ埋入し、歯周組織再生に対する効果を病理組織学的に評価した。

【材料・方法】

コラーゲンハイドロゲルの作製: ウシ真皮由来アテロコラーゲン粉末に滅菌蒸留水を加え攪拌後、塩酸を加えてアテロコラーゲン溶液とし、L (+)-アスコルビン酸と塩化第二銅二水和物を加え、1.5%アテロコラーゲン-5mmol/l 塩酸-1mmol/l アスコルビン酸-0.1mmol/l 塩化第二銅とした。

コラーゲンスポンジの作製: ウシ真皮よりペプシン処理して得られたタイプ I アテロコラーゲンを酸性溶液(pH3.0)で溶解させ、中和処理を行って線維化アテロコラーゲン(FC)を作製した。また、FCと同様のアテロコラーゲン溶液を60℃で30分間熱処理して熱変性アテロコラーゲン(HAC)を作製した。FCとHACの溶液を9:1の割合で混合し、-30℃の凍結乾燥処理によりスポンジ状に成形、熱脱水架橋処理を行い、4%コラーゲンスポンジとした。

コラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドの作製: 5×3×3mmのコラーゲンスポンジにコラーゲンハイドロゲル(100μl)を真空下で含浸させ、コラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドを作製した。

手術方法: ビーグル犬(雌、体重9~10kg、12~16ヵ月齢)3頭に、全身麻酔および局所麻酔下にて上下顎両側前臼歯部頰側に根分岐部 class II 骨欠損を形成し、合計27部位とした。24%EDTAを用いて根面処理を行った後、被験部位を2群に分け、実験群はコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドを欠損部に満たすように埋入し、歯肉歯槽粘膜弁を復位縫合した。対照群では根面処理後何も埋入せずに歯肉歯槽粘膜弁を復位縫合した。

組織学的観察および組織学的計測: 術後2週および4週に周囲組織を含めて摘出し、通法に従い6μmの近遠心的連続薄切標本を作製した。HE重染色、マッソントリクローム染色を行い、組織学的観察および、新生骨面積、新生セメント質長さ、新生歯根膜長さ、上皮侵入長さ、コラーゲンハイドロゲル/スポンジ残存面積について組織学的計測を行い、統計学的分析を行った。また各計測項目について頬舌的な歯周組織の再生量を分析した。

【結果】

対照群 2 週: 欠損部は結合組織で満たされており、炎症性細胞の浸潤や一部に血餅、フィブリン網が観察された。骨欠損底部に新生骨の形成がわずかに観察された。根面に対して結合組織線維が平行に走行しておりセメント質の新生はわずかであった。頰側根分岐部開口部で一部に上皮の侵入が認められた。

対照群 4 週: 対照群 4 週では、対照群 2 週と比べて新生骨が緻密化しており、骨髓腔が多く観察された。根面に結合組織が接しており、根面に対して平行な線維が観察された。骨欠損根尖側において新生骨と新生セメント質の間に歯根膜様組織が観察された。

実験群 2 週: 欠損部は細胞に富んだ線維性結合組織が観察され、一部にコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドが残存しており、残存するコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールド内部および周囲に多くの線維芽細胞様細胞や新生血管が観察され、マクロファージや炎症性細胞はほとんど認められなかった。骨欠損底部に既存骨と連続した新生骨の形成が観察された。また根面に沿って細胞に富んだ線維性結合組織が根面に接しており、ノッチ部に限局してわずかに新生セメント質が認められた。頬側根分岐部開口部でも上皮の侵入は認められなかった。

実験群 4 週: 実験群 4 週では、根分岐部骨欠損内は既存の歯槽骨に連続し、新生セメント質に対向して増生した新生骨が観察され、根分岐部中央部、さらには根分岐部開口部においても多くの新生骨の再生が観察された。根表面には既存のセメント質と連続した無細胞性のセメント質様硬組織が観察された。また新生骨と新生セメント質の間には、歯根膜様線維の走行が多く観察された。新生骨と新生セメント質内には機能的な線維束からなるシャーピー線維の埋入が観察された。なお両群ともに骨性癒着は 1 例も観察されなかった。

組織学的分析結果: 実験群 4 週における歯槽骨、セメント質、歯根膜の再生量は、対照群と比較して有意に大きかった。上皮の侵入は実験群では対照群と比べて有意に抑制した。また各計測項目について頬舌的な歯周組織の再生量を分析した結果、歯根中央部では両群間で再生量に有意差は見られなかったが、頬側の分岐部開口部付近では実験群で再生量が多く有意差が認められた。(p < 0.05)

【考察】

コラーゲンハイドロゲルは、細胞侵入性に優れ、自重の 20～200 倍の水分保持能力を有しており、このような水分吸収性材料はさまざまな成長因子や栄養因子を含む組織間質液を再生スペースに保持するため、組織治癒において効果的なスキャフォールドと考えられている。コラーゲンハイドロゲルはコラーゲンスポンジと併用することで、欠損部に保持され、ゲル状スキャフォールドの流動性は改善された。本実験で用いたコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドは術後早期に吸収され、欠損スペースには、炎症性細胞の浸潤は少なく、線維芽細胞や骨芽細胞のような多くの細胞や新生血管の形成が多く観察された。また上皮の侵入は有意に抑制され、歯槽骨新生率、セメント質新生率、歯根膜新生率ともに実験群 4 週は対照群 4 週と比較して有意に多く認められた。このことからコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドは、優れた生体親和性、細胞侵入性、生体吸収性を有しており、コラーゲンにより術後早期にスキャフォールド内に侵入した間葉系細胞の分化・増殖を促進し、歯槽骨・セメント質・歯根膜の形成を促進したと考えられた。歯周組織再生療法において、歯槽骨と同時に歯根膜が再生することが強固な付着獲得に重要な役割を果たすと考えられている。本実験においては、コラーゲンハイドロゲルを応用することで、根面に沿って細胞に富んだ結合組織が接しており、実験群 4 週ではアンキローシスは見られず、機能的形態を有する新生歯根膜が観察され、新生骨と新生セメント質を接合するシャーピー線維が観察された。これまでもタイプ I コラーゲンをスキャフォールドに用いた結果、セメント質、歯根膜の再生を促進すると報告されており、コラーゲン・ゲルを用いた三次元環境下での細胞培養は、歯根膜細胞のアルカリフォスファターゼ活性陽性を示し、歯根膜細胞の形態、機能をより生理的な状態に維持できることを報告している。これらの結果から、根面に付着したハイドロゲル由来のコラーゲンが歯根膜細胞の増殖を促進させ、歯根膜やセメント質の再構築を促進させたものと考えられた。

【結論】

根分岐部 class II 骨欠損へのコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドの埋入は歯周組織再生に効果的であり、重度歯周炎における再生治療としての有効性が示された。

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

学 位 論 文 題 名

Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs

(イヌ根分岐部class II 骨欠損におけるコラーゲンハイドロゲル／スポンジスキヤフォールド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。

歯周治療において、歯根膜細胞や骨系細胞の再生の場への遊走増殖促進が、機能的歯周組織再生を引き起こすと考えられている。そのために近年、細胞の定着や組織の 3 次元的骨格のためのスキヤフォールドを開発する研究がすすめられている。コラーゲンハイドロゲル/スポンジスキヤフォールドは、優れた細胞誘導効果を有するコラーゲンハイドロゲルと、機械的強度と生体親和性の高いコラーゲンスポンジで構成された 3 次元的スキヤフォールドである。本研究では、コラーゲンハイドロゲル/スポンジスキヤフォールドをイヌ根分岐部 class II 骨欠損へ埋入し、歯周組織再生に対する効果を病理組織学的に評価した。4%コラーゲンスポンジ(FC-HAC スポンジ)にコラーゲンハイドロゲル(1.5%アテロコラーゲン-5mmol/l 塩酸-1mmol/l アスコルビン酸-0.1mmol/l 塩化第二銅)を真空下で含浸させ、コラーゲンハイドロゲル/スポンジスキヤフォールド(5 × 3 × 3 mm)を作製した。ビーグル犬(雌、体重 9～10kg、12～16 ヶ月齢)3 頭に、全身麻酔および局所麻酔下にて上下顎両側前臼歯部頰側に根分岐部 class II 骨欠損を形成し、合計 27 部位とした。24%EDTA を用いて根面処理を行った後、被験部位を 2 群に分け、実験群はコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキヤフォールドを欠損部に満たすように埋入し、歯肉歯槽粘膜弁を復位縫合した。対照群では根面処理後何も埋入せずに歯肉歯槽粘膜弁を復位縫合した。術後 2 週および 4 週に周囲組織を含めて摘出し、通法に従い 6μm の近遠心的連続薄切標本を作製した。HE 重染色、マッソントリクローム染色を行い、組織学的観察および、新生骨面積、新生セメント質長さ、新生歯根膜長さ、上皮侵入長さ、コラーゲンハイドロゲル/スポンジ残存面積について組織学的計測を行い、統計学的分析を行った。また各計測項目について頬舌的な歯周組織の再生量を分析した。

実験群 2 週では細胞に富む結合組織の再生と歯槽骨の新生が観察された。コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体は生体親和性が良好で、その内部には線維芽細胞が侵入して吸収が進んでいると思われた。実験群 4 週では、根分岐部骨欠損内に著明な新生骨、セメント質、歯根膜の形成が観察された。複合体はほとんど吸収されていた。実験群では対照群に比べて上皮の侵入は有意に抑制していた。実験群 4 週における歯槽骨、セメント質、歯根膜の再生量は、対照群と比較して有意に大きかった($p<0.05$)。また各計測項目について頬舌的な歯周組織の再生量を分析した。

結果、歯根中央部では両群間で再生量に有意差は見られなかったが、頰側の分岐部開口部付近では実験群で再生量が多く有意差が認められた。

コラーゲンハイドロゲルは、細胞侵入性に優れ、コラーゲンハイドロゲルはコラーゲンスポンジと併用することで、欠損部に保持され、ゲル状スキャフォールドの流動性は改善された。本実験で用いたコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドは術後早期に吸収され、欠損スペースには、炎症性細胞の浸潤は少なく、線維芽細胞や骨芽細胞のような多くの細胞や新生血管の形成が多く観察された。また実験群では、上皮の侵入は有意に抑制され、歯槽骨新生率、セメント質新生率、歯根膜新生率ともに実験群 4 週は対照群 4 週と比較して有意に多く認められた。これらのことからコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドは、優れた生体親和性、細胞侵入性、生体吸収性を有しており、コラーゲンにより術後早期にスキャフォールド内に侵入した間葉系細胞の分化・増殖を促進し、歯槽骨・セメント質・歯根膜の形成を促進したと考えられた。歯周組織再生療法において、歯槽骨と同時に歯根膜が再生することが強固な付着獲得に重要な役割を果たすと考えられている。本実験においては、コラーゲンハイドロゲルを応用することで、根面に沿って細胞に富んだ結合組織が接しており、機能的形態を有する新生歯根膜が観察され、新生骨と新生セメント質を接合するシャーピー線維が観察された。これまでもタイプ I コラーゲンをスキャフォールドに用いた結果、セメント質、歯根膜の再生を促進すると報告されており、コラーゲン・ゲルを用いた三次元環境下での細胞培養は、歯根膜細胞のアルカリフォスファターゼ活性陽性を示し、歯根膜細胞の形態、機能をより生理的な状態に維持できることを報告している。これらの結果から、根面に付着したハイドロゲル由来のコラーゲンが歯根膜細胞の増殖を促進させ、歯根膜やセメント質の再構築を促進させたものと考えられた。

以上のことから、根分岐部 class II 骨欠損へのコラーゲンハイドロゲル/スポンジスキャフォールドの埋入は歯周組織再生に効果的であり、重度歯周炎における再生治療としての有効性が示された。

審査は主査、副査がそれぞれ個別に申請者に対して、提出論文の内容とそれに関連した学問分野について口頭により諮問する形式で行われた。

主な質問内容は以下のとおりである。

- (1) 銅-アスコルビン酸架橋コラーゲンハイドロゲルの特性について
- (2) FC と HAC のそれぞれの特徴は何か
- (3) コラーゲンスポンジのみ用いた場合の治癒について
- (4) 再生したセメント質、歯根膜と既存のセメント質、歯根膜の組織学的特徴について
- (5) 歯周組織再生における骨、セメント質、歯根膜の再生過程と順序について
- (6) 今後の研究の展開と将来の展望について

これらの質問に対して、申請者はいずれにも適切かつ明快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、コラーゲンハイドロゲルとコラーゲンスポンジ(FC-HAC スポンジ)を併用して移植した場合の歯周組織再生に対する効果を病理組織学的に評価しており、組織工学的手法を用いた新しい歯周組織再生療法として臨床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。