

学位論文題名

Effect of nano-hydroxyapatite on bone morphogenetic protein-2-induced cementum-like hard tissue formation and dentin resorption on dentin surface

(ナノハイドロキシアパタイトがBMP-2によるセメント質様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

【諸言】

BMP-2 を歯周組織に応用すると、骨やセメント質が形成されることが知られている。しかし、象牙質表面に BMP-2 を塗布して口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面に硬組織が形成される一方で象牙質吸収が認められること、BMP-2 濃度を高くすると硬組織形成も増加するが、それ以上に象牙質吸収が増加することが報告されている。これらの研究結果から、BMP-2 で歯周組織を再生させるためには、象牙質の吸収を抑制してセメント質の形成を増加させることが課題と考えられる。

一方当教室では、BMP-2 のキャリアーとしてのコラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを添加すると、骨形成が高められることを報告してきた。このことから、ナノハイドロキシアパタイトを複合化したコラーゲン膜に BMP-2 を配合して象牙質面に応用することで、BMP-2 が低濃度でもセメント質様の硬組織を象牙質上に誘導し、象牙質吸収を抑制できる可能性が考えられる。本研究の目的は、コラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを複合化して BMP-2 のキャリアーとして使用する場合の、象牙質面上へのセメント質様硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響について組織学的に検討することである。

【材料と方法】

ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜は、コラーゲン溶液に塩化カルシウム溶液、リン酸-トリスバッファーを混合して遠心分離後、吸引して膜状にし、1-エチル・

3-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) を加えて架橋、グリシンで架橋停止し、水洗後凍結乾燥を行って作製した。コラーゲン膜は塩化カルシウム溶液を混合せずに同様の方法で作製した。いずれの膜も走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

作製した膜を濃度の異なる rhBMP-2 に 10 分間浸漬し、以下の 4 群に分けた。

C100 群：コラーゲン膜/ rhBMP-2 100 μ g/ml

C400 群：コラーゲン膜/ rhBMP-2 400 μ g/ml

H100 群：ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜/ rhBMP-2 100 μ g/ml

H400 群：ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜/ rhBMP-2 400 μ g/ml

ラット切歯歯根から象牙質片を 66 個作製し、24% EDTA (pH 7.0) で 3 分脱灰し、rhBMP-2 に浸漬した膜を脱灰象牙質上に貼付し、ラット大腿筋内に移植した。2、4 週後に固定、脱灰後、パラフィン包埋して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行って、光学顕微鏡下にて硬組織形成率と象牙質吸収率を組織学的に計測した。各組織学的計測値の統計学的分析には、Mann-Whitney *U* 検定を用いた。

【結果】

1. SEM 観察結果

ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜は多孔性の構造を呈し、50-150 nm の多くのアパタイトの結晶がコラーゲン表面に観察された。一方コラーゲン膜は孔の少ない密な構造が観察された。

2. 組織学的観察結果

C100 群の 2 週後では、一部にのみセメント質様硬組織形成がみられ、新生硬組織上および象牙質上には立方形及び楕円形のヘマトキシリン好染色性の細胞が観察され、象牙質吸収はわずかであった。4 週では、セメント質様硬組織形成と象牙質吸収が 2 週よりも多く認められた。

C400 群の 2 週後は、象牙質上に多核巨細胞を伴う大きな吸収窩が認められ、象牙質上にはヘマトキシリン好染色性の立方形の細胞がみられた。4 週では、象牙質上に有細胞セメント質様硬組織および象牙質吸収が広範囲に認められた。

H100 群の 2 週後では、薄く、均一で連続したセメント質様硬組織が形成され、象牙質吸収はわずかで、吸収窩には多核巨細胞はほとんどみられなかった。4 週でも広範囲に薄いセメント質様硬組織がみられた。

H400 群の 2 週後では、不整形のセメント質様硬組織形成が広範囲に認められ、その上には立方形及び扁平なヘマトキシリン好染色性の細胞が観察された。吸収窩の多くには多核巨細胞がみられた。4 週では、セメント質様硬組織はさらに不整形を呈し、ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜は一部が残存して、その周囲に骨様硬組織がみられた。

3. 組織学的計測結果

1) 硬組織形成率

硬組織形成率は H100 群は 2 週で $27.7 \pm 6.8\%$ で、4 週で $37.7 \pm 6.5\%$ であり、ともに C100 群 2 週 $6.5 \pm 3.4\%$ 、4 週 $12.8 \pm 2.5\%$ より有意に高く、H400 群は 2 週で $34.9 \pm 5.2\%$ で C400 群 2 週 $2.3 \pm 1.6\%$ より有意に高い値を示したが、4 週では有意差がなかった。

2) 象牙質吸収率

象牙質吸収率は 2 週と 4 週後において、C100 群は 1.6~4.7%、H100 群は 4.6~4.7%、C400 群は 6.2~12.9%、H400 群は 4.6~10.8% で、両群間にはいずれの濃度、期間でも有意差はなかった。

C100 群、C400 群、H400 群は 2 週より 4 週の方が有意に大きい値を示したが、H100 群では 2 週 $4.6 \pm 3.3\%$ と 4 週 $4.7 \pm 1.7\%$ で有意差はなかった。

【考察】

本研究の結果、ナノハイドロキシアパタイトを添加することで、低濃度の rhBMP-2 でセメント質様硬組織形成が早期かつ多量に認められ、象牙質吸収はナノハイドロキシアパタイトの有無に関わらず、rhBMP-2 濃度が高くなると多くなった。この理由として次の2つが考えられた。

ナノハイドロキシアパタイトは破骨細胞や多核巨細胞によって吸収されて、カルシウムイオンやリンイオンの局所濃度を上昇させることが報告されており、また、骨芽細胞はカルシウムやリンにより活性が高まることから、ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜が吸収されて、カルシウムイオンとリンイオンが放出されて局所濃度が上昇することによって、セメント芽細胞様細胞の発現や分化が促進された可能性が考えられた。もう一つは、ナノハイドロキシアパタイトは BMP-2 の吸着がよいため、コラーゲン膜よりナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜の方がより多くの rhBMP-2 を吸着し、膜の吸収にともなってより多くの rhBMP-2 を徐放してセメント芽細胞様細胞の活動性を強く亢進した可能性が考えられた。

しかし、象牙質吸収率においては2、4週とも C100 群と H100 群の間に有意差は認められず、また rhBMP-2 の濃度が高くなると破骨細胞の活性が高くなって硬組織形成より象牙質吸収が促進されるという報告があることから、ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜の方がコラーゲン膜より rhBMP-2 の放出量が多かったとは考えにくい。したがって、ナノハイドロキシアパタイトを添加することで、低濃度の rhBMP-2 でセメント質様硬組織形成が早期かつ多量に認められた理由としては、ナノハイドロキシアパタイトから放出されるカルシウムイオンやリンイオンの役割が大きかったと考えられた。

【結論】

コラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを複合化させて rhBMP-2 のキャリアーとして象牙質に貼付して筋内に移植したこと結果、低濃度の rhBMP-2 で象牙質吸収作用を高めることなく、早期に多量のセメント質様硬組織を誘導することが可能であった。

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	教授	亘理	文夫

学位論文題名

Effect of nano-hydroxyapatite on bone morphogenetic protein-2-induced cementum-like hard tissue formation and dentin resorption on dentin surface

(ナノハイドロキシアパタイトがBMP-2によるセメント質様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。初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。

BMP-2 を歯周組織に応用すると、骨やセメント質が形成されることが知られている。しかし、象牙質表面に BMP-2 を塗布して口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面に硬組織が形成される一方で象牙質吸収が認められること、BMP-2 濃度を高くすると硬組織形成も増加するが、それ以上に象牙質吸収が増加することが報告されている。これらの研究結果から、BMP-2 で歯周組織を再生させるためには、象牙質の吸収を抑制してセメント質の形成を増加させることが課題と考えられる。

一方当教室では、BMP-2 のキャリアーとしてのコラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを添加すると、骨形成が高められることを報告してきた。このことから、ナノハイドロキシアパタイトを複合化したコラーゲン膜に BMP-2 を配合して象牙質面に応用することで、BMP-2 が低濃度でもセメント質様の硬組織を象牙質上に誘導し、象牙質吸収を抑制できる可能性が考えられる。本研究の目的は、コラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを複合化して BMP-2 のキャリアーとして使用する場合の、象牙質面上へのセメント質様硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響について組織学的に検討することである。

ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜は、コラーゲン溶液に塩化カルシウム溶液、リン酸-トリスバッファーを混合して遠心分離後、吸引して膜状にし、1-エチル・3-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) を加えて架橋し、水洗後凍結乾燥を行って作製した。コラーゲン膜は塩化カルシウム溶液を混合せずに同様の方法で作製した。いずれの膜も走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

作製した膜を濃度の異なる rhBMP-2 に 10 分間浸漬し、以下の 4 群に分けた。

C100 群：コラーゲン膜/ rhBMP-2 100 μ g/ml

C400 群：コラーゲン膜/ rhBMP-2 400 μ g/ml

H100 群：ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜/ rhBMP-2 100 μ g/ml

H400 群：ナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜/ rhBMP-2 400 μ g/ml

ラット切歯歯根から象牙質片を作製し、24% EDTA (pH 7.0) で3分脱灰し、rhBMP-2 に浸漬した膜を脱灰象牙質上に貼付し、ラット大腿筋内に移植した。2、4 週後に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部位の長さを計測し、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。

SEM 観察結果ではナノハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体膜は多孔性の構造を呈し、50-150 nm の多くのアパタイトの結晶がコラーゲン表面に観察された。一方コラーゲン膜は孔の少ない密な構造が観察された。

組織学的計測結果により硬組織形成率は H100 群 2 週で $27.7 \pm 6.8\%$ で、4 週で $37.7 \pm 6.5\%$ であり、ともに C100 群 2 週 $6.5 \pm 3.4\%$ 、4 週 $12.8 \pm 2.5\%$ より有意に高く、H400 群は 2 週で $34.9 \pm 5.2\%$ で C400 群 2 週 $2.3 \pm 1.6\%$ より有意に高い値を示したが、4 週では有意差がなかった。一方象牙質吸収率は両群間にはいずれの濃度、期間でも有意差はなかった。

コラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを複合化させて rhBMP-2 のキャリアーとして象牙質に貼付して筋内に移植した結果、低濃度の rhBMP-2 で象牙質吸収作用を高めることなく、早期に多量のセメント質様硬組織を誘導することが可能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。主な質問事項は、

1. 当教室におけるこれまでの BMP-2 を用いた研究の結果について
2. ナノハイドロキシアパタイトの性質について
3. 硬組織形成、象牙質吸収の測定方法について
4. 象牙質表面に形成された硬組織について
5. 象牙質表面に硬組織が形成された理由について
6. ナノハイドロキシアパタイトが硬組織形成に及ぼす影響のメカニズムについて

これらの質問に対して、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、ナノハイドロキシアパタイトが BMP-2 による硬組織形成を高めることが明らかとなり、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)の学位を授与するに値するものと認めた。