

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592307

研究課題名（和文） 重度歯周病罹患歯の残存歯根膜を根面に増殖させた歯と BMP の移植による歯周組織再生

研究課題名（英文） Periodontal regeneration after implantation BMP and teeth with cells on the root planed surface populating from periodontal ligament in vitro

研究代表者

齋藤 彰（SAITO AKIRA）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：20301913

研究成果の概要（和文）：enamel matrix derivative（EMD）は、歯根膜細胞の増殖とセメント質形成を促進すると報告されている。本研究は、EMD が培養歯根膜細胞による、結合組織性付着の獲得を促進することが示された。EMD と bone morphogenetic protein（BMP）の歯周組織再生への影響は、移植法によって異なる。さらに EMD と BMP を分けて移植することによって、歯根膜と歯槽骨が再生する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It was reported that EMD had promoted periodontal ligament cells to populate and make new cementum. This study suggested that application of enamel matrix derivative（EMD）had promoted the new connective tissue attachment in the periodontal cultured model. The periodontal regeneration was different from implantation methods of the combination of EMD and bone morphogenetic protein（BMP）. This study suggested that implantation method of the separate EMD from BMP could enhance periodontal regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：EMD、BMP、歯周組織再生

1. 研究開始当初の背景

歯周病によって失われた歯周組織再生に、歯根膜細胞が重要な役割を果たすと考えられている。

そこで我々は、まず罹患歯を摘出して *in vitro* において歯根膜由来細胞を歯根全面に増殖させ、それと平行して骨欠損部に BMP（骨形成因子）を応用して歯槽骨を再生させ

る。次に組織培養した歯の移植を行って、健全歯に近い量の歯周組織の再生をはかる新しい治療法の開発に向けて研究を行っている。

①歯根膜の組織培養と移植後の結合組織性付着の獲得についての研究結果

我々は最初に、摘出歯の歯根膜を *in vitro* で培養した後、口腔内に移植して結合組織性付着を獲得する方法について、基礎的検討を

行った。in vitro で培養すると残存歯根膜由来の増殖細胞は、歯根膜の特徴を維持したままルートプレーニング面を被覆すること、さらに、残存歯根膜は、培養後に移植を行っても歯根膜様組織を形成し、培養の影響を受けにくいことを明らかにした。

続いて臨床モデルを用いて検討を行った。罹患歯モデルを組織培養して移植を行うことで、ルートプレーニング根面では増殖細胞が、上皮の根尖側移動を抑制し、骨性癒着も抑制したが、新生セメント質の形成はわずかであった。これについて、歯の発生期にセメント質形成に重要であると考えられている enamel matrix derivative (EMD) を培養時に添加して移植を行うと、増殖細胞の ALP 発現細胞が増加して、移植後には積極的にセメント質を含む結合組織性付着および歯根膜様組織形成を獲得しうることを明らかにした。

しかし、歯槽骨の形成は移植窩洞内部には認められるものの、歯冠側に再生する事はほとんど認められず、重度歯周炎罹患歯のように歯槽骨吸収が大きい場合には移植歯周囲の歯槽骨の再建が必要と考えられた。

②骨欠損部に bone morphogenetic protein (BMP) を応用した歯槽骨の再生についての研究結果

歯槽骨の再建について、我々は、水平性骨欠損部においても BMP が新生骨を歯冠側に形成しうることを、さらに BMP によって形成される歯槽骨量が、移植床となる既存骨の幅が大きいほど増加することを明らかにしている。

一方、歯周組織に及ぼす BMP の影響として、歯根膜が形成される部位には骨性癒着を生じないことを明らかにし、さらに BMP と根面との間にスペーサー膜を利用することによって、セメント質の形成を伴う歯根膜が再生することを報告して、歯周組織再生における BMP の有効性について明らかにしてきた。

2. 研究の目的

根面に EMD を塗布する場合の条件設定、歯周組織への影響を明らかにしたのちに、EMD と BMP の併用が歯周組織再生に与える影響について明らかにする目的で以下の項目を行った。

- ① EMD 塗布前の根面処理の評価をおこなう
- ② EMD を塗布後直ちに移植した歯の治療について検索を行う

- ③ 根面に EMD を移植し、骨欠損部へ BMP を移植した場合の、歯周組織欠損部の治癒反応を検討する

3. 研究の方法

①ビーグル犬の前歯を摘出して、歯冠側の歯根膜とセメント質を除去して根尖側の歯根膜を残した試料を作製した。根面処理、EMD 塗布後に 4 週間培養を行い、残存歯根膜からルートプレーニング面への細胞増殖について組織学的に観察した。

②ビーグル犬の前歯を摘出して、根管治療後、歯冠側 5 mm の歯根膜、セメント質を除去してルートプレーニングを行い、根尖側の歯根膜を残した試料を作製した。2.4% EDTA (2 分) 処理後に EMD 塗布後、直ちに移植した群と、塗布後 6 週間組織培養した後に移植した群を設定して、移植後 8 週における治癒について病理組織学的に検索を行った。

③ビーグル犬の前歯部に、歯軸方向に 4 mm の水平性欠損モデルを作製した後、以下の群を設定して移植を行った。

- A) EMD 配合コラーゲンを移植 (N=10)
- B) rhBMP2 配合コラーゲンを移植 (N=10)
- C) 根面に EMD/コラーゲンを移植した後、その外側に rhBMP2/コラーゲンを移植 (N=10)
- D) EMD と rhBMP2 混合をコラーゲンに配合して移植 (N=10)
- E) 対照 (コラーゲンのみ移植) (N=10)

観察期間を 8 週として病理組織学的評価を行った。

4. 研究成果

①残存歯根膜からルートプレーニング面への細胞増殖は EMD を塗布すると増加して、根面処理の影響はほとんど認められなかった。しかし、アルカリフォスファターゼ活性陽性細胞は、EMD 塗布前の 2.4% EDTA (2 分) 処理によって統計学的に有意に増加するが、3.6% リン酸 (1 分) 処理では EMD 効果を打ち消すように減少することが示された。

ALP activity and Proliferation

Group (n = 8)	C mm (SD)	CE mm (SD)	E mm (SD)	EO mm (SD)	EE mm (SD)
Cell Proliferation	2.55 (0.54)	3.98 (0.41)	5.38 (0.24)	5.39 (0.49)	5.32 (0.34)
ALP Activity	0.31 (0.13)	0.42 (0.29)	1.35 (0.42)	0.08 (0.34)	3.13 (1.04)

②組織培養によって歯根膜細胞がルートプレーニング面を覆った群では、結合組織性付着が71%認められたが、EMD塗布後に組織培養を行わずに直ちに移植した場合は、結合組織性付着は根尖側約30%にとどまり、それより歯冠側の根面では根吸収や骨性癒着が観察された。

	対照移植群		EMD移植群		EMD培養移植群	
	%	平均	SD	平均	SD	平均
上皮最深部	55.44	27.90	28.36	8.96	19.37	5.21
セメント質	0.36	0.49	30.41	6.46	71.87	3.16
根吸収	14.28	12.69	23.60	7.20	0.84	2.05
骨性癒着	24.56	19.59	2.93	5.73	0.00	0.00

Kruskal-Wallis検定	対照移植群	対照移植群	EMD移植群
	EMD移植群	EMD培養移植群	EMD培養移植群
上皮最深部		**	
セメント質	*	**	*
根吸収		**	**
骨性癒着	*	**	
Scheffeの方法 * P<0.05 ** P<0.01			

③rhBMP2/コラーゲン群および rhBMP2 と EMD 混和/コラーゲン群は、新生骨が有意に増加したが、セメント質の形成は認められず、局所的に根吸収や骨性癒着が認められた。それに対して EMD と rhBMP2 の 2 層に分けた移植法は、新生骨の増加とセメント質の形成が認められ、骨性癒着は認められなかった。

歯周組織の治癒 (%±SD)

	A群	B群	C群	D群	E群
Downgrowth of junctional epithelium	24.9±8.7	27.6±10.1	23.9±10.2	28.6±10.1	74.9±8.1
Cementum regeneration	38.3±11.2	5.8±7.6	61.6±7.8	11.1±10.8	3.0±4.0
Height of regenerated bone	1.6±2.0	27.0±18.3	40.5±5.1	40.1±6.8	-1.4±2.4
Ankylosis	0.0±0.0	1.1±2.6	0.0±0.0	6.0±10.3	0.0±0.0

以上の結果から、

- 1) EMD 塗布の前に 2.4%EDTA(2分) 処理が有効であることが示された。
- 2) EMD 塗布と歯根膜の組織培養は、結合組織性付着に有効であることが示された。
- 3) EMD と rhBMP2 の歯周組織再生への影響は、移植法によって異なる。
- 4) EMD と rhBMP2 を分けて移植することによって、歯根膜と歯槽骨が再生する可能性が示唆された。
- 5) 現在、EMD による歯周組織再生療法は臨床応用されているが、狭い骨欠損が適応とされてきた。しかし、本研究で用いた移植法で BMP を併用することによって、広い骨欠損でも歯周組織再生の適応となる可能性が示唆された。

6) 申請者が考案した歯周組織再生療法の確立に、有効な移植法であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Emiko Saito, Akira Saito, Yoshinori Kuboki, Mariko Kimura, Yoshiyuki Honma, Tomomi Takahashi, Masamitsu Kawanami: Periodontal repair following implantation of beta-tricalcium phosphate with different pore structures in class III furcation defects in dogs. *Dental Materials Journal* 31: 681-688. (2012) (査読有)
2. Akira Saito, Emiko Saito, Yoshitaka Yoshimura, Dairo Takahashi, Ryohei Handa, Yoshiyuki Honma, Noboru Ohata: Attachment formation after transplantation of teeth cultured with enamel matrix derivative in dogs. *Journal of Periodontology* 82 :1462-1468. (2011) (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

1. Emiko Saito, Akira Saito, Hitomi Odanaka, Toshinori Nakajima, Fumihiko Yuge, Hiroki Uekita, Yoshiyuki Honma, Masamitsu Kawanami: Periodontal healing after implantation of combination BMP with B-FGF in circumferential defects of dogs. 第 98 回米国歯周病学会、2012 年 9 月 30 日、Los Angeles Convention Center, アメリカ。
2. Akira Saito, Emiko Saito, Toshinori Nakajima, Fumihiko Yuge, Tsuyoshi Kato, Hiroki Uekita, Yoshiyuki Honma, Noboru Ohata: Periodontal regeneration following application of basic fibroblast growth factor 2 in combination with beta tricalcium phosphate in class III furcation defects in dog. 第 98 回米国歯周病学会、2012 年 9 月 30 日、Los Angeles Convention Center, アメリカ。
3. 弓削文彦, 齋藤 彰, 齋藤恵美子, 加藤剛士, 中島利徳, 上北広樹, 大畑 昇: コラーゲンハニカム構造が水平性骨欠損部の歯周組織治癒に及ぼす影響. 第 121 回日本補綴学会 2012 年 5 月 26-27 日、神奈川県民ホール、神奈川。

4. 加藤剛士, 齋藤 彰, 齋藤恵美子, 中島利徳, 弓削文彦, 上北広樹, 大畑 昇: 根分岐部欠損Ⅲ度へ bFGF-2 配合ランダムトンネル型 -TCP を移植した後の歯周組織再生; 第 121 回日本補綴学会 2012 年 5 月 26-27 日, 神奈川県民ホール, 神奈川.
5. 上北広樹, 齋藤 彰, 齋藤 恵美子, 弓削文彦, 中島利徳, 加藤剛士, 大畑 昇: 根分岐部欠損Ⅲ度へ移植した β TCP の気孔構造が歯周組織再生に及ぼす影響. 第 121 回日本補綴学会, 2012 年 5 月 26-27 日, 神奈川県民ホール, 神奈川.
6. 中島 利徳, 齋藤 恵美子, 齋藤 彰, 弓削 文彦, 加藤 剛士, 上北 広樹, 大畑 昇: エムドゲインと BMP の併用が水平性骨欠損の歯周組織治癒に及ぼす影響. 第 121 回日本補綴学会, 2012 年 5 月 26-27 日, 神奈川県民ホール, 神奈川.
7. Akira Saito, Emiko Saito, Dairo Takahashi, Fumihiko Yuge, Tsuyoshi Kato T, Yoshiyuki Honma, Noboru Ohata: Effect of tunnel pipe structure of bone grafts on periodontal regeneration in furcation class III defects. 第 97 回米国歯周病学会, 2011 年 11 月 11-15 日, Miami Beach Convention Center, アメリカ.
8. Emiko Saito, Akira Saito, Ryohei Handa, Yoshiyuki Honma, Masamitsu Kawanami: Periodontal healing after transplantation of teeth cultured with EMD in vitro. 第 97 回米国歯周病学会, 2011 年 11 月 11-15 日, Miami Beach Convention Center, アメリカ.
9. 齋藤 彰, 齋藤 恵美子, 大畑 昇: 根分岐部欠損Ⅲ度へ移植した β TCP の気孔構造が歯周組織再生に及ぼす影響. 第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会. 2011 年 9 月 24 日, 海峡メッセ下関, 山口.
10. 齋藤恵美子, 齋藤 彰, 半田良平, 小田中瞳, 川浪雅光: 根分岐部欠損Ⅲ度へ bFGF-2 配合ランダムトンネル型 β -TCP を移植した後の歯周組織再生. 第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2011 年 9 月 24 日, 海峡メッセ下関, 山口.
11. Emiko Saito, Akira Saito, Ryohei Handa, Masamitsu Kawanami: Effect of Enamel matrix derivative Application for healing after transplantation of teeth with periodontitis. 第 43 回日本結合組織学会学術大会 第 58 回マトリックス研究会大会 合同学術集会, 2011 年 6 月 10 日, 別府ビーコンプラザ, 大分.
12. 齋藤恵美子, 齋藤 彰, 高橋大郎, 半田良平, 川浪雅光: 重度歯周炎罹患歯の移植後の治癒に対するエムドゲイン塗布の効果. 第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2011 年 6 月 9 日, 東京ベイ舞浜ホテル, 横浜.
13. 弓削 文彦, 齋藤 彰, 齋藤 恵美子, 谷野 之紀, 加藤 剛士, 大畑 昇: エムドゲインを塗布する前に行う根面処理が抜去歯の残存歯根膜へ及ぼす影響: 日本補綴歯科学会第 120 回記念学術大会, 2011 年 5 月 20 日, 広島国際会議場, 広島.
14. 加藤 剛士, 齋藤 彰, 齋藤 恵美子, 弓削 文彦, 大畑 昇: 歯牙移植後の付着様式に与えるエムドゲイン塗布と組織培養の影響. 日本補綴歯科学会第 120 回記念学術大会, 2011 年 5 月 20 日, 広島国際会議場, 広島.
15. Saito A, Saito E, Kuboki Y, Yoshimura M, Takahashi D, Honma Y, Takita H, Takayama M, Hanada R, Honma K, Ohata N: Effect of tunnel pipe structure of bone grafts on regeneration. IADR 88th General Session, 2010 年 7 月 14-17, Centre Convencions Internacional Barcelona, スペイン.
16. Emiko Saito, Akira Saito, Yoshinori Kuboki, Dairo Takahashi, Yoshiyuki Honma, Hiroko Takita, Mariko Takayama, Ryohei Handa: Bone and vascular formation by a beta-TCP with random-tunnel structure in furcation class III defects. 第 42 回日本結合組織学会学術大会 第 57 回マトリックス研究会大会 合同学術集会, 2012 年 8 月 19-20 日, 秋田拠点センター・アルヴェ, 秋田.
17. 齋藤 彰, 齋藤恵美子, 友永章雄, 弓削文彦, 加藤剛士, 小野倫之, 大畑 昇: 歯牙移植後の付着様式に与えるエムドゲイン添加培養歯根膜の効果. 平成 22 年度日本補綴歯科学会東北・北海道支部学術大会, 2010 年 10 月 24 日, 北海道歯科医師会館, 北海道.
18. 齋藤 彰, 齋藤 恵美子, 福本真大, 大畑 昇: rhBMP-2 の担体に感温性ゲルを移植した場合の硬組織形成. 日本補綴歯科学会第 119 回学術大会, 2010 年 6 月 12 日, 東京ビックサイト, 東京.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 彰 (SAITO AKIRA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：20301913

(2) 研究分担者

齋藤 恵美子 (SAITO EMIKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80374528

吉村 善隆 (YOSHIMURA YOSHITAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30230816

有馬 太郎 (ARIMA TARO)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80346452

(3) 連携研究者

()

研究者番号：