骨形成タンパク質添加 DNA/アテロコラーゲンによる ビーグル犬歯周組織の再生

村田 勝・佐藤 大介・佐々木智也
平 博彦・有末 眞

Regeneration of periodontal tissue by bone morphogenetic protein-treated DNA/atelocollagen in beagle dogs

Masaru MURATA · Daisuke SATO · Tomoya SASAKI
Hirohiko TAIRA · Makoto ARISUE

Abstract: A unique biomaterial, DNA/atelocollagen membrane, was newly developed. The effect of DNA/atelocollagen combined with bovine derived-bone morphogenetic proteins (BMP) on osteogenesis was evaluated histologically in subcutaneous tissue and supra-alveolar and periodontal defects. DNA/atelocollagen was prepared as a composite of DNA from salmon milt and pepsin-digested type I collagen (atelocollagen) from bovine dermis. The composite fiber showed structural characteristics of DNA-coated atelocollagen on phase-contrast and fluorescence microscopy. The time-course of bone induction was investigated, using a rat ectopic bone formation assay. DNA/collagen (10×5×1 mm) was subcutaneously implanted with 100 μg of BMP induced osteoblast differentiation 1 week after operation. Histological examination of the BMP/DNA/collagen showed direct bone formation, and carrier DNA/collagen fibers were found in woven bone. Wounds through the supra-alveolar bone and periodontal ligament (10×5×5 mm) were surgically created on the mesial root of the mandibular second and third premolars in 6 beagle dogs. The defects were immediately filled with either DNA/collagen (10×5×5 mm) combined with 500 μg of BMP or DNA/collagen alone, or were left unfilled (controls). Animals treated with BMP/DNA/collagen showed regeneration of alveolar bone, periodontal ligament, and cementum on the exposed dentin at 4 and 6 weeks, while the other groups showed virtually no regeneration. In addition, the newly formed bone and cementum were separated by a periodontal ligament-like tissue, and no ankylosis was seen. These results indicate that DNA/collagen is an effective absorbable material that can be used as a carrier matrix for BMP. DNA/collagen sponge combined with BMP may promote tissue regeneration without disturbing periodontal homeostasis in supra-alveolar and periodontal defects.

Key words: BMP (骨形成タンパク質), DNA (デオキシリボ核酸), atelocollagen (アテロコラーゲン), periodontal ligament (歯根膜), regeneration (再生)

緒 言

失われた歯周組織をコラーゲン性材料と成長因子の併用

北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座
(主任: 有末 眞教授)

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido (Chief: Prof. Makoto Arisue)

受付日: 2002年1月7日

採択日: 2002年10月22日

により組織工学的に再生させる研究^{1~4)}が進行中である。組織工学に基づく再生医療の基本理念は、天然あるいは人工の高分子(バイオマテリアル)を細胞増殖分化の場として使用し、生体外で疑似組織を再構築した後、生体内で失われた組織や臓器の構造的・機能的再生を図ることにある。近年、組織再生の概念に基づき、組織の再生を妨げない生体親和性に優れた分解吸収性材料の使用が増加している。特に動物組織の基本成分であるコラーゲンは生体親和性に優れた吸収性材料で、臨床応用のみならず臓器再生研

究に多用されている。現在、医療用コラーゲンは非ヘリックス構造を呈するテロペプチド領域を除去して（アテロ化）、抗原性のきわめて低いアテロコラーゲンとして調整・利用されている。アテロコラーゲン線維の特徴として、コラゲナーゼなどの分解酵素によって分解されにくく物理的強度（生体内安定性）に優れていることがあげられるが、細胞侵入性に劣ることが指摘され⁵⁾、熱変性コラーゲンを配合することで細胞侵入性を高めた複合材料が開発されている⁶⁾。われわれは従来より、生体主要成分であり吸収性で低抗原性のアテロコラーゲンに注目して骨誘導や骨増生、骨欠損修復のための人工基質として動物実験に使用し、その効果を報告してきた^{7, 8)}。

近年、デオキシリボ核酸（Deoxyribonucleic acid: DNA）を遺伝子としてではなく、天然に多量に存在する機能性高分子としてとらえる研究^{9~11)}が進行し、1996年DNA相互作用の特異性を利用した新しいバイオセンサーが報告された¹²⁾。DNAはI型コラーゲンに親和性がある¹³⁾ことが知られており、DNA存在下でアテロコラーゲン溶液を中性化するとDNAがアテロコラーゲン線維化のマトリックスとして働き、横紋構造を有するアテロコラーゲン線維が再構成されることが明らかになった¹⁰⁾。われわれは、天然未利用生物資源であるサケ精巢由来DNAとウシ真皮由来アテロコラーゲンからなる複合材料（DNA／コラーゲン）を株式会社サンギおよび北海道大学大学院地球環境科学研究科（主任：西 則雄教授）と共同開発した。

顎骨内に発生する嚢胞や腫瘍を摘出した後、骨面や歯根面が露出することがある。病巣完全除去後の欠損部は瘢痕で治癒するのではなく、速やかに本来の組織で再生されることが理想である。また、歯周病や歯根嚢胞は骨が吸収されるだけでなく病巣部根面の歯根膜も消失する病変である。歯根膜を失うと骨性癒着が生じたり、炎症性歯根吸収や置換性歯根吸収が進行することが知られている^{14, 15)}。骨の再生研究や歯の移植・再植など細胞生物学的治療が進展する今日、支持組織であり感覚受容器である歯根膜の再生は骨再生とともに歯科口腔外科領域における大きな課題である。そのため、大型動物に歯槽骨と歯根膜の複合欠損を作製し、DNA／コラーゲンに骨誘導能を有する骨形成タンパク質（Bone morphogenetic proteins: BMP）を添加して組織内埋入型材料としての可能性を試みた。

本研究の目的は、新素材DNA／コラーゲンをBMPの担体として用い、背部皮下組織内での骨誘導過程を観察するとともに歯周組織欠損部の再生に対する効果を組織形態学的に評価することである。

写真1 DNA／コラーゲン複合線維の走査電子顕微鏡像
幅約100 μ mのリボン状線維で構成されたスポンジ構造。

材料および方法

1. DNA／コラーゲン複合線維の作製とBMP

サケ精巢由来DNA（分子量100万以上、サルデ株式会社）を50%エタノールを用いて濃度1%になるよう溶解したものをDNA溶液とした。アテロコラーゲン溶液は、通法に従いウシ真皮由来コラーゲンを酢酸溶媒中でペプシンを用いて可溶化した後精製し、1%アテロコラーゲン酸性溶液とした。DNA／コラーゲン複合線維の作製は、アテロコラーゲン溶液を紡糸繊維装置のノズル（直径1cmあたり100穴、径100 μ m）を通してDNA溶液中に噴射した。その後、線維状物を100メッシュのステンレス製の網に乗せ、はじめ50%エタノール溶液で洗浄し、10%刻みでエタノール濃度を下げ、最終的に蒸留水に置換後凍結乾燥して形状（膜あるいはスポンジ状）を付与した（写真1）。なお、線維にDNA結合型蛍光色素（H33258, シグマ社）を反応させた後、位相差蛍光顕微鏡で観察すると蛍光発色が認められたことから、表面にDNAが存在し、アテロコラーゲンは内部に存在する2層構造であることが判明した（写真2）。

BMPは、ウシ骨から抽出・分離・精製¹⁶⁾されたBMP部分精製物（BMP cocktail, サンギ株式会社）を使用した。

2. ラット皮下組織内骨誘導実験

DNA／コラーゲンシートから10×5×1mm大の膜片を調整し、添加するBMP量を決定するため濃度依存実験を行った結果、単位膜あたり100 μ gのBMPを添加すると2週後に確実に骨誘導が認められた¹⁷⁾。この結果に基づき、骨誘導過程観察のため、実験群として100 μ gのBMPを含むリン酸緩衝液（15 μ l）をDNA／コラーゲン膜に滴下含浸した。対照として、DNA／コラーゲン膜にリン酸緩衝液（15 μ l）を滴下した。実験動物として、ウィスター系ラット

写真2 DNA結合型蛍光染色によるDNA/コラーゲン複合線維の位相差蛍光顕微鏡像

DNA結合型蛍光色素を線維に反応させると蛍光発色が認められた。線維構造はDNAが表面に存在し、アテロコラーゲンが内部に存在する2層性である。

12匹(雄性, 4週齢, 体重平均75g)を使用した。全身麻酔下で背部に左右それぞれ2か所ずつ皮下切開を加えた後、実験群としてBMP/DNA/コラーゲン膜、対照群としてDNA/コラーゲン膜をそれぞれ2か所ずつ(1匹あたり合計4か所)に埋入した。1, 2, 3週後に4匹ずつ屠殺し、試料は組織学的観察のため、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、10%蟻酸で3日間脱灰した。パラフィン包埋後、切片(厚さ4 μ m)をヘマトキシリン-エオジン(H-E)で染色して組織学的に観察した。

3. ビーグル犬歯周組織再生実験

実験動物として、ビーグル犬6頭(雄性, 11~13か月齢, 体重平均9.6kg)を使用した。動物は室温平均24℃, 明暗12時間周期のもとで固形飼料と水を自由に与えて1か月飼育後使用した。チオペンタールナトリウム(ラボナール; 50mg/kg, 田辺製薬)の静脈内注射による全身麻酔を施行した。皮膚は10%ポピオンヨードと80%エタノールを用いて消毒し、口腔内は3%過酸化水素水を用いて消毒を行った。下顎左側第1前臼歯部と第4前臼歯部頰側に縦切開を加え、粘膜骨膜弁を剥離反転後、第2前臼歯と第3前臼歯の近心根相当歯槽骨に縦10mm, 横5mm, 深さ5mmの1壁性裂開型骨欠損を注水下でフィッシャーバーとチゼルを用いて2か所形成した。その後、露出した根面を歯根膜が残存しないように搔爬し、生理食塩水で洗浄した(図1)。実験群として、DNA/コラーゲンスポンジ(10×5×5mm)にBMP溶液を75 μ l(BMP 500 μ g含有)滴下含浸した群(BMP/DNA/コラーゲン群)とDNA/コラーゲンスポンジにリン酸緩衝液75 μ lのみを滴下した群(DNA/コラーゲン群)を設定し、対照として欠損のままである

図1 ビーグル犬下顎における歯槽骨・歯根膜欠損モデル

下顎左側第1前臼歯部と第4前臼歯部に縦切開を加え、粘膜骨膜弁を剥離反転後、第2前臼歯(P2)と第3前臼歯(P3)の近心根相当歯槽骨に骨欠損(縦10mm×横5mm)を2か所形成後、露出根面を歯根膜やセメント質が残存ないように搔爬し、生理食塩水で洗浄した。

P2: 第2前臼歯, P3: 第3前臼歯, M1: 第1臼歯

非填入群を設定した。各処置を施した後、粘膜骨膜弁を復位させ、創部をナイロン糸で縫合した。手術後4, 6週目に3頭ずつ屠殺し、歯、下顎骨および周囲の軟組織を一塊として摘出した。試料は、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、10%蟻酸で20日間脱灰した。前額断でパラフィン連続切片作製(厚さ4 μ m)後、H-E染色を行い、光学顕微鏡で観察した。形態計測分析のため、欠損部相当を計測領域として、同部に形成された組織を3種類(新生骨・骨髄・歯根膜様組織を含む組織、結合組織、細胞侵入のみられない担体)に分け、各組織の割合を計測した。新生組織と既存組織の境界は骨の緻密度と構造から容易に判定できた。計測に使用した切片は、各群6枚ずつで、欠損部中央切片と中央部から約100 μ m離れた両切片に対してWeibel法¹⁸⁾を用いて組織評価した。これら6点の平均値を平均面積とし、ANOVA分析を用いて有意差検定をした。すべての処置は動物実験の国際基準に従って行われた。

結 果

1. 皮下組織内骨誘導過程

1) BMP/DNA/コラーゲン群

埋入後1週では複合物周囲のDNA/コラーゲン線維間に血管の侵入と未分化間葉細胞の増殖がみられ、胞体の大きな骨芽細胞の分化が認められた(写真3A)。2週では担体線維上に添加性の骨形成を認め、梁状の線維骨が誘導された。線維骨には多数の骨細胞が不規則に封入され、骨表面には骨芽細胞の配列がみられた(写真3B)。3週では骨梁間に骨髄組織が認められ、DNA/コラーゲン線維の残留

写真3 背部皮下埋入実験組織像

- (A) BMP/DNA/コラーゲン群1週後. DNA/コラーゲン線維(*)表面に胞体の大きな骨芽細胞(↑)が多数みられた. (H-E ×230)
- (B) BMP/DNA/コラーゲン群2週後. 梁状の線維骨が誘導され, 新生骨内にDNA/コラーゲン線維(*)の残留を認めた. 線維骨表面に骨芽細胞の裏装がみられた. (H-E ×150)
- (C) BMP/DNA/コラーゲン群3週後. 血管の豊富な骨髄組織が認められ, 新生骨とDNA/コラーゲン線維の混在がみられた. (H-E ×150)
- (D) DNA/コラーゲン群3週後. DNA/コラーゲン線維間に線維芽細胞がみられた. (H-E ×150)

がみられた(写真3C). なお, 軟骨は認められなかった.

2) DNA/コラーゲン群

埋入後1週では担体線維間に円形細胞の浸潤と未分化間葉細胞の侵入がみられた. 2, 3週後には線維芽細胞への分化がみられたが, 骨や軟骨は認められなかった(写真3D).

2. 歯周組織再生実験

1) 組織学的観察

a) BMP/DNA/コラーゲン群

4週後本来の歯槽骨部は梁状骨で占められ, 歯根と新生骨間には正常に比べ拡大傾向を示すものの比較的均一な幅の歯根膜様組織がみられた(写真4A). 新生骨梁は連続しており, 骨梁間には血管の豊富な骨髄形成が認められた. DNA/コラーゲン線維の残存はみられなかった. 歯根面は搔爬により波状を呈し, 露出象牙質面に連続性のあるセメント質の形成がみられた(写真4B). 6週後, 新生歯槽骨

から歯根方向に走行する斜線維が認められ, 露出象牙質面には無細胞性セメント質と有細胞性セメント質と思われるような細胞の認められるセメント質の形成が混在してみられ, 歯根膜様組織が形成された(写真4C). 新生骨と根面の癒着(アンキローシス)は観察されなかった. また, 歯根膜様組織内にマラッセの残存上皮は認められなかった.

b) DNA/コラーゲン群

4週後歯根面は波状を呈し, 歯根根尖側から1/2付近に細い新生骨形成が認められたものの, 本来の歯槽骨部は主に結合組織で占められていた(写真5A). 歯頸部象牙質に吸収窩がみられ, 結合組織の線維走行は垂直方向であった(写真5B). DNA/コラーゲン線維の残存が局所的に認められた. 6週後骨形成レベルは少し増加したものの骨梁は細く, 新生骨梁と新生セメント質との間のみに比較的均一な幅の歯根膜様組織がみられた. 非骨形成部の結合組織の線維走行は, 歯根にほぼ平行な垂直方向であった. DNA

写真4 BMP/DNA/コラーゲン群の組織像

- (A) 4週後組織像. 歯根面は波状を呈し, 本来の頬側歯槽骨を含む欠損部は連続性のある新生骨梁(*)で占められ, 骨梁間には血管の豊富な骨髄形成が認められた. 歯根と新生骨との間には, 比較的均一な幅の歯根膜様組織(↑)がみられた. DNA/コラーゲン線維の残存はみられなかった. (H-E ×10)
- (B) 4週後組織像. 細胞性セメント質(↑)が露出象牙質面(*)に形成された. (H-E ×150)
- (C) 6週後組織像. 斜め方向に走行する線維が認められ, 象牙質面には有細胞性セメント質と思われるような細胞の認められるセメント質(↑)と無細胞性セメント質(*)がみられた. (H-E ×150)

写真5 DNA/コラーゲン群4週後の組織像

- (A) 歯根面は波状を呈し, 歯根1/2付近に細い新生骨(↑)と既存骨から連続した骨形成が認められたが, 他の部位は結合組織で占められた. (H-E ×15)
- (B) (A) 歯頸部の拡大. 象牙質表面は不規則に吸収されていた. 結合組織の線維走行は垂直方向であった. (H-E ×75)

表1 新生組織に対する各組織の占める割合の変化

群	4週			6週		
	BT	CT	C	BT	CT	C
BMP/DNA/コラーゲン	73.2 ^{ab}	26.8 ^{ab}	0.0	75.9 ^{ab}	24.1 ^{ab}	0.0
DNA/コラーゲン	11.6	80.2	8.2 ^{ac}	29.6	70.4	0.0
非填入	11.1	88.9	—	26.1	73.9	—

全組織量を100%とした。数値は各群6切片の平均値でパーセント表示。

BT：骨，骨髓，歯根膜様組織。CT：結合組織，C：細胞侵入のみられない担体。

a：BMP群とDNA/コラーゲン群に有意差あり， $P<0.001$

b：BMP群と非填入群に有意差あり， $P<0.001$

c：DNA/コラーゲン群と非填入群に有意差あり， $P<0.001$

写真6 非填入群6週後の組織像

欠損部への周囲軟組織の陥入がみられ，結合組織線維の走行は垂直方向であった。既存骨から連続した骨形成がわずかに認められた。(H-E ×10)

／コラーゲン線維は吸収されていた。

c) 非填入群

4週後の露出した象牙質表面にセメント質が部分的に形成された。欠損部は主に結合組織で占められ，広範囲にわたる結合組織性付着と歯根の根尖側1/3付近までの既存骨と連続した細い梁状骨が認められた。

6週後，新生骨はわずかに厚みを増すものの骨形成レベルは変化がなく，広範囲にわたって周囲軟組織の陥入が認められた(写真6)。

2) 形態計測

BMP/DNA/コラーゲン群における4週後の新生骨・骨髓・歯根膜様組織を含む組織の割合は73.2%で他2群の

約6倍を示し，明らかな有意差が認められた($P<0.001$)。同群の担体は4週後から吸収されていた。一方，DNA/コラーゲン群において，4週後に担体の残留を認めた(8.2%)が6週後には吸収され，結合組織が70.4%を占めていた(表1)。

考 察

骨形成タンパク質(BMP)は骨基質から発見された非コラーゲン性タンパク質で，強力な軟骨・骨誘導因子である¹⁹⁻²¹⁾。異所性骨誘導実験において，コラーゲン性材料をBMPの担体に用いると骨芽細胞への分化による直接骨化が優位に認められることが多数報告されている²²⁻²⁵⁾。従来BMPは軟骨誘導因子として定義されていたが，現在BMPによる骨誘導過程はBMP濃度や担体の構造に由来する細胞環境，酸素分圧，メカニカルストレス(伸展，圧縮)，他の成長因子との相互作用によって軟骨性骨化あるいは膜性骨化様の直接骨化が起きるものと考えられている^{7, 26, 27)}。本研究においても，DNA/コラーゲン線維をBMPの担体として用いた場合，骨形成過程は直接骨化様式を呈し，誘導骨内に担体線維の残存を認めた。これは，BMP標的細胞と考えられている未分化間葉細胞がDNA/コラーゲン線維を足場としてBMP作用により直接骨芽細胞に分化し，軟骨を介さずに骨を担体線維表面に添加形成したものと考えられた。Bassettら²⁷⁾は骨芽細胞と軟骨芽細胞の前駆細胞は共通であり，その前駆細胞の置かれた環境，特に酸素分圧とメカニカルストレスによって分化方向が決定されることを提唱した。これより，DNA/コラーゲン材料の構造が血管の侵入しやすい構造であり，骨芽細胞への分化が優位となる組織環境であった可能性が推察された。

われわれは歯周組織欠損部にBMPを応用すると新生骨と根面の骨性癒着が部分的に起こるものと予想した。しかし，本実験期間において明らかな癒着は認められなかった。新生骨と新生セメント質間に存在する歯根膜様組織の幅は

正常に比べ拡大傾向を示すものの比較的均一であり、アンキローシスを起こさずに組織が再構成されつつあることは生物学的にきわめて興味深い現象である。この結果は Rajshankar ら²⁾や Kuboki ら³⁾の報告と同様であり、BMP/DNA/コラーゲンシステムは歯周組織の再生を妨げずに治癒を促進する可能性を示唆している。しかしながら、類似研究でアンキローシスを部分的に認めた報告^{1, 4)}もあり、組織反応には BMP 濃度や周囲組織に残存している歯根膜細胞の数や活性、根面の性状、担体の性状などいくつかの局所因子が治癒に関与するものと考えられる。今後長期観察して一度形成された歯根膜様組織部にアンキローシスが起きないか、新生骨の改造が進行して緻密骨となるまで観察する必要があると思われる。BMP/DNA/コラーゲン群 4 週後に正常歯槽骨にはほぼ相当する幅と高さの骨が欠損部に形成され、その新生歯槽骨内から歯根方向へシャープ線維様の太いコラーゲン線維の水平走行と搔爬根面に新生セメント質がみられた。これは、残存歯根膜細胞が BMP の作用により担体内で増殖し骨芽細胞やセメント芽細胞に分化して歯根膜様組織を再生しつつあるものと考えられた。マラッセの残存上皮は正常歯根膜に生涯にわたって存在する歯原性上皮細胞であるが、本実験で形成された歯根膜様組織には残存上皮は認められなかった。この結果は、井上ら²⁸⁾によるビーグル成犬の歯槽骨-歯根窩洞形成後の歯根膜再生実験で、歯槽骨と歯根膜は再生するがマラッセの残存上皮は再生しないことと一致していた。このように残存上皮が存在しなくとも歯根膜が再生したとの報告²⁶⁾や移植・再植歯の歯根膜の再生に最も重要な細胞はセメント細胞およびセメント芽細胞であるとの報告²⁹⁾から、残存上皮が歯根膜再生に関与している可能性は低いものと思われる。なお非填入群において、歯槽骨および歯根膜、セメント質の正常構造に類似した治癒は認められなかったことから、本実験モデルは自然治癒不可能な条件であると思われる。

セメント質の発生過程において、最初に形成される原生セメント質には細胞成分が含まれず無細胞性セメント質と呼ばれている。1997年 Hammarstrom ら³⁰⁾は、サルを用いて頰側の歯槽骨、歯根膜およびセメント質を歯科用バーで削除した 1 壁性裂開型骨欠損を形成し、ヘルトヴィッヒ上皮鞘の細胞から分泌されるエナメル基質タンパク (エムドゲイン®) を根面に塗布した研究結果より、無細胞性セメント質が再生されることを報告した。本実験で形成された新生セメント質には封入細胞 (セメント細胞) が存在する有細胞性セメント質と無細胞性セメント質の混在が認められた。有細胞性セメント質は、第三象牙質同様に基質形成速度が急速であるとき、形成細胞が基質に埋め込まれたものといわれている。したがって、BMP による細胞分化の加

速によりセメント細胞を封入した新生セメント質を形成したものと考えられ、BMP とエムドゲイン®の細胞分化の相違を示唆している可能性がある。

従来より生体由来高分子はドラックデリバリーシステムに利用されており、近年コラーゲンを遺伝子導入ベクターの担体として活用する遺伝子治療法が提案されている³¹⁾。コラーゲンは動物のからだを構成している構造タンパク質であり、ヒドロキシアパタイトとともに骨の主要成分である。既製のコラーゲン性材料のほとんどはタンパク質分解吸収速度を調整するために化学物質処理による架橋結合の導入が行われていた。しかし、化学処理後の未反応剤の細胞毒性が生体親和性を低下させることが指摘されていた³²⁾。新しく開発した DNA/アテロコラーゲン材料には化学的架橋剤を使用していないので、コラーゲン本来の生体親和性を損なわない特徴がある。アテロコラーゲンへの DNA 複合化の利点として、(1) DNA 共存下で太く強靱な横紋構造を有するアテロコラーゲン線維が再生する¹⁰⁾、(2) 細胞毒性のある化学物質を使用せずに複合線維化できる、(3) DNA コーティングにより酵素によるアテロコラーゲン線維の分解速度が遅くなる⁶⁾、(4) DNA の水溶性により血小板凝集速度を遅延化できる³³⁾、(5) 天然に大量に存在する未利用生物資源の有効再利用となる可能性が挙げられる。なお、動物由来成分を原料とする医薬品の品質および安全性についてはきわめて慎重でなくてはならない。現在、ウシ由来物としてゼラチンやコラーゲン、乳カゼインなどがあり、ゼラチンは止血材や薬のカプセルに多用されている。今回実験で使用したコラーゲンは牛海面状脳症 (BSE, 狂牛病) の発生していない地域のウシ由来であり、かつ牛海面状脳症感染因子である異常プリオンが検出されていない皮膚真皮から抽出された製品である。世界保健機構 (WHO) はウシ皮を伝染力が検知されないカテゴリー IV に分類しており、国際獣疫事務局は獣皮由来のゼラチンやコラーゲンの安全性を承認している。今後の発展性として、DNA/アテロコラーゲン複合線維を安全で付加価値のある機能性材料として改良することや、DNA とコラーゲンは生体に大量に存在する高分子であるため自家組織由来 DNA/アテロコラーゲン線維を作製することも可能であろう。今後、DNA/アテロコラーゲンの構造や配合比率を改良したり BMP 濃度を調整することで、より確実な歯周組織再生法を確立することができるであろう。

結 論

DNA/コラーゲン複合材料を骨形成タンパク質 (BMP) の担体として用い、背部皮下組織内で骨誘導過程を観察するとともに歯周組織欠損部再生に対する効果を評価し、以

下の結果と結論を得た。

1. DNA コーティングアテロコラーゲン複合線維をBMPの担体として用いると骨誘導が確認され、骨形成過程は直接骨化様式を示した。

2. BMP/DNA/アテロコラーゲンスポンジにより、露出根面と新生骨間にアンキローシスを認めずに歯周組織の再生が促進された。

以上より、BMP添加DNA/アテロコラーゲンスポンジは歯周組織の欠損を再生するための吸収性基質として有効であり、歯根膜の恒常性維持機構を阻害せずに歯周組織の再生を促進する可能性が示唆された。

本研究は、科学技術振興事業団（平成11年度独創的研究成果育成事業、95番）と北海道科学・産業技術振興事業団（平成12年度研究開発シーズ育成補助金、シ-035番）から援助された研究費で行われた。

引用文献

- 1) Ripamonti, U., Heliotis, M., et al.: Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1/BMP-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Arch Oral Biol* 41: 121-126 1996.
- 2) Rajshankar, D., McCulloch, C.A.G., et al.: Osteogenic inhibition by rat periodontal ligament cells: modulation of bone morphogenetic protein-7 activity in vivo. *Cell Tissue Res* 294: 475-483 1998.
- 3) Kuboki, Y., Sasaki, M., et al.: Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering. *Eur J Oral Sci* 106: 197-203 1998.
- 4) Wikesjö, E.M., Guglielmoni, P., et al.: Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 26: 392-400 1999.
- 5) Huang, C. and Yannas, I.V.: Mechanical studies of enzymatic degradation of insoluble collagen fibers. *J Biomed Mater Res* 11: 137-154 1977.
- 6) Koide, M., Osaki, K., et al.: A new type of biomaterial for artificial skin: Dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J Biomed Mater Res* 27: 79-87 1993.
- 7) Murata, M., Huang, B.Z., et al.: Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 28: 232-237 1999.
- 8) Murata, M., Maki, F., et al.: Bone augmentation by onlay implant using recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat skull without periosteum. *Clin Oral Implants Res* 11: 289-295 2000.
- 9) Bernstein, K.A., Valerio, R.D., et al.: Glomerular binding activity in MRL lpr serum consists of antibodies that bind to a DNA/histone/type IV collagen complex. *J Immunol* 154: 2424-2433 1995.
- 10) Kitamura, H., Iwamoto, C., et al.: Marked effect of DNA on collagen fibrillogenesis in vitro. *Int J Biol Macromol* 20: 241-244 1997.
- 11) Kitamura, H., Takemoto, N., et al.: Suppression for the proliferation of fibroblasts by external DNA. *Int J Biol Macromol* 21: 337-340 1997.
- 12) Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., et al.: A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382: 607-609 1996.
- 13) Izui, S., Lambert, P.H., et al.: In vitro demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA: a possible basis for a local formation of DNA-anti-DNA complexes in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 144: 28-43 1976.
- 14) Andreasen, J.O.: Relationship between cell damage in the periodontal ligament after replantation and subsequent development of root resorption. *Acta Odont Scand* 39: 15-25 1981.
- 15) Andreasen, J.O.: Review of root resorption systems and models. Etiology of root resorption and the homeostatic mechanisms of the periodontal ligament. In the biological mechanisms of tooth eruption and root resorption. edited by Davidovitch, Z., EBSCO Media, Birmingham, 1988, p9-21.
- 16) Kuboki, Y., Saito, T., et al.: Two distinctive BMP-carriers induce zonal chondrogenesis and membranous ossification, respectively: geometrical factors of matrices for cell-differentiation. *Connect Tissue Res* 31: 1-8 1995.
- 17) Murata, M., Arisue, M., et al.: Bone induction using a newly developed DNA/collagen membrane and BMPs. *Br J Oral Maxillofac Surg* 40: 131-135 2002.
- 18) Weibel, E.R.: Stereological methods: Practical methods for biological morphometry. Academic Press, New York, 1980, p1-20.
- 19) Urist, M.R.: Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899 1965.
- 20) Wang, E.A., Rosen, V., et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2220-2224 1990.
- 21) Wozney, J.M., Rosen, V., et al.: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534 1988.
- 22) Murata, M., Inoue, M., et al.: Carrier-depend-

- ency of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein in ectopic sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27: 391-396 1998.
- 23) Sasano, Y., Ohtani, E., et al.: BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification in vivo. *Anat Rec* 236: 373-380 1993.
- 24) Aono, A., Hazama, M., et al.: Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4 / 7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 670-677 1995.
- 25) Kusumoto, K., Bessho, K., et al.: Intramuscular osteoinduction and bone marrow formation by the implantation of rhBMP-2 with atelopeptide type I collagen. *Br J Oral Maxillofac Surg* 35: 433-437 1997.
- 26) Omura, S., Mizuki, N., et al.: A carrier for clinical use of recombinant human BMP-2: dehydrothermally cross-linked composite of fibrillar and denatured atelocollagen sponge. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27: 129-134 1998.
- 27) Bassett, C.A.L.: Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature* 190: 460-461 1961.
- 28) 井上 孝, 榎谷保信, 他: 創傷治癒後の歯根膜の恒常性維持に関する研究. *歯基礎誌* 37: 58-69 1995.
- 29) 濱本宜興, 中島民雄, 他: 移植歯歯根表面の肉眼的性状と臨床的経過に関する研究. *日口外誌* 40: 1222-1227 1994.
- 30) Hammarstrom, L., Hejil, L., et al.: Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 24: 669-677 1997.
- 31) Ochiya, T., Takahama, Y., et al.: New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the minipellet. *Nature Medicine* 5: 707-710 1999.
- 32) Hey, K.B., Lachs, M., et al.: Crosslinked fibrous collagen for use as a dermal implant: control of the cytotoxic effects of glutaraldehyde and dimethylsuberimidate. *Biotechnol Appl Biochem* 12: 85-93 1990.
- 33) 西 則雄, 北村秀光: 素材としてのDNA-生医学分野での利用を中心に-. *高分子* 47: 398-401 1998.