エナメルマトリックスタンパクと GTR 法との併用による 歯周組織再生効果の組織学的研究

伊海博之* 児玉利朗** 古郷辰二** 木次大介*
田村利之* 堤弘治* 伏見肇** 杉山貴志**
古谷淳* 弓場光泰* 堀俊雄*

*神奈川歯科大学歯周病学講座

**再建治療研究所

(2000 年 1 月 8 日受理)

Histopathological Study of the Effect of Guided Tissue Regeneration (GTR) with Enamel Matrix Protein

Hiroyuki Ikai*, Toshirou Kodama**, Tatsuji Kogou**, Daisuke Kitsugi*,
Toshiyuki Tamura*, Kouji Tsutsumi*, Hajime Fushimi**, Takashi Sugiyama**,
Jun Furuya*, Mitsuyasu Yumiba* and Toshio Hori*

*Department of Periodontology, Kanagawa Dental College, **Oral Reconstruction Therapy Institute

Accepted for publication 8 January 2000

The purpose of this study is to reconsider the attachment pattern and to evaluate the effects of Guided Tissue Regeneration (GTR) with Biodegradable collagen membrane (Tissue Guide™) and enamel matrix protein (EMDOGAIN®) applied to experimental periodontal bone defects.

The mesial roots of the lower third and fourth premolars from 10 beagle dogs were used.

Mucoperiosteal flaps were reflected and bone defects were created measuring 5 mm in width and 5 mm in height.

The experimental bone defects were treated by four different methods : ① flap operation (control) ; ② GTR with biodegradable collagen membrane (Tissue Guide™) (T group) ; ③ applying enamel matrix protein (EMDOGAIN®) (E group) ; ④ GTR with Tissue Guide™ and EMDOGAIN® applied (TE group).

After 6-12 weeks of healing, histologic sections were processed and histologically analyzed.

In new cementum of T, E, and TE groups, hardly any cement cells were recognized, and no significant differences in attachment pattern among the three groups were noticeable.

More significant new bone formation was found in the TE group than in the other groups, suggesting that GTR with Tissue Guide™ and EMDOGAIN® applied may facilitate periodontal tissue regeneration. J. Jpn. Soc. Periodontol., 42 : 29~42, 2000.

Key words : EMDOGAIN®, Tissue Guide™, attachment apparatus

要旨 : 本研究の目的は、歯肉剥離搔爬手術時にエナメルマトリックスタンパクおよび GTR 法の応用によって生じる付着様式および歯周組織再生効果について検索することである。実験動物はビーグル犬 10 頭を使用し、実験材料は吸収性コラーゲン膜 (Tissue Guide™) およびエナメルマトリックスタンパク (EMDOGAIN®) を使用した。実験方法は下顎左右側第三・第四前臼歯の歯肉弁を粘膜骨膜弁にて剥離後、近心根に高さ 5 mm、幅 5 mm の人工的裂開型骨欠損を作製し、以下の 4 群を設定した。① C 群 (歯肉剥離搔爬手術のみを施行した群)、② T 群 (Tissue Guide™ による GTR 法を施行した群)、③ E 群 (EMDOGAIN® を応用した群)、④

TE 群 (Tissue Guide™ と EMDOGAIN® の併用を施行した群)。観察期間は 6 週・12 週とし、病理組織学的に検索した。

その結果、T 群、E 群および TE 群においては C 群と比較して、新生セメント質の形成量が顕著に認められた。更に、3 群間では新生セメント質内にセメント細胞様細胞の出現はほとんど観察されず、根面に対する付着様式にも差異は認められなかった。一方、TE 群では他群と比較して著明な骨再生が認められたことから、Tissue Guide™ と EMDOGAIN® の併用による外科療法は、歯周組織の再構築を助長する可能性が示唆された。

索引用語: EMDOGAIN®, Tissue Guide™, 付着様式

緒 言

GTR 法は新付着を獲得するという概念^{1,2)}のもとに、予知性の高い再生療法として確立されてきた。しかしながら、近年 GTR 法により形成されたセメント質は、有細胞性セメント質であり、歯根形成時に生じるセメント質とは発生学的に異なることが指摘³⁾されるようになった。

そこで、歯周組織本来の構造と機能の回復という観点から、エナメルマトリックスタンパク (EMP) が注目されるようになった。EMP は、胎生期にヘルトヴィッヒ上皮鞘の細胞から分泌され、歯小囊周囲の間葉系細胞を刺激することで、セメント芽細胞が歯根象牙質基質に誘導される。その後、細胞成分を含まない無細胞性セメント質が形成される⁴⁾。このような見地から、EMDOGAIN® は EMP を歯周外科領域における再生療法に応用することを目的として開発された⁵⁾。歯肉剥離掻爬手術への EMDOGAIN® の応用は、無細胞性セメント質の形成を誘導し、歯周組織再生にとって有用であるとの報告⁵⁻⁷⁾がされている。

一方、著者らの吸収性コラーゲン膜・Tissue Guide™ を用いた GTR 法に関する一連の組織学的研究⁸⁻¹¹⁾では、新生セメント質内に細胞成分がほとんど観察されず、歯根表面と新生セメント質が剥離しているような所見はほとんど認められなかった。また、これまでに EMDOGAIN® に関する研究は多く報告されているものの、吸収性コラーゲン膜による GTR 法ならびに両者の併用法とを比較検討した研究報告は少ない。

そこで本研究は、Tissue Guide™ および EMDOGAIN® を用い、各々の単独応用と併用療法における術後の付着様式および歯周組織再生効果について病理組織学的に検索を行った。

材料および方法

1. 実験材料

実験動物には、全身所見および口腔内所見ともに異

常を認めないビーグル犬 (体重 10~15 kg, 推定年齢 2~8 歳) 10 頭を使用した。

実験材料には、吸収性コラーゲン膜・Tissue Guide™: T-square type (高研社製)¹²⁾ および EMDOGAIN® (ビオラ社製) を使用した。EMDOGAIN® はアメロジェニン等のエナメルマトリックスタンパクを凍結乾燥したものを主剤とし、溶解液プロピレングリコールアルジネート溶液 (PGA) との合剤である⁷⁾。

2. 実験方法

外科手術は、前投薬として硫酸アトロピン (0.5 mg/ml: 田辺製薬株式会社) 0.5 mg をイヌ頸部皮下に注射した後、5% 塩酸ケタミン (動物用ケタラル®, 50 mg/ml: 大日本製薬株式会社) 25 mg/kgw の静注による全身麻酔下で行った。

実験部位は下顎左右側第三、第四前臼歯とし、以前著者らの行った方法⁹⁾と同様の骨欠損モデルを実験に供した。すなわち、同部に歯肉溝切開を行った後、粘膜骨膜弁を作製し、近心根に垂直的高径 5 mm, 近遠心的幅径 5 mm の人工的裂開型骨欠損を作製した。更に、ルートプレーニングにて露出根面のセメント質を完全に除去し、骨欠損底部に近接する根面にエンジン用ラウンドバー # 1/2 にて組織計測用ノッチを付与した後、以下の 4 群を設定した (図 1)。

① Control 群 (以下 C 群): 通常の歯肉剥離掻爬手術のみを施行した群

② Tissue Guide 群 (以下 T 群): Tissue Guide™ を用いて GTR 法を施行した群

③ EMDOGAIN 群 (以下 E 群): 露出根面に対して EMDOGAIN® を塗布した群

④ Tissue Guide-EMDOGAIN 群 (以下 TE 群): EMDOGAIN® の応用と Tissue Guide™ による GTR 法を併用した群

なお、EMDOGAIN® の応用に際し、本研究では根面への酸処理を行わなかった。Tissue Guide™ の設置に関しては、骨欠損を 2~3 mm 被覆するように調整した後、被験歯に結紮固定を行った。この時、膜上縁が歯肉辺縁より約 2 mm 根尖側に位置し、膜が完全に被覆されるように歯肉弁を復位・適合させ、歯肉

図 1 左からC群, T群, E群, TE群設置時の口腔内所見

辺縁がCEJよりも約1mm 歯冠側に位置している状態で歯間部単純縫合および懸垂縫合を行い、外科手術を終了した。

実験のタイムスケジュールは、観察期間が術後6週および12週となるように設定した(図2)。なお、術前処置として外科手術1週前にスケーリングを行い、術直後からは毎日0.2% グルクロン酸クロルヘキシジン水溶液(住友製薬株式会社)による局所洗浄と、術後2週以降から観察期間が終了するまでは週3日ブラッシングとの併用により、プラークコントロールを徹底して行った(図3)。

3. 組織標本の作製

観察期間終了後直ちに、第二前臼歯遠心部と第一後臼歯近心部で下顎骨を切断し、被験歯を含めて周囲組織を一塊として摘出した。摘出された組織塊は10%中性緩衝ホルマリン溶液にて1週間固定後、10%ギ酸ホルマリン溶液にて約4カ月間脱灰操作を行い、パラフィン包埋した。その後、厚さ約3 μ mの頬舌断連続切片を作製し、Hematoxylin-Eosin染色を施し、顕微鏡観察用標本とした。

4. 組織学的計測方法および統計分析

組織計測は、各群において被験歯の近遠心幅中央部に相当し、歯髓腔、根尖部を明瞭に確認できる各標本より、それぞれ近遠心的に約100 μ m間隔で10枚ずつ選択し、40倍の顕微鏡下にて行った。計測項目は図4に示すように、ノッチ底すなわちルートプレーニング最根尖側端(以下ARP)を基準として、セメント-エナメル境つまりルートプレーニング最歯冠側端(以下CRP)までの距離、歯肉辺縁(以下GM)までの距

図 2 実験のタイムスケジュール

離、接合上皮最根尖側端(以下JE)までの距離、新生セメント質最歯冠側端(以下NC)までの距離、新生骨最歯冠側端(以下NB)までの距離を計測した。また、歯根表面に沿って穿下性吸収窩(以下Rc~Ra)および骨性癒着(以下Ac~Aa)が認められる場合には、各々の合計距離を計測した。

そして、ルートプレーニングを行った領域(ARP~CRP)の距離に対する、ARP~GM, ARP~JE, ARP~NC, ARP~NB, Rc~Ra, Ac~Aaの距離の割合を百分率で算出し、各々を歯肉退縮抑制率、接合上皮深部増殖抑制率、新生セメント質形成率、新生骨形成率、歯根吸収率、骨性癒着率とした。術後6週および12週における組織計測結果に対する統計分析として、Mann-Whitney's U-testを用いて群間ならびに経時的な有意差検定を行い、各群における計測結果の代表値として便宜的に平均値を用いた。

更に、T群, E群およびTE群において形成された

図3 左からC群, T群, E群, TE群の術後12週の口腔内所見

- CRP: ルートプレーニング最歯冠側端
- GM: 歯肉辺縁
- JE: 接合上皮最根尖側端
- Rc: 歯根吸収窩最歯冠側端
- Ra: 歯根吸収窩最根尖側端
- NC: 新生セメント質最歯冠側端
- NB: 新生骨最歯冠側端
- Ac: 骨性癒着最歯冠側端
- Aa: 骨性癒着最根尖側端
- ARP: ルートプレーニング最根尖側端

歯肉退縮抑制率 = $\frac{ARP \sim GM}{ARP \sim CRP} \times 100$	接合上皮深部増殖抑制率 = $\frac{ARP \sim JE}{ARP \sim CRP} \times 100$
新生セメント質形成率 = $\frac{ARP \sim NC}{ARP \sim CRP} \times 100$	新生骨形成率 = $\frac{ARP \sim NB}{ARP \sim CRP} \times 100$
歯根吸収率 = $\frac{Rc \sim Ra}{ARP \sim CRP} \times 100$	骨性癒着率 = $\frac{Ac \sim Aa}{ARP \sim CRP} \times 100$ (%)

図4 組織学的計測方法

図5 新生セメント質内における細胞数の計測方法

新生セメント質については、骨欠損に隣接する露出根面を歯軸方向に歯冠側1/2領域および根尖側1/2領域に分け、新生セメント質内に存在する細胞、すなわちセメント細胞様細胞の数を各領域毎に100倍の顕鏡下にてカウントした。なお、セメント細胞様細胞については、セメント小腔と核の局在を明瞭に確認できる細胞成分とした(図5)。統計分析として、Wilcoxon signed-ranks testにより群間ならびに経時的な有意差検定を行い、各群における代表値としては便宜的に平均値を用いた。

結 果

1. 臨床所見

全ての群において、術後2週程度まで術後性の炎症反応と思われる所見が認められたが、その後は創の哆開、治癒の遅延などの異常所見は観察されず、肉眼的に良好な治癒を示した。

2. 骨欠損計測結果

人工的裂開型骨欠損作製後、全ての被験歯について骨欠損の深さ、頬舌幅、近遠心幅を計測し、術後6週および12週の各群における計測値について、t-testを用いて統計分析を行い比較検討した結果、作製した骨欠損は術後6週および12週ともに、全ての群間における有意差は認められず、ほぼ規格化された骨欠損モデルであることが確認された。

3. 組織所見

1) 術後6週

C群(図6)においては、歯肉辺縁はルートプレッシング最歯冠側端(CRP)付近に位置し、接合上皮は搔爬根面の中央部付近まで深部増殖している所見が

認められた。更に、その根尖側では再生結合組織線維が搔爬根面と平行に走向し、新生セメント質の形成は搔爬根面の1/2程度、新生骨の形成は根尖側領域に局限してわずかに認められた。また、歯根吸収窩はほとんど認められず、骨性癒着については全く観察されなかった。

T群(図7)、E群(図8)およびTE群(図9)においては、ほぼ同様の所見が観察された。すなわち、歯肉辺縁はCRPよりもやや歯冠側に位置し、接合上皮は搔爬根面の歯冠側1/4程度の位置で停止していた。新生セメント質については、ARPから接合上皮最根尖側端直下まで、既存のセメント質と連続して形成されている所見が認められた。また、根尖側領域では、ノッチ内根面に沿って形成された新生セメント質内にわずかにセメント細胞様細胞の存在が認められた。一方、歯冠側領域では、接合上皮直下の根面に形成された吸収窩に沈着するセメント質内に、セメント細胞様細胞が埋入されている所見が一部の標本で観察された。新生骨については、搔爬根面の根尖側1/4程度認められ、新生セメント質との間に歯根膜様構造を呈する所見が観察された(図10a, b)。また、歯根

図6 術後6週・C群

図7 術後6週・T群

図8 術後6週・E群

図9 術後6週・TE群

JE: 接合上皮最根尖側端 NC: 新生セメント質最歯冠側端

NB: 新生骨最歯冠側端 N: ノッチ最根尖側端 (HE染色 ×4)

図 10 術後6週・E群 術後6週・TE群
 図 10 新生セメント質と新生骨の間には、歯根膜様の組織が認められる。
 (HE 染色 ×100)

吸収窩はほとんど認められず、骨性癒着については全く観察されなかった。

更に、T群およびTE群において膜構造が多数の標本で観察され、その周囲にはマクロファージあるいは異物巨細胞の存在を示す所見が一部の標本で認められた。また、E群では歯冠側領域に形成された新生セメント質表面に、紡錘形の核を有する線維芽細胞様細胞が、規則正しく配列している所見が多数の標本で観察された(図11a, b, c)。

2) 術後12週

C群(図12)においては、歯肉辺縁の位置は術後6週と同程度に認められ、接合上皮は搔爬根面の歯冠側1/3程度の位置で停止していた。新生セメント質および新生骨は術後6週と同程度に認められ、再生結合組織線維は搔爬根面と平行に走向して認められた。歯根吸収窩はほとんど認められず、骨性癒着については全く観察されなかった。

T群(図13)、E群(図14)およびTE群(図15)における歯肉辺縁の位置、接合上皮の停止位置および新生セメント質の形成は術後6週と同程度であった。また、新生セメント質については術後6週と同様の所見が認められ、搔爬根面の全領域において、3群ともに新生セメント質内に存在する細胞はほとんど観察されず、多数の標本で根面と新生セメント質が付着している所見が観察された(図16a, b, c)。新生骨はT群およびE群で搔爬根面の1/3程度、TE群で2/5程度認められ、新生セメント質との間には歯根膜様構造を呈する所見が多数の標本で観察された(図17a,

b)。歯根吸収および骨性癒着に関しては、術後6週と同様の所見が認められた。また、T群およびTE群では、膜構造が残存して認められる所見が一部の標本で観察された。

4. 組織学的計測結果

1) 歯肉退縮抑制率(図18)

術後6週ではC群(96.9%)、T群(116.7%)、E群(120.7%)、TE群(116.2%)であり、術後12週ではC群(108.2%)、T群(114.3%)、E群(116.9%)、TE群(116.2%)であった。術後6週および12週ともに、T群、E群およびTE群がC群に比較して有意な歯肉退縮抑制($p<0.05$)が認められた。また、術後6週から12週にかけて、各群における経時的に有意な変化は認められなかった。

2) 接合上皮深部増殖抑制率(図19)

術後6週ではC群(63.1%)、T群(76.3%)、E群(76.1%)、TE群(77.1%)であり、術後12週ではC群(72.8%)、T群(78.1%)、E群(77.6%)、TE群(75.8%)であった。術後6週および12週ともに、T群、E群およびTE群がC群に比較して有意に高い抑制率($p<0.05$)を示し、それら3群間での有意差は認められなかった。また、術後6週から12週にかけて、C群で経時的に有意な深部増殖抑制($p<0.05$)が認められた。

3) 新生セメント質形成率(図20)

術後6週ではC群(48.9%)、T群(74.6%)、E群(72.6%)、TE群(76.2%)であり、術後12週ではC群(49.6%)、T群(75.5%)、E群(75.5%)、TE

図 11 接合上皮最根尖側端直下における新生セメント質内には、セメント細胞様の細胞はほとんど認められない。(HE染色 ×100)

群 (75.4%) であった。術後6週および12週ともに、T群、E群およびTE群がC群に比較して有意に高い形成率 ($p < 0.05$) を示したが、それら3群間での有意差は認められなかった。術後6週から12週にかけて、各群における経時的に有意な変化は認められなかった。

4) 新生骨形成率 (図 21)

術後6週ではC群 (17.2%)、T群 (29.1%)、E群 (25.9%)、TE群 (27.2%) であり、術後12週ではC群 (18.2%)、T群 (30.0%)、E群 (29.6%)、TE群 (40.6%) であった。術後6週および12週ともに、T群、E群およびTE群がC群に比較して有意に高い形成率 ($p < 0.05$) を示し、更に術後12週のTE群ではT群およびE群と比較して有意に高い形成率

($p < 0.05$) を示した。術後6週から12週にかけては、E群およびTE群で経時的に有意な増加 ($p < 0.05$) を示した。

5) 歯根吸収率 (図 22)

術後6週ではC群 (3.0%)、T群 (2.9%)、E群 (1.6%)、TE群 (1.5%) であり、術後12週ではC群 (3.1%)、T群 (3.0%)、E群 (4.2%)、TE群 (2.7%) であった。術後6週および12週ともに全ての群間における有意差は認められなかった。術後6週から12週にかけては、E群で経時的に有意な増加 ($p < 0.05$) を示した。

6) 骨性癒着については、術後6週および12週の全ての群で認められなかった。

図 12 術後 12 週・C 群 図 13 術後 12 週・T 群 図 14 術後 12 週・E 群 図 15 術後 12 週・TE 群
 JE: 接合上皮最根尖側端 NC: 新生セメント質最歯冠側端 NB: 新生骨最歯冠側端
 N: ノッチ最根尖側端 (HE 染色 ×4)

7) 新生セメント質内に存在する細胞数 (図 23)

術後 6 週において, T 群では根尖側 1/2 領域で 2.8, 歯冠側 1/2 領域で 1.0, E 群では根尖側 1/2 領域で 3.6, 歯冠側 1/2 領域で 1.8, TE 群では根尖側 1/2 領域で 4.1, 歯冠側 1/2 領域で 1.5 であった。

術後 12 週において, T 群では根尖側 1/2 領域で 4.2, 歯冠側 1/2 領域で 1.1, E 群では根尖側 1/2 領域で 4.0, 歯冠側 1/2 領域で 1.5, TE 群では根尖側 1/2 領域で 4.9, 歯冠側 1/2 領域で 1.2 であった。術後 6 週および 12 週において, 3 群ともに歯冠側 1/2 領域と比較して根尖側 1/2 領域で有意に多く ($p < 0.05$) の細胞が認められたが, 3 群間における有意差は認められなかった。また, 術後 6 週から 12 週にかけて, 3 群ともに経時的に有意な変化は認められなかった。

考 察

GTR 法は, 新付着を獲得する^{2,13,14)}ことから, 予知性の高い再生療法として確立されてきた。すなわち, 歯周外科処置後の創傷部領域において, 治癒速度の早

い上皮組織と歯肉結合組織をバリアメンブレンによって歯根表面から排除することにより, 新付着形成能を有するとされる歯根膜組織由来の細胞を選択的に罹患根面に再集合させ, 新付着を獲得するという概念に基づいている^{15~18)}。

しかしながら, 近年 Araújo らは, イヌ III 度分岐部病変に GTR 法を施した結果, 形成されたセメント質は有細胞性セメント質であり, 本来の組織とは異なっていたことを報告している³⁾。有細胞性セメント質では, セメント細胞が存在するセメント小腔から, 隣接するセメント小腔やセメント質表層に向かって細管が開口しているため, 細菌侵入や為害性物質の浸透がセメント質下の象牙質まで達する可能性があるとする報告¹⁹⁾も認められている。つまり, GTR 法によって再生されたセメント質は, 歯根発生期に生じる本来の組織とは異なることや, 象牙質と新生セメント質との結合が脆弱となる可能性が指摘されるようになった。

そこで, 以前から数多くの研究^{20~25)}により, セメント質形成に関与するといわれるエナメルマトリックスタンパク (EMP) を, 歯周外科領域へ応用する方法が注目されるようになった。つまり, 胎生期におけ

術後12週・T群 術後12週・E群 術後12週・TE群
 図16 接合上皮最根尖側端直下における新生セメント質内には、セメント細胞様の細胞はほとんど認められない。(HE染色 ×100)

る歯根形成の際、ヘルトヴィッヒ上皮鞘がEMPを分泌し、歯小囊周囲の間葉系細胞が刺激されることで、セメント芽細胞が歯根象牙質基質に誘導され、無細胞性セメント質が形成されるというものである。Hammarströmらは、サルを用いた研究により、EMP中のアメロジェニンと、プロピレングリコールアルジネート(PGA)との組み合わせが歯周組織再生に有用であることを報告⁵⁾し、EMPの臨床応用を目的として、EMPを主剤とし、PGAを溶解液とするEMDOGAIN®が開発された。更に、EMDOGAIN®を歯周外科処置に応用した場合、接合上皮の根尖側移動の防止、無細胞性セメント質の再生および歯槽骨の再生が生じるという報告⁵⁻⁷⁾はあるが、それらの詳細に関しては明らかにされていない。

一方、著者らの吸収性コラーゲン膜・Tissue Guide™を用いたGTR法に関する一連の研究⁸⁻¹¹⁾では、新生セメント質内にはセメント細胞様細胞の存在がほとんど観察されず、セメント質と象牙質との付着が阻害されているような所見も認められなかったことや、新生骨との間には歯根膜様組織の再構築を示唆する所見が認められた。そこで、著者らはEMDOGAIN®およびTissue Guide™を単独で用いた歯周外科処置、あるいは両者の併用法に関して、同一条件下で行った後の治癒様式や歯周組織再生効果について比較検討する必要があると考えた。

本研究では、各群間の術後の再生様式を同一条件下で比較するために、骨欠損を規格化した。すなわち、作製した裂開型骨欠損においては、その深さ、頬舌

術後12週・E群

術後12週・TE群

図 17 新生セメント質と新生骨の間には、歯根膜様の組織が認められる。
(HE染色 ×100)

Mann-Whitney's U test († $p < 0.05$)

図 18 歯肉退縮抑制率

Mann-Whitney's U test († $p < 0.05$)

図 19 接合上皮深部増殖抑制率

幅、近遠心幅を計測し、統計分析を行い、術後6週・12週ともに全ての群間における均一性を確認している。また、EMDOGAIN®の塗布に先立って、根面の酸処理を行わなかった。その理由として、本研究が人工的に骨欠損を作製したモデル実験であり、炎症を惹起したモデルと異なり、根面処理の妥当性がないことが挙げられる。更に、残存する歯根膜組織へのダメージ²⁶⁾を考慮し、術後の治癒環境を阻害する危険因子と

考えられるものを排除するとともに、群間の治癒環境を可及的に同一条件に設定する必要があると考えたからである。

組織学的計測に関しては、被験歯の近遠心幅中央部付近の切片にて組織計測を行い、Tissue Guide™ によるGTR法、EMDOGAIN®の応用、および両者の併用法が術後の歯周組織再生に及ぼす影響について定量評価し、統計分析を施すことで各群間および経時的

図 20 新生セメント質形成率

図 21 新生骨形成率

な比較検討を行った。

歯肉退縮の抑制効果については、術後6週および12週ともに、T群、E群およびTE群がC群と比較して有意に抑制されていた。Tissue Guide™を用いた群に関して古郷ら²⁷⁾は、本材料を移植した場合、歯肉弁への血液供給を阻害することなく、歯肉弁の維持安定に働き、歯肉退縮を抑制すると報告している。EMDOGAIN®に関しては、Hammarströmらがサルを用いて本研究と同様の骨欠損モデルにEMDOGAIN®を応用した結果、術後に若干の歯肉退縮が認められたと報告⁵⁾しているが、本研究結果ではC群と比較してE群における歯肉退縮が抑制された。その理由については、EMDOGAIN®に関する詳細な報告が数少なく明らかにすることはできなかった。

接合上皮の深部増殖に対する抑制効果については、術後6週および12週ともに、T群、E群およびTE群がC群と比較して有意に抑制され、新生セメント質形成についても、術後6週および12週ともに、T群、E群およびTE群がC群と比較して有意に高い形成率を示した。Tissue Guide™を用いた群に関しては、古郷らの報告²⁷⁾にあるように、術後初期において膜が接合上皮の根尖側移動を物理的に抑制し、セメント質形成能を有する歯根膜組織由来未分化間葉系細胞の歯冠側増殖を達成した後、膜の吸収に伴い周囲組織とスムーズに置換された結果、接合上皮の深部増殖を阻止できたものと考えられる。また、EMDOGAIN®に関しては、Gestrelusらの *in vitro* においてEMPが早

図 22 歯根吸収率

期に歯根膜組織由来の未分化間葉系細胞の増殖を促進するという報告^{28,29)}や、HammarströmらのEMPの応用により接合上皮の深部増殖が抑制され、術後8週で75%前後の新生セメント質形成が認められたという報告⁵⁾と、本研究結果がほぼ一致したことから、前述の結果として接合上皮の深部増殖を抑制できたものと考えられる。

新生セメント質内に存在する細胞については、術後6週および12週のT群、E群およびTE群ともに、

Wilcoxon signed-ranks test (* $p < 0.05$)

図 23 新生セメント質内に存在する細胞数

同様の所見が認められた。すなわち、歯冠側領域では接合上皮最根尖側端付近の歯根吸収窩に形成されたセメント質内に、また根尖側領域では骨欠損最根尖側端のノッチ付近でわずかに細胞成分が認められた。歯根吸収窩に形成されるセメント質は、歯根吸収に続いて起こる修復帰転としての細胞性固有性線維性セメント質と考えられており、本研究において接合上皮最根尖側端付近で認められた細胞成分を含む新生セメント質は、それらと同様のものと考えられる。一方、AraújoらはⅢ度分岐部病変を用いて、GTR法を行った群では歯冠側および根尖側ともに有細胞性セメント質が認められたのに対し、GTR法とEMDOGAIN®を併用した群では歯冠側で有細胞性セメント質、根尖側では無細胞性セメント質が認められたことから、EMPが消失する術後2週までに、セメント質形成能を有する細胞が歯冠側へ到達できなかったのではないかと考察している⁶⁾。しかしながら、本研究ではこのような所見が認められなかった。すなわち、骨欠損最根尖側端における細胞成分を含む新生セメント質は、従来歯根の根尖部および根分岐部に存在する細胞性混合重層性セメント質と同様のものと考えられる。

新生骨形成率については、術後6週および12週ともにT群、E群およびTE群がC群と比較して有意に高い形成率を示し、T群とE群の間で有意差が認められなかったことから、本研究で使用した骨欠損モデル

に対しては、EMDOGAIN®の単独応用とTissue Guide™によるGTR法では、術後12週で同程度の骨再生が生じるものと考えられる。一方、術後12週のTE群では、T群およびE群と比較して有意に高い形成率を示した。その理由として、GTR法による骨および骨膜あるいは歯根膜組織由来の骨形成能を有する細胞の歯冠側への増殖を助長する働き¹²⁾、そして、EMDOGAIN®による細胞の増殖・分化に対するマトリックスとしての働き²⁸⁾という相互の役割が阻害し合うことなく、骨再生にとって良好な治癒環境が得られたものと考えられる。但し、本研究で使用したTissue Guide™は、生体適合性も良好で優れた歯周組織再生効果を有する^{12,27)}反面、材質上歯肉弁の張力などに対する機械的強度に若干の問題を有する。また、EMDOGAIN®は無細胞性セメント質の形成を促す一方、残存する歯周組織量が少ない場合、十分な再生効果は期待できない。つまり、1壁性骨欠損のような残存骨壁数が少なく、広範囲に及ぶ骨欠損に対しては、骨移植材等の併用³⁰⁾など、歯周組織再生にとってより良好な治癒環境を達成しうる術式について検討を加える必要があると考えている。

歯根吸収については、術後6週および12週ともに全ての群においてわずかに観察されるものの、群間の有意差は認められず、骨性癒着については全ての群で観察されなかった。本研究では、接合上皮最根尖側端

付近の歯冠側領域において吸収窩の多くが認められ、それらの吸収窩は細胞成分を有する新生セメント質によって被覆されていた。つまり、外科的侵襲に伴う術後性の炎症反応によって生じた炎症性細胞の関与、あるいは骨膜由来の細胞の関与^{31,32)}が考えられ、炎症性変化が消退した時点で吸収窩にはセメント芽細胞が出現し、速やかにセメント質形成が行われた³³⁾ものと考えられる。また、経時的にはE群で歯根吸収の有意な増加を示した。この点に関して、Karringらは歯周外科手術後の歯根吸収は術後2〜3週で活性化され、12週以降も認められると報告³⁴⁾している。しかしながら、EMDOGAIN®と歯根吸収に関する詳細な報告はなく、本研究では明らかにできなかった。骨性癒着については、全ての群で認められず、Tissue Guide™によるGTR法を行った以前の研究⁸⁾においても、術後24週までに骨性癒着は全く観察されなかった。また、本研究でEMDOGAIN®を単独応用したものに関しても骨性癒着は全く観察されず、EMPは骨芽細胞よりも歯根膜組織由来細胞の増殖・分化に対し、より強く作用する可能性が示唆された。

本研究では、EMDOGAIN®を併用することによるコラーゲン膜への影響について分析を行っていないが、術後6週および12週のTE群における一部の標本では、T群と比較して膜構造が減少傾向にある所見が認められた。この点に関しては、EMDOGAIN®の溶媒であるPGAは酸性および低温の環境下では粘性が高く、生理的条件下において粘性が徐々に減少する性質を有している³⁰⁾ことから、PGAの存在下では術後初期におけるpHなど、創部の治療環境の変化がコラーゲン膜に何らかの作用を及ぼし、その結果膜の吸収時期がやや早期に生じた可能性が考えられる。しかしながら、付着様式あるいは歯周組織再生量の結果を比較してみても、EMDOGAIN®とTissue Guide™との併用は、歯周組織の再生療法として有用な術式であるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際しTissue Guide™の提供ならびにご教示を賜りました(株)高研の皆様方に厚く謝意を表します。

本論文の要旨は第42回春期日本歯周病学会学術大会(1999年4月22日)において発表した。

文 献

1) Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T. and Egel-

- berg, J.: Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. *J. Periodont. Res.*, 20: 201-208, 1985.
- 2) Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Wennström, J.: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J. Clin. Periodontol.*, 13: 604-616, 1986.
- 3) Araújo, M., Berglundh, T. and Lindhe, J.: The periodontal tissues in healed degree III furcation defects. *J. Clin. Periodontol.*, 23: 532-541, 1996.
- 4) Hammarström, L.: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 24: 658-668, 1997.
- 5) Hammarström, L., Heiji, L. and Gestrelus, S.: Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J. Clin. Periodontol.*, 24: 669-677, 1997.
- 6) Araújo, M. and Lindhe, J.: GTR treatment of degree III furcation defects following application of enamel matrix proteins. *J. Clin. Periodontol.*, 25: 524-530, 1998.
- 7) Heiji, L.: Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J. Clin. Periodontol.*, 24: 693-696, 1997.
- 8) 伊海博之, 児玉利朗, 木次大介, 杉山貴志, 堤 弘治, 古郷辰二, 伏見 肇, 堀 俊雄: アテロコラーゲン・天然アパタイト複合材を併用したGTR法の有用性に関する病理組織学的研究. *日歯周誌*, 41: 125-143, 1999.
- 9) 杉山貴志, 児玉利朗, 木次大介, 伊海博之, 堤 弘治, 伏見 肇, 堀 俊雄: Tissue Guide™によるGTR法の病理組織学的研究 2. 一壁性骨欠損モデルにおける有用性について. *日歯周誌 (秋期特別号)*, 39: 129, 1997.
- 10) 木次大介, 児玉利朗, 杉山貴志, 伊海博之, 堤 弘治, 伏見 肇, 堀 俊雄: Tissue Guide™によるGTR法の病理組織学的研究 3. 歯周組織の再生量の分析. *日歯周誌 (秋期特別号)*, 39: 130, 1997.
- 11) 杉山貴志, 児玉利朗, 木次大介, 伊海博之, 堤 弘治, 伏見 肇, 堀 俊雄: Tissue Guide™によるGTR法の病理組織学的研究 一壁性骨欠損モデルにおける有用性について. *日歯周誌 (春期特別号)*, 40: 72, 1998.
- 12) 児玉利朗: Tissue Guide™: One stage Guided tissue regeneration system manual, 1995.
- 13) Pontoriero, R., Nyman, S., Lindhe, J., Rosenberg, E. and Sanavi, E.: Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J. Clin.*

- Periodontol., 14 : 618-620, 1987.
- 14) Caffesse, R., Smith, B., Castelli, W. and Nasjleti, C. : New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J. Periodontol.*, 23 : 589-594, 1988.
 - 15) Melcher, A. : On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
 - 16) Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Planten, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 394-401, 1980.
 - 17) Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. : Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 96-105, 1980.
 - 18) Isidor, F., Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. : New attachment-reattachment following reconstructive periodontal surgery. *J. Clin. Periodontol.*, 12 : 728-735, 1985.
 - 19) Adriaens, P.A., De Boever, J.A. and Loesche, W. J. : Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J. Periodontol.*, 59 : 222-230, 1988.
 - 20) Slavkin, H.C. : Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited. *J. Periodontol.*, 47 : 249-255, 1976.
 - 21) Lindskog, S. : Formation of intermediate cementum. I : early mineralization of aprismatic enamel and intermediate cementum in monkey. *J. Craniofac Genet Dev Biol.*, 2 : 147-160, 1982.
 - 22) Lindskog, S. : Formation of intermediate cementum. II : a scanning electron microscopic study of the epithelial root sheath of Hertwig in monkey. *J. Craniofac Genet Dev Biol.*, 2 : 161-169, 1982.
 - 23) Lindskog, S. and Hammarström, L. : Formation of intermediate cementum. III : ³H-tryptophan and ³H-proline uptake into the epithelial root sheath of Hertwig in vitro. *J. Craniofac Genet Dev Biol.*, 2 : 171-177, 1982.
 - 24) Fong, C.D., Slaby, I. and Hammarström, L. : Amelin : an enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J. Bone Miner Res.*, 11 : 892-898, 1996.
 - 25) Hammarström, L. : The role of enamel matrix proteins in the development of cementum and periodontal tissues. *Ciba Found Symp.*, 205 : 246-260, 1997.
 - 26) Blomlöf, J. and Lindskog, S. : Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J. Clin. Periodontol.*, 22 : 464-468, 1995.
 - 27) 古郷辰二, 児玉利朗, 三辺正人, 田村利之, 堀 俊雄, 宮田暉夫 : Atelocollagen-Tendoncollagen Complex Membrane 移植後の歯周組織再生に関する病理組織学的研究. *日歯周誌*, 34 : 133-148, 1992.
 - 28) Gestrelus, S., Andersson, C., Lidström, D., Hammarström, L. and Somerman, M. : In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J. Clin. Periodontol.*, 24 : 685-692, 1997.
 - 29) Gestrelus, S., Andersson, C., Johansson, A.C., Persson, E., Brodin, A., Rydhag, L. and Hammarström, L. : Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J. Clin. Periodontol.*, 24 : 678-684, 1997.
 - 30) Melloning, J.T. : Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery : Technique and clinical and histologic Case report. *Int. J. Periodont. Dent.*, 19 : 9-19, 1999.
 - 31) 野口吉廣 : 歯肉剥離搔爬手術後の歯肉の付着に関する超微構造学的研究—外科的に象牙質を裸出させた根面に対する剥離歯肉弁の付着について—. *日歯周誌*, 26 : 21-31, 1984.
 - 32) 大阿久国賢 : 歯周組織再生に関する実験病理学的研究—歯根膜の有無が歯の移植に及ぼす影響—. *日歯周誌*, 31 : 55-71, 1989.
 - 33) 高田耕平 : 歯肉剥離搔爬手術後の新付着に関する研究—骨再生が新生セメント質に及ぼす影響について—. *日臨電顕誌*, 18 : 283-303, 1985.
 - 34) Karring, T., Nyman, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. : Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J. Clin. Periodontol.*, 11 : 41-52, 1984.

連絡先 :

神奈川県歯科大学歯周病学講座

〒238-0003 神奈川県横須賀市稲岡町 82