

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	山近梨奈(神奈川県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第497号
学位授与年月日	平成31年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Effects of DNA/protamine and DNA/gelatin paste on bone formation at tooth extraction wound sites (ラット抜歯窩におけるDNA/プロタミンペーストおよびDNA/ゼラチンペーストの骨形成能について) Journal of Hard Tissue (JHTB) 第28巻 第2号 191頁～198頁掲載 平成31年4月24日発行
論文審査委員	主査 教授 山越康雄 副査 教授 大久保力廣 副査 教授 細矢哲康

内容の要旨

【緒言】

DNAとプロタミン複合体は骨形成に優れており、粉末、多孔体およびフィルムなどの様々な形態に加工が可能である。チタンインプラントにコーティングし、骨形成を促進することも報告されている。また、DNA/プロタミン複合体は、水で練和することによってペースト状になる特性を有しており、新規のインジェクタブル骨再生材料として期待されている。しかしながら、臨床応用に当たっては、ペーストの作製方法や賦形性の保持、操作性に問題があった。本研究では、これらの問題点を解決するために、DNA複合体ペーストの改良を目指し、さらに、この改良型DNA複合体ペーストの骨形成効果について動物実験により評価した。

【材料と方法】

1. 改良型DNAペーストの作製

DNA/プロタミン複合体に水を添加してペースト化するのではなく、DNA水溶液にプロタミンを添加し、その場でペーストを作製する方法を考案した。DNA水溶液の濃度や添加するプロタミンの量を調整して、賦形性の保持および流動性に優れた改良型DNA/プロタミンペーストを作製することができた。具体的には、DNA 50 mgを200 μ lの純水に溶解し、そこにプロタミン 50 mgを添加して、改良型DNA/プロタミンペーストを作製した。

また、カチオン性タンパク質として塩基性ゼラチンに注目し、改良型DNA/ゼラチンペーストも作製した。この場合、まず、塩基性ゼラチン 50 mgを純水 400 μ lに溶解し、次にDNA 50 mgを添加して、DNAペーストを作製した。

2. ペースト充填器具の作製

ペーストの流動性を維持したまま、細部まで充填できる器材の改良を行った。充填用コンポジットレジ用CRシリンジの注入口に、デントジェット用シリンジの先端1.5 cmを切断した後に、先端部分を接合した。ペーストをCRシリンジに充填し、プラグをプラグーにて圧接し、デントジェット用シリンジの先端より適応部位にペーストを注入することとした。

3. 改良型DNAペーストの稠度測定

改良型DNA/プロタミンペーストおよび改良型DNA/ゼラチンペーストの稠度の測定を行った。それぞれのペーストを内径5 mmのシリコンモールド内に充填した後、モールドから取り出し、2 MPaにて10分間圧接を行い、広がったペーストの直径を測定して、稠度とした。比較として、従来型DNA/プロタミン複合体ペーストの稠度も測定した。

4. 動物充填実験

2種類の改良型 DNA ペースト (DNA/プロタミンペーストおよび DNA/ゼラチンペースト) の骨形成に与える影響を検討するために動物充填実験を行った (鶴見大学歯学部動物実験委員会 承認番号: 28A071)。2種類の改良型 DNA ペーストをその場で作製して、6週齢のラット (Wistar 系, 雄性) の上顎第一大臼歯を抜歯後、抜歯窩に即時充填した。抜歯後、ペーストを充填しない場合をコントロールとした。ペースト充填2週後に周囲骨を含めて試料を摘出し、ホルマリン固定、アルコール脱水を行い、X線マイクロCTにて抜歯窩の治癒状態を観察した。また各サンプルの TMD (Tissue Mineral Density) 値を測定した。

次に、非脱灰研磨標本および脱灰標本を作製した。非脱灰研磨標本は、試料を MMA 樹脂にて包埋後に、薄切切片を切り出し、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を施した。脱灰研磨標本は、試料を EDTA・2Na を用いて脱灰後、パラフィン包埋を行い、薄切切片を切り出し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

それぞれ、光学顕微鏡を用いて骨形成状態を観察した。さらに画像解析ソフトを用いて、抜歯窩の骨形成量 (Bone Mass, BM) を求めた。

なお上記の統計学的検索はすべて one-way ANOVA, Tukey の検定で行った。

【結果および考察】

DNA/プロタミン複合体からのペースト作製には、大量の水が必要、少量作製が困難、保存安定性に劣る、流動性が不十分、複合体合成が煩雑などの問題があった。本研究では、複合体を合成することなく、その場で必要量だけの DNA ペーストを作製することに成功した。

ペーストの稠度を測定した結果、従来の DNA/プロタミン複合体ペーストと比較して、改良型 DNA/プロタミンペーストおよび DNA/ゼラチンペーストは稠度が向上し、流動性に優れていることが判明した。

X線マイクロCT観察の結果、2種類の改良型 DNA ペーストを充填した場合、コントロール群と比較して骨形成状態は良好であった。また TMD 値測定の結果、DNA/プロタミンペースト充填群および DNA/ゼラチンペースト充填群では、TMD 値がコントロール群より有意に高く ($p < 0.05$)、石灰化度が高いことが分かった。また、DNA/ゼラチンペースト充填群の方が DNA/プロタミンペースト充填群よりも、有意に高い TMD 値を示した ($p < 0.05$)。

非脱灰研磨標本の観察でも、DNA/プロタミンペースト充填群および DNA/ゼラチンペースト充填群は、コントロールと比較して骨形成は良好であり、抜歯窩の治癒が促進されていることが確認された。脱灰標本においても良好な骨形成が確認された。さらに、コントロール群では骨髓腔の大きさが大きく観察されたのに対して、DNA/プロタミンペースト充填群と DNA/ゼラチンペースト充填群は骨髓腔の大きさが小さいことが確認できた。全体的に、コントロール群では骨形成が未熟であったが、DNA/プロタミンペースト充填群および DNA/ゼラチンペースト充填群、どちらも成熟骨が形成されていた。BM を測定した結果、DNA/プロタミンペースト充填群および DNA/ゼラチンペースト充填群は、コントロール群より有意に高かった ($p < 0.05$)。また、DNA/ゼラチンペースト充填群の方が DNA/プロタミンペースト充填群よりも有意に高い BM 値であった ($p < 0.05$)。

以上、本研究で考案した改良型 DNA/プロタミンペーストおよび DNA/ゼラチンペーストは、操作性に優れ、骨形成を促進することが判明した。さらに DNA/ゼラチンペーストの方が、DNA/プロタミンペーストよりも骨形成に優れている可能性が示唆された。

本研究で作製した改良型 DNA/プロタミンペーストおよび DNA/ゼラチンペーストは、ペースト稠度の調整が容易であり、成長因子などの添加も可能である。今後は、垂直性骨欠損への応用など、DNA/プロタミンペーストおよび DNA/ゼラチンペーストのインジェクタブル骨再生材料としての臨床応用の可能性について、さらに詳細に検討する。

審査の結果の要旨

骨形成を促進する DNA/プロタミン複合体のペースト化は、新規のインジェクタブル骨再生材料として期待されている。本研究では、改良型の DNA/プロタミンペーストを作製して骨形成効果について動物実験より評価することを目的とした。

従来のペースト作製方法とは異なる方法を考案し、改良型 DNA/プロタミンペーストおよび改良型 DNA/ゼラチンペーストを作製した。また、ペースト充填器具もペーストの流動性を維持したまま、細部まで充填できる器材に改良した。この器材を用いて改良型 DNA/プロタミンペーストおよび改良型 DNA/ゼラチンペーストの稠度を比較した。動物実験は、2種類の改良型 DNA ペーストを6週齢のラット上顎第一大臼歯抜歯窩に即時充填し、2週後に試料を摘出して X線マイクロ

CTにて抜歯窩の治癒状態を観察した。また各試料の組織ミネラル密度（TMD）を測定した。次に、非脱灰研磨標本および脱灰標本を作製し、光学顕微鏡を用いて骨形成状態を観察した。さらに抜歯窩の骨形成量（BM）を算出した。

コントロールとして用いた従来型のDNA/プロタミン複合体ペーストと比較して、2種類の改良型ペーストは稠度が向上し、流動性に優れていることが判明した。また、動物実験で得られたX線マイクロCT像もコントロールよりも骨形成の状態は良好であった。TMD値は両ペースト充填群ともコントロール群よりも有意に高く、DNA/ゼラチンペースト充填群はさらにDNA/プロタミンペースト充填群よりも有意に高値を示した。

非脱灰研磨標本および脱灰標本の観察でも両ペースト充填群はコントロールよりも良好な骨形成が観察され、BM値もTMD値と同様の結果を示した。

本研究で考案した改良型DNA/プロタミンペーストおよび改良型DNA/ゼラチンペーストは、操作性に優れ、骨形成を促進することが判明した。さらに改良型DNA/ゼラチンペーストの方が、改良型DNA/プロタミンペーストよりも骨形成に優れている可能性が示唆された。

本研究で作製された両ペーストは、垂直性骨欠損等の症例に対するインジェクタブル骨再生材料として用いることの出来る可能性を含んでおり、さらにペースト稠度の調整が容易であることより、成長因子などを結合させて歯科インプラント治療に関連した医療応用へ発展することが大いに期待できると考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。