

学 位 論 文 題 名

Influence of the Nature of Dentin Surfaces
on Proliferation and Mineralization Activity
of Gingival and Periodontal Ligament Cells

（象牙質の表面性状が歯肉細胞と歯根膜細胞の増殖と石灰化能に及ぼす影響）

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周組織の再生をめざして歯周外科手術を行う場合、ルートプレーニングした根面に付着する細胞が重要な役割をすることが明らかにされている。すなわち、根表面にセメント質を形成することが必要であり、それには根表面に付着した細胞と根表面との相互作用がきわめて重要な役割をしていると考えられる。したがって、根表面に種々の処理を行って性状を変えることにより、付着した細胞の増殖や分化を進め、セメント質形成に大きな影響を与えることが可能と思われる。

日常臨床で行われる歯周組織の再生を目的とした歯周外科手術では、ルートプレーニングにより根表面はセメント質が除去されて象牙質が露出し、そこに歯肉細胞あるいは歯根膜細胞が付着する可能性が高い。しかし、付着した歯肉細胞や歯根膜細胞の増殖や分化が象牙質表面の性状の違いにより、どのような影響を受けるかは明確にされていない。そこで、本研究は歯周組織の再生をより効果的に行うための第一段階として、象牙質の表面性状を変化させ、その上で歯肉細胞と歯根膜細胞を培養し、歯根象牙質の表面性状が、付着した細胞の増殖や石灰化能にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で行った。

【材料と方法】

（１）試験片の作製

牛歯から歯根膜、セメント質を除去し、4x3×1mmの大きさの象牙質ブロックを作製した。作製した象牙質ブロックは３群に分け、次の表面処理を行った。1)Rp群：ハンドスケーラーで表面を一層ルートプレーニングした。2) CA群：pH1のクエン酸で３分間処理後、充分水洗した。3)Na群：pH1のクエン酸で３分間処理後、10%次亜塩素酸ナトリウムで３分間処理して充分に水洗した。さらにハイドロオキシアパタイトブロックを Bisoserum® を用いて4x3×1mmの大きさに作製し、HA群とした。

(2) 細胞培養

歯肉細胞は、28歳女性の右上第一小臼歯の辺縁歯肉から採取し培養した細胞を用いた。歯根膜細胞は13歳女性の矯正で便宜抜歯した左上第一小臼歯から培養した細胞を用い、いずれも第3～6代の細胞を実験に供した。培養は10% fetal bovine serum, antibiotic (Penicillin 100 units/ml and Streptomycin 100 μ g/ml)を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium®(DMEM)で、37°C、95% air、5% CO₂の条件下で行った。

(3) アルカリ性フォスファターゼ(ALP)活性と総蛋白量の計測

各ブロックを24well培養プレートに静置し、歯肉細胞または歯根膜細胞を 6.8×10^4 cell/well に調整して播種、上記と同じDMEMで1、3、5、7、10、14日間、培養した。ALPの計測はBesseyらの方法を改良して行った。すなわち、培養細胞の付着、増殖した各ブロックをsucroseで洗った後、p-nitrophenyl phosphateを基質とした試薬(pH10)に40分浸漬し、420nmで吸光度を測定した。バックグラウンドの測定には非特異的ALPの阻害剤であるlevamisoleを用いた。

総蛋白量の計測は、ALPを計測した後、細胞の付着した各ブロックをsucroseで洗って、10% sodium dodecylsulfate中で攪拌し、Bio-Rad protein assay kit®を用いて行った。

(4) 石灰化結節の計測

歯肉細胞または歯根膜細胞を35mm dishに培養し、confluentになった時点で上記4群のブロックを細胞層の上に静置、10% fetal bovine serum, antibiotic, 100nM dexamethasone, 10mM β -glycerophosphateを添加した α -Minimum Essential Mediumでさらに培養を行った。ブロックを静置後、1,2,3週目にvon-Kossa染色を行って石灰化結節を染色し、デジタル写真をパーソナルコンピューターに取り込んで、画像解析ソフトNIH-image®を用いて各ブロック辺縁に形成された石灰化結節の面積を計測した。

【結果】

(1) 総蛋白量

歯肉細胞と歯根膜細胞の総蛋白量を比較すると、4群とも3日目まではほぼ同様に増加したが、5日目以後は歯肉細胞の総蛋白量が歯根膜細胞の総蛋白量より多くなった。4群間の総蛋白量の増加速度を比較すると、歯肉細胞ではNa群が他の3群より遅く、歯根膜細胞ではCA群が他の3群より速かった。

(2) ALP活性

ALP活性は、4群とも歯肉細胞では培養開始後1～3日まで低く、7日目以後高くなった。歯根膜細胞も1～3日まで低く、7日目以後上昇し始めた。歯根膜細胞と歯肉細胞を比較すると、いずれの群でも歯根膜細胞が著しく高いALP活性を示した。4群間で比較すると、歯肉細胞では差が見られなかったが、歯根膜細胞ではCA群のALP活性が他の3群に比べて高く、Na群とHA群はRp群より低かった。

(3) 石灰化結節

各群のブロック辺縁に形成された石灰化結節の面積は、歯肉細胞と歯根膜細胞とも経時的に増加したが、Rp群では歯根膜細胞の方が歯肉細胞より多く、3週後には2倍の差が見られた。CA群はRp群とほぼ同様の変化を示したが、歯根膜細胞での増加がとくに著明で、3週後には歯肉細胞の3倍の石灰化結節を形成した。Na群では歯根膜細胞の石灰化結節面積の増加は少なく、歯肉細胞と差がなかった。HA群はRp群とほぼ同様の変化であった。4群間で比較すると、石灰化結節は歯根膜細胞ではCA群、Rp群、HA群、Na群の順で多く、3週後にはCA群はNa群の2.7倍になった。歯肉細胞では4群間に差は見られなかった。

【考察および結論】

本実験では総蛋白量の増加は付着、増殖した細胞数の増加とほぼ相関することから、総蛋白量の測定を行った。その結果、根面に付着する細胞数の増加は、クエン酸や次亜塩素酸ナトリウムを用いて象牙質表面性状を変えても、歯肉細胞も歯根膜細胞も1～3日間はほぼ同程度であったが、5日を過ぎると歯肉細胞の増加が著しくなった。歯根膜細胞は歯肉細胞より増殖は少なかったが、ルートプレーニングのみよりクエン酸処理を行うと増殖は多くなり、歯肉細胞も次亜塩素酸ナトリウム処理を行うと増殖が阻害されるのが認められた。

ALP活性と石灰化結節形成の測定結果から、歯肉細胞は歯根膜細胞に比べて著しく少ないが石灰化能があることが認められた。しかし、象牙質表面性状を変えても大きな変化はなかった。歯根膜細胞はCA群が他の3群より明らかにALP活性と石灰化結節ともに多く、クエン酸処理により象牙質表面にコラーゲンなど有機成分を露出させると石灰化能が高まると考えられた。一方、Na群はALP活性、石灰化結節とも少なく、次亜塩素酸ナトリウム処理を行って根面のコラーゲンなど有機成分を除去すると、石灰化能は低下すると考えられた。

本研究の結果から、歯周外科手術を行った時、1) クエン酸処理や次亜塩素酸ナトリウム処理により、象牙質表面性状を変えることによって、歯肉細胞と歯根膜細胞いずれか一方の細胞を根面に誘導することは困難と考えられた。2) 歯根膜細胞の石灰化能は象牙質表面性状を変えることにより増加することから、GTR法などにより象牙質表面に歯根膜細胞を選択的に増殖させれば、歯根表面の性状を変化させることにより石灰化能が高まり、セメント質をより効果的に形成するのに役立つと考えられた。さらに、3) 歯肉細胞は少ないながらも石灰化結節を形成したことから、適切な刺激を与えることによりセメント質などの石灰化物を形成できる可能性があることが明かとなった。すなわち、歯肉細胞も適切な生体活性化因子（生理活性物質）などを用いることにより、歯周組織の再生に役立つ可能性があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙

副 査 教 授 久保木 芳 徳

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

Influence of the Nature of Dentin Surfaces on Proliferation and Mineralization Activity of Gingival and Periodontal Ligament Cells

(象牙質の表面性状が歯肉細胞と歯根膜細胞の増殖と石灰化能に及ぼす影響)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

歯周組織の再生には、根面にセメント質を形成することが必要であり、そのためには根面に付着した細胞と根面との相互作用がきわめて重要な役割をしていると考えられ、根面に種々の処理を行って性状を変えることにより、付着した細胞の増殖や分化を進め、セメント質形成に大きな影響を与えるのではないかとと思われる。

日常臨床で行われる歯周外科手術では、ルートプレーニングにより露出した歯根象牙質に、歯肉細胞あるいは歯根膜細胞が付着する場合が多い。しかし、象牙質表面の性状の違いが、付着した歯肉細胞や歯根膜細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるかは明確にされていない。そこで本研究は、歯根象牙質の表面性状が、付着した細胞の増殖や石灰化能にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、歯根象牙質の表面性状を変化させ、その上で歯肉細胞と歯根膜細胞を培養し、付着した細胞の総蛋白量やアルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化結節形成に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】

牛歯から4×3×1mmの大きさの象牙質ブロックを作製し、次の3群に分けて表面処理を行った。1) Rp群：ハンドスケーラーでルートプレーニング、2) CA群：ルートプレーニングした根面をpH1のクエン酸で3分間処理、3) Na群：pH1のクエン酸で3分間処理した根面を、10%次亜塩素酸ナトリウムで3分間処理を行った。さらにhydroxyapatiteブロックを同じ大きさに作製し、HA群とした。

歯肉細胞と歯根膜細胞は、矯正で便宜抜歯した上顎第一小臼歯の辺縁歯肉と歯根から採取した歯根膜を培養した。各ブロックを24well培養プレートに静置し、歯肉細胞または歯根膜細胞を 6.8×10^4 cell/wellで播種、DMEMで1、3、5、7、10、14日間培養後、ALP活性と総蛋白量を計測した。ALP活性は、p-nitrophenyl phosphateを基質として行い、総蛋白量の計測はBio-Rad protein assay kit®を用いて行った。

次に、歯肉細胞または歯根膜細胞を培養し、confluentになった時点で上記4群のブロックを細胞層の上に静置、100nM dexamethasone, 10mM β -glycerophosphateを添加した α -MEMでさらに培養を行った。その後1, 2, 3週目にvon-Kossa染色を行って石灰化結節を染色し、各ブロック辺縁に形成された石灰化結節の面積を計測した。

【結果】

歯肉細胞と歯根膜細胞の総蛋白量を比較すると、4群とも3日目まではほぼ同様に増加したが、5日目以後は歯肉細胞が歯根膜細胞より著しく多くなった。4群間で比較すると、歯肉細胞ではNa群が他の3群より増加速度が遅く、歯根膜細胞ではCA群が他の3群より増加が速かった。

ALP活性は、歯肉細胞では4群とも1～3日まで低く、7日目以後わずかに高くなった。歯根膜細胞は3日目までは低かったがそれ以後増加し、いずれの群も歯肉細胞と比較して著しく高いALP活性を示した。4群間で比較すると、歯肉細胞では差がなかったが、歯根膜細胞ではCA群が最も高く、他の3群と有意差がみられ、Na群とHA群はRp群よりも低かった。

各群のブロック辺縁に形成された石灰化結節の面積を歯根膜細胞と歯肉細胞で比較すると、Na群では差がなかったが、他の3群では歯根膜細胞の方が有意に多かった。4群間で比較すると、歯根膜細胞ではCA群、Rp群、HA群、Na群の順で多く、歯肉細胞では4群間に差は見られなかった。

【考察および結論】

本実験で総蛋白量の増加は付着、増殖した細胞数の増加とほぼ相関することから、クエン酸処理を行うことにより歯根膜細胞は増殖が速くなり、次亜塩素酸ナトリウム処理を行うと歯肉細胞の増殖が阻害されると考えられた。

ALP活性と石灰化結節形成量の測定結果から、歯肉細胞は歯根膜細胞に比べて著しく低い石灰化能を有し、根面処理により象牙質表面性状を変えても石灰化能に大きな変化は生じなかった。一方、歯根膜細胞は高い石灰化能を有し、クエン酸処理により象牙質表面に有機成分を露出させると石灰化能が高まり、次亜塩素酸ナトリウム処理を行って有機成分を除去すると石灰化能は低下した。

これら本実験の結果から、通常歯根象牙質表面では歯肉細胞が歯根膜細胞より増殖速度が速いが、歯根膜細胞を象牙質表面に選択的に増殖させることができれば、歯根表面の性状を変化させることにより石灰化能が高まり、セメント質の形成を促進できることを示唆していると考えられた。さらに、歯肉細胞は少ないながらも石灰化結節を形成したことから、適切な生体活性化因子（生理活性物質）などを用いることにより、セメント質などを形成して歯周組織再生に役立つ可能性があると思われた。

引き続き審査担当者と申請者のあいだで、論文内容および関連事項について質疑応答がなされたが、いずれの質問にも明快な回答が得られた。本研究は、象牙質の表面性状が歯肉細胞と歯根膜細胞の増殖と石灰化におよぼす影響について詳細に検討し、根面処理により象牙質の無機成分を除去すると、付着した歯根膜細胞の石灰化能が向上することを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認められた。