

rhBMP-2 で処理した象牙質が歯肉線維芽細胞の アルカリ性フォスファターゼ活性と 石灰化物形成に及ぼす効果

学位論文内容の要旨

緒 言

現在臨床応用されている組織誘導再生法（GTR法）は、歯根膜細胞を根面に増殖させ、セメント質と歯根膜を再生させようとする方法である。しかし、GTR法の適応範囲は狭く、特に歯周組織が大きく破壊され残存する歯根膜細胞が少ない場合において十分な臨床成績が得られていないのが現状である。

一方、歯肉結合組織は硬組織形成能が低いことから、再生療法では根面への増殖を阻止する必要があると考えられてきた。しかし、歯肉線維芽細胞はわずかであるが石灰化能を有しており、これを上昇させて根面にセメント質様硬組織を形成できれば、多量の歯周組織を再生できる新しい治療法に発展する可能性がある。

そこで細胞の石灰化能を強く上昇させる生体活性化物質の一つであるrhBMP-2で根面を処理する方法で、付着増殖した歯肉結合組織の硬組織形成能が上昇するかを知る目的で、rhBMP-2で処理した象牙質片が歯肉線維芽細胞のALP活性と石灰化物形成量に及ぼす効果について検討した。

材料および方法

実験1. rhBMP-2で処理した象牙質片に付着した細胞のALP活性の検討

1. 培養細胞

実験への供与に同意の得られた患者から歯根膜、歯肉結合組織を採取し、10 % FBS、抗生剤含有D-MEMを用いて培養して、歯肉線維芽細胞と歯根膜細胞を得た。

2. 象牙質片の処理と細胞培養

ウシ下顎切歯から4×4×1 mmの象牙質片を90個作製し、EDTAで3分間脱灰した

後、0、1、5、10 $\mu\text{g/ml}$ の rhBMP-2 に 10 分間浸漬し、その上に歯肉線維芽細胞 (1.5×10^5 個/well) を播種して、歯肉 0、1、5、10 群とした。一方、rhBMP-2 に浸漬しない象牙質片上に歯根膜細胞 (1.5×10^5 個/well) を播種し、歯根膜群とした。各群とも 0.1 % FBS、抗生剤含有 D-MEM で 1、3、7 日間培養した。

3. ALP 活性と総蛋白量の測定

各培養期間毎に象牙質片に付着した細胞の ALP 活性を次の方法で測定した。細胞の付着した象牙質片を pNPP 溶液に浸漬後、37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させ 420 nm の吸光度を測定し、ALP 活性を算出した。総蛋白量は、細胞の付着した象牙質片を、Bio-Rad[®] DC プロテインアッセイキットを用いて測定した。

実験 2. rhBMP-2 で処理した象牙質片周囲の石灰化物形成の検討

1. 象牙質片の処理と培養

実験 1 で用いた培養細胞をそれぞれ培養ディッシュに播種し、10 % FBS、抗生剤含有 α -MEM を用いて培養して、cell layer を作製した。

その後、実験 1 と同様に $3 \times 3 \times 0.5$ mm の大きさに作製した象牙質片 120 個を EDTA で 3 分間脱灰した後、0、1、5、10 $\mu\text{g/ml}$ の rhBMP-2 に 10 分間浸漬し、作製した歯肉線維芽細胞 cell layer 上に静置して、歯肉 0、1、5、10 群とした。一方、rhBMP-2 に浸漬しない象牙質片を歯根膜細胞 cell layer 上に静置して、歯根膜群とした。各群とも 10 mM β -グリセロリン酸、0.1 % FBS、抗生剤含有 α -MEM を用いて 5、7、10 日間培養した。

2. 石灰化物形成量の計測

各培養期間毎に象牙質片ごと cell layer を固定し、Von Kossa 染色して、位相差顕微鏡で観察した。さらに、位相差顕微鏡像をパーソナルコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェアを用いて、象牙質片の周囲に形成された石灰化物の面積を計測し、これを象牙質片縁の長さで除して石灰化物形成量とした。

結 果

実験 1. ALP 活性

歯肉 1、5、10 群の ALP 活性は、1 日目では歯根膜群に比較して有意に低く ($p < 0.05$)、歯肉 0 群と有意差は認められなかったが ($p > 0.05$)、3 日目では歯根膜群と有意差のない値まで上昇し ($p > 0.05$)、歯肉 0 群に比較して有意に高く約 6 倍の値

だった ($p < 0.01$)。7日目では歯肉1、5、10群はいずれも3日目に比較して低下したが、歯肉10群は低下が少なく歯根膜群と有意差のない高い値を維持していた ($p > 0.05$)。

実験2. 石灰化物形成量

歯肉1、5、10群の石灰化物形成量は、5日目では少なく歯肉0群と有意差は認められなかったが ($p > 0.05$)、7日目では歯根膜群と有意差のない値まで増加し ($p > 0.05$)、歯肉0群に比較して有意に高く約2.5倍の値だった ($p < 0.05$)。10日目では歯肉10群のみさらに増加し、歯根膜群に比較して有意差のない高い値だった ($p > 0.05$)。なお、歯肉1、5、10群の石灰化物は象牙質片の周囲に形成され、ディッシュ底面の象牙質片から離れた位置にはほとんど形成されなかった。

考察および結論

rhBMP-2は、骨系細胞に限らず様々な細胞の石灰化能を著しく上昇させ、生体内でも強い異所性の硬組織誘導能を有することから、本研究では石灰化能を促進する生体活性化物質の一つとして着目した。すなわち根面にrhBMP-2が局在すれば、付着増殖した歯肉結合組織によってセメント質様硬組織が形成される可能性があると考え、本研究ではその第一段階として象牙質片をrhBMP-2で処理し、付着した歯肉線維芽細胞の石灰化能を評価した。

その結果、培養3日目の歯肉1、5、10群のALP活性は、歯根膜群と同程度まで上昇し、培養7日目の歯肉1、5、10群の石灰化物形成量は歯根膜群と有意差のない値まで上昇した。これは、rhBMP-2で処理した象牙質片が、付着した歯肉線維芽細胞に作用し、その石灰化能を歯根膜細胞と同程度まで上昇させたためと考えられる。

一方、培養7日目の歯肉1、5、10群のALP活性は、3日目に比較して低下したが、高濃度のrhBMP-2で処理した群ほど低下は少なく、培養10日目の歯肉1、5、10群の石灰化物形成量は、7日目に比較して歯肉10群のみ増加し、歯根膜群と比較して有意差のない値だった。これは、高濃度のrhBMP-2で象牙質片を処理すると、低濃度のものより付着した歯肉線維芽細胞の石灰化能をより長い期間上昇させることを示し、象牙質片を処理するrhBMP-2の濃度が歯肉線維芽細胞の石灰化能に影響を与えることを示している。

なお、培養ディッシュ底面に静置した象牙質片から離れた位置にある歯肉線維芽細胞

胞は石灰化物をほとんど形成しなかったことから、rhBMP-2は象牙質片から培地に放出され、培養ディッシュ内の全細胞に作用している可能性は低いと考えられる。

rhBMP-2が象牙質にどのように保持されているかは明らかではないが、本研究ではEDTAを用いて象牙質片を脱灰しており、rhBMP-2はコラーゲンに親和性が高いことから、象牙質片表面に露出した象牙質基質のコラーゲンに保持されていた可能性が高いと考えられる。

本研究の結果、根面をEDTAで脱灰後、rhBMP-2を塗布することにより、歯肉結合組織が根面に硬組織を形成できる可能性が示唆された。今後さらに、rhBMP-2の適切な濃度の検討や病理組織学的実験を行う必要があると考えている。

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 松 本 章

学 位 論 文 題 名

rhBMP-2 で処理した象牙質が歯肉線維芽細胞の

アルカリ性フォスファターゼ活性と

石灰化物形成に及ぼす効果

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。

現在臨床応用されている組織誘導再生法（GTR法）は、歯根膜細胞を根面に増殖させ、セメント質と歯根膜を再生させようとする方法であるが、歯周病が進行し残存する歯根膜が少ない場合、十分な臨床成績が得られず適応症が狭い欠点がある。

歯肉結合組織は重度歯周病罹患歯でも周囲に多量に存在するが、硬組織形成能が低いため、GTR法などの再生療法では根面への増殖を阻止する必要があると考えられてきた。しかし、歯肉線維芽細胞はわずかであるが石灰化能を有しており、これを上昇させて根面にセメント質様硬組織を形成できれば、重度の歯周病にも適応できる新しい歯周組織再生療法を開発できる可能性がある。

そこで結合組織由来細胞の石灰化能を強く上昇させるrhBMP-2に着目し、rhBMP-2で歯根面を処理する方法で、歯肉線維芽細胞の石灰化能が上

昇するかを知る目的で、rhBMP-2で処理した象牙質片上で培養した歯肉線維芽細胞のALP活性と石灰化物形成について検討した。

【材料と方法】

実験1. ALP活性の検討

実験への供与に同意の得られた患者から歯根膜、歯肉結合組織を採取し、歯肉線維芽細胞と歯根膜細胞を得た。ウシ下顎切歯から4×4×1mmの象牙質片を作製し、pH 7.0に調整した24%EDTAで3分間脱灰して5群に分け、歯肉0、1、5、10群は0、1、5、10 $\mu\text{g/ml}$ のrhBMP-2を含むMEMに、歯根膜群はrhBMP-2を含まないMEMに10分間浸漬した。その後、象牙質片を取り出して乾燥し、歯肉0、1、5、10群は 1.5×10^5 個/wellに細胞数を調整した歯肉線維芽細胞を、歯根膜群は同様に調整した歯根膜細胞を象牙質片上に播種し、0.1%FBSを含むMEMを用いて培養し、1、3、7日目に象牙質片に付着した細胞のALP活性をMahmudらの方法を用いて測定した。

実験2. 石灰化物形成の検討

実験1で用いた歯肉線維芽細胞と歯根膜細胞を培養し、cell layerを作製した。その後、3×3×0.5mmの大きさの象牙質片を作製し、実験1と同様にrhBMP-2で浸漬処理した。その後、象牙質片を取り出して、歯肉0、1、5、10群は歯肉線維芽細胞cell layer上に、歯根膜群は歯根膜細胞cell layer上に静置し、10mM β -グリセロリン酸と0.1%FBSを含む α -MEMを用いて培養し、5、7、10日目にVon-Kossa染色して、位相差顕微鏡で観察した。さらに、画像解析ソフトウェアを用いて、石灰化物形成量を計測した。

【結果】

実験1. ALP活性

歯肉1、5、10群のALP活性は、1日目では低く歯肉0群と有意差はなく、歯根膜群より有意に低かった。3日目では著しく上昇し歯根膜群とほぼ同程度となり有意差は認められず、歯肉0群より有意に高く約6倍の値となった。7日目では歯肉1、5群は3日目より低下し歯根膜群より有意に低くなったが、歯肉10群は低下が少なく歯根膜群と有意差のないかなり高い値を示した。

実験2. 石灰化物形成量

石灰化物形成量は歯肉1、5、10群は5日目では少なく歯肉0群と有意差はなかった。しかし、7日目では増加し歯肉0群より有意に多く約2.5倍に上昇し、歯根膜群と有意差はなかった。10日目では歯肉1、5群は増加せず歯根膜群より有意に低くなったが、歯肉10群はさらに増加し歯根膜群と有意差のない高い値を示した。

【考察および結論】

rhBMP-2で処理した象牙質片が歯肉線維芽細胞のALP活性と石灰化物形成を上昇させることが可能かをヒト歯肉線維芽細胞を用いて検討した。その結果、rhBMP-2で処理した象牙質片は、付着した歯肉線維芽細胞のALP活性と石灰化物形成を歯根膜細胞と同程度まで上昇させた。これは象牙質片表面にrhBMP-2が保持され象牙質片に付着した歯肉線維芽細胞に作用し、その石灰化能を歯根膜細胞と同程度まで上昇させたと考えられる。さらに高濃度のrhBMP-2で象牙質片を処理するほど、付着した歯肉線維芽細胞のALP活性と石灰化物形成能をより長い期間上昇させており、象牙質片を処理するrhBMP-2の濃度が歯肉線維芽細胞の石灰化能に影響を与える可能性が高いことを示唆していると考えられる。

これらの結果から、根面を脱灰しrhBMP-2を塗布することで、歯肉結合組織が根面に硬組織を形成できる可能性が示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、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、重度歯周病に対する新しい歯周組織再生療法を開発する目的のもと、象牙質面をrhBMP-2で処理することが、歯肉線維芽細胞のALP活性と石灰化物形成にどのような影響を及ぼすかを詳細に検討した。その結果、象牙質片に付着した歯肉線維芽細胞の石灰化能が上昇することを明らかにし、歯肉結合組織が象牙質面に硬組織を形成し、歯周組織を再生できる可能性が高いことを明確にした点が高く評価された。本研究の内容は、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。