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

宮治裕史 菅谷 勉 加藤 颯

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座

歯周病学分野

(2000 年 10 月 7 日受理)

Effect of rhBMP-2 Applied Dentin on Alkaline Phosphatase Activity and Mineralized Nodule Formation in Gingival Fibroblasts

Hirofumi Miyaji, Tsutomu Sugaya and Hiroshi Kato

Periodontology and Endodontology, Department of Oral Health Science,

Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

Accepted for publication 7 October 2000

The purpose of this study was to examine the effects of rhBMP-2 applied dentin on alkaline phosphatase (ALP) activity and mineralized nodule formation in gingival fibroblasts *in vitro* with a view toward developing periodontal regenerative therapy inducing hard tissue to form on the root surface by gingival connective tissue *in vivo*.

Dentin blocks were demineralized with EDTA, divided into 5 groups, then labeled based on the treatment, *i.e.*, groups 0, 1, 5, and 10 with 0, 1, 5, and 10 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-2 applied and group PL treated with only D-MEM.

Human gingival fibroblasts (HGF) were seeded on each dentin block in groups 0, 1, 5, and 10 and human periodontal ligament cells (HPLC) on those of group PL. ALP activity and protein concentration of attached cells were assessed on days 1, 3, and 7.

Dentin blocks in each group were then placed over the confluent HGC and HPLC monolayers and incubated in α -MEM supplemented with β -glycerophosphate. The area of mineralized nodules around dentin blocks was stained by the Von Kossa method and measured on days 5, 7, and 10.

On day 1, the attached HGF in groups 0, 1, 5, and 10 showed lower ALP activity than that in group PL. On day 3, groups 1, 5, and 10 had about 6 times higher ALP activity than group 0 ($p < 0.01$), and almost the same level as group PL ($p > 0.05$). On day 7, ALP activity in groups 1 and 5 decreased, whereas that in group 10 showed no significant difference compared to the PL group ($p > 0.05$). The amount of mineralized nodule in groups 1, 5, and 10 was about 2.5 times higher than that in group 0 ($p < 0.05$), and was not significant compared to the PL group on day 7 ($p > 0.05$). RhBMP-2 applied dentin thus enhanced ALP activity and mineralized nodule formation in HGF to the level in HPLC. These results suggest that the application of rhBMP-2 may induce hard tissue formation on the root surface by gingival connective tissue. J. Jpn. Soc. Periodontol., 42 : 247~254, 2000.

Key words : gingival fibroblast, rhBMP-2, dentin, alkaline phosphatase activity, mineralized nodule

要旨 : 本研究は歯肉結合組織によって根面に硬組織を形成する新たな歯周組織再生療法を開発する第一段階として, rhBMP-2 で処理した象牙質が歯肉線維芽細胞の ALP 活性と石灰化物形成に及ぼす効果を検討した。象牙質片を EDTA で脱灰し, 5 群に分け, 歯肉 0, 1, 5, 10 群は 0, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ の rhBMP-2 で, 歯根膜群

は rhBMP-2 を含まない D-MEM で処理した。まず、歯肉 0, 1, 5, 10 群は象牙質片上に歯肉線維芽細胞を播種し、歯根膜群は歯根膜細胞を播種して 1, 3, 7 日間培養し、象牙質片に付着した細胞の ALP 活性と総蛋白量を測定した。次に各群の象牙質片を歯肉線維芽細胞と歯根膜細胞の cell layer 上に静置し、 β -グリセロリン酸を含む α -MEM で 5, 7, 10 日間培養し、Von Kossa 染色して石灰化物形成量を計測した。その結果、歯肉 1, 5, 10 群の ALP 活性は 1 日目は上昇せず、3 日目に歯肉 0 群と比較し約 6 倍で、歯根膜群と同程度まで上昇した。7 日目は歯肉 1, 5 群は低下したが、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だった。歯肉 1, 5, 10 群の石灰化物形成量は 7 日目に歯肉 0 群と比較し約 2.5 倍で、歯根膜群と有意差のない値だった。以上の結果から、rhBMP-2 で処理した象牙質は、付着した歯肉線維芽細胞の ALP 活性と石灰化物形成能を上昇させることが明らかとなり、根面を rhBMP-2 で処理することで歯肉結合組織が根面に硬組織を形成する可能性が示唆された。

索引用語：歯肉線維芽細胞, rhBMP-2, 象牙質, アルカリ性フォスファターゼ活性, 石灰化物

緒 言

歯根膜細胞が根面に増殖した場合のみセメント質の形成を伴う結合組織性付着が再生するという仮説¹⁾をもとに、組織誘導再生法 (GTR 法) が開発された^{2,3)}。しかし GTR 法の臨床的 attachment gain は 3 mm 程度の報告^{4~8)}が多く、歯周組織の破壊が大きく周囲に残存する歯根膜細胞が少ない 1 壁性や、3 級根分岐部病変などの骨欠損は、GTR 法を応用しても attachment gain が少ない^{9~11)}ことから、新たな歯周組織再生療法の開発が必要と思われる。

一方、重度に進行した歯周病罹患歯の周囲では歯根膜細胞は減少しているが、歯肉結合組織は多量に存在することが多い。歯肉結合組織の硬組織形成能は歯根膜に比較して著しく低く^{12~16)}、Nyman ら¹⁷⁾は歯肉結合組織を接触させた根面にはセメント質が再生されないことを報告しており、歯肉結合組織は歯周組織再生療法において排除すべきであると考えられている。

しかし、歯肉結合組織の線維芽細胞はわずかであるがアルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性を有しており^{12~16)}、これを上昇させることが可能であれば、歯肉結合組織によって、根面に硬組織を形成する新しい歯周組織再生療法を開発できる可能性があると思われる。細胞の石灰化能の上昇についてはこれまで様々な研究が行われているが、recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP) が細胞の石灰化能を強く上昇させることから注目されており、中でも rhBMP-2 は歯根膜細胞の ALP 活性を上昇させることが報告^{18,19)}されている。

そこで根面を rhBMP-2 処理することで、根面に付着した歯肉結合組織の硬組織形成能を上昇させることが可能かを知る目的で、rhBMP-2 で処理した象牙質片による歯肉線維芽細胞の ALP 活性と総蛋白量、および石灰化物形成量の変化について比較検討した。

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 活性および総蛋白量の検討

1. 歯肉線維芽細胞と歯根膜細胞

矯正治療のため便宜抜去が必要で、実験への供与に同意の得られた患者 5 名の抜去歯から、メスを用いて歯根膜を採取した。さらに抜歯窩周辺の付着歯肉から約 2 mm 四方の結合組織を採取した。

採取した歯根膜と歯肉結合組織を 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., USA), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., USA) を用いて 37°C, 5% CO₂, 95% Air の条件で培養し、outgrowth した細胞をそれぞれ 3~5 継代し、歯肉線維芽細胞 5 株、歯根膜細胞 5 株を得た。

次に、Bessey らの方法²⁰⁾を用いて、得られた各細胞株の ALP 活性を測定した。すなわち、各細胞を 24 well plate に播種し confluent になった時点で、*p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) を基質として、420 nm の吸光度を測定した。さらに、歯肉線維芽細胞 5 株と歯根膜細胞 5 株の ALP 活性の平均値を求め、それぞれ平均値に最も近い ALP 活性を有する歯肉線維芽細胞株、歯根膜細胞株を決定し、以下実験に用いた。

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、pH 7.0 に調整した 24% EDTA で 3 分間脱灰した後、蒸留水にて数回洗浄し、1,000 U/ml penicillin, 1,000 μ g/ml streptomycin 含有生理食塩水に 24 時間浸漬した。

その後象牙質片を、歯肉 0, 1, 5, 10 群および歯根

膜群の5群(各群N=18)に分けた。rhBMP-2(山之内製薬株式会社, 東京)を次の濃度にD-MEMで調整し, 歯肉0, 1, 5, 10群をそれぞれ10分間浸漬した。歯肉0群: 0 $\mu\text{g/ml}$, 歯肉1群: 1 $\mu\text{g/ml}$, 歯肉5群: 5 $\mu\text{g/ml}$, 歯肉10群: 10 $\mu\text{g/ml}$ とした。歯根膜群はrhBMP-2を含まないD-MEMに10分間浸漬した。

浸漬後, 象牙質片を取り出し, ガーゼで余剰分を拭き取り, 24 well plate上に静置し, 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浮遊液を象牙質片上に播種し, 歯根膜群は歯根膜細胞浮遊液を象牙質片上に播種した。5群とも0.1% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin 含有D-MEMを用いて37°C, 5% CO₂, 95% Airの条件下で1, 3, 7日間培養を行い, 培養期間中に培地の交換は行わなかった。

3. ALP活性と総蛋白量の測定

培養1, 3, 7日目に象牙質片に付着した細胞のALP活性, および総蛋白量を測定した。ALP活性の測定はBesseyらの方法を改変したMahmudらの方法¹⁰⁾を用いて行った。すなわち, 1 mM MgCl₂, 25 mM sucrose, 5 mM tris-HCl buffer (pH 10.0), および基質として2 mM pNPPを含む混合液に細胞の付着した象牙質片を浸漬後, 37°Cで反応させ420 nmの吸光度を測定した。バックグラウンド測定には5 mM levamisoleを用いた。総蛋白量の測定は, 細胞の付着した象牙質片を10% sodium dodecylsulfateで攪拌し, Bio-Rad® DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いて行った。

各測定値の統計学的分析には, Mann-WhitneyのU検定を用いた。

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で用いた歯肉線維芽細胞浮遊液と歯根膜細胞浮遊液をそれぞれ24 well plateに播種し, 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin 含有 Minimum Essential Medium Alpha Medium (α -MEM, GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., USA)を用いてconfluentになるまで培養し, cell layerを作製した。

その後, 実験1と同じ方法で作製した3×3×0.5 mmの大きさの象牙質片120個を, pH 7.0に調整した24% EDTAで脱灰し, 蒸留水にて数回洗浄して, 歯肉0, 1, 5, 10群および歯根膜群の5群(各群N=24)に分けた。rhBMP-2を実験1と同じ濃度に α -MEMで調整し, 歯肉0, 1, 5, 10群をそれぞれ

10分間浸漬した。歯根膜群はrhBMP-2を含まない α -MEMに10分間浸漬した。

浸漬後, 象牙質片を取り出し, ガーゼで余剰分を拭き取り, 歯肉0, 1, 5, 10群は作製した歯肉線維芽細胞のcell layer上に静置し, 歯根膜群は歯根膜細胞のcell layer上に静置した。各群とも10 mM β -glycerophosphate, 0.1% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin 含有 α -MEMを用いて37°C, 5% CO₂, 95% Airの条件下で5, 7, 10日間培養を行い, 培養期間中に培地の交換は行わなかった。

2. 石灰化物形成量の計測

培養5, 7, 10日目に10% 中性緩衝ホルマリン溶液で象牙質片ごとcell layerを固定し, Von Kossa染色して, 位相差顕微鏡(OLYMPUS® IMT, オリパス光学工業株式会社, 東京)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(NIH image, Free Ware)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。

各計測値の統計学的分析には, Mann-WhitneyのU検定を用いた。

結 果

実験1

1. ALP活性

歯肉0, 1, 5, 10群および歯根膜群のALP活性の変化を表1に示した。歯肉0群は1日目からALP活性が低く, 経時的にさらに低下した。歯根膜群は1日目から高いALP活性を示し, 7日目に若干の低下が見られたが培養期間中は高い値を維持していた。

歯肉1, 5, 10群のALP活性は, 1日目では歯肉0群と比較して有意差はなく($p > 0.05$), 歯根膜群に比較して有意に低かった($p < 0.05$)。しかし, 3日目では歯根膜群とほぼ同程度まで著しく上昇し, 有意差は認められなかった($p > 0.05$)。また, 歯肉0群に比較して有意に高く($p < 0.01$), 約6倍の値だった。7日目になると歯肉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($p > 0.05$)。一方, 歯肉1, 5群は低下が著しく歯根膜群より有意に低い値を示した($p < 0.05$)。

2. 総蛋白量

歯肉0, 1, 5, 10群および歯根膜群の総蛋白量を表2に示した。歯肉0群の総蛋白量は経時的に著しく増加したが, 歯根膜群はほとんど増加しなかった。

表 1 rhBMP-2 処理象牙質片に付着した細胞の ALP 活性

	1 日目	3 日目	7 日目
歯肉 0 群	0.18±0.07†	0.07±0.04††	0.03±0.02††
歯肉 1 群	0.22±0.12†	0.40±0.09**	0.05±0.03††
歯肉 5 群	0.19±0.11†	0.45±0.18**	0.12±0.08*†
歯肉 10 群	0.16±0.05†	0.41±0.13**	0.25±0.11**
歯根膜群	0.50±0.14*	0.53±0.11**	0.36±0.18**

単位: $\mu\text{mol Pi/min/mg protein}$ * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (歯肉 0 群との比較), † $p<0.05$, †† $p<0.01$ (歯根膜群との比較)

表 3 rhBMP-2 処理象牙質片周囲の石灰化物形成量

	5 日目	7 日目	10 日目
歯肉 0 群	0.63±0.69	0.56±0.21††	1.07±0.57††
歯肉 1 群	0.79±0.70	1.50±0.43**	1.51±0.72††
歯肉 5 群	0.61±0.24	1.46±0.60*	1.69±0.66†
歯肉 10 群	0.94±0.65	1.49±0.80**	2.09±0.51*
歯根膜群	0.99±0.54	1.92±0.77**	3.40±1.51**

単位: $\text{mm}^2/\text{mm} (\times 100)$ * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (歯肉 0 群との比較), † $p<0.05$, †† $p<0.01$ (歯根膜群との比較)

歯肉 1, 5, 10 群の総蛋白量は, 1 日目では歯肉 0 群と有意差はなかったが ($p>0.05$), 3 日目では歯肉 0 群に比較して有意に低い値だった ($p<0.05$)。7 日目になると歯肉 1, 5 群はいずれも 3 日目に比較して著しく増加し, 歯肉 0 群と有意差のない値まで上昇した ($p>0.05$)。しかし, 歯肉 10 群は増加せず, 歯肉 0 群より有意に低い値を示した ($p<0.05$)。

実験 2

1. 石灰化物形成量

歯肉 0, 1, 5, 10 群および歯根膜群の石灰化物形成量の変化を表 3 に示した。歯肉 0 群は石灰化物形成量が 7 日目まで増加せず, 10 日目において若干の増加が見られるのみであった。一方, 歯根膜群は経時的に著しく増加した。

歯肉 1, 5, 10 群は 5 日目では石灰化物形成量は少なく, 歯肉 0 群, 歯根膜群と比較して有意差はなかった ($p>0.05$)。しかし, 7 日目では増加し, 歯肉 0 群に比較して有意に高く ($p<0.05$), 約 2.5 倍に上昇し, 歯根膜群と比較して有意差はなかった ($p>0.05$)。10 日目になると歯肉 10 群は, 7 日目よりさらに増加し, 歯根膜群に比較して有意差のない高い値だった ($p>0.05$)。一方, 歯肉 1, 5 群は 7 日目からほとんど増加せず, 歯肉 0 群と比較して有意差はなく

表 2 rhBMP-2 処理象牙質片に付着した細胞の総蛋白量

	1 日目	3 日目	7 日目
歯肉 0 群	1.21±0.54	2.41±1.16†	2.97±1.39†
歯肉 1 群	0.93±0.21	0.57±0.14**†	2.86±0.83††
歯肉 5 群	0.79±0.31	0.57±0.20**†	1.89±0.62†
歯肉 10 群	1.11±0.38	0.90±0.35*	1.17±0.33*
歯根膜群	0.64±0.28	0.88±0.10*	1.22±0.27*

単位: mg/mm^2 * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (歯肉 0 群との比較), † $p<0.05$, †† $p<0.01$ (歯根膜群との比較)

図 1 培養 10 日目の象牙質片 (D) 周囲に形成された石灰化物 (矢印) 像 (Von Kossa 染色 $\times 3.3$) a: 歯肉 0 群, b: 歯肉 1 群, c: 歯肉 5 群, d: 歯肉 10 群, e: 歯根膜群

($p>0.05$), 歯根膜群より有意に低い値を示した ($p<0.05$)。

なお, 歯肉 0, 1, 5, 10 群の石灰化物は象牙質片の周囲に形成され (図 1), 培養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。一方, 歯根膜群の石灰化物は象牙質片の周囲だけではなく, 象牙質片から離れた位置にも若干形成された。

考 察

重度に進行した歯周病罹患歯に対し、根面にセメント質を広範囲に再生する歯周組織再生療法はまだ開発されていないのが現状である。そこで本研究は、根面を生体活性化物質で処理することで、歯肉結合組織が根面に硬組織を形成する新しい歯周組織再生療法を開発することを目標に、その第一段階として、rhBMP-2 で処理した象牙質片が歯肉線維芽細胞の石灰化能を上昇させることが可能か検討した。Mahmud ら¹⁶⁾ は象牙質表面に増殖した細胞の石灰化能には、細胞と象牙質基質との相互作用が大きく関与していることを報告している。このことから、石灰化能の低い歯肉結合組織の細胞が根面に増殖した場合、根面に石灰化能を上昇させる因子が局在すれば、その細胞の石灰化能を上昇させ、根面に硬組織が形成される可能性があると考えられる。

本研究では石灰化能を促進する生体活性化物質として、rhBMP-2 を選択した。rhBMP-2 は、骨系細胞に限らず様々な細胞の ALP 活性を著しく上昇させ^{18,19,21~23)}、生体内でも強い異所性の硬組織誘導能が確認されている^{24~26)}。そこで本研究でも歯肉線維芽細胞の石灰化能を上昇させる生体活性化物質として効果を期待できると考えた。

本研究に用いた細胞は、歯肉線維芽細胞 5 株と歯根膜細胞 5 株の ALP 活性を測定し、その平均値に最も近い ALP 活性を有する歯肉線維芽細胞と歯根膜細胞とした。一般に歯肉線維芽細胞の ALP 活性は歯根膜細胞と比較して低いと報告^{12~16)}されているが、一方で ALP 活性は個体差^{13,14,27)}があり、機械的外力^{28,29)}などの影響をうけると報告されている。本研究でも各細胞株の ALP 活性はばらつきが多く、歯根膜細胞株より高い ALP 活性を有する歯肉線維芽細胞株も存在していたことから、最も平均値に近い細胞株を選択した。

象牙質片は、表面を 24% EDTA で脱灰し蒸留水にて水洗後、直接 rhBMP-2 で処理した。象牙質表面を脱灰すると、表面に形成されたスメア層が除去され、象牙質基質のコラーゲン線維と象牙細管が露出する³⁰⁾。コラーゲンは rhBMP-2 の担体として用いられる^{25,31~33)}ことから、脱灰により rhBMP-2 が象牙質表面に保持される可能性が高く、また象牙細管の露出によって象牙質の表面積が増加し、rhBMP-2 の保持量が増加する可能性がある。さらに象牙質表面を脱灰すると細胞の付着が増加すると報告³⁴⁾されていることから、本研究において象牙質片表面への rhBMP-2 の保

持と、歯肉線維芽細胞の付着に有利であると考え、象牙質片表面の脱灰を行った。

脱灰液には 24% EDTA (pH 7.0) を使用した。中性の EDTA で象牙質表面を脱灰すると、クエン酸などの酸性脱灰液に比較してコラーゲン線維の露出が多く、細胞の付着が増加すると報告^{30,35)}されており、さらに生体内において組織に対する為害性が低く、歯周組織の治癒を妨げないことが報告^{36,37)}されていることから EDTA を選択した。

象牙質片の rhBMP-2 処理は、象牙質片を rhBMP-2 溶液に浸漬する方法を採用した。これは、rhBMP-2 を象牙質片全面にできる限り均等に保持させ、付着した細胞の反応のばらつきを最小にできると考えて行った。一方、象牙質片に付着した歯肉線維芽細胞が、象牙質片表面に保持された rhBMP-2 量によって異なった反応を示す可能性が考えられるため、象牙質片を処理する rhBMP-2 の濃度を 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ の 3 段階とし、rhBMP-2 を含まない歯肉 0 群を negative control とした。さらに、石灰化能が高く、歯周組織再生能があると考えられている歯根膜細胞を positive control として比較した。象牙質片を処理する rhBMP-2 の濃度に関して、Zaman ら¹⁸⁾が rhBMP-2 で処理した象牙質片上で培養した歯根膜細胞の石灰化能と、rhBMP-2 の濃度に関連があることを報告しており、本研究においても Zaman らの方法を参考に、低、中、高濃度の rhBMP-2 として 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を設定した。なお、本研究では各群の象牙質片に保持されている rhBMP-2 量の測定を行っていないため、rhBMP-2 量と細胞の石灰化能との関係については今後さらなる研究が必要と考えられる。

実験期間中の細胞培養は、Mahmud ら¹⁶⁾の方法を参考に行った。実験 1 では rhBMP-2 で処理した象牙質片上に直接細胞を播種し、各期間培養後に象牙質片を培養ディッシュから取り出し、象牙質片を十分に洗浄し、象牙質片に付着した細胞のみを対象として評価した。実験 2 ではあらかじめ作製した cell layer 上に rhBMP-2 で処理した象牙質片を静置し、象牙質片の周囲に形成された石灰化物のみを計測対象とした。これは本研究において rhBMP-2 で処理した象牙質片に付着した細胞の反応のみを評価するためである。

rhBMP-2 で処理した象牙質片に付着した歯肉線維芽細胞の石灰化能の評価は、ALP 活性と石灰化物形成量を指標として行った。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ていた。さらに、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ていた。これらの結果は、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ことを示していると考えられる。

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3群とも低下していたが、高濃度のrhBMP-2で象牙質片を処理した群ほど低下は少なく、高い値を維持していた。また、培養10日目の歯肉1, 5, 10群の石灰化物形成量は、歯肉1, 5群では7日目に比較してほとんど増加しなかったが、歯肉10群は増加し、歯根膜群と比較して有意差は認められなかった。これらの結果は、高濃度のrhBMP-2で処理した象牙質片は、低濃度で処理した象牙質片に比較して、歯肉線維芽細胞の石灰化能をより長い期間上昇させていることを示しており、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と考えられる。

BeertsenとVan den Bos³⁸⁾は小腸型ALPによって、象牙質上に石灰化物が形成されることを報告しており、石灰化物は非特異的ALP活性だけではなく、小腸型ALP活性の上昇によっても形成される可能性がある。しかし、本研究においてALP活性の測定に用いた方法は非特異的ALPを対象とするものであること、および石灰化物形成量の変化がALP活性の変化と同様の傾向を示したことから、本研究では歯肉線維芽細胞の非特異的ALP活性が上昇していたと考えられる。

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は、石灰化物をほとんど形成しなかった。この結果から、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く、象牙質片表面に保持されていたと考えられる。しかし、Ihashimotoら³⁹⁾はコラーゲンがrhBMP-2の効果を促進すると報告していることから、本研究において象牙質片表面に露出したコラーゲンがrhBMP-2の作用をさらに増強し、歯肉線維芽細胞の石灰化物形成能が象牙質片の周囲に局限して上昇した可能性も考えられる。

培養3日目の歯肉1, 5, 10群の総蛋白量は、歯肉0群に比較して増加しなかった。この結果から、rhBMP-2で処理した象牙質片が歯肉線維芽細胞の総蛋白量の増加を抑制していると考えられる。Zamanら¹⁸⁾はrhBMP-2によって歯根膜細胞の増殖が抑制されることを報告しており、本研究においても総蛋白量の増加の抑制は、細胞増殖が抑制されたことが最も大きく関与している可能性が高いと考えられる。

本研究において、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

形成能を歯根膜細胞と同程度まで上昇させた。これらの結果は根面をEDTAで脱灰した後、適切な濃度のrhBMP-2を塗布し、歯肉結合組織を付着増殖させることで、歯肉結合組織の細胞によって根面に硬組織を形成する可能性があることを示唆するものである。しかし、歯肉結合組織内には歯肉線維芽細胞以外に多種の細胞が存在し、複雑な細胞間相互作用、細胞-細胞外基質間相互作用が起こると考えられるため、動物実験を行い歯肉結合組織がどのような反応を示すかを今後さらに検討し、また適切なrhBMP-2の濃度を明確にしたいと考えている。

本論文の要旨は、第43回春季日本歯周病学会学術大会(2000年5月14日)において発表した。

文 献

- 1) Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
- 2) Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament, an experimental study in the monkey. *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 257-265, 1982.
- 3) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 290-296, 1982.
- 4) Pontoriero, R., Nyman, S., Lindhe, J., Rosenberg, E. and Sanavi, F. : Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J. Clin. Periodontol.*, 14 : 618-620, 1987.
- 5) 瀬戸田尚志, 高良憲明, 松永 信, 中山清貴, 竹内敏郎, 田方義弘, 樋渡京子, 立石基高, 内田博文, 南 睦美, 上稲葉隆, 竹内 誠, 保坂 均, 末田武, 稲垣幸司, 吉成伸夫, 五十子元, 西山 均, 石川和弘, 中島 徹, 野口俊英, 横田 誠 : EPTFEメンブレンを用いた組織再生誘導法の臨床効果について. *日歯周誌*, 33 : 1032-1039, 1991.
- 6) Proestakis, G., Bratthall, G., Söderholm, G., Kullendorff, B., Gröndahl, K., Rohlin, M. and Attröm, R. : Guided tissue regeneration in the treatment of infrabony defects on maxillary premolars. *J. Clin. Periodontol.*, 19 : 766-773, 1992.
- 7) Weltman, R., Trejo, P.M., Morrison, E. and Caffesse, R. : Assessment of guided tissue regeneration procedures in intrabony defects with bioabsorbable and non-resorbable barriers. *J. periodontol.*, 68 : 582-591, 1997.
- 8) Ratka-Krüger, P., Neukrantz, E. and Raetzke, P. : Guided tissue regeneration procedure with bio-

- resorbable membranes versus conventional flap surgery in the treatment of infrabony periodontal defects. *J. Clin. Periodontol.*, 27 : 120-127, 2000.
- 9) Becker, W., Becker, B.E., Berg, L., Prichard, J., Caffesse, R. and Rosenberg, E. : New attachment after treatment with root isolation procedures : report for treated class III and class II furcations and vertical osseous defects. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 8 : 9-23, 1988.
 - 10) Pontoriero, R., Lindhe, J., Nyman, S., Karring, T., Rosenberg, E. and Sanavi, F. : Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars, a clinical study of degree III involvements. *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 170-174, 1989.
 - 11) Cortellini, P., Pini Prato, G., Baldi, C. and Clauser, C. : Guided tissue regeneration with different materials. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.*, 10 : 137-151, 1990.
 - 12) Kawase, T., Sato, S., Miake, K. and Saito, S. : Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv. Dent. Res.*, 2 : 234-239, 1988.
 - 13) Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R. and Foster, R.A. : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J. Dent. Res.*, 67 : 66-70, 1988.
 - 14) Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R.A. and Somerman, M.J. : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro*. *J. Periodontol.*, 62 : 499-503, 1991.
 - 15) Ogata, Y., Niisato, N., Sakurai, T., Furuyama, S. and Sugiya, H. : Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J. Periodontol.*, 66 : 1025-1031, 1995.
 - 16) Mahmud, M.A.H., Sugaya, T. and Kato, H. : Influence of the nature of dentin surfaces on proliferation and mineralization activity of gingival and periodontal ligament cells. *J. Jpn. Soc. Periodontol.*, 40 : 411-420, 1998.
 - 17) Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Plantén, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 394-401, 1980.
 - 18) Zaman, K.U., Sugaya, T. and Kato, H. : Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J. Periodont. Res.*, 34 : 244-250, 1999.
 - 19) Kobayashi, M., Takiguchi, T., Suzuki, R., Yamaguchi, A., Deguchi, K., Shionome, M., Miyazawa, Y., Nishihara, T., Nagumo, M. and Hasegawa, K. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J. Dent. Res.*, 78 : 1624-1633, 1999.
 - 20) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164 : 321-329, 1946.
 - 21) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Tanaka, H., Omura, S. and Suda, T. : The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172 : 295-299, 1990.
 - 22) Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J. M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T. and Yoshiki, S. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J. Cell Biol.*, 113 : 681-687, 1991.
 - 23) Kawasaki, K., Aihara, M., Honmo, J., Sakurai, S., Fujimaki, Y., Sakamoto, K., Fujimaki, E., Wozney, J.M. and Yamaguchi, A. : Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin. *Bone*, 23 : 223-231, 1998.
 - 24) Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., LaPan, P., Luxenberg, D.P., McQuaid, D., Moutsatsos, I.K., Nove, J. and Wozney, J.M. : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 2220-2224, 1990.
 - 25) Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Ogawa, Y. and Iizuka, T. : 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) Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y. and Kuboki, Y. : Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem.*, 121 : 317-324, 1997.
 - 27) Carnes, D.L., Maeder, C.L. and Graves, D.T. : Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. *J. Periodontol.*, 68 : 701-707, 1997.
 - 28) 松本 徹 : 生体材料の生化学的研究—機械的外力に

- よる細胞応答について一. 神奈川歯学, 22 : 355-366, 1987.
- 29) Yamaguchi, M., Shimizu, N., Shibata, Y. and Abiko, Y. : Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells. J. Dent. Res., 75 : 889-894, 1996.
- 30) Lasho, D.J., O'Leary, T.J. and Kafrawy, A.H. : A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. J. Periodontol., 54 : 210-220, 1983.
- 31) 伊藤 豊, 加藤 熙, 久保木芳徳 : 歯周治療への Bone morphogenetic protein (BMP) の応用に関する研究—リコンビナント BMP 配合コラーゲン膜による骨形成の観察—. 日歯周誌, 36 : 56-66, 1994.
- 32) 高橋大郎, 加藤 熙, 久保木芳徳 : リコンビナント ヒト BMP-2 を応用した歯周組織再生療法に関する研究. 日歯周誌, 39 : 467-481, 1997.
- 33) Wikesjö, U.M.E., Guglielmoni, P., Promsudthi, A., Cho, K.-S., Trombelli, L., Selvig, K.A., Jin, L. and Wozney, J.M. : Periodontal repair in dogs : effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. J. Clin. Periodontol., 26 : 392-400, 1999.
- 34) Zaman, K.U., Sugaya, T., Hongo, O. and Kato, H. : A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution. J. Periodontol., 71 : 1094-1099, 2000.
- 35) Blomlöf, J. and Lindskog, S. : Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. Eur. J. Oral Sci., 103 : 17-24, 1995.
- 36) Blomlöf, J. and Lindskog, S. : Periodontal tissue vitality after different etching modalities. J. Clin. Periodontol., 22 : 464-468, 1995.
- 37) Blomlöf, J., Jansson, L., Blomlöf, L. and Lindskog, S. : Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. J. Clin. Periodontol., 23 : 50-55, 1996.
- 38) Beertsen, W. and Van den Bos, T. : Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin : an *in vitro* study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum. J. Dent. Res., 70 : 176-181, 1991.
- 39) Hashimoto, Y., Shimokobe, H., Mizuno, M. and Kuboki, Y. : Effect of BMP on the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts in a collagen-gel culture. Jpn. J. Oral Biol., 37 : 130-143, 1995.

連絡先 :

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周病学分野
〒060-8586 北海道札幌市北区北13条西7丁目