

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592103

研究課題名（和文） Crude-BMP の覆髄剤適用に関する研究

研究課題名（英文） Study of Crude Bone Morphogenetic Protein (BMP) for use as Pulp-Capping Material

研究代表者

中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40064878

研究成果の概要：ブタ骨から Crude-BMP (PC-BMP) を抽出、精製し、歯髄に対するその効果を検索して、3種類の市販覆髄剤の効果と比較検討した。その結果、PC-BMP は市販覆髄剤に比べて、①十分な異所性骨誘導活性を有していること、および②歯髄細胞の増殖能と石灰化に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。したがって、PC-BMP は歯髄保存療法における新しい生体材料として有用となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 2007 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2008 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 540,000 | 3,240,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科保存治療において、歯髄の保存は大きな目標である。偶発的な露髄症例において施行される直接覆髄法も歯髄保存療法の一つであり、これまで多くの手技、および様々な材料が試されてきた。使用される覆髄剤には、酸化亜鉛ユージノールセメントや水酸化カルシウムなどがあり、以前より多くの研究が行われたきたが、安定した効果が得られる最良の材料は現在も確立されていない。一方、基礎研究では Bone Morphogenetic Protein (BMP) などの生体材料も試験され、注目されている。

(2) ブタ Crude-BMP (PC-BMP) は、マウスの *in vivo* 実験系において、強力な異所性骨誘導が認められている。これまでウシ Crude-BMP およびリコンビナント BMP が、歯髄の石灰化および象牙質再生の可能性に関することは報告されてきたが、PC-BMP に関する報告はされていない。リコンビナント BMP が、単一のタンパクであるのに対して、Crude-BMP は BMP を含む様々なタンパクを含有しており、歯髄の石灰化、象牙質の再生に強力に作用する可能性を有している。しかし、その作用に関しては現在のところ未知数であり、今後、再生歯科医療研究の一つとして意義のあるものと認識している。

2. 研究の目的

ブタ骨から Crude-BMP (PC-BMP) を抽出、精製して、歯髄の石灰化および象牙質の再生に対するその効果を生化学的ならびに組織学的に検索する。さらに市販覆髄剤の効果と比較検討することによって、PC-BMP が歯髄保存療法における新しい生体材料として有用であることを証明する。

3. 研究の方法

(1) PC-BMPの精製

Uristらの方法に準じて、ブタ骨より調製した。ブタ骨を粉砕してクロロホルム・メタノールにて軟組織を除去した。除去した骨片を塩酸で溶解して硬組織を除去した。抽出したタンパクを濃縮・精製し、凍結乾燥させ実験に使用した。

(2) PC-BMPの異所性骨誘導活性試験

PC-BMPをゼラチンカプセルに入れ、そのカプセルを4週齢の雄性ddyマウスの大腿筋膜部に移植した。4週後に移植部を軟X線およびヘマトキシリン-エオジン染色にて観察を行い、異所性骨誘導能を検索した。

(3) ラット歯髄細胞 (RDP細胞) の調製

5週齢の雄性SDラットの下顎切歯から歯髄組織を摘出し、トリプシン-コラゲナーゼ酵素処理により歯髄細胞を分離した。分離した細胞をカルチャーフラスコに移し、10%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含む α -MEMにて、37°C、5% CO₂下で培養した。実験には3継代以内のものをRDP細胞として使用した。

(4) 市販覆髄剤の溶出液の調製

3種類の市販覆髄剤、スーパーボンドクイック (サンメディカル社)、ダイカル (デンツプライ三金社)、ニューアパタイトライナータイプ1 (デンツプライ三金社) を使用した。市販覆髄剤を5×5×5mmの大きさに硬化させ調製した。硬化させたものをエチレンオキサイド滅菌し、その後生理食塩水に浸漬して24時間抽出させた。抽出液を培養液 (継代培養に用いたもの) に加え、その培養液を用いて培養を行い、RDP細胞に対する影響を検索した。

(5) PC-BMP含有培養液の調製

培養液 (継代培養に用いたもの) にPC-BMPを10、100、1000mg/ml (終濃度) となるように加え、調製した。

(6) 細胞増殖能試験

前培養を行った細胞を24ウェルカルチャープレートに播種し、24時間前培養を行った。

24時間後に培養液を抽出液およびPC-BMPを含有したものにそれぞれ交換した。培養後、トリプシン-EDTAにて、RDP細胞を剥離し、トリパンブルーおよび血球計算盤を用いて生細胞数を計数した。生細胞数を比較することにより、PC-BMPおよび市販覆髄剤がRDP細胞の増殖能に及ぼす影響を検索した。

(7) 細胞の形態観察

(6)と同様に培養を24時間、72時間および1週間行った。所定の培養期間が経過した後、PC-BMPおよび覆髄剤がRDP細胞の形態に与える影響を位相差顕微鏡下にて観察した。

(8) アルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性試験

サブコンフルエントまで培養したRDP細胞を24ウェルカルチャープレートに播種し、継代培養で用いた培養液にて24時間前培養を行った。24時間後に培養液を市販覆髄剤抽出液、またはPC-BMPを含有したものにそれぞれ交換した。培養後、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質とする試薬を用いて、RDP細胞のALPase活性を測定した。

(9) 石灰化結節形成能試験

サブコンフルエントまで培養したRDP細胞を12ウェルカルチャープレートに播種し、継代培養で用いた培養液にて24時間前培養を行った。24時間後に培養液を市販覆髄剤の抽出液、またはPC-BMPを含有したものにそれぞれ交換した。3週および5週間培養を行い、アリザリンレッド染色にて石灰化結節形成能を試験する。

(10) RT-PCR法を用いた骨誘導マーカー分子 mRNA発現の検索

サブコンフルエントまで培養したRDP細胞を12ウェルカルチャープレートに播種し、継代培養で用いた培養液にて24時間前培養を行った。24時間後に培養液を市販覆髄剤の抽出液、またはPC-BMPを含有したものにそれぞれ交換した。5週間培養後、通法に従って、RDP細胞のmRNA抽出を行った。その後RT-PCR法により、ALPase、I型コラーゲンおよびオステオカルシンのmRNA発現を検索した。

(7) 新しく市販された歯科用覆髄材料 MTA (Mineral Trioxide Aggregate) の工学的性質の検討

新しく市販された歯科用覆髄材料 MTA (プロルート MTA、デンツプライ三金社) を疑似体液に4週間浸漬した。その後、その表面性状を走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察した。

4. 研究成果

(1) PC-BMP の異所性骨誘導活性について

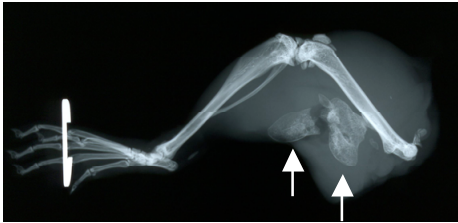


図1 マウスのPC-BMP 移植部の軟エックス線像

軟エックス線所見ではPC-BMP を移植した部位に直径約 5mm の不透過像が認められた(図1、矢印)。

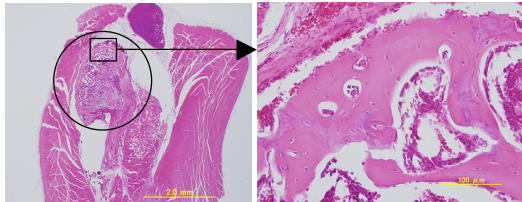


図2 移植部組織のヘマトキシリン-エオジン染色像(左: 20倍、右: 400倍)

また、組織学的所見では新生骨と思われる組織が観察された(図2)。

以上のことから、今回ブタ骨より精製したPC-BMP は十分な異所性骨誘導活性を有していることが示唆された。

(2) PC-BMPおよび市販覆髄剤がRDP細胞の増殖能に及ぼす影響について

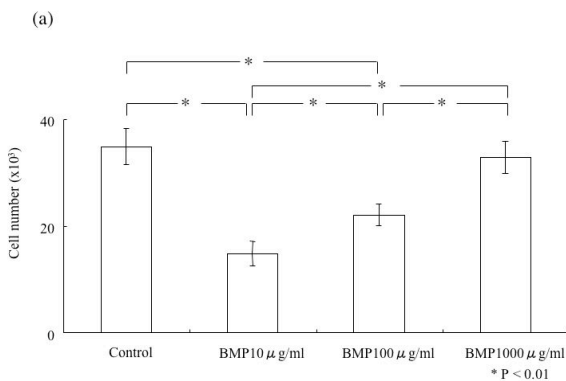


図3 PC-BMPがRDP細胞の増殖能に及ぼす影響

PC-BMPは、10μg/mlおよび100μg/mlの低濃度で、RDP細胞の増殖を有意に抑制した

($p < 0.01$)。また、1000μg/mlの高濃度では、無添加のコントロールと比べて、有意差は認められなかった。

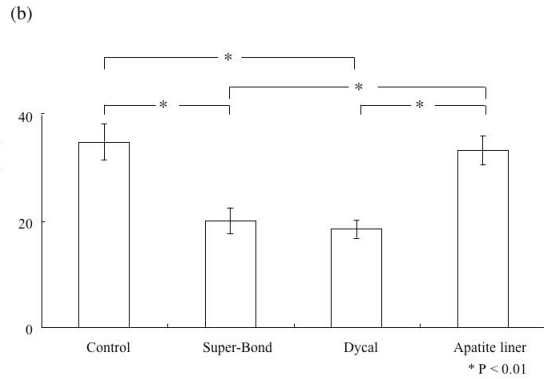


図4 市販覆髄剤がRDP細胞の増殖能に及ぼす影響

一方、3種類の市販直接覆髄剤においては、スーパーボンドクイックおよびダイカルは、RDP細胞の増殖を有意に抑制した($p < 0.01$)。また、ニューアパタイトシーラータイプ1は、無添加のコントロールと比べて、有意差は認められなかった。

(3) PC-BMPおよび市販覆髄剤がRDP細胞の形態に及ぼす影響について

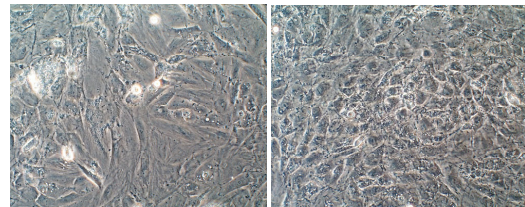


図5 RDP細胞の位相差顕微鏡像(左: PC-BMP100μg/ml、右: コントロール)

PC-BMP添加により、RDP細胞の細胞質の拡大が認められた。その傾向は培養72時間後に顕著に認められた(図5)。一方、3種類の市販直接覆髄剤をそれぞれRDP細胞に作用させた場合、その細胞形態は、無添加のコントロールと比べて、明らかな相違は認められなかった(データ未表示)。

(2)(3)の結果から、PC-BMPは、3種類の市販覆髄剤と比較して、RDP細胞の細胞増殖能ならび細胞形態に対してより大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。

(4) PC-BMPおよび市販覆髄剤がRDP細胞のALPase活性に及ぼす影響について

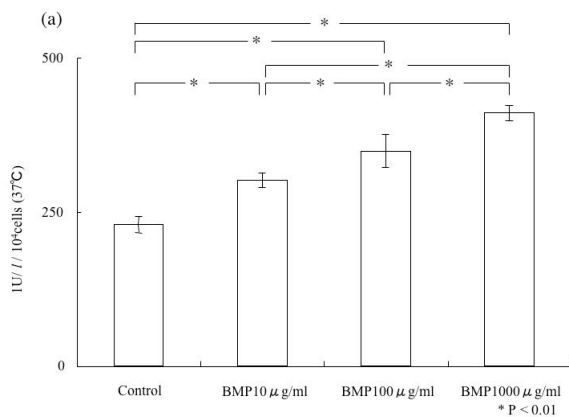


図6 PC-BMPがRDP細胞のALPase活性に及ぼす影響

PC-BMPは、RDP細胞のALPase活性を濃度依存的に促進した(図6)。

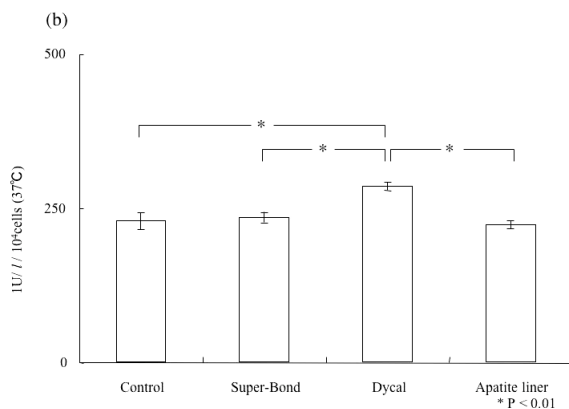


図7 市販覆髄剤がRDP細胞のALPase活性に及ぼす影響

一方、3種の市販覆髄剤では、ダイカルはRDP細胞のALPase活性をわずかに促進したが、スーパーボンドクイックとニューアパタイトライナータイプ1は影響を及ぼさなかった(図7)。

- (5) PC-BMPおよび市販覆髄剤がRDP細胞の石灰化結節形成能に及ぼす影響について

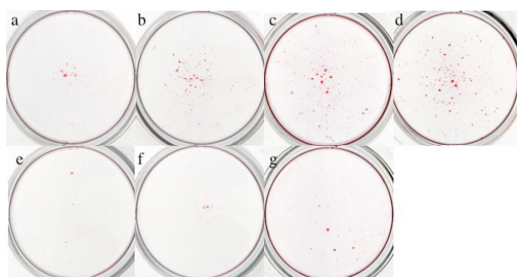


図8 RDP細胞が形成した石灰化結節の位相差顕微鏡観察像(培養3週)

- (a:コントロール, b:PC-BMP10μg/ml, c:PC-BMP100μg/ml, d:PC-BMP1,000μg/ml, e:スーパーボンドクイック, f:ダイカル, g:ニューアパタイトライナータイプ1)

PC-BMPは、培養3週ではRDP細胞の石灰化結節形成を促進したが、5週では逆に抑制した。

一方、3種の市販覆髄剤は、すべてRDP細胞の石灰化結節形成に影響を及ぼさなかった(図8)。

- (6) PC-BMPおよび市販覆髄剤がRDP細胞の骨誘導マーカー分子mRNA発現に及ぼす影響について

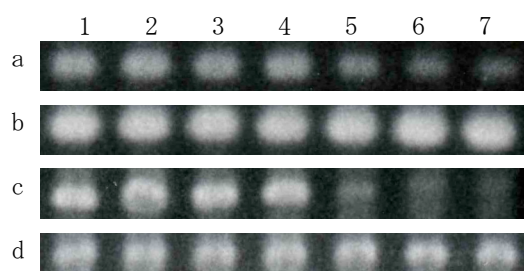


図9 PC-BMPおよび市販覆髄剤によるRDP細胞の骨誘導マーカー分子mRNA発現(RT-PCR法)

- (a:ALPase, b:I型コラーゲン, c:オステオカルシン, d:GAPDH, レーン1:コントロール, 2:スーパーボンドクイック, 3:ダイカル, 4:ニューアパタイトライナータイプ1, 5:PC-BMP10μg/ml, 6:PC-BMP100μg/ml, 7:PC-BMP1,000μg/ml)

PC-BMPは、培養5週でRDP細胞のALPaseとオステオカルシンのmRNA発現がみられたが、I型コラーゲンでは変化はみられなかった。

一方、3種の市販覆髄剤はすべて、RDP細胞の骨誘導マーカー分子mRNA発現に影響を及ぼさなかった(図9)。

- (7) 新しく市販された歯科用覆髄材料MTA(Mineral Trioxide Aggregate)の工学的性質

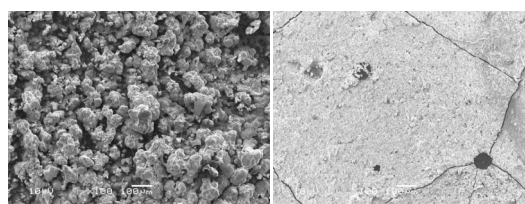


図 10 疑似体液に浸漬した MTA の表面の SEM 観察像

(左：疑似体液 (4 週間浸漬)、右：コントロール (蒸留水))

疑似体液に浸漬した MTA の表面には Ca/P 比が 1.45 の低結晶性カルシウム欠損 B タイプ炭酸含有アパタイトが析出していることが明らかとなった (図 10)。

このアパタイトは骨や歯を構成するアパタイトと類似した組成であり、生体内でデンチンブリッジやセメント質などの硬組織形成に大きく関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Ando K, Nakamura A, Nakata K, Kawai T, Nakamura H: Effects of crude bone morphogenetic protein and pulp-capping materials on rat dental pulp cell proliferation and calcification *in vitro*, Key Engineering Materials, Vols.309-311, 2006, 931-934、査読なし

[学会発表] (計 7 件)

①山本光徳、渡邊泰三、中村文美、鰐部春昌、北村成孝、中田和彦、中村 洋：MTA の基礎的研究、第 21 回日本歯科医学会総会、2008. 11. 15、横浜

② Watanabe T, Yamamoto M, Nakata K, Nakamura A, Wanibe H, Kitamura N, Nakamura H, Tsuruta S, Kawai T, Ban S: Apatite formation on mineral trioxide aggregates in simulated body fluid, 86th IADR, 2008. 7. 2, Toronto

③渡邊泰三、山本光徳、中村文美、鰐部春昌、北村成孝、中田和彦、中村 洋、鶴田昌三、河合達志：疑似体液に浸漬した Mineral Trioxide Aggregates (MTA) の表面析出物の組成分析、第 128 回日本歯科保存学会、2008. 6. 5、新潟

④ Yamamoto M, Watanabe T, Nakamura A, Wanibe H, Kitamura N, Nakata K, Nakamura H: Characterization of apatite formation on mineral trioxide aggregates、第 6 回日韓合同歯内療法学会、2008. 4. 26、光州

⑤ Watanabe T, Yamamoto M, Nakata K, Nakamura A, Wanibe H, Kitamura N, Nakamura H: Analysis of deposits on mineral trioxide aggregates soaked in simulated body fluid、第 6 回日韓合同歯内療法学会、2008. 4. 26、光州

⑥ Watanabe T, Yamamoto M, Nakata K, Nakamura A, Wanibe H, Kitamura N, Nakamura H, Tsuruta S, Kawai T: Deposits on mineral trioxide aggregates soaked in simulated body fluid、第 50 回日本歯科理工学会、国際歯科材料会議、2007. 11. 23、Bangkok

⑦ Nakamura H, Yamamoto M, Watanabe T, Nakamura A, Wanibe H, Nakata K, Tsuruta S, Kawai T: Comparison of physical properties and chemical composition of mineral trioxide aggregate and other pulp-capping agents、第 50 回日本歯科理工学会、国際歯科材料会議、2007. 11. 23、Bangkok

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：40064878

(2) 研究分担者

中田 和彦 (NAKATA KAZUHIKO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：70261013

(3) 連携研究者

なし