

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592219

研究課題名(和文) 再生促進因子を応用した根尖部歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for periapical bone defect using bone regeneration-stimulating factors

研究代表者

阿南 壽 (ANAN HISASHI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80158732

研究成果の概要：

ラット根尖病変モデルを用いて、エナメルマトリックスタンパク(EMD)および生体活性ガラス(BAG)の根尖部歯周組織に及ぼす影響について、免疫組織化学的に解析した。その結果、EMDの応用によりラット根尖病変の治癒は促進され、TGF- β 1を発現した抗炎症性マクロファージの一時的な増加と持続的なBMP-2を発現した修復性マクロファージの増加が、根尖部歯周組織再生のトリガーとなる可能性が推察された。また、BAGは高い骨伝導能を有する優れた生体材料であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：根尖性歯周炎、再生医療、エナメルマトリックスタンパク、生体活性ガラス、マクロファージ、BMP-2

1. 研究開始当初の背景

(1) 日常の臨床において、自家歯移植術や歯根尖切除術の際にEMDを応用するといった試みが報告されており、その有用性が示唆されている(船越栄治他、the Quintessence 24, 2005)。しかしながら、EMDの歯周組織再生に及ぼす科学的なメカニズムについては多くの不明な点が残されている。

(2) 生体活性ガラス(BAG)に関しては、骨補填剤(水沼一昭他、日口腔インプラント誌、1999)や人工歯根のコーティング材(山森徹雄他、補綴誌、1992)としての臨床応用の検討がなされてはいるものの、BAGを骨代用材料としてスペースメーカーの目的で、根尖周囲の骨欠損部に応用し、骨形成への影響を解析した報告は少ない。

2. 研究の目的

- (1) 動物モデルを用いて、エムドゲインゲル (EMD) の破壊された根尖部歯周組織に及ぼす影響について免疫組織化学的に検索する。
- (2) 根尖周囲の骨欠損部のスペースメイキングに生体活性ガラス (BAG) を応用した歯周組織誘導再生療法の有用性について検討する。
- (3) 臨床で用いられている EMD を科学的根拠に基づいて検証することにより、破壊された根尖部歯周組織に対する EMD の治癒のメカニズムに関して、多角的かつ総合的に解析を行う。

3. 研究の方法

実験 I

実験には5週齢のSD系雄性ラット35匹を用いた。下顎第一臼歯の髓腔を電気エンジンにて開拓し、遠心根管のみ#25K型ファイルにて可及的に抜髄、開放することにより根尖病変の成立を計った。その後7日目にラットを2群に分け、一方は対照(0日目)として標本を採取した。また、他方は遠心根管を機械的清掃後、EMDあるいはEMDの溶解液であるプロピレングリコールアルジネート(PGA)を貼葉した。その後、7、14、28日目にそれぞれ標本を採取した。

Periodate-Lysine-Paraformaldehyde 固定液による灌流固定を行った。さらに、浸漬固定を12時間施し、固定完了後、下顎骨を第一臼歯を含む部位で切断した。そして、7.5%Polyvinyl pyrrolidoneを含む10% EDTA液(pH7.3)で4℃にて28~56日間脱灰し、OCT compoundに包埋した。縦断切片(厚さ5μm)作製後、免疫染色を施し組織定量的に解析した。

酵素組織化学染色

破骨細胞系細胞のマーカーとして100mM-L(+)酒石酸耐性酸フォスファターゼ(以下TRAPと略す)染色を行うとともに、骨芽細胞系細胞のマーカーとしてアルカリフォスファターゼ(以下ALPと略す)染色を施した。

免疫組織化学染色

マクロファージ系細胞のマーカーである抗ラットED1抗体(Serotec社製)、抗ラットIL-1β抗体(Endogen社製)、抗RANKL抗体(Santa Cruz社製)、抗TGF-β1抗体(Promega社製)、抗BMP-2抗体(Santa Cruz社製)、抗PCNA抗体(ZYMED社製)、抗ラットDentine Matrix Protein-1(DMP-1)抗体(タカラバイオ社製)を一次抗体として、シンプルステインMAX-PO(MULTI)キット(ニチレイ社製)あるいはSABC-POキット(ニチレイ社製)を用いた免疫染色を施し鏡検した。

組織定量的解析

400倍光学顕微鏡下で7mm四方のグリッド(オリンパス社製・接眼マイクロメーター)を根尖病変内に設置し、グリッド内の各抗体陽性細胞数を計測した。統計分析はone-way ANOVAとPost hoc t検定により行った。

実験 II

ラット上顎第一臼歯近心根の歯根尖切除部にBAGを填入し、その治癒過程を超微構造学的に解析した。

4. 研究成果

実験 I

(1) EMDの効果に関する組織定量的解析

ED1陽性の単核細胞数は両群とも14日目より減少傾向を示し、特にEMD群では有意な減少が認められた(図1)。RANKL発現細胞数は実験期間を通して、両群とも著しく低い値を示した(図2)。IL-1β発現細胞数においては、EMDおよびPGA両群において14日目に有意な減少が認められた。一方、28日目においては、EMD群ではさらなる減少を示したのに対して、PGA群ではEMD群に比較して有意に高い値を示した(図3)。TGF-β1発現細胞数においては、EMD群では早期に著しい増加が認められ、7日目をピークとした増減を示した(図4)。また、BMP-2発現細胞数は、EMD群では早期に著しい増加が認められ、各時期においてPGA群に比較して有意に高い値を示した(図5)。

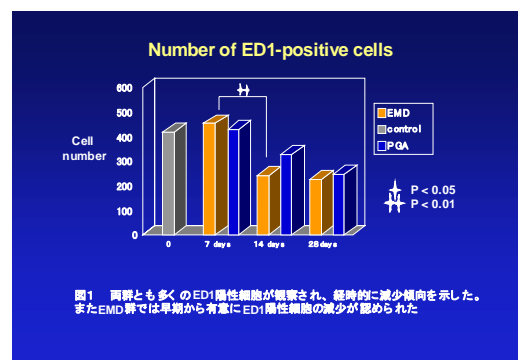


図1 両群とも多くのED1陽性細胞が観察され、経時的に減少傾向を示した。またEMD群では早期から有意にED1陽性細胞の減少が認められた。

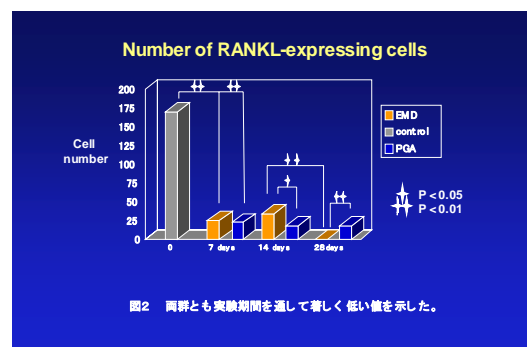
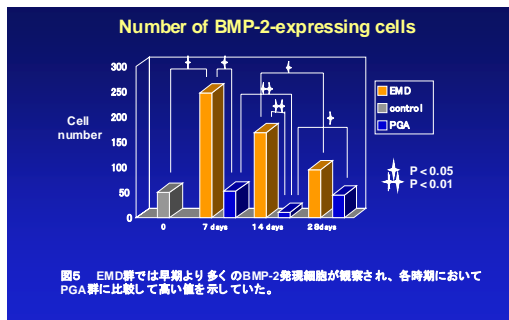
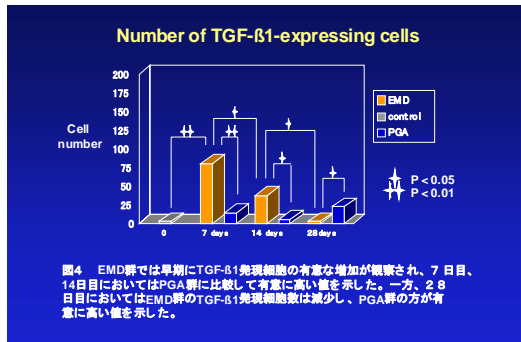
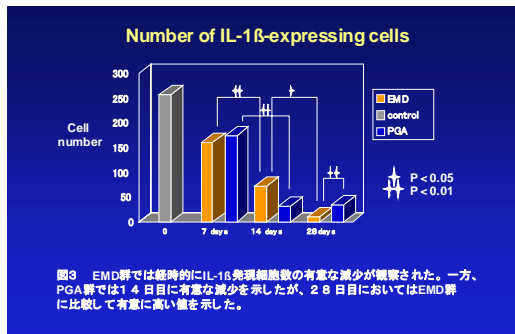


図2 両群とも実験期間を通して著しく低い値を示した。



(2) EMD の効果に関する免疫組織化学的解析

1) 術後 0 日 (抜髄開放後 7 日)

歯髄は壊死しており、拡大した根尖病変内に多数の IL-1β を発現したマクロファージの浸潤像が観察された。また、病巣周囲の骨面では骨芽細胞は減少し、TRAP 陽性を示す胞体の大きな破骨細胞が多く観察された。また、破骨細胞の近傍には、多数の RANKL 発現細胞とともに多くの IL-1β を発現したマクロファージが認められた。

2) EMD 投与群

①術後 7 日

病巣中には 0 日目と同様に、IL-1β を発現した多くのマクロファージの浸潤像が観察された。しかし、骨吸収および骨形成に関与する因子の発現パターンは異なっており、RANKL 発現細胞は著しく減少する一方で、マクロファージおよび骨芽細胞様細胞に BMP-2 および TGF-β1 の発現の増加が認められた。また、骨面では破骨細胞は減少し、代わって多数の ALP 陽性を示す骨芽細胞が層状に配列

し、その周囲には PCNA を発現した骨芽細胞前駆細胞と考えられる細胞が多く観察された。

②術後 14 日

病巣中のマクロファージの浸潤は 7 日目に比較して著しく減少していた。また、IL-1β の発現は著しく減少し、TGF-β1 発現細胞は少数散在性に認められた。一方、病巣全般にわたって多数の PCNA 発現細胞が観察され、BMP-2 を発現したマクロファージが骨面および根尖部近傍に局限して認められた。また、骨面では骨芽細胞が多層に配列するとともに、7 日目と同様に多数の PCNA を発現した骨芽細胞前駆細胞が認められ、消失した骨組織の著しい回復傾向が認められた。さらに、病巣周囲の ALP 活性は上昇し、破壊された根尖孔部に DMP-1 陽性を示すセメント質の添加が観察されるとともに、セメント質より骨面に向けて走行するコラーゲン線維が観察された。

③術後 28 日

病巣は縮小し、マクロファージは根尖孔部近傍に局限して認められたものの、IL-1β および RANKL の発現はほとんど観察されなかった。一方、病巣全般にわたって強い ALP 活性が観察され、根尖直下のセメント質と骨面の距離は著しく狭まり、健常レベルの歯根膜幅への回復傾向が認められた。また、14 日目に比較して病巣中の BMP-2 および PCNA 発現細胞は減少していた。骨面には骨芽細胞が規則的に配列し、セメント質と骨組織を連絡する厚いコラーゲン線維が観察された。

3) PGA 投与群

①術後 7 日

病巣全般にわたって多数の IL-1β を発現したマクロファージの浸潤像が観察された。RANKL 発現細胞は EMD 投与群の 7 日目とほぼ同様に、著明な減少を示した。一方、BMP-2 および TGF-β1 の発現パターンは EMD 投与群とは異なり、陽性細胞は少数散在性に観察された。骨面近傍の PCNA 発現細胞は少数であり、骨面には骨芽細胞が単層に配列していた。

②術後 14 日

根尖周囲に膿瘍が形成され、病巣中には多くのマクロファージの浸潤像が観察された。しかし、EMD 投与群と同様に、IL-1β の発現は著しく減少していた。一方、病巣中に BMP-2 および TGF-β1 発現細胞はほとんど観察されず、骨面近傍に PCNA 発現細胞はほとんど観察されなかった。病巣部の ALP 活性は著しく低下しており、セメント質の添加像や活発な骨組織の形成像は認められなかった。

③術後 28 日

病巣は拡大し、病巣全般にわたってマクロファージが散在性に観察され、14 日目に比較して TGF- β 1 および BMP-2 発現細胞は増加していた。しかし、骨面近傍の ALP 活性は減弱しており、消失した骨量の回復や病巣の縮小は認められなかった。また、根尖周囲はケラチン陽性を示す上皮細胞により被覆されていた。

対照とした EMD の溶解液であるプロピレングリコールアルジネート貼薬群に比較して、炎症反応は早期に消退し骨組織の著明な回復が認められた。さらに、EMD の貼薬後早期に、TGF- β 1 および BMP-2 発現細胞の有意な増加が観察された。その後、TGF- β 1 発現細胞は減少傾向を示す一方、BMP-2 発現細胞の持続的な増加が認められた。

実験 II

BAG の骨伝導能に関して電顕的に解析した結果、BAG 粒子はコラーゲン線維と密に接しており、その周囲には、BAG 粒子が溶解したと考えられる帯状層が観察され、BAG 粒子の境界部にはやや density の高い微細な顆粒状物が多数観察された。



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 4 件)

1. Hisashi ANAN, Hiroshi MATSUURA, Masahiro YONEDA, Shigeki MATSUYA, Toshio IZUMI, Kazuhiko YAMADA, Takao HIROFUJI, Noriyoshi MATSUMOTO, Taro EIDA, Akie FUKUSHIMA, Chieki SHIGEYAMA: Expression of TGF- β 1 during the healing process of rat periapical lesions. J Fukuoka Dent Coll 33, 133-146, 2008. 査読有
2. Hikaru Kaida, Takafumi Hamachi, Hisashi Anan, Katsumasa Maeda: The wound

healing process of injured pulp tissues using Emdogain®gel. J Endod 34, 26-30, 2008. 査読有

3. Naoya Fujishiro, Hisashi Anan, Takafumi Hamachi, Katsumasa Maeda: The role of macrophages in the periodontal regeneration using Emdogain®gel. J Periodont Res 43, 143-155, 2008. 査読有
4. 松家茂樹, 泉 利雄, 阿南 壽: 生体活性ガラスの歯科領域への応用. The Journal of Dental Engineering 167, 31-33, 2008. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 福島晶絵, 泉 利雄, 阿南 壽, Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 新規相互因子の検索, 第34回福岡歯科大学学会総会 平成19年12月9日 福岡県歯科医師会館大ホール.
2. 松本典祥, 泉 利雄, 松浦洋志, 榮田太郎, 片山知子, 福島晶絵, 岸 保光, 白水一崇, 宮地久崇, 佐藤寛子, 阿南 壽, 加齢に伴うラット根尖病変におけるIL-1発現細胞の動態変化, 第34回福岡歯科大学学会総会 平成19年12月9日 福岡県歯科医師会館大ホール.
3. 福島晶絵, 岡部幸司, 松本典祥, 片山知子, 茂山千英子, 泉 利雄, 阿南 壽, ヒト歯根膜細胞における炎症性サイトカインによるSOCSの発現, 第129日本歯科保存学会秋季大会 平成20年11月6-7日 富山国際会議場
4. 吉兼 透, 米田雅裕, 阿南 壽, 山田和彦, 鈴木奈央, 内藤 徹, 岡田一三, 岩元知之, 榊尾陽一, 廣藤卓雄, 第129日本歯科保存学会秋季大会 歯周病原性細菌に対する宿主応答—マウス膿瘍モデルを用いた免疫組織学的検討—, 平成20年11月6-7日 富山国際会議場
5. 松本典祥, 阿南 壽, 泉 利雄, 松浦洋志, 榮田太郎, エムドゲインゲルの根尖部歯周組織創傷治癒に及ぼす効果に関する免疫組織学的解析, 第35回福岡歯科大学学会総会 平成20年12月14日 福岡県歯科医師会館大ホール.

[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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿南 壽 (ANAN HISASHI)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80158732

(2) 研究分担者

泉 利雄 (IZUMI TOSHIO)
福岡歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：40248547
柴田太郎 (EIDA TARO)
福岡歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60425246

(3) 連携研究者

なし