

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592439

研究課題名（和文） 生体活性ガラス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 bioactive glass

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（和文）：

ラット歯髄創面への bFGF の応用により早期に TGF- β 1 および BMP の発現は亢進され、修復象牙質形成の有意な増加が観察された。bFGF 群とビタペックス群間における歯髄創傷治癒過程では、サイトカインおよび増殖因子の発現の時期および程度が異なる可能性が示唆された。また、BAG と bFGF を併用することにより、骨欠損部では活発な新生骨の形成が認められたことより、生体活性ガラス（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推察された。

研究成果の概要（英文）：

Pulpotomy was performed in the mandibular first molars of rats, and then bFGF or Vitapex® (VIT) containing calcium hydroxide were applied to the exposed pulp tissues. In the bFGF-treated rats, cells expressing TGF- β 1 or BMP-2 rapidly increased in number, and newly formed reparative dentin was observed earlier and larger in amount than that seen in the VIT-treated rats. It is suggested that there may be a difference in the time and extent of expression of cytokine and growth factors between bFGF and VIT-treated rats.

Active new bone formation was observed in the bone defect with a combination of bFGF and Bioactive glass (BAG). It is speculated that BAG was a useful biomaterial with high bone conductivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：創傷治癒、再生医療、bFGF、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) basic fibroblast growth factor (bFGF) は、医科領域において難治性潰瘍の治療薬として臨床応用されており、歯科領域でも歯周組

織再生治療薬としての応用が期待されている。しかしながら、bFGF の歯周組織再生メカニズムにはいまだ不明な点が多く残されており、それらの歯髄組織に対する効果につ

いてはまったく明らかになっていない。

(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、bFGFの歯髄創面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ーカーに生体活性ガラス(BAG)とbFGF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. 研究の方法

実験 I

実験には5週齢のSprague-Dawley系雄性ラット45匹を用いた。電気エンジンを用いて、下顎第一臼歯の咬合面より直径1mm・深さ1mmの窩洞を形成し露髄させた。窩洞形成時には、切削熱による歯髄の損傷を避けるため、滅菌生理食塩水による注水を十分に行った。出血は滅菌生理食塩水および滅菌綿球を用いてコントロールした。

露髄面に対して0.1% bFGF(科研製薬社より供与)(bFGF群、15匹、30歯)、対照として水酸化カルシウム製剤であるVIT(ネオ製薬社)(VIT群、15匹、30歯)を貼薬し、ガラスアイオノマーセメント(Fuji IX[®]、GC社)にて仮封した。また、何も貼薬しない場合の治癒過程を調べるためガラスアイオノマーセメントにて仮封のみ行った群を準備した(GIC群、15匹、30歯)。各群とも、術後7、14、28日目に5匹ずつ(10歯)屠殺し標本を採取した。試料作製は、

Periodate-lysine-paraformaldehyde (3% paraformaldehyde, 0.01M NaIO₄ and 0.075M lysine in 0.025M phosphate buffer pH7.3)による灌流固定を行った後、臼歯部を含む位置で下顎骨を切断、同様の固定液にて浸漬固定を12時間施した。固定完了後、7.5% polyvinylpyrrolidoneを含む10% EDTA液(pH7.3)で4℃にて14日間脱灰後、OCT compoundに凍結包埋した。凍結包埋した試料は歯軸に平行に近遠的な平面で連続的に薄切した(厚さ5 μ m)。凍結標本作製後、酵素染色および免疫染色を行い、組織学的・組織定量的に解析した。

酵素組織化学染色

酵素組織化学染色として、骨芽細胞系細胞のmarker enzymeであるALP染色を行った。ALP染色にはnaphthol AS-BI phosphate (Sigma社)を基質とし、Fast Red Violet LB salt (Sigma社)を発色剤として使用した(23)。作製した標本を調整した酵素染色液中に浸漬し、25分間インキュベーター(53℃)中で発色させた。発色終了後水洗を行い、メチルグリーンで対比核染色を施した。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色はlabeled streptavidin biotinylated antibody (LSAB)法により行った。まず作製した標本に0.3%過酸化水素を添加したメタノールを室温で30分間作用させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。PBSでよく洗浄後、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)、T細胞系細胞のマーカーである抗ラットCD5抗体(生化学工業社)、抗ラットIL-1 β 抗体(Endogen社)、抗TGF- β 1抗体(Promega社)、抗BMP-2抗体(Santa Cruz社)、抗BMP-4抗体(Santa Cruz社)および抗ラットDMP-1抗体(タカラバイオ社)を一次抗体とした免疫染色を、ニチレイ社から発売されているヒストファイブ SAB-PO キット(LSAB法キット)を用いて行った。反応終了後PBSにて洗浄し、DAB溶液(ニチレイ社)にて発色反応を行った。発色反応終了後水洗を行い、メチルグリーンで対比核染色を施した。

壊死層の幅と新生修復象牙質の計測

計測用ソフト(Scion Image)を用いて歯髄創傷部における壊死層の幅と新生された修復象牙質の量(面積)の計測を行った。

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0.1% bFGFとBAGを填入し、その治癒過程を組織学的に解析した。

4. 研究成果

実験 I

(1) 組織定量的解析

壊死層の幅：実験期間を通して、VIT群は他

2 群と比較して有意に高い値を示していた (図 1a)。

新生修復象牙質量: 3 群とも経時的に増加傾向を示した。しかし、実験期間を通して、bFGF 群は他 2 群と比較して有意に高い値を示した。また、28 日目において VIT 群は GIC 群と比較して有意に高い値を示していた (図 1b)。

ED1 陽性細胞数: 3 群とも多くの ED1 陽性細胞を認め、経時的に減少傾向を示した。また、3 群間に統計学的に有意な差は認められなかった (図 1c)。

CD5 陽性細胞数: 3 群とも実験期間を通して、CD5 陽性細胞はわずかにしか認められず、統計学的に有意な差を認めなかった (図 1d)。

IL-1 β 発現細胞数: 3 群とも経時的に減少傾向を示した。しかし、7 および 14 日目において bFGF 群は他 2 群と比較して有意に低い値を示した (図 2e)。

TGF- β 1 発現細胞数: bFGF 群では 7 日目、VIT および GIC 群では 14 日目に有意に高い値を示した (図 2f)。

BMP-2 発現細胞数: bFGF 群では 14 日目をピークとする増減を示し、7 および 14 日目において他 2 群と比較して有意に高い値を示した。一方、VIT および GIC 群では経時的に増加傾向を示した (図 2g)。

BMP-4 発現細胞数: BMP-2 とほぼ同様の結果を得た (図 2h)。

PCNA 発現細胞数: 3 群とも経時的に減少傾向を示した。しかし、7 および 14 日目において bFGF 群は他 2 群と比較して有意に高い値を示した (図 2i)。

FGFr 発現細胞数: 3 群とも経時的に減少傾向を示した。しかし、7 および 14 日目において、bFGF 群、VIT 群、GIC 群の順に有意に高い値を示していた。(図 2j)。

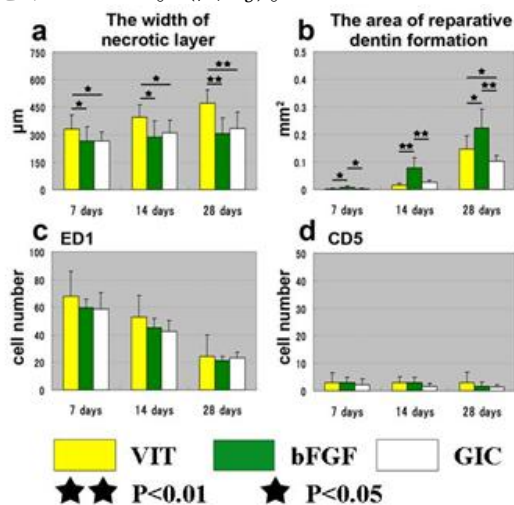


図 1

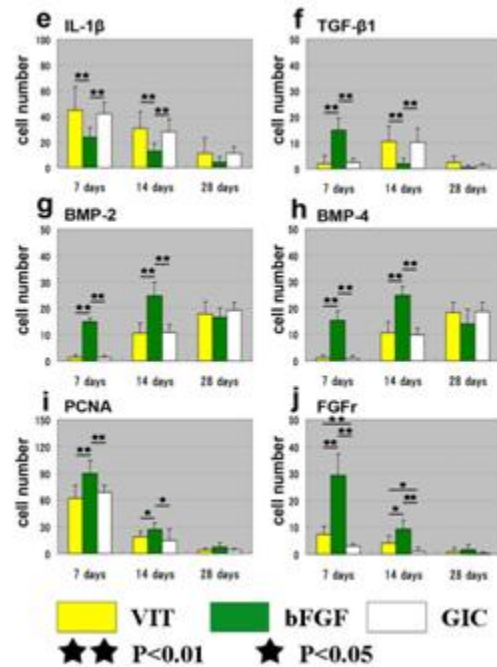


図 2

(2) 組織化学的解析

術後 7 日目

VIT 群: 歯髄全体に強い ALP 活性を認めたが、壊死層の幅が大きく、修復象牙質の形成は認められなかった。壊死層直下には好中球の浸潤層を認めるとともに、胞体の大きいマクロファージおよび IL-1 β 発現細胞が多数観察された。また、IL-1 β 発現細胞の局在・形態などから、その発現にマクロファージが強く関与していると推察された。一方、TGF- β 1、BMP-2 および BMP-4 の発現はほとんど認められなかった。T 細胞は散在性に認められ、健全歯髄における分布と変わりなかった。

壊死層周囲において、様々な形態の細胞に PCNA の発現が多数認められた。また、紡錘形の細胞に FGF α の発現がわずかに観察された。
bFGF 群: 歯髄全体に強い ALP 活性が認められ、根管壁には DMP-1 陽性を示す修復象牙質の添加が観察された。壊死層の幅はせまいが、その直下に IL-1 β もしくは TGF- β 1 を発現した細胞の浸潤が多数認められた。IL-1 β および TGF- β 1 発現細胞の局在・形態などから、それらの発現にマクロファージが強く関与していると推察された。壊死層や新生された修復象牙質の周囲に多くの BMP-2 および BMP-4 の発現が観察され、様々な形態の細胞に PCNA の発現を多数認めた。また、紡錘形の細胞に FGF α の発現が多数観察された。T 細胞は VIT 群と同様に散在性に認められた。T 細胞の所見は実験期間中同様の所見を示したため、以後省略する。

術後 14 日目

VIT群: 歯髄全体に強いALP活性が認められ、根管壁にはDMP-1陽性を示す不規則な修復象牙質の添加が観察された。しかし、壊死層は拡大傾向を示しており、その直下には好中球、胞体の大きいマクロファージおよびIL-1 β 発現細胞がまだまだ多数観察された。一方、壊死層周囲にTGF- β 1の発現が増加していた。IL-1 β およびTGF- β 1発現細胞の局在・形態などから、それらの発現にマクロファージが強く関与していると推察された。また、炎症層近傍の血管周囲や修復象牙質の周囲にBMP-2およびBMP-4の発現が増加していた。

PCNAおよびFGFrの発現は減少していた。
bFGF群: 歯髄全体に強いALP活性が認められ、冠部歯髄中にDMP-1陽性を示す島状の修復象牙質の形成が多量に観察された。壊死層直下から新生された修復象牙質の間に多数のマクロファージの浸潤を認めるものの、IL-1 β の発現は少なく、TGF- β 1の発現はほとんど観察されなかった。壊死層や新生された修復象牙質の周囲にBMP-2およびBMP-4の発現がさらに増加していたが、PCNAおよびFGFrの発現は減少していた。術後28日目

VIT群: 歯髄全体に強いALP活性を認めたが、壊死層の幅が大きく、修復象牙質の形成は認められなかった。壊死層直下には好中球の浸潤層を認めるとともに、胞体の大きいマクロファージおよびIL-1 β 発現細胞が多数観察された。また、IL-1 β 発現細胞の局在・形態などから、その発現にマクロファージが強く関与していると推察された。一方、TGF- β 1、BMP-2およびBMP-4の発現はほとんど認められなかった。T細胞は散在性に認められ、健全歯髄における分布と変わりはない。

PCNAおよびFGFrの発現はほとんど観察されなかった。

bFGF群: 冠部歯髄から根管口部にかけてDMP-1陽性を示す密な修復象牙質が多量に形成されていた。マクロファージの浸潤は減少しており、IL-1 β およびTGF- β 1の発現もほとんど観察されなかった。また、BMP-2およびBMP-4の発現が減少しており、PCNAおよびFGFrの発現はほとんど観察されなかった。

実験II

BAGの骨伝導能に関して電顕的に解析した結果、骨欠損部へのBAGとbFGFとの併用療法の有用性について解析した結果、骨欠損部では活発な新生骨の形成が認められた。歯根尖切除部の創腔内は大部分が骨組織で満たされ、BAG粒子は骨基質中に封入された状態で観察された。骨面には核や胞体の大きな骨芽細胞が密に配列していた(図3)。一方、

BAG粒子の形状、大きさにより新生骨の形成状態およびマクロファージの浸潤程度が異なることが明らかになった。同一材料であっても形状および粒子径の違いによって出現すると考えられる材料効果の差異を明確にし、その要因を今後の臨床応用のために追及する必要性が生じ、さらなる検索が必要と考えられた。

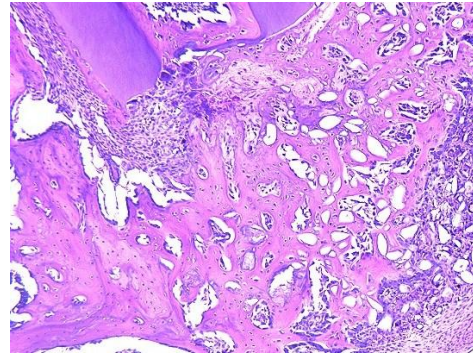


図3 骨創腔はBAGを包含する新生骨組織で満たされていた。

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7件)

① PTHrP induces Notch Signaling in periodontal ligament cells, Nakao A, Kajiya H, Fukushima H, Fukushima A, Anan H (2 others): J Dent Res, 査読有, 2009; 88, 551-556.

② ラット根尖病変創傷治癒に及ぼす Emdogain®gel の効果の解明, 松本典祥, 茂山千英子, 泉利雄, 阿南壽: 日歯保存誌, 査読有, 2009; 52:493-504.

③ Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells, Akie Fukushima, Hiroshi Kajiya, Toshio Izumi, Chieko Shigeyama, Koji Okabe, Hisashi Anan: J Endod, 査読有, 2010; 36: 1004-1008.

④ 歯髄創傷治癒に及ぼすエムドゲイン®ゲルの影響, 阿南壽, 松本典祥, 泉利雄, 松浦洋, 諸富孝彦 他6名: 福岡歯科大学学会雑誌, 査読有, 2010; 36: 119-127.

⑤ Effects of heat stress and starvation on clonal odontoblast-like cells, Takahiko Morotomi, Chiaki Kitamura, Takashi Toyono, Toshinori Okinaga, Ayako Washio, Noriko Saito, Tatsuji Nishihara, Masamichi Terashita, Hisashi Anan: J Endod, 査読有, 2011; 37:

955-961.

⑥ Confusing Endodontic Cases: Case Series Report, Masahiro Yoneda, Nao Suzuki, Sonia M. Macedo, Hisashi Anan, Takao Hirofuji: Smile Dental Journal, 査読有, 2011; 6: 26-31.

⑦ ラット根尖病変に及ぼすオフロキサシン眼軟膏の影響, 阿南 壽, 松本典祥, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦他 6 名: 日本歯内療法学会雑誌, 査読有, 2011; 32: 28-37

〔学会発表〕(計 7 件)

① 諸富孝彦, 鷺尾絢子, 北村知昭, 寺下正道, 阿南壽. 軽度の熱刺激は象牙芽細胞様細胞の熱耐性を向上させる. 132 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2010. 6. 4-5. (熊本市)

② Shigeyama C, Awano S, Akihiro Y, Kakinoki Y, Anan H, Ansai T. Association between salivary cortisol and BMS. 88rdGeneral Session &Exhibition of the IADR, July 14-17, 2010. (Barcelona, Spain)

③ 諸富孝彦, 北村知昭, 西藤法子, 鷺尾絢子, 寺下正道, 阿南壽. 低栄養条件下における熱刺激の象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響. 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2010, 10, 28-29. (岐阜市)

④ 諸富孝彦, 泉利雄, 松浦洋志, 柴田太郎, 茂山千英子, 松本典祥, 國本俊雄, 福田泰子, 西村彰弘, 久原裕子, 阿南壽. 歯髓由来細胞株の熱耐性向上を誘導する機構の解析. 37 回福岡歯科大学学会総会, 2010. 12. 12. (福岡市)

⑤ 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 坂上竜司, 阿南 壽. 軽度の熱刺激は歯髓由来細胞株の致死的な熱刺激への耐性を誘導する. 134 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2011. 6. 9-10. (浦安市)

⑥ 諸富孝彦, 北村知昭, 鷺尾絢子, 寺下正道, 阿南壽. 熱刺激が低栄養条件下で象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響 32. 32 回日本歯内療法学会学術大会, 2011. 7. 30-31. (長崎市)

⑦ 松本典祥, 水上正彦, 泉利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 柴田太郎, 春名千英子, 國本俊雄, 福田泰子, 牛尾悟志, 阿南壽. 破壊された根尖孔でのセメント質形成に及ぼ

す EmdogainRgel の効果の解明. 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2011. 10. 20-21. (大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

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