

原 著

## BMP-2 処理した象牙質表面におけるセメント質様 硬組織形成のビスフォスフォネートによる抑制

本郷 哲也 宮治 裕史 菅谷 勉 川浪 雅光

北海道大学大学院歯学研究科  
口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

(受付日：2006年8月9日 受理日：2006年10月15日)

Suppression of cementum-like tissue formation on BMP-2-applied dentin  
surface by bisphosphonate

Hongo Tetsunari, Hirofumi Miyaji, Tsutomu Sugaya, and Masamitsu Kawanami

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science,  
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

(Received : August 9, 2006 Accepted : October 15, 2006)

**Abstract** : We studied the effects of bisphosphonate administration on cementum-like tissue formation and dentin resorption induced by BMP-2 in rats.

Incadronate (1 $\mu$ g/kg/day) was administered intraperitoneally to rats three times per week, from two weeks before implanting dentin blocks to the end of the observation period. Saline was administered under the same protocol without incadronate to the control group. We prepared 180 dentin blocks from rat teeth roots and treated them with 24%EDTA. Each block had 0,100 or 400 $\mu$ g/ml rhBMP-2 applied. Blocks were then implanted into palatal connective tissue of rats, and specimens were prepared 2, 4, and 8 weeks after implantation for histological and histomorphometric examination.

Results showed that dentin resorption in the control group was significantly greater than that in the experimental group ( $p < 0.01$ ). New cementum-like tissue formed in the experimental group was also significantly less than that in the control group ( $p < 0.01$ ). 80% of new cementum-like tissue were formed on resorption site of dentin and 20% on the nonresorption site. TRAP positive cell numbers did not show any significant difference between groups.

These findings suggested that osteoclast-like cells mediated new cementum-like tissue formation, and dentin resorption was suppressed by bisphosphonate administration and osteoclasts this play an important role in has been new cementum-like tissue formation on dentin surfaces to which BMP-2 applied. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 48 : 285-296, 2006.

**Keywords** : rhBMP-2, dentin resorption, cementum-like tissue, bisphosphonate

**要旨** : 本研究の目的は、ビスフォスフォネートを投与して破骨細胞様細胞の機能を抑制することで BMP-2 処理した象牙質表面における硬組織の形成や象牙質吸収がどのような影響を受けるかを検索することである。

象牙質片を 24% EDTA (pH7.0) に 3 分間浸漬後、0, 100, 400 $\mu$ g/ml のリコンビナントヒト BMP-2 に 10 分間

連絡先：本郷哲也

〒060-8586 北海道札幌市北区北13条西7丁目北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室  
Tetsunari Hongo

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of  
Dental Medicine.

Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

e-mail h.tetsu@den.hokudai.ac.jp

浸漬処理した。ラットを2群に分け実験群はインカドロネートを $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , 3回/週を腹腔より投与し, 観察期間終了まで継続した。対照群は生理食塩水を同様に投与した。各群のラット口蓋結合組織に象牙質片を埋植して, 2, 4, 8週後に組織標本を作製し, 象牙質吸収率と硬組織形成率を計測した。

象牙質吸収率は実験群が対照群に比較して有意に低かった( $p < 0.01$ )。硬組織形成率も同様に実験群が対照群に比較して有意に低かった( $p < 0.01$ )。硬組織形成のうち80%程度が吸収面に形成され, 20%程度が非吸収面に形成されていた。また, TRAP陽性細胞率はBMP-2濃度0, 100,  $400\mu\text{g}/\text{ml}$ の全実験期間で両群間に有意差はなかった。

以上の結果から, ビスフォスフォネートを投与すると, BMP-2処理した象牙質片において, 破骨細胞様細胞の機能を抑制し, 象牙質の吸収が減少するとともに, 硬組織形成も抑制することが明らかになり, BMP-2による象牙質表面への硬組織形成には破骨細胞様細胞が重要な役割を有することが示唆された。

キーワード: rhBMP-2, 象牙質吸収, セメント質様硬組織, ビスフォスフォネート

## 緒言

近年, 様々な成長因子を歯周組織再生療法に応用する研究が行われている。特に Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は骨芽細胞に対する強力な分化誘導作用や骨誘導能を有することが明らかになっており<sup>1-5)</sup>, 歯槽骨の再生への有効性が報告<sup>6-11)</sup>されている。BMP-2を用いた再生療法ではBMP-2を担体も含浸させて生体内に移植するのが一般的である<sup>8-11)</sup>。しかし Zamanら<sup>12)</sup>, 宮治ら<sup>13)</sup>は象牙質をEDTAで脱灰してBMP-2処理することで, 象牙質にBMP-2が保持されることを明らかにした。さらに伊部ら<sup>14)</sup>はビーグル犬に実験的歯周組織欠損を作製し, 露出した歯根象牙質をEDTAで処理してBMP-2を塗布することで, 歯周組織の再生が有意に高められたと報告しており, 象牙質をBMP-2の担体とした新たな歯周組織再生療法に発展する可能性を示している。

一方で, Miyajiら<sup>15,16)</sup>, 天雲ら<sup>17)</sup>はBMP-2で処理した象牙質片をラット結合組織に移植し, 象牙質上にセメント質様硬組織が形成され, この硬組織の形成には象牙質面の吸収を伴わずにセメント質様硬組織が形成される場合と, 象牙質の吸収窩にセメント質様硬組織が形成される場合があることを報告している。

一般に, 生体内で骨組織は破骨細胞と骨芽細胞のカップリング現象によってリモデリングが行われていることが知られている<sup>18,19)</sup>。カップリング因子とその発現制御機構の詳細はまだ不明な点が多いが, 破骨細胞によって骨が吸収すると, 細胞外マトリックスから transforming growth factor- $\beta$  が遊離され骨芽細胞の分化を促進する可能性が報告されている<sup>20)</sup>。また破骨細胞が放出する因子が未分化間葉細胞を骨芽細胞への分化誘導することも報告<sup>21)</sup>されている。

BMP-2は骨芽細胞の分化誘導だけでなく, 破骨細胞の発現を活性化し, 破骨細胞前駆細胞に直接作用し

て破骨細胞の吸収能を活性化させることが報告<sup>22)</sup>されている。また, BMP-2による破骨細胞の発現と吸収能は, 濃度依存的, 経時的に活性化することも報告<sup>23)</sup>されている。したがってBMP-2による硬組織形成は, 骨芽細胞の分化誘導を直接的に引き起こすだけでなく, 破骨細胞と骨芽細胞が関与したカップリングによるリモデリングも重要な因子となっている可能性が考えられ, これを解明することはBMP-2を用いた再生療法を進展させるために重要と考えられる。

ビスフォスフォネートはピロリン酸類似の化合物で, ハイドロキシアパタイトに強い親和性があり, 一般に分化した破骨細胞に取り込まれて不活性化することで破骨細胞の機能を抑制し, 骨吸収抑制作用を発揮することが明らかになっている<sup>24-28)</sup>。したがって, ビスフォスフォネートで破骨細胞を抑制することにより, BMP-2による硬組織形成における破骨細胞の関与を明らかにできると思われる。

本研究の目的は, ラットにビスフォスフォネートを投与して破骨細胞の機能を抑制し, BMP-2処理した象牙質表面におけるセメント質様硬組織形成や象牙質吸収がどのような影響を受けるかを組織学的に評価することである。

## 材料と方法

本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て同ガイドラインに従って行った。

### 1) 試験片の作製

12~14週齢のWistar系雄性ラットより採取した切歯を, ターピンを用いてエナメル質, セメント質を除去し, 歯根中央部付近の象牙質から砥石を用いて $1 \times 1 \times 0.3\text{mm}$ の大きさで180個を作製した。作製した象牙質片は24% EDTA (pH7.0)で3分間脱灰処理した後, phosphate buffered saline (PBS)で数回洗浄して,  $1000\text{U}/\text{ml}$  penicillin,  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin

(GIBCO™, Grand Island, New York U. S. A.) 含有 PBS に 24 時間浸漬した。その後、象牙質片を洗浄し、0, 100 および 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に調製したリコンビナントヒト BMP-2 (アステラス製薬株式会社, 東京) 溶液に 10 分間浸漬処理した。処理後に余剰の BMP-2 溶液はガーゼにて除去した。

### 2) ビスフォスフォネートの調整と投与方法

10 週齢の Wistar 系雄性ラットを実験群 90 匹と対照群 90 匹に分け、実験群には手術 2 週間前よりビスフォスフォネート (インカドロネート, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , アステラス製薬株式会社, 東京) を 1 週間に 3 回の頻度で観察期間終了まで腹腔内投与を継続して行い、対照群は生理食塩水を同様に腹腔内投与した。

### 3) 象牙質片の埋植手術方法

ラットにペントバルビタールナトリウム (ネプタール® injection, 大日本製薬, 大阪) の腹腔内投与 ( $7.0 \times 10^{-4} \text{ml}/\text{g}$ ) による全身麻酔を行った後、口蓋粘膜を部分層弁で剥離し、口蓋部結合組織内に BMP-2 処理した各象牙質片を移植して縫合した。

### 4) 病理組織学的観察と組織学的計測

2, 4, 8 週の観察期間終了後に、移植象牙質片と周辺組織を 1 塊として摘出し、10%ホルマリン溶液 (pH7.4) にて固定、10% EDTA (pH7.0) にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、前頭面断で厚さ 5 $\mu\text{m}$  の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色と酒石酸耐性フォスファターゼ (TRAP) 染色および、オステオカルシン免疫染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。オステオカルシン免疫染色は、ヒストファイン SAB-PO (M) キット (ニチレイ, 東京) を用いて行った。組織切片を脱パラフィン後、0.01mol/l PBS (pH7.4) で洗浄し、3%過酸化水素加メタノールで 15 分間処理後、PBS で洗浄、抗オステオカルシンモノクローナル抗体 (OC4-30, 宝酒造, 大津) を 200 倍希釈して一次抗体とし、4 $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間作用させた。次にビオチン標識 IgG, IgA, IgM からなる二次抗体 (ニチレイ, 東京) を室温で 10 分間作用させ、0.6%過酸化水素加 3, 3'-ジアミノベンチジン 4 塩酸塩トリス塩酸緩衝液で発色させた。

組織学的計測には連続切片中央部の標本とその前後 200 $\mu\text{m}$  離れた標本の 3 枚を選択した。組織画像をパーソナルコンピューターに取り込み Scion Image (Frederick, Maryland, U.S.A.) を用いて以下の項目を計測した。

(1) 象牙質吸収率：象牙質片の表面における吸収面の長さを計測し、象牙質片表面全周の長さに対する百分率で算出した。

- (2) 総硬組織形成率：象牙質片表面上に形成された硬組織の長さを計測し、象牙質片表面全周の長さに対する百分率で算出した。
- (3) 吸収形成率：象牙質片表面が吸収された部位に形成された硬組織の長さを計測し、象牙質片表面全周の長さに対する百分率で算出した。
- (4) 非吸収形成率：象牙質片表面の吸収されていない部位に直接形成された硬組織の長さを計測し、象牙質片表面全周の長さに対する百分率で算出した。
- (5) 吸収面に対する吸収形成率：象牙質片表面が吸収された部位に形成された硬組織の長さを計測し、吸収面の長さに対する百分率で算出した。
- (6) 非吸収面に対する非吸収形成率：象牙質片表面の吸収されていない部位に直接形成された硬組織の長さを計測し、非吸収面の長さに対する百分率で算出した。
- (7) TRAP 陽性細胞数：TRAP 陽性細胞数を計測し、象牙質表面全周の長さで除して算出した。

各測定値の統計学的分析には、SPSS (Chicago, Illinois, U. S. A.) を使用し Kruskal-Wallis 検定と Mann-Whitney の U 検定を用いた。

## 結果

22 匹のラットは術後感染および移植象牙質片の露出がみられたため計測から除外し、実験群：BMP-2 濃度 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  は 26 匹、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  は 25 匹、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$  は 27 匹、対照群：BMP-2 濃度 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  は 24 匹、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  は 29 匹、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$  は 27 匹を計測した。

### 1. 組織学的観察結果

#### 1) BMP-2 濃度 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

両群とも象牙質片は線維性結合組織で被包され、象牙質表面の吸収は実験群ではほとんどみられず、対照群ではごくわずかにみられた (図 1A, B)。

#### 2) BMP-2 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

実験群：2 週では、表在性の象牙質吸収と、セメント質様硬組織形成が認められた。形成されたセメント質様硬組織は、厚みは薄く骨髓腔はみられずセメント細胞様細胞を含む有細胞性であった (図 2A)。4 週および 8 週ではセメント細胞様細胞を含むセメント質様硬組織が象牙質表面の吸収面に 20 $\mu\text{m}$  程の厚みで形成されていた (図 2B, C)。また、8 週ではセメント質様硬

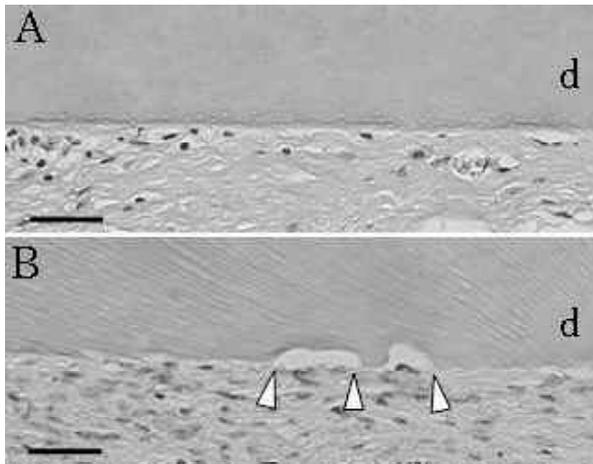


図1 BMP-2 濃度  $0\mu\text{g/ml}$  (8週) : HE 染色。(A) : 実験群。象牙質(d)表面に硬組織形成はみられなかった。(B) : 対照群。実験群と同様に硬組織形成はみられず、一部の象牙質表面に表在性の吸収( $\triangle$ )がみられた。Scale bar :  $50\mu\text{m}$

組織が象牙質表面の非吸収面に直接形成された標本もみられた(図2D)。

対照群 : 2週では、実験群と同様に表在性に象牙質片が吸収され、吸収面の象牙質片表面には骨芽細胞様細胞が観察され、セメント質様硬組織が形成されていた(図3A)。4および8週では、象牙質片は吸収が進行し、吸収面の一部に硬組織が形成されていた(図3B, C)。象牙質の非吸収面に形成されたセメント質様硬組織がみられた(図3D)。また、セメント質様硬組織周囲には多くの骨芽細胞様細胞が観察され、これらはオステオカルシン陽性であった(図3E)。

### 3) BMP-2 濃度 $400\mu\text{g/ml}$

実験群 : 2, 4, 8週的全観察期間において表在性の象牙質吸収が観察され、吸収面の一部を覆うようにセメント質様硬組織形成がみられた。セメント質様硬組織はBMP-2濃度  $100\mu\text{g/ml}$ で見られたものと同様に、有細胞性で象牙質片表面に薄く形成されていた(図4A, B, C)。また、象牙質表面が吸収せず直接セメント質様硬組織が形成されているものもわずかにみられた。

対照群 : 2週では、実験群と同様に表在性の象牙質吸収とセメント質様硬組織形成が観察された(図5A)。4週では穿下性に吸収が進行し、吸収窩にはTRAP陽性で多核の破骨細胞様細胞が観察された(図5B, C)。8週では吸収窩の一部は硬組織で被覆され、硬組織周囲には骨芽細胞様細胞が観察され、これらはオステオカルシン陽性であった(図5D)。また、象牙

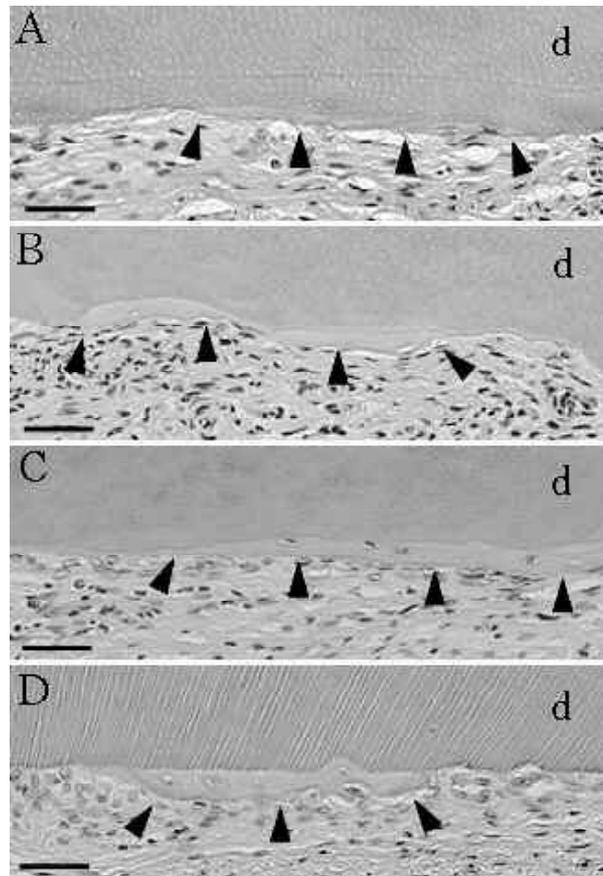


図2 BMP-2 濃度  $100\mu\text{g/ml}$  実験群 : HE 染色。(A) 2週 : 象牙質(d)表面の吸収は表在性で、一部にセメント質様硬組織( $\blacktriangle$ )の形成がみられた。(B) 4週 : 吸収面の一部にセメント質様硬組織( $\blacktriangle$ )が形成されていた。(C) 8週 : 吸収面の多くの部分にセメント質様硬組織( $\blacktriangle$ )が形成されていた。(D) 8週 : 象牙質表面が吸収していない部位に直接セメント質様硬組織( $\blacktriangle$ )が形成されていた。Scale bar :  $50\mu\text{m}$

質の非吸収部にもセメント質様硬組織がわずかに観察された。

## 2. 組織学的計測結果

### 1) 象牙質吸収率

BMP-2濃度  $0\mu\text{g/ml}$ では、2週の実験群が4.2%、対照群が4.4%、4週では4.2%と7.8%、8週では4.5%と7.9%で、4, 8週で実験群が対照群より有意に低かった( $p < 0.01$ )。BMP-2濃度  $100\mu\text{g/ml}$ では、2週の実験群が6.0%、対照群20.1%、4週では9.0%と30.2%、8週では20.0%と38.3%で、全ての観察期間

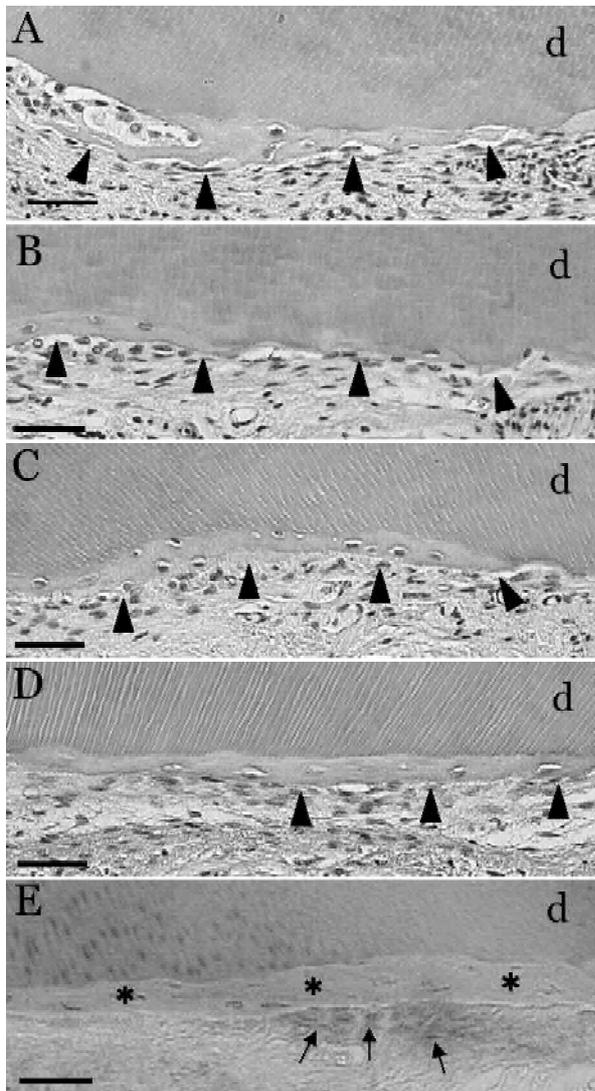


図3 BMP-2 濃度 100 $\mu\text{g/ml}$  対照群 : (A-D) HE 染色。(E) オステオカルシン免疫染色。(A)2 週 : 吸収した象牙質(d)表面には骨芽細胞様細胞が観察され、セメント質様硬組織(▲)が形成され、その周囲には骨芽細胞様細胞が存在した。(B)4 週 : 象牙質片は吸収が進行し、吸収面の一部にセメント質様硬組織(▲)が形成されていた。(C)8 週 : 吸収面の多くにセメント質様硬組織(▲)が形成され、周囲には骨芽細胞様細胞が観察された。(D)8 週 : 象牙質(d)表面の吸収がみられず、直接硬組織が形成されているものも観察された。(E)8 週 : 象牙質(d)表面に形成されたセメント質様硬組織(\*)の周囲にはオステオカルシン陽性細胞(↑)がみられた Scale bar : 50 $\mu\text{m}$

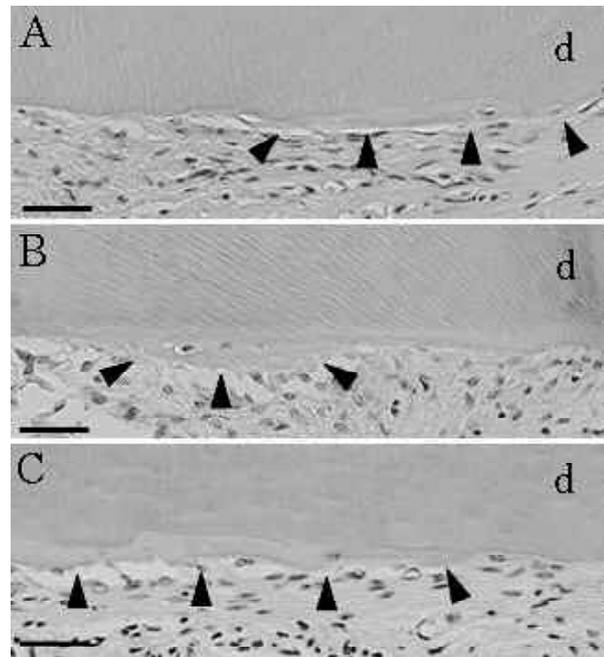


図4 BMP-2 濃度 400 $\mu\text{g/ml}$  実験群 : HE 染色。(A) 2 週 (B) 4 週 (C) 8 週 : 象牙質(d)表面が表在性に浅く吸収し、一部にセメント質様硬組織(▲)が形成されていた。Scale bar : 50 $\mu\text{m}$

において実験群が対照群より有意に低かった ( $p < 0.01$ )。BMP-2 濃度 400 $\mu\text{g/ml}$  では 4 週の実験群が 18.0%で対照群が 31.0%、8 週では実験群が 18.5%で対照群が 45.0%で実験群が有意に低かった ( $p < 0.01$ ) (図6)。

BMP-2 濃度で比較すると、両群の全ての観察期間において、BMP-2 濃度 100 $\mu\text{g/ml}$  と 400 $\mu\text{g/ml}$  の間では有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。また BMP-2 濃度 0 $\mu\text{g/ml}$  と 100 および 400 $\mu\text{g/ml}$  で比較すると、両群の全ての観察期間において BMP-2 濃度 0 $\mu\text{g/ml}$  が有意に低かった ( $p < 0.01$ )。

## 2) 総硬組織形成率

BMP-2 濃度 0 $\mu\text{g/ml}$  では両群とも全実験期間で硬組織は形成されなかった。

BMP-2 濃度 100 $\mu\text{g/ml}$  では、2 週において実験群と対照群の間で有意差は見られなかった ( $p > 0.05$ )。実験群の 4 週が 4.1%、8 週が 17.5%で、対照群の 4 週が 16.2%、8 週が 38.7%であり、4、8 週では実験群は対照群に比べ有意に低かった ( $p < 0.01$ )。BMP-2 濃度 400 $\mu\text{g/ml}$  の 2、4 週では実験群と対照群の間で有意差は見られず ( $p > 0.05$ )、8 週では実験群が 5.0%、対照群が 13.1%で実験群が有意に低かった ( $p < 0.01$ ) (図7)。

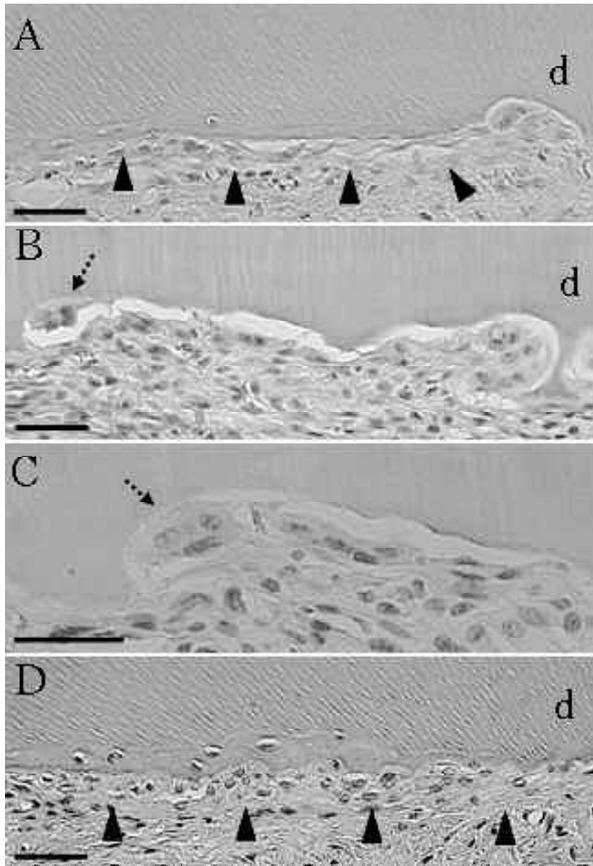


図5 BMP-2 濃度 400 $\mu$ g/ml 対照群 : (A,B, D) HE 染色。(C) TRAP 染色。(A) 2 週 : 表在性に象牙質(d)表面が吸収し、一部にセメント質様硬組織(▲)が形成されていた。(B) 4 週 : 象牙質が穿下性に吸収し、吸収窩には多核巨細胞(↑)がみられた。(C) 4 週 : TRAP 陽性細胞(↑)が象牙質吸収窩にみられた。(D) 8 週 : 吸収窩の多くにセメント質様硬組織(▲)が形成された。Scale bar : 50 $\mu$ m

また、BMP-2 濃度で比較すると、2 週では両群とも BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml と 400 $\mu$ g/ml 間で有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。4 週では対照群の BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml が 400 $\mu$ g/ml に比較して有意に高く ( $p < 0.05$ )、実験群の BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml と 400 $\mu$ g/ml 間では有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。8 週では両群とも BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml が 400 $\mu$ g/ml より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

### 3) 吸収形成率

BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml は、4 週では実験群が 2.8% であるのに比較して対照群が 14.5% で実験群が有意に低く ( $p < 0.01$ )、8 週では実験群 13.8% に対し対

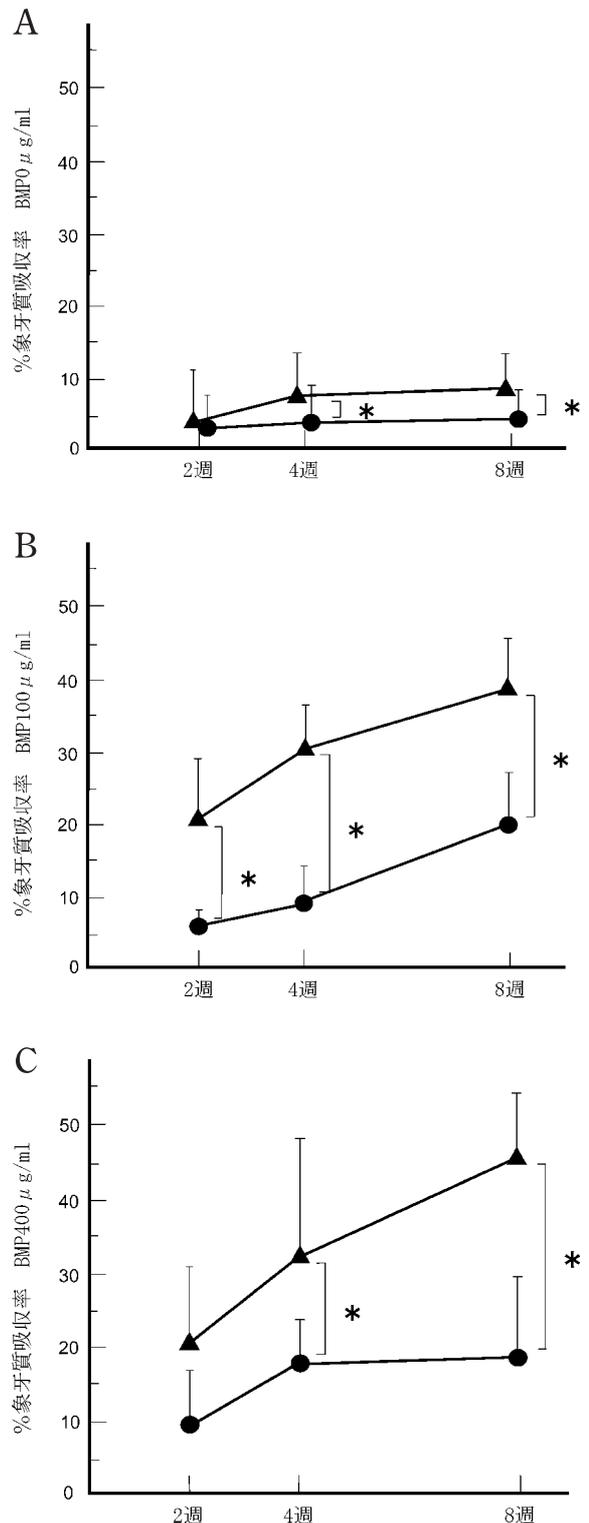


図6 象牙質吸収率 : (A)BMP-2 濃度 0 $\mu$ g/ml (B) BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml (C)BMP-2 濃度 400 $\mu$ g/ml ● : 実験群, ▲ : 対照群。 \* :  $p < 0.01$

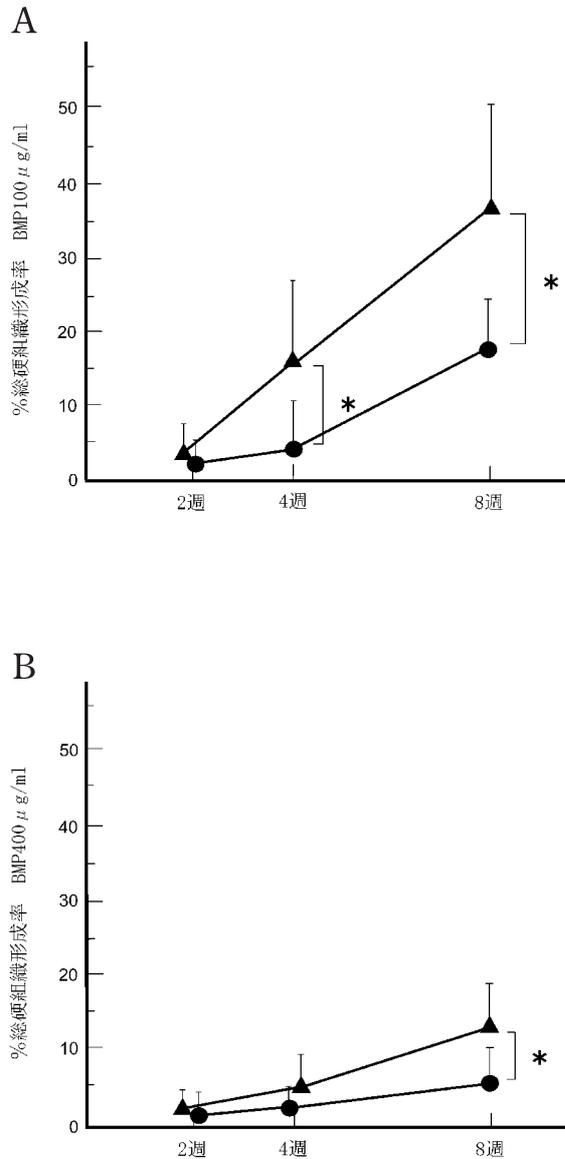


図7 総硬組織形成率：(A)BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml  
(B)BMP-2 濃度 400 $\mu$ g/ml ●：実験群，  
▲：対照群。 \*： $p < 0.01$

照群は 33.4% で実験群が有意に低かった ( $p < 0.01$ )。BMP-2 濃度 400 $\mu$ g/ml は、4 週では実験群が 2.4% に比較して対照群が 5.3% で実験群が有意に低く ( $p < 0.01$ )、8 週では実験群 2.0% に対し対照群は 9.8% で実験群が有意に低かった ( $p < 0.01$ ) (図 8)。

BMP-2 濃度で比較すると、2 週は両群とも BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml と 400 $\mu$ g/ml 間で有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。4 週では実験群の BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml と 400 $\mu$ g/ml 間では有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ ) が、対照群の BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml は

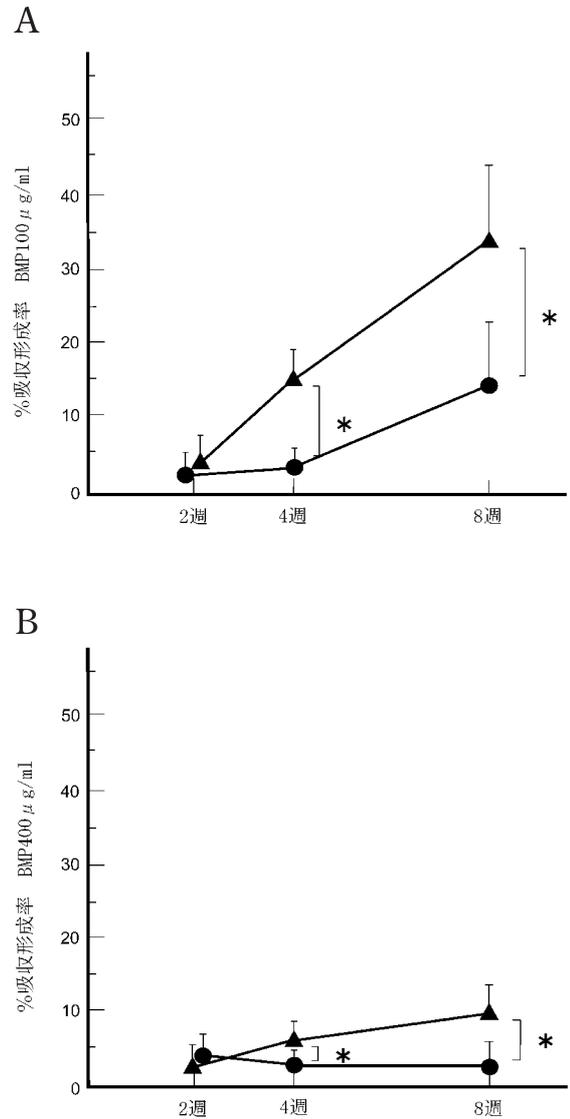


図8 吸収形成率：(A)BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml (B)  
BMP-2 濃度 400 $\mu$ g/ml ●：実験群，▲：  
対照群。 \*： $p < 0.01$

400 $\mu$ g/ml より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。8 週では両群とも BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml が 400 $\mu$ g/ml より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

#### 4) 非吸収形成率

BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml、400 $\mu$ g/ml とともに、すべての実験期間において実験群、対照群の間に有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ ) (図 9)。

BMP-2 濃度での比較では、すべての観察期間で両群ともに有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。

#### 6) 吸収面に対する吸収形成率

BMP-2 濃度 100 $\mu$ g/ml では 4 週で実験群が 32.0%、

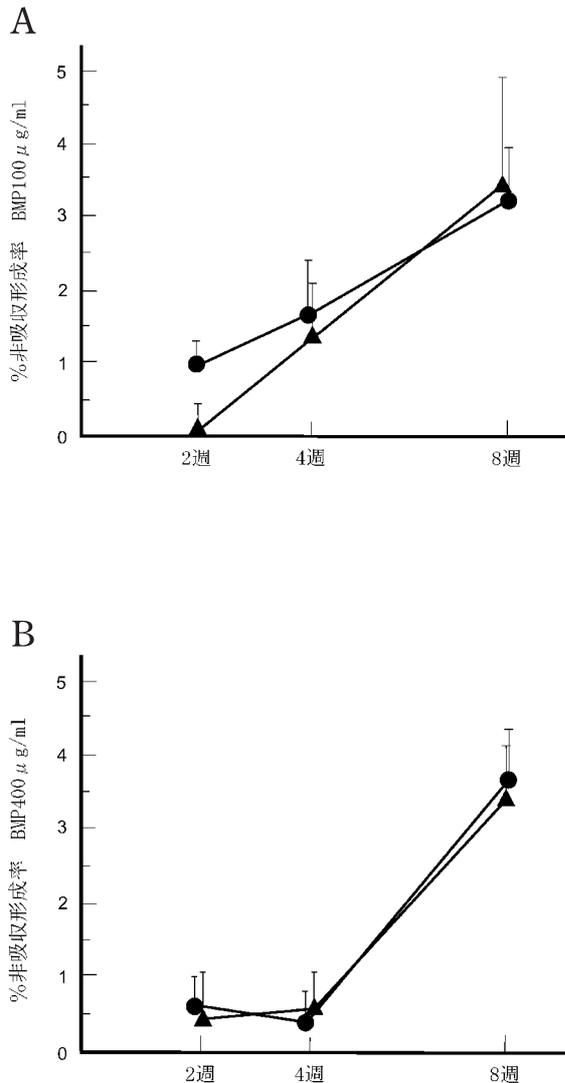


図9 非吸収形成率：(A) BMP-2 濃度 100μg/ml (B) BMP-2 濃度 400μg/ml ●：実験群，▲：対照群。\*： $p < 0.01$

対照群が 50.2%，8 週では実験群が 70.2%，対照群が 89.4% で 4, 8 週とも実験群が対照群より有意に低かった ( $p < 0.05$ )。BMP-2 濃度 400μg/ml では 2, 4 週で両群間に有意差はみられなかったが，8 週では実験群が 9.2%，対照群が 20.8% で実験群が有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (図 10)。

BMP-2 濃度で比較すると，実験群は 2, 4 週で有意差はみられなかったが，8 週では BMP-2 濃度 100μg/ml が 400μg/ml に比べ有意に高かった。同様に対照群の 4, 8 週でも BMP-2 濃度 100μg/ml が有意に高かった。

#### 7) 非吸収面に対する非吸収形成率

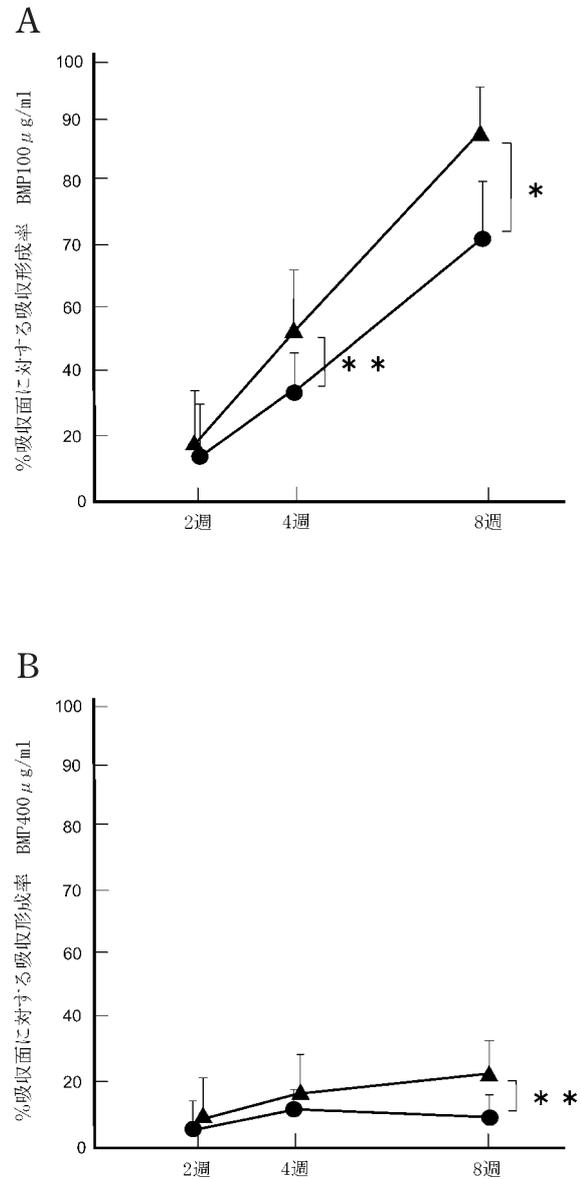


図10 吸収面に対する吸収形成率：(A) BMP-2 濃度 100μg/ml (B) BMP-2 濃度 400μg/ml ●：実験群，▲：対照群。\*： $p < 0.01$  \*\*： $p < 0.05$

BMP-2 濃度 100μg/ml, 400μg/ml ともすべての観察期間において実験群と対照群の間に有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ ) (図 11)。

BMP-2 濃度で比較すると，2 および 8 週で両群とも BMP-2 濃度 100μg/ml, 400μg/ml の間に有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。4 週は実験群では有意差がみられなかったが，対照群では BMP-2 濃度 100μg/ml が 3.3%，400μg/ml が 0.9% で BMP-2 濃度

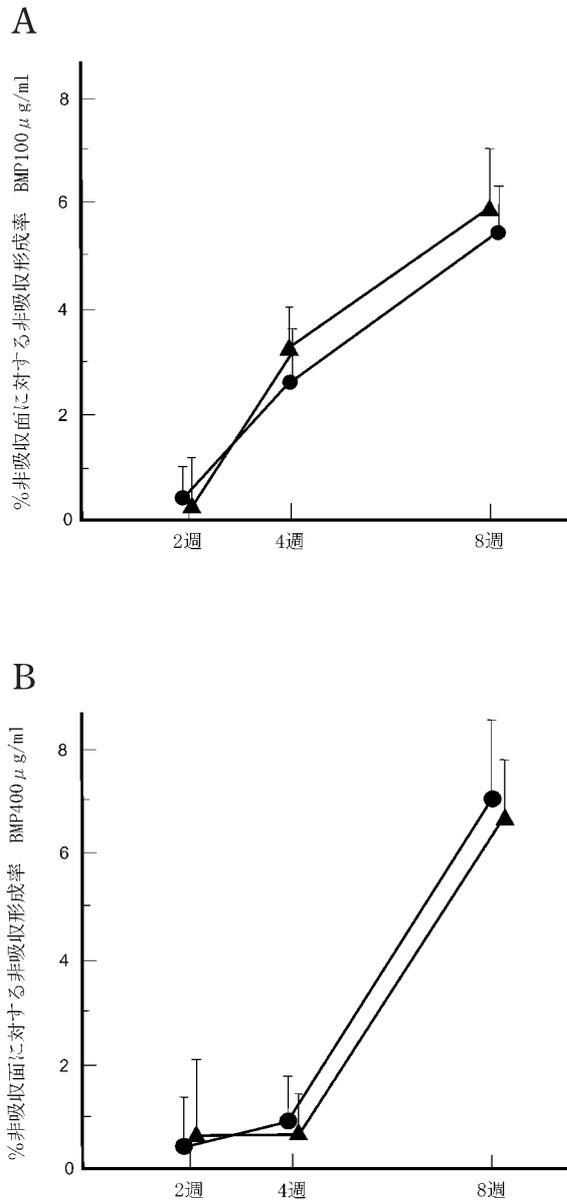


図 11 非吸収面に対する非吸収形成率：(A) BMP-2 濃度 100µg/ml (B) BMP-2 濃度 400µg/ml ●：実験群，▲：対照群。\*： $p < 0.01$

100µg/ml が 400µg/ml より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

#### 8) TRAP 陽性細胞数

BMP-2 濃度 0µg/ml, 100µg/ml, 400µg/ml とともにすべての観察期間において実験群と対照群の間に有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ ) (図 12)。

BMP-2 濃度での比較では、2 および 8 週で両群とも BMP-2 濃度 100µg/ml, 400µg/ml の間で有意差は

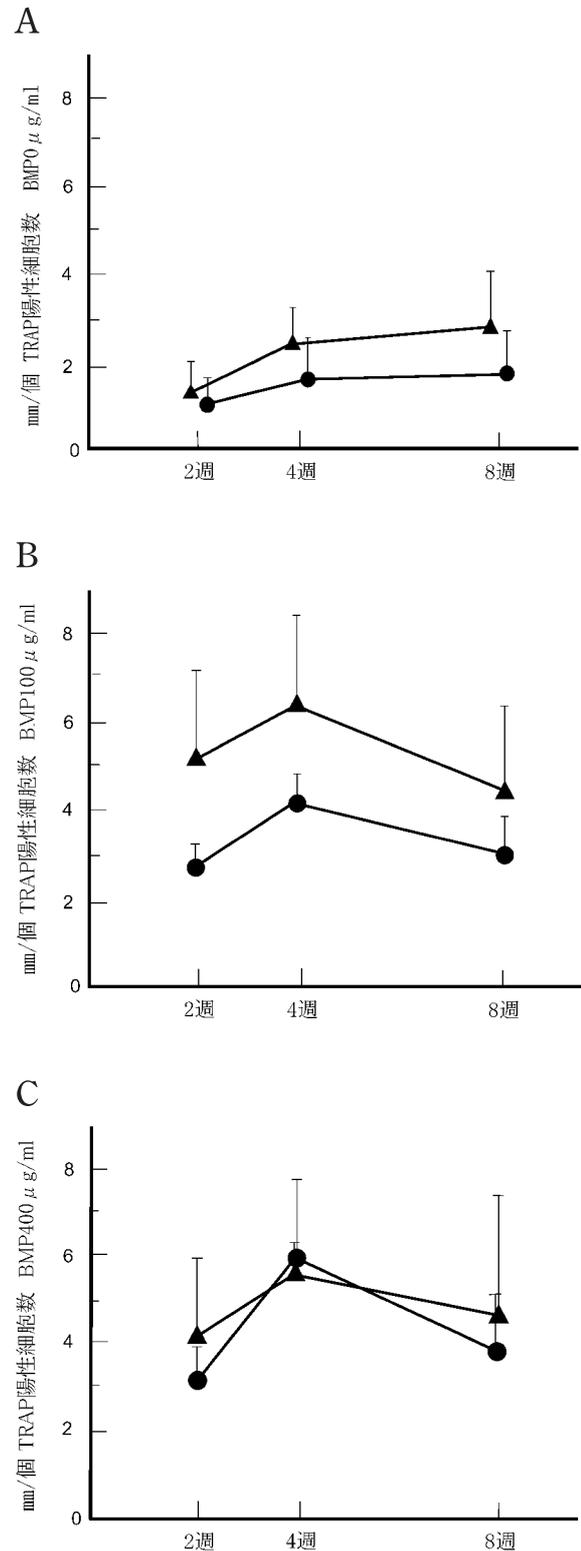


図 12 TRAP 陽性細胞数：(A) BMP-2 濃度 0µg/ml (B) BMP-2 濃度 100µg/ml (C) BMP-2 濃度 400µg/ml ●：実験群，▲：対照群。\*： $p < 0.01$

みられなかった ( $p > 0.05$ )。4 週では実験群が BMP-2 濃度  $100\mu\text{g/ml}$  で 4.0 個/mm,  $400\mu\text{g/ml}$  で 5.7 個/mm であり, BMP-2 濃度  $400\mu\text{g/ml}$  が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。対照群は BMP-2 濃度間で有意差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。また, BMP-2 濃度  $0\mu\text{g/ml}$  と 100 および  $400\mu\text{g/ml}$  で比較すると, 対照群はすべての観察期間で BMP-2 濃度  $0\mu\text{g/ml}$  が 100 および  $400\mu\text{g/ml}$  に比較して有意に低かった ( $p < 0.01$ )。実験群は 2 週では有意差がみられなかったが ( $p > 0.05$ ), 4, 8 週では BMP-2 濃度  $0\mu\text{g/ml}$  が 100 および  $400\mu\text{g/ml}$  に比較して有意に低かった ( $p < 0.01$ )。

## 考 察

Hughes ら<sup>28)</sup>は, マウスの骨髄細胞を活性型ビタミン D 3 存在下で培養した後, ビスフォスフォネートを添加すると, ビスフォスフォネートの濃度依存的に TRAP 陽性細胞のアポトーシスを誘発し, 破骨細胞の機能を抑制することと, マウスにビスフォスフォネートを投与すると骨吸収が抑制され, 破骨細胞がアポトーシスしているのが観察されたと報告している。したがって本研究でも破骨細胞の機能を抑制するための方法としてビスフォスフォネート投与を行った。

Gong ら<sup>29)</sup>はラットを用いた実験においてビスフォスフォネートを  $1\mu\text{g/kg/day}$  濃度の腹腔内投与を行い, 破骨細胞の吸収活性が抑制されたことを報告しており, 本研究においても同様の濃度に設定した。さらにビスフォスフォネートの効果を確実に発揮させるために, 観察期間終了まで投与を継続した。本研究の結果, BMP-2 濃度  $0\mu\text{g/ml}$  でビスフォスフォネートを投与すると, 投与しなかった場合に比較して象牙質吸収は有意に少なかった。したがってビスフォスフォネートは破骨細胞様細胞の機能を十分に抑制していたと考えられた。一方でビスフォスフォネートを投与してもわずかな吸収は認められたので, 完全に破骨細胞様細胞の機能が停止していなかったと考えられた。

ビスフォスフォネートを投与しない対照群で, BMP-2 濃度  $400\mu\text{g/ml}$  が  $100\mu\text{g/ml}$  より穿下性の象牙質吸収が多くみられた。これは高濃度の BMP-2 で象牙質を処理した方が象牙質表面の吸収は穿下性であったとする Miyaji らの報告<sup>16)</sup>と一致していた。また, ビスフォスフォネートを用いた実験群の象牙質吸収率は, BMP-2 濃度が  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $400\mu\text{g/ml}$  いずれの場合でも対照群に比較して有意に少なく 20% 以下まで抑制された。BMP-2 は破骨細胞の発現を活性化し, 破骨細胞前駆細胞に直接作用して破骨細胞の吸収

能を活性化させることが報告<sup>22)</sup>されている。したがってビスフォスフォネートは BMP-2 によって活性化された破骨細胞でも吸収機能を抑制することができ, さらに BMP-2 濃度に影響しないことが明らかになった。一方, TRAP 細胞数は実験群および対照群ともに同等の値であったことから, ビスフォスフォネートは破骨細胞の発現や分化を抑制するのではなく, 吸収機能を抑制したと考えられ, Murakami らの報告<sup>26)</sup>に一致していた。

本研究の結果, BMP-2 を塗布した象牙質表面におけるセメント質様硬組織形成は象牙質が一層吸収された後に硬組織が形成されているものと, 吸収されていない象牙質表面に硬組織が形成されているものが観察され, Miyaji ら<sup>15,16)</sup>天雲ら<sup>17)</sup>の報告に一致していた。総硬組織形成のうち BMP-2 濃度  $100\mu\text{g/ml}$  の対照群では非吸収面の硬組織形成は 20% 程度, 吸収面の硬組織形成は 80% 程度であり, BMP-2 濃度  $400\mu\text{g/ml}$  の対照群では非吸収面の硬組織形成は 30% 程度, 吸収面の硬組織形成は 70% 程度であったことから, BMP-2 処理した象牙質表面の硬組織形成には破骨細胞様細胞による象牙質面の吸収が大きく関与していることが示唆された。

BMP-2 は骨芽細胞を直接誘導することが報告<sup>1-5)</sup>されている。したがって本研究において非吸収面に形成されたセメント質様硬組織は, 破骨細胞様細胞の関与はなく, 象牙質に保持された BMP-2 が硬組織を直接誘導していると考えられた。また, 非吸収面に対する非吸収形成率はすべての観察期間で両群ともに同程度であったことから, ビスフォスフォネートは BMP-2 によるセメント質様硬組織の直接的な誘導には影響を及ぼさないことが明らかになった。しかし Suzuki ら<sup>30)</sup>は *in vitro* において, ビスフォスフォネートが骨芽細胞にも作用してアルカリフォスファターゼやチロシンフォスファターゼの活性に影響し, ビスフォスフォネートによる骨量減少抑制作用は骨芽細胞の活性化によるものもあることを示唆している。したがって *in vivo* におけるビスフォスフォネートの局所濃度などによっては, 骨芽細胞や硬組織形成に影響を及ぼす可能性も考えられる。

実験群 8 週の吸収面に対する吸収形成率は, 対照群より有意に少ない値だった。したがってビスフォスフォネート投与による破骨細胞様細胞の機能抑制によって, 硬組織形成が抑制されたと考えられた。破骨細胞様細胞によって象牙質吸収を受けた部位に硬組織が形成される機序として次の 2 つが考えられる。第一に, 骨のリモデリングと同様に破骨細胞が放出する因子が骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞への分化を促進した

と考えられる。第二に、象牙質基質には BMP などの成長因子が微量に含まれることが報告<sup>31,32)</sup>されており、Dallas ら<sup>20)</sup>は、破骨細胞による骨吸収によって骨基質中に埋め込まれた成長因子が放出され、これにより骨芽細胞が活性化されると報告していることから、象牙質基質が吸収された場合も同様に成長因子が放出されることで骨芽細胞が活性化して、硬組織が形成された可能性が考えられる。しかし BMP-2 濃度 0 $\mu$ g/ml では吸収面に硬組織の形成はみられなかったため、象牙質基質内の成長因子はこの実験系では硬組織形成に関与せず、象牙質表面に塗布した BMP-2 がコラーゲンやアパタイトに保持され、これが破骨細胞様細胞による吸収によって放出された結果、硬組織が形成されたと考えられる。

本研究の結果、BMP-2 による象牙質表面のセメント質様硬組織形成は、吸収面に形成される硬組織が大部分を占めていることが明らかになり、さらにビスフォスフォネート投与によって破骨細胞様細胞の機能を抑制することで象牙質吸収面の硬組織形成が抑制されたことから、BMP-2 によるセメント質様硬組織形成は破骨細胞様細胞が重要な役割を有することが示唆された。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行にご協力いただきました川村直人博士、天雲太一博士、大谷香織女史、得永佳介氏ならびに教室員各位に心より御礼申し上げます。

本論文の要旨は第 49 回秋季日本歯周病学会学術大会(2006 年 10 月 21 日)において発表した。なお、本論文は北海道大学審査学位論文である。

#### 文 献

- 1) Urist MR, Strate BS : Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, 50 : 1392-1406, 1971.
- 2) Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 2220-2224, 1990.
- 3) Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y : Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem*, 121 : 317-324, 1997.
- 4) Isobe M, Yamazaki Y, Mori M, Ishikawa K, Nakabayashi N, Amagasa T : The role of human bone morphogenetic protein-2 in PLGA capsules at an extraskeletal site of the rat. *J Biomed Mater Res*, 45 : 36-41, 1999.
- 5) Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusakoto K, Ogawa Y, Iizuka T : Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 29 : 62-66, 2000.
- 6) King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defect. *J Dent Res*, 76 : 1460-1470, 1997.
- 7) Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S, Ishikawa I : Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol*, 68 : 103-109, 1997.
- 8) Saito E, Saito A, Kawanami M : Favorable healing following space creation in rhBMP-2-induced periodontal regeneration of horizontal circumferential defects in dogs with experimental periodontitis. *J Periodontol*, 74 : 1808-1815, 2003.
- 9) 西村浩司, 小田島朝臣, 川浪雅光 : rhBMP-2 による歯周組織再生と骨性癒着抑制法の長期的観察. *日歯周誌*, 44 : 376-386, 2002.
- 10) 中根恒治, 松本敦至, 川浪雅光 : 中年齢ビーグル犬に rhBMP-2 を応用した場合の歯周組織再生. *日歯周誌*, 45 : 33-42, 2003.
- 11) 小田島朝臣, 本郷興人, 加藤 熙 : ポリ乳酸共重合体 / ゼラチンスポンジ複合体を担体として用いた場合の rhBMP-2 によるセメント質と歯根膜および歯槽骨の誘導再生に関する研究. *日歯周誌*, 41 : 392-408, 1999.
- 12) Zaman K, Sugaya T, 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.
- 13) 宮治裕史, 菅谷勉, 加藤 熙 : 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. *日歯周誌*, 42 : 247-254, 2000.
- 14) 伊部敬介, 宮治裕史, 菅谷勉, 川浪雅光 : BMP-2 の歯根象牙質表面への塗布による歯周組織再生. *日歯周誌*, 46 : 278-287, 2004.
- 15) Miyaji H, Sugaya T, Miyamoto T, Kato K, Kato H : Hard tissue formation on dentin surfaces applied with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the connective tissue of the palate. *J Periodont Res*, 37 : 204-209, 2002.
- 16) Miyaji H, Sugaya T, Kato K, Kawamura N, Tsuji H, Kawanami M : Dentin resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. *J Periodont Res*, 41 : 311-315, 2006.

- 17) 天雲太一, 宮治裕史, 菅谷勉, 川浪雅光 : 象牙質表面処理剤の違いが BMP-2 による硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響. 日歯周誌, 47 : 269-279, 2005.
- 18) Parfitt A.M : The mechanism of coupling: A role for the vasculature. *Bone*, 26 : 319-323, 2000.
- 19) Lener U.H : Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, 85 : 584-595, 2006.
- 20) Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF : Proteolysis of latent transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-binding protein-1 by osteoclasts. *J Biol Chem*, 277 : 21352-21360, 2002.
- 21) Udagawa N, Itoh K, Li XT, Ozawa H, Takahashi N : Expression of osteoblast differentiation factor in mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 17 : S344, 2002.
- 22) Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, Kumegawa M, Chihara K : Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res*, 10 : 1681-1690, 1995.
- 23) Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nagasawa M, Toyama Y, Yabe Y, Kumegawa M, Hakeda Y : Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP-2) and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone*, 27 : 479-486, 2000.
- 24) Fleisch H, Russel R G G, Fransis M D : Bisphosphonate inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science*, 165 : 1262-1264, 1969.
- 25) Coxon P F, Helfrich H M, Robert V N, Said S, Ralston H S, Hamilton A, Rogers J M : Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonate and GGTI-298. *J Bone Miner Res*, 15 : 1467-1476, 2000.
- 26) Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T : A possible mechanism of the specific action of bisphosphonate on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone*, 17 : 137-144, 1995.
- 27) Flanagan M A, Chambers J T : Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonate, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int*, 49 : 407-415, 1991.
- 28) Hughes D, Wright K, Harry L UY, Sasaki A, Yoneda T, Roodman G, Mundy G, Boyce B : Bisphosphonate promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*, 10 : 1478-1487, 1995.
- 29) Gong L, Hoshi K, Ejiri S, Nakajima T, Shingaki S, Ozawa H : Bisphosphonate incadronate inhibits maturation of eptopic bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Bone Miner Metab*, 21 : 5-11, 2003.
- 30) Suzuki K, Deyama Y, Nishikata M, Matsumoto A : The effects of bisphosphonates on tyrosine phosphatase activity of osteoblastic MC3T3-E1 cell. *Dentistry in Japan*, 37 : 35-38, 2001.
- 31) Bessho K, Tagawa T, Murata M : Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg*, 48 : 162-169, 1990.
- 32) Finkelman R, Morhan S, Jennings J, Taylor A, Jepsen S, Baylink J : Quantitation of growth factors IGF- I , SGF/IGF- II , and TGF- $\beta$  in human dentin. *J Bone Miner Res*, 5 : 717-723, 1990.