

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 5月 18日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791931

研究課題名（和文）：細胞成長因子とTCP基材の積層応用によるバイオミメティック歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）：The development of biomimetic periodontal regenerative therapy by layered application of various growth factors and TCP-based materials

研究代表者：白方 良典 (Shirakata Yoshinori)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60359982

研究成果の概要（和文）：

イヌ骨内欠損においてエナメルマトリックス蛋白（EMD）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）とβ三リン酸カルシウム（TCP）の歯周組織再生に及ぼす影響について比較検討を行った。外科的に作製したイヌ1壁性骨内欠損に対し、無作為にTCP単独、EMDとTCP併用（EMD/TCP）、bFGFとTCP併用（bFGF/TCP）および全て併用（EMD/bFGF/TCP）処置を行った。新生骨形成量は全群で有意差は認められなかった。EMD/bFGF/TCP群はTCP群やbFGF/TCP群より有意にセメント質形成量が多く、有意差は認めないもののEMD/TCP群より多かった。これらのことはEMD/bFGF/TCPの積層応用はセメント質再生に有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study evaluated the effects of enamel matrix derivative (EMD) and/or basic fibroblast growth factor (bFGF) with β-tricalcium phosphate (β-TCP) on periodontal healing in intrabony defects in dogs. One-wall intrabony defects created in dogs were treated with β-TCP alone (TCP), EMD with β-TCP (EMD/TCP), bFGF with β-TCP (bFGF/TCP), and their combination (EMD/bFGF/TCP). The amount of new bone formation was not significant for any group. EMD/bFGF/TCP group induced significantly greater new cementum formation than TCP and bFGF/TCP groups, and formed, although not significantly, more new cementum than EMD/TCP group. These findings indicate that EMD/bFGF/TCP treatment is effective for cementum regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：【医歯薬学】

科研費の分科・細目：【歯学・歯科医用工学・再生歯学】

キーワード：歯周組織再生療法、細胞成長因子、EMD、bFGF、リン酸三カルシウム、CMキチン、1壁性骨欠損

1. 研究開始当初の背景

リン酸三カルシウム（TCP）は高い生体親

和性、骨伝導能を有する人工骨補填材として知られている。これまでの研究で歯周組織再生を目的とした骨移植術においてTCPを用いた場合、吸収速度が遅く狭小な欠損ではむしろ残留TCPが組織再生を遅延させる可能性が示唆された。

さらに治癒スピード、質の向上を目指し適切な成長因子の選択・併用が重要である。国内では成長因子として塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を用いた *in vitro, in vivo* の基礎研究により骨芽細胞の増殖、血管新生、細胞外基質形成促進に基づく歯周組織再生の可能性が報告されている。その安全性と効果についても bFGF/HPC(ヒドロキシプロピルセルロース) 製剤として多施設臨床治験が第Ⅲ相まで進行しており近い将来、日本発のサイトカイン療法として大いに期待されている。一方、同様のゲル製剤として既に広く使用されているエナメルマトリックス蛋白 (EMD) との適応、および効果の違いについては明らかではない。そこで我々は bFGF と EMD の応用が歯周組織に与える影響についてイヌ 2 壁性欠損を用いて比較検討を行った。8 週後、EMD 群ではこれまでの報告同様、上皮の深部増殖が抑制され、さらに欠損底部より機能的配列を有する緻密な歯根膜線維と共に薄い無細胞性セメント質が歯冠側まで認められた (図 1)。

新生骨形成量については bFGF 群が EMD 群より統計学的に有意に多かった。しかしながら新生セメント質については厚い有細胞性セメント質が優位で歯根膜線維の走行は一部で不規則で歯根面から剥離しており、急速で著明な新生骨形成に対し機能的配列を有する歯根膜およびセメント質形成が十分でない可能性が示唆された (図 2)。以上の結果より、EMD、bFGF、TCP 基材各々の歯周組織に対する異なる反応性・利点を活かし、根面側に EMD 塗布、欠損内の根面側では TCP/CMキチン複合体スポンジ、残存骨側では bFGF/TCP 顆粒を積層応用し機能的歯周組織再生を獲得する新規バイオメティック (生体模倣的) 歯周組織再生療法の着想を得た。

図 1 EMD 群 (2 壁性骨欠損 8 週)

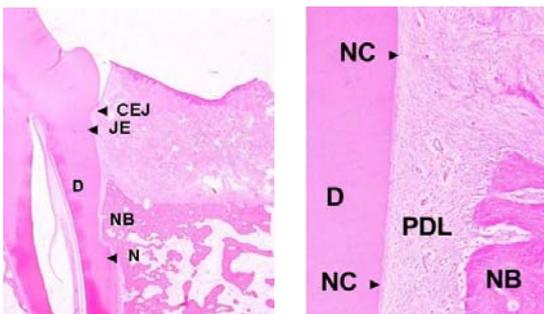
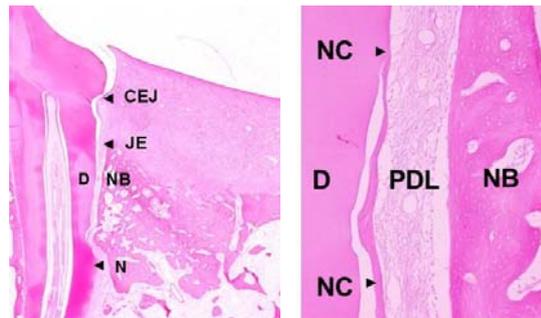


図 2 bFGF 群 (2 壁性骨欠損 8 週)



CEJ:セメントエナメル境、JE:上皮、D:象牙質、NB:新生骨、NC:新生セメント質、PDL:歯根膜、N:根尖部ノッチ

2. 研究の目的

近年、重度慢性歯周炎により失われた歯周組織を再生するべく細胞・細胞成長因子・足場材料の各々を組み合わせ歯周組織欠損に応用する組織再生工学的アプローチが国内外で盛んに試みられている。しかしながらこれらの適応には限界があるうえ、真の歯周組織再生を達成する手法はいまだ確立されていない。そこで本研究では、イヌ 1 壁性骨欠損内で生理活性作用の異なる 2 種の成長因子と、TCP 基材を積層に空間配置したうえで応用し、これらの特性を最大限に利用する新規のバイオメティック歯周組織再生療法により解剖学的かつ機能的に真の歯周組織再生を早期に達成することを目的とする。

3. 研究の方法

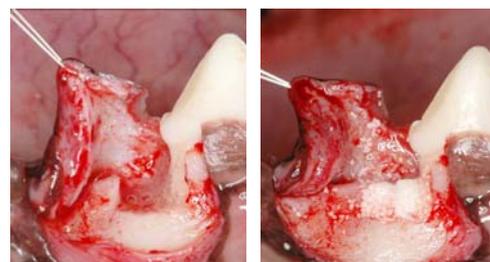
実験動物を用い EMD、bFGF、TCP 基材 (顆粒・スポンジ) を併用したアプローチの可能性について、およびその歯周組織再生効果について組織学的に評価・検討することである。

4. 研究成果

リン酸三カルシウム (TCP: TCP 顆粒) を基材として EMD と bFGF 各々、およびこれらを併用 (EMD 根面塗布後 図 3a)、bFGF 含浸 TCP 充填 図 3b) : してイヌ 1 壁性骨欠損に局所応用した

図 3 イヌ 1 壁性骨欠損

TCP+EMD+bFGF 群



a) EMD 根面塗布 b) bFGF/TCP 充填

8 週後の新生骨形成量については TCP 群 (図 4)、TCP+EMD 群 (図 5)、TCP+bFGF 群 (図 6) および TCP+EMD+bFGF 群 (図 7) の全群で有意差は認められなかった。TCP+EMD+bFGF 群では新生セメント質形成量が TCP 群および TCP+bFGF 群より有意に多く、また有意差は認められなかったが TCP+EMD 群と比較しても多かった。これらのことから TCP を基材とした EMD および bFGF の併用療法はセメント質形成に有効であることが示唆された。

図 4 TCP 群 (1 壁性骨欠損 8 週)

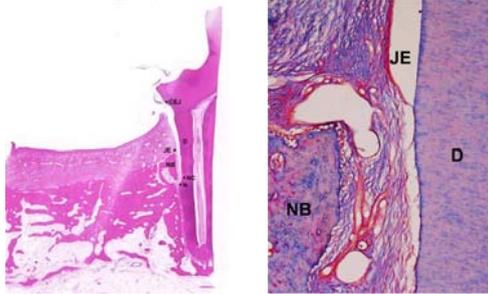


図 5 TCP+EMD 群 (1 壁性骨欠損 8 週)

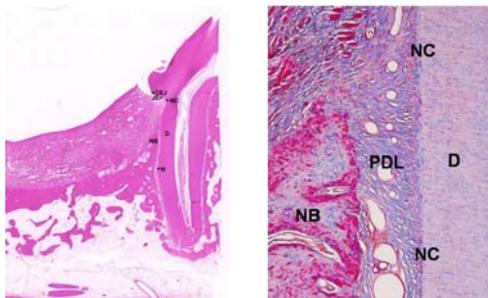


図 6 TCP+bFGF 群 (1 壁性骨欠損 8 週)

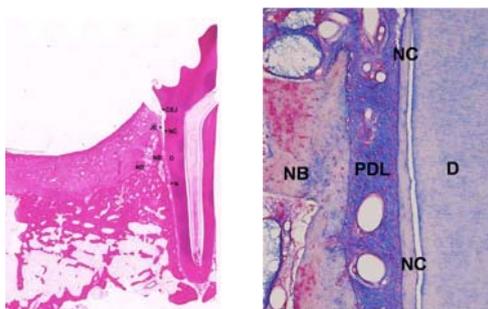
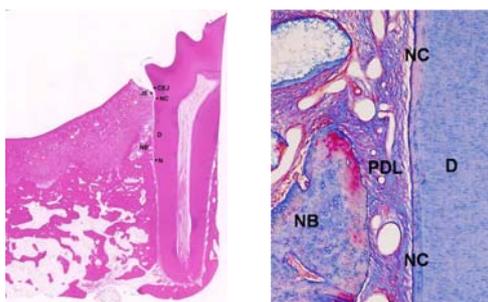


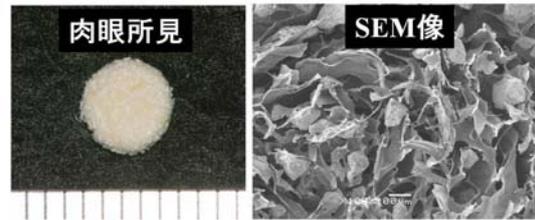
図 7 TCP+EMD+bFGF 群 (1 壁性骨欠損 8 週)



CEJ:セメントエナメル境、JE:上皮、D:象牙質、NB:新生骨、NC:新生セメント質、PDL:歯根膜、N:根尖部ノッチ

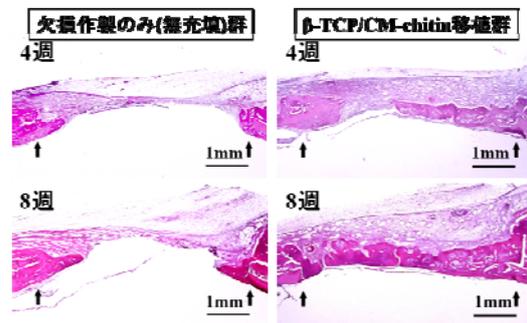
さらに TCP 基材として顆粒は、充填量の規定が困難なこと、術野からの漏出および吸収速度のコントロール等の点で問題を有することから、抗原性が低く創傷治癒促進効果・抗炎症効果を有する天然ムコ多糖類のキチンに着目し、そのカルボキシルメチル (CM) 基の化学修飾によりさらに生分解性を向上させた CM キチンと β -TCP からなる複合体 TCP /CM キチンスポンジ (TCP/CM) (図 8) にも着目した。

図 8 TCP/CM キチンスポンジ



ラットの頭蓋骨欠損を外科的に作製し片側に TCP/CM (直径 5mm、厚さ 1mm) を充填し (実験群)、対側は未処置 (対照群) とした。8 週において欠損領域に対する新生骨の閉鎖率は対照群では 41.4%であったのに対して、実験群では 81.1%と有意に高い値を示した。さらに 残存 TCP/CM は経時的に減少しており、8 週において残存 β -TCP 粒子は完全に新生骨に被包化されていた。以上のことより、TCP/CM は良好な骨伝導性と生体吸収性を併せ持つことにより理想的な物性を有するスキャフォールド(足場材)であることが示唆された(図 9)。

図 9 ラット頭蓋骨欠損への β -TCP/CM-chitin 移植実験



上記の結果に基づき、TCP 基材として TCP/CM を使い、前術のイヌ 1 壁性骨欠損において EMD および bFGF の併用移植を行い同様に 8 週観察を行った。本研究結果については現在解析中である。

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 3 件)

- ① Katsuyoshi Taniyama、Yoshinori Shirakata、Takehiko Yoshimoto、Naoshi Takeuchi、Yusuke Yoshihara、Kazuyuki Noguchi. Bone formation using β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite scaffold in rat calvarial defects. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology 査読有、(2012, In press)
- ② Yoshinori Shirakata、Katsuyoshi Taniyama、Takehiko Yoshimoto、Naoshi Takeuchi、Kazuyuki Noguchi. Effect of bone swaging with calcium phosphate bone cement on periodontal regeneration in dogs. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology 査読有、(2011, In press)
- ③ Yoshinori Shirakata、Naoshi Takeuchi、Takehiko Yoshimoto、Katsuyoshi Taniyama、Kazuyuki Noguchi. Effects of enamel matrix derivative and basic fibroblast growth factor with β -tricalcium phosphate on periodontal regeneration in 1-wall intrabony defects: An experimental study in dogs. Int J Periodontics Restorative Dent 査読有、(2011, In press)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 白方良典、竹内尚士、吉元剛彦、谷山勝義、野口和行 イヌの 1 壁性骨欠損における β -TCP を基材とした EMD および FGF 併用による歯周組織再生
第 54 回春季日本歯周病学会学術大会
2011. 5. 28 博多

[図書] (計 1 件)

- ① 白方良典、吉元剛彦、中村利明、谷山勝義、竹内尚士、野口和行 歯周組織再生療法の現状と今後の展望 鹿児島県歯科医師会会報 査読無、Vol 100, No 679 , P5-7, 12・1

[その他]

ホームページ等

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/4079>

43.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白方 良典 (SHIRAKATA YOSHINORI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60359982