

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10011

研究課題名(和文) In situ組織工学アプローチによる真の歯周組織再生獲得に向けた治療基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of in situ tissue engineering approach using bioactive agent and various biomaterials for obtaining true periodontal tissue regeneration

研究代表者

白方 良典 (Shirakata, Yoshinori)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：60359982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が歯周組織再生療法に広く臨床応用されている。しかしその単独効果は1壁性骨欠損では限定的で骨移植材の併用が推奨されている。またその評価も臨床的および放射線学的評価であるため、真の歯周組織再生が獲得されているかは不明である。そこでbFGFの各種骨移植材(リン酸三カルシウム:TCP,炭酸アパタイト:CO3Ap),牛骨ミネラル:DBBM)への吸着能とこれらのイヌの1壁性骨欠損への応用後の組織治癒造を確認した。その結果DBBMはbFGFの担体に適しbFGFとDBBMの併用処置はbFGF単独、TCP,CO3Apとの併用処置より歯周組織再生を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、bFGFは併用する骨移植材の特性により各々の相性(affinity)が異なることが示唆された。なお歯周組織再生療法に用いる生体材料は足場材としての役割でなく、生理活性物質の担体としての役割を併せもつものが理想的であることが示され今後、理想的な生体材料の開発にも繋がる知見が得られた。さらには世界に先駆けて、本邦におけるbFGFと骨移植材を併用した歯周組織再生治療の治療指針のエビデンスを提示できた点において非常に意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To evaluate periodontal wound healing of 1-wall intrabony defects treated with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP), carbonate apatite (CO3Ap), or deproteinized bovine bone mineral (DBBM) in dogs. The stability of rhFGF-2 adsorbed onto the bone substitutes was evaluated by ELISA. Significantly higher amount of rhFGF-2 was adsorbed to CO3Ap compared with β -TCP. The rhFGF-2/DBBM group demonstrated the highest amount of periodontal tissue regeneration. The rhFGF-2/DBBM group yielded significantly greater formation of new attachment than the rhFGF-2 group. New bone area in the rhFGF-2/DBBM was significantly greater than that in the rhFGF-2, rhFGF-2/ β -TCP and rhFGF-2/CO3Ap groups. The present data indicate that DBBM seems to be a suitable carrier for rhFGF-2 and the rhFGF-2/DBBM treatment promotes favorable periodontal regeneration compared with rhFGF-2, rhFGF-2/ β -TCP and rhFGF-2/CO3Ap treatments in 1-wall intrabony defects.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：歯周組織再生 骨移植材 塩基性線維芽細胞増殖因子 担体 足場材 ティッシュエンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

重度歯周炎により失われた歯周組織の形態と機能の「再生」は歯の保存、審美性の回復、そして人類の健康寿命の延伸に関わる究極の目標である。この目標を達成すべく様々な歯周組織再生療法が40年来求められている。特に近年は再生医工学的な概念を具現化し、生理活性を有するシグナル分子と足場材・担体としての生体材料に加え、様々な(幹)細胞移植により積極的かつ多量の組織再生を模索する基礎研究・臨床研究が盛んである。しかし細胞移植法の実現には安全性・簡便性・費用対効果等未だ克服すべき課題も多く、歯周組織欠損における細胞移植の優位性は確立されていない¹⁾。一方、歯周組織には元来、内在性の歯根膜幹細胞が存在し、それは骨髄由来間葉系幹細胞よりはるかに高い増殖能と多分化能を有することが知られている^{2),3)}。そこでシグナル分子を歯周組織欠損へ応用し宿主細胞の動員と賦活化、創傷治癒の促進を計ることは合理的であり、申請者はこれまで細胞移植を行うことなく、戦略的に歯周組織欠損を改変したうえで各種シグナル分子と生体材料を用いた *in situ* (欠損その歯での) 歯周再生アプローチを検証しその効果を報告してきた。特に骨壁数が少ない1-, 2-壁性骨欠損は切除療法(フラップ手術: OFD)では歯槽骨を始めセメント質・歯根膜の再生はほとんど認められないため、現在、シグナル分子として臨床応用されているエナメル蛋白(EMD)と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が歯周組織に与える影響についてイヌ2壁性骨欠損を用いて比較検討を行った⁴⁾。EMD群では、上皮の深部増殖が抑制され、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。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が、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歯根膜とセメント質形成が十分でなく、シグナル分子の種類により病理組織学的に異なる結果が得られた。さらに1壁性骨欠損に対しては現在、シグナル分子の応用のみでは歯周組織再生は獲得できず、上皮の欠損部への侵入を遮断し血餅の安定や組織再生スペースの確保ができる物理的強度と、シグナル分子の適切な徐放性や骨伝導性を有し吸収性を併せ持つ生体材料の開発とその併用が行われている。しかし、シグナル分子と生体材料の併用療法の結果はバラツキが大きく、なんら併用効果を認めないとする報告⁵⁾もある。そこでこれまでEMDと各種生体材料を用いて、EMDの主成分であるアメリロジェニンの生体材料に対する親和性について評価を行ってきた。その結果、併用材料によりアメリロジェニンの吸着性が大きく異なり、それに応じて歯周組織再生量も異なることを明らかとした。しかし本邦で2016年より歯科(歯周)治療にその応用が保険収載されたbFGF製剤については1壁性骨欠損においていずれの生体材料(骨移植材)の併用が歯周組織再生に効果的なのかエビデンスは未だなく、さらに本当にこれらの歯周組織欠損への応用が「真の」歯周組織再生をもたらすかについては不明である。

参考文献

(参考文献) 1) Corre P et al. *Acta Biomaterialia*, 2015, 2) Tamaki Y et al. *Odontology* 2015, 3) Seo BM et al. *Lancet* 2004, 4) Shirakata et al. *J Clin Periodontol* 2010, 5) Matarasso et al. *Clin Oral Investig* 2015

2. 研究の目的

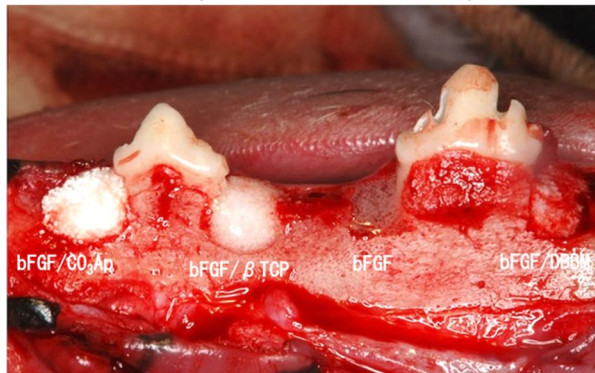
本研究は、bFGFと様々な生体材料(骨移植材)の親和性を *in vitro* で評価し、*in vivo* では実験動物の外科的歯周組織欠損においてbFGFとこれら骨移植材を応用後の歯周組織再生効果・再生像の検証を行い歯周組織再生治療の治療指針のエビデンスを提示することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究において骨移植材としてはリン酸三カルシウム(TCP)、炭酸アパタイト(CO₃Ap)および脱タンパク牛骨ミネラル(DBBM)を選択した。まず、*in vitro* においてbFGFの各移植材への吸着量を評価するために、各骨移植材に0.1mlのリグロを滴下浸漬10分後をベースラインとし、8時間、1日、3日、5日、10日後にPBS洗浄を行い、遊離したbFGFを含んだ溶液を回収後ELISAにてタンパク定量を行った。なお、各移植材間、経時的变化についてTwo-wayANOVA、線形回帰分析を用いた。

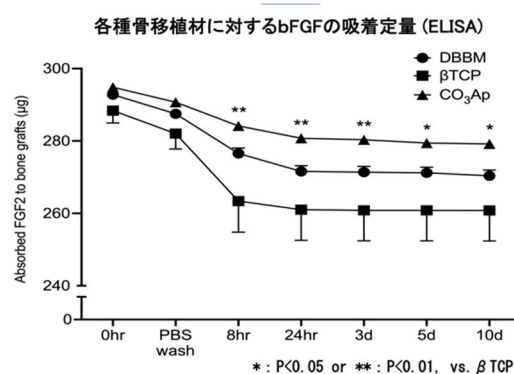
In vivo における評価としてビーグル雄成犬(5匹)の下顎左右の第1および第3前臼歯および第1後臼歯の抜歯を前処置を行った。8週の治癒期間を経て臼歯部において歯肉弁の剥離・翻転後、第2前臼歯および第4前臼歯の近心および遠心部に1壁性骨縁下欠損(8欠損/頭)を歯科用回転切削器具および手用切削器具を用いて外科的に作製し、これら欠損にbFGFと

TCP, CO₃Ap, DBBM 各々との併用移植 (bFGF/ TCP 群, bFGF/CO₃Ap 群, bFGF/DBBM 群) と bFGF 単体 (bFGF 群) を無作為に施した (図 1)。観察期間中は経時的 (術後, 2 週, 6 週, 10 週) に規格エックス線写真撮影を行い放射線学的解析を行った。術後 10 週で動物の安楽死を行い脱灰薄切標本を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色後, 組織学的評価/組織形態計測 (欠損長, セメント質, 歯槽骨形成量, アンキローシス, 結合組織接着量, 新付着量, 上皮の深行増殖量, 歯根膜スコア) を行った。組織学的パラメーターの群間比較について ANOVA および Bonferoni post-hoc テストを行った。



4. 研究成果

ELISA の結果, 各骨移植材に対する bFGF の吸着量は各移植材とも経時的に bFGF の徐放により減少を認めたが, Co3AP では 10 日間にわたり吸着が高く維持されていたのに対して TCP では 8 時間後にはかなりリリースがすすみその後の吸着量は Co3AP と比較し有意に少なかった (図 2)。

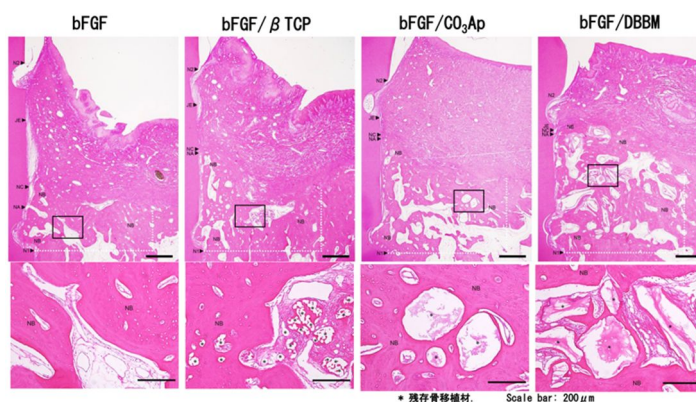


口腔内所見としては術後 2 週まではやや歯肉の腫脹や発赤を認める部位, 個体があったが経時的に炎症は消退し実験期間を通じて創面の裂開や排膿等は認められなかった。

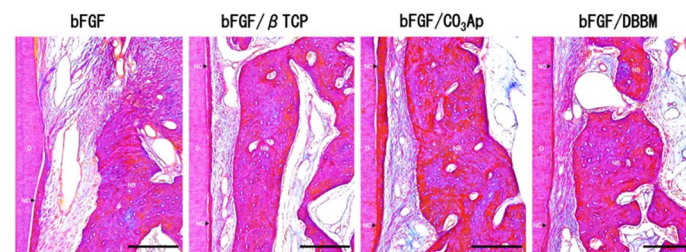
デンタルエックス線所見では, 術直後から骨移植材の違いにより不透過性が異なっていた。2 週後では一旦, 骨移植材の吸収/拡散により透過性が亢進しその後, 経時的に不透過性の亢進を認めた。特に bFGF/DBBM 群でその傾向が強く認められた。

組織学的評価の結果, bFGF 群では歯肉弁の陥没が認められさらに骨形成量が少なかったのに対し, 骨移植併用群では概ね軟組織の高さは維持されていた。さらに骨欠損内部において bFGF 群でも緻密骨を認めたが, 他群より広い骨髓腔を認めた。TCP 群ではわずかな部位で小顆粒が残存し骨に被包化されていた。Co3AP 群では残存骨移植材の全周が緊密に新生骨に覆われていた。

DBBM 併用群ではそのほとんどが欠損内に残留しており欠損上部にいたるまで広範囲で新生骨形成が認められた (図 3)。セメント質, 歯根膜再生も全群で様々な程度で認められたが bFGF 単独ではコラーゲン線維は他の 3 群に比べると疎で, その走行も歯根面に対して平行なものが多く認められた。一方, 骨移植併用群では主に細胞性セメント質と歯槽骨に機能的な配列を有するコラーゲン線維の埋入が認められた。



特に DBBM 群では緻密なコラーゲン線維が認められた (図 4)。また少数例で僅かな量であるが, 全ての骨移植併用群で欠損底部でアンキローシスを認める部位があった。



組織形態計測結果, bFGF 群より骨移植材併用群で歯周組織再生量は多く, TCP, Co3AP, DBBM の順に多く認められた。新付着量は bFGF/DBBM 群が最大で他群より有意に多かった。

骨移植材周囲の骨添加は様々なレベルで認められたが, 骨移植材の残留は bFGF/ TCP 群で最も少なく, bFGF/DBBM 群で最大であった。なお bFGF 群と bFGF/ TCP 群間で歯周組織再生量に有意

D: 歯根象牙質, NC: 新生セメント質, NB: 新生骨, NPL: 歯根膜, (アザンマロリー染色 Scale bar: 200 µm)

差がなかったことは TCP の早期の吸収さらに bFGF の急速リリースにより TCP が足場材/担体として効果的に機能しなかったことに起因するかもしれない。一方,CO₃Ap への bFGF 吸着量は最大で長期徐放と高い骨伝導能を示したが,新付着および歯槽骨形成量は bFGF/DBBM 群の方が多かった.このことは各々移植材の物性・吸収速度/動態の違いに加え bFGF の生理活性の発現調節のバランスに起因するかもしれない。以上のことから bFGF と DBBM の併用処置は bFGF 単独および TCP ,CO₃Ap との併用処置より効果的に歯周組織再生を促進することが示唆された。

これまで国際的には EMD の応用が歯周組織再生療法のゴールドスタンダードの一つとして広く使用されているが,本邦発の bFGF の臨床応用における本研究結果に基づく今回の知見は今後のさらなる歯周組織再生療法,生体材料,生理活性物質の応用において新たな科学的根拠を提供し得る点で学術的にも非常に意義深く「真の歯周組織再生」獲得を目的とすることで,歯周炎患者の天然歯保存と QOL 向上に大いに寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshinori Shirakata, Fumiaki Setoguchi, Kotaro Sena, Toshiaki Nakamura, Takatomo Imafuji, Yukiya Shinohara, Masayuki Iwata, Kazuyuki Noguchi	4. 巻 49
2. 論文標題 Comparison of periodontal wound healing/regeneration by recombinant human fibroblast growth factor-2 combined with -tricalcium phosphate, carbonate apatite, or deproteinized bovine bone mineral in a canine one-wall intra-bony defect model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 599-608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcpe.13619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshinori Shirakata, Takatomo Imafuji, Toshiaki Nakamura, Yukiya Shinohara, Masayuki Iwata, Fumiaki Setoguchi, Kazuyuki Noguchi, Anton Sculean	4. 巻 49
2. 論文標題 Cross-linked hyaluronic acid gel with or without a collagen matrix in the treatment of class furcation defects: A histologic and histomorphometric study in dogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 1079-1089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcpe.13694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshinori Shirakata, Kotaro Sena, Toshiaki Nakamura, Yukiya Shinohara, Takatomo Imafuji, Fumiaki Setoguchi, Kazuyuki Noguchi, Tomoyuki Kawase, Richard J. Miron.	4. 巻 19
2. 論文標題 Histological evaluation of gingival and intrabony periodontal defects treated with platelet-rich fibrin using different protocols: A canine study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Health and Preventive Dentistry	6. 最初と最後の頁 537-546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3290/j.ohpd.b2182985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Imafuji T, Shirakata Y, Shinohara Y, Nakamura T, Noguchi K	4. 巻 -
2. 論文標題 Enhanced bone formation of calvarial bone defects by low-intensity pulsed ultrasound and recombinant human bone morphogenetic protein-9: a preliminary experimental study in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-021-03897-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirakata Y, Nakamura T, Kawakami Y, Imafuji T, Shinohara Y, Noguchi K, Sculean A	4. 巻 48
2. 論文標題 Healing of buccal gingival recessions following treatment with coronally advanced flap alone or combined with a cross-linked hyaluronic acid gel. An experimental study in dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 570-580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shirakata Y, Imafuji T, Nakamura T, Kawakami Y, Shinohara T, Noguchi K, Pilloni A, Sculean A	4. 巻 -
2. 論文標題 Periodontal wound healing/regeneration of two-wall intrabony defects following reconstructive surgery with cross-linked hyaluronic acid-gel with or without a collagen matrix: a preclinical study in dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Quintessence International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3290/j.qi.b937003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miron RJ, Moraschini V, Fujioka-Kobayashi M, Zhang Y, Kawase T, Cosgarea R, Jepsen S, Bishara M, Canullo L, Shirakata Y, Gruber R, Ferenc D, Calasans-Maia MD, Wang HL, Sculean A	4. 巻 25
2. 論文標題 Use of platelet-rich fibrin for the treatment of periodontal intrabony defects: a systematic review and meta-analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 2461-2478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-021-03825-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Pilloni A, Rojas MA, Marini L, Russo P, Shirakata Y, Sculean A, Iacono R	4. 巻 -
2. 論文標題 Healing of intrabony defects following regenerative surgery by means of single-flap approach in conjunction with either hyaluronic acid or an enamel matrix derivative: a 24-month randomized controlled clinical trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-021-03822-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miron RJ, Moraschini V, Del Fabbro M, Piattelli A, Fujioka-Kobayashi M, Zhang Y, Saulacic N, Schaller B, Kawase T, Cosgarea R, Jepsen S, Tuttle D, Bishara M, Canullo L, Eliezer M, Stavropoulos A, Shirakata Y, Stahli A, Gruber R, Lucaciu O, Aroca S, Deppe H, Wang HL, Sculean A	4. 巻 24
2. 論文標題 Use of platelet-rich fibrin for the treatment of gingival recessions: a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 2543-2557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-020-03400-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yoshinori Shirakata
2. 発表標題 Current status and future prospects of biological molecule-based regenerative/reconstructive periodontal therapy
3. 学会等名 108th Annual Meeting, American Academy of Periodontology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshinori Shirakata
2. 発表標題 In situ tissue engineering approaches using biologics/biomaterials for bone and periodontal regeneration
3. 学会等名 The 4th International Conference Brawijaya Dentistry (ICBD) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshinori Shirakata
2. 発表標題 Hyaluronic acid in dental procedures -a scientific and clinical update Preclinical evaluation of the effects of cross-linked hyaluronic acid gel on periodontal wound healing/regeneration in periodontal defects.
3. 学会等名 Europerio 10 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白方良典
2. 発表標題 歯周組織再建/再生療法を科学的に検証する -真のゴールを目指して-
3. 学会等名 令和4年度第1回日本臨床歯周病学会中国四国支部教育講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白方良典
2. 発表標題 Evidence-based periodontal regenerative therapy -クリニシャン・サイエンティストを目指して-
3. 学会等名 第3回南九州歯学会 (Web開催) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白方良典
2. 発表標題 ランチョンセミナーL2 「実験動物を用いたサイトカインおよび生体材料の歯周組織再生能評価」
3. 学会等名 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会（現地およびWeb開催）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白方良典
2. 発表標題 歯周組織再生/再建療法を俯瞰する
3. 学会等名 JSCT (JIADS STUDY CLUB TOKYO) 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白方良典
2. 発表標題 歯周組織再建治療におけるバイオマテリアルの意義とその選択
3. 学会等名 Web講演会 歯周治療シリーズ2022 part 1 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shirakata Y, Nakamura T, Kawakami Y, Imafuji T, Shinohara Y, Noguchi K, Sculean A
2. 発表標題 Effects of hyaluronic acid on healing of gingival recession defects in dogs
3. 学会等名 106th Annual Meeting American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Imafuji T, Shirakata Y, Shinohara Y, Nakamura T, Noguchi K
2. 発表標題 LIPUS enhances rhBMP9-induced bone formation in rat calvarial bone defects
3. 学会等名 106th Annual Meeting American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Miron RJ, Tuttle D, Moraschini V, Eliezer M, Cosgarea R, Japsen S, Shirakata Y, Wang HL, Sculean A	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Quintessence Publishing Co. Inc	5. 総ページ数 16
3. 書名 Chapter 12 Use of PRF for the treatment of gingival recessions in Understanding Platelet-Rich Fibrin	

1. 著者名 Miron RJ, Moraschini V, Moghaddas O, Shirakata Y, Mealey B, Wang HL, Sculean A	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Quintessence Publishing Co. Inc	5. 総ページ数 12
3. 書名 Chapter 13 Use of PRF for the treatment of intrabony and furcation defects in Understanding Platelet-Rich Fibrin	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学ホームページ 研究者総覧 https://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100004960_ja.html?k=白方良典</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 利明 (Nakamura Toshiaki) (60381183)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	篠原 敬哉 (Shinohara Yukiya) (30761647)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------