

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11458

研究課題名(和文) 歯根象牙質を介した外向きドラッグデリバリーによる新たな歯周組織再生スキームの構築

研究課題名(英文) Application of novel DDS strategies for induction and regeneration of periodontal tissues

研究代表者

高野 吉郎 (Takano, Yoshiro)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90126425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周疾患の罹患部に残存する歯を薬物チェンバー(歯髄腔)を内包する徐放性カプセルと見立て、髄腔内に封入した再生誘導物質を歯根象牙質表面から徐放して患部に作用させる効率的なドラッグデリバリーシステムの確立を目的に、そのための導入実験としてラット/マウス臼歯部を対象とする動物実験系を構築した。様々な条件下で実験を行い、将来の臨床応用に向けたデータの定量化に必要な実験条件の絞り込みに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織再生療法の期待が高まる中生理活性物質を局所に無駄なく長期間維持できる徐放性ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が望まれている。歯の象牙質は無数の象牙細管で穿たれた多孔性の物質で、歯髄と外界を繋ぐ歯の物質拡散路として機能している可能性が高い。

我々は歯周病の患部に残存する「歯」を薬物チェンバー(歯髄腔)を内包する徐放性カプセルと位置づけ、残存歯の髄腔に再生誘導因子を封入して直近の患部組織へ徐放させる新規のDDSの開発とその応用を目指している。本研究ではラット/マウスの臼歯を徐放カプセルに見立てた動物実験系を構築し、臨床応用に向けて必要となるノウハウと基礎データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To establish an efficient drug delivery system (DDS) applicable for periodontal tissue regeneration, we looked up a tooth remaining in the areas affected by periodontal diseases as a bio-ceramic drug delivery capsule, which should allow consistent delivery of bio-active agents from the pulp chamber to periodontal tissues via dentinal tubules. To explore applicability of novel DDS concept in dental clinics, we constructed an animal experimental model in which the upper molars were utilized as the drug delivery capsules.

After root canal treatment, emptied pulp chamber of the 1st molar or rat or mouse was filled with FGF2 or with normal saline. One to 4 weeks later, histology of periodontal tissues of the respective teeth were examined by various histological methods. The proposed animal experiment model of novel DDS was practical and easy to construct, but shown to require high skills successfully perform canal treatment in the narrow oral cavities of small animals.

研究分野：歯学 解剖学 組織学 発生学

キーワード：歯周組織再生誘導 ドラッグデリバリーシステム 歯髄 象牙質 蛍光トレーサー FGF2 FGFR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生療法

今日の歯科臨床では、歯周組織再生に向けて、生理活性物質を含浸させた担体を患部に塗布あるいは留置することで、局所における細胞の増殖/分化を効率的に制御し、歯槽骨、歯根膜、セメント質の再生を促す治療法が広く試みられている。歯周組織の再生には、成長因子等を分散させた粒状ないしスポンジ状の高分子やゲルシートを用いた薬剤徐放システム(DDS)を用いるのが一般的であるが、歯周疾患の治療は術野が狭いため患部に DDS の担体を留置するスペースを確保することが困難なケースがあり、その様な場合は術野を密閉することも難しくなる。そのため薬剤が患部から流失してしまう可能性は否定できず、術後感染のリスクも少なからずある。

象牙質の物質透過性

歯に象牙質窩洞を形成すると、歯髄のリンパ液が象牙細管経由で窩壁に浸出することはよく知られた事実である。ラットやマウスの歯では血中に投与したタンパク性トレーサーが歯髄血管から漏出し、象牙細管経由でエナメル象牙境に達すること知られており、トレーサーがエナメル質内へ拡散する例も確認されている。また、エナメル質形成期にある歯胚では、エナメルタンパク質の一部が象牙細管を逆行して歯髄側へ拡散することもわかっている。これらの事実は無数の象牙細管で貫かれた象牙質が、歯髄の内と外を繋ぐ生理的な物質拡散路として機能することを示唆している。

本研究は、歯周疾患罹患部の解剖学的特性と、罹患部に残存する歯と歯周組織の構造上の特性の理解を基に、再生誘導物質を患部に確実に供給し、歯周組織の効率的再生を可能にする方法としての「罹患部の残存歯そのものを担体とする」全く新しい概念のドラッグデリバリーシステム (*in situ* DDS) の開発を目指して立案されたものである。

2. 研究の目的

近年、歯根膜幹細胞の維持と増殖/分化に関わる物質が次々と同定され、歯周組織再生への期待が高まりつつあるが、再生療法は高価な生理活性物質を、長期間局所に一定濃度維持することが求められるため、医療費抑制の観点からも、再生療法の推進には効率的なドラッグデリバリーシステム (DDS) の導入が急務となっている。

象牙質はリンパで満たされた無数の象牙細管で貫かれ、歯髄と外界を繋ぐ物質拡散路を提供している可能性が高い。我々は患部に残存する「歯」を歯髄腔を内包するバイオセラミックス製徐放性カプセルと位置付け、髄腔内に歯周組織再生誘導因子を封入することで、誘導因子を直近の歯周組織へ長期安定的に徐放する *in situ* DDS の確立と臨床応用を目指している (図1 概念図)。本研究の目的は、そのための導入研究としてラット/マウスの臼歯部を対象に *in situ* DDS の動物実験系を構築し、その歯周組織再生誘導効果を *in vivo* で検証することにある。

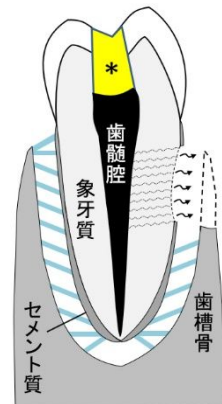


図1 歯を徐放性カプセルに見立てた *in situ* DDS の概念

3. 研究の方法

- (1) ヒト抜去歯を用いた歯根象牙質の物質透過性の評価
- (2) ラット/マウス臼歯部象牙質の物質透過性の評価
- (3) 臼歯部における FGF2、FGFR2 の局在の検証 (免疫組織化学的評価)
- (4) 臼歯部を対象とする顕微鏡下 *in situ* DDS 実験系の構築

4. 研究成果

(1) ヒト抜去歯を用いた歯根象牙質の物質透過性の評価

新鮮抜去歯の根面に象牙質窩洞を形成し、抜去後、髄腔に水溶性蛍光トレーサー Lucifer Yellow (LY) を填入、2~6時間湿潤条件下で保持したのちに歯根の横断切片を作製し、蛍光顕微鏡下で LY の分布を観察した (図2)。

【結果】健全なセメント質で被われた歯根象牙質では、髄腔からの LY の拡散を示す強い蛍光シグナルは髄腔側 1/2~2/3 の領域に留まっていたが、窩洞形成部 (図2 *) では髄腔壁から窩底に至る全層の象牙細管内に LY の強い蛍光が見られた。特に高低部での蛍光が強かったことから、根表面のセメント質を除去すれば、ヒトの歯でも蛍光物質が象牙細管経由で滲出することが確認された。

歯周疾患罹患部の残存歯は、セメント質の脱灰や吸収が起きている可能性が高く、歯科臨床

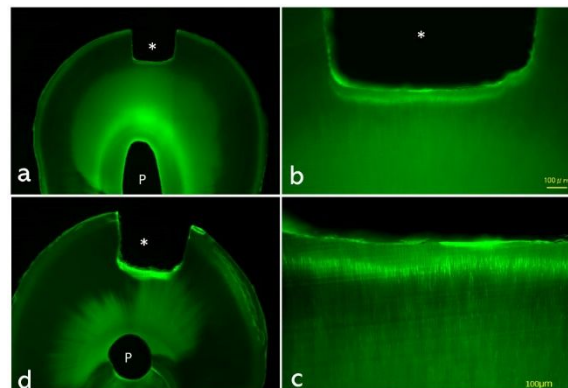


図2 ヒト抜去歯の歯根象牙質横断切片 (非脱灰) LY 貼薬 3 時間後の蛍光シグナル a, b, c 下顎犬歯、d 上顎小白歯、P 髄、*窩洞、c は b の拡大図

ではルートプレーニングを施すことが一般的であることから、歯科臨床において髄腔に再生誘導因子を貼薬した場合、誘導因子が象牙細管経由で歯根膜側へ滲出(徐放)されることは十分に考えられる。

(2) ラット/マウス臼歯部象牙質の物質透過性の評価

ラット成獣の上顎第1臼歯(M1)の近心根を抜髄後、蛍光トレーサー(LY)を含浸させペーパーポイントで髄腔に填入しアイオノマーセメントで仮封した(図3*)。1週後M1のレジン充填部に明瞭な蛍光が見られ(図3a)、近心根の縦断面では髄腔全域が強い蛍光を発しており(図3b)、近心根管がDDSの薬物貯留槽の役割を果たしたことが実証された。歯根の歯根膜側表面にも蛍光が確認され(図3d矢印)、ラット臼歯ではLYが根管壁の厚い象牙質を通過して、歯根膜腔に徐放されることが確認された。

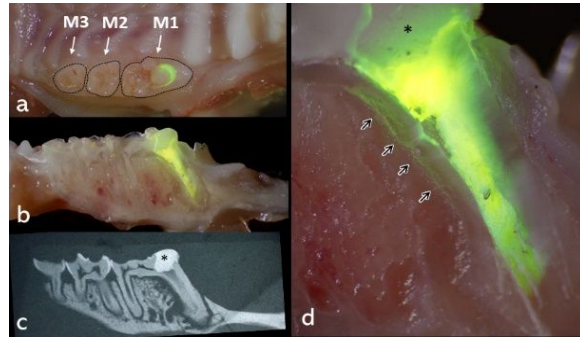
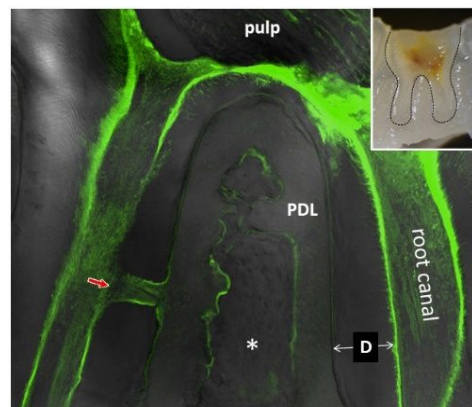


図3 ラット成獣 M1抜髄・LY貼薬・レジン充填後1W

ラットよりはるかに小型のマウスでは、物理的な制約から目的とする上顎第2臼歯(M2)の抜髄が困難であったため、M2の冠部歯髄のみを除去し、髄腔に蛍光トレーサーであるカルセインを貼薬して封入することとした。その結果、24時間後には歯根象牙質全域の石灰化前線と象牙細管の一部、根管中隔(図4*)の表面に明瞭なカルセインの標識を認めた。同実験では断髄後に瘡面の覆罩を行わなかったためカルセインが根部歯髄へ浸透し、一部は側根管から歯根膜へ拡散したと考えられる(図4矢印)。従ってマウス臼歯では象牙細管経由のトレーサーの徐放の確認はまだできていないが、根部歯髄が活性を保ち歯周組織の形成(石灰化)も維持されていたことから、冠部歯髄のみを除去するマウス臼歯の系も歯周組織再生誘導のための *in situ* DDS の一つのモデルとして検討する価値ありと考えられた。



5WマウスM2(冠髄除去→calcein貼薬→翌日固定)

図4 樹脂包埋ブロック研磨表面の共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)所見

(3) 臼歯部の FGF2 と FGF2 受容体(FGFR2)の局在の免疫組織化学的評価

本研究の *in situ* DDS では歯周組織再生誘導因子として FGF2 を用いるが、筆者の知る限り、歯周組織形成野における FGF2 とその受容体の局在を明確に示した免疫組織化学的所見は未だ報告されていない。

今回 40g ラットの臼歯部脱灰パラフィン切片を FGF2 と FGFR2 の特異抗体での免疫染色を試みたところ、FGF2 の免疫反応は骨基質の形成を終えたばかりの幼弱骨細胞が強陽性である一方、骨芽細胞と深部の骨細胞は陰性あるいはごく弱い陽性反応を示すのみであった。その受容体である FGFR2 の免疫反応は骨芽細胞と幼弱骨細胞には殆ど見られず、陽性の骨細胞が骨全域に散在する様子が認められた。しかしマウスの試料では、臼歯部での免疫反応の局在パターンに同様な所見は認められなかった。本実験系のデータの信ぴょう性を高め、歯周組織再生誘導の分子機構の一端を明らかにする上でも両因子の発現の消長とその生物学的意義の検証を進めて行く必要がある。

(4) ラット/マウス臼歯部を対象とする *in situ* DDS 実験系

老齢ラット上顎臼歯部の歯周組織再生誘導実験系の構築と評価(図5)

成果(2)に示した蛍光トレーサー実験の結果を踏まえ、抜髄したM1近心根の髄腔に FGF2 を填入して、FGF2 が歯周組織の修復/再生に及ぼす効果を形態学的手法で検証した。

実験には加齢による歯髄腔の適度の狭小化を期待して 300g 以上の老齢ラットを用いた。しかし老齢ラットであっても、実際にはM1近心根の根管は依然として太く、根尖孔も広く開大していた。結果として抜髄時の組織ダメージが想定以上に大きく、その影響が根尖周囲に波及した可能性があり、殆どの個体で根尖周囲に様々な程度の骨吸収が生じていた。

そこで我々は当初の予定を変更し、本実験を髄腔内に填入した FGF2 が根尖周囲の骨吸収野にどのように作用するかを検証するパイロットスタディーと位置付け、以下の要領で実験を進めることとした。

- M1 近心根抜髄後、髓腔に生理食塩水を填入し、術後 2 週間放置して骨吸収の終息を待つ
- 2 週後に M2 の薬物チェンバー（髓腔）を開け内容を生理食塩水から FGF2 溶液に交換する
- 更に 2 週後（抜髄から 4 週後）に動物を固定し上顎臼歯部の状態を解析してコントロールと比較する

本実験では M1 近心根の根尖周囲に生じた骨吸収の程度の差が個体間で非常に大きく、結果として骨増生/再生に果たす FGF2 の効果を評価するに足る定量的データを得ることはできなかった。抜髄時に根尖孔を確実に封鎖すればこのようなことは防ぐことができるはずであり、今後実験を継続する上で特に留意すべき点と思われる。抜髄後の根尖孔の封鎖処置が徹底されれば、おそらく本実験系に老齢ラットを用いる必然性はなくなり、組織標本作製に要する労力が軽減され作業効率の向上も期待できる。

マウス臼歯部歯周組織再生誘導への *in situ* DDS 実験系の応用

マウスは成長が早く組織の治癒のスピードも早い優れた小型実験動物であるが、口腔内がとても狭く、先にラットで試みた臼歯の抜髄や根管処置は至難の業であるため、研究報告も皆無である。

今回我々は今後の *in situ* DDS 研究の可能性を広げる意味も含め、マウス臼歯部の歯周組織再生誘導系の構築を視野に、*in situ* DDS 実験系の検証を試みた。実験の流れは以下の通りである。

- 絹糸結紮法で上顎 M2 部の歯槽骨を吸収させた歯周病モデルマウスを 20 匹作製して実験に備える
- 実験期間中に進行するであろう骨の吸収と添加量を計測する基準点を設定するために、実験開始直前にカルセインを腹腔内注射して骨形成野を蛍光標識する
- 麻酔下で両側の上顎 M2 の冠部歯髄を除去し、片側は髓腔に FGF2 (Regros) を、対側は生理食塩水を填入して仮封用セメントで封鎖する
- 1 週後、2 週後にマウスを灌流固定してマイクロフォーカス X 線 CT、CLSM、組織化学、免疫組織化学等で術野の解析を行う

マウス口腔内は術野の防水管理が難しく、貼薬完了後の窩洞壁の乾燥を必要とする密封作業はやや困難を伴う。そのためか、固定時に仮封セメントが両側臼歯に残存していたのは全 17 例中 7 例で、そのうち実験開始時に両側の M2 に結紮糸が残存していたのはわずか 2 例にすぎなかった。全個体から図 6 に示すような興味深いデータを大量に得ることができたが、本実験では、*in situ* DDS による FGF2 の歯周組織誘導効果を評価する上で必要な定量データを揃えることはまだできていない。

本研究の成果は現時点で未発表の状態であるが、今後引き続いてデータの解析を進める場が得られれば、成果を学術誌等に公表し、社会に還元する予定である。

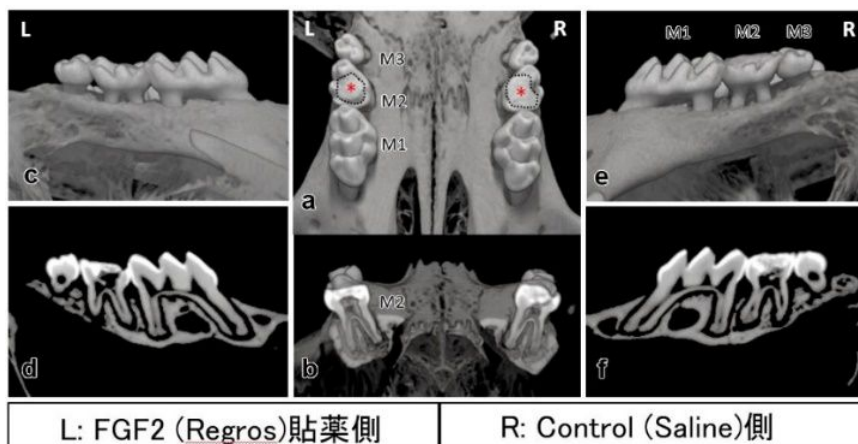


図 6 FGF2 貼薬後 2 週のマウス臼歯部の Microfocus X 線 CT 像
 a 両側臼歯部の俯瞰像。* は M2 の咬合面上の仮封セメント b 第 2 臼歯の頬側根と舌側根を通る冠状面の所見、c, d: FGF 貼薬側の臼歯頬側面と矢状断面像、e, f: control 側の臼歯頬側面と矢状断面像

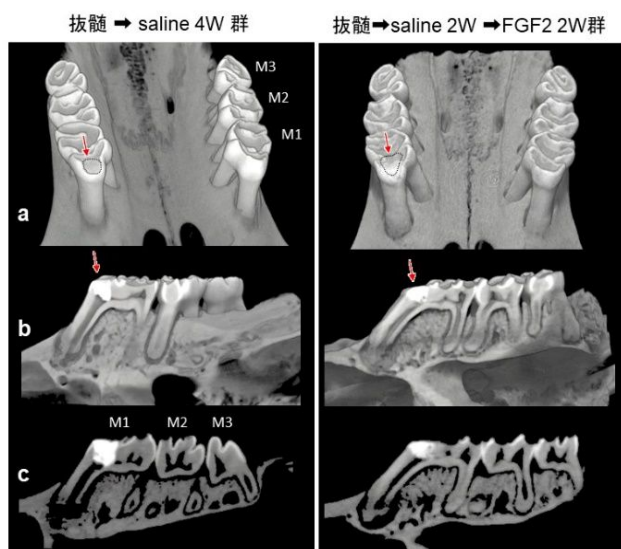


図 5 髓腔に saline を填入して 4W 後のコントロール群(左列)と、2W 後に saline を FGF2 に変更した実験群(右)のマイクロフォーカス X 線 CT 所見 矢印は仮封セメント、a, b 立体復構像、c 矢状断 X 線 CT 像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Y. Furukawa, N. Haruyama, M. Nikaido, M. Nakanishi, N. Ryu, M. Oh-Hora, K. Kuremoto, K. Yoshizaki, Y. Takano, I. Takahashi | 4. 巻 96 |
| 2. 論文標題 Stim1 Regulates Enamel Mineralization and Ameloblast Modulation | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dental Research | 6. 最初と最後の頁 1422-1429 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034517719872 | 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 Azetsu Y, Inohaya K, Takano Y, Kinoshita M, Tasaki M, Kudo A. | 4. 巻 431(2) |
| 2. 論文標題 The sp7 gene is required for maturation of osteoblast-lineage cells in medaka (<i>Oryzias latipes</i>) vertebral column development | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Dev Biol | 6. 最初と最後の頁 252-262 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2017.09.010 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yuta Seino, Yoshiro Takano, Hayato Ohshima | 4. 巻 59(3) |
| 2. 論文標題 The positional and ultrastructural changes in peripheral pulp capillaries correlate with the active phase of dentin deposit and mineralization in rat molars | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 163-171 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2017.05.006 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshiro Takano |
| 2. 発表標題 Structure and function of maturation ameloblasts - An overview - |
| 3. 学会等名 第58回歯科基礎医学学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 高野吉郎 | 4. 発行年 2016年 |
| 2. 出版社 ニュートン・プレス | 5. 総ページ数 192 |
| 3. 書名 10万種類のタンパク質（ニュートン別冊） | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 | 大島 勇人 (Hayato Ohshima) (70251824) | 新潟大学・医歯学系・教授 (13101) | |
| 研究 分担者 | 田畑 純 (Tabata Makoto) (20243248) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602) | |