

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790141

研究課題名 (和文) カルシウムレスポンシブル亜鉛関連ナノ粒子を用いた時間制御型新規歯周病治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of control type new periodontitis treatment method using of calcium responsible zinc containing nano particle

研究代表者 徳留 嘉寛 (TOKUDOME YOSHIHIRO)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：70409390

研究成果の概要：

卵巣摘出、特殊飼料を給餌して顎部低骨密度ラットの作成を行った。SD 系雌性ラットの左右卵巣摘出し、さらに特殊飼料(低亜鉛、マグネシウム、カルシウム、ビタミン D)を給餌することによって従来よりも効率的に顎部低骨密度ラットの作成が可能となった。

ここで作成した顎部低骨密度ラットに陽性対照として亜鉛にリン酸カルシウムを導入した ZnTCP (Zinc containing tricalcium phosphate)、水溶性化合物として硫酸亜鉛、陰性対照として溶媒のコーン油 (無治療群)、新規マテリアルとしてオクタン酸またはステアリン酸の亜鉛化合物を 1 週間に 1 度顎部付近に投与した。試験開始 12 週間後において、ZnTCP、オクタン酸およびステアリン酸亜鉛投与群では無治療群に比べて、体重上昇、顎骨量が有意に上昇し、Sham コントロール群とほぼ同程度まで顎骨形成促進した。この結果は陽性対照群とほぼ同程度の効果であった。一方、水溶性の硫酸亜鉛投与群では無治療群とほぼ同程度の体重、骨量であった。以上の結果から、水溶性の硫酸亜鉛投与では体重上昇や、骨量の増加が認められないこと、脂溶性の亜鉛化合物によって、効率的に顎部骨量を上昇させることがわかった。また、経時的に採血を行い血中の亜鉛濃度の測定を行ったところ薬物濃度時間下曲線 (Area under the curve, AUC) は ZnTCP や新規亜鉛化合物で高い亜鉛濃度が認められ、特にオクタン酸亜鉛適用群で最も AUC は高値を示した。このことはオクタン酸亜鉛は脂溶性も水溶性も兼ね備えており比較的脂溶性が高いので亜鉛の徐放化がされている可能性がある。本研究で得られた結果から、脂溶性の比較的高い亜鉛化合物を用いることによって新規歯周病治療法として提案できる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：再生医療

科研費の分科・細目：医療系薬学（6806）

キーワード：DDS, バイオマテリアル, 歯槽骨, 歯周病, 骨再生

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国は世界に類を見ない速度で高齢化が進行していることから、高齢者のQOL(Quality of life)の改善を目指した医薬品や医薬部外品が製薬会社や大学などにおいて盛んに研究・開発されている。人が通常の生活を営む上では、衣食住が重要であることはもちろん、特に食に関する満足度は、人生の一つの価値として欠かすことができない。人が食事をする上で、必須の役割を担っているのが歯牙組織であることは言うまでもない。一般的に歯は虫歯や歯周病などで一旦失うと元通りに再生するのは困難とされているため、高齢者の歯牙の残存機能保全は、QOL 低下を抑制する 8020 推進運動 (<http://www.8020zaidan.or.jp/index2.html>) として活発に展開されている。歯を失うことになれば人は食生活を限定され、通常の食生活を行うことが困難となり、QOL を維持する上で非常に大きな問題となる。歯牙を失う大きな原因のひとつである“歯周病（歯槽膿漏）”を治療・改善することができれば、自らの歯牙を長く維持できることから高齢患者の QOL の低下を顕著に抑制することができる。歯周病は、歯周病菌に侵されて歯の周りにうみが溜まり、歯を支える骨である歯槽骨の骨吸収が亢進して弱くなることにより、歯周組織の破壊が進み、歯槽骨が歯を支えられなくなることによって歯牙が脱落することが原因とされている。特に、歯槽骨の骨吸収亢進すなわち“歯槽骨の骨密度の低下”は“骨粗しょう症”によって誘発される。つまり、全身の骨密度が低下する骨粗しょう症では、歯を支える歯槽骨にも大きな影響を及ぼす。歯槽骨の骨密度が低下して弱くなれば、歯周組織の破壊も進みやすくなる。すなわち、骨粗しょう症は歯周病を進行させる大きな一因になる。実際に、骨粗しょう症になると、歯周病が進行するリスクは高まる。日本人女性を対象にした、骨密度と歯周病の関係を調べた研究では、骨密度が低下している閉経後女性では、歯周病が著しく進行し、歯を早期に失う可能性が高いことを示す結果が報告されている[1]。従って、歯槽骨の骨密度を正常に保つことができれば歯牙の脱落を抑制する可能性がある。即ち、全身の骨密度を増やすことによって歯周病の予防につなげることが可能となる。骨粗しょう症あるいは歯周病は骨形成と骨

吸収のバランスが崩れ、骨吸収が骨形成を上回った際に生じる。すなわち、骨粗しょう症と歯周病は骨形成という観点においては同じメカニズムで引き起こされる病気で非常に密接な関係がある。逆に考えると、骨粗しょう症治療薬は歯周病治療薬に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

顎部低骨密度動物に亜鉛関連化合物を局所的に適用することによって顎部骨形成を質的・量的に促進することを確認し、歯周病の新規治療法の可能性を提案する。さらに骨形成促進効果が高い亜鉛をより効果的に目的部位に届けるために、新規亜鉛含有マテリアルの溶解性（脂溶性）、結晶性を制御し、より効果の高いマテリアルを見出す。また、実使用を考慮し、経皮・経粘膜吸収に適した剤形開発などもあわせて検討する。本研究では研究代表者が研究してきた骨形成促進効果を有するマテリアル（骨粗鬆症に有用なマテリアル）を応用し、生体内信号に応答した歯周病治療薬としての新規バイオマテリアルを見出す。

また、より実使用に近づけるため投与方法の変更などの検討によって、新たな切り口の、QOL 向上新規歯周病治療法を見出すことを目的とする。さらに、より効果向上を考慮した、フッ素やマグネシウムの添加、溶解性を制御した新規バイオマテリアルを用いること、より実施用に近づけるため投与方法の変更などの検討によって、新たな切り口の、今までにない、歯周病治療法を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 顎部低骨密度動物の作成方法の確立

既報（研究目的の参考論文 [2]）に従って顎部低骨密度動物を作成する。具体的には、雌性ラットの卵巣を摘出後、特殊飼料（低亜鉛、低マグネシウム、低カルシウム、低リン酸、低ビタミン D3 食）を 1 週間または 4 週間与えることにより、顎部低骨密度ラットを作成する。特殊飼料で 1 週間または 4 週間飼育した顎部低骨密度ラットを小動物用 3 次元 X 線 CT 装置（既有）により顎部の骨密度を測定し、顎骨の骨密度が低下していることを標準動物と比較して確認する。ここで、特殊飼料での飼育期間を決定する。

(2) 顎部低骨密度動物における新規マテリアルの骨形成促進効果の確認 (1)

顎部低骨密度動物の顎部（患部近傍）に、骨粗しょう症動物に効果の高い Zn-TCP を 1 週間に 1 回局所投与する。また、1 週間に 1 回、動物用 X 線 CT 装置により顎部の骨密度を 3 次元的に測定する。これを 4 週間連続で行うことにより、骨形成促進効果を確認する。また、経時的に採血し、血漿中の金属イオン濃度を測定し、骨形成促進と血中イオン動態の関係を把握する。

(3) 顎部低骨密度動物における新規マテリアルの骨形成促進効果の確認(2)

Zn-TCP 投与によって顎部骨形成促進効果が認められた場合には、骨形成および生体内石灰化を促進することが知られているフッ素やマグネシウムの添加や、溶解性、結晶化度、イオンの放出性をコントロールした新規マテリアルを用いて、より有効な骨形成促進、新規歯周病治療法を顎部低骨密度動物を使用して見出す。結晶化度は X 線回折法により、溶解性はマテリアルからのイオン放出試験により行う。

4. 研究成果

(1) 顎部低骨密度動物の作成方法の確立

特殊飼料（低亜鉛、低マグネシウム、低カルシウム、低リン酸、低ビタミン D3 食）を 1 週間または 4 週間与えたラットの顎部骨密度を小動物用 3 次元 X 線 CT 装置により測定した。特殊飼料 1 週間給餌させたもので正常ラットの約 85 % 程度の骨密度に、4 週間給餌させたラットでは正常ラットの約 70 % の骨密度となった。今までは老齢ラットの卵巣を摘出することや、老齢ラットに特殊食を給餌して動物モデルを作成しているのが一般的であった。今回は、若年ラットの両卵巣を摘出し、さらに特殊食を給餌することによって効率的に顎部低骨密度ラットの作成が可能となった。本モデルは顎部低骨密度ラットの作成において極めて重要である。

(2) 顎部低骨密度動物における新規マテリアルの骨形成促進効果の確認 (1)

上記で作成した顎部低骨密度ラットの顎部に ZnTCP の 1% アルギン酸ナトリウム溶液を 1 週間に 1 回適用した。顎骨密度、体重を指標に骨形成促進効果を確認した。陰性対照としてアルギン酸溶液を適用した。また、比較対象として、卵巣摘出せず、擬似手術を行った群もラットも同様に試験した

12 週間の試験を行った結果、ZnTCP 適用

群において、陰性対照群と比べて有意な顎骨量の増加が認められた。また、全身性の効果の指標として、体重変動、3 点曲げ法による大腿骨強度も併せて検討した。ZnTCP 適用群で有意な体重増加が認められた。また大腿骨強度は有意に上昇した。この結果から、ZnTCP 適用によって顎骨量の増加のみならず大腿骨強度にも影響したことから、全身的な効果が認められることが想定された。

(3) 顎部低骨密度動物における新規マテリアルの骨形成促進効果の確認 (2)

上記で作成した顎部低骨密度ラットの顎部に ZnTCP, 脂溶性の新規マテリアルとしてステアリン酸亜鉛またはオクタン酸亜鉛を、水溶性のマテリアルとして硫酸亜鉛を用いた。亜鉛量は投与液の約 6% とした。これらのコーン油懸濁液を 1 週間に 1 回適用した。顎骨密度、体重を指標に骨形成促進効果を確認した。陰性対照としてコーン油を適用した。また、比較対象として、卵巣摘出せず、擬似手術を行った群もラットも同様に試験した

12 週間の試験を行った結果、顎骨量は脂溶性のステアリン酸亜鉛、オクタン酸亜鉛、陽性対照の ZnTCP 適用群において、陰性対照群と比べて有意な顎骨量の増加が認められた。また、全身性の効果の指標として、体重変動、3 点曲げ法による大腿骨強度も併せて検討した。一方、水溶性の化合物として試験した硫酸亜鉛適用群では顎骨の上昇や体重増加、大腿骨強度の増加は認められなかった。

本試験で血漿中亜鉛濃度を測定した結果、硫酸亜鉛や陰性対照群の亜鉛濃度は低かったが、陽性対象、脂溶性のマテリアル投与群では亜鉛濃度が高かった。血漿中亜鉛濃度が高いことは全身性の効果が期待できるので、本マテリアルを用いることによって、顎骨の治療のみならず、全身骨量を増加させることができることが示された。

本試験で明らかになったことは以下のとおりである。

(1) 卵巣摘出、特殊食を給餌し、飼育したラットは顎骨密度や顎骨量が正常動物に比べて有意に減少しており、顎骨低密度ラットが効率的に作成できる方法を確立した。

(2) ZnTCP を顎部低骨密度の顎部に適用することによって、顎部低骨密度ラットの顎骨量を有意に上昇させた。また、全身的な効果も示唆されるようなデータが得られた。

(3) 脂溶性のステアリン酸亜鉛、オクタン酸亜鉛、水溶性の硫酸亜鉛を顎部低骨密度ラットの顎部に適用することによって、顎部低骨

密度ラットの顎骨量を有意に上昇させた。また、全身的な効果も示唆されるようなデータが得られた。一方、水溶性亜鉛化合物である硫酸亜鉛適用群では効果が認められなかった。

以上の結果から、ZnTCP や脂溶性の亜鉛化合物を適用することによって顎骨量を上昇させることが可能であった。顎骨量を増加させることは歯槽骨量の増加にもつながる可能性があり、本マテリアルを使用することによって新たな歯周病治療ができる可能性が示された。

参考論文)

[1] 稲垣 幸司他, 日本歯科保存学雑誌, 46, 538-548, 2003.

[2] Effect of controlled zinc release on bone mineral density from injectable Zn-containing beta-tricalcium phosphate suspension in zinc-deficient diseased rats, M. Otsuka, Y. Ohshita, S. Marunaka, Y. Matsuda, A. Ito, N. Ichinose, K. Otsuka, W. Higuchi, J. Biomed. Mater. Res. A., 69(3), 552-60, 2004

[3] Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation, A. Ito, M. Otsuka, H. Kawamura, M. Ikeuchi, H. Oguchi, Y. Sogo, N. Ichinose, Current Applied Physics 5, 402-406, 2005.

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0件)

現在論文を準備中。

[学会発表] (計1件)

大塚誠、徳留嘉寛、伊藤敦夫、RZ. LeGeros、必須微量元素含有リン酸カルシウムナノ懸濁注射剤が骨粗しょう症ラットの歯槽骨形成促進に与える影響、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, 東京, 2008年11月

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]
○出願状況 (計 件)

現在準備中

○取得状況 (計 件)

なし

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳留 嘉寛 (TOKUDOME YOSHIHIRO)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：70409390

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし