

機関番号：27102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592433

研究課題名（和文）ウシラクトフェリンを応用した抜歯窩治癒促進材の開発

研究課題名（英文）Bovine lactoferrin-based agents which promotes healing of tooth socket

研究代表者

中島 啓介（NAKASHIMA KEISUKE）

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：80227785

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ラット抜歯窩におけるウシラクトフェリンの治癒促進作用を評価した。4週齢のウイスター系雄性ラットの下顎右側第一臼歯を抜歯し、抜歯窩に徐放性ウシラクトフェリン材を挿入した。1週間後に下顎骨を摘出し、抜歯窩の三次元画像と組織像から治癒状態を評価した。その結果、徐放性ウシラクトフェリン材をラット抜歯窩内に挿入すると創面直下の好中球数が減少し新生骨量も増加する傾向が認められた。

研究成果の概要（英文）：Effects of lactoferrin on healing of tooth socket were evaluated in this investigation. Right lower first molar of 4 weeks-old Wistar male rats was extracted under general anesthesia. Collagen sponge containing controlled-released bovine lactoferrin was inserted in the tooth socket. One week later, the rats were sacrificed. Healing of tooth socket was evaluated with 3-D images and histological images. Results of the investigation showed that controlled-released bovine lactoferrin decreases the number of neutrophils under the gingival epithelium and increase new bone formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：外科，歯学，生体分子，タンパク質，動物

## 1. 研究開始当初の背景

分泌液（乳汁，涙，唾液）および好中球に存在するラクトフェリンは、ほぼ同数のアミノ酸から構成されるC末端側とN末端側が球状に丸まり結合したような構造をしている。各球体の中心に鉄イオン（ $Fe^{3+}$ ）を1個ずつキレートし、 $Fe^{3+}$ に対する親和性が類似するトランスフェリンと比較して300倍高いため、

感染局所において抗菌的に作用する。また、N末端にはリポ多糖結合タンパク質（LBP）と競合してグラム陰性菌のリポ多糖（LPS）と結合する部位が存在するため、LPSの生物学的活性を阻害する（Infect Immun 66: 486-91, 1998）。このため、特にグラム陰性菌による感染症では重要な役割を果たす。

歯科領域のラクトフェリン研究は古くか

ら行われているが、歯肉溝浸出液中あるいは唾液中の一つのマーカーとして捉えた研究がほとんどであった。1990年代になって Kalfas らは①歯周病原細菌へのラクトフェリンの結合、②歯周病原細菌の線維芽細胞あるいは上皮細胞への付着に対するラクトフェリンの影響、③歯周病原細菌によるラクトフェリンの分解、などを報告している (Oral Microbiol Immunol 6(6): 350-355, 1991, Apmis 103(2): 154-160, 1995, FEMS Microbiol Lett 145(2): 209-214, 1996, Apmis 105(9): 680-688, 1997)。また、SNP によるラクトフェリン N 末端から 11 番目 (Genes Immun 6(7): 632-635, 2005) および 29 番目 (Infect Immun 71(11): 6141-6147, 2003) のアミノ酸変異が侵襲性歯周炎と関連していると報告されている。

## 2. 研究の目的

応募者らは、古くから食品添加物として使用され安全性が高いラクトフェリンに着目しこれを歯周治療に応用することを最終目標として研究を継続してきた。しかし、優れた歯周病動物病態モデルが存在しないため、これまでの研究結果を活用しラクトフェリンの臨床応用を行うための基礎データを得ることが困難であった。

最近の概説 (Biometals 17(3): 331-5, 2004) では、*in vitro* の系においてラクトフェリンは生理学的濃度で骨芽細胞の増殖促進作用、破骨細胞の形成抑制作用を持つとされている。*in vivo* の系においてもマウス頭蓋骨皮下にラクトフェリンを注入すると骨の添加 (骨増生) が認められた (Endocrinology 145(9): 4366-74, 2004)。株式会社ライオンは前述の第 2 回ラクトフェリンフォーラムにおいて、ヒト口腔由来線維芽細胞に対する増殖作用 (創傷治癒促進) を発表している。ラクトフェリンのこれらの作用を発揮できる場として抜歯窩は最適であり、ラットを使った動物実験モデルもすでに確立されている。さらに、歯科ラクトフェリン研究会 (<http://www.dental-lactoferrin.com>) ではドライソケット内にラクトフェリン錠剤を入れると 30 分以内に疼痛が軽減した (消炎・鎮痛) と発表されている。そこで視点を変え、下表のように優れた特徴を持つウシラクトフェリンによる抜歯窩の治癒促進効果を検討することを考えた。

本研究課題ではより実現の可能性が高い、ラクトフェリンを応用した抜歯窩治癒促進材の開発を試み、それを発展させ「歯周治療におけるラクトフェリンの応用」を目指すとい

う着想に至った。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物と実験スケジュール

3 週齢の Wistar 系雄性ラットを 50 匹購入し、新しい環境に順応させるまで 1 週間、飼育して実験に用いた。4 週齢になったラットに対し体重 100 g あたりペントバルビタール量が 3-4 mg となるようにペントバルビタールナトリウム溶液 (商品名: ソムノベンチル) を腹腔内投与し、全身麻酔を行った。その後、歯科用プライヤーの先端を改造した抜歯鉗子で下顎右側第一臼歯を抜歯した。抜歯された第一臼歯の歯根形態から抜歯窩内での歯根残存が疑われるラットに関してはペントバルビタールナトリウム溶液の腹腔内過剰投与により安楽死させ、解析対象から除外した。完全に抜歯できたと考えられたラットに関しては、抜歯窩内に調整済みの試験材 (表 1) を挿入した。抜歯 7 日後に体重 100 g あたりペントバルビタール量が 10 mg となるようにペントバルビタールナトリウム溶液を腹腔内投与することによって、安楽死させた。安楽死後、ラットから軟組織を含む下顎骨を摘出し 10% 中性緩衝ホルマリン溶液中で保存した。

### (2) 試験材料の調製

100 mg/ml のウシラクトフェリン溶液を調整し、その 1  $\mu$ l を 1 mm $\times$ 1 mm のコラーゲンスポンジに浸透させた (ラクトフェリン材)。また、ペプシン可溶性 I 型コラーゲン溶液 (0.2 ml) をマイクロチューブの中に入れ、ウシラクトフェリン 100  $\mu$ g を混和しゲル化させた後、凍結乾燥した。得られたスポンジを 0.2 ml のコラーゲン溶液に浸して再度、凍結乾燥した (徐放性ラクトフェリン材)。

### (3) 抜歯窩内新生骨の三次元的分析

ラット下顎骨標本を、愛知学院大学大学院歯学研究科未来口腔医療研究センターに設置してある実験動物用 3D マイクロ X 線 CT (R<sub>m</sub>CT) により撮像した。撮像したデータをラトック社製 TRI-BON にて解析した。抜歯窩内に認められる石灰化度が低いボクセルを新生骨として抽出しボクセル数を算出した。また、ラットの個体差を考慮し、新生骨の総ボクセル数を左側同名歯の歯槽窩に相当するボクセル数で割った値を算出して比較することにした。

### (4) 抜歯窩軟組織における炎症状態の観察 三次元解析が完了した標本はギ酸による

脱灰後、パラフィン包埋を行った。図に示す白線の間で20枚の連続切片を作製し、HE染色を行った(図1)。この20枚の中で、最大断面を含む3枚を選択しデジタル写真撮影を行った。写真撮影には、HSオールインワン蛍光顕微鏡BZ-9000(BIOREVO, キーエンス、大阪)を使用した。

炎症性細胞数の計測には、専用の画像計測・解析ソフト(BZ-II解析アプリケーション)を用いた。後述する範囲において重複しないように視野を分割し、細胞数を計測した。

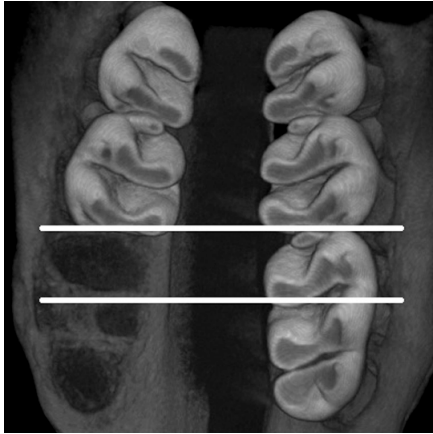


図1 連続切片を作製した部位

#### 4. 研究成果

##### (1) ラクトフェリン材の徐放性

ラクトフェリン材を調製した結果、図2のように48時間後までラクトフェリンが徐放され良好な性能を持つことが明らかとなった。

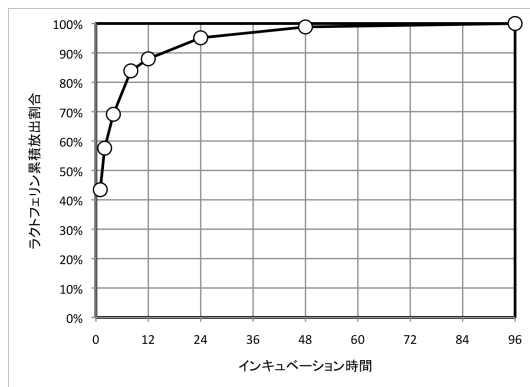


図2 調製したラクトフェリン材の徐放性

##### (2) 動物実験と試験材料の割り付け

抜歯時の歯根の破折、麻酔による死亡により、各実験での解析対象になったラット数と割り付け材料は表1のようになった。

表1 解析に使用したラット数

実験	A	B	C
実験1	2	2	2
実験2	A	B	C
ラット数	2	3	3

実験1では抜歯のみ(A)、コラーゲンスポンジ(B)、ラクトフェリン材(C)、実験2では抜歯のみ(A)、コラーゲンスポンジ(B)、徐放性ラクトフェリン材(C)

##### (3) 抜歯窩内新生骨の三次元的解析

μCTによって解析した結果、実験1においては抜歯窩内にコラーゲンスポンジを挿入した群は他群と比較し新生骨の割合がわずかに高かった。ラクトフェリン材を挿入した抜歯窩内の新生骨の割合は、何も挿入しなかった群と差がなかった(図3)。しかし、実験2において徐放性ラクトフェリン材を抜歯窩に挿入した群では、コラーゲンスポンジを挿入した群あるいは何も挿入しなかった群と比較し新生骨の割合が高かった(図4)。

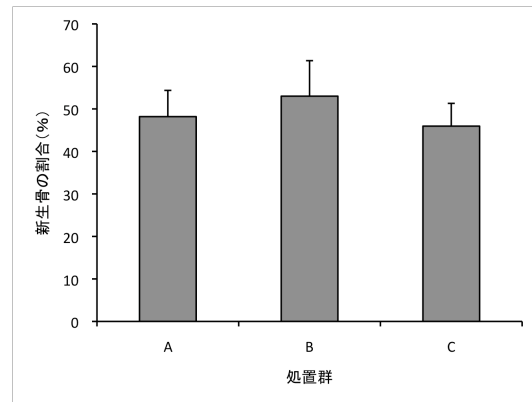


図3 新生骨の割合(実験1)

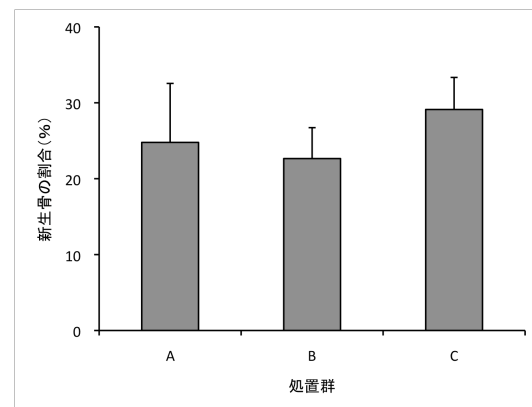


図4 新生骨の割合(実験2)

##### (4) 抜歯窩内軟組織における炎症状態

各視野における細胞数を合計したものをその切片における細胞数とした。抜歯窩の上

部（窩口部）すなわち頬舌側の歯槽骨壁、新生骨の直上部、頬舌側の歯槽骨壁の最内側点を結ぶ線で囲まれた範囲（図5）において観察される好中球数の計測を行った。また、抜歯窩より上部すなわち歯肉粘膜上皮、抜歯窩上限ライン、頬舌側の歯槽骨壁の最内側点より垂線を立てた線で囲まれた範囲（図6）内の上皮直下において観察される好中球数の計測を行った。

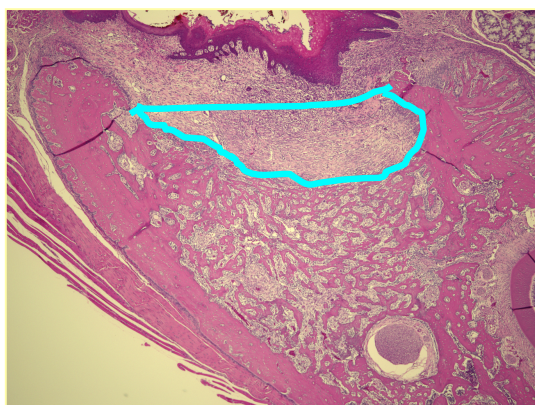


図5 抜歯窩計測領域（水色の線の範囲）

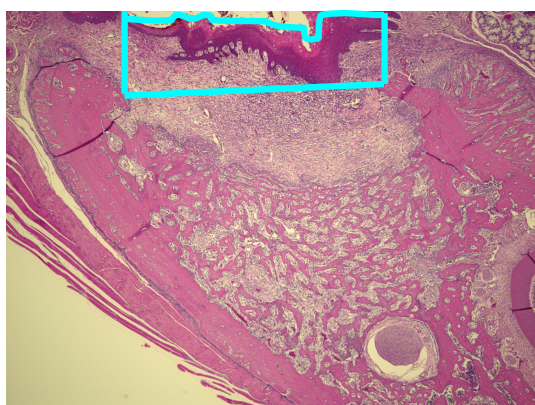


図6 上皮直下計測領域（水色の線の範囲）

観察したすべての標本において抜歯窩は上皮により閉鎖されていた。上皮結合組織では、毛細血管の新生と線維芽細胞および幼弱な繊維の走行が確認される肉芽組織が形成されていた。肉芽組織内部には、好中球を主体とする炎症性細胞浸潤が多数観察された。また、新生骨が抜歯窩の中 2/3 以上に形成されていた。さらに、徐放性ラクトフェリン材群では抜歯窩のほぼ全体が新生骨で満たされており、新生骨骨小柱は骨改造の結果密度が粗くなり、既存骨との境界が不明瞭となっていた。

抜歯窩直上と上皮直下における好中球数を算出したところ、実験1においてはラクトフェリン材群において抜歯窩直上の好中球

が他群と比較し多く認められた（図7）。しかし、上皮直下の好中球数は何も挿入しなかった対照群と比較してわずかに低下していた。

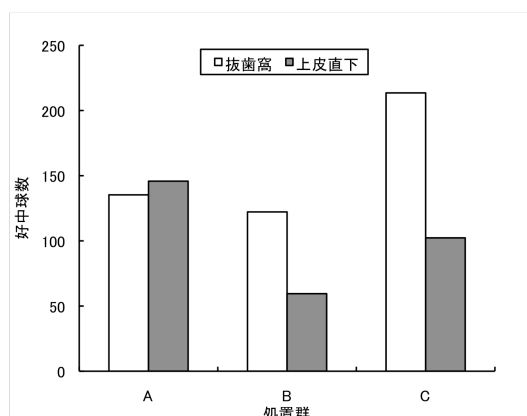


図7 組織標本で認められた好中球数（実験1）

実験2においては実験1と同様に抜歯窩直上では、徐放性ラクトフェリン材群において他群と比較し多く認められた（図8）。しかし、上皮直下の好中球数は他群と比較して明らかに低下していた。

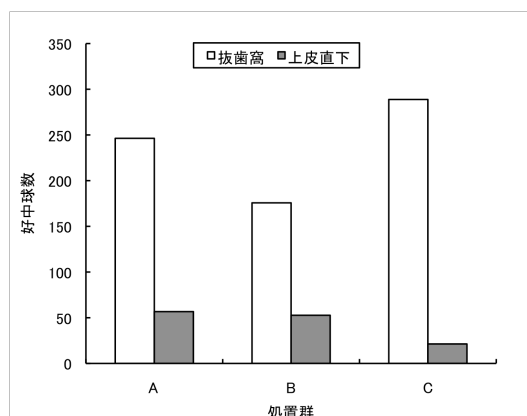


図8 組織標本で認められた好中球数（実験2）

本研究課題の結果から、調製した徐放性ウシラクトフェリン材をラット抜歯窩内に挿入すると創面直下の好中球数が減少し、新生骨の量も増加する傾向が認められた。しかし、解析に用いることが出来たラット数が非常に少なかったことが問題として挙げられる。今後は、ラット数を増加させ今回の所見の検証を行うと同時に当初予定していた免疫染色等も行う必要が考えられた。

## 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7件）

- 1) Tsutsumi, T., K. Nakashima, T. Isoda, M. Yokota and T. Nishihara, Involvement of adhesion molecule in *in vitro* plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide, J Periodontal Res 45(4): 550-556, 2010, 査読有
- 2) Saito S, Takayama Y, Mizumachi K, Suzuki C, Lactoferrin promotes hyaluronan synthesis in human dermal fibroblasts, Biotechnol Lett, 33(1): 33-39, 2011, 査読有
- 3) Nakamura S, Saitoh M, Yamazaki M, Nishimura M, Kurashige Y, Arakawa T, Takuma T, Kaku T, Abiko Y, Nicotine induces upregulated expression of beta defensin-2 via the p38MAPK pathway in the HaCaT human keratinocyte cell line, Med Mol Morphol, 43: 204-210, 2010, 査読有
- 4) Kasai H, Nakashima K, Yokota M, Nishihara T, The G1 cell cycle arrest of macrophages infected with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Oral Diseases, 16:305-309, 2010, 査読有
- 5) Saitoh M, Kurashige Y, Nishimura M, Igarashi S, Kaku T, Abiko Y, Expression of claudin-4 and -7 in porcine gingival junctional epithelium, Medical Molecular Morphology, 42: 212-215, 2009, 査読有
- 6) Yoshiharu Takayama and Koko Mizumachi, Effect of lactoferrin-embedded collagen membrane on osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells, J Biosci Bioeng, 107: 191-195, 2009, 査読有
- 7) 中島啓介, 湯本泰弘, 古市保志, ヒトラクトフェリンによるエンドトキシン作用の抑制, 歯界展望, 112: 726-727, 2008, 査読無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 啓介 (NAKASHIMA KEISUKE)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：80227785

### (2) 研究分担者

安彦 善裕 (ABIKO YOSHIHIRO)  
北海道医療大学・個体差医療科学  
センター・教授  
研究者番号：90260819  
高山 喜晴 (TAKAYAMA YOSHIHARU)  
農業・食品産業技術総合研究機構・  
畜産草地研究所・主任研究員  
研究者番号：00343989

(3) 連携研究者  
なし