

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18571

研究課題名（和文）3Dプリンタを応用した水平性骨欠損、根分岐部病変に対する歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of periodontal regenerative therapy for horizontal bone defects and furcation involvements using 3D printer technology.

研究代表者

福場 駿介（Fukuba, Shunsuke）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：50845625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周組織再生療法の予知性の向上の探索のため、さまざまな側面からの探索を行なった。具体的には後ろ向きコホート研究として歯周組織再生療法の予後に影響を与える要因の探索を行なった。新規成長因子としてFGF-18の検討、骨移植材として炭酸アパタイトの有効性を前臨床研究における検証から、臨床での有効性の確認をおこなった。ダイオードレーザーの歯周組織への影響についての網羅的な探索を行なった。また歯周炎に類似したインプラント周囲炎についても、骨補填材に違いによる炎症への抵抗性について検証を行なった。緊急事態宣言による実験期間の制限のため、3Dプリンタを用いた骨補填材の開発に関しては現状として不可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病で失われた組織は歯周組織再生療法によって改善できるものの、その予知性や効果は不均一である。そこで新たな成長因子や骨補填材、手術手技の向上として、線維芽細胞増殖因子-18や、炭酸アパタイト顆粒、ダイオードレーザーなどの有効性の検証を網羅的に行なった。どれも歯周組織再生療法の予知性を高める可能性を示唆するものであり、今後の歯周組織再生療法に対するアプローチに関する研究において一助となり、実際の臨床場面において、歯周炎患者へ還元できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To explore the improvement of predictability in periodontal tissue regeneration therapy, we conducted various investigations from different aspects. Specifically, we conducted a retrospective cohort study to explore factors that affect the prognosis of periodontal tissue regeneration therapy. We verified the effectiveness of FGF-18 as a new growth factor and the effectiveness of carbonate apatite as a novel bone graft material through preclinical research and confirmed their effectiveness in clinical practice. We conducted a comprehensive investigation into the impact of diode laser on periodontal tissue. We also examined the resistance of bone graft materials to inflammation caused by differences in peri-implantitis similar to periodontitis. Due to the limitations of the experimental period caused by the COVID-19 pandemic, it was currently impossible to develop bone graft materials using 3D printing technology.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：歯周組織再生療法 トランスレーショナルリサーチ 炭酸アパタイト ダイオードレーザー 臨床研究
FGF-2 FGF-18 インプラント周囲炎

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周炎によって失われた歯周組織も、適応症の範囲では歯周組織再生療法によって、比較的予知性を持って改善できるようになってきた。しかしながら、水平性骨吸収や根分岐病変3度など、適応外への歯周組織再生は未だ実現が困難な現状にある。そこで本研究計画では、この歯周組織再生療法の適応拡大を目指し、新たな治療法の探索を検討することとした。

2. 研究の目的

まずは歯周組織再生療法の予後に与える因子について、網羅的に探索することとした。その上で、歯周組織再生療法の可能性を広げるような成長因子FGF-18、低出力半導体レーザーの歯周治療への応用、骨補填材炭酸アパタイトの応用をした場合の形態学的、組織学的、そして臨床的有効性を評価することを目的とした。

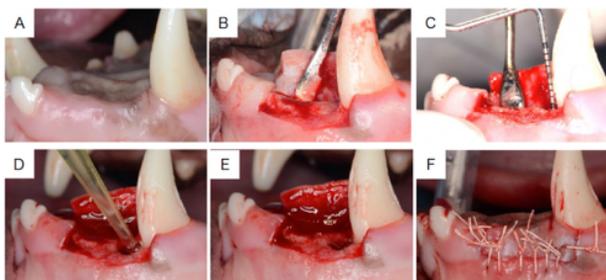
3. 研究の方法

(1) 歯周組織再生療法の予後に影響を与える因子の探索

歯周組織再生療法の予後向上のために、まずはどのような因子が臨床結果に影響を与えるか調査を行うこととした。歯周組織再生療法でその有効性が示されている線維芽細胞増殖因子 (FGF-2 製剤) を用いた歯周組織再生療法を行った症例のうち、3年間メンテナンスを継続している60症例を対象とした。プロービングポケット深さ(PPD)およびデンタルエックス線上で計測した骨欠損深さ(BDD)をアウトカムとし、BDDの3年間の変化量(Δ BDD)に影響を与える因子を探索した。

(2) 線維芽細胞増殖因子-18 (FGF-18) の歯周組織再生療法への応用

線維芽細胞増殖因子-18 (FGF-18) は、骨・軟骨形成において重要な役割を果たしている。FGF-18 は歯の原基に対し塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) よりも歯周組織形成を促進すること、また骨形成タンパク質-2 (BMP-2) の存在下において FGF-2 より強く骨再生を促進することが報告されている。そこで本研究では、FGF-18 の歯周組織再生における有効性を前臨床研究にて検証することを目的とした。1歳齢ビーグル雄成犬4頭の両側上顎第2、3前歯を抜歯した。12週の治療期間の後、両側上顎犬歯近心に3壁性骨欠損 (近遠心4mm×頬舌4mm×深さ5mm) を外科的に作製した。実験群では FGF-18、対照群では FGF-2 を欠損内に塗布した。2週間後に抜糸及び処置部位の消毒を行った。術後8週で標本採取を行い、micro-CTによる形態学的解析後、脱灰標本を作成後、光学顕微鏡による組織学的評価を行った。



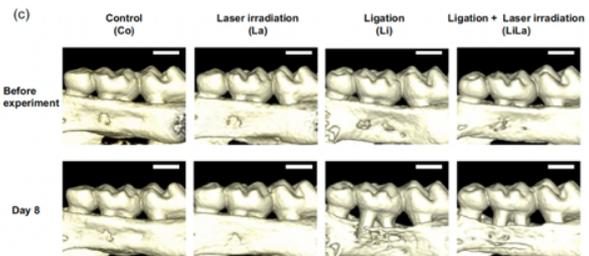
(3) 低出力半導体レーザーの歯周治療への応用

歯周治療において高出力半導体レーザーによる歯周ポケット治療や、低出力半導体レーザーによる Photobiomodulation (PBM) を用いた治療促進に関する研究が進められている。しかしながら歯肉や細菌に対する半導体レーザー照射による直接的な影響については未だ不明な点が多い。本研究では、結紮誘導歯周炎モデルマウスを用いて低出力半導体レーザー照射による歯周炎進行の抑制効果について明らかにすることを目的とした。9週齢の C57BL/6J 雄マウスの上顎右側第2臼歯に対して6-0絹糸を結紮した。実験群では結紮側に対して、波長910nmの半導体レーザーを結紮部より1mmの距離で、結紮後1、3、5日にそれぞれ0.2W、30 KHzで7分30秒照射 (総エネルギー量: 90J) を行った。歯周炎による骨吸収量を評価するため、結紮前、結紮

後 5、8 日で micro-CT 撮影を行った。次に結紮後 8 日でレーザー照射した結紮糸と非照射の結紮糸を除去し、それぞれの結紮糸より DNA を抽出、ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーを用いた 16S rDNA 解析を行った。細菌叢の違いを Principal Coordinate Analysis およびクラスタ解析により分析し、細菌間のネットワーク構造の違いを SparCC value を基に Cytoscape にて可視化し評価した。結紮 3 日後に上顎第二臼歯の結紮周囲歯肉を採取し、total RNA を抽出し、RNA-Seq を行い遺伝子発現に関して網羅解析を行った。また、RNA-Seq により得られた発現変動遺伝子に関して、結紮 8 日後での qPCR による遺伝子発現量を比較検討した。

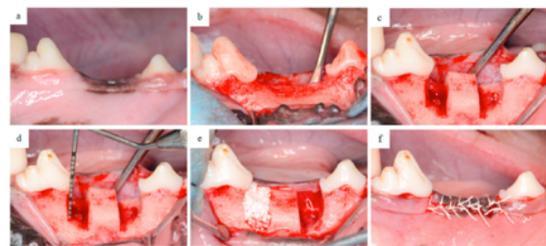
(4) 炭酸アパタイト骨補填材を用いた歯周組織再生療法の形態学的、組織学的評価

生体骨の主要構成成分はリン酸カルシウム的一种であるハイドロキシアパタイトであるが、その水酸基が一部、炭酸基に置換した炭酸アパタイトも存在し、生体内において破骨細胞による吸収が認められ、骨に置換されることが知られている。



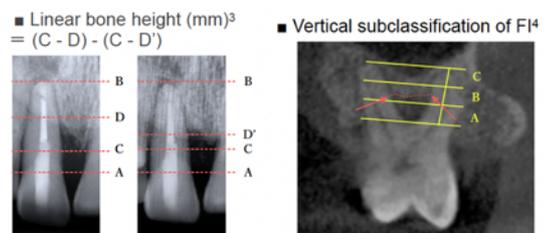
*In vivo*での骨欠損モデルや上顎洞底挙上術を用いた臨床研究における有効性は報告されているが、歯周組織への影響について述べた報告は少ない。そこで本研究では、炭酸アパタイトの歯周組織再生療法における効果を

イヌ 1 壁性骨欠損モデルを用いて形態学的、組織学的に評価することを目的とした。1 歳齢ビーグル雄成犬 4 頭の両側下顎第 2、4 前臼歯を抜歯した。12 週の治癒期間の後、両側化学第 2 前臼歯遠心、第 4 前臼歯近心に 1 壁性骨欠損 (頬舌 4mm×深さ 5mm) を外科的に作製した。実験群では炭酸アパタイト、陽性対照群ではβ三リン酸カルシウムの填入、陰性対照群では欠損作成のみを行なった。術後 8 週で標本採取を行い、micro-CT による形態学的解析後、脱灰標本を作成後、光学顕微鏡による組織学的評価を行った。



(5) 炭酸アパタイト骨補填材を用いた歯周組織再生療法の臨床的評価

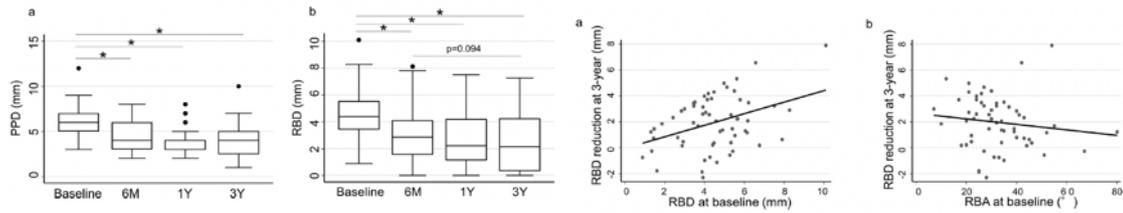
炭酸アパタイト顆粒を用いた臨床研究において、上顎洞底挙上術での安全性、有効性は報告されているが、歯周組織再生療法への有効性を評価した報告はない。そこで本研究では垂直性骨欠損、根分岐部病変Ⅱ度、Ⅲ度の骨欠損を有する歯周炎患者に対して炭酸アパタイトを用いた歯周組織再生療法の有効性を評価することを目的とした。選択基準、除外基準に合致し、研究参加への同意が得られた歯周炎患者 7 症例 (垂直性骨欠損 3 症例、根分岐部病変 2 度 2 症例、根分岐部病変 3 度 2 症例) に対して炭酸アパタイト顆粒を用いた歯周組織再生療法を行い、その臨床的有効性を評価した。



4. 研究成果

(1) 歯周組織再生療法の予後に影響を与える因子の探索

術前のPPDは 6.07 ± 1.92 mmであり、術後1年で 3.72 ± 1.42 mm、術後3年で 4.00 ± 1.88 mmと術前と比較して有意に改善した(それぞれ $p < 0.001$)。BDDは術前の 4.46 mmから1年後、3年後はそれぞれ 2.73 ± 1.90 mm、 2.51 ± 2.15 mmへ有意に改善した(それぞれ $p < 0.001$)。ΔBDDに影響を与える因子として、ΔBDDと術前のBDDに有意な正の相関を認め($\rho = 0.27$, $P = 0.04$)、ΔBDDと術前の骨欠損角度には負の相関($\rho = -0.22$, $P = 0.09$)の傾向が見られた。さらに多重線形回帰分析より、年齢、性別、骨欠損形態、骨欠損角度で補正を行っても、術前のBDDはΔBDDに対して有意に影響を与えることが示された(偏回帰係数: 0.49, 95%信頼区間: 0.19-0.79, $P = 0.002$)。FGF-2製剤を用いた歯周組織再生療法は術後3年の長期的評価において、術後1年に観察された有意なPPDの改善、エックス線上の骨欠損深さの改善は3年後も維持されていた。さらに、術前の骨欠損深さは術後の骨欠損回復量に影響を与える因子であることが示された。



Factors affecting RBD gain at 3-year examination.

	Univariate model			Multivariate model ^a		
	Coef.	95% CI	p-value	Coef.	95% CI	p-value
Age (year)	-0.02	-0.06 to 0.02	0.35	-0.02	-0.06 to 0.02	0.35
RBD at baseline (mm)	0.48	0.19 to 0.77	0.002	0.48	0.17 to 0.78	0.003
RBA at baseline (mm)	-0.003	-0.041 to 0.036	0.89	-0.007	-0.044 to 0.030	0.71
Furcation involvement	None or Degree 0	Reference		Reference		
	Degree 1 or	0.13	-1.34 to 1.61	0.19	-1.39 to 1.77	0.81
Defect morphology	Containing	Reference		Reference		
	Non-containing	-0.04	-1.25 to 1.17	-0.12	-1.41 to 1.16	0.85

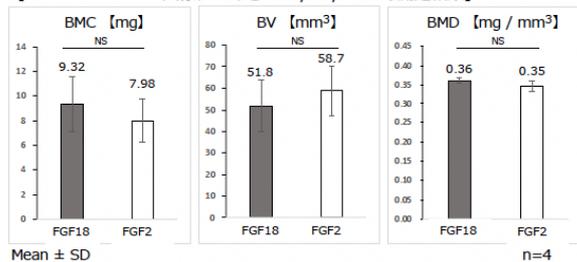
Coef, coefficient; CI, confidence interval; RBA, radiographic bone defect angle; RBD, radiographic bone defect depth.

^a Adjusted for all covariates.

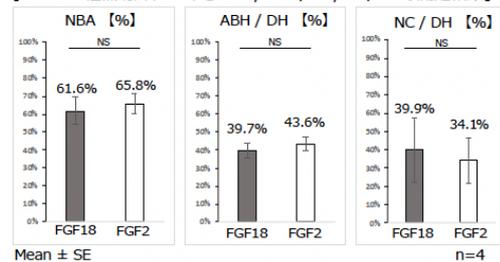
(2) 線維芽細胞増殖因子-18 (FGF-18) の歯周組織再生療法への応用

術後の歯肉腫脹、排膿、膿瘍形成等の合併症は全ての欠損において認められず治癒は良好であった。micro-CT 上において両群ともに欠損作成部位の新生骨の形成を認めた。欠損作成部位の新生骨の骨体積及び骨塩量において両群に有意差は認められなかった。欠損中央を断面とする組織切片上でFGF-18群における新生骨・新生セメント質を認めた。本研究結果から歯周組織再生においてFGF-18による新生骨形成および新生セメント質形成を認め、その効果はFGF-2と同等である可能性が示唆された。

【Table1. micro CT画像におけるBMC, BV, BMDの測定結果】

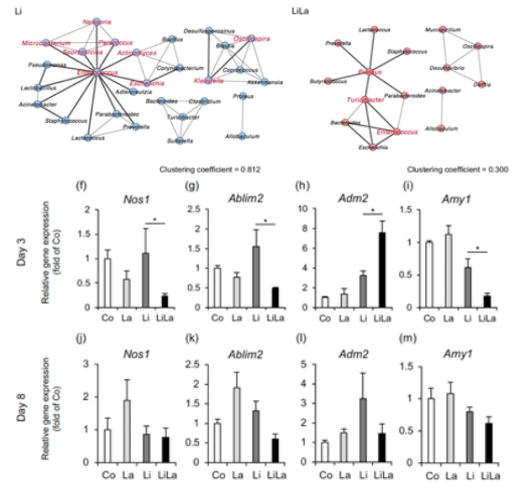


【Table2. 組織切片におけるNBA, ABH/DH, NC/DHの測定結果】



(3) 低出力半導体レーザーの歯周治療への応用

micro-CT 解析において、結紮後 8 日では歯根 1/2-1/3 程度の骨吸収が生じることが明らかになった。また、レーザー照射群においては結紮後 8 日で骨吸収量が有意に抑制された。結紮系より抽出された DNA 量は、非照射群と比較してレーザー照射群では減少していた。細菌叢の多様性と組成は、レーザー照射した結紮系と照射していない結紮系の間では有意な差は認められなかったものの、細菌間のネットワーク構造に変化が認められた。結紮誘導歯周炎モデルマウスにおいて、低出力半導体レーザー照射による宿主応答や細菌への影響により、歯周炎の進行が抑制できる可能性が示唆された。本研究により、積極的な歯周治療での介入が難しい歯周炎患者に対して、低出力半導体レーザーを用いることにより、細菌叢や免疫応答を制御し、歯周炎の進行抑制および予防が出来る可能性が示された。



(4) 炭酸アパタイト骨補填材を用いた歯周組織再生療法の形態学的、組織学的評価

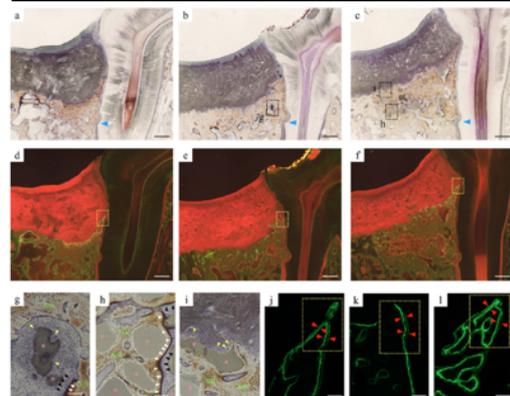
術後の歯肉腫脹、排膿、膿瘍形成等の合併症は全ての部位において認められず治癒は良好であった。micro-CT 上において全ての群において欠損作成部位の不透過性の亢進を認めた。新生骨高さおよび新生セメント質の長さに関して炭酸アパタイト群は陰性対照群より大きな値を示す傾向を認めたものの、有意な差は認めなかった。新生骨面積に関して炭酸アパタイト群は陰性対照群より大きく、有意な差を認めた。残存顆粒面積に関して炭酸アパタイト群は陽性対照群より大きく、有意な差を認めた。全ての群において新生骨および新生セメント質の間に新生歯根膜を認めた。本研究結果から炭酸アパタイトを用いた歯周組織再生の有効性が示唆された。

Histological analysis of residual granule measurements.

Parameter	β-TCP	CO ₃ Ap
Ratio of residual granules (%)	2.4 ± 4.7	12.2 ± 10.3
Bone contact percentage (%)	10.5 ± 9.5	62.5 ± 21.3*

Bone histomorphometric analysis.

Parameter	Control	β-TCP	CO ₃ Ap	Statistically significant differences
MAR (μm/day)	3.14 ± 0.46	4.82 ± 1.11	5.13 ± 1.23	NS



(5) 炭酸アパタイト骨補填材を用いた歯周組織再生療法の臨床的評価

全ての症例において術後の著明な炎症や感染は認められなかった。炭酸アパタイトを用いた歯周組織再生療法後 36 週において、平均的な PPD 減少量、CAL 獲得量はそれぞれ 5.0 ± 1.0 mm、4.7 ± 1.2 mm (垂直性骨欠損)、4.5 ± 0.7 mm、4.5 ± 0.7 mm (根分岐部病変 II 度)、1.5 ± 0.7 mm、0.0 mm (根分岐部病変 III 度) であった。また垂直性骨欠損においてデンタルエックス線写真上で 2.41 ± 0.51 mm の新生歯槽骨の増加を認め、先行研究と比較しても同等であった⁶。根分岐部病変 II 度に対しては完全な分岐部閉鎖は達成されなかったものの、SubclassB から A へと垂直的な骨吸収の改善を認めた。本研究において垂直性骨欠損および根分岐部病変 II 度に対する炭酸アパタイトを用いた歯周組織再生療法の有効性が示唆された。

Subject	1	2	3	4			
Age/Sex	69/M	35/F	79/F	65/M			
Smoking	No	No	No	No			
DM	No	No	No	No			
Tooth location (FDI)	#11 MB	#16 MB	#24 DB	#16 B	#36 M	#46 BL	#47 BL
Defect Type	1-2wall	1-2wall	2-3wall	F1	F1	F1	F1
PPD baseline (mm)	7	8	9	10	7	6	7
PPD 36w (mm)	3	3	3	5	3	4	6
CAL baseline (mm)	10	8	9	10	7	8	9
CAL 36w (mm)	6	4	3	5	3	8	9
BOP baseline	-	-	+	+	+	-	+
BOP 36w	-	-	-	-	-	-	+
Mobility baseline	1	0	0	0	0	0	1
Mobility 36w	1	0	0	0	0	0	1
Linear bone height (mm)	2.41	1.92	2.94				
Subclass				B-A	B-A	B-B	B-B

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 0件）

1. 著者名 Sato Ryo, Matsuura Takanori, Akizuki Tatsuya, Fukuba Shunsuke, Okada Munehiro, Nohara Kohei, Takeuchi Shunsuke, Hoshi Shu, Ono Wataru, Maruyama Kiichi, Izumi Yuichi, Iwata Takanori	4. 巻 8
2. 論文標題 Influence of the bone graft materials used for guided bone regeneration on subsequent peri-implant inflammation: an experimental ligature-induced peri-implantitis model in Beagle dogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry	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) 10.1186/s40729-022-00403-9	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 Saida Hiroyuki, Fukuba Shunsuke, Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Iwata Takanori, Nitta Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Two-stage approach for class II mandibular furcation defect with insufficient keratinized mucosa: a case report with 3 years' follow-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of International Medical Research	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) 10.1177/03000605211044595	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 Nohara Kohei, Itoh Soichiro, Akizuki Tatsuya, Nakamura Miho, Fukuba Shunsuke, Matsuura Takanori, Okada Munehiro, Izumi Yuichi, Iwata Takanori, Yamashita Kimihiro	4. 巻 108
2. 論文標題 Enhanced new bone formation in canine maxilla by a graft of electrically polarized tricalcium phosphate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 2820 ~ 2826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34612	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 -

1. 著者名 Fukuba Shunsuke, Akizuki Tatsuya, Matsuura Takanori, Okada Munehiro, Nohara Kohei, Hoshi Shu, Shujaa Addin Ammar, Iwata Takanori, Izumi Yuichi	4. 巻 56
2. 論文標題 Effects of combined use of recombinant human fibroblast growth factor 2 and tricalcium phosphate on ridge preservation in dehiscence bone defects after tooth extraction: A split mouth study in dogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 298 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12818	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 -

1. 著者名 Fukuba Shunsuke, Okada Munehiro, Nohara Kohei, Iwata Takanori	4. 巻 14
2. 論文標題 Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14051096	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 -

1. 著者名 福場駿介、 岩田隆紀	4. 巻 39
2. 論文標題 テルフィールを用いた歯周組織再生療法の実践	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DE 日本理工会誌	6. 最初と最後の頁 25-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大杉勇人, 畑佐将宏, 下平 剛, 芝 多佳彦, 駒津匡二, 土谷洋輔, 福場駿介, 前川祥吾, 新見ひろみ, 森田和機, 片桐さやか, 岩田隆紀, 青木 章
2. 発表標題 結紮誘導歯周炎モデルマウスを用いた ダイオードレーザー照射による歯周炎抑制効果
3. 学会等名 第33回日本レーザー歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 竹内 俊介, 岡田 宗大, 福場 駿介, 松浦 孝典, 秋月 達也, 野原 康平, 佐藤 諒, 土居 洋文, 今村 亨, 井関 祥子, 青木 章
2. 発表標題 イヌ 3 壁性骨欠損モデルにおける線維芽細胞増殖因子 - 18 による歯周組織再生効果
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 福場駿介
2. 発表標題 矯正治療後の前歯部歯肉退縮に対して審美的改善を図った一症例
3. 学会等名 第 8 9 回関東支部教育研修会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福場駿介	4. 発行年 2021年
2. 出版社 デンタルダイヤモンド	5. 総ページ数 6
3. 書名 【GPが知っておきたいペリオドントロジー最新トピックス】ここまでできる歯周組織再生療法 エムドグインとリグロスの基礎知識とその比較	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------