

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463211

研究課題名(和文)空間的ドラッグデリバリーシステムによる成長因子複合移植法の開発

研究課題名(英文)The development of the implant method by the combination of growth factor using spatial drug delivery system

研究代表者

齋藤 恵美子 (SAITO, Emiko)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80374528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周組織再生量の増大をはかる目的で、成長因子の担体の構造が歯周組織再生に与える影響及びBMPとFGF、EMDの新規併用法(Double layer method)の有効性を検索した。その結果、内径200～400μmのハニカム構造を有するコラーゲンは、トンネル方向が細胞増殖を調整する可能性が示唆された。さらに、BMPとFGFならびにBMPとEMDのDouble layer methodは、混合または単独の場合よりも、新生骨と新生セメント質の形成量の増大がみられ、異常治癒を抑制した。以上の結果から、Double layer methodが歯周組織再生に有効である可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effect of the combination of BMP, FGF and EMD, and the effect of honeycomb structure of carrier used when the growth factor was implanted with the aim of increase of periodontal regeneration. This study suggested that the collagen having honeycomb structure of an inner diameter of 200-400μm could adjust the induction of the cells depending on the tunnel direction. Additionally, the new bone formation and cementum formation of the double-layer implantation method consisting of both BMP-2-containing carrier and FGF-2-containing carrier or EMD applying were larger than that of the complex implantation method of BMP-2, FGF-2 and EMD and BMP-2 or FGF-2 or EMD only implantation method. The aberrant healing like ankylosis was inhibited, too. From the above results, this study suggested that implantation method of the double-layer using both BMP-2-containing carrier and bFGF-2-containing carrier or EMD applying could enhance periodontal regeneration.

研究分野：歯周治療学

キーワード：水平性骨欠損 BMP FGF EMD ハニカムコラーゲン

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生療法は様々な研究が行われている分野で、特に水平性骨欠損に対する再生療法の開発は臨床的ニーズがますます高まっている重要な課題である。歯周組織の再生は、一般に結合組織性付着の獲得を目標とするが、水平性骨欠損のような広い骨欠損の場合には、歯槽骨を歯冠側へ向かって再生させることも重要であると考えられる。しかしながら現在まで、歯冠側に骨形成を誘導したと報告された成長因子は、Bone Morphogenetic Protein (BMPs)のみである。しかし同時に BMPs は骨性癒着、根吸収などの異常治癒の報告もあった。

我々は、以前 BMP の新しい移植法としてスパーサー法を考案して、この移植法は異常治癒を抑制することが可能であると報告したが、再生量は歯冠側へ 1mm 程度であり、臨床応用のためには、歯周組織再生量の増大が必要であると考えた。

そこで我々はスパーサー法を発展させて BMP に、Fibroblast Growth Factor (FGF) または Enamel Matrix Derivative (EMD) を組み合わせる移植法として、新しくダブルレイヤー法を提案した。

また一般に、成長因子を用いるには担体が必要とされる。担体には、成長因子の徐放性のほか、細胞の足場、スペースメイキングなどの役割があると報告されている。本研究ではまず BMP、FGF の徐放性等からコラーゲンが有効であろうと推測した。次に細胞の足場、スペースメイキングについては、我々は以前、度の根分岐部欠損をもちいて β TCP のトンネル構造の有効性を検索し、トンネル構造が、血管の増殖、拡散(進展)を促進して、再生量を増大することを報告した。しかしトンネル構造を持つハニカムコラーゲンについて、歯周組織欠損モデルを用いた歯周組織再生に関する検索は、まだ行なわれていない。

2. 研究の目的

本研究は、

ハニカムコラーゲンの水平性骨欠損モデルに対する歯周組織再生の有効性について

BMP と FGF または EMD のダブルレイヤー法の有効性、特に成長因子を混合して用いた場合との比較についての 2 課題を目的とした。

3. 研究の方法

(1)担体の構造が歯周組織再生へ与える影響についての検索

気孔径 200 ~ 400 μ m のハニカム構造を有するコラーゲンを用いた。

ビーグル犬の上下顎前歯部に歯槽骨を骨頂より 4mm 削除して水平性骨欠損モデルを作製した。その後、以下の 3 群に分け処置を行った。

実験群(N=10) ハニカム構造コラーゲンをトンネル方向が歯軸に平行に移植した。

対照群(N=10) ハニカム構造コラーゲンのトンネル方向が歯軸と垂直で、かつ近遠心側に開口するように移植した。

コントロール群(N=10) 何も移植を行わなかった。

移植後、全層弁を復位して縫合した。

観察期間を 12 週とした。評価方法は、通法に従って、病理組織標本を作製して、病理学的観察及び組織計測を行った。統計学的分析は、Kruskal-Wallis test を用いた。

(2)BMP と FGF あるいは EMD を組み合わせることによる歯周組織再生に与える影響の検索

実験部位はビーグル犬 8 頭の上下前歯 90 歯を用いた。水平性骨欠損は前歯の CEJ より高さ 4mm の歯槽骨を削除して外科的に作製し、露出根面はスケーリング・ルートプレーニングを行なって、歯根膜とセメント質を除去した。その後、以下の 9 群に分けて処置を行った。

1) 以下の 4 群に対しては 24%EDTA にて根表面を 3 分間処理、水洗した後に処置を行った。

(1)EB-DL 群(N=10) 根面にエムドゲインゲル(4.0 μ l)を塗布後、その上に BMP-2(4.0 μ l)を配合したコラーゲン膜(3 \times 3 \times 3 mm)の移植を行った。

(2)EB-M 群(N=10) エムドゲインゲル(4.0 μ l)と BMP-2(4.0 μ l)を混和した後、コラーゲン膜(3 \times 3 \times 3 mm)に配合して移植した。

(3)E 群(N=10) 根面にエムドゲインゲル(4.0 μ l)を塗布した後、コラーゲン膜(3 \times 3 \times 3 mm)の移植を行った。

(4)EF-DL 群(N=10) 根面にエムドゲインゲル(4.0 μ l)を塗布後、その上に FGF-2(4.0 μ l)を配合したコラーゲン膜(3 \times 3 \times 3 mm)の移植を行った。

2) 以下の 5 群は 24%EDTA による根表面処理を行わずに処置を行った。

(5)FB-DL 群(N=10) bFGF-2(2.0 μ l)をコラーゲン膜(3 \times 3 \times 1mm)に配合して移植後、その上に BMP-2(4.0 μ l)をコラーゲン膜(3 \times 3 \times 2 mm)に配合して移植を行った。(double layer 法)

(6)FB-M 群(N=10) bFGF-2(2.0 μ l)と BMP-2(4.0 μ l)を混和した後、コラーゲン膜(3 \times 3 \times 3 mm)に配合して移植した。

(7)B 群(N=10) BMP-2(4.0μl)を配合したコラーゲン膜(3×3×3 mm)の移植を行った。

(8) F 群(N=10) bFGF-2(4.0μl)を配合したコラーゲン膜(3 × 3 × 3 mm)を移植した。

(9)C 群(N=10)は、根面にコラーゲン膜(3 × 3 × 3 mm)の移植を行った。

その後、歯肉弁を復位縫合した。観察期間は、8 週とした。評価方法は、通法に従い、病理組織標本を作製して、HE 染色後に病理学的観察および組織計測を行った。統計学的分析は、Kruskal-Wallis test を用いた。

4. 研究成果

(1)担体の構造が歯周組織再生へ与える影響についての検索

術後の治癒は、肉眼的にすべての部位でおおむね良好であり、歯肉の炎症もほとんど認められなかった。病理組織学的観察では、ハニカム構造コラーゲンをトンネル方向が歯軸に平行に移植した実験群は、新生骨が 24.79% であり、ハニカム構造コラーゲンのトンネル方向が歯軸と垂直で、かつ近遠心側に開口するように移植した比較群よりも有意に大きく、また、新生セメント質の形成量も有意に大きかった。しかしながら、わずかではあるが、骨性癒着が観察された。

これまでの研究報告から、コラーゲンは生体親和性が高く、欠損部へ移植することによって、周囲組織からの細胞増殖のための足場として働くと考えられている。しかし、水平性骨欠損の場合、成長因子を配合せずにコラーゲン単独で移植を行った後の再生は僅かであると報告されていた。それに対して本研究で用いたハニカムコラーゲンは、歯軸方向に移植された場合、欠損底部の既存骨、歯根膜から細胞と血管が歯冠側方向へ増殖し、新生セメント質および新生骨の形成が促進される可能性を認めた。さらに、限局的にはあるが、骨性癒着が認められるほど骨が再生した。以上の結果より、水平性骨欠損部に対して、ハニカムコラーゲンが歯周組織再生に有効である可能性が示唆された。今後さらにハニカム構造による組織誘導のメカニズムを解明し、より再生に適した担体を開発することが重要と考えられる。

Histometric analysis of periodontal healing (Group mean ± SD in percentage)

| | 実験群 | 比較群 | 対照群 |
|------------|----------------|------------------|------------------|
| 上皮のダウングロース | 59.25 ±7.13 | 77.07 ±8.95** | 77.62 ±8.27** |
| 新生セメント質 | 14.86 ±7.08 | 1.66 ±2.19** | 0.88 ±1.42** |

| | | | |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|
| 新生骨 | 24.79 ±12.78 | 1.15 ±1.62** | 0.01 ±1.18** |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|

** Significantly different from experimental group (P <0.01);

Kruskal-Wallis test; statistical differences between the three groups.

(2)BMP と FGF あるいは EMD を組み合わせることによる歯周組織再生に与える影響の検索

(1)と同様に術後の治癒は、肉眼的に歯肉の炎症もほとんど認められず、概ね良好であった。

セメント質の形成量は、double layer 法で移植した FB-DL 群、EB-DL 群が、コントロールならびに成長因子を単独で移植した群、さらに混合法で移植した群に比べて、いずれも有意に大きかった。なお FB-DL 群、EB-DL 群では有意差は認められなかった。

新生骨の高さは、FB-M 群がもっとも多く形成が認められ、ついで FB-DL 群、EB-DL 群、EB-M 群で多く形成が認められた。

骨性癒着は B 群、EB-M 群、FB-M 群に認められた。

以上の結果より、BMP-2 と EMD の Double-layer 法および BMP-2 と FGF-2 の Double-layer 法は、いずれも単独での移植や混合して移植を行うよりも、歯周組織再生量を増大することが示唆され、Double-layer 法の有効性が明らかになった。

Double-layer 法による歯周組織が増大したメカニズムについては、エムドゲイン、FGF-2 とともに根面の歯根膜細胞の増殖を促進して、セメント質の形成量を増大するとともに、さらにエムドゲイン、FGF-2 とともに骨欠損部への細胞供給を促進したことによって BMP-2 による骨形成の増大につながったのではないかと示唆された。

また、BMP-2 と FGF-2 を混合して移植すると骨再生量が増大した結果より、混合法は、歯槽骨形成術への臨床応用が有効ではないかと推測された。このメカニズムについては FGF-2 が血管と細胞増殖を誘導して、BMP の作用が担体内全体に働く環境が整ったためと考えられた。

本研究の結果、成長因子を組み合わせる移植を行う場合には、用いる成長因子の種類、組み合わせ方、さらにその移植法が再生に影響を与える可能性が示唆され、その 1 方法として Double-layer 法が有効であり、今後、より詳細な検索が必要と思われた。

Histometric analysis of periodontal healing (Group mean ± SD in percentage)

| | | |
|-----------|--------------------------|-----------------------|
| Parameter | Downgrowth of epithelium | Cementum regeneration |
|-----------|--------------------------|-----------------------|

| | | |
|-------------|------------|---------------|
| C group | 82.9±8.6 | 4.2±5.0 |
| E group | 24.9±8.7a | 38.2±11.2abc |
| F group | 30.6±8.5a | 34.5±12.1abc |
| B group | 27.9±6.6a | 5.9±7.8 |
| EF-DL group | 29.7±6.4a | 35.2±6.9abc |
| EB-M group | 28.6±10.1a | 11.1±10.8 |
| EB-DL group | 23.9±10.2a | 61.6±7.8abcd |
| FB-M group | 28.9±8.3a | 7.6±7.4 |
| FB-DL group | 28.7±9.8a | 59.1±10.4abcd |

| Parameter | Bone regeneration | ankylosis |
|-------------|-------------------|-----------|
| C group | -1.4±4.4 | 0.0±0.0cd |
| E group | 1.6±2.0 | 0.0±0.0cd |
| F group | 9.4±14.7 | 0.0±0.0cd |
| B group | 27.1±18.4a | 4.8±8.2cd |
| EF-DL group | 4.6±5.6 | 0.0±0.0cd |
| EB-M group | 31.7±10.8ae | 6.0±10.3 |
| EB-DL group | 40.5±5.1ae | 0.0±0.0cd |
| FB-M group | 73.1±11.9abefg | 18.1±16.3 |
| FB-DL group | 61.5±9.0aefg | 0.0±0.0cd |

a Statistically significant difference compared to C group (P <0.01).

b Statistically significant difference compared to B group (P <0.01).

c Statistically significant difference compared to M-FB group (P <0.01).

d Statistically significant difference compared to M-EB group (P <0.01).

e Statistically significant difference compared to E group (P <0.01).

f Statistically significant difference compared to F group (P <0.01).

g Statistically significant difference compared to EF-DL group (P <0.01).

Kruskal-Wallis test

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. Akira Saito, Emiko Saito : Influence of root conditioning prior to EMD application on periodontal ligament cells of extracted teeth. **Oral Health and Dental Management** 13:543-547.(2014)(査読有)
2. Akira Saito, Emiko Saito : The effect of EMD application for intentional replantation of periodontally involved

teeth in dogs. **Journal of Interdisciplinary Medicine and Dental Science**, online journal.(2014) (査読有)

3. Akira Saito, Emiko Saito : Healing Following Implantation of Root With Remaining Periodontal Ligament Cultured In Vitro. **Dentistry** 4, online journal (2014) (査読有)
 4. Akira Saito, Emiko Saito, Yasuo Ueda, Yoshihiro Shibukawa, Yoshiyuki Honma, Tomomi Takahashi, Mariko Kimura, Yoshinori Kuboki, Hiroshi Kato : Effect of Tunnel Structure of β -TCP on Periodontal Repair in Class III Furcation Defects in Dogs. **Biochem Development and Applications** 4, online journal(2014) (査読有)
 5. Emiko Saito : Periodontal healing following various implantation methods of BMP-2, bFGF-2 and EMD in circumferential defects. **Journal of Periodontology** 85:998-999(2014)(査読有)
 6. Emiko Saito, Akira Saito, Yoshihiro Shibukawa, Fumihiko Yuge, Masamitsu Kawanami. Ectopic Bone Formation after Implantation of Thermoreversible Gelation Polymer as a Carrier of Bone Morphogenetic Protein-2. **日歯保存誌** 57, 484-491(2014) (査読有)
 7. Akira Saito, Emiko Saito, Yoshinori Kuboki, Mariko Kimura, Toshinori Nakajima, Fumihiko Yuge, Tsuyoshi Kato, Yoshiyuki Honma, Tomomi Takahashi, Noboru Ohata: Periodontal regeneration following application of basic fibroblast growth factor-2 in combination with beta tricalcium phosphate in class III furcation defects in dogs, **Dental materials journal**32: 256-262 (2013)(査読有)
- [学会発表](計9件)
1. Emiko Saito, Akira Saito, Yoshihiro Shibukawa, Satoshi Inoue, Hiroshi Kato, Masamitsu Kawanami: Stress analysis under applying Lateral force in one direction or jiggling type to periodontally involved teeth by FEM. 第101回米国歯周病学会、2015年11月14-17日、オランダ市、米国。
 2. Akira Saito, Emiko Saito, Fumihiko Yuge, Hiroshi Kato, Taihiko Yamaguchi: Stress analysis on periodontium of sound teeth and teeth with reduced alveolar bone support model by FINITE ELEMENT METHOD. 第101回米国歯周病学会、2015年11月14-17日、オランダ市、米国。
 3. 齋藤恵美子、齋藤彰、加藤熙、川浪雅光 . 重度歯周炎罹患歯の二次性咬合性外傷に配慮して義歯補綴処置を行った一症

- 例．日本歯周病学会第 58 回春季学術大会、2015 年 5 月 14-16 日（土）幕張メッセ（千葉県・千葉市）、プログラムおよび講演抄録集 P 151、2015
4. 齋藤彰、齋藤恵美子、加藤熙．治療抵抗性歯周炎患者に対して再スケーリング時に抗菌薬を併用した後に歯周組織再生療法を行った一症例．日本歯周病学会第 58 回春季学術大会、2015 年 5 月 14-16 日（土）幕張メッセ（千葉県・千葉市）、プログラムおよび講演抄録集 P 138、2015
 5. 齋藤恵美子、齋藤彰、渋川義宏、弓削文彦、加藤熙、菅谷勉、川浪雅光：X 線 CT データを用いた破折歯の早期診断による保存治療の選択肢拡大の可能性．日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会（第 140 回）、滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール（滋賀県・大津市）、2014 年 6 月 19-20 日、プログラムおよび講演抄録集：198、2014．
 6. Emiko Saito, Akira Saito, Yoshihiro Shibukawa, Satoshi Inoue, Shigeru Takahashi, Hiroshi Kato, Yoshiyuki Honma, Tomomi Takahashi, Masamitsu Kawanami: Effect of honeycomb structure of collagen on periodontal repair in horizontal defects of dogs. 第 100 回米国歯周病学会、2014 年 9 月 19-22 日、サンフランシスコ市、米国.
 7. Akira Saito, Emiko Saito, Yoshihiro Shibukawa, Yasuo Ueda, Toshinori Nakajima, Fumihiko Yuge, Hiroshi Kato, Taihiko Yamaguchi: Compatibility of biomaterials created using 3D modeling using imaging data of periodontal defects acquired by X-ray CT. 第 100 回米国歯周病学会、2014 年 9 月 19-22 日、サンフランシスコ市、米国.
 8. 齋藤恵美子、齋藤彰、弓削文彦、中島利徳、上北広樹、川浪雅光：BMP とエムドゲインの併用が水平性骨欠損の歯周組織治癒に及ぼす影響．第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）、2013 年 6 月 28 日、プログラム抄録集：P225、2013．
 9. Emiko Saito, Akira Saito, Shigeru Takahashi, Fumihiko Yuge, Toshinori Nakajima, Hiroki Uekita, Yoshiyuki Honma, Tomomi Takahashi, Hiroshi Kato, Masamitsu Kawanami: Periodontal healing following various implantation methods of BMP-2, bFGF-2 and EMD in circumferential defects. 第 99 回米国歯周病学会、フィラデルフィア市、米国. 2013 年 9 月 28 日-10 月 1 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤恵美子 (SAITO, Emiko)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80374528

(2)研究分担者

高橋 茂 (TAKAHASHI, Shigeru)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：70241338

(3)連携研究者

齋藤 彰 (SAITO, Akira)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：20301913

高橋智美 (TAKAHASHI, Tomomi)
北海道大学・大学院歯学研究科・技術専門
職員
研究者番号：50399953