

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462871

研究課題名(和文) S-PRGフィラーを用いた新規歯周炎予防技術の開発

研究課題名(英文) The development of a novel preventive method of periodontal disease using S-PRG Filler eluate

研究代表者

小林 洋子(岩松洋子)(Iwamatsu-Kobayashi, Yoko)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50261524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：複合レジン成分であるS-PRGフィラーは、6種の金属イオンを放出することで蝕や歯周病原菌に対する抗菌性を有することが知られている。しかし、*in vivo*での歯周病予防に関する報告はない。本研究では、S-PRG抽出液のマウス歯周炎結紮モデルに対する効果を検討した。

C57BL/6マウスを、結紮なし、結紮あり、結紮ありS-PRG抽出液投与群の3つに分けた。その結果、S-PRG抽出液は明らかに歯周炎モデルの歯槽骨吸収を抑制し、炎症性細胞浸潤を抑制しており、特にボロンイオンの分布が確認された。以上のことから、S-PRG抽出液は抗炎症効果により歯周病の組織破壊を予防する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：S-PRG filler, a component of composite resin, is capable of releasing 6 metal ions that possess antibacterial activity against caries and periodontal pathogens. Although S-PRG has been suggested to be involved in oral disease prevention, no reports have been published regarding its preventive effect on periodontal disease *in vivo*. The present study investigated whether the eluate from S-PRG (S-PRG eluate) has a preventive effect on a mouse model of ligature-induced periodontal disease.

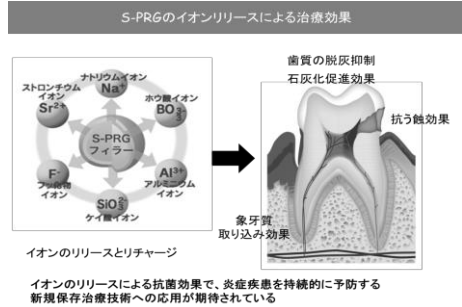
C57BL/6 mice were divided into three groups; no ligature, ligature and ligature with S-PRG eluate group. S-PRG eluate clearly inhibited alveolar bone loss of ligature-induced periodontal disease and reduced the infiltration of inflammatory cells. TOF-SIMS analysis revealed that more boron ions were present in the S-PRG group. Our results suggest that the S-PRG eluate has a preventive effect against tissue destruction in periodontal disease through its anti-inflammatory effects *in vivo*.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Periodontal disease Bone loss Inflammation S-PRG filler

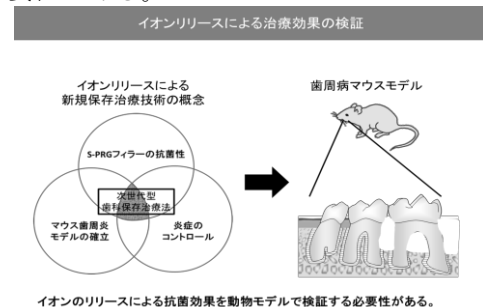
1. 研究開始当初の背景

S-PRG フィラーは、コンポジットレジンなどに配合することにより、フッ素、ストロンチウム、ホウ素、ナトリウム、アルミニウム、ケイ酸イオンを徐放・再取り込みが可能であり、これまでにイオンのリリースとリチャージ(Fujimoto Y et al, Dent Mater J, 2010)、歯質の脱灰抑制・石灰化促進効果(Mukai Y et al, Eur J Oral Sci, 2009, Ito S et al, J. Dent, 2011, Ma S et al, Dent Mater J, 2012)、抗菌性(Tanaka E & Yamamoto K, Dent Mater J, 2010)を示す事が報告されてきた。

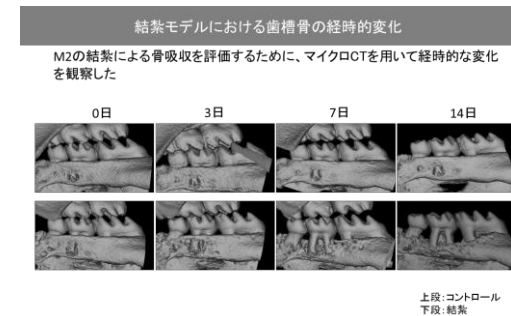


近年、このフィラーによるイオンリリースが歯根象牙質への取り込まれるため、抗菌作用を有する根管充填用シーラーとして応用できることも報告された (Han L & Okiji T, Dent Mater J, 2011)。従って、S-PRG フィラーはイオンのリリースによる抗菌効果で歯周病を含む口腔内の炎症疾患を持続的に予防するという、新しい保存治療技術の概念へと発展することが期待されている。

う蝕および歯周炎治療において、細菌活性を抑制するために、抗菌性歯科材料を含む様々な材料が開発されてきた。この中でS-PRG フィラーは、S. Mutans に対して、細胞増殖には影響を及ぼさないが、象牙質面の接着を抑えるためプラークの形成を阻害することが報告されている (Saku S et al, Dent Mater J, 2010)。また、P. Gingivalis の gelatinase 活性と F. Nucleatum の凝集反応を抑制することも確認されている (Yoneda M et al, Int J Dent, 2012)。これらの研究成果より、S-PRG フィラーは歯周病原菌の活性化を抑制することで、歯周炎を予防できる可能性を有しており、急速な超高齢社会を迎えた我が国でますますの増加が予測される歯周炎の新たな予防技術として発展することが期待される。その技術を確認するためには、S-PRG フィラーによるイオンリリースが、歯周炎に対して予防効果を示すかを検証する必要性がある。



歯周炎モデルとして、1) 歯周病原菌を歯肉に数日おきに局所投与しあるいは摂取させて歯肉へ菌を定着させるモデル、2) 結紮モデルによる歯肉溝に細菌を持続的に付着させる歯周炎を誘発するモデルがある。これらは共に歯肉に対する細菌感染により歯周炎を誘発するモデルだが、1) のモデルは歯周炎様の病態を示すまでに長時間かかる事が難点として挙げられてきた。一方、2) のモデルでは、短期間で歯周炎様の病態を引き起こすことができる (Branco-de-Almeida LS et al., J periodontol., 2012)。これまで、ラットを対象としていたが、近年、ラットと同様にマウスの第二臼歯に結紮を行う事で、迅速な骨吸収を伴う歯周病に類似したモデルの確立に成功した (Eskan MA et al., Nat Immunol., 2012)。このことにより、遺伝子組み換え動物を含む病態モデル実験への応用が可能となった。本モデルは、結紮した絹糸に細菌が付着することで歯周炎が惹起されることが知られており、当教室においても同モデルを用いて経時的な歯周組織の変化を観察した結果、歯周病と類似した病態を示すことが確認された。これらの研究成果より、マウス歯周炎モデルを用いることでS-PRG フィラーによる歯周炎予防効果を解析できる可能性が示された。



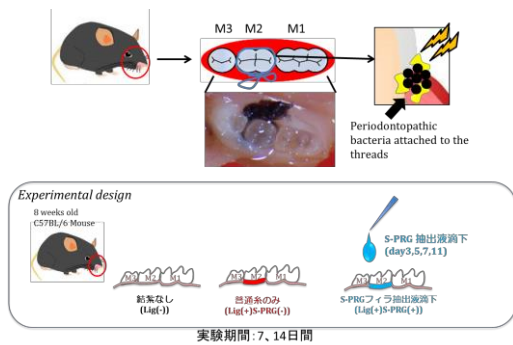
2. 研究の目的

本研究では、イオンリリース型の S-PRG フィラーを用いて新規歯周炎予防技術の開発を目指している。そのため S-PRG フィラーが、マウス歯周炎モデルを引き起こす病原菌に対して抗菌作用を示し、歯周炎の予防効果を示すかを解析する。具体的には、マウス歯周炎モデルとして絹糸を歯肉溝に結紮するだけの従来型と、一定期間結紮した絹糸を取り除き、その後の歯周組織の回復期間を設ける改良型を用い、S-PRG フィラーを投与する。S-PRG フィラーの投与方法に関しても、希釈して飲ませる方法とスキャホールドを利用する方法について検討する。術後、歯周炎に対する効果を経時的にマイクロCTならびに、抗炎症マーカーを用いた組織学的手法、免疫組織学的手法を用いて検討する。また、培養細胞を用いてイオンリリース型材料の抗炎症効果を解析する予定である。

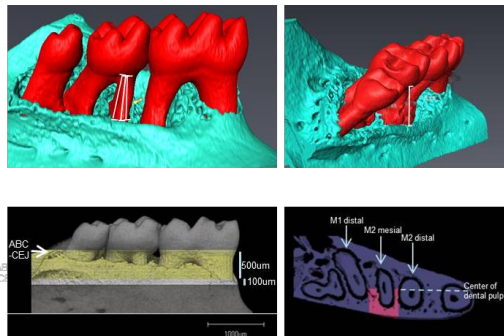
3. 研究の方法

(1) S-PRG フィラー抽出液の作製：S-PRG フィラー抽出液は、等量の蒸留水中で24時間、室温にて攪拌した後、濾過ならびに遠心により上清を分離することで作製した。各イオン濃度は、フッ素 110.5 ppm, ストロンチウム 103.5 ppm, ナトリウム 544.5 ppm, ホウ素 2001.1 ppm, アルミニウム 12.1 ppm, ケイ素 14.0 ppm だった。

(2) マウス歯周炎モデル：生体内で歯周炎を再現するために、生後8週齢の C57BL/6 マウス下顎第二臼歯歯肉溝に全身麻酔下で実体顕微鏡を用いて5-0 絹糸を挿入し、結紮した (Lig(+))S-PRG(-)群)。さらに、術後0,4,7,11 日後に S-PRG フィラー抽出液を結紮した絹糸に滴下した群を Lig(+))S-PRG(+))群とした。コントロールとして、絹糸を結紮しなかった群を Lig(-))群とした。手術7,14 日後に屠殺し、下顎を摘出し、マイルドホルムにて固定を行った。



(3) 画像解析：マイクロ CT を撮影し、骨吸収量を定量的に解析した。マイクロ CT は(株)クレハ分析センターに依頼し、3次元解析ソフト(AVIZO)を用いて解析した。



(4) 組織解析：試料を蟻酸-クエン酸脱灰し、通法に従い、厚さ 5 μ m のパラフィン連続切片を作成した。H-E 染色を施し、光学顕微鏡 (Leica CTR6000)にて観察した。また、炎症性細胞浸潤を検討するため、Ly6G (Abcam, UK) ならびに F4/80 (Abcam, UK) 抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。

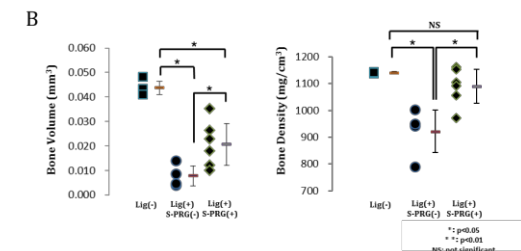
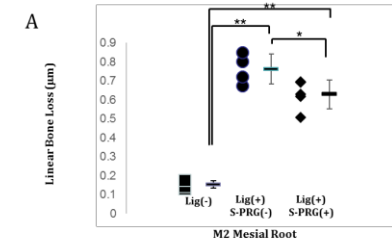
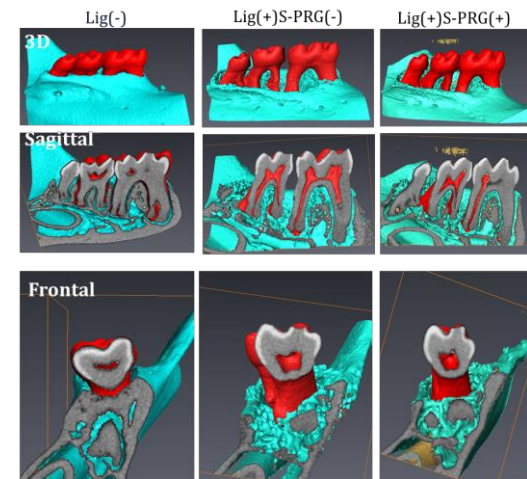
(5) TOF-SIMS 分析：摘出した下顎骨は非脱灰のまま樹脂包埋し、下顎第二臼歯の近遠心根が露出するまで研削したのち、耐水研磨紙 #1200 を用いて研磨した。TOF.SIMS5 (ION-TOF GmbH)を用いて Bunching mode

(High mass resolution mode)で組織上のイメージング分析を行った。一次イオン種には発生量の多い Bi⁺を選択し、エネルギー：25 keV, 電流：1.25 pA, 分析範囲：500 \times 500 μ m²と設定した。また、チャージ補正用電子銃を併用し、金属イオンのイオン化率を上げるため、O₂ パージを行いながら分析した(真空度 2.0E⁻⁶mbar)。

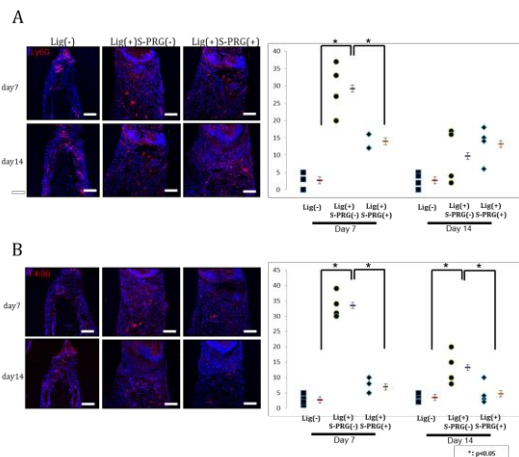
(6) S-PRG フィラーの効果を単純化するため、ヒト由来骨芽細胞を用いて、各種起炎症因子を添加し、フィラーの有無によって炎症性サイトカインの発現がどのように変化するかに関して検討した。

4. 研究成果

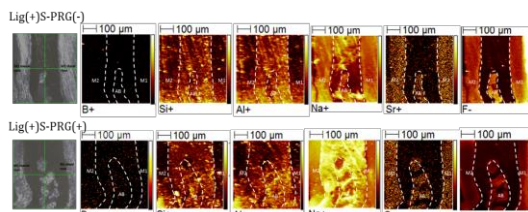
(1) 画像解析：下顎第二臼歯結紮による歯周炎誘発を解析するため、マイクロ CT を用いて観察したところ、術後14 日において、S-PRG フィラー抽出液を滴下した Lig(+))S-PRG(+))群では、S-PRG フィラー抽出液を滴下しなかった Lig(+))S-PRG(-))群と比較して有意な歯槽骨吸収の抑制が観察された。



(2) 組織解析：H-E 染色の結果から、マウス歯周炎モデルにおいて、第二臼歯周囲ならびに第二臼歯分岐部の歯槽骨に吸収がみられ、歯根上部の歯根膜線維配列の乱れと炎症性細胞浸潤が観察され、歯周組織の全体的な破壊が確認された。Lig(+)**S-PRG(+)**群では、Lig(+)**S-PRG(-)**群と比べて、いずれの破壊程度も軽度であった。また、免疫組織学的検討の結果、Ly6G 陽性好中球ならびに F4/80 陽性マクロファージとも、特に術後 7 日において **S-PRG** フィラー抽出液を投与することでその浸潤が抑制されていた。



(3) TOF-SIMS 分析により第二歯根周囲の組織上で、**S-PRG** フィラーに含まれる 6 つのイオンの解析が可能であった。特に Lig(+)**S-PRG(+)**群では、Lig(+)**S-PRG(-)**群と比べて、ボロンイオンのシグナル分布の範囲が広がった。



(4) *in vitro* の解析を行うため、ヒト由来骨芽細胞を用いて炎症性サイトカインの 1 つである **TNF- α** を投与したときの I 型コラーゲン遺伝子発現を調べたところ、**S-PRG** フィラー抽出液を投与することで I 型コラーゲンの発現上昇がみられた。また、**TNF- α** 投与により下流の炎症性サイトカインである **MMP-9** の上昇を抑制することがわかった。

以上のことから、**S-PRG** 抽出液は抗炎症効果により歯周病の組織破壊を予防する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Iwamatsu-Kobayashi Y., Saito M. et al., Metal ions from **S-PRG** filler have the potential to prevent periodontal disease, *Clinical and Experimental Dental Research*, 査読有、3 巻、2017 年、印刷中

(2) Orimoto A., Saito M. et al., F-spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of **TGF β** activity, *Archives of Oral Biology*, 査読有、79 巻、2017 年、7-13

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.02.019>

(3) 遠藤直樹、小林洋子、他、新規チタン製バリアメンブレンの各種培養細胞への効果、*日本歯科保存学雑誌*、査読有、58 巻(6)、2015 年、503-509

<http://doi.org/10.11471/shikahozon.58.503>

[学会発表] (計 7 件)

(1) 石河真幸、小林洋子、齋藤正寛、他、Pannexin 3 による **Wnt/b-catenin** および **p21 signaling** を介した骨前駆細胞の増殖機構の解析. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2016 年 10 月 27-28 日、松本。

(2) Iwamatsu-Kobayashi Y., Saito M. et al., The effect of **S-PRG** filler eluate on periodontitis models. The 6th International symposium for interface oral health science, 2016 年 1 月 18-19 日、Sendai

(3) 小林洋子、齋藤正寛、他、**S-PRG** フィラー抽出液由来イオンによるマウス歯周炎モデル抑制機構の解析. 第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2015 年 11 月 12,13 日、東京

(4) 半田慶介、小林洋子、齋藤正寛、他、マルフアン症候群モデルマウスにおける歯周炎の組織破壊機構に関する研究. 第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会、2015 年 6 月 25, 26 日、北九州

(5) Iwamatsu-Kobayashi Y., Saito M. et al., Development of **S-PRG** Filler as a dental material that has an ability of preventing periodontal disease. 94th IADR, 2015 年 3 月 12 日、Boston (USA)

(6) Iwamatsu-Kobayashi Y., Saito M. et al., Effect of **S-PRG** Filler Eluate on the Tissue Destruction of the Ligature-induced Periodontitis Model. 62nd JADR, 2014 年 12 月 5 日、大阪

(7) 小林洋子、齋藤正寛、他、S-PRG フィラ
ー抽出液によるマウス歯周炎モデル予防効
果の解析. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学
術大会、2014 年 10 月 30 日、山形

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 洋子 (IWAMATSU-KOBAYASHI, YOKO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50261524

(2) 研究分担者

齋藤 正寛 (SAITO, MASAHIRO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40215562

島内 英俊 (SHIMAUCHI, HIDETOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授
研究者番号：70187425

(3) 連携研究者

鈴木 治 (SUZUKI, OSAMU)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60374948