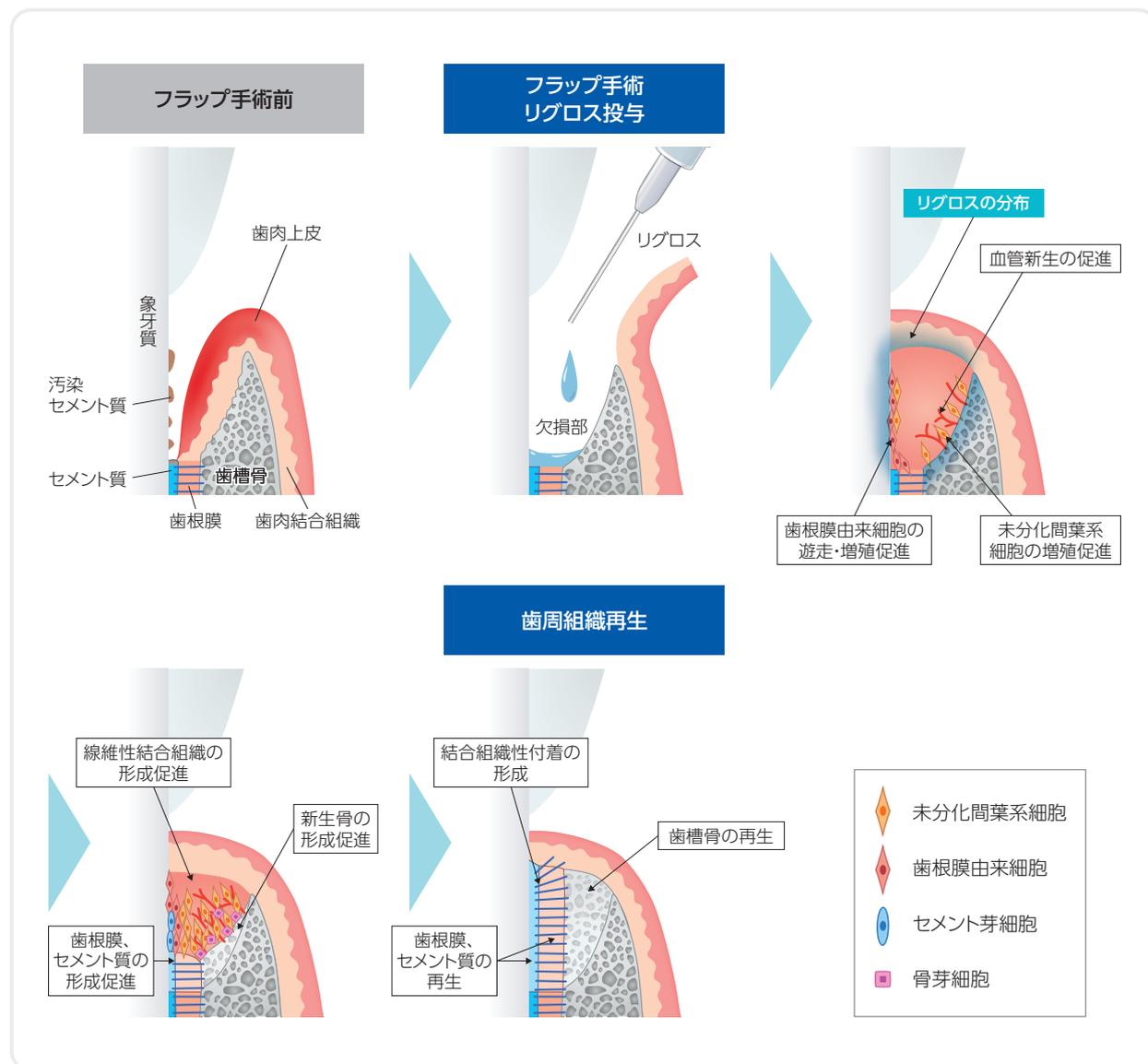


1. 歯周組織再生機序⁷⁾

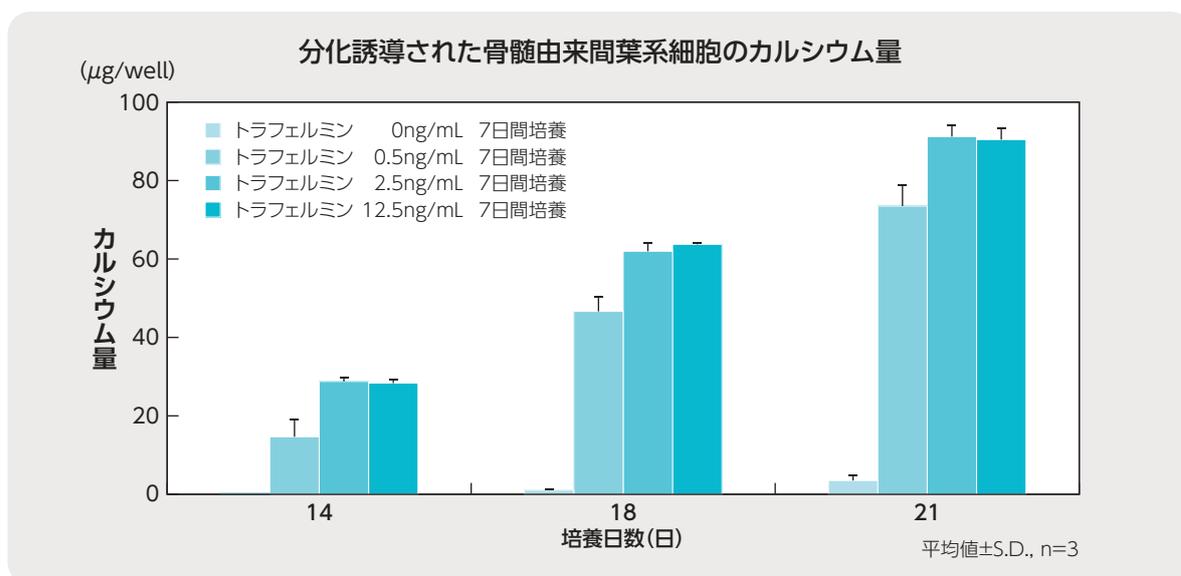
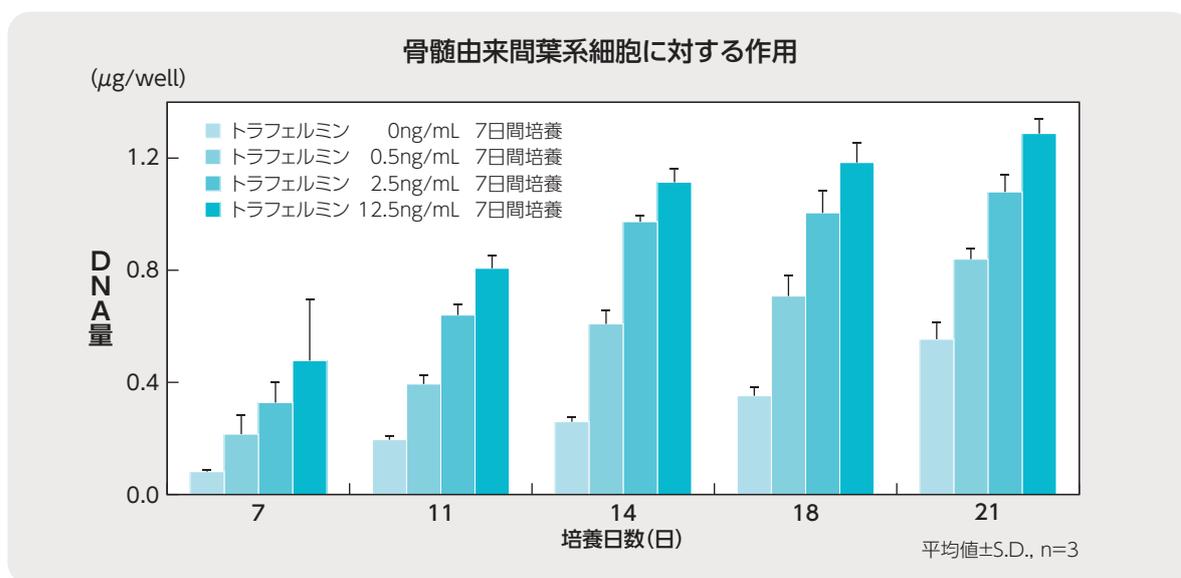
リグロスは歯周組織欠損部の未分化間葉系細胞、歯根膜由来細胞に対して増殖促進作用を示すとともに血管新生を促進します。これらの作用により増殖した細胞は骨芽細胞、セメント芽細胞へと分化し、歯槽骨、セメント質及び歯根膜の新生や結合組織性付着の再構築により歯周組織が再生されます。



2. 未分化間葉系細胞と歯根膜由来細胞に対する作用

(1) ラット骨髄由来間葉系細胞の増殖と分化に対する作用 (*in vitro*)⁷⁾

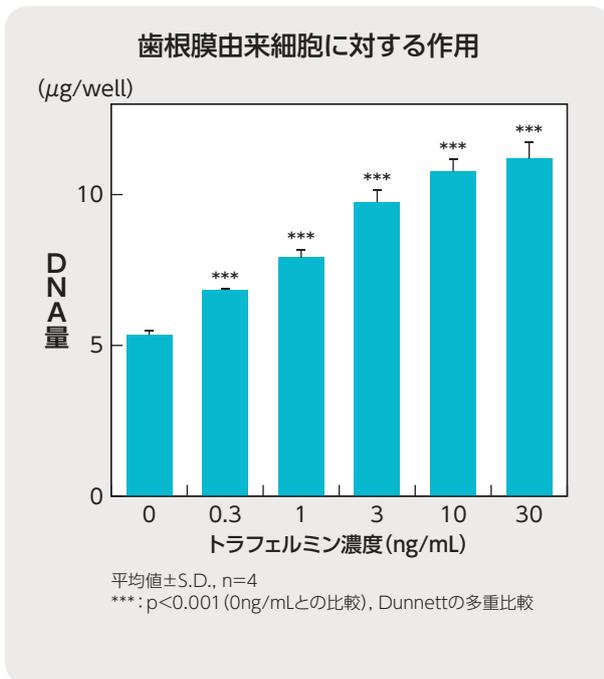
トラフェルミンは骨髄由来間葉系細胞を濃度依存的に増殖させ、細胞外基質に沈着したカルシウム量が増加しました。したがって、トラフェルミンにより骨髄由来間葉系細胞中の未分化な細胞が増殖し、これらが骨芽細胞へ分化することにより歯周組織欠損部の新生骨の形成を促進することが示唆されました。



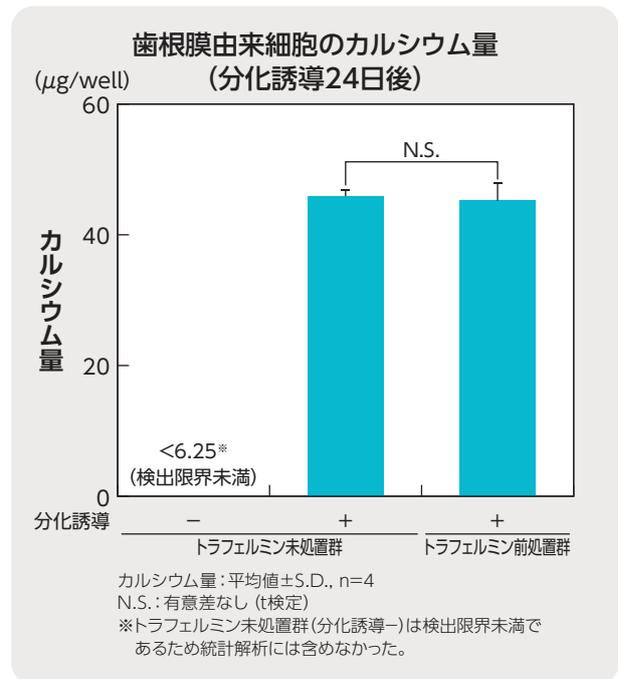
方法：ラットの骨髄から採取した間葉系細胞をプラスチックディッシュに播種し、デキサメタゾン(最終濃度100nmol/L)及びトラフェルミン(最終濃度0.5、2.5、12.5ng/mL)を添加した。培養7日後にトラフェルミンを除くとともに分化誘導培地に交換し、骨芽細胞への分化を誘導した。培養7、11、14、18及び21日後に、細胞増殖の指標としてDNA量を測定した。培養14、18及び21日後に石灰化の指標として細胞外基質に沈着したカルシウム量を測定した。

(2) ヒト歯根膜由来細胞の増殖と分化に対する作用 (*in vitro*)⁷⁾

歯根膜由来細胞はトラフェルミンにより増殖した後もセメント芽細胞や骨芽細胞への分化能を保持していることが示されました。



方法: ヒト歯根膜由来細胞にトラフェルミン(最終濃度0.3、1、3、10、30ng/mL)を添加して3日間培養し、細胞増殖の指標としてDNA量を測定した。



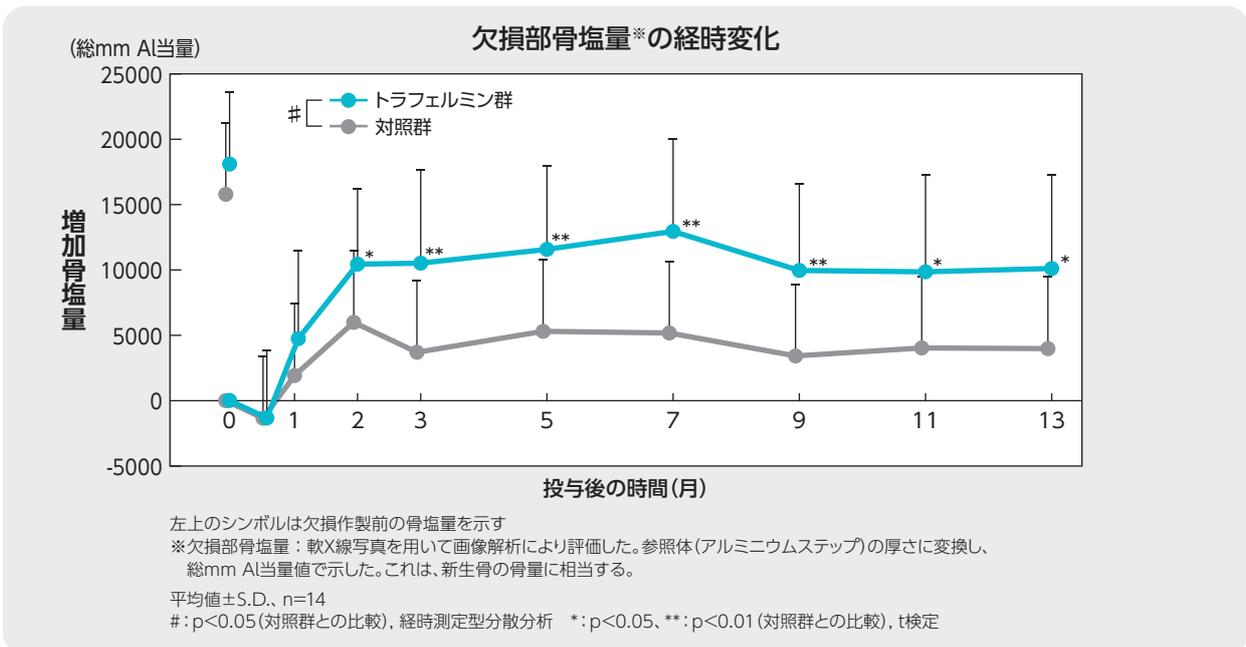
方法: ヒト歯根膜由来細胞をトラフェルミン添加(最終濃度10ng/mL、トラフェルミン前処置群)あるいは非添加(トラフェルミン未処置群)で3日間培養後、トラフェルミン非存在下で同数の細胞を再播種した。24時間後に分化誘導培地に置換し、分化誘導24日後に細胞外基質に沈着した石灰化の指標としてカルシウム量を測定した。

3. 歯周組織再生作用

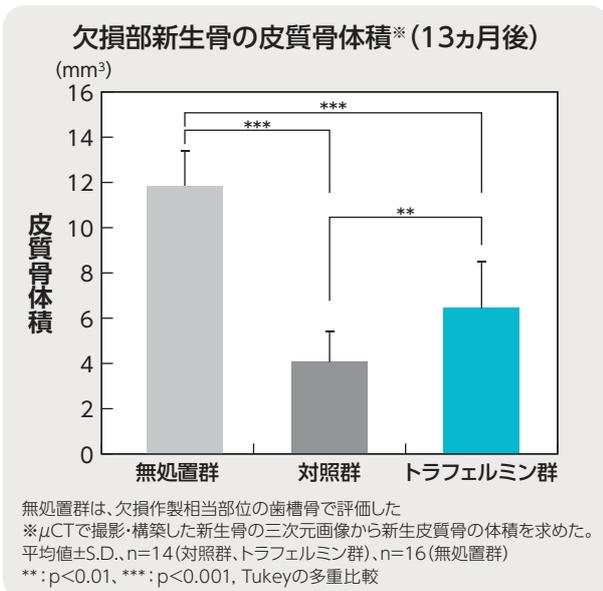
(1) 歯周組織欠損モデルに対する作用 –長期観察(イヌ)–7,8)

① 新生骨に対する増加作用

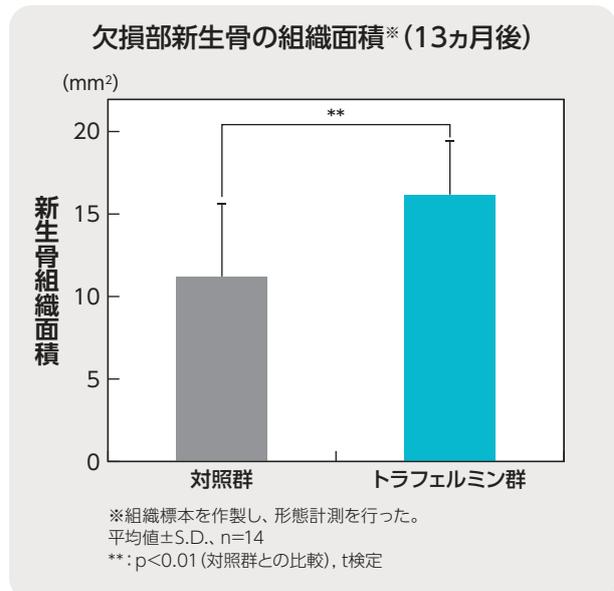
トラフェルミンは、歯槽骨欠損部の骨塩量(骨量に相当)、皮質骨及び新生骨を増加させました。増加した新生骨の質は対照群と微細構造に差が見られず、自然治癒による新生骨と同等であることが示されました。



Anzai J et al. Long-term Observation of Regenerated Periodontium Induced by FGF-2 in the Beagle Dog 2-Wall Periodontal Defect Model. PLoS One. 2016;11:e0158485 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158485>)
 © Anzai J et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
 利益相反:本研究は著者が所属する科研製薬のサポートにより実施された



Anzai J et al. Long-term Observation of Regenerated Periodontium Induced by FGF-2 in the Beagle Dog 2-Wall Periodontal Defect Model. PLoS One. 2016;11:e0158485 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158485>)
 © Anzai J et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
 利益相反:本研究は著者が所属する科研製薬のサポートにより実施された



Anzai J et al. Long-term Observation of Regenerated Periodontium Induced by FGF-2 in the Beagle Dog 2-Wall Periodontal Defect Model. PLoS One. 2016;11:e0158485 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158485>)
 © Anzai J et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
 利益相反:本研究は著者が所属する科研製薬のサポートにより実施された

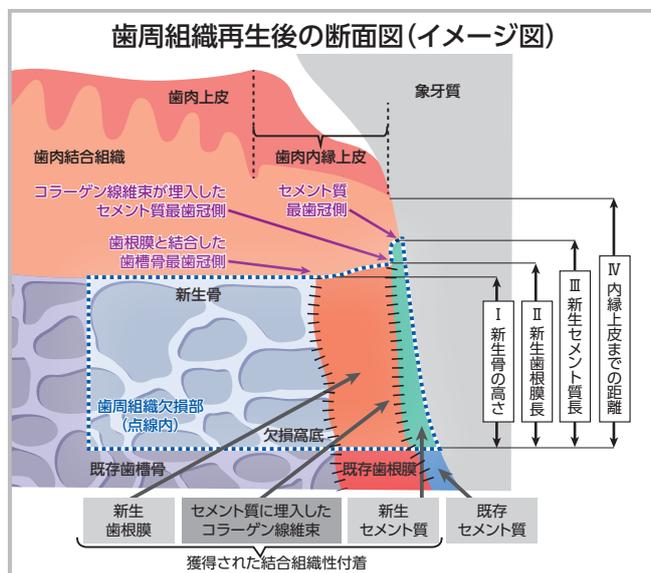
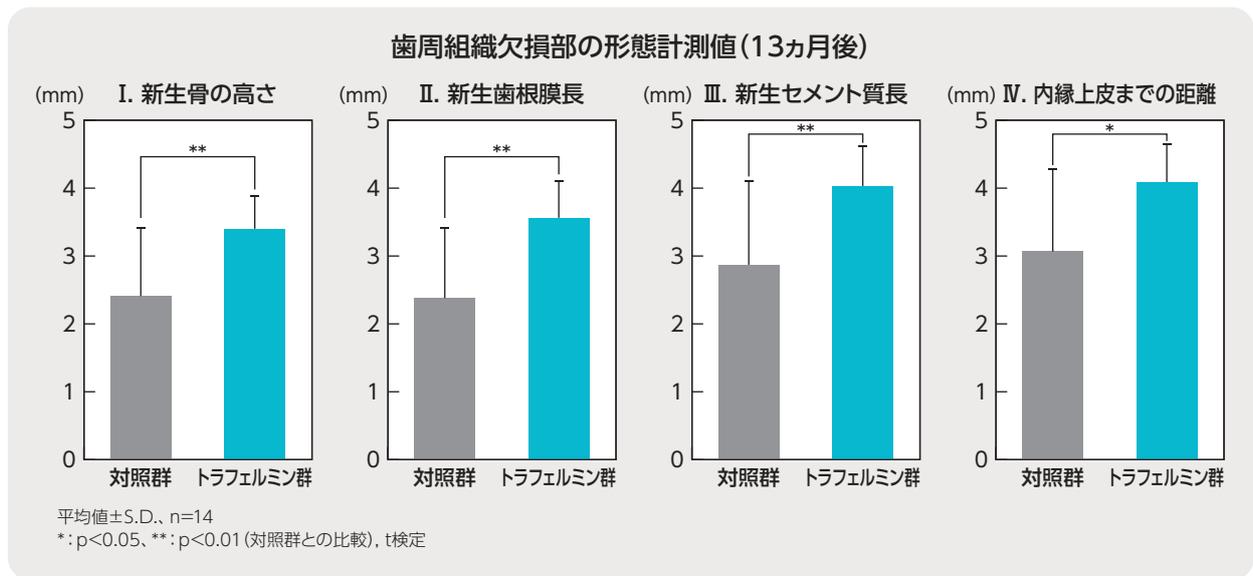
イヌ歯周組織欠損モデルにおける新生海綿骨骨梁の微細構造解析(13ヵ月後)

評価項目(単位)	無処置群	対照群	0.3%トラフェルミン群
骨の種類	既存骨	新生骨	
骨梁体積率(%)	35.2±9.9	54.2±24.2**	63.4±13.5***
骨梁厚(μm)	178.2±31.3	174.2±33.7	174.4±21.5
骨梁間隙(μm)	429.0±166.3	223.6±110.5***	170.5±88.7***
骨梁数(本)	0.8±0.2	1.1±0.5*	1.1±0.2*

平均値±S.D., n=14(対照群, 0.3%トラフェルミン群), n=16(無処置群)
 無処置群は、欠損作製相当部位の歯槽骨で評価した
 *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001(無処置群との比較), Tukeyの多重比較
 対照群と0.3%トラフェルミン群間にはいずれの項目においても差は認められなかった

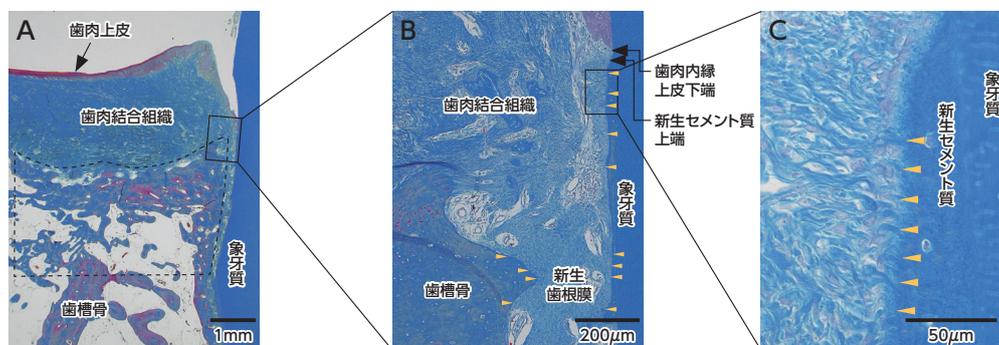
② 結合組織性付着に対する作用

トラフェルミンは結合組織性付着の形成を促進させました。



Anzai J et al. Long-term Observation of Regenerated Periodontium Induced by FGF-2 in the Beagle Dog 2-Wall Periodontal Defect Model. PLoS One. 2016;11:e0158485 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158485>)
 © Anzai J et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
 利益相反:本研究は著者が所属する科研製薬のサポートにより実施された

新生歯根膜及び歯肉結合組織から新生セメント質に埋入する太いコラーゲン線維束(シャープピー線維)が観察され、結合組織性付着の形成が認められました。



A, B: イヌ歯周組織欠損モデルにおける再生歯周組織の組織像
 C: イヌ歯周組織欠損モデルにおけるセメント質最歯冠側の組織像
 アザン染色
 点線内は欠損部。黄三角は埋入したコラーゲン線維束(シャープピー線維)を示す。A, B内の黒四角は、それぞれB及びCの領域を示す。

Anzai J et al. Long-term Observation of Regenerated Periodontium Induced by FGF-2 in the Beagle Dog 2-Wall Periodontal Defect Model. PLoS One. 2016;11:e0158485 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158485>)
 © Anzai J et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

方法: イヌ2壁性歯周組織欠損モデルを作製し、0.3%トラフェルミン(トラフェルミン180µg/HPC* 60µL)又は対照(HPC 60µL)を欠損部に単回投与した。既存歯槽骨の指標として、無処置群を設けた。経時的に撮影された軟X線写真から欠損部の骨塩量を求め、欠損作製直後からの増加量で評価した。骨塩量が一定となった投与13か月後に下顎骨を摘出し、µCTで撮影・構築した新生骨の三次元画像から新生皮質骨の体積を求めた。また、新生骨の骨質を評価するため、新生骨内部の海綿骨骨梁の微細構造を解析した。加えて、組織標本を作製し、観察及び形態計測を行った(24頁「歯周組織再生後の断面図」)。

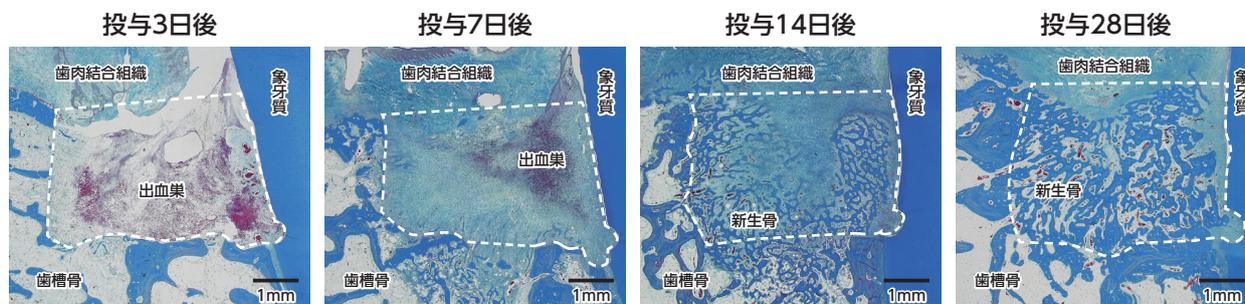
※ヒドロキシプロピルセルロース

(2) 歯周組織欠損モデルに対する作用 –再生初期過程の観察(イヌ)–7.9)

① 組織学的検討

トラフェルミンは線維性結合組織を早期から増加させ、これらの組織が速やかに新生骨に置換されることにより、歯槽骨の再生を時間的及び量的に促進することが示されました。また、歯根膜由来細胞の増殖を促進することにより、セメント質及び歯根膜を早期に形成させることが示されました。

イヌ歯周組織欠損部の組織像(トラフェルミン群)



出血巣で占められていた。

出血巣は縮小し、線維性結合組織が増殖し、既存骨辺縁では新生骨形成を認めた。

欠損中央部に線維性結合組織が残存していたが、大部分は新生骨で占められた。

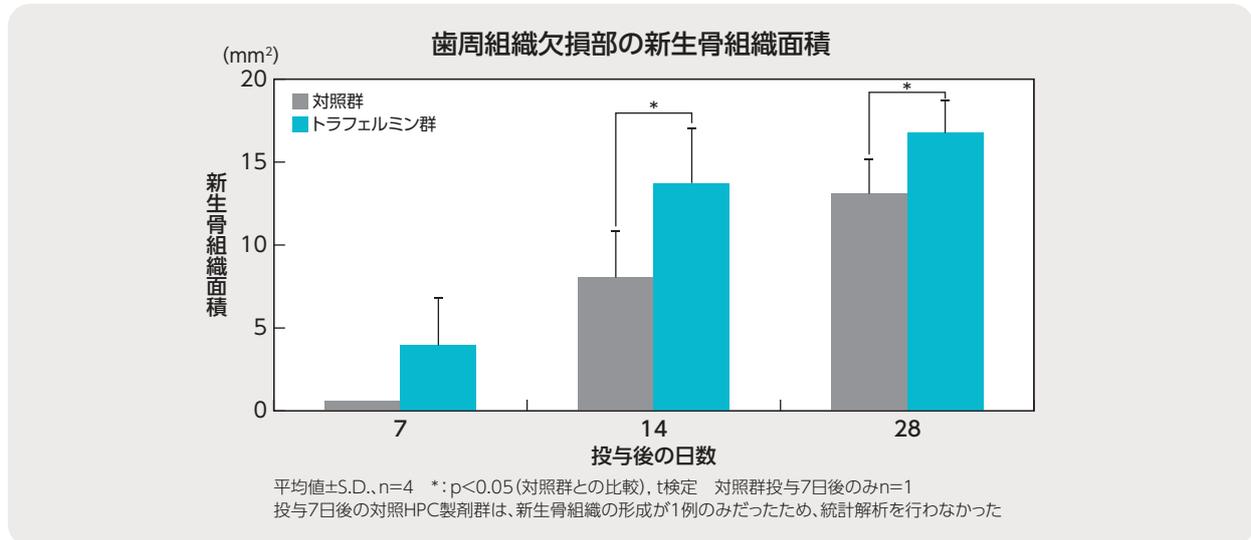
欠損部全域で新生骨が観察された。

アザン染色
 点線内は欠損部を示す

Nagayasu-Tanaka T et al. Action Mechanism of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) in the Promotion of Periodontal Regeneration in Beagle Dogs. PLoS One. 2015;10:e0131870 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131870>)
 © Nagayasu-Tanaka et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
 利益相反: 本研究は著者が所属する科研製薬のサポートにより実施された

② 新生骨組織面積

トラフェルミン群では投与14及び28日後において、新生骨組織面積は対照群に比べて有意に増加しました(p<0.05、t検定)。

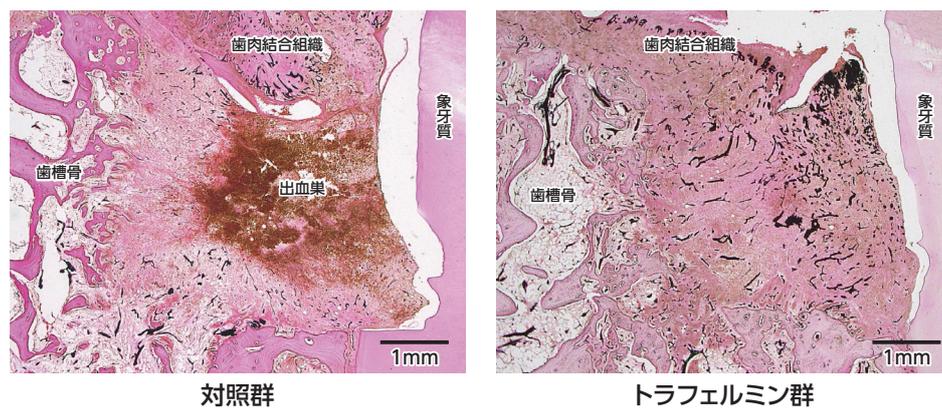


Nagayasu-Tanaka T et al. Action Mechanism of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) in the Promotion of Periodontal Regeneration in Beagle Dogs. PLoS One. 2015;10:e0131870 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131870>)
© Nagayasu-Tanaka T et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
利益相反:本研究は著者が所属する科研製薬のサポートにより実施された

③ 血管新生作用

歯周組織欠損部全体では、投与7日後において対照群では限局的に血管新生が観察されたのに対して、トラフェルミン群では全域に認められました。トラフェルミンは早期に血管新生を促進し、再生に適した環境を構築すると考えられました。

投与7日後の歯周組織欠損部の血管走行



エオジン染色
墨汁を灌流し血管を黒色で示した

Nagayasu-Tanaka T et al. Action Mechanism of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) in the Promotion of Periodontal Regeneration in Beagle Dogs. PLoS One. 2015;10:e0131870 (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131870>)
© Nagayasu-Tanaka T et al. 2015 Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
利益相反:本研究は著者が所属する科研製薬のサポートにより実施された

方法：イヌ3壁性歯周組織欠損モデルを作製し、0.3%トラフェルミン(トラフェルミン 180μg/HPC 60μL)又は対照(HPC 60μL)を欠損部に単回投与した(各群各時点4例)。投与3、7、14及び28日後に採取した標本を組織学的に評価し、新生骨組織面積を測定した。また、欠損部における血管新生を評価するため、投与7日後において墨汁灌流標本を用いて歯周組織欠損部全体の新生血管を観察するとともに、歯根面近心側1mm幅の血管数を計測した。