

ポリリン酸による歯周組織再生医療の試み

学位論文内容の要旨

近年、失われた組織・器官を回復する再生医療に注目が集まり、歯科・口腔領域においても歯周疾患により咬合機能を消失する患者への対策が考えられてきた。以前は一度失われた歯周組織の再生は困難と考えられてきたが、最近、成長因子や分化誘導因子などの生理活性物質を用いることによって歯周組織が再生できる可能性が示された。その一部は臨床にも応用されてきたが、現在のところ、いずれの物質も生体に対する安全性やコスト、効果などの問題があり実用的に臨床応用をされるまでに至っておらず、新たな歯周組織再生治療薬の開発が望まれている。

ポリリン酸はリン酸が直鎖状に重合した生体高分子で、食品添加物などとして古くから使用され人体への安全性が確立されている物質で、化学構造は単純であり、精製のためのコストも低い。ポリリン酸はほとんどすべての生物の組織内や細胞内に存在し、歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞に多量に存在していることが報告されている。ポリリン酸は原核細胞ではエネルギー供与体やリン酸リザーバーとして機能していることが明らかになっているが、真核細胞における役割の詳細は不明である。近年、ポリリン酸が線維芽細胞増殖因子を安定化すること、マウス骨芽細胞の石灰化を促進することが報告され、ポリリン酸が線維や骨組織の分化・再生を促進する可能性が示唆された。しかし、培養細胞系以外でのポリリン酸の効果についての検索はない。

そこで今回、ラットに実験的歯周組織欠損モデルを作成し、*in vivo* においてポリリン酸が歯周組織修復・再生におよぼす影響について検索した。さらに、炎症性サイトカインである IL-1 β 遺伝子発現と、齶蝕・歯周疾患の原因と考えられている口腔内細菌の増殖に対するポリリン酸の影響について検索した。

平均鎖長 65 のポリリン酸ナトリウムに鶏アテロコラーゲンを加えてポリリン酸ゲル (ポリリン酸濃度 100 mM, コラーゲン濃度 1.64mg/ml pH 7.0) を作成し、実験に供した。

6週齢のWistar系雄ラット84匹を2群に分け、ポリリン酸投与実験群42匹、対照群として42匹を用いた。ラットをエーテル吸入全身麻酔下に上顎左側第一臼歯の頰側に水平性骨欠損の歯周組織欠損モデルを作成し、実験群の欠損部にはポリリン酸ゲルを、対照群にはポリリン酸を含まないコラーゲンゲルを塗布し、術後12時間後、1、3、5、7、14日目に安楽死させ上顎骨を取り出し、通法に従い標本を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織学的に検索した。同様の処置を行った各群3匹より歯周組織を採取しtotal RNAを抽出後、real time RT-PCR法を行い再生組織中のIL-1 β mRNA発現を検索した。また、*P. gingivalis*、*S. mutans*を嫌気培養し、培地中にポリリン酸ナトリウム水溶液(pH 7.0)を添加し、細菌増殖活性におよぼすポリリン酸の影響について検索した。

その結果、術後12時間目、1日目に多数の菌塊と好中球の浸潤が対照群で認められたのに対し、実験群では実験初期に好中球の著しい浸潤がみられ、明らかな菌塊は認められなかった。術後3日目の実験群では、好中球は減少しマクロファージやリンパ球を主体とした炎症性細胞浸潤を伴う幼若な血管結合組織の増生が認められたが、対照群では創部の大部分は好中球を主体とした炎症性細胞浸潤と滲出物が残存していた。術後5日目になると対照群でも炎症性細胞浸潤は減少し肉芽組織の増生がみられるようになってきたが、実験群では基質化がより一層進行していた。術後7日目対照群では炎症性細胞が一部残存し新生骨形成はごく僅かにみられる程度だったが、実験群欠損部は成熟した線維性結合組織で修復され、歯槽頂部へ向かって活発に形成される梁状の新生骨が認められた。術後14日目には、対照群でも既存骨から連続して歯冠側へ梁状に形成された幼若な新生歯槽骨がみられたが、実験群では、部分的に層板構造を認める比較的緻密な骨からなる術前の形態に近い状態まで再生された歯槽骨を認められた。新生骨の頰側には一列に配列する細胞成分とその外側に存在する緻密な線維構造を呈する骨膜が認められ、歯根吸収や骨性癒着は認められなかった。新生骨と根面の間には根面に対して垂直あるいは斜走に配列するコラーゲン線維が認められた。

定量RT-PCRで再生組織でのIL-1 β 発現量を検索したところ、両群とも術後12時間から術後1日目に著しい増加がみられたが、実験群は、術後12時間後で対照群の4倍、術後1日目で2.5倍の高発現を示した。その後、実験群では術後3日目以降、発現はほとんどみられなくなった。対照群では術後7日目までIL-1 β は2倍程度発現していたが、漸次減少する傾向を認め、14日目までにはほぼ術前の値に復位した。

*in vitro*における未処置の菌体増殖率を100%とした時に、0.02%のポリリン酸処理に

より *P.gingivalis* の菌体増殖率は 2.5 % に低下し、0.5 % の濃度では増殖は完全に停止した。*S.mutans* では 0.06 % のポリリン酸処理により、菌体増殖率は 1.3 % に低下し、0.5 % の濃度では増殖は認められなかった。

今回の検索により、ラットに作成した実験的歯周組織欠損モデルにおいてポリリン酸は組織の再生を積極的に誘導することが明らかになった。組織修復の初期において炎症反応は重要な役割を演じている。IL-1 β は炎症反応をコントロールするサイトカインの一つとして好中球の分化、誘導に働くことが知られている。今回の検索で、IL-1 β の発現は、術後 12 時間、1 日目に著しく亢進していた。この結果は、病理組織学的にみられたポリリン酸処理群における術後早期の著しい好中球浸潤と術後 3 日目以降の消退と一致しており、ポリリン酸の投与によって導かれた IL-1 β mRNA の発現亢進が、好中球の血管からの遊走と活性化をコントロールしていることが示唆された。実験群で明らかな細菌塊が認められなかったことは、術後早期の IL-1 β の発現亢進による好中球の浸潤により外来性細菌が貪食されたことが一因であると思われるが、それに加えて、*in vivo* においても口腔内細菌の増殖に対してポリリン酸が抑制的に働き、その相乗効果により感染が抑制されたものと思われた。

歯周組織は歯肉・歯槽骨・歯根膜から構成され、歯周組織の再生に際しては、再生の場へ集積する細胞の由来が重要となる。今回の実験で、歯槽骨の再生が実験群で顕著に認められ、歯根吸収や骨性癒着を疑わせる像は 1 例もなかったことから、ポリリン酸が歯根膜細胞由来の細胞分化に適切な活性化を促したものと思われた。実験群では対照群に比し早期に肉芽組織の成熟～骨新生の活性化が認められた。このような所見は細菌の侵入に伴う組織のダメージがポリリン酸により軽減されたため修復機転が早期に進行したことに加えて、より積極的な線維芽細胞・骨芽細胞などの分化誘導がポリリン酸により生じたことを示している。今回、術後 3 日目から障害部位に多数の線維芽細胞が出現し、術後 5 日目にはコラーゲン線維の活発な産生と成熟がみられたことは、ポリリン酸による線維芽細胞の積極的な活性化を意味するものと思われた。実験群では、術後 7 日目から多数の骨芽細胞の出現により歯冠側へ向かって活発に形成される骨新生像がみられ、術後 14 日目には成熟した歯槽骨形成が認められ、培養骨芽細胞株でみられたポリリン酸の骨誘導機能亢進が *in vivo* でも生じていることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学位論文題名

ポリリン酸による歯周組織再生医療の試み

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行った。審査論文の概要は、以下の通りである。

本研究は、ポリリン酸の歯周組織修復・再生能を明らかにするために、ラットの実験的歯周組織欠損モデルを用いて病理組織学的に検索し、併せてポリリン酸の IL-1 β 遺伝子発現ならびに口腔内細菌の増殖に対する影響を検討したものである。

実験に先立ち、平均鎖長 65 のポリリン酸ナトリウムに鶏アテロコラーゲンを加えてポリリン酸-コラーゲングル（ポリリン酸濃度 100 mM, コラーゲン濃度 1.64mg/ml pH 7.0）を作成した。6週齢のWistar系雄ラットの上顎左側第一臼歯部歯肉粘膜を骨膜下で剥離後、ラウンドバーを用いて歯根の約2/3が露出する深さまで頬側歯槽骨を削除し、歯根膜ならびにセメント質を除去した。実験群の欠損部にはポリリン酸-コラーゲングルを、対照群にはポリリン酸を含まないコラーゲングルを塗布して歯槽粘膜を復位縫合し、その後も週5日、同一薬剤を歯肉溝・辺縁歯肉部に塗布した。術後12時間後、1, 3, 5, 7, 14日目に安楽死させ上顎骨を取り出し、通法に従い標本作製してヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的に検索した。同様の処置を行った各群3匹より歯周組織を採取し、total RNAを抽出後、real time RT-PCR法を行い再生組織中のIL-1 β mRNA発現量を検索した。また、齶蝕や歯周疾患の原因菌と考えられている *P. gingivalis*, *S. mutans* を嫌気培養し、培地中にポリリン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.0) を添加し、細菌増殖活性に及ぼすポリリン酸の影響について検索した。

病理組織学的検索においては、実験群では、術後12時間で、創部の上皮下及び既存骨の断端に、好中球を主体とした炎症性細胞浸潤が対照群に比べてより顕著であったが、明らかな菌塊は認めなかった。術後3日目には炎症性細胞浸潤は消退し、術後5日目から骨芽細胞が増殖し、術後7日目には骨断端から歯槽頂部へ向かう梁状の新生骨を認め、術後14日目には部分的に層板構造を伴う歯槽骨の形成が認められた。歯根吸収や骨性癒着はみられず、新生骨と根面の間には根面に対して垂直ないし斜めに配列

するコラーゲン線維が認められた。一方、対照群においては、術後12時間、1日目に、多数の菌塊と好中球の浸潤が認められた。また、炎症性細胞浸潤の消退や骨芽細胞の増殖、新生骨の形成は実験群に比べいずれも遅れて認められた。

定量RT-PCRで再生組織でのIL-1 β 発現量を検索したところ、両群とも術後12時間から術後1日目に著しい増加がみられた。特に、実験群では、術後12時間で対照群の4倍、術後1日で2.5倍の高発現を示した。実験群では術後3日目以降、発現はほとんどみられなくなったが、対照群では術後7日目まで2倍程度発現しており、以後漸次減少し、14日目までにほぼ術前の値となった。

細菌増殖活性におよぼすポリリン酸の影響について、*in vitro*における未処置の菌体増殖率を100%とした時に、培地への0.02%のポリリン酸添加により *P. gingivalis* の菌体増殖率は2.5%に低下し、0.5%の濃度では増殖は完全に停止した。*S. mutans* では0.06%のポリリン酸添加により、菌体増殖率は1.3%に低下し、0.5%の濃度では増殖は認められなかった。

これらの結果は、ポリリン酸は創傷の初期にサイトカインIL-1 β の発現を高めて、好中球を中心とした炎症性細胞浸潤を促すとともに、口腔細菌の増殖を抑制することで細菌感染を防御し、これにより受傷組織の損傷を軽減して早期の修復過程への移行を可能とし、さらに歯周組織構成細胞の分化を誘導することで、組織の修復・再生を促進させていることを示唆している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、1) 菌塊であることをどのように確認したのか、2) 成熟骨と未熟骨との違いは何か、3) 鎖長65のポリリン酸を用いたのは何故か、4) IL-1 β 遺伝子発現量を検索した組織はどの部分から採取したのか、5) ポリリン酸刺激によりIL-1 β 遺伝子の発現が亢進した細胞は何か、6) ポリリン酸の抗菌作用に関して過去の報告は、7) ポリリン酸が組織の修復・再生能を有するという根拠は何か、8) オステオポンチン等の検索は行っていないのか、9) 何をコントロールにして *P. gingivalis* の増殖抑制効果を検討したのか、等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、ポリリン酸が組織の修復・再生を促進させることを確認し、さらにその機序の一端を明らかにしたこと、ならびにポリリン酸の抗菌作用を明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。