2.6 非臨床試験の概要文

2.6.1 緒言

2.6.1.1 名称及び化学構造式

KCB-1 の名称及び化学構造式は以下の通りである。

一般名：トラフェルミン（遺伝子組換え）［Trafermin (genetical recombination)］

化学構造式：

10 20
R-Gly-Ser-Ile-Thr-Thr-Leu-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-
21 30 40
Pro-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr-Cys-Lys-Asn-Gly-Gly-Phe-Phe-Leu-
41 50 60
Arg-Ile-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro-His-Ile-Lys-
61 70 80
Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Ser-Ile-Lys-Gly-Val-Cys-Ala-Asn-Arg-
81 90 100
Tyr-Leu-Ala-Met-Lys-Glu-Asp-Gly-Arg-Leu-Leu-Ala-Ser-Lys-Cys-Val-Thr-Asp-Glu-Cys-
101 110 120
Phe-Phe-Phe-Glu-Arg-Leu-Glu-Ser-Asn-Asn-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Thr-
121 130 140
Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-Gly-Ser-Lys-Thr-Gly-Pro-
141 150 154
Gly-Gln-Lys-Ala-Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Met-Ser-Ala-Lys-Ser

R＝Ala-Ala （65%以上）
R＝Ala （35%以下）

分子式：$C_{764}H_{1201}N_{217}O_{219}S_6$ 及び $C_{761}H_{1196}N_{216}O_{218}S_6$

分子量：17122.42 及び 17051.35

2.6.1.2 薬理作用

KCB-1 は、遺伝子組換え技術により大腸菌を用いて製造したヒト塩基性線維芽細胞成長因子［basic fibroblast growth factor（bFGF)、一般名：トラフェルミン（遺伝子組換え)］である。bFGF は線維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞等の増殖や遊走の促進、細胞外基質産生を制御する作用を有し、生体への投与により血管新生及び組織再生を誘導する。

また、KCB-1 は歯周組織欠損部に存在する未分化間葉系細胞を増殖させる作用も有し、これが骨芽細胞・セメント芽細胞・歯根膜細胞に分化することで歯槽骨・セメント質が新生し、更に歯と歯槽骨との結合組織性付着が再構築することにより、歯周組織の再生が促進される。

2.6.1.3 予定する効能・効果

歯周炎による歯槽骨の欠損

<効能･効果に関連する使用上の注意>

1. 本剤は、歯周ポケットの深さが 4 mm 以上、骨欠損の深さが 3 mm 以上の垂直性骨欠

損がある場合に使用すること。

2. 本剤は、インプラント治療に関する有効性及び安全性は確立していない。

2.6.1.3 予定する用法、用量

歯肉剥離掻爬手術時に歯槽骨欠損部を満たす量を塗布する。

＜用法・用量に関連する使用上の注意＞

本剤の使用にあたっては【臨床成績】の項を参照し適切な量を用いること。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文----4
2.6.2.1 まとめ----4
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験----4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ----8
2.6.2.2.1 歯周組織再生作用 ----8
2.6.2.2.2 作用機序 ---- 18
2.6.2.3 副次的薬理試験 ---- 34
2.6.2.4 安全性薬理試験 ---- 34
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 ---- 34
2.6.2.6 考察及び結論 ---- 35
2.6.2.7 図表---- 38
2.6.2.8 引用文献 ---- 39

表 2.6.2-1 用語及び略語一覧 ----3
表 2.6.2-2 本試験における評価項目、評価方法及び計測内容----9
表 2.6.2-3 本試験における評価項目、評価方法及び計測内容---- 12
表 2.6.2-4 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 ---- 14

図 2.6.2-1 歯周組織欠損の模式図及び歯周組織断面図----8
図 2.6.2-2 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部の骨塩量----9
図 2.6.2-3 イヌ歯周組織欠損モデルにおける新生骨組織面積---- 10
図 2.6.2-4 イヌ歯周組織欠損モデルにおける歯周組織欠損窩底部の組織像 ---- 10
図 2.6.2-5 イヌ歯周組織欠損モデルにおける新生セメント質長及び新生歯根膜長 ----11
図 2.6.2-6 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部骨塩量の経時変化 ---- 13
図 2.6.2-7 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部新生骨の皮質骨体積 ---- 13
図 2.6.2-8 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部の形態計測 - 新生骨組織面積 - ----- 14
図 2.6.2-9 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 ---- 16
図 2.6.2-10 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部の形態計測 - 内縁上皮までの距離、新生セメント質長、新生歯根膜長及び新生骨の高さ ---- 17
図 2.6.2-11 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---- 17
図 2.6.2-12 KCB-1 刺激後のラット骨髄由来間葉系細胞の増殖（DNA 量） ---- 18
図 2.6.2-13 KCB-1 刺激後のラット骨髄由来間葉系細胞の ALP 活性 ---- 19
図 2.6.2-14 KCB-1 刺激後のラット骨髄由来間葉系細胞のカルシウム量 ---- 19
図 2.6.2-15 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の細胞増殖に対する作用（DNA 量） ---- 20
図 2.6.2-16 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の ALP 活性及びカルシウム量に及ぼす影響---- 21
図 2.6.2-17 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の遊走（ケモタキシス）に及ぼす作用 ---- 22
図 2.6.2-18 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の遊走（ケモキネシス）に及ぼす作用 ---- 23
図 2.6.2-19 イヌ歯周組織欠損モデルにおける免疫染色の観察部位 ---- 24

図 2.6.2-20 イヌ歯周組織欠損モデルにおける免疫染色による KCB-1 の分布 ---------- 25
図 2.6.2-21 KCB-1 投与後の歯周組織欠損部の変化---------- 28
図 2.6.2-22 歯槽骨欠損部のアザン染色及び抗 PCNA 抗体免疫染色像 ---------- 29
図 2.6.2-23 歯周組織欠損部の新生骨組織面積 ---------- 29
図 2.6.2-24 歯周組織欠損部の歯根面のアザン染色及び抗 PCNA 抗体免疫染色像 ---------- 30
図 2.6.2-25 歯周組織欠損における結合組織性付着の再生 ---------- 30
図 2.6.2-26 KCB-1 投与 7 日後の歯周組織欠損部の血管走行 ---------- 31
図 2.6.2-27 KCB-1 投与 7 日後の歯根面から近心側 1 mm 幅の領域の血管数---------- 31
図 2.6.2-28 歯周組織欠損部の総 RNA 量---------- 32
図 2.6.2-29 歯周組織欠損部の再生組織における骨関連たん白質の遺伝子発現---------- 33
図 2.6.2-30 KCB-1 の歯周組織再生促進の作用機序---------- 37

表 2.6.2-1 用語及び略語一覧

用語及び略語	内容
18S rRNA	18S ribosomal RNA：18S リボソーム RNA
ALP	Alkaline phosphatase：アルカリフォスファターゼ
bFGF	basic Fibroblast growth factor：塩基性線維芽細胞成長因子
BMP-2	Bone morphogenetic protein -2：骨形成たん白質 2
BV/TV	Bone volume / tissue volume：骨梁体積率
DEX	Dexamethasone：デキサメタゾン
DNA	Deoxyribonucleic acid：デオキシリボ核酸
HPC	Hydroxypropylcellulose：ヒドロキシプロピルセルロース
KCB-1	遺伝子組換えヒト bFGF ［一般的名称：トラフェルミン（遺伝子組換え）］
KCB-1 HPC 製剤	KCB-1（凍結乾燥品）を [redacted]% HPC 液で溶解した製剤
μCT	Micro computed tomography：マイクロフォーカス X 線コンピュータ断層撮影
OC	Osteocalcin：オステオカルシン
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen：増殖細胞核抗原
PSP	Phenolsulfonphthalein：フェノールスルホンフタレイン
RNA	Ribonucleic acid：リボ核酸
real-time RT-PCR	real-time reverse transcription polymerase chain reaction：リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
Sp7	骨芽細胞の転写因子（別名: Osterix）
Tb.N	Trabecular number：骨梁数
Tb.Sp	Trabecular separation：骨梁間隙
Tb.Th	Trabecular thickness：骨梁厚
アザン染色	膠原線維（コラーゲン）を青染する染色法
結合組織性付着	結合組織（歯肉及び歯根膜）からセメント質内に埋入しているコラーゲン線維により歯と歯周組織が結合している様式
ケモキネシス	走化因子刺激によるランダムな遊走
ケモタキシス	走化因子の濃度勾配による遊走
骨性癒着	歯根（象牙質）が歯槽骨と直接癒着した状態。癒着した歯根は、骨のリモデリングを受け、徐々に吸収され骨に置き換わり脆弱化する[1)]
深行増殖	歯肉内縁上皮が歯根側に増殖すること。治癒過程においては、治癒の結果、歯根面との間に長い上皮性付着が形成される場合にもみられる
対照 HPC 製剤	KCB-1 を含まない HPC 製剤
フラップ手術	歯肉剥離掻把術。歯根面及び歯周ポケットの内部に蓄積した細菌及び細菌由来の汚染物質を取り除き、歯肉軟組織が歯根面に付着することを促すことを主目的とした歯周外科手術の 1 つ。歯周組織再生療法などに応用される基本的な手術法である

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

KCB-1 は、遺伝子組換え技術により大腸菌を用いて製造したヒト塩基性線維芽細胞成長因子［basic Fibroblast growth factor（bFGF）、一般名：トラフェルミン（遺伝子組換え）］である。

日本国内においては 2001 年 4 月にフィブラスト®スプレーの商品名で、褥瘡、皮膚潰瘍（熱傷潰瘍・下腿潰瘍）の効能・効果で製造承認を取得した。当該適応症に対する効力を裏付ける試験については、フィブラスト®スプレー資料概要書 ホ項（資料番号 1.13.1）に記載している。

KCB-1 は褥瘡、皮膚潰瘍の治癒以外にも、骨形成 [2,3]及び歯周組織再生 [4,5]に効果を示すことが知られている。この効果は、血管新生作用 [6]や骨髄及び歯根膜に存在する未分化な間葉系細胞の増殖を促進する作用に基づくと考えられている [7,8,9,10]。これらの知見に基づき、歯周炎により喪失した歯周組織を再生する医薬品としての可能性を示すことを目的に、以下の効力を裏付ける試験を実施した。

KCB-1 の歯周組織再生作用を明らかにするために、イヌ歯周組織欠損モデルを用いて KCB-1 HPC 製剤の薬理効果を検討した。また、歯周組織再生に関する KCB-1 の作用機序を検討するため、歯周組織の欠損部に投与した KCB-1 の分布を観察し、再生組織の経時変化及び遺伝子発現を解析した。更に、再生に寄与する細胞に対する作用として、ラット骨髄由来間葉系細胞やヒト歯根膜細胞を用いて KCB-1 による増殖、分化及び遊走について検討した。

安全性薬理試験は一般薬理試験としてフィブラスト®スプレー承認申請時に実施しており［フィブラスト®スプレー資料概要書 ホ項（資料番号 1.13.1）］、新たに検討すべき項目はないと判断した。また、副次的薬理試験及びその他の薬理試験（薬力学的薬物相互作用試験）についても検討すべき項目はなかった。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1 歯周組織再生作用

イヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルの欠損部に KCB-1 HPC 製剤（0.03～0.3%）あるいは対照 HPC 製剤を単回投与し、3 ヵ月後に新生骨、新生セメント質及び新生歯根膜への影響を評価した。KCB-1 は欠損部の骨塩量及び新生骨組織面積を用量依存的に増加させ、0.1%以上の濃度で対照 HPC 製剤群に対して有意に新生骨の形成を促進した。KCB-1 で得られた新生歯根膜は、コラーゲン線維束が新生セメント質に埋入し、結合組織性付着を形成していることが観察された。新生セメント質長及び新生歯根膜長は、KCB-1 の用量に依存して増加し、0.1%以上で対照 HPC 製剤群と比較して有意な差を示した。

また、再生組織の長期経過後の状態を検討するため、同モデルの欠損部に 0.3% KCB-1 HPC 製剤あるいは対照 HPC 製剤を単回投与した後に、欠損部の骨塩量を経時的に測定し、投与 13 ヵ月後に新生骨、新生セメント質及び新生歯根膜への影響を評価した。対照 HPC 製剤群の欠損部の骨塩量は投与 2 ヵ月後に最大に達し、その後は大きな変動なく推移した。0.3% KCB-1 HPC 製剤群の骨塩量は、投与 2 ヵ月後から対照 HPC 製剤群に対して有意な増加を示し、その差は投与 13 ヵ月後まで維持された。また、投与 13 ヵ月後の皮質骨体積や新生骨組織面積も、0.3% KCB-1 HPC 製剤群は対照 HPC 製剤群に対して有意に高値を示した。新生骨内部の海綿骨の構造は、0.3% KCB-1 HPC 製剤群と対照 HPC 製剤群間に差がなく、KCB-1 により形成された新生骨は自然治癒で形成された新生骨と同質であった。また、対照 HPC 製剤群及び 0.3% KCB-1 HPC 製剤群とも、セメント質及び歯根膜が形成され結合組織性付着が観察された。新

生セメント質及び新生歯根膜の長さは、いずれも 0.3% KCB-1 HPC 製剤群で対照 HPC 製剤群に対して有意に増加しており、KCB-1 による結合組織性付着の再生促進が認められた。新生骨の高さについては、0.3% KCB-1 HPC 製剤群は対照 HPC 製剤群に比べて有意に高値を示した。なお、骨性癒着は、いずれの群にも認められなかった。

2.6.2.1.1.2 作用機序

歯周組織の再生には、骨髄及び歯根膜由来の細胞が関与することが明らかにされている[11,12,13,14]。骨髄には未分化間葉系細胞が存在し、骨芽細胞の前駆細胞として歯槽骨の再生を担う[11]。また、歯根膜組織は、セメント芽細胞、骨芽細胞、それらの前駆細胞及び未分化間葉系細胞などから構成され、セメント質及び歯根膜の再生に中心的な役割を担う[12,13,14]。更に、組織再生には、酸素や栄養を供給するための血管新生が必須である[15,16]。

これらの報告に基づき、KCB-1 の作用をラット骨髄由来間葉系細胞及びヒト歯根膜細胞を用いて検討した。KCB-1 の作用部位を推察するため、イヌ歯周組織欠損モデルを用いて歯周組織欠損部での分布を観察した。また、再生初期過程における欠損部の細胞や組織の動態及び血管新生への影響を評価した。更に、再生組織の遺伝子発現の解析から、KCB-1 が新生骨形成に及ぼす影響を検討し、作用機序を考察した。

(1) 骨髄由来間葉系細胞に対する作用

ラット骨髄由来間葉系細胞に対して、KCB-1（0.5～12.5 ng/mL）は添加濃度に依存した増殖促進作用を示した。KCB-1 の除去後に骨芽細胞への分化を誘導することにより、細胞数（DNA 量）に依存して分化の指標である ALP 活性が上昇した。また、石灰化の指標であるカルシウム沈着量は、すべての濃度で時間の経過とともに増加した。

(2) 歯根膜細胞に対する作用

ヒト歯根膜細胞に対して、KCB-1 は増殖促進作用（0.3～30 ng/mL）及び遊走促進作用［ケモタキシス（1 及び 10 ng/mL）、ケモキネシス（10 及び 100 ng/mL）］を示した。KCB-1 の添加によって増殖したヒト歯根膜細胞は、KCB-1 の除去後に硬組織形成細胞への分化を誘導することにより、ALP 活性及びカルシウム沈着量が上昇した。

(3) 歯周組織欠損部における KCB-1 の分布

イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、欠損部に投与した KCB-1 の分布を免疫組織学的に観察した。投与 6 時間後及び 1 日後では、欠損部に面する既存歯槽骨、象牙質、既存歯根膜及び歯肉結合組織に抗ヒト bFGF 抗体陽性部位を認めた。投与 3 日後では、象牙質の陽性部位は投与 1 日後と同様に分布したが、既存歯槽骨及び歯肉結合組織では縮小し限局的となり、既存歯根膜では消失した。なお、対照 HPC 製剤群では、いずれの時点でも陽性部位を認めなかった。

(4) 歯周組織欠損部の再生初期過程における作用

イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、再生に関わる細胞や組織の動態及び血管新生に対する KCB-1 の作用を組織学的に評価した。

1) 歯槽骨欠損部

対照群では、既報[17]と同様に、骨髄に由来する線維芽細胞が既存骨辺縁から増殖することにより、肉芽組織の形成が投与 7 日後から観察された。肉芽組織は増加するとともに、線維性結合組織に置換されながら、投与 14 日後に欠損部全体に拡大した。これらの組織は投与 7 日後から順次、新生骨に置換されたが、投与 28 日後でも骨欠損部全体を新生骨が占めるには至らなかった。

一方、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では、対照 HPC 製剤群で観察された一連の再生反応が、より早期にかつ広範囲に観察された。骨髄に由来する線維芽細胞の増殖及び肉芽組織の形成は投与 3 日後から認められた。また、線維性結合組織及び新生骨の形成は、対照 HPC 製剤群と同様に投与 7 日後から観察されたが、より広範囲に認められた。投与 28 日後には、骨欠損部は新生骨で占められ、対照 HPC 製剤群に対して明らかな新生骨組織面積の増加を認めた。

2) 歯根面

対照 HPC 製剤群では、投与 7 日後から歯根膜に由来する線維芽細胞が歯冠側方向に増殖・遊走し、投与 14 日後に歯根面を覆った。しかし、投与 28 日後でも、4 例中 1 例でセメント質が再生されたのみであった。

一方、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では、対照 HPC 製剤群と比較して早期に歯根膜から線維芽細胞が増殖し、投与 7 日後に歯根面を覆った。投与 14 日後には 4 例中 1 例で、投与 28 日後では 4 例中 3 例でコラーゲン線維束の埋入した新生セメント質が観察され、対照 HPC 製剤群に対して、早期に結合組織性付着の再生が認められた。

3) 血管新生

投与 7 日後に新生血管を観察した。歯周組織欠損部全体では、対照 HPC 製剤群では血管新生が限局的に観察されたのに対して、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では全域に認められた。また、歯根面から近心側 1 mm 幅では、血管径 10 μm 以下、10 μm 超～30 μm 以下及び 30 μm 超のいずれの血管でも、0.3% KCB-1HPC 製剤群の血管数は対照 HPC 製剤群に比べて高値を示した。

(5) 歯周組織欠損部における骨関連たん白質の遺伝子発現

イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、欠損部の再生組織における骨関連たん白質の遺伝子発現を検討した。KCB-1 は、投与 7 日後に対照 HPC 製剤に対して細胞数の指標となる総 RNA 量を増加させるとともに、投与 7 及び 14 日後には BMP-2、Sp7、ALP 及び OC の遺伝子発現を増加させた。

2.6.2.1.1.3 効力を裏付ける試験のまとめ

効力を裏付ける試験から、KCB-1 HPC 製剤は、イヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、歯周組織を構成する歯槽骨、セメント質及び歯根膜の再生を促進することが明らかとなった。KCB-1 により形成された新生骨と対照 HPC 製剤群の自然治癒による新生骨とでは、海綿骨微細構造に差がなく、骨質は同等であることが確認された。また、KCB-1 により新生したセメント質と歯根膜による付着様式は、結合組織性付着であった。

歯周組織の再生を促進する機序についての検討から、歯周組織欠損部に投与した KCB-1 は、

歯槽骨、歯根膜及び象牙質に分布して、分化能を維持した状態で骨髄及び歯根膜由来の細胞の増殖や遊走を促進するとともに血管を新生させ、欠損部を細胞で満たし再生を促進すると推察された。増殖した細胞は、KCB-1 消失後に BMP-2 を介してすみやかに分化・成熟して新生骨を形成するとともに、セメント質及び歯根膜を形成し、結合組織性付着を伴う歯周組織を再生すると考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験
2.6.2.2.1 歯周組織再生作用
2.6.2.2.1.1 用量反応性

資料番号 4.2.1.1-1

イヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルを用い、KCB-1 の歯周組織再生促進作用の用量反応性を検討した。

<試験方法>

イヌの下顎左右第 1 後臼歯近心側に 2 壁性歯周組織欠損（[redacted]mm [redacted]mm [redacted]mm）を作製し（図 2.6.2-1A）、KCB-1 HPC 製剤［0.03、0.1、0.3%（それぞれ 18、60、180 μg/60 μL）］又は対照 HPC 製剤（60 μL）を欠損部に単回投与した。投与 3 ヵ月後、軟 X 線写真像により欠損部の骨塩量を求めた。更に歯周組織欠損部の組織標本を用いて形態計測（図 2.6.2-1B）及び組織学的観察を行った。

本試験における評価指標、評価項目及び計測の定義等の一覧を、表 2.6.2-2 に示した。

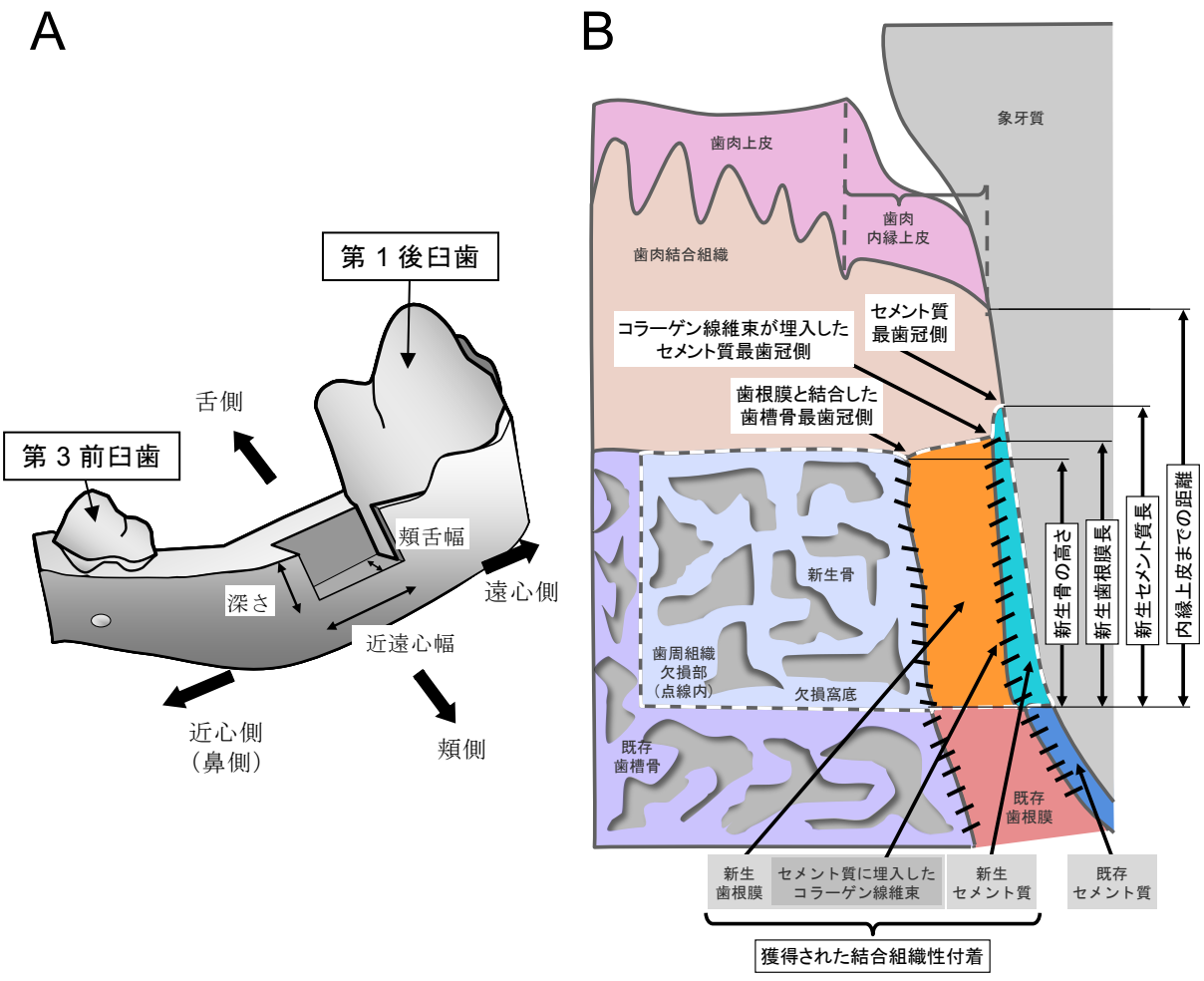


図 2.6.2-1 歯周組織欠損の模式図及び歯周組織断面図

A：イヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルの欠損形態（下顎左側）を示す
B：歯周組織欠損部の近遠心断面図を示す。白点線部を欠損させている

表 2.6.2-2 本試験における評価項目、評価方法及び計測内容

評価項目	指標	方法	計測内容
新生骨に対する作用	骨塩量	軟 X 線写真を用いた画像解析	欠損部の骨塩量を、参照体（アルミニウムステップ）の厚さに変換し、総 mm Al 当量値で示した。これは、新生骨の骨量に相当する
	新生骨組織面積	組織標本を用いた形態計測（近遠心断面：図 2.6.2-1B 参照）	歯槽骨欠損部に形成された新生骨の面積を定量した
結合組織性付着に対する作用	新生セメント質長		欠損窩底から、欠損部歯根面に形成された新生セメント質の最歯冠側までの距離を測定した
	新生歯根膜長		欠損窩底から、コラーゲン線維束が埋入した新生セメント質の最歯冠側までの距離を測定した

<試験成績>

(1) 新生骨に対する作用

KCB-1 HPC 製剤は、用量依存的に欠損部の骨塩量（図 2.6.2-2）及び新生骨組織面積（図 2.6.2-3）を増加させ、対照 HPC 製剤に比べて 0.1%以上の用量で有意に新生骨の形成を促進した。

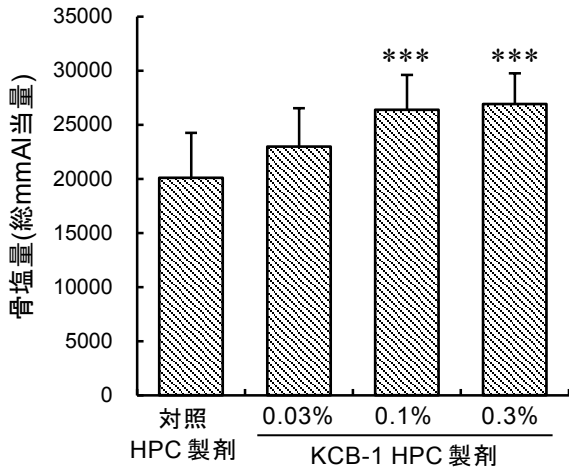


図 2.6.2-2 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部の骨塩量

平均± S.D.、n = 17（対照 HPC 製剤）、n = 14（0.03%）、n = 18（0.1%）、n = 17（0.3%）
***：p< 0.001（対照 HPC 製剤との比較、Dunnett の多重比較）

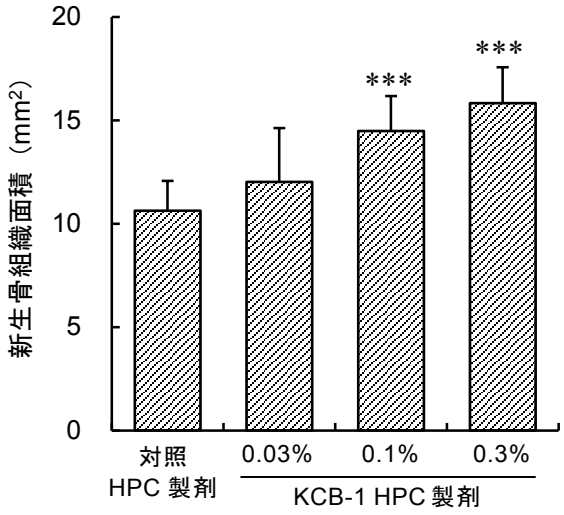


図 2.6.2-3 イヌ歯周組織欠損モデルにおける新生骨組織面積
平均± S.D.、n = 17（対照 HPC 製剤）、n = 14（0.03%）、n = 18（0.1%）、n = 17（0.3%）
*** : p< 0.001（対照 HPC 製剤との比較、Dunnett の多重比較）

(2) 結合組織性付着に対する作用

両群とも窩底部では、新生セメント質と新生骨との間には新生歯根膜が形成され、斜めに走行するコラーゲン線維束がセメント質に埋入した結合組織性付着像を呈した（図 2.6.2-4）。

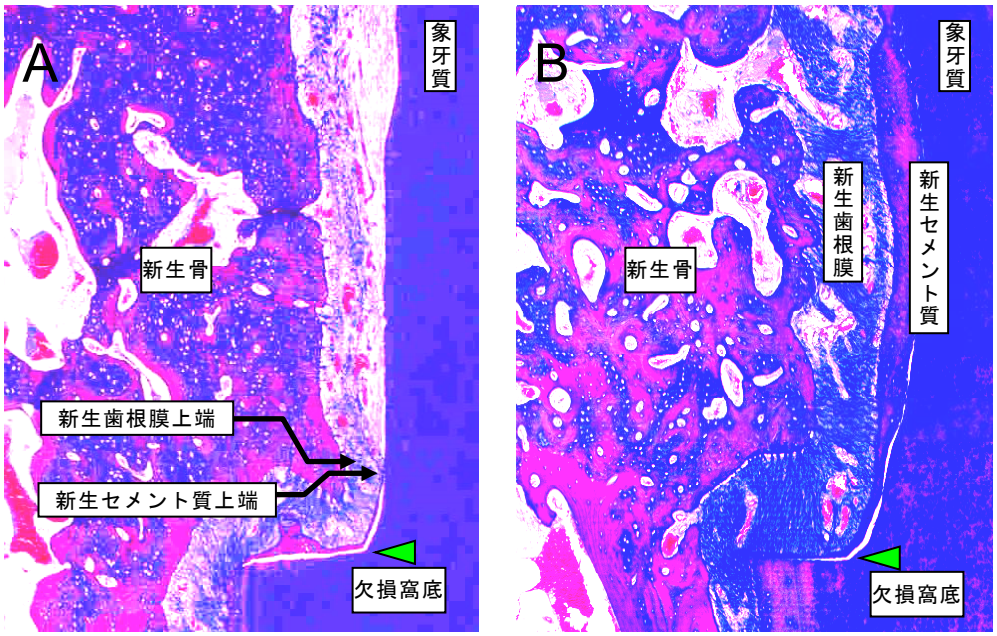


図 2.6.2-4 イヌ歯周組織欠損モデルにおける歯周組織欠損窩底部の組織像
アザン染色、緑矢印：欠損窩底
A：対照 HPC 製剤。新生歯根膜上端より歯冠側には、歯根面に平行走行したコラーゲン線維束を有する結合組織が観察された（方向を合わせるため原図を反転した）
B：0.3% KCB-1 HPC 製剤。新生歯根膜には、新生セメント質と新生骨に埋入したコラーゲン線維束の斜行像が観察された

対照 HPC 製剤群では、新生セメント質の厚みが既存セメント質よりも薄い未熟な組織像が観察された。一方、KCB-1 HPC 製剤群では、新生セメント質が厚みを持ち再生した組織像や、歯根面に沿って歯冠側まで伸長した組織像が認められた。

組織学的な形態計測によって、形成された新生セメント質及び新生歯根膜の長さを測定した（図 2.6.2-5）。新生セメント質長及び新生歯根膜長は、KCB-1 HPC 製剤の用量に依存して増加し、0.1%以上で対照 HPC 製剤と比べて有意な差を示した。

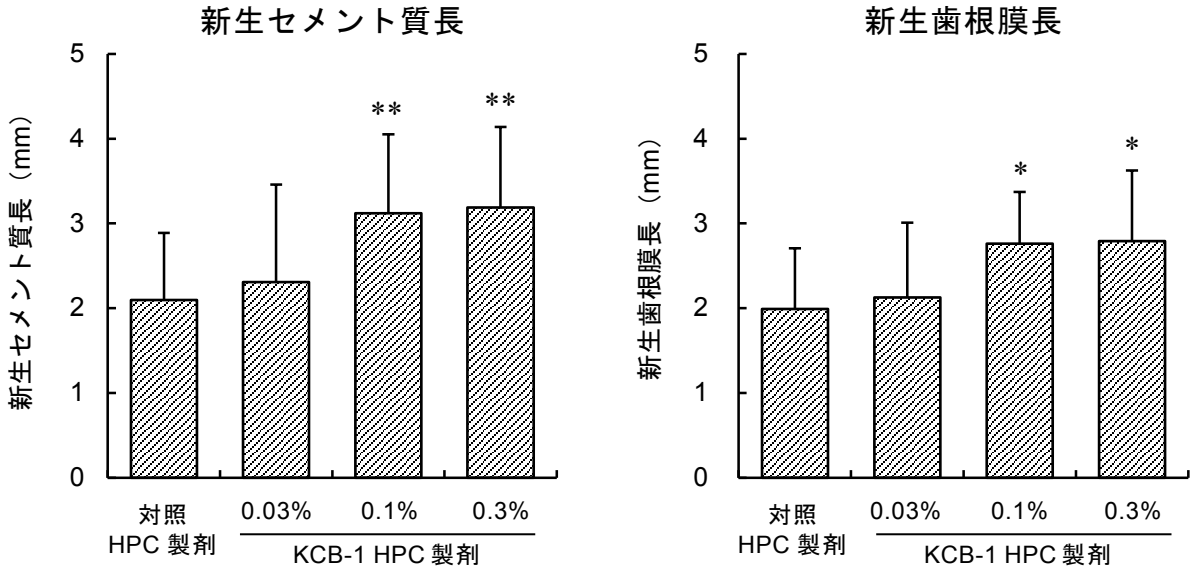


図 2.6.2-5 イヌ歯周組織欠損モデルにおける新生セメント質長及び新生歯根膜長

平均± S.D.、n = 17（対照 HPC 製剤）、n = 14（0.03%）、n = 18（0.1%）、n = 17（0.3%）
*：p< 0.05、**：p< 0.01（対照 HPC 製剤との比較、Dunnett の多重比較）

2.6.2.2.1.2 長期観察

資料番号 4.2.1.1-2、4.2.1.1-3、4.2.1.1-4

イヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルを用い、新生骨の形成の推移を観察した。骨塩量が一定となった投与 13 ヵ月後において、KCB-1 により再生した歯周組織の量的及び質的評価を行った。

<試験方法>

用量反応試験（2.6.2.2.1.1 項）と同様にイヌ 2 壁性歯周組織欠損モデルを作製し、0.3% KCB-1 HPC 製剤（180 µg/60 µL）又は対照 HPC 製剤（60 µL）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 ヵ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（図 2.6.2-1B）。

本試験における評価指標、評価項目及び計測の定義等の一覧を、表 2.6.2-3 に示した。

表 2.6.2-3 本試験における評価項目、評価方法及び計測内容

評価項目	指標	方法	計測内容
新生骨に対する作用	骨塩量	軟 X 線写真を用いた画像解析	欠損部の骨塩量を、参照体（アルミニウムステップ）の厚さに変換し、総 mm Al 当量値で示した。これは、新生骨の骨量に相当する
	皮質骨体積	µCT を用いた形態計測	新生骨及び無処置群の欠損作製相当部位の皮質骨の体積を測定した
	骨梁体積率、骨梁厚、骨梁間隙、骨梁数		新生骨内部に形成された海綿骨について、骨髄腔内の海綿骨の比率（骨梁体積率）、骨梁の厚み（骨梁厚）、骨梁間の距離（骨梁間隙）及び骨梁の数（骨梁数）を計測した
	新生骨組織面積	組織標本を用いた形態計測（近遠心断面：図 2.6.2-1B 参照）	歯槽骨欠損部に形成された新生骨の面積を定量した
	新生骨の高さ		欠損窩底から、コラーゲン線維束が埋入した新生骨の最歯冠側までの距離を測定した
結合組織性付着に対する作用	新生セメント質長		欠損窩底から、欠損部歯根面に形成された新生セメント質の最歯冠側までの距離を測定した
	新生歯根膜長		欠損窩底から、コラーゲン線維束が埋入した新生セメント質の最歯冠側までの距離を測定した
	内縁上皮までの距離		欠損窩底から、歯肉内縁上皮の最根尖側までの距離を測定した

<試験成績>

(1) 新生骨に対する作用

1) 骨量の解析

対照 HPC 製剤群の欠損部の骨塩量は、投与 2 ヵ月後に最大となりその後、大きな変化なく推移した（図 2.6.2-6）。0.3% KCB-1 HPC 製剤群の欠損部の骨塩量は、投与 2 ヵ月後から対照 HPC 製剤群に対して有意に増加し、その差は投与 13 ヵ月後まで維持された。µCT を用いた解析により、投与 13 ヵ月後の皮質骨の体積は、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では対照 HPC 製剤群に比べて有意に増加することが明らかとなった（図 2.6.2-7）。組織学的な形態計測から、0.3%

KCB-1 HPC 製剤群の新生骨組織面積は対照 HPC 製剤群に比べて有意に高値を示した（図 2.6.2-8）。

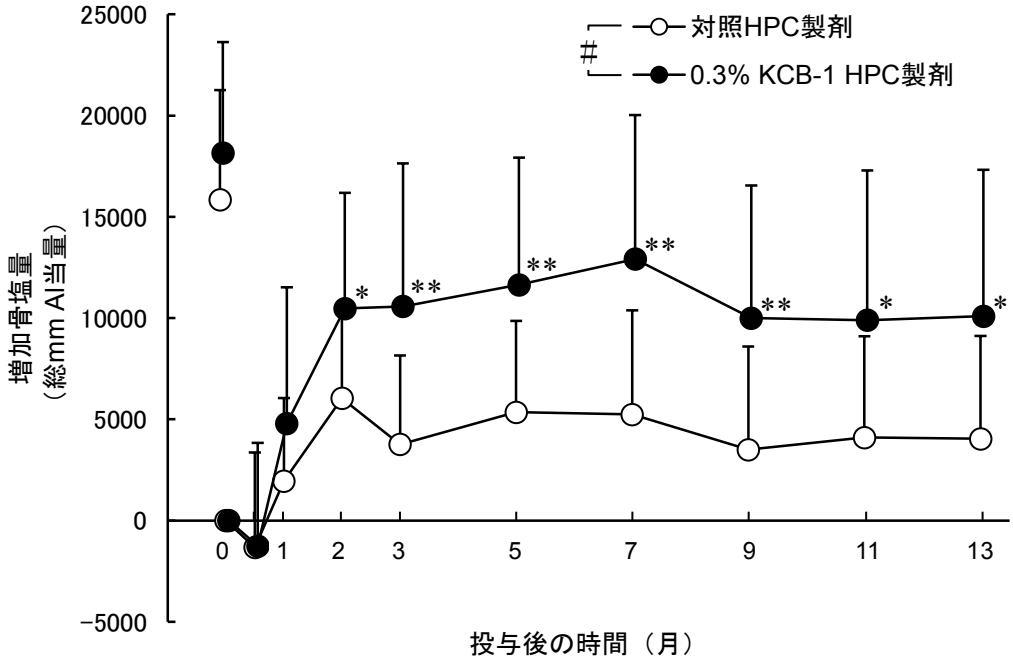


図 2.6.2-6 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部骨塩量の経時変化
平均± S.D.、n = 14。左上のシンボルは欠損作製前値を示す
*：p< 0.05、**：p< 0.01（対照 HPC 製剤との比較、t 検定）
#：p< 0.05（対照 HPC 製剤との比較、経時測定型分散分析）

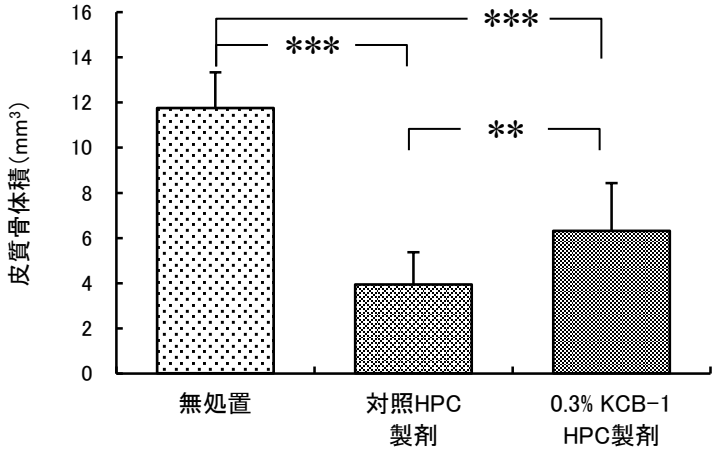


図 2.6.2-7 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部新生骨の皮質骨体積
平均± S.D.、n = 14（対照 HPC 製剤、0.3% KCB-1 HPC 製剤）、n = 16（無処置群）
無処置群は、欠損作製相当部位の歯槽骨で評価した
：p< 0.01、*：p< 0.001（Tukey の多重比較）

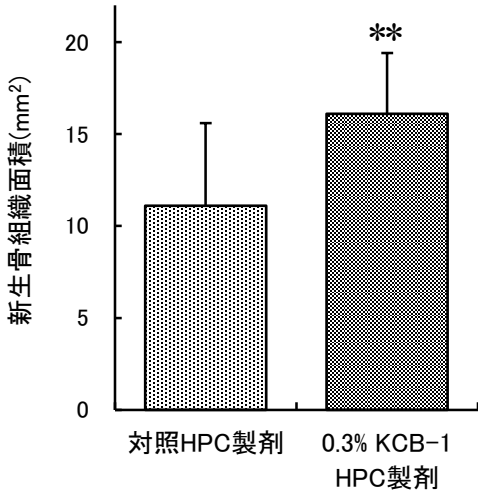


図 2.6.2-8 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部の形態計測 - 新生骨組織面積 -
平均± S.D.、n = 14、**：p< 0.01（対照 HPC 製剤との比較、t 検定）

2) 骨質の解析

骨髄腔内の海綿骨の比率（骨梁体積率：BV/TV）、骨梁の形態を示す骨梁厚（Tb.Th）、骨梁の位置関係を示す骨梁間の間隙の距離（Tb.Sp）及び骨梁数（Tb.N）は、対照 HPC 製剤群と 0.3% KCB-1 HPC 製剤群間でいずれも同等であり（表 2.6.2-4）、新生海綿骨の骨梁の微細構造に差は認められなかった。

表 2.6.2-4 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

評価項目（単位）	無処置	対照 HPC 製剤	0.3% KCB-1 HPC 製剤
骨の種別	既存骨	新生骨	
骨梁体積率；BV/TV（%）	35.2 ± 9.9	54.2 ± 24.2 **	63.4 ± 13.5***
骨梁厚；Tb.Th（μm）	178.2 ± 31.3	174.2 ± 33.7	174.4 ± 21.5
骨梁間隙；Tb.Sp（μm）	429.0 ± 166.3	223.6 ± 110.5***	170.5 ± 88.7***
骨梁数；Tb.N（本）	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.5 *	1.1 ± 0.2 *

平均± S.D.、n = 14（対照 HPC 製剤、0.3% KCB-1 HPC 製剤）、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 HPC 製剤群と 0.3% KCB-1 HPC 製剤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

対照 HPC 製剤群及び 0.3% KCB-1 HPC 製剤群ともに、無処置群に対して BV/TV、Tb.Sp、Tb.N で差が認められ、骨梁の多い密な構造であることが明らかとなった。これは対照 HPC 製剤群及び 0.3% KCB-1 HPC 製剤群は新生骨であり、無処置群は既存骨であるため、骨の成熟の程度が異なっていたことによると考えられた。このことは皮質骨体積についても同様であり、対照 HPC 製剤群及び 0.3% KCB-1 HPC 製剤群ともに、無処置群に対して低値を示す理由であると推察された（図 2.6.2-7）。新生骨と既存骨の構造的な差は、更なる継続的な過重負荷を受け骨の成熟が進むに伴って減少すると考えられた [18)]。

これらの結果から、歯周組織欠損部の新生骨の量は、KCB-1 により投与 2 ヵ月後から対照 HPC 製剤群に対して有意に増加し、投与 13 ヵ月後まで高値を維持することが明らかとなった。また、KCB-1 により増加した新生骨の質は、対照 HPC 製剤群とその微細構造に差はないことから、自然治癒による新生骨と同等であることが示された。

(2) 結合組織性付着に対する作用

組織学的な観察から、対照 HPC 製剤群及び 0.3% KCB-1 HPC 製剤群とも、新生セメント質及び新生歯根膜の再生が認められた（図 2.6.2-9）。組織学的な形態計測により、0.3% KCB-1 HPC 製剤群の新生セメント質長及び新生歯根膜長は、対照 HPC 製剤群に比べて有意に増加することが明らかとなった（図 2.6.2-10）。また、両群とも歯根面には、新生歯根膜及び歯肉結合組織の太いコラーゲン線維束が新生セメント質に埋入した結合組織性付着像が観察された（図 2.6.2-11）。新生セメント質は、対照 HPC 製剤群及び 0.3% KCB-1 HPC 製剤群とも既存セメント質より薄かったが一定の厚みで形成されていた。骨性癒着はいずれの群でも認められなかった。

また、新生骨の高さは、新生歯根膜長と同程度であり、対照 HPC 製剤群と比較して 0.3% KCB-1 HPC 製剤群で有意な増加を認めた（図 2.6.2-10）。この結果より、新生骨と新生歯根膜は同程度の高さであることが明らかとなった。更に、骨塩量（図 2.6.2-6）及び新生骨組織面積（図 2.6.2-8）から示された新生骨の形成量の差は、新生骨の高さにも反映されることが明らかとなった。

内縁上皮までの距離に関しても、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では、対照 HPC 群に対して有意に増加し（図 2.6.2-10）、歯肉内縁上皮は歯冠側に保たれ、その深行増殖は観察されなかった。

これらの結果から、投与 13 ヵ月後において、KCB-1 によって結合組織性付着の獲得が促進することが明らかとなった。

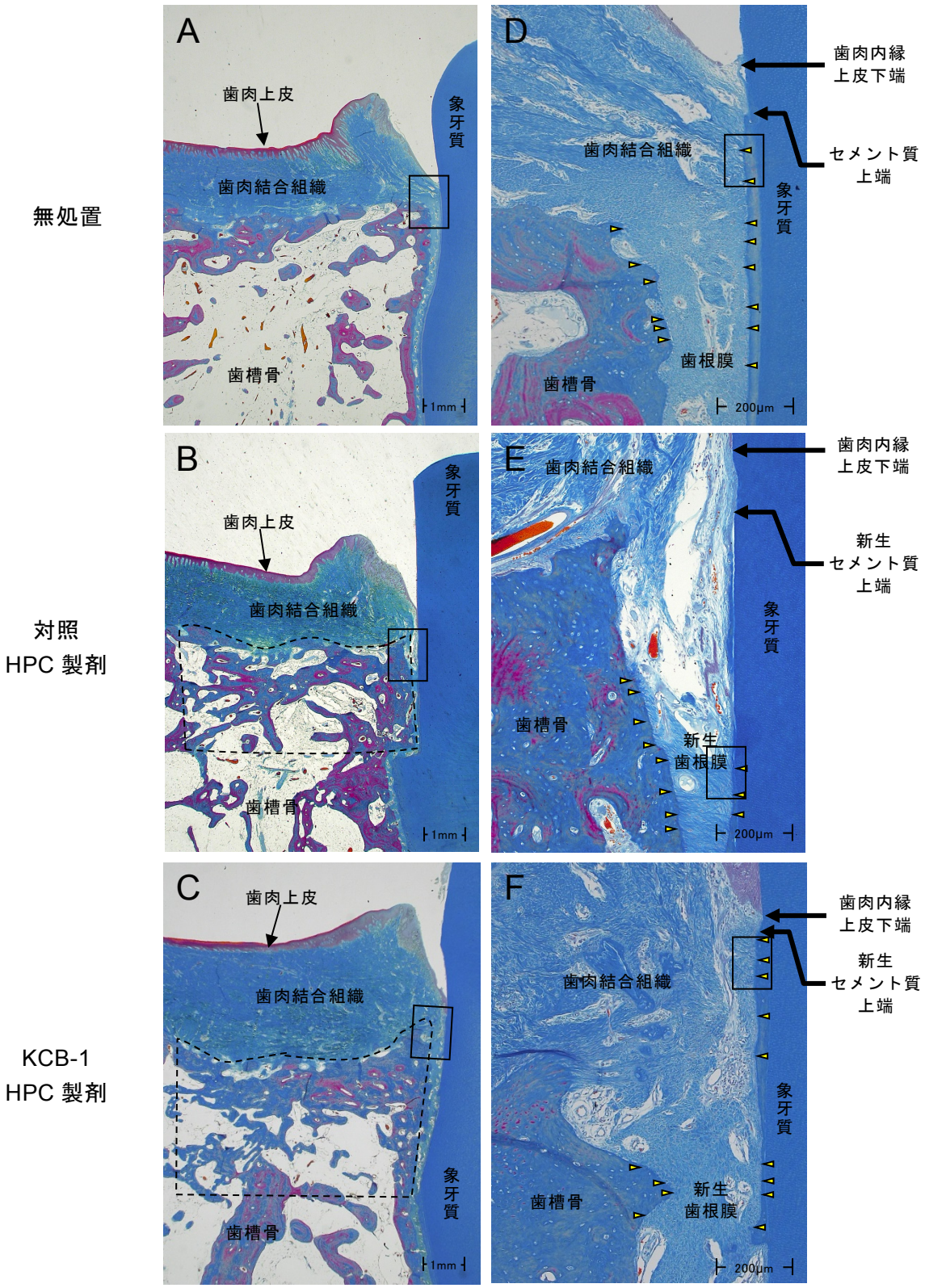


図 2.6.2-9 イヌ歯周組織欠損モデルにおける再生歯周組織の組織像

アザン染色

A 及び D：無処置群、B 及び E：対照 HPC 製剤群、C 及び F：0.3% KCB-1 HPC 製剤群

点線内は欠損部。黄三角は埋入したコラーゲン線維束を示す。A～C 内の黒四角は、それぞれ D～F の領域を示す。D、E 及び F 内の黒四角は、それぞれ図 2.6.2-11 A、B 及び C の領域を示す

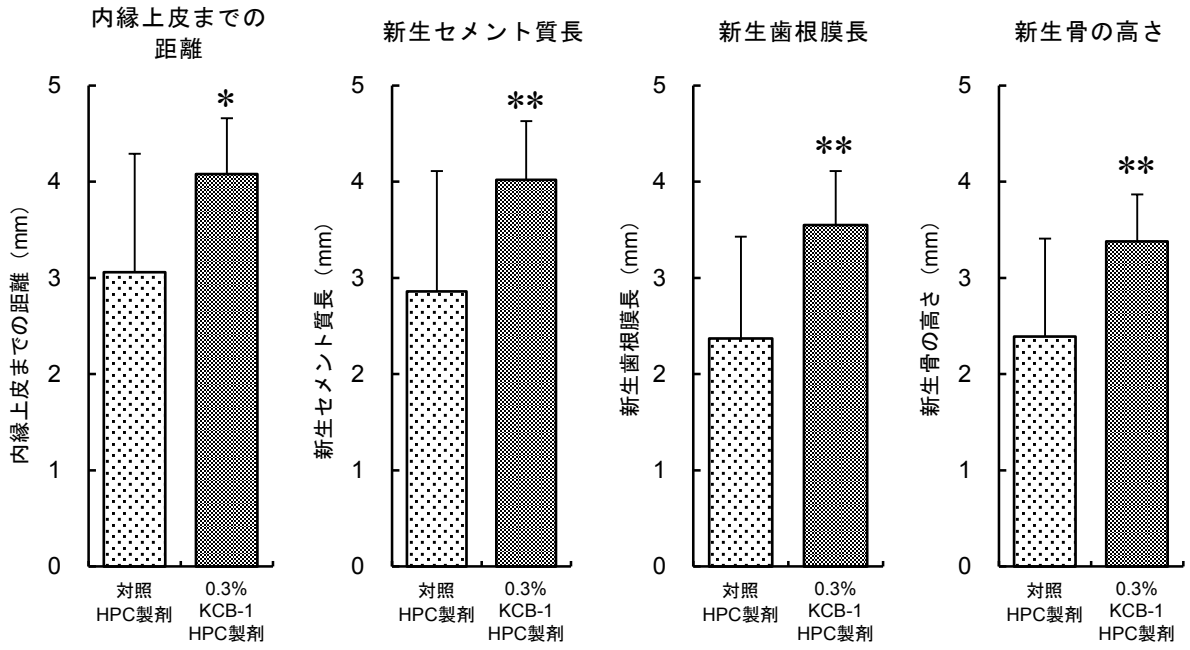


図 2.6.2-10 イヌ歯周組織欠損モデルにおける欠損部の形態計測 - 内縁上皮までの距離、新生セメント質長、新生歯根膜長及び新生骨の高さ -

平均± S.D.、n = 14、*：p< 0.05、**：p< 0.01（対照 HPC 製剤との比較、t 検定）

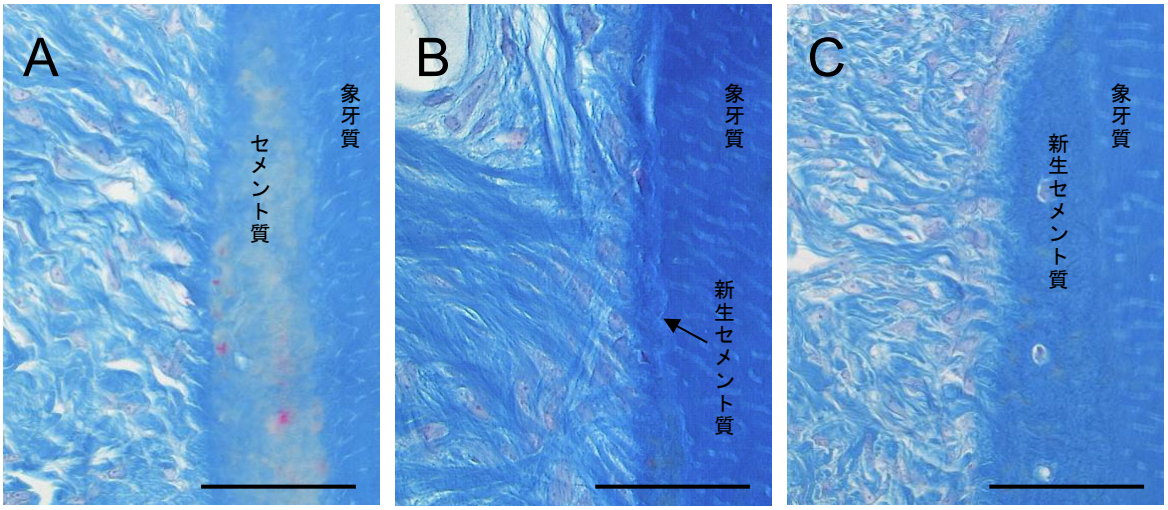


図 2.6.2-11 イヌ歯周組織欠損モデルにおけるセメント質最歯冠側の組織像

アザン染色、A：無処置群、B：対照 HPC 製剤群、C：0.3% KCB-1 HPC 製剤群
図 2.6.2-9 D、E 及び F の黒四角の拡大像を示す
新生セメント質へのコラーゲン線維束の埋入が認められる
横棒は 50 μm を示す