### 2.6.2.2.2 作用機序

#### 2.6.2.2.2.1 ラット骨髄由来間葉系細胞の増殖と分化に対する作用

資料番号 4.2.1.1-5

骨髄に由来する間葉系細胞のうち、線維芽細胞様の形態を有する細胞集団に未分化な細胞が存在し、この細胞が骨芽細胞へ分化することが知られている [19]。bFGF の骨形成促進作用は、骨髄の未分化間葉系細胞を増殖させ、増殖した細胞が骨芽細胞へ分化することに基づくと考えられている [7,8,9]。この効果を検証するために、ラット骨髄由来間葉系細胞の増殖と分化に対する KCB-1 の作用を検討した。

<試験方法>

ラットの骨髄から採取した間葉系細胞を播種し、DEX（最終濃度 $1 \times 10^{-7}$ mol/L）及び KCB-1（最終濃度 0.5、2.5、12.5 ng/mL）を添加した。培養 7 日後に KCB-1 を除くとともに分化誘導培地（最終濃度 DEX $1 \times 10^{-7}$ mol/L、アスコルビン酸 50 μg/mL 及び β-グリセロホスフェート 10 mmol/L を含む培養液）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、骨芽細胞の分化の指標として ALP 活性を測定した。ALP 活性は、*p*-ニトロフェノール産生量から算出した。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定量した。

<試験成績>

KCB-1 は、培養 7 日後の DNA 量を濃度依存的に増加させ、この変化は、KCB-1 非存在下の培養 11 日以降も維持された（図 2.6.2-12）。ALP 活性は、培養 11 日後において増殖した細胞の数（DNA 量）に依存して上昇し、以後培養 21 日後まで一定値を示した（図 2.6.2-13）。細胞外基質に沈着したカルシウム量は、すべての KCB-1 の濃度で培養 14 日から 21 日後にかけて経時的に増加した（図 2.6.2-14）。

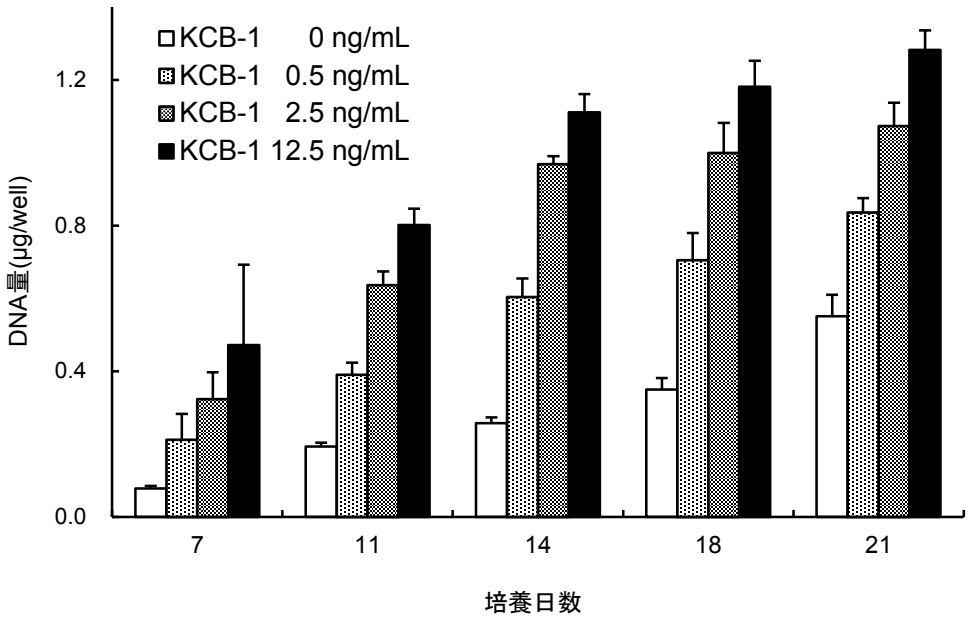



図 2.6.2-12 KCB-1 刺激後のラット骨髄由来間葉系細胞の増殖（DNA 量）

平均± S.D.、n = 3

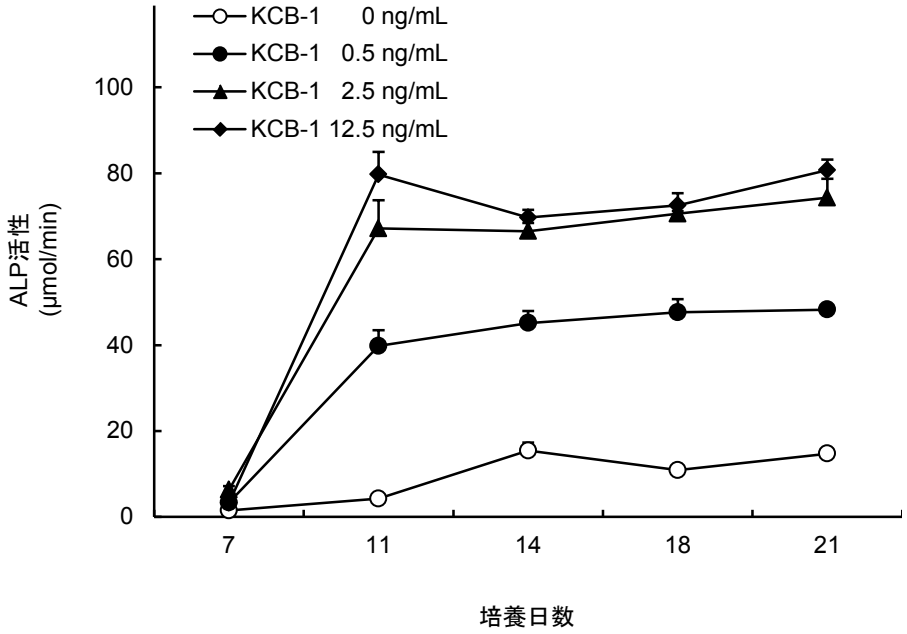



図 2.6.2-13 KCB-1 刺激後のラット骨髄由来間葉系細胞の ALP 活性
平均± S.D.、n = 3、ALP 活性は *p*-ニトロフェノールの産生量（μmol/min）で表した

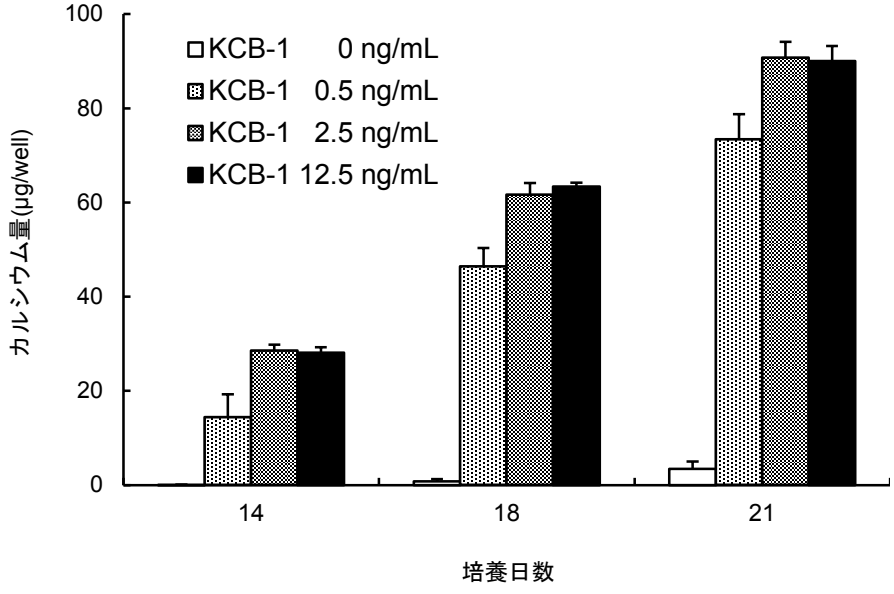



図 2.6.2-14 KCB-1 刺激後のラット骨髄由来間葉系細胞のカルシウム量
平均± S.D.、n = 3

### 2.6.2.2.2.2 ヒト歯根膜細胞の増殖と分化に対する作用

資料番号 4.2.1.1-6

ヒト歯根膜細胞に対する KCB-1 の増殖促進作用及び硬組織形成細胞（セメント芽細胞及び骨芽細胞）への分化能について検討した。

**(1) 細胞増殖に対する作用**

<試験方法>

ヒト歯根膜細胞に KCB-1（最終濃度 0.3、1、3、10、30 ng/mL）を添加して 3 日間培養し、細胞の DNA 量を指標に増殖促進作用を検討した。

<試験成績>

KCB-1 は 0.3 ng/mL から濃度依存的にヒト歯根膜細胞の増殖を促進した（図 2.6.2-15）。

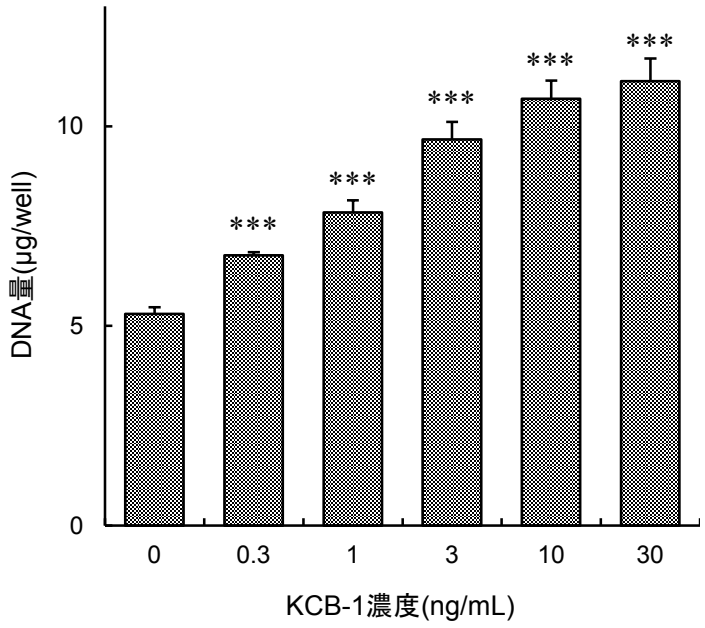



図 2.6.2-15 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の細胞増殖に対する作用（DNA 量）

平均± S.D.、n = 4 、***：p< 0.001（0 ng/mL との比較、Dunnett の多重比較）

(2) 硬組織形成細胞への分化に対する作用

<試験方法>

ヒト歯根膜細胞を KCB-1（最終濃度 10 ng/mL）添加あるいは非添加で 3 日間培養後、KCB-1 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（アスコルビン酸 50 μg/mL 及び β-グリセロホスフェート 10 mmol/L を含む培養液）に置換して、硬組織形成細胞への分化を誘導した後、24 日間培養した。分化の指標として、ALP 活性（分化誘導 14 日後）と細胞外基質に沈着したカルシウム量（分化誘導 24 日後）を評価した。

<試験成績>

KCB-1 により増殖した細胞を分化誘導したところ、KCB-1 非添加の場合と同様に ALP 活性及びカルシウム量が上昇した（図 2.6.2-16）。

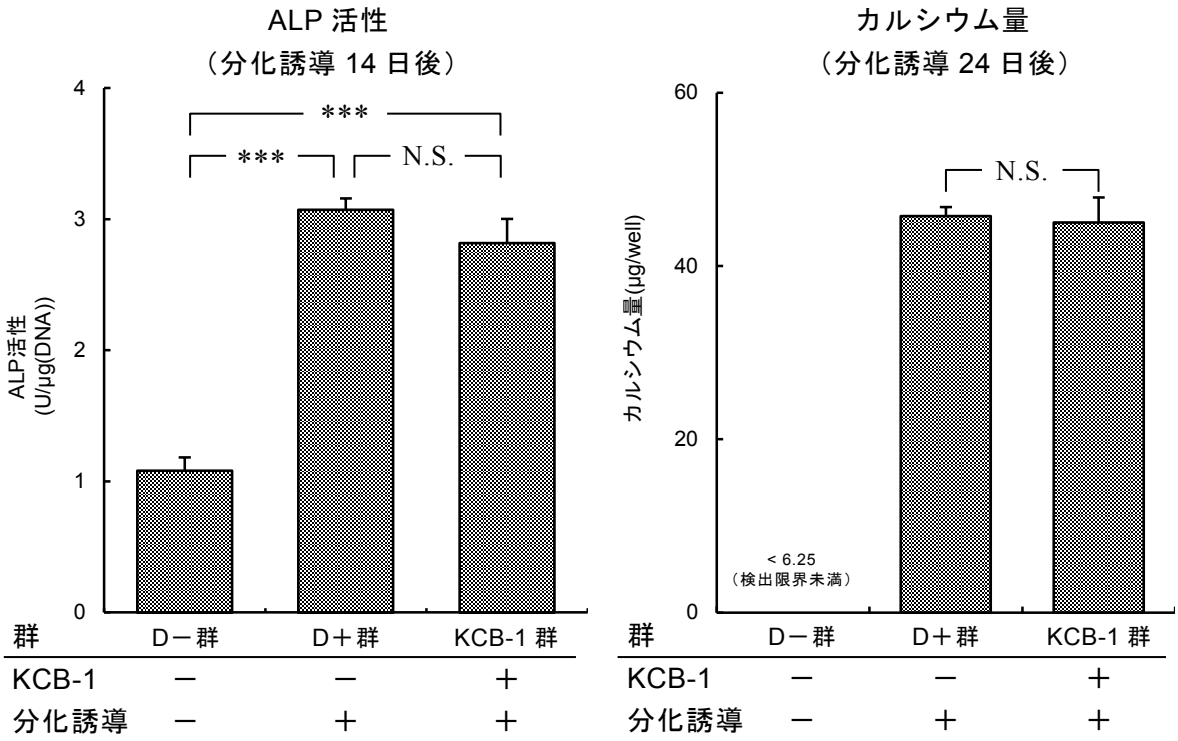



図 2.6.2-16 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の ALP 活性及びカルシウム量に及ぼす影響

D－群：KCB-1 非添加・分化誘導なし
D＋群：KCB-1 非添加・分化誘導あり
KCB-1 群：KCB-1 添加・分化誘導あり
ALP 活性：平均± S.D.、n = 4、N.S.：有意差なし、***：p< 0.001（Tukey の多重比較）
カルシウム量：平均± S.D.、n = 4、N.S.：有意差なし、D－群は検出限界未満であるため統計解析には含めなかった（t 検定）

### 2.6.2.2.2.3 ヒト歯根膜細胞の遊走に対する作用

資料番号 4.2.1.1-7、4.2.1.1-8

ヒト歯根膜細胞の遊走に対する KCB-1 の作用を調べるため、ケモタキシス及びケモキネシスを評価した。

#### (1) ケモタキシス作用

<試験方法>

細胞培養ウェルに装着したメンブレンインサートの上室にヒト歯根膜細胞を播種し、下室に種々の濃度の KCB-1（最終濃度 0.01、0.1、1、10、100 ng/mL）を添加した。8 時間培養後、メンブレンの下面に遊走した細胞数を計測した。

<試験成績>

KCB-1 は、1 及び 10 ng/mL の濃度で遊走細胞数を増加させた（図 2.6.2-17）。

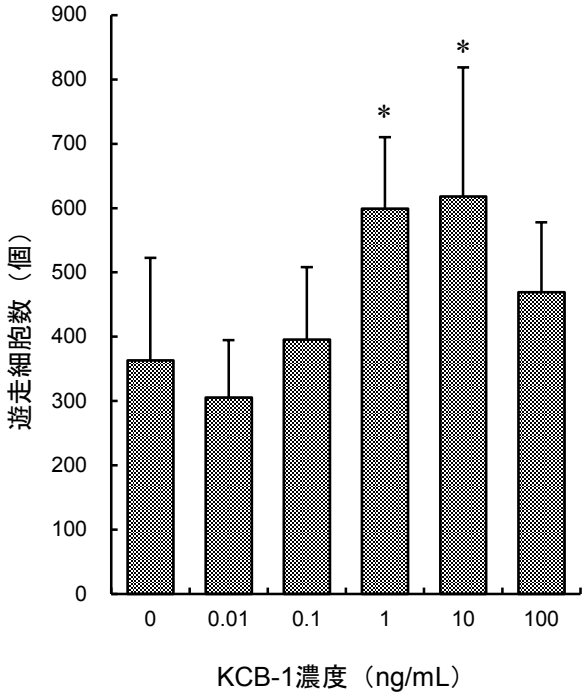



図 2.6.2-17 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の遊走（ケモタキシス）に及ぼす作用

平均± S.D.、n = 6、* : p< 0.05（0 ng/mL との比較、Dunnett の多重比較）

(2) ケモキネシス作用

<試験方法>

細胞培養ウェルの中央に無細胞領域を作製し、ヒト歯根膜細胞を播種した。播種 24 時間後にマイトマイシン処理により細胞増殖を抑制した。マイトマイシンを除去後 KCB-1（最終濃度 0.01、0.1、1、10、100 ng/mL）を添加し、48 時間後に各ウェル中央に形成された無細胞領域へ遊走した細胞数を計測した。

<試験成績>

KCB-1 は、10 及び 100 ng/mL の濃度で遊走細胞数を増加させた（図 2.6.2-18）。

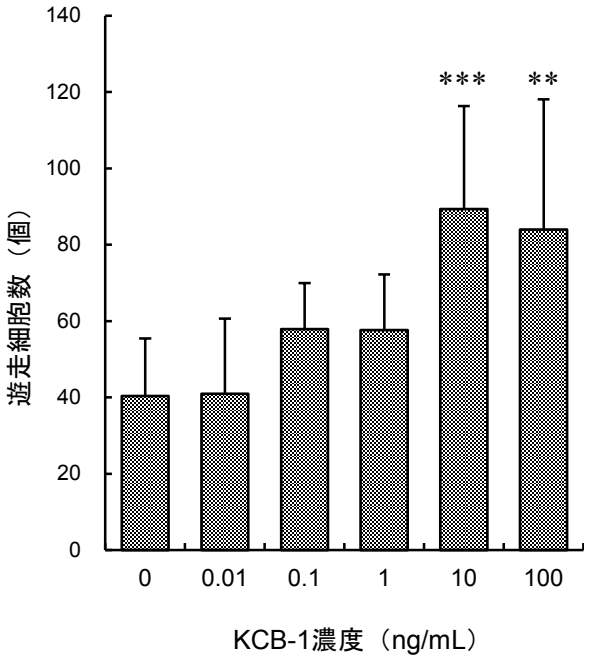



図 2.6.2-18 KCB-1 のヒト歯根膜細胞の遊走（ケモキネシス）に及ぼす作用

平均± S.D.、n = 8、** : p< 0.01、*** : p< 0.001（0 ng/mL との比較、Dunnett の多重比較）

### 2.6.2.2.2.4 イヌ歯周組織欠損部における KCB-1 の分布

**資料番号** 4.2.1.1-9

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。

イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルは、2 壁性歯周組織欠損モデルと比較して歯肉が欠損部に侵入しにくく、再生に必要な空間が維持されやすいため、再生に関する細胞や組織の動態の観察に適している。このため、本項、2.6.2.2.2.5 項及び 2.6.2.2.2.6 項の試験では 3 壁性歯周組織欠損モデルを用いた。

<試験方法>

イヌの下顎左右第 1 後臼歯近心側に 3 壁性歯周組織欠損 [redacted] mm [redacted] mm [redacted] mm）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。投与 6 時間、1 日及び 3 日後に組織を採取し（各群各時点 4 例）、その組織標本を抗ヒト bFGF 抗体により免疫染色し、KCB-1 の分布を観察した。観察部位を図 2.6.2-19 に示した。

<試験成績>

0.3% KCB-1 HPC 製剤の投与 6 時間後及び 1 日後では、抗ヒト bFGF 抗体の陽性部位が、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認められた（図 2.6.2-20 1B、1C、2B、2C、3B、3C、4B、4C）。投与 3 日後では、象牙質の陽性部位は投与 1 日後と同様に分布が認められたが（図 2.6.2-20 2D）、既存歯槽骨、歯肉結合組織では限局的となり、既存歯根膜では消失した（図 2.6.2-20 1D、3D、4D）。なお、対照 HPC 製剤群では、いずれの時点及び部位でも陽性部位は観察されなかった（図 2.6.2-20 1A、2A、3A、4A）。

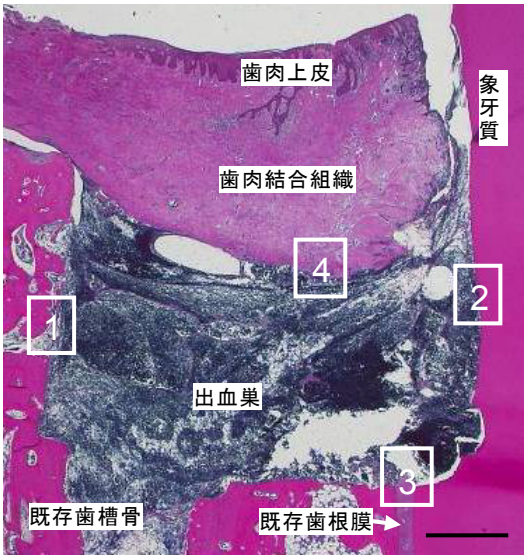



**図 2.6.2-19 イヌ歯周組織欠損モデルにおける免疫染色の観察部位**

欠損部の HE 染色像を示す（対照 HPC 製剤群投与 6 時間後）。図 2.6.2-20 における観察部位を白四角で示した（原図の周囲をトリミングして掲載した）
1：既存歯槽骨、2：象牙質、3：既存歯根膜、4：歯肉結合組織
横棒は 1 mm を示す

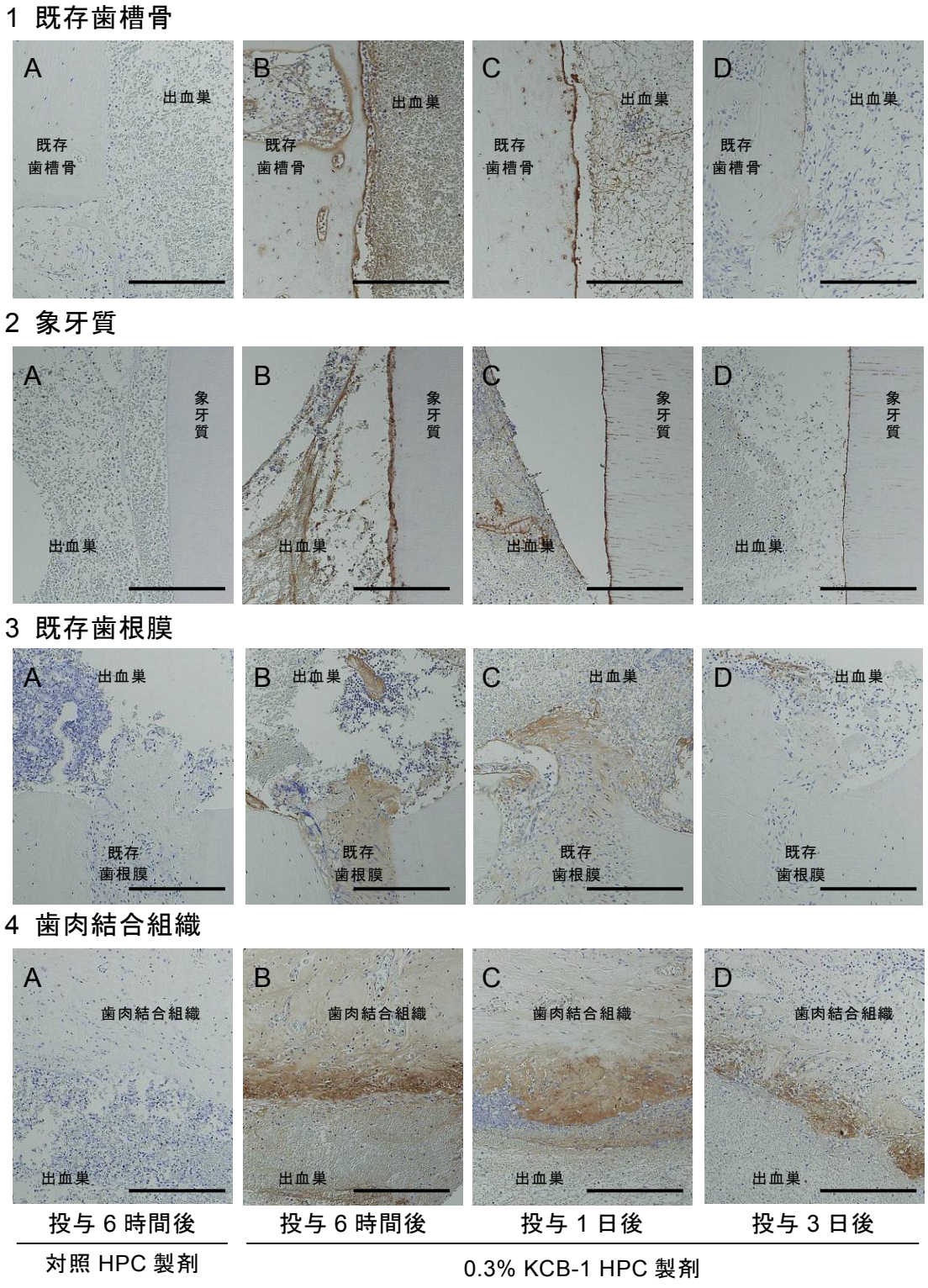



**図 2.6.2-20 イヌ歯周組織欠損モデルにおける免疫染色による KCB-1 の分布**

抗ヒト bFGF 抗体の免疫染色像を示す。抗ヒト bFGF 抗体陽性部位は、茶褐色で染色されている（原図をトリミングして掲載した）

横棒は 200 μm を示す

### 2.6.2.2.2.5 イヌ歯周組織欠損部における再生初期過程の観察

**資料番号** 4.2.1.1-4、4.2.1.1-10

歯周組織再生に関与する細胞・組織の動態の検討から、歯周組織欠損の再生初期過程では、まず欠損部位で出血巣が形成された後、欠損窩底部や欠損の壁面に沿って主に線維芽細胞と新生血管により構成される肉芽組織が形成される。肉芽組織は、次第に欠損部全域に拡大するとともに、線維性結合組織に置き換わる [17]。次いで既存骨の周囲では新生骨が、歯根面ではセメント質及び歯根膜が形成される。また、このような組織再生には、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]。

本試験では分布の観察（2.6.2.2.2.4 項）と同様にイヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、歯槽骨欠損部及び歯根面で増殖する線維芽細胞の変化を観察し、KCB-1 の作用を評価した。加えて、KCB-1 の血管新生作用について検討した。

<試験方法>

イヌ 3 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（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、増殖期の細胞を観察するため抗 PCNA 抗体を用いて免疫染色した。更に、欠損部における血管新生を評価するため、投与 7 日後において墨汁潅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 1 mm 幅の血管数を計測した。

<試験成績>

(1) 歯槽骨欠損部（図 2.6.2-21、欠損部全域）

対照 HPC 製剤群において、投与 3 日後の欠損部は出血巣で占められていた。投与 7 日後では、投与 3 日後と同様に欠損部の大部分を出血巣が占めたが、PCNA 陽性の増殖期にある細胞が観察され、既存骨辺縁から肉芽組織及び線維性結合組織のわずかな増殖が認められ（図 2.6.2-22 K）、4 例中 1 例で新生骨が形成された。投与 14 日後では出血巣は退縮し、肉芽組織及び線維性結合組織が形成され、既存骨辺縁には新生骨が観察された。投与 28 日後には、残存する出血巣の周囲に線維性結合組織が形成され、それらを取り囲むように新生骨が凹状に観察された。

一方、0.3% KCB-1 HPC 製剤群において、投与 3 日後の欠損部は出血巣で占められていたが、既存骨辺縁で PCNA 陽性細胞が出現し、血管新生及び肉芽組織形成が観察された（図 2.6.2-22 J）。投与 7 日後では出血巣は縮小し、ほぼ欠損部全域に PCNA 陽性の細胞が多数観察され、肉芽組織及び線維性結合組織が増殖し（図 2.6.2-22 L）、既存骨辺縁では新生骨形成を認めた（図 2.6.2-21 D）。投与 14 日後において、欠損部の大部分を新生骨が占め、欠損中央部に肉芽組織と線維性結合組織が残存していた（図 2.6.2-21 F）。投与 28 日後では、欠損部全域で新生骨が観察された。

組織学的計測結果から、投与 14 及び 28 日後において 0.3% KCB-1 HPC 製剤は、新生骨組織面積を対照 HPC 製剤に比べて有意に増加させた（図 2.6.2-23）。なお、投与 7 日後では、対照 HPC 製剤群では 4 例中 1 例のみで新生骨が形成されたが、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では全例とも新生骨が観察された。

以上のことから、KCB-1 は既存骨骨髄に由来する線維芽細胞の増殖を促進して肉芽組織及び線維性結合組織の形成を早期に増加させ、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と考えられた。

(2) 歯根面（図 2.6.2-21、象牙質表面）

対照 HPC 製剤群において、投与 3 日後では欠損窩底部から歯冠部まで出血巣が認められた（図 2.6.2-24 M）。投与 7 日後では線維芽細胞の増殖・遊走が既存歯根膜から認められ、投与 14 日後では歯冠側まで観察された（図 2.6.2-25 Q）。投与 28 日後において、4 例中 1 例でセメント質の再生を認めた。

一方、0.3% KCB-1 HPC 製剤群において、投与 3 日後では欠損窩底部から歯冠部まで出血巣が認められたが、既存歯根膜から歯冠側への線維芽細胞の増殖が観察された（図 2.6.2-24 N）。投与 7 日後では PCNA 陽性細胞が多数観察され（図 2.6.2-24 P）、線維芽細胞が歯冠側まで増殖した。投与 14 日後では、緻密な線維構造を呈し、コラーゲン線維束が埋入する新生セメント質が 4 例中 1 例で観察された（図 2.6.2-25 R）。投与 28 日後には、欠損窩底近傍で新生セメント質及び新生骨へのコラーゲン線維束の埋入像が 4 例中 3 例で観察された（図 2.6.2-25 T）。

歯肉内縁上皮及び歯肉結合組織では、0.3% KCB-1 HPC 製剤群は PCNA の発現率がいずれの時点においても対照 HPC 製剤群に対してわずかに高かったが、これらの組織の増殖に KCB-1 の影響は認められなかった。

以上のことから、0.3% KCB-1 HPC 製剤は、対照 HPC 製剤群と比べて既存歯根膜からの線維芽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と考えられた。

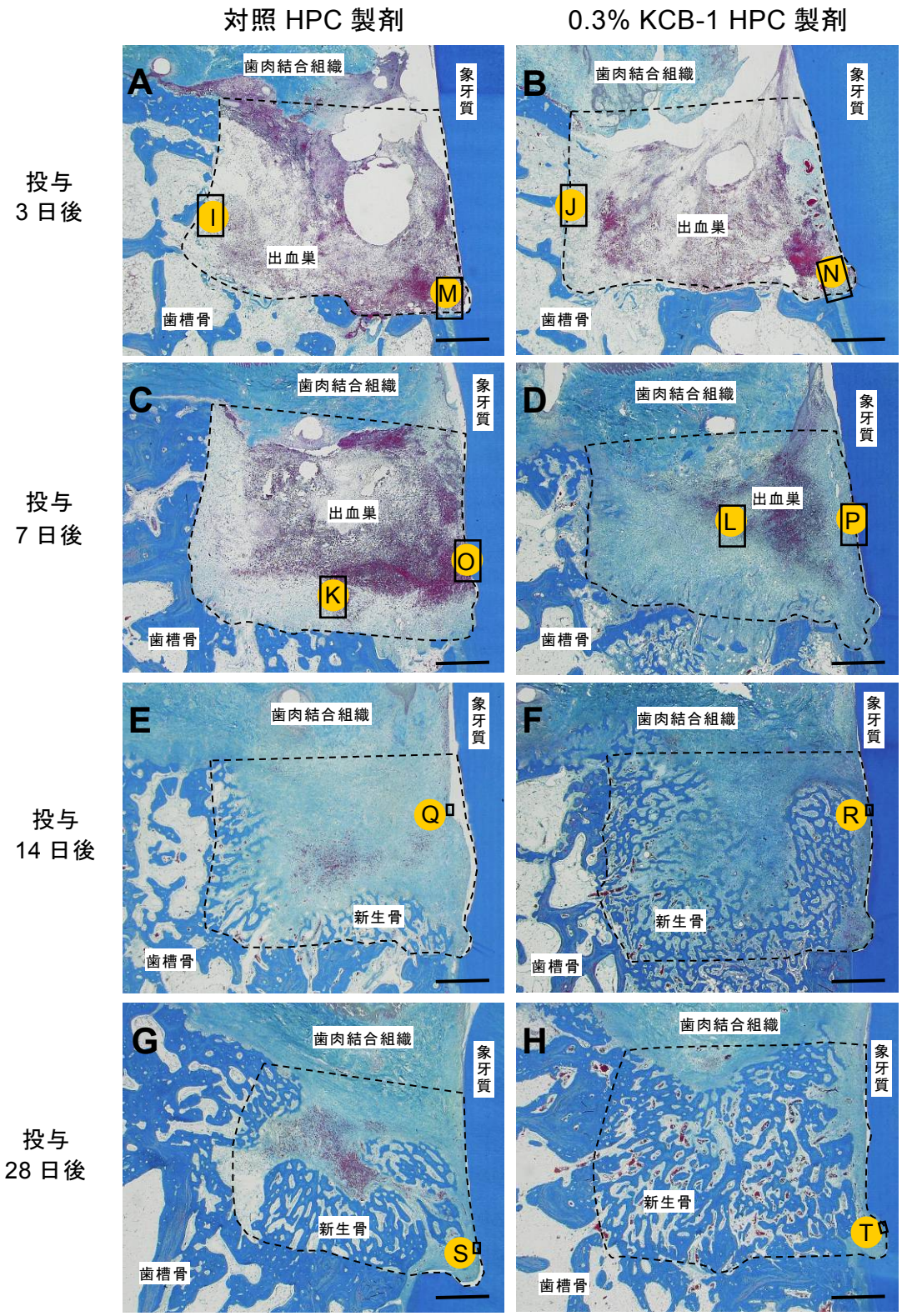



図 2.6.2-21 KCB-1 投与後の歯周組織欠損部の変化
アザン染色、図中の四角枠 I～T の拡大図は図 2.6.2-22、図 2.6.2-24 及び図 2.6.2-25 に示した
点線内は欠損部を示す（方向を合わせるため一部は原図を反転した）
横棒は 1 mm を示す

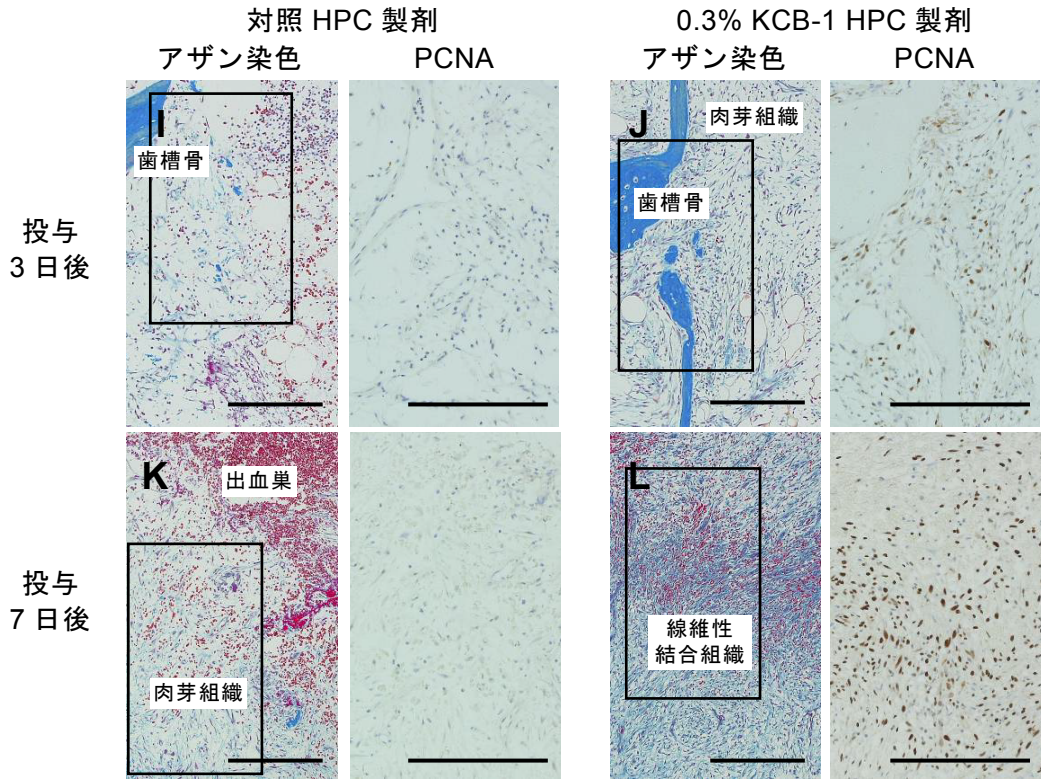



**図 2.6.2-22 歯槽骨欠損部のアザン染色及び抗 PCNA 抗体免疫染色像**

図 2.6.2-21 の拡大像、アザン染色像中の黒枠は、右の抗 PCNA 抗体免疫染色像の撮影部位を示す
PCNA 陽性細胞は細胞核が褐色で染色されている（原図をトリミングして掲載した）
横棒は 200 μm を示す

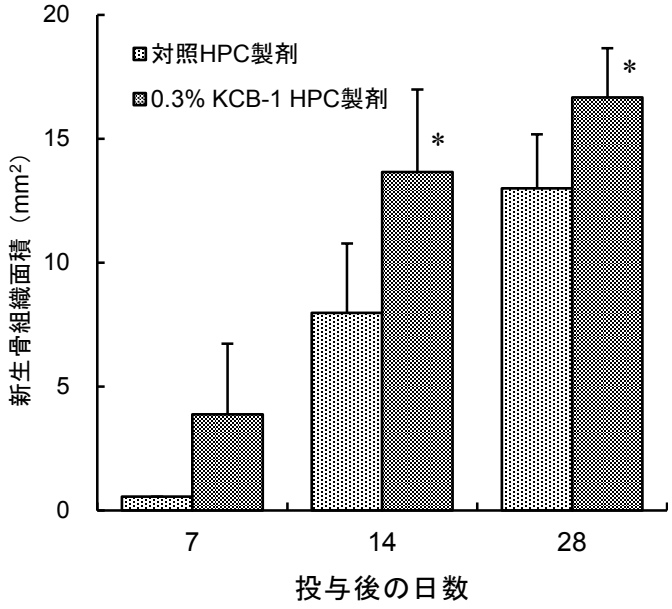



**図 2.6.2-23 歯周組織欠損部の新生骨組織面積**

平均± S.D.、n = 4、対照 HPC 製剤投与 7 日後のみ n = 1
投与 7 日後の対照 HPC 製剤群は、新生骨組織の形成が 1 例のみだったため、統計解析を行わなかった
*：$p < 0.05$ （対照 HPC 製剤との比較、t 検定）

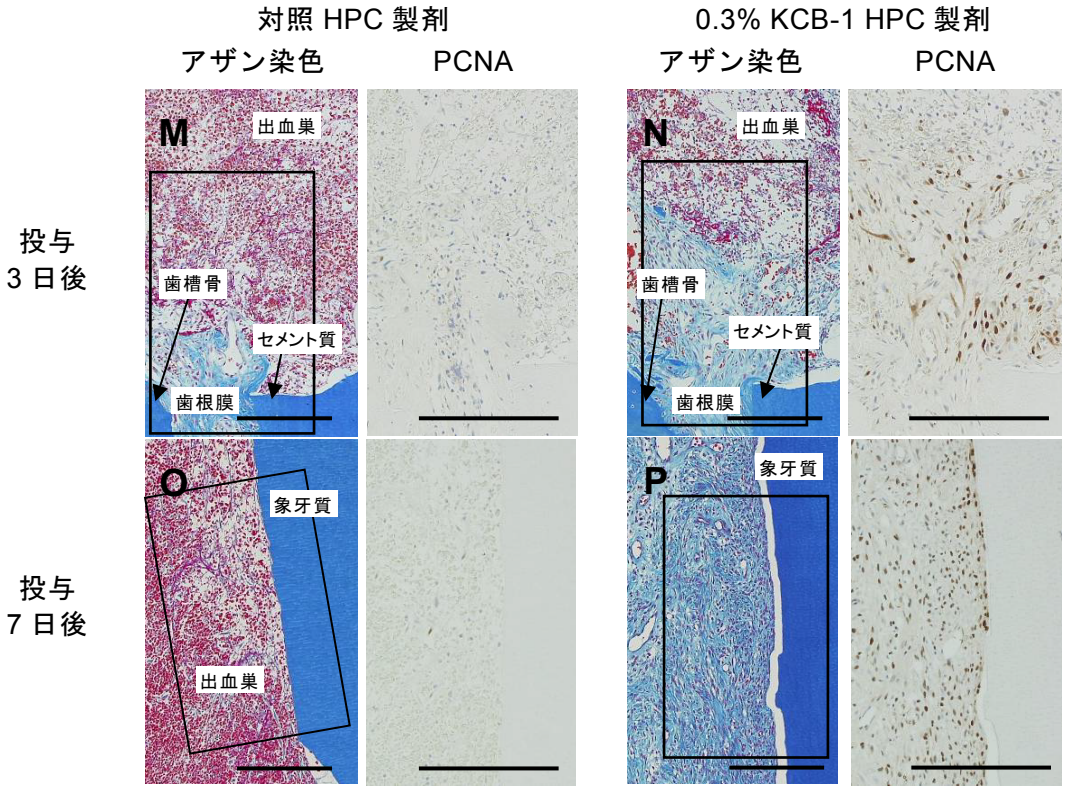



図 2.6.2-24 歯周組織欠損部の歯根面のアザン染色及び抗 PCNA 抗体免疫染色像
図 2.6.2-21 の拡大像
アザン染色像中の黒枠は、右の抗 PCNA 抗体免疫染色像の撮影部位を示す
PCNA 陽性細胞は細胞核が褐色で染色されている
横棒は 200 μm を示す（原図をトリミングして掲載した）

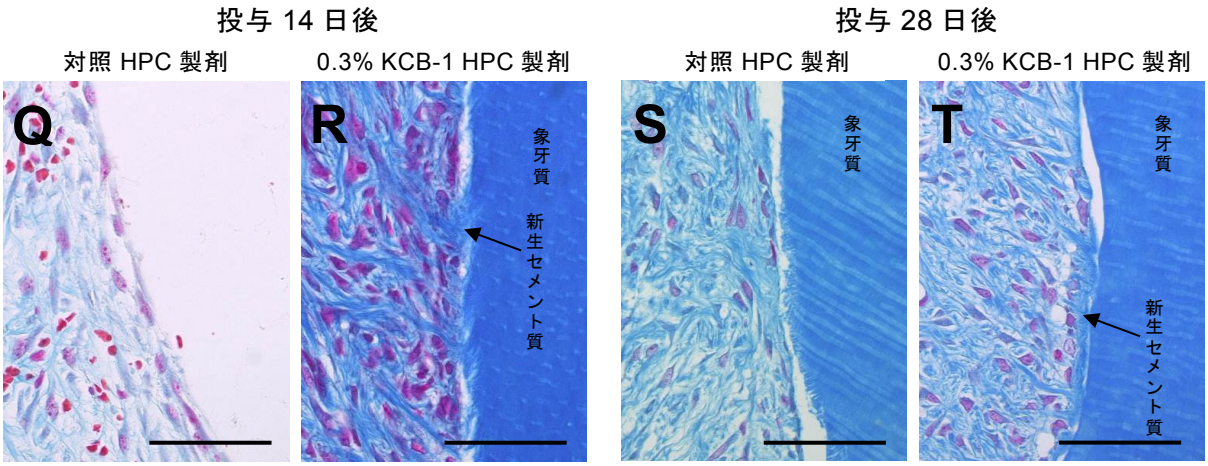



図 2.6.2-25 歯周組織欠損における結合組織性付着の再生
図 2.6.2-21 の拡大像、アザン染色
横棒は 50 μm を示す

(3) 血管新生

血管新生が最大となる投与 7 日後に、歯周組織欠損部全体と、結合組織性付着が形成される領域である歯根面から近心側 1 mm 幅で、新生血管を観察した。

歯周組織欠損部全体では、対照 HPC 製剤群では限局的に血管新生が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（図 2.6.2-26）。また、歯根面から近心側 1 mm 幅の領域では、血管径 10 μm 以下、10 μm 超～30 μm 以下及び 30 μm 超のいずれの血管についても、0.3% KCB-1 HPC 製剤群の血管数は対照 HPC 製剤群に比べて高値を示し、10 μm 超～30 μm 以下の血管では有意な差を認めた（図 2.6.2-27）。

以上のことから、KCB-1 は歯周組織欠損部において血管新生を促進し、再生初期に増殖した細胞への栄養や酸素の供給を増加させ、再生に適した環境を構築すると考えられた。

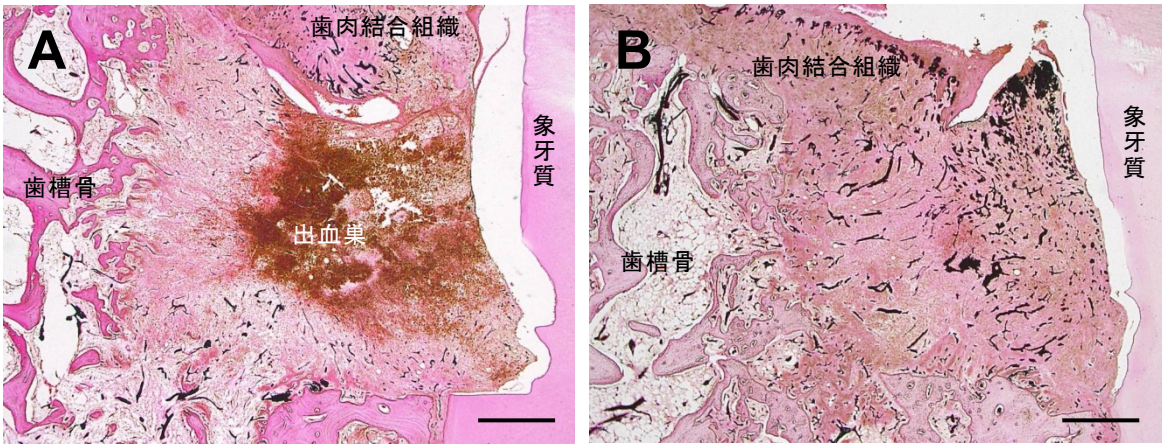



**図 2.6.2-26 KCB-1 投与 7 日後の歯周組織欠損部の血管走行**

A：対照 HPC 製剤、B：KCB-1 HPC 製剤、エオジン染色
墨汁を潅流し血管を黒色で示した（原図を反転して掲載した）
横棒は 1 mm を示す

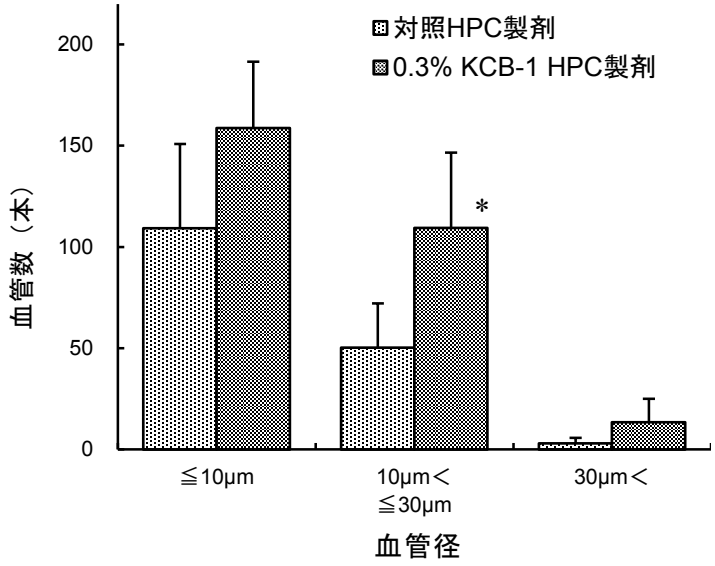



**図 2.6.2-27 KCB-1 投与 7 日後の歯根面から近心側 1 mm 幅の領域の血管数**

平均± S.D.、n = 4、*：p< 0.05（対照 HPC 製剤との比較、t 検定）

### 2.6.2.2.2.6 イヌ歯周組織欠損部における骨関連たん白質の遺伝子発現

**資料番号 4.2.1.1-11**

KCB-1 により歯槽骨再生が促進する作用機序を考察するため、分布の観察（2.6.2.2.2.4 項）と同様にイヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルを用い、投与 7 及び 14 日後に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。骨関連たん白質として、BMP-2、Sp7、ALP 及び OC を評価した。BMP-2 は、骨芽細胞への分化を誘導する成長因子であり、骨髄由来間葉系細胞に作用して、骨芽細胞への分化を誘導する転写因子の一つである Sp7 を発現させる [20]。骨芽細胞は分化に伴い、ALP 及び骨基質たん白質である OC を産生し、新生骨を形成する [21]。これらの遺伝子の発現から、KCB-1 による細胞増殖後に新生骨が形成される機序を考察した。

<試験方法>

イヌ 3 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）を単回投与した。投与 7 及び 14 日後に欠損部の再生組織を採取し、総 RNA を抽出した。細胞数の指標として総 RNA 量を測定するとともに、この総 RNA を用いて real-time RT-PCR 法により骨関連たん白質の遺伝子発現を定量した（各群各時点 6 例）。内部標準遺伝子（細胞・組織間で発現量が一定である遺伝子）として 18S rRNA を用いた。

<試験成績>

(1) 歯周組織欠損部の総 RNA 量

対照 HPC 製剤群の総 RNA 量は投与 7 日後に対して 14 日後では高値を示した（図 2.6.2-28）。0.3% KCB-1 HPC 製剤群は、いずれの時点においても対照 HPC 製剤群より高値を示し、KCB-1 による細胞増殖促進が示唆された。

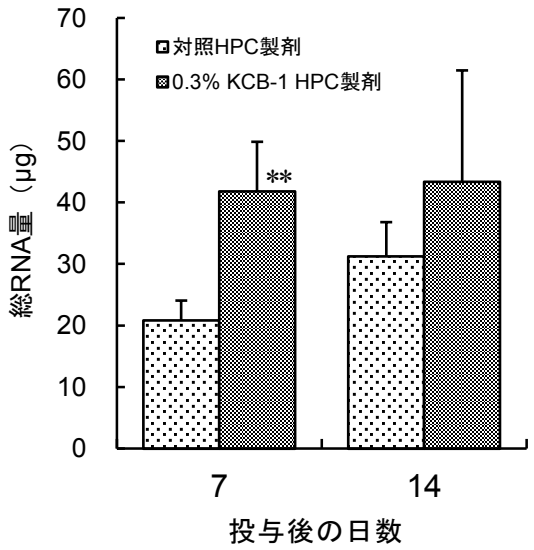



**図 2.6.2-28 歯周組織欠損部の総 RNA 量**

平均± S.D.、n = 6、** : p< 0.01（線形混合モデルによる解析、各時点における対照 HPC 製剤との比較）

(2) 再生組織の骨関連たん白質の遺伝子発現

0.3% KCB-1 HPC 製剤群の BMP-2、Sp7、ALP 及び OC 遺伝子の発現は、投与 7 及び 14 日後のいずれの時点でも対照 HPC 製剤群に対して有意に増加した（図 2.6.2-29）。また、BMP-2 遺伝子の発現量は、投与 7 日後で 14 日後より高値を示したのに対して、Sp7、ALP 及び OC 遺伝子の発現量は逆に 14 日後でより高値となった。

したがって、歯周組織欠損部では、KCB-1 により早期に細胞が増殖した後、BMP-2 の産生上昇により Sp7 の発現が誘導され、ALP 陽性の成熟した骨芽細胞への分化が促進することによって、OC に代表される骨基質の産生量が増加し、すみやかに新生骨が形成されると考えられた。

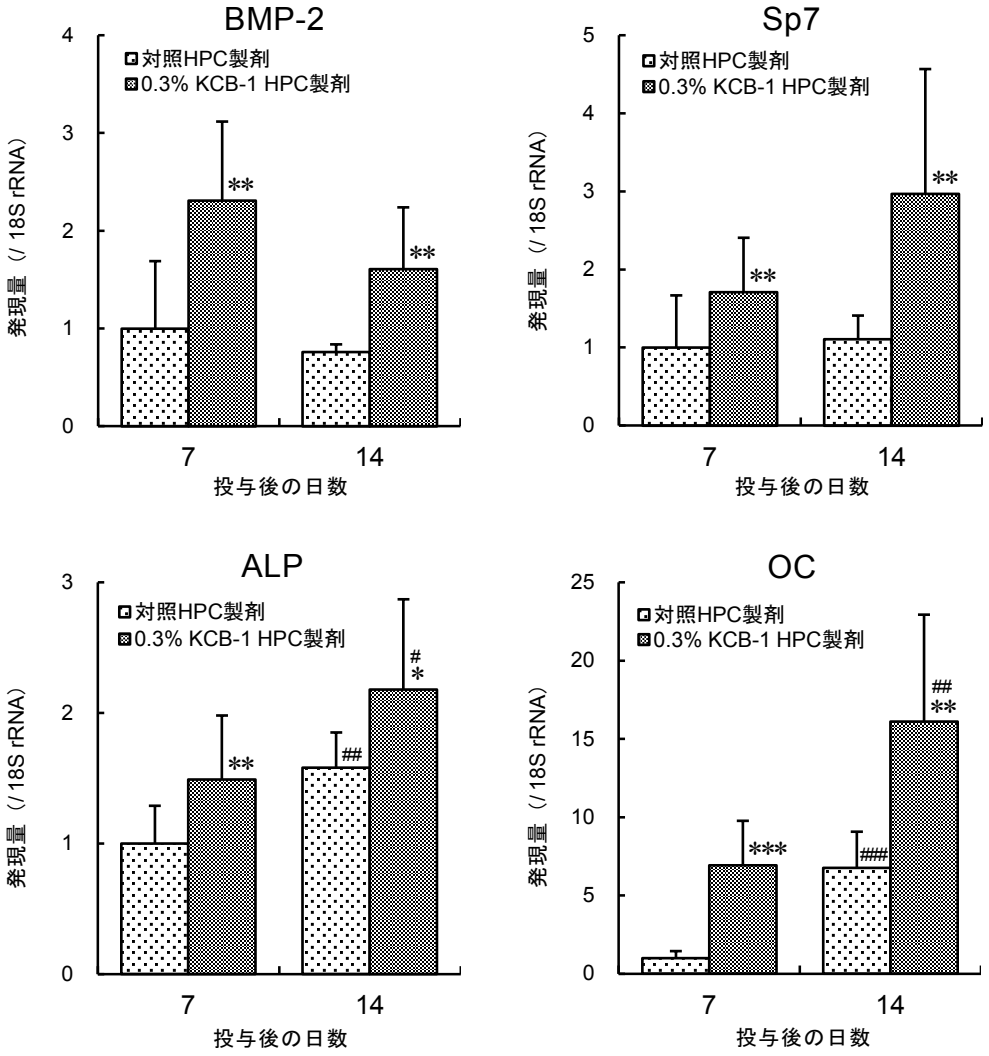



図 2.6.2-29 歯周組織欠損部の再生組織における骨関連たん白質の遺伝子発現

平均± S.D.、n = 6、発現量は投与 7 日後の対照 HPC 製剤群に対する相対値で示した

*：p< 0.05、**：p< 0.01、***：p< 0.001（線形混合モデルによる解析、各時点における対照 HPC 製剤との比較）

#：p< 0.05、##：p< 0.01、###：p< 0.001（線形混合モデルによる解析、各群における投与 7 日後との比較）

### 2.6.2.3 副次的薬理試験

本申請における本項に該当する資料はない。

### 2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は一般薬理試験として実施し、

1. 一般症状及び行動と中枢神経系に及ぼす影響
2. 自律神経系及び平滑筋に及ぼす影響
3. 呼吸・循環器系に及ぼす影響
4. 消化器系に及ぼす影響
5. 体性神経系に及ぼす影響
6. 水及び電解質代謝に及ぼす影響
7. その他の作用（PSP 排泄能、全血凝固時間に及ぼす影響等）

が検討されたが、臨床上特に留意すべき作用は認められなかった。試験成績の詳細はフィブラスト®スプレー資料概要書 ホ項（資料番号 1.13.1）に記載されている。

### 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

本申請における本項に該当する資料はない。

### 2.6.2.6 考察及び結論

歯周組織再生作用

病的に破壊された歯周組織の再生には、歯槽骨の再生と結合組織性付着の獲得が必須であるが、この二つは個別に再生することが知られている[22)]。したがって、KCB-1 の歯周組織再生作用を評価するため、イヌ歯周組織欠損モデルを用いて歯槽骨を形成する新生骨、結合組織性付着を構成するセメント質及び歯根膜の形成量をそれぞれ評価した。

KCB-1 HPC 製剤は、歯周組織欠損部への投与により対照 HPC 製剤に対して新生骨の形成を 0.1%から有意に促進させた（2.6.2.2.1.1 項）。また、0.3% KCB-1 HPC 製剤群の骨塩量は、対照 HPC 製剤に対して投与 2 ヵ月後から有意に増加し、13 ヵ月後までこの差が維持された（2.6.2.2.1.2 項）。これらの結果から、KCB-1 は歯槽骨の再生促進作用を有するとともに、再生した歯槽骨は長期間維持されることが明らかとなった。

投与 13 ヵ月後において、0.3% KCB-1 HPC 製剤群の新生骨の海綿骨の骨梁微細構造は、対照 HPC 製剤群の自然治癒で形成された新生骨と同等であった（2.6.2.2.1.2 項）。この結果より KCB-1 により増加した新生骨は、最終的に既存骨と一体化すると考えられた。

また、0.3% KCB-1 HPC 製剤群と対照 HPC 製剤群の新生骨の海綿骨骨梁構造は、既存骨である無処置群の歯槽骨に対して、骨梁が多く密な構造を呈した（2.6.2.2.1.2 項）。これは、骨形成後の時間の違いに基づくものと推察された。一般的に、骨は荷重負荷に応じてリモデリングされる。既存骨は、新生骨と比較して長期間に渡り咀嚼などによる力学的負荷を受けているため、リモデリングの程度に差が生じたと考えられた。このため、新生骨は、今後次第にリモデリングを受け、既存骨の構造に近づくと考えられた[18)]。

組織学的な評価から、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では結合組織性付着が形成され、新生セメント質長及び新生歯根膜長は、対照 HPC 製剤群に対していずれも有意に増加することが明らかとなった（2.6.2.2.1.1 項及び 2.6.2.2.1.2 項）。投与 13 ヵ月後において、再生した歯根膜は新生骨の高さと同等であり、KCB-1 により歯根膜と歯槽骨がともに再生したことが示された（2.6.2.2.1.2 項）。また、欠損窩底から内縁上皮までの距離は、0.3% KCB-1 HPC 製剤群では、対照 HPC 群に対して有意に増加しており、歯肉内縁上皮は歯冠側に保たれていた。これにより、KCB-1 は結合組織性付着の形成量を増加させることによって、フラップ手術後に頻出する歯肉内縁上皮の深行増殖や歯肉の退縮を抑制することが期待された。なお、KCB-1 の投与による骨性癒着はみられなかった。

KCB-1 は、歯周組織欠損部への投与により、新生骨、セメント質及び歯根膜の形成を促進させ、歯槽骨と結合組織性付着をともに再生することが明らかとなった。再生した組織は、自然治癒によるものと同質であると考えられた。

作用機序

歯周組織再生において、歯槽骨は主に骨髄由来の未分化な間葉系細胞から分化した骨芽細胞により、結合組織性付着を構成するセメント質及び歯根膜は、既存歯根膜組織に由来する細胞により形成される[11,12,13,14)]。KCB-1 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を有しており[7,8,9,10)]、創傷治癒[23)]、骨形成[2,3)]及び歯周組織再生[4,5)]に効果を示すことが明らかにされている。このような知見に基づき、歯周組織再生にかかわる骨髄由来間葉系細胞や歯根膜細胞に対する KCB-1 の作用を検討し、歯周組織欠損部で歯槽骨及び結合組織性付着の再生を促進する作用機序を推察した。

歯周組織欠損部に投与した KCB-1 は、投与 6 時間後に欠損部に面する既存歯槽骨、象牙質

及び既存歯根膜に分布した（2.6.2.2.2.4 項）。また、これらの組織への分布が観察された投与 3 日後までに、既存歯槽骨から歯槽骨欠損部に、既存歯根膜から歯根面へ、KCB-1 により線維芽細胞の増殖・遊走が観察された（2.6.2.2.2.5 項）。これらの観察から、KCB-1 は投与後速やかに、骨髄及び歯根膜の細胞に対して増殖や遊走を促進すると考えられた。*In vitro* 試験から、KCB-1 は骨髄由来間葉系細胞の増殖を促進することが明らかとなっている（2.6.2.2.2.1 項）。また、歯根膜細胞に対しても KCB-1 は、増殖及び遊走を促進する（2.6.2.2.2.2 項及び 2.6.2.2.2.3 項）。さらに、bFGF は象牙質に吸着した状態でも同様な作用を示すことが報告されている [24]。これらの *in vitro* 試験で観察された KCB-1 の作用が歯周組織でも発揮され、歯周組織欠損部を早期に細胞で満たしたと考えられた。

その後、歯槽骨欠損部では、KCB-1 によって増殖した骨髄由来の線維芽細胞により肉芽組織及び線維性結合組織が形成された。続いてこれらの組織は、速やかに新生骨に置換され、著しく新生骨組織面積を増加させた（2.6.2.2.2.5 項）。これは骨関連たん白質の遺伝子発現の検討から、KCB-1 消失後（2.6.2.2.2.4 項及び 2.6.4.4.3 項）、細胞数の増加及び BMP-2 の産生上昇（2.6.2.2.2.6 項）により骨芽細胞が増加したためと推察された。このことは、KCB-1 により増殖した骨髄由来の間葉系細胞が、KCB-1 除去後の分化誘導により骨芽細胞へ分化し、細胞数に依存して ALP 活性及びカルシウム沈着が増加した *in vitro* 試験からも支持された（2.6.2.2.2.1 項）。すなわち、KCB-1 が歯槽骨の再生を促進する作用機序は、分化能を維持した状態で骨髄由来の間葉系細胞の増殖を促進し、KCB-1 消失後にこれらの細胞が骨芽細胞へと分化することによると考えられた。

また、歯根面では、KCB-1 によって増殖・遊走した歯根膜由来の線維芽細胞により、速やかにセメント質及び歯根膜は再生し（2.6.2.2.2.5 項）、長期間経過後にはこれらの再生量が顕著に増加した（2.6.2.2.1.2 項）。*In vitro* 試験から、歯根膜細胞は KCB-1 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明らかとなっている（2.6.2.2.2.2 項）。これらの結果から、KCB-1 が歯根面の結合組織性付着の再生を促進する作用機序は、分化能を維持した状態で歯根膜由来の線維芽細胞の増殖・遊走を促進し、KCB-1 消失後に増殖した細胞が成熟・分化することにより、セメント質及び歯根膜が再生することによると考えられた。

加えて、KCB-1 は、歯周組織欠損部でも血管新生作用を示し、歯根面及び歯槽骨欠損部で血管数を増加させることが明らかとなった（2.6.2.2.2.5 項）。象牙質に吸着した bFGF が *in vitro* で血管内皮細胞の遊走・増殖及び管腔形成を促進することが報告されており [16]、象牙質に分布した KCB-1 も歯根面での血管数増加に関与したと推察される。KCB-1 は歯周組織再生を担う種々の細胞の増殖を促進させるとともに、これらの細胞に酸素と栄養を供給する血管を新生させ、歯周組織再生を多面的に加速させていると考えられた。

これらの結果及び考察をもとに、推察される KCB-1 の作用機序を図 2.6.2-30 にまとめた。

以上の薬理試験の結果から、KCB-1 は、血管新生及び細胞増殖を促進し、歯周組織欠損部を骨髄及び既存歯根膜に由来する細胞で満たすことにより、新生骨及び結合組織性付着の形成を促進すると考えられた。KCB-1 は歯周組織の再生治療において有用な薬剤となることが期待される。

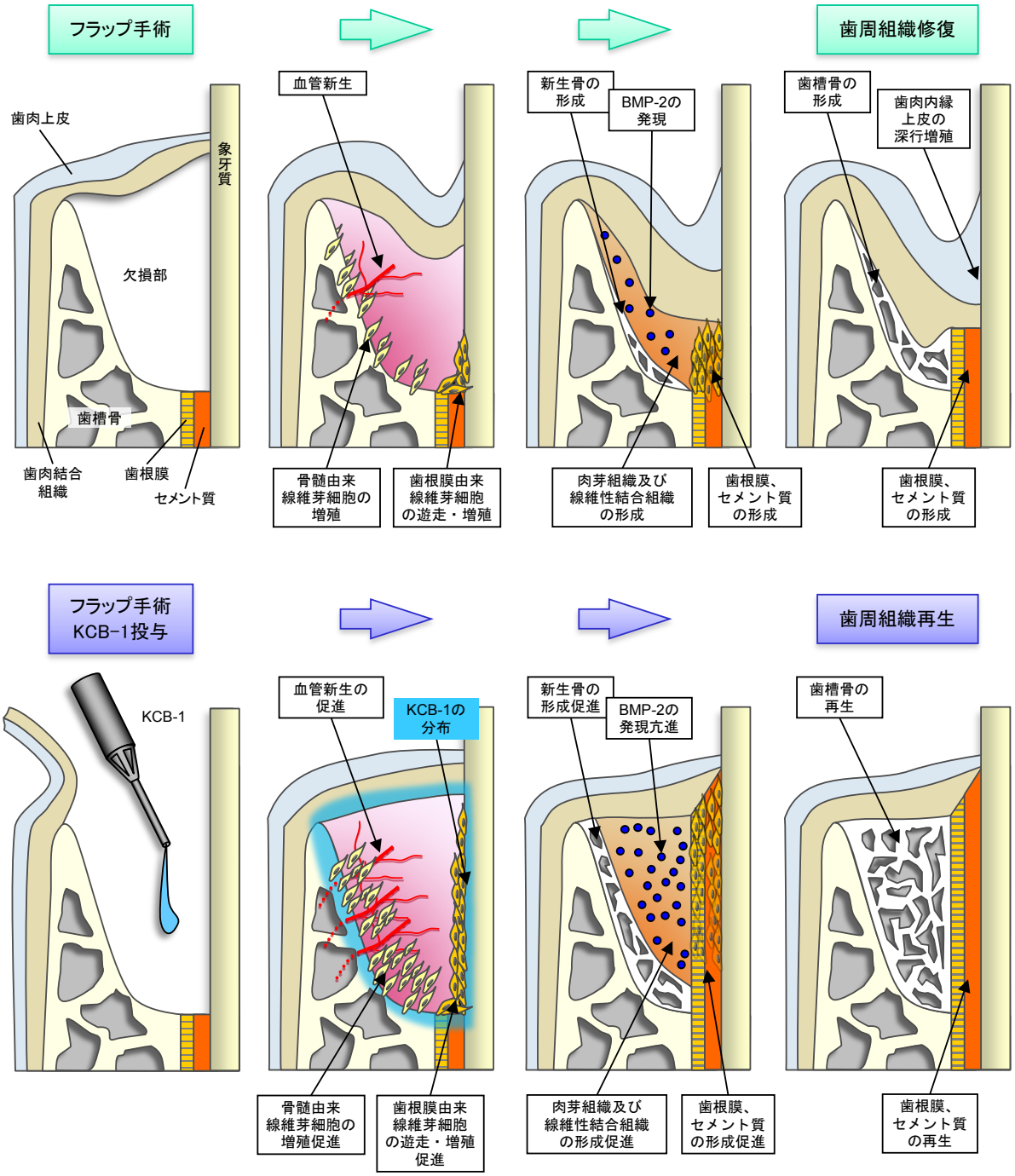



図 2.6.2-30 KCB-1 の歯周組織再生促進の作用機序

### 2.6.2.7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

### 2.6.2.8 引用文献


1. Gault P. Idiopathic ankylosis-resorption: diagnosis and treatment. Int Orthod. 2013; 11(3): 262-77.
2. Mayahara H, Ito T, Nagai H, Miyajima H, Tsukuda R, Taketomi S, Mizoguchi J, Kato K. In vivo stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats. Growth Factors. 1993; 9(1): 73-80.
3. Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Shibanushi T, Nigi H, Tagawa M, Fukumoto S, Matsumoto T. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. Endocrinology. 1995; 136(3): 1276-84.
4. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 1997; 32(8): 667-75.
5. Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. J Periodontal Res. 1999; 34(7): 425-30.
6. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science. 1987; 235(4787): 442-7.
7. Pitaru S, Kotev-Emeth S, Noff D, Kaffuler S, Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. J Bone Miner Res. 1993; 8(8): 919-29.
8. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res. 1997; 12(10): 1606-14.
9. Pri-Chen S, Pitaru S, Lokiec F, Savion N. Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture. Bone. 1998; 23(2): 111-7.
10. Hidaka T, Nagasawa T, Shirai K, Kado T, Furuichi Y. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1(+)/CD146(+) periodontal ligament cells. Arch Oral Biol. 2012; 57(6): 830-40.
11. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Koch G. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. J Periodontal Res. 1988; 23(2): 107-17.
12. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin Periodontol. 1982; 9(3): 257-65.
13. Aukhil I, Iglhaut J. Periodontal ligament cell kinetics following experimental regenerative procedures. J Clin Periodontol. 1988; 15(6): 374-82.
14. Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, Tachikawa T, Hasegawa K. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. J Periodontol. 2001; 72(3): 314-23.
15. Fang TD, Salim A, Xia W, Nacamuli RP, Guccione S, Song HM, Carano RA, Filvaroff EH, Bednarski MD, Giaccia AJ, Longaker MT. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. J Bone Miner Res. 2005; 20(7): 1114-24.

16. Tweden KS, Spadone DP, Terranova VP. Neovascularization of surface demineralized dentin. J Periodontol. 1989; 60(8): 460-6.
17. Caton JG, DeFuria EL, Polson AM, Nyman S. Periodontal regeneration via selective cell repopulation. J Periodontol. 1987; 58(8): 546-52.
18. Huja SS, Rummel AM, Beck FM. Changes in mechanical properties of bone within the mandibular condyle with age. J Morphol. 2008; 269(2): 138-43.
19. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 1970; 3(4): 393-403
20. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 309(3): 689-94.
21. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. J Biol Chem. 2008; 283(43): 29119-25.
22. Houston F, Sarhed G, Nyman S, Lindhe J, Karring T. Healing after root reimplantation in the monkey. J Clin Periodontol. 1985; 12(9): 716-27.
23. Okumura M, Okuda T, Nakamura T, Yajima M. Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor. Biol Pharm Bull. 1996; 19(4): 530-5.
24. Terranova VP, Odziemiec C, Tweden KS, Spadone DP. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. J Periodontol. 1989; 60(6): 293-301.

# 目次

2.6.3 薬理試験概要表---------- 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 ---------- 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験（1） ---------- 3
2.6.3.3 効力を裏付ける試験（2） ---------- 4
2.6.3.4 効力を裏付ける試験（3） ---------- 5
2.6.3.5 副次的薬理作用 ---------- 5
2.6.3.6 安全性薬理試験 ---------- 5
2.6.3.7 薬力学的薬物相互作用試験 ---------- 5

# 2.6.3 薬理試験概要表

## 2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：KCB-1

| 試験の種類 | | 試験系 | 投与方法 | 実験施設 | 試験番号 | 記載箇所 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 効力を裏付ける試験 | | | | | | |
| 歯周組織再生作用 | 用量反応性 | イヌ/ ビーグル犬 | 歯周組織欠損部へ滴下 | 科研製薬（株） | KP[redacted]0401 | 4.2.1.1-1 |
| | 長期観察 | イヌ/ビーグル犬 | 歯周組織欠損部へ滴下 | 科研製薬（株） | P[redacted]0501<br>P[redacted]0504<br>P[redacted]0401 | 4.2.1.1-2<br>4.2.1.1-3<br>4.2.1.1-4 |
| 作用機序 | ラット骨髄由来間葉系細胞の増殖と分化に対する作用 | ラット骨髄由来間葉系細胞 | 培養液に添加 | 科研製薬（株） | KP[redacted]0107 | 4.2.1.1-5 |
| | ヒト歯根膜細胞の増殖と分化に対する作用 | ヒト歯根膜細胞 | 培養液に添加 | 科研製薬（株） | P[redacted]0401 | 4.2.1.1-6 |
| | ヒト歯根膜細胞の遊走に対する作用（ケモタキシス作用） | ヒト歯根膜細胞 | 培養液に添加 | 科研製薬（株） | P[redacted]0402 | 4.2.1.1-7 |
| | ヒト歯根膜細胞の遊走に対する作用（ケモキネシス作用） | ヒト歯根膜細胞 | 培養液に添加 | 科研製薬（株） | P[redacted]0502 | 4.2.1.1-8 |
| | イヌ歯周組織欠損部における KCB-1 の分布 | イヌ/ビーグル犬 | 歯周組織欠損部へ滴下 | 科研製薬（株） | P[redacted]0501 | 4.2.1.1-9 |
| | イヌ歯周組織欠損部における再生初期過程の観察 | イヌ/ビーグル犬 | 歯周組織欠損部へ滴下 | 科研製薬（株） | P[redacted]0401<br>P[redacted]0402 | 4.2.1.1-4<br>4.2.1.1-10 |
| | イヌ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/ビーグル犬 | 歯周組織欠損部へ滴下 | 科研製薬（株） | P[redacted]0501 | 4.2.1.1-11 |

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験 (1)

歯周組織再生作用 被験物質：KCB-1

| 試験項目 | 試験系<br>（例数） | 投与<br>経路 | 投与量 | 試験成績 | 試験番号 | 記載箇所 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 用量反応性 | イヌ/<br>ビーグル犬<br>（14～18） | 歯周組織<br>欠損部 | 媒体対照（0 μg/60 μL）<br>0.03%（18 μg/60 μL）<br>0.1%（60 μg/60 μL）<br>0.3%（180 μg/60 μL） | 0.1%以上の用量で骨塩量、新生骨組織面積は有意に増加した。新生セメント質長及び新生歯根膜長は0.1%以上の用量で有意に増加した。また、新生歯根膜の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が認められた。 | KP[redacted]0401 | 4.2.1.1-1 |
| 長期観察 | イヌ/<br>ビーグル犬<br>（14、16） | 歯周組織<br>欠損部 | 媒体対照（0 μg/60 μL）<br>0.3%（180 μg/60 μL） | 投与 2 ヵ月後から 13 ヵ月後まで骨塩量の有意な増加が認められた。投与 13 ヵ月後の新生骨組織面積は有意に高値を示した。KCB-1 により再生した新生歯槽骨の海綿骨構造は、対照 HPC 製剤群と同等であった。<br>投与 13 ヵ月後の新生セメント質長、新生歯根膜長、新生骨の高さ、内縁上皮までの距離は有意に高値を示した。また、新生歯根膜及び歯肉結合組織の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が認められた。 | P[redacted]0501<br>P[redacted]0504<br>P[redacted]0401 | 4.2.1.1-2<br>4.2.1.1-3<br>4.2.1.1-4 |

## 2.6.3.3 効力を裏付ける試験 (2)

作用機序 被験物質：KCB-1

| 試験項目 | 試験系（例数） | 投与経路 | 投与量 | 試験成績 | 試験番号 | 記載箇所 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ラット骨髄由来間葉系細胞の増殖と分化に対する作用 | ラット骨髄由来間葉系細胞（3） | 培養液に添加 | 0、0.5、2.5、12.5 ng/mL | 濃度依存的に DNA 量を増加させた。また、KCB-1 を除去後に骨芽細胞へ分化誘導すると、DNA 量依存的にアルカリフォスファターゼ活性及びカルシウム量が増加した。 | KP[redacted]0107 | 4.2.1.1-5 |
| ヒト歯根膜細胞の増殖と分化に対する作用 | ヒト歯根膜細胞（4） | 培養液に添加 | 0、0.3、1、3、10、30 ng/mL | 0.3 ng/mL 以上で細胞増殖を促進した。また KCB-1 により増殖した細胞では、硬組織形成細胞への分化誘導により、アルカリフォスファターゼ活性及びカルシウム量が KCB-1 非添加の細胞と同様に上昇した。 | P[redacted]0401 | 4.2.1.1-6 |
| ヒト歯根膜細胞の遊走に対する作用（ケモタキシス作用） | ヒト歯根膜細胞（6） | 培養液に添加 | 0、0.01、0.1、1、10、100 ng/mL | 1 及び 10 ng/mL の濃度でケモタキシスを促進した。 | P[redacted]0402 | 4.2.1.1-7 |
| ヒト歯根膜細胞の遊走に対する作用（ケモキネシス作用） | ヒト歯根膜細胞（8） | 培養液に添加 | 0、0.01、0.1、1、10、100 ng/mL | 10 及び 100 ng/mL の濃度でケモキネシスを促進した。 | P[redacted]0502 | 4.2.1.1-8 |

### 2.6.3.4 効力を裏付ける試験 (3)

作用機序 被験物質：KCB-1

| 試験項目 | 試験系（例数） | 投与経路 | 投与量 | 試験成績 | 試験番号 | 記載箇所 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| イヌ歯周組織欠損部における KCB-1 の分布 | イヌ/ビーグル犬（4） | 歯周組織欠損部 | 媒体対照（0 μg/60 μL）<br>0.3%（180 μg/60 μL） | 投与 6 時間及び 1 日後には、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 KCB-1 の分布が認められた。3 日後では、象牙質に分布が認められたが、その他の領域では 1 日後と比較して分布領域の減少あるいは消失が観察された。 | P[redacted]0501 | 4.2.1.1-9 |
| イヌ歯周組織欠損部における再生初期過程の観察 | イヌ/ビーグル犬（4） | 歯周組織欠損部 | 媒体対照（0 μg/60 μL）<br>0.3%（180 μg/60 μL） | 歯周組織欠損部の再生初期において、既存骨骨髄及び既存歯根膜に由来する線維芽細胞の増殖並びに血管新生が促進された。新生骨組織面積の増加、歯根膜及びセメント質の再生促進が認められた。 | P[redacted]0401<br>P[redacted]0402 | 4.2.1.1-4<br>4.2.1.1-10 |
| イヌ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/ビーグル犬（6） | 歯周組織欠損部 | 媒体対照（0 μg/60 μL）<br>0.3%（180 μg/60 μL） | 投与 7 及び 14 日後に歯周組織欠損部において、総 RNA 量を増加させるとともに、BMP-2、Sp7、アルカリフォスファターゼ及びオステオカルシンの遺伝子発現を上昇させた。 | P[redacted]0501 | 4.2.1.1-11 |

### 2.6.3.5 副次的薬理作用

該当する資料はない。

### 2.6.3.6 安全性薬理試験

安全性薬理試験は一般薬理試験として実施し、その成績はフィブラスト®スプレー資料概要書 ホ項（資料番号 1.13.1）に記載しているため作表を省略した。

### 2.6.3.7 薬力学的薬物相互作用試験

該当する資料はない。