歯周治療用テトラサイクリン固定化ポリ乳酸 マイクロスフェアの有効性に関する臨床的検討

竹内佳世 三辺正人* 斉藤数宏* 矢沢裕*
飯田正人* 児玉利朗 茂木信道 堀俊雄
梅本俊夫** 玄丞侏*** 篠義人***

神奈川歯科大学保存学第2講座

(主任：堀俊雄教授)

* 奥羽大学歯学部保存学第1講座

(主任：飯田正人教授)

** 神奈川歯科大学口腔細菌学教室

(主任：梅本俊夫教授)

*** 京大学生体医療工学研究センター

(主任：篠義人教授)

(平成2年12月21日受付)

Clinical Effects of Local Application of Poly (L-Lactic Acid) Microspheres Containing Tetracycline

Kayo TAKEUCHI, Masato MINABE*, Kazuhiro SAITOU*, Hiroshi YAZAWA*,
Masato IIDA*, Toshirou KODAMA, Nobumichi MOGI, Toshio HORI,
Toshio UMEMOTO**, Song-Hyu HYON*** and Yoshito IKADA***

Department of Periodontology, Kanagawa Dental College

82, Inaoka-cho, Yokosuka, JAPAN

(Chief : Prof. Toshio HORI)

* Department of Periodontology, Ohu University School of Dentistry

(Chief : Prof. Masato IIDA)

** Department of Oral Microbiology, Kanagawa Dental College

(Chief : Prof. Toshio UMEMOTO)

*** Reseach Center for Biomedical Engineering, Kyoto University

(Chief : Prof. Yoshito IKADA)

Poly (L-lactic acid) microspheres containing tetracycline (TC-PLA-MS) were prepared using hydrophilic petrolatum or atelocollagen solution as the base. Clinical effects of the preparation were determined in 14 patients with periodontal disease after single administration to 57 sites involving periodontal pockets of more than 4 mm in depth. The results showed that bleeding on probing, total

counts of anaerobic bacteria and the proportion of black pigmented bacteroides decreased significantly up to day 14 after administration in the TC-PLA-MS group, while, no significant difference was found in the probing depth, sulcus bleeding index and the proportion of spirochetes through the study period. There was also no significant difference in the density of microorganisms in pockets between

the TC-PLA-MS group and the controls after 7 days. No definite difference was noted in therapeu-

tic effects between the different bases.

Key words : Tetracycline, Poly (L-lactic-acid) microspheres, Local administration, Periodontal disease

要旨: 親水性ワセリンおよびアテロコラーゲン溶液を基材としたテトラサイクリン固定化ポリ乳酸マイクロスフェア (TC-PLA-MS) を歯周疾患患者 14 名の 4 ミリ以上の歯周ポケットを有する 57 披検歯部位に 1 回局所投与し、その臨床的効果について検討を行った。その結果、プロービング時の出血、培養可能な総菌数および黒色色素産生バクテロイデスの比率については、TC-PLA-MS 投与群は、Control 群 (アテロコラーゲン水溶液投与群) と比較して、14 日目迄有意な減少が認められたが、Probing depth, Sulcus Bleeding Index, スピロヘータの比率は、試験期間中を通して、Control 群との間に有意差は認められなかった。また、ポケット内微生物密度は、7 日目以降、Control 群との間に有意差は認められなかった。基材の相違による明確な治療効果の差異は認められなかった。

索引用語: テトラサイクリン, ポリ乳酸マイクロスフェア, 局所投与, 歯周疾患

緒 言

筆者らは、歯周治療における局所薬剤配送システム (LDDS) を用いた歯肉縁下プラークの化学的抑制法の開発と臨床応用に関する研究を行い、その有用性を確認してきた^{1,2)}。本研究では、特にメンテナンス期に応用可能な薬剤徐放能 (一定濃度の薬剤の長期間にわたる放出) に優れた生体内分解性担体を用いた LDDS を開発することを目的として、テトラサイクリン固定化ポリ乳酸マイクロスフェア (TC-PLA-MS) を試作し、その有用性について臨床的検討を行った。

材料および方法

1. テトラサイクリン固定化ポリ L 乳酸マイクロスフェアの製法

アセトニトリルで溶解したポリ乳酸溶液をテトラサイクリン塩酸塩水溶液と混合、攪拌した。得られた溶液に界面活性剤 (Span-80) を含有した Cotton oil を滴下し、攪拌した。溶剤であるアセトニトリルと水を除く為に、40°C に加熱後、残渣を遠心、n-hexane で洗浄することによって、10~20 μ 径のテトラサイクリン塩酸塩を含むポリ乳酸マイクロスフェア (TC-PLA-MS, TC 10% 固定化, 分子量 5400) を調製した。歯科用シリンジを用いて TC-PLA-MS をポケット内に注入するために、親水性ワセリン (Vasellum Hudrophilicum: VH, 丸石製薬株式会社製) および 3% アテロコラーゲン水溶液 (AC, コラーゲンインプ

ラント[®], 高研社製, 東京) を基材としてゲル状に調製した。

2. 試験方法

神奈川歯科大学付属病院第 2 保存科および奥羽大学歯学部付属病院保存科に来院した全身の疾患の既往のない歯周疾患患者 14 名 (平均年齢 43 歳, 男性 3 名, 女性 11 名) を被検者とした。過去 3 ヶ月以内に抗生剤の投与を受けていないことを問診にて確認した。また患者にはあらかじめ試験薬剤, 試験目的について説明を行い、同意を得た。試験期間中患者に対する口腔清掃指導は特に実施せず、患者の用いている通常の方法を行わせた。被検歯には X 線上で骨吸収が認められ 4 ミリ以上の歯周ポケットを有する相隣接しない歯牙を被験者 1 人当り 3~5 歯選択し (表 1), 各々の部位に、無作為に TC-PLA-MS+VH (Exp I 群, N=24), TC-PLA-MS+AC (Exp II 群, N=24), AC (Cont 群, N=9) を一回注入した。(0.02 ml, TC 量として 1 mg) 注入前, 注入後 3, 7, 14 日目に臨床診査, すなわち, Plaque index (PII, Silness & Loe 1964), Sulcus Bleeding Index (SBI, Muhlemann & Son 1971), Periotron 値 (PU, HAR-6000 model), Probing depth (PD), プロービング時の出血指数 (BOP), および細菌学的検査として、位相差顕微鏡を用いたポケット内プラーク中の微生物密度 (MD), スピロヘータの構成比率 (S) の算定および嫌気培養法による培養可能な総菌数 (TB) に対する黒色色素産生バクテロイデス (BPB) の比率の算定を実施した。臨床的診査および細菌学的検査法は、以前の方法に従って行った^{2,3)}。SBI の評価時には、歯肉辺縁より 1~2 ミリに位置する歯肉溝内壁をプローブにより擦過した。また、

表 1 上;被検歯および実験開始時の臨床所見
下;実験プロトコール

(14 Patients Mean age 43 ♂3 ♀11)

	Sampling site			P.D. (mm)	Bleeding (%)	Diagnosis*	
	Anterior	Premolar	Molar			Moderate	Severe
Exp I(TC-PLA-MS+VH)	12	6	6	7.1	100	7	17
Exp II(TC-PLA-MS+AC)	7	10	7	6.3	100	5	19
Control(AC)	4	2	3	6.1	100	3	6

* Spiegel at el.(1979)

プロービング後 30 秒以内に出血の認められた場合、出血の程度を Papilla Bleeding Index (Saxer & Muhlemann, 1975) の度数 (1~4) に準じて評価したものをプロービング時の出血指数とした。なお、根分岐部を有する歯は、診査対象から除外し、診査は、平滑根面を有する各歯 1 部位を対象とした⁴⁾。

3. 統計処理

Exp I 群, II および Cont 群間の比較には Mann-Whitney's U test を用い、試験開始時 (0 日目) に対する経時的比較には、Wilcoxon's sign rank test を用いた。いずれの検定も、危険率 5% 以下を有意水準とした。

結 果

1. 臨床評価について

PII は, Exp I, II 群ともに経時的に増減し, Cont 群との間に有意差は認められなかった (図 1)。PU は, Exp II 群において, 7 日目以降減少傾向を示したが, 他群との間に有意差は認められなかった (図 2)。SBI は, 試験開始時 (0 日目) において, Exp I 群で 2.6, II 群で 2.8 であったものが, 0 日目に比較して, 3 日目以降有意な減少を示し, 14 日目には, Exp I 群で, 1.7, II 群で 1.5 となった。しかしながら, Cont 群との間に有意差は認められなかった (図 3)。PD は, 0 日目において, Exp I 群で 6.3 ミリ, II 群で, 7.1 ミリであったも

Plaque Index

図 1 Plaque Index の経時的変化

のが, 0 日目に比較して, 3 日目以降有意な減少を示し, 14 日目には, Exp I 群で, 5.6 ミリ, II 群で 6.4 ミリとなった。しかしながら, Cont 群との間に有意差は認められなかった (図 4)。一方, BOP は, 0 日目において, Exp I 群で 2.1, II 群で 2.2 であったものが, 0 日目に比較して 3 日目以降有意な減少を示し, 14 日目には, Exp I 群で 0.5, II 群で 0.8 となった。また, Cont 群と比較して, 両群ともに, 3, 7, 14 日いずれの時期においても有意差が認められた。3 日目には, Exp I 群が 1.6, II 群が 0.7 で, 群間で有意差が認められた (図 5)。

図2 Periortron Unitの経時的変化

図4 Probing Depthの経時的変化

図3 Sulcus Bleeding Indexの経時的変化

図5 Bleeding on Pocket Probingの経時的変化

2. 細菌学的評価について

培養可能な総菌数は、0日目において、Exp I群で 9.8×10^5 、II群で 8.9×10^5 であったものが、0日目と比較して、3日目以降有意な減少を示し14日目には Exp I群で、 2.4×10^5 、II群で 1.9×10^5 となった。また、Cont群と比較して、両群ともに、3、7、14日目いずれの時期においても有意差が認められた。Cont群は、0日目 7.8×10^5 、14日目 8.8×10^5 で、経時的にはほぼ一定の変動を示した。Exp I群では、7日目以降増加傾向を示したが、Exp II群との間に有意差は認められなかった(図6)。BPBは、0日目において Exp I群で 28.3%、II群で 25.1% であったものが、3日目には、Exp I群で 2.8%、II群で 3.2% と最も低い値を示し、7日目以降増加傾向を示したが、0日目および Cont

群と比較して、経時的に有意差が認められた。Cont群は0日目27.5%、7日目32.8%、14日目22.6%と7日目から14日目にかけて減少傾向を示したが、0日目と比較して、有意差は認められなかった。7日目において Exp I群では 5.6%、II群で 2.4% と群間で有意差が認められたが、14日目では、群間の有意差は認められなかった(図7)。MDは、0日目において、Exp I群で $19.2 \times 10^7/\text{ml}$ 、II群で $23.2 \times 10^7/\text{ml}$ であったものが、3日目には、Exp I群で $5.0 \times 10^7/\text{ml}$ 、II群で $4.8 \times 10^7/\text{ml}$ と最も低い値を示し、7日目以降、増加傾向を示したが、0日目と比較して、有意差が認められた。また、Cont群と比較して両群ともに3日目においてのみ有意差が認められた。Cont群は0日目 $15.1 \times 10^7/\text{ml}$ 、7日目 $7.5 \times 10^7/\text{ml}$ と減少傾向を示

図 6 培養可能な総菌数の経時的変化

図 7 黒色色素産生のバクテロイデスの経時的変化

したが、0日目と比較して経時的有意差は認められなかった(図8)。Sは、0日目において、Exp I群で8.3%、II群で10.6%であったものが、3日目は、Exp I群で0.3%、II群で1.4%と最も低い値を示し、7日目以降増加傾向を示したが、0日目と比較して有意差が認められた。しかしながら、いずれの時期においても、Cont群との間に有意差は認められなかった。Cont群は、0日目6.7%、14日目で4.7%と3日目以降やや減少傾向を示したが、0日目と比較して、経時的有意差は認められなかった(図9)。

図 8 微生物密度の経時的変化

図 9 スピロヘータの経時的変化

考 察

現在まで、種々の歯周治療用徐放薬剤が開発され、その有用性が明らかにされてきている。徐放性薬剤を用いた治療間隔を決定する為には、歯周ポケット内に1回投与後の歯周病原性細菌に対する薬剤有効濃度維持期間や臨床の効果持続期間を知る必要がある。

Goodsonら⁵⁾は、テトラサイクリンを固定化したエチレンアセテートビニルファイバーを歯周ポケット内に10日間維持することによって、1ヵ月間運動性微生物を抑制できたことを報告している。また、Addyら⁶⁾は、クロールヘキシジンを含有したポリメチルメタクリレート製ストリップの使用により、4日間は、スピロヘータの出現を抑制できたことを報告している。

生体内分解性担体を用いた報告では、Soskolne ら⁷⁾が、クロールヘキシジン含有エチルセルロース性ストリップスにより、10 日間のスピロヘータの出現抑制を、また、栗本ら⁸⁾は、2% ミノサイクリン含有徐放性軟膏を用いることにより微生物密度の減少および運動性微生物の抑制効果が2週間にわたって認められたことを報告している。筆者らも、以前、テトラサイクリン固定化コラーゲンフィルムを用いることにより3週間の微生物密度の減少と、7週間のスピロヘータの出現抑制に加えて、歯周ポケット底部からの出血の減少が3週間にわたって認められることを報告した^{2,9)}。現在まで、どの程度の期間、どれ位の濃度の薬剤が歯周ポケット内で維持される必要があるのかについては、明確な回答は得られていない。Williams ら¹⁰⁾は、テトラサイクリン(TC 1000 mg/day)を2週間投与した後に、250 mg/day の TC を21~114 日間投与した群では、グラム陰性菌の抑制が著明であったのに対し、1000 mg/day の TC を1週間投与した群では、グラム陰性菌の抑制が不十分であったことを報告している。Goodson ら⁵⁾は、最適な治療効果を発揮するためには、薬剤の抗菌活性が10 日間は維持される必要があると述べている⁵⁾。また、最近の報告では、歯周病関連性細菌の発育を十分に抑制する為には、25~32 $\mu\text{g/ml}$ 程度の TC あるいはミノサイクリン濃度が必要であるという指摘¹¹⁾や継続性(; Substantivity)の期待できる塩酸テトラサイクリン系薬剤においては高濃度水溶液を用いて、歯周ポケット内を長時間かけて irrigation することで徐放性薬剤を用いた場合と同等の効果を期待できるとする報告もある^{12,13)}。現在用いられている、あるいは開発中の徐放性薬剤は、いずれも歯周ポケット内において、TC 系薬剤の場合は、数 $\mu\text{g/ml}$ から十数 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度を1週間程度維持することを目的としているが、これらの報告を加味すれば、薬剤徐放能をさらには向上させる必要性が示唆される。

抗生物質の歯周治療への応用を具体化するためには、治療効果についての検討だけでなく、歯周病関連性細菌以外の細菌を含めたポケット内細菌叢全体に対する影響を考慮する必要がある¹⁴⁾。梅本ら¹⁵⁾は、TC 系徐放剤を1週間隔で4連投した結果、歯周ポケット内細菌叢が病的細菌叢から正常細菌叢に遷移し、TC 耐性菌および菌交代症発現の危惧が少ないことを確認している。O'Conner ら¹¹⁾は、*in vitro* の実験で、歯周病関連性細菌に対する致死量以下のミノサイクリン濃度を1ヵ月間維持した場合においても、耐性化の傾向は

認められなかったことを明らかにしている。今後、数種の歯周病関連性細菌の複合性感染と考えられている再発性歯周炎あるいは、抗療性歯周炎に対する治療を含めたメインテナンス期における徐放性薬剤の適用を考えていく場合には、これまでの週単位に替わり、月単位の薬剤徐放化が論理的と考えられる¹⁶⁾。

以上の観点から、筆者らは、歯周炎治療用薬剤として、生体内分解性で、かつ一定薬剤濃度の長期間にわたる0次放出¹⁷⁾が期待できる材料として、ポリ乳酸マイクロスフェアに注目し、これにテトラサイクリンを固定化した徐放剤(TC-PLA-MS)を試作し、臨床的効果持続期間について検討を加えた。また、基材としては、歯周ポケット内停留性の期待できる3% アテロコラーゲン水溶液と親水性ワセリンを選択し、シリンジによる歯周ポケット内注入方式とすることで、臨床操作性の改善を図った。その結果、SBI やペリオトロン値については、Exp I, II 群と Cont 群との間に試験期間中を通して、有意差は認められなかった。これは、試験期間中、特にブラッシング指導は実施しておらず、PII に著明な差異が認められなかったことから、歯肉縁上プラークの影響を受けやすかったためと考えられる。歯周ポケット底部の炎症状態を示すプロービング時の出血指数、培養可能な総菌数、黒色色素産生バクテロイデスの比率は、2週間にわたって、Cont 群と比較して有意な減少を示したことから、TC-PLA-MS の歯周治療における有効性が示唆された。しかしながら、ポケット内微生物密度は7日目以降、スピロヘータの構成比率は試験期間中を通して Cont 群との間に有意差は認められなかった。これらの結果は以前、筆者らが実施した TC フィルムの1回局所投与後の成績^{2,9)}に比較して不十分なものと考えられる。この原因としては、本研究における被検部位の歯周ポケットが深いため、深さの減少によるポケット内環境の変化が期待しにくかったことや TC-PLA-MS の歯周ポケット内停留性が不十分であった可能性が示唆された。三辺ら¹⁸⁾は、本研究で用いたものと同一の TC-PLA-MS の *in vitro*, *in vivo* 徐放試験を行った結果、*in vivo* における阻止円出現率は、2~3 日目迄に50% 前後に減少し、その後、14 日目迄に約20~40% に減少したことを報告している。この理由としては、ゲル状基材を用いたため、ポケットの形状によっては、TC-PLA-MS が十分にポケット底部に到達しなかったことや、大部分の TC-PLA-MS が注入時に、ポケット外に溢出したことが考えられる。今後、ポケット内停留性を

改善するためには、担体の形状について工夫を加えるとともに、歯肉溝滲出液による薬剤の排除作用を考慮して、ポケット内に十分量の TC を供給することや、歯周ポケット内の炎症状態を抑制することなどが必要と考えられる^{1,18,19)}。また、*in vitro* 徐放試験においては、TC-PLA-MS は、初期バースト²⁰⁾を示したことから、TC 徐放効率を改善するための工夫も同時に必要と考えられる。現在、これらの点を考慮して、より優れた歯周治療用徐放性薬剤の開発を検討中である。

結 論

歯周治療用徐放性薬剤として、テトラサイクリン固定化ポリ乳酸マイクロスフェア (TC-PLA-MS) を開発し、歯周ポケット内へ 1 回局所投与後の効果持続期間を臨床的に検討した。その結果、

1. Exp 群は、Cont 群と比較して、プロービング時の出血指数は、3, 7, 14 日目に有意な減少を示したが、PD, SBI は、Cont 群との間に有意差は認められなかった。

2. Exp 群は、Cont 群と比較して、培養可能な総菌数及び BPB は、3, 7, 14 日目に有意な減少を示したが、微生物密度は、7 日目以降、また、スピロヘータ比は、試験期間中を通して、Cont 群との間に有意差は認められなかった。

以上のことから、確実な治療効果を期待するには、TC-PLA-MS の歯周ポケット内停留性および TC の徐放効率をさらに向上させる必要性が示唆された。

本研究の一部は、1990 年度 (平成 2 年度) 文部省科学研究費、一般研究 (C) - 02670860 の援助のもとに行なわれた。

文 献

- 1) 三辺正人, 竹内佳世, 辻上 弘, 堀 俊雄, 梅本俊夫: ドラッグデリバリーシステム—担体を用いた薬剤投与法—. 歯科ジャーナル, 28 : 700-711; 1988.
- 2) Minabe, M., Takeuchi, K., Tamura, T., Hori, T. and Umemoto, T.: Subgingival administration of tetracycline on a collagen film. J. Periodontol., 60 : 552-556, 1989.
- 3) 三辺正人, 竹内佳世, 友松栄子, 植松厚夫, 大林洋子, 三浦志保, 堀 俊雄, 梅本俊夫: Local drug delivery system の歯周治療への応用 2. テトラサイクリン固定化架橋コラーゲンフィルムの局所投与の効果. 日歯周誌, 30 : 236-247, 1988.
- 4) Loos, B., Nylund, K., Claffey, N. and Egelberg, J.: Clinical effects of root debridement in molar and non-molar teeth. A 2year follow up. J. Clin. Periodontol., 16 : 498-504, 1989.
- 5) Goodson, J.M., Offenbacher, S., Farr, D.H. and Hogan, P.E.: Periodontal disease treatment by local drug delivery. J. Periodontol., 56 : 265-272, 1985.
- 6) Addy, M., Rawle, L., Handler, L., Newman, H.N. and Coventry, J.F.: The development and *in vivo* evaluation of acrylic strips and dialysis tubing for local drug delivery. J. Periodontol., 53 : 693-699, 1982.
- 7) Soskolne, A., Golumb, G., Friedman, M. and Sela, M.N.: New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. 2. Use in periodontal therapy. J. Periodont. Res., 18 : 330-336, 1982.
- 8) 栗本桂二, 磯島 修, 直良直香, 穴田 高, 小林芳友, 栗原英見, 木下正彦, 野村慶雄, 村山洋二: ミノサイクリンの局所的応用による歯周病治療法, LS-007 至適濃度の臨床的検討. 日歯周誌, 29 : 930-936, 1987.
- 9) 三辺正人, 竹内佳世, 田村利之, 栗原聖子, 大林洋子, 三浦志保, 堀 俊雄, 梅本俊夫: Local drug delivery system の歯周治療への応用. 3. テトラサイクリン固定化架橋コラーゲンフィルムの局所投与後の効果持続期間について. 日歯周誌, 30 : 576-582, 1988.
- 10) Williams, B.L., Osterberg, S.K. and Jorgensen, J.: Subgingival microflora of periodontal patients in tetracycline therapy. J. Clin. Periodontol., 6 : 210-211, 1979.
- 11) O'Connor, B.C., Newman, H.N. and Wilson, M.: Susceptibility and resistance of plaque bacteria to minocycline. J. Periodontol., 61 : 228-233, 1990.
- 12) Baker, P.J., Evans, R.T., Slots, J. and Genco, R.J.: Susceptibility of human oral anaerobic bacteria to antibiotic suitable for topical use. J. Clin. Periodontol., 12 : 201-208, 1985.
- 13) Puchalsky, C.S., Christerson, L.A., Norris, L.A., Dunford, R.G. and Genco, R.J.: Release of active tetracycline HCL from, *in vivo*, irrigated human teeth. J. Dent. Res. 66 : Special issue A, 356, 1987.
- 14) Slots, J. and Rams, T.E.: Antibiotics in periodontal therapy : advantages and disadvantages. J. Clin. Periodontol., 17 : 479-493, 1990.
- 15) 梅本俊夫, 三辺正人, 堀 俊雄: 歯周治療薬—徐放性抗生物質の臨床応用—デンタルダイヤモンド. 3 : 66-71, 1989.
- 16) 三辺正人: 歯周治療における LDDS を用いた薬物療法. the Quintessence, 9 : 113-122, 1990.
- 17) Tonetti, M., Cngi ni, M.A. and Goodson, J.M.: Zero-order delivery with periodontal placement of tetracycline-loaded ethylene vinyl acetate fibers.

- J. Periodont. Res. 25 : 243-249, 1990.
- 18) 三辺正人, 飯田正人, 竹内佳世, 堀 俊雄, 玄 丞
然, 筏 義人 : 歯周炎治療を目的としたテトラサイ
クリン固定化ポリ乳酸マイクロスフェアの開発.
Drug Delivery System, 投稿中.
- 19) Goodson, J.M. : Pharmacokinetic principles contr-
olling efficacy of oral therapy. J. Dent. Res. 68 :
1625-1632, 1989.
- 20) Steinberg, D., Friedmen, M., Soskoline, A. and
Sela, M.N. : A New degradable controlled release
device for treatment of periodontal disease : In
vitro release study. J. Periodontol., 61 : 393-398,
1990.
-

連絡先 :

神奈川歯科大学保存第2講座

〒 238 神奈川県横須賀市稲岡町 82