歯周治療用ミノサイクリン含有コラーゲンペレットの 局所投与後のミノサイクリン濃度および局在について

木村 三右衛門 相羽 寿史 三辺 正人
岡本 浩 堀内 登*

奥羽大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任:岡本 浩)

*奥羽大学歯学部口腔生化学教室

(主任:堀内 登)

(平成6年6月20日受付)

Concentration and Localization of Minocycline Following Local Administration of Collagen Pellets Containing Minocycline for Periodontal Use

Kazumori KIMURA, Toshifumi AIBA, Masato MINABE,
Hiroshi OKAMOTO and Noboru HORIUCHI*

Ohu University, Faculty of Dentistry, Department of Periodontics & Restorative Dentistry
(Chief: Prof. Hiroshi OKAMOTO)

*Department of Oral Biochemistry, Ohu University, Faculty of Dentistry
(Chief: Prof. Noboru HORIUCHI)

31-1, Misumido, Tomita-cho, Koriyama-City, Fukushima, 963, Japan

In order to improve sustained release of collagen pellet containing minocycline for periodontal treatment (MINO pellet), the efficacy of inserting a MINO pellet into the gingival tissue around the periodontal pocket (intra gingival administration) was studied clinically by determining MINO levels in the gingival tissue and periodontal pocket and morphologically observing the localization of MINO in the gingival tissue and the process of absorption of the MINO pellet after the gingival

administration. The mean MINO levels in the gingival tissue were 40.5 $\mu\text{g/ml}$ and 6.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and the rate of detection was 100% for both sites. Fluorescence of MINO in the gingival tissue was observed until 14 days after the administration, suggesting that the MINO pellet is adsorbed or diminished from 14 days onward. The results showed that gingival administration enables secure long-term maintenance of high concentration of MINO in the gingival tissue and periodontal pocket.

Key words: Minocycline, Collagen pellet, Intra gingival administration, Local Drug Delivery for periodontal pocket therapy

要旨: 歯周治療用ミノサイクリン含有コラーゲンペレット (MINO ペレット) の薬剤徐放性を向上させる目的で、MINO ペレットを歯周ポケット周囲歯肉組織内に刺入する方法 (歯肉組織内投与法) の有効性について臨床試験を行った。すなわち MINO ペレットを歯肉組織内投与後の歯肉組織内と歯周ポケット内のミノサイクリン濃度測定および歯肉組織内のミノサイクリンの局在と MINO ペレットの吸収過程について形態観察を行った。結果

はミノサイクリン平均濃度は投与後7日目に歯肉組織内で40.5 $\mu\text{g/ml}$, 歯周ポケット内で6.5 $\mu\text{g/ml}$ であり, ともに検出率は100%であった。歯肉組織中のミノサイクリンの蛍光は14日目まで観察され, 14日目以降にMINOペレットは吸収消失するものと考えられた。以上の結果から本法は歯肉組織内および歯周ポケット内に高濃度のミノサイクリンを長期間確実に維持できる方法であることが明かとなった。

索引用語: ミノサイクリン, コラーゲンペレット, 歯肉組織内投与, 歯周ポケット局所薬物療法

緒 言

現在, 生体内吸収性担体を用いた抗生物質の歯周ポケット局所療法 (Inter-pocket antibiotic therapy; 以降IPATと略す) が臨床応用され, その有用性が確認されている¹⁾。しかしながら生体内吸収性担体は, 生体内非吸収性担体を用いた場合に比較して一定の薬剤濃度を長期間ポケット内で維持することは困難であり, 薬剤のポケット内残留性もポケット内環境, すなわちポケット深さや形状, 歯肉炎症状態, 滲出液流量などにより影響を受けやすい^{2~4)}。

著者らはIPATの一手段としてミノサイクリン含有コラーゲンペレット (以降MINOペレット略す) を開発し, その有効性を報告してきた^{5,6)}。本研究では, 生体内吸収性の生体材料であるアテロコラーゲンペレットが歯科領域において抗癌剤の局所投与に応用され, 皮下組織内に刺入することにより, 長期間安定した抗癌剤の放出が期待できることに注目し, MINOペレットを歯周ポケット内周囲歯肉組織内に刺入する, いわゆる歯肉組織内投与法が, 従来の歯周ポケット内投与法に比較して, 薬剤徐放性の点で優れているか否かについて明らかにすることを目的とした⁷⁾。すなわちMINOペレットを歯肉組織内投与後の歯肉組織内と歯周ポケット内のミノサイクリン濃度測定および歯肉組織内のミノサイクリンの局在とMINOペレットの吸収について形態学的検討を行った。

材料と方法

1. ミノサイクリンの投与方法

成人性歯周炎患者12名の35部位 (Probing depth ≥ 6 mm, Bleeding on probing +) を対象とした。歯肉剝離搔爬術の1, 3, 5, 7, 10, 14日前にMINOペレットの局所投与 (ミノサイクリン量として約1~1.5 mg) を行った。投与方法は図1に示すように, 従来の歯周ポケット内投与 (6部位) と歯肉組織内に局所麻酔下でペレットが歯肉に完全に埋入され

るように刺入する方法 (29部位) の2通りを行った。歯肉剝離搔爬術直前に投与部位の歯周ポケット内にペーパーストリップスを挿入し, 歯肉溝滲出液を採取後に歯肉組織を採取し, 冷生理食塩水で洗浄後に2分割し, ミノサイクリン濃度測定試料と, ミノサイクリン蛍光観察試料とした。後者はtissue mount[®] (サクラ社, 東京) で包埋後, -80°C で保存した。

2. ミノサイクリンの濃度測定方法

図2にミノサイクリン濃度測定法を示した。歯肉溝滲出液の採取および滲出液中のミノサイクリン濃度測定法は木村らの方法⁸⁾を用いた。また, 歯肉組織中のミノサイクリン濃度測定法は国分らの方法⁹⁾に基づいて行った。すなわち歯肉組織の10倍量の0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.3) を加えて, PORYTPON (KINEMATIKA, Switzerland) にてホモジナイズした後, 組織ホモジネートを15,000 rpm, 30 min 遠心した。上清0.3 ml に, 0.1 M EDTA (pH 6.5) 100 μl , 内部緩衝溶液 (a-ナフチルアミン, 200 $\mu\text{g/ml}$) 50 μl , リン酸・亜硫酸緩衝液 (pH 6.5) 1 ml を加え, さらに酢酸エチル 6 ml を加え, 10 分間浸漬混和し, 遠心分離 (3,000 rpm 3 min) した。酢酸エチル層 5 ml を分取し, これに0.1 M エスコルビン酸・0.1% システイン溶液 100 μl を加え混和し, N_2 ガス気流下で蒸発乾固 (25°C) させた。この残渣を0.1 M シュウ酸・20% ジメチルホルムアミド溶液 (pH 3.6) 100 μl に溶解し, 検体試料とした。検体からのミノサイクリンの抽出は里見らの方法⁹⁾に従って行い, 上

図1 MINOペレットの局所投与法

澄液 $10\mu\text{l}$ を HPLC カラム (Inertsil ODS $\phi 4.6\text{ mm} \times 15\text{ cm}$, ガスクロ社, 東京) に注入した。検出器は島津 SPD-5 AV を使い, 検出波長 354 nm , 流量 1.5 ml/分 の条件で分析を行った。移動相には 0.1 M シュウ酸 20% ジメチルホルムアミド溶液 ($\text{pH}=3.8$) を用いた。

3. ミノサイクリンの蛍光観察法

Tissue mount[®] に包埋した歯肉組織ブロックからク

ライオスタット (CM-3 型, サクラ精機, 東京) を用いて厚さ $9\mu\text{m}$ の凍結組織切片を作製し, スライドガラスに貼付し室温で 30 分間 風乾した後, 蛍光顕微鏡観察用は無蛍光グリセリンで封入した。この標本を落射型蛍光顕微鏡 (LABOPHOTO YF-EFD, ニコン, 東京) により観察した。また, H.E. 染色用は風乾後 H.E. 染色し, 光学顕微鏡観察を行った。

結 果

1. 臨床所見について

図 3 は上顎中切歯口蓋側歯間乳頭部に MINO ペレットを刺入直後と 1 週間経過後の状態を示した。MINO ペレットを刺入した 29 部位全例において刺入部周囲に著明な炎症反応や疼痛の発現は認められなかった。

2. ミノサイクリン濃度について

図 4 に MINO ペレットを歯肉組織内に投与後の経時的な歯肉組織中および歯肉溝滲出液中のミノサイクリン濃度の推移を示した。濃度は Ciancio らの報告¹⁰⁾ に基づき, 歯肉組織重量当りのミノサイクリン量 (ng/mg) を水溶液中のミノサイクリン濃度 (μl) に換算して表示した。歯肉組織中のミノサイクリン平均濃度は 1 日目 $717.0\mu\text{g/ml}$, 3 日目 $212.5\mu\text{g/ml}$, 5 日目 $125.4\mu\text{g/ml}$, 7 日目 $40.5\mu\text{g/ml}$, 10 日目 $25.3\mu\text{g/ml}$ であった。一方, 歯肉溝滲出液中のミノサイクリン平均濃度は 1 日目 $127.0\mu\text{g/ml}$, 3 日目 $21.0\mu\text{g/ml}$, 7 日目 $6.5\mu\text{g/ml}$ であった。また, 全ての試料からミノサイクリンが検出され, 検出率は 100%

図 2 ミノサイクリン濃度測定法

図 3 上顎中切歯口蓋側歯間乳頭部に MINO ペレットを刺入直後 (a) と 1 週間経過後 (b) の歯肉所見

図 4 ミノサイクリンの歯肉組織内濃度およびポケット内濃度

図 5 MINO ペレットを歯肉組織内に投与後 1 日目の全体像 (a, $\times 5$) と強拡大像 (b, $\times 50$)
(H.E. 染色, M-P; MINO ペレット)

であった。MINO ペレットを歯周ポケット内に投与後の歯肉組織内ミノサイクリン平均濃度は、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ であり、6 部位中 2 部位からミノサイクリンが検出され、検出率は 33% であった。

3. ミノサイクリンの蛍光観察および MINO ペレットの吸収について

図 5 に MINO ペレットを歯肉組織内に投与後 1 日目の H.E. 染色所見を示した。ペレットは周囲組織との境界が明瞭で周囲に炎症性細胞はほとんど認められ

図 6 MINO ペレットを歯肉組織内に投与後 3 日目の H.E. 染色所見 (a, $\times 50$) と蛍光観察所見 (b, $\times 50$)

図 7 MINO ペレットを歯肉組織内に投与後 5 日目の全体像 (a, $\times 5$) と強拡大像 (b, $\times 50$)
(H.E. 染色, M-P ; MINO ペレット)

ず、線維性組織と密に接していた。投与後 3 日目においてはペレットは部分的に溶解吸収し、ペレット内に細胞の侵入が認められペレット周囲には線維芽細胞様細胞の集合が観察された (図 6 a)。ミノサイクリンの蛍光はペレットを中心に放散性に顕著に認められた (図 6 b)。投与後 5 日目ではペレットの吸収はさらに亢進し、ペレット周囲から線維性組織による基質化置換が生じた (図 7)。投与後 7 日目では脱離したペレットの周囲にペレット溶解部と考えられる濃染した領域が存在し、それに一致してミノサイクリンの蛍光が観察された。また、その周囲には線維芽細胞様細胞

の集合が観察された (図 8)。投与後 14 日目ではペレットは細片化し、それに一致してミノサイクリンの蛍光が観察された。細片化したペレットは濃染して認められ、周囲は細胞成分に富む線維性組織で置換されていた (図 9)。一方、MINO ペレットを歯周ポケット内に投与した場合には、観察期間中を通して、歯肉組織中にミノサイクリンの蛍光は観察されなかった。

考 察

著者らの以前の報告¹¹⁾では MINO ペレットを歯周

図 8 MINO ペレットを歯肉組織内に投与後 7 日目の H.E. 染色所見 (a, $\times 50$) と蛍光観察所見 (b, $\times 50$)

図 9 MINO ペレットを歯肉組織内に投与後 14 日目の H.E. 染色所見 (a, $\times 10$) と蛍光観察所見 (b, $\times 25$)

(M-P ; MINO ペレット)

ポケット内に投与した場合のミノサイクリン濃度は投与後 3 日目で $2.6 \mu\text{g/ml}$, 7 日目で $1.9 \mu\text{g/ml}$ でありミノサイクリンの残留率は各々 72% と 67% であった。本研究において, MINO ペレットを歯肉組織内に投与した場合のポケット内ミノサイクリン濃度は 3 日目で $21.0 \mu\text{g/ml}$, 7 日目で $6.5 \mu\text{g/ml}$ であり, ミノサイクリンの残留率は 100% であった。ポケット内で吸収されるタイプの担体を用いた抗生物質の局所投与法では, ポケット内でいかに抗生物質濃度を長期間確実に維持できるかが問題であり, 本法は担体がコ

ラーゲンであるという特性を生かした従来のポケット内投与法に比較して, より有効性の高い抗生物質の局所投与法であることが示唆された^{1,2,4)}。

MINO ペレットを歯肉組織内に投与後, 臨床的に炎症の増悪や長期化および疼痛の発現など異常所見は認められなかった。また, 病理組織所見においても異物反応は認められなかった。本研究で用いたアテロコラーゲンペレットは医科領域では抗癌剤の局所投与の担体として, また歯科領域においては GTR 法に用いる生体内吸収性膜として用いられており, きわめて生

体親和性の高い生体材料である^{7,12)}。MINO ペレットは歯肉組織内投与後3日目以降から部分的吸収が開始し、細片化、14日目以降に吸収消失するものと考えられ、ミノサイクリンのペレットからの放散を示す蛍光像はMINO ペレットの吸収過程および歯肉組織中や歯周ポケット内のミノサイクリンの濃度変化を裏づけるものであった。

MINO ペレットを歯肉組織内に投与することにより経口投与で得られる歯肉組織内ミノサイクリン濃度に比較して、より高濃度のミノサイクリンが長期間維持されることが明かとなった⁴⁾。一方、MINO ペレットを歯周ポケット内に投与した場合においては、歯肉組織内へのミノサイクリンの移行は期待できないことが明かとなった。Ciancio らによれば、テトラサイクリン含有ファイバーを用いて歯周ポケット内に高濃度のテトラサイクリンを長期間維持した場合においても歯肉組織内へのテトラサイクリンの移行は生じないことが明らかにされている¹⁰⁾。発症に *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans* と略す) が関与していると考えられている若年性歯周炎においては経口投与によって得られるミノサイクリン濃度で十分な *A. actinomycetemcomitans* の抑制が可能だと考えられているが、それ以外の歯周炎においては、*A. actinomycetemcomitans* の十分な抑制が期待できないとする報告もある^{13,14)}。ポケット内からの *A. actinomycetemcomitans* の駆逐が困難な理由としては、*A. actinomycetemcomitans* の歯肉組織内侵入によるのかあるいはポケット外からの再感染によるのか明かではないが、前者によるものだとすると *A. actinomycetemcomitans* の駆逐が困難な症例の部位特異的治療法として本法は有効と考えられる^{15,16)}。

結 論

本研究では、ミノサイクリン含有コラーゲンペレットの歯肉組織内投与後の薬剤徐放性について検討を行った。その結果、本法は従来の歯周ポケット内投与法に比較して、ポケット内および歯肉組織内に高濃度のミノサイクリンを長期間確実に維持できる方法であることが明かとなった。

文 献

1) Kornman, K.S.: Controlled-release local deliv-

ery antimicrobials in periodontics: Prospects for the future. J. Periodontol., 64: 782-791, 1993.

- 2) 三辺正人, 木村三右衛, 斎藤数宏, 飯田正人: 歯周病における抗生物質を用いたメンテナンス療法の展望. The Quintessence, 10: 79-89, 1991.
- 3) Goodson, J.M.: Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. J. Dent. Res., 68: 1625-1632, 1989.
- 4) 木村三右衛, 三辺正人, 飯田正人: 歯周ポケット内ミノサイクリン貯留性に影響を及ぼす因子についての臨床的検討. 日歯周誌, 33: 936-942, 1991.
- 5) 三辺正人, 木村三右衛, 鈴木史彦, 斎藤数宏, 竹内佳世, 田村利之, 堀 俊雄: ミノサイクリンの局所投与法と経口投与法を用いた歯周病治療の臨床的比較研究. 日歯周誌, 36: 271-280, 1993.
- 6) 竹内佳世: Local drug delivery system の歯周治療への応用—ミノサイクリンおよび塩化リゾチウム含有コラーゲンペレットの局所投与に関する臨床的検討—. 日歯周誌, 34: 741-758, 1992.
- 7) 井谷史嗣, 坂上賢一, 松岡順浩, 小野田正, 藤原俊義, 合地 明, 折田薫三: 徐放性 IL-2 製剤 (IL-2 ミニペレット) を用いた乳癌局所免疫療法の検討. Drug Delivery System, 6: 296, 1991.
- 8) 国分正美, 伊藤真美, 川久保安朗, 加藤篤行, 松浦昌宏, 杉原邦夫: LS-007 をイヌ実験的歯周炎モデルに局所投与した時の歯周組織への移行性. 日本レダリー資料
- 9) 里見綾子, 浦口良治, 野口俊英, 石川 烈, 田丸博秋, 北村正孝: LS-007 投与後の歯周ポケット内ミノサイクリン濃度. 日歯周誌, 29: 937-943, 1987.
- 10) Ciancio, S.G., Cobb, C.M. and Leung, M.: Tissue concentration and localization of tetracycline following site-specific tetracycline fiber therapy. J. Periodontol., 63: 849-853, 1992.
- 11) 三辺正人, 木村三右衛, 竹内佳世, 児玉利朗, 堀俊雄, 伊藤 博, 結城幸一: 歯周治療用ミノサイクリンおよび塩化リゾチウム含有コラーゲンペレットの薬剤徐放性. 歯薬療法, 11: 166-173, 1992.
- 12) 三辺正人, 児玉利朗, 古郷辰二: コラーゲン膜を用いた GTR 法, 末田 武, 岡本 浩, GTR 法の臨床. 日本歯科評論, 東京, 84-97, 1993.
- 13) Müller, H.P., Lange, D.E. and Müller, R.F.: Failure of adjunctive minocycline-HCL to eliminate oral actinobacillus actinomycetemcomitans. J. Clin. Periodontol., 20: 498-504, 1993.
- 14) Müller, H.P., Lange, D.E. and Müller, R.F.: A 2-year study of adjunctive minocycline-HCL in actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. J. Periodontol., 64: 509-519, 1993.
- 15) Saglie, F.R., Newman, M.G., Carranza, F.A. and Pattison, G.L.: Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. J. Periodontol., 53: 217-222, 1982.
- 16) Liakoni, H., Barber, P. and Newman, H.N.: Bacterial penetration of pocket soft tissue in

chronic adult and juvenile periodontitis cases. An
ultrastructural study. J. Clin. Periodontol., 14 :

22-28, 1987.

連絡先 :

奥羽大学歯学部歯科保存学第一講座

〒963 福島県郡山市富田町三角堂 31-1