

## 歯周病の再生治療材料：ヒト自家骨膜シートの特性

### A Promising Biomaterial for Periodontal Regenerative Therapy: Characteristics of the Cultured Human Periosteal Sheet

川瀬 知之<sup>a</sup>, 奥田 一博<sup>b</sup>, 吉江 弘正<sup>b</sup>  
Tomoyuki Kawase, Kazuhiro Okuda and Hiromasa Yoshie

<sup>a</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科歯科基礎移植・再生学分野

<sup>b</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野

**要 旨** われわれが実施している自家培養骨膜シートをもちいた歯周再生治療は、健康な歯槽骨から採取した骨膜片をシート状になるまで培養し、骨欠損のある部位に移植する治療法である。作製された骨膜シートは、豊富な細胞外基質と重層化した細胞集団が効果的に統合した人工的な組織である。骨原性誘導によって、そこに含まれる細胞のアルカリホスファターゼ活性が大きく亢進し、石灰化物沈着も促進する。これは骨芽細胞系の未分化な細胞が数多く含まれていることを示唆するが、組織特異性幹細胞が含まれる可能性も考えられる。「生きた DDS (Drug Delivery System)」として骨代謝に関与する増殖因子を徐放することと考え合わせると、十分に自家骨の代替となりうるものとして位置付けられる。培養期間の短縮化が最大の課題であるが、培養法の改良やスキャホールドとの複合化などにより解決の方向性が見えてきた。また、同時に検討している高機能化の実現によって、中規模骨欠損にも対応できる移植物への発展性も期待される。

キーワード：歯周再生治療、培養骨膜シート、スキャホールド、増殖因子、未分化間葉系細胞

#### 1. 骨膜とは骨を覆っている膜状の組織である

骨膜とは、緻密骨を覆っている線維性の膜状組織である。比較的厚めの骨膜の場合、骨に接する側の骨形成層 (cambium layer) と結合組織側の線維層 (fibrous layer) の二層から構成されているのが容易に観察される。図 1A に示したブタの中手骨の骨膜が典型的な例である。しかし、同じブタでも部位によって、その骨形成活性に大きな差があることがうかがえる。下顎骨の骨膜はかなり肥厚して、骨形成層のなかに新生骨が入り込んだような構造を形成しており (図 1B)、それは小腸の絨毛を連想させる。実験用小動物の代表であるラットの場合、頭蓋骨の骨膜は非常に薄く (図 1C)、細胞の重層化が乏しいため線維層と骨形成層の区別がつかない。それに比べて、下顎骨の骨膜はブタほどではないものの、骨形成活性が旺盛なようで二層構造が確認できる (図 1D)。哺乳類ではないが、参考までにニワトリの手羽の骨膜を紹介すると、図 1E に示すように、かなり肥厚した骨形成層と線維層から構成されていることがわかる。

ヒト歯槽骨も二層構造からなる典型的な骨膜で覆われているものと考えられるが、倫理的な制限から骨膜を含めた歯槽骨を採取して観察する機会がなく、結果的にこれまで筆者自

身の目で直接確認していない。ただ、少なくとも採取した骨膜に典型的な骨形成層を認めることはほとんどない (図 1F)。おそらく採取の際に剥離・脱落しているのではないかと思われる。このような状態で採取された骨膜片を組織培養することによって、移植に耐えられる数の細胞と細胞外基質 (ECM) を含んだ細胞の重層化したシート状になるまで成長させることになる<sup>1~4)</sup>。よく間違えられるので、詳細は後述するが、この骨膜シートは分散した細胞による単層培養細胞シートとは性質を異にすることをあらかじめ断っておきたい。

#### 2. 口腔内という資源的に限られた環境とそこからの逆転の発想

整形外科分野で、骨折や腫瘍切除後の組織再建に骨膜を使用してみようという試みは古くからあった。骨膜を培養で増やすのに成功したのは 1930 年代のことである<sup>5)</sup>。それから骨膜細胞に関する研究も進められてきたが、骨再生治療のメインストリームとして脚光を浴びたことはなかったように思われる。われわれが直接のお手本とした名古屋大学の上田らによるイヌの歯槽骨再生実験が報告されたのは 2000 年代も半ばになってからのことである<sup>6)</sup>。

プロトコールは至ってシンプルであり、2-3×2-3 mm 大に細分化した骨膜片を培養ディッシュに静置し、剥がれないように培養液を注ぎ、そのまま組織培養を行う (図 2A)。ちなみに 35 日間培養すると、図 2B に示すように長径が 40 mm 程度の骨膜シートが形成される。ただ、培養開始直

<sup>b</sup> 〒951-8514 新潟市中央区学校町通 2-5274  
TEL: 025-227-2869; FAX: 025-227-0808  
E-mail: yoshie@dent.niigata-u.ac.jp  
2012 年 9 月 2 日受付

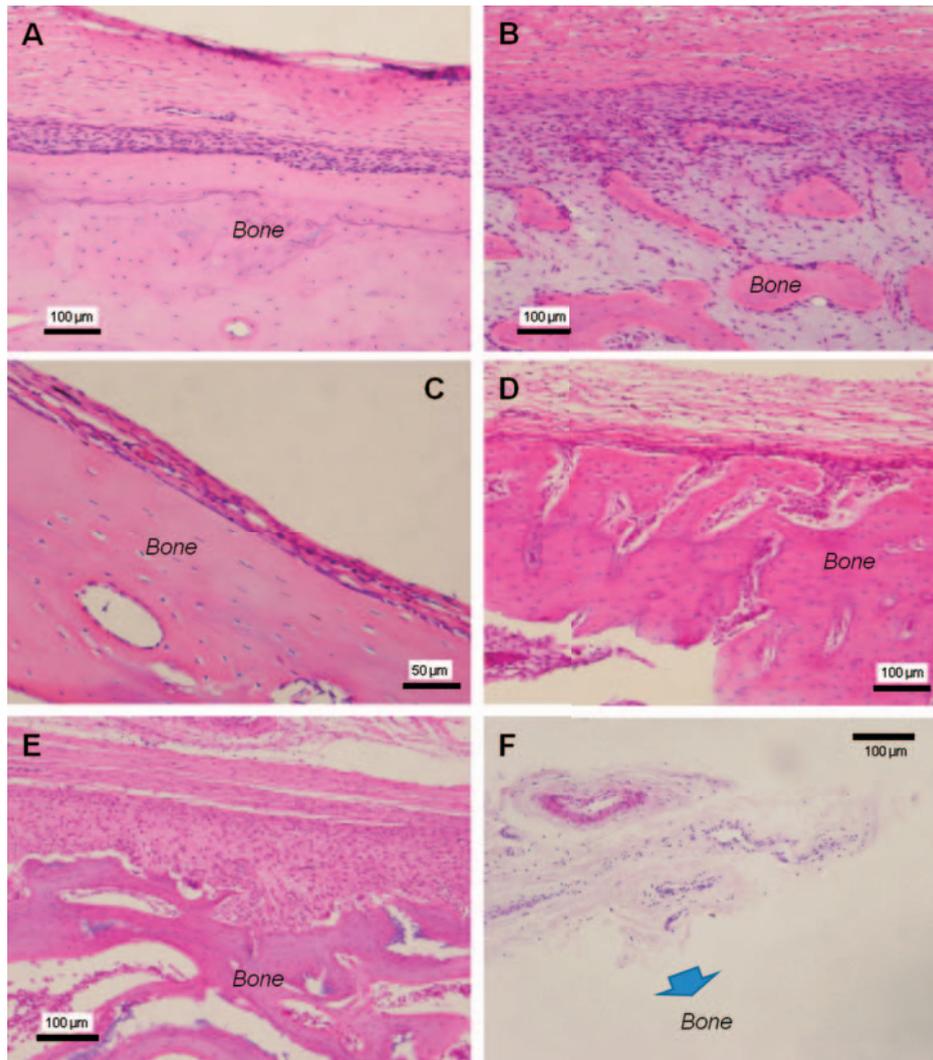


図1 さまざまな動物種の骨膜。(A) ブタ中手骨, (B) ブタ下顎骨, (C) ラット頭蓋骨, (D) ラット下顎骨, (E) ニワトリ手羽中, (F) ヒト下顎歯槽骨から採取した骨膜。HE染色。

後から順調に細胞の遊走が見られるわけではなく、1週間から10日前後の停滞した期間がある。なお、この間の細胞の消長については、別誌を参照してもらいたい<sup>7)</sup>。図2Cは1週間目前後から細胞遊走がはじまった例の8日目の骨膜片周辺の様子である。骨膜シートの成長を連続的に観察し、骨膜シートの長径と短径の平均を直径として経時的な変化をプロットすると、図2Dのようになった。遊走細胞は水平方向にだけ広がっているわけではなく、垂直方向に積層する部分もあるので、厳密な細胞数の指標ではない。しかし、Medium199による通常培養の場合、細胞の重層化はそれほど顕著でないため、正の相関関係にあると考えて差し支えない。

### 3. 組織片培養でなければ骨膜シートはできなかった

移植治療用細胞の加工の世界では、できるだけ細胞のダメージになるような手を加えない方がよいとされているが、培養初期の細胞分散だけでなく、細胞数の確保のために継代

するという程度であれば十分許容範囲であると考えてよい。骨膜細胞の加工について文献を調べると、ほとんどが分散細胞を用いた研究を行っている。分散細胞を使った培養の最大の利点は、短期間に必要な細胞数にまで増やすことができることであり、付加的な利点としては複雑な微細構造の足場に細胞を送達しやすいことがあげられる<sup>8)</sup>。反面、欠点として骨膜本来の構造に近い細胞の重層化を再現できないことがあげられる。

よく知られていることであるが、分散した正常細胞を単層培養した場合、細胞同士は自発的に重なり合って重層化することはない。教科書に書かれているように“contact inhibition”がかかって、細胞同士がきれいに敷石状に並ぶのも珍しいが、とにかく骨膜細胞も重層化しない。これは、同時に、コラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスを豊富に蓄積できないことを意味している。東京女子医大の岡野らが提唱する「細胞シート工学」では、三次元組織構築のために単相培養した細胞シートを重ね合わせる技術を開発してい

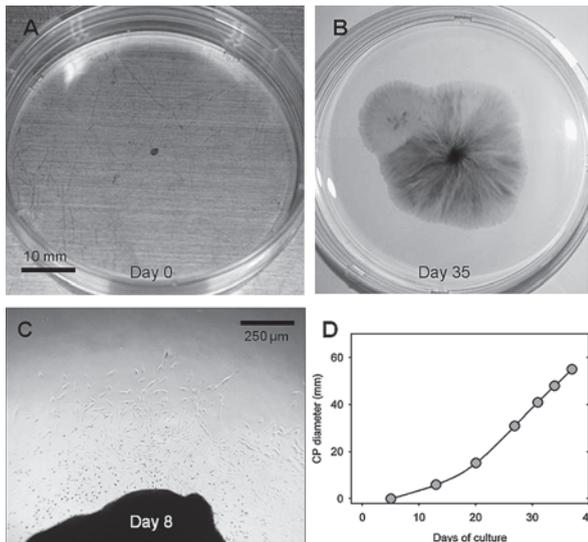


図2 骨膜シートの成長過程。(A) ヒト歯槽骨から採取した骨膜片を2×2 mm 大に細片化して静置培養を開始したところ。(B) 培養35日目の骨膜シートのALP活性染色所見。Bar = 10 mm。(C) 骨膜片からの細胞遊走開始。培養8日目。Bar = 250 μm。(D) 骨膜シート成長曲線。CP: Cultured Periosteal sheet。

る<sup>9)</sup>。心筋再生などにおいてその有用性が検証されているが、骨膜のような(あるいは骨のような)細胞と同じくらいECMが重要な位置を占める組織においては、その構造自体が細胞シートの重層化だけでは容易に達成できない領域となっている。

ここで翻って考えなおしてみると、整形外科領域で扱う骨欠損は比較的大規模であり、それをまかなうのに十分な量の自家骨採取が不可能であるから骨膜にその機能の一部を代替させられないかと考えたわけであり、その流れはわかりやすい。それに引き換え、小規模な骨欠損を特徴とする歯周病で骨膜移植に頼る必要があるのかと問われた場合、大方を納得させられるような回答が見つけられない。強いて答えを求めるとすれば、それは歯科医ゆえの制限のためであり、「小規模とはいえ、口腔内から理想的な海綿骨が採取できないため」ということになろうか。したがって、調製された骨膜シートには自家骨と同程度の骨形成能が備わっているのが理想的であり、またそう期待される。

特に整形外科関係の研究者から、よく「骨膜を培養していると軟骨ができるんじゃないですか?」と聞かれることがある。確かに、発現遺伝子の網羅的解析を進めていくと「軟骨的な性格」を垣間見ることがあるが、少なくとも歯槽骨由来の骨膜細胞が、表現型として典型的な軟骨細胞に自発的に分化することはない。この質問の背景には、同じヒトの場合でも、顎顔面骨と体幹骨の骨膜とでは、性状に大きな差があるという事情がある。これは臨床的によく知られていることであるが、顎骨骨折の治療過程において軟骨の形成は認められない。一方、整形外科領域では20年以上前から骨膜を軟骨再生の材料にできないかという研究が行われてきた<sup>10,11)</sup>。こ

の差がどこにあるのかという分子生物学的な研究から、最近、Wnt/β-cateninシグナル伝達系の優劣が、軟骨内骨化と膜内骨化の線引きになっているということが明らかになってきた<sup>12~14)</sup>。それよると、顎骨の骨膜細胞にも軟骨を作る能力はあるらしいのである。場の環境がそうさせていないのかもしれないが、まだ直接的な科学的証拠は報告されていない。

以下に詳しく述べるが、厚みのある骨膜シートを形成すると、遊走した細胞によって構成された重層化部には比較的広い空間が細胞と細胞の間に存在し、薄い骨膜シートよりも圧倒的に多くのECMをため込むことができるような構造になる<sup>15)</sup>。これが、骨膜組織片培養の大きなメリットである。

#### 4. 骨膜シートの形態学的特徴

まず移植治療に用いる培養骨膜シートについて、その形態的な特徴から説明する。骨膜シートの形成は、骨膜のような二層構造をもった組織をin vitroで再構築することが目標ではない。そうできれば治療法もさらに発展させられるのかもしれないが、骨膜本来の二層構造をもたなくとも、移植した際に骨形成・骨誘導を発揮し、結果的に欠損部の骨組織を再生することができれば、歯周治療学的な目標は達成される。また、そもそもなぜ二層構造が形成されているのかということを考えてみると、培養骨膜シートでこれを模倣することの積極的な組織工学的意義は見当たらないように思う。

二層構造はともかく、細胞が重層化した構造は骨膜シートを移植物として成功させるための大きなポイントである。これはマクロ的には単層培養の細胞シートでは得られないレベルの機械的強度を得ることに有効であり、ミクロ的にはECMの蓄積において重要な役割を果たしている。細胞間スペースに豊富に沈着したコラーゲン・マトリックスは石灰化物沈着のためのスキヤホールドとなりうる。したがって、厚みのある骨膜シートを作るとというのが、肉眼的にも容易に確認できる初期の目標となる。

臨床的に骨膜の厚みと治療効果の相関性を厳密に検討した結果はないものの、経験的には厚みのあるほうが高い治療効果を示すという感触を持っている。それに対するもっとも道理的な説明は、移植する細胞が高密度(多数)であることと細胞外マトリックスが豊富なことによるということになるが、われわれは厚みのある骨膜シートには薄い骨膜シートには認められない機能が付加されているためではないかという作業仮説を立てている。

これを立証するためには、採取部位にかかわらず、厚みのある骨膜シートを再現性高く調製する技術が必要である。10% FBSを加えたMedium 199で培養した場合、骨膜片(PTS: periosteum tissue segment)から遊走した細胞が形成する細胞重層化膜の厚さは、パラフィン切片上で50~80 μmである(図3A)。骨膜シートの厚さを増すためにわれわれが試した方法のなかでは、多孔質のポリ乳酸膜を足場とする方法や市販の幹細胞用培地の使用が効果的であった。特に、後者の場合、静置培養環境下においても、300 μm以上の細胞重層化

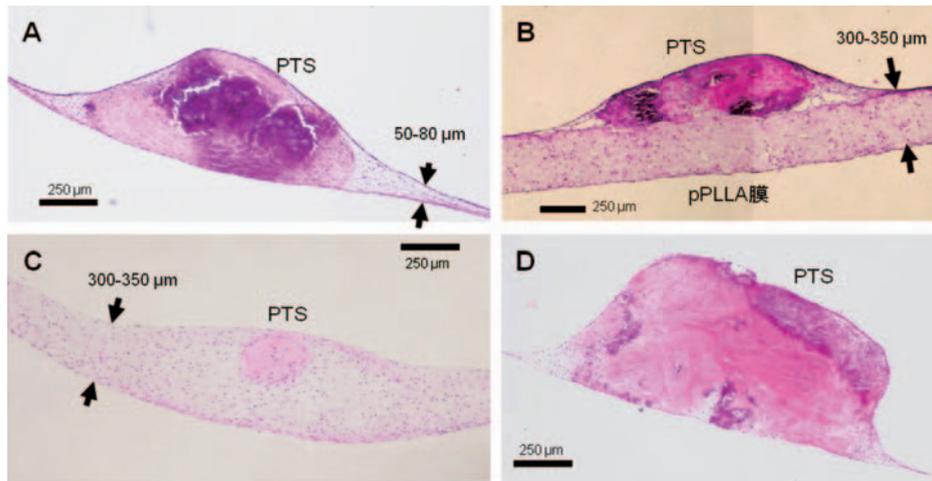


図3 さまざまなスキャホールド上で培養した骨膜シートの細胞重層度。(A) ポリスチレン培養ディッシュ、(B) ポリ乳酸多孔質膜、(C) ポリスチレン培養ディッシュ、ただし幹細胞様培地 (MesenCult) 使用、(D) ポリ乳酸-カプロラクトン共重合フィルム。PTS : Periosteum Tissue Segment.

を誘導することが可能である (図 3B, C)。ちなみに、「採取部位にかかわらず」と書いたのは、通常、厚みのある骨膜は厚みのある骨膜シートにはならないことをしばしば経験しているからである。厚みのある骨膜片を培養した場合、細胞が遊走化した部分ではせいぜい 10 数層の重層化しかみられないことが多い。われわれは、これを「釣鐘型」骨膜シートと呼んでいる (図 3D)。骨膜片とディッシュの接着があまり良くないときに見られる傾向にあることから、線維層からの細胞遊走効率が悪いことによるのではないかと想像しているが、採取した骨膜片の細胞密度がそもそも低かったからという場合もあるだろう。細胞との親和性が劣るスキャホールドの場合は細胞接着因子を介在させる。またポリスチレン培養ディッシュの場合は培地量を極限まで減らすことによって大きな改善がみられることが多い。ただし、幹細胞用培地 (たとえば、MesenPRO, MesenCult, STK-1 など) はこのような場合においても、厚みのある骨膜シートを再現性よく形成することができる<sup>15)</sup>。

## 5. 自家骨移植の代替になりうるために必要なこと

### 5.1 スキャホールドとして

では、どうやって骨膜シートに骨形成能を発現させるかという問題がある。当然のことであるが、自家骨は無機質および有機質のスキャホールドを大量に提供できる。移植治療用の骨膜シートの場合、骨芽細胞前駆細胞の場合と同様、dexamethasone と  $\beta$ -glycerophosphate の添加によって、すみやかに alkaline phosphatase (ALP) 活性の発現を誘導することができる (ただし、臨床使用する場合は、分化誘導を実施していない)。それに伴って、*in vitro* での石灰化も認められる。このように分化誘導された骨膜シートをヌードマウスの皮下に移植すると骨様組織を形成する<sup>3)</sup>。しかし興味深いことに、6 週間も培養していると、骨膜シートの中には自発的に ALP 活性が発現してくる場合も少なくなく、マウスへの

移植においても 20-40% の割合で石灰化あるいはより高度な骨様組織の形成を認める。

ここで、石灰化という現象について、少し復習しておいたほうがよいだろう。一般的に医学生物学に軸足を置いている研究者にとって、石灰化とは骨芽細胞の分化誘導の結果と即座に連想されると思う。つまり基質小包の産生をはじめとする生物学的プロセスのアウトプットの一つであるという理解である。しかし、実は活性化した骨芽細胞などなくても *in vitro* で石灰化を誘導することは容易なことである。古く小久保の疑似体液 (SBF) の研究により明らかにされたことであるが、ハイドロキシアパタイト (HAp) に対して溶解度が過飽和な SBF は自発的に HAp を形成することはないが、いったん核が形成されると、それを成長させ石灰化沈着物として認識されるまでになりうる<sup>16)</sup>。採取した骨膜片は、骨形成層を欠いていて、ほとんどが線維性 (コラーゲン主体) の組織であり、そこに含まれている細胞も少ないわけであるが、ある程度の ALP 活性を示している。微小な HAp の核が含まれていたとしても不思議ではない。実際、骨膜シート形成の過程において、中心部の骨膜片部分は高い確率で石灰化する。しかし、驚くべきなのは、凍結融解などの方法により細胞を破壊したのちでも、この骨膜片を培養液に入れてインキュベートすると石灰化物の沈着が起こってくる。

もちろん骨膜シートが多数の成熟した骨芽細胞によって形成されていた方がいいのは間違いない。Dexamethasone などを用いる定法により分化誘導を試みると、遊走し重層化した骨膜シート部分の細胞にも ALP 活性が発現するようになり、石灰化物の沈着が認められるようになる。これこそが、いわゆる狭義の生物学的石灰化ということができるところであるが、いずれのメカニズムによっても *in vitro* で形成された石灰化の核やそこから成長した石灰化沈物は、生体内に移植した際に骨形成の「起点」になるだけでなく、石灰化を成長させるミネラルのリザーバーとして機能しうるものと考えら

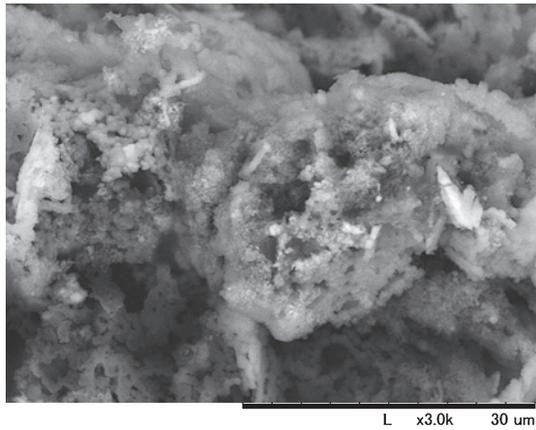


図4 骨膜細胞によって産生された石灰化物のSEM所見.

れる。また、これらの石灰化物を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察すると、微小顆粒が凝集し、数ミクロン以下の微小な気孔を有していることが分かる（図4）。したがって、これらの所見を総合的に検討すると、培養骨膜シートは石灰化部において少なくとも多孔質のリン酸カルシウム系骨充填材と同様の骨伝導活性を示すことが期待される。

一方、有機質のスキヤホールドについてであるが、骨膜シートには旺盛なI型コラーゲン産生活性がある。これは、幹細胞用培地に替えることによって、顕著に亢進することができる<sup>15)</sup>。したがって、移植した部位において、ホストの細胞を引き込むに足るスキヤホールドとして機能することは十分期待される。

### 5.2 未分化細胞のソースやリザーバーとして

海綿骨を移植骨として選択した場合、骨芽細胞やその未熟な前駆細胞のほかに骨膜細胞や骨髄細胞の供給も期待される。組織特異性間葉系幹細胞が含まれる確率（比率）は定かではないが、これらの細胞よりは分化方向の決定された骨芽細胞の前駆細胞が含まれている確率のほうが圧倒的に高くなっているものと思われる。

その点、培養骨膜シートの場合は考え方が二極化している。「骨形成層の骨芽細胞がそのまま揃っている」と思いこんでいる賛同派と、「ほとんどが線維芽細胞であろう」という意見の否定派に分けられるようである。しかし、実態はどちらでもない。その証拠は未発表のデータも含めていくつか挙げられるが、まずALP活性の亢進した細胞への分化誘導や石灰化物形成の誘導が可能である。一方、脂肪細胞への分化誘導に反応して少なくとも1-2%の細胞に脂肪滴の形成が認められるようになる。軟骨細胞発現型の誘導も可能である。さらに、細胞膜表面のCD分析から、国際細胞治療学会が提案している間葉系幹細胞の最低基準<sup>17)</sup>であるCD73, CD90, CD105の陽性、CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DRの陰性を骨膜シートに含まれる細胞は満たしている<sup>15)</sup>。図5には、骨膜シートからトリプシンにより細胞を分散させ、そこに発現しているCD抗原を免疫蛍光染色した結果である。CD90とCD105は強陽性、CD34は陰性、CD146は弱陽性を示し

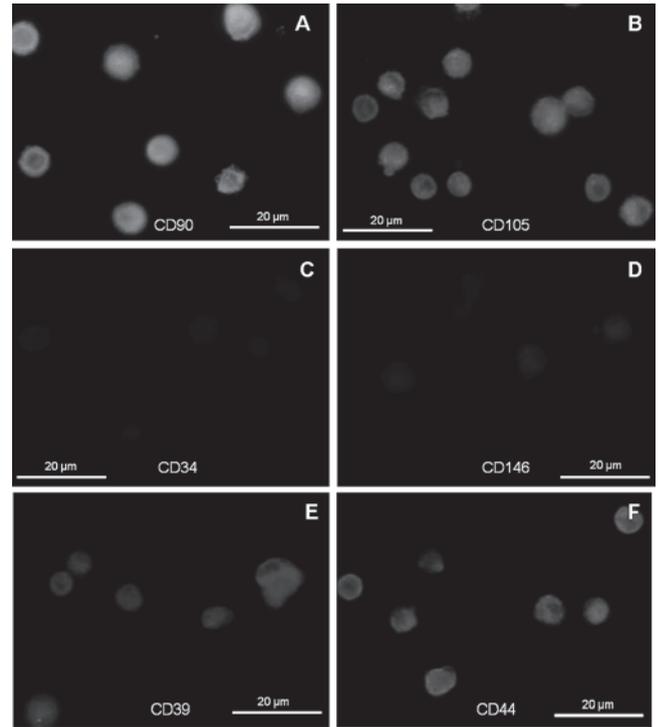


図5 骨膜細胞の表面抗原の免疫蛍光染色所見。(A)CD90、(B)CD105、(C)CD34、(D)CD146、(E)CD39、(F)CD44.

ている。また、上記の基準には含まれていないが、CD39とCD44は中程度の陽性を示している様子が確認できる。したがって、海綿骨のように成熟した骨芽細胞（培養中に自発的に成熟化する可能性も含めて）が含まれている可能性は低いものの、分化誘導によって容易にALP活性を発現するようになる骨芽細胞先駆細胞や未分化間葉系幹細胞も含まれているという解釈が成り立つ。

移植治療に際しては、その移植部位で移植された細胞がどのくらいの間生存し機能しているかというデータはないが、ヌードマウスでの実験では、少なくとも3か月は生存していることが確認されている<sup>17)</sup>。これだけの期間、骨芽細胞への成熟化や細胞外基質や石灰化物の産生という機能を果たしていれば、ホストの細胞に先立って骨形成（再生）の先鞭をつけるには十分だと思われる。

### 5.3 増殖因子を徐放する生きたDDSとして

局所的に投与した薬物が、瞬時の分解や拡散によって急激に濃度低下することを避け、薬物の有効濃度をできるだけ一定に保ち、かつ長期間作用させることができるようにするために、さまざまな方法で「徐放系（DDS: drug delivery system）」を付与する研究がなされている。しかし、これらの技術に頼らなくても移植した細胞が生存していれば、それらが「生きたDDS」として機能しホストの細胞に影響を与えるはずである。

実際、われわれはin vitro と in vivo の両面から、その直接的・間接的な証拠を得ている。まず、in vitro で培養骨膜シートの産生するサイトカインを分析すると、骨芽細胞への分化

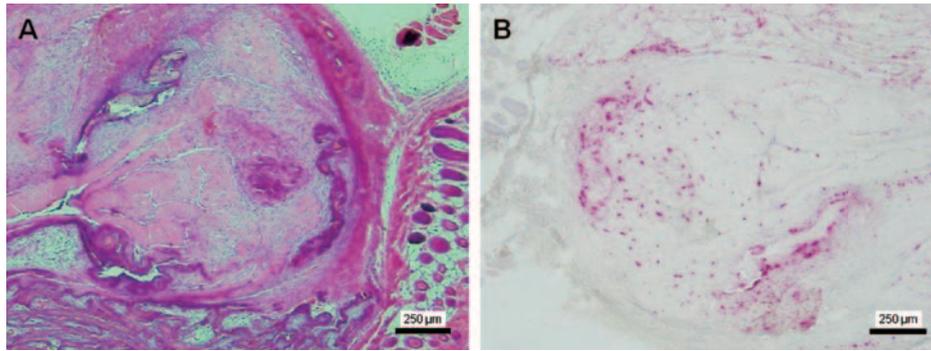


図6 ノードマウス結合組織に移植した培養骨膜シートの組織学的所見. 35日間培養し,分化誘導を掛けた骨膜シート(単独)をノードマウス背部皮下に移植. 2週間後に摘出. (A) HE染色, (B) TRAP染色.

誘導によって, そのプロファイルに顕著な変化が表れ, IL-6などの炎症性サイトカインは激減し, 骨代謝へのポジティブな関与が示唆されるIL-13やVEGFなどの産生が大きく亢進する<sup>3)</sup>. さらに, これらの培養骨膜シートをノードマウスに移植すると, 分化誘導をかけた骨膜シートの周囲においてすみやかに多くの破骨細胞様細胞が誘導・形成されるのが確認される<sup>18,19)</sup>. 図6には, 骨芽細胞系に分化誘導した骨膜シートをノードマウスの背部皮下に移植し2週間後に摘出し結果を示した. 図6Aは非脱灰標本のHE所見であるが, 小規模な石灰化組織が何か所も形成されているのが認められる. また, 図6Bに酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色した結果を示すが, TRAP陽性の破骨細胞様細胞がすみやかに誘導・形成されている様子がうかがえる. これらの所見は, 培養骨膜シートが移植された部位においても, 十分な種類と量のサイトカインを徐放し, ホストの細胞が骨形成・吸収系の整った場を形成するのを支援していることを示唆している.

さらに, これは生理活性物質の提供という点ではやや異質になるが, 培養骨膜シートが*in vitro*で形成した石灰化物を移植部位に持ち込むことも意義のあることである. これから形成しようとする骨組織にカルシウムとリンを提供しようという点で, 培養骨膜シートはこれらのミネラル成分のリザーバーとして貢献する可能性があるからだ. 骨はHApから成り立っていることはよく知られているが, その結晶性は医療用の焼成したHAp骨充填材と比較すると低く, Ca<sup>2+</sup>の結晶格子からの欠落や置換もよくあることである. したがって, 溶解しやすいという特徴がある. われわれは, 骨膜細胞シートから分散した細胞が産生した石灰化物をX線回折分析(XRD), フーリエ変換赤外線分光分析(FT-IR), X線マイクロアナリシス(XMA)などで分析したことがあるが, それは骨組織から得た結果と近似したものであった<sup>20)</sup>. すなわち, 骨膜シートを伴って移植されたその石灰化物は, 移植部位において, 骨のHApと同様の挙動を示し, 破骨細胞によって比較的容易に吸収されることも想像に難くない.

## 6. 骨膜シートをより広く臨床応用するための橋渡し研究的課題

これまでの5年間, 骨膜シートの技術を引き継ぎ, われわれの治療目的や現状にあった形に確立することに全精力をつぎ込んできた. 現在, これを高機能化するために, 骨膜シートの詳細な分析を通してスキャホールドやサプリメントの最適な使用条件を探索している. また, 近い将来的には, 骨再生以外の骨膜シートの新たな可能性を見つけて, 臨床応用の幅を広げたいと考えている.

一方, われわれも多少関与しているが, 安全性確保や品質管理のための技術革新も必要である. 検体のロスを最小限にし, 迅速に検査する方法の確立と標準化も急がれる.

## 7. 培養骨膜シート移植を応用した歯周組織再生法

以上が骨膜シート再生治療法をさらに発展させるべく行ってきた研究であるが, 最後に実際に臨床の場で行っている治療法とその成果について簡単に紹介してまとめに代えたい.

われわれは, 研究プロジェクトの柱として多血小板血漿(PRP)の研究にも力を注いできた<sup>21~24)</sup>. 生体材料に関する研究では, 生分解性高分子化合物とともに生体活性セラミックスの研究も行っている<sup>25,26)</sup>. このような経緯もあって, 歯周組織を再生させるための“戦略”として, 細胞として骨膜細胞, スキャホールドとしてHAp顆粒, 細胞増殖因子としてPRPを選択し, 臨床研究を計画した. これらの組み合わせによって, 理論的には組織工学の3要素が満たされることとなり, 骨形成および付着の獲得による歯周組織再生が期待された.

培養骨膜シートについては, 患者の下顎大臼歯頬側部の付着歯肉下の骨表面より, 2-3×2-3 mmの骨膜小片を採取後, 上述の方法で培養骨膜シートを作製した. PRPと顆粒状のHAp骨充填材の調製については, 患者末梢血8.5 mLから2回の遠心分離により, 0.6 mLのPRPを調製し, このうち0.3 mLのPRPにつき, 0.1 gのアルギン酸ナトリウムを添加して活性化し, 0.5 gのHAp骨充填材と混和させることとした<sup>12)</sup>. この治療法の臨床効果を知るために本学倫理委員会

の承認を得た後、自主臨床研究を展開した。

新潟大学歯学総合病院に通院する慢性歯周炎患者のうち、歯周基本治療を完了して同意の得られた30名(男性2名, 女性28名)を被験者とした。6 mm以上のポケットと6 mm以上の付着レベル, 規格エックス写真より3 mm以上の骨内欠損深さを示す中等度から重度の歯周炎罹患部位30部位を被験部位として, 年齢, 性別, 骨欠損形態, 歯種をマッチングさせて15部位ずつ, 培養骨膜シート適用群と非適用群の2群に分けた。術後は1か月に1回の頻度で専門的清掃を行い, 1年目に群間および群内比較を行った。歯周ポケットの改善については両群とも術前と比較して有意に改善した。しかし, 付着レベルおよび骨欠損の深さについては, 培養骨膜シート適用群で有意な改善がみられた<sup>1,2)</sup>。

さらに, 培養骨膜シート適用群22症例について, 1年および3年予後データを比較したところ, ポケットの深さおよび付着レベルは3年経過しても1年目で得られた改善値が維持されていた。骨欠損深さは, 3年目では1年目で得られた値よりもさらに統計学的に有意な改善がみられたことから, 骨の再生が経時的に促進されていることが判明した<sup>27)</sup>。培養骨膜シートをPRPとHAp骨充填材に併用して用いる本法には, 歯周組織再生効果があることが臨床的にも示されたことになる。

最長経過症例は5年を経過しているが, これまでのところ有害事象は生じていない。本治療法の効果は, 従来のPRPとHAp骨充填材の効果すなわち足場と増殖因子の効果に加えて, 骨芽細胞へ分化し得ると考えられる骨膜細胞の作用と, シート性状が増殖因子の徐放体および上皮の深部増殖に対する遮断膜として作用したことによるものと考えられる。今後はさらに基礎研究や橋渡し研究と密接な連携を保ち<sup>28)</sup>, 培養骨膜シートから再生医療の裾野を広げていきたいというのがわれわれの抱負である。

## 文 献

- 1) Yamamiya, K., Okuda, K., Kawase, T. *et al.*: *J. Periodontol.*, **79**, 811–818 (2008)
- 2) Okuda, K., Yamamiya, K., Kawase, T. *et al.*: *J. Int. Acad. Periodontol.*, **11**, 206–213 (2009)
- 3) Kawase, T., Okuda, K., Kogami, H. *et al.*: *J. Tissue Eng. Reg. Med.*, **3**, 218–229 (2009)
- 4) Nagata, M., Hoshina, H., Li, M. *et al.*: *Bone*, **50**, 1123–1129 (2012)
- 5) Fell, H.B.: *J. Anat.*, **66**, 157–180 (1932)
- 6) Mizuno, H., Hata, K.I., Kojima, K. *et al.*: *Tissue Eng.*, **12**, 1227–1335 (2006)
- 7) Kawase, T., Kogami, H., Nagata, M. *et al.*: *Cryobiol.*, **62**, 202–209 (2011)
- 8) Hutmacher, D. and Sittinger, M.: *Tissue Eng.*, **9**(Supple 1), S45–64 (2003)
- 9) Masuda, S., Shimizu, T., Yamato, M. and Okano, T.: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 277–285 (2008)
- 10) Nakahara, H., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E. *et al.*: *Bone*, **11**, 181–188 (1990)
- 11) O'Driscoll, S.W., Recklies, A.D. and Poole, A.R.: *J. Bone Joint Surg. Am.*, **76**, 1042–1051 (1994)
- 12) Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L. and Yang, Y.: *Dev. Cell*, **8**, 739–750 (2005)
- 13) Hill, T.P., Später, D., Taketo, M.M. *et al.*: *Dev. Cell*, **8**, 727–738 (2005)
- 14) Ling, L., Nurcombe, V. and Cool, S.M.: *Gene*, **433**, 1–7 (2009)
- 15) Uematsu, K., Kawase, T., Nagata, M. *et al.*: *Stem Cell Res.*, **10**, 1–19 (2012)
- 16) 岡崎正之, 山下仁大 (編): セラミックスバイオマテリアル, コロナ社, 東京 (2009)
- 17) Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I. *et al.*: *Cytotherapy*, **8**, 315–317 (2006)
- 18) Kawase, T., Tanaka, T., Nishimoto, T. *et al.*: *J. Bioact. Compat. Polym.*, **27**, 107–121 (2012)
- 19) Kawase, T., Okuda, K., Kogami, H. *et al.*: *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **21**, 731–739 (2010)
- 20) 川瀬知之: PCT 出願, PCT/JP2010/53661
- 21) Okuda, K., Kawase, T., Momose, M. *et al.*: *J. Periodontol.*, **74**, 849–857 (2003)
- 22) Kawase, T., Okuda, K., Wolff, L.F. and Yoshie, H.: *J. Periodontol.*, **74**, 858–864 (2003)
- 23) Okuda, K., Tai, H., Tanabe, K. *et al.*: *J. Periodontol.*, **76**, 890–898 (2005)
- 24) Kawase, T., Okuda, K., Saito, Y. and Yoshie, H.: *J. Periodontol.*, **76**, 760–767 (2005)
- 25) Kawase, T., Okuda, K., Kogami, H. *et al.*: *J. Periodontol.*, **81**, 420–427 (2010)
- 26) Nakayama, H., Burns, D.M. and Kawase, T.: *J. Nondest. Eval.*, **30**, 71–80 (2011)
- 27) 吉江弘正, 奥田一博: ザ・クインテッセンス, **30**, 75–90 (2011)
- 28) 川瀬知之: 日本歯周病学会誌, **52**, 3–11 (2010)