

総説

—日本歯周病学会学術賞受賞—

歯周組織再生療法の基礎的および臨床的エビデンスの構築

奥田 一博

新潟大学医歯学総合病院歯み合わせ診療科歯周病診療室

Establishment of Biological and Clinical Evidences in Periodontal Tissue Regeneration

Kazuhiro Okuda

Niigata University Medical and Dental Hospital, Department of Occlusal Function,
Division of Periodontics

はじめに

歯周炎により破壊された組織を再生させることは歯周治療の究極の目標である。歯周組織の再生治療としては、1) 歯槽骨、歯根膜、セメント質の再生治療と、2) 歯肉組織の再生治療の2つに大別される。

一方、再生の3要素の観点から、(幹)細胞、増殖因子、足場の3要素が必要でこれに適切な環境と時間が加わることで組織再生がおこるという概念がある¹⁾。歯周組織再生について、足場としては、骨移植材である人工合成骨移植材(ハイドロキシアパタイト材; HA, β -第三リン酸カルシウム; β -TCP), GTR膜(非吸収性; PTFE膜, 吸収性; collagen膜)が利用されてきた。また増殖因子や細胞が含まれる材料としては、自家骨や他家骨(脱灰凍結乾燥他家骨; DFDBA, 凍結乾燥他家骨; FDBA), 異種骨がある。増殖因子としては骨形成タンパク; BMP, 塩基性線維芽細胞増殖因子; bFGF, 形質転換増殖因子; TGF- β , カルシトニン遺伝子関連ペプチド; CGRPがある。また増殖因子が複数存在するものとして、幼若ブタの歯胚から抽出したエナメル基質由来タンパク(EMD)や自家の多血小板血漿(PRP)が

臨床応用されている。

細胞を基盤とした歯周再生治療は、研究段階のものが多くこれからの発展が期待される。動物実験から臨床試験段階にあるものとして、骨髓間葉系細胞移植があり、腸骨や口腔内から採取した骨髓細胞を増殖因子と培養し、幹細胞を歯槽骨欠損部に移植するものである。また、歯根膜細胞あるいは骨膜細胞を培養してシートを作製し歯周組織欠損部に静置して再生能を得る研究が動物レベルで進められている。さらに口腔粘膜培養シートによる歯肉増大手術は臨床試験研究の段階である。

基礎的研究から得られた知見を 臨床で具現化させるための戦略

治療学に関する研究のゴールは、研究のための研究で留まるのではなく、明確に臨床現場へその成果を反映させなければならない。その戦略としてまず、歯周治療とEvidence-Based Medicineについて確認しておきたい。

歯周疾患は多因子性で複雑な要因が絡み合った慢性疾患=生活習慣病である。このような疾患に対しては、要素還元手技的なアプローチつまり原因解明のた

連絡先: 奥田一博

〒951-8514 新潟市学校町通2-5274 新潟大学医歯学総合病院歯み合わせ診療科歯周病診療室

Kazuhiro Okuda

Division of Periodontics, Department of Occlusal Function Niigata University Medical and Dental Hospital
2-5274 Gakko-cho, Niigata 951-8514

E-mail okuda@dent.niigata-u.ac.jp

めに徹底的に掘り下げて分子レベルにまで追求していく方法だけでは対応できない。そこで現象面に立脚しどのような症状に対してどのような治療を行った場合にどの程度の予後が見込まれるかといったことを確率・統計論的に明らかにして医療の標準化、効率化を確立することが、近年、声高に叫ばれている。要するに慢性疾患の対応としていろいろな治療を行う場合には、根拠になる研究論文＝無作為比較臨床研究のデータを踏まえて「あるべき治療法」を定め、それを実践しようとする考え方が Evidence-Based Medicine である²⁾。すなわち基礎研究から得られた科学的根拠を臨床現場へ応用し、無作為比較臨床研究を展開することではじめて Evidence-Based Medicine に耐えうるデータベースとなる。またすでに商品として完成しているものは、まず、比較臨床研究で臨床効果および安全性を確認したあと、その基礎的生物学的根拠を探るという逆の方法をとることもある。

以下に紹介する内容は、この点を意識しながら研究を進めた私どもの成果の一部である。受賞課題の対象論文を中心に概説したい。

TGF- β の組織再生効果

1. TGF- β 1 の骨再生作用 (図 1)

ラット頭頂骨に作成した直径 3 mm の円形骨欠損部へ β -第三リン酸カルシウム (β -TCP) のペレットを担体とした TGF- β 1, 1 μ g を投与し、対照側の担体と比較した。実験側において明らかに母床骨断端からの新生骨形成および alkaline phosphatase (ALPase) と酒石酸抵抗性 acid phosphatase (TRACPase) の強陽性免疫染色結果が得られたことから活発な骨芽細胞および破骨細胞による骨代謝が促進されていることを確認した³⁾。

2. TGF- β 1 の軟組織創傷治癒促進作用

さらに TGF- β 1 の軟組織創傷治癒過程に及ぼす影響について、増殖細胞核抗原 (PCNA) および細胞外基質であるテネイシン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG), IV 型コラーゲンの免疫染色動向を検討した。TGF- β 1 は溶液として手術直後 2 μ g/ μ l, 1 日後, 2 日後に 1 μ g/ μ l ずつ投与して、術後 3 日, 7 日目の組織を検討した。7 日目の PCNA 陽性細胞の増加所見から TGF- β 1 は G1 期から S 期にかけての

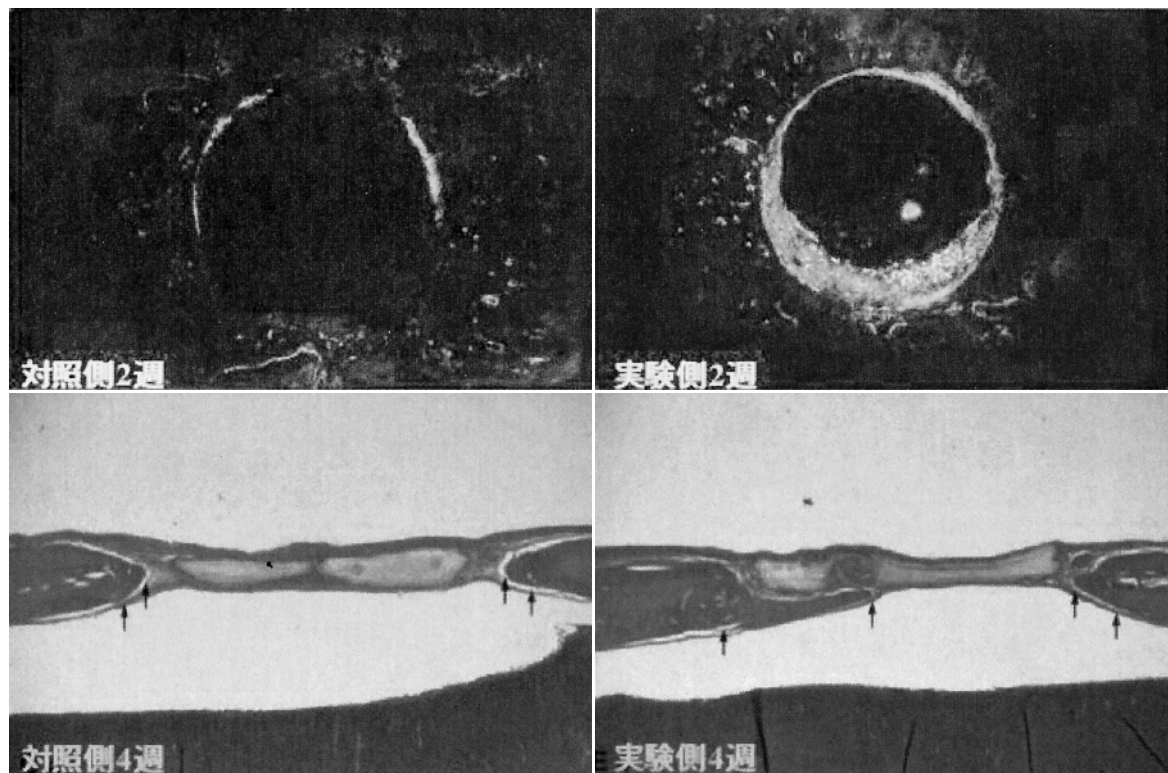


図 1 TGF- β の骨再生作用

上段：共焦点レーザー顕微鏡所見 下段：H-E 染色所見

歯肉線維芽細胞様細胞のサイクルを刺激して、IV型コラーゲン、テネイシンの産生を促進しHSPG陽性領域が減少することで歯周組織創傷の早期の肉芽形成を促進することで創傷治癒促進効果があることが明らかになった⁴⁾。

GTR膜による歯周組織再生効果

垂直性骨欠損と下顎根分岐部II級病変を有する部位に対する歯周組織再生誘導法(GTR法)の臨床効果を対照群であるフラップ手術の効果と無作為比較臨床研究を行った。さらに、GTR法の臨床効果に影響を及ぼす因子について多変量解析法を用いて評価した。被験者および被験部位は、各人につき1部位、垂直性骨欠損60歯または下顎根分岐部II級病変20歯を有する80名を対象とした。これらの部位を実験群(GTR群)と対照群(フラップ手術群)に無作為に割付けられ6カ月目および1年目に臨床評価を行った。その結果、垂直性骨欠損を有する部位では、GTR群、フラップ手術群ともにベースラインと比較して6カ月目および1年目で、歯周ポケット深さ、垂直的付着の獲得量、辺縁歯肉の退縮量、X線上の骨再生量に有意に改善が見られた。さらに、GTR群はフラップ手術群よりも術後6カ月目、1年目の垂直的付着の獲得量、辺縁歯肉の退縮量、骨再生量で統計学的に有意な差をもって改善した。根分岐部II級病変を有する部位では、GTR群においてのみ、ベースラインと比較して6カ月目および1年目の評価で、歯周ポケット深さ、垂直的付着、ならびに水平的付着の獲得量に有意に改善が見られた。またGTR群はフラップ手術群と比較して術後6カ月目、1年目の水平的付着の獲得量に有意な改善が見られた。膜の露出は垂直的付着獲得量、骨再生量、水平的付着の獲得量と負の関係を示した。GTR法の結果に及ぼす因子について多変量解析を行った結果、ベースライン時の歯周ポケット深さ、骨吸収量、水平的付着の喪失量が、術後6カ月目の垂直的付着獲得量、骨再生量、水平的付着の獲得量の予測値となることが示された。さらに術後6カ月目の垂直的付着の獲得量、骨再生量、水平的付着の獲得量が、術後1年目の垂直的付着の獲得量、骨再生量、水平的付着の獲得量の予測値であることが示された。故に、垂直性骨欠損を有する部位ではベースライン時の歯周ポケット深さと骨吸収量が、また根分岐部II級病変を有する部位では、ベースライン時の水平的付着の喪失量が歯周組織再生量を予測する因子であり、術後6カ月間で最終的な組織再生量が予測し得るものと考えられた⁵⁾。

BMP-2の骨再生効果

TGF- β スーパーファミリーであるBMP-2に関してはその骨造成効果を*in vivo*で検証した。ラット頭頂骨に作成した直径1.0mmの円形骨欠損部へ①BMP-2と高さ0.6mmのGBR膜併用群、②BMP-2単独群、③GBR膜単独群の3群に分けて、2週目、4週目、8週目に観察を行った。BMP-2とGBR膜併用群は2週目に、高さ0.6mmの空隙をほぼ100%満たす骨造成が見られ、その量は8週目もほぼ維持されていた。BMP-2単独群は2週目では150%を超える骨造成が見られたが8週目では次第にその量が減少しGBR膜単独群は2週目では骨造成量は50%に満たない量であったが、8週目では次第にその量が増加した。しかし8週目では両群ともBMP-2とGBR膜併用群よりも有意差をもって骨造成量は少なかった。BMP-2とGBR膜併用群は非特異的alkaline phosphatase (TNAP)活性が新生骨表面に見られ、酒石酸抵抗性acid phosphatase (TRACP)活性は骨芽細胞の間に分散して認められた。このことはBMP-2が未分化間葉系細胞をTNAP陽性骨芽細胞への分化を刺激した可能性を示すことになる⁶⁾。

エナメル基質由来タンパクによる歯周組織再生効果

エナメル基質由来タンパク(EMD)として、幼若ブタの歯胚から抽出したものが現在臨床で使用されており(商品名;エムドゲイン)、主成分はアメロジェニンであり、その他のエナメル基質由来タンパクおよび各種増殖因子が含有されている。

1. エナメル基質由来タンパクの細胞への作用

1) 上皮細胞への抑制作用(図2)

腫瘍由来の上皮細胞への作用としては、細胞分裂抑制があり、増殖抑制タンパクについて調べてみるとp21^{WAF1/cip1}の誘導とそれによる細胞周期のG1期での停止が深く関与していることが明らかとなった⁷⁾。細胞毒性やアポトーシスとしての作用はなく、またサイトケラチン18の産生を抑制する⁷⁾。細胞内においては、MAPカイネースのリン酸化が認められ、smad2の核内移動があることから、TGF- β 様作用が推定される^{8,9)}(図3)。

2) 歯肉線維芽細胞・歯根膜細胞への促進作用^{7,10,11)}(図2)

株化および継代正常細胞についてみると、付着・遊

は4.2 mm となった^{13,14)}。付着獲得量については、フラップ手術では、平均0.8 mm の付着獲得であるのに対して、EMD を局所応用すると15編の論文の平均は3.1 mm であった^{13,14)}。

2) 歯槽骨の添加量

エナメル基質由来タンパクを応用した歯周手術前後の計測・実測値では0.9 mm から2.6 mm の範囲で、平均1.6 mm の骨再生が得られている¹³⁾。6 カ月予後の時点では、フラップ手術では、平均-2.29% に対して、EMD 投与群では11.4% の歯槽骨の添加がみられた¹⁴⁾。

3) 無作為二重盲検法に基づくエナメル基質由来タンパクの臨床効果

16 名の患者の口腔内を無作為に2分割し、術者、検査者いずれもどちらの部位になにを投与したか知らせないようにした上で、片方の部位にEMD を、もう片方はEMD の溶媒であるPGA を対照 (Cont) として投与して12 カ月後の臨床評価を行った。歯周ポケットの減少量 (EMD : Δ 3.00 mm, Cont : Δ 2.22 mm, $p < 0.05$), 付着の獲得量 (EMD : Δ 1.72 mm, Cont : Δ 0.83 mm, $p < 0.05$), レントゲンの骨密度増加量 (EMD : Δ 20.2%, Cont : Δ -3.94%, $p < 0.01$) において有意にエナメル基質由来タンパク投与群が優れていた¹⁵⁾。

4) 歯肉溝滲出液 (GCF) 成分に及ぼす影響

臨床的に効果があるのは、創傷治癒過程の早期に何らかの生物学的メディエーターの関与があるとの仮説のもとに、上記の患者群でGCF 中に含まれる組織破壊および治癒促進のマーカーとして有用な、間質コラゲナーゼであるMMP-1 (matrix metalloproteinases-1) とMMP-8 およびその特異的inhibitor であるTIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) の変動を観察した。

術後2週目は手術侵襲がおよんでいるので両群間の差は認められないが、4週目ではGCF 量とTIMP-1 量についてEMD 群では対象群に比較して低い値を示した。MMP-1 量は2, 4, 12週目においてエムドゲイン群が、対象群に比較して低い値を示した。MMP-8 量は4, 12週目においてEMD 群が、対照群に比較して低い値を示した。

TIMP 1/MMPs の比については有意差は認められなかったが、4週目においてEMD 群が高い傾向を示した。これより、手術後早期 (1~3 カ月) の創傷治癒過程でEMD はコラゲナーゼ活性を抑制し、結合組織破壊に対する防御機構を高めていることが示された¹⁶⁾。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) と歯周組織の再生

CGRP はカルシトニン (CT) 遺伝子に由来する37個のアミノ酸からなるペプチドで、主に中枢及び末梢神経系に発現が認められる¹⁷⁾。このCGRP の上皮や線維芽細胞の増殖・再生に及ぼす影響については、胃や皮膚といった組織を中心に *in vitro* および *in vivo* でもよく検討されてきた^{18,19)}が、筆者らはCGRP が歯肉線維芽細胞の増殖をERK のリン酸化を介して促進していることを報告した²⁰⁾ (図4)。一方、骨芽細胞に対する直接作用については、生理学的濃度のCGRP が直接作用して骨芽細胞の増殖分化および石灰化を促進することが証明された²¹⁻²⁴⁾。

CGRP の増殖促進効果自体はFGF やTGF- β に比べて穏やかである。CGRP の本領はFGF などの増殖因子とは明らかに区別されるべきであり、末梢神経網による全身のおよび局所的なバランス制御の中心的役割を担っていると解釈するのが正しいと考えている。歯肉軟組織と骨組織を調和良く再生させていくことが既知の増殖因子あるいは分化促進因子単独では非常に難しいのに対して、知覚神経終末から創傷に応じて放出されるCGRP には、自己治癒能力をバランス良く発揮させるという生物学的意義が認められないだろうか。矯正力による歯の移動に伴う骨の改造とCGRP の発現と消退の相関関係はよく研究されている一例である。以上のような理由から、歯周組織再生療法において、これを外部から補充することは、劇的效果に乏しくとも、為害作用の少ない調和のとれた再生の促進につながるものと期待されるのである。

CGRP の生物学的半減期が短いという欠点を補う意味でも、各受容体サブタイプの実態を解明し、それらに特異的なアゴニストやアンタゴニストを開発することは重要な課題である。筆者らは、現在、骨芽細胞に古典的な1型サブタイプのみならず非1型サブタイプが発現していることを確認し、その実態解明に取り組んでいるところである^{25,26)}。

多血小板血漿の歯周組織再生効果

多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma : PRP) は、濃縮された血小板を含む血漿であり、① 増殖因子であるTGF- β やPDGF, ② 血漿中の接着因子であるフィブロネクチン、ビトロネクチン、および糖蛋白であるフィブリンが含まれており、歯周手術時に使うことで、創傷治癒促進効果および歯周組織再生の促進効果が期待されている。

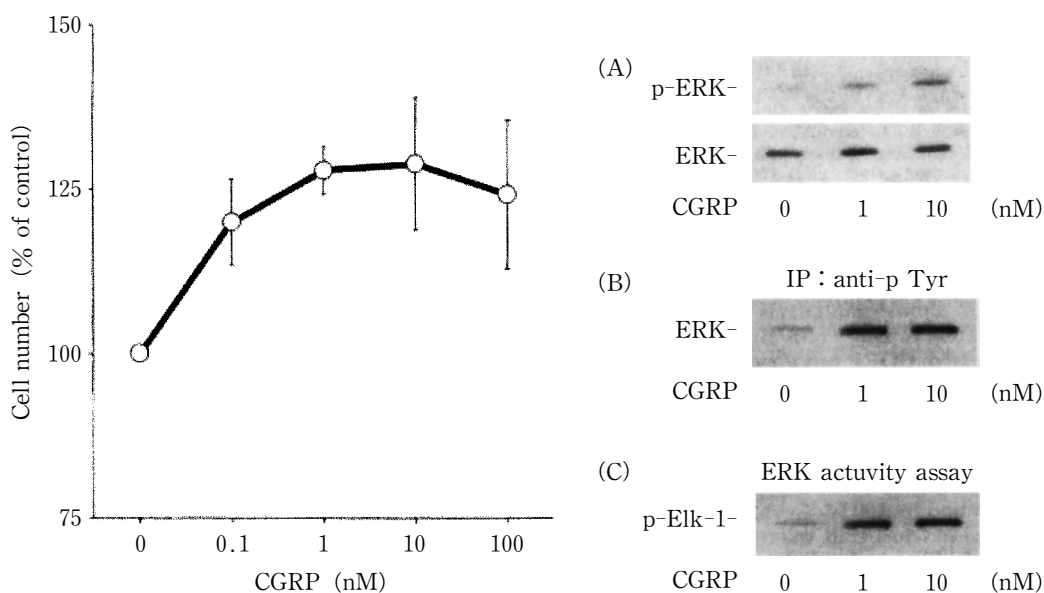


図4 CGRP (calcitonin gene-related peptide) は歯肉線維芽細胞の増殖を ERK のリン酸化を介して促進する。

ERK: p 44-MAPK protein (extracellular signal response kinase)

p-ERK: リン酸化された ERK

IP: anti-pTyr: 抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降してから, 抗 ERK 抗体で検出した。

p-Elk-1: リン酸化された Elk-1

PRP の調整方法としては, 患者自身の自己血を 8.5 cc 採取したあと, 遠心分離器で 2,400 回転, 10 分間回転し, 下層の血液細胞分画の最上部から上 1 mm の上層分画を採取し, 再び 3,600 回転, 15 分間回転して得られた下層分画, 約 0.6 cc を PRP として使用している。この方法で, PRP は通常血漿と比べて血小板は約 2.8 倍, TGF- β は約 3.5 倍, PDGF は約 4.4 倍に濃縮されていることが明らかとなった²⁷⁾。

1. PRP の各種細胞への作用

1) 骨芽細胞, 歯肉線維芽細胞および上皮細胞に及ぼす影響

35 mm 培養皿中で 2×10^5 の細胞数に調整した骨芽細胞および歯肉線維芽細胞に対して 5% PRP を 24 時間処理した。骨芽細胞, 歯肉線維芽細胞では細胞数の増殖促進が認められ, 上皮細胞では増殖抑制が示された²⁷⁾。

2) ゲル形成と歯根膜細胞のコラーゲン産生

歯根膜細胞に 5% PRP を添加すると, 30 分以内にフィブリン塊が形成される。その後, 0.5% PRP で歯根膜細胞を 24 時間処理すると, I 型コラーゲンの産生が促進され (図 5), また PRP を活性化させるのに必要なトロンビンは, 骨芽細胞および歯根膜細胞から供給されていることが明らかとなった²⁸⁾。

2. 臨床効果

通常, 歯周手術の際に, PRP+アルギン酸ナトリウム+ハイドロキシアパタイト複合体を骨欠損部へ移植して使用している (図 6)。実験群を上記複合体の投与群, 対照側を生食+ハイドロキシアパタイト投与群として観察期間 1 年にわたる無作為比較臨床研究を行った。

1) 付着獲得量の増加

PRP+アパタイト複合体を局所応用した 35 症例の 1 年予後は, 平均 3.4 mm の付着獲得量であった。対照群としての生食+アパタイトのみ投与した群では, 平均 2.0 mm であり, 明らかに再生能力が認められた。また, 臨床的印象としては, 創傷治癒の促進が認められる²⁹⁾。

2) 歯槽骨の添加量

生食+アパタイト群では, 平均 2.7 mm の骨添加に対して, PRP+アパタイト複合体群では 3.5 mm の骨添加が認められた²⁹⁾。

口腔粘膜培養シートによる歯肉増大への試み

口歯肉軟組織の上皮細胞および線維芽細胞を培養し臨床応用可能なシートに成形することに成功した。そこでこの自家培養歯肉上皮シートならびに自家培養線

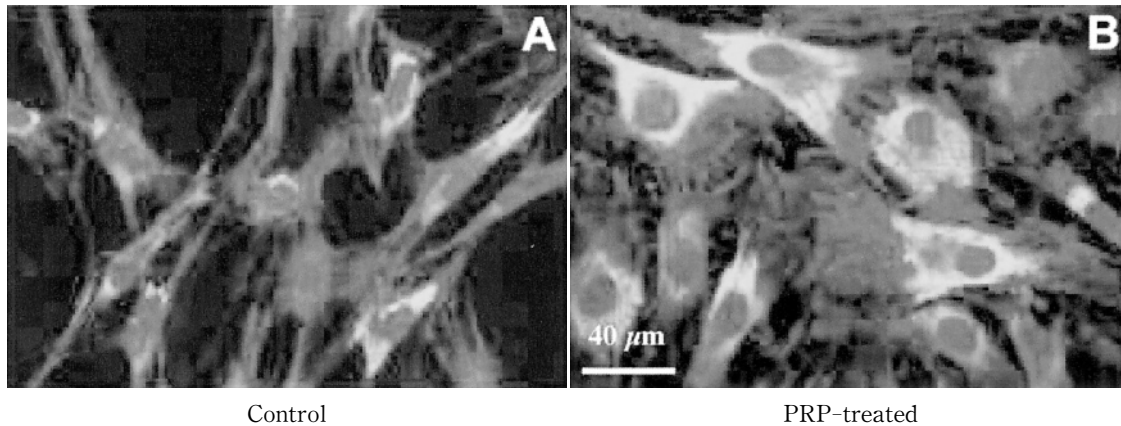


図 5 歯根膜細胞における PRP のコラーゲン合成効果



図 6 PRP+アルギン酸ナトリウム+ハイドロキシアパタイト複合体を骨欠損部へ移植した臨床例

維芽細胞シートを歯肉増大術に臨床応用した。

1. 自家培養歯肉上皮シート

作製法；患者の下顎臼後結節部位から、健全な付着歯肉組織、2×2 mm を外科的に採取して、畠および Green らの方法を改良した方法³⁰⁻³²⁾で培養上皮シートを作製した。すなわち、歯肉小片をディスパーゼで上皮層を分離し、トリプシン処理により上皮細胞を単離させ、マイトマイシンCで処理されたマウス3T3-J2細胞をフィーダー層とて、上皮細胞を播種し、37℃、10% CO₂ 下で培養し、10-12 日でコンフ

ルエントに達し、15 日目で重層化した。

1) 培養歯肉上皮シートの生物学的性状

シート形成過程で細胞から培養液中に VEGF, TGF-β1, TGF-α, EGF が放出され、高い濃度で検出された³³⁾。また、シートの組織切片について、増殖細胞核抗原・PCNA 陽性細胞が基底細胞層で多数認められ、上皮細胞の分化マーカーであるサイトケラチン 19, インボルクリンの陽性細胞も基底細胞上層に存在した。これより歯肉培養上皮シートは細胞増殖活性および角化能を有していることから、創傷治癒お

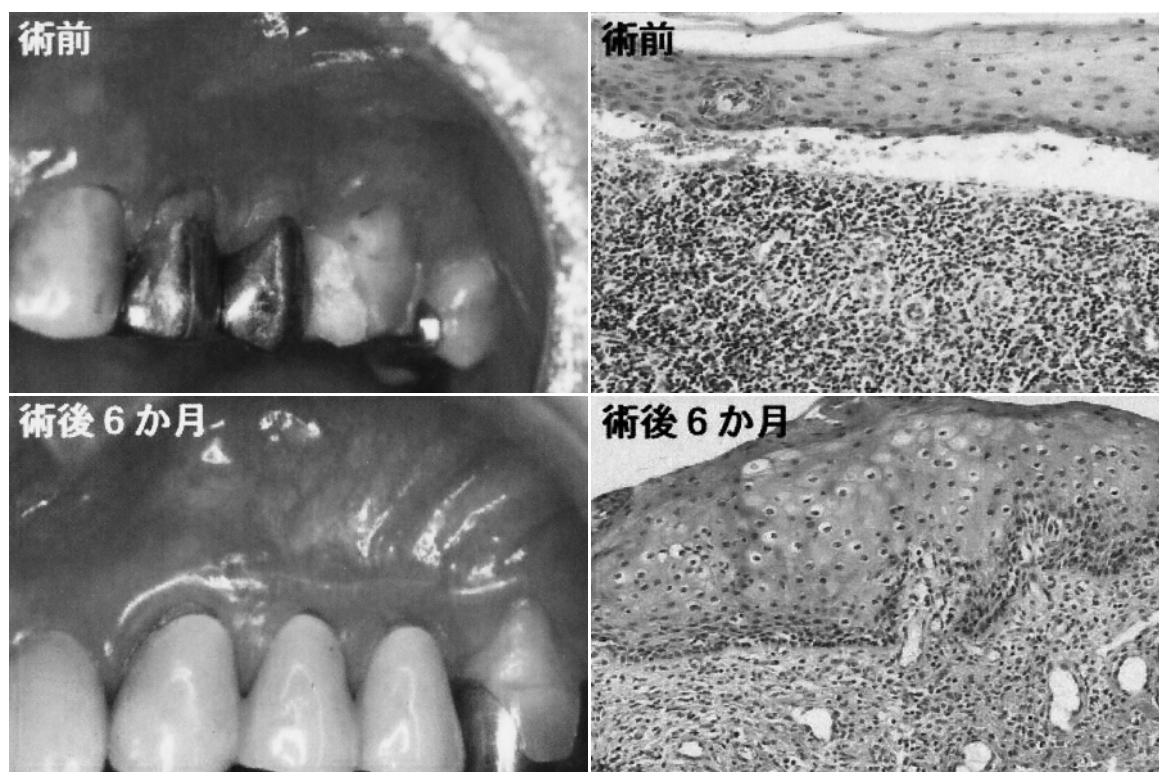


図7 自家培養歯肉上皮シートを慢性剥離性歯肉炎治療に応用した術前と術後6カ月の臨床所見および組織学的所見

よび組織再生を促進することが示唆された³⁴⁾。

2) 慢性剥離性歯肉炎に応用した症例 (図7)

患者は60歳女性、上顎左側の歯肉の発赤、潰瘍、疼痛を主訴に来院した。患者の臼後結節部の付着歯肉小片を採取して培養上皮シートを作製した。これをコラーゲン/シリコン2層膜を担体として上皮シートを巻き付け、病変部を切除した受容床に適合させ縫合した。6か月後、当該部位は術前と比較して炎症所見は全く認められず新しく角化歯肉が獲得された。術前の組織所見では上皮組織は萎縮して、上皮と結合組織の間に亀裂が認められ、結合組織層には、毛細血管とリンパ球浸潤を伴う炎症性肉芽組織が広範に認められた。培養上皮シート移植6か月後の組織所見では、上皮と結合組織の亀裂は消失し炎症性細胞浸潤は著明に減少した³⁵⁾。

2. 自家培養歯肉線維芽細胞シート

このシートについては、北里大学大学院医療系研究科再生組織工学、黒柳能光教授との共同研究である。細胞のスキヤフォールドにはヒアルロン酸スポンジにアテロコラーゲンのゲルを組み合わせたマトリックスを使用した。ヒアルロン酸分子は細胞遊走、血管新生を促進させ、アテロコラーゲン分子は線維芽細胞の走

化性を有している。

作製法；自己の歯肉組織小片から線維芽細胞を分離・培養し、所定の数の線維芽細胞を含んだ培養液にアテロコラーゲンゲル水溶液を加えて細胞浮遊液を調整する。次に、この細胞浮遊液をヒアルロン酸スポンジに播種して37°Cでコラーゲンをゲル化させた後、培養液を加えて1週間培養して培養歯肉線維芽細胞シートを作製した^{36,37)}。

1) 培養歯肉線維芽細胞シートの生物学的性状

線維芽細胞培養1週間で培養液中へ放出される増殖因子については、interleukin-6, hepatocyte growth factor (HGF), interleukin-8, VEGF, TGF- β のレベルが上昇していた³⁸⁾。IL-6はケラチノサイトの遊走と増殖に密接に関連しており、IL-8は血管内皮細胞の遊走と増殖を刺激することが知られている。HGFは血管新生を含む多くの作用を有していることが報告されている。

2) 歯肉退縮部位の根面被覆術への症例 (図8)

24歳女性、下顎前歯部唇側の歯肉退縮と審美性改善のための治療を希望して来院された。同一患者の下顎臼後結節部から健全な歯肉小片を採取して培養歯肉線維芽細胞シートを作製した。受容床を部分層弁にて

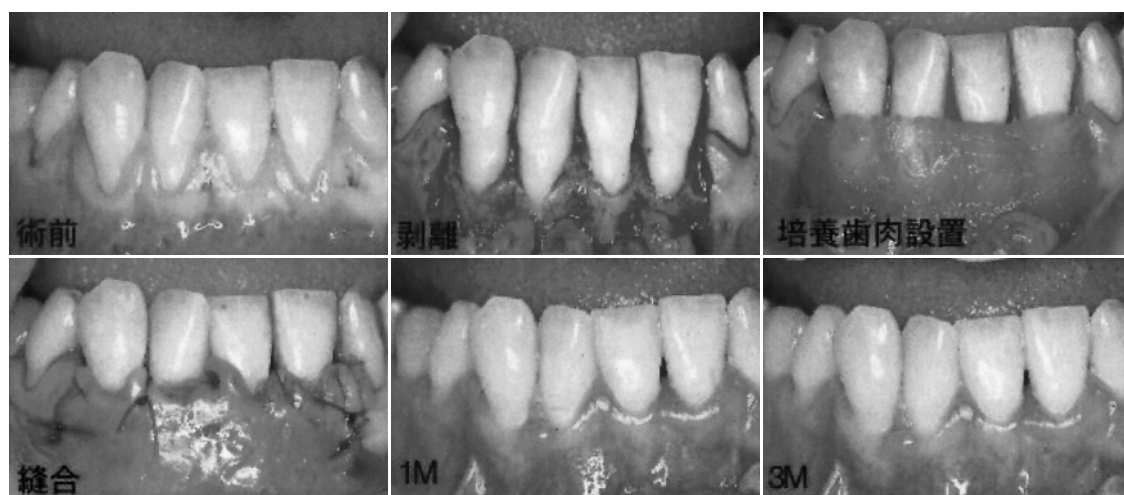


図 8 歯肉退縮部位への自家培養歯肉線維芽細胞シートによる根面被覆症例

形成・剥離後，露出した歯根面表面を徹底的に清掃して，36% 正リン酸で酸処理した。培養歯肉線維芽細胞シートの大きさを受容床の大きさに合わせて調整し，根面に適合させた。その上から歯肉弁を歯冠側へ移動して縫合した。術前と術後3カ月目の所見から，歯肉が増大した所見が認められる³⁹⁾。

組織工学的に作製された培養上皮シートおよび培養歯肉線維芽細胞シートは，従来の歯肉増大手術と比較して，① 大きな供給床が必要ない，② 小歯肉片から大量の上皮また結合組織を得られる，③ 十分な角化歯肉幅を得られる，④ 創傷治癒，組織再生を促進する，⑤ 創面が1カ所となるので患者は，最低限の不快感で済むなどの多くの利点がある。

おわりに

筆者の歯周組織再生治療に関する一連の研究姿勢は，常に基礎的な生物学的根拠を確認したうえで，かつそれらが実験室止まりで終わらないように無作為比較臨床研究へと発展させ，医療の現場へ具体的に還元することを念頭においている。

これまで，我が国においては無作為比較臨床研究に対しては単なる比較試験だとか原因解明から程遠いといった理由で“発見”とか“解明”といった研究に比べ，冷遇されて来たように思われる。しかし医療情報開示が当たり前となった現在，エビデンスをもっていない医師は臨床現場では生き残れないのは明白であろう。このエビデンスこそは無作為比較臨床研究によって作られるのであるから，その重要性を今こそ認識する必要がある。

我々の発表してきたいずれの知見も世界をリードす

るもので多くの論文に引用されており，EBM の世界的基準である Cochrane Library に収載された論文もある¹⁵⁾。この着実なステップが高度先進医療への申請につながり，新規医療技術の開発へと発展していることを確信している。

謝 辞

稿を終えるにあたり，研究の遂行に終始ご指導いただきました本学 原 耕二名誉教授，歯周診断・再建学分野 吉江弘正教授をはじめとする多くの先生方に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は，第48回春季日本歯周病学会学術大会（平成17年4月22日）において発表した。

文 献

- 1) Lynch SE: Introduction. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, eds, Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics, 1st ed, Quintessence, Carol Stream, 1999, xi-xviii.
- 2) 広井良典: 医療情報の不確実性と医療システム改革, 村上陽一郎/NTT データシステム科学研究所, 21世紀の「医」はどこに向かうかー医療・情報・社会, NTT 出版, 東京, 2000, 59-67.
- 3) Okuda K, Nakajima Y, Irie K, Sugimoto M, Kabasawa Y, Yoshie H, Hara K, Ozawa H: Transforming growth factor- β 1 coated β -tricalcium phosphate pellets stimulate healing of experimental bone defects of rat calvariae. Oral Diseases, 1: 92-97, 1995.
- 4) Okuda K, Murata M, Sugimoto M, Saito Y, Kabasawa Y, Yoshie H, Saku T, Hara K: TGF- β 1 influences early gingival wound healing in

- rats : an immunohistochemical evaluation of stromal remodelling by extracellular matrix molecules and PCNA. *J Oral Pathol Med*, 27 : 463-469, 1998.
- 5) Okuda K, Murata M, Sugimoto M, Nomura T, Wu C-H, Hara K : Comparison of guided tissue regeneration procedure to conventional flap surgery in treating intrabony and class II furcation defects, and analysis of factors affecting the prognosis following GTR. *J Jap Soc Periodontol*, 40 : 358-370, 1998.
- 6) Takeishi H, Irie K, Okuda K, Ozawa H, Yajima T, Ejiri S : Molded bone augmentation by a combination of barrier membrane and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Oral Diseases*, 7 : 281-286, 2001.
- 7) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM : Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC 25 epithelial cells. *J Periodont Res* : 35, 291-300, 2000.
- 8) Kawase T, Okuda K, Momose M, Kato Y, Yoshie H, Burns DM : Enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad 2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodont Res*, 36 : 367-376, 2001.
- 9) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM : Anti-TGF- β antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p 21^{WAF1/cip1} and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodont Res*, 37 : 255-262, 2002.
- 10) van der Pauw MT, van den Bos T, Everts V, Beertsen W : Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor β 1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 71 : 31-43, 2000.
- 11) Hoang AM, Oates TW, Cochran DL : In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 71 : 1270-1277, 2000.
- 12) Schwartz Z, Carnes Jr DL, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD : Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2 T 9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG 63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol*, 71 : 1287-1296, 2000.
- 13) 吉江弘正 : エナメルタンパク再生療法のゆくえ. *日本歯周病学会会誌*, 43 : 99-106, 2001.
- 14) 奥田一博, 百瀬 学, 宮崎 朗, 村田雅史, 横山茂, 米澤由香里, 吉江弘正 : EMDOGAIN® の歯周骨内欠損に及ぼす臨床効果 : 6 カ月予後. *新潟歯学会雑誌*, 33 : 253-260, 2003.
- 15) Okuda K, Momose M, Miyazaki A, Murata M, Yokoyama S, Yonezawa Y, Wolff LF, Yoshie H : Enamel matrix derivative in the treatment of human intrabony osseous defects. *J Periodontol*, 71 : 1821-1828, 2000.
- 16) Okuda K, Miyazaki A, Momose M, Murata M, Nomura T, Kubota T, Wolff LF, Yoshie H : Levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and matrix metalloproteinases-1 and-8 in gingival crevicular fluid following treatment with enamel matrix derivative (EMDOGAIN®). *J. Periodont. Res*, 36 : 309-316, 2001.
- 17) Amara SG, Jones V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM : Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNA encoding different polypeptide products. *Nature*, 298 : 240-244, 1982.
- 18) Miller CA, Nakashima M, Gittes GK, Debas HT : Calcitonin gene-related peptide (CGRP) upregulates the restitution of rat gastric mucosa in vitro. *J Surg Res*, 58 : 421-424, 1995.
- 19) Cruise BA, Xu P, Hall AK : Wounds increase activin in skin and a vasoactive neuropeptide in sensory ganglia. *Dev Biol*, 271 : 1-10, 2004.
- 20) Kawase T, Okuda K, Wu H-C, Yoshie H, Hara K, Burns DM : Calcitonin gene-related peptide acts as a mitogen for human Gin-1 gingival fibroblasts by activating the MAP kinase signalling pathway. *J Periodont Res*, 34 : 160-168, 1999.
- 21) Kawase T, Howard GA, Roos BA, Burns DM : Diverse actions of calcitonin gene-related peptide on intracellular free Ca²⁺ concentrations in UMR 106 osteoblastic cells. *Bone*, 16(Supple 1) : 379 s-384 s, 1995.
- 22) Kawase T, Howard GA, Roos BA, Burns DM : Calcitonin gene-related peptide rapidly inhibits calcium uptake in osteoblastic cell lines via activation of ATP-sensitive potassium channels. *Endocrinology*, 137 : 984-990, 1996.
- 23) Burns DM, Kawase T : Calcitonin gene-related peptide, amylin, or parathyroid hormone stimulates in vitro biomineralization. *J Bone Miner Res*, 12(Supple 1) : F 392, 1997.
- 24) Kawase T, Burns DM : Calcitonin gene-related peptide stimulates potassium efflux through ATP-sensitive potassium channels and produces

- membrane hyperpolarization in osteoblastic UMR 106 cells. *Endocrinology*, 138 : 3492-3502, 1998.
- 25) Kawase T, Okuda K, Burns : Immature human osteoblastic MG 63 cells predominantly express a subtype 1-like calcitonin gene-related peptide receptor that inactivates extracellular signal response kinase by a cAMP-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol*, 470 : 125-137, 2003.
- 26) Burns DM, Stehno-Bittle L, Kawase T : Calcitonin gene-related peptide elevates calcium and polarizes membrane potential in MG 63 cells by both cAMP-independent and-dependent mechanisms. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 287 : C 457-467, 2004.
- 27) Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*, 74 : 849-857, 2003.
- 28) Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-rich plasma (PRP)-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*, 74 : 858-864, 2003.
- 29) Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato T, Saito Y, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-Rich Plasma Combined With a Porous Hydroxyapatite Graft for the Treatment of Intrabony Periodontal Defects in Humans : A Comparative Controlled Clinical Study *J Periodontol* : in press.
- 30) Rheinwald JG, Green H : Formation of keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*, 6 : 317-330, 1975.
- 31) Rheinwald JG, Green H : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6 : 331-344, 1975.
- 32) Hata K, Kagami H, Ueda M, Torii S, Matsuyama M : The characteristics of cultured mucosal cell sheet as a material for grafting ; comparison with cultured epidermal cell sheet. *Ann Plast Surg*, 34 : 530-538, 1995.
- 33) Momose M, Murata M, Kato Y, Okuda K, Yamazaki K, Shinohara C, Yoshie H : Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- α , and- β are released from human cultured gingival epithelial sheets. *J Periodontol*, 73 : 748-753, 2002.
- 34) Murata M, Momose M, Okuda K, Ninagawa Y, Ueda M, Yoshie H : Immunohistochemical localization of cytokeratin 19, involucrin and PCNA in human cultured gingival epithelial sheets. *J Int Acad Periodontol*, in press.
- 35) Okuda K, Momose M, Murata M, Saito Y, Inoue M, Shinohara C, Wolff LF, Yoshie H : Treatment of chronic desquamative gingivitis using tissue-engineered human cultured gingival epithelial sheets : a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 24 : 119-125, 2004.
- 36) Kuroyanagi Y, Yamada N, Yamashita R, Uchinuma E : Tissue-engineered product : allogenic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts. *Artif Organs*, 25 : 180-186, 2001.
- 37) Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H, Kim HJ, Numari S, Mabuchi Y, Kagawa S : Establishment of banking system for allogeneic cultured dermal substitute. *Artif Organs*, 28 : 13-21, 2004.
- 38) 久保健太郎, 黒柳能光, 奥田一博, 吉江弘正 : 歯肉由来線維芽細胞とマトリックスから成る培養歯肉の開発 : 生物学的評価. *日歯周誌 (春季特別号)*, 46 : 112, 2004.
- 39) 村田雅史, 奥田一博, 百瀬 学, 吉江弘正, 久保健太郎, 黒柳能光 : 歯肉由来線維芽細胞とマトリックスから成る培養歯肉の根面被覆術への応用 : 症例報告. *日歯周誌 (春季特別号)*, 46 : 113, 2004.