

## 総 説

歯周組織再生を促す生理活性物質と細胞療法に関する  
トランスレーショナルリサーチ

川瀬 知之

新潟大学医歯学系 歯科基礎移植・再生学分野

Translational researches in the periodontal regenerative therapy :  
From bioactive factors to cytotherapy

Tomoyuki Kawase, DDS, PhD

Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University

## 1. はじめに

90年代、歯周組織再生治療はGTR法によって新時代に突入したといえよう。しかし、その物理的な方法は膜の生体への親和性の問題からしばしば為害作用の原因となり、さらに摘出手術を含めた二度の手術は生体への余計な負担を強いることがあった。したがって、術者には適応とすべきかどうかの判断力と高い技術的習熟度が求められた。このような流れの中で1997年に登場したのが、ブタ歯胚から抽出したエナメル基質タンパクを主体としたエムドゲインであった<sup>1)</sup>。歯の発生に関与するこのタンパクは、37℃での高い疎水性から「基材」的なスペースメイキングの役割も期待されたが、本質的には歯槽骨形成期にamelogeninなどに代表されるエナメル基質蛋白がみせる生物活性を再生治療においても発揮してくれることが期待されたわけである。しかし、遺伝子工学の発展に支援されてリコンビナント型に一斉にシフトしている薬剤開発の現状を考えると、あらためて異種動物由来のタンパクを導入するということは時代の流れに逆らっているような印象を受ける。さらに、近年の狂牛

病の問題は動物由来成分の医療への使用をより慎重にさせている。

このような展開を見越していたかのように1998年にMarx<sup>2,3)</sup>らによって発表されたのが、自家血由来のPRPの再生治療への有効性であった。PRPは血友病への治療のほかにも、古くから外科手術用の「糊」、fibrin glueとして使用されてきたことはよく知られている。また、臨床検査の世界では血小板数を測定する際に日常的に分画されていたものであり(現在は分画の必要がなくなった)、いわばそれ自体に目新しいところは何もなかった。しかし、血小板中に含まれる増殖因子を濃縮し局所投与することによって、歯周組織を再生することができるという発想は新鮮なものであった。コスト面では遠心機などへの初期投資が若干必要であるものの、(定法では)ランニングコストはほとんどかからない。また、用事調製の労力が負担になるものの、動物由来成分や大腸菌に産生させるリコンビナント型増殖因子を使用することに比べたら、(患者に由来しない)未知の微生物などの混入という危険性はなく、このような意味での安全性(「安心性」とい

連絡先：川瀬知之

〒951-8514 新潟県新潟市中央区学校町通2-5274

新潟大学医歯学系 歯科基礎移植・再生学分野

Tomoyuki Kawase

Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University

2-5274 Gakkocho-dori, Chuo-ku, Niigata, 951-8514, Japan

E-mail : kawase@dent.niigata-u.ac.jp

うべきか)は医師と患者の双方に説得力がある。以上の理由から、積極的に導入を図る開業医も少なくなかったように聞いている。現在は、第二世代のPRPなども創作され<sup>4)</sup>、PRP調整用の遠心機も様々なタイプのものが開発・実用化されている。

PRPも一種の細胞治療法といえるが、患者の細胞を体外で増殖・加工して患部に移植するという本格的な細胞治療が歯周再生の分野に導入されはじめたのもほとんど同時期である。骨髄由来の幹細胞をなんらかの足場とともに培養して「培養人工骨」として移植するというアプローチがもっとも一般的であると思われるが、われわれは骨膜小片をそのままシート状になるまで培養し、ハイドロキシアパタイト(HAp)顆粒やPRPとともに移植するという方法を確立し、実践している。GTR法などの従来の治療法と比較して、その再現性の高い顕著な治療効果もさることながら、為害作用がまったくないというのがこの治療法の特徴である。今後は、この治療法の科学的根拠をさらに明確にするとともに、社会的普及のために操作性の向上やコストの削減などの課題を解決して、実用性を向上させる方向性で研究を進めていかなければならない。また、このような研究や臨床において、X線に頼らない非侵襲的評価法の開発も重要な課題である。

以上のように治療技術の開発や発展とリンクする形で実践してきたわれわれのトランスレーショナルリサーチの歴史を図1にまとめた。また、以下に、これらの研究成果について、その現状を含めて概要を記述する。

## 2. Emdogain<sup>®</sup>

1997年にHammarströmらのグループが、歯胚発生のメカニズムにヒントを得て、幼弱ブタ歯胚から抽出したエナメル基質タンパクが歯槽骨の欠損部を再生させることを発表した<sup>1)</sup>。彼らは一連の基礎研究の結果から、この作用がいわゆる生理活性物質によるものではなく、amelogeninを主体とする構成タンパクの作用であると考えた<sup>5-7)</sup>。確かに、amelogeninは温度感受性にその立体構造を変化させ、親水性から疎水性へと性状を変化させる興味深い性質をもつタンパクであるが、*in vitro*での生理活性を説明するには不十分であると感じられた。

そこで、われわれは「ある種の生理活性物質が含まれている」という作業仮説のもとで検証実験を行うこととした(図2)。戦略としては、細胞感受性の有無と細胞内情報伝達系の特異性から生理活性物質候補を絞り、最後に中和抗体による阻害で確証を得るというものであったが、それは比較的容易に的中した。すなわ

ち、上皮細胞と歯根膜細胞や線維芽細胞では細胞増殖に対する効果が正反対であった。増殖が抑制された上皮系細胞では、p21<sup>WAF1/cip1</sup>の発現を介した細胞周期がG2期でのgrowth arrestであり、いわゆるapoptosisなどによる細胞死を誘導しているわけでないことを確認している<sup>8-10)</sup>。さらに、細胞内情報伝達系では、多くの生理活性物質同様にERKのリン酸化などが見られたものの、Ca<sup>2+</sup>動態やcAMP産生に対する作用はなく、しかし決定的だったのはsmad2のリン酸化と核内への移動だった。そこで、候補をTGF-β1に絞り、Emdogain中の存在と中和抗体による阻害効果を確認した。抽出方法が公表されていないことから、生理活性物質が含まれること自体に無理があるかもしれないという疑念がわれわれ自身にもあったが、結果は明白であった。Hammarströmらのグループはこれに否定的であったように仄聞しているし、製造販売メーカーからの反応は「好ましくない発表」というものであったようだ。

今に至るまでもEmdogainの基礎研究発表はコンスタントに出ており、最近ではEmdogainで培養した細胞がどのようなサイトカインを産生するか検討した報告が多い<sup>11-14)</sup>。また、なかにはBMP様の物質がEmdogainに含まれているという可能性を示唆する報告もある<sup>15)</sup>。しかし、製造法がまったく明らかにされていないEmdogainにはロット間格差がどの程度あるかも不明であることから、含まれているサイトカインを詳細にプロファイリングすることにどれだけの意義があるか疑問である。それよりも、この物質の本質に関する疑問、すなわち、量的にサイトカインをはるかに凌駕する構造蛋白に細胞増殖促進などの生理活性がどの程度あるのか、あるいはそこに含まれるサイトカインとの間にどの程度の薬物動態学的・薬理的協調性があるのかを再検討することが必要であると思う。また、ある種のニッチを形成するのに重要な発生生物学的役割を果たしている可能性も捨てきれない。

## 3. PRP

Emdogainの利点の一つは、その操作性の良さであったといえよう。しかしながら、異種動物の成分を生体内に注入するというのは、未知の病原体への感染という危険性を常に意識しなければならない。すなわち、これは薬剤全般についても言えることではあるが、「有効性」と「危険性」を天秤にかけて最終判断すべきものである。ということから、患者自身の成分を使用することができないかという期待が膨らんできたところに登場したのがPRPであった<sup>2,3)</sup>。患者の血液から血小板を濃縮して得た血漿分画をPRPというが、

### History of our translational research investigation

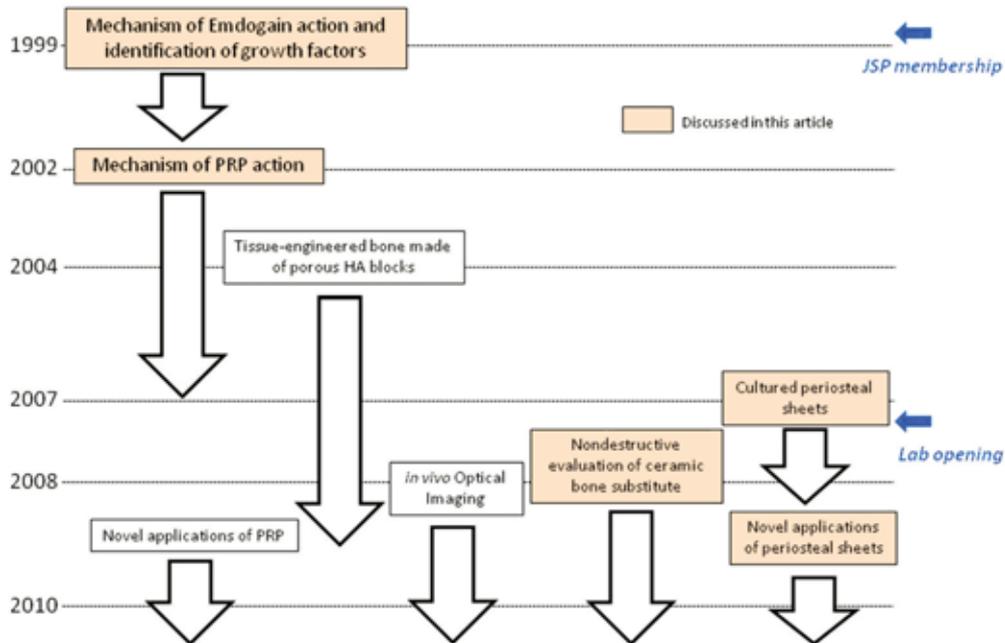


図1 われわれの歯周組織再生を促す生理活性物質と細胞療法に関するトランスレーショナルリサーチの歩み

### Strategy of emdogain investigation

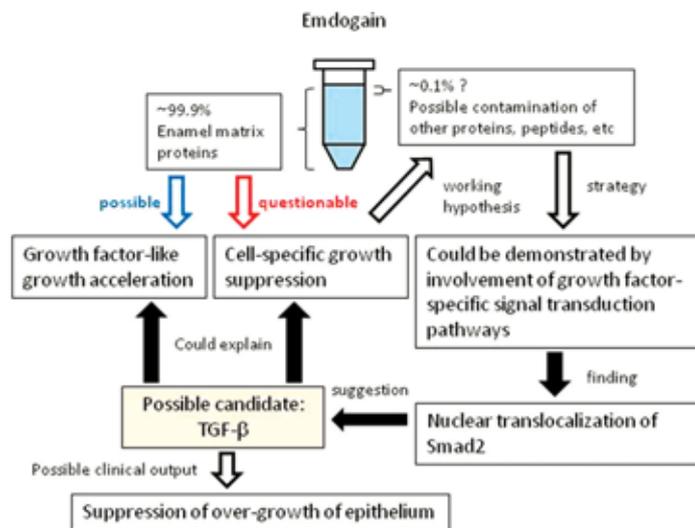


図2 Emdogain 研究でとったわれわれの戦略

## What are expected for PRP?

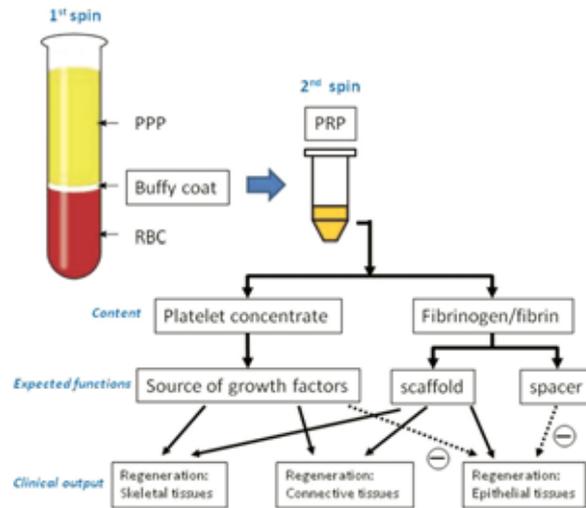


図3 PRPに期待されるものはなにか？

血小板が濃縮されているゆえに TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF, bFGF などの増殖因子が高濃度に含まれていることを特徴とする。

われわれが PRP を研究する上で立てた戦略は、主体となっている生理活性物質に目星をつけた上で、Fibrinogen の役割を解明し、最終的に石灰化への関与を明確にしようというものであった。予想通り、PRP 中の血小板の濃度(数)と正の相関関係をもって TGF- $\beta$ 1 や PDGF-AB が濃縮されている事実を確認した<sup>16)</sup>。また、PRP を *in vitro* で作用させると、Emdogain 同様に歯根膜細胞などに対しては増殖促進的に、上皮系細胞には増殖抑制的に作用することがわかった<sup>16)</sup>。これは常識的に考えれば、TGF- $\beta$ が生理活性物質として主導的役割を果たしているということになる。

しかし、われわれの目的は、PRP 中の増殖因子の生理活性ランキングをつけることではない。確かに、PRP 中の増殖因子にだけ注目して、治療に使用する場合でもウシの thrombin や calcium を添加して fibrin clot を形成させることによって、上清中に増殖因子を濃縮するという方法を採用している医療施設もあるようだ。しかし、むしろこの fibrin clot にこそ PRP の再生誘導活性の秘密が隠されているものと、われわれは睨んだ(図3)。 *in vitro* 実験の結果、fibrin 形成を阻害することによって、PRP の増殖促進効果はある程度抑制されることを確認した。これは、不溶性の fibrin によって繊維状に形成されるネットワークが、細胞に足場を提供するとともに、増殖因子に徐放性を付与する

基材として機能している可能性を示唆している<sup>17,18)</sup>。いずれにしても、PRP の効果には増殖因子だけではなく、fibrin の関与が大きいことが明らかになったわけである。

次に検証しなければならなかったことは、「PRP は石灰化を促進するか?」という疑問についてであった。この疑問は、主たる実験系を *in vivo* に移して、現在も論争的となっている<sup>20,21)</sup>。しかし、個人的な感想を述べると、*in vivo* では骨欠損の人工的作成や埋植などの実験手技の習熟度が、レシピエント側の創傷治癒機転に大きく影響していることは疑問の余地もなく、外部から導入した PRP の正味の効果を正確に吟味することをしばしば困難にしている。われわれは、当然のように *in vitro* の実験系を選択し、特に石灰化の initiation に注目して PRP の影響を調べた。ここで使用したヒト歯根膜細胞は、分化誘導によって *in vitro* で石灰化物を形成する能力を発現する。電子顕微鏡レベルでの観察から、歯根膜細胞はその初期の石灰化過程において、針状結晶を血小板の細胞膜上に形成することが分かった<sup>19)</sup>。これは確率の問題かもしれないが、当時、われわれは生理的に針状結晶が高親和性をもってコラーゲン上に形成されると類似していると解釈した。

先に述べたように、PRP に関する大方の興味は、現在に至るまで、その分画方法についてであったといえるだろう。すなわち、どのように分画すれば高濃度の増殖因子を含んだ PRP が調製できるかということである。文献的に確認できるだけでも 10 数種類の分画

調製法があるが、それぞれの医療施設で多少の改変がなされてルーチン化されていると推測されることから<sup>22)</sup>、その方法は膨大な数に昇るものと推定される。それらの方法を比較して優劣をつけようとする試みもしばしば見かけるが、そもそも同一個体から採取した PRP でも、採取時刻や体調などの要因によって含まれる増殖因子の濃度に大きな差が生ずることがあることを考えると、文献的比較や考察などはあまり意義のある試みとは思えない。

現在、広義の PRP は混入している白血球が多いか少ないか、液状かゲル状かで分類されている<sup>22)</sup>。たとえば、Choukroun らによって提唱された PRF (platelet-rich fibrin) は、ウシの thrombin や calcium の添加なしに、遠心力と血液が本来持つ凝固系を利用して作成されたゲル状のもので、白血球が比較的多く含まれることを特徴とする<sup>4, 23)</sup>。また、Anitua らが提唱した PRGF (Platelet-rich growth factors) は、抗凝固剤の存在下の PRP 調製過程でできる PPP (Platelet-poor plasma) の下層に増殖因子が比較的豊富に含まれていることに着目し、この分画と血小板分画を合わせたものである<sup>24, 25)</sup>。したがって、白血球の混入は少なく、さらに液状である。これらの PRP は第二世代といわれ期待されているが、少なくとも操作性と費用対効果の向上という点で臨床家のニーズに据えているといえよう。

また、以上のような調製法とはまったく別の次元でなされたイノベーションであるが、今後考慮に値するものとして紹介しておきたい適用法もある。2001 年、アメリカにおいて救急医療の現場で緊急な止血治療の必要性に応えるために「凍結乾燥血小板」というものが開発された<sup>26)</sup>。救急医療への利用ということからもわかるように、他家移植が基本になっている点が歯科で用いられる PRP とは大きく異なっている。イラクやアフガニスタンといった戦地において、特にその有用性が期待されている。また、わが国のなかには、このような凍結乾燥血小板を肝臓の再生医療に適用できると報告している例もある<sup>27)</sup>。PRP の用事調製から解放されるというメリットもあり、歯周再生治療への適用も検討に値すると思うが、一方では血液製剤による薬害問題の記憶も新しく、PRP の大きなメリットの一つが外来病原体への感染リスクがないことであることを考慮すると、社会的に受け入れられるまでには時間が必要かもしれない。

#### 4. 培養骨膜シート

次に論ずる培養骨膜シートは、われわれにとって現在進行中のプロジェクトであり、その医学的貢献度の

みならず、医療の地域格差是正の観点からもその技術的發展と社会的普及に期待を寄せている。

##### 1) 背景と基本的機能

骨膜を骨折の治療などに応用しようという試みは古くからあった。しかし、移植目的に採取した骨膜片で治療できる部位はサイズの限られてくる。歯周病により欠損した歯槽骨は決して大きくはないが、このような制限を克服するために培養によって骨膜片を拡大する方法が考案され、イヌの歯周組織で効果が検証された<sup>28)</sup>。奥田らは培養骨膜シートによる治療法をいち早く臨床研究に導入し、その有効性を確信した<sup>29, 30)</sup>。

われわれは、それを EBM として確立すべく基礎研究を進めた。まず、第一の疑問、「移植した培養骨膜シートは骨形成に直接関与するのか?」に対して、ヌードマウスの皮下移植という実験系で検証を試みた(図 4)。ヒト培養骨膜シートは培地にビタミン C を添加するだけでも、ある程度の自発的分化を誘導することができ、結果的に ALP 活性の上昇と *in vitro* での石灰化をもたらした。ここに Dexamethasone や  $\beta$ -glycerophosphate を添加すると、分化と石灰化はさらに促進された。この状態でヌードマウスに移植すると、PRP や HAp との組合せによらない単独での使用でも、異所性に類骨を形成することが確認された。また、間接的には、骨代謝に関連の深いサイトカインの産生を介して、レシipient 側の破骨細胞形成を誘導することも確認された<sup>31)</sup>。臨床での使用に関しては、ビタミン C を除く分化誘導剤の使用を控えているが、経験上学んできた「コンフルエントまで増殖させることによって分化誘導のスイッチを入れる」という選択肢もありえるだろう<sup>32)</sup>。

##### 2) 骨芽細胞層は機能しているか?

第二の疑問は、「いわゆる骨芽細胞層 (cambium layer) が培養骨膜シートに保存されて、それが石灰化に関与しているのか?」である。本技術が開発された当初、培養中も骨膜の極性を維持することが重要と思われていた。これは、必ずしも *in vitro* での石灰化能の温存などを想定していたわけではなく、むしろ骨面を培養ディッシュの底面に合わせることで、移植時にその面を容易に骨側に向けることが可能であり、*in vivo* での骨再生に好都合であろうという希望的観測に基づいていたのではないかと想像する。この疑問に答えるために、われわれはこれまで続けてきたヒト歯槽骨の骨膜のほか、ラット・マウスからウシ・ブタ・ニワトリなど入手しやすい骨について、広範囲に骨膜の組織学的な構造と

## Mechanisms of osteogenic actions of implanted periosteal sheets

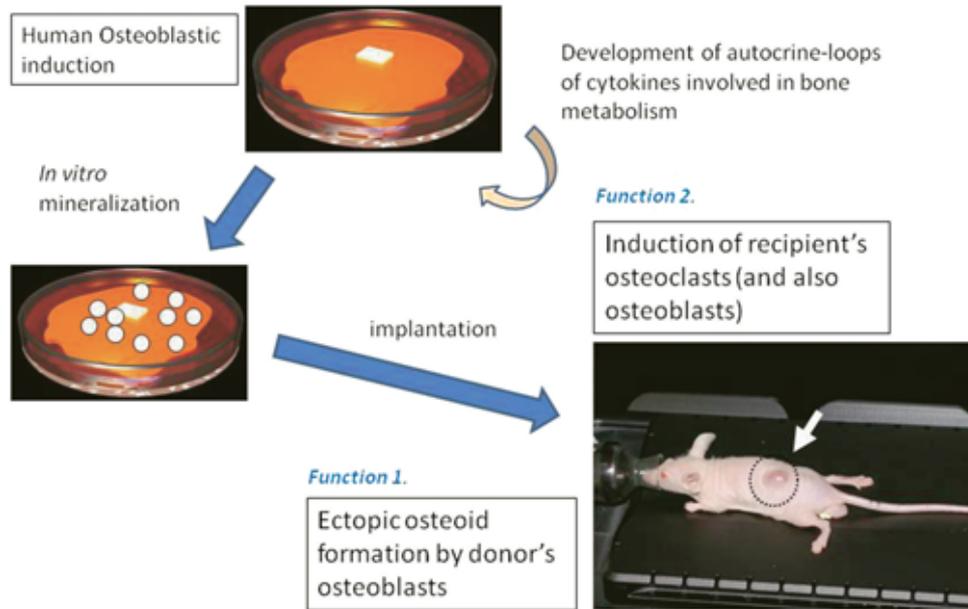


図4 培養骨膜シートの骨再生活性はどのようにして発揮されるか？

培養適応性を調査した。その結果わかったことのひとつは、cambium layer をできるだけ維持した状態で培養系に移すことができたとしても、静置培養ではそれが短期間のうちに失われてしまうということであった。また、ヒト歯槽骨から採取した骨膜では、智歯周囲の比較的厚い骨膜の場合でも、骨芽細胞が重層化した典型的な cambium layer を採取することはほとんど困難であった。

では、骨芽細胞やその前駆細胞が失われた組織片を培養して、どのようにして *in vitro* で顕著な石灰化を誘導しうるのか？、どのようにして移植後の類骨形成を誘導しうるのか？ という疑問が生ずる。これらのメカニズムについては現在詳細に解析しているところであるが、大規模な細胞の淘汰と入れ替えが起こり、そこから骨芽細胞が新たに分化誘導されてくることを示唆するデータを得ている<sup>33)</sup>。実際の臨床現場では、上述のように、cambium layer はほとんど採取できないと考えた方がよく、運良く採取できたとしてもそれはわずかであり、さらに通常の静置培養下では骨膜片の極性を維持することは困難であると理解すべきである。以上の2つの根拠から、採取した骨膜片の表裏に必要以上に神経質になる必要はないというのがわれわれの結論である。

### 3) 足場の必要性

ところで、培養骨膜シートは単層培養の細胞シートに比べて細胞が重層化していることもあって、それなりの強度を維持している。しかし、剥離によって収縮するため、ピンセット1本でつまみ上げるのには難がある。台紙を使って貼り付けるやり方も考えられるが、われわれは移植可能な3次元足場の上で骨膜を培養すれば、細胞重層化の促進と移植時の操作性向上、さらには培養日数の短縮化という一石二鳥あるいは三鳥の効果が得られるのではないかと考えた。これまでにさまざまな基材を試したが、2例ほど紹介する。一つはコラーゲンで表面をコートした ePTFE メッシュであり、もう一つはフィルム状の乳酸-カプロラクトン共重合体(LCL)である。

コラーゲンコートした ePTFE メッシュ (Vecell 3D-insert<sup>®</sup>) では、その初期の骨膜片に対する接着効果は特筆に値するものであり、100  $\mu\text{m}$  程度の厚みをもつ3次元立体構造を形成しているため遊走化した細胞は横への広がりだけでなく、重層化をこなしながら増殖する。そのため、デイッシュで培養したときに比べて、増殖は遅いが自発的骨芽細胞分化の程度は高いことが多い。培養日数については、臨床研究に使用している  $\phi 90$  mm のデイッシュで6週

## What's next in the investigation of cultured periosteal sheets?

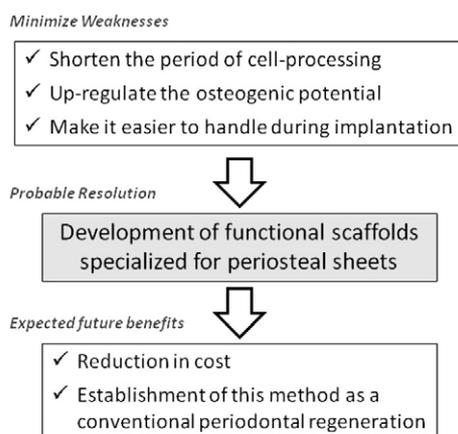


図5 培養骨膜シートに残された課題と解決法

間ほど要し、直径が40-60 mmに達したものを移植に使用している。これと同等の細胞数を基準とした場合、剥離時の収縮もないので直径20 mm程度で十分移植に耐えられると考えている。ヌードマウスに移植した場合、メッシュ表面にも石灰化物の沈着が認められ、全体的な類骨形成能も比較的高いと評価している<sup>34)</sup>。

一方、LCL [poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)] フィルムについては、そのままでは骨膜の初期接着が低いレベルであるためコラーゲンコートなどの手段によって、ある程度の接着性を確保する必要があるが、この基材の最大のメリットは、その光透過性ゆえに顕微鏡による細胞観察が常時可能なことである。その他にも、骨膜シートを培養した状態でそのまま移植できることから、移植時に行っているディッシュからの剥離操作が不要となり、さらにフィルムで裏打ちされた骨膜シートはピンセット1本で移植できるようになるため、操作性は全体として大きく向上する。ただし、上記のメッシュのような細胞重層化におけるメリットはない<sup>35)</sup>。

紙面の都合上すべてのプロジェクトを紹介しきれないのが残念であるが、現在、さらにいくつかの足場の骨膜シート適応性について検討中である。「足場」というと、付着系細胞の生存に必須のもので、組織工学三要素のひとつと認識されている読者が多いと思う。しかし、繰り返しになるが、培養骨膜シートは足場がなくとも移植部位で骨形成活性を十分発揮する。では、なぜ「足場」に固執するのかということであるが、それは高機能性の足場を開発する

ことによって、操作性やコスト面で大きな改善が見込まれるとともに、培養骨膜の機能においても向上が期待されるからである(図5)。このような要件を具備する有望な足場について、近い将来にもその成果を実用化の方向に向かって前進させ、本治療法の社会的普及につなげたい。なお、細胞プロセッシングを含めた臨床的な側面については、他稿を参照していただきたい<sup>36-38)</sup>。

### 5. 非侵襲的骨再生評価法

日常の診療活動を支える歯周診断法はすでに確立されている。手作業による計測は病状を全体的に把握する上において簡便な方法と言えるが、再生状況や活性を評価するには微妙な差に術者のバイアスがかかりやすい。また、単純X線による歯槽骨再生の評価は、客観性は増すものの定量性までは期待できない。

われわれはこの課題を解決するために、まず<sup>99m</sup>Tc-HMDPというbisphosphonate (BP)の一種をプローブとして利用する骨シンチグラフィによる骨形成活性評価の可能性について検討した。ご存知のように、骨シンチグラフィは腫瘍の骨転移などの診断によく使われる手段であるが、これはBPが骨形成活性の高い部位に集積する、すなわち、新生骨にBPが取り込まれやすいという現象を根拠としている。実際、セラミックスと造骨細胞の組み合わせによる骨原生移植物をラットの背部皮下に移植した実験では、病理組織学的な類骨形成と並行して<sup>99m</sup>Tcの集積が観察された<sup>39)</sup>。

しかし、ラジオアイソトープ(RI)を用いる方法は、

データの定量性に乏しく、また操作面では実施施設などに制限があることなどから、将来的な発展性に欠けると判断し、プローブを近赤外(NIR)蛍光色素でラベルしたものに切り替えて、同様の検討をしているところである。この方法はFrangioniらのグループが骨芽細胞の活性評価として先駆的研究を行っており<sup>40)</sup>、tomography化する研究も進んでいる。われわれはCCDカメラを備えた廉価タイプの撮影装置(Pearl<sup>TM</sup>, LI-COR)を使用しているが、骨膜細胞を培養した多孔質セラミックス・ブロック体に高い骨形成活性があることを証明した<sup>41)</sup>。また、骨形成のモデルである移植骨肉腫での2波長同時測光などにも挑戦している(Nakayama *et al.* manuscript in submission)。これまでの経験から、*in vivo* NIR イメージングの長所と短所を要約すると、RIに比較して組織透過性は劣るものの、イメージング機器の性能も含めて感度はより鋭敏であり、広いダイナミックレンジをもつことから骨の重複部分においても高い定量性が確保され、複数の波長での同時測光が可能である。今後は、臨床においても使用できるようなプローブと機器の改良にも取り組んでいきたい。

## 6. 生体材料の非破壊評価法

誤解を恐れずに述べると、再生医療を後方から支えている生体材料は、工学部系の研究者やエンジニアだけでなく、医学生物学系の研究者ももっと関心を持つべき対象である。大方の医学研究者が関心を示してきたのは、培養細胞や動物実験を通じた生体反応性や機能性の検討であり、ここから実際の患者に適用する臨床研究へ引き上げる足掛かりを掴むことであるように思う。歯学系の関係者は比較的生体材料について馴染みがある方ではあるが、それでも動物実験などから得られたデータを生体材料の開発者あるいは製造者にフィードバックすることはあっても、そこから「どのような性状の基材が適当なのか？」ということを開発者らと同じ目線で再検討することは少ないように思う。われわれは、多孔質セラミックスを対象とした非破壊検査法の研究に携わり、その微細構造を数値化して評価することの意義について検討してきた。すなわち、そこには構造や物性の定量的評価と生物学的評価の間にあるだろう相関性を明らかにすることによって、合目的な基材の開発を誘導することができるだろうというビジョンがある。

このような研究活動は、そもそも経済産業省基準認証研究開発事業として2008年に発足した「生体活性セラミックスの特性評価に関する標準化」のための委員会において、ISOへ提案する「生体活性セラミック

スの標準的評価法」を策定するためのラウンドロビンテストに参画したことを発端としている。われわれが担当した分野が $\mu$ CT検査法ということで、医療用の多孔質セラミックス・ブロック体を破壊することなく、内部構造を把握し数値化するためにもっとも正確で効率的なプロトコルを模索および検討してきた<sup>42)</sup>。われわれのデータは堤定美委員長(日大歯)の取りまとめでプロトコルの一部として組み入れられ、昨年9月に京都で開催されたISO委員会に提案された。また、われわれの初期の研究成果はすでに論文として発表しているが<sup>43)</sup>、現在、さらに撮影機構の異なる $\mu$ CTを使用した場合に必然的に生ずるハード間のデータのばらつきを最小限にするためのノウハウや微細構造(大小の気孔や連通孔の体積や数や分布・局在)を数値化することの限界について検討している(Nakayama *et al.*, manuscript in submission)。

## 7. 今後の展望

再生医学全体の方向性を考えると、iPS細胞作製技術の有効利用というのが最大のトピックであることは間違いない。しかしながら、再生医療という観点からは、治療部位の重要性や緊急性とコストを勘案する必要が出てくるであろうし、それを実施できる施設の処理能力がボトルネックとなってくる。少なくとも細胞による歯周再生治療は、現時点でもいわゆる「患者に届いている再生医療」の一つである。なかでも、われわれが用いている自家培養骨膜シート法は、歯科医師でも容易に採取できる組織・細胞を用いること、患者への侵襲性が最小限であること、採取した骨膜小片には(細胞がダメージを受ける可能性がある)酵素処理や継代などの操作が含まれていないことなどから、培養初心者でも技術的な障害はほとんどない。

然るに、増殖因子投与法と比較すると、なんと言っても、その簡便性に劣ることは明白である。インプラント法と比較した場合、治療日数を要すること、初期投資コストと維持コストを乗せると治療費が社会的認知や普及への足枷となっている。ここでは、関連省庁が設ける政策的な「壁」の存在が、細胞治療の裾野の拡大を阻害するように作用している。すなわち、まず高額な初期投資を必要とするCPCなどの施設(ハード)が求められ、さらにその運用にかかわるソフト部分には工業製品と同様の品質管理基準の遵守が求められる。このような根拠から算定される初期投資コストと維持コストを「原価治療費」に上乘せると、治療費の高額化は避けられなくなる。再生医療すべてを十把一絡げに「高度先進医療」と位置付けた場合、医療施設の拠点化という政策が適用されるのは当然の流れ

かもしれない。

確かに、資源の一点集中は、医学的水準の維持と向上に有意義なばかりではなく、経済効率的にもプラスであると思う。しかし、すでに「患者に届いている再生医療」にとって、また地方在住者にとって、このような政策は医療の格差拡大につながるものとは映らない。われわれは、すでに「患者に届いている再生医療」である培養骨膜治療法を社会的に普及させるために、それを低コスト・省スペースでも安全確実に実施するための培養用デバイスの開発にも力を入れてきた<sup>44)</sup>。近い将来、これらのデバイスを実用化して、われわれの研究成果を世の中に還元したいと願っている。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、まず原耕二名誉教授(新潟大学)のご指導とご鞭撻には特に深く感謝申し上げます。学内リストラにより研究の場を失い、結果的に学外研究費の獲得も不安定になっていた時期、原先生からいただいた物心両面の支援のおかげで研究生命を断ちきらずに済みました。また、このような苦しい時期から共同研究を立ち上げ、現在に至るまで歯周組織再生治療法の開発と検証を二人三脚で進めてきていただきました奥田一博准教授(新潟大学)に感謝申し上げます。本稿が似たような境遇にある研究者にとって励みとなれば望外の幸せです。最後に、われわれの研究活動に特別のご理解とご配慮をいただき、様々な角度からご支援をいただきました吉江弘正教授(新潟大学)には、この場をお借りしてあらためて御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24: 658-668, 1997.
- 2) Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85: 638-646, 1998.
- 3) Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*, 10: 225-228, 2001.
- 4) Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101: e37-44, 2006.
- 5) Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, 24: 669-677, 1997.
- 6) Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag L, Hammarström L. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol*, 24: 678-684, 1997.
- 7) Gestrelus S, Andersson C, Lidström D, Hammarström L, Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*, 24: 685-692, 1997.
- 8) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. *J Periodont Res*, 35: 291-300, 2000.
- 9) 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 smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodont Res*, 36: 367-376, 2001.
- 10) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Anti-TGF- $\beta$  antibody blocks enamel matrix derivative-induced up-regulation of p21<sup>WAF1/cip1</sup> and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodont Res*, 37: 255-262, 2002.
- 11) Parkar MH, Tonetti M. Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: Analysis using cDNA arrays. *J Periodontol*, 75: 1539-1546, 2004.
- 12) Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, Katagiri T, Oida S. Enamel matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF- $\beta$ . *J Dent Res*, 84: 510-514, 2005.
- 13) Heng NH, N'Guessan PD, Kleber BM, Bernimoulin JP, Pischon N. Enamel matrix derivative induces connective tissue growth factor expression in human osteoblastic cells. *J Periodontol*, 78: 2369-2379, 2007.
- 14) Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML, Reseland JE. Enamel matrix proteins: old molecules for new applications. *Orthod Craniofac Res*, 12: 243-53, 2009.
- 15) Saito K, Konishi I, Nishiguchi M, Hoshino T, Fujiwara T. Amelogenin binds to both heparan sulfate and bone morphogenetic protein 2 and pharmacologically suppresses the effect of noggin. *Bone*, 43: 371-376, 2008.
- 16) 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- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*, 74: 849-857, 2003.
- 17) Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*, 74: 858-864, 2003.
  - 18) Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H. In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor- $\beta$  or platelet-derived growth factor. *J Periodontol*, 76: 760-767, 2005.
  - 19) Kawase T, Okuda K, Saito Y, Amizuka N, Suzuki H, Yoshie H. Platelet-rich plasma (PRP) provides nucleus for mineralization in cultures of partially differentiated periodontal ligament cells. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim*, 41: 171-176, 2005.
  - 20) Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. The effect platelet-rich plasma on healing in critical-size long bone defects. *Biomaterials*, 29: 3983-3992, 2009.
  - 21) Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*, 30: 4956-4966, 2009.
  - 22) Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 27: 158-67, 2009.
  - 23) Choukroun JI, Braccini F, Diss A, Giordano G, Doglioli P, Dohan DM. Influence of platelet rich fibrin (PRF) on proliferation of human preadipocytes and tympanic keratinocytes: A new opportunity in facial liposstructure (Coleman's technique) and tympanoplasty? *Rev Laryngol Otol Rhinol*, 128: 27-32; 2007. (in French)
  - 24) Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14: 529-35, 1999.
  - 25) Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*, 24: 227-234, 2006.
  - 26) Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology*, 42: 79-87, 2001.
  - 27) Hoshi R, Murata S, Matsuo R, Myronovych A, Hashimoto I, Ikeda H, Ohkohchi N. Freeze-dried platelets promote hepatocyte proliferation in mice. *Cryobiology*. 55: 255-260, 2007.
  - 28) Mizuno H, Hata KI, Kojima K, Bonassar LJ, Vacanti CA, Ueda M. A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng*, 12:1227-1335, 2006.
  - 29) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite graft in treating human periodontal infrabony osseous defects: A comparative controlled clinical study. *J Periodontol*, 79: 811-818, 2008.
  - 30) Okuda K, Yamamiya K, Kawase T, Mizuno H, Ueda M, Yoshie H. Treatment of human infrabony periodontal defects by grafting human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite granules: case series. *J Int Acad Periodontol*, 11: 206-213, 2009.
  - 31) Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Nakata K, Yoshie H. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. *J Tissue Eng Reg Med*, 3: 218-229, 2009.
  - 32) Thomas DM, Johnson SA, Sims NA, Trivett MK, Slavin JL, Rubin BP, Waring P, McArthur GA, Walkley CR, Holloway AJ, Diyagama D, Grim JE, Clurman BE, Bowtell DD, Lee JS, Gutierrez GM, Piscopo DM, Carty SA, Hinds PW. Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27<sup>Kip1</sup>, is disrupted in osteosarcoma. *J Cell Biol*, 167: 925-934, 2004.
  - 33) 川瀬知之. 培養骨膜シートをもちいた歯周組織再生療法に関する基礎的研究. *再生医療*, 9(supple): 106, 2010.
  - 34) Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Yoshie H. Osteogenic activity of human periosteal sheets cultured on salmon collagen-coated ePTFE meshes. *J Mater Sci Mater Med*, 21: 731-739, 2010.
  - 35) 奥田一博, 川瀬知之, 山中克之, 須田洋子, 金子正, 小神浩幸, 中山均, 永田昌毅, 吉江弘正. ポリ乳酸カプロラクトン重合体フィルムのヒト骨膜シート培養・移植への応用再生医療, 9(supple): 276, 2010.
  - 36) 川瀬知之. ヒト培養骨膜のポテンシャル. *ザ・クインテッセンス*, 27: 48-50, 2008.
  - 37) 奥田一博, 山宮かの子, 川瀬知之, 吉江弘正. 培養骨膜シート移植を応用した歯周組織再生法. *ザ・クインテッセンス*, 27: 54-57, 2008.
  - 38) 吉江弘正, 奥田一博, 川瀬知之. 歯肉細胞シート・

- 骨膜シートを用いた歯周再生治療. 日本口腔外科学会雑誌, 55: 432-439, 2009.
- 39) Nakayama H, Kawase T, Okuda K, Kogami H, Inoue H, Oda T, Hayama K, Tsuchimochi M, Wolff LW. Evaluation by bone scintigraphy of osteogenic activity of commercial bioceramics (porous  $\beta$ -TCP and HAp particles) subcutaneously implanted in rats. J Biomater Appl, DOI: 10.1177/0885328209341845, 2009.
- 40) Zaheer A, Lenkinski RE, Mahmood A, Jones AG, Cantley LC, Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging of osteoblastic activity. Nat Biotechnol 19: 1148-1154, 2001.
- 41) Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Sato T, Wolff LF, Yoshie H. Human periosteum-derived cells combined with superporous hydroxyapatite blocks used as an osteogenic bone substitute for periodontal regenerative therapy: Animal implantation study using nude mice. J Periodontol, 81: 420-427, 2010.
- 42) 社団法人日本セラミックス協会. 基準認証研究開発事業 生体活性セラミックスの特性評価に関する標準化. 平成 20 年度経済産業省委託事業成果報告書, 2009.
- 43) 中山 均, 川瀬知之. X線マイクロCTによる生体活性セラミックス多孔体の微小構造解析. 歯科放射線, 49: 33-40, 2009.
- 44) 布施一郎, 川瀬知之, 川嶋香代子, 梶 昌美, 小神晴美, 瀧澤 淳, 中田 光, 奥田一博, 吉江弘正. 診療室設置型簡易細胞プロセッシングキャビネット作成の試みと無菌環境に関する検証. 再生医療, 8 (Suppl): 265, 2009.