

参考文献

- 1) トップドラッグから学ぶ創薬化学. 有機合成化学協会編. 東京化学同人, 東京, 2012.
- 2) 臨床試験のABC. 日本医師会, 東京, 2006.
- 3) 臨床薬理学 第三版, 日本臨床薬理学会 編, 医学書院, 2011.
- 4) クリニカルクエストにこたえる! 臨床試験ベーシックナビ, 臨床試験を適正に行える医師養成のための協議会編集, 医学書院, 2012.
- 5) IV.イノベティブ新薬開発促進の支援. PMDAの取り組み. 豊島聡, *In* 生物学的製剤による難病の治療革命, 関節リウマチ治療のブレークスルーから疾患全領域の治療の新展開へ, 田中良哉編集, 日本医学出版, 東京, 2009.
- 6) 「医薬品・医療機器開発に対する理解増進に関する研究」研究班 (主任研究者: 平山佳伸): 医薬品・バイオ研究の実用化に向けて一知っておきたい薬事規制. (<http://www.nibio.go.jp/guide/index.html>).
- 7) 鈴木健司: 炎症性腸疾患の治療と新規治療法開発の戦略. 新潟県医師会報, No. 693, 2-9, 2007.
- 8) Kiryu H, Terai G, Imamura O, Yoneyama H, Suzuki K and Asai K: A detailed investigation of accessibilities around target sites of siRNAs and miRNAs. *Bioinformatics* 27: 1788 - 1797, 2011.
- 9) Suzuki K, Sun X, Nagata M, Kawase T, Yamaguchi H, Sukumaran V, Kawauchi Y, Kawachi H, Nishino T, Watanabe K, Yoneyama H and Asakura H: Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. *Pathol Int* 61: 228 - 238, 2011.
- 10) Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Sukumaran V, Kawauchi Y, Yokoyama J, Tomita M, Kawachi H, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H and Takagi R: Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol* 45: 140 - 151, 2012.

3 自己培養骨膜シートを用いた歯槽骨再生研究 —データをどのように収集してどのように評価するか—

奥田 一博・吉江 弘正

新潟大学大学院医歯学総合研究科, 摂食環境制御学講座
歯周診断・再建学分野
(主任: 吉江弘正教授)

川瀬 知之

新潟大学大学院医歯学総合研究科, 顎顔面再建学講座
歯科基礎移植・再生学分野
(主任: 川瀬知之准教授)

中田 光

新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センター
(主任: 中田 光教授)

Reprint requests to: Kazuhiro OKUDA
Division of Periodontology Department of
Oral Biological Science Institute of Medicine and
Dentistry Niigata University
2-5274 Gakko-cho Chuo-ku,
Niigata 951-8514 Japan

別刷請求先: 〒951-8514 新潟市中央区校町通2-5274
新潟大学医歯学系摂食環境制御学講座
歯周診断・再建学分野

奥田 一博

Tissue Engineered Cultured Periosteal Sheet Application to Periodontal Regeneration – How to Collect and Evaluate Data –

Kazuhiro OKUDA and Hiromasa YOSHIE

*Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science,
Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University
(Director: Prof. Hiromasa YOSHIE)*

Tomoyuki KAWASE

*Division of Oral Bioengineering, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction,
Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University
(Director: Assoc.prof. Tomoyuki KAWASE)*

Koh NAKATA

*Bioscience Medical Research Center, Niigata University Medical and Dental Hospital
(Director: Prof. Koh NAKATA)*

Abstract

To regenerate periodontal tissue destroyed by chronic periodontitis, autologous cultured periosteal sheets in combination with platelet - rich plasma (PRP) and hydroxyapatite (HA) granules were used as a clinical application. The periosteum specimens were dissected from each patient, and were incubated for approximately six weeks until the sheets were formed. Prior to placement of the cultured periosteal sheets, osseous defects were thoroughly debrided and filled with HA granules in combination with PRP. Standardized clinical and radiographic measurements were determined during follow - up examinations at one, two and three years. Clinical attachment level (CAL) and radiographic infrabony defect depth (IBD) were determined as primary end - point. As secondary end - point, inflammatory indices including plaque index (PI), gingival index (GI) and bleeding on probing (BOP) were determined. Results were averaged for the clinical and radiographic parameters. Taking into account the paired nature of the changes from baseline to one year, and three years in each group, the Wilcoxon signed - rank test was performed. The Mann - Whitney U test was applied to compare clinical and radiographic outcomes between test and control groups at baseline and 1 year post surgery. The null hypothesis was rejected when the risk percentage was $< 5\%$ ($p < 0.05$). One year results of this treatment have shown favorable clinical results, and these effects were stable and maintained after three years, when compared to baseline. The cultured periosteal sheets function as a living drug delivery system to favorably influence cellular functions and serves as seeds for ectopic bone formation near the implantation site through production of important growth factors related to periodontal regeneration.

Key words: chronic periodontitis, cultured periosteal sheet, clinical attachment level, radiographic infrabony defect depth, Wilcoxon signed - rank test, Mann - Whitney U test

歯周病とは

国民の8割が罹患しているとされる歯周病（慢性歯周炎）は歯周ポケットに堆積するプラーク細菌が主な原因となって引き起こされる炎症性疾患である¹⁾。歯周組織局所において持続的かつ過剰な免疫応答の結果、歯を支持している歯周組織の付着の喪失および歯槽骨吸収が生じ、放置すると歯は自然脱落する。炎症により破壊された歯周組織を再生させるためにはまずは原因であるプラーク細菌を除去すること、すなわちプラークコントロールおよび歯根面の歯石および病的セメント質の除去は最も重要なことである。しかし複雑に破壊された骨欠損部を再生させるためにはそれに加えもう一工夫、組織工学的な“戦略”が必要である。

歯周病に対する再生治療の進展

歯周組織再生法として行われてきた手術方法を歴史的に考察してみたい。「第一世代」は、アパタイトや第三リン酸カルシウムを利用した人工骨移植手術や遮断膜を利用した組織再生誘導（GTR）法が相当し、細胞の足場（スキャフォールド）を確保する治療法である。次に、「第二世代」は、エナメル基質タンパク質（EMDOGAIN, Straumann）、多血小板血漿（PRP）、各種増殖因子（血小板由来増殖因子 PDGF、線維芽細胞増殖因子 FGF、骨形成タンパク質 BMP）を利用したもので、いわゆる増殖因子（サイトカイン）療法である。そして、「第三世代」は、口腔内から採取した各種の細胞（粘膜上皮細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞、骨膜細胞）をシート状に加工して利用する、いわゆる細胞シート療法である。さらに、「第四世代」として、口腔外から採取した各種細胞を人為的に変化させたものの利用、あるいはヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞の応用があり、現在、in vitro や動物レベルで研究されつつある。第三世代までが臨床応用の試みが行われた方法で、いわゆる“患者まで届いている治療”と言えよう²⁾。

培養骨膜シートの性状および PRP と HA 移植物の作製

失われた組織を再生させるためには（幹）細胞、細胞の足場、細胞増殖因子の3要素が必要でそこに適切な環境と時間が関与することが必要であるとする組織工学の概念がある³⁾。歯周組織を再生させるための組織工学的“戦略”として我々は、細胞として患者自己由来骨膜細胞、足場としてハイドロキシアパタイト顆粒（HA）、細胞増殖因子として患者自己由来多血小板血漿（PRP）を選択した。理論的には組織工学の3要素を満たすこととなり、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る。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、5 mm × 5 mm の骨膜小片を採取後、ウシ胎児血清（10%）、抗生物質（1%）、アスコルビン酸（25 μg/ml）を含む Medium199 にて培養シャーレ上で6週間培養して直径が40-50 mm 程度になるシート状構造物を得た。骨膜小片を培養系に移してから、4-8日後に最初の細胞遊走を確認することができる。増殖の速度は経日的に増してくるが、骨膜小片の周囲にアルカリホスファターゼ（ALP）活性の発現を認める。未分化骨膜での石灰化はほとんど認められないが、デキサメタゾン・ビタミンC・β-グリセロリン酸を添加した「分化誘導培地」で培養すると、ALP発現および石灰化は顕著に誘導される。未分化状態では、線維芽細胞同様にIL-6の産生が認められるが、分化誘導によってIL-8、IL-13、IGF-I、IGFBPなどの産生が亢進するようになる。培養骨膜シートは、5層以上に細胞は重層化される⁴⁾。

PRP と HA 移植物の調整については、患者末梢血 8.5cc から2回の遠心分離により、0.6cc の PRP を調整し、このうち PRP 0.3ml につき、0.1g のアルギン酸ナトリウムを添加して活性化し、0.5g の HA と混和させた⁵⁾。

臨床症例

66歳の男性、下顎左側第二小臼歯近心に8mmの

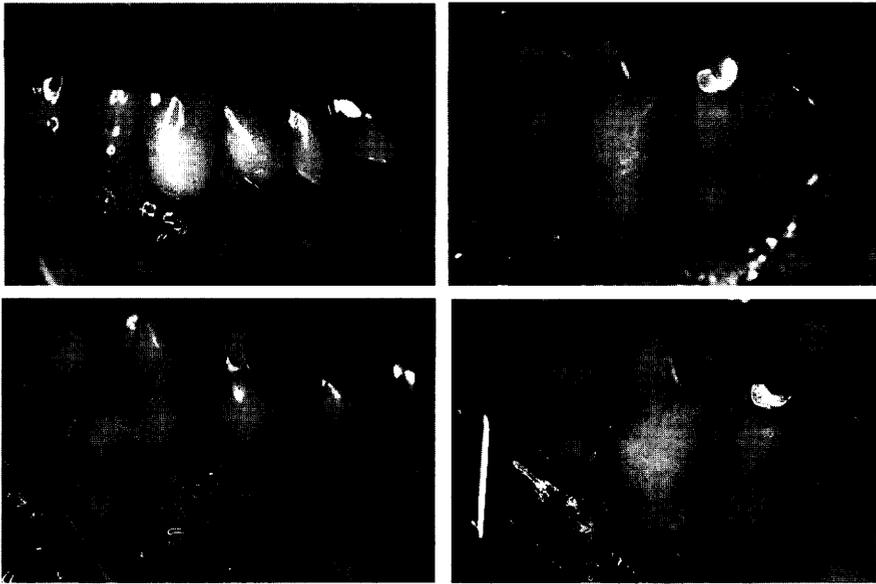


図1 培養骨膜シート移植手術

歯周基本治療が完了し歯肉表面の炎症は除去されている (A). 全層弁を形成・剥離後、病巣部を徹底搔爬して3壁性骨欠損部を明示 (B), PRP + HA 複合体を移植し (C), その上を被覆するように培養骨膜シートを設置して (D), 歯肉弁を縫合した。

歯周ポケット (PD), 8 mm の付着の喪失 (CAL), およびエックス線的に 6 mm の骨欠損深さ (IBD) を示す 3 壁性骨欠損を認めた。下顎左側中切歯中央部から下顎左側第二小臼歯遠心部まで歯肉溝切開を加え、全層弁を形成して剥離し、徹底的な炎症性肉芽組織および病的セメント質を搔爬して吸収された骨欠損形態を明示した。HA と PRP を混合した移植物を骨辺縁まで充填し、さらにその上から培養骨膜シートを移植物を覆うように静置して、歯肉弁を復位させ縫合した (図 1)。

術後 1 年目において、歯周ポケット (PD) は 3 mm, 付着の喪失 (CAL) は 5 mm を示した。すなわち 5 mm のポケット減少と 3 mm の付着の獲得が得られた。エックス線的骨欠損深さは 4 mm の改善が認められた。

臨床比較研究

新潟大学医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。ステントを用いて 6 mm 以上のポケット (PD) と 6 mm 以上の付着の喪失 (CAL), 規格エックス線写真より 3 mm 以上の骨欠損深さ (IBD) を示す 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 2 群に分けた。術後は 1 か月に 1 回の割り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。また骨膜シート適応群については 3 年目までさらに観察を続け, ベースラインおよび 1 年目と群内比較を行った。主要評価項目に付着の喪失 (CAL) とエックス線的骨欠損深さ (IBD) を設定し, 副次的評価項目として再生効果に重大な影響を及ぼす炎症指数 (プラーク指数; PI, 歯肉炎

表 1 培養骨膜シート適応群と非適応群の臨床効果

培養骨膜シート適応群と非適応群の臨床効果 (平均値±標準偏差, 各群15名, 15部位)

	ベースライン	術後 1 年	p 値
PD (mm)			
骨膜 + PRP + HA	7.7 ± 1.1	2.9 ± 0.4	p <0.01
PRP + HA	7.6 ± 1.1	3.3 ± 1.0	p <0.01
p 値	NS	NS	
CAL (mm)			
骨膜 + PRP + HA	8.1 ± 1.2	4.1 ± 1.2	p <0.01
PRP + HA	8.0 ± 1.3	5.3 ± 1.5	p <0.01
p 値	NS	p <0.05	
IBD (mm)			
骨膜 + PRP + HA	5.3 ± 1.1	0.4 ± 0.9	p <0.01
PRP + HA	4.9 ± 1.4	1.7 ± 1.2	p <0.01
p 値	NS	p <0.01	

PD : 歯周ポケット深さ, CAL : 付着の喪失, IBD : エックス線の骨欠損深さ,

PRP : 多血小板血漿, HA : ハイドロキシアパタイト顆粒, NS : 統計学的に有意差無し

指数; GI, プロービング時の出血; BOP) を設定した。すべての計測値は平均値および標準偏差で表した。郡内比較を統計学的に解析するためには、対応のある検定として Wilcoxon signed-rank test を採用した。また群間比較には対応のない検定として Mann-Whitney U test を採用した。

ベースラインと1年目の間で、付着の獲得量については培養骨膜シート群で平均3.9mmで、対照群の2.7mmと比較して統計学的に有意な改善が示された。さらにエックス線の歯槽骨の獲得量

も培養骨膜シート群で有効な改善量が見られた(4.9mm vs 3.2mm)⁶⁾⁷⁾(表1)。

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。ベースラインでは歯周ポケットは平均7.6mm、付着の喪失は8.0mm、エックス線の骨欠損深さは4.6mmであった。1年予後では、それぞれ2.9mm, 4.8mm, 1.4mmであった。3年予後では、それぞれ3.0mm, 4.7mm, 0.5mmであった。ベースラインと1年予後、ベースラインと3年予後、それぞれの群間で

統計学的に有意な改善がみられた。また歯周ポケット深さの減少量と付着の獲得量では、ベースラインと1年予後、ベースラインと3年予後の両者間で差は無かったことから1年目で得られた効果が3年経過後も維持されていたことが明らかとなった。エックス線の骨欠損深さの減少量についてはベースラインと1年予後、ベースラインと3年予後の両者間で3.2mm, 4.1mmと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⁸⁾。

結論および考察

培養骨膜シートをPRPとHA移植体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示された。最長経過症例は8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HA移植物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が考えられる。

文 献

- 1) Haffajee AD and Socransky SS: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 5: 78 - 111, 1994.
- 2) 吉江弘正: VI歯周再生治療の流れと将来展望, 伊藤公一・内田剛也編 日常臨床における再生療法のテクニックと長期経過 ヒョーロン・パブリッシャーズ, 東京, pp170 - 171, 2009.
- 3) Lynch SE: Introduction. In: Lynch SE, Genco RJ and Marx RE (eds) *Tissue engineering - Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Quintessence Publishing Co, Inc, Chicago, ppxi - xviii 1999.
- 4) Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Nakata K and Yoshie H: Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. *J Tissue Eng Regen Med* 3: 218 - 229, 2009.
- 5) Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato H, Kawase T, Saito Y, Wolff LF and Yoshie H: Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intra-bony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study *J Periodontol* 76: 890 - 898, 2005.
- 6) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF and Yoshie H: Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol* 79: 811 - 818, 2008.
- 7) Okuda K, Yamamiya K, Kawase T, Mizuno, H, Ueda M and 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.
- 8) 吉江弘正, 奥田一博: section1 コンセプト・先進医療編 歯周組織再生の現在と未来を探る, 新春特集 2011年再生歯科医療の最前線を知る. *ザ・クインテッセンス* 30: 75 - 90, 2011.