

***In situ* tissue engineering approach を応用した 歯周組織再生療法の試み**

白方 良典

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻
顎顔面機能再建学講座 歯周病学分野

Challenges for periodontal regenerative therapy using an *in situ* tissue engineering approach

Yoshinori Shirakata

Department of Periodontology
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

ABSTRACT

Periodontitis is a globally prevalent inflammatory disease that causes the destruction of the tooth-supporting periodontal tissue (i.e. gingiva, alveolar bone, periodontal ligament, and root cementum). In the past 4 decades, a variety of procedures, including bone grafting, guided tissue regeneration, the use of enamel matrix derivative and growth factors (GFs), either alone or in combination, have been performed to accomplish periodontal regeneration. More recently, tissue engineering technologies using scaffolds, GFs and cells have been developed in regenerative medicine. However, all current approaches have been shown to have variable outcomes and limitations. To obtain favorable periodontal healing, there is an ongoing need to develop more reasonable therapeutics based on self-repair capacity in injured periodontal defects where the progenitor/stem cells from neighboring tissues can be recruited for *in situ* periodontal regeneration. In this review, the emerging various challenges for periodontal regenerative therapy using an “*in situ* tissue engineering approach” that avoid the *ex vivo* culture of cells are addressed for future clinical management of periodontal intrabony defects.

Key words: periodontal tissue engineering approach, growth factors, scaffolds, mechanical stress, blood supply

I. はじめに

歯周病はバイオフィルムを形成するプラーク（歯周病原性細菌）によって惹起される炎症性疾患であり、2001年には人類史上最も有病率の高い感染症の一つとギネスブックに認定されている。一般に歯周病はその進行が遅く自覚症状を認め難いため歯槽骨吸収を伴う重度の歯周組織破壊をきたす歯周炎患者も少なくない。このような歯周病患者に対して、プラークコントロールに始まる歯周基本（原因除去）治療や、歯肉剥離搔爬術（フラップ手術）を主体とする切除療法により一定の歯周組織の改善が得られている。しかし、こ

れらの処置後には歯肉退縮や審美性の低下を伴うことが多く、またその治療様式の多くはプラーク抵抗性の低い長い上皮性付着である^{1,2)}とされている。さらに深い骨縁下欠損や根分岐部病変に対してはこれら従来の治療だけではその効果に限界がある。そこで、中等度・重度慢性歯周炎により破壊された歯周組織（歯肉、歯槽骨、セメント質および歯根膜）の形態と機能を完全に回復し、咀嚼機能や審美性の向上を目的に様々な歯周組織再生療法や生体材料が開発され臨床応用されてきた。1990年代からは疾病により失われた組織・臓器の形態と機能を再生すべく幹細胞、足場材（スキャ

ホールド), および増殖因子の3要素を積極的に利用する組織工学的手法 (Tissue engineering) を取り入れた再生医学が幕開け, 特に近年では人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem (iPS) cells) を用いた技術の発展もあり, 種々の細胞をソースにした細胞移植療法が脚光を浴びている。著者らはこれまで予知性の高い歯周組織再生療法の検証とその確立を目指し研究を行ってきた。そこで今回, 歯周組織再生療法を効果的に実践する際に必要となるエビデンスの整理と, 歯周組織における新たな *in situ* (欠損その場での) 組織工学アプローチの有用性と意義を考察してみたい。

II. 歯周組織の特徴と歯周組織再生療法の現状

A. 歯周組織における創傷治癒のバイオロジー

一般にカリエス, 歯根破折, 外傷等が認められた場合, 部分的な「切除: resection」や「充填: fill」に始まり, 欠損部位については各種歯科材料を用いた「修復: restore」, あるいは義歯, ブリッジ, インプラント等を用いて「置換: replace」するといった概念のもとで治療が行われることが多い。しかしながら, 天然歯の保存を本質的に目指すには歯肉縁下を含めた歯周組織が健全でなければならず, 歯周組織破壊を認める場合は歯周組織の「再生: regeneration」を達成しなければならない。そこで歯周組織の特殊な構造と創傷治癒のバイオロジーを正しく理解する必要がある。つまり歯周組織は①歯肉・歯槽骨・歯根膜・セメント質といった軟・硬・軟・硬の異なる組織が連続して存在するサンドイッチ構造を有する組織複合体であり, その治療においては, ②歯肉弁と歯槽骨側の有血管性の創傷面と歯根側の無血管性の創傷面を結びつける治療であり, さらに③創傷治癒の過程において口腔内細菌・汚染から隔離できない開放状態にある³⁾ ことを念頭に置かねばならない。現在, 歯周組織再生療法の適応は一般に垂直性骨内欠損と1度-2度の根分岐部病変とされている。垂直性骨内欠損において, 歯槽骨とセメント質の再生はその残存骨壁数に有意に影響を受け, 特に1壁性骨欠損と3壁性骨欠損では全く異なり⁴⁾, 3壁性骨欠損は1壁性骨欠損に比べ3mm以上のクリニカルアタッチメント (CAL) ゲイン (歯に付着する上皮性付着と結合組織性付着の増加・獲得) が2.7倍になるとする報告⁵⁾ もある。さらに垂直性骨欠損の角度が小さく (狭く) 深い程, CALゲインが得られ易いことが知られている⁶⁾。また血餅の保持が困難となる1-2壁性骨欠損や2度の根分岐部病変においては, 骨再生をサポートする骨移植材が必要となること

が多いが, この骨移植材については, ①骨形成能: 移植材中の前骨芽細胞および骨芽細胞が実際に新生骨形成を促進する能力, ②骨誘導能: 移植材中の成長因子が未分化間葉系細胞にシグナリングを行い新生骨形成を促進もしくは誘導する能力, および③骨伝導能: 移植材がスキャホールドとして隣在する既存骨に由来する前骨芽細胞あるいは骨芽細胞の遊走・増殖を促し新生骨形成を生じさせるといった3つの属性⁷⁾ を有することが望ましいことが知られている。

B. 歯周組織再生療法の選択

歯周組織再生療法に関する多くの基礎研究・臨床研究から 歯槽骨内欠損において歯周組織再生療法を成功させるためには 1)患者, 2)欠損, 3)適切な外科的アプローチおよび 4)使用する生体材料の4要素の全てを適切に吟味, 選択したうえで欠損部における①創傷治癒の安定化, ②創傷部の保護および③組織再生のスペース確保を図ることが極めて重要である⁸⁾ ことが知られている。近年では拡大鏡, マイクロスコープやマイクロインスツルメントの普及も進み minimally invasive surgery (最小侵襲手術) を主とした外科手技の改変・改良, さらに種々の新規マテリアルの開発が進み歯周組織再生療法の選択の指針が見直され^{9, 10)}, 天然歯の保存が積極的に試みられてきている (図1)。

C. 歯周組織再生療法の変遷

歯周組織再生療法は, 臨床的に 1)ポケットプロービング深さ (PPD) の減少, 2)CALゲインの獲得 3)生理的な歯槽骨の形態回復, そして 4)組織学的な歯槽骨, 歯根膜, セメント質の再生を目的とする。これまでの歯周組織再生療法の変遷¹¹⁾ (図2) と概要を以下に示す。

1) 骨移植術

歯周外科処置における骨移植術は文献的には1923年の Hegedus にまでさかのぼるが, 1960年代から盛んとなりこれまで多くの骨移植材が開発・臨床応用されている⁷⁾。なかでも自家骨は骨形成能, 骨誘導能, 骨伝導能を全て有すると考えられ, 骨移植材として第一選択であり良好な成績が得られるが, 採取部位へ外科的侵襲, 供給量の制限, 早期吸収等の問題がある。欧米ではヒト凍結乾燥脱灰骨などの同種骨や牛由来の異種骨が多用されているが, 本邦においては感染リスクや倫理的問題等もあり厚労省未認可医用材料が多い。こうした背景から安全性, 供給性の高いハイドロキシアパタイト (HA) やリン酸三カルシウム (TCP) といっ

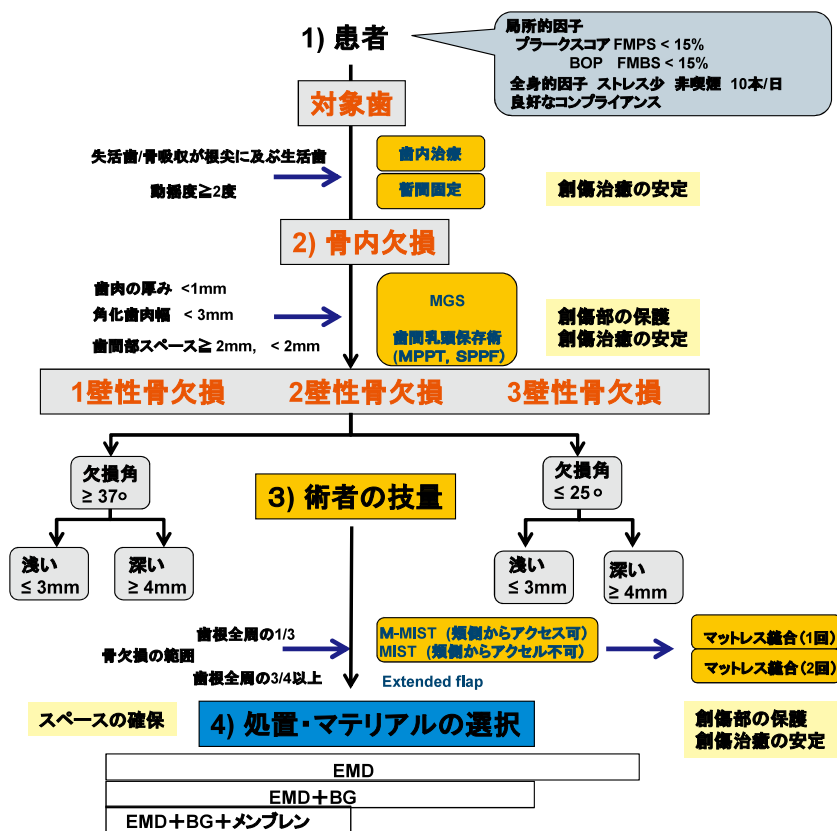


図1. 骨内欠損における歯周組織再生療法のデジジョンツリーとその治療戦略
 (Froum, S., Cortellini, P. et al より一部引用改変)
 FMPS: 全顎におけるブラークスコア, FMBS: 全顎におけるプロービング時の出血,
 MGS: 歯肉歯槽粘膜炎形成術, MPPT: 改良型歯冠乳頭保存術, SPPF: 単純型歯冠乳頭
 保存フラップ, M-MIST: 改良型低侵襲外科テクニック, MIST: 低侵襲外科テクニ
 ック, EMD: エナメルマトリックスデリバティブ, BG: 骨移植術

た人工骨が開発されている。しかしながら非吸収性の HA の歯周骨内欠損への応用後、残存する HA 顆粒と歯根の癒着や、HA へのプラーク蓄積に起因する歯周炎の再発等の報告¹²⁾ もあり、非吸収性材料の使用は術後感染のリスクが高いことが示唆されている。そこで、我々は吸収性でかつ複雑な歯周骨内欠損へ注入可能な TCP セメント (CPC) に着目した。CPC は欠損部へ注入後、体温下で急速に硬化し生体内で骨置換を伴いながら徐々に吸収する特性を有する人工骨として整形外科領域で最初に報告¹³⁾ された。まず CPC の歯周組織欠損における効果を検証すべく、イヌの顎骨に外科的に作製した骨内欠損 (開窓型欠損, 3 壁性骨欠損) へ移植を行った。12 週後の組織学的評価において CPC は生体親和性が高く、良好なスキヤホールド

として骨伝導能を発揮しその周囲に骨形成が認められた。さらに CPC と露出歯根面の間には欠損底部から伸展する新生セメント質と歯根膜様組織を認め、CPC が創傷治癒の安定にも大きく寄与していることが示唆された¹⁴⁾。その後、ヒト骨内欠損における CPC 移植 (実験群) とフラップ手術 (コントロール群) の臨床的効果の比較検証を目的に臨床試験¹⁵⁾ を行った。術後 1 年において両処置群共に術前に比べて有意に PPD の減少と CAL ゲインの獲得が認められ臨床的にも改善が認められた。しかしながら両群間においていずれの臨床的パラメーターにも有意差は認められなかった。実験群では CPC の充填量が多かった部位においては術後に一部、露出が認められた。露出を認めなかった部位においても 1 年後にレントゲン上で CPC の残存が

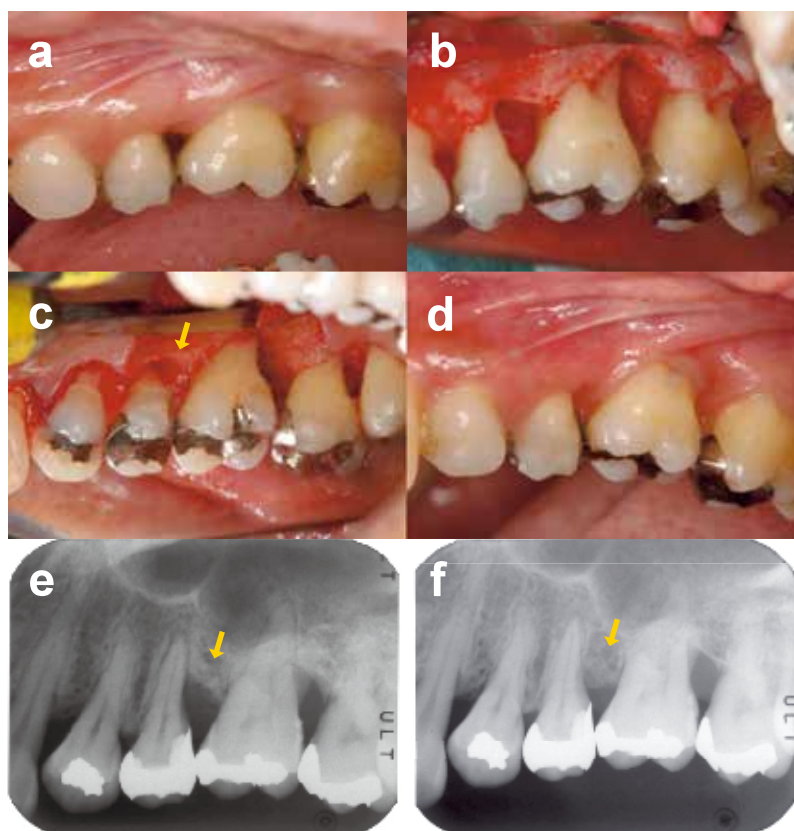


図3. ヒト1壁性骨欠損(25遠心)における EMD と自家骨移植の併用症例

(a)術前, (b)術中(デブライドメント後 頬側), (c)術中(デブライドメント後 口蓋側) 25遠心の1壁性骨欠損(矢印)に EMD と自家骨を併用移植, (d)術後17カ月, (e)術前レントゲン写真, (f)術後レントゲン写真(17カ月) PPDは3mm 減少し3mmのCALゲインが得られた。

て広く多彩な効果を発揮し良好な創傷治癒に関わること²¹⁾, 臨床研究ではフラップ手術単独と比較して有意にCALゲインの獲得量が大きいこと²²⁾, EMDの歯周組織欠損への応用によりGTR法と同等の良好な臨床成績が得られるとの報告^{23,24)}がされるようになった。さらにEMD応用後の歯根面においては歯根発生期に認められる無細胞性外部線維性セメント質が優勢で, 歯根膜線維の走行が機能的配列を有すること²⁵⁻²⁷⁾, さらに臨床的にEMDの応用はGTR法に比べて1)メンブレンを用いないことから手術時間, 外科的侵襲が少なくさらに術後の合併症や肉肉退縮が少ない²⁸⁾, 2)複数歯における骨内欠損に応用しやすい, 3)歯根の近接, 歯列不正等の影響を受けにくい等の理由もあり適応症も広く頻繁に用いられている(図1, 表1)。4)増殖因子の応用

現在, 特定の細胞の遊走, 増殖, 分化を促進する生理活性物質(サイトカイン)である増殖因子(成長因子: Growth factor)として骨誘導タンパク(bone morphogenetic protein: BMP), インシュリン様増殖因子(insulin like growth factor: IGF), 血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor: PDGF), 塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)等が知られている。異所性骨形成を誘導する物質としてUristらにより骨基質中から発見されたBMP²⁹⁾はいち早く遺伝子工学的に作製が可能となりリコンビナントタンパクとして利用されるようになった。中でもBMP-2はその強力な骨形成作用について数多くの報告がされてきた。しかしながら歯周骨内欠損への応用においては著名な歯槽骨形成を認めるものの, アンキロシスや歯根吸収等の問題点^{30,31)}が指摘されている。本邦では強力な血管

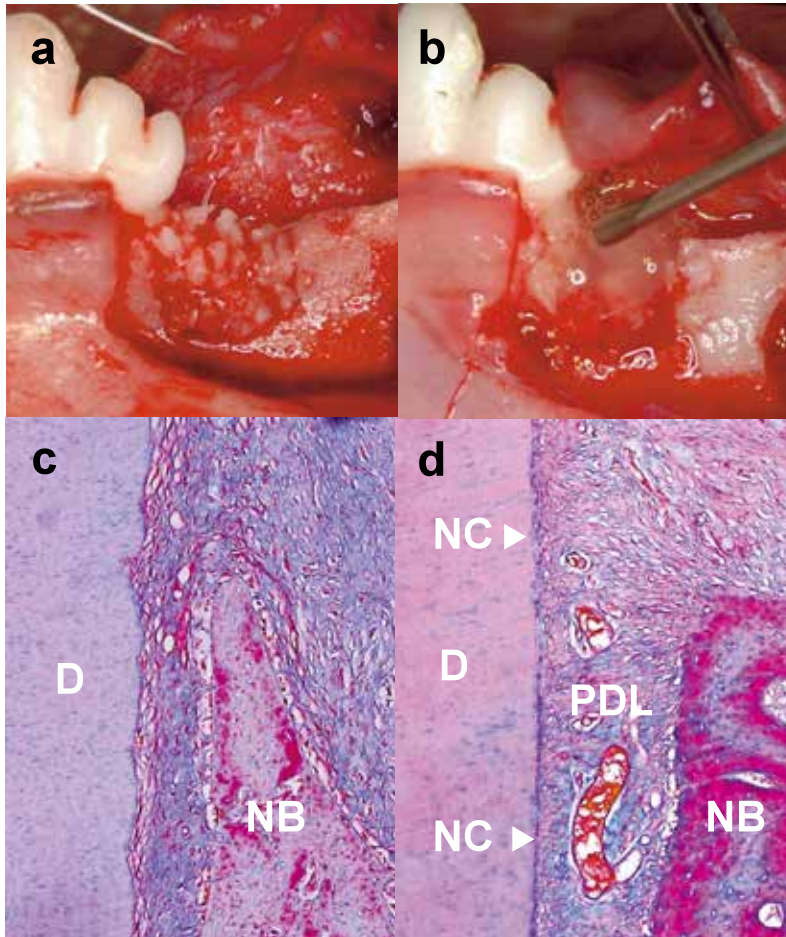


図4. イヌ1壁性骨欠損における自家骨移植単独とEMDと自家骨移植併用処置の比較 (a)自家骨移植のみ, (b)自家骨移植とEMDの併用処置, (c)自家骨移植後の欠損内最歯冠側の治癒像(術後8週). 新生骨形成は認めるがセメント質形成は認めない., (d)自家骨移植とEMD併用後の欠損内最歯冠側の治癒像(術後8週). 無細胞性セメント質の形成と機能的配列を有する緻密な歯根膜組織に注目. D:象牙質, NC:新生セメント質, NB:新生骨, PDL:歯根膜)(アザン染色)

新生促進作用を有するサイトカインである bFGF に関する基礎研究, 臨床研究が盛んに進められ, 基礎研究においては bFGF が培養ヒト歯根膜由来細胞 (HPDL) の遊走と増殖を促進すること, HPDL からのオステオポンチンやヒアルロン酸等の細胞外基質の産生を高めることが明らかとなっており, 歯周組織再生に適した微小環境を創出する可能性が示唆されている³²⁾。またリコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2 (rhFGF2) /HPC (ヒドロキシプロピルセルロース) ゲル (以下 rhFGF2) を骨内欠損に用いた多施設臨床治験においてその安全性が確認され, さらに rhFGF-2 と EMD の

比較臨床試験の結果, rhFGF-2の方がEMDより放射線学的評価において骨形成量が多いことが報告³³⁾されている。現在, 日本発のサイトカインを用いた新たな歯周組織再生療法として, その使用認可が待ち望まれている。

5) 各種併用療法

歯周組織は前述のように軟組織と硬組織が隣接する生体内でも極めて特異的な組織複合体であるため理想的な歯周組織再生を獲得するためには単一の因子, 処置だけでなく種々の因子を併用する必要性が考えられる。特に骨壁の裏打ちのない骨縁下欠損 (Non-

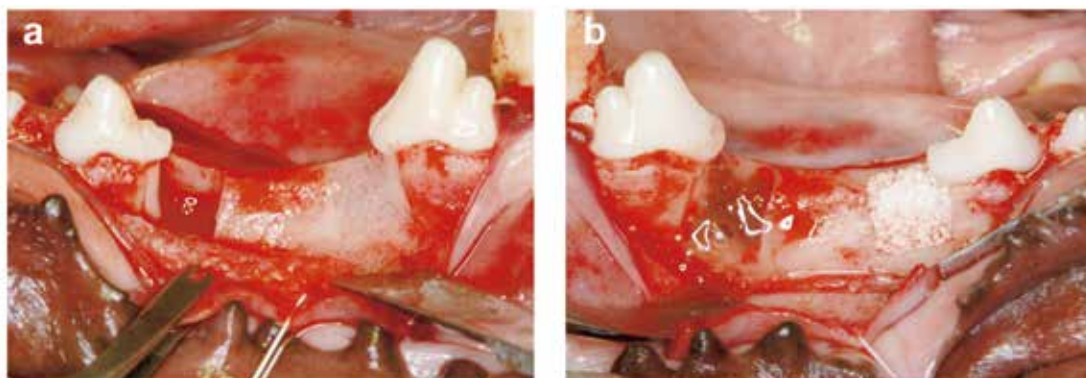


図5. イヌ下顎骨における2壁性骨欠損

(a)左：歯肉剥離搔爬術(OFD)，右：rhFGF2の応用 (b)左：EMDの応用，右：PDGF/ β -TCPの充填（文献26より引用）

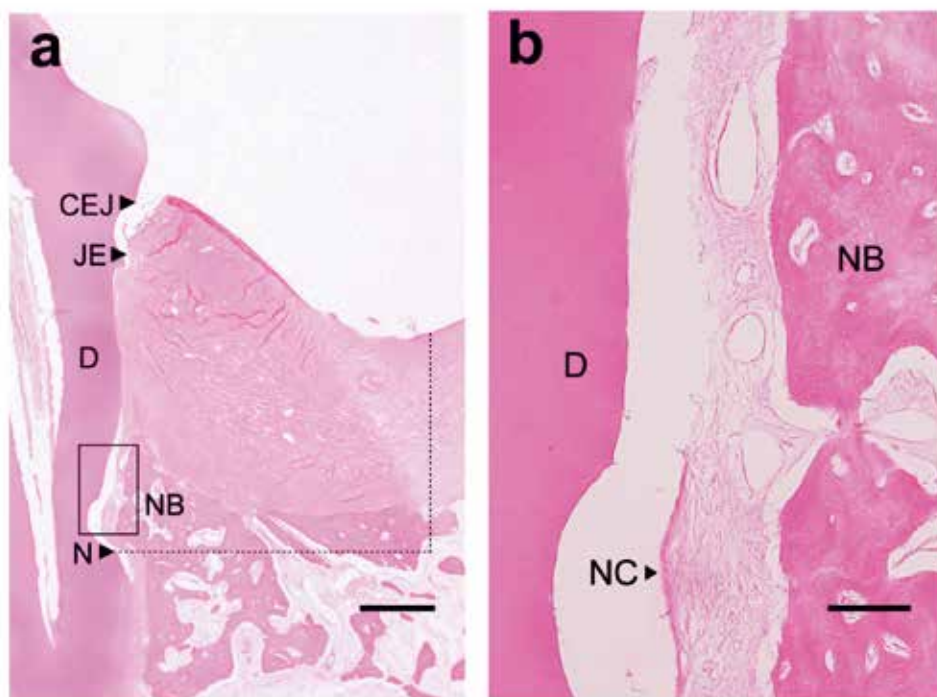


図6. 歯肉剥離搔爬術(OFD)術後の治癒像

(a)弱拡大像。歯周組織再生は欠損底部に局限している。破線部は欠損範囲を示す。(scale bar: 1mm) (b)根尖側フレーム部の強拡大像。歯根膜線維は疎で歯根に並走している。(scale bar: 200 μ m) CEJ：セメントエナメル境，JE：上皮の最根尖側，NB：新生骨，NC：新生セメント N：根尖部ノッチ，D：象牙質，ヘマトキシリン・エオジン染色（文献26より引用改変）

contained defect: 1-2壁性骨欠損)においては, EMDは粘性を有するゲルであるためEMD単独ではフラップの崩落, 歯周組織再生に必要な場の確保が十分に得られない懸念も報告されている^{34,35}). こうして現在, EMD単独処置による臨床的限界の克服と1-, 2-壁性の骨内欠損での臨床成績の向上, 適応症の拡大を目指しEMDとメンブレンや種々の骨移植材が併用されることが多くなっている。本邦で使用できる骨移植材には制限があるが, EMDと自家骨の併用処置はEMD単独処置に比べ有意に術後の歯肉退縮量が抑制され, アタッチメントゲインの獲得率が高いとの報告^{36,37})がある。当科におけるEMDと自家骨の併用症例でも臨床的パラメーターおよび放射線学的評価において良好な結果が認められている(図3)。なおイン1壁性骨欠損モデルにおいて自家骨移植のみとEMDと自家骨移植の併用後の治療像を組織学的に比較検証した結果, 自家骨移植のみではセメント質形成が乏しいのに対し, EMDを併用することにより歯槽骨再生のみならずシャーピー線維を密に埋入したセメント質の再生が欠損底部から歯冠側まで連続的に認められた(図4)。またNon-contained defectに対してはPDGFと β -TCPの併用使用を前提としたGEM21S[®](日本国内未認可)が北米を中心に使用されており, 良好な臨床効果が報告³⁸)されている。

前述のように, 各々の歯周組織再生療法は利点, 欠点を有し, またそれらの適応症の選択が不適切な場

合には本来の治療効果が発揮されることはない。そこで我々はEMD, rhFGF2, GEM21S[®](以下PDGF/ β -TCP)の応用を実験群として, 歯肉剥離搔痒術(OFD)を対照群としてイン2壁性骨欠損(深さ5mm, 頬舌径5mm, 近遠心径5mm)(図5)においてこれらの歯周組織再生に及ぼす効果について比較検討を行った²⁶). 術後8週での組織学的所見として, OFD群では, 既存骨骨頂の吸収が著しく欠損底部に僅かに新生骨形成が認められた(図6)のに対し, 実験群では既存骨骨頂および欠損底部より欠損歯冠側にかけて顕著な新生骨形成が認められた(図7-図9)。また実験群では歯根面に沿って機能的な配列を有するシャーピー線維の埋入を伴った新生セメント質の伸展, および歯根膜様組織が認められた。新生セメント質形成に関してOFD群では, 欠損底部に局限するのみであったのに対し, EMD群では薄い無細胞性セメント質が, rhFGF2群およびPDGF/ β -TCP群では厚い細胞性セメント質が優位に認められた(図6-図9)。組織形態計測結果として, 実験群はOFD群より, またrhFGF2群はEMD群より統計学的に有意に新生骨形成量が多かった(表2)。このように2壁性骨欠損におけるEMD群, rhFGF2群, PDGF/ β -TCP群で各々良好な歯周組織再生が認められた。しかしながらEMDのみではスペースメンテナンスが困難で, 無細胞性セメント質の再生には有効であるが顕著な骨誘導能を有さない可能性が示唆された。rhFGF2群は担体を用いなかっ

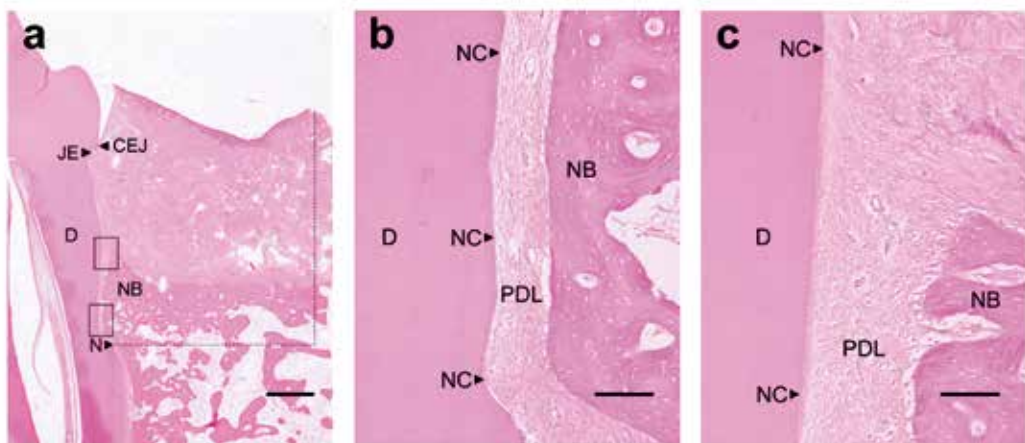


図7. EMD 応用後の治療像

(a)弱拡大像, 新生骨形成が歯根に沿って認められる。破線部は欠損範囲を示す。(scale bar: 1mm), (b)根尖側フレーム部の強拡大像, (c)歯冠側フレーム部の強拡大像, 新生骨と無細胞セメント質間に斜走する歯根膜線維が密に認められる。(scale bar: 100 μ m) CEJ: セメントエナメル境, JE: 上皮の最根尖側, NB: 新生骨, NC: 新生セメント質, PDL: 歯根膜, N: 根尖部ノッチ, D: 象牙質, ヘマトキシリン・エオジン染色(文献26より引用改変)

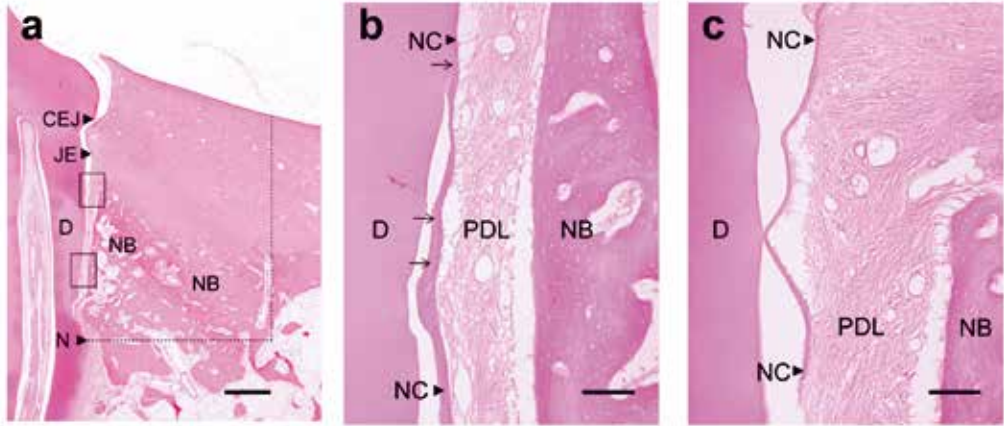


図8. rhFGF2応用後の治癒像

(a) 弱拡大像, 既存骨頂部から歯冠側に向けて著名な骨形成が認められる。破線部は欠損範囲を示す。(scale bar: 1mm), (b) 根尖側フレーム部の強拡大像, 矢印: セメント細胞, (c) 歯冠側フレーム部の強拡大像, シャーピー線維の埋入・非埋入した厚い細胞性セメント質を認める。(scale bar: 100 μ m) CEJ: セメントエナメル境, JE: 上皮の最根尖側, NB: 新生骨, NC: 新生セメント質, PDL: 歯根膜, N: 根尖部ノッチ, D: 象牙質, ヘマトキシリン・エオジン染色 (文献26より引用改変)

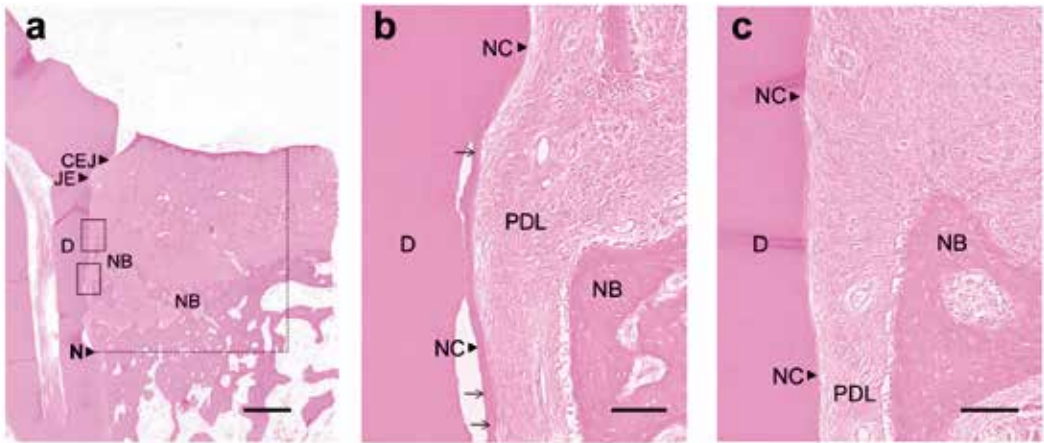


図9. PDGF/ β -TCP 応用後の治癒像

(a) 弱拡大像, 既存骨頂部から歯冠側に向けて骨形成が認められるが, 欠損中央部では β -TCP の残留と一部, 線維性の被包化が認められる。破線部は欠損範囲を示す。(scale bar: 1mm) (b) 根尖側フレーム部の強拡大像, 細胞性セメント質を主体として機能的配列を有する歯根膜線維が認められる。矢印: セメント細胞 (c) 歯冠側フレーム部の強拡大像, 薄い無細胞性セメント質が連続的に根尖側から伸展している。(scale bar: 100 μ m) CEJ: セメントエナメル境, JE: 上皮の最根尖側, NB: 新生骨, NC: 新生セメント質, PDL: 歯根膜, N: 根尖部ノッチ, D: 象牙質, ヘマトキシリン・エオジン染色 (文献26より引用改変)

表2. 各処置後の組織学的パラメーター (平均±SD, mm)

	処置内容				統計学的有意差
	1 OFD	2 EMD	3 rhFGF2	4 PDGF/ β -TCP	
DH	6.3±0.2	6.2±0.4	6.5±0.1	6.2±0.4	NS
JE	0.8±0.4	0.3±0.2	0.7±0.2	0.8±0.2	1vs.2 (P<0.05) 2vs.3 (P<0.05) 2vs.4 (P<0.05)
CT	2.4±0.8	1.4±1.0	1.2±0.7	0.6±0.5	1vs.3 (P<0.01) 1vs.4 (P<0.01)
NB	3.1±0.5	3.3±0.7	4.1±0.8	3.7±0.3	1vs.3 (P<0.01) 2vs.3 (P<0.05)
NC	3.0±0.7	4.6±1.2	4.3±1.3	4.7±0.7	1vs.2 (P<0.01) 1vs.4 (P<0.01)

DH: 欠損高さ, JE: 上皮の深部増殖量, CT: 結合組織性接着 (セメント質なし), NB: 新生骨形成量, NC: 新生セメント質形成量, NS: 統計学的有意差なし (文献26より引用改変)

たにも関わらず臨床治験の結果同様 新生骨形成量が最も多く骨誘導能が極めて高いことが示唆された。PDGF/ β -TCP 群では β -TCPの骨伝導能の発現, 欠損部で血餅, 創傷治癒の安定化により安定した歯周組織再生が認められた。しかし rhFGF2 群と比較し骨形成量が少なく β -TCPの残留が一部で認められ, 骨移植材の吸収速度が改めて課題となることが示唆された。このように成長因子の種類や用いる骨移植材により併用療法後の治癒像はそれぞれ異なる可能性があるが, それが臨床的な長期的予後にどのように関わるかは未だ判明していない³⁹⁾。

Ⅲ. 歯周組織再生における *in situ* tissue engineering approach の可能性

医科領域ではスキャホールドと増殖因子の応用に加え, 体外からの細胞移植を組み合わせた組織工学 (Tissue engineering) の手法⁴⁰⁾により積極的かつ多量の組織・器官再生を目的に現在, 盛んに研究報告されている⁴¹⁾。口腔領域においても骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs)⁴²⁾, iPS細胞⁴³⁾, 歯肉線維芽細胞⁴⁴⁾等を細胞ソースとした顎骨・歯周組織再生が報告され多くの期待が寄せられている。しかし細胞採取の侵襲, 限られた幹細胞数, 分化コントロール手法の確立, 外来遺伝子の導入等の課題と共に実用化に関わるコスト, チェアサイドに至るまでの時間のコントロール等, 解決すべき点が少ない⁴⁵⁾。元来, GTR法においても重要な役割を有するとされる歯根膜細胞 (歯根膜幹細胞) は欠損周囲に内在し BMSCs よりはるかに高い増

殖能があり⁴⁶⁾, 損傷を受けるとそれは6倍になる⁴⁷⁾こと, さらに多分化能を有する⁴⁸⁾ことが知られている。そこで, 歯周組織欠損 (その場) において創傷治癒の安定と歯根膜細胞のポテンシャルを最大限に発揮するべく Non-contained defect において意図的な骨欠損の改変 (改造) のうへ, スキャホールドと EMD を用いたいわば *in situ* (その場での) 組織工学アプローチを考案しその有用性を検証した。イヌの1壁性骨欠損において 1) EMDのみ (EMD群), 2) 有茎自家骨移植 (Bone swaging: BS)のみ (BS群) 3) EMDとBSの併用 (EMD/BS群), および 4) EMD, BSとCPCの移植 (EMD/BS/CPC群) の4処置 (図10) を無作為に施し, 8週後, 組織学的評価を行った。その結果, EMD群ではセメント質形成は認めるものの既存骨の吸収が著しく (図11), 欠損改変を行ったBS群では骨吸収が抑制されこと (図12, 図13), EMD/BS/CPC群は全群間で新生骨形成量 (高さ, 面積) およびセメント質形成量も最大で, 機能的配列を有するシャービー線維を有する歯根膜組織の再生が有意に認められた (図14, 表3)。このことは 1) BSにより欠損の狭小化, 血餅の安定化, 血液供給が維持されたこと, 2) 自家骨が有する骨形成能・骨伝導能・骨誘導能が効果的に発揮されたこと, 3) EMDによる上皮の深部増殖抑制効果, 新生セメント質の形成, 固有歯槽骨の誘導, それに伴う結合組織性付着の獲得が計られたこと, 4) CPCの既存骨側のみの充填により, 吸収速度の遅い骨移植材の充填量をコントロールしたうへで, 有茎自家骨の安定化, 骨伝導能の発現および既存

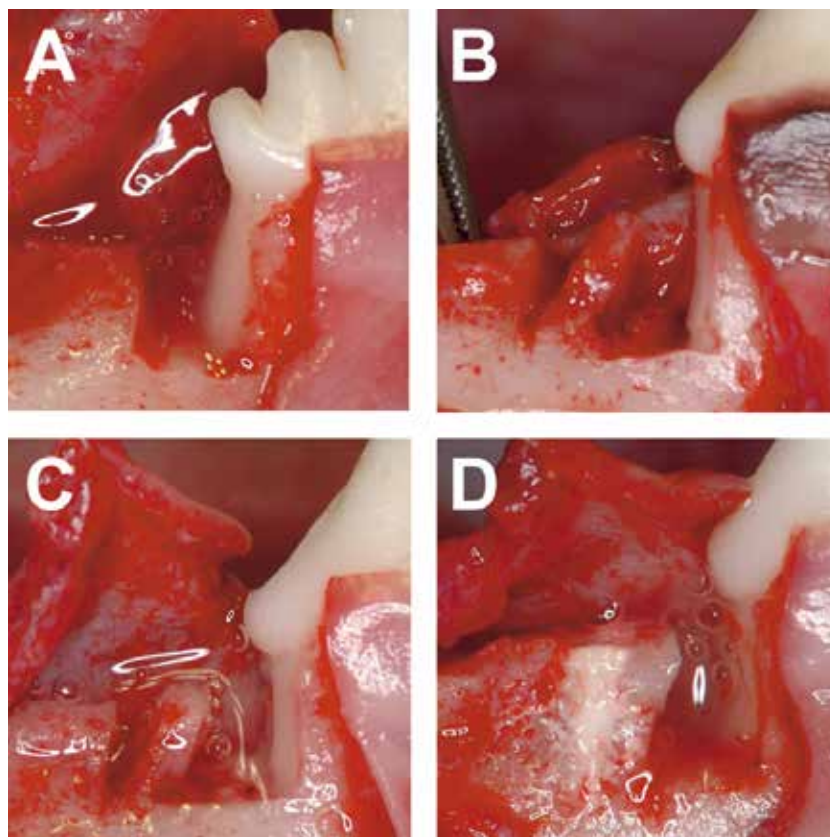


図10. イヌ下顎骨における1壁性骨欠損

(A)EMDのみ, (B)BSのみ, (C)EMD/BS併用, (D)EMD/BS/CPC(リン酸三カルシウムセメント)併用(文献49より引用)

骨の吸収を効果的に抑制したことに起因するものと考えられる。このように生体外から細胞移植を行わず歯周組織欠損内における処置のみで良好な歯周組織再生が得られることが示唆された⁴⁹⁾。しかしながらBSは適応症に限界があるため、さらに異なるアプローチの必要性も考えられる。創傷治癒を考慮する際、動物実験や臨床研究から骨髓穿孔(IMP)による血液供給の促進が骨再生に有効なことが報告^{14, 50)}されている。これにより骨髓中の未分化間葉系細胞が欠損部に浸潤し、線維素血餅が形成される。さらに動力学効果が骨芽細胞の活動を刺激し細胞外基質の産生をはじめ骨形成や骨改造を促すこと⁵¹⁾、適切な矯正力を付与することにより歯周組織欠損内で骨添加が促進すること⁵²⁾、また近年、難治性の骨折等に対して微弱な超音波パルス波(LIPUS)で刺激することで骨修復の過程に関わる種々の細胞の遊走・増殖・分化が誘導され創傷治

癒に関わるシグナル分子の発現が増加すること⁵³⁾、歯根膜細胞の骨分化を促進させる⁵⁴⁾等が報告されている。このように血液供給の確保や各種のメカニカルストレスを歯周組織欠損へ付与することでin situ tissue engineering approachがより確実になるものと考えられる(図15)。今後、歯周組織本来の生物学的・解剖学的・発生学的なバックグラウンドに基づき、歯周組織欠損内で戦略的に物理刺激や適切な生体シグナル分子/足場材を用いることで、内在性幹細胞である歯根膜を軸に、周辺細胞の活性化と細胞周辺環境の整備によりシンプルかつ効率的に歯周組織再生を計る本アプローチは合理的であると考えられる。さらに本アプローチの有効性が確立されれば、臨床的に細胞移植療法より簡便、低侵襲、低コストでありながら高い安定性、安全性が担保され、汎用性と予知性が極めて高い治療法を多くの歯周病患者者に提供し得るものと思われる。

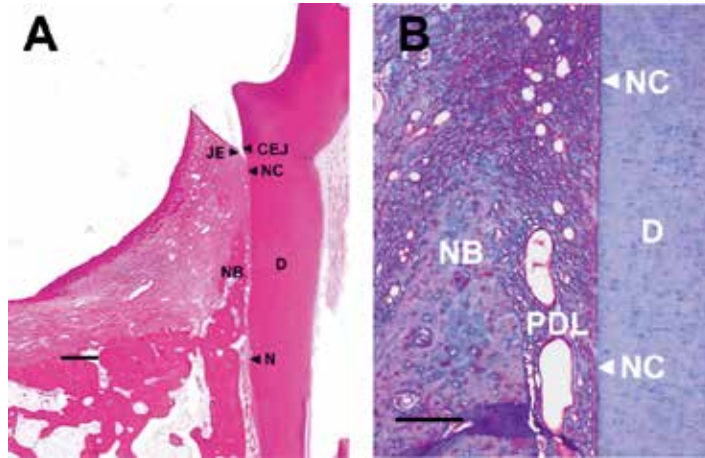


図11. EMD 応用後の治癒像

(A)弱拡大像, 新生骨形成が歯根に沿って薄く認められる。scale bar: (1mm), ヘマトキシリン・エオジン染色, (B)骨頂部の強拡大像, 新生骨と無細胞性セメント質間に斜走する歯根膜線維が密に認められる。(scale bar: 150 μ m) CEJ: セメントエナメル境, JE: 上皮の最根尖側, NB: 新生骨, NC: 新生セメント質, PDL: 歯根膜, N: 根尖部ノッチ, D: 象牙質, アザン染色 (文献49より引用改変)

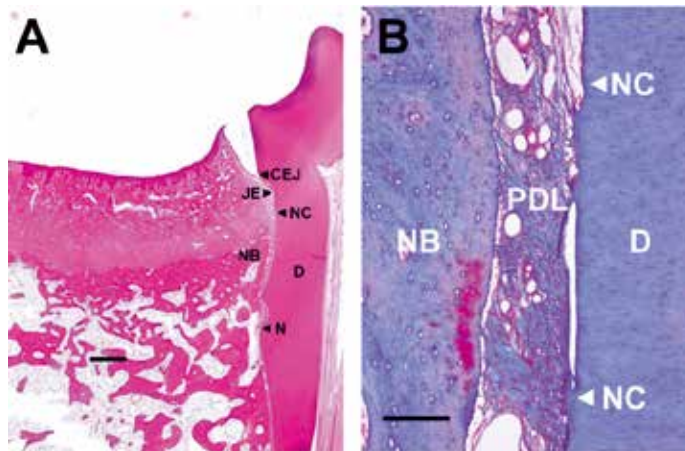


図12. BS 後の治癒像

(A)弱拡大像, 既存骨の吸収は抑制され新生骨形成が歯冠側に向けて認められる。(scale bar: 1mm) ヘマトキシリン・エオジン染色, (B)欠損中央部の強拡大像, 新生骨と細胞性セメント質間に斜走する歯根膜線維を伴う部分がある。(scale bar: 150 μ m) CEJ: セメントエナメル境, JE: 上皮の最根尖側, NB: 新生骨, NC: 新生セメント質, PDL: 歯根膜, N: 根尖部ノッチ, D: 象牙質, アザン染色 (文献49より引用改変)

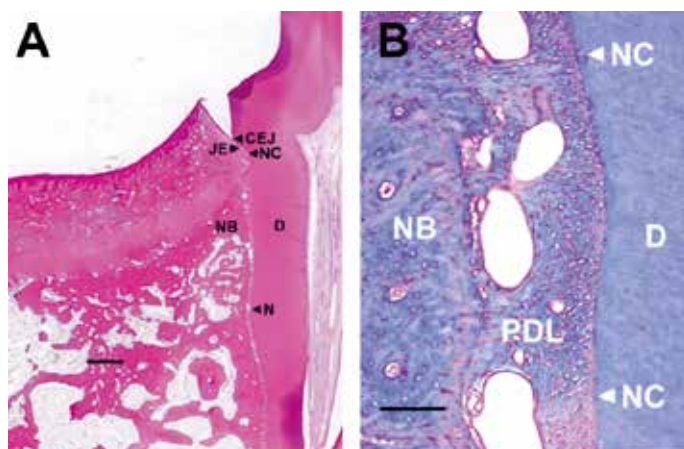


図13. EMD/BS 併用後の治癒像

(A) 弱拡大像, 既存骨の吸収は抑制され新生骨形成が歯冠側に向けて認められる。(scale bar: 1mm) ヘマトキシリン・エオジン染色, (B) 骨頂部の強拡大像, 新生骨と無細胞セメント質間に斜走する歯根膜線維が密に認められる。(scale bar: 150 μ m) CEJ: セメントエナメル境, JE: 上皮の最根尖側, NB: 新生骨, NC: 新生セメント質, PDL: 歯根膜, N: 根尖部ノッチ, D: 象牙質, アザン染色 (文献49より引用改変)

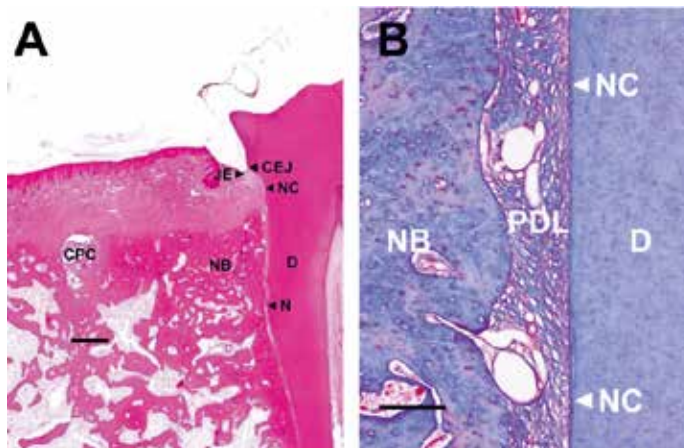


図14. EMD/BS/CPC 併用後の治癒像

(A) 弱拡大像, 既存骨の吸収が完全に抑制され著名な骨形成が認められる。(scale bar: 1mm) ヘマトキシリン・エオジン染色 (B) 骨頂部の強拡大像, 新生骨と無細胞セメント質間に斜走する歯根膜線維と血管が豊富に認められる。(scale bar: 150 μ m) CEJ: セメントエナメル境, JE: 上皮の最根尖側, NB: 新生骨, CPC: リン酸三カルシウムセメント, NC: 新生セメント質, PDL: 歯根膜, N: 根尖部ノッチ, D: 象牙質, アザン染色 (文献49より引用改変)

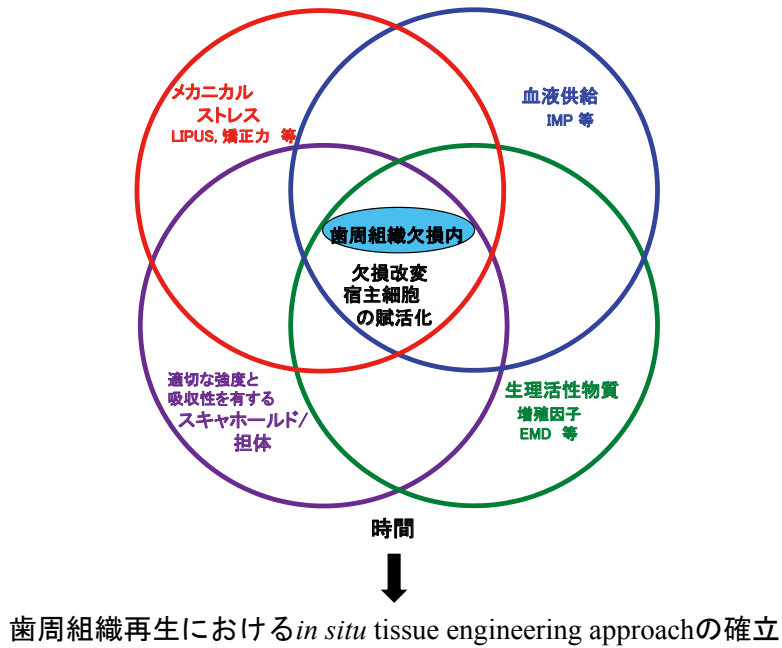


図15 歯周組織再生における *in situ* tissue engineering approach の概念図

表3. 各処置後の組織学的パラメータ— (平均± SD, mm/mm²)

	処置内容				統計学的有意差
	1 EMD	2 BS	3 EMD/BS	4 EMD/BS/CPC	
DH	4.97 ± 0.33	4.96 ± 0.46	5.02 ± 0.34	5.08 ± 0.40	NS
JE	0.05 ± 0.05	0.51 ± 0.20	0.20 ± 0.11	0.14 ± 0.10	1vs.2 1vs.3 2vs.3 2vs.4
CT	0.28 ± 0.16	0.52 ± 0.46	0.15 ± 0.14	0.13 ± 0.15	2vs.3 2vs.4
NB	3.32 ± 0.45	2.74 ± 0.33	2.88 ± 0.98	3.73 ± 0.30	2vs.4 3vs.4
NBA	3.68 ± 0.33	3.48 ± 1.26	3.38 ± 1.37	5.68 ± 1.66	1vs.4 2vs.4 3vs.4
NC	4.63 ± 0.42	3.93 ± 0.56	4.67 ± 0.30	4.78 ± 0.54	1vs.2 2vs.3 2vs.4

DH: 欠損高さ, JE: 上皮の深部増殖量, CT: 結合組織性接着 (セメント質なし), NB: 新生骨形成量, NBA: 新生骨面積, NC: 新生セメント質形成量, NS: 統計学的有意差なし (文献49より引用改変)

IV. おわりに

現在、種々多様な医用材料や歯周外科手技が開発されており、これらの臨床応用に際し、術者により異なった選択やアプローチもなされており治療成績に必ずしも一貫性が認められていない。現在、高い再現性と予知性を有し真の歯周組織再生を可能とする方法・材料は未だ確立されていないが、いかなる処置においても常に生物学的エビデンスの構築・検証とその深い理解を伴ったうえでの臨床が重要と考えられる。今後臨床に還元できる研究を推進すると同時に、日々の臨床の中から浮かび上がる clinical question を見逃さずさらに発展的な研究と予知性の高い歯周治療へと繋げていきたい。

参考文献

- Listgarten, M. A., Rosenberg, M. M.: Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol.* 50, 333-344, 1979
- Stahl, S. S., Froum, S. J., Kushner, L.: Healing responses of human intraosseous lesions following the use of debridement, grafting and acid toot treatment. II. Clinical and histologic observations: one year postsurgery. *J Periodontol.* 54, 325-338, 1983
- 安藤修：裏づけのある歯周再生療法 原理、原則に基づいた臨床のために 第2章 歯周組織の再生条件の重要性－骨内欠損の治療様式と再生条件－、初版、23-78、クインテッセンス出版株式会社、東京、2006
- Kim, C. S., Choi, S. H., Chai, J. K., Cho, K. S., Moon, I. S., Wikesjö U. M., Kim, C. K.: Periodontal repair in surgically created intrabony defects in dogs: influence of the number of bone walls on healing response. *J Periodontol.* 75, 229-235, 2004
- Tonetti, M. S., Lang, N. P., Cortellini, P., Suvan, J. E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmoussis, I., Mayfield, L., Rossi, R., Silvestri, M., Tiedemann, C., Topoll, H., Vangsted, T., Wallkamm, B.: Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol.* 29, 317-325, 2002
- Klein, F., Kim, T. S., Hassfeld, S., Staehle, H. J., Reitmeir, P., Holle, R., Eickholz, P.: Radiographic defect depth and width for prognosis and description of periodontal healing of intrabony defects. *J Periodontol.* 72, 1639-1646, 2001
- 白方良典 和泉雄一：臨床歯周病学 第3編 アドバンス編－専門的な歯周治療－第1章 骨移植術、初版、吉江弘正 伊藤公一 村上伸也 申 基喆 編、258-265、医歯薬出版、東京、2007
- Susin, C., Fiorini, T., Lee, J., De Stefano, J. A., Dickinson, D. P., Wikesjö, U. M.: Wound healing following surgical and regenerative periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 68:83-98, 2015
- Froum, S., Lemler, J., Horowitz, R., Davidson, B.: The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal osseous defect: Clinical decision tree based on biologic principle of regeneration. *Int J Periodont Rest Dent.* 21:437-449, 2001
- Cortellini, P., Tonetti, M. S.: Clinical concepts for regenerative therapy in intrabony defects. *Periodontol* 2000. 68: 282-307, 2015
- 白方良典, 吉元剛彦, 中村利明, 谷山勝義, 竹内尚士, 野口和行. 歯周組織再生療法の現状と今後の展望 鹿児島県歯科医師会会報, 679, 5-7, 2011
- Yoshinuma, N., Sato, S., Fukuyama, T., Murai, M., Ito, K.: Ankylosis of nonresorbable hydroxyapatite graft material as a contributing factor in recurrent periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 32, 331-336, 2012
- Constantz, B. R., Ison, I. C., Fulmer, M. T., Poser, R. D., Smith, S. T., VanWagoner, M., Ross, J., Goldstein, S. A., Jupiter, J. B., Rosenthal, D. I.: Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science.* 267 :1796-1799, 1995
- Shirakata, Y., Oda, S., Kinoshita, A., Kikuchi, S., Tsuchioka, H., Ishikawa, I.: Histocompatible healing of periodontal defects after application of an injectable calcium phosphate bone cement. A preliminary study in dogs. *J. Periodontol.* 73: 1043-1053, 2002
- Shirakata, Y., Setoguchi, T., Machigashira, M., Matsuyama, T., Furuichi, Y., Hasegawa, K., Yoshimoto, T., Izumi, Y.: Comparison of injectable calcium phosphate bone cement grafting and open flap debridement in periodontal intrabony defects: A randomized clinical trial. *J. Periodontol.* 79: 25-32, 2008
- Melcher, A.H.: On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 47: 256-260, 1976
- Mayfield, L., Soderholm, G., Hallstrom, H.,

- Kullendorff, B., Edwardsson, S., Bratthall, G., Bragger, U., Attstrom, R.: Guided tissue regeneration for the treatment of intraosseous defects using a bioabsorbable membrane: A controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 25: 585-595, 1998
- 18) Needleman, I., Tucker, R., Giedrys-Leeper, E., Worthington, H.: Guided tissue regeneration for periodontal intrabony defects: A Cochrane Systematic Review. *Periodontol 2000.* 37: 106-123, 2005
- 19) Schüpbach, P., Gaberthüel, T., Lutz, F., Guggenheim, B.: Periodontal repair or regeneration: structures of different types of new attachment. *J Periodontol Res.* 28: 281-293, 1993
- 20) Araújo, M., Berglundh, T., Lindhe, J.: The periodontal tissue in healed degree III furcation defects: An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 23: 532-541, 1996
- 21) Bosshardt, D. D.: Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol.* 35: 87-105, 2008
- 22) Froum, S. J., Weinberg, M. A., Rosenberg, E., Tarnow, D.: A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry study. *J Periodontol.* 72: 25-34, 2001
- 23) Sculean, A., Donos, N., Blaes, A., Lauemann, M., Reich, E., Brex, M.: Comparison of enamel matrix protein and bioabsorbable membrane in the treatment of intrabony periodontal defects. A split-mouth study. *J Periodontol.* 70: 255-262, 1999
- 24) Pontoriero, R., Wennström, J., Lindhe, J.: The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled study. *J Clin Periodontol.* 26: 833-840, 1999
- 25) Hammarström, L.: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol.* 24: 658-668, 1997
- 26) Shirakata, Y., Taniyama, K., Yoshimoto, T., Miyamoto, M., Takeuchi, N., Matsuyama, T., Noguchi, K.: Regenerative effect of basic fibroblast growth factor on periodontal healing in two-wall intrabony defects in dogs. *J Clin Periodontol.* 37: 374-381, 2010
- 27) Kalpidis, C. D., Ruben, M.P.: Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol.* 73, 1360-1376, 2002
- 28) Sanz, M., Tonetti, M. S., Zabalegui, I., Sicilia, A., Blanco, J., Rebelo, H., Rasperini, G., Merli, M., Cortellini, P., Suvan, J. E.: Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or barrier membranes: results from a multicenter practice-based clinical trial. *J Periodontol.* 75: 726-733, 2004
- 29) Urist, M. R.: Bone formation by autoinduction. *Science.* 150: 893-899, 1965
- 30) Wikesjö, UME., Selvig, K. A.: Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000.* 19: 21-39, 1999
- 31) Takahashi, D., Odajima, T., Morita, M., Kawanami, M., Kato, H.: Formation and resolution of ankylosis under application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) to class III furcation defects in cats. *J Periodontol Res.* 40: 299-305, 2005
- 32) Murakami, S.: Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy?. *Periodontol 2000.* 56: 188-208, 2011
- 33) Kitamura, M., Akamatsu, M., Kawanami, M., Furuichi, Y., Fujii, T., Mori, M., Kunimatsu, K., Shimauchi, H., Ogata, Y., Yamamoto, M., Nakagawa, T., Sato, S., Ito, K., Ogasawara, T., Izumi, Y., Gomi, K., Yamazaki, K., Yoshie, H., Fukuda, M., Noguchi, T., Takashiba, S., Kurihara, H., Nagata, T., Hamachi, H., Maeda, K., Yokoto, M., Sakagami, R., Hara, Y., Noguchi, K., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Ohmae, M., Koizumi, H., Watanuki, M., Murakami, S.: Randomized placebo-controlled and controlled non-inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth factor 2, and enamel matrix derivative in periodontal regeneration in intrabony defects. *J Bone Miner Res.* doi:10.1002/jbmr. 2738, 2015
- 34) Polimeni, G., Koo, K. T., Qahash, M., Xiropaidis, A. V., Albandar, J. M., Wikesjö, U. M.: Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of a space-providing biomaterial on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 31: 725-729, 2004
- 35) Siciliano, V. I., Andreuccetti, G., Siciliano, A. I., Blasi, A., Sculean, A., Salvi, G. E.: Clinical outcomes after

- treatment of non-contained intrabony defects with enamel matrix derivative or guided tissue regeneration: a 12-month randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 82: 62-71, 2011
- 36) Guida, L., Annunziata, M., Belardo, S., Farina, R., Scabbia, A., Trombelli, L.: Effect of autogenous cortical bone particulate in conjunction with enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intraosseous defects. *J Periodontol.* 78: 231-238, 2007
- 37) Yilmaz, S., Cakar, G., Yildirim, B., Sculean, A.: Healing of two and three wall intrabony periodontal defects following treatment with an enamel matrix derivative combined with autogenous bone. *J Clin Periodontol.* 37: 544-550, 2010
- 38) Nevins, M., Giannobile, W. V., McGuire, M. K., Kao, R. T., Mellonig, J. T., Hinrichs, J. E., McAllister, B. S., Murphy, K. S., McClain, P. K., Nevins, M. L., Paquette, D. W., Han, T. J., Reddy, M. S., Lavin, P. T., Genco, R. J., Lynch, S. E.: Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol.* 76: 2205-2215, 2005
- 39) Bosshardt, D. D., Sculean, A.: Does periodontal tissue regeneration really work?. *Periodontol 2000.* 51: 208-219, 2009
- 40) Langer, R., Vacanti, J. P.: Tissue engineering. *Science.* 260: 920-926, 1993
- 41) Griffith, L. G., Naughton, G.: Tissue engineering -current challenges and expanding opportunities. *Science.* 295: 1009-1014, 2002
- 42) Kim, S. H., Kim, K. H., Seo, B. M., Koo, K. T., Kim, T. I., Seol, Y. J., Ku, Y., Rhyu, I. C., Chung, C. P., Lee, Y. M.: Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol.* 80: 1815-1823, 2009
- 43) Duan, X., Tu, Q., Zhang, J., Ye, J., Sommer, C., Mostoslavsky, G., Kaplan, D., Yang, P., Chen, J.: Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol.* 226: 150-157, 2011
- 44) Yu, X., Ge, S., Chen, S., Xu, Q., Zhang, J., Guo, H., Yang, P.: Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells contribute to periodontal regeneration in beagle dogs. *Cells Tissues Organs.* 198: 428-437, 2013
- 45) Chen, F. M., Zhang, J., Zhang, M., An, Y., Chen, F., Wu, Z. F.: A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials.* 31, 7892-7927, 2010
- 46) Tamaki, Y., Nakahara, T., Ishikawa, H., Sato, S.: In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology.* 101, 121-132, 2013
- 47) Gould, T. R., Melcher, A. H., Brunette D. M.: Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodontol Res.* 15, 20-42, 1980
- 48) Seo, B. M., Miura, M., Gronthus, S., Burtold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y., Shi, S.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 364, 149-155, 2004
- 49) Shirakata, Y., Yoshimoto, T., Takeuchi, N., Taniyama, K., Noguchi, K.: Effects of enamel matrix derivative in combination with bone swaging and calcium phosphate bone cement on periodontal regeneration in one-wall intrabony defects in dogs. *J Periodontol Res.* 48, 37-43, 2013
- 50) Crea, A., Deli, G., Littarru, C., Lajolo, C., Orgeas, G. V., Tatakis, D. N.: Intrabony defects, open-flap debridement, and decortication: a randomized clinical trial. *J Periodontol.* 85, 34-42, 2014
- 51) Burger, E. H., Klein-Nulend, J.: Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res.* 13, 93-98, 1999
- 52) Nemcovsky, C. E., Beny, L., Shanberger, S., Feldman-Herman, S., Vardimon, A.: Bone apposition in surgical bony defects following orthodontic movement: a comparative histomorphometric study between root- and periodontal ligament-damaged and periodontally intact rat molars. *J Periodontol.* 75, 1013-1019, 2004
- 53) Padilla, F., Puts, R., Vico, L., Raum, K.: Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics.* 54, 1125-1145, 2014
- 54) Hu, B., Zhang, Y., Zhou, J., Li, J., Deng, F., Wang, Z., Song, J.: Low-intensity pulsed ultrasound stimulation facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *PLoS One.* 9, e95168, 2014