

歯科口腔外科における顎骨再生療法の動向について

京都第二赤十字病院 歯科口腔外科

猪田 浩理

要旨：組織再生技術の発達はめざましく、歯科口腔外科領域においては骨再生療法に関する研究が注目を浴びている。骨欠損部を修復するためには、骨移植、人工材料の使用が一般的である。骨再生療法の発達はリコンビナント技術と細胞培養技術の発達によってもたらされた。細胞増殖因子は細胞増殖と分化を誘導することで創部治癒を促進する能力を有している。特に骨形成タンパク（BMP）の存在、3次元細胞培養の技術は臨床における骨再生療法の将来的な向上に寄与すると考えられる。今回は最近の骨再生療法の動向について報告を行う。

Key words：骨再生療法、骨形成タンパク、3次元培養

はじめに

歯科医療において、今後に多くの注目を浴びる分野として、顎骨再生療法への取り組みが考えられる。これは歯周病などで歯の喪失後や顎骨腫瘍切除後の顎骨形態回復は、その後の補綴治療（人工材料で歯牙構造を再構築すること）において極めて有利な選択肢を求めることができる。しかし、今までの歯科医学における生物学的なアプローチは細菌学や免疫学に向けられていたが、近年は再生医療分野からの研究発表も充実してきた。今回は、近年の歯科口腔外科領域における骨再生療法の基礎、及び臨床応用の可能性について報告を行う。

歯科領域における骨再生療法の必要性

歯科治療の最終ゴールは、疾患によって喪失した歯の機能を取り戻し、咀嚼と発音機能を回復することにある。再生医療研究の最前線では、幹細胞から歯胚の分化誘導が可能であることが明らかになってきたが、生体器官としての再現性を得るためには程遠い道のりである。しかし、顎骨再生療法については、臨床応用に強い期待を持てる可能性もあり、今後のさらなる展開が待たれる。

1) 顎骨再生医療の需要背景

動物が歯牙喪失になると捕食機能を喪失したと同じであり、生命維持の危機に瀕する。ヒトは仮に歯牙喪失しても、摂食形態を変えることで栄養摂取を持続できる。さらに補綴治療（喪失した歯牙を人工材料によって機能回復する歯科専門分野）を行うことで歯牙喪失前の機能に回復する手段を有する。歯科学の最終ゴールには、いわゆる“アンチエイジング”の概念で歯牙喪失を防ぐこと、つまり、う蝕や歯周病による組織損傷をコントロールしながら加齢を重ねていく考え方がある。もう一方では喪失した歯牙の機能を材料学や生物学を駆使して、機能を回復させる考え方である。

近年、前者に関する分野は開拓されつつあり、患者の予防観念習得のためコミュニケーション手法も取り入れながら発達している。顎骨再生医療への需要は後者の考え方であり、歯牙喪失後の機能回復を図る際に、治療選択肢に多様性を付与する上で不可欠な方法となってきた。特に、歯周病で喪失した歯周支持組織、歯槽骨の回復、腫瘍や外傷にて生じた顎骨骨欠損を回復すれば、精度の高い補綴物装着や咀

嚙機能の回復が期待できる。

2) 顎骨再生医療の歴史

歯科学の発展は材料、形態、細菌に関するキーワードで括られてきたイメージが強い。歯周病によって喪失された骨組織を回復する必要性は、以前より認識されていたものの、細菌学的なコントロールを加えることで、歯牙喪失時期を遅らせることが主たるコンセプトであった。また、人工材料を用いて骨欠損部を置換する発想も用いられていたが、組織親和性の低さや創部易感染性などの問題があり、応用性に乏しい手法であった。

いわゆる生物学的な手として、失われた骨組織を獲得する目的で最初に紹介されたのが GTR (Guided Tissue Regeneration) 法, GBR (Guided Bone Regeneration) 法であった。これは生体親和性のある人工膜を骨欠損部に設置し、骨欠損部へ創部治癒過程で発生する線維性組織の侵入を防ぎ、骨芽細胞が遊走しやすい状態を作り出すことで、骨組織再生を促す方法であった。一方、この方法は骨欠損形態によって奏効結果に差があることや、骨組織再生のための待機期間中の局所感染への注意が必要など、実用性に乏しい背景も有していた。これらの組織再生の方法は生体固有の治癒過程を利用するものであったが、1980 年代になってからは細胞増殖因子 (Growth factor: GF) による硬組織再生を目指す考え方が報告されるようになった。

3) 骨組織分化誘導概念による顎骨再生

骨組織再生においてもっとも中心的な役割を果たしているのは BMP (Bone Morphogenic Protein) である。この存在を最初に指摘したのは整形外科医の Urist¹⁾であった。BMP はその発見を機会に、骨組織の治癒、再生に対しての関与の他、発生学的にも個体の体軸形成をコントロールする役割も果たしていることが明らかになった。現在は BMP スーパーファミリーとして詳細が判明しており、骨芽細胞に分化誘導能を最も強く発揮するのは BMP2 とされている。一方、BMP は骨肉腫などの悪性腫瘍発生にも関与しており、臨床応用を目指すには BMP の分化誘導能をコントロールし、治療目的に応じた組織再生を誘導する方法、そして未知の生体為害性が存在する可能性を推測することが課題となる。

顎骨再生療法実現への取り組み

筆者が過去に関った研究などを含めて、顎骨再生療法に関する現状と今後の方向性について以下に述べる。

1) 顎骨再生療法コンセプトの明確化

歯科一般治療、口腔外科の診療では骨組織再生療法の需要は多くの場面で見られる。比較的小さな骨再生療法の需要としては、歯周病によって喪失した歯槽骨の回復がある。この場面で骨再生療法が応用できたなら、将来の最終補綴物に義歯ではなく、インプラント治療が選択肢に加わることになる。腫瘍切除によって生じた顎骨欠損においては、人工材料や遊離骨移植によって骨の機能的構造は回復できるが、骨再生療法が応用できれば審美的な治療ゴールが目指せる。いわば骨再生療法の応用は治療ゴールの選択肢を増やすことにつながる。

特に最近では歯科医療の中においてもアンチエイジングの概念が浸透しつつあり、歯牙喪失の大きな理由となる歯周病進行による骨喪失は、その後の治療方針決定に大きく作用し、失われた骨の回復を目指す骨再生療法の研究は極めて重要である。

2) 顎骨再生における“Tissue engineering”をめざして：増殖（Proliferation）から分化誘導（Differentiation）へ

①人工材料の応用

骨再生を達成するために最初に用いられる概念は増殖（Proliferation）である。これは従来の自然治癒進行の延長上に理想的な再生骨量を獲得する考え方であり、材料学的には良好な細胞増殖足場媒体（Scaffold）を作り出すことで、骨再生を促すことができる。

HAP（Hydroxyapatite）は本来の生体親和性が高いことを基盤として、表面多孔性を増やすことで骨接触面積を増加させ、さらに孔のサイズを調整することで人工材料内への良好な細胞侵入を促がせるようになった。この HAP は顎骨補填材として当初は需要の高い材料であったが、口腔内の創部は極めて感染のリスクにさらされやすい背景もあり、長期にわたる定着性に問題を有していた。

その後に HAP のいくつかの問題点を克服して登場したのが β TCP（Tricalcium Phosphate）である。当科でも顎骨補填材として使用する場合に本材を使用している（図 1）。本材は良好な生体親和性を有し、吸収置換性に骨再生を誘導することに HAP とは違った特性を発揮する。骨再生は最終的には形態的、機能的な回復はもとより、欠損した骨組織がその生体固有の骨組織で再生することが理想的である。

②細胞成長因子（Growth Factor）の作用を応用

・ PDGF（Platelet Derived Growth Factor）

生体内で組織修復がなされる際には、GF による細胞の増殖作用（Proliferation）と分化誘導作用（Differentiation）がその過程にて発揮され、相互的かつ適正な制御下にて治癒完了まで作用する。一方、これらの制御が破綻した状態は腫瘍的变化を起こす可能性がある。GF の作用には各因子によって特殊性があり、特に骨芽細胞の増殖作用を発揮するものとして、血小板内に含まれる PDGF がよく知られている。PDGF に PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB があり、特に PDGF-BB の増殖作用が優れている。

PDGF の作用を臨床の場において、簡易的に応用する方法を示したのが Marx²⁾らによって紹介された PRP（Platelet Rich Plasma）である。PRP は採取した血液を遠心分離操作を行い、血小板浮遊層をとり出し、術野で操作しやすいようにするためゲル化したものである（図 2）。血小板の凝集体であるため、

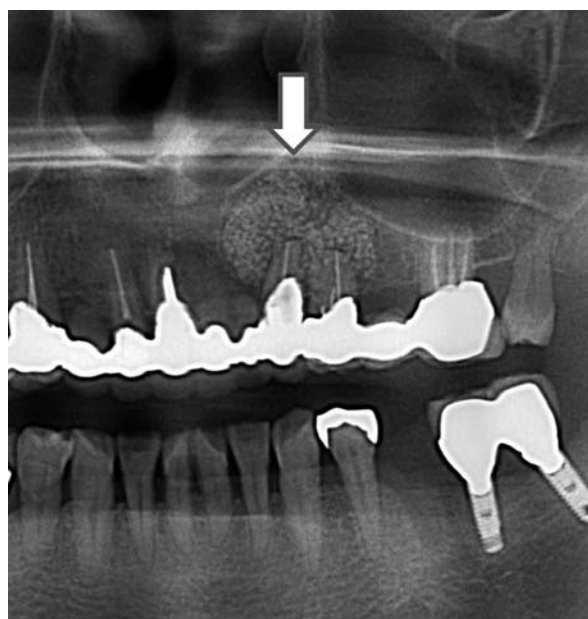


図 1 上顎骨嚢胞摘出後に β TCP を填入した症例。下顎骨は良好な骨再生が期待できるが、上顎骨はその傾向が乏しいため、症例によって β TCP を使用している。

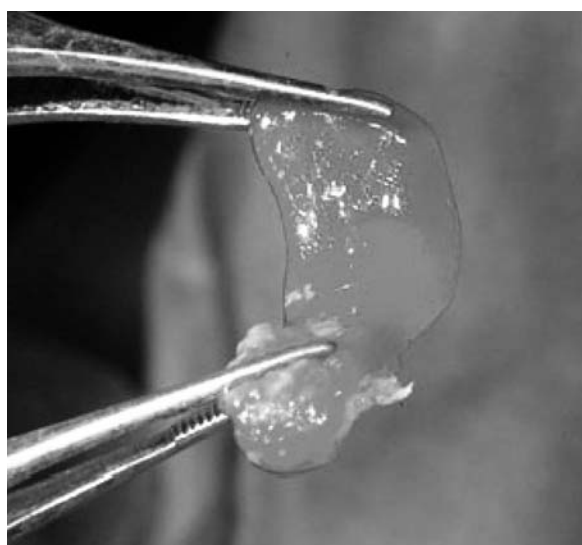


図 2 手術対象患者の自己血に遠心分離処理操作を加え、ゲル化した PRP。ピンセットで把持できる状態になる。

内部に存在する PDGF の増殖作用が期待できるとする考え方である。これは手術を行う同一個体より採取した血液から作成するため、感染などの危険性がないことが利点である。歯科領域では、歯周病のよって喪失した組織再生や、顎骨欠損の骨再生に臨床応用されてきた。ただし *in vitro* の実験においては、PDGF などの GF がその増殖作用を発揮できるのは、極めて高い濃度で骨芽細胞に暴露された条件下である。PRP 中の血小板数は通常血液の数倍の凝集であるため、その作用の発揮については今後も検証の余地があると考えられるが、臨床的な高い評価を支持する報告もある³⁾。

・BMP (Bone Morphogenic Protein)

BMP は生体内の硬組織に存在し、主に骨折などの修復時にその作用を発揮する。また、骨肉腫などにおいては過剰発現が見られるが、全体的には骨組織の恒常性維持に大きな役割を果たしている。BMP の存在は、脱灰処理した骨組織を軟組織中に移植すると、そこに異所性に新生骨が発生することにより、存在が明らかになってきた。つまり、脱灰骨の中に BMP があり、軟組織中の細胞を骨芽細胞に分化誘導することで骨組織が発生すると考えられた。その後は BMP のサブタイプ分類も明らかになっている。

BMP の存在は骨再生医療の方向性を大きく決定づけるように思われたが、骨組織から BMP を抽出することは極めて困難であり、生物学的作用を期待するには、抽出するための莫大な材料が必要であった。しかし、その後リコンビナント技術（大腸菌などの遺伝子を組み込んで目的とするタンパク質を作り出す）が発達し、精製された BMP を用いることができるようになった。そこで、筆者らは BMP を用いて同一個体の体内に移植して、筋組織内の幹細胞を骨組織に分化誘導する方法で、組織分化誘導骨 (Tissue Engineered Bone: TEB) の形成をラットを用いて試みた⁴⁻⁶⁾。

TEB は BMP2 をアテロコラーゲン（臨床の現場でも使用されている材料）に特殊処理下にて浸透させて運搬体をつくり、ラットの腹直筋内に移植して形成させる。9 週間経過すると、筋肉組織内の幹細胞などから骨組織が形成され、移植骨として使用可能な形状と物性を有する。TEB は BMP の運搬体として利用したアテロコラーゲンと BMP 以外は、すべて同一個体由来のものから形成されている点が大きな特徴である。図 3 は TEB の形成過程を示し、移植後 3 週間で明らかな骨組織の発生が確認できる。この時には運搬体表面（生体と接触する面）より軟骨内骨化にて骨形成が進行し、TEB 収穫時の移植後 9 週には骨組織は成熟している。

BMP は骨基質に含まれ、骨芽細胞、前骨芽細胞によって分泌される。特に骨修復進行時、骨発達時には多くの BMP が集積している可能性がある。そこで、TEB を頭蓋骨に移植した際に、母床骨（固有の骨組織）からの骨伝導能を比較し、移植骨としての特性を評価した。移植骨に求められることとして、速やかな母床骨からの骨伝導能と、その後の組織安定性である。筆者らは、現状の臨床的手法として用いられている自家骨、凍結他家骨移植と TEB 移植による骨伝導能を評価した。その結果、TEB は自家骨、凍結他家骨と比較して、有意に高い骨伝導能を示した。いわば TEB は胎生期の骨組織に類似した高い生物学的活性を有し、BMP を移植部に自ら分泌し、供給できる性質も有するため、従来の移植骨より良好な結果が得られたと考えている（図 4）。

臨床応用を念頭に入れると、紹介した実験のように筋組織内が TEB の形成誘導部位としては適切である。筋組織は幹細胞が脂肪組織と比較して多く含まれており、体表に近い部位であるなどの

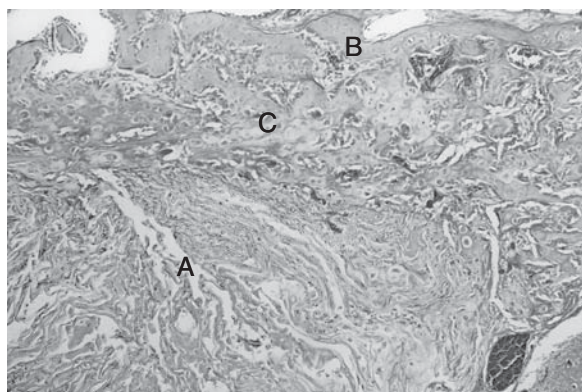


図 3 筋組織内に移植された BMP の効果により、軟骨内骨化をへて TEB が形成される。写真は TEB 形成開始後 3 週。（HE 染色，A：BMP を封入したアテロコラーゲン，C：軟骨細胞，B：新生骨）

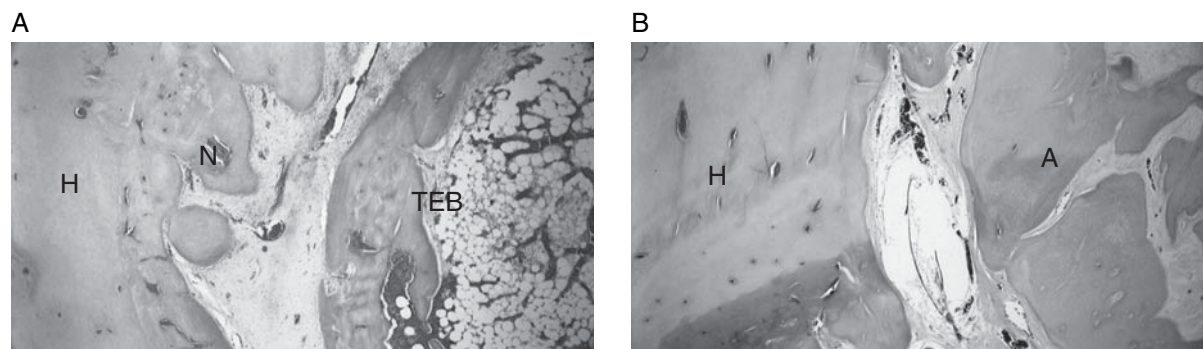


図4 骨欠損部にTEB移植(A), 自家骨移植(B)6週間後。TEB移植において、移植骨と母床骨の隙に速やかな骨新生が確認できる。(HE染色, TEB:組織分化誘導骨, H:母床骨, N:骨新生, A:自家移植骨)

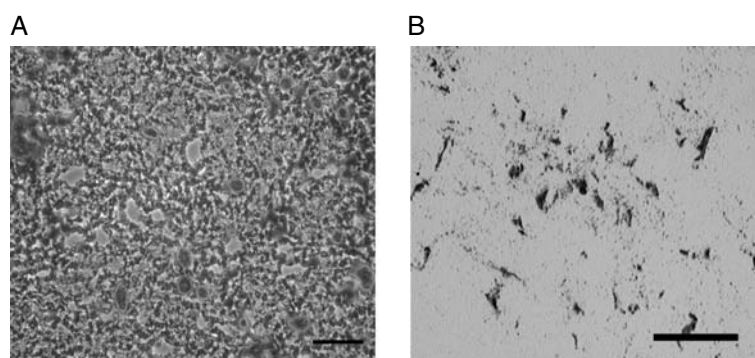


図5 3次元培養骨の免疫組織化学染色写真:AはARS染色,Bはvon Kossa染色,バーは100 μm . 培養開始から3週後の染色状態を示す。両染色ともに陽性部位は石灰化が進行していることを示す。【本写真は眞岡(旧姓日高)美代子先生より提供】

点で有利である。しかし、ヒトの生体内で同様の生物学的操作を行うためには、大量のBMP2が必要であること、使用部位によっては軟組織腫脹を発生させてしまうことなどの問題点が存在する。そこで、レプチンなどの他因子との相互作用にて、BMP2の活性を増強する様な方向性が探索されている。

③3次元培養骨作製を目指して

臨床応用時に安全で、形態制御が可能な骨再生を実現することを目的として、現在、最も実現性の高い方法は、対象個体の幹細胞を収集し、培養増殖の上で骨組織に分化させる発想である。細胞は平面的には増殖できるが、骨は立体的な構造が必要である。平面的な細胞増殖による組織誘導は可能であるが、骨組織では重力に逆らって、立体的に培養された細胞集合体を作り上げなければならない。現状では平面的な細胞培養技術にて、皮膚組織については臨床応用されているが、骨組織においては確実な3次元培養手法が開発されない限り実現は不可能である。

そこで、従来のような平面状態の細胞培養方法ではなく、3次元的に培養細胞を分布させる方法として考え出されたのが、Rotary three-dimensional culture systemである。これは細胞培養を低速回転する容器内で継続し、細胞が定着する足場媒体に立体的に細胞が分布するような状態を作り出すことができる(図5)。その方法を用いて、前骨芽細胞を可塑性を有するコラーゲンなどの足場媒体に浸潤させ、培養骨として生体内の骨欠損部に移植し、同部の骨再生を図る方法が最も実現性が高い。

立体的な足場媒体に前骨芽細胞などを内部にまんべんなく浸潤させるには、いくつかの問題がある。第一に足場媒体の表層には簡単に細胞は浸潤するものの、内部まで浸潤させるための材料が選定されなければならないこと。第2に足場媒体の深部に細胞が侵入できたとしても、細胞が生存するに足る酸素や栄養の供給状態が維持できる条件の確保。第3には、培養骨を生体内に移植した際に、その後の組織再生が進行しうる細胞密度を確保しておかなければならない。応用性を高めるためには、これら3点

の課題を克服していく必要がある。培養骨としての生物学的活性を有するためには、Warren⁷⁾らは $1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ cells/mL 以上の細胞集積密度を達成することが必要であると述べている。

Su⁸⁾らはラットの頭蓋骨由来の前骨芽細胞に3次元培養手法を用いて、ディスク状の足場媒体中に細胞が生存した状態で定着できることを証明した。さらに Hidaka⁹⁾らはこの前骨芽細胞を定着させた培養骨を生体内に移植し、骨組織の発生誘導が可能であることを証明した。今後の臨床応用にあたっては、足場媒体中の良好な細胞集積状態を作り出す方法が確立できれば、実現の可能性が高くなってくると考えられる。

ま と め

今後の再生医療の在り方を決定づける iPS 細胞の獲得手法の発見など、ES 細胞の獲得手法発見以来、再生医療は未分化細胞を大量に獲得し、そこから目標とする臓器への分化誘導を目指す方向にあると考えられる。しかし、これらの手法は大きな立体構造が求められない平面的な臓器においてその実現が先行すると考えられる。一方、骨は立体的構造が求められ、培養した細胞が定着できる足場構造の確立と、何より重力に逆行して細胞培養を3次元的に実現できる手法の確立が望まれる。本誌上で紹介した発想はその点では、道半ばではあるが、応用性においては一つの選択肢と考える。歯科口腔外科領域でも顎骨組織再生が叶えば、歯周病進行による歯牙喪失の可能性低下や、安全なインプラント治療の顎骨条件向上など、加齢における咀嚼機能の維持に貢献できると考えられる。

謝辞

筆者が骨再生をテーマにした研究に関する機会をいただき、指導をいただきました滋賀医科大学医学部歯科口腔外科学講座 山本学教授、この度の本文執筆にあたり3次元培養骨の写真を提供していただきました眞岡（旧姓日高）美代子先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Urist MR. Bone-formation by autoinduction. Science 1965; **150** (3698): 893-899.
- 2) Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; **85**: 638-646.
- 3) Faratzis G, Leventis M, Chrysomali E, et al. Effect of autologous platelet-rich plasma in combination with a biphasic synthetic graft material on bone healing in critical-size cranial defects. J Craniofac Surg 2012; **23**: 1318-1323.
- 4) Inoda H, Yamamoto G, Hattori T. Histological investigation of osteoinductive properties of rh-BMP2 in a rat calvarial bone defect model. J Craniomaxillofac Surg 2004; **32**: 365-369.
- 5) Inoda H, Yamamoto G. Histological study of osteoinduction by rh-BMP2 in bone defect of rat calvaria. Proc 5th Int Congr Maxillofac Rehab 2002: 148.
- 6) Inoda H, Yamamoto G, Hattori T. rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. Int J Oral Maxillofac Surg 2007; **36**: 39-44.
- 7) Warren LG, Sarindr B, Christopher C. et al. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. Tissue Eng Part A 2008; **14**: 1809-1820.
- 8) Su GNC, Hidata M, Kimura Y, et al. In situ collagen gelatin: a new method for constructing large tissue in rotary culture vessels. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2003; **39**: 368-374.
- 9) Hidaka M, Su GNC, Chen JKH, et al. Transplantation of engineered bone tissue using a rotary three-dimensional culture system. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2007; **43**: 49-58.

Recent trends in bone regeneration in the field of oral and maxillofacial surgery

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kyoto Second Red Cross Hospital
Hirosato Inoda

Abstract

There has been outstanding development in the methods of tissue regeneration. In the field of oral and maxillofacial surgery, the method of bone regeneration is gaining attention. Bone grafts are implanted to repair bone defects. Recombinant protein production and tissue culture techniques have also contributed to bone regeneration methods. Growth factor can accelerate wound healing by cell proliferation or differentiation. Three-dimensional tissue culture and osteoinductive techniques by using bone morphogenic protein (BMP), in particular, has inspired the next stage of bone regeneration for creating clinical alternatives. Herein, we have reported the recent trends in bone regeneration and their application in bone defect repair.

Key words : Bone regeneration, Bone morphogenic protein, Three-dimensional culture