

学位研究紹介

組織工学的に作製された培養骨膜シートと多血小板血漿およびハイドロキシアパタイト顆粒混合物を移植した歯周組織再生法

Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects

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

山宮かの子

Division of Periodontology,  
Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

Kanoko Yamamiya

【緒言と目的】

失われた組織を再生させるためには、組織工学的コンセプトが必要である。すなわち（幹）細胞、細胞の足場、細胞増殖因子の3要素に加えて、そこに適切な環境と時間が関与することが必要である。われわれはこれまでに歯周炎により破壊された骨欠損の再生を期待して、増殖因子として多血小板血漿（PRP）、足場としてハイドロキシアパタイト顆粒（HA）を選択し、それらの複合体移植がHA単独移植と比較してポケット減少量、付着の獲得量について統計学的に有意差を持って有効であることを報告した。これは増殖因子と足場の2要素を押さえた治療法が、足場だけを確保するHA単独移植の治療法に比較して良好な結果を導いたと思われる。しかし、骨再生効果については対照群と比較して有意差は得られなかったことから、残された要素である“骨形成能を有した細胞移植の添加”が必要とされた。一方、水野・上田らは動物実験において骨膜組織の小片を採取し培養骨膜シートを作製することに成功し、これに含まれる細胞およびシート自体に骨形成能を有していることを報告した。さらにイヌ下顎骨より骨膜組織を採取して培養骨膜シートを作製して、同イヌに人工的に作製した下顎第三小臼歯のⅢ級分岐部病変に応用したところ、分岐部欠損を完全に覆うように骨が新生していることを確認した。そこで今回、歯周炎により破壊されたヒトの骨内欠損に

対して培養骨膜シート+PRP+HAを移植して、その予後経過1年のデータについてケースコントロールスタディを行ったので報告する。

【材料と方法】

培養骨膜シートおよびPRP+HA複合体作製法：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、5mmx5mmの骨膜小片を採取後、直ちにウシ胎児血清（10%）、各種抗生物質（1%）、アスコルビン酸（25μg/ml）を含むMedium199にて培養シャーレ上で6週間培養してシート状構造物を得た。PRP+HA複合体の調整については、患者末梢血8.5mlから2回の遠心分離により0.6mlのPRPを調整し、このうちPRP0.3ml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、0.5mgのHAと混和させた。

被験者：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6mm以上のポケット（PD）と6mm以上の付着レベル（CAL）、規格エックス線写真より3mm以上の骨内欠損深さ（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「培養骨膜シート+PRP+HA」群と「PRP+HA群」の2群、各15部位ずつに分けた。

治療法：当該被験歯の隣接歯に及んで歯肉溝切開を加え全層弁にて剥離し徹底的なデブライドメントを行った。PRP+HA複合体を移植し、さらにその上から培養骨膜シートをPRP+HA複合体を完全に覆うように静置し歯肉弁を復位させた。縫合、歯周包帯をして2週間後に抜糸した<sup>1)</sup>。

評価項目：炎症評価としてプラーク指数（PII）、歯肉

表1 炎症改善評価

	ベースライン	12か月目	P
PII（平均±標準偏差）			
培養骨膜シート+PRP+HA	0.2±0.4	0.0±0.0	NS
PRP+HA	0.1±0.3	0.0±0.0	NS
P	NS	NS	
GI（平均±標準偏差）			
培養骨膜シート+PRP+HA	0.7±0.7	0.0±0.0	<0.01
PRP+HA	0.8±0.7	0.1±0.3	<0.01
P	NS	NS	
BOP（平均±標準偏差）			
培養骨膜シート+PRP+HA	0.9±0.4	0.0±0.0	<0.01
PRP+HA	0.9±0.4	0.2±0.4	<0.01
P	NS	NS	

NS = not significant (P > 0.05)

炎指数 (GI), プロービング時の出血 (BOP) を測定し, 臨床改善評価としてポケット深さ (PD), 付着レベル (CAL), エックス線写真から計測した骨欠損深さ (IBD), および vertical relative attachment gain (V-rAG) を計測した。評価はステントおよびバイトブロックを用いて半規格化して測定した。ベースラインおよび12か月目の「培養骨膜シート+PRP+HA」群と「PRP+HA群」のデータに対して群間比較 (Mann-Whitney U test) および群内比較 (Wilcoxon signed-rank matched-pair test) を行い統計学的に検討を加えた。

## 【結 果】

術前・術後の観察期間を通じてすべての症例について厳密な口腔内清掃プログラムにより管理を行ったため手術結果にプラーク細菌による炎症の影響はきわめて少なかった (表1)。臨床改善評価は表2に示すように術前の歯周ポケット深さおよび付着レベルは培養骨膜シート群で7.7mm, 8.1mm, 対照群で7.6mm, 8.0mmであった。また術中に計測した骨欠損深さ (INFRA) は培養骨膜シート群で4.8mm, 対照群で4.7mmであった。歯周ポケットの減少量は培養骨膜シート群で4.8mm, 対照群で4.3mmで両群間に差はなかった。しかし付着の獲得量については培養骨膜シート群で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。さらに歯槽骨の再生量およびV-rAGも培養骨膜シート群で有効な改善量がみられた (4.9mm vs 3.2mm, 84% vs 55%)<sup>2)</sup>。

## 【結論および考察】

以上の結果より培養骨膜シートの付加的な歯周再生効

果が臨床的に明らかとなった。移植直前の骨膜シートの免疫組織標本からはシートに固着した中心部から拡散するようにアルカリホスファターゼ活性陽性所見がみられ, フォンコッサ染色でもアルカリホスファターゼ陽性部位と一致するように石灰化している所見を確認した。さらにRT-PCR解析からはI型コラーゲン, アルカリホスファターゼ, オステオカルシン, オステオポンチンのmRNAが上昇していることを確認した。このことは培養骨膜シートに含まれる細胞は骨原性能力を有していることを意味する。さらに厚さは薄いながらも張力に富んだシート性状は上皮の深部増殖に対する遮断膜として, また増殖因子の徐放体として作用していることも想像される。

## 【文 献】

- 1) 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 of Periodontol: 11: 206-213, 2009.
- 2) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H: Tissue engineered 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: 811-813, 2008.

表2 臨床改善評価

	ベースライン	12か月目	P	Δ (ベースライン-12か月目)	P
PD (mm: 平均 ± 標準偏差)					
培養骨膜シート+PRP+HA	7.7±1.1	2.9±0.4	<0.01	4.8±1.1	NS
PRP+HA	7.6±1.1	3.3±1.0	<0.01	4.3±1.1	
P	NS	NS			
CAL (mm: 平均 ± 標準偏差)					
培養骨膜シート+PRP+HA	8.1±1.2	4.1±1.2	<0.01	3.9±1.6	<0.05
PRP+HA	8.0±1.3	5.3±1.5	<0.01	2.7±1.3	
P	NS	<0.05			
IBD (mm: 平均 ± 標準偏差)					
培養骨膜シート+PRP+HA	5.3±1.1	0.4±0.9	<0.01	4.9±1.2	<0.01
PRP+HA	4.9±1.4	1.7±1.2	<0.01	3.2±1.1	
P	NS	<0.01			
V-rAG (%: 平均 ± 標準偏差)					
培養骨膜シート+PRP+HA		83.5±31.7			
PRP+HA		55.0±21.9			
P		<0.05			
INFRA (mm: 平均 ± 標準偏差)					
培養骨膜シート+PRP+HA	4.8±1.1				
PRP+HA	4.7±1.3				
P	NS				