

調査報告 (3)

歯牙組織と歯周組織

(担当；名古屋大学大学院医学研究科、頭頸部感覚器外科学講座 上田実)

1. 対象とする組織および疾患

歯牙および歯周組織にはエナメル質、象牙質、歯髄、歯の土台である歯槽骨、歯の表面を覆っているセメント質、歯槽骨とセメント質を連絡している歯根膜組織で構成されている。この歯牙における疾患としてはウ蝕と歯周病が2大疾患である。ウ蝕に罹患した場合の治療法としてはウ蝕を機械的に除去し、その欠損部に人工材料を補填する方法が一般的である。現在、保険で適応されている治療法としては、小さな欠損にはレジンで、大きな欠損が生じた症例では金属にて修復されている。

一方で、歯周疾患に罹患すると炎症により歯槽骨は破骨細胞にて吸収され、最終的には歯牙の欠落に至る。その直接的な原因は微生物の感染であるが、噛み合せや全身疾患がさらにそれを悪化させる要因とみなされている。また、歯周病は生命にかかわる事はないものの、人類に広く蔓延している疾患の一つである。ヨーロッパでの大半の調査では、34-40歳の40%に歯周ポケットが存在すると報告されている(1)。

従来の歯周治療は、この歯槽骨の吸収にて発生した骨欠損にアパタイトなどの人工材料を移植してきた。しかし、これらの人工骨材料による治療は、歯槽骨を回復することは可能であったが、歯を維持するセメント質および歯根膜組織の再生は不可能であった。

2. ウ蝕に対する組織工学的手法を用いた治療法

近年、歯牙の2大疾患であるウ蝕や歯周病においても組織工学的手

法を用いた歯牙組織の再生および歯周組織の再生の研究が散見されるようになってきた。次にこれらを組織別に説明する。

ウ蝕に罹患した場合にその深度を3つに分けることができる。浅い順に①エナメル質に限局したもの、②象牙質に達するもの、③歯髄まで達しているもの、と分類できる。このように歯牙が細菌によって崩壊した場合には、エナメル質と象牙質を修復させるために一つの方法として組織工学的手法が有用であると考えられ、その現状について述べる。

2-1. エナメル質

エナメル質は歯冠のもっとも表層に位置する硬組織で人体の中でもっとも硬い組織である。今日までにわれわれが涉猟しうるかぎりではエナメル質を再生させたという報告はない。一方でエナメル質を形成するエナメル芽細胞の培養法についての報告も多くはない。

エナメル芽細胞の採取法および培養法

Den Bestenらは埋伏している大白歯から分離したエナメル組織を0.02%EDTA溶液に40分間浸漬させた後に1mg/mlのコラゲナーゼ、ディスパーゼにて55分間酵素処理を行う。この酵素処理にて細胞を単離することでエナメル芽細胞を採取することができる。これらの細胞を培養した後にmRNAを取り出しエナメル芽細胞特有であるアメロジエニンの発現を確認している。

MacDougallらはマウスのエナメル組織から単離した細胞を10%血清とアスコルビン酸を含む培地にて培養すると、in vitroにおいてミネラルの沈着を認めたと報告している(2)。

結論：以上のようにエナメル組織の欠損を組織工学的手法によって再生させる治療法の確立には時間がかかると考えられる。

2-2. 象牙質

象牙質はエナメル質の下方に位置している。象牙質がウ蝕に罹患した場合には表層のエナメル質と深層にある象牙質を再生させることが必要となる。この複合した組織を再生させる試みの報告はない。

次に、象牙質のみを再生させる研究報告は近年、動物実験において散見されるようになってきた。

Holtgraveらは出世後5日のラット大白歯より歯乳頭を取り出し細胞を酵素処理にて分離した。細胞の担体として多孔性のハイドロキシアパタイト (Interpore 200, Irvine, CA, USA) を使用し、次の3つの実験群に分類して大腿骨の筋膜下に移植した。①歯乳頭の細胞と多孔性の担体、②歯乳頭細胞のみ、③担体のみ。移植後6ヶ月経過した後にサンプルを取り出した。歯乳頭細胞のみを移植した群では歯髓組織様の組織が観察されその周囲に象牙芽細胞の前駆細胞が観察された。ハイドロキシアパタイトと歯乳頭細胞を混合したものを移植した群では、象牙質様の組織が観察された。一方で、ハイドロキシアパタイトのみを移植した群においては硬組織の観察は認めなかった(3)。

Bruurmaらは細胞を成人の歯髓組織から分離した。細胞の担体はPGA (polyglycolic acid) のメッシュ (Albany International Research) を応用した。ヒト歯髓組織よりコラゲナーゼを用いた酵素処理にて細胞を単離し 10^6 cell/mlの濃度に調節してPGAに播種した。播種後24時間経過した後にヌードマウスの背部皮下に移植した。組織学的には象牙質様の組織を認めたという報告はないが、移植3週間経過後に取り出した組織からタイプIコラーゲ

ンとBMPの発現は確認している(4)。

Gronthosらはヒト歯髓細胞をヒト歯髓組織から単離した。歯髓組織は歯科の外来にて抜歯した際の歯牙より採取している。細胞の担体はHA/TCP ceramic Powder (Zimmer, Warsaw, IN) を使用した。歯髓組織を抜歯した歯牙より取り出し、酵素処理を行い細胞を単離している。酵素処理は3 mg/ml Collagenase I と4 mg/ml dispaseに1時間処理を行った後に70 μ mのcell stainerを通して単離している。細胞培養液はalpha modification of Eagle's medium に20% FCSと100 μ M L-ascorbic acid, 2 μ M L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycinを混合させたものである。移植方法は約 5.0×10^6 の細胞に40mgのHA/TCPセラミックパウダーを混合させてヌードマウスの背部皮下に移植している。移植後6週にてサンプルを取り出した。組織学的にHA/TCPの周囲に象牙質様の組織が再生された。また、サンプルからRNAを抽出してRT-PCRにて象牙質特有のRNAが発現され、この組織が象牙質であることを示唆した(5)。

結論：以上のように象牙質を再生させる目的に組織工学的手法を用いた研究は徐々に進展しているようである。しかし、未だ動物実験レベルであり、臨床応用されたという報告はない。しかし、ヒト細胞から象牙質が再生可能であることが確認されたいま、今後の見通しとして適応症例を的確に見極めることによって臨床応用も近いと考えられる。

3. 組織工学的手法を用いた歯周治療法

3-1. GTR法

現在、臨床に応用されている歯周組織に対する再生療法は組織再生誘導法 (guided tissue regeneration, GTR) と呼ばれている。すなわち、これは接合上皮の侵入

を防ぐ膜を利用したものである。

以前の歯周病の治療は初期治療後に、いかに病変の進行を抑制するかが課題であった。そこで、キュレタージ、フラップオペレーションや種々の骨移植などが行われてきた。しかしこれらの治療のほとんどは、部分的にしか治癒せず、歯周ポケットの残存が多く認められた。それは、高度に分化した歯周組織の前駆細胞は容易に再生せず、また、歯周外科では創の完全閉鎖が困難なためである。一般に創傷治癒過程において、いかなる創でも直ちに血餅が形成される。歯周組織では、歯肉は歯牙の血管表面の一部としか結合することができず、その接着が非常に脆弱であったり、創の血餅が急速に吸収することもある。このような場合、長い接合上皮が歯牙とフラップとの間に侵入し、その結果として歯周ポケットを形成する。この歯周ポケットが、細菌の生殖部位となり、骨吸収が再び始まり歯周病が再炎する結果となる。そこで、これらの問題を解決するために新しい歯周治療として、接合上皮の侵入を防ぐ方法が望まれていた。

このGTRの技術は垂直的な骨欠損部に適用され、非常に効果的で良好な結果を生むこととなった。Nymanらは歯肉上皮と結合組織細胞を排除し歯根膜とセメント質そして歯槽骨を効果的に再生させるために膜が有用であることを報告した(6)。現在、用いられている膜はポリテトラフルオロエチレン(e-PTFE)であり、生体適合性が高く、硬さが十分にあり骨形成のための空間をより多く確保できることなどの利点を備えている(7)。このe-PTFE膜を骨欠損部に応用した組織再生法は組織学的にヒトと動物実験においてセメント質、歯根膜および歯槽骨の再生が確認されている(6,8)。一方この材料にも欠点がある。それは歯肉の退縮

を引き起こしやすいこと、露出しやすいこと、露出した後に大量の歯垢が蓄積することである。このような膜の露出を防ぐ方法としてコラーゲンや多糖類重合体を使った吸収性の膜が開発された(9)。高分子材料としてはPLAやPGAが臨床に応用されている。Laurellらは47の骨欠損症例に対してPLA膜を用いたGTR法によって4.9mmの歯周組織が再生されたと報告している(10)。Beckerらも24例の骨欠損症例にGTR法を応用したところ、4.3mmの歯周組織の再生を得たと報告している(11)。

結論：GTR法、すなわち適切な膜の使用により著明な歯周組織の再生を得ることが可能であることがこれらの報告から証明された。このことは歯周治療に有用であることを示唆している。現在、日本においてGTR法は歯周病専門医によって行われることが多く、一般開業まで完全に浸透していない。

3-2. 歯周組織再生へのBMPの応用

再生医療における有望な生物活性分子として骨形成因子BMPがある。歯周組織の再生を目的にBMP(Bone morphogenetic protein)も動物実験に応用されている。Wikesjöらはビーグル犬に歯牙周囲に垂直的な骨欠損を作成し、BMP-2を充填したものと充填しなかったものとを比較した。BMP-2はGenetics Instituteが製造しているrh-BMP-2をpoly(D, L-lactide-co-glycolide) microparticles (PLGA) (Genetics Institute)を混合したものを使用した。BMPの濃度は0.2mg/mL rhBMP-2を約2.5mlの欠損部に注入した。rhBMP-2を注入した欠損部において95%の再生が認められたがコントロール側では43%しか再生しなかった(12)。このようにBMP-2は動物実験において歯周組織の再生に有効であることが示されているが、臨床に有効であったという報告は無い。結論：動物実験においては良好な結

果が報告されているが、臨床応用における評価の報告は無い。

3-3. 歯周組織再生へのエムドゲイン®(生化学工業)の応用

吸収された歯周組織の再構築への新たな試みとしてアメロジェニンの使用がされている。アメロジェニンはエナメル質の形成する上皮細胞中に認められる成長因子であり、細胞性セメント質を新たに形成することが報告された(13)。アメロジェニンは製品化されすでに販売されている。エムドゲインは、スウェーデンのピオラ社で開発された新しい歯周組織再生誘導材料で、日本における商品名をエムドゲインと呼び生化学工業から販売されている。エムドゲインの主成分(エナメルマトリックスデリバティブ)は、子どもの頃、歯が生えてくるときに重要な働きをするたんぱく質の一種です。歯周外科手術の際に、手術部位にエムドゲインを塗布することにより、歯の発生過程に似た環境を再現する。こうして、初めて歯が生えたときと同じような強固な付着機能をもつ歯周組織の再生を促すのです。すなわち、歯根膜およびセメント質を再生させ2次的に歯槽骨の再生を誘導する。利点としてはGTRよりも適応範囲が広い、一回の手術でよい、などである。一方で欠点として手術野から一旦血液を排除しなければならぬので手術が難しい、上顎7番～8番の大白歯では明視野で手術ができないので適応症ではない、などが残されており、その成功率は約50%程度に留まっている。

エムドゲインであるエナメルマトリックスタンパク質とはアメロジェニンを主成分とするタンパク質の複合体である。従来の研究ではエナメルマトリックスタンパク質はエナメル質を石灰化させるための基質としてみられていましたが、近年では無細胞セメント質の形成にも深く関与していることが知られてきました。象牙質表面にエナメルマトリックスが

存在すると、歯根膜にある未分化の間葉組織がセメント芽細胞に分化し、線維を出します。この線維を型紙にして石灰化が起こります。セメント芽細胞は外側へ移動し、細胞を含まない硬いセメント質、すなわち無細胞セメント質が形成されます。

エナメルマトリックスは象牙質とセメント質を強固に結合させる働きがあります。エナメルマトリックスが存在しないと、歯根膜にある未分化の間葉組織がセメント芽細胞に分化する程度は低いと報告されている。エムドゲインとGTRの方法の違いはGTR法によって新たに形成されるセメント質は有細胞セメント質になり、エムドゲインにより形成されるのは無細胞セメント質になる。ある診療所ではエムドゲインによる骨再生術に対して1手術につき60,000円、1歯につき10,000円という値段を設定している。

結論：製品化されているので開業医にて入手可能である。臨床評価は部分的な歯周組織の再生は可能となった。術式の困難さが解決されることでさらに普及されると思われる。

3-4. 成長因子の歯周組織再生への応用

Growth factorは骨基質内に存在し骨形成に関与していることが良く知られている。歯周組織の再生を起こさせるためには歯冠側への歯根膜(periodontal ligament)の増殖が必要である。Platelet-derived growth factor(PDGF)とinsulin growth factors(IGF-I)は歯周組織の再生に有効であることが知られるとともにPDGFは創傷治癒においても重要な働きがある。HowellらはPDGFとIGF-Iを臨床に応用した結果を報告している。歯周病が原因で骨欠損を引き起こした歯牙周囲の欠損部38症例に対して、RhPDGF-BBとIGF-Iの濃度を150ug/mlとし4%のメチルセルロースと一緒に移植した。移植後6-9ヵ月後に取り出すと、PDGFとIGF-Iを使用したグループは43.2%の骨再生を認めたが、フラップ

手術のみの群においては18.5%の骨再生しか認めなかった。この結果より、PDGFとIGFの成長因子の併用により歯周組織の再生に有用であることが示唆された(14)。

結論：現在、日本においての臨床報告は無い。これらの成長因子が製品化されることで簡便に使用できるようになれば普及すると思われる。

4. 組織学的手法を用いた歯槽骨再生

4-1. GBR法

歯槽骨は歯を支持する骨であり、歯を失うと同時に歯槽骨は吸収し始める。無歯顎では歯槽堤萎縮が顕著に見られるが、ほとんどの場合インプラントの職立によって歯槽堤の萎縮が防止できる。インプラントを植立する際に、解剖学的上最も問題となるのは上顎洞と下歯槽神経の存在である。しかしインプラントには歯槽骨の高さだけではなく十分な歯槽骨の幅も必要になってくる。このような症例に組織工学的手法を用いた治療法が考え出された。その一つにバリアーを用いた骨再生誘導法(GBR:guided bone regeneration)である。GBRを行う目的は歯周病学的における組織再生誘導法とは異なっている。歯周病領域から見る組織再生誘導法とは、骨縁下ポケットが歯牙周囲に認められた場合に歯根膜細胞の再生を期待することになる。インプラントを目的とした骨再生誘導法では、単に骨の再生領域に軟組織の侵入を防ぐことだけを考えることになる。Schenkらはバリアーメンブレンによって完全な閉鎖空間が作られれば、2ヶ月以内に骨再生がみられ、4ヶ月で皮質骨と海面骨の構造が形成されると報告している(15)。また、術式の成功には閉鎖空間に貯留した血餅の保護が不可欠で、そのためバリアーメンブレンには物理的強度が必要である。しかし、バリアーメンブレンのみでは外力に対して変形しやすいため、通常、支えとしてチタンや吸収性ポリマーで作られたスクリュー

やピンによってメンブレンを固定することになる。これらはテントの支柱として外力による膜の陥没を防ぐ役割をしている。チタンで補強されたe-PTFEメンブレンのような非吸収性膜は術後除去しなければならないこと欠点となるがGBRではGTRよりもリスクが少ないため汎用されている。

結論：GBR法はインプラントの適応範囲を広げることになり有用な術式となる。GBR法において骨増生は可能となったが、確実な増生を求めるには、細胞移植を併用するなどの術式の改良が必要であると考えられる。

4-2. 歯槽骨増生法へのBMP-2の応用

歯槽骨を増生させる目的にrhBMP-2が臨床に応用され始めた。口腔領域での骨欠損の修復に対して、自家骨移植はもっとも一般的な治療方法であったが、自家骨移植には多部位への侵襲も加わるために小さな侵襲で行える治療法が望まれていた。

CochranらはrhBMP-2をヒトの歯槽骨を増生する目的に応用し、3年経過後に骨の生検を行ったところ正常の骨組織と類似していたと報告している。さらに、その再生された骨に植立したインプラントは正常に機能している(16)。

結論：GBR法と併用することで大きな成果が期待される。

5. 細胞を応用した人工歯根の植立

人工歯根はあくまで歯根の代わりにはすぎず、歯周組織を置き換えるものではない。インプラントの多くはチタンでできており、生体親和性を持っているが、ティッシュエンジニアリングの範疇にはみなされていない。1969年にBranemarkらによって骨結合という概念が提唱され、その中で骨はチタンと直接接するものと考えられていた。しかし、後にAlbrektssonらによってインプラントと骨の境界面にはプロテオグリカンやコラーゲンによる20-40nmにわたる層があることが証明された。歯とインプラント周囲の組織の接着様式には類似点

もあるが相違点もある。歯牙は歯槽骨とセメント芽細胞と歯根膜によって結合しているからである。そこで、インプラントの接着様式を天然歯と同様な構造にすることを目的にインプラント表面にセメント質を再生させる研究が行われている。この中で歯根膜細胞をインプラント体の表面に接着させて移植するとインプラント周囲にセメント組織が観察されたと報告された。つまり歯根膜細胞をインプラントに接着させることで天然歯に近づく一歩となったことが示唆された(17)。

結論：この研究はまだ始まったばかりであり、実験動物においてのみの試みである。今後の研究の進展によっては新しい人工歯根の開発が期待される。

6. 今後の課題

今回の調査対象は3つ分類することができる。第1はエナメル質や象牙質の欠損いわゆる歯蝕に対する再生療法、第2は歯周組織の再生療法、そして第3は歯槽骨の再生療法である。

現在、歯蝕の療法としての象牙質の再生療法は動物実験段階である。また、ヒト細胞からの象牙質の再生が確認されたとの報告もあるが、その再生した部位はヌードマウスの背部皮下である。したがって、この方法を臨床に応用するまでには、適応となる部位へ移植する実験モデルの確立が必要であり、その次に、前臨床応用となる。今後、このような研究にて大きな成果が積まれることで臨床応用が近づくと考えられる。

歯周組織に対する再生療法はすでにいくつかの方法が臨床に応用され大きな成果を生み、それらは膜のみを使用するGTR法、アメロジェニンのタンパクによる再生、PDGFのグロースファクターによるものである。これらを応用することで歯周病にて生じた部分的な欠損の再生は予測可能となってきた。現在、これらの方法で使用するGTR用の膜とエムドゲイン

は日本の開業医にて購入可能であるが、専門医による治療が行われているのみで一般開業医では行われていないのが現状である。今後、術式を普及させることによって、広く普及するものと考えられる。しかし、これらの方法にも2つの欠点が存在する。それは完全な歯槽骨の再生はいまだ困難であること、すべての治療に外科的手術が必要となることである。今後の課題としては、歯槽骨の完全な再生への挑戦と、外科的手術を必要としない治療法の開発である。これらの解決策として細胞移植の応用や注入式による外科的侵襲の回避が考えられる。これらの問題を克服するために今後、新しい展望が期待される。

バイオマテリアルによって歯周組織の欠損を再生させる試みとこれまでに達成された成果を考え合わせると、われわれは歯周組織の破壊を阻止できると同時に失われた組織の完全再生の可能性についても達成しつつあるといえる。

第3は歯槽骨の再生である。これは歯周組織の再生と関連している。GBR法はすでに臨床に応用され日本においてもGBRにて使用する膜は購入可能である。そしてrhBMP-2も臨床に応用され良好な結果が報告されているにもかかわらず、商品化のめどは未だたっていないのが現状である。一方で、歯槽骨の増生を目的とした細胞移植の報告は無い。今後、より確実な骨の増成を期待する場合には細胞移植が有用な選択となると考えられる。

7. 参考文献

- (1)Miyazaki H.,Pilot T., and Leclercq MH et al (1991) Profile of periodontal conditions in adults measured by CPITN. Int Dent J.41.74-80
- (2)MacDougall M.,Theimann F.,Diekwish T(1994) Enamel biomineralization in vitro in the absence of mineralized dentin. J Dent Res.73.112
- (3)Holtgrave EA.,Donath K.(1995) Response of odontoblast-like cells to

- hydroxyapatite ceramic granules. *Biomaterials*.16.155-159
- (4)Buurma B.,Gu K.,Rutherford R.(1999) Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. *Eur J Oral Sci*.107:282-289
- (5)Gronthos S.,Mankani J.,Brahim P.,Gehron Robey.,Shi S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells(DPSC) in vitro and in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.97. 13625-13630
- (6)Nyman S.,Gottlow J.,Lindhe J et al.(1982) New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*.9.290-296
- (7)Becker W.,Becker BE.,Prichard F et al.(1987)Root isolation for new attachment procedures. A surgical and suturing method:Three case reports. *J Periodontol*. 58:819-826
- (8)Caffesse R.,Kerry GS.,Chaves ES et al.(1988)New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol*.59.589-594
- (9)Minabe M(1991) A critical review for the biologic rationale for guided tissue regeneration. *J Periodontol*.62.171-179
- (10)Laurell L.,Falk H.,Fornell J et al.(1994) Clinical use of a bioresorbable matrix barrier guided tissue regeneration therapy. Case series. *J Periodontol*.65.967-975
- (11)Becker W.,Becker BE.(1993) Treatment of mandible 3-wall intra-bony defects by flap debridment and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. Long term evaluation of 32 treated patients. *J Periodontol*.63.1138-1144
- (12)Wikesjo UME.,Kean CJC Zimmerman GJ.(1994)Periodontal repair in dogs:Supra-alveolar defect models for evaluation of safety and efficacy of periodontal reconstructive therapy. *J Periodontol*.65.1151-1157
- (13)Hammarstrom L.Heiji L.,Gestrelus C.(1997)Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin.Periodontol*.24.669-677
- (14)Howell TH.,Fiorellini JP.,Paquette DW et al.:(1997)Evaluation of a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease.68.1186-1193
- (15)Schenk RK.,Buser D.,Harwick WR et al.(1994)Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects. *Int J Oral Maxillofac Imp*.9.13-29
- (16)Cochran DL.,Jones AA.,Lily LC.et al.(2000)Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral application including the use of endosseous implants:3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol*.71.1241-1257.
- (17)Byung-Ho Choi. Periodontal ligament formation around titanium implants using cultured periodontal legament cells: A pilot study. *Int J Oral & Maxillofac Imp*,2000;15:193-196

調査報告 (4)

歯周治療およびインプラント治療における歯周組織再生 (担当：東京医科歯科大学大学院歯周病学分野 石川 烈)

I. 対象臓器・疾患あるいは用途 (細胞・組織を用いる必要性について)

①歯周炎による組織欠損に対する再生治療
日常臨床において、重度歯周炎に罹患し歯周組織破壊が高度に進行した症例では、適切な治療法がなく抜歯されることが多いのが現状であり、歯周炎により破壊され失われた組織の再生は、歯周治療の新しい大きな目標の一つとなっている。歯周治療における組織再生は、新生セメント質および歯槽骨、そしてこの2つの硬組織の間に存在して機能的に配列し兩者をつなぐ歯周靭帯の再生を指す。歯周組織が破壊されて露出した歯根面に、機能的に配列した結合組織線維の埋め込まれたセメント質が新たに形成されることを‘新付着’と呼んでいるが、歯周組織再生治療の最終的な目標は、歯根表面にこの新付着を達成して再び歯周組織が機能するように回復させることである。これまで移植、歯根面処理、組織再生誘導法、GTR、エムドゲインといった各種の組織再生法が臨床に用いられてきたが、その予後のほとんどが組織欠損部位の環境状態に左右され易いため、成績が安定せずまた歯周組織の完全な機能、形態を回復させるまでには至っていないのが現状である。

(1) 移植・・・自家骨、同種骨(脱灰凍結乾燥骨etc.)、人工移植材(ハイドロキシアパタイト等のリン酸カルシウム系セラミックetc.)の移植が行われているが、これらの移植によって骨の増生は起こるものの、歯根膜を含めた線維性結合の明らかな再生が起こったという報告はない。

(2) 歯根面処理・・・歯根表面を脱灰して、象牙質コラーゲン線維を裸出させることによって周囲組織からの間葉系細胞または残存歯根膜組織由来細胞を歯根表面に定着させ、同時にセメント質形成細胞へと誘導することを目的としているが、これまでの研究ではその効果の裏付けはなされていない。

(3) 組織再生誘導法 (Guided Tissue Regeneration : GTR)・・・Karring

らは歯周組織の再生において、歯根表面に結合組織性の付着を形成する前駆細胞は歯根膜中にのみ存在するという研究結果 (1, 2, 3, 4) を示した。これに基づいて考案された術式がGTR法であるが、これまでの研究および臨床経験では、全ての症例に対してはその有効性に限界があると報告されている。

(4) 成長因子・・・適当な担体と組み合わせることで組織欠損部に適応することにより、周囲組織および残存歯根膜組織の組織再生能を賦活させることを目的とする。これまでにBMP, FGF, PDGFなど種々の成長因子の効果が研究されている (5, 6, 7) が、歯周組織再生における成長因子の役割については更なる研究で評価する必要がある、また臨床で用いられるまでは至っていない。

※ エムドゲイン・・・近年、精製されたエナメルマトリックスタンパク質を露出歯根面に塗布すると、象牙質に強固に付着する無細胞性セメント質、歯根膜および歯槽骨が形成されることが報告された (8)。新しい歯周組織再生用材料として注目されているが、詳しい作用機序などは未だ完全に解っておらず、これについても更なる研究で明らかにする必要がある。

PRP (Plateret-Rich Plasma)・・・自家血より得られ、これまでにPDGF, TGF- β 1, TGF- β 2, IGF-I, bFGFなど多数の成長因子を含んでいることが明らかにされており、その作用は創傷治癒全過程に広く影響を及ぼすものと考えられる (9)。歯周組織に対する有効性については未だ報告はないが、患者本人より採血された血液を用いて容易に精製でき、移植のような免疫拒絶反応の問題もないため臨床的に大きな期待を集めている。

②インプラント体における歯周組織再生
インプラント体が天然歯と同じように機能し、長期間の使用に耐え得るようになるにはその周囲に歯根膜組織を構築することが

理想であり、インプラント治療における一つの到達点ともいえる。インプラント体を顎骨に埋入した場合、通常オッセオインテグレーションと呼ばれるあたかもインプラント体が周囲骨と直接接触しているかのような治癒機転をたどるか、もしくは線維性組織による被包が生じ、歯根膜は形成されない。もし骨との界面に歯根膜組織形成細胞が存在すればインプラント体周囲に歯根膜が構築される可能性がある。Boykoらはいわゆるcell seedingがその有効な手段となり得ることを示し(10)、Buserらはインプラント体周囲にも歯根膜の再生をもたらすことが可能であることを報告した(11)。また玄らはインプラント体表面に歯根膜細胞をより効率的に接着・増殖させる方法を開発した(12)。これらの研究はインプラント体周囲にも細胞移植により歯根膜組織が形成される可能性を示しているといえよう。一方、井上らは実験的にインプラント体周囲に歯根膜組織を作ることは可能でもそれを維持代謝させることは容易ではないと述べている(13)。このようにインプラント周囲組織の再生に培養細胞を用いる方法は高い可能性を秘めているが、引き続き更なる検討が必要である。

組織再生においては3大要素 (cell, scaffolds, signaling molecules) が必要であると言われている。従来の歯周組織再生治療はこの3大要素を全て満たしているものではなく、また成長因子の応用は試みられているものの一切外来性の細胞を用いずに行われてきた。しかし組織欠損部が大きいケースでは、残存組織からの細胞遊走を期待するだけでは形態、機能を完全に回復させるには不十分であり、歯周組織を構成する能力を持った細胞を移植することは必然的に要求される。現在、培養細胞を組織欠損部位に移植することによって歯周組織を再構築する研究は数多く行われており、新しい治療法となりうる可能性を示す報告もいくつかなされてきている。

II. 細胞ソース

Melcherらは歯根膜由来細胞のみが歯根膜形成能を有するという仮説を示し(1)、それに基づいて、GTR法に代表されるような現在の歯周組織再生治療が行われてきた。培養歯根膜由来細胞は、形態的には線維芽

細胞様形態を示すにも関わらず、高いアルカリフォスファターゼ活性を示し(14, 15)、また石灰化物形成能を持つ(16, 17)ほか、骨特異性の高いオステオカルシン産生能を有し(18, 19)、骨シアロタタンパク、オステオポンチンなどの遺伝子発現を示すなど(20)、硬組織原性細胞としての性質を持つことが報告されている。このため歯根膜由来細胞は歯周靭帯だけでなくセメント質や歯槽骨といった硬組織の再生に強く関与している可能性があり、歯周組織の再生には歯根膜由来細胞の存在が重要であると考えられる。現在セメント芽細胞に特定のマーカーは確認されていないが、その由来については歯槽骨内に存在するprogenitor cellが歯根膜内に侵入し歯根表面側に移動してセメント質を形成するという報告もされている(21)。このことから歯根膜組織の位置によってその細胞分布に違いがあることも考えられる。現在では、歯根膜由来細胞はheterogeneousな細胞集団であり、その中に含まれる各組織のprogenitor cellが様々なシグナルを受けることにより各細胞に分化し歯根膜組織を形成するものと考えられている。一方、歯周病における骨欠損は克服すべき重要な病態であるが、骨の再生に目的を絞った場合、骨芽細胞の利用も有効と思われる。これらのことから歯周組織再生を目的とした細胞の供給源として以下のものが考えられる。

1. 歯根膜由来細胞・・・これまでの研究では、抜去歯の歯根表面に付着している歯根膜組織より機械的に得ているものがほとんどで、その他には抜歯窩血餅より歯根膜細胞を得る方法(22, 23)も報告されている。しかし、これらの方法は矯正治療の一環として抜歯される小臼歯や、治療上の必要性から抜歯される第三大臼歯などが供給源となるため、抜去歯が得られない場合は不可能となる。一方、特定の組織を再生する目的で培養細胞を用いる場合、局所に必要な種類の細胞を一定量集めてやらなければならない。歯根膜組織の再生においてはセメント質の再構築が焦点となるため、より効率的かつ確実な組織再生を求めるならば、培養歯根膜由来細胞内に存在すると考えられるcementoblasticな細胞だけを集めてくる必要がある。歯根膜中に存在するセメン

ト芽細胞および骨芽細胞に関しては、現在歯根膜由来細胞中から硬組織形成能を持つ細胞だけを、適当な細胞表面マーカーを用いて標識し分離回収する研究が進められている(27)。

※ 最近の再生医療では幹細胞が注目を集めているが、その目標として個々の臓器における組織幹細胞の分離が1つの課題となっている。歯根膜組織に存在する幹細胞システムを明らかにして、組織幹細胞のみを回収、特定の細胞へ分化させることが出来ればより効率的な方法となり得る可能性がある。

2. 骨髄由来細胞・・・Pittengerらによれば、成人の骨髄由来細胞中には造血系の細胞の他、様々な組織へと分化しうる骨髄間質細胞(間葉系幹細胞)が存在する(24)。これら骨髄間質細胞を分離、培養増殖させ適当な担体とともに移植することによりセメント質、靭帯、歯槽骨ほか歯周組織全体の再構築を期待するものである。大串らは多孔性インプラント上で骨髄細胞を増殖させ培養骨髄細胞/セラミックハイブリッド体を作製し、それを生体内に埋植すると早期に骨形成を起こすことを見出して、インプラント治療において培養骨髄細胞/セラミックハイブリッド体が有効であることを示した(25)。これは骨の再生という点では、骨髄由来細胞の歯周治療およびインプラント治療における可能性を示しているが、歯根膜およびセメント質の再生への骨髄細胞の有効性については更に検討する必要がある。

※ 骨芽細胞・・・骨の再生に焦点を合わせた場合、骨芽細胞の移植が有効と思われる。前述の骨髄由来細胞から分化、増殖させる手段が確立しており(34)、歯科領域においては培養細胞/人工骨ハイブリッド体を作製し骨欠損部位へ移植することによる臨床応用に期待される。

現段階では、歯根膜組織中に存在する幹細胞を同定・分離することは見通しが立っておらず早期に実現できる可能性は低い。また骨髄間質細胞の歯周組織に対する再生能については細胞分化機構の解明を含めた更なる検討が必要である。石川らは歯根膜由来細胞においてアルカリフォスファターゼ(ALP)を発現している細胞のみを抗ALP抗

体および磁気ビーズを用いて分離し、その細胞の硬組織形成細胞への分化度が高いことを示し、歯根膜由来細胞から特定の細胞を分離できる可能性を示唆した(27)。したがって従来の方で回収された歯根膜由来細胞をそのまま用いるか、その中から組織幹細胞よりも更に分化の下流段階にある細胞を同定・分離し、特定の細胞を任意の位置に配置することが出来れば特殊な階層構造をもった歯根膜組織の再構築という点で有効な手段となり得るだろう。

III. 細胞の単離・培養

歯根膜由来細胞については、抜去された第三大臼歯もしくは矯正治療において便宜的に抜歯される小臼歯などに残存する健全歯根膜組織片を機械的な方法で採取する。その組織片をウシ胎児血清下で培養し、拡散増殖してシャーレに付着した状態の線維芽細胞様細胞をトリプシン処理により回収して、数回継代した後移植に用いる。その他、抜歯窩に残る血餅や、抜歯窩内壁に付着した歯根膜組織片を採取し細胞を得る方法もある。歯根膜組織は、歯槽骨側、中央部、セメント質側で細胞の分布と構成が異なるといわれている(28, 29)。採取した細胞は従来の線維芽細胞の培養法に準じて行う。その他、生体吸収性の薄膜上に細胞を播種、培養して増殖させた後組織欠損部に移植するという研究も行われている(30)。また一方では、日高らはインプラント体へのcell seedingにおいてコラーゲンゲル内3次元培養が歯根膜細胞の機能、形態を保存させる上で有効な手段であることを示している(31)。歯根膜組織由来細胞を用いる場合、継代を重ねると硬組織形成能および細胞分裂能が低下することが知られており(32, 33)、そのため移植に用いる細胞は継代数が可及的に少ない方が良いと考えられる。歯周炎による骨欠損部位やインプラント治療時の支持周囲骨の増生、サイナスリフト等を目的とした骨の再生においては、多孔性人工骨材料に細胞を播種し培養することで、細胞/人工骨ハイブリッド体を作製して移植する方法も有効と考えられる。骨芽細胞については骨髄間質細胞より誘導・分化出来ることが報告されており(34)、また骨髄間質細胞は腸骨からの穿刺吸引により採取された新鮮骨髄細胞を培養し浮遊

細胞を除去することによって得られる。

IV. 細胞移植法

歯周炎による組織欠損に対しては、外科処置時に病変部を郭清した後に、前述のように骨欠損部に培養細胞/人工骨ハイブリッド体を填入する方法や、生体吸収性膜上に細胞を播種し培養した後、膜ごと露出歯根面に移植する方法等の研究が展開されている(29)。またインプラント治療を目的とした実験では、純チタンやハイドロキシアパタイト焼結体から成るインプラント体に細胞を直接播種して一定期間培養を行い、表面に細胞を増殖させた後に生体内へ埋植する実験(35)や、培養細胞を含んだコーゲンゲル内で3次元培養を行うことによってインプラント体表面に細胞を付着増殖させた後に移植する実験が行われている。

V. 今後の課題

再生した歯根膜が機能的にも生理的にも天然歯根膜と同等の性質を持つためには、歯根表面のセメント質の形成と、それに埋入して機能的に配列しながら歯牙と歯槽骨を強固に連結するコーゲン線維束の再生が必要となる。しかし現段階では天然歯根膜の持つその特殊な構造を、積極的な方法によって再構築することは出来ていない。培養細胞を用いてこれを達成するためには、第一に歯根膜組織を形成する能力をもった細胞が必要になり、第二に細胞移植時の担体および組織形成の足場となるマトリックスの選択、そして第三に成長因子の投与が要求される。それには歯根膜組織内における細胞分化のKeyとなる成長因子の解明とそれを必要な部位に必要な期間補うDDSの開発が必要になるだろう。また可能であれば歯根膜の各組織を形成し得る細胞を同定・回収してそれらを適所に配置する、つまりセメント質形成細胞、歯槽骨形成細胞、歯周靭帯形成細胞を同定、分離回収しそれぞれを歯根膜腔内の特定部位に配置することができればより効率的な方法になると考えられる。歯根膜を有するインプラント体においてはこれらに追加しインプラント体表面の性状改質や、天然歯根膜には存在する感覚受容器を有する神経機構をインプラント周囲にも再構築する技術も必要となっ

てくる。一方、前述のように歯根膜由来細胞を用いることが現段階では最短の方法と思われるが、この細胞の供給源は自己の抜去歯が必要となるため、抜去歯が得られない場合に供給手段を検討する必要がある。また何らかの理由で抜去歯が得られた場合には、その抜去歯もしくは細胞を長期にわたって保存する技術や社会的なシステムが必要になろう

VI. 参考文献

1. Melcher AH: On the repair potential of periodontal tissues: J Periodontol 47:256-260, 1976
2. Karring T, Nyman S, & Lindhe J: Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. J Clin Periodontol 7: 96-105, 1980
3. Nyman S, Karring T & Lindhe J et al: Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue: J Clin Periodontol 7: 394-401, 1980
4. Karring T, Isidor F, Nyman S et al: New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament: J Clin Periodontol 12: 51-60, 1985
5. Giannobile W V: Periodontal tissue engineering by growth factors: Bone 19, 27-37, 1996
6. Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S, Ishikawa I: Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs: J Periodontol 68, 103-109, 1997
7. Murakami S, Takayama T, Ikezawa K et al: Regeneration of periodontal tissue by basic fibroblast growth factor: J Periodont Res 34, 425-430, 1999
8. Hammarstrom L, Heiji 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
9. Robert EM: Platelet-Rich Plasma

- : A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts : Tissue Engineering Applications in Maxillofacial and Periodontics, 71-81, Quintessence Publishing Co. Inc, Illinois, 1999
10. Boyko GA, Melcher AH, Brunette DM : Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after cultured in vitro : J Periodont Res 16, 73-88, 1981
11. Buser D, Warrer K, Karring T : Formation of a periodontal ligament around titanium implants : J Periodontol 61, 597-601, 1990
12. 玄丞侏、彭春岩、村松和明ほか : 歯根膜を有する人工歯根の開発研究 [I] チタンインプラントへの高分子膜の接着と表面処理、[II] コラーゲン固定化EVA上でのヒト歯根膜細胞培養。歯材器 18 (Sep. 34) : 134-135, 1990
13. 井上孝、下野正基 : 口腔インプラント学検視考 - インプラント周囲では何が起きているか - インプラントにないもの生物学的幅徑そして歯根膜と歯髓 : Inspection of the Oral Implantology (7) No. 636 : 159-171, October 1995
14. Kawase T, Saito S, Miyake K : Alkaline Phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. Adv. Dent. Res, 2: 234-239, 1988
15. Somerman M. J, Archer S. Y, Imm G. R, and Foster R. A : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblast in vitro : J Dent Res 67, 66-70, 1988
16. Cho M. I, Matsuda N, Lin WL, Moshier A and Ramakrishnan P. R : In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat : Calcif Tissue Int 50, 459-467, 1992
17. Mukai M, Yoshimine Y, Akamine A, and Maeda K : Bone like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells : Cell Tissue Res 271, 453-460, 1993
18. Nojima N, Suda T, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N and Hasegawa K : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts : J Periodont Res 25, 179-185, 1990
19. Robey P. G : The biochemistry of bone : Endocrinol Metab Clin North Am 18, 859-902, 1989
20. Ramakrishnan P. R, Lin W. L, Sodek J and Cho M. I : Synthesis of non-collagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro* : Calcif Tissue Int 57, 52-59, 1995
21. McCulloch C. A, Nemeth E, Lowenberg B and Melcher A. H : Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations : Anat Rec 219, 233-242, 1987
22. Cho M. I, Matsuda N, Lin W. L, Moshier A and Ramakrishnan P. R : *In vitro* formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat : Calcif Tissue Int 50, 459-467, 1992
23. Matsuda N, Lin W. L, Cho M. I, and Genco R. J : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors *in vitro* : J Periodontol 63, 515-525, 1992
24. Pittenger MF et. al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells : Science 284, 143-147, 1999
25. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S : Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite : J Biomed Mat Res 32, 481-492, 1996
26. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI : Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rat : Acta Orthop Scand 60, 334-339, 1989
27. 村上裕矢、小島丈尚、長澤敏行、小林宏明、石川烈 : アルカリフォスファターゼ陽性歯根膜細胞の分離と解析 : 日本歯周病学会会誌第43巻秋季特別号、p136、2000 (概要)

28. McCulloch C.A : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice : Anat Rec 211, 258-262, 1985
29. 下野正基, 井上孝 : 移植, 再植における歯根膜の重要性 : 治癒の病理 臨床編 第3巻 医歯薬出版 東京 1995, 85-104
30. 竹腰利嗣, 二階宏昌ほか : 培養細胞移植による歯周組織再生についての実験的研究・長期観察例についての組織学的, 組織計測学的検討 : 日本歯周病学会会誌第41巻 秋季特別号, p142, 1998 (概要)
31. 日高丈博, 木下勲彦, 福岡真一ほか : コラーゲンゲル内三次元培養における歯根膜細胞の性状と人工歯根に対する細胞付着性の検討 : 生体材料 15, 162-167, 1987
32. 森幹郎, 菅谷勉 : 培養歯根膜細胞移植による歯根膜, セメント質の再生に関する研究 - 歯根膜細胞を培養, 付着させた移植象牙質片の組織学的検討 -, 日歯周誌 38, 447-456, 1996
33. 中島正人 : 生体材料の生化学的研究 - ヒト歯根膜細胞の特性について - : 神奈川歯学 22, 340-354, 1988
34. Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH : Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats : Cell Tissue Res 254, 317-330, 1988
35. Byung-Ho Choi : Periodontal ligament formation around titanium implants using cultured periodontal ligament cells : A pilot study : Int J Oral Maxillofac Implants 15, 193-196, 2000

調査報告（5）

末梢神経

（担当：名古屋大学大学院医学研究科 頭頸部感覚器外科学 上田 実）

はじめに

交通外傷、災害、などにより末梢神経が損傷を受け修復しきれない症例や腫瘍切除などにより神経を含む切除をせざるを得ない臨床症例は多い。一般的に末梢神経の損傷が軽度であれば自然修復も期待できるが、神経の切断が認められるような症例では自然治癒は期待できない。臨床的には切断された神経のギャップが短い場合には直接縫合を行ったり、そのギャップ長に応じて自家神経移植などが行われている。しかし、自家神経移植ではドナーとなる神経の

採取にはおのずから限界があり、採取された神経の支配領域にしびれや麻痺などの合併症が生じる。

近年、再生医療の進歩に伴い自家神経に代わる新たな移植材料としての人工神経や技術の開発が望まれている。

神経損傷の分類

末梢神経が損傷された場合、その程度により予後が異なる。このため初めの臨床診断はその後の治療と神経の修復に重要となる。

Seddon の分類¹⁾

Neurapraxia : 一時的な圧迫による機械的な遮断。経過観察で機能は完全に回復する。

Axonotmesis : 神経の圧挫、挫創により endoneurium tube（神経内膜管）は連続性を有するが、軸索が断裂し、その末梢に Waller 変性をきたしている。endoneurium tube が温存されているため、保存的療法により治癒する。

Neurotmesis : 神経の完全断裂。手術適応となる。

人工神経を用いた再生医療において主にターゲットとなる症例は **Neurotmesis**（神経の完全断裂。手術適応）と考えられる。人工神経に配合されたり、その移植治療時に使用されるであろう神経栄養因子などは当然、**Neurotmesis** より軽度な損傷においても使用されることとなる。

現在の治療法

1. 神経吻合

臨床的には神経の切断ギャップが 5mm 以下 ならば直接吻合させることによって機能を再生させることができる。それ以上のギャップ（20mm～30mm まで）でも断端の新鮮化の後、テン

ションがかからないように断端を寄せることができれば、直接吻合が可能とされている。縫合に際し、切断された神経の両断端の新鮮化を行い、ミスマッチングの予防のため神経束配列（知覚線維と運動線維の区別）を十分識別し、神経束の縫合を行う。

①時期：受傷後3ヶ月以内が望ましい。

②予後

知覚神経：回復は比較的容易で、知覚の受容体に軸索が到達すれば粗大感覚の回復が起こる。受傷後数年を経過した症例でも、術後 protective sensation（熱傷などから身体を守るため必要な感覚）は獲得できるといわれている。

運動神経：運動神経の回復は受傷から手術までの期間に依存。受傷後3ヶ月以上では筋の機能はほとんど回復しない。

〈理由〉

・運動神経軸索が神経筋接合部運動神経終板に到達後、両者が機能的結合を形成し、神経刺激に应答して筋収縮が起こるまでに比較的時間を要するため。

・筋線維自体の変性が進行した症例では、たとえ神経終板が形成されても筋収縮が起こり得ないため。

・神経終板の線維化が起こってしまうため。

2. 自家神経移植

断端の新鮮化後、20~30mm 以上のギャップが存在する場合、自家神経移植の適応となる。

①ドナーの選択

ドナーは前腕内・外側皮神経、腓腹神経など神経を採取しても機能障害が比較的少ない部位が選択される。修復される神経束が太い場合は、必要に応じてケーブルグラフト法（20cm程の長い神経を採り、何本かを束にして移植する）などが行われるため、ドナー採取による合併症は大きくなる。

②予後：知覚神経はほぼ再生するものの、運動機能の再生率は低い

③合併症：採取部に形成される断端神経腫知覚支配領域のしびれ感

3. 同種神経移植

欧米ではヒト死体より採取し凍結保存した神経を多数の臨床例に用いられてきた²⁾。この本法は、免疫抑制剤の進歩に伴い臨床成績の向上をみた。しかし、移植された同種神経が自己の神経に置換されるまでに長期間を要すること、免疫抑制剤を使用するためにその副作用が生じることなどの問題点がある。また、採取に伴う倫理的問題点も有している。

4. 凍結処理同種神経移植

免疫抑制剤を用いない末梢神経の再生方法として、採取した神経を凍結と解凍を繰り返し、基板成分のみに単純化した移植材を用いた座

骨神経の再生実験が行われ、形態的に良好な再生が観察されてたと報告されている^{3,4)}。

人工神経接合チャンネル

末梢神経再生の様式

神経幹の損傷が起こるとシュワン細胞が増殖してルートを開き、その後を神経軸索が伸展して修復を開始する。しかし、神経幹が完全に断列しているとギャップの間に線維芽細胞の増殖を伴うため再生軸索は伸展を妨げられて、末梢断端にたどり着けない場合が多く、神経腫を形成して機能を失う。また、末梢断端までたどり着けた軸索も本来の標的器官に出会うとは限らず過誤支配（misdirection）を起こす。再生軸索の伸展速度は1 mm/dayといわれており、断裂した場合は末梢側の変性が起こるため損傷部の修復時間に加えて、損傷部から効果器官までの距離によっても機能回復期間や程度が影響される。そこで、1980年代初め頃より人工的な材料による接合チューブを用いて、末梢神経のギャップを連結し、神経の再生を試みる研究が盛んに行われるようになってきた。

接合チャンネルの具備すべき条件

現在、人工神経に求められている条件は以下の如くである。

- ・神経束の再生まで外部からの結合組織の進入を防ぐこと
- ・チャンネル内外の物質交流が可能なこと
- ・チャンネル内に軸索やシュワン細胞の増殖に適した足場となる物質が充填されていること
- ・再生後はチャンネルの材料は分解吸収されること
- ・軸索や細胞の成長増殖因子が人為的に組み込み可能なこと
- ・培養増殖させた細胞（シュワン細胞など）の組込が可能な構造であること

接合チャンネルの種類

1. 非吸収性人工材料

1980年代よりシリコン、ポリエチレンテレフタレートなどの非吸収性人工材料で作られた人工神経（チューブ状）による神経再生の動物実験が多く試みられてきた。当初これらのチューブは非吸収性材料による中空状のチューブであったが、改良が加えられ内部にフィブリン、コラーゲン・ゲル、コラーゲン・ファイバーなどを充填し再生神経の足場とする試みがなされた^{5,6,7,8)}。

これらの人工神経は小動物の座骨神経などの比較的短いギャップ（10mm～20mm）に用いられ、組織学的連続性および電気生理学的な回復を示すにとどまり、自家神経移植を越えた成績を報告しているものはない。非吸収性人工材料によるガイドチューブではチューブ内外の物質交流ができないこと、毛細血管の新生が起こらないことなどが、長いギャップ再生の場合に良好な結果が得られない原因ともされている。

2. 生体内分解吸収性材料

シリコンなどの非吸収性人工材料とは異なり、生体内で加水分解を受け吸収される人工材料が検討されている。

Bora⁹⁾らはネコ座骨神経のギャップ（15mm）を吸収性のポリオルソエステルのチューブで連結し、形態学的な神経連続性の回復および電気生理学的機能の回復が観察されたと報告している。Mackinnon¹⁰⁾らはマクソンのメッシュチューブと牛腱由来のI型コラーゲンチューブの比較し、サルの尺座骨神経20mmのギャップでは両材料は組織学的、電気生理学的にも良好な再生を観察できたものの、橈骨神経の50mmのギャップでは形態学的にもほとんど再生を観察できなかったと報告している。

また、Mackinnon¹¹⁾は polyglycolic acid (PGA) のチューブを指神経損傷の15例に応用し、1/3が excellent、1/2が

good result であったと報告している。現在、臨床で使用されている人工神経はPGAチューブ (NEUROTUBE, Neuroregen, L.L.C., USA)のみであり、ヒトの末梢神経の30mm以下のギャップで神経移植と同等の結果が得られると報告されている。このチューブは日本では認可されていないため臨床報告はされていない。

国内の研究状況

●京都大学再生医科学研究所：清水慶彦先生

ポリグリコール酸（PGA）—コラーゲン複合チューブ

ポリグリコール酸（PGA）の筒状のメッシュに豚由来のコラーゲンをコーティングし熱架橋を加え作成した複合チューブ。

1. チューブ内にはラミニンを含む Matrigel に細胞増殖因子を

① nerve growth factor (2.5S Mouse NGF, 100 μ g/tube)

② basic fibroblast growth factor (human recombinant bFGF, 10 μ g/tube)を加えたものを充填した群と中空状の群とを比較した。

実験動物：ネコの座骨神経（ギャップ長：25mm）

結果：細胞増殖因子を含むマトリゲルを充填した群では形態的に中空群と比較軸索の再生数が多く電気生理学的にも早期の回復が認められた。歩行パターンも7ヶ月後には正常の歩行パターンを示したと報告している^{12,13)}。

2. I型コラーゲン糸の表面にラミニン・コーティングを行った糸束を充填
実験動物：イヌの総腓骨神経（ギャップ長：80mm）

結果：形態学的にも電気生理学的にも早期に良好な回復を認め、歩行パターンも3ヶ月頃には正常化したと報告している^{14,15)}。

《臨床》

2000.2.1 京都府立医科大学付属病院にて日本初の人工神経移植が施行された。患者は直腸腫瘍のため骨盤

内臓摘出手術を施行され、左座骨内の神経に生じた約 25mm のギャップをポリグリコール酸 (PGA) - コラーゲン複合チューブにより接合された。経過は順調であると報道されている。

●京都大学・奈良先端科学技術大学 アルギン酸スポンジ/ポリグリコール酸 (PGA)

アルギン酸の架橋ゲルを凍結乾燥し、スポンジ状にしたものをポリグリコール酸 (PGA) メッシュで巻いて棒状にしたもの。

実験動物：ネコの座骨神経 (ギャップ長：50mm)

結果：術後 13 週で電気生理学的回復が認められ、術後 7 ヶ月の組織学的評価では癒痕組織の侵入はほとんど無く、多数の軸索が確認でき再生に有用であると報告¹⁶⁾。

アルギン酸スポンジ

アルギン酸の架橋ゲルを凍結乾燥し、スポンジ状にしたもの。

1. 末梢神経

実験動物：ネコの座骨神経 (ギャップ長：50mm)

結果：術後約 8 週で電気生理学的に良好な結果が得られ、形態学的には正常神経と比較し細く、低密度の神経束が観察されたと報告¹⁷⁾。

2. 中枢神経

実験動物：幼若ラット (生後 8~10 日) の胸髄 Th7~8 のレベルで約 2mm のギャップを作成した。

結果：術後 6 週にて電気生理学的接続が確認でき、術後 8 週の組織学的評価ではギャップを越えた軸索の伸長が確認できたが、運動機能に関してはほとんど回復が見られなかったと報告¹⁸⁾。

●金沢医科大学、日本ハム

Polyethylene terephthalate (PET) - コラーゲン複合チューブ

豚由来のコラーゲン糸にラミニン、フィブロネクチンをコーティングし Polyethylene terephthalate (PET) のチュ

ーブないに充填した。

実験動物：ラットの座骨神経 (ギャップ長：10mm)

結果：術後 60 日で電気生理学的に良好な回復が観察されたと報告²³⁾。

●東京医科歯科

シリコン-コラーゲンチューブ

シリコンチューブ内にラミニン、合成ラミニンペプチド (YIGSR 配列) をコーティングしたアテロコラーゲン繊維を充填した。実験動物：ラットの座骨神経 (ギャップ長：15mm)

結果：シリコンチューブ内にアテロコラーゲン繊維を充填しただけのものと比較し、ラミニン、合成ラミニンペプチド (YIGSR 配列) をコーティングしたアテロコラーゲン繊維を充填した群では、形態学的に有意に回復が認められたと報告している¹⁹⁾。

キトサンチューブ

カニの腱由来のキトサンによりチューブを作成、内面にラミニン・ペプチドをコーティングした。

神経栄養因子

人工神経接合チャンネルにおいても内部に神経栄養因子などの添加が検討されている。神経栄養因子には神経細胞の生存維持、分化、シナプスの形成抑制など様々な因子が発見されている。これらの中には FGF、EGF、IGF、TGF- β などから脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor : GDNF)、毛様体由来神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor : CNTF) および合成ピリミジン化合物 (MS-818, MS-430) など様々な因子が検討され、その有用性が期待されている。

中枢神経系に関する研究

神経幹細胞

従来、中枢神経系では新たな神経

細胞は産生されないと考えられてきた。しかし、近年ヒトの成熟脳においても神経幹細胞が存在し、抽出、培養が可能なが報告された。このため神経幹細胞をドナー細胞とした細胞移植療法への期待が高まっている。

ヒトの場合、神経幹細胞は脳質の周囲 subventricular zone(SVZ)、海馬から抽出し培養が可能である^{20,21)}。また、これらの細胞は適切な培養条件下で機能的な神経細胞への分化も可能であると報告されている²²⁾。

これらの神経幹細胞を用いた移植治療実験では、ホスト神経組織内で

- ・高い生着率
- ・正常脳組織内での高い遊走能
- ・正常脳内では必要以上に分裂・増殖しないこと
- ・増殖・分化にはホスト神経組織の微小環境に高度に依存すること

などが示されており、細胞移植治療法のドナー細胞として期待されている。

一方、骨髄中に含まれる細胞を神経系へと分化誘導し、この細胞をドナー細胞として用いる治療も報告されている²³⁾。

その他の治療

中枢神経の再生に用いられる移植材料は生体由来の移植材がほとんどで、主なものは Iwashita¹⁹⁾が同種胎児脊髄組織、Cheng²⁰⁾らが自家肋間神経、Li²¹⁾らが olfactory ensheathing cell、Guest²²⁾らが異種シュワン細胞などを報告している。

参考文献

- 1)Seddon HJ : Three types of nerve injury. *Brain* 66: 237, 1943
- 2)Susan, E., Mackinnon, M. D.: *J. Neurosurg.*, 84, 671-676, 1996
- 3)Ide, C., Osawa, T., Tohyama, K. : *Neurobiology*, 34, 1-38, 1990
- 4)Tajima, K., Tohyama, K., et al.: *J. Bone Joint Surg.*, 73, 172-185, 1991
- 5)Lundborg, G., Dahlin, L.B., et al : *Exp Neurol* 76, 361-375, 1982
- 6)Spector, J. G., Lee, P., et al : *Laryngoscope*, 103, 548-558, 1993
- 7)Tong, X., Hirai, K., et al : *Brain Res.*, 663, 155-162, 1994
- 8)Valentini, R.F. : pp. 1985-1996, CRC Press & IEEE Press, USA, 1995
- 9)Bora, F.W., Sumner, A.J. : *J. Hand Surg.*, 12, 685-692, 1987
- 10)Mackinnon, S.E., Dellon, A.L : *J. Reconst. Microsurg.*, 6, 117-121, 1990
- 11)Mackinnon, S.E., et al : *Plast Reconstr. Surg.*, 85, 419, 1990
- 12)Kiyotani, T., Teramachi, M., et al : *Brain Res.*, 740, 66-74, 1996
- 13)鈴木 京子、清谷 哲也、他 : *人工神経*、27、490-494、1998
- 14)Matsumoto, K., Ohnishi, K., et al : , *American Society for Artificial Internal. Organs J.*,46, 415-20, 200
- 15)Matsumoto, K., Ohnishi, K., et al : , *Brain Res.*, 868, 315-28, 2000
- 16)Suzuki, Y., Tanihara, M.,et al : *Neurosci Lett* 259, 75-78, 1999
- 17)吳 溯帆、鈴木 義久、他 : *人工臓器*、29、225-227、2000
- 18)片岡 和哉、鈴木 義久、他 : *人工臓器*
- 19)Itoh, S., et al : *J Marerial Science : Materials in Medicine* 10, 129, 1999
- 20)Akiyama, Y., et al : *Exp Neurol* 167, 27-39, 2001
- 21)Honmou, O., et al : *Restrative Neurology and neuroscience*, 17, 147, 2000
- 22)端 和夫、他 : *脳と循環*、5、53-57、2000
- 23)Sasaki, M., et al : *Glia* 35, 26-34, 2001
- 24)Iwashita, Y., Kawaguchi, S., et al : *Nature* 367, 167-170, 1994
- 25)Cheng, H., Cao, Y., et al : *Science* 273, 510-513, 1996
- 26)Li, Y., Field, P.M., et al : *Science* 277, 2000-2002, 1997
- Guest, J.D., Rao, A., et al : *Exp Neurol* 148, 502-522, 1997

調査報告 (6)

中枢神経細胞移植

(担当：大阪大学医学部機能制御外科 澤 芳樹)

1. 対象臓器・疾患及び細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性
変性性疾患や外傷などにより生じた中枢神経系の損傷において、ヒト成人の中枢神経系では、ニューロンを産生し組織を再構築しようとする機転が働かないため、不可逆的である。近年、細胞移植によって新たな神経回路を構築することにより、神経機能を再生させようとする研究が続けられている。現実には、Parkinson病に対して胎児脳の黒質部を移植する試みは1980年代後半に欧米で臨床応用され、ある程度の治療効果が得られている。しかし、これまでの胎児組織移植においては、人工流産により提供された検体が用いられており、倫理面での問題を多く抱えているものと思われる。また、倫理面だけではなく、Parkinson病に対する移植治療では、1回に4-8体の胎児が用いられており、ドナー確保にも大きな問題を抱えている。

近年、神経幹細胞や胚性幹細胞の性質が次々と明らかになり、脳に移植するとニューロンやグリアに分化することもわかってきた。倫理面、ドナー不足等の問題を解決する方法として、このような神経幹細胞、胚性幹細胞の移植による神経再生が次世代的治疗法として注目されている。

2. 神経幹細胞移植による神経再生
幹細胞とは、その細胞と同等な性質を持った細胞を細胞分裂により作り出せる能力、及びその細胞より多種類の細胞を作り出せる能力を併せ持つ細胞である。神経幹細胞は、epidermal growth factor(EGF)、またはbasic fibroblast growth factor(bFGF)存在下で自己複製を行い、培養条件を変えることによって、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化し、他に様々なニュー

ロンが出現することが報告されている。

神経幹細胞を移植細胞として用いる利点として、以下の項目を挙げることができる。

a. *in vitro* で増殖させられるので均一な細胞を大量に得ることが可能

b. 分化誘導を行うことによって必要なタイプのニューロンを選択的に移植可能

c. 神経系由来の細胞であるため、胎児ニューロンと同様にレシピエントとの新たな神経回路網が形成可能

移植した神経幹細胞が、レシピエント神経系とシナプスを形成するか、適当な部位で適当な細胞に分化し、成熟していくことは、重要な問題である。MaKayらは、胎児由来の幹細胞を用いてグリア細胞なしでも、*in vitro* においてシナプスの形成が認められたことを報告しており(1)、さらにこの細胞を胎児海馬に移植し、生後にこの細胞が脳内でシナプスを形成していることを確認した(2)。また、Suhonenらは、成体海馬由来の幹細胞を成体ラットの海馬、小脳、rostral migratory pathway(RMP)に移植したところ、RMPに沿って嗅球に移動し、嗅球に特有なカルビンデインまたはTH陽性ニューロンやNeuN陽性ニューロンへと分化していたことを報告した(3)。

また、神経幹細胞移植の臨床応用において、ヒト由来神経幹細胞が存在するかということは、極めて重要である。Vescoviらは、single cell cultureによってsingle cell由来の細胞をヒト胎児脳から得ることに成功し、その細胞が*in vitro* においてニューロンにもグリアにも分化しうることを証明した(4)。また、成人脳に関しては、Royらは、ヒト海馬から神経幹細胞様の細胞を分離培養し、この細胞が*in vivo* でニューロンに分化すること

を報告し(5)、少なくとも成人脳においてニューロン新生を起こす細胞が存在することを示唆した。

3. 胚性幹細胞移植による神経再生
胚性幹細胞は、初期胚中の未分化細胞に由来する全能性幹細胞であり、1998年にヒトES細胞株が樹立されると(6,7)、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉に属する細胞への多分化能を保持することが注目され、新たなドナー細胞として期待されるようになった。

In vitroで分化をコントロールすることができれば、ES細胞から必要なニューロンやグリアを大量に得て移植に用いることが可能である。In vitroにおいて、Deaconらは、レチノイン酸処理したマウスES細胞をマウスやラットの脳内に移植し、それがTHや5-HT陽性のニューロン、GFAP陽性のアストロサイトに分化することを報告した(8)。

このように、ES細胞由来の神経系細胞移植による神経再生は、可能であると思われるが、今後分化をどのようにコントロールするかが重要な問題となるものと思われる。

4. 細胞単離、培養、増殖

Weissらは、neurosphere法を開発し、成体マウスの線条体に神経幹細胞が存在することが、初めて報告された(9)。neurosphere法とは、中枢神経系より採取した細胞を非接着性の培養皿で、高濃度のEGFかbFGF、またはその両方を含む無血清培地により培養する方法で、採取した細胞中にわずかに存在する神経幹細胞が増殖因子に反応し、選択的に培地中に浮遊した状態で増殖し、球形の細胞塊を形成する。この細胞塊を接着性の培養皿に撒き、培地から増殖因子を除き血清を加えることで、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが産生される。

5. 臨床応用における問題点

a. 神経幹細胞

上述したように、ヒト脳から、神経幹細胞が得られることが判明し、神経幹細胞を臨床応用できる期待が高まっている。しかし、神経幹細胞を臨床応用するためには、様々な問題を解決することが重要であるものと思われる。神経幹細胞の臨床応用に関する問題点を列記する。

ア. 胎児由来神経幹細胞を移植に用いる場合、胎児細胞利用するという点で、倫理的な問題が生じる。

イ. 成人神経幹細胞を移植に用いる場合、非常に数が少ないことが予想されるため、どのようにして均一で大量の細胞を高度の安全性を保ちつつ移植の場に供給できるかが重要な問題点である。また、神経幹細胞を分化増殖させる際に、どのように分化をコントロールして目的とする細胞を効率よく得るか今後の検討を要するものと思われる。

b. 胚性幹細胞

胚性幹細胞を臨床応用するためには、以下の問題を解決することが重要であるものと思われる。

ア. ES細胞の樹立において、受精卵もしくは中絶した胎児より採取した始原生殖細胞を用いるため、倫理的問題が生じるものと思われる。

イ. 胚性幹細胞はテラトーマを形成する可能性があるため、分化を誘導してから移植する細胞を純化して、胚性幹細胞を除く必要があること。

ウ. 胚性幹細胞は、多分化能を有するため、的確に目的とする細胞を分化誘導させることが重要であり、今後分化制御機構の解明が鍵となるものと思われる。

6. 参考文献

1. Vicario-Abejon C, et al. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci* 12:677-688,2000.
2. Auerbach J M, et al. Transplanted CNS stem cells form functional synapses in vivo. *Eur J Neurosci* 12:1696-1704,2000.
3. Suhonen JO, et al. Differentiation of