

骨の形態的解析法の進歩

骨の *in vivo* 蛍光イメージングの現状と展望

飯村忠浩^{1,2)}、中根綾子^{2,3)}、姫野彰子^{1,2,4)}、杉山真由⁵⁾、山口朗^{1,2)}

¹⁾東京医科歯科大学・グローバル COE、

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・²⁾口腔病理学分野、³⁾小児歯科学分野、⁴⁾歯周病学分野

⁵⁾東京薬科大学大学院生命科学研究科ゲノム情報学研究室

Key words: skeletal development, bone, microscopy, imaging

抄録

骨組織を対象にした“イメージング”研究が話題になりつつある。もっとも硬い組織である骨に最新の光を当てて何がわかってきたのか？本稿では、骨格系の発生や骨組織を対象とした蛍光イメージング観察のトピックスを上げ、「骨の *in vivo* 蛍光イメージング」の現状報告とその展望について議論する。

イントロダクション

生命が正常に発生し恒常性を維持するには、細胞の増殖や分化・機能発現が、時間的にも空間的にも正しい位置で生じることが必要である。同様に、そのような細胞機能を担う生体分子も時空間的に適切な場所で機能している。蛍光タンパク質や蛍光物質によって標識された細胞や分子の動態を観察する「蛍光イメージング」は、時間や空間の流れの中でそれらの動態を観察することを可能にする。本稿では、まず、蛍光イメージングに用いられる通常の蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡さらに多光子レーザー顕微鏡（二光子励起観察）について概説する。そして、それらの顕微鏡を用いた研究トピックを、骨格系の発生や骨組織を対象とした個体や組織レベルでの蛍光観察にフォーカスを当てて紹介し、「骨の *in vivo* 蛍光イメージング」の現状報告としたい。なお、蛍光顕微鏡や蛍光イメージングに関するより詳細で網羅的な解説は、すぐれた良書があるので参照されたい¹⁻⁴⁾。

蛍光

ある分子内の電子が何らかのエネルギーによって励起状態になり、励起状態からより安定な基底状態に戻るときに発する光を「蛍光」という（図 1-a）。基底状態の軌道にあった電子が、励起光のエネルギーによってより高いエネルギー準位に遷移する。しかし、この状態は電子にとって不安定であり、すぐにエネルギーを放出して基底状態に戻る。この放出エネルギーの一部が光として放出されたものが蛍光である。この際、放出

されたエネルギーは、分子に与えられたエネルギーより小さい。したがって、蛍光物質が特定の波長の光を吸収した際に発する蛍光の波長は、かならず吸収波長より長いものになる（長波長シフト）。蛍光顕微鏡の光学系は、この長波長シフトの性質を利用して設計されており、それぞれの蛍光物質の長波長シフトの性質の違いを利用することで、マルチカラー（多色）の蛍光観察が可能になる。

全視野顕微鏡

全視野顕微鏡いわゆる最もスタンダードな蛍光顕微鏡は、対物レンズを通して励起光を試料に照射する（図 2）。波長の違いを利用して励起光と蛍光を分離するのがダイクロイックミラーである。ダイクロイックミラーは光の波長に応じて透過率が異なるミラーで、低波長の励起光を反射し、長波長の蛍光を透過させるように設計してある。図 2 では鏡筒内に、ダイクロイックミラーが 45 度に傾けて設置されており、励起光源は鏡筒に垂直方向に設置されている。光源を発した励起光はダイクロイックミラーで反射され、対物レンズを通過して試料に照射される。一方、試料から発した蛍光は対物レンズを通過し、さらにダイクロイックミラーを通過して検出器に到達する。繰り返しになるが、励起光を反射し、長波長の蛍光を透過させるのが、ダイクロイックミラーのミソである。

全視野顕微鏡の場合、光源として水銀ランプやハロゲンランプを用いるので波長の幅は広く、いわゆる青から赤までの励起が可能である。必要な波長（幅）の励起光のみを選択するためのフィルターが励起フィルターで、光源とダイクロイックミラーの間に置かれる。一方、検出の際は、迷光を除き特定の波長の蛍光のみを選択するためのバリアフィルターが検出器の前に置かれる。

共焦点レーザー顕微鏡の仕組み

共焦点蛍光顕微鏡は各種のレーザーを光源とするが、ダイクロイックミラーなど光学系は全視野蛍光顕微鏡と同様である。レーザーを一点に集光し、その一点から出た光を、焦点位置に置いたピンホールを通して PMT (photomultiplier tube ; 光電子増倍管) で検出する。これによって焦点面からずれた光を排除し、より高解像度の画像を得るように設計されている。励起光の集光点とピンホールの位置関係が互いに焦点になるように設計されてことから共焦点顕微鏡と呼ばれる。

多光子レーザー顕微鏡（二光子励起観察）

同じ波長の 2 個の光子が同時に蛍光色素をヒットした時に、その半分の波長の光子 1 個によるものと同様の励起が起こる（図 1-b）。このことを二光子励起という。二光子励起観察では、二光子励起が起こる頻度は光子の密度の 2 乗に比例するため、高出力レーザーいわゆるフェムト秒レーザーを光源に用い、目的の蛍光色素の励起波長の 2 倍の

波長の光（エネルギーが半分）を励起光として用いる。蛍光を検出する際に、PMTの前にピンホールは置かない。二光子励起が起こる頻度は集光点に集中しそれ以外の領域を励起しないため、ピンホールがなくても共焦点顕微鏡と同じ効果を出すことができる。そのため、試料に対するダメージや蛍光の褪色を少なくできるという利点がある。また、赤外光を用いるため、散乱が少なく試料の深いところまで減衰せずに励起光が到達できることから、生物試料のより深いところまで観察することが可能である。像の明るさは二光子励起の効率に依存するので、蛍光の暗い試料には適さないと考えられる。

三次元イメージング

細胞や組織の三次元像は、顕微鏡の焦点を段階的に移動させながら各焦点面での顕微鏡像を集め、これらを積み重ね再構成することで得られる。しかしながら、このように作られた三次元顕微鏡像は、試料物体の忠実な拡大ではない。光学的な「にじみ」を含んでいる（図 3）。たとえば、直径 $0.1 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズは分解能の限界より小さいので点光源とみなせる（図 3-a）。蛍光顕微鏡で焦点を段階的に変えながらこの蛍光ビーズの三次元像を撮ると、焦点面から離れるにつれて点像が同心円を描いて広がる（図 3-b）。また、これを光軸に沿った断面図で見ると、焦点面の上下で円錐状に広がる（図 3-c）。すなわち、一点から出た光が顕微鏡を通った時に、光軸方向に延びた楕円球とそれを幾重にも囲むリング状の縞として三次元的に広がる。このように、厚みのある三次元試料の顕微鏡像を撮った時に、光が焦点面だけに留まらず、隣接する領域に「にじみ」を持って検出される。

このように、顕微鏡中では一点から出た光が三次元的に広がるが、この広がりを数学的に記述する三次元関数は点像分布関数（PSF ; point-spread function）と呼ばれる。その結果、三次元の試料物体の各点からの光は、それぞれに広がり互いに重なり合って三次元像を形成する。この「にじみ」が顕微鏡の分解能を著しく低下させることになる。このため、高分解能の三次元顕微鏡像を得るためには、「にじみ」をなくして元の試料物体にできるだけ近い像を得る工夫が必要となる。単層の培養細胞ではなく、骨組織のような多層の細胞からなる組織の観察には、バックグラウンドやアーチファクトを除き本来のシグナルを得るうえで重要な課題である。

この工夫として、コンピュータ演算による画像処理があげられるが、現在普及しているものとして、デコンボリューション演算がある。顕微鏡像の輝度分布は、試料物体の輝度分布と点像分布関数とのコンボリューション（convolution : 重畳積分、たたみ込み積分）と呼ばれる積分になる。したがって、コンピュータ演算によって、コンボリューションの逆演算としてデコンボリューション（deconvolution）処理を行えば、顕微鏡像の「にじみ」を数学的に除去し本来の試料物体の輝度分布を回復することが可能となる。

一方で、共焦点顕微鏡では、受光器の前にピンホールを置くことによって非焦点面から来る光を排除するため、点像分布関数を数学的には小さくすることと同様の効果が期

待できる。これによって、観察される顕微鏡像の輝度分布を試料物体の輝度分布に近づけることができる。二光子励起観察では、励起の生じる空間を絞ることで、共焦点顕微鏡と同様の効果が可能になる。

顕微鏡の選択

どの顕微鏡システムを選ぶかは、観察したい対象や実験の内容による。全視野顕微鏡は弱い励起で十分な明るさの画像を得られるので、励起による細胞毒性を抑え、生細胞イメージングを行うには非常に有効であり、設備投資の面でも最もスタンダードである。しかしながら、上記のように全視野顕微鏡は非焦点情報を含むので、高い分解能を得たい場合には、三次元画像を撮ってデコンボリューション演算で非焦点情報を除去する必要がある。これに対して、共焦点顕微鏡は、演算処理をしなくてもより高い分解能が得られる。組織切片や卵細胞など試料が厚く、蛍光が十分に明るい場合は、共焦点顕微鏡が適すると考えて良い。透明度の低い充実した組織で、より深いところからのシグナルも拾いたい場合には、多光子レーザー顕微鏡による二光子励起観察が良いと思われる。以下、それぞれの顕微鏡を用いた蛍光観察のトピックスを紹介する。各項目のはじめに、使われている顕微鏡系の簡単な解説を述べ、続いてそれぞれの研究から得られた知見について紹介する。

全視野顕微鏡によるニワトリ胚個体の蛍光ライブイメージングによる骨格系前駆細胞の観察

ニワトリ初期胚は、平板な円盤状で組織層が比較的薄く、胚組織からの蛍光シグナルを得るのに好都合である。また、卵の外に出しても培養 (ex ovo) が可能なので、顕微鏡下でのライブ観察に適している。成長に従って、組織の厚みが変わるために、焦点面も変化するのが問題となるが、以下に紹介する **Limura** らの研究では、最も輝度値の高い焦点面に自動でフォーカスが合うように、試料ステージを動かすプログラムを用いている。したがって、蛍光観察は、2次元情報の経時間的なライブ観察を採用している。

Limura ら⁵⁾ は、ニワトリ胚を全視野顕微鏡下で培養し、中軸骨格 (脊椎骨) の前駆細胞を含む中胚葉の形成と形態形成運動を蛍光観察し、脊椎動物の中軸骨格の形態形成に重要な **Hox** 遺伝子群の新規機能を明らかにした。**Hox** 遺伝子群の初期胚における機能分担を調べるために、個々の **Hox** 遺伝子を発現ベクターに組み込んだ。その際に標的遺伝子の下流に **IRES (Internal Ribosomal Entry Site)** を介して蛍光タンパク質を組み込み、組織非特異的なユビキタスプロモーターにより、**Hox** と蛍光タンパク質が同時に発現することを期待した。また、異なる **Hox** の機能分担を比べるために、緑と赤の2種類の蛍光タンパク質を用いて、それぞれの **Hox** 発現細胞の動きや系譜を観察した。これらの発現ベクターを電気的遺伝子導入法で中胚葉前駆細胞のわずかな集団 (数十から数百) に遺伝子を導入したのちに、経時間的なライブ観察を行った。さらに、そ

それぞれのHox遺伝子を発現する細胞の分布パターンを詳細に計測した。これによって、Hox遺伝群が中胚葉の形成段階で機能発現し、ゲノムの3'側に位置するHoxほど中胚葉細胞を頭側へ、5'側のHoxほど尾側へ中胚葉細胞を分布させる能力があることを観察した。Hox遺伝子群は39個の相同な転写因子群が4つゲノム上に分布し、それぞれのゲノム上で約10個の遺伝子が連続して並んでいる。これまで、Hoxのゲノム上での配列順番と頭尾軸に沿った機能発現が相関することが知られていたが、この観察は、その相関性を確立するための極めてシンプルかつ合理的なプロセスを明らかにした。

さらに、Imuraら⁶⁾は同様のライブ観察法をさらに発展させ、中軸骨格形成にかかわる中胚葉前駆細胞の形成には、定位置にとどまって前駆細胞を産生し続ける幹細胞集団と、周囲から流入し幹細胞由来の細胞集団と合流する2つの細胞集団があることを観察した。すなわち、細胞増殖の著しいと思われる初期胚において、自己複製能の高い細胞集団と、比較的低い細胞集団が時空間的に分布・強調して、形態形成を担っていることが明らかとなった。

共焦点レーザー顕微鏡によるゼブラフィッシュ胚の発生における細胞周期進行の網羅的観察

ゼブラフィッシュ胚は、透明度が高くしかもほぼ室温に近い温度で発生するので、ライブ観察に最も適したモデル脊椎動物である。共焦点レーザー顕微鏡を使えば数百ミクロンの深さからのシグナルも高解像度で検出可能である。以下に紹介するSugiyamaらの研究では、3次元画像の経時間的なライブ観察により、発生過程に出現するほぼすべての細胞核の検出に成功している。

Sugiyamaら⁷⁾は、細胞周期インディケーター(Fucci: Fluorescent Ubiquitination-based cell cycle indicator)を導入したトランスジェニック・ゼブラフィッシュ(Cecyl: Cell cycle illuminated)を作成した。さらに、Cecyl胚を共焦点レーザー顕微鏡下で3次元の経時間的なライブ観察(4次元観察)をすることによって、胚発生過程における細胞周期の進行パターンを時間的にも空間的にも網羅的に観察することに成功した。細胞周期インディケーター(Fucci) Sakae-Sawanoらによって哺乳類版が開発されていた。Sakae-Sawanoら⁸⁾は、細胞周期の制御にかかわる二つのタンパク質、Cdt1とGemininの動態に注目した。すなわち、Cdt1タンパク質およびGemininタンパク質はS/G2/M期とGo/G1期に、それぞれ細胞周期の時期特異的にユビキチン化され分解されることに注目した。したがって、Cdt1タンパク質はGo/G1期にのみ、Gemininタンパク質はS/G2/M期にのみ細胞核内に存在し機能する。そこで、オレンジ色蛍光たんぱく質(mKO2: monomeric Kusabira Orange 2)とCdt1のユビキチン化配列を含む部分配列を融合したタンパク質を、Go/G1期のインディケーターとした。同様に、緑色蛍光タンパク質(mAG: monomeric Azami Green)にGemininのユビキチン化配列を含む部分配列を融合したタンパク質を、S/G2/M期のインディケーターと

した。これらの融合たんぱく質を発現する DNA コンストラクトを組織非特異的ユビキタスプロモーターでドライブすることで、培養細胞およびマウス個体において、細胞周期をオレンジ色と緑の相補的な蛍光色のシグナル変化としてライブ観察することが可能になった。このオリジナル Fucci の、とくに、Cdt1 を用いたインディケーターは魚類では有効に機能しなかった。それは、魚類と哺乳類間でのユビキチン化の機構が異なるためであった。そこで、Sugiyama らは、魚類版での Fucci、すなわち zFucci を作成し、胚発生における細胞周期の進行の様子をライブ観察することに成功した。

二光子励起によるマウス胚の分節時計遺伝子の時空間的発現パターンの観察

マウス咽頭期胚は、透明度も高くなく共焦点レーザー顕微鏡では表層のシグナルしか検出できない。以下に紹介する研究では、マウスの胚の一部を顕微鏡下で培養し、二光子励起法により深部から表層にかけてのシグナルをまとめて投射する方法で検出し、微弱なシグナルの時空間的な変遷を可視化するのに成功している。

Aulehla ら⁹⁾は、二光子励起法により培養マウス胚をライブ観察し、脊椎骨の分節形成に関わる時計遺伝子（分節時計）の発現リズムを可視化することに成功した。分節時計遺伝子の一つである Lunatic Fringe のプロモーターの下流に蛍光タンパク質 Venus を発現するトランスジェニック・マウスを作成し、時計遺伝子の時空間的な発現パターンをライブ観察した。その際、蛍光タンパク質 Venus の半減期は十数時間と長いため、2 時間周期の時計遺伝子の発現のオン・オフを可視化するためには時間分解能が不十分であった。この問題を解決するために、トランス・ジーン（導入遺伝子）の下流に mRNA を不安定化する配列を導入し、さらに Venus にもタンパク質分解を促進するアミノ酸配列を導入した。

骨細胞の蛍光イメージングによる形態計測

骨細胞は、骨を構成する細胞のなかで最も多く存在する細胞で、骨組織中に細胞突起ネットワークを形成している。また、機械的刺激を受容して骨代謝を調整していることから、そのネットワークの可視化は、蛍光イメージングによる 3 次元再構築の対象として意義深い。Kamioka らの一連の研究では、より高解像度でのネットワーク再構築を意図して、幼弱な骨の定点観察がなされている。

Kamioka ら¹⁰⁾は、胎生 16 日のニワトリの頭蓋骨に f-actin を染色する蛍光 phalloidin とニワトリ骨細胞に特異的なモノクローナル抗体 OB7.3 で蛍光染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡と微分干渉レーザー顕微鏡を用いた骨組織の同時撮影によって、骨表面に存在する骨芽細胞から、骨深部に存在する骨細胞の蛍光断層切片を作製し骨細胞性ネットワークを観察した。さらに、同じ研究グループの Sugawara ら¹¹⁾は、同様に胎生 16 日ニワトリ頭蓋骨に phalloidin 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いた 3 次元再構築を行った。詳細な画像解析により、細胞突起の長さ、細胞の表面積や体積を測定し

た。この手法により、実際の骨細胞ネットワークが再現でき、蛍光染色した骨細胞から形態計測データを手に入れることが可能になった。

Vasta ら¹²⁾は、共焦点レーザー顕微鏡と nano-CT を用いて、マウスの頭蓋骨と腓骨の骨細胞の形態の違いを観察し、前者が球状で後者が紡錘形であることを観察した。また、骨細胞の配向性は、腓骨でより機械的刺激に対する加重方向（すなわち長軸方向）へ並ぶ傾向があることを観察した。同じグループの van Hove ら¹³⁾は、ヒトの頸骨近位端の骨細胞(Osteocyte)と骨小腔(Osteocyte lacunae)を3種類の症例で調べた。症例は、BMD(bone mineral density)が低い骨減少症、中程度の変形性関節症、さらに BMD が高い大理石骨病の3種で、結果は、骨細胞1つあたりの大きさは骨減少症のものが比較的大きく丸く、変形性関節症のものは比較的小さく円盤状で、大理石骨病のものは比較的大きく紡錘形であった。骨小腔1つ当たりの体積や表面積は、変形性関節症が最も小さい値を示した。これらの観察結果は骨細胞の機械的刺激への感受性の違いを反映している可能性があると考えられている。

二光子励起法による骨髄のライブ観察

2009年には、生きた骨髄を対象とした、二光子励起法によるライブ観察を用いた重要な知見が相次いで報告された。充実した組織である骨髄中を細胞は3次的に動き回るので、深部からのシグナルを検出できる二光子励起法は極めて有効である。

Xie ら¹⁴⁾は、造血系幹細胞を蛍光タンパク質 GFP でラベルし、ホストマウスに移植した。4時間後に移植マウスから大腿骨を取り出し、顕微鏡下で培養し、二光子励起による骨髄のライブ観察を、いわゆる *ex vivo* で行った。これによって、造血系幹細胞はおもに海綿骨領域に分布すること、通常は骨髄内に広く分布しているが、放射線照射された骨髄では、骨内膜周辺に集積する傾向があることを明らかにした。

Ishii ら¹⁵⁾は、成獣マウスを顕微鏡下に固定し頭蓋冠を露出させ、対物レンズを直接に頭蓋骨にあてることで、二光子励起による骨髄のライブ観察を行った。破骨細胞前駆細胞を蛍光タンパク質 GFP でラベルし、Sphingosine-1-phosphate(S1P)が破骨細胞前駆細胞の血管から骨表面への遊走を、ネガティブに調節することを明らかにした。このことは、S1Pの破骨細胞系譜特異的なノックアウトマウスが、骨粗鬆症様のフェノタイプを示すことから確かめられた。

今後の展望

細胞や分子の機能を蛍光や発光の光の変化としてとらえる機能的イメージングは、その輝度値の変化量と空間的・時間的な分布パターンから、組織や細胞をありのまま (*in situ*) に、より定量的なアッセイを可能にする。一方、このような機能的イメージングには、最新技術にはつきものの、適用限界がある。機能的イメージングの技術は培養細胞や比較的単純な構造の実験動物系など、単層で均一な細胞系を用いて発展してきた。

しかしながら、脊椎動物個体や臓器など多細胞系への応用の際には、様々な理由でノイズが生じ本来のシグナルを検出することが困難になる。とくに骨組織は充実性の結合組織で、自家蛍光も強く、光の透過性などの観点から最も扱いにくい組織である。そこで、共焦点レーザー顕微鏡や多光子レーザー顕微鏡の本領が発揮される。本稿で紹介した Fucci のような細胞機能蛍光プローブの開発や新たな顕微鏡光学系の開発、さらには画像解析や計測プログラムの開発において、本邦は世界のトップレベルにある。先進の技術を用いることで、医学生物学的にどのような重要な課題が解決できるのか、コストパフォーマンスの面からも、現実的な接点を見極めるのは重要であると思われる。

結語

フランスの外科医である Couly ら¹⁶⁾は、ウズラ・ニワトリの体節の交換移植実験によって、後頭骨が体節由来であること、すなわち背骨の変形したものであることを 1993 年に報告した。このことは、Hoxd4 を本来の位置より頭側で発現させたトランスジェニック・マウスの骨の表現型より支持される¹⁷⁾。すなわち、本来第一頸椎以後でしか発現しない Hoxd4 が後頭骨形成領域にも発現したために、このマウスでは、後頭骨が頸椎のように分節化したのである。後頭骨が背骨の変形したものであるらしいことは、18 世紀ドイツの文豪、ゲーテが予想していたことらしい。骨を観察して、いつ？どこで？何がおきたのか？ 蛍光イメージングによる新たな観察眼が、今後の医学・医療の発展へと展開されることを期待したい。本稿がその一助となれば幸いである。

謝辞

稿を終えるにあたり、第 29 回日本骨形態計測学会シンポジウム「骨の形態的解析法の進歩」にて発表の機会を与えて下さいました北海道大学大学院歯学研究科・網塚憲生教授、ならびに、本論文執筆の機会を与えて下さいました大阪市立大学大学院医学研究科・西沢良記教授、産業医科大学・中村利孝教授に深謝いたします。

文献

- 1) 宮脇敦史：GFP とバイオイメージング、羊土社、東京、2000.
- 2) 高田邦昭：初めてでもできる共焦点顕微鏡活用プロトコール、羊土社、東京、2004.
- 3) 高松哲郎：バイオイメージングがわかる、羊土社、東京、2005.
- 4) 原口徳子、木村宏、原岡泰、生細胞蛍光イメージング、共立出版、東京、2007.
- 5) Iimura, T. and O. Pourquie, *Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression*. Nature, 2006. **442**(7102): p. 568-71.
- 6) Iimura, T., et al., *Dual mode of paraxial mesoderm formation during chick gastrulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p. 2744-9.

- 7) Sugiyama, M., et al., *Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009.
- 8) Sakaue-Sawano, A., et al., *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. Cell, 2008. **132**(3): p. 487-98.
- 9) Aulehla, A., et al., *A beta-catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 186-93.
- 10) Kamioka, H., T. Honjo, and T. Takano-Yamamoto, *A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy*. Bone, 2001. **28**(2): p. 145-9.
- 11) Sugawara, Y., et al., *Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy*. Bone, 2005. **36**(5): p. 877-83.
- 12) Vatsa, A., et al., *Osteocyte morphology in fibula and calvaria --- is there a role for mechanosensing?* Bone, 2008. **43**(3): p. 452-8.
- 13) van Hove, R.P., et al., *Osteocyte morphology in human tibiae of different bone pathologies with different bone mineral density---is there a role for mechanosensing?* Bone, 2009. **45**(2): p. 321-9.
- 14) Xie, Y., et al., *Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 97-101.
- 15) Ishii, M., et al., *Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 524-8.
- 16) Couly, G.F., P.M. Coltey, and N.M. Le Douarin, *The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras*. Development, 1993. **117**(2): p. 409-29.
- 17) Lufkin, T., et al., *Homeotic transformation of the occipital bones of the skull by ectopic expression of a homeobox gene*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 835-41.

図の説明

(図1) 1光子励起と2光子励起

(a) 1光子励起では、基底状態にある蛍光分子が1つの光子(励起光)を吸収し励起状態になる。基底状態に戻るときに励起光よりも長波長の光(蛍光)を出す(長波長シフト)。 (b) 2光子励起では、基底状態にある蛍光分子がほぼ同時に2つの光子(励起光)を吸収し励起状態になる。この場合、励起光の半分の波長の光子による1光子励起と同様の励起状態になる。したがって、励起光よりも短い波長の蛍光を出す。右図では、1光子励起の場合(左図、 λ_{ex})の2倍の波長($2\lambda_{ex}$)の光子2つが励起光として蛍光分子に照射されている。したがって発する蛍光は、左右どちらの場合も同じ波長の蛍

光 (λ_{em}) を発する。

(図 2) 蛍光顕微鏡の基本システム

励起フィルターによって光源から抽出された一定幅の波長の励起光は、ダイクロイックミラーによって反射され、対物レンズによって集光され試料を励起する。試料から出た傾向は長波長側にシフトしているため、ダイクロイックミラーを通過して検出器に届く。検出器の前には、抽出したい波長に応じたバリアフィルターを置いて、励起光からの迷光の混入を防ぐ。

(図 3) 蛍光顕微鏡により取得した 3 次元画像の光学的 “にじみ”

小さな蛍光ビーズ (直径 $1\mu\text{m}$ 程度) を、蛍光顕微鏡により焦点をずらして撮影し、2 次元画像を重ね合わせて 3 次元画像を再構成する (a)。再構成像は、焦点から離れるにつれて、同心円状の光の広がりとして観察される (b)。光軸 (z 軸) に沿った面で見ると、最も明るい部分が、上下方向で円錐状に広がりラグビーボールを縦にした形の光の広がりとして見える (c)。この空間的な光の広がり、数学的に点像分布関数として表現できる。共焦点レーザー顕微鏡では、焦点面以外からの迷光を除くことで、二光子励起法では 2 光子励起が生じる空間を絞ることで、この光のにじみの問題を解決し、より高いコントラストと分解能を上げている。デコンボリューション法という数学的な計算処理によって解決するシステムもある。

Current topics in fluorescent bio-imaging in skeletal development and bone biology

Tadahiro Iimura^{1,2)}, Ayako Nakane^{2,3)}, Akiko Himeno^{1,2,4)}, Mayu Sugiyama⁵⁾,
Akira Yamaguchi^{1,2)}

¹⁾Global COE program,

²⁾Department of Oral Pathology

³⁾Department of Pediatric Dentistry

⁴⁾Department of Periodontology

Tokyo Medical and dental University,

1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, 113-8549, Tokyo, Japan

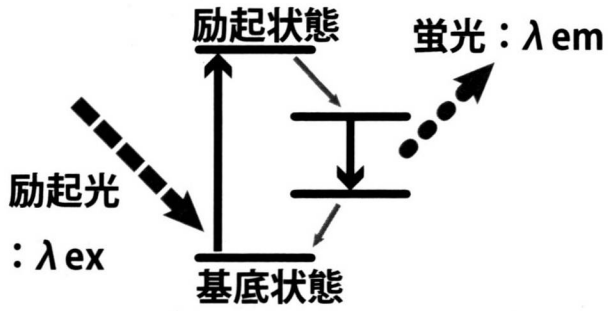
⁵⁾ Laboratory of Genome and Biosignal, School of Life Science, Tokyo University of
Pharmacy and Life Science,

1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

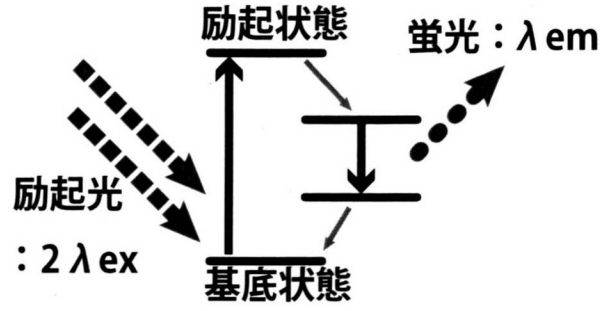
Fluorescent bio-imaging is a current emerging technology in bone biology and medicine. In this short review, we first introduce advantages in usages of confocal microscopy and multi-photon microscopy to acquire more quantitative *in situ* observation of bone tissue, and then overview current topics in fluorescent bio-imaging in skeletal development and bone biology.

1

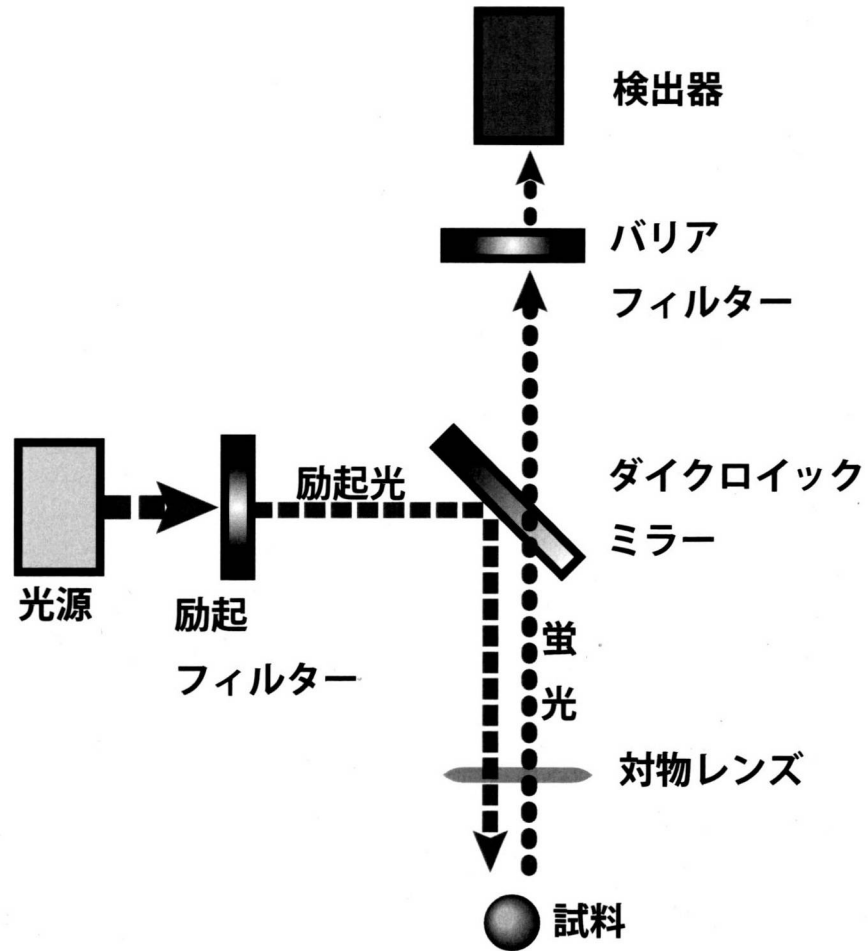
a) 1 光子励起



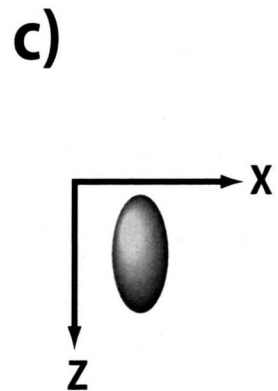
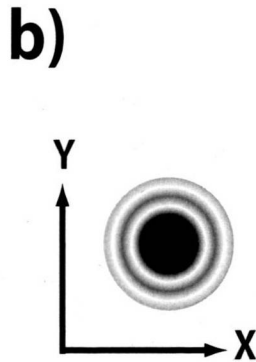
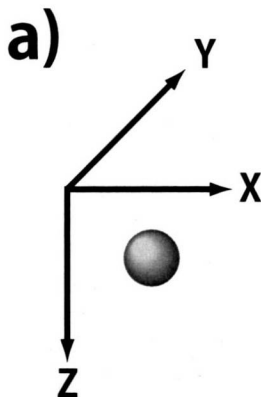
b) 2 光子励起



2



3



歯科領域での骨の再生の基礎と臨床：歯科インプラント治療と骨造成

春日井昇平

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 インプラント・口腔再生医学分野 教授

歯が欠損した場合の治療法としてインプラント治療は確実な治療法であるが、骨が十分に存在しない場合には適用が困難である。新たな骨造成法の登場により、インプラント治療の適用範囲は拡大するであろう。

かすがい しょうへい
 1979年 東京医科歯科大学 歯学部 卒業
 1983年 東京医科歯科大学 歯学研究科 大学院修士
 歯学部 歯科薬理講座 助手
 1989-1991年 トロント大学 ポスドク
 2000年 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
 摂食機能制御学分野 教授
 2001年 東京医科歯科大学 歯学部附属病院 インプラント外来 科長(併任)
 2005年 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
 インプラント・口腔再生医学分野(名称変更) 教授
 日本口腔インプラント学会、顎顔面インプラント学会、Academy of Osseointegration(AO)、European Association for Osseointegration(EAO)

はじめに

1965年にブローネマルクによってチタン製のスクリュー型の歯科インプラント(以下インプラント)の臨床試験が開始されてから、40年以上が経過した。現在歯が欠損した場合の治療法として骨結合型のインプラント治療は確実な治療法となっている。可撤性義歯やブリッジによる治療と比較して、義歯をしっかりと固定することが可能であることと、残存歯に対して負担をかけないことがインプラント治療の利点であり、インプラント治療を希望される患者さんは多い。しかしインプラントを支える骨が十分に存在しない場合、インプラント治療は困難となる。骨造成のゴールドスタンダードは現在においても自家骨移植である。口腔領域の下顎枝前縁や下顎大臼歯部頰側あるいはオトガイ部、または口腔以外の腸骨や脛骨から採取した骨を移植して骨造成をおこなう。しかし、骨採取部位への侵襲性と、採取骨量に限度があることが、自家骨移植による骨造成の問題点である。

歯周組織再生法として、膜を用いて歯周組織再生のスペースを確保するGTR(Guided tissue regeneration)が1980年代に登場した¹⁾。1990年代になってGTRと同様に膜を用いて骨再生のスペースを確保するGBR(Guided bone regeneration)がインプラント治療に必要な骨造成法として登場した²⁾。骨を離断して特殊な器具を用いて骨を固定し、一定期間待った後

に一定のスピードで離断部を伸長する仮骨延長法は、1960年代に長管骨の延長法として開発されたが、1990年代には顎骨の造成に使用されるようになった³⁾。さらに1990年代には、上顎臼歯部の上顎洞に近接した場合におけるインプラント治療に必要な骨造成法(上顎洞底挙上術)として、様々な術式が登場した。また、狭窄した顎堤を水平的に骨造成するリッジエクспанション(Ridge expansion)も1990年代にインプラント治療に必要な骨造成法として臨床応用されるようになった。このように、現在おこなわれているインプラント治療に関連した様々な骨造成法は1990年代に登場した。

20世紀の半ばより現在に到る間、細胞生物学と分子生物学そして材料工学は著しく進歩した。細胞の増殖および分化を制御する分子(シグナル分子)の同定がおこなわれ、多くのシグナル分子のリコンビナントタンパクが作成された。また生体親和性の高い様々な生体材料が開発された。組織再生には、再生させたい組織の構成細胞へと増殖分化できる「細胞(Cell)」、その細胞の増殖あるいは分化を促す「シグナル分子(Signal molecule)」、そして細胞が接着して増殖分化するための「足場(Scaffold)」の3要素が必須であると考えられる(図1)。したがって、組織再生の場合に、これら3要素の一つあるいは複数を適用することで、組織再生の促進が期待できる。このような考えに基づいて組織再生を研究し、再生医療への応用を目的

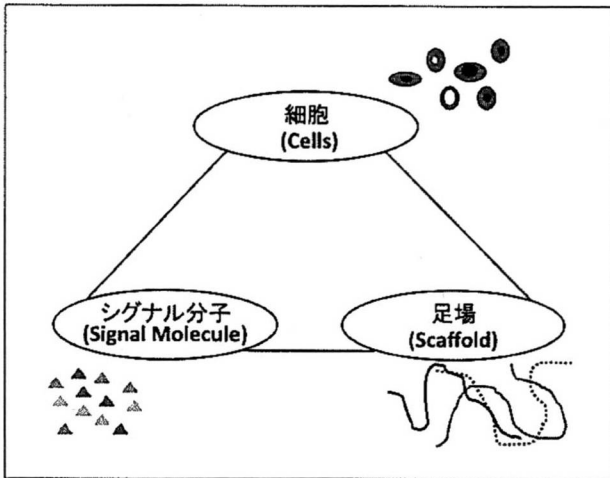


図1 組織再生の3要素

とする科学分野が「組織工学 (Tissue engineering)」である。以下、歯科領域における骨再生、特にインプラント治療に関連した骨造成について、組織工学的な観点から述べる。

足場の応用：骨補填材

1980年代より、リン酸カルシウム系材料であるハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite, HA) そしてベータ三カルシウムリン酸 (beta-tricalcium phosphate, beta-TCP)が自家骨に代わる骨補填材として、整形外科領域そして歯科領域で臨床応用されるようになった。現在臨床で使用されている骨補填材は作成法によって、生物由来のものと、合成によるものに分類

できる(表1)。死体から採取した骨、あるいはその骨を脱灰して凍結乾燥した脱灰凍結乾燥骨(Demineralized freeze-dried bone allograft, DFDBA)は有機成分を含むが、その他の生物由来の骨補填材は高温で焼結されているので、有機成分を含まない。牛骨、珊瑚、海藻由来の骨補填材は、連続性の多孔構造を有することが特徴的である。表2に現在使用されている骨補填材の材料を、吸収性および非吸収性の程度によって整理した。HAは最も吸収を受けにくい材料であり、beta-TCPは吸収性の材料に分類される。同一の材料であっても結晶性の相違や、材料の3次元構造によって吸収性の度合いは著しく異なる。我々は、alpha-TCPを骨欠損部に適用した場合、この材料が吸収性の骨と置換する骨補填材として優れていること¹⁾、さらにbeta-TCPに比較してより吸収性の高い骨置換型の骨補填材であることを報告した²⁾。各骨補填材に添付されている説明書および材料の特質から推測して表2を作成した。

骨欠損部に骨補填材を適用すると、骨補填材の表面に骨芽細胞の前駆細胞あるいは骨芽細胞が接着し、増殖する分化することで骨が形成される。このような骨補填材の性質を「骨伝導性」という(図2)。骨欠損部に骨補填材を適用すると、骨補填材は骨再生の足場として機能するが、骨再生に必要な細胞は周囲の組織から供給され、細胞の増殖と分化に必要なシグナル分子も内因性に供給される。骨補填材を用いる場合には、骨補填材が自家骨に比較すると力不足であること

表1 骨補填材の作成法と由来による分類

骨補填材	
・ 生物由来	凍結骨、脱灰凍結乾燥骨(DFDBA) 焼成骨(Bio-Oss) 海藻由来骨補填材(C-GRAFT) 珊瑚由来骨補填材(Pro-osteon)
・ 合成	Hydroxyapatite beta-tricalciumphosphate
	有機成分を含まず

表2 骨補填材の吸収性の度合いによる分類。材料名には下線を付け、商品名は斜体で示した

吸収性 > > > >	>	非吸収性
<u>alpha-tricalcium phosphate (alpha-TCP)</u>	TCP + HA <i>Ceratte</i>	<u>Hydroxyapatite (HA)</u> <i>Apocerum</i> <i>Bonacerum</i> <i>Bonetite</i> <i>Bonefill</i> <i>Osteograft</i>
<u>beta-tricalcium phosphate (beta-TCP)</u> <i>Ossferion</i> <i>Bioresorb</i> <i>Serasorb</i> <i>Osteon</i>	<u>Bio Glass</u> <i>Cerabone</i>	
<u>海藻由来骨補填材 C-GRAFT</u>	<u>珊瑚由来骨補填材 Pro-osteon</u>	
<u>Calcium Sulfate (石膏)</u>	<u>HA + SiO₂</u> <i>NanoBone</i>	<u>焼成骨</u> <i>Bio-Oss</i> <i>Colograft</i>
<u>脱灰凍結乾燥骨 (DFDBA)</u>		

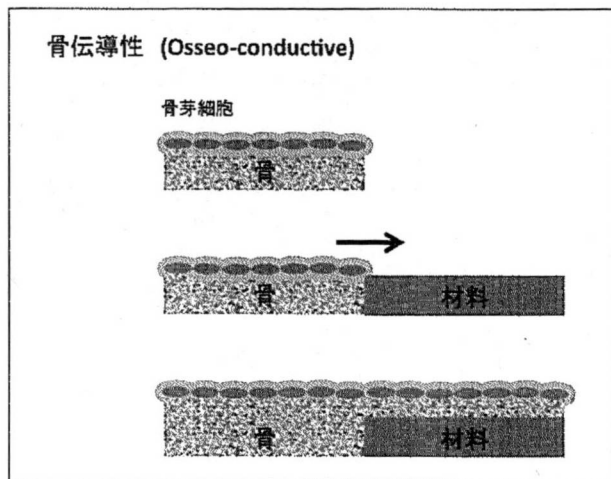
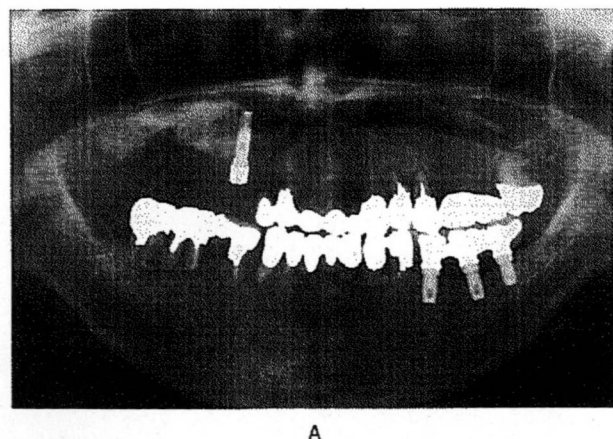


図2 骨伝導性の模式図

を十分に理解して使用する必要がある。骨造成部位の周囲を骨に囲まれた4壁性あるいは3壁性の骨欠損部は、適用した骨補填材の保持が容易であり、周囲の骨組織からの骨形成が期待できる。一方、骨補填材の保持が難しい場合や、水平あるいは垂直性に骨を造成する場合には骨補填材だけで骨造成をおこなうことは困難である。

5年前にBio-Ossを用いた上顎洞挙上術を受け、その部位に埋入した4本のインプラントの3本が脱落した患者さんが来院した。この患者さんのパノラマX線写真(図3A)において、上顎洞底に見られるX線不透過像は骨ではなく残存しているBio-Ossであると推測される。図3Bは、インプラント治療を希望さ



A

れた別の患者さんの下顎骨のCT像である。骨内部にX線不透過性の極めて高い像が観察される。15年以上前にこの部位の歯を抜歯した際に、顎堤の形態を保つために、抜歯窩にHA系の材料が適用されていた。このように適用した骨補填材の大部分が残存している部位に、インプラントを埋入することは得策でない。インプラント埋入予定部位へ骨造成をおこなう場合には、骨と置換する吸収性の骨補填材を使用するのが好ましいと私は考えている。

骨の3次元構造は骨に負荷されるメカニカルストレスに大きく影響されること(Wolfの法則)が古くから知られている。したがって、骨造成をおこなった場合、造成された骨に適切なメカニカルストレスが負荷されない場合には、造成された骨が吸収を受ける。自家骨を用いて上顎洞挙上術をおこないインプラントを埋入した場合、インプラントに近接した骨はメカニカルストレスが負荷されることで保持されるが、インプラントから離れた部位の骨にはメカニカルストレスが十分に負荷されないので吸収を受ける(図4)。この

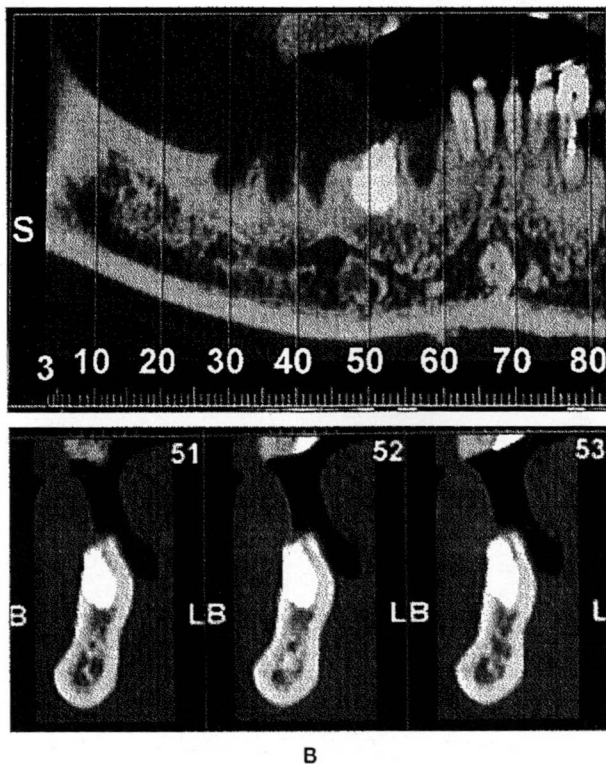


図3 吸収が遅い骨補填材の長期残存。吸収が遅いBio-Ossを用いた上顎洞挙上術を5年前に受け、その部位に埋入したインプラントが脱落した患者さんのパノラマX線写真(A) 抜歯後に抜歯窩に吸収が遅いHA系の材料を15年以上前に適用された患者さんのCT写真(B)

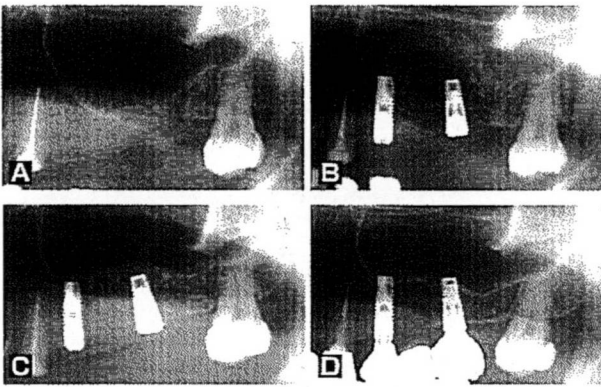


図4 自家骨移植による骨造成部の吸収。上顎洞に近接した上顎大白歯欠損部 (A)。上顎洞挙上術直後 (B)。インプラント埋入直後 (C)。最終補綴物を装着して1年後 (D)

ような現象は臨床において良く経験される。

インプラント治療においては、機能的回復だけでなく審美的回復も要求される。審美的要求が強い部位への骨造成には、インプラントを保持固定するための骨造成と、インプラント周囲の軟組織の審美的形態を長期的に維持するための造成をおこなう必要がある。インプラントを保持固定するための骨造成には自家骨あるいは吸収性の骨補填材を使用し、インプラント周囲の軟組織の形態を維持するための造成には非吸収性のHA系骨補填材を使用するのが適していると考えられている (図5)。

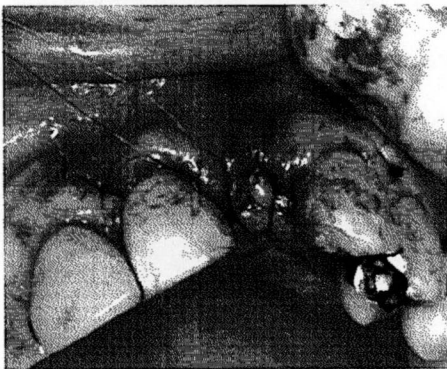
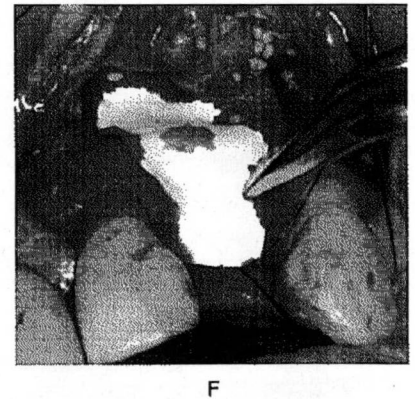
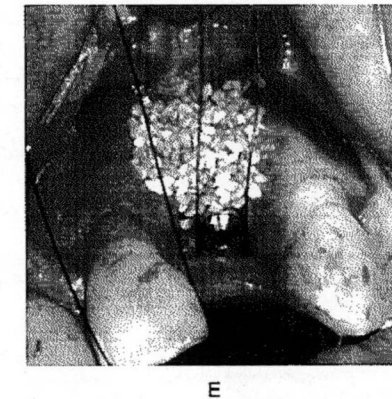
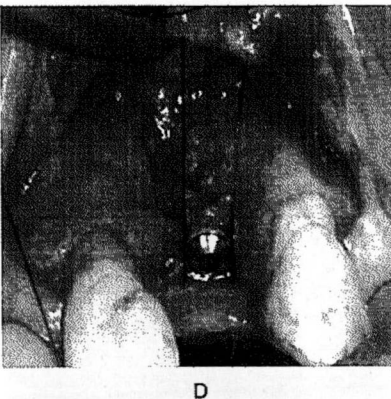
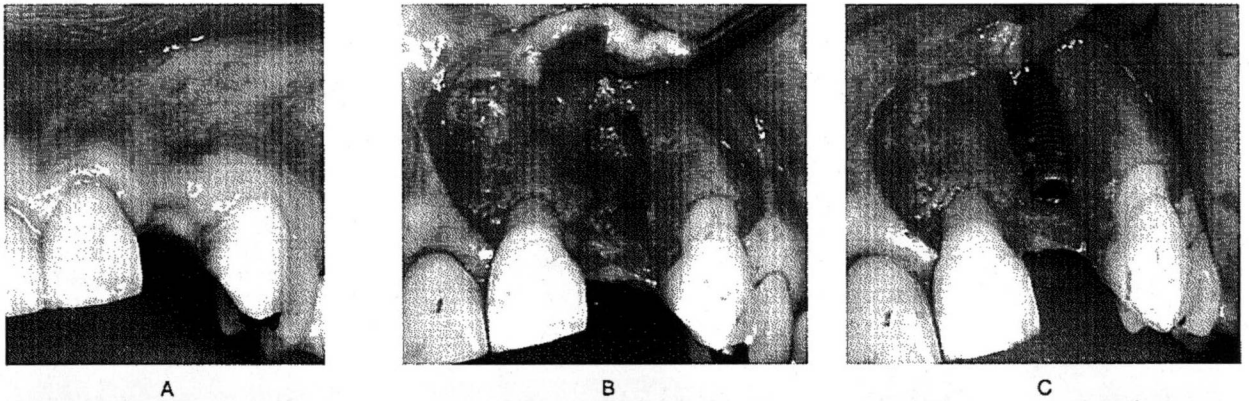


図5 審美領域における骨造成。インプラント周囲炎によりインプラントを除去した部位の術前写真 (A)。粘膜骨膜弁剥離をおこなって観察された骨欠損 (B)。インプラント埋入 (C)。インプラント露出面の自家骨による被覆 (D)。自家骨の上に非吸収性のHA系骨補填材の適用 (E)。吸収性GBR膜による被覆 (F)。縫合による閉鎖 (G)

シグナル分子の応用：PDGF および BMP2

細胞の増殖あるいは分化を制御するシグナル分子を骨の造成に用いる骨造成が、米国で臨床応用されている。血小板由来の細胞増殖因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF) は、多種類の細胞の増殖を強力に促進する。PDGF の一種類である PDGF-BB のヒトリコンビナントタンパクである rhPDGF-BB と、骨補填材である beta-TCP を組み合わせて歯周組織の欠損部に適用すると、歯周組織再生が促進されることが報告された⁶⁾。rhPDGF-BB と beta-TCP を組み合わせた製品は、2006年より米国で“GEM21S”という商品名で販売されている。この製品が、インプラント治療に必要な骨造成にも有効であるかについては、今後の報告が待たれる。“GEM21S”は歯科領域で初めてのシグナル分子（この場合 PDGF）と足場材料（この場合 beta-TCP）を組み合わせた再生医療のための製品である。今後も骨造成を目的として、様々なシグナル分子と足場材料を組み合わせた製品が開発され、臨床応用されることが期待される。

1960年代に脱灰した骨を動物の皮下や筋肉内に移植すると骨が誘導される現象を、米国の Urist が発見した。通常は骨が存在しない部位に骨が誘導される現象を異所性骨形成という。Urist は脱灰した骨の中に異所性骨形成を誘導する分子が存在することを予測し、この分子を Bone morphogenetic protein (BMP) と命名した⁷⁾。Wozney は BMP をコードする DNA 配列を解明し、それに基づいて作成されたリコンビナントタンパクが異所性骨形成を誘導することを1988年に報告した⁸⁾。その後の研究により BMP は TGF-beta に

類似した分子であり、多種類の BMP が存在することが明らかになった。1990年代には、BMP2 および BMP7 のヒトリコンビナントタンパクである rhBMP2 および rhBMP7 を用いた整形外科および歯科領域での臨床試験がおこなわれた。2007年に米国において rhBMP2 とウシ由来の I 型アテロコラーゲンスポンジを組み合わせた“INFUSE”という製品の上顎洞への骨造成と、抜歯した部位への骨造成への適用が承認された。ヒトにおいて骨造成効果を期待するためには mg 単位の rhBMP2 が必要であり、rhBMP2 の価格が高いことから当初臨床応用は広まらなかった。しかし、rhBMP2 による骨造成効果が著しいこと⁹⁾、歯科領域での骨造成用に量を減らした製品が登場したこと、また価格も低価格になったことから、rhBMP2 を用いた骨造成が、インプラント治療に必要な骨造成法として広まっていくことが予想される。rhBMP2 の最大の特徴は、幹細胞あるいは組織幹細胞に作用してこれらの細胞を骨芽細胞へと分化させることであり、これを骨誘導性という (図6)。現在、骨誘導性を示すシグナル分子は BMP 以外に存在しない。rhBMP2 と組み合わせて使用されているアテロコラーゲンは、rhBMP2 を適用部位に保持し徐放するキャリアーとして作用すると同時に、骨再生のための足場としても機能する。rhBMP2 を確実に保持して周囲に徐放し、骨再生のための優れた足場として機能する材料を開発することで、骨造成に必要な rhBMP2 の量を減らすことが期待できる。

rhPDGF および rhBMP2 はいずれもリコンビナントタンパクである。したがって、これらのタンパクをコードする DNA を細胞に遺伝子導入し、遺伝子導入した細胞にリコンビナントタンパクを作成させ、リコンビナントタンパクを精製する。その結果、一般的にリコンビナントタンパクは高価格である。さらに、リコンビナントタンパクは化学的・物理的に不安定であることが多く、取り扱いに注意が必要である。

1999年に、コレステロールの合成阻害薬であるシンバスタチンが骨芽細胞における BMP2 発現を亢進させることが報告された¹⁰⁾。シンバスタチンは高コレステロール血症の治療薬として使用されている化合物であり、安価で生産が可能であり、物理的・化学的に安定性が高い。我々は、吸収性の骨置換型の骨補填材で

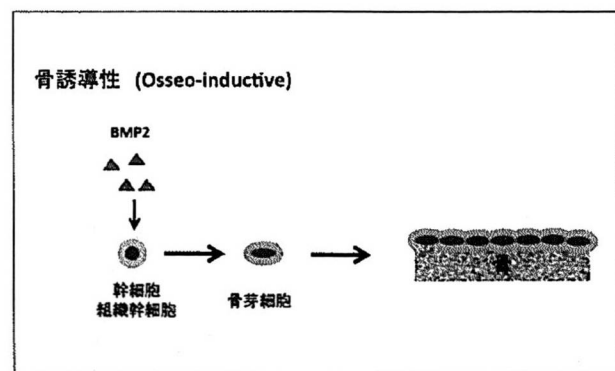


図6 骨誘導性の模式図

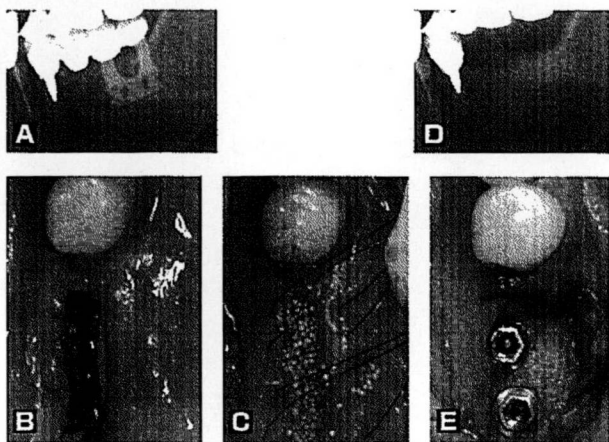


図7 コレステロール合成阻害薬であるシンバスタチンと、吸収性骨補填材である alpha-TCP を組み合わせた材料の臨床試験。動揺が見られたブレードインプラントのX線写真 (A)。ブレードインプラント除去直後の骨欠損 (B) と骨欠損部への新規骨補填材の填入 (C)。新規骨補填材を適用して3ヶ月後のX線写真 (D)。骨補填材適用4ヶ月後のインプラント再埋入時における骨欠損部の治癒状況 (E)。骨欠損部は固い骨に覆われおり、インプラントの初期固定は良好であった。

ある alpha-TCP にシンバスタチンを組み合わせた材料を開発した。動物実験において、この新規材料を骨欠損部に適用すると、骨形成が促進されて骨欠損部の修復が促進されることを観察した¹¹⁾。次に、学内倫理委員会の承認を得て、本学歯学部附属病院インプラント外来において、この新規材料を骨欠損部に適用する臨床試験をおこなった。11症例の臨床試験をおこない、いずれの症例においても良好な骨造成を観察した。11症例中の7症例において、骨造成部位へのインプラント治療をおこない、治療経過は順調である。臨床試験の一症例を図7に示した。

細胞の応用

組織再生には「細胞」と「シグナル分子」と「足場」の3要素が必要であることは既にのべた。「幹細胞 (Stem cell)」はどのような細胞にも分化することが可能な細胞の呼称であり、組織を再生させるためには幹細胞をいかに再生の場に供給するかの戦略が重要である。様々な組織中に幹細胞が存在することが明らかにされ、このように組織中に存在する幹細胞は「組織幹細胞」と呼ばれている。組織の欠損が大きい場合は、欠損部周囲に存在する組織幹細胞に欠損部の再生を期待することは困難であるので、再生に必要な細胞

を外部から供給する細胞治療がおこなわれる。

骨髄組織中に軟骨細胞や骨芽細胞の前駆細胞が存在し、この細胞が軟骨細胞や骨芽細胞に分化して、軟骨や骨を形成することは以前から知られていた¹²⁾。そして、近年骨髄中に胚性幹細胞 (ES 細胞) に匹敵する多分化能を持った幹細胞が存在することが報告された¹³⁾。骨髄由来の細胞を用いる場合には、ES 細胞を用いる場合のような倫理的問題がないこと、細胞を得ることが容易であることが大きな利点である。そのような理由から、骨髄幹細胞を用いる再生医療への期待は大きい。培養骨髄細胞とリン酸カルシウム系の生体材料を組み合わせ、それを大きな骨欠損部に埋入することにより、その欠損部が治癒したという臨床報告がされている¹⁴⁾。我が国においても名古屋大学医学部口腔外科の上田実教授のグループを筆頭にいくつかの施設において、同様の手法を用いた顎骨の再建や骨の造成が試みられている。

骨膜は骨組織を覆う結合組織であり、骨膜中には骨芽細胞の前駆細胞が存在している。顎骨の骨膜から採取した骨膜細胞を培養し、生体分解性の高分子と組み合わせ培養下で骨を作成し、この組織工学的に作成した骨を用いた上顎洞底への骨造成が報告されている¹⁵⁾。通常骨髄細胞を腸骨から採取するが、骨膜細胞は顎骨の骨膜から得ることが可能である。顎骨の骨膜は、歯科医がおこなう骨造成のための細胞ソースとしてはアプローチが容易である点で有利である。

骨造成に有用な幹細胞は脂肪組織にも存在しており¹⁶⁾、脂肪組織由来の細胞を用いて骨造成をおこなうことも可能である。また、末梢血中に骨芽細胞へ分化可能な幹細胞が存在することも報告されている¹⁷⁾。脂肪組織あるいは末梢血から幹細胞を効率良く得る方法を開発することで、細胞を用いた骨造成を簡便におこなうことが期待できる。

2006年に京都大学の山中伸也のグループは、マウスの線維芽細胞に4つの遺伝子 (Oct 3/4, Sox 2, Klf 4, c-Myc) を導入することで、ES 細胞と同様の多分化能を持つ細胞を作成できることを報告した¹⁸⁾。この細胞は iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells, 誘導多能性幹細胞) と呼ばれる。さらに、山中博士のグループはヒトの線維芽細胞からも同様の方法を用いて iPS 細胞が作成できることを報告した。iPS 細胞作

成法の開発により、受精卵やES細胞を使用することなく、多能性幹細胞を作成して使用することが可能になった。現在iPS細胞を再生医療に用いることは安全性の面で問題はあがるが、iPS細胞の再生医療への応用が大きく期待されている。

今後の展望とまとめ

再生医療を含めて新規開発された治療法が、多くの臨床医によって応用されるようになるためには、以下の4つの条件を満たす必要があると私は考えている。第1に「臨床的に有効であること」、第2に「安全であること」、第3に「簡便であること」、第4に「適切な価格であること」である。細胞を用いる再生医療への期待は大きいですが、細胞を用いる再生医療が歯科領域での一般的な治療法となるためには、解決されなくてはならない問題が多い。細胞を採取し、細胞を培養して増やし、その細胞を再生医療に用いるためには、培養をおこなうための特別な設備と機器、培養操作をおこなう人手、再生医療に使用する細胞の安全性を確認するための検査が必要である。これらのコストを低く抑えることが求められている。rhBMP2を用いる骨造成は、臨床効果、安全性、簡便性の3つの条件を満たしているが、価格が高いことが障害となっている。

コレステロール合成阻害薬であるシンバスタチンと、alpha-TCPを組み合わせた我々が開発品は上記の4条件を満たしていると考えられる。しかし、この製品が市販され多くの臨床医に使用されるようになるためには、もう一つ大きなハードルを越えなくてはならない。そのハードルとは、この製品の安全性と有効性を証明するための臨床治験をおこない、国からの承認を得ることである。厚生労働省は我々の開発した製品について、「材料としてではなく薬剤としての治験をおこなうべきである」と決定した。材料として臨床治験をおこなう場合に比較して、薬剤として臨床治験をおこなう場合には莫大な費用と期間が必要とされるので、我々は臨床治験をおこなうことを断念した。

米国においては、rhPDGFとbeta-TCPを組み合わせた製品、rhBMP2とアテロコラーゲンを組み合わせた製品のいずれも材料(Device)としての治験がおこなわれ、承認を受けている。再生医療に関連した製品が次々に承認され、臨床応用可能となっている

米国の状況に比較して、我国の状況は絶望的である。インプラント治療に必要な骨造成法として、骨補填材、シグナル分子、細胞を用いた方法について紹介したが、殆どの製品は我が国で承認を受けていないため使用することができない。このような状況は国民の健康と幸福を妨げていると同時に、医療産業の発展を阻害していることは明らかである。近年の再生医療の進歩は著しく、効果的で、安全性が高く、簡便で、低価格な新たな骨造成法の登場が期待される。それが臨床応用されるためには、我国の医薬品と医療器材の承認システムを大きく改善する必要がある。

インプラント治療が確実な治療法となっているが、骨が不足する場合には治療が困難となる。今後、効果的で、安全で、簡便で、価格も適当な骨造成法が登場し臨床応用されることで、インプラント治療の適用のさらなる拡大が期待できる。歯や歯周組織等の口腔組織が欠損による口腔機能の低下に対して、我々歯科医は、欠損部をメタルやセラミック等の材料を用いて補填することで口腔機能を回復している。インプラント治療も材料による機能回復の一種である点では、従来の補綴法と基本概念は同一である。21世紀の歯科医療においては、材料による治療から再生治療への移行が予測される。「再生歯」による治療は我々歯科医の究極の夢であり、「再生歯」に関する研究は近年急速に進展している。しかし、再生歯による治療が臨床応用可能な手法となるには、まだ解決されなくてはならない問題も多く、10年から20年の期間が必要であると考えられる。今後も歯科医療の本流は材料による治療である一方で、インプラント治療に必要な骨造成法に代表される「再生治療と材料による治療の融合した医療」が新しい歯科医療の流れとなることが予測される。

【参考文献】

- 1) Nyman S, Lindhe J, et al.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 9(4): 290~296, 1982.
- 2) Dahlin C, Sennarby L, et al.: Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 4(1): 19~25, 1989.
- 3) McCarthy JG, Schreiber J, et al.: Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg*. 89(1): 1~10, 1992.
- 4) Kihara H, Shiota M, et al.: Biodegradable process of alpha-

- TCP particles and new bone formation in a rabbit cranial defect model. *Journal of Biomedical Material Research, Part B: Applied Biomaterials*79B : 284~291, 2006.
- 5) Yamada M, Shiota M, et al.: Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha- and beta-tricalcium phosphate (TCP) in block grafts. *Journal of Biomedical Material Research, Part B: Applied Biomaterials*82(1) : 139~48, 2007.
 - 6) Nevins M et al. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: Results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontology*76 : 2205~2215, 2005.
 - 7) Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science*. 150 (698) : 893~899, 1965.
 - 8) Wozney JM, Rosen V, et al.: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 242(4885) : 1528~1534, 1988.
 - 9) Boyne PJ, Lilly LC et al.: De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 63 (2) : 693~707, 2005.
 - 10) Mundy GR, Garrett R et al.: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*286 : 1946~1949, 1999.
 - 11) Nyan M, Sato D et al.: Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clinical Oral Implant Research*20(3) : 280~7, 2009.
 - 12) Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, et al.: Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell & Tissue Kinetics*. 20(3) : 263~272, 1987.
 - 13) Yuehua J, Balkrishna N, et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*418 : 41~49, 2002.
 - 14) Quarto R, Mastrogiacomo M, et al.: Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New England Journal of Medicine*344 : 385~386, 2001.
 - 15) Scmelzeisen R, et al.: Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone from maxillary sinus floor augmentation, a preliminary report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 31 : 34~39, 2003.
 - 16) Zuk PA, Zhu M, et al.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*13(12) : 4279~95, 2002.
 - 17) Eghbali-Fatoureh GZ, Lamsam J, et al.: Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *New England Journal of Medicine*352 : 1959~66, 2005.
 - 18) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*126(4) : 663~76, 2006.