

原 著

ヒト歯周組織の培養細胞に対する
同種血液由来因子の影響について

茂田 圭弘*¹ 佐藤 悦子*¹ 鴨井 久博*^{1,2}
石川 博*³ 鴨井 久一*¹

*¹日本歯科大学歯学部歯周病学講座

*²日本医科大学付属千葉北総病院歯科

*³東京慈恵会医科大学解剖学講座第二

(2004年1月17日受理)

Effects of Platelet Releasate on the Culture Cells from Human Periodontal Tissue

Keihiro Shigeta*¹, Etsuko Sato*¹, Hisahiro Kamoi*^{1,2},
Hiroshi Ishikawa*³ and Kyuichi Kamoi*¹

*¹Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo

*²The Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital Dental Clinic

*³Department of Anatomy (II), The Jikei University, School of Medicine

Accepted for publication 17 January 2004

Platelet releasate (PR) has been used in regenerative medicine because it contains cell growth factors such as transforming growth factor- β (TGF- β) and platelet-derived growth factor (PDGF) that are effective in regenerating periodontal tissue. There have been many clinical reports on the use of PR, which is prepared by concentrating and processing human platelets, but the biological effects of PR on cells have not been fully clarified. Hence, to ascertain the effects of PR on periodontal tissue-derived cultured cells, TGF- β 1 expression was measured using RT-PCR and ELISA and cell proliferation activity was assessed by monolayer and three-dimensional (3-D) culture methods. The results showed that the cell proliferation activities of periodontal tissue-derived human gingival fibroblasts (HGF), vascular endothelial cells (HVEC), epithelial cells (HEC), and periodontal ligament fibroblasts (HPLF) were greater with PR compared to cells cultured without PR. Next, the effects of PR on the cell proliferation activity of HGF and HPLF were investigated by the 3-D culture method using collagen matrix. The results showed that when compared to the no addition of PR, there were increases in cell proliferation rates on addition of PR (HGF : 2.66 times, HPLF : 4.37 times). Furthermore, when PR was added to PR-treated HPLF, the expression of TGF- β 1 mRNA (3.38 times) and the production of TGF- β 1 (24, 48, 72 h PR FCM : 10.76, 12.15, 13.02 ng/ml) by these cells increased.

The above findings show that PR facilitates the growth of cells that make up damaged periodontal tissue,

連絡先：佐藤悦子

〒102-8158 千代田区富士見 2-3-16 日本歯科大学歯学部歯周病学講座

Etsuko Sato

Department of Perionatology, The Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo

2-3-16, Fujimi, Chiyodaku, Tokyo 102-8158, Japan

E-mail satoetsu@jikei.ac.jp

and when scaffolding (collagen matrix) is provided, even more stable cellular proliferation is achieved. Also, since PR increases the production of TGF- β 1, a growth factor important for periodontal regeneration, to levels sufficient to meet the conditions necessary for tissue regeneration, PR appears to be useful for regenerating periodontal tissue *in vitro*. J Jpn Soc Periodontal, 46 : 39~50, 2004.

Key words : platelet releasate, periodontal regeneration, TGF- β 1, collagen matrix

要旨 : 同種血液由来因子 (Platelet releasate : PR) はヒト血小板より濃縮・調整され、歯周組織再生に有効とされる Platelet-derived growth factor (PDGF) および Transforming growth factor- β (TGF- β) などの細胞増殖因子を含み、再生医療に応用されている。PR を用いた臨床症例は多く報告されているが、細胞に対する生物学的効果は不明な点が多い。そこで本研究は PR の歯周組織由来培養細胞に及ぼす影響を検討するために、単層培養法および三次元培養法を用いた細胞増殖活性、さらに RT-PCR 法と ELISA 法を用いた TGF- β 1 発現について解析を行った。

その結果、PR に対するヒト歯周組織由来の歯肉線維芽細胞 (HGF)、内皮細胞 (HVEC)、上皮細胞 (HEC) および歯根膜線維芽細胞 (HPLF) の細胞増殖作用は PR 非添加の対照群と比較して、細胞増殖作用の促進を示した。次に PR に対する HGF および HPLF の細胞増殖作用を、コラーゲンマトリックスを用いた三次元培養で検討した結果、PR 非添加群と比較し、PR 添加群において細胞増殖率の上昇 (HGF : 2.66 倍, HPLF : 4.37 倍) が認められた。さらに HPLF に PR を添加した結果、HPLF における TGF- β 1 mRNA 発現量 (3.38 倍) および TGF- β 1 産生量 (24, 48, 72 h PR FCM : 10.76, 12.15, 13.02 ng/ml) が増加を示した。

以上の結果より、PR は喪失した歯周組織を構成する細胞の増殖を促進させ、さらにコラーゲンマトリックスという足場を得る事でさらに安定した細胞増殖を示した。また、歯周組織再生に重要な細胞増殖因子である TGF- β 1 を発現させる事で組織再生に必要な条件を十分に満たすことから *in vitro* における歯周組織再生への有用性が示された。

索引用語 : 同種血液由来因子, 歯周組織再生, TGF- β 1, コラーゲンマトリックス

緒 言

歯周治療の最大の目的は、歯周病によって喪失した歯周組織の再生である。歯周組織の再生を成功させるために、歯周組織を構成する細胞もしくは喪失した組織へ分化する能力を有する細胞、細胞を増殖・分化させる因子 (細胞増殖因子)、さらに細胞が増殖・分化できる空間 (scaffold) といったこれら 3 つの条件を揃える事が重要である¹⁾。

創傷治癒過程は炎症期、肉芽形成および再上皮化期、マトリックス形成および再構築期に分類される²⁾。組織が傷害を受けて修復反応が開始される炎症期において、損傷部位の血小板は組織修復に重要な役割を果たす³⁾。すなわち、受傷により血小板が凝集活性化されると血小板 α 顆粒が脱顆粒し、血小板から platelet-derived growth factor (PDGF) もしくは transforming growth factor (TGF- β) などの細胞増殖因子 (以下、GFs とする) が放出される。これら GFs は組織を構成する線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞などに作用し、細胞の遊走と増殖、分化および細胞外基質の合成を直接または間接的に調節して

いる^{4,5)}。近年、分子生物学や細胞生物学の進歩により、歯周病によって破壊された歯周組織の修復もしくは再生に GFs が重要な役割を果たしている事が明らかとなり、特に TGF- β 1 や PDGF が歯周組織再生に有用とされる研究が多く報告されている^{6,7)}。

血小板が放出する TGF- β 1 もしくは PDGF などの GFs に注目し、ヒト血液から血小板を分離・濃縮して調製された同種血液由来因子 (Platelet releasate : 以下、PR とする) は創傷部位に応用すると歯周組織再生に必要な GFs の局所濃度が高まることで組織の修復・再生能が最大限に高まり、創傷治癒を促進させる可能性が期待できる⁸⁾。

我々は歯周組織の修復・再生に不可欠な GFs を含む PR を適応した歯周組織再生への応用を検討している。この PR は皮膚潰瘍の創傷組織に適用すると創傷部位の完全上皮化 (治癒) に費やす治療期間を短縮させたという臨床報告⁸⁻¹⁰⁾や、さらに歯科領域において、患者の血小板を濃縮・調整した血漿成分を Platelet-rich plasma とし、これを応用した下顎骨再建術¹¹⁻¹⁵⁾およびインプラント埋入部位の骨補填剤¹⁶⁻¹⁹⁾としての有効性が報告されている。しかしながら PR を用いた臨床症例は多く報告されているが、

歯周組織を構成する細胞に対する生物学的効果については不明な点が多い。

そこで本研究は、血小板中のGFsを濃縮して調整されたPRの歯周組織由来培養細胞に与える影響について、単層培養法に加えてscaffoldとしての役割をもつコラーゲンマトリックスを用いた三次元培養法による検討を行い、さらに歯周組織再生に重要な役割を持つTGF- β 1発現について解析を行った。

研究材料および方法

1. ヒト歯周組織由来細胞の分離培養

ヒト歯周組織を採取し組織より分離培養した細胞の本研究への使用は、日本歯科大学歯学部倫理委員会の承認後、歯科矯正治療中の患者または健常ボランティアより術前にインフォームドコンセントを確立し同意を得て行った。

1) ヒト歯根膜線維芽細胞の培養

ヒト歯根膜線維芽細胞(以下、HPLFとする)は、歯科矯正治療中の患者(女性、年齢18歳)の便宜抜去した健常な上顎小臼歯歯根面に付着した歯根膜組織をメスにて剥離し、組織片を60mmディッシュ(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.)に静置した。60mmディッシュに少量の20% Fetal bovine serum (MOREGATE Bio Tech, Bulimba, QLD, AUS.:以下、FBSとする)を含むGrowth medium(表1;以下、GMとする)を添加し、37°C、5% CO₂条件下で培養した。組織片から細胞がout growthし、ディッシュ内の細胞がコンフルエントに達した時点で10cmディッシュ(Becton Dickinson Labware)へ継代培養を行い、この継代培養を3回繰り返した後に10% FBS含有GMを用いて培養し本研究に使用した。

2) ヒト歯肉線維芽細胞の培養

ヒト歯肉線維芽細胞(以下、HGFとする)、歯科矯正治療中の患者(男性、年齢18歳)の便宜抜去した健常歯に付着している歯肉結合組織をメスで剥離後、歯肉結合組織を0.1%トリプシン・0.02% EDTA/Ca free phosphate-buffered saline (-) 溶液 (TRYP SIN 250 : DIFCO, Kansas City, MO, U.S.A., Ca free phosphate-buffered saline (-) : 日水製薬, 東京 : 以下、PBSとする)で解離し、20% FBS含有GMを用いて60mmディッシュに解離された組織もしくは細胞を播種し37°C、5% CO₂条件下で培養を行った。解離された組織もしくは細胞がout growthしコンフルエントに達した後、継代・培養を3回繰り返したのちに10% FBS含有GMに

表 1 Growth medium の組成

D-MEM/F-12 粉末*	12 mg/ml
L-glutamine**	0.02 mg/ml
MEM Non-Essential Amino Acid Solution 10 mM (100 x)*	1 mM/ml
10,000 U/mL Penicilin G-	50 U/ml
10,000 μ g/mL Streptomycin*	50 μ g/ml
Amphotericin B*	0.25 μ g/ml
NaHCO ₃	2.44 mg/ml

*Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A.

**SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, U.S.A.

変えて培養を行い、本研究に使用した。

3) ヒト歯肉上皮細胞の細胞

ヒト歯肉上皮細胞(以下、HECとする)は、健常ボランティア(男性、年齢23歳)から得た歯肉の上皮組織をメスにて上皮面と結合組織面を含むように細切後、細切片を60mmディッシュの底に上皮と結合組織を含む細切面が接するように並べ、極少量の20% FBS含有GMを添加して37°C、5% CO₂条件下で培養し、細切片の接着を待って徐々に20% FBS含有GM量を増やした。細切面の組織よりout growthしてくるHECのコロニーを奥村の濾紙法²⁰⁾で分離培養した。HECの継代・培養を繰り返したのちに10% FBS含有GMに変えて培養を行い、本研究に使用した。

4) ヒト歯根膜由来血管内皮細胞の培養

歯科矯正治療中の患者(女性、年齢15歳)より歯根膜組織を採取し、上記に示した歯根膜線維芽細胞の培養法に従い、37°C、5% CO₂条件下で歯根膜組織より歯根膜細胞の初代培養を行った。歯根膜組織の初代培養においてヒト歯根膜由来血管内皮細胞(以下、HVECとする)はHPLFと混在して単層で増殖するが、HVECのコロニーを奥村の濾紙法²⁰⁾を用いて、HPLFから分離培養し、20% FBS含有GMを用いて継代・培養を繰り返し、本研究に使用した。

2. PRの調製

ヒト血液の採血は東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を受け、倫理的配慮を考慮して行った。

ヒト血小板中の細胞増殖因子を多量に含むPRを以下に示す方法にて調整した。ヒト血液は東京慈恵会医科大学附属病院輸血部において、予め採血前に本研究内容の説明を十分に受け、採血する事に同意して同意書に署名が得られた健常ボランティア3名(男性、平均年齢33歳、血液型A型)より採血された。供血者は日本輸血学会の指針に準じて選択した²¹⁾(表2)。

静脈針付き自己血貯血用血液バッグCPDA(株式

表 2 健康ボランティアの選択基準

・年齢 20~40 歳健康人男性
・体重 40 kg 以上
・ヘモグロビン 11.0 g/dl 以上 ヘマトクリット 33% 以上
・最高収縮期血圧 180 mmHg 未満
・最高拡張期血圧 100 mmHg 未満
・全身状態良好
・採血可能な血管がない場合、採血を中止することがある
・その他、採血が不相当と判断した場合

会社テルモ、東京：以下、血液バッグとする）を用いてボランティアの肘静脈より約 400 ml を採血した。ボランティアから採血して得た血液の匿名化を行った後、血液の一部を用いて梅毒血清反応、HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1/2 抗体および HTLV-1 抗体のスクリーニング検査を行い、検査結果が陰性である血液のみを研究に供した。

血液バッグ中の血液を HIMAC CR 7 B 3（日立製作所、東京）を用いて、16°C、1.970×g、4 分間遠心を行って Platelet Rich Plasma 層（以下、PRP とする）と血球層に分離した。血液バッグから PRP を回収し、さらに 16°C、1.970×g、15 分間遠心を行って Platelet Poor Plasma 層と血小板層に分離した。Platelet Poor Plasma 層を廃棄した後、血小板層の血小板に血小板容量の 10% 量の Acid citrate dextrose を添加した。Sysmex K-1000（シスメックス株式会社、神戸）にて血小板数を算出し、PBS を用いて 1×10^9 個/ml となるように調整した。予め、PBS にて調整した 5,000 U/ml トロンビン（日本薬局方 トロンビン；三共株式会社、東京）を血小板懸濁液 1 ml に対し トロンビン 1 U の割合になるように血小板懸濁液に添加して攪拌後、10 分間室温で放置し血小板の脱顆粒を行った。続いて 4°C、950×g、10 分間遠心分離して上清を回収して New steradisc 25（倉敷紡績株式会社、大阪）を用いて濾過滅菌を行い、研究に使用するまで -20°C にて凍結保存した。

3. PR の歯周組織由来培養細胞に対する効果

無血清 GM（以下、GM とする）にて 2.5×10^3 個/75 μ l に調整された各種の培養細胞懸濁液を 96 ウェルプレート（costar®, Corning Inc., Corning, NY, U.S.A.）の各ウェルに 75 μ l 分注し、予め GM を用いて 1~1/64 倍に希釈された 25 μ l の 1×PR 希釈液を各ウェルに添加して、96 ウェルプレート内での細胞数および PR の最終希釈率が 2.5×10^3 個/ウェル、1/4~1/256 倍になるように調整した。各種の培養細胞の培地交換は 3 日間ごとに行い、37°C、5% CO₂ 条

件下で 12 日間培養を行って各種の培養細胞に対する PR の増殖作用を検討した。なお、GM で培養した各種の培養細胞をコントロールとした。

4. 細胞増殖活性の測定

12 日間培養した 96 ウェルプレート中の各種の培養細胞に、XTT 試薬（Roche Diagnostics, Basel, Switzerland）を各ウェル中の 100 μ l の PR GM もしくは GM あたり 50 μ l 添加して 37°C、5% CO₂ 条件下で 7 時間培養を行った。培養後、マイクロプレートリーダー MPR A 4（TOSOH（株）、東京）を用いて、450 nm 波長の条件下で吸光度を測定し細胞増殖活性を検討した。

5. PR の HGF と HPLF に対する効果—単層培養法と三次元培養法を用いた検討—

(1) 単層培養法

HGF もしくは HPLF を 0.1% トリプシン・0.02% EDTA/PBS 液を用いて 10 cm ディッシュより回収し 2 枚の 48 ウェルプレート（Becton Dickinson Labware）に 0.5% FBS 含有 GM を用いて 5×10^3 個/ウェルを播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。24 時間後、48 ウェルプレートのウェル内にある GM を廃棄して新たに 20% (V/V) PR 含有 GM（以下、PR GM とする）もしくは GM を各ウェルに添加し、6 日間培養を行った。

(2) 三次元培養法

予め直径 6 mm の円形に型抜きされた真皮欠損用グラフト テルダームス（株式会社テルモ、東京：以下、テルダームスとする）を 96 ウェルプレートのウェルの底に配置し、テルダームスの上から 0.5% FBS 含有 GM を用いて 5×10^3 個/ウェルとなるように調整された HPLF もしくは HGF を播種し 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後、各ウェルから細胞を含むテルダームスを取り出してテルダームスを 48 ウェルプレートの各ウェル中央に配置し、PR GM もしくは GM を各ウェルの側壁から滴下して、以下、単層培養法と同様に培養を行った。

(3) 細胞増加率の判定

PR を用いて単層もしくは三次元培養された各種培養細胞の細胞増加率の判定は、CyQUANT® Cell Proliferation Assay kit (Molecular Probes Inc., Eugene OR, U.S.A.) を用いて行った。

単層培養が行われた 48 ウェルプレートの各ウェルから PR×GM もしくは GM を廃棄し、150 μ l の PBS、細胞を溶解させるために 448.5 μ l の Cell lysis buffer、さらに細胞を溶解させて得た DNA に蛍光物質を吸着させるために 1.5 μ l の 2x CyQUANT GR dye をそれぞれ添加した。48 ウェルプレートを遮光

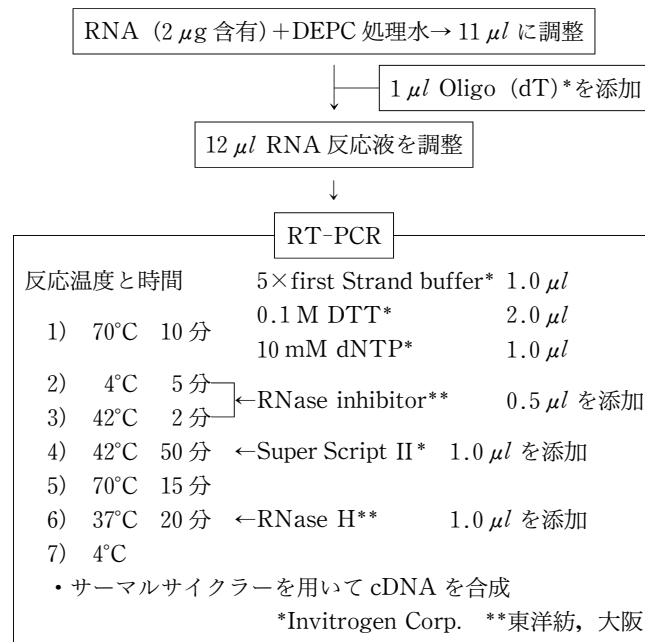


図 1 RT-PCR 法による cDNA の合成

しながら約1分間プレートを振盪して室温，暗所に15分静置し，各ウェルからDNAを含む溶液をマイクロチューブに回収した後，DNAが吸着した蛍光物質の強度を励起波長450nmおよび発光波長520nmの条件下でSPECTROFLUOROPHOTOMETER RF-5300 PC（島津製作所，東京）を用いて測定した。

三次元培養が行われた48ウェルプレートのウェルから細胞を含むテルダームスをそれぞれマイクロチューブに回収した。単層培養と同様にマイクロチューブにPBS，Cell lysis bufferおよび2×CyQUANT GR dyeを添加し約30秒間ボルテックスにかけた。その後，マイクロチューブを室温，暗所に15分静置した。さらにマイクロチューブからテルダームスを取り去り，単層培養時と同様に蛍光物質の強度を測定した。

なお，PRのHGFもしくはHPLFに対する効果は，6日間培養を行ったPR非添加群の蛍光物質の強度に対するPR添加群の蛍光物質の強度の割合を算出し，これを細胞増加率とした。

6. RT-PCR 法

(1) total RNA の抽出

10cmディッシュ内で培養されたコンフルエント状態のHPLFをPBSにて洗浄後，GMを添加して37°C，5%CO₂条件下で24時間培養を行った。PBSにてHPLFを2回洗浄し，10%（v/v）PR含有GM（以下，PR GMとする）またはコントロールとして

のGMを各ディッシュに添加して再度24時間培養した。

PRを作用させたHPLFのtotal RNA抽出を以下の方法にて行った。各ディッシュ内のPR GMもしくはGMを廃棄後，3.2mlのTRI REAGENT® LS（MOLECULAR RESEARCH CENTER INC.，Cincinnati，OH，U.S.A.）を添加し，セルスクレーパーを用いてHPLFを掻き取り，ポリプロピレンラウンド・チューブ（Becton Dickinson Labware：以下，ラウンド・チューブとする）に回収して5分間静置した。次に0.43mlの1-ブromo-3-クロロプロパンをラウンド・チューブに添加し攪拌後15分間放置し，その後4°C，12,000×g，15分間遠心を行って液層を3層に分離した。上層をラウンド・チューブに回収し2.4mlのイソプロパノールを加えて10分後に4°C，12,000×g，8分間遠心分離を行った。ラウンド・チューブ内の上清を捨てRNA沈殿をマイクロチューブに回収し1mlの75%エタノールを加えて4°C，7,500×g，5分間遠心分離し，この操作を2回繰り返した。マイクロチューブ内の75%エタノールを廃棄し3分間室温でRNAを乾燥させdiethylpyrocarbonate処理水（以下，DEPC処理水とする）中に溶解して分光光度計にてRNA濃度を測定，これをHPLFのtotal RNA試料とした。

(2) RT-PCR 法

HPLFから抽出された各total RNA試料のうち，mRNAを鋳型とし逆転写によってcDNAを合成し

表 3 TGF- β 1 および EF のプライマー

Primer		PCR 産生物 (bp)
TGF- β 1	F (5'-3') GAGCCTGAGGCCGACTACTA	227
	R (5'-3') CTGGTACAGCTCCACGTGCT	
EF	F (5'-3') TCAGCTGATTATCCTGAACCATC	449
	R (5'-3') TTAAATGGCCAATTGAAACAAAC	

PCR 反応液の調整

5 Unitl Takara Ex Taq*	0.2 μ l	PCR	反応温度と時間	
10 x Ex Taq buffer*	2.5 μ l		1) Denature	94°C45 秒
2.5 mM each dNTP Mixture*	0.2 μ l		2) Annealing	58°C45 秒
Primer 1**	0.5 μ l		3) Extension	72°C90 秒
Primer 2**	0.5 μ l		4) 1)→ 3) : 30 サイクル	
滅菌蒸溜水	18.3 μ l		5)	4°C
Template	1.0 μ l		・サーマルサイクラーを用いて cDNA を増幅	
Total	25.0 μ l			

*宝酒造, 大津 **Invitrogen Corp.

図 2 RT-PCR 法による cDNA の増幅

た。図 1 に示した手順に従い、マイクロチューブに RNA 反応液を調整し、プログラマブル・サーマルサイクラーコントローラー PTC-100™ (MJ Reseach Inc., San Francisco, CA, U.S.A. : 以下, サーマルサイクラーとする) を用いて cDNA を合成した。

TGF- β 1 および Eukaryotic elongation factor α 1 (以下, EF とする) の増幅は表 3 のプライマーを用いた PCR 法にて行った。

図 2 に示した手順に従い、マイクロチューブに PCR 反応液を調整し、ミネラルオイルを滴下しサーマルサイクラーにて 94°C, 45 秒間の熱変性, 58°C, 45 秒間のアニーリング, 72°C, 90 秒間の伸長反応を 1 サイクルとして TGF- β 1 および EF の cDNA の増幅を 30 サイクル行った。

7. TGF- β 1 の相対的発現量の検討

2% アガロースゲルを用いて 100 mA, 40 分の条件で各 PCR 反応物を電気泳動し, 10 mg/ml エチレンブロマイド溶液にて 60 分間染色を施し, 2% アガロースゲルを紫外線照射下で写真撮影した。ATTO Light Capture Type AE-6961 (株式会社アトー, 東京) を用いて TGF- β 1 もしくは EF の各増幅物の積算値を測定し, EF を内部標準遺伝子として TGF- β 1 の相対的発現量を検討した。

8. 培養上清中の TGF- β 1 産生量の測定

10 cm ディッシュ内で培養されたコンフルエント状態の HPLF を PBS で洗浄後, 0.5% FBS 含有 GM

を添加して 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養を行った。24 時間後, PBS にて HPLF を洗浄し, PR GM または GM をディッシュに添加して 24, 48 もしくは 72 時間それぞれ培養を行った。GM を添加して培養された HPLF の 24, 48 もしくは 72 時間の各培養上清 (以下, 24, 48 もしくは 72 h FCM とする) および PR GM を添加して培養された HPLF の 24, 48 もしくは 72 時間の各培養上清 (以下, 24, 48 もしくは 72 h PR FCM とする) を回収した。

FCM 中の TGF- β 1 産生量を Quantikine Human TGF- β 1 Immunoassay kit (R & D Systems, Mineapolis, MN, U.S.A.) を用いて測定した。0.5 ml の PR GM もしくは各種 FCM に 0.1 ml の 1 N HCl を添加し 10 分間, 室温にて放置した後に 0.1 ml の 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES を加え, FCM 中の TGF- β 1 を活性化した。酸処理を行った 200 μ l の各種 FCM を, 予め TGF- β RII がコートされた 96 ウェルプレートに分注し, 3 時間, 室温にて放置した。ウェル内の溶液を捨て 200 μ l の wash buffer にて洗浄, この操作を 3 回繰り返した。次に各ウェルに 200 μ l の TGF- β 1 conjugate (HRP 標識 TGF- β 1 ポリクローナル抗体) を添加し, 90 分間, 室温にて放置した。再度ウェル内の溶液を捨て wash buffer にて洗浄, この操作を 3 回繰り返す, さらに 200 μ l の Substrate Solution を加え, 20 分間, 室温, 遮光の条件で放置した。最後に 50 μ l の Stop Solution (2 N

硫酸溶液)を加え、直ちにImmunoreader E Max (和光純薬工業株式会社, 大阪)を用いて450 nm波長の条件下で吸光度を測定し、予め作成したTGF-β1の検量線をもとにTGF-β1産生量を算出した。

9. 統計学的検索

PRの各種歯周組織由来細胞に対する増殖活性はコントロールとPR添加群の比較について、HGFもしくはHPLFにおける単層培養法もしくは三次元培養法を用いた細胞増殖率はPR非添加およびPR添加群の比較について、HPLFにおけるTGF-β1の相対的発現量は、PR非添加およびPR添加群の比較について、さらにTGF-β1産生量はPR GMと24, 48もしくは72 h PR FCMの比較について、それぞれStudent *t*-検定を用いて統計学的に検索した。

結 果

1. PRの歯周組織由来培養細胞に対する増殖効果

各種歯周組織由来培養細胞に1×PRを96ウェルプレート内での最終希釈率が1/4~1/256倍になるように添加して12日間培養を行った結果を示す。

HVECに対するPRの細胞増殖作用は、コントロールと比較し、1/32×, 1/16×, 1/8×, 1/4×PR添加群において濃度依存的な細胞増殖作用を示し、1/16×, 1/8×, 1/4×PR添加群において統計学的に有意差が認められた(図3)。

HGFに対するPRの細胞増殖作用は、コントロールと比較し、1/128×, 1/64×, 1/16×, 1/8×, 1/4×PR添加群において細胞増殖作用を示し、1/64×, 1/8×, 1/4×PR添加群において統計学的に有意差が

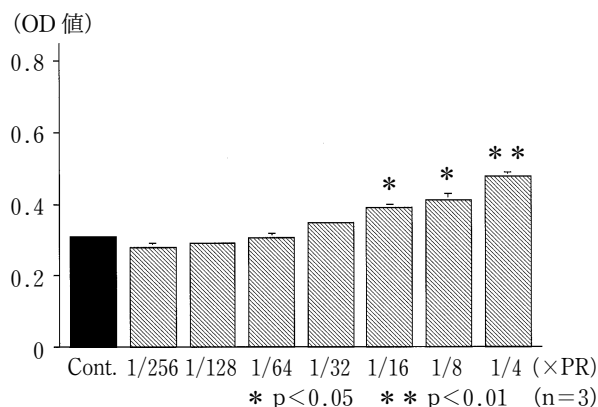


図3 HVECに対するPRの細胞増殖作用

コントロールと比較し、PRを作用させると、1/32×, 1/16×, 1/8×, 1/4×PR添加群に細胞増殖作用が認められ、その作用は濃度依存性を呈した。

認められた(図4)。

HECに対するPRの細胞増殖作用は、コントロールと比較し、すべてのPR添加群において統計学的に有意な細胞増殖作用を示し、その効果は濃度依存性を呈した(図5)。

HPLFに対するPRの細胞増殖作用は、コントロールと比較し、すべてのPR添加群において濃度依存的な細胞増殖作用を示し、さらに1/128×, 1/64×, 1/32×, 1/16×, 1/8×, 1/4×PR添加群において統計学的に有意差が認められた(図6)。

2. 単層培養によるPRの各種培養細胞に対する効果

HGFもしくはHPLFにPR GMもしくはGMを添加して48ウェルプレート内で6日間単層培養を

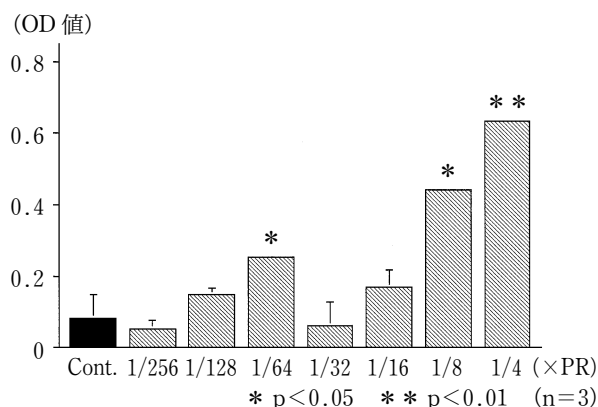


図4 HGFに対するPRの細胞増殖作用

コントロールと比較し、PRを作用させると、1/128×, 1/64×, 1/16×, 1/8×, 1/4×PR添加群において細胞増殖作用が認められた。

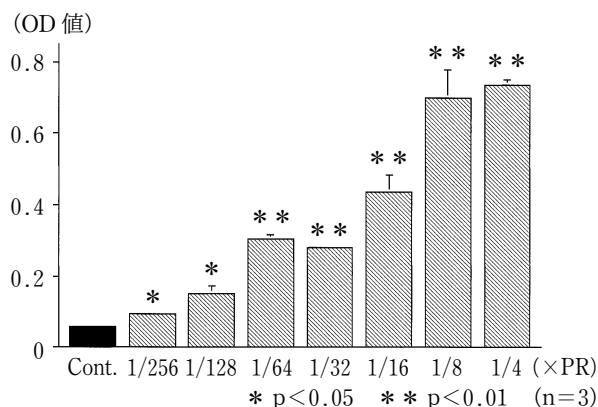


図5 HECに対するPRの細胞増殖作用

コントロールと比較し、PRを作用させると、すべてのPR添加群に細胞増殖作用が認められ、その作用は濃度依存性を呈した。

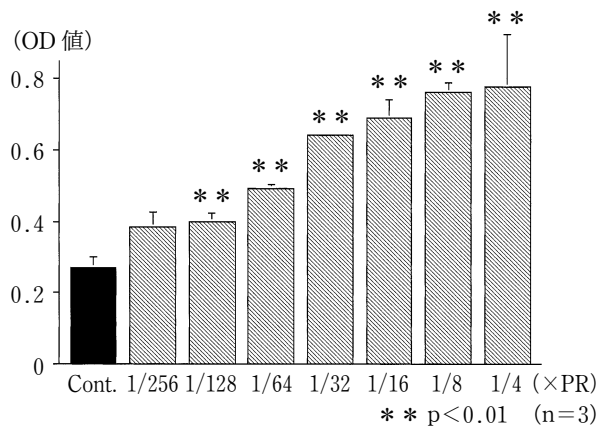


図 6 HPLF に対する PR の細胞増殖作用

コントロールと比較し、すべての PR 添加群に細胞増殖作用が認められ、その作用は濃度依存性を呈した。

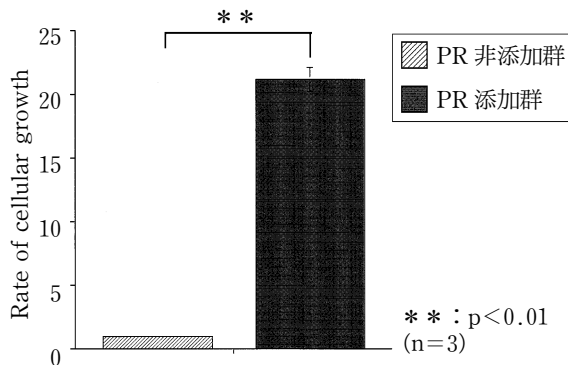


図 8 単層培養による PR の HPLF 増殖作用

PR 非添加群と比較し、PR 添加群において細胞増殖率の上昇が認められた。

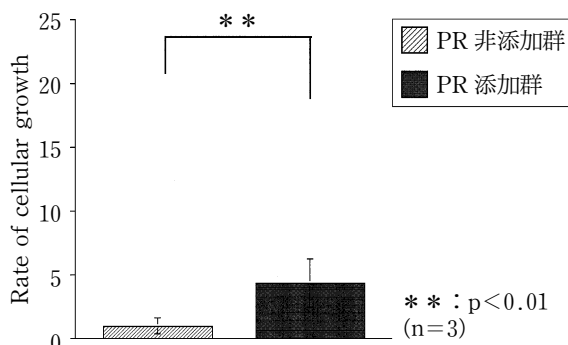


図 10 三次元培養による PR の HPLF 増殖作用

PR 非添加群と比較し、PR 添加群において細胞増殖率の上昇が認められた。

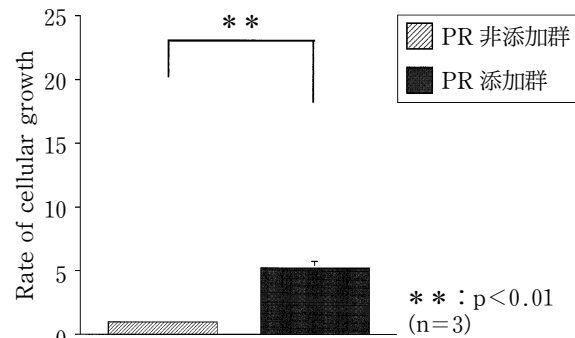


図 7 単層培養による PR の HGF 増殖作用

PR 非添加群と比較し、PR 添加群において細胞増殖率の上昇が認められた。

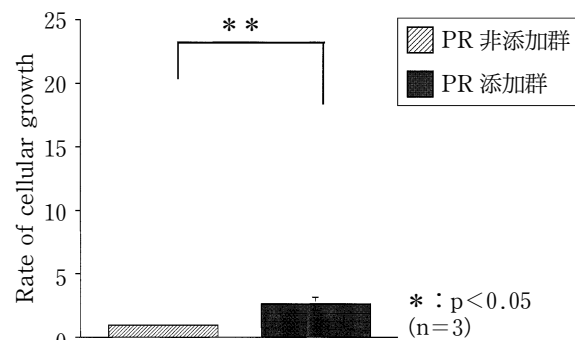


図 9 三次元培養による PR の HGF 増殖作用

PR 非添加群と比較し、PR 添加群において細胞増殖率の上昇が認められた。

行った結果を示す。

HGF の増加率は、PR 非添加群と比較し、PR 添加群において 5.22 倍を示し、統計学的に有意な細胞増殖率の上昇が認められた (図 7)。

HPLF の増殖率は、PR 非添加群と比較し、PR 添加群において 21.17 倍を示し、統計学的に有意な細胞増殖率の上昇が認められた (図 8)。

3. 三次元培養による PR の各種培養細胞に対する効果

テルダーミス内に HGF もしくは HPLF を播種して PR GM もしくは GM を添加し、48 ウェルプレート内で 6 日間三次元培養を行った結果を示す。

HGF の増加率は、PR 非添加群と比較し、PR 添加群において 2.66 倍を示し、統計学的に有意な細胞増殖率の上昇が認められた (図 9)。

HPLF の増殖率は、PR 非添加群と比較し、PR 添加群において 4.37 倍を示し、統計学的に有意な細胞増殖率の上昇が認められた (図 10)。

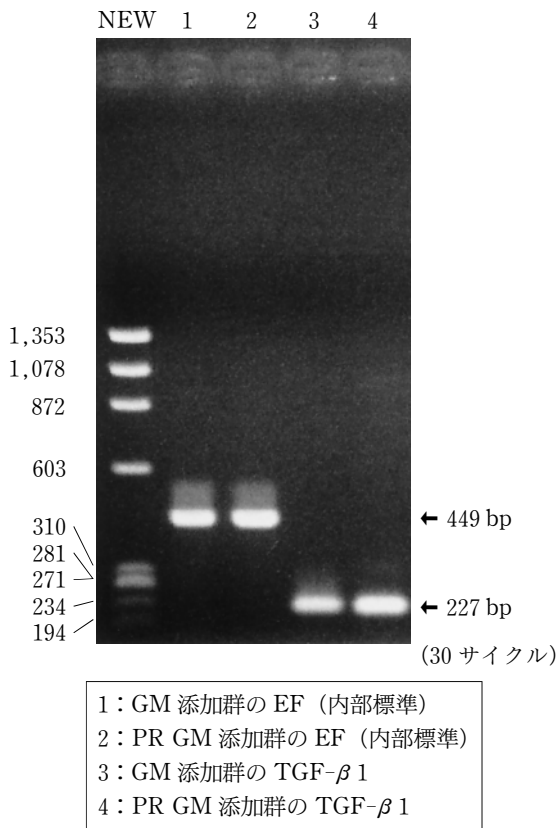


図 11 TGF-β 1 mRNA の発現

PR GM もしくは GM を添加後、24 時間培養された HPLF における EF もしくは TGF-β 1 の mRNA の発現を示す。

4. TGF-β 1 の mRNA 相対的発現量の比較検討

PR GM もしくは GM 添加 24 時間後における HPLF の TGF-β 1 mRNA の発現状態を図 11 に示す。

PR GM を添加した HPLF の TGF-β 1 mRNA 発現量は GM のそれと比較し、3.38 倍であり、統計学的に有意な増加が認められた (図 12)。

5. TGF-β 1 産生量の比較検討

HPLF の TGF-β 1 産生量は、PR GM と比較し経時的に増加傾向を示し、その効果は統計学的に有意な増加であった (図 13)。なお、24、48 もしくは 72 h FCM 中の TGF-β 1 産生量は 0.5 以下 ng/ml であった。

考 察

創傷治癒過程において GFs は組織を構成する細胞の遊走と増殖、分化および細胞外基質の合成を調節している^{2,5)}。特に創傷治癒の反応は血小板から放出さ

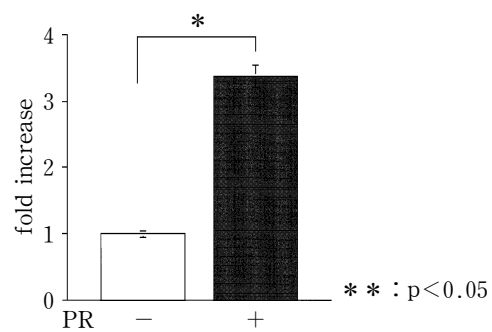


図 12 TGF-β 1 mRNA 発現に及ぼす PR の影響
GM 添加 HPLF の TGF-β 1 mRNA 発現量と比較し、PR GM 添加 HPLF における TGF-β 1 mRNA 発現量の増加が認められた。

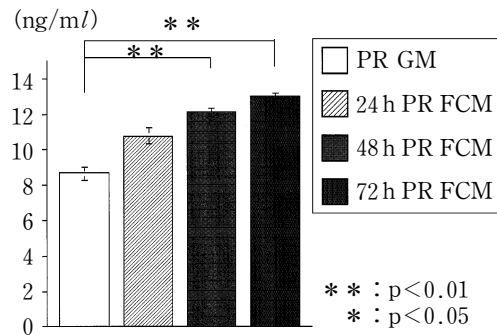


図 13 HPLF の TGF-β 1 産生に及ぼす PR の効果
HPLF の TGF-β 1 産生量は経時的に増加傾向を呈した。

れる GFs が損傷部位の細胞に遊走と増殖を促す事から開始される³⁾、よって血小板中の GFs が組織の修復・再生に果たす役割は大きいと考えられる。

本研究に用いた PR はヒト血液から血小板を分離し、高濃度に濃縮した後、トロンピンを用いて血小板 α 顆粒中に含まれる GFs を放出させたもの⁸⁾で、創傷治癒過程に重要な役割を持つ TGF-β 1、PDGF および b-FGF などの GFs^{5,6)} が多量に含まれている^{22,23)}。PR は Platelet derived wound healing factor (PDWHF) とも呼ばれ、1982 年、Knighton らはウサギの角膜を用いた *in vivo* の研究において、トロンピンで活性化された血小板が創傷治癒過程において重要な血管新生、線維増殖 (fibroplasia) およびコラーゲン合成を促進させたと報告した^{24,25)}。この研究報告により医科領域において、1986 年以降、トロンピンで活性化された血小板より放出された GFs を PDWHF とし、糖尿病、外傷および脈管炎などが原因で生じた慢性難治性皮膚潰瘍の患者の自己血より PDWHF を調整して患部に適応した所、従来の完全

上皮化（治癒）と比較し上皮化に費やす時間が短縮されたとの報告がなされた⁸⁻¹⁰。歯科領域においても、ヒト血小板中のGFsを濃縮・調整したPRP（歯科領域ではPlatelet-rich plasma: PRPとして報告されている）を臨床応用した症例が報告されている。1998年にMarxらはPRPおよび骨移植材を併用した骨欠損部位に対する増大術において新生骨の増加および骨質の向上を報告した¹⁵。以後、PRPは骨移植材と併用された術式¹¹⁻¹⁵もしくはインプラント埋入部位またはインプラント埋入予定部位への骨補填材¹⁶⁻¹⁹として応用され良好な結果が報告されている。さらにPRもしくはPRPがいち早く臨床応用が可能となった理由として、治療を目的とする患者の自己血液から直接血小板を調製し適用する事で、血液製剤からの感染が報告される肝炎もしくはHIVによる感染の危険性を回避する事が可能であるため、患者の同意が得やすいと考えられる²⁶。

このように医科および歯科領域においてPRもしくはPRPの治療への効果が注目されて臨床応用により良好な結果が報告されているにもかかわらず、*in vitro*もしくは*in vivo*における細胞生物学的研究報告は少なく、不明な点が多い。そこで本研究において、組織の修復・再生に重要な血小板由来のGFsを高濃度の割合で含むPRのヒト歯周組織由来の培養細胞に対する影響を検討した。

HGFに1/4~1/256×PRを作用させた結果、二相性の細胞増殖作用が認められ、特に1/32, 1/16×PRにおいてコントロールと比較しHGFの細胞増殖が抑制された結果となった。これはHGFに対するPRの至適濃度が存在する可能性が示唆されるが、さらなる検討が必要である。さらにHVEC, HECもしくはHPLFに1/4~1/256×PRを作用させた結果、濃度依存的な細胞増殖作用が認められた。これはOkudaraらの研究報告でもPRPによる歯肉線維芽細胞もしくは歯根膜線維芽細胞の細胞増殖活性の促進を報告している²³。通常ヒト末梢血中の血小板数は $10\sim 40\times 10^4$ 個/ μ lである、これに対し本研究に使用したPRは 1×10^9 個/mlであり、血小板数を約2.5~10倍に濃縮させている。よってHGF, HVEC, HECもしくはHPLFの増殖促進は、これらの細胞増殖活性を促進させるGFsを高濃度に作用させた結果と考察される。しかしながらOkudaraらはPRPを作用させると上皮細胞の増殖活性は抑制されると報告しており²³、本研究のHECの結果とは相反している。我々はこの結果の違いを以下に考察する。第一はOkudaraらが研究に用いたPRPと本研究に使用したPRの血小板中のGFs濃縮率の違いにある。血小板中に多く存在す

るTGF- β 1は一般に上皮細胞の増殖を抑制する働きがある²⁷。しかしながら、TGF- β 1の細胞増殖効果には至適濃度があること、さらに培養条件によっては増殖にも抑制にも働くとの報告がある²⁷。このTGF- β 1の濃度または培養条件の違いが2つの結果を招いた可能性を示唆する。第二にOkudaraらが使用した上皮細胞(SCC-25)²⁸はヒト舌由来の扁平上皮癌由来の細胞であり、本研究に使用したヒト正常歯周組織より分離した上皮細胞とは細胞の性質が異なる可能性がある、よってPRもしくはPRPに対する感受性に違いが生じたと推測する。

テルダーミス内で培養されたHGFもしくはHPLFにPRを作用させた結果、PR非添加群と比較しPR添加群の細胞の増殖率が上昇した。組織欠損部の再生において、細胞同士を接着させ、再生される組織の最終的な形態を決定し保持するためには細胞外基質あるいはScaffoldが必要である¹。細胞外基質あるいはScaffoldは欠損部へのGFsの局在性を持たせるためにも重要である。本研究に使用したテルダーミスは牛皮膚由来の線維化もしくは熱変性アテロコラーゲンを混合凍結乾燥させたもので、新生組織への置換がスムーズに行われる組織再構築型のコラーゲンマトリックスである²⁹⁻³¹。コラーゲンマトリックスは生体内での高い安定性と細胞親和性を備えているため、マトリックス内への細胞の侵入が容易で、尚かつ線維芽細胞形成能に優れていると報告されている²⁹。よって、テルダーミス内で培養されたHGFもしくはHPLFにPRを応用すると細胞増殖率が上昇したという結果は、テルダーミスが細胞外基質あるいはScaffoldとしての役割を十分に備えて、さらにテルダーミスにPRが併用されることにより、細胞、増殖因子、Scaffoldの3要素を揃えることが組織再生の成功につながるという概念¹を十分に反映し、歯周組織再生術への応用が期待できる。

単層および三次元培養において、HPLFに対するPRの細胞増殖作用が強かったという結果を踏まえ、歯周組織再生に重要な役割を持つTGF- β 1のパラクリンもしくはオートクリン作用による細胞増殖作用の可能性を推測し、HPLFに対するTGF- β 1の遺伝子およびタンパクレベルの検索を行った。PR GMを添加したHPLFを24時間培養した結果、HPLF内のTGF- β 1の遺伝子発現量が促進された。引き続き、PR GMを添加し、24時間培養して回収したHPLFのFCM中のタンパク発現量を検討した結果、PR GMと比較してTGF- β 1のタンパク発現量はわずかに促進効果が認められたが統計学的有意差は認められなかった。よって、さらに48もしくは72時間培養し

て回収した HPLF の FCM 中のタンパク発現量を検討した所、統計学的に有意な TGF- β 1 タンパク発現量の経時的な増加が認められた。本研究において、HPLF に対する PR の TGF- β 1 タンパク発現量の影響を検索するに当たり、PR GM 中の TGF- β 1 タンパクと比較した。PR 中にはもともと TGF- β 1 が含まれており、PR の影響による TGF- β 1 タンパク発現量の増加を検討するには、PR GM 中の TGF- β 1 タンパク量を考慮してこれと比較することが必要と考えた。また、GM を添加した HPLF を 24, 48 もしくは 72 時間培養して回収した FCM 中の TGF- β 1 タンパク発現量は、0.5 以下 ng/ml であり本研究で応用した ELISA 法では検出範囲を下回るほどの微量な TGF- β 1 タンパク発現であった。TGF- β 1 は、分子量 12.5 KDa の相同ポリペプチドが S-S 結合により 25 KDa の二量体より構成され、ヒト血小板や骨に多く存在する²⁷⁾。TGF- β 1 は線維芽細胞に対する増殖促進効果、血管新生作用および細胞外マトリックス合成促進など、歯周組織の創傷治癒を促進させる効果を持つ^{27,32,33)}。さらにイヌの歯周組織に人工的に骨欠損部を作製し、リコンビナント TGF- β 1 を用いて GTR 法を行った結果、新生骨量が増加したとの報告がある^{34,35)}。よって PR を添加すると HPLF の TGF- β 1 産生量が促進され、線維芽細胞の増殖、血管新生、細胞外基質の合成、および新生骨量の増加といった歯周組織再生に必要な不可欠な作用が増強される可能性を示唆する。

以上の事から、PR にはヒト歯周組織を構成する細胞の増殖を促進させるだけでなく、Scaffold としての役割を担うコラーゲンマトリックスを用いた三次元培養においても細胞の増殖率を上昇させ、創傷治癒過程に重要な役割をもつ TGF- β 1 の発現量を促進させる効果があるという事が明らかとなった。この事は歯周組織の再生医療に必要な、細胞、増殖因子、Scaffold の 3 要素を *in vitro* のレベルで十分に満たし、基礎研究より先行した PR を用いた臨床応用が良好な結果を示す理由の 1 つとなるであろう。しかしながら、歯周組織を構成する器官に硬組織が存在し、硬組織由来の細胞に対する更なる PR の作用解析が必要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、数々のご助言、ご鞭撻を頂きました、東京慈恵会医科大学解剖学講座第二、橋本尚詞助教授をはじめ、教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第 42 回秋季日本歯周病学会学術大会

(1999 年 10 月 22 日)、第 43 回春季日本歯周病学会学術大会 (2000 年 5 月 14 日) において発表した。

文 献

- 1) Langer R: Tissue engineering (Review). Mol Ther, 1:12-15, 2000.
- 2) 竹原和彦: 細胞増殖因子の作用と疾患, 羊土社, 東京, 1998, 116-121.
- 3) 藤田寛子, 小島 至: 創傷治癒と増殖因子. 細胞工学, 9: 896-900, 1990.
- 4) Terranova VP, Jendresen M, Young F: Healing, regeneration, and repair: prospectus for new dental treatment. Ade Dent Res, 3: 69-79, 1989.
- 5) Aukhil I: The potential contributions of cell and molecular biology to periodontal tissue regeneration. Curr Opin dent, 2: 91-96, 1992.
- 6) Giannobile WV: Periodontal Tissue Engineering by Growth Factors. Bone, 19: 23-37, 1996.
- 7) Graves DT, Cochran DL: Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. Curr Opin Periodontol, 178-186, 1994.
- 8) Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL: Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-Platelet-derived wound healing factors (PDWHF). Ann Surg, 204: 322-330, 1986.
- 9) Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F: Stimulation of repair in Chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using Platelet-derived wound healing formula. Surg Gynecol Obstet, 170: 56-60, 1990.
- 10) Gillam AJ: Treatment of wound with procuren. Ann Pharmacol Ther, 27: 1201-1202, 1993.
- 11) Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB: Comparison of Platelet-Rich Plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus Platelet-Rich Plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: A reentry study., J Periodontol, 73: 198-205, 2002.
- 12) Shanaman RS, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ: Localized ridge augmentation using GBR and Platelet-rich plasma: Case reports. Int J Periodontic Restorative Dent, 21: 345-355, 2001.
- 13) 大屋高德, 太田敏博, 斉藤英朗, 星野正行, 田崎哲典: 吸収性生体材料ポリ-L-乳酸製メッシュトレーに自家骨髓海骨細片と多血小板血漿を用いた新しい顎骨再建法. 日歯先技研会誌, 8: 2-8, 2002.
- 14) Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H: Autologous concentrated platelet-rich plasma

- (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 31 : 615-619, 2002.
- 15) Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR : Platelet-rich plasma : Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85 : 638-646, 1998.
 - 16) 丸山誠二, 澤 裕一郎, 原 禎幸 : インプラント周囲の遊離歯肉移植術に PRP を使用した 1 症例. *日歯周誌*, 45 : 260-266, 2003.
 - 17) 椎貝達夫 : PRP (Platelet-rich plasma) のインプラント治療への応用. *歯界展望*, 100 : 1244-1253, 2002.
 - 18) Petrungaro PS : Treatment of the infected implant site using Platelet-rich plasma. *Compendium*, 4 : 363-376, 2002.
 - 19) Anitua E : Plasma rich in growth factors : Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14 : 529-535, 1999.
 - 20) Ishiwata I, Nozawa S, Inoue T, Okumura H : Development and characterization of established cell lines from primary and meta static regions of human endometrial adenocarcinoma. *Cancer Res*, 37 : 1777-1785, 1997.
 - 21) 術前貯血式自己血輸血療法のガイドライン. *日輪会誌*, 38 : 会告 I, 1992.
 - 22) Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM : The effect of platelet release on wound healing in animal models. *J Am Acad Dermatol*, 22 : 781-791, 1990.
 - 23) Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-Rich Plasma contains high levels of Platelet-derived growth factor and Transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*, 74 : 849-857, 2003.
 - 24) Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH : Role of platelets and fibrin in the healing sequence. An in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg*, 196 : 379-388, 1982.
 - 25) Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, Goldson III WH, Andrews WS : Studies on inflammation and wound healing : Angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery*, 96 : 48-54, 1984.
 - 26) Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI : Is Platelet-Rich Plasma the perfect enhancement factor ? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18 : 93-103, 2003.
 - 27) 平井玲子 : TGF- β の生物学. *実験医学*, 10 : 1826-1832, 1992.
 - 28) Rheinwald JG, Beckett MA : Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res*, 41 : 1657-1663, 1981.
 - 29) 上田 実, 大久保 肇, 藤本雄大, 新美 敦, 沢木佳弘, 金田敏郎 : スポンジ状アテロコラーゲンの骨欠損治癒に及ぼす影響. *口科誌*, 43 : 363-368, 1994.
 - 30) 水木信之, 堀本 進, 海野 智, 川辺良一, 大村進, 藤本浄秀 : テルダームス®を用いた歯槽堤形成術の検討. *歯界展望*, 86 : 1995-1998, 1986.
 - 31) 小西 淳, 吉本 剛, 三浦暁美, 大崎健一 : アテロコラーゲン製抜歯創用保護材 (TRE-641) の抜歯創に対する創傷治癒効果についての実験的検討. *生体材料*, 16 : 266-275, 1998.
 - 32) 牛 忠英, 花澤重正, 竹下 玲, 村上幸生, 片山伊九右衛門, 北野繁雄 : ヒト歯根膜由来の線維芽細胞の機能と遺伝子発現に関する Transforming growth factor- β の作用. *歯基礎誌*, 33 : 133-141, 1991.
 - 33) Miyazono K, Yuki K, Takaku F, Wernstedt C, Kanzaki T, Olofsson A, Hellman U, Heldin CH : Latent forms of TGF- β : structure and biology. *Ann NY Acad Sci*, 593 : 51-58, 1990.
 - 34) Wikesjö UME, Razi SS, Sigurdsson TJ, Tatakis DN, Lee MB, Ongpipattanakul B, Nguyen T, Hardwick R : Periodontal repair in dogs : effect of recombinant human transforming growth factor- β 1 on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 25 : 475-481, 1998.
 - 35) Mohammed S, Pack AR, Kardos TB : The effect of transforming growth factor beta one (TGF- β 1) on wound healing, with or without barrier membranes, in class II furcation defect in sheep. *J Periodontal Res*, 33 : 335-344, 1998.