

## 論文内容要旨

題目           アパタイトセメントの骨との置換  
—培養破骨細胞および骨芽細胞を用いた検討—

著者           湯浅 哲也

## 内容要旨

アパタイトセメントは、優れた生体親和性と骨伝導性を示す生体活性セメントである。しかし、このアパタイトセメント（従来型）には硬化時間が長い（30～60分）、硬化前のペーストが体液と接触すると崩れてしまうなどの問題点があった。そこでわれわれは、約5分で硬化する迅速硬化型アパタイトセメントを、さらに練和直後に血清に浸漬しても崩れることなく約5分で硬化する非崩壊型アパタイトセメントを開発し、優れた生体親和性と骨伝導性をもつことを明らかとしてきた。

骨欠損部に補填されたアパタイトセメントの骨との置換に関しては、必ずしも一定の見解は得られていない。そこで本研究では、アパタイトセメントが骨と置換するか否かを検討する目的で、培養破骨細胞によるセメントの吸収と培養骨芽細胞によるセメント上での骨形成の二面から検討を行った。

【材料と方法】従来型、迅速硬化型、非崩壊型の3種類のアパタイトセメントを粉液比2.0で練和し、37℃相対湿度100%の条件下で24時間硬化させたディスク状硬化体を試料とした。対照として、焼結体アパタイトを用いた。さらに、セメント吸収性の実験には、牛皮質骨より調整した骨片も対照として用いた。

家兎の長管骨より採取した破骨細胞を含む骨髓細胞を試料上に播種し、48時間培養した後、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色を行い、試料上に付着した破骨細胞数を計測した。また、走査型電子顕微鏡を用いて、付着破骨細胞の形態を観察するとともに、吸収窩数および吸収窩面積について定量的測定を行った。アパタイトセメントが骨芽細胞に及ぼす影響についての実験では、当教室においてこれまで継代培養されてきたヒト骨芽細胞を各試料上に播種し、初期接着性、細胞増殖、アルカリホスファターゼ活性、I型コラーゲン合成量、オステオカルシン産生量について評価を行った。

【結果】破骨細胞を用いたセメント吸収性に関する検討では、付着破骨細胞数はアパタイトセメント群および骨片では差がなかったのに対し、焼結体アパタイト上の付着破骨細胞数はアパタイトセメント群および骨片に比べ、有意に少なかった。また、吸収窩に関して、焼結体アパタイト表面には破骨細胞による吸収窩が全く認められなかったのに対し、アパタイトセメント群においては破骨細胞吸収窩が認められた。アパタイトセメント表面に認められた吸収窩数、吸収窩面積は、骨片のそれと比較してそれぞれ1/12、1/120であった。また、3種のアパタイトセメント間に有意な差は認められなかった。培養骨芽細胞を用いた骨形成に関する検討では、初期接着性および細胞増殖に関して、アパタイトセメント群と焼結体アパタイトとの間で有意な差は認められなかった。しかし、骨芽細胞の分化マーカーの発現に関しては、検討したすべての時期でアパタイトセメント群は焼結体アパタイトに比較して有意に高い値を示した。なお、アパタイトセメント間に有意差は認められなかった。

【結論】本研究結果から、アパタイトセメントは、焼結体アパタイトに比較して、破骨細胞により吸収されやすく、また、骨芽細胞の分化を促進させることが明らかとなった。また、迅速硬化型および非崩壊型アパタイトセメントは、破骨細胞および骨芽細胞に対して従来型アパタイトセメントと同じ挙動を示すことから、骨と置換される有用な生体材料であることが示唆された。

アパタイトセメントの骨との置換  
—培養破骨細胞および骨芽細胞を用いた検討—

湯 浅 哲 也

徳島大学大学院歯学研究科

徳島大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：長山 勝教授)

②

アパタイトセメントの骨との置換  
—培養破骨細胞および骨芽細胞を用いた検討—

湯 浅 哲 也

徳島大学大学院歯学研究科  
徳島大学歯学部口腔外科学第一講座  
(主任：長山 勝教授)



— 目次 —

緒言	1
材料と方法	5
結果	11
考察	15
結論	24
謝辞	25
参考文献	26
図の説明	36
表	39
図	40
英文抄録	53

## 「緒言」

口腔外科領域における骨欠損の再建には、これまで自家骨移植が最善の方法とされてきた。しかし近年、生体材料の開発が進み、自家骨移植に代わる種々の骨補填材が開発され、臨床応用されるようになってきた<sup>1-8)</sup>。なかでも、焼結体アパタイトは、骨や歯などの生体硬組織の無機主成分であるハイドロキシアパタイトを化学合成し、焼結したもので、優れた組織親和性と骨伝導性を示すことが知られている<sup>3-7)</sup>。そのため現在、ブロック状と顆粒状の焼結体アパタイトが市販されており、臨床の場において広く用いられている<sup>1-4)</sup>。しかし、ブロック状の焼結体アパタイトには、術中に形態を自由に形成できないこと、また被覆した粘膜への血行を遮断するため、粘膜の経時的菲薄化、粘膜の裂開によるアパタイトの露出などの問題点がある<sup>8)</sup>。また、顆粒状焼結体アパタイトは、ブロック状焼結体アパタイトと比較すると形態付与の点では優れるが、機械的強さを期待できないこと、また移植後周囲組織中へ移動し形態を維持できないなどの問題がある<sup>9,10)</sup>。

一方、1986年にBrownとChowによって開発されたアパタイトセメント（以下従来型アパタイトセメントと略記する）はアパタイト系骨補填材の形態形成能に関する問題点を解決する極めて有用な骨再建材料として着目されている<sup>11-17)</sup>。従来型アパタイトセメントはリン酸四カルシウムとリン酸水素カルシウムの等モル混合物からなり、蒸留水で練和すると石膏と同様の硬化機構で硬化し、その硬化体がアパタイトになるため、優れた生体親和性と骨伝導性を示す生体活性セメントとして欧米での臨床応用が始まっている<sup>11-17)</sup>。しかし、従来型アパタイトセメントの硬化時間は30～60分と長く、40分以内に硬化が確認できない場合には再充填が指示されている。また、硬化前のペーストが体液な

どの液体と接触すると形態を保てず崩れる（崩壊性）ため、臨床的応用に際しては完全な止血が必須条件となっている。

著者らの研究グループでは、アパタイトセメントにおける硬化反応の律速段階がセメント構成成分の一つであるリン酸水素カルシウムの溶解に基づくリン酸イオンの供給不足によるものであることを見出し、練和液として  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  中性リン酸水素ナトリウム水溶液を用いることで、硬化時間を約5分に短縮した迅速硬化型アパタイトセメントを開発した<sup>18-22)</sup>。迅速硬化型アパタイトセメントは、その組成が迅速にアパタイトに変換し、短時間で硬化するため、初期より大きな機械的強さが発現する特徴を有しており、昨年より欧米のアパタイトセメントは迅速硬化型アパタイトセメントに変更された。迅速硬化型アパタイトセメントは従来型アパタイトセメントと比較すると、硬化時間に関しては改善されているが、やはり出血部位へ適用した場合には、セメントが形態を保てず崩れるという問題点が残っていた。そこで、練和液にアルギン酸ナトリウムを添加してセメントペーストへの水分の浸透を抑制し、硬化前に体液と接しても崩壊せず、約5分で硬化する非崩壊型アパタイトセメントを開発した<sup>23-32)</sup>。非崩壊型アパタイトセメントは従来型アパタイトセメントの問題点および顆粒状焼結体アパタイトの問題点をほぼ解決していると考えられるが、機械的強さは超硬石膏と同程度であり、ブロック状焼結体アパタイトと比較すると劣る。

ところで、従来型アパタイトセメントは長期的にはあるが、骨と一部置換することが報告されている<sup>17, 33, 34)</sup>。骨には力学的機能以外にも生物学的機能があり、理想的な骨再建材料は骨と置換する材料であると考えられる。アパタイトセメントが骨と置換するの

であれば、アパタイトセメント硬化体の機械的強さを増大させるより、アパタイトセメントの骨置換を促進する方法を検討する方がより好ましいと考えられる。しかしながら、アパタイトセメントの骨置換に関しては、セメントが置換されるとの報告<sup>17, 33, 34)</sup>と置換されないとの報告<sup>16, 35)</sup>があり、必ずしも統一した見解が得られているとは言い難い。当教室の Miyamoto<sup>21-25)</sup>や武知<sup>26-29)</sup>は、従来型および迅速硬化型アパタイトセメントをラット脛骨に充填した実験において、4か月ではいずれのアパタイトセメントにも明らかな骨置換はみられなかったと報告した。このようにアパタイトセメントの骨置換に関する見解が異なる理由としては、各々の実験に用いられた動物種、埋入期間、埋入部位、埋入方法、さらに骨との置換に関する評価方法の違いなどが原因として考えられる。

そこでアパタイトセメントの骨置換に関する客観的かつ定量的な知見を得るには、細胞レベルでの研究が必要不可欠であると考えられるが、これまでに培養細胞を用いてアパタイトセメントの骨置換について評価した報告はない。そこで、本研究においてはアパタイトセメントの骨置換に関する客観的かつ、定量的知見を得ることを目的に、骨置換を培養破骨細胞によるアパタイトセメントの吸収とアパタイトセメントが培養骨芽細胞に及ぼす影響の二面に分けて、焼結体アパタイトと比較、検討した。また、迅速硬化型や非崩壊型アパタイトセメントは、従来型アパタイトセメントと比較して、より機能的なセメントであると考えられるが、いずれも著者らの研究グループで独自に開発したアパタイトセメントであり、迅速硬化型や非崩壊型アパタイトセメントの骨置換に関する報告は、Miyamoto<sup>21-25)</sup>、武知<sup>26-29)</sup>の報告以外にはみあたらない。そこで、迅速硬化型アパタイトセメントおよび非崩壊型アパタイトセメントが、従来型と同様の挙動を示すか否かにつ



いても検討を行った。

2002年

（以下、本文のほとんどは非常に薄い文字で印刷されているため、正確な内容を読み取ることは困難です。以下に、可能な限り読み取ったと思われる内容を要約的に記載します。）

この報告は、2002年度の調査結果について、その概要と、今後の対応策について述べている。調査の結果、多くの課題が明らかになった。特に、環境問題に関する意識の向上と、具体的な行動の実践が求められている。また、地域社会の協力体制の構築も重要な課題として挙げられている。

今後の対応策としては、まず、関係機関との連携を強化し、情報共有を進めることである。さらに、市民に対する啓発活動を実施し、環境意識を高める必要がある。また、地域住民の参加を促すための仕組みづくりも重要である。

以上、2002年度の調査結果と今後の対応策について述べてきた。引き続き、関係機関と連携し、地域社会の協力体制を構築し、環境問題の解決に取り組んでいく必要がある。

## 「材料と方法」

### 1. 各ディスク体試料の調整、作製

本研究で用いたアパタイトセメントの粉末部は、リン酸四カルシウム（太平化学、東京）とリン酸水素カルシウム（J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA）の等モル混合物であり、両者をマイクロミル（SK-M2, 協立理工, 東京）で混合し調整した。調整したアパタイトセメント粉末は 60℃ のバキュームオープン内に保管した。従来型アパタイトセメントの練和液には、蒸留水を用い、迅速硬化型アパタイトセメントの練和液に  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  リン酸水素ナトリウム水溶液（pH 7.4）を用いた。 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  リン酸水素ナトリウム水溶液は、37℃ の  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  のリン酸水素二ナトリウム水溶液に、 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  のリン酸二水素ナトリウム水溶液を混合し、pH 7.4 に調整、作製した。非崩壊型アパタイトセメントの練和液としては、迅速硬化型アパタイトセメントの練和液である  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Na}_{1.8}\text{H}_{1.2}\text{PO}_4$  水溶液に、0.5 wt% アルギン酸ナトリウム（Nacalai Tesque, 京都）を添加し、調整した。粉液比 2.0 で練和後、1 分以内に直径 10 mm のプラスチックモールドに充填し、バイブレーター（Automatic Labo-Mixer NS-8, USA）を用いて気泡を除去した後、37℃、相対湿度 100%、約 1.0 MPa の圧力条件下で 24 時間経過したアパタイトセメント硬化体を、耐水研磨紙（丸本ストルアル、東京）を用いて裏面を研磨し、厚さを 300  $\mu\text{m}$  に調整したものを試料とした（以下セメント硬化体と略記する）。

対照に用いた焼結体アパタイトは、水酸化アパタイト（富田化学、徳島）粉末を金属製のモールドを用いて、約 15 MPa の圧力下で成型した。成型したディスクを電気炉（Keramax BS4308N, Nikkato, 東京）を用いて、毎分 5℃ で昇温し、1200℃ で 2 時間

係留させ、炉冷したものを試料とした。その後、セメント硬化体と同様、厚さを 300  $\mu\text{m}$  に調整した。また、骨片は、3~5 年 齢牛大腿骨を用い、アセトンで脱脂した後、ゼー ゲミクロトーム (Saw microtome 1600, Leitz, Wetzlar, Germany) を用いて薄切し、直径 6 mm、厚みを 100  $\mu\text{m}$  に調整したものを試料とした。

試料の表面粗さは、非接触型レーザー光を用いた表面粗さ測定機 (SE-2300 PU-OS100, 小坂研究所, 東京) を用いて測定した。測定条件は、演算方式 JIS B0601-1994 に従い、評価長さ 4 mm、カットオフ値 0.8 mm、送り速さ 0.5  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  で行った。3 種類のアパタイトセメント硬化体の平均表面粗さは 1.66~1.82  $\mu\text{m}$  であり、有意な差は認められなかった。また、焼結体アパタイトの平均表面粗さは 1.78  $\mu\text{m}$  であり、セメント硬化体との間に有意な差は認められなかった。一方、牛皮質骨骨片の平均表面粗さは 0.33  $\mu\text{m}$  で、他の試料と比較して、低い値を示した (図 1、表 1)。

## 2. ディスク体試料の成分分析

セメント硬化体を、液体窒素に浸漬し、セメント成分のアパタイトへの変換反応を停止させ、凍結乾燥後、乳鉢で粉砕して得られた粉末を粉末 X 線回折装置 (以下 XRD と略記する; Rint 2000, Rigaku, 東京) により分析した。焼結体アパタイトおよび牛皮質骨骨片もセメント硬化体と同様に処理し、分析を行った。測定は、銅管球を使用し、管電圧 40kV、管電流 30 mA および  $2\theta = 1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$  ( $\theta$ : 回折角度) の条件で行った。

## 3. 培養破骨細胞を用いたディスク体試料上の破骨細胞数の測定

破骨細胞の採取方法は、Chambers ら<sup>36, 37)</sup>の方法に準じて行った。生後 5 日齢の日本白色種雄性家ウサギ（井上実験動物センター，熊本）の頸椎を脱臼後、長管骨（上腕骨，大腿骨）を摘出し、骨を長軸にそって分割後、海綿骨とともに骨髄を採取した。ピペッティング操作により細胞を骨から遊離させ、細胞懸濁液を得た。培養液には 10% 牛胎仔血清（FBS, Whittaker Bioproducts, Inc., Walkerville, MO, USA）を添加したアルファ変法イーグル培地（以下  $\alpha$ -MEM と略記する；大日本製薬株式会社，大阪）を使用した。4°C、200 rpm で 20 分間遠心分離して小骨片を除去した後に、 $1500 \text{ 個} \cdot \text{ml}^{-1}$  の多核巨細胞を含む細胞懸濁液  $200 \mu\text{l}$  を、24 穴マイクロプレート（24 well cell culture cluster, Corning, NY, USA）内に静置した直径 10 mm のディスク体試料上に播種した。37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 2 時間培養後、培地でディスク体試料上の非接着性細胞を洗い流した。2 ml の培地が入った 24 穴マイクロプレート 1 穴にディスク体試料 1 個を移し、ついで 48 時間培養を行った。ディスク体試料上に存在する破骨細胞を確認するため、破骨細胞のマーカー染色である酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（tartrate-resistant acid phosphatase, 以下 TRAP と略記する）染色を行った。培養した細胞を 10% ホルマリン水溶液にて 20 分間固定した後、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を含まないリン酸緩衝生理食塩水（以下 PBS(-) と略記する；日水製薬、東京）で洗浄した。その後、Takahashi ら<sup>38, 39)</sup>の方法に準じて TRAP 染色を行った。すなわち、20 mg ナフトール AS-MX リン酸ナトリウム塩を含む 0.5 ml N,N'-ジメチルホルムアミド（Wako Pure Chemical Industries, Ltd, 大阪）と 388 mg 酒石酸ナトリウム（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）を含む  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）40 ml を混合した溶液に、20 mg のファースト

バイオレット LB salt (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を加えた染色液を用いて染色した。なお、反応停止液として  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  水酸化ナトリウムを用いた。TRAP 陽性で、3 つ以上の核を有する短径  $50 \mu\text{m}$  以上の細胞を破骨細胞とみなし、実体顕微鏡を用いて細胞数を測定した。

#### 4. ディスク体試料上の吸収窩数、吸収窩面積の測定と破骨細胞の形態観察

ディスク体試料上の破骨細胞数を測定した後、走査型電子顕微鏡 (Scanning electric microscope, 以下 SEM と略す ; JSM-5300, 日本電子, 東京 ) を用いて、破骨細胞の形態観察および破骨細胞によるディスク体試料上の吸収窩数、吸収窩面積の測定を行った。ディスク体試料を 2.5% グルタルアルデヒドを含む PBS (-) で 2 時間前固定した後、2% 四酸化オスミウムを含む PBS(-) で 2 時間後固定を行った。その後、ディスク体試料をエタノール上昇系列により脱水した後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥を行った。乾燥させたディスク体試料にイオンスパッタ法による金蒸着を施したものを、SEM 観察用試料とした。

#### 5. ヒト骨芽細胞の初期接着性および相対増殖率の測定

ヒト骨芽細胞として、当教室において継代培養を行っている細胞を用いた<sup>40, 41)</sup>。  $1 \times 10^4$  個の細胞を直径 10 mm ディスク体試料上に播種し、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -グリセロリン酸 ( $\beta$ -GP, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) および  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  アスコルビン酸 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を含む  $\alpha$ -MEM に 10% FBS を添

加した培地にて培養した。培養系は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で維持し、培地交換は 3 日毎に行った。

初期接着性は、5 時間後の付着骨芽細胞数を測定した。ディスク体試料上に付着した骨芽細胞を 0.1% コラゲナーゼおよび 0.1% トリプシンを含む PBS(-) を用いて剥がし、細胞を回収後、0.15 % トリパンプルーを用いた色素排除法にて生細胞数を算定した。算定には Turk 血球計算板を使用した。

相対増殖率は、24 穴マイクロプレートに静置した直径 10 mm ディスク体試料上に  $1 \times 10^4$  個のヒト骨芽細胞を播種し、5 時間培養した後に、さらに 2 ml の培地を加えて培養を行った。2、4、6、8 日後に、最終濃度が  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  になるように 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (以下 MTT と略記する; 同仁化学、熊本) を加え、37°C で 4 時間反応させた後、形成された MTT ホルマゼンをジメチルスルホキシド (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) で溶解し、波長 570 nm にて吸光度を測定した。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー (コロナ電気、茨城) を使用した。なお、2 日目の焼結体アパタイトの吸光度を 100% とした。

#### 6. ヒト骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性、タイプ I コラーゲン合成量、オステオカルシン産生量の測定

アルカリホスファターゼ (以下 ALP と略記する) 活性の測定は、以下のように行った。細胞をトリス緩衝液 (以下 TBS と略記する; TaKaRa、滋賀) にて洗浄後、ラバーポリスマンを用いて細胞をディスク体試料上より剥離、回収した。この細胞を TBS に浮

遊させ、氷冷下にて超音波処理を行い、遠心分離後、その上清を採取し-20℃にて保存した。酵素活性の測定にはp-ニトロフェノールリン酸を基質とするエンザイムイムノアッセイキット (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を用いた。ALP の酵素活性は 1 分間あたりに生成された p-ニトロフェノール nmol 数を蛋白量で標準化し、マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を測定した。蛋白量は Bradford 法<sup>42)</sup>を用いて測定した。

タイプ I コラーゲン合成量、オステオカルシン産生量の測定は、0.6 N 塩酸を用い、30 分間脱灰した試料の脱灰液をサンプルとして、脱灰液中に含まれるプロコラーゲンタイプ I c-ペプチド (以下 PICP と略記する)、オステオカルシン産生量をそれぞれ PICP 測定キット (TakaRa, 滋賀)、オステオカルシン測定キット (TaKaRa, 滋賀) を用いて測定をした。

## 7. 統計学的分析

実験結果は、t 検定を用いて検定した。

## 「結果」

### 1. ディスク体試料の成分分析

練和後 24 時間経過したセメント硬化体は、ほぼアパタイトに変換していたが、アパタイトセメント粉末の組成であるリン酸四カルシウムの残存がわずかにみられた (図 2a-c)。3 種類のアパタイトセメントのアパタイトへの変換には、差は認められなかった。セメント硬化体のアパタイト結晶は、骨アパタイトと同様に低結晶性アパタイトであった (図 2e)。一方、焼結体アパタイトは、セメント硬化体、牛皮質骨骨片と比較して、著しく高い結晶性を示した (図 2d)。

### 2. ディスク体試料上の破骨細胞数の測定

単位面積当たりの破骨細胞数は、3 種類のセメント硬化体の間に有意な差は認められず、牛皮質骨骨片上の破骨細胞数と比較しても有意な差はみられなかった。しかし、焼結体アパタイト上の破骨細胞数は、他のディスク体試料に比べて、有意に少なかった (図 3)。

### 3. ディスク体試料上の破骨細胞の形態観察

セメント硬化体上で 48 時間培養を行った破骨細胞は、半円球状あるいは円盤状を呈していた。また、破骨細胞の直下には、セメント硬化体の他部位の表面ではみられないセメント内部の小さな気孔が多数露出していた。気孔の露出した部分の大きさはほぼ破骨細胞の大きさに類似していることから、破骨細胞がアパタイトセメントを吸収したために生じた吸収窩であると考えられた。3 種類のセメント硬化体の間で、破骨細胞および吸収窩



の形態に差はみられなかった (図 4a, b, c)。

一方、焼結体アパタイト上の破骨細胞は、やや小型で球形を呈しており、アパタイトセメント上の破骨細胞の形態とは明らかに異なっていた。また、破骨細胞直下あるいはその周辺に、アパタイトセメント内部の気孔が露出した部位はみられず、明らかに陥凹した部位も認められなかった (図 5)。

牛皮質骨骨片上の破骨細胞の形態は、アパタイトセメント上の破骨細胞と同様に、半円球状あるいは円盤状を呈し、破骨細胞直下およびその周囲には多くの陥凹した吸収窩が観察された (図 6)。

#### 4. ディスク体試料上の吸収窩数、吸収窩面積

アパタイトセメント上の破骨細胞による単位面積当たりの吸収窩数は、従来型、迅速硬化型、非崩壊型の間に有意な差はなく、約 70 個  $\text{cm}^{-2}$  であった。一方、牛皮質骨骨片上の吸収窩数はアパタイトセメント上の吸収窩数の約 12 倍であったが、焼結体アパタイト上には吸収窩が全く認められなかった (図 7)。

アパタイトセメント上の破骨細胞による吸収窩の全面積は、試料表面全体の約 0.2% であった。アパタイトセメントの吸収窩面積は、従来型、迅速硬化型、非崩壊型の間に有意な差はなかった。一方、牛皮質骨骨片上の破骨細胞による吸収窩全面積は、試料表面全体の約 25% で、アパタイトセメントの約 120 倍であった。焼結体アパタイト上には、吸収窩は全く認められなかった (図 8)。

## 5. ヒト骨芽細胞の初期接着性および相対増殖率

ディスク体試料に対するヒト骨芽細胞の初期接着性は、3種類のアパタイトセメントの間に有意な差はみられず、焼結体アパタイトとも差はなかった。しかし、培養用プレート上には、アパタイトセメントおよび焼結体アパタイトと比較して、多くの細胞が接着していた(図9)。

ヒト骨芽細胞の相対増殖率については、培養期間中、骨芽細胞は経時的に増殖したが、3種類のアパタイトセメントの間に有意な差はみられなかった。また、アパタイトセメントと焼結体アパタイトの間にも有意な差は認められなかった(図10)。

## 6. ヒト骨芽細胞のALP活性、タイプIコラーゲン合成量、オステオカルシン産生量

ディスク体試料上での骨芽細胞の分化を検討するため、その代表的な分化マーカーであるALP活性、タイプIコラーゲン合成量、オステオカルシン産生量の測定を行った。

初期の分化マーカーとされるタイプIコラーゲン合成量の指標であるPICP量は、全ての試料において経時的に減少傾向を示した(図11)。3種類のアパタイトセメントのPICP量は、3日目、6日目、9日目において焼結体アパタイトよりも高値を示した。また、焼結体アパタイトも同時期には、培養用プレートよりも高値であった。培養期間中、3種類のセメントの間に有意な差は認められなかった。

ALP活性は、アパタイトセメント群および焼結体アパタイトでは経時的に減少し、培養用プレートでは増加した(図12)。しかし、培養3日目、6日目のアパタイトセメント群は、焼結体アパタイトと比較して高値を示した。焼結体アパタイトも、同時期におい

では、培養用プレートよりも高値を示した。培養全期間を通じて、3種類のアパタイトセメントの間に差は認めなかった。

オステオカルシン産生量は、全ての試料において培養 20 日目まで経時的に増加を示した(図 13)。アパタイトセメント群のオステオカルシン産生量は、培養 15 日目に著しく増加した。焼結体アパタイトについても培養用プレートと比較して、培養 15 日目、20 日目で高値を示したが、アパタイトセメント群よりも低値であった。3種類のアパタイトセメントの間に有意な差は認めなかった。

## 「考察」

### 1. 培養破骨細胞を用いたアパタイトセメントの吸収

焼結体ハイドロキシアパタイトの生体内における吸収については、種々の報告がある。Muller-Mai ら<sup>43)</sup>は、ウサギ大腿骨に円柱状の緻密体ハイドロキシアパタイトを埋入し、埋入 12 週後において試料表面が破骨細胞によって吸収されたと報告している。また、Ichikawa ら<sup>44)</sup>は病的条件ではあるが、インプラント周囲炎を惹起した焼結体ハイドロキシアパタイトを表面コートしたインプラント体を摘出し組織学的に観察を行ったところ、インプラント頸部に細菌性プラークが形成され、アパタイト表面が粗造になっていることを報告している。また青木<sup>45)</sup>は緻密なハイドロキシアパタイトをイヌ大腿骨に 7 年間埋入して組織学的検討を行った結果、自家骨との置換速度は年間数  $\mu\text{m}$ であることを報告した。しかし、西村<sup>46)</sup>はイヌ歯槽骨に歯周病の骨欠損モデルを作製し、高温で焼成した顆粒状ハイドロキシアパタイトを充填し、充填 2 4 週後では明らかな量的変化はみられなかったとし、倉科ら<sup>47)</sup>はウサギ下顎骨下縁に骨欠損を作製し、緻密体と多孔体の両ハイドロキシアパタイトをワイヤーにて固定し、2 年後に組織学的に観察を行ったところ、両者とも吸収破壊の所見はみられなかったと報告している。また、山崎<sup>48)</sup>はイヌ歯牙を抜歯 2 か月後の歯槽骨に気孔率約 70% の多孔質アパタイトブロックを埋入したところ、孔内に骨組織の侵入を認めたが、破骨細胞は認められず、二次的に吸収される所見はなかったと報告している。このように焼結体アパタイトの吸収に関する報告は様々であるが、臨床的には、焼結体ハイドロキシアパタイトは生理的条件下ではほとんど吸収されることはなく、骨と置換しない安定した材料とされている<sup>1-7, 46-48)</sup>。

一方、アパタイトセメントは長期においてではあるが、骨と置換することが報告されている<sup>17, 33, 34)</sup>。Friedman ら<sup>17)</sup>はネコ前頭洞にアパタイトセメントを充填した場合、18か月で約60%が母床骨と置換したとし、Shindo ら<sup>33)</sup>はイヌ頭蓋骨に augmentation した場合、9か月で40%が骨と置換したと報告している。また、Lew ら<sup>34)</sup>もイヌ頭蓋骨の欠損に充填した場合、6か月で約40%が骨と置換したと報告している。竹沢ら<sup>49)</sup>はアパタイトセメントをラット大腿骨に加圧注入した場合、填入後4週でセメントが減少したことから、破骨細胞によって吸収された可能性があると報告し、西村<sup>46)</sup>はアパタイトセメントをイヌ歯槽骨に作製した骨欠損部に充填し、1-2週でそのほとんどが破骨細胞により吸収され、組織から消失したと報告している。これに対して、Costantino ら<sup>16)</sup>はネコ頭蓋骨骨膜下に移植した場合、9か月ではほとんど骨置換しなかったと報告し、Kurashina ら<sup>35)</sup>は軟組織に接した部位ではセメントは著明に吸収されたが、骨と接した部位ではセメントの吸収はほとんどみられなかったと報告している。Schmitz ら<sup>50)</sup>はアパタイトセメントの吸収は極微量であり、吸収は非常に緩慢に起こるとしている。また、当教室の Miyamoto ら<sup>22)</sup>はアパタイトセメントをラット脛骨に充填した場合、2か月においてセメントの破骨細胞やマクロファージによる吸収は観察されなかったと報告し、さらに武知<sup>26)</sup>は4か月でも明らかな骨置換はみられなかったとしている。このようにアパタイトセメントの骨置換に関しては、未だ一定の見解が得られていない。このような報告の相違は、各々の実験に用いられた動物種、埋入部位、埋入期間、埋入方法の違いに加えて骨置換に関する評価方法の違いが原因と考えられる。そこで本研究では、アパタイトセメントの吸収について、より客観的、定量的知見を得るため、培養破骨細胞を用いてアパ

タイトセメントの吸収を検討した。

材料表面の粗さが破骨細胞に及ぼす影響について、Ogura ら<sup>51)</sup> はハイドロキシアパタイト顆粒の圧接条件を変えることにより、また Gomi ら<sup>52)</sup> は、カーバイドペーパーを用いて焼結体アパタイトディスクの表面粗さを変えることにより、材料表面の性状と破骨細胞による吸収について検討を行い、その結果、試料表面が粗であるほど、骨髄細胞から形成される破骨細胞が増加し、吸収量は減少したと報告している。しかし、Doi ら<sup>53)</sup> は焼結体アパタイトの表面粗さを変えた同様の実験を行い、材料の表面粗さと破骨細胞の間には関係はなかったと報告している。このように、材料の表面粗さと破骨細胞の吸収性との間には種々の報告があるが、本研究においては、材料の表面粗さが破骨細胞に影響を与えないように試料の表面を同一の表面粗さに調整した。

試料に付着した破骨細胞数は、アパタイトセメントと骨との間で有意な差は認められなかったのに対して、焼結体アパタイト上の破骨細胞はアパタイトセメントに比較して有意に少なかった。この差については幾つかの要因が考えられる。一つは、これら 2 つの材料に対する破骨細胞の接着力が異なっているため、付着した破骨細胞数に違いが生じたことが考えられる。図 5 の SEM 写真に示したように、焼結体アパタイト上の破骨細胞は球形を呈しており、焼結体アパタイトとの接着面積が小さいことから、接着力が弱く、試料を培養液で洗浄した際に剥がれやすく、その結果、破骨細胞数が減少した可能性がある。また、アパタイトの結晶性が破骨細胞の接着力に及ぼす影響についても報告されており、Shimizu ら<sup>54)</sup> は単結晶型のアパタイト上の破骨細胞は多結晶型のアパタイト上の破骨細胞よりも材料と強く接着することを報告している。もう一つの要因として、焼結体アパ

イト上とアパタイトセメント上では、骨髓細胞に含まれる前破骨細胞の破骨細胞への分化に相違があった可能性が考えられる。アパタイト系の生体材料が破骨細胞の分化に影響を与える要因として、アパタイト結晶が生成されるとき温度、アパタイトの溶解性および結晶性などが挙げられる<sup>55, 56)</sup>。アパタイトの焼成温度と破骨細胞との関係について、Takeshita ら<sup>57)</sup>は異なる温度で作製した焼結体アパタイトをラット顎骨内に埋入した場合、より低い温度で作製した焼結体アパタイト表面により多くの破骨細胞が出現したと報告している。すなわち、本研究で用いたアパタイトセメントのアパタイト結晶は 37°C の低温で形成されたため、セメント上で形成された破骨細胞が増加したとも考えられる。また、Doi ら<sup>53)</sup>はリン酸カルシウム系材料の溶解性が破骨細胞に及ぼす影響について、溶解性の高いリン酸水素カルシウムやリン酸四カルシウム上に骨髓細胞を播種した場合、形成される破骨細胞数は減少したと報告している。

これまで、高温で焼結されたハイドロキシアパタイトは *in vitro* では破骨細胞によって吸収されないとの報告が多い<sup>53, 54, 58, 59)</sup>。本研究においても、これまでの報告と同様に焼結体アパタイトは破骨細胞に吸収されなかったが、アパタイトセメントは明らかに破骨細胞によって吸収された。このアパタイトセメントと焼結体アパタイトの吸収性の差は、アパタイト結晶が形成されるとき温度に起因すると考えられる。De Bruijn ら<sup>58)</sup>は 1250°C で焼結されたハイドロキシアパタイトは培養破骨細胞によって吸収されないが、600°C や 900°C などの低温度で焼成されたハイドロキシアパタイトは吸収されたと報告した。一般に、高温で形成されたアパタイト結晶は、低温で形成されたアパタイト結晶と比較して、結晶欠陥や dissolution site が減少するため、物理化学的溶解性は低下する<sup>55, 56)</sup>。すな

わち、アパタイトセメントは低温でアパタイト結晶が形成されるため、焼結体アパタイトと比較して、結晶欠陥や dissolution site が増加、溶解性が増し、破骨細胞が形成する酸性環境によって多くの吸収窩が形成されたと考えられる。

付着破骨細胞数に関して、アパタイトセメントと骨との間に差は認めなかったが、吸収窩数および吸収窩面積は、骨の方が有意に多かった。この差は、アパタイトセメントがハイドロキシアパタイトを主成分とする無機物だけで構成されているのに対して、骨は無機成分であるアパタイト以外に、コラーゲンなど種々のタンパクを含んでいることに起因すると考えられる。De Bruijn ら<sup>58)</sup>は破骨細胞によって吸収されない焼結体アパタイトにあらかじめ骨芽細胞を播種させた後、破骨細胞を播種すると吸収窩が生じたと報告している。これは、骨芽細胞の産生する何らかの細胞外基質タンパクが破骨細胞の吸収を促進させた結果であると考えられる。特に、オステオカルシン、オステオポンチン、グリコサミノグリカンが破骨細胞の吸収に重要な役割を果たすことが知られている。Webber ら<sup>60)</sup>は破骨細胞の分化におけるオステオカルシンの影響を検討するため、オステオカルシンを吸着させたアパタイトと吸着させなかったアパタイトを鶏卵内に移植したところ、オステオカルシンを吸着させたアパタイトの周囲にはラッフルドボーダーと明帯をもつ活動的な破骨細胞が多数認められたことを、破骨細胞に特異的な膜抗原に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に証明している。また、Glowacki ら<sup>61)</sup>はオステオカルシンでコートしたアパタイト顆粒をラット皮下に埋入すると、破骨細胞の形態的特徴を有する多核の吸収性細胞の分化を促進させたと報告している。また、最近、オステオポンチンも破骨細胞の細胞膜上にあるビトロネクチンレセプターに結合し、破骨細胞の基質への接着



を制御することによって、骨吸収に影響を与えることが知られている<sup>62)</sup>。また、Fullerら<sup>63)</sup>は、骨吸収を刺激する osteoclast resorption-stimulating activity factor は、骨吸収ホルモンを用いて培養した骨芽細胞により放出され、骨芽細胞の表面あるいは細胞外基質の中にあるヘパリン様グリコサミノグリカンに結合し、破骨細胞の活性化に影響を与えると報告している。アパタイトセメントと比較して、骨が破骨細胞による吸収を受けやすかった他の原因として、アパタイト結晶に含まれる微量元素の影響がある。骨のアパタイト結晶は、アパタイトセメントのアパタイト結晶とは異なり、多くの微量元素を含んでいる。とりわけ炭酸基の含有量は多く、アパタイト結晶内に炭酸基を取り込んだ炭酸アパタイトを4～8%含んでいることが知られている。炭酸アパタイトは炭酸基を含まないアパタイトに比べて溶解性が高く<sup>64)</sup>、Doiら<sup>59)</sup>は炭酸基を含有させた焼結体アパタイトが培養破骨細胞によって吸収されたことを報告している。

## 2. アパタイトセメントが培養ヒト骨芽細胞に及ぼす影響

焼結体アパタイトは骨内で、骨と化学的に結合し、優れた骨伝導性と良好な生体親和性を示すことが知られている<sup>3-7)</sup>。また、アパタイトセメントも、焼結体アパタイトと同様に、良好な組織親和性と優れた骨伝導性を示すことが報告されている<sup>13-17, 21-29)</sup>。しかし、これまで焼結体アパタイトとアパタイトセメントを比較し、骨芽細胞に及ぼす影響について検討した報告はない。そこで、本研究では、アパタイトセメントが培養骨芽細胞の分化に及ぼす影響について検討を行った。

材料表面の粗さが骨芽細胞に及ぼす影響について、Martinら<sup>65)</sup>は培養ヒト骨芽細胞

を表面粗さを変えたチタンディスク上で、Hatano ら<sup>66)</sup>は、ラット頭蓋骨由来骨芽細胞を同じく培養用ポリスチレン上で培養し、表面粗さが骨芽細胞の増殖と分化に影響を与えることを報告している。そこで本研究では、培養骨芽細胞を用いた実験においても、試料を同一の表面粗さに調整した。

ディスク体試料に対する骨芽細胞の接着性は、焼結体アパタイトとアパタイトセメントの間に有意な差はみられなかったが、培養用プレートはより高い接着性を示した。これまで、骨芽細胞の焼結体アパタイトへの接着性は、培養用プレートに比べ低いと報告されており<sup>67-69)</sup>、本研究結果と一致する。材料により細胞の接着性が異なる理由について、Puleo ら<sup>67)</sup>は骨芽細胞の産生する細胞外基質タンパク量が材料によって異なることを挙げ、Hott ら<sup>68)</sup>は血清中に含まれる何らかのタンパクの材料への吸着量が、材料によって異なることが原因であると考察している。一方、アパタイトセメントと焼結体アパタイトの間に差がみられなかったのは、両者は結晶性が異なるもののいずれも同じアパタイト結晶から構成されているためと考えられる。また、アパタイトセメント群において差が生じなかった原因も、迅速硬化型および非崩壊型アパタイトセメントが、従来型アパタイトセメントとほぼ同じ構成成分から成るためと考えられる。

焼結体アパタイトは培養用プレートに比べて骨芽細胞の増殖を促進させることが、これまでも報告されている<sup>70, 71)</sup>。しかし、その一方で骨芽細胞の増殖に影響を与えないとの報告もある<sup>67, 72)</sup>。本研究において、アパタイトセメント群、焼結体アパタイトおよび培養用プレートの中に骨芽細胞の増殖に差がみられなかったのは、単位面積あたりに播種した細胞数が比較的多く、早期にコンフルエントに達したことが一因と考えられる。

焼結体アパタイトが骨芽細胞の分化を促進させることは、これまでに多く報告されている<sup>67-74)</sup>。本研究においても、焼結体アパタイトは骨芽細胞の分化マーカーの発現を著明に促進させた。この理由については、アパタイト表面が化学的に骨基質関連蛋白を吸着しやすい特性を持つことやアパタイト上のカルシウム濃度、リン酸濃度の上昇やアパタイト核の析出が原因と考えられている<sup>69, 71, 73)</sup>。さらに、本研究では、アパタイトセメント上の骨芽細胞は、焼結体アパタイトと比べても、より高い分化マーカーを発現した。この原因は、主としてアパタイトセメントの高い溶解性によって生じるカルシウムおよびリン酸濃度の上昇に起因すると考えられる。Matsuoka ら<sup>75)</sup>は、高濃度のカルシウムイオン下で骨芽細胞を培養すると ALP とオステオカルシンの mRNA が上昇することを示し、その原因が TGF- $\beta$  を介した骨芽細胞の活性化であると考察しており、アパタイトセメントも同様の機序で骨芽細胞の分化マーカーの発現を促進したと考えられる。さらに、Maxian ら<sup>74)</sup>は低結晶性ハイドロキシアパタイト上の骨芽細胞が高結晶性ハイドロキシアパタイト上よりも高い ALP 活性を示すことを報告し、この原因もハイドロキシアパタイトの結晶性の違いから生じるアパタイトの溶解性の差に起因するものとしている。さらに、アパタイトの焼結温度とその溶解性には密接な関係があることが知られている。すなわち、アパタイトの焼結温度が高くなると、格子欠損や dissolution site が減少することによって溶解性は小さくなる<sup>55, 56)</sup>。永井ら<sup>76)</sup>は 200℃と 800℃で焼成したハイドロキシアパタイトをそれぞれラット顎骨に埋入した結果、200℃で焼成したもののほうが 800℃で焼成したものよりも、初期の骨形成速度が大きかったと報告している。さらに、田村<sup>77)</sup>は 900℃と 1400℃で焼成したハイドロキシアパタイト顆粒を家兎顎骨欠損部に埋入した場合、

900℃で焼成したものが、より速く骨を誘導したと報告している。上述したように、アパタイトセメントが骨芽細胞の分化を促進した原因には、アパタイト結晶の溶解性が深くかわっていると思われるが、未だその詳細な機序は不明で、今後の重要な研究課題と考えている。

本研究の結果から、アパタイトセメントは、焼結体アパタイトと比較して破骨細胞による吸収を受けやすく、骨芽細胞の分化を促進させる可能性があることが示唆された。さらに、著者らが開発した迅速硬化型および非崩壊型アパタイトセメントは、生体内においても従来型と同様の挙動を示すものと考えられた。今後、これらのアパタイトセメントを動物に埋入し、長期におけるアパタイトセメントの動態を詳細に検討する予定である。

## 「結論」

アパタイトセメントの骨置換に関する知見を得るため、培養破骨細胞によるアパタイトセメントの吸収と、アパタイトセメントが培養骨芽細胞に及ぼす影響について検討を行い、次の結果を得た。

1. 焼結体アパタイトは、破骨細胞によって全く吸収されなかった。
2. アパタイトセメントは破骨細胞により吸収されたが、骨と比較すると、吸収窩数は約 1/12、吸収窩面積は約 1/120 程度であった。
3. 破骨細胞による吸収は、3 種類のアパタイトセメント間に差はなかった。
4. 骨芽細胞の初期接着性および細胞増殖については、アパタイトセメントと焼結体アパタイトの間に差は認められなかった。
5. 骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性、タイプ I コラーゲン合成量、およびオステオカルシン産生量は、焼結体アパタイトに比較して、アパタイトセメント群が高い値を示した。
6. 骨芽細胞の増殖および分化マーカーの発現においては、3 種類のアパタイトセメントの間に差はみられなかった。

以上の結果から、アパタイトセメントは焼結体アパタイトと比較して破骨細胞により吸収されやすく、骨形成を促進させる可能性のある有用な生体材料であることが示唆された。

## 「謝 辞」

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ御指導、御校閲を賜った口腔外科学第一講座長山 勝教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、懇切なる御校閲をいただいた歯科補綴学第一講座市川哲雄教授、口腔解剖学第二講座羽地達次教授に深謝いたします。さらに、本研究の実施に際し終始御指導をいただいた第一口腔外科宮本洋二講師、歯科理工学講座石川邦夫博士（現岡山大学歯学部歯科理工学講座助教授）に心から謝意を表します。また、研究の遂行のために御協力いただいた口腔外科学第一講座の諸先生方に深謝いたします。

「参考文献」

- 1) Ogiso M: Reassessment of long-term use of dense HA as dental implant: case report. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 43(3), 318-320 (1998)
- 2) Burstein F D, Cohen S R, Hudgins R and Boydston W: The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 100(4), 869-874 (1997)
- 3) De Groot K: Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* 1(1), 47-50 (1980)
- 4) Donath K, Rohrer M D and Beck-Mannagetta J: A histologic evaluation of a mandibular cross section one year after augmentation with hydroxyapatite particles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 63(6), 651-655 (1987)
- 5) Page D G and Laskin D M: Tissue response at the bone-implant interface in a hydroxylapatite augmented mandibular ridge. *J Oral Maxillofac Surg* 45(4), 356-358 (1987)
- 6) Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T and Oka M: Transmission electron microscopy observations at the interface of bone and four types of calcium phosphate ceramics with different calcium/phosphorus molar ratios. *Biomaterials* 16(14), 1101-1107 (1995)
- 7) Tracy B M and Doremus R H: Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface. *J Biomed Mater Res* 18(7), 719-726 (1984)
- 8) Kent J N, Quinn J H, Zide M F, Guerra L R and Boyne P J: Alveolar ridge augmentation using nonresorbable hydroxylapatite with or without autogenous cancellous bone. *J Oral Maxillofac*

- Surg 41(10), 629-642 (1983)
- 9) Wittkamp A R M: Augmentation of the maxillary alveolar ridge with hydroxylapatite and fibrin glue. *J Oral Maxillofac Surg* 46(11), 1019-1021 (1988)
- 10) Propper R H: A technique for controlled placement of hydroxylapatite over atrophic mandibular ridges. *J Oral Maxillofac Surg* 43(6), 469-470 (1985)
- 11) Kveton J F, Friedman C D, Piepmeier J M and Costantino P D: Reconstruction of suboccipital craniectomy defects with hydroxyapatite cement: a preliminary report. *Laryngoscope* 105(2), 156-159 (1995)
- 12) Kveton J F: Obliteration of the eustachian tube using hydroxyapatite cement: a permanent technique. *Laryngoscope* 106(10), 1241-1243 (1996)
- 13) Brown W E and Chow L C: A new calcium phosphate, water-setting cement, in *Cements Research Progress*, ed. P. W. Brown. American Ceramic Society, Westerville (OH), 1986, 351-379
- 14) Chow L C and Takagi S: Self-setting calcium phosphate cements, in *Specialty Cements With Advanced Properties*, ed. B. E. Scheetz, A. G. Landers, I. Odler, and H. Jennings. 179. Materials Research Society, Pittsburgh, PA, 1989, 3-24
- 15) Chow L C: Development of self-setting calcium phosphate cements. *J Ceram Soc Jpn* 99(10), 954-964 (1991)
- 16) Costantino P D, Friedman C D, Jones K, Chow L C, Pelzer H J and Sisson G A: Hydroxyapatite cement: I. basic chemistry and histologic properties. *Arch Otolaryngol Head*



- Neck Surg 117(4), 379-384 (1991)
- 17) Friedman C D, Costantino P D, Jones K, Chow L D, Pelzer H J and Sisson G A: Hydroxyapatite cement: II. obliteration and reconstruction of the cat frontal sinus. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 117(4), 385-389 (1991)
- 18) Ishikawa K, Takagi S, Chow L C, Ishikawa Y, Eanes E D and Asaoka K: Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. Dent Mater 10(1), 26-32 (1994)
- 19) Ishikawa K and Asaoka K: Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. J Biomed Mater Res 29(12), 1537-1543 (1995)
- 20) Ishikawa K, Takagi S, Chow L C and Ishikawa Y: Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements. J Mater Sci Mater Med 6(9), 528-533 (1995)
- 21) Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao H, Sawada M, Nagayama M, Kon M and Asaoka K: *In vivo* setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. Biomaterials 16(11), 855-860 (1995)
- 22) Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yoshida Y, Nagayama M, Kon M and Asaoka K: Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone. J Biomed Mater Res 37(4), 457-464 (1997)
- 23) Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Yuasa M, Kon M, Nagayama M and Asaoka K: Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: setting behaviour in calf serum and its tissue response. Biomaterials 17(14), 1429-1435 (1996)
- 24) Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yuasa T, Nagayama M and Suzuki K: Basic

- properties of calcium phosphate cement containing atelocollagen in its liquid or powder phases.  
Biomaterials 19(7),707-715 (1998)
- 25) Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yuasa T, Nagayama M and Suzuki K:  
Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when  
implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing. J Biomed Mater Res (Appl  
Biomater) 48(1), 36-42 (1999)
- 26) 武知正晃：キトサンを用いた非崩壊型アパタイトセメントの作製とその生体親和性。  
四国歯誌 11(1)、167-176 (1998)
- 27) Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Toh T, Yuasa T, Nagayama M and Suzuki K: Initial  
histological evaluation of anti-washout type fast-setting calcium phosphate cement following  
subcutaneous implantation. Biomaterial 19(22), 2057-2063 (1998)
- 28) Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Yuasa M, Nagayama M, Kon M and Asaoka K: Non-  
decay type fast-setting calcium phosphate cement using chitosan. J Mater Sci Mater Med 7(6),  
317-322 (1996)
- 29) Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Nagayama M, Kon M, Asaoka K and Suzuki K: Effects  
of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast-setting calcium phosphate  
cement. J Biomed Mater Res 39(2), 308-316 (1998)
- 30) Ishikawa K, Miyamoto Y, Kon M, Nagayama M and Asaoka K: Non-decay type fast-setting  
calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. Biomaterials 16(7), 527-532  
(1995)

- 31) Ishikawa K, Miyamoto Y, Takechi M, Ueyama Y, Suzuki K, Nagayama M and Matsumura T:  
Effects of neutral sodium hydrogen phosphate on setting reaction and mechanical strength of  
hydroxyapatite putty. *J Biomed Mater Res* 44(3), 322-329 (1999)
- 32) Ishikawa K, Miyamoto Y, Takechi M, Toh T, Kon M, Nagayama M and Asaoka K: Non-decay  
type fast-setting calcium phosphate cement: hydroxyapatite putty containing an increased  
amount of sodium alginate. *J Biomed Mater Res* 36(3), 393-399 (1997)
- 33) Shindo M L, Costantino P D, Friedman C D and Chow L C: Facial skeletal augmentation using  
hydroxyapatite cement. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119(2), 185-190 (1993)
- 34) Lew D, Farrell B, Bardach J and Keller J: Repair of craniofacial defects with hydroxyapatite  
cement. *J Oral Maxillofac Surg* 55(12), 1441-1449 (1997)
- 35) Kurashina K, Kurita H, Kotani A, Takeuchi H and Hirano M: *In vivo* study of a calcium  
phosphate cement consisting of  $\alpha$ -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/  
tetracalcium phosphate monoxide. *Biomaterial* 18(2), 147-151 (1997)
- 36) Chambers T J, Revell P A, Fuller K and Athanasou N A: Resorption of bone by isolated rabbit  
osteoclasts. *J Cell Sci* 66(4), 383-399 (1984)
- 37) Chambers T J, Thomson B M and Fuller K: Effect of substrate composition on bone resorption  
by rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* 70(1), 61-71 (1984)
- 38) Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman G D, Mundy G R, Jones S J, Boyde A and Suda  
T: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone  
marrow cultures. *Endocrinology* 122(4), 1373-1382 (1988)

- 39) Yamashita T, Asano K, Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Martin T J and Suda T:  
Cloning of an osteoblastic cell line involved in the formation of osteoclast-like cells. *J Cell Physiol* 145(3), 587-595 (1990)
- 40) Gotoh Y, Hiraiwa K and Nagayama M: *In vitro* mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone Miner* 8(3), 239-250 (1990)
- 41) Yamanouchi K, Gotoh Y and Nagayama M: Dexamethasone enhances differentiation of human osteoblastic cells *in vitro*. *J Bone Miner Metab* 15(1), 23-29 (1997)
- 42) Bradford M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(7), 248-254 (1976)
- 43) Muller-Mai C M, Voigt C and Gross U: Incorporation and degradation of hydroxyapatite implants of different surface roughness and surface structure in bone. *Scanning Microsc* 4(3), 613-624 (1990)
- 44) Ichikawa T, Hirota K, Kanitani H, Wigianto R, Kawamoto N, Matsumoto N and Miyake Y:  
Rapid bone resorption adjacent to hydroxyapatite-coated implants. *J Oral Implantol* 22(3), 232-235 (1996)
- 45) 青木秀希：驚異の生体物質 アパタイト。第1版。東京，医歯薬出版株式会社，1999，  
87-117
- 46) 西村安義：イヌ実験的歯槽骨欠損部に移植したリン酸カルシウムセメントの組織内動態および歯周組織の反応。 *四国歯誌* 7(1)，75-93 (1994)
- 47) 倉科憲治、矢島幹人、野村 健、峯村俊一、竹内啓泰、尾野幹也、小谷 朗：Ceramic

- 材料の臨床応用に関する研究—第六報：2年間埋入例における hydroxyapatite に対する家兎下顎骨の反応. 日本口腔科学会雑誌 35(4), 144-150 (1986)
- 48) 山崎安晴：人工骨としての多孔質アパタイト—顎骨補填実験. 口腔病理学会雑誌 51(2), 184-218 (1984)
- 49) 竹沢保政、土井 豊、柴田俊一、宇野克美、堀口敬司、若松宣一、亀水秀男、行徳智義、足立正徳、森脇 豊、山本宏治、生内良男：自己硬化型アパタイトセメント—VI. 骨補填材としての可能性. 歯科基礎医学会雑誌 31(3), 240-247 (1989)
- 50) Schmitz J P, Hollinger J O and Milam S B: Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. J Oral Maxillofac Surg 57(9), 1122-1126 (1999)
- 51) Ogura M, Sakae T and Davies J E: Resorption of calcium hydroxyapatite substrata by osteoclast-like cells *in vitro*. Bioceramics 4, 121-126 (1991)
- 52) Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G and Davies J E: Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts *in vitro*. Biomaterials 14(2), 91-96 (1993)
- 53) Doi Y, Iwanaga H, Shibutani T, Moriwaki Y and Iwayama Y: Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. J Biomed Mater Res 47(3), 424-433 (1999)
- 54) Shimizu H, Sakamoto S, Sakamoto M and Lee D D: The effect of substrate composition and condition on resorption by isolated osteoclasts. Bone Miner 6(3), 261-275 (1989)
- 55) Okazaki M: Crystallographic morphology of heterogeneous fluoridated carbonate apatites. J Dent Res 72(9), 1285-1290 (1993)
- 56) Ellies L G, Nelson D G A and Featherstone J D B: Crystallographic structure and surface

- morphology of sintered carbonated apatites. *J Biomed Mater Res* 22(6), 541-553 (1988)
- 57) Takeshita N, Akagi T, Yamasaki M, Ozeki T, Nojima T, Hiramatsu Y and Nagai N: Osteoclastic features of multinucleated giant cells responding to synthetic hydroxyapatite implanted in rat jaw bone. *J Electron Microsc* 41(3), 141-146 (1992)
- 58) De Bruijn J D, Bovell Y P, Davies J E and Van Blitterswijk C A: Osteoclastic resorption of calcium phosphates is potentiated in postosteogenic culture conditions. *J Biomed Mater Res* 28(1), 105-112 (1994)
- 59) Doi Y, Shibutani T, Moriwaki Y, Kajimoto T and Iwayama Y: Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 39(4), 603-610 (1998)
- 60) Webber D, Osdoby P, Hauschka P and Krukowski M: Correlation of an osteoclast antigen and ruffled border on giant cells formed in response to resorbable substrates. *J Bone Miner Res* 5(4), 401-410 (1990)
- 61) Glowacki J, Rey C, Glimcher M J, Cox K A and Lian J: A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 45(3), 292-302 (1991)
- 62) Reinholt F P, Hultenby K, Oldberg A and Heinegard D: Osteopontin – a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(12), 4473-4475 (1990)
- 63) Fuller K, Gallagher A C and Chambers T J: Osteoclast resorption-stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 181(1), 67-73 (1991)
- 64) Gron P, Spinelli M, Trautz O and Brudevold F: The effect of carbonate on the solubility of

- hydroxylapatite. Arch Oral Biol 8(3), 251-263 (1963)
- 65) Martin J Y, Schwartz Z, Hummert T W, Schraub D M, Simpson J, Lankford J Jr, Dean D D, Cochran D L and Boyan B D: Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblasts-like cells(MG63). J Biomed Mater Res 29(3), 389-401 (1995)
- 66) Hatano K, Inoue H, Kojo T, Matsunaga T, Tsujisawa T, Uchiyama C and Uchida Y: Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. Bone 25(4), 439-445 (1999)
- 67) Puleo D A, Holleran L A, Doremus R H and Bizios R: Osteoblast responses to orthopedic implant materials *in vitro*. J Biomed Mater Res 25(6), 711-723 (1991)
- 68) Hott M, Noel B, Bernache-Assolant D, Rey C and Marie P J: Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. J Biomed Mater Res 37(4), 508-516 (1997)
- 69) Zreiqat H, Evans P and Howlett C R: Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. J Biomed Mater Res 44(4), 389-396 (1999)
- 70) 飯島啓一郎、板倉良暢、大野 敬、小玉博明、天貝裕地、須藤博子、山本茂久：骨原性細胞 MC 3 T 3 - E 1 によるハイドロキシアパタイトの生体適合性に関する研究。歯科基礎医学会雑誌 28(3)、170-176 (1986)
- 71) 飯島啓一郎、須藤博子、山本茂久：合成ハイドロキシアパタイト表面における骨原性細胞株 MC3T3-E1 の動態。東北歯大誌 15(1)、15-24 (1988)

- 72) Ozawa S and Kasugai S: Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials* 17(1), 23-29 (1996)
- 73) Wilke A, Orth J, Lomb M, Fuhrmann R, Kienapfel H, Griss P and Franke R P: Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures. *J Biomed Mater Res* 40(2), 301-306 (1998)
- 74) Maxian S H, Stefano T D, Melican M C, Tiku M L and Zawadsky J P: Bone cell behavior on Matrigel-coated Ca/P coatings of varying crystallinities. *J Biomed Mater Res* 40(2), 171-179 (1998)
- 75) Matsuoka H, Akiyama H, Okada Y, Ito H, Shigeno C, Konishi J, Kokubo T and Nakamura T: *In vitro* analysis of the stimulation of bone formation by highly bioactive apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic: released calcium ions promote osteogenic differentiation in osteoblastic ROS17/2.8 cells. *J Biomed Mater Res* 47(2), 176-188 (1999)
- 76) 永井教之、竹下信義、白須賀英樹、秋場道保：合成水酸化アパタイトのラット顎骨補填時における病理組織学的研究. *日本口腔外科学会雑誌* 31(6)、1352-1361 (1985)
- 77) 田村博宣：水酸化アパタイト顆粒による顎骨補填に関する病理組織学的研究.  
*日本口腔科学会雑誌* 34(4)、652-661 (1985)



## 図の説明

### 図1 ディスク体試料表面のSEM像

- a : 従来型アパタイトセメント
- b : 迅速硬化型アパタイトセメント
- c : 非崩壊型アパタイトセメント
- d : 焼結体アパタイト
- e : 牛皮質骨骨片

### 図2 XRDによる各試料の組成分析

- a : 従来型アパタイトセメント
- b : 迅速硬化型アパタイトセメント
- c : 非崩壊型アパタイトセメント
- d : 焼結体アパタイト
- e : 牛皮質骨骨片

各試料体の組成分析を行い、結晶性を比較した。アパタイトセメントは、骨と類似していたが、焼結体アパタイトは著しく高いピークを示した。

### 図3 各種ディスク体試料上の破骨細胞数

ディスク体試料上に多核巨細胞を播種し、48時間培養を行った後の単位面積当たりの破骨細胞数を比較した。各値は平均値±標準偏差(n=16)を示す。

焼結体アパタイトに対して有意な差を認めた(\*\* P<0.005)。

### 図4 各種アパタイトセメントのSEM像

- a : 従来型アパタイトセメント
- b : 迅速硬化型アパタイトセメント
- c : 非崩壊型アパタイトセメント

矢印は吸収窩を示す。OCは破骨細胞を示す。

### 図5 焼結体アパタイトのSEM像

OCは破骨細胞を示す。破骨細胞はやや小型で、吸収窩はみられなかった。

### 図6 牛皮質骨のSEM像

矢印は吸収窩を示す。OCは破骨細胞を示す。破骨細胞の周辺には、多くの吸収窩を認めた。

- 図7 各種ディスク体試料上の破骨細胞による吸収窩数  
ディスク体試料上に破骨細胞を48時間培養した後の単位面積当たりの吸収窩数を比較した。各値は平均値±標準偏差 (n=16) を示す。  
3種類のアパタイトセメント間には有意な差は認めなかった。  
焼結体アパタイトに対して有意な差を認めた (\*\* P<0.005)。
- 図8 各種ディスク体試料上の破骨細胞による吸収窩面積  
ディスク体試料上に破骨細胞を48時間培養した後の試料表面全体に対する吸収窩面積を比較した。各値は平均値±標準偏差 (n=16) を示す。  
3種類のアパタイトセメント間には有意な差は認めなかった。  
焼結体アパタイトに対して有意な差を認めた (\*\* P<0.005)。
- 図9 各種ディスク体試料上における骨芽細胞の初期接着性  
ディスク体試料上に骨芽細胞を播種し、5時間後に付着している生細胞数を比較した。各値は平均値±標準偏差 (n=10) を示す。  
3種類のアパタイトセメント間には有意な差は認めなかった。  
焼結体アパタイトに対して有意差を認めた (\* P<0.01)。
- 図10 各種ディスク体試料上における骨芽細胞の相対増殖率  
ディスク体試料上に骨芽細胞を培養し、2日目の焼結体アパタイトを100%として、2、4、6、8日後の細胞数をMTT assayにより比較した。各値は平均値±標準偏差 (n=9) を示す。  
■, 従来型: ●, 迅速硬化型: ▲, 非崩壊型: □, 焼結体アパタイト ○, 培養用プレート。
- 図11 各種ディスク体試料上における骨芽細胞のPICP量  
ディスク体試料上に骨芽細胞を培養し、3、6、9、12日目のPICP量を比較した。各値は平均値±標準偏差 (n=9) を示す。  
3種類のアパタイトセメントの間に有意差は認めなかった。  
■, 従来型: ●, 迅速硬化型: ▲, 非崩壊型: □, 焼結体アパタイト ○, 培養用プレート。  
焼結体アパタイトに対して有意な差を認めた (\*\* P<0.005)。

図12 各種ディスク体試料上における骨芽細胞のALP活性  
ディスク体試料上に骨芽細胞を培養し、3、6、9日目のALP活性を比較した。各値は平均値±標準偏差 (n=9) を示す。  
3種類のアパタイトセメント間に有意な差は認めなかった。  
■, 従来型: ●, 迅速硬化型: ▲, 非崩壊型: □, 焼結体アパタイト  
○, 培養用プレート。  
焼結体アパタイトに対して有意な差を認めた (\*\* P<0.005)。

図13 各種ディスク体試料上における骨芽細胞のオステオカルシン  
産生量  
ディスク体試料上に骨芽細胞を培養し、5、10、15、20日目の  
オステオカルシン産生量を比較した。各値は平均値±標準偏差  
(n=9) を示す。  
3種類のアパタイトセメントの間に有意差は認めなかった。  
■, 従来型: ●, 迅速硬化型: ▲, 非崩壊型: □, 焼結体アパタイト  
○, 培養用プレート。  
焼結体アパタイトに対して有意な差を認めた (\*\* P<0.005)。

試料の表面粗さ

試料名	表面粗さ ( $\mu\text{m}$ )
従来型	1.72 $\pm$ 0.25
迅速硬化型	1.82 $\pm$ 0.27
非崩壊型	1.66 $\pm$ 0.10
焼結体アパタイト	1.78 $\pm$ 0.22
牛皮質骨骨片	0.33 $\pm$ 0.09 **

各値は7試料の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

焼結体アパタイトに対して有意な差を認めた(\*\* P<0.005)。

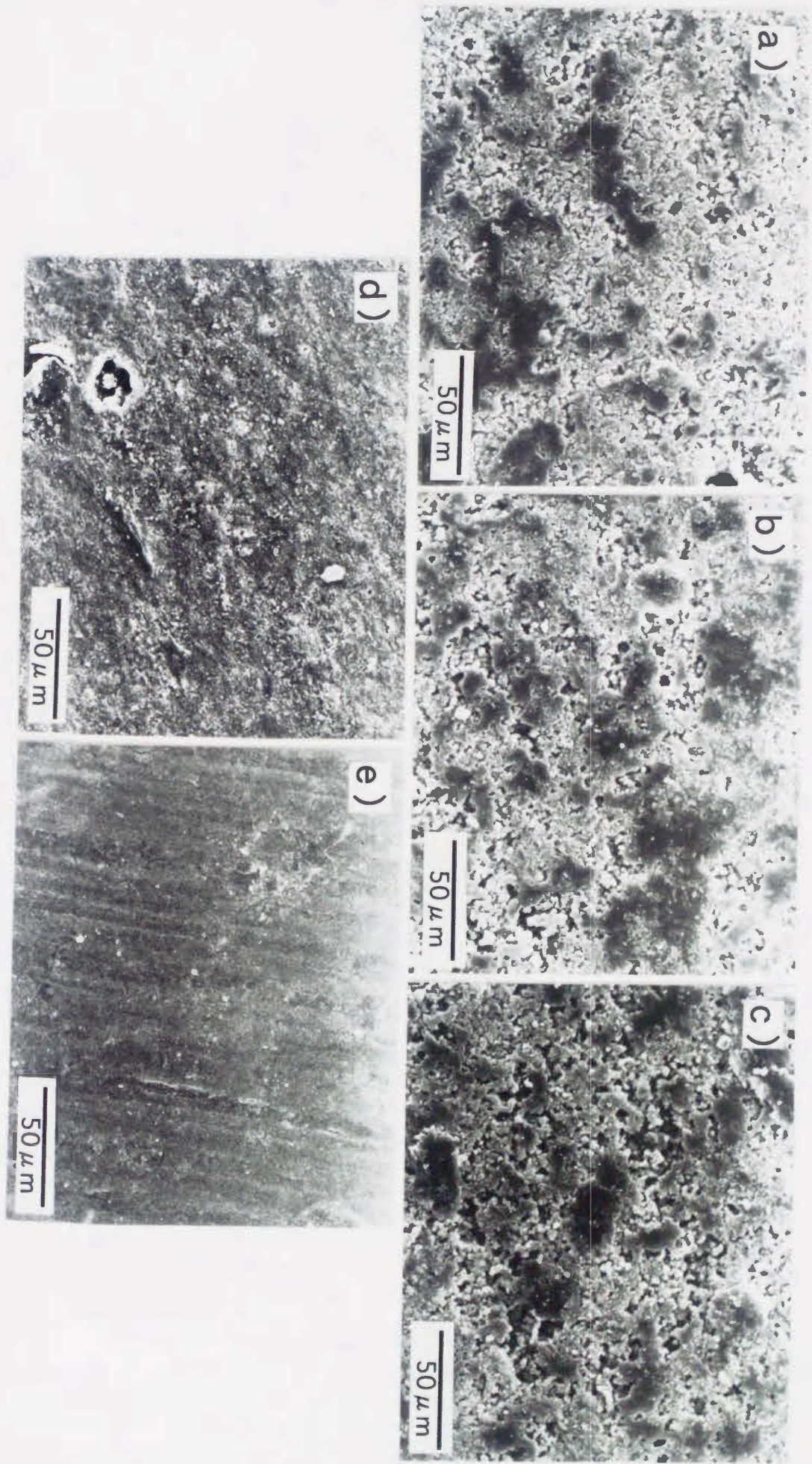


图 1

図 2

Intensity

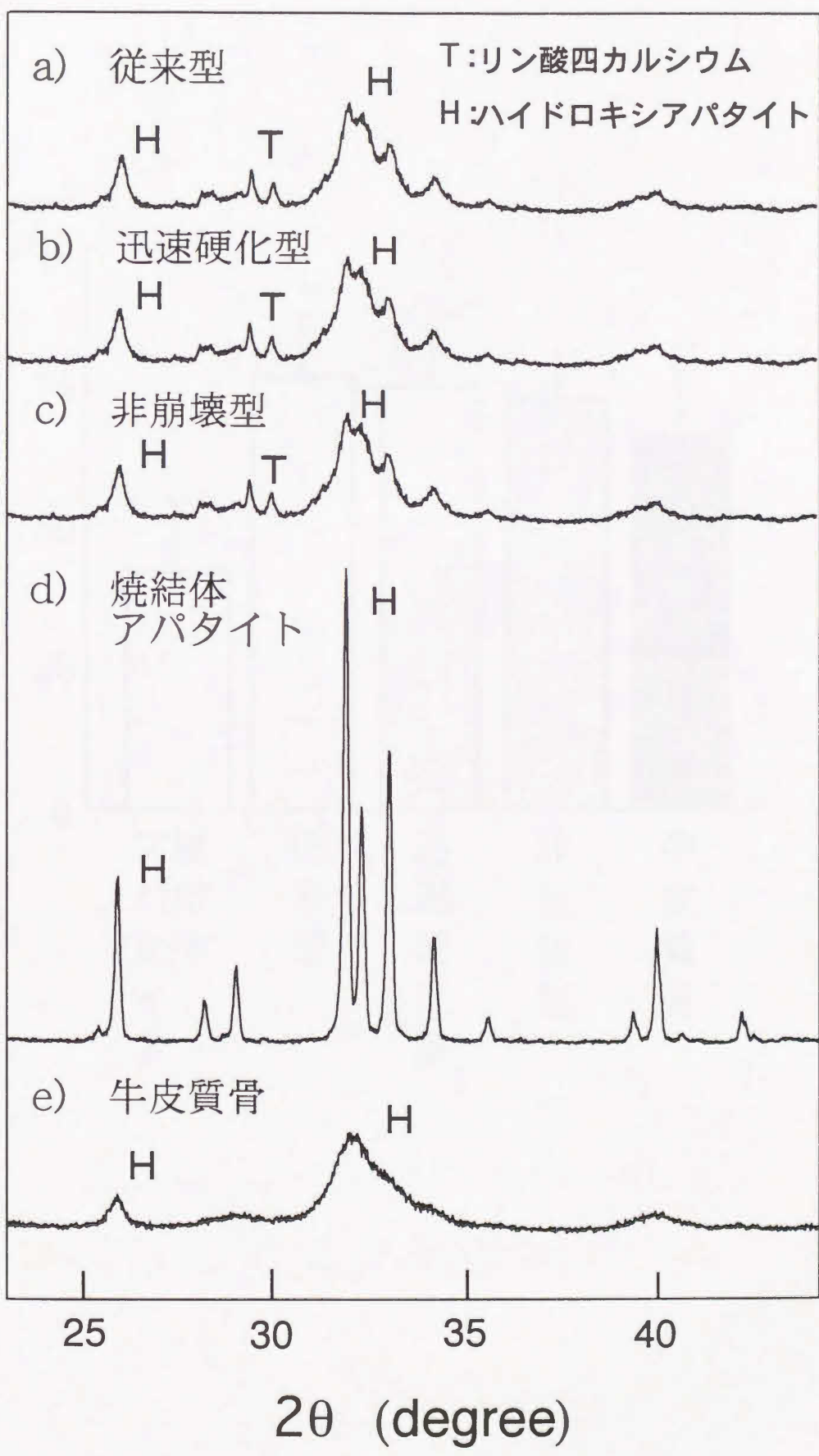
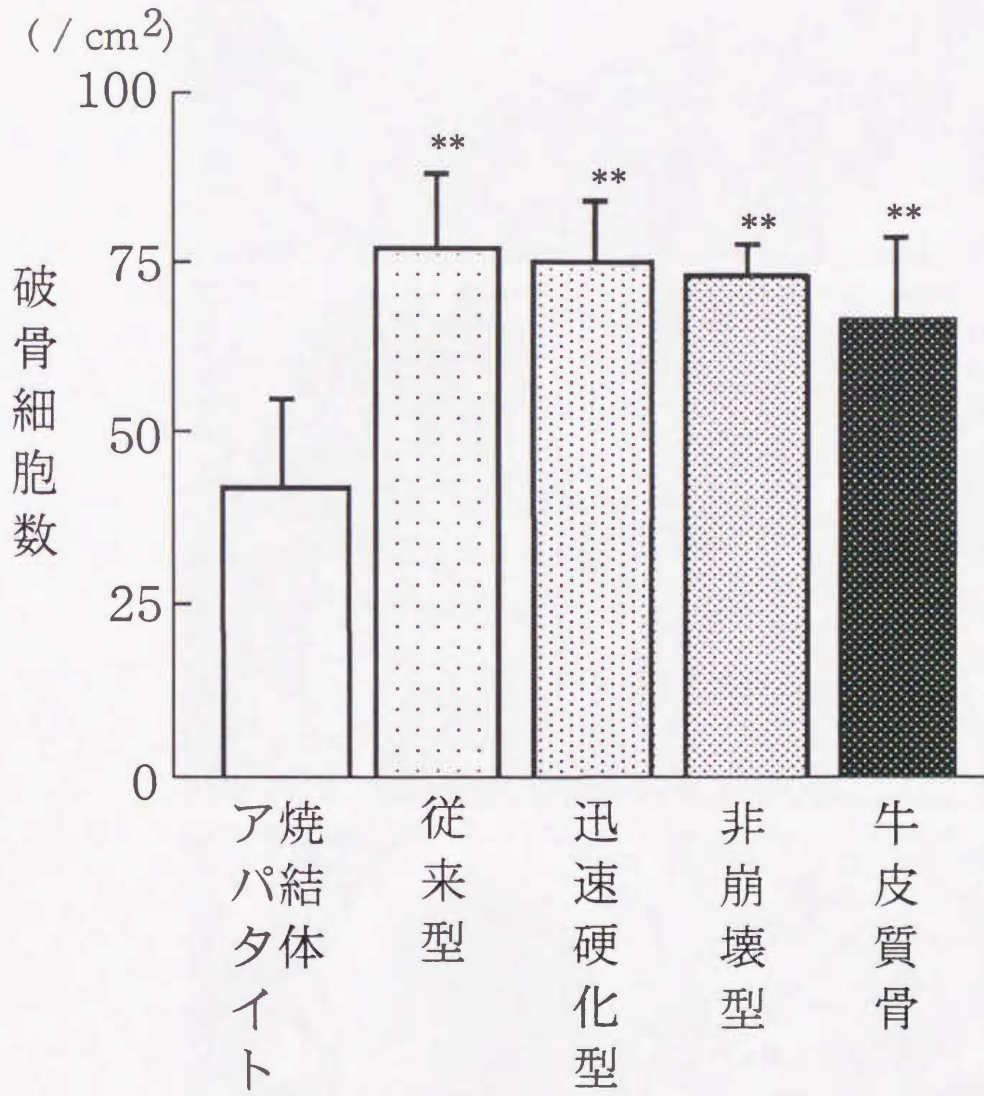
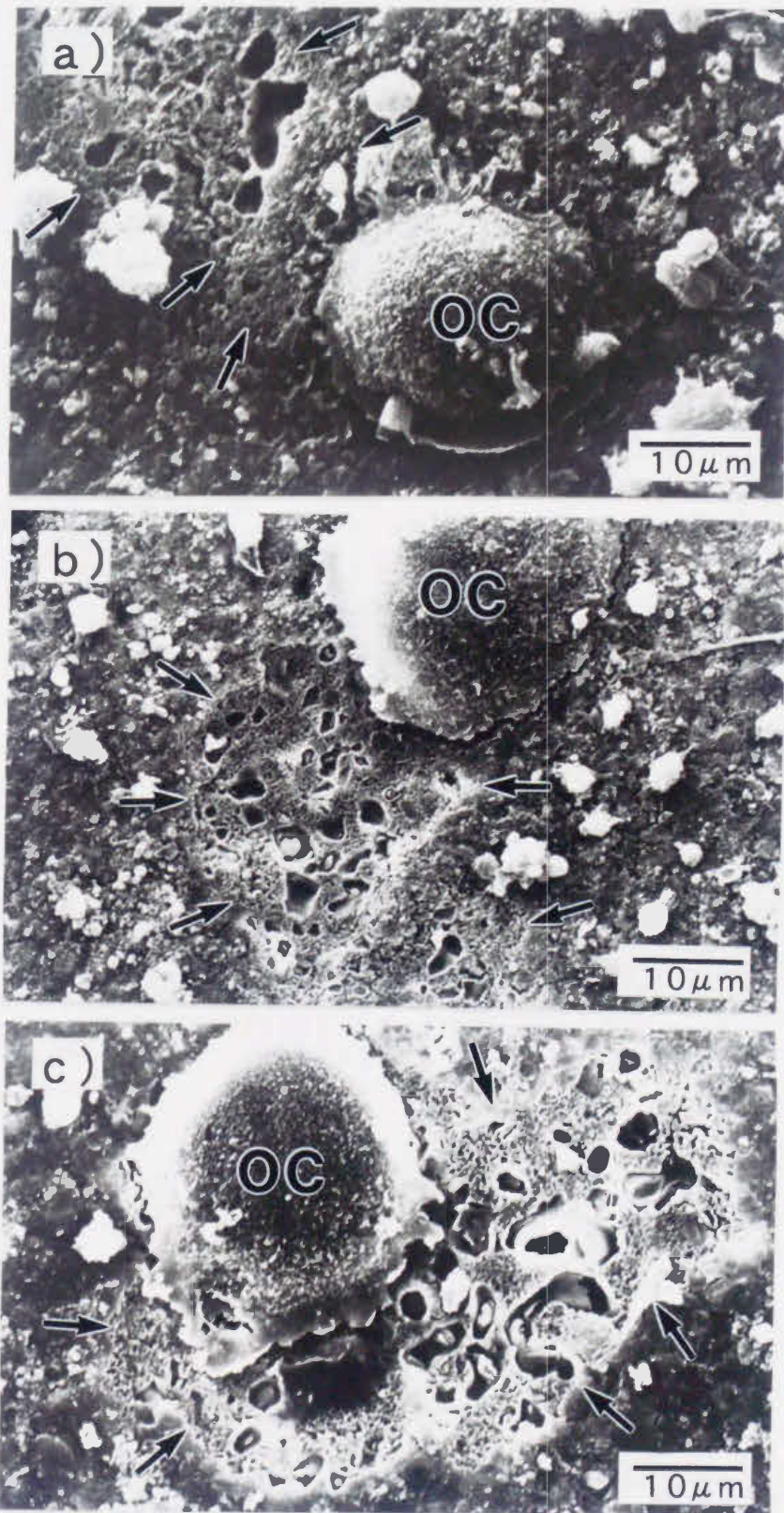
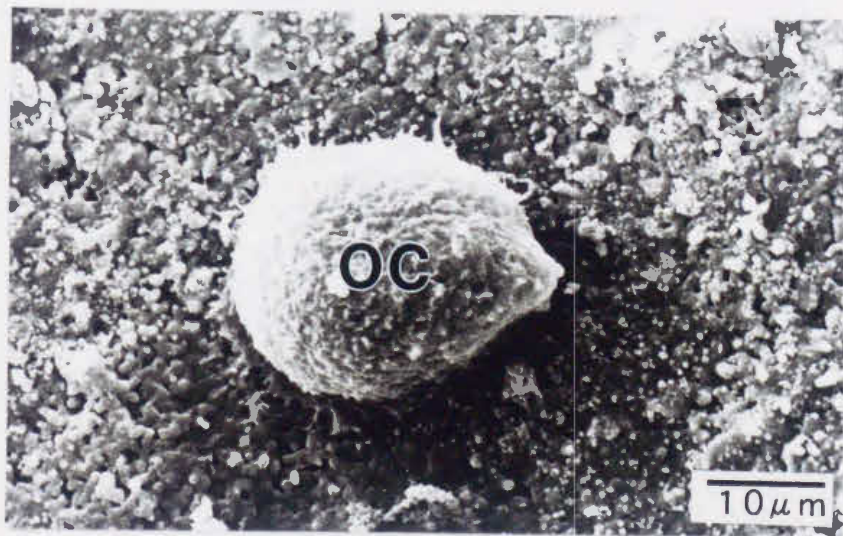


図 3









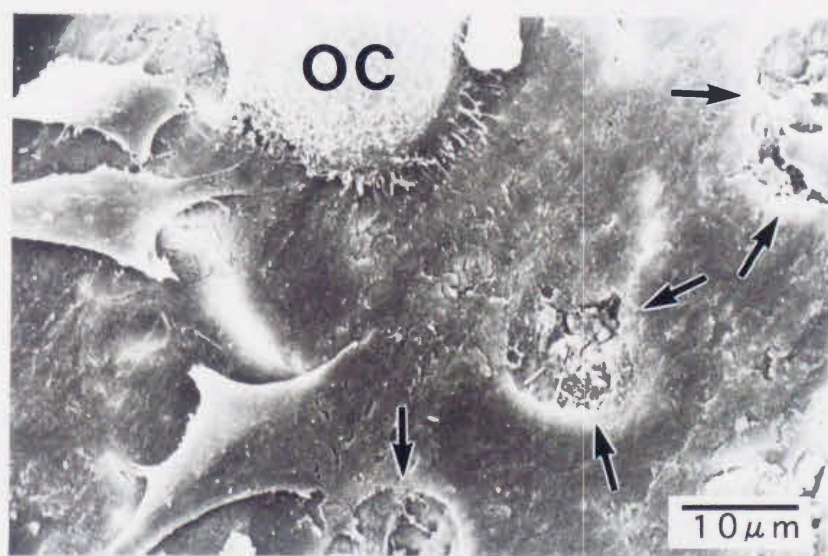
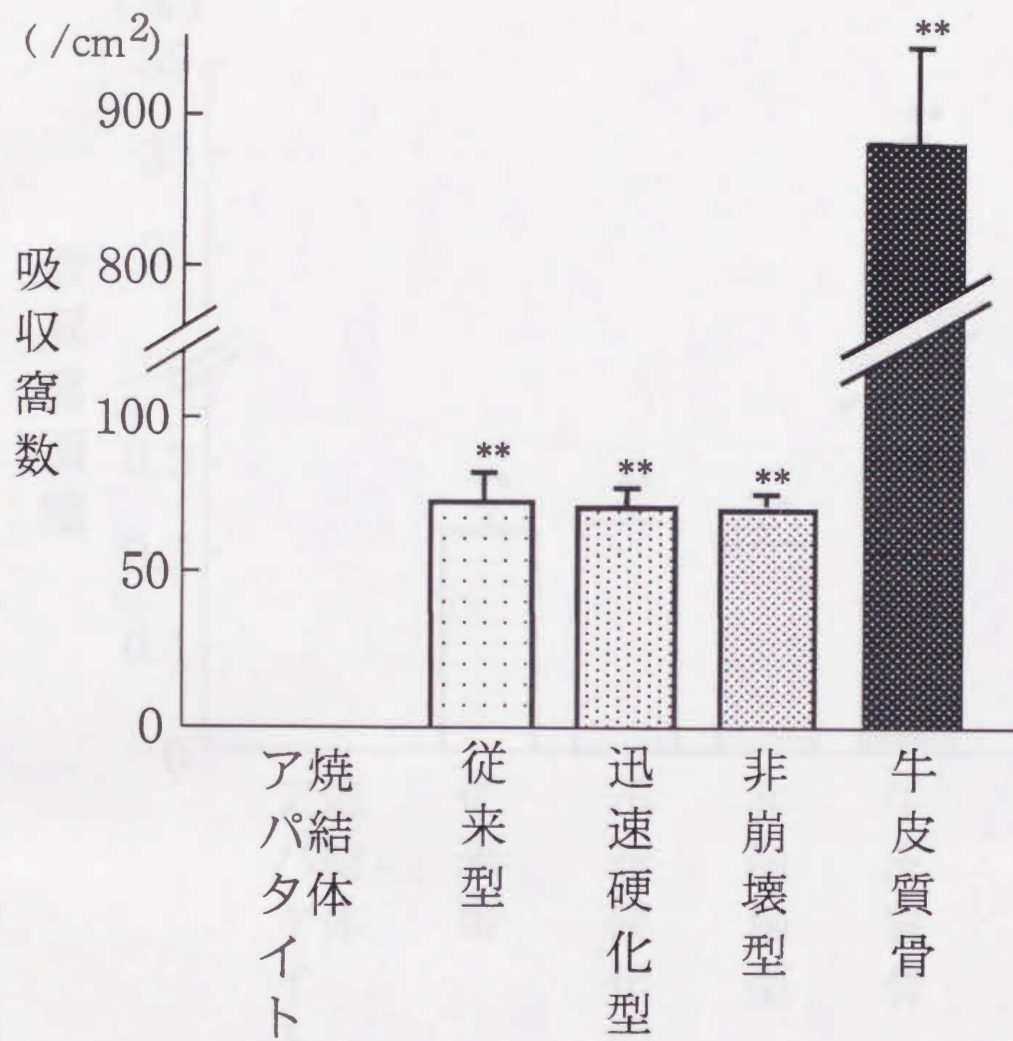


図 7



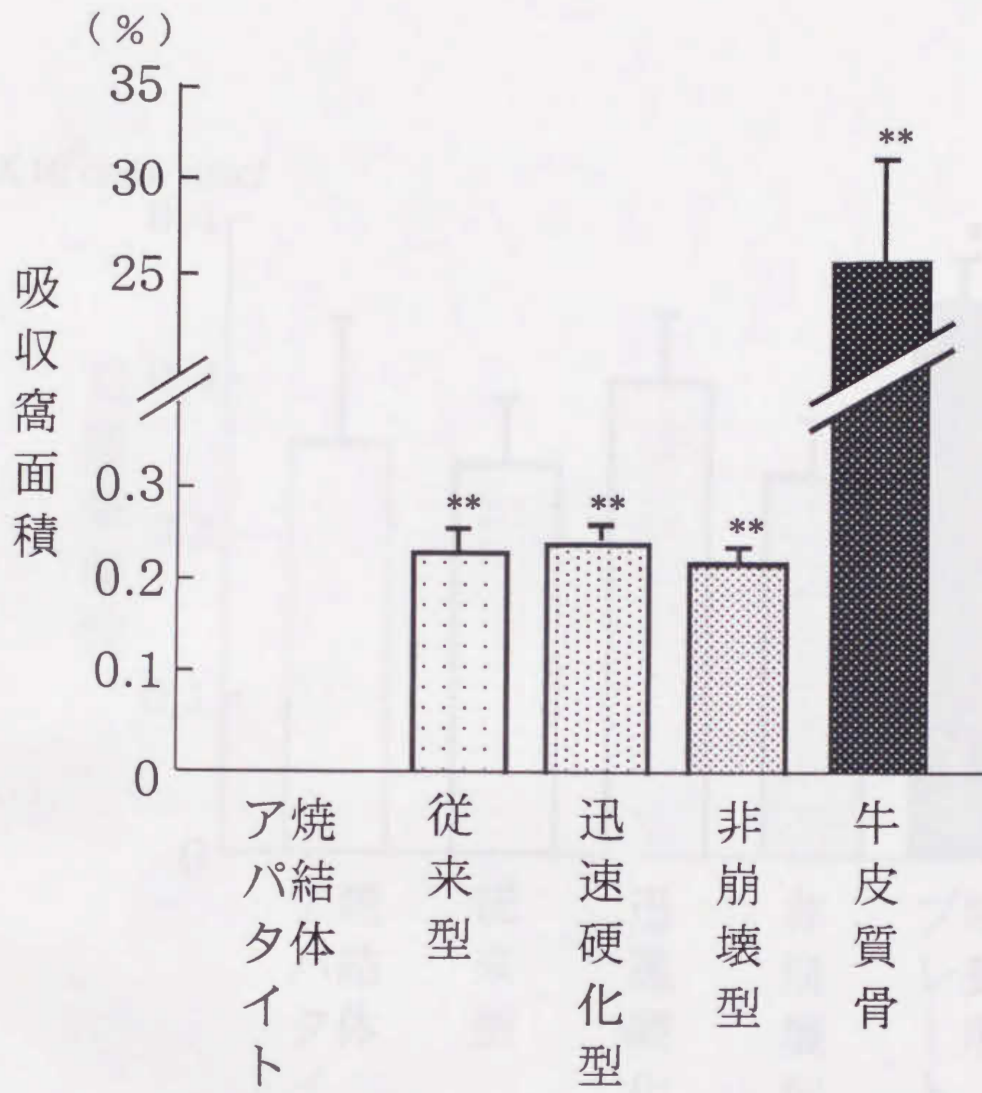


図 9

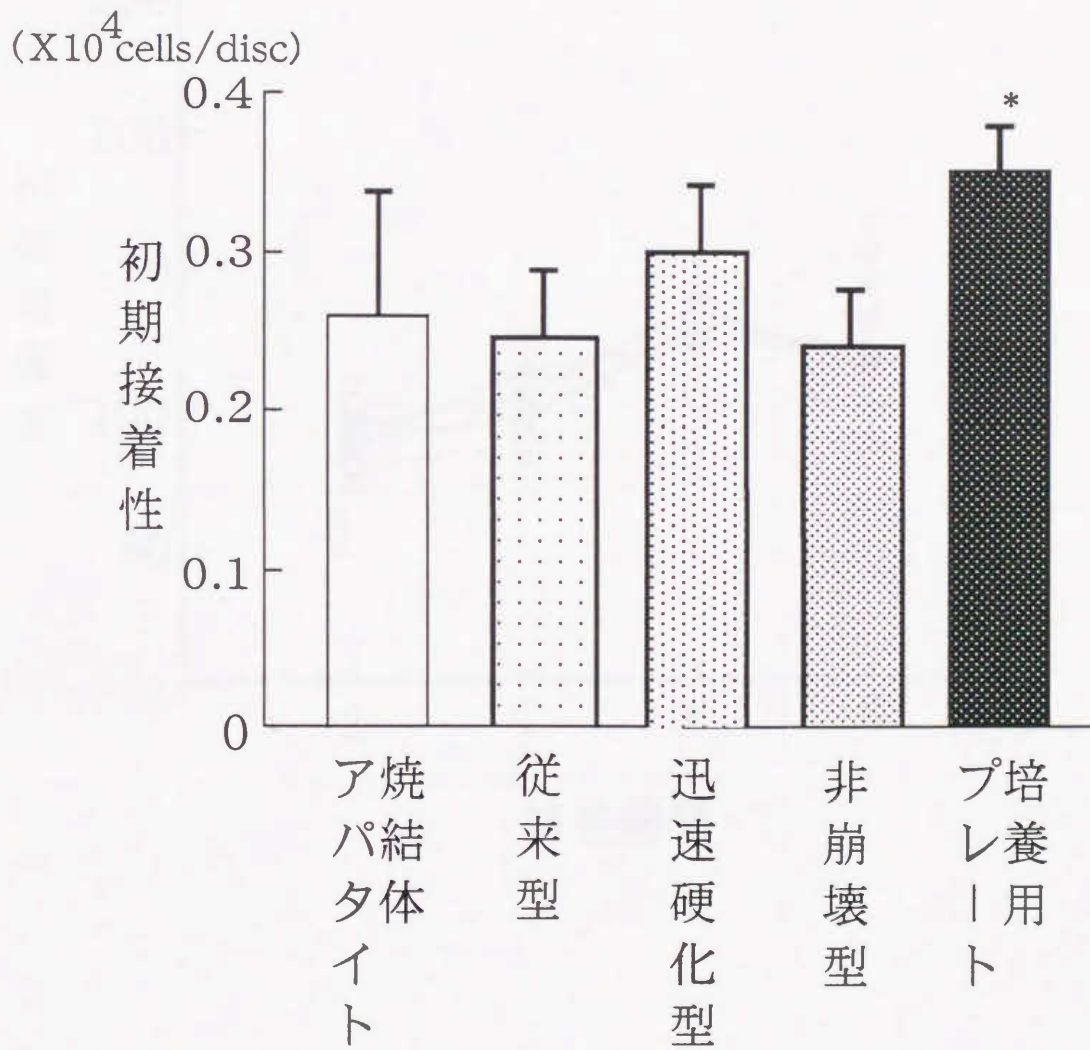


図10

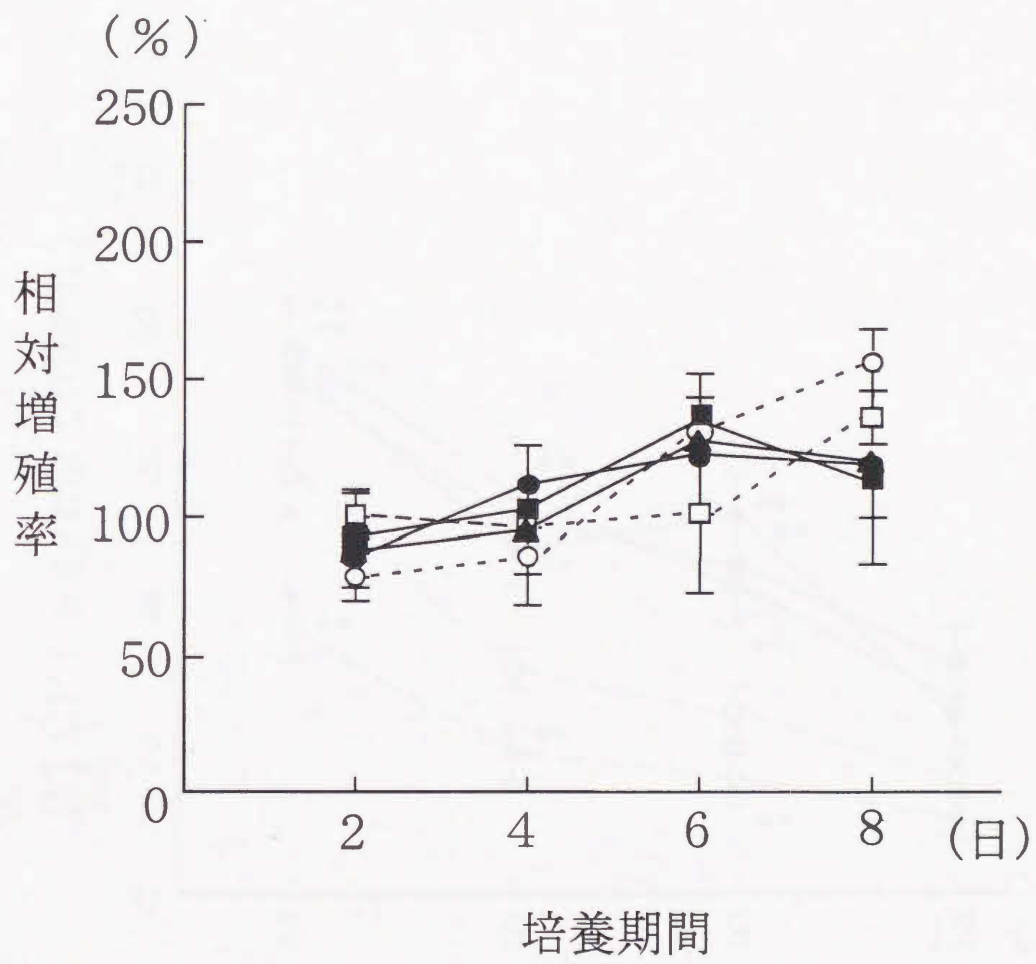


図 11

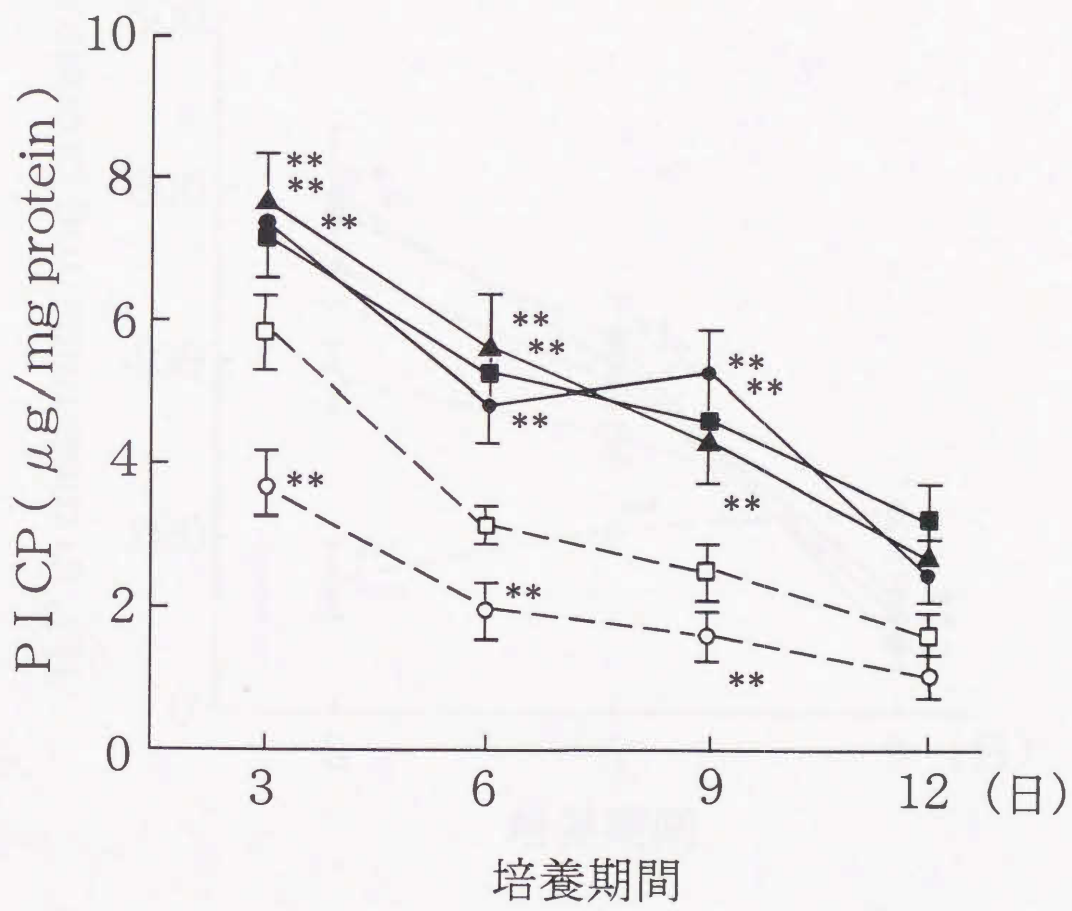


図 12

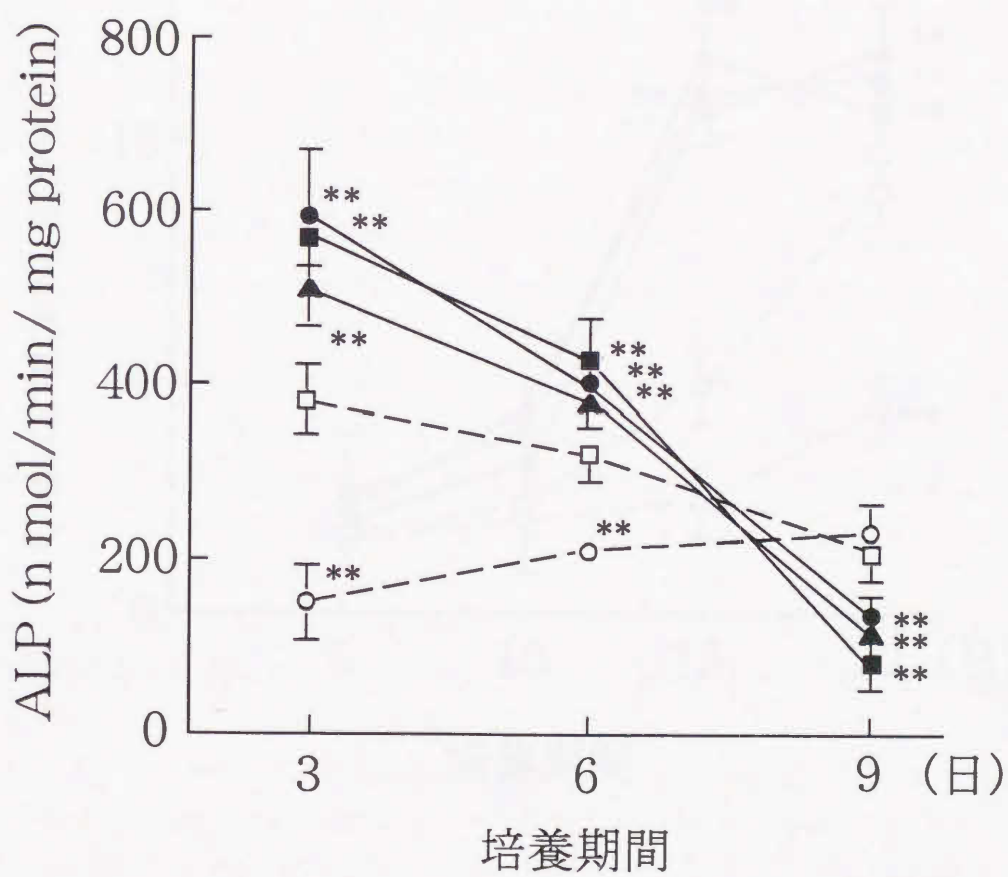
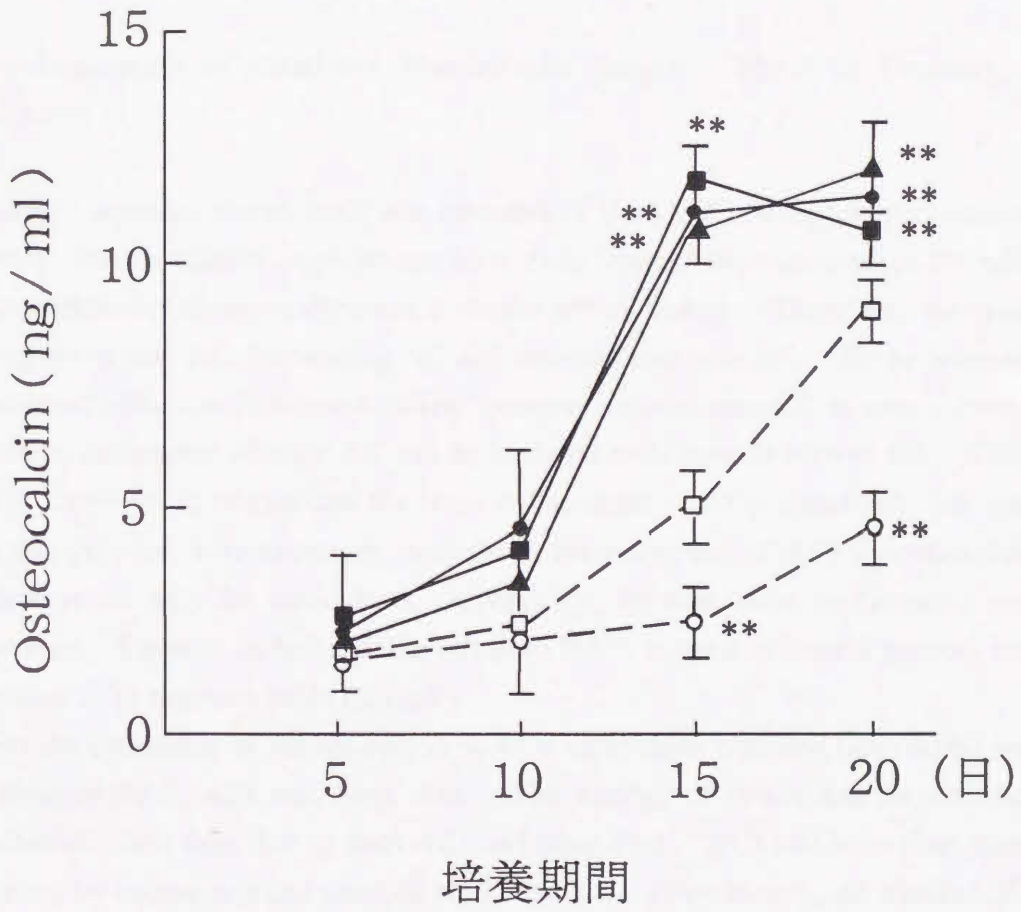




図 13



## The Bone Replacement of 3 Types of Apatite Cement

—Evaluation of Apatite Cements with Osteoblasts and Osteoclasts *in Vitro*—

Tetsuya YUASA

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Tokushima University

**Abstract :** Apatite cement (AC) was invented in 1986 and is used for reconstruction of bony defects but its clinical applications have been limited because it takes 30 min to set and decays immediately upon exposure to liquid before setting. Therefore, we have developed two types of new AC; fast-setting AC and anti-washout type AC. These cements have good biocompatibility and osteoconductivity same as conventional AC *in vivo*. However, it is a controversial matter whether AC can be replaced with bone *in vivo* or not. The aim of this study, therefore, is to evaluate the bone replacement of ACs objectively and quantitatively. For that purpose, it is necessary to evaluate the resorption of ACs by osteoclasts and bone formation on ACs by osteoblasts, respectively, because bone replacement includes both processes. Sintered hydroxyapatite (sintered HAP) is used as control because sintered HAP is known to be nonresorbable clinically.

For the evaluation of the resorption of ACs, osteoclasts obtained from rabbit were cultured on sintered HAP, ACs and bone slice. The number of osteoclasts on sintered HAP was significantly less than that on both ACs and bone slice. ACs and bone slice were obviously resorbed by osteoclasts but sintered HAP was not. Interestingly, the number of lacunae on bone slice was about 12 times as those on ACs and the resorption area on bone slice was about 120 times as those on ACs. There was no significant difference among 3 types of AC.

For the evaluation of the bone formation, human osteoblasts were cultured on ACs and sintered HAP. There were no difference in initial cell attachment and proliferation of osteoblasts on between ACs and sintered HAP. The alkaline phosphatase activities of ACs, however, and protein levels for type I collagen and osteocalcin of ACs were greater than that of sintered HAP. Thus, the differentiation of osteoblasts was promoted on ACs more than on sintered HAP. There was no difference among ACs. These results suggested that ACs would be resorbed by osteoclasts *in vivo*.

In this study, it is suggested that ACs would be resorbed by osteoclasts and that osteoblasts on ACs would produce larger amount of new bone than those on sintered HAP. In conclusion, ACs are useful biomaterials which can be replaced with bone.

NO. 1002

様式7

論文審査の結果の要旨

報告番号	① 乙	歯第 155 号	氏名	湯浅哲也
審査委員	主査	長山 勝		
	副査	市川 哲雄		
	副査	羽地 達次		

題目

アパタイトセメントの骨との置換

—培養破骨細胞および骨芽細胞を用いた検討—

要旨

顎骨切除後に生じる骨欠損部を再建する生体材料として種々の骨補填材料が開発されてきた。その一つにアパタイトセメントがあり、優れた生体親和性と骨伝導性を示すことが知られている。しかし、同セメントの骨との置換に関しては、必ずしも一定の見解が得られていない。そこで本研究では、アパタイトセメントが骨と置換するか否かについて検討する目的で、培養破骨細胞によるセメントの吸収と培養骨芽細胞によるセメント上での骨形成の両面から検討を行った。なお、3種類のアパタイトセメント間についても比較検討した。対照として焼結体アパタイトを用い、セメント吸収性の実験では牛皮質骨より調整した骨片も対照として用いた。

得られた結果は以下のごとくである。

- 1) 焼結体アパタイトは、破骨細胞によって全く吸収されなかった。
- 2) アパタイトセメントは破骨細胞により吸収されたが、骨と比較すると、吸収窩数は約1/12、吸収窩面積は約1/120程度であった。
- 3) 破骨細胞による吸収は、アパタイトセメント間に差はなかった。
- 4) 骨芽細胞の初期接着性および細胞増殖については、アパタイトセメントと焼結体アパタイトの間に差は認められなかった。
- 5) 骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性、タイプIコラーゲン合成量およびオステオカルシン産生量は、焼結体アパタイトに比較して、アパタイトセメント群が高い値を示した。
- 6) 骨芽細胞の増殖および分化マーカーの発現においては、アパタイトセメント間に差はみられなかった。

本研究結果から、アパタイトセメントは、焼結体アパタイトに比較して、破骨細胞により吸収されやすく、また、骨芽細胞の分化を促進させることが明らかとなった。このことから、アパタイトセメントは骨と置換される可能性を有する有用な材料であることが示唆された。したがって、本研究は歯科医学の発展に貢献するところ大であり、本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものとする。