

人工歯根用合成ハイドロキシアパタイト表面における 結合組織性新付着形成に関する組織学的研究

片 内 恒 平

Histological Study on Formation of New Connective Tissue Attachment on Hydroxyapatite Implant Material

Kohei Katauchi

(平成5年1月20日受付)

緒 言

歯冠の崩壊や歯の喪失に伴って失われた口腔の諸機能と審美性を回復するため、従来よりクラウン、ブリッジ、有床義歯等による補綴処置がなされてきた。しかし、今日では生活レベルの向上とともに口腔への関心が高まり、より高度の機能および審美性の回復が求められつつある。その要望を満たす方法の一つとして、古くから試みられてきた喪失歯の再現とも言うべきインプラントが注目され、さまざまな歯科インプラントシステムが開発されてきた。インプラントが安定した治療法として定着するには、臨床的に長期に及ぶ高い成功率を得る必要があり、それにはとりわけインプラントと生体との界面のあり方が重要視されてきた。顎骨・インプラント界面形態には結合組織性被包、骨接触、骨性癒着、さらにそれらの混合型があるとされており^{1,2)}、それらの支持様式は一般に結合組織介在型と骨支持型に大別される。

結合組織介在型界面に対しては、咬合圧を緩衝する歯周靭帯の機能を期待する考え方が³⁻⁵⁾、炎症の波及しやすい形態であり、これまでも病理学的にはインプラントに対する異物反応としての結合組織による被包として捉えられている。また、この界面形態はインプラント沈下の原因とも考えられており、骨支持の得られなかった場合に生じることから、今のところインプラントの失敗の指標の一つと考えられている。

一方、骨支持型界面を備えたインプラントは、長期にわたり口腔内で機能することが報告されており⁶⁾、インプラント周囲歯肉に起きた炎症が骨界面部に波及しにくい形態であるとされている⁷⁾。しかし病理学的には異物反応としての骨性被包とも見なされており、咬合圧の顎骨への直接伝達や歯根膜感覚の欠如に伴う神経筋機構への影響等の欠点についても論じられている⁸⁾。そのためインプラント体内部や上部構造物に緩衝機能を付与する方策も検討されているが、十分な問題解決はなされていない⁹⁾。

将来、理想的なインプラントを考えるに当たって、天然歯と同様の支持構造を付与することを工夫すれば、咬合圧伝達に関する問題が解決されるだけでなく、感覚や組織恒常性の維持も改善される可能性が期待される。最近、歯周病学の分野においては、歯周靭帯細胞のみが結合組織性付着形成に関与することが明らかとなり、付着を喪失した罹患歯根面に対して歯周靭帯由来細胞の増殖を誘導することによって新付着を獲得する治療法が開発されている¹⁰⁻¹⁴⁾。

そこで本研究では、このような歯周靭帯細胞の特性に着目し、歯周靭帯と同様の構造と機能を有する組織で支持される人工歯根を開発するための基礎的データを取得する目的で、代表的人工歯根材料である合成ハイドロキシアパタイト（以下、HAと略す）ブロック表面に歯周靭帯由来細胞の増殖を誘導することを試み、結合組織性新付着形成の可否ならびにその形成過程について組織学的に検討した。

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座（主任：津留宏道教授）本論文の要旨は第20回日本口腔インプラント学会総会（平成2年7月）、第85回日本補綴歯科学会学術大会（平成3年5月）、第24回広島大学歯学会総会（平成3年6月）において発表した。

材料ならびに方法

実験1：歯周靱帯細胞をHAブロック表面に誘導することによる結合組織性新附着形成の観察

実験部位は雑種ネコ（体重約3.5kg）3匹の両側上顎犬歯部、計6部位とし、以下の実験を行った。ケタミン（動物用ケタラル®50, 三共）20mg/kgと硫酸アトロピン（田辺製薬）0.05mg/kg混合液の筋肉内注射による全身麻酔下および2%リドカイン（歯科用キシロカイン®, 藤沢薬品工業）による局所麻酔下で、上顎犬歯頰側歯肉に2本の縦切開と歯槽頂線維を切断する歯肉溝からの切開を加え、粘膜骨膜弁を形成し、歯槽骨を露出させた（図1）。次に生理食塩水の注水下にて、歯槽頂から約5mm幅の歯槽骨を残すように、シリンダースクエヤー・バー（No. 502, メルファー）で歯根面に達するまで穿孔し、直径2.1mmの窓状の円形骨欠損を形成した（図2）。さらに露出歯根面中央部にジャケットクラウン・バー（No. 956, メルファー）で、HAブロック（直径0.8mm, 厚さ0.3mm, 焼成温度1,300度, 京セラ）（図3）を挿填するために規格窩洞を形成した（図4）。窩洞内および露出歯根面を生理食塩水にて洗浄後、HAブロックをアロンアルファ®（東亜合成化学工業）にて窩洞内に緊密に接着した（図5）。HAブロック表面および歯周靱帯断端部周囲への歯肉結合組織由来細胞の侵入を阻止するため、ミリポア膜（ミリラップ®, 5×5mm, ポアサイズ:0.5μm, 日本ミリポア）で骨削除面を被覆し（図6）、粘膜骨膜弁を復位、縫合した（図7）。実験デザインの概略は図8に示す通りである。術後より3日間、感染防止のためセファロリジン（ケフロジン®, シオノギ製薬）20mg/kgを筋肉内注射し、術後1週間は切開創保護のためネコ用軟性飼料（オリエンタル酵母工業）、抜糸後からは固形飼料（日本クレア）にて飼育した。6カ月後、全身麻酔下にて10%中性緩衝ホルマリンによる灌流固定を行い、両側実験部位を一塊として摘出した。摘出材料をさらに3日間同固定液に浸漬し、ブランク・リュクロ迅速脱灰液にて脱灰後、通常に従ってパラフィン包埋し、4.5μm厚の頬舌断連続切片を作製した。これらにヘマトキシリン・エオジン（以下、HEと略す）染色、アザン・マロリー（以下、アザンと略す）染色ならびにオキシタラン線維染色^{15,16)}を施し、光学顕微鏡で観察した。

実験2：HAブロック表面における組織形成過程の経時的観察

8週齢ウイスター系雄性ラット（体重約210g）の両側上顎第1臼歯部を実験部位として、以下の実験を

行った。ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール®注射液, アボット・ラボラトリーズ）25mg/kgの腹腔内注射にて全身麻酔後、上顎第1臼歯近心部歯肉に切開を加え、粘膜骨膜弁を剥離し、歯槽骨を露出させた（図9）。次に生理食塩水注水下にて、歯槽頂より約1mm幅の歯槽骨を残すように、ジャケットクラウン・バー（No. 956, メルファー）で骨を削除し、上顎第1臼歯近心根の近心面を露出させた（図10）。露出歯根に実験1と同様の窩洞を形成し（図11）、同サイズのHAブロックを挿填した（図12）。ミリポア膜（MF-ミリポアフィルター, 3×3mm, ポアサイズ:0.45μm, 日本ミリポア）にて骨削除面を被覆（図13）した後、粘膜骨膜弁を復位、縫合した（図14）。なお、これらの実験群（21匹, 42部位）に対して、歯根内に窩洞を形成後、HAブロックを挿填しなかった動物を対照群（21匹, 42部位）とした。術後3日間、セファロリジン（ケフロジン®, シオノギ製薬）20mg/kgを筋肉内注射し、術後から1週は粉末飼料（日本クレア）、抜糸後は固形飼料（日本クレア）で飼育した。両群とも術後3日, 1, 2, 4, 6, 8, 12週間の観察期間ごとに、各3匹よりエーテル麻酔下にて両側上顎臼歯部組織を一塊として摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて3日間固定、脱灰処理を施した。通常に従ってパラフィン包埋し、4.5μm厚の頬舌断連続切片を作製し、HE染色、アザン染色、オキシタラン線維染色を施し、光顕的に観察した。

結 果

実験1

歯根に挿填したHAブロック表面は、歯根表面とほぼ同平面上に位置していた。また、ミリポア膜は歯肉結合組織下に位置し、骨欠損部位とHAブロック表面への歯肉結合組織の増殖を阻止していた。ミリポア膜下には歯槽骨の再生が認められ、HAブロック挿填のため削除した歯槽骨欠損部は、新生骨によりほぼ完全に埋められていた。

HAブロック表面のほぼ全面にわたって硬組織形成が認められた。HA上の硬組織は、近接する歯根表面に添加された新生セメント質と連続していた（図15）。HAブロック表面の硬組織はほぼ一定の厚径を有していた。この硬組織には細胞封入および数本の成長線が観察され（図16）、コラーゲン線維束が硬組織内へ垂直ないしは斜め下方向に挿入されるとともに、これらの線維束は再生歯槽骨内へも挿入されていた（図17）。また、硬組織表面には類セメント質を思わせる非石灰化層が観察され、これに接してセメント芽細胞様細胞が配列していた（図18）。そのほか、HAブロック上

に形成された硬組織には、少数のオキシタラン染色陽性線維の挿入もしばしば観察された(図19)。

実験 2

I. 実験群の組織所見

術後 3 日

接合上皮の歯根面に沿っての深行増殖はなく、歯肉結合組織の HA ブロック上への増殖も骨削除面を覆ったミリポア膜によって阻止されていた(図20)。ミリポア膜と HA ブロック表面との間隙は線維素性滲出物で満たされており、この部への歯周靱帯断端部からの細胞増殖は認められなかった(図21)。

術後 1 週

HA ブロック表面は、毛細血管と線維芽細胞よりなる肉芽組織によって覆われていた。創傷断端部の歯周靱帯から HA ブロック上に向かって線維芽細胞の増殖が観察され、これらは HA ブロックに接して平行に配列していた(図22, 23)。

術後 2 週

HA ブロックは歯周靱帯由来の肉芽組織で覆われ、その表面では線維芽細胞が密に層をなして配列していた。歯冠側の歯槽骨は吸収されていたが、接合上皮の歯根表面への深行増殖は観察されなかった。また、骨削除部分へ向かっての骨再生が根尖側に残存する歯槽骨の歯周靱帯断端部から起こっていた(図24)。

術後 4 週

骨削除部分には歯槽骨が再生し、HA ブロックと再生歯槽骨との間に位置する結合組織の幅径は、この部に連続する歯周靱帯に比べて歯冠側寄りやや狭い傾向を示していた(図25)。HA ブロック表面では線維芽細胞が密に配列しており、それらのさらに外側にはコラーゲン線維束が HA ブロック表面と平行に走行していた(図26)。

術後 6 週

HA ブロック表面に硬組織が不連続に出現し、その厚径は一定でなかった。硬組織に対して垂直ないしは斜め下方向にコラーゲン線維束の挿入が観察された。硬組織の添加の見られない HA ブロック表面では、線維芽細胞がこれと平行に配列していた(図27, 28)。また、近接する歯根表面上の新生セメント質に連続して、HA ブロック表面への硬組織添加の開始を思わせる像も認められた(図29)。

術後 8 週

6 週目と同様に、HA ブロック表面に不連続に硬組織形成が認められた。硬組織は HA 上に広範囲に形成され、その厚径は位置によってさまざまであった。HA ブロック上の硬組織には垂直ないしは斜め下方向

へのコラーゲン線維束の挿入が観察され、それらの一部は再生歯槽骨との間で機能的配列を示していた(図30)。

術後12週

HA ブロック上の硬組織の厚径は8週目よりも厚くなり、ブロック表面全域で連続していた。硬組織は近接する歯根セメント質とほぼ同様の形状を呈しており、しばしば細胞の封入や層板構造を伴っていた。また、HA ブロックと再生歯槽骨とを連結するコラーゲン線維束は、天然歯におけると同様の機能的配列を示していた。HA ブロックと再生歯槽骨との間に形成された結合組織の幅径は、6週目以降ほとんど変化なく推移した(図31, 32)。また、HA ブロック上の硬組織へのオキシタラン染色陽性線維の挿入も認められた。

II. 対照群の組織所見

術後 3 日

露出象牙質、セメント質窩洞壁ならびに骨削除部分への歯肉結合組織の増殖は、ミリポア膜で完全に阻止されていた。ミリポア膜と窩洞との間に見られる組織間隙は、少量の出血を伴う線維素性滲出物で満たされており、この部への歯周靱帯断端部からの細胞増殖は認められなかった(図33, 34)。接合上皮根尖側端から下方の歯根に吸収がわずかに認められたが、上皮の深行増殖は観察されなかった。

術後 1, 2 週

窩洞壁面は歯周靱帯由来の肉芽組織で覆われており、2週目ではその密度を増していた。窩洞内には線維芽細胞が不規則に分布し、窩洞壁面にも配列していたが、セメント質の新生添加は認められなかった。また、接合上皮の歯根面に沿っての深行増殖も観察されなかった。歯槽骨削除部分には骨の再生が起こっており、窩洞壁と再生歯槽骨との間の再生歯周靱帯の幅径は、連続する歯根に接する歯周靱帯よりやや狭い傾向を示していた(図35)。

術後 4 週

窩洞壁面に菲薄なセメント質の形成が観察された。窩洞近くには再生歯槽骨が存在し、新生セメント質との間にコラーゲン線維束の機能的配列が観察された。新生セメント質と再生歯槽骨との間の歯周靱帯の幅径は、連続する歯根に接する歯周靱帯とほぼ同様であった(図36, 37)。歯冠側に残置させた歯槽骨はほとんど吸収されていたが、この部への接合上皮の深行増殖は認められなかった。

術後 6-12週

6週以降から12週にかけて、窩洞壁面に形成された

セメント質の厚径が増し、連続する既存のセメント質とほぼ類似の形状を呈していた。再生コラーゲン線維束の機能的配列はさらに明瞭となり、新生セメント質と再生歯槽骨との間の歯周靱帯は、連続する歯根に接する歯周靱帯と常にほぼ同様の幅径を示していた(図38)。

考 察

I. 実験方法について

1. 実験動物および実験材料について

実験および飼育過程において取り扱い容易なラットおよびネコの顎骨をレントゲン撮影し、歯根の長さ、太さ、形態、顎骨内における位置等について比較検討した結果に基づいて、両実験での操作性に応じた実験部位をそれぞれ選択した。

実験材料として純チタン、チタン合金、ジルコニア、アルミナ、生体ガラス、HA等が考えられる。その中で純チタン、チタン合金、ジルコニア、アルミナのような生体不活性材料と骨との界面には骨接触を生じることが知られている。一方、生体活性材料として知られるHAや生体ガラスでは、骨癒着が起るとされている^{1,2)}。生体活性材料は骨と化学的に結合するのに対して、生体不活性材料は骨と接触するだけであることから、前者の方が生体親和性に優れていると考えられ、本実験に用いることにした。しかし生体ガラスを用いた場合には、研磨標本作製せねばならず、標本作製のため削除される部分の組織観察はできなくなり、組織変化を全体的に把握できない。これに対してHAを用いた場合には、連続切片の作製が可能であり、より総合的で詳細な組織所見が得られる¹⁷⁾。加えて、研磨標本では染色法が限定されるのに対して、パラフィン切片では各種の特殊染色法を適用できる。以上の利点を考慮して、本研究では代表的なインプラント材料でもあるHAを実験材料として選択した。また、これに付与する形状としては、歯根内に窩洞形成の容易な円柱形とした。

2. 本実験のデザインについて

本実験のデザインは、歯周治療に応用される組織再生誘導法とは大きく異なっている。すなわち歯周疾患の場合には、歯根の露出、歯槽骨の吸収や歯肉の退縮が生じているため、根尖部に残存する歯周靱帯および骨組織に由来する細胞によって歯周組織の再生が図られる。そのため歯周治療法への応用を目指した組織再生誘導実験では、歯槽頂部を含めた歯冠側寄りの歯槽骨を削除し、歯周病罹患歯に対応した付着喪失状態をデザインする必要があった。

本研究の予備実験では、当初、歯周病罹患歯を想定

した付着喪失状態を作り、HAブロックの歯根内埋入を試みた上で、歯肉組織の歯根上への増殖を防ぐことを目的とした臨床的応用法に倣って、セメント・エナメル境を越えて歯冠に接するようにミリポア膜を貼付した。その結果、早期の段階(1週目)で、ミリポア膜に沿っての歯肉上皮の深行増殖が起こることが判明した。そこでこれを防ぐため、本実験では、歯肉上皮とミリポア膜が最初から接触することのないように、ミリポア膜の歯冠側端を歯槽頂に近接させ、口腔内に露出しないように配置することによって、膜上への歯肉上皮の深行増殖を抑制した。さらに、開窓型の骨欠損を形成して歯根面を露出させ、歯槽頂を含めた歯冠側の歯槽骨を残存させることによって、セメント・骨膜線維、歯槽頂線維および水平線維の一部の残存を図り、これによって歯根面に沿った歯肉上皮の深行増殖の抑制が可能になると考えた。その結果、ほとんどの標本で、外科的侵襲によると思われる歯槽骨吸収が歯冠側に認められたものの、歯肉上皮の深行増殖は抑制できた。したがって本研究でのミリポア膜適用の目的は、HAブロック方向への歯肉結合組織の増殖抑制を図るだけとなり、その目的が達成されたことで、1, 2週目に見られたHAブロック上への肉芽組織の増殖が歯周靱帯に由来することを明らかにできた。換言すれば、本実験は、外科的に露出された歯根面への結合組織性新付着の達成を示したNymanら¹¹⁾の実験デザインを応用し、露出歯根を部分的にHAブロックに置き換えて、組織再生誘導を行ったと言える。

歯根セメント質と連続した硬組織が純チタン製インプラント表面に形成されたことを報告したBuserら¹⁸⁾の実験は、歯根を残存させた顎骨にインプラントを植立する方法によるものであった。植立されたインプラントは歯根および骨に接していたため、いずれの組織に由来した細胞がインプラント上の硬組織形成に関与したかは明らかにされていない。結合組織性付着の形成には骨組織由来細胞の関与も考慮すべきである^{17,19)}ところから、本研究のように、手術当初から骨とインプラント体とが接触する可能性を排除する実験デザインが必要であった。

今回考案した実験モデルを用いることによって、今後、他のインプラント材料が歯周靱帯由来細胞の増殖分化に適した表面性状を有するかどうかについて、in vitroのみならず^{20,21)} in vivoでの検討が可能となるであろう。

II. HAブロック表面に形成された硬組織について

実験1で、6カ月後にHAブロックのほぼ全表面にわたって形成された硬組織は、近接する歯根上に新

生されたセメント質と連続しており、セメント質に類似した細胞封入と層板構造を伴っていた。また、コラーゲン線維束が硬組織内に垂直方向に挿入される像も観察された。これらのコラーゲン線維束は再生歯槽骨にも挿入されており、両硬組織間で天然歯における同様の機能的配列を示していた。さらにまた、HAブロック表面に形成された硬組織には、歯周靱帯の歯根側寄りに分布し、セメント質内への挿入の知られるオキシタラン線維^{15,16)}が挿入されていることが証明された。以上の所見を総合すると、HAブロック上の硬組織は、Schroederら²²⁾によって分類された細胞性混合性重層性セメント質に相当するものと推察される。

1週から2週にかけてHAブロックに接して歯周靱帯由来肉芽組織が増生していたことから、歯周靱帯由来の線維芽細胞がHAブロック表面近くでセメント芽細胞へと分化し、セメント質様硬組織の形成に関与したと考えられた。4週目の実験群には硬組織形成が認められなかったのに対して、同時期の対照群にはセメント質形成がわずかに認められた。この相違は、後者において象牙質およびセメント質由来の硬組織形成因子の関与することを示唆しているかもしれない。あるいはHAブロックの有無による表面形態の差異が細胞周囲の微小環境に影響したことも考えられる。いずれにせよ、実験群、対照群の両群で12週目に観察された硬組織が既存のセメント質と同じ形状を呈していたことから、前述の形成因子は細胞の分化や硬組織形成速度に影響を与える可能性が考えられる。

6週経過した段階で、HAブロック上に歯根セメント質に連続してセメント質様硬組織の形成が開始されたのは、いわゆる伝導形式によると考えられる。すなわち周囲歯根のセメント質近傍に位置する前駆細胞がセメント芽細胞に分化して、HAブロック表面にセメント質様硬組織を形成したものと推測された。また、セメント質との連続性を欠いた硬組織も観察されたので、誘導形式による可能性もある。すなわちHAによる骨誘導²³⁾に類似した過程として、未分化間葉系細胞がセメント芽細胞に分化し、セメント質様硬組織形成機能を発現したとも考えられよう。このような現象に関しては、歯周靱帯様組織中の細胞群が、HAブロック周囲の血清中に存在するさまざまなタンパク質や細胞の分化・増殖因子等の化学的因子の影響下にあることを認識するとともに、物理的因子として、たとえば組織圧等の影響についても考慮する必要がある。

本研究の結果から、歯周病学の分野でかつて象牙質にしか結合組織性付着は獲得できないとされてきた見

解²⁴⁾に対して、付着を喪失した罹患歯根にも新付着を生じうる^{11,12)}ように、HAに対しても結合組織性付着形成の可能であることを明らかにできた。これはHAがセメント質様硬組織形成の足場となりうることを証明するものであり、今後、歯周靱帯様組織支持型インプラントの開発研究を遂行することに強い支持を与えるものである。

Ⅲ. インプラント材料とセメント質様硬組織との結合機構について

天然歯と同様の支持構造を備えたインプラントを開発する上で、セメント質様硬組織とHA(あるいは他のインプラント材)との結合力は、この部に加わる咬合圧に十分対応できるものでなくてはならない。

ところでHAと骨とは結晶学的配位性をもって結合すると報告されており²⁵⁾、両者は化学的に結合していると考えられる。歯周靱帯は骨芽細胞およびセメント芽細胞の前駆細胞を含んでいると考えられており^{17,19,26,27)}、セメント質と骨との類似性を考えると、HAと骨との結合機構がHAとセメント質の間にも存在する可能性が高い。

また、露出象牙質表面にセメント質が形成された場合、象牙質と新生セメント質との間にグリコサミノグリカンの存在することが明らかにされており²⁸⁻³⁰⁾、HAブロックと新生セメント質様硬組織の間にも糖タンパク質の介在することが推測される。今後、電子顕微鏡観察や電顕組織化学などの手法を用いて、HAとセメント質様硬組織との界面に介在する接合物質の化学的性状について検討を進めることが必要であろう。

Ⅳ. 今後の展望について

本研究結果より、HA表面に歯周靱帯細胞を誘導することによって結合組織性新付着を獲得できることが明らかとなった。しかしながら臨床の場では、インプラント床は無歯顎部位に設定され、歯周靱帯細胞は存在しないことから、歯周靱帯細胞の特性を備えた細胞をこの部へ導入することを考える必要がある。

歯周靱帯由来培養細胞には、硬組織形成能の指標となるアルカリホスファターゼ活性の高いことがよく知られている^{31,32)}。さらに *in vitro* では、この培養細胞に TGF- β や EGF を加えることによってその増殖が促進され、アルカリホスファターゼ活性を上昇させること³³⁾、また、デキサメサゾンや β -グリセロリン酸等を添加して培養することにより石灰化構造物を形成すること³⁴⁻³⁶⁾、さらにデキサメサゾンに PDGF と IGF-I を加えることで細胞増殖が促進されること³⁷⁾ 等

が明らかにされており、これら細胞成長因子と HA の併用も今後の検討課題である。

一方、歯周靱帯由来培養細胞を歯根面に適用することにより、結合組織性付着が獲得されたという報告^{38,39)}もあり、直接本細胞を局所に応用した際、生体内で機能発現することも期待される。

さらに歯周靱帯に特有の構築をめざすためには、適度な機能圧が必要であることも考えねばならない。本研究では、切開創保護のため飼料を抜糸時期に合わせて調整したが、HA 上に形成された硬組織内に挿入されたコラーゲン線維束に機能的配列が明らかであり、歯周靱帯様組織の幅径も一定であったことから、機能圧が実験部位に伝達されたと考えられる。一般的に、天然歯の再植に当たって良好な予後を得るには、適切な時期に適度な機能圧を付与する必要があるとされており⁴⁰⁻⁴²⁾、歯周靱帯様組織支持型インプラントにとっても機能圧がその成否に関わる重要因子の一つになるであろう。

また、天然歯の再植で骨癒着をきたす原因として、歯の表面の歯周靱帯細胞あるいはセメント芽細胞の損傷が推察されている⁴⁰⁻⁴³⁾ことから、インプラント体に対して培養細胞を密に付着させる必要性が示唆される。そのためには、フィブロネクチン^{44,45)}や脱灰象牙質内の骨誘導タンパク質⁴⁶⁾、あるいはセメント質内の接着性タンパク質の応用についても検討する価値があるであろう⁴⁷⁻⁴⁹⁾。

以上に述べた諸問題についてさらに詳細に検討し、それらを応用することによって、インプラント表面への歯周靱帯由来培養細胞導入によるセメント質様硬組織の形成・添加の技術開発が大きく推進されるものと期待される。

結 論

歯周靱帯由来細胞の特性に着目し、歯周靱帯と同様の構造と機能を有する組織で支持される人工歯根を開発するための基礎的データを得る目的で、ネコおよびラットを実験動物として、HA ブロックを歯根内の規格窩洞に挿填し、ミリポア膜を貼付することによって歯周靱帯由来細胞を HA ブロック表面に誘導することを試み、その際の結合組織性新付着形成の可能性とその形成過程ならびに HA ブロックを挿填しなかった対照群とを組織学的に検討し、以下の結果を得た。

1) ネコの上顎犬歯歯根に HA ブロックを挿填 6 カ月後、HA ブロック表面には歯周靱帯に相当する組織を伴ったセメント質様硬組織の形成が認められ、歯周靱帯由来細胞を HA 表面に誘導した際に、HA ブロック表面に対する結合組織性新付着形成は可能であ

ることが実証された。

2) ラット臼歯歯根に HA ブロック挿填後 1 週から 4 週では、HA ブロック表面は歯周靱帯由来の肉芽組織で覆われた。6 週になると硬組織形成が開始され、経時的に硬組織は連続性と厚径を増し、12 週では既存のセメント質と同様の形状を備えていた。HA ブロックを挿填しなかった対照群では、1 週から 2 週で、窩洞壁面は歯周靱帯由来の肉芽組織で覆われ、4 週以降、窩洞壁上にセメント質形成が観察され、6 週以降には既存セメント質と同様の形状を示すに至っていた。HA 面に対するセメント質様硬組織形成は対照群に比較して形成開始時期がやや遅れるものの、ほぼ同様の過程によることが明らかになった。

3) HA ブロック表面あるいは露出根面における硬組織形成の増加につれて、コラーゲン線維束の挿入と機能的配列が明瞭化し、歯周靱帯様組織の幅径もほとんど変化しなかったことから、HA あるいは根面上の硬組織を介した機能圧の関与が示唆された。

以上の結果より、歯周靱帯由来細胞を HA 表面に誘導した際に結合組織性新付着が形成されることがその形成過程とともに明らかとなった。

本研究の結果は、本実験モデルが人工歯根材料への結合組織性新付着形成の可否の検討に有用であることを示すとともに、今後、人工歯根表面に歯周靱帯由来細胞の特性を備えた細胞の増殖分化を誘導することにより、歯周靱帯に相当する結合組織性の支持組織を備えた人工歯根を開発できる可能性を示唆するものである。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第一講座津留宏道教授に衷心より感謝の意を表します。また、それぞれの御専門の立場から御教示、御校閲を賜りました本学口腔病理学講座二階宏昌教授ならびに本学歯科保存学第二講座岡本 莫教授に深謝致します。さらに、本研究の遂行および本論文作成上、終始御指導、御助言を頂きました本学附属病院臨床検査室高田 隆講師に厚くお礼申し上げます。最後に、本研究に対して終始多大なる御助言、御協力を頂きました赤川安正助教授に深謝致しますとともに、御支援頂きました本学歯科補綴学第一講座と本学口腔病理学講座の各位ならびに実験材料の提供を頂いた京セラ株式会社に感謝致します。

文 献

- 1) Strunz, V., Gross, U.M. and Männer, B.: Ergebnisse histologischer Untersuchungen an

- den Grenzflächen zwischen Knochengewebe und Glaskeramik (Ceravital) mit Apatitstruktur. Der heutige Stand der Implantologie, Carl Hanser Verlag, München Wien, 49-75, 1980.
- 2) Osborn, J.F. and Newsely, H.: Dynamic aspects of the implant-bone-interface. Dental implants materials and systems. Carl Hanser Verlag, München Wien, 111-123, 1980.
 - 3) James, R.A.: The support system and the pergingival defense mechanism of oral implants. *J. Oral Implantol.* **6**, 270-285, 1975.
 - 4) James, R.A.: Connective tissue-dental implant interface. *J. Oral Implantol.* **13**, 607-621, 1988.
 - 5) Weiss, C.: Tissue integration of dental endosseous implants. Description and comparative analysis of the fibro-osseous integration and osseous integration system. *J. Oral Implantol.* **12**, 169-214, 1986.
 - 6) Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. and Brånemark, P.-I.: A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg.* **10**, 387-416, 1981.
 - 7) 松本仁門：ブランク付着に伴うセラミックインプラント周囲組織の変化に関する実験的研究。広歯誌 **20**, 105-124, 1988.
 - 8) 関根 弘, 小宮山彌太郎, 吉田浩一：インプラント周囲組織とその受圧感覚特性。歯科ジャーナル **25**, 597-605, 1987.
 - 9) 小林 優：天然歯と人工歯根の緩圧機構に関する生体力学的研究。日口外誌 **36**, 802-821, 1990.
 - 10) Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Plantén, S.: Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.* **7**, 394-401, 1980.
 - 11) Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J.: The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J. Clin. Periodontol.* **9**, 257-265, 1982.
 - 12) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **9**, 290-296, 1982.
 - 13) Isidor, F., Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J.: The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 145-150, 1986.
 - 14) 岡本 莫, 小川哲次：上皮性ならびに結合組織性付着の再形成：ニューアタッチメント；歯周治療の科学（青野正男監修）1版，医歯薬出版，東京，215-221, 1991.
 - 15) Fullmer, H.M. and Lillie, R.D.: The oxytalan fiber: A previously undescribed connective tissue fiber. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 425-430, 1958.
 - 16) Fullmer, H.M., Sheetz, J.H. and Narkates, A.J.: Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J. Oral Pathol.* **3**, 291-316, 1974.
 - 17) Caton, J.G., DeFuria, E.L., Polson, A.M. and Nyman, S.: Periodontal regeneration via selective cell repopulation. *J. Periodontol.* **58**, 546-552, 1987.
 - 18) Buser, D., Warrer, K. and Karring, T.: Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J. Periodontol.* **61**, 597-601, 1990.
 - 19) McCulloch, C.A.G., Nemeth, E., Lowenberg, B. and Melcher, A.H.: Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat. Rec.* **219**, 233-242, 1987.
 - 20) 中島正人：生体材料の生化学的研究—ヒト歯根膜細胞の特性について—。神奈川歯学 **22**, 340-354, 1987.
 - 21) 斎藤素子, 岡部太一, 斎藤 修, 笹崎弘己, 奥田礼一, 菅野恵美, 清水義信：歯根修復に関する研究 第2報 各種形状純チタン面へのヒト歯根膜細胞培養と機能発現。日歯保誌 **32**, 1612-1621, 1989.
 - 22) Schroeder, H.E.: The periodontium. Handbook of Microscopic Anatomy, Springer-Verlag Vol. v/5, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 15-128, 1986.
 - 23) Yamasaki, H.: Heterotopic bone formation around porous hydroxyapatite ceramics in the subcutis of dogs. *Jpn. J. Oral Biol.* **32**, 190-192, 1990.
 - 24) Aukhil, I., Simpson, D.M., Suggs, C. and Pettersson, E.: In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 862-868, 1986.
 - 25) 小木曾誠：アパタイト・セラミックスとデンタル・インプラントについて。ザ・クインテッセンス **4**, 389-407, 1985.
 - 26) Iglhaut, J., Aukhil, I., Simpson, D.M., Johnston, M.C. and Koch, G.: Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *J. Periodont. Res.* **23**, 107-117, 1988.
 - 27) Nojima, N., Kobayashi, M., Shionome, M., Takahashi, N., Suda, T. and Hasegawa, K.: Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotype of osteoblasts. *J. Periodont. Res.* **25**, 179-185, 1990.
 - 28) Listgarten, M.A.: Electron microscopic study of the junction between surgically denuded root surfaces and regenerated periodontal tissues. *J. Periodont. Res.* **7**, 68-90, 1972.
 - 29) Nalbandian, J. and Frank, R.M.: Electron microscopic study of the regeneration of cementum and periodontal connective tissue attachment in the cat. *J. Periodont. Res.* **15**, 71-89, 1980.

- 30) Knox, B. and Aukhil, I.: Ultrastructural study of experimental cementum regeneration in rats. *J. Periodont. Res.* **23**, 60-67, 1988.
- 31) Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R. and Foster, R.A.: A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.* **67**, 66-70, 1988.
- 32) Kawase, T., Sato, S., Miake, K. and Saito, S.: Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv. Dent. Res.* **2**, 234-239, 1988.
- 33) 鈴木英之: TGF- β および EGF のヒトの培養歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞とへの影響 1. 細胞増殖とアルカリホスファターゼ活性. *日大歯学* **66**, 395-404, 1992.
- 34) Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R.A. and Somerman, M.J.: Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J. Periodontol.* **62**, 499-503, 1991.
- 35) 井上 孝, 陳 盛輝, 下野正基: ラット歯髓, 歯根膜, 骨髓細胞の骨形成能ならびに軟骨誘導に関する実験的研究. *歯基礎誌* **33**, 16-25, 1991.
- 36) Cho, M.-I., Matsuda, N., Lin, W.-L., Moshier, A. and Ramakrishnan, P.R.: In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif. Tissue Int.* **50**, 459-467, 1992.
- 37) Rutherford, R.B., Trail-Smith, M.D., Ryan, M.E. and Charette, M.F.: Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factor mitogenesis in vitro. *Archs Oral Biol.* **37**, 139-145, 1992.
- 38) Boyko, G.A., Melcher, A.H. and Brunette, D.M.: Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. *J. Periodont. Res.* **16**, 73-88, 1989.
- 39) Van Dijk, L.J., Schakenraad, J.M., Van der Voort, H.M., Herkströter, F.M. and Busscher, H.J.: Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts. A novel technique to create new attachment; A pilot study. *J. Clin. Periodontol.* **18**, 196-199, 1991.
- 40) Andreasen, J.O.: The effect of splinting upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *Acta Odont. Scand.* **33**, 313-323, 1975.
- 41) Nasjleti, C.E., Castelli, W.A. and Caffesse, R.G.: The effects of different splinting times on replantation of teeth in monkeys. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **53**, 557-566, 1982.
- 42) Andersson, L., Lindskog, S., Blomlöf, L., Hedström, K.-G. and Hammarström, L.: Effect of masticatory stimulation on dentoalveolar ankylosis after experimental tooth replantation. *Endod. Dent. Traumatol.* **1**, 13-16, 1985.
- 43) Line, S.E., Polson, A.M. and Zander, H.A.: Relationship between periodontal injury, selective cell repopulation and ankylosis. *J. Periodontol.* **45**, 725-730, 1974.
- 44) Nasjleti, C.E., Caffesse, R.G., Castelli, W.A., Lopatin, D.E. and Kowalski, C.J.: Effect of fibronectin on healing of replanted teeth in monkeys: A histologic and autoradiographic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **63**, 291-299, 1987.
- 45) 岡本 莫, 東 富恵: 歯周病罹患歯露出根面の処置; 歯周治療の科学 (青野正男監修) 1 版, 医歯薬出版, 東京, 222-230, 1991.
- 46) Bang, G. and Urist, M.R.: Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. *Arch. Surg.* **94**, 781-789, 1967.
- 47) McAllister, B., Narayanan, A.S., Miki, Y. and Page, R.C.: Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J. Periodont. Res.* **25**, 99-105, 1990.
- 48) Somerman, M.J., Perez-Mera, M., Merkhofer, R. M. and Foster, R.A.: In vitro evaluation of extracts of mineralized tissues for their application in attachment of fibrous tissue. *J. Periodontol.* **58**, 349-351, 1987.
- 49) Somerman, M.J., Sauk, J.J., Foster, R.A., Dickerson, K., Norris, K. and Argraves, W.S.: Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J. Periodont. Res.* **26**, 10-16, 1991.

付 図 説 明

- 図1 ネコ上顎犬歯頰側の歯槽骨を露出。
- 図2 歯槽骨の穿孔により歯根面を露出。
- 図3 実験に用いられた合成ハイドロキシアパタイト (HA) ブロック (直径 0.8 mm, 厚さ 0.3 mm, 焼成温度 1,300度)。
- 図4 HA ブロック挿填のため歯根に規格窩洞を形成。
- 図5 歯根内窩洞に HA ブロックを挿填。
- 図6 骨削除面をミリポア膜 (5×5 mm, ポアサイズ: 0.5 μ m) で被覆。
- 図7 粘膜骨膜弁を復位, 縫合。
- 図8 術式の模式図。HA: HA ブロック, MF: ミリポア膜, PDL: 歯周靭帯, AB: 歯槽骨, C: セメント質, GCT: 歯肉結合組織, GE: 歯肉上皮, E: エナメル質, D: 象牙質
- 図9 ラット上顎第1白歯近心側の歯槽骨を露出。
- 図10 歯槽骨の穿孔により第1白歯近心根の近心面を露出。
- 図11 歯根に窩洞を形成。
- 図12 窩洞に HA ブロックを挿填。
- 図13 骨削除部分をミリポア膜 (3×3 mm, ポアサイズ: 0.45 μ m) で被覆。
- 図14 粘膜骨膜弁を復位, 縫合。
- 図15 術後6カ月。ミリポア膜下には歯槽骨の再生が認められ, HA 上には近接する歯根表面に添加された新生セメント質と連続して硬組織が形成されている (図の上方が歯冠側, 以下の図においても同様である)。
*: 人工亀裂 ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色 $\times 13.2$
- 図16 図15の拡大。HA ブロック表面の硬組織には細胞封入および成長線が観察される。HE 染色 $\times 66$
- 図17 コラーゲン線維束が HA ブロック表面の硬組織内および再生歯槽骨内へ挿入されている。アザン・マロリー (アザン) 染色 $\times 66$
- 図18 HA ブロック上の硬組織表面には類セメント質を思わせる非石灰化層が形成され, これに接してセメント芽細胞様細胞 (矢印) が配列。HE 染色 $\times 132$
- 図19 HA ブロック表面に形成された硬組織にオキシタラン染色陽性線維 (矢印) が挿入。オキシタラン線維染色 $\times 132$
- 図20 実験群の術後3日。接合上皮の歯根面への深行増殖はなく, 歯肉結合組織の HA ブロック上への増殖もミリポア膜で阻止されている。*: 人工亀裂 HE 染色 $\times 13.2$
- 図21 図20の拡大。ミリポア膜と HA ブロック表面との間隙は線維素性滲出物で満たされており, この部への歯周靭帯断端部からの細胞増殖は認められない。HE 染色 $\times 33$
- 図22 実験群の術後1週。HA ブロック表面は, 毛細血管と線維芽細胞よりなる肉芽組織によって覆われている。HE 染色 $\times 13.2$
- 図23 図22の拡大。創傷断端部の歯周靭帯から HA ブロック上に向かって線維芽細胞が増殖。HE 染色 $\times 33$
- 図24 実験群の術後2週。HA ブロック表面に接して線維芽細胞が密に配列。HE 染色 $\times 33$
- 図25 実験群の術後4週。歯槽骨削除部分に骨再生が認められ, HA ブロック表面と再生歯槽骨の間の結合組織の幅径は歯冠側でやや狭い傾向にある。HE 染色 $\times 13.2$
- 図26 図25の拡大。HA ブロック表面には線維芽細胞が密な配列をし, それらの外側にはコラーゲン線維束が HA ブロック表面と平行に走行している。HE 染色 $\times 33$
- 図27 実験群の術後6週。HA ブロック表面に硬組織の形成が不連続に出現し, それらに対してコラーゲン線維束が垂直ないしは斜め下方向に挿入。HE 染色 $\times 33$
- 図28 図27の拡大。HA ブロック表面に硬組織が不連続に出現。HE 染色 $\times 66$
- 図29 実験群の術後6週。近接する歯根セメント質に連続して, HA ブロック表面への硬組織添加が開始している。HE 染色 $\times 33$
- 図30 実験群の術後8週。HA ブロック表面に不連続に硬組織 (矢印) が形成され, コラーゲン線維束がそれらに対して垂直ないしは斜め下方向に挿入。HE 染色 $\times 33$
- 図31 実験群の術後12週。HA ブロック表面の硬組織の厚径は厚くなり, HA ブロック表面全域で連続的となっている。HE 染色 $\times 33$
- 図32 図31の拡大。HA ブロック表面の硬組織は細胞の封入や層板構造を伴っている。コラーゲン線維束は HA ブロックと再生歯槽骨との間で機能的に配列。HE 染色 $\times 66$

- 図33 対照群の術後3日。歯根内窩洞壁および骨削除部分への歯肉結合組織の増殖は、ミリポア膜で阻止されている。HE染色 ×13.2
- 図34 図33の拡大。ミリポア膜と窩洞との間は線維素性滲出物で満たされている。HE染色 ×33
- 図35 対照群の術後2週。窩洞内は歯周靱帯由来の肉芽組織で満たされ、窩洞壁に接して線維芽細胞が配列。HE染色 ×33
- 図36 対照群の術後4週。窩洞壁と再生歯槽骨との間の歯周靱帯の幅径は、連続する歯根に接する歯周靱帯とほぼ同様である。HE染色 ×13.2
- 図37 図36の拡大。窩洞壁上に菲薄なセメント質が形成され、新生セメント質と再生歯槽骨との間にコラーゲン線維束が機能的に配列。HE染色 ×33
- 図38 対照群の術後12週。窩洞壁上に形成されたセメント質は、連続する既存のセメント質とほぼ類似の形状を呈している。再生コラーゲン線維束の機能的配列はさらに明瞭となり、新生セメント質と再生歯槽骨との間の歯周靱帯の幅径は近傍の歯周靱帯とほぼ同様である。アザン染色 ×33













