

# 結晶化ガラス (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>-CaF 系) の 骨補填材としての有用性について

西 野 綾 子

## Study on Availibility of Glass Ceramics (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>-CaF) for a Synthetic Bone Grafting Material

Ayako Nishino

(平成 5 年 2 月 18 日 受付)

### 緒 言

近年、生体工学の発展にともない種々の人工材料が開発され、人工骨や人工歯根として臨床に応用されてきた。現在主に用いられている材料は、金属材料<sup>1)</sup>、有機高分子材料<sup>2)</sup>およびセラミックス材料<sup>3,4)</sup>の3つに大別できる。骨と有機的に結合する NaO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> 系のバイオガラスは、Hench ら (1971)<sup>5)</sup> によって開発され、以後、同材料に種々の改良<sup>6-8)</sup> が加えられ今日に至っている。本研究に用いたバイオガラスは、1988年、インプラント応用を目的として、さらに材質強化を図ったアパタイト・ウォラスナイト・ディオプサイド系結晶化ガラス<sup>9)</sup> (GC と略) で日本電気硝子社により創成されたものである。本素材は、骨との有機的な結合が期待できると共に、ガラスの物理的特質を利用して特に機械的強度を向上させた人工材料<sup>10,11)</sup> である。

本研究では、GC の骨補填材としての有用性を検討するため、合成ハイドロキシアパタイト (HA と略、三菱マテリアル社製) を比較材料として、*in vitro* の実験により細胞の付着と増殖に及ぼす影響を検討した。さらに、*in vivo* の実験により組織反応を観察し、客観的評価として新生骨の形成量を計測、解析し、本素材の生物学的有用性についての基礎的検討を行った。

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任：下里常弘教授) 本論文の要旨は、第 5 回バイオリミックス研究会 (平成元年 6 月 19 日)、第 7 回バイオリミックス研究会 (平成 3 年 5 月 20 日)、第 8 回バイオリミックス研究会 (平成 4 年 4 月 20 日) において発表した。

### 材料ならびに方法

#### I. 実験材料

##### 1. 生体材料

今回実験に供した GC は、焼成温度 1050°C で、SiO<sub>2</sub>-43.6%、CaO-36.0%、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-9.2%、MgO-11.2% と微量の CaF を含有する組成を有し、緻密度 3.03 g/cm<sup>3</sup> (99.0%) のものを使用した。比較材料の HA は、焼成温度 1200°C で、CaO-55.99%、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-42.43%、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-0.002%、SO<sub>3</sub>-0.003% の組成で、緻密度 3.132 g/cm<sup>3</sup> (99.2%) である。また、コントロールとして、シリカガラス (SG と略、旭製作所社製、SiO<sub>2</sub>: 99.9%) を用いた (表 1)。物理的特性では、GC は、HA に比較して機械的強度が増強され、特に高い曲げ強度を有している材料である (表 2)<sup>10)</sup>。

*in vitro* の材料は、GC、HA および SG ともに、直径 10 mm、厚さ 1 mm の円板状に成形し用いた。

*in vivo* の材料は、破砕状で大きさが直径約 350~700 μm の GC (GC1 と略)、破砕状で GC とほぼ同様の大きさの HA (HA と略)、GC1 と形状の異なるビーズ状の GC (GC2 と略)、破砕状で GC1 より粒径の小さい GC (GC3 と略) の 4 種類を用いた (図 1)。

##### 2. 培養細胞

使用細胞は、C57BL/6 マウス頭蓋冠より樹立され、明海大学久米川教授より供与された骨原性細胞株 MC3T3-E1<sup>12,13)</sup> (E1 細胞と略) を用いた。

##### 3. 実験動物

動物は、体重約 300 g の 9 週齢 Wistar 系雄性ラットを各群 5 匹使用した。

表1 使用材料

GC.	焼成温度 1050°C
組成	SiO <sub>2</sub> -43.6%, CaO-36.0%, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -9.2%, MgO-11.2%, 微量の CaF
緻密度	3.03 g/cm <sup>3</sup> (99.0%)
HA.	焼成温度 1200°C
組成	CaO-55.99%, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -42.43%, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -0.002%, SO <sub>3</sub> -0.003%
緻密度	3.132 g/cm <sup>3</sup> (99.2%)
SG.	SiO <sub>2</sub> -99.9%

## II. 実験方法

### 1. 細胞培養法

35 mm プラスチックシャーレ (クローニング社製) の中央に被検材料を置き, その上に10%牛胎児血清 (ペーリンガー・マンハイム社製) を加えた alpha-modification of Eagle's minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM と略, Flow 社製) にて  $5 \times 10^3$  個/ml に調整した E1 細胞浮遊液 0.1 ml を静かに乗せた。37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下にインキュベーター内で2時間静置し, その後, 10%牛胎児血清を加えた  $\alpha$ -MEM を 2 ml 加え, 所定期間培養した。長期間培養する場合, 培養液は, 3日毎に交換した。

### 2. 細胞増殖曲線および初期付着率

クリスタルバイオレット法で細胞数を算出した。17, 24, 48, 72および96時間被検材料上で培養した細胞を, 10%ホルマリン緩衝液で固定した後, 0.5%クリスタルバイオレットで3分間染色を施した。次に, 1%ドデシル硫酸ナトリウムにより抽出し, その抽出液を Spectrometer (日立社製, 100-60型) を用い, 波長 595 nm で吸光度を測定した。各群の吸光度の値により, 細胞増殖曲線を求め, さらに, 対照である SG を 100 とし, 以下のごとく初期付着率<sup>14)</sup> を求めた。

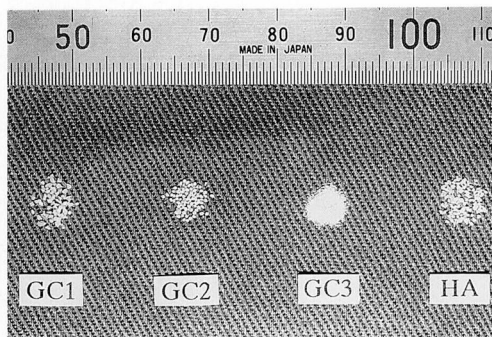
$$\text{初期付着率} = \left\{ \frac{[(17\text{時間培養した試料溶液の吸光度}) - (\text{ブランクの吸光度})]}{[(17\text{時間培養した対照試料の吸光度}) - (\text{ブランクの吸光度})]} \right\} \times 100$$


図1 補填材の形状.

- GC1. 直径約 350~700  $\mu$ m の破砕状顆粒.
- GC2. 直径約 350~500  $\mu$ m のビーズ状顆粒.
- GC3. 直径約 110~220  $\mu$ m の破砕状顆粒.
- HA. 直径約 300~500  $\mu$ m の破砕状顆粒.

### 3. 細胞の形態観察

グルタルアルデヒド (4°C, pH 7.4) とオスミウム酸 (4°C, pH 7.4) で2重固定を行い, エタノール上昇系列により脱水し, ブチルアルコールで置換後, 臨界点乾燥 (日立社製, HCP-1型) を行った。さらに, イオンコーター (GIKO, IB-3型) で金蒸着し, 走査型電子顕微鏡 (日本データム社製, JSM-6300) で各細胞の形態を観察した。

### 4. 補填材填入法および標本作製法

ネプタール麻酔下, ラットの大腿骨を露出後, 直径 2 mm のラウンドバーで骨欠損を形成し, 左側大腿骨に各種材料 (GC1, GC2, GC3, HA) を皮質骨の高さまで填入した後, 縫合し, 補填材填入群とした。すべての被験ラットにおいて, 反対側大腿骨は, 骨欠損形成のまま縫合し自然治癒群とした。填入後, 動的な骨標識として2か月間, 3日毎に2% Tetracycline (TC と略) 10 mg/kg, 填入2か月以降は0.2% Calcein (CA と略) 4 mg/kg を1週間毎に腹腔内に投与した。填入1週, 2週, 1か月および3か月目の注射24時間後に, それぞれ被験部大腿骨を摘出し, 10%ホルマリンで固定後, リゴラック包埋を行った。硬組織薄切

表2 物理的特性 (松井ら, 1988<sup>11)</sup>)

	自然骨	GC	HA
曲げ強度 (kg/cm <sup>2</sup> )	300~1900	2700	1100~1900
圧縮強度 (kg/cm <sup>2</sup> )	900~2300	11000	5000~9000
弾性率 (kg/cm <sup>2</sup> )	$3.8 \sim 17 \times 10^4$	$125 \times 10^4$	$35 \sim 120 \times 10^4$
ビッカース硬度 (kg/cm <sup>2</sup> )	—	730	700
熱膨張係数 30~380 ( $\times 10^{-7}$ )	—	90	115
破壊靱性 (MPa/m)	—	2.0	0.9

Wistar 系ラット (9 週齢, 雄), 各群 5 匹

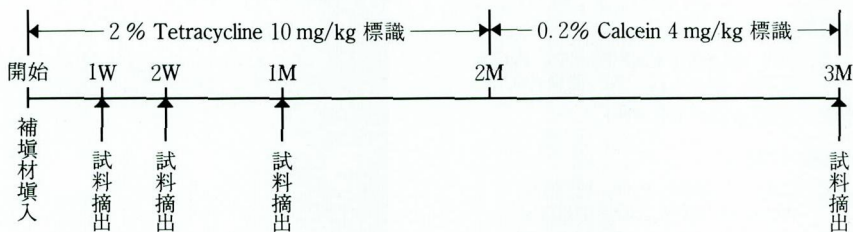


図 2 実験スケジュール。

器 (Exakt 社製) を用いて薄切し, さらにマイクログランドニングマシン (Exakt 社製, MG-4000) で以下の厚さに研磨を行い, 非脱灰研磨標本を作製した (図 2)。

### 5. 組織学的観察

標本の厚さは,  $70 \mu\text{m}$  として, toluidine-blue 染色 (T.B. 染色と略) および Cole の Hematoxylin-Eosin 染色 (H.E. 染色と略) を施し, 光学顕微鏡下で組織反応を観察した。

### 6. 新生骨の面積計測

蛍光顕微鏡観察は,  $100 \mu\text{m}$  の厚さの標本を, 落射型蛍光顕微鏡 (OLYMPAS 社製) を用いて, B あるいは V 励起で観察し, カラー写真の撮影を行った。写真を合成し, トレースした後, 画像解析装置 (武藤工業社製) にて面積を計測した。図 3 に計測法の 1 例を示す。欠損部の皮質骨骨髓側を直径とする半円と, 皮質骨部の面積を合わせた部分を欠損部面積 (S) と規定し, この S 内での填入した材料の総面積 (M), TC で標識された新生骨の総面積 (TC), CA で標識された新生骨の総面積 (CA) を計測した。そして以下の方式で計算し, 相対新生骨量および補填率を求めた。

$$\text{TC で標識された相対新生骨量} = \frac{\text{TC}}{\text{S} - \text{M}} \times 100$$

$$\text{CA で標識された相対新生骨量} = \frac{\text{CA}}{\text{S} - \text{M}} \times 100$$

$$\text{TC と CA で標識された相対新生骨量} = \frac{\text{TC} + \text{CA}}{\text{S} - \text{M}} \times 100$$

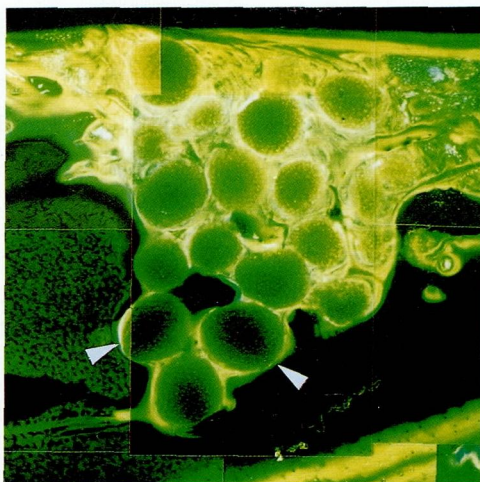
$$\text{補填率} = \text{M/S}$$

## 実験結果

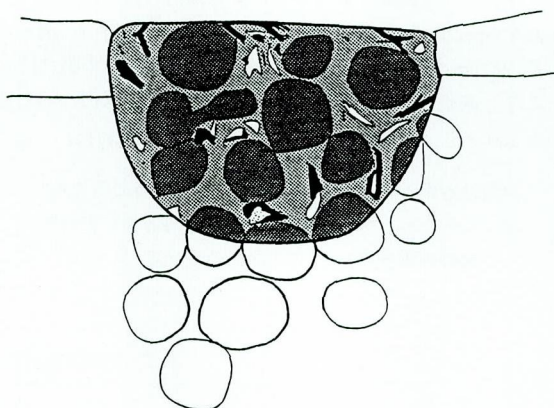
### I. 細胞増殖曲線および初期付着率

細胞の増殖曲線を図 4 に示す。GC, HA および SG とも増殖曲線の傾きは, ほぼ平行であった。

初期付着率では, GC の 244.4% に対して HA は, 111.1% であった。GC, HA とも, SG より, 高値で



A: 蛍光顕微鏡所見 (合成). (GC2, 3 カ月目)  
◄ は補填材を示す。



- S: 規定した部位の総面積。
- M: S 内での填入した材料の総面積。
- ▨ TC: TC で標識された新生骨の総面積。
- CA: CA で標識された新生骨の総面積。

B: A のトレース像。

図 3 相対新生骨量の計測方法。

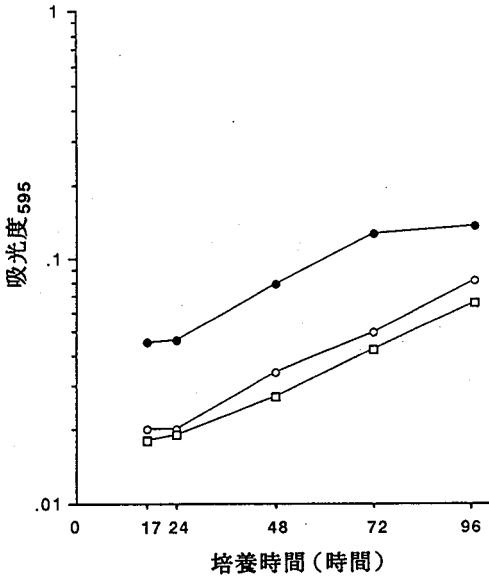


図4 E1細胞の増殖曲線.

● GC  
○ HA  
□ SG

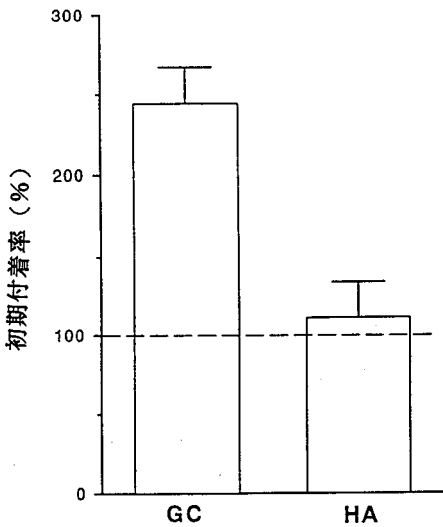


図5 E1細胞の初期付着率.

あったが、GCの方がHAより高い値を示した(図5)。

## II. 細胞の形態観察所見

GCおよびHA上での細胞は、材料上で密に配列し外形は、多角形を呈しており、細胞質突起は短く、SGと形態的にはほぼ同様の所見であった(図6A, B)。

## III. 組織学的観察所見

### 1. 自然治癒群

#### (1) 1週目

骨欠損部内は、線維性結合組織で満たされ、骨欠損部周囲の骨髄および欠損部底部に内骨膜より梁状の新生骨の形成が認められた(図7A)。

#### (2) 2週目

骨欠損部内に、梁状の新生骨の形成はさらに進行したが、骨欠損部周囲の骨髄側の新生骨は、吸収される所見が観察された(図7B)。

#### (3) 1か月目

骨欠損部皮質骨側の骨新生は著明に進行したが、骨髄側の新生骨は、皮質骨側に向けて吸収される所見が観察された(図7C)。

#### (4) 3か月目

骨欠損部皮質骨側は新生骨で満たされ、ほぼ正常に修復されていたが、骨欠損部骨髄側の新生骨は、細く、すう疎となる傾向を示した(図7D)。

### 2. 補填材填入群

#### (1) 1週目

GC群(図8A)、HA群(図8B)とも、既存の内骨膜面より新生骨が骨欠損部の周囲の骨髄内に向けて形成されていた。また、欠損部皮質骨側の補填材周囲は、線維性結合組織で覆われ、結合組織内に炎症細胞の浸潤はほとんどみられなかった。欠損部骨髄側では、類円形の骨芽細胞が新生骨および補填材周囲に列をなしている所見が認められた。特にGC群(図8C)では、HA群(図8D)よりも新生骨が若干多くみられた。

#### (2) 2週目

GC群(図8E)、HA群(図8F)とも、補填材の間隙にも梁状の新生骨が形成され、さらに補填材の周囲に沿って骨新生が進行している所見が観察された。

#### (3) 1か月目

GC群(図8G)、HA群(図8H)とも、補填材は、結合組織を介することなくほぼ全周で新生骨と密に接している所見が観察された。梁状の新生骨の幅は、2週目よりさらに増大し、互いに癒合する傾向がみられた。また、皮質骨側方向へも骨新生が進行している所見がみられた。一方、骨髄側の骨欠損部周囲より、内側に向かって、補填材の間隙に形成された骨が、吸収される所見が認められた。

#### (4) 3か月目

GC群(図8I)およびHA群(図8J)とも、皮質骨の欠損部はほぼ新生骨で満たされ、補填材の間隙の残存新生骨も成熟したものとなり、ハーバース管の形成が多数認められた。また、骨髄側の新生骨は、1か月目

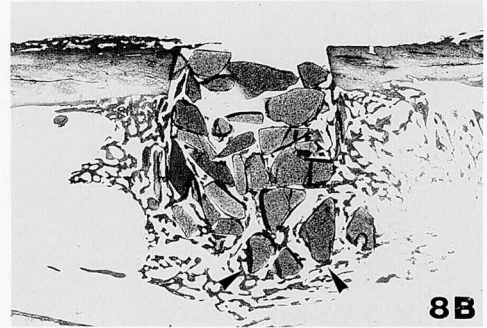
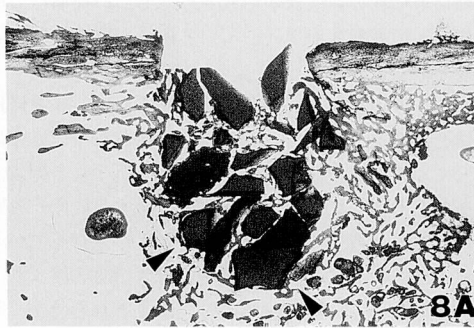
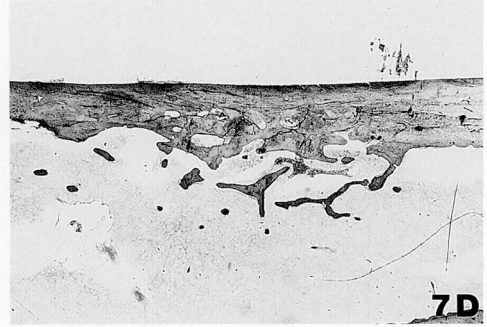
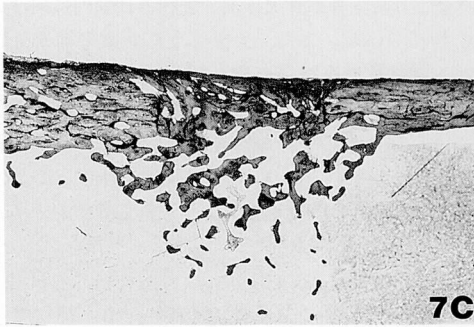
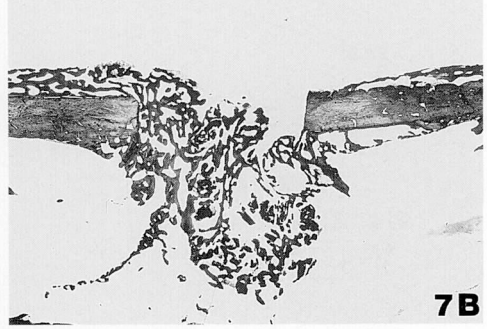
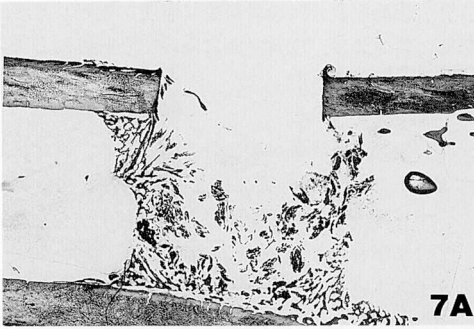
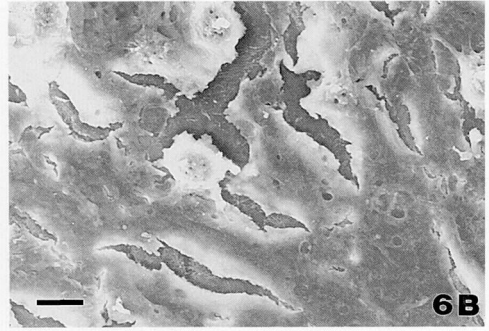
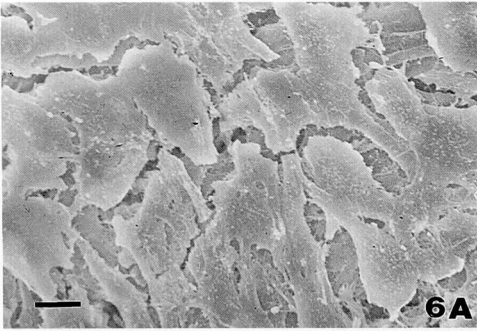
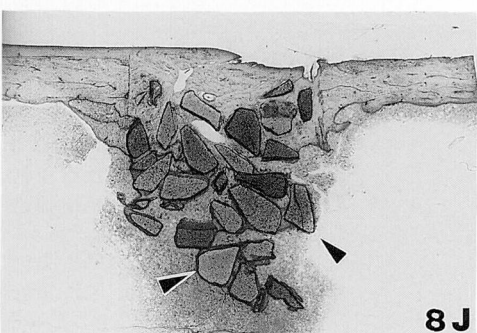
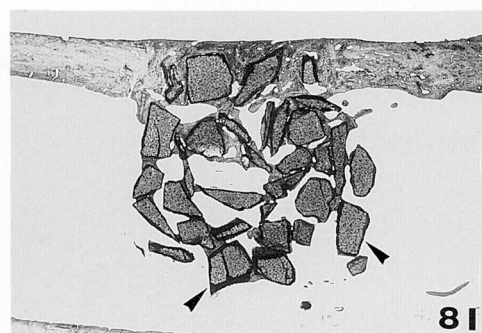
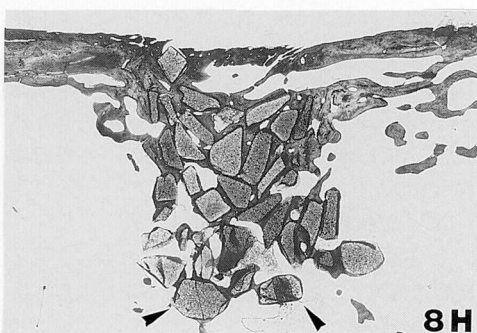
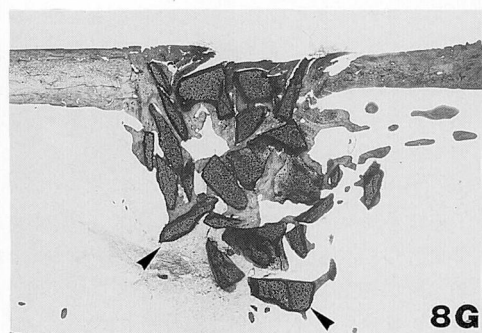
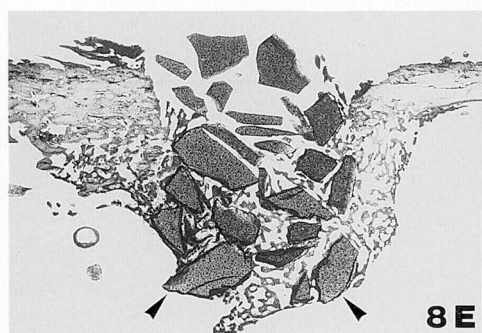


図6 細胞の形態観察所見，培養5日目のE1細胞．走査型電子顕微鏡所見，バーは10 $\mu$ m.

A:GC. B:HA.

図7 組織学的観察所見，自然治癒群( $\times 10$ , T.B.染色).

A:1週目. C:1カ月目.  
B:2週目. D:3カ月目.



に比較して、さらに、吸収が進行して菲薄化し、骨髓に置換される傾向を示した。

IV. 新生骨の面積計測

填入された各種材料の補填率を表3に示す。

表3 各種材料別補填率

補填率 (%)	
GC1	40.3±3.9
GC2	43.4±6.1
GC3	50.2±6.1
HA	39.4±6.9

(平均値±S.D., \* P<0.05)

1. GC と HA との比較

組織学的観察所見より、GC は HA と比較し早期に骨形成がみられたため、新生骨の量を客観的に検討することを目的として、骨形態計測を行った。まず、形状および大きさのほぼ同様の GC1 と HA を用いて検討した。GC1 群と HA 群の補填率は、ほぼ同じ値であった。相対新生骨量の経時的推移を、図9に示す。1週目で GC1 群が28.1%、HA 群が16.9%と GC1 群は、1週目で HA の1.7倍と有意に高い値を示した。しかし、1か月目以降は、両群間に差がみられなかった。また、填入2か月以後の CA で標識された相対新生骨量は、GC1 群(2.5%)、HA 群(3.0%)との間には、有意差はみられなかった。

2. GC の形状および大きさによる比較

GC は、HA より早期に新生骨の形成の生じることが客観的に判明したので、GC の形状および大きさによる骨形成の影響を検討した。

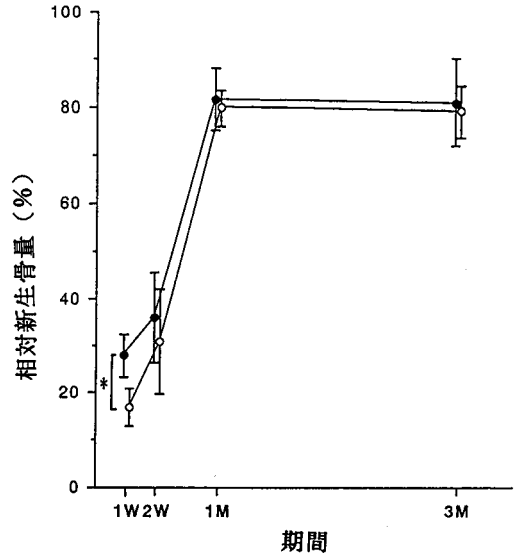


図9 GC と HA 新生骨量の比較。

● GC1  
○ HA  
\* P<0.05

(1) 形状による比較

大きさがほぼ同じで、形状の異なる GC1 と GC2 を用いて検討した。補填率は、ほぼ同じ値であった。相対新生骨量の経時的推移は、図10に示したように、相対新生骨量は、全期間を通して GC1 群と GC2 群間で有意差はみられなかった。

(2) 大きさによる比較

形状が同一で大きさの異なる GC1 と GC3 を用いて検討した。補填率は、GC3 群が55.7%、GC1 群が40.3%で GC3 群が有意に高い値を示した。相対新生骨量の推移を図11に示す。相対新生骨量は、GC1 群

図8 組織学的観察所見，補填材填入群。◀あるいは\*は補填材を示す。

- A : GC, 1週目 (×10, T.B. 染色).
- B : HA, 1週目 (×10, T.B. 染色).  
新生骨は、既存の内骨膜面より、欠損部周囲の骨髓内に向けて形成されていた。
- C : GC, 1週目 (×66, H.E. 染色).
- D : HA, 1週目 (×66, H.E. 染色).  
欠損部骨髓側の強拡大所見。
- E : GC, 2週目 (×10, T.B. 染色).
- F : HA, 2週目 (×10, T.B. 染色).  
補填材間隙にも新生骨は形成され、骨新生が進んでいた。
- G : GC, 1か月目 (×10, T.B. 染色).
- H : HA, 1か月目 (×10, T.B. 染色).  
新生骨は結合組織を介することなく密に補填材と接していた。
- I : GC, 3か月目 (×10, T.B. 染色).
- J : HA, 3か月目 (×10, T.B. 染色).  
骨髓側の新生骨は、菲薄化し、骨髓に置換する傾向を示した。

考 察

I. GC の生物学的特性について

腫瘍および嚢胞等の摘出後に生じた顎骨欠損部の形態回復および修復促進は、臨床上極めて重要な課題である。現在まで、骨欠損部への補填材として臨床で主に用いられてきた HA は、骨のミネラルと同様の成分であり活性型セラミックスと言われている<sup>15)</sup>。HA は、骨と有機的な結合をするが、材質強度や生体親和性などの観点から、必ずしも満足すべき特質を有しているとは言い難い。最近、新しく、アパタイト・ウォラスナイト・ディオプサイド系結晶化ガラスが歯科領域での材料として開発され、材料学的観点からその有用性が論じられつつある<sup>16-18)</sup>。そこで本研究では、GC の骨補填材としての有用性を従来使用されている HA と比較検討した。

GC は、Homsy の疑似体溶液中に浸漬すると、Ca, Mg, P および Si の低レベルの溶出が起り、以後、時間の経過とともに、表面に花卉状の析出物が出現し、その析出物の組成を蛍光 X 線および X 線回折で分析した結果、アパタイトの結晶であることが証明された<sup>19)</sup>。この点から、GC は骨と有機的な結合する生体活性型の材料と言えるであろう。

II. 細胞へ与える影響について

GC および HA 上での培養細胞の発育を、細胞の付着、増殖および細胞形態という点から観察し、その材料が細胞へ与える影響を検討した。

用いた培養細胞は、実際に補填を行う場が骨組織であることから、培養下で骨芽細胞に分化し、骨組織を形成する機能をもつ E1 細胞を用いた。E1 細胞は、生体材料の親和性やその生体作用を解明していくためには貴重な細胞株<sup>20,21)</sup>である。またコントロールとして、被検材料の GC および HA が無機材料であるということを考慮してガラスシャーレの成分である SG を使用した。

文献的には、GC や HA は細胞の増殖を促進させるという報告がみられる。Cheung ら (1985)<sup>22)</sup> は、滑膜由来線維芽細胞様細胞を用いて HA に細胞増殖促進作用があることを明らかにし、向山 (1991)<sup>23)</sup> は、樹立した歯根膜由来細胞を用い、GC, HA 両者ともに細胞増殖促進作用があることを報告している。その理由として、材料表面に析出したアパタイトやその構成成分の溶出により解離したリン酸カルシウムが細胞に取り込まれ細胞増殖の刺激となったとしている。しかし、吉本ら (1989)<sup>24)</sup> は、ヒト腫瘍由来細胞 HT-1080, Ca9-22, NY および E1 細胞を用い GC 上の細

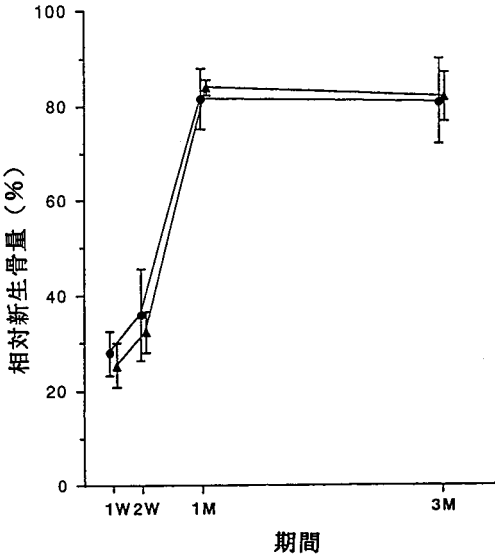


図10 形状別の新生骨量の比較.

● GC1  
▲ GC2

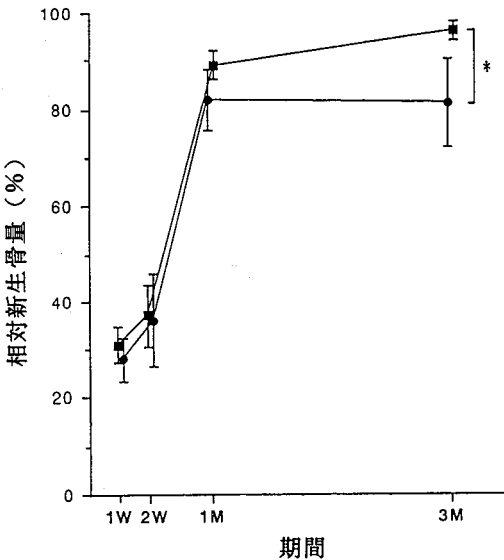


図11 大きさ別の新生骨量の比較.

● GC1  
■ GC3  
\* P<0.05

と GC3 群で、1週目と2週目では差がみられなかったが、1か月目から3か月目で GC3 群が高い値を示し、3か月目では有意に高い値を示した。



胞増殖を検討した結果コントロールと同程度であったと報告している。本研究では、GCはHAに比較して細胞の初期付着が良好であったが、両者ともに細胞の増殖への影響はみられなかった。

細胞形態に関する評価には種々の見解がみられ、細胞の外形や厚さ、接触面積の広がりなどを評価基準としている報告が多い<sup>25)</sup>。一般に増殖期のE1細胞は、セラミック系で多角形を呈し、細胞に障害を与える材料以外では、著明な差はないと報告されている<sup>26)</sup>。本実験では、細胞形態を二次元的に観察したため、細胞の厚さに関して適切な評価はできなかったが、両材料ともにSGと形態的にはほぼ同様の所見であったことから、細胞への為害作用はないと思われた。

### Ⅲ. 生体内での親和性について

まず、補填材填入群で検討した。組織内に種々の生体材料を填入した際の生体反応の第1段階として、線維性結合組織の被包があげられる。青木ら(1977)<sup>27)</sup>は、その線維性被膜は生体の防御反応であるとし、材料の刺激性に比例して被膜の厚さが増すと報告している。また、Denissenら(1980)<sup>28)</sup>は、筋肉内にHAを埋入した実験で、筋肉内では材料の強固な固定ができないため生体の防御反応として線維性被膜が形成され、顎骨内では、新生骨と直接接していたと報告している。さらに、榎本ら(1988)<sup>29)</sup>は、ラットの皮下およびウサギの骨内にGC、HAを填入し、皮下での線維性被膜は、GCはHAより厚さが薄かったとし、さらに骨内では両者ともに被膜の形成もなく障害作用は認められなかったと報告している。本研究では骨内にGC、HAを填入したが、両材料とも、填入部の皮膚の発赤や創傷の治癒不全を思わせる所見はみられなかった。また、両材料とも、線維性被膜の形成はみられず、新生骨と緊密に接し、周囲組織の急性炎症や骨に障害を与えている所見は認められなかった。

次に、補填材填入群と自然治癒群での比較検討を行った。原ら(1983)<sup>30)</sup>は、HAをイヌの顎骨に填入した結果、4週目で自然治癒群と同様に骨修復が完了し、HAが骨芽細胞や骨組織再生に対して何ら障害を与えなかったと報告している。向中野ら(1989)<sup>31)</sup>は、GCをサル顎骨に填入した結果、4週目まで、GCを填入した群が自然治癒群に比較し、新生骨量が多く、8週目には、その差はみられなくなったと報告している。本研究では、GC、HAでの骨修復は、3か月でほぼ終了し自然治癒群と同じであったことから、GCとHAと同様に組織に対して非刺激性であり、生体親和性を有している<sup>32,33)</sup>ことが示唆された。

### Ⅳ. 補填材としての有用性について

補填材の目的は、骨欠損部を補填材で満たすことにより、自然治癒で回復できない量の形態付与を行ったり、あるいは回復までの時間を短縮することにある。そのためには、補填材により骨欠損部の量を減少させ、しかもその間隙により骨が早く新生してくることが重要である。本研究では、計測部位を規定して、補填間隙を満たす新生骨の量(相対新生骨量)の計測に主眼をおいて解析した。骨標識は、TCとCAを用いて<sup>34-36)</sup>行い、骨欠損部の新生骨の形成過程とその時間的経過を検討するため、長期間投与にした。TC投与期間中の新生骨の総面積は、投与間隔を3日以内にするラベリング線が、相接して判定しやすくなると言われている<sup>37)</sup>。また、石灰化異常を起こさせないで、しかも鮮明なラベリングが可能な量は、micro-radiogramおよび組織学的観察所見から、ラットで1~5 mg/150 g body weightであると報告されている<sup>38)</sup>。そこで本研究でも同様に、TCを3日毎、1.5 mg/150 g body weight投与した。またCAは、Ca<sup>2+</sup>とキレート結合し、TCより鮮明な緑色の蛍光線としてあらわれる事が知られている<sup>39)</sup>。あらかじめ予備実験で、骨欠損部の治癒が約2~3か月で終了することが確認されたので、修復後に新たに形成された骨を観察するため、填入2か月以降からCAを使用した。

実際に骨形態計測を行った結果、GCは、HAより、早期に新生骨が形成されたことが客観的に評価され、組織学的観察所見と同様な結果を得た。この理由として、GC表面のイオンの溶出が、生体内でより骨形成に適した環境を作ったのではないかと推測される。しかし、骨を形成する過程には数々の因子<sup>40,41)</sup>が相互に作用し合っているので、GCの溶出イオンの影響は、現在のところ、まだ不明であり、今後さらに検討を要する点である。

次に、実際にGCを骨内へ填入する際、どのような形状でどのような大きさの材料を填入するのが良いかについて、検討した。まず形状による比較を行うにあたり、大きさのほぼ同じ破砕状(GC1)とビーズ状(GC2)で比較検討した。Misiekら(1980)<sup>42)</sup>は、HAの破砕状とビーズ状の材料を犬の頬粘膜にそれぞれ埋入し、形態による生体適合性の違いを検討した結果、破砕状のHAは周囲の鋭縁部が欠けたりしてそれが周囲組織への刺激となったため、ビーズ状がより生体親和性が優れていたと報告している。本研究では、組織学的観察所見および新生骨の計測結果では、両者に特に差は認められなかった。Misiekらが報告しているように破砕状の顆粒は形態的に脆いことが想像されるが、今回の研究のように安定した場所への補填であ

れば補填材の形状は、さほど影響が無いものと考えられる。むしろ形状の影響より、補填材と骨の間隙や、補填材間の間隙が、骨の新生に与える影響の方が大きいと言われている<sup>43)</sup>。Shapoffら(1980)<sup>44)</sup>は、100~300 $\mu\text{m}$ と1000~2000 $\mu\text{m}$ の大きさの乾燥骨をそれぞれ猿の大腿骨に填入し、前者が骨の新生により適していたと報告している。また、金田ら(1980)<sup>45)</sup>は、HAのインプラントを犬の顎骨に埋入し、その際のHAと骨の間隙について検討し、50 $\mu\text{m}$ 以下では、血管の進入が妨げられ、骨の組織分化が遅延するため、間隙は100 $\mu\text{m}$ よりやや広めを設定するのが適当であると報告している。さらに、原ら(1983)<sup>30)</sup>は、犬の顎骨にHAの顆粒を填入し、100 $\mu\text{m}$ 以下の顆粒より、200~1000 $\mu\text{m}$ の顆粒を填入した方が、骨梁の再生は活発であったと報告している。しかし、本研究では、顆粒の大きさは、1週~1か月目の間の骨の新生に対しては影響を与えなかったが、3か月目で、大きさ110~220 $\mu\text{m}$ のGC3の新生骨量が有意に高い結果が得られた。これは、填入1か月以後、新生骨の形成と並行して起こる材料間の骨吸収が起こりにくくなったためと考える。つまり顆粒を小さくして補填率を高め、補填材間の間隙を狭くした方が骨が吸収されずに維持されることが示唆された。その理由として、新生骨の周囲は密にGCで囲まれていることと、GCの生体親和性が高いことから、骨の吸収が遅延するのではないかと推測される。この現象は、填入した補填材を十分維持し、同部の強度および形態が保たれるという点でその臨床的意義があると思われる。以上の事より、骨補填を行う際には、操作上可及的に顆粒を小さくして補填率を高め、補填材間の間隙を狭くした方が、より臨床的有用性の高いことが示唆された。

## 総 括

GCの骨補填材としての有用性を検討するため、従来使用されているHAを比較材料として、*in vitro*の実験により細胞の付着と増殖に及ぼす影響を、*in vivo*の実験で組織反応を観察し、さらに客観的評価として新生骨の形成量を計測、解析し、以下の結果を得た。

### I. 細胞の増殖曲線および初期付着率

E1細胞の増殖曲線および初期付着率を求めた結果、GC、HAはともにSGに比較して細胞の初期付着が良好であり、GCはHA以上の高い初期付着率を示した。しかし、両者ともに細胞の増殖への影響はみられなかった。

### II. 細胞の形態観察所見

E1細胞の形態を観察した結果、GCおよびHA上の細胞は、SG上の細胞とはほぼ同様の所見であった。

### III. 組織学的観察所見

1. GCおよびHAでの骨修復は、3か月でほぼ終了し、自然治癒群と同じ過程で治癒した。
2. GCおよびHAの周囲には炎症所見はみられず、また、GCおよびHAは結合組織の介在がなく、形成された新生骨と密に接していた。

### IV. 新生骨の面積計測

1. HA群と比較した結果、GC1群は1週目において相対新生骨量が有意に高かった。
2. GCの形状別で比較した結果、GC1群、GC2群ともに相対新生骨量には影響を与えなかった。
3. GCの大きさ別で比較した結果、GC3群はGC1群に比較し、3か月目において相対新生骨量が有意に高かった。

以上の結果より、GCはHAに比較し、早期に骨内で安定し、より生体に親和する補填材であることが示唆された。また、GCは顆粒を小さくして補填率を高め、補填材間の間隙を狭くした方が、相対新生量が高く、臨床的に有用性の高いことが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました恩師下里常弘教授に衷心より謝意を表します。適切なる御教示、御校閲を頂いた歯科理工学講座山本昌雄教授ならびに口腔解剖学第一講座前田憲彦教授に厚くお礼申し上げます。また、御指導と御助言をいただいた口腔外科学第二講座安井良一博士に感謝いたします。さらに、研究遂行上、多大な御支援を賜りました補綴学第一講座津留宏道教授をはじめ、医局員各位に心からお礼申し上げますとともに、本研究を遂行するにあたり、多大なる御助言と御鞭達を賜りました口腔外科学第二講座石川武憲助教授をはじめ、医局員に深謝いたします。最後に、 $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MgO-SiO}_2\text{-CaF}$ 系結晶化ガラスを提供して下さいました日本電気硝子株式会社ならびにハイドロキシアパタイトを提供して下さいました三菱マテリアル株式会社に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Hahn, H. and Palich, W.: Preliminary evaluation of porous metal surfaced titanium for orthopedic

- implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 4, 571-577, 1970.
- 2) Peterson, L.J., Pennel, B.M., McKinney, R.V., Klawitter, J.J. and Winstein, A.M.: Clinical radiographic and polymethylmethacrylate dental implants. *J. Dent. Res.* 58, 489-496, 1979.
- 3) Cranin, N.A., Schnitman, P.A., Rabkin, M. and Dennison, T.: Alumina and zirconia coated vitalium oral endosteal implants in beagles. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 6, 257-262, 1975.
- 4) Wolfson, S.H., Svare, G.W. and Weber, D.: Load-bearing capacity of functioning alumina dental endosseous implants. *J. Dent. Res.* 55, 22-29, 1976.
- 5) Hench, L.L., Splinter, R.J., Allen, W.C. and Greenlee, T.K.: Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symp. No. 2* (Part 1), 117-141, 1971.
- 6) Blencke, B.A., Bromer, H. and Deutscher, K.K.: Compatibility and long-term stability of glass ceramic implants. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 12, 307-316, 1978.
- 7) 中村孝志, 山室隆夫, 東正一郎, 伊藤節郎, 田代 仁, 小久保正: CaO·P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> セラミックスを用いた新骨置換材料の基礎的研究, 第一報 各種 CaO·P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> セラミックスと骨反応について. 中部整災誌 23, 1799-1801, 1980.
- 8) 中村孝志, 山室隆夫, 東正一郎, 伊藤節郎, 田代 仁, 小久保正: CaO·P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> セラミックスを用いた新骨置換材料の基礎的研究, 第二報. 中部整災誌 24, 462-464, 1981.
- 9) 平成元年, 特許公報. No. 54291.
- 10) 松井 昌, 渋谷武宏: Bioramics の場における生体機能ガラスセラミックスの開発研究 IV. 特に顎骨反応内応用を目的とした生体活性ガラスセラミックス (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>-CaF 系結晶化ガラス) の創成と応用に関する研究. the Quintessence 7, 1122-1138, 1988.
- 11) Kitsugi, T., Yamamura, T., Nakamura, T., Higashi, S., Kakutani, Y., Hyakuna, K., Ito, S., Kokubo, T., Takagi, M. and Shibuya, T.: Bone bonding behavior of three kinds of apatite containing glass ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 20, 1295-1307, 1986.
- 12) Kodama, H., Amagi, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S.: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.* 23, 889-901, 1981.
- 13) Sudo, H., Kodama, H., Anagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S.: *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96, 191-198, 1983.
- 14) 張 彩霞, 今井庸二, 中林宣男, 渡辺昭彦: 培養細胞法の医用材料の生体適合性評価. 医器材研報 19, 89-93, 1985.
- 15) 石田光輔: アパタイトセラミックス・インプラントの骨組織による保持に関する組織学的研究. 口病誌 51, 333-371, 1984.
- 16) 本郷興人, 向中野浩, 浅野元広, 川浪雅光, 加藤 照: 結晶化ガラス (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>-CaF 系) 人工歯根のサル歯槽骨内インプラント後の臨床的, 病理組織学的観察. 日歯周誌 31, 1119-1129, 1989.
- 17) 麻生智義: 結晶化ガラス (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>-CaF 系) 人工歯根機能負荷による顎骨組織の組織学的変化に関する実験的研究. 日口外誌 38, 1387-1404, 1992.
- 18) 北村完二: 結晶化ガラス人工歯根埋入による顎骨の経時的変化に関する実験的研究. 日口外誌 36, 915-933, 1990.
- 19) 川原春幸, 大島 浩, 五海老輝一, 工藤貴也, 土井 秀: 生体材料の細胞毒性評価. 組織培養 12, 46-50, 1986.
- 20) Itakura, Y., Kosugi, A., Sudo, H. and Yamamoto, S.: Development of a new system for evaluating the biocompatibility of implant materials using an osteogenic cell line (MC3T3-E1). *J. Biomed. Mater. Res.* 22, 613-622, 1988.
- 21) 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 MC3T3-E1 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. *Jpn. J. Oral Biol.* 28, 170-176, 1986.
- 22) Cheung, H.S. and McCarty, D.J.: Mitogenesis induced by calcium-containing crystals role of intracellular dissolution. *Exp. Cell Res.* 157, 63-70, 1985.
- 23) 向山 仁: ハイブリッド型人工歯根に関する基礎研究—ヒト歯根膜由来細胞の増殖および分化機能に及ぼす人工歯根用結晶化ガラスの影響について—. 口病誌 58, 475-489, 1991.
- 24) 吉本由起子, 原 宜興, 安部達也, 赤峰昭文, 前田勝正, 青野正男: 結晶化ガラス (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>-CaF 系) に関する基礎研究, 1. 位相差顕微鏡による培養細胞の形態学的観察および細胞増殖について. 日歯周誌 31, 640-649, 1989.
- 25) Nakamura, H., Kawahara, H., Imai, K., Kawamoto, T., Hosohama, T. and Kataoka, Y.: Cell contact to metal surface. *J. Dent. Appara. Mater.* 19, 98-111, 1978.
- 26) 板倉良暢: 骨原性細胞株 MC3T3-E1 によるインプラント材料の生体親和性に関する研究. 補綴誌 31, 21-29, 1987.
- 27) 青木秀希, 加藤一男, 小木曾誠, 田端恒雄: 新しいインプラント材料としてのアパタイト焼結体. 歯界展望 49, 567-575, 1977.
- 28) Deniseen, H.W., Groot, K., Makkes, P. Ch.,

- Hooff, A. and Klopper, P.J.: Tissue Response to dense apatite implants in rats. *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 713-721, 1980.
- 29) 榎本 眞, 井上博之, 山本敏男, 塩田 覚, 松井 昌: 結晶化ガラス人工歯根, 骨補綴用結晶化ガラスの安全性評価 2. *Bioramics* の場における生体機能ガラスセラミックスの開発研究. *the Quintessence* **8**, 1658-1669, 1988.
- 30) 原 宜興, 古川猛士, 岸 哲也, 鄭 有仁, 赤峰昭文, 青野正男: リン酸カルシウムの歯周治療への応用 1. Hydroxyapatite についての基礎実験. *日歯周誌* **25**, 806-816, 1983.
- 31) 向中野浩, 本郷興人, 浅野元広, 川浪雅光, 加藤 潔: 顆粒状結晶化ガラス (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>-CaF 系) の歯周治療への応用—サル根分岐部填入後の病理組織学的観察—. *日歯周誌* **31**, 1110-1118, 1989.
- 32) 小木曾誠: Apatite 焼結埋入による顎骨組織の経時的推移変化. *口病誌* **45**, 170-209, 1978.
- 33) 長嶺尚子: 結晶化ガラスの歯周治療への応用—犬の実験的骨欠損に填入後の組織学的検索—. *九州歯会誌* **45**, 377-389, 1991.
- 34) 代田達夫: 移植腸骨へのヒドロキシアパタイト人工歯根の適用に関する実験的研究. *日口外誌* **37**, 578-594, 1991.
- 35) 高橋栄明: 非脱灰骨組織像の読み方. *骨代謝* **6**, 53-63, 1971.
- 36) Steendijk, R.: Studies on the mechanism of the fixation of the tetracyclines to bone, edited by H.J.J. Blackwood. Pergamon Press, Oxford. 49-63, 1964.
- 37) 大野康亮: 抜歯窩骨性治癒過程の microradiography ならびにラベリング法による研究. *歯学* **60**, 839-868, 1970.
- 38) 大野康亮: テトラサイクリンによる形成期硬組織のラベリング像に及ぼす諸条件について. *歯基礎誌* **20**, 252-269, 1978.
- 39) 狩山昌万: 三色蛍光標示法によるワニの歯と顎骨の発育に関する研究. *阪大歯誌* **14**, 17-31, 1969.
- 40) Dulbecco, R. and Elkington, J.: Induction of growth in resting fibroblastic cell cultures by Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 1584-1588, 1975.
- 41) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明: 骨の無機成分, 石灰化の機構, 血清カルシウムの恒常性とその調節機構; 骨の科学. 医歯薬出版株式会社, 東京, 120-179, 1990.
- 42) Misiek, D.J., Kent, J.N. and Carr, R.F.: Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes. *J. Oral maxillofac. Surg.* **42**, 150-160, 1984.
- 43) Zaner, D. and Yukna, R.: Particle size of periodontal bone grafting materials. *J. Periodontol* **55**, 406-409, 1980.
- 44) Shapoff, C.A., Bowers, B.L., Mellonig, J.T. and Yukna, R.A.: The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. *J. Periodontol* **51**, 625-630, 1980.
- 45) 金田浩之: Apatite Implant の埋入間隙と骨組織形成との関連性に関する研究. *口病誌* **47**, 57-87, 1980.