

各種支台材料における結合組織性付着形成に関する実験的研究

高 橋 啓

An Experimental Study of Connective Tissue Attachment Formation on Various Biomaterial Cores

Akira Takahashi

(平成11年1月11日受付)

緒 言

齶蝕や歯の破折、歯の内部性あるいは外部性吸収、穿孔等によって正常な歯質の欠損が歯槽骨縁下まで達した場合、矯正学的挺出¹⁻⁴⁾、外科的挺出⁵⁻⁸⁾、骨切除^{9,10)}あるいは抜歯等の処置が適用されている。しかしながら、抜歯はもとより、上記のいずれの処置を施した場合でも支持組織は減少し、それに伴って歯冠歯根比の悪化を招くことがある。一方、歯槽骨縁下に及ぶ歯質欠損を従来の支台材料で置換した場合は、支台材料表面に結合組織性付着が再現されることはなく、歯周ポケットを形成する潜在的な場を提供することになる。

近年、Melcherらは、歯周外科処置後の歯周組織の治癒に際し周囲に残存する歯周組織創縁から歯面に増殖する細胞の種類により術後の治癒形態が決定されるとの仮説を立てた¹¹⁾。KarringおよびNymanらは、この仮説をもとに一連の実験を行い、露出象牙質に対して歯周靭帯（以下PDLと略す）由来細胞のみに結合組織性付着形成能があることを明らかにした¹²⁻¹⁵⁾。このPDL由来細胞の特性に着目し、その増殖を罹患歯根面に誘導することによって新付着獲得を目指す組織再生誘導法（Guided tissue regeneration; GTR法）が開発され、臨床応用が盛んになされている¹⁶⁻²²⁾。

また最近、Takataら²³⁻²⁵⁾、Buserら^{26,27)}およびWarrarら²⁸⁾は、PDL由来細胞の結合組織性付着形成能に注目し、同細胞の増殖を人工材料表面に誘導した際にもコラーゲン線維の挿入を伴ったセメント質の添加が起こるか否かを検討した。その結果、象牙質のみ

ならずハイドロキシアパタイト（以下HAと略す）、バイオグラスおよびチタンなどの生体材料に対しても結合組織性付着が生じることを明らかにしている。

そこで本研究では、残存歯根に生体材料支台を組み合わせた新しい歯冠修復用支台築造法を確立するための基礎的データを得ることを目的として、以下の2つの研究を行った。歯槽骨縁下深くに及ぶ欠損に対して生体材料による支台築造を行い、支台表面に対してPDL由来細胞の増殖を誘導した際にも結合組織性付着が形成されるか否かを組織学的立場から検討した。また、支台材料表面における歯周組織細胞の動態を明らかにするため、支台材料表面上でのPDL由来細胞の増殖、機能ならびに細胞形態について、*in vitro*での検討を加えた。

材料ならびに方法

実験1：PDL由来細胞の増殖を誘導した際の生体材料による支台表面における付着形態の組織学的観察

本実験は、広島大学動物実験指針および広島大学医学部附属動物実験施設内規に従って行った。

1. 実験動物、部位および前処置

ビーグル成犬（体重10~12kg）6頭を用い、各動物の下顎両側第二、第三小臼歯近遠心根および第四小臼歯近心根を実験部位とした。

前処置として、実験2週前に実験歯の抜髄処置を行い、水酸化カルシウム製剤（ビタベックス、ネオ製薬工業）による根管充填を施した。また、実験歯の歯石除去を行うとともに、実験開始まで週5日にわたるブ

ラッシングを施し、実験部歯周組織を健康な状態に維持した。

2. 支台材料および実験手順

支台材料には、HA（焼成温度 1300°C、京セラ社製）、ワイヤ放電加工した純チタン（以下WTと略す、昭和大学歯学部歯科理工学教室から提供）およびプラズマコーティングした純チタン（以下PTと略す、GC社から提供）の3種類を用いた。支台材料のサイズとしては、HA（直径 1.8, 2.2, 2.6 mm、高さ 2.5 mm）、WT（直径 1.8, 2.2, 2.6 mm、高さ 2.0 mm）、PT（WTと同規格）とし（図1）、歯根に近似した直径の材料を使用した。なお、WTおよびPTは、中心部が1.0 mm径の中空形態となっており、これらの支台材料の維持には純チタン製ポスト（GC社から提供：直径 0.9 mm、長さ 4.0 mm）（図1）を併用した。支台材料は、実験前にオートクレーブ（SD-321、トミー工業）を用いて121°C、30分間滅菌処理したものを用いた。

ベントバルビタールナトリウム（ネブタール注射

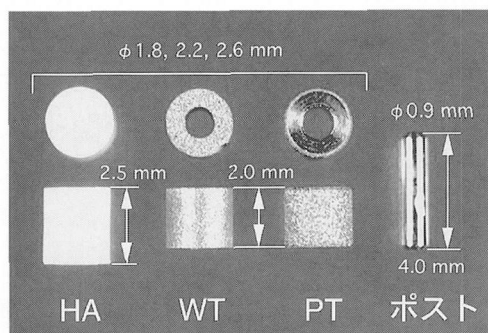


図1 各種支台材料およびポスト

- HA：ハイドロキシアパタイト焼結体
（直径 1.8, 2.2, 2.6 mm、高さ 2.5 mm）
WT：ワイヤ放電加工した純チタン
（直径 1.8, 2.2, 2.6 mm、高さ 2.0 mm）
PT：プラズマコーティングした純チタン
（WTと同規格）
純チタン製ポスト（直径 0.9 mm、長さ 4.0 mm、）

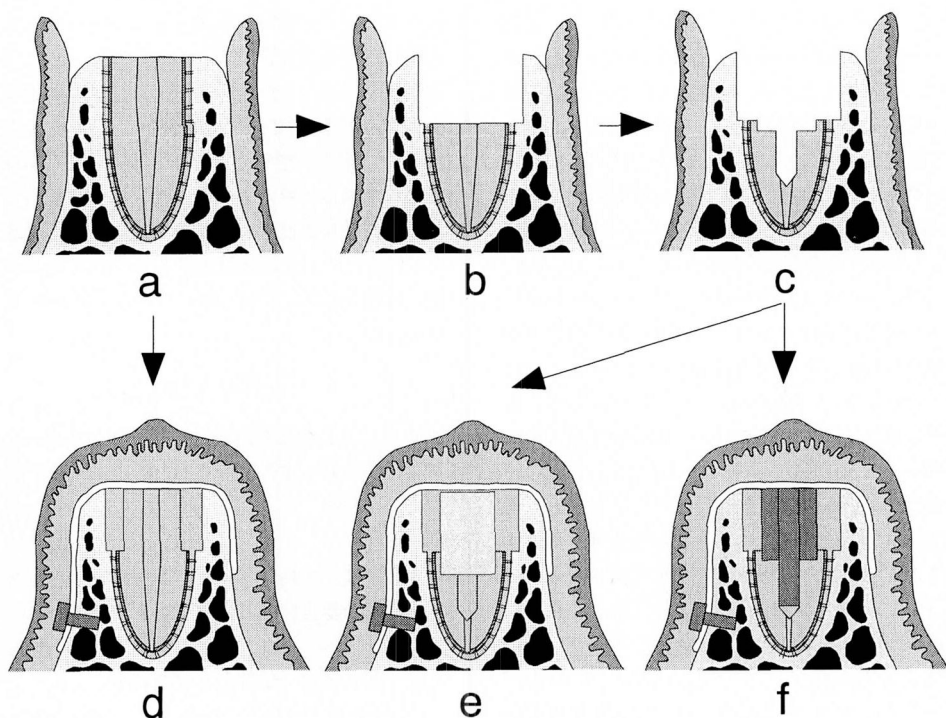


図2 実験手順

- a：歯肉を切開剥離後、歯冠および歯根の一部を削除
b：骨縁下約 2 mm の位置まで歯冠根、PDL ならびに歯槽骨内面を削除
c：小窩形成用バーにて根面窩洞を形成
d：対照群。骨縁下約 2 mm までセメント質、PDL ならびに歯槽骨内面を掘状に削除
e：HA 群。根面窩洞に HA を合着
f：WT 群および PT 群。根面窩洞にポストを併用して WT および PT を合着

液, アボットラボラトリーズ) 25 mg/kg と硫酸アトロピン (田辺製薬) 0.05 mg/kg 混合液の静脈内投与による全身麻酔および 2% リドカイン (歯科用キシロカイン, 藤沢薬品工業) による局所麻酔の併用下, 動物の下顎第一小白歯近心部から第一大臼歯近心部まで歯肉溝切開を加え, 粘膜骨膜弁を剥離することによって, 歯頸部歯槽骨を明視野においた。次に, 滅菌蒸留水の注水下にて, 各実験対象歯の歯根がそれぞれ単根状態になる高さまでジェット・カーバイドバー (No. 703, 松風) を用いて歯冠, 髓床底および歯根の一部を切削した (図 2a)。実験群では, ジェット・カーバイドバーを用いて骨縁下約 2 mm の位置までさらに歯根を削除するとともに, PDL ならびに歯槽骨内面の表層部分を除去した (図 2b)。その後, 支台材料を歯根形成面に保持し, 歯根形成面と支台材料が可及的に緊密に適合するように, 歯根に近似した径を有する小窩形成用バー (直径 1.8, 2.2, 2.6 mm, GC) (図 3) を用いて, 根面窩洞を形成した (図 2c)。ポストを併用しない HA の根面窩洞については, WT や PT よりも約 0.5 mm 深く形成し歯根に支台を挿入することにより維持を図るとともに, 欠損部に露出する支台表面の長さを同様とした。なお, 小窩形成用バーならびに前述の支台材料の直径を規格化するにあたっては, あらかじめ撮影した実験歯のレントゲン写真上での歯根径計測値を参考とした。実験部位を十分に圧迫止血した後, 生理食塩水にて洗浄を行い, 支台材料を外科用接着材料 (アロンアル

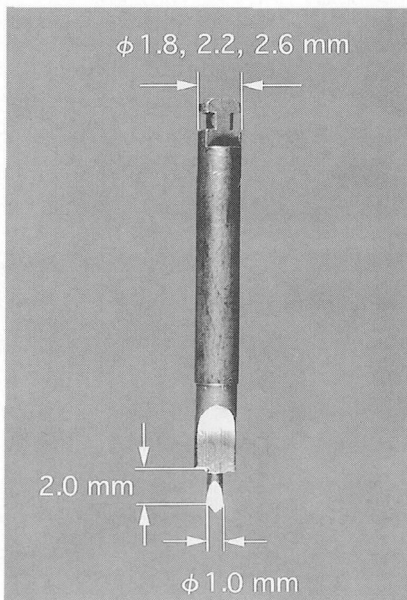


図 3 根面の小窩形成用バー
合着する支台材料と同じ直径のバーを選択して使用した。

ファ A, 三共) によって窩洞内に合着した (図 2e, f)。対照群では, ジェット・カーバイドバー (No. 699, 松風) を用いてセメント質, PDL および歯槽骨内面を骨縁下約 2 mm の深さまで堀状に除去し, 実験群の支台と同様の形態となるよう象牙質を整形した (図 2d)。

さらに片側では, 支台周囲への歯肉由来線維芽細胞の侵入を阻止するため, 実験野を遮蔽膜 (Oval-9, ジャパンゴアテックス) で被覆し, ミニスクリュー (メンフィックススクリュー, Strauman) にて膜の固定を行った (図 2d, e, f. 以下膜有群と略す)。その後, 同部を粘膜骨膜弁にて被覆縫合した。一方反対側でも, 対応する部位に上記と同様の処置を施した後, 遮蔽膜は適用せず粘膜骨膜弁のみで被覆縫合した (以下膜無群と略す)。

術後より 1 週間, 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) 20 mg/kg の筋肉内注射を毎日一回行った。また, 観察期間は術後 3 カ月間とし, この間は実験部位への過度な刺激を避けるため軟性飼料にて飼育するとともに, 週 5 日にわたるブラッシングを施し, 実験歯周囲組織を健康な状態に維持した。術後 3 カ月目に以下の方法により標本作製を行った。

3. 標本作製および観察方法

(1) 標本作製法

動物を全身麻酔下にて 10% 中性緩衝ホルマリンにより灌流固定し, 実験部位を摘出した。HA 群では, 同固定液による浸漬を 3 日間継続した後, 急速脱灰液 (K-CX, ファルマ) にて 3 日間脱灰, 通法に従いパラフィン包埋後, 6 μ m 厚の頬舌断標本を作製し, HE 染色を施した。WT 群, PT 群および対照群では, 同固定液による 3 日間の浸漬固定後, 脱灰することなくアルコール系列にて脱水, アセトンおよびブチレンモノマー (応研商事) にて透徹した。その後 2 種類の樹脂包埋材料 (Rigolac 2004, Rigolac 70F, 応研商事) を 4:1 で混合した包埋材を減圧下で浸透させて脱気し, 60°C, 24 時間で重合した。硬組織用薄片作成システム (EXAKT-Cutting-Grinding System, EXAKT) を用い, 支台材料の中央部より約 50 μ m 厚の頬舌断非脱灰研磨標本を作製し, トルイジンブルー染色を施した。

(2) 組織学的観察

支台材料表面における周囲組織の付着形態や歯槽骨頂の位置 (以下骨レベルとする) を光学顕微鏡で観察した。なお, 支台材料が歯根に適合していなかった実験例は観察対象から除外した。

(3) 組織形態計測

上記と同様の基準で組織標本を選択し, 各支台の頬舌側を観察部位として, 膜有群 36 部位 (HA 群 8, WT

群 10, PT 群 11, 対照群 7), 膜無群36部位 (HA 群 9, WT 群 9, PT 群 12, 対照群 6) を対象に, ocular-micrometer を装着した光学顕微鏡を用い, 40倍にて以下の項目について計測, 評価を行った。

評価項目 (図 4)

2) 骨レベル保存長さ (BL)

歯根形成面を基準として計測した歯槽骨頂までの長さ

3) 結合組織性付着様構造長さ (CTL)

支台表面に対して垂直方向に走行する線維がみられる部分の長さ

なお, 統計学的分析には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

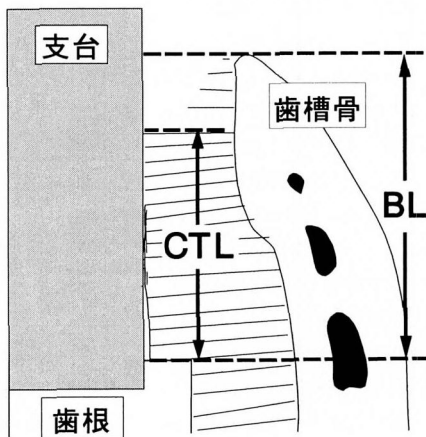


図 4 組織形態計測の評価項目

BL : 骨レベル保存長さ

CTL : 結合組織性付着様構造長さ

いずれも歯根形成面を基準面とした。

実験 2 : PDL 由来細胞, 骨芽細胞様細胞および歯肉由来線維芽細胞の HA, WT ならびに PT 上における細胞増殖・機能の解析および細胞形態の観察

1. 培養細胞および支台材料

(1) PDL 由来細胞

8 週齢雄性ルイス系ラット (体重 200~250 g) の口腔内を 70% アルコールにて消毒後, 上下顎両側臼歯周囲の歯肉を剥離した。骨縁上の歯根周囲軟組織を完全に除去した後, 歯牙を抜去した。次いで, 抜去臼歯を PBS (phosphate buffered saline, ニッスイ) にて洗浄後, $\phi 35$ mm シャーレ (3001, FALCON) に静置し, 抗生物質 (10000 U/ml PenicillinG, 10000 mg/ml Streptomycin, 10 mg/ml Gentamicin) を添加した 10% ウシ胎

児血清 (以下 FBS と略す, EQUITECH-BIO) 含有 DMEM (Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM, ニッスイ) にて 37°C , 5% CO_2 条件下で培養した。その後, 歯根表面の PDL から遊出してきた細胞を上記の条件で継代培養し, 5~7 代目の細胞を実験に供した。

(2) 大腿骨由来骨芽細胞様細胞 (以下 FOB と略す)

Maniopoulos ら²⁹⁾ の方法に従い, 8 週齢雄性ルイス系ラット (体重 200~250 g) より大腿骨を無菌的に摘出し, 周囲軟組織を可及的に除去した。その後, 抗生物質 (10000 U/ml PenicillinG, 10000 mg/ml Streptomycin, 10 mg/ml Gentamicin) を添加した 15% FBS 含有 α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Medium, GIBCO) にて洗浄後, 大腿骨近位骨端を切断し, 先の抗生物質に $50 \mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 10 mM Na- β -glycerophosphate および 10^{-8} M dexamethasone を加えた 15% FBS 含有 α -MEM 5 ml を用いて, シリンジにて各大腿骨骨髓組織を同様の培養液 10 ml 中に射出した。得られた組織を 15% FBS 含有 α -MEM にて 37°C , 5% CO_2 条件下で培養を行い, 5~7 代目の細胞を実験に使用した。

(3) 歯肉由来線維芽細胞 (以下 GF と略す)

8 週齢雄性ルイス系ラット (体重 200~250 g) の口腔内を 70% アルコールにて消毒後, 上下顎両側第一, 第二, 第三臼歯周囲の付着歯肉を外科用メスを使って摘出した。PBS にて洗浄した歯肉片を $\phi 35$ mm シャーレに静置し, 遊出してきた細胞を PDL 由来細胞の場合と同条件で培養し, 5~7 代目の細胞を実験に用いた。

(4) 支台材料 (図 5)

支台材料には実験 1 で用いたと同じ HA, WT および PT を使用した。サイズはいずれも $1 \times 1 \times 0.1$ cm とし, 実験 1 と同様の表面処理を施されたものを用いた。

HA は, 1M phosphate buffer (pH 6.8) に 24 時間浸漬して吸着タンパクを除去後, 精製水にて 3 回洗浄さ

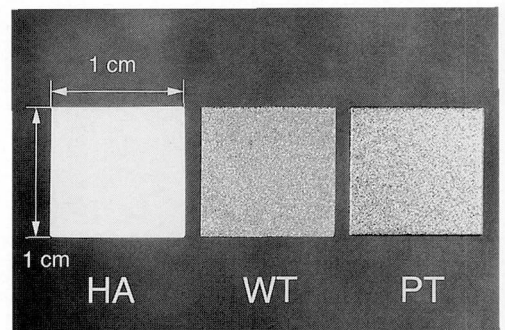


図 5 培養実験用支台材料 ($1 \times 1 \times 0.1$ cm)

HA : ハイドロキシアパタイト焼結体

WT : ワイヤ放電加工した純チタン

PT : プラズマコーティングした純チタン

れた。WTおよびPTは、アセトン中で15分間洗浄後、精製水にて3回超音波洗浄が施された。その後、各材料をオートクレーブを用いて121°C、30分間滅菌処理し、実験に供した。

2. 細胞増殖率

各支台材料を24 well培養プレート（マルチプレート24F, 住友ベークライト）底面に静置し、以下の実験を行った。PDL由来細胞およびGFには、10% FBS含有DMEMに50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 10 mM Na- β -glycerophosphate および 10^{-8} M dexamethasone を加え調整した培地、FOBには15% FBS含有 α -MEMに50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 10 mM Na- β -glycerophosphate および 10^{-8} M dexamethasone を加え調整した培地を用い、 1×10^4 /ml/wellの細胞密度で各細胞を播種した。1.5時間および1, 3, 6, 10日間の培養を行い、0.05% trypsin, 0.01% EDTAを含むPBSにて細胞分散後、コールターカウンター（COULTER Z1, Coulter Electronics）にて各支台材料上の細胞数を算出し、増殖曲線を得た。なお、統計学的分析には、Mann-WhitneyのU検定を用いた。

3. ALP 活性の測定

各支台材料を24 well培養プレート底面に静置し、 1×10^5 /ml/wellの細胞密度で各細胞を播種した。細胞増殖率の検討時と同条件の培地を用いて各細胞を10および20日間培養後、ALP活性をLowryらの方法³⁰⁾に従い測定した。すなわち、各種材料をPBSにて洗浄後、0.2% Triton X-100 750 μl にて細胞成分を溶解し、超音波ホモジナイザー（Handy Sonic model UR-20P, トミー工業）で10秒間ホモジナイズした。10,000 rpmにて10分間遠心した後、上清50 μl をALP buffer (0.1M Tris, 6.7 mM p-nitrophenyl phosphate, 2 mM MgCl_2) 125 μl に加え、37°Cで30分間インキュベートした。0.2N NaOH 125 μl を加えて反応を終了させた後、分光

光度計（MPR-A4i, 東ソー）にて405 nmにおける吸光度を測定した。同時に、細胞数もコールターカウンターを用いて算出し、1細胞あたりのALP活性をp-Np nmol/cell in 30 minで表した。なお、統計学的分析には、Mann-WhitneyのU検定を用いた。

4. 走査型電子顕微鏡（以下SEMと略す）による細胞の形態観察

細胞増殖率の検討と同じ条件で各種支台材料上に各細胞を播種し、1および6日間培養した時点で細胞形態を観察した。

支台材料上の細胞は、PBSによる洗浄後、2.5%グルタルアルデヒド（Polysciences）にて1時間、室温で前固定、洗浄された後、1%四酸化オスミウム（Polysciences）にて30分、室温で後固定された。これらはアルコール系列で脱水後、通法に従い臨界点乾燥、Pt-Pd蒸着を施され、細胞形態はSEM（JSM6300, 日本電子データム）にて観察された。

結 果

実験 1

1. 支台周囲の骨レベル

実験群の膜有群では、術前の骨レベルがほぼ維持されており（図6a）、一部では支台を覆うようにドーム状の骨増生を示していた（図6b）。一方、膜無群では、術前とほぼ同じ骨レベルを示すもの（図6c）、支台材料表面の1/2以下まで骨吸収を生じたもの（図6d）、さらには歯根形成面以下まで骨吸収が起こったもの（図6e）など、多様な骨レベルがみられた。対照群においても同様に、膜有群では術前の骨レベルが維持されていたのに対し、膜無群での骨レベルは多様であった。

これらの骨レベルについて、支台材料表面の1/2以上、1/2以下、歯根形成面以下の3段階に分類し（図7）、膜の有無ならびに支台材料の違いによる差を評価

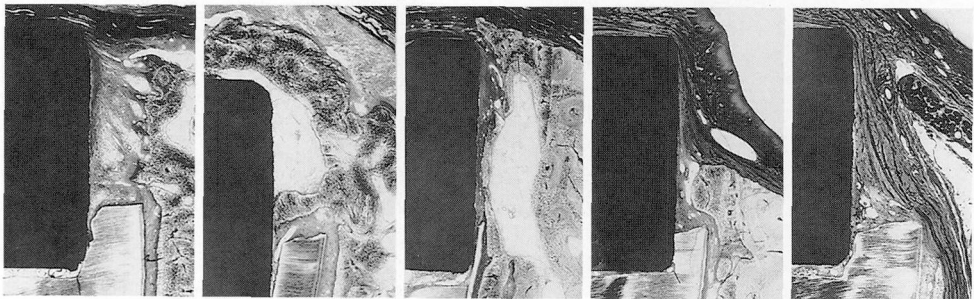


図6 膜有群 (a, b) および膜無群 (c, d, e) における骨レベル（トルイジンブルー染色 $\times 20$ ）

膜有群では、全例において術前の骨レベルが保たれ (a)、一部では支台を覆うようにドーム状の骨増生がみられた (b)。膜無群では、支台の上面レベルまで骨が存在するもの (c)、支台の約1/2まで骨吸収がみられるもの (d)、歯根形成面以下まで骨吸収がみられるもの (e) 等、多様な骨レベルを示した。

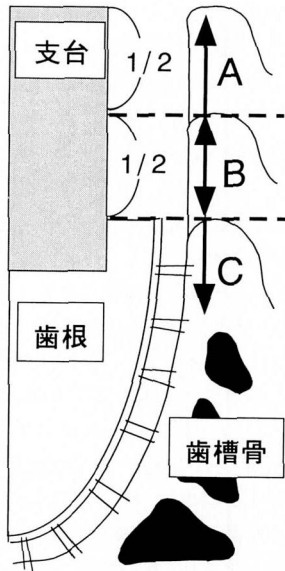


図7 骨レベルの分類基準
 A: 支台面の 1/2 以上
 B: 歯根形成面から支台の 1/2 まで
 C: 歯根形成面以下

した(表1)。その結果、膜有群の骨レベルは、どの支台材料においても材料表面の 1/2 以上に維持されていたのに対し、膜無群では支台材料の種類によらず多様であった。対照群においても、膜有群および膜無群の骨レベルは同様の傾向を示していた。

骨レベル保存長さに関する組織形態計測の結果にお

表1 各群における分類された骨レベル

	膜有			膜無		
	A	B	C	A	B	C
HA 群	8	—	—	2	4	3
WT 群	10	—	—	4	3	2
PT 群	11	—	—	4	5	3
対照群	7	—	—	2	2	2

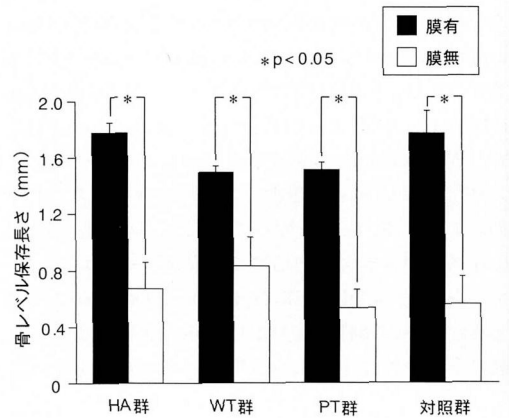


図8 骨レベル保存長さ(平均値±S.E.)
 実験群, 対照群ともに、膜有群は膜無群に比較して有意に高い骨レベルを示した (p<0.05)。

いても(図8)、支台材料の種類に関係なく膜有群は膜無群よりも有意に大きな値を示していた (p<0.05)。

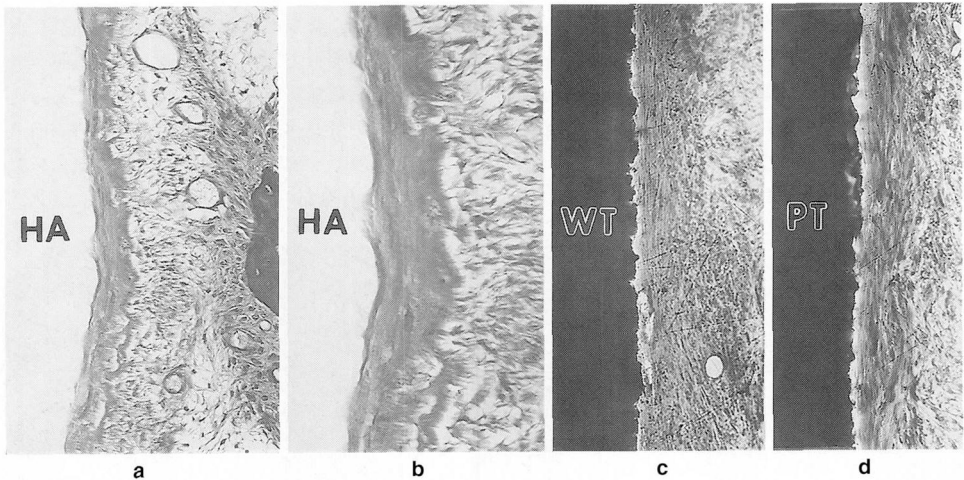


図9 各種支台表面における代表的な組織像
 a: HA: 支台表面に対し、コラーゲン線維が垂直方向に走行している (HE 染色 ×200)。
 b: aの拡大, HA表面にコラーゲン線維の封入を伴ったセメント基質様物質の沈着が認められる。(HE 染色 ×400)。
 c: WT: 支台表面に対して、コラーゲン線維は平行に走行している (トルイジンブルー染色 ×200)。
 d: PT: コラーゲン線維は支台表面に対して平行に走行している (トルイジンブルー染色 ×200)。

2. 支台表面における付着形態

支台表面への周囲組織の付着形態の評価は、主として骨レベルを維持していた膜有群について行った。各群の代表的付着形態として、HA群ではコラーゲン線維の走行が支台材料面に対して垂直に走行する傾向があり、一部ではセメント基質の沈着を思わせる組織像も認められた(図9a, b)。一方、WT群とPT群の付着形態は類似しており、コラーゲン線維が支台材料表面に平行に走行し、セメント質様組織の添加は認められなかった(図9c, d)。対照群では、象牙質表面に既存セメント質から連続したセメント質様組織が形成され、垂直方向にコラーゲン線維束の挿入を伴っていた(図10)。そこで、支台表面への付着形態を結合組織性付着もしくはそれに類似するもの(タイプI)、結合組織に

よる被包(タイプII)、オッセオインテグレーションあるいはアンキロシス(タイプIII)の3種類に大別し、各タイプの混在する場合を含めて6種類に分類し検討した(表2)。HA群ではタイプIあるいはタイプI+タイプIIIが多かったのに対し、WTおよびPT群はタイプIIあるいはタイプII+タイプIIIが主体を占めていた。一方、対照群は全例がタイプIの形態を示した。

次に、結合組織性付着様構造獲得長さをみると(図11)、対照群では約1.8mmであったのに対し、実験群では獲得長さが一般に小さかったが、HA群はWTおよびPT群に比較して有意に大きな値を示した($p < 0.01$)。

なお、膜無群では、どの支台材料においても歯槽骨が吸収された部分の支台材料表面に密な歯肉結合組織による被包が観察された(図12)。また、歯槽骨の残存する部分の付着形態の分類では、膜有群におけると同様の傾向が認められた。

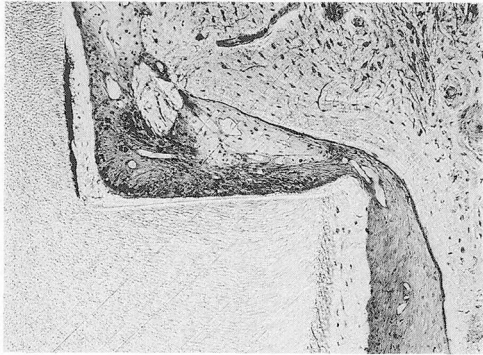


図10 対照群の代表的な組織像
露出象牙質表面に結合組織性付着が形成され、既存のセメント質から連続したセメント質様硬組織構造が認められる(トルイジンブルー染色×200)。

実験2

1. 各種支台材料上における細胞増殖率

各種支台材料上における細胞増殖率は、PDL由来細胞ではHA群が培養3日以降でWTおよびPT群に比較して有意に高い値を示した($p < 0.05$)(図13a)。FOBおよびGFは、HA群が培養10日でWTおよびPT群に比較して有意に高い値を示した($p < 0.05$)(図13b, c)。

また、培養初期における細胞増殖速度を比較するため、細胞増殖率の検討に用いた培養1日から6日の間における各細胞の各種材料上での倍加時間を算出し

表2 各群における付着形態の分類

	I	I+II	I+III	II	II+III	III
HA群	3 (38%)	—	3 (38%)	1 (13%)	1 (13%)	—
WT群	—	1 (10%)	—	5 (50%)	4 (40%)	—
PT群	—	1 (9%)	2 (18%)	4 (36%)	4 (36%)	—
対照群	7 (100%)	—	—	—	—	—

タイプI：結合組織性付着もしくはそれに類似するもの
 タイプII：被包型の結合組織
 タイプIII：オッセオインテグレーションあるいはアンキロシス

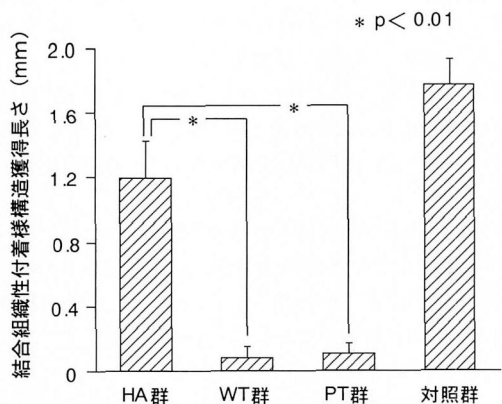


図11 結合組織性付着様構造獲得長さ (平均値±S.E.)
HA群は、WTおよびPT群に比較して有意に高い結合組織性付着様構造獲得長さを示した ($p < 0.01$)。対照群は、約 1.8 mm の高い結合組織性付着様構造獲得長さを示した。

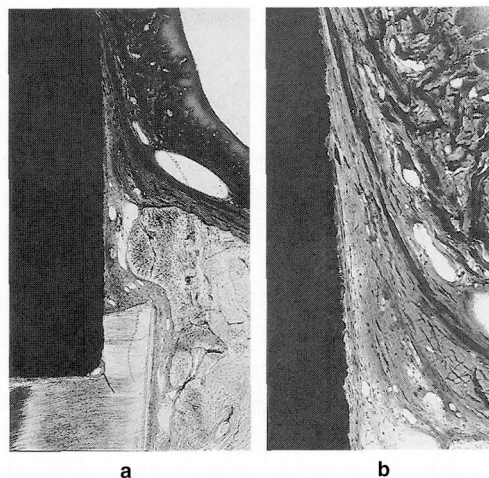


図12 膜無群の代表的組織像

a : 残存 PDL 近接する部位では、膜有群でみられたと同様の結合組織性付着構造が観察された (トルイジンブルー染色 $\times 40$)。
b : a の拡大。骨吸収部位は、密な菌肉由来結合組織によって被包されていた (トルイジンブルー染色 $\times 100$)。

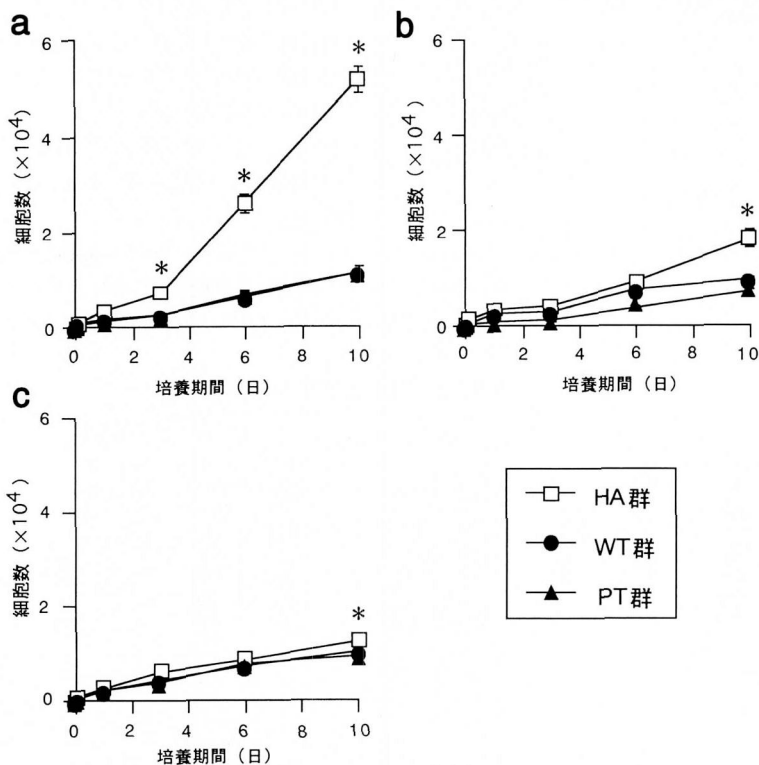


図13 PDL由来細胞, FOBおよびGFにおける各支台材料上の細胞増殖率 (平均値±S.E.)
a : PDL由来細胞における各支台材料上の細胞増殖率
b : FOBにおける各支台材料上の細胞増殖率
c : GFにおける各支台材料上の細胞増殖率
* : HAとWTおよびPTそれぞれの間に有意差 ($p < 0.05$) のあることを示す

た。PDL由来細胞では、HA群がWTおよびPT群よりも倍加時間が短くなる傾向を示したのに対し、FOBおよびGFではHA群がWTおよびPT群よりも倍加時間が長くなる傾向を示した(表3)。

表3 各種支台材料上における細胞倍加時間

	PDL由来細胞	FOB	GF
HA群	1.68	3.35	3.07
WT群	2.52	2.89	2.74
PT群	2.22	2.43	2.74

(H)

2. 各種支台材料上におけるALP活性

培養10日ならびに20日目の各細胞のALP活性は、FOBおよびPDL由来細胞で高値であったが、GFではほとんど活性が認められなかった。各種支台材料群間

ではいずれの細胞でもこれらの値に有意差を認めなかった(図14a, b, c, d)。

3. 各種支台材料上における細胞形態

PDL由来細胞、FOBならびにGFの各種支台材料への付着形態は、培養直後では支台材料の表面構造によるとみなされる差を示していたが、培養6日ではほぼコンフルエントになるとともに細胞形態にも各細胞間で大きな差は認められなくなっていた。

HA上では、培養1日において各細胞が材料に密着していた(図15a, b, c)。培養6日になると扁平化した細胞が互いに密接し、写真上では細胞形態を判別しづらい状態であった(図15d, e, f)。WTおよびPT上では、培養1日において各細胞が材料表面の凹凸に沿って橋渡しをするように細胞突起を伸ばし接着していた(図15g, h, i, m, n, o)。ほぼコンフルエントになった培養6

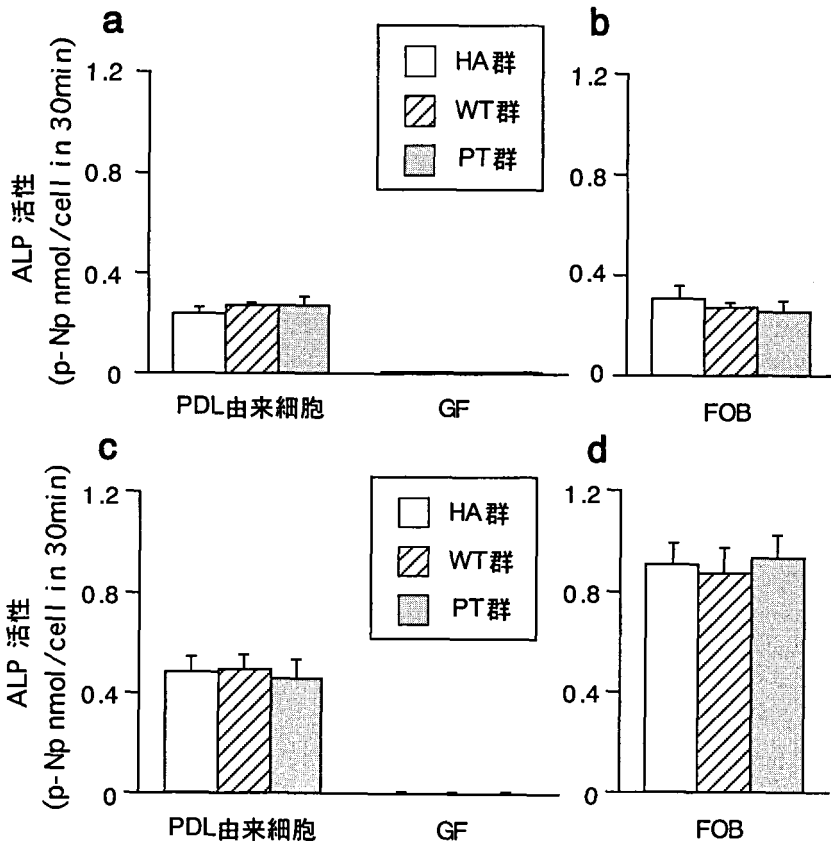


図14 各支台材料上におけるPDL由来細胞、GFおよびFOBのALP活性(平均値±S.E.)

いずれの細胞においても、材料間にALP活性の差は認められなかった。

- a: 培養10日目のPDL由来細胞およびGFのALP活性
- b: 培養10日目のFOBのALP活性
- c: 培養20日目のPDL由来細胞およびGFのALP活性
- d: 培養20日目のFOBのALP活性

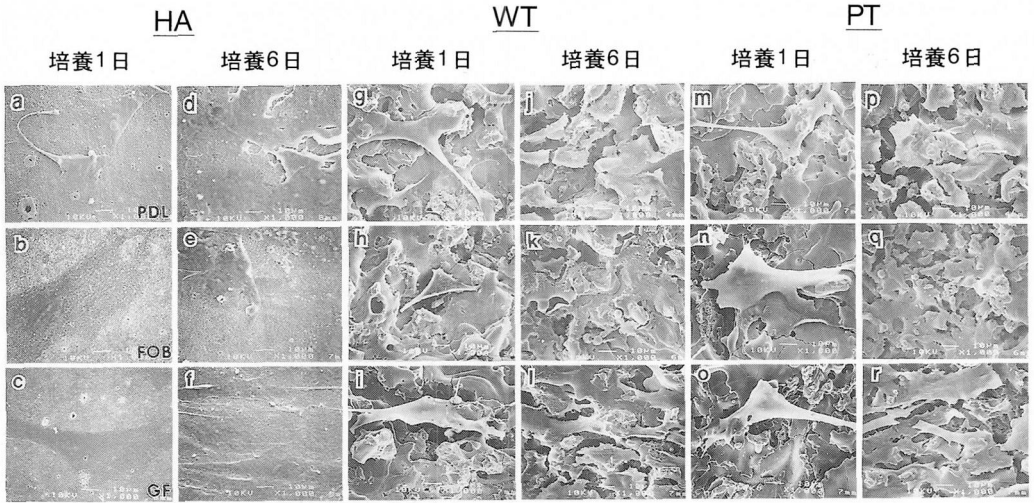


図15 各種材料上におけるPDL由来細胞, FOBおよびGFのSEM像(×1000)
 上段. PDL由来細胞
 中段. FOB
 下段. GF

日では, 扁平化した細胞が密に接着しあって増殖していた(図15j, k, l, p, q, r)が, HAほど密接せず, 写真上で個々の細胞形態を確認できた。

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

本研究の重要な手技である支台築造等の処置を行うにあたり, 歯根が十分な径を有すること, 長期間飼育可能であること, 術後の口腔管理が容易であること等が必須要件であると考えられ, これらの点からビーグル成犬を実験動物として選択した。

現在, 支台築造材料としては主に銀合金や金合金が臨床において使用されている。これらは casting による成型が可能であり, 根面窩洞に対して良好な適合を示し, 上部構造物を維持するための十分な強度を備えている。しかしながら, これらの多くは合金系非生体材料であり, 材料表面への結合組織性付着の獲得は期待できない。そこで本研究では, 結合組織性付着形成の可能性がある材料として, HA, WT および PT を選択した。HA は組成が生体硬組織の主成分と類似しており, 生体適合性に優れた材料として知られている。最近では, 歯科用インプラント材料としても臨床応用されており^{31,32}, Takata らは根面窩洞の実験モデルにおいてHAに結合組織性付着形成を生じることを明らかにしている²³⁻²⁵。また, 純チタンであるPTおよびWTも生体適合性に優れ, すでに歯科インプラントに臨床応用さ

れている。PTはチタン製の母材にチタン粉末を溶融しつつ衝突させ固化させたもので, この処理によってチタン表面を適度に粗造にするとともに表面積を拡大し, 生体適合性はさらに向上している³³⁻³⁵。Buser らは, 歯根に接触するように埋入したPT製インプラント上に結合組織性付着形成が誘導されたことを報告している^{26,27}。WTはワイヤ放電加工法を施したチタンでPTと似た表面形態を示し, より生体親和性に優れている³⁶⁻⁴⁰。この加工法は, 金属ワイヤを電極として用い, 被加工物との間を数 μm まで接近させ, 火花(放電柱)を安定的に繰り返し発生させることによって, 非接触の状態では被加工物の微小領域を溶融する方法である。チタンは一般的に表面に酸化チタン層を形成するため耐蝕性が優れていることが知られ, この層がチタンの生体親和性に関与すると考えられている⁴¹。従来のチタンでは酸化チタン層が5-20nm厚程度であったが, ワイヤ放電加工法で処理した場合, 1 μm 以上の厚さに達するため, 耐蝕性に優れ, 骨に対する親和性も向上している³⁶⁻⁴⁰。そこでWTにも結合組織性付着形成の可能性を期待して, 被験材料の一つとして選択した。なお, 本加工法によるオッセオインテグレートッドタイプの歯科インプラントについても臨床応用が開始されている。以上のように本研究では, 支台材料としての強度ならびに生体適合性を考慮し, 結合組織性付着形成を期待できる3種類の支台材料について検討を行った。

2. 実験方法について

実験 1

Lindhe らは、サルの上顎歯根を用いて本実験における対照群と同様に、歯根半分の高さまでセメント質、PDL、歯槽骨内面を除去し、欠損部象牙質表面に結合組織性付着が残存 PDL 由来細胞によって形成されることを報告している¹⁵⁾。本研究では、彼らの実験デザインを参考に、露出象牙質部分を人工材料に置き換えることにより各種支台材料表面への結合組織性付着形成の有無を検討した。

本研究のための予備実験として、平坦な歯根形成面に支台材料を維持するためのチタン製ポストを併用して支台の合着を試みた。その結果、支台材料と歯根との安定した適合状態を得ることが困難であったので、次に支台材料と同径のバーを用いて窩洞を歯根面に形成、その窩洞に支台材料を埋め込む方法を考案した。この方法では、支台材料と歯根との接合部に段差が生じる(図 1e, f)ので、理想的な支台形態とはいえないが、細胞の増殖に必須と考えられる支台の歯根形成面との適合性ならびに安定した維持を獲得することができた。また、今回用いた支台築造法は、支台材料と歯根との適合を安定化すると同時に、ポストの無い材料に対しても十分な維持力を与えることが予備実験で明らかになったので、中空形態の付与が困難な HA についてはポストを併用せず、高さを 2.5 mm として WT や PT よりも約 0.5 mm 深く歯根に支台を挿入することにより維持を図った。PT および WT 群ではチタンという材質のため非脱灰研磨標本の作製を余儀なくされたので、対照群においても非脱灰研磨標本作製した。一方、HA 群では脱灰標本の作製が可能であり、連続切片による詳細な形態観察を行うことができた。

なお、支台材料の直径は、実験動物の歯根の X 線写真およびマクロ標本を参考に、3 規格の直径(直径 1.8, 2.2, 2.6 mm)をそれぞれの支台材料で用意し、実験歯根のサイズに近似した材料を選択して用いた。

Karring および Nyman らは、一連の研究¹²⁻¹⁵⁾において、PDL 由来細胞が結合組織性付着形成に重要な役割を果たし、歯槽骨表面に遮蔽膜を適用することによって歯肉由来結合組織の侵入が阻止され、PDL 由来細胞が歯根表面で優先的に増殖することによって結合組織性付着形成が起こることを報告してきた。本研究においても、対象歯の半数に、PDL 由来細胞の増殖を選択的に誘導する目的で遮蔽膜を適用し、非適用例との比較検討を行った。

実験 2

Melcher は、歯周外科処置後の歯周組織の治癒過程において、歯根表面に増殖する細胞の種類によって付

着様式が決まるという仮説¹¹⁾を発表した。この説では、上皮細胞が増殖すると長い接合上皮が形成され、歯肉結合組織由来細胞が増殖すると歯根吸収が起こり、骨細胞が優位になるとアンキローシスが発生するが、PDL 由来細胞が増殖してくると結合組織性付着が形成されるとしている。実験 1 の支台材料間でみられた付着形態の違いをもたらす要因が、支台材料表面に増殖してくる細胞の種類に依存しているのか、あるいは増殖してきた細胞の機能に対する支台材料の影響によるのか等を明らかにするため、各支台材料表面における PDL 由来細胞、FOB および GF の増殖率を比較するとともに、硬組織形成細胞への分化の指標としての ALP 活性の測定、ならびに SEM による細胞形態の観察を行った。実験には既に培養法が確立しており、それぞれの細胞特性を *in vitro* でもある程度保持することが確認されているラットの PDL、骨および歯肉由来の細胞を用いた^{29, 42, 43)}。また、これまで人工材料上における歯周組織細胞の増殖率に関する検討はほとんどみられないが、歯周組織の創傷治療過程において肉芽組織が 7 日位で歯根表面を覆うとされている²⁸⁾ことから、細胞増殖初期における増殖速度の比較のため、培養 1 日から 6 日の間の倍加時間を算出した。

II. 研究結果について

支台材料周囲の骨レベルは、材料の種類に関わらず膜無群が多様な骨レベルを示したのに対し、膜有群ではほぼ術前の骨レベルが維持されていた。膜無群では支台周囲に存在する骨に、抜歯窩周囲の骨縁にみられると同様のリモデリングに伴う骨吸収が起こると同時に、骨形成能を欠いた歯肉結合組織由来細胞が骨縁部で増殖し、そのため骨レベルが低下したと考えられる。また、実験歯周囲には各歯に固有の骨幅径があり、そのため支台周囲に残存する骨の厚さに個体差があったことによることも推測される。これに対し膜有群では、Karring および Nyman らが明らかにした¹²⁻¹⁵⁾ように、遮蔽膜によって歯肉結合組織由来細胞の侵入が排除され、支台周囲に骨形成能を有する骨および PDL 由来細胞の増殖が誘導された結果、リモデリング現象に伴う骨吸収が発生しても、遮蔽膜に沿って骨再生が起こり、結果として骨レベルが維持されたものと考えられる。

とくに HA 群の支台表面における周囲組織の付着形態には、結合組織性付着様構造を伴う場合が多かった。この所見は、HA 上に結合組織性付着形成を観察した Takata らの報告²³⁻²⁵⁾によく一致している。しかし、彼らの実験系では根面に埋入された HA ブロックの全面にわたって結合組織性付着が認められたのに対し、今

回の実験ではセメント質様基質の沈着が部分的にはみられたものの、材料全面を覆うセメント質様組織の形成は観察されなかった。Takataらの根面窩洞内にHAの小ブロックを埋入した実験モデル²³⁻²⁵⁾では、PDL由来細胞の供給源であるPDLが人工材料の全周に存在したのに対して、今回の実験では、支台材料の根尖側に残存する歯根周囲にしかPDLは存在しておらず、結果に差を生じたものと推察できる。

一方、WTおよびPT群の支台材料表面における付着形態は類似しており、結合組織性の被包が最も多くみられた。この結果は、チタン製インプラント表面に結合組織性付着を認めたBuserらの所見^{26,27)}とは異なるものであった。彼らの実験は、歯根に接触するようにインプラントを埋入することによって結合組織性付着を誘導したものであり^{26,27)}、本研究に比較して、人工材料周囲にPDLが豊富に存在し、PDL由来細胞の増殖が容易であったと考えられる。また、Buserらのモデルは、外科的侵襲に乏しい閉鎖系骨内欠損モデルであり、創傷治癒が容易に起こる環境であったことから付着形態の差を説明できるかもしれない。

対照群では、全例に結合組織性付着が形成されており、最も大きな結合組織性付着様構造獲得長さが示された。この結果は、象牙質が人工材料よりも結合組織性付着誘導能に富むためと考えられる。事実、象牙質には種々の細胞成長因子が存在することが明らかにされつつあり⁴⁴⁻⁴⁶⁾、これらがPDL由来細胞の増殖、分化を促進し、象牙質表面への結合組織性付着形成を促した可能性がある。一方、対照群ではアンキローシスを示す例が皆無であったのに対し、HA、WTおよびPT群の一部では、軟組織を介さないオッセオインテグレーション型の付着様式が観察された。このことから、象牙質に含まれる因子には、成長因子のみならず歯周組織再生を誘導した際に骨組織の過剰な増殖を防げる物質も存在するのかもしれない⁴⁷⁾。

膜無群では様々な程度の骨吸収が起こっていたが、残存した骨レベル内での付着形態は、膜有群と同様であった。残存するPDLに近い部分ではPDL由来細胞が優位に増殖してくる結果、膜有群と同様の付着形態を生じたのであろう。

実験2では、*in vitro*で各種支台材料上におけるPDL由来細胞、FOBおよびGFの細胞増殖率ならびにALP活性を検索した。その結果、PDL由来細胞においてHA群が増殖初期よりWTならびにPT群に比較して有意に高い細胞増殖率を示し ($p < 0.05$)、培養初期の増殖速度に関しても、PDL由来細胞はHA群が速やかに増殖する傾向を示した。また、FOBおよびGFでも、培養10日目にHA群がWTならびにPT群に比較して

有意に高い値を示した。細胞によって培養条件が異なるため直接的な比較はできないが、FOBやGFのHA上における増殖傾向はPDL由来細胞のものほど高くはなかった。一方、ALP活性については、材料間で有意差を認めなかった。前述のようにPDL由来細胞のみに結合組織性付着形成能があることと考え併せると、HAはPDL由来細胞の増殖により適した材料であり、実験1でみられた材料間での付着形態の差にも、支台材料表面における細胞増殖率の差が1つの要因となっている可能性がある。HA上で各種細胞とりわけPDL由来細胞が他の材料に比較して高い増殖傾向を示した理由については明らかではないが、HAの高いタンパク吸着能が細胞の接着、増殖を促進した可能性が考えられる⁴⁸⁻⁵⁰⁾。HA表面に吸着したタンパクを利用してPDL由来細胞が増殖しやすい環境にあったことが推測される。

Ⅲ. 今後の展望について

本研究結果より、歯根上に築造される支台材料に対してもPDL由来細胞を誘導することにより結合組織性付着を獲得できる可能性が示唆された。また、支台材料の種類によって結合組織性付着の程度に差があることも示された。HAがチタンよりも結合組織性付着様構造を得ることが多かったが、その全面に結合組織性付着だけを誘導することはできなかった。しかしこの結果は、支台材料表面に結合組織性付着を形成する試みを否定するものではない。新しい治療法として、この考えを発展させるためには、支台表面にさらに結合組織性付着形成を促進する方法を検討する必要がある。

最近、さまざまな細胞成長因子がPDL由来細胞の増殖を促進することが*in vitro*の実験で明らかにされ⁵¹⁻⁵³⁾、*in vivo*の動物実験でもその歯周組織再生への効果が報告され始めている⁵⁴⁻⁵⁷⁾。また、歯周病患者を対象としたHowellらの報告⁵⁸⁾でも、PDGF-BB、IGF-Iの混合投与によって、高い骨再生率が認められている。したがって、細胞成長因子を応用することによって、生体材料を用いた支台材料上にもより確実に結合組織性付着形成が得られる可能性は十分にあるだろう。また、歯の硬組織中に存在する接着性タンパク、細胞成長因子⁴⁴⁻⁴⁷⁾特にエナメル質タンパクであるアメロゲンinは歯周組織の発生に関与するので、歯周再生療法へ応用されつつある⁵⁹⁻⁶²⁾。これらの歯の硬組織由来物質の支台表面への応用も今後の興味深い検討事項であらう。

一方、PDL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もあり^{63,64)}、培養したPDL由来細胞を適用することによっても支台材料表面に広範囲に結合組織性付着が獲得さ

れることも期待される。

IV. 結 論

結合組織性付着を有する新しい支台築造法を開発するための基礎的データを得ることを目的として、ビーグル成犬の歯根にHA, WTおよびPTの支台を築造し、それらの材料表面にPDL由来細胞の増殖を誘導することにより、結合組織性付着が形成されるか否かを組織学的に検討した。さらに、各種支台表面にみられた付着形態の差異がどのような因子に依存しているかを検討するため、PDL由来細胞、FOBおよびGFの培養細胞を用いて各種支台材料上における細胞増殖率、ALP活性ならびに細胞形態について比較検討し、以下の知見を得た。

1. いずれの支台材料においても、遮蔽膜を用いることによって、支台周囲への歯肉結合組織由来細胞の増殖が阻止され、PDL由来細胞の増殖が誘導されることによって、支台周囲の歯槽骨頂の位置が維持された。

2. HAの支台表面には、セメント基質様物質が沈着し、コラーゲン線維が材料面と垂直に走行している結合組織性付着様構造が主に形成されていた。一方、WTおよびPTの支台表面では、コラーゲン線維が材料面と平行に走行しており、結合組織による被包が主に形成されていた。

3. 各種支台材料上における細胞増殖率については、PDL由来細胞がHA上において早期より高い増殖傾向を示したが、ALP活性ならびに細胞形態については細胞、材料の種類による有意な差は認められなかった。このことから、*in vivo* 実験系でみられた支台材料間での付着形態の差異には、PDL由来細胞の増殖率の差が反映されている可能性が示唆された。

4. 対照群の全例で結合組織性付着が広範囲に得られた。

以上、本研究結果は、このたびの実験モデルが各種支台材料への結合組織性付着形成の検討に有用であることを示すとともに、結合組織性付着を有する新しい支台築造法開発の可能性を示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科補綴学第一講座赤川安正教授に心より感謝の意を表します。本研究の論文の作成上、それぞれ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並びに本学歯科保存学第二講座栗原英見教授に深謝いたします。

さらに、本研究の遂行および論文作成にあたり、直

接の御指導を賜りました本学口腔病理学講座高田隆助教授に心より感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、実験材料を提供して頂きました昭和大学歯学部歯科理工学講座宮崎隆教授、株式会社GCならびに京セラ株式会社に感謝の意を捧げますとともに、御助言、御協力を頂きました本学歯科補綴学第一講座並びに本学口腔病理学講座の方々、特に研究遂行に御助力頂きました、歯科補綴学第一講座菊崎健司先生、卜部雅嗣先生、歯科保存学第二講座金田俊彦先生、口腔病理学講座竹腰利嗣先生ならびに昭和大学歯学部歯科理工学講座李元植先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Heithersay, G.S.: Combined endodontic-orthodontic treatment of transverse root fractures in the region of the alveolar crest. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **36**, 404-415, 1973.
- 2) Simon, J.H.S., Kelley, W.H., Gordon, D.G. and Ericksen, G.E.: Extrusion of endodontically treated teeth. *J. Am. Dent. Assoc.* **97**, 17-23, 1978.
- 3) Ivey, D.W., Calhoun, R.L., Kemp, W.B., Dorfman, H.S. and Wheless, J.E.: Orthodontic extrusion: Its use in restorative dentistry. *J. Prosthet. Dent.* **43**, 401-407, 1980.
- 4) Lovdahl, P.E.: Periodontal management and root extrusion of traumatized teeth. *Dent. Clin. North Am.* **39**, 169-179, 1995.
- 5) Tegsjö, U., Valerius-Olsson, H. and Olgart, K.: Intra-alveolar transplantation of teeth with cervical root fractures. *Swed. Dent. J.* **2**, 73-82, 1978.
- 6) Kahnberg, K.E., Warfvinge, J. and Birgersson, B.: Intraalveolar transplantation. *Int. J. Oral Surg.* **11**, 372-379, 1982.
- 7) Tegsjö, U., Valerius-Olsson, H., Frykholm, A. and Olgart, K.: Clinical evaluation intra-alveolar transplantation of teeth with cervical root fractures. *Swed. Dent. J.* **11**, 235-250, 1987.
- 8) Warfvinge, J. and Kahnberg, K.E.: Intraalveolar transplantation of teeth. *Swed. Dent. J.* **13**, 229-233, 1989.
- 9) Ochsenein, C. and Ross, S.: A reevaluation of osseous surgery. *Dent. Clin. North Am.* **13**, 87-102, 1969.
- 10) Nevins, M.: Periodontal considerations in prosthodontic treatment. *Curr. Opin. Periodontol.* 151-156, 1993.
- 11) Melcher, A.H.: On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.* **47**, 256-260, 1976.
- 12) Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Planten, S.: Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.* **7**, 394-401, 1980.
- 13) 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.
- 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Gottlow, J.: Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J. Periodontol.* **64**, 1157–1165, 1993.
 - 17) Becker, W. and Becker, B.E.: Treatment of mandibular 3-wall intrabony defects by flap debridement and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. Long-term evaluation of 32 treated patients. *J. Periodontol.* **64**, 1138–1144, 1993.
 - 18) Florès-de-Jacoby, L., Zimmermann, A. and Tsalikis, L.: Experiences with guided tissue regeneration in the treatment of advance periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **21**, 113–117, 1994.
 - 19) Demolon, I. A., Persson, G.R., Ammons, W.F. and Johnson, R.H.: Effects of antibiotic treatment on clinical conditions with guided tissue regeneration: one-year results. *J. Periodontol.* **65**, 713–717, 1994.
 - 20) Cortellini, P., Pini Prato, G.P. and Tonetti, M.S.: Long-term stability of clinical attachment following guided tissue regeneration and conventional therapy. *J. Clin. Periodontol.* **23**, 106–111, 1996.
 - 21) Gouldin, A.G., Fayad, S. and Mellonig, J.T.: Evaluation of guided tissue regeneration in interproximal defects. *J. Clin. Periodontol.* **23**, 485–491, 1996.
 - 22) Machtei, E.E., Grossi, S.G., Dunford, R., Zambon, J.J. and Genco, R.J.: Long-term stability of class II furcation defects treated with barrier membranes. *J. Periodontol.* **67**, 523–527, 1996.
 - 23) Takata, T., Katauchi, K., Akagawa, Y. and Nikai, H.: New periodontal ligament formation on a synthetic hydroxyapatite surface. *Clin. Oral Impl. Res.* **4**, 130–136, 1993.
 - 24) Takata, T., Katauchi, K., Akagawa, Y. and Nikai, H.: New connective tissue attachment formation on various biomaterials implanted in roots. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **9**, 77–84, 1994.
 - 25) Takata, T., Katauchi, K., Miyauchi, M., Ogawa, I., Akagawa, Y. and Nikai, H.: Periodontal tissue regeneration on the surface of synthetic hydroxyapatite implanted into root surface. *J. Periodontol.* **66**, 125–130, 1995.
 - 26) Buser, D., Warrer, K., Karring, T. and Stich, H.: Titanium implants with a true periodontal ligament: An alternative to osseointegrated implants? *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **5**, 113–116, 1990.
 - 27) Buser, D., Warrer, K., and Karring, T.: Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J. Periodontol.* **61**, 597–601, 1990.
 - 28) Warrer, K., Karring, T. and Gotfredsen, K.: Periodontal ligament formation around different types of dental implants. I. The self-tapping screw type implant system. *J. Periodontol.* **64**, 29–34, 1993.
 - 29) Maniopoulos, C., Sodek, J. and Melcher, A.H.: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* **254**, 317–330, 1988.
 - 30) Lowry, O.H., Roberts, N.R., Wu, M.L., Hixon, W.S. and Crawford, E.J.: The quantitative histochemistry of brain. *J. Biol. Chem.* **207**, 19–39, 1954.
 - 31) Block, M.S., Gardiner, D., Kent, J.N., Misiak, D.J., Finger, I.M. and Guerra, L.: Hydroxyapatite-coated cylindrical implants the posterior mandible: 10-year observations. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **11**, 626–633, 1996.
 - 32) Evian, C.I.: A comparison of hydroxyapatite-coated micro-vent and pure titanium swede-vent implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **11**, 639–644, 1996.
 - 33) Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Dean, D.D., Cochran, D.L. and Boyan, B.D.: Effect of titanium surface roughness on proliferation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 389–401, 1995.
 - 34) Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D. and Boyan, B.D.: Surface roughness modulates the the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **32**, 55–63, 1996.
 - 35) Boyan, B.D., Batzer, R., Kieswetter, K., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D. and Schwartz, Z.: Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 77–85, 1998.
 - 36) 稲用隆史：チタンの放電加工に関する研究（第1報）チタンの放電加工特性. 歯材器 **7**, 606–621, 1988.
 - 37) 稲用隆史：チタンの放電加工に関する研究（第2報）補綴物製作への応用. 歯材器 **7**, 622–632, 1988.
 - 38) 宮崎 隆, 藤森伸也, 李 元植, 板橋勇人：ワイヤ放電加工処理チタンの表面微小形状. 歯材器 **14**, 131–135, 1995.
 - 39) 板橋勇人, 宮崎 隆, 藤森伸也, 李 元植：異なっ

- た微小表面性状を有するチタン表面上での骨芽細胞様細胞の初期動態について. 歯材器 14, 136-141, 1995.
- 40) 藤森伸也: 種々の微小表面形状を付与したチタン板の表面分析並びにその表面上での骨芽細胞様細胞の増殖と分化に関する研究. 歯材器 14, 155-168, 1995.
 - 41) Kasemo, B.: Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. *J. Prosthet. Dent.* 49, 832-837, 1983.
 - 42) 高田 隆, 宮内睦美, 伊集院直邦, 二階宏昌, 森下真行: ラット臼歯部歯周韧带由来初代培養細胞の形態学的観察. 日歯周誌 34, 145, 1992.
 - 43) 高田 隆, 宮内睦美, 伊集院直邦, 二階宏昌: ラット臼歯部歯周韧带由来初代培養細胞の形態学的観察. コラーゲンゲル包埋培養法による観察. 日歯周誌 35, 153, 1993.
 - 44) Finkelman, R.D., Mohan, S., Jennings, J.C., Taylor, A.K., Jepsen, S. and Baylink, D.J.: Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- β in human dentin. *J. Bone Miner. Res.* 5, 717-723, 1990.
 - 45) Harada, K., Oida, S., Sasaki, S. and Enomoto, S.: Chondrocyte-like colony formation of mesenchymal cells by dentin extracts in agarose gel culture. *J. Dent. Res.* 69, 1555-1559, 1990.
 - 46) Linde, A. and Goldberg, M.: Dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 679-728, 1993.
 - 47) Takata, T., D'Errico, J.A., Atkins, K.B., Berry, J.E., Strayhorn, C., Taichman, R.S. and Somerman, M.J.: Protein extracts of dentin affect proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells, *in vitro*. *J. Periodontol.* 69, 1247-1255, 1998.
 - 48) Bagambisa, F.B., Joos, U. and Schilli, W.: The interaction of osteogenic cells with hydroxylapatite implant materials *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 5, 217-226, 1990.
 - 49) Hjørtting-Hansen, E., Worsaae, N. and Lemons, J.E.: Histologic response after implantation of porous hydroxylapatite ceramic in humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 5, 255-263, 1990.
 - 50) Okamoto, K., Matsuura, T., Hosokawa, R. and Akagawa, Y.: RGD peptides regulate the specific adhesion scheme of osteoblasts to hydroxyapatite but not to titanium. *J. Dent. Res.* 77, 481-487, 1998.
 - 51) Terranova, V.P., Odziemiec, C., Tweden, K.S. and Spadone, D.P.: Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. *J. Periodontol.* 60, 293-301, 1989.
 - 52) Dennison, D.K., Vallone, D.R., Pinero, G.J., Rittman, B. and Caffesse, R.G.: Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 65, 641-648, 1994.
 - 53) Nishimura, F. and Terranova, V.P.: Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. *J. Dent. Res.* 75, 986-992, 1996.
 - 54) Sigurdsson, T.J., Lee, M.B., Kubota, K., Turek, T.J., Wozney, M. and Wikesjö, U.M.E.: Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J. Periodontol.* 66, 131-138, 1995.
 - 55) Park, J.B., Matsuura, M., Han, K.Y., Norderyd, O., Lin, W.L., Genco, R.J. and Cho, M.I.: Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J. Periodontol.* 66, 462-477, 1995.
 - 56) Giannobile, W.V., Hernandez, R.A., Finkelman, R.D., Ryan, S., Kiristy, C.P., Andrea, M. and Lynch, S.E.: Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J. Periodont. Res.* 31, 301-312, 1996.
 - 57) Ripamonti, U. and Reddi, A.H.: Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8, 154-163, 1997.
 - 58) Howell, T.H., Fiorellini, J.P., Paquette, D.W., Offenbacher, S., Giannobile, W.V. and Lynch, S.E.: A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J. Periodontol.* 68, 1186-1193, 1997.
 - 59) Hammarström, L.: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J. Clin. Periodontol.* 24, 658-668, 1997.
 - 60) Hammarström, L., Heijl, L. and Gestrelius, S.: Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J. Clin. Periodontol.* 24, 669-677, 1997.
 - 61) Gestrelius, S., Andersson, C., Johansson, A., Persson, E., Brodin, A., Rydhag, L. and Hammarström, L.: Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. *J. Clin. Periodontol.* 24, 678-684, 1997.
 - 62) Gestrelius, S., Andersson, C., Lindström, D., Hammarström, L. and Somerman, M.: *In vitro* studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J. Clin. Periodontol.* 24, 685-692, 1997.
 - 63) 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.
- 64) 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.