

インプラント表面への歯周靭帯様組織形成に 関する実験的研究

ト 部 雅 嗣

An Experimental Study on Periodontal Ligament-like Tissue Formation on Dental Implants

Masaji Urabe

(平成11年1月19日受付)

緒 言

Brånemark らは1965年より始めた多くの基礎的ならびに臨床的研究結果に基づいて、口腔インプラント表面に生きている骨組織が直接接触するいわゆるオッセオインテグレーションが口腔インプラントの長期間の成功を予知できる界面構造であると提唱した¹⁾。その後、この考えが多くの他国の医療機関において検証され、オッセオインテグレーション界面を有するインプラントが長期にわたり良好な臨床成績を示すことが明らかにされてきた²⁻⁴⁾。そこで現在では、オッセオインテグレートッドインプラント、すなわち骨支持型インプラントが最も成功率の高い口腔インプラントであると認識されている。しかしながら、この骨支持型インプラントにおいては、咬合機能から生じる荷重が直接骨組織に伝達されるため荷重の制御が十分ではなく、過重負担によるインプラントのコンポーネントの疲労破折^{5,6)} やインプラント周囲骨の吸収⁷⁾ などの問題点が指摘されている。またインプラントと連結された天然歯の圧下⁸⁻¹⁰⁾ やインプラントに隣在する、あるいは対合する天然歯に動揺がみられる⁹⁾ などの合併症も報告され、天然歯列と共存する口腔インプラントにはいまだに解決されなければならないいくつかの問題が残されている。さらに、骨支持型インプラントが口腔内の加齢変化に順応できるか否かについても今日までほとんど明らかにされていない。

そこで、これらの問題点を解決する方法として、イ

ンプラント体やその上部構造に緩衝機構を設ける試みがなされたが^{11,12)}、歯周組織のもつ生理的機能を代償することはできず、完全な問題の解決には至っていない。口腔インプラント周囲にオッセオインテグレーションとは異なり天然歯歯周組織と同様の生理的ならびに生体力学的機能を備えた支持機構を付与できれば、口腔インプラントに加わる機能圧の受容と制御に関する上記のさまざまな問題点が解決されると期待される。加えて、この口腔インプラントが天然歯と同様の支持組織を有することで、天然歯列内で残存天然歯とよく共存でき、長期にわたり天然歯列が保全できると考えられる。

インプラント周囲に天然歯と同様の支持組織を確立することを目指す試みは、Buser ら^{13,14)} および Warrer ら¹⁵⁾ によってなされ、そこでは、歯根に接触させて埋入した純チタンインプラント表面にコラーゲン線維束の挿入を伴うセメント質が新生されることが示されている。また、開窓状骨欠損を形成し歯根窩洞内に埋入された生体材料表面に歯周靭帯の誘導を試みた Takata らの報告¹⁶⁾ では、チタン合金やジルコニア表面は線維性結合組織で被覆されるのに対して、ハイドロキシアパタイトや生体ガラス表面には結合組織性付着が形成され、生体活性材料表面にセメント質の添加を伴った歯周靭帯様組織が形成される可能性が明らかにされている。しかし、前述の Buser らのモデル^{13,14)} では生体不活性材料の純チタン表面に歯周靭帯様組織が形成されているとともに純チタン以外の材料は用いられておらず、Takata ら¹⁶⁾ の示唆する材料による生体活性の相違が歯周靭帯様組織形成に影響を及ぼすか否かは明らかにされていない。また、Takata らのモデル¹⁶⁾ と異なり埋入された生体材料は骨組織に近接していることか

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座（主任：赤川安正教授）本論文の要旨は、平成9年6月の第30回広島大学歯学部歯学会総会および平成9年10月の第98回日本補綴歯科学会学術大会において発表した。

ら、表面への骨形成速度および骨形成量に優れる生体活性材料^{17,18)} 周囲では歯周靭帯様組織が形成されない可能性も考えられる。

本研究では、天然歯と同様の支持組織を備えた口腔インプラントを開発するための基礎的知見を得ることを目的として、骨組織が近接する条件下で材料の異なるインプラント表面における歯周靭帯様組織形成能を、主として組織学的ならびに組織形態計測学的立場から検討した。

材料ならびに方法

I. インプラント材料

インプラント材料はチタン合金 (Ti-6Al-4V) インプラント (以下, TA と略す) およびハイドロキシアパタイトコーティングインプラント (以下, HA と略す) の2種類とし、それぞれ同一形状を備えたスクリュータイプインプラント (STERI-OSS[®], 直径 3.25 mm, 長さ 8 mm, A BAUSCH & LOMB Company) を用いた (図 1)。

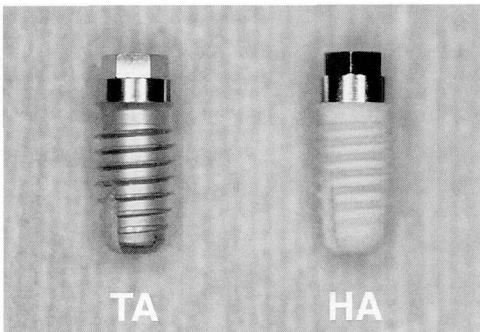


図 1 本研究で用いたインプラント材料。

表面の異なる材質で同一形状を有する市販のスクリュータイプインプラント (STERI-OSS[®], 直径 3.25 mm, 長さ 8 mm) を用いた。

(左: TA. チタン合金インプラント, 右: HA. ハイドロキシアパタイトコーティングインプラント)

II. 実験動物および歯周靭帯様組織形成モデル

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。

実験動物には1年齢雄性ビーグル犬 (広島実験動物) 3頭 (体重 9-10 kg) を用いた。まず前処置として、埋入するインプラントの歯髄への接触を防ぐため動物の下顎左右第1, 第2, 第3, 第4小臼歯を抜髄, 水酸化カルシウム製剤 (Sealapex[®], Kerr) を用いて根管充填後, 光重合レジン (クリアフィル[®] AP-X, クラレ) を築盛して同歯に歯冠修復を施した。1週後に、これ

ら左右8小臼歯の舌側に歯肉溝切開を加えて粘膜骨膜弁を形成し、露出した歯槽骨に外科用インスツルメント (The STERI-OSS Dental Implant System, A BAUSCH & LOMB Company) を用いてドリリングを行い、深さ 9 mm の骨窩を左右に3個ずつ形成した。この際、滅菌生理食塩水による注水を十分に行い、さらに同歯周囲のデンタルX線写真を参考にしながら、埋入するインプラントが隣接する歯根にできるだけ広範囲に接触するよう留意した。骨窩を形成後、窩側壁にタップ形成用ドリルを用いてタップを付与し、その後に、インプラントを手圧にてねじ込んだ (図 2)。埋入するインプラントは左側に TA, 右側に HA とし、各々3本ずつ埋入した。埋入後、各インプラントにヒーリングスクリューを装着 (図 3)、翻転してあった粘膜骨膜弁を戻しながら同部を完全に被覆した後、縫合した。その後、インプラントと歯根との接触を確認するため、埋入部のデンタルX線撮影を行った (図 4)。以上の小臼歯の歯内療法およびインプラント埋入処置はいずれも、硫酸アトロピン (硫酸アトロピン注射液タナベ[®], 田辺製

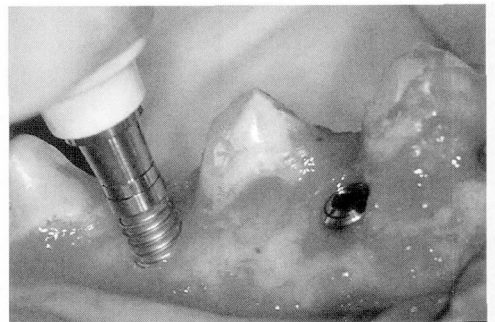


図 2 インプラントの埋入時。

インプラント埋入窩を左右第1, 第2, 第3, 第4小臼歯間部に形成後、隣接する歯根に広範囲に接触するようインプラントを埋入した。



図 3 インプラントの埋入直後。

インプラントは各小臼歯歯冠に接触しないよう、舌側寄りから埋入されている。



図4 インプラント埋入直後のデンタルX線写真。
各インプラントは隣接する歯根に接触して埋入されていることを確認できる。

薬) 0.05 mg/kg, 塩酸クロルプロマジン (コントミン[®], 吉富製薬) 1.0 mg/kg および塩酸ケタミン (動物用ケタラール[®] 50, 三共) 20 mg/kg の筋肉内注射ならびにペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®] 注射液, ダイナポット) の静脈内注射による全身麻酔とエピネフリン含有2%リドカイン (キシロカイン[®], 藤沢薬品工業) による局所麻酔を併用して行った。また, 埋入後1週間は毎日, 感染防止のためセフェム系抗生物質セファロリジン (ケフロジン[®], 塩野義製薬) 0.25 g 力価/day を筋肉内注射し, また, 0.2% クロールヘキシジングルコネート水溶液による口腔内洗浄も併せて行った。それ以後は2日毎に, 小児用歯ブラシを用いて同水溶液による天然歯のブラッシングを観察期間終了まで継続した。動物の飼育では, 埋入3週後まではインプラント埋入部位の安静状態を確保するためイヌ用固形飼料 (DEQ[®], オリエンタル酵母工業) を温水に浸漬して作製した軟性飼料 (1日量: 250 g) を与え, その後は同じ固形飼料に変更し, 観察期間終了まで埋入したインプラント周囲の天然歯に機能圧を負荷した。

Ⅲ. 観察方法

1. 肉眼的観察

粘膜の炎症, インプラントの露出, 歯の動揺や破折および光重合レジン修復物の脱落などの有無を, 観察期間中の毎ブラッシング時に観察した。

2. 組織学的観察

埋入12週後, 塩酸ケタミン (動物用ケタラール[®] 50, 三共) 20 mg/kg の筋肉内注射による全身麻酔下に, 血液凝固阻止剤ヘパリン (ノボ・ヘパリン注 1000, 日本ヘキスト・マリオン・ルセル) 5000単位を静脈内注射後, 10%中性緩衝ホルマリン水溶液を動物の総頸動脈に注入して灌流固定した。その後下顎骨を摘出し, 10%中性緩衝ホルマリン固定液に48時間浸漬した。次いで,

固定された下顎骨から各インプラントとその近遠心側に隣接する歯根を含む部分をブロックとして切り出し, それらの非脱灰研磨標本および脱灰標本を以下の手順に従って作製した。

(1) 非脱灰研磨標本

各動物でTA および HA それぞれ3つの骨ブロックのうち無作為に2つを選択し, 上昇アルコール系列にて脱水, アセトンおよびスチレンモノマー (応研商事) にて透徹後, 減圧下でレジン系樹脂包埋材 (Rigolac 2004[®] と Rigolac 40F[®] (応研商事) を4:1に混合したもの) を浸透させながら, 60°C 恒温槽内で1日間重合して包埋した。得られたレジブロックを硬組織薄切機 (硬組織用カッティング・マシンBS-3000, EXAKT) を用いてインプラント長軸に対して平行な近遠心方向あるいは水平方向に薄切し, 約 200 μ m 厚の切片を得た。これら2種の切片より超精密硬組織研磨機 (マイクロ・グラインディングマシンMG-4000, EXAKT) を用いて約 60 μ m 厚の非脱灰研磨標本作製¹⁹⁾, これらにトルイジンブルー染色を施して光顕的に観察した。

(2) 脱灰標本

残る1つの骨ブロックについてはEDTA-塩酸脱灰液 (K-CX 脱灰液, 藤沢薬品工業) で脱灰し, インプラントと歯の界面を損傷しないようインプラントの近心舌側, 遠心舌側および頬側から替え刃 (フェザー剃刃S, フェザー安全剃刀) を用いてインプラント表面に達する切開を加えて分割した。その後, インプラントを注意深く除去し, 分割された骨ブロックの個々を通常に従いパラフィン包埋した。その後, 近遠心方向に約 6 μ m 厚の切片を作製し, これらにヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色およびオキシタラン線維染色 (Oxone[®]-aldehyde fuchsin-Halmi stain)^{20,21)} を施して光顕観察した。

3. 組織形態計測学的観察

材料間での埋入条件を比較し, さらにインプラント表面の組織形成を定量的に評価するため, すべての非脱灰研磨トルイジンブルー染色標本を用いて組織形態計測を行った。始めに標本の光顕写真 (倍率: 近遠心方向10倍, 水平方向20倍) を撮影, 得られた像を35 mm フィルムスキャナ (CanoScan 2700F, キヤノン) にてパーソナルコンピュータ (Performa 6210, アップルコンピュータ) に取り込んでデジタル化した。これらの近遠心および水平方向の組織像から, 画像解析ソフト (NIH Image) ならびにグラフィックス用ミニタブレット (ArtPad II[®], ワコム) を用いて, 以下の3通りの長さを測定した。すなわち,

A: 歯根接触長さ (インプラントと天然歯歯根が接触

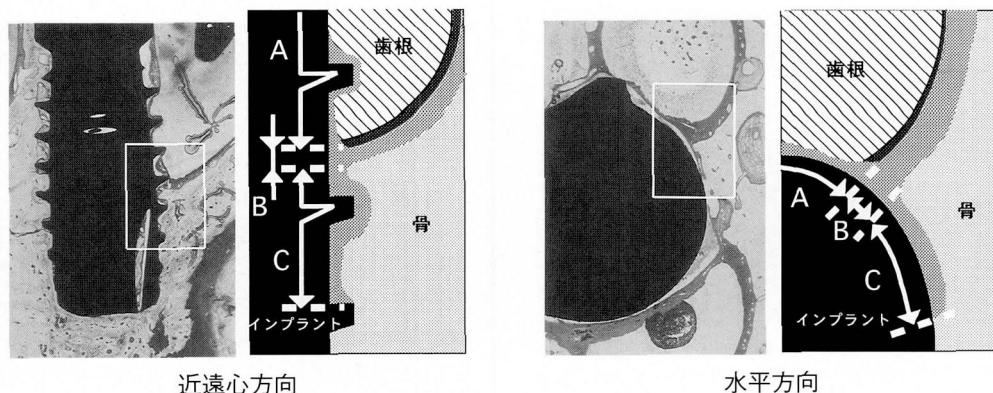


図5 非脱灰研磨標本組織像を用いた組織形態計測法を示す模式図。

各方向における非脱灰研磨標本(左図左, 右図左)をデジタル化し, 歯根接触長さ(インプラントと天然歯歯根が接触する長さ, A), 歯周靭帯接触長さ(インプラントと天然歯歯周靭帯が接触する長さ, B)および線維性結合組織形成長さ(インプラントと骨との間で天然歯歯周靭帯から連続して形成された線維性結合組織の長さ, C)を計測した。

(左図左と右図左の□は, それぞれ左図右, 右図右に模式図として示してある。

する長さ)

B: 歯周靭帯接触長さ(インプラントと天然歯歯周靭帯が接触する長さ)

C: 線維性結合組織形成長さ(インプラントと骨との間で天然歯歯周靭帯から連続して形成された線維性結合組織の長さ)

を計測した(図5)。各インプラントにおける近遠心, 水平方向でのこれらの計測値の平均を代表値とし, Studentのt検定を用いて統計学的に検討した。

4. X線学的観察

(1) コンタクトマイクロラジオグラフィー(以下, CMRと略す)

HA表面に形成されたセメント質様組織の石灰化ならびにその程度を検討するため, 非脱灰研磨標本のCMR撮影^{22, 23)}を行った。すなわち, 軟X線撮影装置(SOFTEX, 日本ソフテックス)を用い, 非脱灰研磨標本の研磨面を高解像度フィルム(SO-343, Eastman Kodak Company)に密着させ, 線源からフィルム面までの距離6 cm, 管電圧20 kV, 管電流3 mAの条件のもと, 軟X線を24分間照射した。このようにして得られたCMR像からインプラント表面におけるX線不透過性石灰化組織の存在および分布を観察し, またそのX線不透過性の程度について天然歯セメント質と比較検討した。

(2) 蛍光X線分析法

蛍光X線分析法を用いて, HA表面に形成されたセメント質様組織の元素分析を非脱灰研磨標本について行い, 同組織内のCaおよびPの局在を求めた。この蛍光X線分析にはX線分析顕微鏡(XGT-2000W, 堀場製

作所)を用い, 測定領域を同セメント質様組織を含む部位に設定し, 同部のCaおよびPの面分析を管電圧30 kV, 管電流3 mAの条件で行った。また, この測定領域においてハイドロキシアパタイトコーティング層, セメント質様組織および天然歯セメント質を通る直線を任意に設定し, その線上におけるCa, PおよびTiの線分析から, これらの組織の相違についても比較した。

結 果

1. 肉眼的所見

すべての動物は観察期間を通じて体重に減少はなく, 全身的に良好な状態を維持していた。口腔内においても, 観察期間を通じて粘膜の炎症, インプラントの露出, 歯の動揺や破折および光重合レジン修復物の脱落などは全くみられなかった(図6)。



図6 インプラントの埋入12週後。

小白歯周囲肉肉や同周辺の粘膜には炎症はみられず, またインプラントの露出も認められない。

II. 組織学的所見

埋入したすべてのインプラントは隣接する天然歯歯周靭帯に接触していた。

TAおよびHAのすべての標本において、天然歯歯周靭帯との接触部位から離れたインプラント表面では、骨が直接接触したいわゆるオッセオインテグレーションの状態が認められたが、天然歯歯周靭帯に近接する部位では、いずれのインプラント表面にも歯周靭帯から連続する線維性結合組織が形成されていた(図7A, B, 図8A, B)。

インプラントと形成された線維性結合組織との界面構造は材料間で全く異なっていた。すなわち、TA表面では線維性結合組織はインプラント表面に直接接触していたのに対し(インプラントと線維性結合組織との

隙間は標本作製時の裂隙を示す)、HA表面ではインプラントと線維性結合組織との間に天然歯セメント質と連続し、かつ一定の厚径を示すセメント質様組織が形成されていた。一方、TA、HAのいずれの場合もインプラントに接触する露出歯根象牙質表面には、セメント質と連続するセメント質様組織が形成されていた(図7A, B, 図8A, B)。

インプラント表面に形成された線維性結合組織は、TA周囲では不均一な幅径を有しコラーゲン線維束の走行は不規則であるか、あるいはインプラント表面に対し平行であった(図7C, 図8C)。一方、HA周囲では線維性結合組織の幅径は均一でコラーゲン線維束は規則的配列を示し、その一部をセメント質様組織へ垂直に挿入している像が観察された(図7D,

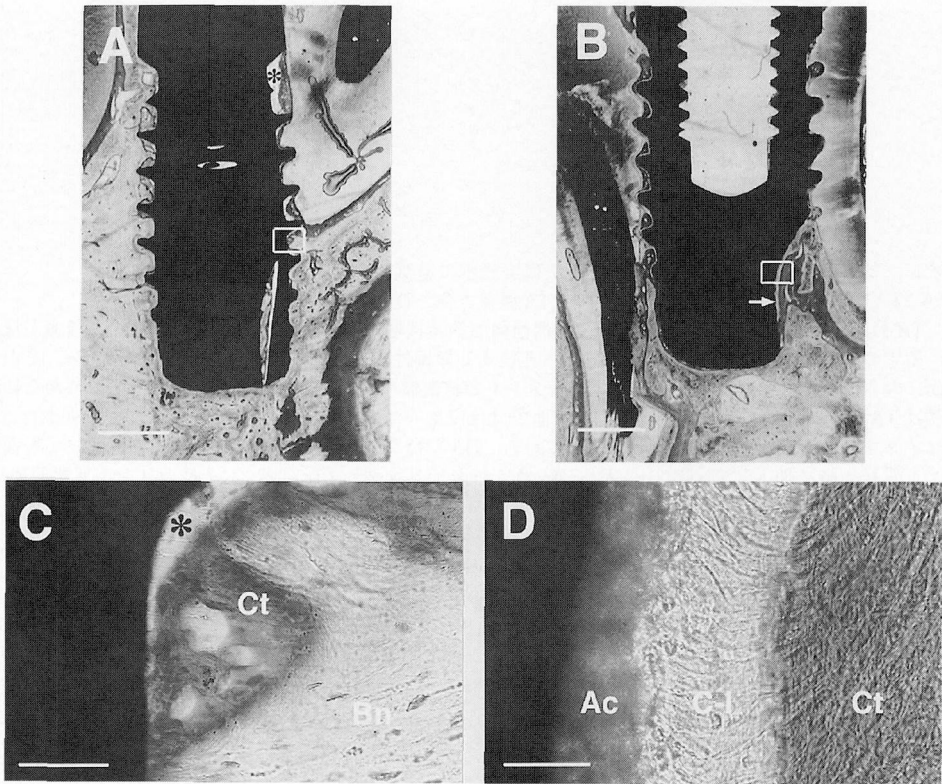


図7 インプラントの近遠心方向に薄切した非脱灰研磨標本の組織像。

(A: TA 弱拡大像, B: HA 弱拡大像, C: TA 強拡大像, D: HA 強拡大像)

TAおよびHAのいずれの表面にも、天然歯歯周靭帯接触部位から離れた部位では直接骨組織が接触しているものの近接する部位では歯周靭帯から連続する線維性結合組織が形成されている(A, B)。またHA表面にのみ天然歯セメント質から連続するセメント質様組織(矢印)の形成がみられる。線維性結合組織の幅径はTA表面では不均一であるが、HA表面ではほぼ均一である。また、コラーゲン線維束の走行はTAでは不明瞭であるのに対し、HAではこのコラーゲン線維束は規則的に配列して表面のセメント質様組織に挿入している(C, D)。Acはアパタイトコーティング層、C-1はセメント質様組織、Ctは線維性結合組織、Bnは骨、*は標本作製時の裂隙を示す。AとBの□は、それぞれC, Dに強拡大像として示している。

(トルイジンブルー染色, A, B——: 1 mm, C, D——: 50 μm)

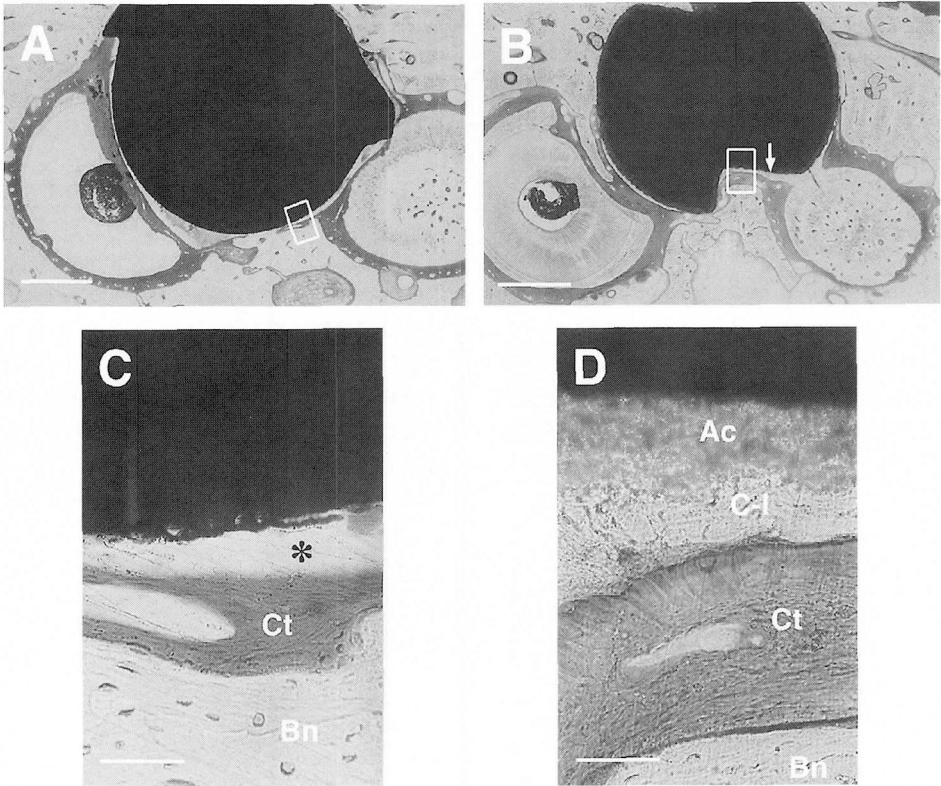


図8 インプラントの水平方向に薄切した非脱灰研磨標本の組織像。

(A: TA 弱拡大像, B: HA 弱拡大像, C: TA 強拡大像, D: HA 強拡大像)

TA および HA のいずれの表面にも、天然歯歯周靭帯接触部位から離れた部位では直接骨組織が接触しているものの近接する部位では歯周靭帯から連続する線維性結合組織が形成されている (A, B)。また HA 表面にのみ天然歯セメント質から連続するセメント質様組織 (矢印) の形成がみられる。線維性結合組織の幅径は TA 表面では不均一であるが、HA 表面ではほぼ均一である。また、コラーゲン線維束の走行は TA ではインプラント表面に対し平行であるのに対し、HA ではコラーゲン線維束は規則的に配列して表面のセメント質様組織に挿入している (C, D)。Ac はアパタイトコーティング層、C-1 はセメント質様組織、Ct は線維性結合組織、Bn は骨、* は標本作製時の裂隙を示す。A と B の □ は、それぞれ C, D に強拡大像として示している。

(トルイジンブルー染色, A, B — : 1 mm, C, D — : 50 μ m)

図8D)。

また脱灰標本において、TA 表面にはセメント質様組織はみられず線維性結合組織のみが形成されていた。一方、HA 表面には線維性結合組織とともにセメント質様組織が形成され、セメント質様組織はしばしば細胞の封入や層板構造を伴い、天然歯セメント質とほぼ同様の組織構造を呈し (図9)、さらに、オキシタラン線維染色陽性線維も挿入されていた (図10)。

III. 組織形態計測学的所見

歯根接触長さは近遠心方向および水平方向のいずれの標本においても TA および HA 間で有意差を示さなかった (図11)。また、歯周靭帯接触長さにも有意差は

なかった (図12)。

線維性結合組織形成長さを計測した結果を図13に示した。TA および HA において、それぞれ近遠心方向で 2.6 ± 0.6 mm, 3.0 ± 1.2 mm, 水平方向で 1.3 ± 1.0 mm, 1.6 ± 0.6 mm であり、いずれの方向で検討しても TA, HA 両材料間に有意差は認められなかった。

IV. X線学的所見

1. CMR 所見

高いX線不透過性を示すインプラントの表層にハイドロキシアパタイトコーティング層を示す均一幅のX線不透過像がみられ、さらにその表面には組織像で観察されたセメント質様組織に一致してX線不透過像が

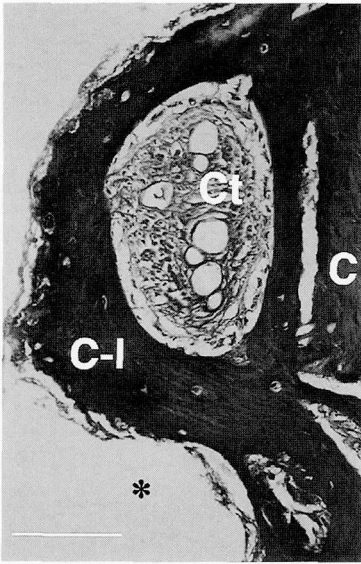


図9 脱灰標本組織像 (HA)。

形成されたセメント質様組織には細胞の封入や層板構造がみられる。C-Iはセメント質様組織、Ctは線維性結合組織、Cはセメント質、*はインプラントの存在していた部位を示す。(HE染色、—:50 μ m)

存在していた。このX線不透過性は、ハイドロキシアパタイトコーティング層より低いものの、連続する天然歯セメント質における不透過性に極めて類似しており、天然歯セメント質との間に明らかな境界は認められなかった(図14)。

2. 蛍光X線分析所見

面分析の結果、組織像で観察されたセメント質様組織およびCMRにより同部に認められたX線不透過像に一致して、CaおよびPの局在が認められた。それらCaおよびPの分布領域はいずれもハイドロキシアパタイトコーティング層と一体化していたため、セメント質様組織の特定はできなかった。しかし、ハイドロキシアパタイトコーティング層が均一な厚径であるにもかかわらず、この領域の幅は一定でなかったことから、HA表面に形成されたセメント質様組織にもCa、P両元素が局在しているとみなされた(図15)。

線分析の結果、CaおよびPの各スペクトルのX線強度はハイドロキシアパタイトコーティング層で最大値を示した。隣接するセメント質様組織においてそれら両元素はともにハイドロキシアパタイトコーティング層の約10%程度少ない値を示し、この値は天然歯セメント質に近似していた(図16)。

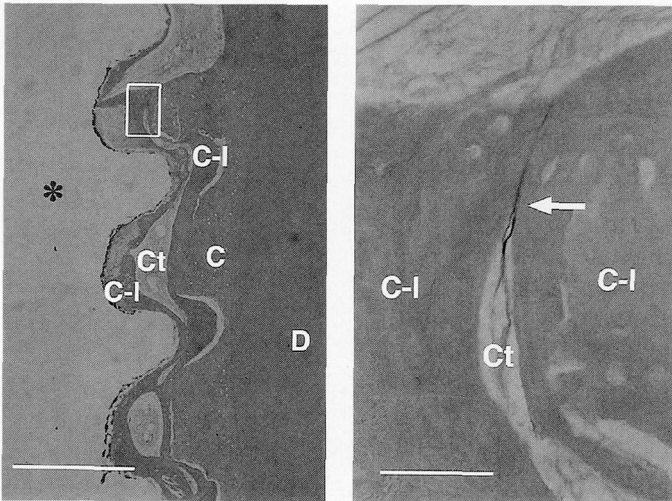


図10 脱灰標本組織像 (HA)。

(左側:弱拡大像,右側:左側□の強拡大像)

インプラント周囲にセメント質様組織と線維性結合組織が形成されており(左側),セメント質様組織内にはオキシタラン線維(矢印)の挿入がみられる(右側)。C-Iはセメント質様組織、Ctは線維性結合組織、Cはセメント質、Dは象牙質、*はインプラントの存在していた部位を示す。

(オキシタラン線維染色,左側—:500 μ m,右側—:50 μ m)

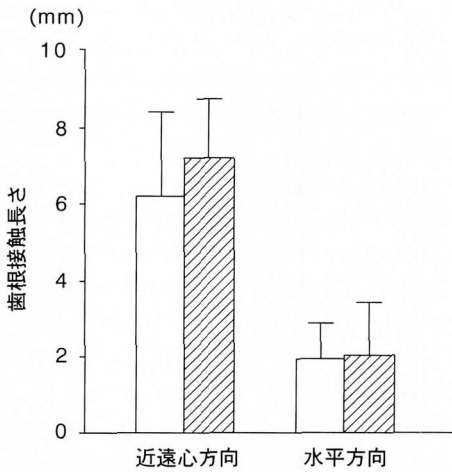


図11 近遠心あるいは水平方向でみられた歯根接触長さ。

埋入したインプラントと歯根との接触長さは、近遠心および水平方向とともに TA, HA の間で有意差は認められない。

数値は検討したインプラント (3本) の平均値と S.D. を示す。

(□ : TA, ▨ : HA)

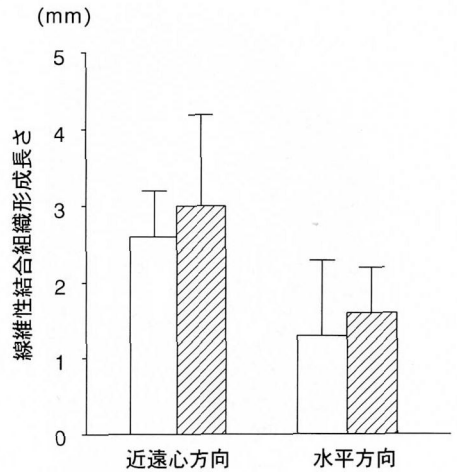


図13 近遠心あるいは水平方向でみられた線維性結合組織形成長さ。

インプラントと骨との間に形成された線維性結合組織の長さは、近遠心および水平方向とともに TA, HA の間で有意差は認められない。

数値は検討したインプラント (3本) の平均値と S.D. を示す。

(□ : TA, ▨ : HA)

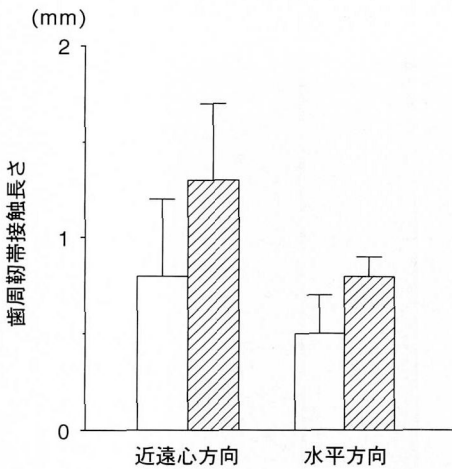


図12 近遠心あるいは水平方向でみられた歯周靭帯接触長さ。

埋入したインプラントに接触したと考えられる天然歯歯周靭帯の長さは、近遠心および水平方向とともに TA, HA の間で有意差は認められない。

数値は検討したインプラント (3本) の平均値と S.D. を示す。

(□ : TA, ▨ : HA)

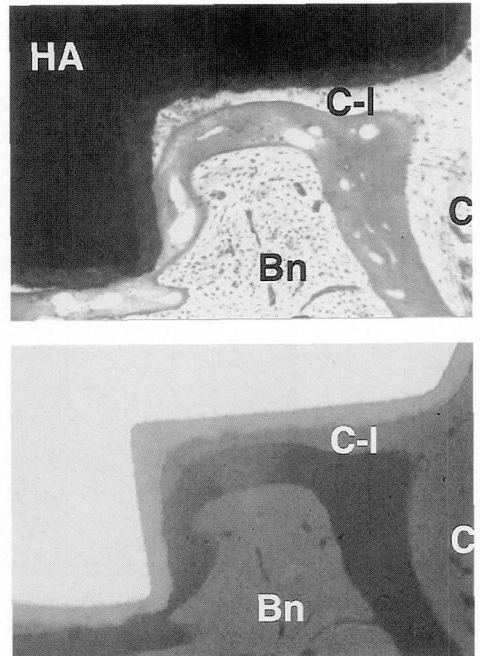


図14 HA における水平方向の組織像 (上段) とそれに対応する CMR 像 (下段)。

組織像 (上段) にみられるセメント質様組織に一致して X 線透過像が認められる。その X 線透過性は天然歯セメント質と同程度であり、両組織に明らかな境界は認められない。C-1 はセメント質様組織、C は天然歯セメント質、Bn は骨を示す。

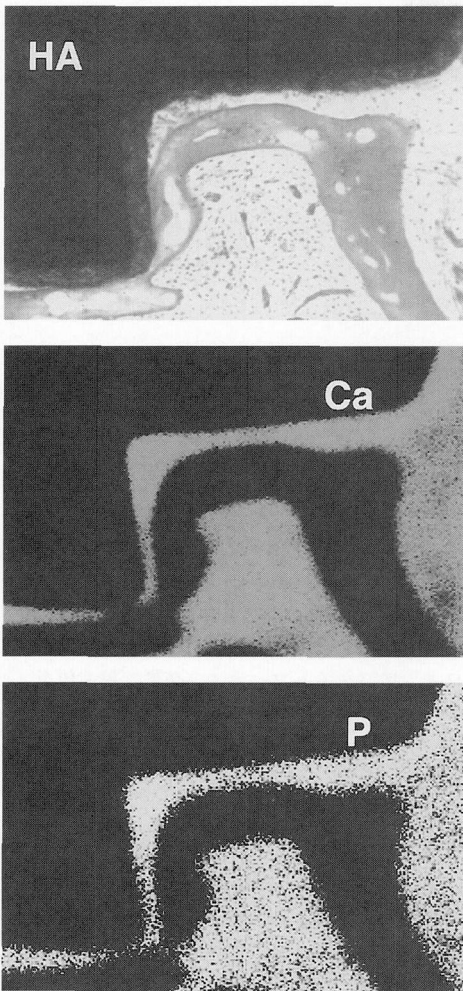


図15 HAにおける水平方向組織像(上段)およびその面分析(Ca:中段, P:下段)。

組織像(上段)にみられるセメント質様組織に一致してCaおよびPの局在が認められる。

考 察

I. 実験方法について

1. 埋入材料の選択

本研究では、歯周靭帯様組織の形成をみる埋入材料として市販のスクリュー形状のチタン合金およびハイドロキシアパタイトコーティングインプラントを用いた。*in vivo*において生体材料表面への歯周靭帯様組織形成を試みたこれまでの報告では、ディスク状ブロック^{16, 24-26}や市販の歯科インプラント¹³⁻¹⁵が用いられている。Takataら¹⁶はチタン合金、ハイドロキシアパタイトなどのディスク状ブロックを開窓法によって形成された歯根窩洞内に埋入、一方、Buserら^{13, 14}およびWarrarら¹⁵は歯科インプラントを歯根に接触させ

て埋入することで材料表面に歯周靭帯由来細胞の増殖を誘導している。しかし、将来の臨床応用を考えるとこれらのモデルでは埋入は天然歯の隣接部位に限定され、この解決には生体外でインプラント表面に歯周靭帯由来培養細胞を付着させた後に骨窩へ埋入することを考える必要がある。その際、インプラントは無歯顎部骨窩に埋入され周囲には骨組織が近接していることから骨組織由来骨系細胞の誘導を考慮する必要がある。そこで、インプラント表面に天然歯と同様の歯周靭帯様組織が形成される可能性を明らかにしようとするれば、骨組織に近接した条件下での埋入が必要である。ディスク状ブロックでは開窓状骨欠損作製後に形成された歯根窩洞内に埋入されるため、埋入時にブロック表面には骨組織は存在しない。一方、歯科インプラントは規格化された骨窩に埋入されるため表面には骨組織が近接している。以上のことから、本研究では埋入材料に歯科インプラントを用いることとし、埋入窩の形成が一定となるべく術式の確立している市販のものを用意した。その際の形状は、初期固定が確実に埋入時に必ず組織形成のスペースが確保される陥凹部を有するスクリュタイプとした。

材料に関しては、骨組織が近接する実験モデルでは純チタン以外の材料は用いられていないため、Takataらの示唆する生体活性材料表面への歯周靭帯様組織形成がこのモデルにおいても生じるかは明らかでなく、また骨組織が近接する条件下では生体活性材料表面に早期に骨組織が形成され歯周靭帯様組織形成がみられない可能性も考えられた。そこで本研究では、Takataらの実験¹⁶で用いた生体材料のうち、生体不活性および生体活性材料としてそれぞれ代表的なチタン合金およびハイドロキシアパタイトを選択した。

2. 実験動物

本研究ではビーグル犬を用いた。ビーグル犬は年齢や性別を一定にでき、全身麻酔を行うことなく口腔内の管理が可能であるとの利点を有することに加え、顎骨も大きく、さらに下顎小白歯部では各歯間部に2-5mmの隙が存在するため同部にインプラント埋入窩を形成することが比較的容易である。

生体材料表面に歯周靭帯様組織形成を試みた従来の研究では、ラット^{24, 26}、ネコ^{16, 24, 25}、サル¹³⁻¹⁵などが用いられている。本研究では前述の理由より市販の歯科インプラントを用いることとしたため、ラットおよびネコでは顎骨が小さく除外した。サルは歯列および咬合がヒトに類似して顎骨も比較的大きく適した動物であるものの、歯が緊密に接触する歯列弓にインプラント埋入窩を形成するには困難が予想された。歯を残根にして埋入骨量を確保する方法も考えられるが、残

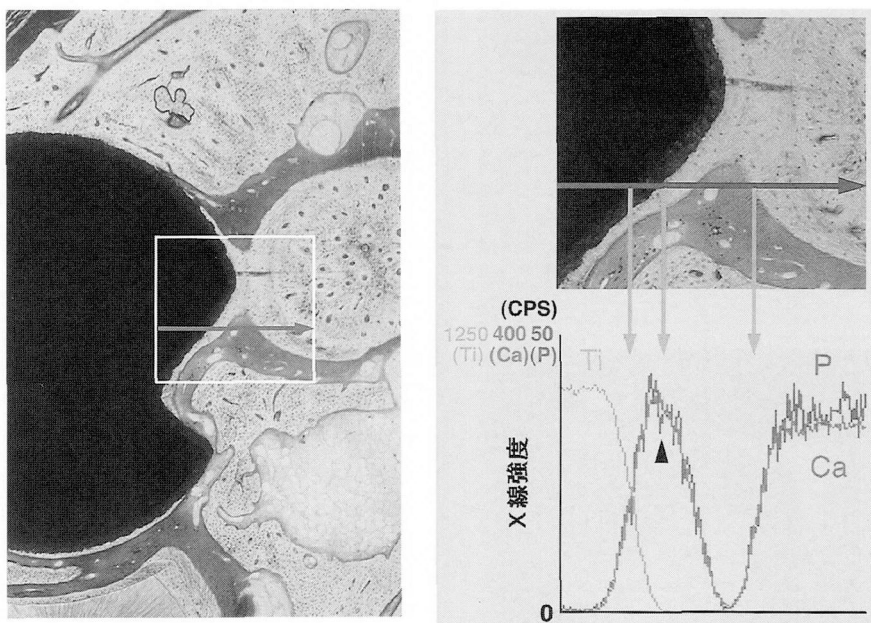


図16 HAにおける水平方向組織像（左側と右側上段）およびその線分析（Ti, Ca, P, 右側下段）。

CaおよびP両スペクトルのX線強度はハイドロキシアパタイトコーティング層で最大値を示し、セメント質様組織でいずれも約10%程度の減少（矢頭）がみられる。天然歯セメント質とセメント質様組織におけるX線強度は、Ca, P両元素ともに同程度である。CPSはCount Per Secondの略称を、数値は各元素のフルスケールをそれぞれ示す。

根では歯周靭帯の廃用性萎縮を引き起こす可能性があり、埋入部位によって歯周靭帯由来細胞の増殖条件が異なることが考えられるなどの理由から用いなかった。

3. 歯周靭帯様組織形成モデル

インプラント表面に歯周靭帯様組織を形成させようとする *in vivo* のモデルには、開窓状骨欠損を作製し歯根表面に形成された窩洞内にディスク状ブロックを埋入する方法^{16, 24-26} とインプラントを歯根に接触させて埋入する方法¹³⁻¹⁵ などがある。本研究では、Buserら^{13, 14}, Warrerら¹⁵ の研究方法にもとづいてインプラントを歯根に接触させて埋入することで、インプラント表面に骨組織が近接した状態をシミュレートし、同表面に歯周靭帯様組織形成を試みた。しかし、埋入時にインプラントが歯髄に接触する可能性が高く、歯髄細胞が結合組織性付着形成に影響を及ぼすこと、またBuserらのモデル^{13, 14} では残根を用いていることから歯周靭帯細胞の活性が非生理的であることなどを考慮し、Buserらのモデル^{13, 14} を二点改良した。一点は、歯髄細胞の強い増殖能と再生能²⁷ を考え、インプラント埋入前に下顎小白歯の抜髄を施すこととした。もう一点は、咬合機能を営まない歯の歯周靭帯では廃用性萎縮によりアンキローシスが生じることが知られ²⁸、また咀嚼刺激は血管や線維芽細胞の再生を促して機能

的な歯周靭帯を形成する²⁹ とされていることを考慮し、小白歯の抜髄後、同歯に歯冠修復を施し、インプラント埋入3週後にインプラントと接触する天然歯歯周靭帯に咀嚼刺激を与えて歯周靭帯細胞の生理的活性を保つこととした。

4. 石灰化の評価

本研究では、CMRと蛍光X線分析法を併用して、インプラント表面に形成されたセメント質様組織の石灰化の程度を評価した。歯周治療により象牙質表面に新生した組織の石灰化を観察した研究では、CMR³⁰ や電子顕微鏡を用いた微小部X線微量元素分析法³¹、硬組織ラベリング法^{30, 32, 33} などが用いられている。一方、インプラント表面に形成された組織の石灰化に関しては、硬組織ラベリング法によって同組織に一致して標識される構造物がみられたことが報告されているが¹⁵、同組織内に石灰化の確証となるCaやPなどの無機塩は同定されていない。無機塩の分布を組織化学的に観察する際に要求される条件は、その反応が物質の存在に対して鋭敏であることと、その反応の強さが物質の部位的な沈着密度の違いを良く表現することとされている²²。硬組織ラベリング法では前者の条件を満たすものの、後者の条件には全く適していない。また、この方法は蛍光物質が石灰化の起こった部位に局限して

沈着する性質を利用するため、脱灰操作によっては蛍光物質が除かれるか蛍光を発しなくなり、そこですべて非脱灰標本を用いなければならない³⁴⁾。一方、CMRは硬組織の石灰化像の研究に広く用いられ^{35,36)}、組織の構造を示すだけでなく無機塩の分布と密度を示すことから、前述の後者の条件を満たしている。しかしながら、CMRは無機塩の存在に対し必ずしも鋭敏な方法でないため、石灰化度の極めて低い部位、例えば石灰化の初期段階では常に透過像がみられる傾向がある。さらに、軟X線照射により得られたフィルム像からX線不透過性を検討するため、観察箇所が石灰化組織であるとの確証は得られない。そこでCMRによる所見に他の手技による検索を加える必要があると考えた。硬組織形成を観察する代表的な方法としては、組織内のCaやPなどの局在を明らかにする微小部X線微量元素分析法³¹⁾がある。これは試料に電子線を照射することにより発生するX線から組織内に局在する元素を特定する方法であるが、試料表面への蒸着および長時間の電子線照射による標本の損傷といった問題点を有している。そこで本研究では、無蒸着で、X線照射によって元素分析が可能な蛍光X線分析法を用いることにした。

II. 観察結果について

1. インプラント表面に形成された組織について

TAおよびHAのいずれの表面においても、天然歯歯周靭帯に近接する部位では歯周靭帯から連続して線維性結合組織が形成され、歯周靭帯から離れた部位では骨組織が直接インプラント表面に接触していた。これらの所見は、歯根象牙質表面における歯周組織の再生を説明するMelcherの仮説³⁷⁾に従って、最初にインプラント表面に付着する細胞の種類により形成される組織が決定されることを示唆している。すなわち、歯周靭帯に近接する部位では骨組織由来骨系細胞よりも歯周靭帯由来細胞の増殖が早期に誘導された結果、線維性結合組織が形成されたものと解釈できる。

インプラント表面に天然歯支持組織と同様の組織を構築しようとする、線維性結合組織はもちろんのこと、コラーゲン線維束の挿入を伴ったセメント質様組織が形成されなければならない。本研究では、用いた材料間でインプラント表面に形成された組織に明らかな差異がみられた。TA表面ではセメント質様組織を思わせる像もみられたが、無構造かつその厚径は不均一で、天然歯セメント質と連続していなかったことから標本作製時の裂隙とみなされ、実際に形成されていたのは線維性結合組織だけであった。一方、HA表面では線維性結合組織に加え天然歯セメント質に連続して

セメント質様組織も形成されていた。また、その構造は天然歯セメント質によく類似し、歯周靭帯の歯根側寄りに分布しセメント質内へ挿入することが知られるオキシタラン線維²¹⁾の挿入もみられ、天然歯セメント質に類似したX線不透過性を示すとともに、CaおよびPのX線強度も同程度であった。これらの所見を総合すると、HA表面に新しく形成されたセメント質様組織は天然歯セメント質に極めて近い硬組織であるとみなされよう。

材料表面に形成された線維性結合組織をみると、TA周囲ではその幅径は不均一でコラーゲン線維束は不規則に走行していたが、HA周囲では均一の幅径を有しコラーゲン線維束のセメント質様硬組織内への挿入が認められた。歯周療法分野では、露出歯根象牙質表面に対し結合組織性新付着を獲得する治療法が開発されており、形成される線維性結合組織は歯周靭帯と連続して同様の幅径を有し、コラーゲン線維束のセメント質様硬組織内への挿入を伴っている^{38,39)}。結合組織性新付着は歯根表面における歯周靭帯の再生を表すものと認識されていることから、HA表面にみられた組織は天然歯と同様の歯周靭帯様組織であることが期待される。一方、TAではセメント質様組織は新生されず線維性結合組織による被覆、すなわち修復による治療形態を示し、歯周靭帯様組織の再生はみられなかった。これらの結果はディスク状ブロックを用いたTakataらの実験結果¹⁶⁾ともよく一致している。

2. 歯周靭帯様組織形成について

TAとHAの材料間で歯周靭帯様組織形成には明らかな質的差異がみられ、特にセメント質様組織はHA表面にのみ認められた。歯周組織再生におけるセメント質形成の機序は十分に解明されていないが、セメント芽細胞への分化には歯周靭帯中に含まれる前駆細胞の象牙質表面への接触が必要であるとされている⁴⁰⁾。本研究においても、インプラント表面でのセメント質様組織形成は材料により明らかな相違を示したのに対し、象牙質表面にはセメント質様組織が形成されていたことから、象牙質にセメント質様組織形成を誘導する特異的因子が存在する可能性がある。さらに、HA表面には天然歯に極めて類似したセメント質様組織が形成されたことから、ハイドロキシアパタイトが歯周靭帯様組織形成に関与したことが推測される。周知のごとく、ハイドロキシアパタイトは骨伝導性を有する⁴¹⁻⁴³⁾。この骨伝導性の機序に関してはいくつかの見解があり、ハイドロキシアパタイトの成分が骨アパタイトと類似しているため骨芽細胞の分化や石灰化を助けるとするもの^{41,42)}や、ハイドロキシアパタイト表面に接着因子や増殖因子が吸着することで骨芽細胞の接着と増殖が

促進され、その結果骨形成が活性化されるとする考え⁴³⁻⁴⁵⁾などがある。前者に関して、象牙質構成成分の約70%はハイドロキシアパタイトであり、その成分はHA表層のハイドロキシアパタイトと類似していることから、ハイドロキシアパタイトが象牙質表面におけると同様セメント芽細胞の分化やセメント質様組織形成を助けたのかもしれない。また、後者の見解に関しては、ハイドロキシアパタイトに吸着する蛋白量はチタンの約60倍に及ぶこと⁴⁵⁾に加え、セメント質内に同定された接着蛋白はハイドロキシアパタイトに対し特異的に結合すること⁴⁶⁾から、ハイドロキシアパタイトに吸着する多量の蛋白質中にはセメント質様組織形成に関与する接着蛋白がチタンに比較して多く吸着しており、HAに対するセメント芽細胞の接着を制御しているのかもしれない。

本研究では、TA周囲には線維性結合組織が介在するだけであったが、過去に純チタンインプラント表面にコラーゲン線維束の挿入を伴ったセメント質様硬組織が形成されたとの報告¹³⁻¹⁵⁾もあり、純チタンでは生体活性や蛋白吸着能とは無関係に歯周靭帯様組織が形成されるのかもしれない。純チタンとチタン合金では周囲組織反応にいくつかの相違が存在し、*in vitro*の研究においてチタン合金小片の接触による細胞の損傷⁴⁷⁾や漏出した Al^{3+} による骨髄幹細胞の成熟芽細胞への分化抑制の可能性⁴⁸⁾が報告されている。骨とセメント質の類似性を考えると、本研究では漏出した Al^{3+} によって歯周靭帯由来未分化間葉系細胞のセメント芽細胞への分化が抑制された可能性が推察される。

3. インプラント表面性状が歯周靭帯様組織形成に及ぼす影響について

インプラント表面における細胞の反応はその表面性状に影響され⁴⁹⁾、歯肉結合組織のコラーゲン線維束がインプラントの粗い表面に対し垂直に走行することから⁵⁰⁾、材料の表面性状も歯周靭帯様組織形成に関わる因子の一つであると考えられる。そこでBuserら^{13,14)}の純チタン (I.T.I.[®])、Warrarら¹⁵⁾の純チタン (ASTRA[®]) および本研究で用いたチタン合金 (STERI-OSS[®])、ハイドロキシアパタイトコーティング (STERI-OSS[®]) の各インプラントの表面粗さ (Ra) を合焦点式ナイフエッジ法表面粗さ測定機 (SV-624, MITSUTOYO) により計測したところ、それぞれ2.65, 1.74, 1.40, 2.19 μm であった。このことから、材料の生体活性とは無関係にRaが1.40 μm を超える粗い表面には歯周靭帯様組織が形成される可能性もある。

4. 組織形態計測学的結果について

本研究では、インプラントを埋入する際に天然歯との接触関係を厳密に規定することは不可能であったた

め、両材料間で埋入条件に差が生じなかったかどうかの確認を歯根および歯周靭帯との接触長さにより検討した。その結果、いずれの長さも両材料間に有意差がなかったことから、埋入条件は両材料間でほぼ同一であったとみなしてよい。インプラント表面に形成された線維性結合組織の質にはTAとHAで明らかな差異がみられたにもかかわらず、その長さには有意差が認められなかった。ハイドロキシアパタイトコーティングインプラントはチタンインプラントよりも表面への骨形成速度ならびに骨形成量が上廻っていることから^{17,18)}、研究開始前にはHA表面にはTAに比較して早期に骨組織が形成され、線維性結合組織の長さは短いと予測された。しかし、実験結果をみると、形成された線維性結合組織の長さに両者間で有意差はみられなかった。このことはHA表面ではTAに比較して歯周靭帯由来細胞の遊走および増殖が旺盛であったため、両材料表面への骨形成速度の差が相殺されたことを説明するかもしれない。

5. 今後の展望について

本研究の結果から、TAおよびHA表面に歯周靭帯由来細胞の増殖を誘導することによって線維性結合組織が形成されるものの材料間で大きな質的違いがあること、またHA表面では天然歯に極めて類似したセメント質様硬組織が形成されることなどが明らかとなり、HA表面には天然歯と同様の支持組織を構築できる可能性が示された。しかしながら、本研究モデルでは天然歯への外傷、インプラント埋入部位の制限、インプラント全周への組織形成は不可能であるなどの問題点があり、臨床モデルとしての利用には制限がある。そこで、HAに歯周靭帯様組織を形成させるためには別の視点が必要となり、例えば生体外でインプラント表面に歯周靭帯細胞の特性を備えた細胞を付着させることを試みる必要がある。

歯周靭帯由来培養細胞を歯根面に適用することによって、結合組織性付着が獲得されたとの報告もあり^{51,52)}、インプラント表面に同細胞を付着した後に埋入すれば生体内でインプラント表面に歯周靭帯様組織が形成されることが期待される。しかしながら、天然歯の移植、再植において歯の表面の歯周靭帯細胞が損傷すると骨癒着をきたすことから^{29,53)}、インプラント表面に培養細胞を緊密に付着させる必要がある。そのためには、今後、歯周靭帯由来細胞のインプラント表面への接着機序の解明を目指す必要がある。

総 括

天然歯と同様の支持組織を備えた口腔インプラントを開発するための基礎的知見を得ることを目的として、

本研究では、骨組織が近接する条件下で材料の異なる2種類のインプラント(TAおよびHA)表面における歯周靭帯様組織形成能を、主として組織学的ならびに組織形態計測学的に比較検討した。

1. 歯根に接触させて埋入したTAおよびHAのいずれの表面にも、埋入12週後に隣接する天然歯歯周靭帯と連続して線維性結合組織の形成がみられた。HA表面ではさらにセメント質様組織の形成も伴っていた。形成された線維性結合組織の長さには両材料間で有意差は認められなかった。

2. 形成された線維性結合組織には両材料間で組織学的に著明な差異がみられ、TA周囲ではその幅径は不均一でコラーゲン線維束が不規則に走行していたのに対して、HA周囲では均一な幅径を有し、そのコラーゲン線維束が規則的配列を示しながらHA上のセメント質様組織内に挿入されていた。

3. HA表面に形成されたセメント質様組織には、天然歯セメント質への挿入が知られるオキシタン線維の挿入が認められた。また、同組織は天然歯セメント質と同程度のX線不透過性を示すとともに、CaおよびPのX線強度も天然歯と類似していた。これらのことから、HA表面に形成されたセメント質様組織は天然歯セメント質に極めて類似した硬組織であることが示唆された。

以上の結果から、ハイドロキシアパタイト上に歯周靭帯様組織の形成が可能であることが確認されるとともに、骨組織が近接した実験モデルにおいても歯周靭帯組織が接触したHA表面には天然歯に類似した支持組織が形成され得ることが明らかとなり、歯周靭帯様組織によって支持される口腔インプラントの開発への可能性が示唆された。

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。また、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。

本研究の遂行および論文の作成にあたり、御指導、御助言を頂きました本学歯科補綴学第一講座細川隆司助手、佐藤裕二助教授並びに本学口腔病理学講座高田隆助教授に心より御礼申し上げます。また、本研究に対して御助言、御協力を頂きました和田本昌良講師をはじめとする本学歯科補綴学第一講座の方々、特に研究遂行に御助力頂きました菊崎健司先生、高橋 啓先

生、千葉大輔先生に感謝いたします。最後に、実験材料を提供して頂きました株式会社ヨシダ並びに実験の遂行にあたり格別の御支援を頂きました株式会社堀場製作所並びに広島市経済局経済振興課先端科学技術推進室の鶴岡 誠室長、福原啓聡技師に感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) Brånemark, P-I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindström, J., Hallen, O. and Ohman, A.: Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw; Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **16**, 1-132, 1977.
- 2) Zarb, G.A. and Symington, J.M.: Osseointegrated dental implants: Preliminary report on a replication study. *J. Prosthet. Dent.* **50**, 271-276, 1983.
- 3) Zarb, G.A. and Schmitt, A.: The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: The Toronto study. Part I: Surgical results. *J. Prosthet. Dent.* **63**, 451-457, 1990.
- 4) Teerflinck, J., Quirynen, M., Darius, P. and Van Steenberghe, D.: Periotest[®]: An objective clinical diagnosis of bone apposition toward implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **6**, 55-61, 1991.
- 5) Jemt, T., Book, K., Lindén, B. and Urde, G.: Failures and complications in 92 consecutively inserted overdentures supported by Brånemark implants in severely resorbed edentulous maxillae: A study from prosthetic treatment to first annual check-up. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **7**, 162-167, 1992.
- 6) Piattelli, A., Scarano, A., Piattelli, M., Vaia, E. and Matarasso, S.: Hollow implants retrieved for fracture: a light and scanning electron microscope analysis of 4 cases. *J. Periodontol.* **69**, 185-189, 1998.
- 7) Isidor, F.: Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys. *Clin. Oral Impl. Res.* **7**, 143-152, 1996.
- 8) Cho, G.C. and Chee, W.W.L.: Apparent intrusion of natural teeth under an implant-supported prosthesis: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.* **68**, 3-5, 1992.
- 9) 椎貝達夫, 武田孝之, 藤関雅嗣, 吉本真人: インプラント適用症例の経時的変化に関する臨床統計的考察. 第1報 インプラントが隣在歯と対合歯に及ぼす影響について. 補綴誌 41・97回特別号, 25, 1997.
- 10) Garcia, L.T. and Oesterle, L.J.: Natural tooth intrusion phenomenon with implants: A survey. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **13**, 227-31, 1998.
- 11) Skalak, R.: Biomechanical considerations in

- osseointegrated prostheses. *J. Prosthet. Dent.* **49**, 843-848, 1983.
- 12) Kirsch, A. and Mentag, P.J.: The IMZ endosseous two phase implant system: A complete oral rehabilitation treatment concept. *J. Oral Implantol.* **12**, 576-589, 1986.
 - 13) 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.
 - 14) Buser, D., Warrer, K. and Karring, T.: Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J. Periodontol.* **61**, 597-601, 1990.
 - 15) Warrer, K., Karring, T. and Gottfredsen, K.: Periodontal ligament formation around different types of dental titanium implants. I. The self-tapping screw type implant system. *J. Periodontol.* **64**, 29-34, 1993.
 - 16) 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.
 - 17) Block, M.S., Kent, J.N. and Kay, J.F.: Evaluation of hydroxylapatite-coated titanium dental implants in dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **45**, 601-607, 1987.
 - 18) Block, M.S., Finger, I.M., Fontenot, M.G. and Kent, J.N.: Loaded hydroxylapatite-coated and grit-blasted titanium implants in dogs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **4**, 219-225, 1989.
 - 19) Donath, K. and Breuner, G.: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The sawing and grinding technique. *J. Oral Pathol.* **11**, 318-326, 1982.
 - 20) Fullmer, H.M. and Lillie, R.D.: The oxytalan fiber: A previously undescribed connective tissue fiber. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 425-430, 1958.
 - 21) Fullmer, H.M., Sheetz, J.H. and Narkates, A.J.: Oxytalan connective tissue fibers: A review. *J. Oral Pathol.* **3**, 291-316, 1974.
 - 22) 須賀昭一：硬組織の microradiography. 歯界展望 **27**, 495-515, 1966.
 - 23) 見明康雄：骨・歯牙の非脱灰研磨標本の作製法とマイクロラジオグラフィ；骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際（永井教之編），学際企画，東京，159-172, 1991.
 - 24) 片内恒平：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. 広大歯誌 **25**, 163-179, 1993.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) Trowbridge, H.O.: Pathways of the pulp; Pulp histology and physiology. ed. 3, Mosby, St Louis, 323-378, 1984.
 - 28) Cohn, S.A.: Disuse atrophy of the periodontium in mice. *Arch. Oral Biol.* **10**, 909-919, 1965.
 - 29) Andersson, L., Lindskog, S., Blomlöf, L., Hedström, K-G. and Hammarstrom, L.: Effect of masticatory stimulation on dentoalveolar ankylosis after experimental tooth replantation. *Endod. Dent. Traumatol.* **1**, 13-16, 1985.
 - 30) Ogura, N., Mera, T., Sato, F. and Ishikawa, I.: Longitudinal observation of cementum regeneration through multiple fluorescent labeling. *J. Periodontol.* **62**, 284-291, 1991.
 - 31) 西村和晃, 高田耕平, 野口吉広, 野口秀夫, 永石真幸, 林正純, 仲秀典, 白井義英, 山岡昭：歯肉剥離掻爬手術後の新付着に関する研究（第4報）—術後の結合織付着部に対するX線定量分析によるセメント質沈着の可能性について—。日歯周誌 **27**, 416-423, 1985.
 - 32) Blomlöf, L., Lindskog, S., Appelgren, R., Jonsson, B., Weintraub, A. and Hammarström, L.: New attachment in monkeys with experimental periodontitis with and without removal of the cementum. *J. Clin. Periodontol.* **14**, 136-143, 1987.
 - 33) Blomlöf, L., Friskopp, J., Appelgren, R., Lindskog, S. and Hammarström, L.: Influence of granulation tissue, dental calculus and contaminated root cementum on periodontal wound healing.: An experimental study in monkeys. *J. Clin. Periodontol.* **16**, 27-32, 1989.
 - 34) 須賀昭一：硬組織と Tetracycline. 歯学 **53**, 137-143, 1965.
 - 35) Kagayama, M., Akita, H., Sasano, Y. and Kindaichi, K.: Localization of uncalcified cementum in adult rat molar roots and its relation to physiological tooth movement. *Arch. Oral Biol.* **39**, 829-832, 1994.
 - 36) Clergeau, L.P., Danan, M., Clergeau-Guérithault, S. and Brion, M.: Healing response to anorganic bone implantation in periodontal intrabony defects in dogs. Part I. Bone regeneration. A microradiographic study. *J. Periodontol.* **67**, 140-149, 1996.
 - 37) Melcher, A.H.: On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.* **47**, 256-260, 1976.
 - 38) 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.
 - 39) 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.
- 40) 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.
- 41) Jarcho, M.: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop.* **157**, 259–278, 1981.
- 42) Jarcho, M.: Biomaterial aspects of calcium phosphates. Properties and applications. *Dent. Clin. North Am.* **30**, 25–47, 1986.
- 43) 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.
- 44) Hjerting-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.
- 45) 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.
- 46) Pitaru, S., Narayanan, S.A., Olson, S., Savion, N., Hekmati, H., Alt, I. and Metzger, Z.: Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J. Periodontal. Res.* **30**, 360–368, 1995.
- 47) Evans, E.J.: Cell damage in vitro following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy. *Biomaterials* **15**, 713–717, 1994.
- 48) Thompson, G.J. and Puleo, D.A.: Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation timecourse in vitro. *Biomaterials* **17**, 1949–1954, 1996.
- 49) Brunette, D.M.: The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **3**, 231–246, 1988.
- 50) Schroeder, A.: Soft Tissue (“Gingiva” Collar); Oral Implantology (Schroeder, A., Sutter, F. and Krekeler, G.), Thieme Medical Publishers, Inc., New York, 101–107, 1991.
- 51) 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. Periodontal. Res.* **16**, 73–88, 1981.
- 52) 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.
- 53) Andreasen, J.O.: Periodontal healing after replantation and autotransplantation of incisors in monkeys. *Int. J. Oral Surg.* **10**, 54–61, 1981.