

学位論文

連通多孔性ハイドロキシアパタイトに
インプラント体を組み入れた
インプラント複合体の
インプラントの骨支持に関する実験的研究

学位申請者 梶原 志穂

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座
先端歯科補綴学研究室
(主任：菅井基行)

2014年

連通多孔性ハイドロキシアパタイトにインプラント体を組み入れた
インプラント複合体のインプラントの骨支持に関する実験的研究

梶原 志穂

An experimental study on bone support ability of novel implant complex utilizing
interconnected porous calcium hydroxyapatite

Shiho Kajihara

緒言

インプラント治療は現在、歯を喪失した患者の補綴治療として広く用いられている。インプラントは埋入されたインプラント体と骨が接触するオッセオインテグレーションを獲得することにより安定するため、インプラントの成功は埋入部位の骨質と骨量に依存する¹⁾。しかしながら、臨床においてはインプラントの埋入部位に常に十分な骨質や骨量が存在しているとは限らず、骨質や骨量が不足する場合には骨再建が必要となる²⁻⁵⁾。一方、オッセオインテグレーションを獲得し上部構造が装着されたインプラントは機能的および審美的回復を達成するが、長期経過の過程で、プラークコントロール不良による細菌感染や咬合力の過負担などによるインプラント体の周囲骨の吸収などの懸念がある。このようにインプラント体を支持する骨組織に吸収が起きるとインプラント周囲炎の状態となり、重篤な場合にはインプラントの動揺や脱落につながり、インプラント体の除去に加えて周囲の感染組織除去が必要となる。このため、インプラント体除去部位に大きな骨欠損が生じてしまう。そのためインプラント治療を再適用するには骨再建を

行う必要があり、インプラント埋入手術と合わせて複数回の手術を行うこととなる⁶⁾。さらに骨再建後の骨の再吸収の問題などが、未だ懸念されたままである⁷⁾。

骨再建に用いる材料としては、自家骨、同種骨、異種骨、人工骨などがあげられるが⁸⁻¹⁹⁾、同種骨に関しては、感染や拒絶反応の問題から臨床で用いられるケースは限られている。骨欠損部が小さい場合は、自家骨や人工骨、異種骨などによる骨再生誘導法（GBR）がインプラント埋入手術に併用される。しかしながら、自家骨移植においては、骨欠損が大きな症例では自家骨採取時の侵襲が大きくなり、供給量にも限界がある。吸収性の人工骨や異種骨による骨再建は、骨欠損が大きくなると形態保持が困難となり、骨再建後の骨吸収が起こる可能性がある。また従来の非吸収性人工骨では、長期症例において、線維性結合組織による被包化や体外への排出などの問題点が指摘されていた²⁰⁾。

連通多孔性ハイドロキシアパタイト（Interconnected porous calcium hydroxyapatite, IP-CHA, 図1）は気孔率75%、圧縮強さ15 MPa、平均気孔径150 μm 、連通孔径40-70 μm の材料特性を持つ人工骨であり、生体親和性、骨伝導、機械的強度、3次元構造に優れていることから、骨補填材として近年、整形外科領域や歯科領域において広く用いられている²¹⁻²⁵⁾。IP-CHAは3次元構造を有し、骨伝導に優れるため、細胞や成長因子の足場として有用であることが知られている^{26, 27)}。IP-CHAの骨再生療法応用に関しては、DoiらがIP-CHAに骨髄間質細胞を導入し骨分化誘導を行った培養人工骨をイヌの大腿骨に埋入したところ、骨形成が有意に促進された²⁸⁾ことや、Moritaらが生体高分子であるポリリン酸を吸着させたIP-CHAをウサギの大腿骨に埋入したところ、IP-CHA単体と比較して骨形成が有意に促進されことを²⁹⁾報告している。そこで、IP-CHAによる骨組織の再生とインプラント埋入を同時に達成することで手術回数の増加や、骨再建後の骨吸収といった問題を解決できると考え、IP-CHAとインプラント体を組み合わせたインプラント複合体が着想された

(図 2) .

本研究は IP-CHA にインプラント体を設置したインプラント複合体を製作し、生体内におけるインプラントの骨支持を評価し、骨再建とインプラントの骨支持を同時に達成する材料としての有用性を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

本研究は広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野ライフサイエンス教育研究支援部動物実験施設内規および利用細則に従って行った。

実験 1 インプラント複合体の製作およびイヌ大腿骨における骨再建とインプラントの骨支持の評価

1-1 インプラント複合体の製作および観察

【材料】

インプラントはチタン製インプラント 1 本（直径 3.75 mm, 長さ 8.5 mm, Brånemark System[®] MKIII TiUnite, ノーベルバイオケアジャパン株式会社, 東京）, 骨補填材料は中空状 IP-CHA 2 個（外形 6.0 mm, 内径 3.0 mm, 高さ 8.5 mm, NEOBONE[®], コバレントマテリアル株式会社, 東京）を用いた。

【方法】

中空状 IP-CHA 2 個の内側にインプラントスレッド窩をスクリータップおよびカウンターボアを用いて形成した。その後、一方は 2 分割し、内面構造を走査型電子顕微鏡（SEM, JMS-7300, 日本電子株式会社, 東京）にて観察した。もう一方の

IP-CHA には内部にインプラント体を設置し (図 3A, B) , エタノールにて脱水, アセトンにて透徹し, 光重合型ポリエステルレジン (Technovit 7200VLC, Kulzar, Wehrheim) にて包埋した. レジンプロックは, 硬組織薄切機 (BS-3000, EXAKT APPARATEBU, Germany) を用いて複合体の正中で切断し, 断面を観察した.

1-2 ホルマリン固定がインプラント安定指数 (ISQ 値) に及ぼす影響の評価

本研究において骨支持によるインプラントの安定性を評価する指標として用いる ISQ 値は, プローブから磁気パルスを発信し, インプラント体に装着されたトランジェューサー (スマートペグ) との共鳴振動周波数を測定する共鳴振動周波数分析を用いた数値であり, インプラント体の安定性を示す客観的データとして認知されている³⁰⁻³³⁾. ISQ 値の正確な測定のためにはスマートペグをインプラント体に直接固定する必要がある. 動物実験において, 2 回法インプラントの安静期間終了時の組織学的評価と同時に ISQ 値の測定を行う際には, ホルマリン固定後に ISQ 値を測定することとなる. ホルマリン固定はタンパク凝固や組織量の膨張により骨組織を変化させるため, ISQ 値の測定に影響を与える可能性がある. そこで, 骨組織のホルマリン固定が ISQ 値の測定に与える影響に関する検討が必要と考え, 以下の実験を行った.

【材料】

実験動物には雄性ビーグル・ラブラドル犬 1 頭 (24 ヶ月齢, 体重 25 kg) を用い, 1 ヶ月間個別のケージ内で飼育し, 環境に十分順応させた. インプラントとしてチタン製インプラント 6 本 (直径 3.75 mm, 長さ 8.5 mm, Brånemark System[®] MK III) を用いた.

【方法】

動物の両側大腿骨骨体中央部にインプラントを Brånemark System[®]のプロトコル

に従って、それぞれ3本ずつ埋入した。埋入後筋膜および皮膚をそれぞれ絹糸にて縫合し、創部を閉鎖した。以上の外科処置はいずれも、0.1 ml/kg の塩酸メドミジン 1.0 mg/ml (ドミツール[®], 日本全薬工業株式会社, 福島) の筋肉内注射および 0.5 ml/kg のペントバルビタールナトリウム 64.8 mg/ml (ソムノペンチル[®], 共立製薬株式会社, 東京) 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[®], デンツプライ三金株式会社, 東京) による局所麻酔を併用しておこなった。また、術後の感染予防のため、2.0 ml/day のエンフロキサシン製剤 (バイトリル[®], バイエル薬品株式会社, 東京) を術後 1 週間筋肉内注射した。埋入 2 ヶ月後、動物にペントバルビタールナトリウムおよび血液凝固阻止薬 (ノボ・ヘパリン注, 持田製薬株式会社, 東京) を静脈内注射, 開胸を行い, 心膜を剥離した後, 大動脈を介して左心室から生理食塩水を体重相当量注入して灌流し, インプラントを含む骨組織ブロックを採取した。

ISQ 値の測定

6 本すべてのインプラント体に対して共鳴振動周波数分析装置 (Osstell[®], Integration Diagnostics, Göteborg) にて ISQ 値を測定した。ISQ 値の測定は, インプラント周囲の軟組織を除去し, インプラント体とスマートペグが軟組織の介在なしに固定された状態で, 長軸方向および短軸方向から各 3 回ずつ, 合計 6 回測定し, その平均値を各時期の測定値とした (図 4)。その後, 骨組織ブロックを 20°C-22°C の室温で実験期間中 10%中性緩衝ホルマリン溶液 (4%ホルムアルデヒド含有) に浸漬し, 固定開始後 4 時間, 1, 7, 14, 21, 28 日の各観察時期において ISQ 値を測定した。

ISQ 値の増減率

増減率は固定前の ISQ 値に対する各観察時期における ISQ 値を百分率として個々に算出した。

統計学的分析

得られたデータの統計学的分析には一元配置分散分析および Tukey の HSD 検定を用いた。有意水準は 0.05 以下とした。

1-3 イヌ大腿骨における骨再建およびインプラントの骨支持の評価

【材料】

実験動物には雄性ビーグル・ラブラドル犬 3 頭 (24 ヶ月齢, 体重 20 - 25 kg) を用い, 1 ヶ月間個別のケージ内で飼育し, 環境に十分順応させた。インプラント材料として, チタン製インプラント 3 本 (直径 3.75 mm, 長さ 8.5 mm, Brånemark System[®] MKIII TiUnite) と, 中空状 IP-CHA (外径 6.0 mm, 内径 3.0 mm, 高さ 8.5 mm) 内へチタン製インプラント (直径 3.75 mm, 長さ 8.5 mm) を設置したインプラント複合体 9 個を用いた。

【方法】

実験プロトコルを図 5 に示す。動物の大腿骨骨体中央部に骨窩 (直径 6.0 mm, 深さ 8.5 mm) を形成し (図 6A), 動物屠殺時の観察期間が 2 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月になるようにインプラント複合体を埋入した (複合体群, 図 6B)。コントロールとしてインプラント単体を Brånemark System[®] のプロトコルに従って埋入し, 埋入後 2 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月の時点で ISQ 値を継続的に測定した (コントロール群)。以上の外科処置はいずれも, 0.1 ml/kg の塩酸メデトミジン 1.0 mg/ml の筋肉内注射および 0.5 ml/kg のペントバルビタールナトリウム 64.8 mg/ml の静脈内注射による全身麻酔とエピネフリン含有 2%リドカインによる局所麻酔を併用しておこなった。また, 術後の感染予防のため, 2.0 ml/day のエンフロキサシン製剤を術後 1 週間筋肉内注射した。動物にペントバルビタールナトリウムおよび血液凝固阻止薬を静脈内注射した深性麻酔下にて屠殺し, 大動脈から体重相当量の生理食塩水および 10%

中性緩衝ホルマリン溶液を注入することにより灌流し、大腿骨を摘出後、ISQ 値を測定した。

組織学的観察

標本はただちに 10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬した後、エタノールにて脱水、アセトンにて透徹し、光重合型ポリエステルレジンにて包埋した。得られたレジブロックは硬組織薄切機を用いて薄切し、200 μm 厚の切片を得た。これらの切片を超精密硬組織研磨機 (MG-4000, EXAKT APPARATEBAU, Germany) を用いて 70 μm 厚に研磨し、非脱灰研磨標本とした。各標本にトルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡にて組織学的に観察した。

ISQ 値の測定

ISQ 値の測定は共鳴振動周波数分析装置にて長軸方向および短軸方向から各 3 回ずつ、合計 6 回測定し、その平均値を各時期の測定値とした。

骨インプラント接触率 (BIC) の測定

BIC はインプラントのショルダ一部から皮質骨の底部までのインプラントスレッドの全長に対する骨接触部の長さとして算出した。BIC の測定には Image J (National Institutes of Health, Bethesda) を用いた (図 7)。

統計学的分析

得られたデータの統計学的分析には一元配置分散分析および Tukey の HSD 検定を用い、有意水準は 0.05 以下とした。

実験 2 荷重負荷条件下におけるインプラント複合体のインプラントの骨支持の評価

【材料】

実験動物には雄性ビーグル・ラブラドル犬 4 頭 (24 ヲ月齡, 体重 20-25 kg) を

用い、1 ヶ月間個別のケージ内で飼育し、環境に十分順応させた。インプラント材料として、チタン製インプラント 4 本（直径 3.3 mm, 長さ 10.0 mm, Brånemark System[®] MKIII TiUnite）と、中空状 IP-CHA（外径 5.0 mm, 内径 3.0 mm, 高さ 10.0 mm）内へインプラント（直径 3.3 mm, 長さ 10.0 mm）を設置したインプラント複合体 4 個を用いた。また荷重負荷の際の固形飼料としてペレット状固形飼料（直径 8.0 mm, 圧縮強さ 0.65 MPa, Laboratory Canine Diet, PMI Feeds, St. Louis）を用いた。

【方法】

実験プロトコルを図 8 に示す。前処置として動物の両側第 4 小臼歯（P4）を抜歯した後、3 ヶ月の治癒期間を置き、無歯顎部を準備した。治癒期間終了後、片側無歯顎部にトレフィンバーを用いて骨窩（直径 5 mm, 深さ 10 mm）を形成し、インプラント複合体を埋入（図 9A）、非吸収性メンブレンにて被覆した。反対側無歯顎部には Brånemark System のプロトコルに従ってインプラント単体を埋入した（図 9B）。以上の外科処置はいずれも、0.1 ml/kg の塩酸メデトミジン 1.0 mg/ml の筋肉内注射および 0.5 ml/kg のペントバルビタールナトリウム 64.8 mg/ml の静脈内注射による全身麻酔とエピネフリン含有 2%リドカインによる局所麻酔を併用して行った。また、術後の感染予防のため、2.0 ml/day のエンフロキサシン製剤を術後 1 週間筋肉内注射した。埋入から 3 ヶ月後複合体群においてメンブレンを除去した。埋入から 6 ヶ月後、2 次手術を行い、ISQ 値を測定した後、ヒーリングアバットメントを装着し（図 9C）、同日より固形飼料摂取による荷重負荷を開始した。荷重負荷は埋入後 6 ヶ月から 11 ヶ月までの 5 ヶ月間行った。埋入 11 ヶ月後、動物にペントバルビタールナトリウムおよび血液凝固阻止薬を静脈内注射した深性麻酔下にて屠殺し、大動脈から体重相当量の生理食塩水および 10%中性緩衝ホルマリン溶液を注入することで灌流し、顎骨を摘出した。

組織学的観察

標本はただちに 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、エタノールにて脱水、アセトンにて透徹し、光重合型ポリエステルレジンにてレジン包埋した。得られたレジンブロックは硬組織薄切機を用いて薄切し、200 μm 厚の切片を得た。これらの切片を超精密硬組織研磨機を用いて 70 μm 厚に研磨し、非脱灰研磨標本とした。各標本にトルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡にて組織学的に観察した。

ISQ 値の測定

荷重負荷開始前（埋入 6 ヶ月後）、荷重負荷開始 3 ヶ月後、4 ヶ月後、5 ヶ月後において ISQ 値を測定した。ISQ 値の測定は、インプラント体にスマートペグを装着し、近遠心方向および頬舌方向から 3 回ずつ測定し（図 10）、その平均値を測定値とした。

BIC の測定

BIC は実験 1-3 と同様にインプラントのショルダ一部からインプラント底部までのインプラントスレッドの全長に対する骨接触部の長さの百分率として算出した。BIC の測定には Image J を用いた（図 7）。

統計学的分析

得られたデータの統計学的分析には Student の t 検定を用い、有意水準は 0.05 以下とした。

結果

実験 1 インプラント複合体の製作およびイヌ大腿骨における骨再建とインプラントの骨支持の評価

1-1 インプラント複合体の製作および観察

図 11A に IP-CHA の内側面像を、図 11B に SEM 像を示す。内側面像において IP-CHA 内側部にインプラントスレッド窩が形成されているのが観察でき、SEM 像においては、スレッド窩形成後も気孔や連通孔などの IP-CHA の特徴的な構造が破壊されずに残存しているのが確認できた。また、インプラント複合体の断面図において、インプラントのスレッドと IP-CHA のスレッド窩が嵌合している様子が観察された (図 12A, B)。

1-2 ホルマリン固定がインプラント安定指数 (ISQ 値) に及ぼす影響の評価

ISQ 値の測定

0 時間 (固定前) における ISQ 値は 67.5 ± 4.8 で、固定開始後、ISQ 値は経時的に増加した (表 1)。増減率においては、0 時間と 7, 14, 21, 28 日の間にそれぞれ有意差が見られた (図 13)。

1-3 イヌ大腿骨における骨再建およびインプラントの骨支持の評価

経過観察

すべての動物において、観察期間を通じて体重の減少はなく、全身的に良好な健康状態が維持されていた。また、埋入手術部位においても皮膚の裂開や周囲組織の炎症性所見は見られなかった。

組織学的観察

複合体 2 ヶ月群において、皮質骨近くの IP-CHA の気孔内に既存骨から連続する新生骨形成が観察された。IP-CHA 上部および中央部の気孔内には部分的に新生骨の形成が確認できたが、IP-CHA 底部には新生骨は見られなかった (図 14A)。また、インプラント表面には新生骨が達しておらず、インプラント表面と IP-CHA との界面には結合組織が多く見られた (図 14D)。複合体 3 ヶ月群においては、IP-CHA

の上部および中央部の気孔内は新生骨で満たされており、インプラントスレッド表面にも新生骨が達し、部分的にオッセオインテグレーションが獲得されていた。しかし、IP-CHA 底部は新生骨がわずしか見られなかった（図 14B, E）。複合体 6 ヶ月群においては IP-CHA 上部、中央部および底部の気孔内は新生骨で満たされていた（図 14C）。また、新生骨はインプラント表面まで達しており、十分なオッセオインテグレーションが獲得されていた（図 14F）。

ISQ 値の測定

複合体群とコントロール群の ISQ 値の測定結果を図 15 に示す。複合体 2 ヶ月群の ISQ 値は 47.4 ± 11.4 , 3 ヶ月群で 72.0 ± 5.7 , 6 ヶ月群で 77.8 ± 2.9 と、経時的に増加した。このうち複合体 3 ヶ月群および 6 ヶ月群の ISQ 値は 2 ヶ月群の ISQ 値と比較して有意に高い値であった。また、複合体 2 ヶ月群の ISQ 値はコントロール群と比較して有意に低い値を示したが、3 ヶ月群および 6 ヶ月群においてはコントロール群との比較では両群間に有意な差はみられなかった。

BIC の測定

複合体 2 ヶ月群の BIC は $2.2 \pm 3.8\%$, 3 ヶ月群で $44.0 \pm 29.6\%$, 6 ヶ月群で $51.0 \pm 8.3\%$ であり、6 ヶ月群の BIC は 2 ヶ月群の BIC と比較して有意に高かった（図 16）。

実験 2 荷重負荷条件下におけるインプラント複合体の骨再建とインプラントの骨支持の評価

経過観察

すべての動物には観察期間を通じて体重の減少はなく、全身的に良好な健康状態が維持されていた。また、インプラント埋入部位において周囲組織の炎症所見は見られなかった。

組織学的観察

荷重負荷 5 か月後の組織像を図 17 に示す。複合体群では, IP-CHA の気孔内に新生骨が形成されていた。IP-CHA と既存骨界面にも新生骨形成が見られ, インプラント複合体と既存骨が結合している様子が観察できた (図 17A) 。また, 新生骨がインプラント表面に達し, インプラントスレッド表面と接触しており, オッセオインテグレーションが獲得されていた (図 17B) 。コントロール群では, インプラント体周囲に新生骨が形成され, インプラントスレッド表面と接触し, オッセオインテグレーションが獲得されていた (図 17C, D) 。

ISQ 値の測定

複合体群およびコントロール群における荷重負荷開始後の ISQ 値の測定結果を図 18 に示す。荷重負荷開始後, 複合体群の ISQ 値は経時的に増加した。複合体群において, 荷重負荷開始 3 カ月後, 4 カ月後, 5 カ月後の ISQ 値はそれぞれ, 73.8 ± 5.0 , 74.6 ± 3.6 , 76.8 ± 3.7 であり, 荷重負荷開始前の ISQ 値, 59.7 ± 20.5 と比較して有意に高い値であった ($p < 0.05$) 。コントロール群においては荷重負荷開始前と荷重負荷開始後の ISQ 値に有意な差は見られなかった。また, 荷重負荷期間を通して複合体群とコントロール群の間に有意な差は見られなかった。

BIC の測定

荷重負荷 5 カ月後における BIC の測定結果を図 19 に示す。コントロール群の BIC は $56.6 \pm 6.9\%$, 複合体群は $49.1 \pm 19.6\%$ で両群間に有意な差は見られなかった。

考察

<実験方法について>

I 実験動物について

本研究では、実験1,2ともにビーグル・ラブラドルのハイブリット犬を用いた。近年インプラントおよび骨補填材の報告にはウサギ³⁴⁻³⁶⁾やイヌ^{37,38)}などが主に用いられている。ウサギの大腿骨部はインプラント埋入後の骨組織反応の検討によく用いられているが、咀嚼圧等の機能的負荷を与える研究では、顎骨の大きさや性状がヒトと著しく異なっており、条件の設定が困難である。ビーグル・ラブラドル犬は実験用動物として用意されたものであり、血統、性別、年齢、体重などの条件を可及的に一定とすることができる。また、*in vivo*におけるインプラントの研究ではビーグル犬もよく用いられるが、ビーグル・ラブラドル犬の方がより大型犬であるため、無歯顎堤の頬舌幅径や骨高径が十分確保できることから、臨床に近いインプラント埋入条件の設定が可能であると考え、選択した。

II 実験部位について

実験1では大腿骨骨体部を用いた。同骨は顎骨同様、皮質骨、海綿骨、骨髄から構成されている。同骨の骨折治癒は膜性骨化と内軟骨性骨化の両方が見られるが、内軟骨性骨化の発現は微小動揺や酸素分圧の低下が関係しており、微小動揺がなく酸素分圧が高い骨欠損部における治癒過程は膜性骨化を起こすとされる^{39,40)}。下顎体の発生は膜性骨化であり、その骨治癒も膜性骨化とされている⁴¹⁾。本研究では各観察期間で典型的な軟骨細胞は観察されず内軟骨性骨化とは考えにくい。また、IP-CHAの気孔内に多数の血管新生が見られたこと、周囲を骨髄組織で囲まれていることから考えると、酸素供給が豊富で酸素分圧が高いため、大腿骨の骨欠損の治癒過程は顎骨と同じ膜性骨化である可能性が高い。また、同骨は顎骨と比較して、周囲が筋組織で覆われており、インプラント複合体に影響を及ぼす外的因子を極力排除することができるため^{28,37)}、新規材料の骨再建を観察する環境および部位としては適切であると考えた。

実験2では埋入部位として動物の下顎骨小白歯部を選択した。同部はインプラ

ントに関する他の動物実験でもよく用いられており^{28,37)}、これらと比較することにより本研究で使用したインプラント複合体の有用性を検討したいと考えた。また、大臼歯部への適応も検討したが、大臼歯部を抜歯すると咬合支持を喪失し、咬合接触関係の消失および動物の衰弱する可能性が考えられたため、大臼歯部は保存し、第4小臼歯部（P4）を選択した。

III 観察期間について

実験1では骨再建の観察期間を2ヵ月、3ヵ月、6ヵ月に設定した。先行研究によりイヌの大腿骨へ円柱状のIP-CHAブロックを埋入し、3ヵ月および6ヵ月において観察したところ、3ヵ月では皮質骨領域の辺縁部に新生骨形成が見られたが、IP-CHA中心部までは骨伝導が進んでおらず、6ヵ月においてIP-CHAの中心部まで骨伝導が達成された。また、臨床において骨再建後にインプラント埋入を行う際は、一般的に骨再建後に3ヵ月、インプラント埋入後に3ヵ月の治癒期間を設定する。したがって、骨再建の経過の観察および従来の骨再建後のインプラント埋入との比較を考え、観察期間を2ヵ月、3ヵ月、6ヵ月と設定した。

実験2ではインプラント複合体の治癒期間に6ヵ月、荷重負荷期間を5ヵ月に設定した。治癒期間に関しては実験1において、通常の治癒期間である3ヵ月後ではISQ値においてコントロール群との間に差はほぼ認められなかったものの、BICにおいて標準偏差が非常に大きかったこと、組織像において骨接触が少ない部位が認められたこと、インプラント複合体埋入6ヵ月後にインプラントスレッド表面に新生骨が接触し十分なオッセオインテグレーションを獲得できたことなどから6ヵ月に設定した。荷重負荷期間に関しては、本研究と同様にヒーリングアバットメント装着後の固形飼料摂取による荷重負荷法を用いた他の文献で荷重負荷期間を3ヵ月としていた⁴²⁾ことから、本研究も当初は荷重負荷期間を3ヵ月と設定していたが、経時的にISQ値を測定したところ、荷重負荷3ヵ月後のISQ値において

有意差はないものの、コントロール群と比較して低い値であり標準偏差も大きかったことから、その後も値が上昇することが予測された。したがって観察期間を延長したところ、荷重負荷4ヵ月後にインプラント複合体のISQ値はコントロール群とほぼ同値となった。さらに観察を続けたところ、荷重負荷5ヵ月後のISQ値は荷重負荷4ヵ月後のISQ値とほぼ同値であり安定したものと考えられたため、荷重負荷期間を5ヵ月とした。

IV 骨補填材料の選択について

本研究ではインプラント複合体に用いる骨補填材料としてIP-CHAを用いた。骨補填材料の所要条件として、①生体親和性に優れること、②機械的強度を有していること、③組織再生のためのスペースを確保できること、④再生組織の形態を回復できること、⑤細胞への栄養供給路である血管を新生させることができること、などが挙げられている⁴³⁾。

また、骨補填材料の種類としては自家骨、同種骨、異種骨、人工骨に大別される。我が国では骨補填材料として自家骨がよく用いられるが、供給量が限られていることや、供給側への侵襲や感染の危険性などから、欠損が大きい場合には適用が困難な場合がある。凍結脱灰乾燥骨に代表される同種骨は、骨再生を促進する成長因子や骨基質が含まれていることから骨形成能を有しているが¹⁵⁾、肝炎やHIVの感染や拒絶反応といった免疫応答を起こす危険性が指摘されている¹⁰⁾。

Bio-Oss®に代表される牛骨由来移植骨などの異種骨は構造的にヒト骨組織と類似した骨伝導能をもち¹³⁾、欧米では広く用いられており、最近我が国でも厚生労働省に承認されたが、異種骨であるため患者の同意が得にくい可能性がある。人工骨は代表的なものとして β -TCPやHAなどがあげられるが、 β -TCPは初期強度が2MPa程度と弱く、負荷のかかる部位での応用が困難であり、また吸収性材料であることから早期に吸収されて形態回復ができないことや完全に骨組織へ置換され

ないことが懸念される⁴⁴⁻⁴⁶⁾。HAは生体硬組織と同じCaやPを主成分とし、その吸収性は焼結温度、形状、微細構造などにより異なる。また、HAは生体アパタイトと類似した六方晶系の結晶構造を持つことで生体親和性に優れ、骨と化学的に結合する^{47,48)}。しかしながら、これまでのHA骨補填材料は各気孔間を結ぶ連通構造がないため、材料内部への骨新生は困難であった^{21,49)}。気泡ゲル技術により開発された連通構造を有するIP-CHAは、ユニークな3次元的構造を有することで内部への細胞や血管が導入され確実な骨伝導を得ることができる^{21,26)}。また、平均気孔率75%、平均気孔径150 μm で、さらに各気孔間は平均40 μm の小孔で連通した構造を有している。一方、海綿骨は骨密度20-30%、梁状間隙径100-500 μm であり⁵⁰⁾、IP-CHAは海綿骨の3次元的構造をよく模倣しているといえる。材料強度の点では、IP-CHAの初期圧縮強度は海綿骨と同等の10-15Mpaであり、気孔内への新生骨形成の進行に伴い、経時的に圧縮強度は増加するとされている²⁰⁾。以上のことから、本研究では、インプラント複合体に用いる骨補填材としてIP-CHAを選択した。

<研究結果について>

実験1 インプラント複合体の製作およびイヌ大腿骨における骨再建とインプラントの骨支持の評価

1-1 インプラント複合体の製作

IP-CHAの内側には、切削器具によりインプラントスレッド窩が明確に形成されており、製作したインプラント複合体において、インプラントスレッドとIP-CHAが嵌合している様子が観察できた。これらの結果はインプラント複合体が本研究で使用したBrånemark System[®]インプラントだけでなく、歯科や整形外科で使用されている他の多くのインプラントシステムにも適用可能であることを示している。

また、インプラント複合体の製作方法として、成形した IP-CHA にインプラント体を設置する方法と、IP-CHA とインプラント体を同時に焼成する方法が考えられる。しかしながら、後者は IP-CHA を任意の形態にすることが難しく、また高温での焼成によりインプラント表面に酸化膜が形成される可能性がある。したがって、インプラント複合体の製作には本研究で用いた様に、埋入窩の形態に適合する IP-CHA 内面にインプラントスレッド窩を形成し、埋入直前にインプラント体を設置する方法が最適と考えられる。IP-CHA は切削器具や CAD/CAM を用いることにより任意の形態に製作することができるため²⁷⁾、種々の欠損形態への適応が期待できる。

1-2 ホルマリン固定が ISQ 値に及ぼす影響の評価

本研究で行った ISQ 値の測定はインプラントの安定性を非侵襲的に評価する方法として現在臨床において広く用いられている^{30,31)}。しかしながら、動物実験において、観察期間終了時の組織学的評価と同時に ISQ 値の測定を行う際には、ホルマリン固定後に ISQ 値を測定することとなる。ホルマリン固定は形態や抗原性、広範囲の組織や組織成分の分子的特徴を保存する方法として広く用いられている一方、組織状態にも影響を及ぼす^{51,52)}。

ISQ 値はインプラント周囲の骨量およびインプラント界面の骨の剛性に依存することが知られている^{53,54)}。また、骨に埋入されたインプラント体の上部は皮質骨に接するが、中央部から底部は海綿骨や結合組織、骨髄などに接しているため、ISQ 値はインプラント表面に接する軟組織や結合組織の比率によっても影響される^{54,55)}。先行研究において 4 時間のホルマリン固定は ISQ 値の測定に影響を及ぼさないことが示されたが⁵¹⁾、本研究において、4 時間後においても増加傾向が認められ、1 日以上ホルマリン固定は ISQ 値を有意に増加させた。これはホルマリン

の主成分であるホルムアルデヒドが組織細胞に浸透し、タンパク凝固を起こすことによりタンパク質の3次元構造に影響し、骨組織を硬化させたこと⁵¹⁾、また、組織への固定液の浸透により細胞膨潤が起こり、結合組織や骨髄などの軟組織に影響を与えたためと考察される⁵⁶⁾。したがって、ホルマリン固定はISQ値の測定に影響を与えることが明らかとなり、ISQ値の測定はホルマリン固定開始直後に行うのが望ましいことが示唆されたため、本研究のISQ値の測定は生体内あるいはホルマリン固定開始直後に測定した。

1-3 大腿骨における骨再建およびインプラントの骨支持の評価

組織所見では、複合体2ヵ月群,3ヵ月群,6ヵ月群において、IP-CHA内への新生骨の侵入が観察された。インプラント表面への新生骨の接触は3ヵ月群および6ヵ月群において観察されたが、2ヵ月群においては、インプラント表面には線維性結合組織および骨髄が観察され、新生骨は接触していなかった。複合体3ヵ月群および6ヵ月群におけるISQ値が2ヵ月群と比較して有意に高くなったことは、組織学的観察結果をよく反映したものであった。コントロール群のISQ値は観察期間を通して70以上であり、コントロール群での観察期間による有意差は見られなかった。これは、コントロール群のインプラントが埋入時にすでに十分な骨質と骨量を有する骨に埋入され、安定していたことを示している。複合体3ヵ月群および6ヵ月群におけるISQ値はコントロール群と比較して有意な差が見られなかった。一方、本研究ではインプラント複合体のオッセオインテグレーションの評価としてBICの測定を行った。オッセオインテグレーションは「生活を営む骨組織と機能負荷を受けているインプラント体表面との直接の構造的ならびに機能的結合」と定義され、その評価方法として、過去の文献でもBICが多く用いられている^{53-55,57,}

⁵⁸⁾。本研究において複合体2ヵ月群のBICは6ヵ月群のBICと比較して有意に低

かった。これは組織所見および ISQ 値の測定結果と一致している。しかしながら、複合体 2 ヶ月群の BIC と 3 ヶ月群の BIC には有意差がみられなかった。これは、複合体 3 ヶ月群のインプラント複合体はインプラント表面への骨接触がまだ進行中で不安定なことにより標準偏差が大きくなったためと考えられる。

以上のことより、インプラント複合体は埋入 2 ヶ月後ではインプラント体表面への骨接触が十分ではなく、埋入 6 ヶ月後にインプラント表面での良好な骨新生およびインプラントの骨支持を獲得することが示された。

実験 2 荷重負荷条件下におけるインプラント複合体の骨再建とインプラントの骨支持の評価

本研究の荷重負荷方法としては、埋入したインプラント体に安静期間終了後、ヒーリングアバットメントを装着し、固形飼料を摂取させることによって行うこととした。イヌの咬合様式は鉤状咬合のため、固形飼料の摂取によりインプラントに荷重を負荷することが可能なため、同様の手法で荷重負荷の検討を行った研究⁴²⁾を参考に研究計画を立案した。

荷重負荷 5 ヶ月後の組織所見では、複合体群において IP-CHA 内への新生骨の形成及びインプラント体表面への新生骨の直接の接触が観察された。Vandamme らは、生理的範囲内の適切な荷重がインプラント体に付与された場合、インプラントと骨の界面で骨反応が促進されると報告している⁵⁹⁾。荷重負荷開始後の ISQ 値の経時的な増加もあわせて考えると、0.65 MPa の圧縮強さを有する固形飼料を摂取させることによって与えた適切な荷重負荷がインプラント体に付与されたと考えられる。さらに、顎骨の荷重負荷条件下における特徴的な組織所見として、皮質骨領域である複合体上部にとどまらず海綿骨領域である複合体の中央部や底部を含め、周囲を取り囲むような顕著な骨形成が観察されたことが挙げられる。インプ

ラント体に加わった適切な荷重は周囲の IP-CHA を介して複合体周囲のすでに形成された骨組織に伝達され、骨組織内に存在する骨細胞が機械的に刺激されることによってシグナル物質が放出されて、周囲に存在する間葉系幹細胞が破骨細胞や骨芽細胞へと分化し⁶⁰⁾、骨応答が活性化することとあわせて、IP-CHA の良好な骨伝導性も加わったため、本研究で複合体周囲に顕著な骨形成が観察されたものと考えられる。また、コントロール群においてインプラント周囲に新生骨が形成され、インプラント表面と新生骨は接触しており、オッセオインテグレーションを獲得していることが示された。

複合体群の ISQ 値は荷重負荷開始後経時的に増加し、荷重負荷 3 ヶ月以降は 70 以上で安定していた。またコントロール群の ISQ 値は荷重負荷期間中 70 以上で安定していた。予後良好のインプラントの ISQ 値は 57 - 82 との報告があることから³⁰⁾、荷重負荷後も両群のインプラントは安定していたことが示唆される。また、観察期間終了時における BIC の測定結果で、複合体群とコントロール群に有意差が見られなかったことから、荷重負荷条件下においてもインプラント複合体がオッセオインテグレーションを維持していたことが示唆される。

以上の結果より、インプラント複合体は荷重負荷条件下においてもインプラント表面でのオッセオインテグレーションを維持し、インプラント体が良好に支持されていたことが明らかとなった。

<将来の臨床応用に対する展望について>

従来、非吸収性である HA は長期にわたり生体内で残存することや、時には線維性結合組織に被包化され長期症例において組織外へ排出されることが指摘され、骨補填材としての欠点とされていた²⁰⁾。しかしながら、IP-CHA はほとんど線維性結合組織による被包化は認められず、周囲骨と良好に結合する^{28,61)}。本研究にお

いても、インプラント複合体の IP-CHA は既存骨から連続する骨と良好に結合している像が観察され、インプラント複合体は線維性結合組織に覆われることなく周囲骨と一体化していた。また、骨再建後の骨吸収もみられなかったことから、インプラント複合体が骨再建とインプラント埋入を同時に達成する材料として有用であると考えられる。また、IP-CHA は加工が容易な材料であることから、臨床応用に向けてさらに大きな骨欠損や種々の欠損形態への適用が期待される。

本研究では周囲が既存骨に囲まれた骨窩での検討を行ったが、将来的には血管や細胞の供給の乏しい骨治癒に不利な環境、または顎骨区域切除後のアパタイトブロックによる顎骨再建などへの適応を目指したい。しかしながら、IP-CHA は骨伝導能に優れるものの、それ自体に骨誘導能や骨形成能は有しておらず、確実な骨形成およびインプラント支持の獲得にはさらに改良が必要であると考え。この解決に向けては、IP-CHA への細胞導入や成長因子との併用が骨形成を促進させたとの報告があることから^{26,28,37)}、インプラント複合体の IP-CHA への細胞導入や成長因子の導入を行うことで治癒期間の短縮や大きな骨欠損領域での骨治癒が達成されることが期待できる。

総括

骨再建とインプラント埋入を同時に達成する材料の開発を目指し、骨伝導能を有する IP-CHA にインプラント体を設置したインプラント複合体を製作し、動物モデルにおいてインプラント複合体の骨再建とインプラントの骨支持を組織学的、組織形態学的立場から検討した。

1. IP-CHA の内側および製作したインプラント複合体の断面を観察したところ、IP-CHA の 3次元構造を破壊することなく、インプラント複合体の製作が可能であ

った。

2. ホルマリン固定による ISQ 値の測定への影響を検討したところ、ホルマリン固定後、ISQ 値が経時的に増加したことから、ISQ 値の測定は生体内あるいは固定開始直後に行うのが望ましいことが示唆された。

3. イヌ大腿骨にインプラント複合体を埋入し、インプラント複合体の骨再建およびインプラントの骨支持を検討したところ、インプラント複合体は6ヵ月の治療期間でインプラント表面での良好な骨形成およびインプラントの骨支持を獲得した。

4. イヌ下顎骨にインプラント複合体を埋入した後荷重負荷を与え、荷重負荷条件下におけるインプラント複合体の骨再建およびインプラントの骨支持を検討したところ、インプラント複合体は荷重負荷条件下においてもインプラント表面でのオッセオインテグレーションを維持し、インプラント体が良好に支持されていた。

以上の結果から、IP-CHA とインプラント体の複合体は、骨再建とインプラントの骨支持を同時に回復する材料として有用であることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました奥羽大学赤川安正学長ならびに本学大学院医歯薬保健学研究院基礎生命科学部門細菌学研究室菅井基行教授に深甚なる謝意を表します。また、御教示、御校閲を賜りました本学大学院医歯薬保健学研究院基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学研究室高田隆教授、本学大学院医歯薬保健学研究院基礎生命科学部門硬組織代謝生物学研究室吉子裕二教授、ならびに本学大学病院口腔維持修復歯科口腔インプラント診療科阿部泰彦講師に感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、御助言、御協力を頂きました本学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門歯科放射線学研究室谷本啓二教授、本学大学院医歯薬保健学研究院統合健康科学部門歯科麻酔学研究室入船正浩教授に深謝いたします。さらに研究遂行上及び本論文作成上の御助言と御鞭撻を賜りました本学大学病院口腔維持修復歯科口腔インプラント診療科久保隆靖准教授、ならびに本学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門先端歯科補綴学研究室土井一矢博士に感謝の意を表します。さらに多くのご支援を頂きました、本学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門先端歯科補綴学研究室の津賀一弘准教授をはじめ、教室員の方々、特に研究遂行に御助力頂きました林和彦博士、森田晃司博士、大上博史博士、牧原勇介先生、加藤寛先生に感謝いたします。また、材料の提供を頂きましたコバレントマテリアル株式会社及び株式会社エム・エム・ティーの方々、最後に常に私を支えてくれた両親に感謝いたします。

参考文献

- 1) Brånemark P-I, Zarb G, Albrektsson T. Tissue-integrated prostheses. Chicago: Quintessence Publishing 1985: 11 - 43.
- 2) Becker W, Becker BE. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: surgical techniques and case report. *Int J Periodont Rest Dent* 1990; 10: 376 - 391.
- 3) Hermann JS, Buser D. Guided bone regeneration for dental implants. *Curr Opin Periodontol* 1996; 3: 168 - 177.
- 4) Kalk WW, Raghoobar GM, Jansma J, Boering G. Morbidity from iliac crest bone harvesting. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54: 1424 - 1429.
- 5) Chiapasco M, Abati S, Romeo E, Vogel G. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. *Clin Oral Impl Res* 1999; 10: 278 - 288.
- 6) Von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 359 - 366.
- 7) Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Impl Res* 2010; 21: 688 - 698.
- 8) Langer F, Czitrom A, Pritzker KP, Gross AE. The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg Am* 1975; 57: 216 - 220.
- 9) Finn RA, Bell WH, Brammer JA. Interpositional grafting with autogenous bone and coralline hydroxyapatite. *J Maxillofac Surg* 1980; 8: 217 - 227

- 10) Schallhorn RG. Long term evaluation of osseous grafts in periodontal therapy. *Int Dent J* 1980; 30: 101 - 116.
- 11) Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174: 28 - 42.
- 12) Boyne PJ. Advances in preprosthetic surgery and implantation. *Curr Opin Dent* 1991; 1: 277- 281.
- 13) Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jöhnson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50: 241 - 249.
- 14) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920 - 926.
- 15) Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 1996; 67: 918- 927.
- 16) Becker W, Urist M, Becker BE, Jackson W, Parry DA, Bartold M, Vincenzzi G, De Georges D, Niederwanger M. Clinical and histologic observation of sites implanted with intraoral autologous bone graft or allografts. 15 human case reports. *J Periodontol* 1996; 67: 1025 - 1033.
- 17) Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *J Periodontol* 1999; 19: 74 - 86.
- 18) Reuben SS, Vieira P, Faruqi S, Verghis A, Kilaru PA, Maciolek H. Local administration of morphine for analgesia after iliac bone graft harvest. *Anesthesiology* 2001; 95: 390 - 394.
- 19) Froum SJ, Wallace SS, Elian N, Cho SC, Tarnow DP. Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine matrix (Bio -

- Oss) for sinus augmentation histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006; 26: 543 - 551.
- 20) 大野 敬. 多孔性ハイドロキシアパタイト顆粒の有用性について. 奥羽大学歯学誌 1992; 19: 81 - 88.
- 21) Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo*. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 110 - 117.
- 22) Deie M, Ochi M, Adachi N, Nishimori M, Yokota K. Artificial bone grafting [calcium hydroxyapatite ceramic with an interconnected porous structure (IP-CHA)] and core decompression for spontaneous osteonecrosis of the femoral condyle in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008; 16: 753 - 758.
- 23) Kuriyama K, Hashimoto J, Murase T, Fujii M, Nampei A, Hirao M, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa H. Treatment of juxta-articular intraosseous cystic lesions in rheumatoid arthritis patients with interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic. *Mod Rheumatol* 2009; 19: 180 - 186.
- 24) Tamai N, Myoui A, Kudawara I, Ueda T, Yoshikawa H. Novel fully interconnected porous hydroxyapatite ceramic in surgical treatment of benign bone tumor. *J Orthop Sci* 2010; 15: 560 - 568.
- 25) Shigeishi H, Takechi M, Nishimura M, Takamoto M, Minami M, Ohta K, Kamata N. Clinical evaluation of novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary sinus floor augmentation procedure. *Dent Mater J* 2012; 31: 54 - 60.
- 26) Ito Y, Tanaka N, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Agung M, Ochi M. Bone formation using novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic

- hybridized with cultured marrow stromal stem cells derived from Green rat. *J Biomed Mater Res* 2004; 69: 454 - 461.
- 27) Yoshikawa H, Tamai N, Murase T, Myoui A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface* 2009; 6: S341 - S348.
- 28) Doi K, Kubo T, Hayashi K, Imura K, Akagawa Y. Development of cell-hybrid artificial bone: effect of osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells on bone formation with newly developed interconnected porous calcium hydroxyapatite. *Dent Mater J* 2007; 26: 162 - 169.
- 29) Morita K, Doi K, Kubo T, Takeshita R, Kato S, Shiba T, Akagawa Y. Enhanced initial bone regeneration with inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite. *Acta Biomater* 2010; 6: 2808 - 2815.
- 30) Meredith N, Alleyne D, Cawley P. Quantitative determination of the stability of the implant-tissue interface using resonance frequency analysis. *Clin Oral Impl Res* 1996; 7: 261 - 267.
- 31) Friberg B, Sennerby L, Linden B, Gröndahl K, Lekholm U. Stability measurements of one-stage Brånemark implants during healing in mandibles. A clinical resonance frequency analysis study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999; 28: 266 - 272.
- 32) De Santis E, Botticelli D, Pantani F, Pereira FP, Beolchini M, Lang NP. Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. *Clin Oral Impl Res* 2011; 22: 430 - 437.
- 33) Isoda K, Ayukawa Y, Tsukiyama Y, Sogo M, Matsushita Y, Koyano K. Relationship between the bone density estimated by cone-beam computed

- tomography and the primary stability of dental implants. Clin Oral Impl Res 2011; 23: 832 - 836.
- 34) Koo S, König B Jr, Allegrini S Jr, Yoshimoto M, Carbonari MJ, Mitri-Luiz FF. Titanium implant osseointegration with calcium pyrophosphate in rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006; 76: 373 - 380.
- 35) Carmagnola D, Abati S, Celestino S, Chiapasco M, Bosshardt D, Lang NP. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. Clin Oral Impl Res 2008; 19: 1246 - 1253.
- 36) Minami M, Takechi M, Ohta K, Ohta A, Ninomiya Y, Takamoto M, Fukui A, Tada M, Kamata N. Bone formation and osseointegration with titanium implant using granular- and block-type porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA). Dent Mater J 2013; 32: 753 - 750.
- 37) Hayashi K, Kubo T, Doi K, Tabata Y, Akagawa Y. Development of new drug delivery system for implant bone augmentation using a basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel complex. Dent Mater J 2007; 26: 170 - 177.
- 38) De Santis E, Lang NP, Cesaretti G, Mainetti T, Beolchini M, Botticelli D. Healing outcomes at implants installed in sites augmented with particulate autologous bone and xenografts. An experimental study in dogs. Clin Oral Impl Res 2013; 24: 77 - 86.
- 39) Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. J Bone Joint Surg Am 1959; 41: 1243 - 1254.
- 40) Shaw JL, Bassett AL. An improved method for evaluating osteogenesis *in vitro*. Anat Rec 1964; 149: 57 - 66.

- 41) Schenk RK. Histology of primary bone healing in light of new concepts of bone reconstruction. *Unfallheilkunde* 1978; 81: 219 - 227.
- 42) Bilal AI-N, Wilfried W, Knut AG. Insertion torque and resonance frequency analysis of dental implant system in an animal model with loaded implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 21: 726 - 732.
- 43) 岡 高茂. 組織再生のための足場材料. *BIO Clinica* 2000; 15: 1128 - 1131.
- 44) Klein CP, De Blicck-Hogervorst JM, Wolke JG, De Groot K. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles *in vitro*. *Biomaterials* 1990; 11: 509 - 512.
- 45) Koerten HK, Van Der Meulen J. Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 78 - 86.
- 46) Fujita R, Yokoyama A, Kawasaki T, Kohgo T. Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate blocks. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 1045 - 53.
- 47) Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals: preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 99 - 107.
- 48) Kim HM, Himeno T, Kokubo T, Nakamura T. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials* 2005; 26: 4366 - 4373.
- 49) Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR, Wolford LM. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56: 1297 - 1301.
- 50) Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 1995; 314: 266 - 280.

- 51) Morita K, Doi K, Oue H, Kajihara S, Hayashi K, Akagawa Y. Influence of formalin fixation on the implant stability quotient and mechanical characteristics of bone. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2012; [Epub ahead of print].
- 52) Rouleau L, Tremblay D, Cartier R, Mongrain R, Leask RL. Regional variations in canine descending aortic tissue mechanical properties change with formalin fixation. *Cardiovasc Pathol* 2012; 21: 390 - 397.
- 53) Huang HM, Chiu CL, Yeh CY, Lee SY. Factors influencing the resonance frequency of dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61: 1184 - 1188.
- 54) Tawse-Smith A, Perio C, Payne AG, Kumara R, Thomson WM. One-stage operative procedure using two different implant systems: a prospective study on implant overdentures in the edentulous mandible. *Clin Impl Dent Relat Res* 2001; 3: 185 - 193.
- 55) Hui E, Chow J, Li D, Liu J, Wat P, Law H. Immediate provisional for single tooth implant replacement with Brånemark system: preliminary report. *Clin Impl Dent Relat Res* 2001; 3: 79 - 86.
- 56) Bahr GF, Bloom G, Friberg U. Volume changes of tissues in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment. *Exp Cell Res* 1957; 12: 342 - 355.
- 57) Abrahamsson I, Linder E, Lang NP. Implant stability in relation to osseointegration: an experimental study in the Labrador dog. *Clin Oral Impl Res* 2009; 20: 313 - 318.
- 58) Blanco J, Alvarez E, Muñoz F, Liñares A, Cantalapedra A. Influence on early osseointegration of dental implants installed with two different drilling protocols: a histomorphometric study in rabbit. *Clin Oral Impl Res.* 2011; 21: 92 - 99.

- 59) Vandamme K, Naert I, Geris L, Vander Sloten J, Puers R, Duyck J. The effect of micro-motion on the tissue response around immediately loaded roughened titanium implants in the rabbit. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 21 - 29.
- 60) Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 2013; 54: 182 - 190.
- 61) 名井 陽, 古野 雅彦, 荒木 信人, 藤井 昌一, 富田 哲也, 玉井 宣行, 越智 隆弘, 吉川 秀樹. 連通気孔を有する新規ハイドロキシアパタイトセラミックスの優れた骨伝導能. *臨整外* 2001; 36: 1381 - 1388.

各測定時期の ISQ 値

固定時間	ISQ値 (n=6)
0時間	67.47 ± 4.79
4時間	71.00 ± 3.78
1日	73.58 ± 3.37
7日	76.14 ± 3.01
14日	77.25 ± 2.38
21日	77.33 ± 3.01
28日	79.31 ± 1.81

表 1

付図説明

図1 円柱ブロック状 IP-CHA と IP-CHA 表面の SEM 像

連通構造を有する円柱ブロック状の多孔性ハイドロキシアパタイト (A) .
IP-CHA の各気孔間は連通孔により互いに連なった構造を持っている (B) .

図2 インプラント複合体の模式図

中空状の IP-CHA の内側にインプラント体を設置したインプラント複合体
を考案した (特許番号 : 4215595) .

図3 インプラント複合体の製作 (実験 1-1)

中空状の IP-CHA の内側にインプラント体を設置した (A) . 完成したイン
プラント複合体 (B) .

図4 ISQ 値の測定の様子 (実験 1-2)

インプラント周囲の軟組織を除去し, インプラント体とスマートペグが軟
組織の介在なしに固定された状態で, 長軸方向, 短軸方向から各 3 回ずつ,
合計 6 回測定し, その平均値を各時期の測定値とした.

図5 実験プロトコル (実験 1-3)

観察期間が 2 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月になるようにインプラント複合体を埋入し
た (複合体群) . コントロールとしてインプラント単体を埋入し, 埋入後 2
ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月の時点で ISQ 値を測定した (コントロール群) .

図 6 大腿骨へのインプラント複合体の埋入（実験 1-3）

大腿骨骨体中央部に骨窩（直径 6 mm, 深さ 8.5 mm）を形成し（A）, インプラント複合体を埋入した（B）.

図 7 BIC の模式図（実験 1-3, 実験 2）

BIC はインプラントスレッド全長（青線部）に対する骨接触部（赤線）の長さの百分率として算出した.

図 8 実験プロトコル（実験 2）

前処置として P4 を抜歯し, 3 ヶ月の治癒期間後, 片側にインプラント複合体を埋入し, 非吸収性メンブレンにて被覆した, 反対側にはインプラント単体を埋入した. 埋入から 3 ヶ月後, インプラント複合体群においてメンブレンを除去した. 埋入から 6 ヶ月後, 2 次手術を行い, ISQ 値を測定した後, ヒーリングアバットメントを装着し, 固形飼料摂取による荷重負荷を開始した. 荷重負荷は埋入後 6 ヶ月から 11 ヶ月までの 5 ヶ月間行った. 埋入 11 ヶ月後, 動物を屠殺し, 骨組織ブロックを採取した.

図 9 顎骨へのインプラント複合体とインプラント単体の埋入（実験 2）

片側無歯顎部にインプラント複合体を埋入し（A）, 反対側無歯顎部にはインプラント単体を埋入した（B）. 埋入から 6 ヶ月後, 2 次手術を行い, ヒーリングアバットメントを装着した（C）.

図 10 ISQ 値測定の様子（実験 2）

ISQ 値の測定は, インプラント体にスマートペグを装着し, 近遠心方向

および頬舌方向から 3 回ずつ測定し、その平均値を測定値とした。

図 11 スレッド窩形成後の IP-CHA の内側面像 (実験 1-1)

IP-CHA 内側面にインプラントスレッド窩が形成されていた (A) . SEM 像において、スレッド窩形成後も IP-CHA の構造が残存していた (B) .

図 12 インプラント複合体の断面図 (実験 1-1)

インプラント体が IP-CHA に内面に設置されており (A) , インプラントスレッドと IP-CHA のスレッド窩が嵌合していた。

図 13 ISQ 値の増減率 (実験 1-2)

0 時間と 7, 14, 21, 28 日の間に有意差がみられた ($p < 0.05$) .

図 14 大腿骨へ埋入した各観察期間の複合体群の組織像 (実験 1-3)

2 ヶ月群では皮質骨近くに新生骨がみられたが (A) , インプラント表面までには達していなかった (D) . 3 ヶ月群では IP-CHA の上部および中央部に新生骨がみられ (B) , インプラント表面にも部分的に接触していた (E) . 6 ヶ月群では IP-CHA 上部, 中央部及び底部に新生骨がみられ (C) , インプラント表面にも十分に接していた (F) .

図 15 ISQ 値の測定結果 (実験 1-3)

複合体群の ISQ 値は経時的に増加していた。埋入 2 ヶ月後において、複合体群はコントロール群よりも有意に低い値を示したが ($p < 0.05$) , 埋入 3 ヶ月および 6 ヶ月後においては両群間に有意差はみられなかった。

図 16 複合体群の BIC の測定結果 (実験 1-3)

複合体 6 ヶ月群の BIC は, 2 ヶ月群の BIC と比較して有意に高かった ($p < 0.05$) .

図 17 顎骨に埋入したインプラント複合体およびインプラント単体の組織像 (実験 2)

複合体群では, IP-CHA の気孔内に新生骨が形成され, さらに IP-CHA と既存骨界面にも新生骨形成がみられ, インプラント複合体と既存骨が結合していた (A) . また, 新生骨がインプラント表面に達し, インプラントスレッド表面と接触していた (B) . コントロール群では, インプラント体周囲に新生骨が形成され, インプラントスレッド表面と接触していた (C, D)

図 18 荷重負荷期間中の ISQ 値の測定結果 (実験 2)

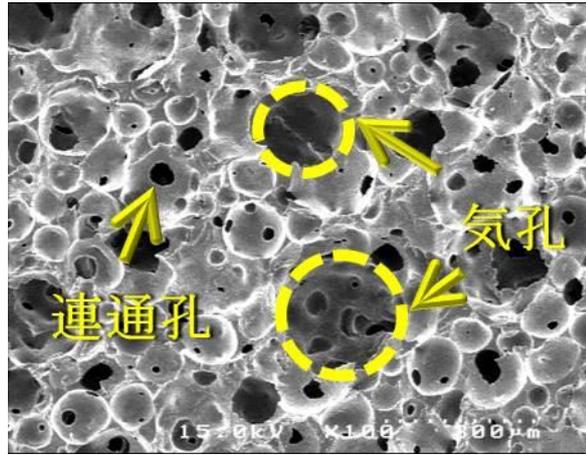
荷重負荷開始後, 複合体群の ISQ 値は経時的に増加していた. 荷重負荷期間中, コントロール群と複合体群に有意差はみられなかった.

図 19 荷重負荷 5 ヶ月後の BIC の測定結果 (実験 2)

コントロール群と複合体群との間に有意な差は見られなかった.



A



B

図 1

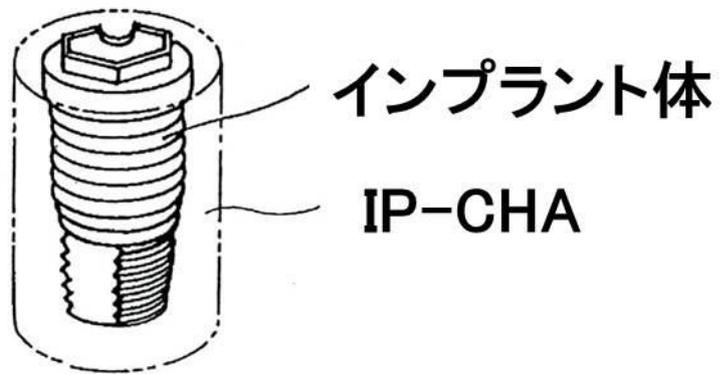
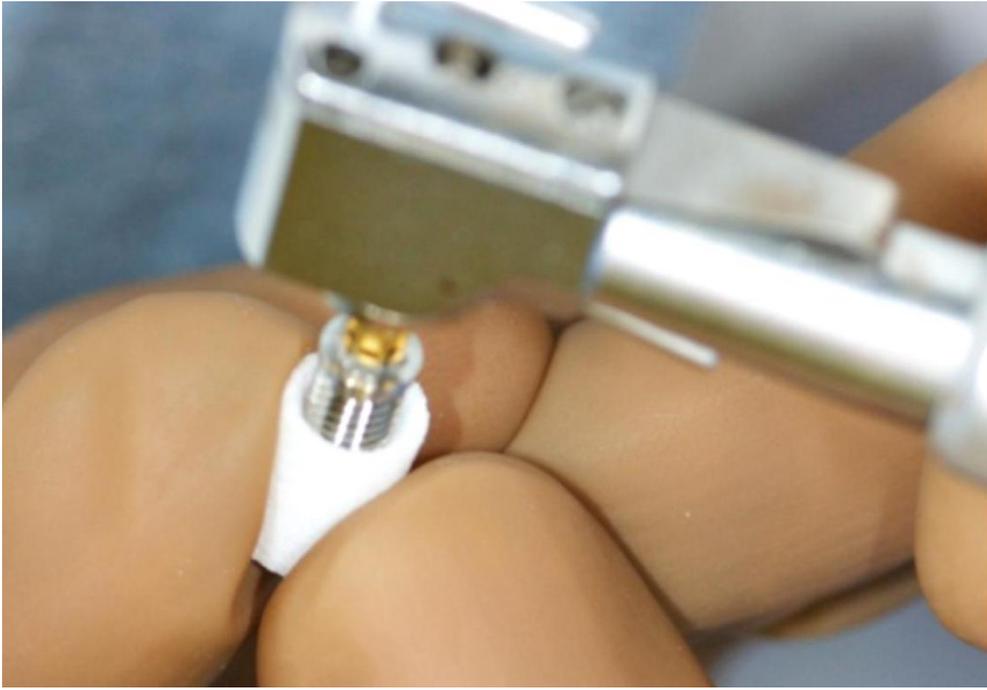


図 2



A



B

☒ 3

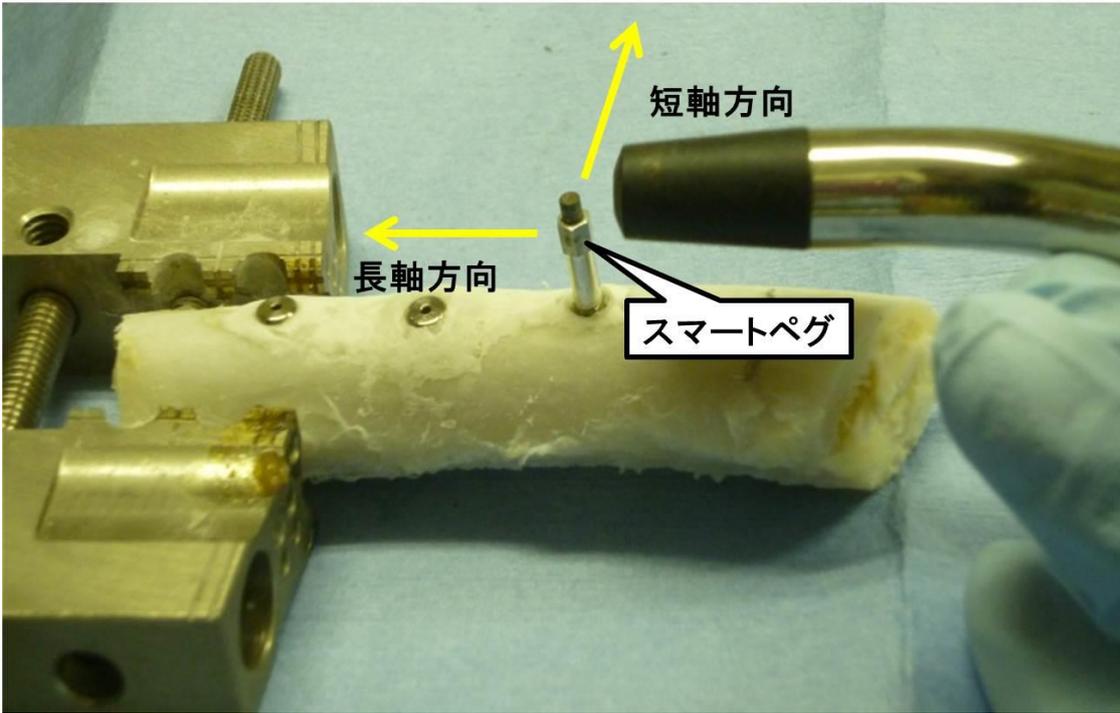
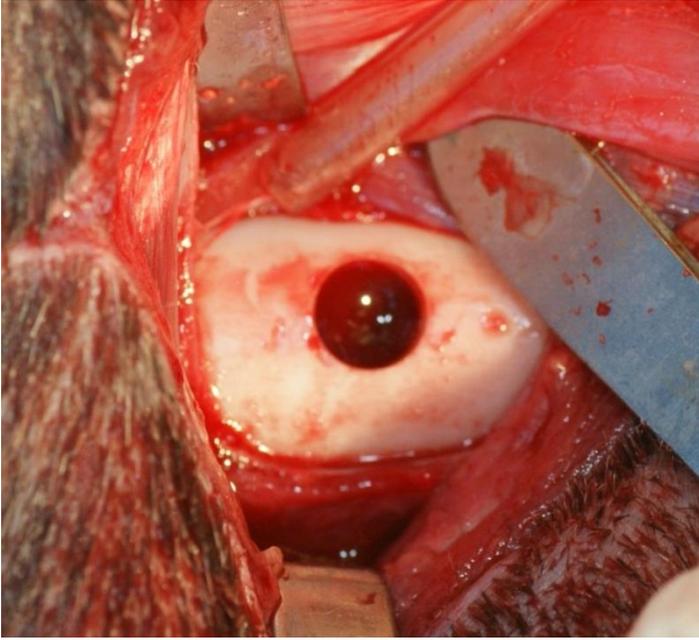


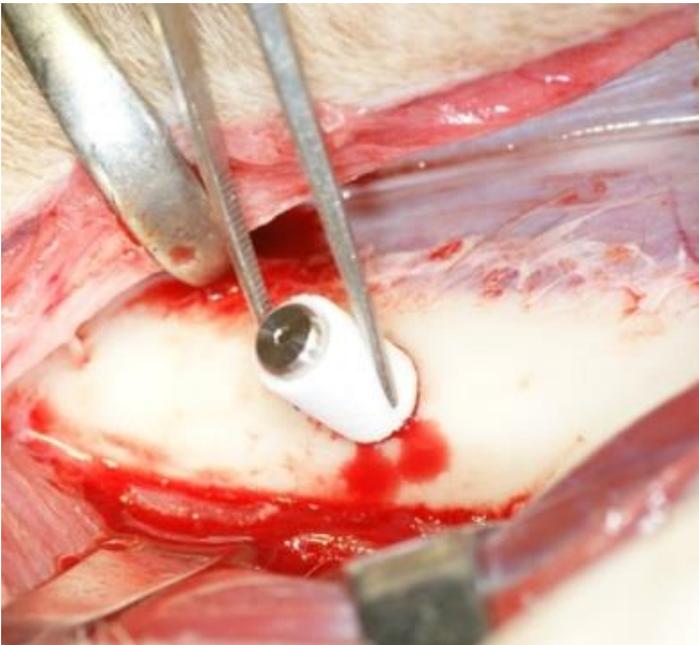
図 4



図 5



A



B

图 6

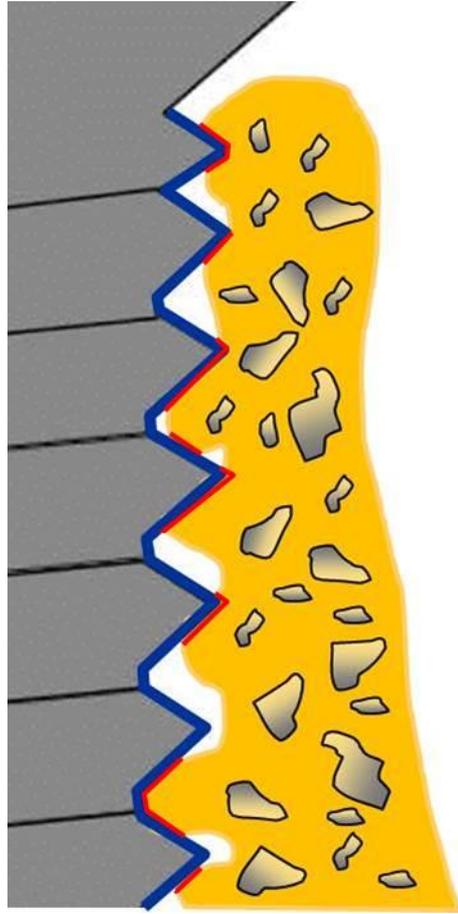


图 7

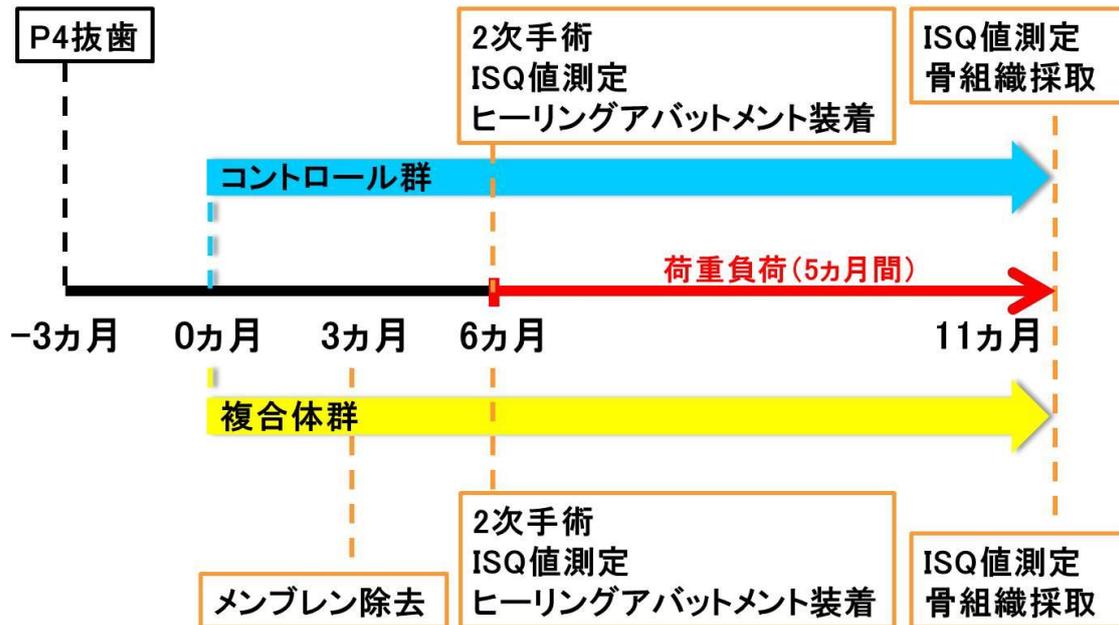
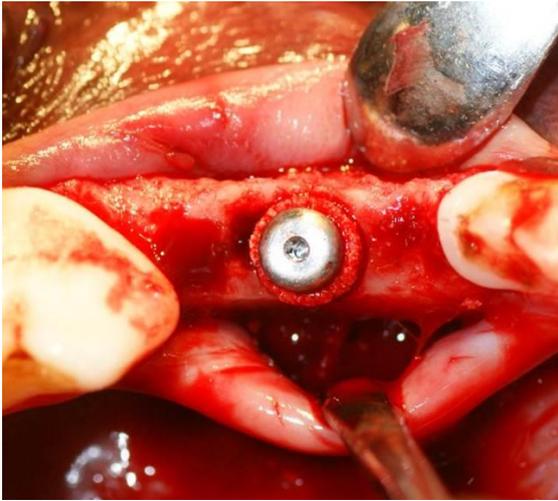


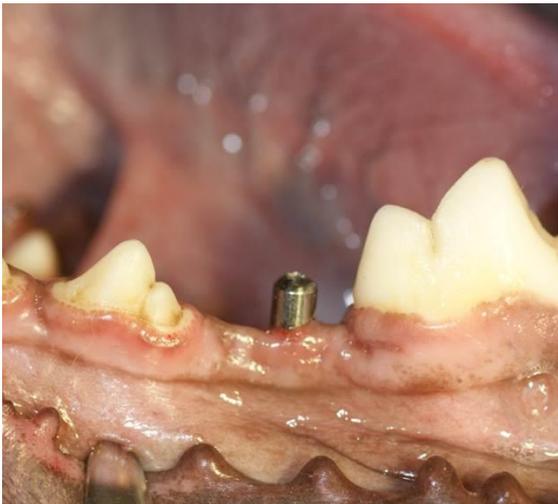
図 8



A



B

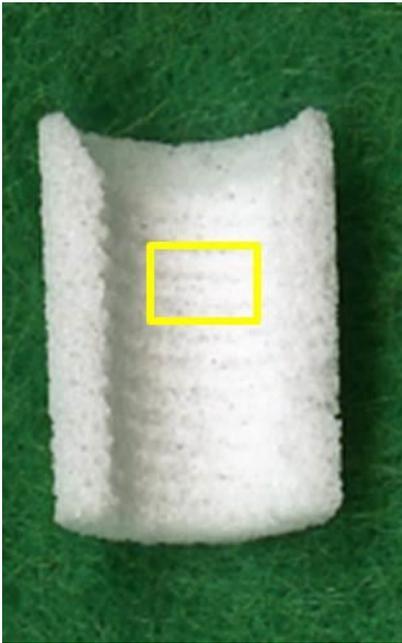


C

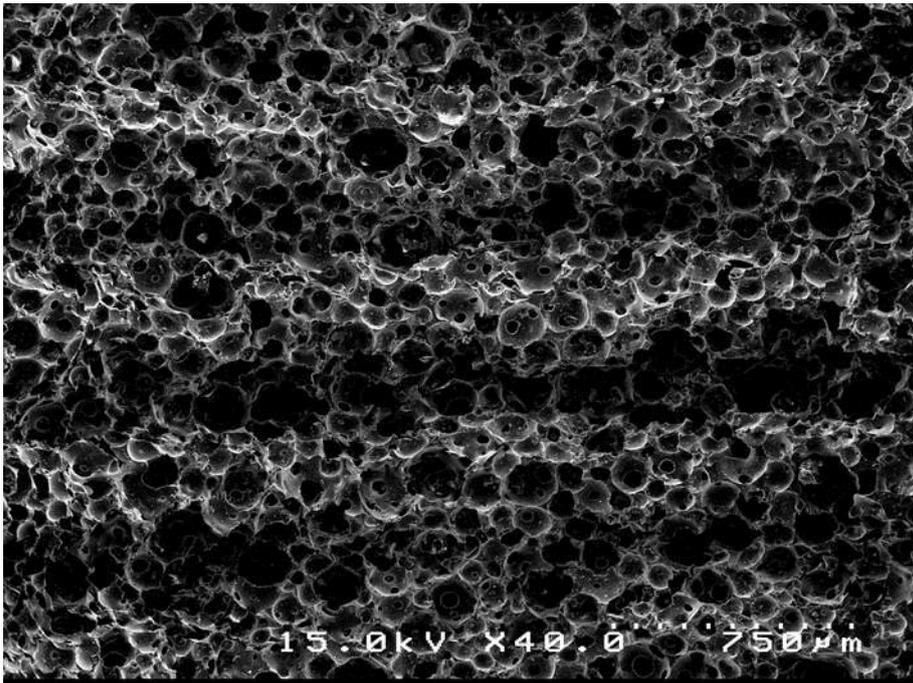
图 9



图 10

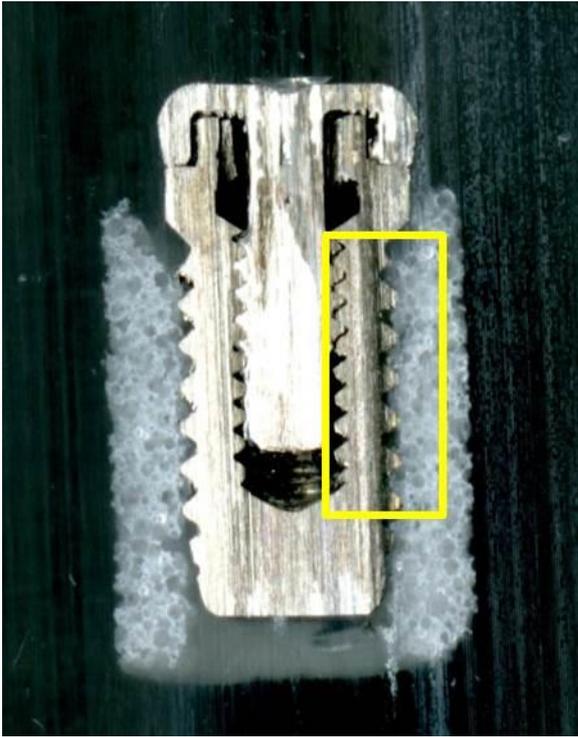


A



B

图 11



A



B

图 12

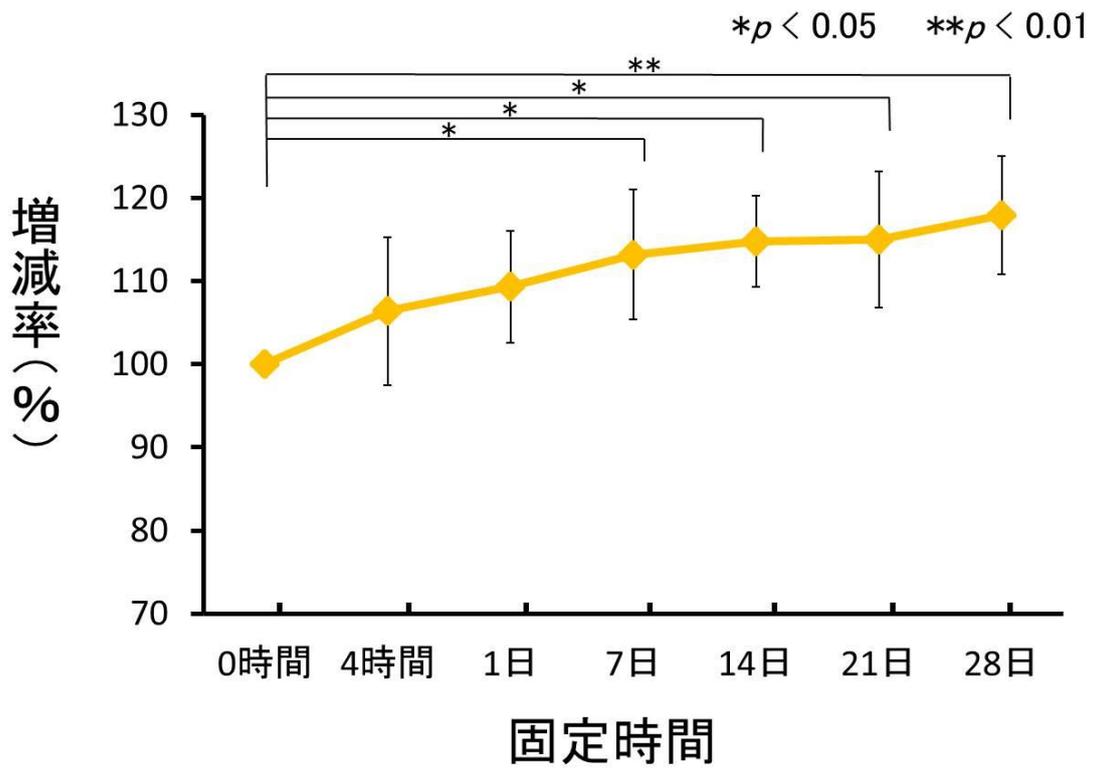
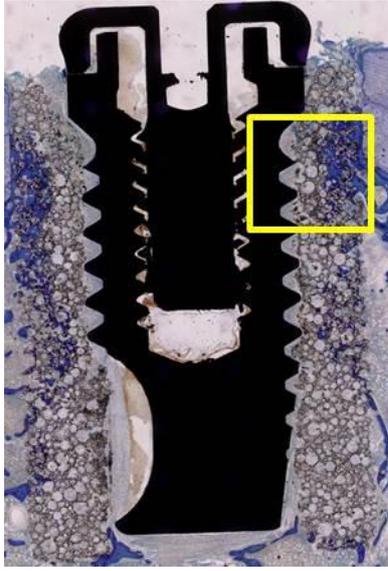
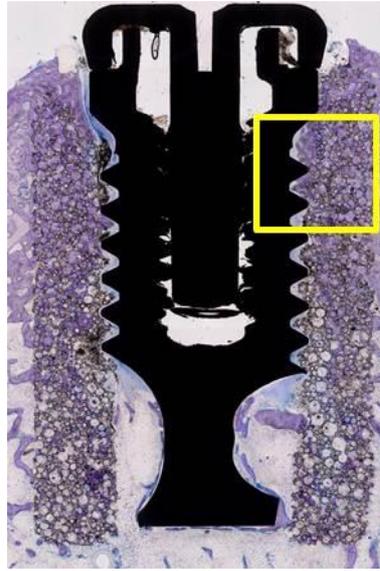


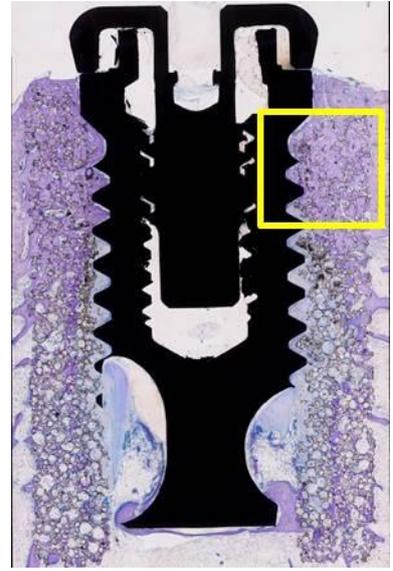
図 13



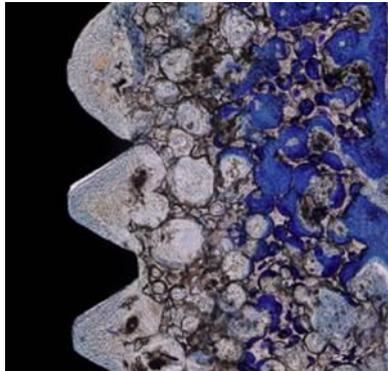
A



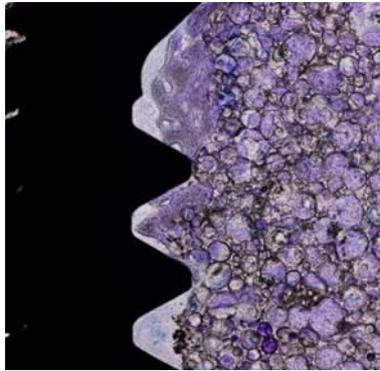
B



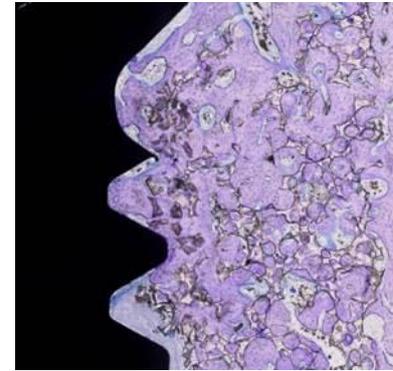
C



D



E



F

图 14

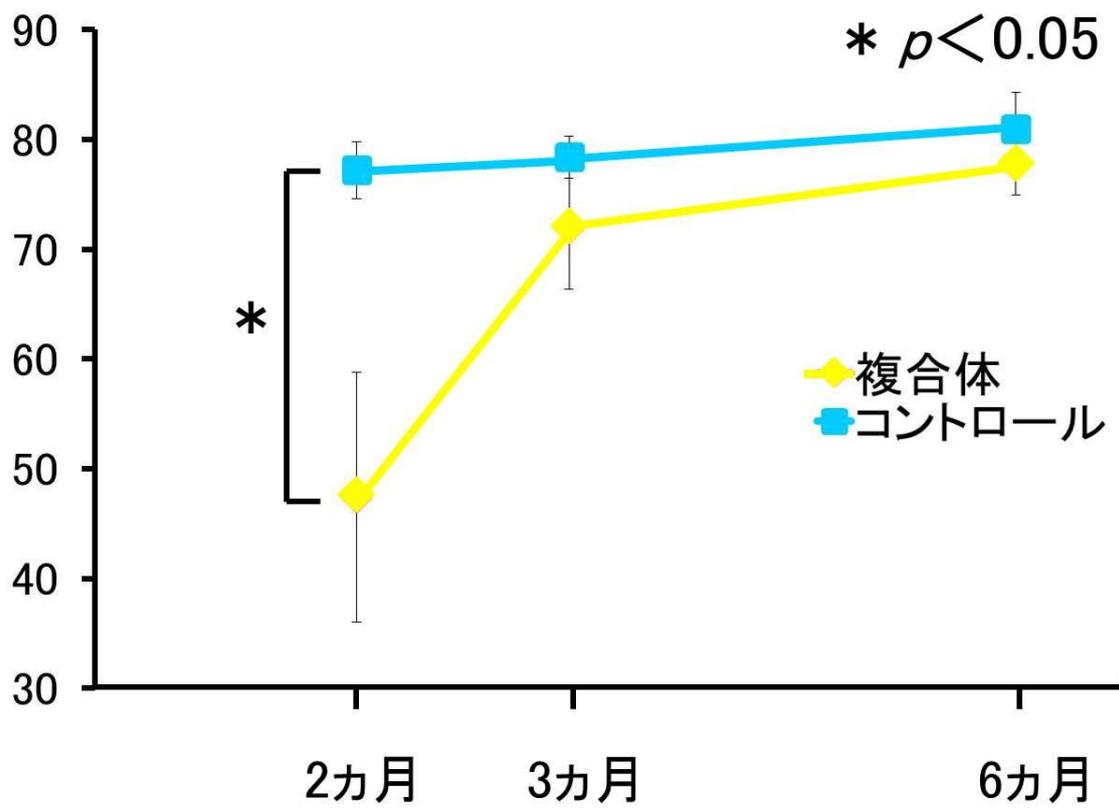


図 15

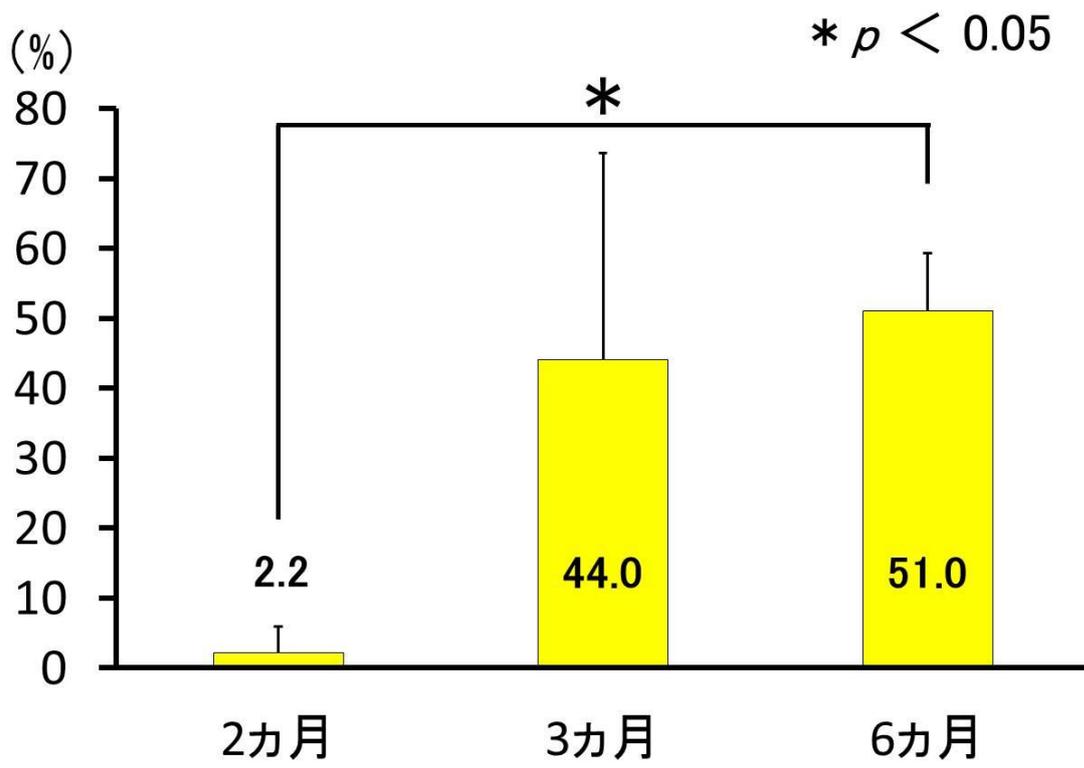
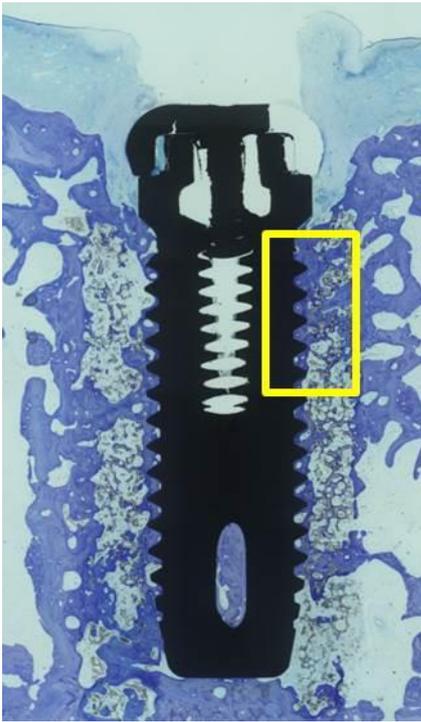
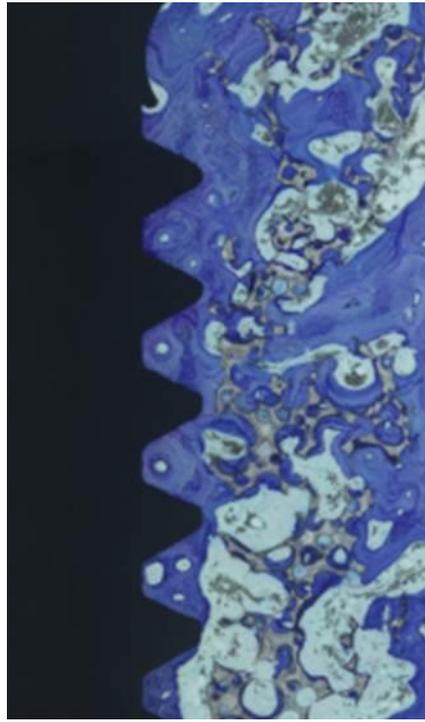


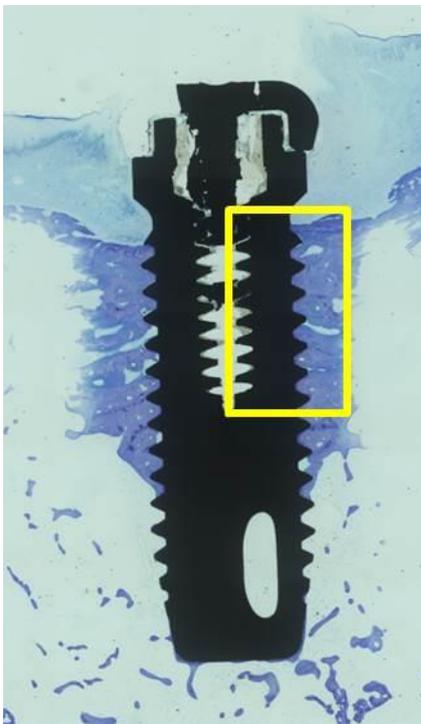
図 16



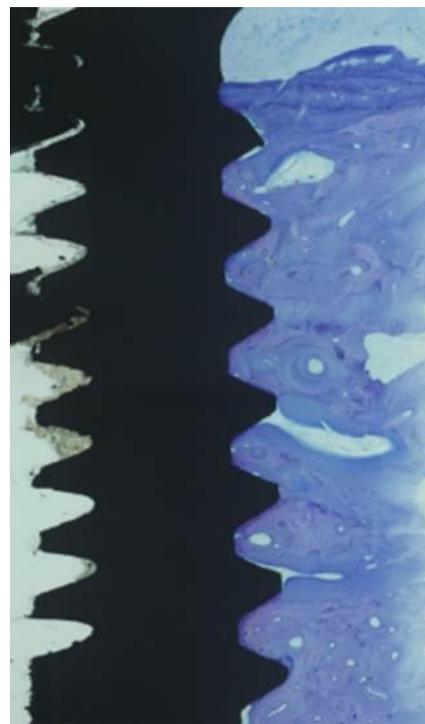
A



B



C



D

图 17

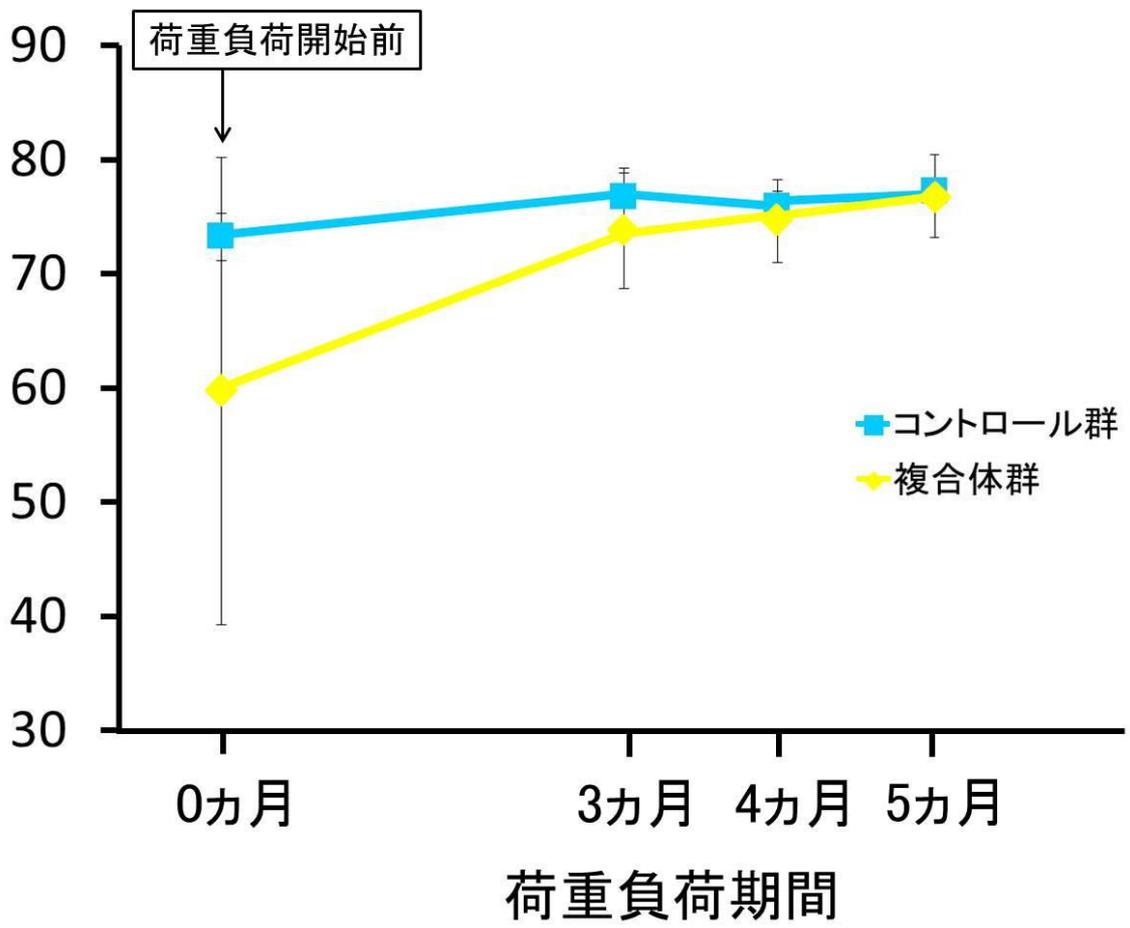


図 18

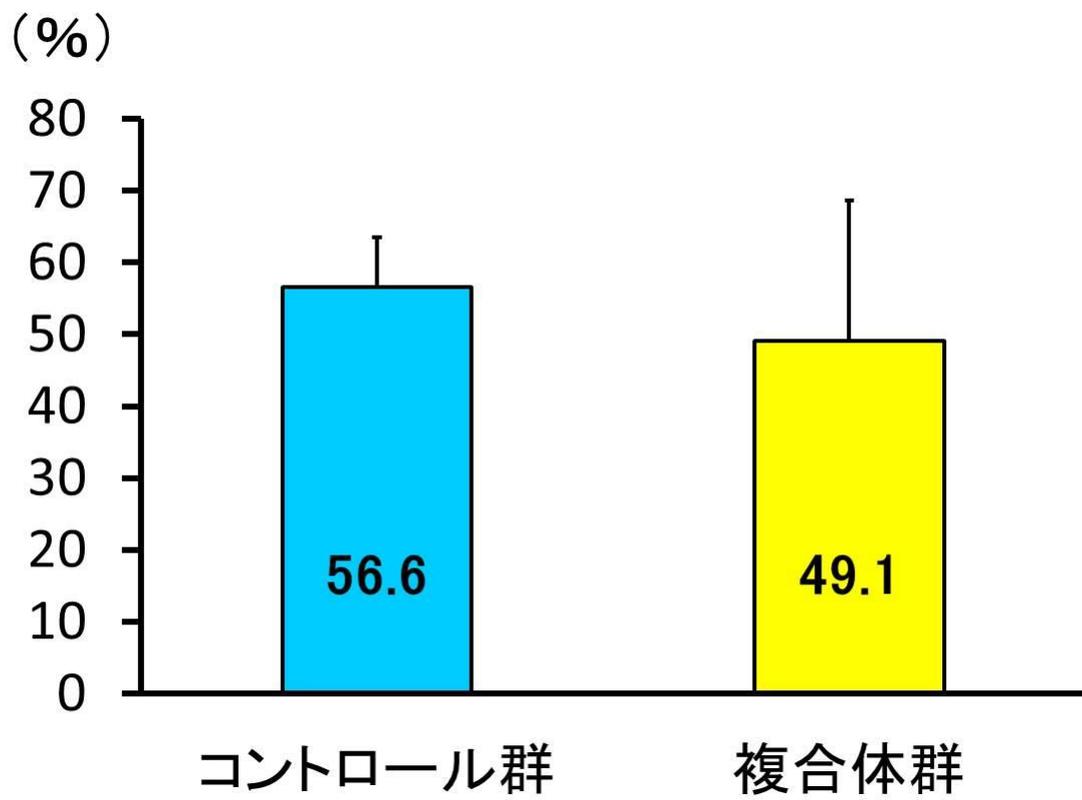


図 19