

オッセオインテグレーションの in vitroでの研究

大阪歯科大学 口腔解剖学講座
主任教授 岩井 康智



はじめに

1960年代初頭、スウェーデンのイエテボリ大学のBrånemarkらによって、骨組織に支持を求めて機能させる、まったく新しいインプラント体の開発が始められた。骨組織の支持はオッセオインテグレーション (osseointegration) とよばれ、軟組織の層を介することなく骨組織とインプラント体とが直接的に結合する状態をさしている。オッセオインテグレーションの獲得がインプラントの成功に非常に重要な鍵と考えられており、インプラント体の材質、形状、表面性状に試行錯誤が繰り返されてきた。現在、インプラントは骨内インプラントが主流となっており、現時点において最も用いられているインプラント体はチタン (純チタン、チタン合金) を材料としたスクリュー型のもので、表面性状は微小粗面が好まれている。粗造面を得る方法として、表面を削除することによるもの (サンドブラスト、酸エッチング、陽極酸化処理) と、表面に添加することによるもの (チタニウムプラズマスプレー、ハイドロキシアパタイトコーティング) があり、インプラント体メーカー各社による競争が続いている。これらのインプラント体を用いた臨床例は近年増加の一途をたどっている。

インプラント体の形態や微細構造はオッセオインテグレーションの獲得に大きな影響を与えるものと考えられ、in vivoを中心に多くの研究が行われているが、in vitroでの研究も増加してきている。インプラント体表面に接する骨形成 (peri-implant osteogenesis) には、骨がインプラント表面に直接形成されるもの (contact osteogenesis) とインプラント体表面から離れた部位で形成されるもの (distant osteogenesis) の2つの現象が認められる¹⁻⁸⁾。本稿ではインプラン

ト体の各種の表面性状の違いが、その骨形成にどのような違いをもたらすかについてin vitroでの研究で得られた知見を紹介する。

材料と方法

1. チタンインプラント体

表面性状の異なる市販のスクリュー型のインプラント体をもちいた。一般的に入手しやすいFINAX (陽極酸化、Ti-6Al-4V、日本メディカルマテリアル (JMM)、大阪、日本：IP-AO)、FINATITE (ハイドロキシアパタイトコーティング、JMM：IP-HA)、SPI (プラスト処理、純チタン (JIS type 4)、トーメン・メディカル・ジャパン/モリタ、大阪、日本：IP-SPI) の3種類を実験に用いた。

2. 細胞

KUSA/A1細胞 (C3H/Heマウスから得られた骨髄由来幹細胞) をJCRB細胞バンク (大阪、日本) から入手して用いた。

3. KUSA/A1細胞の予備研究

1) KUSA/A1細胞を単層培養およびCellmatrix type I-Aコラーゲンゲル (新田ゼラチン、大阪、日本) を用いた3次元培養を行い、分化を誘導するため培地にアスコルビン酸 (AA)、 β -グリセロリン酸 (β -GP)、デキサメタゾン (DEX) を添加した。細胞増殖を調べるためDNA量の計測を行い、分化を調べるため細胞分化のマーカーであるアルカリホスファターゼ活性と、骨に特有のタンパク質であるオステオカルシン (OC) 量を定量した。また、経時的にCKX41位相差顕微鏡 (オリンパス、東京、日本) により観察した。

2) IP-AO、IP-HA、IP-SPIと同じ表面処理したチタンディスクを用意し、その上でKUSA/A1細胞を単層培養した。培養開始後、1時間、3時間にてディスクを取り出し、固定後白金-パラジウムコーティングし、S-4100走査型電子顕微鏡（日立、東京、日本）で観察した。

4. インプラント体表面でのKUSA/A1細胞のコラーゲン三次元培養

1) 培養3代目の細胞を分離し、コラーゲングルと混和し細胞塊を形成した。10cmディッシュに底面からコラーゲングル層、細胞混和コラーゲングル層、コラーゲングル層の3層からなる三次元培地を作製し、中層の細胞混和コラーゲングル層に表面性状の異なる3種類のインプラント体を置き、AA、 β -GP、DEXを含む培地を加え5%CO₂、37℃環境下で3週間培養した。

2) 位相差顕微鏡観察

IP-AO、IP-HA、IP-SPI試料を埋入したディッシュを経時的にCKX41位相差顕微鏡で観察し写真撮影した。

3) 光学顕微鏡観察

3週間の培養後インプラント体を周囲の培地とともに取出し、レジン（Technoviz 7200 VLC；Heraeus Kulzer GmbH, Germany）包埋し、EXACT BS-300CP-AバンドソーとEXACT MG-400CSマイクロカッティングマシン（メイワフォーシス、大阪、日本）を用いて研磨標本を作製した。標本はヘマトキシリンエオジン（HE）、アニリンブルー（AB）、アリザリンレッドS（AR）、トルイジンブルー（TB）染色を行った。標本はBX-41/FX380光学顕微鏡/CCDデジタルカメラシステム（オリンパス）により撮影した。

4) 超微細構造研究

Technoviz 7200 VLCで包埋したインプラント体の標本は、通法により白金-パラジウムコーティングした後S-4100走査型電子顕微鏡で観察した。また、3週間培養後のインプラント体周囲の培地をインプラント体から切り離し、通法によりエポキシ包埋し、ダイヤモンドナイフにより超薄切片を作製した。標本をH-7100透過型電子顕微鏡（日立）で観察した。

結果

1. 予備研究で認められたKUSA/A1細胞の性質

単層培養と三次元培養したKUSA/A1細胞は活発に増殖し、培養3日目以降、石灰化塊を形成する細胞に分化してきた。さらにDNA量、ALP活性、OC量の分析では培養3日から7日の間にピークを迎え、骨形成能をもつKUSA/A1細胞が、単層培養、3次元培養ともにOCを分泌する成熟した細胞に分化したことを意味した⁹⁾。チタンディスク上で単層培養したKUSA/A1細胞は培養1時間では球形をした細胞が認められた。培養3時間では増殖・分化し扁平で、多角形、多形性の仮足を伸ばした細胞がディスク全面を覆っているのが観察されたが、ディスクの表面処理による違いは認められなかった（図1）。

2. 培養3週後のインプラント体表面

位相差顕微鏡観察により、インプラント体（IP-AO、IP-HA、IP-SPI）の周囲を取り巻いて不透明な細胞外基質の経時的な発達がみられた。IP-HAではより不透明な細胞外基質が得られたように見える（図2）。光学顕微鏡観察により3次元培養されたKUSA/A1細胞の増殖と分化およびCellmatrix type I-Aゲルの中に挟まれた細胞塊層の中にコラーゲン線維が分布していることが明らかにされた⁹⁾。

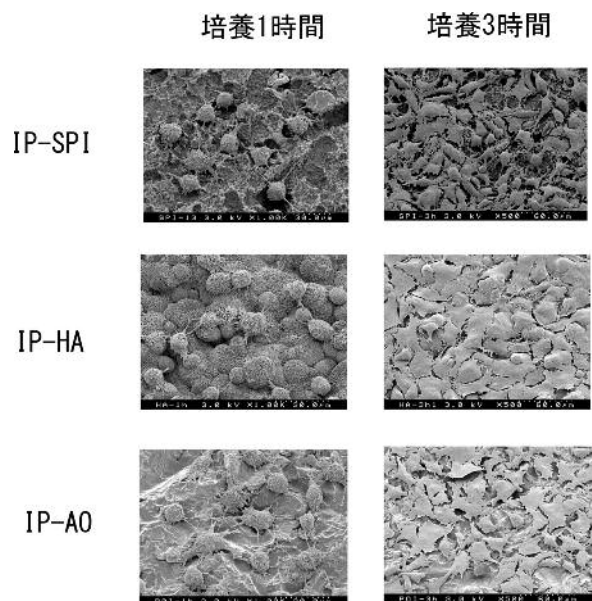


図1 ディスク表面におけるKUSA/A1細胞の変化

3. 各種インプラント体におけるオッセオインテグレーションの組織学 (図3)

1) Contact osteogenesis 現象

Technoviz 7200 VLCに包埋した標本 (IP-AO、IP-HA、IP-SPI) を光学顕微鏡で観察して次の結果が得られた。

IP-AO：光学顕微鏡像 (TB染色) では細胞と陽極酸化膜の界面の大部分は、多数の塊状の構造物で構成された不均一な石灰化層 (5-40 μ m厚) で敷き詰められていることが示された。

IP-HA：光学顕微鏡像 (TB染色) では、10-25 μ m (平均20 μ m厚) の透明層で構成されたハイドロキシアパタイト層が連続的に被覆している。その上に10 μ mの均一な石灰化層が明確に示された。

IP-SPI：(TB染色) 純チタン表面は、微細にブラスト研磨され、多数の不規則な陥凹と突起があることが示された。微小粗面のチタン表面は特に陥凹部において、不連続に無線維性の5-40 μ m厚の石灰化層が形成されている。

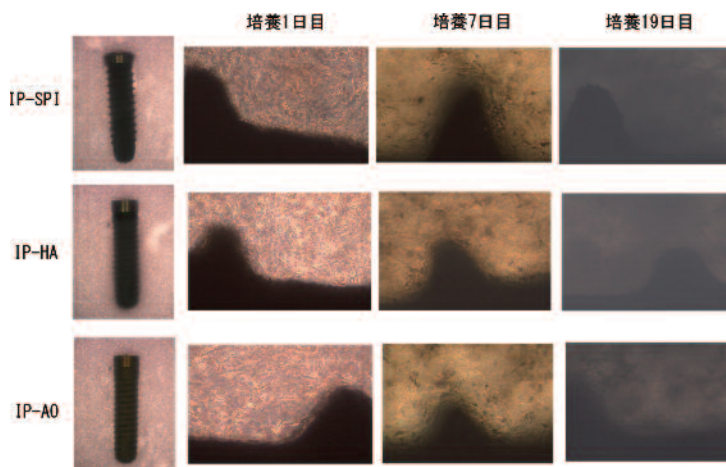


図2 細胞外基質の経日的変化

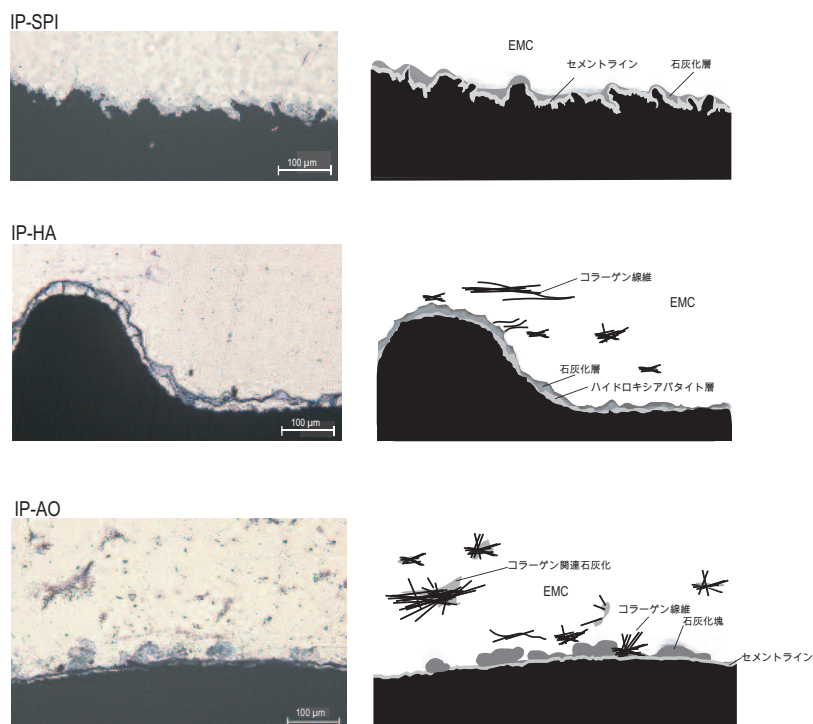


図3 Contact osteogenesis

2) Distant osteogenesis 現象

今回の光学顕微鏡観察で、インプラント体の表面に、KUSA/A1細胞の分布、OCN発現のみられる細胞外基質コラーゲンの分泌が確認された。一方、透過型電子顕微鏡観察で増殖能をもつKUSA/A1細胞がインプラント体を取り囲む不透過性の基質の中では線維芽細胞様であり、細胞質中によく発達した粗面小胞体、ゴルジ装置、多くの水解小体を含んでいることが認められた。分化した骨芽細胞による基質小胞のマイクロアポクリン分泌と、基質小胞とコラーゲンに關係する石灰化が細胞外基質中で観察された(図4)。

まとめ

生体不活性のチタンやチタン合金で作られたインプラント体は、インプラント窩に直接的には結合しないことが明らかにされているが、チタンインプラント体は表面の微小構造に修飾を受けることにより、生物活性を獲得し、骨-インプラント体界面における骨形成を調節している可能性がある。オッセオインテグレーションは、組織学的に見てインプラント体がbone-to-implant direct contact (BIC) によって治癒することであるが、未成熟の骨芽細胞が接着することにより始まる。その細胞は移動・増殖し、細胞集団を作るが、増殖率の低下に従って、成熟した骨芽細胞に分化する。その分泌型細胞は細胞外基質を作り出し、骨誘導能をもつインプラント体表面でBICを開始する。組織学的にみると、インプラント体がインプラント窩に定着するとすぐに、炎症反応が起こり、初期の有機基質の沈着と初期の石灰化無線維性(コラーゲンを含まない)層の形成が誘導される。

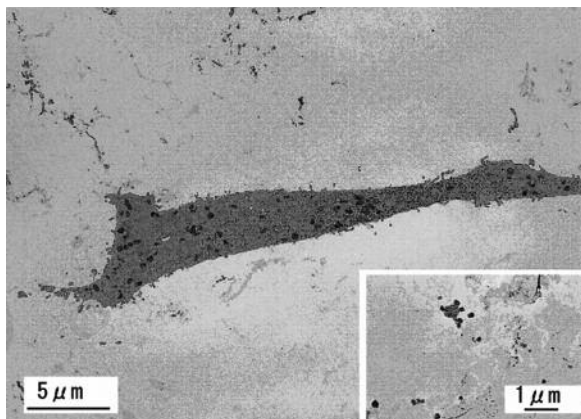


図4 KUSA/A1細胞のTEM像

その有機基質と石灰化無線維層がインプラント体周囲の骨形成を促進するセメントラインとなると考えられる。上に述べた初期の骨-インプラント体界面での骨組織の形成過程を分かりやすくするため模式図を示す(図5)。その後、インプラント体周囲の小柱骨は、徐々に骨改造と骨形成がおこなわれ、長期間安定した機能的オッセオインテグレーションが発達するのである^{8,10-14)}。

今回のコラーゲンをスキヤフォールドとして骨髄由来細胞を培養した中に、インプラント体を包埋した実験は、guided bone regeneration (GBR; 骨造成) をin vitroでシミュレーションしたものである。今回、我々は次のことを明らかにした。

(1) 3次元培養したKUSA/A1細胞はインプラント体周囲に骨形成を生じ、骨誘導能をつ表層(IP-AO, IP-HA, IP-SPI)を有するインプラント体と結合した。(2) アモルファスなセメントライン基質の形成により開始したcontact osteogenesisは、インプラント体の表面性状に応じて、異なる形態を示しながら始まった。(3) 一方、膜内骨化に類似したdistant osteogenesisは、インプラント体を取り巻く細胞外基質の中に認められた。(4) インプラント体周囲の骨形成はコラーゲンスキヤフォールド内で成長し、それによってBICを獲得した。特に、IP-HAは実験21日以内に、より多く類骨基質を誘導した。

生体吸収性のスキヤフォールドの中でインプラント体周囲に骨形成が増加し、より多くの類骨が形成されることが示唆された。このことは骨欠損の大きなインプラント窩において役立ち、また、ここで造成された骨組織は骨改造現象を受けてインプラント周囲骨組織の治癒が進むと考えられ、より安定した咀嚼機能を可能にするオッセオインテグレーション(functional osseointegration)の獲得につながることを期待される。

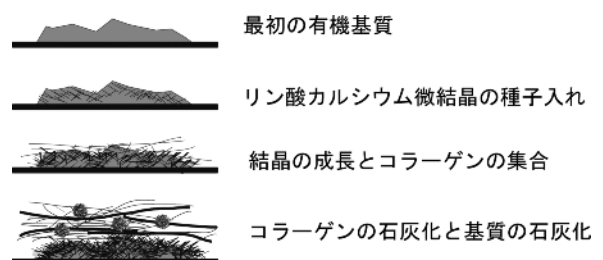


図5 骨-インプラント体表層界面での骨組織形成の模式図

稿を終えるにあたり、大阪歯科大学同窓会報に発表の機会を与えていただきました関係の先生方に心より感謝申し上げます。また、本研究に対しご協力を頂きました口腔解剖学講座隈部俊二准教授、中塚美智子講師、上田甲寅助教、安 春英助教、乾千珠子助教、中央歯学研究所堀 英明主任にお礼申し上げます。

参考文献

1. Davies JE. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 1996;245:426-445.
2. Nasatzky E, Gultchin J, Schwartz Z. The role of surface roughness in promoting osteo-integration. *Refuat Happen Vehashinayim* 2003;20:8-19, 98.
3. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003;67:932-949.
4. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* 2005;36:630-644.
5. 岡本 浩監訳. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Lindhe 臨床歯周病学とインプラント 第4版 [インプラント編] 東京：クインテッセンス出版，2005：887-908.
6. Ferguson SJ, Langhoff JD, Voelter K, von Rechenberg B, Scharnweber D, Bierbaum S, Schnabelrauch M, Kautz AR, Frauchinger VM, Mueller TL, von Lenthe H, Schlottig F. Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Intl J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:1037-1046.
7. Langhoff JD, Voelter K, Scharnweber M, Schnabelrauch M, Schlottig F, Hefti T, Kalchofner K, Nuss K, von Rachenberg B. Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep. *Intl J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:1125-1132.
8. 古谷野潔，松浦正朗編著. 朝比奈泉，和泉雄一，佐藤博信，寺田善博，細川隆司. エッセンシャル口腔インプラント学. 第1版. 東京：医歯薬出版，2009；10-71.
9. 中塚美智子，橋本典也，隈部俊二，安 春英，上田甲寅，三上博子，岩井康智. 歯科用インプラント体表面への細胞接着と初期硬組織形成 解剖学雑誌 2010；第115回総会・全国学術集会抄録号：177.
10. Murai K, Takeshita F, Ayukawa Y, Kiyoshima T, Suetsugu T, Tanaka T. Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats. *J Biomedical Materials Res* 1996;30:523-533.
11. Ferretti M, Palumbo C, Contri M, Marotti G. Static and dynamic osteogenesis: Two different types of bone formation. *Anat Embryol* 2002;21-29.
12. 山崎長郎，高橋常男，勝山英明，林 揚春，井上 孝（編集）. Ultimate Guide IMPLANTS. 第1版. 東京：医歯薬出版，2004：38-51.
13. 赤川安正，松浦正朗，矢谷博文，渡邊文彦（編集）. よくわかる口腔インプラント学. 第1版. 東京：医歯薬出版，2005：47-59.
14. Joos U, Meyer U. New paradigm in implant osseointegration. *Head Face Med* 2006;2:19.