骨原性細胞株 MC3T3-E1 による インプラント材料の生体親和性に関する研究

板倉 良暢

In Vitro Study on Biocompatibility of Implant Materials Using MC3T3-E1 Osteogenic Cell Line

Yoshinobu Itakura

Abstract : This study was investigated to clarify the biocompatibility of implant materials by means of MC3T3-E1 osteogenic cell line established from newborn mouse calvaria. These cells have the ability to differentiate into osteoblasts *in vitro* and to deposit hydroxyapatite crystals on extracellular matrix produced by them. So they seem to be more suitable than fibroblasts for the *in vitro* evaluation of implant materials, since the materials are mostly applied into bone. The materials used in this study are aluminium oxide (single crystal and poly crystal), titanium, zirconium, palladium-alloy, thermanox plastic cover slip (control). Disks (diameter : 10 mm, thickness : 1 mm) of these materials were placed in ϕ 60 mm plastic dishes. On these disks, 3,000/disk of cells were inoculated and cultured in 5 ml of α -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. On 2 days of culture, the cells on titanium and zirconium were thick and spindle in shape, similarly to them grown on plastic dishes.

To study the effect of implant materials on cell growth, differentiation and calcification, the cells were cultured for 17 days. The protein and DNA contents in the cells cultured on titanium and aluminium oxide were significantly greater than those on the other materials. Titanium and aluminium oxide poly crystal hastened cell growth. The values of alkaline phosphatase activity were high on titanium and zirconium. The capability of collagen synthesis has been examined using tritium proline. Zirconium was the most capable material on the proportion of collagen to protein synthesized. Titanium and zirconium accelerated cell differentiation. Ca and P contents were the highest on titanium, while they were lower on the other materials than those on control.

In conclusion, these results suggest that titanium has very well biocompatibility to the bone tissue as an implant material.

Key words : implant, *in vitro*, osteoblast, biocompatibility activity, calcification

I. 緒 言

今後高齢化社会の到来に伴い、口腔機能の回復がきわ

めて重要な問題になることは衆目の一致するところである。このような気運のなかで、口腔機能を回復する手段として、近年インプラント法が急速に注目を浴び、臨床応用例は急激な増加を示している。にもかかわらず、これに用いるインプラント材料に関する基礎的研究は十分とはいえず、加えてそれらの生体親和性についての知見は必ずしも一致した見解をみていない。従来、インプラント材料に関する研究は、動物を用いた *in vivo* の実験が主流を占め、埋入後の経過観察あるいは病理組織学

東北歯科大学補綴学第1講座 (指導: 潤田和好教授; 指導: 山本茂久教授 (口腔解剖学第2講座))

Department of Prosthodontics, Tohoku Dental University
(Director : Prof. Kazuyoshi Uruta ; Director : Prof. Shigehisa Yamamoto (Department of Anatomy))

昭和61年8月1日受付

的検索等が行われてきた¹⁻³⁾。また, *in vitro* では線維芽細胞あるいは上皮性細胞等を用いて, 細胞の増殖性あるいは表面形態等によりインプラント材料の評価実験が行われている⁴⁻⁸⁾。しかし, 歯科インプラント材料の大部分が骨内に適用され, 骨による維持力が期待されることを考えあわせると, これらの細胞を使用したインプラント材料の評価法は, 必ずしも適切な実験方法であるとはいえない。

そこで著者は, 最近 Kodama ら⁹⁾がマウス頭蓋冠より樹立し, Sudo ら¹⁰⁾によりその特性が解明された培養下で骨組織を形成する能力を保持している正常細胞由来の骨原性細胞株 MC3T3-E1 を用い, 最近普及の著しいセラミックス材料や純金属等のインプラント材料の生体親和性について検討を行った。

II. 材料と方法

1. 実験対象としたインプラント材料

実験に用いたインプラント材料は, セラミックス材料として単結晶酸化アルミニウム (ALS), 多結晶酸化アルミニウム (ALP), また, 金属材料としてチタン (Ti; 99.9%), ジルコニウム (Zr; 99.9%), パラジウム合金 (Pd) (Castwell 12, GC Co., 東京) (Ag 45%, Pd 20%, Cu 18%, Au 12%, Ot 5%) である。対照としては Thermanox plastic cover slip (PCS) (Miles Lab. Inc., Elkhart, In, USA) を用いた。これらの材料を直径 10 mm, 厚さ 1 mm の円盤状に成型し, かつ表面を滑面 (0.3 μ m) に仕上げた。PCS は直径 10 mm に切り抜いて用いた。

2. 培養方法

実験に用いた培養細胞 MC3T3-E1 は, C 57 BL/6 マウス新生仔頭蓋冠より樹立した骨原性細胞株である。細胞は α -modification of Eagle's minimal essential medium (α -MEM) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) に牛胎仔血清 (M.A. Bioprod., Walkersville, MD, USA) を 10% 加え, さらに硫酸カナマイシン (明治製菓, 東京) を 60 μ g/ml の割合で添加した培地で, 温度 37°C, 湿度飽和状態, CO₂ を 5% 混和した条件にて培養し, Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) で作製した 0.003% actinase E (科研製薬, 東京)-0.02% EDTA で分散, 継代した。

実験は, 懸濁培養用 ϕ 60 mm のポリスチレンディッシュ (Falcon, Becton Dickinson, Cockeysville,

MD, USA) 内に置いたインプラント表面上に 3,000 個の MC3T3-E1 細胞を植え込み, 培地を 5.0 ml 加えて培養し, 3 日ごと培地交換する方法で行った。

3. 細胞形態の観察

形態の観察には, 細胞植え込み後 2 日間, 4 日間培養したものを試料として用いた。試料を N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid 緩衝液 (pH 7.4) (HEPES) (SIGMA Chemical. Co., St Louis, MO, USA) にて十分に洗浄し, 0.1 M sodiumcacodylate (TAAB Lab., Berks., England) 緩衝液 (pH 7.4) で調整した 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde 固定液にて 3 時間の固定を行った。さらに, 上昇エタノール系列にて脱水後, CO₂ を用い臨界点乾燥を行った。乾燥後の試料にイオンスパッター (E 101, 日立) を用い, 金・パラジウムの蒸着を施し, 走査型電子顕微鏡 (S-450, 日立) により, 加速電圧 15 kV で観察した。

4. 総タンパク量および DNA 量の測定

17 日間培養を行い, 総タンパク量と DNA 量の測定を行った。なお, 短期間での石灰化を図るため sodium β -glycerophosphate (β -GP) (和光, 大阪) を 5 mM の濃度で培地に加えた。試料は HEPES にて十分に洗浄後, 材料表面より細胞層を剝離し, 1.0 ml の HEPES を加えて glass-Teflon homogenizer にて細胞をホモジナイズした。さらに, Ti, ALP, PCS については培養 5, 9, 13, 17 日後の DNA 量を測定した。

1) 総タンパク量

総タンパク量は Bradford¹¹⁾ の方法に従い, ホモジナイズの終了した試料 0.8 ml に, protein assay dye reagent (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) 0.2 ml を加え攪拌後, 595 nm の波長にて吸光度を測定した。なお, 標準試料として牛血清アルブミンを用いた。

2) DNA 量

DNA 量は Hinegardner¹²⁾ の方法に従い, エタノールで固定した試料に, 40% 3, 5-diaminobenzoic acid dihydrochloride (DABA) (Aldrich Chem., Milwaukee, WI, USA) を 0.1 ml 加え, 60°C, 45 分間反応させ, 1 N HCl で反応停止後蛍光分析を行った。なお, 標準試料として仔牛胸腺 DNA (SIGMA) を用いた。

5. ALPase 活性の測定

総タンパク量の測定に用いた試料の一部について, ALPase 活性を Lowry ら¹³⁾の方法により測定した。16

mM p-nitrophenyl phosphate disodium salt (和光, 大阪) と 1 M の 2-amino-2-methyl-1-propanol (pH 10.0) とを等量混合した溶液を試料に加え, 37°C にて 30 分間反応させ, 0.25 N NaOH で反応停止後, 遊離した p-nitrophenol を 410 nm の波長にて吸光度測定した。

6. コラーゲン合成能の測定

コラーゲン合成能の測定は, Peterkovsky & Diegelman¹⁴⁾ の方法に準じて行った。5 mM の β -GP を含む培地で 17 日間培養した細胞に, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸と β -aminopropionitrile を含む α -MEM 1 ml と, 5 μCi の L-[3, 4- ^3H] proline (New England Nuclear Corp. Boston, MA, USA) を加えて 3 時間ラベルした。

その後, 材料から細胞を剝離し, 0.2 N NaOH を 1.0 ml 加えてホモジナイズした。ついで 50% トリクロル酢酸 (TCA, 5% タンニン酸を含む) 0.2 ml を加え, タンパクを沈殿させた。そして, この沈殿タンパク質をさらに 10% TCA (1% タンニン酸を含む) で 2 回遠心沈殿させ, 氷冷アセトンで脱 TCA 後, 1.0 ml の 0.1 N NaOH で溶解した。この溶液を 0.5 N HCl で中和後, 2 等分し, それぞれに等量の 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6, 10 mM CaCl_2 と 20 mM N-ethylmaleimide を含む) を加えた。そして, 一方には, 20 units の精製した細菌性コラーゲナーゼ (SIGMA) を加え, 他方には, 上記の Tris-HCl 緩衝液を等量加え, 37°C で 3 時間消化した。その後, TCA の最終濃度が 10% になるように, TCA で調整した。

Fig. 1 Scanning electron micrographs of 2-day cultures of MC3T3-E1 cells on implant materials
a : PCS, b : ALS, c : ALP, d : Ti, e : Zr, f : Pd, scale : 30 μm

ンパクを沈殿させ、コラゲナーゼで消化された上清成分の放射活性から、コラーゲンの合成能を測定した。

7. Ca 量と P 量の測定

5 mM の β -GP を加えた培地で、17 日間培養を行い試料とした。試料は HEPES にて十分に洗浄後、材料表面より細胞層を剝離し、1.0 ml の HEPES を加えてホモジナイズした。試料に 2.0 ml の蒸留水、1.0 ml の HNO_3 と 0.25 ml の 70% HClO_4 を加え、攪拌後 180°C の恒温台にて乾燥した (湿性灰化)。乾燥した試料に 3 N-HCl と蒸留水を加えて、全量を 10 ml の灰化溶液 (酸規定度: 0.3N) とし、高周波誘導結合プラズマ (inductively coupled plasma, ICP) 発光分析装置 (ICPS-50, 島津,

京都) により灰化溶液中の Ca, P を定量した。

8. von Kossa 染色による観察

5 mM の β -GP を加えた培地で、17 日間培養を行い試料とした。試料は HEPES にて洗浄後、HEPES 緩衝 formalin で固定した。そして、十分な水洗後に 5% AgNO_3 水溶液に浸漬、5 分間紫外線照射を行った。つぎに、水洗後 5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液に 5 分間浸漬した。染色の終了した試料は材料表面より剝離し、スライドガラスにパラサムにて封入した。

Fig. 2 Scanning electron micrographs of 4-day cultures of MC3T3-E1 cells on implant materials
a: PCS, b: ALS, c: ALP, d: Ti, e: Zr, f: Pd, scale: 30 μm

Table 1 Protein and DNA contents in clone MC3T3-E1 cells cultured on implant materials

	Protein ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	DNA ($\mu\text{g}/\text{disk}$)
PCS (control)	173.38 $\pm$ 22.46 (100)	11.48 $\pm$ 0.92 (100)
ALS	236.36 $\pm$ 29.95 (136)*	16.26 $\pm$ 1.51 (142)**
ALP	259.09 $\pm$ 26.78 (149)*	19.04 $\pm$ 1.57 (166)**
Ti	255.84 $\pm$ 16.57 (148)**	18.78 $\pm$ 3.46 (164)*
Zr	196.10 $\pm$ 8.79 (113)	14.14 $\pm$ 0.44 (123)*
Pd	105.84 $\pm$ 19.71 (61)*	8.32 $\pm$ 0.72 (73)**

Values are the means $\pm$ SD for 3 disks

Numbers in parentheses are percentages of control values

* $p<0.05$; ** $p<0.01$ compared with control (t test)

III. 結 果

1. 細胞の形態

対照として用いた PCS 上での培養 2 日目, 増殖期の細胞外形は, 不整多角形を示し, 短い細胞質突起がわずかにみられ, 胞体は薄く扁平で, 周辺には短い糸状偽足 filopodia (FP) が散見される。核周囲の胞体表面には, 微絨毛 microvilli (MV) がわずかにみられる。培養 4 日目の細胞は密に配列し, confluent に達し, その外形は多角形を呈する。細胞質突起は短く, 周辺には短い FP が伸びているがその数は少ない。また核周囲の胞体表面には多くの MV がみられる (Figs. 1 a and 2 a)。

ALS および ALP 上における培養 2 日目の細胞形態は (Figs. 1 b and 1 c), PCS のそれとよく類似している。一方, Ti, Zr, Pd においては (Figs. 1 d~1 f) 細胞外形は紡錘形で, いずれも胞体は厚みがあり, 長い細胞質突起を多方向に伸ばしている。細胞周辺では, FP が多方向へ長く伸びており, MV が多数認められる。すなわち, 細胞形態はセラミックス系で多角形, 金属系で紡錘形を呈する。

培養 4 日目になると (Fig. 2), Pd を除くすべての材料における細胞形態は, PCS と同様の形態を呈するようになる。一方, Pd では細胞は類円形で, 多方向に短い細胞質突起を伸ばしている。また, FP はほとんどみられず, MV が散見される。すなわち, Pd 以外のインプラント材料では, 形態学的に特にその障害は認められなかった。

2. 細胞の増殖

まず, 17 日間培養した細胞についてみると, Pd を除くすべての材料で総タンパク量と DNA 量は対照より大きな値を示した。なかでも, ALP および Ti において,

Fig. 3 Time course of DNA contents in MC3T3-E1 cells on implant materials

対照に比べ総タンパク量は 1.5 倍, DNA 量は 1.6 倍といずれも有意に大きな値であった。一方, Pd では総タンパク量および DNA 量いずれも最小で, 有意に小さな値を示した (Table 1)。

さらに Ti, ALP 上で培養した細胞の DNA 量の経日的変化をみてみると, DNA 量は培養 5 日目までは特に差はみられないが, 9 日目頃から増加し始め, 13 日では対照の約 1.7 倍となった。しかし, 13 日目以後両材料と

も DNA 量はほとんど増加しなかった (Fig. 3). 以上の結果から, ALP と Ti は細胞増殖の点からは良好な材料であることが明らかとなった.

3. 細胞の分化に対するインプラント材料の影響

各材料上で 17 日間培養した細胞の ALPase 活性は Ti と Zr で対照よりも高く, ALP, ALS では対照とほぼ同程度の値を示した. 一方, Pd では逆に ALPase 活性が低下し, 0.7 倍となった (Table 2).

また, コラーゲンおよびコラーゲン以外のタンパク質の合成能を測定した結果 (Fig. 4), Zr 上で培養した細胞におけるコラーゲンの合成率は対照の 2 倍で最も大きかった. Ti と ALS では約 1.3 倍であったが, Pd では対照より小さく 0.9 倍となった. これらの結果より骨芽細胞の分化には Ti と Zr がよいことが示唆された.

4. 細胞の石灰化に対するインプラント材料の影響

Ca 量と P 量を測定した結果, 最も多かったのが Ti 上で培養した細胞で, 対照よりはるかに大きく Ca 量

1.3 倍, P 量 1.4 倍となり, Zr, ALS, ALP では Ca/P 量とも対照よりやや小さな値で, Pd ではさらに小さな値で, 有意の差が認められた (Table 3). また, Ca/P 比は, Pd と ALP 以外の材料ではハイドロキシアパタイトの Ca/P である 1.67 に近い値を示した.

また, von Kossa 染色の結果, 対照の PCS では試料全面は褐色に染色され, 黒褐色に染まった部分が辺縁寄りでは斑状に, 中心部には島嶼状に存在している. Ti では

Fig. 4 Collagen synthesis in clone MC3T3-E1 cells (percent of collagen in total protein)

Table 2 ALPase activity in clone MC3T3-E1 cells cultured on implant materials

	ALPase activity (units/mg · protein)
PCS (control)	2.66 ± 0.48 (100)
ALS	2.64 ± 0.49 (99)
ALP	2.92 ± 0.42 (110)
Ti	3.05 ± 0.27 (115)*
Zr	3.07 ± 0.30 (115)*
Pd	1.78 ± 0.78 (67)*

Values are the means ± SD for 3 disks

Numbers in parentheses are percentages of control values

*p < 0.05 compared with control (t test)

Table 3 Ca and P contents in clone MC3T3-E1 cells cultured on implant materials

	Ca content ($\mu\text{g}/10^{-1}\text{mg} \cdot \text{protein}$)	P content ($\mu\text{g}/10^{-1}\text{mg} \cdot \text{protein}$)	Ca/P ratio
PCS (control)	25.53 ± 6.65 (100)	14.89 ± 3.76 (100)	1.712 ± 0.155
ALS	18.34 ± 7.80 (72)	11.35 ± 4.69 (76)	1.610 ± 0.061
ALP	17.43 ± 8.90 (68)	11.54 ± 4.89 (78)	1.462 ± 0.428
Ti	33.14 ± 8.31 (130)	20.39 ± 4.94 (164)	1.623 ± 0.036
Zr	22.10 ± 11.68 (87)	13.55 ± 6.02 (91)	1.592 ± 0.377
Pd	4.03 ± 0.29 (16)*	2.18 ± 0.33 (15)*	1.886 ± 0.939

Values are the means ± SD for 3 disks

Numbers in parentheses are percentages of control values

*p < 0.01 compared with control (t test)

Fig. 5 Photographs of 17-day cultures of MC3T3-E1 cells on implant materials stained with von Kossa

対照と同様試料全面は褐色に染色され、辺縁部、中央部それぞれに黒褐色を示す部分かなり大きな斑状として観察される。そして、ALS、ALP、Zr等では試料面全体は淡褐色に染色され、辺縁部および中央部でALS、ALPでは黒褐色に染まった部分が小点として、Zrでは斑状として観察される。一方、Pdにおいて黒褐色を示す部分はみられず、試料面全面にわたる染色も微弱で、色調の確認はできない (Fig. 5)。

CaとP量ならびにvon Kossa染色の結果、Tiは骨組織の石灰化に最も良い材料であることが示唆された。

IV. 考 察

従来のインプラント材料の評価実験には、培養細胞として悪性腫瘍由来のHeLa⁴⁾あるいは線維芽細胞のL細胞^{5,15)}等が用いられてきた。これらの細胞がインプラント材料の評価に適当でない理由として、まず悪性腫瘍由来の細胞では、正常組織の環境を*in vitro*で再現しているとは考えられない。また、線維芽細胞等では長期間の培養を行っても、細胞の分化や代謝機能等に特徴的な変化は現れない。したがって、これらの細胞を用いる限り、材料と細胞の接触部における形態変化あるいはコロニー形成能等を材料の判定基準とせざるを得なかった。しかし、これらの判定基準は、材料の毒性試験としては有効であっても、生体親和性の適否を論ずるには必ずしも十

分な基準であるとはいえない。加えて最も重要なことは、これらの細胞がいずれも骨由来の細胞でないという点で、*in vitro*において骨内の状態を再現し評価しているとは考えられない。これに対し、本研究に用いた骨原性細胞株MC3T3-E1は正常細胞由来で、石灰化能をはじめ生体内の骨芽細胞に類似した種々の特徴的な性質を保持している¹⁰⁾。そこで、本細胞を用いることにより、骨芽細胞への分化あるいは骨組織形成に伴う細胞の変化とともにインプラント材料の生体親和性の生化学的検索が可能である。すなわち、本実験法を用いれば、主として骨内に移植されるインプラント材料の評価が、従来の方法よりはるかに客観的かつ詳細に行え、加えてより適切な点で、現段階における評価法としては最良の方法と考えられる。

Nakamura⁶⁾は走査型電子顕微鏡像で細胞と金属材料との接触を観察し、細胞毒性を有する材料以外ではその形態に顕著な差はないと述べている。しかし、本実験における走査電子顕微鏡による細胞形態の観察結果から、材料間で細胞の外形や厚さ、接触面積の広がり若干の差がみられた。これは材料の親和性の指標とも考えられる。しかし、本実験においても細胞周期を考慮しなかったため、その違いによる形態差も含まれるものと思われるが、この形態変化には他の因子も関与している可能性があるため、その解析は容易ではない。したがって、培養初期の形態から、直ちに材料の親和性を論ずるのは適

切さを欠くと思われる。すなわち、細胞形態の観察は生体親和性の適否を知る上で、現段階においては有用な指標となり得ないものと思われる。ただ、培養初期の細胞形態と将来に起こる分化および石灰化との相関関係については、今後も引き続き検索すべき事柄と考えられる。

また、今回実験に用いた材料はパラジウム合金を除いて、どの材料についても、特に毒性はなく、いずれも良好な生体材料であると報告されている¹⁷⁻²⁰⁾。また Zr については、ZrO₂ 焼結体の生体親和性は良好であると述べられている^{21,22)}が、純粋 Zr に関する報告はない。一方、パラジウム合金はその成分である Cu, Ag 等により、細胞増殖が阻害されることや、不良な細胞形態が指摘されている^{5,6)}。著者が細胞増殖を調べて得た結果は、本細胞に対し Pd だけが細胞毒性を示し、その他の材料では増殖阻害は認められず、これまでの報告を骨系の細胞で裏付けた。いいかえると、パラジウム合金以外は生体材料として適当であるといえる。

さて、インプラント材料の組織親和性は本研究に用いた材料を使い、*in vivo* において種々の角度より検討がなされている。Brånemark は Ti を用い、材料と骨組織は一体化すると報告しており¹⁷⁾、また永井は、ZrO₂ をサルに植立し、その骨界面の超微細構造を観察し、材料と新生骨基質が直接接し、一部ではわずかな線維性結合組織が介在すると述べている²²⁾。しかし、これらの報告はいずれも骨組織の形成が完了した時期の観察であり、骨組織形成過程における骨芽細胞に対するインプラント材料の影響については論じていない。

本実験では、培養 17 日目の ALPase 活性の測定結果から Pd 以外の材料は細胞の分化を促進しているが、顕著な差は認められない。また、総タンパク量および DNA 量が少なかった Zr でコラーゲン合成が最も活発に行われ、その蓄積量の多い Ti では逆の結果が得られた。これは材料により増殖、分化の時期に差が生じているためと思われる。Ca 量と P 量は Ti, PCS, Zr, ALP, ALS の順で多く、von Kossa 染色の結果もほぼ同様な傾向を示し、特に Ti 上での石灰化が最も進行していた。いいかえると、分化に対する影響は材料間で差はほとんど認められないものの、石灰化に対してある特定の材料で良好である。さらに、材料上に沈着した石灰塩が生体内におけるものと同様であるかを調べた。その Ca/P 比は、Pd を除くすべての材料でハイドロキシアパタイトの Ca/P 比の 1.67 に近似した値を示した。すなわち、Ti は骨組織への移植材料として優れた性質を有することが明らかとなった。なお、Pd 上においては、本細胞の石灰化能

は抑制されており、Ca/P 比もアパタイトのそれとは異なっていた。したがって、インプラント材料の判定基準を骨組織との親和性に求めるならば、石灰化をより促進する材料を選択すべきである。その選択にあたっては、本実験法を用いて細胞の分化、石灰化の程度を定量化し、材料の生体親和性を客観的に評価することが望ましい。

以上の結果より、Ti はインプラント材料として、Zr あるいはセラミックス系の ALS および ALP よりも良好な生体親和性を有することが示唆された。そこで、今後インプラント材料として Ti の生体親和性についてさらに詳細に検討する必要があると思われる。

V. 結 論

インプラント材料の生体親和性を明らかにするため、生体内の骨芽細胞に類似した種々の特徴的性質を保持する骨原性細胞株 MC3T3-E1 を用い、材料と細胞分化あるいは骨組織形成等の関係について検討し、以下の結果を得た。

1. 細胞形態は増殖期ではセラミックス系で多角形、金属系で紡錘形を呈する。
2. パラジウム合金を除く酸化アルミニウム（単結晶、多結晶）、チタン、ジルコニウムでは細胞に対する毒性はない。
3. チタン、酸化アルミニウム（単結晶、多結晶）、ジルコニウムは骨芽細胞の分化を促進していた。
4. チタンは特に石灰化を促進していた。

以上の結果より、チタンはインプラント材料として、ジルコニウムあるいはセラミックス系の酸化アルミニウム（単結晶、多結晶）よりも良好な生体親和性を有することが示唆された。

稿を終るにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った補綴学第 1 講座、潤田和好教授に心から感謝の意を表します。また本研究を遂行するにあたり種々のご教示とご指導、ご校閲を頂いた城西歯科大学口腔解剖学第 1 講座久米川正好教授、ならびに東北歯科大学口腔解剖学第 2 講座山本茂久教授に心から深謝いたします。さらに種々の面にわたりご援助頂いた補綴学第 1 講座、口腔解剖学第 2 講座、生理学講座の教職員各位に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究の一部は昭和 61 年度文部省科学研究費補助金（奨励研究 A、課題番号 61771610）、および昭和 61 年度日本私学振興財団・学術研究振興資金による。

文 献

- 1) Smith, L. : Ceramic-plastic material as a bone substitute. *Arch. Surgery*, 87 : 653~661, 1963.
- 2) Shklar, G., Hodosh, M. and Povar, M. : Tissue reactions to the plastic tooth implant. *Oral Surgery*, 22 : 349~357, 1966.
- 3) Cutright, D.E., Bhaskar, S.N., Brady, J.M., Getter, L. and Posey, W.R. : Reaction of bone to tricalcium phosphate ceramic pellets. *Oral Surgery*, 33 : 850~856, 1972.
- 4) Smith, D.C. : Biological properties of dental materials. *Dent. Pract.*, 20 : 81~86, 1969.
- 5) Campbell, E., Meirowsky, A. and Hyde, G. : Studies on the use of metals in surgery. *Annals of Surgery*, 114 : 472~479, 1941.
- 6) 川原春幸 : 金属と細胞, 歯界展望, 17 : 755~764, 1960.
- 7) Sisca, R.F., Thonard, J.C., Lower, D.A. and George, W. : Responses of Epithelial-like Cells in Tissue Culture to Implant Materials. *J Dent Res*, 46 : 248~252, 1967.
- 8) Autian, J. : The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. *Int Dent J*, 20 : 481~490, 1970.
- 9) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J Oral Biol*, 23 : 899~901, 1981.
- 10) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*, 96 : 191~198, 1983.
- 11) Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248~254, 1976.
- 12) Hinegardner, R.T. : An improved fluorometric assay for DNA. *Anal Biochem*, 39 : 197~201, 1971.
- 13) 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 : 19~37, 1954.
- 14) Peterkovsky, B. and Diegelman, R. : Use of a mixture of proteinase-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry*, 10 : 989~994, 1971.
- 15) Autian, J. : Toxicologic aspects of implants. *J Biomed Mater Res*, 1 : 433~449, 1967.
- 16) Nakamura, M., Kawahara, H., Imai, K., Kawamoto, T., Hosohama, T. and Kataoka, Y. : Cell contact to metal surface. *J Dent Appara Mater*, 19 : 98~111, 1978.
- 17) Brånemark, P.I., Breine, U., Adell, R., Hanson, B.O., Lindstrom, J. and Ohlsson, A. : Intra-osseous anchorage of dental prostheses. *Scand. J Plast Reconstr Surg*, 3 : 81~100, 1969.
- 18) Beder, O.E. and Ploger, W.J. : Intraoral titanium implants. *Oral Surg., Oral Med and Oral Pathol*, 12 : 787~799, 1959.
- 19) Bhaskar, S.N., Cutright, D.E., Knapp, M.J., Beasley, J.D., Lieutenant, B.P. and Driskell, T.D. : Tissue reaction to intrabony ceramic implants. *Oral Surg*, 31 : 282~289, 1971.
- 20) Griss, P., Krempien, B., Andrian-Werburg, H.F., Heimke, G., Roland, F. and Diehm, T. : Experimental analysis of ceramic-tissue interactions. A morphologic, fluorescenceoptic, and radiographic study on dense alumina oxide ceramic in various animals. *J Biomed Mater Res*, 5 : 39~48, 1974.
- 21) Nagai, N., Takeshita, N., Hayashi, J., Kuwana, Y., Shirasuga, N., Maruyama, H., Sekine, H. and Fujii, Y. : Biological reaction of zirconia ceramic as a new implant material in the dental field. *Jpn. J Oral Biol*, 24 : 759~762, 1982.
- 22) 永井教之, 竹下信義, 丸山晴義, 白須賀直樹, 関根 弘, 岸 正孝, 今村嘉直, 鮎沢信夫 : ジルコニア・セラミックス歯科インプラントの基礎的研究—骨内インプラント周囲組織の病理組織学的検索—, 補綴誌, 28 : 498~514, 1984.