原 著 論 文

歯科インプラントへの骨誘導因子の応用に関する実験的研究

—アパタイトインプラントにおける効果—

澤瀬 隆

Experimental Study on Application of Bone Morphogenetic Protein to Dental Implant

—As to the Hydroxyapatite Implant—

Takashi Sawase

Abstract : Bone Morphogenetic Protein (BMP) induces the differentiation of the mesenchymal cells into the osteoblastic cells *in vivo*.

The purpose of this study is to carry out early bone formation and more rigid support of the dental implant after insertion of it with BMP.

In this study, the BMP fraction was extracted from the bovine cortex bone and purified by means of gel filtration. The partially purified BMP was combined with a rough surfaced implant (trial production) and inserted in the dog mandible. After insertion, the effect of BMP was evaluated by removable torque strength, rate of bone contact with implant surface and histomorphometric investigation.

As a result of the application of BMP to dental implants, supporting strength of mandibular bone was advanced and bone formation between bone and implant surface was promoted at 2 weeks after implantation. However at 8 weeks after implantation, the implants with BMP were not different from unapplied groups concerning bone formation.

Key words : Bone Morphogenetic Protein, dental implant, removable torque strength, rate of bone contact

I. 緒 言

顎骨内に直接埋入され、骨中で強固に植立安定することにより、咀嚼機能を営むことを目的とする骨内イ

ンプラント法¹⁻⁵⁾においては、その術式に関する研究^{5,6)}や、インプラント体の材質・形状に関する研究等⁷⁻¹⁰⁾は多く試みられてきた。

しかしながら、顎骨に積極的に働きかけ、インプラント体と骨の結合を早期に、また確実にするための試み¹¹⁻¹³⁾は少ない。

1965年 Urist¹⁴⁾ は脱灰骨基質中に、異所性に骨を誘導する非コラーゲン性のタンパク質が存在することを報告し、これを Bone Morphogenetic Protein

長崎大学歯学部歯科補綴学第一講座（主任：熱田 充教授）
Department of Fixed Prosthodontics, Nagasaki University
School of Dentistry (Chief : Prof. Mitsuru Atsuta)
平成4年10月9日受付

(BMP) と名付けた。

以降 BMP に関する研究は進み、1988 年 Wozney ら¹⁵⁾は遺伝子工学的手法を用い BMP の塩基配列を決定し、その後現在までに 6 種類のリコンビナント BMP が報告されている¹⁵⁻¹⁸⁾。

また BMP の臨床応用の研究も試みられ、BMP が骨基質中において骨形成を促進するという報告もされている^{19,20)}。

そこで著者は骨内インプラント体埋入後早期で、かつ強固なインプラント体周囲への骨の造成を目的として、インプラント体への BMP の応用を考え本実験を行った。

BMP をインプラント体に応用するにあたり、表面を粗造にしたインプラント体を試作し、それに BMP を含浸させ、BMP を徐放系にして活性を効果的に発揮させるようにした。このようにして作製したインプラント体を、イヌ下顎骨に埋入し、埋入後のインプラント体周囲骨の変化の形態学的な検索と、インプラント体周囲骨の支持力の検索を行った。

II. 材料と方法

1. 粗 BMP 画分の抽出

粗 BMP の抽出は朝比奈¹⁹⁾の方法に従い以下のように行った (図 1)。

1) 脱灰骨基質の調整

成牛長幹骨より骨端部、骨膜、骨髓を除去し骨皮質のみとしたのち、液体窒素存在下に 1.0~2.0 mm の大きさに粉碎し骨粉を調整した。以下の操作は特にことわりのない限りすべて 4℃ の低温室にて行った。

成牛骨粉を蒸留水にて洗浄後、クロロホルム:メタノール/1:1 溶液にて十分脱脂を行った。この骨粉を 0.6 N 塩酸にて脱灰を行い、蒸留水にて洗浄後、再び脱脂を行ったものをドラフト中にて乾燥し脱灰骨基質を得た。

2) BMP 画分の抽出

脱灰骨基質より 3 種のプロテアーゼインヒビター (100 mM 6-アミノ-n カプロン酸, 5 mM 塩酸ベンザミジン, 1 mM ベンジルスルホニルフルオリド) を含む、10 倍溶 (vol/wt) の 4 M 塩酸グアニジン/50 mM Tris-HCl pH 7.4 にて 48 時間抽出を行い、濾紙にて濾過後、その濾液を塩酸グアニジン抽出画分 (G-Ext) とした。G-Ext を限外濾過 (透過分子量 10,000 以下, Diaflow) にて 8 倍程度に濃縮し、セル

図 1 BMP 画分の抽出・粗精製過程

ロースチューブ (孔径 24 Å, Union Carbide Corp.) を用い 0.5 M 塩酸グアニジンに対して透析を行った。透析後 8,500 rpm にて 30 分間遠心を行い、G-Ext を 0.5 M 塩酸グアニジン可溶性画分 (G-S/0.5) と不溶性画分 (G-I/0.5) とに分離しそれぞれ凍結乾燥を行った。

3) ゲル濾過クロマトグラフィー

G-I/0.5 を 4 M 塩酸グアニジン/50 mM Tris-HCl pH 7.4 に再溶解し、同じ緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (2.0×90 cm, Pharmacia) により分画した。溶出液は流速を 36 ml/hr とし、280 nm での吸光度を測定し、6 ml ずつ分取した。

各フラクションはプールして、蒸留水に対して透析した後凍結乾燥を行った。

2. 骨誘導活性の検定

1) 移植ペレットの作製

移植ペレットは、Sephacryl S-200 カラムにおける各フラクションと、担体として、移植動物である Wistar 系ラットの長幹骨を 74~420 μm に粉碎したものより、先に示したのと同様の方法で、4 M 塩酸グアニジン抽出を行い、得られた残渣 (以降 G-Res とする) と、生体吸収性の骨置換材料として知られる β-tricalcium phosphate (ジョンソン・エンド・ジョンソン社製, シンソグラフト®, 以降 β-TCP) の 2 種

図 2 ラット背部皮下への移植ペレットの埋入

類を、200 μ l の 4 M 塩酸グアニジン溶液に十分溶解・懸濁した後、エタノールにて沈澱させ、37°C 恒温槽にて乾燥して作製した。

2) 移植実験

移植ペレットは、ペントバルビタールナトリウム麻酔下にて、4 週齢の Wistar 系雄性ラットの背部皮下に移植し (図 2)、2 週間後にペレットを摘出し、軟 X 線撮影を行ったのち、10% の中性ホルマリンで固定し、脱灰後、通法どおりパラフィン包埋を行い 4 μ m の薄切切片を作製した。標本はヘマトキシリン・エオジン染色を施し、組織形態学的に観察した。

以上により骨誘導活性の認められた Sephacryl S-200 column Fr. III (以降 S-200 Fr. III) を粗 BMP として以下の実験に供した。

3. インプラント体埋入実験

1) 試作インプラント体の作製

今回の実験においては、BMP を応用する場がインプラント体と骨の界面という微小な空間であり、その目的から担体は、BMP を徐放系にするマトリックスとしての働きに加えて、インプラント体を取り扱う際に剥がれ落ちることのない程度にインプラント体と結合していることが必要であり、またインプラント体が機能を営み、理想的な骨のリモデリングに応じて担体自体は生体に吸収される材料であることが望まれる。そのため市販緻密体ハイドロキシアパタイトインプラント体 (旭光学社製アパセラム®) に平均粒径 7 μ m の β -TCP 顆粒を積層焼結したインプラント体 (旭光学社製) を試作した。なお形状および寸法は旭光学社製アパセラム® S 型歯根 (RS 0940) に準じ、直径 4 mm 長さ 9 mm とした。

図 3 は左が 2-piece type アパセラム S 型歯根、右

図 3 市販アパセラム人工歯根(左)
 β -TCP 焼結試作人工歯根(右)の SEM 像

表 1 今回埋入されたインプラント体とその略称

略称	表面性状
HA インプラント体	緻密体ハイドロキシアパタイト (アパセラム®)
TCP インプラント体	HA インプラント体に β -TCP 顆粒焼結
BMP インプラント体	TCP インプラント体に粗 BMP 吸着

が今回試作した β -TCP 焼結試作インプラント体の SEM 像である。左の緻密体ハイドロキシアパタイトは、3 μ m 程度の結晶欠陥を含むものの、ほぼ高密度に焼結された多結晶体であることがわかる。一方右の試作インプラント体には、5~10 μ m の β -TCP 顆粒が積層焼結され、顆粒間には平均 10 μ m 程度の間隙の存在が認められる。

2) インプラント体への BMP の吸着

成年長幹骨より抽出した粗 BMP (S-200 Fr. III) を 4 M 塩酸グアニジン/50 mM Tris-HCl pH 7.4 緩衝液に 20 mg/ml の濃度で再溶解し、その溶液 0.2 ml 中に前述の試作インプラント体を 24 時間減圧下にて浸漬した。浸漬後 85% エタノールにてインプラント体を十分洗浄し、37°C 恒温槽内でインプラント体を乾燥させた。

なおコントロールとして、粗 BMP を吸着させない試作インプラント体と、同規格の緻密体ハイドロキシアパタイトインプラント体 (旭光学社製アパセラム® S 型歯根 RS 0940) を用いた。

以降、BMP を吸着させた試作インプラント体を BMP インプラント体、吸着させていない試作インプラント体を TCP インプラント体、緻密体ハイドロキシアパタイトインプラント体を HA インプラント体とする (表 1)。

図 4 顎骨に埋入されたインプラント体

3) 実験動物

実験動物には、体重 10~15 kg の健康な雑種成犬 15 頭を用い、6 頭をインプラント体除去トルク値の測定に、9 頭を組織学的検索および骨-インプラント体接触率の測定に供した。

4) インプラント体の埋入

実験動物はペントバルビタールナトリウム（ネプタール®）静注による全身麻酔下で、あらかじめ下顎第 1 小臼歯から第 4 小臼歯を抜歯した。抜歯後 90 日以上経過した後、同部位の粘膜骨膜を剥離し、歯槽頂部にアパセラム®埋入用のドリルおよびハンドリーマーにて、片側 3 か所合計 1 匹当たり 6 か所の直径 4.3 mm、深さ 9.0 mm のインプラント体埋入窩を形成した。埋入されるインプラント体は、BMP インプラント体、TCP インプラント体および HA インプラント体の 3 本を 1 組とし片側ずつ順不同に埋入した（図 4）。

なお除去トルク値測定に用いる動物 6 頭には、測定の際測定器具による把持部を必要とするため、把持部として利用する支台の取付可能な 2-piece type の歯根を使用した。

5) 除去トルク値の測定

実験動物はインプラント体埋入後、2、4 週間後にそれぞれ 3 頭ずつ無痛下にて安楽死させたのち、直ちに下顎骨を第 1 大臼歯近心より離断後粘膜骨膜弁を剝離翻転し、各インプラント体歯根部に把持部となるチタン製支台（旭光社製 AT 0840）をネジ止めし、トルクゲージ（model 6-BTG Tohnichi 社製、図 5 A）の先端のチャックにてこの支台を把持し、回転トルクを与え、各インプラント体の破断値を測定し、この値をそれぞれの除去トルク値とした（図 5 B）。

図 5 A 除去トルク値測定に用いたトルクゲージ 6-BTG（東日社製）

図 5 B 除去トルク値の測定方法

インプラント体の歯根部に支台をネジ止めし、トルクゲージ先端のチャックにて把持し、回転トルクを与え、置針を読みとり測定する

6) 骨-インプラント体接触率の計測

実験動物をインプラント体埋入後 2、4、8 週間後にそれぞれ 3 頭ずつ無痛下にて屠殺したのち、直ちに下顎骨を第 1 大臼歯近心より離断して標本採取を行った。

採取した標本を 10% 中性ホルマリン緩衝液で約 2 週間固定したのち、流水で十分洗浄し、アルコール系列で脱水、アセトン置換後メタクリル酸メチルによる樹脂包埋を行った。樹脂包埋された標本はバンドソー（EXAKT®）により 200 μ m の頬舌断薄切切片を作製し、耐水研磨紙 # 600~# 1500 にて、100 μ m まで順次研磨を行った。

この薄切切片を軟 X 線照射器にて焦点被写体間距離 40 cm、管電圧 20 kVp、電流 10 mA、照射時間 25 sec、の条件下で撮影を行い、現像されたフィルムを画像入力装置（ドラムスキャナー）にてサンプリングピッチ 25 μ m でデジタル化し、このデジタル画像を

図 6 A マッキントッシュ上に描画したデジタル画像 (埋入 2 週間後の BMP インプラント体)

マッキントッシュ上に転送し、画像解析プログラム Image 1.44 にて解析を行った。

解析は、図 6 A に示されるようなマッキントッシュ上に転送されたデジタル画像において、DENSITY の差によって構造物の定性を行った。つまり図 6 A における L1 について、その DENSITY を縦軸にとりプロットすると図 6 B のようなプロフィールが得られる。このプロフィールにおいて、あらかじめ計測しておいた、画像上での各構造物の平均 DENSITY を参照すると、a-b 間は骨組織、b-c 間は軟組織、c-d 間はアパタイト、e-f 間は骨組織であると考えられ、c ではアパタイトと軟組織 (骨組織ではない構造物) が、d ではアパタイトと骨組織が接触していることが理解できる。

この考え方に基づき、骨-インプラント体接触率の解析を行った。図 6 A においてアパタイト (インプラント体) 表面に引かれた接線 L2 のプロフィールが図 6 C である。このプロフィール上で、網掛けで示される範囲はデジタル画像上において、あらかじめ測定しておいた骨組織の DENSITY の ± 1 SD の範囲である。つまり図 6 C に示されるインプラント体表面上のプロットのうち、この範囲内にあるプロットを骨組織であると考え、その割合を計算することにより、インプラント体表面上に骨組織が占める割合 (骨-インプラント体接触率) を算出した。この解析を得られた標本のインプラント体の長軸すべてについて行った。

図 6 B 図 6 A の L1 における DENSITY のプロフィール

図 6 C 図 6 A の L2 における DENSITY のプロフィール

7) 組織学的検索

骨-インプラント体接触率の測定において用いた薄切切片をラッピングフィルム (9, 3 μ m) にて再研磨し、20 μ m の未脱灰研磨標本を作製した。作製した標本にトルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。

III. 結 果

1. 抽出粗 BMP の骨誘導活性

Reddi²¹⁾ は、同種脱灰骨を皮下に移植すると埋入後 7 日目で軟骨が形成され、14 日目には軟骨組織はほとんど骨組織に置換し、21 日目には内部の脂肪髄様の組織を皮質骨様の新生骨が取り囲み、あたかも管状骨の様相を呈する、と報告している。

本実験では移植後 14 日目の骨形成の程度を観察し骨誘導能を比較した。

成牛長幹骨より脱灰骨基質を調整し、4 M 塩酸グアニジンにより抽出を行い、その抽出液を 0.5 M 塩酸グアニジンに対して透析を行うことにより、約 1% (dry wt/wt) の 4 M 塩酸グアニジン可溶性、0.5 M

図 7 G-I/0.5 の Sephacryl S-200 カラムにおける吸光度曲線

図 8 移植 14 日後のペレットの軟 X 線像
1 : G-Res
2 : G-Res+S-200 Fr. III
3 : β -TCP+S-200 Fr. III

塩酸グアニジン不溶性画分 (G-I/0.5) を得た。

G-I/0.5 について Sephacryl S-200 カラムによるゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、図 7 に示す溶出パターンを得た。これに従い 5 つのフラクションに分け、それぞれの画分より得た凍結乾燥試料を 2 種類の担体と複合し移植した。

2 週間後の Softex 写真および組織学的検索により、S-200 Fr. III に高い骨誘導活性を認めた。

図 8 は骨誘導活性を認めたペレットの軟 X 線写真の一例である。左より 1 は G-Res のみのコントロール、2 は粗 BMP (S-200 Fr. III) と、担体として G-Res を複合したペレット、3 は粗 BMP (S-200 Fr. III) と、担体として β -TCP 複合したペレットである。1 の G-Res のみのコントロールにおいては、X 線不透過像は全くみられないのに対し、2 の S-200 Fr. III + G-Res においては、石灰化像を思わせる骨梁様の X

図 9 移植 14 日後のペレットの組織像
A : G-Res
B : G-Res+S-200 Fr. III
C : β -TCP+S-200 Fr. III
ヘマトキシリン・エオジン染色,
A : $\times 25$, B, C : $\times 100$
M : マトリックス (G-Res)
NB : 新生骨組織
OC : 破骨細胞
TCP : β -TCP 顆粒

線不透過像が認められ、また 3 の S-200 Fr. III + β -TCP では骨梁様の X 線不透過像に加えて、 β -TCP 顆粒と思われる点状の X 線不透過像もみられる。

図 9 A~C は、図 8 の 3 種類のペレットのヘマトキシリン・エオジン染色標本である。G-Res のみのペ

図 10 インプラント体除去トルク値

レットでは、線維性の結合組織によって被包された G-Res (M) がみられるのみで、骨組織の新生は全くみられなかった (図 9 A)。S-200 Fr. III と G-Res を複合し移植したペレットでは、島状に点在する G-Res (M) を繋ぐように、細胞成分の多い幼若な新生骨組織 (NB) が観察され、またその近傍には破骨細胞と思われる多核の巨細胞 (OC) がみられ、骨のリモデリングが行われていることが示唆された (図 9 B)。S-200 Fr. III と β -TCP を複合したペレットでは、脱灰により白く抜けた、 β -TCP 顆粒 (TCP) の存在していた部位に密接して新生骨組織 (NB) が観察され、またこの新生骨組織は網目状に顆粒間にも広がっている像が観察された (図 9 C)。

以上より、今回成牛長幹骨より抽出粗精製を行い得られた画分 S-200 Fr. III は、G-Res および β -TCP 顆粒を担体として複合することで、少量でも効果的に異所性の骨誘導活性を示した。

2. インプラント体埋入後の肉眼的観察

2 週間後の HA インプラント体の 1 本を除き、2, 4, 8 週間後において他のすべてのインプラント体は、臨床的に動揺は認められず安定し、インプラント体周囲には炎症所見は観察されなかった。

3. 除去トルク値の測定

2, 4 週間後の除去トルク値の測定結果を、図 10 に示す。

2 週間後の除去トルク値の平均値において、HA インプラント体と BMP インプラント体間に危険率 5%

図 11 骨—インプラント体接触率

で有意差を認めた。(Student t 検定)

4 週間後の TCP インプラント体と BMP インプラント体の除去トルク値は、6 つの試料のうちそれぞれ 5 つでは最大値である 6 kgf·cm を越えた後、インプラント体と骨との破断が起こる前に、インプラント体自体の破壊 (トルクゲージの把持部であるチタンコア部のネジ切れ、もしくはアパタイト—チタン接着部の剝離) を起こし、今回の測定方法における 2-piece type アパセラム®インプラント体の構造的最大値を超える値を示した。

なお 4 週間後の HA と TCP あるいは BMP インプラント体間には 1% の危険率で有意差を認めた (Student t 検定)。

4. 骨—インプラント体接触率の測定

2, 4, 8 週間後の各インプラント体の骨—インプラント体接触率の平均値を図 11 に示す。

接触率の経時的な推移において、HA インプラント体では 2, 4, 8 週とほぼ直線的に有意な増加を示しているのに対し、TCP, BMP インプラント体では 4 週目まで有意に増加した後、以降はわずかな増加はみられるものの、ほぼ平衡に達していると思われる。

埋入各週後の骨—インプラント体接触率において、BMP インプラント体は HA インプラント体に対し 2, 4 週間後に危険率 1% で有意に高い値を示し、TCP インプラント体に対し 2 週間後に危険率 5%, 4 週間後に危険率 1% で有意に高い値を示した。また TCP インプラント体は HA インプラント体に対し 2 週間後に危険率 5%, 4 週間後に危険率 1% で有意に高い値を示した。8 週間後の各インプラント体間には

図 12 (A~C) 埋入 2 週間後の骨-インプラント体界面の組織像
トルイジンブルー染色, ×25
A: HA インプラント体, B: TCP インプラント体, C: BMP インプラント体

図 13 (A~C) 埋入 4 週間後の骨-インプラント体界面の組織像
トルイジンブルー染色, ×25
A: HA インプラント体, B: TCP インプラント体, C: BMP インプラント体

有意差は認められなかった。

5. 形態観察所見

2, 4, 8 週間後の HA, TCP, BMP インプラント体の骨インプラント体界面の拡大像を図 12~14 に示す。写真中の左側がインプラント体側で右側が顎骨側

である。

- 1) 埋入 2 週間後のインプラント体周囲組織について

埋入 2 週間後, 3 種類の各インプラント体ともに, 顎骨側の切断面には染色性の異なる幼若骨様の新生組織が観察され, インプラント体と切断面の間隙にも細

図 14 (A～C) 埋入 8 週間後の骨—インプラント体界面の組織像
トルイジンブルー染色, $\times 25$

A: HA インプラント体, B: TCP インプラント体, C: BMP インプラント体

い骨梁様の新生組織が観察された (図 12 A～C)。

さらに HA および TCP インプラント体においては、間隙に存在する細い骨梁様の新生組織は部分的にインプラント体表面に達し直接接していた (図 12 A, B)。一方 BMP インプラント体においては、切断面での幼若骨様組織の新生および切断面とインプラント体の間隙の細い骨梁様組織の新生とともに、インプラント体表面に沿って薄く一層の幼若骨様の新生組織が観察された (図 12 C)。

2) 埋入 4 週間後のインプラント体周囲組織について

埋入後 4 週間後、3 種類の各インプラント体とも、2 週間後における顎骨の切断面にみられた幼若骨様の新生組織は既存の顎骨と、染色性の差がみられなくなり、一部には成熟度の増した層板状の構造を呈している所見も観察された (図 13 A～C)。

またインプラント体と切断面の間隙にみられた細い骨梁様の新生組織は、その厚みを増しインプラント体表面に広く接し、それは山裾のようにインプラント体表面に広がっていた (図 13 A, B)。特に TCP インプラント体においては、インプラント体表面に接した骨梁様組織がインプラント体表面に沿って一層広がるように延びている像が多く観察された (図 13 B)。

BMP インプラント体においてはインプラント体表面に新生骨様組織が厚く広がっているのが特徴的で、

それはインプラント体と顎骨の切断面の間隙の、厚みを増した骨梁様の新生骨様組織によって顎骨と部分的に連結されていた (図 13 C)。

3) 埋入 8 週間後のインプラント体周囲組織について

埋入 8 週間後になると 3 種類の各インプラント体とも新生骨組織はその幅を増し網目状に伸展しており、顎骨の切断面とインプラント体を密に連結していた。各インプラント体間には骨の量的な差は認められなかった (図 14 A～C)。

IV. 考 察

1. 抽出 BMP の骨誘導活性について

Urist¹⁴⁾ により脱灰骨基質中に異所性に骨を誘導する非コラーゲン性のタンパク質 (BMP) の存在が報告されて以来、その抽出のため多くの試みがなされた。

その結果 Takaoka ら²²⁾や Hanamura ら²³⁾によって、4 M 塩酸グアニジンで BMP が可溶化、抽出されることがわかり、以降 8 M 尿素/1 M NaCl, 1% SDS, 6 M 尿素/0.5 M CaCl₂ によっても抽出されることが報告された^{24,25)}。これにより BMP の精製への道は大きく開かれ、その単離のために多くの研究がなされた²⁶⁻³⁰⁾。しかしながら完全精製にはいたらず、

それを成し得たのは Wozney ら¹⁵⁾による遺伝子工学的手法を用いたものによってであった。これにより現在では各種のリコンビナント BMP が作成され、それぞれについての基礎的研究は盛んに行われている^{17,18,31~33)}。

しかし現在のところ、BMP による骨誘導活性は *in vivo* でのみ発揮され、*in vitro* においては軟骨までの誘導しか示さない^{34,35)}。このことは異所性の骨誘導活性の発揮には何らかの別のファクターの存在を示唆し、それが特定されていない現在、骨誘導活性の検定には *in vivo* におけるバイオアッセイが用いられている。そのため結果の再現性に欠けること、また結果の確認にある程度の期間を必要とすることなどの問題が存在する。

さらにそのバイオアッセイにおいて、BMP のみを移植した場合、その大部分は拡散や血流により移植部位より運び去られたり、大食細胞に取り込まれたりすることが考えられるため、BMP の骨誘導活性を効果的に発揮させるためには BMP を徐放系にする、何らかの担体が必要と考えられている。朝比奈¹⁹⁾、Reddi ら³⁶⁾、Sampath ら^{24,37,38)}は BMP のバイオアッセイにおける移植動物の長幹骨 4 M 塩酸グアニジン抽出残渣を担体として用いた。Kawai ら³⁹⁾はハイドロキシアパタイトの、Urist ら^{20,40)}は多孔性 β -TCP の BMP の担体としての有用性を実証した。また朝比奈¹⁹⁾は bovine atelocollagen を、Yamazaki らは石膏⁴¹⁾およびマイクロカプセル⁴²⁾を担体として用い、異所性の骨誘導能を実証した。

本実験においては抽出粗精製を行い、得られた画分 S-200 Fr. III を Sampath ら^{24,37,38)}および Urist ら^{20,40)} Kawai ら³⁹⁾の方法に準じ G-Res および β -TCP と複合することにより、粗 BMP のみの移植では骨誘導活性を発揮し得ない 1 mg という少量でも、ラットでの *in vivo* バイオアッセイにおいて十分な異所性の骨誘導活性を認めた。

2. 試作インプラント体について

BMP を歯科骨内インプラント法に応用するにあたって、インプラント体自体に BMP の担体としての働きを持たせるため、旭光学社により、ハイドロキシアパタイト緻密体であるアパセラム®インプラント体(旭光学社製)に β -TCP 顆粒を焼結し表面を粗造にしたインプラント体を試作してもらい実験に供した。

多孔性 β -TCP の骨内埋入実験において、Klawit-

ter ら⁴³⁾は、骨小柱の内方成長には最低 30~40 μ m の気孔が必要で、また osteonal bone の内方成長には約 200 μ m の気孔が必要であると報告している。

今回の実験においては、 β -TCP 顆粒は BMP の担体としての働きのみを期待したため、評価方法の 1 つである除去トルク値測定の際、顆粒間への骨の成長による機械的嵌合力が除去トルク値へ及ぼす影響をできる限り排除するため、 β -TCP 顆粒間の間隙は図 3 に示されるように 10 μ m 程度とした。

3. インプラント体埋入実験について

今回の実験においてはより臨床に近づけた実験系を設定するため、インプラント体には市販インプラント体およびそれと同規格のものを使用し、埋入部位には皮質骨と海綿骨の性状および形状の点からイヌ下顎骨を選択した。

施術に際してインプラント体を埋入するために、あらかじめ実験動物の両側第 1 小臼歯から第 4 小臼歯までを抜歯し、その後 90 日以上経過した後、各インプラント体の埋入を行った。イヌにおいて抜歯を行った場合、抜歯窩内の血管形成は抜歯後 15 日前後で完了し、その後、新生血管網の改造が起こり、その改造機転も抜歯後 50~80 日で完了するといわれている^{44~46)}。また抜歯窩内の骨の新生について高橋^{47,48)}は、抜歯後 15 日では抜歯窩の 2/3 に新生骨梁が形成され、抜歯後 30 日になると抜歯窩は、ほぼ細い新生骨梁で満たされ、抜歯後 50 日では骨梁の肥厚と骨髓の形成がみられ、抜歯後 80 日では新生骨、骨髓ともほぼ定型的な構造を示す、と報告している。また松本⁴⁹⁾は抜歯後 3 カ月を経過すると、抜歯による下歯槽管の上方への移動も停止することを報告している。

今回の実験においては、抜歯後 3 カ月以上経過し、上記のような状態を呈していると考えられるイヌ下顎骨に対して、インプラント体埋入実験を行った。

インプラント体の埋入に際しては、実験動物間の個体差による影響をできる限り排除するため、今回使用した 3 種類のインプラント体 (HA インプラント体、TCP インプラント体、BMP インプラント体) を 1 組として片顎ずつ順不同に埋入した。つまり動物 1 頭あたり各インプラント体を 2 本ずつ、合計 6 本のインプラント体を埋入した。

またインプラント体を埋入する際、顎骨との摩擦により、試作インプラント体表層の β -TCP 顆粒が影響を受けないように、インプラント体埋入窩の直径を

4.3 mm と、埋入されるインプラント体の直径より 300 μ m 大きくした。

4. 各評価方法について

今回の実験においてはその結果を数量化した評価方法として、除去トルク値測定による力学的検索と、骨・インプラント体ブロックの未脱灰研磨標本を作成し、軟X写真撮影後、デジタル化した画像における骨-インプラント体接触率の計測を行った。また同標本を用いて光学顕微鏡による形態観察もあわせて行った。

1) 力学的検索について

インプラント体と骨との結合の力学的検索に小木曾⁵⁰⁾は顎骨とインプラント体のブロックをトリミングした後、押し出し試験を行い、また Carlsson ら⁵¹⁾はスクリュータイプのインプラント体に対してトルクゲージを用いて、インプラント体の除去トルク値を測定することにより、顎骨によるインプラント体の把持力の測定を行った。

今回の実験においては、動物を屠殺後直ちに測定ができ、かつインプラント体が顎骨中に埋入されたままの状態、つまりより臨床における口腔内に近い状態での、顎骨によるインプラント体把持力を測定し得る、トルクゲージを用いた除去トルク値の測定により、インプラント体と骨との結合力の力学的検索を行った。

2) 組織形態学的検索について

インプラント体埋入後の予後診断において、村上⁵²⁾はパーソナルコンピュータを用いた、歯科口内法X線写真の画像解析法を報告している。また関根ら⁵³⁾はビーグル犬下顎骨に埋入された Osseointegrated implant において、X線診断と組織検査での骨結合、接触状態の比較を行った。

今回の実験においてはその結果の数量化を、先に述べた力学的検索とともに、骨・インプラント体ブロックの未脱灰研磨標本を作成し、軟X写真のデジタル化画像における、骨-インプラント体接触率の計測により行った。

今回行った骨-インプラント体接触率の測定においては、軟X線像（アナログ画像）をドラムスキャナーにて、デジタル画像に変換する際、サンプリングピッチを同機の最大解像値である 25 μ m に設定し変換を行い解析した。つまりはインプラント体表面上の 25 μ m 四方のピクセル単位の平均 DENSITY により、そのピクセルが骨で構成されているかもしくは骨以外

の軟組織等で構成されているかを骨および軟組織の平均 DENSITY と比較することにより判断した。この 25 μ m という値は、骨とインプラント体の界面という微小な部位での骨の新生および吸収の詳細を把握するには、十分な解像力とはいえないが、形態観察における所見と比較してもその概要は捉え得るものと思われる。

また今回行った解析方法は実際の臨床においても、インプラント体埋入後からの定期的な歯科口内法X線規格撮影を行い、その画像を同様の方法でデジタル化した画像においても十分応用が可能であり、有用なものであると思われる。

5. インプラント体埋入後の評価結果について

インプラント体埋入 2 週間後：BMP インプラント体は他のインプラント体に比較して除去トルク値および骨接触率で有意に高い値を示した。また同時期における形態観察で BMP インプラント体表面に約 20 μ m 程度の一層の幼若新生骨様組織の形成がみられた。この 2 週間後の BMP インプラント体に特徴的な骨様組織のインプラント体表面での新生が、除去トルク値および骨接触率の向上の要因となっているものと思われる。

またこの形態観察においてみられた一層の幼若新生骨様組織の新生は、インプラント体表面のほぼ全周にわたって観察されたが、今回の実験における骨接触率の平均値は、約 50% であった。これは今回の骨接触率の計測での解像度が 25 μ m であり、2 週間後の BMP インプラント体表面にみられた 20 μ m 程度の新生骨様組織の存在の有無を、正確に捉えることができなかったためと考えられる。

インプラント体埋入 4 週間後：除去トルク値の測定結果において、TCP インプラント体は BMP インプラント体とともに、今回の測定方法における 2-piece type アパセラムインプラント体の構造的最大値を越える値を示し、インプラント体が顎骨中において強固に植立していることが示された。これは BMP インプラント体においては、その形態観察からも、インプラント体埋入 2 週間後において、インプラント体表面に新生された一層の幼若な新生骨様組織の成長によるものと考えられ、TCP インプラント体においては、HA インプラント体に比較して、4 週間後の形態観察でみられた、より高い骨伝導能の影響によるものと思われる。しかし、TCP、BMP インプラント体とも、

β -TCP 顆粒を焼結した試作インプラント体を使用しており、その表面性状は前述のとおり、約 10 μ m 程度の間隙があり、その間隙への新生骨組織の伸展の可能性について、できる限り排除するような設計にしたものの、若干の存在は認められ、また単純にその表面積も約 2 倍ほどに増大している。これらも TCP, BMP 両インプラント体の除去トルク値を向上させた一要因と考えられる。

インプラント体埋入 8 週間後：2, 4 週間後において TCP, BMP インプラント体と比較して、インプラント体表面と顎骨切削面間での骨形成の程度に遅れがみられた HA インプラント体も、骨の量的にはほぼ同程度まで形成が進み、インプラント体と顎骨とは新生骨組織によって密に結合されていた。また 3 種のインプラント体とも 60~70% の骨接触率を示し、これは関根ら⁵³⁾の報告するチタンスクリューインプラント体埋入後 5 カ月以上経過して、ほぼ骨改造が平衡に達したと思われるものの X 線による骨接触率にはほぼ一致する。

小木曾¹⁰⁾の報告によると、相対密度 95% の apatite 焼結体をイヌ下顎骨に埋入した結果、すでに術後 5 日目に新生骨組織の一部は、焼結体表面に接触している状態が観察され、術後 15 日になると、焼結体表面は血管洞が近接している部分を除いて、新生骨組織が拡大形成され、術後 30 日になると新生骨組織は層板構造を示すようになり、焼結体と顎骨との間隙は新生骨組織によって満たされた状態になるといわれている。これは今回行った実験における形態観察と比較すると、骨形成の進捗がはやく、今回の実験における BMP インプラント体の骨形成の進捗にはほぼ一致する。両実験は埋入されたインプラント体の形状等の違いのため単純な比較はできないが、今回の実験においては、特に埋入操作時のインプラント体の表面の損傷を防ぐため、インプラント体埋入窩をインプラント体の直径よりも大きく形成したため、インプラント体の骨結合に重要とされる、初期固定が十分ではなかったことがその原因と考えられる。今回の実験において、実験群ではインプラント体表面に β -TCP を焼結し、それに BMP を吸着するという複雑な構造であったため、前述のようにインプラント体埋入窩を大きめに形成した。今後、インプラント体に BMP を応用する際の担体については、さらに検討を加える必要があると考えられる。

V. 結 論

歯科骨内インプラント法において、インプラント体と顎骨との結合を、早期にまた確実にに行わせることを目的として、まず成牛長幹骨より骨誘導因子画分（粗 BMP）を抽出し、これをインプラント体に吸着しイヌ下顎骨に埋入した。

その結果以下の結論を得た。

1. 今回成牛長幹骨より抽出し粗精製を行い得られた画分は、ラットにおけるバイオアッセイの結果十分な異所性の骨誘導活性を示し、また担体として使用したラット長幹骨 BMP 抽出残渣および β -TCP は、抽出 BMP の骨誘導活性を効果的に発揮させることができた。

2. 除去トルク値測定による、骨—インプラント体周囲骨の力学的検索の結果、4 週間後において、 β -TCP 顆粒を焼結した試作インプラント体は、緻密体ハイドロキシアパタイトインプラント体に比較して有意に高い値を示し、さらに試作インプラント体に粗 BMP を吸着させたものは、2 週間後から有意に高い値を示した。

このことから、緻密体ハイドロキシアパタイトインプラント体の表面性状を変えることにより顎骨の把持力が向上し、またさらにそれに粗 BMP を吸着させることによって、より早期からの顎骨の把持力を向上させることが示唆された。

3. 骨—インプラント体接触率の測定および組織形態観察において、粗 BMP を吸着した試作インプラント体は、早期からのインプラント体表面での骨様組織の新生が観察され、骨—インプラント体接触率の上昇が認められた。

しかしこの 3 種のインプラント体間の新生骨形成の差も 8 週間後には認められず、骨の量的には同程度の形成が観察された。

本論文の一部は、平成 3 年度日本補綴歯科学会九州支部学術講演会（平成 3 年 9 月、北九州市）、および第 88 回日本補綴歯科学会学術大会（平成 4 年 10 月、東京）において発表した。

稿を終えるにあたり、本研究に際し終始ご懇篤なるご指導およびご校閲を賜りました熱田 充教授に深甚なる感謝の意を捧げるとともに、ご指導ご教示を賜りました長崎大学歯学部口腔生化学講座馬場友巳助手ならびに東京医科歯科大学歯学部生化学講座大井田新一郎助手に感謝の意を表します。

さらに試作インプラント体の作成に協力して頂いた(株)旭光学工業ニューセラミックス部技術課各位および骨接触率の計測に際しご指導を賜りました長崎大学歯科放射線学講座医局員各位に心よりお礼申し上げますとともに、日頃よりご助言ご協力をいただきました長崎大学歯学部歯科補綴学第一講座医局員各位に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. et al : A 15-years study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw, *Int J Oral Surg*, 10 : 387~416, 1981.
- 2) Brånemark, P-I : Osseointegration and its experimental background, *J Prosthet Dent*, 50 : 399~410, 1983.
- 3) 赤川安正 : アルミナセラミックス・インプラントの臨床と研究, 別冊ザクインテッセンス 骨内インプラントの限界と可能性, 67~77, クインテッセンス出版, 東京, 1984.
- 4) 小宮山彌太郎 : 骨結合インプラント (Osseointegrated implant) —その理論と症例—, *歯科学報*, 84 : 1751~1765, 1984.
- 5) 小木曾誠, 金田浩之, 塩田 真ほか : Apatite 2-peice implant 第 3 報 臨床治験について, *補綴誌*, 32 : 523~533, 1988.
- 6) 小木曾誠, 相川修二, 田端恒雄ほか : Apatite 2-peice implant 第一報 歯根部移植実験, *補綴誌*, 31 : 1522~1530, 1987.
- 7) Albrektsson, T. : Direct bone anchorage of dental implants, *J Prosthet Dent*, 50 : 255~261, 1983.
- 8) 福与碩夫 : 形状記憶合金インプラント, *補綴誌*, 31 : 1354~1363, 1987.
- 9) 永井教之, 木庭茂治, 立石聡明ほか : 部分安定化ジルコニア・セラミックス歯科インプラント (1 回法), *歯界展望/別冊デンタル・インプラント*, 129~139, 1987.
- 10) 小木曾誠 : Apatite の焼結体埋入による顎骨組織の経時的推移変化, *口病誌*, 45 : 170~221, 1978.
- 11) 益田高行 : Apatite implant 適用を目的とした顎骨内部構造の改善に関する実験的研究, *口病誌*, 56 : 289~313, 1989.
- 12) 守屋光孝, 田中久敏 : 歯科骨内インプラント法への微小電流刺激の応用 第 1 報 微小電流刺激装置及び電極の試作, *補綴誌*, 34 : 309~317, 1990.
- 13) 石原秀一郎 : アパタイト顆粒により挙上した顎堤へのインプラント適用に関する実験的研究—アパタイトインプラントと骨付きアパタイトインプラントの組織学的観察—, *口病誌*, 58 : 136~173, 1991.
- 14) Urist, M.R. : Bone : Formation by autoinduction, *Science*, 150 : 893~899, 1965.
- 15) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J. et al : Novel Regulators of Bone Formation : Molecular Clones and Activities, *Science*, 242 : 1528~1534, 1988.
- 16) Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S. et al : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 2220~2224, 1990.
- 17) Sampath, T.K., Coughlin, J.E., Whet Stone, R.M. et al : Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2a, two members of transforming growth factor- β superfamily, *J Biol Chem*, 265 : 13198~13205, 1990.
- 18) 大井田新一郎 : 骨誘導因子 (BMP と OIF), *THE BONE*, 5 : 37~43, 1991.
- 19) 朝比奈泉 : 骨形成因子 (BMP) の精製とその臨床応用に関する基礎的研究, *口病誌*, 54 : 91~105, 1987.
- 20) Urist, M.R., Nilsson, O., Rasumssen, J. et al : Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defect in dogs, *Clin Orthop*, 214 : 295~304, 1987.
- 21) Reddi, A.H. : Cell biology and biochemistry of endochondral bone development, *Coll Res*, 1 : 209~226, 1981.
- 22) Takaoka, K., Ono, K., Amitani, K. et al : Solubilization and concentration of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma, *Clin Orthop*, 148 : 274~280, 1980.
- 23) Hanamura, H., Higuchi, Y., Nakagawa, M. et al : Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix, *Clin Orthop*, 148 : 281~290, 1980.
- 24) Sampath, T.K. and Reddi, A.H. : Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 7599~7603, 1981.
- 25) Urist, M.R., Lietze, A., Mizutani, H. et al : A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction, *Clin Orthop*, 162 : 219~232, 1982.
- 26) Takaoka, K., Yoshikawa, H., Shimizu, N. et al : Purification of a bone-inducing substance (osteogenic factor) from a murine osteosarcoma, *Biomed Res*, 2 : 466~471, 1981.
- 27) Takaoka, K., Yoshikawa, H., Shimizu, N. et al : Partial purification of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma, *Clin Orthop*, 164 : 265~270, 1982.
- 28) Urist, M.R., Huo, Y.K., Brownell, A.G. et al : Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 : 371~375, 1984.
- 29) Bentz, H.R., Nathan, D.M., Rosen R.M. et al : Purifica-

- tion and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone, *J Biol Chem*, 264 : 20805~20810, 1989.
- 30) Luyten, F.P., Cunningham, N.S., Ma, S. et al : Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation, *J Biol Chem*, 264 : 13377~13380, 1989.
- 31) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T. et al : The nonosteogenic pluripotent cell line C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Biochem Biophys Res Commun*, 172 : 295~299, 1990.
- 32) Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T. et al : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro, *J Cell Biol*, 133 : 681~687, 1991.
- 33) Thies, R.S., Baudy, M., Atson, B.A. et al : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stroma cells, *Endocrinology*, 130 : 1318~1324, 1992.
- 34) Sato, K. and Urist, M.R. : Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture, *Clin Orthop*, 183 : 180~187, 1984.
- 35) Syftestad, G.T., Triffitt, J.T. and Urist, M.R. : An osteo-inductive bone matrix extract stimulates the in vitro conversion of mesenchyme into chondrocytes, *Cal Tis Int*, 36 : 625~627, 1984.
- 36) Reddi, A.H. and Sullivan, N.E. : Matrixinduced endochondral bone differentiation ; Influence of hypophysectomy, growth hormone and thyroid-stimulating hormone, *Endocrinology*, 107 : 1291~1299, 1980.
- 37) Sampath, T.K. and Reddi, A.H. : Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 : 6591~6595, 1983.
- 38) Sampath, T.K. and Reddi, A.H. : Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation, *J Cell Biol*, 98 : 2192~2197, 1984.
- 39) Kawai, T., Miki, A., Watanabe, T. et al : Osteoinductive activity of BMP (Bone Morphogenetic Protein)-hydroxyapatite, complex, edited by Kawahara, H., *Oral Implantology and Biomaterials*, 65~70, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1989.
- 40) Urist, M.R., Lietze, A. and Dawson, E. : β -tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein, *Clin Orthop*, 187 : 277~280, 1984.
- 41) Yamazaki, Y., Oida, S., Akimoto, Y. et al : Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of paris, *Clin Orthop*, 234 : 240~249, 1988.
- 42) 山崎安晴, 塩谷信幸, 大井田新一郎ほか : 骨形成因子 (BMP) の徐放系システムに関する実験的研究, *日骨代謝誌* 第10回日本骨代謝学会抄録号, 10 : 341, 1992.
- 43) Klawitter, J.J. and Hulbert, S.F. : Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications, *J Biomed Mater Res Symp*, 2 : 161~229, 1971.
- 44) 岡野博朗, 水野直之 : 脈管系の再生と治癒, *歯科ジャーナル別冊*, 377~389, 第4編, 国際医書出版, 東京, 1988.
- 45) 真木亮二 : 抜歯創の血管新生に関する実験的研究, *岡山医誌*, 72 : 153~174, 1959.
- 46) 野間弘泰 : 抜歯創の血管新生およびその経過に関する実験的研究, *歯科学報*, 66 : 202~279, 1966.
- 47) 高橋庄二郎 : 抜歯創治癒経過のレントゲンのならびに病理組織的所見に関する実験的研究 (その一), *歯科学報*, 52 : 212~216, 1952.
- 48) 高橋庄二郎 : 抜歯創治癒経過のレントゲンのならびに病理組織的所見に関する実験的研究 (その二), *歯科学報*, 52 : 265~271, 1952.
- 49) 松本重之 : インプラント窩形成がその周囲組織に及ぼす影響について, *口病誌*, 58 : 403~446, 1991.
- 50) 小木曾誠 : ハイドロキシ・アパタイト・セラミックス・インプラント, 別冊ザ・クインテッセンス 骨内インプラントの限界と可能性, 53~66, クインテッセンス出版, 東京, 1984.
- 51) Carlsson, L.V., Albrektsson, T. and Berman, C. : Bone response to Plasmacleaned titanium implants, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 4 : 199~204, 1989.
- 52) 村上広樹, 松原正典, 奥森直人ほか : インプラント予後診断における1画像解析法の開発 第1報 システムの利用法, *日口腔インプラント誌*, 5 : 1~10, 1992.
- 53) 関根 弘, 岸 正孝, 吉田浩一ほか : Osseointegrated implantに関するX線的ならびに組織学的検討 (第1報) —ビーグル犬顎骨適用例について—, *日口腔インプラント誌*, 5 : 186, 1992.