原 著 論 文

in vivo にて表面反応層を形成した生体活性
ガラスの免疫細胞に対する影響

武部 純

The Effect on the Immunocytes of the Bioactive Glass
Surface Layer Formed *in vivo*

Jun Takebe

Abstract : Since bioactive glass has been known as a biomaterial that can bind directly with bone by forming a calcium-phosphate and silica-rich layer on its surface, it is necessary to ascertain the mechanism and biological characteristics involved in the surface layer of bioactive glass. Thus, to approach this matter, the author investigated the surface layer of bioactive glass *in vivo* by implanting them into the abdominal cavities of mice for 21 days, and compared them to other experimental materials such as hydroxyapatite and titanium. The bioactive glass surface layer was confirmed by an energy-dispersive X-ray analysis, and the effect of these biomaterials on immunocytes were also evaluated.

Results showed lipopolysaccharide (LPS)-induced ^3H -thymidine uptake by spleen cells and nitric oxide (NO) production by mice peritoneal macrophages to be reduced by the intact bioactive glass, and LPS-induced interleukin 1 α (IL-1 α) production by human peripheral mononuclear cells to be enhanced. However, after formation of a surface layer on the bioactive glass, hardly any effect in terms of LPS-induced ^3H -thymidine uptake, production of NO, and IL-1 α was observed, as well as with the other biomaterials.

Studies suggest that the surface layer of bioactive glass formed *in vivo* had very little effect on immunocytes, and that these results were similar to hydroxyapatite and titanium which are considered to be biocompatible.

Key words : bioactive glass, biomaterial, immunocytes, calcium-phosphate and silica-rich layer, *in vivo*

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第二講座（指導：石橋寛二教授）

Department of Fixed Prosthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University (Director : Prof. Kanji Ishibashi)

平成 5 年 10 月 8 日受付

I. 緒 言

生体活性ガラスは生体内でリン酸カルシウムとシリカリッチ層¹⁻³⁾(以下反応層と称す)を形成することに

特徴があり、この反応層が骨との化学的結合に関与していると考えられている^{4,5)}。これまでの基礎的、臨床的研究から、骨との結合機構における反応層の役割が解明されつつある⁶⁻²⁰⁾。

一方、生体活性ガラスの免疫機構に対する影響については、反応層形成前の生体活性ガラスはマウスのB細胞およびT細胞の増殖を抑制し、B細胞の抗体産生を促進するが²¹⁻²³⁾、*in vitro*で反応層を形成した生体活性ガラスはマウスリンパ球の増殖やヒト末梢血単核球からのIL-1 α 産生には影響を与えないと報告されている²⁴⁾。しかしながら、生体活性ガラスを生体に用いた場合には、生体活性ガラス表面は組織液の緩衝能やpH、イオンなど¹⁷⁾の影響を受けると考えられ、その結果、生体内で形成された反応層は*in vitro*で形成された反応層とは異なる性質をもつ可能性が考えられる。

そこで著者は、SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅系生体活性ガラスをdiffusion chamber内²⁵⁾に入れ、これをマウス腹腔内に挿入して*in vivo*での反応層の形成を試みた。さらに、*in vivo*で反応層を形成した生体活性ガラスの免疫機構やマクロファージ機能に及ぼす影響について検討した。

II. 材料と方法

1. 材料

1) 被験材料

被験材料として、生体活性ガラス (SE-51, ニコン社製)、ハイドロキシアパタイト (セントラル硝子)、純チタン (JIS 2種) の3種類を用いた。試料の大きさは4×4 mmの正方形で厚さ1 mmの板状とした。生体活性ガラス、ハイドロキシアパタイトは180°C、45分間乾熱滅菌し、純チタンは121°C、20分間高圧蒸気滅菌を行った。各材料とも4試料を非透過性、非毒性のMFセメント®(日本ミリポア社製)により接着固定した後、滅菌し、マウス腹腔内への挿入に用いた(図1)。

2) diffusion chamber の作製

接着固定した4試料を固定するためアクリル製のdiffusion chamber ring (外径14 mm, 内径10 mm, 厚さ2 mm, 日本ミリポア社製) 内にフィッシャーバーにより4カ所のくぼみを付与した。75~80°Cで24時間加熱処理し、さらに24時間紫外線滅菌後、滅菌済みの4試料をフィルターと接触しないように内側

図1 実験に用いた試料とdiffusion chamber

のくぼみに入れてMFセメントで固定し、ringの両面に滅菌した直径14 mm, 孔径0.45 μ mのミリポアフィルター(日本ミリポア社製)をMFセメントで接着した(図1)。

3) diffusion chamber の腹腔内への挿入

マウス(ddY, 雄, 8~12週齢, 日本SLC)をベントバルビタールナトリウム(ネンブタール®, 0.12 ml/10 g 体重, アボット ラボラトリーズ)により腹腔内麻酔後、腹部を約2 cmにわたって縦切開し、試料の封入された3種類のdiffusion chamberを挿入した。腹部の切開部は外科用接着剤アロンアルファA(三共)で閉鎖した。挿入21日後に頸椎脱臼により屠殺し、腹腔内よりdiffusion chamberを取り出した。この実験では合計9頭のマウスを用いた。

4) 培養液

組織培養用RPMI 1640粉末培地(日水)を蒸留水により溶解し、高圧蒸気滅菌後に2 mM L-グルタミン(日水)、結晶ペニシリン-Gカリウム(明治)100 U/ml、硫酸ストレプトマイシン(明治)100 μ g/ml、20 mM HEPESを加え、7.5%炭酸水素ナトリウム水溶液によりpHを7.2~7.4に調整した。さらに、50°C、30分間加熱非働化した牛胎児血清(以下FCSと略す, GIBCO社製)を、マウスリンパ球とヒト末梢血単核球の培養用として10%、マウス腹腔マ

クロファージの培養用として5%をRPMI 1640培養液に加えた。

5) Mitogen

Bリンパ球 mitogen として lipopolysaccharide (LPS, E. coli O111:B4, Difco 社製) を無菌生理食塩水に溶解して用いた。

2. 方法

1) 生体活性ガラス表層部の分析

生体内挿入21日後に diffusion chamber 内より生体活性ガラスを取り出し、蒸留水により洗浄、乾燥後、ポリエステル樹脂 (リゴラック 2004, 70 F, 応研商事) に包埋した。バンドソー (BS-3000, Exakt 社製) で中央部を切断し、切断面を研磨後、乾燥させた。カーボン蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM, DS-130 S, トプコン社製) とエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX, PV-9100, PHILIPS 社製) を用いて、ガラス切断面の形態観察と Ca, P, Si の線分析を行った。

2) マウス脾臓細胞の採取と ^3H -thymidine の取り込みの測定方法

マウス (C57BL/6, 雄, 8~12 週齢, 日本 SLC) 1 頭を頸椎脱臼により屠殺後、脾臓細胞を無菌的に取り出し、細胞浮遊液を調製した。挿入前後の被験材料を 96 well マイクロプレート (平底, Nunc 社製) の well 底部に静置後、 2.5×10^6 cells/ml に調整し、脾臓細胞を 5.0×10^5 cells/well ずつ分注した。被験材料を静置していない脾臓細胞のみの well をコントロールとした。コントロールと被験材料の入った各 well に LPS を 0, 1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加し、 37°C , 5% CO_2 -95% 空気の条件下において培養を開始した。48 時間培養後、各 well に ^3H -thymidine (Amersham 社製) を 18.5 kBq/10 μl 添加した。さらに 18 時間培養後、オートマチックセルハーベスター (LM 101, ラボ・サイエンス社製) を用いて細胞を回収し、シンチレーター (Scintisol AM-1, 同仁化学) を使用して液体シンチレーションカウンター (LSC-1000, アロカ社製) により放射活性を測定した。

3) ヒト末梢血単核球からのインターロイキン 1α (IL- 1α) 産生とその測定方法

ヘパリン加ヒト末梢血を採取し、PBS (-) により 2 倍希釈した。これを等量の室温に温めたリンパ球比重分離液 (sodium metrizoate ficoll; H-SMF,

SG; 1.077, 日本抗体研究所) に重層し、 $400 \times \text{G}$ (1,600 rpm, KN-70, Kubota 社製) で 30 分間室温において遠心した。界面の末梢血単核球画分を採取し、PBS (-) に浮遊させ、1,500 rpm で 15 分間室温において遠心した。上清を捨て、PBS (-) を加えて細胞を浮遊させ、再度 1,200 rpm で 10 分間遠心した。上清を捨て RPMI 1640 培養液 (10% FCS) を加えて 5×10^5 cells/ml の単核球浮遊液とした。被験材料を 24 well マイクロプレート (平底, Nunc 社製) の well 底部に静置後、 4.5×10^5 cells/well ずつ単核球浮遊液を分注した。また、被験材料を静置していない単核球のみの well をコントロールとした。コントロールと被験材料の入った各 well に LPS を 0, 0.1, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加し、 37°C , 5% CO_2 -95% 空気の条件下において 24 時間培養後、各 well の培養上清を採取し 3,000 rpm で 15 分間遠心した。IL- 1α を測定するために上清を -20°C に保存した。IL- 1α 濃度は酵素抗体法 (ELISA, 大塚アッセイ) により測定した。

4) マクロファージからの活性酸化窒素 (nitric oxide; 以下 NO と略す) 産生とその測定方法

マウス (ddY, 雄, 8~12 週齢, 日本 SLC) 3 頭に高圧蒸気滅菌したチオグリコレート培地 (栄研化学) を 1.5 ml 腹腔内投与し、3 日後に腹腔浸出マクロファージを 90% 以上含む腹水を採取した。腹水を 1,000 rpm で 10 分間、遠心した後、上清を捨て、沈渣の細胞 (以下腹腔マクロファージと称す) を RPMI 1640 培養液 (5% FCS) により 1×10^6 cells/ml に調整した。被験材料を 96 well マイクロプレートの well 底部に静置後、 1×10^5 cells/well ずつ腹腔マクロファージ浮遊液を分注した。被験材料を静置していない腹腔マクロファージのみの well をコントロールとした。コントロールと被験材料の入った各 well に LPS を 0, 0.1, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加し、 37°C , 5% CO_2 -95% 空気の条件下において 20 時間培養後、培養上清液を採取し Griess 試薬 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine-2 HCl, 2.5% H_3PO_4) と反応させて 550 nm の吸光度を測定し、亜硝酸ナトリウムの標準曲線から NO 量を算定した²⁶⁾。この試薬は NO が酸化されてできる NO_2^- を測定するものであるが、ここでは NO として表示した。

5) 統計学的検討

統計学的検討は、各 LPS 濃度における被験材料

の ^3H -thymidine の取り込み量, ヒト末梢血単核球の IL-1 α 濃度, マウス腹腔マクロファージの NO_2^- 濃度の平均値の多重比較を Newman-Keuls test にて行った。

III. 結 果

1. EDX による生体活性ガラス表層部の線分析

SEM による観察の結果, 腹腔内挿入後の生体活性ガラス表層部では約 $80\ \mu\text{m}$ の反応層の形成が認められた。EDX による線分析の結果, 反応層の外側に約 $50\ \mu\text{m}$ の厚さの Ca と P とからなるリン酸カルシウム層が形成され, 未反応部の元素分布よりも Ca では約 2 倍, P では約 3 倍の分布が示された。Si は反応層の内側でピークがみられるものの, 反応層の外側では未反応部よりも低い傾向が認められた (図 2 a~c)。

2. マウスリンパ球の ^3H -thymidine の取り込みに対する影響

LPS 刺激によるマウスリンパ球の ^3H -thymidine の取り込みに対する挿入前後の生体活性ガラス, ハイドロキシアパタイト, 純チタンの影響について検討した。

LPS 無添加 ($0\ \mu\text{g}/\text{ml}$) の場合は培養 66 時間後においてもほとんど ^3H -thymidine の取り込みは認められず, 挿入前後の生体活性ガラス, ハイドロキシアパタイト, 純チタンともにコントロールに比較して有意差は認められなかった。LPS を添加 ($1.0, 10.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$) すると, コントロールと挿入後の生体活性ガラスとでは LPS 濃度に依って ^3H -thymidine の取り込みの増加がみられた。これに対して, 挿入前の生体活性ガラスではコントロールに比較して ^3H -thymidine の取り込みが有意に抑制された。挿入後の生体活性ガラスとコントロールとの間には有意差が

図 2 EDX による挿入後の生体活性ガラスの線分析
(a): Ca (b): P (c): Si

(a) 生体活性ガラス

* : $p < 0.01$ (挿入前の生体活性ガラスに対する有意差を示す)

(b) ハイドロキシアパタイト

(c) 純チタン

図 3 LPS 刺激によるマウスリンパ球の ^3H -thymidine の取り込みに対する被験材料の影響

認められなかった。

一方、挿入前後のハイドロキシアパタイト、純チタンはコントロールに比較して有意差は認められず、 ^3H -thymidine の取り込みに対する影響は認められなかった (図 3)。

3. ヒト末梢血単核球からの IL-1 α 産生に対する影響

LPS 刺激によるヒト末梢血単核球からの IL-1 α 産生に対する挿入前後の生体活性ガラス、ハイドロキシアパタイト、純チタンの影響について検討した。

LPS 無添加 (0 $\mu\text{g/ml}$) の場合、挿入前後の生体活性ガラス、ハイドロキシアパタイト、純チタン、コントロールの IL-1 α 産生はきわめてわずかで、いずれもコントロールとの間に有意差は認められなかった。LPS を添加 (0.1, 1.0 $\mu\text{g/ml}$) すると、コントロールと挿入前の生体活性ガラスでは LPS 濃度に依存して IL-1 α 産生の増強がみられた。コントロール

と挿入前の生体活性ガラスはともに LPS 濃度間に有意差が認められたが、挿入後の生体活性ガラスには LPS 濃度間の有意差はみられなかった。挿入前の生体活性ガラスはコントロールならびに挿入後の生体活性ガラスに比較して IL-1 α 産生を有意に促進したが、挿入後の生体活性ガラスとコントロールの間には有意差が認められなかった。

一方、挿入前後のハイドロキシアパタイト、純チタンは生体活性ガラスと同様に LPS 濃度に依存して IL-1 α 産生の増加がみられるが、コントロールとの有意差はなく、ハイドロキシアパタイトと純チタンの IL-1 α 産生に対する影響は認められなかった (図 4)。

4. マウス腹腔マクロファージからの NO 産生に対する影響

LPS 刺激によるマウス腹腔マクロファージからの NO 産生に対する挿入前後の生体活性ガラス、ハイド

(a) 生体活性ガラス

** : $p < 0.05$ (挿入前の生体活性ガラスに対する有意差を示す)

(b) ハイドロキシアパタイト

(c) 純チタン

図 4 LPS 刺激によるヒト末梢血単核球からの IL-1 α 産生に対する被験材料の影響

ロキシアパタイト、純チタンの影響について検討した。

LPS 無添加 (0 $\mu\text{g/ml}$) の場合、挿入前後の生体活性ガラス、ハイドロキシアパタイト、純チタンの NO 産生はコントロールとの有意差は認められなかった。LPS を添加 (0.1, 1.0 $\mu\text{g/ml}$) すると、挿入前後の生体活性ガラス、ハイドロキシアパタイト、純チタンともに NO 産生は増加の傾向を示すが、これらはともに LPS 濃度間に有意差が認められなかった。また、挿入後の生体活性ガラス、挿入前後のハイドロキシアパタイト、純チタンはともにコントロールとの間には有意差が認められなかった。しかし挿入前の生体活性ガラスのみは、コントロールと挿入後の生体活性ガラスに比較して NO 産生の抑制が有意に認められた (図 5)。

IV. 考 察

1. 本研究の意義について

生体材料を組織に埋入した場合、組織と材料間では種々の生体反応が生じる。とりわけ、人工歯根材料を骨組織に埋入した場合、その界面で起こる反応については常に問われるところである。組織内において生体材料表面は常に組織液中のイオンや各種細胞に触れる。しかし、生体材料による刺激が強いと炎症や血栓形成などの異物反応が生じる場合があるため、動物実験や各種培養細胞を用いた生体材料の評価が必要となる。

今回、実験で用いた生体活性材料である生体活性ガラスは、ラットや兎の大腿骨、脛骨へ埋入した場合、周囲骨組織の炎症性細胞浸潤は少なく、骨組織の新生が促進されていたと報告されている^{5,8,11,13}。また犬の顎骨に埋入した生体活性ガラス表面では、線維骨で覆

(a) 生体活性ガラス

(b) ハイドロキシアパタイト

* : $p < 0.01$ (挿入前の生体活性ガラスに対する有意差を示す)

(c) 純チタン

図 5 LPS 刺激によるマウス腹腔マクロファージからの NO 産生に対する被験材料の影響

われていない部分に顆粒状の石灰化物が認められ、これはガラス表層部に形成されたリン酸カルシウム層からの PO_4^{3-} や Ca^{2+} の供給が関与している可能性がある¹⁶⁾。このように生体活性ガラスを人工歯根として応用した場合、骨組織中では生体活性な性質により骨形成能が促進される可能性が示唆されている。

一方これまでに、生体活性ガラス人工歯根が口腔上皮と接する部位での免疫細胞との関連について、*in vitro* による検討が行われ、口腔内細菌などの抗原因子による免疫応答に対する生体活性ガラスの影響が解明されつつある。すなわち、免疫細胞であるリンパ球やマクロファージを mitogen により刺激した結果、反応層形成前の生体活性ガラスは mitogen 濃度に依存して免疫細胞に対する影響が認められたが、*in vitro* において生体活性ガラス表層部に反応層を形成することにより免疫細胞に対する影響は消失したと報告されている²¹⁻²⁴⁾。

したがって生体内において形成された生体活性ガラ

スの反応層の特性を明らかにし、その反応層に対する免疫細胞の影響について検討しておく必要がある。

そこで本研究では、diffusion chamber を用いて生体活性ガラスをマウス腹腔内に 21 日間挿入し、組織液による反応層の形成を試みた。さらに、これら材料を用いてグラム陰性菌の細胞壁構成成分である LPS²⁷⁾ により刺激されたリンパ球やマクロファージに対する影響について検討した。すなわち種々の生体内因子による影響を受けて形成された反応層が、*in vitro* でのものとは異なる性質を有する可能性を検討するために、今回の実験で用いた 3 つのパラメータのうち 2 つは工藤²⁴⁾と同様の方法にて行った。もう 1 つのパラメータとして、生体材料として生体内に埋入された場合、異物反応として種々の免疫反応に関与するマクロファージが遊走してくることが考えられるので、NO 産生を指標としたマクロファージ機能の解析を行った。また生体活性ガラスの反応と比較するために、歯科領域で応用されている生体親和性の良好なハ

イドロキシアパタイトと純チタンを被験材料に加えた。

2. 実験結果について

1) EDXによる生体活性ガラス表層部の線分析

生体活性ガラス表層部での反応に関しては、Tris-HCl緩衝液^{2,3,6,17)}を用いた *in vitro* による検討が行われてきた。工藤²⁴⁾は Tris-HCl緩衝液では細胞に対する毒性が強いことから、組織培養用 RPMI 1640 培養液を用いて反応層を形成させ、リンパ球や単核球に対する影響について報告している。

また、Fujita ら²⁸⁾はラット背部皮下組織に直接埋入した生体活性ガラス表層部にリン酸カルシウムとシリカリッチ層の形成が認められたと報告している。これは組織液の緩衝作用にて生体活性ガラス表層部に反応層が形成されたことを意味しており、埋入部位は異なるものの、今回の diffusion chamber 法によるマウス腹腔内における反応層の形成結果と一致している。生体内では器官相互間で常に組織液が流動しており²⁹⁾、この組織液が生体活性ガラス表面に緩衝作用などにより様々の影響を与えていると考えられている¹⁷⁾。したがって、マウス腹腔内に diffusion chamber を埋入した場合、腹腔内組織液は孔径 0.45 μm のミリポアフィルター穴を通じて循環しており、生体活性ガラスは組織液のみと接することになり、細胞成分の影響を受けることなく組織液の緩衝作用などを受けてことになる。SEM による観察ではガラス表層部に約 50 μm のリン酸カルシウム層が形成されていたが、これは生体内の組織液との接触の結果、組織液の緩衝作用などによって形成されたものと考えられる。生体活性ガラス表層部を EDX により線分析した結果、反応層表面側ではリン酸カルシウム層が、内側ではシリカリッチ層の形成が認められ、*in vitro* における工藤²⁴⁾の実験と同様の結果が示された。

2) 免疫細胞に対する影響

本実験で用いた LPS は炎症誘起物質²⁷⁾であり、投与局所に炎症性細胞を浸潤させる。さらに、LPS はマクロファージの活性化やマウス脾臓細胞中の B リンパ球を分裂させ、非特異的に抗体を産生させる mitogen としての作用が知られている²⁷⁾。また、各種サイトカインを誘導したり、様々な生物活性を有しており免疫応答に対して多彩な作用を示すことが報告されている³⁰⁾。LPS により刺激を受けたマクロファージは細胞内代謝活性が高まり、様々な活性化物質を産

生する。その中でも IL-1 は免疫応答や組織の炎症、修復に関与しているサイトカインとして知られている³¹⁾。また近年、LPS により刺激されたマクロファージに L-アルギニン依存性機構が働き、活性化マクロファージ内で NO が産生され、この NO が細胞障害活性の発現に関与していると報告されている^{32,33)}。

反応層形成前の生体活性ガラスは線維芽細胞の増殖を抑制することが知られている^{34~37)}。この抑制には、ガラス表面性状の構造変化、およびガラスから溶出したイオンによる pH 上昇に伴って細胞周期の時間が長くなることが関与していると考えられている。挿入前の生体活性ガラスは、挿入後の生体活性ガラスやコントロールに比較して免疫細胞に対する反応に有意の差が認められた。これは挿入前の生体活性ガラス内部から溶出されたアルカリイオンによりガラス周囲の pH が上昇したために、リンパ球の細胞分裂の抑制や活性化マクロファージ内での L-アルギニン代謝経路が阻害され、結果として挿入前の生体活性ガラスではリンパ球の増殖や NO 産生が抑制されたと推察された。また挿入前の生体活性ガラスで IL-1 α 産生が促進傾向を示した理由として、LPS による炎症誘起作用およびイオンによりマクロファージ周囲で炎症が惹起した状態となったことが考えられる。しかしながら、diffusion chamber 法によりマウス腹腔内において生体活性ガラス表層部に反応層を形成させることにより、免疫細胞に対する影響は消失した。このように反応層を形成した生体活性ガラスは、リンパ球の増殖と IL-1 α 産生に対しては *in vitro* での結果²⁴⁾と同様であった。今回の実験で検討した反応層形成後の生体活性ガラスは、bioactivity が減少し、生体に不活性な材料となりハイドロキシアパタイトや純チタンなどの生体親和性のある生体材料と同様な傾向を示した。生体活性ガラスは腹腔内において反応層を形成することにより、ガラス内部からのアルカリイオンの溶出が減少し、その結果ガラス周囲の pH が上昇しなくなったためリンパ球の増殖や IL-1 α 産生、NO 産生に対して影響を与えなかったものと推察された。

生体活性ガラスと比較するために用いたハイドロキシアパタイトと純チタンは、細胞の増殖および分化機能を促進し細胞親和性が認められること^{38,39)}や、純チタンの表面へ酸化皮膜 (TiO_2) を形成することにより耐腐食性が得られ、生体内安定性を有することが報告されている⁴⁰⁾。したがって今回用いたこれら材料の

表層部は、腹腔内組織液による緩衝作用を受けてもイオンの溶出や pH の変化は認められなかったため、免疫細胞に対して影響を与えなかったものと推察された。

マウス腹腔内においてガラス表層部に反応層を形成することにより材料自体の活性が減少し、マウスリンパ球の免疫機構やマクロファージの炎症惹起に伴う IL-1 α 産生、NO を指標としたマクロファージ機能に対しても影響を及ぼさないことが推察された。

V. 結 論

マウス腹腔内において反応層を形成した生体活性ガラスを用いて免疫細胞に対する影響を検討した結果、以下の結論を得た。

1. マウス腹腔内において生体活性ガラスの表層部にリン酸カルシウム層とシリカリッチ層が形成されており、反応層が認められた。

2. LPS による濃度依存性の ^3H -thymidine の取り込みの増加に対して、反応層形成前の生体活性ガラスはそれを有意に抑制したが、反応層形成後の生体活性ガラス、挿入前後のハイドロキシアパタイト、純チタンは抑制しなかった。

3. LPS による濃度依存性の IL-1 α 産生の増強に対して、反応層形成前の生体活性ガラスはそれを有意に促進したが、反応層形成後の生体活性ガラス、挿入前後のハイドロキシアパタイト、純チタンは促進しなかった。

4. LPS による濃度依存性の NO 産生の増強に対して、反応層形成前の生体活性ガラスはそれを有意に抑制したが、反応層形成後の生体活性ガラス、挿入前後のハイドロキシアパタイト、純チタンは抑制を示さなかった。

以上により、生体活性ガラスは *in vivo* において表層部に反応層を形成することにより、LPS にて刺激された免疫細胞に対して影響を及ぼさないことが示唆された。

稿を終えるに臨み、ご指導ならびにご校閲を賜りました石橋寛二教授に謹んで感謝の意を表します。またご専門の立場からご懇切なご教示をいただきました医学部細菌学講座吉田昌男教授、稲田捷也講師に深く感謝いたします。また有益なご助言を賜りました歯科補綴学第二講座塩山 司助教授、伊藤創造博士、工藤淳一博士に深謝いたします。さらに、試料の提供なら

びにご協力をいただきました(株)ニコン金子則夫氏、石沢 均氏、村田 剛氏に深く感謝の意を表しますとともに、本研究に際しご援助いただきました歯科補綴学第二講座の諸先生方に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は第 89 回日本補綴歯科学会学術大会(1993 年 5 月、札幌)において発表した。

文 献

- 1) Pantano, C.G. JR., Clark, A.E. JR. and Hench, L.L. : Multilayer corrosion films on bioglass surfaces, J Am Ceram Soc, 57 : 412~413, 1974.
- 2) Ogino, M., Ohuchi, F. and Hench, L.L. : Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass, J Biomed Mater Res, 14 : 55~64, 1980.
- 3) Ogino, M. and Hench, L.L. : Formation of calcium phosphate films on silicate glasses, J Non-Cryst Solids, 38 & 39 : 673~678, 1980.
- 4) Hench, L.L., Splinter, R.J. and Allen, W.C. : Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, J Biomed Mater Res Symp, No. 2(part 1) : 117~141, 1971.
- 5) Clark, A.E., Hench, L.L. and Paschall, H.A. : The influence of surface chemistry on implant interface histology : A theoretical basis for implant materials selection, J Biomed Mater Res, 10 : 161~174, 1976.
- 6) Hench, L.L. and Paschall, H.A. : Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle, J Biomed Mater Res Symp, No. 4 : 25~42, 1973.
- 7) Wilson, J., Pigott, G.H., Schoen, F.J. et al : Toxicology and biocompatibility of bioglasses, J Biomed Mater Res, 15 : 805~817, 1981.
- 8) 井上直彦, 伊藤学而, 亀谷哲也 : 生体活性ガラスを用いた人工歯根の開発, 日矯歯誌, 40 : 291~299, 1981.
- 9) Fujiu, T. and Ogino, M. : Difference of bond bonding behavior among surface active glasses and sintered apatite, J Biomed Mater Res, 18 : 845~859, 1984.
- 10) 工藤啓吾, 藤岡幸雄, 宮沢政義ほか : 生体活性ガラスを用いた人工歯根の臨床応用-第 1 報 埋植成績について-, 日口外誌, 32 : 2083~2089, 1986.
- 11) 鈴木鍾美, 井上直彦, 伊藤学而ほか : 生体活性ガラスの骨組織に及ぼす影響に関する実験的研究 (第 1 報), 岩医大歯誌, 11 : 320~325, 1986.
- 12) Merwin, G.E. : Bioglass middle ear prosthesis : Preliminary report, Ann Otol Rhinol Laryngol, 95 : 78~82, 1986.
- 13) Ito, G., Matsuda, T., Inoue, N. et al : A histological comparison of the tissue interface of bioglass and silica

- glass, J Biomed Mater Res, 21 : 485~497, 1987.
- 14) 石橋寛二, 藤野雅美 : 生体活性ガラスを用いた人工歯根, 材料技術, 7 : 132~135, 1989.
 - 15) 青木美佳子, 塩山 司, 山森徹雄ほか : 生体活性ガラスを用いたインプラントの力学的検討—二次元有限要素法による応力解析—第 1 報 天然歯との比較, 補綴誌, 35 : 772~778, 1991.
 - 16) 山森徹雄, 塩山 司, 細川 貢ほか : 生体活性ガラスを用いたインプラントの組織学的研究—生体活性ガラス周囲の骨形成について—, 補綴誌, 36 : 669~676, 1992.
 - 17) 石沢 均, 金子則夫, 荻野 誠 : 生体活性ガラスのトリス緩衝溶液中での反応と生体内反応との関係, 生体材料, 11 : 153~159, 1993.
 - 18) 塩山 司, 青木美佳子, 山森徹雄ほか : 生体活性ガラスを用いたインプラントの力学的検討—二次元有限要素法による応力解析—第 2 報 各種条件による上部構造の応力分布, 補綴誌, 37 : 318~326, 1993.
 - 19) 笹嶋 泉, 塩山 司, 北村 靖ほか : 生体活性ガラスを用いたインプラントの力学的検討—二次元有限要素法による応力解析—第 3 報 インプラントおよび周囲歯槽骨の応力分布, 補綴誌, 37 : 401~406, 1993.
 - 20) 山野目聡之, 山森徹雄, 塩山 司ほか : 生体活性ガラスを用いたインプラント周囲骨の経時的観察, 補綴誌, 37 : 635~640, 1993.
 - 21) 伊藤創造 : 生体活性ガラスのリンパ球免疫機能に対する影響, 補綴誌, 32 : 151~158, 1988.
 - 22) Itoh, S., Ishibashi, K., Inada, K. et al : The effects of bioactive glass on the function of lymphocytes, edited by Yamamuro, T., Hench, L.L. and Wilson, J., Handbook of bioactive ceramics volume I, 227~233, CRC Press, Boca Raton, 1990.
 - 23) Itoh, S., Kudo, J. and Ishibashi, K. : The effects of bioactive glass on interleukin 1 production, edited by Tsuru, H., Preiskel, H.W., Matsuo, E. et al, Advanced prosthodontics worldwide, 436~437, WCP publications committee, Hiroshima, 1991.
 - 24) 工藤淳一 : 生体活性ガラス表面反応層の生物学的活性に関する検討, 補綴誌, 37 : 182~191, 1993.
 - 25) 佐渡敏彦 : diffusion chamber による方法, 矢田純一, 藤原道夫編, 新リンパ球機能検索法, 414~419, 中外医学社, 東京, 1990.
 - 26) 樋口昌宏, 西村慶子 : 窒素酸化物, 徳永 徹, 吉田 彪, 赤川清子編, マクロファージ実験マニュアル, 220~222, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1992.
 - 27) 横地高志 : エンドトキシンの免疫系に及ぼす作用, 化学療法の領域, 5 : 34~38, 1989.
 - 28) Fujita, Y., Yamamuro, T., Nakamura, T. et al : Mechanism and strength of bonding between two bioactive ceramics *in vivo*, J Biomed Mater Res, 26 : 1311~1324, 1992.
 - 29) Rhoads, J.E. and Rhoads, J.E. JR. : The peritoneum, edited by Bockus, H.L., Gastroenterology volume 4, 33~47, W.B. Saunders, Phila., 1976.
 - 30) 中野昌康 : 総論—エンドトキシン研究の歴史の変遷とその生体におよぼす影響, 化学療法の領域, 5 : 13~17, 1989.
 - 31) 中野昌康 : マクロファージの産生する活性物質, 日本臨牀, 47 : 526~533, 1989.
 - 32) 斉藤慎二, 中野昌康 : マクロファージの抗腫瘍作用における L-アルギニン/NO 系, 臨床免疫, 23 : 1313~1320, 1991.
 - 33) Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. : Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology, pharmacol Rev, 43 : 109~142, 1991.
 - 34) Seitz, T.L., Noonan, K.D., Hench, L.L. et al : Effect of fibronectin on the adhesion of an established cell line to a surface reactive biomaterial, J Biomed Mater Res, 16 : 195~207, 1982.
 - 35) Matsuda, T., Yamauchi, K. and Ito, G. : The influence of bioglass on the growth of fibroblasts, J Biomed Mater Res, 21 : 499~507, 1987.
 - 36) Häkkinen, L., Yli-Urpo, A., Heino, J. et al : Attachment and spreading of human gingival fibroblasts on potentially bioactive glasses *in vitro*, J Biomed Mater Res, 22 : 1043~1059, 1988.
 - 37) 久保浩二, 柿元隆志, 政 信行ほか : 生体活性ガラスへの線維芽細胞の親和性について, 生体材料, 11 : 85~89, 1993.
 - 38) 板倉良暢 : 骨原性細胞株 MC 3 T 3-E 1 によるインプラント材料の生体親和性に関する研究, 補綴誌, 31 : 21~29, 1987.
 - 39) 飯島啓一郎, 須藤博子, 山本茂久 : 合成ハイドロキシアパタイト表面における骨原性細胞株 MC 3 T 3-E 1 の動態, 東北歯大誌, 15 : 15~24, 1988.
 - 40) 川原春幸 : インプラント材料の生物理工学, 石木哲夫, 一条 尚, 懸田利孝ほか編, 口腔インプラント学, 131~161, 医歯薬出版, 東京, 1991.