歯槽骨補填に関する研究

—天然焼成骨-コラーゲン複合体の応用—

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科補綴学第2専攻(指導:内田康也教授)

九州歯科大学学生化学講座(指導:野口知雄教授)

日本学術振興会特別研究員(受入指導者:野口知雄教授)

細川隆司

平成元年10月25日受付

Studies on Alveolar Bone Augmentation

—Application of the Sintered Bone-Collagen Complex for Hard Tissue Prosthesis—

Ryuji Hosokawa

Second Department of Prosthetic Dentistry (Director: Prof. Yasunari Uchida)

Department of Biochemistry (Director: Prof. Tomoo Noguchi)

Fellowships of the Japan Society for the Promotion of Science for Japanese

Junior Scientists (Director of Recipient: Prof. Tomoo Noguchi)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

The surgical treatment for preventing severe atrophy of the alveolar ridge caused by extraction of a tooth or cystectomy has improved considerably because of a development of calcium phosphate implant materials, in particular hydroxyapatite (HA), which has been shown to be bioactive in hard tissues. Histological studies have demonstrated that HA directly bonds with a bone after implantation. However, there has been no accurate answer to the question why HA shows bioactivity. In addition, numerous studies show that alveolar ridge augmentation utilizing HA granules does not always produce good results.

Attempts to overcome these questions and clinical disadvantage have been made by a biochemical study of initial calcification of HA surrounding tissues and by a clinical study of sintered bone (TBC)-collagen complex.

1. Matrix vesicles were isolated from the epiphyseal growth plate of young rabbits. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was detected in the isolated matrix vesicles only in the presence of detergents. The isolated matrix vesicles contained all five LDH isoenzymes but not other cytosolic enzymes. These results show that LDH is located in the matrix vesicles.

2. Non-enzymatic phosphatase activity was detected in HA. Among different types of HA, biological HA (sintered bone; True Bone Ceramic) showed the highest activity.

3. True Bone Ceramic (TBC)-collagen complex was prepared. Collagen serves as an adherent for the HA particles, resulting in a material that is easy to handle in the

augmentation of a bone.

4. In a primary culture of chicken growth chondrocytes, TBC-collagen complex promoted cell growth and cell differentiation.

5. The healing process of TBC implanted dental extraction sites in mongrel dogs was histologically evaluated with and without the use of collagen. At 4 weeks after implantation of TBC-collagen, numerous immature osteoids were observed in the central area of extraction sites. At 12 weeks, TBC-collagen showed good ossification at the extraction sites where cortical bone had existed.

Key words : *Matrix vesicles/Chondrocytes/Hydroxyapatite/Collagen/
Bone augmentation*

緒 言

外傷や嚢胞摘出などにより、治癒後の顎堤形態が良好に維持できないことが予想される場合がある。このとき、骨欠損部に対し、顆粒状人工骨材料を充填することにより良好な予後が得られるならば、歯科補綴治療における意義は大きい。

近年、顆粒状人工骨材料としてリン酸カルシウム系人工骨材料が歯科臨床に盛んに用いられるようになった。リン酸カルシウム系人工骨材料は、骨伝導能をもつ生体活性(Bioactive)材料と考えられている¹⁾。リン酸カルシウム系人工骨材料が生体活性を持つことの証明は主に組織学的な研究結果より得られたものであるが、この材料が何故生体活性を示すのかという根本的な問題に対して回答は示されていない。

リン酸カルシウム系人工骨材料は、様々な種類のものが市販されており、顆粒の形状も異なっている。また、リン酸カルシウム系人工骨材料の中で最も多用されている合成ハイドロキシアパタイトは、焼成温度が異なると、水中における溶解性をはじめとする諸性質が異なることが明らかにされている²⁾。本研究は、まず人工骨顆粒周囲の初期石灰化の機構の解明の一貫として、初期石灰化に重要な役割を演じているとされる³⁾基質小胞に局在する酵素群を検索したところ、この小胞に指標酵素である alkaline phosphatase (以下 ALP と略称) の外に lactate dehydrogenase (以下 LDH と略称) が存在することを明らかにした。さらに、人工骨顆粒自体が持つ生体内活性の指標として ATP, ADP に対する非酵素的フォスファターゼ活性を測定した。また、この非酵素的フォスファターゼ活性が合成ハイドロキシアパタイトと比較してはるかに高かった天然ハイドロキシアパタイト(天然焼成骨; True Bone Ceramic (以下

TBC と略称))の臨床応用を試みた。また、填塞時の簡便性を考えると同時に充填後の顆粒の流失を防ぐため、なんらかの方法で骨補填材自身に適度な成形性を持たせることが歯槽骨の小欠損に対する骨補填材として必要であると考え、コラーゲン溶液の併用を検討した。

実験材料と方法

I. 材 料

日本白色家兎(550~750g, 雄)および雑種成犬(9~11kg, 雄)を用いた。

骨充填材料として、TBC 顆粒(高研社製、直径300~600 μ m)、合成多孔質ハイドロキシアパタイト顆粒(旭工学社製、直径300~600 μ m)および合成緻密質ハイドロキシアパタイト顆粒(三菱工業セメント社製、直径300~600 μ m)を用いた。TBC は、天然焼成骨の一種で、牛皮質骨より得られた多孔質の天然ハイドロキシアパタイト結晶体であり、ブロック状のものと顆粒状のものがある(Fig. 1)。Fig. 2 に、製造過程の概略を示す。また、コラーゲン溶液として、高研社製アテロコラ

Fig. 1 Outside appearance of True Bone Ceramics.

Fig. 2 Preparation procedure of True Bone Ceramic.

ーゲン溶液（1%）を用いた。TBC-コラーゲン複合体の作製は、次のように行った。すなわち、1%のコラーゲン溶液を体積比1:1でTBC顆粒と混和した後、顆粒内部にデッドスペースをなくすため、可及的に無菌状態を保ちながら減圧チャンバーに入れ減圧脱泡したものを試作のアプリケーターに入れて使用した（Fig. 3）。

Pyruvate sodium salt, p-nitrophenyl phos-

Fig. 3 True Bone Ceramic-collagen complex in a syringe.

phate, 細胞分散用コラーゲナーゼは、和光純薬工業社製、digitonin は Merk (U.S.A.) 社製、Triton X-100 は半井化学工業社製、 β -NADH はオリエンタル酵母工業社製を用いた。牛胎児血清は、Sera-lab (U.K.) 社製、ペニシリン-ストレプトマイシン混合液は、M.A. Bioproducts (U.S.A.) 社製、ATP sodium salt, ADP sodium salt, AMP sodium salt, Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 Ham 混合増殖培地は、Sigma (U.S.A.) 社製、6-well cell culture cluster は、Costar (U.S.A.) 社製を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級を用いた。

I. 方法

A. 酵素活性の測定法

1. LDH の活性

Reeves ら (1966)⁴⁾の方法に従いピルビン酸と β -NADH を基質とし反応によって減少した β -NADH の340nmの吸光度から測定した。

2. ALP の活性

p-nitrophenyl phosphate を基質とし反応によって生じた p-nitrophenol の405nmの吸光度の増加を測定した⁵⁾。

B. ウサギ肋軟骨骨端成長軟骨よりの基質小胞および軟骨細胞の単離

頸椎を脱臼させたウサギよりすばやく肋骨-肋軟骨接合部を取り出し、軟組織を剥離除去後肉眼的に透明な成長軟骨の肥大層を中心に成長軟骨部を切り出した。これを、細切後、Bernard ら (1986)⁶⁾の方法に準じコラーゲナーゼ処理の後、Fig. 4 に示すように分画遠心を行って基質小胞画分と細胞画分を得た。

C. 基質小胞画分に対する digitonin 処理

Noguchi ら (1979)⁷⁾の方法に従った。0.25M 蔗糖溶液に1.2%の digitonin を加え加熱して溶解した後2°Cに冷やした。この溶液を0.25M 蔗糖溶液で段階的に希釈しこれに基質小胞画分を等量加え混和した。15分間静置した後、100,000×gで30分間遠心し上清のLDH活性を等張緩衝液中（0.25M sucrose/20mM glycyl-glycine, pH 7.5）で測定した。

D. ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動

1. 電気泳動

Fritz ら (1970)⁸⁾の方法に従った。5%のポリアクリルアミドゲルを分離用ゲルとし、50mM グリシン-NaOH 緩衝液（pH 10.0）を泳動用緩衝液として4°Cで1時間、1カラム当り5mAで行った。

2. 活性染色

Netisewojo ら (1976)⁹⁾の方法で行った。NAD⁺とピルビン酸の存在下で LDH により生じた NADH が PMS を介してテトラゾリウム塩を還元しゲル中にホルマザン(紫色)を生じることにより活性の存在位置を知った。

E. 基質小胞画分および成長軟骨細胞の蔗糖密度勾配遠心分画

de Duve ら (1955)¹⁰⁾の方法を一部改変して用いた。前述に従ってウサギ3頭より得られた基質小胞画分(1.5ml)を、33mlの直線的蔗糖密度勾配[24-40% sucrose (w/w)/20mM グリシルグリシン (pH 7.5)]に重層した。また、ウサギ3頭より得た細胞画分は、マイクロホモジナイザー(Physicotron, 日音医理工機株式会社製)を用いて目盛り5のスピードで15秒間×2回ホモジナイズし、これを300×gで5分間遠心し、上清(1.5ml)を33mlの直線的蔗糖密度勾配[24-54% sucrose (w/w)/20mM グリシルグリシン (pH 7.5)]に重層した。ついで、両者とも55P-72型超遠心機(日立製作所社製)とバーチカルローター RPV 50T-160を用いて132,400×gで70分間遠心した。遠心終了後、遠心管の底から2.1mlずつ分画し、直ちに酵素活性を測定した。以上の操作はすべて4°Cで行った。

F. 非酵素的フォスファターゼ反応

1. 非酵素的フォスファターゼ活性の測定

各種ハイドロキシアパタイト顆粒25mgを20mM Tris-HCl pH 7.5 0.5ml中に浸漬し、基質(ATP, ADP)を終濃度5mMになるよう加え、37°Cで攪拌しながら反応させ、溶液中に遊離してきた無機リン酸をBaginski ら (1974)¹¹⁾の方法で定量した。これから基質非存在下において検出される無機リン酸濃度(ハイドロキシアパタイト顆粒自体からの溶出)を差し引いたものを非酵素的フォスファターゼ活性とした。

2. 反応生成物の定量

HPLC(高速液体クロマトグラフ) HLC-803D, インテグレート CP-8000およびアニオン交換樹脂充填カラム DEAE-5PW(以上TOSOH社製)を用い、反応液を遠心後、上清をアセトニトリルを20%含むリン酸濃度勾配0.1M-0.5M(30min linear gradient)によりATP, ADP, AMPを分離溶出した。Flow rateは、1.0ml/minとし、UV 260nmでヌクレオチドのピークを検出した。

G. 走査電顕による天然および合成ハイドロキシアパタイト顆粒表面構造の比較

ハイドロキシアパタイト顆粒をデシケータ内で乾燥

後、イオンスパッタで金銀パラジウム蒸着を施し、走査型電子顕微鏡S-530(日立社製)で観察した。

H. X線回折分析

DP-61 X線回折分析装置(島津製作所製)を用い、乳鉢にて微粉末にしたハイドロキシアパタイト顆粒をCuターゲット, 30KVp, 30mA, 2θ angle = 20~57(deg.)で測定をおこなった。

I. 初代培養軟骨細胞を用いたコラーゲン使用群と非使用群の顆粒周囲における細胞形態の比較

若いbroiler(4週齢)より、脛骨の骨端成長軟骨を採取し細切後、Wuthier らの方法¹²⁾に準じ15時間のコラーゲナーゼ処理を行い、メッシュで濾過後、600×gで15分間遠心し軟骨細胞を回収した。10%牛胎児血清、50μg/mlのペニシリンG, 50units/mlのストレプトマイシンとアスコルビン酸を50μg/ml加えたDulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham F-12混合増殖培地に細胞を浮遊させ、5.0×10⁵ cell/wellの密度で6-well cell culture clusterに播種した。なお、6-well cell culture clusterには、TBC-コラーゲン複合体(5mg)と、あらかじめ生食水を含浸させたTBC顆粒(5mg)をそれぞれ入れておき5% CO₂/95% Air, 37°Cで培養した。なお、培地は3日ごとに交換した。細胞形態の観察は、倒立型位相差培養顕微鏡を用いた。

J. 雑種成犬抜歯窩に対する充填実験

雑種成犬四頭を用い、pentobarbital sodium (25mg/kg)静脈麻酔下で、第2~第4前臼歯を抜歯後、直ちにボンドドリルで抜歯窩壁を一層削除した。この抜歯窩に、TBC顆粒を、生食水と混和したものと、TBC-コラーゲン複合体の2群に分けて充填し、緊密に縫合した。4週および12週経過後10%中性緩衝ホルマリン液を頭頸部より注入し、灌流固定を行い顎骨を採取した。嶋村ら(1971)¹³⁾の方法に従い、リゴラック樹脂包埋による110-150μmの非脱灰切片を作成し1%トルイジンブルー染色を施し、顆粒周囲の骨形成像を光顕で観察した。

結 果

I. 基質小胞の指標酵素の検討(基質小胞内にLDH isoenzymesを発見)

Fig. 4に従ってウサギ肋軟骨の成長軟骨よりコラーゲナーゼ処理および遠心分画によって得られた基質小胞画分では、界面活性剤(Triton X-100およびdigitonin)存在下においてのみLDH活性が検出されることを発見した。そこで、さらにこの画分を濃度の異なるdigi-

Fig. 4 Preparation of MVEM (Matrix Vesicles Enriched Microsomal) fraction and cell fraction from growth cartilage. Both fractions were suspended in 0.25M sucrose/20mM glycyl-glycine, pH 7.5.

Fig. 5 The solubilized profiles of lactate dehydrogenase from the isolated matrix vesicles by digitonin. Stock 1.2% solutions of digitonin were prepared just before use by heating in 0.25M sucrose solution. Stock solution at 0-2 °C was added to the matrix vesicle suspension (0-10 ml digitonin solution/1 ml matrix vesicle suspension) and mixed. After 15 min, the suspension was centrifuged at 100,000×g for 30 min and the supernatant fluid was carefully removed with a Pasteur pipette. The resulting supernatant was assayed for LDH.

tonin 処理による LDH の基質小胞画分からの可溶化パターンを調べた. Fig. 5 に, その結果を示す. 0.1mg/ml 以上の digitonin 濃度で LDH が可溶化されはじめ, 2 mg/ml 以上の digitonin 濃度で完全に可溶化された. また, Triton X-100 を用いた場合, 0.2% 以上の濃度で基質小胞画分から LDH が完全に可溶化された. この結果は, 基質小胞画分に latent な LDH 活性が存在していることを示唆している. そこでこの latent な LDH 活性が基質小胞によるものかどうかをさらに確認するため, この基質小胞画分を蔗糖密度勾配遠心分画法により分画した (Fig. 6). ALP 活性は蔗糖濃度約 24.5% を中心とした単一の幅広いピークとして検出された. 界面活性剤の非存在下では LDH 活性はほとんど検出されなかったが, 界面活性剤 (0.2% Triton X-100) 存在下では活性が出現し, この活性は ALP の活性とほとんど同一の沈降パターンを示した (Fig. 6). これらの結果は, LDH の基質小胞内存在を示唆している. しかし, 軟骨細胞膜あるいは細胞内の顆粒状構造物に LDH が存在しており, これが基質小胞画分に混入している可能性がある. そこで, このことを明らかにするた

Fig. 6 Sucrose density gradient centrifugation of the isolated matrix vesicles. Matrix vesicles were isolated from epiphyseal growth plates as described in Fig. 4, homogenized with 3 ml of 0.25M sucrose/20mM glycyl-glycine, pH 7.5 and subjected to sucrose density gradient centrifugation. After fractionation from the bottom of the tube, LDH activity was determined in the absence (▲) and the presence (△) of Triton X-100 at final concentration of 0.2%, alkaline phosphatase activity (○) in the absence of Triton X-100 and concentration of sucrose (•).

め、細胞画分を蔗糖密度勾配遠心分画法により分画した。Fig. 7 にその結果を示す。ALP の活性は成長軟骨細胞の顆粒画分に検出された。この画分に LDH 活性が全く検出されないことから細胞外マトリクスに存在する基質小胞の中に LDH が存在していることが明らかとなった。さらに、この基質小胞内の LDH と軟骨細胞内の LDH をそれぞれ抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による isoenzymes の比較を行ったところ、両者とも 5 個の isoenzymes がすべて存在しており、同一な泳動パターンを示した (Fig. 8)。また、他の成長軟骨細胞のシトソールの酵素 (malate dehydrogenase, aldolase, alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase) は基質小胞中に検出できなかった。これにより、成長軟骨細胞のシトソールに存在する LDH isoenzymes は、なんらかの特異的な取り込み機構により基質小胞内に取り込まれていることが明らかになった。以上の発見は、現在基質小胞の唯一の指標酵素とされている ALP に加え、LDH が新しい指標酵素となり得ることを示している。

Fig. 7 Sucrose density gradient centrifugation of epiphyseal cartilage chondrocytes. Chondrocytes were prepared from epiphyseal growth plates of three young rabbits, homogenized with 3 ml of 0.25 M sucrose/20 mM glycyl-glycine, pH 7.5 and then subjected to sucrose density gradient centrifugation. LDH activity (Δ) was determined in the presence of Triton X-100 at a final concentration of 0.2%, alkaline phosphatase activity ($\circ$) in the absence of Triton X-100 and concentration of sucrose ($\bullet$).

II. 非酵素的フォスファターゼ活性の測定

ハイドロキシアパタイト結晶は、その結晶構造に由来して、非酵素的フォスファターゼ活性を示すことが報告

Fig. 8 Polyacrylamide gel electrophoresis of matrix vesicles and cytosolic lactate dehydrogenase isoenzymes. Matrix vesicles and chondrocytes were isolated from rabbit epiphyseal cartilage, solubilized with 0.2% Triton X-100 and centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min. The resulting matrix vesicle extract and the chondrocyte extract were separately subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. Matrix vesicles were solubilized with 0.2% Triton X-100 and centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min and the precipitate was discarded. Cytosolic fraction of chondrocytes was prepared as described in Fig. 7. The extract of matrix vesicles (7.5 units of LDH) and the cytosol (7.5 units) of chondrocytes were separately subjected to polyacrylamide gel electrophoresis.

されている^{14,15)}。とくに ATP, ADP などのヌクレオチド多価リン酸化合物は、良い基質となる。Fig. 9 は、3 種のハイドロキシアパタイト顆粒の ATP を基質とした場合の非酵素的フォスファターゼ活性の比較を示している。合成ハイドロキシアパタイト (s-HAp: 合成多孔質ハイドロキシアパタイト, s-HAd: 合成緻密質ハイドロキシアパタイト) に比べ、天然ハイドロキシアパタイト (TBC) は、非常に高い活性を示すことがわかった。また、Fig. 10 に示すように HPLC によるヌクレオチドの定量分析をおこなった。左図は、反応開始 24 分後、右図は、反応開始 3 時間後の反応溶液の溶出パターンである。反応時間が進むにつれ ATP のピークが減少し ADP, AMP のピークが増加していることが明らかとなり、ATP が ADP, さらに AMP にまで脱リン酸されていることが明らかにされた。

Ⅲ. 天然ハイドロキシアパタイト (TBC) と合成ハイドロキシアパタイトとの比較

1. 天然および合成ハイドロキシアパタイト顆粒表面構造の比較

Fig. 11 に走査電顕による各種ハイドロキシアパタイト顆粒の表面構造を示す。TBC 顆粒の表面構造は、緻密質合成ハイドロキシアパタイト顆粒とは全く違い多孔質構造を示していた。また、多孔質合成ハイドロキシアパタイト顆粒と比較すると、TBC 顆粒表面のほうがよ

Fig. 9 Non-enzymatic ATPase activity of hydroxyapatites. 25mg of each material was added in 0.5 ml of 5 mM ATP-Na/20 mM Tris-HCl, pH 7.5 and incubated for 15 min at 37°C with a laboratory shaker. Reaction mixtures were centrifuged and supernatants were subjected to inorganic phosphate quantification. Non-enzymatic ATPase activity was corrected by blank experiences (without ATP-Na) which clarified the solubilized inorganic phosphate from the materials.

s-HAp, synthetic hydroxyapatite porous granules; s-HAd, synthetic hydroxyapatite dens granules; TBC, True Bone Ceramic.

Fig. 10 The elution profiles of nucleotides of reaction mixtures with True Bone Ceramics. 25 mg of True Bone Ceramics were added in 0.5 ml of 5 mM ATP-Na/20 mM Tris-HCl, pH 7.5 and incubated at 37°C with a laboratory shaker. Reaction mixtures were centrifuged and supernatants (0.1 ml) were subjected to HPLC (Column: DEAE-5 PW, TOSOH, Tokyo JAPAN) for determination and quantification of nucleotides.

left, 24 min incubation; right, 3 h incubation.

Fig. 11 Scanning electron micrograph of True Bone Ceramics (left), synthetic porous hydroxyapatites (center) and synthetic dens hydroxyapatites (right).

り緻密な多孔質であり表面に微小な突起が密集していることがわかった。

2. X線回折分析

Fig. 12 は、TBC と市販多孔質合成ハイドロキシアパタイトとの X 線回折による結晶構造の比較である。TBC は、合成ハイドロキシアパタイトとほとんど同一なピークパターンを示しており、 α -および β -TCP のピークは全く観察されなかった。

Ⅳ. TBC-コラーゲン複合体と TBC 単体との比較

1. 初代培養軟骨細胞を用いたコラーゲン使用群と非使用群の顆粒周囲における細胞形態の比較

Fig. 13 に、培養開始後 5 日目の細胞形態を示す。培養 5 日目でコラーゲン複合体の方が人工骨周囲における細胞の付着が良好なことで、増殖が盛んに行われていること、さらに軟骨細胞特有のポリゴナル、いわゆる敷石状の形態が多く見受けられ、形態的にも分化が進んでいることを示唆した。

2. 雑種成犬抜歯窩への充填実験

肉眼的経過観察では、TBC-コラーゲン複合体を用いた群では、生食水を用いた群に比べ、顆粒の流出が極めて少なく良好な治癒過程をたどっていることが観察された。また、非脱灰標本による 4 週例の光顕所見では、両

群とも TBC 顆粒周囲に沿って著明な骨新生像がみられ、基質成分に富んだオステオイドが顆粒周囲に観察された。しかし、充填部の中心部分においては染色性からみて TBC-コラーゲン複合体群の方が石灰化度の低い幼弱な骨組織が多く、骨組織の成熟度(石灰化度)からみると TBC 単体充填群の方がむしろ進んでいるような傾向がみられた (Fig. 14)。

12 週例では、充填部の中心部分においては両群ともほとんど同様な治癒経過をたどっていた。皮質骨部においては TBC-コラーゲン複合体群の方に新生骨組織の見えるものがあつたが TBC 単体群の方ではほとんど見られなかった (Fig. 15)。

考 察

Ⅰ. 基質小胞について

基質小胞 (Matrix Vesicles) は、人工骨周囲の初期石灰化に重要な役割を果たすとされている細胞外小器官である。基質小胞は、細胞の形質膜に存在する ALP, 5'-AMPase, pyrophosphatase, ATPase, などの膜酵素を含むことが知られている。基質小胞は 1960 年代の後半 Anderson と Bonucci により発見されて以来、主に形態学的に研究されてきた。その結果、基質小胞の

Fig. 12 X-ray diffraction patterns of True Bone Ceramics (left) and synthetic porous hydroxyapatites (right). Materials were ground with a mortar and pestle and applied to DP-61 X-ray diffraction analyzer (Shimazu, Tokyo JAPAN) with a Cu-target under following conditions; 30 KVp, 30 mA, 2θ angle = 20–57 deg.

Fig. 13 Effect of collagen on primary cultured chondrocytes. 5mg of materials were sterilized and placed in each well of a 6-well cell culture cluster. Chondrocytes were prepared for primary cell culture by collagenase digestion and seeded at 5.0×10^5 cells/well in 2ml/well of DMEM/F-12 Ham cell culture medium with 10% FCS. Media were changed every 72h. 5-day culture cells were examined with a phase-contrast photomicroscope.

left, True Bone Ceramics; right, True bone Ceramics-Collagen complex.

Fig. 14 Photomicrograph of 4 weeks after operation. Undecalcified section with toluidine blue staining. ($\times 50$)

left, True Bone Ceramics; right, True bone Ceramics-Collagen complex.

Fig. 15 Photomicrograph of 12 weeks after operation. Undecalcified section with toluidine blue staining. ($\times 50$)

left, True Bone Ceramics; right, True bone Ceramics-Collagen complex.

存在様式については明らかになってきたが、その機能については不明な点が多く、生化学的同定も充分ではない。基質小胞の機能を解明する手段として現在一般的に行われている細胞分画の手法を用いる場合、指標酵素として用いられている ALP は、細胞の形質膜のほかに、細胞内の *microsomes* にも存在しており、基質小胞の指標酵素として不適格である。

本研究により、LDH が基質小胞中に存在することが明らかとなった。成長軟骨の形質膜や細胞内の顆粒に、LDH を含む小胞が検出されないことから、LDH は基質小胞の新しい指標酵素として利用できるものと考えられる。このことから、基質小胞の定量化が可能となり、基質小胞の機能研究にとって新しい展開が期待できるものとする。

Ⅱ. ハイドロキシアパタイト結晶が示す非酵素的フォスファターゼ活性について

ハイドロキシアパタイト結晶には、その結晶構造に由来して、ある種のリン酸エステルのエステル結合を加水分解する能力があることが報告されている^{14), 15)}。とくに、ATP, ADP などのヌクレオチド多価リン酸化合物は、末端のリン酸基が作用を受け、無機リン酸が遊離しこれが非酵素的フォスファターゼ活性として検出される。本研究により、TBC は他の合成ハイドロキシアパタイト顆粒に較べてきわめて高い非酵素的フォスファターゼ活性を持つことが明らかになった。また、ATP から ADP のほかに、AMP も生成する能力があることも明らかになった。軟骨内骨化において、成長軟骨の各層における各種ヌクレオチド化合物の含量を調べると、ATP と ADP は石灰化層に近づくにつれて減少しているのに対し AMP は増加しているという報告がある¹⁶⁾。これは、*in vivo* の骨形成の場で、実際に ATP と ADP がフォスファターゼの基質となっている可能性を示唆している。骨形成の場で無機リン酸の濃度上昇は石灰化に有利であると考えられ、ハイドロキシアパタイトのこの活性は生体内での *bioactivity* の *index* となる可能性がある。この仮定の上に立てば本研究の結果から、天然ハイドロキシアパタイト (TBC) の方が合成ハイドロキシアパタイトより *bioactivity* が高いということになる。

Ⅲ. 天然ハイドロキシアパタイト (TBC) について

現在、リン酸カルシウム系人工骨材料として最も多く用いられている合成ハイドロキシアパタイトは、骨の無機成分 (天然ハイドロキシアパタイト) と全く同じ物ではないことが知られている。植野ら (1985)¹⁷⁾ は、合成

ハイドロキシアパタイトはリンとカルシウム以外の金属元素は全く含まないが、天然ハイドロキシアパタイトは、微量の金属元素を含んでおり、TBC にも、ナトリウム、マグネシウム、アルミニウム、シリカ、鉄、銅、鉛などが、きわめて微量に含まれていると述べている。また、分子レベルにおける結晶構造を比較すると、天然ハイドロキシアパタイトの方が格子欠陥が多く存在しているともいわれている。この天然ハイドロキシアパタイトが、合成ハイドロキシアパタイトに較べ極めて高い非酵素的フォスファターゼ活性を持つことが明らかになったので、この天然ハイドロキシアパタイトを主成分とした天然焼成骨 (TBC) を歯科補綴領域における骨補填材として応用を試みた。

TBC は牛骨由来で、Fig. 2 に示すように除蛋白操作の後、細かく割断し、二度に分けて焼成している。こうした操作により骨の有機成分はすべて取り除かれ、したがってこの TBC のみでは生体の免疫機構における抗原とはなり得ない。要するに TBC は、移植材料の分類によるところの異種骨材料ではなく、単なる天然ハイドロキシアパタイトを主成分とした無機材料ということになる。この TBC を用い、植野らは、すでに整形外科領域で臨床治験を行っており良好な結果を得ている¹⁷⁾。

本研究では、まず TBC と他の市販合成ハイドロキシアパタイト顆粒の構造の比較を行った。SEM による観察では、TBC 顆粒は、表面の微細構造が市販の多孔質合成ハイドロキシアパタイトとは異なり、同じ多孔質といっても特異的な表面構造をしていることが明らかになった。

Taves ら (1969)¹⁵⁾ によれば、ハイドロキシアパタイト結晶自体が持つ非酵素的フォスファターゼ活性はその結晶構造に由来すると述べている。そこで、TBC と合成ハイドロキシアパタイト顆粒の結晶構造を比較するため、両者の X 線回折分析を行ったところ、X 線回折による結晶構造の解析からは TBC と合成ハイドロキシアパタイトのフォスファターゼ活性の違う理由は、明らかにはならなかった。しかし、X 線回折以外の方法で分子レベルの結晶構造解析を行えば、この活性の違いが何に由来するものかを明らかにすることができる可能性が高いと思われる。ただしこの TBC の高い非酵素的フォスファターゼ活性が、*in vivo* で TBC の優位性をそのまま示すのかどうか、さらに今後の研究および臨床治験の結果を待つ必要があると考える。

Ⅳ. TBC-コラーゲン複合体の検討

コラーゲンは、上皮組織の創傷治癒を促進し、骨欠損

部における骨形成を促進するという報告がある^{18,19)}。また、臨床において、顆粒の充填の際に顆粒を維持することが困難であり、また、充填後の顆粒の流失により予後の不良を招くことがある。そこで、創傷治癒と骨形成の促進を期待し、さらに顆粒に成形性を付与し充填操作をしやすく、しかも顆粒の流失を防ぐ方法としてコラーゲン溶液を顆粒状 TBC のバインダーとして利用することを考えた。本研究では、1%のコラーゲン溶液を用いて体積比 1:1 で顆粒と混和した後、顆粒表面にデッドスペースをなくすため、可及的に無菌状態を保ちながら減圧チャンバーに入れ減圧脱泡したものを試作のアプリケーションに入れて使用した。この TBC-コラーゲン複合体は、Fig. 3 に示すように適度な成形性を得ることが出来、光重合レジンで充填するようなタッチで操作を行うことが可能であり、生食水に TBC 顆粒を浸したものに比べ、明らかに操作性が向上している。コラーゲンとハイドロキシアパタイトの複合体をつくり骨補填剤として用いる試みはいくつか報告されている²⁰⁻²²⁾が、いずれも複合体形成過程において乾燥処理されており、本実験の複合体のように成形性はない。

使用したコラーゲン溶液は、すでに形成外科領域での使用が認可されているコラーゲン溶液（アテロコラーゲン、高研社製）であり、本研究ではこのコラーゲン溶液の 1% のものを使用した。高研社製コラーゲン溶液は、ペプシン処理によりコラーゲン分子両端のテロペプチドを外しており、これにより抗原性は著しく低下している。

Kleinman ら (1985)²³⁾ は、各種細胞にとって、コラーゲンは優れた細胞外基質成分として作用しコラーゲンゲル上では細胞がより長期間生存し得ることを示している。また、Madri ら (1983)²⁴⁾ は、培養筋原細胞はコラーゲン存在下でないと筋繊維への分化が起こらない事実を示し、コラーゲンは、細胞分化にとって重要な役割を果たすことを示唆した。これらの事実から、人工骨顆粒に対するコラーゲンの併用は、生体内の人工骨周囲の環境を細胞の分化増殖にとって有利なものにする可能性がある。本研究では、初代培養成長軟骨細胞による評価を行ったところ、TBC-コラーゲン複合体のほうが細胞の付着が良好なことで、顆粒周囲で、細胞増殖が盛んに行われていること、さらに軟骨細胞特有のポリゴナル、いわゆる敷石状の形態が多く見受けられ、形態的にも分化が進んでいることを示唆する結果が得られた。この結果は、コラーゲンの持つ細胞外基質としての特徴からしごく当然のものと考えられた。

一般的に、培養系を使った人工骨材料に対する評価方法として、MC3T3-E1 などの *in vitro* で石灰化能を持つ株化された骨芽細胞様細胞を用いるか、あるいは、マウス胎仔の頭蓋冠由来のクローン化した骨芽細胞様細胞を用いて人工骨周囲に形成される石灰化物を定量する方法が行われている。しかし、本研究では初代培養成長軟骨細胞を用いた。これは、最近、Grant ら (1987)²⁵⁾ が、骨欠損部の修復時に、骨再形成が起ころうとしている部位に Type II および Type X コラーゲンが出現すると報告しており、骨欠損の修復機転に軟骨細胞の関与が明らかになったからである。また、成長軟骨細胞はその特異的な細胞形態から細胞の分化の度合いが比較的判断しやすいことも理由の一つである。*in vitro* での石灰化という現象は、細胞外基質の組成など生体とかけ離れた要因が多く、果して *in vivo* でその結果が反映されるのか疑問があることから、本研究においては、あくまで培養細胞に対する形態や分化への影響についてのみ検討を加えた。

また、*in vivo* における人工骨顆粒の評価法として一般的に行われている雑種成犬の抜歯窩に対する人工骨顆粒の充填実験を行った。この実験では、4 週例の組織像から、TBC-コラーゲン複合体の方が TBC 単体に比べ、充填部の中央付近でオステオイドが多く観察され、骨形成は盛んだが石灰化は遅れていることが明らかになった。この結果は、使用したコラーゲンの吸収と骨組織への置換が顆粒充填部の中央部分では遅れることを示している。また、12 週例の組織像から、TBC-コラーゲン複合体は皮質骨の治癒を促進するという結果が得られた。この結果は、次の点を考慮して評価する必要がある。すなわち、本実験の際、TBC-コラーゲン複合体を充填後、さらに顆粒の上に 1% コラーゲンを滴下したことである。今回の結果は、この顆粒の上に滴下したコラーゲンが、皮質骨の治癒を促進して得られたものである可能性がある。したがって、TBC 単体を充填後、顆粒の上から 1% コラーゲンを滴下しても同様な結果が得られたかもしれない。この点に関しては、さらに今後の検討が必要と思われる。

結 論

歯科補綴領域での人工骨を用いた歯槽骨補填について検討した。まず、人工骨周囲の骨形成に重要な役割を果たすとされる基質小胞の生化学的同定を試みた。さらに、HA 結晶が持つ非酵素的フォスファターゼ活性について検索し、この活性がきわめて高い TBC の骨補填材

への応用を考え、TBCの諸性質を市販の合成ハイドロキシアパタイトと比較するとともに、人工骨顆粒の固定と成形性を増すためコラーゲン溶液を併用し複合体を形成する方法について検討した。その結果以下のような知見を得た。

1. 成長軟骨細胞より分離された基質小胞の中にはLDHが存在し、しかも軟骨細胞のシトソール由来の全てのLDH isoenzymesが存在することが明らかになった。このことより、新しい基質小胞の指標酵素としてLDHを用いることにより基質小胞の定量化が可能となり石灰化機構研究の新展開が可能となった。

2. TBCを構成する天然ハイドロキシアパタイト結晶は、合成ハイドロキシアパタイト結晶に比べ非常に高い非酵素的フォスファターゼ活性を持つことが明らかとなった。このことから、生体内に存在するATPやADPに対しTBC顆粒自体が持つフォスファターゼ活性が働いて無機リン酸濃度の上昇をひき起こすことにより、顆粒周囲の骨形成に有利な環境を与え得ることが示唆された。しかし、X線回折による分析では天然ハイドロキシアパタイトと合成ハイドロキシアパタイトの結晶構造の差を明らかにすることはできなかった。

3. TBC-コラーゲン複合体は初代培養軟骨細胞に対し増殖や分化に有利に働いていることが示唆された。

4. 雑種成犬の抜歯窩に対する充填実験の結果、4週例では、TBC-コラーゲン複合体はTBC単体に比べ、抜歯窩中央部では骨形成が遅れる傾向がみられた。しかし、逆に12週例では、皮質骨部の骨形成に関してTBC-コラーゲン複合体はTBC単体に比べ骨形成が良好な所見が観察された。

5. 本研究に用いたTBC-コラーゲン複合体は適度な

成形性を持ち、臨床的にみて操作性に優れており、優れた人工骨充填材料となり得ることが示唆された。

稿を終るに臨み、本研究に際し終始御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師九州歯科大学歯科補綴学第二講座内田康也教授、ならびに生化学講座野口知雄教授に心より感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、多大な御援助を賜りました産業医科大学分子生物学教室三田隆教授ならびにアニマルケア古賀和弘技師に深く御礼申し上げるとともに実験材料の御提供を頂き有益なる御助言を賜りました日本医用高分子研究所秋山太一郎博士、宮田暉夫博士に甚大なる感謝の意を表します。また、本研究に多くの御助言、御協力を頂いた九州歯科大学第二口腔解剖学教室嶋村昭辰教授、ならびに同教室の諸先生方に衷心より御礼申し上げるとともに、種々の御援助を頂いた生化学講座、補綴学第二講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、昭和63年4月28日 The 3rd International Congress of Implantology and Biomaterials in Stomatology (大阪)、昭和63年5月27日第79回日本補綴歯科学会学術大会(東京)、昭和63年8月14日4th International Congress of Cell Biology (モントリオール、カナダ)、昭和63年10月3日第61回日本生化学会大会(東京)、昭和63年10月9日第30回歯科基礎医学会総会(福岡)および平成元年7月21日第19回日本口腔インプラント学会総会(福岡)にて発表した。

なお本研究の一部は平成元年度文部省科学研究費(奨励A特第01790542号)によった。

引用文献

- 1) Beirne, O.R., Curtis, T.A. and Greenspan, J.S.: Mandibular augmentation with hydroxyapatite. *J. Prosthet. Dent.* 55: 362—367, 1986.
- 2) 青木秀希・丹羽滋郎: バイオセラミックスの開発と臨床. クインテッセンス出版, 東京, 1987, 53—64.
- 3) Wuthier, R.E.: Mechanism of matrix vesicles mediated mineralization of cartilage. *ISI atlas of science; Biochemistry/1988* 231—241, 1988.
- 4) Reeves, W.J. and Fimognari, G.M.: Lactate dehydrogenase. *Methods Enzymol.* 9: 288—1966.
- 5) Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M.: Phosphatase, alkaline. In: *Methods of Enzymatic Analysis Vol. 1* (ed. by Bergmeyer, H.U.) 1974, 496—497.
- 6) de Bernard, B., Gherardini, M., and Lunazzi, G.C.: Role of the Ca^{2+} -binding alkaline phosphatase in the mechanism of cartilage calcification. In: *Cell mediated calcification and*

matrix vesicles (ed. by Ali, S.Y.). Excerpta Medica, Amsterdam, 1986, 95—100.

- 7) **Noguchi, T., Takada, Y. and Oota, Y.** : Intraperoxisomal and intramitochondrial localization, and Assay of pyruvate (glyoxylate) aminotransferase from rat liver. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360** : 919—927, 1979.
- 8) **Fritz, P.J., Morrison, W.J., White, E.L. and Vesell, E.S.** : Comparative study of methods for quantitation of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Anal. Biochem.* **36** : 443—453, 1970.
- 9) **Nitisewojo, P. and Hultin, O.** : A comparison of some kinetic properties of soluble and bound lactate dehydrogenase isoenzymes at different temperatures. *Eur. J. Biochem.* **67** : 87—94, 1976.
- 10) **de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmmans, F.** : Tissue fractionation studies; 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **60** : 604—617, 1955.
- 11) **Baginski, E.S., Foa, P.P. and Zak, B.** : Glucose-6 - phosphatase. In: *Methods of Enzymatic Analysis Vol. 2* (ed. by Bergmeyer, H.U.) 1974, 876—880.
- 12) **Hale, J.E. and Wuthier, R.E.** : The mechanism of matrix vesicle formation. Studies on the composition of chondrocyte microvilli and on the effects of microfilament-perturbing agents on cellular vesiculation. *J. Biol. Chem.* **262** : 1915—1925, 1987.
- 13) 嶋村昭辰・藤 英俊・内田康也 : 硬組織薄切装置による歯とその周囲組織の非脱灰切片調整法. 歯基礎誌 **13** : 62—69, 1971.
- 14) **Krane, S.M. and Glimcher, M.J.** : Transphosphorylation from nucleoside di- and triphosphates by apatite crystals. *J. Biol. Chem.* **237** : 2991—2998, 1962.
- 15) **Taves, D.R. and Reedy, R.C.** : A structural basis for the transphosphorylation of nucleotides with hydroxyapatite. *Calcif. Tiss. Res.* **3** : 284—292, 1969.
- 16) **Matsumoto, H., Golub, E.E., and Shapiro, I.M.** : Is superoxide required for matrix vesicle formation? In: *Cell mediated calcification and matrix vesicles.* (ed. by Ali, S.Y.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam and New York, 1986, 241—245.
- 17) 植野 裕・川上 守・嶋 良宗・桜井啓一・秋山太一郎 : True Bone Ceramics の紹介. *Orthopaedic Ceramic Implants* **5** : 155—160, 1985.
- 18) **Shoshan, S. and Finkelstein, S.** : Acceleraton of wound healing induced collagen solutions. *J. Surg. Res.* **10** : 485—491, 1970.
- 19) **Manai, C., Leake, D., Pizzoferrato, A., Ciapett, G. and Sangiorgi, C.** : Histologic evaluation of purified bovine tendon collagen sponge in tooth extraction sites in dogs. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **61** : 315—323, 1986.
- 20) **Hayashi, K., Takeshi, Y., Tabuchi, K. and Fujii, T.** : Repair of experimental bone defect with a collagen block containing synthesized apatite. *Arch. Ortheop. Traumat. Surg.* **99** : 265—269, 1982.
- 21) **Shen, K. and Gongloff, R.K.** : Collagen tube containers: An effective means of cotrolling particulate hydroxyapatite implants. *J. Prosthet. Dent.* **56** : 65—69, 1986.
- 22) 小川優司 : Hydroxyapatite-Collagen 複合体移植の歯周組織に与える影響についての実験的研究. 神奈川歯学 **22** : 669—686, 1988.
- 23) **Kleinman, H.K., Klebe, R.J. and Martin, G.R.** : Role of collagen matrices in the mechanism and growth of cells. *J. Cell. Biol.* **88** : 473—481, 1981.
- 24) **Madri, J.A. and Williams, S.K.** : Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.* **97** : 153—159, 1983.

- 25) **Grant, W.T., Wang, G. and Balian, G.** : Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. *J. Biol. Chem.* **262** : 9844—9849, 1987.