

ラット頭蓋骨に設置したチタンキャップ内面の
ハイドロキシアパタイト処理が垂直的骨増大に
及ぼす効果

奥羽大学大学院歯学研究科歯内・歯周療法学専攻

吉野 浩正

(指導教員：高橋 慶壮 教授)

Effects of Hydroxyapatite-Coating into Titanium Cap
on Bone Augmentation in Rat Calvaria

Department of Endodontics and Periodontics,
Ozu University, Graduate School of Dentistry

Hiromasa Yoshino

(Director: Prof. Keiso Takahashi)

Abstract

The purpose of this study was to build up a novel model of vertical bone augmentation within a titanium cap in rat calvaria and to evaluate how the status of the inner surface of the cap effects on bone augmentation. Thirty-two 10-week old male Sprague-Dawley rats were used. In the animals, the calvarium was exposed, and 2 trephine grooves (6mm) without marrow penetration were created in each parietal bone bilaterally. Three types of titanium caps those inner surfaces were differently prepared, i.e. machine polished, sandblast-treated and HA-coated, were used. Two titanium caps from the 3 different caps were randomly chosen and set in the grooves with their openends facing the bones of every rat. At 4 or 8 weeks after surgery, the animals were sacrificed to obtain sections for histology, histomorphometry and immunohistochemistry. The amounts of the both newly generated tissues and bone within the caps were quantitated using image analyzer. New bone formation in close contact with the surface of calvarial bone was observed in extracalvarial experimental space and the newly generated tissue consisted of mineralized bone and marrow spaces. High magnification showed osteoblasts and osteocytes, while few osteoclasts in newly generated bone. Osteocalcin positive cells were observed around the newly generated bone while osteopontin positive cells were done around and into the bone, respectively. The amount of mineralized bone

in the generated tissue was the highest in the HA-coated surfaces compared with the other 2 groups ($p<0.05$). Neither the volume of augmented tissue nor the volume of mineralized bone significantly differed between the sandblast-treated and the machine polished groups. In this rat GBR model using 3 different titanium caps, vertical bone augmentation was observed in the all groups and HA-coated surface significantly enhance bone augmentation into the cap.

Key words: HA-coated titanium cap, vertical bone augmentation, rat calvaria, osteoblasts

和文抄録

本研究の目的は、ラット頭蓋骨上にチタンキャップを設置した垂直的骨増大術モデルを確立し、チタンキャップに内面処理を施した際の骨増大効果を比較・検討することである。32匹の10週齢の雄Sprague-Dawleyラットを実験に供した。頭蓋骨を露出し、6mm径の溝を頭蓋骨の左右側に1つずつトレフィンバーで形成した。皮質骨穿孔は行なわなかった。キャップ内面にそれぞれ機械研磨、サンドブラスト処理あるいはハイドロキシアパタイト処理を施した3種類のチタンキャップを試作し、それら3種の中から2種類のチタンキャップを選んでキャップの開いた面を頭蓋骨に接するように溝に設置した。設置後4あるいは8週間後に動物を屠殺し、組織学的、組織計測学的および免疫組織化学的検討を行なった。イメージ解析ソフトを用いてキャップ内に新生された組織と新生骨量を定量した。頭蓋骨上に接する新生骨および石灰化骨と骨髄から成る新生組織が観察された。高倍率の観察から、骨芽細胞および骨細胞を認めたが、破骨細胞はほとんど認められなかった。オステオカルシン陽性細胞は新生骨周辺に観察され、オステオポンチン陽性細胞は新生骨周辺および新生骨内にそれぞれ観察された。新生組織中の石灰化骨量は他の2群に比較してHA処理群で最も高かった($p < 0.05$)。サンドブラスト処理群と機械研磨群間には新生組織量と石灰化骨量とに有意差は無かった。本研究で確立したGBRモデルにおいて、垂直的な骨増大はいずれの実験群でも観察され、HA処理が最も骨新生を促進した。

諸 言

組織再生誘導法 (guided tissue regeneration) の概念を利用した骨再生誘導法 (guided bone regeneration 以下 GBR) の有効性が Dahlin ら¹⁾によって報告され, 遮蔽膜を用いた骨増大術が臨床応用されている。Kostopoulos ら²⁾はラットの下顎骨後部にテフロンカプセルを設置した実験モデルを用いて, 骨膜の有無に関わらず皮質骨穿孔を行っていない無傷の顎骨上に骨隆起が形成されたと報告した。臨床でも顎骨上に新生骨を誘導して口腔インプラント治療を行うことが可能になってきているが, 水平的骨増大に比較して垂直的骨増大術の予知性は低く, 歯周病によって歯と歯槽骨を喪失した患者に対しては垂直的な骨増大術を効率よく実践することが望まれる。

垂直的 GBR の動物実験にはこれまで主にウサギが使用され, 頭蓋骨にさまざまな形態や性状の装置を設置した研究が報告されている^{3~6)}。Schmid ら³⁾は, ウサギ頭頂骨上に設置したデバイスとの密閉空間に骨新生が起こることから, GBR による骨誘導には遮蔽膜の透過性は必須ではないと報告した。Yamada ら⁶⁾は穴の無い密閉型のチタンキャップが骨新生に有利であると報告した。上述した研究ではいずれもキャップあるいはシリンダー内面を機械研磨したものが使用されており, チタンキャップの内表面性状が骨増大に及ぼす効果は検討されていない。

Lundgren ら⁷⁾は機械研磨されたチタン製シリンダー内面をサンドブラスト処理することによってシリンダー内の新生骨量は有意には増加しなかつ

たものの、石灰化骨がシリンドー内面に直接接触している面積が増加したことを報告した。この研究結果はチタン製シリンドーの内表面を物理的あるいは化学的に処理することによって、シリンドー内表面への骨形成関連細胞群の遊走、増殖および分化に影響を与え、新生骨の石灰化が促進されたことを示唆している。また、チタンメッシュ表面を **hydroxyapatite**（以下 HA）処理することによっても骨新生を促進できることが報告されている^{8, 9)}。チタン製材料内表面の改質によって GBR の効率が高まれば、人工生体材料、シグナルあるいは幹細胞を応用した方法に比較して安全でかつ安価に骨増大が可能になるため、臨床的な意義は大きい。

骨新生時には多数のタンパク質が関与して細胞間の情報伝達が行なわれる。とりわけ、骨基質に含まれる非コラーゲン性のカルシウム結合性タンパク質であるオステオカルシン (**osteocalcin** 以下 OCN) は骨芽細胞で合成されハイドロキシアパタイト結合能を有しており、骨芽細胞による骨形成マーカーと考えられている¹⁰⁾。一方、オステオポンチン (**osteopontin** 以下 OPN) は骨芽細胞および骨細胞から産生され、骨新生に重要な役割を果たすと考えられている¹¹⁾。GBR モデルにおける骨新生については従来の組織学的検討に加えて、新生組織内の細胞群による骨関連タンパク質 (OCN および OPN) の産生様態の観点から検討することにより垂直的 GBR の実験モデルにおける骨新生機序の分子基盤を構築するための情報を得ることが期待される。

本研究では、ラット頭蓋骨上の垂直的骨増大術の実験モデルを構築し、3種類の内面処理、①機械研

磨,②サンドブラスト処理,③HA処理を施したチタン製キャップを試作し,それぞれのチタンキャップ内で起こる骨新生について組織学的,組織計測学的および免疫組織化学的に比較・検討した。

材料および方法

1. チタン合金キャップ

日本メディカルマテリアル株式会社(以下JMM,大阪)と共同で開発したチタン合金キャップ(以下チタンキャップ)を実験に使用した。予備実験からラット頭蓋骨の矢状縫合線左右側の頭頂骨に設置可能なチタンキャップの直径を6mmに決定した(図1a)。本研究で使用したチタンキャップにはサンドブラスト処理およびHA処理に耐え得る金属の厚みが必要であったため,チタン合金ブロック

(Ti-6Al-4V;アルミ6%,バナジウム4%を含むJMMの歯科インプラントと同じ材料)から0.5mmの肉厚で重さ220mgのチタンキャップを作製して実験に供した(図1b)。

機械研磨されたチタンキャップ内面にアルミナビーズ#180を吹き付けてサンドブラスト処理¹²⁾を行った(図1c)。これはJMMのフィクスチャーFINATITE®のHA処理前と同じ表面性状である。さらに,サンドブラスト処理を施したチタンキャップにフレイム溶射法によりHAコーティングを行った¹³⁾(図1d)。これはJMMのフィクスチャーFINATITE®と同じ表面性状である。上述した3種類(機械研磨,サンドブラスト処理,HA処理)のチタンキャップを超音波洗浄し,オートクレーブ滅菌を施して実験に供した。

2. 実験動物

Sprague Dawley系雄性ラット(10週齢 300～350g 日本クレア社,東京) 32匹を実験に用いた。実験開始に先立ち1～2週間予備飼育し,ラットが健康であることを確認した。飼育期間中には固形飼料(オリエンタル酵母工業,東京) および水を与え,奥羽大学動物実験研究施設(室温 24℃,湿度 65%)で飼育した。なお,本研究は奥羽大学動物実験委員会の承認(承認番号 No. 42)を得て奥羽大学動物実験規定を遵守して行った。

3. 実験方法

Itoらの報告⁵⁾に準じて行なった。すなわち,ラット腹腔にペントバルビタールナトリウム(Somnopentyl[®] 共立製薬,東京)をラット体重1kgあたり 50mg投与し全身麻酔を行なった。さらにエピネフリン1/80,000添加2%塩酸リドカイン(歯科用キシロカイン[®]カートリッジ,昭和薬品化工業株式会社,東京)を用いて局所麻酔を行った。次いで#15c 替刃式外科用メスを用いて両耳を結ぶように皮膚を横切開し,骨膜を剥離した(図2a)。中央の縫合線を挟んで左右の頭頂骨部に滅菌生理食塩水(大塚製薬,東京)の注水下で直径5mmのトレフィンバー(GC社,東京)を用いて頭蓋骨に輪状の溝を形成した後(図2b)フィッシャーバー(#700)を用いてチタンキャップが安定するように溝の幅を0.5mmまで拡大し,直径6mmの円形の輪状の溝を形成し,形成した溝に3種のチタンキャップのいずれか1つを設置した(図2c)。チタンキャップが動か

ないように先ず手術用縫合糸(D8106 エチコン J&J, USA)を用いて骨膜縫合し(図2d),その後手術用縫合糸(789G エチコン J&J)を用いて皮膚縫合した(図2e)。また,術後の感染予防としてペニシリンG(60,000IE/0.02ml, 明治製菓, 東京)1mlを皮下注射した。

4. 組織学的研究

術後4週間および8週間飼育後に,ジエチルエーテル吸引により苦痛なく死亡させた後,直ちに頭蓋骨と周囲組織を一塊として摘出し,4℃の10%中性緩衝ホルマリン液で24時間固定後に10% EDTA (ethylenediamine tetra acetic acid)溶液に浸漬して脱灰し(4℃,4週間),チタンキャップを除去後に通法に従ってパラフィン包埋した。頭蓋骨上に形成された左右の新生組織を同一切片上で観察できるように厚さ5 μ mの前頭断切片を作成して,ヘマトキシリンエオジン染色(以下H・E染色)を行い形態学的な観察を行った。

5. TRAP 染色

破骨細胞の存在を確認するために酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色(以下TRAP染色)を行った。すなわち,脱パラフィン後の切片を10mMリン酸緩衝生理食塩水(以下PBS, pH7.4)で洗浄し,ナフトールAS-MX phosphate(Sigma, USA)を基質として0.2M酢酸緩衝液で50mM酒石酸に浸漬してTRAP染色を行った¹⁴⁾。PBS洗浄後にマイヤーのヘマトキシリン液に3分間浸漬し,乾燥,キシレン透徹・封入後にTRAP陽性細胞を観察した。

6. 免疫組織化学

免疫染色は Moriya らの報告¹⁶⁾に従って行なった。キシレンによる脱パラフィンを行った後、切片を3%過酸化水素水に室温で20分浸漬して内因性ペルオキシダーゼを除去した。一次抗体として、PBSで1,000倍希釈したマウス抗ラットOCN抗体(タカラバイオ,大津)またはPBSで100倍希釈したマウス抗ラットOPN抗体(ARP,USA)を使用し、いずれも切片と30分間室温で反応させた。PBS洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識アミノ酸ポリマーを結合した抗マウス抗体(ニチレイバイオサイエンス,東京)と室温で30分間反応させた。PBS洗浄後、ペルオキシダーゼの発色はDABキット(ニチレイバイオサイエンス,東京)により行い、ヘマトキシリンで核染色して光学顕微鏡を用いて組織学的観察を行なった。陰性対照として一次抗体に換えてPBSで反応を行った切片を用いたが、それら対照切片の全てにおいて陽性反応は認められなかった。

7. 組織計測学的研究

チタンキャップ内部の新生組織および新生骨面積の定量は、H・E染色を行った組織切片の画像について、画像解析ソフト(WinRoof, 三谷商事,福井)¹⁵⁾を用いて計測範囲ROI(Region of Interest)を確定し、新生組織面積に対する新生骨面積の割合(%)を算出した。

8. 統計処理

有意差検定はMann-Whitney U-testによって行なった。

$p < 0.05$ のとき有意差ありと判定した。

結 果

1. 組織学的観察

4 週後：チタンキャップの内面性状に関わらず新生骨組織がチタンキャップ内で増生していた。頭蓋骨外表面と平行に層板状に新生骨が形成されている（図 3 a）のが観察された。また，石灰化骨がチタンキャップ内面に沿うように上方に向かって形成されていた（図 3 a）。新生組織頂上部の新生骨梁は疎に分布し，線維性結合組織が骨梁間に介在していた（図 3 a）。新生骨梁の表面には，類円状の形態をした骨芽細胞が整然と配列していた（矢印 図 3 b）。

8 週後：4 週後に比較して，チタンキャップの内面性状に関わらずより多くの新生骨が形成されており，チタンキャップ内を新生組織が完全に満たしていることがあった（図 3 c，図 4 a-f）。頭蓋骨上に平行して形成された層板状の新生骨は頭蓋骨に類似しており骨細胞を認めた。術後 8 週間では骨芽細胞は紡錘形を呈していた（図 3 d）。新生骨組織内には造血性細胞を含む骨髓組織が観察された（図 3 c，図 4 a-f）。

HA 処理チタンキャップ使用例では石灰化骨が HA 処理チタンキャップ内面に沿うように上方に形成され，完全な半円状になっていることがあった（図 4 c）。

2. TRAP 染色

チタンキャップの内表面性状に関わらず TRAP 陽性細胞は既存の頭蓋骨中に散在していたが，新生骨

にはほとんど見られなかった（図 5 a, b）。

3. 免疫組織化学的所見

チタンキャップの内面性状に関わらず新生骨表面における骨芽細胞において、ほとんど全ての細胞が OCN 陽性を示していた（図 6 a, b）。

新生骨表面の骨芽細胞と新生骨梁内の骨細胞のいずれにも OPN 陽性細胞の局在を認めた（図 6 c, d）

4. 組織計測学的結果

新生骨の定量は 8 週間後の試料で行った。HA 処理群は新生骨面積が最も高かった ($p < 0.05$)。サンドブラスト処理群と機械研磨群との間には有意差は無かった（図 7）。

HA 処理群は機械研磨群に比較して新生骨面積 / 新生組織面積（%）が統計学的に有意に高かった ($p < 0.05$)（図 8）。

考 察

本研究から以下の結果を得た。1) HA 処理群で新生骨量が最大であった, 2) 骨芽細胞は術後 4 週間ではまだ類円形を呈しており高い活動性が推測されたが, 術後 8 週間では紡錘形を呈し成熟しているとみなされた, 3) OCN は新生骨組織周辺の骨芽細胞に, OPN は新生骨組織中の骨細胞および骨芽細胞に高頻度に発現していた, 4) 破骨細胞はほとんど観察されなかった。

これまで報告されたウサギ頭蓋骨を用いた垂直 GBR モデルの研究では, 表面の滑沢なチタンキャップが使用されてきた^{3, 4, 6)}。本研究では, ラット頭

蓋骨に設置可能でなおかつ HA 処理が可能なチタンキャップを試作して実験を行った。具体的には、チタン合金ブロックから内面が直径 5mm の半球形ドーム状で、3,000°C の熱処理に耐えられるように最薄部の厚みが 0.5mm のチタンキャップ（図 1 a）を試作した。本研究で使⽤したチタンキャップ内面の HA コーティングには溶射温度が 3,000°C と比較的低いフレイム溶射法を⽤した。HA コーティング法にはフレイム溶射法の他にもプラズマ溶射法、熱分解法およびスパッタリング法があり、インプラント体の表面構造、コーティング層の厚み、多孔率および膜密着性が異なるため¹⁷⁾、HA コーティング法の違いによっても骨新生効果が異なるかもしれない。

機械研磨したチタンキャップを設置した場合にも骨新生が確認された（図 3，4）。この結果は、サルなどの大型動物に比較してラットでは骨新生が生じ易い可能性を示唆した Aspenberg らの結果¹⁸⁾を支持していた。動物種の違いによって骨増大の程度が異なるのかもしれない。

実験の 4 週後には骨芽細胞の形態が類円形であったこと（図 3 b）から 4 週後ではまだキャップ内で骨形成が活発に行なわれていると判断し、8 週後の新生骨量を定量した。HA 処理群では機械研磨群に比較して新生骨面積が有意に増加していたが（図 8）、サンドブラスト処理群では有意差は見られなかった。この結果はチタン表面をサンドブラスト処理しても骨新生の増大効果が見られなかったとする報告⁷⁾と矛盾しない。HA 処理群の骨新生が有意に促進されたのは、サンドブラスト処理によってチタン内面の表面積が増加したことにより細胞接触

面積が増えたことに加えて HA 処理による骨新生の促進作用が働いた結果と考えられる。今回の実験で使ったいずれのチタンキャップにおいても骨新生が頭蓋骨表面に平行して形成される場合とチタンキャップ内面に沿って上方へと形成される場合があり（図 4），新生骨組織の内部には脂肪細胞や造血細胞を含んだ骨髓組織が観察された。骨の石灰化程度については今回検討していないが，新生骨組織内部の石灰化度は概して十分ではないと思われた。この傾向はマイクロ CT を用いた観察結果^{19, 20)}と一致していた。

本研究の骨増大モデルでは規格化されたチタンキャップ（図 1）を使用し，ラット頭蓋骨とチタンキャップとで囲まれた閉鎖空間に新生された組織を評価対象にした。本実験系では骨膜由来細胞の遊走を期待できないため，母床骨由来の細胞群，すなわち骨細胞および骨髓由来の未分化間葉系細胞が骨新生に関わったと考えられる。Yamada ら⁶⁾はウサギ頭蓋骨にチタンキャップを設置して完全密閉されたキャップと穴を開けたもののとの比較から，3 ヶ月後の新生組織量は「穴なし」は「穴あり」より骨再生量が有意に高いことを報告した。穴あき群では，軟組織由来の線維性結合組織がキャップ内に入り込んで増殖することで新生組織の形成を阻害することが示された。この結果は，骨膜の効果がキャップ内部の骨増大にさほど大きく影響しない可能性を示唆しているが，穴の大きさを小さくすれば，骨膜由来因子の効果が加わって骨新生をより促進できる可能性も考えられ，小さな穴を開けるマイクロピラス法などの技術的な工夫が期待される。

Miyamoto ら²¹⁾は骨膜由来細胞を移植することで骨増大効果があったと報告しており、骨細胞と骨膜由来細胞の相互作用によって骨新生を促進出来る可能性も考えられる。

これまでの骨増大の動物実験モデルには主にウサギが使用されてきたが、本研究ではラットを使用した。経済面や飼育面の優位性に加えて、細胞生物学的および分子生物学的アプローチが容易になり、骨新生機序の分子基盤を構築することが期待される。市販された抗体は主にヒト、マウスおよびラットに対して作製されているため、実験動物をウサギからラットに変えたことにより免疫組織化学的研究が詳細に行なえると共に、*in situ hybridization* 法を用いて骨新生部位における骨芽細胞および骨細胞の遺伝子発現様態についても研究を進展させることが可能になる。

新生骨表面の骨芽細胞はほとんど全てが OCN 陽性であった（図 6 a, b）。一方、新生骨の骨芽細胞および骨細胞は OPN 陽性であった（図 6 c, d）。本結果はこれら骨関連タンパク質が GBR モデルで新生された骨形成機序に重要な役割を演じていることを示唆する。OPN は硬組織以外にも腎臓、皮膚、マクロファージなどにも分布しており、カルシウムとの高い結合能を示すがリン酸カルシウムの結晶成長を阻害する役割も果たしているとされる²²⁾。また、OPN は分子内にインテグリン結合部位を有しており、これを介した細胞・基質間接着を通じて細胞分化誘導に関与することが知られている。また OPN は、骨芽細胞のインテグリンと結合し、骨芽細胞の初期分化を促進する²³⁾。本研究において、骨芽細胞の骨形成マーカーである OCN が新生骨周辺の骨芽細胞のほとんどで認められたこ

とと、新生骨における骨芽細胞の分化および誘導因子である OPN が認められたことから、新生骨の形成が OCN と OPN によって促進されていることが示唆された。

これまでの研究からは GBR における皮質骨穿孔の必要性について支持する研究^{24~27)}とそうでない研究^{7, 28, 29)}とが報告されており、統一見解は得られていない。皮質骨穿孔が必須の治療ステップではないとする考えもある³⁰⁾。予備実験の段階でラット頭蓋骨に皮質骨穿孔を行わなくとも骨新生を観察出来たため、本研究ではチタンキャップ内面の処理効果を評価する上で生じ得る人為的な作業誤差を減らすことを考慮して皮質骨穿孔を行わなかった。臨床でも上顎臼歯部の垂直骨増大術を行う際には、顎骨の厚みが 1~2mm 程度の場合には皮質骨穿孔は出来ない。Rompen ら²⁷⁾はラット頭蓋骨に中空の平行六面体のチタンチェンバーを設置して骨増大の実験を行っており、皮質骨穿孔と血液を添加した場合に骨増大が促進されたと報告しているが、対照群においても骨新生が観察されており、下顎枝上で骨新生を観察した Kostopoulos らの報告²⁾と類似した結果であった。もっとも、本研究ではトレフィンバーで 6mm の輪状の溝を形成しており（図 2 b）、厳密には皮質骨に侵襲を加えていないとはいえず、トレフィンバーで形成した溝周辺の骨髓から未分化間葉系細胞が頭蓋骨とチタンキャップで密閉された空間に遊走して骨増大に関与した可能性は残る。

本研究では、ラット頭蓋骨上にチタンキャップを設置して垂直的 GBR モデルを構築し、チタンキャップ内を HA 処理することで垂直的骨増大が促進されることを明らかにした。遺伝子治療や幹細胞治療は

萌芽的で先進的ではあるが，コストと安全性に多くの問題を抱えている。一方，本研究では材料学的な工夫によって骨増大を効率的に促進することが可能であったことから，垂直的骨増大術に適するチタンメッシュあるいは遮蔽膜の開発へ繋がる。

結 論

ラット頭蓋骨上にチタンキャップを設置した垂直的 GBR モデルにおいて，チタンキャップ内表面を HA 処理することにより新生骨形成を促進した。

本論文の要旨は，第 30 回日本顎咬合学会学術大会（平成 24 年 6 月 10 日，東京）および第 55 回奥羽大学歯学会（平成 25 年 6 月 15 日，郡山市）において発表した。

文 献

- 1) Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A., Nyman, S.: Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 4 ; 19-25 1989.
- 2) Kostopoulos, L., Karring, T., Uraguchi, R.: Formation of jawbone tuberosities by guided tissue regeneration. An experimental study in the rat. *Clin. Oral Implants Res.* 5 ; 245-253 1994.
- 3) Schmid, J., Hämmerle, C.H., Olah, A.J., Lang, N.P.: Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin. Oral Implants Res.* 5 ; 125-130 1994.
- 4) Lundgren, D., Lundgren, A.K., Sennerby, L., Nyman, S.: Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit. *Clin. Oral Implants Res.* 6 ; 67-72 1995.
- 5) Ito, K., Nanba, K., Murai, S.: Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria. *J. Periodontol.* 69 ; 1229-1237 1998.
- 6) Yamada, Y., Nanba, K., Ito, K.: Effects of occlusiveness of a titanium cap on bone generation beyond the skeletal envelope in the rabbit calvarium. *Clin. Oral Implants Res.* 14 ; 455-463 2003.

- 7) Lundgren, A.K., Lundgren, D., Wennerberg, A.,
Hämmerle, C.H., Nyman, S.: Influence of surface
roughness of barrier walls on guided bone
augmentation: experimental study in rabbits. Clin.
Implant Dent. Relat. Res. 1 ; 41-48 1999.
- 8) Vehof, J.W., Spauwen, P.H., Jansen, J.A.: Bone
formation in calcium-phosphate-coated titanium
mesh. Biomaterials 21 ; 2003-2009 2000.
- 9) Vehof, J.W., van den Dolder, J., de Ruijter, J.E.,
Spauwen, P.H., Jansen, J.A.: Bone formation in
CaP-coated and noncoated titanium fiber mesh. J.
Biomed. Mater. Res. A. 64 ; 417-426 2003.
- 10) Neve, A., Corrado, A., Cantatore, FP.:
Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. J.
Cell. Physiol. 228 ; 1149-1153 2013.
- 11) Morinobu, M., Ishijima, M., Rittling, S.R., Tsuji,
K., Yamamoto, H., Nifuji, A., Denhardt, D.T., Noda,
M.: Osteopontin expression in osteoblasts and
osteocytes during bone formation under mechanical
stress in the calvarial suture in vivo. J. Bone Miner.
Res. 18 ; 1706-1715 2003.
- 12) Yamagami, A., Yoshihara, Y., Suwa, F.:
Mechanical and histologic examination of titanium
alloy material treated by sandblasting and anodic
oxidization. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 20 ;
48-53 2005.
- 13) Hayashi, K., Uenoyama, K., Matsuguchi, N.,
Sugioka, Y.: Quantitative analysis of in vivo
tissue responses to titanium-oxide- and
hydroxyapatite-coated titanium alloy. J. Biomed.

- Mater. Res. **25**; 515-523 1991.
- 14) 河原 元 硬組織標本作製法 検査と技術
29 ; 1169-1179 2001.
- 15) Ekuni, D., Tomofuji, T., Sanbe, T., Irie, K.,
Azuma, T., Maruyama, T., Tamaki, N., Murakami, J.,
Koikeguchi, S., Yamamoto, T.: Periodontitis-
induced lipid peroxidation in rat descending aorta
is involved in the initiation of atherosclerosis. J.
Periodontal Res. **44**; 434-442 2009.
- 16) Moriya, K., Maruo, Y., Minagi, S.: Does
rotational strain at screw tightening affect the
attainment or maintenance of osseointegration?
Clin. Oral Implants Res. **17** ; 451-458 2006.
- 17) 懸田明弘, 山下 忍, 原田順男, 金内洋光, 青木
秀希: 表面構造分析によるハイドロキシアパタイト
コーティングインプラントの実験的研究. 日
口腔インプラント誌 **20** ; 592-601 2007.
- 18) Aspenberg, P., Lohmander, L.S., Thorngren,
K.G.: Monkey bone matrix induces bone formation
in the athymic rat, but not in adult monkeys. J.
Orthop. Res. **9**; 20-25 1991.
- 19) Tamura, T., Fukase, Y., Goke, E., Yamada, Y.,
Sato, S., Nishiyama, M., Ito, K.: Three-dimensional
evaluation for augmented bone using guided bone
regeneration. J. Periodontal Res. **40**; 269-276 2005.
- 20) Min, S., Sato, S., Saito, M., Ebihara, H., Arai,
Y., Ito, K.: Micro-computerized tomography
analysis: dynamics of bone augmentation within a
titanium cap in rabbit calvarium. Oral Surg. Oral

- Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. **106**; 891-895
2008.
- 21) Miyamoto, I., Tsuboi, Y., Takahashi, K., Hyon, S.H., Iizuka, T.: Enhancement of bone volume in guided bone augmentation by cell transplants derived from periosteum: an experimental study in rabbit calvarium bone. Clin. Oral Implants Res. **15**; 308-314 2004.
- 22) Sodek, J., Ganss, B., McKee, M.D.: Osteopontin; Crit. Rev. Oral Biol. Med. **11**; 279-303 2000.
- 23) Liaw, L., Skinner, M.P., Raines, E.W., Ross, R., Cheresch, D.A., Schwartz, S.M., Giachelli, C.M.: The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. J. Clin. Invest. **95** ; 713-724 1995.
- 24) Nishimura, I., Shimizu, Y., Ooya, K.: Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. Clin. Oral Implants Res. **15** ; 293-300 2004.
- 25) Majzoub, Z., Berengo, M., Giardino, R., Aldini, N.N., Cordioli, G.: Role of intramarrow penetration in osseous repair: a pilot study in the rabbit calvaria. J. Periodontol. **70** ; 1501-1510 1999.
- 26) Min, S., Sato, S., Murai, M., Okuno, K., Fujisaki, Y., Yamada, Y., Ito, K.: Effects of marrow penetration on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. J. Periodontol. **78** ;

1978-1984 2007.

- 27) Rompen, E.H., Biewer, R., Vanheusden, A., Zahedi, S., Nusgens, B.: The influence of cortical perforations and of space filling with peripheral blood on the kinetics of guided bone generation. A comparative histometric study in the rat. Clin. Oral Implants Res. **10** ; 85-94 1999.
- 28) Slotte, C., Lundgren, D.: Impact of cortical perforations of contiguous donor bone in a guided bone augmentation procedure: an experimental study in the rabbit skull. Clin. Implant Dent. Relat. Res. **4** ; 1-10 2002.
- 29) Lundgren, A.K., Lundgren, D., Hämmerle, C.H., Nyman, S., Sennerby, L.: Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. Clin. Oral Implants Res. **11** ; 99-106 2000.
- 30) Greenstein, G., Greenstein, B., Cavallaro, J., Tarnow, D.: The role of bone decortication in enhancing the results of guided bone regeneration: a literature review. J. Periodontol. **80** ; 175-189 2009.

図表の解説

図 1 実験に使用したチタンキャップの形状

a 外形 ϕ 6mm, 内径 ϕ 5.0mm, 高さ 3mm で肉厚が厚さ 0.5mm, 内面の高さ 3mm の半球ドーム状である。 b 機械研磨したチタンキャップの内面性状 c サンドブラスト処理したチタンキャップの内面性状 d HA 処理したチタンキャップの内面性状

図 2 チタンキャップの設置方法

a 皮膚および骨膜の切開および剥離 b 溝の形成 c キャップ設置 d 骨膜縫合 e 皮膚縫合

図 3 H・E 染色の光学顕微鏡像

a 実験開始 4 週後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面像（機械研磨群）（低倍率像）。母床骨上に層板状の骨新生（矢印）を, またチタンキャップ内面に沿って骨新生（矢頭）が生じているが, 上方の組織新生は不十分である。 b 新生骨上に類円形を呈した骨芽細胞が骨表面に並んでいた（矢印, 高倍率像）。 c 実験開始 8 週後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面像（機械研磨群）（低倍率像）。チタンキャップに沿って骨新生（矢印）が生じているが, 上方には線維性結合組織（矢頭）が形成されている。 d 新生骨上に紡錘形を呈した骨芽細胞が骨表面に並んでいた（矢印, 高倍率像）。

図 4 H・E 染色の光学顕微鏡像

a 実験開始 8 週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面（機械研磨群）（低倍率像）。

頭蓋骨上およびチタンキャップに沿って上方に新生骨および新生組織が形成されている（矢印）。また，骨髓組織が豊富である（矢頭）。

b 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面（ブラスト群）（低倍率像）。機械研磨群と同様に頭蓋骨上およびキャップに沿って上方に新生骨および新生組織が形成されている（矢印）。また，骨髓組織が豊富である（矢頭）。

c 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面（HA処理群）（低倍率像）。頭蓋骨上およびキャップに沿って上方に新生骨および新生組織が形成されている（矢印）。新生組織量および骨量が共に多い傾向があった。

d aの高倍率像

e bの高倍率像

f cの高倍率像

NB；新生骨，BM；骨髓，CO；線維性結合組織

図5 TRAP染色の光学顕微鏡像

a 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織（HA処理群）（低倍率像）。TRAP陽性細胞はほとんど確認できなかった。

b 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織（機械研磨群）（中倍率像）。TRAP陽性細胞（矢印）は母床骨に散在したが，新生骨中にはほとんど確認できなかった。

NB；新生骨，BM；骨髓，B；頭蓋骨

図6 OCNおよびOPNの免疫組織化学的染色像

a,b：OCN陽性細胞（矢印，a；中倍率 b；高倍率像）

新生骨骨膜における骨芽細胞のほとんどが OCN 陽性を示した。 c, d: OPN 陽性細胞 (矢印, c; 中倍率像 d; 高倍率像) 新生骨骨膜における骨芽細胞および骨梁内の骨細胞が OPN 陽性を示した。

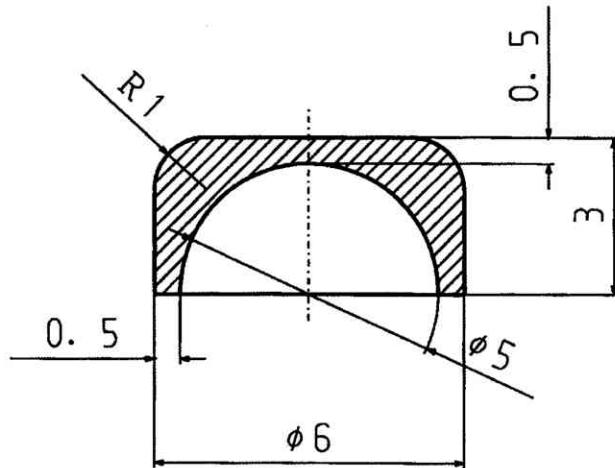
NB; 新生骨, BM; 骨髄, CO; 線維性結合組織

図 7 3 実験群間の新生骨量の比較 (ROI 値)

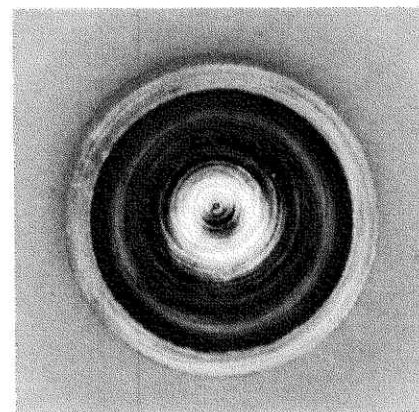
HA 処理群は機械研磨処理群に比較して有意に新生骨量が増大していた。 * : $p < 0.05$

図 8 3 実験群間の新生骨量/新生組織量 (%) の比較

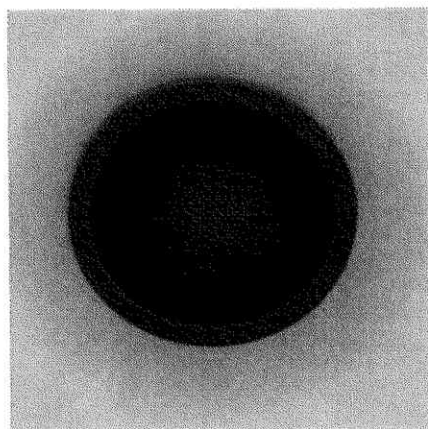
HA 処理群は機械研磨処理群に比較して有意に新生骨量/新生組織量 (%) が高かった。 * : $p < 0.05$



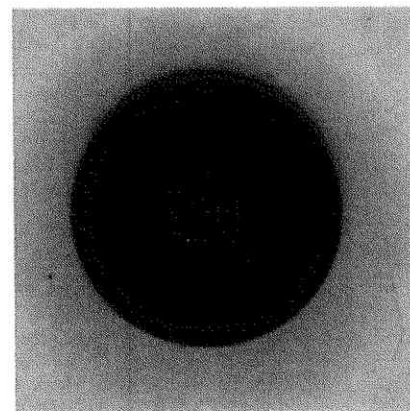
a



b



c

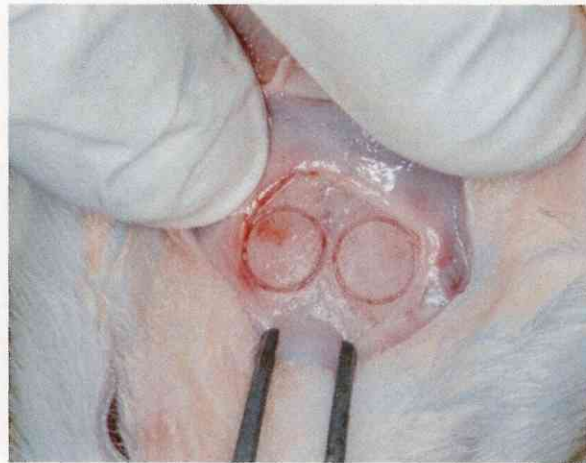


d

图 1



a



b



c

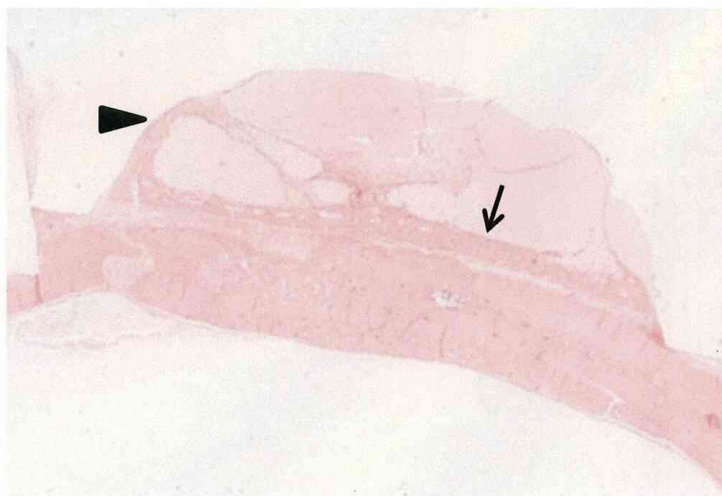


d

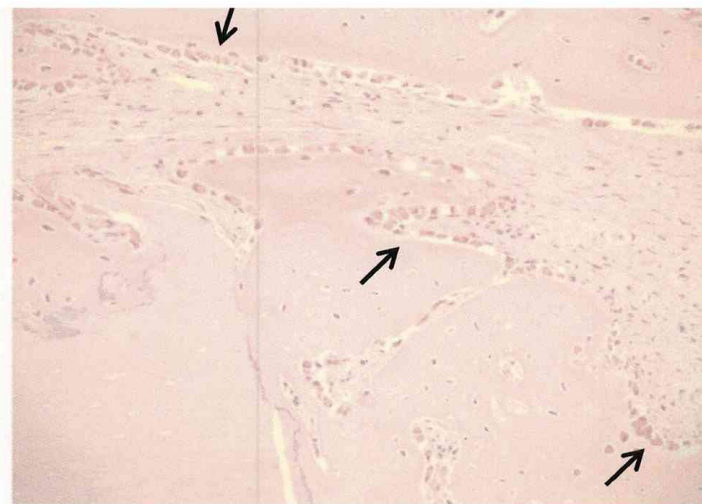


e

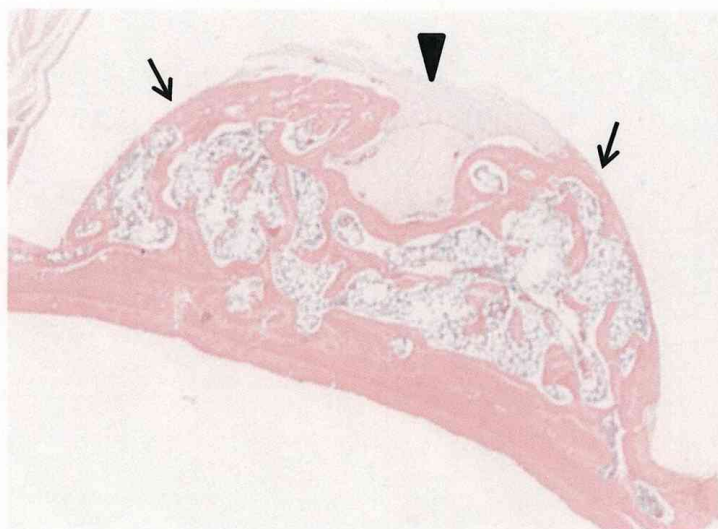
图2



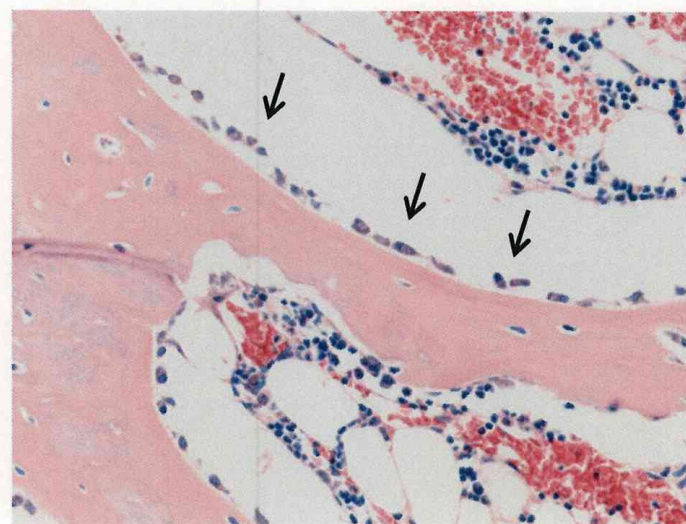
a



b

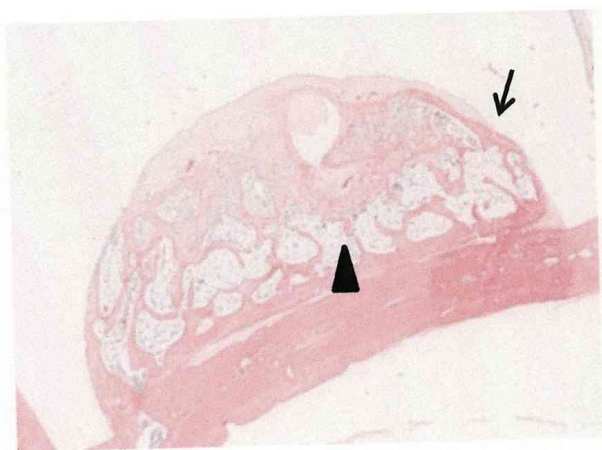


c

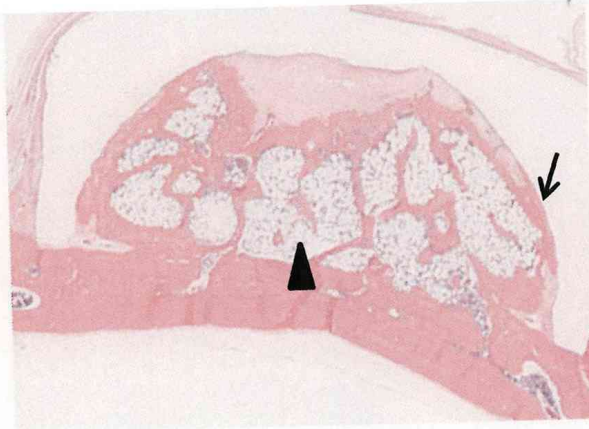


d

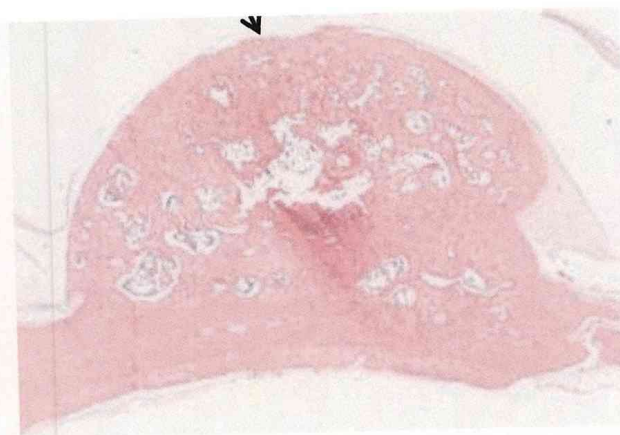
图 3



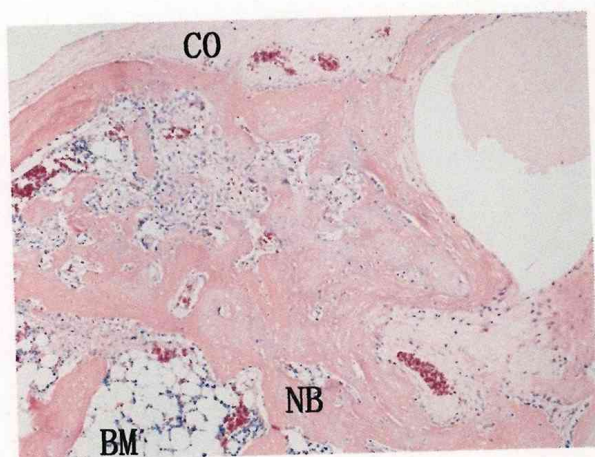
a



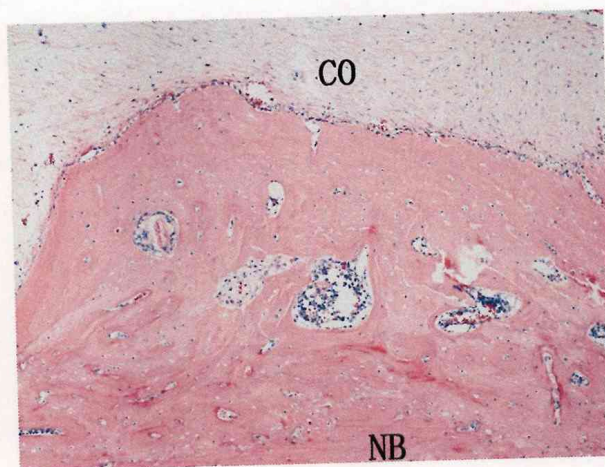
b



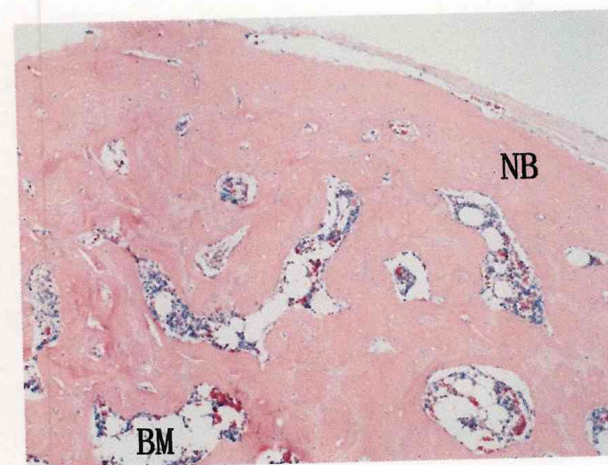
c



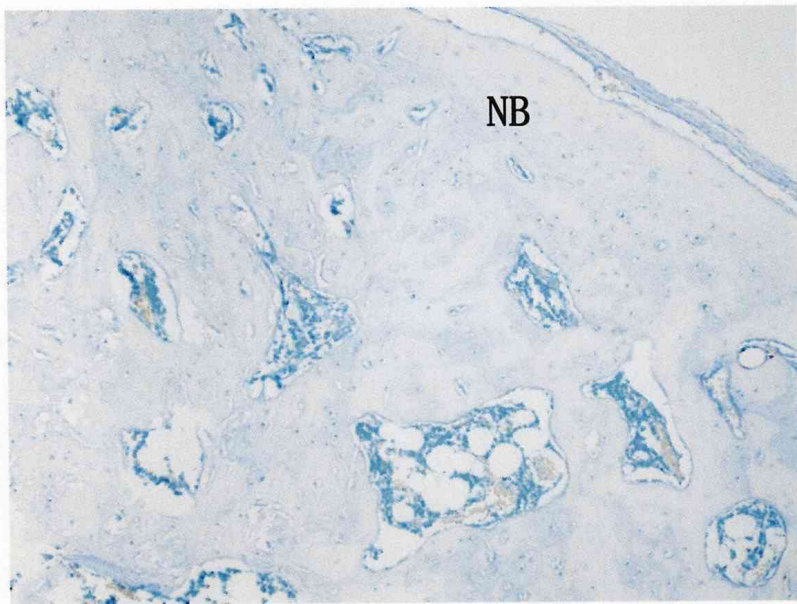
d



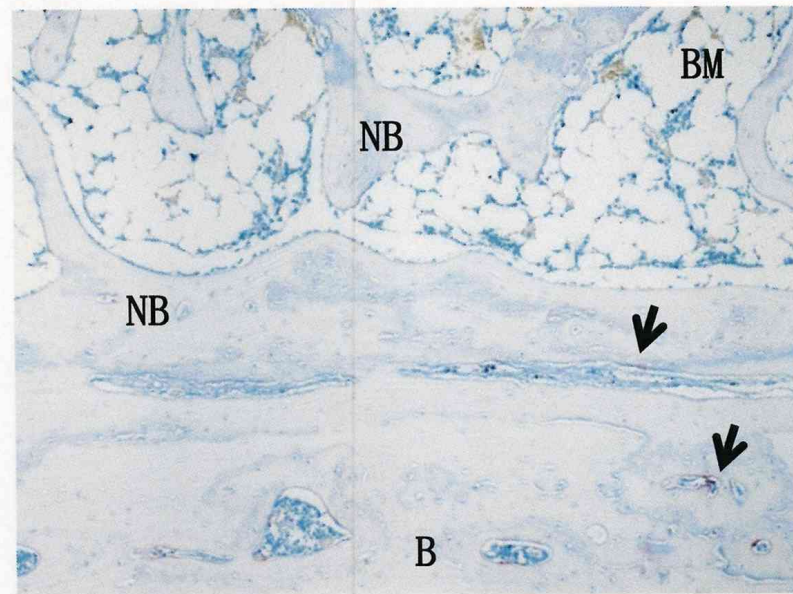
e



f

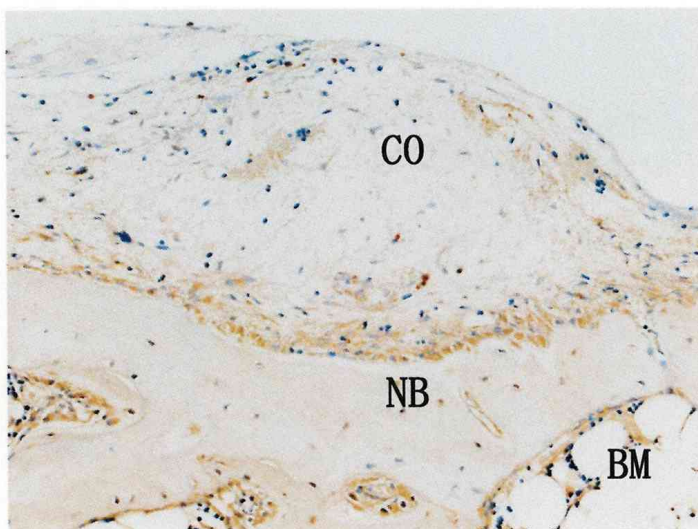


a

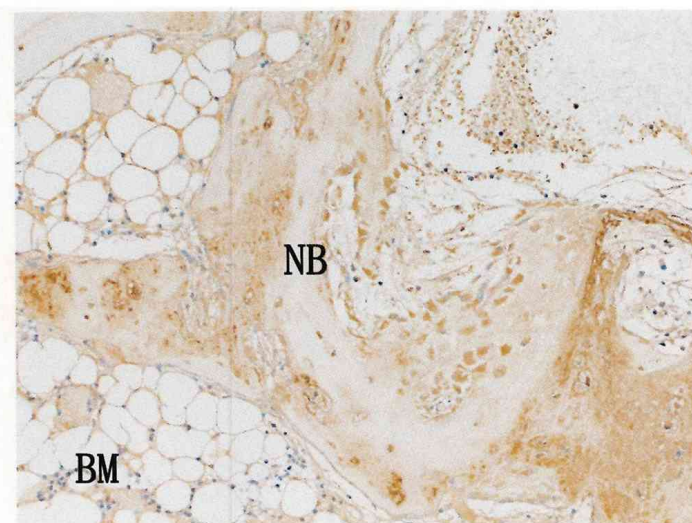


b

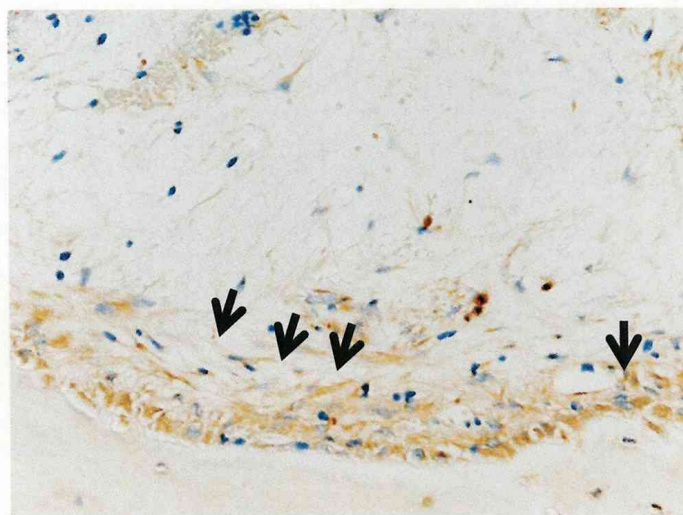
图5



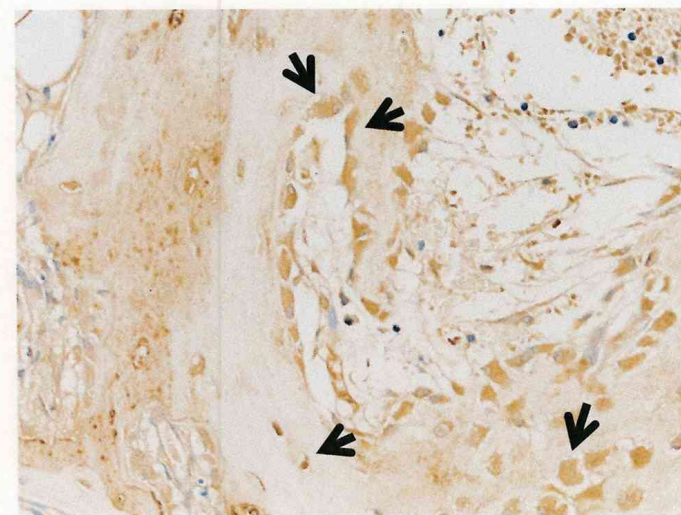
a



c



b



d

图6

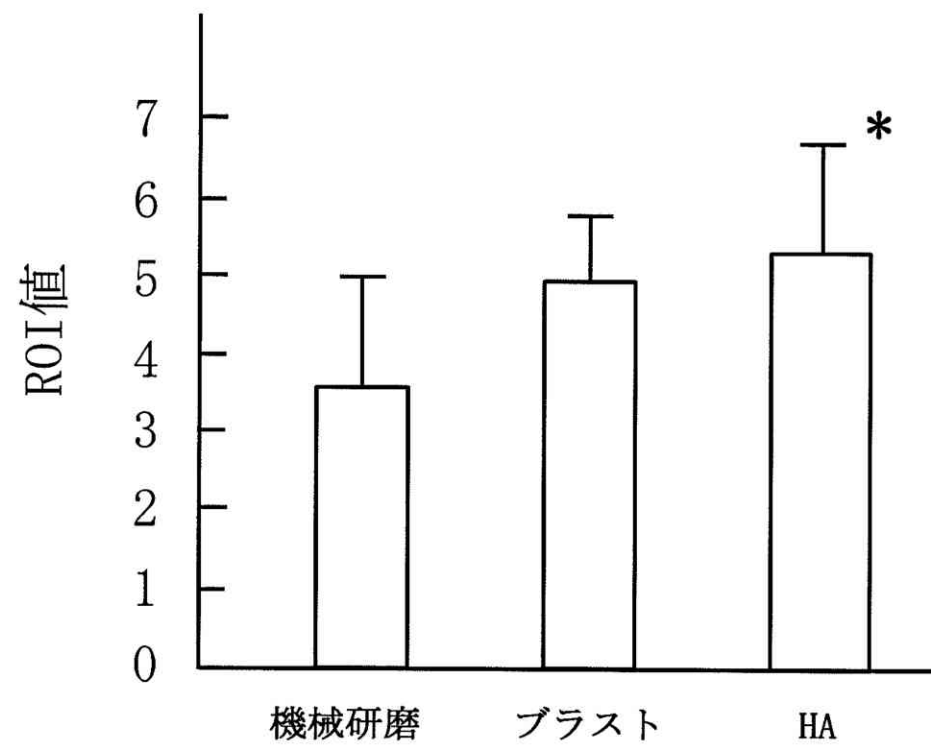


図7

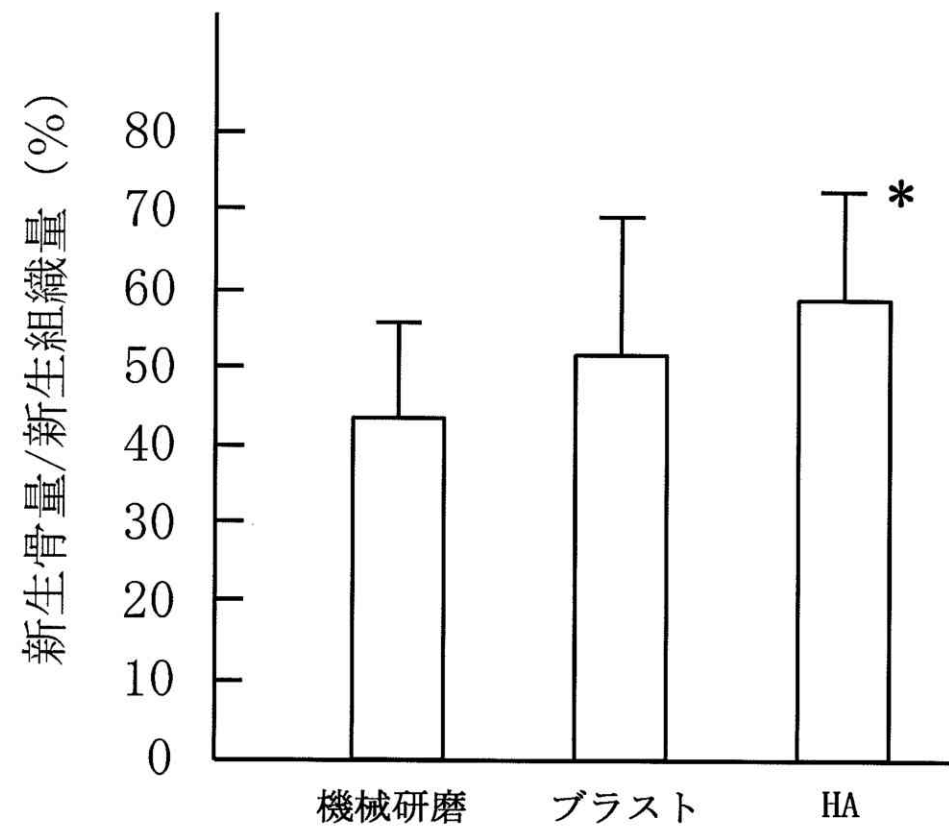


図8