

## 骨補填材としての焼結炭酸含有アパタイトの培養細胞での評価

岩 永 寛 司<sup>1</sup> 渋谷 俊 昭<sup>1</sup> 土 井 豊<sup>2</sup>  
森 脇 豊<sup>2</sup> 岩 山 幸 雄<sup>1</sup>

1. 朝日大学歯学部歯周病学講座 (主任: 岩山幸雄教授)

2. 朝日大学歯学部歯科理工学講座 (主任: 森脇 豊教授)

**抄録** 炭酸イオンを含有したアパタイト焼結体(CAp)の骨補填材としての有用性を評価するために、ラットから採取した骨芽細胞様細胞をCAp基盤上で培養し、骨基質形成に及ぼす基盤の影響を検討した。比較基盤として、水酸化アパタイト(HAp)、 $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)、マグネシウムを添加し高温安定化したリン酸三カルシウム(Mg- $\beta$ -TCP)、HApとMg- $\beta$ -TCPを混合し(HAp-Mg,  $\beta$ -TCP)作製した基盤、および培養用スチロールプレートを用いた。形状および表面性状をほぼ同一とした各基盤上に4-5週齢Wistar系ラットから採取した培養骨芽細胞様細胞を播種し、8日及び14日間培養し、アルカリホスファターゼ活性(ALP活性)、DNA量及び石灰化物に起因するカルシウム及びリン酸濃度を測定した。また、各基盤表面のSEM観察および剥離組織のEPMA観察ならびにX線回折も行い、基盤表面に沈着した石灰化相の同定も行った。

培養8日目では、 $\beta$ -TCPはCAp, HAp, Mg- $\beta$ -TCP, HAp-Mg,  $\beta$ -TCPよりALP活性が低い傾向を示すものの、DNA量に関しては各リン酸カルシウム系基盤間で大きな差異は認められなかった。しかし、スチロール基盤に比べ、各リン酸カルシウム系基盤はALP活性およびDNA量で大きな値を示し、細胞の分化・増殖がリン酸カルシウム系基盤では助長されることが示唆できた。また、カルシウムおよびリン酸濃度の基盤依存性はALP活性およびDNA量の基盤依存性と類似し、リン酸カルシウム系基盤上では石灰化相の形成も助長されることが示された。培養14日目になると、各基盤についてALP活性、DNA量、カルシウムおよびリン酸濃度は上昇するが、スチロール基盤では、上昇程度が相対的に高く、リン酸カルシウム系基盤上では細胞がコンフルエントな状態になっていることが推察された。しかしながら、 $\beta$ -TCPではALP活性およびDNA量が他のリン酸カルシウム系基盤に比べ有意に低く、また、Mg- $\beta$ -TCPではカルシウムおよびリン酸濃度が低い値を示す傾向にあった。これに反し、CApはHApおよびHAp-Mg,  $\beta$ -TCPと遜色なく、細胞の分化・増殖および石灰化相を含む基質形成が良好で、骨補填材として有用な材料となることが確認できた。

キーワード：骨芽細胞，焼結炭酸含有アパタイト，DNA，アルカリホスファターゼ活性，骨補填材

### 緒 言

歯周疾患によって失われた歯槽骨欠損部の修復として再生療法や骨補填材などを使用する骨移植法が用いられている。再生療法として組織再生誘導法(Guided Tissue Regeneration; GTR法)<sup>1-4)</sup>が広く応用されているが、骨欠損部が比較的小さい症例に限定され、さらに、術後の歯肉弁の維持管理が容易でないことから、適応範囲に制約があるのも事実である<sup>5, 6)</sup>。一方、骨補填材は、骨欠損部位が比較的大きくても適用が可能であることから、適用範囲の制限を受けにくく、臨床で

も使用されている。

骨補填材としては自家骨が最も適しているものの、健全骨採取のため二次的な外科的侵襲を必要とし、加えて量的な制限も受ける。また、根との癒着や根の吸収も生じやすいと言われている<sup>7)</sup>。また、他家骨移植は、欧米で脱灰凍結乾燥骨の使用が多く報告されているものの<sup>8)</sup>、倫理的また安全性の問題から我が国では受け入れられていない。さらに骨誘導能にロット間の差異が大きく、安定性に欠けることが報告されている<sup>9)</sup>。これに反し、人工骨補填材は、安定性、安全性に優れ、使用量の制限を受けないことや新鮮自家骨などの材料採取にかかわる外科的侵襲を必要としないことから臨床応用に有利であることが報告されている<sup>10-22)</sup>。現在用

本論文の一部は第34回日本歯科理工学会学術講演会(1999年10月10日,札幌)において、また要旨は第130回岐阜歯科学会(1999年12月4日,岐阜)において発表した。  
(平成13年4月25日 受理)

いられている人工骨補填材はリン酸カルシウム化合物を基材としたものがほとんどで、その中でも水酸化アパタイト (HAp),  $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) およびこれらの混合焼結体は骨補填材としての評価が高く、顆粒状および多孔体の形状のものが用いられている<sup>23-28</sup>。HApは生体親和性に富むものの吸収されにくく<sup>23, 26, 29, 30</sup>、感染の原因や、埋入後の顆粒の流出などの<sup>15, 20, 21</sup>問題点も指摘されている。一方、 $\beta$ -TCPは骨の形成や歯周組織の再生に劣るものの、経時的に吸収され<sup>23, 28</sup>、骨補填材としてはHApに比べ $\beta$ -TCPの方が優るとする報告もある。

近年、炭酸イオンを含有したアパタイト (CAp) を原料とした焼結体が開発され、その焼結体の物理化学的性状は骨アパタイトに類似し、弱酸中での溶解性はHApに比べ著しく大きく、脱有機骨アパタイトおよび $\beta$ -TCPに匹敵することが明らかにされ、CApの骨補填材としての有用性が示唆されている<sup>29-31</sup>。しかしな

がら、骨補填材として用いた場合、材料周囲に新生骨が生成するののかといった詳細な検討は未だなされず、骨補填材としてのCApの有用性に関しては不明な点が多いのも現状である<sup>32</sup>。

本研究では、CApの生体内吸収性および骨基質形成に及ぼす影響を *in vitro* で明らかにすることを目的とし、骨芽細胞系細胞との共存培養<sup>33, 34</sup>によるCApの骨基質形成に及ぼす影響に関して検討を行った。なお、HAp,  $\beta$ -TCP, マグネシウム (Mg) を添加し高温安定化した $\beta$ -TCP (Mg,  $\beta$ -TCP) および HApとMg,  $\beta$ -TCPを7:3で混合し焼結した試料 (HAp-Mg,  $\beta$ -TCP), コントロールとして培養用マルチプレートを用い、各基盤上の細胞形態を比較検討するとともに、剥離細胞懸濁液中のデオキシリボ核酸量、アルカリホスファターゼ活性、カルシウムおよびリン酸濃度を測定し、培養骨芽細胞様細胞の分化・増殖に及ぼす基材の影響について検討した。

## 材料・方法

### 1. 基盤原料の作成

CApおよびHApは土井ら<sup>29</sup>の方法に準じて合成し、 $\beta$ -TCPは炭酸カルシウムと第二リン酸カルシウム二水塩を1:2モル比でアセトン分散媒中で均一混合したものを900°Cで2時間加熱して得た。

CAp試料は仮焼(400°C 1時間, 1°C/分)したものをを用いた。また、 $\beta$ -TCPに0.3weight%の酸化マグネシウム(予備実験で添加濃度(0~0.6weight%)を種々変化させ、1200°Cで $\beta$ -TCP単相となる最小添加量を求めた)を添加し、950°Cで5時間加熱(昇温・降温300°C/60分)し、高温安定化した $\beta$ リン酸三カルシウム (Mg,  $\beta$ -TCP) も作成した。さらに、70weight%のHApと30weight%のMg,  $\beta$ -TCPを混合したものも作成した。各原材料はX線回折で不純物相がないことを確認し、75 $\mu$ mメッシュを通過した粉体を金型成形(約15×15×60~70mm)し、さらに200MPa静水圧処理(約13×13×52~60mm)した。

### 2. 基盤の作成

静水圧処理後の圧粉体の形状・大きさ(約13×13×52~60mm)をサンドペーパーで調整した後焼結した(Table 1)。CAp試料は昇温速度5°C/分で750°Cまで昇温し、この温度で2時間保持して焼結体を作成し、HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP, Mg,  $\beta$ -TCPは昇温・降温速度

1°C/分で1200°Cで2時間保持して焼結した。マグネシウムを添加していない $\beta$ -TCPは昇温・降温速度1°C/分で950°Cで5時間保持して焼結した。焼結後、各試料を約11mm×11mm×2mmに切断し正方形薄片試料を得、#800耐水研磨紙で全面研磨後、一方の正方形表面を10 $\mu$ m研磨し、次いで0.1 $\mu$ mアルミナペーストで鏡面研磨した。研磨後、アセトン中に研磨台および試料を一昼夜浸漬し、試料を剥離後アセトン、エタノールおよび蒸留水で超音波洗浄をした。また、コントロールとしては、培養用マルチプレート(住友、東京)を裁断(約11mm×11mm×2mm)したもの(ポリスチレン基盤)を用い、この試料も0.1 $\mu$ mアルミナペーストで研磨し、研磨後、エタノールおよび蒸留水で超音波洗浄をした。リン酸カルシウム系焼結基盤はオートクレーブ滅菌し、コントロールとして用いたポリスチレン基盤はエチレンオキシドでガス滅菌して培養実験に供した。

### 3. 骨芽細胞の調整

骨芽細胞様細胞はManiopoulosら<sup>33</sup>)の方法に準じて採取した。4~5週齢Wistar系ラット6匹(3匹×2回)の大腿骨を取り出し、軟組織除去後に骨端を削除し、骨髓腔内に#22ゲージの注射針を注入し、10%FCS含有 $\alpha$ -MEM(60 $\mu$ g/mlカナマイシン(ナカライテスク, 京都)を添加)を1本の大腿骨当たり5ml流入し遊離

Table 1. Sintering conditions for calcium phosphate substrates

Substrate	Heating Temperature	Temperature	Hold Time
CAp	5°C/min	750°C	2h
HAp	1°C/min	1200°C	2h
$\beta$ -TCP	1°C/min	950°C	5h
Mg, $\beta$ -TCP	1°C/min	1200°C	2h
HAp-Mg, $\beta$ -TCP	1°C/min	1200°C	2h

細胞を採取した。採取後、細胞数計数器で細胞数を測定後、4℃で400グラムGで10分間遠沈して細胞ペレットを得た。その後、細胞採取に用いた培養液と同じ培養液を細胞ペレット容器に入れ、培養液1ml当たり $2 \times 10^7$ 個細胞となるように調整した。

#### 4. 細胞附着

12穴マルチプレート(住友, 東京)に配置した基盤上に細胞浮遊液を50 $\mu$ l注ぎ、基盤表面に均一となるようにし、3時間炭酸ガス培養器(5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37℃)内で静置した。その後、非附着細胞を廃棄し、前述の培養液を各プレートに1ml注ぎ、炭酸ガス培養器(5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37℃)内で12時間培養した。

#### 5. 細胞培養

細胞培養に用いた培養液は、細胞附着時に用いた培養液に、さらに、0.2mMリン酸エステルアスコルビン酸(和光純薬工業, 大阪)<sup>34</sup>、1mM $\beta$ グリセロリン酸ナトリウム(Na- $\beta$ GP, SIGMA, St.Louis, MO)および $10^{-8}$ Mデキサメサゾン(DEX, SIGMA, St.Louis, MO)<sup>33</sup>を添加し用いた。培養液は2日毎に交換し、8日および14日間培養した。この時、リン酸エステルアスコルビン酸は、培養液交換時ごとに添加し、Na- $\beta$ GPおよびDEXは100倍濃度(Na- $\beta$ GPは蒸留水で溶解し100mM濃度、DEXは無水アルコールに溶解し $10^{-6}$ M濃度)のものをそれぞれ培養液交換時ごとに1vol%添加した。

各培養で各基盤7片を使用し、2片は10%ホルマリン-PBS(pH7.4)固定後、走査電子顕微鏡ならびに電子線マイクロアナライザー分析に供した。残り5片については、0.25%トリプシン処理後に細胞を剥離し、遠沈後生理食塩水で3回洗浄し、最終的には1mlもしくは2ml(培養10日以降の試料)の生理食塩水に分散させ、さらに超音波破砕機で細胞および石灰化物を均一分散するように破砕した。これらの試料はアルカリホスファターゼ活性、細胞数、石灰化物に起因するカルシウムおよびリン酸濃度などの化学分析測定に供した。また、一部の試料ではトリプシン処理後の表面を1N NaOH10mMEDTA溶液処理<sup>35</sup>(1時間程度室温で浸漬)し、遊離物質を上述と同様に超音波破砕し、以下の化学分析試料とした。

#### 6. 化学分析

化学分析結果は全て1ml生理食塩水中での濃度とした。2ml生理食塩水に懸濁した場合は1ml中の濃度に換算し、統計解析ソフト(StatView)を用い有意差検定(Student t)をし、危険率5%以下(P<0.05)の場合を有意差とした。

#### 7. アルカリホスファターゼ活性測定

アルカリホスファターゼ活性はアルカリ性ホスファターゼB-テストキット(和光純薬工業, 大阪)を用い、0.2N水酸化ナトリウム溶液を加え反応を停止させ、96穴マルチプレートリーダーを用い、405nmの波長で吸収強度を測定した。標準液としp-ニトロフェノールを用い、

BL単位でアルカリホスファターゼ活性値を表した。また、ブランク値は生理食塩水を試料量と同量加えたものを用い、この吸収強度を引いた値からアルカリホスファターゼ活性値を求めた。

#### 8. デオキシリボ核酸(DNA)量測定

DNA量はサイクアントキット(CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit Molecular Probes, Inc; Oregon USA)を用い、励起波長480nmで520nm波長の蛍光強度から算出した。このキットはリボ核酸(DNA)およびデオキシリボ核酸(RNA)両者を蛍光染色するため、リボ核酸酵素(DNA酵素を含有しない)で試料を処理してDNA量を求めた。濃度基準としてキットに内装されている $\lambda$ DNAを用い、 $10^{-9}$ g/ml(pg/ml)単位でDNA量を表した。リボ核酸酵素としてリボヌクレアーゼA(ナカライテスク, 活性量82.5Kunitz units/mg)を用い、180mM塩化ナトリウム、1mMエチレンジアミン四酢酸および20倍希釈のCell Lysis Bufferを含む溶液に1.35Kunitz units/mlとなるように溶解した。このリボ核酸酵素溶液1mlに細胞浮遊液試料を10~50 $\mu$ l入れ、室温で1時間放置し試料中のリボ核酸を酵素分解した。その後、20倍希釈のCell Lysis Bufferを用い200倍希釈としたCyQUANT-GR dyeをリボ核酸酵素処理後の試料に入れDNA量を測定した。

#### 9. カルシウム濃度測定

超音波破砕処理した試料0.5mlに2N塩酸0.5mlを添加し石灰物を溶解し、イオンクロマトグラフィー(島津, HIC-6A)を使用し、カルシウム濃度を測定した。

#### 10. リン酸濃度測定

イオンクロマトグラフィー測定後の試料中のリン酸濃度は、分光光度計(島津, UV-150-02)を使用し、リンモリブデン酸を用い求めた。

#### 11. SEM観察

各リン酸カルシウム系基盤は臨界点乾燥し、コントロールとして用いたポリスチレンはグルタルアルデヒド固定後自然乾燥した。その後パラジウムイオンスパッターコーティングしSEM観察した。

#### 12. 電子線マイクロアナライザー(EPMA)分析

臨界点乾燥後の一部の試料上の細胞ならびに石灰化物顆粒を含む基質構造物を剃刀で基盤を傷つけないように剥離し、アルミ試料台上のドウタイトテープに粘着し、パラジウムイオンスパッターコーティングを施し、加速電圧15kV、試料電流10 $\mu$ Aで窒素、カルシウムおよびリン原子について電子線マイクロアナライザー(島津, EPMA-8750)を用い元素分析をした。なお、コントロールとして用いたポリスチレン基盤上の細胞ならびに石灰化物顆粒は剥離せず、パラジウムイオンスパッターコーティングを施し、窒素、カルシウム及びリン原子についてEPMA観察した。

## 結 果

1. アルカリホスファターゼ, DNA, Ca, PO<sub>4</sub>

各基盤上における培養8日目の細胞由来のアルカリホスファターゼ活性を示す (Fig. 1). なお, アルカリホスファターゼ活性測定時に推奨されている0.02N水酸化ナトリウム溶液では停止反応は完了せず, 10倍濃度にするると停止反応を完了できることが確認できたため, 本実験では0.2N水酸化ナトリウム溶液を用いた. コントロールとして用いたポリスチレン基盤はリン酸カルシウム系基盤 (CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP, Mg,  $\beta$ -TCPおよび $\beta$ -TCP) に比べアルカリホスファターゼ活性は有意に低く, また, リン酸カルシウム系基盤の中では $\beta$ -TCPが低いアルカリホスファターゼ活性を示す傾向にあったものの, CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCPおよびMg,  $\beta$ -TCP基盤間に有意な差は認められなかった.

Fig. 1と同一試料中のDNA量を測定すると (Fig. 2), 基盤間のDNA量の差異はFig. 1に示した基盤間のアルカリホスファターゼ活性の差異と同様の傾向を示し, コントロール基盤は, 各種リン酸カルシウム系基盤 (CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP, Mg,  $\beta$ -TCPおよび $\beta$ -TCP) に比べDNA量は有意に低く, また, リン酸カルシウム系基盤の中では $\beta$ -TCPが低いDNA量を示す傾向にあったものの, CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCPおよびMg,  $\beta$ -TCP基盤間では有意な差は認められなかった.

Fig. 1と同一試料中の各基盤上の石灰化物に起因するカルシウム濃度 (Fig. 3A) およびリン酸濃度 (Fig. 3B) を示す. リン酸カルシウム系基盤 (CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP, Mg,  $\beta$ -TCPおよび $\beta$ -TCP) 間では, いずれの濃度に関しても有意差は認められなかったものの, コントロール基盤の場合ではいずれの濃度とも有意に低く, 各種リン酸カルシウム系基盤に比べカルシウム濃度およびリン酸濃度とも約1/5程度であった.

各基盤上での培養14日目の細胞由来のアルカリホスファターゼ活性を示す (Fig. 4). 培養14日目になると, コントロール基盤とリン酸カルシウム系基盤 (CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP, Mg,  $\beta$ -TCPおよび $\beta$ -TCP) とのアルカリホスファターゼ活性の有意差は認められず, 有意差が認められたのは $\beta$ -TCPとHAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCPおよびMg,  $\beta$ -TCPの間で, この4者間では $\beta$ -TCPが有意に低いアルカリホスファターゼ活性を示した.

Fig. 4と同一試料中のDNA量を測定すると (Fig. 5), コントロール基盤も含め各基盤間では有意差は認められず, 破碎細胞懸濁液1 ml中のDNAは約14  $\mu$ gであった.

Fig. 4と同一試料中のカルシウム濃度 (Fig. 6A) およびリン酸濃度 (Fig. 6B) を示す. カルシウム濃度 (Fig.

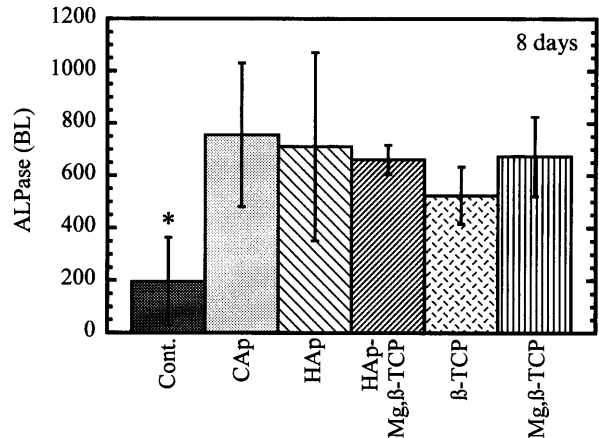


Fig. 1. Substrate dependence on ALPase concentrations at 8-day culture.

Substrates used are polystyrene (cont.), sintered carbonate apatite (CAp), hydroxyapatite (HAp), mixture of 70wt% HAp and 30wt% magnesium containing  $\beta$ -tricalcium phosphate (HAp-Mg,  $\beta$ -TCP),  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and magnesium containing  $\beta$ -tricalcium phosphate (Mg,  $\beta$ -TCP). The asterisk indicates that the control substrate is significantly different in ALPase from any of other substrates.

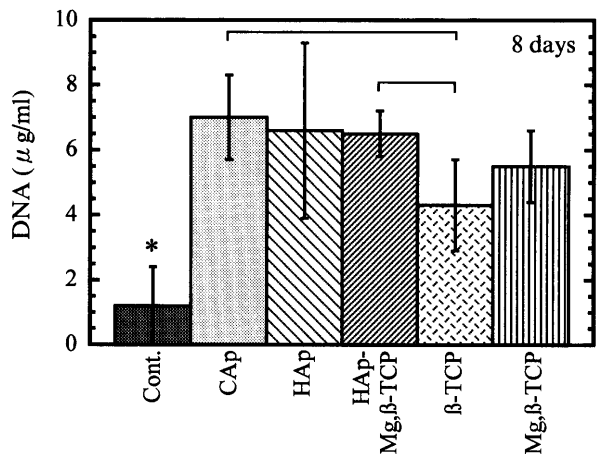


Fig. 2. Substrate dependence on DNA contents at 8-day culture.

The asterisk indicates that the control substrate is significantly different in DNA contents from any of other substrates and bars indicates that two substrates linked by a bar are significantly different from each other.

6A) をみると, コントロール基盤はMg,  $\beta$ -TCPおよび $\beta$ -TCPと同程度であり, CAp, HApおよびHAp-Mg,  $\beta$ -TCPに比較して低い傾向を示すものの, 有意差が認められたのはMg,  $\beta$ -TCPとCApおよびHAp基盤間で, この3者間ではMg,  $\beta$ -TCPが有意に低い値を示した. また, リン酸濃度に関してはMg,  $\beta$ -TCP

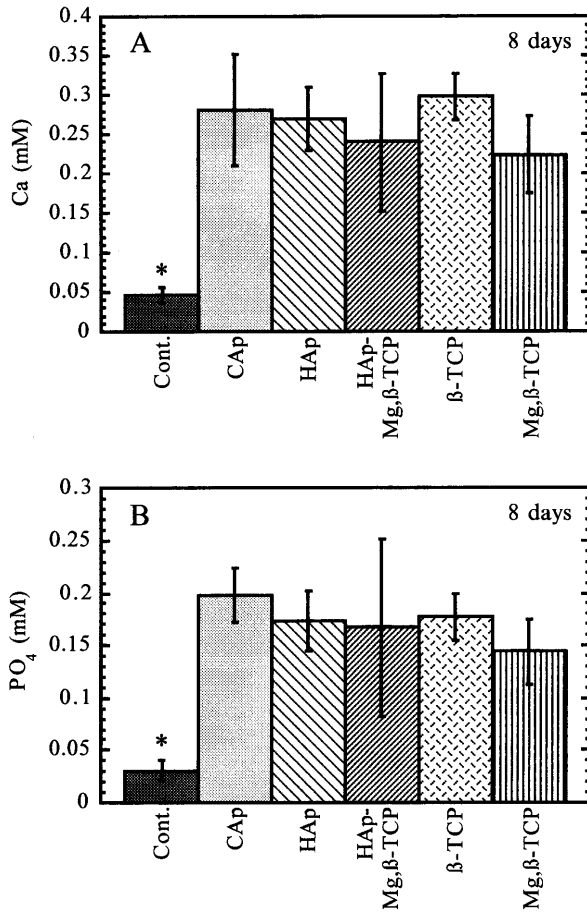


Fig. 3. Substrate dependence on calcium (A) and phosphate (B) concentrations at 8-Day day culture.

The asterisk indicates that the control substrate is significantly different from any of other substrates.

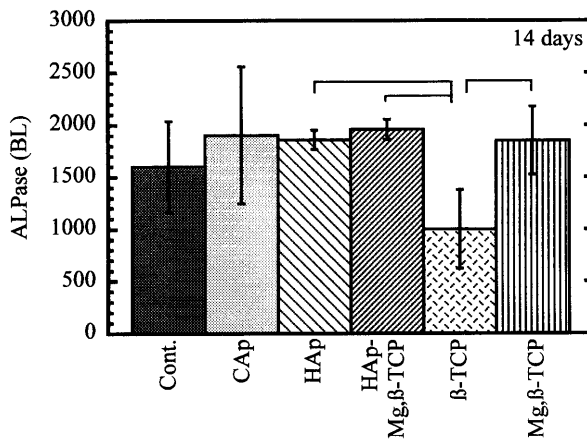


Fig. 4. Substrate dependence on ALPase concentrations at 14-day culture.

Bars indicate that two substrates linked by a bar are significantly different from each other.

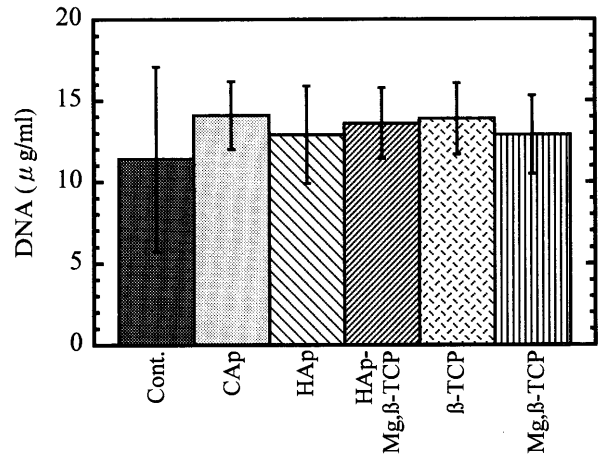


Fig. 5. Substrate dependence on DNA contents at 14-day culture.

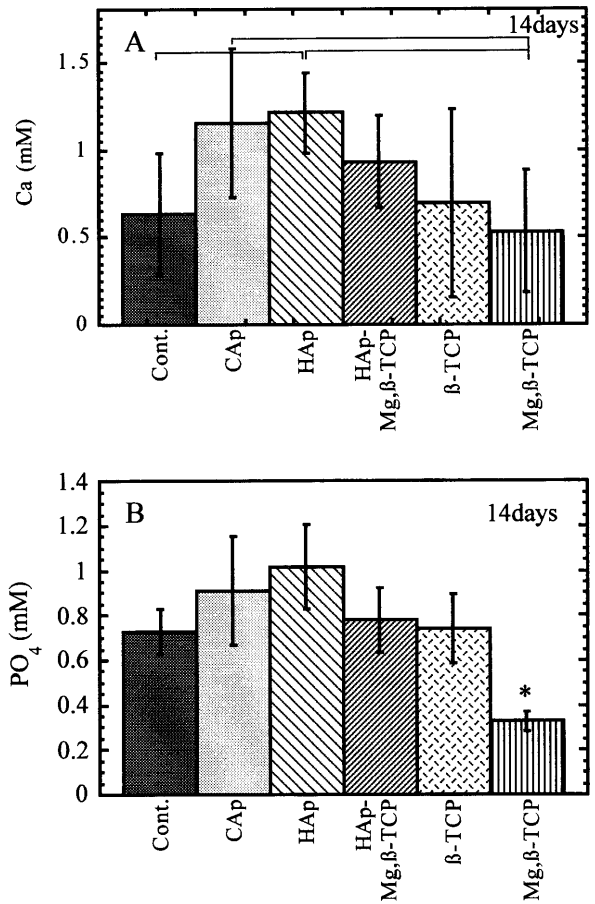


Fig. 6. Substrate dependence on calcium (A) and phosphate (B) concentrations at 14-day culture.

Bars in Fig. 6A indicate that two substrates linked by a bar are significantly different in Ca concentrations from each other. The asterisk in Fig. 6B indicates that the control substrate is significantly different in phosphate concentrations from any of other substrates.

基盤が他の基盤に比べ有意に低い濃度を示した。

## 2. SEM像

培養8日目 (Fig. 7) および14日目 (Fig. 8) の各基盤

上のSEM像である。培養8日目ではコントロール基盤上 (Fig. 7a) に球状および2~3の球状細胞が触手を介し互いに融合している像が支配的であったが、各種

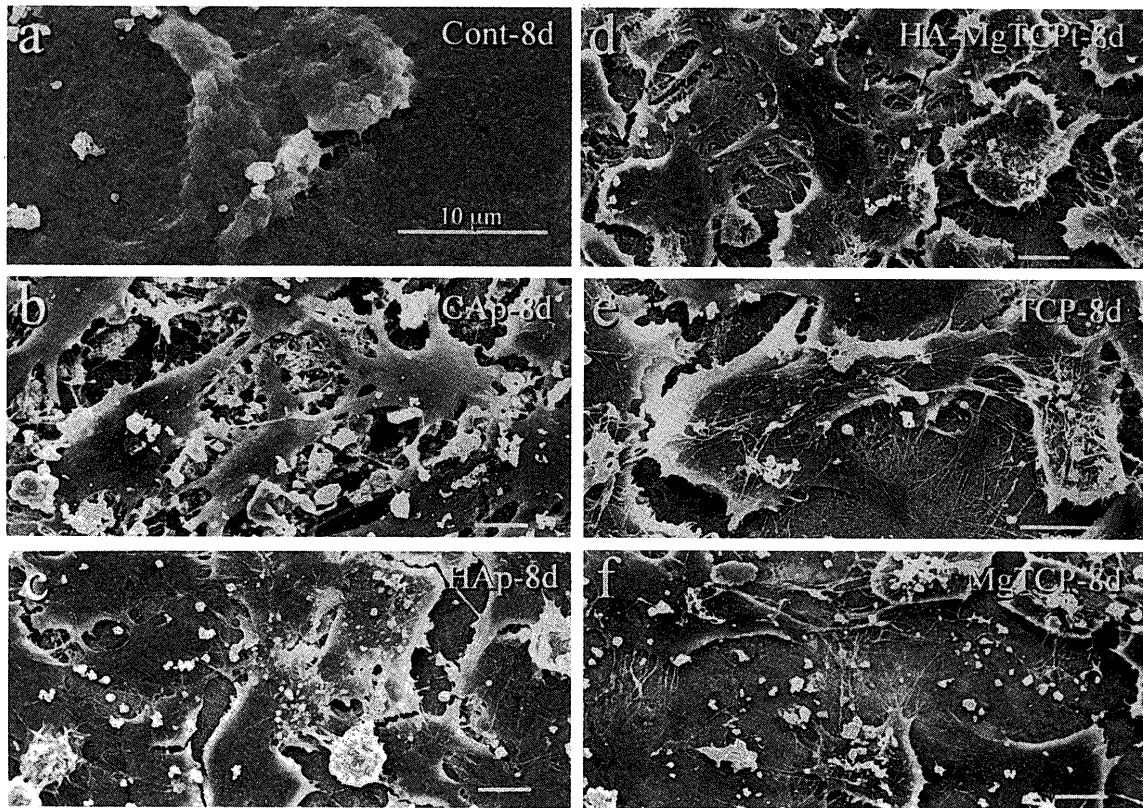


Fig. 7. SEM micrographs of osteoblast-like cells on various substrates at 8-day culture. The white bar in each figure is a scale showing 10mm in length.

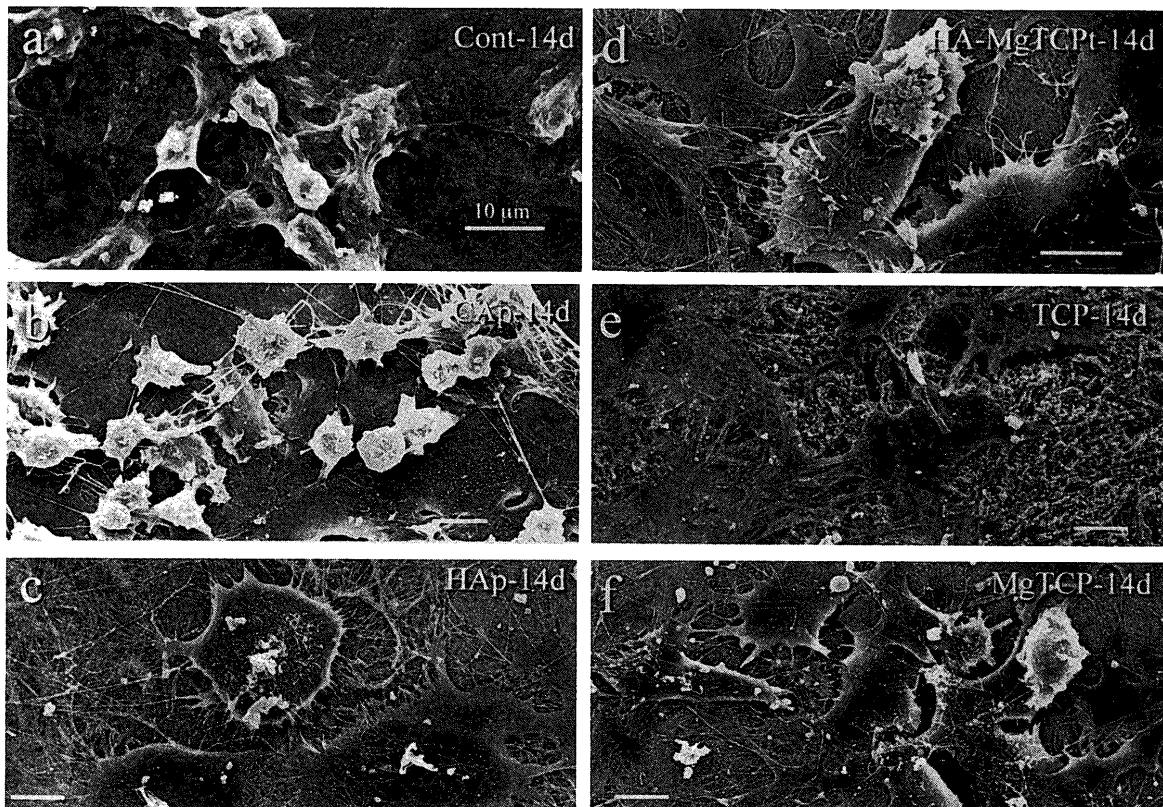


Fig. 8. SEM micrographs of osteoblast-like cells on various substrates at 14-day culture. The white bar in each figure is a scale showing 10mm in length.

リン酸カルシウム系基盤上 (Fig. 7b-f) では、細胞は扁平状を呈し、線維状組織および基質様構造物も基盤間でその形態に差異は認められず、顆粒状構造物の形態的な差異も認められなかった。培養14日目で各種リン酸カルシウム系基盤を比較すると、CAp基盤上 (Fig. 8b) では扁平状細胞に加え球状を呈する細胞も多数認められたが、扁平状細胞および線維状組織の形態には各基盤間で大きな差異は認められず、いずれの基盤上でもほぼ同様な細胞形態を有していた。しかしながら、 $\beta$ -TCP基盤上 (Fig. 8e) では基質様構造物が消失し、細胞および線維状組織が直接基盤に接している様相を呈していた。

### 3. EPMAおよびX線回折

培養14日目のCAp基盤上の細胞および顆粒状構造物を含む基質様構造物を機械的に剥離し、その組織をEPMA分析した結果および、この試料と本質的に同じ試料をX線回折した結果をまとめたものである (Fig.

9)。この結果をみると、リン原子の分布は本質的にカルシウム原子の分布と同じで結果としては示していないが、カルシウムは顆粒状構造物および線維状組織において顕著であり、顆粒状構造物および線維状組織がリン酸カルシウム化合物、もしくはリン酸カルシウム化合物を含んでいることを示す。また窒素の分布は基盤上で一様に認められるが、SEM像に対応する線維状組織上で相対的に高く基盤上に一様に窒素を含む化合物 (有機基質) が層をなし、その上にコラーゲン様の線維組織が形成されていることが示唆された。一方X線回折では、 $32^\circ/2\theta$  近傍に微弱ながら回折ピークおよび  $26^\circ/2\theta$  近傍にショルダーも確認でき、EPMAで確認できたリン酸カルシウム化合物が低結晶性の水酸化アパタイトであることがわかった。結果としては示していないが、コントロール基盤上でも程度の差はあるものの同様なEPMA像が確認できた。

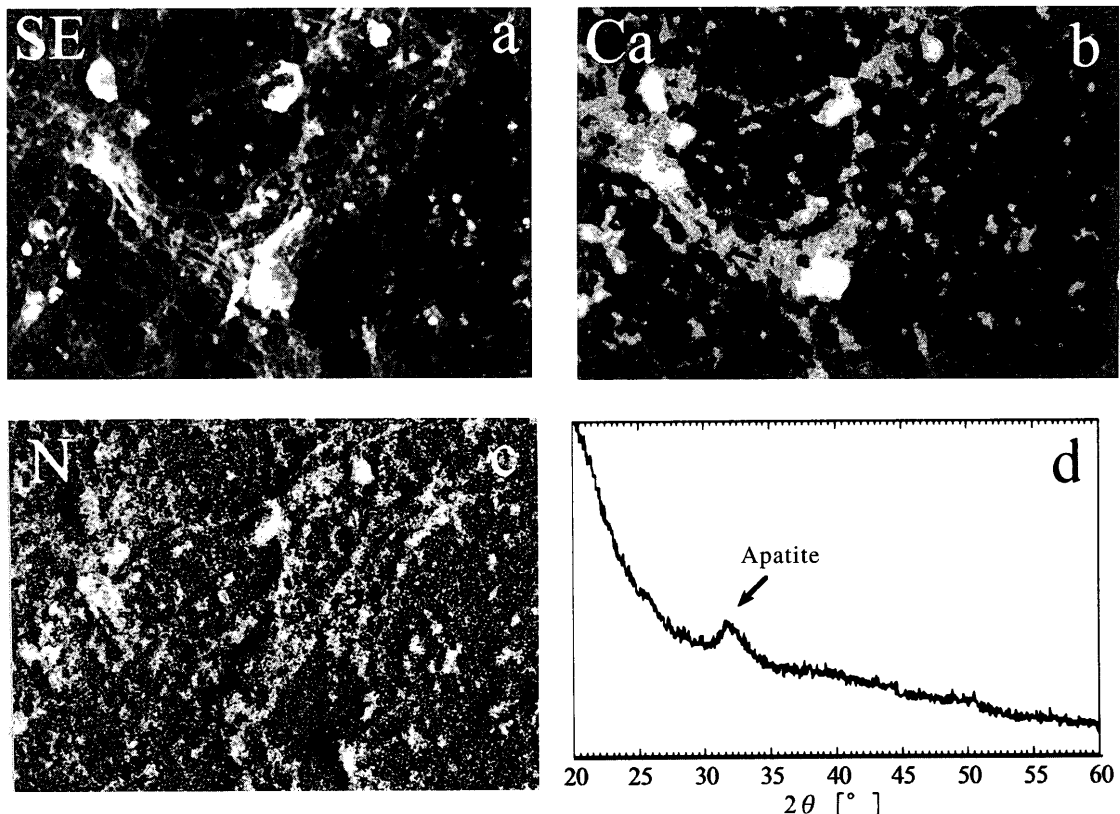


Fig. 9. EPMA micrographs of tissue scraped from the surface of a CAp substrate at 14-day culture showing calcium (b) and nitrogen (c) distribution. A secondary electron image of the tissue (a) was included and X-ray diffraction pattern of the tissue that is essentially the same as that used for EPMA was shown in Fig. 9d.

## 考 察

人工骨補填材は生体親和性に優れ、日本も含め世界各国で臨床応用されている。なかでも、HAp、 $\beta$ -TCP およびこれらの混合焼結体を基材とする骨補填材は評価が高く、緻密体、多孔体および顆粒状のものが市販もしくは開発されている<sup>23-26)</sup>。一般に、HApは生体親

和性に富むものの、生体内で吸収されにくいいため骨補填材としての有用性を懸念する研究者も多い<sup>29)</sup>。一方、 $\beta$ -TCPは生体親和性の点ではHApに若干劣り、骨の形成や歯周組織の再生に時間を要するものの、組織内で経時的に消失しそれに伴い新生骨が生成するとの報

告もあり、骨補填材としてはHApに比べ $\beta$ -TCPの方が優るとする見解もある<sup>28)</sup>。本研究ではこれらリン酸カルシウム基材に加え、CApの骨補填材としての有用性を骨芽細胞培養系で評価した。

骨芽細胞培養系での生体材料の研究はここ数年来世界各国で活発に始められ、炭酸カルシウム<sup>36, 39)</sup>、水酸化アパタイト<sup>36, 52~59)</sup>、バイオガラス<sup>34, 45, 46, 48, 49)</sup>、チタン<sup>34, 45, 46, 50)</sup>などについての研究報告がなされているものの、水酸化アパタイト、バイオガラス以外のリン酸カルシウム系基材についての研究例はほとんどなく、粉末状材料について水酸化アパタイトと $\beta$ リン酸三カルシウムの比較研究をした報告<sup>43)</sup>があるのみである。これら報告の一部では株化された骨芽細胞様細胞<sup>40, 47, 49)</sup>を用いた研究もなされているものの、研究の大部分は骨髄幹細胞を用いている。しかしながら、動物種がラット<sup>34, 38, 41, 48, 50)</sup>、マウス<sup>45)</sup>、ヒト<sup>39, 42~44, 46)</sup>と異なり、さらに同一動物種においても採取骨部位が大腿骨<sup>34)</sup>、頭蓋骨<sup>38, 4145, 48)</sup>、寛骨<sup>39)</sup>と異なり、また培養条件も異なるため、同一材料においてもその評価が研究者間で様でないのが実状であった。

Maniopoulosら<sup>33)</sup>はアスコルビン酸、 $\beta$ グリセロリン酸ナトリウムおよび副腎皮質ホルモンのコルチゾン<sup>46)</sup>に類似したデキサメサゾンの骨髄幹細胞の分化・増殖に及ぼす影響を検討し、これら試薬を培養液に添加すると、骨芽細胞の分化・増殖が促進され、培地において石灰化物の沈着を生じることを見出した。本研究では、彼らと本質的に同一条件下で、CApも含め、各リン酸カルシウム系基材の骨髄幹細胞の骨芽細胞の分化・増殖に及ぼす影響を比較検討をした。使用した指標はアルカリホスファターゼ活性、DNA量およびカルシウムならびにリン酸濃度で、石灰化の指標はアルカリホスファターゼ活性とカルシウムおよびリン酸濃度から評価し、細胞数の指標はDNA量とした。なお、トリプシン処理後の基盤をさらに1N NaOH、10 mM EDTA溶液<sup>37)</sup>で処理した試料からは、アルカリホスファターゼ活性、DNA量およびカルシウムならびにリン酸濃度とも実験誤差内で検出できず、本実験で用いたトリプシン処理で細胞はほとんど全部剥離したものと考えられ、これらの値は基材表面に付着していた細胞に直接的に関係し、さらに基材の差異を直接的に反映しているものと思われた。

培養8日目では各基材を比較すると、ポリスチレン基盤に比べCAp、HAp、HAp-Mg、 $\beta$ -TCP、Mg、 $\beta$ -TCP、 $\beta$ -TCP基盤では、DNA量が有意に高く、同様な培養条件下でも、ポリスチレン基盤に比べHAp基盤ではDNA量が有意に高くなることが報告<sup>34)</sup>されており、これらリン酸カルシウム系基材では細胞の分化・増殖が促進されることが理解できた。また、SEM観察時にはポリスチレン基盤上の細胞観察に比べ、リン酸カルシウム系基盤上の細胞観察は極めて容易で、後者

の場合では、どの基盤部位でも細胞が容易に確認できたが、ポリスチレン基盤上では何回かの試行錯誤の後確認できた。このことからリン酸カルシウム系基材では細胞の分化・増殖が促進されることが再確認できた。アルカリホスファターゼ活性と石灰化の関係については明確ではないが、この酵素が骨の石灰化に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>51)</sup>。ポリスチレン基盤とリン酸カルシウム系基盤を比較すると、アルカリホスファターゼ活性とカルシウムならびにリン酸濃度との間には相関性が認められ、アルカリホスファターゼ活性が高いと、カルシウムならびにリン酸濃度とも高く、培養系での石灰化にもアルカリホスファターゼ活性が深く関与していると考えられる。また、リン酸カルシウム系基盤のみを比較すると、 $\beta$ -TCP基盤ではアルカリホスファターゼ活性およびDNA量とも低く、細胞の分化・増殖および石灰化が他のリン酸カルシウム系基盤に若干劣ることが示唆されたが、アルカリホスファターゼ活性/DNA量比は基盤間で差異は認められず、 $\beta$ -TCP基盤では細胞数が相対的に低いために、アルカリホスファターゼ活性も低くなったことが明らかとなった。しかしながら、カルシウムならびにリン酸濃度から評価した石灰化の程度は、CAp、HAp、HAp-Mg、 $\beta$ -TCP、Mg、 $\beta$ -TCP、 $\beta$ -TCP基盤間で有意な差異は認められず、しいて言えばMg、 $\beta$ -TCPが若干劣っていた。

SEM観察で培養8日目の各基盤上の細胞形態を比較すると、ポリスチレン基盤上の細胞形態は、予備実験で確認しCAp基盤上の培養2~4日目で認められた細胞形態に類似し、3~4個の球状の細胞が互いに触手を介して融合しようとしている像を呈し、細胞形態学的にもポリスチレン基盤に比べCAp基盤では細胞の分化・増殖が進んでいたことが示唆された。一方、CApを含めたリン酸カルシウム系基盤上では細胞形態の差異は認め難く、多くは骨芽細胞に特徴的な形態の扁平状を呈し、基盤と細胞間には一層の有機基質と思われる構造物も認められ、線維状組織および顆粒状構造物も認められた。この顆粒状構造物は、上述のカルシウムならびにリン酸濃度が極めて低い値を示したポリスチレン基盤上では認め難く、リン酸カルシウム化合物であると考えられた。

アルカリホスファターゼ活性、DNA量、カルシウムならびにリン酸濃度とも、用いた基盤の種類に関係なく、培養14日目では培養8日目に比べ有意に高くなり、アルカリホスファターゼ活性およびDNA量は約2.5倍、カルシウムならびにリン酸濃度ではおおむね4倍となり、この期間では細胞の分化・増殖に比べ、リン酸カルシウム化合物の生成が顕著になったことが理解できた。なかでも、ポリスチレン基盤では、この期間中でのアルカリホスファターゼ活性およびDNA量の上昇が顕著で、リン酸カルシウム系基盤との差異がなくな



る傾向を示し (Fig. 4), 逆に  $\beta$ -TCP 基盤の方がポリスチレン基盤に比べアルカリホスファターゼ活性が低い値を示すようになった。また, カルシウム濃度は Mg,  $\beta$ -TCP が最も低い値を示し (Fig. 6A), ポリスチレンは  $\beta$ -TCP と同程度で CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP に比べ低い値を示した。Mg,  $\beta$ -TCP では Fig. 6B に示したようにリン酸濃度も低く, この基盤上ではリン酸カルシウム化合物の生成が相対的に遅延していたことが思われた。

しかしながら, Fig. 7 で示したようにポリスチレン基盤では, 培養14日目でも培養8日目と認められたような, 球状細胞が互いに融合しあっている像を呈し CAp, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP, Mg,  $\beta$ -TCP,  $\beta$ -TCP 基盤上で支配的であった扁平状細胞は認め難く, 必ずしも化学分析の結果とは一致していなかった。一方リン酸カルシウム系基盤では, 培養8日目で認められた線維状組織, 顆粒状構造物とも培養14日目ではより顕著となるものの, 基盤全体にわたり扁平状を呈する細胞が支配的で, リン酸カルシウム系基盤上では細胞がコンフルエントな状態になっていたと思われた。また, 上述したように, 培養8日目から14日目までのアルカリホスファターゼ活性およびDNA量の上昇の程度はポリスチレン基盤で有意に高く, 細胞の分化・増殖がこの基盤上のみで相対的に顕著であったことから, リン酸カルシウム系基盤上の細胞がコンフルエントな状態に近づいていたことが思われる。細胞がコンフルエントな状態に近づけば, アルカリホスファターゼ活性およびDNA量の上昇も相対的に低下することは容易に想像でき, 上述のSEM像と化学分析結果の不一致はこのためと思われる。リン酸カルシウム系基盤を比較して得られた興味ある知見の一つとして,  $\beta$ -TCP 基盤では細胞と基盤の間に存在していた基質様組織が消失していたことがあげられる。培養14日目では,  $\beta$ -TCP 基盤では細胞, 線維組織などが基盤に直接接している像を呈し (Fig. 8e), 上述したように, アルカリホスファターゼ活性も低い値を示したことから, 基質組織形成にもアルカリホスファターゼ活性が関与していることが示唆された。

これまで述べてきたように, 細胞の分化・増殖にともないリン酸カルシウム化合物が生成していることは化学分析の結果から示唆できた。Fig. 9 で示したように, 培養14日目のCAp基盤上の細胞を含む有機基質相

## 結 論

焼結炭酸含有アパタイトの骨補填材としての有用性を検討するために, 骨芽細胞培養系で細胞形態を観察するとともに, 剥離細胞懸濁液中のデオキシリボ核酸量, アルカリホスファターゼ活性, カルシウムおよびリン酸濃度を測定し, 培養骨芽細胞様細胞の分化・増

を機械的に剥離し, EPMA分析すると, カルシウムおよびリン酸濃度は線維状組織および顆粒状構造物では他の部位に比べ相対的に高く, またX線解析によりこのリン酸カルシウム化合物がアパタイト様構造を有することも明らかとなり, 線維状組織および顆粒状構造物はアパタイト相を含むことが証明できた。さらに窒素分布をみると, 基盤一様に窒素の分布が認められるものの, 線維組織に沿って相対的に高く, 基盤上に一様な窒素を含む層, すなわち有機基質が存在し, その上に窒素を含む線維組織, すなわちコラーゲンの存在が示唆された。窒素, カルシウムおよびリンの分布を同時に考慮すると, コラーゲン線維は石灰化し, 細胞の分化・増殖にともない基質形成も進化し, 基盤上で骨様組織が形成されたことが分かった。これまでの初代培養の骨芽細胞を用いた系<sup>50)</sup>でも, 細胞の増殖とともにコラーゲンが形成され, コラーゲンの形成が進むにつれて, 基質が形成され, さらにこの頃になるとアルカリホスファターゼなどの骨芽細胞のマーカーが強く発現されてくるようになり, 基質形成の成熟とともに, 石灰化がおこることが報告されており, 本研究結果でも本質的に同じ過程を経て石灰化が進行した。本研究では, 非リン酸カルシウム系基材として, 細胞培養用プレート (ポリスチレン) を用い, 形状, 表面研磨状態を同一としたものと比較したが, コンフルエントな状態になる以前 (例えば培養8日目) ではポリスチレン基盤に比べCAp基盤ではアルカリホスファターゼ活性, DNA量, カルシウムならびにリン酸濃度とも有意に高く, 詳細な機構は不明ながら, CAp基盤は骨芽細胞の分化・増殖に適した場を提供していることは事実のようである。

以上まとめると, CAp基盤は骨芽細胞培養系でHApおよびHAp70weight%と30weight%Mg,  $\beta$ -TCPを複合したHAp-Mg,  $\beta$ -TCPに遜色なく, Mg,  $\beta$ -TCPおよび $\beta$ -TCPに優ることが示唆された。骨形成の点で大きな差異がないとすれば, 基盤の生体内吸収性がより重要な意味を持つてくるものと考えられるが, CApは破骨細胞の吸収を受けやすく<sup>36)</sup>, HAp, HAp-Mg,  $\beta$ -TCP, Mg,  $\beta$ -TCPおよび $\beta$ -TCP系骨補填材に比べ, より優れた骨補填材となり得る。動物実験での評価は未だ確立されていないものの, 骨芽細胞とのハイブリット体の作製は興味ある研究課題であり, 骨補填材としての有用性も含め今後の研究課題である。

## 論

殖に及ぼす基材の影響について検討した結果, 焼結炭酸含有アパタイトは骨芽細胞の活性を抑制せず, 破骨細胞による吸収性が高いことから, 置換性骨補填材として有用性であることが示唆された。

## 文 献

- 1) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, **9** : 290~296, 1982.
- 2) Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, **11** : 494~503, 1984.
- 3) Pontoriero, R., Nyman, S., Lindhe, J., Rosenberg, E. and Sanavi, F. : Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J. Clin. Periodontol.*, **194** : 618~620, 1987.
- 4) Cortellini, P., Clauser, C. and Pini P. G. : Histologic assessment of new attachment following the treatment of a human buccal recession by means of a guided tissue regeneration procedure. *J. Periodontol.*, **64** : 387~391, 1993.
- 5) Becker, W. and Becker, B. E. : Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences. : Surgical techniques and case reports. *Int. J. Perio. Rest. Dent.*, **10** : 377~391, 1990.
- 6) Lu, H. : Topographical characteristics of root trunk length related to guided tissue regeneration. *J. Periodontol.*, **63** : 215~219, 1992.
- 7) 加藤 熙 : 最新歯周病学. 第1版, 医歯薬出版(東京), 218, 1994.
- 8) Rummelhart, J. M., Mellonig, J. T., Gray, J. T. And Towle, H. T. : A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. *J. Periodontol.*, **60** : 655~663, 1989.
- 9) Schwartz, Z., Somers, A., Mellonig, J. T., Carnes, D. L. Jr., Dern, D. D., Cocchran, D. L. and Boyan, B. D. : Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J. Periodontol.*, **69** : 470~478, 1998.
- 10) Levin, M. P., Getter, L. and Cutright, D. E. : A comparison of iliac marrow and biodegradable ceramic in periodontal defects. *J. Biomed. Mater. Res.*, **9** : 183~195, 1975.
- 11) Nery, E. B. and Lynch, K. L. : Preliminary clinical studies of bioceramic in periodontal osseous defects. *J. Periodontol.*, **49** : 523~527, 1978.
- 12) Strub, J. R., Gaberthuel, T. W. and Firestone, A. R. : Comparison of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. *J. Periodontol.*, **50** : 624~629, 1979.
- 13) 原 宜興, 古川猛士, 岸 哲也, 赤峰昭文, 青野正男 : リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用, 1. : Hydroxyapatiteについての基礎実験. 日歯周誌, **25** : 806~816, 1983.
- 14) 林 成忠, 木村善保, 呉 啓変, 米良豊常, 西原達次, 野口俊英, 木下四郎, 加藤一男 : サルの歯槽骨欠損部におけるHydroxyapatite移植の臨床および組織学的研究. 日歯周誌, **25** : 919~935, 1983.
- 15) 青野正男, 原 宜興 : 歯槽骨欠損に対するハイドロキシアパタイト移植の現状と展望. ザ・クインテッセンス, **4** : 1801~1814, 1983.
- 16) Snyder, A. J., Levin, M. P. and Cutright, D. E. : Alloplastic implants of tricalcium phosphate ceramic in human periodontal osseous defects. *J. Periodontol.*, **55** : 273~277, 1984.
- 17) Baldock, W. T., Hutchens, Jr. L. H., McFall, Jr. W. T. and Simpson, D. M. : An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients. *J. Periodontol.*, **56** : 1~7, 1985.
- 18) Ganeles, J., Listgarten, M. A. and Evian, C. I. : Ultrastructure of Durapatite-periodontal tissue interface in human intrabony defects. *J. Periodontol.*, **57** : 133~140, 1986.
- 19) Stahl, S. S. and Froum, S. : Histological evaluation of human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. 1. Three to eight months. *J. Periodontol.*, **57** : 211~217, 1986.
- 20) 掘田善史 : ブロック状ならびに顆粒状合成ハイドロキシアパタイトサル人工的歯周骨欠損への移植. 日歯周誌, **29** : 384~404, 1987.
- 21) 勝谷芳文, 岩山幸雄, 掘田善史(青野正男, 原耕二編) : ブロック状ならびに顆粒状ハイドロキシアパタイト歯周骨欠損移植材としての応用(歯科における生体新素材の応用), クインテッセンス出版(東京), 79~92, 1987.
- 22) 石田ひとみ, 勝谷芳文, 村橋慶宣, 山村早百合, 掘田善史, 堀口優美, 田中竜男, 村上純一, 白木雅文, 岩山幸雄 : 合成ハイドロキシアパタイトの歯周骨欠損移植材としての臨床応用. 日歯周誌, **30** : 292~299, 1988.
- 23) Jarcho, M. : Biological aspects of calcium phosphates. Properties and applications. *Dent. Clin. North Am.*, **30** : 25~47, 1986.
- 24) de Groot, K. : Macropore tissue ingrowth : a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, **7** : 137~143, 1986.
- 25) LeGeros, R. Z., Orly, I., M. Gregoire, M. and Daculsi, G. : Substrate surface dissolution and interfacial biological mineralization," in *The Bone-Biomaterial Interface*, J.E.Davies (ed.), University of Toronto Press (Toronto) 76~88, 1991.
- 26) Muller-Mai, C. M., Voigt, C. and Gross, U. : Incorporation and degradation of hydroxyapatite implants of different surface roughness and surface structure in bone. *Scann. Microsc.*, **4** : 501~511, 1991.
- 27) de Bruijn, J. D., Bovell, Y. P., Davies, J. E. and Van Blitterswijk, C. A. : Osteoclastic resorption of calcium phosphates is potentiated in postosteogenic cul-

- ture conditions. *J. Biomed. Mater. Res.*, **28** : 105~112, 1994.
- 28) Klein, C. P. A. T., de Groot, K., Driessen, A. A. and van der Lubber, H. B. M. : Interaction of biodegradable  $\beta$ -whitlockite ceramics with bone tissues : An in vivo study. *Biomaterials*, **6** : 189~192, 1985.
  - 29) Doi, Y., Koda, T., Wakamatsu, N., Goto, T., Kamemizu, H., Moriwaki, Y., Adachi, M. and Y. Suwa. : Influence of carbonate on sintering of apatite. *J. Dent. Res.*, **72** : 1279~1284, 1994.
  - 30) Doi, Y., Shibutani, T., Moriwaki, Y., Kajimoto, T. and Iwayama, Y. : Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.*, **39** : 139~143, 1998.
  - 31) Doi, Y., Koda, T., Adachi, M., Wakamatsu, N., Goto, T., Kamemizu, H., Moriwaki, Y. and Suwa, Y. : Pyrolysis-gas chromatography of carbonate apatite used for sintering. *J. Biomed. Mater. Res.*, **29** : 1451~1457, 1996.
  - 32) Doi, Y., Saku, S., Iwanaga, H., Kajimoto, T., Moriwaki, Y., Yamamoto, K., Shibutani, T., Iwayama, Y., Mizuta Y. and Ikeda, Y. : Bioresorbable bone substitute materials made of sintered carbonate apatites. *Bio ceramics*, **11** : 323~326, 1998.
  - 33) Maniatopoulos, C., Sodek, J. and Melcher, A. H. : Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tiss. Res.*, **254** : 317~330, 1988.
  - 34) Ozawa, S. and Kasugai, S. : Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials*, **17** : 23~29, 1996.
  - 35) Stephan, E. B., Jiang, Di., Lunch, S., Bush, P. and Dziak, R. : An organic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. *J. Periodontol.*, **70** : 634~639, 1999
  - 36) Doi, Y., Iwanaga, H., Shibutani, T., Moriwaki, Y. and Iwayama, Y. : Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *J. Biomed. Mater. Res.*, **47** : 424~433, 1999.
  - 37) LeGeros, R. Z. : Apatite crystallites : Effect of carbonate on morphology. *Science*, **155** : 1409~1411, 1967.
  - 38) Sautier, J. M., Nefussi, J. R., Boulekbache, H. and Forest, N. : In vitro bone formation on coral granules, In *Vitro Cell Dev. Biol.*, **26** : 1079~1085, 1990.
  - 39) Doherty, M. J., Schlag, G., Schwartz, N., Mollan, R. A. B., Nolan, P. C. and Wilson, D. J. : Biocompatibility of xenogener bone, commercially available coral, a bioceramics and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials*, **15** : 601~608, 1994.
  - 40) Frank B, Bagambisa and Ulrich, Joos. : Preliminary studies on the phenomenological behaviour of osteoblasts cultured on hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, **11** : 50~56, 1990.
  - 41) Malik, M. A., Puleo, D. A., Bizios, R. and Doremus, R. H. : Osteoblasts on hydroxyapatite, alimina and bone surfaces in vitro : morphology during the first 2h of attachment. *Biomaterials*, **13** : 123~128, 1992.
  - 42) Zambonin, G., and Grano, M. : Biomaterials in orthopaedic surgery : effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation rate and bone matrix synthesis by human osteoblasts. *Biomaterials*, **16** : 397~402, 1995.
  - 43) Sun J-S., Tsuang Y-H., Liao C-J., Liu H-C., Hang, Y-S. and Lin F-H. : The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.*, **37** : 324~334, 1997.
  - 44) Hott, M., Noel, B., Bernache-Assolant D, Rey, C. and Marie, P. : Proliferation and differentiation of human trabecula osteoblastic cells on hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, **37** : 508~516, 1997.
  - 45) 福田幸泰 : 骨芽細胞様細胞の各種骨補填材への親和性. *日口外誌*, **44** : 42~51, 1998.
  - 46) Wike, A., Orth, J., Lomb, M., Fuhrmann, R., Kienapfel, H., Griss, P. and Franke, R. P. : Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cultures. *J. Biomed. Mater. Res.*, **40** : 301~306, 1998.
  - 47) Ong, J. L., Hoppe, C. A., Cardenas, H. L., Cavin, R., Carnes, D. L., Sogal, A. and Raikar, G. N. : Osteoblast precursor cell activity on HA surfaces of different treatments. *J. Biomed Mater Res.*, **39** : 176~183, 1998.
  - 48) Matsuda, T. and Davies, J. E. : The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass. *Biomaterials*, **8** : 275~284, 1987.
  - 49) Price, N., Bendall, S. P., Frondoza, C., Jinnah, R. H. And Hungeford, D. S. : Human osteoblast-like cells (MG63) proliferate on a bioactive glass surface. *J. Biomed. Mater. Res.*, **37** : 394~400, 1997.
  - 50) Stanford, C. M., Keller, J. C. and Solursh, M. : Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. *J. Dent. Res.*, **75** : 1061~1071, 1994.
  - 51) Harris, H : The human alkaline phosphatases : what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta.*, **186** : 133~150, 1990.
  - 52) Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., Kennedy, M. B., Pockwinse, S., Lian, J. B. and Stein G. S. : Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro : Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell Physiol.*, **143** : 420~430, 1990.

## Evaluation of Sintered Carbonate Apatite as Bone Substitutes in Osteoblastic Cell Cultures

HIROSHI IWANAGA<sup>1</sup>, TOSHIAKI SHIBUTANI<sup>1</sup>, YUTAKA DOI<sup>2</sup>,  
YUTAKA MORIWAKI<sup>2</sup>, YUKIO IWAYAMA<sup>1</sup>

1 : Department of periodontology, Asahi University School of Dentistry  
(Chief : Prof. Yukio Iwayama)

2 : Department of Dental Materials & Technology, Asahi University School of Dentistry  
(Chief : Prof. Yutaka Moriwaki)

**Key words :** Osteoblast, Sintered carbonate apatite, DNA, ALPase activity, Bone substitute

**ABSTRACT** *In rat-marrow-cell cultures, sintered carbonate apatite (CAp) as a bone substitute was evaluated, investigating the ability of marrow cells to proliferate and to produce a mineralized matrix on this substrate. In these cell cultures, calcium phosphate bioceramics such as hydroxyapatite (HAp),  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), magnesium containing  $\beta$ -tricalcium phosphate (Mg,  $\beta$ -TCP), a mixture of hydroxyapatite and magnesium containing  $\beta$ -tricalcium phosphate (HAp-Mg,  $\beta$ -TCP), and polystyrene, which is a material used as plating dishes, were compared with CAp. When compared at 8 days of culture, the number of cells, which could be estimated by DNA content, was significantly greater with calcium phosphate substrates, irrespective of the difference in compositions, than with polystyrene substrates. The dependence of ALPase activity on substrates was essentially the same with that of DNA content, suggesting that bone marrow cells can proliferate and differentiate similarly on any type of calcium phosphate substrates. In addition, no significant differences were observed in the morphology of cells on calcium phosphate substrates, on which they appeared to be spread and to contact with their borders, in contrast to the spherical appearance with the control substrates. With the exception of the polystyrene substrate, fibral extracellular matrix was evident on calcium phosphate substrates. ALPase activity as well as DNA content doubled approximately at 14 days of culture for all substrates made of calcium phosphates except  $\beta$ -TCP, with which they were about 20% lower than the averaged values. With polystyrene substrates, however, both the ALPase activity and DNA content increased to an extent that was comparable with HAp, CAp, Mg,  $\beta$ -TCP, and HAp-Mg,  $\beta$ -TCP substrates. In addition, calcium and phosphate contents had markedly increased by day 14 for all substrates including polystyrene. The results showed that CAp is as effective as HAp and HAp-Mg,  $\beta$ -TCP as a material to support cell growth.*