

インプラント体埋入部に近接する骨欠損への炭酸含有アパタイト-bFGF複合体の応用

むかい けいすけ

向井 景祐

本論文の要旨は，第160回朝日大学大学院歯学研究科
発表会(平成26年10月9日，岐阜)において発表した。
本論文の一部は，第57回春季日本歯周病学会学術大
会(平成26年5月23，24日，岐阜)において発表した。

緒言

抜歯後の機能回復処置として、歯科インプラント治療が選択されるケースが増加している。しかし、十分な骨量が得られない場合、インプラント体を埋入すると、その一部が露出することがあるため、骨増生が必要とされることが少なくない。インプラント体周囲の骨増生を目的として、各種の骨増生法が考案されている¹⁻³⁾。

近年、骨補填材としてハイドロキシアパタイト(HA)、 β -リン酸三カルシウム(β -TCP)の有効性が認められている^{4,5)}。Chooら¹⁾はインプラント体周囲骨欠損に β -TCPと血小板由来増殖因子(PDGF)の複合材を使用し、 β -TCP単体と比較して骨増生が促進されたと報告している。HAは骨アパタイトに結晶性が類似するため生体親和性に優れるが焼結すると異常に結晶性が高くなるため生体内でほとんど吸収されない⁶⁾。骨補填材としては新生骨に置換し、正常な骨代謝に移行する材料が望まれている⁷⁾。 β -TCPは生体内で吸収され、それに伴い新生骨に置換されるため、骨補填材としてHAより優れるという報告もある⁸⁾。しかし、HAに比べ生体親和性は劣るとの報告もある⁹⁾。

炭酸含有アパタイト(CA)は炭酸基を含む骨の組成に近いアパタイトであり、HAと同様の親和性を持つ。また、 β -TCPと同様に吸収性を持ち、新生骨に置換し

ていく¹⁰⁾。CAは増殖因子を保持する担体として有効であると考えられる¹¹⁾。これまでにラットの大腿骨でCA担体と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の複合体が骨造成を促進することが報告されている¹²⁾。

近年、骨形成タンパク質(BMP)、PDGFなどの増殖因子を用いた歯周再生療法が行われている^{13,14)}。bFGFも同様に歯周組織再生療法への応用が試みられている¹⁵⁾。bFGFは線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、血管平滑筋細胞、上皮細胞など多種類の細胞増殖を誘導することが知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。これまでにビーグル犬やカニクイザルを用いた動物実験で歯槽骨欠損部にbFGFを局所投与することにより、歯周組織再生が誘導されることが確認されている^{15,19)}。また、2, 3壁性歯槽骨欠損を有する歯周炎患者を対象とした臨床研究においてもその有効性が報告されている^{20,21)}。これらの研究では、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)を基材としたゲル状のbFGFが用いられた。しかし、骨欠損が大きくなると、再生のスペースを保持するためのスキャフォールドが必要であり、bFGFの局所投与のみでは不十分と考えられる。スキャフォールドには強度、生体親和性、骨伝導性、吸収性が求められる。これまでに、 β -TCPをスキャフォールドにbFGFを添加する実験が行われ、歯周組織再生に良好な結果をもたらすと報告されている²²⁾。

CAをスキャフォールドとしてbFGFを含浸させた複

合体にすることで，より広範囲の骨増生が期待できることから，インプラント体周囲の骨増生においても有効であると考えられる．

本研究ではインプラント体周囲の骨増生において，CA-bFGF複合体の有効性を検討した．

材料および方法

1. 実験材料

インプラント体はチタン製 $3.0 \times 8.0 \text{ mm}$ (Integra-CP[®], Bicon, Jamaica Plain, MA, USA) を用いた。CA は土井ら²³⁾の方法に準じて合成したものをを用いた。CA 粉末と $250 \sim 500 \mu \text{ m}$ 径に調節した顆粒糖とを 1:1 で混合し、円柱状に金型成形し、 200 MPa 静水圧処理した。得られた円柱状 CA 多孔体を蒸留水中に 1 時間浸漬して糖を溶出させた。乾燥後、 700°C まで昇温し、この温度で 1 時間保持して焼結 CA 多孔体を作製した。多孔体を破砕し篩にかけ、 $600 \sim 1000 \mu \text{ m}$ の CA 多孔体を得た。bFGF (フィブラストスプレー[®], 科研製薬, 東京) は凍結乾燥体 $250 \mu \text{ g}$ を 1 ml の生理食塩水に溶解し使用した。また、CA-bFGF 複合体は金山ら¹²⁾の方法に準じて 1 ml bFGF 溶液を CA に含浸させ使用した。

2. 動物実験

実験動物として雄性ビーグル犬 1 歳 6 か月齢、体重 $10 \sim 12 \text{ kg}$ 、3 頭を用いた。本実験は朝日大学動物実験管理規程に従い、朝日大学動物実験専門委員会の承認 (承認番号 11-021) を得て実施した。実験動物は、キシリン塩酸塩 (セラクター 2% 注射液[®], バイエル薬品, 大阪) 0.1 ml/kg の筋肉注射を行い、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル[®], 共立製薬, 東

京)0.5ml/kgの静脈内注射により全身麻酔を施した。処置部位である下顎両側第3,4前臼歯(以下P3,P4)部に1/8万エピネフリン含有2%塩酸リドカイン(キシロカイン[®]カートリッジ,デンツプライ三金,東京)1.8mlを局所麻酔後,No.15cの替刃メスにて歯肉溝内切開を加え粘膜剥離子を用いて全層弁で歯肉を剥離した。P3,P4の根分岐部中央をゼックリアバーで分割し鉗子で抜歯した(図1-a)。歯肉弁を復位しナイロン糸(ソフトレッチ[®],ジーシー,東京)で縫合を行った。

術後は,飼料を軟食に変更し,セファロチンナトリウム(コアキシ[®],ケミックス,横浜)1gを1日1回で3日間筋肉内注射した。

抜歯後12週に全身麻酔下でP3,P4部を全層弁で剥離(図1-b)後,パイロットドリルで深さ11mmになるようにパイロットホールを形成しラッチリーマーで3.0mm径に拡大した後に,頬側骨を注水下で近遠心3.0mm,縦7.0mmになるようにゼックリアバーで骨欠損を作製した(図1-c)。

その後,インプラント体を1頭につき片顎3本,計6本を埋入(図1-d)し,ヒーリングプラグ[®](Bicon, Jamaica Plain, MA, USA)を骨縁で除去後,歯肉弁を復位しナイロン糸で縫合を行った。実験群は,CAにbFGFを含浸させた群(CA+FGF群),bFGFのみ(FGF群),CAのみ(CA群)を使用した群の3群とした。欠損のみをコントロール群とした。また,CA+FGF群,FGF群,

CA 群 (図 1-e) は各材料を填入し完全に歯肉で被覆できるように縫合を行った (図 1-f).

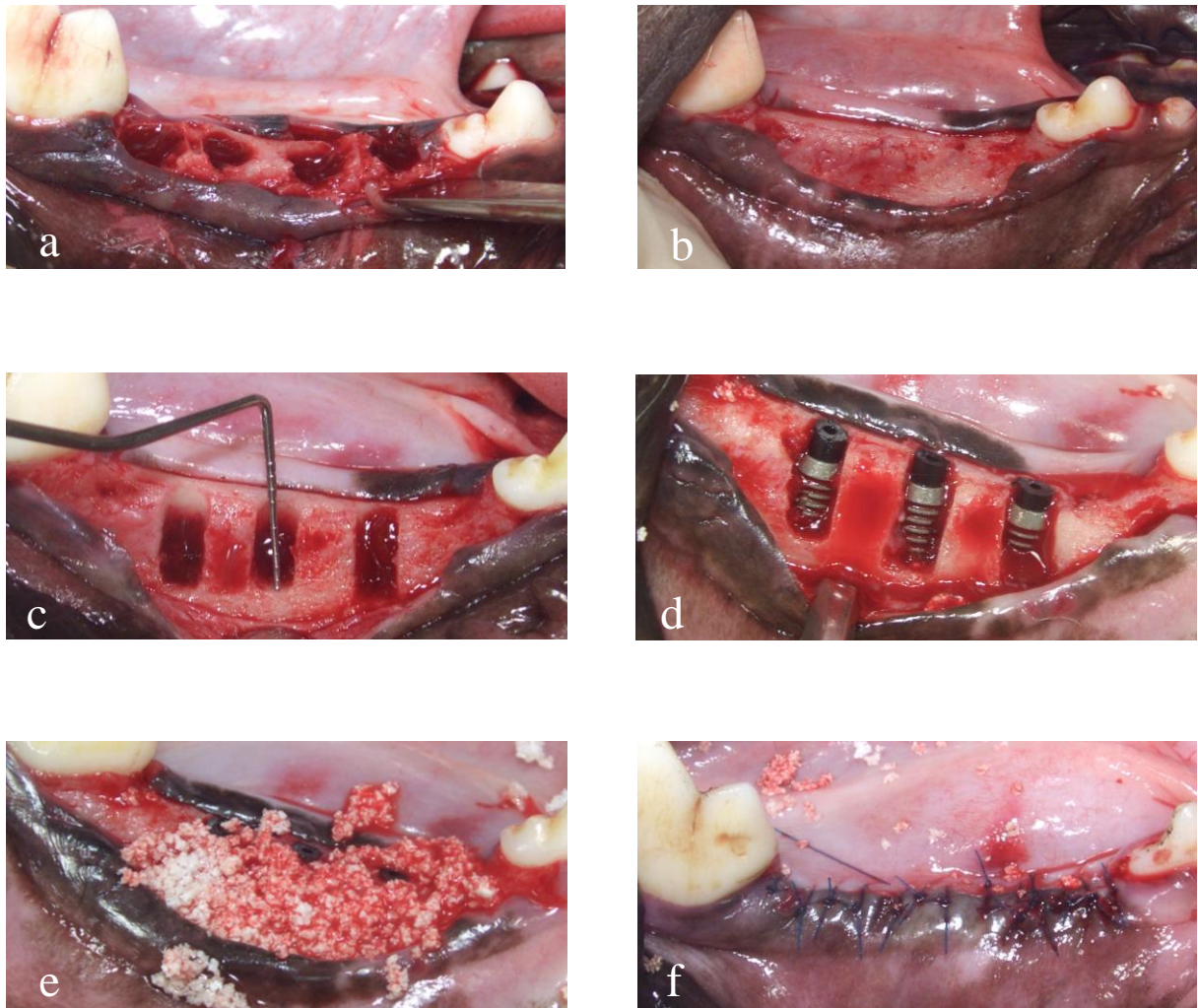


図 1 術中の口腔内写真

a: 抜歯窩, b: 12 週後剥離時, c: 頬側骨欠損

d: インプラント埋入時, e: CA 填入時, f: 縫合時

術後は, 飼料を軟食に変更し, セファロチンナトリウム 1 g を 1 日 1 回で 3 日間筋肉内注射した. 8 週間後にペントバルビタールナトリウムの過量投与により安楽死させた. 下顎骨を軟組織と共に切断して試料を採取し 4 % パラホルムアルデヒドにて固定を行った.

3. μ -CT 撮影

試料は 4% パラホルムアルデヒドにて固定後に， μ -CT 装置 (Scanmate-RB090SS150, Comscan, 横浜) を使用し，管電圧 90kV，管電流 $89\mu\text{A}$ ，倍率 2.5 倍の設定で断層撮影を行った．三次元画像解析ソフトウェア (3D-BON, RATOC, 大阪) にて骨塩量 (bone mineral density: BMD) の計測を行った． μ -CT 上で CA 顆粒と周囲の新生骨との識別はインプラント体のアーチファクトもあり困難なため残存した CA を含め BMD の計測を行った．BMD 計測範囲として高さは歯槽骨頂から欠損底，横はインプラント体の直径，奥行きは欠損底の外側の骨からインプラント体までとした (図 2)．

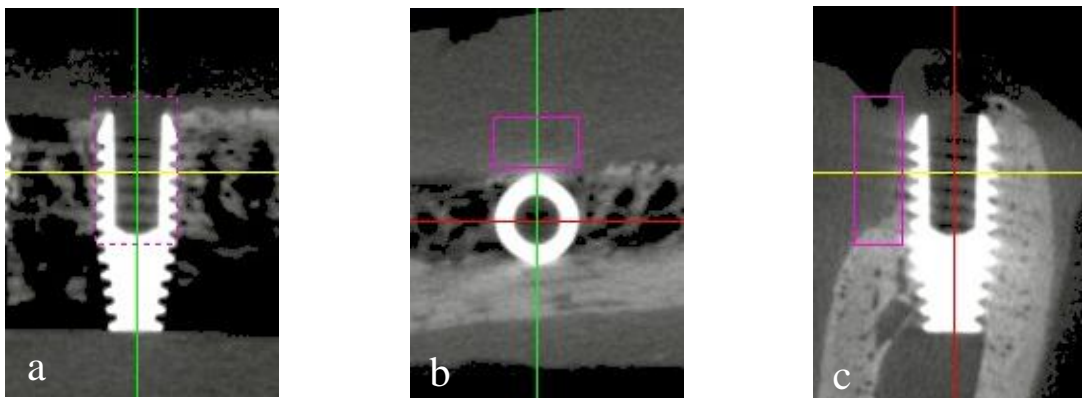



図 2 BMD 計測範囲

( の範囲を計測)

a: 近遠心面観，b: 上面観，c: 頬舌面観

4. 組織標本作製および観察

採取した試料は4%パラホルムアルデヒドにて固定後、樹脂包埋を行いインプラント体中央で頬舌的に厚さ $30\mu\text{m}$ の研磨切片を作製した。切片はトルイジンブルーで染色し光学顕微鏡(BX60, オリンパス, 東京)で観察を行った。

5. 新生骨量, 新生骨高さおよびCA残存率の計測

コントロール群, FGF群, CA群, CA+FGF群の染色された切片を各3枚抽出し画像処理ソフトウェア(ImageJ, National Institutes of Health, Maryland, USA)を用いて組織形態計測を行った。横は欠損底の頬側骨外側の骨からインプラント体外側, 縦は欠損底からインプラント体第1スレッドの範囲(図3-a)で新生された骨の割合を求め, 新生骨高さは欠損底からインプラント体に近接する新生骨の高さを計測した(図3-b)。またCA群とCA+FGF群において新生骨量を計測した範囲でCA残存率を計測した(図3-c)。

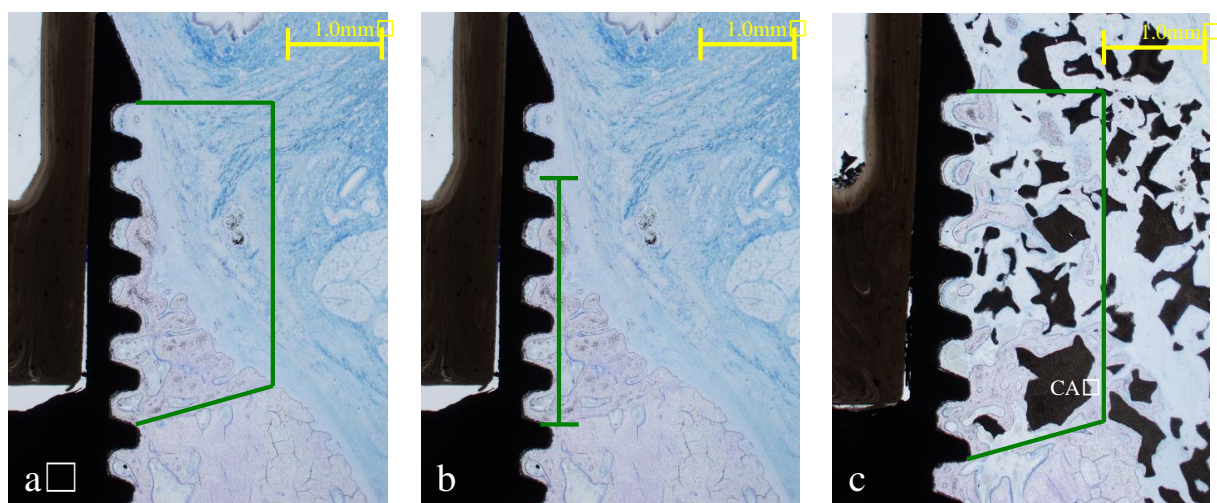


図 3 計測範囲

a: 新生骨量計測範囲 (インプラント体から — の範囲で新生された骨を測定)

b: 新生骨高さ計測範囲 (|—| の長さを計測)

c: CA 残存率計測範囲 (インプラント体から — の範囲の面積に対する残存 CA の面積の割合を測定)

6. 統計学的分析

BMD, 新生骨量, 新生骨高さ, CA 残存率の統計学的有意差の検定は, Bonferroni-Dunn 法により多重比較検定を行った. $P < 0.05$ を有意水準とした. 実験結果は平均 ± 標準誤差で表示した.

結果

1. 臨床的観察結果

実験動物は全研究期間を通じて変化は認められなかった。また、インプラント体の脱離も認められなかった。術後1週は発赤、若干の腫脹が認められたが、その後、症状は軽減し8週ではほぼ正常な歯肉の形態を示し、肉眼的には各群に明瞭な差は認められなかった。

2. μ -CT 所見

埋入8週後の μ -CT画像によりCA群及びCA+FGF群においてCA顆粒の残存が認められた(図4)。

BMDは、コントロール群 $186.2 \pm 24.9 \text{ mg/cm}^3$ 、FGF群 $209.3 \pm 9.8 \text{ mg/cm}^3$ 、CA群 $385.6 \pm 38.6 \text{ mg/cm}^3$ 、CA+FGF群 $402.1 \pm 22.6 \text{ mg/cm}^3$ であった。各群で比較を行ったところ、コントロール群に対してCA群、CA+FGF群に有意差を認めた($P < 0.05$)。CA群、CA+FGF群間に有意差は認められなかった(図5)。

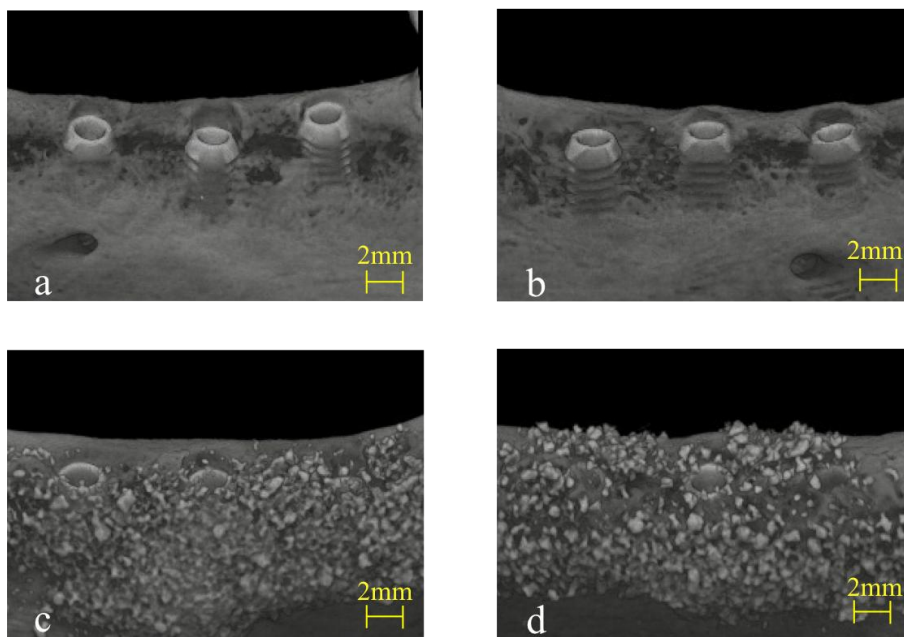


図 4 3D イメージ画像

a: コントロール群, b: FGF 群, c: CA 群, d: CA+FGF 群
 CA 群, CA+FGF 群に CA 顆粒の残存が認められる。

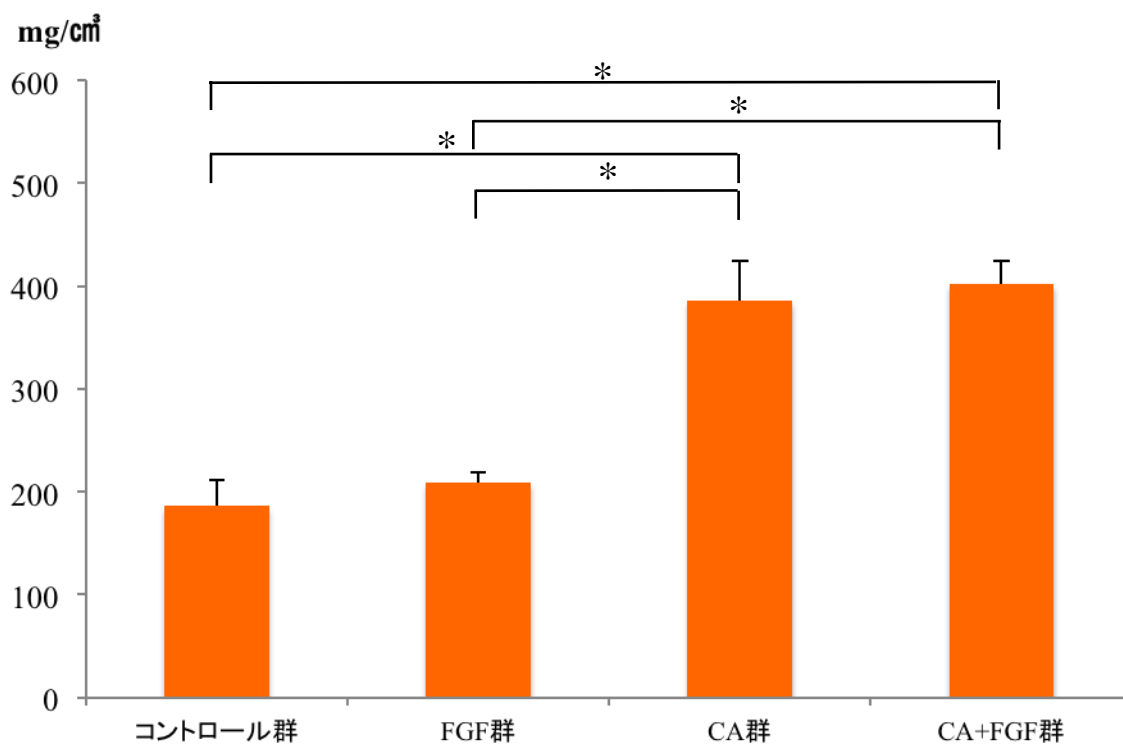


図 5 BMD ((新生骨 + CA の質量) / 欠損部体積)

* $P < 0.05$

3. 組織学的観察

1) コントロール群

炎症性細胞は認められなかった。既存骨から連続した新生骨が認められた。インプラント体との接触も認められた(図6)。

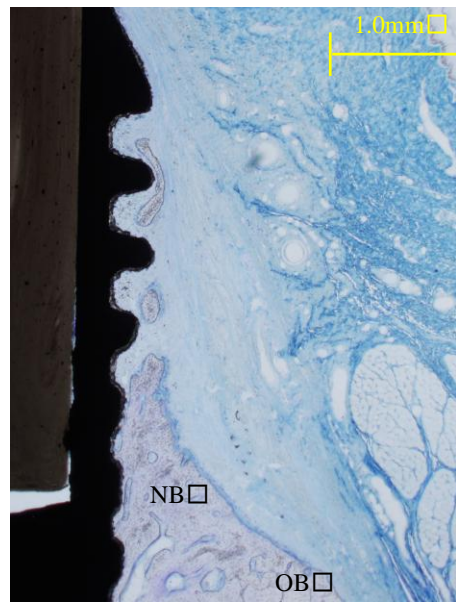


図6 コントロール群の組織像

新生骨が欠損底部でインプラント体に接触している。

NB:新生骨, OB:既存骨

2) FGF 群

炎症性細胞は認められなかった。既存骨から連続した新生骨が認められた。インプラント体との接触も認められた。第2スレッドの高さまで新生骨が認められた(図7)。

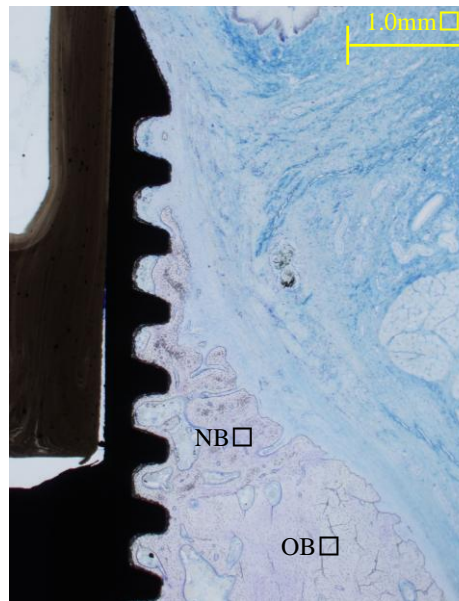


図 7 FGF 群 の 組 織 像

第2スレッドの高さまで新生骨が認められる。

NB:新生骨, OB:既存骨

3)CA 群

残存した CA 顆粒が多数認められた。新生骨はインプラント体上端付近まで認められたが骨梁間が広がった。インプラント体側に著明な骨の造成を認め頰側で多くの CA 顆粒の残存が認められた(図 8)。

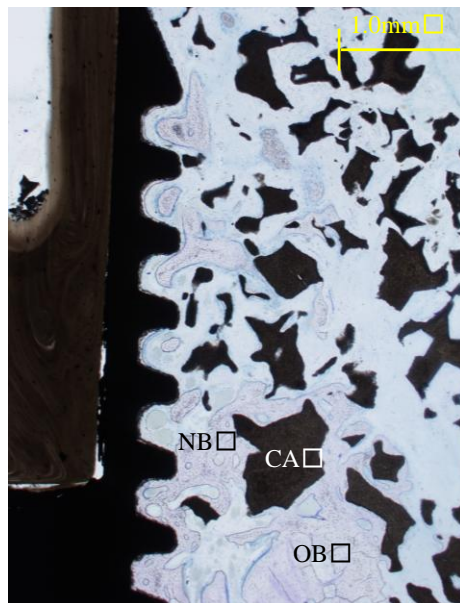


図 8 CA 群の組織像

全スレッドに新生骨が認められる。

NB:新生骨, OB:既存骨

4) CA+FGF 群

著明な新生骨の造成を認めた。新生骨はインプラント体上端まで造成を認め骨梁間の狭い緻密な骨が観察された。CA 顆粒の残存が認められたが、著明な炎症性細胞は認められなかった(図 9)。

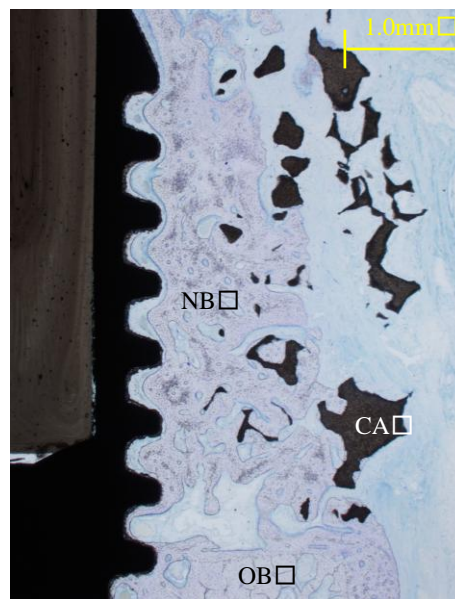


図 9 CA+FGF 群の組織像

著明な新生骨の造成を認める。

NB:新生骨, OB:既存骨

3. 新生骨量

新生骨量は、コントロール群は $26.4 \pm 11.3\%$ 、FGF群は $21.1 \pm 6.5\%$ 、CA群は $24.8 \pm 2.9\%$ 、CA+FGF群は $48.8 \pm 7.8\%$ であった。各群間で比較すると CA+FGF群に対してコントロール群、FGF群、CA群間に有意差が認められた ($P < 0.05$) (図 10)。

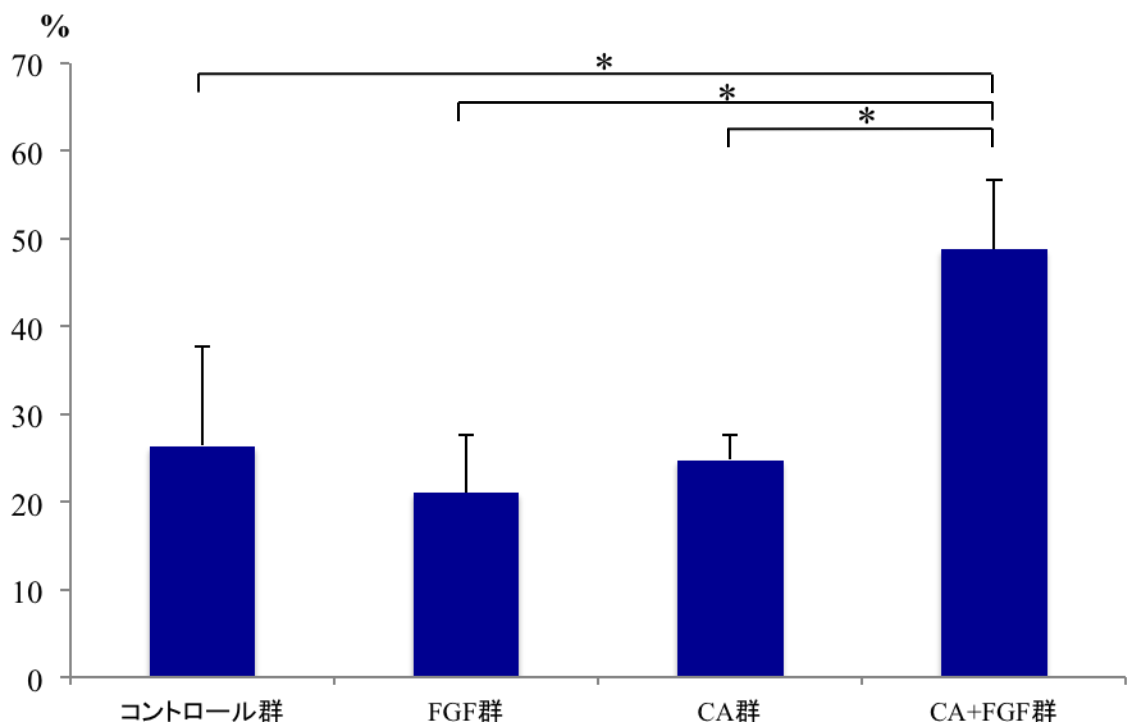


図 10 新生骨量 (新生骨の面積 / 欠損部の面積)

* $P < 0.05$

4. 新生骨高さ

新生骨高さは，コントロール群は 3.5 ± 0.7 mm，FGF群は 3.1 ± 0.9 mm，CA群は 5.4 ± 0.8 mm，CA+FGF群は 5.9 ± 0.3 mmであった．各群間で比較するとコントロール群に対して CA群，CA+FGF群間に有意差が認められた ($P < 0.05$)．FGF群に対して CA群，CA+FGF群間にも有意差が認められた ($P < 0.05$) (図 11)．

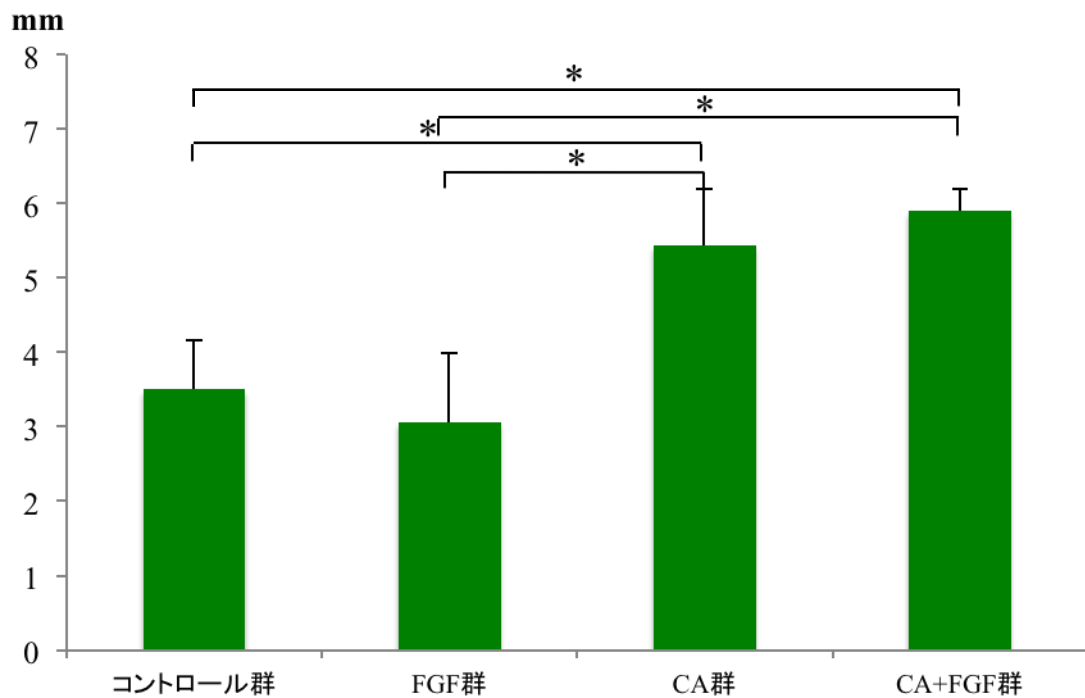


図 11 新生骨高さ (母床骨縁 - 新生骨縁までの距離)

* $P < 0.05$

5. CA 残存率

CA 残存率は、CA 群は $21.1 \pm 2.7\%$ 、CA+FGF 群は $11.1 \pm 4.1\%$ であった。CA+FGF 群の CA 残存率は CA 群と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$) (図 12)。

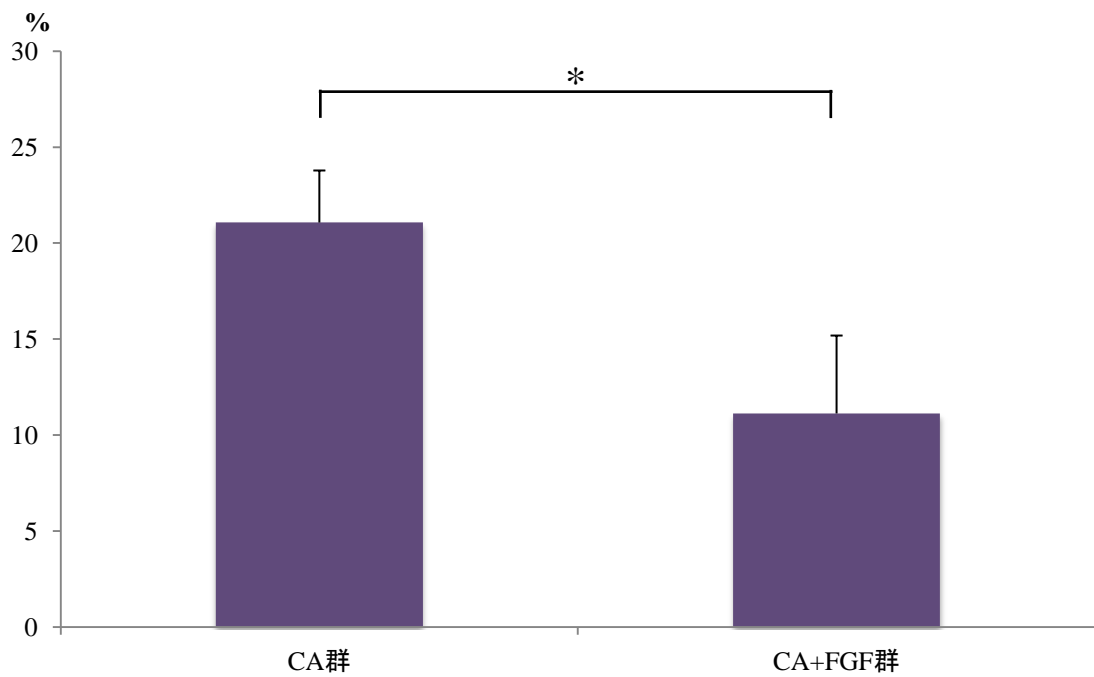


図 12 CA 残存率 (残存 CA の面積 / 欠損部の面積)

* $P < 0.05$

考察

インプラント体周囲骨欠損における増殖因子と骨補填材を組み合わせた各種の骨造成法が考案されており、Chooら¹⁾は β -TCPと血小板由来増殖因子(PDGF)の複合材を使用し、 β -TCP単体と比較して骨再生が増強されたと報告している。また、Merawら²⁾はリン酸カルシウムセメントとBMP-2, TGF- β , PDGF, bFGFを組み合わせて使用し、リン酸カルシウムセメント単体より有意にインプラントに接する骨量が増加したと報告している。

本実験ではCA-bFGF複合体をインプラント体周囲骨欠損に使用した。

術後8週の μ -CT画像上でCA群, CA+FGF群ではCA顆粒の残存が認められた。

BMDはCA群とCA+FGF群で有意に高い値が認められた。両群間に有意差は認められなかった。CAを含む硬組織が形成され、インプラント体を支持する硬組織が多く増生されたと考えられる。

組織学所見ではCA群およびCA+FGF群で著明な新生骨の増生が認められ、CA顆粒の残存が認められた。炎症性細胞は認められず、欠損は新生骨とCA顆粒で満たされていた。CAの生体親和性、高い骨伝導性が示された。

新生骨量がCA+FGF群で有意に高い値が認められた

のは bFGF を添加したことで骨新生が促進したことによると考えられる。CA は HA, β -TCP に比べ極めて微細な結晶でできていることに加え、低温で焼結できる²⁴⁾。このため焼結 CA の多孔壁は微細な焼結粒で構成され、裂溝、凹部などが多数存在する¹²⁾。そのため、多孔体 CA は効率よく成長因子、骨芽細胞などを保持する優れた担体となると考えられる。添加された bFGF の放出速度は不明であるが、骨芽細胞の分化を促進し、CA がスキャフォールドとして機能した結果、それぞれを単体で使用した場合よりも骨の新生が促進されたと考えられる。また、bFGF は血管新生を促進することが知られており¹⁸⁾、栄養血管の増加が早期の骨増生を促進したと考えられる。

新生骨高さが CA 群, CA+FGF 群で有意に高い値を示したのは CA がスキャフォールドとして骨再生のスペースを保持し、良好な骨伝導能を有したことによると考えられる。

bFGF 群では新生骨量, 新生骨高さ共にコントロール群と有意差が認められなかった。これは bFGF を生理食塩水に溶解し液状で使用したため、欠損内に停滞する期間が短かったこと、スキャフォールドがないため欠損内が軟組織で修復され骨再生のスペースが得られなかったことに起因すると考えられる。

CA 残存率は CA 群に対して CA+FGF 群で有意に低い値を認めた。ウサギ由来の破骨細胞培養系において、

CA は骨片とほぼ同程度に吸収されることが明らかになっている²⁵⁾。CA, HA, β TCP, Ti 基盤上で破骨細胞を培養し破骨細胞のマーカー遺伝子の産生量を測定した研究でも V-ATPase, カテプシン K および TRAP-mRNA の産生量は CA で有意に高いことが報告されており, CA が破骨細胞性吸収性に富むことが確認されている²⁶⁾。CA をウサギの膝骨に埋入した実験においても, CA は破骨細胞によって吸収されることが確認された²⁷⁾。bFGF によって骨芽細胞, 破骨細胞が活性化されることが知られており²⁸⁾, これらのことにより, 本研究においても CA の吸収, 骨への置換を促進したと考えられる。

以上よりインプラント体周囲骨欠損に対して, CA-bFGF 複合体は早期の骨新生を促すことが示唆された。

結論

イヌ下顎第3, 4前臼歯部に骨欠損を作製しインプラント体を埋入後, 欠損部にCA-bFGF複合体を填入して骨増生を試み, その有用性を検討した. その結果以下の結論を得た.

1. 填入後8週ではCA群, CA+FGF群にCA顆粒の残存が認められた.
2. インプラント体周囲ではBMDはコントロール群, FGF群に対してCA群, CA+FGF群で高い値を示した.
3. インプラント体周囲では新生骨量はCA+FGF群が最も高かった.
4. インプラント体周囲では新生骨高さはコントロール群, FGF群に対してCA群, CA+FGF群で高い値を示した.
5. インプラント体周囲ではCA残存率はCA群に対してCA+FGF群で低い値を示した.

以上の結果から, CA-bFGF複合体はインプラント体周囲骨欠損部の骨増生に有用であることが示唆された.

引用文献

- 1) Choo T, Marino V and Bartold PM. Effect of PDGF-BB and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on bone formation around dental implants: a pilot study in sheep. *Clin Oral Impl Res.* 2013;24:158-166.
- 2) Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM and Sioussat TM. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J Periodontol.* 2000;71:8-13.
- 3) Park J, Lutz R, Felszeghy E, Wiltfang J, Nkenke E, Neukam FW and Schlegel KA. The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. *Biomaterials.* 2007;28:2772-2782.
- 4) Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato T, Kawase T, Saito Y, Wolff LF and Yoshie H. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *J Periodontol.* 2005;76:890-898.
- 5) Stavropoulos A, Windisch P, Szendrői-Kiss D, Peter R, Gera I and Sculean A. Clinical and histologic

- evaluation of granular beta-tricalcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects: a report on five cases. *J Periodontol*. 2010;81:325-334.
- 6) Doi Y, Moriwaki Y, Aoba T and Kani M. ESR on the hydroxyl ion vacancies in the apatites. *Calcif Tissue Int*. 1982;34:47-51.
- 7) 幸田起英, 土井 豊, 志水雄一郎, 若松宣一, 足立正徳, 後藤隆奏, 亀水秀男, 森脇 豊. 炭酸含有アパタイトの焼結-弱酸性での焼結体の溶解挙動-. 歯材・器. 1997;16:107-113.
- 8) Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res*. 1981;157:259-278.
- 9) De Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials*. 1980;1:47-50.
- 10) 山口健一. 骨補填材としての炭酸含有アパタイトの有用性に関する基礎的研究. 岐歯学誌. 2005;32:47-65.
- 11) 土井 豊. 炭酸含有アパタイトバイオセラミックス. 日歯理工会誌. 2014;33:65-71.
- 12) Kanayama K, Kitago M, Shiraki M, Doi Y and Shibutani T. Induction of new bone by basic FGF-loaded porous carbonate apatite implants in femur defects in rats. *Clin Oral Impl Res*.

- 2009;20:560-565.
- 13) Choi SH, Kim CK, Cho KS, Huh JS, Sorensen RG, Wozney JM and Wikesjö UM. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge(rhBMP-2/ASC) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. *J Periodontol.* 2002;73:63-72.
- 14) Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK and Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet derived growth factor-bb(rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol.* 2003;74:1282-1292.
- 15) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T and Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor(bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodont Res.* 2003;38:97-103.
- 16) Iwasaki M, Nakahara H, Nakata K, Nakase T, Kimura T and Ono K. Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. *J Bone Surg.* 1995;77:543-554.
- 17) Robinson D, Bab I and Nevo Z. Osteogenic growth

- peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 1995;10:690-696.
- 18) 長濱悦子, 佐藤淳一, 川口浩司. bFGF/コラーゲンスポンジ複合体による歯周組織再生修復に関する実験的研究. *鶴見歯学.* 2001;27:171-186.
- 19) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M and Okada H. Periodontal regeneration by FGF-2(bFGF) in primate models. *J Dent Res.* 2001;80:2075-2079.
- 20) Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, Furuuchi T, Fukuda M, Noguchi T, Shibutani T, Iwayama Y, Takashiba S, Kurihara H, Ninomiya M, Kido J, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Hara Y, Izumi Y, Hirofuji T, Imai E, Omae M, Watanuki M and Murakami S. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *Plos One.* 2008;3:e2611.
- 21) Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Ykota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Shibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Ioroi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H,

- Kunimatsu K, Kawanami M, Fujii T, Furuuchi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M and Murakami S. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res*. 2011;90:35-40.
- 22) Oi Y, Ota M, Yamamoto S, Shibukawa Y and Yamada S. β -tricalcium phosphate and basic fibroblast growth factor combination enhances periodontal regeneration in intrabony defects in dogs. *Dent Mater J*. 2009;28:162-169.
- 23) Doi Y, Koda T, Wakamatsu N, Goto T, Kamemizu H, Moriwaki Y, Adachi M and Suwa Y. Influence of carbonate on sintering of apatites. *J Dent Res*. 1993;72:1279-1284.
- 24) 土井 豊, 幸田起英, 足立正徳, 若松宣一, 後藤隆泰, 亀水秀男, 森脇 豊. 炭酸含有アパタイトの焼結. 歯材・器. 1995;14:313-320.
- 25) Doi Y, Iwanaga H, Shibutani T, Moriwaki Y and Iwayama Y. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *J Biomed Mater Res*. 1999;47:424-433.
- 26) Kanayama K, Sriarj W, Shimokawa H, Ohya K, Doi Y and Shibutani T. Osteoclast and osteoblast activities on carbonate apatite plates in cell

- cultures. *J Biomater*. 2011;26:435-449.
- 27) Hasegawa M, Doi Y and Uchida A. Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits. *J Bone Joint Surg*. 2003;85:142-147.
- 28) Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, Ogata N, Shimokawa T, Takato T, Nakamura K and Kawaguchi H. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoclasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res*. 2001;16:2074-2081.