

博士學位論文

生体材料の性質の違いが骨芽細胞の活性
に与える影響

—細胞内遊離カルシウムの変化について—

塩路 浩也

平成9年度提出

(岩手医科大学)

①

博士學位論文

生体材料の性質の違いが骨芽細胞の活性
に与える影響

—細胞内遊離カルシウムの変化について—

塩路 浩也

平成9年度提出

(岩手医科大学)

表題：生体材料の性質の違いが骨芽細胞

の活性に与える影響

—細胞内遊離カルシウムの変化について—

The Effect of Biomaterials on the Activities
of Osteoblasts

-Alterations of Intracellular free Calcium-

著者：塩路浩也

Hiroya Shioji

所属：岩手医科大学歯学部歯科補綴学第二講座

(指導：石橋寛二教授)

Department of Fixed Prosthodontics School of
Dentistry, Iwate Medical University

(Director: Prof. Kanji Ishibashi)

Abstract:

The purpose of this study was to clarify how different components of biomaterials affect cell activities of osteoblasts. In this experiment, osteoblasts were cultured on titanium and bioactive glass, and the intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) that plays an important role in the intracellular signalling system was measured. In the early stages of the culture, the osteoblasts tended to increase $[Ca^{2+}]_i$ when cultured on bioactive glass more than on titanium. This indicated that direct contact of osteoblasts to bioactive glass was essential to generate the observed effect on $[Ca^{2+}]_i$. Furthermore, elevation of $[Ca^{2+}]_i$ did not occur when extracellular calcium was supplied. These results suggested that bioactive glass affected the intracellular signalling system of the osteoblasts when in contact with bioactive glass.

Key words: bioactive glass, intracellular free calcium
, osteoblast

英文抄録に対する和文

本研究の目的は、生体材料の性質の違いが骨芽細胞の活性に違いを生じさせる機構の一端を明らかにすることである。チタンおよび生体活性ガラス上で細胞を培養し、細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしている細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) について測定を行った。

その結果、BAG上では、Ti上に比べ、 $[Ca^{2+}]_i$ が培養初期において上昇した。この現象は細胞がBAGに接触していることが必要で、細胞外カルシウムの上昇のみでは同様な現象は起こらなかった。

以上のことから、BAGは直接的に接する骨芽細胞の細胞内情報伝達系に、何等かの影響を与えたものと考えられる。

I. 緒言

現在，口腔インプラントは高い予知性をもった治療術式として確立されつつある．口腔インプラントに汎用されている生体材料は，骨組織の反応性の差異により生体不活性材料と生体活性材料に大別できるが，生体材料/骨組織の界面の詳細については未だ不明な点も多い．なかでも，これらの材料の性質の差異が周囲の骨組織の反応に違いを生じさせる機構に関してはほとんど解明されていない．骨形成において中心的役割を果たしている骨芽細胞の生体材料上における動態を解明することは，口腔インプラント周囲の骨形成あるいは骨結合をコントロールするうえで重要である．

今回，生体材料の性質の違いが骨芽細胞の活性にどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とし，bioinertならびにbioactiveな材料上で骨芽細胞を培養し，細胞内の情報伝達系において重要な役割を果たしている細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)¹⁾ について比較検討した．

II. 材料ならびに方法

1. 被験材料の調整

bioinertな材料としてチタン (Titanium:Ti, JIS2種)，bioactiveな材料として $SiO_2-P_2O_5-CaO-Na_2O$ 系の生体活性ガラス (bioactive glass: BAG, SE-51, 株式会社ニコン社製)

2), コントロールとしてカバーガラス (MATSUNAMI) を用いた. Ti は表面を耐水ペーパーで # 1500 まで研磨し平滑面とし, BAG およびカバーガラスは鏡面研磨されたものを使用した. 被験材料を $10 \times 10 \times 1$ mm の板状に調整し, Ti およびカバーガラスは, 15 分間滅菌蒸留水で超音波洗浄後, 121°C で 20 分間高圧蒸気滅菌, BAG はニコンにて水洗, 乾燥, 乾熱滅菌されたものを使用した.

2. 細胞の採取および培養法

骨芽細胞は, ラットの大腿骨から Maniopoulos ら³⁾の方法に準じて採取した. すなわち, 生後 40~43 日齢, 体重 110~120 g の Wistar 系雄性ラットを頸椎脱臼により屠殺後, 無菌的に両側大腿骨を摘出し, 抗生物質 (1.0 mg/ml penicillin G, 0.5 mg/ml gentamycin, 3.0 μ g/ml fungizone) を含んだ α -minimum essential medium (GIBCO, 以下 α -MEM と記す) で 3 回洗浄した. 細胞は大腿骨骨端を切離した後, α -MEM に 1/10 濃度の上記抗生物質, 15% 牛胎児血清 (GIBCO), 50 μ g/ml ascorbic acid (GIBCO), 10 mM β -glycerophosphate (SIGMA) および 10^{-8} M dexamethasone (SIGMA) を添加した培養液を 10 ml シリンジ (Falcon) を用いて大腿骨骨端を切離した骨断端より注入し細胞を抽出した. その後, 培養用フラスコ (Falcon) を用いて 37°C , 95% air, 5% CO_2 混合気相下で 6 日間培養した. その間 2 日おきに培地交換を行った. 細胞の継代は, Dulbecco's phosphate buffered

saline を用いて 2 回洗浄後, 0.02 %trypsin を用いて細胞を剥離した. 遠心分離 ($\times 1000$, 5 分, 室温) によって集めた培養細胞を, hemocytometer を用いて 1×10^5 cells/ml の細胞浮遊液に調整後, 24 multi-well plate (Nunc) の well 底部に静置した各材料上に半球状となるように 200μ l/well ずつ分注し, 30 分後上記培養液を 800μ l 加え培養を行った. 培養後 1, 3, 6, 8, 12, 24 時間目に各生体材料上における $[Ca^{2+}]_i$ の測定を行った. なお, 培養 1, 24 時間目の各材料上の細胞については, 蛍光像の観察もあわせて行った. さらに各生体材料と細胞の接触が $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響について検討するため, ① Ti 上, ② BAG 上, ③ 培養液中に BAG を浸漬した Ti 上 (図 1), ④ カバーガラス上 (コントロール) の 4 条件にて細胞を 12 時間培養し $[Ca^{2+}]_i$ の測定を行った. また, 細胞外カルシウムの $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響については高濃度 (5mM, 10mM $CaCl_2$) カルシウム培養液中で Ti 上の細胞を 12 時間培養し, $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定することにより検討した.

3. 細胞内カルシウムイオン濃度の測定

$[Ca^{2+}]_i$ の測定は, 培養終了後, 細胞の付着した各材料上より medium を吸引し, 5μ M Fura-2AM (DOJIN) を添加した 10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose, 0.1 % BSA 含有 (pH 7.4) 緩衝液中で $37^\circ C$, 30 分間インキュベーションした. 次に上記の HEPES

Bufferで数回洗浄後，各生体材料から細胞を剥離することなくカバーガラス上にスぺーサーを介し静置して $[Ca^{2+}]_i$ の測定を行った(図2)．測定には，細胞内カルシウムイオン濃度画像解析システム(ARGUS-50/CA;浜松ホトニクス社製)を用いて，励起波長340 nm及び380 nm, 蛍光測光波長500 nmにて $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測光し， $[Ca^{2+}]_i$ を疑似カラーにて表示した(図3)． $[Ca^{2+}]_i$ はTsienら⁴⁾の方法にしたがって算出し，各群の細胞12個を無作為に抽出して測定に供した．平均値と標準偏差を求め，Mann-Whitney U testを行った． Ca^{2+} のキャリブレーションはCalcium Calibration Buffer Kit #2 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)を用いて行った．

III. 結果

1. 各生体材料上における骨芽細胞の形態学的観察

TiおよびBAG上にて骨芽細胞を培養した後，1時間および24時間目の蛍光像の観察を行った．培養1時間目では，各材料間で細胞の形態的差異はなく，細胞はともに細胞突起様の形態をもたない球形を呈していた．培養24時間目では各材料上の細胞は多角形を呈し細胞突起様の形態が認められるが，培養1時間目と同様に両材料間で形態的差異は認められなかった(図4)．

2. 各生体材料上における $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化

各生体材料上で骨芽細胞を培養し 24 時間目までの $[Ca^{2+}]_i$ を経時的に測定した。培養 1 時間後 BAG 上の骨芽細胞では 121 ± 95.3 nM で Ti の 55 ± 7.4 nM と比較して 2.2 倍の高値を示した。その後も BAG は 3 時間目～24 時間目で $90 \sim 140 \pm 87.1$ nM を示し、 $[Ca^{2+}]_i$ の持続的上昇が起こっていた。Ti では 24 時間を通してほとんど変動がなく $55 \sim 65 \pm 27.3$ nM の間で推移した (図 5)。

3. 各生体材料と細胞の接触が $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響

BAG 上の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は、Ti 上、カバーガラス上および BAG を培養液中に浸漬した Ti 上における細胞の $[Ca^{2+}]_i$ と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。しかし、Ti 上、カバーガラス上および BAG を培養液中に浸漬した Ti 上の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の間に有意な差は認められなかった。(図 6)。

4. 細胞外カルシウムが $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響

Ti 上に細胞を播種し、通常の培養液および $CaCl_2$ 濃度を 5 mM, 10 mM に調整した培養液中で培養を行い、培養 12 時間目に $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。通常の培養液中において $[Ca^{2+}]_i$ は 65 ± 27.3 nM, $CaCl_2$ 濃度 5 mM で 56 ± 10.6 nM 10 mM で 58 ± 15.7 nM であり、通常の培養液と $CaCl_2$ 濃度 5 mM および 10 mM との間に有意な差は認められなかった (図 7)。

IV. 考察

口腔インプラントの臨床において，早期に骨結合を獲得することは，治療を成功に導くために重要である．Tiは生体親和性，機械的強度に優れた材料であるが，生体内に埋入後，osseointegrationを獲得するまで3～6ヶ月の治療期間が必要とされている^{5,6)}．近年，より早期の骨結合の獲得，適応範囲の拡大を目的としてTi表面にハイドロキシアパタイト（HA）をコーティングする各種方法が検討されている^{7,8,9)}．梶村ら¹⁰⁾，有住ら¹¹⁾は，Tiインプラントを放電陽極酸化，水熱処理することによりTiO₂表面にHAの超薄層を形成させたインプラントは純Tiインプラントに比較して顎骨埋入後の新生骨の形成が速いことを確認している．BAGにおいても，Tiに比べ新生骨の形成が速まるとされている¹²⁾．BAGはガラス内部よりNa, Ca, Pイオンなどを溶出する特徴を有し，強度的にはTiに劣るもののそのbioactivityの高さ，骨と早期に化学結合するという点で興味深い性質を有している¹³⁾．骨芽細胞を用いたinvitroの研究では，Tiに比べてBAG上でDNA合成能，ALP-ase活性，石灰化物形成能の亢進が起こることが確認されており¹⁴⁾，TiおよびBAG両生体材料間で骨芽細胞の活性に及ぼす影響に違いがみられることは明らかである．しかしBAG上でこのような細胞活性の亢進が起こる機序についてはほとんど解明されていない．bioactiveな材料が骨芽細胞の細胞活性の亢進を起こす機序の解明は，生体材料のbioactivityの本態を明らかにする手がかりとなり，より早期の骨結合

の獲得，適応範囲の拡大を図るうえで重要な課題の一つと考えられる。

本研究では，bioinertな材料としてTi，bioactiveな材料としてBAGをとりあげ，骨芽細胞内の情報伝達系において重要な役割を果たしている $[Ca^{2+}]_i$ に各生体材料が与える影響を検討した。

今回，Tsienら¹⁵⁾によって開発された蛍光顕微画像解析法を応用して $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。この方法では細胞に固定という非生理的な処理を加えることなく，生きた状態の細胞の機能についての分析が可能となる。これまでに骨格筋細胞，神経細胞，免疫細胞，卵細胞等の機能の解析が行われてきた¹⁶⁾。本研究では，生体材料が骨芽細胞に及ぼす影響を検討するため，生体材料上から細胞を剥離することなく $[Ca^{2+}]_i$ を測定することが可能であった。この方法により，生理的な状態で生体材料が細胞に及ぼす影響を分析できたものと考えられる。

細胞の運動，分泌，分裂，死において $[Ca^{2+}]_i$ が重要な役割を演じていることが明らかにされてきた¹⁷⁾。生きている細胞は， $[Ca^{2+}]_i$ を 10^{-7} Mレベルあるいはそれ以下に保っている。そして何等かの刺激が与えられたとき $[Ca^{2+}]_i$ は上昇する。それは細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位からの放出，あるいは細胞外からの流入によって引き起こされ，次いで種々の細胞活動を賦活化する¹⁸⁾。

骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に関する最近の知見から，細胞外液

カルシウムに応答し, $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する^{19,20)}, 骨芽細胞による破骨細胞機能の抑制は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を伴う²¹⁾, 骨芽細胞を低 Ca 環境下におくと $[Ca^{2+}]_i$ の低下が起こる²²⁾, 電磁場刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が生じる²³⁾等の報告があり, 細胞活動における $[Ca^{2+}]_i$ の役割が注目されている.

今回の実験結果では, 休止状態における骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は 61 ± 8.2 nM であった. ラット頭蓋冠由来骨芽細胞は 124 ± 7.5 nM²³⁾, Rat osteosarcoma cell line である ROS17/2.8 と ROS25/1 ではそれぞれ 363 ± 42 nM と 109 ± 15 nM と報告²⁴⁾されている. Fura-2 などの蛍光プローブを用いた $[Ca^{2+}]_i$ 測定方法では, 光路系の相違やキャリブレーションのやり方の違いにより, 算出された値が異なってくる. また細胞系が異なるため, 今回得られた測定値と過去に報告された測定値とを単純に比較して相違を論じることにはできないが, 今回の実験において休止状態における骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ はごく低い値に保たれていることを確認した.

各生体材料上における骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は Ti では培養期間を通してほとんど変化が認められなかった. bioinert な材料である Ti は材料表層に TiO_2 からなる不動態化膜を形成することにより生体内あるいは疑似体液中ではきわめて安定な状態にある²⁵⁾. 従って骨芽細胞の細胞活動に与える影響も少なく, $[Ca^{2+}]_i$ も常に低い状態を維持していたと考えられる. これに対して BAG 上の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は培養 1

時間目において 121 ± 95.3 nM で Ti の 2.2 倍であり，以降も培養 24 時間を通して 1.6 ~ 2.3 倍と高い値を示した。

BAG の表層反応の過程で Ca, Na, P イオンが溶出することが知られている²⁶⁾。この BAG 表層におけるイオン溶出反応は細胞の存在の有無に関係なく起こる。BAG を培養液中に浸漬した状態でも同様な材料表層の変化が起こっていたものと考えられるが，同液中に浸した Ti 上の骨芽細胞は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられなかった。従って BAG より溶出した物質が遠隔的に骨芽細胞へ働きかけるとは思われぬ。Shen ら²⁷⁾ はテトラサイクリンのラベリング法を用いた骨芽細胞による石灰化物の形成量，形成速度を調べたところ，BAG の生体活性能は細胞と材料との直接的な接触が必須条件であるとしており，今回の結果も $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に細胞と BAG との直接的な接触が必要であることを示している。そこで，BAG 表層反応の過程で溶出する Ca, Na イオンと $[Ca^{2+}]_i$ との関連について検討した。細胞外カルシウムの上昇は，骨芽細胞の増殖能に対する促進的作用²⁸⁾，破骨細胞形成能の抑制²⁹⁾，骨芽細胞の化学走化性の惹起²¹⁾を起すことが報告されている。細胞外 Ca の影響を調べる目的で高濃度カルシウム培養液中で Ti 上の細胞を培養し $[Ca^{2+}]_i$ の測定を行った。培養液の $CaCl_2$ 濃度が 5 mM, 10 mM において通常の $CaCl_2$ 濃度 (2 mM) と比べて有意な差はなかった。BAG 表層からの Ca イオンの溶出はわずかであり，大部分が $CaO-P_2O_5$ となる。今回，培養液の $CaCl_2$ 濃度が通

常の5倍においても $[Ca^{2+}]_i$ に変化がみられなかったことから、BAGより培養液中に溶出したCaイオンが $[Ca^{2+}]_i$ に影響を与えた可能性は低いと考えられた。

材料表層からのNaイオンの溶出は培養液のpHを上昇させる。培養液のpHの上昇は、線維芽細胞に対しては増殖を抑制し^{30, 31)}、一方骨芽細胞に対しては増殖を抑制しない³²⁾。また、Naイオンの溶出による弱アルカリ環境が骨芽細胞のALP-ase活性を促進する可能性が指摘されている³²⁾。しかしながらBAGに細胞が直に接する場合には $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が生じたのに対し、BAG浸漬下におけるTi上で培養した細胞では培養液のpHの上昇が起こっていると考えられる³²⁾にもかかわらず $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められなかった。

以上のことからBAG表層より培養液中に溶出したCaあるいはNaイオンが細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた可能性は低いと思われた。Daviesら³³⁾は、培養細胞を用いた組織学的分析から生体材料上における石灰化の過程を、①骨芽細胞による蛋白の分泌、②石灰化の始まり、③結晶の成長、④コラーゲン繊維の組み立ての4段階にわけた。これらの過程で最初に分泌される骨基質蛋白は、細胞が基質および生体材料に接着し、細胞活動を営む上で重要であると考えられている³⁴⁾。さらに骨基質蛋白は、単に細胞接着としての機能だけでなく、細胞の接着という機能を通じて外界を認識する、あるいは外界の情報を細胞内に伝達するという機能をもっていることが明らかになってきた³⁵⁾。 $[Ca^{2+}]_i$

の上昇が BAG と骨芽細胞の直接的な接触があるときのみ起こったことから BAG 上の細胞は，直接あるいは細胞外基質を介して何らかの BAG からの影響を受けていた可能性が考えられる。

今回の実験からは BAG に直に接した細胞に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こる機構を解明するには至らなかった。しかし，BAG 上の細胞は培養後 1 時間で $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こっていたことから，増殖分化機能の亢進が起こる以前に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を伴ったなんらかの細胞活動が賦活化されたと思われる。これら *in vitro* の結果を安易に *in vivo* にあてはめるのは早計であるが，実際の BAG による骨形成促進作用と考えあわせると，口腔インプラント埋入後の骨形成においても同様の現象が起きている可能性は高いと思われる。

V. 結論

今回，bioinert なチタン上ならびに bioactive な生体活性ガラス上で骨芽細胞を培養し，生体材料の性質の違いが細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響について比較検討した結果，以下のような結論を得た。

1. 骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は，チタン上では変化が認められず、生体活性ガラス上では培養期間を通してチタンに比べて高値を示した。
2. $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には生体活性ガラスと骨芽細胞との直接的な接触が必要であった。

3. 生体活性ガラスから培養液中に溶出したカルシウムイオンが骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こすことはなかった。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました石橋寛二教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を進めるに当たり多大のご指導とご教示をいただきました本学医学部解剖学第二講座佐藤洋一教授に厚くお礼申し上げます。ならびに懇切なるご指導をいただいた本学歯学部歯科補綴学第二講座伊藤創造博士に心よりお礼申し上げます。またご援助，ご協力をいただきました当講座の諸先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 佐藤洋一, 西村朋子, 木村桂ほか. マウス小腸ブルナー腺における細胞内カルシウム動態の画像解析. 解剖学雑誌 71:692, 1996.
- 2) 山室隆夫. 生体材料と骨形成の様式. 生体材料 7:19-23, 1989.
- 3) Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res 254:317-330, 1988.
- 4) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RYA. new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260:3440-3450, 1985.
- 5) Brånemark PI, Zarb G, Albrektsson T et al. Tissue integrated prostheses, Osseointegration in clinical dentistry 11-76, Chicago: Quintessence Publishing Co, 1985.
- 6) Adell R, Eriksson B, Lekholm U et al. A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. Int J Oral Maxillofac Implants 5:347-359, 1990.
- 7) Denissen HW, Kalk W, Nieuport HM et al. Mandibular bone response to plasma-sprayed coatings of hydroxyapatite. Int J Prosthodont 3:53-58, 1990.

- 8) Cook SD, Thomas KA, Dalton JE et al. Hydroxyapatite coating of porous implants improves bone ingrowth and interface attachment strength. J Biomed Mater Res 26:989-1001, 1992.
- 9) Piattelli A, Trisi P, Emanuelli M. Bone reactions to hydroxyapatite-coated dental implants in humans: Histologic study using SEM, light microscopy, and laser scanning microscopy. Int J Oral Maxillofac Implants 8:69-74, 1993.
- 10) 梶村幸市, 塩山司, 山森徹雄ほか. 水熱処理した陽極酸化 Ti インプラントに関する組織学的研究. 補綴誌 40:946-951, 1996.
- 11) 有住達也, 伊藤創造, 塩山司ほか. 水熱処理した陽極酸化 Ti インプラントの周囲に形成された骨組織の分析 -埋入 4 週後の周囲組織について-. 補綴誌 40:416-422, 1997.
- 12) 二木みか. 骨と生体材料界面の組織学的, 物理的ならびに化学的性状に関する比較研究. 生体材料 12:5-21, 1994.
- 13) Hench LL, Splingter RJ, Allen WC et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. J Biomed Mater Res Symposium No. 2 (Part 1):117-141, 1971.
- 14) 有明徹. 生体材料の性質の違いがラット骨髄間質細胞

の初期石灰化に与える影響 -純チタンと生体活性ガラスの比較研究-. 補綴誌 40:347-356, 1996.

15) Williams DA, Fogarty KE, Tsien RY et al. Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. Nature 318:558-561, 1985.

16) 工藤佳久. 実験医学別冊 バイオマニュアル UPシリーズ 細胞内カルシウム実験プロトコール 東京: 株式会社 羊土社, 1996.

17) Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361:315-324, 1993.

18) Clapham DE. Calcium signalling. Cell 80:259-268, 1995.

19) Donahue HJ, Iijima K, Goligorsky MS et al. Regulation of cytoplasmic calcium concentration in tetracycline-treated osteoclasts. J Bone Miner Res 7:1313-1318, 1992.

20) Kamioka H, Miki Y, Sumitani K et al. Extracellular calcium causes the release of calcium from intracellular stores in chick osteocytes. Biochem Biophys Res Commun 212:692-696, 1995.

21) Sugimoto T, Kanatani M, Kano J. Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the

- formation of osteoclast-like cells. J Bone Miner Res 8:1445-1452, 1993.
- 22) Matsumoto A, Hisada Y. Intracellular free calcium and phosphatidyl inositol-1,4,5-triphosphate in bone cells cultured in a low calcium environment. Journal of Bone and Mineral Metabolism 10:1-7, 1992.
- 23) 佐竹司. 骨芽細胞におけるパルス電磁場の影響-細胞内カルシウムの変化について-. 神奈川歯学 24:692-701, 1990
- 24) Boland CJ, Fried RM, Tashjian AH. Measurement of cytosolic free Ca^{2+} concentrations in human and rat osteosarcoma cells: action of bone resorption-stimulating hormones. Endocrinology 118:980-988, 1986.
- 25) 山室隆夫. 1. 整形外科用生体材料研究の現況と今後の展望. 整形・災害外科 30:1129-1138, 1987.
- 26) Hench LL. Bioceramics :from concept to clinic. J Am Ceram Soc 74:1487-1510, 1991.
- 27) Shen X, Zhong J, Greenspan DC et al. Cell contact to potentiate bone growth in the presence of bioactive glasses. Fifth world biomaterials congress:976, 1996.
- 28) Kanatani M, Sugimoto T, Fukase M et al. Effect of elevated extracellular calcium on the direct and

- proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: its indirect effects via monocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 181:1425-1430, 1991.
- 29) Zaidi M, Datta HK, Patchell A et al. Calcium-activated intracellular calcium elevation: a novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 163:1461-1465, 1989.
- 30) Matsuda T, Yamauchi K, Ito G. The influence of bioglass on the growth of fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 21:499-507, 1987.
- 31) 久保浩二, 柿本隆志, 政信行ほか. 生体活性ガラスへの線維芽細胞の親和性について. *生体材料* 11:85-89, 1993.
- 32) 清水義信, 水沼一昭, 山下忍ほか. 骨改造に対する生体活性ガラス, ハイドロキシアパタイトおよび脱灰凍結乾燥人骨粉の作用. *生体材料* 15:103-112, 1997.
- 33) Davies JE, Lowenberg B, Shiga A. The bone-titanium interface in vitro. *J Biomed Mater Res* 24:1289-1306, 1990.
- 34) Shen X, Roberts E, Peel SAF et al. Organic extracellular matrix components at the bone cell / substratum interface. *Cells and Materials* 3:257-272, 1993.
- 35) 宮坂昌之. 最新医学からのアプローチ②接着分子 3-4

東京：メジカルビュー社，1992.

図表の説明

図 . 1 Culture method of osteoblast with the presence of BAG

BAG 浸漬下での骨芽細胞の培養方法

図 . 2 Analyzing method of $[Ca^{2+}]_i$ of osteoblast

$[Ca^{2+}]_i$ の測定方法

図 . 3 Color imaging of $[Ca^{2+}]_i$ of osteoblast cultured on Ti and BAG

Ti および BAG 上における骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化

図 . 4 Fluorescence image of osteoblast cultured on Ti and BAG

各生体材料上における骨芽細胞の蛍光像

図 . 5 Time course of $[Ca^{2+}]_i$ of osteoblast cultured on Ti and BAG

各生体材料上における $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化

図 . 6 Influence of cell contact on biomaterials to $[Ca^{2+}]_i$

各生体材料と細胞の接触が $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響

図 . 7 Influence of extracellular calcium to $[Ca^{2+}]_i$
細胞外カルシウムが $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響

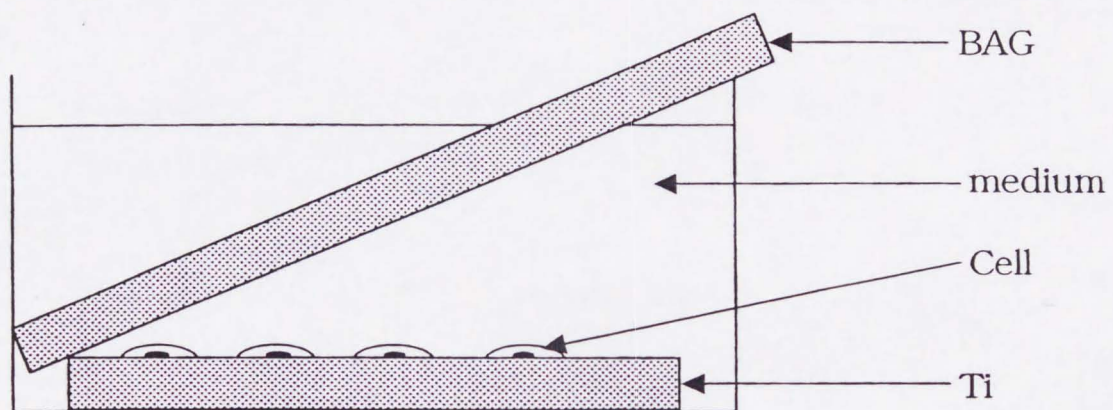


図 . 1 Culture method of osteoblast with the presence of BAG

BAG 浸漬下での骨芽細胞の培養方法

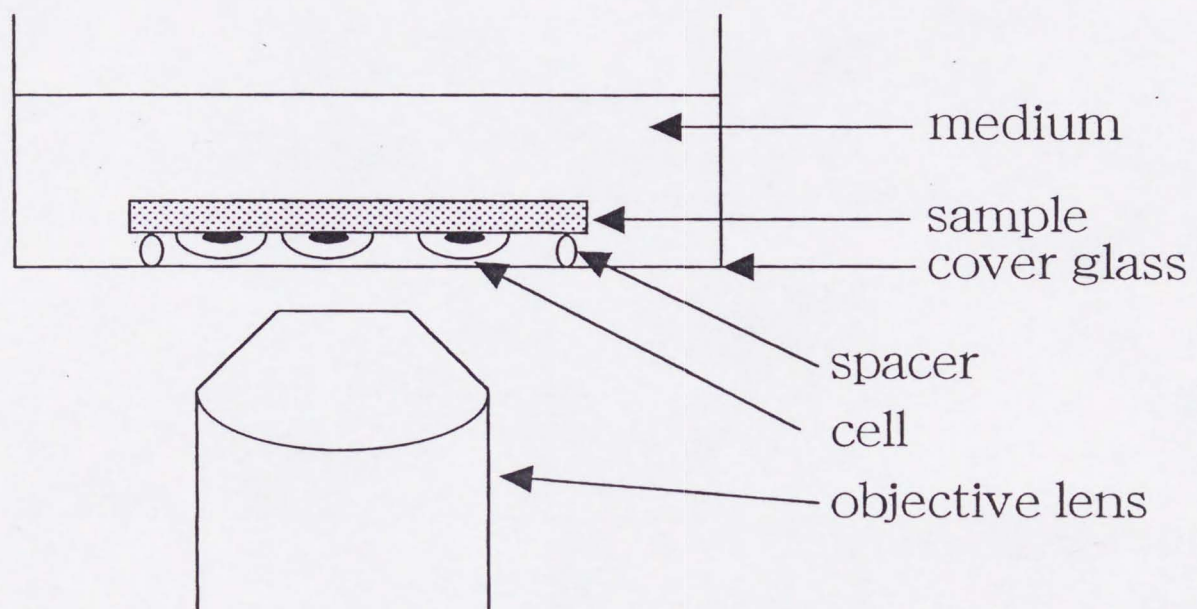


図 . 2 Analyzing method of $[Ca^{2+}]_i$ of osteoblast
 $[Ca^{2+}]_i$ の 測定 方法

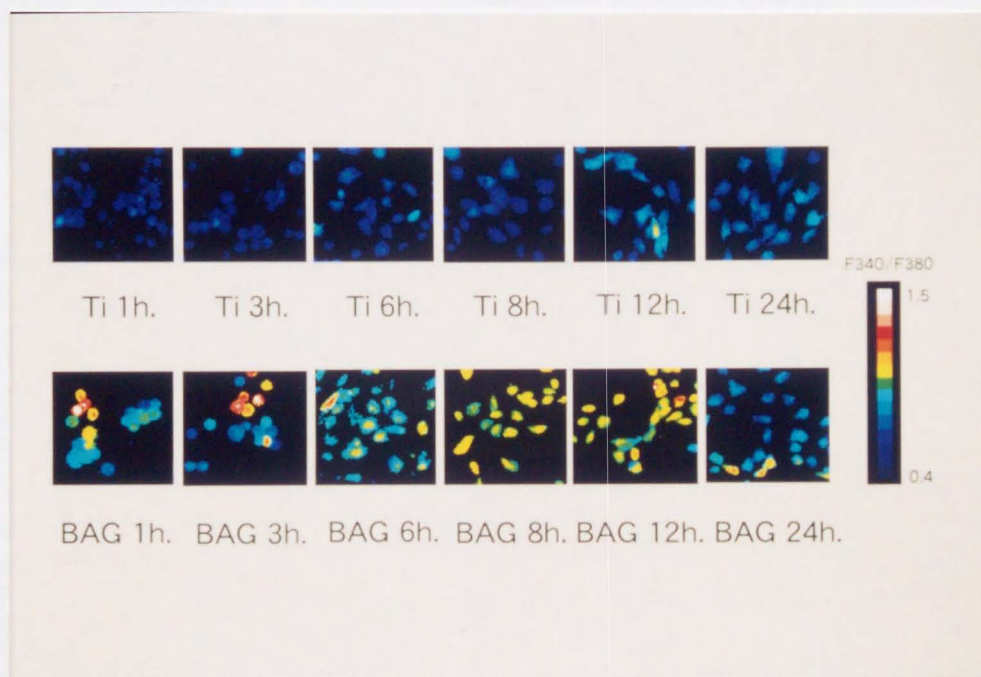


図 . 3 Color imaging of $[Ca^{2+}]_i$ of osteoblast cultured on Ti and BAG

Tiおよび BAG 上における骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化

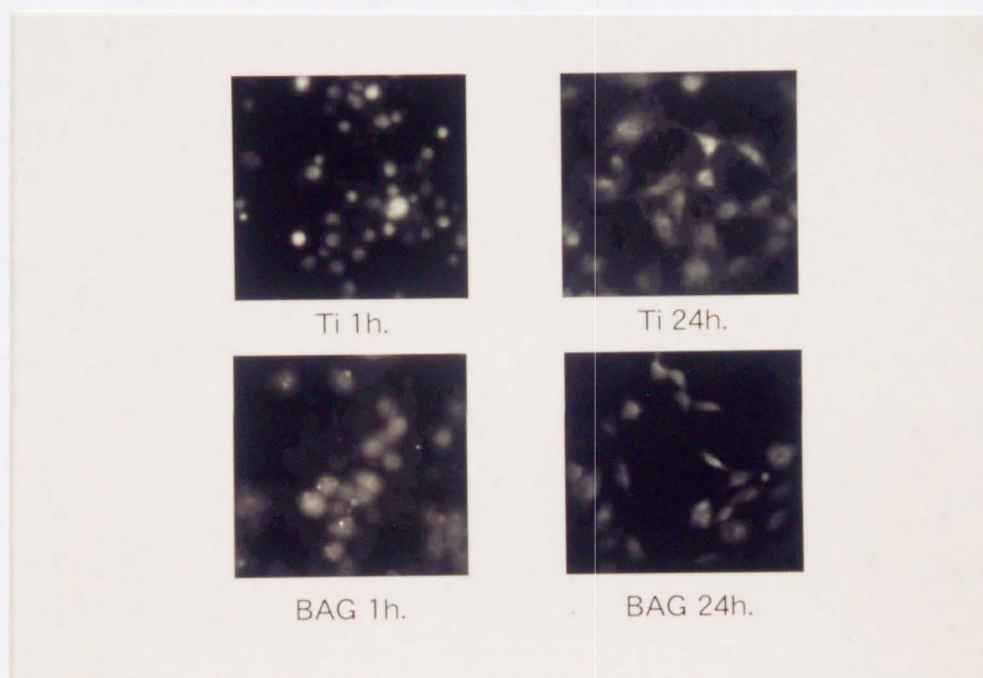


図 . 4 Fluorescence image of osteoblast cultured on
Ti and BAG

各生体材料上における骨芽細胞の蛍光像

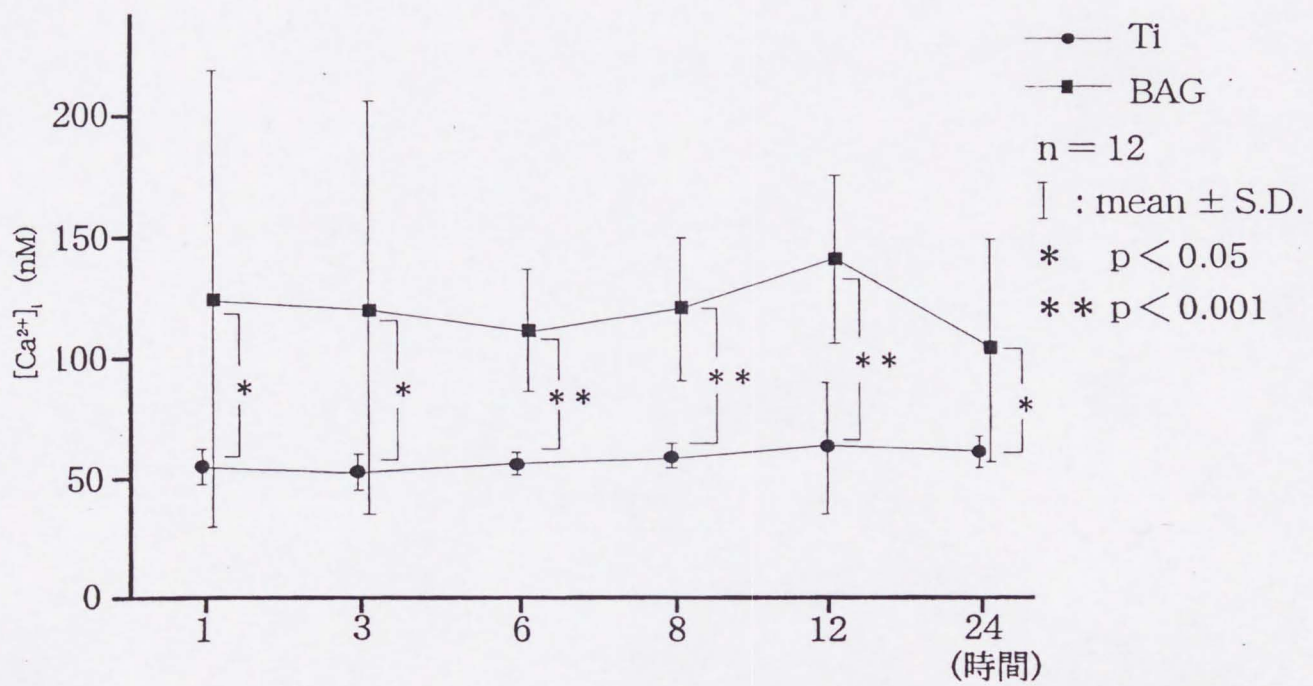


図 . 5 Time course of $[Ca^{2+}]_i$ of osteoblast cultured on Ti and BAG

各生体材料上における $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化

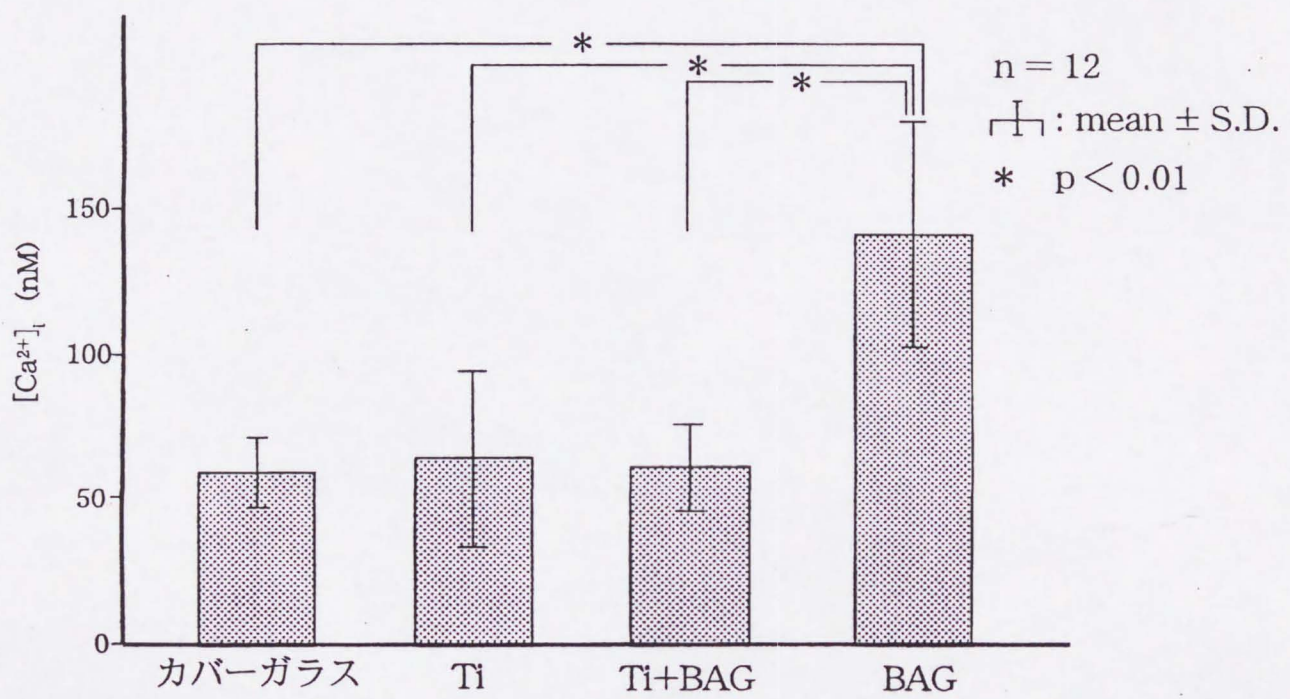


図 . 6 Influence of cell contact on biomaterials to $[Ca^{2+}]_i$

各生体材料と細胞の接触が $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響

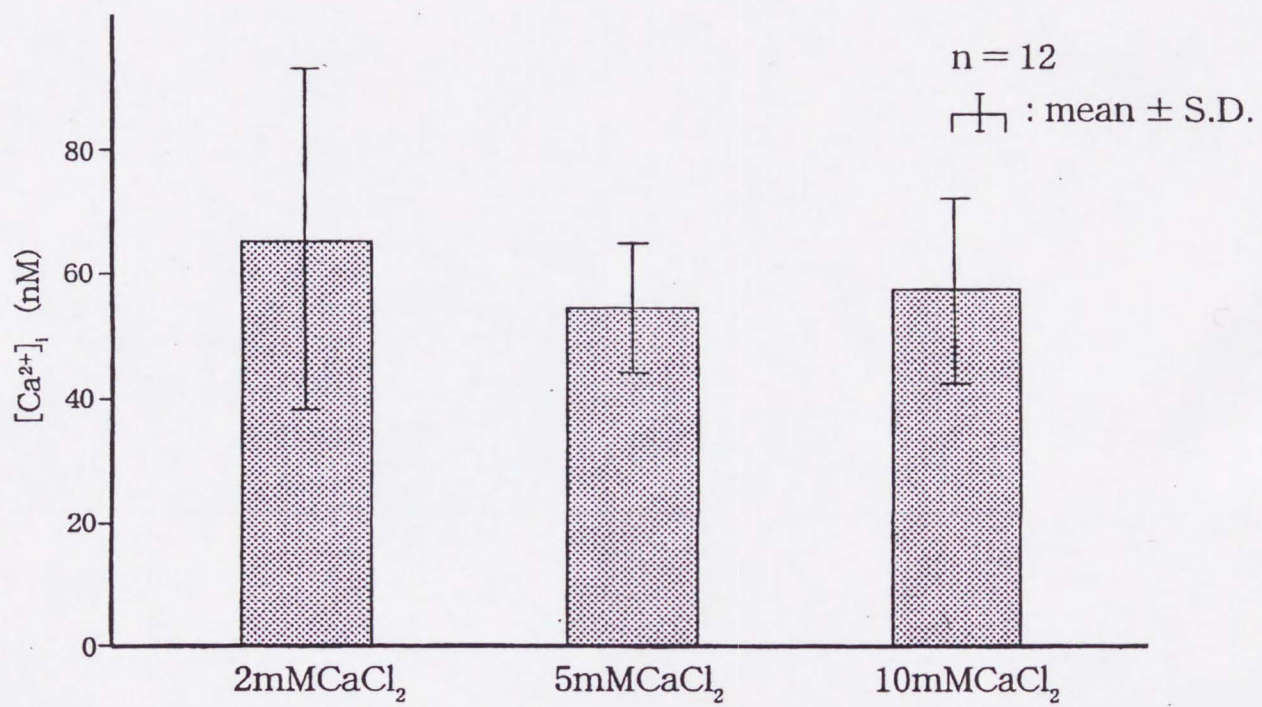


図. 7 Influence of extracellular calcium to $[Ca^{2+}]_i$
 細胞外カルシウムが $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響

表題：生体材料の性質の違いが骨芽細胞の活性に
与える影響
—細胞内遊離カルシウムの変化について—

紹介文

口腔インプラントが早期に骨結合することは、臨床における成功のポイントである。その意味で生体活性材料への期待は大きい。

本論文は、口腔インプラント周囲の骨形成あるいは骨結合をコントロールする上で重要な骨芽細胞の活性を、生体材料との関わりで追究したものである。

細胞内の情報伝達系で重要な役割を果たしている細胞内カルシウムイオン濃度は、チタン上では変化しないが、生体活性ガラス上では上昇することがわかった。この現象は、生体活性材料が骨芽細胞に接触することによって細胞内情報伝達系に何らかの影響を与えたことを示唆するものである。

(石橋 寛二 記)



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19

