

総 説

分子・細胞学的側面からみたインプラント表面上での骨形成

武部 純, 石橋 寛二

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第二講座

(主任: 石橋 寛二 教授)

(受付: 2001年 5 月16日)

(受理: 2001年 6 月19日)

Abstract : Osseointegration depends on the activity of osteoblastic cells to form and maintain bone. Although changes in implant design, surgical technique, and restorative method may be improved with regard to osseous responses, the fundamental aspects of bone cell biology and osseous physiology must be considered as a source for additional clues of improving implant success. Particularly, molecular and cellular information concerning the process of osteogenesis at implant surfaces is presently required. The aim of this article is to identify molecular and cellular determinants of bone formation that may be used in clinical attempts to improve the application of endosseous implants for dental and craniofacial prosthetics.

A review of bone biology, dental and orthopedic implant manuscripts was performed using published monographs and Medline.

It is indicated that molecular and cellular approaches for formation of bone mass may be used to enhance or expand the application of dental implants. The regulation of cellular activity should be the guide to the development of novel strategies for improving tissue integration of dental prostheses.

Key words : molecular and cellular analysis, osseointegration, osteogenesis, endosseous implant, interface

1. はじめに

顎骨内へ埋入後のインプラントとその周囲骨が接する領域に起こる組織界面反応は、インプラントの予後に影響を与える。インプラントと骨境界面の反応は創傷治癒の中で起こり、骨創面側からの要因では存在する各種細胞群の機能

や走化性、成長因子、骨質の他、インプラント表面形状（表面の微細構造：細胞動態や細胞の表現形質に大きな影響を及ぼす）・性状（表面の化学的組成：各種タンパク質の吸着や細胞付着現象（ぬれ性、電位などが関与）に影響を及ぼす）などの幾何学的・生物化学的要因が関与

Molecular and cellular analysis of bone formation at the endosseous implant surfaces

Jun TAKEBE and Kanji ISHIBASHI

Department of Fixed Prosthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University
1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate-ken 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 26 : 61-76, 2001

している。

インプラント表面での安定した骨形成は、Brånemarkにより提唱された osseointegration (正常な営みを続けている骨と機能中のインプラント表面との形態的、機能的な直接結合) という概念のもとに成り立っている¹⁾。その後 Albrektsson ら²⁾や Zarb ら³⁾により、osseointegration は臨床的に機能的負荷をかけられている骨において、異物を形成するような材料が無症状的に強固な固定を達成し、持続する過程としてより臨床的に定義された。

インプラントと骨境界面での電子顕微鏡レベルによる解析では、両者は直接に接することはなく、無定形構造層による間隙(この層の厚みは文献により、20–50nm⁴⁾、100nm前後⁵⁾、100–500nm⁶⁾等と異なるがいずれもこの層はプロテオグリカン^{7–9)}によるものである)が認められている。最近では、このプロテオグリカン層は糖としてのグリコサミノグリカンに非コラーゲン性骨基質タンパク質(オステオポンチン、オステオカルシンなど)が結合したものであると報告されており^{10,11)}、インプラントと骨境界面領域での組成やそれに関わる骨基質タンパク質の役割について徐々に解明されつつある。

近年、インプラントと骨境界面での骨形成を促進させ、早期に osseointegration を獲得するために、種々の表面形状・性状を有するインプラントが臨床へ導入されてきた。そして、インプラントの表面デザイン選択のための臨床的ガイドラインを確立する目的で、インプラント周囲の骨形成への表面形状の影響に関する *in vivo*^{12–14)} や *in vitro*^{15–20)} による研究が行われてきた。これらは、インプラント表面形状・性状が骨の形成過程に影響を与えていることを示すものである。

インプラントと骨境界面に存在する骨芽細胞は、骨の形成過程で活発に反応することで、osseointegration へと導く²¹⁾。したがって骨形成・維持の調節に関与する骨芽細胞の分化とそれに関連した細胞外基質の生成へのインプラン

トの影響を分子・細胞学的側面より分析しておくことは重要なことである²²⁾。さらに、分子・細胞学的アプローチによりインプラント周囲を支持する骨組織形成量のコントロールが可能となれば、インプラント表面の改良や治療の補助・適応範囲拡大に貢献できると考える。

そこで本論文は、osseointegration 獲得までの過程と現象について、osseointegration を導く基礎となる分子・細胞学的側面から文献をもとに詳述する。さらに、インプラントを用いた治療範囲の拡大を目的として、インプラントと骨境界面での骨誘導、骨形成促進へ向けての組織工学的技術を応用した将来性についても考察を加えてみた。

2. インプラント周囲での骨形成

(1) 創傷治癒に関わる分子・細胞の役割

インプラントと骨境界面で起こる骨の形成は、インプラント埋入後から始まる創傷治癒の一連の流れに沿った過程の中で行われていく。インプラント埋入後から起こる創傷治癒を円滑に行わせることは、インプラント周囲での骨組織形成への条件となる。創傷治癒の中で起こるインプラント周囲での骨形成過程(osseointegration 獲得まで)を時間軸に沿ってみると、次の(a)–(c)に示す経過をとっている^{24–25)}。

(a) 創傷部での出血・凝固により血餅形成が起こる。血餅中のフィブリン(fibrin: 血液凝固に関わるタンパク質)–フィブロネクチン(fibronectin: 細胞接着性糖タンパク質)は細胞が移動・増殖するための足場となる基質の役割を果たす。血小板からは、血小板内の α 顆粒に含まれる成長因子(growth factor)が分泌され、これは種々の細胞を骨の修復へと誘導・増殖・分化させるためのシグナルとなる。PDGF(血小板由来成長因子)は、再生に関与する細胞の増殖、血管形成の促進、他の成長因子や細胞の上向き調節をする働きがある。TGF- β (トランスフォーミング β 成長因子)は、骨芽細胞前駆細胞の走化性や分裂の促進、

Table 1. A principle source of growth factors at wound sites^{22, 26)}

Growth factor	Major sources at the wound site	Function
Platele-Derived Growth Factor(PDGF)	Plateletes, macrophage, bone matrix, epithelial cells, endothelial cells, smooth muscle cells	Mitogenesis, angiogenesis, up-regulation of other growth factors and cells
Fibroblast Growth Factor(b-FGF)	Macrophage, endothelial cells, osteoblasts, bone matrix	Mitogenesis, angiogenesis
Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	Platelets, macrophages, osteoblasts, bone matrix	Chemotaxis and mitogenesis of osteoblast precursors, stimulate their deposition of the collagen matrix for connective tissue wound healing and bone formation
Insulin-like Growth Factor(IGF)	Serum, osteoblasts, platelets, bone matrix, epithelial cells, endothelial cells, smooth muscle cells	Mitogenic to osteoblast lineage cells, stimulators of bone formation from existing differentiated osteoblasts
Bone Morphogenetic Proteins(BMPs)	Osteoblasts, bone matrix	Osteoinductive, regulates osteogenesis

コラーゲン基質の合成を刺激することによる創傷治癒および骨形成の促進、破骨細胞の形成や骨吸収を抑制することで骨吸収よりも骨形成を助長する働きがある。IGF（インスリン様成長因子）は、骨芽細胞へ分化する細胞の分裂を促進させ、既存の骨芽細胞の骨形成能を活性化させる働きがあり、血小板にも含まれている^{22, 26)} (Table 1)。

(b) 血小板から分泌されていた成長因子はシグナル分子として線維芽細胞や血管内皮細胞などに作用し、これらの細胞をインプラントと骨境界界面部（創傷部）へと誘導する。線維芽細胞からはコラーゲン線維やプロテオグリカンのような結合組織における細胞外基質が産生される。これにより血餅という暫時的足場からよりしっかりとした足場へ変わっていく。この時期は血小板に替わってマクロファージの働きが主体となり、マクロファージから分泌される成長因子は骨再生へのシグナルとなる。マクロファージの分泌する成長因子としては、PDGFやTGF- β 、IGFのような血小板にも含まれるものもあれば、FGF（線維芽細胞成長因子）のような線維芽細胞の増殖や、血管の新生や内皮細胞の増殖に関わるVEGF（Vascular Endothelial Growth Factor：血管内皮細胞増殖因子）があり、骨再生にとって重要な成長因子となる^{22, 26)} (Table 1)。インプラントと骨境界界面における創傷部では、血餅の器質化が始まり、同時に血管内皮細胞による新性血管の豊富

な幼弱な線維性結合組織（肉芽組織）が形成されて組織修復への足掛かりをつける。

(c) 結合組織の線維芽細胞の一部は骨芽細胞に分化し、インプラント周囲の既存骨表面には骨芽細胞が配列される。この時期は骨の形成が盛んとなり、骨芽細胞から活発にBMP（骨形成タンパク）やFGF、TGF- β 、IGFなどの成長因子が分泌され、インプラント表面側へ骨形成が行なわれていく^{22, 26)} (Table 1)。新生骨がインプラント表面に接触すると、インプラント表面上には骨芽細胞がリクルートメント（動員）され、付着・増殖・分化するにつれて基質タンパク質を合成・分泌して骨基質を形成していく。

osseointegrationを達成した新生骨梁は、インプラントと骨境界界面部における骨のリモデリングによって成熟した層板骨へと移行しインプラントを強固に保持する。骨がインプラント表面で恒常性を維持していくためには、骨の継続的なリモデリングのバランス（骨芽細胞/破骨細胞間での情報伝達）を崩さぬようにしていく必要がある²⁷⁻²⁹⁾。

(2) 骨形成メカニズム

インプラント周囲での骨形成過程に関わる因子としては、未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化形質獲得への度合い、骨芽細胞の分化に伴う骨基質タンパク質の合成・分泌量、成熟骨芽細胞により形成された骨基質の石灰化の程度や速度などが挙げられる。また、インプラント

表面形状・性状の違いが周囲骨組織や細胞増殖・分化に影響を与えていると報告されている^{12-14, 30-31)}。骨の形成過程については、1) 骨伝導 (osteochonduction), 2) 骨形成 (osteogenesis), 3) 骨誘導 (osteoinduction) の3つについて考えておく必要がある³⁶⁾、この章では、インプラント表面の化学的性状が骨形成過程に与える影響を含めて分析する。

1) 骨伝導は、生物学的あるいは人工的な部位や表面に沿って、宿主もしくは移植された骨原性細胞から起こる新生骨形成と定義することができる。ハイドロキシアパタイト (Hap: Hydroxyapatite) をコーティングしたインプラントや Hap などの骨補填材料のような生体活性の強い組成からなるインプラントの骨再生は骨伝導によるものである。Hap 周囲の既存骨表面に骨の形成と添加が起こると同時にインプラント表面にも直接骨形成が起こる。そして既存骨から増生する骨組織とインプラント側から同時に増生する骨組織が一塊となって、インプラント周囲の骨となり、インプラント表面と新生骨は癒合した様な結合をする³⁰⁾。また、補填材料としての Hap は、細胞増殖の活発な骨芽細胞前駆細胞を組み込んだ足場材料 (scaffold) として利用することができる³⁷⁾。動物実験による基礎的報告から、未処理チタンインプラントに比較して Hap をコーティングしたインプラント、あるいはチタン表面を改質して Hap を析出させたインプラント表面では、早期の骨形成が認められている³⁸⁾。さらに、遺伝子発現レベルにおいても Hap インプラント表面上では骨芽細胞の分化マーカーが優位に高いとの報告³³⁾がある。Hap インプラント表面に直接骨形成が起こる理由としては、材料表面に付着した骨芽細胞から合成・分泌された骨基質タンパク質が biological conditioning の役割を果たしている可能性が考えられる。骨組織には特異的な細胞外基質タンパク質が多く存在しており、これらの多くは細胞接着機構に関与している³⁹⁾。Hap インプラント上に付着した細胞外基質タンパク質の骨芽細胞への機能調節について

は、接着機構に関わる細胞接着レセプターであるインテグリン (Integrin: 細胞膜貫通タンパク質) によりシグナルが細胞内へ伝達され^{19, 33, 40-42)}、細胞からの特異的な形質発現により骨誘導が促進されていく。

2) 骨形成は、未分化間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞前駆細胞からの新生骨の形成と定義することができる。自家骨による移植例では、移植骨中に骨原性細胞や骨基質タンパク質、成長因子が含まれているため、これらの因子が新生骨形成に大きく関わっている⁴³⁾。インプラント臨床において、骨形成を促進させるためには、骨芽細胞数の増加や骨芽細胞からの骨基質タンパク質の合成・分泌により形成される骨基質の形成量の促進が求められる。多くの成長因子の役割としては、骨芽細胞を活性化させることで骨基質タンパク質の合成・分泌を促進させ、骨形成へと誘導させることが報告されている^{44, 45)}。したがって、インプラントと骨境界面における既存骨側に存在する成長因子や骨基質タンパク質をコントロールすることが可能となれば、インプラント周囲での骨形成促進のための一手段として臨床に取り入れることができるであろう。

3) 骨誘導は骨を誘導するタンパク質により未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化を誘導された新生骨形成と定義することができる。この骨誘導物質として BMP が重要な役割を担っており、BMP は異所性に骨の形成を誘導させる働きのあるタンパク質であることが知られている^{46, 47)}。遺伝子工学の手法を用いた遺伝子組み替え骨形成タンパク (rhBMP: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein)⁴⁸⁾ や自家骨移植法などは、この骨誘導の分類に含まれる。

3. osseointegration 獲得までの骨形成に関わる骨芽細胞の役割

骨が再生されるためには、骨を作る細胞、細胞の足場となる細胞外基質、細胞へのシグナルの3つが有効に作用しなければならない。骨組

織中に存在する細胞の中で、骨形成の中心的役割を果たしているのは骨芽細胞である。

骨芽細胞の生理的機能は、osseointegration獲得へ影響を与えている。このことから、インプラント周囲での骨芽細胞の活性をコントロールするには、(1)骨芽細胞のリクルートメント(動員)、(2)骨芽細胞の付着、(3)骨芽細胞の増殖、(4)骨芽細胞の分化について考えておく必要がある。また、骨のリモデリング時に認められる骨芽細胞と破骨細胞との細胞間でのシグナル分子の伝達による細胞応答についても考慮しておく必要がある。分子細胞生物学・生化学的側面からの解析は、インプラント周囲での細胞生物学・生化学的反応をより明らかにするものと考ええる。

(1) 骨芽細胞のリクルートメント(動員)

骨芽細胞は軟骨細胞、筋肉、骨髄間質細胞(骨髄中の脂肪細胞を含む)などと共通の多分化能を有する未分化間葉系幹細胞に由来すると考えられている⁴⁹⁾。未分化間葉系幹細胞は、BMPやレチノイン酸、デキサメタゾンの作用により骨芽細胞系細胞への分化能を獲得することで骨原性細胞となり、骨芽細胞前駆細胞へと分化していく。骨原性細胞の性状は十分に解析されていないが、それらが骨髄内や骨内膜、骨膜の形成層に存在することが報告されている⁵⁰⁾。骨芽細胞は、細胞質が豊富な円形または立方形を呈する骨芽細胞(活性型骨芽細胞芽)と扁平化した骨芽細胞(Bone lining cell:休止期骨芽細胞芽)の2種類の細胞に大別され、骨内膜や骨膜に存在している⁵⁰⁾。骨芽細胞のリクルートメントには、骨芽細胞表面に存在する細胞内ヘシグナルを伝達するレセプターと細胞を誘導させる性質の備わった成長因子との結合が必要である。さらに、細胞が移動してくるための足場となる細胞外基質の存在が必要となる。

(2) 骨芽細胞の付着

骨形成を担う骨芽細胞は、細胞表面のインテグリンレセプターを介して、骨芽細胞から産生された骨基質タンパク質あるいは細胞外マト

リックス(Extracellular Matrix; ECM)に存在する細胞接着性糖タンパク質と接着することにより、その成熟および機能発現が制御されている。生体内においてECMには、細胞の接着・伸展・増殖に必要な足場形成や細胞の形質発現など、細胞の活動に直接に関与する重要な働きがある⁵¹⁾。ECMは(a)細胞接着に関係するフィブロネクチンやラミニンなどの糖タンパク質や骨芽細胞から産生される骨基質タンパク質、(b)基質の網目骨格を作る線維性のコラーゲンやエラスチンの構造タンパク質、および(c)プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの複合糖質により構成されている⁵²⁾。この現象によりECMから細胞へ情報伝達が行なわれ、ECM中の細胞認識部位(リガンド;細胞接着に必須の最小のアミノ酸配列であるArg-Gly-Asp(RGD) peptide)とそれに対する細胞表面レセプターのリガンド・レセプター相互作用により接着している⁵²⁾。つまり、ECMの構成成分である骨基質タンパク質や細胞接着性糖タンパク質と結合する細胞表面には、特異な糖タンパク質である細胞接着レセプターの働きをするインテグリンが存在している。細胞が伸展・移動する際には、インテグリンにより細胞内の細胞骨格形態を担っている細胞骨格系タンパク質(アクチンフィラメント)にシグナルが伝達され、細胞形態の動的変化や運動への機能を発揮するのである。さらにインテグリンは、細胞付着・増殖・分化・形態形成・組織修復・炎症・癌転移、最近ではアポトーシスなど、さまざまな現象において重要な働きをしていることがわかっている⁵²⁾。インプラント表面への骨芽細胞の付着現象に関しては、インプラント表面上にてインテグリンを介して骨基質タンパク質やECMが骨芽細胞と接着することにより、細胞分化シグナルが細胞内へ伝達され、骨基質の石灰化、骨形成へと導かれる⁵⁴⁾(Fig. 1)。骨基質タンパク質は細胞接着機構への関与の他に、骨基質の石灰化に関与していることが報告されている⁵⁵⁾。このことは、インプラントと骨組織との界面にて起こる骨の再生や、インプラ

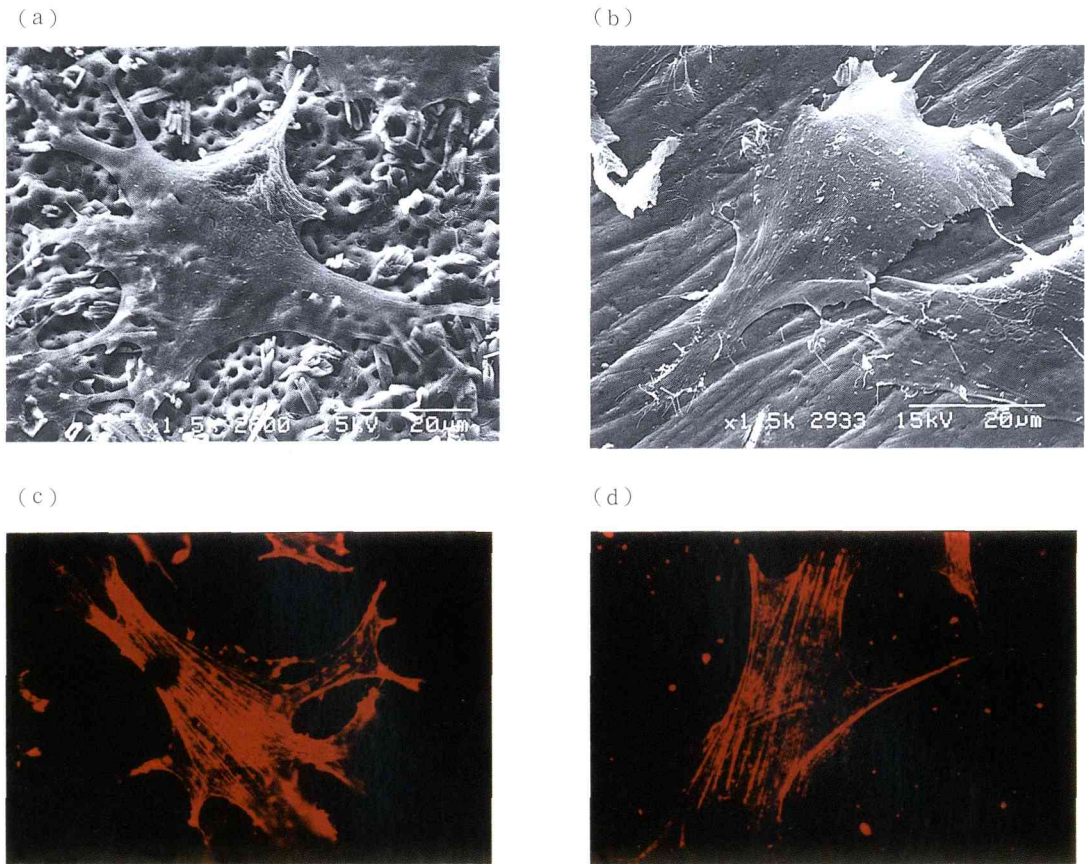


Fig. 1. Scanning electron microscopy of osteoblast cell morphology on (a) treated commercially pure titanium (cpTi) disk and (b) non-treated cpTi disk of cell culture. Confocal laser scanning microscopic of osteoblast cell cytoskeletal organization on (c) treated commercially pure titanium (cpTi) disk and (d) non-treated cpTi disk of cell culture. Cytoskeletal organization is related to cell adhesion, motility states of differentiation, and gene expression on implant substrates. The cytoskeletal organization is important for initial attachment as well as at ability of attachment on implant substrates. Focal contacts have been described as the primary structures for cells to implant substrate adhesion. Regulation of cellular differentiation and growth may be mediated by the molecules involved in focal contact or focal adhesion formation, which in turn is determined by the nature of the implant substrate. Osteoblast use integrin receptors to bind proteins adsorbed on implant substrate.¹⁹⁾

ント周囲骨組織の恒常性の維持に働きリモデリングにも関わりがある (Fig. 2)。

(3) 骨芽細胞の増殖

基質表面に接着・伸展した細胞は移動・増殖を繰り返して組織化を行う。一般に高い接着性を有する基質上では、細胞の伸展性はよく、また、高い細胞増殖を示す。細胞/基質間、細胞/細胞間の接着情報が細胞の増殖や分化を規制する重要な因子である (細胞増殖の基質依存性 (anchorage dependency))。多くの細胞は細

胞外基質に接着すると、細胞骨格装置 (Adherents Junction: インテグリンからアクチンフィラメントへのシグナル伝達の分子構築) のことで、複数のタンパク質が関与している⁵²⁾ が細胞周期の増殖シグナルをスイッチ・オンしているのではないかと考えられている⁵⁶⁾。

創傷治癒の中で起こる骨再生の過程において、細胞外基質の存在は骨形成に関わる骨芽細胞群の足場となり、その後の細胞増殖には欠かすことができない。骨を形成していくためには

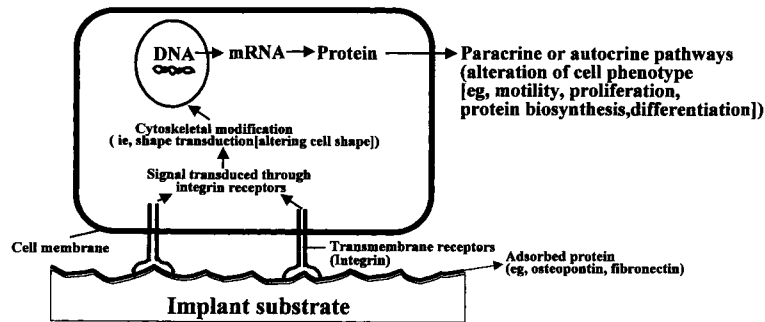


Fig. 2. Cell attachment to implant surfaces is adhesive extracellular matrix (ECM) proteins (eg, osteopontin, fibronectin). The transmembrane receptors (integrins) that transduce important signals to the adherent cells and inform the cell of its structural environment (cell motility, proliferation, protein biosynthesis, and differentiation). Cell attachment ushers intracellular cytoskeleton. Shape transduction triggers DNA transcriptional events within the nucleus, mRNA translational activities in the cytoplasm, and protein formation. Protein expressed by the cell either can influence the activities of other cells (by paracrine pathways) or can influence the cell of origin (by autocrine pathways). Shape transduction following cell-ECM adhesion can promote configurational arrangement of cell receptors, priming them for growth factor binding.^{51, 54)}

数多くの骨芽細胞が必要であり、骨芽細胞の増殖には細胞周囲に存在する細胞外基質の他に自らが分泌する骨基質タンパク質、成長因子、ホルモンそしてサイトカインなどが関係してくる⁵⁷⁾。細胞の増殖・分化に関わるこのような分泌物は、シグナル分子としてシグナル細胞（分泌する細胞側）から分泌されて標的細胞（相手側の細胞）表面に存在するレセプターに結合することで情報が伝わる（細胞間でのシグナリングについては他にも伝達様式がある）。インプラント周囲骨組織での骨芽細胞への分化調節機構においては、成長因子がシグナル分子として作用し、分化した骨芽細胞の増殖にも成長因子が関与していく。骨芽細胞は活発に増殖しながらシグナル分子を分泌し、さらに細胞の分化にともない骨基質を形成しインプラント周囲の骨形成を高めていく。

(4) 骨芽細胞の分化

創傷治癒の中で起こる osseointegration は、インプラントと骨境界面での骨基質の石灰化の促進により獲得されていく。既存骨表面あるいはインプラント表面では、骨芽細胞前駆細胞がリクルートメントされて増殖し、未熟な骨芽細胞を経てしだいに骨芽細胞の表現形質を獲得し

ていく。そして、骨芽細胞が産生する骨基質タンパク質により骨基質が形成される。骨芽細胞の分化が進展し、成熟した骨芽細胞により形成された骨基質の石灰化が起こり、骨形成が完了する⁵⁸⁾。

骨基質を形成する有機質成分の90%がI型コラーゲンよりなっており、残り10%が非コラーゲン性骨基質タンパク質である⁵⁹⁾。I型コラーゲン (Col I : Collagen I) を中心とする骨基質タンパク質は非石灰化骨 (類骨) を形成し、骨量の増大や骨の形態維持に関与している。さらに骨基質タンパク質は多くの成長因子やサイトカインと結合し^{60, 61)}、それらを骨基質中に保持するとともにそれらの作用や活性を調節する役割をも担っている。骨基質タンパク質は骨芽細胞へ接着することで骨芽細胞の分化・機能の調節、骨基質の石灰化への促進に関与している^{62, 63)}。骨芽細胞は Col I をはじめとするさまざまな骨基質タンパク質や成長因子を合成・分泌し、成長因子の多くはオートクライン (autocrine signaling : 自己分泌型シグナリング) 的に作用して、みずからの増殖・分化・活性化を促す。骨芽細胞の分化が進展して成熟骨芽細胞により形成された骨基質の石灰化が起こ

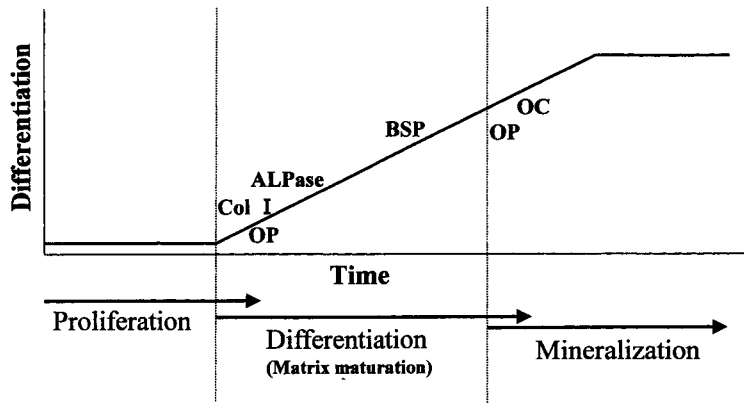


Fig. 3. Formation of bone matrix at any surface requires the coordinated proliferation and differentiation of osteoblasts to osteocytes. During this process, a temporal pattern of bone matrix protein expression is revealed. Collagen I (Col I) and Alkaline phosphatase (ALPase) are early markers of differentiation process. Bone sialoprotein (BSP) expression precedes matrix mineralization. Osteocalcin (OC) expression is coincident with mineral accumulation. Osteopontin(OP) at implant surfaces represents a first step because it's role as a cell attachment molecule. OP is also expressed later and is present at the implant bone interface. This step wise process of bone formation and differentiation occurs at implant surfaces in vivo and in vitro. Studying this process may guide the engineering of osteogenic or osteoconductive implant surfaces.^{22, 58, 72)}

り、骨形成が完了する。骨質石灰化期には骨基質タンパク質の産生は低下し、骨芽細胞は周囲の骨基質に埋め込まれて骨細胞となり、そのライフサイクルを完了する⁵⁸⁾。

細胞の分化を知る方法として、その組織に特異的に発現するタンパク質または遺伝子の発現をとらえる方法がある。骨形成に関与している細胞の中で骨芽細胞前駆細胞に関しては特異的マーカー（骨芽細胞の分化指標）はないが、骨芽細胞の分化に伴う指標としては、アルカリフォスファターゼ（ALPase：Alkaline Phosphatase）の発現およびその活性の上昇が重要とされている^{15, 63-65)}。成熟した骨芽細胞ではオステオカルシン（OC：Osteocalcin）が特異的に発現し、最終的分化段階の指標として認められている⁵⁸⁾。

*In vitro*⁶⁷⁻⁶⁹⁾ や *in vivo*^{70, 71)} の実験系による骨芽細胞を用いた遺伝子発現での検討から、分化初期には Col I や ALPase, TGF- β の発現、後期には非コラーゲン性骨基質タンパク質である骨シアロ酸含有タンパク質 (BSP: Bone Sialoprotein), オステオポンチン (OP:

Osteopontin), OC が発現することが報告されている^{22, 58, 72)} (Fig. 3)。

BSP は、骨形成の分化度を示すマーカーとして重要であり⁷³⁾、石灰化に先行して起こる骨基質形成過程に分泌されると報告されている⁷⁴⁾。機能としては、細胞接着、骨基質の石灰化に関与する骨芽細胞機能の調節に関わっていると考えられている^{74, 75)}。また、BSP は、骨基質の石灰化形成に関わる Hap の核形成に関わりがあると考えられている⁷⁶⁾。

OP は骨芽細胞の骨基質形成過程で分泌される⁷⁷⁾。OP はカルシウムに高い親和性を示すことから破骨細胞や骨芽細胞の骨基質表面への接着、骨芽細胞の分化、骨のリモデリングに関与していると考えられている^{77, 79)}。また OP は、カルシウム濃度を上昇させ Hap と結合することで Hap の形成と成長を調節していると考えられている^{54, 76, 78)}。BSP と OP は、石灰化機構の調節に関与している可能性が考えられる。

インプラントと骨境界面に存在する無定形構造物の組成⁴⁻⁹⁾ に関しては、*in vivo*^{10, 80-82)} や *in vitro*⁸³⁾ による免疫組織細胞化学的分析により、

非コラーゲン性骨基質タンパク質の一つである OP の存在が同定されている。この OP は培養初期においても発現されることが報告されている⁶⁹⁾。インプラントと骨組織との境界領域での OP の役割は明らかにされていないが、インプラント周囲における石灰化形成機構に関与している可能性が考えられる。

OC は、骨芽細胞の分化の最終的な段階にあるマーカーである。OC は骨芽細胞で産生され、骨組織と歯牙にのみ存在している。産生された OC の多くは、骨の無機成分である Hap と結合して骨基質に取り込まれており、骨吸収や骨のリモデリングに関わっていると考えられている⁷²⁾。

インプラントの表面形状・性状が周囲骨組織の形成量^{13, 14, 84, 85)}や骨芽細胞の分化に伴う表現形質や遺伝子発現、細胞形態に影響を与えていることが報告されている^{18, 19, 31-33, 86, 87)}。また、インプラントと骨境界面に存在する成長因子やホルモン、サイトカイン、ECMなどは骨芽細胞の分化調節機構に関わり、骨芽細胞の表現形質を変化させていることから⁸⁸⁾、骨形成量をコントロールしている因子として考えることができる。近年、インプラント材料の開発にともない、インプラント表面形状・性状の骨形成に与える影響に関する研究が行われるようになってきた。しかし、現在のところインプラント表面での遺伝子レベルでの骨芽細胞の分化調節機構の詳細な解析はなされていないため、今後さらなる解析が必要である。また、骨形成の調節に関与していると考えられている骨芽細胞から合成・分泌される非コラーゲン性骨基質タンパク質の遺伝子レベルでの機能や、転写制御・調節領域の解析を行う必要がある。このような解析は osseointegration の研究に反映されるからである。

4. 分子・細胞学的側面からみたインプラント周囲での骨形成促進へ向けての strategy

インプラントと骨の界面での骨形成を促進させて早期の osseointegration を獲得するため

に、様々な表面形状・性状を有するインプラントが臨床に導入されると同時に^{13, 14, 84, 85)}、現在の研究の潮流ともなっている³⁰⁾。インプラント表面の形状・性状を変えることや、インプラント表面積を増大させることにより、多くの骨芽細胞をインプラント周囲に集合させることが可能となる⁸⁹⁾。さらに、その後の細胞の分化をコントロールすることが可能となる¹⁸⁾。表面形状・性状は、骨芽細胞への分化形質の獲得にも関与し、骨芽細胞からの成長因子²²⁾や骨基質タンパク質などの産生量¹⁸⁾に影響を与えていることが報告されている。このことはひいてはインプラントと骨との強固な結合の獲得にもつながる^{14, 84)}。現在、著者らの研究グループでは、チタンに特殊な処理を施すことで表面に Hap を析出させた骨伝導性を有するインプラント材料についての研究を行っている。これまでの *in vivo*^{90, 91)}、*in vitro*^{19, 20, 35)} による検討にて、インプラント表面での早期の骨形成が認められたことから、インプラント表面の性状が骨芽細胞の分化を調節していると推察している。近い将来、われわれが開発しているインプラント材料を用いることで、インプラント臨床の範囲拡大に貢献できるものと考えている。

一方、骨系細胞への増殖・分化に影響を与える要因となるインプラント表面形状・性状を利用して、分子・細胞学的アプローチによるインプラントと骨境界面部での骨形成・誘導を促進させる方法も、近年の組織工学 (Tissue Engineering) 技術の進歩にともない、臨床応用へ向けて研究されては始めている。インプラント周囲での骨形成促進へ向けての将来展望としては次の(1)―(5)が挙げられる。(1)骨形成・誘導に関わる成長因子や細胞外基質タンパクなどのインプラント表面への生物化学的修飾、(2)組織工学的手法を用いて、骨系細胞と遺伝子組み替え技術により精製されたタンパク質を用いた人工骨材料を形成し、骨欠損部へ移植する方法、(3)インプラント埋入時の成長因子の添加、(4)クローニングされた遺伝子を導入した細胞の移植、(5)自己血液から採取した血小板に含まれ

る成長因子を用いて骨組織再生を促進させる方法。特に成長因子は、細胞の増殖・分化過程に関わるため、インプラントと骨境界部での骨形成を導く骨芽細胞への分化に作用する重要な因子である。この結果、インプラント表面での骨芽細胞の接着・増殖・分化あるいは基質生成能が高まり、骨組織の形成が行なわれる。

(1)インプラント埋入後、表面には生体内タンパク質が吸着し、この吸着タンパク質がその後の反応に影響すると考えられる。*in vitro*の実験系から、インプラント表面に細胞外基質タンパク質を修飾することで、細胞分化に影響を与えたとの報告がある⁹³⁾。インプラント表面に単体あるいは複合体にした基質タンパク質を表面修飾することで、表面での細胞増殖や骨基質の石灰化を促進させ(生物学的活性の向上)、より早期に治癒を促進させて骨形成を獲得することが可能となるかもしれない⁹²⁾。予備的な動物実験報告ではあるが、Piattelliら⁹³⁾は、alkaline phosphatase をチタンプラズマスプレー型インプラント表面に修飾することで、骨接触率や骨形成量が増加したと報告している。また、*in vitro*の基礎的実験で遠藤らは⁹⁴⁾、ヒト血漿 fibronectin を NiTi 合金表面に固定させてヒト歯肉線維芽細胞を培養した結果、細胞増殖が認められ、ヒト血漿 fibronectin は生体活性を失うことなく安定状態にあったと報告している。BMP などの成長因子をその活性を失うことなくインプラント表面へ修飾する方法が可能となれば、骨芽細胞の活性をコントロールすることができるかもしれない。BMP をインプラントにコーティングすることで、インプラント表面での活発な骨誘導機構による骨形成促進を認めた基礎的報告がある^{95,96)}。このことから Hap とチタンは BMP のキャリアーとして働くの可能性があるが⁹⁷⁾、BMP の濃度やキャリアーとして用いるインプラントの表面形状・性状について検討しておく必要がある。

(2)インプラント治療の予後は、埋入部歯槽骨の形態・骨量によるところが大きい。そこでインプラント埋入の前処置として、欠損部の顎骨

再生や上顎洞底挙上術などに対して成長因子と移植材料との併用や、移植材料上で成長因子を添加した状態で造骨系細胞を一定期間培養後に人工骨材料として用いる方法が検討されている。インプラント治療に成長因子を応用することは、骨組織中に存在する未分化間葉系幹細胞や前骨芽細胞を活発な骨基質を産生する骨芽細胞へと誘導することが可能となる。さらに成長因子は、骨組織側の血管形成やコラーゲン基質の合成を刺激する作用があり、創傷治癒と骨形成を促進させることで治療の適応範囲を広げることができる。骨芽細胞への分化能を高める作用のある成長因子としては、rhBMP の他に、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic Fibroblast Growth Factor : bFGF)、PDGF、IGF-I が挙げられる⁹⁸⁾。臨床報告例では、抜歯窩や顎骨欠損部に rhBMP₂ をコラーゲンスポンジに吸着させて移植することで骨再生が認められている^{99,100)}。上顎洞底挙上術に際しては、rhBMP₂⁴⁸⁾ や bFGF を吸収性の材料に含浸させて補填することで、良好な骨形成促進が認められたと報告されている^{101,102)}。また細胞培養技術を用いて培養骨をつくり、移植する方法も臨床応用へ向けて研究が行われている(あらかじめ細胞培養しておく必要があることから、用いる血清の選択が重要である)。3次元足場となる材料中に未分化間葉系幹細胞を組み込み、rhBMP や bFGF などの成長因子の存在下で骨芽細胞へと分化させ、細胞組み込み型の人工骨を作製して骨欠損部へ補填する、いわゆる組織工学を用いた治療法である¹⁰³⁾。

(3)インプラント埋入後の初期の創傷治癒を促進させて早期の osseointegration を獲得することを目的とした研究が報告されている。成犬の顎骨内へチタンインプラント埋入と同時に PDGF と IGF-1 の成長因子を複合して添加した場合¹⁰⁴⁾や、表面処理を施したインプラントと共に TGF- β を添加して埋入した場合¹⁰⁵⁾に骨形成促進が認められている。成長因子の放出を調節する方法としては、ドラッグ・デリバリー・システムの応用法なども考えられる。サ

イトカイン療法において、成長因子を単独あるいは複合して用いるかは骨質や骨欠損状態、骨組織再生法の種類により異なってくると思われる。また、成長因子を吸着させるキャリアー（生体吸収性材料など）の研究開発も重要となってくる。rhBMP などのように純化された単一の増殖因子では、複雑な骨再生を行うには無理があり、小さな骨欠損領域のみの再生に限定されてしまうかもしれない。成長因子を複合して用いることは、様々の再生過程を促進できる可能性がある。骨組織再生法（細胞培養法を用いた場合）に用いる場合の細胞の分化程度は、細胞増殖能や細胞の分化・機能が活発な前骨芽細胞（細胞増殖能、ECM の分泌、細胞間同士の接触能が高い）、分泌型骨芽細胞（CoI I や特異的骨基質タンパクの分泌能が高い、骨基質の形成が盛んで石灰化形成へと移行する）が適していると思われる²²⁾。

(4)分化・成長因子を作用させる代わりに、遺伝子工学技術を応用して骨系細胞の表現形質を発現させる遺伝子を導入する遺伝子治療をインプラント治療へ応用する方法も考えられる。この場合、用いるベクター（遺伝子の運び屋）の種類（プラスミドやウイルスベクター）や、遺伝子導入されたベクターの挙動、安全性についての確認は大変重要である。近い将来、骨組織再生を促進させる方法の一つとして可能となるであろうし、今後の発展が期待される。

(5)最近、自己血液中の血小板のみを採取し、血小板に含まれる成長因子（PDGF, TGF- β , IGF-I）を自己移植骨あるいは β -TCP などの吸収性マトリックスと混合し、骨欠損部へ移植する多血小板血漿（Platelet-Rich Plasma : PRP）療法¹⁰⁶⁾が注目され、臨床で応用されはじめてきている。この療法は一種のサイトカイン療法であり、成長因子の作用により移植後の隣接する骨組織側の幹細胞や前骨芽細胞を骨芽細胞へと誘導し、新生血管形成を促進させ、細胞の移植から通常のリモデリングを行う成熟した骨へと再生させることを目的としている。自己の血小板に含まれるすべての成長因子を利用

するため、今後のインプラント治療を補助する組織工学技術として期待される。

5. おわりに

インプラント表面形状・性状などのデザイン、外科手技、補綴処置法を改良することは、インプラント周囲での骨形成促進に繋がる。骨形成は osseointegration の過程の中で起こり、骨芽細胞の果たす役割は大きい。臨床家は、osseointegration を導く分子・細胞学的な側面からみた現象についての知識を持っていなければならない。なぜならば、骨形成過程に関わる分子的・細胞生物学的反応や骨組織の生理的・化学的反応などの基礎的メカニズムを理解しておくことは、臨床を行う上での有用な情報となり、ひいては治療の適応範囲の拡大（インプラントを支持する周囲骨組織の骨量の改善など）や成功へと導くことができるからである。また、骨形成へ向けての遺伝子レベルでの骨芽細胞の分化調節機構の解明は、今後の osseointegration の研究に反映されるものと考えられる。本論文で示した内容は、将来、生理活性物質や細胞培養技術を複合した組織工学的アプローチをインプラント臨床へ応用し可能とするための strategy の一助になるであろう。

文 献

- 1) Brånemark, P-I: Introduction to osseointegration, tissue-integrated prosthesis. Quintessence, Berlin. 11-77, 1987.
- 2) Zarb, G.A., Albrektsson, T.: Consensus report: Towards optimized treatment outcomes for dental implants. *Int J Prosthodont.* 11: 389, 1998.
- 3) Albrektsson, T., Zarb, G.A., Worthington, P., Ericsson, A.R.: The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1: 11-25, 1986.
- 4) Albrektsson, T., and Sennerby, L.: Direct bone anchorage of oral implants: Clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont.* 3: 30-41, 1990.
- 5) Sennerby, L., Thomsen, P., Ericson, L.E.: Ultrastructure of the bone-titanium inter face in rabbits. *J Biomed Mater Res.* 3: 262-271, 1992.
- 6) Linder, L., Obrant, K., Boivin, G.: Osseointegration of metallic implants. II. Transmission electron microscopy in the rabbit. *Acta Orthop Scand.* 60: 135-139, 1989.
- 7) Li, J.: Behaviour of titanium and titania based-ceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 14: 229-232, 1993.
- 8) Albrektsson, T., Brånemark, P-I, Hansson, H-A., Kasemo, B., Larsson K., Lundstrom, I., McQueen, D.H., Skalak, R.: The interface zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng.* 11: 1-27, 1983.
- 9) De Lange, G., de Putter, C.: Structure of the bone interface to dental implants in vivo. *J Oral Implantol.* 19: 123-135, 1993.
- 10) Ayukawa, Y., Takeshita, F., Inoue, T., Yoshinari, M., Ohtsuka, Y., Murai, K., Shimono, M., Suetugu, T. and Tanaka, T.: An ultrastructural study of the bone-titanium interface using pure titanium coated plastic and pure titanium rod implants. *Acta Histochem Cytochem.* 29: 243-254, 1996.
- 11) 田中輝男, 鮎川保則, 竹下文隆, 吉成正雄, 井上孝, 大塚芳郎, 末次恒夫, 下野正基: チタンは本当に骨に結合するのか?. *日歯医学会誌.* 17: 94-98, 1998.
- 12) Gotfredsen, K., Nimb, L., HjOrting-Hansen, E., Jansen, J.S., Holmen, A.: Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clin Oral Implants Res.* 3: 77-84, 1992.
- 13) Wong, M., Eulenberger, J., Schenk, R., Hunziker, E.: Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res.* 29: 1567-1575, 1995.
- 14) Wennerberg, A., Albrektsson, T., Andersson, B.: Animal study of cp titanium screws with different surface topographies. *J Mater Sci Mater Med.* 6: 302-309, 1995.
- 15) Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, J.Jr., Dean, D.D., Cochran, D.L., Boyan, B.B.: Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res.* 29: 389-401, 1995.
- 16) Keller, J.C., Dougherty, W.M.J., Grotendorst, G.F., Wightman, J.P.: In vitro cell attachment to characterized cp titanium surface. *J Adhesion.* 28: 115-133, 1989.
- 17) DeSantis, D., Guerriero, C., Nocini, P.E., Ungersbock, A., Richards, G., Gotte, P.: Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxyapatite discs. *J Mater Sci Mater Med.* 25: 711-723, 1996.
- 18) Cooper, L.F., Masuda, T., Whitson, S.W., Yliheikkila, K.P., Felton, D.A.: Formation of mineralization osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 14: 37-47, 1999.
- 19) Takebe, J., Itoh, S., Okada, J., Ishibashi, K.: Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Biomed Mater Res.* 51: 398-407, 2000.
- 20) Ariake, T., Itoh, S., Takebe, J., Ishibashi, K., Ishizawa, H.: The effects of the SA treated pure titanium implant materials on primary calcification. Edited by T. Kokubo, T. Nakamura, F. Miyaji, Proceedings of the 9th International Symposium on Ceramics in Medicine. Otsu, Japan, 333-336, 1996.
- 21) Cooper, L.F., Masuda, T., Yliheikkila, K.P., Felton, A.D.: Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 13: 163-174, 1998.
- 22) Cooper, L.F.: Biologic determinants of bone formation for osseointegration: Clues for future clinical improvements. *J Prosthet Dent.* 80: 439-449, 1998.
- 23) 井上 孝: インプラントの生体反応—創傷治癒の中の新しい病態. *日歯医学会誌.* 17: 118-122, 1998.
- 24) Masuda, T., Salvi, E.S., Offenbacher, S., Felton, D.A., Cooper, L.F.: Cell and matrix reactions at titanium implants in surgically prepared rat tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 12: 472-485, 1997.
- 25) Gross, U.M.: Biocompatibility-The interaction

- of biomaterials and host response. *J Dental Education*. 52: 798-803, 1988.
- 26) Lynch, S. E., Genco, R.J., Marx, R. E., editors.: *Tissue engineering*: Quintessence publishing Co, Inc, Chicago, 1999.
- 27) Robert, W.E., Helm, F.R., Marshall, K.J., Gongloff, R.K.: Rigid endosseous implants for orthodontic and orthopedic anchorage. *Angle Orthod*. 59: 247-256, 1989.
- 28) Burr, D.B., Martin, R.B.: Errors in bone remodeling: toward a unified theory of metabolic bone disease. *Am J Anat*. 186: 186-216, 1989.
- 29) Lanyon, L.E.: Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodeling. *J Biomech*. 20: 1083-1093, 1987.
- 30) 井上 孝, 吉成正雄, 鮎川保則, 田中輝男, 下野正基: 歯科インプラントと生体骨組織との界面—表面構造の影響—. *表面技術*. 49: 682-689, 1998.
- 31) Puleo, D.A., Holeran, L.A., Doremus, R.H., Bisios, R.: Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res*. 25: 711-723, 1991.
- 32) Lowenberg, B., Chernecky, R., Shiga, A., Davies, J.E.: Mineralized matrix production by osteoblasts on solid titanium in vitro. *Cell Mater*. 1: 177-187, 1991.
- 33) Ozawa, S., Kasugai, S.: Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials*. 17: 23-39, 1996.
- 34) 武部 純: in vitro にて表面反応層を形成した生体活性ガラスの免疫細胞に対する影響. *補綴歯*. 38: 315-324, 1994.
- 35) Takebe, J., Itoh, S., Ariake, T., Shioji, H., Shioyama, T., Ishibashi, K.: The Effect on Immunity of Anodic Oxide Titanium after Hydrothermal Treatment. *J Biomed Mater Res*. 42: 272-277, 1998.
- 36) Kale, A. A., Di Cesare, P. K.: Osteoinductive agents. Basis science and clinical applications. *Am J Orthop Dentofacial Orthop*. 24: 752-761, 1995.
- 37) Jarcho, M., Kay, J.F., Gumaer, K.I., Doremus, R.H., Drobeck, H.P.: Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxyapatite interface. *J Bioeng*. 1: 79-92, 1977.
- 38) Biesbrock, A.R., Edgerton, M.: Evaluation of the clinical predictability of hydroxyapatite-coated endosseous dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 10: 712-720, 1995.
- 39) Robey, P.G., Boskey, A.L.: The biochemistry of bone. In: Marcus, R., Feldman, D., Kelsey, J., editors. *Osteoporosis*. New York: Academic Press, pp95-184, 1996.
- 40) Matsuura, T., Hosokawa, R., Okamoto, K., Kimoto, T., and Akagawa, Y.: Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium. *Biomaterials*. 21: 1121-1127, 2000.
- 41) Shina, R.K., Tuan, R.S.: Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone*. 18: 451-457, 1996.
- 42) Shina, R.K., Morris, F., Shah, S.A., and Tuan, R.S.: Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Rel Res*. 305: 258-272, 1994.
- 43) Kamijou, T., Nakajima, T., Ozawa, H.: Effects of osteocytes on osteoinduction in the autogenous rib graft in the rat mandible. *Bone*. 15: 629-637, 1994.
- 44) Linkhart, T.A., Mohan, S., Baylink, D.J.: Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone*. 19(1 Suppl): 1 S-12S, 1996.
- 45) Bab, I.A., Einhorn, T.A.: Regulatory role of osteogenic growth polypeptides in bone formation and hemopoiesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 3: 31-46, 1993.
- 46) Urist, M.R., Strates, B.S.: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 50: 1392-1406, 1971.
- 47) Mundy, G.R.: Regulation of bone formation by bone morphogenetic protein and other growth factors. *Clin Orthop*. 323: 24-28, 1996.
- 48) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whittiers, M.J., Krutz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*. 242: 1528-1534, 1988.
- 49) Caplan, A.I.: Mesenchymal stem cells. *Orthop Res*. 9: 641-650, 1991.
- 50) Owen, M.: Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 10: 63-76, 1988.
- 51) Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D.: *Molecular cell biology*. 2nd ed., Scientific American Books, pp903-951, 1990.
- 52) 本田雅規, 木全弘治: 細胞外マトリックス分子と細胞との情報伝達, 上田実編集: ティッシュ・エンジニアリング, 名古屋大学出版会, 名古屋, 32-42 ページ, 1999.
- 53) Roskelley, C.D., Srebrow, A., Bissell, M.J.: A hierarchy of ECM-mediated signaling regulates tissue-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol*. 7: 736-747, 1995.
- 54) Young, M.F., Kerr, J.M., Ibaraki, K., Heegaard, A.M., Robey, P.G.: Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop*. 281: 275-293, 1992.
- 55) Boskey, A.L.: Non collagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Miner*. 6: 111-123, 1989.

- 56) 松田武久: 細胞行動形態を操作する人工基材の表面設計 (I): 細胞接着・組織化過程の細胞バイオメカニクス. 生体材料. 12(4): 187-195, 1994.
- 57) Goldring, S. R., and Goldring, M.B.: Cytokines and skeletal physiology. Clin Orthop. 324 : 13-23, 1996.
- 58) Stein, G. S., Lian, J.B.: Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocr.Rev. 14:424-442, 1993.
- 59) Young, M.F., Kerr, J.M., Ibaraki, K. et al: Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. Clin Orthop. 281: 275-294, 1992.
- 60) Dallas, S.L., Miyazono, K., Skerry, T.M., et al: Dual role for the latent transforming growth factor- β in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. J Cell Biol. 131: 539-549, 1995.
- 61) Takeuchi, Y., Kodama, Y. and Matsumoto, T.: Bone matrix decorin binds transforming growth factor- β and enhances its bioactivity. J Biol Chem. 269: 32634-32638, 1994.
- 62) Franceschi, R., Iyer, B.S. and Cui, Y.: Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC 3 T 3 -E 1 cells. J Bone Miner Res. 9: 843-854, 1994.
- 63) Takeuchi, Y., Nakayama, K. and Matsumoto, T.: Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. J Biol Chem. 271: 3938-3944, 1994.
- 64) Groessner-Schreiber, B., and Tuan, R.S.: Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. J Cell Sci. 101: 209-217, 1992.
- 65) de Bruijn, J.D., van Bitterswijk, C.A., Davies, J.E.: Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. J Biomed Mater Res. 29: 89-99, 1995.
- 66) Aronow, M. A., Gerstenfeld, L.C., Owen, T. A., Tassinari, M.S., Stein, G.S., Lian, J.B.: Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. J Cell Physiol. 143: 213-221, 1990.
- 67) Kasugai, S., Todescan, R. Jr., Nagata, T., Yao, K. L., Butler, W.T., Sodek, J.: Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. J Cell Physiol. 147: 111-120, 1991.
- 68) Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M., Antosz, M.E.: Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int. 38: 143-154, 1986.
- 69) Ibaraki, K., Termine, J.D., Whitson, S.W., Young, M.F.: Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts. J Bone Miner Res. 7: 742-754, 1992.
- 70) Jingushi, S., Joyce, M.E., Bolander, M.E.: Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. J Bone Miner Res. 7: 1045-1055, 1992.
- 71) Virolainen, P., Perala, M., Vuorio, E., Aro, H. T.: Expression of matrix genes during incorporation of cancellous bone allografts and autografts. Clin Orthop. 317: 263-272, 1995.
- 72) Stein, G.S., Lian, J.B., Owen, T.A.: Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J. 4: 3111-3123, 1990.
- 73) Chen, J., Shapiro, H. S., Sodek, J.: Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. J Bone Miner Res. 7: 987-997, 1992.
- 74) Bianco, P., Riminucci, M., Bonucci, E., Termine, J. D., Robey, P.G.: Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation; relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. J Histochem Cytochem. 41: 183-191, 1993.
- 75) Kasugai, S., Nagata, T., Sodek, K.: Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), and osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. J Cell Physiol. 152: 467-477, 1992.
- 76) Hunter, G.K., Goldberg, H. A.: Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 8562-8565, 1993.
- 77) Mckee, M.D., Farach-Carson, M.C., Butler, W. T., Hauschka, P. C., Nanci, A.: Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and α_2 HS-glycoprotein) proteins in rat bone. J Bone Miner Res. 8: 485-496, 1993.
- 78) O'Neal, R.B., Sauk, J.J., Somerman, M.J.: Biological requirements for material integration. J Oral Implantology. 18: 243-255, 1992.
- 79) Butler, W. T.: The nature and significance of osteopontin. Connect Tissue Res. 23 : 123-136, 1989.
- 80) Mckee, M.D., and Nanci, A.: Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical studies on bone and interfaces. Cells Mater. 3 : 219-243, 1993.
- 81) Kawaguchi, H., Mckee, M.D., Okamoto, H., Nanci, A.: Immunocytochemical and lectin-gold characterization of the interface between alveolar bone and implanted hydroxyapatite in the

- rat.:Cells Mater. 3: 337-350, 1993.
- 82) Mckee,M.D., and Nanci,A.: Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues:a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis.Anat Rec. 245: 394-409, 1996.
- 83) Shen,X., Roberts,E., Peel,S.A.F., Davies,J.E.: Organic extracellular matrix components at the bone cell/substratum interface.Cells Mater. 3: 257-272, 1993.
- 84) Buser,D., Nydegger,T., Hirt, H., Cochran,D., Nolte,L.: Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs.J Oral Maxillofac Implants. 13: 611-619, 1998.
- 85) De Lange,D.G., De Putter,C., De Wijs,F.L.: Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface.J Biomed Mater Res. 24: 829-845, 1990.
- 86) Standford,C.M., Keller,J.C., Solursh,M.: Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. J Dent Res. 73: 1061-1071, 1994.
- 87) Yliheikkila, K. P., Masuda, T., Ambrose, W., Suggs,C.A., Felton,A.D., Cooper,L.F.: Preliminary comparison of mineralizing multiplayer culture formed by primary fetal bovine mandibular osteoblasts grown on titanium,hydroxyapatite and glass substrates. Int J Oral Maxillofac Implants. 60: 129-134, 1996.
- 88) Baylink, D. J., Finkelman, R. D., Mohan, S.: Growth factors to stimulate bone formation.J Bone Miner Res.8 suppl 2: S565-S572, 1993.
- 89) Sutter,F.: Oral implantology: Principles of the hollow cylinder design.Stuttgart:Georg Thime Verlag, pp37-58, 1991.
- 90) Ishizawa H, Ogino M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P.: J Biomed Mater Res. 29 : 65-72, 1995.
- 91) 梶村幸市, 塩山 司, 山森徹雄, 伊藤創造, 細川 貢, 島崎伸子, 有住達也, 石橋寛二, 石沢 均.: 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 (5) : 946-951, 1996.
- 92) Dee,K.C., Rueger,D.C., Andersen,T.T., Bizios,R.: Conditions which promote mineralization at the bone-implant interface:a model in-vitro study. Biomaterials. 17: 209-215, 1996.
- 93) Piattelli,A., Scarano,A., Corigliano,M., Piattelli, A.: Effects of alkaline phosphatase on bone healing around plasma-sprayed titanium implants:a pilot study in rabbits. Biomaterials. 17 : 1443-1449, 1996.
- 94) Endo, K. : Chemical modification of metallic implant surface with biofunctional proteins. Dental Material J. 14: 185-198, 1996.
- 95) Rutherford,R. B., Sampath,T.K., Rueger,D.C., Taylor,T.D.: Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants.Int J Oral Maxillofac Implants. 7 : 297-301, 1992.
- 96) Xiang,W., Baolin,L., Yan,J., Yang,X.: The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. J Oral Maxillofac Surg. 51: 647-651, 1993.
- 97) Missana,L., Nagai,N., Kuboki,Y.: Comparative histological studies of bone and cartilage formations induced by various BMP-carrier composites.Jpn J Oral Biol. 36: 9-19, 1994.
- 98) Howell,T.H., Fiorellini,J.P., Paquette,D.W., Offenbacher,S., Giannobile,W.V., Lynch,S.E.: Evaluation of a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-1 in patients with periodontal disease.J Periodontol. 68: 1186-1193, 1997.
- 99) Howell,T.H., Fiorellini,J., Jones,A., Alder,M., Nummikoshi,P., Lazaro,M., Lilly,L., Cochran,D.: A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. Int J Periodont Rest Dent. 17: 125-139, 1997.
- 100) Yasko,A.W., Lane,J.M., Fellingner,E.J., Rose,V., Wozney,J.M., Wang,E.A.: The healing of segmental bone defects induced by recombinant bone morphogenetic protein(rhBMP-2a). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. J Bone Joint Surg. 74-A: 659-671, 1992.
- 101) Yamada, K., Tabata, Y.: Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration.J Neurosurg. 86: 871-875, 1997.
- 102) Boyne,P.J., Marx,R.E., Nevins,M., Triplett,G., Lazaro,E.,Lilly,L.C., Alder,M., Nummikoshi,P.: A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation.Int J Periodontics Restorative Dent. 17(1): 11-25, 1997.
- 103) Hanada,K., and Dennis,J.E.: Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells.J Bone Mineral Res. 12: 1606-1614, 1997.
- 104) Giannobile, W.V., Finkelman,R.D., Lynch,S.E.: Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy:results following a single administration of PDGF/IGF-1.J Periodontol. 65: 1158-1168, 1994.
- 105) Lind,M.,Overgaard,S., Ongpipattanakul,B., Nguyen,T.,Bunger,C., Soballe,K.: Transforming

growth factor-beta 1 stimulates bone on-growth to weightloaded tricalcium phosphate coated implants:an experimental study in dogs. J Bone Joint Surg(Br). 78: 377-382, 1996.

- 106) Marx,R.E. : A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In:Lynch,S.E., Genco,R.J.,Marx,R.E., editors.Tissue engineering.: Quintessence publishing Co,Inc., Chicago, pp71-82, 1999.