合成水酸化アパタイトのラット顎骨補填時における病理組織学的研究

永井 教之・竹下 信義・白須賀英樹・秋 場 道 保

Histopathological studies of implantation of hydroxyapatite in the rat jaw bone

Noriyuki NAGAI・Nobuyoshi TAKESHITA・Hideki SHIRASUGA・Michiyasu AKIBA

Abstract: This study was performed to examine the osteogenesis-inducing capacity of hydroxyapatite (HAP) with non-sintering or sintering condition. Three HAPs, Undrying slurry HAP, drying HAP at 200°C and sintering HAP at 800°C, were used. Each HAP was filled into an osseous cavity prepared in the rat mandible. Observation periods were 3 days, 1, 3, 8 and 12 weeks after the filling of each HAP into the osseous cavity.

Histologic sections showed osteogenesis around each HAP particle. Each HAP particle was embedded in the new bone unlike tricalcium phosphate. Also, it was difficult to determine the difference of osteogenesis between each HAP.

In early periods of HAP filling, macrophages or multinuclear giant cells phagocytized HAP micro-particles. Thus, this study indicated that HAP had osteogenesis-inducing capacity which was not affected by sintering conditions in the synthesis process of HAP. We also proposed that the particle size of HAP had to be larger than the size of the particle phagocytized by phagocytic cells for the inducer of osteogenesis.

Key words: hydroxyapatite, sintering condition, osteogenesis

緒 言

近年、合成ハイドロキシアパタイト (HAP) は骨補填材や人工歯根として、生体材料の重要な位置を占めている。合成ハイドロキシアパタイトの骨補填材応用に関して、多くの臨床的、実験的研究が行われ、HAP が骨形成を誘導することが示されている¹⁻⁵⁾。また、HAP は生成条件、特に焼成温度により化学的、物理的性質に差異が生じることも知られている^{3,6,7)}。現在までに報告された HAP の骨埋入実験に使用された HAP は、高温焼成 (900~1,200°C) であることが多い。非乾燥状態 (スラリー) を含め種々の焼成温度で生成された HAP に対する骨組織の生物学的反応は全く知られていない。われわれは、スラリーを初め焼結温度の異なる数種類の HAP

を人工的顎骨欠損部に埋入し、新生骨形成過程を組織学的に検索した。

材料および方法

実験動物は雄 Wister ラット (体重: 200 g) 40匹である。使用した HAP は湿式法により合成 (太平化学産業研究部) されたものであり、(1) 合成直後のスラリー (S-HAP; HAP 30% 含有)、(2) 合成後 200°C 乾燥したもの (2-HAP)、および (3) 合成後 800°C 焼成したもの (8-HAP) の3種類である。また、2-, 8-HAP は乾燥または焼成後、粉碎して粉末状としたものであり、粒径は各 HAP とともに 0.5~40 μm である。

動物を腹腔内麻酔して、下顎骨下縁に沿って皮膚に切開を加え、十分に骨面を露出し、歯科用ラウンドバー (#2) により 2×1.5×1.5 mm の窩洞形成を行った。窩洞内を滅菌生食水で十分に洗滌し、各 HAP を窩洞に填入後筋組織および皮膚を縫合した。観察期間は HAP 埋入後 3 日、1, 3, 8 および 12 週間である。次に観察期間に従って動物を 2% グルタルアルデヒド・2% パラホルムアルデヒド固定液により灌流固定して、下顎骨を摘

岡山大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 永井教之教授)

Department of Oral Pathology, Okayama University School of Dentistry (Chief: Prof. Noriyuki Nagai)

受付日: 昭和60年1月24日

出した。摘出した下顎骨を10% EDTA 液で脱灰後、常法に従ってパラフィン包埋し、4 μm パラフィン切片を作製した。また、パラフィン切片にはヘマトキシリン・エオジン染色を施して、光顕的に観察を行った。

結 果

1. S-HAP

埋入3日目：S-HAP 粒子間隙には、好中球浸潤、フィブリンの析出および赤血球が混在している。また窩洞底部より、リンパ球、マクロファージ、線維芽細胞に富んだ肉芽組織が増殖している。この肉芽組織内では、S-HAP 微小粒子を貪食したマクロファージが認められ、粒径20 μm 以上のS-HAP 粒子は類円形、紡錘形細胞によって包囲されている(写真1)。

埋入1週間：線維芽細胞の豊富な肉芽組織が、S-HAP 粒子間隙を充満して増殖し、S-HAP 粒子に接して類円形細胞が認められる。炎症性細胞浸潤は認められない。また窩洞底部より梁状 Callus 形成が認められ、一部の Callus には、S-HAP 粒子が埋入されている(写真2)。これら Callus 表面には多数の骨芽細胞が配列し、また、Callus 間の線維性組織には、S-HAP 微小粒子を貪食したマクロファージが散見される。

埋入3週間：種々の太さの Callus が S-HAP を包埋して著明に増生している。Callus 周囲には多数の骨芽細胞が配列し、また、Callus 間隙には線維芽細胞に富んだ線維性組織が存在している(写真3)。Callus 内S-HAP 粒子と Callus 基質との境界は不明瞭である(写真4)。

埋入8週間：不規則な層板構造を有する緻密骨組織が埋入窩洞を完全に補填し、骨組織内にはS-HAP 粒子が包埋されている。また、骨組織にはHaver's 管腔および骨髓腔も形成されている。S-HAP 粒子と骨組織との境界は不明瞭であるが、時に粒子周縁にヘマトキシリン好性線が存在している(写真5)。

埋入12週間：埋入8週間と同様に、大小不整なS-HAP 粒子は緻密、層板骨組織によって包埋され、粒子周縁にはヘマトキシリン好性線が認められる(写真6, 7)。また、骨組織内には、多数の骨細胞、Haver's 管腔および骨髓腔が存在し、S-HAP 粒子が細胞を介して骨髓腔と接するところも観察される(写真8)。

2. 2-HAP

埋入3日目：埋入した2-HAP 粒子間隙には、好中球浸潤、フィブリンの析出が認められ、窩洞底部よりリンパ球、マクロファージおよび線維芽細胞などに富む肉芽組織が増殖が認められる。肉芽組織内には、2-HAP 微小粒子を貪食したマクロファージ多核巨細胞が存在し、また、2-HAP 粒子周囲には類円形細胞や、骨芽細胞様細胞が認められる(写真9)。

埋入1週間：2-HAP 粒子間隙は、線維芽細胞に富ん

だ肉芽組織により満され、窩洞底部よりは、種々の太さの梁状 Callus が新生している。肉芽組織内では、2-HAP 粒子に接した骨芽細胞様細胞が認められる。また Callus 増生域では、Callus が2-HAP 粒子を包囲するように新生し、2-HAP 粒子を埋入した Callus も認められる(写真10)。Callus 周囲には多数の骨芽細胞が不規則に配列している。

埋入3週間：埋入窩洞をほぼ補填するように、Callus が形成され、Callus 内には大小の2-HAP 粒子が包埋されている(写真11)。また、Callus 間の狭い間隙には粗な線維性組織が認められる。包埋された2-HAP 粒子と Callus との境界は比較的不明瞭であり、Callus が粒子内に進入するように形成されているところも観察される(写真12)。Callus 周囲には、多数の骨芽細胞が配列している。

埋入8週間：2-HAP 粒子を包埋した、不規則な層板構造を有する緻密骨組織が埋入窩洞を完全に補填している(写真13)。2-HAP 粒子と骨組織の境界にはヘマトキシリン好性線が認められるが、一部では2-HAP 粒子は骨組織との境界がきわめて不明瞭となっている(写真14)。緻密骨組織は多数の骨細胞、Haver's 管腔および骨髓腔を含有している。

埋入12週間：2-HAP 粒子は緻密層板骨組織により包埋され、両者の境界にはヘマトキシリン好性線が認められる(写真15)。骨組織は多数の骨細胞、Haver's 管腔および骨髓腔を有しており、2-HAP 粒子が骨髓腔と接していないところも観察される(写真16)。

3. 8-HAP

埋入3日目：埋入した8-HAP 間隙に、好中球、析出フィブリンおよび赤血球が混在している。窩洞底部より、多数のマクロファージ、線維芽細胞を含有した肉芽組織が増殖している。肉芽組織は8-HAP 粒子を取り込みながら増殖し、8-HAP 粒子は類円形、紡錘形細胞によって包囲されている(写真17)。少数の8-HAP 粒子は骨芽細胞様細胞によって囲まれている。また、微小粒子はマクロファージや多核巨細胞によって貪食されている。

埋入1週間：肉芽組織が8-HAP 間隙を満して増殖し、窩洞底部より Callus 新生が始まっている。肉芽組織域では、8-HAP 粒子が多数の骨芽細胞様細胞や紡錘形細胞によって囲まれている。また、Callus 新生域では、8-HAP 粒子は Callus と接するものや、Callus に埋入されたものなど多様であり、Callus 周囲には多数の骨芽細胞が配列している(写真18)。

埋入3週間：8-HAP 粒子を包埋した Callus が窩洞全体にわたり形成されている。狭小な Callus 間隙には線維性組織が存在している(写真19)。また、8-HAP 粒子と Callus との境界は不明瞭で、Callus 表面には多数の骨芽細胞が認められる(写真20)。

埋入8週間：8-HAP 粒子を包埋した Callus は緻密成

熟骨組織に完全に移行し、両者の境界には薄いヘマトキシリン好性層が認められる(写真21)。また、骨組織は不規則な層板構造を有し、多数の骨細胞、Haver's 管腔および骨髓腔も認められる。

埋入12週間：8週間と同様に8-HAP粒子は緻密層板骨組織に包埋されている(写真22, 23)。また、8-HAP粒子が直接、骨髓腔と接しているところも認められる(写真24)。

考 察

合成ハイドロキシアパタイト(HAP)はリン酸カルシウム系セラミックスのひとつであり、三リン酸カルシウム(TCP)とともに生体材料として種々の生体内応用が期待されている¹⁻¹²⁾。HAPは合成条件、特に焼結温度により異なった物理的、化学的性質を示すことも知られている^{3,6,7)}。すでに、田端ら¹³⁾は高温焼結して得られたHAPを人工歯根として実用化している。一方、骨補填材の応用に関して、人工的骨欠損部へHAPを補填して新生骨形成を検討した実験的研究が行われている^{1-5,8-10)}。これらの研究によると、多孔質HAP⁶⁾あるいは粒状HAP^{1-5,8,10)}のいずれにおいても、HAPが新生骨誘導能を有することが示されている。また、これらほとんどの実験的研究は900~1,300℃と高温焼結したHAPを使用している。

われわれはHAPの生成条件、特に焼成温度の差と骨誘導との関連性の有無について検討した結果、1週間目でいずれの状態のHAPもHAP粒子を埋入しながら幼若骨組織形成が開始されていた。また、S-HAPでも幼若骨組織形成に先立って、HAP粒子が骨芽細胞様細胞により取り囲まれていたことを考え合せると、本材料の場合どのような焼結状態であっても、HAPが骨形成の核となり、骨誘導能を有することが示唆された。このことから、HAPの骨誘導能はHAPの基本的性質であり、焼結温度によって影響を受けないことが示唆された。HAPの骨誘導機構について不明の点が多い。HAP表面が微量溶解することによる化学的刺激という考え方もあるが⁶⁾、Caイオンの局所的濃度上昇に成因があるとするれば、溶解性の高いスラリーや200℃乾燥粉末の周囲は骨形成の条件が有利に展開している可能性があり、われわれは今後、この方向から研究していく必要がある。

先にわれわれは、HAPを皮下移植実験の結果、HAP粒子は大きさにより、また経時的にマクロファージ、多核巨細胞による貪食や線維性組織による被包化を受けることを明らかにしたが、それらは生体の基本的な防御反応のひとつと考えられている。本実験において、HAPの骨埋入初期においては、いずれのHAPにおいてもマクロファージや多核巨細胞がHAP微小粒子を貪食していたが、大型粒子は貪食されることなく、新生幼弱骨が

その表面に添加され、最終的に成熟骨に包埋されていた。HAPが骨補填材となるためにはその粒径が、貪食細胞や多核巨細胞に貪食されない以上の大きさが必要と考えられる。

HAPと同じリン酸カルシウム系セラミックである三リン酸カルシウム(TCP)は骨埋入され、溶解、消失しながら新生骨と置換する^{14,15)}。これに対して、HAPは、本実験でも示したように、ほとんど溶解、消失せず、新生骨組織に包埋、残留していた。HAPはBioactiveセラミックとして、TCPはBiodegradableセラミックとして位置付けされているが、骨補填材として、HAP、TCPのいずれを選択するかは、今後さらに詳細な研究を重ねる必要があると思われる。

結 論

われわれは、生成条件、特に焼成温度の異なる3種類の合成ハイドロキシアパタイト(HAP)、S-HAP、2-HAP、8-HAPをラット下顎骨に埋入し、新生骨誘導について組織学的に比較、検討して、以下の結論を得た。

1. いずれのHAP埋入でも、埋入3日から1週間で、HAP微小粒子を貪食するマクロファージや多核巨細胞が出現していた。
2. HAP粒子に接してCallus形成が開始し、いずれのHAPも同程度の骨誘導能を有することが確認された。
3. 各HAP埋入後のCallus形成時期、新生骨成熟期にほとんど差異がなく、HAP埋入後の骨形成過程の組織学的推移に、焼成温度は影響しないことが明らかとなった。
4. HAPが骨誘導能を発現するためには、マクロファージ、多核巨細胞に貪食されない粒径の大きさが必要であることが示唆された。

引 用 文 献

- 1) 永井教之・セラミック・歯科インプラントの病理学的アプローチ。東京歯科医師会雑誌 39: 316-323 1984。
- 2) 高橋 忍、丹羽滋郎、他：人工移植骨材としての合成水酸アパタイト。医学のあゆみ 116: 156-157 1981。
- 3) 原 宣興、古川猛士、他：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。
- 4) 鴨井久一、那波明夫、他：歯周治療における骨移植の研究。第2報 Hydroxyapatite のマイクロラジオグラフィおよび病理組織学的研究。日歯周誌 26: 523-531 1984。

- 5) 渡辺英弥, 青木宏道, 他: リン酸カルシウム系セラミックの歯内療法領域への応用に関する基礎的検討 (第1報). 特にハイドロキシアパタイト系材品 Periograf™ について. 歯科学報 84: 1175-1183 1984.
- 6) 青木秀希, 加藤一男, 他: 新しい歯科インプラント材料としてのアパタイト焼結体. 歯界展望 49: 567-575 1977.
- 7) 鴨井久一, 米山武義, 他: 歯周治療における骨移植の研究. 第1報 Hydroxyapatite の基礎的研究. 日歯周誌 26: 275-288 1984.
- 8) 山崎安晴: 人工骨としての多孔質アパタイト——顎骨補填実験——. 口病誌 51: 372-406 1984.
- 9) 林 成忠, 木村喜保, 他: サル歯槽骨欠損部における Hydroxyapatite 移植の臨床的および組織学的研究. 日歯周誌 25: 919-935 1983.
- 10) 原 宜興, 岸 哲也, 他: リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用. 3. 実験的歯周炎への Hydroxyapatite の応用. 日歯周誌 26: 542-555 1984.
- 11) 中川寛一: 歯内療法領域における生体材料の応用に関する臨床病理学的研究. 特にハイドロキシアパタイトの応用価値に関する検討. 歯科学報 83: 501-527 1983.
- 12) 庄司 茂, 石川潤一, 他: 多孔質ハイドロキシアパタイトの歯内療法への応用. 1. 根管充填材として. 日歯保誌 27: 658-667 1984.
- 13) 田端恒雄, 小木曾誠: アパタイトセラミックインプラント. 歯科ジャーナル 18: 337-348 1983.
- 14) 永井教之, 丸山晴義, 他: 合成水酸化アパタイト粉末の皮下移植試験に関する基礎的研究. 岡山歯誌 4: 57-65, 1985.
- 15) Bhaskar, S.N., Brady, J.M., et al.: Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. Oral Surg 32: 336-346 1971.
- 16) Jarcho, M.: Calcium phosphete ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop Res 157: 259-278 1981.
- 17) 古川猛士, 岸 哲也, 他: リン酸カルシウム系セラミックの歯周組織への応用. 2. Tricalcium phosphate についての基礎実験. 日歯周誌 26: 263-274 1984.

写真 1 HAP スラリー埋入 3 日目
(H-E, $\times 300$)

写真 3 HAP スラリー埋入 3 週目
(H-E, $\times 150$)

写真 2 HAP スラリー埋入 1 週目
(H-E, $\times 150$)

写真 4 HAP スラリー埋入 3 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 5 HAP スラリー埋入 8 週目
(H-E, $\times 150$)

写真 7 HAP スラリー埋入 12 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 6 HAP スラリー埋入 12 週目
(H-E, $\times 150$)

写真 8 HAP スラリー埋入 12 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 9 200-HAP 埋入 3 日目
(H-E, $\times 300$)

写真 11 200-HAP 埋入 3 週目
(H-E, $\times 77$)

写真 10 200-HAP 埋入 1 週目
(H-E, $\times 150$)

写真 12 200-HAP 埋入 3 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 13 200-HAP 埋入 8 週目
(H-E, $\times 77$)

写真 15 200-HAP 埋入 12 週目
(H-E, $\times 77$)

写真 14 200-HAP 埋入 8 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 16 200-HAP 埋入 12 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 17 800-HAP 埋入 3 日目
(H-E, $\times 300$)

写真 19 800-HAP 埋入 3 週目
(H-E, $\times 77$)

写真 18 800-HAP 埋入 1 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 20 800-HAP 埋入 3 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 21 800-HAP 埋入 8 週目
(H-E, $\times 150$)

写真 23 800-HAP 埋入 12 週目
(H-E, $\times 300$)

写真 22 800-HAP 埋入 12 週目
(H-E, $\times 77$)

写真 24 800-HAP 埋入 12 週目
(H-E, $\times 300$)