加齢がヒドロキシアパタイトと骨との結合に及ぼす影響について ——ラット脛骨内に埋入後の組織学的所見——

代田 達夫・大野 康亮・鈴木 香奈子
宮本 宰・松井 義郎・道 健一

The effect of aging on the hydroxylapatite-bone bonding —Histological findings of the tissue reaction after installation of a hydroxylapatite ceramics—

Tatsuo SHIROTA・Kohsuke OHNO・Kanakano SUZUKI
Osamu MIYAMOTO・Yoshiro MATSUI・Ken-ichi MICHII

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect of aging on the healing process after installation of hydroxylapatite (HA) implant into bone tissue. Three groups of eight male Wistar rats, aging 6 weeks (Young group), 12 weeks (Adult group), and approximately two years (Old group) were used in this experiment. Two implants were installed into the rats tibiae bilaterally. The animals were sacrificed 7, 14, 28, and 56 days after the installation, and 15 μ m hematoxylin-eosin stained undecalcified sections were prepared. The healing processes were examined histologically.

In the Young group, new trabecular bone was formed actively around the HA implant, and good HA-bone bonding was achieved rapidly compared to the Adult group. In the Old group, both the quantity of newly formed trabecular bone around the implant and the extent of HA-bone bonding were less than in the other groups. These results suggested that the activity of new bone formation after implantation declines with increasing age. Therefore, it is concluded that aging has disadvantages in the achievement of good HA-bone bonding.

Key words: aging (加齢), hydroxylapatite (ヒドロキシアパタイト)

緒 言

ヒドロキシアパタイトは優れた組織親和性を有し、骨と直接結合することから、人工歯根、骨補填材などの生体材料として広く応用されている¹⁻⁷⁾。これらの生体材料は、特に高齢者へ適用される機会が多いが、高齢者では骨と活性の低下あるいは骨の代謝異常などをきたしていることが多く⁸⁻¹⁰⁾、生体材料の適用の条件は厳しいものと考えられる。しかし、加齢が骨創治癒に及ぼす影響

についての研究は少なく^{11,12)}、特に個体の老化がヒドロキシアパタイトと骨との結合に及ぼす影響に関する検討は見当たらない。したがって、高齢者に対してこれらの生体材料を適用する場合、アパタイトと骨との結合の程度、結合に要する時間あるいはアパタイト周囲における骨のリモデリングなどについては明らかではない。

そこで本研究では、ヒドロキシアパタイト焼結体を成熟度の異なる動物の骨組織中に埋入し、個体の加齢がアパタイトと骨との結合、新生骨梁の形成ならびにそのリモデリングなどに及ぼす影響について組織学的に検討した。

実 験 方 法

1. 実験動物

実験動物は、生後6週、12週および約120週の雄性

昭和大学歯学部第1口腔外科学教室

(主任：道 健一教授)

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Showa University (Chief: Prof. Ken-ichi Michi)

受付日：平成3年9月17日

写真 1 脛骨の組織所見 (H-E 染色, $\times 100$)

結 果

1. 各群における脛骨の組織学的所見 (写真 1)

幼若ラットと成熟ラットとの脛骨を比較すると、緻密骨は薄い傾向を示した。また、緻密骨の外基礎層板ならびに内基礎層板も薄く、ハバース層板との境界は不明瞭であった。ハバース管およびフォルクマン管は広いものが多く、これらの管腔内では類骨が盛んに形成され、類骨に接して類円形の骨芽細胞が認められた。骨小腔は丸みを帯びた楕円形のものが多く、不規則な配列を示した。骨髓腔は成熟ラットに比べ相対的に広く、大部分は骨髓細胞によって占められていた (写真 1a)。

成熟ラットの脛骨は、外基礎層板および内基礎層板の骨層板は規則的に配列し、ハバース層板との境界は明瞭な像を呈していた。骨小腔の大部分は楕円形を呈し、規則的な配列を示した。骨髓腔の大部分は骨髓細胞によって占められ、一部に脂肪細胞が散在しているのが認められた (写真 1b)。

老齢ラットと成熟ラットを比較すると、外基礎層板および内基礎層板は薄く、骨層板は減少する傾向を示した。ハバース管およびフォルクマン管の一部には成熟ラットと比べ広いものが認められた。骨小腔は成熟ラットに比べ扁平形を呈するものが多くみられた。骨髓腔の大部分は脂肪組織によって占められ、一部に骨髓細胞がみられた (写真 1c)。

Wistar 系ラット各 8 匹を使用し、6 週齢のものを幼若群、12 週齢のものを成熟群、約 120 週齢のものを老齢群とした。

2. 埋入材料

直径 2 mm, 長さ約 3 mm の円柱型の緻密性ヒドロキシアパタイト焼結体 (以下 HA)¹³⁾ を用いた (旭光学社製)。

3. 手術方法

麻酔は、ペントバルビタール (ネブタール®) 30 mg/kg の腹腔内投与により行った。左右下腿部を広く剃毛し、皮膚消毒の後脛骨を露出させた。生理食塩水を滴下しながらラウンドバーで左右脛骨の外側骨面に 2 か所骨孔を形成し、ついで直径 2.2 mm のボンドリルを用いて、これらの骨孔が直径約 2.2 mm となるように整形した。HA は上縁が骨面と一致するように埋入した。創の閉鎖は骨膜、筋肉および皮膚の 3 層縫合にて行った。術後の感染予防のためにアンピシリン 10 mg (ビクシリン®) を筋注した。

4. 試料作成および観察方法

実験期間は HA 埋入後、7, 14, 28 および 56 日とし、それぞれの一定期間ごとに屠殺して、脛骨を摘出し、10% リン酸緩衝ホルマリン溶液 (pH 7.2) にて固定、脱水および stylen monomer による透徹を経て、polyester 樹脂に包埋、重合、硬化させた。その後、EXAKT Cutting-Grinding System にて HA の長軸とほぼ垂直の厚さ約 15 μ m の横断研磨標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色¹⁴⁾を施し、組織学的な検討を行った。

写真 2 術後7日目の所見 (H-E 染色, $\times 100$)

2. HA 埋入後の組織所見

1) 術後7日目 (写真2)

幼若群では、HA 表面の各所で新生骨との結合が認められた。HA 周辺には多量の新生骨梁が形成され、互いに癒合し、HA 表面の各所で新生骨と結合していた。新生骨梁の骨小腔は、既存の骨に比べて大きく、不規則に配列していた。新生骨梁の周辺には厚い類骨の層が形成され、その周辺には類円形の骨芽細胞が認められた。骨髓腔は拡張した血管を伴った疎な線維性結合組織によって占められていた (写真 2a)。

成熟群では、HA 表面の一部で新生骨との結合が認められたが、大部分は HA 表面に走行する幼若な線維性結合組織によって覆われていた。HA 周辺の骨髓腔には緻密骨の内面から幼若な新生骨梁が HA 表面に沿って形成されていた。新生骨梁の骨小腔は、既存の骨に比べて大きく、不規則な配列を示した。新生骨梁の表面には類骨が形成され、その周辺には類円形の骨芽細胞が認められた (写真 2b)。

老齢群では、HA と新生骨との結合はほとんどみられず、HA 表面の全域は幼若な線維性結合組織によって覆われていた。HA 周辺の骨髓腔には緻密骨の内面から HA 表面に沿って幼若な新生骨梁が形成され、成熟群とほぼ同様の所見を呈していた (写真 2c)。

2) 術後14日目 (写真3)

幼若群では HA 表面の大部分に新生骨との結合が認

められた。HA 周辺の新生骨梁は術後7日目に比べ疎化し、島状に散在していた。新生骨梁の周囲の骨芽細胞の大部分は橢円形を呈し、類骨は術後7日目に比べて減少していた。骨髓腔の大部分は骨髓細胞によって占められ、一部には拡張した血管を伴う疎な線維性結合組織と脂肪組織が散見された (写真 3a)。

成熟群では、HA 表面の各所で新生骨との結合が認められた。HA 周辺では新生骨梁の形成が術後7日目と比較して著しく増大し、新生骨梁は互いに癒合し、各所で HA 表面の新生骨と結合していた。これらの新生骨梁の骨小腔は既存の骨に比べて大きく、不規則な配列を呈していた。また、新生骨梁の表面には厚く類骨の層が形成され、その周辺に類円形の骨芽細胞がみられた。HA 周辺の骨髓腔は拡張した血管を伴う疎な線維性結合組織によって占められていた (写真 3b)。

老齢群では成熟群とほぼ同様に HA 表面の各所で新生骨との結合が認められた。HA 周辺には成熟群とほぼ同様に新生骨梁が形成されていたが、その形成量は成熟群に比較して少ない傾向を示した。HA 周辺の骨髓腔には、成熟群とほぼ同様に拡張した線維性結合組織がみられたが、脂肪組織の占める部分が比較的多く認められた (写真 3c)。

3) 術後28日目 (写真4)

幼若群では HA 表面のほぼ全域で新生骨と癒合し、これらの新生骨は術後14日目に比べ薄く、均一な幅を有

写真 3 術後14日目の所見 (H-E 染色, $\times 100$)

写真 4 術後28日目の所見 (H-E 染色, $\times 100$)

写真 5 術後56日目の所見 (H-E 染色, ×100)

していた。HA 周辺の新生骨梁は術後14日目に比べさらに疎化し、島状あるいは点状に散在していた。骨髓腔の大部分は骨髓細胞によって占められ、一部に脂肪組織が散在していた (写真 4a)。

成熟群では HA 表面の大部分で新生骨との結合がみられ、これらの新生骨は不規則な厚みを呈していた。HA 周辺の新生骨梁は術後14日目に比べ疎化し島状に散在し、骨梁表面の類骨の幅は減少していた。骨髓腔の大部分は骨髓細胞によって占められ、一部に脂肪組織が散在していた (写真 4b)。

老齢群では、HA 表面と新生骨との結合は術後14日目に比べ増大していた。しかし、成熟群に比べるとその範囲は少なく、HA 表面に沿って走行する線維性結合組織が介在している部分が比較的多くみられた。HA 周辺の新生骨梁は疎であり、成熟群に比較して細く、小さな新生骨梁が多くみられた。骨髓腔には脂肪組織が多く認められ、一部に骨髓細胞が散在していた (写真 4c)。

4) 術後56日目 (写真 5)

幼若群では、HA 表面の全域で新生骨が結合していた。これらの新生骨は術後28日目にほぼ同様に薄く、ほぼ均一な厚みを有していた。HA 周辺の新生骨梁は術後28日目に比べ疎化し、点状に散在していた。骨髓腔の大部分は骨髓細胞によって占められ、一部に脂肪細胞が散在していた (写真 5a)。

成熟群では、HA 表面の大部分で新生骨との結合が認

められたが、一部は緻密な線維性結合組織が形成されていた。HA 表面の新生骨は薄く、ほぼ均一な厚みを有していた。HA 周辺の新生骨梁は疎化し、点状に散在していた。骨髓腔の大部分は骨髓細胞によって占められ、一部に脂肪組織が散在していた (写真 5b)。

老齢群における HA と新生骨との結合は術後 28 日目に比べ増大していたが、他の群と比較するとその範囲は少なかった。HA と新生骨との結合がみられない部分には、HA 表面に沿って走行する緻密な線維性結合組織がみられた。HA 周辺には新生骨梁はほとんど認められなかった。骨髓腔の大部分は脂肪組織によって占められ、一部に骨髓細胞が散在していた (写真 5c)。

考 察

1. 実験方法について

加齢に伴い骨粗鬆症の発症頻度は高くなるが、骨粗鬆症は生理的な骨の加齢の基盤のうえに、カルシウムの不足あるいはホルモンの不均衡などが重なって、発症した病的状態であって、正常な老化現象とは区別されている^{8-10,15)}。したがって、加齢が HA と骨との結合に及ぼす影響を検討する場合には、低 Ca 食などで実験的に骨粗鬆症を発症させたラット^{16,17)}よりも、寿命に近い期間まで飼育されたものを老化のモデルとして用いた方が妥当であると考えられる。そのため本実験では生後約 120

週飼育された老齢ラットを老化のモデルとして用いた。一方、Wistar 系ラットの体重の増加は生後4週から8週にかけて最も著しく¹⁸⁾、したがって骨組織においても最も活発な成長時期であると推測される。そこで6週齢のものを幼若ラットとして用いた。また、Wistar 系ラットは一般に10週齢前後のものが成熟ラットとして用いられていることから、本実験では12週齢のものを成熟ラットとして用いた。

試料作製にあたっては、包埋材は従来から広く用いられているポリエステル樹脂を使用し、研磨切片の作製には EXAKT Cutting-Grinding System を用いた。また、研磨切片の染色には 著者が考案した HE 染色法を施した。本法の特徴は、包埋操作や重合操作が容易なポリエステル樹脂を使用すること、試料の片面をアクリル板に固定した状態で研磨するため、破壊による組織の欠損をきたすことなく 15 μm という非常に薄い研磨標本の作製が可能なこと、また、細胞レベルの詳細な組織学的な観察が行いえることなどである¹⁹⁾。したがって生体材料の界面あるいは周囲の所見を組織学的に検討する研究において、本法は有用な方法であると思われる。

2. 組織所見について

今回の結果から、幼若群では HA 周辺における骨梁形成ならびに HA と骨との結合は成熟群に比べ7日程度早く進行していたことになる。従来より幼若な個体では骨形成能力がきわめて高く、骨移植を行った場合では、その治癒経過は成熟した個体に比べ早いといわれている¹⁷⁻¹⁹⁾。本実験で得られた結果は HA 埋入時においても同様ながいえることを示唆するものと考えられる。術後28日目以後、HA 周囲に線維性結合組織の介在する部分がほとんどみられず、非常に良好な骨との結合が認められた。これは、幼若ラットでは HA 周辺に比較的短時間で多量の新生骨梁が形成され、HA と骨との結合が速やかに進行したためと思われる。HA 周辺の新生骨梁は、術後7日以後経時的に疎化する傾向を示した。すなわち、HA 周辺における新生骨梁のリモデリングは成熟群に比べて7日程度早く進行したことになる。

老齢群では新生骨梁の形成は術後14日目に最も盛んであったと思われる。したがって、成熟群と比較した場合、時間的には大きな違いはないことになる。しかし、HA 周辺における骨梁の形成状態を成熟群と詳細に比較すると、老齢群の方が形成量が少ない傾向を示した。これらのことは、老齢群では骨形成能の低下をきたしていることを示唆するものと考えられる¹²⁾。HA と新生骨との結合は術後14日目まで各所で認められ、その範囲は術後28日目までさらに増大していたが、それ以後では結合範囲が増大する傾向はみられなかった。また、HA と新生骨との結合がみられない部分には緻密な線維性結合組織が形成されていた。今回、老齢群で良好な骨との結合が得られなかった原因としては、HA 周辺における新生骨梁

の形成が少なく、HA 表面に新生骨が結合する前に緻密な線維性結合組織によって覆われた部分が他の群に比べて多かったことが考えられる。また、老齢群では術後28日以後時間が経過しても HA 表面に形成された線維性結合組織に阻害され、新生骨との結合範囲はほとんど増大しないものと想像される。老齢群の新生骨梁に対するリモデリングは、今回得られた所見より、成熟群とほぼ同時期から進行するものと考えられた。

結 語

成熟度の異なる Wistar 系ラットの脛骨に HA を埋入し、加齢が HA と骨との結合 および新生骨のリモデリングに及ぼす影響について組織学的に検討を行い以下の結果を得た。

1. HA 周辺の新生骨梁の形成は、幼若群では術後7日頃が最も活発な時期であり、成熟群に比べ7日程度早く進行するものと考えられる。これに対し、老齢群では術後14日頃が新生骨梁の形成の最も盛んな時期であり、時期的には成熟群とほぼ同様の傾向を示した。

2. 成熟群と老齢群とを詳細に比較すると、術後14日目の HA 周辺における新生骨梁は老齢群では比較的少ない傾向を示し、骨形成能が低下しているものと考えられる。

3. HA 表面と新生骨との結合は幼若群では成熟群に比べ7日程度速く進行し、術後28日以降では HA 表面の全域が新生骨によって覆われていた。一方老齢群では術後28日目までは成熟群とほぼ同様の経過を示した。しかし、術後28日以降では成熟群と異なり骨結合の範囲の増大は少なく、術後56日目においても線維性結合組織の介在する部分が比較的多くみられた。

4. HA 周辺における新生骨梁のリモデリングは、幼若群では成熟群に比べ7日程度早く進行したが、老齢群では成熟群とほぼ同時期からリモデリングが進行していた。

5. 以上のことから、HA を骨組織に埋入した場合、発育途上にある幼若な個体では成熟した個体に比べ早く良好な骨との結合が得られ、また、新生骨に対するリモデリングも比較的早く進行するものと思われる。これに対し、個体が老化すると骨形成能が低下し、一方では新生骨のリモデリングが進行しているため、HA と骨との良好な結合を得る条件は厳しいものと考えられる。

引 用 文 献

- 1) Kent, J.N., Quinn, J.H., et al.: Alveolar ridge augmentation using nonresorbable hydroxylapatite with or without cancerous bone. J Oral Maxillofac Surg 41: 629-642 1983.

- 2) Lew, D.: A method for augmenting the severely atrophic maxilla using hydroxylapatite. J Oral Maxillofac Surg 42: 793-796 1984.
- 3) 小木曾 誠, 金田浩之, 他: アパタイト・インプラント—特に 2-piece implant の基礎と臨床—。歯科ジャーナル 25: 617-633 1987.
- 4) 大野康亮, 松井義郎, 他: 緻密質ハイドロキシアパタイト金属複合体人工歯根の顎補綴への応用に関する研究 (第2報)。人工歯根の臨床応用。昭歯誌 8: 337-348 1988.
- 5) Kent, J.N., Block, M.S., et al.: Biointegrated hydroxylapatite-coated dental implants: 5-year clinical observation. J Am Dent Assoc 121: 138-144 1990.
- 6) 神林秀昭: 多孔質アパタイト人工骨による下顎骨再建に関する実験的研究—区域切除後の架橋補填について—。口科誌 40: 43-65 1991.
- 7) Ohno, K., Sugimoto, A., et al.: Histological findings of apatite-titanium complex dental implants in the jaws of dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 71: 426-429 1991.
- 8) 折原 肇, 白木正孝: 骨疾患と代謝。日老医誌 17: 237-238 1980.
- 9) 折原 肇: 骨粗鬆症をめぐって—退行期骨粗鬆症—。日老医誌 28: 455-463 1991.
- 10) 中村哲郎, 折原 肇: 生理的老化と病的老化 5. 骨代謝の側面から。日老医誌 28: 318-323 1991.
- 11) Amler, M.H.: The age factor in human extraction wound healing. J Oral Surg 35: 193-197 1977.
- 12) The effect of aging on fracture healing in the rat. Calcif Tissue Int 45: 292-297 1989.
- 13) 小木曾 誠: アパタイト・セラミック・インプラント。第1版, 旭光学工業K.K. ニューセラミック部, 東京, 1948, 25頁.
- 14) 代田達夫: 移植腸骨へのヒドロキシアパタイト人工歯根の適用に関する実験的研究。日口外誌 37: 578-594 1991.
- 15) 奥野泰久, 西沢良記: 骨粗鬆症の定義と分類。治療学 25: 641-644 1991.
- 16) Harrison, M. and Fraser, R.: Bone structure and metabolism in calcium-deficient rats. J Endocr 21: 197-205 1960.
- 17) 三木 知: 低カルシウム・ビタミンD欠乏食で飼育したラット抜歯創治癒過程における組織学的ならびに骨形態計測学的研究。昭歯誌 10: 105-123 1990.
- 18) 今道友則監修: 実験動物の飼育管理と手技。第1版, ソフトサイエンス社, 東京, 1978, 251-252頁.
- 19) Murphy, J.B.: Contribution to the surgery of bones, joints and tendons. J Amer Med Ass 58: 14-19 1912.
- 20) 根本浩介: 幼若骨移植に関する実験的研究。京府医大誌 52: 195-226 1952.
- 21) 工藤啓吾: 下顎骨における自家腸骨移植の実験的研究。特に幼犬と成犬との比較。岩手医誌 22: 226-252 1970.