原著論文

各種生体不活性材料に対する組織形態学的解析

高田 博樹 竹下 文隆 末次 恒夫

Histometric Analysis of Various Bioinert Materials

Hiroki Takata, Fumitaka Takeshita and Tsuneo Suetsugu

Abstract: The tissue reaction to four implant materials inserted transcortically and extending into the medullary canal of rat tibiae was examined, and quantitative assessment of the differences in bone reaction was made using an image processing system. The materials examined were pure titanium (Ti), anodic oxidized Ti (AO-Ti), titanium alloy (Ti-6 Al-4 V), and zirconium (ZrO_2). Four bioinert implant materials were progressively encapsulated with bone tissues.

Analysis revealed no significant differences among the tissue reactions to Ti, AO-Ti and Ti-6 Al-4 V. The ZrO_2 implant showed the highest bone contact rate.

Key words: bone contact, histometrics, image analysis, biomaterial, bioinert

I. 緒 言

整形外科や歯科の領域では骨折時における骨や関節部の固定材、また部分切除における置換材として古くから金属材料やセラミックスが使用されてきた。金属材料は機械的性質に優れているが、生体内での腐食の可能性が指摘されており、逆にセラミックスは生体内での安定性は優れているが機械的性質に劣るといわれてきた。これらの各種生体材料についての生体内での反応については同一の規定された条件下で相互に比較検討を行った報告はほとんどない¹⁻⁴⁾。それぞれの材料が骨組織とどのような関係を構築しどのような差が存在するのかよく理解されていないまま臨床応用されているのが現状であるように思われる。そこでわれわれはインプラント材料に対する骨組織の被覆の程度の組織学的な比較を行おうと決意した。

Takeshita⁴⁾は日本で使用頻度の高かったアルミナ単結晶、多結晶、多孔質多結晶に対する骨組織の被覆を骨接触率、接触骨厚さ、接触骨面積をパラメーターとして比較し3種類のアルミナのなかでは単結晶が最も優れた性質を

有することを報告した。今回第2段としてチタン、表面を酸化処理したチタン、チタン合金、ジルコニアについてラット脛骨内骨組織の反応を組織形態学的に観察し生体不活性材料に対する一連の研究を完成させたので報告する。

II. 材料と方法

1. 実験動物とインプラント材料について

実験には60匹の雄のWister King Aラット (SPF, 6週齢)を用いた。飼育は固形試料 (CE-2: 日本クレア) と水を自由にとらせる形で行った。実験に用いた材料は純チタン (以後 Ti, 平均荒さ $0.438 \mu m$)、陽極酸化法により表面に $1,350 \text{ \AA}$ の酸化チタン被膜で表面を覆われたチタン (以後 AO-Ti, 平均荒さ $0.414 \mu m$)、チタン合金 90 Ti-6 Al-4 V (以後 Ti-6 Al-4 V, 平均荒さ $0.582 \mu m$) そしてジルコニアセラミック (以後 ZrO_2 , 平均荒さ $0.498 \mu m$) それぞれ25個である。それぞれ15匹のラットの左右両側の脛骨に円筒状で直径 1.0 mm で長さ 1.5 mm のインプラントが埋入された。

2. 外科処置について

ネンプタールによる全身麻酔下で両側の脛骨を開き膝関節より下方 10 mm の骨幹部にラウンドバーで位置決めした後で歯科用リーマーで徐々に孔を拡大し最後に直径 1.0

九州大学歯学部歯科補綴学第2講座 (主任: 末次恒夫教授)
Prosthetic Dentistry II, Faculty of Dentistry, Kyushu University
(Chief: Prof. Tsuneo Suetsugu)
平成7年1月25日受付

mm のバーで孔を完成させた。生理食塩水で埋入窩を洗浄後、オートクレーブで滅菌されたインプラントを皮質骨を貫き骨髓腔までに達するまで埋入した。創は通法に従い縫合された。

3. 組織学的手順について

手術後 7, 14, 28, 84, 168 日ごとに全身麻酔下で腹部大動脈を通して 10% 中性ホルマリンを用いて灌流固定した。その後脛骨を取り出し 10% 中性ホルマリン中に保存した。骨内におけるインプラントの位置を低電圧の X 線 (Softex : Koizumi X-senkosha Co., Japan) で確認したあとでおよそ 70 μm の厚さのインプラントを含む切片⁵⁾を脛骨の長軸に平行に切断し作製した。切片は約 30 μm の厚さまで耐水研磨紙を用いて手指により研磨し 0.1% トルイジンブルー染色⁶⁾を行った。

4. 画像解析の手順

骨髓の中央部で得られた標本それぞれ 1 枚ずつ計 100 枚を画像処理装置 (Excel : 日本アビオニクス) を用いて解析した。インプラントと骨組織の間の界面の顕微鏡写真はビデオカメラ (C 2400 : 浜松フォトニクス) を装備した光学顕微鏡で得た。インプラントの周囲長 (A) とインプラントに直接接触している骨組織の表面境界の長さ (B) を測定し、以下に定める公式に従い百分率 (%) を計算した (骨接触率 = $(B)/(A) \times 100$)。百分率は分布に偏りがあるためそれを修正するために百分率から角度 ($\text{angles} = \arcsine \sqrt{\text{percentages}}$) に変換して t-test による統計処理を行った。接触骨厚さと接触骨面積については成熟骨が観察できる 14 日以降について計測した。接触骨厚さ (C) はインプラント表面の接線に垂直な各断面で 20 点で計測した。骨接触面積は次のように定義された。 $(C) \times \{(B)/(A)\} \times (A)$

III. 結 果

1. 組織学的な観察

7 日後、それぞれの種類のインプラントの周りに網状に広がる線維骨が観察された (図 1)。それらの一部にはインプラントに付着しているものもみられた。線維骨の接触がみられないインプラント面には線維芽細胞様の細胞の付着が観察された。4 種類のインプラント間に組織学的な差はみられなかった。

14 日後では、インプラント周囲に観察される骨は層板骨の薄い層に発達していた (図 2)。7 日と同様に線維芽細胞様の細胞は骨が付着していないインプラントの表面に観察された。4 種類のインプラント間に組織学的な差はみられなかった。

28 日以降それぞれのインプラントは骨組織に次第に被覆されていき、骨の厚さは次第に増加していった (図 3~6)。4 種類のインプラント間に組織学的な差はみられ

図 1 Ti 術後 7 日。インプラント周囲を網状の線維骨が取り囲んでいる (拡大率 $\times 16$)
Photograph of Ti 7 days after operation. A network of woven bone tissue surrounding the implant (original magnification $\times 16$)

図 2 Ti 術後 14 日。線維骨から成熟骨への変化がみられる (拡大率 $\times 16$)
Photograph of Ti 14 days after operation. Woven bone developed into lamellar bone (original magnification $\times 16$)

図 3 Ti 術後 28 日。インプラント周囲を層板骨が取り囲んでいる (拡大率 $\times 16$)
Photograph of Ti 28 days after operation. Lamellar bone layer encapsulating the implant (original magnification $\times 16$)

図 4 Ti 術後 84 日。層板骨は厚みを増している (拡大率 $\times 16$)

Photograph of Ti 84 days after operation. Lamellar bone layer becoming a thicker (original magnification $\times 16$)

図 5 Ti 術後 168 日。厚みを増した層板骨 (拡大率 $\times 16$)

Photograph of Ti 168 days after operation. Lamellar bone layer thickness increasing (original magnification $\times 16$)

図 6 ZrO_2 術後 168 日。インプラント周囲を層板骨が取り囲んでいる (拡大率 $\times 16$)

Photograph of ZrO_2 168 days after operation. Lamellar bone layer encapsulating the implant (original magnification $\times 16$)

図 7 すべてのインプラントの骨接触率は実験期間を通じて増加している。バーは標準誤差 (SEM) を示している

Bone contact rates of all implants increasing during all experimental period. Vertical bars indicate standard errors of mean (SEM)

図 8 ZrO_2 は 28 日以降プラトーに達した。他の骨接触厚さは実験期間を通じて増加している。バーは標準誤差 (SEM) を示している

ZrO_2 reached a plateau at 28 days. Bone contact thickness of others increasing during all experimental period. Vertical bars indicate standard errors of mean (SEM)

なかった。

2. 画像解析による観察

図 7 に脛骨内にそれぞれのインプラントを埋入して各測定日における骨接触率をパーセントで示している。 ZrO_2 の骨の接触率の増加率は Ti の約 2 倍であった。Ti, AO-Ti, そして Ti-6Al-4V はほぼ同様の増加傾向を示している。骨接触率の違いの統計分析の結果は表 1 に示す。

表 1 骨接触率

Bone contact rate

Duration	Implant	Rate $\pm$ SE(μ m)	Ti	AO-Ti	Ti-6 Al-4 V	ZrO ₂
7 days	Ti	18.2 $\pm$ 3.3	—	*	*	*
	AO-Ti	18.2 $\pm$ 3.3	*	—	*	*
	Ti-6 Al-4 V	12.7 $\pm$ 2.7	*	*	—	*
	ZrO ₂	13.4 $\pm$ 2.5	*	*	*	—
14 days	Ti	39.5 $\pm$ 4.5	—	p < .01	*	p < .05
	AO-Ti	22.1 $\pm$ 2.1	p < .01	—	*	*
	Ti-6 Al-4 V	28.4 $\pm$ 1.6	*	*	—	*
	ZrO ₂	22.4 $\pm$ 2.6	p < .05	*	*	—
28 days	Ti	42.2 $\pm$ 3.4	—	*	*	*
	AO-Ti	41.2 $\pm$ 3.5	*	—	*	*
	Ti-6 Al-4 V	45.1 $\pm$ 3.6	*	*	—	*
	ZrO ₂	48.4 $\pm$ 11.9	*	*	*	—
84 days	Ti	59.7 $\pm$ 5.9	—	*	*	p < .01
	AO-Ti	49.6 $\pm$ 4.3	*	—	*	p < .01
	Ti-6 Al-4 V	54.4 $\pm$ 4.9	*	*	—	p < .01
	ZrO ₂	93.9 $\pm$ 1.9	p < .01	p < .01	p < .01	—
168 days	Ti	74.1 $\pm$ 1.5	—	*	*	p < .01
	AO-Ti	71.1 $\pm$ 0.5	*	—	*	p < .01
	Ti-6 Al-4 V	68.5 $\pm$ 0.6	*	*	—	p < .01
	ZrO ₂	91.5 $\pm$ 4.5	p < .01	p < .01	p < .01	—

* 有意差なし

* Not significant

表 2 骨接触の厚さ

Bone contact thickness

Duration	Implant	Thickness $\pm$ SE(μ m)	Ti	AO-Ti	Ti-6 Al-4 V	ZrO ₂
14 days	Ti	25.1 $\pm$ 2.6	—	*	*	*
	AO-Ti	29.1 $\pm$ 1.2	*	—	*	*
	Ti-6 Al-4 V	32.5 $\pm$ 6.3	*	*	—	*
	ZrO ₂	25.1 $\pm$ 1.5	*	*	*	—
28 days	Ti	28.0 $\pm$ 2.8	—	*	*	*
	AO-Ti	35.3 $\pm$ 3.8	*	—	*	*
	Ti-6 Al-4 V	32.5 $\pm$ 3.4	*	*	—	*
	ZrO ₂	35.5 $\pm$ 2.0	*	*	*	—
84 days	Ti	50.7 $\pm$ 6.8	—	*	*	p < .05
	AO-Ti	47.1 $\pm$ 4.7	*	—	*	p < .05
	Ti-6 Al-4 V	44.2 $\pm$ 3.2	*	*	—	p < .05
	ZrO ₂	29.7 $\pm$ 3.8	p < .05	p < .05	p < .05	—
168 days	Ti	86.1 $\pm$ 20.2	—	*	p < .01	*
	AO-Ti	108.1 $\pm$ 4.6	*	—	*	p < .01
	Ti-6 Al-4 V	67.0 $\pm$ 9.8	*	p < .01	—	p < .01
	ZrO ₂	35.0 $\pm$ 5.3	*	p < .01	p < .01	—

* 有意差なし

* Not significant

図 8 に各インプラントの接触骨の厚さの変化について示す。Ti と Ti 合金は似たような増加のパターンを示し、ZrO₂ については、14 日にはプラトーを示した。骨接触の厚さの違いについての統計分析を表 2 に示す。

図 9 に骨接触面積の変化について示す。Ti, AO-Ti,

そして Ti-6 Al-4 V の増加のパターンは類似しており、ZrO₂ の骨接触の領域は 84 日でプラトーに達した。これらの結果についての統計分析の結果は表 3 に示す。

表 3 骨接触の領域
Bone contact area

Duration	Implant	Area $\pm$ SE (10^{-2}mm^2)	Ti	AO-Ti	Ti-6 Al-4 V	ZrO ₂
14 days	Ti	3.1 $\pm$ 0.4	—	p < .05	*	p < .05
	AO-Ti	1.8 $\pm$ 0.1	p < .05	—	p < .05	*
	Ti-6 Al-4 V	2.9 $\pm$ 0.7	*	p < .05	—	*
	ZrO ₂	1.7 $\pm$ 0.1	p < .05	*	*	—
28 days	Ti	3.6 $\pm$ 0.5	—	*	*	*
	AO-Ti	3.5 $\pm$ 0.7	*	—	*	*
	Ti-6 Al-4 V	4.8 $\pm$ 0.5	*	*	—	*
	ZrO ₂	5.3 $\pm$ 1.3	*	*	*	—
84 days	Ti	9.3 $\pm$ 2.0	—	*	*	*
	AO-Ti	7.2 $\pm$ 0.1	*	—	*	*
	Ti-6 Al-4 V	7.5 $\pm$ 0.8	*	*	—	*
	ZrO ₂	8.8 $\pm$ 1.2	*	*	*	—
168 days	Ti	19.5 $\pm$ 4.7	—	*	*	*
	AO-Ti	18.4 $\pm$ 3.3	*	—	*	p < .05
	Ti-6 Al-4 V	13.2 $\pm$ 1.2	*	*	—	*
	ZrO ₂	9.8 $\pm$ 1.2	*	p < .05	*	—

* 有意差なし

* Not significant

図 9 すべての実験期間を通じて 4 種類の試料間に有意の差はなかった。バーは標準誤差 (SEM) を示している

There is no significant difference among 4 materials during all experimental period. Vertical bars indicate standard errors of mean (SEM)

IV. 考 察

1. 実験条件の設定

1) 実験動物と実験部位の選択

インプラントに対する骨の被覆を観察する実験だから、実験部位として骨梁の少ない長幹骨を選び、筋肉などが剝離しやすく手術しやすい脛骨を選んだ。また統計処理を行うことを考え多数飼育しやすいラットを選んだ。またこの

実験ではインプラントに対する骨の新生、被覆を純粹に観察したかったので既存の骨梁の少ない diaphysis (骨幹部) を選んだ。

2) インプラントサイズの選択理由

インプラントの水平断により円形となることから円柱状の形にした。また 6 週例のラット脛骨に埋入する場合、側方および反対側の皮質骨にあらず骨髓内にある大きさということで直径 1.0 mm、長さ 1.5 mm とした。

3) 実験期間の設定

この研究は試料に対する骨組織の被覆の観察に重点を置いている。外科的侵襲を加えることにより生じる類骨組織、線維骨、成熟骨という骨組織が治癒の進展に伴い試料にどのように対応するのか変化の状況を観察しようと観察期間を 5, 7, 14 日とし後は 14 日の整数倍の 28, 84, 168 日とした。

4) 組織標本について

脱灰標本ではパラフィン包埋のため薄い標本が製作できる利点があるが、インプラントを試料から機械的に除去する必要が生じる。製作する組織標本は製作前にインプラントを除去しなければならずインプラント界面の組織の破壊といった問題がつきまとう。この点を改善するためインプラントを組織標本内に含んだままでインプラント界面を観察できる非脱灰組織標本を採用した。しかしながら樹脂包埋でインプラントを含んでいるためパラフィン切片よりも厚いという短所がある。この点は 30 ミクロン程度まで研磨することにより界面の観察を可能にした。

5) 検定に用いた数

統計の目的は少数の標本から効率よく母集団の情報をつかむことである。ここで有意差検定して差し支えない最小

のデータ数について考える⁷⁾とパラメトリック検定では分布の正規性に関する制約があるが、計算可能ならデータ数には制約がない。したがって少数例の時は、分布に偏りがみられてもデータ数不足ゆえに正規性の検定をパスするので一応検定して差し支えないことになる。しかしデータ数が増えると判定が容易に覆るだけでなく分布の偏りが明らかになることも多い。これに対しノンパラメトリック検定ではデータの分布性の制約を受けないが、そのかわりデータ数の制約が存在し少なすぎると確率的に差を検出できなくなる。そのためノンパラメトリック検定を適用できる最小のデータ数が有意差検定しても差し支えない最小のデータ数ということになる。それは分布型に仮定をおかず、純粋に確率的に検定することすら許されないそれ以下のデータ数（ノンパラメトリック検定を適用できないデータ数）では分布型に仮定をおくパラメトリック検定を適用すべきでないと考えからである（ただし母集団の正規性が明確な場合はこの限りではない）。したがって独立2群の場合、 $n_1=n_2=4$ が検定可能な最小のデータ数であるので $n_1=n_2=5$ というこの実験のデータ数は合理的な数と考えられる。

以上よりこの実験で用いられた条件は生体材料の相互比較という目的に合致している。

6) 画像解析について

インプラントが含まれたままの組織標本の画像を光学顕微鏡に設置したカメラをとおして取り込んだ。その上で骨接触の有無を光学顕微鏡を用いて確認する、という手法をとった。試料は円形の単純な形態として画像化され、その円周長に対し骨組織が接触している長さの比を骨接触率として百分率で表した。同様な骨組織の親和性を表すパラメーターとして接触骨厚さ、接触骨面積を設定した⁴⁾。接触骨厚さは接触していると判定された骨組織の厚さを全週に亘り20点で計測した。計測は試料の中心を通る線上で計測した。接触骨面積は骨接触率と接触骨面積から計算により求めた。

2. 実験結果からの考察

1) ジルコニアインプラントについて

Hayashi ら⁸⁾は、アルミナ (Al_2O_3) と ZrO_2 のシリンドーインプラントをイヌの大腿骨端に植立してその後4週から96週間の骨接触率について組織学的観察を行った。その結果、組織学的な差異は観定されていないが、量的解析においては、 ZrO_2 がわずかに Al_2O_3 よりも高い骨接触率を示している。われわれの研究では、 ZrO_2 の骨接触率は84日後には有意な増加傾向を示している。われわれの研究では、 Al_2O_3 に関する同様のデータ⁴⁾と比較し ZrO_2 は骨接触率において比較的高く、骨接触の厚さ・骨接触面積については Al_2O_3 より低い値を示した。また画像解析の数値の結果は Ti, AO-Ti, Ti-6 Al-4 V と比較して 28

日以降高い増加傾向を示している。しかしながら接触骨の厚さは28日以降プラトーに達し Ti, AO-Ti, Ti-6 Al-4 V と比べて低い値を示している。Ichikawa ら³⁾は ZrO_2 、多結晶 Al_2O_3 の試料をラット皮下に埋入する実験を行い、線維組織で被包される過程を経時的に観察し被包している線維組織の厚みに差がみられないことから同様な組織親和性を示していると報告している。線維組織による被包と骨組織による被包と観察している部位は異なっているが、生体に埋入された材料に対する被包現象を観察している点は同じである。Takeshita ら⁴⁾によれば多結晶 Al_2O_3 に対する骨組織の厚さは84日以降プラトーに達しており、今回得られた ZrO_2 のデータとほぼ近似した数値を示している。この点では Ichikawa ら³⁾の結果と同じであるが、骨接触率では ZrO_2 が多結晶 Al_2O_3 と比較して非常に高い値を示している。いかなる理由によるものかは分らないが、それを被包する骨接触面積では他の試料と変わらない値を示している。

2) Ti, AO-Ti, Ti-6 Al-4 V について

生体材料としてのチタンの優れた性質と有用性は多くの研究者が報告しており臨床で多用されている事実が、何よりも雄弁にそれを物語っている。この研究ではチタンを対照として選んだ。Kasemo and Lausmaa⁹⁾はチタンの高い生体適合は表面の酸化物の耐腐食性や高い誘電率、比較的清潔な表面処理がされていることにおそらく関係しているだろうと報告している。この実験で用いた AO-Ti インプラントは電気化学的な方法で陽極酸化処理され $1,350 \text{ \AA}$ の酸化層を表面に有している。また Ti-6 Al-4 V 合金は機械的強度において Ti の1.3倍であることで Ti の代用として用いられている。われわれの研究において Ti, AO-Ti と Ti-6 Al-4 V の間には骨接触率、骨接触の厚さ、骨接触の領域については有意な違いはなかった。そもそも純チタン表面には空気中で酸化チタン被膜が $3\sim 5 \text{ nm}$ の厚さで存在しており¹⁰⁾、これらの結果は Ti 表面に意図的に一定の厚みで TiO_2 の被膜が存在したとしても骨接触の増加には影響がないということを示した。Kasemo and Lausmaa¹¹⁾によればオートクレーブをかけた Ti、陽極酸化法によりチタン表面に酸化膜を形成したもの、Ti-6 Al-4 V の3種類の試料表面状態を XPS スペクトルで調べているが、いずれの試料表面にも表面酸化物は TiO_2 であることを示している。われわれの実験結果では3者間に差はないが、その理由はいずれの試料表面も表面酸化物 TiO_2 であることに由来するのではなからうか。

この研究の結果は様々な生体不活性な物質に対する骨組織による被包反応には材料によって被包のスピード、厚さ等に違いがあることを示した。これらの物質を臨床的に用いる際にはこれらの違いを考慮にいれるべきである。

V. 結 論

ラット脛骨に埋入された純チタン、酸化チタンで表面被覆したチタン、チタン合金 (Ti-6 Al-4 V)、ジルコニアの4種類の生体不活性インプラント材料に対する組織反応を画像解析を用いて検証した。

1. 4種類の試料は経時的にそれぞれ骨組織によって被覆されていった。

2. 画像解析では純チタン、酸化チタンで表面被覆したチタン、チタン合金 (Ti-6 Al-4 V) の間に骨接触率、接触骨厚さ、接触骨面積ともに有意差がないことを示した。

3. ジルコニアは全試料のなかで最も高い骨接触率を示した。

この稿を終えるにあたり研究の企画、立案にご助力頂いた森本啓三先生 (福岡市開業) と研究の遂行にご協力頂いた明渡秀樹先生に謝意を表します。

文 献

- 1) Akagawa, Y., Hashimoto, M., Kondo, N. et al : Tissue reaction to implanted biomaterials, *J Prosthet Dent*, 53 : 681~686, 1985.
- 2) Johansson, C.B., Sennerby, L. and Albrektsson, T. : A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and vitallium implants, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 6 : 437~441, 1991.
- 3) Ichikawa, Y., Akagawa, Y., Nikai, H. et al : Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo, *J Prosthet Dent*, 68 : 322~326, 1992.
- 4) Takeshita, F., Morimoto, K. and Suetsugu, T. : Tissue reaction to alumina implants inserted into the tibiae of rats, *J Biomed Mater Res*, 27 : 421~428, 1993.
- 5) Donath, K. and Breuner, G.A. : A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues, *J Oral Pathol*, 11 : 318~326, 1982.
- 6) Kihara, A., Morimoto, K. and Suetsugu T. : An improved method using the bubble-free adhesion technique for the preparation of semi-serial undecalcified histologic sections containing dental implants, *Oral Implantol*, 15 : 87~94, 1989.
- 7) 市原清志 : バイオサイエンスの統計学, 南江堂, 東京, 1990.
- 8) Hayashi, K., Matsuguchi, N., Uenoyama, K. et al : Re-evaluation of the biocompatibility of bioinert in vivo, *Biomaterials*, 13 : 195~200, 1992.
- 9) Kasemo, B. and Lausmaa, J. Metal selection and surface characteristics, edited by Zarb, G.A. and Albrektsson, T., *Tissue-Integrated Prostheses : Osseointegration in Clinical Dentistry*, 99~116, Quintessence Pub., Chicago, 1985.
- 10) Kasemo, B. and Lausmaa, J. : Surface properties and process of biomaterial-tissue interface, *Materials Science and Engineering, C* 1 : 115~119, 1994.
- 11) Kasemo, B. and Lausmaa, J. : The effects of implant surface topography on the behavior of cells, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 3 : 247~259, 1988.