原 著

アパタイト表面における骨組織形成ならびに その石灰化について

小木曾 誠

東京医科歯科大学歯学部第2 歯科補綴学教室 (主任: 田端恒雄教授)

(1982年10月18日 受付)

Formation and Calcification of Bone Tissue on the Surface of Apatite Ceramics

Makoto Ogiso

The 2nd Department of Prosthodontics Faculty of Dentistry Tokyo Medical and Dental University
(Director: Prof. Tsuneo Tabata)

Apatite implantation into the jaw bones of adult dogs was carried out histologically to check the biocompatibility.

At 5 days, the bone matrix formation began on the surface of the apatite. In the 10-day specimen, the area of bone formation on the surface of the apatite was enlarged and at the same time the calcification began.

TEM observation of this condition revealed the differentiation of the osteoblast around the surface of the apatite, followed by the formation of collagen fibers and osteoid with many small round deposits of bone crystals and matrix vesicles in an isolated form.

A thin layer without the collagen fibers was observed on the surface of the apatite. In such areas, the plate-shaped crystals began to deposit directly on the surface of the apatite.

In the area where the bone formation was rapid at 10 days, gradually the isolated crystal deposits became larger by the further deposition of crystals in the longitudinal direction to the surrounding collagen fibers and fused with each other, and fused further with the crystal layer without the collagen fibers on the surface of the apatite. Finally, a wide calcified layer was formed on the apatite.

Subsequently, the crystals on and around the apatite grew gradually and exhibited a condition similar to that of the normal mature bone at 30 days.

1. 緒 言

歯の欠損部に人工の歯を植立し、それに天然歯の機能を代行させようとするデンタル・インプラントに関して、かなり古くから多くの研究者によってさまざまな材料が用いられ、さらにそのデザインをも含めて研究がなされてきた。

今世紀半ばにいたり、材料の加工性および物性の問題に加え、生体組織内での安定性ならびに親和性に重点がおかれるようになった。以来、金属、合成樹脂、セラミックスなど多くの材料について、組織との親和性に関し研究がなされてきている。

著者は、顎骨内に埋入されたデンタル・インプ

ラントが、周囲骨組織によって強固に把持されるためには、インプラント体が骨組織に対して無害であることにとどまらず、骨組織と直接結合することが必要な条件であると考えている。

今日までインプラント材料として研究の対象となってきた多くの材料の中で以上のような条件をそなえた材料は、Bioglass^{1,4)}, glassceramics^{5,6)}, TCP⁷⁻⁹⁾, apatite ceramics¹⁰⁻¹⁸⁾ の 4 種類リン酸カルシウム系セラミック材のみにしぼられる。

著者は生体硬組織を構成する無機質の主成分であるアパタイトをデンタル・インプラント材料として用いれば、免疫反応を起こさずに高い組織親和性が得られるのではないかと考え、アパタイトを材料としたデンタル・インプラントの開発を企てた。

まず、1978年顎骨内に埋入したアパタイト周囲の骨組織形成に関して、主として光学顕微鏡を用いて経時的变化の観察を行った¹⁰⁾。この結果に基づきアパタイト・デンタル・インプラントに関してさらに種々の研究を積み重ね^{11,12)}、現在臨床的に応用する段階にいたっている¹²⁻¹⁴⁾。

今回は著者が観察を行ってきた光学顕微鏡所見とともに、アパタイト表面に形成される骨組織の形成過程、とくにアパタイト表面上における骨組織の結晶沈着状態について、透過電子顕微鏡を用いて観察を行った結果を報告する。

2. 研究材料および研究方法

埋入材料として焼結性が異なる相対密度56~99%の synthetic hydroxy apatite ceramics (旭光社製、図16、以下アパタイトと記載する)を、直径4.7mm、長さ8~10mmの円筒形に形成したものを使用した。

実験動物には成犬を用い、下顎第4小臼歯および第1大臼歯を抜去、3カ月後抜歯した部位の粘膜を剝離し、顎骨に歯槽頂側から直径5.0mmのドリルで片側に3個の穴をあけ、それに前述のアパタイトをそれぞれ1個、アパタイト上縁が骨表面と一致するように埋入し、粘膜縫合を行った。

埋入後3~410日経過したのち、アパタイト上

部表面に形成された軟組織や骨組織を除去し、生理食塩水注水下で歯科用ダイヤモンドディスクを用いて、アパタイトの隅角部を顎骨組織とともに幅約1mmのクサビ状に切断し、電子顕微鏡用観察標本とし、残部を光学顕微鏡用観察標本として用いた。

電子顕微鏡用観察標本は5% glutaraldehyde および2% O_3O_4 の二重固定を行い、Epon 812包埋後未脱灰のままダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製した。それらの切片を一部は無染色のまま、一部は uranylacetate および lead hydroxide の二重染色を行ったのち、電子顕微鏡を用いて観察を行った。

光学顕微鏡用観察標本は10%ホルモールアルコールで固定後、一部は脱灰セロイジン包埋した後約10 μ mの頬舌断連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。一部は未脱灰のままリゴラック包埋を行い、アパタイトと顎骨組織を含む約100 μ mの横断薄切切片を作製し、トリジン・ブルー染色を施して観察を行った。

3. 結 果

1. 埋入後3日および5日

埋入後3日では、アパタイトと埋入時ドリルによって切削された顎骨組織との間隙ではほとんど組織分化が進行しておらず、アパタイト周囲に骨組織の形成は全く認められない。しかしながら、埋入時ドリルによって切削された骨梁の切断面に隣接する骨梁表面およびその近傍においては、骨芽細胞が分化を起こし骨組織の形成が開始されている(図17)。

埋入後5日にいたると、アパタイト周囲での組織分化が進行し、とくにアパタイトが海綿質に埋入されている領域では、元来の骨梁周囲から幼若な新生骨梁がアパタイト表面に向かって毛細血管をさけつつ、網目状に形成されるようになる(図18)。

これらの新生骨梁はところどころでアパタイト表面に達している。さらにこの接触部位を中心として、アパタイト表面で骨芽細胞が分化を起こ

し、骨組織の形成が開始されている領域も観察される(図19)。これらアパタイト表面およびその近傍に形成されている新生骨組織は、トルイジン・ブルーによって薄青く染色され、骨基質を構成する膠原線維の密度が低く、石灰化も開始されていない幼若な骨組織であることが認められる。

アパタイト表面に形成された骨組織を透過電子顕微鏡で観察すると、骨芽細胞によって形成された collagen 線維の密度は、通常の骨前質における collagen 線維のそれに比していまだかなり粗な状態であり、とくにアパタイト表面においてはその近傍に比して collagen 線維の密度が低い(図1)。このようなアパタイト表面周囲に形成されている骨基質にはいまだ結晶の沈着は認められない。

また顎骨内に埋入されたアパタイトの焼結性が低く相対密度が低い場合には、アパタイト表面に多核の破骨細胞が出現しているのが観察される(図20)。このような破骨細胞を透過電子顕微鏡で観察すると、微細なアパタイトの結晶粒をとりこんでいるのが認められる。

2. 埋入後10日

アパタイトと元来の顎骨組織との間隙における骨組織の形成は、埋入後5日に比してさらに進行するとともにその形成範囲も拡大され、緻密質領域・海綿質領域のいずれにおいても、アパタイト周囲に網目状の骨梁が密に形成された状態となる。それに伴いアパタイトの表面における骨組織の形成も進行し、とくに焼結性の高いアパタイトの場合には、緻密質領域・海綿質領域ともにその表面のほぼ全域に骨組織の形成が認められる(図21)。また焼結性の低いアパタイトの場合においても、アパタイト表面に骨組織の形成範囲が拡大するが、多核の細胞も数多くその表面に出現している。これらのアパタイト周囲の新生骨梁、およびアパタイト表面に形成された新生骨組織は、埋入後5日で認められたそれに比して幅がかなり広く発育している。

アパタイト表面に形成されている新生骨組織のトルイジン・ブルーに対する染色性は、部位によりかなりの差異が認められる(1422, 23)。一般的には赤紫色に異調染色される骨組織が多いが、一部には青く染色される部分、また青く染色される骨基質中に、赤紫色に異調染色される小さな顆

図1 アパタイト表面近傍で骨基質の形成が始まっている (×16,800)

粒状構造物が多数混在している部分なども観察される。アパタイト表面に形成された骨基質中に異調染色される構造物が出現する際、まずアパタイト表面上に出現し始め、順次骨芽細胞の方に向かって拡大していく。

アパタイト表面に形成された骨組織を透過電子顕微鏡で観察すると、アパタイト表面には collagen 線維が密に配列した幅広い層が形成されており(図2)、その層の中でもアパタイト近傍では collagen 線維間に結晶が群集をなして沈着している状態が観察される(図3)。それらは大小さまざまな円形をなし島状に多数出現している。個々の結晶群は、細長い板状結晶により構成されており、板状結晶の配列には規則性はない。また結晶沈着周囲には限界膜が部分的に認められるものも多い。さらに collagen 線維間にさまざまな大きさの基質小胞が存在している(図14)。これらの基質小胞内には結晶沈着が認められるものと認められないものがある。結晶が認められない基質小胞の内部は、一様に電子密度が高い構造からなるものや、電子密度が高い部分と低い部分とが混在するものなど種々な状態が観察される。アパタイト表面近傍の骨基質内にこのような結晶沈着が開始されると、アパタイト表面においても細長い板状結晶が直接形成され始めている(図3, 5)。アパタイト表面を詳細に観察すると、アパタイト表面の collagen 線維は周囲に比べて一般に粗な状態となっており、なかには collagen 線維が達していない部分もみられる。アパタイト表面に結晶が直接形成され始めている時期では、アパタイト表面近傍の collagen 線維形成領域において、前述のような結晶沈着が認められる以外に、まだ collagen 線維に沿った結晶沈着はほとんど観察されない。すなわちアパタイト表面では、collagen 線維に沿って結晶沈着が生ずる以前に、collagen 線維とは関係なく結晶が形成されている。

またアパタイトの焼結性が低く相対密度が低い場合には、アパタイト表面に多数の小孔がみられ、そのアパタイト表面から内部に位置する小孔

内においても、小孔壁に沿って細い板状結晶が形成されている(図6)。この際これら内部の小孔内には、一般に collagen 線維の形成はみられない。

上記の状態より石灰化がさらに進行している領域では、骨基質内において島状に多数存在する結晶沈着を中心として周囲 collagen 線維に沿った結晶沈着が進行するようになり、隣接の結晶沈着領域と順次融合し結晶の沈着領域が拡大している。それらはやがてアパタイト表面を基盤とした結晶の沈着層とも連続した状態となる(図6)。

以上のような状態で埋入後10日において骨形成が早く進行している領域では、アパタイト表面にかなり幅広い石灰化層が形成されている(図7)。しかしこの時期では骨組織の石灰化が最も亢進している部位でも、骨結晶は成熟骨のそれに比べて細く短く、いまだ幼若な発育状態である(図8)。

またアパタイト表面では、結晶の形成開始時期に比べて結晶密度が著しく増大し、それらの結晶沈着が周囲の骨組織とは異なり均質な状態で観察される部位も認められる(図8)。このアパタイト表面に形成された結晶層の幅は、必ずしも一定しているとは限らず、ほとんど認められない領域から約 $0.2\mu\text{m}$ に及ぶ領域も観察される。

3. 埋入後14日

アパタイトと元来の顎骨組織との間隙における骨組織の形成は、埋入後10日に比してさらに進行した状態となる。新生された骨組織は、トルイジン・ブルーによる染色性が減少していることから、石灰化がかなり進行していることがうかがえる(図24)。

また埋入後14日にいたると、アパタイトが緻密質と海綿質に埋入されている領域とでは、アパタイト周囲における骨組織形成の進行度が異なってくる。すなわちアパタイトが緻密質に埋入されている領域では、すでに細い血管を中心としたハース層板の形成が各所で開始されている。またこの領域に形成されている骨組織表面には、幅広い骨前質ならびに密に配列した骨芽細胞が観察さ

図2 アパタイト表面に形成された骨前質 (×9,200)

図3 骨前質の中でもアパタイト表面側から結晶沈着が開始される (×21,800)

図4 Collagen 線維間にさまざまな状態の基質小胞が認められる (×69,600)

図5 アパタイト表面に細長い板状結晶が直接形成され始めている (×126,500)

図6 基質小胞を基盤とした結晶沈着域と、アパタイト表面を基盤とした結晶沈着層が一体化している (×14,700)

図7 埋入後10日。結晶沈着領域が拡大している (×5,200)

図8 埋入後10日。アパタイト表面の拡大。骨結晶の状態はいまだ幼若である (×43,400)

れ、破骨細胞の出現は少ない(図24)。

アパタイトが海綿質に埋入されている領域においても、アパタイト表面に形成された骨組織や、アパタイト周囲の新生骨梁は全般に発育肥厚している。しかしながらアパタイト周囲の新生骨梁は、緻密質領域と異なり、その表面に破骨細胞が数多く出現し、各所で骨吸収が進行している。したがってアパタイト周囲における新生骨梁は、前段階に比して発育肥厚する一方、骨梁間隙は拡大している。アパタイト表面に形成されている骨組織表面には破骨細胞はほとんどみられず、一般には骨芽細胞が密に配列している(図25)。

またアパタイト表面に形成された骨組織を透過電子顕微鏡で観察すると、骨結晶の状態は埋入後10日の状態に比較してかなり発育しているのが認められる(図9, 10)。

4. 埋入後30日

アパタイト表面およびその周囲における骨組織形成は、埋入後14日の状態に比してさらに進行し、アパタイトが緻密質に埋入されている領域では、元来の緻密質切断面とアパタイトとの間隙に

おいて新生骨組織が発育肥厚し、すでにハバース管の形成が多数認められる。しかしながら、これらの骨組織にはいまだ比較的大きな骨髄腔が数多く残存しており、通常の緻密質の状態にはいたっていない(図26)。

アパタイトが海綿質に埋入されている領域では、アパタイト周囲に形成されている骨梁は埋入後14日の状態に比してその太さがわずかに増加している反面、骨梁間隙が全体としてさらに拡大されている(図27)。骨梁間隙の拡大はとくにアパタイトから離れた領域で早く進行している。アパタイトに近接する部分ではそれほど顕著でなく、骨梁間隙も比較的狭い。場所によっては骨梁の発育肥厚に伴い、ハバース管が形成されている部分も認められる。またアパタイト周囲の骨梁表面における破骨細胞の出現は、埋入後14日に比して少なくなっており、骨芽細胞が密に配列している。海綿質領域におけるアパタイト表面の骨組織は、埋入後14日の状態に比してやや発育肥厚している。

アパタイト表面に形成されている埋入後30日の骨組織について透過電子顕微鏡で観察すると、

図9 埋入後14日の弱拡大 ($\times 4,000$)

図10 埋入後14日のアパタイト表面の拡大。骨結晶の状態は埋入後10日のものより発育している ($\times 61,100$)

図11 埋入後30日。骨結晶の状態は成熟骨のそれとほぼ同様となっている (×52,000)

骨組織内における骨結晶の沈着状態は成熟骨のそれとほとんど差がみられなくなっている (図11)。

5. 埋入後60日

緻密質領域においては、アパタイトと緻密質切削面との間隙における骨組織の形成が埋入後30日の状態に比してさらに進行し、それらの間隙内では間隙の広狭にかかわらずハバース層板が发育肥厚し、緻密質構造を備えた骨組織によって満たされた状態となっている (図28)。しかしながら、これら新生骨組織内にはいまだ小さな骨髓腔が残存している。

アパタイトが海綿質に埋入されている領域では、アパタイト周囲における元来の太い骨梁に骨組織が新生添加され、それらがアパタイト表面に直接接している状態を除き、術後新たに形成された骨梁はほとんど吸収消失されている (図29)。しかしながら、アパタイト表面には比較的厚い一層の骨組織が形成されており、とくに太い骨梁がアパタイトに接している部位の近辺では、アパタイト表面に沿って厚い骨組織が形成されている。

これらの骨梁および骨組織表面では骨前質の幅が減少しており、さらには消失している部分も認められる。なお骨前質が観察されても、それらの表面にはすでに骨芽細胞が消失し、扁平な細胞や造血細胞が接している部分も認められる。破骨細胞もほとんど観察されない状態となっている。またアパタイト周囲の骨髓組織には脂肪細胞が出現し始めてきている。

相対密度の低いアパタイト表面部を透過電子顕微鏡で観察すると、アパタイト表面から内方に向かって骨組織が侵入形成されている状態が認められる (図12)。

6. 埋入後120日

緻密質領域では骨組織の形成が埋入後60日の状態よりさらに進み、アパタイトと緻密質切削面との間隙は通常の緻密質によって満たされた状態となっている (図30)。

海綿質領域におけるアパタイト周囲の骨組織の状態は、埋入後60日の状態と同様アパタイト表面に骨梁が各所で接しており、そのような部位の近傍におけるアパタイト表面には厚い骨組織が形成

図12 埋入後60日。低密度アパタイトの場合、表面から浅い気孔内にも骨が形成され、比較的深い気孔においてもその壁に結晶沈着が認められる (×4, 200)

されている。アパタイト表面に骨梁が接していない部分においても一層の骨組織が形成されており、それらの骨組織は埋入後60日のものよりやや発育肥厚している。しかしながらこの時期にいたると、骨組織表面には骨芽細胞がほとんど観察されない。

またアパタイト周囲の骨髄は、すでに通常のスポンジ質と同様、黄色骨髄となっている(図31)。アパタイト表面近傍に形成されている骨組織を透過電子顕微鏡で観察すると、その構造は通常のスポンジ質のそれと全く同様な状態となっている(図13, 14)。

7. 埋入後410日

緻密質領域におけるアパタイトは通常のスポンジ質によって包み込まれており、これらの状態は埋入後120日の状態と全く同様である。

スポンジ質領域においては、埋入後120日の標本と同様アパタイト表面のはほぼ全周に一層の骨組織が形成されており、それら骨組織は各所で骨梁と連絡している。しかしながらアパタイト表面に形成

されている骨組織は、埋入後120日のものと比較してその幅がやや細くなっている(図32)。またアパタイト周囲の骨髄ではその一部に、アパタイトの相対密度にかかわらず、脂肪細胞間に微細なアパタイト結晶をとりこんだマクロファージが観察されることがある(図33)。

アパタイト表面の骨組織は透過電子顕微鏡で観察すると、埋入後60日のものと全く同様、通常の成熟骨の状態となんら差異が認められない(図15)。

4. 考 察

従来よりインプラント材料の開発は、材料の組織親和性が良好で、異物反応をひきおこさないことを目標として進められている。しかしながらそれらの材料の多くでは、骨内に埋入された場合、材料周囲に線維性結合組織の被膜が形成されることが知られている。

このような材料周囲における線維性被膜の形成は、骨組織による異物反応の結果であると考えら

図13 埋入後120日。アパタイト表面に形成された骨は通常の成熟骨と全く同様である
($\times 2,300$)

図14 図13におけるアパタイト表面の拡大 ($\times 49,000$)

図15 埋入後410日 (×5,600)

れるが、たとえこれが異物反応の結果生ずるものではないとしても、線維性被膜の存在は Hulbert ら¹⁹⁾が記載しているように、埋入材料の動揺や周囲骨組織の吸収の原因となると考えられる。またデンタル・インプラントの場合、埋入材料の動揺は口腔内から顎骨組織への細菌感染を誘い、インプラントを不成功に終わらせる原因であるとも考えられる。

インプラント周囲に形成される線維性被膜に対して、一部の研究者は臨床的立場から pseudo-periodontal membrane²⁰⁾と呼んでいるが、当然のことながらこの組織は天然歯周囲の歯根膜とは全く異なるものであり、機能的意義を認めることはできない。

以上のようなことから、最近10年間に骨組織と結合することを目指す材料の開発研究が進み、現在では骨と直接結合する材料として Hench ら²⁾, Clark ら³⁾による Bioglass, Strunz ら⁵⁾, Bunte ら⁶⁾による Ceravital, Bhasker⁷⁾ら, Levin ら⁸⁾による TCP, および 小木曾¹⁰⁾, Jarcho¹⁵⁾, Denissen と de Groot¹⁷⁾ らによる アパタイトの4種が報告

されている。

1. Bioglass

Greenlee ら¹⁾によるとラット大腿骨に Bioglass を埋入した場合、術後2週では新生骨との接触がみられず、4週になると新生骨との接触が認められたと記載している。この Bioglass を用いた実験の場合には、著者が用いているアパタイトと比べて、新生骨との最初の接触時期がかなり遅い結果となっている。Clark ら³⁾はラット脛骨に Bioglass を埋入し、5週後新生骨との接触界面を透過電子顕微鏡を用いて観察した結果、骨組織と Bioglass との間に $2,000 \sim 3,000 \text{ \AA}$ の amorphous 層があると述べている。また Hench ら²⁾も同様な実験を行い、両者の間に $800 \sim 1,000 \text{ \AA}$ の amorphous 層を観察し、この amorphous 層は Bioglass からのシリカを主体としたゲル層で、Bioglass と骨組織を強固に結合させる層であると説明している。しかしながら、生体内でのこのようなシリカを主体としたゲル層や Bioglass 自体の安定性の問題、さらにゲル層の表面に骨組織が形成される過程については不明な点が多い。

2. Ceravital

Ceravitalは Bioglass を改良したものである。Strunz ら⁵⁾はブタの下顎骨に Ceravital を埋入し、術後5日から5カ月にいたる組織学的観察を行っている。それによると術後5週以上経過すると新生骨が材料表面に接触し、3カ月にいたると材料周囲の骨組織は層板構造をとるようになるという。しかし骨組織と Ceravital との間に giemsa 液に青く濃染する幅数ミクロンの層があることを観察している。Bunte ら⁶⁾は骨組織と Ceravital との間に観察される giemsa 液に強染する数ミクロンの層は、bioactive な層であると説明している。しかしながら、この bioactive な層とはどのような組織構造からなるものであるのか、またどのような経緯で骨組織が表面に形成されるのかについては説明されていない。

3. Tricalcium phosphate

TCP は一般に多孔体として用いられ、骨置換材つまり biodegradable な材料として研究が進められている。Bhasker ら⁷⁾は骨組織が本材に直接接する領域がある反面、破骨細胞様多核細胞により吸収が行われている領域もあることを認めている。他の研究者達^{8,9)}もほぼ同様の所見を述べており、さらに最終的には本材は骨内で消失することを認めている。しかしながら、この材料の消失が多核細胞だけによる吸収なのか、体液によっても溶解するのか否かについては明らかにされていない。また骨内において本材が消失する時期に関しても研究者によってかなり差がある。著者¹⁰⁾はアパタイト埋入実験において、焼結性の低い場合にはその表面に多核細胞が出現する部分があり、焼結性の高い場合には多核細胞はほとんど出現しないことを観察している。すなわちアパタイトの化学組成に近い TCP の吸収・消失において、その焼結性が重要な因子ではないかと考えられる。いずれにしても、材料の一部分が骨組織と直接結合しているにせよ、他の部分が吸収、消失されるような材料はデンタル・インプラント材料としては好ましくないといえる。

以上のごとくいずれの材料を用いた研究におい

ても、材料表面に骨基質が形成され石灰化していく過程や、生体内での材料自体の変化の有無、さらには最終的に材料表面に形成される骨組織と通常の骨組織との比較検討などがなされていないため、それらが真にインプラント材料として適しているか否かを立証する根拠は乏しい。

著者はアパタイトが顎骨組織に対して親和性が高いことを観察した光学顕微鏡所見¹⁰⁾をもとに、今回それらの根拠をさらに追及するためアパタイト表面における骨組織の形成過程、ならびにそれに伴って生ずる界面領域の結晶形成状態について、主として透過電子顕微鏡を用いて観察を行った。

4. アパタイト

1) 埋入後3日および5日の標本

アパタイト周囲での骨組織の形成は埋入後3日では全くみられない。埋入後5日にいたるとアパタイト周囲での組織分化が進行するにつれ、元来の骨梁周囲から幼若な新生骨梁がアパタイト表面に向かって形成されるようになり、それらの一部がアパタイト表面にまで達するようになる。アパタイト周囲にこのような新生骨梁が形成され始めると、アパタイト表面においても骨芽細胞が分化を起し、骨組織の形成が開始される。

しかしながら、これらアパタイト表面の骨組織や近傍の骨梁はトルイジン・ブルーによって薄青く染色されることから、いまだ骨基質を構成する膠原線維の密度が低く石灰化も生じていないことが理解される。著者ら²¹⁾はまた、多孔質のアパタイトを用いイヌの脛骨に埋入実験を行った。その結果では、海綿質領域では5日ですでにアパタイト表面に石灰化を起した骨組織の形成が観察される。これはアパタイト周囲の組織分化が、顎骨の場合よりも脛骨の海綿質の方が早く進行した結果によると考えている。

いずれにしても、アパタイト表面の新生骨との接触および骨組織の形成は埋入後5日で開始されるのに対し、Bioglass をラットの大腿骨に埋入した Greenlee ら¹⁾の実験によると、埋入後2週ではいまだ新生骨との接触はみられないと述べて

いる。また Ceravital をブタ下顎骨に埋入した Strunz ら⁵⁾の実験では、術後5週以上経過すると、新生骨が材料表面に接すると報告されている。これらの実験結果では、埋入時トゥーリングによって生ずる熱傷などの原因による遅れも考えられるが、材料表面に骨組織の接触する時期は著者らの所見と比較して、実験動物のちがいがあつてにせよ明らかに遅い。

著者が用いたアパタイトでは、その周囲に新生骨梁が形成され始めると、ただちにそれらの骨梁の一端がアパタイトに直接接するとともに、さらにその部を中心としてアパタイト表面で骨芽細胞が分化を起こし、骨組織の形成が始まる。このように新生骨梁がアパタイト表面に達すると、アパタイト表面では骨原性組織が比較的早く分化を起こしている。

以上の結果からみて、Greenlee が用いた Bioglass ならびに Strunz が用いた Ceravital に比して、アパタイトの骨組織に対する親和性は優るとも劣らないといえよう。

2) 埋入後10日の標本

アパタイト周囲における組織分化は埋入後5日の状態に比してかなり進行し、アパタイト周囲に網目状の新生骨梁が密に形成された状態となる。とくにアパタイトの焼結性が高い場合には、緻密質領域、海綿質領域ともにその表面のほぼ全域に骨組織の形成が認められる。アパタイト表面に形成された骨組織はトルイジン・ブルーによる染色性が場所によってかなり異なることから、アパタイト表面に形成された骨組織は、その石灰化の程度がかなりさまざまな状態にあると考えられる。このような骨組織を透過電子顕微鏡で観察すると、骨組織の形成が最も遅れている部分では埋入後5日の所見と同じく collagen 線維がまだ粗な状態で観察される。

骨組織形成がやや進んでいる領域では、アパタイト表面に collagen 線維が密にしかも幅広く形成されている。これら collagen 線維間にはほぼ球形に結晶が沈着した部分が多数出現しており、さらに基質小胞も多く認められる。

これらの基質小胞はその内部に結晶の沈着が認められるものと認められないものがあり、後者においてもその内部の電子密度は種々の状態で観察される。また球形に結晶が沈着した部分の周囲に、限界膜が部分的に認められるものがあることなどから、基質小胞と結晶沈着物とは関連があることが想像される。

通常の骨組織における初期石灰化の基盤は、主として基質小胞であることがすでに明らかにされている²²⁾。アパタイト表面に形成された骨基質は、通常の骨組織における石灰化と同じ機序で石灰化が始まっているといえる。

アパタイト表面周囲の骨基質にこのような結晶沈着が始まると、アパタイト表面上にも直接結晶が形成され始める。これらの結晶はアパタイト表面近傍の collagen 線維とは無関係に形成されている。すなわちアパタイト表面周囲に形成された骨基質は通常の骨組織形成と同様、基質小胞などを基盤として結晶が沈着し始めるのに対し、アパタイト表面においてはアパタイトを基盤に結晶が形成され始める。このようなことから、アパタイト面に最初に形成される結晶はアパタイトと epitactic な結合をしているのではないかと思われる。

以上のような部分より石灰化がさらに進行している部分では、前述した球形の結晶沈着やアパタイト表面の結晶形成部から、その周囲の collagen 線維に沿ってさらに結晶沈着が進行することにより、アパタイト表面に幅広い結晶沈着層が形成されている。

またアパタイト表面には、微細な結晶がとくに密に沈着した幅の狭い層が観察される場合が多い。これは術後5日の所見および図5で示すように、アパタイト表面には必ずしも collagen 線維が接しているとは限らず、また近接している場合でも、それらの密度がアパタイト表面からやや離れた領域における骨基質の collagen 線維密度に比してかなり低い場合が多く、そのような部分でまず最初にアパタイトに接して結晶が密に析出し始め、やがてその周囲を満たすように結晶が密に

沈着した結果、形成された層である。したがって、その部分では密な collagen 線維に結晶が沈着する通常の骨組織とは、下地をなす collagen 線維が非常に少ない点で異なっている。この結晶沈着層と通常の骨組織の構造をとる部分との境界は明瞭ではないが、それらの層がほとんど認められない部分から約 $0.2\mu\text{m}$ 幅に及ぶ部分までさまざまである。

このような collagen 線維が粗で骨結晶が密に沈着した層は、通常の硬組織においても観察されるものである。すなわち、田中²³⁾はモルモットの cementum pearl の形成について観察を行い、エナメル質表面に最初に形成される cementum pearl には下地となる collagen 線維が認められず、結晶の配列方向も不規則であり、cementum pearl の厚さが $0.2\mu\text{m}$ 程度になると collagen 線維がわずかに出現してくると述べている。また水城²⁴⁾はヒト下顎歯槽骨内壁の線維骨について観察し、ヘマトキシリンに濃染するいわゆる休止線と接合線の領域は、結晶が均質な状態で密に沈着しているが、collagen 線維は全く、あるいはほとんど観察されないと述べている。アパタイト表面に形成される collagen 線維を下地としない石灰化層は、形成初期の cementum pearl や顎骨の休止線、あるいは接合線にみられる構造物と同一の結晶沈着状態を示し、アパタイト表面にのみ特異的に出現する物ではないことが理解される。

Denissen¹⁸⁾はアパタイト表面に形成された骨組織について、脱灰後透過電子顕微鏡により観察した結果、アパタイト表面に沿って電子透過性の高い比較的無構造な層があることを記載し、この層はその幅が $0\sim 1.0\mu\text{m}$ であり、アパタイトと骨組織との bonding layer であると述べている。Denissen が述べている bonding layer は、著者の観察所見と比較してその幅がやや広く、また彼が脱灰標本を用いているため結晶の沈着状態については明らかではないが、おそらくそれは collagen 線維の少ない、高度に石灰化した層に相当するものと思われる。

埋入後10日で骨組織形成の最も進行した部分で

は、アパタイト表面に幅広い石灰化層が形成されているが、骨組織内における個々の結晶は成熟骨のそれに比してその長さおよび太さはまだ幼若である。

3) 埋入後14日の標本

アパタイト周囲の骨組織の形成は埋入後10日の状態に比してさらに進行し、発育肥厚した骨梁が密に形成されるとともに、アパタイト表面にも比較的厚い骨組織が観察される。これらの新生骨組織はトルイジン・ブルーによる染色性が減少し、それら骨組織の石灰化がかなり進行していることがうかがえる。

また緻密質領域において、アパタイト周囲の新生骨組織は破骨細胞によって吸収されることは少なく、発育肥厚することによりハバース管の形成が数多く認められる状態になるのに反し、海綿質領域においてはアパタイト周囲の新生骨梁は一部のものが発育肥厚する一方、一部のものは破骨細胞によって吸収をうけ骨梁間隙が拡大し始めている。

すなわち顎骨内に埋入されたアパタイト周囲の新生骨組織は、埋入後14日より緻密質領域においては緻密質構造に、海綿質領域においては海綿質構造に移行し始めたものと思われる。

4) 埋入後30日の標本

アパタイト周囲の新生骨組織の状態は、緻密質領域においては骨組織の形成がさらに進行し、各所でハバース管が形成された状態となる。また海綿質領域においては骨吸収が前段階に比してさらに進行しており骨梁間隙が拡大されている。しかしながら一部の骨梁は発育肥厚し、アパタイト表面に形成された骨組織もその幅を増大させている。

この時期のアパタイト表面および周囲に形成されている骨組織のトルイジン・ブルーによる染色性は、元来の骨組織のそれとほぼ同様となっており、また透過電子顕微鏡による所見では骨結晶の沈着状態は成熟骨のそれとほとんど差のない状態となっている。

5) 埋入後60日、120日の標本

埋入後60日にいたると、緻密質領域においては埋入時の骨切削面とアパタイトとの間隙における新生骨組織はさらに発育が進みほぼ緻密質の状態となり、120日では全く緻密質の状態となっている。

海綿質領域においてはアパタイト周囲の新生骨梁は経時的に粗な状態となるとともに、一部に残存した骨梁はかなり肥厚し、場所によっては本来の太い骨梁に太い新生骨梁が追加され、それらの骨梁がアパタイト表面の各所に直接接している。アパタイト表面の骨組織は埋入後30日に比してやや発育肥厚しており、とくに骨梁が接している部分の周囲では他領域に比して骨組織形成が早く進行している。またアパタイト周囲の骨髄には埋入後60日より脂肪細胞が出現し始め、120日にいたると元来の骨髄と全く同様な骨髄となる。成犬の場合には黄色骨髄となる場合が多い。

このように顎骨内に埋入されたアパタイト周囲は、埋入後120日にいたると完全にもとの状態に復し、埋入後の活発な治癒機転は一応終了したものと認められる。

アパタイト表面に形成されている骨組織を透過電子顕微鏡で観察すると、骨結晶の状態は埋入後60日のものから成熟骨の状態と全く同様になっており、その組織構造になんら異常は観察されない。

6) 埋入後410日の標本

アパタイト周囲における骨組織の状態は埋入後120日の状態と基本的に差はない。しかしながら、海綿質領域においてはアパタイト周囲の骨梁や表面の骨組織の幅がやや減少している。

抜歯後経時的に顎骨が廃用性萎縮に陥り、海綿質領域においても骨梁の数が減少するとともにその太さが細くなってくることは先に荒崎²⁵⁾らの観察によって報告されている。このような現象はアパタイト周囲においても当然起こりうることである。

今回の観察では、アパタイトが顎骨内に完全に埋入されており、全く無機能下の状態について行ったものである。アパタイトに咀嚼機能が加わる機能的負荷状態下に置かれた場合、このような顎

骨の廃用性萎縮を抑制し得るかどうかについては、機能的負荷状態下のアパタイト歯根について、今後さらに研究を進めていく予定である。

7) アパタイト表面構造の安定性

焼結性が低いアパタイトの場合、埋入後初期の段階でその表面にアパタイトの結晶塊をとりこむ破骨細胞が出現し、とくに埋入後15日ではアパタイト表面全体の半分以上に破骨細胞が出現した状態となる。しかしながらそれら細胞は、光顕的にアパタイト表面の形態を変化させるほどアパタイト結晶をとりこむことはなく、漸次アパタイト表面から離脱する。やがてそれらの領域にも骨組織の形成が開始され、埋入後60日にいたるとアパタイト表面のほとんどが新生骨組織で被われた状態となる。この際アパタイト表面の骨組織の形成が進行するにつれ、周囲の骨髄内にアパタイトの結晶塊をとりこんだ細胞が認められるようになり、術後120日以上経過しても骨髄の脂肪細胞間に上記細胞が多数存在している。このような所見から破骨細胞はアパタイト結晶塊をとりこんでも、それら結晶をすみやかに溶解消失させ得ないのではないかと思われる。

いずれにしてもアパタイトをデンタル・インプラント材料として用いる場合には、材料表面における骨組織の形成の速さから、また物性の観点からも焼結性が高いアパタイトでなければならない。

焼結性の高いアパタイトの場合、アパタイト表面での骨組織の形成は埋入後5日で始まり、10日ではその全表面において認められるようになる。埋入後60日にいたると緻密質領域においてはアパタイト表面に緻密質が形成され、海綿質領域では一層の骨組織に被われた状態となる。なおこの状態は埋入後410日においてもほとんど変わらない。以上のように骨内におけるアパタイトは埋入当初の短期間を除き、それ以後は新生骨組織によって被われた状態が維持される。さらにアパタイトを構成している結晶は、骨組織の結晶と比較してその結晶性が高く、大きさはおよそ0.5~1.0 μm で、骨結晶の大きさと比較してはるかに大き

い。したがって顎骨内に埋入されている焼結性の高い高密度アパタイトが体液によって溶解するということはあまり考えられない。事実そのような所見は観察されていない。結論的には顎骨内に埋入されたアパタイトは、安定した状態にあるといえよう。

結 論

アパタイト表面における骨組織の形成過程ならびにその石灰化について、アパタイト埋入後3日から410日間経過した成犬下顎骨標本を用い、組織学的に観察を行った。

①アパタイト表面における骨基質の形成は、すでに埋入後5日で開始されている。

②アパタイト表面上に形成される collagen 線維の密度は、その周囲に形成される collagen 線維の密度に比して低い場合が多い。

③焼結性が高いアパタイトの場合、埋入後10日でアパタイト表面のほぼ全域に骨組織の形成が認められる。

④アパタイト表面に形成された骨基質の石灰化は埋入後10日で開始される。

⑤アパタイト表面に幅広く形成された骨基質の石灰化は、collagen 線維間に存在する基質小胞などを基盤として開始される。

⑥アパタイト表面においては、collagen 線維に沿った結晶沈着が生ずる以前に collagen 線維とは関係なく、アパタイトを基盤として結晶が形成され始める。

⑦アパタイト表面を基盤として生じた結晶層と、基質小胞などを基盤として生じた結晶の沈着領域は、やがて各々の周囲に存在する collagen 線維に沿った結晶沈着が開始されることにより、連続した結晶沈着層となる。

⑧アパタイト表面上には collagen 線維が比較的粗で、結晶密度の高い層が埋入後410日にいたるまで観察される。しかしこの層の幅は部位によって差がみられ、約0.2 μ mに及ぶ領域からほとんど認められない領域まであって一定しない。

⑨アパタイト表面に形成された骨組織の結晶の

沈着状態は、埋入後60日のものから成熟骨の状態と全く同様となり、その組織構造においてもなんら異常は観察されない。

⑩埋入後60日にいたると、顎骨の緻密質領域に埋入されたアパタイト周囲には緻密質が形成され、海綿質領域に埋入されたアパタイト表面には厚い一層の骨組織が形成され、それら骨組織が骨梁と各所で連絡した状態となる。

⑪埋入後410日のアパタイト周囲の骨組織の状態は、60日の状態とほとんど同じである。

⑫アパタイトが経時的に吸収や溶解を受けていると思われる所見は、埋入後410日にいたっても観察されず、顎骨内に埋入されたアパタイトは安定したものであることが認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜りました歯学部第2歯科補綴学教室田端恒雄教授に謹んで感謝の意を表します。

また懇切丁寧なご指導、ご教授をいただきました歯学部解剖学教室一條尚教授、ならびに山下靖雄教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Greenlee, T. K., Beckham, C. A., Crebo, A. and Malmorg, J. C.: Glass ceramic bone implants. A light microscopic study. J. Biomed. Mater. Res. 6: 235-244, 1972.
- 2) Hench, L. L. and Paschall, H. A.: Histochemical responses at a biomaterial's interface. J. Biomed. Mater. Res. Symp. 5: 49-64, 1974.
- 3) Clark, A. E., Hench, L. L. and Paschall, H. A.: The influence of surface chemistry on implant interface histology: A theoretical basis for implant materials selection. J. Biomed. Mater. Res. 10: 161-174, 1976.
- 4) Brent, E. M. and Shapiro, P. A.: A method of obtaining an epithelial attachment on an endosseous implant. J. Prosthet. Dent. 45: 550-557 1981.
- 5) Strunz, V., Bunte, M., Stellmack, R., Gross, U. M., Kühl, K. and Deutscher, K.: Bioactive Glaskeramic als Implantatmaterial in der Kieferchirurgie. Dtsch. Zahnärztl. Z. 32: 287-290, 1977.
- 6) Bunte, M., Strunz, V., Gross, U. M., Kühl, K.

- and Deutscher, K.: Kiefer-Augmentation mit Glaskeramic in Tievesuch. Dtsch. Zahnärztl. Z. 32: 323-325, 1977.
- 7) Bhasker, S. D., Brady, J. M., Getter, L. Grover, M. F. and Driskell, T.: Biodegradable ceramic implants in bone. Oral Surg. 32: 336-346, 1977.
 - 8) Levin, M. P., Getter, L., Cutright, D. E. and Bhasker, S. N.: Biodegradable ceramic in periodontal defects. Oral Surg. 38: 344-351, 1974.
 - 9) Mors, W. A. and Kaminski, E. J.: Osteogenic replacement of tricalcium phosphate ceramic implants in the dog palato. Archs. Oral Biol. 20: 365-367, 1975.
 - 10) 小木曾誠: Apatite 焼結体埋入による顎骨組織の経時的推移変化. 口病誌 45: 170-221, 1978.
 - 11) Ogiso, M., Kaneda, H., Arasaki, J., Tabata, T. and Hidaka, T.: Epithelial attachment and bone tissue formation on the surface of hydroxyapatite ceramics dental implants. Biomaterials 1980, Edited by G. D. Winter, D. F. Gibbons, and H. Plenk, Jr., U. S. A., 1982, John Wiley and Sons Ltd., 59-64.
 - 12) Ogiso, M., Kaneda, H., Arasaki, J., Ishida, M., Shiota, T., Mitsuwa, T., Tabata, T., Yamazaki, Y. and Hidaka, T.: Hydroxyapatite ceramics (H. A. C.) implant under occlusal function. Animal studies and clinical studies. Trans. 7th Ann. Meet. Soc. Biomater. 13th Int. Biomater. Symp., 1981, 54.
 - 13) Ogiso, M., Ishida, K., Tabata, T., Yamazaki, Y. and Hidaka, T.: Clinical application of apatite implant (I) and experimental study of healing process of mucous membrane around implant. Trans. 8th Ann. Meet. Soc. Biomater. 14th Int. Biomater. Symp., 1982, 77.
 - 14) 小木曾誠, 田端恒雄: アパタイトセラミックス・インプラント. the Quintessence 1: 12-16, 1982.
 - 15) Jarcho, M., Jasty, V., Guamer, K. I., Kay, J. F. and Doremus, R. H.: Electron microscopic study of a bone-hydroxyapatite implant interface. Trans. 4th Ann. Meet. Soc. Biomater. 10th Int. Biomater. Symp., 1978, 112.
 - 16) Jarcho, M.: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clinical Orthopaedics 157: 259-278, 1981.
 - 17) Denissen, H. W. and de Groot, K.: Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite. J. Prosthet. Dent. 42: 551, 1979.
 - 18) Denissen, H.: Dental root implants of apatite ceramics. Vrije Universiteit te Amsterdam. 1979, Boek-en offsetdrukkerij Los-Naarden.
 - 19) Hulbert, S. F., Richbourg, H. L., Klawitter, J. J. and Sauer, B. W.: Evaluation of a metal-ceramic composite hip prostheses. J. Biomed. Mater. Res. Symp. 6: 189-198, 1975.
 - 20) Linkow, L. I., Chercheve, R. and Tones, M.: Theories and techniques of oral implantology. Volume one, Saint Louis, 1970, Mosby, 81-133.
 - 21) 山崎安晴, 大西正俊, 塩田重利, 小木曾誠, 一條 尚: 人工骨としての多孔質アパタイト—1. 脛骨埋入実験—. 口病誌 49: 251-278, 1982.
 - 22) Talmage, Roy, V., 小沢英浩: 硬組織の形成と石灰化—第10回国際解剖学会硬組織シンポジウム記録—. 1978, 東京, 社会保険出版社, 9-82.
 - 23) 田中 秀: モルモット臼歯の cementum pearl に関する組織発生学的研究. 口病誌 47: 281-328, 1980.
 - 24) 水城春美: ヒト下顎歯槽骨内壁における線維骨の構造に関する組織学的観察. 口病誌 46: 65-104, 1979.
 - 25) 荒崎淳三: 抜歯後における下顎骨の経時的変化. 口病誌 49: 358-399, 1982.

図16 実験に用いたアパタイト (Ap) のX線回折図形。結晶性の高いハイドロキシ・アパタイトであることを示す。相対密度の違いによる図形の差はほとんど認められなかった

図19 図18の拡大。新生骨梁は毛細血管の周囲に形成され、それらの一部は Ap 表面に達している。また Ap 表面でも骨基質形成が開始されている (トルイジン・ブルー染色, ×50)

図17 密度95% Ap 埋入後3日。Ap から離れた領域における骨表面および骨髄内では骨基質形成が開始されている (トルイジン・ブルー染色, ×20)

図20 密度56% Ap 埋入後5日。幼若な骨梁の一端が Ap に達している。Ap 表面に多核細胞が分化出現している (トルイジン・ブルー染色, ×80)

図18 密度95% Ap 埋入後5日。Ap 周囲に網目状をなした幼若な骨梁の形成が認められる (トルイジン・ブルー染色, ×20)

図21 密度95% Ap 埋入後10日。Ap は脱灰により消失している。Ap 周囲では骨梁が密に形成され、また Ap 表面のほぼ全域に一層の骨組織が形成されている (ヘマトキリン・エオジン染色, ×5)

図22 密度56% Ap 埋入後10日。Ap 表面に形成された骨基質の石灰化が開始されている。紫に染色されている部分が石灰化の始まった領域に相当する (トルイジン・ブルー染色, $\times 80$)

図25 密度68% Ap 埋入後2週の海綿質領域。Ap 表面には一層の骨組織が形成されているが、海綿質の新生骨梁は粗なっている (ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 13.2$)

図23 密度79% Ap 埋入後10日。骨形成の早い領域では幅広い石灰化層が形成されている (トルイジン・ブルー染色, $\times 80$)

図26 密度95% Ap 埋入後1カ月の緻密質領域。Ap と骨切剖面との間に形成された新生骨は緻密質構造に移行し始めている (トルイジン・ブルー染色, $\times 20$)

図24 密度95% Ap 埋入後2週の緻密質領域。Ap 周囲に発育肥厚した骨梁が密に形成され、しかもその染色性は低下している (トルイジン・ブルー染色, $\times 20$, 金田氏提供)

図27 密度79% Ap 埋入後1カ月。海綿質領域では埋入後2週のものに比して、Ap 表面の骨組織が肥厚している反面、周囲の骨梁は減少している (ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 3$)

図28 密度95% Ap 埋入後 2 カ月の緻密質領域。Ap 周囲には緻密質が形成されている (トルイジン・ブルー染色, $\times 20$)

図31 密度79% Ap 埋入後 4 カ月の海綿質領域における拡大。Ap を被った骨組織表面に骨芽細胞は認められない (トルイジン・ブルー染色, $\times 66$)

図29 密度 68% Ap 埋入後 2 カ月の海綿質領域。Ap 表面の骨組織は埋入後 1 カ月のものより肥厚している。海綿質には太い骨梁が粗な状態で観察される (ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 13.2$)

図32 密度95% Ap 埋入後 410日の海綿質領域。Ap に骨梁が接していない部では一層の薄い骨組織が被っている (トルイジン・ブルー染色, $\times 13.2$)

図30 密度 68% Ap 埋入後 4 カ月。Ap 周囲の骨髄は黄色骨髄となっている (ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 3$)

図33 図32の一部を拡大。脂肪細胞間にアパタイトの微粒子をとりこんだマクロファージが観察される