

博士(医 学) 古 梶 正 洋

学 位 論 文 題 名

Reaction between Bone and Apatite Wallastonite Glass Ceramic
implanted in Mouse Tibia-Scanning Electron Microscopic Study-

(マウス脛骨に移植したセラミックと骨の反応－走査電子顕微鏡による観察－)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

研究目的

アパタイト-珪灰石-ガラスセラミック (Apatite wollastonite containing glass ceramic, AWガラスセラミック) は骨組織中に移植されると、周囲に活発な骨形成を来し、セラミックと骨が強固に結合するといわれている。これまで、骨とセラミックとの結合は、セラミックと生体との化学反応によりセラミック表面にできたアパタイト層と新生骨基質のアパタイトが結合する化学結合であると報告されている。このような結合の際の化学反応は、順に1) セラミック表面にアパタイト層を生ずる反応と、2) セラミック表面化学的アパタイトと骨形成による骨基質アパタイトとの反応の2段階に分けられることになるが、セラミック表面に進行していく骨形成の生物学的現象とその時間経過との関連で不明な点が多い。

そこで、AWガラスセラミックをマウス脛骨に移植し、1) セラミックの表面に起きる変化、2) セラミック表面に骨が形成されていく経時的過程、3) セラミックと骨との結合界面の微細形態を走査電子顕微鏡と光学顕微鏡で観察し、実像を論拠として、セラミックと骨との結合を考えた。

材料と方法

実験動物には35匹の雄のddマウスを用いた。マウスは生後7週で脛骨骨幹端に直径約2mmの穴をあけて、そこに直径約1mmの球状のAWガラスセラミックを移植し、移植後1, 2, 3, 4週で骨とともに摘出して以下の方法で観察した。

1) 走査電子顕微鏡による観察：摘出した標本を約5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で軟部組織を溶解し走査電子顕微鏡で観察した。腹腔内に移植したガラスセラミックについても同様の操作を行い走査電子顕微鏡で観察した。

2) 元素分析：移植前のガラスセラミックと骨移植後4週のガラスセラミックをカーボン蒸着し、エネルギー分散型元素分析装置を用いてセラミック表面の元素分析を行った。

3) 樹脂包埋切片標本の観察：セラミック移植後1, 3, 4週で取り出した標本を固定後、スチレン-メタクリル樹脂に包埋し、切断研磨した。これをトルイジンブルー染色して光学顕微鏡で観察した。

4) 破骨細胞の観察：セラミック移植後2週で標本を摘出し、固定後、酸性フォスファターゼ染色をし、赤染する破骨細胞を光学顕微鏡で観察した。

結 果

1. 走査電子顕微鏡による観察

移植前のAWガラスセラミック球状体の表面は滑らかな顆粒状の凹凸を示していた。

移植後1週のAWガラスセラミックは、表面に網状に骨組織が形成されていた。この新生骨組織は索状あるいは微細スponジ状でセラミック表面に直接に接していた。

移植後2週では、AWガラスセラミックを囲んで形成された新生骨組織は索状から密な組織となり、平滑なシート状を呈していた。シート状の骨組織はセラミックの凹凸を覆いかくして平滑な面を示して広がっていた。

移植後3週では、セラミック表面を覆う新生骨表面には、骨吸収窓の集合する骨吸収面が出現していた。骨吸収面では、骨吸収窓の底にその下のガラスセラミックの表面がしばしば露出していた。この露出したAWガラスセラミックの表面は移植後2週までと異なり、著明な変化を示した。滑らかだったセラミックの面が径2~3μmの楕円形、多角形の粒子の集合へと変化していた。これらの粒子は敷石状に並び、個々の粒子は微細小孔状となり軽石状の外観を呈していた。

移植後4週では、セラミック表面は移植後3週と同様に軽石状を呈していた。このセラミックを構成している粒子の上には、所々に骨基質膠原線維が不規則に走り、骨形成初期像を示していた。また、骨の膠原線維束が、セラミック粒子の間に入り込んでいる像、あるいは粒子に複雑に絡みついている像も観察された。腹腔に移植されたセラミックの表面は移植後4週でも移植前と同様で変化していなかった。

2. 元素分析

移植前のAWガラスセラミックの表面は主にリン、カルシウム、珪素イオンから成っていた。移植後4週になると珪素イオンの割合が減少していた。

3. 樹脂包埋切片標本の観察

移植後1週では辺縁部から中心部まで全体として均質なセラミックの表面に接して骨組織ができていた。

移植後3週になると骨と接しているセラミックの最表層に半透明の薄層が出現した。この薄層は顆粒の集合からなっていた。

移植後4週ではセラミックの表層部の顆粒の輪郭はさらに明確となり、おののが分離して見えるようになった。

4. 破骨細胞の観察

骨移植後2週のセラミック表面には酸性フォスファターゼ反応陽性の巨細胞を認めた。

考 察

セラミックを疑似生理食塩水液中に浸漬しておくと、セラミック表面に厚さ6~7μmで、葉状結晶の集合からなるアパタイト層が出現することが観察されている。この所見とともに、セラミックが骨に移植された場合にも表面にアパタイト層が出現し、このアパタイトと骨のアパタイトが化学的に結合すると報告してきた。しかし、移植セラミックの表面には、このような結晶は出現しなかった。したがって、このようなアパタイト層の出現をアパタイトと骨との結合の論拠とはしにくい。一方、AWガラスセラミック表面は、最初の骨形成が進行したあとで、多数の小孔を持つ粒子の集合体に変化していた。このようなセラミック表面の形態変化は、セラミック表面の上に微細結晶が新しくできてくる像ではなく、元来の表面レベルをそのままに、主としてAWガラスセラミックの特定の成分が溶出してできる像とみなされる。元素分析の結果から溶出した成分は主に珪素イオンであることがわかった。しかも、これは周囲に骨がない場合には認められなかつたことから、AWガラスセラミックの形態変化には骨特有の環境が関与していると考えられる。

セラミック表面に骨が形成されていく過程を所見から考えると、移植後1~2週で表面に骨芽細胞が出現して、膠原線維を形成し、ここにハイドロキシアパタイトが沈着してセラミック表面を直接におおう骨がつくられる。ついでリモデリングのために破骨細胞が出現して骨吸収が行われるようになり、また、この骨吸収面に続いて再び骨形成が進行する。この過程でAWガラスセラミックでは出現した軽石状粒子の表面に種々の方向に膠原線維

が形成され、線維とセラミックが互いに噛み合い、強固な結合が生じる。

確かにセラミック表面に走査電子顕微鏡では観察できないような物質が化学的に產生されることは否定できない。しかし、セラミック表面に骨が結合していくことの最初は、膠原線維形成であり、きわめて生物学的現象である。セラミックに骨が密着する反応の中心は化学反応というよりは生物学的反応と考えたい。

結語

移植後AWガラスセラミックと骨との結合はセラミックを構成している顆粒と骨芽細胞によって作られる膠原線維との間の噛み合せによる機械的な結合である。

学位論文審査の要旨

主査教授 金田清志
副査教授 阿部和厚
副査教授 長嶋和郎

学位論文題名

Reaction between Bone and Apatite Wallastonite Glass Ceramic
implanted in Mouse Tibia-Scanning Electron Microscopic Study-
(マウス脛骨に移植したセラミックと骨の反応－走査電子顕微鏡による観察－)

骨腫瘍摘出による骨欠損部の補填に種々のセラミック製骨補填材が使われている。なかでも、Apatite-wollastonite containing glass ceramic (AWGC, 日本電気硝子社製) は骨組織中に移植した場合、周囲に活発な骨形成をきたすことが知られている。しかし、その骨形成過程および骨との結合様式については不明な点が多い。これらの点を明らかにする目的で、マウス脛骨に移植したAWGCと骨との反応を組織学的に観察した。

実験動物には35匹の雄のddマウスを用いた。マウスは生後7週で脛骨骨幹端に直径約2mmの穴をあけて、そこに直径約1mmの球状のAWガラスセラミックを移植し、移植後1, 2, 3, 4週で骨とともに摘出して以下の方法で観察した。1)走査電子顕微鏡による観察：摘出した標本を約5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で軟部組織を溶解し走査電子顕微鏡で観察した。腹腔内に移植したガラスセラミックについても同様の操作を行い走査電子顕微鏡で観察した。2)元素分析：移植前のガラスセラミックと骨移植後4週のガラスセラミックをカーボン蒸着し、エネルギー分散型元素分析装置を用いてセラミック表面の元素分析を行った。3)樹脂包埋切片標本の観察：セラミック移植後1, 3, 4週で取り出した標本を固定後、スチレンーメタクリル樹脂に包埋し、切断研磨した。これをトルイジンブルー染色して光学顕微鏡で観察した。4)破骨細胞の観察：セラミック移植後2週で標本を摘出し、固定後、酸性フォスファターゼ染色をし、赤染する破骨細胞を光学顕微鏡で観察した。

走査電子顕微鏡で観察すると、AWGC球状体の表面は一般に滑らかな凹凸を示してた。移植後4週では、AWGCは、径2~3μmの粒子の集合体としてみえるようになった。各粒子は軽石状の外観を呈していた。AWGCの表面を覆っている新生骨組織の骨基質の膠原線維束は粒子の間にも入り込んでいた。切片を光学顕微鏡で観察すると、移植後1週ではAWGC周囲に骨形成を認めた。移植前ではセラミックの表面は滑らかだったが、移植後4週ではセラミックの表層に粒子の集合層を認めた。この層は厚さが15~20μmであった。骨はこの表面にも密接して形成されていた。元素分析の結果、骨移植後セラミック表

面から主に珪素イオンが溶出していることが判った。皮下組織内に移植したAWGCの表面は移植後4週でも滑らかなままで変化しなかった。移植後2週のAWGC表面を酸性フォスファターゼ染色すると胞体が赤く染まる多核の巨細胞を認めた。

AWガラスセラミック表面は、最初の骨形成が進行したあとで、多数の小孔を持つ粒子の集合体に変化していた。このようなセラミック表面の形態変化は、セラミック表面の上に微細結晶が新しくできてくる像ではなく、元来の表面レベルをそのままに、主としてAWガラスセラミックの特定の成分が溶出してできる像とみなされる。元素分析の結果から溶出した成分は主に珪素イオンであることがわかった。しかも、これは周囲に骨がない場合には認められなかつたことから、AWガラスセラミックの形態変化には骨特有の環境が関与していると考えられる。セラミック表面に骨が形成されていく過程を所見から考えると、移植後1～2週で表面に骨芽細胞が出現して、膠原線維を形成し、ここにハイドロキシアパタイトが沈着してセラミック表面を直接におおう骨がつくられる。ついでリモデリングのために破骨細胞が出現して骨吸収が行われるようになり、また、この骨吸収面に続いて再び骨形成が進行する。この過程でAWガラスセラミックでは出現した軽石状粒子の表面に種々の方向に膠原線維が形成され、線維とセラミックが互いに噛み合い、強固な結合が生じる。

セラミック表面に骨が結合していくことの最初は、膠原線維形成であり、きわめて生物学的現象である。今回の研究からセラミックに骨が密着する反応の中心は化学反応というよりは生物学的反応であることが明らかになった。

さらにこの形態学的観察を経時的に継続することにより移植された生体材料に対する細胞反応をさらに解明することができると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。