

博士 (歯 学) 堀内(藤田)留美

学 位 論 文 題 名

Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite
and β -tricalcium phosphate ceramics
and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone

(ハイドロキシアパタイトセラミックスおよび

β -3リン酸カルシウムセラミックスと骨との界面の超微細構造ならびに
骨内における β -3リン酸カルシウムセラミックスの置換機構について)

学位論文内容の要旨

[緒言]

歯科補綴領域において、義歯の維持安定を得るため、顎堤が著しく吸収した症例の顎堤形態を改善することは、重要な課題のひとつになっている。リン酸カルシウム系セラミックスのうち、ハイドロキシアパタイト (HA) および β -3リン酸カルシウム (β -TCP) は生体適合性や骨伝導性に優れていることから、硬組織代替材料として研究され、臨床にも応用されている。HA は表面活性型セラミックスのひとつで、その表面にアパタイト層を形成して骨と接することが報告されているが、その層の成因などの詳細については不明である。一方、 β -TCP は生体内吸収性セラミックスの一種であり、骨と直接結合し経時的に骨と置換すると考えられているが、HA に比較すると骨形成や骨内における吸収についての研究は少なく、特に骨組織との置換については不明な点が多い。これまでに、著者は、臨床における顎堤挙上をモデル化した Onlay graft を用いた実験系を用いて、HAP と β -TCP 周囲での骨形成および埋入した材料の生体内での動態について光学顕微鏡を用いて組織学的、組織計量学的に比較検討を行った。その結果、埋入 24 週後の材料

周囲の骨形成量および残存材料量は、 β -TCP では HA に比較し有意に少なく、また β -TCP においては、新生骨周囲に塩基好性に染色される網状構造が認められることを報告した。本研究では、HA と β -TCP のそれぞれの材料と骨組織との界面および材料周囲での骨形成、特に β -TCP の骨組織との置換の機構を明らかにすることを目的とし、透過型電子顕微鏡を用いて超微細構造学的検索をおこなった。

[材料と方法]

実験材料として、気孔率 55%、直径 5mm、厚さ 2mm の多孔質の HAP および β -TCP ブロックを用いた。焼結温度は、HA は 1200°C とし、 β -TCP は 1100°C とした。気孔は、200 ~ 400 μ m のマクロポアと 2 μ m のマイクロポアからなり、気孔相互が連続する開放性の構造を有している。これらの材料は、ethylene dioxide gas にて滅菌後、実験に用いた。

実験動物としては、6 週齢雄性 Wistar 系ラット（平均体重 190 $\pm$ 14g）22 匹を用いた。

ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による全身麻酔下にてラット頭頂部を剃毛後、皮膚に切開を加え、骨膜を剥離後、頭頂骨骨面上頭蓋骨膜下に各材料を埋入するとともに、腹部皮下にもポケットを形成し、皮下組織にこれらを埋入した。術後 4 および 8 週後に材料を周囲組織とともに摘出し、Karnovsky 固定液（2.5% glutaraldehyde および 4.0% paraformaldehyde を含む 0.05mol/L sodium cacodylate 緩衝液）で 1 日間前固定し、その後標本を 2 分割し、一方を EDTA による脱灰標本、もう一方を非脱灰標本とした。透過型電子顕微鏡（TEM）による観察視野を決めるため、それぞれの標本の一部を hematoxylin-eosin および van Gieson を用いて染色し、光学顕微鏡下にて検索した。それぞれの標本は、TEM 観察のために、1% OsO₄ で後固定し脱水後エポキシ樹脂で包埋した。ダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色後、TEM にて検索した。さらに、HA の超薄切片の一部を 0.1N 塩酸で脱灰し観

察した。

[結果]

HA では、術後 4 および 8 週の頭頂骨骨膜下に埋入した標本において、電子密度の高い層を介して骨と接している像が観察され、層の形態はさまざまであったが、経時的にその層の電子密度は高くなり層の数も増加する傾向が認められた。また、腹部皮下組織に埋入した標本においても、HA 表面に電子密度の高い層が観察された。これらの切片を、0.1 N 塩酸を用いてさらに脱灰すると、頭頂骨骨膜下埋入した標本の HA と骨との介在層には、線維状の規則的な構造が観察された。この構造は、腹部皮下組織に埋入した標本においては認められなかった。

一方、 β -TCP を頭頂骨骨膜下に埋入した標本においては、4 および 8 週のいずれにおいても、材料表面に電子密度の高い層は観察されず、材料と新生骨は直接接しており、 β -TCP と骨との界面は不明瞭であった。腹部皮下組織に埋入した標本では、周囲軟組織と直接接しており、その界面は不明瞭であった。光学顕微鏡で観察された β -TCP ブロック内の新生骨周囲の特徴的な好塩基性の網状構造には、石灰沈着を示す電子密度の高い領域が観察された。さらに拡大すると電子密度の高い領域の間に鬆粗なコラーゲン線維が観察された。また、 β -TCP は経時的に小さくなっており、この吸収が進んでいる β -TCP の周囲に形成された骨組織には、 β -TCP の表面に近接して骨細胞の突起が観察され、一部では β -TCP 方向に伸長している突起も認められた。 β -TCP におけるこの突起の数は、経時的に増加しており、HA に比較し多く、その大きさも大きい傾向を示した。

[考察]

HA では骨膜下埋入、皮下組織埋入のいずれにおいても材料表面に電子密度の高い層が観察され、 β -TCP ではこの層が観察されなかったことから、この層は周囲の環境より材

料に依存して形成されたと考えられた。また、HA と骨の間の層内の微細な線維状構造は、骨組織との間にのみ観察されることから、HA 表面の骨形成メカニズムと関係していることが示唆された。同時に HA が β -TCP に比較し生体内で安定である理由として、この層が HA の溶解を抑制していることが推察された。

一方、 β -TCP においては、新生骨との境界部付近の β -TCP の周囲に骨細胞の突起が多数観察されたこと、および β -TCP が経時的に減少することから、これらの突起が材料の吸収に関与している可能性が示唆された。これは、骨細胞が骨内の圧受容器として重要な機能を果たしているという説を裏付けるものと考えられる。さらに、 β -TCP では、骨形成と同時に材料の吸収が起こることによって骨組織との置換が生じるため、骨組織との境界は HA と異なり不明瞭になると推察された。また、骨形成は、基質内のコラーゲン線維にハイドロキシアパタイトが沈着することにより生じるとされているが、TEM による観察で新生骨の形成前に石灰化が生じていることが示されたことから、 β -TCP の周囲においては、特徴的な骨形成が生じていることが示唆された。

[結論]

HA および β -TCP において、材料表面の超微細構造に差異が認められた。HA の表面に形成される電子密度の高い層と骨形成との関連が示唆された。また、 β -TCP の吸収と骨形成、すなわち β -TCP の骨組織との置換には骨細胞の突起が関与していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone

(ハイドロキシアパタイトセラミックスおよび

β -3リン酸カルシウムセラミックスと骨との界面の超微細構造ならびに
骨内における β -3りん酸カルシウムセラミックスの置換機構について)

審査は向後、吉田および川崎審査委員全員が出席のもとに、まず論文提出者に対して参考論文を含めた提出論文の内容の要旨を説明させ、論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文提出者は、ハイドロキシアパタイト (HA) および β -3リン酸カルシウム (β -TCP) について、臨床における顎堤挙上を想定してラット頭頂骨骨膜下に埋入し、それぞれの材料と骨組織との界面および材料周囲での骨形成、特に β -TCP の骨組織との置換機構を明らかにすることを目的とし、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて超微細構造学的検索を行った。
[材料と方法]

実験材料として、気孔率 55%、直径 5mm、厚さ 2mm の多孔質の HA および β -TCP ブロックを用いた。焼結温度は、HA は 1200°C とし、 β -TCP は 1100°C とした。気孔は、直径 200~400 μ m のマクロポアと直径約 2 μ m マイクロポアからなり、気孔相互が連続する開放性の構造を有していた。実験動物としては、6 週齢雄性 Wistar 系ラット 22 匹を用いた。

ベントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による全身麻酔下にてラット頭頂部を剃毛後、皮膚に切開を加え、骨膜を剥離後、頭頂骨骨面上頭蓋骨膜下に各材料を埋入するとともに、腹部皮下にもポケットを形成し、皮下組織に埋入した。術後 4 および 8 週に材料を周囲組織とともに摘出し、Karnovsky 固定液で前固定し、その後標本を 2 分割し、一方を EDTA による脱灰標本、もう一方を非脱灰標本とした。TEM による観察視野を決めるため、それぞれの標本の一部を光学顕微鏡下にて検索した。それぞれの標本は、TEM 観察のために、1% OsO₄ で後固定し脱水後エポキシ樹脂で包埋した。ダイヤモンドナイフを用いて超薄

切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色後、TEM による超微細構造学的検索を行った。さらに、HA の超薄切片の一部を 0.1N 塩酸で脱灰し、TEM 観察を行った。

[結果と考察]

HA では、術後 4 および 8 週の頭頂骨骨膜下に埋入した標本および腹部皮下組織に埋入した標本において、材料の表面に電子密度の高い層が観察された。これらの切片を、さらに 0.1 N 塩酸を用いて脱灰すると、頭頂骨骨膜下埋入した標本の HA と骨との介在層には、線維状の規則的な構造が観察された。一方、 β -TCP を頭頂骨骨膜下に埋入した標本および腹部皮下組織に埋入した標本においては、4 および 8 週のいずれにおいても、材料表面にこのような構造の層は観察されず、材料と新生骨は直接接しており、 β -TCP と骨との界面は不明瞭であった。これまでの光学顕微鏡を用いた研究において、 β -TCP ブロック内で認められた新生骨周囲の特異的な好塩基性の網状構造には、TEM による検索では、石灰沈着を示す電子密度の高い領域が観察された。さらに拡大すると電子密度の高い領域の間に鬆粗なコラーゲン線維が観察された。また、 β -TCP は経時的に小さくなっており、この吸収が進んでいる β -TCP の周囲に形成された骨組織には、 β -TCP の表面に近接して骨細胞の突起が観察され、一部では β -TCP 方向に伸長している突起も認められた。 β -TCP におけるこの突起の数は、経時的に増加しており、HA に比較し多く、その大きさも大きい傾向を示した。

HA の材料表面に観察された電子密度の高い層は、 β -TCP では観察されず、この層は周囲の環境より材料に依存して形成され则认为された。また、HA と骨の間の層内の微細な線維状構造は、骨組織との間にのみ観察されることから、HA 表面の骨形成メカニズムと関係していることが示唆された。同時に HA が β -TCP に比較し生体内で安定である理由として、この層が HA の溶解を抑制していることが推察された。

一方、 β -TCP においては、新生骨との境界部付近の β -TCP の周囲に骨細胞の突起が多数観察されたこと、および β -TCP が経時的に減少するという、これまでの研究の組織計量学的検索結果から、これらの突起が材料の吸収に関与している可能性が示唆された。これは、骨細胞が骨内の圧受容器として重要な機能を果たしているという説を裏付けするものと考えられる。さらに、 β -TCP では、骨形成と同時に材料の吸収が起きることにより骨組織との置換が生じるため、骨組織との境界は HA と異なり不明瞭になると推察された。また、骨形成は、基質内のコラーゲン線維にハイドロキシアパタイトが沈着することにより生じるとされているが、光学顕微鏡観察で認められた β -TCP の好塩基性網状構造は、TEM による観察で新生骨の形成前に石灰化が生じていることを示しており、 β -TCP 周囲での特徴的な骨形成のメカニズムが示唆された。

[結論]

HA および β -TCP において、材料表面の超微細構造に差異が認められ、HA の表面に形成される電子密度の高い層と骨形成との関連が示唆された。また、 β -TCP の吸収と骨形成、すなわち β -TCP の骨組織との置換には骨細胞の突起が関与していることが示された。

以上の論述に引き続き実験方法、結果、考察、今後の展望および臨床とのつながりについての質疑応答を行い、論文提出者はいずれにも明快な回答と説明を行った。

本研究は、TEM を用いた超微細構造学的検索により、HA および β -TCP ブロックをラット

頭頂骨骨膜下に埋入した場合の材料表面の超微細構造における差異ならびに β -TCPの骨組織との置換における骨細胞の突起の関与について明らかにした。これは、臨床におけるHAおよび β -TCPブロックの有効性を広げる可能性を示唆している。また、本論文提出者は本論文の内容に関係のある事項に対しても明確な知識を有していた。さらに今後の展望に関してもしっかりとした研究立案をもっており、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。