

原 著

生体活性ガラス (Bioglass) 顆粒のラット背部皮下組織に及ぼす影響に関する病理組織学的検討

金子良司 武田泰典* 鈴木鍾美*

金子歯科診療室

*岩手医科大学歯学部口腔病理学講座 (主任: 鈴木鍾美教授)

〔受付: 1987年6月1日〕

抄録: ラット背部皮下組織に Bioglass 顆粒および水酸化カルシウムを埋入し, その経日的変化を病理組織学的に比較観察した。その結果, 1) 埋入した Bioglass 顆粒および水酸化カルシウムの周囲には種々の程度の肉芽組織の形成がみられたが, Bioglass 顆粒では水酸化カルシウムに比較して肉芽組織の形成量は少なかった, 2) 肉芽組織中には Bioglass 顆粒を貪食した組織球が散見された, 3) 水酸化カルシウム埋入例では近接する筋組織に壊死をみたが, Bioglass 埋入例ではこのような所見をみたものはなかった, 4) 水酸化カルシウムは5日目より, Bioglass 顆粒は10日目より石灰化がはじまり, これらの石灰化した埋入材料は経過とともに吸収されていた, 5) 創傷の治癒は Bioglass 埋入例では水酸化カルシウム埋入例より早期に完了していた。

Key words : Bioglass granules, tissue reaction, subcutaneous tissue.

緒 言

近年, 医用生体材料の研究の進歩とともに, 組織親和性を有する種々の材料が開発されている¹⁻³⁾。歯科領域においても, 骨欠損ないし不可逆性の機能的損傷などに対して生体材料を応用し, これらの組織に対する影響, 埋入する生体材料の形態および機能, 機能時の組織反応, さらに手術方法など種々の点についての研究が進められている。なかでも歯科インプラント材料に関する研究では, 金属, レジン, 陶材, ガラス, アパタイトなどの様々な材質に関する研究^{1, 9-15)}, 材料の形態に関する研究^{6, 7, 16)}, 骨内, 骨膜下, 歯内骨内などの応用に関する研究^{7, 16)}

など多数の報告がなされている。また, 材質が同一であっても形状や大きさが著しく異なる場合には, その組織反応に差が生じてくることも指摘されている⁹⁾。しかしながら, 生体材料を微細化してその材料に対する生体の組織反応を詳細に検討した報告は非常に少ない^{8, 16)}。

そこで今回, 著者らは歯科インプラント材料のひとつである Bioglass (生体活性ガラス 45 S 5・日本光学株式会社製・成分: SiO₂(45.0%), CaO (24.5%), Na₂O (24.5%), P₂O₅ (6.0%)) を最大径20 μmの顆粒 (Fig.1) にし, これをラット背部皮下組織に埋入し, Bioglass 顆粒の変化と周囲の組織反応を病理組織学的に検索したので, その結果を報告する。

Histopathological study on the effect of Bioglass granules in the rat subcutaneous tissue.

Ryoji KANEKO, Yasunori TAKEDA* and Atsumi SUZUKI*.

(Kaneko Dental Office*, Morioka 020, *Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市内丸19-1 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 12 : 123-129, 1987

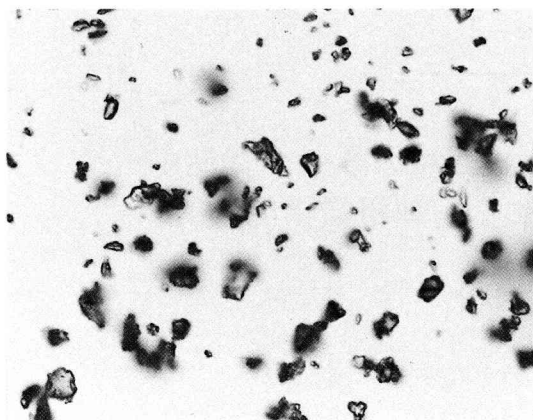


Fig.1 Granular Bioglass 45S5 with up to 20 μm in size. $\times 900$.

実験材料および方法

1) Bioglass 顆粒の染色性と pH の測定 :

Bioglass 顆粒 0.5g を滅菌蒸留水 1mg に加え、室温にて、直後、3日目、5日目、10日目、20日目および30日目の Bioglass 顆粒をヘマトキシリン・エオジン染色およびコッサ染色を施し鏡検した。また、同時に pH の測定をおこなった。

2) 皮下に埋入した Bioglass 顆粒に対する組織反応 :

動物は Wistar 系雄性ラット (10~11週齢、体重300~400g) 15匹を用いた。これらのラットをエーテルにて吸入麻酔をした後、速やかに体重を測定し、ペントバルビタールナトリウム (Nembutal[®]) の腹腔内注射 (0.08ml/100g) により全身麻酔を行った。ラットを伏臥位に固定し、背部を剃毛用バリカンにて注意深く剃毛し、70%エチルアルコールで術野を消毒した。次いで長さ 5mm 程度の皮膚切開を加え、皮膚と皮下組織とを十分分離し、あらかじめ乾熱滅菌処置をしておいた Bioglass 顆粒および水酸化カルシウムをそれぞれ滅菌蒸留水に混和したもの 0.1g を皮下に埋入した。

埋入部位はラット一匹につき背部の左側に 2カ所、右側に 3カ所の計 5カ所とした。これらのうち、1カ所にはコントロールとして滅菌蒸留水のみを、1カ所には水酸化カルシウムと滅

菌蒸留水を混和したものを、残り 3カ所には滅菌 Bioglass 顆粒と滅菌蒸留水を混和したものをそれぞれ埋入した。埋入後、直ちに滅菌ブレードシクにて皮膚を縫合した。

観察期間は埋入後 5日、10日、20日、30日、40日とした。各期間経過後、エーテルの過剰吸入により屠殺し、実験時と同様に、埋入部を注意深く剃毛した。次いで実験材料埋入部を周囲組織と一塊にして採取後、直ちに 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定、通法の如く脱水、パラフィン包埋をし、厚さ 3~4 μm の連続切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色、コッサ染色、マッソン染色を施し、病理組織学的に検索した。

結 果

1) Bioglass 顆粒の染色性と pH 測定の結果 :

Bioglass 顆粒の染色性はいずれの時期も同様の所見を呈した。すなわち、顆粒周囲はヘマトキシリン・エオジン染色ではヘマトキシリンに濃染し、内側は淡染した。コッサ染色においても顆粒周囲では黒色ないし黒褐色に濃染し、内側は淡染していた。一方、pH はすべての時期でほぼ同一であり、pH13.4~pH13.6 を示した。

2) 皮下埋入実験 :

1. Control 群

5日目では埋入部にはリンパ球および形質細胞を伴った肉芽組織を認められ、線維化も進捗しつつあった。しかし、切開創表層の上皮の被覆は不完全であった (Fig.2)。

10日目では、肉芽組織の大部分は膠原線維に置換していた。また、切開創は完全に上皮で被覆された (Fig.3)。

20日目では切開創部は完全に治癒していた。

2. 水酸化カルシウム群

5日目では、剥離した部分を中心に水酸化カルシウムが帯状に存在していた。切開創部上皮直下には好中球浸潤を伴う炎症性肉芽組織が形成され、また水酸化カルシウム埋入部周囲組織には水腫、壊死ならびに好中球浸潤を伴う炎症性肉芽組織が形成されていた (Fig.4)。

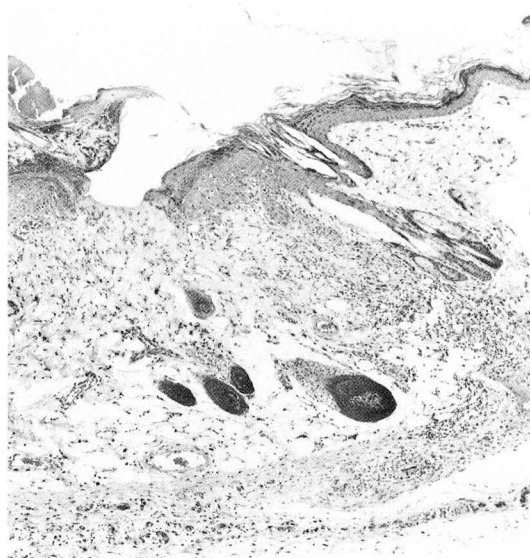


Fig.2 5 days after incision without implantation. (H-E stain, $\times 15$).

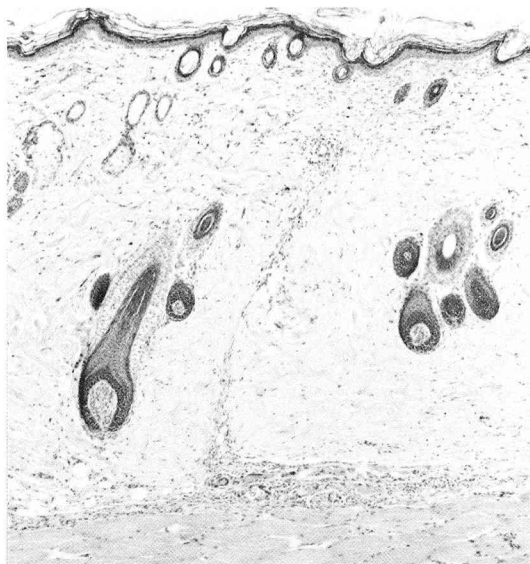


Fig.3 10 days after incision without implantation. (H-E stain, $\times 15$).

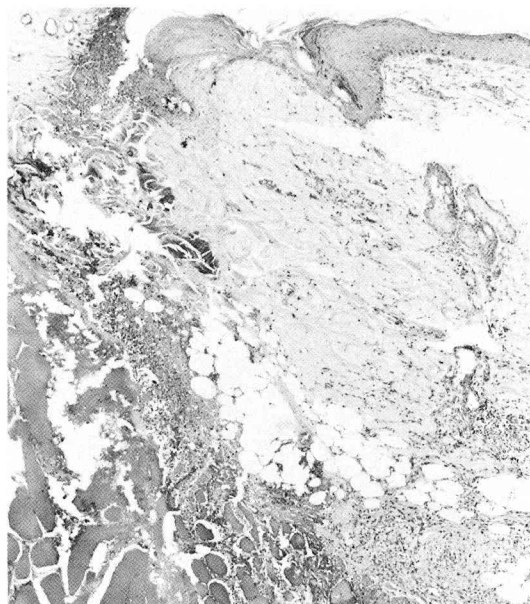


Fig.4 5 days after implantation of calcium hydroxide. (H-E stain, $\times 15$).

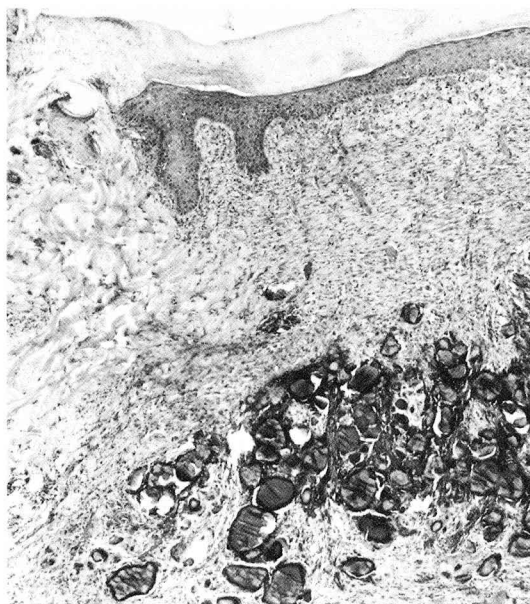


Fig.5 10 days after implantation of calcium hydroxide. (H-E stain, $\times 15$).

10日目では、水酸化カルシウム埋入部の肉芽組織は次第に線維化傾向を呈するようになり、また、ほとんどの例で埋入された水酸化カルシウムは石灰化を示していた (Fig.5)。しかし、切開部付近の上皮下においては未だ好中球浸潤がみられ、上皮は炎症性増生を示すものの、切

開創部の上皮による閉鎖はみられなかった。

20日目では、肉芽組織はほぼ線維化していた。埋入した水酸化カルシウムはほぼ完全に石灰化し、それらの周囲には多数の組織球や巨細胞が散見された (Fig.6)。この時期になると切開創は上皮で被覆されていた。

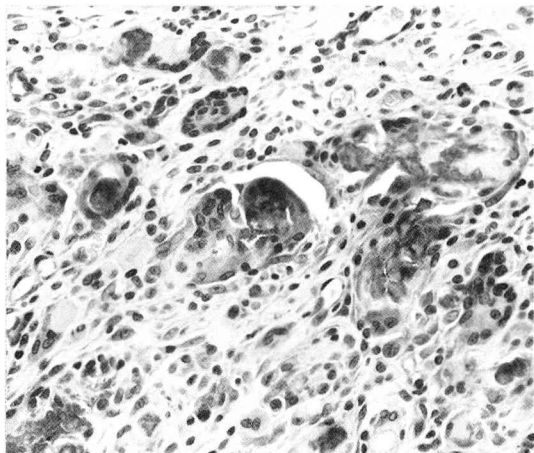


Fig.6 20 days after implantation of calcium hydroxide. (H-E stain, $\times 200$).

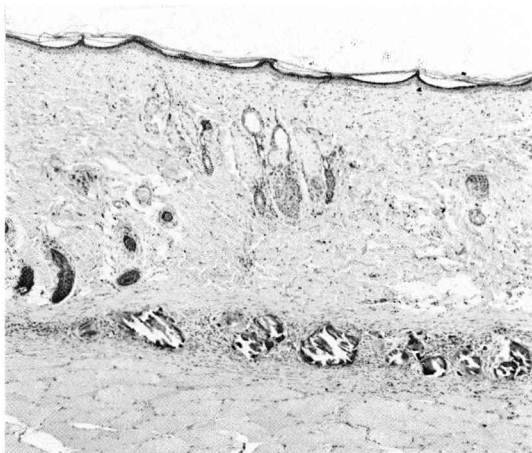


Fig.7 30 days after implantation of calcium hydroxide. (H-E stain, $\times 10$).

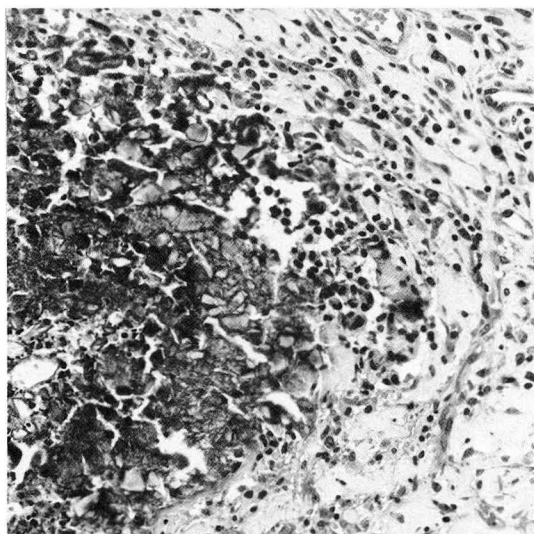


Fig.8 5 days after implantation of Bioglass granules. (H-E stain, $\times 200$).

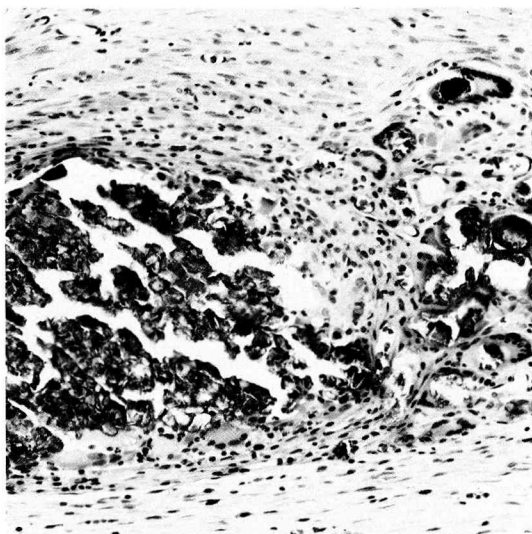


Fig.9 30 days after implantation of Bioglass granules. (H-E stain, $\times 180$).

30日目では、水酸化カルシウム埋入部には球状あるいは不定形の石灰化物が筋層に接して存在し、それらは線維性結合組織にて被包されていた (Fig.7)。切開創は完全に治癒していた。

3. Bioglass 顆粒群

5日目では、埋入した Bioglass 顆粒は帯状に集簇しており、また個々の顆粒の原形をとどめていた。Bioglass 顆粒の周囲には幼若な肉芽組織層が形成され (Fig.8)、この肉芽組織の一部には Bioglass 顆粒を貪食する多核巨細胞もみられた。なお、切開創表層は上皮で被覆さ

れていなかった。

10日目では、Bioglass 顆粒の石灰化が次第に進み、顆粒の原形をとどめないものが多くなっていた。また Bioglass 顆粒をとりまく肉芽組織は漸次線維性結合組織に置換されつつあった。これら肉芽組織あるいは線維性結合組織中には Bioglass を貪食した組織球が多数散在していた。この時期になると切開創は上皮で被覆されていた。

20日目では、過半数の例で Bioglass 顆粒が石灰化を示していた。また肉芽組織のほとんど

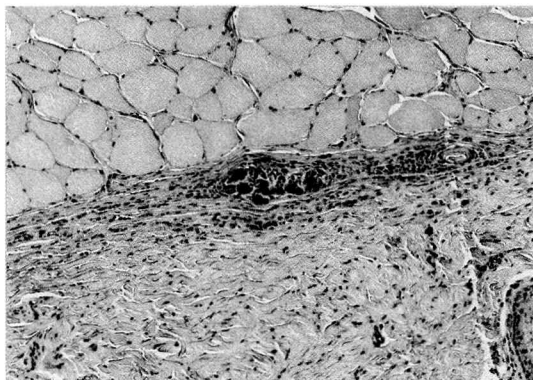


Fig.10 40 days after implantation of Bioglass granules. (H-E stain, × 13).

は線維性結合組織に置換されていた。

30日目では、9例中4例でBioglass顆粒のほとんどは石灰化を示しており、原形をとどめたBioglass顆粒が一部にのみ残遺していた。また、残り2例ではBioglass埋入部位に小石灰化物を認めるのみであった。石灰化物あるいは石灰化したBioglass顆粒は密で走行の一定した線維性結合組織で被包されていたが(Fig.9)、顆粒の周囲には多数の多核巨細胞がいまだに認められた。

40日目では9例中4例で、Bioglass顆粒埋入部位に小石灰化物のみを認め、それらは少量の線維性結合組織で囲まれていた(Fig.10)。残りの5例では埋入部に軽度の小円形細胞浸潤を伴った線維性結合組織のみがみられた。

考 察

今回、実験に用いたBioglassは、主に歯科インプラントの体部として臨床への応用が行われようとしている。このBioglassは骨組織内へ埋入されると周囲にハイドロオキシアパタイトの結晶が析出し、骨形成が促進されることが知られている。しかしながら、細顆粒状にしたBioglassを使用する場合、生体諸組織へ及ぼす影響についてはほとんど検討がなされていなかった。そこで著者らは細顆粒状のBioglassを生活歯髓切断法へ応用した場合の歯髓組織へ及ぼす影響を実験的に検討してきた¹⁷⁾。その結果、水酸化カルシウム応用例に比較して

Bioglass顆粒応用例は治癒成績はやや劣っていたものの、庇蓋象牙質の形成はBioglass応用例で最も顕著であった。そこで今回はラット背部皮下組織内において水酸化カルシウムとBioglass顆粒がいかなる動態を示すかを比較検討した。

Mitchell and Shnkwalker¹⁸⁾は水酸化カルシウムをラット背部皮下結合組織に埋入し、術後10日から35日経過例に骨様石灰化物の形成を認めたと報告した。Yoshiki and Mori¹⁹⁾も同様にラット背部皮下組織に水酸化カルシウムを埋入し、3週間経過例に骨様硬組織を観察している。また、枝ら²⁰⁾は歯科用ストップング製の筒の中に水酸化カルシウムを填塞してイヌの皮下、抜歯窩、骨膜下、筋肉内に埋植した。その結果、抜歯窩や骨膜下に埋入した場合、水酸化カルシウムと関連して骨の増生を認めているが、軟組織においては硬組織の形成はみられなかったと報告している。一方、川上ら²¹⁾はラット大腿骨付近、上顎骨膜下、腹部あるいは背部皮下組織内に糊剤根管充填材コードホルム・水酸化カルシウムパスタ(ビタベックス[®])を埋入した場合、大腿骨および上顎骨の骨膜付近に埋入した、わずか1例にのみ骨の新生を認めている。また、皮下に埋入したものでは術後61日に不定形の石灰化物の形成を認めたと、骨ないし類骨の形成は認められていない。

今回の実験においては、水酸化カルシウム埋入後5日目に、Bioglass顆粒では10日目に石灰化がみられ、水酸化カルシウムの方が比較的早期に石灰化をきたしていた。また、水酸化カルシウムの石灰化はほぼ全体にわたって一様にみられたのに対して、Bioglass顆粒ではすべてが一様に石灰化されるわけではなく、一部に貪食、吸収がみられた。また、水酸化カルシウム埋入例ならびにBioglass埋入例ともに初期には一部に好中球浸潤をみたが、このような所見は切開部付近の上皮下に局限していたことから、埋入材料に対する反応ではなく、術中の感染に起因したものであると考えられる。創傷の治癒経過についてみると、Bioglass顆粒埋入例で

は水酸化カルシウム埋入例に比べてコントロール群と同時期に切開創での再生上皮の被覆が認められ、さらに、埋入材周囲の肉芽組織の層が比較的薄く、かつ、細胞浸潤も少なかった。これらの所見から、Bioglass 顆粒は生体内においては水酸化カルシウムより組織親和性が強いと考えられる。なお、水酸化カルシウムより Bioglass 顆粒の石灰化の時期がやや遅れてみられたが、この石灰化という現象は埋入材の生体内における親和性とは別の現象と考えられる。水酸化カルシウム水溶液は pH12.4 であったのに対し Bioglass 顆粒浸漬液は pH13.6 と、どちらも強アルカリ性であった。しかしながら、水酸化カルシウム埋入例では、それに接した筋組織の壊死をみたのに反し、Bioglass 顆粒埋入例では周囲組織の壊死をみることもなく、また、細胞浸潤も比較的軽度であった。このことは歯髄組織での結果¹⁰⁾と異なっており、Bioglass 顆粒が組織の種類により異なった反応を示すものと考えられ、この点に関しては今後さらに検討を要するものと思われる。

結 語

ラット背部皮下組織に生体活性ガラス (Bioglass) を顆粒状としたものと水酸化カル

シウムをそれぞれ埋入し、その周囲組織の変化を病理組織学的に検索し以下の結論を得た。

1. Bioglass 顆粒埋入例では、周囲の肉芽組織の形成や炎症性細胞浸潤は水酸化カルシウム埋入例より少なく、また、周囲筋組織の壊死もみられなかった。
2. 水酸化カルシウム埋入例では、Bioglass 顆粒埋入例に比べて多くの肉芽組織が形成され、炎症性変化も強かった。また、水酸化カルシウムに近接する筋組織には壊死がみられた。
3. 肉芽組織中には組織球、多核巨細胞が散見され、とくに10日目において多くの Bioglass 顆粒が貪食されている像が顕著であった。
4. Bioglass 顆粒および水酸化カルシウムの石灰化は経日的に進行するとともに、次第に吸収され、消失する過程が観察された。
5. 創傷の治癒は Bioglass 顆粒埋入例が水酸化カルシウム埋入例より早期に完了していた。

本研究に際し、Bioglass 45S5 を提供して戴いた日本光学株式会社硝子技術課の荻野誠氏、二見俊彦氏をはじめ関係者各位に対し、衷心より感謝の意を表します。

Abstract : Histopathological study of Bioglass granules and calcium hydroxide powder implanted in subcutaneous tissue was made experimentally. The animals used were male Wistar rats, and were sacrificed 5, 10, 20, 30, and 40 days after subcutaneous implantation of Bioglass granules and calcium hydroxide powder. The results were as follows : 5 and 10 days after implantations, calcium hydroxide powder and Bioglass granules were surrounded by granulation tissue, but the amount of granulation tissue around the calcium hydroxide powder was greater than that around the Bioglass granules. 10 days after implantation histiocytes phagocytizing the Bioglass granules were scattered throughout the granulation tissue. 5 and 10 days after implantations, necrosis of the muscle tissue adjacent to the calcium hydroxide powder was noted, but such finding was not noted adjacent to the Bioglass granules. Calcification of calcium hydroxide powder began 5 days after, on the other hand, such calcification of Bioglass granules began 10 days after. The wound healing was slower in calcium hydroxide powder-implanted cases than in Bioglass granules-implanted cases.

文 献

- 1) Hench, L. L. : *Biomaterials. Science.* 208 : 826-831, 1980.
- 2) 末次恒夫 : 歯科インプラント法の展望, 歯科ジャーナル, 18 : 263-271, 1983.
- 3) 唐澤重雄 : セラミックス製人工股関節の開発に関する実験的研究, 日整会誌, 53 : 1579-1594, 1979.
- 4) 石木哲夫 : インプラントと病理学, 歯界展望, 別冊, インプラントの臨床 : 57-66, 1975.
- 5) 石木哲夫 : 歯科インプラントをとりまく病理学的諸問題, 歯科ジャーナル, 18 : 273-279, 1983.
- 6) 押鐘 篤 : 歯科ハンドブック, 理論編, 第1版, 文京書院, 東京, 133-134, 1977.
- 7) 鈴木鍾美 : 歯科インプラントに関する病理組織学的知見, 歯科ジャーナル, 18 : 281-291, 1983.
- 8) 小木曾誠 : 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, 口病誌, 50 : 1-22, 1983.
- 9) 山崎安晴 : 人工骨としての多孔質アパタイト—顎骨補填実験—, 口病誌, 51 : 372-406, 1984.
- 10) Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C. and Greenlee, T. K. : Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 2 : 117-141, 1971.
- 11) Hench, L. L. and Paschall, H. A. : Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 4 : 25-42, 1973.
- 12) Hench, L. L. and Paschall, H. A. : Histochemical responses at a biomaterials interface. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 5 : 49-64, 1974.
- 13) 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.
- 14) Greenlee, T. K., Beckhem, C. A., Crebo, A. and Malmorg, J. C. : Glass ceramic bone implants. A light microscopic study. *J. Biomed. Mater. Res.* 65 : 235-244, 1972.
- 15) 不二崎正彦 : 微細化したアルミナセラミックスに対する組織反応について, 補綴誌, 26 : 13-29, 1982.
- 16) 押鐘 篤 : 歯科ハンドブック, 手技編, 第2版, 文京書院, 東京, 707-710, 1979.
- 17) 金子良司 : Bioglass の生活歯髄切断法への応用に関する病理学的研究, 岩医大歯誌, 11, 229-245, 1986.
- 18) Mitchell, D. F. and Shankwalker, G. B. : Osteogenic potential of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. *J. Dent. Res.* 37 : 1157-1163, 1958.
- 19) Yoshiki, S. and Mori, M. : enzyme histochemistry on the tissue reaction to calcium hydroxide. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 2 : 32-43, 1961.
- 20) 枝 重夫, 坂野一郎, 平田昌弘, 伊藤正道 : 水酸化カルシウムによる異所性硬組織形成に関する実験的研究(予報), 歯科学報, 62 : 477-483, 1962.
- 21) 川上敏行, 中村千仁, 林 俊子, 枝 重夫, 赤羽章司 : ヨードホルム・水酸化カルシウムペースタ(糊剤根管充填材ビタベックス)の組織埋入に関する実験的研究 第1報 病理組織学的検索, 松本歯学, 5 : 35-44, 1979.