

原著論文

水熱処理した陽極酸化 Ti インプラントに関する 組織学的研究

梶村 幸市 塩山 司 山森 徹雄* 伊藤 創造 細川 貢
島崎 伸子 有住 達也 石橋 寛二 石沢 均**

A Histological Study of Anodic Oxide Titanium Implant after Hydrothermal Treatment

Kouichi Kajimura, Tsukasa Shioyama, Tetsuo Yamamori*, Sozo Itoh, Mitsugu Hosokawa,
Nobuko Shimazaki, Tatsuya Arizumi, Kanji Ishibashi and Hitoshi Ishizawa**

Abstract: The surface characteristic of titanium was improve by developing a hydroxyapatite film on top of an anodic titanium oxide film containing Ca and P via hydrothermal treatment (SA treatment). This study was conducted to investigate how SA treated implants affect the surrounding bone tissue based on early stage histological observations after insertion.

Cylindrical plasma sprayed pure titanium implants and SA treated plasma sprayed pure titanium implants were inserted into the mandible of beagles. Four weeks after insertion, undercalcified samples were observed by light microscopy.

The results suggested that SA treated implants have more contact directly with surrounding bone tissue than titanium implants, leading to the conclusion that SA treatment increased the compatibility of the titanium surface, and was found to be a useful method for inducing early bone formation around implant.

Key words: titanium implant, anodic oxide, hydrothermal treatment, hydroxyapatite layer, SA treatment

I. 緒 言

純チタン製オーラルインプラントは近年広く臨床応用され、良好な成績が報告されている^{1,2)}。しかし骨の高さや幅あるいは骨質にも適応限界があり、さらに埋入後 osseointegration を獲得するまでに数か月から半年以上の治療期間を要している。

一方、生体内でより早期に安定し適応症の広いインプラントの開発を目的としてチタン表面に対する改良も試みられている³⁻⁵⁾。その1つとして、優れた生体活性を有するハイドロキシアパタイト (HA) をプラズマ溶射によりチタン表面にコーティングする方法がある^{6,7)}。これは HA をインプラントに応用する最も一般的な方法であるが、この方法による HA 皮膜には皮膜と基盤間の付着強度が弱いこと、皮膜中に α , β -tricalcium phosphate, tetracalcium phosphate, oxyhydroxyapatite などの非晶質相やリン酸カルシウム相が含まれており化学的安定性が低いことなど、未だ改良の余地を残している⁸⁻¹⁰⁾。

著者らは Ca イオンと P イオンを含む特殊な電解質中でチタンインプラントを放電陽極酸化し、さらに水熱処理を施すことにより、TiO₂ の表層に HA の超薄層をコーティングする新しい表面処理方法 (以下 SA 処理と略す) を開

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第二講座 (主任: 石橋寛二教授)

*奥羽大学歯学部歯科補綴学第二講座 (主任: 濱野和夫教授)

**株式会社ニコン

Department of Fixed Prosthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University (Chief: Prof. Kanji Ishibashi)

*Department of Removable Prosthodontics, School of Dentistry, Ohu University (Chief: Prof. Kazuo Seino)

**Nikon Corporation

平成8年5月27日受付

発した¹¹⁻¹³⁾。

本研究では SA 処理したインプラント体の有用性を検討する第一段階として、犬顎骨内埋入後 4 週におけるインプラント体周囲を組織学的に観察し、特に硬組織の反応について検討した。

II. 材料と方法

1. 実験材料

本研究に用いたインプラントは表面にチタンプラズマ溶射を施した直径 3.6 mm、長径 8.0 mm の純チタン製シリンドラー型インプラントで、さらに SA 処理を施したものを実験群、SA 処理を施さないものをコントロール群とし、それぞれ 4 本ずつ、計 8 本を用いた。

SA 処理の条件については、まず β -グリセロリン酸ナトリウム (β -GP) と酢酸カルシウム (CA) の濃度がそれぞれ 0.01 mol/l、0.15 mol/l、液温 10°C となるよう電解質を調製した。次にこの溶液中でインプラント体を陽極、純チタン製ロッドを陰極として電圧 350 V、電流 50 mA/cm²、放電時間 10 分にて陽極酸化処理を行い、水洗乾燥後に 300°C で 2 時間水熱処理を行った。

陽極酸化処理後のインプラント体表面の SEM 像を観察すると、陽極酸化処理後はチタンプラズマ溶射による表面の凹凸が平坦化し、直径数 μ m の放電痕が認められ (図 1)、さらに水熱処理を施すことにより HA の針状結晶が析出していた (図 2)。析出した HA 結晶を観察すると個々の結晶が単結晶に近いと思われる定型的な六角柱を呈していた (図 3)。

今回の処理条件ではインプラント体表面に厚さ 4.5 μ m の TiO₂ 層と 1.0 μ m の HA 層が生じ、HA 結晶は TiO₂ 表面のおよそ 60% を被覆していた。

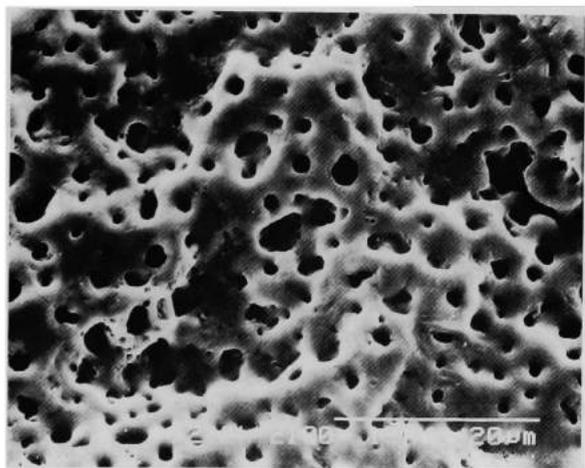


図 1 Surface of an anodic oxide film containing Ca and P ($\times 1,500$)

Ca と P を含む陽極酸化膜表面

2. 実験方法

実験動物には生後 2 年のビーグル犬 2 頭を用いた。下顎左右側 P3、P4 を抜去し、12 週後に片側について実験群、コントロール群のインプラント体をそれぞれ 1 本ずつ埋入した。埋入に際しては粘膜骨膜弁を形成した後、ラウンド・ドリル、パイロット・ドリル、ツイスト・ドリルを用いて生理食塩水注水にて埋入窩を形成した。ドリル類はすべて毎分 1,000 回転にて使用した。埋入にあたり歯槽骨頂部に骨鋭縁が存在している部位は、破骨鉗子と手用骨やすりを用いて平滑化した。埋入窩にインプラント体を手指圧で適合させ、マレットニングによりインプラント体頂部が頬舌の骨縁に可及的に一致する位置まで挿入、初期固定が十分得られたことを確認してカバースクリューを装着し、粘膜骨膜弁を戻して縫合した。

埋入 4 週後に屠殺し、タングステンカーバイド・バーにより下顎骨を離断して標本を採取した。採取した標本は中



図 2 Surface of SA treated titanium ($\times 1,500$)
SA 処理後のチタンインプラント表面

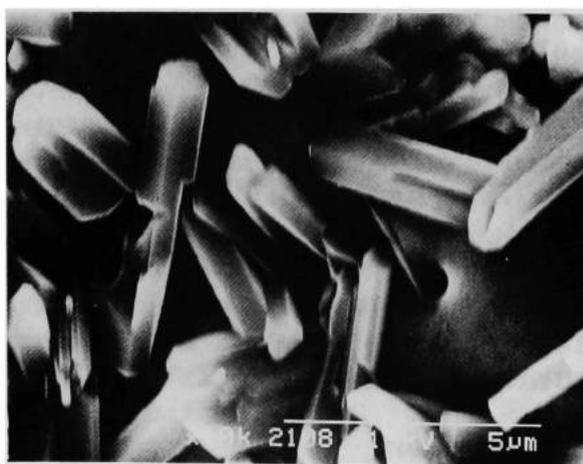


図 3 HA crystals precipitated on TiO₂ layer ($\times 10,000$)
TiO₂ 層上に析出した HA 結晶

性緩衝10%ホルマリン水溶液で約1週間浸漬固定した後、流水で十分洗浄し、アルコール系列で脱水、アセトン置換後、ポリエステル樹脂(リゴラック2004, 70F応研商事)に包埋した。バンド・ソー(BS-3000 Exakt社製)によりインプラントの近遠心的中央部で頬舌断した後、近遠心方向に切断し、グラインディングマシン(MG-4000 Exakt社製)で厚さ約140 μ mの非脱灰標本を作製した。標本にはヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

また、光学顕微鏡40倍の像を顕微鏡に接続したビデオカメラにて映像として画像解析装置VIDAS(KONTRON ELECTRONIK社製)に取り込み、標本上でインプラント体表面に骨が直接接している部分と非接触部分を同一検者が識別してマニュアル操作にて入力した後、画像処理して骨接触率を算出した。測定結果はt検定により統計的に比較検討した。なお、計測対象はインプラント体頬舌的中央部の近遠心側断面とした。

III. 結 果

1. 組織所見

コントロール群ではインプラント体表面の多くの部分が骨と直接接している像が観察された(図4-a)。既存の骨梁に近接している部分においてインプラント体表面に線維骨あるいは類骨が接しており、それが層板骨に連続している像が多く認められた。また、線維骨の外側にはエオジン好性の類骨様の層を介して骨芽細胞様の大型の間葉系細胞が配列している部位もみられた。しかし、骨との接触部分と非接触部分との差が比較的明瞭で、非接触部分と海綿骨梁との間は線維芽細胞や膠原線維に富む組織よりなっていた(図4-b)。

実験群においてもインプラント体表面の多くの部分が骨と直接接していた(図5-a)。既存の骨梁と近接している部分においてはコントロール群と同様に線維骨あるいは類骨が層板骨に連続していたが、既存の骨梁と近接していない部分においてもインプラント体表面が厚さ数 μ m~数十 μ mの線維骨に覆われ、その外側にはエオジン好性の類骨様の層を介して骨芽細胞様の大型間葉系細胞が密に配列している部分が多く認められた(図5-b)。また、線維骨が接していない部分のインプラント体表面に近接した軟組織中には石灰化物と考えられる顆粒状構造物がみられ、その周囲には骨芽細胞様の細胞が散在している部位も認められた(図5-c)。HA層が剝離、貪食されたような像は観察されなかった。

2. 骨接触率

コントロール群における骨接触率は最大値53.7%、最小値38.8%で平均43.9%、実験群においては最大値

68.9%、最小値55.0%で平均61.9%であった。両群の平均値の差をStudent's t-testにて検定したところ、実験群はコントロール群に比較して危険率5%以下で有意に高い骨接触率であった(表1)。

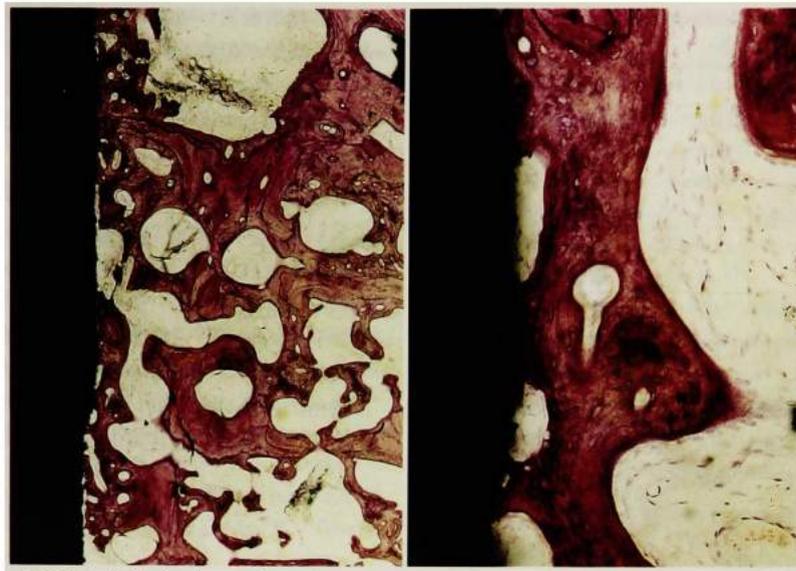
IV. 考 察

イヌにおける抜歯窩の治癒過程については、抜歯後50日では新生骨梁が肥厚し骨髄が形成されるが、上方の骨髄は狭小で炎症性変化が残存しており、抜歯後80日になり新生骨、骨髄ともほぼ定型的構造を示すといわれている¹⁴⁾。本研究ではインプラント体表面処理の違いに焦点を絞り、抜歯窩の治癒過程における部位差や残存する炎症性変化を排除したいと考えた。そこで抜歯窩の治癒がほぼ完了したと考えられる抜歯後12週(84日)にインプラント体を埋入した。そして、生体活性ガラスインプラント埋入後4週で、すでにインプラント周囲に幼弱な線維骨が観察された¹⁵⁾ことから、SA処理の有用性を検討する第1段階としてインプラント体埋入初期における周囲組織、特に周囲硬組織に着目して検討を行うには、埋入後4週(28日)での観察が妥当であると考えた。

チタン製インプラントにおける酸化膜の重要性については多くの報告^{16,19)}があるが、酸化膜により不動化したチタンも生体内で腐食が認められるとの報告^{18,19)}もあり、安定した厚い酸化膜を獲得するべくさまざまな試みが行われてきた²⁰⁻²²⁾。現在、厚いTiO₂層の付与を目的として臨床に応用されているのは加熱酸化処理と陽極酸化処理である。化学的酸処理も見受けられるがこれは酸化膜の厚径を増加させるというよりもむしろその強力な腐食作用によりTi表面に微細な凹凸を付与することを目的としている。加熱酸化処理ではTiO₂層が3~5nmであるのに対し、陽極酸化処理では10 μ m程度まで膜厚を増加させることが可能である²³⁾が、酸化膜の物性や安定性から、未だ加熱酸化処理が主流となっている。

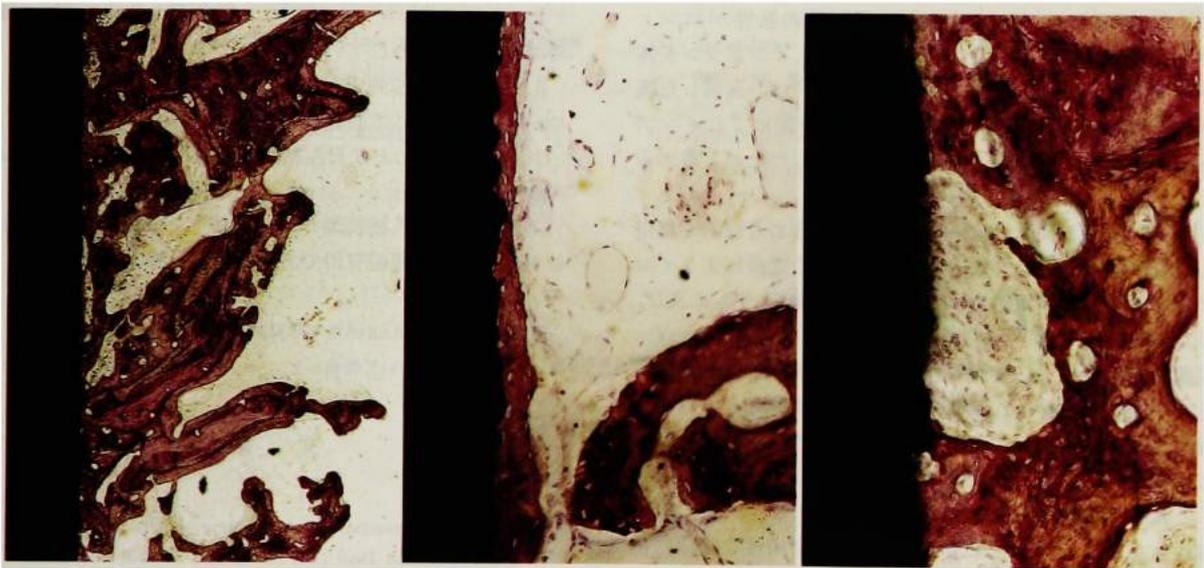
一方、生体活性を有する材料をインプラントに応用しようとする多くの試みの中でも、HA粉末をプラズマ溶射し、チタンインプラント表面にコーティングする方法が最も普及している^{6,7)}。この方法で得られるHA皮膜は優れた生体活性を有する反面、いくつかの問題点も指摘されている⁸⁻¹⁰⁾。皮膜の付着強度が低いこと、HA粉末が超高温のプラズマ炎を通過する際に一時的に溶解することに起因すると思われる結晶性の低さにより化学的安定性が低いこと、溶射という方法から細かいスレッド間隔を有するような精密な形態を付与しづらいことなどである。

今回、著者らが開発したSA処理によるHA皮膜は単結晶に近いと考えられる定型的な形態を有した結晶が均一に分布し、膜厚は1.0 μ mと薄く、皮膜の付着強度も高い¹²⁾ことから、それまでのプラズマ溶射によるHAコー



a : Histological observation of control (×40) コントロールの組織像
b : Histological observation of control (×200) コントロールの組織像

図 4



a : Histological observation of experimental (×40) 実験群の組織像
b : Histological observation of experimental (×200) 実験群の組織像
c : Granular particles which looked like mineralized substances (×200) 顆粒状構造物

図 5

ティングとは全く異なるものである。現在までに確認できている SA 処理の特徴をまとめると以下の通りである。

1. HA の生体活性により骨質の劣る部位への応用範囲拡大や治癒期間の短縮を期待できる。

2. シリンダー型のインプラント体はもちろんのこと、細かいスレッド間隔を有するスクリュー型のような精密な形態のインプラントにも応用が可能である。

3. 処理後の皮膜厚さにばらつきがなく、高い精度を保持できる。

4. SA 皮膜の厚さや性状は処理条件の変更により、コントロール可能である。

5. 長期経過後に HA 層の吸収、溶解等が起きても、その後は厚い TiO₂ 層に覆われたチタンインプラントとして高い予知性を保持することができる。

表 1 Bone contact ratio

	骨接触率 (%)	
	コントロール群	実験群
	43.4	55.0
	39.8	60.4
	38.8	63.2
	53.7	68.9
平均	43.9	61.9*
(標準偏差)	(6.81)	(5.78)

n=4

(*: p<0.05, Student's t-test)

6. SA 処理自体が簡便で、経済的である。

これらの特徴は SA 処理の長所と捉えることができる。

今回の光顕的観察では、SA 処理したインプラント体表面の多くの部分に線維骨や類骨の菲薄な層が観察された。海綿骨内ばかりでなく、インプラント体先端が下歯槽管内に穿孔している部分においても実験群では菲薄な骨が広範囲に観察されたものが多く、コントロール群とは異なる組織像を呈していた。また、線維骨あるいは類骨上に認められる骨芽細胞様の大型間葉形細胞の数ならびに形態からも、SA 処理したインプラント体周囲骨の活性がコントロールに比較して高まっていると思われた。インプラント体を被包するようなこの菲薄な骨の成長は、近接した既存の骨梁周囲の骨芽細胞が HA の骨伝導能によりインプラント体表面に広がるように移動、分化したためと考えられる。

今回、観察された組織像を定量的に評価する目的で測定した骨接触率においては、この菲薄な骨の成長によりインプラント体-骨界面において実験群は平均 61.9% に及び、コントロール群の平均 43.9% と比較して有意に高かった。組織断面における二次元的評価ではあるが光学顕微鏡観察と同一の標本で得られるこの接触率は、周囲骨との直接接触を必要とするインプラント体の組織学的評価法の 1 つとして有用である。

これらの結果から SA 処理はチタンインプラントの組織親和性を高め、埋入後 4 週の評価でその有用性を確認できた。しかも従来の HA プラズマ溶射インプラントにみられたような皮膜の剝離、吸収等は認められなかった。埋入後 4 週以降はインプラント体表面を被覆する率が増加するとともに、線維骨そのものの厚みも増し、既存の海綿骨梁との連結、成熟が予想される。

線維骨や類骨の認められない部分においてみられた顆粒状の構造物は、SA 処理したインプラント体表面に近接した部位に認められた。結合組織中での石灰化開始については血清中でリン酸イオンとカルシウムが骨塩に対して過飽和であることから、何らかの酵素や触媒が活性化エネルギーを下げることによって骨塩が形成されるという説²⁴⁾や、石灰化開始部位付近に存在する基質小胞中で形成され

た結晶様構造物が増大して細胞膜を破り、石灰化が始まるという説²⁵⁾が報告され、基質小胞中での結晶化についてはアルカリフォスファターゼが関与しているという説²⁶⁾や、脂質が関与しているという説²⁷⁾があるが、現在に至るまで定説はない。

SA 処理による HA 皮膜の付着強度は高く、今回の標本においても HA 結晶が遊離していると思われる像は認められなかったこと、SA 処理における HA 結晶の大きさに比較して顆粒状物はかなり大きいこと、分布状態が局限しており埋入時あるいは標本研磨時の機械的破壊によることは考えられないことなどから、今回観察された顆粒状構造物は局所的にリン酸カルシウムの濃度が高まることにより軟組織中にて発生した石灰化物と考えられる。

V. 結 論

特殊な陽極酸化ならびに水熱処理 (SA 処理) を施した純チタンインプラント周囲の組織変化を検討する目的で、ビーグル犬顎骨中に埋入し、埋入後 4 週での周囲組織を観察、検討したところ、以下の結論を得た。

1. SA 処理したインプラント体表面の多くの部分が菲薄な線維骨に覆われていた。
2. 骨接触率を測定したところ、SA 処理なしのコントロール群に比較して有意に高い値を示した。
3. SA 処理による HA 結晶の剝離や貪食等は認められなかった。

これらより埋入後初期でのインプラント体周囲の骨形成において SA 処理が有用であることが示唆された。

本論文の要旨は第 92 回日本補綴歯科学会学術大会 (1994 年 11 月 4 日、鹿児島) において発表した。

文 献

- 1) Kopp CD. Branemark osseointegration, Prognosis and treatment rationale. Dent Clin North Am 33: 701-731, 1989.
- 2) Kirsh A. The IMZ endosseous two phase implant system. J Oral Implantol 12: 576-589, 1986.
- 3) Kay J. Bioactive surface coatings, cause for encouragement and concern. J Oral Implantol 14: 43-54, 1988.
- 4) Klein C, Patka P, Vinderlubbe H et al. Plasma sprayed coatings of tetracalciumphosphate, hydroxyapatite and alfa TCP on titanium alloy, an interface study. J Biomed Mater Res 25: 53-65, 1991.
- 5) Hanawa T, Murakami K, Kihara S. "Calcium phosphate precipitation on calcium-ion-implanted titanium in electrolyte". In: Horowitz E, Parr JE, editors, Characterization and Performance of Calcium Phosphate Coatings for Implants, ASTM STP 1196, 170-184, American Society for Testing and

- Materials, 1994.
- 6) Thomas K, Kay J, Cook S et al. The effect of surface microtexture and hydroxyapatite coatings on the mechanical strength and histological profiles of titanium implant materials. *J Biomed Mater Res* 21 : 1395-1414, 1987.
 - 7) Lemons J. Hydroxyapatite coatings. *Clin Orthop* 235 : 220-223, 1988.
 - 8) Ellies LG, Nelson DGA, Featherstone JDB. Crystallographic changes in calcium phosphates during plasma-spraying. *Biomaterials* 13 : 313-316, 1992.
 - 9) Whitehead RY, Lacefield WR, Lucas LC. Structure and integrity of a plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium. *J Biomed Mater Res* 27 : 1501-1507, 1992.
 - 10) Zyman Z, Wen J, Liu X et al. Phase and structural changes in hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 15 : 151-155, 1994.
 - 11) Ishizawa H, Ogino M. Formation and Characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res* 29 : 65-72, 1995.
 - 12) Ishizawa H, Ogino M. Characterization of thin hydroxyapatite layers formed on anodic titanium oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *J Biomed Mater Res* 29 : 1071-1079, 1995.
 - 13) Ishizawa H, Ogino M. Mechanical and histological investigation of hydrothermally treated and untreated anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res* 29 : 1459-1468, 1995.
 - 14) 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.
 - 15) 山森徹雄, 塩山 司, 細川 貢ほか. 生体活性ガラスを用いたインプラントの組織学的研究…生体活性ガラス周囲の骨形成について. *補綴誌* 36 : 209-216, 1992.
 - 16) Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue-integrated prostheses. *Quintessence*, 99-115, 1985.
 - 17) Kasemo B. Biocompatibility of titanium implant, surface science aspect. *J Prosthet Dent* 49 : 832-837, 1983.
 - 18) Ducheyne P, Willems G, Martens M et al. In vivo metal ion release from porous titanium fiber material. *J Biomed Mater Res* 18 : 293-308, 1984.
 - 19) 矢野英雄. 生体材料の腐食. *金属* 62(2) : 45-51, 1992.
 - 20) Lausmaa J, Kasemo B, Hansson S. Accelerated oxide growth on titanium implants during autoclaving caused fluoride contamination. *Biomaterials* 6 : 23-27, 1985.
 - 21) Kasemo O, Lausmaa J. Surface science aspects of inorganic biomaterials. *Biocompatibility* 2 : 335-380, 1986.
 - 22) 橋 隆夫. 電解質中においてチタン表面に生成する皮膜の解析. *歯材器* 8 : 832-844, 1989.
 - 23) 鈴木利彦, 藤森伸也. リン酸電解質中での放電陽極酸化処理に関する研究. *昭徳誌* 12 : 134-146, 1992.
 - 24) Neuman WF, Neuman MW. The chemical dynamics of bone mineral. 23-31, Chicago : Chicago University Press, 1958.
 - 25) Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 41 : 59-72, 1969.
 - 26) Matsuzawa T, Anderson HC. Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J Histochem Cytochem* 19 : 801-808, 1971.
 - 27) Peress NS, Anderson HC, Sajdera SW. The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calc Tiss Res* 14 : 275-281, 1974.