

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791462  
 研究課題名（和文） 生体アパタイト結晶がオッセオインテグレーションに与える影響を  
 分析した基礎的研究  
 研究課題名（英文） Basic research on analyzes influence of biological apatite crystal  
 gives Osseointegration.  
 研究代表者  
 中田 浩史（NAKADA HIROSHI）  
 日本大学・松戸歯学部・講師  
 研究者番号：10349970

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、インプラント周囲における新生骨のミネラル成分による骨質評価について明らかにする。新生骨の石灰化は皮質骨に伸展する部位から  $PO_4^{3-}$ 、 $CO_3^{2-}$ 、および Amide I の分布量が経時的に高くなり石灰化が観察された。また皮質骨から離れた新生骨において、 $PO_4^{3-}$ 、 $CO_3^{2-}$ 、および Amide I は経時的に分布量が高くなるが、皮質骨から伸展する部位と比較すると分布量は低かった。本研究は骨を構成する元素・分子の化学結合や分布量から石灰化に関わる骨質の変化が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate changes in bone quality associated with the mineralization of new bone forming around implants. This study investigated the quality and composition of new bone that formed around implants at 4 and 8 weeks post-implantation, compared to those of cortical bone. In new bone near cortical bone,  $PO_4^{3-}$ ,  $CO_3^{2-}$ , and amide I distributions increased over time, and calcification progressed. In new bone more distant from cortical bone,  $PO_4^{3-}$ ,  $CO_3^{2-}$ , and amide I distributions also increased over time, but to a lesser extent compared to that close to cortical bone. Our findings clearly showed changes in bone quality related to the degree of mineralization, based on sequential changes in chemical bonding and the distribution of elements and molecules comprising bone.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	660,000	3,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：歯学、細胞・組織、骨、動物、インプラント

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、インプラント周囲に形成された新生骨の石灰化に関わる骨質変化を明らかにするために、X-ray Photoelectron

Spectroscopy (XPS)による元素の定性分析と定量分析、偏光顕微鏡による組織の観察、および顕微赤外分光法である FTIR Imaging による新生骨と皮質骨の分子分布を行い、イン

プラント周囲における新生骨の生体アパタイト結晶がオッセオインテグレーション（骨結合）に与える影響について明らかにする。

## 2. 研究の目的

インプラント周囲の骨質評価に関する研究において、Nakano や石本らは新生骨の骨密度や生体アパタイトの配向性について報告し、また Gupta らは生体アパタイト結晶における微小サイズでの石灰化器質について報告している。また骨質評価に関連する我々の研究グループでは、インプラント周囲に形成された新生骨と皮質骨の骨質評価として偏光顕微鏡および走査電子顕微鏡を利用した骨組織の観察、顕微 FT-Raman 分析で新生骨におけるリン酸のピークの分析、PSPC Micro-XRD でアパタイトのピークの分析、顕微 FTIR 分析で生体アパタイト結晶の分析、Micro-CT で新生骨の骨梁形成の観察および骨塩量の測定、さらにパラメトリック X 線による新生骨の観察などの研究から、新生骨と皮質骨での骨質評価を行い、両者には異なる骨質であることを示唆してきた。特に新生骨に関連する基礎的研究は極めて少なく、骨の基本構造である生体アパタイトの分子や元素の状態においては今日まで見過ごされているのが現状である。

そこで本研究は、インプラント周囲に形成された新生骨の石灰化に関わる骨質変化を明らかにするために、偏光顕微鏡による組織の観察と顕微 FTIR Imaging による新生骨と皮質骨の分子分布から、以下の知見を得た。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

本研究の実験プロトコールは、日本大学松戸歯学部動物実験倫理委員会の承認を受けて実施された (No. 07-0016 号)。実験動物は、1 週間の予備飼育した 18 週齢の兔、雄、体重約 3 kg、8 羽を使用した。

### (2) 試験材料

本研究は、直径 3.0 mm、長さ 7.0 mm に成型した Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta (Ti-15-4-4) 製インプラントを用い、エッチング処理と疑似体液に浸漬した表面処理を施した材料を使用した。

### (3) 埋入方法

兔はケタラル静注用<sup>®</sup>を 2.0mg/kg の分量で投与し、全身麻酔を行った。埋入窩は膝間接から抹消 20mm の脛骨に、滅菌生理食塩水による注水下で直径 2.8mm のラウンドバーで

左右両側に一箇所ずつ形成を行い、インプラント試料を埋入した。兔は術後にヨードチンキによる消毒を 3 日間行い、埋入後 4 週と 8 週で過量の全身麻酔薬の投与により屠殺を行い、脛骨を摘出した。

摘出した左右側の脛骨は 10%ホルマリン溶液にて浸漬固定を行った。脛骨は、70-100% エタノールと 100%アセトンにより脱水と脱脂を行い、樹脂に包埋した。標本は、インプラントの長軸に対し平行に、ダイヤモンドディスクを用いて薄切 (約 100  $\mu$ m) し、無染色の非脱灰標本を作製した。

### 1) 偏光顕微鏡観察

骨の非脱灰標本は、無機質と有機質のいずれも含有している複雑な組織である。PM は骨に偏光を照射し、複屈折特性による偏光像と干渉像を呈示させる性質を利用した観察法である。偏光顕微鏡 (Optiphot2-POL: Nikon Co., Ltd, Japan) は、新生骨と皮質骨における骨質変化をクロスニコル法 (cross nicol method) と検板法 (gypsum Plate method) で観察を行った。

### 2) FTIR Imaging 測定

本研究では、新生骨と皮質骨に含有される分子分布測定の為に、FTIR Imaging (Spotlight 400: PerkinElmer, Inc., MA, USA) を用いて反射イメージング測定を行った。測定部位は、XPS 測定と同じ箇所とした。測定条件は、測定波数範囲: 4000-680 $\text{cm}^{-1}$ 、積算回数: 2 回、分解能: 4 $\text{cm}^{-1}$ 、データ変換: K-K 変換、PCA 解析、イメージ画像のピクセルサイズ: 25  $\mu$ m とした。

## 4. 研究成果

### (1) 偏光顕微鏡観察

Fig. 1 (A and B) と Fig. 2 (A and B) は、コラーゲン線維の配向性が特徴的に表れるクロスニコル法と検板法の観察結果を示す。新生骨と皮質骨の境界は Fig. 4 に示す。4 週の新生骨は、皮質骨からインプラントへ伸展し、クロスニコル法の観察像で消光位と対角位が索状で不規則な配列を示し、層板構造を形成していないために皮質骨との境界が明瞭であった。索状の部分はインプラント埋入後に形成された新生骨であり、4 週の新生骨は未成熟な線維性骨であることを観察した。8 週の新生骨は皮質骨と平行して数層の縦走層板、つまり第 1 次 Havers 層板と管状構造を観察し (Fig. 3)、皮質骨との境界が不明瞭であった。しかし層板数はまだ少なく、各層板内におけるコラーゲン線維の走行の規則性が不十分なことから、8 週の新生骨はフェルト状層板または最小層板系の骨質であることを観察した。検板法において、4 週の新生骨は散在性に強い偏光特性を示す部分が

観察された。8週の新骨は皮質骨に接する部分では規則的に強い偏光特性を観察し、皮質骨から離れた部位では散在性に示す偏光特性が観察された。

(2) FTIR Imaging 測定

Fig. 1-C と Fig. 2-C に示すスペクトルは、骨の主要成分である  $PO_4^{3-}$  (HA 由来),  $CO_3^{2-}$  (HA 中の  $PO_4^{3-}$  や OH に置換した  $CO_3^{2-}$ ), および Amide I-III (骨を構成する蛋白質, 主に Type I コラーゲン由来) の存在を示す。Fig. 1 と Fig. 2 のイメージ像 (D, E, F) は  $PO_4^{3-}$ ,  $CO_3^{2-}$ , および  $CO_3^{2-}/PO_4^{3-}$  比の分布量を示す。

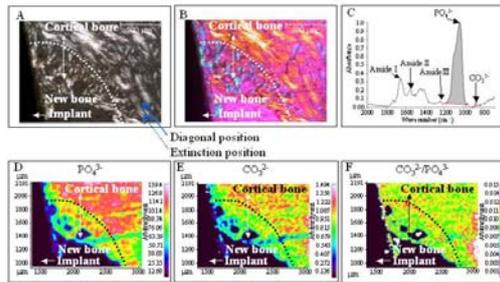


Fig. 1

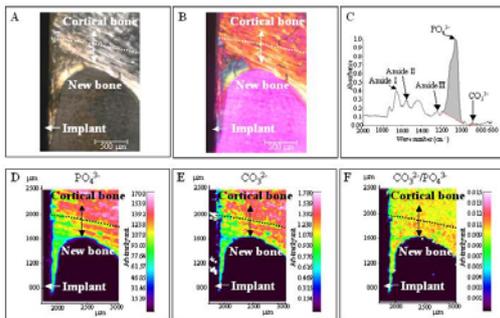


Fig. 2

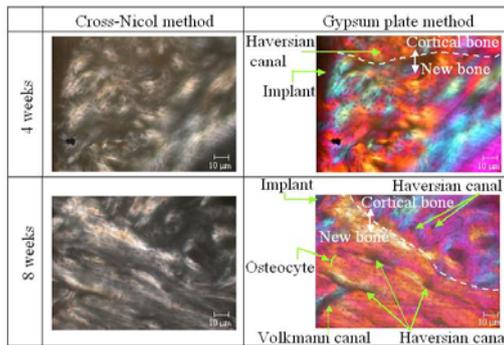


Fig. 3

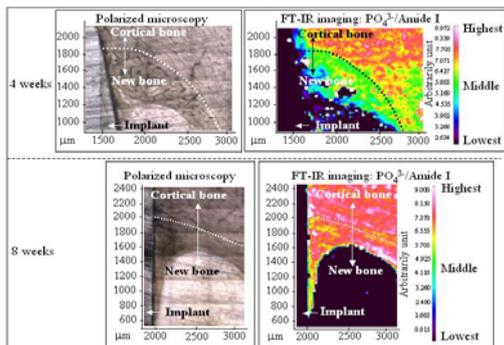


Fig. 4

4週の新骨 (Fig. 1) は、皮質骨に比べ  $PO_4^{3-}$  と  $CO_3^{2-}$  共に分布量が少なかった。皮質骨は、主に赤・黄色 (分布量: High) を示し、新骨では緑・青色 (分布量: Middle から Low) を示した。皮質骨と新骨は、吸収の異なる明瞭な境界が認められた。一方、 $CO_3^{2-}/PO_4^{3-}$  比の分布 (Fig. 6-F) において、新骨と皮質骨の違いは観察されなかった。

8週の新骨 (Fig. 2) において  $PO_4^{3-}$  と  $CO_3^{2-}$  共に皮質骨から伸展する部位では、緑・黄色で一部赤色 (分布量: Middle から High) を示し皮質骨に近い石灰化となるが、離れた部位は緑・青色 (分布量: Middle から Low) を示し、石灰化が低い結果となった。

Fig. 4 は 4 週と 8 週における  $PO_4^{3-}$ /Amide I 比の分布量を示す。4 週の新骨において、皮質骨と接する大部分は緑色 (分布量: Middle) を示し境界は明瞭であるが、皮質骨から離れた部位では青色 (分布量: Low) を示し  $PO_4^{3-}$  が少ない骨であった。8 週の新骨は 4 週と比較すると、皮質骨と接する部位では赤・黄色 (分布量: High) を示し、皮質骨から離れた部位では黄・緑色 (分布量: Middle から High) を示した。FTIR Imaging において 4 週よりも 8 週の新骨は  $PO_4^{3-}$ 、 $CO_3^{2-}$ 、および Amide I の分布量が多くなり、新骨と皮質骨の境界は 8 週で不明瞭となった。

本研究は助成金交付 3 年間で、本研究は新生骨と皮質骨の境界部において、新生骨の石灰化は皮質骨に接する部位から  $PO_4^{3-}$ 、 $CO_3^{2-}$ 、および Amide I の分布量が高くなり、4 週から 8 週にかけて経時的な石灰化が観察された。皮質骨から離れた新生骨において、 $PO_4^{3-}$ 、 $CO_3^{2-}$ 、および Amide I は経時的に分布量が高くなるが、皮質骨に接する部位と比較すると分布量は低かった。8 週の偏光顕微鏡観察において、皮質骨から伸展する新生骨は Havers 層板が観察され、インプラント埋入時の外科的侵襲で血管の断端から派生した微細血管構築より、石灰化の進行が考えられた。そこで新生骨の石灰化は皮質骨に接する部位から微細血管構築により、4 週から 8 週において XPS で Ca と P の経時的な上昇や、FTIR Imaging で  $PO_4^{3-}$ 、 $CO_3^{2-}$ 、および Amide I の分布量が高くなり、生体アパタイト結晶がオッセオインテグレーションに与える骨質変化が明らかとなった。そこで今日まで明らかにできなかった元素・分子レベルの経時変化について研究が行えたことは、大きな成果といえるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 中田浩史, 沼田靖子, 寒河江登志朗, 玉木大之, 加藤仁夫  
ウサギを用いた新生骨の骨塩量に関する骨質変化の観察: インプラント体周囲の新生骨と皮質骨の比較  
日口腔インプラント誌、22(3):285-291、2009. 査読有
- ② Yasuko Numata, Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Hiroimi Kimura-Suda, Racquel Z. LeGeros, Kihei Kobayashi and Masaharu Makimura  
Qualitative study of the New Bone formation Surrounding the Ti-implant by FTIR and Polarizing Microscope  
J. Hard Tissue Biology, 17:131-140, 2008. 査読有
- ③ Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Yoshimitsu Okazaki, Yasuhiro Tanimoto, Hiroyuki Tamaki, Takao Kato, Atsushi Ookubo, Kihei Kobayashi and Racquel Z. LeGeros,  
Comparison of Bone Mineral Density and Area of Newly formed Bone around Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta Alloy and Ti-6%Al-4%V Alloy Implants, J. Hard Tissue Biology, 17:99-108, 2008. 査読有
- ④ 中田浩史, 沼田靖子, 寒河江登志朗, 諏訪武利, 佐伯啓行, 谷本安浩, 加藤仁夫, 河相安彦, 金澤英作, 小林喜平, Racquel Z. LeGeros,  
インプラント周囲に形成された新生骨を X-ray Photoelectron Spectroscopy 分析により骨質評価を行った基礎的研究、日大口腔科学、34(2):52-62, 2008. 査読有
- ⑤ 沼田靖子, 寒河江登志朗, 中田浩史, 諏訪武利, 小林喜平, 佐藤勇,  
硬組織の質的評価に Micro FT-Raman を使用した基礎的研究、Journal of Hard Tissue Biology, 16(4):209-213, 2007. 査読有
- ⑥ Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Hiroshi Nakada, Taketoshi Suwa, Racquel Z. LeGeros, Yoshimitsu Okazaki and Kihei Kobayashi,  
Micro-CT Analysis of Rabbit Cancellous Bone Around Implants, J. Hard Tissue Biology, 16:91-93, 2007. 査読有
- ⑦ Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Hiroshi Nakada,

Racquel Z. LeGeros and Kihei

Kobayashi,  
Qualitative and quantitative evaluation of bone and synthetic calcium phosphates using Raman Spectroscopy, Key Engineering Materials, 361-363:135-138, 2008. 査読有

- ⑧ Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Taketoshi Suwa, Yoshimitsu Okazaki, Racquel Z. LeGeros, Toshiro Sakae, Takao Kato, Katsuhisa Kuwahara, and Kihei Kobayashi,  
Newly formed bone around implanted new titanium alloy: Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta, Key Engineering Materials, 361-363:661-664, 2008. 査読有
- ⑨ 沼田靖子, 寒河江登志朗, 中田浩史, 諏訪武利, 小林喜平, 佐藤勇,  
硬組織の質的評価に Micro FT-Raman を使用した基礎的研究、Journal of Hard Tissue Biology, 16(4):209-213, 2007. 査読有
- ⑩ 諏訪武利, 寒河江登志朗, 中田浩史, 小林喜平,  
ウサギ脛骨における炭酸カルシウム結晶の検出—微小部 X 線回析法による研究—、Journal of Hard Tissue Biology, 16(4):195-198, 2007. 査読有
- ⑪ Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Racquel Z. LeGeros, John P. LeGeros, Taketoshi Suwa, Yasuko Numata, Kihei Kobayashi,  
Early Tissue Response to Modified Implant Surfaces Using Back Scattered Imaging, Implant Dentistry, 16(3):281-289, 2007. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中田浩史、林 幸男、寒河江登志朗、玉木大之、加藤仁夫. インプラント周囲に形成された新生骨の骨質変化—XPS測定、偏光顕微鏡観察、およびFTIRイメージ測定—。  
平成 21 年 9 月 26 日  
第 39 回日本口腔インプラント学会、大阪
- ② 沼田靖子, 中田浩史, 寒河江登志朗, 諏訪武利, 木村一須田廣美, 林幸男, 矢崎貴啓, 小林喜平.  
FTIR イメージングを用いたインプラント周囲新生骨の質的評価。  
平成 21 年 6 月 6 日  
第 118 回日本補綴歯科学会、京都
- ③ Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Yoshimitsu Okazaki, Kihei Kobayashi,

Usefulness of implant-surrounding newly formed bone quality evaluation method using micro-CT.

平成 20 年 11 月 28 日,  
第 1 回再生補綴医学研究会, 名古屋

- ④ Yasuko Numata, Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Yoshimitsu Okazaki, Kihei Kobayashi, John P. LeGeros, and Racquel Z. LeGeros,

Observation of the biocompatibility of surface-treated Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta alloy, and measurement of bone mineral density,  
平成 20 年 9 月 14 日,  
The 4<sup>th</sup> International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials, Manila.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 浩史 (NAKADA HIROSHI)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号: 1 9 7 9 1 4 6 2

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

寒河江 登志朗 (SAKAE TOSHIRO)  
日本大学・松戸歯学部・准教授  
研究者番号: 2 0 1 1 2 9 4 8

沼田 靖子 (NUMATA YASUKO)  
日本大学・松戸歯学部・大学院生

Racquel Z. LeGeros  
New York University College of Dentistry, Department of Biomaterials & Biomimetics, Professor

John P. LeGeros  
New York University College of Dentistry, Department of Biomaterials & Biomimetics, Professor