

機関番号 : 32665

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20592289

研究課題名 (和文) 骨親和性ナノテクチャーインプラントの開発とその骨形成の遺伝子ネットワークの解析

研究課題名 (英文) Development osseointegrative nano-textured implant and analysis of its gene network

研究代表者

佐藤 吉則 (SATO YOSHINORI)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号 : 70060051

研究成果の概要 (和文) :

本研究では、高強度フェムト秒光レーザーをチタン表面に照射することによりナノ表面チタンを作成し、この表面にラット骨髄間質細胞の培養を行い、増殖および分化を検索した。ナノ表面チタンは、機械表面チタンに比べ、表面粗さが大きく増大し、細胞培養では培養後 7 日目および 10 日で増加が認められ、免疫組織化学においては培養後 10 日目ではオステオカルシン陽性細胞はコラーゲン陽性細胞よりも増加が認められた。

研究成果の概要 (英文) :

A novel nano-surfaced titanium has been generated by irradiated with Femto-sec laser and demonstrate stimulation of proliferation and differentiation of rat bone stroma cells. Numbers of cultured cell were counted and expressions of collagen and osteocalcin were studied *in vitro*. The surface roughness was increased by laser irradiation. In the culture with nano-surfaced Ti, the numbers of cultured were increased than those of machined surface at 7 day and at 10 day after the culture. The number of osteocalcin-positive cell increased than that of collagen-positive cell by the immunohistochemistry at 10 day after the culture.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 歯学・補綴系歯学

キーワード : 歯学, ナノ材料, シグナル伝達, 蛋白質, 核酸

## 1. 研究開始当初の背景

近年、抜歯後の欠損では、インプラントによる補綴治療が増加する傾向にある。歯科用インプラントや人工関節に使用する生体材料は機械的性質、耐触性および生体適合性に優れていることが要求される。従来は、歯科用インプラントおよび人工関節

の材料として、コバルトなどが使用されていたが、生体に様々な為害作用を持つことが指摘されている<sup>1~3)</sup>。チタンは、これらの金属に比べ、機械的な強度が優れているとともに<sup>4, 5)</sup>、生体内において化学的に安定で<sup>5)</sup>、最も多く用いられている生体用金属材料である。しかし、機械加工チタン表面は、骨芽細胞との親和性が低いことが報

告されている<sup>6)</sup>。したがって、チタン表面に直接的に骨が形成される、骨性癒合(osseointegration)が行われるチタンの開発が望まれている。そこで、チタン表面に細胞増殖を図るため、表面の改質について多くの検討が行われている<sup>7-18)</sup>。骨芽細胞は細胞の分化の段階によって種々の細胞外マトリックスを発現することが知られている<sup>19)</sup>。幼弱な段階では、コラーゲンを合成し、骨芽細胞ではオステオネクチン、成熟した段階ではオステオポンチン、骨シアロタンパク(BSP)およびオステオカルシンを合成することが報告されている<sup>1)</sup>。本研究ではこれらの細胞外マトリックスを指標にして骨芽細胞の分化を観察した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、チタンの表面をナノレベルに加工するために、高強度フェムト秒光レーザーをチタン表面に照射したナノ表面チタンを製作し、このナノ表面チタンの表面上と、従来から多くの研究および臨床で用いられている機械加工したチタン表面上にラット骨髄間質細胞を培養し、細胞数と細胞外マトリックスの局在の変化を比較検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

直径5 mmの円筒形のⅢ種商用純チタン(神戸製鋼社製)を、厚さ1 mmに切断して製作した(以後、機械表面チタンと略記)。

### (2) レーザー処理法

レーザーは、チタンサファイヤ再生増幅器(サーフビートR, キヤノンマシーナリー社製)から波長800 nmの高強度フェムト秒光パルスで1 kHzの繰り返しパルスで照射した(以後、ナノ表面と略記)。試料は、ステージによって、1 mm/secの速度でX-Yの方向に走査した。さらに、1パルス400  $\mu$ Jのパワーで、直角方向に交差する方向に2回目のレーザー照射を行い、レーザーによるクロス加工を行った(以下、ナノ表面チタンと略記)。チタンの表面は、走査型電顕(Hitachi S-400)を用いて、ナノ表面チタンと機械表面チタンの表面性状を比較検討した。

### (3) 表面粗さおよび表面深さの測定

測定は、ナノ表面チタン5個および機械表面チタンそれぞれ5個を試料として用い、試料中心付近を3点計測し、その平均値を表面粗さおよび表面深さの測定値とした。表面粗さおよび表面深さの測定は、レーザー顕微鏡(1 LM2型, レーザーテック)を用い、中心線平均粗さおよび深さを測定し、有意差検定を行った。

## (4) 細胞培養

実験動物には体重100 gのWistar系ラットを用いた。動物実験は日本大学歯学部実験動物委員会の動物実験指針にしたがって行った。ラットには体重10 g当たり0.5 mgの割合でNembutal (Dainabot)を投与して麻酔を行った。大腿部の皮膚を切開し、大腿骨周囲の筋組織を剥離して、大腿骨を取り出した。両端の骨端部を切り取り、 $\alpha$ -MEM培養液を含むシリンジに挿入し、ポンピングを行った。次いで培養細胞 $1 \times 10^4$ /wellを32穴培養用ウエルに置いたチタンdisk上に撒き、95% air+5% CO<sub>2</sub>で10%ウシ血清, 1 mM  $\beta$ グリセロリン酸(和光), 0.2M アスコルビン酸(和光), 10 nMデキサメタゾン(SIGMA)を含む $\alpha$ -MEM培養液で2次培養を行った。

培養後の細胞数の測定はMTS法により490 nmの吸収波長で行った。一方、対照実験は機械チタン表面を用いて同様に培養を行い、前記培養の結果と比較検討した。培養は実験群および対象実験群ともに各培養期間について5個行った。

## (5) 免疫組織化学

培養3, 7および10日目に、細胞を室温で4% paraformaldehyde 溶液で10分間固定を行い、試料を10%オバルブミン溶液でブロッキングを行なった。一次抗体による反応は抗ラット $\alpha$ 1-procollagenウサギ抗体(Santa Cruz)および抗ラット・オステオカルシンウサギ抗体(Santa Cruz)を用いて4°Cでovernight行った。次いで、Alexa Fluor 488(緑色蛍光)で標識した抗ウサギ抗体で反応を行った。免疫反応後、PBSで洗浄を行い、チタンdiskをスライドグラスに乗せ、培養細胞面にカバーグラスをかけて蛍光の分布をZeiss Axioplane 蛍光顕微鏡にて観察した。免疫反応陽性を示す細胞の算定はチタンdisk中央部の $100 \times 100 \mu$ mの範囲の3視野を対物レンズ20倍のレンズで撮影して行った。培養は実験群および対象実験群ともに各培養期間について3個行った。

## 4. 研究成果

(1) ナノ表面チタンおよび機械表面チタンの表面粗さおよび表面深さ  
機械表面チタンの表面粗さは $3.3 \pm 0.4 \mu$ mで、ナノ表面チタンは $7.9 \pm 0.7 \mu$ mだった。ナノ表面チタンは機械表面チタンと比較して2.3倍の表面粗さがあり、両者には有意差( $p < 0.05$ )が見られた。機械表面チタン表面深さは $34.5 \pm 1.9 \mu$ mで、ナノ表面チタンは $44.4 \pm 4.6 \mu$ mであり、両者には有意差( $p < 0.05$ )が見られた(第1表)。  
ナノ表面チタンの二次元像および三次元的像では、機械表面チタンよりも小突起や小陥凹部がみられた。

## (2) ナノ表面チタンおよび機械表面チタンの表面性状

800  $\mu\text{J}$  でレーザー照射したナノ表面チタンの表面全体には、600-700 nm の縞状構造が形成された。さらに、400  $\mu\text{J}$  で照射したものは、200-300 nm の縞状構造が形成された (第1図, 2-a, 2-b)。

一方、機械加工によって切り出した機械表面チタンについては、直径 5 mm の円筒型チタンから切り出された際にできた条理が観察されたが、ナノ表面チタンのような縞状構造はみられなかった (第1図, 2-c)。

## (3) 細胞培養

ナノ表面チタンに骨髄間質細胞を培養した結果、培養後3日目において  $9 \pm 0.4 \times 10^4$ 、培養後7日目では  $14 \pm 0.7 \times 10^4$ 、培養後10日目では  $22 \pm 1.1 \times 10^4$  であった。

一方、機械表面チタンにおける同培養では、培養後3日目において  $6.2 \pm 0.3 \times 10^4$ 、培養後7日目では  $7 \pm 0.3 \times 10^4$ 、培養後10日目では  $7.2 \pm 1.1 \times 10^4$  であった (第3図)。ナノ表面チタンでは、機械表面チタンに比べ培養後3日目において細胞数が約1.5倍、7日目では約2倍、培養後10日目では約3.1倍に増加した (第2図)。ナノ表面チタンは、機械チタン表面よりラット骨髄間質細胞の増殖を刺激した。

## (4) 免疫組織化学

ナノ表面チタンでは、コラーゲン陽性を示す細胞数は培養後3日目において  $2,225 \pm 95$ 、7日目では  $1,734 \pm 75$ 、10日目では  $972 \pm 70$  であった (第3図)。オステオカルシン陽性細胞では培養後3日目において  $375 \pm 21$ 、7日目では  $905 \pm 54$ 、10日目では  $1,600 \pm 74$  であった (第3図)。それぞれの陽性細胞の割合を比較すると、培養後3日目において、コラーゲン陽性反応を示す細胞は、オステオカルシン陽性細胞より多いが、培養後7日目では、オステオカルシン陽性細胞が増加するために、コラーゲン陽性細胞との割合は約ほぼ等しくなり、培養後10日目ではオステオカルシン陽性細胞とコラーゲン陽性細胞との割合は逆転し、オステオカルシン陽性細胞はコラーゲン陽性細胞よりも増加する傾向が認められた。

機械表面チタンでは、コラーゲン陽性細胞は培養後3日目において  $2,125 \pm 92$ 、7日目では  $1,700 \pm 60$ 、10日目では  $1,675 \pm 41$  であった。オステオカルシン陽性細胞は養後3日目において  $275 \pm 29$ 、7日目では  $800 \pm 42$ 、10日目では  $825 \pm 43$  であった。培養後3, 7および10日の期間中にコラーゲン陽性細胞はオステオカルシン陽性細胞よりも多く、オステオカルシン陽性細胞がコラーゲン陽性細胞より増加する傾向は認められなかった (第3図)。

## 考察

様々な type の細胞が材質の表面構造によって変化し<sup>8-19)</sup>、骨芽細胞などの細胞がナノ加工を行った表面に培養すると分化すると報告されている<sup>7,8,10,13,14)</sup>。このためチタンの表面を粗造化する方法が多く試みられている<sup>7,8,10,13,14)</sup>。

プラズマ法を用いてチタン表面を粗造化する方法は、照射中に高熱が発生して酸化膜ができるために、骨芽細胞などと親和性がきわめて低く、osseointegrationに問題があることが指摘されている<sup>19)</sup>。これに対して、フェムト秒レーザーは、パルス幅が短いことからレーザーパルスのエネルギーが熱に変換される前に照射が終了しており、他のレーザーやプラズマ法などと比較して、熱の影響が少なく、照射面に酸化膜を形成することなく表面にナノ構造を加工することが可能な方法である<sup>11)</sup>。de Oliveira ら<sup>7)</sup> は強酸でエッチングした nano-textured チタンを作成し、ラットの頭頂骨から分離した骨髄間質細胞を培養すると、細胞の増殖は認められないが、機械表面チタンに比べて骨芽細胞に分化する割合が高いことを示した。

本実験では、ナノ表面チタンに骨髄間質細胞を培養した結果、機械表面チタンに比べて培養後7日目において細胞数が約2倍、培養後10日目では約3倍に増加した。対照試料の機械表面チタンに培養したものは、培養後10日目でも顕著な細胞数の増加はみられなかった。したがって、ナノ表面チタンは機械表面チタンに比べラット骨髄間質細胞の増殖を刺激することが明らかとなった。

ナノ加工を行ったチタンについては、酸処理を行った nano-textured チタンについて多くの研究が行われている<sup>7,8,10,13,14)</sup>。酸処理を行う時間や濃度のなど条件によりナノ構造は異なっているが、一般に約250 nm の孔を形成するものが報告されている。本研究で用いたレーザー照射では1パルス800  $\mu\text{J}$  でレーザー照射したナノ表面チタンの表面全体には、600-700 nm の縞状構造、また400  $\mu\text{J}$  で照射したものは、200-300 nm の縞状構造が形成された。このように、直角方向に照射した2回の照射により表面粗さは機械表面チタンに比べ約2.3倍、深さは約10  $\mu\text{m}$  深化した。ナノ表面チタンが機械表面チタンよりラット骨髄間質細胞の増殖を刺激する理由は、レーザー照射により加工された独特のナノ表面構造に起因するものと考えられた。

骨芽細胞は前駆細胞から成熟した骨芽細胞にいたる分化過程の段階で幼弱な時期から異なった細胞外マトリックスを合成する。前駆細胞の段階ではコラーゲン、分化初期の骨芽細胞ではフィブロネクチン、成熟した骨芽細胞ではオステオポンチン、骨の基質が石灰化した段階ではオステオカルシンを合成する

と報告されている<sup>7,8,10,13,14,19)</sup>。  
骨芽細胞がチタン表面に結合し分化する際には、様々な細胞外マトリックスが合成分泌されることが報告されている<sup>7,8,10,13,14)</sup>。Nefussi ら<sup>19)</sup> はチタン表面に培養した骨芽細胞の前駆細胞の分化に関する詳細な研究を初めて行った。その結果、アルカリホスファターゼ (ALPase)、オステオカルシン、骨シアロタンパク (BSP) は骨芽細胞により合成されるが、オステオネクチンは合成されないことを示した。また、BSP はコラーゲンとは結合することなく、石灰化物の針状のクリスタルに結合していることを示した。また、オステオカルシンは成熟した骨芽細胞の細胞質と石灰化前線に認められることを証明した。de Oliveira ら<sup>7)</sup> は強酸でエッチングした nano-textured チタン上にラット頭頂骨から分離した骨髄間質細胞を培養すると、培養後 6 時間目では、機械表面チタンに比べて、フィブロネクチンと BSP 陽性を示す細胞が多く、nano-textured チタンが骨芽細胞の分化を刺激することを示した。さらに de Oliveira ら<sup>14)</sup> は同様な実験から、nano-textured チタンでは骨芽細胞の初期分化を示す ALPase は培養後 7 日目でピークに達し、培養後 7 日目でオステオポンチン、BSP の合成およびフィブロネクチンの集積量が最大となり、石灰化した nodule が形成されたことを示した。また、Nakamura ら<sup>8)</sup> は強酸でエッチングしたチタン上に歯髄細胞を培養すると機械表面チタンに比べ I 型コラーゲン、オステオポンチンおよびオステカルシンの発現が増加することを示した。Butz ら<sup>10)</sup> は、同様にエッチングしたチタンをラット大腿骨の骨端部に埋入した結果、3-4 週間後では機械表面チタンに比べて 4 倍の骨結合が見られること示した。このように、チタン表面の nano-textured パターンが骨芽細胞の分化や骨形成を刺激することが示されている。本研究における免疫組織化学的では、ナノ表面チタンにラット骨髄間質細胞を培養すると、培養後 3 日目ではコラーゲン陽性反応を示す細胞がオステオカルシン陽性細胞よりも多く、培養後 7 日目では、オステオカルシン陽性細胞が増加するために、コラーゲン陽性細胞との割合は約ほぼ等しく、培養後 10 日目ではオステオカルシン陽性細胞コラーゲン陽性細胞との割合は逆転し、オステオカルシン陽性細胞がコラーゲン陽性細胞よりも多かった。他方、機械表面チタンではコラーゲン陽性細胞は培養後 3 日目、7 日目および 10 日目の期間中において、オステオカルシン陽性細胞コラーゲン陽性細胞との割合は逆転することなく、コラーゲン陽性反応を示す細胞がオステオカルシン陽性細胞よりも多かった。コラーゲンは骨芽細胞の分化初期に発現し、オステオカルシンは骨芽細胞

が成熟し骨組織が石灰化する時期に発現することから、高強度フェムト秒光パルス照射によって得られたナノ表面チタンは、骨髄間質細胞の分化を促進するものと考えられた。

#### 結論

高強度フェムト秒レーザーをチタン表面に照射することによってナノ表面チタンを作成した。この表面に骨髄間質細胞を培養し、細胞の増殖と分化を観察し機械加工表面と比較検討し、以下の結論を得た。

(1) 800  $\mu$ J で照射したチタン表面全体には、600-700nm の縞状構造、400  $\mu$ J で照射したものは、200-300nm の縞状構造が形成された。  
(2) 機械表面チタンでは著しい細胞の増加はみられなかったが、ナノ表面加工チタンでは、培養後 7 日目では培養 3 日目に比べて、約 2 倍、培養後 10 日目では約 3 倍に増加した。このように、ナノ表面チタンは、機械表面チタンよりラット骨髄間質細胞の増殖を刺激した。

(3) 免疫組織化学では、ナノ表面チタン表面では、コラーゲン陽性を示す細胞数は、培養後 3 日目においてコラーゲン陽性反応を示す細胞は、オステオカルシン陽性細胞より多いが、培養後 7 日目では、オステオカルシン陽性細胞が増加するために、コラーゲン陽性細胞との割合は約ほぼ等しく、培養後 10 日目ではオステオカルシン陽性細胞コラーゲン陽性細胞との割合は逆転し、オステオカルシン陽性細胞はコラーゲン陽性細胞より増加する傾向が認められた。機械表面チタンではコラーゲン陽性細胞は 10 日目においてもオステオカルシン陽性細胞の数を超えることは無かった。

この実験結果から、高強度フェムト秒光パルス照射によって得られたナノ表面チタンは、骨芽細胞系細胞の増殖分化を促進するものと考えられた。

#### 文献

- 1) Raap U, Stiesch M ら (2009) Investigation of contact allergy to dental metals in 206 patients, Contact Dermatitis, 60, 339-43.
- 2) 佐藤直毅, 金原正敬ら (2008) ニッケルアレルギーの自然免疫を背景とした発症機序, 臨床免疫・アレルギー科, 50, 618-624.
- 3) 中田土起丈, 飯島正文ら (2009) 金属アレルギーのパッチテストが有用である患者を対象としたパッチテストテープ (硫酸ニッケル, 塩化コバルト) の 3 較臨床試験 Finn Chamber を用いたパッチテスト試薬貼布を対照としたランダム化単盲検自己対照比較臨床試験, 臨床医薬, 25, 937-950.
- 4) 宮崎隆 (2000) 歯科インプラントの展望, 先端医療シリーズ, 歯科医学 1, 上田実, 赤川

安正, 市川哲雄, 河野文昭編, 先端医療技術研究所, 東京, 319-345.

- 5) 小野拓仁, 早野圭吾ら (2008) インプラント材としてのチタンの機械的性質-純度による影響, 31, 149-154.
- 6) Torgersen S, Gjerdet NR ら (1995) Metal particles and tissue changes adjacent to miniplates. Aretrieval study, 53, 65-71.
- 7) de Oliveira PT, A. Nanci (2004) Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells, Biomaterials 25, 403-413.
- 8) Nakamura H, Saruwatari L ら (2005) Molecular and Biomechanical Characterization of Mineralized Tissue by Dental Pulp Cells on Titanium, J Dent Res 84, 515-520.
- 9) 大橋芳夫 (2005) レーザアブレーション法を用いて製作したハイドロキシアパタイト超薄膜被覆チタンインプラントの骨形成に関する実験的研究, 歯科医学, 68, 79-9.
- 10) Butz F, Aita H ら (2006) Harder and Stiffer Bone Osseointegrated to roughened Titanium, J Dent Res 85, 560-565.
- 11) 川原公介, フェムト秒レーザー誘起表面周期構造の金属インプラントへの応用 (2006) 電気学会研究会資料, OQD, 光・量子デバイス研究, 1, 1-4.
- 12) 川村研二, 松原秀樹ら (2006) くる病ラットにおけるサンドブラスト処理および陽極酸化処理チタンインプラントの骨接触率, 北海道医療大学歯学雑誌 25, 119-126.
- 13) Ogawa T, Nishimura I (2006) Genes Differentially Expressed in Titanium Implant Healing, J Dent Res 85, 566-570.
- 14) de Oliveira PT, Zalzal ら (2007) Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium, by chemically produced nanotopography, J Biomed Mater Res 80A, 554-564.
- 15) Liu Y, Huse RO ら (2007) Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants, J Dent Res, 86, 84-9.
- 16) Stadlinger B, Bierbaum S ら (2009) Increased bone formation around coated implants, J Clin Periodontol, 36, 698-704.
- 17) Cho LR, Kim DG ら (2010) Bone response of Mg ion-implanted clinical implants with the plasma source ion implantation method, Clin Oral Implants Res.
- 18) 河野文昭 (2000) 人口歯根の材料, 歯科インプラントの展望, 先端医療シリーズ, 歯科医学 1, 上田実, 赤川安正, 市川哲雄, 河野文

昭編, 先端医療技術研究所, 東京, 8-14.

- 19) Nefussi JR, Brami G ら (1997) Sequential Expression of Bone Matrix Proteins During Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation In Vitro, J of Histochem & Cytochem 45, 493-503.

#### 付図

第1表 レーザー顕微鏡を用いた表面粗さおよび表面深さの測定

試料	表面粗さ		表面深さ	
	機械表面	ナノ表面	機械表面	ナノ表面
1	3.8	8.7	35.3	49.4
2	3.3	7.8	36.5	43.3
3	3.7	6.9	31.4	39.9
4	3.0	8.2	35.0	40.3
5	3.0	8.0	34.5	44.4
平均	3.3	7.9	34.5	44.4
標準偏差	0.4	0.7	1.9	4.6

単位:  $\mu\text{m}$

第1図 高強度フェムト秒光パルス照射本特許に使用したチタンディスクの走査電顕写真を示したもの。

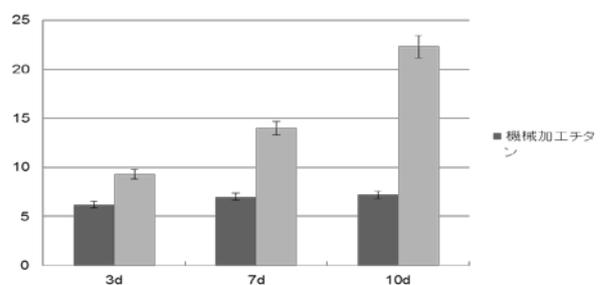


2-a 800 nmの高強度フェムト秒光パルス出力400  $\mu\text{J}$ 、1 kHzでパルス幅は120 fsを用いて照射したものは、幅約100~200 nmの縞状構造物が観察された。同じ条件で800  $\mu\text{J}$ のパワーで照射したものは、幅約600~700 nmの縞状構造物が観察される。

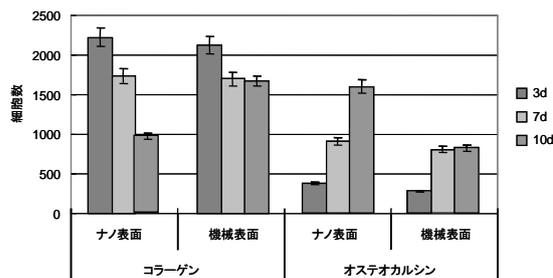
2-b:2-aの条件で照射した後、直角方向に400nmの高強度フェムト秒光パルス、出力400  $\mu\text{J}$ 、1KHzの条件で照射したもの。幅約600~700 nmの縞状構造物と直角方向に幅約200~300 nmの縞状構造物。

2-c, 高強度フェムト秒光パルス照を射行わないチタンディスク表面。直径5 mmのチタンチューブから機械加工によって切り出した際に来た、条理(矢印)が観察される。5,000  $\times$

#### 第2図培養後の細胞数



### 第3 図免疫組織化学



#### 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1件)

- ① 稲毛稔彦, 佐藤吉則, 稲毛寛彦, 藤田哲夫, 桑田文幸: レーザー加工を用いた医療用ナノ表面チタンの骨芽細胞の分化に関する影響, 日大歯学, 査読あり, 84 巻, 2010 年, p10-15

[学会発表] (計2件)

- ① T. Inage, H. Inage, T. Fujita, F. Kuwata and Y. Satoh: Efficiency of Nano-surfaced Ti Implant for bone formation, American Dental Association 2009 年次総会, 2009 年 10 月 2 日, Honolulu, Hawaii
- ② T. Inage, H. Inage, T. Fujita and Y. Satoh: Nano-surfaced Biomimetic Ti Implant for Bone, International Association for Dental Research, 2010 年 7 月 16 日, Barcelona, Spain

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 吉則 (SATO YOSHINORI)  
 日本大学・歯学部・教授  
 研究者番号: 70060051

##### (2) 研究分担者

稲毛 稔彦 (INAGE TOSHIHIKO)  
 日本大学・歯学部・准教授  
 研究者番号: 90096769

桑田 文幸 (KUWATA FUMIYUKI)  
 日本大学・歯学部・教授  
 研究者番号: 60120440