原

著

ポーリング水酸アパタイトの骨形成能に関する 材料学的および組織学的評価

小林 孝之

東京医科歯科大学生体材料工学研究所素材部門無機材料分野（主任・指導：山下仁大教授）

（2000 年 6 月 30 日 受付）

Physicochemical Characterization and Histological Bone-Formability Evaluation of Electrically Polarized Hydroxyapatite

Takayuki Kobayashi

Department of Inorganic Materials, Institute of Biomaterials and Bioengineering,
Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. Kimihiro Yamashita)

Acceleration and deceleration of bone-like crystal growth on electrically polarized hydroxyapatite ceramics are induced by their surface changes, as recently reported by Yamashita, *et al.* In this study, new-bone-forming ability of electrically polarized hydroxyapatite was physicochemically characterized and histologically evaluated using femora and tibiae of rabbits. The electrical polarizability of hydroxyapatite was demonstrated by thermally stimulated current measurements. No significant difference between polarized and non-polarized hydroxyapatite was recognized by IR spectroscopy and X-ray diffractometry. A negatively charged hydroxyapatite surface exhibited osteogenesis with direct bone contacting in early stage. A positively charged surface resulted in a small amount of bone formation on the surface. On the contrary, in the zone isolated by fibrous layer, a large volume of bone newly formed. It is useful that the outstanding bone-formability in the early stage on a negatively charged surface implies more rigid initial fixation in orthopedic and dental fields. Positively charged surfaces have a new-bone-conducting property that acts over a long distance, and the possibility of controlling osteogenesis.

I. 緒 言

21 世紀には高齢者人口の増加がさまざまな面で社会的問題となってくるであろうといわれている。増加する高齢者自身の身体的問題についても白内障における人工水晶体の移植のように、人工材料により日常生活の質を低下させないで済む分野が出現してきている。同じく人工材料を使う整形外科学または歯科学領域でも骨補填、人工関節や人工歯根などで人工材料が使われるようになり患者の生活の質を低下させずに済む工夫が臨床応用されている。また高齢化のもう一方の問題として骨粗鬆症に伴い減少しつつある骨量を保持しようとする分野の研究が盛んに行われている¹⁻⁴⁾。さらに失われた骨量を再生したり、癒合しにくい骨の治癒を促進しようとして BMP⁵⁾に代表されるサイトカインなどの研究が盛んに行われている。生体材料科学分野でも材料表面の改質また

は材料の複合化などにより目的の部位に生体活性の高い骨を人工的に伝導するような、患者に優しくかつ長期にわたり使用可能な質の高い人工材料を開発する試みがなされている⁶⁻⁹⁾。

山下らは既存の水酸アパタイト（以下 HAp）の電磁気学的特性を詳細に検討し電氣的に分極可能であることを見いだした¹⁰⁾。また、この電氣的に分極した HAp セラミックスを人工体液中に浸漬し、分極によって形成された表面電荷の作用により骨類似アパタイトの形成量を調整できることを証明し、表面電荷が HAp セラミックスの骨形成能を変調する可能性を示唆した^{11,12)}。分極 HAp セラミックス表面に誘起された電荷はセラミックス内部の空間電荷に起因するもので、正負の両電荷を導体でショートしても電流は流れない。したがって、骨内に埋入した場合にも、組織中に電流は流れず、骨の圧電現象の発見以来、骨の修復促進に用いられてきた電気刺激^{13,14)}

図1 分極の方法

とは全く異なった骨組織反応が生じると考えられる。

本研究においては、HApセラミックスが本来持っている骨形成能が、分極によって誘起された表面電荷によっていかなる影響を受けるかを検討することを目的とした。まず分極がHApセラミックスに与える材料学的効果を熱刺激電流測定、X線回折測定（以下XRD）および赤外線吸収スペクトル（以下IRスペクトル）測定により解析した。次に分極HApセラミックスを家兔骨内に埋入し、組織学的に評価した。この結果、特にN面では早期より面に接して骨が形成され、そのまま密度の高い骨になることが観察された。したがって分極HApセラミックスは埋入初期よりN面に接し骨が伝導されたことから、強固な接着性を発揮する通常のHApセラミックスよりも生体活性の高い生体材料として有望であることが示唆された。

II. 材料および方法

1. 水酸アパタイトの合成並びに分極試料の作製

実験に使用したHApは炭酸カルシウム(CaCO_3)、和光純薬工業製アルカリ分析用とリン酸(H_3PO_4)、和光純薬工業製特級(85%)を出発材料として湿式法で合成した。得られたHAp粉末を850℃で仮焼した後バインダーを加えて造粒し、これを200メッシュのふるいにかけて粒径を整えた。最大圧力200 MPaで一軸加圧成形し円盤状の圧粉体を得た。この圧粉体を1,250℃で焼成しHAp焼結体を得た。これを低速ダイヤモンドカッターにより切断し、 $10 \times 5 \times 0.7\text{mm}$ のHApセラミックス試験片を得た。板状試験片の両側を対向する白金板電極で挟み300℃、 1 kVcm^{-1} の直流電場を1時間印加して分極処理を行った(図1)。分極により試料表面に負電荷が誘起している面を便宜的にN面と呼び、正電荷が誘起している面をP面と呼ぶ。また未分極のHApの面を0(ゼロ)面と呼ぶ。

2. 分極処理HApの材料学的評価

X線回折装置(PHILIPS社製, PW-1710)により分極したHApセラミックス試料のXRD測定を行って相同定を行った。測定条件はターゲットCu、電圧40 kV、電流40 mA、ステップ幅 0.010 degs^{-1} 、測定範囲(2θ) $3\text{--}60\text{ deg}$ とした。

赤外分光光度計(日本分光社製, FT-230)によりHAp

図2 分極HApセラミックスの埋入方法とAffinity index 評価部位

セラミックス表面のIRスペクトル測定を行った。測定条件は積算回数262回、スキャンスピード 2.0 mms^{-1} 、分解能 4 cm^{-1} 、測定波数範囲 $4,000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ とした。

分極処理によってHApセラミックスに生じた空間電荷は熱刺激電流（以下TSC）¹⁵⁻¹⁷測定により行った。HApセラミックス試料の両端を一对の白金板電極で挟み昇温速度を $5\text{ }^\circ\text{Cmin}^{-1}$ として、室温から400℃まで加熱し、電極間に流れる電流を微小電流計（日本ヒューレット・パッカード社製, 4140 B）で測定した。

3. 分極HApの生体内評価

実験動物には獣医師が健康と認めた成熟家兔（ニュージーランドホワイト種、雄）10羽を用いた。試料はあらかじめエチレンオキサイドガスで滅菌処理を行い実験に供した。試料埋入に際し麻酔はIsofluraneの吸入麻酔を用い大腿骨と脛骨皮質骨に歯科用フィッシャーバーを用いて注水下で骨軸に沿って骨の中央で皮質骨を切削し埋入溝を作製した。円筒形の試料であればドリルを用いて正確に溝を刻むことが可能であるが板状の試料を埋入するため可能な限り丁寧に切削を行い、試料面と切削した皮質骨との間隙が最大0.5 mm以内となるようにした。その後溝周囲の切削屑を生理食塩水にて洗浄してから試料を挿入した。実験期間は1, 2, 4週間とした。実験期間終了後、実験動物にバルビタール系麻酔薬を静脈内注射することで苦痛を伴わない安楽死を行った後、試料を周囲の骨とともに摘出した。なお実験動物の手術および管理はすべて獣医師の指導の下に行った。

摘出した試料は20%緩衝ホルマリン液を用いて固定を行った後、脱灰標本を作製しHematoxylin-Eosinな

図3 分極 HAp セラミックスの熱刺激電流曲線

らびに Toluidine-blue 染色を行った。また、骨の軸方向に対して垂直に薄切した試料片の皮質骨部分の厚さに対して切削した皮質骨面と対向している HAp セラミックス表面に接した新生骨の長さの比を計測して Affinity index¹⁸⁾を算出し、分極された面による骨形成能の違いを統計学的に評価した (図2)。

III. 結 果

1. 熱刺激電流 (TSC) 測定

分極処理を行った HAp セラミックス試料の TSC 曲線を図3で示す。これにより最大電流密度は 3.25 nAcm^{-2} 、総電荷量は $3.3 \mu\text{C}$ の TSC 曲線が得られた。

2. HAp としての材料学的評価

1) X 線回析 (XRD)

分極処理を行った HAp セラミックス試料を XRD 測定した結果、図4で示すとおり HAp に帰属するピークのみが検出され HAp 単相であることがわかった。

2) 赤外線分光分析 (IR)

分極処理を行った HAp セラミックス試料の IR スペクトルから (図5) $1,100\text{--}960 \text{ cm}^{-1}$ と $600\text{--}470 \text{ cm}^{-1}$ に PO_4^{3-} のグループ振動に起因する吸収が認められた。また $3,571 \text{ cm}^{-1}$ および 632 cm^{-1} には OH^- に起因する吸収が認められた。

図4 分極 HAp セラミックスの X 線回折パターン

図5 分極 HAp セラミックスの赤外線吸収スペクトル

3. 分極 HAp の組織学的評価

埋入後 1 週目では N 面に接しておよそ 0.02 から 0.05 mm の厚さを持った層状の新生骨が観察された。新生骨が認められない部位では扁平傾向のある核を持った線維芽細胞様細胞が試料に接して観察された。また対向する皮質骨切削面上と、試料と皮質骨切削面に挟まれる空間には周囲に 1 層の骨芽細胞を伴い、内部に比較的小型の骨細胞を伴った新生骨が観察された。またこれらの骨形成部周囲には毛細血管、線維芽細胞様細胞と骨髓系の細胞が観察された。P 面側でも一部標本で試料面に部分的に直接接する新生骨を認めたが、ほとんどの標本では試料面は類円形または扁平傾向のある核を持つ線維芽細胞様細胞のレイヤーで被われていた。また対向する皮質骨切削面上と、試料と切削面に挟まれた空間には周囲に大型の核を持った骨芽細胞を伴う、染色性が不均一な新生骨が観察された。また新生骨周囲によく発達した毛細血管が観察された。0 面と接する部位には新生骨を認めなかったが、代わって扁平傾向または扁平な核を持った線維芽細胞様細胞と赤血球のレイヤーが観察された。

図6 分極 HAp セラミックス周囲の組織像 (撮影倍率 200 倍)

a, b, c: 埋入 1 週後の N, P, O 面周囲

d, e, f: 埋入 2 週後の N, P, O 面周囲

g, h, i: 埋入 4 週後の N, P, O 面周囲

一部 O 面試料では、皮質骨切削面と接触した新生骨を認めた。この新生骨周囲には骨芽細胞を認めない部分も観察された。また新生骨内部には大型の核を伴った骨細胞が観察された。

2 週目では、N 面に接する新生骨の染色性が均一となり、厚さも 1 週目に比べさらに増していた。この新生骨中には核が濃染した骨細胞が、周囲には小型扁平の骨芽細胞のレイヤーが観察された。N 面周囲でも N 面と対

向する皮質骨切削面との空隙をほぼ埋めるまでに増大した新生骨がその周囲に骨芽細胞のレイヤーと内部に骨細胞を伴って観察された。また新生骨周囲の毛細血管も多く観察された。2 週目の P 面周囲では P 面に接して染色性が低い部分と高い部分が混在した新生骨が観察された。P 面周囲の皮質骨切削面と対向する空隙には均一な染色性を示す部分と不均一な染色性を示す部分とが混在する新生骨が内側に骨細胞、周囲に骨芽細胞のレイヤー

を伴って観察された。この領域に現れた新生骨の量は N 面側と同様に増加の傾向にあった。これら新生骨の周囲を取り巻く骨芽細胞は 1 週目で観察されたものに比べ小型化する傾向がみられた。また、これらの新生骨を取り巻いて多数の毛細血管を認めた。0 面周囲でも内部に骨細胞、周囲に骨芽細胞のレイヤーを伴った多量の新生骨が観察され、周囲には毛細血管の走行も認められた。しかし、多くは扁平な核を持った線維芽細胞様細胞が新生骨と試料との間に介在しており新生骨は 0 面と直接接していなかった (図 6)。

4 週目では N 面周囲は内部に骨細胞を伴って染色性が均一となった新生骨がほぼ空隙を埋め尽くしていた。また、この新生骨は皮質骨切削面との境界が不明瞭であった。P 面周囲でも P 面に接する均一な染色性を示す新生骨がほぼ全域にわたり接触していたが、N 面と比べると非接触面の割合が大きかった。この新生骨と皮質骨切削面との境界部は明瞭な部分と不明瞭な部分が認められた。0 面周囲では 0 面と接触する染色性が均一な新生骨が空隙を埋めていた。しかし試料面との非接触領域と周囲空隙中の骨未形成部分とが分極 P 面に比べて多く

図 7 皮質骨に面した部位での Affinity index
Mann-Whitney U 検定 * : $p < 0.01$, ** : $p < 0.05$

認められた。また皮質骨切削面との接触部位は明瞭であった (図 6)。

4. Affinity index

図 7 および表 1 に示すように N 面では 1 週目の標本から平均 30% の接着新生骨が観察され、2 週目では約 70% の割合で骨が接着していた。また 4 週目の標本では 94% の接着率が認められた。P 面では 1 週で 2.7%、2 週では 30.6%、4 週では 82.4% としだいに骨量が増していった。0 面では 1 週で 0% と全く接着骨が観察されなかった。2 週では 19.8% に増加し 4 週で 77.5% と後半に急激に骨量を増していった。

また、Mann-Whitney U 検定の結果から 2 週目の N 面と P 面、N 面と 0 面と 4 週目の N 面と P 面、N 面と 0 面との間に有意差をもって N 面に接する骨量が多かった。

IV. 考 察

1. 分極 HAp の材料学的評価

1) 熱刺激電流測定による HAp 分極特性の検討

分極処理を行った HAp セラミックス試料の TSC 測定から総電荷量を計算した結果、 $3.3 \mu\text{C}$ となり、本研究に使用した HAp セラミックスが表面電荷を保持していることが明らかになった。また、生体温度において流れた電流は検出限界以下であり、分極緩和は、 37°C ではほとんど起こらないとみなせる。したがって生体内に数カ月及ぶ長期にわたって分極 HAp セラミックスを埋入した場合でも、表面電荷は定常的に存在していたと考えられる。分極により誘起された電荷が解放されることによって生体内組織に電流は流れないと考えてよい。

2) X 線回折法ならびに赤外線スペクトル分析

分極処理を行った HAp セラミックスの X 線回折 (XRD) 測定の結果、分極 HAp 試料から得られた回折パターンは未分極 HAp セラミックスのパターンと全く変わらず結晶性の高い HAp 単相よりなることがわかった。また、配向も認められなかった。赤外線スペクトル測定 (IR) の結果から PO_4^{3-} 、 OH^- 基ともにその状態は分極前後で差異が認められなかった。以上より、分極処

表 1 皮質骨に面した部位での Affinity index

Implant term (week)	1			2			4		
	N	P	0	N	P	0	N	P	0
Number of Samples	5	5	5	9	8	10	6	6	8
Mean (%)	30.00	2.70	0	69.99	30.60	19.76	94.00	82.37	77.50
SD (%)	42.26	3.70	0	12.85	20.64	25.02	5.87	8.10	16.34
SEM (%)	18.90	1.66	0	4.28	7.30	7.91	2.40	3.31	5.78

理によって HAp を構成している原子の配列状態はほとんど変化していないと考えられた。

HAp の分極機構について、山下らは HAp が 500℃ 以上の高温でプロトン (H^+) 伝導性を持つことから、 OH^- 基を構成している H^+ と H^+ 位置にある空孔の一部が直流電場下における加熱によりシフトすることによるとしている。

本研究の XRD および IR スペクトル測定による解析では H^+ および空孔の移動は検出できなかった。しかし、 H^+ の X 線に対する原子散乱因子が小さいこと、移動する H^+ と空孔の絶対数が小さいことを考慮すれば、まったく同様の分極操作を行っていることから本研究の HAp の分極機構も同様の理由によると考えられる。

3) 骨内での組織反応

通常 HAp セラミックスを試料面と皮質骨切断面との空隙がほとんどないように骨に埋入した場合、約 1 週間後より試料周囲から骨新生が起り、約 4 週間後には骨をほぼ完全に修復するといわれている¹⁹⁾。本研究では 0.7 mm 厚の立方体の試料を骨に埋入する必要性があったことから、骨面の切削はドリルを用いて円筒穴を開削する場合のように均一な切削ができず、歯科用切削バーを注意深く使用しても切削溝の幅が不規則になってしまう傾向があった。それにもかかわらず、埋入 1 週目の時点で埋入 5 試料中 2 試料から分極 HAp の N 面に直接接し、Affinity index が 60% を越える新生骨の形成が観察された。埋入 1 週後の N, P, 0 面に対する Affinity index の平均値に対する U 検定では統計学的有意差は認められなかった。1 週後の Affinity index はばらつきが特に大きく、これが本質的なものなのか、あるいは個体差によるものなのか現時点では不明である。また、N と P の両面ともに全く試料面に接した骨新生を認めなかった 2 試料が存在したことから、分極処理が不十分であった可能性も考えられる。したがって、埋入初期の反応は再度慎重に検討する必要があると考えられた。また、埋入 2 週間後における Affinity index の検索結果から N と P 面、N と 0 面の間では骨形成に有意な差が認められた。埋入 4 週間後の骨量も同様に N と P 面、N と 0 面の間では骨形成に有意な差が認められた。これらの事実から分極 HAp の N 面は P 面と未処理 HAp よりも短時間で試料表面に新生骨を接触させたことになる。よって N 面は初期から面に接して骨を伝導し、試料周囲にも相対的に短期間で試料と接触する骨を伝導し、さらに密な骨を形成する能力を持つことが証明された。

山下は人工体液 (SBF) に浸漬した分極 HAp の N 面に骨類似の結晶成長が起こることを認め、この原理を分極 HAp の N 面が持つ表面電荷を補償する反対電荷を持つイオンすなわち陽イオンが集まって分極 HAp 表

面に凝集して骨類似結晶が析出したとしている¹²⁾。この現象から分極した HAp の表面電荷は生体内において同様に骨類似結晶を析出させることができる可能性を持っていると考えられるが、埋入 1 週目の N 面に接して観察された新生骨にはすでに周囲に骨芽細胞のレイヤーと内部に取り込まれ骨細胞となった細胞が観察されている。これらの事実から、N 面に接して初期に骨が形成されたのは分極 HAp の N 面が持つ選択的にイオンを集め骨類似結晶を析出する能力と生体がこれに反応して骨芽細胞を選択的に N 面周囲に集め、結果としてさまざまな骨形成因子が引き寄せられ、骨形成を促すメカニズムに影響を及ぼした結果、生体が新生骨を作りやすくなったことが示唆された²¹⁾。

近年、分子生物学的な研究が進み分子レベルで生体の活動を理解できるようになってきているが、骨内に埋入した分極 HAp 周囲にみられる反応を分子レベルで以下のように推定することも可能であると考えられる。SBF 中において N 面上には骨類似結晶が早期に析出する事実から、骨内反応の第 1 に骨内に埋入された N 面の負の表面電荷により生体骨内でも Ca^{2+} や Mg^{2+} などの陽イオンが選択的に引き寄せられたと考えられる。これに続いて周囲よりリン酸イオンなどが引き寄せられ骨類似の HAp 微結晶が析出してくることが予想される。第 2 に生きた骨内に埋入した分極 HAp の N 面に選択的に集められた Ca^{2+} に対して高い親和性を持つ osteonectin, fibronectin などの骨基質蛋白やサイトカインがさらに選択的に引き寄せられ、造骨系を刺激する核となることが考えられる^{22~25)}。第 3 に活性化された造骨系メカニズムにより骨芽細胞が fibronectin などの RGD 配列を持つ接着蛋白を介してインテグリンによる骨基質への強固な接着や、ヘパラン酸プロテオグリカンを介する荷電による緩い接着によって N 面表面に析出したアパタイト結晶へ骨芽細胞が接着すると考えられる^{26~32)}。さらに骨芽細胞は分極 N 面上で細胞基質間接着や骨芽細胞同士の細胞間接着によって互いに接着すると骨芽細胞系の細胞内情報伝達機構が働き、造骨系本来の反応がさらに活性化し N 面周囲に素早くそして大量の新生骨を形成し周囲に広がっていった^{25,30,32~34)} というような推定も可能である。

分極 HAp セラミックスを骨内に埋入して得られた 1 週後の組織学的標本から P 面側は面に接して線維芽細胞様細胞のレイヤーが観察され試料面に接する骨形成が起りにくかった。しかし、試料周囲には大型の骨芽細胞や新生骨中にも大型の細胞が観察されたことから、初期には N 面、0 面と異なる課程を経て、P 面と対向する皮質骨切断面との間の空間で骨新生が起こっていることが示唆された。2 週後の標本では骨芽細胞、骨細胞ともに通常の大きさに戻っていたが、骨量は N 面周囲に比べ

相対的に少なかった。4 週後には空隙をほぼ満たす骨量が観察されたが、Affinity index は N 面に比べ有意に低かった。このことから P 面周囲には N 面と異なるメカニズムで骨が伝導されてくるものと考えられた。

1 週目の組織標本で P 面周囲には多量の骨新生が認められるが、P 面に直接接するような骨新生は観察されなかったことが N 面との大きな違いであった。しだいに骨量を増し 2 週では P 面に直接接触する骨形成が観察され、N 面に次ぐ骨形成量が観察された。この結果は山下らが SBF 中に分極 HAp を浸漬し P 面周囲で骨類似 HAp の析出が抑制される観察結果と逆であった。この現象は第 1 に材料として分極 HAp の P 面がプラスの表面電荷を持つことから、HAp 表面での骨形成の起点となる Ca^{2+} が P 面表面には引き寄せられないことに起因すると思われる。生体内ではそのほか P 面表面に骨芽細胞を集める骨基質蛋白なども集合することができず、結果的に P 面に接する位置には骨新生が起こりにくかったと考えられた。また、このために骨形成因子は P 面周囲の対向する皮質骨切断面との空隙で、骨芽細胞の活発な活動を引き起こし、生体の機能を引き出しながらこの領域に骨新生が起こりやすくなったものと考えられる。この P 面周囲に形成された新生骨が増大して P 面表面に物理的に接すると試料表面にはプラスの電荷で引き寄せられていた PO_4^{2-} が存在すると考えられることから、試料周囲からの新生骨は細胞間の空隙より P 面の PO_4^{2-} と結合し、分極 HAp の P 面との直接接触が起こり、接着面の拡大が進行していったものと考えられる。

0 面周囲に現れた組織学的所見は 1 週目ではほとんどの試料で骨の形成反応が観察されなかった。図 6 c で示す唯一試料周囲に骨反応が認められた標本でも試料周囲は線維性細胞で被われていた。ただし、P 面周囲に観察された線維性細胞のレイヤーに比べその密度は低いものであった。また埋入 2 週後でも Affinity index が相対的に低いことから、未分極の HAp 周囲の新生骨形成は埋入後 2 週を過ぎた頃より急速に増大すると考えられた。すなわち、分極 N 面周囲には相対的に早い時点から面に接する骨が形成され、そのまま緻密な骨になってゆき、P 面では面の周囲に早期より骨が形成され、しだいに P 面と接すると同時に周囲骨量も増やす性質を持つといえる。

今日、HAp セラミックスは焼結体、多孔体、粉体さらには金属にコーティングした形で臨床応用されている。一例として人工関節や人工歯根などへ応用すれば埋入したインプラント材の初期固定性を高め、安定保持につながり、ひいてはインプラント治療を受けた患者が早い時期から患部を使用でき、結果的に入院や治療期間も短くなるなど患者の QOL を改善する可能性が考えられる。

また、骨粗鬆症の治療のうち、骨吸収を抑える方法は

数々現実的に臨床応用されるようになってきている。しかし、今日でも骨を回復する治療法には決定打がなく、骨量を減少させてしまった患者が再び骨量を回復して生活の質を向上させることは非常に困難である。骨内に埋入した分極 HAp はこの問題に対して解決の糸口となる可能性を持った材料であり方法であることが期待される。

V. 結 語

分極 HAp セラミックス表面が生体に及ぼす影響を検討する目的で分極処理を行った試料を材料学的に評価した後、兎の骨内に埋入して無処理の HAp と比較して次のような結論を得た。

1. HAp を分極処理して誘電性を持ったことの確認は TSC 測定で可能となった。
2. XRD, IR, SEM で分極処理した HAp の材料学的評価を行ったが未処理の HAp と差を認めることができなかったことから、材料学的には分極後も HAp としての性質を保つことが証明された。
3. 生体埋入の結果

兎骨内に埋入した分極 HAp の N 面は骨伝導系を活性化することにより周囲に骨を呼び、骨を維持する積極的な作用を持つ、P 面では電荷の関係で面より少し離れた位置で骨伝導系を活性化作用を持つことが示唆された。

本研究の一部は The sixth world biomaterials congress (May 15~20, 2000, USA) において発表した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、ご懇切なる指導とご校閲を賜りました東京医科歯科大学生体材料工学研究所素材部門無機分野・山下仁大教授に感謝申し上げます。さらに終始懇切なるご指導とご教示をいただきました生体材料工学研究所素材部門無機分野の中村 聡博士と大柿真毅博士に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Notelovitz, M. : Estrogen therapy and osteoporosis. Principles and practice. Am. J. Med. Sci. 313 : 2, 1997.
- 2) Lyritis, G. P., Magiasis, B. and Tsakalakos, N. : Prevention of bone loss in early nonsurgical and nonosteoporotic high turnover patients with salmon calcitonin : the role of biochemical bone markers in monitoring high turnover patients under calcitonin treatment. Calcif. Tissue Int. 56 : 38-41, 1995.
- 3) Orimo, H., Shiraki, M., Hayashi, Y., Hoshino, T., Onaya, T., Miyazaki, S., Kurosawa, S., Nakamura, T. and Ogawa, N. : Effects of 1 α -hydroxyvitamin D3 on lumbar bone mineral density and vertebral fracture in

- patients with postmenopausal osteoporosis. *Calcified Tissue International* 54 (5) : 370-376, 1994.
- 4) Liberman, U. A., Weiss, S. A., Broll, J., Minne, H. W. and Quan, H. : Effect of oral alendronate on bone mineral density and incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 333(22) : 1437-1443, 1995.
- 5) Lane, J. M., Yasuko, A. W., Tomin, E., Waller, S., Browne, M., Turec, T. and Gross, J. : Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin. Orthop. & Relat. Res.* 361 : 216-227, 1999.
- 6) Geesink, R. G., de-Groot, K. and Klein, C. P. : Bonding of bone to apatite-coated implants. *J. Bone Joint Surg. Br.* 70 : 17-22, 1988.
- 7) Takatsuka, K., Yamamuro, T., Nakamura, T. and Kokubo, T. : Bone-bonding behavior of titanium alloy evaluated mechanically with detaching failure load. *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (2) : 157-163, 1995.
- 8) Kitsugi, T., Nakamura, T., Oka, M., Senaha, Y., Goto, T. and Shibuya, T. : Bone-bonding behavior of plasma-sprayed coating of Bioglass, AW-glass ceramics, and tricalcium phosphate on titanium alloy. *J. Biomed. Mater. Res.* 30 : 261-269, 1996.
- 9) Nishiguchi, S., Nakamura, T., Kobayashi, M., Kim, H., Miyaji, F. and Kokubo, T. : The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials* 20 (5) : 491-500, 1999.
- 10) Yamashita, K., Kitagaki, K. and Umegaki, T. : Thermal instability and proton conductivity of ceramic hydroxyapatite at high temperatures. *J. Am. Ceram. Soc.* 78 (5) : 1191-1197, 1995.
- 11) Calvert, P. and Mann, S. : The negative side of crystal growth. *Nature* 386(13) : 127-128, 1997.
- 12) Yamashita, K., Oikawa, N. and Umegaki, T. : Acceleration and deceleration of bone-like crystal growth on ceramic hydroxyapatite by electric poling. *Chem. Mater.* 8 : 2697-2700, 1996.
- 13) Yasuda, I., Noguchi, K. and Sata, T. : Dynamic calls and electric callus. *J. Bone Joint Surg.* 37-A : 1292-1293, 1955.
- 14) Bassett, C. A. L. : Biological significance of piezoelectricity. *Calc. Tiss. Res.* 1 : 252-271, 1968.
- 15) Vssilikou-Dova, A., Kalogeras, I. M. and Macalik, B. : Polarizing-field orientation and thermal treatment effects on the dielectric behavior of fluorapatite. *J. Appl. phys.* 85 : 352-361, 1999.
- 16) Bennis, M. F., Hitmi, N., Vignoles, M., Heughebaert, M. L. A. and Lacabanne, C. : Influence of defects and substitutions on polarization phenomena of bioelectrets. *IEEE Trans. Electr. Ins.* 27 : 826, 1992.
- 17) Hitmi, N., Lamure-Plaine, E., Lamure, A., Lacabanne, C. and Young, R. A. : Reorientable electric dipoles and cooperative phenomena in human tooth enamel. *Calcif. Tissue Int.* 38 : 252, 1986.
- 18) Hayashi, K., Uenoyama, K., Matsuguchi, N., Nakagawa, S. and Sugioka, Y. : The affinity of bone to hydroxyapatite and alumina in experimentally induced osteoporosis. *J. Arthroplasty* 4 (3) : 257-262, 1989.
- 19) Albrektsson, T. and Albrektsson, B. : Osseointegration of bone implants : a review of an alternative mode of fixation. *Acta Orthop. Scand.* 58 : 567-577, 1987.
- 20) Schwartz, Z. and Boyan, B. D. : Underlying mechanisms at the bone-biomaterial. *J. Cellular Biochem.* 56 : 340-347, 1994.
- 21) Ruoslahti, E. and Obrink, B. : Common principles in cell adhesion. *Experimental Cell Res.* 227 : 1-11, 1996.
- 22) Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. and Shaw, S. : T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1. *Nature* 361 : 79-82, 1993.
- 23) Aizawa, M., Koyama, S., Kimura, K., Haruyama, T., Yanagida, Y. and Kobayake, E. : Electrically stimulated of cellular function in proliferation, differentiation, and gene expression. *Electrochemistry* 67 (2) : 118-125, 1998.
- 24) Dedhar, S. : Regulation of expression of the cell adhesion receptors, integrins, by recombinant human interleukin-1 b in human osteosarcoma cells : inhibition of cell proliferation and stimulation of alkaline phosphatase activity. *Cell. Physiol.* 138 : 207-214, 1989.
- 25) Salter, D. M., Hughes, D. E., Simpson, R. and Gardner, D. L. : Integrin expression in human bone. *J. Bone Miner. Res.* 8 : 527-533, 1993.
- 26) Okazaki, M., Takeshita, S., Kawai, S., Kikuno, R., Tsujimura, A., Kudo, A. and Amann, E. : Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 269 : 12092-12098, 1994.
- 27) Clover, J., Dodds, R. A. and Gowen, M. : Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *J. Cell Sci.* 103 : 267-271, 1992.
- 28) Wojciech, J., Grzesik, P. and Robey, G. : Bone matrix RGD glycoproteins : Immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 9 : 487-496, 1994.
- 29) Schiro, J. A., Chan, B. M. and Roswit, W. T. : Integrin $\alpha 2 \beta 1$ (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell* 67 : 403-410, 1991.
- 30) Richard, O. Hynes, : Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11-25, 1992.
- 31) Springer, T. A. : Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346 : 425-434, 1990.
- 32) Takeuchi, Y., Nakayama, K. and Matsumoto, T. : Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 271 : 3938-3944, 1996.
- 33) Arana-Chavez, V. E., Soares, A. M. and Katchburian, E. : Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy. *Arch. Histol. Cytol.* 58 (3) : 285-292, 1995.
- 34) Lee, Y. S. and Chuong, C. M. : Adhesion molecules in skeletogenesis : I. Transient expression of neural cell adhesion molecules (NCAM) in osteoblasts during endochondral and intramembranous ossification. *J. Bone Miner. Res.* 7 : 1435-1446, 1992.