

原著

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 -

諏訪武利^{1,2)}、寒河江登志朗²⁾、中田浩史³⁾、小林喜平³⁾

¹⁾ 日本大学大学院松戸歯学研究科 総義歯学専攻 271 - 857 千葉県松戸市栄町西松戸

²⁾ 日本大学大学院松戸歯学研究科 組織・発生・解剖学講座 271-857 千葉県松戸市栄町西松戸

³⁾ 日本大学大学院松戸歯学研究科 顎口腔義歯リハビリテーション学講座 271-857 千葉県松戸市栄町西松戸

(受理日: 2006 年 9 月 26 日)

抄録: インプラント周囲の微小部領域における新生骨の経時的な結晶度について Imaging Plate-Micro-X-ray diffraction (以下 IP-Micro-XRD) により分析を行っていたところ, 新生骨において CaCO_3 (カルサイトおよびアラゴナイト) の存在が認められた。そこで今回、インプラントを埋入していない正常なウサギ脛骨の皮質骨を IP-Micro-XRD により分析を行ったところ、正常なウサギ脛骨の皮質骨においても CaCO_3 (カルサイト) が 19 ポイントの測定点において認められた。

皮質骨においてカルサイトの存在が確認されたことは、骨における CaCO_3 の存在の議論を再吟味する必要性が示唆された。

Detection of Calcium Carbonate Crystal in Rabbit Tibia - Study by Micro-X-Ray Diffraction -

Taketoshi Suwa¹⁾, Toshiro Sakae²⁾, Hiroshi Nakada³⁾, Kihei Kobayashi³⁾

¹⁾ Complete Denture Prosthodontics, Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

²⁾ Department of Histology, Cytology and Developmental Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

³⁾ Department of Gnatho-Oral Prosthetic Rehabilitation, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

Abstract: Previously, we reported that the structure of new bone formed around implants and the crystalline structure differed from the cortical bone. Furthermore, we analyzed the crystallization of new bone in a small region after implantation, and detected CaCO_3 (calcite and aragonite) in the new bone.

Then, we analyzed the cortical bone of a normal rabbit tibia by Imaging Plate-Micro-X-ray diffraction (IP-Micro-XRD), and detected CaCO_3 (calcite) in the normal bone. The involvement of CaCO_3 in the normal bone suggests that it is important to re-evaluate the mechanism of the bone.

Key words: IP-Micro-XRD, CaCO_3 , calcium carbonate, calcite, cortical bone

緒言

これまでわれわれは、インプラント周囲に形成される新生骨には異なるタイプの構造があり、皮質骨とは結晶性が異なることを報告してきた¹⁻⁵⁾。さらに、インプラント周囲の微小部領域における新生骨の経時的な結晶度について Imaging Plate-Micro-X-ray diffraction (以下 IP-Micro-XRD) により分析を行っていたところ、新生骨において CaCO_3 (カルサイトおよびアラゴナイト) の存在が認められた(現在、投稿中である)。そこで今回、インプラントを埋入してい

ない正常なウサギ脛骨の皮質骨を IP-Micro-XRD により分析を行ったところ、正常なウサギ脛骨の皮質骨においても CaCO_3 (カルサイト) の存在を確認することが出来たため報告する。

材料および方法

実験動物

実験プロトコールは、日本大学松戸歯学部実験動物倫理委員会の承認を受けて実施された(承認番号第 ECA-03-

HA:Hydroxyapatite

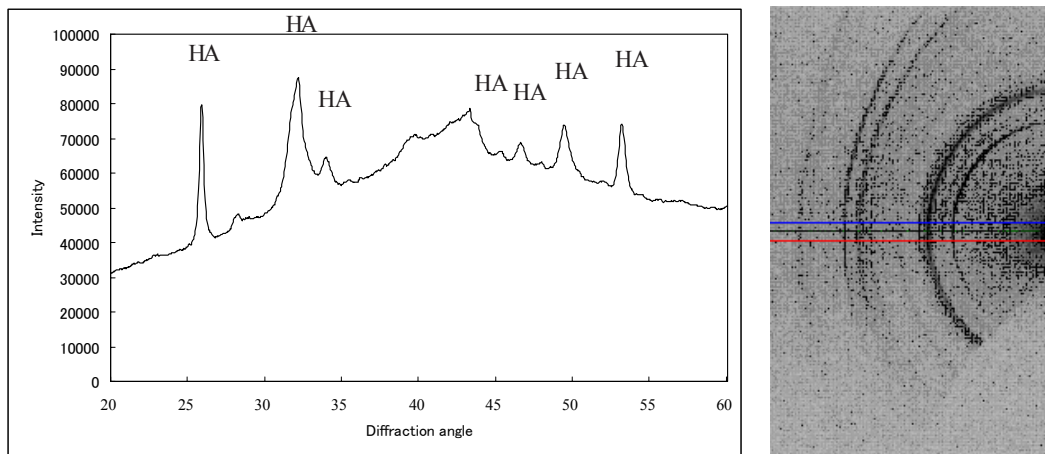


図1. IP-Micro-XRDによる測定点Aのリングおよび回折パターン

HA:Hydroxyapatite C:Calcite

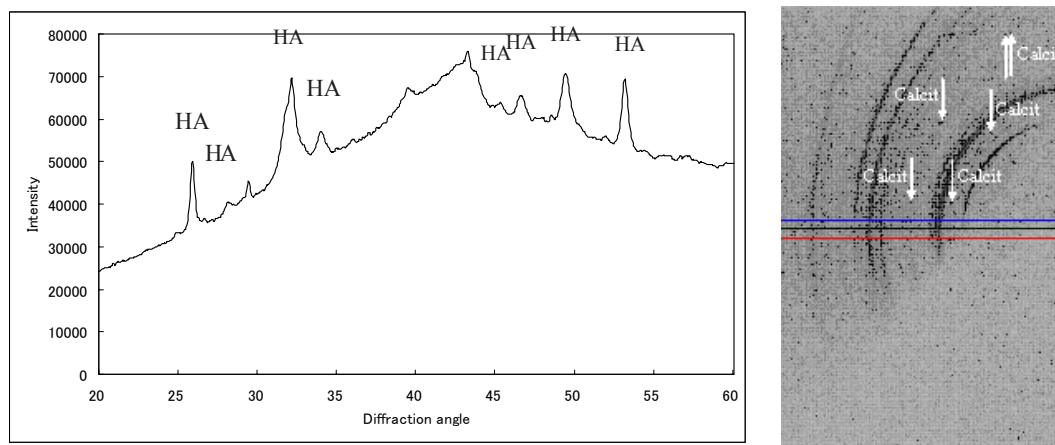


図2. IP-Micro-XRDによる測定点Bのリングおよび回折パターン

0038号)。実験動物は、2週間以上予備飼育した25週齢のNew Zealand White Rabbit、体重約3.0 kg（三協ラボサービス、Japan）を使用した。

試料の作製

抽出した脛骨は、10% Buffer formalin液により2週間固定を行った後、長軸方向に対し垂直に膝関節から約10 mmの部分ダイヤモンドディスク（Isomet[®]: Buehler, U. S. A.）を用いて厚さ約5 mmの試料を作製した。

IP-Micro-XRDによる分析

IP-Micro-XRDによる分析は、RINT RAPID RIGAKUA Japan）を用いて以下の測定・条件により行った。

X線管ターゲット：Cu、加速電圧：50 kV、加速電流：26 mA、X線モノクロメーター：グラファイト結晶、X線波長：1.5418（CuK α ）、X線ビームコリメーター：直径100 μ mイメージングプレート（IP、Fuji Film Co. Ltd, Japan）、IPサ

イズ：466 mm x 256 mm、カメラ半径：127.4 mm、ピクセルサイズ：100 μ m x 100 μ m角度分解能：0.04度、サンプルセッティング：反射モード、試料位置： $\omega=25$ 固定、 $\phi=0$ 固定、計測時間：6h、データ解析ソフト：R-AXIS display software（RIGAKU,Japan）およびJADE 5.0+（MDI、U.S.A.）

結果

IP-Micro-XRDによる測定は、皮質骨を約0.1 mmおきに全周、合計測定点75ポイント行った。それぞれのリングの結果に関しては、データ解析ソフトR-AXIS display software（RIGAKU, Japan）を用いて、検出された黒い斑点をリン酸カルシウム系およびCaCO₃の主要なピークの角度（2 θ ）から絞り込み結晶の同定を行った。チャートの結果に関しては、JADE 5.0+（MDI、U. S. A.）を用いて結果のピークからリン酸カルシウム系およびCaCO₃の同定を行った。その中でCaCO₃（カルサイト）のピークが19ポイントの測定点において認められた。今回は、アパタイトのピークのみのも

表1. 測定点Aおよび測定点BにおけるX線回折データ

測定点A			測定点B			Calcite				HA			
2	$d_0() I_0$		2	$d_0() I_0$		2	$d() I$	hkl		2	$d() I$	hkl	
25.9	3.44	20.3	25.9	3.44	79.4	-	-	-	-	25.88	3.4400	40.0	002
28.2	3.16	1.10	28.1	3.17	8.20	-	-	-	-	28.13	3.1700	12.0	102
-	-	-	29.4	3.04	20.6	29.405	3.0350	100.0	104	-	-	-	-
32.1	2.78	14.7	32.1	2.78	100	-	-	-	-	32.2	2.7780	60.0	112
33.9	2.64	3.00	34.0	2.63	25.6	-	-	-	-	34.05	2.6310	25.0	202
-	-	-	36.0	2.49	4.30	35.965	2.4950	14.0	110	-	-	-	-
-	-	-	39.5	2.28	14.2	39.401	2.2850	18.0	113	-	-	-	-
-	-	-	43.2	2.09	38.9	43.145	2.0950	18.0	202	-	-	-	-
45.3	2.00	0.90	45.3	2.00	7.60	-	-	-	-	45.31	2.0000	6.0	203
46.6	1.95	2.80	46.5	1.95	24.9	-	-	-	-	46.71	1.9430	30.0	222
49.4	1.84	6.70	49.4	1.84	61.4	-	-	-	-	49.47	1.8410	40.0	213
53.1	1.72	9.70	53.1	1.72	80.1	-	-	-	-	53.14	1.7220	20.0	004

の(測定点A)およびCaCO₃(カルサイト)のピークが認められたもの(測定点B)の測定結果を図1、図2、及び表1に示す。測定点Aでは、認められたピークは、全てアパタイトであり、骨における生体アパタイト特有のブロードな回折パターンを示した。B点では、25.9度(002)、28.1度(102)、32.1度(112)、34.0度(202)、45.3度(203)、46.5度(222)、49.4度(213)および53.1度(004)においてアパタイトのピークを認め、29.4度(104)、36.0度(110)、39.5度(113)および43.2度(202)においてCalciteのピークが認められた(Table 1)。さらに、29.4度(104)、36.0度(110)、39.5度(113)および43.2度(202)のカルサイトのリングにおいては、黒い斑点が認められた。

考察

本実験で使用したウサギ脛骨は、皮質骨のほとんどの場所では、従来の報告にある生体アパタイトXRDパターンと類似したパターンを得た⁶⁾。しかしながら、測定点Bにおいてカルサイトのピークを認め、またリングにおいて黒い斑点が認められたことは、カルサイトが大きな結晶として存在していることになる。今回は、測定点75ポイントのうち19ポイントにおいてCaCO₃(カルサイト)のピークを認め、かなり高い割合でCaCO₃(カルサイト)が検出された。しかし、カルサイトはIP上で極めて少量の回折スポットを示しているのみで、結晶量は極少量であると思われる。これまでX線回折は試料を粉末にして測定を行っていたため、骨に極少量のCaCO₃(カルサイト)が存在していても検出されなかったと考えられる。

従来、骨においてCaCO₃が独立しているという説がある⁷⁾。また現在、骨の基本構造は、コラーゲンを主体とした有機基質とそこに沈着した無機相である生体アパタイトの微結晶で構成されているとされているが、どちらの説も結論は、明かでない。しかしながら今回、皮質骨においてカル

サイトの存在が確認されたことは、骨におけるCaCO₃の存在の議論を再吟味する必要性が示唆された。

今後は、個体数を増やしさらに他の動物の骨も検討することによりCaCO₃の出現の原因を追及していく予定である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に於いて利用したIP-Micro-XRDは、日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設(LEBRA)に設置されたものであり、佐藤 勇教授、早川健教授、田中 俊成教授、早川 恭史助教授をはじめLEBRAの関係者各位に深く謝意を表します。

本研究費の一部は、平成12年度および平成18年度日本大学量子科学研究所電子線利用施設研究所学術フロンティア推進事業(代表:小嶋勝衛)、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究費(C)課題番号18592145、代表:小林喜平)によって行われた。

文献

1. 中田浩史、寒河江登志朗、町田健、加藤仁夫、小林喜平: プラスト処理したインプラント周囲の骨形成パターン - ウサギ脛骨における反射電子顕微鏡像観察 - . 日本口腔インプラント学会誌 . 16 : 477-484 , 2003
2. 中田浩史、寒河江登志朗、真辺剛史、町田健、諏訪武利、加藤仁夫、小林喜平: インプラント周囲骨の発生段階について偏光顕微鏡による観察 . 日大口腔科学 . 29: 160-163, 2003
3. Suwa T, Sakae T, Nakada H, Racquel Z LeGeros and Kobayashi K : Variation in Composition of Bone Surrounding Implants. Key Engineering Materials 309-311 : 19-22, 2006
4. Nanada H, Sakae T, Suwa T, Racquel Z LeGeros, Gunji A, Kato T and Kobayashi K : Observation of Newly Formed Bone Around Dental Implants Using Parametric X-ray. Key

諏訪 武利 ほか：骨における炭酸カルシウム結晶

- Engineering Materials 309-311 : 31-34, 2006
5. Nakada H, Sakae T, Suwa T, Racquel Z LeGeros, Gunji A, Kato T, Kozawa Y and Kobayashi K : Observation of Newly Formed Bone Around Implants Using Parametric X-ray. Journal of Hard Tissue Biology 14 : 1-4, 2005
 6. LeGeros RZ. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Karger, Basel; 1991. p. 108-29.
 7. Marcel J Dallemagne, Leon J Richelle : Biological Mineralization, Wiley-Interscience; 1973. p. 27-28