

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17220

研究課題名(和文) サプリメント療法が機械研磨インプラント体の骨結合促進に与える影響

研究課題名(英文) Effect of a Dietary Supplement on Peri-Implant Bone Osseointegration in a Rat Model of Machined Surface Implants

研究代表者

渡邊 丈紘 (WATANABE, Takehiro)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号：80759986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ラットに機械加工の表面処理をしたインプラント体を埋入し、サプリメントを経口摂取させることでインプラント体周囲の骨形成を促進させ治療期間の短縮に寄与できるか検討をおこなった。

その結果、骨密度、引き抜き強度がサプリメントを摂取しなかった群よりもサプリメントを摂取した群が有意に高い値を示し、リアルタイム PCR および蛍光顕微鏡観察により骨形成を促進させることを明らかにした。この研究は、機械加工の表面処理をしたインプラント体においてサプリメントの経口摂取が、インプラント体周囲の骨形成を促進させインプラント治療期間の短縮に寄与できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粗面な表面形状はインプラント周囲炎の危険因子の一つと考えられている。従って、局所的アプローチである表面処理に頼らない方法でオッセオインテグレーションを促進させる事が必要と考える。そこでサプリメントを経口摂取させることでインプラント周囲炎になりにくい滑面な機械研磨の表面処理をしたインプラント体を埋入したラットのオッセオインテグレーション獲得に寄与できるか検討を行う。

その結果、機械加工の表面処理をしたインプラント体においてサプリメントの経口摂取が、インプラント体周囲の骨形成を促進させインプラント治療期間の短縮に寄与できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to conduct an animal study to verify how peri-implant bone formation might be improved by dietary supplementation of SBM in rats with machined surface dental implants.

BMD, pull-out strength, real-time PCR and fluorescence microscopy observations were both significantly greater in the diet with SBM group than in the diet without SBM group. This study demonstrated that SBM could be effective in accelerating peri-implant bone formation for machined surface implants during the healing period after implantation.

研究分野：インプラント

キーワード：サプリメント療法 機械研磨インプラント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント体の表面形状はオッセオインテグレーションの短期獲得の観点から滑面な機械研磨から粗面なエッチングブラスト処理等に進化してきた。しかしながら粗面な表面処理はオッセオインテグレーションを短期間で獲得することが可能であるが、細菌の付着がしやすいという傾向を持っている。そのため粗面な表面形状はインプラント周囲炎の危険因子の一つと考えられている。特にインプラント体埋入者が高齢化し様々な理由で自ら十分な口腔内清掃を行うことが不可能になった場合、インプラント周囲炎が顕在化する可能性が高いことからインプラント周囲炎に対する対策は必須である。

細菌が付着しにくい表面処理として滑面な機械研磨がある。しかしながら粗面な表面形状と比較してオッセオインテグレーションの獲得まで長期間必要とされる。つまり、インプラント周囲炎の予防とオッセオインテグレーションの獲得効率は相反するものとなり、表面形状の観点からのアプローチでは限界がある。従って、局所的アプローチである表面処理に頼らない方法でオッセオインテグレーションを促進させる事が必要と考える。これまでに申請者は全身のアプローチとしてサプリメント療法に着目し、ブラスト処理をしたインプラント体を埋入したラットに SBM を経口摂取させた研究¹⁾を行ってきた。この研究結果を踏まえ申請者は SBM を経口摂取させることでインプラント周囲炎に罹患しにくい滑面な機械研磨の表面処理をしたインプラント体を埋入したラットのオッセオインテグレーション獲得に寄与できると考えた。

2. 研究の目的

SBM を経口摂取させることでインプラント周囲炎に罹患しにくい滑面な機械研磨の表面処理をしたインプラント体を埋入したラットのオッセオインテグレーション獲得に寄与できるか検討を行い、さらにブラスト処理したインプラント体を埋入したラットのオッセオインテグレーションの獲得期間と比較検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 飼料の作製: SBM は LeGeros³⁾の方法に従い作製した。すなわちリン酸二カルシウム二水和物の混合物 ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Mg および Zn の塩化物 (MgCl_2 , ZnCl_2) を炭酸カリウム及びフッ化ナトリウムを含有する蒸留水で溶解し加水分解して作製した。実験動物の飼料として対照群 (Diet without SBM) には米国国立栄養研究所で開発された AIN-93M (オリエンタル酵母 (株), 東京, 日本) を、実験群 (Diet with SBM) には Mijares ら⁴⁾の作製方法に従い AIN-93M および SBM で作製した飼料 (AIN-93M + SBM (オリエンタル酵母 (株), 東京, 日本)) を使用した。AIN-93M および AIN-93M + SBM の組成成分を表に示す。

	AIN-93M	AIN-93M + SBM
Calcium (Ca)	0.51	0.74
Phosphate (P)	0.30	0.48
Magnesium (Mg)	0.05	0.35
Zinc (Zn)	0.003	0.036
Fluorine (F)	0	0.005
Carbonate (CO ₃)	0	0.12
Sodium (Na)	0.10	0.13
Potassium (K)	0.35	0.75
Chlorine (Cl)	0.16	0.17

SBM: synthetic bone mineral

(2) 実験動物および試料の作製: 実験に用いた動物は 7 週齢 Wistar 系雌性ラットを 64 頭 (三協ラボサービス (株), 東京, 日本) とした。ラットは室温 25 ± 1 , 湿度 50 ± 1 % に保たれた金属ゲージ内に 1 頭ずつ入れ、水と食事を自由に摂取できる環境下で飼育した。ラットは環境変化に順応させるため 1 週間の予備飼育を行った後、7 週齢時にラットを無作為に 32 頭ずつ対照群および実験群に割り付けそれぞれの飼料摂取を開始した。8 週齢時に塩酸メドミジン、ミダゾラムおよび酒石酸ブトルファノールによる全身麻酔下において左大腿部を切開し左大腿骨にインプラント体埋入手術を全てのラットに行った。インプラント体は直径 1.2 mm , 長径 4.0 mm の円柱状の純チタン (CLINE (株), 東京, 日本) で、超音波洗浄機で洗浄、オートクレーブにより滅菌処理を行った。埋入手術は直径 1.2 mm のラウンドバーを生理食塩水注水下で回転速度 500 rpm で大腿骨骨幹中央部に直径 1.2 mm , 深さ 2.5 mm の埋入窩を形成し、インプラント体を埋入した。この際、インプラント体の引き抜き強度を測定するため 1.5 mm を骨外に残した。埋入 1 週間後、各群 32 頭のラットにインプラント体周囲に形成された新生骨を視覚的に観察するため骨標識剤としてよく用いられるカルセイン (20mg/kg) を腹腔内注射し、インプラント体埋入 2 週間後に安楽死させ大腿骨を摘出し試料とした。残りのラットはその飼育を続け、インプラント体埋入後 4 週目に同様の割り当てをして安楽死させた。

実験プロトコールは日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号: AP14-MD018)。

(3) 引き抜き試験: 大腿骨をロードセルとインプラント体が水平になるように調整し、ロードセルの力を最小限に抑えるため、可能な限り垂直にインプラント体を引き抜けるよう、常温重合型レジンとベースプレートを用いて機械的に固定した。その後インプラント体上部およびロードセルとの間を 50 mm 離し 110 mm のステンレス鋼線にて、ロードセルとインプラント体上部の通し穴を繋げた。インストロン型万能試験機システム (TG-5k, ミネベア (株), 神奈川, 日本) を用い、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min で引き抜き試験を行い、骨からインプラント体を引き抜く際の値 (N) を引き抜き強度とし記録した。

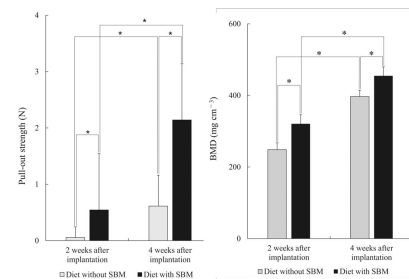
(4) BMD および BMD color imaging: 引き抜き試験実施後, R_mCT2 装置 (リガク (株), 東京, 日本) を用い, インプラント体と接していた内側皮質骨の界面からインプラント体長軸方向に深さ 1.0 mm の位置でインプラント体周囲新生骨の周囲 1.5 mm, 深さ 0.5 mm の直方体を撮像領域とし, 撮像条件を分解能 $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}$ ボクセル, 電圧 90 kV で撮像した。得られた撮像データは R_mCT 画像解析ソフトウェア (リガク (株), 東京, 日本) にて 3D モデルを構築し, 3D モデルから TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング (株), 東京, 日本) およびファントムにて作製した検量線を用い BMD を算出した。また, 算出された数値から BMD color imaging を作製した。

(5) 蛍光顕微鏡観察: 大腿骨を滅菌生理食塩水で洗浄後, 70~100% エタノール系および 100% アセトンによる骨組織の脱水と脱脂を行い 樹脂包埋用キット (オステオレジン包埋キット®, 和光純薬工業 (株), 大阪, 日本) にてレジン包埋後, ダイヤモンドディスク (Isomet®21, Buehler, Illinois, USA) を用いてインプラント体中央部を長軸方向に対して垂直に $30 \mu\text{m}$ の切片に切断し, 非脱灰標本を作製した。標本はインプラント体周囲の新生骨の観察のため蛍光顕微鏡 (BX51, オリンパス (株), 東京, 日本) を使用し観察した。

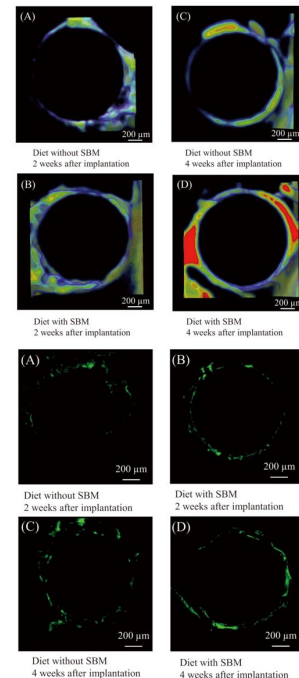
(6) 統計解析: 埋入 2 週間後と埋入 4 週間後での引き抜き強度, BMD および骨梁構造測定の間比較に, Mann-Whitney U 検定を用いた。すべての統計解析は, PASW® Statistics 18.0 (SPSS, IL, USA) を使用し, 有意確率は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 引き抜き試験: 対照群および実験群の引き抜き強度は埋入 2 週間後においてそれぞれ $0.55 \pm 0.14 \text{ N}$, $0.06 \pm 0.14 \text{ N}$ で実験群が約 9.9 倍有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。埋入 4 週間後ではそれぞれ $2.14 \pm 0.38 \text{ N}$ および $0.61 \pm 0.38 \text{ N}$ で, 実験群の引き抜き強度は対照群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。



(2) BMD: 対照群および実験群の BMD は埋入 2 週間後においてそれぞれ $248.43 \pm 19.07 \text{ mg/cm}^3$, $320.62 \pm 25.35 \text{ mg/cm}^3$ で実験群が約 1.6 倍有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。埋入 4 週間後ではそれぞれ $396.85 \pm 17.70 \text{ mg/cm}^3$ および $454.77 \pm 25.07 \text{ mg/cm}^3$ で, 実験群の BMD は対照群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。



(3) BMD color imaging: 対照群の BMD color imaging は埋入後 2 および 4 週間後で主に青および緑色が多く観察された (Fig. 6A-a and c)。同じ時点における実験群の BMD color imaging は主に黄色が多く, 一部に青と赤色が観察された (Fig. 6A-b and d)。BMD color imaging は青, 緑, 黄, オレンジ, 赤の順に高い BMD を示したことからインプラント体周囲の骨は, 対照群に比べ実験群がより高い BMD を有することを示した。

(4) 蛍光顕微鏡観察: 群間比較における実験群の埋入 2 および 4 週間後の蛍光顕微鏡画像は対照群と比較して, 骨形成を示す緑色蛍光を示した。以上の結果からラットにおける SBM の摂取は, インプラント体周囲の骨形成を促進させ, 骨梁構造を向上させることが明らかとなった。また, インプラント治療期間の短縮に繋がる可能性が示唆され, 今後より長い SBM 経口摂取期間を検討する必要があると考えられた。

<引用文献>

- 1) Potential for acceleration of bone formation after implant surgery by using a dietary supplement: an animal study. Watanabe T, Nakada H, Takahashi T, et al. J Oral Rehabil. 42. 447-453. 2015.
- 2) Effect of a dietary supplement on peri-implant bone strength in a rat model of osteoporosis. Takahashi T, Watanabe T, Nakada H, et al. J Prosthodont Res. 60. 131-137. 2016
- 3) LeGeros RZ. Patent. 2008: US 7,419,680, B2 (submitted 2004, issued September 2, 2008). US2009/0068285A1 (CIP, March 12, 2009). Calcium phosphate-based
- 4) Oral Bone Loss Induced by Mineral Deficiency in a Rat Model: Effect of a Synthetic Bone Mineral (SBM) Preparation Mijares D, Kulkarni A, Lewis K, et al. Arch Oral Biol, 57: 1264-1273, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

骨粗鬆症モデルラットにおいて Synthetic Bone Mineral が大腿骨に与える影響 . 渡辺丈紘 , 高橋卓裕 , 中田浩史 , 他 . 日大口腔科学 . (掲載確定)(査読有)

Effect of a synthetic bone mineral supplement on bone growth in the distal end of the rat femur. H Sato, Takehiro W, Takahiro T, et al . Int J Oral-Med Sci. (in Print)(査読有)

Effect of a Dietary Supplement on Peri-Implant Bone Strength in a Rat Model of Machined Surface Implants . H Sato, Takehiro W, Takahiro T, et al . J Hard Tissue Biol. 28 . 71-78. 2019. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

Synthetic bone mineral および光機能化を用いたインプラント周囲の骨形成促作用の相乗効果 . 渡辺丈紘 , 砂治大介 , 他 . 日本口腔インプラント学会学術大会 (大阪国際会議場 , 大阪府 , 北区 , 2018. 9.16)

骨粗鬆症モデルラットにおいて Synthetic Bone Mineral が大腿骨に与える影響 . 佐藤博紀 , 渡辺丈紘 , 高橋卓裕 , 他 . 補綴歯科学会第 128 回学術大会(北海道 , 札幌市 , 白石区 , 2019. 5.11)

サプリメント療法がインプラント体周囲骨骨形成に与える影響に PCR 法を用いた検討 . 砂治大介 , 渡辺丈紘 , 佐藤博紀 , 他 . 日本大学口腔科学会 第 17 回 学術大会 (日本大学松戸歯学部 , 千葉県 , 松戸市 , 2017. 9.3)

サプリメント療法および光機能化はインプラント体周囲骨の骨形成を促進させるか . 佐藤博紀 , 渡辺丈紘 , 高橋卓裕 , 他 . 日本補綴歯科学会第 126 回学術大会 (パシフィコ横浜 , 神奈川県 , 横浜市 , 2017. 7.2)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。