

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09705

研究課題名(和文) 骨代謝分析と臨床栄養学的アプローチによる新規インプラント治療ストラテジーの構築

研究課題名(英文) Establishment of implant treatment strategy based on bone metabolic analysis and clinical nutritional approach

研究代表者

正木 千尋 (Masaki, Chihiro)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60397940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンK2が卵巣摘出(OVX)ラットの骨微細構造および機械的特性にどのような影響を及ぼすかについて検討することを目的とした。OVX後のラットに対し、メナキノン7(MK-7)を30 mg/kgで12週間経口投与した。大腿骨のマイクロCT解析の結果、MK-7投与により骨梁幅は変わらないものの、骨梁数の増加および骨梁間隙の減少が認められた。一方、下顎骨を用いたナノインデンテーション試験では応力-ひずみ曲線の降伏点応力が、OVX群よりもMK-7投与群において有意に高い値を示すことが示された。MK-7の投与により、OVXによる骨粗鬆症モデルでの骨の劣化がマルチスケールで改善される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのインプラントの術前CT検査では、骨密度の指標であるCT値で評価するのみであり、骨質を含めた骨強度の評価はできていないのが現状である。本研究では骨粗鬆症モデルラットに対し、ビタミンK2であるメナキノン7を投与したところ、大腿骨の骨質が改善されただけでなく、顎骨のナノレベルでの機械的強度が改善することが示された。本研究の結果より、閉経後の女性患者にインプラント治療を行う場合、術前に血中ucOC量などでビタミンK2の摂取状況を把握し、積極的な栄養指導を行っていくことが有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vitamin K2, also called menaquinone (MK), inhibits bone loss in postmenopausal women. We demonstrate the microstructural and mechanical properties of bone recovery in ovariectomized (OVX) rats during MK-7 administration. Bilateral ovariectomy and a sham operation were performed on 14-week-old female Wistar rats. MK-7 was orally administered at 30 mg/kg daily for 12 weeks. The femur was used for the 3-point bending test and microstructural analysis by micro-CT, and the mandibular cortical bone for the nanoindentation test. Micro-CT revealed that MK-7 group had greater bone volume per tissue volume and a higher trabecular number than the OVX group. The bulk-scale 3-point bending test did not allow the mechanical properties between OVX and OVX/MK7 groups to be discerned, yet at the smallest level, the elastic-plastic transition point of the nanoindentation stress-strain curve of the mandibular cortical bone was higher in the MK-7 group than in the OVX group.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ビタミンK 骨代謝 インプラント 骨質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、整形外科領域では、骨粗鬆症の診断や治療薬の選択における骨代謝マーカーの有効性や骨質維持のための臨床的な栄養学的管理の有効性が報告されているものの、口腔インプラントを支持する顎骨に関する研究は他に例がない。インプラント埋入時に脆く壊れやすい顎骨は臨床上大きなリスクであり、微小骨折を起こしやすい顎骨はインプラント治療の予後不良の大きなリスクであるため、インプラント治療患者の栄養学的評価の有効性を明らかにできれば、インプラント治療の失敗リスクを減らし、長期安定が得られる可能性があるものの、顎骨に対する栄養学的評価の有効性は全く明らかになっていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

閉経後骨粗鬆症モデルラットを用いて、大腿骨の骨微細構造解析、3点曲げ試験、および下顎骨に対するナノインデンテーション試験を行うことにより、骨量減少や骨の機械的特性の低下に対するビタミン K2 (メナキノン) 投与の効果を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

13週齢の雌性 Wistar ラット 30 匹を温度と湿度が制御された部屋 (21~23 と 40~60%) で 12 時間の明/暗サイクルで個別に飼育した。すべてのラットにビタミン K2 が含まれていない食餌 (Rodent Diet CE-2, CLEA, Japan) を与え、糞食防止のため糞食予防ゲージを使用した。すべての動物実験は国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関するガイドに従って実施され、九州歯科大学動物実験委員会によって承認された (承認番号 18-027)。

#### (2) 実験モデル作製

ラットはランダムに 6 つの群に割り当てた: 偽手術後に食用油を添加した群 (Sham 群), 偽手術後にメナキノン-4 (MK-4) またはメナキノン-7 (MK-7) を添加した群 (Sham/MK4 および Sham/MK7 群), 卵巣摘出後に食用油を添加した群 (OVX 群), 卵巣摘出後に MK-4 または MK-7 を添加した群 (OVX/MK4 および OVX/MK7 群), (N=5)。OVX および偽手術は 1 週間の順応後、三種混合麻酔下で実施した。手術の 3 日後からフィーディングニードルを用いて 12 週間、毎日 MK-4 (sigma-aldrich, St. Louis, USA) を 30 mg/kg に調整したひまわり油あるいは 30 mg/kg の MK-7 含有ひまわり油 (J-OIL MILLS, INC, Tokyo, Japan) を経口投与した。またメナキノンを投与しない OVX および Sham 群には食用油であるひまわり油 (J-OIL MILLS, INC, Tokyo, Japan) のみを投与した。12 週間投与後に三種混合麻酔下で屠殺し、下顎骨および大腿骨の摘出を行った。

#### (3) マイクロ CT 分析

骨の形態変化を評価するために、大腿骨を 4 %ホルムアルデヒド下 4 で 48 時間固定し、各ラットの右大腿骨をマイクロ CT スキャナーで成長板を基準に近位方向に 0.8 mm からスキャンした。骨体積分率 (BV/TV; %), 骨梁の厚さ (Tb.Th;  $\mu\text{m}$ ), 骨梁の数 (Tb.N; /mm), 骨梁間隙 (Tb.Sp;  $\mu\text{m}$ ) をマイクロ CT で分析し、骨微細構造を評価した。

#### (4) 三点曲げ試験

三点曲げ試験は骨材料試験機 (MZ-500D; マルトー社製) を用いて大腿骨で行った。大腿骨の両端を固定し、支点間距離を 13 mm とした。骨が破壊されるまで 2 mm/min の速度で荷重を負荷し、最大荷重 (N), 破断変位 (mm), 剛性 (N/mm), エネルギー (N・mm) を計測した。

#### (5) ナノインデンテーション試験

下顎骨質骨ブロック (厚さ 4 mm) は歯槽堤の前方部から採取した。サンプルはエポキシ樹脂に包埋し、室温で保存した。ナノインデンテーション試験は定量的ナノメカニカル試験装置を使用して皮質骨領域で測定した。連続的な動的試験を皮質骨領域から得た。最大荷重力を 1000N に設定し、0.061s<sup>-1</sup> のひずみ速度を用いて一定のひずみ速度負荷後、5 秒間保持した荷重-変位曲線を記録した。正弦波振動の振幅は、100Hz の周波数で信号振幅 1~2 nm とした。応力-ひずみ挙動、貯蔵弾性率は下村らが提唱する方法で同時に測定した。ナノインデンテーション応力-ひずみ応答は、圧子の接触半径を有効圧子半径 (a/R) で割ったものに対する平均接触圧力をプロットすることによって可視化した。貯蔵弾性係数は応力-ひずみ曲線で観察された弾性変形領域の平均値とした。

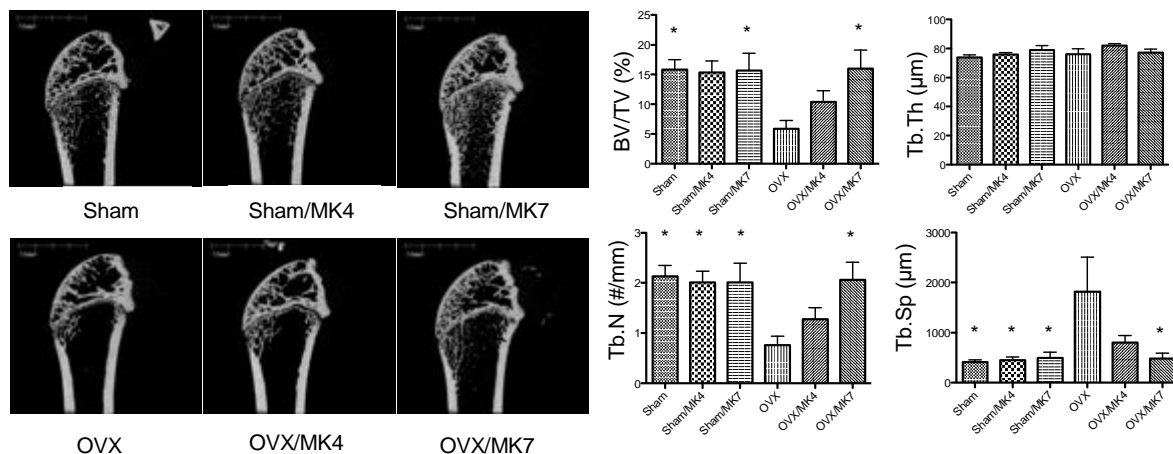
#### (6) 統計分析

各グループ間の解析には、Mac OS X 用の GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を使用した。マイクロ CT 解析, DEXA 解析, 三点曲げ試験, ナノインデンテーションで得られたデータの比較は一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて行い、その後、群間比較のために Tukey のポストホック検定を行った。有意水準は P<0.05 とした。

### 4. 研究成果

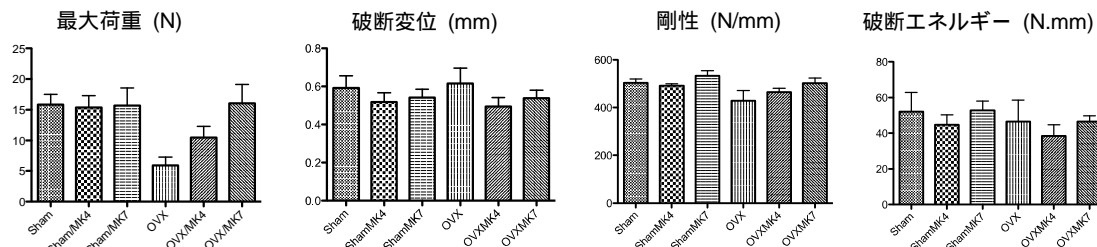
#### (1) マイクロ CT 分析

Tb.N および BV/TV に関して OVX 群 ( $0.76 \pm 0.36$ ) は Sham 群 ( $2.13 \pm 0.43$ ) と比較して有意に減少したものの、OVX/MK7 群 ( $2.06 \pm 0.70$ ) では Sham 群と同程度まで増加されることが示された ( $P < 0.05$ )。また Tb.Sp に関しても OVX 群 ( $1817.17 \pm 1381.89$ ) において Sham 群 ( $411.67 \pm 90.73$ ) より有意に増加することが示されたが、OVX/MK7 群 ( $479.46 \pm 216.10$ ) においては Sham 群と同程度まで減少することが示された ( $P < 0.05$ )。OVX/MK4 群では OVX 群と比較して有意ではないものの、Tb.N ( $1.28 \pm 0.47$ )、BV/TV、Tb.Sp ( $802.23 \pm 275.00$ ) などのパラメータにおいて若干改善する傾向が認められた。一方、Sham/MK4 および Sham/MK7 群においては Sham 群と比較してすべてのパラメータにおいて有意な差は認められなかった。



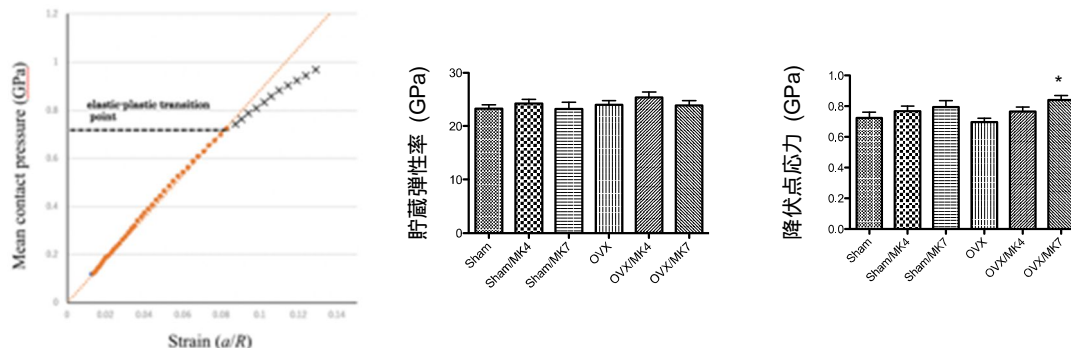
### (2) 三点曲げ試験

最大荷重、剛性においては Sham 群と比較して OVX 群において低い傾向が認められたものの、有意な差は認められなかった。また OVX/MK4 および OVX/MK7 群では OVX 群と比較し高い値を示す傾向が見られたものの、有意な差はみとめられなかった。一方、破断変位、エネルギーに関しては、すべての群の中で有意な差は認められなかった。



### (3) ナノインデンテーション試験

試料表面の貯蔵弾性率は、23.2-25.4GPa で測定されたが、すべての試料で統計的に一定な値を示した ( $P > 0.05$ )。皮質骨の応力-ひずみ曲線は線形弾性応答を示した。弾性範囲の限界（降伏点応力）は、直線性から逸脱しなかった曲線の領域から近似して求めた。応力-ひずみ曲線から算出された降伏点応力では OVX 群 ( $0.70 \pm 0.09$ ) と比較し、OVX/MK7 群 ( $0.84 \pm 0.12$ ) では有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。一方、他のグループ間では有意な差は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Daisei Iwamoto, Chihiro Masaki, Yo Shibata, Chie Watanabe, Tomotaka Nodai, Takashi Munemasa, Taro Mukaibo, Yusuke Kondo, Ryuji Hosokawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Microstructural and mechanical recovery of bone in ovariectomized rats: The effects of menaquinone-7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmbbm.2021.104571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩本大征, 正木千尋, 野代知孝, 宗政翔, 向坊太郎, 近藤祐介, 細川隆司
2. 発表標題 骨粗鬆症モデルラットにおける臨床栄養学的骨代謝リスクの検討-メナキノン摂取が骨代謝に及ぼす影響-
3. 学会等名 令和2年度公益社団法人日本補綴歯科学会九州支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本大征, 正木千尋, 柴田陽, 渡邊知恵, 野代知孝, 宗政翔, 向坊太郎, 近藤祐介, 細川隆司
2. 発表標題 メナキノン7が卵巣摘出ラットの骨微細構造および骨強度に及ぼす影響
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 祐介 (Kondo Yusuke)  (00611287)	九州歯科大学・歯学部・講師  (27102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柄 慎太郎  (Tsuka Shintaro)  (20759386)	九州歯科大学・歯学部・特別研修員    (27102)	
研究分担者	細川 隆司  (Hosokawa Ryuji)  (60211546)	九州歯科大学・歯学部・教授    (27102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関