

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791942

研究課題名（和文） 生体元素を配合した新規なインプラント表面処理法による骨粗鬆症ラットの骨質変化

研究課題名（英文） Changes in bone quality associated with the newly surface treatment implant using bioelement in the ovariectomised rat.

研究代表者

中田 浩史（NAKADA HIROSHI）

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：10349970

研究成果の概要（和文）：

インプラント周囲に形成された新生骨は、多くの研究報告において、「海綿骨」と報告されている。しかし、形状は海綿骨様であっても新生骨の骨質は皮質骨様に成熟しているか、本当に海綿骨、類骨、または軟骨程度で未熟なのか、判別が困難なために骨質評価の必要性が問われている。本研究では生体元素を配合したインプラント表面処理により、インプラント周囲に形成された新生骨と皮質骨を Micro-XRD と EDX を用いて骨質の違いを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To achieve the long-term retention and stability of implants under such conditions, the quality of newly formed bone around implants is important. There have been many studies reporting that new bone formed around implants is spongy bone. However, although the morphology is reportedly like spongy bone, it is difficult to discriminate whether the bone quality of new bone is mature like cortical bone, or immature, being similar to spongy bone, osteoid, or cartilaginous bone; therefore, evaluation of the bone quality is required. In this study, differences in the bone quality between new bone and cortical bone formed around implants were investigated using Micro-XRD and EDX.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：歯学、細胞・組織、骨、動物、インプラント

1. 研究開始当初の背景
骨粗鬆症患者は欧州、米国、日本で約 7,500 万人と推定され、社会の高齢化が拍車をかけ

ている。骨粗鬆症治療にはカルシウム製剤、ビスホスフォネート等が使用されている。しかし、治療薬は骨吸収速度の遅延効果はある

が、既に喪失した骨の再生には至っていない。今後の治療薬の開発は骨代謝機能を活性化し、新生骨形成や骨塩量の増加を起させる事が重要である。そこで本研究は Mg, Zn, F をリン酸カルシウムに配合するインプラントの新規な表面処理法を開発し、骨粗鬆症ラットの脛骨へ埋入して形成される新生骨の結晶学的な骨質変化と生体元素の効果を解明し、さらに Mg, Zn, F の生体元素が骨内での除放効果より骨塩量や骨強度の活性から骨粗鬆症治療の一助として、歯科界の知的財産となる骨粗鬆症治療の研究基盤を確立する。

2. 研究の目的

高齢化社会となった現代で、骨粗鬆症患者や予備群の増加は社会的問題となっている。歯科領域において骨粗鬆症患者がインプラント治療を希望する際に Osseointegration 獲得までの時間の遅延が示唆されている。またインプラントを長期安定へ導くには骨のモデリングおよびリモデリングの過程でインプラント周囲の新生骨を増加させる必要がある。現在、骨の基本構造はコラーゲン線維の走行を主体とした有機基質とそこに沈着した無機質の生体アパタイト微結晶で構成されているが、その生体アパタイト微結晶の成熟度は明らかでない。

申請者はこれまで Micro computed tomography, Micro Fourier Transform Infrared Spectroscopy および Raman 分光分析を利用してインプラント周囲に形成された新生骨の骨密度および骨質評価によるミネラル成分の違いを明らかにしてきた。しかし、これらの方法を用いても新生骨のコラーゲン線維の走行および生体アパタイト微結晶の成熟度は、明らかにされていない。

そこで本研究は、インプラント周囲の新生骨の生体アパタイト微結晶の結晶性の成熟度を主とした骨質評価のため、骨粗鬆症においてもっとも病的なラットとして低ミネラル食を与えた卵巣摘出ラット(実験群)および健常ラット(対照群)に、インプラントを埋入した後に形成される新生骨の組織像(コラーゲン線維の走行)および結晶性の経時的な変化を、偏光顕微鏡(OPTIPHOTO2-POL :Nikon®, 東京、日本)、RINT-2500 湾曲 PSC 型微小部エックス線回折装置 (PSC-RINT-2500-Micro X-ray-Diffractometer, Rigaku, 以下: Micro-XRD, 東京、日本) およびエネルギー分散 X 線装置 (Energy dispersive X-ray spectrometer: 以下 EDX, (株) 日立ハイテクノロジーズ, Swift ED 3000, 東京、日本) を用いてインプラント周囲新生骨とインプラントには接しない脛骨・皮質骨に存在する

ミネラル (Ca, P, Na, Mg および K) の正味強度および濃度分布を測定した。

3. 研究の方法

1) 骨粗鬆症進行モデルラットの作製

実験動物は、19 週齢の Wistar 系雌性ラット 24 頭((株)三協ラボサービス, 東京, 日本)を用いた。実験プロトコルは、日本大学松戸歯学部実験動物倫理委員会の承認(承認番号: AP09-MD011)を受けて実施し、また動物実験は日本大学における動物実験ガイドラインに沿って行われた。実験動物は、24 頭を無作為に Group1(実験群): 低ミネラル食 (American Institute of Nutrition (以下 AIN-93M) with reduced mineral content, (株)日本農産工業, 神奈川)を与えた卵巣摘出手術群(以下 G1) および Group2(対照群): 普通食(AIN-93M, (株)日本農産工業, 神奈川)を与えた疑似卵巣摘出手術群(以下 G2)に分けた。手術は 20 週齢時に、ケタラール®(第一三共プロファーマ, 東京, 日本)とセラクタール®((株)バイエル薬品, 大阪, 日本)による全身麻酔とブトルファノール®(スタドール, Bristol-Myers Squibb Co., New York, USA)による鎮静剤の投与により、G1 は傍正中切開による両側卵巣摘出と G2 は疑似卵巣摘出を行った。術後から G1 は低ミネラル食を与え、G2 には普通食を与えた。

(2) 試験材料

インプラントは直径 2.5mm, 長さ 8.0mm の Ti-6%Al-4%V 合金を 24 本使用し、12 本は表面処理をリン酸カルシウムコーティング (calcium deficient apatite; 2g S874 + 400mg NaF + 20ml 4.25% H₃PO₄ (using only the super natant to coat Titanium, 60 度で 12 時間保温する。その後、0.1M Na₂CO₃ (1.05g: Na₂CO₃, DDS: 100ml)にて 1 時間、60 度で乾燥処理を行った。残り 12 本はブラスト材による表面処理を行った。

(3) 埋入方法

インプラント埋入手術は 24 週齢となったラットに全身麻酔下で埋入窩を膝関節から末梢側 20mm の位置で、脛骨の長軸に対し垂直に直径 2.5mm とし、インプラント用エンジン (IMPLANTOR-S®, (株)京セラ, 大阪、日本)を用いて滅菌生理食塩水の注水下で形成後、インプラントを埋入した。

ラットはインプラント埋入後 4, 12 および 20 週で全身麻酔下にて安楽死させ、脛骨を摘出した。脛骨は滅菌生理食塩水で洗浄後、70~100%のエタノール系列および 100%アセトンにより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, 大阪、日本)にてレジン包埋後、自動精密切断機 (Isomet®, Buller, Illinois,

USA.) を使用して 40 μm 幅の非脱灰標本を作製した。

4. 研究成果

1) 組織像の観察

偏光顕微鏡による観察では G1 および G2 でインプラント埋入後 4, 12 および 20 週において、インプラント周囲に新生骨が形成されていた。新生骨は索状または網状に配列した線維性骨により構成され、強い偏光性が観察された。コラーゲン線維の走行は G1 および G2 で線維の走行方向がすべての週齢において一定であることを認めた。

以上のことからコラーゲン線維に関してどのような条件であってもコラーゲン線維の走行に差がないと推察された。

2) 結晶の成熟度評価

各試料は、4 点ずつアパタイトのピーク 002 および 004 の半価幅を中央値である 0.575 で区切り、 ≥ 0.575 を結晶性の低いグループ、 $0.575 >$ を結晶性の高いグループに分類し各週齢における G1 および G2 における 2×2 表に示す (Fig. 2)。各週齢ともに G1 および G2 の間に有意の差を認めなかったが、G1 は G2 と比較して 12 週齢における結晶性が低い傾向を認めた。以上のことから初期と後期の結晶性に差は認められなかったが、12 週齢において G2 は G1 と比較して結晶性が高い傾向であることから 新生骨の成熟度は G2 の方が早期に行われることが推察された。

3) ミネラル分布

インプラント周囲の新生骨と脛骨の皮質骨における正味強度を比較した結果において、新規のミネラルコーティングしたインプラントでは有意にカルシウムやリンの正味強度が上がった (Table. 1)。質量濃度は皮質骨よりも若干インプラント周囲の新生骨は低い結果となった (Table. 2)。

インプラント周囲の新生骨はコラーゲン線維の走行の観察から G1 と比較して G2 はすべての週齢においてコラーゲン線維の走行が一定で規則性が認められた。このことから G1 および G2 には、コラーゲン線維による差は認められなかった。

結晶性では 12 週齢において G1 と比較して G2 の結晶性が高い傾向を認めたので G2 の方が新生骨の成熟が早いと推測される。

今後の展望

本研究はコラーゲン線維の走行に差は認められなかったが、コラーゲン線維の量および幅について触れられていないので今後それらについても検討していく必要があると考えられた。

また結晶性については G2 の方が 12 週齢に

おいて新生骨の成熟度が高い傾向であったが、分析部位数がまだ少なくまだ明確な差は認められないので今後分析部位数を増やし検討していく必要がある。

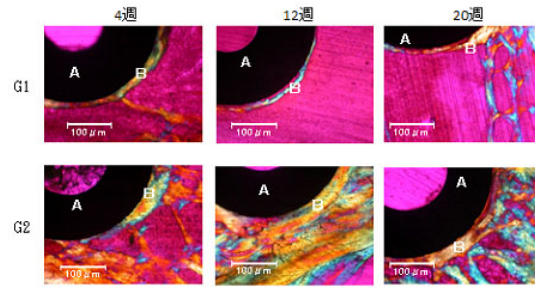


Fig.1インプラント周囲の偏光顕微鏡像(検板法)

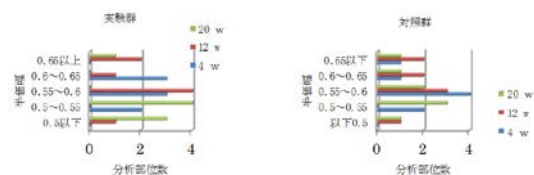


Fig. 2 半価幅の比較

Table 1 EDX による正味強度

	正味強度				◆ P<0.05 (cps / ev) K
	Ca	P	Na	Mg	
Group 1 脛骨・皮質骨	2169.1 ± 84.5	1526.5 ± 53.9	51.8 ± 7.9	37.9 ± 9.9	9.5 ± 7.9
Group 1 インプラント 周囲新生骨	1849.8 ± 91.0	1355.6 ± 69.9	41.8 ± 8.8	32.7 ± 8.9	5.9 ± 4.2
Group 2 脛骨・皮質骨	2168.6 ± 89.5	1516.9 ± 95.6	53.9 ± 9.4	37.7 ± 10.8	9.0 ± 3.8
Group 2 インプラント 周囲新生骨	1953.9 ± 96.4	1419.0 ± 60.5	50.0 ± 7.4	34.1 ± 8.0	6.4 ± 7.7

Table 2 EDX による正味強度

	質量濃度					◆ P<0.05 (weight %) K
	Ca	P	Na	Mg	K	
Group 1 脛骨・皮質骨	70.3	25.8	1.4	1.4	0.2	
Group 1 インプラント 周囲新生骨	68.5	28.1	2.0	1.3	0.2	
Group 2 脛骨・皮質骨	70.8	26.1	1.0	1.0	0.2	
Group 2 インプラント 周囲新生骨	68.9	28.3	1.9	0.9	0.1	

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 8 件)

- ① 中田浩史, 鈴木静夏, 渡辺丈紘, 寒河江登志朗, 谷本安浩, 河相安彦. 低ミネラル食を摂取させた卵巣摘出ラットの大腿

骨骨幹端部における骨変化、日本補綴歯科学会誌，4巻，76-84，2012。査読有

- ② Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Yasuhiro Tanimoto, Mari Teranishi, Takao Kato, Takehiro Watanabe, Hiroyuki Saeki, Yasuhiko Kawai and Racquel Z. LeGeros. Assessment of the Quality of Newly Formed Bone around Titanium Alloy Implants by using X-ray Photoelectron Spectroscopy. International Journal of Biomaterials, 2012. doi:10.1155/2012/615018. 査読有
- ③ Shizuka Suzuki, Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Yasuhiro Tanimoto, Yasuhiko Kawai and Racquel Z. LeGeros. Bone quality of the femoral mid-shaft of ovariectomized rats fed a low-mineral diet. Journal of Hard Tissue Biology, 21, 245-256, 2012. 査読有
- ④ Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Mari Teranishi, Takao Kato, Takehiro Watanabe, Takahiro Takahashi, Yasuhiko Kawai and Racquel Z. LeGeros. Changes in bone quality of the femoral diaphysis induced by high-level fluorine ingestion in ovariectomized rats, Key Engineering Materials, 529-530, pp.341-344, 2012. 査読有
- ⑤ Toshiro Sakae, Hiroshi Nakada, Mari Teranishi, Takao Kato, Shizuka Suzuki, Akira Yanagawa, Norio Yasuda, Shukichi Ochiai, Nobby Kitagawa, Yasuhiko Kawai and Racquel Z. LeGeros. Comparison between the lateral and medial femur in low-mineral-diet-fed ovariectomized rats using Raman spectral analysis. Key Engineering Materials, 529-530, pp.337-340, 2012. 査読有
- ⑥ 中田浩史, 鈴木静夏, 渡辺丈紘, 寒河江登志朗, 谷本安浩, 久保山 昇, 中臺麻美, 寺西真理, 櫻井 甫, 木本 統, 矢崎貴啓, 林 幸男, 郡司敦子, 佐伯啓行, 加藤仁夫, 河相安彦. 卵巣摘出したラットが摂取するミネラルの違いによる大腿骨骨幹部の骨質変化—Micro-CTによる観察—. 日大口腔科学, 37: 13-21, 2011. 査読有
- ⑦ Hiroshi Nakada, Shizuka Suzuki, Toshiro Sakae, Yasuhiro Tanimoto, Noboru Kuboyama, Mari Teranishi, Takao Kato, Takehiro Watanabe, Hiromi Kimura-Suda, Racquel Z. LeGeros, and Yasuhiko Kawai. Quantitative and qualitative analyses of low-mineral-diet ovariectomised rat femora using microscopic computed tomography. Journal of Hard Tissue Biology, 20, 107-114, 2011. 査読有

⑧ Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Hiromi Kimura-Suda, Yasuhiro Tanimoto, Hiroyuki Saeki, Mari Teranishi, Takao Kato, Racquel Z. LeGeros. Changes in bone quality associated with the mineralization of new bone formed around implants -Using XPS, polarized microscopy, and FTIR imaging-. Journal of Hard Tissue Biology, 19: 101-110, 2010. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 渡辺丈紘、中田浩史、寒河江登志朗、鈴木静夏、河相安彦. 低ミネラル食を与えた卵巣摘出ラットのインプラント周囲の新生骨の形成に関する検討. 平成24年5月27日、第121回日本補綴歯科学会学術大会、神奈川県民ホール、神奈川。
- ② 鈴木静夏、中田浩史、林 幸男、郡司敦子、河相安彦. 低ミネラル食を与えた卵巣摘出ラットの大腿骨を Micro-CT による定性と定量分析. 平成23年5月21日、第120回 日本補綴歯科学会、広島国際会議場、広島。
- ③ 鈴木静夏、中田浩史、寺西真理、加藤仁夫、河相安彦. 卵巣摘出したラットに低ミネラル食を与えた際の大腿骨の骨質変化. 平成23年1月22日、日本口腔インプラント学会 28 回九州支部学術大会、かごしま県民交流センター、鹿児島。
- ④ T. SAKAE, H. OKADA, H. NAKADA, K. SUZUKI, and H. YAMAMOTO. X-ray Phase Contrast Imaging of Dental Tissues. 平成22年11月20日、The 58th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Kyushu Dental College, Fukuoka.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 浩史 (NAKADA HIROSHI)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：19791462