

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06645

研究課題名(和文)骨粗鬆症モデルラットへのSBM経口投与が骨結合の促進に与える影響

研究課題名(英文)Effect of Synthetic Bone Mineral to Osseointegration in a Rat Model of Osteoporosis

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は骨粗鬆症モデルラットを用いてサプリメントの経口投与がオッセオインテグレーションを促進させ治療期間の短縮に寄与できるか検討を行った。その結果、SBMの摂取は骨密度および引き抜き強度が有意に増加し、蛍光顕微鏡観察によりインプラント体周囲の骨形成を促進させることを明らかにした。さらに骨体積の増加、骨表面積の減少、太い骨梁、連続性がより向上した骨梁構造を示した。以上のことから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た。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to confirm whether intake of Synthetic bone mineral (SBM) developed for osteoporosis supplement, affect peri-implant bone formation in an ovariectomized rat. Pull-out strength and BMD for the Diet with SBM group were significantly greater than those without SBM group. Fluorescence microscopy imaging of the Diet with SBM group demonstrated more green fluorescence (indicating bone formation) than that of the Diet without SBM group. BV/TV, BS/BV, TbTh and Vtr in the Diet with SBM group were significantly greater than those in the Diet without SBM group. This study demonstrated that SBM could be effective in accelerating peri-implant bone formation and improve the trabecular structure in an ovariectomized rat.

研究分野：インプラント

キーワード：サプリメント 骨粗鬆症 インプラント

1. 研究開始当初の背景

インプラント体埋入後の治癒期間は3 - 6か月とされ、この期間は摂食機能が制限されるためQOLが大きく低下する。特に広範囲欠損のインプラント治療では骨代謝の機能低下を伴う高齢者が対象になることが多く、本邦に1,300万人いるといわれる骨粗鬆症に悩む高齢者の場合、更に治癒期間は長期化する。将来的に超高齢社会の我が国では、インプラント治療を希望する高齢者の増加が予測される。これらのことから治療期間の短縮は臨床上重要な命題と言える。治療期間を短縮させるため様々な研究が行われている。治療方法の観点から埋入後に即時荷重法が臨床応用されているが、十分な骨量および骨強度を持つ患者が対象でありこの治療方法を受け入れられる高齢者は少ない。他のアプローチとしてインプラント体の表面処理方法に焦点があてられてきた。その一つとして表面を紫外線照射により表面特性を物理化学的および生物学的に最適化させることでオッセオインテグレーション獲得の期間を短縮させる試みも行われている。しかしながらこれまでの報告では局所的アプローチが多く、サプリメント療法等全身的アプローチによりインプラント治療期間を短縮させることを目的とした報告は少ない。そこで申請者は、サプリメント療法に着目し、その効果を評価するため動物研究^{1, 2)}を行ってきた。超高齢社会の我が国では将来的にインプラント治療を希望する高齢者の増加が予測される。特に骨粗鬆症に罹患している高齢者は骨代謝機能の低下により治療期間が長期となることから、骨代謝が低下したモデルを使用した研究も必要と考える。

2. 研究の目的

本研究は、骨粗鬆症モデルラットにおいてSBMの経口摂取がインプラント体周囲骨の骨形成に与える影響を検討するため研究を行った。

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(CaHPO₄·2H₂O)、MgおよびZnの塩化物(MgCl₂、ZnCl₂)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Mijares⁴⁾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1に示す。

表1 AIN-93M および AIN-93M + SBM の組成成分 (wt%)

	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6週齢卵巣摘出Wistar系雌性ラットを36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18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ン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1.2mm、長径4.0mmの円柱状の純チタン(CLINE(株)、東京、日本)で、直径110µmの酸化アルミナでプラスト処理にて表面処理を行い、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1.2mmのラウンドバーを生理食塩水注水下で回転速度500rpmで大腿骨骨幹中央部に直径1.2mm、深さ2.5mm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1.5mmを骨外に残した。埋入1週間後、各群9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50mm離し110mm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, オリパス (株), 東京, 日本) を使用し観察した。

(6) 骨微小構造測定: 骨微小構造測定は撮像したデータを TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング (株), 東京, 日本) を用いて骨微小構造を計測した。計測項目は骨体積分率 (Bone volume fraction: 以下, BV/TV), 骨表面積比 (Bone surface ratio: 以下, BS/BV), 骨梁幅 (Trabecular thickness: 以下, TbTh), Trabecular star volume (以下, Vtr), 骨梁数 (Trabecular Number: 以下, TbN) とした。

(7) 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群間比較に, 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 (図 1): 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 $6.70 \pm 0.72 \text{ N}$, $10.6 \pm 4.86 \text{ N}$ 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 $23.00 \pm 4.18 \text{ N}$ および $34.10 \pm 8.85 \text{ N}$ 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 (図 1): 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 $292.04 \pm 15.60 \text{ mg/cm}^3$, $474.13 \pm 59.39 \text{ mg/cm}^3$ 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 $484.64 \pm 75.59 \text{ mg/cm}^3$ および $709.36 \pm 56.65 \text{ mg/cm}^3$ 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 ($p < 0.05$)。

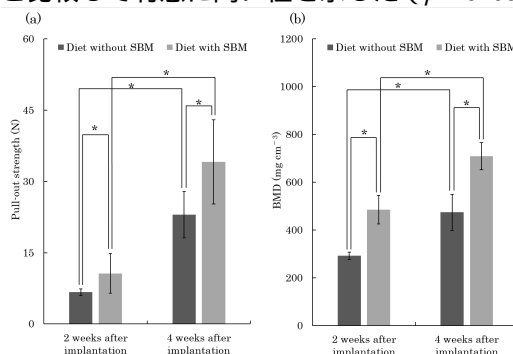


図 1 (a) 引き抜き強度お (b) BMD

(3) BMD color imaging (図 2): 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 (図 2): 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。

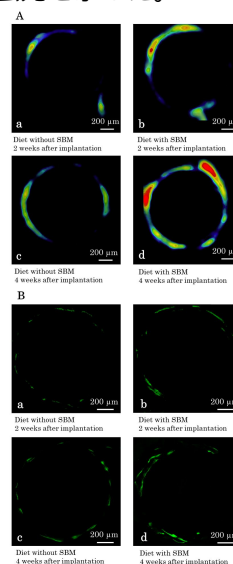


図 2 (A) BMD color image (B) 蛍光顕微鏡観察 (5) 骨体積分率 (BV/TV) (図 3): 対照群および実験群の BV/TV は埋入 2 週間後において $7.81 \pm 3.40 \%$ および $15.89 \pm 2.58 \%$, 埋入 4 週間後において $14.96 \pm 4.17 \%$ および $20.29 \pm 1.97 \%$ で実験群の

BV/TV は対照群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)

(6) 骨表面積比 (BS/BV)(図3)

対照群および実験群の BS/BV は埋入 2 週間後において 44.68 ± 4.88 1/mm および 35.87 ± 1.82 1/mm, 埋入 4 週間後において 38.75 ± 6.69 1/mm および 31.25 ± 1.91 1/mm で実験群の BS/BV は対照群と比較して有意に低い値を示した ($p < 0.05$)

(7) 骨梁幅 (TbTh)(図3)

対照群および実験群の TbTh は埋入 2 週間後において 69.65 ± 4.00 μm および 79.30 ± 5.35 μm , 埋入 4 週間後において 75.77 ± 11.87 μm および 94.24 ± 7.50 μm で実験群の TbTh は対照群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)

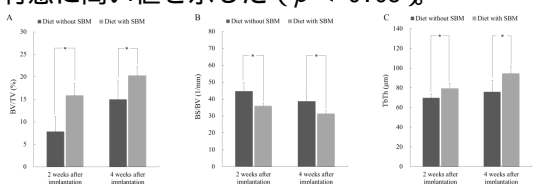


図3 (A) BV/TV (B) BS/BV (C) TbTh

(8) Trabecular star volume (Vtr)(図4)

対照群および実験群の Vtr は埋入 2 週間後において 0.009 ± 0.003 mm^3 および 0.016 ± 0.005 mm^3 , 埋入 4 週間後において 0.012 ± 0.006 mm^3 および 0.018 ± 0.005 mm^3 で実験群の Vtr は対照群と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)

(9) 骨梁数 (TbN)(図4)

対照群および実験群の TbN は埋入 2 週間後において 0.70 ± 0.30 1/mm および 0.89 ± 0.16 1/mm, 埋入 4 週間後において 1.11 ± 0.20 1/mm および 1.07 ± 0.15 1/mm で群間比較では有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)

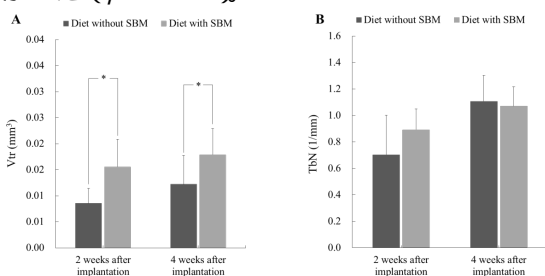


図4 (A) Vtr (B) TbN

BMD および BMD color imaging の結果はインプラント体周囲骨が SBM を摂取した OVX ラットにおいてより多くの骨が形成されたことを示した。これは骨のリモデリング動態を示す蛍光顕微鏡像の結果と一致していた。それらにより SBM を摂取しなかったラットに比べ SBM を摂取したラットの引き抜き強度が高かったと考えられた。

骨の微小構造の評価では、BV/TV および BS/BV, TbTh, Vtr における群間比較より、実験群は対照群と比較して骨体積が増加し、骨表面積が減少し、骨梁幅が大きくなり、骨梁の連続性が向上したことが示され骨梁間隙が減少し密な骨梁構造を呈したことが考え

られた。TbN の群間比較の結果から SBM の経口摂取は SBM が骨梁数の増加ではなく骨梁構造の改善に効果を発揮していると考えられた。

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

(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2件)

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. (査読有)

Improved Bone Micro Architecture Healing Time after Implant Surgery in an Ovariectomized Rat. Takahashi T, Watanabe T, Nakada H, et al. J Hard Tissue Biol. 25. 257-262. 2016. (査読有)

(学会発表)(計3件)

Study on Synthetic Bone Mineral Shorten Implant Treatment in a Rat Model of Osteoporosis. Takehiro Watanabe, Takahiro Takahashi, Hiroshi Nakada, etc. IADR/AADR/CADR GENERAL SESSION & EXHIBITION (SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA, 2017. 3. 25)

サプリメントの摂取が骨粗鬆症モデルラットのインプラント体周囲骨の骨形成に与える影響. 高橋卓裕, 渡辺丈紘, 佐藤博紀, 他. 第46回日本口腔インプラント学会学術

大会(名古屋国際会議場,愛知県,名古屋市,
2016. 9. 18)

骨粗鬆症ラットにおけるインプラント体
周囲骨の微小構造に対するサプリメントの
影響. 渡辺丈紘, 高橋卓裕, 佐藤博紀, 他.
補綴歯科学会第 125 回学術大会(石川県立
音楽堂, 石川県, 金沢市, 2016. 7.10)

骨粗鬆症モデルラットにおいて SBM の経
口摂取が骨形成作用に与える影響. 石渡幸志,
渡辺丈紘, 高橋卓裕, 他. 補綴歯科学会第 125
回学術大会(石川県立音楽堂, 石川県, 金沢
市, 2016. 7.9)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者