

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09624

研究課題名(和文)インプラントの新生骨が短期間で形成可能な生体骨アパタイトコーティング法の基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on living bone apatite coating method that can form new bone of implant in a short period of time

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

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)：本研究は、Synthetic bone mineral (SBM)で表面処理したインプラントをラット大腿骨へ埋入後に形成される新生骨形成と骨質に関する影響を解明することを目的とした。24頭の8週齢のWistarラットはランダムに4群に割り当てた。埋入後、2週間と4週間のデータを比較すると、SBM群の引き抜き強度とBMDは、コントロール群よりも有意に高いことが明らかとなった。BMDカラー画像と組織学的観察は、対照群と比較して、SBM群の新生骨は、より広い幅およびより高いBMDを有することを示した。我々の結果は、早期の骨形成を促進するインプラント表面処理の開発に役立つことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Synthetic bone mineral (SBM)の応用はインプラント治療で治療期間の短縮、治療希望患者の増加、治療不適当とする高齢者や骨粗鬆症患者への応用、インプラント治療により充実した食生活、審美性およびQOLの向上に繋がると考える。そこで本研究はSBMをインプラントへ表面処理(コーティング)することで骨結合を容易に、そして早期な骨形成と骨質向上への有用性を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the post-implantation formation of new bone in the peri-implant region of synthetic bone mineral (SBM)-coated implants in rat femur models and aimed to elucidate the effects of SBM surface treatment on early bone formation and bone tissue quality. Twenty-four 8-week-old Wistar rats were randomly assigned to four experimental groups. After implantation, the following data were collected and compared: pull-out strength, bone mineral density (BMD), BMD color images, and histological characteristics. Comparisons of the two- and four-week data indicated that the pull-out strengths and BMD of the SBM group were significantly higher than those of the control group. BMD color imaging and histological observations indicated that, in comparison with the control group, the new bone formed in the peri-implant region of the SBM group had greater width and higher BMD. Our results will aid the development of implant surface treatments that facilitate early bone formation.

研究分野：アパタイト

キーワード：インプラント 動物実験 Micro-CT 骨密度 表面処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療の成否は、インプラント体埋入後に形成される新生骨がインプラント周囲への結合により骨結合するか否かにより大きな影響を受ける。また、高齢者のインプラント治療または骨粗鬆症患者では十分な海綿骨の支持が得られずに骨密度(bone mineral density: BMD)や骨質の低下が疑われることからインプラント治療の適否を慎重に検討する必要がある。インプラント埋入時に骨幅の不足や骨量不足の際には自家骨移植が臨床的に有効な方法であり、骨増量法のゴールドスタンダードと言われている。しかし、自家骨移植は骨を採取部位への侵襲と採取できる骨量に限界があることが問題となり、種々の生体材料や生体材料をscaffold(細胞の足場)とする再生医療の研究が盛んに行われている。骨再建用の生体材料としては、リン酸三カルシウムやハイドロキシアパタイトが既に臨床応用されている。リン酸三カルシウムは吸収性の生体材料ではあるが、元来生体には存在しない物質で、吸収も不完全であり、時に炎症を惹起する。一方、ハイドロキシアパタイトは優れた骨伝導性を示すが、体内で吸収されずに再生された骨の中に異物として残存するという欠点がある。

2. 研究の目的

LeGeros R.Z.はリン酸カルシウムに生体微量元素の Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} およびFをリン酸カルシウムに配合することで生体の骨と同等な生体骨アパタイト:synthetic bone mineral (SBM)の開発を行ってきた。そのSBMを利用した研究では、SBMをサプリメントとしてOsteopenia、Osteoporosisおよびインプラント埋入の術前投与に関連する実験)で全身的な骨質改善に良好な成果を報告している。またSBMの摂取は全身での骨形成を促進させることでインプラント治療期間の短縮に有効である可能性が示唆された。しかしながら、SBMの応用はサプリメントとして全身での骨代謝に有用とのデータはあるが、局所への応用により生体反応を明らかにした報告はこれまでにない。そこで本研究はSBMを表面処理(コーティング)したインプラントを動物実験として大腿骨内へ埋入することで、インプラント周囲に形成される新生骨に着目し、SBMの表面処理が早期な骨形成や骨質向上への有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

研究プロトコルは、日本大学松戸歯学部動物実験倫理委員会(AP19MAS002-2)により承認された。24頭の8週齢のWistarラットが研究に用いた。2頭のラットはランダムに2つのグループに分けられた。ラットは個別に飼育され、餌と水は自由に与えられ、温度と相対湿度はそれぞれ $20^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ と $50\% \pm 1\%$ に維持された。

(2) インプラント表面処理

インプラントはTi-6%Al-4%V合金製で、サイズは直径1.2mm、高さ4.0mmの円柱とし、上端から0.5mmの位置に引張試験用の通し穴を作成した24本を用いた。その24本のインプラントはWatanabeとSato[®]らの方法に準じて直径110 μ mのブラスト粉末によるブラスト処理と超音波洗浄を行った12本をコントロール群で用い、残りの12本はSBMコーティング処理を施したインプラントを実験群で用いた。インプラントへのSBMコーティング法は100mlの0.3% H_3PO_4 に0.4gのSBM粉末を混和後、沈殿した上澄液を採取した。インプラントはシャーレに直立させ、その中に上澄液を浸漬させた状態で、75 $^{\circ}C$ 恒温槽の中で24時間放置した。すべてのラットは、全身麻酔下で、9週齢で大腿骨にインプラント埋入手術を行った。手術では直径1.2mmのドリルを使用して、大腿骨に穴を開けた。次に、骨の加熱を避けるために生理食塩水で洗浄しながら、埋

入した。埋入2週と4週後には各群でそれぞれ6頭の中からランダムに1頭を組織観察用とし、残りの5頭は引き抜き強度とBMDカラーイメージング用に割り当て、炭酸ガスにて安楽死させた。

(3) 引き抜き強度

インプラント本体と骨の接着強度を評価するために、引き抜き試験を実施した。インプラント上部とロードセルを50mm離れた。クロスヘッド速度1.0mm/minの引き抜き試験には、インストロン型万能試験機を使用した。

(4) BMDおよびBMDカラーイメージング

インプラント周囲新生骨の骨密度を定量化および視覚化するために、BMDおよびBMDカラーイメージングの測定を行った。引き抜き試験後、大腿骨は、R_mCT2を用いてマイクロコンピュータ断層撮影を行った。測定後にはR_mCT画像解析ソフトウェアを使用して、スキャンしたデータを使用して3次元モデルを生成した。

(5) 組織学的顕微鏡観察

ダイヤモンドディスクを使用して、長軸の中心で大腿骨を切断した。骨組織を70~80%エタノール系列で脱水し、続いて100%アセトンで脱水し、メタクリル酸メチルアクリル樹脂に包埋し、硬化させた。ダイヤモンドディスクを使用してインプラントの長軸に垂直な30~40μmのセクションに切断され、最終的な厚さ30μmに研磨され、Villanueva Goldner染色で染色され、骨幹領域から非脱灰標本とし、インプラント周囲の新生骨形成を顕微鏡で観察した。

(6) 統計分析

結果のすべての値は、平均±標準偏差として示した。Student-t検定は、体重、引き抜き強度およびBMD測定の結果に使用され、対照群とSBM群(バージョン22.0、SPSS、シカゴ、イリノイ州、米国)の間に差は存在しないという帰無仮説とした。

4. 研究成果

(1) 引き抜き強度

引き抜き強度の結果をFig. 1に示す。インプラント埋入2週後のコントロール群は 1.8 ± 0.4 NでSBM群は 18.6 ± 2.7 NでSBM群が有意に高い結果($P < 0.01$)となった。インプラント埋入4週後のコントロール群は 4.4 ± 1.3 NでSBM群は 24.4 ± 5.1 NでSBM群が有意に高い結果 $P < 0.01$ となった。群内比較において、コントロール群はインプラント埋入2週後と比較して4週後で有意に高い結果($P < 0.05$)となった。またSBM群はインプラント埋入2週後と比較して4週後で有意に高い結果($P < 0.05$)となった。

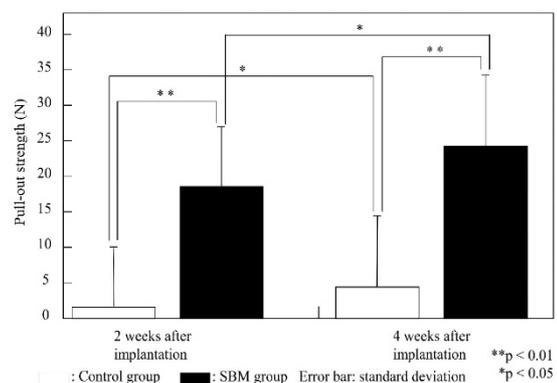


Fig. 1 Result of between- and within-group comparisons of pull-out strength.

(2) 骨密度

BMDの結果を Fig.2 に示す。埋入 2 週後における SBM 群の BMD は $770.0 \pm 49.7 \text{ mg/cm}^3$ であり、対照群の BMD は $437.8 \pm 71.0 \text{ mg/cm}^3$ ；群間比較: $P < 0.01$ 。埋入 4 週後における SBM 群の BMD は $957.9 \pm 40.0 \text{ mg/cm}^3$ であり、対照群の約 2.0 倍となった ($489.1 \pm 37.9 \text{ mg/cm}^3$ ；群間比較、 $P < 0.01$)。SBM 群は埋入 2 週後から 4 週後で統計的に有意な BMD の増加を示した (群間比較、 $P < 0.05$)。

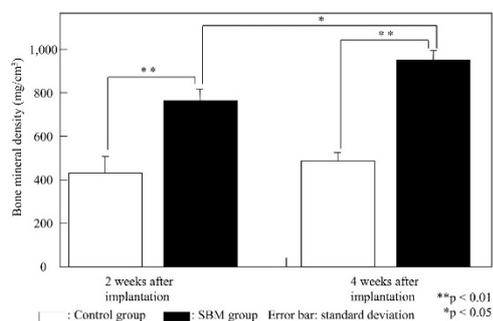


Fig. 2 Result of between- and within-group comparisons of bone mineral density.

(3) BMD カラーイメージング

コントロール群の埋入 2 週後でインプラント周囲に形成された新生骨の BMD 濃度を 6 色に分けた結果を Fig.3(a) と埋入 4 週後を Fig.3(b) に示す。また SBM 群で埋入 2 週後を Fig. 3(c) と埋入 4 週後を Fig. 3(d) に示す。インプラント埋入 2 週後のコントロール群 (Fig.3(a)) はおおよそ青色で低い BMD の新生骨でインプラントを覆い、一部皮質骨に近い部分の新生骨 (Fig.3(a) で左端) は赤色から緑色に示す BMD を示したが、新生骨は薄い骨幅であった。インプラント埋入 4 週後のコントロール群 (Fig. 3(b)) は一部に赤、黄、緑、および青色を示す BMD を示し、2 週に比べて BMD の濃度は若干高かったが、新生骨の幅はほぼ同様であった。インプラント埋入 2 週後の SBM 群 (Fig.3(c)) はインプラント周囲をおおよそ緑色から黄色で中程度の BMD の新生骨で覆われ、一部はオレンジ色から赤色に示す BMD を示した。新生骨はインプラント周囲から骨髓部に広がるやや高い BMD の新生骨を観察した。インプラント埋入 4 週後の SBM 群 (Fig.3(d)) はおおよそ黄色からオレンジ色でやや高い BMD の新生骨で覆われ、一部は赤色に示す BMD を示し、埋入後 2 週の SBM 群 (Fig.3(c)) と比べて color scale の高い BMD であった。新生骨はインプラント周囲から骨髓部全体に広がる高い BMD の新生骨を観察した。

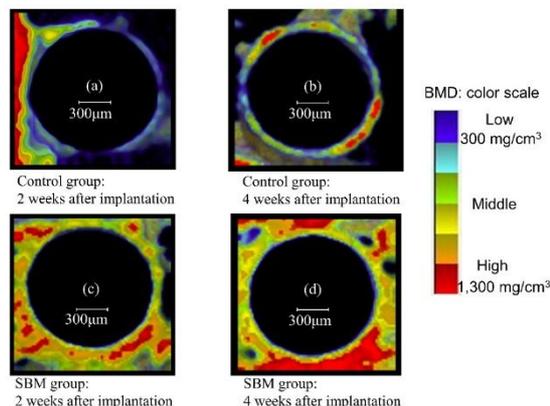


Fig.3 Results of BMD color imaging. Control group after (a) two and (b) four weeks; SBM group after (c) two and (d) four weeks. Blue/light blue, green/yellow, and orange/red represent low, medium, and high BMD values, respectively.

(4) 組織学的顕微鏡観察

Fig. 4 (b) ではインプラント周囲に骨髓を内張りするように赤色に染色される類骨 (矢印) の形成がみられた。コントロール群で埋入 4 週後の弱拡大像を Fig. 4 (c) に、強拡大像を Fig. 4 (d) に示す。Fig. 4 (c) ではインプラント周囲の石灰化様の新生骨の形成とインプラント上方に皮質骨と繋がる緑色に染色された新生骨の形成が Fig. 4 (a) と比較してより強くみられた。Fig. 4 (d) ではインプラント周囲の骨髓内の類骨 (矢印) の形成がコントロール群の 2 週 (Fig. 4 (b)) と比較してより強くみられた。SBM 群でインプラント埋入 2 週後の弱拡大像を Fig. 5 (a) に、強拡大像を Fig. 5 (b) に示す。Fig. 5 (a) ではインプラント周囲の石灰化骨の形成とインプラント上方に接する皮質骨内の骨髓の形成がコントロール群 (Fig. 4 (a)) と比較してより強くみられ、

インプラントのほぼ全周を類骨と新生骨で取り囲んでいた。Fig. 5 (b)ではインプラント周囲の骨髓内の類骨(矢印)の形成がコントロール群(Fig. 4 (b))と比較してより強くみられた。SBM群でインプラント埋入4週後の弱拡大像をFig. 5 (c)に、強拡大像をFig. 5 (d)に示す。Fig. 5 (c)ではインプラント周囲の皮質骨側からインプラントの3/5位の壁面に沿って緑色に染色される石灰化骨の形成がみられ、4週のコントロール群(Fig. 4 (c))と比較してインプラントが皮質骨に接する部分の両側の石灰化骨形成がより強く観察された。Fig. 5 (d)では緑色に染色される石灰化骨の中に赤色に染色される類骨(矢印)の形成が観察された。

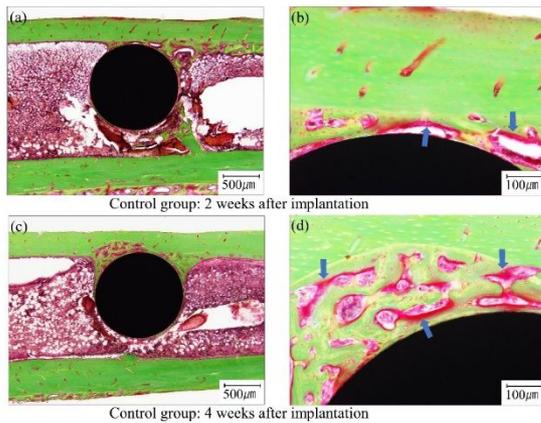


Fig.4 Villanueva -Goldner staining of femur cross-section of specimen in control group after (a, b) two and (c, d) four weeks; (b) and (d) are magnified images of the area around the implant in (a) and (c), respectively. The arrows indicate osteoid formation within the bone marrow. The black circular area in the images is the implant.

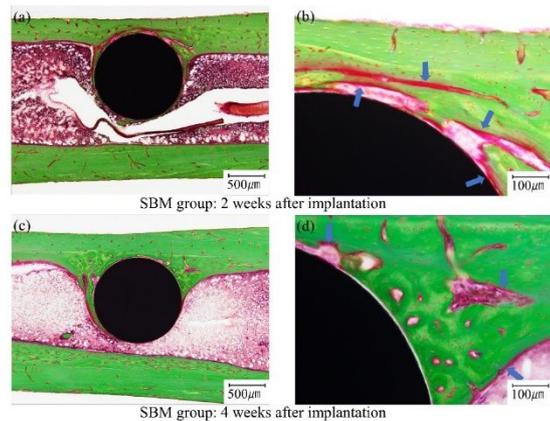


Fig.5 Result of Villanueva Goldner stain observation image (a) of a cross section of the femur in the SBM group at 2 weeks after implantation. (b) Enlarged image around the implant. Villanueva Goldner stain observation image (c) of a cross section of the femur in the SBM group at 4 weeks after implantation. (d) Enlarged image around the implant.

<引用文献>

Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, et.al.

Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent* 3: 23, 2017 doi: 10.1186/s40729-017-0084-4

Uchida A, Araki N, Shinto Y, et. al. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg Br* 72: 298-302, 1990

LeGeros RZ, LeGeros J and Mijares, DQ. Calcium phosphate-based biomaterials incorporating magnesium, zinc, fluoride and carbonate. US Patent US9199005B2, 2008

Watanabe T, Nakada H, Takahashi T, et. al. Potential for acceleration of bone formation after implant surgery by using a dietary supplement: an animal study. *J Oral Rehabil* 42: 447-453, 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nakada Hiroshi, Watanabe Takehiro, Takahashi Takahiro, Sato Hiroki, Isaji Daisuke, Sato Kanami, Kimoto Suguru, Mijares Dindo Q., Zhang Yu, Kawai Yasuhiko | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Coating Dental Implants with Synthetic Bone Mineral for Early New Bone Formation in Vivo. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology | 6. 最初と最後の頁 339 ~ 346 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.30.339 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kono Tetsuro, Sakae Toshiro, Nakada Hiroshi, Kaneda Takashi, Okada Hiroyuki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Confusion between Carbonate Apatite and Biological Apatite (Carbonated Hydroxyapatite) in Bone and Teeth | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Minerals | 6. 最初と最後の頁 170 ~ 170 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/min12020170 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|--|--------------------------------|----|
| 研究協力者 | 佐藤 佳奈美 (SATO Kanami) (00801177) | 日本大学・松戸歯学部・専修医 (32665) | |
| 研究協力者 | 渡邊 丈紘 (WATANABE Takehiro) (80759986) | 日本大学・松戸歯学部・兼任講師 (32665) | |

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 |
|-------|---|--|----|
| 研究協力者 | 高橋 卓裕 (TAKAHASHI Takahiro) (00793374) | 日本大学・松戸歯学部・兼任講師 (32665) | |
| 研究協力者 | 佐藤 博紀 (SATO Hiroki) (70843978) | 日本大学・松戸歯学部・兼任講師 (32665) | |
| 研究協力者 | 砂治 大介 (ISAJI Daisuke) | 日本大学・松戸歯学部・兼任講師 (32665) | |

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 | | |
|---------|--|----------------------------|--|
| 米国 | New York University College of Dentistry | University of Pennsylvania | |