

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390428

研究課題名(和文) 骨代謝活性と骨内応力分布との空間対応によるインプラント周囲骨のメカノバイオロジー

研究課題名(英文) Mechanobiology in peri-implant bone evaluated by the bone metabolism and stress distribution

研究代表者

横山 政宣 (Yokoyama, Masayoshi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：20396500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：バイオメカニクスと骨メカノバイオロジーの観点から、歯科インプラント臨床の科学的基盤を確立することを目的として、荷重下のインプラント周囲骨における骨代謝動態に関して、1. 有限要素解析(FEA)によるインプラント周囲骨の応力分布、2. 高解像度NaF-PETによるインプラント周囲骨の骨代謝活性の両者を空間的に対応付け、その関連について分析した。

さらに、低強度・高周波の振動刺激のオッセオインテグレーションおよび周囲骨への有効性を詳細に検討し、また骨粗鬆症モデルにて振動刺激と薬剤との併用についても検討を加えた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine the influence of mechanical loading on the dynamic changes of bone metabolism around dental implants using a super-high resolution semiconductor sodium 18F-fluoride (Na18F)-PET and FEM analysis. CT scanning was also performed in order to determine the anatomical orientation in the PET images, the images were superposed onto CT images. The results suggests the loading effects in early stage on peri-implant bone formation. Furthermore we evaluated the effect of low-magnitude and high-frequency (LMHF) loading, applied by means of whole-body vibration (WBV), on peri-implant bone healing and implant osseointegration in ovariectomized rats treated with alendronate (Ale) and parathyroid hormone (PTH) [1-34]. The results showed that combined treatment of WBV with PTH enhances peri-implant bone healing and implant osseointegration most.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インプラント 骨代謝 PET オッセオインテグレーション 高周波振動 メカノバイオロジー

### 1. 研究開始当初の背景

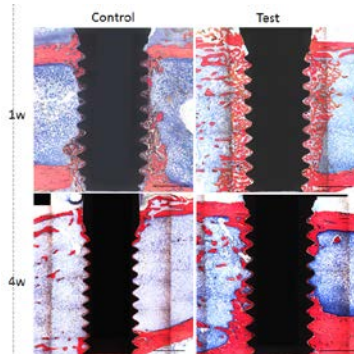
歯科インプラント治療の成功への鍵は、感染制御ともにインプラント体に加わる機能時負荷を制御し、生体機能との調和を保つことにある。すなわちインプラント治療を予知性の高いものとするためには、適正な力学的負荷条件の解明が必要不可欠であり、負荷下のインプラント周囲骨のメカノバイオロジカルな反応の把握が極めて重要となる。

骨形態と力学的負荷の関連性については、19世紀から Wolff の法則として「骨格の形状や内部構造は、骨格に伝達される荷重や歪みの影響を強く受けて機能的に適応している」ということが知られている。ヒトが宇宙空間に数週間滞在したり、入院等で長期的に臥床を強いられたりすると、骨量の著しい低下がおきる、あるいは跳躍や瞬間的な体重移動を必要とするスポーツを行っている、骨量の増加効果あることは、これを如実に表している。2004年には Frost が、骨には mechanoreceptor が存在し、力学的負荷が閾値に達すると、骨形成と骨吸収を促進または抑制させるという mechanostat theory を提唱した。

歯科インプラントにおいても、過度の負荷がインプラント周囲骨の吸収を導いた報告、反対に適切な荷重が周囲骨量や骨質に positive な影響を及ぼすという報告があり、即時荷重・早期荷重を含めて機能時のインプラント体に加わる機能圧が周囲支持骨に大きく影響することが報告されている。

つまり生体力学的因子がインプラント治療の予後に大きく関わっているといえる。また骨粗鬆症や糖尿病等などの不利なケースでは、これらの因子のより細心の配慮が必要となる。

一方、Wolff の法則や Mechanostat theory 等のいわゆる低周波負荷を対象とした概念に対し、Rubin らは極めて低強度の高周波振動(LMHF loading)が osteogenic な効果を示すという画期的な現象を報告した。その後、数々の研究によってその妥当性・信頼性が向上し、現在では骨粗鬆症患者への臨床応用も一部なされ、整形外科領域では注目を集めている。申請者らは、この現象の歯科インプラントへ適用に着目し、2008年よりルーベンカソリック大学(ベルギー)との共同研究によりラット脛骨モデルを用いた基礎研究を行った(下図)。



本研究ではこの全く機序の異なる高周波振動刺激の骨形成促進反応をも含めて研究対象とし、一歩先をいったプロトコル確立を目指す。

共同研究者である東北大学大学院工学研究科量子エネルギー工学グループは、世界で初めて 1mm 以下の高空間分解能を持つ実用型動物用半導体ポジトロンエミッション断層撮像装置(fine PET)を開発した。この PET カメラは、検出器に CdTe 半導体を用いており、ガンマ線に対する吸収効率が高く、ガンマ線エネルギーを直接電気信号に変換することで高い検出効率を実現することができる。これによりマウス・ラットのような小型動物の詳細な解析が可能となった。

申請者らは、ラット脛骨にインプラントを埋入した際の骨代謝動態を撮像し、明瞭な画像を得ることに成功している(図 4)。

また、池田(東北大学大学院工学研究科)らとの共同研究により、インプラント周囲骨の生体内応力動態を、CT スキャンによる生体形状データと上記生体内測定データに基づいて有限要素(FEA)解析することを可能にした。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ラット脛骨にインプラント埋入し、各種の荷重負荷を加えた際の FEA によるストレス発現様相の分析および高解像度 NaF-PET による生体内骨代謝反応の分析から、メカニカルストレスと骨代謝との空間的対応を詳細に検討することで、インプラント周囲骨の骨代謝反応とメカニカルストレスとの関連の解明を目的とした。また、低強度の高周波振動(LMHF loading)のインプラント周囲骨の osteogenic な効果については詳細に検討を加えた。

### 3. 研究の方法

**研究 1** 骨粗鬆症モデルでの LMHF loading の局所応用の骨形成活性効果と最適刺激条件の検索

11 週齢 Wister 雌性ラットに卵巣摘出術を施行した。16 週齢にて、両側脛骨にインプラントを埋入する。イソフルラン吸入麻酔下にて、脛骨骨幹端基部を剖出する。サージカルドリルを用いて低速回転・生理食塩水注水下にて、脛骨の長軸に対して垂直な埋入窩洞を形成し、カスタムメイドの純チタン製インプラント(直径 2mm×全長 13mm)を埋入した(図 1)。埋入後は、インプラント上部が露出するよう縫合した。

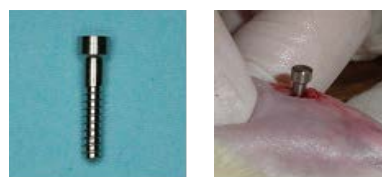


Fig1. A custom made implant (left) and implantation (right)

翌日より投薬を再開，各群をさらに2群に分け，1群には振動刺激装置 (Big Wave G-Master, 旭製作所, 東京, 日本) にて加速度 0.5G, 周波数 50Hz, 刺激時間 15分/日, 週5日の条件で全身的な低強度高周波振動刺激 (WBV) を付与した (図2)。



Fig2. A vibration device (left) and WBV stimulus (right)

評価は，インプラント治療期間 1 週および 4 週にて，ラットを屠殺後，両側の脛骨をインプラント体と一塊にして摘出した。

#### (1) 除去トルク試験による力学的評価

摘出した検体について，トルクゲージ本体 (ATG1.5CN・ATG12CN, TOHNICHI Mfg. Co.) を用いて除去トルク試験を行う。インプラント長軸が同一軸上になるよう嵌合させ，インプラント長軸に対する水平回転荷重を手圧によって一定の速度で回転力を増大し，インプラントが水平回転を起こすまでの最大回転力を計測した (図3)。



Fig3. Removable torque test

(2)  $\mu$ CT 撮像による骨構造の三次元的評価  
摘出した検体について， $\mu$ CT 撮影装置 (ScanXmate-D225RSS270, Comscantecno Co.) を用いて  $\mu$ CT 画像撮影を行った。撮影した画像は画像解析ソフト (TRI/3D-BON, RATOC Systems, Inc.) にて解析し，相対グレー値，骨塩量計測，3D 海綿骨形態計測指標を算出，各パラメータについて評価した (図4)。

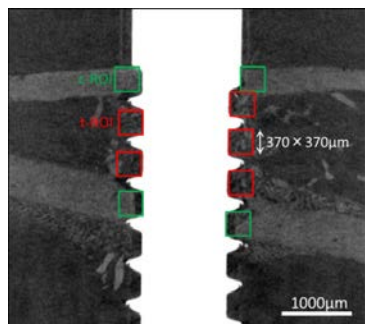


Fig4. Micro-CT analysis

#### (3) 組織・組織形態学的評価

除去トルク試験終了後の検体にて，脱灰標本を作製，H-E 染色，von Kossa 染色，TRAP 染

色，ALP 染色を行い，インプラント埋入窩周囲の骨芽細胞，破骨細胞，およびカルシウム塩の分布状況を把握し，骨のリモデリング動態の評価を行った。一方， $\mu$ CT 撮影終了後の検体にて，非脱灰標本を作製，Villanueva Goldner 染色を行い，骨の形態組織パラメータ (骨-インプラント接触率 (BIC)，インプラント周囲骨全体・皮質骨・海綿骨の骨密度 (BF)) を評価した。

どちらの標本も，光学顕微鏡 (Leica Laborlux, Leica Microsystems) にて観察，および専用カメラにてスキャンし画像解析ソフト (Axiovision 4.0, Zeiss) にて解析した。

## 研究 2

(1) 高解像度 NaF-PET によるインプラント周囲骨の骨代謝動態の定量的解析  
Wistar 雄性ラット 20 週齢を被験動物として用いた。イソフルラン吸入麻酔下にて，ラットの両側脛骨に， $\phi$  1.5mm の CP チタン製インプラントを各々 1 本ずつ，脛骨の長軸に対して垂直かつインプラント体の先端が海綿骨内にとどまる深さに埋入した。縫合は，創部の組織増殖によりインプラントの頭部が埋没しないよう，インプラント体を囲むように垂直マットレス縫合を行った。すでに先の実験でオッセオインテグレーションの獲得に必要なことが判明している 4 週間の期間をヒーリングステージとして設定し，その後，イソフルラン吸入麻酔下で，咀嚼力を想定した間歇的な荷重の入力を 1 回/日，10 分間/回行う。入力方向は垂直とし，入力する力の大きさは 1N, 10N, 50N とした。

骨代謝活性の経時的変化を把握するため， $^{18}\text{F}$ -74MBq を尾静脈より投与し，投与 1 時間後に Fine PET を用いてイソフルラン吸入麻酔下にて撮像を行った (図5)。

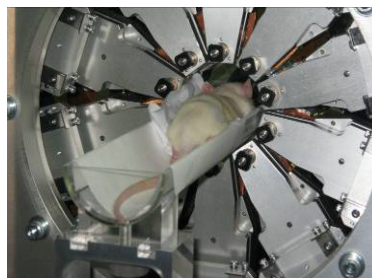


図5. ラットの PET 撮像の様子

(2) マイクロ CT によるインプラント周囲骨骨密度測定および骨梁構造の形態解析

Fine PET 撮像日と同日に，小動物用 CT (Clairvivo CT) (島津製作所) にて CT 撮像を行う。CT 画像では，インプラント周囲骨の骨密度測定，骨梁構造の観察，体積測定などを行った (図6)。

PET/CT 融合像を作成し，インプラントの位置を正確に同定した上で，インプラント体側面や基底面といったより細かい領域に着目した分析を行いインプラントへの荷重負荷によって生じる骨内応力と骨代謝活性の関連について検討した。

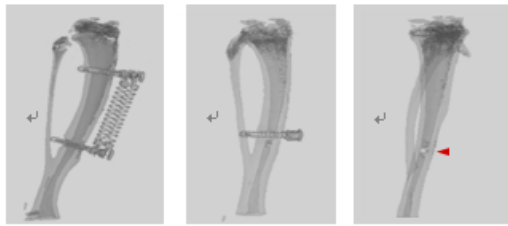


Fig.1-a: IL Fig.1-b: NL Fig.1-c: BD<sup>+</sup>  
Fig6. CT images

(3) 組織標本によるインプラント周囲骨の組織学的評価

インプラント体を含めた非脱灰薄切片を作成した。本実験系では、低温重合レジン (Heraeus KULZER 社製: Technovit8100) を用いて組織切片を作成した。染色は Villanueva Goldner 染色を用い、また画像解析ソフト (Axiovision 4.0, Zeiss) にて骨の形態組織パラメータ (骨-インプラント接触率, 骨密度等) を算出した。

統計処理には、統計解析ソフト MLwiN version 2.26 (Centre for Multilevel Modelling, University of Bristol) を用い、multilevel multiple linear models 法を用いて継時的な対応のあるデータ解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 研究 1

(1) 除去トルク試験による力学的評価

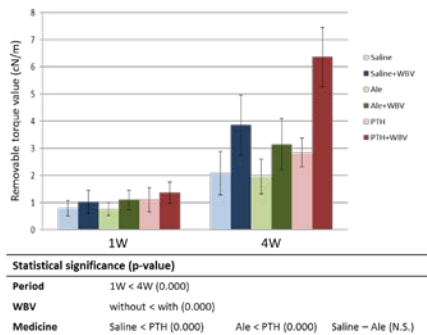


図 7: 除去トルク値評価

治癒期間については、インプラント治癒期間 1 週に比べ、4 週で除去トルク値が有意に高くなった (ANOVA;  $p < 0.01$ )。振動刺激については、有意にその効果が認められた (ANOVA;  $p < 0.01$ )。投与薬剤については、PTH を投与した場合群は、生食 Saline および Ale 投与群と比べ、有意に高い値を示した (Tukey's HSD test;  $p < 0.01$ )。一方、生食 Saline およびアレンドロネート Ale 群投与群の間には、有意な差は認められなかった。また、PTH+WBV 群群については、1 週、4 週において平均値は最も高い値を示し、特に 4 週においては、生食 Saline のみ (Saline 群) と比較すると約 3 倍の値を示した。

(2)  $\mu$  CT 形態評価: 相対グレイ値による評価

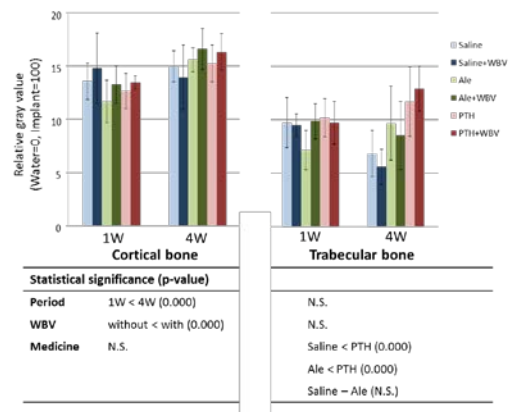
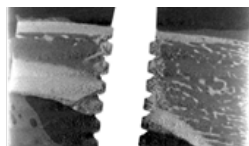


Fig8. Relative gray value in micro-CT analysis

マイクロ CT 撮像の 1 例を示す。相対グレイ値は、皮質骨において 1 週に比較して 4 週、また WBV 付与群が付与しない群に比べ有意に高い値を示した。投与薬剤の違いによる差は認められなかった。一方、海綿骨では PTH 投与群は Saline 群, Ale 群と比べ有意に高い値を示した。治癒期間、振動刺激の有無による有意差は認められなかった (図 8)。

(3) 組織・組織形態学的評価

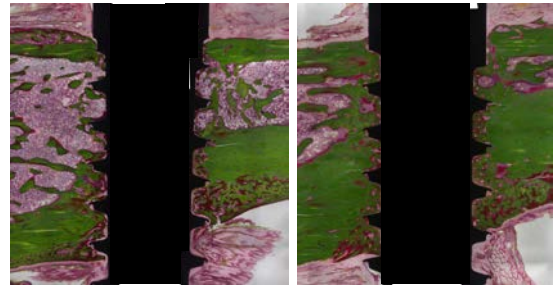


Fig9. 組織像 (ビラネバゴールドナー染色) 治癒期間 4 週 Control (Right), Test (Left)

組織像の一例を示す (図 9)。インプラント周囲骨は振動刺激群において高い骨形成反応が観察された。

##### 研究 2

(1) NaF-PET によるインプラント周囲骨の骨代謝動態の定量的解析

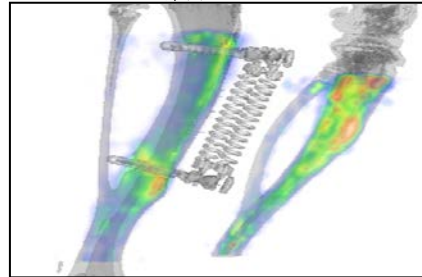


図 10: PET および CT 画像の融合イメージの例

インプラント埋入後、1 週後に骨代謝活性のピークが認められた。また loading 群は、no loading および bone defect 群と比較し、早

期に骨代謝活性の現象が観察された(図 11)。

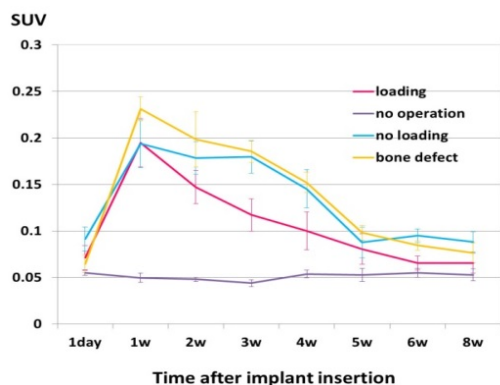
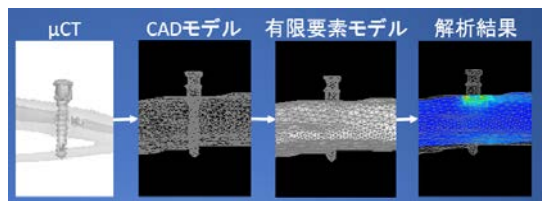


図 11 インプラント周囲骨代謝活性の継時的な変化

(2) マイクロ CT によるインプラント周囲骨骨密度測定および骨梁構造の形態解析(図 12)



μCT データを用い、3次元モデルを作成インプラント周囲骨の形態学的な解析および FEM モデルにて骨内応力動態の観察を行った。

(3) 組織標本によるインプラント周囲骨の組織形態学的解析(図 13)



ピラヌエバゴールドナー染色を用いたインプラントおよび周囲骨の組織サンプルの 1 例を示す。インプラント周囲に新生骨の形成が認められた。

CTR 群を除く 3 テスト群ともに負荷開始後 7 日目まで SUV が上昇し、28 日目までは有意に CTR よりも高い活性を示した。その後は徐々に下降し平衡に達した。3 テスト群の中では IL 群が NL 群や BD 群よりも有意に早く CTR 群の代謝活性と同じレベルに回帰した。これらの結果は従来の研究で用いた Tc99m-MDP 骨シンチグラフィで見られたものとは異なる結果であった。

組織・組織形態学的評価においては有意な違

いは観察されなかった。

NaF-PET を導入したことにより、3次元解析が可能となっただけでなく、飛躍的に敏感に捕捉された骨代謝活性の高精細な描出が観察された。PET で得られた骨代謝活性の動態と、骨シンチグラフィで観察された動態との違いはトレーサーの骨付着機序の違いに起因すると推察され、この PET と骨シンチグラフィでの動態の比較により、即時荷重は新生骨の形成を妨げるものではなく、かつ新生骨の石灰化を促進する可能性が示唆された。これらのことは、インプラント即時荷重プロトコル策定、インプラント周囲骨の骨代謝反応とメカニカルストレスとの関連の解明の一助となると思われた。

また、研究 1 の結果から骨粗鬆症を含め様々な条件下においても、適切な高周波振動刺激を積極的に用いることで、安全で効率よいオッセオインテグレーションの獲得の可能性が示唆された。

## 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 3 件)

(1) Ogawa T, Vandamme K, Zhang X, Naert I, Possemiers T, Chaudhari A, Sasaki K, Duyck J. Stimulation of titanium implant osseointegration through high frequency vibration loading is enhanced when applied at high acceleration. *Calcif Tissue Int.* 2014; 95(5): 467-75.

doi: 10.1007/s00223-014-9896-x. (査読有)

(2) Yamamoto M, Ogawa T, Yokoyama M, Koyama S, Sasaki K.

Influence of immediate and early loading on bone metabolic activity around dental implants in rat tibiae. (\$ : Shared first authorship). *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(9): 1084-90.

doi: 10.1111/clar.12218. (査読有)

(3) Shigemitsu R, Ogawa T, Matsumoto T, Yoda N, Gunji Y, Yamakawa Y, Ikeda K, Sasaki K.

Stress distribution in the peri-implant bone with splinted and non-splinted implants by in vivo loading data-based finite element analysis. *Odontology.* 2013; 101: 222-6.

doi: 10.1007/s10266-012-0077-y. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Shibamoto A, Ogawa T, Duyck J, Naert I, Sasaki K. Effect of whole-body vibration and parathyroid hormone on implant osseointegration. 93rd International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Boston, USA. 2015/03/11-14.

(2) Ogawa T, Shibamoto A, Zhang X, Naert I, Sasaki K, Duyck J. Effect of low-magnitude and high-frequency loading on peri-implant bone healing and osseointegration in rats. China-Japan-Korea Dental Science Symposium 2014, Dalian, China. 2014/11/8-9.

(3) Shigemitsu R, Mito T, Yoda N, Sasaki K. Evaluation of the influences of implant alignment to peri-implant stress. 5th. Advanced Digital Technologies in head and neck reconstruction: (ADT), Beijing, China. 2014/09/6-8.

(4) Yutaka Matsuo, Miou Yamamoto, Toru Ogawa, Masayoshi Yokoyama, Keiichi Sasaki, [<sup>18</sup>F]NaF-PET Image Analyses Peri-implant Bone Metabolism Elicited by Loading, 7<sup>th</sup> East Asian Consortium on Biomedical Engineering, Taipei, Taiwan. 2013/11/18-20.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山政宣 (MASAYOSHI YOKOYAMA)  
東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師  
研究者番号：20396500

### (2) 研究分担者

小川 徹 (OGAWA TORU)  
東北大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号：50372321

佐々木 啓一 (SASAKI KEIICHI)  
東北大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：30178644

船木 善仁 (HUNAKI YOSHIHITO)  
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・助教  
研究者番号：00508921

池田 清宏 (IKEDA KIYOHITO)  
東北大学・工学(系)研究科・教授  
研究者番号：50168126

山川 優樹 (YAMAKAWA YUKI)  
東北大学・工学(系)研究科・准教授  
研究者番号：80324010