

Synthetic bone mineral の摂取がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

渡辺 丈紘

(指導： 河相 安彦 教授)

1. Abstract
2. 緒言
3. 材料と方法
 3. 1. 健常ラットにおける SBM の経口摂取が骨形成作用に与える影響（研究 1）
 3. 1. 1. 飼料作製
 3. 1. 2. 実験動物及び試料の作製
 3. 1. 3. 測定項目
 - 1) 骨の曲げ強度
 - 2) BMD および BMD color imaging
 3. 1. 4. 解析方法
 3. 2. 健常ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響（研究 2）
 3. 2. 1. 飼料作製
 3. 2. 2. 実験動物及び試料の作製
 3. 2. 3. 測定項目
 - 1) 引っ張り試験
 - 2) BMD および BMD color imaging
 - 3) 蛍光顕微鏡観察
 - 4) 体重測定
 3. 2. 7. 統計解析
4. 結果
 4. 1. 健常ラットにおける SBM 経口摂取が骨形成作用に与える影響（研究 1）
 4. 1. 1. 骨の曲げ強度
 4. 1. 2. BMD
 4. 1. 3. BMD color imaging
 4. 2. 健常ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響（研究 2）
 4. 2. 1. 引っ張り試験
 4. 2. 2. BMD
 4. 2. 3. BMD color imaging
 4. 2. 3. 蛍光顕微鏡観察
 4. 2. 4. 体重測定
5. 考察
6. 結論
7. 参考文献

1. Abstract

Background

Oral implant treatment is an effective modality to restore loss of esthetic and masticatory functions. However, healing after implant surgery takes at least 3 to 6 months. This prolonged healing period poses several difficulties for individuals with a large edentulous area and decreases their quality of life. Consequently, shortening the healing period and accelerating final prosthesis placement after surgery is very clinically important. We speculate peri-implant bone may be improved by systematic approaches such as use of osteoporosis supplement promoting bone metabolism.

As a first step, an animal pilot study was conducted to confirm whether intake of a supplement developed for osteoporosis, synthetic bone mineral (SBM), is effective in bone formation. As a second step, an animal pilot study was conducted to confirm whether intake of SBM is effective in accelerating peri-implant bone formation as part of the healing process after implantation.

Objective

Research 1: To confirm whether intake of SBM is effective in bone formation.

Research 2: To confirm whether intake of SBM is effective in bone formation after implantation.

Material and Methods

Research 1: Twelve 20 week old female Wistar rats were randomly assigned to receive a standardized control group (n=6) or experimental group (n=6).

After eight weeks, the rats were sacrificed by CO₂ inhalation, and bone mineral density (BMD) and bone flexure strength between of femur were compared between the groups at 28 weeks old, and were analyzed by Mann–Whitney U test.

Research 2: Twenty-four 5-week-old female Wistar rats were randomly assigned to receive a standardized control group (n=12) or experimental group (n=12). The rats had implant surgery at 8 weeks of age under general anesthesia. The main outcome were bone mineral density (BMD) and pull-out strength in the implant and femur, which were compared between the groups at 2 and 4 weeks after implantation, and were analyzed by using the Mann–Whitney U test.

Results

Research 1: BMD was significantly higher for the experimental group at compared to the control group. Bone flexure strength was also significantly higher with control group.

Research 2: BMD was significantly higher for the experimental group at 2 and 4 weeks after implantation compared to the control group. Pull-out strength was significantly higher with experimental group at 2 and 4 weeks after implantation compared to the control group.

Conclusion

This study indicates that SBM could be effective in bone formation and bone formation of peri-implant bone. This suggested that SBM were shorten the healing period after implantation.

2. 緒言

口腔インプラント治療は歯の喪失に起因する審美不全や咀嚼障害の改善に対して有効な治療方法である。しかしながら、インプラント体と骨との確実なオッセオインテグレーションを得るためには3から6か月に及ぶ長期の治療期間が必要となる¹⁾。このため広範囲な歯牙欠損による咀嚼障害を呈している患者のQOLを著しく阻害する。高本ら²⁾の報告ではインプラント治療に関するアンケート調査から約80%の患者がインプラント治療の治療期間は長いと回答している。従ってインプラント体埋入後、最終補綴装置の装着までの治療期間を短縮することは临床上重要な課題である。

インプラント体埋入後の治療期間短縮のため、様々な研究が行われている。治療方法の観点から埋入後の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適応対象でこの治療法を受けられる患者は少ない^{3, 4)}。他のアプローチとしてインプラント体の表面形状は細胞動態、細胞の表現性質だけでなくタンパク質の吸着や細胞付着現象にまで影響を及ぼすことから表面処理方法に焦点があてられてきた。Ogawaら^{5, 6)}はインプラント体表面のエッジングに着目し、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方法を考案している。また振動刺激を与え、インプラント体と周囲の骨組織の治療を促進させオッセオインテグレーション獲得までの期間を短縮させる試みも行われている⁷⁾。しかしながらこれまでの報告ではサプリメントおよび内服薬によるインプラント体表面と骨とのオッセオインテグレーションを早期獲得させ治療期間の短縮をさせることを目的とした報告は行われていない。

本研究では骨粗鬆症サプリメント^{8, 9)}がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響について着目した。

LeGerosら¹⁰⁾は骨粗鬆症の治療および予防のためにリン酸カルシウムにマグネシウム(Mg)、亜鉛(Zn)、フッ素(F)および炭酸塩(CO₂)を組み込んだ骨形成の促進および骨吸収の抑制をさせるSynthetic bone mineral(以下;SBM)を開発した。SBMは骨形成と骨吸収において重要な役割をはたしているMg, ZnおよびFを含んでいる¹¹⁻¹⁴⁾。Mgはサイトカインの増加を抑制させ破骨細胞数の増加を抑制させる¹⁵⁾。Znはカタペシンおよび炭酸脱水酵素のmRNAの発現を減少させ破骨細胞の活動を阻害させる¹²⁾。Fは総コラーゲン含有量及びALP活性を増加させることにより骨芽細胞の分化を促進させる^{13, 14)}。Mijaresら¹⁶⁾はSBMの効果をZnおよびFによる個々の観点から説明することで、骨形成や骨吸収などの骨細胞活動に関する併用効果を説明することができると述べている。従ってSBMをサプリメントとして経口摂取することによりインプラント体周囲新生骨の骨形成を促進させインプラント治療期間の短縮に利用できると考えられる。

そこで本研究は、SBMがインプラント体埋入後の治療期間中にインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響を検討するため以下の動物実験を行った。

研究 1 : 健常ラットにおける SBM の経口摂取が骨形成作用に与える影響

研究 2 : 健常ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響

3. 材料と方法

3.1. 健常ラットにおける SBM の経口摂取が骨形成作用に与える影響 (研究 1)

3.1.1. 飼料の作製

SBM は LeGeros ら¹⁰⁾の作製方法に従い作製した。作製方法はリン酸二カルシウム二水和物の混合物 ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Mg および Zn の塩化物 (MgCl_2 , ZnCl_2) 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。実験動物の飼料は control group (以下; 対照群) として米国国立栄養研究所で開発された AIN-93M (日本農産工業 (株), 横浜, 日本) を使用し, experimental group (以下; 実験群) として Mijares ら¹⁶⁾の作製方法に従い AIN-93M および SBM で作製された飼料 (AIN-93M + SBM (日本農産工業 (株), 横浜, 日本)) を使用した。AIN-93M および AIN-93M + SBM の組成成分を Table 1. に示す。

3.1.2. 実験動物および試料の作製

実験には 19 週齢の Wister 系雌性ラットを 12 頭 (三協ラボサービス (株), 東京, 日本) 用いた。ラットは 1 頭ずつ室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 1\%$ の金属ゲージ内で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。20 週齢時にラットを無作為に 6 頭ずつ対照群 (n=6) および実験群 (n=6) に割り付け各飼料の摂取を開始した。8 週間後, すべてのラットは CO_2 チャンバーを用いて安楽死させ, 右大腿骨は, ラットの安楽死直後に摘出し, 軟組織をガーゼで除去し生理食塩水に入れ, 24 時間 8°C で保存し測定時に滅菌布で乾燥後, 骨の曲げ強度測定を行った。左大腿骨は摘出後軟組織をガーゼで除去し Bone Mineral Density (以下; BMD) の測定を行った。

実験プロトコールは日本大学松戸歯学部実験動物倫理委員会の承認を受けて実施した (承認番号: AP12-MD017)。

3.1.3. 測定項目

1) 骨の曲げ強度 (Fig. 1)

骨の曲げ強度の測定は, 3 点曲げ試験をインストロン型万能試験機 (TG-5k, ミネベア (株), 神奈川, 日本) を用いて行った。測定方法は大腿骨を支点間距離 20 mm とした 3 点曲げ試験機を使用して保持し, 大腿骨の中点をクロスヘッドスピード 5.0 mm/min で上方から力を加え, 骨が破折した際の値 (N) から大腿骨骨幹中央部の長軸

に対し垂直な断面の表面積 (cm²) を除し、骨の曲げ強度 (MPa) とした。

2) BMD および BMD color imaging (Fig. 2)

撮像領域は大腿骨骨幹中央部 (4.0 mm × 4.0 mm × 2.0 mm) とし, R_mCT (リガク (株), 東京, 日本) を用いて撮像した。撮像条件は分解能 30 × 30 × 30 μm ボクセル, 電圧 90 kV とした。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) を用いて 3D モデルを構築した。構築した 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) およびファントムから作製した検量線を用いて BMD を算出し, 算出した BMD の数値を画像化した BMD color imaging を作製した。BMD color imaging は赤, オレンジ, 黄, 緑, 青の順に高い BMD を示す。

3. 1. 4. 統計解析

2 群間における骨の曲げ強度および BMD の有意差検定は Mann–Whitney U 検定を用いて行った。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。

3. 2. 健常ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響 (研究 2)

3. 2. 1. 飼料の作製

飼料の作製は研究 1 に準じて行った。

3. 2. 2. 実験動物および試料の作製 (Fig. 3)

実験には 5 週齢の Wister 系雌性ラットを 24 頭 (三協ラボサービス (株), 東京, 日本) 用いた。ラットは 1 頭ずつ室温 25 ± 1°C, 湿度 50 ± 1% の金属ゲージ内で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。6 週齢時にラットを無作為に 12 頭ずつ対照群 (n=12) および実験群 (n=12) に割り付け飼料の摂取を開始した。すべてのラットは 8 週齢時にケタミンおよびキシラジ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行った。インプラント体は直径 1.2 mm, 長径 4.0 mm の円柱状の純チタン (フルウチ化学 (株), 東京, 日本) で, 直径 110 μm の酸化アルミナでブ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 1.2 mm のラウンドバーを生理食塩水の注水下にて回転速度 500 rpm で大腿骨遠位端から 10.0 mm の骨髓腔の幅が一番あると考えられる位置に直径 1.2 mm, 深さ 2.5 mm で穿孔しないように埋入窩を形成しインプラント体を埋入した。インプラント体は引き抜き強度を測定するため 1.5 mm を骨外に残した¹⁷⁻¹⁹⁾。埋入 1 週間後, 各群 6 頭のラットを無作為割り付けし, その内 2 頭選択しインプラント体

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) を腹腔内注射した。他の 4 頭は引き抜き試験および BMD 測定に割り当て、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後成長を続け、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実験動物倫理委員会の承認を受けて実施した (承認番号: AP13-MD009)。

3.2.3. 測定項目

1) 引き抜き試験 (Fig. 4)

大腿骨は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。大腿骨の固定は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、ロードセルの剪断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っ張ることができるように固定した。その後インプラント体上部およびロードセルとの間を 50 mm 離し 110 mm のステンレス鋼線を用いてロードセルとインプラント体上部の通し穴を繋げた。引き抜きには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) を用いて、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min とした。骨からインプラント体を引き抜く際の値 (N) からインプラント体の表面積 (cm²) を除し、引き抜き強度 (MPa) とした。

2) BMD および BMD color imaging (Fig. 5)

引き抜き試験後、撮像領域はインプラント体と内側皮質骨の界面からインプラント体の長軸方向に深さ 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 の直方体とし、R_mCT2 装置 (リガク (株), 東京, 日本) を用いて撮像した。撮像条件は分解能 30 × 30 × 30 μm ボクセル, 電圧 90 kV とした。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) を用いて 3D モデルを構築した。構築した 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) およびファントムから作製した検量線を用いて BMD を算出し、算出した BMD の数値を画像化した BMD color imaging を作製した。

3) 蛍光顕微鏡観察

大腿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 (株), 大阪, 日本) でレジン包埋後、ダイヤモンドディスク (Isomet[®]21, Buller, Illinois, USA) を使用してインプラント体中央部を長軸方向に対して垂直に 30 μm 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, オリンパス (株), 東京, 日本) を使用した。

4) 体重測定

24 頭のすべてのラットは、良好な健康状態および成長を確認するため 6, 8, 10 および 12 週齢時に体重測定を行った。なお 10 および 12 週齢時の体重測定は安楽死の直前に行った。

3. 2. 7. 統計解析

2 群間における埋入 2 週間後と埋入 4 週間後での引き抜き強度, BMD および体重の有意差検定を Mann-Whitney U 検定を用いて行った。2 群間の体重が経時的に差を示さないという仮説検定のもと Friedman 検定を行った。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. 結果

4. 1. 健常ラットにおける SBM の経口摂取が骨形成作用に与える影響 (研究 1)

4. 1. 1. 骨の曲げ強度 (Fig. 6A)

対照群および実験群における骨の曲げ強度の中央値は 28 週齢時においてそれぞれ 164.2 MPa および 177.8 MPa であった。実験群の骨の曲げ強度は対照群と比較して有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。

4. 1. 2. BMD (Fig. 6B)

対照群および実験群における BMD の中央値は 28 週齢時においてそれぞれ 1261.9 mg/cm³, 1295.6 mg/cm³ だった。実験群の BMD は対照群と比較して有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。

4. 1. 3. BMD color imaging (Fig. 7)

BMD color imaging は 28 週齢時の対照群においてオレンジが主に観察された。実験群の 28 週齢時における BMD color imaging はオレンジと赤で観察された。実験群の BMD color imaging は対照群と比較して赤が多かった。

4. 2. 健常ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響 (研究 2)

4. 2. 1. 引っ張り試験 (Fig. 8A)

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 2.08 ± 1.42 MPa, 12.45 ± 4.28 MPa で実験群が約 6 倍で有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。埋入 4 週間後ではそれぞれ 17.99 ± 3.20 MPa および 35.31 ± 9.10 MPa で, 実験群の引き抜き強度は対照群と比較して有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。埋入 2 週間後の実験群の引き抜き強度は対照群の埋入 4 週間後に近く, またそれぞれの群において埋入 2 週間

後と埋入 4 週間後を比較すると埋入 4 週間後は有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。

4. 2. 2. BMD (Fig. 8B)

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 $666.95 \pm 77.00 \text{ mg/cm}^3$, $1333.63 \pm 109.51 \text{ mg/cm}^3$ で、実験群の引き抜き強度は対照群と比較して有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。埋入 4 週間後ではそれぞれ $782.83 \pm 46.46 \text{ mg/cm}^3$ および $1671.88 \pm 334.55 \text{ mg/cm}^3$ で、実験群の引き抜き強度は対照群と比較して有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。またそれぞれの群において埋入 2 週間後と埋入 4 週間後を比較すると埋入 4 週間後は有意な高い値を示した ($P < 0.05$)。

4. 2. 3. BMD color imaging (Fig. 9A)

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黄色が多く観察された (Fig. 8A-a and c)。実験群の BMD color imaging は埋入後 2 および 4 週間後で主にオレンジおよび赤色が多く観察された (Fig. 8A-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においてより高い BMD を有することを示した。

4. 2. 4. 蛍光顕微鏡観察 (Fig. 9B)

対照群の埋入 2 週間後における蛍光顕微鏡における観察は蛍光を示さなかった (Fig. 8 4B-a)。実験群の埋入 2 および 4 週間後, 対照群の埋入 4 週間後の蛍光顕微鏡における観察ではインプラント体周囲に不規則な帯状の蛍光を示した (Fig. 8 4B-b, c and d)。

4. 2. 5. 体重測定 (Fig. 10)

それぞれの群におけるラットの体重は実験期間中に有意に増加した。(Friedman 検定, $P < 0.0001$)。対照群および実験群の体重は埋入 2 週間後においてそれぞれ $153.36 \pm 8.86 \text{ g}$ および $156.56 \pm 4.59 \text{ g}$ and $153.36 \pm 8.86 \text{ g}$, 埋入 4 週間後において $169.42 \pm 4.95 \text{ g}$ および $169.80 \pm 6.37 \text{ g}$ だった。埋入 2 週間後および埋入 4 週間後の群間には有意な体重差を示さなかった (Mann-Whitney U 検定, $P > 0.05$)。また両群における埋入 2~4 週間後の群内における体重は有意な増加を示し ($P < 0.05$) 以前の報告と同様であった²⁰⁾。

5. 考察

この研究では SBM の経口摂取がインプラント体埋入後の治癒期間中にインプラント体周囲の骨形成を促進させ治療期間の短縮に有効であるか検討を行うことを目的とし 2 つの動物実験を行った。研究 1 において健常ラットにおける SBM の経口摂取が骨

形成作用に与える影響について骨の曲げ強度, BMD, BMD color imaging を用いて評価した。この研究の結果を踏まえ, 研究 2 には健常ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲新生骨の骨形成に与える影響について引き抜き強度, BMD, BMD color imaging, 蛍光染色を用いて評価した。

その結果研究 1 において SBM を摂取したラットは SBM を摂取しなかったラットに比べ骨の曲げ強度および BMD において定量的に有意な高い値を示し, 骨形成に有効であったことを明らかにした。さらに BMD を定性的に観察するために BMD の強さを描いた BMD color imaging を作成し BMD の高い範囲を SBM を摂取したラットにおいて示した。この結果は骨の曲げ強度の値が BMD の値と相関関係があることを明らかにした以前の報告²¹⁾と同様な傾向を示したと考えられる。研究 2 においては SBM を摂取したラットは SBM を摂取しなかったラットに比べインプラント体の引き抜き強度および BMD を増加させたことから SBM はインプラント体周囲の骨形成を促進させる可能性を示唆した。

研究 1 および 2 における対照群および 実験群の介入の違いは, 飼料に SBM が含まれているか, いないかの違いである。研究 1 における大腿骨骨幹中央部および研究 2 におけるインプラント体周囲の骨の BMD の差は SBM の骨形成促進作用であるとされる。SBM を含む飼料には対照の飼料と比較して Mg を 7 倍および Zn を 12 倍含み, さらに対照の飼料には含まれない F を含んでいる。Mg, Zn および F は骨形成と骨吸収において重要な役割を果たしている¹¹⁻¹⁴⁾。Mg はサイトカインの増加を抑制させ破骨細胞数の増加を抑制させる¹⁵⁾。Zn はカテプシンおよび炭酸脱水酵素の mRNA の発現を減少させ破骨細胞の活動を阻害する¹²⁾。F は総コラーゲン含有量及び ALP 活性を増加させることにより骨芽細胞の分化を促進させる^{13, 14)}。Mijares ら¹⁶⁾は SBM の効果を Mg, Zn, および F による個々の観点から説明することで, 骨形成や骨吸収などの骨細胞活動に関する併用効果を説明することができると述べている。これらの研究は SBM を摂取したラットが SBM を摂取しなかったラットに比べ高い BMD を示したことを説明できると考えられる。定性的に観察するため作成した BMD color imaging においても 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インプラント体周囲における骨の BMD が高かった。BMD および BMD color imaging の結果はインプラント体周囲の骨が SBM を摂取したラットにおいて迅速に形成されたことを示しており, それにより 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る。SBM を摂取したラットは SBM を摂取しなかったラットと比較して BMD は有意な差を示したが, 埋入 2 および 4 週間後の群内比較においては増加傾向を示したが有意な差を示さなかった。この理由として試料の数が少なかったことが考えられ, 今後試料数の数を増やし再検討する必要があると考えられる。蛍光色素の取り込みを利用してインプラント体周囲骨の骨形成を明らかにした蛍光顕微鏡画像の結果においても SBM を摂取したラットは埋入 2 週間後に蛍光像

を示したことからインプラント体周囲新生骨の骨形成が SBM により促進されると考えられる。以上から SBM はインプラント体周囲新生骨の骨形成を促進させることを明らかにした。

6. 結論

本研究では健常ラットにおける SBM の経口摂取が骨形成作用を持つことを明らかにし、インプラント体埋入後の治癒期間中にインプラント体周囲新生骨の骨形成を促進させることを明らかにした。さらに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。

本稿は主となる論文 Potential for acceleration of bone formation after implant surgery by using a dietary supplement: An animal study. (Journal of Oral Rehabilitation Article first published online: 9 JAN 2015), 副となる論文 The influence of synthetic bone mineral to bone formation (International Journal of Oral-Medical Sciences 掲載予定) をまとめたものである。

7. 参考文献

1. Johansson C, Albrektsson T: Integration of Screw Implants in the Rabbit: a 1-yr Follow-up of Removal Torque of Titanium Implants, Int J Oral Maxillofac Implants, 2: 69-75, 1987.
2. 高本 愛, 時数智子, 臺信花菜ほか: インプラント治療を目的とした骨造成手術に対する患者の不安と満足度に関するアンケート調査. 広大歯誌. 44: 29-35, 2012.
3. Rocuzzo M, Aglietta M, Cordaro L: Implant Loading Protocols for Partially Edentulous Maxillary Posterior Sites, Int J Oral Maxillofac Implants, 24: 147-157, 2009.
4. Cordaro L, Torsello F, Rocuzzo M: Implant Loading Protocols for the Partially Edentulous Posterior Mandible, Int J Oral Maxillofac Implants, 24: 158-168, 2009.
5. Ogawa T: Ultraviolet Photofunctionalization of Titanium Implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 29: 95-102, 2014.
6. Suzuki S, Kobayashi H, Ogawa T: Implant Stability Change and Osseointegration Speed of Immediately Loaded Photofunctionalized Implants, Implant Dent, 22: 481-490, 2013.
7. Ogawa T, Zhang X, Naert I, et al.: The Effect of Whole-body Vibration on Peri-implant Bone Healing in Rats, Clin Oral Implants Res, 22: 302-307, 2011.
8. Otsuka M, Oshinbe A, Legeros RZ, et al.: Efficacy of the Injectable Calcium Phosphate

- Ceramics Suspensions Containing Magnesium, Zinc and Fluoride on the Bone Mineral Deficiency in Ovariectomized Rats, *J Pharm Sci*, 97: 421-432, 2008.
9. Tokudome Y, Otsuka M, Ito A, et al.: Long-term Therapeutic Effect of Novel Calcium Phosphate-based Compounds Injected in Ovariectomized Rats, *J Biomed Mater Res B, Appl Biomater*, 90: 229-237, 2009.
 10. LeGeros RZ. Patent. 2008: US 7,419,680,B2 (submitted 2004, issued September 2, 2008). US 2009/0068285A1 (CIP, March 12, 2009). Calcium phosphate-based biomaterials incorporating magnesium, zinc, fluoride and carbonate.
 11. Rude RK, Gruber HE.: Magnesium Deficiency and Osteoporosis: Animal and Human Observations, *J Nutr Biochem*, 15: 710-716, 2004.
 12. Yamada Y, Ito A, Kojima H, et al.: Inhibitory Effect of Zn²⁺ in Zinc-containing Beta-Tricalcium Phosphate on Resorbing Activity of Mature Osteoclasts, *J Biomed Mater Res A*, 84: 344-352, 2008.
 13. Inoue M, LeGeros RZ, Inoue M, et al.: In vitro Response of Osteoblast-like and Odontoblast-like Cells to Unsubstituted and Substituted Apatites, *J Biomed Mater Res A*, 70: 585-593, 2004.
 14. Miyagi M, Tsuruda K, Kawamura M, et al.: Effects of Fluoride Intake on the Mineral Content, Acid Solubility and Resorption Caused by Experimental Periodontitis of Rat Alveolar Bone, *Arch Oral Biol*, 39: 163-166, 1994.
 15. Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, et al.: Dietary Magnesium Reduction to 25% of Nutrient Requirement Disrupts Bone and Mineral Metabolism in the Rat, *Bone*, 37: 211-219, 2005.
 16. Mijares D, Kulkarni A, Lewis K, et al.: Oral Bone Loss Induced by Mineral Deficiency in a Rat Model: Effect of a Synthetic Bone Mineral (SBM) Preparation, *Arch Oral Biol*, 57: 1264-1273, 2012.
 17. Alghamdi HS, Cuijpers VM, Wolke JG, et al.: Calcium-Phosphate-coated Oral Implants Promote Osseointegration in Osteoporosis, *J Dent Res*, 92: 982-988, 2013.
 18. Aparicio C, Padros A, Gil FJ: In vivo Evaluation of Micro-rough and Bioactive Titanium Dental Implants Using Histometry and Pull-out Tests, *J Mech Behav Biomed Mater*, 4: 1672-1682, 2011.
 19. Zacchetti G, Wiskott A, Cugnoni J, et al.: External Mechanical Microstimuli Modulate the Osseointegration of Titanium Implants in Rat Tibiae, *Biomed Res Int*, 234093, 2013.
 20. 日本エスエルシー株式会社 : 2007年データ集 Slc:Wistar(SPF), <http://jslc.co.jp/inform/2007data/wistar2007.pdf#search='http%3A%2F%2Fwww.jslc.co.jp%2Finform%2F2007data%2Fwistar2007.pdf'>.accessed (2014年9月7日現在)

21. Ferretti JL, Capozza RF, Zanchetta JR: Mechanical Validation of a Tomographic (pQCT) Index for Noninvasive Estimation of Rat Femur Bending Strength, *Bone*, 18: 97-102, 1996.

Table & Figures

Table 1: Mineral compositions (Wt%) of AIN-93M and AIN-93M + SBM

	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
Natrium (Na)	0.10	0.13
Kalium (K)	0.35	0.75
Chlorine (Cl)	0.16	0.17

SBM: synthetic bone mineral

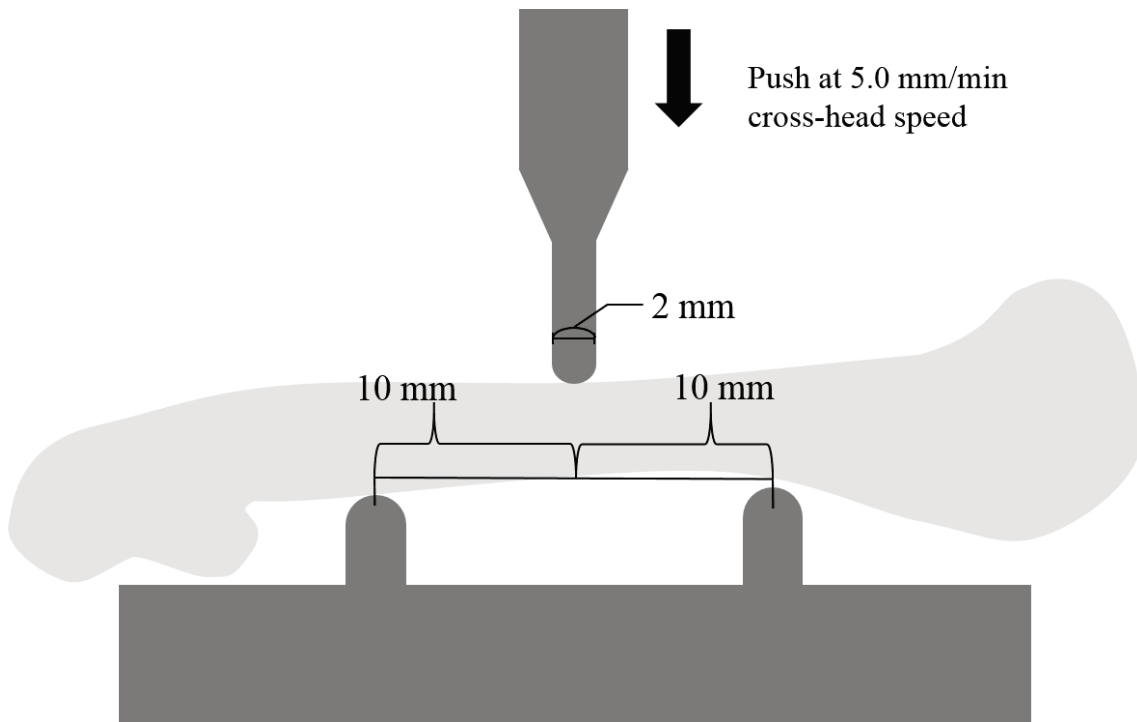


Figure 1: Bone flexure strength

The femur bone was supported using a 3-point bending jig with a between-fulcrum distance of 10 mm, and a bending force was loaded on the middle point of the bone length at 5.0 mm/min.

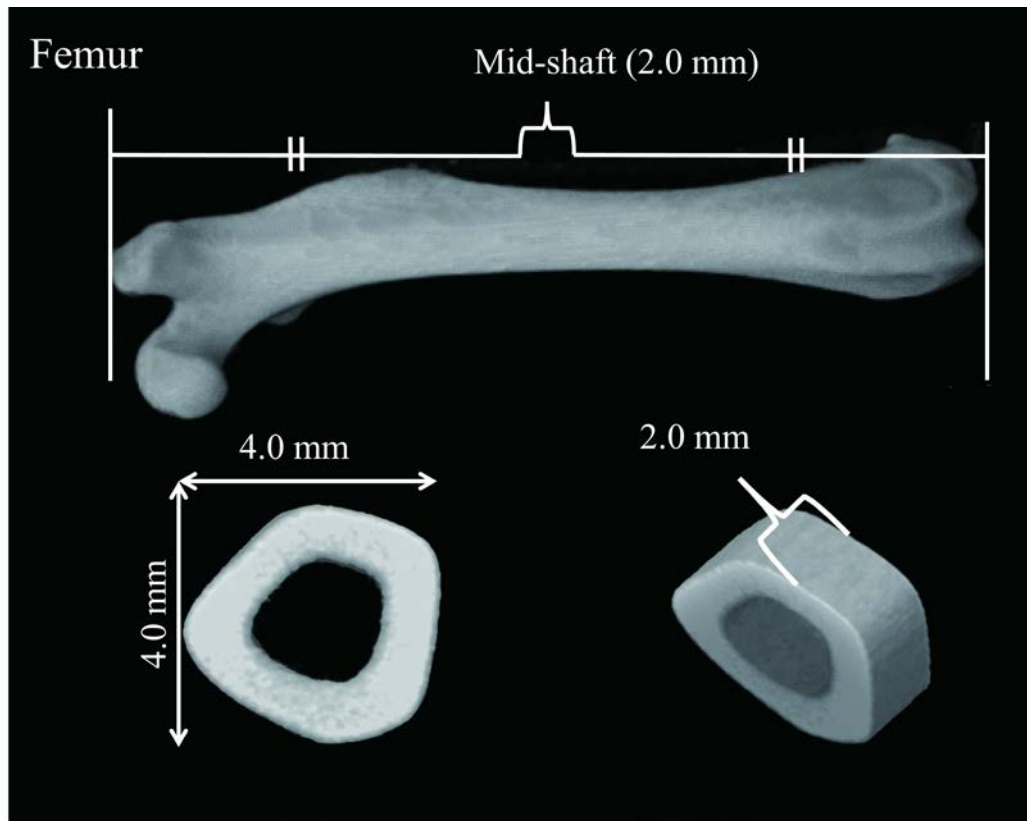


Figure 2: Scanning of femur mid-shaft for BMD analyses
Analysis sites in the femur (top). The measurement range (4.0 mm × 4.0 mm × 2.0 mm) for BMD is at the femoral mid-shaft.

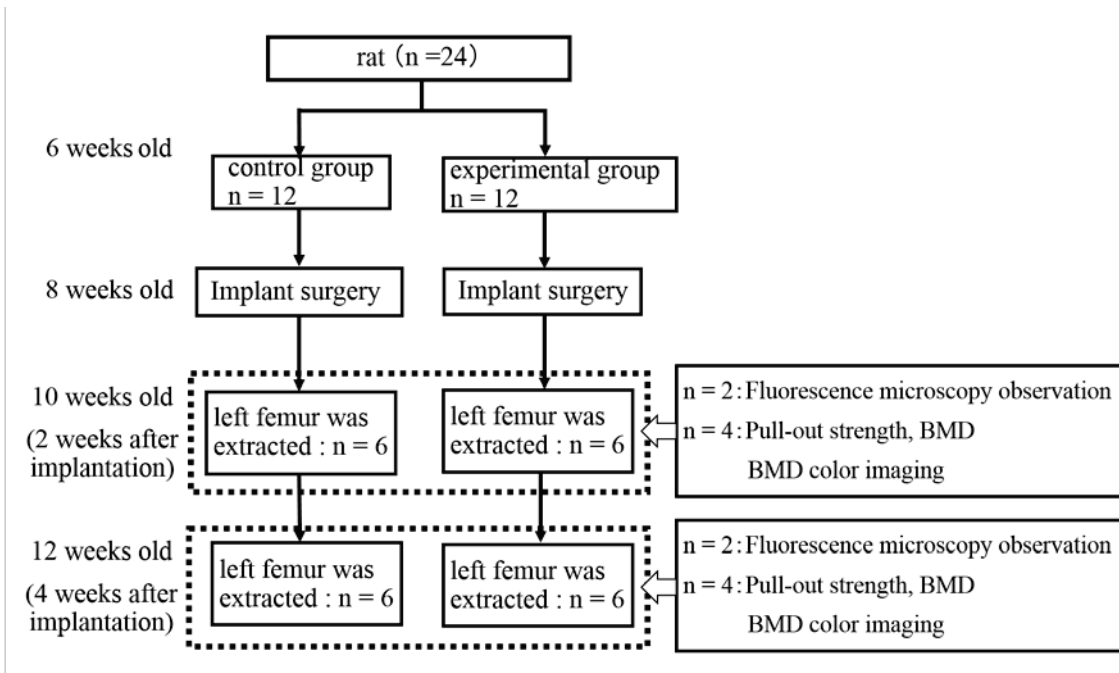


Figure 3: Time schedule

6-week-old rats were randomly allocated to one of two groups: a control group fed a diet without SBM or an experimental group fed a diet with SBM. All 8-week-old rats underwent implant surgery. Six rats in each group were randomly selected and euthanised at 2, 4 weeks after implantation, of which 4 were allocated for pull-out testing and BMD analysis and 2 were allocated for fluorescence microscopy observation.

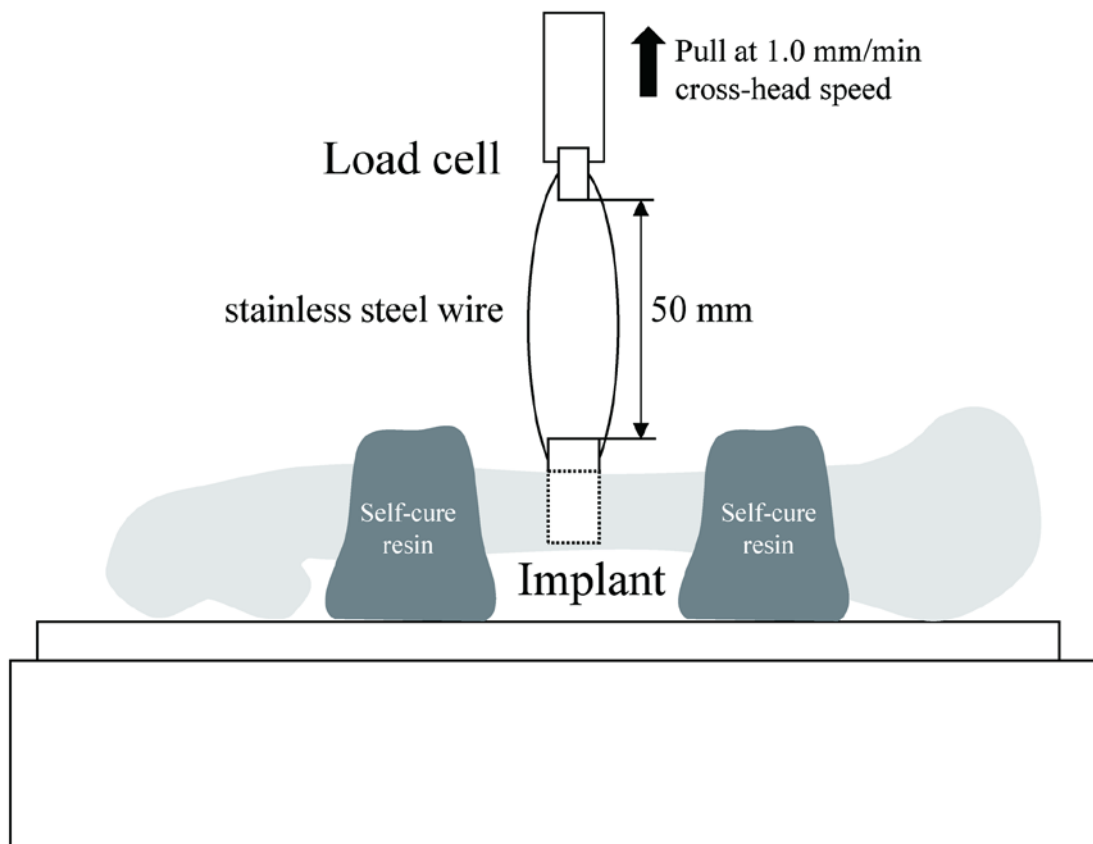


Figure 4: Pull-out strength test

The specimens were mechanically anchored to a baseplate by self-curing resin. The load cell pulled the implant as perpendicularly as possible to minimize shear forces at 1.0 mm/min cross-head speed.

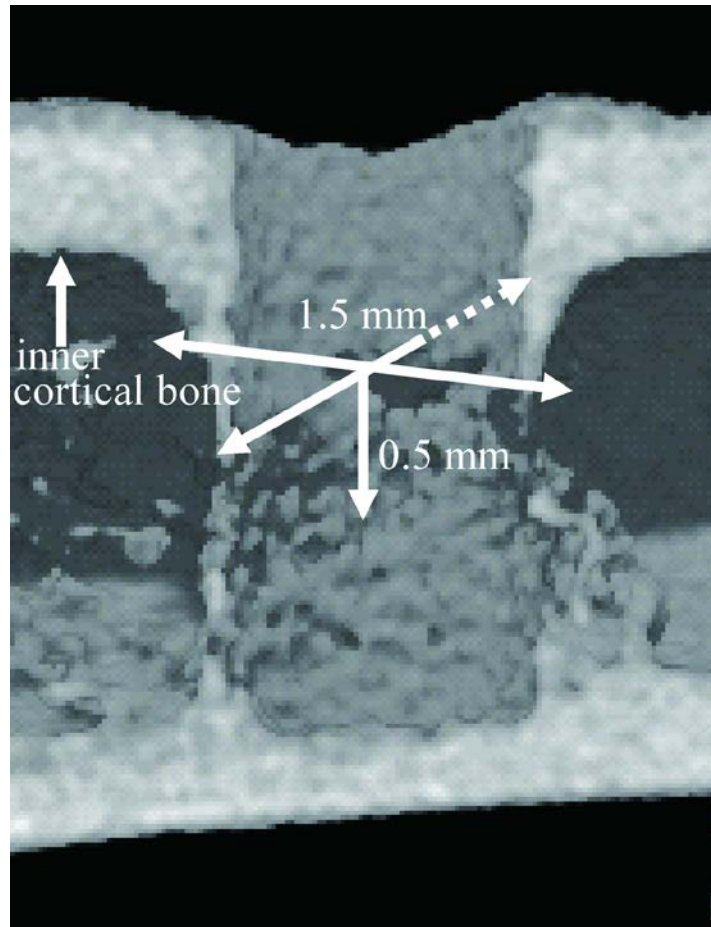


Figure 5: Scanning of peri-implant bone for BMD analyses

A 1.5-mm^2 area surrounding the bone socket where a 1.2-mm implant had been placed was three-dimensionally scanned from 0.5-mm depth to 1.0-mm depth apart from inner cortical bone. Thus, a peri-implant bone cuboid with a $1.5 \times 1.5\text{-mm}$ base and 0.5-mm height was scanned.

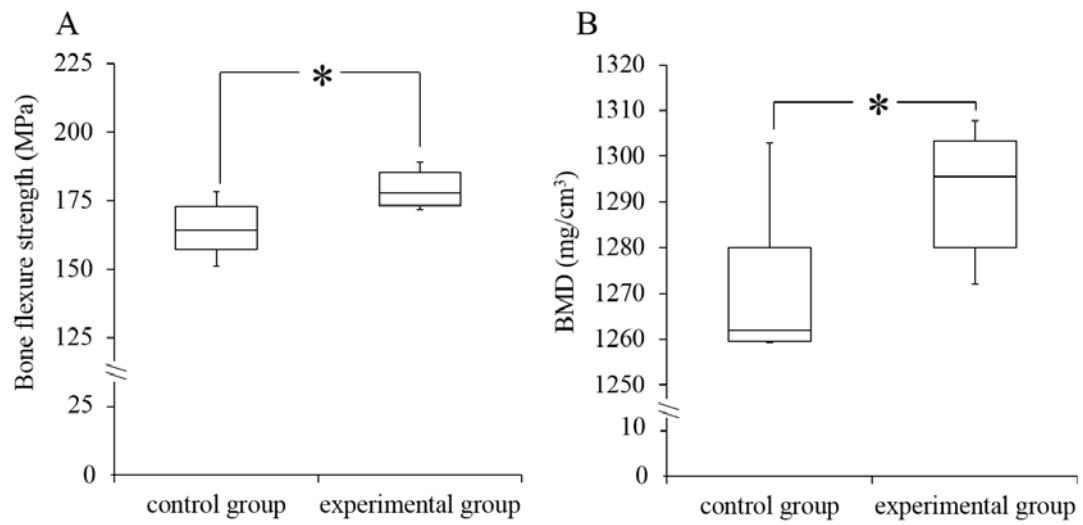


Figure 6: Between group differences in bone mechanical strength and BMD.

Results of bone mechanical strength (A): Bone flexure strength was significantly higher than those of control group at 28 weeks old ($*P < 0.05$).

Results of BMD (B): BMD was significantly higher than those of control group at 28 weeks old ($*P < 0.05$).

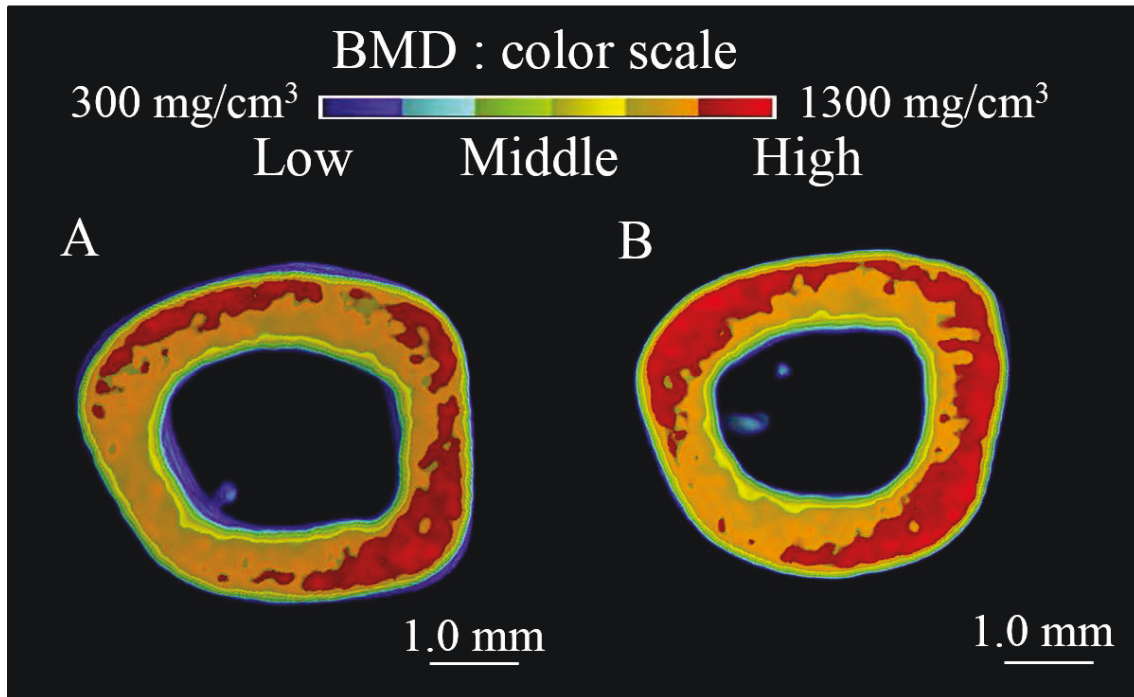


Figure 7: BMD color imaging

BMD color image observation: Color image of the control group at 28 weeks old revealed mainly orange (A). In contrast, the color image of the experimental group occupied mainly the orange and red end of the spectrum (B).

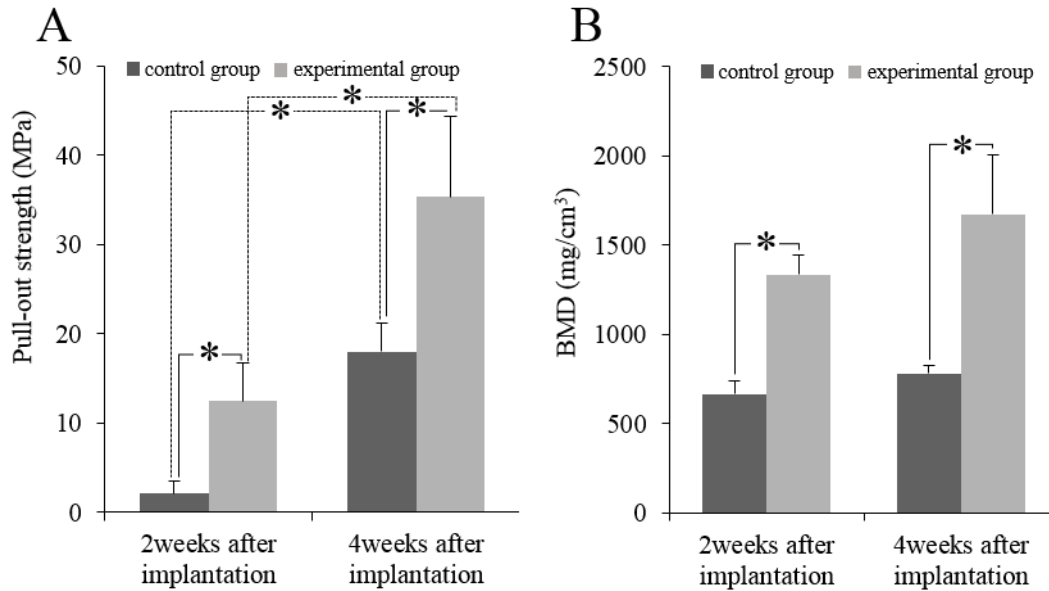


Figure 8: Between- and within-group comparison of BMD and pull-out strength

Results of pull-out strength (A): Pull-out strength was significantly greater in the experimental group than the control group at 2 and 4 weeks after implantation ($*P < 0.05$). Pull-out strength also significantly increased within both groups between 2 weeks and 4 weeks after implantation ($*P < 0.05$).

Results of BMD (B): BMD was significantly greater in the experimental group than the control group at 2 and 4 weeks after implantation ($*P < 0.05$). However, BMD did not significantly increase within either group between 2 weeks and 4 weeks after implantation ($*P > 0.05$).

The continuous line and broken line represent between-group comparison and within-group comparison, respectively. The asterisks represent significant differences ($*P < 0.05$).

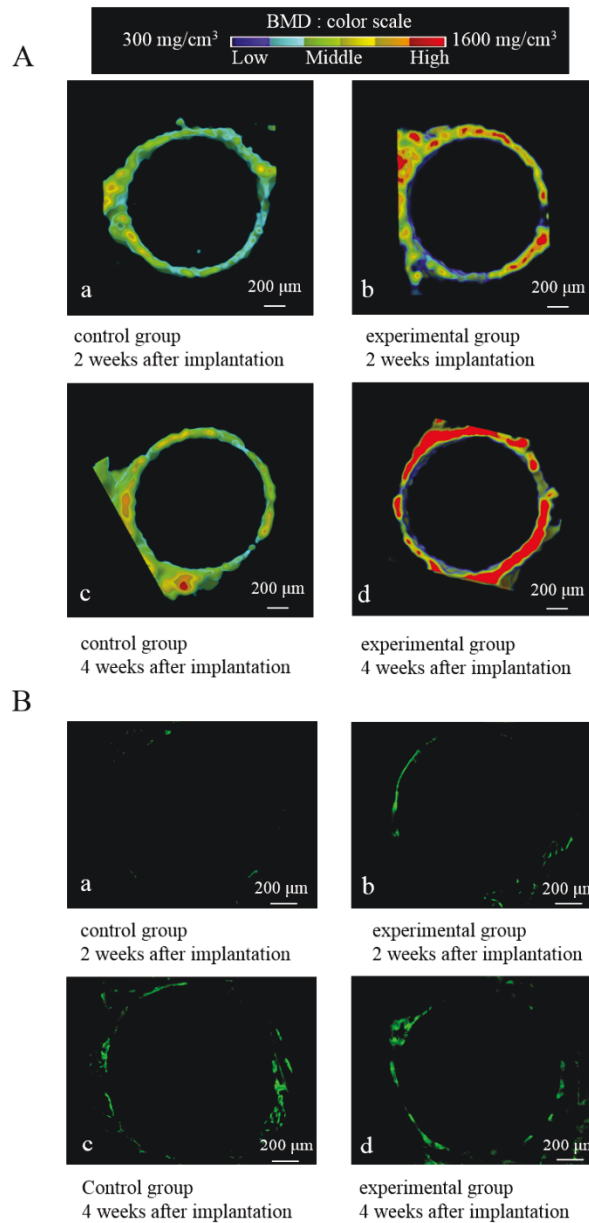


Figure 9: BMD color imaging and fluorescent imaging

BMD color image observation (A): Color imaging of the control group at 2 and 4 weeks after implantation revealed mainly blue and yellow (a and c). However, color imaging of the experimental group at 2 and 4 weeks after implantation occupied mainly the orange and red end of the spectrum (b and d).

Fluorescence image (B): Fluorescence microscopy imaging of the control group at 2 weeks after implantation shows no green fluorescence (a). However, fluorescence microscopy imaging of the experimental group at 2 and 4 weeks after implantation and the control group at 4 weeks clearly shows green fluorescence (c, b, and d).

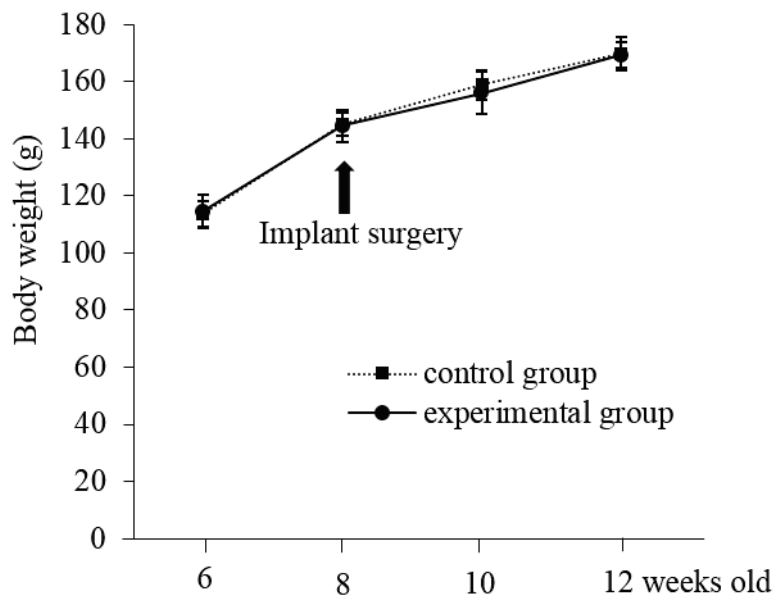


Figure 10: Body weight change of rats

Body weight significantly increased in both the experimental groups and control groups over the feeding period ($P < 0.0001$). Significant body weight differences were not observed between the groups at 2 (10 weeks old) or 4 weeks (12 weeks old) after implantation.