

卵巣摘出ラットにおける Synthetic bone mineral の摂取がインプラント体周囲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

高橋 卓裕

(指導： 河相 安彦 教授)

Abstract

1. 緒言
2. 材料と方法
 - 1) 飼料作製
 - 2) 実験動物及び試料の作製
 - 3) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨量に与える影響（研究 1）
 - (1) 測定項目
 - a. 引き抜き試験
 - b. BMD および BMD color imaging
 - c. 蛍光顕微鏡観察
 - d. 体重測定
 - (2) 統計解析
 - 4) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨質に与える影響（研究 2）
 - (1) 骨微小構造測定 3D データの作製
 - (2) 測定項目
 - (3) 統計解析
3. 結果
 - 1) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨量に与える影響（研究 1）
 - (1) 引き抜き試験
 - (2) BMD
 - (3) BMD color imaging
 - (4) 蛍光顕微鏡観察
 - (5) 体重測定
 - 2) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨質に与える影響（研究 2）
 - (1) 骨体積分率
 - (2) 骨表面積比
 - (3) 骨梁幅
 - (4) Trabecular star volume
 - (5) 骨梁数
4. 考察
5. 結論
6. 参考文献

Abstract

Background

Osteoporosis contributes to impaired bone regeneration and remodeling through an imbalance of osteoblastic and osteoclastic activity, and can delay peri-implant bone formation after dental implant surgery, resulting in a prolonged treatment period. It poses several difficulties for individuals with large edentulous areas, and decreases their quality of life. Consequently, prompt postoperative placement of the final prosthesis is clinically very important. Peri-implant bone formation may be enhanced by systemic approaches, such as use of osteoporosis supplements, to promote bone metabolism. The Synthetic bone mineral (SBM) has been developed as osteoporosis supplement to improve and prevent the disease. Investigation of peri-implant bone has been carried out in normal rats fed with SBM, to clarify the acceleration of peri-implant bone formation with SBM. However, peri-implant bone formation of ovariectomized rat is unknown.

Objective

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.

Material and Methods

Research 1:

Thirty-six 7-weeks-old ovariectomized female Wistar rats were randomly assigned to receive a standardized diet with or without SBM (Diet with SBM group and Diet without SBM group, n = 18 for respective group). The rats underwent implant surgery at 9 weeks of age under general anesthesia. The main outcome measures, pull-out strength, bone mineral density (BMD), BMD color imaging and fluorescence microscopy imaging of the implant from the femur, were compared at 2 and 4 weeks after implantation by using the Mann-Whitney U test.

Research 2:

The outcome measures, bone volume fraction (BV/TV), bone surface ratio (BS/BV), trabecular thickness (TbTh), trabecular star volume (Vtr) and trabecular number (TbN) of the implant from the femur, were compared between group at 2 and 4 weeks after implantation using the Mann-Whitney U test.

Results

Research 1:

Pull-out strength and BMD for the Diet with SBM group were significantly greater than those

without SBM group at 2 and 4 weeks after implantation. BMD color imaging of the Diet with SBM group demonstrated high BMD of peri-implant bone than that of the Diet without SBM group at both 2 and 4 weeks after implantation. Fluorescence microscopy imaging of the Diet with SBM group also demonstrated more green fluorescence (indicating bone formation) than that of the Diet without SBM group at both 2 and 4 weeks after implantation.

Research 2:

BV/TV, TbTh and Vtr in the Diet with SBM group were significantly greater than those in the Diet without SBM group at 2 and 4 weeks after implantation, whereas BS/BV was significantly smaller with Diet with SBM.

Conclusion

This study demonstrated that SBM could be effective in peri-implant bone formation and improve the trabecular structure in an ovariectomized rat.

1. 緒言

日本は超高齢社会であることが知られている¹⁾。その中でも骨粗鬆症患者は 1000 万人以上と推定されており²⁾、今後、更なる超高齢社会の進展に伴い増加することが考えられる^{3, 4)}。骨粗鬆症は骨代謝の低下により骨強度が低下する疾患である⁵⁾。骨強度は National Institutes of Health consensus において骨密度 (Bone mineral density: 以下, BMD) および骨質に分けられると定義されている^{6, 7)}。BMD は 骨量 (Bone volume: 以下, BV) あたりのミネラル含有量を指し、骨質は骨の微小構造、骨代謝、損傷蓄積および石灰化を指すとされている⁶⁻⁸⁾。このような骨粗鬆症患者が、歯の喪失に起因する審美不全や咀嚼障害の改善に有効な口腔インプラントによる治療を行う場合、骨代謝の低下がインプラント体周囲骨において骨形成および骨強度に不利な影響を及ぼし^{9, 10)}、治癒期間が延長する^{11, 12)}。一般的に、インプラント体と周囲骨との確実なオッセオインテグレーションの獲得には 3 から 6 か月に及ぶ長期の治癒期間が必要となる¹³⁾。Takamoto ら¹⁴⁾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の治療期間は長いと回答している。よってインプラント体埋入後から最終補綴物装着までの期間を短縮することは临床上重要な課題であるが、骨粗鬆症患者ではさらに治癒期間が延長することが想定され、広範囲な歯の欠損による咀嚼障害を呈している患者の Quality of life を著しく阻害する。

インプラント体埋入後の治癒期間短縮のため、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^{15, 16)}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。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^{17, 18)}。Ogawa¹⁹⁾ および Suzuki ら²⁰⁾はインプラント体表面の経年変化に着目し、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癒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^{21, 22)}。これらの局所的なアプローチに加えて、骨代謝を促進するような骨粗鬆症薬の使用などの全身的アプローチを用いたインプラント体周囲の骨形成を改善することも試みられている²³⁻²⁷⁾。骨形成を改善させる方法として、LeGeros²⁸⁾によって骨粗鬆症の治療および予防のために開発された Synthetic bone mineral (以下, SBM) の経口摂取がある²⁹⁾。SBM はリン酸カルシウムに、骨形成と骨吸収において重要な役割をはたしているマグネシウム (Mg)、亜鉛 (Zn)、フッ素 (F)³⁰⁻³²⁾ および炭酸塩 (CO₃) を含んでいる。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^{32, 33)}。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させる³⁰⁾。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³¹⁾。Mijares ら²⁹⁾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。このような背景をもとに、Watanabe らは^{23, 34)}インプラント体の埋入の有無にかかわらず健常ラットにおける骨形成を促進させることを明らかにした。しかしながら、SBM を骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ラット (Ovariectomized rat 以下, OVX ラット) に摂取させた場合のインプラント埋入後の骨形成に関する検討はされていない。そこで本研究は、骨粗鬆症モデルである OVX 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以下の研究を行った。

研究 1 : 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨量に与える影響

研究 2 : 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨質に与える影響

2. 材料と方法

1) 飼料の作製

SBM は LeGeros²⁸⁾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 ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、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。実験動物の飼料として対照群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, 実験群には Mijares ら²⁹⁾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 Table 1 に示す。

2) 実験動物および試料の作製 (Fig. 1)

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 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 1\%$ 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 週齢時に塩酸メデトミジン、ミダゾラムおよび酒石酸ブトルフェノール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 1.2 mm, 長径 4.0 mm の円柱状の純チタン (CLINE(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注水下で回転速度 500 rpm で大腿骨骨幹中央部に直径

1.2 mm , 深さ 2.5 mm 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 1.5 mm を骨外に残した³⁵⁻³⁷⁾ (Fig. 2)。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実験動物倫理委員会の承認を受けて実施した (承認番号 : AP14-MD018)。

3) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨量に与える影響 (研究 1)

(1) 測定項目

a. 引き抜き試験 (Fig. 2)

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 50 mm 離し 110 mm 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。

b. BMD および BMD color imaging (Fig. 3)

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 × 30 × 30 μm 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。

c. 蛍光顕微鏡観察

大腿骨を滅菌生理食塩水で洗浄後, 70~100% エタノール系列および 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 (オステオレジン包埋キット®, 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 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) を使用し観察した。

d. 体重測定

すべての OVX ラットの健康状態および成長を確認するため 7, 9, 11 および 13 週齢時に体重測定を行った。なお 11 および 13 週齢時の体重測定は安楽死の直前に行った。

(2) 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 および体重の群間比較に, Mann-Whitney U 検定を用いた。2 群間の体重が経時的に差を示さないという仮説検定は, Fridman 検定を用いて行った。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) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨質に与える影響 (研究 2)

(1) 骨微小構造測定 3D データの作製

研究 1 にて得たインプラント体周囲骨の試料を用い, 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 の直方体における領域を撮像領域とし, 撮像条件を分解能 30 × 30 × 30 μm ボクセル, 電圧 90 kV で撮像したデータから, TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング (株), 東京, 日本) にて閾値を L 値 17000, Mask 値 4800 に設定し, 骨微小構造測定 3D データを作製した。

(2) 測定項目

作製した骨微小構造測定 3D 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。計測項目の模式図を Fig. 4 に示す。

(3) 統計解析

2 週間後と埋入 4 週間後における BV/TV, BS/BV, TbTh, Vtr および TbN 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。

3. 結果

1) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨量に与える影響 (研究 1)

(1) 引き抜き試験 (Fig. 5A)

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 ± 0.72 N, 10.6 ± 4.86 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 ± 4.18 N および 34.10 ± 8.85 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 (Fig. 5B)

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 ± 15.60 mg/cm³, 474.13 ± 59.39 mg/cm³ 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 ± 75.59 mg/cm³ および 709.36 ± 56.65 mg/cm³ 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 ($p < 0.05$)。

(3) BMD color imaging (Fig. 6A)

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色が多く観察された (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 (Fig. 6B)

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。

(5) 体重測定 (Fig. 7)

OVX ラットの経時的な体重変化は両群において 7 週齢時から 9, 11, 13 週齢にかけて有意に増加を示した (Friedman 検定, $p < 0.01$)。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 167.18 ± 6.58 g および 184.39 ± 11.27 g, 埋入 4 週間後において 193.87 ± 13.04 g および 196.16 ± 10.17 g であった。埋入 2 週間後および埋入 4 週間後の群間比較では有意な差を示さなかった (Mann-Whitney U 検定, $p > 0.05$)。また両群における埋入 2 週間後および 4 週間後の群内比較では有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

2) 卵巣摘出ラットにおける SBM の経口摂取がインプラント体周囲骨質に与える影響 (研究 2)

(1) 骨体積分率 (BV/TV) (Fig. 8A)

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 ($p < 0.05$)。

(2) 骨表面積比 (BS/BV) (Fig. 8B)

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 ($p < 0.05$)。

(3) 骨梁幅 (TbTh) (Fig. 8C)

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 ($p < 0.05$)。

(4) Trabecular star volume (Vtr) (Fig. 9A)

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 ($p < 0.05$)。

(5) 骨梁数 (TbN) (Fig. 9B)

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 ($p > 0.05$)。

4. 考察

OVX 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ことを目的に 2 つの研究を行った。研究 1 は SBM の経口摂取がインプラント周囲骨量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。さらに研究 2 は SBM の経口摂取がインプラント体周囲における骨質に与える影響について、骨の微小構造を明らかにするため、骨体積を示す BV/TV、骨表面積を示す BS/BV、骨梁の太さを示す TbTh、骨梁の連続性を示す Vtr、骨梁数を示す TbN を用いて評価した。

研究 1 において SBM を摂取した OVX ラットは、SBM を摂取しなかった OVX ラットに比べ引き抜き強度および BMD を増加させたことから SBM は OVX ラットにおけるインプラント体周囲の骨形成を促進させることが明らかとなった。研究 2 に

において SBM を摂取した OVX ラットは SBM を摂取しなかった OVX ラットに比べ骨体積の増加，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ことから，SBM はインプラント体周囲における骨梁構造を密に改善させることが明らかとなった。

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った。研究 1 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考えられた。研究 2 においてインプラント体周囲における骨の微小構造の評価で認められた差は SBM の組成物から誘導された可能性がある。SBM を含む飼料には対照群の飼料と比較して Mg を 7 倍，Zn を 12 倍含み，さらに対照群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³⁰⁻³²⁾。Mg はサイトカインの増加を抑制し破骨細胞数の増加を抑制させ³³⁾，Zn はカ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³⁰⁾。また，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³¹⁾。これらの研究は SBM を摂取した OVX ラットが SBM を摂取しなかった OVX 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た。定性的に観察するため作成した BMD color imaging においても SBM を摂取した OVX ラットのインプラント体周囲骨は SBM を摂取しなかった OVX ラットに比べ 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 OVX ラットに比べ SBM を摂取した OVX 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，骨梁幅が太くなり，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。また OVX ラットの全身に介入した際のインプラント周囲骨における骨体積分率，骨梁幅，骨梁数は非投与群と比較して，高脂血症治療薬 12 週間投与²⁷⁾が 37%, 16%, 75% の上昇，副甲状腺ホルモン 12 週間投与²⁷⁾が，64%, 26%, 54% の上昇，活性型ビタミン D₃ の 8 週間投与²⁵⁾が，96%, 48%, 112% の上昇，骨粗鬆症治療薬であるラネル酸ストロンチウム 12 週間投与²⁶⁾が 63%, 35%, 118% の上昇を認めたと報告がされている。これに対し本研究において SBM 摂取群の骨体積分率，骨梁幅，骨梁数は非摂取群と比較して埋入 2 週間後それぞれ 103%, 13%, 27% の上昇を認めた。埋入 4 週間後ではそれぞれ 35%, 24% の上昇，4% の低下を認めた。SBM 摂取群における埋入 2 週間後の骨体積分率の上昇率は比

較的高く、他の全体的アプローチよりも高い効果を発揮したことが推察された。SBMの摂取期間を延長した際の効果は本研究では不明であり、今後摂取期間を延長することにより検討する必要がある。しかしながら、埋入4週間後では骨体積分率の上昇率は低下しているためSBMの摂取はインプラント周囲の骨形成において早期に効果を発揮しその後効果は緩やかになることが推察された。また骨梁幅および骨梁数に関しては他の分析法によっても検討が可能であり、今後検討する必要がある。前述の全体的なアプローチは薬として摂取し、骨微小構造計測において対照群より非常に高い値を示していた。一方、SBMは栄養補助食品として摂取することが可能であるとされており、重篤な副作用はないとされている。臨床的立場からは重篤な副作用は示さず必要最小限の効果を示し、臨床的な有用性を持つという他の治療薬には無い全体的な汎用性が考えられた。Jingら²²⁾は振動刺激を6週間与えた際のインプラント周囲骨における骨体積分率、骨梁幅、骨梁数について刺激を与えなかった群と比較して133%、17%、64%の上昇を認め、骨表面積比では30%の減少を認めたと報告し、振動刺激は骨形成の促進を示すと結論づけた。本研究の骨微小構造計測の結果はJingら²²⁾の報告と近似した傾向を示したことから、本研究の範囲内ではSBMの経口摂取が上記の効果を発揮することにより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。

5. 結論

OVX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経口期間を検討する必要があると考えられた。

6. 参考文献

1. Orimo H, Nakamura T, Hosoi T, et al.: Japanese 2011 guidelines for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary, Arch Osteoporos, 7: 3-20, 2012.
2. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al.: Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study, J Bone Miner Metab, 27: 620-628, 2009.
3. Sakuma M, Endo N, Oinuma T, et al.: Incidence of osteoporotic fractures in Sado, Japan in 2010, J Bone Miner Metab, 32: 200-205, 2014.
4. Nakamura T, Shiraki M, Fukunaga M, et al.: Effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib administered once weekly on bone mineral density in Japanese patients with osteoporosis: a double-blind, randomized, dose-finding study, Osteoporos Int, 25: 367-376, 2014.
5. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis, Report of a WHO Study Group, World Health Organ Tech Rep Ser, 843: 1-129, 1994.
6. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, NIH Consens Statement, 17: 1-45, 2000.

7. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, *Jama*, 285: 785-795, 2001.
8. McDonnell P, McHugh PE, O'Mahoney D: Vertebral osteoporosis and trabecular bone quality, *Ann Biomed Eng*, 35: 170-189, 2007.
9. Pan J, Shiota T, Ohno K, et al.: Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats, *J Oral Maxillofac Surg*, 58: 877-882, 2000.
10. Duarte PM, César Neto JB, Gonçalves PF, et al.: Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: a histometric study in rats, *Implant Dent*, 12: 340-346, 2003.
11. Friberg B, Ekestubbe A, Mellstrom D, et al.: Brånemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study, *Clin Implant Dent Relat Res*, 3: 50-56, 2001.
12. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, et al.: Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density, *J Oral Maxillofac Surg*, 55: 351-361, 1997.
13. Johansson C, Albrektsson T: Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2: 69-75, 1987.
14. 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.
15. Rocuzzo M, Aglietta M, Cordaro L: Implant loading protocols for partially edentulous maxillary posterior sites, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24 Suppl: 147-157, 2009.
16. Cordaro L, Torsello F, Rocuzzo M: Implant loading protocols for the partially edentulous posterior mandible, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24 Suppl: 158-168, 2009.
17. Shibata Y, Tanimoto Y: A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration, *J prosthodont Res*, 59: 20-33, 2015.
18. Shibata Y, Tanimoto Y, Maruyama N, et al.: A review of improved fixation methods for dental implants. Part II: Biomechanical integrity at bone–implant interface, *J prosthodont Res*, 59: 84-95, 2015.
19. Ogawa T: Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 29: e95-102, 2014.
20. Suzuki S, Kobayashi H, Ogawa T: Implant stability change and osseointegration speed of immediately loaded photofunctionalized implants, *Implant Dent*, 22: 481-490, 2013.
21. 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.
22. Jing D, Tong S, Zhai M, et al.: Effect of low-level mechanical vibration on osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in the repair of long bone defects, *Sci Rep*, 5: 17134, 2015.
23. 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.

24. Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, et al.: Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae, *J Oral Rehabil*, 37: 123-130, 2010.

25. Zhou C, Li Y, Wang X, et al.: 1,25 Dihydroxy vitamin D (3) improves titanium implant osseointegration in osteoporotic rats, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 114: S174-178, 2012.

26. Li Y, Li X, Song G, et al.: Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats, *Clin Oral Implants Res*, 23: 1038-1044, 2012.

27. Tao ZS, Zhou WS, Tu KK, et al.: The effects of combined human parathyroid hormone (1-34) and simvastatin treatment on osseous integration of hydroxyapatite-coated titanium implants in the femur of ovariectomized rats, *Injury*, 46: 2164-2169, 2015.

28. 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.

29. 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.

30. 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.

31. 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.

32. Rude RK, Gruber HE: Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations, *J Nutr Biochem*, 15: 710-716, 2004.

33. 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.

34. Watanabe T, Nakada H, Takahashi T, et al.: The Influence of Synthetic Bone Mineral to Bone Formation, *Int J Oral-Med Sci*, 13: 89-93, 2015.

35. Alghamdi HS, Cuijpers VM, Wolke JG, et al.: Calcium-phosphate-coated oral implants promote osseointegration in osteoporosis, *J Dent Res*, 92: 982-988, 2013.

36. Zacchetti G, Wiskott A, Cugnoni J, et al.: External mechanical microstimuli modulate the osseointegration of titanium implants in rat tibiae, *Biomed Res Int*, 2013: 234093, 2013.

37. Aparicio C, Padrós 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.

Table & Figures

Table 1: Mineral compositions (Wt %) of diets without and with SBM

	AIN-93M (Diet without SBM)	AIN-93M + SBM (Diet with SBM)
Calcium (Ca)	0.51	0.74
Phosphate (P)	0.30	0.48
Magnesium (Mg)	0.05	0.10
Zinc (Zn)	0.003	0.036
Fluorine (F)	0.00	0.005
Carbonate (CO ₃)	0.00	0.12
Natrium (Na)	0.10	0.10
Kalium (K)	0.35	0.35
Chlorine (Cl)	0.16	0.16

SBM: Synthetic bone mineral

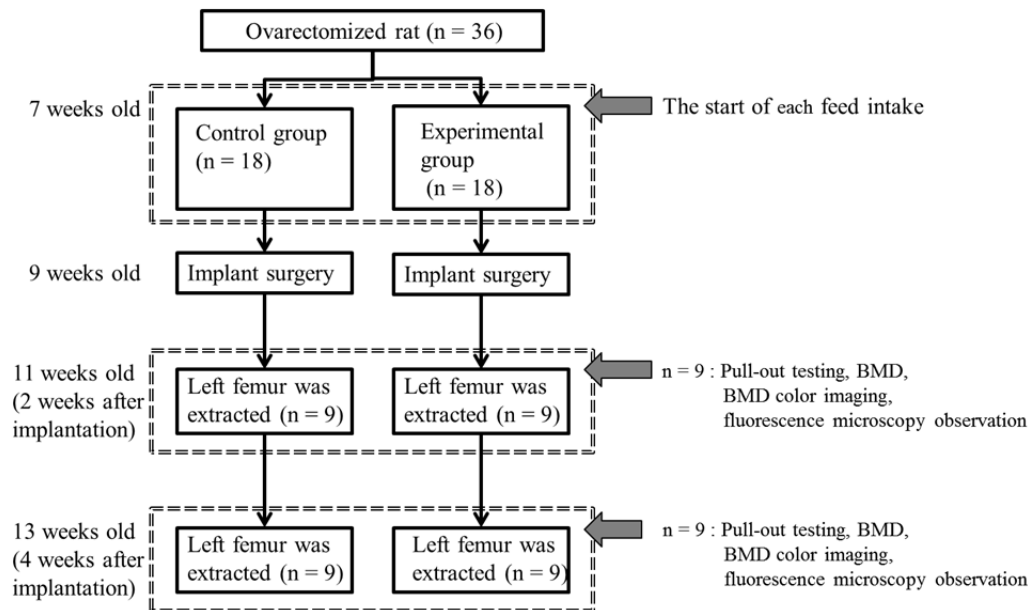


Figure 1: Time schedule

7 weeks old rats were randomly allocated to one of two groups: a control group was given the diet without SBM or an experimental group was given the diet with SBM. All 9 weeks old rats underwent implant surgery. Nine rats in each group were randomly selected and euthanised at 2, 4 weeks after implantation. All rats were allocated for pull-out testing, BMD analysis and fluorescence microscopy observation.

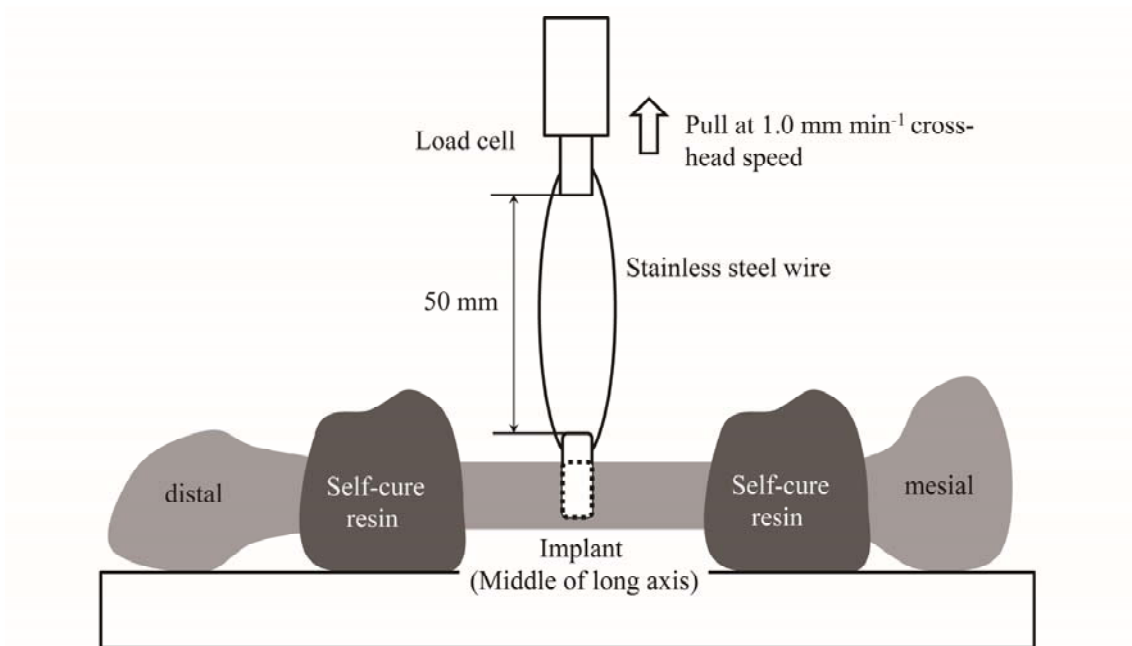


Figure 2: Pull-out strength test

Specimens were mechanically anchored to a baseplate with self-curing resin. The load cell was positioned to pull the implant as perpendicularly as possible to minimize shear forces, at a cross-head speed of 1.0 mm/min⁻¹.

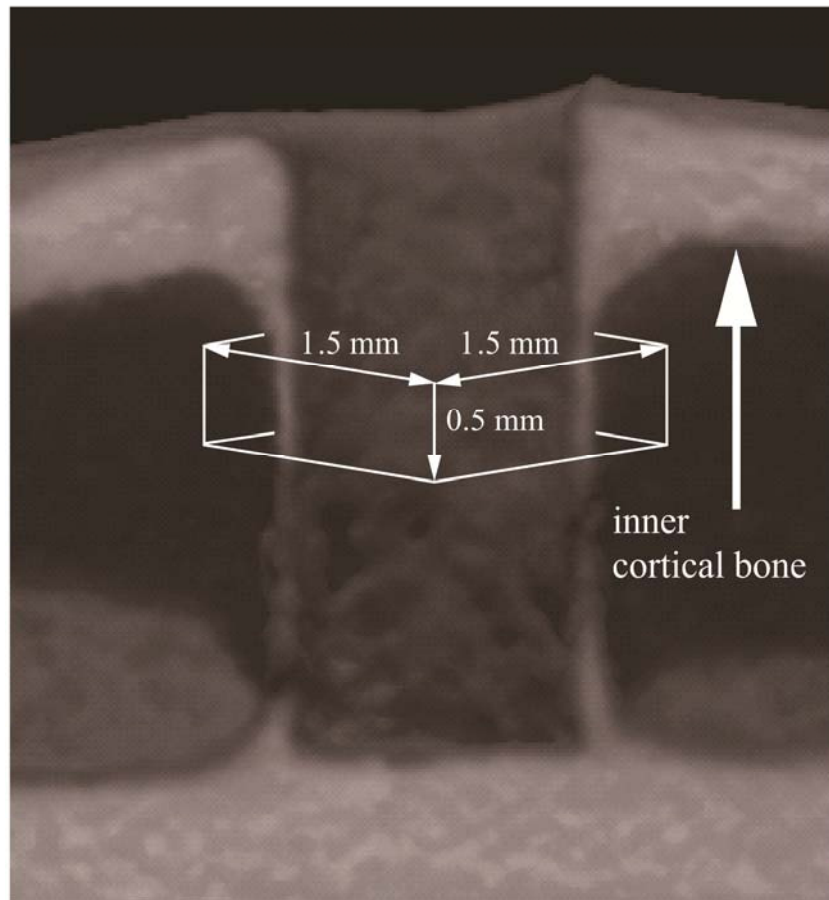


Figure 3: Peri-implant bone scanning for BMD analyses

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

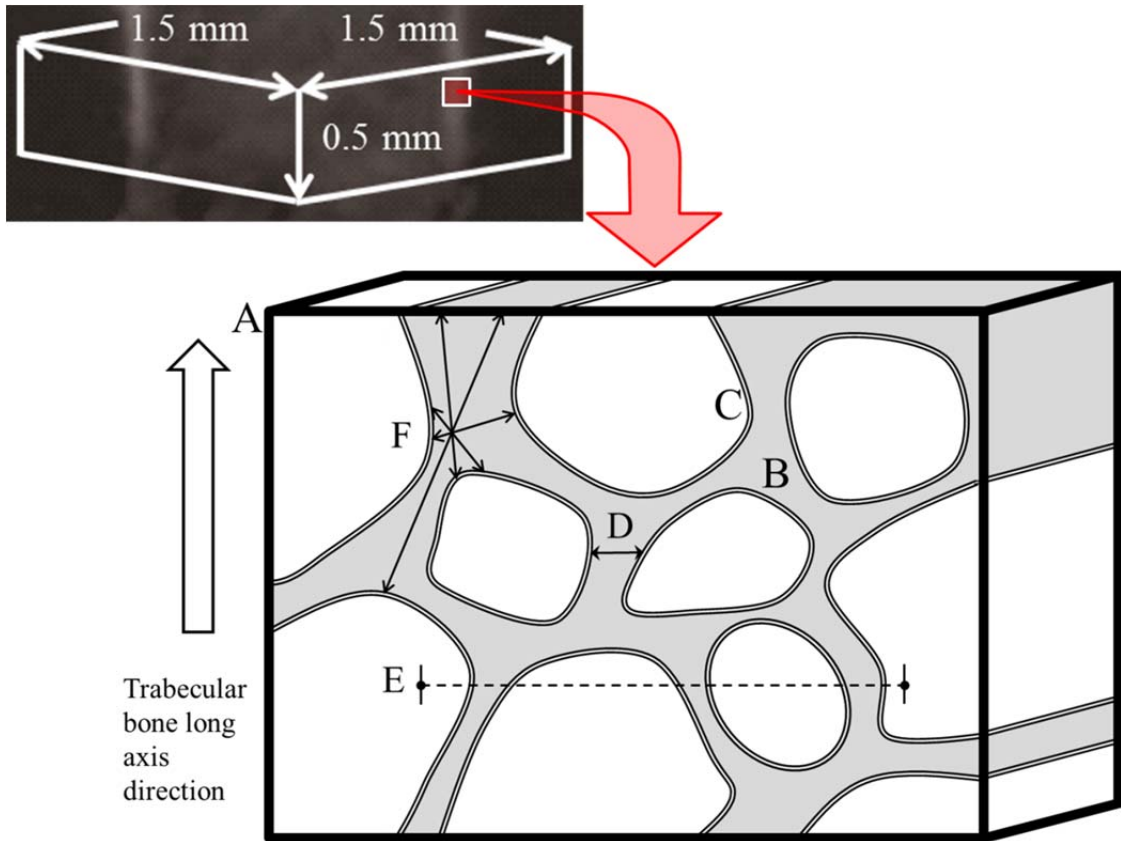


Figure 4: Bone quality measurement

- A. Total volume (TV): The volume of the entire figure, outlined by the bold black line.
- B. Bone volume (BV): The volume of the grey area.
- C. Bone surface: The surface area within the double lines.
- D. Trabecular thickness (TbTh): The distance between the two arrows.
- E. Trabecular number (TbN): The number of trabecular structures in the dashed line.
- F. Trabecular star volume (Vtr): Indicated by the radial arrows.

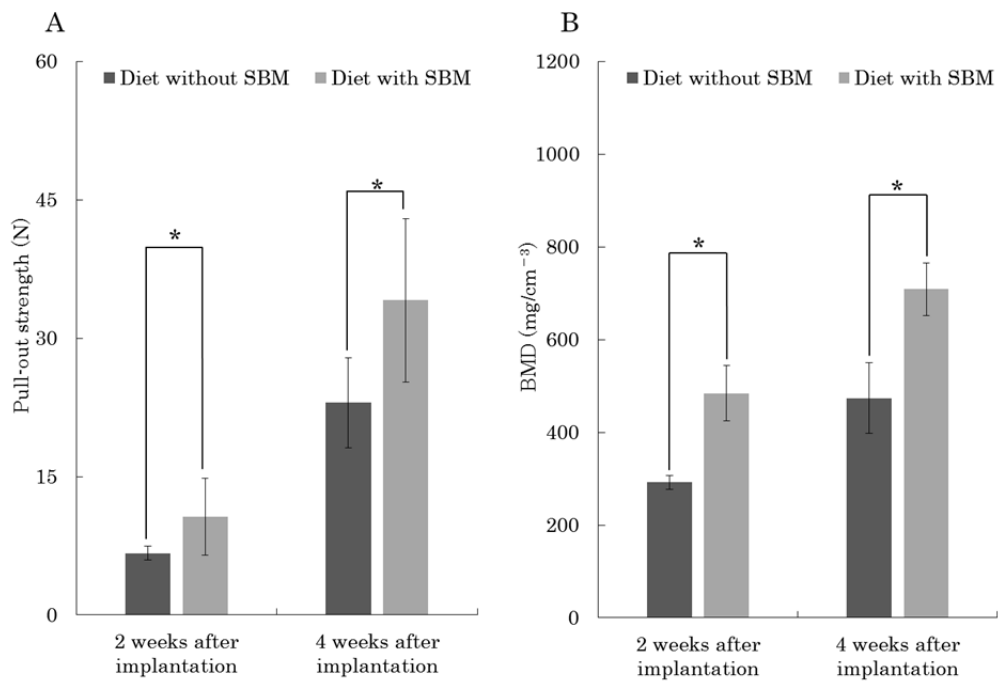
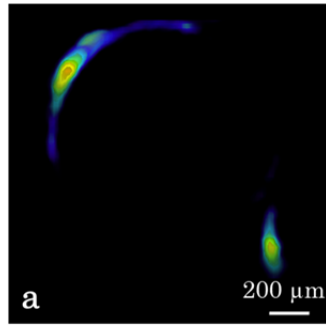


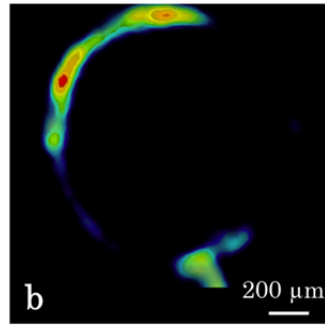
Figure 5: Between-group comparisons of BMD and pull-out strength (*: $p < 0.05$)

BMD: Bone mineral density, SBM: Synthetic bone mineral.

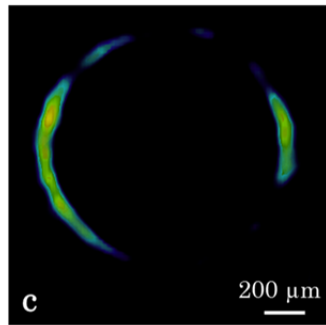
A



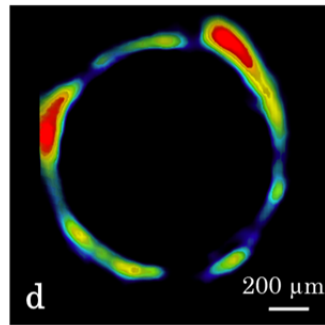
Diet without SBM
2 weeks after implantation



Diet with SBM
2 weeks after implantation

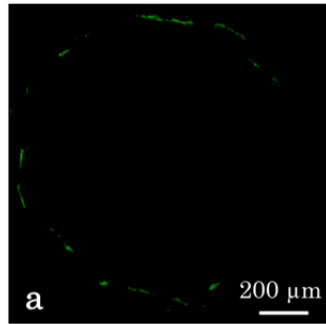


Diet without SBM
4 weeks after implantation

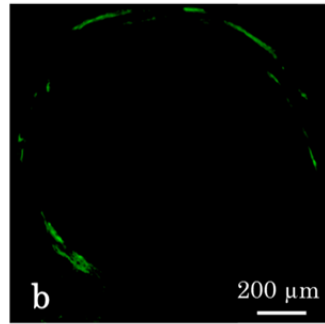


Diet with SBM
4 weeks after implantation

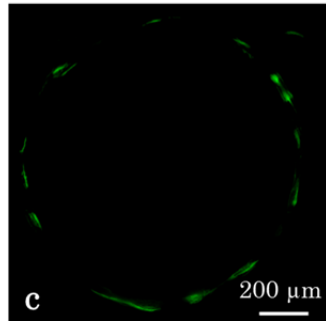
B



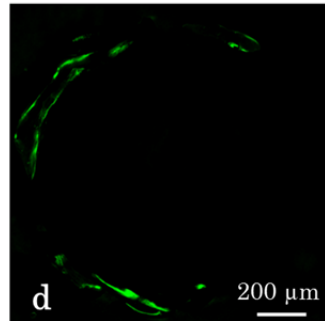
Diet without SBM
2 weeks after implantation



Diet with SBM
2 weeks after implantation



Diet without SBM
4 weeks after implantation



Diet with SBM
4 weeks after implantation

Figure 6: BMD color imaging and fluorescent imaging

A: BMD color image observations.

The Diet without SBM group color image was predominantly blue and green at 2 and 4 weeks after implantation (Figs. 6A-a and c); however, the Diet with SBM group color image was predominantly yellow, with some red and blue, at 2 and 4 weeks after implantation (Figs. 6A-b and d). Blue/light blue, green/yellow, and orange/red represent low, medium, and high BMD values, respectively.

B: Fluorescence images.

Fluorescence microscopy imaging of the Diet with SBM group had more green fluorescence (indicating new bone formation) than that of the Diet without SBM group at both 2 and 4 weeks after implantation (Fig. 6).

BMD: Bone mineral density, SBM: Synthetic bone mineral.

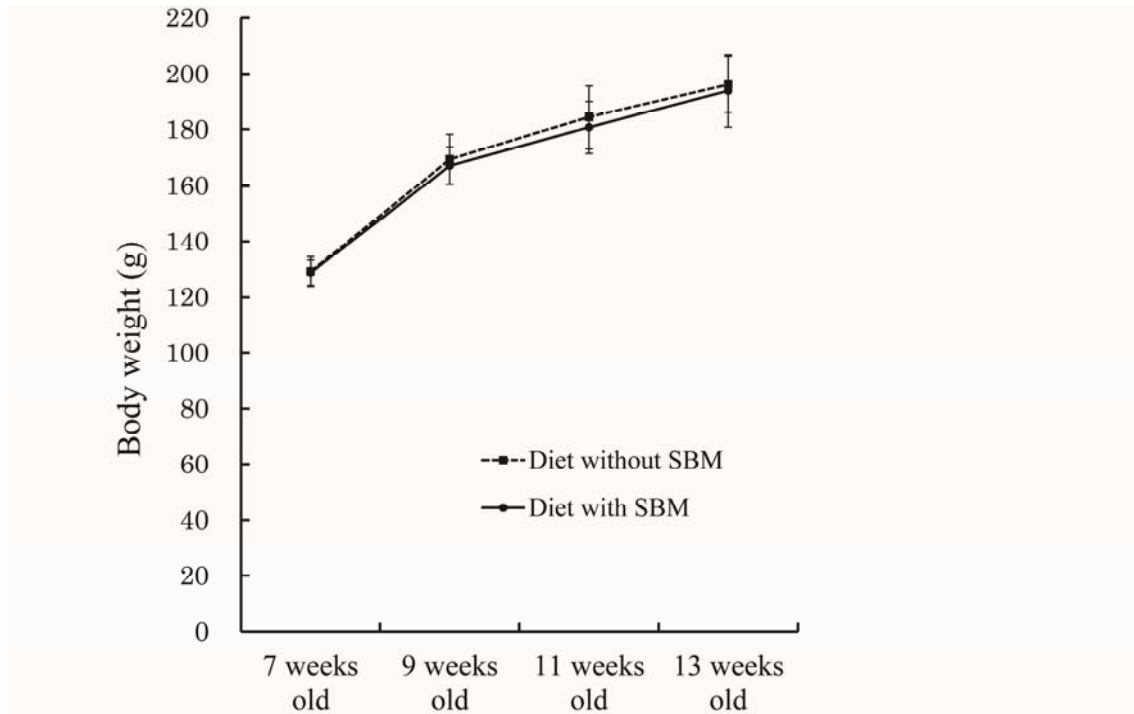


Figure 7: Body weight changes in the rats

Body weight significantly increased in both the Diet with SBM and Diet without SBM groups over the feeding period ($p < 0.01$). No significant body weight differences were observed between the groups at 2 and 4 weeks after implantation.

SBM: Synthetic bone mineral.

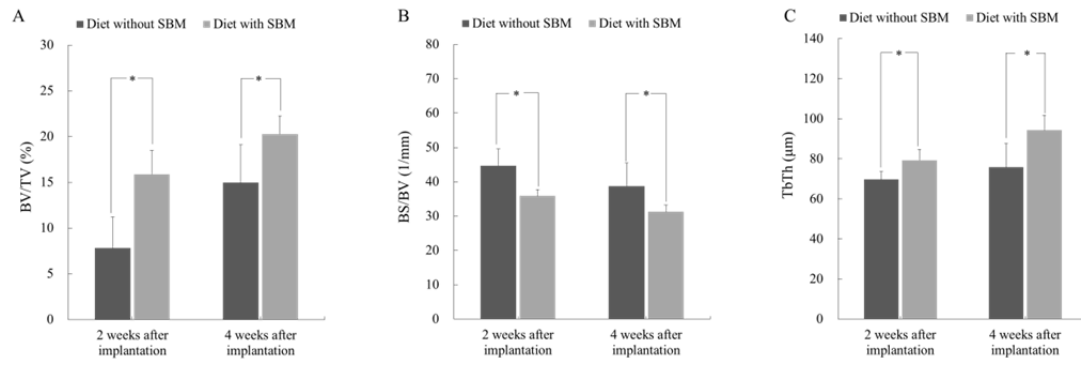


Figure 8: Between-group comparisons of BV/TV, BS/BV and TbTh (*: $p < 0.05$)

BV/TV: Bone volume fraction, BS/BV: Bone surface ratio, TbTh: Trabecular thickness.

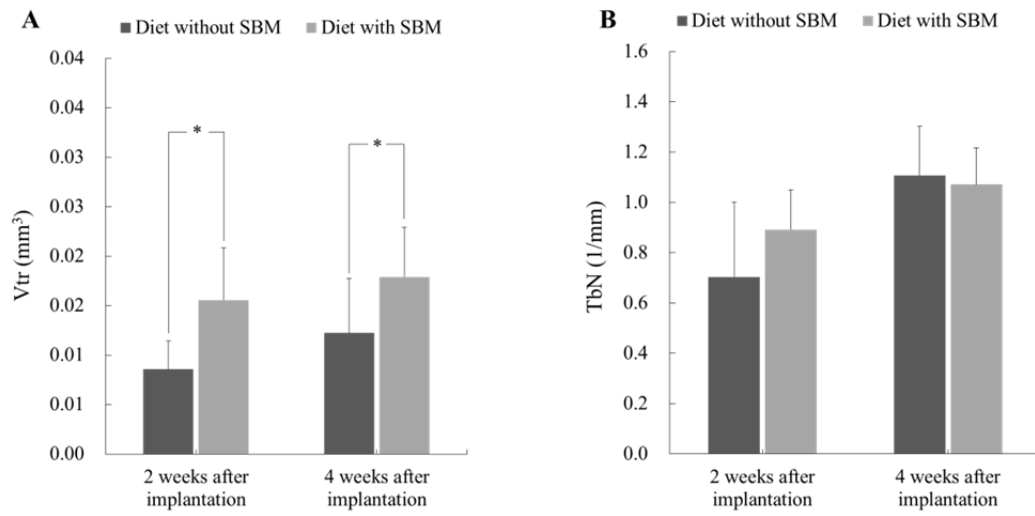


Figure 9: Between-group comparisons of Vtr and TbN (*: $p < 0.05$)

Vtr: Trabecular star volume, TbN: Trabecular number.