

依頼論文

◆特集：臨床イノベーションのための若手研究者の挑戦
バイオマテリアル・エンジニアリングの新たな展開

新しい骨増生術式および骨補填材料の開発 —スタチンの局所投与—

神野 洋平

Development of the novel bone augmentation technique and bone substitute materials —topical application of statin—

Yohei Jinno, DDS, PhD

抄 録

インプラント治療において、骨量不足症例への挑戦が増加し、骨増生の重要性が高まっている。骨増生に関する我々の研究を紹介する。

①骨増生の簡便化を目指し新術式の開発を行っている。単回のスタチン注射投与による無切開・非侵襲的骨増生を提案する。スタチンの骨形成作用に関する研究から、今回の開発に至った経緯について解説する。

②“骨を模倣する”というコンセプトで骨補填材料の開発を行っている。組織再生に必要な要素として、細胞、成長因子、足場、血流が知られており、骨とりわけ海綿骨はすべての要素を含んでいる。合成高分子化合物をスタート材料とした、海綿骨を模倣した自己細胞侵入型骨補填材を紹介する。

和文キーワード

骨増生、骨補填材料、スタチン

I. はじめに

口腔インプラントをとりまく状況は大きく変わり、外科手技の進歩、インプラント体の表面性状の改善などにより、骨量が不足する症例においてもインプラント体が埋入され、患者のインプラント治療に対する期待度が高くなっている。しかし、骨量が不足している部位へのインプラント体の埋入は術者を悩ませることが多い。外科主導のインプラント治療から補綴主導のインプラント治療へのシフトに伴い、インプラント埋入予定部位における骨量改善はインプラント治療に付随する処置のなかでも最も重要度の高い処置である。

我々の研究室では骨増生というテーマに対し、2つのアプローチで研究を進めている。

①現在の骨増生の術式(骨移植、上顎洞底挙上術など)は、難易度が高いことが多く、術者に高度な技術が要求され、患者の身体的負担も大きい。そこで我々は骨増生の簡便化を目指し新術式の開発を行っている。単回の薬剤注射による無切開・非侵襲的骨増生の新術式を提案する。我々は長年、高脂血症治療薬スタチンの

骨形成作用に関する研究を行っている。今回の新術式開発に至った経緯についても説明する。

②我々は、“海綿骨を模倣する”というコンセプトで骨補填材料の開発を行っている。再生に必要な四要素として、細胞、成長因子、足場、血流がよく知られており、海綿骨はすべての要素を含んでいる。我々は合成高分子化合物(poly-L-lactic acid (PLLA), polycaprolactone (PCL))をスタート材料とし、海綿骨の骨梁構造の再現(足場)を目指した。さらに、無機材料との複合化により材料内への細胞および血管侵入の効率化を達成した(細胞・血流)。さらにスタチン(増殖・分化因子)を用いることにより、高い骨形成能を持った自己細胞侵入型骨補填材料(ハイブリッド型骨補填材料)の開発を進めている。

これらの2つのアプローチの進行状況を紹介する。

II. スタチンを用いた研究から、新規骨増生法の開発に向けた研究へ

高脂血症治療薬スタチンは、3hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害剤で

あり、肝臓におけるコレステロール生合成を減少させ、その結果血清中のコレステロール濃度を低下させる。副作用が少ないことから世界中で広く用いられている。1999年にMundyらがスタチンが骨形成を促進し、BMP-2のmRNA発現を促進することを報告¹⁾して以降、スタチンの骨に対する様々な報告がされている。in vivo, in vitro 実験系で骨形成促進の報告が多数あり^{2,3)}、臨床研究においても、骨折リスクが減少したという報告⁴⁾がある。しかし、一方で骨形成を促進せず、骨吸収が促進されたという報告⁵⁾や、臨床研究でも骨折リスクに影響はないといった報告⁶⁾もある。

スタチンの生体での効果は最終的な結論に至っていないが、我々はスタチンを用いた口腔領域における骨増生を目指し研究を進めてきた。ラットへのスタチンの全身投与が、インプラント周囲骨に与える影響を解析し、インプラント周囲の骨密度およびインプラント-骨接触率が非投与群と比べて有意に増加したという報告⁷⁾を行った。実際に歯科領域での適用には局所投与が望ましいと考え、ラットの骨欠損モデルで、スタチンの局所投与を行い、骨形成促進、破骨細胞の活性抑制効果を明らかにした。しかし、スタチンの骨に対する効果は短期間に限られており、スタチンが局所で長期間作用できるためのキャリアの必要性が示唆された。キャリアとしてアルギン酸プロピレングリコールを用い、インプラント周囲にスタチンを局所投与した際のインプラント周囲への骨形成促進を報告⁸⁾した。

その後、種々の骨補填材料からスタチンを徐放させることにより、骨補填材料の機能の向上を目指した。ラットの骨欠損モデルにおいてスタチン含有の骨補填材料を填入したところ、骨補填材料周囲のみならず、少し離れた部位の既存骨への新生骨の添加が認められた。この結果より、スタチンと骨補填材料の複合体を、切開等の外科的処置を行うことなく経皮的に注射することによって投与し、骨増生を達成する可能性を探ることとした（複合体をドラッグデリバリーシステムとして用いた）。

今回、使用したのは α TCP（リン酸三カルシウム）粉末・アテロコラーゲンゲル・スタチンの複合体である。これらの構成成分を練和し、シリンジに注入、その後ラット頭蓋冠直上に注射した（図1）。最長8週の観察期間ののち、組織学的検討および組織形態計測学的検討を行った。スタチンを添加した群において、注入した複合体の直下や周囲の既存骨に新生骨の添加が認められた（図2）⁹⁾。観察期間が長くなるにつれて、添加した骨の密度および石灰化度が高くなっていった。観察期間が4週を超えると、添加した骨の成熟化が進み、既存骨との同一化が認められた。

臨床においては、垂直的な骨増生にはオンレーグラ

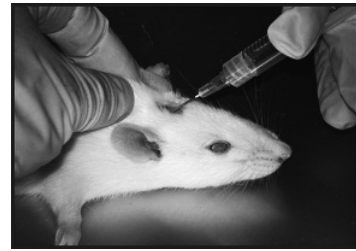


図1 Injection of the experimental composite
The experimental composites were injected subcutaneously over the calvarial periosteum with a 21-gauge needle.

実験試料（複合体）の注射

複合体は、頭蓋骨骨膜上に経皮的に注入した。

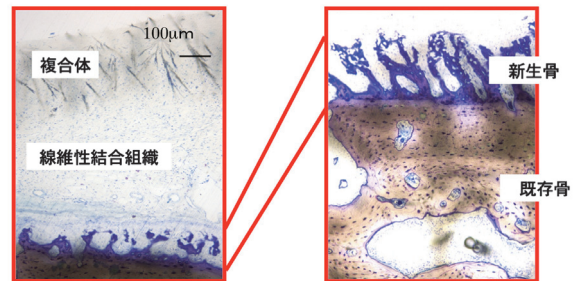


図2 Light micrographs of the bone in statin group
Direct contact between the injected composite and the existing bone is not observed. Newly formed bone is seen to be in direct contact with preexisting bone.

スタチン投与群における組織像

注入した複合体と既存骨の間に直接の接触はなかった。既存骨から連続的に新生骨の形成が認められた。

フトがしばしば用いられる。オンレーグラフトはレシピエントサイトに加えてドナーサイトの手術が必要であり、またレシピエントサイトは必ず粘膜が不足し、緊密な縫合が困難であるケースが多い。その結果、縫合部の裂開、粘膜の壊死とそれに伴う移植骨の感染という経過をたどるケースも少なくない。本複合体は、切開をせずに注射により非観血的に投与されるため、患者の負担軽減に加えこれらのリスクも大きく回避できる可能性がある。スタチンを添加した群にのみ、垂直的な骨増生が認められたことにより、本複合体が適切な速度でスタチンを徐放していることが示唆された。

この手法の臨床応用にはさらなる複合体の改良、大動物での実験が必要である。イヌの口腔内で同様の手技を用いた検討を行ったが、イヌにおいては垂直的な骨増生効果は認められなかった。さらなる至適濃度の検討を行い、大動物での骨増生を目指している。

III. 海綿骨を模倣した骨補填材料の開発

我々は、“海綿骨を模倣する”というコンセプトで骨補填材料の開発をおこなっている。海綿骨は、再生に必要な要素である細胞、成長因子、足場、血流の四要

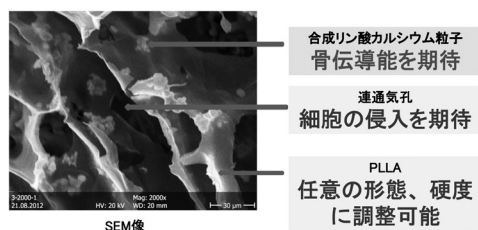


図3 SEM imaging of the spongyform PLLA with calcium phosphate
無機材料を封入したスポンジ状 PLLA の SEM 像

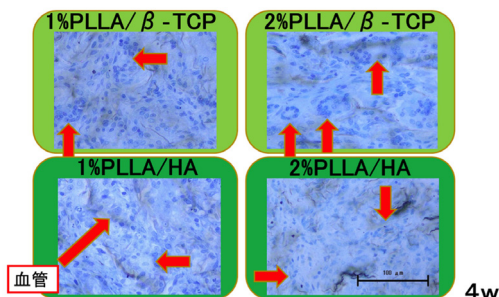


図4 Light micrographs of blood vessels and cell in the spongyform PLLA with calcium phosphate
Abundant blood vessels and cell infiltration into interconnected pores of the materials were observed.
無機材料・PLLA 複合体の組織像 (ラット頭蓋骨骨欠損部) すべての標本において、試料内部への多数の血管、細胞の侵入が認められた。

素をすべて含んでいる。この四要素を満たした材料が理想的な骨補填材料であると考えられるが、そのような人工材料は未だ実現していない。

我々は、①高分子化合物をスポンジ状に成形することによる足場として有効な性状の付与、②内部への細胞、血流の侵入の効率化、③スタチンを封入、徐放させることによる迅速な骨への置換、の三段階の戦略で、海綿骨を模倣した自己細胞侵入型骨補填材料を目指すことにした。それぞれの戦略について解説を行う。

①高分子化合物は、強度や構造を任意に調整可能であり、今回は PLLA, PCL を凍結乾燥し、スポンジ状の形態を付与した。作製した材料を SEM にて観察したところ、海綿骨に類似した構造が確認できた。作製した材料をラット頭蓋骨に作製した骨欠損に填入した。4 週の観察期間の後、組織学的検討を行った。PLLA を用いた試料の群において試料内部への線維性結合組織の侵入が認められた。

② PLLA に、無機材料 (β TCP, HA) を封入し (図 3), 材料内部への骨系の細胞、および血管の侵入を目指した。作製した材料をラット頭蓋骨および脛骨に作製した骨欠損に填入した。4 週の観察期間の後、組織学的検討を行った。頭蓋骨に作製した骨欠損部に填入した材料の内部に、多くの細胞 (線維芽細胞様細胞) および

血管の侵入が認められた (図 4)。脛骨に作製した骨欠損部に填入した材料の内部には、新生骨が認められた。

③さらにスタチンを封入した材料を作製した。ラット脛骨に作製した骨欠損に填入し、組織学的検討を行った。スタチンなしの群と比較して多くの新生骨を材料内部に確認できた。

我々は、既存の材料を組み合わせることにより (ハイブリッド型骨補填材料)、自己細胞侵入型骨補填材料実現への第一歩を踏み出した。今回開発中の骨補填材料はスポンジ状であり操作性も良好である。抜歯窩への適用も含め、広い用途での使用が期待される。現在、さらなる材料内部への新生骨の誘導を目指している。

IV. 今後の展望

インプラント治療において、骨増生は避けて通れない処置であり、その手法の簡便化、よりよい骨補填材料の開発は多くの歯科医師から期待されている。さらなるデータの蓄積を進め、今回紹介した 2 つのコンセプトの臨床応用につなげたい。

文 献

- 1) Mundy GR, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; 286: 1946-1949.
- 2) Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 688-692.
- 3) Yazawa H, Zimmermann B, Asami Y, Bernimoulin JP. Simvastatin promotes cell metabolism, proliferation, and osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2005; 76: 295-302.
- 4) Chen KA, Andrade SE, Boles M, Buist DS, Chase GA, Donahou JG, Goodman MJ, Gurwitz JH, LaCroix AZ, Platt R. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet* 2000; 355: 2185-2188.
- 5) Von Stechow D, Fish S, Yahalom D, Bab I, Chorev M, Muller R, Alexander JM. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskelet Disord* 2003; 4: 8.
- 6) Van Staa TP, Wegman S, de Vries F, Leufkens B, Cooper C. Use of statins and risk of fractures. *JAMA* 2001; 285: 1850-1855.
- 7) Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. A histological and histometrical study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 346-350.
- 8) Moriyama Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Koyano K. Topical application of statin affects the bone healing around implants. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 600-605.
- 9) Jinno Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Tsukiyama Y, Koyano K. Vertical bone augmentation with fluvastatin in an injectable delivery system: a rat study. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 756-760.

著者連絡先：神野 洋平

〒 812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1

Tel: 092-642-6441

Fax: 092-642-6380

E-mail: jinno315@dent.kyushu-u.ac.jp