

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893179

研究課題名(和文) 薬剤徐放カプセル キトサン複合体の骨補填材への応用研究

研究課題名(英文) Development of bone substitute materials using chitosan containing microsphere.

研究代表者

内藤 禎人 (NAITO, Yoshihito)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：20509773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：シンバスタチンは骨形成を促進する薬剤として広く知られている。そこで、薬剤徐放能を發揮する乳酸グリコール酸重合体(PLGA)からなる薬剤徐放カプセルを作製し、シンバスタチンを封入した。徐放期間による骨形成促進作用の違いを知るために、2種類の異なる徐放プロファイルを有するカプセルを作製し、それぞれ足場材料としてキトサンと混練した。マイクロカプセルでは徐放期間は約1カ月間であったが、ナノカプセルでは初期の段階で放出していた。ラット頭蓋骨を用いた動物実験により、骨形成促進作用の比較を行ったが、継続的にシンバスタチンを徐放し続けたマイクロスフェア・キトサン混合体では有意に骨形成促進効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that simvastatin is a cholesterol-lowering drug known to affect bone formation in vivo and its sustainable administration into localized areas is of particular interest in the dental field. Simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) formulations (PLGA microspheres and PLGA nanospheres) were compared to investigate whether a sustainable supply of simvastatin is effective for bone regeneration. PLGA microspheres successfully presented sustained release of simvastatin for one month, whereas simvastatin was continuously released from PLGA nanospheres within one week. In animal study, PLGA microspheres were superior to PLGA nanospheres on bone regeneration effect. Our data suggest that simvastatin-loaded PLGA microspheres can release simvastatin sustainably and induce bone formation more efficiently than PLGA nanospheres, thus promoting bone regeneration.

研究分野：歯科補綴

キーワード：生体材料 歯科インプラント 骨補填材 薬剤徐放性

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療予定部位に十分な骨量が確保できない場合、骨補填材を補填した後、インプラント体を埋入する。自家骨を移植した場合は、母床骨とのなじみも良く、良好な結果が得られる可能性が高いが、採取できる骨量に限界があるため、近年では人工骨を利用することが多い。人工骨は自家骨に比べ骨伝導能が劣る欠点がある。したがって、材料学的に優れている人工骨に対して、骨形成能を付与することが望まれている。

また、骨再生、骨形成に要する期間に渡り、薬剤が持続的に作用することが好ましい。そこで、薬剤徐放担体として頻用されている乳酸グリコール酸重合体 (PLGA) に着目した。PLGA に薬剤を封入し、徐放カプセルを作製する。PLGA は体内で加水分解により二酸化炭素、水に分解され体外に排出されるため、非常に生体安全性に優れた材料である。PLGA 徐放カプセルの粒径を制御することで、カプセルの崩壊するタイミングを調整できる。つまり粒径の配合比率を最適化することで、骨形成期間中にわたって徐放させることが可能である。

2. 研究の目的

(1) 徐放カプセル - キトサン複合体の最適化

骨形成能を有するシンバスタチン粉末を封入し、薬剤徐放プロファイル制御可能な徐放カプセルを調製する。そして、キトサンハイドロゲルとの複合体を作製し、その物性を *in vitro* 試験にて確認する。

(2) 複合体の臨床応用可能性の検討

徐放プロファイル評価で最適 (30 日にわたって徐放制御可能) と判断された徐放カプセル骨補填材複合体を、*in vivo* 試験として、ラット頭蓋骨に骨欠損を作製し材料を填塞、骨形成能の評価を行う。

3. 研究の方法

骨形成能を有するシンバスタチン粉末を封入し、薬剤徐放プロファイル制御可能な徐放カプセルを調製した。そして、骨補填材としてキトサンを選択し、キトサンとの複合体を作製し、その物性、骨形成能を *in vitro*、*in vivo* 試験にて確認する。

(1) 薬剤徐放カプセルの調製

骨形成促進作用のあるシンバスタチン粉末を使用した。マイクロスフェア粒子の調製は乳酸グリコール酸重合体 (PLGA) とシンバスタチン粉末を調製することで得た。

PLGA とスタチン粉末をジクロロメタン (DCM) PLGA に溶解した油相 (O) を混合し、高速攪拌した。これを外水相 (W) のポリビニルアルコール (PVA) 溶液に滴下し、高速攪拌して O/W エマルジョンを得たのち、室温にて攪拌して溶媒を溜去し固化した後、

粒子を洗浄後凍結乾燥しスタチン含有マイクロスフェアを得た。

調製した徐放カプセルからの徐放プロファイル (放出量の経時的变化) を検討した。溶出試験溶液として、50 mL の 0.1 w/v% ポリソルベート PBS 溶液を用意した。これに透析膜内に 1 mg のマイクロ粒子と溶出試験溶液 1 mL 入れ、サンプル瓶内で 250 rpm で攪拌した。1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 日後に透析膜の外側の溶液 1 mL を取り出し、これを 0.46 μm のフィルターにかけ、高速液体クロマトグラフィーで測定波長を 293 nm としてシンバスタチンの定量を行い、検量線を作成し、徐放プロファイルの評価を行った。

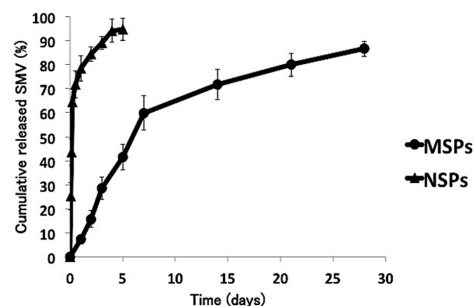
また、調製した徐放カプセルの骨芽細胞に対する効果や徐放特性を *in vitro* で確認した。シンバスタチン原粉末、Blank PLGA カプセル (何も封入していないマイクロスフェア粒子)、スタチン含有徐放カプセルをそれぞれ粉末の状態や懸濁液の状態で骨芽細胞へ投与し、細胞生存数、ALP 活性、von Kossa 染色等で評価した。

複合体の *in vivo* 評価

in vitro 試験で最適封入条件と判断された徐放カプセルを用いて、動物実験を行い、骨再生能を評価した。実験動物にはラットを用い、鎮静麻酔、局所麻酔下で頭頂部を切開し、径 5mm の骨欠損を作製。3 つの欠損を用意し、なにも補填しない群、シンバスタチンを添加した群、徐放カプセルを添加した群を設置し、軟組織を閉鎖、縫合した。シンバスタチン添加群と徐放カプセル添加群の欠損体積当たりの薬剤量は統一しておいた。なお、動物実験は徳島大学動物実験指針に従って行った。4, 8 週間後に周囲組織と一塊で取り出し、固定する。試料と周囲組織の反応状態をマイクロ CT による観察、分析によって評価した。つまり、欠損部内への骨成長を確認し、欠損部体積あたりの新生骨体積を計測した。

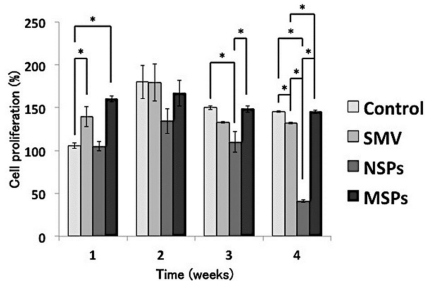
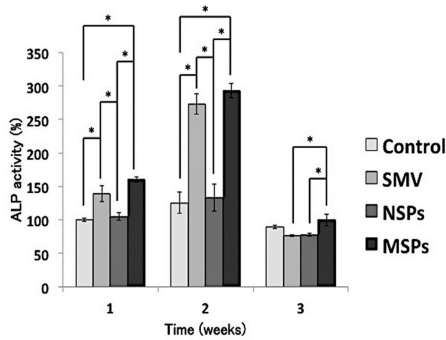
4. 研究成果

作製したシンバスタチン含有マイクロスフェアは、薬剤含有率が $89.82 \pm 0.78 \%$



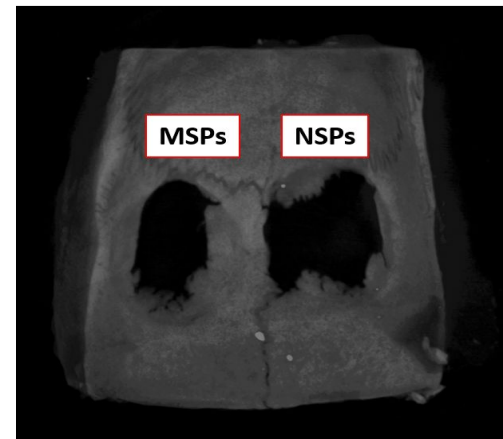
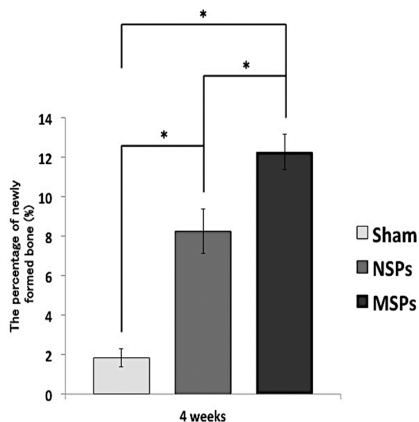
であり、平均粒径が 24.72 μm であった。徐放プロファイルは約 30 日かけて緩やかな徐放挙動を示した。

骨芽細胞に対する評価では、細胞分化、ALP 活性ともにマイクロスフェア含有群で有意に良好な値を示した。



ラット頭蓋冠への埋植試験においては、4, 8 週ともに無添加群、シンバスタチン含有群に比べて、マイクロスフェア含有群で有意に高い骨形成能を示した。

今後、より綿密な材料設計の最適化や大型動物での評価が必要であるが、徐放担体を駆使し、骨形成期間内に持続的に骨形成促進薬を徐放させることは、骨形成能を促進に有利であることが示唆された。



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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 禎人 (NAITO, Yoshihito)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：20509773

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：