

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06490

研究課題名(和文)インプラント周囲組織の治癒を促進する新規手法の開拓

研究課題名(英文)Development of the new technique to promote healing of the implant treatment

研究代表者

安波 礼之(Yasunami, Noriyuki)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：00758021

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)：歯を抜くと周りの骨は経時的に吸収し、それに伴って周囲歯肉のボリュームも減少するため、インプラントを含めた欠損補綴処置に困難を来すことが多い。本研究では、脂質異常症治療薬でありながら多様な効果が報告されているスタチンに着目し、インプラント埋入後周囲組織の治癒に対する効果を検討した。ラットインプラント埋入モデルを用い、インプラント埋入と同時にフルバスタチン含有マイクロカプセルを投与した結果、インプラント周囲の骨-インプラント接触率が向上することを確認した。また、すなわち、フルバスタチンはインプラント周囲の治癒を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An adequate volume of alveolar bone is one of the most important factors determining a favorable outcome in the field of dental implantology. Statins have been widely used for the clinical treatment of hyperlipidemia. In addition, it was reported that it promoted bone formation. In this study, we examine the effect of fluvastatin on promotion of bone-implant contact (BIC) after implant treatment. Right maxillary first molars were extracted from rats and replaced with experimental implants. Then one of the following was immediately injected, as a single dose, into the gingivobuccal fold: control (no administration), PLGA microspheres without a statin (active control), or PLGA microspheres containing 0.5 (FS-PL 0.5) or 1.0 mg/kg (FS-PL 1.0) of fluvastatin. At days 28 after injection, BIC were evaluated. BIC was significantly promoted at FS-PL 0.5 and 1.0. A single dose of topically administered fluvastatin-impregnated PLGA microspheres promoted BIC at implant treatment.

研究分野：歯学

キーワード：インプラント 治癒 スタチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、欠損した歯を補う方法の一つとしてインプラントが選択されるようになり、高い成功率が報告されている

(Albrektsson, 1988 Adell, 1999)。インプラントは顎骨に埋入されるため、インプラントを支えるためには十分な骨幅・骨高さが必要となる。また、審美性の維持のためにも十分な軟組織の量が必要である(Nozawa, 2006)。しかし抜歯を行うと周囲の既存骨は吸収してしまい(Schropp, 2003 Araújo, 2005)、それに伴い軟組織のボリュームも減少してしまう。その結果、欠損部の機能的・審美的回復を行うことが困難になり、また治療の長期予後にも影響する点が懸念される。

我々の研究室では、HMG-CoA reductase inhibitors(スタチン)による骨形成促進効果に着目して研究報告を行ってきた。スタチンとは、脂質異常症の治療薬(Goldstein, 1990 Endo, 1992)で、副作用がほとんどなく安全で安価・安定な薬剤であり、変性を起こしにくく、保管や運搬が容易なため、世界中で幅広く使用されている。また、コレステロールを低下させるだけでなく、骨形成促進作用(Mundy, 1999)、骨質・骨量の改善効果(Ayukawa, 2009 Masuzaki, 2010)、抗炎症作用(Sakoda, 2006 Rego, 2007)、抗菌作用(Jerwood, 2008)、血管新生促進作用(Altieri, 2001 Maeda, 2004 Liu, 2009)、皮膚の治癒促進作用(Vukelic, 2010)など、多面的な作用が数多く報告されている。

我々の研究室ではスタチンを用い骨形成の促進効果を研究報告してきた(Ayukawa, 2009 Masuzaki, 2010)。しかし、局所投与において適切なキャリアを用いなければ長期的にスタチンの効果が減弱してしまうことが問題点として挙げられた。そこで申請者は、局所において注射にて投与可能で、さらには薬剤の長期徐放が可能で PLGA マイクロカプセルにフルバスタチン(FS)を内包した複合体を作製し(FS-PL)、局所単回投与によるラット抜歯窩の治癒促進効果を検討した。その結果、抜歯後3日目にはFS-PLを投与することによって抜歯窩上部の上皮の連続性が回復していた。抜歯後28日目には、結合組織面積が増加、歯槽骨の骨密度、骨高さ、骨体積の増加が認められた。

すなわち、FS-PLを投与することによって、抜歯術後の骨・軟組織の治癒を促進させる可能性が示唆された。

そこで、スタチンの多面的作用を用いることによって、インプラント治療施術後の治癒を促進するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

スタチンがインプラント周囲組織に与える

影響について検討すること

## 3. 研究の方法

### (1) FS-PLの作製

スタチンを一回の皮下投与で長期的に作用させるために、過去に当研究室で報告した長期徐放性のある PLGA-フルバスタチン複合体(FS-PL)を用いることとした。蒸留水 2.5 ml に gelatin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 400 mg, フルバスタチン (Toronto Research Chemicals Inc, North York, Canada) 450 mg を混ぜ 60 で攪拌した。この過程で W1 相が形成される。次にジクロロメタン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 5ml に対し PLGA-7510 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 4 g を混合、攪拌後、その中に W1 エマルジョンを注ぎ攪拌し 15 まで冷却した。この過程で W1/O エマルジョンが形成される。さらに 0.25 % ポリビニルアルコール (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を蒸留水中に溶解させ水溶液を作製し、数日間攪拌し懸濁液とした。この過程で Ww1/O/W2 エマルジョンが形成されることとなる。74  $\mu$ m の篩を通して粗大粒子を除去後、2000 rpm/2 min で遠心分離し分取、水洗後、真空凍結乾燥機 (Type75050, Labconco Corp, Missouri, USA) を用いて凍結乾燥し、十分に脱溶媒した。同様の方法を用いてフルバスタチンを加えない PLGA のみの顆粒も作製した。

### (2) fluvastatin 徐放試験

FS-PL 1mg を 2ml の人工的組織液(SBF)中に浸水し、ポリ塩化ビニル製チューブに入れ、それを 37 に保温したウォーターバスに浸漬し、1日おきに SBF を 70 $\mu$ l 採取し分光光度計で吸光度を測定することで累積溶出量を 30 日間測定した

### (3) インプラント埋入および薬剤投与

実験動物には、6週齢の雄性 Wistar 系ラット (Kyudo, Tosu, Japan) を用いた。ラット第一臼歯抜歯窩に適合するように設計した直径 2 mm 長さ 4.5 mm の純チタン製スクリータイプインプラント (Skyblue, Fukuoka, Japan) を用いた。全身麻酔下にて上顎右側第一臼歯抜歯後、歯科用リーマー (Torpan, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) の #80~#120 を用いて順次拡大し、インプラント埋入窩を形成した。インプラント体はプラットフォームが歯肉と同縁になるように植立した。植立後、抜歯窩近傍の歯肉頬移行部に以下に示す薬剤を 11 G の注射針にて投与した。投与群はフルバスタチンの有無、含有量により 4 群に分類した(表 1)。歯科用リーマーにてインプラント埋入窩を形成し、インプラント埋入後注射針にて PLGA-フルバスタチンを投与した。コントロールは生理食塩水を 0.1 ml 注射し、PLGA 及び PLGA-フルバスタチン複合体は、0.1 M リン酸緩衝液 0.1 ml に懸濁して注射した。

インプラント埋入 4 週後に屠殺を行った。

抱水クロラルによる全身麻酔下にて、ヘパリン(2000 I.U./ml)含有リン酸緩衝液(PBS)(PH7.4, 4 )にて脱血後、0.1 M リン酸緩衝 5%グルタルアルデヒドおよび 4%パラホルムアルデヒド混合液(pH7.4, 4 )にて灌流固定を施した。インプラント体を含む右側上顎骨を採取し、さらに同固定液にて4、1週間の浸漬固定を行った。その後、通法通りエタノール上昇系列および 100%アセトン、100%キシレンにて脱水後、メチルメタクリレート樹脂(日新イーエム(株)、東京)に包埋し、加熱重合を施した。試料をインプラントの長軸に平行になるように、EXAKT Cutting & Grinding System (Exakt Appratable, Norderstedt, Germany)を用い、Donath and Breuner の方法(65)に準じて、薄切・研磨し、厚さ 70 μm の非脱灰研磨標本を作製した。

組織学的評価は光学顕微鏡を用いて行った。全ての標本の染色には hematoxylin-eosin 染色を用いた。染色後、封入し、光学顕微鏡(BX51, オリンパス光学工業)にて組織学的観察を行った。

#### 形態計測学的評価

光学顕微鏡を用いて、Ti インプラントに対する骨接触率(BIC)を算出した。

データは平均値+標準偏差で表示した。統計学的解析は一元配置分散分析によって行った。有意差検定は 5 %以下を統計学的有意差ありとした。

non-statin 群	コントロール(生理食塩水)	CO
	PLGA	PL
statin 群	フルバスタチン 0.5 mg/kg 含有 PLGA	FS-PL 0.5
	フルバスタチン 1.0 mg/kg 含有 PLGA	FS-PL 1.0

[表1] 投与群の分類

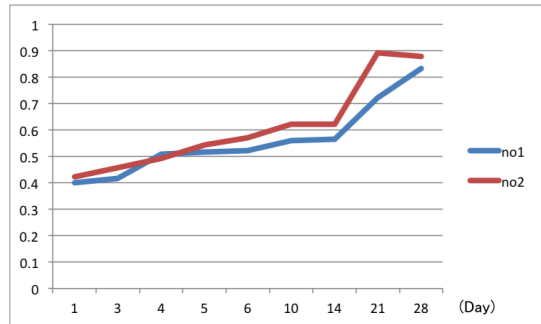
抜歯のみ群(active control)をCO、PLGA投与群(negative control)をPL、フルバスタチン 0.5mg/kg 含有 PLGA 投与群をFS-PL 0.5、フルバスタチン 1.0mg/kg 含有 PLGA 投与群をFL-PL 1.0と表記。

## 4. 研究成果

### (1) fluvastatin 徐放試験

複合体からの fluvastatin 溶出量は1日目

が最も多く、その後はほぼ一定量の溶出量を示した(図1)。



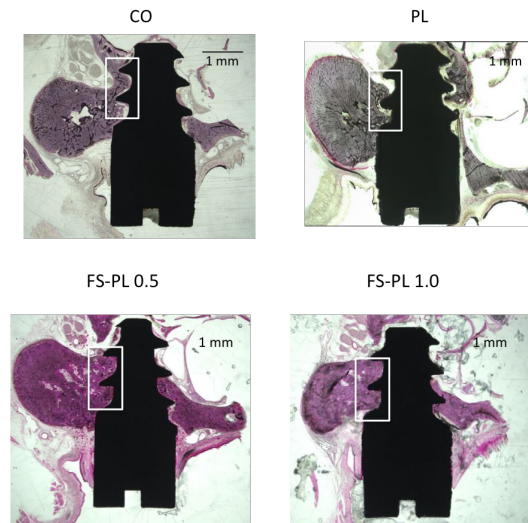
[図1] fluvastatin 徐放試験

1日目は fluvastatin の溶出が大きい、それ以降はほぼ一定の溶出であることが認められた。

### (2) 組織学的検討

全ての群でチタンインプラントがオッセオインテグレーションしている所見が確認された。スタチン投与群では非投与群と比較してより緊密な骨との接触が確認された。全ての群においてインプラント周囲溝から上皮性付着部位、結合組織性付着部位をへて骨縁へといたる生物学的幅径の形成が確認された。

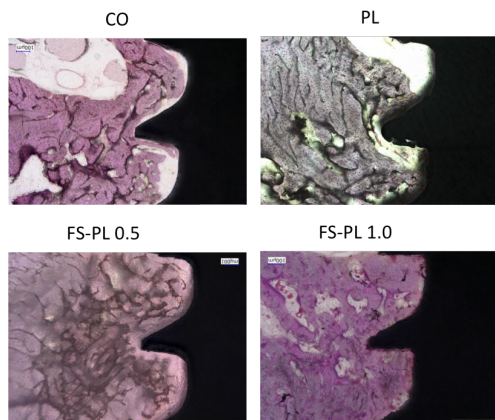
また、全ての群で感染所見は認められなかった(図2)。



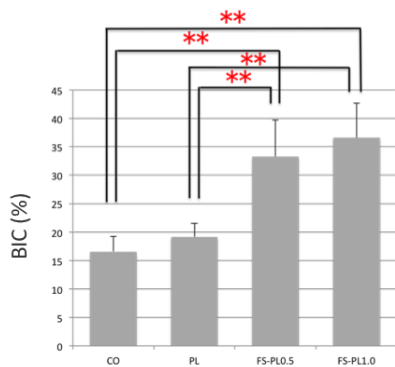
[図2] 観察期間 28 日の光学顕微鏡像(ヘマトキシリン・エオジン染色)

### (3) BIC (Bone Implant Contact)

投与 28 日目において、PLGA-フルバスタチン複合体投与群ではフルバスタチン非投与群と比較して有意に BIC が増加した(図3)。



スケールバー：100 μm



[図 3] BIC (Bone Implant Contact)

n=5

## 5. 考察

インプラントと骨との直接的な接触、すなわちオッセオインテグレーションはインプラント治療の長期生存率に関与することは知られている。オッセオインテグレーションインプラントのオリジナルプロトコールでは、インプラント埋入後、下顎では3ヵ月、上顎では6ヵ月の免荷期間を設定し、周囲骨組織の治癒を完全に行うとしている。それは、この期間が荷重を加える前の十分なオッセオインテグレーションを獲得するために必要な期間とされてきたためである(Atsuta, 2005)。しかし、骨質が悪く、良好な初期固定が得られない場合はさらに免荷期間を延長する必要がある。本解析では、FS-PLを投与することによってインプラント埋入後28日目に、フルバスタチン非投与群と比較してBICが向上することを確認した。このことは、以前の研究においてFS-PLを投与することによって骨密度・骨体積・垂直の高さを増加した結果と矛盾しない。すなわち、インプラント埋入後にFS-PLを局所投与することによって、BICを向上したと考えられる。近年、欠損補綴の1選択肢としてインプラント治療が普及する中、埋入部位の骨質が脆弱なケースや、短いインプラントの使用、抜歯

即時にインプラントを埋入するといったシビアなケースが増えているのが現状である。そのようなケースにおいても、FS-PLを局所投与することで、より強固な早期のオッセオインテグレーションを獲得することができると示唆された。

## 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 2 件)

Norio Goto, Ken Okazaki, Yukio Akasaki, Kohei Ishihara, Koji Murakami, Kiyoshi Koyano, Yasunori Ayukawa, Noriyuki Yasunami, Tomohiro Masuzaki, Yasuharu Nakashima. Single Intra-Articular Injection of Fluvastatin-PLGA Microspheres Reduces Cartilage Degradation in Rabbits With Experimental Osteoarthritis. J Orthop Res. 2017 Mar 17. doi: 10.1002/jor.23562. 査読有

Noriyuki Yasunami, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Ikiru Atsuta, Yunia Dwi Rakhmatia, Yasuko Moriyama, Tomohiro Masuzaki, Kiyoshi Koyano. Acceleration of hard and soft tissue healing in the oral cavity by a single transmucosal injection of fluvastatin-impregnated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. An in vitro and rodent in vivo study. Biomedical Materials, 11(1), 015001, 2016. 査読有

[学会発表](計 1 件)

原口拓也, 鮎川保則, 荻野洋一郎, 熱田生, 安波礼之, 古橋明大, 大城和可奈, 古谷野潔. チタンの塩化カルシウム水熱処理がタンパク質, 細胞および細菌の付着に与える影響. 第46回日本口腔インプラント学会学術大会. 2016年9月17日. 名古屋.

[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

安波 礼之 (Yasunami Noriyuki)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：00758021

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )