

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390490
 研究課題名（和文） 戦略的補綴治療としての補綴前骨増生を手術なしで行う手法の開発とその原理の検討
 研究課題名（英文） The development of non-surgical preprosthodontic bone augmentation procedure for the strategic prosthodontic treatment
 研究代表者
 鮎川 保則（AYUKAWA YASUNORI）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：50304697

研究成果の概要（和文）：

人工材料を使用せず、自身の骨で、ドナーサイトを作らずに骨量増大を達成することを目標として本研究を企画した。

種々のキャリアより、アテロコラーゲンと α TCPの組み合わせ、あるいはPLGAが生体内残存性、骨形成活性を有するスタチン徐放性両方の点で優れていることが示唆された。また、これらのキャリアには有害性がないことが示唆された。これらは培養骨芽細胞の分化を促進し、ラット生体内において骨増生効果を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to achieve preprosthodontic bone augmentation without using artificial, exogenous or autogenous bone substitute. Among several drug delivery systems, a compound consisted of atelocollagen and alpha-TCP, and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) were superior to others from the point of view of persistence and sustained-release capability of statin, a bone promotive drug. Both statin-collagen-TCP complex and statin-impregnated PLGA had a promotive effect on osteoblastic cell differentiation in vitro, and they had a bone formation capacity in rat model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,500,000	2,500,000	11,050,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：補綴前骨再生、トップダウントリートメント、インプラント

1. 研究開始当初の背景

近年、「トップダウントリートメント」の概念の広がりとともに、インプラント治療においては<埋入できる部位>にインプラントを埋入するのではなく、<埋入したい部位

>にインプラントを埋入する、またブリッジにおいてもできるだけ審美的な、自然なエマージェンスプロファイルを有するポンティックを作製するようにパラダイムがシフトしてきた。トップダウントリートメントに際

しては、補綴部位の歯槽堤形態が最も重要な要素となるが、そもそもアジア人は骨幅が小さいのに加えて、歯周病等で抜歯した部位の骨量は水平的・垂直的にさらに不足することが多い。このため、特にインプラント治療に際してかなりの割合で歯槽堤形成術が併用されるが、これには以下のような問題点が存在する。

- ・自家骨移植の場合、ドナーサイトの創傷が発生する
- ・他科骨・異種骨を使用する場合、常に感染やアレルギーの問題が生じるうえ、現在本邦ではこれらの材料はほとんど認可されておらず、多くの開業医は個人輸入して使用している
- ・本邦で認可されている人工骨補填材のうち、上記目的に適しているとされているものはない
- ・人工骨材料は生体内で吸収されないか、吸収されてもその速度が緩徐であり、その後インプラント埋入窩を形成しがたい

このような問題点を克服するには、

- (1) 人工材料を使用せず、自身の骨で骨量を増大する
- (2) ドナーサイトを作らず、骨量増大を希望する部位のみで手術が完結するようにする

ことが肝要であると考えられるが、これまではそのような取り組みはほとんどなされていない。

これまで我々は、スタチンと呼ばれる薬剤の骨誘導能に注目して研究を行ってきた。スタチンとは HMG-CoA 還元酵素阻害剤の通称であり、高コレステロール血症の第一選択薬として世界中で幅広く用いられてきた。1999 年、スタチンが骨芽細胞の分化を促進することが報告され (Mundy et al, 1999)、以降骨と

スタチンの関連について多数の報告がなされてきた。これまでに我々がスタチンと bone biology に関して行ってきた報告は以下の通りである。

- ・インプラント周囲の骨形成に非常に有効
- ・低回転型骨粗鬆症においても statin がインプラント周囲骨形成を著しく改善
- ・statin の局所投与により、新生骨量増加、軟骨の新生、骨形成マーカーの増加、骨吸収マーカーの減少

これらのデータを踏まえ、我々は先述の、「骨増生を手術なしで行う」ことを目的とし、予備実験を行ったところ、あるキャリアの組み合わせで、単回の経皮的投与（注射）で、いかなる切開も加えずに垂直的に骨を増生させることに成功した。

2. 研究の目的

以上のことを踏まえ、本研究は骨移植・骨補填材を使用せず、手術なしで骨を増生させる手法を確立させることを目的として設定した。具体的には、本研究で立案する骨増生法の有用性を実証するため、

- (1) キャリアの要件は薬剤を徐放することであるが、今実験の場合骨増生のスペースメイキングを図り粘膜の圧力を分散することも求められる。それを達成するため、よりよいキャリアを検討する
- (2) スタチン-キャリア複合体 (以下複合体) をラット脛骨や顎骨に注射し、本研究の骨増生手法の有用性を検討する
- (3) 複合体をイヌなど大型動物の顎骨や抜歯窩に注射し、本研究の骨増生手法の有用性を検討する
- (4) 増生された骨がインプラント埋入に適切であるか否かについて、増生された骨にインプラントを埋入し、埋入トルク値計測および共振振動数解析を行う

の 4 点を当初の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、

(1) 適切なキャリアの検討

(2) 決定したキャリアによる、in vitro および小動物における骨増生効果の検討およびそのメカニズムの解析

(3) 動物における骨増生効果の検討

を解析するため、組織（形態計測）学的手法、分子生物学的手法、生体工学的手法を用いた。まず、本研究では、骨増生物質としてスタチンを用いた。スタチンとは HMG-CoA 還元酵素阻害剤の通称であり、高コレステロール血症の第一選択薬として世界中で幅広く用いられてきたが、1999 年にスタチンが骨芽細胞の分化を促進することが報告され、以降骨とスタチンの関連について多数の報告がなされてきたものである。本研究で用いるキャリアは特に以下の要件を満たすことが理想である。

- ・スタチンを徐放可能であること
- ・注入後にキャリアが粘膜の圧力で分散せず、また新生骨の増生スペースを確保するために、注入後はある程度の硬度を有する材料であること

これらの要件を満たすため、コラーゲンゲル、ゼラチンハイドロゲル、アルギン酸プロピレングリコールあるいは水溶性ワセリンを種々の配合比でリン酸カルシウム系骨補填材（ α -TCP、 β -TCP、HA）と混合したもの、あるいは PLGA とスタチンの複合体を作製し、キャリアからの徐放性と体内崩壊性について人工体液に浸漬したスタチン含有キャリアからのスタチン放出量を測定した。

適切と思われるキャリアが作製できた時点で、まずキャリア自身を培養した骨芽細胞に投与あるいはラット口腔粘膜下（傍骨膜）に注射し、為害性を検討した。検討パラメーターは、

・経時的細胞数の変化（MTT アッセイ）（培養実験）

・細胞形態の変化（培養実験）

・炎症細胞浸潤（ラット）

とした。また、複合体を骨芽細胞培養系に投与し、骨芽細胞の分化促進効果について検討した。検討パラメーターは、

・オステオカルシン産生量（ELISA 法）

・アルカリフォスファターゼ陽性細胞数（組織化学染色）

・石灰化物形成量（alizarin red S 染色）

とした。

さらに、ラットの骨に複合体を経皮的に注射し、注射後 2, 4, 8 週間での骨増生効果について検討した。検討パラメーターは、

・層板状構造の有無、新生骨密度、新生骨高さ、骨細胞数、ビラネバ・ゴールドナー染色による骨石灰化度測定とした。

4. 研究成果

<キャリアからのスタチン徐放性と生体内崩壊性について>

キャリアからの徐放性と体内崩壊性については、人工体液に浸漬したスタチン含有キャリアからのスタチン放出量を測定した。その結果、アテロコラーゲンと α TCP の組み合わせ、あるいは PLGA が生体内残存性、スタチン徐放性両方の点で優れていることが示唆された。

<キャリアの為害性について>

今回検討したすべてのキャリアにおいて、為害性は認められなかった。具体的には、培養骨芽細胞数や細胞形態には変化を与えず、また生体内においても炎症を惹起しなかった。

<複合体の骨芽細胞培養系に対する影響>

アテロコラーゲン- α TCP-スタチン複合体、あるいは PLGA-スタチン複合体を培

養骨芽細胞系内に投与すると、培養液中のオステオカルシン産生量およびアルカリフォスファターゼ活性が向上した。また、組織化学染色により、アルカリフォスファターゼ陽性細胞数が増加し、石灰化物形成量も増加した。以上のことより、これらの複合体は *in vitro* において骨芽細胞様細胞の分化を促進していることが示唆された。

<複合体を生体内に経皮投与した際の骨の反応について>

(1) アテロコラーゲン- α TCP-スタチン複合体

まず、ラット脛骨にインプラントを埋入し、皮膚縫合後、アテロコラーゲン- α TCP-スタチン複合体を経皮的に注射で単回投与した。その結果、インプラント周囲に大量の海綿骨が形成されることが明らかになった (図1、2)。

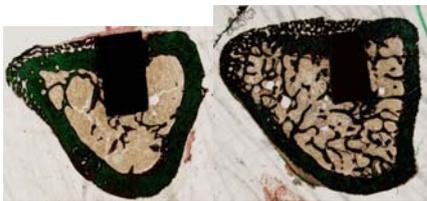


図1 アテロコラーゲン- α TCP 複合体 (左) およびアテロコラーゲン- α TCP-スタチン複合体 (右) 投与後2週間の組織像。スタチン含有複合体投与群においてインプラント周囲の骨量が増加しているのが観察される。



図2 アテロコラーゲン- α TCP 複合体 (左) およびアテロコラーゲン- α TCP-スタチン複合体 (右) 投与後4週間の組織像。スタチン含有複合体投与群においてインプラント周囲の骨量が増加しているのが観察される。

また、同複合体投与群においては、骨-インプラント接触率や骨髓腔の骨密度が有意に高かった。

次に、同複合体をラット頭蓋骨 (インプラント埋入等の外科的侵襲を与えていない骨) に経皮的に単回注射し、骨反応を観察した。その結果、スタチン含有複合体投与群においては、経時的に頭蓋骨の厚みが増加することが明らかになった (図3、4)。

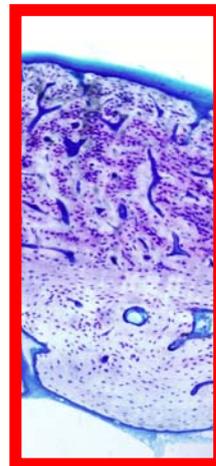
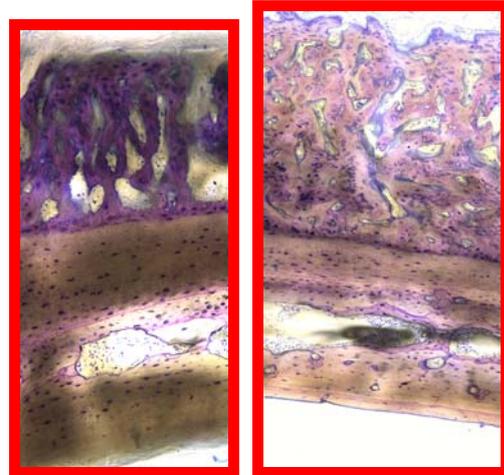
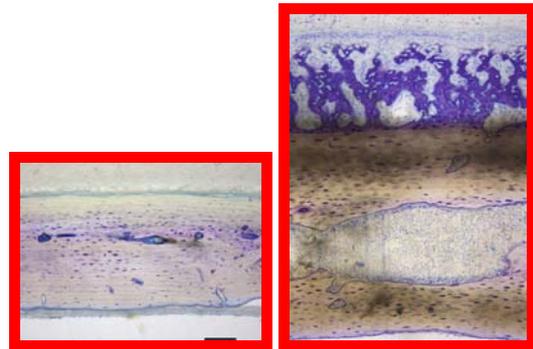


図3 アテロコラーゲン- α TCP 複合体（上左）およびアテロコラーゲン- α TCP-スタチン複合体注射後1週（上右）、2週（中左）、4週（中右）、8週（下）経過後の組織像。対照群として設定した群（上左）では骨に明らかな変化は見られないが、スタチン含有複合体を注射した群では骨が垂直的に形成されているのが観察される。新生骨は既存骨から伝導的に形成されている。また新生骨は経時的にトリイジブルー染色性が低下しており、このことから新生骨が時間とともに石灰化度を増していることが示唆される。

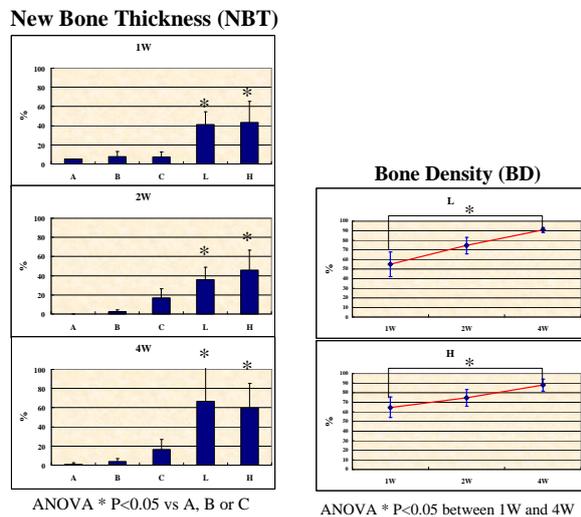


図4 アテロコラーゲン- α TCP-スタチン複合体注射後の新生骨の厚みの変化（左）および新生骨密度（右）。スタチン含有のL, H群は、コントロール群（A, B, C）より有意に骨が厚く、また経時的に厚さが増加している。また、スタチン含有群における新生骨の密度は経時的に増加している（右）。

以上のことより、本研究で作製した2種類のスタチン複合体は、注射によって投与可能であり、単回の注射でインプラント周囲骨形成を促進し、あるいは既存の骨の厚みを増加させる働きを有す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3件）

- ① Masuzaki T, Ayukawa Y, Moriyama Y, Jinno Y, Atsuta I, Ogino Y, Koyano K. The effect of a single remote injection of statin-impregnated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres on osteogenesis around titanium implants in rat tibia. *Biomaterials*, 31, 3327-3334, 2010.
- ② Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, Tsukiyama Y, Koyano K. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *Journal of Oral Rehabilitation*, 37, 123-130, 2010.
- ③ 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. *Clinical Oral Implants Research* 20, 756-760, 2009.

〔学会発表〕（計4件）

- ① 鮎川保則. 骨増生・骨再生の極近未来 -bench to clinic-. 平成22年度日本補綴歯科学会九州支部学術講演会, 熊本市, 11月27日, 2010. (招待講演)
- ② Ayukawa Y. Bone engineering for dental implantology: which modalities are really potential? The 6th Congress of the Asian academy of Osseointegration, Seoul, Korea, November 14, 2010. (招待講演)
- ③ Masuzaki T, Ayukawa Y, Moriyama Y, Tsukiyama Y, Koyano K. Single transdermal application of statin

enhances bone healing around titanium implants in rats. The 6th Biennial Meeting of Asian Academy of Prosthodontics, Seoul, Korea, April 25, 2009. (ポスター発表)

- ④ Jinno Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Tsukiyama Y, Koyano K. Vertical Bone Augmentation with Injectable Statin Derivery System. 4th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration (AAO), Hiroshima, July 19 2008. (ポスター発表)

[その他]

ホームページ等

http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/koza/koku_kinou_shufuku/soshaku_kinou_saiken/kenkyugaiyo.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA YASUNORI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50304697

(2) 研究分担者

荻野 洋一郎 (OGINO YOICHIRO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50380431

古谷野 潔 (KOYANO KIYOSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：50195872

熱田 生 (ATSUTA IKIRU)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：30423487

(H20のみ)