

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791907

研究課題名（和文） 非侵襲的インプラント術前骨増生法の開発—臨床応用に向けた研究—

研究課題名（英文） Development of the novel noninvasive bone augmentation technique

研究代表者

神野 洋平（JINNO YOHEI）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40507779

研究成果の概要（和文）：

我々が開発したフルバスタチン-コラーゲン- α リン酸三カルシウムの複合体は、ラット頭蓋骨上に経皮的に注射することにより、新生骨が既存骨上に添加され、既存骨の厚みが増す。新規インプラント埋入術前骨増生法として臨床応用するために実験計画を立て、研究を行った。イヌ及びラットの口腔内における骨添加を目指したが、研究期間中に新生骨添加を実現することができなかった。今後、フルバスタチンの試適濃度の探索及び複合体の再検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Within the limitation of our study, we suggest that a single-shot percutaneous injection of fluvastatin with a collagen- α -tricalcium phosphate (α TCP) composite induces new bone formation in a vertical direction around and under the composite (calvarial bone of rat). However, it is very difficult to obtain new bone on the alveolar bone (rat, dog). Further study is needed for clinical application. (ideal concentration of fluvastatin, investigation of the novel drug delivery system)

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：歯科補綴学分野

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨増生・歯科用インプラント・スタチン・非侵襲・骨

1. 研究開始当初の背景

スタチンとは HMG-CoA 還元酵素阻害剤の総称であり、高脂血症治療薬の第一選択薬として世界中で広く用いられている薬剤である。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て以来 (Mundy et al, 1999)、スタチンと骨形成に関連する多数の報告がなされている。

我々もラットを用いた研究によりスタチン

の全身投与及び局所投与がインプラント周囲の骨形成をプラスにシフトすることを示した (Ayukawa et al, 2004)。

骨形成に有効であることが示唆されたスタチンを徐放させることにより、さらに効果的に骨形成を促進できると考え、我々が考案した α TCP-コラーゲン-スタチン複合体（以下複合体と記す）をラットの頭蓋骨上に経皮的に注射投与することにより、複合体

周囲への新生骨の添加を確認した。

2. 研究の目的

現在、インプラント治療は、歯科治療において益々普及しており、患者の治療結果への期待が高まっている。インプラント体埋入のコンセプトも外科主導から補綴主導へ移行し、埋入できる部位にインプラント体を埋入するのではなく、補綴装置を装着したい部位に埋入するというパラダイムシフトが起きている。

すなわち、骨増生の重要性が高まっているが、現在の術式（骨移植、上顎洞底挙上術など）は、難易度が高い場合が多く、患者の負担のみならず術者への負担も大きい。

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きた。

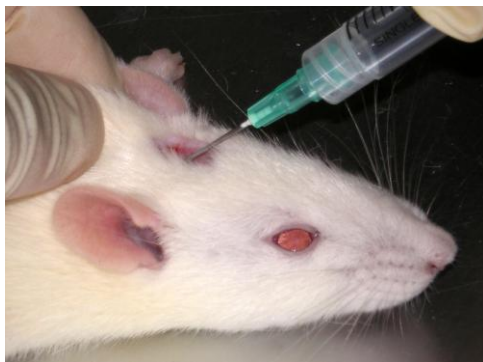
本研究では、我々が開発した新術式（単回の薬剤注射投与による無切開・非侵襲的骨増生）（図1）による新生骨獲得のメカニズムの解明と、顎骨（大動物）におけるインプラント体埋入への有効性の評価を行い、早期の臨床応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、

- (1) 骨添加のメカニズムの解明
- (2) 増生された骨の長期的予後
- (3) 大動物の顎骨における骨増生効果の検討
- (4) 増生された骨に対するインプラント体埋入の妥当性の研究

の4点を大きな目標として計画し、計画を達成するために組織（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ることとした。



(図1)

複合体をラット頭蓋骨上に複合体を注射にて経皮的に注入している様子

(1) 骨添加のメカニズムの解明

骨増生のメカニズムに関しては、PCR Array法を用いて、骨形成・吸収に関わる遺伝子の発現を網羅的に検討する。

ラット体内にて増生された骨より採取したサンプル中の骨関連遺伝子の発現の多寡を調べることにより、骨形成の一連の遺伝子発現の何を促進しているか、または骨吸収に関わる一連の遺伝子発現の何を抑制しているかを明らかにする。

(2) 増生された骨の長期的予後

ラットを用いた予備実験において、観察期間は1、2、4週間である。

実際臨床応用を行う上で、増生された骨の長期的安定が重要である。そこで観察期間を長くし、追加実験を行う。

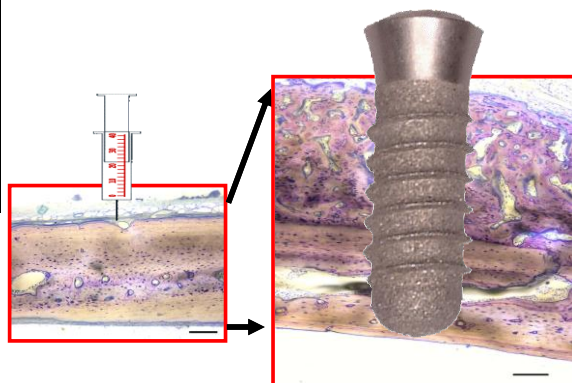
(3) 大動物の顎骨における骨増生効果の検討

実験動物としてイヌを用い、下顎第一、第二前臼歯を抜去する。3カ月の治癒期間の後、スタチンを添加した複合体を歯槽上に注射にて注入し、1カ月後の骨形成量を計測する。上顎においても鼻腔に近い歯槽骨上に経粘膜的に複合体を注入し、歯槽側のみならず、上顎洞底粘膜への骨添加の可能性も検討する。

計測は、複合体注入時および屠殺直前にテトラサイクリンを注射し、テトラサイクリンによる蛍光ラベル間の幅をもって骨形成量とする。

(4) 増された骨に対するインプラント体埋入の妥当性の研究

実験(3)で増生した骨に対し、インプラント体を埋入する。その際、埋入トルクを計測できるインプラント埋入エンジンを用い、最大トルクをもって新生骨の硬さとする。また、埋入されたインプラント体に対し、共振振動数解析を行い、コントロールと比較することによって増生骨に対するインプラント体埋入の妥当性を検討する。



(図2)
注射からインプラント体埋入までのイメージ

4. 研究成果

(1) 骨添加のメカニズムの解明

PCR Array 法を用いて、骨形成・吸収に関わる遺伝子の発現を網羅的に検討する計画を立てていたが形成された新生骨が少量であり採取が困難でありそのため解析ができなかった。そこで、血中の骨形成マーカー、骨吸収マーカーの測定を行った。

10 週齢の雌性 Wistar ラットの頭蓋骨上にスタチン入りの複合体を注射し、1、2 週後にペントバルビタールの過剰投与により屠殺を行い、心停止直前に心採血を行った。遠心分離にて血漿を採取し、比色定量法にて ALP、TRAP の酵素活性を測定した。また、同血漿中の OCN のタンパク濃度を sandwich ELISA 法を用いて定量した。

① ALP 活性

1 週、2 週ともに、すべての群間に有意な差は認められなかった。

今回に比色定量法が、リン酸基の分解能を計測することによって ALP の活性を測定するシステムのため、血漿中に含まれるアイソザイムすべて(小腸型、胎盤型、胎盤様型、臓器非特異型)が計測されることになり、局所で起こっている骨形成が反映されなかったためと考えられる。

② TRAP 活性

1 週、2 週ともに、すべての群間に有意な差は認められなかった。

本複体の投与が破骨細胞活性の抑制に効果がなかった可能性も示唆されるが、比色定量法の検出限界によって TRAP 活性の変化が検出できなかった可能性も考えられる。本研究における破骨細胞の活性に関しては、組織化学的染色による TRAP 陽性多核巨細胞の組織形態計測学的検討や、血漿中の cathepsin K 濃度測定などを加える必要がある。

③ OCN 量

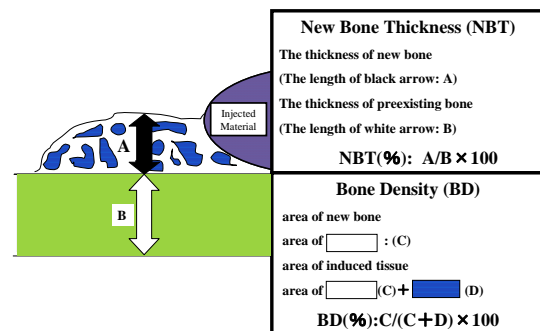
1 週、2 週ともにスタチン添加群におけるオステオカルシン濃度はコントロール群のそれと比べて有意に増加していた。

1 週、2 週頃よりスタチン添加群において骨芽細胞の機能亢進がおこなっていることが示唆された。これは複体投与部位周辺における骨形成亢進を反映していると考えられる。しかし、スタチンの局所投与によって全身的

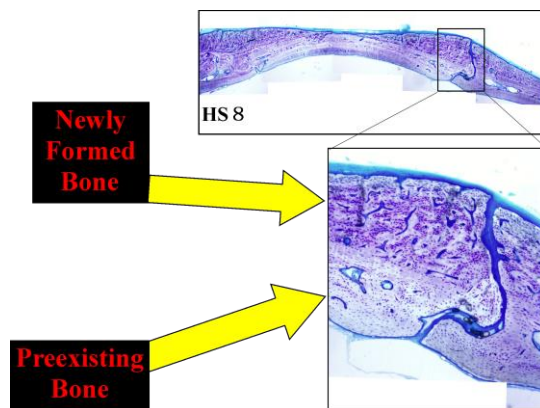
に骨芽細胞活性が刺激された可能性も考えられるため、今後遠隔多部位の骨梁構造の変化などについても検討していく必要がある。

(2) 増生された骨の長期的予後

ラットの頭蓋骨上にスタチンを添加した複合体を注射し、8 週間後に屠殺し、非脱灰研磨標本を作製した。組織学的検討、組織形態計測学的検討(図3)を行った。8 週においても添加された新生骨は吸収することなく維持されたおり、さらに成熟した骨となっていた。(図4)(図5)

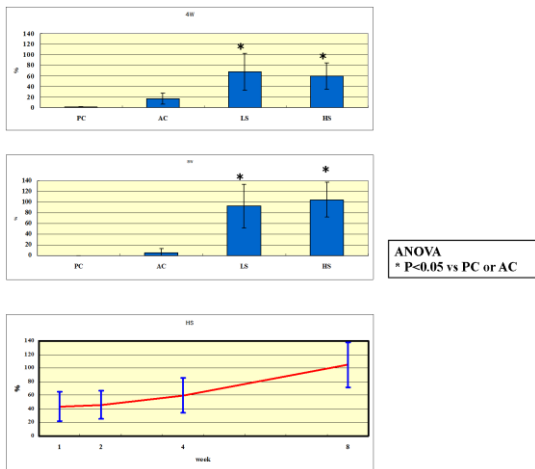


(図3)
組織形態計測学的検討
新生骨厚さ(new bone thickness: NBT)、骨密度(bone density :BD)を図のように定義し、光学顕微鏡像を用いて計測を行った。



(図4)
観察期間 8 週間におけるスタチン添加複合体注入群の組織像
既存骨に連続して新生骨の形成を認める。新生骨と既存骨との間に線維性結合組織の存在はない。1、2、4 週の組織像と比較して、

トルイジンブルーの染色性より石灰化が進んでいることが伺われる。



(図5)

上段より、観察期間4週間における新生骨厚さ、観察期間における新生骨厚さ(左より2本の棒グラフはコントロール群、右より2本の棒グラフはスタチン添加群)を示している。どの観察期間においてもスタチン添加群の新生骨厚さは、コントロール群の新生骨厚さと比較して有意に高い値を示した。経時的に新生骨は厚みを増している。最下段は、スタチン添加群における新生骨の骨密度を示す。経時的に骨密度が上昇している。

(3) 大動物の顎骨における骨増生効果の検討

ビーグル犬の抜歯後の歯槽骨(下顎)及び、鼻腔近傍の歯槽骨(上顎)に複合体を経皮的に注射し、1カ月後に屠殺を行った。組織学的検討を行ったが、新生骨の添加は認められなかった。ラットの頭蓋に注射した複合体と同じ量の複合体を注射したが、既存骨の変化は認められなかった。大動物におけるスタチンの至適濃度の検討が必要である。ラット頭蓋と比較して、注入の手技も難しく複合体の組成そのものの再検討も必要であるかもしれない。

(4) 増生された骨に対するインプラント体埋入の妥当性の研究

実験(3)で、新生骨の添加が認められなかつ

たため、研究を行うことができなかった。口腔内での至適濃度を探るために、ラットの口腔内(上顎口蓋正中中部、鼻腔近傍)に複合体の注射を行い、追加実験とした。注射後、4週後に屠殺を行い、非脱灰研磨標本を作製した。組織学的検討の結果、口蓋及び鼻腔内に新生骨の添加は認められなかった。イヌ、ラット、どちらの実験でも口腔内では新生骨の添加は認められなかった。臨床応用を目指す上で、口腔内の骨の厚みを増すことは必須であり、さらなる検討が必要である。今後、スタチンの濃度、複合体の再検討も含めてさらに研究を進めていく予定である。

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 Jinno Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Tsukiyaka Y, Koyano K
Vertical bone augmentation with fluvastatin in an injectable delivery system: a rat study.
Clin Oral Implants Res
査読有
8, 2009, 756-760

② 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 tibiae.
Biomaterials
査読有
12, 2009, 3327-3334

③ 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.
J Oral Rehabil
査読有
2, 2009, 123-130

[学会発表](計1件)

Jinno Y et al
A New Statin Delivery System to Improve the Bone Thickness

5th Scientific Meeting Asian Academy of
Osseointegration
2009年11月
インドネシア バリ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神野 洋平 (JINNO YOHEI)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：40507779