



Title	The effects of CNHs absorbed simvastatin on bone regeneration [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	山内, 貴紀子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11251号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56147
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Akiko_Yamauchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 山内貴紀子

学 位 論 文 題 名

The effects of CNHs absorbed simvastatin on bone regeneration

(シンバスタチン担持カーボンナノホーンが骨形成に与える影響)

【目的】

カーボンナノホーン（以下 CNHs とする）は直径 2-5nm、長さ 40-50nm のカーボンナノ物質の一種であり、それらが集合し約 100nm の球状を呈している。内部は中空であり、物質を貯蔵し放出する性質を有するため、ドラッグデリバリーシステム（DDS）のキャリアとして研究が進められている。また、製造過程に金属を含まないため、生体への低毒性が明らかとなっており、生体に対する反応や血中投与体内動態についても報告がなされている。

当研究室ではこれまでに GBR(Guided Bone Regeneration)法への応用を目的として研究を行い、CNHs は骨組織との適合性が高く、初期の骨形成に効果的に作用することを報告した。

一方、シンバスタチンはコレステロール合成阻害薬であり、高脂血症の治療薬として臨床において広く用いられている。これらの作用とは別に、局所投与において BMP-2 の遺伝子発現を亢進させ、骨形成促進作用を有することも広く知られている。我々は CNHs の骨組織適合性と DDS のキャリアとしての可能性に着目し骨形成を促進するシンバスタチンを CNHs に担持させ GBR 法に応用することを考案した。本研究の目的は、GBR 法への応用を視野に入れ、ラット頭蓋骨骨欠損部修復過程に及ぼすシンバスタチン担持 CNHs が骨形成に与える影響と頭頂骨欠損部に応用した CNHs の体内動態について解明することである。

【材料と方法】

CNHs1mg を 5ml の 50%エタノールに分散後、吸引濾過により PTFE 膜に固着し、CNHs/PTFE 膜を作製した。CNHs 分散液にシンバスタチン 2mg を加え溶解後、同様の方法で S-CNHs/PTFE 膜を作製し凍結乾燥し、試料とした。2 種類の膜を走査型電子顕微鏡 (SEM)、また、CNHs およびシンバスタチン担持 CNHs を透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察するとともに、TGA 法にて担持したシンバスタチン量を測定した。シンバスタチンの徐放を検討するため、PBS に浸漬させた S-CNHs/PTFE 膜からのシンバスタチン溶出量を測定した。PBS を 1, 3, 5, 7, 10 日とそれ以降は 2 日毎に 4 週間まで回収した。回収した PBS の吸光度測

定によりシンバスタチン量を計算した。また、酸化ガドリニウム(Gd_2O_3)を内包した CNHs を用いて同様に PTFE 膜に固着させ Gd-CNHs/PTFE 膜を作製した。

GBR 法への応用を想定し、以下の動物実験を行った。10 週齢雄性 Wistar 系ラット頭頂骨にトレフィンバーにて直径 7mm の骨欠損を形成し、欠損部を CNHs/PTFE 膜で被覆した群 (NH 群)、S-CNHs/PTFE 膜で被覆した群 (S-NH 群)、および未処置で縫合のみ行った群 (C 群) の 3 群に分類した。術後 2 週および 8 週で膜を含めて頭頂骨を摘出し、軟エックス線学的検索のため softex 撮影後、EDTA にて脱灰し、通法に従いパラフィン標本を作製し、H-E 染色、TRAP 染色を施し、組織学的検索を行うとともに、欠損部の新生骨量ならびに TRAP 陽性細胞数について組織計量学的に検索した。8 週後の一部試料については透過型電子顕微鏡 (TEM) および高分解能透過電子顕微鏡 (HR-TEM) にて超微細構造学的に検索した。また GBR 法に応用した CNHs の各臓器への移行を検索するために、同様に形成した骨欠損部を Gd-CNHs/PTFE 膜で被覆した。術後 6 か月で頭部の皮膚、膜を含めた頭頂骨、脳、肺、肝臓および脾臓の 7 部位を摘出した。摘出した臓器は凍結乾燥後、 $1000^{\circ}C$ の電気炉で 4 時間焼却し、得られた灰を塩酸にて溶解処理を行った。溶解液から誘導プラズマ発光分析法を用いて Gd_2O_3 量を測定し、各臓器に含まれている CNHs 量を計算した。

【結果】

CNHs/PTFE 膜と S-CNHs/PTFE 膜に関して SEM 観察では CNHs が PTFE 膜に均一に固着しており、両者の間に差は認められなかった。TEM 観察にて CNHs にシンバスタチンが担持されていることが確認され、TGA の結果から、CNHs1mg あたりのシンバスタチン担持量は 0.174mg であった。

また、CNHs に担持させたシンバスタチンは、PBS 中で 10 日前後に溶出のピークが認められたが、4 週後まで溶出は持続した。総溶出量は担持総量の約 3% であった。

動物実験において、術後 2 週ではいずれの群においても未成熟な新生骨が欠損部辺縁および辺縁から離れた部分で観察された。NH 群と S-NH 群の肉芽組織中の CNHs の一部はマクロファージに貪食されていた。術後 8 週では S-NH 群において他の群と比較し、多くの新生骨が膜に沿って認められ、TRAP 陽性細胞が膜に沿って観察された。組織計量学的検索において、2 週の NH 群および S-NH 群の新生骨量は、C 群に比較し有意に高かったが、NH 群と S-NH 群の間に有意差は認められなかった。8 週においては S-NH 群の骨形成量は他の 2 群に比較し有意に高い値を示し、C 群と NH 群の間には有意差は認められなかった。TRAP 陽性細胞数は、2 週においては、NH 群と S-NH 群は、C 群に比較し有意に多かったが、2 群間では有意差は認められなかった。8 週においては 3 群間に有意差が認められ、S-NH 群、NH 群、C 群の順であった。TEM 観察において破骨細胞様細胞中に CNHs が認められた。HRTEM 観察では、破骨細胞様細胞に貪食された CNHs の一部は不鮮明な構造を示していた。術後 6 か月では、 Gd_2O_3 は膜を含めた頭頂骨以外の臓器では検出されなかった。 Gd_2O_3 測定結果から、使用した約 75% の CNHs が膜を含む頭頂骨に残存していた。

【考察】

術後 2 週では NH 群と S-NH 群の新骨形成量に有意差が認められず、8 週では S-NH 群の骨形成量が有意に多かったことから、CNHs から徐放されたシンバスタチンが S-NH 群の骨形成を促進したことが推察された。シンバスタチンは PBS 中で CNHs から長期間持続的に溶出したこと、また、破骨細胞様細胞やマクロファージなどに CNHs が貪食され、さらに貪食された CNHs の一部に構造変化を示唆する所見が認められたことから、生体内におけるシンバスタチンの徐放には、溶出と細胞の貪食が関与する可能性が示唆された。長期埋入後も、CNHs は膜を含む頭頂骨のみに検出され、他の臓器では検出されなかったことから、局所に生体材料として応用した場合、他の臓器へ移行すること無く、局所に留まることが示唆された。

【結論】

CNHs はシンバスタチンの徐放キャリアとして有効であり、シンバスタチン担持 CNHs は骨形成を促進した。また局所投与した CNHs は他臓器への移行が認められなかったことから GBR 法への応用の可能性が示された。