



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Bone induction by α -tricalcium phosphate microparticle emulsion containing simvastatin [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	館山, 彰人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13048号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70748
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akito_Tateyama_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 舘 山 彰 人

学 位 論 文 題 名

Bone induction by α -tricalcium phosphate microparticle emulsion containing simvastatin

（ シンバスタチン添加 α -リン酸三カルシウム微粒子エマルジョンの骨形成効果 ）

歯周病、腫瘍、嚢胞などによる著しい骨欠損は、歯槽骨の再建を必要とする。ブロック状の骨補填材料は、大きな骨欠損を治療するために臨床的に使用されているが、賦形性、操作性が低いという問題がある。それらを改善するため、現在、ペースト状の骨補填材（骨ペースト）の開発が進められている。しかしながら、リン酸カルシウムを用いた骨ペーストは既に臨床応用されているが、非吸収性であり、硬化後に高密度となってしまう。そのように硬化した骨ペーストは、細胞浸潤および骨組織への置換が阻害され、体内に長期的に残留し、感染のリスクおよび異常な治癒をもたらすと考えられている。

α -リン酸三カルシウム（ α -TCP）は、 β -TCPと組成は同じであるが、結晶構造が異なる自己硬化型の骨補填材料として広く使用されている。 α -TCPは水中で高い分解性を有し、加水分解によってカルシウム欠損ハイドロキシアパタイト（CDHA）を産生する。過去に α -TCPとPLGA微粒子を用いて、水-油エマルジョンをベースとする新しい骨ペーストを開発された。これは、 α -TCP微粒子と油滴が自己配列して安定化したエマルジョンを形成し、水和反応によりハイドロキシアパタイト（HA）を生成して硬化するものである。

一方、シンバスタチンは、ヒドロキシメチルグルタリルCoA（HMG-CoA）還元酵素を阻害し、コレステロールの合成を抑制するため高脂血症治療薬として使用されている。シンバスタチンは骨芽細胞の分化因子である骨形成タンパク質（BMP-2）の発現を促進し、動物の大腿骨および頭蓋骨の骨形成を促進すると報告されている。さらにシンバスタチンは親油性であるため、エマルジョンを構成する油に溶解することから、シンバスタチンを添加したヒマシ油と α -TCPでエマルジョン骨ペーストを作製することで、骨形成を促進できる可能性が考えられた。そこで本研究では、シンバスタチンを含有する α -TCP微粒子エマルジョン骨ペーストを作製し、特性評価およびラット頭蓋骨欠損へ応用した場合の骨形成効果を病理組織学的に評価した。

β -TCPを1200℃で5時間焼成することにより、 α -TCPを合成した。合成した α -TCPを、ボールミルにより450rpmで1時間粉碎した後、25 μ mの篩を用いて α -TCP微粒子を調整した。続いて、 α -TCP微粒子、ヒマシ油、蒸留水を混合比50/25/25wt%となるよう混合し、プローブ型超音波ホモジナイザーで5分間超音波処理をして、エマルジョン骨ペーストを調製した。

特性評価として、シンバスタチンを添加（0.1wt%）したエマルジョンと無添加のエマルジョンを作製、1週から6週後までの圧縮強度を経時的に評価、比較を行った。さらに4週後の

硬化体のX線回折、SEM観察を行った。

次にラット頭蓋骨に円形の骨欠損（直径 4.5mm）を作製し、シンバスタチンを添加（0、0.01、0.1、1.0mg/defect）したエマルションを作製後直ちに欠損に埋入した。1 週後に組織学的評価、4 週後にデジタル X 線画像による評価と組織学的評価を行った。なお動物実験は北海道大学動物実験委員会の審査承認を受けて行った（北海道大学動物実験委員会 承認番号 13-204）。

圧縮強度測定では、シンバスタチン無添加の骨ペーストの圧縮強度は、1、2、3、4、6週でそれぞれ0.95、1.42、1.47、1.73、2.05 N/mm²であった。一方、シンバスタチン0.1wt%を含む骨ペーストの圧縮強度は、それぞれ1.07、1.2、1.27、1.52、1.77 N/mm²であった。両群の骨ペーストとも、1週間から6週間まで徐々に強度が増加し、2群間に有意差は見られなかった。これらの結果から、時間経過とともにHAの生成が進行し、シンバスタチン添加によりHAの生成は阻害されないことが示された。

β -TCP粉末、 α -TCP粉末、エマルション骨ペーストのX線回折では、それぞれ β -TCP、 α -TCPおよびHAのピークが確認された。骨ペースト中でHAのピークを示したことから、 α -TCPの加水分解によるHAは、エマルション骨ペースト中で生成されたと考えられた。

エマルション骨ペーストのSEM画像は、油滴が入っていたと考えられる50~100 μ mの孔とその周囲にHAの配列がみられた。このことから、 α -TCP微粒子は、エマルション調製中にヒマシ油の油滴を取り囲み、多孔質構造を形成したと考えられた。

手術4週後のX線画像の評価では、何も埋入していないコントロール群で明瞭な円形の透過性領域が認められたが、シンバスタチン添加群では透過性領域が減少した。X線透過像面積は、コントロール群、シンバスタチン0、0.01、0.1、1mg添加群で、それぞれ13.2、11.8、11.5、9.5、11.9mm²であった。シンバスタチン添加0.1mg群の透過像面積は、コントロール群と比較して有意に低かった。

手術1週後の組織学的観察では、骨欠損部に骨ペーストが存在することが示され、骨ペースト中には、油滴と思われる円形無構造の周囲にHA様の物質が観察された。手術4週後のコントロール群では、骨形成はほとんどみられなかったが、骨ペースト埋入群は、既存の骨から連続した新生骨形成が認められた。特に0.1mgのシンバスタチンを含有する骨ペースト群では、既存の骨と比較して骨の厚みが増加していた。また、新生骨は、骨髓、骨細胞様細胞および骨芽細胞様細胞を含んでいた。骨欠損部には線維性の結合組織が観察され、一部に骨ペーストの残留が認められた。

新生骨の長さは、コントロール群、シンバスタチン0、0.01、0.1、1mg添加群で、それぞれ0.3、0.6、0.6、1.1、0.7mmであった。0.1mgシンバスタチンの骨ペーストは、コントロール群、シンバスタチン0mg、0.01mg群と比較して骨形成を有意に促進した。

組織学的評価では、シンバスタチン0.1mg添加群で対照群より有意に新生骨の形成が増加し、X線透過像面積は有意に減少した。したがって、シンバスタチン含有 α -TCP骨ペーストの埋入が、骨形成を促進したと考えられた。また、シンバスタチンの用量では、シンバスタチン0.1mg添加群と比較して1mg添加群で骨形成が低下したことから、シンバスタチン添加による骨形成促進作用は、濃度依存性ではなく至適濃度が存在する可能性が示唆された。

1週の組織学的観察結果ではエマルション構造を認めたが、4週後では残留骨ペーストは

ほとんど観察されなかった。したがって、エマルション骨ペーストは、体内で良好な生分解性を有すると考えられた。

これらの結果から、シンバスタチン添加 α -TCP微粒子エマルション骨ペーストは、多孔質を形成し、シンバスタチン0.1mg添加条件において骨形成を促進することが示唆された。