



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1541号
学位記番号	第317号
氏名	照喜名 孝之
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	歯周組織再生治療に有用な Simvastatin 含有 PLGA 粒子の Simvastatin 放出特性が骨再生誘導能に与える影響
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 尾関 哲也, 山中 淳平, 田中 正彦

名古屋市立大学学位論文

歯周組織再生治療に有用な Simvastatin 含有 PLGA 粒子の
Simvastatin 放出特性が骨再生誘導能に与える影響

平成 27 年度（2016 年 3 月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科
医療機能薬学専攻
薬物送達学分野

照喜名 孝之

本論文は2016年 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 湯浅 博昭 教授
副査 尾関 哲也 教授
山中 淳平 教授
田中 正彦 准教授

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. Yoshihito Naito, Takayuki Terukina, Silvia Galli, Yusuke Kozai, Stefan Vandeweghe, Tatsuaki Tagami, Tetsuya Ozeki, Tetsuo Ichikawa, Paulo G. Coelho, Ryo Jimbo: The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria *Int. J. Pharm.*, 461, 157-162, 2014
2. Takayuki Terukina, Yoshihito Naito, Tatsuaki Tagami, Yoshinori Morikawa, Yoko Henmi, Widyasri Prananingrum, Tetsuo Ichikawa, Tetsuya Ozeki: The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration; comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres

本論文の基礎となる研究は、尾関 哲也教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

【目次】

第 1 章 研究の背景と目的	1
1-1 本研究の背景	
1-1.1 歯科インプラント治療の現状	
1-1.2 歯槽骨	
1-1.3 歯科領域における骨造成法の現状	
1-1.4 骨補填材に用いられるバイオセラミックスの現状	
1-1.5 Calcium-aluminate 骨セメント	
1-1.6 コントロールドリリースとポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA)	
1-1.7 シンバスタチン (SMV)	
1-1.8 本研究の目的	
1-1.9 参考文献	
第 2 章 歯科治療に有用な SMV 封入 PLGA マイクロスフェア (msp) /Calcium-aluminate 骨セメント複合体の調製と骨形成能の評 価	10
2-1 緒言	
2-2 材料と方法	
2-2.1 試薬	
2-2.2 msp の調製	

- 2-2.3 msp の物性評価
- 2-2.4 msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体の調製
- 2-2.5 擬似体液 (Simulated body fluid: SBF) の調製方法
- 2-2.6 msp 及び SMV/Calcium-aluminate 骨セメント混合体、
msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体の SBF 中における SMV
放出試験
- 2-2.7 ウサギを用いた動物実験
 - 2-2.7-1 実験動物
 - 2-2.7-2 ウサギ頭蓋冠欠損モデルと組織切片試料の作製方法
 - 2-2.7-3 マイクロ CT 画像による切片試料の撮影
 - 2-2.7-4 トルイジンブルーを用いた組織的解析
- 2-2.8 統計処理方法
- 2-3 結果
 - 2-3.1 PLGA 粒子 (msp) の物性評価
 - 2-3.2 SBF 中における SMV 放出試験
 - 2-3.3 マイクロ CT 画像の所見
 - 2-3.4 組織学的解析
 - 2-3.5 新生骨形成率
- 2-4 考察
- 2-5 小括
- 2-6 参考文献

第 3 章 SMV 封入 PLGA 粒子の放出挙動の違いが骨形成能に与える影
響・・ 29

3-1 緒言

3-2 材料と方法

3-2.1 試薬

3-2.2 PLGA マイクロスフェア (msp) と PLGA ナノスフェア (nsp) の
調製

3-2.3 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の物性評価

3-2.4 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の PBS 中における SMV 放出試験

3-2.5 Korsmeyer-Peppas モデルによる放出挙動の解析方法

3-2.6 細胞培養

3-2.7 WST-8 アッセイ

3-2.8 アルカリホスファターゼ (ALP) 活性

3-2.9 ラットを用いた動物実験

3-2.9-1 実験動物

3-2.9-2 ラット頭蓋冠欠損モデルの作製法と試料切片の作成方法

3-2.9-3 マイクロ CT 画像を用いた新生骨形成評価方法

3-2.10 統計処理方法

3-3 結果

3-3.1 PLGA 粒子 (msp、nsp) の物性評価

3-3.2 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の PBS 中における放出挙動

3-3.3 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の放出機構の解明

3-3.4 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) がマウス由来骨芽細胞様細胞株

MC3T3-E1 細胞の増殖に与える影響

3-3.5 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) が MC3T3-E1 細胞の分化能に与える

影響

3-3.6 ラット頭蓋冠欠損モデルにおける新生骨形成増加率の評価

3-4 考察

3-5 小括

3-6 参考文献

第 4 章 結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 3

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 5

第1章 研究の背景と目的

1-1 本研究の背景

1-1.1 歯科インプラント治療の現状

歯科インプラント（口腔インプラント）治療は、う蝕や歯周病、不慮の事故等により、歯を失ってしまった患者に対し、失った歯を補うことができる治療法の一つである。歯科インプラント治療では、失った歯の部分にチタン製の人工歯根（インプラント）を埋め入れることにより、歯本来の機能や見た目を取り戻すことができる。

人工歯根の歴史は7世紀ごろまで遡ることができるが、近代用いられるようになった実用に耐えうるチタン製インプラントは、1952年にスウェーデンの整形外科医のBranemarkが発見したOsseointegrationという理論に基づき開発されたものである[1]。Osseointegrationは、ラテン語で「骨」を表す「Oss」と英語で「結合」を示す「integration」を組み合わせた造語であり、チタンと骨が強固に結合することを意味している。チタンと骨は光学顕微鏡レベルで直接結合し、その結合は咬合力に耐えることが可能であり、長期にわたり維持されることが多くの研究で認められている[2-4]。

1-1.2 歯槽骨

個々の歯はコラーゲン線維を主とする歯根膜を介して、適度な可動性のある状態で骨と結合している（Fig. 1-1）。このように歯が直接骨に結合していない理由は、噛み合わせた時に歯にかかる力を緩和し、骨折や歯の破損を防ぐためとされている。これらの歯が植立している部分を解剖学的に歯槽突起と呼び、その部分の骨を歯槽骨という。

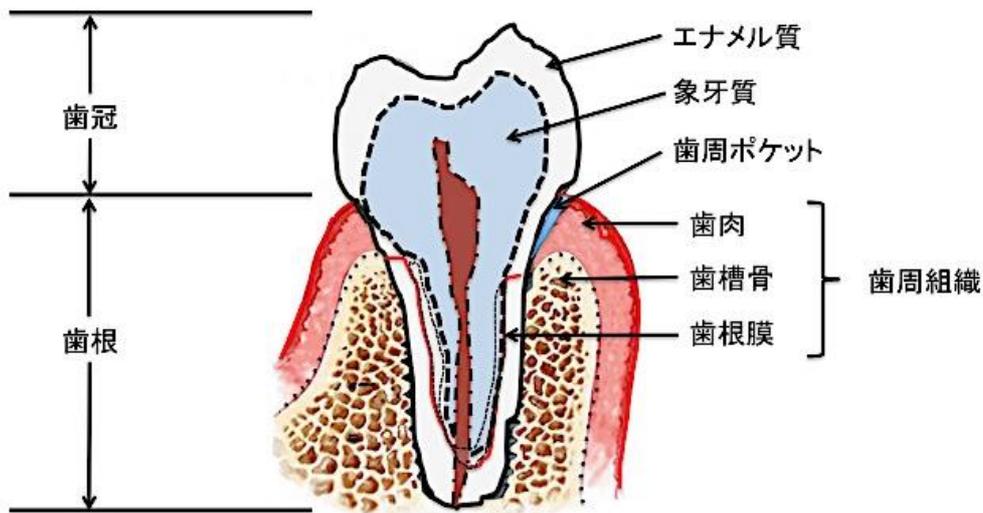


Fig. 1-1 The structure of tooth and alveolar bone

歯槽骨は、固有歯槽骨と支持歯槽骨に分類される。固有歯槽骨は、歯根を取り囲み歯根膜の線維が埋入した一層の骨のことであり、その外側の歯槽突起の大部分を構成する骨のことを支持歯槽骨と呼ぶ。歯の喪失に伴い、歯根膜と複合体を形成している固有歯槽骨は消失し、それを取り巻く支持歯槽骨も骨のリモデリング等によりその体積が減少する。インプラントを顎骨に埋入する際、そのインプラント体を内包できる十分な骨の体積・骨強度が重要である。歯科インプラント治療の成功率を高めるため、歯槽骨再生を目的として次に述べる様々な骨造成法により、歯槽骨の骨量を増加させる試みが行われてきた。

1-1.3 歯科領域における骨造成法の現状

歯科インプラント治療を行う際、一般的な骨造成法として骨移植とGBR (Guided Bone Regeneration) 法を挙げることができる。骨移植はインプラントにおける骨造成法のなかで最も一般的な方法である。現在、自家骨（患者自身の骨）、他家骨（ヒトの脱灰凍結乾燥骨）、異種骨（牛骨由来）、人工骨（アパタイトなどのバイオセラミック材料）が骨移植に使用されている。GBR法は、Dahlin, Nymanらによって提唱されたもので、骨欠損部に遮断膜を置き、骨再生のためのスペースを確保するとともに、骨を再生しないと考えられる結合組織からの細胞の侵入を遮断するものである[8, 9]。現状では再生された骨とインプラントの間の接触率が悪いことが指摘されており、さらなる改良が求められている。

1-1.4 骨補填材に用いられるバイオセラミックスの現状

前項目に対し、骨組織表面への骨形成を促す性質（骨伝導性）を有するバイオセラミックスが骨造成を行う際に利用されている。骨伝導性を備えたバイオセラミックスは、1972年にHench L. L.により報告された $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ 系ガラス（バイオガラス）が最初とされている[11]。生体骨と無機材料が直接結合することが証明され、リン酸カルシウム化合物に代表される水酸アパタイトやアルミナ、ジルコニア等のバイオセラミックスの研究・開発が急速に伸展した。現在では、ポリマーや金属などの異種材料とのコンポジット化や微細構造制御などへの展開、薬物徐放性材料との組み合わせの手法が開発されている。バイオセラミックスは、酸化物系とリン酸カルシウム系に大きく分類でき、さらに生体との反応性から、生体不活性材料・生体活性材料・生体内崩壊性材料の3種類に分類される（Table 1-1）。

Table 1-1 The classification of bioceramics

材料の成分		生体との反応
酸化物	アルミナ (Al_2O_3)	生体不活性
	カルシウムアルミネート ($\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ 系)	
	ジルコニア (ZrO_2)	
非酸化物	カーボン(グラファイト等)	
	窒化ケイ素 (Si_3N_4)	
	炭化ケイ素 (SiC)	
生体ガラス	バイオガラス ($\text{SiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ 系)	生体活性
結晶化ガラス	b- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 系結晶化ガラス	
リン酸カルシウム	ハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)	
リン酸カルシウム	TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) etc	生体内崩壊性
	低結晶性ハイドロキシアパタイト	
カルシウムアルミネート	可溶性カルシウムアルミネート ($\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ 系)	

1-1.5 Calcium-aluminate骨セメント

Calcium-aluminate骨セメントは、主として $\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ 、いわゆるトリカルシウムアルミネート相から成るバイオセラミックスである。Calcium-aluminateの粉末を水ベースの溶液と混合すると、水和による硬化が始まる。硬化の過程は複合的かつ速やかな反応である。硬化したものは、化学的に不活性・強固であり、耐酸性があることから、抗菌性が期待できる歯科骨補填材として有用であると考えられている[12]。歯の充填材料として、Ceramir®が上市されている。

1-1.6 コントロールドリリースとポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA)

PLGAは、生体適合性の高い、生分解性高分子として知られており、これまでにコントロールドリリースの基剤として様々なドラッグデリバリーシステム (DDS) 研究に応用されてきた。PLGAの化学構造について、Fig. 1-2に示した。PLGAは、乳酸とグリコール酸を構成単位とし、エステル結合によってそれらがランダムに共重合したものである。疎水性で非晶質のポリ乳酸 (PLA) と、親水性で結晶性が高く有機溶媒に不溶であるポリグリコール酸 (PGA) から成っており、お互いの性質を補い合うような物性をもつ。両者の組成比や分子量の違いにより、ガラス転移温度や分解速度が異なるため、目的とする製剤設計に応じて、薬物放出速度を制御することが可能である。また、PLGAの分解経路については次のように考えられている。PLGAは水中 (生体内) において、エステル結合部位が加水分解し、分解産物は、腎臓から排出されると考えられている。PLGAの最小構成単位である乳酸やグリコール酸は、代謝経路であるクエン酸回路を経て、最終的に水と二酸化炭素へと分解される。このようにPLGAは、生分解性のため、安全な化合物であると考えられており、FDAにも認可されている。PLGAを薬物キャリアとして用いた実用例として、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) 誘導体を封入したPLGAマイクロ粒子製剤 (リュープリン™) が挙げられる[14]。本製剤により、最長で3カ月に1回投与の長期薬物徐放システムが構築され、前立腺がんなどのホルモン依存性疾患治療に大きく貢献している。

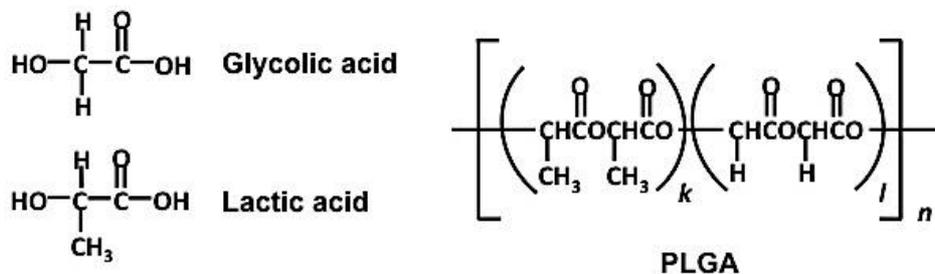


Fig. 1-2 Chemical structure of PLGA

1-1.7 シンバスタチン (SMV)

スタチンは、3hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤の総称であり、肝臓におけるコレステロール合成を減少させることで、血清中のコレステロール濃度を低下させる作用をもつ。スタチン系薬物は副作用が少なく、高脂血症治療薬として、世界中で広く用いられている。SMVは分子量418.57のスタチン系薬物の一つである (Fig. 1-3) が、1999年にMundyらが、SMVが骨形成タンパク質のひとつであるBone morphogenetic protein-2 (BMP-2) のmRNA発現を促進することで骨形成を促進する可能性を報告して以降[15]、シンバスタチンが骨形成に与える様々な影響について報告がされている。in vivo、in vitro実験系において、骨形成促進の報告が多数あり、臨床研究においても、骨折リスクが減少したという報告がある[16, 17]。

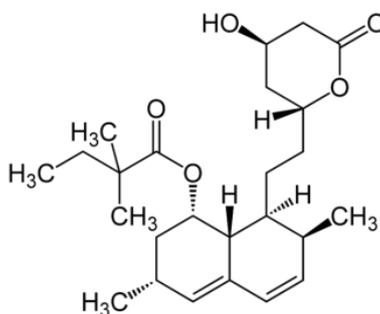


Fig. 1-3 The chemical structure of SMV

1-1.8 本研究の目的

本研究では、骨形成効果を有するSMVに焦点を当て、薬物放出をコントロールできるPLGAをSMVのキャリアとして用い、SMV封入PLGA粒子のSMV放出特性が骨形成効果に与える影響について研究を行った。第2章では、持続的に薬物を放出することができるSMV封入PLGAマイクロ粒子を、Calcium-aluminateを主成分とする骨セメントに充填し、歯科インプラント治療に有用なSMV徐放性骨セメント製剤の開発を行った。リン酸カルシウムを主成分とする骨セメント製剤に関する報告は多数みられるが、Calcium-aluminateを主成分とした骨セメント製剤の開発に関する報告はほとんどなされていない。第3章では、PLGAマイクロ粒子と、PLGAナノ粒子を調製・比較し、*in vitro*と*in vivo*における骨形成に与える影響の評価・検討を実施した。これまでの検討により、徐放性のキャリアを用いてSMVの骨形成を評価する研究報告は散見されるものの、SMVの放出速度がどのように骨芽細胞の分化及び骨再生修復に影響しているのか、ほとんど知られていない。そこで、放出挙動が異なる2種のPLGA粒子を調製し、各PLGA粒子から放出されるSMVが骨形成に与える影響について検討を行った。

1-1.9 参考文献

1. Branemark, P.I., Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*, 1983. **50**(3): p. 399-410.
2. Albrektsson, T., et al., Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*, 1981. **52**(2): p. 155-70.
3. Adell, R., et al., A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*, 1981. **10**(6): p. 387-416.
4. Leonhardt, A., et al., Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. *Clin Oral Implants Res*, 2002. **13**(2): p. 127-32.
5. Tulasne, J.F., [Commentary on maxillary pre-implant rehabilitation. A study of 55 cases using autologous bone graft augmentation]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, 1999. **100**(5): p. 265-6.
6. Pontoriero, R., et al., Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. A clinical study. *J Clin Periodontol*, 1988. **15**(4): p. 247-54.
7. Pontoriero, R., et al., Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. A clinical study of degree III involvements. *J Clin Periodontol*, 1989. **16**(3): p. 170-4.
8. Dahlin, C., et al., Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*, 1988. **81**(5): p. 672-6.
9. Dahlin, C., et al., Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1989. **4**(1): p. 19-25.
10. Schenk, R.K., et al., Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible.

- Int J Oral Maxillofac Implants, 1994. **9**(1): p. 13-29.
11. Hartwig, B.A. and L.L. Hench, The epitaxy of poly-L-alanine on L-quartz and a glass-ceramic. *J Biomed Mater Res*, 1972. **6**(5): p. 413-23.
 12. Unosson, E., et al., Antibacterial properties of dental luting agents: potential to hinder the development of secondary caries. *Int J Dent*, 2012. **2012**: p. 529495.
 13. Hulbert, S.F., et al., Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res*, 1970. **4**(3): p. 433-56.
 14. Okada, H., et al., Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharm Res*, 1994. **11**(8): p. 1143-7.
 15. Mundy, G., et al., Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 1999. **286**(5446): p. 1946-9.
 16. Montagnani, A., et al., Effect of simvastatin treatment on bone mineral density and bone turnover in hypercholesterolemic postmenopausal women: a 1-year longitudinal study. *Bone*, 2003. **32**(4): p. 427-33.
 17. Rejnmark, L., et al., Effects of simvastatin on bone turnover and BMD: a 1-year randomized controlled trial in postmenopausal osteopenic women. *J Bone Miner Res*, 2004. **19**(5): p. 737-44.

第 2 章 歯科治療に有用な SMV 封入 PLGA マイクロスフェア (msp) /Calcium-aluminate 骨セメント複合体の調製と骨形成能の評価

2-1 緒言

SMVによる骨形成効果の報告は、1999年にMundyらによってBMP-2分泌促進効果があると初めて報告された。SMVは、骨密度の増大による骨折予防効果や、骨分化マーカーの発現促進効果を有することが報告されており、今後の応用が期待されている。しかしながら、SMVは血中半減期が短いため、持続的に目的部位にSMVを供給することのできる徐放性DDS製剤が開発されてきた[3, 4]。本研究では、歯科領域独特の骨形成治療を行う場合に有用な方法として、骨セメントを用いたSMV徐放性デバイスの開発を企画し、生分解性の徐放性基剤であるPLGAからなるマイクロ粒子中にSMVを含有し、そのSMV封入PLGAマイクロ粒子 (msp) を骨セメントに含有させた。Calcium-aluminateを主成分とする骨セメントは骨との結合性がよく、適度な強度を有するため、歯科インプラント治療による歯槽骨の骨造成などに使用されている。しかしながら、臨床現場における骨セメントの歴史はまだ浅く、PLGA粒子と組み合わせることで、薬物放出や骨形成効果にどのような影響を与えるのか、まだ明らかとなっていない。本研究では、調製したmsp/Calcium-aluminate骨セメント複合体が、口腔内の歯科インプラント部位において、徐放性を有するかどうかを検討するために、擬似体液 (Simulated Body Flood; SBF) 中における、msp/Calcium-aluminate骨セメント複合体からのSMV放出挙動を評価した。さらに、骨形成効果を評価するために、ウサギの頭蓋冠欠損モデルを作製後、msp/Calcium-aluminate骨セメント複合体を欠損部に埋め込み、欠損部における新生骨形成の評価を行った。

2-2 材料と方法

2-2.1 試薬

PLGA (the ratio of lactic acid to glycolic acid, 75:25, molecular weight, 66,000 – 105,000) 及びポリビニルアルコール (PVA) は、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) グレードのアセトニトリル、エタノールは、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。特級規格品のジクロロメタン (DCM)、アセトンは、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。Calcium-aluminate 骨セメントは主に欧州の臨床現場で使用されている Ceramir® (Doxa Dental, Inc., Uppsala, Sweden) を購入した。

2-2.2 msp の調製

msp は O/W エマルジョン水中乾燥法により調製を行った。Fig. 2-1 にフローチャートを示す。SMV:PLGA=1:50 (質量比) となるように、10 mg の SMV と 500 mg の PLGA を 3 mL の DCM に添加し、油相を得た。次に、ホモジナイザー (PT 3100; Polytron, Kinematica AG, Luzern, Switzerland) を用いて 0.25 % PVA 水溶液 300 mL (外水相) を 10,000 rpm で高速攪拌しながら、ガラス製シリンジを用いて油相を添加した。室温下で、プロペラ攪拌機 (SMT-101; As One Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて、溶液を 350 rpm で 6 時間攪拌し、DCM を揮発させることで msp 分散液を得た。msp 分散液を遠心し (6,000 rpm, 5 min; CF15RX II; Hitachi, Tokyo, Japan)、水による洗浄を 3 回行った。凍結乾燥機 FD-1 (Tokyorikakikai, Tokyo, Japan) を用いて 24 時間凍結乾燥することにより、msp 粉末を得た。msp は、-80°C の冷凍庫内で保存した。

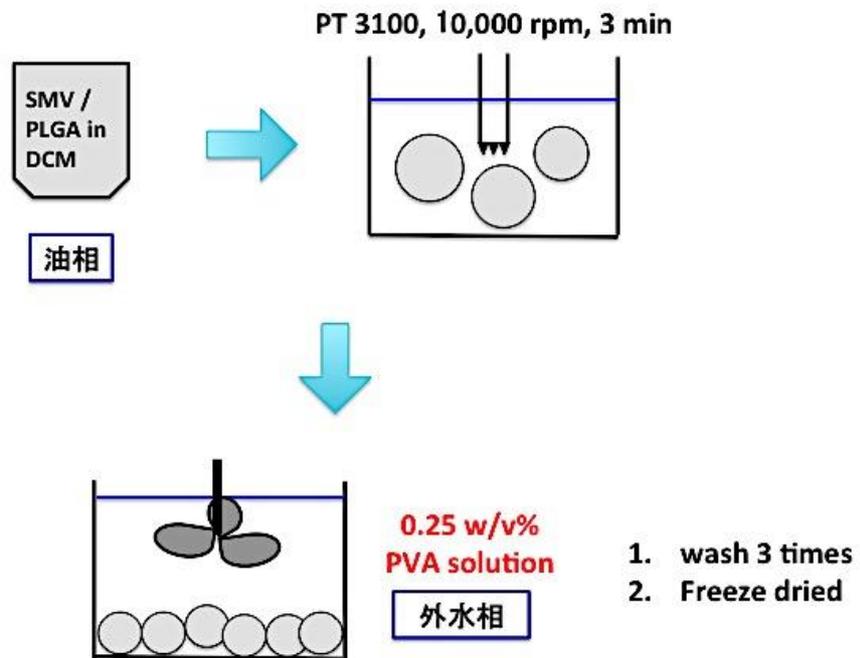


Fig. 2-1 The flowchart of msp preparation.

2-2.3 msp の物性評価

msp の粒子形態を、走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope: SEM, S-4300; Hitachi High Technology, Tokyo, Japan）を用いて観察・撮影した。得られた画像から 100 個の粒子のフェレー径を測定し、粒度分布を得た後、平均粒子径を算出した。

SMV の封入率は HPLC（LC-20 series, Shimadzu, Kyoto, Japan）を用いて測定した。カラム温度を 37°C に設定し、移動相としてアセトニトリルを用いた。HPLC の実験条件の詳細を以下の表に示す（Table 2-1）。

Table. 2-1 HPLC conditions for determination of SMV

カラム	Inertsil ODS-80Aカラム (GL Science, Tokyo, Japan)
カラム温度	37°C
移動相	アセトニトリル
検出器	UV-VIS (SPD-20A; Shimadzu, Japan)
流速	0.2 mL/min
注入量	5 μ L

2-2.4 msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体の調製

2.2-2 で得られた msp (500 μg の SMV を含む) と Calcium-aluminate 骨セメント原料を、質量比 1:5 となるように量り取り、1 mL のミリ Q 水を添加後、乳鉢で 3 分間攪拌した。その後、サンプルをインキュベーター (MIR-154, Sanyo, Osaka, Japan) に入れ、37°C で 24 時間静置した。これを msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体とした。また、コントロールとして、SMV 原末を Calcium-aluminate 骨セメント原料に直接混合し、SMV/Calcium-aluminate 骨セメント混合体を調製した。試料の調製方法のフローチャートを以下の Fig. 2-2 に示す。

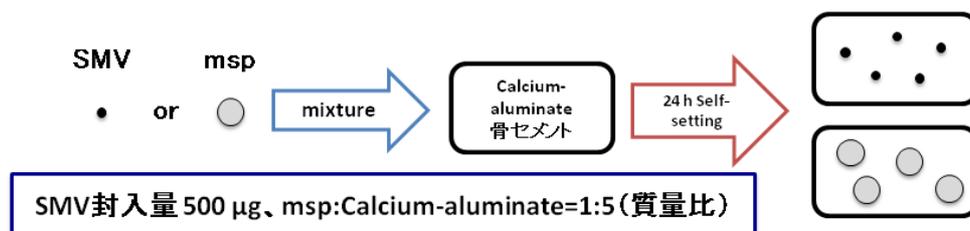


Fig. 2-2 The flowchart of preparation of Calcium-aluminate complex.

2-2.5 擬似体液 (Simulated body fluid: SBF) の調製方法

ヒトの血漿は Table 2-2 に示すように多くの無機イオンを含有している。そこで、ヒトの血漿に比較的近い無機イオン濃度を有する水溶液を調製し、これを SBF とした。この擬似体液は、Kokubo らによって、生体活性セラミックスの生体内での表面構造変化を体外で比較的正確に再現し得ることが確かめられている[5, 6]。

700 mL の蒸留水を攪拌しながら 36.5°C に保った。この蒸留水に順番に、NaCl 7.996 g、NaHCO₃ 0.350 g、KCl 0.224 g、K₂HPO₄・3H₂O 0.228 g、MgCl₂・6H₂O 0.305 g、1M-HCl 40 mL、CaCl₂ 0.278 g、Na₂SO₄ 0.071 g、(CH₂OH)₃CNH₂ 6.057 g を蒸留水に溶解させ、溶液の pH を 7.4 に調整した。この液を 1,000 mL のメスフラスコに移し、元のビーカーを蒸留水で十分に洗浄し、洗液をメスフラスコ内の液に加えた。メスフラスコ内の液に蒸留水を少しずつ加え、1,000 mL とした。メスフラスコを振とうし、液を十分混合し、これを SBF とした。

Table 2-2 The composition of SBF and human plasma (μM)

イオン	擬似体液	ヒトの血漿
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	148.8	103.0
HCO ₃ ⁻	4.2	27.0
HPO ₄ ⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

2-2.6 msp 及び SMV/Calcium-aluminate 骨セメント混合体、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体の SBF 中における SMV 放出試験

msp 及び SMV/Calcium-aluminate 骨セメント混合体、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体 (SMV 量として 1 mg 含有する製剂量) をそれぞれ透析膜 (Spectra/Pore membranes; MWCO 12,000-14,000) 内に入れた。透析膜に入れたサンプルをビーカーに入れた 500 ml の SBF に浮かべ、そのビーカーを恒温槽 (KS-1; As One Co., Ltd., Osaka, Japan) に入れ、サンプルを攪拌した (37°C、300 rpm)。試験開始 1、2、3、5、7、14、21、28 日後に溶出液を 1 mL 採取し、0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過後、等量のアセトニトリルを加えて希釈したものを試料溶液とした。調製した試料溶液中の SMV は、2-2.3 と同じ条件を用い、HPLC を用いて測定した。

2-2.7 ウサギを用いた動物実験

2-2.7-1 実験動物

20週齢のNew Zealand White Rabbitを使用した。本検討で実施した動物実験は、École Nationale Vétérinaire d'Alfort (Maisons-Alfort, Val-de-Marne, France) の倫理規定に従って行った。

2-2.7-2 ウサギ頭蓋冠欠損モデルと組織切片試料の作製方法

吸入麻酔下にて頭頂部を剃毛し、術野を消毒した。頭頂部を切開し、骨膜を剥離した後、注水下で直径 8 mm の円柱状骨欠損を 4 か所形成し、骨欠損内部に各試料を Fig. 2-3 のように埋入した。皮膚および骨膜を旧位に復した後、縫合した。埋入 6 週後にウサギを安楽死させた。ウサギの頭蓋骨欠損部を周囲骨組織と一塊にして採取し、4%パラホルムアルデヒド溶液中に 24 時間静置することで組織固定を行った。試料数はそれぞれの条件で $n = 6$ とした。

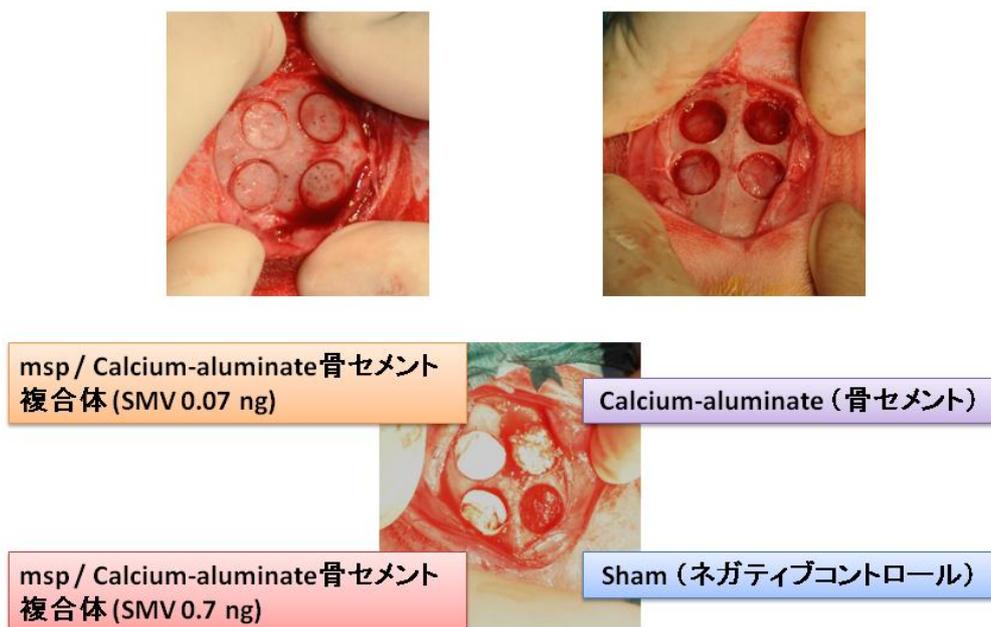


Fig. 2-3 Surgical procedures. A flap was raised and four bone defects of 8 mm were created [(A) and (B)]. The defects were filled with bone cement according to the group. The control group defects were left unfilled (C).

2-2.7-3 マイクロ CT 画像による切片試料の撮影

マイクロ CT (MCT-CB130F; Hitachi Medico, Tokyo, Japan) により切片画像の断面図を観察した。撮影条件は、管電圧 : 60 kV、管電流 : 100 mA、20 μm スライスに設定し、周囲の既存骨を含む範囲で撮影を行った。3D 画像構築には ImageJ software (National Institutes of Health, USA) を使用し、水平方向、矢状方向、前頭方面で 2D 画像を再構築した。

2-2.7-4 トルイジンブルーを用いた組織的解析

2-2.7-2 における試料切片の固定後、骨組織をエタノールの上昇系列により脱水処理を行い、レジン包埋した。レジン包埋した検体を 30 μm の厚さで薄切にし、レジンプロックを作製した。このレジンプロックはトルイジンブルー (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) により染色を施し、光学顕微鏡 (Eclipse ME600; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

2-2.8 統計処理方法

データは平均 \pm 標準誤差 (Mean \pm SEM) で示した。各データの統計処理は、a one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて分散分析を行った後、Dunnett 法によって統計学的処理を行った。有意水準を 5%、1%、0.1% として検定を行った。

2-3 結果

2-3.1 PLGA 粒子 (msp) の物性評価

Fig. 2-4 に msp の SEM 画像を示した。得られた msp は球形で、表面が滑らかなマイクロサイズの粒子であった。また、SEM 写真から 100 個の粒子を無作為に選択し、フェレー径を測定し、粒度分布を得た (Fig. 2-5)。平均粒子径を測定したところ、約 20 μm 程度であった。さらに、msp への SMV 封入率は、約 90% であった。

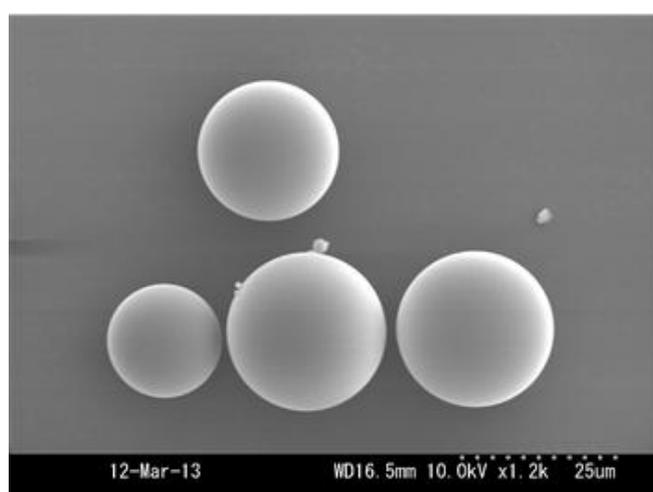


Fig. 2-4 The scanning electron microscope image of msp.

Simvastatin:PLGA	1:50
Encapsulation efficiency	91.4 \pm 3.8 %
Average particle size	21.1 μm

Table 2-3 Encapsulation efficiency and average particle size of msp (n=3).

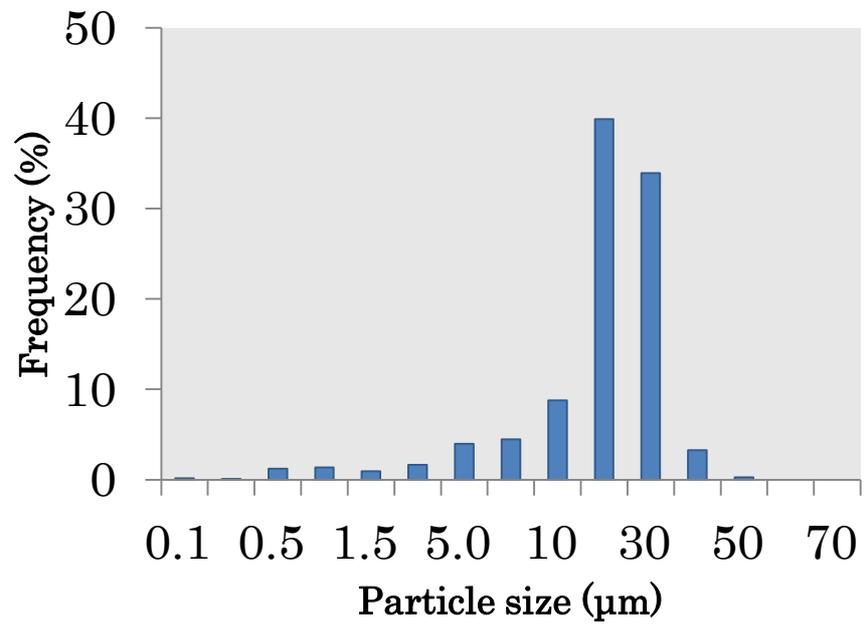


Fig. 2-5 Size distribution of msp

2-3.2 SBF 中における SMV 放出試験

疑似体液である SBF 中における SMV 放出試験の結果を Fig. 2-6 に示す。msp は初期バーストすることなく、約 1 カ月にわたり SMV を放出することを確認した。さらに、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体からの SMV 放出は約 1 カ月にわたり持続的に SMV 放出することを確認した。一方、SMV/Calcium-aluminate 骨セメント混合体からの SMV 放出は、msp 及び msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体のものと比較し、短時間で放出することが示された。

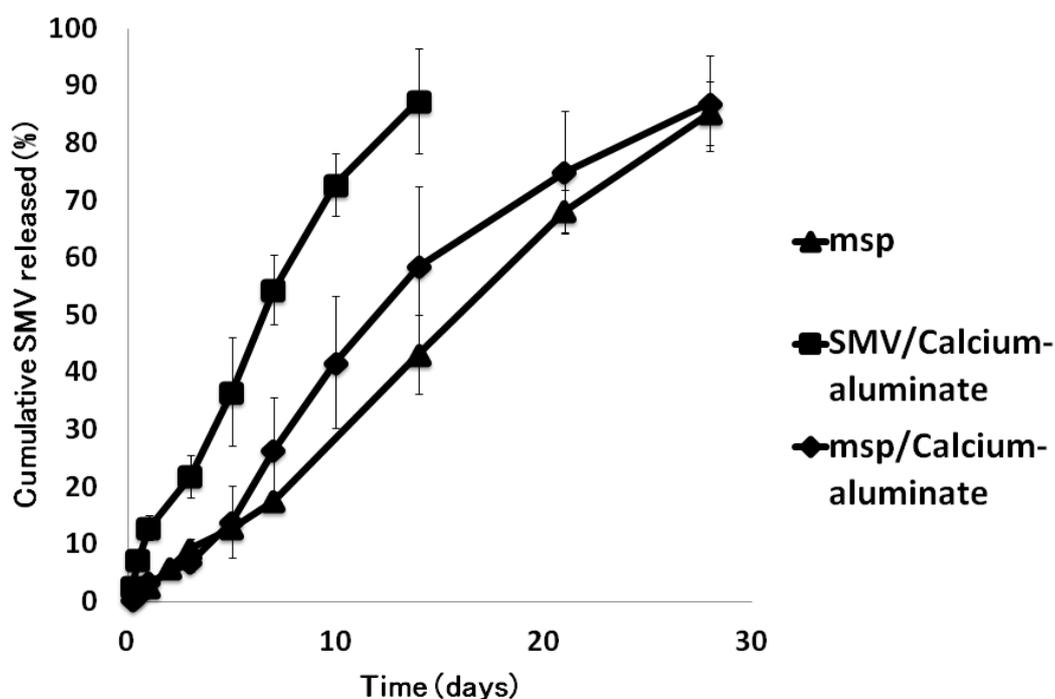


Fig. 2-6 *In vitro* release profile of msp, SMV/Calcium-aluminate complex, and msp/Calcium-aluminate composite using SBF as dissolution medium (n = 5).

2-3.3 マイクロ CT 画像の所見

Fig. 2-7 に移植 6 週間後のマイクロ CT 画像を示す。sham 群や、Calcium-aluminate 骨セメントは、欠損部の端から新生骨が形成していることが確認できたが、隙間があり、十分に骨形成していなかった。一方、msp / Calcium-aluminate 骨セメント複合体は、sham 群や Calcium-aluminate 骨セメント群と比較し、隙間なく新骨を形成していることが確認された。

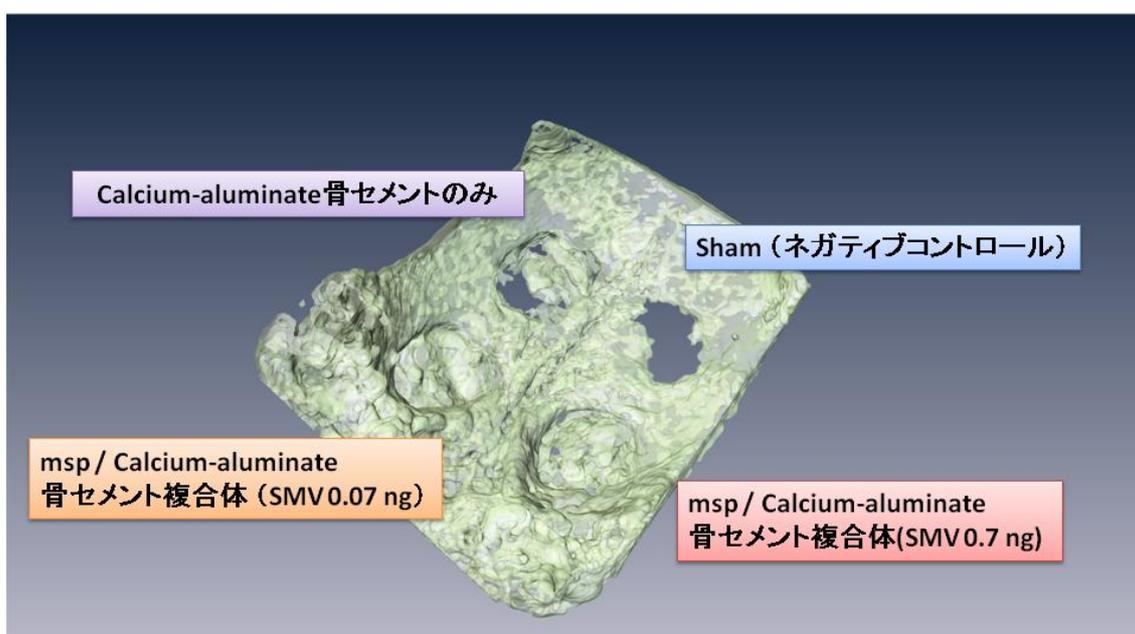


Fig. 2-7 The three dimensionally reconstructed CT image of the four groups.

2-3.4 組織学的解析

sham 群は、マイクロ CT 画像から推察された結果と同様、欠損部の端で新生骨が観察されるものの、大部分が軟組織で覆われていた (Fig. 2-8a)。Calcium-aluminate 骨セメント単独処理群はセメント内部の空孔部にも新生骨が浸潤していたものの、一部空孔表面のみ新生骨が見られた (Fig.2-8b)。これは空孔全体を埋めるように骨芽細胞及び骨組織が浸潤していないことが示唆された。一方、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体処理群 (Composite 1) は、Calcium-aluminate 骨セメント単独処理群よりも新生骨形成が見られた (Fig. 2-8c)。セメント内部の空孔内は全体的に強く染色されており、骨組織がセメント内部に比較的浸潤していることが示唆された (Fig. 2-8e)。また、Calcium-aluminate 骨セメント及び Composite 1、Composite 2 のセメント表面と骨組織の癒着が観察された (Fig. 2-8f)。

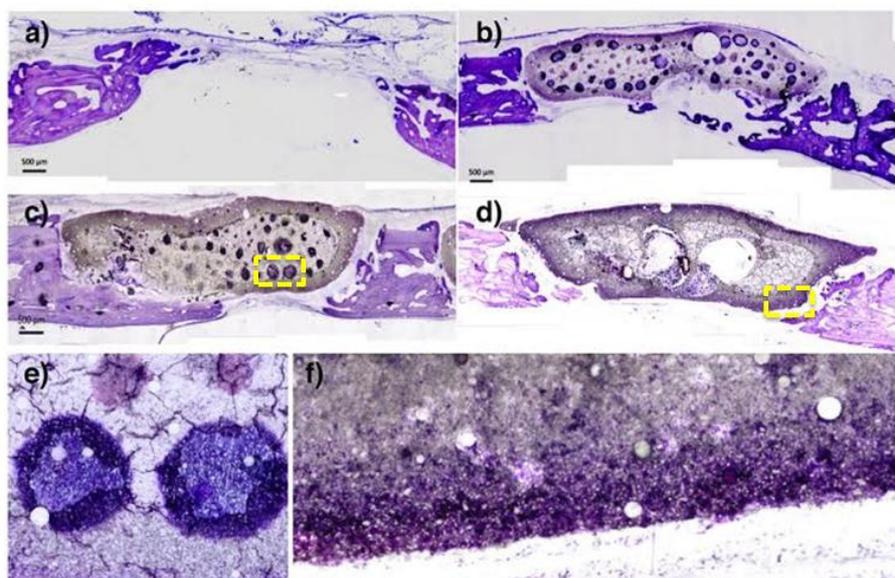


Fig. 2-8 Histological images at 6 weeks, (A) no augmentation, (B) calcium aluminate cement, (C) calcium aluminate cement with 0.7 ng SMV, and (D) calcium aluminate cement with 0.07 ng SMV. (E) and (F) are the high magnification images of the yellow dotted lines of (C) and (D).

2-3.5 新生骨形成率

Fig. 2-9 に新生骨形成率の結果を示す。Calcium-aluminate 処理群及び SMV 含有量を 0.7 ng とした Composite 1 群及び 0.07 ng の Composite 2 群は、sham 群と比較し、新生骨形成率は有意に高かった。また、ポジティブコントロールである Calcium-aluminate 骨セメント処理群に対し、Composite 1 群及び Composite 2 群は有意に高い新生骨形成率を示した（それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ）。

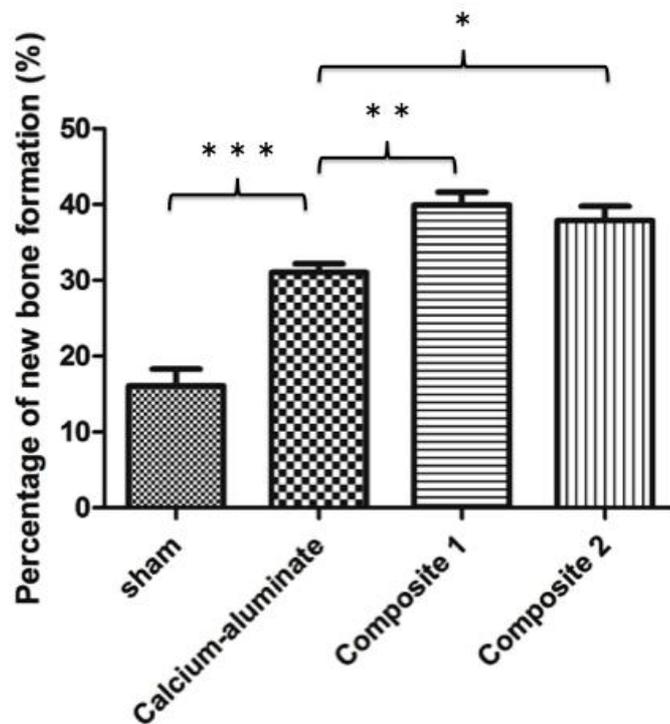


Fig. 2-9 Percentage of new bone formation in 6 weeks. The data represents the mean \pm SEM (n=6, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, compared with calcium-aluminate).

2-4 考察

本検討では、近年骨形成作用が報告されている SMV に注目し、SMV を持続的に骨欠損部位に送達・作用させることができる DDS 技術として、徐放性を有し生体親和性・生体分解性をもつ PLGA を薬物キャリアとして選択した。さらに実用性を高めるため、SMV 封入 PLGA マイクロ粒子（本章では msp と呼称している）を Calcium-aluminate 骨セメントに混合した、新規 SMV 徐放性 Calcium-aluminate 骨セメント複合体（本章では msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体と呼称している）の開発を行った。msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体からの SMV 放出挙動は、msp からの SMV 放出同様約 1 ヶ月間の徐放性を示した。骨セメントは、強度を担保するだけでなく、PLGA の分解により生じる酸性産物を中和する作用を有しており、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体は、合理的な DDS デバイスであると考えられる。

また、*in vivo* 実験で作製したウサギ頭蓋冠欠損モデルにおいて、マイクロ CT 画像の結果より、Calcium-aluminate 骨セメント単独処理群よりも、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体は、有意に新生骨形成を促進した。ただし、本研究ではコントロールとして msp 単独で欠損部に移植した msp 処理群を設定していない。ウサギ頭蓋冠欠損モデルを用いた多くの先行研究において、徐放性を有する PLGA 粒子を足場であるゲルや骨セメントと混合し、sham や陰性対照としてその足場と比較している。この理由に欠損部のサイズが大きく、粉体である PLGA 粒子を欠損部で十分に保持できないことが考えられるため、本研究では msp 処理群を設定しなかった。

組織学的解析においても、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体は、セメント内部に骨組織を誘導し、さらにセメント表面でも骨組織との癒着も確認できたことから、SMV の骨形成効果により、Calcium-aluminate 骨セメントがもつ骨結合効果、骨伝導性が増大したことが示唆された。以上より、SMV の持続的放出により骨形成効果が促進されたことが示唆された。

2-5 小括

SMV を封入した PLGA マイクロスフェアである msp は、SBF を用いた *in vitro* 放出試験において、約 1 ヶ月に渡り持続的に SMV を放出することができた。msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体処理群は、SMV を直接混合した SMV/Calcium-aluminate 骨セメント複合体処理群よりも初期放出率を抑制し、約 1 ヶ月に渡る SMV 徐放性を示した。ウサギの頭蓋冠欠損モデルにおいて、msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体処理群は、セメント内部にも石灰化した骨組織が観察され、新生骨形成を促進していることが示唆された。

以上から、SMV 徐放性 Calcium-aluminate 骨セメント複合体は、元来の骨セメントの骨結合誘導能に加えて、徐放機能を保持していることから、歯周組織（歯槽骨）再生治療に利用できるものとして期待ができる。

2-6 参考文献

1. Cavallaro, J., Jr., B. Greenstein, and G. Greenstein, Clinical methodologies for achieving primary dental implant stability: the effects of alveolar bone density. *J Am Dent Assoc*, 2009. **140**(11): p. 1366-72.
2. Ratanavaraporn, J., H. Furuya, and Y. Tabata, Local suppression of pro-inflammatory cytokines and the effects in BMP-2-induced bone regeneration. *Biomaterials*, 2012. **33**(1): p. 304-16.
3. Tanigo, T., R. Takaoka, and Y. Tabata, Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *J Control Release*, 2010. **143**(2): p. 201-6.
4. Sadiasa, A., M.S. Kim, and B.T. Lee, Poly(lactide-co-glycolide acid)/biphasic calcium phosphate composite coating on a porous scaffold to deliver simvastatin for bone tissue engineering. *J Drug Target*, 2013. **21**(8): p. 719-29.
5. Kokubo, T., et al., Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*, 1990. **24**(6): p. 721-34.
6. Cho, S.B., et al., Apatite formation on silica gel in simulated body fluid: its dependence on structures of silica gels prepared in different media. *J Biomed Mater Res*, 1996. **33**(3): p. 145-51.
7. Yamashita, M., et al., Simvastatin inhibits osteoclast differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 and RANKL through regulating MAPK, AKT and Src signaling. *Regul Pept*, 2010. **162**(1-3): p. 99-108.
8. Moon, H.J., et al., Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. *Exp Mol Med*, 2011. **43**(11): p. 605-12.

9. Hollinger, J.O. and J.C. Kleinschmidt, The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*, 1990. **1**(1): p. 60-8.
10. Aaboe, M., E.M. Pinholt, and E. Hjorting-Hansen, Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg*, 1994. **5**(3): p. 201-3.

第3章 SMV 封入 PLGA 粒子の放出挙動の違いが骨形成能に与える影響

3-1 緒言

SMV の骨形成効果に関する報告が行われて以来、PLGA 粒子を含む数多くの SMV 徐放性キャリアの開発が行われており、キャリアの特性評価および骨形成に与える影響について幅広く検討が行われてきた[1, 2]。しかしながら、SMV が生体内の中でも特に、骨芽細胞に持続的に作用することが、骨芽細胞の分化及び骨再生修復にどの程度関係するかについて検討している報告は少ない。もし骨形成に有用な SMV 量に関する情報および PLGA 粒子に関する情報を得ることができれば、SMV 封入 PLGA 粒子だけでなく他の徐放性 DDS キャリアの開発においても有用な情報源となることが期待できる。

そこで本章では、放出挙動が異なる、長期徐放性のマイクロサイズの PLGA 粒子 (msp) と徐放期間の短いナノサイズの PLGA 粒子 (nsp) を調製し比較を行った。PLGA 粒子からの薬物放出は、次の3段階に分けて考えることができる[3, 4]。1) 製剤表面や表面近傍の薬物が急速に溶解して放出する段階 (初期バースティング、破裂的放出)、2) PLGA マトリクス中に溶解している薬物がポリマー内を拡散して表面から放出する拡散支配放出の段階、そして3) ポリマー全体分解に基づく後期バースティング (破裂放出) の段階である。調製した PLGA 粒子 (msp、nsp) からの薬物放出挙動を分析し、放出メカニズムを検討することは、形成された PLGA 粒子の特性を知る上で重要である。

次に本検討では、マトリクス型製剤の薬物放出の数式モデルのひとつとして知られる、Korsmeyer-Peppas モデルを用いて msp と nsp の放出挙動を解析した。Korsmeyer と Peppas らは、シンク条件で行ったときの、時間 t における薬物放出量が 60% ($M_t/M_\infty < 0.6$) までの範囲での薬物放出挙動を、 $M_t/M_\infty = Kt^n$ で表した[5]。この指数方程式は、フィルム剤及びゲル製剤、球形の粒子からの放出メカニズムの解析に適しているとされ、球形状粒子からの放出メカニズムを Table 3-1 のように式の指数 n を用いて表される。

Table 3-1 Korsmeyer-Peppas model

Korsmeyer-Peppas model

$$M_t / M_\infty = Kt^n$$

M_t/M_∞ : fraction of drug released at time t ,
 K : release rate constant,
 n : the release exponent

Release exponent (n)	Drug transport mechanism
0.43	Fickian diffusion
$0.43 < n < 0.85$	Non-fickian diffusion
$n = 0.85$	Case- II transport
$0.85 < n$	Super Case- II transport

1

指数 n が 0.43 のとき、薬物放出はフィック型拡散に従い、時間に依存した放出速度であることを表す。

指数 n が $0.43 < n < 0.85$ のときは、薬物伝達は変則的で、時間に依存した放出速度であることを表す。

指数 n が 0.85 のときは、薬物放出は、「Case- II transport」と呼ばれており、時間に依存しない定常的な薬物放出速度であることを表す。

指数 $n > 0.85$ のとき、「Super Case- II transport」と呼ばれ、長期間にわたり定常的な薬物放出速度であることを表している。

さらに、骨欠損部における骨再生では、骨組織に分化する骨芽細胞の増殖・分化が必要となる。そこで、本検討では、msp 及び nsp からの SMV 放出挙動が、マウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の細胞増殖・分化に与える影響を、陽性対照である SMV 処理群と比較し、検討した。

最後に、ラット頭蓋冠欠損モデルを作製し、msp 及び nsp からの異なる SMV 放出メカニズムが与える新生骨形成への影響を検討した。

以上より、本検討では、msp と nsp の SMV 放出挙動を比較し、放出メカニズムを Korsmeyer-Peppas モデルを用いて分析後、msp と nsp が骨形成に与える影響について評価を行った。

3-2 材料と方法

3-2.1 試薬

PLGA (乳酸・グリコール酸共重合比 (75:25), molecular weight, 15,000 – 30,000) 及び PVA は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。HPLC グレードのアセトニトリル、エタノールを、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。特級規格品の DCM、アセトン を和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。

3-2.2 PLGA マイクロスフェア (msp) と PLGA ナノスフェア (nsp) の調製

msp は 2-2.2 と同様に調製を行った。nsp は O/W エマルション水中拡散法により調製を行った。nsp の調製方法のフローチャートを Fig. 3-1 に示す。SMV:PLGA=1:100 (質量比) となるように SMV と PLGA を用いた。まず 100 mg の PLGA を 10 mL のアセトンに添加して溶解後、さらに 1 mg の SMV をその溶液に添加し油相を得た。この油相を出力 180 W の超音波洗浄機 (US-4R; As One Co., Ltd., Osaka, Japan) 内で 1 分間超音波処理をした。次に、10 mL の 2 % PVA 水溶液/エタノール混液 (体積比 1:1。いわゆる外水相) にパスツールピペットを用いて油相を添加した後、再び US-4R 内で 15 分間超音波処理をし、nsp 分散液を得た。次に、nsp 分散液を遠心し (15,000 × g)、水による洗浄を 3 回行った。凍結乾燥機 FD-1 を用いて 24 時間凍結乾燥することにより、nsp 粉末を得た。msp と nsp は、-80°C の冷凍庫内で保存した。

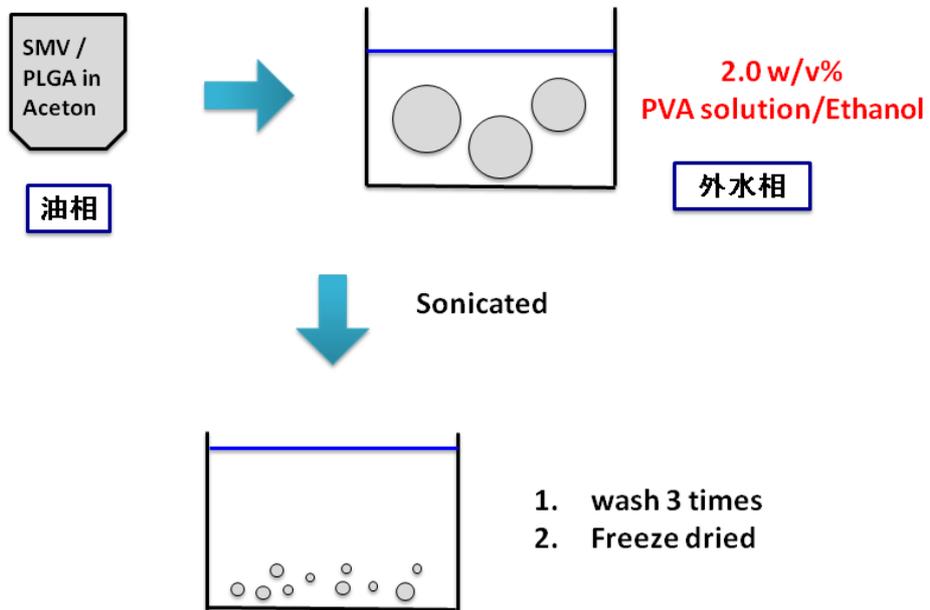


Fig. 3-1 The flowchart of nsp preparation.

3-2.3 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の物性評価

3-2.2 において調製し得られた msp の粒子形態を、2-2.3 と同様に SEM を用いて観察・撮影した。得られた画像より、100 個の粒子のフェレー径を測定し、粒度分布を得た後、平均粒子径を算出した。nsp は、動的光散乱 (DLS) 法 (Zetasizer Nano-S; Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) により、粒度分布と平均粒子径を得た。msp と nsp の封入率は 2-2.3 と同じ条件を用い、HPLC を用いて測定した。

3-2.4 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の PBS 中における SMV 放出試験

msp 及び nsp (SMV 量として 1 mg 含有する製剂量) をそれぞれ透析膜 (Spectra/Pore membranes; MWCO 12,000-14,000) 内に入れた。透析膜に入れたサンプルをビーカーに入れた 500 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浮かべ、そのビーカーを恒温槽 (KS-1; As One Co., Ltd., Osaka, Japan) に入れ、サンプルを攪拌した (37°C、300 rpm)。msp のサンプルの場合は、試験開始 1、2、3、5、7、14、21、28 日後に溶出液を 1 mL 採取し、0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過後、等量のアセトニトリルを加えて希釈したものを試料溶液とした。また、nsp のサンプルの場合は、試験開始 1、3、6、12、24、48、72、96、120 時間後に、msp と同様の処理を行った。調製した試料溶液中の SMV は、2-2.3 と同じ条件を用い、HPLC を用いて測定した。

3-2.5 Korsmeyer-Peppas モデルによる放出挙動の解析方法

3-2.4 で得られた msp と nsp の放出挙動の結果をもとに、Korsmeyer-Peppas モデルの文献に従い、SMV 放出率がそれぞれ 60% に到達するまでの放出挙動のデータを用いて解析した。 $M_t/M_\infty = Kt^n$ の両辺の対数をとると、 $\ln(M_t/M_\infty) = \ln K + n \cdot \ln t$ となる。 $\ln(M_t/M_\infty)$ を縦軸、 $\ln t$ を横軸としてグラフを作成し、その傾きから n の値を求め、放出メカニズムの検討を行った。

3-2.6 細胞培養

マウス由来骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞は、American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) から入手した。細胞は、10% (v/v) FBS (Biowest, Nuaille, France)、1% (v/v) ペニシリン・ストレプトマイシン (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) を含む α -MEM (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) 中で培養を行った。細胞は37°C、5% CO₂環境下で培養を行った。

3-2.7 WST-8 アッセイ

細胞増殖能力を評価するために、WST-8 アッセイキット (Cell Counting Kit-8, Dojindo, Kumamoto, Japan) を使用した。まず、 5×10^3 cell/well となるように MC3T3-E1 細胞を 96-ウェルプレートに播種した。24 時間後、SMV 含有量が 1 μ M/well となるように msp と nsp を細胞に添加し、1、2、3、もしくは4週間培養した。ポジティブコントロールとして SMV 原末を用い、1 μ M/well となるように α -MEM 中に添加した。培地は週5日交換した。次に、各ウェルに 10 μ L の WST-8 溶液を添加し、インキュベーター内で4時間静置した。細胞増殖は、450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Wallac 4000 ARVO multi-label counter; PerkinElmer, MA, USA) を用いて測定した。

3-2.8 アルカリホスファターゼ (ALP) 活性

ALP 活性を評価するために、TRACP & ALP double-stain kit (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan) を使用した。まず、 5×10^3 cell/well となるように MC3T3-E1 細胞を 96-ウェルプレートに播種した。24 時間後、SMV 含有量が 1 μ M/well となるように msp と nsp を細胞に添加し、1、2、もしくは3週間培養した。ポジティブコントロールとして SMV 原末を用い、1 μ M/well となるように α -MEM 中に添加した。培地は週5日交換した。次に、各ウェルに反応基質である p-NPP 溶液を 5 μ L 添加し、37°Cインキュベーター内で 60 分間静置した。その後、0.5N NaOH を各ウェルに 5 μ L ずつ加え、反応を停止させた。ALP 活性は、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Wallac 4000 ARVO multi-label counter;

PerkinElmer, MA, USA) を用いて測定した。

3-2.9 ラットを用いた動物実験

3-2.9-1 実験動物

12 週齢の Wistar 系ラットを使用した。本検討で実施した動物実験は、徳島大学の倫理規定に従って行った。

3-2.9-2 ラット頭蓋冠欠損モデルの作製法と試料切片の作成方法

ケタミン塩酸塩を用いて麻酔を行い、ラットの頭頂部を剃毛し、術野を消毒した。その後、頭頂部を切開し、骨膜を剥離後、注水下で直径 5 mm、厚さ 0.5 mm の円柱状骨欠損を 2 か所形成した。6 匹のラットの骨欠損内部に各試料を Fig. 3-2 のように埋入した。また、コントロールとして、ラットの 2 か所の欠損部を作成しただけのもの (sham) を使用した。試料数はそれぞれの条件で $n = 6$ とした。皮膚および骨膜を旧位に復した後、縫合した。埋入した 4 週間後にラットを安楽死させた。ラットの頭蓋骨欠損部を周囲骨組織と一塊にして採取し、4%パラホルムアルデヒド溶液中に 24 時間静置することで組織固定を行った。その後、脱水、レジン包埋を行い、レジブロックを得た。

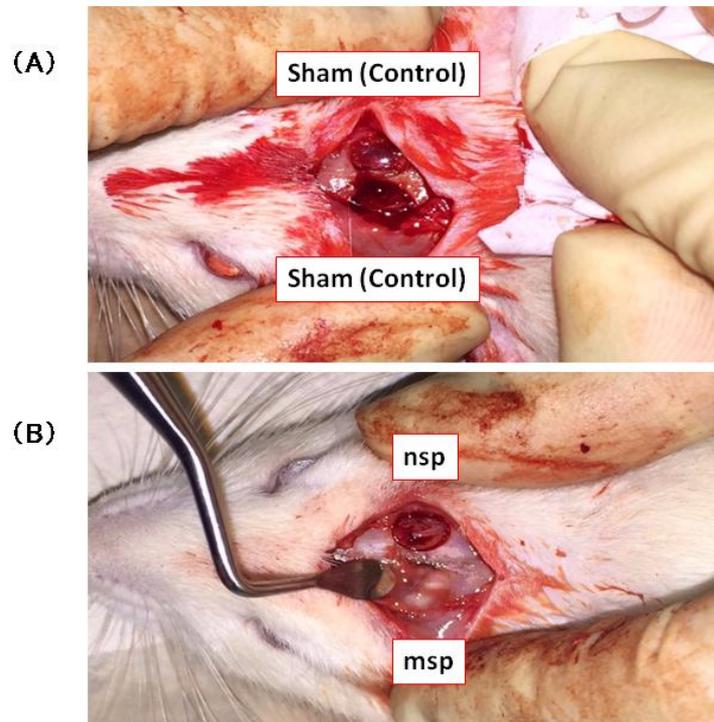


Fig. 3-2 The photos of surgical procedures in rat calvarial defects model. A flap was raised and two bone defects of 5 mm in diameter were created and the defects were filled with msp and nsp. The control group defects were left unfilled.

3-2.9-3 マイクロ CT 画像を用いた新生骨形成評価方法

3-2.9-2 で作成したレジンブロックを、マイクロ X 線 CT (SkyScan 1176, Bruker Micro-CT; Kontich, Belgium) を用いて撮影した。骨欠損解析ソフト (Data Viewer, CT-Analyser, Bruker Micro-CT; Kontich, Belgium) を使用して、欠損体積に対する新生骨体積の割合を算出した。

3-2.10 統計処理方法

データは平均 \pm 標準誤差 (Mean \pm SEM) で表した。各データの統計処理は、a one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて分散分析を行った後、細胞増殖試験と ALP 活性評価を Dunnett 法により統計処理を行った。一方で、*in vivo* 実験は Tukey 法により統計処理を行った。有意水準を 5%、1%、0.1%として検定を行った。

3-3 結果

3-3.1 PLGA 粒子 (msp、nsp) の物性評価

Fig. 3-3 に msp と nsp の SEM 画像を示した。msp と nsp の粒度分布は Fig. 3-4 に示したようになり、平均粒子径はそれぞれ、約 24 μm 、約 300 nm であった (Table 3-2)。また、msp の封入率は約 90%、nsp の封入率は約 15% であった。

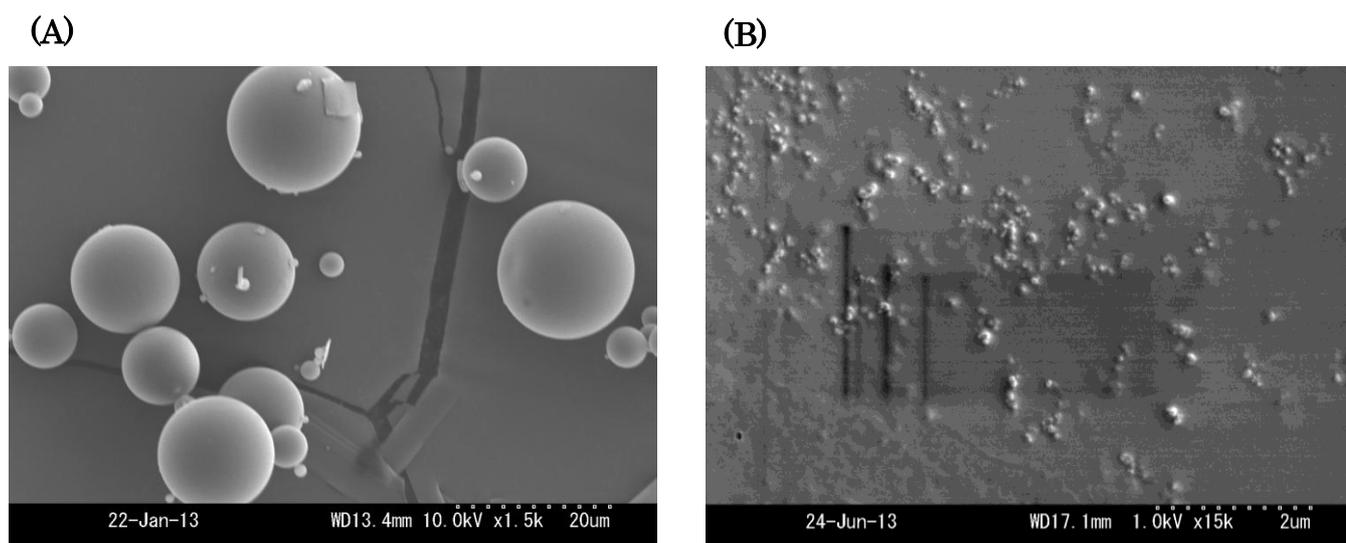


Fig. 3-3 The image of msp (A) and nsp (B) observed by Scanning Electron Microscopy.

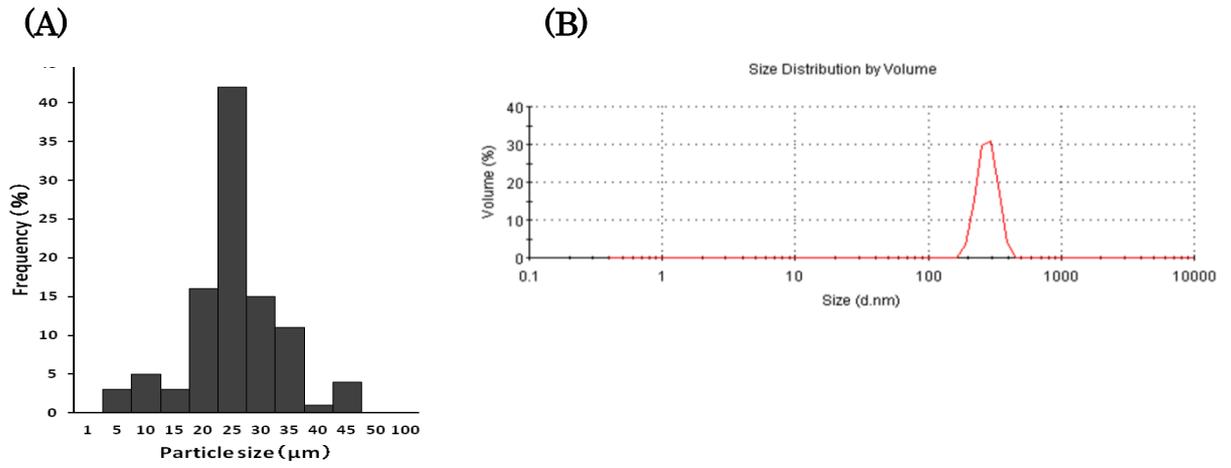


Fig. 3-4 Size distribution of msp (A) and nsp (B).

Table 3-2 Characterization of msp and nsp.

	msp	nsp
SMV:PLGA	1:50	1:100
Encapsulation Efficiency (%)	89.8 ± 0.8	14.7 ± 0.1
Average particle size	24.7 μm	317.7 nm

3-3.2 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の PBS 中における放出挙動

PBS 中における各 PLGA 粒子の放出挙動を Fig. 3-5 に示す。msp は、第 2 章の SBF 中における放出挙動と異なり、初期放出率が高くなった。この理由として、用いた PLGA の分子量の違いが考えられる。第 2 章では、分子量の大きい PLGA (66,000-10,5000) を用いたのに対し、本検討では nsp 調製に最適な分子量が小さい PLGA (15,000-30,000) を用いた。分子量が小さい PLGA は初期バースティングすることが知られているため、第 2 章の msp と異なり、初期放出率が高くなったものと考えられる。msp は、約 1 カ月にわたって持続的な SMV 放出を示した。一方、nsp は SMV を 1 日以内に約 60% 放出しており、短時間における高い初期放出率を示した。本研究で調製した nsp の単位体積当たりの比表面積は msp より約 60 倍以上であり、比表面積の増大が高い初期放出率に寄与したと考えられる。

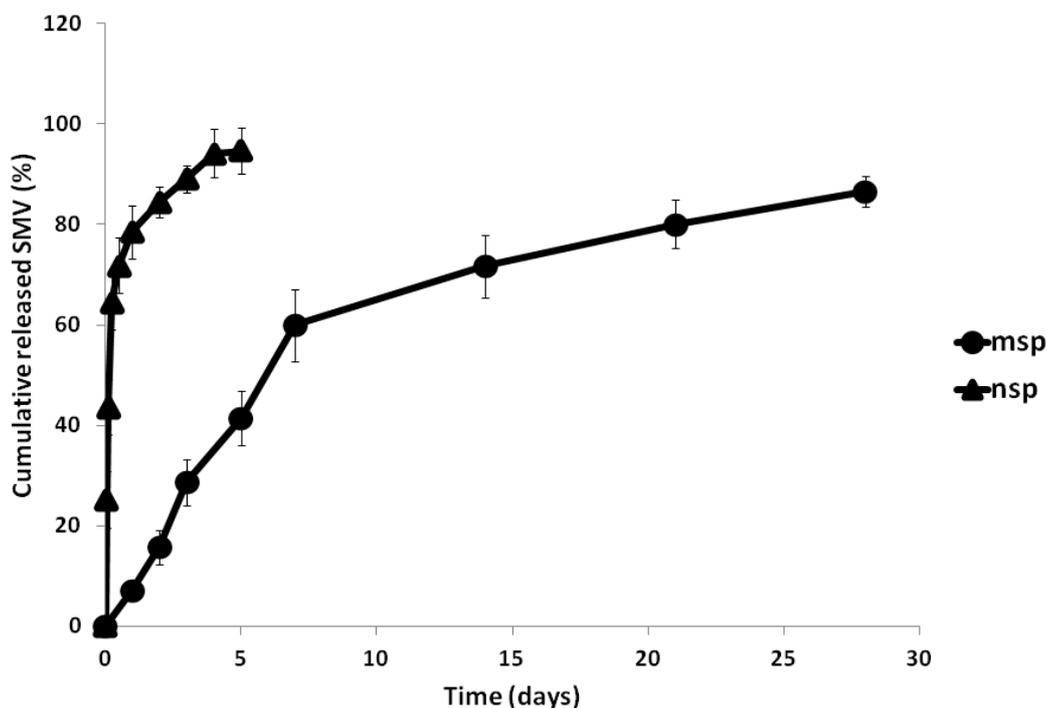


Fig. 3-5 The release profile of SMV from msp and nsp. Each value represents the mean \pm SEM (n=3).

3-3.3 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) の放出機構の解明

前項から得られた、msp、nsp の放出挙動の結果を用いて、Korsmeyer-Peppas モデルを用いて解析したところ、良好にフィットすることを確認した (Fig. 3-6、Table 3-3)。また、msp と nsp の指数 n の値はそれぞれ約 1 と約 0.5 を示した (Table 3-3)。このことから、msp はモデルの中でも、Super Case-II 輸送を示し、一方で、nsp は non-Fickian 輸送であることが示唆された (Table 3-1 を参照)。ただし、msp は SMV と PLGA のマトリックスの膨潤層において、PLGA の緩和速度が放出の律速段階となり、見かけ上時間に依存せず定常的な薬物放出速度であることを表した (Fig. 3-6A)。nsp は Fick 型拡散と Case-II 輸送の両方が寄与しており、薬物放出が変則的で、時間に依存した放出速度であることが示唆された。以上より、msp と nsp は、異なる SMV 放出メカニズムをもつことが示唆された。

Table 3-3 Fit parameters for the release of SMV from msp or nsp by using the Korsmeyer–Peppas model.

PLGA particles	Korsmeyer-Peppas model
msp	$n=1.08, R^2=0.9907$
nsp	$n=0.51, R^2=0.9988$

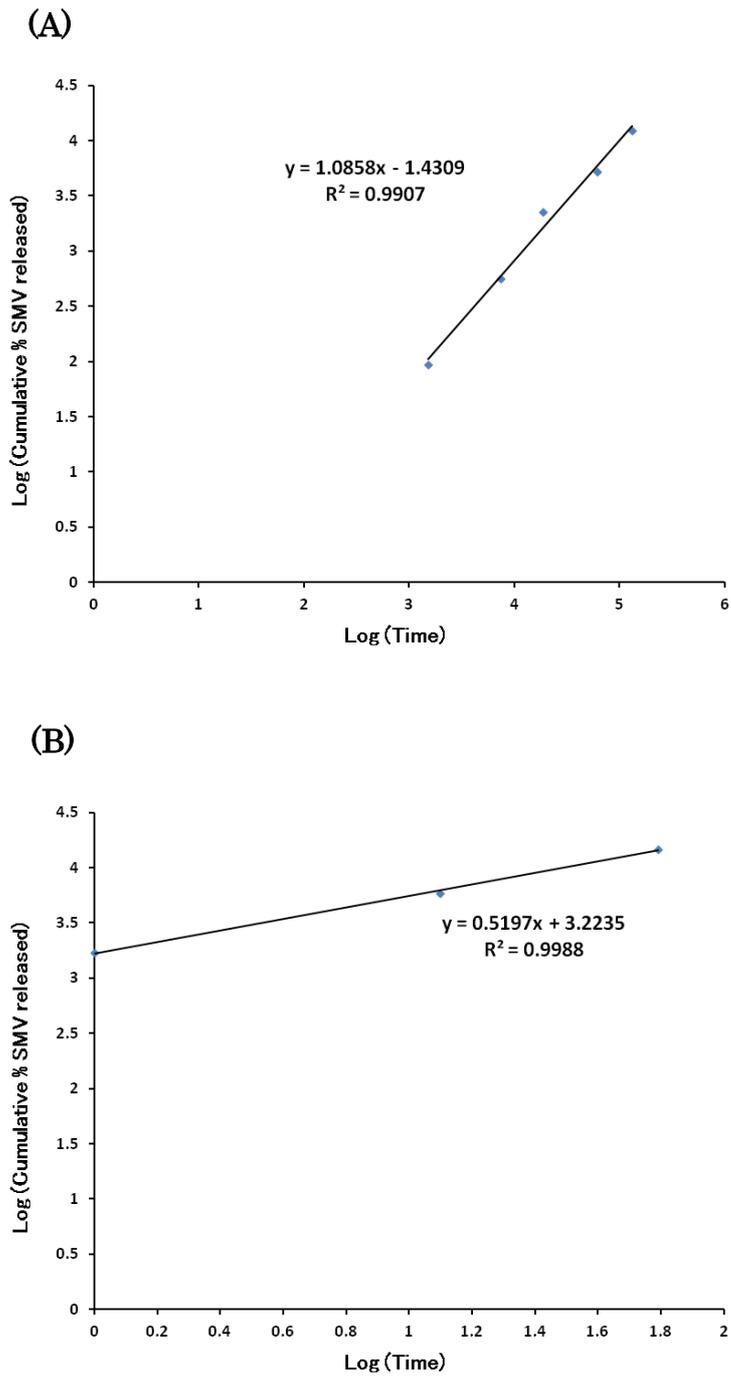


Fig. 3-6 Representative release plots obtained by fitting experimental release data of SMV from msp and nsp to Korsmeyer–Peppas model.

3-3.4 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) がマウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の増殖に与える影響

msp および nsp が、MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に与える影響について、WST-8 アッセイを用いて評価した (Fig. 3-7)。培養後 1 週間目の時点では、Control 群と比較し、SMV 処理群と msp 処理群は、有意な細胞増殖を示した。これらの細胞増殖は培養後 2 週間の時点において認められず、一過性の細胞増殖であることが示された。その一方で、nsp 処理群においては、培養後 1、2 週間目の時点では、Control 群と比較し、細胞増殖の有意な差は認められなかったが、培養後 3、4 週間目の時点では、有意に低下することが確認された。

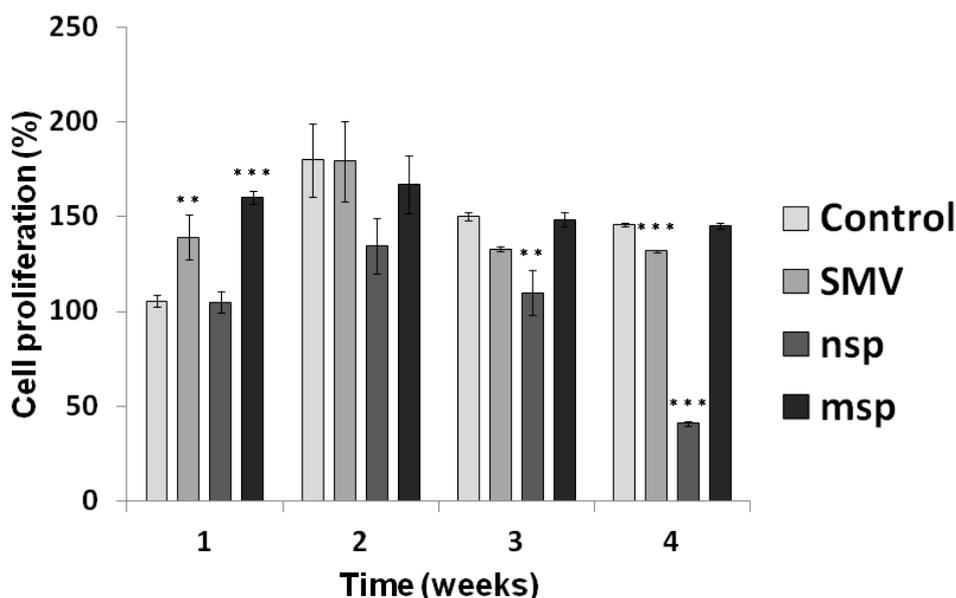


Fig. 3-7 Influence of msp and nsp on cell proliferation on MC3T3-E1 cells. The data represents the mean \pm SEM (n=3, **P < 0.01, ***P < 0.001, compared with control).

3-3.5 各 PLGA 粒子 (msp、nsp) が MC3T3-E1 細胞の分化能に与える影響

msp と nsp が MC3T3-E1 細胞に与える分化能への影響を評価するために、骨分化マーカーのひとつである ALP 活性の評価を行った (Fig. 3-8)。培養後 2 週間目の時点では、Control 群と比較し、ポジティブコントロールである SMV 処理群と、msp 処理群は、有意に ALP 活性が増加していた。その一方で、nsp 処理群はコントロール群との有意差が認められなかった。培養後 3 週間目の時点では、いずれの群においても、Control 群と比較して、有意な差が認められなかった。

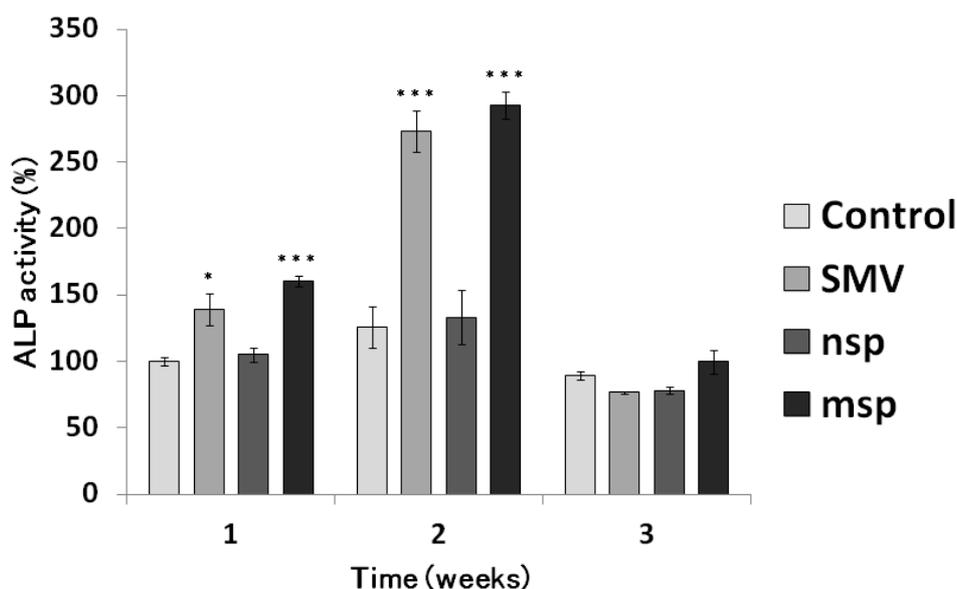


Fig. 3-8 Influence of msp and nsp on ALP activity on MC3T3-E1 cells. The data represents the mean \pm SEM (n=3, *P < 0.05, ***P < 0.001, compared with control).

3-3.6 ラット頭蓋冠欠損モデルにおける新生骨形成増加率の評価

msh と nsh が骨形成への与える影響を検討するために、ラット頭蓋冠欠損モデルを作成して、新生骨形成率を測定した。欠損部に各製剤を埋入し、埋入 4 週間後に頭蓋冠の切片試料を作成し、マイクロ CT により撮影後、画像解析により骨形成効果を評価した (Fig. 3-9 (A, B))。マイクロ CT 画像から、sham 群では、新生骨形成はほとんど観察されなかった。また、msh 処理群及び nsh 処理群では新生骨形成が欠損部の端側から伸展していることが確認された。画像解析による定量評価の結果、手術 4 週間後において、msh 処理群の欠損体積に対する新生骨の割合は約 12% であり、sham 群 (約 2%)、nsh 処理群 (約 8%) と比較して有意に新生骨形成が認められた (Fig. 3-9C)。

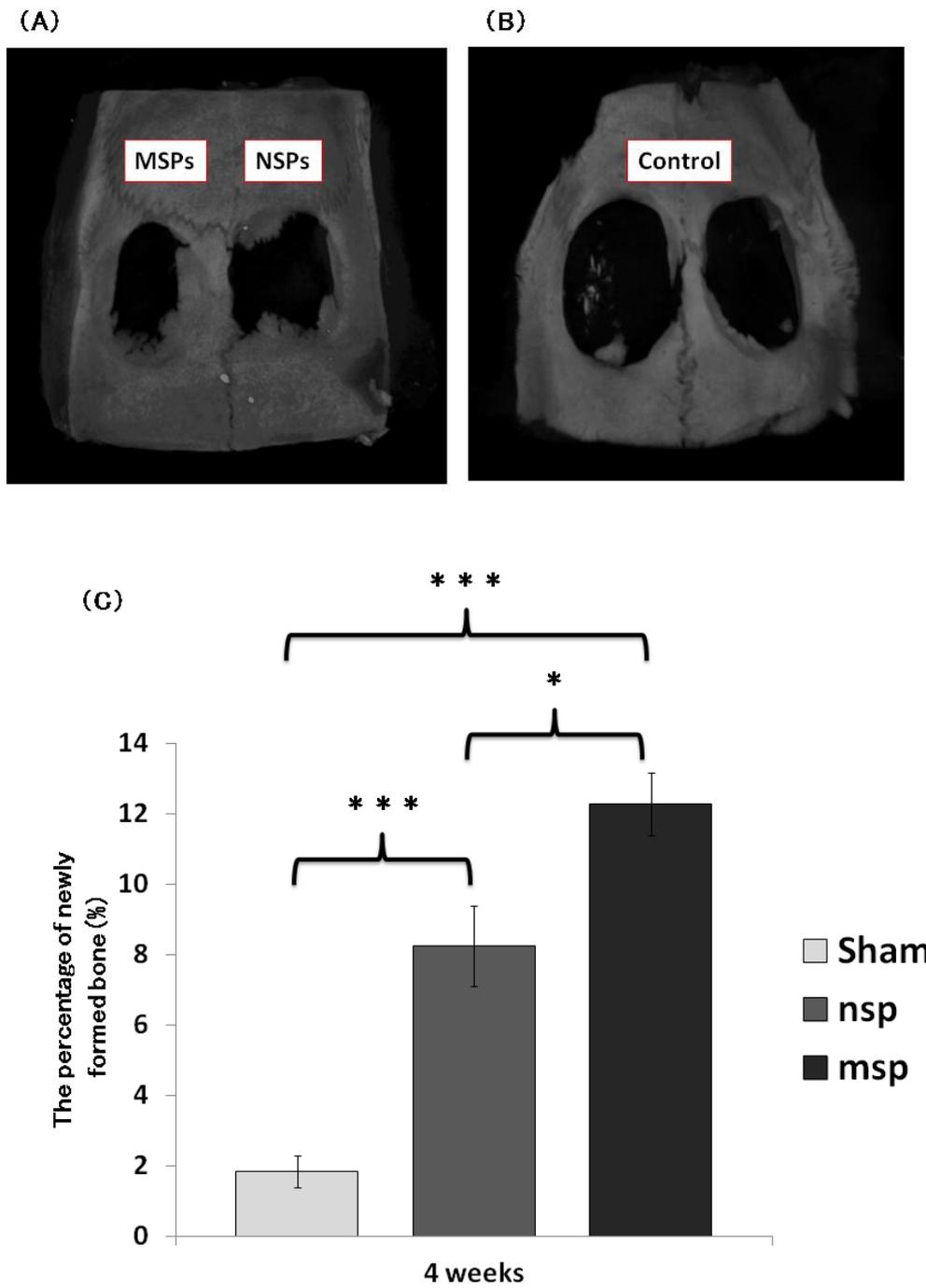


Fig. 3-9 Born generation effect of msp and nsp *in vivo*. Micro-CT images of msp and nsp group tested (A) and untreated (B), and the quantification (C) after 4 weeks. The data represents the mean \pm SEM (n=6, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

3-4 考察

SMV は骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞の増殖・分化を促進することが報告されている[6, 7]。本研究では、薬物キャリアとして長期徐放性の msp と、msp と比較して徐放期間の少ない nsp を比較し、放出挙動の異なる 2 つのキャリアが、骨形成にどのように影響を与えるのか、MC3T3-E1 細胞株による *in vitro* 実験および、ラット頭蓋冠を用いた *in vivo* 実験を用い、検討を行った。msp は SMV と同様、MC3T3-E1 細胞の増殖・分化を有意に促進していることが *in vitro* 実験で示唆された。さらに、msp は *in vivo* 実験によって、control および、nsp と比較し、有意に骨形成効果があることが示された。このことから、msp は骨形成において有力なキャリアとして優れていることが示唆された。今回は、残念ながら、SMV と msp を比較した *in vivo* 実験を行っておらず、SMV に対する msp の有用性を示すに至っていない。一方、nsp は細胞増殖が抑制されていることが *in vitro* 実験で示唆された。Meyer らは PLGA の分解産物である乳酸とグリコール酸が *in vitro* 試験で骨芽細胞の増殖・分化を抑制する可能性があることを以前に報告している[8]。nsp による MC3T3-E1 細胞の細胞増殖の低下の原因として、1) nsp は封入率が低く、見かけの PLGA 量が多くなったこと、さらに 2) nsp は比表面積が大きいため、分解が速くなることから、PLGA の酸性分解物の濃度が高くなることが、影響したと考えられる。培養 1 週間後及び 2 週間後における nsp の ALP 活性評価の結果から、nsp 処理群はコントロール群と有意差がなく、同等の ALP 活性であった。これは、酸性分解産物の MC3T3-E1 細胞に対する細胞活性に与える抑制効果を、SMV が打ち消したことが原因として考えられる。*in vivo* 実験においては、msp 処理群と nsp 処理群の骨形成効果を確認し、さらに nsp 処理群よりも msp 処理群の方が、骨形成効果が大きいことを確認した。Garrett らは、*in vitro* 試験においてマウス由来間葉系細胞である 2T3 細胞に対する各種スタチンの骨形成を促進する有効濃度を検討し、SMV は 0.1-10 μM であることを報告している[9]。定常的な SMV 放出速度を有する msp は、骨芽細胞及び骨組織の周囲において設定した SMV の有効濃度（約 1 μM ）を長期間に渡り維持し、骨形成効果を発揮したと考えられる。一方、nsp は SMV を速やかに

放出し、欠損部に流入した組織液によって吸収・代謝・排泄されると考えられるものの、複数回投与することで、十分な骨形成効果が期待される。

本研究では2つの製剤からの異なる **SMV** 放出挙動が与える骨形成への影響について *in vitro* 及び *in vivo* 実験で検討したが、今後は他の分化・毒性・炎症マーカーの発現について検討を行うことにより、**SMV** 封入 **PLGA** 粒子が骨形成に与える影響についてさらなる詳細な情報が得ることが必要と考えられる。

3-5 小括

持続的に SMV を放出することができる msp は、*in vitro* において骨芽細胞の分化を促進し、*in vivo* においても新生骨形成を促進したことから、局所における持続的な SMV 放出が、骨の修復力を高め、骨再生に有利な環境を作り出していることが示唆された。一方で、nsp は *in vitro* において、培地内の濃度が酸性に傾き骨芽細胞の増殖・分化を妨げる結果となったこと、また *in vivo* 実験において手術 4 週間後において msp よりも新生骨形成が優れなかったことから、msp の方が骨再生に適していることが示唆される。以上より、骨再生過程が重要な歯科インプラント治療において、本研究で開発した SMV 封入 PLGA マイクロ粒子は、単独もしくは骨誘導性または骨伝導性のバイオマテリアルと組み合わせることで、歯周病などを原因とした歯槽骨欠損患者への有効な徐放性製剤になりうるものと期待される。

3-6 参考文献

1. Adah, F., et al., Effects of sustained release of statin by means of tricalcium phosphate lysine delivery system in defect and segmental femoral injuries on certain biochemical markers in vivo. *Biomed Sci Instrum*, 2006. **42**: p. 126-35.
2. Tanigo, T., R. Takaoka, and Y. Tabata, Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *J Control Release*, 2010. **143**(2): p. 201-6.
3. Shastri, V.P., P. Hildgen, and R. Langer, In situ pore formation in a polymer matrix by differential polymer degradation. *Biomaterials*, 2003. **24**(18): p. 3133-7.
4. Frank, A., et al., Study of the initial stages of drug release from a degradable matrix of poly(d,l-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 2004. **25**(5): p. 813-21.
5. Korsmeyer, R.W., et al., Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: effect of entrapped air. *J Pharm Sci*, 1983. **72**(10): p. 1189-91.
6. Maeda, T., et al., Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **280**(3): p. 874-7.
7. Walter, M.S., et al., Simvastatin-activated implant surface promotes osteoblast differentiation in vitro. *J Biomater Appl*, 2014. **28**(6): p. 897-908.
8. Meyer, F., et al., Effects of lactic acid and glycolic acid on human osteoblasts: a way to understand PLGA involvement in PLGA/calcium phosphate composite failure. *J Orthop Res*, 2012. **30**(6): p. 864-71.
9. Garrett, IR. et al., Statins and bone formation. *Current Pharmaceutical Design*, 2001. **7**: p. 715-736

第4章 結論

現在、様々な骨補填材が歯科臨床で広く応用されている。特に歯科インプラント治療においては、インプラントの安定性は埋入部の骨の体積に大きく依存するため、骨補填材が併用されることが多い。歯周病により抜けた歯の根元の骨の部分の治癒が進まず、インプラントを埋入しても、土台となる歯槽骨が不安定であることから、骨補填材の填入を行い、骨量を回復する手段として用いられる骨補填材の役割は大きい。また、不慮の事故等により歯が抜けた直後に、抜歯窩の治癒を待たずにインプラントを即時に埋入する場合、歯根とインプラント体の形状の違いが起りやすく、このギャップに対し、骨補填材を充填して骨形成を促進しなければならないこともある。このように、現在歯科治療において骨補填材は様々な症例で応用されているが、骨補填材の選択をする際、最適な材料を選択しなければならない。これまでに、生体内で吸収されやすく新生骨と置換することが可能なリン酸カルシウム系の人工骨補填材が数多く開発されてきたが、リン酸カルシウム系骨補填材の強度は脆弱であるため、高度な歯周病患者の歯槽骨回復には適さない。第2章では、この弱点を補うことができる力学的強度をもつ Calcium-aluminate 骨セメントと、薬物放出をコントロールできる PLGA を組み合わせた薬物キャリアを用いて、骨形成効果を有する SMV をコントロールドリリースし、その SMV 放出特性が骨再生に与える影響を検討した。本研究で調製した msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体は、約1カ月にわたり SMV を徐放することが可能であった。また、自然閉鎖不可能な直径8mmのウサギ頭蓋冠欠損モデルにおいて、Calcium-aluminate 骨セメント単独で使用するよりも、SMV を持続放出可能な msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体を用いる方が、新生骨形成が増大することを確認した。これらの結果から、新生骨が周囲から侵入することができる元来の骨セメントの有する骨伝導能に加えて、徐放機能を有している msp/Calcium-aluminate 骨セメント複合体は、歯槽骨再生治療に応用できるものと期待される。

第3章では、骨芽細胞による骨組織構築のメカニズムにおいて、SMV の放出

速度がどのように骨芽細胞の分化及び骨再生修復に寄与しているのかを明らかにするため、マウス由来骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いて、SMV 放出特性が細胞増殖能と分化能に与える影響を検討した。nsp からの約 5 日程度の SMV 放出は、MC3T3-E1 細胞の細胞増殖・分化能力を高めることができなかった。その一方で、約 1 カ月にわたり持続放出することができる msp は、有意に細胞増殖・分化を促進しており、SMV の持続放出が骨芽細胞による骨組織構築に有利な環境作りに寄与していることが示唆された。さらに、ラット頭蓋冠欠損モデルにおいて、msp 処理群は新生骨形成を有意に促進していたことから、SMV の持続放出が骨芽細胞による骨形成促進に大きく寄与していることが示された。以上から、SMV による骨形成効果を十分に発揮するためには、SMV を持続放出することが有効であると考えられる。

以上、本研究で得られた知見を基盤として、SMV 徐放性骨補填材が開発されれば、歯科治療のみならず、骨再生治療のさらなる進歩に貢献できる可能性が高い。故に、骨欠損患者に対する治療方法の選択肢を広げることができ、QOL は格段に向上すると考えられる。

謝辞

このような研究の機会を賜り、また本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 尾関 哲也 教授及び田上 辰秋 講師に心より深く感謝いたします。

また、本論文に関し、懇切丁寧なご指導とご助言をいただきました、徳島大学歯学部・大学院口腔顎顔面補綴学 市川 哲雄 教授、大学病院口腔インプラントセンター 内藤 禎人 助教に深く感謝の意を表します。

本研究で動物実験でのご指導とご助言をいただきました、スウェーデンマルメ大学歯学部補綴科 神保 良 准教授に心より感謝を申し上げます。

研究の遂行のみならず、研究生活でも実に多くの方のお力添えをいただきました、薬物送達学分野の皆様我心から深く感謝いたします。

最後に、これまで温かく見守って育ててくださり、教育の機会を与えてくださった両親をはじめとする家族に心より深く感謝いたします。

2016年 3月

照喜名 孝之