

スタチンがラット頭蓋骨に設置した  
チタンキャップ内面の垂直的骨増大に及ぼす効果

奥羽大学大学院歯学研究科歯内・歯周療法学専攻

石澤 正晃

(指導教員：高橋 慶壮 教授)

Effect of Topical Statin Delivery on Bone Formation  
within a Titanium Cap in Rat Calvaria

Department of Endodontics and Periodontics,  
Ozu University, Graduate School of Dentistry

Masaaki Ishizawa

(Director: Prof. Keiso Takahashi)

### **Abstract**

The aim of this study was to investigate the effect of topical delivery of statins on vertical guided bone regeneration (GBR) in rat calvaria. Thirty 10-week old male Sprague-Dawley rats were used. In the all animals, the calvarium was exposed, and 2 circular grooves (5.5 mm in diameter) were prepared bilaterally in each parietal bone of every animal. Two titanium caps were randomly allocated from four groups: (1) Medogel<sup>®</sup> (M) alone (control) , (2) M+simvastatin, (3) M+pravastatin, (4) M+rhBMP-2 and placed on the parietal bone. At 8 weeks after surgery, the animals were euthanized, and histological sections were prepared for histology, histomorphometry and immunohistochemistry. The amounts of the newly formed bone within the caps were quantitated using image analyzer. In the all groups, newly generated tissues in close contact with the surface of calvarial bone were observed and the tissue consisted of mineralized bone and marrow spaces. Osteoclasts were observed around newly generated bone in the all groups as well. The amount of newly formed bone was the highest in the M+rhBMP-2 groups compared with control groups ( $p < 0.05$ ). Both M+simvastatin and M+pravastatin groups tended to increase the new bone formation

compared with control groups although the difference were not significant. In the extracalvarial experimental space, PCNA positive cells were often observed in bone marrows. CD68 positive mononuclear cells were found in bone marrows, while CD68 positive multinucleated cells were done between newly generated bone and bone marrows. In this rat GBR model, both simvastatin and pravastatin tended to enhance vertical bone augmentation, although the effect was lower than that of rhBMP-2.

Key words: vertical bone augmentation, rat calvaria, statin, BMP-2

## 和文抄録

ラット頭蓋骨上の GBR モデルにおいて、局所投与したスタチンが垂直的骨増大に及ぼす効果を調べることを目的とした。30 匹の 10 週齢の雄 Sprague-Dawley ラットを実験に供した。全身および局所麻酔下でラット頭頂部に皮膚骨膜弁を形成し、頭蓋骨を露出し、5.5mm 径の溝を頭蓋の左右側に 1 つずつトレフィンバーで形成した。① Medgel<sup>®</sup>のみ（陰性対照）、② Medgel<sup>®</sup> + BMP-2、③ Medgel<sup>®</sup> + シンバスタチン、④ Medgel<sup>®</sup> + プラバスタチンを添入した 4 群から無作為に 2 つのキャップを設置した。8 週間後にラットを安楽死させ、組織学的、組織計測学的および免疫組織化学的検討を行なった。キャップ内の新生骨量はイメージ解析ソフトを用いて定量した。いずれの実験群においても、頭蓋骨上に新生組織の形成を認め、その組織には新生骨と骨髄組織を認めた。全ての実験群において新生骨周辺に破骨細胞が観察された。BMP-2 添加群で新生骨量が最も高かった ( $p < 0.05$ )。シンバスタチンあるいはプラバスタチン添加群の骨新生量は陰性対照のそれに比較して有意ではなかったが、骨増大傾向が認められた。骨髄中には単核の PCNA 陽性細胞を認めた。一方、骨髄と新生骨の境界領域には CD68 陽性の多核細胞を観察した。本研究から、シンバスタチンとプラバスタチンは BMP-2 程ではなかったが、骨増大効果の上昇が伺われた。

## 諸 言

組織再生には「細胞」「足場」および「細胞増殖因子（シグナル）」が不可欠である。骨新生を目的とした組織再生において未分化間葉系細胞にサイトカインや成長因子を作用させて骨新生に関わるカスケード反応の活性化を図ることを目的とした「生物学的骨増大術」の有効性が検討されている<sup>1~3)</sup>。

骨新生におけるシグナル分子として骨形成タンパク質 (bone morphogenetic proteins 以下 BMPs), とりわけ BMP-2 の有効性が検討されており, ヒトの抜歯窩に BMP-2 を投与した際の骨増大効果が報告されている<sup>4)</sup>。BMP-2 は骨芽細胞分化促進因子であり, 異所性骨新生作用を有するが, 欠点として免疫応答による異物反応や炎症反応を惹起する可能性がある。さらに, BMP-2 は高価であり, 投与部位で急速に分解するため組織停滞性が悪いことも指摘されている。BMP-2 を大量かつ高濃度に投与するか繰り返して投与する必要があるため, 医療費の増大と繰り返し投与によって引き起こされ得る副作用とが懸念されている。Hasegawa ら<sup>5)</sup> は吸収性コラーゲンスポンジに高濃度 (1000 µg/ml) の BMP-2 を含有させ短期間作用させた場合に限り骨増大効果が促進されたと報告している。一方, BMP-2 を徐放性に作用させる担体を用いた局所薬物配送システムを用いて局所的な骨増大効果が増強されることも報告されている<sup>6)</sup>。BMP-2 を含む

シグナル分子を局所投与して骨増大を誘導するためには有効成分を局所で徐放性に作用させる担体が必要であろう。

スタチンはヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼを阻害することから高脂血症治療薬として開発された。しかし、1999年に Mundy ら<sup>7)</sup>によってスタチンが骨芽細胞の BMP-2 発現を亢進して骨形成を促進することが報告されて以来、骨形成促進薬としての効果が注目されている。スタチンは水溶性と脂溶性とに分類され、これまでの研究結果からは脂溶性スタチンである simvastatin の骨形成促進作用が報告されている<sup>8, 9)</sup>。一方、水溶性のスタチンである pravastatin は BMP-2 遺伝子のプロモーター活性を上昇させなかったことから、スタチン間で骨新生効果に差がある可能性が示唆されているが<sup>10)</sup>、pravastatin による BMP-2 産生と骨形成誘導効果が報告されており、pravastatin の骨新生効果については統一した見解が得られていない<sup>11)</sup>。

Simvastatin を局所投与すると骨形成の促進だけでなく炎症反応も惹起するため、低侵襲で効果的な投与方法が検討されている<sup>12)</sup>。また、臨床研究で歯周治療においてスケーリング・ルートプレーニング後に歯周ポケットに simvastatin

(1.2mg) 含有ゲルを注入した際の治療効果が報告されている<sup>13)</sup>。マウス頭蓋骨と骨膜間に

simvastatin (2.2mg) 含有ゲルを1回のみ局所投与すると、炎症反応を惹起したが骨増大効果も認められている<sup>14)</sup>。この研究は骨膜存在下で行なわれており、骨膜由来細胞も骨増大に関与している可能性がある。Simvastatinは骨新生を促進することに加えて炎症も惹起するが、抗炎症薬(cyclooxygenase-2(以下COX-2) inhibitors)を投与すると骨新生と炎症反応の両方を抑制できることが報告されている<sup>15)</sup>。また、simvastatin(2.2~0.5 mg)含有ゲルと抗炎症薬(COX-2 inhibitors)を同時に局所投与することによって炎症反応を抑制して骨増大が可能であることが報告された<sup>16)</sup>。これらの研究からsimvastatinの局所投与に際しては炎症反応を抑制して骨新生効果を維持する工夫が求められる。しかし、simvastatinを長期的に徐放させた際の骨新生効果は報告されておらず、simvastatinを局所で長期間作用させることが出来れば低濃度のsimvastatinであっても骨新生効果が期待できるため、simvastatinと徐放性担体を組合せた際の骨新生効果を検討する必要がある。

コラーゲンを変性させたゼラチンは生体内分解性ポリマーとして多用されており、長い臨床経験から安全性が証明されている。MedGel<sup>®</sup>は京都大学再生医科学研究所、田畑泰彦教授の研究に基づいて開発されたゼラチンベースの生理活性物質の徐放用ハイドロゲルであり、生体内に埋入すると組織の細

胞から分泌されるコラゲナーゼなどの分解酵素によって基材が分解される。MedGel®の分解に伴って約2週間にわたり生理活性物質が徐放性に放出され、MedGel®から徐放されたBMP-2の骨新生効果<sup>17)</sup>やbasic fibroblast growth factorがMedGel®から徐放された際の血管新生効果<sup>18)</sup>が報告されている。

新生組織および新生骨の形成に伴って骨形成に関わる未分化間葉系細胞の増殖および分化が起こるが、guided bone regeneration（以下GBR）における骨新生効果の検討は見当たらない。

Proliferative cell nuclear antigen（以下PCNA）は細胞増殖にかかわる分子で、組織中の細胞増殖マーカーとして利用されている<sup>19)</sup>。一方、マクロファージ系細胞が破骨細胞に分化することが知られているため、骨新生時におけるマクロファージ系細胞の様態を知ることは骨新生機序の理解に繋がると考えられる。CD68はマクロファージと単球に発現するlysosomal/endosomal-associated membrane glycoproteinファミリーの糖タンパク質であり細胞内ではリソゾームに存在し、マクロファージのマーカーになる<sup>20)</sup>。

本研究では、ラット頭蓋骨上の垂直的GBRモデルにおいて、2種類のスタチン(simvastatin, pravastatin)あるいはBMP-2をMedGel®に含有させてチタンキャップ内に添入し上記薬剤を徐放性に作用させた際の骨新生効果について組織学的、組織形態計測学的



および免疫組織化学的に解析することを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

10週齢で体重320～400gの雄性Sprague-Dawley系ラット（日本クレア社，東京）30匹を用いた。実験開始に先立ち1～2週間予備飼育し，全身状態が健康であることを確認して実験に使用した。飼育期間中には固形飼料（オリエンタル酵母工業，東京）および水を与え，奥羽大学動物実験研究施設（室温23℃，湿度65%）で飼育した。本研究は奥羽大学動物実験委員会の承認（受付No. 42）を得て奥羽大学動物実験規定を遵守して行った。

### 2. チタン合金キャップ

実験に使用したチタン合金キャップ（以下チタンキャップ）（図1）は日本メディカルマテリアル株式会社（以下JMM，大阪）と共同で開発した。すなわち，チタン合金（アルミ6%，バナジウム4%を含むJMMの歯科インプラントと同じ材料）ブロックを加工して作製した0.25mmの肉厚のチタンキャップ（重量140mg）を機械研磨して実験に供した。

### 3. 生体材料

Simvastatin (Calbiochem<sup>®</sup>, Germany), pravastatin (メバロチン<sup>®</sup>, (株)第一三共製薬, 東京) および組換えヒトBMP-2 (Wako, 大阪) を実験に使用した。担体としてMedGel<sup>®</sup> (Wako) を使用した。チタンキャップ内にシートから切り出した5mm角のMedGel<sup>®</sup> PI9片を入れ, エタノールに溶解したsimvastatin (50 mg/ml), 滅菌蒸留水に溶解したpravastatin (50 mg/ml) またはBMP-2 (50 µg/ml) をそれぞれ10µlずつMedGel<sup>®</sup>に滴下して吸収させ, 薬剤を吸収させたMedGel<sup>®</sup>を入れたチタンキャップを4℃で一晩保存したものを実験に使用した。陰性対照群ではMedGel<sup>®</sup>片のみをチタンキャップ内に添入して使用した。

#### 4. 実験方法

Muraiらの方法<sup>2)</sup>に準じて行った。すなわち, ラット腹腔にペントバルビタールナトリウム (Somnopentyl<sup>®</sup> 共立製薬, 東京) をラット体重1kgあたり50mg投与し全身麻酔を行なった。さらにエピネフリン1/80,000添加2%塩酸リドカイン(歯科用キシロカイン<sup>®</sup>カートリッジ, 昭和薬品化工業株式会社, 東京)を用いて局所麻酔を行った。次いで#15c替刃式外科用メスを用いて両耳を結ぶように皮膚を切開し, 骨膜を剥離した(図2a)。中央の縫合線を挟んで左右の頭頂骨部に生理食塩水(大塚製薬, 東京)による注水下で内径4.8mm

のトレフィンバー（GC社，東京）を用いて頭蓋骨上に輪状の溝を形成した後（図2b），上述した生体材料を添入したチタンキャップを輪状の溝に嵌合させ設置した（図2c）。設置後にチタンキャップが動かないように先ず手術用縫合糸（D8106 エチコン J&J, USA）を用いて骨膜縫合し（図2d），その後に手術用縫合糸（789G エチコン J&J）を用いて皮膚縫合した（図2e）。また，術後の感染予防としてペニシリン G(60,000IE/0.02ml, 明治製菓，東京) 1mlを皮下注射した。

## 5. 組織学的研究

実験開始8週間後に，ジエチルエーテル吸引により安楽死させた。その後，直ちに断頭して頭蓋冠と周囲組織を一塊として摘出し，チタンキャップを除去後に10%中性緩衝ホルマリン液で固定後10% EDTA (ethylenediamine tetra acetic acid)を用いて脱灰（4℃ 4週間）し，通法に従ってパラフィン包埋を行ない，厚さ5 $\mu$ mの前頭断切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色（以下H・E染色）を行い形態的観察を行った。

## 6. TRAP染色

破骨細胞の存在を確認するために酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色（以下TRAP染色）を行った。すなわち，脱パラフィン後の切片を10mMリン酸緩衝生理食塩水（PBS, pH7.4）に浸漬し，ナフ

トール AS-MX phosphate (Sigma, USA) を基質として 0.2M 酢酸緩衝液で TRAP 染色を行った<sup>21)</sup>。染色液を水洗後にマイヤーのヘマトキシリン液に 3 分間浸漬し、乾燥、キシレン透徹・封入後に TRAP 陽性細胞を観察した。

## 7. 免疫組織化学染色

細胞周期の G1 期から S 期の間核内に出現するタンパクである PCNA とマクロファージのマーカである CD68 の免疫染色を行った<sup>22)</sup>。脱パラフィン後に、PCNA 染色では、切片をあらかじめ 90℃ 蒸留水中で 1 時間加熱して PCNA を賦活化した。PCNA の賦活化後または脱パラフィン後に、すべての切片を 3% 過酸化水素水に室温で 20 分間浸漬して、内因性ペルオキシダーゼを除去した。一次抗体としてマウス抗 PCNA 抗体 (PC10; 300 倍希釈, ダコ・ジャパン, 東京) あるいはマウス抗ラット CD68 抗体 (ED1, 100 倍希釈, BMA Biomedicals, Switzerland) を室温で 1 時間反応させた。PBS による洗浄の後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識アミノ酸ポリマーを結合した抗マウス抗体 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼと DAB キット (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用いて発色させた。核染色はヘマトキシリンで行い、光学顕微鏡で観察した。なお、一次抗

体に換えて PBS で反応を行った切片を陰性対照とし、それら切片に陽性反応がないことを確認した。

## 8. 形態計測による分析

H・E 染色を行った組織切片の画像を取り込み、画像解析ソフト (WinRoof, 三谷商事)<sup>23)</sup>を用いてチタンキャップ内部の計測範囲 ROI (Region of Interest) を確定し、新生骨面積を算出した。

## 9. 統計処理

統計処理に関しては ANOVA 検定によって比較検討を行った。p<0.05 未満の場合を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 全身状態への影響

スタチンあるいは BMP-2 の局所投与による明らかな局所のおよび全身的な異常や体重変化は認めなかった。

### 2. 組織学的所見

いずれの実験群においても新生組織中には、海綿骨と骨髄組織を認め、線維性結合組織が存在することもあった (図 3 a~d)。BMP-2 添加群では、母床骨上およびチタンキャップ内面に沿って上方

への骨新生が観察された(図 3 b)。本実験条件下では明らかな炎症所見は認められなかった。

いずれの実験群においても新生骨梁には骨細胞が存在した(図 4 a)。simvastatin および pravastatin 添加群および対照群では新生組織の上部は線維性結合組織で満たされていることが多かった(図 4 b)。骨髄中には多核細胞が観察された(図 4 c)。新生骨表面に骨芽細胞が観察された(図 4 d)。

### 3. TRAP 染色

いずれの実験群においても TRAP 陽性細胞が認められた。骨髄中に TRAP 弱陽性の単核細胞(図 5 a)を、新生骨表面に TRAP 強陽性の多核細胞を認めた(図 5 b)。

### 4. 免疫組織化学的所見

いずれの実験群においても新生骨骨髄中の細胞(図 6 a)および線維性結合組織中に PCNA 陽性細胞が観察された(図 6 b)。骨芽細胞は極めて弱い陽性反応を示した(図 6 c)。

いずれの実験群においても頭蓋骨と新生骨との境界(図 7 a)および骨髄に面した新生骨(図 7 b)および新生骨表面(図 7 c)には多核の CD68 陽性細胞が観察された。

### 5. 骨新生効果

simvastatin および pravastatin 添加群の骨新生量は MedGel<sup>®</sup>（陰性対照）群に比較して増加傾向を示したが，有意ではなかった（図 8）。一方，BMP-2 添加群では陰性対照群に比較して骨新生量が有意に増加していた ( $p < 0.05$ )（図 8）。

### 考 察

本研究で使用したスタチン（simvastatin と pravastatin）はいずれも BMP-2 に比較して骨新生効果は低かったが，コントロールよりは高い傾向を示した（図 8）。新生組織における骨髄内の細胞は増殖が盛んに行なわれ（図 6），多核のマクロファージ系細胞が新生骨表面に存在しており（図 7），活発な骨代謝が行なわれている可能性が考えられた。

新生骨の骨髄側において TRAP 陽性の単核細胞（図 5 a）と多核細胞（図 5 b）が認められたが，これらのうち単核細胞は前破骨細胞，多核細胞は破骨細胞と考えられる。また，マクロファージ出現状況を把握するために行なった CD68 免疫組織像において，新生骨と頭蓋骨との間や新生骨の骨髄側において，陽性を示す細胞が認められた（図 7）。このことは新生骨髄に単球やマクロファージが存在し，前破骨細胞形成の前準備が備わっていることを示唆する。

さらに，PCNA 陽性細胞が新生骨周囲の結合組織や骨髄側に認められたことから増殖期のステー

ジにある細胞が新生骨梁周囲に存在することが明らかになった。以上3つの結果より新生骨周囲では、単球マクロファージから前破骨細胞、さらには破骨細胞への分化が促進され破骨細胞増加とともに骨改造現象(リモデリング)が活発になされ、著しい速度で骨新生が行なわれている事が推察された。

Setoら<sup>24)</sup>はMundyら<sup>7)</sup>の報告を参考に simvastatin (0.2mg) を1週間に2回ずつ70日間ラット歯肉に投与しているが、現実的には患者への実施は困難であり、一回投与した simvastatin を長期的に作用させることが可能になれば臨床的な意義は大きい。予備実験から simvastatin を2~5mg 局所投与した場合に、術野の炎症反応に起因する出血および腫脹を観察したことから Bradley らの報告<sup>15)</sup> から0.1mgでは十分な骨新生を誘導できない事を勘案し、本研究では simvastatin および pravastatin の投与量を0.5mgに決定した。この使用量では実験動物全てに肉眼的な異常は認めなかった。体重変化にも4群間で有意な差は無かった。しかしながら、simvastatin は骨膜由来細胞に作用する可能性が報告<sup>25)</sup> されていることからすれば、骨膜の介在しない本実験系では十分な骨新生促進効果が得られなかったのかもしれない。本研究ではスタチンの中から simvastatin と pravastatin を選択して実験に使用したが、他にも



fluvastatin<sup>26)</sup> や rosuvastatin<sup>27)</sup> の骨新生効果が報告されており，スタチン類の骨新生効果の機序解明が期待される。

足場とシグナルの相加的効果を期待して simvastatin と  $\beta$ -TCP を併用した際の骨新生効果が検討され<sup>28)</sup>，simvastatin と人工骨の併用により骨新生が増強されたことが報告されている<sup>29)</sup>。森田らは， $\beta$ -TCP が骨新生の足場として優れていることを明らかにしたが（未発表），本実験では「シグナル」の骨新生効果を評価するために人工骨を用いなくてゼラチンベースで薬物を長期的に徐放可能な MedGel<sup>®</sup> を担体として使用した。

免疫組織化学的研究から，いずれの実験群においても骨髄中の単核細胞に PCNA 陽性細胞を認めた（図 6）。この結果は，未分化間葉系細胞や前骨芽細胞が活発に細胞増殖し，骨芽細胞へと分化していることを示唆する。一方，CD68 陽性多核細胞が新生骨と骨髄の境界領域に散見されたことと骨髄組織中に単核の CD68 陽性細胞が存在したこと，さらに TRAP 陽性細胞が CD68 陽性多核細胞と同じような部位に存在していることから，骨芽細胞による骨新生と破骨細胞による活発な骨代謝が起こっていると考えられる。BMP-2 の破骨細胞活性化作用<sup>30)</sup>が関与しているのかもしれない。

陰性対照の MedGel<sup>®</sup>単体に比べ，BMP-2 投与群では顕著な骨形成が見られた。一方，simvastatin と pravastatin 添加群では，BMP-2 投与群の骨形成量には及ばなかったが，BMP-2 と simvastatin あるいは BMP-2 と pravastatin を併用した際の効果の有無についても研究を進展させる必要がある。

### 結 論

ラット頭蓋冠上にチタンキャップを設置した骨増大モデルにおいて simvastatin 投与群と pravastatin 投与群はコントロールに比較して骨増大傾向を示した。一方，BMP-2 投与群はさらに有意な骨増大効果を示した。simvastatin 投与群と pravastatin 投与群でも BMP-2 投与群と同様に増殖期の核分裂を伴う骨芽細胞への分化促進が認められることや単核のマクロファージ前破骨細胞の存在を示す結果から，骨改造現象が活発に行なわれていることが示唆された。

本論文の一部は，第 56 回春季日本歯周病学会学術大会（平成 25 年 5 月 30 日，船堀市）および第 55 回奥羽大学歯学会（平成 25 年 6 月 15 日，郡山市）にて発表した。

### 文 献

- 1) Adelina, S.: Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an

- osteoconductive material in rat crania defects. *Clin. Oral Implants Res.* **18** ; 244-255 2007.
- 2) Murai, M., Sato, S., Koshi, R., Yokoyama, K., Ikeda, K., Narukawa, M., Takayama, T., Yoshinuma, N., Ito, K.: Effects of the enamel matrix derivative and beta-tricalcium phosphate on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *J. Oral Sci.* **47** ; 209-217 2005.
  - 3) Thoma, D.S., Jung, R.E., Hänseler, P., Hämmerle, C.H., Cochran, D.L., Weber, F.E.: Impact of recombinant platelet-derived growth factor BB on bone regeneration: a study in rabbits. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* **32** ; 195-202 2012.
  - 4) Fiorellini, J.P., Howell, T.H., Cochran, D., Malmquist, J., Lilly, L.C., Spagnoli, D., Toljanic, J., Jones, A., Nevins, M.: Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J. Periodontol.* **76** ; 605-613 2005.
  - 5) Hasegawa, Y., Sato, S., Takayama, T., Murai, M., Suzuki, N., Ito, K.: Short-term effects of rhBMP-2-enhanced bone augmentation beyond the skeletal envelope within a titanium cap in rabbit calvarium. *J. Periodontol.* **79** ; 348-354 2008.
  - 6) Liu Y., Huse, R.O., de Groot, K., Buser, D., Hunziker, E.B. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J. Dent. Res.* **86** ; 84-89 2007.
  - 7) Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rossini, G., Boyce, B., Zhao, M., Gutierrez, G.: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* **286** ; 1946-1949 1999.
  - 8) Horiuchi, N., Maeda, T.: Statins and bone metabolism. *Oral Dis.* **12** ; 85-101 2006.

- 9) Park, J.B.: The use of simvastatin in bone regeneration. *Med. Oral Pathol. Oral Cir. Bucal.* **14** ; e485-e488 2009.
- 10) Sugiyama, M., Kodama, T., Konishi, K., Abe, K., Asami, S., Oikawa, S.: Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271** ; 688-692 2000 .
- 11) Alam, S., Ueki, K., Nakagawa, K., Marukawa, K., Hashiba, Y., Yamamoto, E., Sakulsak, N., Iseki, S.: Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **107** ; 22-29 2009.
- 12) Lee, Y., Schmid, M.J., Marx, D.B., Beatty, M.W., Cullen, D.M., Collins, M.E., Reinhardt, R.A.: The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. *Biomaterials* **29** ; 1940-1949 2008.
- 13) Pradeep, A.R., Thorat, M.S.: Clinical effect of subgingivally delivered simvastatin in the treatment of patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J. Periodontol.* **81** ; 214-222 2010.
- 14) Thylin, M.R., McConnell, J.C., Schmid, M.J., Reckling, R.R., Ojha, J., Bhattacharyya, I., Marx, D.B., Reinhardt, R.A.: Effects of statin gels on murine calvarial bone. *J. Periodontol.* **73** ; 1141-1148 2002.
- 15) Bradley, J.D., Cleverly, D.G., Burns, A.M., Helm, N.B., Schmid, M.J., Marx, D.B., Cullen, D.M., Reinhardt, R.A.: Cyclooxygenase-2 inhibitor reduces simvastatin-induced bone morphogenetic protein-2 and bone formation in vivo. *J. Periodontal Res.* **42** ; 267-273 2007.
- 16) Stein, D., Lee, Y., Schmid, M.J., Killpack, B., Genrich, M.A., Narayana, N., Marx, D.B., Cullen,

- D.M., Reinhardt, R.A.: Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J. Periodontol.* **76** ; 1861-1870 2005.
- 17) Takahashi Y, Yamamoto M, Yamada K, Kawakami O, Tabata Y. Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng.* **13** ; 293-300 2007.
- 18) Hosaka A, Koyama H, Kushibiki T, Tabata Y, Nishiyama N, Miyata T, Shigematsu H, Takato T, Nagawa H. Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels. *Circulation* **110** ; 3322-3328 2004.
- 19) Zhao Y, Wang J, Wang M, Sun P, Chen J, Jin X, Zhang H. Activation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells-a new mechanism of defocused low-energy shock wave in regenerative medicine. *Cytotherapy.* **15** ; 1449-1457 2013.
- 20) Torabinia, N., Razavi, S.M., Shokrolahi, Z.: A comparative immunohistochemical evaluation of CD68 and TRAP protein expression in central and peripheral giant cell granulomas of the jaws. *J. Oral Pathol. Med.* **40** ; 334-337 2011.
- 21) 河原 元 硬組織標本作製法 検査と技術 **29** ; 1169-1179 2001.
- 22) 和泉伸一, 伊藤 仁, 梅村しのぶ, 長村義之, 嶋志田伸吾, 川井健司, 芹澤昭彦, 堤 寛, 名倉 宏 : 5. 超高感度法. 渡辺・中根 酵素抗体法 (名倉 宏, 長村義之, 堤 寛 編) 改訂四版 ; 147-150 学際企画 東京 2002.
- 23) Ekuni, D., Tomofuji, T., Sanbe, T., Irie, K.,

- Azuma, T., Maruyama, T., Tamaki, N., Murakami, J., Koikeguchi, S., Yamamoto, T.: Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *J. Periodontal Res.* **44** ; 434-442 2009.
- 24) Seto, H., Ohba, H., Tokunaga, K., Hama, H., Horibe, M., Nagata, T.: Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J. Periodontal Res.* **43** ; 261-267 2008.
- 25) Rutledge, J., Schieber, M.D., Chamberlain, J.M., Byarlay, M., Killeen, A.C., Giannini, P.J., Marx, D.B., Reinhardt, R.A.: Simvastatin application to augment facial jaw bone in a dog model: pilot study. *J. Periodontol.* **82** ; 597-605 2011.
- 26) Moriyama, Y., Ayukawa, Y., Ogino, Y., Atsuta, I., Todo, M., Takao, Y., Koyano, K.: Local application of fluvastatin improves peri-implant bone quantity and mechanical properties: a rodent study. *Acta Biomater.* **6** ; 1610-1618 2010.
- 27) Monjo, M., Rubert, M., Wohlfahrt, J.C., Rønold, H.J., Ellingsen, J.E., Lyngstadaas, S.P.: In vivo performance of absorbable collagen sponges with rosuvastatin in critical-size cortical bone defects. *Acta Biomater.* **6** ; 1405-1412 2010.
- 28) Rojbani, H., Nyan, M., Ohya, K., Kasugai, S.: Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **98** ; 488-498 2011.

- 29) Nyan, M., Sato, D., Kihara, H., Machida, T., Ohya, K., Kasugai, S.: Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. Clin. Oral Implants Res. **20** ; 280-287 2009.
- 30) Kanatani, M., Sugimoto, T., Kaji, H., Kobayashi, T., Nishiyama, K., Fukase, M., Kumegawa, M., Chihara, K.: Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. J. Bone Miner. Res. **10** ; 1681-1690 1995.

## 図表の解説

図 1 本実験に使用したチタンキャップ

a 外形  $\phi$  5.5mm, 内径  $\phi$  5.0mm で肉厚が厚さ  
0.25mm b 本実験に使用したチタンキャップの内  
面

図 2 チタンキャップの設置方法

a 皮膚および骨膜の切開および剥離 b 溝の形成  
c キャップ設置 d 骨膜縫合 e 皮膚縫合

図 3 H・E 染色の光学顕微鏡像

a 実験開始 8 週間後にラット頭蓋骨上に形成され  
た新生組織の前頭断面 (MedGel<sup>®</sup> 添入群 低倍率  
像)。頭蓋骨上に新生骨, 骨髄および線維性結合  
組織が形成されている。

b 実験開始 8 週間後にラット頭蓋骨上に形成さ  
れた新生組織の前頭断面 (MedGel<sup>®</sup> + rhBMP-2 添  
入群 低倍率像)。頭蓋骨上に新生骨および骨髄  
が形成されている。

c 実験開始 8 週間後にラット頭蓋骨上に形成され  
た新生組織の前頭断面 (MedGel<sup>®</sup> + pravastatin 添  
入群 低倍率像)。頭蓋骨上に新生骨, 骨髄およ  
び線維性結合組織が形成されている。

d 実験開始 8 週間後にラット頭蓋骨上に形成され  
た新生組織の前頭断面 (MedGel<sup>®</sup> + simvastatin 添



入群（低倍率像）。頭蓋骨上に新生骨，骨髄および線維性結合組織が形成されている。

NB；新生骨，BM；骨髄，CO；線維性結合組織

#### 図4 H・E染色の光学顕微鏡像

a 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面（MedGel<sup>®</sup>+rhBMP-2添入群 中倍率像）。新生骨梁および骨髄が形成されている。

b 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面（MedGel<sup>®</sup>+simvastatin添入群 中倍率像）。新生骨骨梁および線維性結合組織が形成されている。

c 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面（MedGel<sup>®</sup>+simvastatin添入群 高倍率像）。新生骨および骨髄組織が形成されており，骨髄中には多核細胞が認められた（矢印）。

d 実験開始8週間後にラット頭蓋骨上に形成された新生組織の前頭断面（MedGel<sup>®</sup>+pravastatin添入群 高倍率像）。新生骨および線維性結合組織が形成されている。新生骨上には一列に並んだ骨芽細胞（矢印）が観察された。

NB；新生骨，BM；骨髄，CO；線維性結合組織

#### 図5 TRAP染色の光学顕微鏡像

a TRAP 弱陽性細胞 (MedGel<sup>®</sup> + rhBMP-2 添入群 高倍率像) 骨髓中の単核細胞が TRAP 染色弱陽性であった (矢印), b TRAP 強陽性細胞 (MedGel<sup>®</sup> + rhBMP-2 添入群 高倍率像) 新生骨表面の多核細胞が TRAP 染色強陽性であった (矢印)。

NB ; 新生骨, BM ; 骨髓

#### 図 6 PCNA の免疫組織化学的染色像

a 骨髓中の PCNA 陽性細胞 (高倍率像) 単核球 (矢印) および多核球 (矢頭) が陽性に染色されている。b 線維性結合組織中の PCNA 陽性の単核細胞 (矢印 高倍率像) c 弱陽性に染色された骨芽細胞 (矢印 高倍率像)

NB ; 新生骨, BM ; 骨髓, CO ; 線維性結合組織

#### 図 7 CD68 の免疫組織化学的染色像

a 頭蓋骨と新生骨境界の多核の CD68 陽性細胞 (矢印) (高倍率像)

b 骨髓と新生骨境界の多核の CD68 陽性細胞 (矢印) (高倍率像), 単核の CD68 陽性細胞 (矢頭)

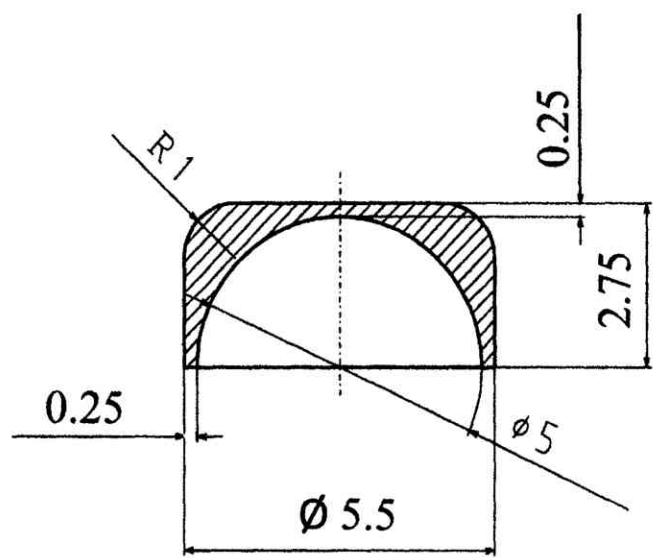
c 骨髓と新生骨境界の多核の CD68 陽性細胞 (矢印) (高倍率像)

NB ; 新生骨, BM ; 骨髓, B ; 母床骨

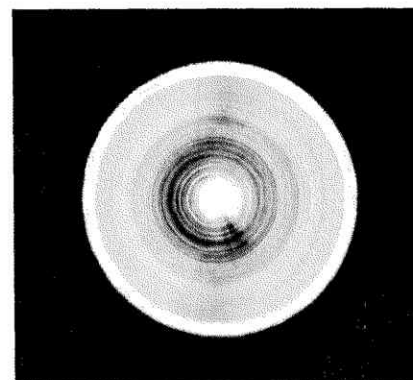
#### 図 8 4 群間の新生骨量の比較 (ROI 値)

MedGel<sup>®</sup> + rhBMP-2 添入群は MedGel<sup>®</sup> 添入群（陰性対照群）よりも有意に新生骨量が増加していた。

\* :  $p < 0.05$  MedGel<sup>®</sup> + simvastatin 添入群および MedGel<sup>®</sup> + pravastatin 添入群は陰性対照群に比較して有意ではなかったが，新生骨量が増加する傾向が見られた。

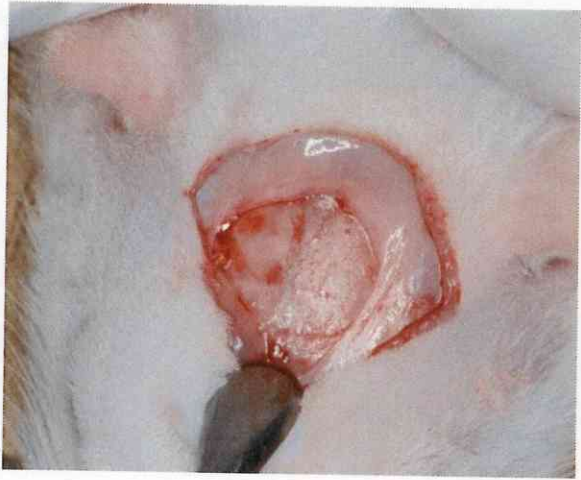


a

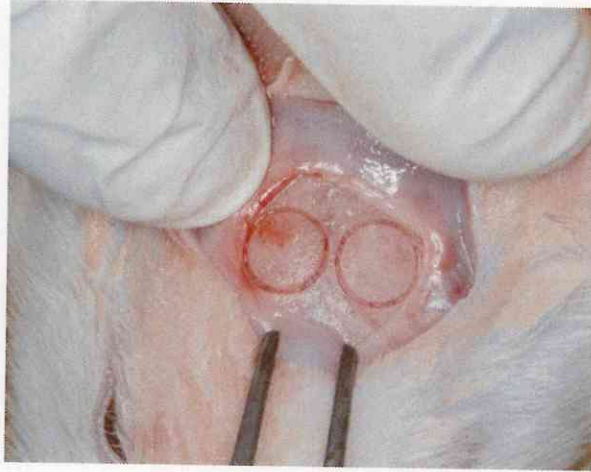


b

图 1



a



b



c

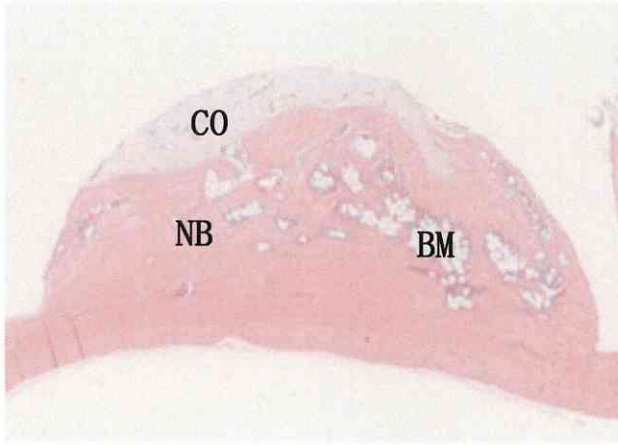


d

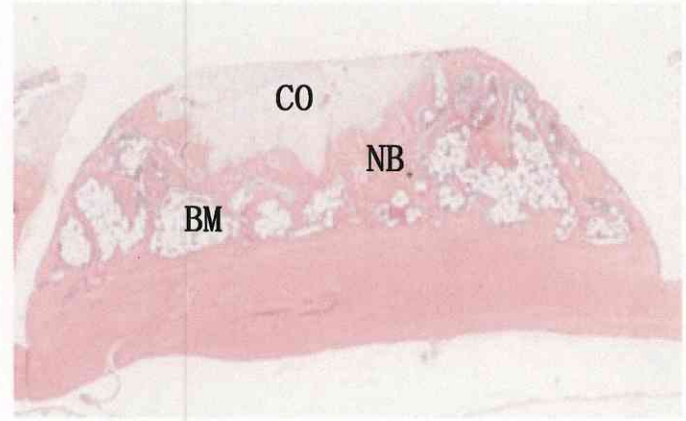


e

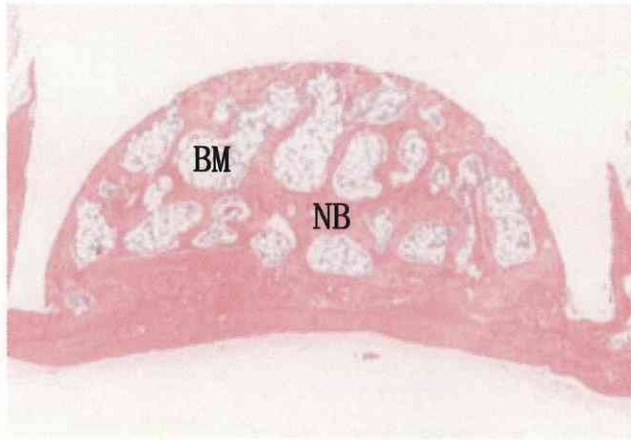
图 2



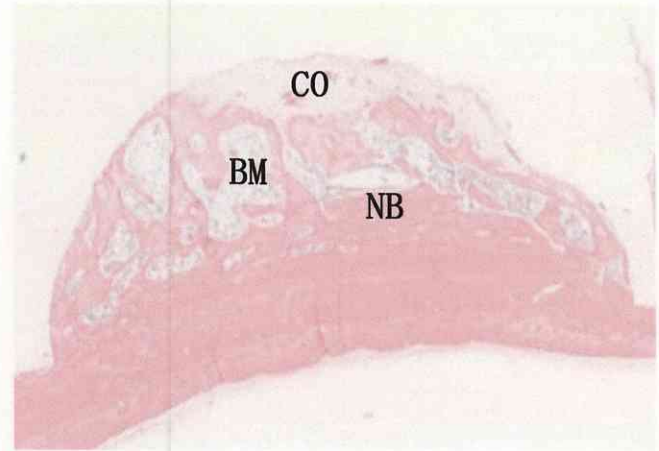
a



c



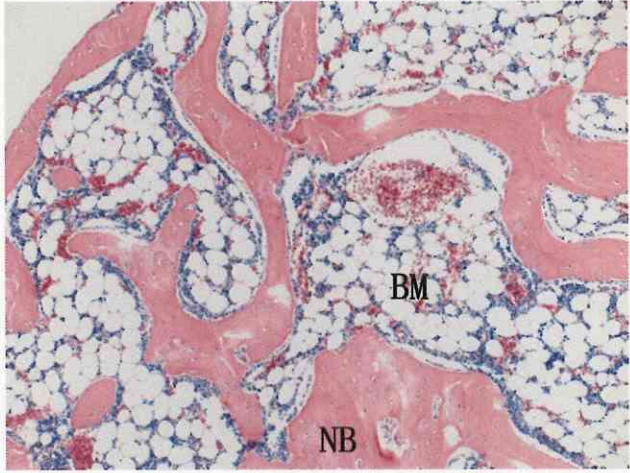
b



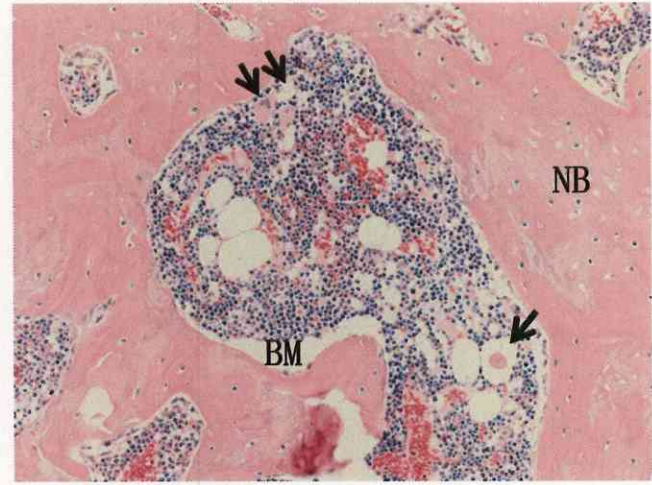
d

图 3

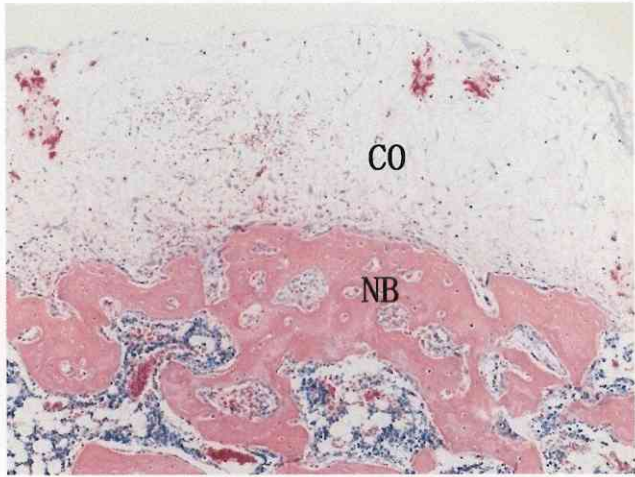




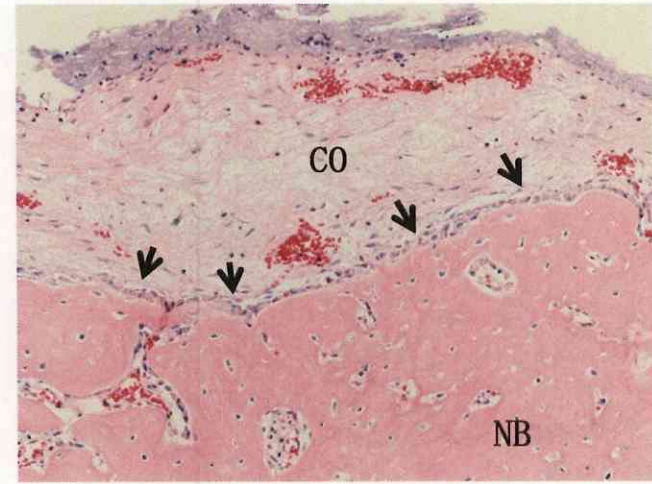
a



c

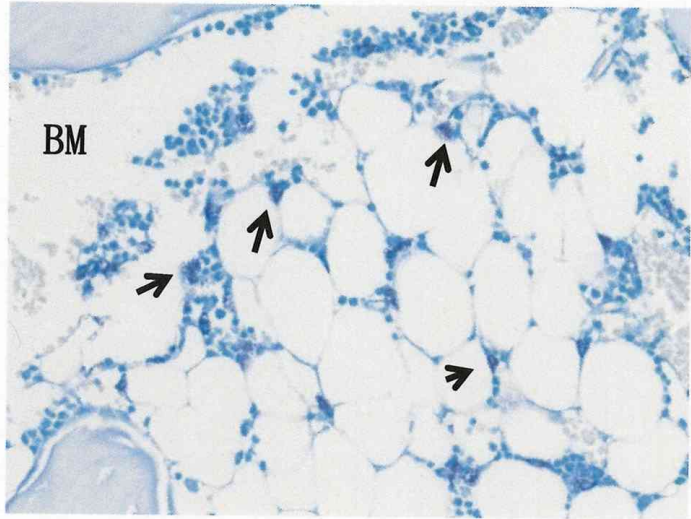


b

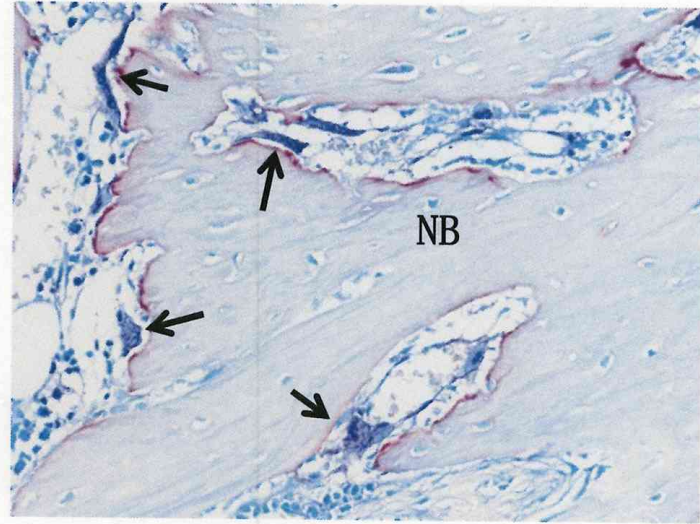


d

图 4



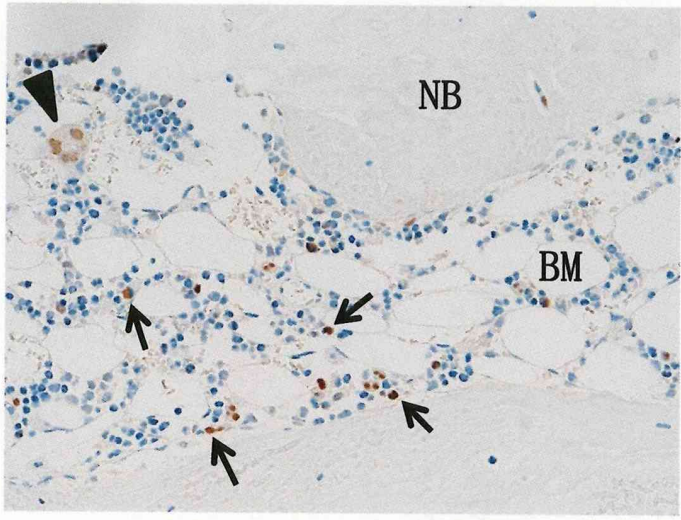
a



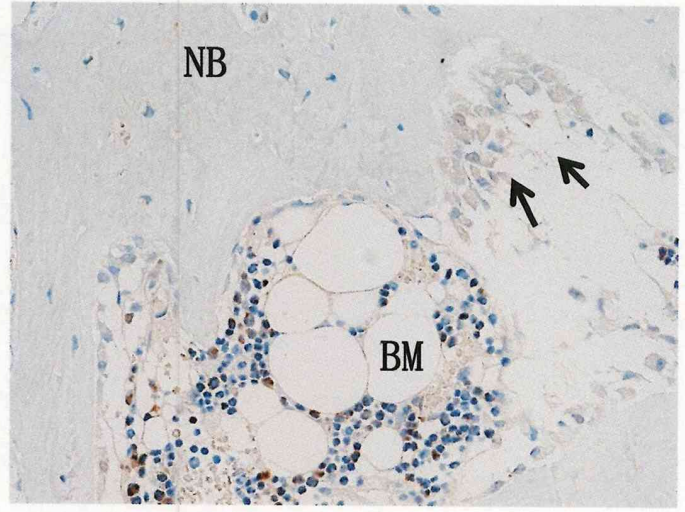
b

图 5

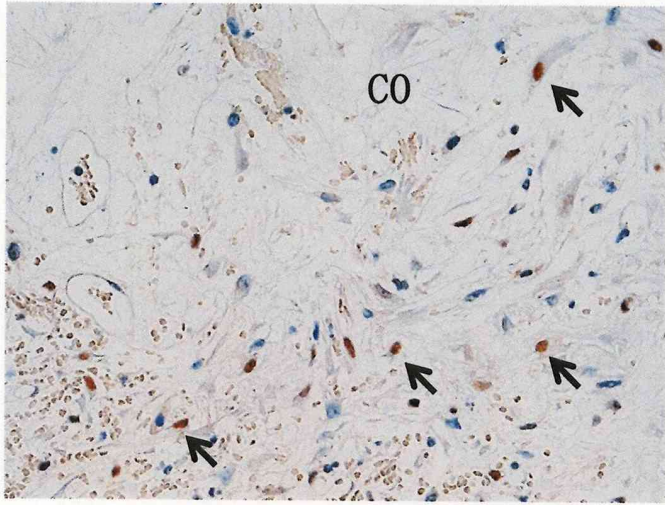




a

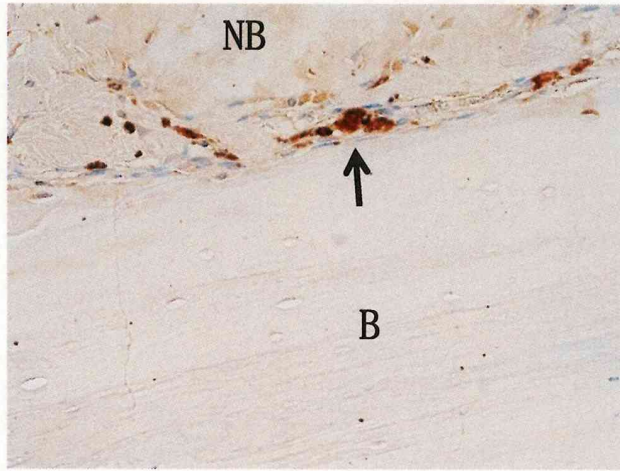


c

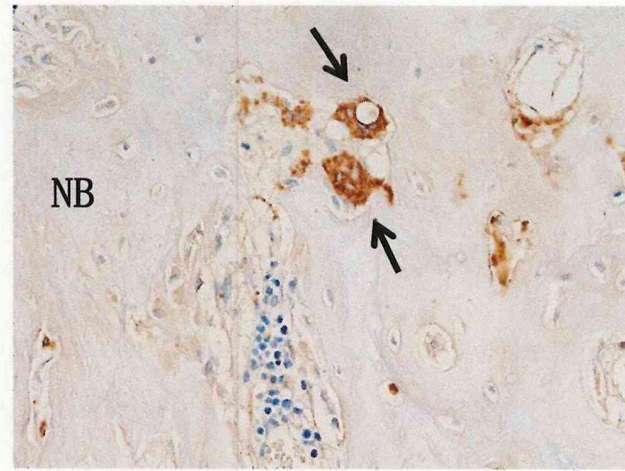


b

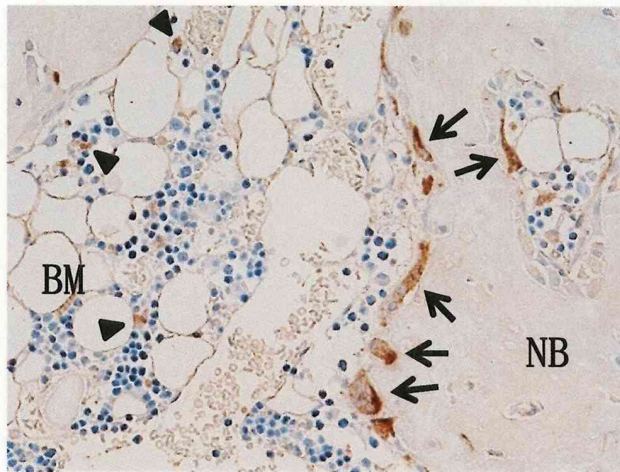
图 6



a



c



b

图 7

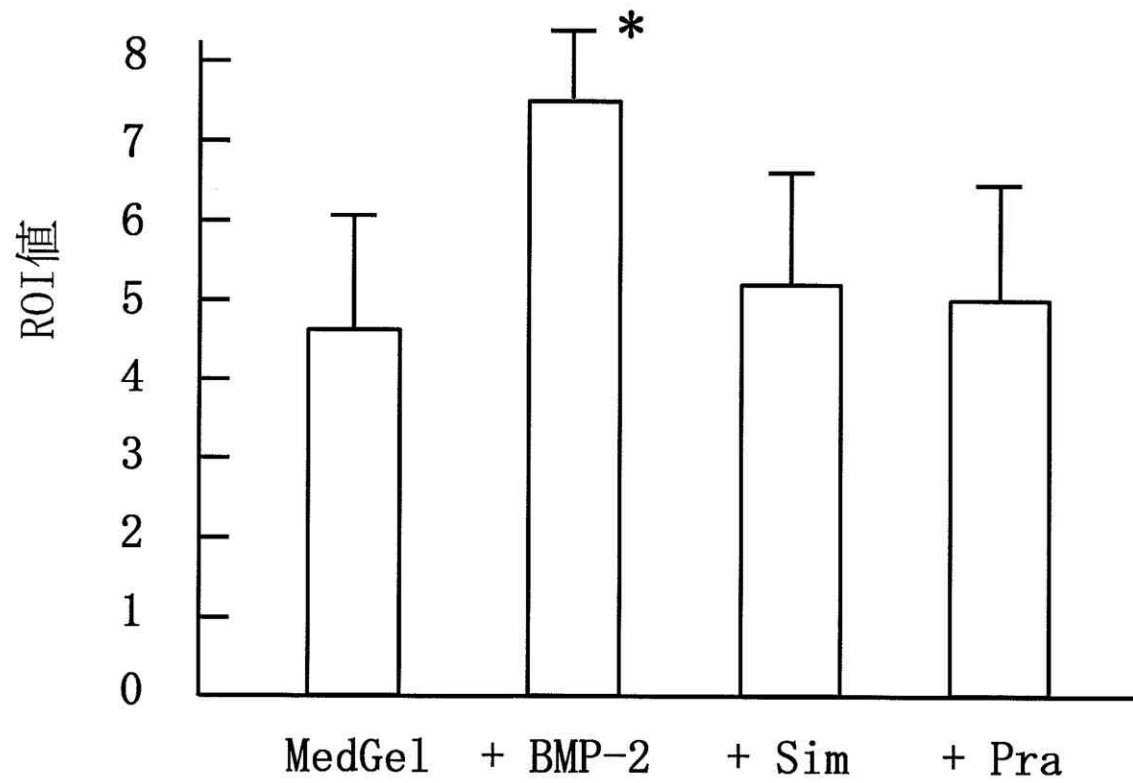


图 8