

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09020

研究課題名(和文) DDS技術を用いた短期間骨折治療技術の開発

研究課題名(英文) Accelerated effect of PEGylated alendronate on fracture healing

研究代表者

松井 誠 (Matsui, Makoto)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：40572376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨折部位への薬物送達技術を確立し短期間での骨折治療の実現を目指すものである。具体的には、骨折部位における出血を利用することで受動的に患部に薬物を送達出来る薬物送達(DDS)キャリアを創製する。骨形成を促進する薬物には、骨粗鬆症治療薬としてすでに臨床応用されているアレンドロネート(ALN)を用いた。ALNとポリエチレングリコール(PEG)とをpH応答性リンカーを介して化学結合させることで、高い血中滞留性を示すALN製剤(PEG-ALN)を作製した。骨折モデルマウスに対してPEG-ALNを投与したところ、連続性を持った新生骨の形成が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨折の治癒期間短縮を目指した薬物送達(DDS)医薬品の開発を目指した。創製したDDS医薬品(PEG-ALN)は、骨折部位に集積し骨折治癒期間の短縮を実現した。高齢者の骨折は、著しい身体機能の低下や長期にわたる療養が原因で歩行困難など要介護状態に直結することが社会問題となっている。本研究結果は、高齢骨折患者のQOL向上に貢献できるものである。

研究成果の概要(英文)：Fracture healing requires a prolonged treatment period, and those patients are tied themselves down to the behavioral restrictions. In response, a push for the development of therapeutic strategies enable to shorten the duration of the therapy is inevitable to improve quality of life (QOL) and social activities in fracture patients. Here, we aimed to develop a drug delivery system (DDS) that enables alendronate (ALN) to efficiently target fracture sites via bleeding. Polyethylene glycol-modified alendronate (PEG-ALN) were synthesized through conjugation reaction by using a pH responsive linker and were systemically administered to fracture model mice to evaluate the biodistribution and therapeutic effects. PEG-ALN exhibited selective accumulation into the fracture site, and displayed an acceleration in significant bone healing. This study highlights the utility of PEG-ALN as systemically injectable medicine, and provides therapeutic novelties to contribute bone fracture patients.

研究分野：生体医工学

キーワード：薬物送達 骨再生 骨折治療

1. 研究開始当初の背景

骨折の治療期間短縮は、患者の QOL を向上させるために重要である。特に、老人の骨折は、著しい身体機能の低下や長期にわたる療養が原因で歩行困難や寝たきりなどの要介護状態に直結することが社会問題となっている。2016 年の「国民生活基本調査(厚生労働省)」によれば、「骨折・転倒」は、要支援者、および要介護者が介護を必要とする状態になった主要な原因の一つとなっている。また、2014 年の「患者調査(厚生労働省)」から骨折総患者数をみると、高齢者の骨折患者が増加していることがわかる。本邦は超高齢者社会に突入しており、骨粗鬆症に関連した骨折の増加が原因であると考えられる。今後、高齢化の進行に伴って骨折患者数がさらに増加することは容易に予想される。そこで、骨粗鬆症患者への早期医療介入による骨折予防が積極的に進められているが、骨折してしまった患者に対する治療促進を目的とした薬物療法の開発は遅れているのが現状である。

現在の骨折治療の第一選択は、ギプスによる外固定、もしくは外科的な骨接合術である。しかし、これらの治療法は治療期間が長期に及ぶため、骨折部の癒合不全などの合併症を引き起こす場合も多い。一方、骨欠損に対しては海綿骨の移植術なども行われているが、骨採取量の限界や採取組織の侵襲といった問題の他に、患者の健康状態や年齢によっては処置できないといった問題も存在する。近年では、大規模な骨欠損に対して足場材料や骨補填材料、さらには人工多能性幹細胞(iPS 細胞)などを用いた再生医療によって骨再生を促進させる研究も盛んに行われている。しかしながら、こういった再生医療は非常に有用ではあるものの、埋入による組織の侵襲や安全面でのリスク、高額な治療費用といった問題が存在している。また、非侵襲的な骨折治療方法として骨折患者への骨形成促進剤の皮下投与が臨床試験されているが、全身性の薬物投与は腎障害や腫瘍形成、大理石病といった副作用の発現が問題となっている。

薬物送達(DDS)技術は医薬品を患部に効率的に送達することを可能とする技術であり、副作用の低減が期待される。そこで、本研究では、骨形成を促進可能な医薬品の DDS 医薬品化を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DDS を活用して骨折部位に骨形成促進剤を送達し、非侵襲的で汎用性の高い短期間骨折治療技術を開発することである。現在行われている骨折治療法は、骨折部位にもよるが骨癒合に約 3~8 週間を要してしまい、長期間にわたって患者の QOL を低下させてしまう。特に、老人が骨折した場合、歩行困難や寝たきりなどの合併症を誘発してしまうことが社会問題にもなっている。近年、骨再生を促進させることを目的とした足場材料や骨形成促進剤の局所徐放材料が世界中で研究開発されているが、治療の侵襲性やコストの問題から単純骨折への応用はなされていない。また、侵襲性を低減させるために骨折部位に直接足場材料や骨形成促進剤を投与する方法も考案されているが、外科用 X 線透過装置を用いるなど煩雑な投与手段が必要なため汎用性のある治療方法とは言い難い。

このような問題点を踏まえ、本申請研究では、骨折部位周辺組織の微小環境を活用した低侵襲な短期間骨折治療技術の確立を目指した。骨折部位では血管の破断や組織傷害が起こっており、周囲の組織に出血している。すなわち、骨折直後に薬物を静脈注射すれば出血に伴って投与された薬物も骨折部位に漏出し、患部に薬物を受動的に集積できる可能性がある。一般的に患部への受動的な薬物集積を達成するためには、薬物が血中に長期間滞留し続けることが重要だと言われている。そこで、投与する薬物を合成高分子であるポリエチレングリコール(PEG)で保護することによって薬物の血中滞留性向上を試みる。また、骨形成を促進する薬物には、骨粗鬆症治療薬としてすでに臨床応用されているアレンドロネート(ALN)を用いる。すなわち、骨折直後に投与された PEG 修飾 ALN(PEG-ALN)が骨折部位に集積し、骨折治癒初期に破骨細胞を減少させることで骨折治癒期間の短縮が期待される。

本研究で開発する DDS 化骨形成促進剤は、骨折部位における出血や炎症といった生体応答を活用して薬剤を送達する低侵襲な骨折治療技術であり、本研究のオリジナルな点である。本研究のコンセプトは、「骨折直後に静脈経路で投薬するだけで骨折治癒を促進できる DDS 化骨形成促進剤の開発」である。このコンセプトが実証されれば、DDS 化骨形成促進剤の投与が骨折治療の第一選択となる可能性が非常に高く、社会的意義は計り知れないものとなる。

3. 研究の方法

(1) DDS 化骨形成促進剤(PEG-ALN)の合成

PEG-NH₂ と ALN とを pH 応答性リンカーを介して結合させた。具体的には、窒素雰囲気下において dichloromethane (DCM) と oxalyl chloride 混合溶液に 2,5-dihydro-4-methyl-2,5-dioxo-3-furanpropanoic acid を溶解させた。ここに DCM に溶解させた PEG-NH₂ と pyridine とを添加し混合した。反応液を ammonium chloride にて酸性化させ、HCl 水溶液(pH3) および超純水に対して透析した。透析後、反応物を凍結乾燥することで PEG-carboxydimethyl maleic anhydride (CDM) 粉末を得た。PEG-CDM を dimethylformamide に溶解後、triethylamine と ALN とを反応させた。

反応溶液を NaOH 水溶液 (pH10)、および超純水に対して透析後、凍結乾燥することで PEG-ALN を得た。得られた PEG-ALN は、³H-NMR、および ³¹P-NMR にて定性分析を行った。

(2) PEG-ALN の pH 応答性評価

CDM は低 pH 環境下において開裂することが知られている。そこで、合成した PEG-ALN を低 pH 条件で加温し、ALN の遊離を評価した。PEG-ALN をクエン酸水溶液 (pH3、および pH4) に溶解後、37 °C で 48 時間加温した。NaOH (pH 10) 水溶液、および超純水に対して透析し、凍結乾燥した後、³¹P-NMR で ALN の残存を評価した。

(3) 破骨細胞に対する PEG-ALN の薬効評価

マウス破骨細胞株 (OSC-14 細胞) を象牙切片上に播種し、異なる濃度の PEG-ALN、あるいは ALN を添加した。3 日間培養後、tertrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色にて生存破骨細胞を染色した。また、破骨細胞を培養した象牙切片は、Von Kossa 染色を行うことで破骨細胞による骨吸収状況を観察した。

(4) 骨芽細胞に対する PEG-ALN の薬効評価

PEG-ALN による骨分化誘導効果を評価するために、マウス間葉系幹細胞株 (KUSA-A1 細胞) を異なる濃度の ALN、あるいは PEG-ALN を添加した骨分化誘導培地中で培養した。3 日に 1 回培養液 (ALN、あるいは PEG-ALN 含有骨分化培地) を交換し、KUSA-A1 細胞を 12 日間培養した。培養後、Alizarin Red S 染色を行うことで PEG-ALN の骨分化誘導効果を評価した。さらに、PEG-ALN による石灰化誘導効果を評価するために、培養皿に沈着したカルシウム量を定量評価した。具体的には、異なる濃度の ALN、あるいは PEG-ALN で KUSA-A1 細胞を刺激後、培養剤等に沈着したカルシウムを 0.5 N 塩酸水溶液で溶解し、含有カルシウム量をメチルキシレノブルー法で定量評価した。

(5) 骨折モデルマウス

すべての動物実験は、東京工業大学動物実験委員会の定めたガイドラインに則って実施した。本研究では C57BL/6J マウス (メス、8 週齢) を用い、外傷性 3 点曲法で閉塞型脛骨骨折モデルを作製後、ギプスによる外固定を施して各種検討に使用した。

(6) PEG-ALN の薬物動態試験

骨折モデルマウスを用いて PEG-ALN の薬物動態試験を実施した。具体的には、Cy5 標識 PEG-ALN、あるいは Cy5-PEG (共に 5 mg/mL, 100 μL) を骨折モデルマウスの尾静脈から投与した。経時的にマウスを安楽死させ、各種臓器と血液に含まれる Cy5 を検出した。さらに、Cy5 標識 PEG-ALN 投与 3 時間後に骨折肢を採取し、組織切片を観察した。

(7) PEG-ALN 投与量評価

骨折治療に適した PEG-ALN の投与量を決定するために、異なる濃度の PEG-ALN を骨折モデルマウスに投与し、骨折部位における骨芽細胞数をカウントした。具体的には、 $2.3 \times 10^{-4} \sim 2.3 \text{ mol}$ の濃度範囲で PEG-ALN を投与し、1、2、3、および 4 週間後に骨折部位周囲の組織を回収した。回収した組織をコラゲナーゼとディスパーゼの混合水溶液中で加温し、細胞を分散させた。回収した細胞と抗 Runx2 抗体とを反応させ、フローサイトメーターにて抗 Runx2 抗体陽性の骨芽細胞数をカウントした。

(8) PEG-ALN の単回投与毒性評価

PEG-ALN の毒性を評価するため、単回投与後に血液生化学検査を実施した。具体的には、C57BL/6J マウスの尾静脈より PEG-ALN ($3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$)、あるいは ALN ($2.73 \times 10^{-5} \text{ M}$) を投与し、24 時間後に下大静脈よりヘパリン採血した。血清を分離後、各種血液生化学パラメーター (AST、ALT、ALP、CPK、BUN、CRE、TP、および TBIL) を Fiji Dry-Chem 4000 システムを用いて評価した。

(9) PEG-ALN による骨折治療実験

骨折治療実験では骨折直後に各薬剤を投与し、4 週間にわたり骨再生効果を評価した。具体的には、骨折モデルマウスに対し、PEG-ALN ($3.04 \times 10^{-6} \text{ mmol/マウス}$)、ALN ($2.73 \times 10^{-6} \text{ mmol/マウス}$)、あるいは PEG ($3.04 \times 10^{-6} \text{ mmol/マウス}$) を投与した。また、薬剤未投与群を比較対象とした。治療効果は、μCT による画像解析、骨密度評価、ならびに組織学解析にて評価した。

4. 研究成果

(1) PEG-ALN の合成と物性評価

PEG への pH 応答性リンカー (CDM) の導入は ¹H-NMR で評価した (¹H-NMR peaks: δ (ppm) = 3.63 (m, ca. 4000H, -CO-NH-CH₂-CH₂-CH₂-O-(CH₂-CH₂-O)₉₀₈-CH₃), 3.37 (s, 2H, -O-CH₃), 2.88 (t, 2H, -CO-CH₂-CH₂-C₅H₃O₃), 2.77 (t, 2H, -CO-CH₂-CH₂-C₅H₃O₃), 2.13 (d, 2H, -CH₃) (図 1a)) さらに、PEG-CDM への ALN の導入は ³¹P-NMR で評価した (³¹P-NMR peaks: δ (ppm) = 19) (図 1b)) ³¹P-NMR

の結果から、PEG-CDM への ALN 導入率は 90% であることがわかった。

次に、低 pH 環境下における PEG-ALN からの ALN の遊離を評価した。図 1c は、異なる pH 条件下で加温した PEG-ALN の ^{31}P -NMR スペクトルを示す。pH3、および pH4 環境で 48 時間加温した PEG-ALN では、19 ppm のピークの消失が観察された。すなわち、ALN は低 pH 環境で PEG-ALN から遊離されることを示している。

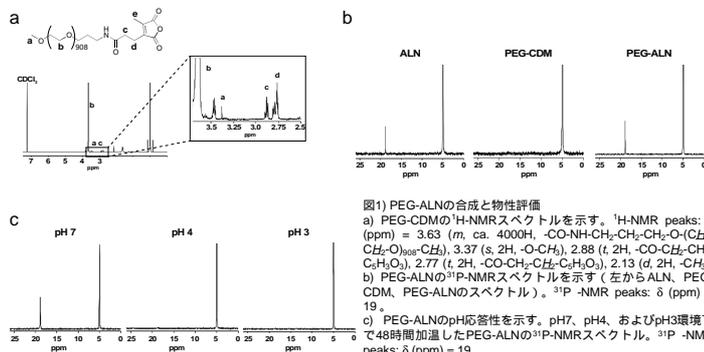


図1) PEG-ALNの合成と物性評価
 a) PEG-CDMの ^1H -NMRスペクトルを示す。 ^1H -NMR peaks: δ (ppm) = 3.63 (m, ca. 4000H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_4-\text{O})_{100}-\text{C}_2\text{H}_5$), 3.37 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2$), 2.88 (t, 2H, $-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_5$), 2.77 (t, 2H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_5$), 2.13 (d, 2H, $-\text{C}-\text{H}$)
 b) PEG-ALNの ^{31}P -NMRスペクトルを示す(左からALN, PEG-CDM, PEG-ALNのスペクトル)。 ^{31}P -NMR peaks: δ (ppm) = 19
 c) PEG-ALNのpH応答性を示す。pH7, pH4, およびpH3環境下で48時間加温したPEG-ALNの ^{31}P -NMRスペクトル。 ^{31}P -NMR peaks: δ (ppm) = 19。

(2) *in vitro* における PEG-ALN の 活性評価

PEG-ALN の骨吸収抑制効果は、破骨細胞株(OSC-14 細胞)を用いて評価した。象牙切片上に播種した OSC-14 細胞を異なる濃度の PEG-ALN、あるいは ALN で刺激後、TRAP 染色で生存破骨細胞を検出した。その結果、薬剤未刺激群では TRAP 陽性の破骨細胞が観察されたものの、PEG-ALN 刺激群と ALN 刺激群とでは、すべての濃度で TRAP 陽性細胞は観察されなかった(図 2a)。

次に、PEG-ALN 刺激による骨吸収抑制を調べるために、破骨細胞を培養した象牙切片を Von Kossa 染色によって観察した。破骨細胞の観察結果と同様に、PEG-ALN 刺激群と ALN 刺激群とではすべての濃度範囲で骨吸収窩を認めなかった(図 2b)。これらの結果より、PEG-ALN は ALN と同等の骨吸収抑制能を持つことが示された。

一方、高濃度の ALN は、破骨細胞のみでなく骨芽細胞もアポトーシス誘導してしまう事が知られている。本研究では、骨折治癒初期に破骨細胞を減少させることで骨折治癒期間の短縮を目指している。すなわち、骨折部位における骨芽細胞には作用しない濃度で PEG-ALN を投与する事が重要となる。そこで、*in vitro* において PEG-ALN の骨芽細胞に対する作用濃度を検討した。KUSA-A1 細胞から分化誘導した骨芽細胞に対して 10^{-9}M ~ 10^{-5}M の濃度範囲で PEG-ALN、あるいは ALN を添加し、それぞれの濃度におけるカルシウム沈着量を定量評価した(図 2c、d)。図 2c は、alizarin red S 染色による石灰化部位の染色像を示す。 10^{-9}M と 10^{-8}M PEG-ALN を添加した群では、ALN 未添加群と同等の石灰化が観察された。一方、 10^{-7}M 以上の濃度の PEG-ALN 添加群では濃度依存的に石灰化が減少し、 10^{-5}M PEG-ALN 添加群では石灰化が認められなかった。図 2d は、沈着したカルシウム量の定量結果を示す。Alizarin red S 染色の結果と同様に、 10^{-9}M と 10^{-8}M PEG-ALN 添加群では未添加群と同量のカルシウム沈着量だったものの、 10^{-5}M PEG-ALN 添加群では 10^{-9}M と 10^{-8}M PEG-ALN 添加群と未処理群と比較して優位にカルシウム沈着量の減少を認めた。これらの結果より、骨芽細胞に対して影響を与えず破骨細胞のみに作用する PEG-ALN の濃度範囲は 10^{-9}M ~ 10^{-8}M であることが示された。

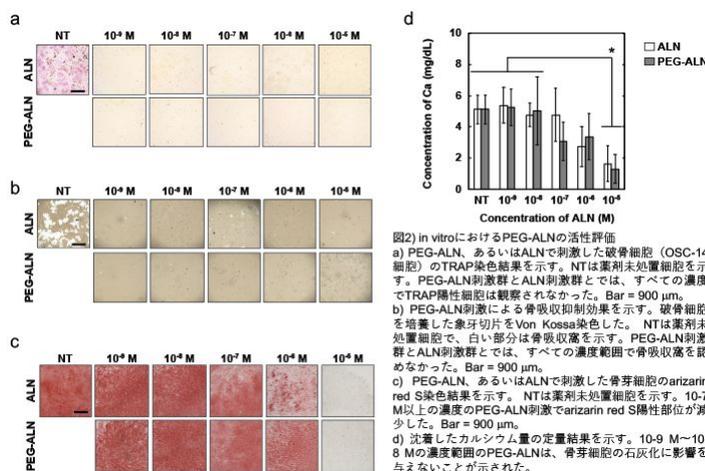


図2) *in vitro* における PEG-ALN の活性評価
 a) PEG-ALN、あるいはALNで刺激した破骨細胞(OSC-14細胞)のTRAP染色結果を示す。NTは薬剤未処理細胞を示す。PEG-ALN刺激群とALN刺激群とでは、すべての濃度でTRAP陽性細胞は観察されなかった。Bar = 900 μm 。
 b) PEG-ALN刺激による骨吸収抑制効果を示す。破骨細胞を培養した象牙切片をVon Kossa染色した。NTは薬剤未処理細胞で、白い部分は骨吸収窩を示す。PEG-ALN刺激群とALN刺激群とでは、すべての濃度範囲で骨吸収窩を認めなかった。Bar = 900 μm 。
 c) PEG-ALN、あるいはALNで刺激した骨芽細胞のalizarin red S染色結果を示す。NTは薬剤未処理細胞を示す。 10^{-7}M 以上の濃度のPEG-ALN刺激でalizarin red S陽性部位が減少した。Bar = 900 μm 。
 d) 沈着したカルシウム量の定量結果を示す。 10^{-9}M ~ 10^{-8}M の濃度範囲のPEG-ALNは、骨芽細胞の石灰化に影響を与えないことが示された。

(3) PEG-ALN の薬物動態と単回投与毒性

図 3 は、PEG-ALN の薬物動態の結果を示す。脛骨骨折モデルマウスの尾静脈より Cy5 標識 PEG-ALN を投与したところ、投与 1 時間後における Cy5 標識 PEG-ALN の集積量は骨折肢に 10.4% ID/g tissue、非骨折肢に 2.4% ID/g tissue であることがわかった(図 3a)。骨折肢への集積量は非骨折肢より 5 倍多く、この傾向は投与 48 時間後においても同様だった。次に、Cy5 標識 PEG-ALN と Cy5 標識 PEG とを用いて血中滞留性、および様々な組織への集積を評価した。血中滞留性は、Cy5 標識 PEG-ALN と Cy5 標識 PEG とでほぼ同様の挙動を示すことがわかった(図 3b)。一方、骨折部位への集積性を比較すると、Cy5 標識 PEG-ALN は時間経過とともに増加する傾向にあるのに対し、Cy5 標識 PEG は速やかに消失した(図 3c)。また、心臓、肺、腎臓、肝臓、

および脾臓への集積量は、それぞれ 4.5、5.1、9.9、4.1、および 4.6%ID/g tissue と非常に少なかった(図 3d)。これらの結果より、PEG-ALN は骨折部位に選択的に集積する性質を持つことが示された。

表 1 は、PEG-ALN 単回投与後の血液生化学パラメーターを示す。AST、ALT、ALP、CPK、BUN、CRE、TP、および TBIL 値を計測したところ、すべての値は未投与群と変化しないことがわかった。すなわち、PEG-ALN は急性毒性を持たないことを示している。

表1) PEG-ALN単回投与後の血液生化学パラメーター

	NT	PEG	PEG-ALN	ALN
AST (IU/L)	68 ± 46.8	51 ± 2.3	37 ± 2.8	43 ± 8.7
ALT (IU/L)	13 ± 2.5	23 ± 8.9	11 ± 2.6	12 ± 0.6
CPK (IU/L)	53 ± 15	46 ± 8.1	31 ± 6.7	39 ± 4.5
ALP (IU/L)	362 ± 66	544 ± 356	410 ± 37.8	333 ± 68.6
BUN (mg/dL)	32 ± 3.1	34 ± 1.4	39 ± 0.4	39 ± 1.4
CRE (mg/dL)	0.1 ± 1.7 × 10 ⁻¹⁷	0.1 ± 1.7 × 10 ⁻¹⁷	0.2 ± 5.8 × 10 ⁻²	0.2 ± 3.4 × 10 ⁻¹⁷
TP (g/dL)	4.2 ± 0.17	4.4 ± 0.15	4.2 ± 0.21	4.1 ± 0.06
TBIL (mg/dL)	0.3 ± 0.15	0.3 ± 0.06	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.06

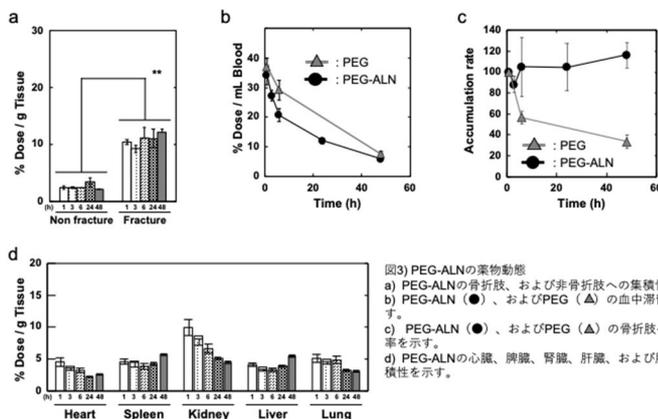


図3) PEG-ALNの薬物動態
a) PEG-ALNの骨折部、および非骨折部への集積性を示す。
b) PEG-ALN (●)、およびPEG (△)の血中滞留性を示す。
c) PEG-ALN (●)、およびPEG (△)の骨折部への集積率を示す。
d) PEG-ALNの心臓、脾臓、腎臓、肝臓、および肺への集積性を示す。

(4) 骨折治癒に最適な PEG-ALN 投与量の決定

異なる濃度の PEG-ALN を骨折モデルマウスに投与し、1、2、3、および 4 週間後に骨折部位における Runx2 発現細胞数を測定した。Runx2 は骨芽細胞の分化に重要な転写因子であり、骨芽細胞のマーカータンパク質として使用されている。Runx2 発現細胞は、 1.5×10^{-5} M と 3.0×10^{-5} M の PEG-ALN 投与群において未投与群と比較して優位に増加していた(図 4a)。また、この細胞数増加は、投与後 1 週間、および 2 週間でのみ観察された(図 4b)。一方、低濃度 PEG-ALN 投与群 (3.0×10^{-7} M、 6.1×10^{-7} M、および 3.0×10^{-6} M) と高濃度 PEG-ALN 投与群 (3.0×10^{-3} M) とでは Runx2 発現細胞の増加は見られなかった。特に、高濃度 PEG-ALN 投与群では、未投与マウスと比較して Runx2 発現細胞数の有意な減少を認めた。

骨折部位の出血量は、ヒト成人におけるクラス I グレードの脛骨骨折でおよそ 10.5 mL/kg とされている。すなわち、本実験で使用したマウス (C57BL/6; 25 g) で換算すると、骨折部位ではおよそ 270 μ L の出血量となる。一方、体内動態試験の結果より、骨折部位には 10.4%ID/g tissue の PEG-ALN の集積が見られた。薬物動態と投与量検討の結果から、 3.0×10^{-5} M の PEG-ALN を投与した際、骨折部位にはおよそ $10^{-8} \sim 10^{-7}$ M の PEG-ALN が骨折部位に集積していると推測される。この濃度は、*in vitro* における骨芽細胞に対して影響を与えず破骨細胞のみに作用する PEG-ALN の濃度範囲と相関性があると考えられる。以上の結果より、骨折治療実験に使用する PEG-ALN の投与量は 3.0×10^{-5} M とした。

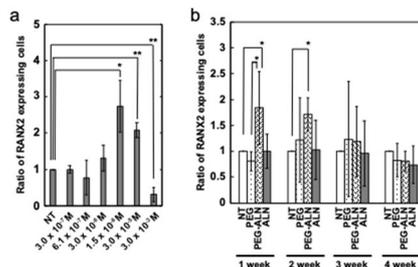


図4) PEG-ALN投与量の最適化
a) 異なる濃度のPEG-ALNを骨折モデルマウスに対して投与し、1週間後の骨折部位におけるRANX2発現細胞数を定量評価した。
b) 骨折モデルマウスに対してPEG-ALN、PEG、ALNを投与し、RANX2発現細胞数の経時的変化を観察した。

(5) PEG-ALN による骨折治癒効果の評価

PEG-ALN による骨折治癒効果は、 μ CT 画像解析、ならびに組織学的解析にて評価した。図 5a、および b は、骨折モデル作製 4 週間後の μ CT 画像と骨密度測定結果を示す。PEG-ALN 投与群において最も仮骨形成が進んでおり、骨密度も高くなっていることがわかる。また、骨折部位の組織切片画像 (HE 染色、および MT 染色) を図 5c に示す。PEG-ALN 投与群では、骨折 4 週間後の時点で形成された仮骨により骨折端の癒合が観察された。一方、未投与群、PEG 投与群、および ALN 投与群では骨折端の癒合はしておらず、骨折部位に線維芽細胞用の結合組織を認めた。以上の結果より、PEG-ALN は骨折部位に集積することで骨形成を誘導し、骨折治癒期間を短縮できる可能性が示された。

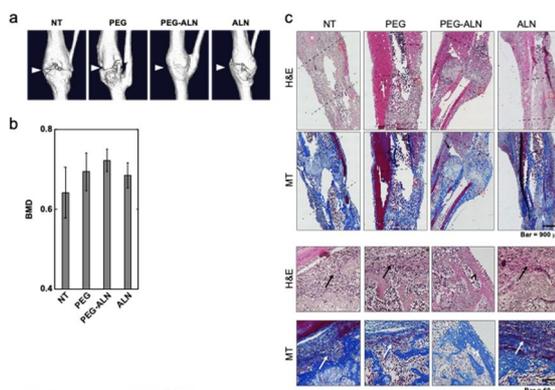


図5) PEG-ALNによる骨折治療効果
a) 骨折モデルマウス作製4週間後の μ CT画像を示す。
b) μ CT画像から算出した骨折部位の骨密度測定結果を示す。
c) 骨折部位の組織切片画像 (HE染色、およびMT染色) を示す。弱拡大像 (上段、4倍対物レンズ、Bar = 900 μ m) の四角で囲んだ部位を強拡大像 (下段、20倍対物レンズ、Bar = 60 μ m) に示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松井 誠
2. 発表標題 薬物送達技術を応用した新規骨折治療法の開発
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Kaihara, Makoto Matsui, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda and Nobuhiro Nishiyama
2. 発表標題 Development of novel drug delivery system for enhancing bone regeneration in bone fracture model mouse.
3. 学会等名 The 12th SPSJ International Polymer Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------