

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09631

研究課題名(和文) 骨変形治療の低侵襲化を目的とした徐放性骨軟化ゲルの開発

研究課題名(英文) Development of slow degradable implantable bone decalcifying gel for decreasing invasiveness of orthopaedic correction surgery.

研究代表者

寺井 秀富 (Terai, Hidetomi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20382046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は生体内で局所的に骨軟化をきたすゲルを開発し、骨変形に対する新しい治療法手段を開発することである。

生体内吸収性骨セメント(リン酸カルシウム骨ペースト)に徐放性DDSとして生体吸収性ポリマーを用い、骨軟化を目的としたリンゴ酸を含有させた混合物を作製し、ゲル化による非崩壊性の付加を目的としたキトサンを主成分とした硬化液との至適な混合比を検証する実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は生体内で局所的に骨軟化をきたすゲルを開発し、骨変形に対する新しい治療法手段を開発することである。局所でコントロールできる生体内脱灰の技術(骨軟化技術)が確立されれば、骨を切らずに骨形態をコントロールできるようになり、椎体骨折後や外傷後の長管骨の変形矯正だけでなく、体内のすべての骨組織に応用できる可能性がある。本研究ではリン酸4カルシウム(TTCP)と第二リン酸カルシウム二水和物(DCPD)を混合した吸収性骨セメント(リン酸カルシウム骨ペースト、CPC)に徐放性DDSとしてPLA-Dx-PEGポリマーを用い、骨軟化を目的としたリンゴ酸を含有させた混合物を作製した。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study was to develop the novel implantable gel that can induce local-or limited decalcification of bone, with which we could develop newly therapeutic methods for orthopaedic correction surgeries. We selected tricalcium phosphate as biodegradable cement mixed with PLA-Dx-PEG co-polymers as drug delivery system containing malic acid as decalcifying agents. To control degradation, chitosan was added to the constructs and its best concentration was studied. We concluded that 2.5 wt% of chitosan and 1% of polymer were the best concentrations from the view of preventing rapid-degradation.

研究分野：整形外科

キーワード：生体内脱灰 骨軟化 変形 生体内分解

## 1. 研究開始当初の背景

骨の成分は約 70%が無機質のハイドロキシアパタイトで構成されており、残りの 22%がI型コラーゲン、プロテオグリカンなどの有機質、8%が水分である。骨を硬組織たらしめているのは、その大部分を占めているハイドロキシアパタイトであり、弱アルカリ性環境下で酸に溶解（カルシウム塩の溶出）する性質を持つ。硬組織標本を作製する脱灰の過程で使用される硝酸やギ酸はこの原理を応用したものであり、脱灰された標本は有機成分が保たれたまま軟化し、容易に変形加工できるようになる。この脱灰操作を生体内で行う技術と再石灰化をコントロールする技術が確立されれば、変形部分を切除することなく注射などの簡便な処置と創外固定やギプスなどの非侵襲的な方法で変形矯正を行えるようになると考えられる。

骨の形成は骨芽細胞が、骨の吸収は破骨細胞が担っていることは周知の事実である。現在までに骨の形成過程または吸収過程における組織学的ダイナミズムは分子生物学的知見も含めて膨大なデータが蓄積されている。しかし、現在までに生体内脱灰を試みた研究は国内外で渉猟できない。体外で脱灰した骨組織から骨形成蛋白（Bone morphogenetic protein: BMP）を抽出し、脱灰骨組織に再度添加することによって生体内で骨組織の再生を誘導した Marshall R. Urist の実験（1965）は BMP の骨誘導能だけでなく、脱灰骨片が生体内で骨形成の Scaffold として働くことをすでに証明している。脱灰骨片は骨と同等の有機成分を含有するために、骨芽細胞が誘導されれば容易に骨形成をきたす。本研究課題で問題となるのはどのようにして生体内で脱灰を行うかという点に集約される。脱灰には有機酸を作用させることになるが、生体内で有機酸を作用させ、かつ安全に脱灰を行うためには（1）有機酸が働くための最適な生体内での pH コントロール（2）急激なカルシウムイオン濃度上昇を防ぐための徐放作用性の担保が必要となる。そこで我々は生体内で加水分解し、その分解速度の調整が可能である生体内吸収性ポリマーに有機酸を含有させて徐放させることにより、これらの問題を克服したいと考えている。

## 2. 研究の目的

現在までに骨形成、骨吸収を扱った研究は我々が行ってきたものも含め多数存在し、臨床応用されている研究成果も多い。しかし、本研究のように生体内脱灰をテーマにし、骨の変形矯正を行おうとした研究は今までにない。生体内脱灰の技術が確立されれば、骨を切らずに形態をコントロールできるようになり、冒頭に述べた椎体骨折後や外傷後の長管骨の変形矯正だけでなく、体内のすべての骨組織に応用できる可能性がある。本技術に加えて新しいインプラントを開発することによって、側彎症や低身長などの疾患、腰部脊柱管狭窄症などの加齢性変性疾患、形成外科領域の疾患など骨を扱う外科的治療全般において革新的な治療方法を提供できる可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1)有機酸含有ポリマーの徐放性、pH 変化に関する In vitro での基礎データ収集

PLA-Dx-PEG ポリマーもしくは PLA-PEG/TCP 複合体に有機酸（リンゴ酸、ギ酸）を溶解し、  
37     PBS 溶液中にてその溶解度と経時的 pH 変化を調査する。ポリマー単独またはポリマー/TCP 複合体の PBS 溶液中の溶解度は現在までの実験データとして蓄積されているので、それ

に有機酸を含有させた場合、pH が変化し、加水分解過程に影響を及ぼすと考えられるので溶解度の変化、pH 変化を再度比較・検討する必要がある。この段階では有機酸の骨脱灰作用は問題としない。

ラット大腿骨摘出標本に で使用したポリマー/TCP/有機酸複合体を注入し、同条件下に骨脱灰度、経時的 pH 変化の調査を行う。(n=50~)ここで、有機酸の最低有効濃度を算出し、In vivo 実験における開始濃度と定める。

#### (2) In vivo 生体内脱灰の作用と安全性についての検証

摘出ラット大腿骨内にポリマー/TCP/有機酸複合体を充填し、経時的に組織作製、力学的試験を行い、生体内脱灰効果について検証する。また、安全性に重要と考えられる血中カルシウムイオン濃度を経時的にモニターし、脱灰効果とカルシウムイオン濃度の関係を明らかにしていく。その中で、有効な有機酸の濃度と安全域を検証していく。

(3) 生体内脱灰の作用と安全性について：ラット大腿骨内に有機酸含有ポリマーを充填し、経時的に組織作製、力学的試験を行い、生体内脱灰効果について検証する。また、安全性に重要と考えられる血中カルシウムイオン濃度を経時的にモニターし、脱灰効果とカルシウムイオン濃度の関係を明らかにしていく。その中で、有効な有機酸の濃度と安全域を検証していく。 摘出ラット大腿骨内にポリマー/TCP/有機酸複合体を充填し、経時的に組織作製、力学的試験を行い、生体内脱灰効果について検証する。また、安全性に重要と考えられる血中カルシウムイオン濃度を経時的にモニターし、脱灰効果とカルシウムイオン濃度の関係を明らかにしていく。その中で、有効な有機酸の濃度と安全域を検証していく。

ラット大腿骨の骨髄を除去し、その後に直接ポリマー/TCP/有機酸複合体を充填し、経時的に生体内脱灰効果について検証し、脱灰効果の持続時間とピークを算出する。

## 4 . 研究成果

最適なポリマーの配合比、セメント材料の配合比、硬化液の配合比を決定するために研究に注力し、最適な Powder/Liquid 比が 3:1 であることが確認できた。また硬化液中のキトサン濃度が増加すると圧縮強度・非崩壊性が向上すること、ポリマー濃度が増加すると圧縮強度低下・崩壊率上昇・流動性低下をきたすことがあきらかとなった。また、リンゴ酸が増加すると硬化時間が短縮し pH が低下するが、強度には影響を及ぼさないことも分かった。以上から硬化液のキトサン濃度 2.5wt%、ポリマー濃度 1%が強度・非崩壊性の観点から適切な含有量であると考えられた。今回の研究期間では In vivo の実験に至っておらず、今後も続けて研究継続を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	玉井 孝司  (Tamai Koji)  (30711824)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師    (24402)	

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