

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591903

研究課題名（和文）生体吸収材料および自家多血小板血漿を用いた骨芽細胞誘導による
固定術の開発研究課題名（英文）Positive Effect on Bone Fusion by the Combination of Platelet-Rich Plasma and
a Gelatin β -Tricalcium Phosphate Sponge: A Study Using a Posterolateral
Fusion Model of Lumbar Vertebrae in Rats

研究代表者

長谷 齊 (HASE HITOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00172883

研究成果の概要（和文）：

本研究では PRP とゼラチン β -TCP スポンジを組み合わせた骨癒合法の有効性を検討した。本骨癒合法は術後 10 週で自家骨移植術と同等の骨癒合促進効果を認めた。また、本法は臨床で使用されているマテリアルのみを材料としているため安全性が高いという利点がある。これらの結果から、本法は有効性および安全性に優れた術式であり、骨癒合法の選択肢のひとつとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The positive effect on bone fusion using the combination of PRP and the gelatin β -TCP sponge is equivalent to that of autogenous bone grafting. This method might be less invasive than autogenous bone grafting in terms of being able to induce bone fusion by autologous blood without impairing of healthy donor site. This method also has the advantage of being very safe to perform, because all these materials have already been extensively used clinically. The current study demonstrates that the bone fusion method using the combination of PRP and the gelatin β -TCP sponge could be an alternative to autogenous bone grafting in terms of its effectiveness, lower invasiveness, and safety.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科

キーワード：多血小板血漿、ゼラチン β -TCP スポンジ、脊椎固定術

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎固定術は病的な不安定性を伴う脊椎に対して従来から行われている優れた方法である。脊椎固定術では椎骨間の骨癒合を得るために自家骨移植が行われてきた。しかし、採骨部位の合併症が約 3 割に生じること、自家骨量が不足するという問題があった。

(2) 多血小板血漿（以下、PRP）は、末梢血を遠心分離して赤血球を除くことにより得られる濃厚血小板血漿である。血小板内には TGF- β 1 または PDGF などの骨再生を促進させる成長因子が複数含有されている。しかし骨形成促進効果の有無については意見の一致をみていないのが現状である。

(3) ゼラチン β -tricalcium phosphate (β -TCP) スポンジ (gelatin β -TCP sponge) は、ゼラチンと β -TCP を混合し多孔体に加工した生体吸収性のスキャフォードである。ゼラチンを化学架橋したゼラチンハイドロゲルは成長因子やプラスミド DNA などの徐放効果を持ちドラッグデリバリーシステムとして臨床で使用されている。 β -TCP はリン酸カルシウム的一种であり多孔体に加工した β -TCP は骨伝導能を持つ生体吸収性のバイオマテリアルとして臨床で使用されている。この 2 つの材料を混合したゼラチン β -TCP スポンジは材料の特性に由来して成長因子の徐放作用、骨芽細胞の侵入のための足場機能を

持つことが報告されている。

2. 研究の目的

PRP とゼラチン β -TCP スポンジとを組み合わせることにより安全性の高い骨癒合法となるのではないかと着想した。本研究の目的は、PRP とゼラチン β -TCP スポンジを用いた骨癒合法の効果を、ラットの腰椎後側法固定モデルを用いて検証することである。

3. 研究の方法

(1) Preparation of gelatin β -TCP sponges
酸処理ゼラチンを蒸留水に溶解して 3 重量%のゼラチン水溶液を調製した。これに β -TCP100 を配合し 0.16 重量%グルタルアルデヒド水溶液を加えてホモジナイザーで 5000rpm、3 分間攪拌することで発泡させた。発泡したゼラチン β -TCP 水溶液を 12cm \times 12cm の型枠に流延し 4 $^{\circ}$ C、12 時間静置し架橋反応を行った。これを -40 $^{\circ}$ C で凍結した後凍結乾燥を行いスポンジ状にした。このスポンジを 0.1N グリシン水溶液を用いて 1 時間洗浄を 3 回行った後、水洗し再度凍結乾燥してゼラチン β -TCP スポンジに加工した。

(2) Preparation of gelatin hydrogel microspheres

等電点 5.0 の 10w%ゼラチン溶液を 25w% glutaraldehyde (GA) 溶液で化学架橋し径 10 \sim 20 μ m のゼラチンハイドロゲル粒子を作製した。

(3) Preparation of gelatin β -TCP sponges incorporating PRP

Sprague-Dawley rats (雄性、8 週齢、240 \sim 290g) にペントバルビタール (40mg/kg BW) を腹腔内注射し全身麻酔を行った。1 匹あたり 5cc の採血を行い、ACD-A 液を 2cc 入れておいた 15 cc 遠心チューブに血液を移した。遠心チューブを遠心分離機を用いて 1500rpm で 10 分間遠心分離した。上層にある透明な血清部分を 14G サーフロー針を用いて吸引し別の遠心チューブに移した。3000rpm で 10 分間遠心分離した。上層の血清部分を 14G サーフロー針を用いて吸引し、platelet poor plasma (PPP) を得た。底に沈殿した血小板および血清 200 μ L をピペッティングし PRP を得た。PRP、血液中、PPP の血小板数を計測した。200 μ L の PRP を、4 \times 8 \times 16mm に裁断したゼラチン β -TCP スポンジに含浸させ 4 $^{\circ}$ C で一晩放置した。対照として、200 μ L の PPP を同じサイズのゼラチン β -TCP スポンジに含浸させ 4 $^{\circ}$ C で一晩放置した。

(4) Concentrations of growth factors in the PRP by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

免疫酵素抗体法 (ELISA法) を用いて PRP に含まれる主な成長因子である TGF- β 1 (n=8) と PDGF-BB (n=8) の濃度を、PRP、血液、PPP において測定した。

実験1 PRP含浸ゼラチン β -TCP スポンジの骨癒合促進効果の検討

Surgical Technique for Constructing L4-L5 Posterolateral Lumbar Fusion Model and Study Groups

SD rats に対してペントバルビタールの腹腔内注射により全身麻酔を行った。The posterolateral lumbar fusion in rats has been well established as an acceptable model of measuring bone growth. ラットの背部を剃毛し、背部正中の皮膚に 40mm の縦切開を加えた。正中から左右 5mm の位置で、傍脊柱筋に 25mm の縦切開を加え、第 4 および 5 腰椎の横突起 (以下、L4, 5 横突起) を両側露出させた。先端が直径 0.5mm のスチールバーを用いて、横突起の背側皮質骨を骨髄からの出血が確認できるまで掘削した。左右の L4, 5 横突起間に、群別に以下のマテリアルを設置し、切開した傍脊柱筋と皮膚を 3-0 ナイロン糸縫合した。移植するマテリアルは 1: PRP 含浸ゼラチン β -TCP スポンジ (以下 PRP sponge)、2: PPP 含浸ゼラチン β -TCP スポンジ (以下、PPP sponge)、3: PRP 含浸ゼラチンハイドロゲル (以下、PRP gel)、4: 自家腸骨 (以下、autograft)、5: 無設置 (以下、no implant) とした。4 の自家骨は設置予定部と同側の腸骨翼を仙骨上縁レベルまで採取しチップ状に裁断し横突起間に移植した。計 5 群間 (各群 n=10、20 椎間) で L4, 5 横突起間の骨癒合に関して以下の検討を行った。

(5) Radiographic evaluation

L4, 5 横突起間の骨形成を評価するために、術後 5 および 10 週で腰椎の単純 X 線正面像を撮影した。左右の L4, 5 横突起間の骨形成を以下の基準で点数化し、各群間で比較した。この測定は 2 者が盲検的に施した。0: minimal or no evidence of new bone formation、1: immature bone formation, with fusion questionable、2: solid-appearing bone, with fusion likely. 術後 10 週間での単純 X 線撮影後、ペントバルビタールで安楽死させ、腰椎を摘出した。

(6) Manual Assessment of Fusion

腰椎摘出後、術後 10 週間での L4, 5 横突起間の癒合を判定するために、徒手検査で各 L4, 5 横突起間の可動性の有無を判定した。両側の横突起が癒合しているものを Fused と判定した。両側または片側の横突起が癒合していないモデルを not fused と判定した。すべての腰椎を Fused or Not fused に判定し、Fused : 1, Not fused: 0 としてスコア化した。

(7) Biomechanical testing by non-destructive three-point bending test
徒手検査後、固定椎間の力学的強度を評価するために 3 点曲げ試験機を用い L4, 5 椎間の 3 点曲げ非破壊試験を行った。幅 20mm の間隔

をあけた治具上に、腰椎を前方が上に向くように設置し直径5mmの円柱治具を用いて0.5Nのプレロードをかけた後、0.1mm/sの速度でL4/5椎間板前方に圧迫力をかけた。変位距離が1mmの時点での荷重を計測した。同様の手技を計3回行い、その平均値を算出した。

(8)Micro-computed tomography analysis
力学試験後L4,5間の骨性癒合および骨形成量を評価するためにL4,5横突起のmicro CT撮影を行った。得られた画像を元に画像再構成ソフトを用いて腰椎背面からの画像およびL4,5横突起の矢状断再構成画像を作成した。画像解析ソフトを用いてL4,5横突起および横突起間を抽出し、骨量を計測した。同様にL1,2横突起および横突起間の骨量も測定し、L1,2の骨量でL4,5間の骨量を除することにより個体差の補正を行った。算出された値を骨量比として各群間を比較した。

(9)Histological Analysis
L4,5横突起間を組織学的に評価するためにMicro CT撮影後L4,5横突起間の組織切片を作製した。0.2% picric acidを添加し4% paraformaldehydeに浸漬し固定した。0.5M ethylenediaminetetraacetic acid (pH 7.5)内で脱灰操作を行い optimal cutting temperature compoundで包埋し正中矢状断における厚さ12 μ mの凍結組織切片を作製した。クライオスタットを用いて横突起間の矢状断面での組織切片を作製し、HE染色を行った。

実験2 実験1で骨癒合が得られた群の骨癒合過程の検討

実験1で骨癒合が得られた群の骨癒合の経時的变化を評価するために、実験1と同様の手技で1群あたり26匹のモデルを作製した。術後2,4,6,8週の時点で、単純X線像を撮影し横突起間の骨形成を評価した。単純X線撮影後、術後2,4,6,8週の時点で1群あたり10,3,10,3匹ずつペントバルビタールの大量投与で安楽死させ腰椎を摘出した。術後2,6週には3点曲げ非破壊試験による固定椎間の力学的強度およびmicro CTによるL1,2の骨量に対するL4,5横突起間の骨量比の評価を行った。術後2,4,6,8週にはmicro CTによるL4,5横突起間の形態学的評価を行った。実験1と同様の手法を用いて組織切片を作製し、HE染色およびサフランin O染色を用いて骨および軟骨形成の評価を行った。

評価項目の table

Weeks after surgery	Number	Radiographic Analysis	Biomechanical Testing	μ CT	Histological Evaluation
2	10	○	○	○	○
4	3	○	n	○	n
6	10	○	○	○	○
8	3	○	n	○	n
10	10	○	○	○	○

○: Evaluated n: not evaluated

4. 研究成果

(1)結果

High concentration of platelets in the PRP

PRP、血液中、PPPの血小板数を計測した。PRP、血液、PPPの血小板数はそれぞれ、 $3077 \times 10^4 \pm 165$ 、 $82.1 \times 10^4 \pm 4.0$ 、 $1.6 \times 10^4 \pm 0.5$ であった。血液中の血小板数に比べて、PRPの血小板数は37.5倍高値であった。

(2) Concentrations of growth factors in the PRP

PRP由来成長因子の濃度を測定するために、免疫酵素抗体法(ELISA法)を行った。

TGF- β 1の濃度は、PRP: 2239.7 ± 317 ng/ml、血液: 95.2 ± 9.3 ng/ml、PPP: 7.3 ± 0.2 ng/mlであった。PDGF-BBの濃度は、PRP: 84.1 ± 17.7 ng/ml、血液: 1.8 ± 0.3 ng/ml、PPP: 0.3 ± 0.02 ng/mlであった。PRPのTGF- β 1およびPDGF-BB濃度は、血液中の濃度に比べてそれぞれ23.5および45.9倍高値であった。

実験1 PRP含浸ゼラチン β -TCPスポンジの骨癒合促進効果

(3) Determination of fusion by radiograph

L4,5横突起間の骨形成を評価するために腰椎の単純X線像を撮影した。術後5週ではPRPスポンジ群、PPPスポンジ群、自家腸骨群でL4,5横突起間に骨形成を認めたが明らかな骨癒合は認めなかった。PRPゲル群および無設置群では骨形成は認めなかった。術後10週ではPRPスポンジ群および自家骨群でL4,5横突起間の骨癒合を認めた。PPPスポンジ群では骨形成を認めたが骨癒合は認めなかった。PRPゲル群および無設置群では骨形成および骨癒合とも認めなかった。術後5週でのX線スコアの点数はPRPスポンジ群が 0.8 ± 0.4 、PPPスポンジ群では 0.4 ± 0.5 、PRPゲル群は 0.15 ± 0.3 、自家骨群は 0.75 ± 0.4 、無設置群は 0.1 ± 0.3 であった。PRPスポンジ群は自家骨群と比較して有意差を認めず他の群に比べて有意に高値であった($p < 0.01$)。術後10週でのX線スコアの点数はPRPスポンジ群が 1.6 ± 0.5 、PPPスポンジ群が 0.4 ± 0.5 、PRPゲル群は 0.15 ± 0.4 、自家骨群は 1.4 ± 0.8 、無設置群は 0.1 ± 0.3 であった。PRPスポンジ群は、自家骨群と比較し有意差を認めずPPPスポンジ群、PRPゲル群および無設置群に比べて有意に高値であった($p < 0.01$)。PPPスポンジ群およびPRPゲル群は無設置群間に比べて有意差を認めなかった($p < 0.01$)。

(4) Fusion assessment by manual palpation

L4,5横突起間の癒合を判定するために、徒手検査で横突起間の可動性の有無を判定した。PRPスポンジ群では10匹中8匹、自家骨群では10匹中7匹を癒合ありと判定した。PPPスポンジ群、PRPゲル群、および無設置群ではすべて癒合なしと判定した。

(5) Biomechanical strength of spine at fused level

固定椎間の力学的強度を評価するために、非破壊3点曲げ試験機を行った。PRPスポンジ

群は 6.6 ± 2.1 N、PPP スポンジ群では 2.7 ± 1.2 N、PRP ゲル群は 1.8 ± 0.7 N、自家骨群は 5.5 ± 2.1 N、無設置群は 1.0 ± 0.4 N であった。PRP スポンジ群は、自家骨群と比較すると有意差はなく、PPP スポンジ群、PRP ゲル群および無設置群より有意に高値であった ($p < 0.01$)。PPP スポンジ群および PRP ゲル群は無設置群間に比べて有意差を認めなかった ($p < 0.01$)。

(6) Evaluation of bone union and bone volume by micro CT

L4,5 間の骨性癒合の有無および骨形成量を評価するために横突起の micro CT 撮影を行った。横突起矢状断面では PRP スポンジ群 13 横突起間と自家腸骨群 12 横突起間に髓腔の連続性を認め骨癒合と判断した。PPP スポンジ群では横突起のリモデリングにより横突起断面の増大や骨形成を認めたモデルもあったが、横突起間の骨癒合は認めなかった。すべての PRP ゲル群および無設置群では骨形成または骨癒合は認めなかった。骨量比は PRP スポンジ群 6.7 ± 2.6 、PPP スポンジ群 2.5 ± 0.8 、PRP ゲル群 2.1 ± 0.5 、無設置群 1.7 ± 0.5 、自家骨群 5.3 ± 2.1 であった。PRP スポンジ群は、自家骨群と比較して有意差を認めず、PPP スポンジ群、PRP ゲル群および無設置群に比べて有意に高値であった ($p < 0.01$)。PPP スポンジ群および PRP ゲル群は無設置群に比べて有意差を認めなかった ($p < 0.01$)。

(7) Histological analysis of bone union

L4,5 横突起間を組織学的に評価するために、横突起間の矢状断面での組織切片を作製し、光学顕微鏡で観察を行った。HE 染色による組織学的評価では PRP スポンジ群および自家骨群で、L4,5 横突起間に前後を皮質骨に挟まれた trabecular bone with hematopoietic bone marrow が形成され横突起間は骨癒合していた。PPP スポンジ群では横突起間に未熟な骨梁構造形成を認めたが横突起の癒合は認めなかった。PRP ゲル群、無設置群ではすべてのモデルにおいて骨形成は認めなかった。

【実験 2】 PRP スポンジ群および自家骨群の骨癒合過程の検討

PRP スポンジ群および自家骨群における骨癒合の経時的変化を評価するために、実験 1 と同様にモデルを作製し、以下の評価を行った。

(8) Radiographic evaluations

腰椎の単純 X 線像を撮影し、L4,5 横突起間の骨形成の経時的変化を評価した。PRP スポンジ群では、術後 2 週では横突起間に明らかな骨形成は認めなかった。術後 4 週で横突起間に新たな骨形成を認めた。その後、術後 6 週および 8 週では経時的に骨形成部分の陰影濃度が増強した。自家骨群では術後 2 週では移植骨の残存を認めた。術後 4 週では移植骨は

吸収され、横突起間に新たな骨形成を認めた。術後 6 週および 8 週では経時的に骨形成部分の陰影濃度が増強した。

(9) Biomechanical testing by non-destructive three-point bending test
3 点曲げ非破壊試験を行い、固定椎間の力学的強度の経時的変化を評価した。PRP スポンジ群の生体力学的強度は、術後 2 週で 1.6 ± 0.3 N、術後 6 週で 3.4 ± 1.2 N であった。自家骨群では、術後 2 週で 1.7 ± 0.3 N、術後 6 週で 3.6 ± 1.0 N であった。術後 2 および 6 週とも両群間で有意差を認めなかった ($p < 0.01$)。

(10) Evaluation of processes of bone union by micro-compute tomography

Micro CT で L4,5 横突起間の骨癒合の経時的変化を評価した。PRP スポンジ群では術後 2 週間ではスポンジに一致して粒状の β -TCP を認めた。掘削した横突起には変化を認めなかった。術後 4 週では掘削した横突起はリモデリングされ髓腔構造を有した新たな新生骨に置換されていた。術後 6 週では、術後 4 週に比べて新生骨が背側および頭尾側へ増大し、それに伴い横突起間隙は狭小化した。術後 8 週では新生骨はさらに横突起間を癒合する方向に拡大した。横突起背側に皮質骨の形成を認めた。自家骨群では術後 2 週では移植骨の残存を認めた。掘削した横突起には変化を認めなかった。術後 4 週では掘削した横突起はリモデリングされ髓腔構造を有した新たな新生骨に置換されていた。術後 6 週では新生骨背側の骨皮質形成を認めた。術後 8 週では横突起間隙はほぼ消失していた。Micro CT による骨量比は、PRP スポンジ群においては術後 2 週で 2.4 ± 0.6 、術後 6 週で 5.5 ± 1.7 であった。自家骨においては術後 2 週で 3.6 ± 0.1 、術後 6 週で 4.5 ± 1.1 であった。術後 2 週においては自家骨群が有意に高値であったが、術後 6 週においては両群に有意差を認めなかった ($p < 0.01$)。

(11) Histological analysis of process of bone union

組織学的に PRP スポンジ群および自家骨群の骨癒合過程を評価するために、HE 染色およびサフラニン O 染色を行った。PRP スポンジ群では、術後 2 週の HE 染色で横突起間のスポンジの一部が消失し、spindle-shaped fibroblast-like cells が多く含まれる細胞密度の高い結合組織に置換されていた。また、結合組織内にはサフラニンで濃染される chondrocyte-like cells の集塊を認めた。術後 4 週では掘削した L4,5 横突起はリモデリングされ、血球系細胞を伴った新生骨梁に置換されていた。横突起間の結合組織と新生骨梁の間には chondrocyte-like cells が層構造をなしており、成長軟骨と類似した組織構

造であった。chondrocyte-like cellsに加えて、その周辺の細胞外基質もサフラニンで染色された。術後6週では、新生骨梁が横突起間を架橋する方向に増大した。また、横突起間の結合組織の大部分は chondrocyte-like cells に置換された。chondrocyte-like cells および細胞外基質はサフラニンに濃染された。術後8週では結合組織内の chondrocyte-like cells の肥大化を認めた。また、サフラニン染色性の細胞外基質の減少を認めた。自家骨群では術後2週の HE 染色で、横突起間に spindle-shaped fibroblast-like cells を含んだ結合組織の形成および自家骨周囲に osteoblast-like cells の集積を認めた。また、横突起の先端の骨皮質の一部はサフラニンに染色される round-shaped cells に置換されていた。術後4週では掘削した横突起はリモデリングされ血球系細胞を伴った新生骨梁に置換されていた。新生骨梁構造の間には、サフラニンで濃染される、immature chondrocyte-like cells と細胞外基質から構成される組織を認めた。この組織と新生骨梁の間に成長軟骨と類似した組織構造を認めた。術後6週では、新生骨梁の増大およびサフラニン染色性の組織の減少を認めた。術後8週では新生骨梁間の背側部分に交通を認めた。サフラニン染色性の細胞および細胞外基質は著しく減少していた。両群において、全期間で移植部周辺の軟部組織に異常所見を認めなかった。

(12) 考察

本研究ではラットの腰椎後側方固定モデルを用いて、PRP とゼラチン β -TCP スポンジを組み合わせた骨癒合法の有用性を検討した。実験1では、術後10週で、PRP スポンジ群は、単純 X 線像、micro CT、および組織学的所見で自家骨群と同等の骨癒合促進効果を認めた。生体力学試験においても固定椎間が自家骨群と同等の力学的強度を持つことを確認した。実験2で PRP スポンジ群および自家骨群の骨癒合過程を評価した。放射線学的検討では、PRP スポンジ群および自家骨群ともに術後4週から横突起のリモデリングを認め、経時的に新生骨梁による横突起間の架橋が進行した。3点曲げ試験による固定腰椎間の力学的強度の検討では術後2および6週において両群に有意差を認めなかった。組織学的評価では両群とも術後4週で横突起周辺の膜性および横突起間の軟骨組織形成が始まり、経時的に軟骨組織が新生骨梁組織に置換されることにより、横突起間が骨癒合することが判明した。一方、PPP スポンジ群、PRP ゲル群および無設置群では横突起間の骨癒合促進効果を認めなかった。

PRP は、血小板の α 顆粒内に含まれる TGF- β 1、PDGF 等の内因性成長因子を高濃度に含ん

でいる。TGF- β 1 は骨芽前駆細胞を刺激し、骨の細胞外基質の主な成分である I 型コラーゲンの合成を直接的に刺激する作用を持つ。PDGF は骨芽前駆細胞を刺激し、骨基質や血管内皮細胞の増殖を促す。また破骨細胞を増殖させ骨のリモデリングを促進する。PRP は自己血液から精製可能であるため感染や自己免疫反応のリスクが極めて低く安全性が高いことから組織再生医療の分野において臨床での使用が始まっている。Marx は 1998 年に PRP が初期の骨癒合を促進することを報告した。それ以降動物実験や臨床において骨再生や骨癒合に有効であったという結果が報告されている。しかし一方で、PRP の骨癒合促進作用について否定的な報告も散見され、骨癒合効果についての見解は一致していない。一般的に成長因子を *in vivo* で使用する際、その半減期の短さが問題点となる。そのため成長因子を組織再生に用いる際には成長因子を局所で徐放するために様々なスキャフォールドが必要である。PRP を用いた骨癒合法でも、PRP 単独では骨形成を促進しないが、成長因子を徐放するキャリアーと併用することにより骨形成促進効果を認めたという報告がある。このため、PRP を用いた骨癒合法を開発するには併用するスキャフォールドの選択が重要であると考えた。

ゼラチンを化学架橋したゼラチンハイドロゲルは生体適合性、生体分解性に優れたバイオマテリアルである。ゼラチンハイドロゲルは様々な成長因子と静電気力で吸着し分解に伴い成長因子の生物活性を保持したまま徐放することが可能である。ゼラチンハイドロゲルは臨床で様々な成長因子を徐放するためのドラッグデリバリーシステムとして使用されている。しかしゼラチンハイドロゲルは骨形成に用いるスキャフォールドとしては力学的に脆弱であり細胞侵入、移動、および分化のための孔構造を持たないという問題点がある。

β -TCP は生体活性を有したリン酸カルシウムであり骨組織に対する適合性に優れている。連結多孔体に加工した β -TCP は高い骨伝導能を有し生体吸収性の骨補填剤として臨床で広く用いられている。しかし、 β -TCP 単独では骨誘導能を持たないため骨再生環境が乏しい部位では骨再生が不十分という報告がある。

われわれは、ゼラチンハイドロゲル、 β -TCP の問題点を同時に解決するためにゼラチン β -TCP スポンジを考案した。ゼラチン β -TCP スポンジはゼラチンと β -TCP をさまざまな割合で混合し、スポンジ状に加工したマテリアルである。ゼラチンに β -TCP を加えてスポンジ状に加工することで、ゼラチンの力学的強度が上がり、細胞侵入、移動、および分化に必要な多孔構造が保持される。また、骨誘導能を持たない β -TCP にゼラチンを加えることで

骨形成に作用する成長因子の徐放が可能となり骨誘導能が期待できる。*in vitro*ではBMP-2を含浸させたゼラチンβ-TCPスポンジ内に骨髄間葉系細胞を播種すると骨形成能が促進した。また、ラットの下顎骨欠損モデルで、BMP-2を含浸させたゼラチンβ-TCPスポンジにより骨形成が促進されたことが報告されている。本研究ではPRPゲル群では横突起間の骨癒合が得られなかったが、PRPスポンジ群では明らかな骨癒合促進効果を得られた。これから、解剖学的に癒合していない脊椎骨において骨癒合を得るために成長因子の徐放効果だけでは不十分であり細胞侵入が可能で3次元構造を持ったスキャフォードが必要であったと考える。また、横突起間のような開放腔では、ゼラチンハイドロゲルは周囲組織に速やかに拡散するが、ゼラチンβ-TCPスポンジは移植部位に一定期間設置することが可能であり骨癒合促進に必要な成長因子の局所濃度および効果持続期間が得られた可能性がある。また予備実験においてPRPとβ-TCPを組み合わせて横突起間に移植した群では、術後10週の時点ではβ-TCPが移植した直後の形状を保持したまま残存し、横突起間の骨癒合が遅延していた。これから、横突起間の癒合を得るためには骨伝導能だけではなく骨誘導能を持つスキャフォードが必要であったと考える。

本研究では、PRPに含有される血小板由来成長因子の骨形成能、ゼラチンβ-TCPスポンジの成長因子徐放能を検討するために、成長因子をほとんど含まないPPPとゼラチンβ-TCPスポンジを組み合わせて移植する群を作製した。PRPが高濃度の成長因子を含有するのに対してPPPは成長因子をほとんど含まずフィブリンが構成成分の大半を占める。フィブリンは骨芽細胞増殖に必要な栄養分を含み血管新生を促すことから、骨形成を誘導すると報告されている。PRPとPPPの骨形成能を比較した研究では両者の骨形成能に有意差は無かったと報告されている。しかし、これらの報告では成長因子を徐放するためのスキャフォードが使用されていないことやPRP中の血小板が低濃度であったことから、移植部位での成長因子の効果持続期間または濃度が不十分であった可能性がある。本研究ではPPPとゼラチンβ-TCPスポンジを組み合わせた群では横突起間の骨癒合を認めたモデルはなかった。これから、PRPに含まれる血小板由来成長因子がゼラチンβ-TCPスポンジにより徐放されることによって骨横突起間の骨癒合が促進されたと考えた。

本研究におけるPRPスポンジ群および自家腸骨群の骨癒合過程の検討では、PRPスポンジ群および自家骨群ともに掘削した横突起がリモデリングされ新生骨梁が形成された。また、横突起間に成長軟骨と類似した構造を

有する軟骨組織が形成され、徐々に新生骨梁に置換され骨髄腔が形成された。Joyceはラットの大腿骨骨折モデルを用いて骨折治癒過程を組織学的に4ステージに分類している。ステージ1は骨折直後の急性反応期、ステージ2が骨折部周辺の骨膜性骨化、ステージ3が骨片間近傍の軟骨新生、ステージ4が成長軟骨板の組織学的所見に類似した軟骨内骨化による骨形成である。この過程はPRPスポンジ群および自家骨群の横突起癒合過程とほぼ同様である。この結果からPRPとゼラチンβ-TCPスポンジおよび自家骨移植による骨癒合法とともに長管骨の骨折治癒と同様の過程を経て骨癒合することが判明した。

(13) 結論

本研究ではPRPとゼラチンβ-TCPスポンジを組み合わせた骨癒合法の有効性を検討した。本骨癒合法は術後10週で自家骨移植術と同等の骨癒合促進効果を認めた。また、本法は臨床で使用されているマテリアルのみ使用するため安全性が高いという利点がある。これらの結果から、本法は有効性および安全性に優れた術式であり、骨癒合法の選択肢のひとつとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

①岡本 慎一、池田 巧、長谷 斉、三上 靖夫 他7名

Positive Effect on Bone Fusion by the Combination of Platelet-Rich Plasma and a Gelatin β-Tricalcium Phosphate Sponge: A Study Using a Posterolateral Fusion Model of Lumbar Vertebrae in Rats、TISSUE ENGINEERING:Part A、査読有、Volume 18、2011、157 - 166

〔学会発表〕(計1件)

① 岡本 慎一、多血小板血漿とゼラチンβ-TCPスポンジを組み合わせた骨癒合法の有性-自家骨移植との比較による骨癒合過程の検討、第26回日本整形外科学会基礎学術総会、2011年10月20日、群馬

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 斉 (HASE HITOSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00172883

(2) 研究分担者

三上 靖夫 (MIKAMI YASUO)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80360030
池田 巧 (IKEDA TAKUMI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40453120

(3) 研究協力者

岡本 慎一 (OKAMOTO SHINICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・大学院生