

平成23年5月17日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800034

研究課題名（和文）

新規骨接着型生体吸収性セメントの薬剤（抗生剤、抗癌剤）徐放能に関する研究

研究課題名（英文）

Research of a novel hard-tissue biodegradable adhesive as a drug delivery carrier.

研究代表者

杉本 佳久 (SUGIMOTO YOSHIHISA)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80423309

研究成果の概要（和文）：申請者らは独自に開発した硬組織接着性多糖誘導体リン酸化プルランを用い、生体親和性が高く、かつ骨に対し強固に接着する生体吸収性骨セメントを創製した。本研究では耐性菌 MRSA に対し効果のある抗菌薬バンコマイシンおよび主要な抗癌剤であるメソトレキセートを用いて、本材の薬物徐放能を検討した。リン酸化プルランは従来のポリメチルメタクリレート骨セメントよりも *in vitro* および *in vivo* とともに良好な薬剤徐放能を示した。

研究成果の概要（英文）：A bioadhesive that can be bonded to hard tissue such as bone and tooth, is highly needed for hard-tissue repair in orthopaedic medicine and dentistry. We developed a novel hard-tissue biodegradable adhesive on basis of phosphorylated pullulan. In this study, we examined the property of phosphorylated pullulan bioadhesive as a drug delivery carrier. As a result, phosphorylated pullulan bioadhesive appears to be an ideal material as a drug delivery carrier.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：骨セメント、生体吸収性、ドラッグデリバリー、抗生剤、抗癌剤、リン酸化多糖

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来、それに伴う介護費や医療費の増大など深刻な社会問題が山積している我が国において、『寝たきり老人』の増加は早急に対処すべき課題である。高齢者の骨折や関節疾患は、『寝たきり』へと移行す

る大きな要因である。さらに骨関節手術や外傷後にみられる化膿性骨髄炎はしばしば難治性となり、重篤な状態に陥ったり、慢性化して再発を繰り返すこともある。これらの疾患の治療法として、人工関節やプレートをレジン系の骨セメントすなわちポリメチルメ

タクリレート骨セメント (PMMA 骨セメント) やアパタイトセメントを始めとするリン酸カルシウム系セメントで固定する手法や抗生剤含有セメントビーズ法が、現時点では幅広く用いられている。さらに悪性骨腫瘍に対しては、手術後の骨欠損部や転移性骨腫瘍の治療を目的として、PMMA 骨セメントに抗癌剤を含有させ局所に徐放させるという基礎研究も行なわれている。

しかし、従来用いられてきた骨セメントは未だ臨床上の大きな問題を抱えている。例えば、PMMA 骨セメントはレジン系であるため、非吸収性であり、加えて、発熱やモノマーの血管内への流入などにより患者が死に至る症例も数多く報告されている。一方、レジン系骨セメントに代わる材料として期待されているリン酸カルシウム系セメントは、生体親和性が高く、生体内で吸収されるというレジン系骨セメントにはない優れた特性を有するものの、脆い、硬化が遅い、骨への接着性が乏しいなど、物性という点では PMMA 骨セメントに全く及ばない。このように、現在の骨セメントの抱える問題は、整形外科治療を行う上で大きな障害となっており、機能性に優れた新たな生体吸収性骨セメントの開発が切望されている。

申請者らはアパタイト接着性多糖複合体を用いた高機能性硬組織セメントの開発に取り組んできた。その結果、独自に開発した硬組織接着性多糖誘導体リン酸化プルランは生体内で吸収され、かつアパタイトやチタンに対して既存の吸収性骨セメントであるリン酸カルシウム骨セメントを遙かに超える接着強さを示した。さらにドラッグデリバリーに関しては、新規骨セメントが生体吸収性であるため従来の PMMA 骨セメントよりも良好な薬剤徐放能が期待された。

## 2. 研究の目的

本研究はリン酸化プルランからの薬物徐放特性を検討することを目的とする。薬物としては抗菌薬と抗癌剤に焦点を当て、徐放特性と薬剤を混入した時の骨セメントの機械的性質を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬物徐放試験

#### ①抗菌薬

MRSA 骨髄炎に対し効果のあるバンコマイシン (VCM) をリン酸化プルラン 40g あたり 1g の割合で混和し、ビーズ状に成型した。同量の VCM を混和した PMMA セメントビーズを作製し、比較対照とした。それぞれ PBS バッファ-500  $\mu$  l に浸漬させ、薬剤を溶出させた。37°C で 24 時間毎にバッファ-を交換した。溶出した VCM 濃度を測定することにより徐放

量を求めた。

#### ②抗癌剤

主要な抗癌剤の一つであるメソトレキセ-ート (MTX) を PP40g あたり 2g の割合で混和し、ビーズ状に成型した。同量の MTX を混和した PMMA セメントビーズを作製し、比較対照とした。それぞれ PBS バッファ-に浸漬させ、VCM と同様に薬剤溶出試験を行った。

### (2) 細胞傷害活性の計測

(1) - (2) で得られた徐放液の腫瘍細胞への効果を検討した。ヒト骨肉腫細胞株 MNNG/HOS を培養し、96 ウェルプレートに 3,000 個づつ播種した。これにリン酸化プルランおよび PMMA からの MTX 徐放液 (1, 3, 5, 7 日目) を加えて、72 時間暴露した。MTT アッセイを行い、腫瘍細胞の活性を測定した。

### (3) 動物実験

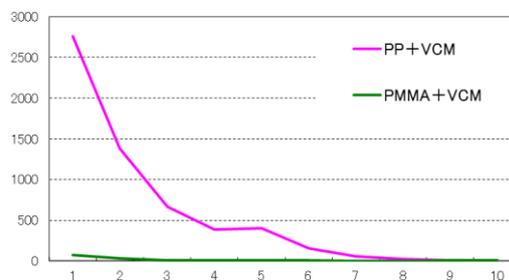
ヌードマウスにヒト骨肉腫細胞株 MNNG/HOS を移植し、皮下に腫瘍を作製した。MTX を 0mg、10mg および 25mg 混和したリン酸化プルランプレート (直径 6mm、高さ 2mm) を作製し、形成された腫瘍の直下に挿入した。腫瘍体積の経時的な変化を計測し、in vivo における抗腫瘍効果を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 薬物徐放試験

#### ①抗菌薬

VCM 含有 PMMA 骨セメントから徐放された VCM 濃度は、1, 2, 3 日目でそれぞれ 72.4, 29.4, 9.9  $\mu$  g/ml であった。すなわち PMMA 骨セメントから徐放される VCM の濃度は徐放開始直後が最も高濃度で、以後は経時的に減少していった。一方、リン酸化プルラン (PP) から徐放された VCM の濃度は 1, 2, 3 日目でそれぞれ 2757.8, 1378.0, 668.2  $\mu$  g/ml であり、8 日目まで PMMA よりも有意に高い徐放能を示した (P<0.01)。

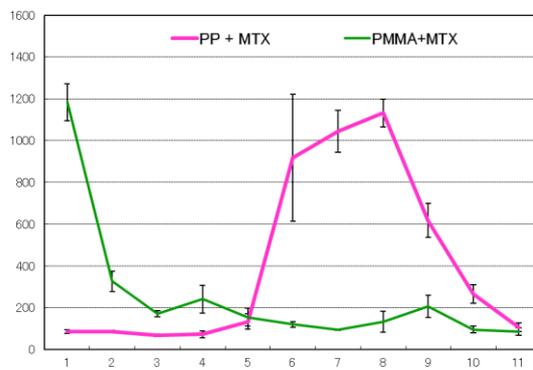


混和した VCM の量は PMMA 骨セメント、新規骨セメントで同じであったにも関わらず、新規骨セメントからは非常に多くの VCM が徐放されていた。PMMA 骨セメントはセメント表面に付着した薬物の徐放が主で、内部からは

極少量しか徐放しないとされている。一方、リン酸化プルランは生体吸収性であり、PBS溶液の中でも徐々に溶解していくため、多くのVCMが徐放されたものと考えられた。以上から、本新規骨セメントはVCMの徐放担体として非常に優れた性質をもつことが示された。

## ②抗癌剤

PMMAからのMTXの徐放はVCMと同様に、1日目にピーク(1183±89 μmol/l)となり、以後は漸減していった。リン酸化プルラン(PP)からは1日目(86±8 μmol/l)から4日目(73±16 μmol/l)までは低濃度であったが、5日目(134±36 μmol/l)から増加し、8日目(1131±66 μmol/l)にピークを迎え、11日目に完全に溶解した。



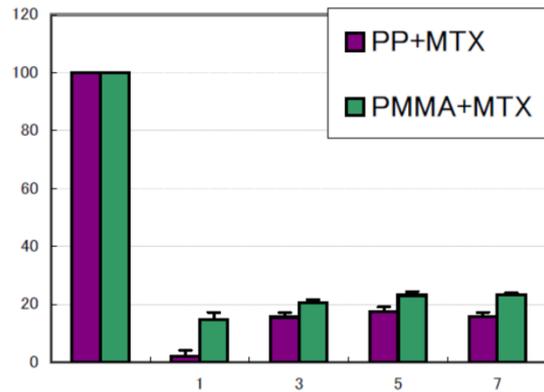
リン酸化プルランからのMTXの徐放はVCMとは異なる特性を示した。その原因としては、リン酸化プルランは多数のリン酸基を有するためMTXの持つ電荷に影響を受けたこと、およびMTXとVCMの分子の大きさの違いによるリン酸化プルランとの安定性の差異が関与していると考えられた。

## (2) 細胞傷害活性の計測

(1)–②で得られたMTX徐放液(1, 3, 5, 7日目)を培養細胞にかけることで、その細胞障害活性を検討した。徐放液投与後72時間でMTT試薬を加え、細胞活性を測定した。

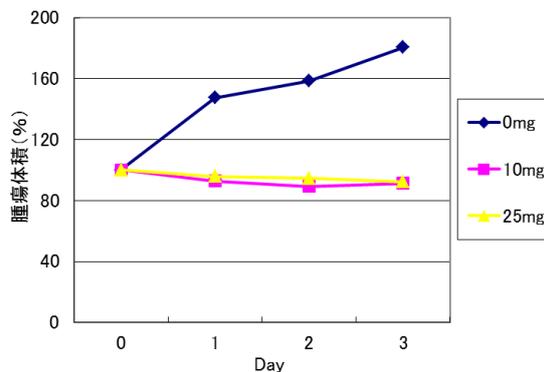
1日目のリン酸化プルラン(PP)からの徐放液が最も効いており、細胞活性はコントロールの2.1%であった。PMMAの方は14.8%であり、リン酸化プルランからの徐放液の方が有意に細胞傷害活性を示した。3, 5, 7日目の結果もリン酸化プルランからの徐放液の方がPMMAよりも細胞傷害効果は高かった。

これらの結果から、リン酸化プルランからの徐放液はin vitroにおいて、ヒト骨肉腫細胞株に対して優れた抗腫瘍効果を示すことが分かった。



## (3) 動物実験

形成された皮下腫瘍の直下にMTXを含まないリン酸化プルランプレートを挿入した群では、挿入後経時的に腫瘍は増大していった。一方、リン酸化プルランプレート1つあたりMTX 10mgを混和した群では、1, 2, 3日で腫瘍体積が93%、89%、91%と縮小していた。またMTX 25mgを混和した群でも、1, 2, 3日目と95%、94%、92%と腫瘍縮小効果がみられた。腫瘍増大抑制効果がみられた。



本研究では、in vitroおよびin vivoにおいてリン酸化プルランは優れた薬物徐放能を示した。リン酸化プルランは従来のPMMA骨セメントを超える徐放能を有するだけでなく、生体吸収性であることから、除去する必要がないなど、既存の治療法を大きく変える可能性を秘めた材料である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 佳久 (SUGIMOTO YOSHIHISA)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80423309

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし