

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 25 年 06 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591688

研究課題名（和文）生体吸収材料および成長因子を用いた肩腱板修復促進法の開発

研究課題名（英文）Positive Effect on Rotator Cuff Repair by the Combination of Gelatin Hydrogel Sheet and Bone Morphogenetic protein 7

研究代表者

森原 徹（MORIHARA TORU）

京都市立医科大学・医学（系）研究科・講師

研究者番号：90336735

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ゼラチンハイドロゲルシート（GHS）を用いた bone morphogenetic protein 7（BMP-7）の徐放による腱板断裂術後修復の促進効果を検討した。その結果、GHS を用いて、BMP-7 を腱-骨接合部で徐放することにより、腱板修復の促進を認めた。BMP-7 は臨床でも使用されており、安全性も高い。これらの結果から、本法は、腱板断裂修復術後リハビリテーションの短縮にもつながり、今後の臨床において有用となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to investigate the positive effect on rotator cuff repair by the combination of gelatin hydrogel sheet (GHS) and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7). Rotator cuff repair was promoted by the controlled release of BMP-7 using GHS on the tendon-to-bone insertion. BMP-7 has already been used clinically and is very safe. This method will bring about shortening of rehabilitation after rotator cuff repair and it is possible that this method is valuable clinically.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，整形外科学

キーワード：肩，腱板，生体吸収材料，成長因子，徐放

1. 研究開始当初の背景

(1) 肩関節腱板損傷や断裂のために疼痛や筋力低下を訴え、日々多くの患者が医療機関を受診している。保存療法で十分な改善が得られない場合は損傷部位を修復する手術療法が行われているが、再断裂率は 20～50% と低いとは言えない。また、腱・靭帯修復術後の早期社会復帰を実現するためには、早期のリハビリテーションが必要である。しかし、早期の可動域訓練や筋力訓練を行うことは

修復腱板の再断裂を生じる危険性を伴う。腱板修復後の腱-骨接合部の修復にはかなりの時間を要するため、現状においては順調に経過しても肩関節機能回復のために術後数ヶ月に及ぶ長期間のリハビリテーションを要する。

(2) 腱-骨接合部は腱、非石灰化線維軟骨層、石灰化線維軟骨層、骨の 4 層構造となっている。腱板修復術後の再断裂は、腱-骨接合部で生じることが多く、腱-骨接合部の良好な

再生が術後成績に影響を及ぼす。腱組織の修復には腱細胞、滑膜細胞、間葉系幹細胞などの細胞が関与しており、一時的に basic fibroblast growth factor (bFGF), bone morphogenetic protein 12 (BMP-12), BMP-13, BMP-14, cartilage oligomeric matrix protein (COMP), connective tissue growth factor (CTGF), platelet-derived growth factor-B (PDGF-B), and transforming growth factor β -1 (TGF β -1)などの成長因子の発現が増加し、それらが修復促進に寄与している。正常な強度の腱-骨接合部の再生を目指して様々な成長因子を用いた研究が行われているが、結果は様々である。

(3) BMP-7は現在、欧米を中心に臨床応用されている。近年、BMP-7の骨形成促進作用だけでなく、軟骨細胞、腱細胞に対する増殖促進や分化誘導作用が注目されており、3要素の複合体である腱-骨接合部の修復促進に有効に作用する可能性がある。

(4) しかし、BMPに代表される成長因子は、生体内寿命が短く不安定であるため、局所の有効濃度を保持することが困難である。ゼラチンハイドロゲルシート(GHS)は生体分解性があり、安全に利用されている。また、等電位点5.0の酸性GHSでは、塩基性である成長因子が吸着し、GHSが分解する際に成長因子が生物活性を維持したまま徐放される。このような Drug Delivery System (DDS)を用いた成長因子徐放による腱板の術後の組織修復を評価した報告はない。このGHSによるDDSを用いて、成長因子を高濃度で持続的に放出することで、早期の腱板組織修復を実現できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、GHSを用いたBMP-7の徐放による腱板修復促進効果の検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

京都府立医科大学の動物舎で飼育された12週齢 Sprague-Dawley (SD) male rats (SHIMIZU Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan) 33匹66肩を用いた。本研究は京都府立医科大学の動物実験倫理委員会の審査と承認を得て行った。

(2) ゼラチンハイドロゲルシートの作製

5wt%ゼラチンハイドロゲル(Nitta Gelatin Co., Osaka, Japan)水溶液を作製後、25%グルタルアルデヒド(GA)(Wako Pure Chemical Ltd., Kyoto, Japan)を添加し、架橋反応させるため4°Cで12時間ディッシュ上に静置した。ディッシュからゼラチンハイドロゲルを剥離し、0.1Mグリシン溶液で未反応GAを不活化および洗浄した(室温、1時間)。

Double-distilled waterで2回洗浄後、-80度で凍結した。凍結乾燥し、ethylene oxide gas sterilizationを行った。

手術前に1cm×1cmに細切し、清潔下でディッシュ上に並べ、予め作製しておいた Phosphate buffered saline (PBS), recombinant human BMP-7 (Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ)をそれぞれ200 μ lずつ滴下し、2時間静置し、十分に溶液を含浸させた。

(3) 手術方法

SD rats にペントバルビタールの腹腔内注射によって全身麻酔を行い、清潔下で両肩の手術を行った。肩の側方から後方に皮切をおき、Acromionを挙上して術野を展開した。棘上筋腱を大結節付着部から尖刃で鋭利に切除した。母床の軟部組織は尖刃で可及的に除去した。0.5mm径のドリルビットを電動ドリルに装着し、大結節の棘上筋腱の母床に皮質骨を貫通するようにドリリングを行い、軟骨を搔爬し、骨髄からの出血を認めた。両側の棘上筋腱は母床とは連続しない大結節の遠位部の骨皮質に前後方向に作製した0.5mm径の骨孔に5-0ナイロンを通し、Mason-Allen法に準じた方法で解剖学的な付着部に再縫着した。皮膚を4-0ナイロン糸で閉創した。ラットは術後、外固定を行わず、ケージ中での自由な運動を許可し、12時間周期の明暗室で飼育した。

(4) ゼラチンハイドロゲルシート徐放能の評価(RI gamma scintigraphy)

SD rats 15匹30肩を用いた。Chloramine-T法により放射性元素(Iodin 125)でBMP-7を標識した。BMP-7(2.5ng/ μ l)を肩峰下滑液包に200 μ l注入した群(注入群 n=15)とBMP-7を含浸させたGHSを、腱板縫合後、腱-骨接合部直上に留置した群(GHS群 n=15)を作製した。

術後1, 3, 7, 14, 21日で、ラットをペントバルビタールの腹腔内過剰投与によって安楽死させ、両肩関節周囲組織を三角筋、腱板組織、上腕骨近位、肩甲骨を含んだ状態で採取した。PACKARD COBRA E5002 Auto-Gamma Counting Systems (PerkinElmer Japan Co., Ltd., Kanagawa, Japan)を用いて、各time point (n=3)でラット肩関節内のBMP-7量を定量した。

(5) 治療群の作製

SD rats 18匹36肩を用いた。術中、閉創前にPBS, BMP-7を肩峰下滑液包内に注射器で注入した(それぞれA, B群 各群n=9)。別の肩の腱-骨接合部直上にはそれぞれPBS, BMP-7を含浸させたGHSを留置した(それぞれC, D群 各群n=9)。

(6) Microcomputed tomography (μ CT)の評価

術後 2, 4, 8 週で, ラットをペントバルビタールの腹腔内過剰投与によって安楽死させ, 両肩関節周囲組織を三角筋, 腱板組織, 上腕骨近位, 肩甲骨を含んだ状態で採取した. 採取した組織は, ただちに 4%ホルムアルデヒドで 24 時間 (4°C) 固定した.

μ CT (micro focus 2D/3D, ScanXmate-E090S40, Comscantecno Co., Ltd., Kanagawa, Japan)を用いて肩関節を撮像した. μ CT images は電圧 60 kV, 電流 40 μ A でスキャンした. 画像再構成ソフト (FanCT ver. 1.3, Comscantecno Co., Ltd., Kanagawa, Japan)を用いて, 三次元再構成を行い, 画像解析ソフト (TRI/3D-BON Ratoc System Engineering Co., Ltd.)で画像化した. 肩における異所性骨化の有無を評価した.

(7) 組織サンプルの作製と観察

μ CT 撮像後, ただちに ethylene diamine tetraacetic acid (pH 7.5) 溶液で 12 週かけて脱灰した (常温).

自動包埋装置 (Tissue-Tek VIP5Jr., Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いてパラフィン浸透させ, 包埋センター (Tissue-Tek Dispensing console IVおよび Tissue-Tek Cryo console, Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて包埋を完了した.

滑走式 Microtome (IVS-410, Sakura Seiki Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて, パラフィンブロックから棘上筋腱長軸と平行な冠状断のスライスで連続切片 (4 μ m 厚)を薄切して, 各切片をスライドガラスに固定した.

標本切片にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い, 光学顕微鏡で腱-骨接合部の細胞形態および組織構築を観察した. 近接切片に対してサフラニン O 染色を行い, 軟骨細胞の評価を光学顕微鏡で行った. Ide らの方法 (The tendon-to-bone maturing score)を用いて, 腱-骨接合部の組織学的修復評価を行った (Table. 1).

評価は 2 blinded colleagues で行った.

Table.1 The tendon-to-bone maturing score (Ide J, Kikukawa K, et al. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. J Shoulder Elbow Surg 2009; 18: 391-8 から引用)

	1	2	3	4
Cellularity	Marked	Moderate	Mild	Minimal
Proportion of fibers oriented parallel	25% >	25-50%	50-75%	75% <
Proportion of fibers of large diameter	25% >	25-50%	50-75%	75% <
Vascularity	Marked	Moderate	Mild	Minimal
Continuity	25% >	25-50%	50-75%	75% <
Bone ingrowth	25% >	25-50%	50-75%	75% <
Fibrocartilage cells	25% >	25-50%	50-75%	75% <
Tidemark	25% >	25-50%	50-75%	75% <

Percentage was relative values as compared to unoperated control tendon-to-bone insertion.

(8) 統計学的解析

すべての結果は平均と標準偏差で表記した. GHS の徐放能の評価に関しては群を被験者内要因とし, 術後週数を被験者間要因として二元配置分散分析によって統計解析した. 組織学的評価に関しては群間および術後週数を被験者間要因として Kruskal Wallis rank を用いた三元配置分散分析によって統計解析した. $P < 0.05$ を有意差ありとした. 統計学的解析には SPSS version 20 (SPSS Inc., Chicago, Illinois)を用いた.

4. 研究成果

(1) ゼラチンハイドロゲルシート徐放能の評価

注入群と GHS 群の肩関節部における BMP-7 の残留量を比較した. 群間と術後日数に有意な主効果を認めた (群間; $P = 0.002$) (術後日数; $P < 0.001$). 群間と術後日数の間に有意な交互作用を認めなかった (群間 \times 術後日数; $P = 0.853$).

GHS 群が注入群より全ての術後日数で有意に肩関節内 BMP-7 の残留量は高かった.

(2) μ CT の評価

異所性骨化の有無を調べるため, μ CT を撮像した. 全ての群において, 明らかな異所性骨化を認めなかった.

(3) 組織学的評価

細胞密度はいずれの群でも経時的に減少した. 術後 2 週では, A 群を除き, 著明な炎症性細胞や間葉系細胞を認めた.

線維軟骨は, 術後 4 週で D 群に認めた. 術後 8 週では, 全ての群で軟骨形成を認めたが, D 群で the columnar arrangement of chondrocytes が見られた.

(4) The tendon-to-bone maturing score

The tendon-to-bone maturing score は A ~D 群で, それぞれ術後 2 週が 15 ± 1 点, 10.3 ± 1.2 点, 12.7 ± 1.2 点, 14 ± 1.7 点, 術後 4 週が 15 ± 1.7 点, 11 ± 1.7 点, 12.3 ± 1.5 点, 14.7 ± 1.2 点, 術後 8 週が, 19 ± 4.6 点, 18.3 ± 4.5 点, 16.3 ± 4.7 点, 23 ± 1

点であった。

A, B, C, D 群の比較では、術後週数に有意な主効果を認めた ($P < 0.001$)。一方、BMP-7 および GHS に有意な主効果は認められなかった (BMP-7; $P = 0.577$) (GHS; $P = 0.561$)。BMP-7 と GHS の間に有意な交互作用を認めた (BMP-7 × GHS; $P < 0.001$)。BMP-7 と術後週数の間、GHS と術後週数の間、BMP-7 と GHS および術後週数の間には有意な交互作用は認められなかった (BMP-7 × Week; $P = 0.082$) (GHS × Week; $P = 0.955$) (BMP-7 × GHS × Week; $P = 0.549$)。

4 群全てで術後週数を経つにつれて、組織修復が得られた。A 群と B 群の比較では A 群の方が平均スコア点数は高かった。一方、C 群と D 群の比較では D 群の方が平均スコア点数は高かった。術後 8 週においては、A, B, C 群のスコア点数はほぼ同等で、D 群のスコア点数が他群より高かった。

(5) 結論

本研究では GHS を用いた BMP-7 の徐放による腱板修復の促進効果を検討した。GHS を用いて、BMP-7 が腱-骨接合部で徐放されることにより、腱板修復が促進された。

BMP-7 は臨床でも使用されており、安全性も高い。これらの結果から、本法は、腱板断裂修復術後リハビリテーションの短縮にもつながり、今後の臨床において有用となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

① 加太 佑吉、ゼラチンハイドロゲルシートを用いた BMP-7 徐放による肩腱板修復促進効果、第 28 回日本整形外科学会基礎学術総会、2013 年 10 月 18 日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森原 徹 (MORIHARA TORU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科・講師
研究者番号：90336735

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし