

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592207

研究課題名(和文) 多血小板血漿と生体吸収性材料を用いた脊椎固定術の開発 臨床応用への橋渡し研究

研究課題名(英文) Positive Effect on Bone Fusion by the Combination of Platelet-Rich Plasma and Tricalcium Phosphate Sponge

研究代表者

池田 巧 (ikeda, takumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40453120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではPRPとゼラチン-TCPスポンジを組み合わせた材料を使用し、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。これに加え、椎体形成術の材料に同材料を使用することを目的とし、まず卵巣摘出ラット椎体に骨欠損を作製し、骨癒合の経過を調査している。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と今回の結果から、本法は有効性および安全性に優れており、脊椎固定術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-TCP sponge is equivalent to that of autogenous bone grafting.

We also study the process of bone repair in a vertebral body defect model in order to use this biomaterial in vertebroplasty.

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-TCP sponge could be an alternative to autogenous bone grafting in terms of its effectiveness, lower invasiveness, and safety.

研究分野：整形外科

キーワード：多血小板血漿 ゼラチン TCPスポンジ 骨癒合 脊椎固定術 椎体形成術

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎手術において、椎体間骨癒合や椎体形成を目的に自家骨を使用することは従来から一般的に行われている。この際、採骨部の疼痛や骨の遷延癒合などの問題が生じることがある。採取できる自家骨量に限界があり、骨量が不足することや、粗鬆骨など自家骨そのものの骨質に問題を有していることもある。

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で得られる濃厚血小板血漿であり、TGF- $\beta$ 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。

ゼラチン-tricalcium phosphate( -TCP) スポンジ(gelatin -TCP sponge)は、ゼラチンと -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すでに臨床で使用されている。多孔体に加工した -TCP も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 -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知られている。

上記の特徴をもった PRP とゼラチン -TCP スポンジを自家骨に代わって使用することを考案し、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

PRP とゼラチン -TCP スポンジを用いた脊椎固定術の骨癒合促進効果、安全性を腰椎後側方固定モデルを用いて検証し、臨床応用への礎とすること。また、この生体材料を骨粗鬆症性椎体骨折に対する椎体形成術に使用することを目的とし、そのために必要な動物モデルを作製すること。

## 3. 研究の方法

以下の方法でマテリアルを準備した。

・ Preparation of gelatin -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 -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 -TCP 水溶液を 12cm x 12cm の型枠に流延し 4、12 時間静置し架橋反応を行った。これを -40 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 -TCP スポンジに加工した。

・ 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 10~20  $\mu$ m のゼラチンハイドロゲル粒子を作製した。

・ Preparation of gelatin -TCP sponges incorporating PRP

Sprague-Dawley rats (雄性、8 週齢、240~290g) に全身麻酔を行った。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  $\mu$ L をピペティングし PRP を得た。PRP、血液中、PPP の血小板数を計測した。200  $\mu$ L の PRP を、4 x 8 x 16mm に裁断したゼラチン -TCP スポンジに含浸させ 4 で一晩放置した。対照として、200  $\mu$ L の PPP を同じサイズのゼラチン -TCP スポンジに含浸させ 4 で一晩放置した。

(1)SD ラットの後側方固定モデルを使用して、PRP とゼラチン -TCP スポンジを用いた脊椎固定術の骨癒合促進効果、安全性を腰椎後側方固定モデルを用いて検証した。

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た。移植するマテリアルは 1: PRP 含浸ゼラチン -TCP スポンジ(以下 PRP sponge)、2: PPP 含浸ゼラチン -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 群間で L4,5 横突起間の骨癒合に関して単純 X 線、 $\mu$ CT で画像評価を行った。また、組織学的評価を行った。

(2)12 週齢 SD ラットの卵巣を摘出することでエストロゲン分泌を抑制し、骨粗鬆症を誘発した。卵巣摘出ラットの腰椎前方にハイスピードドリルを用いて骨欠損を作成した。骨欠損の修復過程を評価し、この欠損が完全に自己修復しないモデルであるかどうかを画像的、組織学的に評価した。

## 4. 研究成果

(1)本研究で使用した PRP とゼラチン -TCP スポンジを組み合わせた骨癒合法は術後 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、成長因子をほとんど含まない PPP とゼラチン -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 -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。また、組織学的にも移植部周辺の軟部組織に炎症反応などを示す異常所見を認めなかった。本法は臨床で使用されているマテリアルのみ使用しているため安全性が高いという利点があ

ることと、得られた骨癒合の結果から、本法は有効性および安全性を持った術式であり、骨癒合法の選択肢のひとつとなる可能性がある。

(2) 卵巣摘出ラットの腰椎の骨塩定量を行い、有意に骨量が減少していることを確認した。卵巣摘出ラットの腰椎前方にハイスピードドリルを用いて骨欠損を作成した。術後 4, 8, 12 週において画像的、組織学的に骨癒合の過程を評価した。骨欠損部に一部新生骨を認めたと、欠損が完全に修復されることはなかった。骨欠損モデルにおいて、バイオマテリアルなどが持つ骨癒合促進能などを評価する際には、作成した骨欠損が、critical defect であることが必要となるが、今回のモデルが critical defect であることを確認できた。今後、PRP とゼラチン-TCP スポンジを組み合わせたマテリアルなどの素材をこの欠損部に使用することで粗鬆骨(椎体)の骨癒合の経過を評価できる可能性がある。

#### 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)

##### [雑誌論文](計 5 件)

Mizuno K, Ikeda T, Ikoma K, Ishibashi H, Tonomura H, Nagae M, Arai Y, Fujiwara H, Mikami Y, Kubo T. Evaluation of resorption and biocompatibility of collagen hemostats in the spinal epidural space. Spine J, 査読有, 14, 2014, 2141-2149

Horii M, Fujiwara H, Ikeda T, Ueshima K, Ikoma K, Shirai T, Terauchi R, Nagae M, Kuriyama N, Kubo T. Urban versus rural differences in the occurrence of hip fractures in Japan's Kyoto prefecture during 2008-2010: a comparison of femoral neck and trochanteric fractures. BMC Musculoskelet Disord. 査読有 14, 2013, 304.

Mikami Y, Nagae M, Ikeda T, Tonomura H, Fujiwara H, Kubo T. Tubular surgery with the assistance of endoscopic surgery via midline approach for lumbar spinal canal stenosis: a technical note. Eur Spine J. 査読有, 22, 2013, 2105-12.

Kida Y, Morihara T, Matsuda K, Kajikawa Y, Tachiiri H, Iwata Y, Sawamura K, Yoshida A, Oshima Y, Ikeda T, Fujiwara H, Kawata M, Kubo T. Bone marrow-derived cells from the footprint infiltrate into the repaired rotator cuff. J Shoulder Elbow Surg

査読有, 22, 2013, 197-205

Okamoto S, Ikeda T, Sawamura K, Nagae M, Hase H, Mikami Y, Tabata Y, Matsuda K, Kawata M, Kubo T. Positive effect on bone fusion by the combination of platelet-rich plasma and a gelatin-tricalcium phosphate sponge: a study using a posterolateral fusion model of lumbar vertebrae in rats. Tissue Eng Part A. 査読有, 18, 2012, 157-66

##### [学会発表](計 5 件)

池田 巧 知っておきたい痙縮治療、第 25 回日本末梢神経学会、平成 26 年 8 月 30 日、京都

池田 巧 ITB 療法開始後の評価およびフォローアップ、ITB シンポジウム、平成 25 年 1 月 26 日、京都

池田 巧、水野健太郎、石橋秀信、長江将輝、三上靖夫、堀井基行、久保俊一、重度痙縮症例に対する ITB 療法の治療成績、第 86 回日本整形外科学会学術総会、平成 25 年 5 月 24 日、広島

池田 巧、堀井基行、森原 徹、白石裕一、板東秀樹、近藤正樹、武澤信夫、中川正法、久保俊一、ITB 療法による重度痙縮の ADL におよぼす影響の検討、第 50 回日本リハビリテーション医学会学術総会、平成 25 年 6 月 14 日、東京

池田 巧、重度痙縮患者の病態と最新治療 IT、第 85 回日本整形外科学会学術総会、平成 24 年 5 月 20 日、京都

##### [図書](計 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (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

##### (3) 連携研究者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371