

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293339

研究課題名(和文) インフェクションコントロール能を有した短期置換型骨補填剤の創成と実用化への展開

研究課題名(英文) Development and practical application of a short-term replacement bone prosthesis to control infection

研究代表者

田中 雅人 (Tanaka, Masato)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20379754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌薬をリン酸化プルランに含有した新規骨補填材の有用性について検討した。骨補填材からの抗菌薬徐放能を検討し、新規骨補填材では従来の骨補填材と比較し良好な徐放能を示した。また、黄色ブドウ球菌をマウス骨髄内に注入し作成した骨髄炎マウスモデルを用いて検討を行い、従来の骨補填材と比較し有意に強い抗菌作用を認めた。以上より抗菌薬含有リン酸化プルランは感染治療に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the availability of a new bone prosthetic material, which contains an antibacterial agent using phosphorylated-pullulan. Examination was done to measure the sustained release of the antibacterial agent from the bone prosthetic material. The new bone material had greater sustained release abilities compared to conventional bone material. Using an osteomyelitis mouse model, prepared by injecting *S. aureus* into the mouse bone marrow, we found a significant strong antimicrobial effect compared to conventional bone substitute material. These results suggest that phosphorylated-pullulan represents a drug delivery system for bone tissue, which is effective for preventing infections using an antibacterial agent.

研究分野：整形外科

キーワード：リン酸化プルラン 骨髄炎

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来により整形外科手術の件数は増大傾向にある。しかし、高齢の患者や、糖尿病・肝硬変・腎不全・低栄養・悪性腫瘍などの基礎疾患を持つ患者、重症外傷・広範囲熱傷患者、ステロイド・抗癌剤・ステロイド・免疫抑制剤を投与されている患者などの易感染性患者では手術部位感染(surgical site infection: SSI)が問題となっている。SSIには浅層と深層で起こる場合があり特に深層でのSSIは重症となりやすく、整形外科手術の中で深層SSIの発生率は関節鏡手術で0.1~0.5%、人工膝関節全置換術で0.2~3.8%、脊椎インストゥルメンテーション手術で0.6~11.9%との報告がある。重症化すると骨髓炎に進行する場合があります、治療に難渋する。

整形外科手術においては骨セメントを用いる場合が多くあり、中でもポリメタクリレート(Polymethylmethacrylate: PMMA)は多く用いられており、人工関節置換術や骨接合術、骨腫瘍手術、脊椎椎体形成術、筋骨系感染手術において多く用いられている。感染手術においてはPMMAに抗菌薬を含有させその薬剤徐放により感染の沈静化を図る方法が多く用いられているが、PMMAは生体非吸収性の骨補填材であることと、セメント硬化時に熱を生じるため抗菌薬の選択に熱耐性の強いものに限られるのが問題である。

当大学では新しい高機能材料である多糖複合体リン酸化プルラン(図1)を創製して組織再生能に優れ、骨に対し強固に接着する全く新しい骨補填剤の実用化に取り組んでいる。原料であるプルランは多糖の1種であるが水溶性が低いという多糖では稀な性質がある。これは被着体表面への「ぬれ」に影響する上、様々な添加物との混合を容易にするなど原料として不可欠な機能である。このプルランにリン酸基を結合させたことで、陰性荷電したリン酸基が陽性荷電した骨に対し高い接着性を示す。また硬化時に熱を生じることもないため優れたドラッグデリバリーシステムを持った担体として用いることができる。本研究では開発中のリン酸化プルラン骨補填剤に薬剤徐放能を付与することにより、さらなる高機能化と整形外科領域における幅広い用途展開を図ることを目的としている。

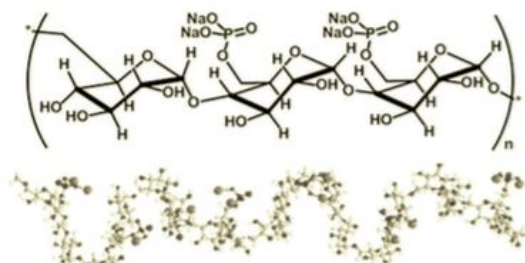


図1：多糖複合体リン酸化プルラン

2. 研究の目的

先端医療機器産業の育成は新成長戦略として政府が進めているが、残念ながら医療研究現場から臨床現場へとつながるものは非常に少ない。そこで岡山大学では開発現場の抱える問題点を考慮し新規生体材料である多糖誘導体リン酸化プルランを創製し多方面にわたる医療用途へ展開してきた。リン酸化プルランは生体接着材やドラッグデリバリーのキャリアとして有効であることが明らかとなっている(国際特許PCT/JP2011/53838)。本材料に関しては、既に口腔用途で先行して実用化が進められている。整形外科用途において高い国際競争力を得るためにも多くの機能を付与する必要が生じ、本研究を企画するに至った。

前述のように整形外科手術における術後感染は骨髓炎に進行した場合、従来のPMMAに抗菌薬を含有させる方法を用いた局所の感染治療では複数回の手術を要し治療に難渋する場合が多く、それに代わる新たな治療法が求められている。

今回、リン酸化プルランに抗菌薬を含有させた新規骨補填材を開発し、従来のPMMAに抗菌薬を含有させた従来の骨補填材を比較検討することで、新規骨補填材の有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1)リン酸化プルランの薬剤徐放能の検討
試作骨補填材の薬剤徐放性を調べるため、リン酸化プルラン40gと抗菌薬ゲンタマイシン0.8gを混和しペース状にした新規骨補填材と、従来のPMMA40gとゲンタマイシン0.8gを混和しペース状にした従来の骨補填材をELISA法を用いて評価した。また、黄色ブドウ球菌を培養した培地上に上記の抗菌薬含有新規骨補填材と従来の抗菌薬含有骨補填材を留置しその抗菌効果を検討した。

(2)in vivoにおけるリン酸化プルランの抗菌効果の検討

in vivoとして発光黄色ブドウ球菌による骨髓炎モデルマウスにおける抗菌薬含有骨補填材の抗菌効果を、発光を感知するin vivo imaging systemで検討した(図2)。

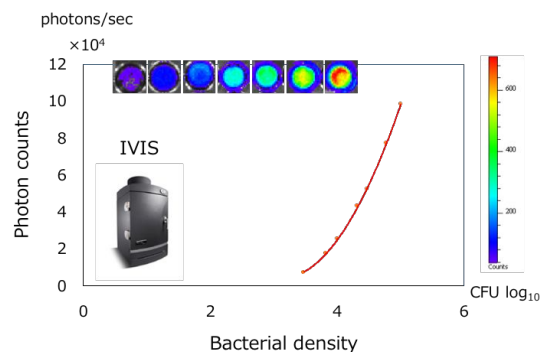


図2：in vivo imaging system(IVIS)を用いた細菌量の測定。細菌密度が大きいほど発光量の増大を示す。

マウス的大腿骨内に発光標識黄色ブドウ球

菌を注入し骨髄炎マウスとした後（図3）、2日目に新規骨補填材と、従来の骨補填材であるPMMAを用いた抗菌薬含有骨補填材をそれぞれマウスの同患部に留置してその後の抗菌効果を比較検討した。また、血清学的評価においては炎症性サイトカインであるIL-1とIL-6を用いて評価した。



図3：マウスの大腿骨内に、発光標識した黄色ブドウ球菌を注入し作成した骨髄炎モデルマウス

4. 研究成果

(1) リン酸化プルランの薬剤徐放能の検討

ELISA法を用いた抗菌薬徐放性の検討では実験開始後7日目まで新規骨補填材群の方が高い薬剤徐放量を認めた（図4）。

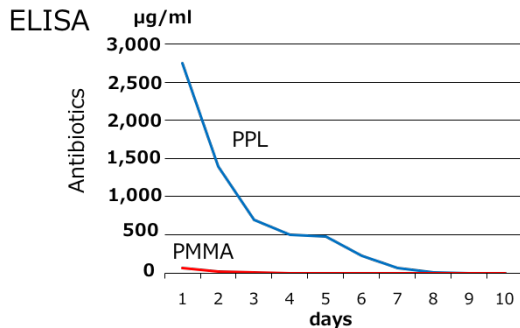


図4：ELISA法を用いた抗菌薬含有新規骨補填材（PPL）と従来の抗菌薬含有骨補填材（PMMA）の薬剤徐放性の比較。新規骨補填材の方が高い薬剤徐放能を認めた。

また、黄色ブドウ球菌を培養した培地上に抗菌薬含有新規骨補填材と従来の抗菌薬含有骨補填材を留置した実験では新規骨補填材の方が高い抗菌作用を認めた（図5）。

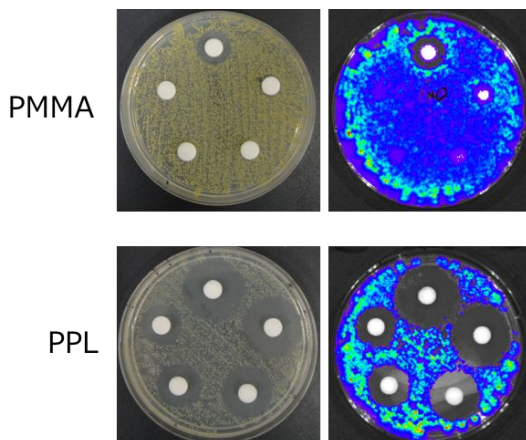


図5：抗菌薬含有新規骨補填材（PPL）と従来の抗菌薬含有骨補填材（PMMA）を黄色ブドウ球菌を培養した培地上に設置し比較検討した抗菌性の比較。新規骨補填材の方が高い抗菌作用を認めた。

(2) in vivoにおけるリン酸化プルランの抗菌効果の検討

骨髄炎モデルマウスにおける抗菌薬含有骨補填材の抗菌効果の検討では、従来の骨補填材であるPMMAを用いた抗菌薬含有骨補填材と比較し、補填材留置後1日目と5日目においてin vivo imaging systemで認める発光量により有意に良好な感染抑制効果を認めた（図6）。

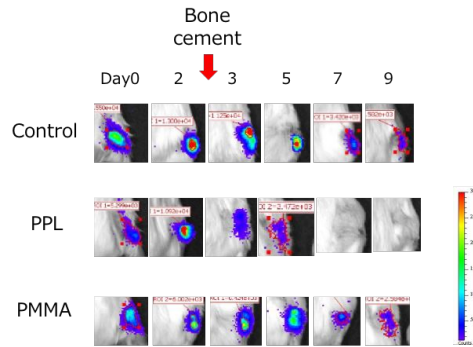


図6：補填材留置後1日目と5日目においてin vivo imaging systemを用いて測定した発光量において、新規骨補填材（PPL）群は従来群（PMMA）群と比較し有意に良好な感染抑制効果を認めた。

血清学的評価においては炎症性サイトカインであるIL-1とIL-6を用いて評価し、骨補填材留置前では血清学的に差を認めなかった骨髄炎マウスに新規骨補填材とPMMA骨補填材をそれぞれ留置し、留置後1週後に評価すると新規骨補填材ではPMMA骨補填材留置群に対してIL-6が低い傾向を認めた（図7）。

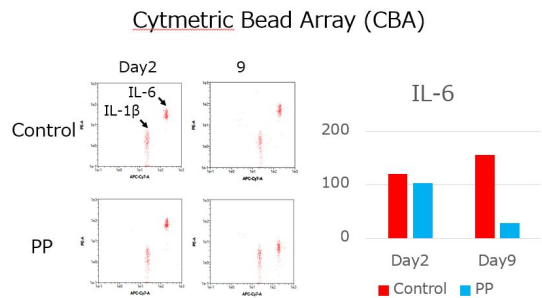


図7：IL-1とIL-6を用いた血清学的評価。留置後1週後に評価すると新規骨補填材ではPMMA骨補填材留置群に対してIL-6が低い傾向を認めた。

本研究においてリン酸化プルランは感染治療において抗菌薬含有セメントとして有用である可能性が示された。

本研究に用いた多糖誘導体であるリン酸

化プルランは申請者らが開発した多糖であるため国内外の他の研究機関が所有していない極めて新規性の高い生体材料である。今回開発を試みた骨セメントはこの多糖誘導体を主成分としており極めて独創性の高い研究開発である。本材は整形外科領域で骨セメントの基材として用いられてきたポリメチルメタクリレート(PMMA)に比べて著しく高い骨への吸着性を有する。このように、本骨セメントは従来の骨セメントに代わる医用材料であり優れたドラッグデリバリー機能を有するため、感染治療への応用など学術的及び臨床的意義も極めて大きい。今後も現在の実験モデルを継続しつつ骨セメントとしてリン酸化プルランがもっとも有効に作用する条件を検討していく予定である。

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)

[雑誌論文](計1件)

Takahata T, Okihara T, Yoshida Y, Yoshihara K, Shiozaki Y, Yoshida A, Yamane K, Watanabe N, Yoshimura M, Nakamura M, Irie M, Van Meerbeek B, Tanaka M, Ozaki T, Matsukawa A. Bone engineering by phosphorylated-pullulan and -TCP composite. Biomed Mater. 20;10(6):065009.2015. doi: 10.1088/1748-6041/10/6/065009.

[学会発表](計5件)

渡邊 典行, 香川 洋平, 張 偉, 吉村 将秀, 吉田 晶, 田中 雅人, 吉田 靖弘, 松川 昭博, 多糖複合体を基材とした感染制御能と生体吸収性を有する抗菌薬含有骨セメントの開発、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、2016年10月13-14日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

香川 洋平, 渡邊 典行, 張 偉, 吉村 将秀, 吉田 晶, 吉田 靖弘, 尾崎 敏文, 松川 昭博、新規生体材料リン酸化プルランによるインプラントコーティング技術の開発、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、2016年10月13-14日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

渡邊 典行, 山根 健太郎, 香川 洋平, 篠原 健介, 張 偉, 吉田 晶, 松川 昭博, 吉田 靖弘, 田中 雅人, 尾崎 敏文、多糖複合体リン酸化プルランを用いた抗菌薬含有骨セメントの開発、第30回日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月22-23日、富山国際会議場(富山県富山市)

Noriyuki Watanabe, Aki Yoshida, Toshifumi Ozaki, Drug delivery system of antibiotics by

phosphorylated pullulan for staphylococcus osteomyelitis, Orthopaedic Research Society Annual meeting 2017, 2017/3/19-2016/3/22, San Diego USA.

Yohei Kagawa, Kentaro Yamane, Kensuke Shinohara, Noriyuki Watanabe, Zhang Wei, Aki Yoshida, Masahide Yoshimura, Yasuhiro Yoshida, Toshihumi Ozaki, Akihiro Matsukawa, New implant coating technology with phosphopullulan bioadhesive materials, Orthopaedic Research Society Annual meeting 2016, 2016/3/5-2016/3/8, Orland USA.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0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0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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

田中 雅人(TANAKA, Masato)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号: 20379754

(2) 研究分担者

尾崎 敏文(OZAKI, Toshifumi)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号: 40294459

沖原 巧(OKIHARA, Takumi)
岡山大学・自然科学研究科・講師
研究者番号: 70243491

渡邊 典之 (WATANABE, Noriyuki)
岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号：80708107

瀧川 朋亨 (TAKIGAWA, Tomoyuki)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：80613166

塩崎 泰之 (SHIOZAKI, Yasuyuki)
岡山大学・大学病院・医員
研究者番号：00596041

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()