

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 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791405

研究課題名（和文）ラット脊椎固定モデルにおけるカーボンナノファイバーの骨誘導能の検討

研究課題名（英文）Enhanced effects of a carbon nanofiber with recombinant human BMP-2 in Rats Spinal Fusion Model

研究代表者

宮崎 正志（Miyazaki Masashi）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30527742

研究成果の概要（和文）：カーボンナノファイバーの骨誘導能の評価及び Bone morphogenetic protein (BMP) の担体としての効果を検討するためにラット脊椎固定モデル、ラット大腿骨骨折モデルを確立した。その結果、カーボンナノファイバーを担体に癒合させた方が骨の癒合、形成が良かった。これより、この組み合わせが、骨癒合を促進させる可能性が示唆され、将来的な臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to investigate the enhanced effect of a carbon nanofiber and recombinant human BMP-2 in a rat spinal fusion model and rat femoral fracture model. The synergic effect of a carbon nanofiber and recombinant human BMP-2 was efficacious for fracture repair and spinal fusion significantly enhanced bone fusion. Our results suggest that this combination facilitates bone healing and has potential clinical application.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：カーボンナノファイバー・骨誘導能・ラット脊椎固定モデル・ラット大腿骨骨折モデル

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域において骨接合術、脊椎固定術は最も頻りに施行されている手技である。しかしながら、様々な治療法の進歩にもかかわらず、いまだ、その骨癒合率は満足できるものではない。偽関節率は 5-43% と報告されている。Bone morphogenetic protein (BMP) は

強力な骨形成能と軟骨形成能、血管新生能を有する蛋白であり、米国においては臨床応用が認められている。しかしながら、BMP はその効果が期待される分、非常に高価であり、また、臨床報告によると、十分な骨癒合を得るためには多量の BMP が必要とされるため、医療費用が問題となる。様々な BMP を用いた

より効果的で安価な方法が模索されている。

2. 研究の目的

ラットモデルも用いて BMP の担体としてカーボンナノファイバーの有効性と安全性を検討することを目的とした。高齢化社会を向かえ骨粗鬆症の患者も増加しており、BMP と Bisphosphonate の相互作用もラット大腿骨骨折モデルを用いて行った。

3. 研究の方法

(1) ラット大腿骨骨折モデルによる BMP と Bisphosphonate の相互効果の検討

まず、BMP と Bisphosphonate の相互作用についてラット大腿骨骨折モデルを用いて検討した。全身麻酔下、58 匹のラット大腿骨モデルを作成する。ラットの大腿外側部を約 4cm 切開し筋膜から進入し大腿骨を展開する。大腿骨をボーンソーにてカットした後、K-wire を髓内釘として骨接合し、筋肉および皮膚を縫合する。58 匹のラットを、Group I, 生食のみ； Group II, 1ug rhBMP-2 のみ； Group III, Zoledronate Acid を投与、Group IV, 1ug rhBMP-2+Zoledronate Acid にわけ評価した。手術 6 週間後に大腿骨を摘出し、徒手骨癒合試験後に、X 線撮影、H.E 染色による病理組織標本作製する。レントゲン像から骨癒合の判定の有無と、さらに病理組織評価を行った。また、マイクロ CT 検査にて新生骨の詳細な検討およびバイオメカニカルテストも施行した。マイクロ CT 検査による評価は骨折部を中心とする 20×10×10mm とし Tissue volume (TV) (組織量)、Bone volume (BV) (骨量)、Bone volume fraction (BV/TV, %) (骨密度)、Trabecular thickness (Tb. Th) (骨梁の厚さ)、Trabecular number (Tb. N) (骨梁の数) Trabecular spacing (Tb. Sp) (骨梁の面積) としバイオメカニカルテストは三点曲げ試験を行い破断強度 Ultimate load (UL) (N)、最大偏位 Maximum displacement (MD) (mm)、剛性 Stiffness (St) (N/mm)、エネルギー吸収量 Energy absorption (EA) (N.mm) を測定した。組織学的評価は取り出した大腿骨を 40% エタノールで固定、10% decalcifying solution HCl (Cal-Ex) で脱灰し洗浄後、75% エタノールに浸含し骨切り部を縦切し H.E 染色にて組織学的骨融合評価、架橋形成、骨陵の大きさ、細胞浸潤の程度など検討した。

(2) ラット大腿骨骨折モデルによるカーボンナノファイバーの BMP との相互効果の検討

ラット大腿骨骨折モデルを用いてカーボンナノファイバーの有効性と安全性を検討した。マテリアルを移植し 6 週間後にラットを sacrifice し移植した脊椎や大腿骨を摘出した。徒手骨癒合試験後に、X 線撮影し、H.E 染色による病理組織標本作製した。また、マイクロ CT 検査やレントゲン像から骨癒合の判定の有無と、さらに病理組織標本から組織学的骨融合評価、架橋形成、骨陵の大きさ、細胞浸潤の程度など検討した。マイクロ CT 検査にて新生骨の詳細な検討を行った。

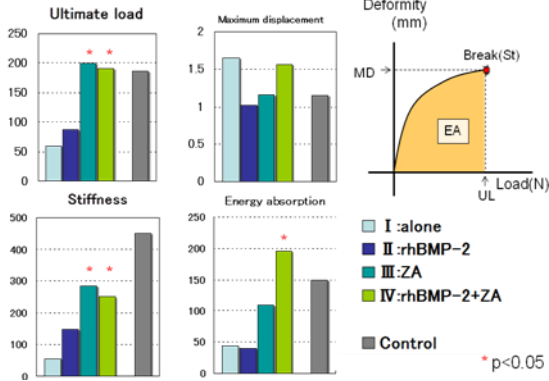
4. 研究成果

(1) ラット大腿骨骨折モデルにおいて徒手骨癒合試験の結果は Group I, 生食のみは 28.6%； Group II, 1ug rhBMP-2 のみは 53.3%； Group III, Zoledronate Acid を投与は 57.1%； Group IV, 1ug rhBMP-2+Zoledronate Acid を投与は 93.3% と Group IV が著明に他の Group と比較して高かった。軟線レントゲン撮影による評価は 3 検者による盲検法にて施行し 4 面にて骨癒合を評価した。その結果も Group I, 1.07； Group II, 2.47； Group III, 2.50； Group IV, 3.67 と Group IV が著明に他の Group と比較して高かった。

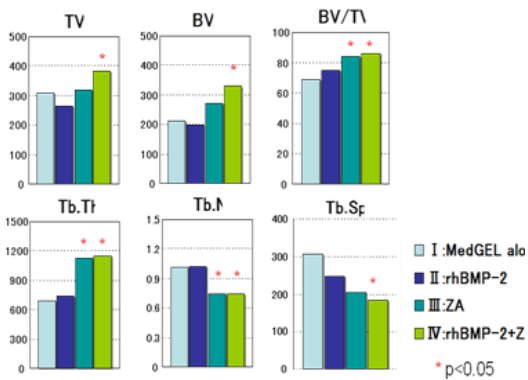
マイクロ CT による解析では TV、BV、BV/TV、Tb. Th とともに Group IV が著明に他の Group と比較して高かった。

バイオメカニカルテストは Ultimate load、Stiffness、Energy absorption にて Group IV が著明に他の Group と比較して高かった。組織学的評価においては Group I では新生骨は見られず線維組織のひろがり Fibrous Tissue (FT) が非癒合部に多く認められる。Group II では軟骨組織 Cartilaginous Tissue (CT) が骨折部に広がっているが成熟骨は形成されていない。Group III では広がった軟骨組織 Cartilaginous tissue (CT) が癒合し、未熟な骨 Immature Bone (IB) が骨折部に形成されていた。Group IV では骨折部に新生骨が形成され、成熟類骨 Mature Osteoid Tissue (MOT)、骨梁形成 Trabeculae Contracts (TC)、骨髓腔形成 Bone Marrow Cavities (BMC) が認められた。

力学的解析

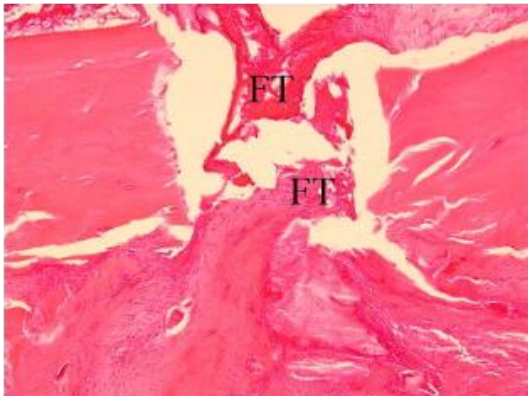


Micro-CT analysis

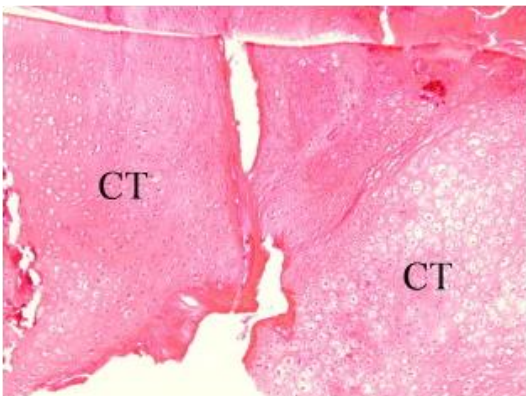


病理組織学的評価

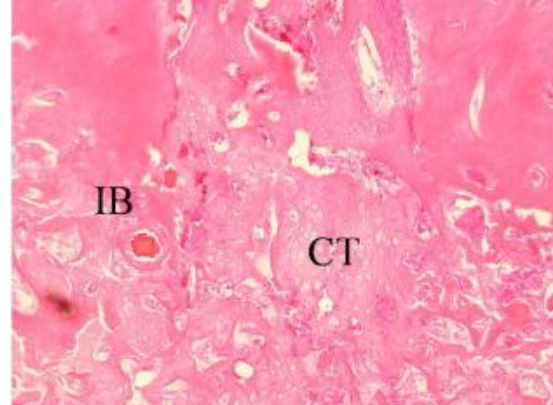
Group I (x100)



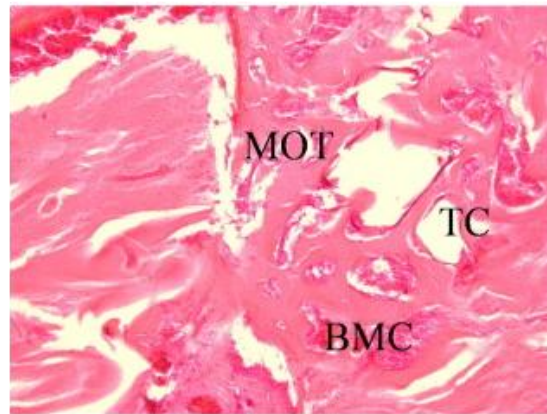
Group II (x100)



Group III (x100)



Group IV (x100)



(2) ラット大腿骨骨折モデルにおいて徒手骨癒合試験の結果は 1ugBMP のみの骨癒合率が 46.7%であったのに対し 1ugBMP にカーボンナノファイバーを加えたものは 73.3%と著明に増加した。レントゲンによる骨癒合判定点数も 1ugBMP にカーボンナノファイバーを加えたものの方において点数が高かった。H.E 染色による病理組織にては 1ugBMP にカーボンナノファイバーを加えたものに成熟した骨組織が多くみられた。また、マイクロ CT 検査にて新生骨の形成も 1ugBMP にカーボンナノファイバーを加えたものに多く認められた。

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)

①Doi Y, Miyazaki M*, Yoshiiwa T, Hara K, Kataoka M, Tsumura H. Manipulation of the anabolic and catabolic responses with BMP-2 and zoledronic acid in a rat femoral fracture model. Bone. 49, 2011, 777-782.

[学会発表] (計 0 件)

[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

<http://www.med.oita-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 正志 (Miyazaki Masashi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30527742