

機関番号：基盤研究 (C)

研究種目：15401

研究期間：2008～2010

課題番号：20591759

研究課題名 (和文) 多血小板血漿を用いた細胞増殖因子の標的治療による骨再生

研究課題名 (英文) Targeted delivery of magnetic liposome encapsulated platelet rich plasma for bone formation in a rat bone-defect model

研究代表者

下瀬 省二 (SHIMOSE SHOUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30304439

研究成果の概要 (和文)：

本研究の目的は多血小板血漿 (PRP) を封入した磁性体リポソームを外磁場装置で人工骨に集積させ、骨の再生誘導を行い、大きな骨欠損を再建することである。ラットの大腿骨骨幹部に5mmの骨欠損を作製し、骨欠損部に多孔体連通孔性ハイドロキシアパタイトセラミックスを充填し固定した。PRP局注、PRP封入磁性体リポソーム局注単独、PRP封入磁性体リポソーム局注および外磁場併用の3治療群を作製した。PRP局注群では人工骨単独群と比較してX線、組織学的にも良好な骨形成を認めた。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study is to reconstruct a large bone defect by collecting Platelet rich plasma PRP encapsulated magnetic liposomes to the artificial bone with use of the external magnetic force and promoting bone formation and bone induction.

A critical sized segmental bone defect (5mm) was created in the mid-part of the femoral shaft in a rat. An interconnected porous hydroxyapatite ceramic was intercalated in the bone defect and fixed by a 1.2 mm kirschner-wire. There were three treatment groups, PRP only, PRP encapsulated magnetic liposomes only, and PRP encapsulated magnetic liposomes with external magnetic force. In the PRP group, new bone formation was well recognized radiologically and histologically than the non-PRP group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：磁性体リポソーム・多血小板血漿・人工骨・細胞増殖因子・骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 大きな骨欠損の再生の必要性について

癌に対する集学的治療の進歩により骨転移が生じた癌患者の生命予後も飛躍的に改

善した。癌患者の寿命が延びた今日、生活の質の維持、向上が重要な課題であり、転移した癌の完全切除とその際に生じる高度な骨欠損の再建が必要不可欠となっている。癌の転移は長管骨の骨幹部に起きやすく、完全に切除すれば大きな骨欠損を生じることが多い。中高年が中心の癌患者では骨形成能の低下あるいは血流不良などのため、若年者に行なわれている骨延長あるいは血管柄付き骨移植などの方法では骨再生、骨癒合が期待できない。したがって、多くの癌患者にも適応できる、侵襲の少ない、より確実な再建方法の開発が急務となっている。

## (2) 用いる材料の状況

①塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) や骨形成因子 (BMP) などの細胞増殖因子の生体内半減期は極めて短く、拡散もしくは蛋白質分解酵素により分解され速やかに消失する。したがって、効果的な骨の再生誘導には高濃度の細胞増殖因子水溶液が必要であるが、大量投与では正常組織に対する副作用が問題となる。細胞増殖因子を目的領域に一定時間保持あるいは複数回投与することができれば、効果的な再生誘導ができ、しかも副作用の軽減につながると考えられる。

②我々は、磁性体リポソームを担体とし、磁力で薬剤を標的に誘導するドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発し、腫瘍、軟骨欠損、骨欠損などに対する標的治療の有用性を証明してきた。外磁場装置を利用すれば一定時間、任意の回数で細胞増殖因子を標的部位に集積させることができる。

③多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) は血小板由来の細胞増殖因子を豊富に含み、骨形成を促進することがわかってきた。自家組織であるため感染や免疫反応の危険性が少なく、細胞増殖因子の供給源として容易に臨床応用可能であり、これまで我々も PRP を用いて血管新生、骨形成を確認してきた。

④本研究に用いる人工骨は三次元連通多孔体構造で気孔率が高く、気孔間連通部径が大きいいため、骨形成細胞、生理活性物質、栄養血管などの生体組織が中心部の気孔に侵入しやすいという骨再生の補助能力を持つ、ハイドロキシアパタイト製骨補填材である。骨欠損部に充填することにより骨再生の促進が期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は標的治療で細胞増殖因子を人工骨に集積させ、骨の再生誘導を行い、大きな骨欠損を再建することである。

(2) 我々がこれまで行なってきた磁性体リポソームによる標的治療と細胞増殖因子を豊富に含む多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を組み合わせ、大きな骨欠損に対する骨の再生誘導を行う。

(3) 外磁場装置を用い、磁性体リポソームに封入した多血小板血漿を人工骨に集積させて骨の再生誘導を行い、さらに磁力作用時間、投与回数などを変えて最適な条件を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 多血小板血漿 (PRP) 封入磁性体リポソームの作製

Phosphatidylcholine (PC) 26  $\mu$  mol、コレステロール 26  $\mu$  mol を 3ml のジエチルエーテルで溶解。エバポレーターで完全に有機溶媒を除去し、リン脂質膜を作製。PRP の溶液およびマグネタイト顆粒 10mg でリン脂質膜を溶解後、ボルテックスミキサーで 10 分間攪拌。ソニケーターで 60 分間超音波処理しリポソームを作製する。

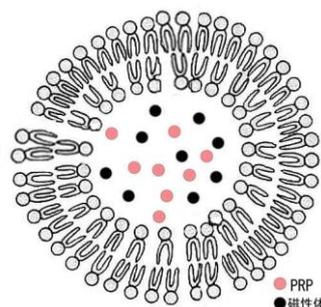


図 1. PRP 封入磁性体リポソーム

(2) 大腿骨骨幹部骨欠損ラットの作製

10 週齢、雄の Wister rat を使用した。大腿骨骨幹部に 5mm の骨欠損を作製し、同部に人工骨を移植し K-wire を用いて髓内釘固定を行った。

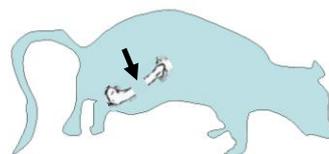


図 2. ラットの大腿骨骨幹部の骨欠損

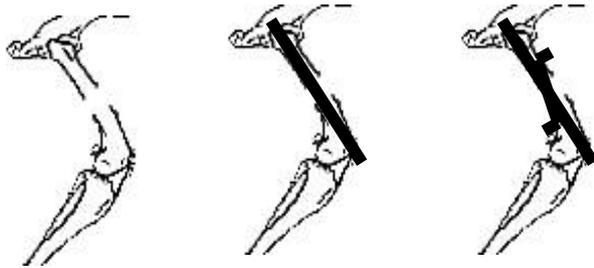


図3. 骨欠損モデルの作製

大腿骨骨幹部に5mm骨欠損を作製し、1.2mmK-wireで髓内固定し、骨欠損ラットを作製した

(3) 骨欠損部人工骨充填ラットの作製

人工骨として多孔体連通孔性ハイドロキシアパタイトセラミックス（ネオボーン）を用いた。その中心に直径1.2mmの貫通孔を作製し、表面を円柱状に加工し使用した。

大腿骨骨幹部の骨欠損に加工したネオボーンを挿入し、1.2mmKirschner-wireで髓内釘固定し骨欠損部人工骨充填ラットを作製した。

(4) 骨欠損に対する骨再生治療

骨欠損に対する治療群として以下の3群を作製した。

- ①人工骨充填のみ
- ②人工骨充填およびPRP投与
- ③人工骨充填およびPRP封入磁性体リポソーム投与（60分間外磁場装置を作用）

コントロールとして5mmの骨欠損を1.2mmK-wireで髓内固定するのみの群と磁場なしで骨欠損部に人工骨充填およびPRP封入磁性体リポソーム投与した群を作製した。

(5) 骨再生の評価

①単純X線による骨形成の評価

X線撮影は術直後および術後1, 3, 6, 9週後に行い、仮骨の形成、骨の再生を評価した。

②組織学的分析

術後9週で大腿骨を摘出し組織学的評価を行った。摘出した標本をトルイジンブルーで染色し組織学的に骨形成を評価した。

③力学的評価

トルク計測器で力学的強度を評価した。

4. 研究成果

(1) PRP封入磁性体リポソームの作製

逆相蒸発法により、Phosphatidylcholine (PC)とコレステロールでリン脂質膜を作製し、多血小板血漿溶液およびマグネタイト顆粒を封入することで多血小板血漿 (PRP) 封入磁性体リポソームを作製した。

(2) 骨欠損モデルラットの作製

10週齢、雄のWistar ratを使用し、大腿骨骨幹部に5mmの骨欠損を作製した。1.2mmKirschner-wireを髓内釘として挿入、近位骨片と遠位骨片を架橋固定し骨欠損ラットを作製した。作製した骨欠損ラットは無治療の場合、架橋形成が見られないことを確認した。

(3) 骨欠損に対する骨再生治療

骨欠損部に①人工骨充填、②人工骨充填およびPRP局注、③人工骨およびPRP封入磁性体リポソーム局注（外磁場併用）の3治療群を作製した。人工骨は多孔性連通孔ハイドロキシアパタイト（ネオボーン）を使用した。その中心に直径1.2mmの貫通孔を作製後、円柱状に加工し挿入した。磁力によるターゲティング効果のコントロールとして外磁場を使用しない群を作製した。

人工骨充填単独群と人工骨にPRPを局注した群で骨の再生を比較検討した。

人工骨とPRP局注群では人工骨単独群に比べX線、組織学的に良好な骨形成を認めた。人工骨とPRP局注群では骨形成は術後6週より見られる傾向があった。組織学的評価では人工骨とPRP局注群で人工骨表面に骨形成を認めた。PRPは有効な細胞増殖因子の供給源と考えられた。

人工骨およびPRP局注群の単純X線所見



図4. 治療後1週間ではほとんど変化は見られなかった

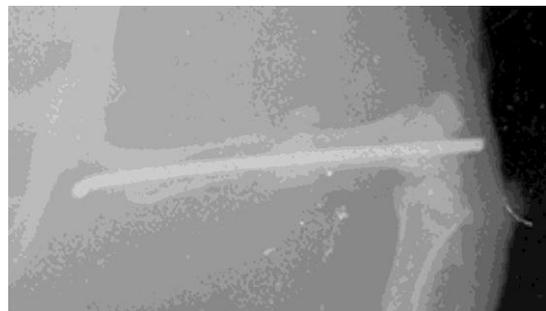


図5. 治療後3週間では徐々に仮骨形成を認める

現在、人工骨充填および PRP 封入磁性体リポソームの局所投与のみの群と人工骨充填および PRP 封入磁性体リポソームの局所投与に外磁場で磁力を 60 分間作用させる群で骨の再生を比較検討し、外磁場による標的治療の効果を検討中である。

多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) は血小板由来の細胞増殖因子を豊富に含み、骨形成を促進することが確認された。PRP は一般臨床の場合においても採取が容易であり、細胞増殖因子の貴重な供給源となりえろと考えられた。一方、三次元連通多孔体構造の人工骨であるネオボーンは気孔率が高く、気孔間連通部径が大きいいため、骨形成細胞、生理活性物質、栄養血管などの生体組織が中心部の気孔に侵入しやすいという骨再生にとって有利な構造を有している。PRP とネオボーンの併用は効果的な骨誘導、骨形成をもたらすと考えられた。

外磁場装置による PRP 封入磁性体リポソームの集積は、外磁場をかける方向により集積部位が異なってくるため、最適な方向、部位を模索中である。その集積効果については実証済みであり、良好な結果が得られるものと思われるが、今後も検討していく必要があると考える。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

下瀬 省二 (SHIMOSE SHOUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30304439

##### (2) 研究分担者

久保 忠彦 (KUBO TADAHIKO)

広島大学・病院・講師

研究者番号：70397959

松尾 俊宏 (MATSUO TOSHIHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：90397977

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・病院・教授

研究者番号：70177244

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：