

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791643

研究課題名(和文) 新規骨接着型生体吸収性材料リン酸化プルランを用いた新しい骨折治療法の検討

研究課題名(英文) New fracture treatment using phosphorylated pullulan bioadhesive for hard-tissue reconstruction

研究代表者

杉本 佳久 (Sugimoto, Yoshihisa)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80423309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した硬組織接着性多糖誘導体リン酸化プルランを用い、生体親和性が高く、かつ骨に対し強固に接着する生体吸収性骨セメントを創製した。本研究の目的は、動物モデルを用いて骨折治療におけるリン酸化プルランの有用性を検討することである。骨折モデルとしてウサギ尺骨欠損モデルを用いて評価を行った。欠損部にリン酸化プルランを充填することで同部位の優れた骨再生を認めた。本研究によってリン酸化プルランの骨折治療への新たな可能性が実証された。

研究成果の概要(英文)：We newly created phosphorylated pullulan bioadhesive for hard-tissue reconstruction. The purpose of this study was to investigate the effect of this material for bone reconstruction. In vivo experiments using rabbit ulnar bone defect model, phosphorylated pullulan filled with defect site replaced new bone quickly. This study suggests that phosphorylated pullulan has a new potentiality for the therapy of fracture.

研究分野：バイオテクノロジー

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：骨再生

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来，スポーツ人口の増加により，骨・関節をはじめとする運動器疾患は大きな問題となっている．中でも，骨粗鬆症に基づく骨折は患者数も多く，治療に長期の臥床を要したり，骨癒合不全，偽関節などを生じたりすると寝たきりになることがあり，患者の ADL が大きく低下する一因である．一般に骨折の治療はギプス等の固定具を用いた保存的治療と主に金属製のインプラントを用いた手術的治療に分けられる．保存的治療は患者にとって低侵襲であるが，変形治療や長期の固定による関節の可動域障害などを来すことがある．また荷重骨に対しては免荷が必要になることも多く，高齢者では筋力低下が急速に進み，たとえ骨癒合が得られても寝たきりになることが多い．

一方，手術的治療は骨折部の整復および強固な内固定を可能とし，早期にリハビリを開始できるという利点があるが，麻酔や手術による侵襲があり，少なからず危険を伴う治療法である．さらに保存的治療，手術的治療いずれを選択した場合でも骨粗鬆症が進んだ骨では骨癒合が得られず，偽関節を生じることもある．これら両者の欠点を補うべく，比較的 low 侵襲かつ強固な内固定が得られる新たな治療法の開発が望まれている．

2. 研究の目的

独自に開発した硬組織接着性多糖誘導体リン酸化プルラン(PP)を用い，生体親和性が高く，かつ骨に対し強固に接着する生体吸収性骨セメントを創製した．これまでの研究でリン酸化プルランは骨の主成分であるヒドロキシアパタイトに対し，優れた接着性を示し，種々のリン酸カルシウムと組み合わせることで骨形成を促進することが分かった．本研究では動物モデルを用いて骨折治療におけるリン酸化プルランの有用性を検討することを目的とする．

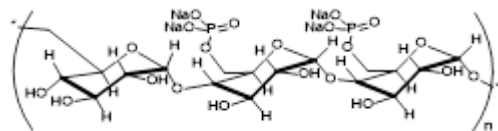


図 1：リン酸化プルランの構造式

3. 研究の方法

(1) 成長因子徐放能の検討

成長因子を含有させたリン酸化プルランをビーズ状に成型し，PBS バッファーに浸漬す

る．成長因子としては BMP-2 を用いる．PBS に浸漬した後より Day1, day3, day5 でそれぞれ PBS を回収し，徐放された成長因子の量を ELISA 法を用いて測定する．リン酸三カルシウム(TCP)とポリメタクリル酸メチル(PMMA)骨セメントと比較する．

(2) 動物モデルを用いた骨癒合促進能の検討 骨接合材として以下のものを用意した．

1. リン酸化プルラン(図 2)
2. リン酸化プルランと BMP-2 の混和物
3. リン酸三カルシウム(TCP)



図 2：リン酸化プルラン

ラット骨折創外固定モデルにおけるリン酸化プルランの有用性の検討

ラット用創外固定器を使用して大腿骨幹部を約 1 cm 骨切りし，大腿骨近位部と遠位部に 1.0mm のキルシュナー鋼線を挿入して大腿骨を固定した(図 3)．1 週，2 週，3 週，4 週，8 週および 12 週後の骨癒合を評価する．骨接合材を用いない骨折モデルと比較する．



図 3：ラット骨折創外固定モデル

ウサギ尺骨欠損モデルにおけるリン酸化プルランの有用性の検討

ウサギ尺骨欠損部(10mm)(図 4)に上記骨接合剤を充填し，閉創する．4 週，および 8 週後の骨形成量を評価する．骨接合材を用いない骨欠損モデルと比較する．評価方法として， μ CT を用いた骨欠損部の画像的評価と組織学的評価を行った．

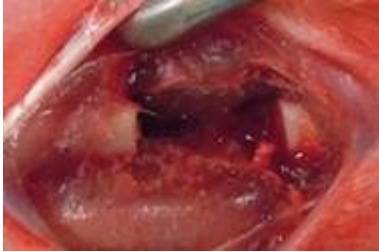
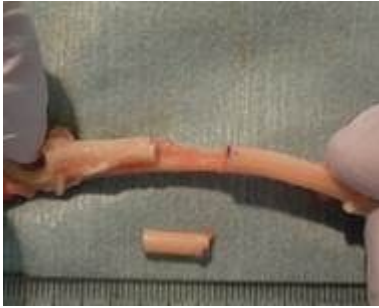


図4：ウサギ尺骨欠損モデル

4. 研究成果

(1) リン酸化プルランの成長因子徐放能

リン酸化プルランに含有させたBMP-2は、TCP、PMMA骨セメントと比較しday1、day3、day5それぞれにおいてより高い徐放能を認めた(図5)。PMMA骨セメントは硬化時に高熱を発生するために成長因子の変性を促進する可能性があるが、リン酸化プルランは熱を発生せずに硬化し、成長因子を効率的に徐放することが可能である。

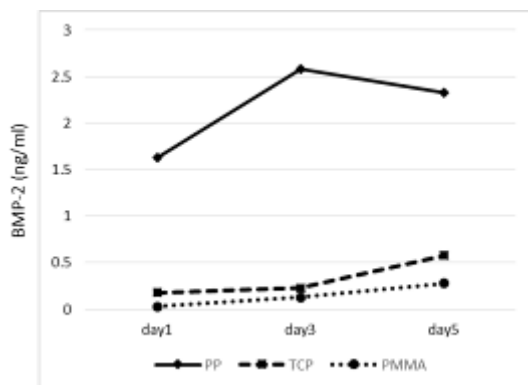


図5：BMP-2徐放量

(2) ラット骨折創外固定モデル

骨欠損のみ(コントロール)のモデルでは4週間経過観察した後に、大腿骨骨欠損部をmicro-CTで撮影し欠損が残存していることを確認した。しかし、インプラントの早期ゆる

みなどが生じ、動物モデルが安定しなかった。そのため骨折部の適切な評価を行うことができず、ウサギ尺骨欠損モデルを用いて評価を行った。

(3) ウサギ尺骨欠損モデル

μCTを用いた評価

リン酸化プルラン充填群では4週後に骨欠損部の骨化を認め、8週後には同部位のリモデリングを認めた。リン酸化プルランにBMP-2を併用した群ではより旺盛な骨化を認めた。TCP群ではTCPは8週後においても吸収されず残存し、骨置換は完了していなかった。既製のTCPは骨置換までに長期間を要するが、リン酸化プルランは早期に分解され新生骨に置換されることが示された。(図6)

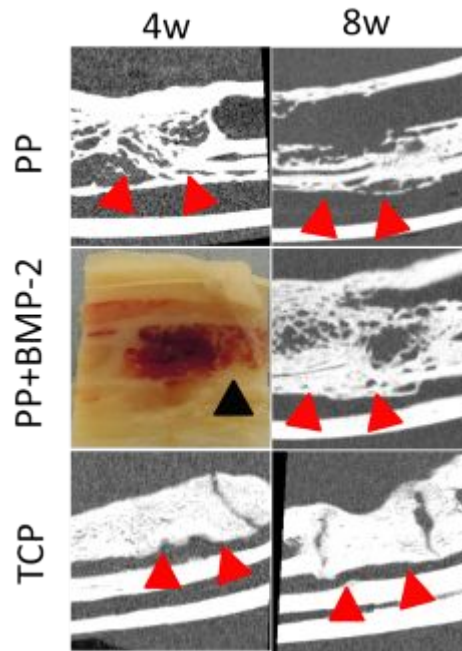


図6

組織学的評価

リン酸化プルラン充填群では、4週でサフラニンO染色において染色される肥大化軟骨細胞様組織を認め、内軟骨性骨化を認めた。8週で成熟骨に置換されていた。リン酸化プルランにBMP-2を併用した群では、より良好な骨形成を認めた。TCP群はμCTの結果が示したように組織学的にも8週後にTCPは吸収されず残存していた。欠損群では、8週でサフラニンO染色において染色される肥大化軟骨細胞様組織を認めたことから、リン酸化プルランは通常よりもより早期に骨置換が得られる可能性が示唆された。(図7)

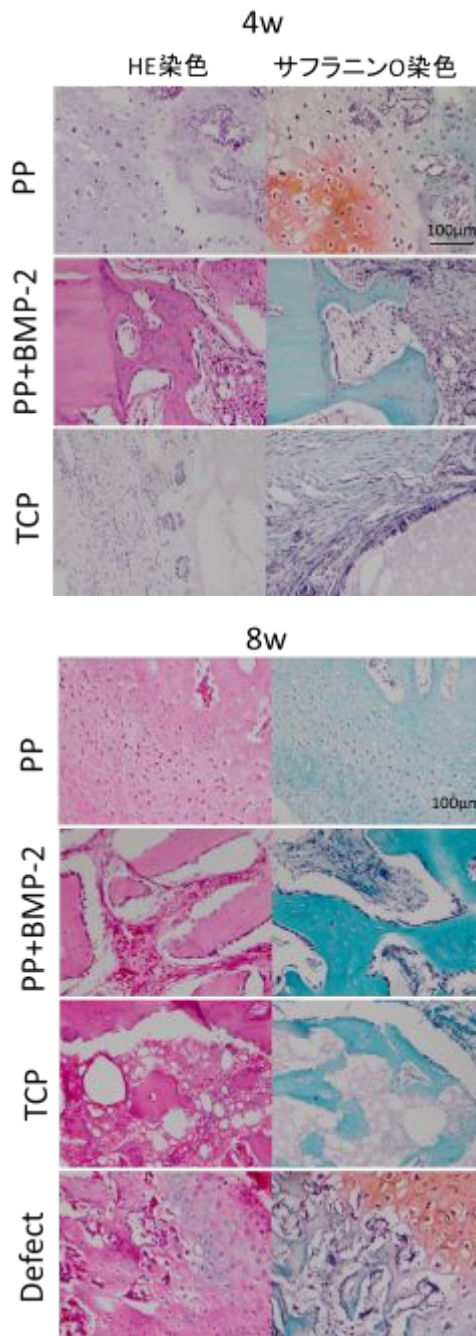


図7

本研究では、リン酸化プルランの優れた骨再生効果と成長因子との相乗効果を動物実験にて実証した。ラット骨折創外固定モデルでは創外固定器具のゆるみによる骨折部の強固な固定が行えず、適切な評価を行うまでには至らなかった。優れた骨折部の固定が実現できれば、理論的にはウサギ尺骨欠損部モデルと同等の効果が期待できると思われる。ウサギ尺骨欠損モデルでは、リン酸化プルランの骨再生能を実証することができた。リン

酸化プルランを用いた骨折治療は今後の臨床応用に向けて新たな可能性を示した。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山根健太郎, 杉本佳久
ウサギ尺骨骨欠損モデルを用いたリン酸化プルランの骨再生能の検討
第27回日本整形外科学会基礎学術集会
2012年10月27日
名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

杉本 佳久 (SUGIMOTO YOSHIHISA)
岡山大学・大学病院・助教 研究者番号：
80423309