

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10404

研究課題名(和文)優れた骨結合能を有する高分子ポリマー脊椎インプラントの開発

研究課題名(英文) Development of high molecular polymeric spinal implant with excellent bone binding capacity

研究代表者

大槻 文悟(Otsuki, Bungo)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30646766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PEEK素材に材料特性を変化させずに酸化チタンをコーティング技術を開発し、その有用性について、in vivoおよびin vitroで検証した。前処理として酸化チタンのブラスト処理、そしてSol-gel法による酸化チタンコーティングを用いて作成したインプラントは、擬似体液でのハイドロキシアパタイトの析出や、骨髄幹細胞の骨分化への促進に優れた表面構造を有していた。また兔をもちいた動物実験では、優れた骨組織との結合を認め、引張り試験にて有意にコントロール群と比較して強い引張り強度を有していた。ビーグル犬をもちいた頸椎前方固定モデルでも、優れた骨癒合率を認め、臨床応用可能な材料であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel TiO<sub>2</sub> coating technology on PEEK surface without changing the material properties of PEEK and verified its usefulness in vivo and in vitro study. Implants prepared using TiO<sub>2</sub> blasting as a pretreatment and TiO<sub>2</sub> coating by the Sol-gel method have superior surface structures for precipitation of hydroxyapatite in simulated body fluids and promotion of bone marrow stem cells into osteogenic differentiation. In animal experiments using rabbits, the material showed better binding ability with bone tissue than that of control group, and the mechanical tensile test had a stronger tensile strength compared with the control group. We also clarified the superiority of the material using anterior cervical fusion model of beagle dogs with higher union rate than that of control material.

研究分野：整形外科

キーワード：PEEK 表面処理 酸化チタン コーティング

### 1. 研究開始当初の背景

チタン金属は特に表面処理を施すことにより、生物学的活性が高くなり、古くより脊椎インプラントに使用されてきたが、骨との弾性率の違いから、ストレスシールディングやケージの沈み込みなどの問題点があった。一方 PEEK(ポリエーテルエーテルケトン)は皮質骨と弾性率が近いことから脊椎外科分野の椎体間ケージの材料として広まってきているが、表面に生物学的活性が乏しく、骨との化学的結合が生じないため、骨組織に用いる材料としての特性に難があった。PEEK 表面に生物学的活性を付与する研究は幾つかされており、ハイドロキシアパタイトや酸化チタンをコーティングする技術の発表はすでに存在したが、コーティング層が厚くなりすぎることや、高熱を必要とすることから PEEK の変形や特性の変化といった欠点があった。

### 2. 研究の目的

PEEK の弾性特性を変化させない酸化チタンコーティングの技術を中部大学との共同研究で開発した。またこの方法は、酸化チタン層が非常に薄く作成でき、PEEK 素材の力学的特性を失わない性質を持っている。本研究の目的はこのチタンコーティング技術の有用性を実験動物を用い in vitro, in vivo で検討することである

### 3. 研究の方法

4 種類のチタンコーティング技術と表面処理の組み合わせとコントロールとして表面処理なし PEEK 材料を以下の方法で評価した。

PEEK implants	Pretreatment	Sol-gel TiO <sub>2</sub> coating	Acid (HCl) post-treatment
Uncoated	-	-	-
OS	O <sub>2</sub> plasma	+	-
OSH	O <sub>2</sub> plasma	+	+
BH	Sandblast	-	+
BSH	Sandblast	+	+

#### (1) in vitro における材料特性における研究

SBF (人口体液) 浸漬によるアパタイト系性能

日本白色家兔大腿骨の骨髄幹細胞をもちいた細胞毒性および骨分化能に関する評価

材料特性に関する評価

#### (2) 日本白色家兔をもちいた評価

PEEK をプレート状に加工したのものを作成し、日本白色家兔の脛骨骨内に移植し、一定

期間後に採取したものを評価した。評価は以下のように行った。

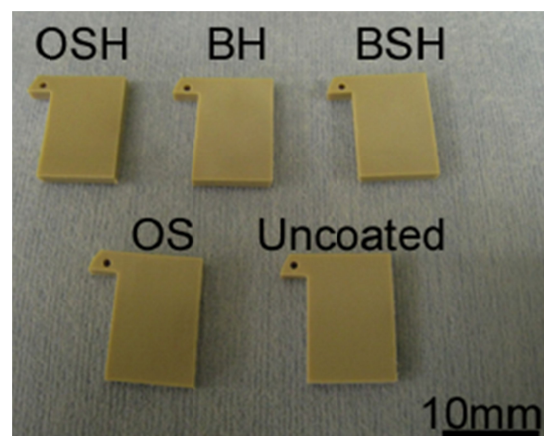
- マイクロ CT による画像的評価
- 引張り試験による骨結合能の評価
- 硬組織標本をもちいた組織学的評価

#### (3) ビーグル犬をもちいた頸椎前方固定モデルの作成

- 独自に作成した椎体間ケージをもちいたモデル動物の作成
- 表面処理ありなしでの骨癒合率や組織学的浄化

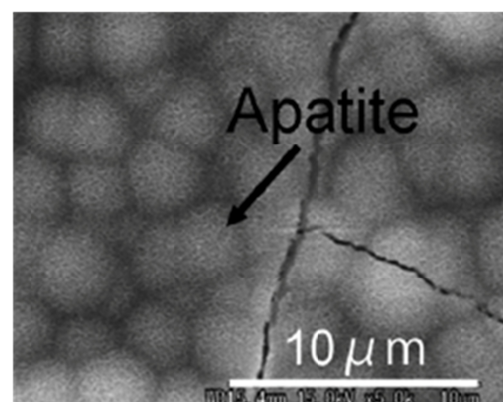
### 4. 研究成果

材料は下処理としての O<sub>2</sub> plasma 処理または酸化チタンの Sandblast 処理のありなし、そして Sol-Gel 酸化チタンコーティングのありなし、表面の酸処理のありなしで 5 種類に材料を作成した。



#### (1) in vitro の研究

SBF への浸漬によって OSH, BH, BSH に旺盛なアパタイトの形成がみられたが、コーティングなしや OS 群では形成がみられなかった。このことから OSH, BH, BSH 群で骨結合能が高いことが予測された。

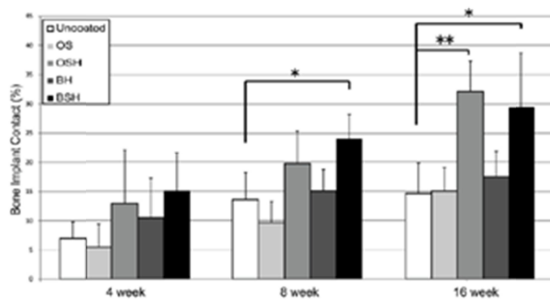


骨髄幹細胞は日本白色家兎より抽出した。多分化能に関してはフローサイトメトリーを用いて確認した。具体的には CD34, 45, 73, 90 が陰性であり、CD105 陽性であることを確認している。細胞を材料表面で培養した結果、uncoated の材料以外への接着能力が高い可能性がアクチン染色による細胞形態から確認された。Cell viability は OSH 群で高い結果となったが、どの群間でも大きな差は認めず、材料表面の細胞毒性は認めなかった。また分化培地をもちいた骨組織への分化誘導において、BH, BSH 群でアルカリフォスファターゼ活性やカルシウム沈着量が有意に高くなり、RNA を用いた発現解析でも ALP, BMP2 の発現が上昇しており BH, BSH 群の表面で、骨髄細胞から骨細胞方向への分化が促進されていることが示された。Col-1 遺伝子の発現量は各材料間で有意な差は認めなかった。

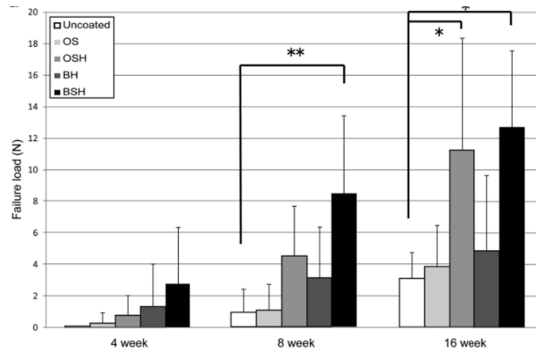
材料表面特性は OSH, BH, BSH 群で Zeta 電位が陽性となり、濡れ性が低下しており、細胞接着に適していると考えられた。材料の Roughness はいずれも 0.13(Ra)程度で大きな差は認めなかった。

(2) 日本白色家兎を用いた in vivo 研究

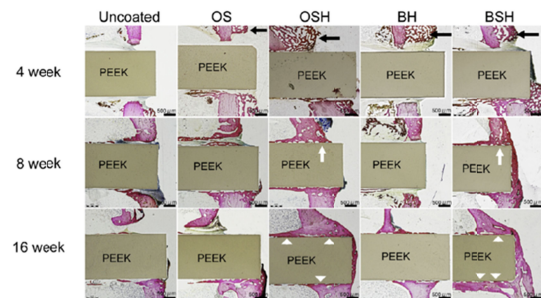
マイクロ CT を用いた評価では 4 週の時点では各群間に差は認めなかったが、8 週で Uncoated 群と BSH 間で、16 週では OSH, BSH 群が Uncoated 群と比べて材料表面への新生骨の形成が有意に高い結果となった。



引張り試験では新生骨形成と同様に 4 週では Failure load に差は認めなかったものの、8 週、16 週とたつにつれ、特に OSH, BSH 群で特に高い引張り強度を確認できた。

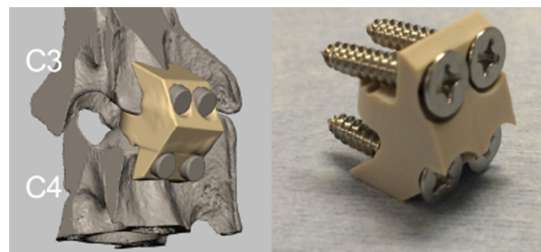


硬組織標本でも材料と骨組織の直接的な結合が OSH, BSH 群で観察された。

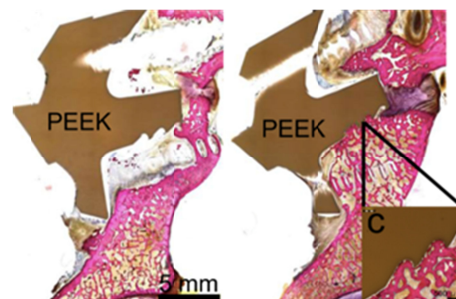


(3) ビーグル犬を用いた in vivo 研究

図のようなケージを CAD を用いて作成し使用した。



術後 3 ヶ月の時点で、サンドブラスト、sol-gel 法によるチタンコーティングありのケージと処理なしのケージで比較したところ、コーティングなし群では 1 例も骨癒合しなかったが (n = 5, 下図左)、コーティング群では 60%(3/5)で骨癒合がみられ (下図右)、組織学的評価で材料と骨との癒合が認められた。



## 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2件)

Shimizu T, Fujibayashi S, Yamaguchi S, Otsuki B, Okuzu Y, Matsushita T, Kokubo T, Matsuda S. In vivo experimental study of anterior cervical fusion using bioactive polyetheretherketone in a canine model. PLoS One. 査読あり 2017 Sep 8;12(9):e0184495.doi:10.1371/journal.pone.0184495.

Shimizu T, Fujibayashi S, Yamaguchi S, Yamamoto K, Otsuki B, Takemoto M, Tsukanaka M, Kizuki T, Matsushita T, Kokubo T, Matsuda S. Bioactivity of sol-gel-derived TiO<sub>2</sub> coating on polyetheretherketone: In vitro and in vivo studies. Acta Biomater. 査読あり 2016 Apr 15;35:305-17.doi:10.1016/j.actbio.2016.02.007. Epub 2016 Feb 6.

〔学会発表〕(計2件)

清水孝彬、藤林俊介、山口誠二、大槻文悟、松下富春、小久保正、松田秀一. Sol-gel 法で TiO<sub>2</sub> コーティングした PEEK のイヌ頸椎前方固定モデルにおける生体活性評価. 第 46 回日本脊椎脊髄病学会. 2017. 4.13-15. 札幌

Shimizu T, Fujibayashi S, Otsuki B, Yamaguchi S, Kokubo T, Matsuda S. Bioactivity of Sol-gel Derived TiO<sub>2</sub> Coating on Polyetheretherketone -. The Orthopedic Research Society Annual Meeting, FL, USA, Mar 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 文悟 (OTSUKI, Bungo)  
京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 30646766

(2)研究分担者

藤林 俊介 (FUJIBAYASHI, Shunsuke)  
京都大学・大学院医学研究科・特定教授  
研究者番号： 30362502

(3)連携研究者

山口 誠二 (YAMAGUCHI, Seiji)  
中部大学・生命健康科学部・講師  
研究者番号： 50726198