

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500407

研究課題名（和文） 生体活性チタン材料の高機能型運動器再建医療への応用

研究課題名（英文） Application of bioactive titanium for high performance orthopedic reconstruction surgery

研究代表者

竹本 充 (TAKEMOTO MITSURU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00456873

研究成果の概要（和文）：

本研究では、生体活性処理チタン製インプラントに軟部組織結合能を付与することで高機能の運動器再建を可能にする技術を開発した。具体的には生体活性処理を行った多孔性チタンに骨形成タンパク（以下 BMP）を含有させることで、チタン材料周囲に骨組織を形成させ、骨組織と周囲の腱組織を接着させる技術である。BMP 含有インプラントをウサギ膝蓋腱内に埋入することで BMP 非含有インプラントに比較して、術後 8 週での優れた骨形成及び腱接着性が獲得されることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Achieving a firm attachment between a tendon and a metal remains a major challenge in orthopedic surgery. In this study, we developed a simple model for evaluating the strength of this attachment using bioactive porous titanium, and confirmed whether bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) can be a help in achieving a firm attachment by ectopic bone formation. Rectangular plate-shaped implants were soak-loaded with BMP-2 (B+ group) and were implanted within the patellar tendon of a rabbit. Implants without BMP-2 (B- group) were used as controls, and they were harvested at 4 and 8 weeks postoperation for mechanical tests and for histological and histomorphometric study. The pull-out failure load of the B+ group was significantly higher than that of the B- group and new bone was more prevalent within the pores and around the implants in the B+ group than in the B-group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生体材料学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工骨、多孔性チタン、生体活性、BMP、軟部組織接着能、Rapid prototyping

## 1. 研究開始当初の背景

生体活性処理チタン製インプラントに軟部組織結合能を付与することで高機能の運動器再建を行うことを目的とする。われわれ人間の健康には運動器機能を維持することが不可欠である。運動器機能の低下には様々な疾病および外傷が関与し、骨・軟骨・筋肉・靭帯などが傷害されることにより生じる。薬や注射などによる内科的治療およびリハビリテーション治療では治療できない疾病に対しては外科的治療による運動器機能の再建が必要となる。近年、様々な金属材料を用いた骨再建インプラントが開発され、外傷、変形性関節症、脊椎疾患、骨腫瘍などの整形外科疾患に使用されている。金属材料を骨再建材料として使用する際の利点として、①力学的特性、②加工性などが上げられ、荷重部で使用される骨再建インプラントのほとんどは金属材料が使用されている。一方、金属材料の問題点としては、生体活性を持たず、生体組織と結合しないという点があげられる。そのため、金属材料を骨再建インプラントとして使用する際には、腸骨などから自家骨を採取して移植する方法、骨との接着剤として骨セメントを用いる方法、生体活性処理を行って、インプラント表面に骨結合能を付与する方法などが行われている。我々のグループでは、化学熱処理を行うことでチタン金属表面に生体活性層が付与されることを見だし、多くの基礎実験にて長期間安定した骨結合能が得られることを見いだした。この生体活性層は微細な網目構造を有する酸化チタンからなり、擬似体液中では生体内で骨形成が起こる時と同様に生体活性層の表面にアパタイト沈着が起こる。動物実験では骨内に埋入した際には生体活性層と骨の直接結合が起こり、材料表面が骨組織に覆われた様な状態になる。これらのデータを元に我々はこの化学熱処理を行った人工股関節を新しい生体活性インプラントとして臨床治験を行い、良好な結果を確認した。このインプラントは日本メディカルマテリアル社より平成19年より市販されている。

この様に、金属-骨の結合に関してはこれまでの研究により一定の成果が得られ臨床応用も開始されているが、人工関節に於ける多数回再手術例や外傷、腫瘍などで、病変が筋肉、腱、靭帯などの軟部組織に及ぶ場合には、骨だけでなく軟部組織を含めた機能再建が必要になる。従来、そのような症例では筋肉組織を直接インプラントに縫いつけるなどの処置が行われていたが、金属製インプラントは軟部組織との結合能を有さないため、接着強度は弱く関節を動かす十分な力源を得ることが出来なかった。その結果、患者は関節不安定性や筋力不足による歩行障害、人工関節の脱臼、弛みなど様々な問題に苦しめ

られることになる。このような臨床的背景から、我々が従来から取り組んできた運動器再建インプラントとしての新しい取り組みとして、本研究では金属製インプラントに軟部組織接着能を付与する技術の開発を行う。

## 2. 研究の目的

一般に骨組織と軟部組織は十分な初期固定を行うことで結合することが分かっている。一方、我々が開発した生体活性処理チタン材料には骨組織との直接の結合能及び、軟部組織内での骨形性能をもつことが分かっている。さらに近年使用可能となっている骨形成タンパク質（以下 BMP）には優れた骨形成能を有することも報告されている。そこで本研究では次のような方法で軟部組織接着能を有する金属製インプラントの開発をすすめる。

### (1) インプラント表面に効果的に骨を形成させる技術を開発する。

我々の生体活性処理チタンインプラントと BMP を組み合わせることで金属材料表面に骨組織を効率的に形成させる技術を確立する。同時に表面処理やチタン表面の多孔構造が材料表面に形成される骨組織にどのような影響を与えるのかを評価する。

### (2) インプラント表面に形成させた骨組織と軟部組織を接着させる技術を開発する。

インプラント表面に形成させた骨組織と軟部組織を結合する技術、その結合強度を測定する方法や実験系を確立する。

### (3) 前臨床的動物実験により軟部組織結合性インプラントのデザインを行う。

インプラントと骨組織、軟部組織を結合する技術を応用した、より大きな骨欠損モデルにおいて骨組織、軟部組織結合性を評価する実験系を確立し、臨床応用への足がかりとする。

## 3. 研究の方法

本研究で提案する軟部組織接着性インプラントはチタン金属製で表面には骨や軟部組織侵入に適したマクロポーラス構造と、表面に化学熱処理による微細な網目構造を持った生体活性層を有する。このような生体活性ポーラスチタン材料はすでに軟部組織内での骨形成能を有することが確認されているが、骨形成能をさらに強化するため材料表面に BMP を含浸させる。本インプラントを使用し、軟部組織接着能を評価する動物実験モデルの確立して評価を行った。

### (1) 材料：焼結ポーラスチタンを使用した、腱接着性インプラントの作製

ポーラスチタンは気孔形成材として炭酸水素アンモニウムを使用して、チタン粉末と混合、焼結することで作製する（焼結ポーラスチタン）。気孔形成材の大きさと量を調節

することで様々な気孔率、気孔径のポーラスチタンが作成可能であるが、力学的強度や多孔構造から気孔率 50%、平均気孔径約 300 $\mu$ m の焼結ポーラスチタンを採用する。ポーラスチタンの基盤から図 1 のような (4 mm  $\times$  8 mm  $\times$  2 mm) の板状インプラントを作成した。



図 1 板状ポーラスチタンインプラント

ポーラスチタンの多孔構造はマイクロ CT を用いて評価する。このポーラスチタンに対し我々が従来開発してきた化学熱処理を行って、インプラントに生体活性を付与する。生体活性処理層の評価として、走査型電子顕微鏡 (FE-SEM)、元素分析 (SEM-EDX)、X 線回析分析 (XRD) などを行う。さらに、ヒトの血しょう成分と類似の組成を持つ擬体液 (SBF) 内へインプラントを浸漬し、材料表面での骨類似アパタイト層の形成を評価する。

この生体活性ポーラスチタンインプラントに対し、5 $\mu$ m の rhBMP-2 を直接含浸させたインプラントを作製した (B+ group)。以下の動物実験では BMP 非含有のインプラントをコントロールインプラントとして使用した (B- group)。

#### (2) 動物実験モデルの確立と腱接着性インプラントの骨形成能、腱接着能の確認

実際に、インプラントが軟部組織内で骨を形成し、さらに骨を介して周囲軟部組織と強固に接着することを動物実験で確認した。図 2(a) のように日本白色家兎の膝蓋腱内にインプラントを一定期間埋入し、膝蓋腱を含めて摘出する。腱とインプラントの接着強度を調査するため、腱内部からのインプラントの引き抜き試験を行う (図 2(b))。又、インプラント表面での骨形成の状態、骨と腱の接着の状態を光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、FE-SEM、SEM-EDX などを用いて組織学的に評価した。

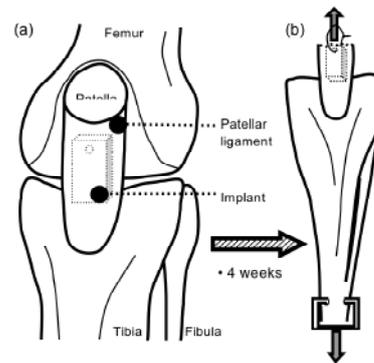


図 2 動物実験のシエーマ

### 4. 研究成果

#### (1) 実験結果

インプラント表面に形成させた骨組織と軟部組織を結合する技術、その結合強度を測定する方法や実験系を確立し、経時的に結合強度の測定を行った。引き抜き強度は 4 週で BMP+ group が 25.1N、BMP- group が 9.3N であった。同様に 8 週ではそれぞれ、142.4N と 12.9N であった。BMP+ group では非常に強い結合強度を有することが判明した。(図 3)

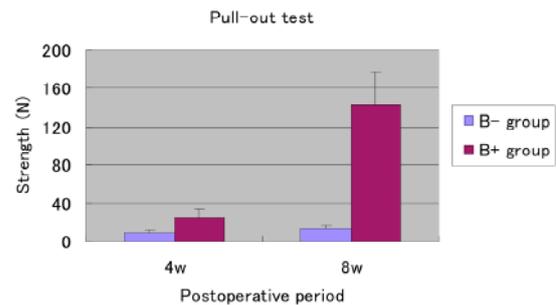


図 3 引き抜き強度

組織学的には腱内でチタン板内及びチタン板周囲に骨組織が形成されること、この骨組織を介して周囲の腱とインプラントが接着していることが確認できた。(図 4)

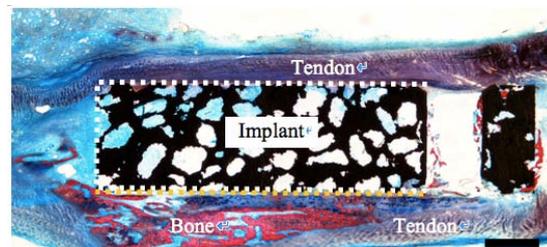


図 4 インプラント-骨-腱の接着の様子  
Bar=1mm、黒:インプラント、赤:骨、青から紫:腱。

コントロールチタンの内部にも量は少ないものの骨組織の形成を認めた。(図 5)

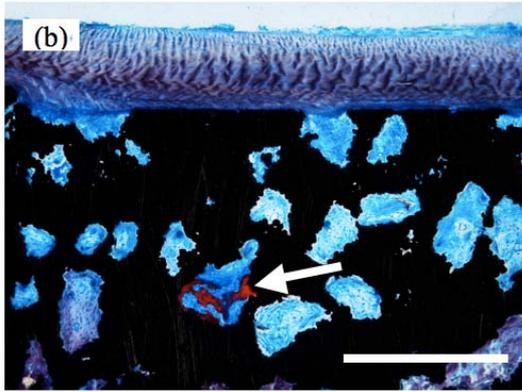


図5 B- groupにおけるインプラント内部での骨形成 Bar=1mm

材料内部の骨の形成量はBMP+ groupでは、4週、8週それぞれ、0.039mm<sup>2</sup>、1.1mm<sup>2</sup>であった。材料周囲の骨形成量は、4週、8週それぞれ、2.6mm<sup>2</sup>、6.0mm<sup>2</sup>であった。インプラント周囲により多くの骨組織が形成されていることが判明した。(図6)

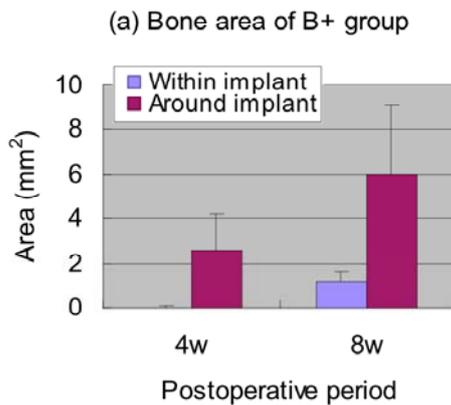


図6 B+ groupにおけるインプラントの周囲及び内部における骨形成面積

## (2) 考察

以上の実験により、BMP含有生体活性処理多孔性チタン材料が腱と接着し、その機械的結合強度が非常に高いことが明らかとなった。これは、我々の提唱するインプラント-骨-腱という接着構造の有効性が確認できた。現在は、実際の臨床応用をより強く意図したインプラントを設計するため、多孔構造やインプラントデザインの自由度の高いRapid prototyping (RP)技術を使用したレーザー焼結法によるチタン製インプラント(以下PRインプラント)の開発を進めている。この技術を実際に臨床応用するため、骨欠損及び軟部再建に適した人工骨及び人工関節の形状を解析し、選択的レーザー溶融法を用いたrapid prototyping (PR)法により実際にチタンインプラントを造形する技術の開発を進

めている。骨及び腱との接着部について、最適な多孔構造の検討を行った。一方、RP法ではこれまで採用してきた気孔形成剤を使用したチタン粉末焼結法に比較して大きなサイズの気孔となる。そのため、臨床応用を意図してRP法で造形したチタンインプラント多孔部と軟部組織の力学的接着についての評価と最適化を行う必要があり今後の課題である。

以上の成果により、チタンインプラントの表面の多孔化及びBMP含有により、チタン材料と軟部組織を高い強度で接着させた、高機能型運動器再建医療への道筋が示された。

## 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3件)

- ① Fukuda A, Takemoto M, Saito T, Fujibayashi S, Neo M, Pattanayak DK, Matsushita T, Sasaki K, Nishida N, Kokubo T, Nakamura T. "Osteoinduction of porous Ti implants with a channel structure fabricated by selective laser melting.", Acta Biomater. 2011 May;7(5):2327-36. 査読有
- ② Pattanayak DK, Fukuda A, Matsushita T, Takemoto M, Fujibayashi S, Sasaki K, Nishida N, Nakamura T, Kokubo T., "Bioactive Ti metal analogous to human cancellous bone: Fabrication by selective laser melting and chemical treatments.", Acta Biomater. 2011 Mar;7(3):1398-406. 査読有
- ③ So K, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Kokubo T, Nakamura T., "Reinforcement of tendon attachment to bioactive porous titanium by BMP-2-induced ectopic bone formation.", J Biomed Mater Res A. 2010 Jun 15;93(4):1410-6. 査読有

[学会発表] (計1件)

- ① 竹本充, 他 「生体活性チタン多孔体による腰椎固定術、自主臨床試験の経験と今後の課題」第83回日本整形外科学会学術総会、2010年5月29日、東京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹本 充 (TAKEMOTO MITSURU)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：00456873

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤林 俊介 (FUJIBAYASHI SYUNSUKE)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30362502