

## 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 8 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591922

研究課題名（和文）：大腸菌由来骨形成蛋白とコンピュータ支援技術を用いた骨欠損部再生修復システムの創生

研究課題名（英文）：Regenerative repair of bone defects with osteoinductive hydroxyapatite fabricated to match the defect and implanted with combined use of computer-aided design, computer-aided manufacturing, and computer-assisted surgery systems: a feasibility study in a canine model

研究代表者：岩城 啓好（IWAKI HIROYOSHI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20381981

研究成果の概要（和文）：骨腫瘍切除後や外傷後に失われた骨格を再建する必要性がしばしば生じるが、解剖学的に健全な再建は現在困難である。本研究では、ビーグル犬腸骨に仮想腫瘍を作成し、その切除および欠損充填をコンピュータ支援設計（computer-aided design, CAD）を用いて行い、術前計画データを使用した欠損部に適合する人工骨設計をコンピュータ支援製造（computer-aided manufacturing, CAM）を用いて行った。コンピュータ支援外科（computer-aided-surgery, CAS）使用手術により、計画通りの正確な骨切除と切削加工した人工骨の設置が可能であった。人工骨に骨形成蛋白（bone morphogenetic protein, BMP）含有ペーストを塗布した。骨欠損は解剖学的な形状に再建できた。コンピュータ支援を駆使した BMP を用いた再生医療は大きな発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Currently, regenerative repair of large bone defect is a challenging issue. The aim of this study was to achieve repair of large bone defects to the original three-dimensional (3D) anatomical state. An imaginary spherical malignant bone tumor of was placed in the left ilium of a canine on the 3D image. Resection of the whole tumor was planned preoperatively by using computer-aided design software. An image of the implant to fill the resulting bone defect was constructed on the computer image. A porous hydroxyapatite implant identical to the imaged bone defect was made with a computer-aided manufacturing system. To resect the iliac bone as planned preoperatively on the 3D CT image, computer-aided surgery was performed. The defect was filled with the fabricated implant and coated with a putty carrier with BMP-2. New bone formation was noted around each implant on CT images and remodeled to restore the original anatomy of the ilium on serial CT images. This new method may enable efficacious and precise regenerative repair of large bone defect without bone grafting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,260,000	360,000	1,560,000
総計	3,360,000	990,000	4,350,000

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：骨形成蛋白（Bone morphogenetic protein, BMP）、巨大骨欠損、解剖学的再建、Computer aided design, Computer aided manufacturing, Computer navigation system, ビーグル犬

## 1. 研究開始当初の背景

骨・軟部腫瘍に対する摘出手術治療や重度の外傷において、巨大な骨欠損の再建を要する例にしばしば遭遇する。また、高エネルギー外傷により骨格の解剖学的形状が失われ、その再建に難渋する例もしばしば存在する。このような例に対する骨格の再生再建方法として、現在、自家骨移植、同種骨移植および人工材料を駆使した再建が行われる。しかし、それぞれの方法にはそれぞれの欠点があり、巨大な骨欠損修復は困難を極めることが多い。巨大欠損の修復は将来的には骨形成活性が付加された改良した人工材料が有望と考える。生体吸収性人工材料は欠損の形状に合致した加工ができ、骨形成活性が付加できれば、宿主側の骨との癒合が可能となり、一定期間で吸収され骨に置換され、元の解剖学的形態の骨格への回復が図れる可能性があると考えられる。現在ではそのような生体材料は存在しないのでその開発には意義が深い。

現在ではCT画像、CAD(コンピュータ支援デザインシステム)、さらにCAM(コンピュータ制御3次元造型システム)、CAS(コンピュータ支援ナビゲーション手術システム)などの工学技術が進歩し、一方で遺伝子組換え技術による活性蛋白である骨形成蛋白(BMP)の合成も可能となっている。また生体適合性に優れた生体材料の開発もなされ、これらの新技術を複合すれば骨欠損の再生修復は理論的には可能な環境となると考える。

我々は、Computer Aided Design (3D-CAD)にて解剖学的に正常な骨格を設計し、Computer Aided Manufacturing (CAM)および3D切削加工機で生体活性材料を加工、このインプラントに骨誘導能を与える為に、骨形成蛋白(Bone Morphogenetic Protein; BMP)およびその薬物伝達系(Drug Delivery System; DDS)を添加し、骨形成性人工骨格を作成することを考案した。

## 2. 研究の目的

我々は従来から、BMPのより有効な使用方法を開発すべく、BMPをより効果的に作用させる薬物伝達系(DDS)の研究を行っている。その結果、以前から使用されているウシ由来I型コラーゲンスポンジよりも優れたDDSとして、生体吸収性合成ポリマー、(polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer; PLA-PEG)を開発した。これにより、骨形成に有するBMP所要量を減じることが可能となることを過去に報告した。(Nat Biotechnol. 2001 Apr;19(4):332-5.)

このDDSとBMP、CAD/CAM systemにより加工した生体材料を組み合わせて、巨大骨欠損の解剖学的修復を行うことは全く新し

い試みである。さらに、動物骨欠損モデルの作成にあたり、手術用ナビゲーションシステムの導入を行う。これにより、術前計画どおりの骨欠損を作成し、骨形成性人工骨の設置を行う。これが成功すれば腫瘍切除における術前シミュレーション通りの切除および再建に非常に有用な方法となることが期待できる。我々はBMPのDDSとしてポリ乳酸、ポリエチレングリコールを主成分とした合成ポリマーを動物骨欠損モデルの再建材料として使用し、その有用性につき報告してきた。(ウサギ上腕骨骨欠損モデル[J Biomater Res.62:169-174. 2002]、ウサギ大腿骨骨欠損モデル:[Biomaterials.26: 5145-5152. 2005])

また、合成ポリマーと $\beta$ -TCP粉末を組み合わせた粘土状の材料をBMPのDDSとして開発した。これはBMPをより効果的に働かせ、なおかつ任意の形状に用手的に加工できる特徴をもつ。この材料をウサギ脊椎固定モデルに使用し、その優れた骨形成性と材料としての利便性を報告した (Spine30: 1717-1722. 2005)

本研究ではこれら我々が開発した材料、技術を組み合わせ、加えてCAD/CAM system、3D切削加工機、手術ナビゲーションシステムなどのコンピュータ支援により、さらに高度な骨格の再生技術を開発これらの技術を複合して新しい骨格再生による再建技術を開発し、その可能性を明らかにするためにビーグル犬での巨大骨欠損の修復を試みることが目的である。

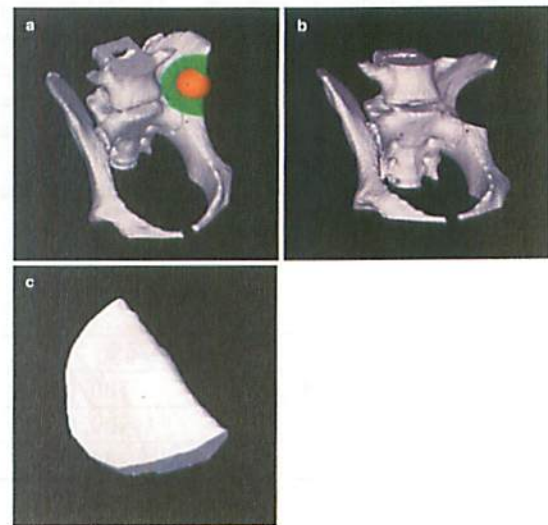


図1

## 3. 研究の方法

術前にビーグル犬の骨盤CT(Lightspeed ULTRA)を撮影した。CT撮影で得られたDICOM画像からCADを使用し、骨盤部分欠損動物モデルの手術シミュレーションを行

った。径 15mm の腫瘍モデル (図 1A、オレンジ) とその周囲 10mm を離して切除する領域 (図 1A、緑) を設定した。この際に CAD ソフトである Mimics10.1 および Magics11 (Materialize Japan) を使用した。Mimics により DICOM データを STL データへと変換し、Magics 上で骨盤部分欠損を作成した。骨切除後できた骨欠損 (図 1B) とそれを充填するインプラント (図 1C) を鏡像イメージから欠損部を差し引きして作成した。

欠損部を充填する 3D データを作成し、これを基に生体活性セラミック・Neobone® (エム・エム・ティ) の切削加工を CAM ソフト (MODELA Player) を利用し 3D 切削加工機 (MDX-20) にて行い、骨欠損部を充填するインプラントを作成した。

このインプラントに骨形成能を持たせるために、大腸菌遺伝子組換えで合成した、安価で純度の高い骨形成蛋白-2 (E-BMP-2、Yano et al. JBMM) 100 $\mu$ g に DDS としてわれわれが開発してきたポリマー (PLA-PEG) 200mg と  $\beta$ -TCP を 200mg 加えた粘土状骨形成物質をインプラント表面に塗布した。BMP を含む粘土状骨形成物質を塗った群 (BMP 使用群) と BMP を含まない群 (BMP 非使用群) を作成した。

Mimics において計画した骨盤部分欠損の STL ファイルを、Mimics において再度 DICOM データに変換し、手術ナビゲーションシステム (Sthealth Station TRIA) に読み込ませ、術前計画通りの骨切除を行った。そして作成した骨切除部分に、骨形成能を有するインプラントを充填した。

作成したインプラントがナビゲーション支援手術により作成した骨切除部分に適合するかを評価した。

経時的に CT 撮影 (術後 3 週、6 週、9 週、12 週) を行い、骨形成の経過を評価する。術後 12 週でと殺時し、摘出した標本をレントゲン、CT、肉眼的評価、組織学的評価を行った。

#### 4. 研究成果

麻酔下にビーグル犬左腸骨に術前計画通

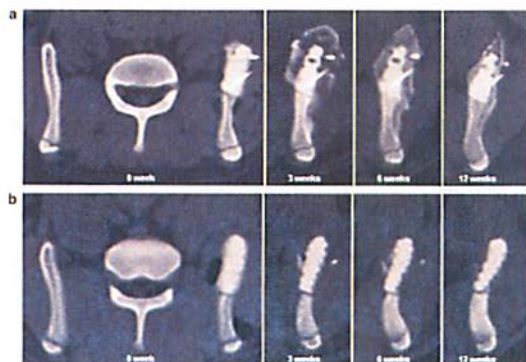


図 2

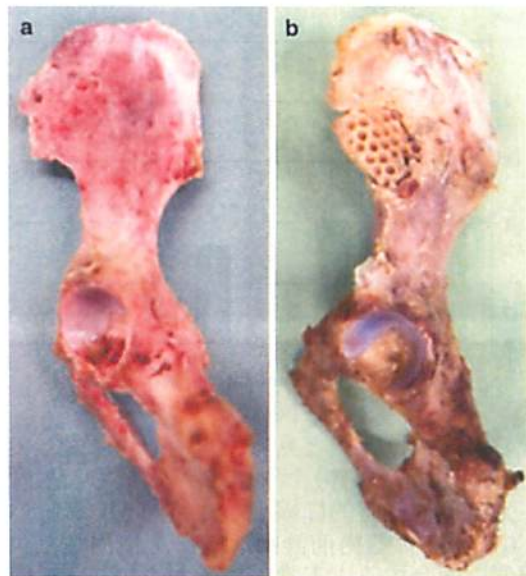


図 3

りの骨欠損を手術ナビゲーションシステムを用いて作成し、その欠損部に術前作成したインプラントがぴったりと適合した。

手術後の経過では、BMP 使用群 (図 2A) において術後 3 週目でインプラントの周囲に新生骨を認め、経時的にその陰影が縮小し濃度が濃くなっていった。術後 12 週ではインプラントは新生骨に覆われていた。肉眼的には、インプラントは新生骨に覆われ、腸骨と連続しており、ほぼ正常の腸骨の様相であった (図 3A)。それに対して、BMP 非使用群 (図 2B) では新生骨の形成は認められず、インプラントは露出した状態であった (図 3B)。

インプラント周囲を非脱灰標本で Villanueva bone staining を行い検討したところ BMP 使用群ではインプラントの周囲およびインプラント内部まで新生骨を認めた (図 4A、新生骨: 黒三角)。それに対して、BMP 非使用群では、新生骨の形成をインプラント周囲および内部に認めなかった (図 4B)。

インプラント周囲の骨新生の面積を計測したところ、BMP 非使用群 (白棒) では新生

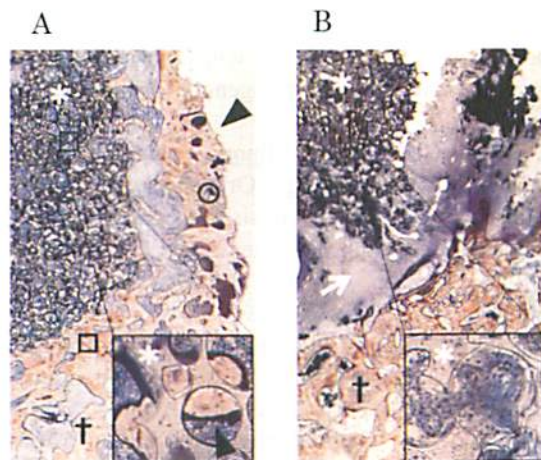


図 4

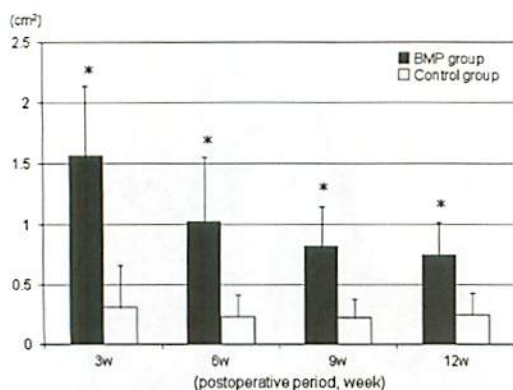


図 5

骨の形成がほとんど見られず、それに対して BMP 使用群 (黒棒) は術後 3 週が最も新生骨が大きく、経時的に縮小した (図 5)。

CAD による術前計画データを使用した欠損部に適合する人工骨の設計および CAS 使用手術により、計画通りの正確な骨切除と切削加工した人工骨の設置が可能であった。コンピューター支援を駆使した BMP を用いた再生医療は大きな発展が期待できる。

#### 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 20 件)

- ① Sugama R, Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Takaoka K, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012. Conventional or navigated total knee arthroplasty affects sagittal component alignment. 査読あり
- ② Iida T, Minoda Y, Kadoya Y, Matsui Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2011. Mid-term clinical results of alumina medial pivot total knee arthroplasty. 査読あり
- ③ Fukunaga K, Minoda Y, Iwakiri K, Iwaki H, Nakamura H, Takaoka K. J Arthroplasty. 2012 Jan;27(1):143-149. Early biological fixation of porous implant coated with paste-retaining recombinant bone morphogenetic protein 2. 査読あり
- ④ Barnes CL, Iwaki H, Minoda Y, Green JM 2nd, Obert RM. J Surg Orthop Adv. 2010 Winter;19(4):200-8. Analysis of sex and race and the size and shape of the distal femur using virtual surgery and archived computed tomography images. 査読あり
- ⑤ Sugama R, Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Hashimoto Y, Takaoka K, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2011 Jan;19(1):74-9. Sagittal alignment of the lower extremity while standing in female. 査読あり
- ⑥ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M,

Inori F, Takaoka K. J Bone Joint Surg Am. 2010 Mar;92(3):700-6. Comparison of bone mineral density between porous tantalum and cemented tibial total knee arthroplasty components. 査読あり

⑦ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Iwakiri K, Inori F, Sugama R, Ikebuchi M, Kadoya Y, Takaoka K. J Bone Joint Surg Am. 2009 Nov;91 Suppl 6:67-73. In vivo analysis of polyethylene wear particles after total knee arthroplasty: the influence of improved materials and designs. 査読あり

⑧ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Mitsuhiro I, Kadoya Y, Ohashi H, Takaoka K, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010 Jun;18(6):718-22. The risk of notching the anterior femoral cortex with the use of navigation systems in total knee arthroplasty. 査読あり

⑨ Iwakiri K, Minoda Y, Kobayashi A, Sugama R, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Ohashi H, Ohta Y, Fukunaga K, Takaoka K. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Nov;91(2):799-804. In vivo comparison of wear particles between highly crosslinked polyethylene and conventional polyethylene in the same design of total knee arthroplasties. 査読あり

⑩ Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y, Iwaki H, Masada T, Kobayashi A, Asada A, Takaoka K. J Orthop Sci. 2008 Sep;13(5):463-8. Epub 2008 Oct 9. Effect of simvastatin on steroid-induced osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome P4503A in a rabbit model. 査読あり

⑪ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ohashi H, Takaoka K. Clin Orthop Relat Res. 2009 Apr;467(4):1000-6. Epub 2008 Aug 20. TKA sagittal alignment with navigation systems and conventional techniques vary only a few degrees. 査読あり

⑫ Iwakiri K, Iwaki H, Minoda Y, Ohashi H, Takaoka K. Clin Orthop Relat Res. 2008 May;466(5):1186-92. Epub 2008 Feb 21. Alumina inlay failure in cemented polyethylene-backed total hip arthroplasty. 査読あり

⑬ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Sugama R, Iwakiri K, Kadoya Y, Ohashi H, Takaoka K. Arch Orthop Trauma Surg. 2008 Apr;128(4):435-42. Epub 2007 Nov 28. Sagittal alignment of the lower extremity while standing in Japanese male. 査読あり

⑭ Iwakiri K, Iwaki H, Kobayashi A, Minoda Y, Kagiya H, Kadoya Y, Takaoka K. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008 Apr;85(1):125-9. Characteristics of Hylamer polyethylene particles isolated from peri-prosthetic tissues of failed cemented total

hip arthroplasties. 査読あり

⑮ Masada T, Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y, Iwaki H, Ohashi H, Takaoka K. J Orthop Res. 2008 Jan;26(1):91-5. Increased hepatic cytochrome P4503A activity decreases the risk of developing steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model. 査読あり

⑯ Kaneshiro Y, Oda Y, Iwakiri K, Masada T, Iwaki H, Hirota Y, Kondo K, Takaoka K. Clin Pharmacol Ther. 2006 Oct;80(4):396-402. Low hepatic cytochrome P450 3A activity is a risk for corticosteroid-induced osteonecrosis. 査読あり

⑰ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Miyaguchi M, Kadoya Y, Ohashi H, Takaoka K. Biomaterials. 2005 Oct;26(30):6034-40. Polyethylene wear particle generation in vivo in an alumina medial pivot total knee prosthesis. 査読あり

⑱ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Miyaguchi M, Kadoya Y, Ohashi H, Takaoka K. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004 Oct 15;71(1):1-6. Characteristics of polyethylene wear particles isolated from synovial fluid after mobile-bearing and posterior-stabilized total knee arthroplasties. 査読あり

⑲ Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Miyaguchi M, Kadoya Y, Ohashi H, Yamano Y, Takaoka K. Clin Orthop Relat Res. 2003 May;(410):165-72. Polyethylene wear particles in synovial fluid after total knee arthroplasty. 査読あり

⑳ Miyaguchi M, Kobayashi A, Iwaki H, Ohashi H, Kadoya Y, Yamano Y. J Biomed Mater Res. 2002 Dec 5;62(3):331-7. Human monocyte response to retrieved polymethylmethacrylate particles. 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

① Intra-Operative Assessment Of Mid-Flexion Instability In Total Knee Arthroplasty Minoda Y, Nakagawa S, Kadoya Y, Kobayashi A, Tomari H, Kondo M, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Matsui Y, Sumitomo A, Sugama R, Mizokawa S, Higuma Y, Noguchi T, Hirakawa H, Nakamura H. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.

② Minoda Y, Nakagawa S, Kadoya Y, Kobayashi A, Tomari H, Kondo M, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Matsui Y, Sumitomo A, Sugama R, Mizokawa S, Higuma Y, Noguchi T, Hirakawa H, Nakamura H. The Extension Gap Becomes Tight and Valgus After Implantation of Mobile-bearing Total Knee Prosthesis. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.

③ Minoda Y, Nakagawa S, Kadoya Y, Kobayashi A, Tomari H, Kondo M, Iwaki H,

Ikebuchi M, Yoshida T, Matsui Y, Sumitomo A, Sugama R, Mizokawa S, Higuma Y, Noguchi T, Hirakawa H, Nakamura H. Operative Technique Affected The Intra-operative Joint Kinematics Of Total Knee Arthroplasty. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.

④ Minoda Y, Hata K, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Miyazaki N, Miyake Y, Nakamura H. In Vivo Wear Particles of Annealed Highly Cross-Linked Polyethylene in Total Hip Arthroplasty. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.

⑤ Hata K, Minoda Y, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Miyazaki N, Miyake Y, Nakamura H. In Vivo Wear Particles of Annealed Highly Cross-Linked Polyethylene in Total Hip Arthroplasty. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.

⑥ Minoda Y, Watanabe K, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Hashimoto Y, Nakamura H. Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2011.2.7. San Diego, CA, USA.

⑦ Minoda Y, Watanabe K, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Hashimoto Y, Nakamura H. High incidence of anterior femoral cortex notching using navigation system in TKA. Annual meeting of American Association of Orthopaedic Surgeons. 2011.2.15. San Diego, CA, USA.

⑧ Minoda Y, Kobayashi A, Ikebuchi M, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Yamasaki S, Nakamura H. Comparison of BMD around the Knee between Trabecular Metal and Cemented Tibial Component; Four-year Follow-Up Study. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2011.1.13. Long Beach, CA, USA.

⑨ Minoda Y, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Yamasaki S, Hirokai N. Flexion Gap Preparation Opens Both the Extension and Flexion Gap during Total Knee Arthroplasty. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2011.1.13. Long Beach, CA, USA.

⑩ Minoda Y, Kobayashi A, Ikebuchi M, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Yamasaki S, Nakamura H. A Cemented Mobile-Bearing Total Knee Arthroplasty Prevents Periprosthetic Loss of Bone Mineral Density around the Femoral Component; Four-year Follow-Up Study. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2011.1.13. Long Beach, CA, USA.

⑪ Minoda Y, Kadoya Y, Kobayashi A, Iwaki H,

Iwakiri K, Iida T, Matusi Y, Ikebuchi M, Yoshida T, Nakamura H. Invited lecture; Future expectation of TKA. 24<sup>th</sup> Annual meeting of the International Society for Technology in Arthroplasty. 2011.9.20. Brues, Belgium.

⑫Minoda Y, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Nakamura H. BMD Change Under Bisphosphonate Therapy -Comparison Between Mobile and Fixed Bearing TKA Prostheses-. 24<sup>th</sup> Annual meeting of the International Society for Technology in Arthroplasty. 2011.9.20. Brues, Belgium.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩城 啓好 (IWAKI HIROYOSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20381981

##### (2) 研究分担者

箕田 行秀 (MINODA YUKIHIDE)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90453133

##### (3) 連携研究者

矢野 公一 (YANO KOICHI)

大阪労災病院・整形外科