

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09010

研究課題名（和文）感染しない創外固定ピンの研究開発

研究課題名（英文）Research and development of external fixation pins that do not cause infection

研究代表者

十時 靖和（Totoki, Yasukazu）

筑波大学・附属病院・病院助教

研究者番号：00882200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ステンレス創外固定ピンの感染予防と骨固着性の向上のために金属表面に組織再生を促すたんぱく質（線維芽細胞増殖因子）とリン酸カルシウムをコーティングした。コーティングしたピンを家兎の下腿に挿入し、コーティングを行っていないピンと感染、骨固着力を比較した。コーティングの有無では感染、骨固着力に差が生じなかった。チタン創外固定ピンを用いた同様の研究では骨固着力が向上したことから、その差を比較した。コーティングの性質や金属との接着性にはチタンとステンレスに明らかな差はなかった。金属表面で骨に成長する細胞を増殖させた。チタンの方が骨が形成される度合いがステンレスよりも多い結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステンレスに線維芽細胞増殖因子とリン酸カルシウムをコーティングした。過去のチタンに同様のコーティングを行った研究と比較し、期待した結果が得られなかった。動物実験におけるコーティングの性能は薬物としてのタンパク質の性能だけで決まるのではなく、組織が接着する基材、つまり金属表面の組織との接着性や生体適合性に依存して決まるという可能性を示唆している。本コーティングを施した創外固定ピンの性能を向上させるためにはピンそのものの組織との接着性や生体適合性を向上させることが必要だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To prevent infection and improve bone fixation of stainless steel external fixation pins, the metal surface is coated with protein that promote tissue regeneration and calcium phosphate. The coated pins were inserted into the lower legs of rabbits and compared with uncoated pins in terms of infection and bone fixation. There was no difference in infection or bone fixation strength with or without coating. A similar study using titanium external fixation pins showed improved bone fixation, so we compared the differences. There was no obvious difference between titanium and stainless steel in terms of coating properties and adhesion to metals. They cells that would grow into bone on metal surfaces. The results showed that the degree of bone formation was higher in titanium than in stainless steel.

研究分野：整形外科

キーワード：線維芽細胞増殖因子 ステンレス チタン 創外固定

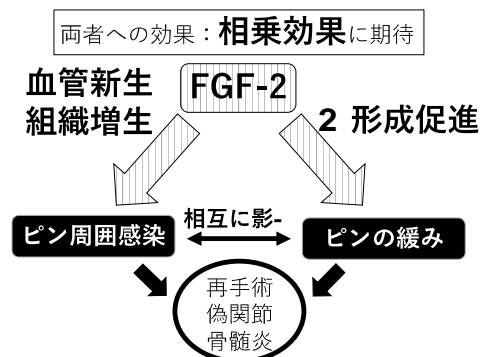
1. 研究開始当初の背景

創外固定は救急外傷外科分野において必須の医療機器であり、不安定型骨盤骨折や開放骨折の治療で頻用する。この創外固定法における治療で最も問題となるのが創外固定ピンの感染である。その感染頻度は多いもので 50%以上との報告がある。

救急治療における創外固定ピン感染は、患者の予備能が低いいため重症感染症に移行する可能性が高く、感染予防対策は重要な課題である。骨関節感染症は難治化しやすく、長期療養・再手術により患者 ADL 低下と大きな社会経済的損失を来す。

創外固定ピンが感染を起こしやすいのは、体外から体内に貫通する金属インプラント(創外固定ピン)と組織の間に“隙間”があるからであり、その隙間に細菌感染が生じる。隙間がなければ細菌の侵入をブロックできる。“隙間”は創外固定ピンと皮膚・皮下組織・骨の間に存在するため、金属(ピン)と皮膚・皮下組織・骨の固着を強化する技術があれば、創外固定ピン感染を予防できると考えた。軟部組織と骨の両者と金属の固着を強める技術として、創外固定ピンに線維芽細胞増殖因子(FGF-2)をコーティングする技術を開発中である。FGF-2は、軟部組織の増殖作用と骨形成作用の両方を有する成長因子である。本課題では、ステンレス製創外固定ピン表面に FGF-2 をコーティングする技術を確認し、コーティングした FGF-2 が、軟部組織および骨とピンとを隙間なく固着させ、感染を予防するかどうかを研究する。

硬組織(骨)と軟組織の両者に作用



2. 研究の目的

我々と産業技術総合研究所と共同でチタン製ネジにハイドロキシアパタイトをコーティングし、アパタイトに FGF-2 を共沈担持させることで、その失活を遅らせること、また FGF-2 が徐放されることを確認した。本コーティング技術は特許を得ている(特願 2007-184312, 特開 2009-18086)。しかし、創外固定ピンの多くは、強度としなやかさを必要とするためステンレス製である。また本コーティング技術は様々なタンパク、様々な基剤にコーティング可能であることが実証済みであり汎用性も高い。実用化されれば日本初の生体活性コーティング整形外科インプラント(コンビネーション医療機器)となり、臨床成績の向上のみならず、インプラント表面加工技術における発展に貢献するものと考えられる。

本研究の目的はチタン製ピンに対する FGF-2 コーティング法を改良して、ステンレスに活性を有する。FGF-2 コーティング法(以下 Cp-FGF コーティング)を開発するべく、浸漬液を調整し、異なる FGF-2 濃度のコーティングピンを作成、FGF-2 活性・FGF-2 担持量を評価項目としてコーティング手法を確立する。

また Cp-FGF コーティングを形成したステンレス創外固定ピンを用い刺入部感染の低減効果を評価した動物実験はこれまでに報告がない。そこで本研究の第 2 の目的は、Cp-FGF コーティングをステンレス創外固定ピンに形成し動物実験にて、その刺入部感染低減効果とそれに影響しうる骨固着性を検証することである。

3. 研究の方法

コーティングスクリー作製のために必要な原材料は全て日本の厚生労働省が承認した医薬品・医療機器で、臨床で患者に使用可能なものである。医薬品（薬剤）は FGF-2 を除き体内投与用の薬剤である。FGF を含有するリン酸カルシウム過飽和溶液（浸漬液）の作製に使用した薬剤は表 A のとおりである。浸漬したスクリーは、ステンレス製（Cancellous Screw: 3.5mm、長さ 30mm、シンセス、チューリヒ、スイス）の医療機器である。

表A リン酸カルシウム過飽和溶液（浸漬液）の作製に使用した医薬品

カルシウム含有輸液
リングル液「オーツカ」、500mL；大塚製薬工場、徳島
塩化Ca補正液 1 mEq/mL、20mL；大塚製薬工場、徳島
リン酸含有輸液
クリニザルツ輸液、500mL；協和クリティケア、東京
リン酸2カリウム注20mEqキット「テルモ」、20mL；テルモ、東京
アルカリ化剤（炭酸水素ナトリウム溶液）
メイロン静注7%、20mL；大塚製薬工場、徳島
溶解・希釈液
大塚生食注、20mL；大塚製薬工場、徳島
注射用水PL「フソー」20mL；扶桑薬品工業、大阪
FGF-2（トラフェルミン）
フィラストスプレー500；科研製薬、東京

スクリーのコーティング条件を複数変更した。FGF の添加濃度、アルカリ化剤の pH、浸漬回数などを変更して生物学的活性に優れたスクリーのコーティング条件を検討した。

コーティングの評価は以下の通りに行った。Cp-FGF ステンレス法および Cp ステンレス法で施したコーティングは、各ピンを 2mL の 10mM クエン酸 クエン酸緩衝液（pH 5.43）で室温にて 30 分浸漬して完全に溶解し抽出した。抽出物の FGF-2 は Bradford 法にて分析した。

動物実験は筑波大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。スクリーはステンレス製 Cancellous Screw: 3.5mm、長さ 30mm、（シンセス、チューリヒ、スイス）を用いた。コーティングを施していないステンレススクリーを SS 群、スクリーの表面にリン酸カルシウムのみコーティングを施したものを Cp 群、スクリーの表面に従来の Cp-FGF ステンレス法（表 B、C）で Cp-FGF コーティングを施したものを FGF 群、生物活性を高めた Cp-FGF コーティング（3.1 の実験 C）を施したものを FGF+ 群として、4 群での比較を行った。対象はオスの日本白色家兔で体重約 2.5kg から 3.0kg（10 - 13 週齢）のもの、65 羽 130 肢とした。過去の研究（Mutsuzaki ら（2008））と同じく家兔の両側脛骨近位骨幹部に経皮的に挿入し、4 週間留置した。

肉眼所見による感染の有無、スクリー挿入・抜去時のトルク計測、病理学的な所見の評価を行った。

4. 研究成果

生物活性を高める Cp-FGF コーティングステンレススクリーの作製条件を検討した。作製に使用する浸漬液の FGF-2 濃度とアルカリ化剤 pH の条件変更、浸漬時間と浸漬回数（実験 B）の変更は有意な生物活性の向上は得られなかった。高 FGF-2 濃度の浸漬液への追加浸漬を検討した結果、高 FGF-2 濃度の浸漬液への追加浸漬だけが、Cp-FGF コーティングの生物活性の向上に有効であった。

予想に反して、生物活性を高めた Cp-FGF コーティングを施したステンレススクリューは刺入部感染の発生率を低減せず、刺入部感染予防効果はステンレススクリューと有意差が無かった。また、生物活性を高めた Cp-FGF コーティングをステンレススクリューに施しても、刺入部感染予防効果に影響しうる骨固着性はコーティングなしのステンレススクリューと比較して有意差が無かった。そればかりか、従来の Cp-FGF コーティングや Cp コーティングをステンレススクリューに施しても、感染予防効果と骨固着性はステンレススクリューと有意差が無かった。

Cp-FGF コーティングステンレススクリューの抗感染性効果がなぜ低いのか、その原因を解明して次の研究に向けての指針を得るため、次の段階としてステンレススクリュー上の Cp-FGF コーティングの物理化学的性質とチタンスクリュー上の Cp-FGF コーティングの物理化学的性質の違いを詳細に検討する必要があると考えた。

ステンレススクリュー上に作製した Cp-FGF コーティングの物理化学的性質を評価し、過去に報告されているチタンスクリュー上に作製した Cp-FGF コーティングの物理化学的特性と差異があるか否かを検証することである。具体的にはステンレススクリューとチタンスクリューに Cp-FGF コーティングを施し、模擬骨を用いた摩擦抵抗由来の抗ゆるみ性能の比較、走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面ミクロ形状の比較、X線回折 (XRD) によるコーティングの結晶性や組成物の比較、剥離試験によるスクリューとコーティングの接着強度の比較、コーティングの FGF-2 徐放性の比較を行った。

結果は各実験において、チタンとステンレスにおける Cp-FGF コーティングの品質は同等であった。過去に報告されているチタン上の Cp-FGF コーティングと本研究で作製したステンレス上の生物学的活性を高めた Cp-FGF コーティングは類似した物理、化学的性質を持っていると考えられた。

コーティングの品質にチタンとステンレスで差異がないことから、ステンレススクリューに対する組織の接着性とチタンスクリューに対する組織の接着性に違いがあり、この違いによって二種類のスクリューの間で抗感染効果と骨固着性が異なる結果になったという仮説をたてた。

チタンとステンレスのスクリュー表面でそれぞれ MSCs を培養した。骨分化条件下で培養を行った後、形成された骨基質をアリザリンレッドで染色し評価した。結果、チタンとステンレスではチタンにより多くの骨形成が観察された。

Cp-FGF コーティング、及び生物学的活性を高めた Cp-FGF コーティングをステンレススクリュー上に作製した。生物学的活性を高めた Cp-FGF ステンレススクリュー、Cp-FGF ステンレススクリューともに家兎における抗感染効果は認められなかった。本研究は Cp-FGF インプラントの *in vivo* 性能は薬物としての FGF の生物活性だけで決まるのではなく、組織の足場になる基材の組織接着性/生体適合性にも依存して決まるということを示唆した。Cp-FGF コーティングを施した創外固定ピンの *in vivo* 性能を向上させるためには、ピンそのものの組織接着性/生体適合性を向上させることが重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------