

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24601  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K10936  
研究課題名(和文) 骨癒合性を付与したPEEK製脊椎インプラントの研究

研究課題名(英文) PEEK Spinal Implants with Improved Bone Union

## 研究代表者

古川 彰 (FURUKAWA, AKIRA)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40607537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PEEK樹脂は骨と接合しないためインプラントに利用した場合に固定が弱く滑りや脱転が生じる場合がある。本研究ではPEEK樹脂表面にアパタイトを炭酸ガスレーザーを利用して熱溶着することで骨癒合性を向上するとともに、アパタイト中にストロンチウムを導入することで骨形成促進作用による一層の骨癒合の促進作用を検討した。ストロンチウムアパタイトを熱溶着した表面で骨芽細胞前駆体細胞の培養を行ったところ、骨形成マーカーであるオステオカルシンの分泌が増大しリン酸カルシウムの析出が顕著な結果を得た。PEEK表面に析出したリン酸カルシウムの接着性は極めて良好であった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

PEEK樹脂は生体骨と力学物性が近似し化学的に安定なため各種インプラントに利用されるが骨と接合し難いことが問題であった。本研究では炭酸ガスレーザーを利用してPEEK樹脂表面にアパタイトを熱融着する新技術を開発した。これによりPEEK樹脂表面にアパタイトが強固に接合し、表面に骨との接合性を付与することに成功した。さらに、ストロンチウムは骨形成を促進するためインプラントに治癒促進作用を付与する可能性を示した。これらの成果から高齢者など骨密度が低下し骨形成能が低下した患者に対して適応可能なPEEK製インプラントを提供できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Since PEEK (polyether ether ketone) is inherently bioinert and does not exhibit osteoconductivity, orthopedic PEEK implants sometimes lead to loosening or dislodgement when they are implanted into patients. In this study laser-bonding of apatite on PEEK surface was examined. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured on the surface of the apatite-coated PEEK. As for apatite, zinc and/or silicon substituted strontium apatite were prepared and their effects on growth and differentiation of the cells were studied. Both strontium and zinc ions synergistically stimulated the growth and differentiation of pre-osteoblastic cells. Enhanced osteocalcin secretion and considerable deposition of both calcium phosphate and extracellular matrix composition were observed. Laser bonding of zinc and silicon substituted strontium apatite on PEEK surface produced an excellently bioactive and osseointegrated PEEK material especially suitable for spinal implants.

研究分野：整形外科

キーワード：PEEK インプラント 骨癒合 アパタイト レーザー ストロンチウム 骨形成促進

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化が急速に進む中、年齢とともに骨は脆弱化が進むため一旦障害が発生すると既存の治療方法では十分な機能回復が期待できないケースが今後益々増えてくる。整形外科領域においては高齢者や骨粗しょう症患者のような脆弱骨に対応可能な整形外科用インプラントの開発が強く望まれている。チタンのような剛性の高いインプラントでは周辺骨がストレスシールドの影響でさらに骨吸収が進むことから、より生体骨の物性とバランスの取れたインプラントが求められている。

高齢者に限らず肩こりや腰痛は日本人の約8割が生涯で一度は経験する疾患であり、原因として脊椎の疾患が最も多い。脊椎のアラインメントが椎体や椎間板の損傷などで損なわれた場合、神経が圧迫され疼痛を生じるが、保存的処置で改善が見込めない場合には脊椎インプラントを用いた脊椎固定術が適用される場合がある。

脊椎インプラントは現状チタン製が多く、その殆どが外国製である。チタン製脊椎インプラントの問題は上記のように移植部周辺骨に対するストレスシールドの影響から骨吸収による脊椎の一層の脆弱化が問題である。また、外国人の体軀に合わせたサイズ設計になっており、日本人の体軀にそぐわないケースが多いことも問題である。これに対して、近年生体適合性高分子材料として PEEK（ポリエーテルエーテルケトン）製脊椎インプラントが使用されるケースが次第に増えて来ている。PEEK の力学的物性は生体骨により近く、骨吸収の問題は回避しやすいが、骨との接合性が欠如していることから骨癒合性の改良が大きな問題である。最近、表面を多孔質加工することで新生骨の侵入（イングロース）の場を提供しインプラントと移植母床間の **osseointegration** を促進させる提案もなされているが、基本的に PEEK 材料表面と骨とは接合しないことから効果には限界があると考えられる。PEEK 樹脂は様々な方法で3次元立体造形によるオーダーメイド化が可能であるため、個々の患者の体形に合わせたインプラントの設計が可能である。PEEK 樹脂成型後に表面改質を行うことで骨癒合性を付与するようなプロセスの実現が望まれている。

### 2. 研究の目的

PEEK 樹脂の表面改質を行い表面に骨との親和性を高めるために生体硬組織の成分であるアパタイト皮膜を形成することを検討する。従来からの様々な方法で形成したアパタイト皮膜は、PEEK 樹脂との接着性に劣るため、PEEK 樹脂と一体化した極めて強固なアパタイト・PEEK 接合皮膜を形成することを目的とし、炭酸ガスレーザーによる熱溶着技術の開発を検討する。

さらに、アパタイトとして各種金属イオンを導入した新規なアパタイトの合成とその利用を検討する。インプラント表面において骨形成を促進させることで、インプラントの移植母床における骨癒合の完成を早めることを目的とする。骨形成促進作用を示す成分として従来は BMP-2 などのタンパク質の利用が検討された時期もあったが、高価であり、滅菌が困難で副作用の問題もあるため本研究では無機素材としてストロンチウムの利用を検討する。ストロンチウムは骨芽細胞を活性化し、一方で破骨細胞の働きを抑制する作用を示すことが知られている。さらにストロンチウムと相乗の効果を期待して亜鉛やケイ素を導入したアパタイトの利用も検討する。これらにより、インプラント自体が骨形成促進作用を示し、治癒を早める作用を具備する骨癒合性を改良した PEEK 製インプラントの実現を可能とする基盤技術の完成を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 炭酸ガスレーザーとしてキーエンス社製 3-Axis Laser Marker ML-Z9510 を用いた。レーザー照射条件として、出力 30W, working distance 300 mm、スポット径 217  $\mu\text{m}$ 、スキャンピッチ 140  $\mu\text{m}$  とし、Duty100%の条件で様々なスキャン速度を変化させ、照射中の試料の表面温度を測定した。表面温度の測定は高速デジタルパイロメーター（LumaSense Technologies Inc. IGA6/23）を使用し、デジタルオシロスコープ（Siglent Technologies、SDS1000CML）を介して PC にデータを取り込み解析した（図1）。尚、working distance は焦点距離の約 1.5 倍にとり defocusing することでスポット部のエネルギー密度を下げアブレーションを回避した。

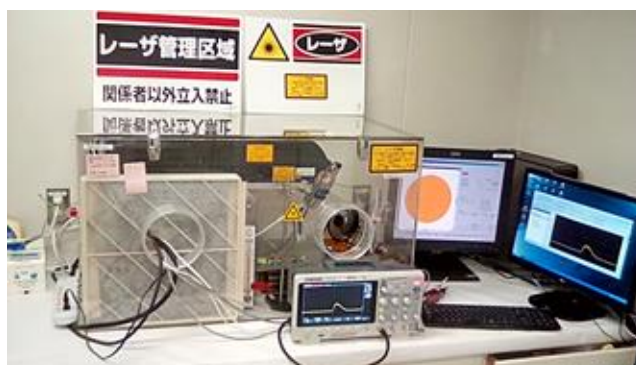


図1 炭酸ガスレーザーと測定系。装置全体をアクリル製ボックス内に設置し、ターゲットをレーザー直下に設置しレーザー照射した。高速表面温度計からの出力はデジタルオシロスコープに取り込み、PCで解析した。

(2) スترونチウムアパタイト (SrHAP) ( $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) の合成はリン酸水素ストロンチウム ( $\text{SrHPO}_4$ ) を水酸化ナトリウム水溶液中で加熱して合成した。ケイ酸ストロンチウムアパタイト (SrSiP) ( $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_2$ ) の合成はリン酸水素ストロンチウムをメタケイ酸ナトリウム水溶液中で加熱して合成した。亜鉛置換ケイ酸ストロンチウムアパタイト (SrZnSiP) ( $\text{Sr}_{10-y}(\text{Zn})_y(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_2$ ) の合成は SrSiP に対して塩化亜鉛を添加し、過剰のアンモニア水を加えて加熱することで合成した。

ストロンチウムアパタイト分散液の作製は、各々の粉体 5 グラムに対してクエン酸を 0.25 グラム添加し、100ml 容量ポリプロピレン製容器内でエタノール 25 グラムおよびジルコニアボール (ニッカトー YTZ-0.3) 100 グラムを加えて 2 日間 (9 時間×2 日) 振とう器を用いて 200 cpm の速度で往復運動することでアパタイト粉末を微細化し、得られた分散液をデカンテーションで分離し、これをコーティング溶液として使用した。

PEEK 製インプラントのモデルとして PEEK 樹脂 (Victrex 450G) を厚さ 1mm、直径 13 mm にカットした円形ディスクを使用し、この表面に上記のアパタイト分散液をコーティングし乾燥した。その後前記した炭酸ガスレーザーにより表面を加熱した。

(3) 細胞培養は F344 ラット大腿骨から採取し培養後に得た骨髄間葉系幹細胞を  $1 \times 10^6$  個/ml の浮遊液とした。これに人工骨を浸漬し、陰圧下で細胞搭載した。12 ウェルプレート内で、14 日間 37 °C で培養した。培地は MEM 培地に FBS (ウシ胎児血清) およびデキサメタゾン、 $\beta$ -グリセロリン酸、アスコルビン酸を加えた骨形成培地を使用し、2 日毎に培地交換した。骨形成マーカーとして培地中に分泌されたオステオカルシン濃度を ELISA 法により測定した。

#### 4. 研究成果

アパタイトをコーティングした PEEK ディスクを炭酸ガスレーザー照射しながら表面温度の計測を行い図 2 に示す結果を得た。レーザー光をディスク表面で高速スキャンし、ディスク表面全面で均一な温度プロファイルを得て熱溶着することが出来た。PEEK 樹脂の融点である約 340°C まで加熱することでアパタイトが熱溶着することを見出した。

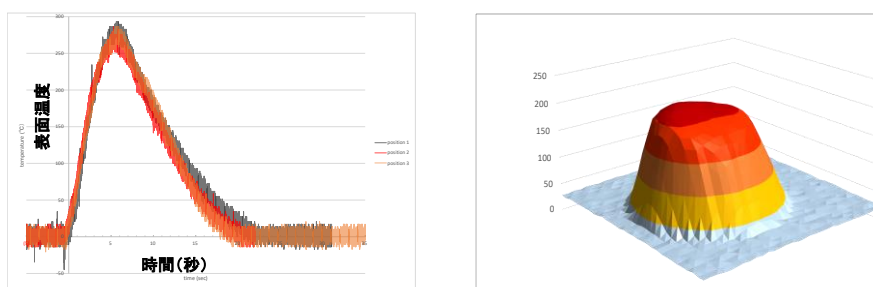


図 2 (左)炭酸ガスレーザー照射時の表面温度の計測結果。PEEK ディスク上の様々な位置における表面温度の重ね合わせ。(右) 表面温度の 3 次元プロファイル。レーザー加熱直後にサーモグラフィ (カスタム社サーモキャプチャー THG-01) で測定した。

熱溶着したアパタイト層の表面写真 (SEM 観察) を図 3 に示した。表面に夥しい亀裂とドーム状の隆起が認められたが、隆起部は PEEK 内部に閉じ込められた水分がレーザー加熱により蒸発することで形成されたものと推測され、予め PEEK ディスクを 150°C で加熱することで解消した。亀裂に関しては、照射後の冷却による急激な体積収縮を避けるため PEEK ディスクを 200~300°C に加熱しながらレーザー照射することで大幅に減少することを見出した (図 4)。

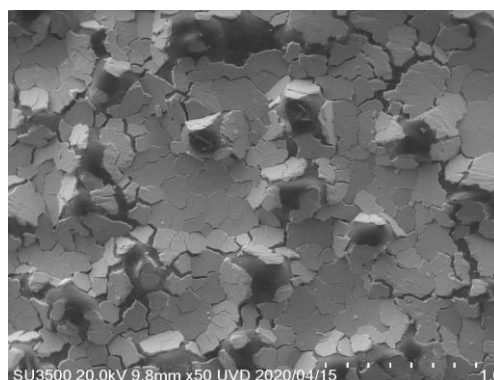


図 3 アパタイトをコーティングした PEEK ディスクを室温下でレーザー加熱した場合の表面形状。倍率 50 倍。アパタイトは SrZnSiP を使用した。

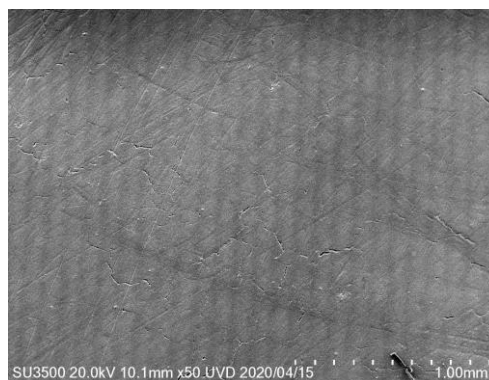


図 4 150°C で予備加熱後に SrZnSiP をコーティングした PEEK ディスクを 300°C に加熱しながらレーザー加熱した場合の表面形状。倍率 50 倍。



レーザー溶着したアパタイト層をSEMにより詳細に解析を行った(図5)。液体窒素中にディスクを浸漬して冷却後、裏面からハンマーで粉碎しコーティング層の凍結断面の観察を行った。図5には、コーティング層断面のSEMによる観察と、EDS(エネルギー分散型X線分光器)によるストロンチウムの元素マッピング像を示した。ストロンチウムの分布はSEM像におけるコーティング層の界面からPEEKバルク層中に拡散している様子が観察された。

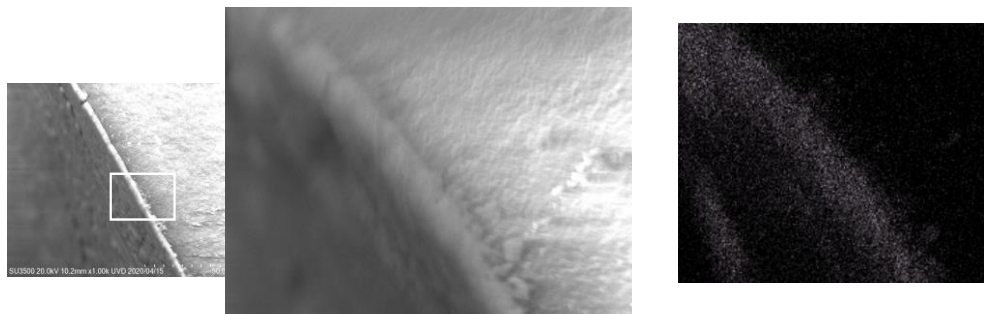


図5 (左)レーザー溶着後のアパタイト層の凍結断面写真(倍率1000倍)。(中央)右図の拡大写真(3500倍)。(右)ストロンチウムの元素マッピング像(3500倍)。

次にアパタイト層を酸エッチングにより溶解除去してアパタイト層の直下のPEEK樹脂表面の状態を観察したところ、図6に示すようにアパタイト層の亀裂をそのままレリーフしたPEEK樹脂表面が露出した。アパタイト層内のアパタイト粒子同士がレーザー加熱で焼結すると同時に、大気中への熱拡散により急速に冷却されることで体積収縮が起こり、これにより表面に亀裂が発生すると考えられた。その際、アパタイト層がPEEKバルク層に拡散していることから、アパタイト層の体積収縮に伴いPEEK表面の混合界面も同様に収縮することでこのようなレリーフパターンがPEEK表面に形成されたと考えられた。

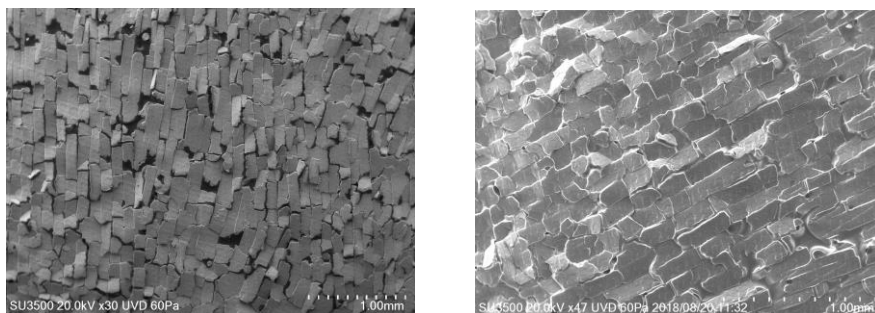


図6 (左)レーザー溶着後のアパタイト層の表面写真(倍率30倍)。(右)アパタイト層を酸エッチングで溶解除去した後の表面写真(倍率47倍)。

上記のようにして作製したアパタイトをレーザー溶着したディスクの表面において、ラット大腿骨から採取し培養後に得た骨髄間葉系幹細胞の培養を行った。

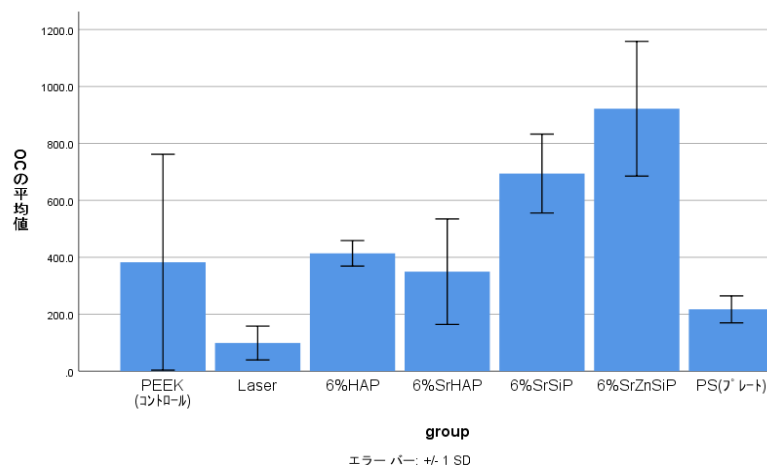


図7 各種アパタイトをレーザー溶着したPEEKディスク表面で細胞培養を行い、day14において培地中に分泌されたオステオカルシン濃度の比較。

図7には、細胞培養後 day14 において培地中に分泌されたオステオカルシン濃度の比較を示した。ここでアパタイトとして SrHAP、SrSiP、SrZnSiP および比較として HAP(ハイドロキシアパタイト:市販品)の4種類を用い、さらにレーザー加熱のみ施した PEEK ディスクと未処理のディスクを比較に用い、セルプレートで培養した結果も併せて示した。図7より、アパタイトとして SrZnSiP を用いた場合に最もオステオカルシンの分泌濃度が高い結果を示しており、ストロンチウムおよび亜鉛の存在により骨芽細胞前駆体細胞の骨芽細胞への分化が促進されることを示唆するものであった。

細胞培養前後における表面の形状変化と元素分析結果を比較した結果を図8に示した。図8において細胞培養後の表面にはリン酸カルシウムの沈着と細胞外マトリクスに由来するものと考えられる有機物(炭素および窒素の存在が右下図に表れている)の析出が認められた。

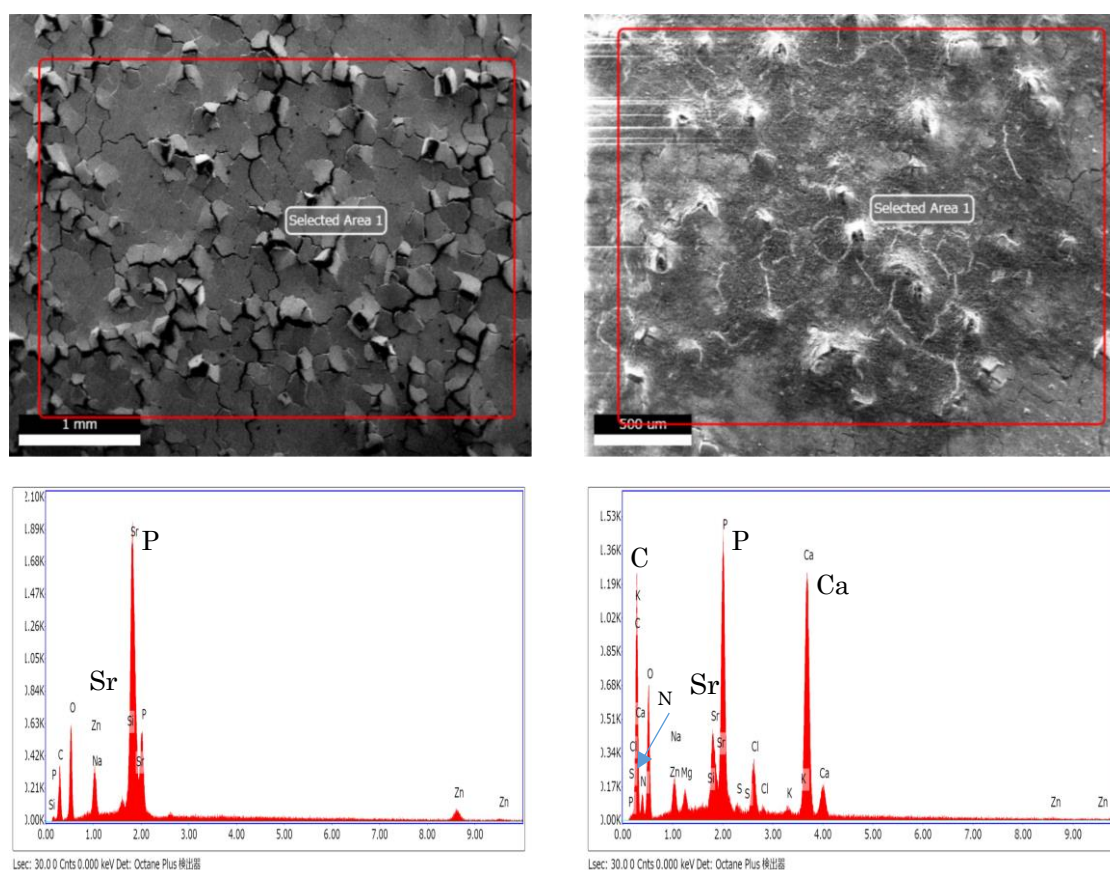


図8 SrZnSiP をレーザー溶着した PEEK ディスク表面における細胞培養前後の表面写真。左上はコーティング表面(倍率30倍)とEDSによる元素分析結果(左下)。右上は細胞培養後の表面写真と元素分析結果(右下)。

アパタイトをレーザー溶着した PEEK ディスク表面で細胞培養した結果、いずれのアパタイトを用いた系でもリン酸カルシウムの沈着が認められ、さらに表面を強く擦過してもリン酸カルシウムは脱落することなくアパタイト層とともに PEEK 表面に強固に接着していることを確認した。これらの結果より、アパタイトのレーザー溶着により PEEK 表面に良好な osseointegration が実現しており、骨形成はストロンチウムおよび亜鉛の存在で促進されることが示された。これより、SrZnSiP をレーザー溶着した PEEK 樹脂を用いたインプラントとしての利用に際して、PEEK と移植母床における生体骨との界面における骨癒合の早期の完成が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akira Furukawa, Manabu Akahane and Yasuhito Tanaka	4. 巻 782
2. 論文標題 CO2 Laser Bonding of Silicate-Substituted Strontium Apatite on PEEK and Osteointegration on its Surface	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Key Engineering Materials	6. 最初と最後の頁 145-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4028/www.scientific.net/KEM.782.145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egawa T, Inagaki Y, Akahane M, Furukawa A, Inoue K, Ogawa M, Tanaka Y	4. 巻 20
2. 論文標題 Silicate substituted strontium apatite nano coating improves osteogenesis around artificial ligament.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） h/https://doi.org/10.1186/s12891-019-2777-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akira Furukawa, Manabu Akahane and Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 CO2 Laser Bonding of Silicate-Substituted Strontium Apatite on PEEK and Osteointegration on its Surface
3. 学会等名 Bioceramics30（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川彰、赤羽学、田中康仁
2. 発表標題 -SrHP04のストロンチウムアパタイトへの変換と表面における骨髄間葉系幹細胞培養
3. 学会等名 日本セラミックス協会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川彰、吉良務、赤羽学、田中康仁
2. 発表標題 ケイ酸ストロンチウムアパタイトの合成と人工骨への表面コーティング
3. 学会等名 日本セラミックス協会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Furukawa A., Akahane M., Kawasaki S. and Tanaka Y.
2. 発表標題 Improved Osseointegration of Bone Substitutes by Zinc or Magnesium Substituted Strontium Apatite Coatings
3. 学会等名 Bioceramics31 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川彰、赤羽学、川崎佐智子、吉良務、田中康仁
2. 発表標題 整形外科用インプラント表面への各種ストロンチウムアパタイトのレーザー溶着加工と骨形成促進作用に関する検討 (第三世代の整形外科用インプラントに向けて)
3. 学会等名 砥粒加工学会 学術講演会 (ABTEC 2019)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ケイ酸ストロンチウムアパタイトおよびこれを含む細胞培養基材と生体活性インプラント	発明者 赤羽学、田中康仁、 古川彰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-208653	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 低結晶性ストロンチウムアパタイトとそれを利用した医療用インプラントおよびその製造方法	発明者 古川彰、赤羽学、川 崎佐智子、田中康仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-154977	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	赤羽 学  (AKAHANE MANABU)  (40326327)	国立保健医療科学院・医療・福祉サービス研究部・部長    (24601)	
研究分担者	田中 康仁  (TANAKA YASUHITO)  (30316070)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	