

## 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 5月5日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591889

研究課題名（和文）組織誘導再生法を応用した難治性脊椎感染症に対する新しい治療法の開発  
 研究課題名（英文）Establishment of a Novel Therapeutic Strategy Using Tissue Regeneration for Intractable Spinal Infections.

研究代表者

伊東 学（ITO MANABU）

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：00271677

研究成果の概要（和文）：超音波溶解析出法により市販多孔性バイオセラミックスを部分溶解後、材料表面にリン酸カルシウム微結晶を析出させ、骨形成蛋白質（rhBMP-2）の吸着徐放性を制御し、生体吸収性と骨誘導性に優れたリン酸カルシウム系セラミックスを開発した。バイオセラミックスの表面改質方法として、輸液中の超音波処理技術を確立し、その抗生物質（セファゾリン）吸着徐放性を解明した。組織誘導再生に適切な生体模倣性アパタイト/コラーゲン複合材料を合成し、良好な生体吸収性を立証した。臨床感染巣の新しい定量的評価法の確立には、8例の難治性脊椎感染患者に対して、FDG-PET CTによる感染重症度マッピングの作成を行った。

研究成果の概要（英文）：Commercial porous bioceramics were partially dissolved in saturated acid solutions and calcium phosphate microcrystals were precipitated on the surfaces of bioceramics by the supersonic dissolution-precipitation method. Calcium phosphate ceramics having excellent bio-absorption and osteoinduction were newly produced by controlling adsorption and release characteristics of bone-morphogenetic protein (rhBMP-2). As a surface modification technique of bioceramics, the supersonic treatment technology using commercial parenteral fluids was established and antibiotic (Cefazolin)-adsorption and release characteristics on the ceramics were clarified. Biomimetic composites of apatite and collagen which were suitable for tissue regeneration were synthesized and the good bio-absorption was recognized. Concerning a quantitative evaluation for patients with intractable spinal infections, severity maps of infection sites were created in 8 cases of intractable spinal infections by using FDG-PET CT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リン酸カルシウム、超音波処理、抗生物質、骨形成蛋白質、吸着徐放性、  
脊椎感染症

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来に伴い、高齢者のQOL（生

活の質）を脅かす難治性脊椎感染症に対する効果的治療法の確立が急務とされている。そ

の際、脊椎感染症、炎症、骨融解を制御、感染巣周囲の生物学的環境を整えるような抗生物質や破骨細胞不活性化薬剤の徐放材料、椎体周辺での骨新生を促進させ、椎体破壊を阻止し、脊椎感染を収束させる骨形成因子の徐放材料の開発が切望されている。

## 2. 研究の目的

難治性感染症等の治療に有効な生体材料の開発と臨床応用を目的として、組織誘導再生法により、脊椎感染を抑制・収束させる抗生物質、骨新生を促進し椎体破壊を阻止する骨形成因子の吸着徐放性リン酸カルシウム系セラミックスを開発、それを用いた治療法を検討する。更に、感染巣の重症度を定量的に評価できる画像診断法を確立し、組織誘導再生法の臨床応用への具体的治療法の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨再生医療に有効なバイオセラミック複合材料の開発 (H21-23)

市販リン酸カルシウム系セラミックス（顆粒・多孔体）の微細構造と結晶相を変える作製技術として、超音波・攪拌処理を伴う部分溶解析出法を検討し、物理化学的特性を評価した。骨再生の足場材料として、魚由来アパタイト/コラーゲン複合材料を作製し、微細構造と生体親和性・吸収性の関係を検討した。

### (2) 抗生物質や骨成長因子の吸着徐放性セラミックスの開発 (H21-22)

抗生物質や骨成長因子の吸着徐放性セラミックスとして、部分溶解析出処理のリン酸カルシウム系セラミックスについて、所定量の骨形成蛋白質 (rhBMP-2) やセファゾリン (CEZ) を担持し、吸着徐放性を考察し、動物実験より生体吸収と骨誘導を検証した。

### (3) バイオセラミックス表面の機能設計 (H22-23)

市販リン酸カルシウム系セラミックス顆粒の効果的、効率的な表面改質技術として、超音波処理条件（輸液の種類、処理温度と時間）を選定し、表面特性を評価した。

### (4) 組織誘導再生に及ぼす固液界面の解明 (H22-23)

各種輸液中で超音波処理した HAp セラミックス顆粒を用いた CEZ 吸着等温線の作成と疑似体液への徐放量の測定から、CEZ 吸着徐放機構を考察した。

### (5) FDG-PET CT を用いた脊椎感染巣の重症度に関する定量的評価法の確立

(H22-23)

重篤な脊椎感染症の症例 8 例に対し、

FDG-PET CT を用いて感染巣内の糖代謝を定量化し、感染巣内の重症度のマッピングを作成し、手術所見との相関について検討した。また、従来の MRI や CT 画像との画像情報の特性について比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) リン酸カルシウム系セラミックスの表面改質と機能設計

リン酸カルシウム系セラミックスとして、HOYA 社製水酸アパタイト (HAp) の AX A-1 (気孔率 85%) と B-4-1010 (55%)、オリンパス・テルモ・バイオマテリアル社製リン酸三カルシウム (β-TCP) の A3 (75%) を選択した。それらを 5×5×5mm 立方体に切断加工し、HNO<sub>3</sub> 水溶液に完全溶解後、同種試料を浸漬、部分溶解した。酸処理は、298K、300rpm、1-24h の攪拌溶解、120W、38kHz、5-20min の超音波溶解を採用した。

HAp の飽和 HNO<sub>3</sub> 水溶液中 HAp セラミックスの溶解特性では、時間の経過に伴い、AX A-1、B-4-1010、A3 の溶解と崩壊現象が同時に進行し、溶解効率は単調に増加、機械的強度は徐々に低下した。超音波溶解は、攪拌溶解に比べて AX A-1、B-4-1010、A3 の溶解効率が顕著に高く、微小亀裂も多数観察され、短時間の表面改質に効果的な酸処理法であることが分かった。超音波溶解 15min でリン酸カルシウム系セラミックスの溶解効率は A3 が 56%、AX A-1 が 46%、B-4-1010 が 15% であり、β-TCP は HAp より溶解崩壊性が強い傾向を示した。

部分溶解後の AX A-1 や A3 に NH<sub>3</sub> 水を添加し、298K、pH 6-10 で析出、24h 熟成、濾過洗浄、乾燥により、それぞれ、PDP-HAp や PDP-TCP セラミックスを作製した。15min 超音波溶解、pH 9-10 で 24h 析出の PDP-HAp セラミックスでは、HAp 単一相が得られた。AX A-1 の初期形状は維持され、HAp 顆粒に複合化したナノ結晶が析出し、体液浸透に有益なマクロ・ミクロ細孔及び微小亀裂が観察された。一方、1h 攪拌溶解、pH6-7 で 24h 析出の PDP-TCP セラミックスでは、CaHPO<sub>4</sub>、HAp、β-TCP 相が同定され、試料形状が塊に激変、板状凝集結晶が生成し、比表面積と全細孔容積は顕著に増加した。

### (2) 抗生物質や骨成長因子の吸着徐放性セラミックスの開発

A3、PDP-HAp、PDP-TCP セラミックスを用いて、骨形成蛋白質 (rhBMP-2) の用量依存性を調べ、その徐放性と骨誘導、骨組織の関係を考察した。そのセラミックスに所定量の rhBMP-2 を添加し、ラット背部皮下組織内へ埋入、3 週後に摘出、固定、脱灰、及び H-E 染色後、形態学的に組織標本を観察した。

ラット背部皮下組織内埋入 3 週後では、

PDP-TCP セラミックスは A3 より、体液が浸透し骨組織面積が広く、少ない rhBMP-2 用量 (0.3 $\mu$ g) で徐放性を制御した骨誘導が可能であった。

rhBMP-2 (5 $\mu$ g) 添加のラット頭頂骨骨膜上へ埋入では、4 週後で PDP-HAp は全ての細孔内に、HAp は一部の細孔内に硬組織形成が認められ、8 週後で PDP-HAp は辺縁部に梁状骨が、HAp は単なる新生骨が形成された。

ウサギ大腿骨埋入では、AX と PDP-HAp は周囲組織との親和性が良好であり、4 週後で骨進入が認められ、16 週後で AX が立方体を保つのにに対し、PDP-HAp は角が丸く吸収され、新生骨の存在量が多いことが判明した。これは、微小亀裂の進展とナノ結晶の生成が体液浸透を促し、破骨細胞の分化や機能を刺激、骨芽細胞を活性化したためと推察される。

以上の結果から、市販リン酸カルシウム系セラミックスは、溶解析出条件の選定により生体吸収性を改善、骨リモデリングを促進する微細構造設計が可能である。特に、超音波溶解析出法は、体液浸透と骨伝導に優れた生体模倣セラミックスの簡易作製技術に有効であると考えられる。

### (3) バイオセラミックス表面の機能設計

市販 HAp (HOYA 製、直径 20-50 $\mu$ m) 球状顆粒を Amino-fluid 輸液 (大塚製薬製: アミノ酸 (Amino-U)、糖質と電解質 (Amino-D)、混合液 (Amino-C)) 中で 120W、38kHz、5-15min 超音波処理し、遠心分離、乾燥により Amino-U/HAp、Amino-D/HAp、Amino-C/HAp 顆粒を作製した。いずれの輸液でも 15 min 以内の超音波処理では、HAp 顆粒の球形は保持された。室温乾燥 Amino-C/HAp では、表層に輸液由来の付着凝集物が観察され、窒素吸着法によるマイクロ・メソ細孔領域において、直径 3-5 nm、30-60nm の部分細孔容積の極大が認められ、比表面積はと全細孔容積は減少した。一方、Amino-U/HAp は 10-20  $\mu$ m の線状凝集物が、Amino-D/HAp は直径 1-10  $\mu$ m の楕円状凝集物が観察され、それらの比表面積と全細孔容積は同等の値であった。

### (4) 組織誘導再生に及ぼす固液界面の解明

#### ① HAp セラミックスの CEZ 吸着特性

バッチ法により、各種 HAp セラミックスと CEZ 生理食塩水溶液を混合し、セラミックス表面上の CEZ 吸着量を測定し、生体模倣環境中の吸着機構を考察した。

HOYA 社製 HAp (G-S-10、カラム用) 顆粒またはウシ由来焼成・溶解析出アパタイト (r-HAp) 粉末を 0.5-2.0 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ -CFZ 溶液や生理食塩水へ添加し、異なる吸着温度の 295K、310K で 72h 攪拌混合、遠心分離後、その上澄み液を紫外線分光分析 (272.6nm) より CEZ 濃度を測定し、吸着量を算出した。G-S-10、

カラム用 HAp 及び r-HAp では、吸着前後で HAp 単一相が得られ、溶液中の pH は 5.2-5.5 から 6.0-6.9 へ変化し、比表面積が低く HAp の結晶性のよい G-S-104 は、溶解率は低い値となった。

同様に、Amino/HAp を CEZ 生理食塩水溶液へ添加し、309.5K で 72h 攪拌混合した HAp (CEZ/Amino/HAp) 顆粒を作製した。HAp 表面の CEZ 吸着は Langmuir 型単分子層吸着に近似された。CEZ 吸着後でも HAp 単一相が得られ、溶液の pH は 5.2-5.5 から 6.3-7.7 へ変化し、Amino-C/HAp は HAp に比べ溶解率が低く、CEZ 吸着量は多少高い値になった。

生体環境を模倣した擬似体液の循環系では、CEZ の吸着・徐放挙動は、HAp 表面上に存在する吸着サイトが、温度、pH、流速に依存した溶解析出反応により変動するため、HAp 顆粒サイズと細孔分布の設計・制御が重要と推察される。

#### ② HAp セラミックスの CEZ 徐放特性

CFZ 吸着の室温や凍結乾燥顆粒を 309.5K、pH7.40 で擬似体液 (SBF:細胞がない疑似血漿溶液) へ浸漬攪拌後、CEZ 徐放率の経時変化を測定した。凍結乾燥 Amino-C/HAp の徐放率は最も高く、浸漬 1h で 39% から単調に減少するのに対し、室温乾燥 Amino-C/HAp と HAp の徐放率はそれぞれ、4h 以後 10%、1-72h で 6% の一定値を示した。各種輸液処理顆粒を用いた徐放率の序列は Amino-D/HAp、Amino-C/HAp、Amino-U/HAp となり、アミノ酸を吸着した HAp 表面における強い CEZ 分子の吸着強度が示唆された。

以上の結果から、輸液組成と凍結乾燥を選定した超音波表面修飾により HAp 顆粒の微細構造を制御し、CEZ 吸着・徐放機能の設計が可能であることが明らかになった。

### (5) 魚由来生体模倣材料の創製と評価

鮭骨の焼成、酸溶解により HAp 水溶液を、鮭皮の脱脂、酸抽出、消化、塩析、透析によりアテロコラーゲン水溶液を調製した。それらを所定比 (H/C) で混合後、pH 7.5-7.9 で熟成、HAp/コラーゲン (HA-C) 複合材料を合成した。H/C=3.5 で HAp 凝集粒子が、H/C=2 でコラーゲンに配向した柱状 HAp 粒子が観察された。

生物検定では、HA-C 粉末をラット背部皮下組織内へ埋入 2 週後で、HAp 微粒子内へ体液がよく浸透し、巨細胞浸潤が認められ、良好な生体吸収性が検証された。

### (6) FDG-PET CT を用いた感染症重症度評価の確立

手術所見における活動性のある感染巣 (外科的な搔爬術を行った部位) の SUV 値 (standardized uptake value) は 3.9 以上であり、膿瘍形成部では 6.0 以上であった。3

以下の領域は反応性の組織像を呈する領域も多く、必ずしも外科的治療を必要とする部位ではないと判断された。この結果から、今後感染巣の治療をより限局して行うことができる可能性が示唆された。

以上の、組織誘導再生法、抗生物質の効果的徐放法の融合と、感染巣の重症度マッピングにより、将来、低侵襲で効果的な脊椎感染の治療の確立の基礎的情報が集積できた。

#### 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17件)

① T Akazawa, M Murata, M Ito, et al., Characterization of bio-absorbable and biomimetic apatite/collagen composite powders derived from fish bone and skin by the dissolution-precipitation method, Key Engineering Materials, 査読有, 493-494, 2012, 114 - 119, doi: 10.4028 / www.scientific.net/ KEM. 493-494. 114

② 伊東 学, 腰椎感染性病変に対する内視鏡手術, MB Orthop, 査読無, 25 巻, 2012, 54-60

③ 長濱 賢, 伊東 学, 脊椎感染症と腰痛. 脊椎感染症と腰痛. 第6章脊椎各要素と腰痛 (1) 椎体. 脊椎脊髄 25(4), 月刊脊椎脊髄ジャーナル, 査読無, 25 巻, 2012, 281-287

④ X Ding, M Takahata, T Akazawa, N Iwasaki, Y Abe, M Komatsu, M Murata, M Ito, et al., Improved Bioabsorbability of Synthetic Hydroxyapatite through Partial dissolution-precipitation of its Surface, J Mater Sci: Mater Med, 査読有, 22 巻, 2011, 1247-1255, DOI 10.1007/s10856-011-4291-x

⑤ T Akazawa, M Murata, Y Tabata, M Ito, Microstructure and Biocompatibility of Hydroxyapatite Porous Ceramics Designed by a Partial Dissolution-Precipitation Technique with Supersonic Treatment for Bone Regeneration, Bone Regeneration, INTECH, 査読有, 2011, ISBN 978-953-308-68-4.

⑥ M Ito, et al., Retrospective Multicenter Study of Surgical Treatments for Osteoporotic Vertebral Fractures, Journal of Orthopaedic Science, 査読有, 15 巻, 2010, 289-293

⑦ T Akazawa, M Murata, M Takahata,

X Ding, Y Abe, K Nakamura, J Hino, J Tazaki, K Ito, M Ito, et al., Characterization of microstructure and bio-absorption of hydroxyapatite ceramics modified by a partial dissolution and precipitation technique using supersonic treatment, Journal of Ceramic Society of Japan, 査読有, 118 巻, 2010, 535-540

⑧ M Komatsu, M Takahata, M Sugawara, Y Takekuma, T Kato, M Ito, et al., Penetration of linezolid into rabbit intervertebral discs and surrounding tissues, European Spine Journal, 査読有, 19 巻, 2010, 2149- 2155

⑨ H Sudo, M Ito, et al., One-stage posterior instrumentation surgery for the treatment of osteoporotic vertebral collapse with neurological deficits, European Spine Journal, 査読有, 19 巻, 2010, 907-915

⑩ M Murata, T Akazawa, M Takahama, M Ito, et al, Bone induction of human tooth and bone crushed by newly developed automatic mill, Journal of the Ceramic Society of Japan, 査読有, 118 巻, 2010, 434-437

⑪ M Ito, et al., Simultaneous Double Rod Rotation Technique in Posterior Instrumentation Surgery for Correction of Adolescent Idiopathic Scoliosis, J of Neurosurgery:Spine, 査読有, 12 巻, 2010, 93-300

⑫ 放生 憲博, 伊東 学, ほか, 脊椎外科における生体内吸収性材料使用の可能性, 脊椎脊髄, 査読無, 23 巻, 2010, 59-65

⑬ 伊東 学, 化膿性脊椎炎に対する経皮的鏡視下病巣搔爬洗浄術, The Spine Perspective, 査読無, 7 巻, 2010, 11-14

⑭ 伊東 学, 脊柱再建術における生体材料の歴史的展開—ショートレビュー—, 脊椎脊髄, 査読無, 23 巻, 2010, 16-18

⑮ M Ito, et al., Minimally invasive surgical treatment for tuberculous spondylodiscits, Minimally Invasive Neurosurgery, 査読有, 52 巻, 2009, 250-253

⑯ T Akazawa, M Murata, M Takahama, D Xianjun, Y Abe, K Nakamura, J Hino, J Tazaki, K Ito, M Ito, et al., Microstructure and Bio-Absorption

Characteristics of Hydroxyapatite Modified by a Partially Supersonic Dissolution-Precipitation Technique, Archives of BioCeramics Research, 査読有, 9 巻, 2009, 123-126

①赤澤 敏之, 村田 勝, 伊東 学, 生体模倣性アパタイトの開発と骨再生工学, Phosphorus Letter, 査読有, 66 巻, 2009, 4-13

[学会発表] (計 17 件)

①K Nagahama, M Ito, et al., Posterolateral endoscopic debridement and irrigation for postoperative spinal infections in the thoraco-lumbar spine, 12th Annual Conference of International Society for the Advancement of Spine Surgery (招待講演), March 2-23, 2012, Spain

②伊東 学, 脊椎感染症の最近の動向と治療最前線, 長崎 LCS フォーラム (招待講演), 2011. 11. 17, ホテルニュー長崎 (長崎県)

③ T Akazawa, M Ito et al., Characterization of bio-absorbable and biomimetic apatite/collagen composite powders derived from fish bone and skin by the dissolution-precipitation method, Bioceramics 23, November 6-9, 2011, Turkey

④M Ito, Minimally invasive surgery for spinal infection, A0 spine advances course (招待講演), Sept29-Oct1, 2011, Yokohama Symposia, Kanagawa

⑤赤澤敏之, 伊東学 他, 水酸アパタイト顆粒の表面設計とその抗生物質吸着特性, 日本セラミックス協会秋季シンポジウム, 2011. 9. 7-9, 北海道大学 (札幌市)

⑥伊東 学, 脊椎外科領域におけるバイオマテリアルの現状と将来, 日本セラミックス協会秋季シンポジウム, 2011. 9. 7-9, 北海道大学 (札幌市)

⑦M Ito, The role of minimally invasive surgery for treatment of spinal infections, 2011 Annual Meeting of Taiwan Spine Society, 19th Annual Congress of Taiwan of Spine Society (招待講演), March 19, 2011, Chang Gung Memorial Hospital, Taipei, Taiwan

⑧M Ito, Evidence of effectiveness of MIS treatment for spinal infections in thoracic to lumbosacral spine, 15th

International ArgoSpine Symposium (招待講演), Jan27-18, 2011, France

⑨M Ito, Evidence of effectiveness of MIS treatment for spinal infections in thoracic to lumbosacral spine, 15th ArgoSpine Symposium (招待講演), Jan 27-18, 2011, Pullman Paris Tour Eiffel, Paris, French

⑩M Ito, Effectiveness of posterolateral endoscopic debridement and irrigation for various types of spinal infection at thoracic and lumbar spine, The 5<sup>th</sup> Sino-Japan Symposium on Spine Infections (招待講演), Dec 2-4, 2010, HJ International Hotel, Dongguan, China

⑪M Ito, Minimally invasive surgery for spinal infection, A0 spine advances course (招待講演), Sept30-Oct2, 2010, Yokohama Symposia, Yokohama, Japan

⑫ M Ito, et al., Effectiveness of Posterolateral Endoscopic Debridement and Irrigation for Various Types of Spinal Infection at Thoracic and Lumbar Spine, 7th SICOT/SIROT Annual International Conference combined with Swedish Orthopaedic Association (招待講演), 30 Aug - 3 Sept, 2010, Swedish Exhibition and Congress Centre, Gothenburg, Sweden

⑬ M Ito, Infectious spondylodiscitis treated by endoscopic debridement, 2<sup>nd</sup> World Congress of Minimally Invasive Spine Surgery and Techniques (招待講演), May31-June4, 2010, The MGM Grand Hotel, as Vegas, USA

⑭ M Ito, Percutaneous endoscopic procedure for spinal infections, The 2<sup>nd</sup> MISS Summit Forum (招待講演), 2010. 3. 13, Aichi Spine Center, Aichi

⑮M Ito, MIS for discitis and spondylitis, A0 Spine Advanced Course, 2009. 9. 17, Yokohama Symposia, Yokohama

⑯伊東 学, 臨床現場が金属材料に求める生体機能の即時代替と生体適合性の向上, 日本金属学会 2009 年秋季大会 (招待講演), 2009. 9. 15, 京都大学, 京都

⑰伊東 学, 高齢化社会における硬組織再生・再建の重要性, 第 18 回硬組織再生生物学会学術大会・総会 (招待講演), 2009. 9. 5,

北海道医療大学札幌キャンパス, 札幌

[図書] (計1件)

伊東 学, 中山書店, 膿性脊椎炎. 肩こり・  
頸部痛クリニックプラクティス, 整形外科  
臨床パサージュ, 2011, 8ページ (140-147)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 学 (ITO MANABU)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号: 00271677

### (2) 研究分担者

赤澤 敏之 (AKAZAWA TOSHIYUKI)

地方独立行政法人 北海道立総合研究機構・  
産業技術研究本部 工業試験場高分子・セラ  
ミックス材料グループ・研究主幹

研究者番号: 80469692

放生 憲博 (HOJYO YOSHIHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 60451423

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: