

令和元年6月5日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03056

研究課題名（和文）粗鬆骨でもゆるまない内固定材料の開発

研究課題名（英文）Development of internal fixation material that does not loosen for osteoporosis

研究代表者

六崎 裕高（Mutsuzaki, Hirotaka）

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50550927

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症ラットを用い、FGF-2をハイドロキシアパタイトに担持した体内固定用ピン（Ap-FGFピン）の効果検証を行った。その結果、Ap-FGFチタンピンは、粗鬆骨においても固着強度の値が高く、初期固定性が良いことが示唆された。次に、Ap-FGFスクリュー周囲骨形成の効果と不良発生率の評価に関して、ウサギを用い検証を行った。その結果、Ap-FGF層には安定した骨形成作用があり、ピン周囲の骨形成不良のリスクを大幅に低減できることが示された。さらに、サルを用いてAp-FGFスクリューの安全性・有効性の検証を行った。その結果、Ap-FGFスクリューは安全であり、骨形成効果があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共沈担持法でシグナル物質であるFGF-2を担持させ徐放させる技術を体内固定用ピンに応用したのは、我々が初である。本技術は全て薬事法上の認可物である医療用材料のみで施行可能であるため、薬事申請を目指す場合に非常に有利である。この材料の開発は、骨粗鬆症患者の骨において有効な固定力を有する内固定材料開発の第一歩となる。これにより、健康寿命の延伸、介護費用の削減が期待できる。高齢化先進国として世界に発信すべき新しい技術になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The effect verification of the pin for internal fixation coated with FGF-2-apatite composite layers (Ap-FGF) was performed using the osteoporosis rat. As a result, it was suggested that the Ap-FGF group had a high value of the fixation strength even in osteoporosis and suggested that the initial fixation was good. We clarified the Ap-FGF titanium screws on bone formation around the screw. These screws were implanted percutaneously in tibia of rabbits. Using inflammation-free histological sections, we histomorphometrically assessed them for the presence of bone formation. Weibull plot analysis was then applied to the data. The Ap-FGF titanium screws significantly reduced the risk of impaired bone apposition to the screw. Furthermore, the safety and efficacy of the Ap-FGF screw were examined using monkeys as human-like species. As a result, it was considered that the Ap-FGF screw was safe, and effective on bone formation.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：線維芽細胞増殖因子 骨粗鬆症 ハイドロキシアパタイト 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症では内固定材料がゆるみ、それがもとでの疼痛や再手術によって、リハビリテーション開始の遅延・活動性の低下・日常生活へ復帰困難がみられる。高齢化社会を迎え、国内の骨粗鬆症患者は約 1,100 万人存在し、大腿骨近位部骨折や脊椎骨折といった骨粗鬆症に起因する骨折は増加の一途である。2012 年、大腿骨近位部骨折は約 19 万件発生し、脊椎の治療として用いられる椎弓根スクリューは約 7 万件に使用され年々増加している。このような骨粗鬆症患者の手術治療における最大の課題は、術後約 20%にみられる“内固定材料のゆるみ”である¹⁾。骨粗鬆症の高齢者では内固定材料であるネジ、プレート、髄内釘が骨と十分に固着しない。内固定材料のゆるみによる疼痛や再手術はリハビリテーション開始時期を遅延させ、活動性の低下をまねき日常生活への復帰を困難にしている。介護理由および介護者の労災事由の上位を占める腰痛、大腿骨近位部骨折などの術後リハビリテーションと予後に寄与するために、骨粗鬆症患者の骨において有効な固定力を有する内固定材料を開発する必要がある。

骨との固定力を向上させるため、内固定材料表面にハイドロキシアパタイト (Ap) でコーティングする方法が存在する。過去に、Ap を高温でプラズマ溶射した体内固定用ピンが作製され、骨との固定力が有意に強くなったことが報告された²⁾。他方、37 以下の低温で簡単に Ap コーティングを作製する方法として、過飽和の擬似体液を用い浸漬する溶液法がある³⁾。我々は、チタンピンを溶液法によって Ap コーティングし、日本白色家兎を用いた動物実験において骨固定力の向上に成功した⁴⁾。さらに、我々はこの技術を応用し、溶液法にて骨形成のシグナル物質である線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) を Ap コーティングに取り込む共沈担持法を開発した (特願 2007-184312, 特開 2009-18086)。我々は、日本白色家兎を用い、FGF-2 担持 HA コーティング体内固定用ピン (Ap-FGF ピン) を経皮的に埋植する実験を施行し、術後 4 週での骨固着強度が約 1.4 倍向上したことを報告した⁵⁾。また、皮膚軟部組織においても手術創部の修復が早く、また、ピンと皮膚軟部組織の間に密な線維性組織の結合を認め、ピンと皮膚軟部組織が強固に固着していることを確認した⁶⁾。我々は、骨とピンの固着改善と、ピン周囲の皮膚軟部組織の修復促進の効果を有する内固定材料を開発することに成功した。

FGF-2 は骨芽細胞の分化・増殖促進効果があり、比較的早期から効果を発揮し、極微量でも骨形成を促進できる^{7, 8)}。また、線維芽細胞を創傷部に遊走・増殖させ、血管新生を促進することによって軟部組織再生に寄与することができる⁶⁾。また、我々は軟部組織修復と骨固着強度の双方を向上させる溶液中の FGF-2 の濃度設定・温度設定も明らかにし、動物実験にて本 Ap-FGF ピンピンの効果の再現性を確認した⁹⁾。他のシグナル物質として BMP (Bone Morphogenetic Protein) が存在し、アメリカで臨床応用されているが、本邦では使用されていない。また、BMP は分化初期の細胞に作用するシグナルであるため、分化初期の細胞が存在しない骨粗鬆症の場合使用できない。

しかし、本 Ap-FGF ピンにおいては、骨形成における FGF-2 の安全性・有効性、粗鬆骨における有効性は不明である。

2. 研究の目的

(1) 卵巣を切除した (OVX) 骨粗鬆症ラットを用い Ap-FGF チタンワイヤーの効果検証を行う。

(2) Ap-FGF スクリュー周囲骨形成の効果と不良発生率の評価に関して、ウサギ脛骨スクリュー刺入モデルを用いて検証を行う。

(3) ヒトに近い種としてサルを用いて Ap-FGF スクリューの安全性・有効性の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) ウィスターラット 92 匹を使用しての卵巣摘出手術後 (OVX) 58 匹と卵巣摘出ししない同様手術 (Sham) 34 匹を作成した。大腿骨片側には未処理チタンワイヤーを挿入し、対側には FGF のない Ap チタンワイヤー、あるいは、Ap-FGF チタンワイヤーを挿入し、2 週間後に安楽死させた。力学試験として、各群におけるワイヤーの押し込み試験を行った。

(2) 日本白色家兎オスの脛骨近位に経皮的に Ap-FGF チタンピン、Ap チタンピン、チタンピンを挿入し 4 週で抜去し組織評価で炎症を認めない 52 羽 67 肢に対して、スクリュー抜去後の骨組織でスクリューの骨被覆率を計測した。これら 3 群を更に FGF (-): チタンピン + Ap チタンピン、及び FGF (+): Ap-FGF チタンピンの 2 群にまとめ、t 検定および不良発生確率や最低保障値を計算可能な Weibull 分析を行った。

(3) Ap-FGF チタンスクリューの安全性確認のために、カニクイザル 6 頭を用い、コントロール群 3 頭、Ap-FGF 群 3 頭とし、腰椎椎体にスクリューを 3 本ずつ埋植した。90 日間の埋植を行い、健康状態、行動異常、血液学的所見を評価した。また、画像評価として、単純 X 線でのゆるみ所見の評価を行った。組織学的評価として、脊髄・脊椎組織およびインプラント周囲の腫瘍性細胞や炎症細胞浸潤の有無を評価した。また、各群のスクリュー周囲の骨被覆率と骨形成率を組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) OVX - チタン群 54 検体、OVX - Ap チタン群 27 検体、OVX - Ap-FGF チタン群 28 検体、Sham - チタン群 30 検体、Sham - Ap チタン群 14 検体、Sham - Ap-FGF チタン群 14 検体を得ることができた。これらの検体のうち、感染などの評価不良例を削除した。力学試験としてワイヤーの押し込み試験を行ったところ、Ap-FGF チタン群 $6.1 \pm 4.0\text{N}$ に対して、チタン群 $2.7 \pm 2.4\text{N}$ であった。Ap-FGF チタン群は、粗鬆骨においても固着強度の値が高く、初期固定性が良いことが示唆された。今後も評価を継続する予定である。

(2) FGF(+)群の骨被覆率 ($88.6 \pm 4.4\%$) は、FGF(-)群の骨被覆率 ($83.0 \pm 9.5\%$) よりも有意に高かった (図1)。FGF(+)群の骨被覆率は 79~94%の狭い範囲に集中したのに対して、FGF(-)群の骨被覆率は 64~98%で低骨被覆率側にすそ野を引く分布を持ち、骨被覆の不良発生確率が高いことを示した (図2)。傾きが大きいほど不良発生率が低いことを示す回帰直線の傾き、すなわち Weibull 係数は FGF(+)群で有意に高値であった (FGF(+): 22.6、FGF(-): 9.42、 $p = 7.3 \times 10^{-34}$)。そこで、近似直線より不良発生率を 2 群に対して求めた：仮に FGF(-)群における下位 5%にあたる 63.75%以下を骨被覆不良と定義した場合、骨被覆不良検体の発生率は、FGF(+群)で 3.5×10^{-4} 、FGF(-)群で 0.05 となった。FGF(+群)と FGF(-)群の骨被覆の平均値ではわずか 6%の差であっても、骨形成不良出現確率では FGF(+群)が FGF(-)群の 142 倍低値となる (図3)。FGF-2 を含む Ap-FGF 層には安定した骨形成作用があり、ピン周囲の骨形成不良のリスクを大幅に低減できることが示された。

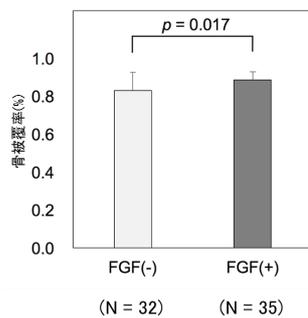


図1: 骨被覆率

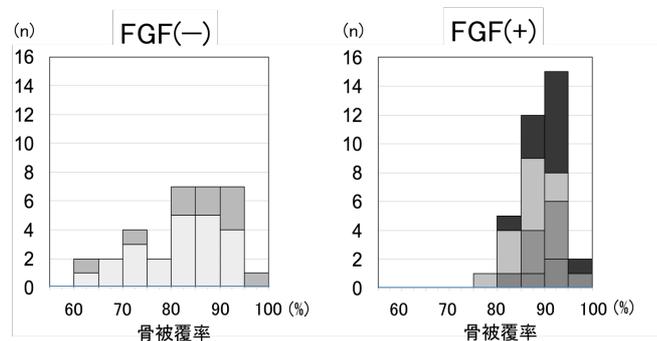


図2: 骨被覆率のヒストグラム

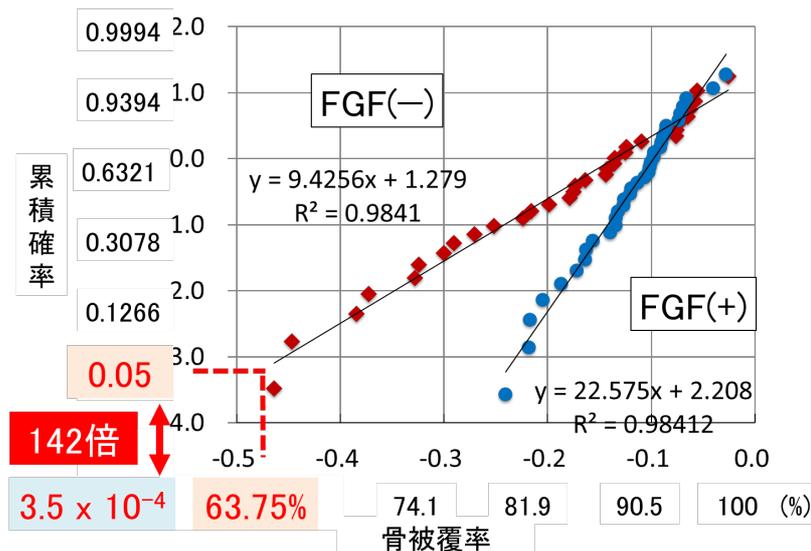


図3: 骨被覆率のWeibull分析

(3) 両群全個体とも、健康状態は保たれ、行動異常もみられず、採血上の異常所見もなく、90日の埋植期間を生存した。画像評価でのゆるみ所見もなかった。脊髄・脊椎組織およびインプラント周囲の癒痕組織に腫瘍性細胞や炎症細胞浸潤は認めなかった。Ap-FGF コーティング群の骨被覆率・骨形成率は、コントロール群に比べ高かった。ヒトに近い種としてサルを用いた検証の結果、Ap-FGF スクリューは安全であり、骨形成の効果があると考えられた。

< 引用文献 >

- 1) Wu ZX, Gong FT, Liu L, Ma ZS, Zhang Y, Zhao X, Yang M, Lei W, Sang HX. A comparative study on screw loosening in osteoporotic lumbar spine fusion between expandable and conventional pedicle screws. Arch Orthop Trauma Surg. 2012;132(4):471-6.
- 2) Moroni A, Heikkila J, Magyar G, Toksvig-Larsen S, Giannini S. Fixation strength and pin tract infection of hydroxyapatite-coated tapered pins. Clin Orthop Relat Res. 2001;(388):209-17.
- 3) Yang B, Uchida M, Kim HM, Zhang X, Kokubo T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. Biomaterials. 2004;25(6):1003-10.
- 4) Mutsuzaki H, Ito A, Sakane M, Sogo Y, Oyane A, Ebihara Y, Ichinose N, Ochiai N. Calcium phosphate coating formed in infusion fluid mixture to enhance fixation strength of titanium screws. J Mater Sci Mater Med. 2007;18(9):1799-808.
- 5) Mutsuzaki H, Ito A, Sakane M, Sogo Y, Oyane A, Ochiai N. Fibroblast growth factor-2-apatite composite layers on titanium screw to reduce pin tract infection rate. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008;86(2):365-74.
- 6) Mutsuzaki H, Ito A, Sogo Y, Sakane M, Oyane A, Ochiai N. Enhanced wound healing associated with Sharpey's fiber-like tissue formation around FGF-2-apatite composite layers on percutaneous titanium screws in rabbits. Arch Orthop Trauma Surg. 2012;132(1):113-21.
- 7) Nakajima F, Nakajima A, Ogasawara A, Moriya H, Yamazaki M. Effects of a single percutaneous injection of basic fibroblast growth factor on the healing of a closed femoral shaft fracture in the rat. Calcif Tissue Int. 2007;81(2):132-8.
- 8) Tsurushima H, Marushima A, Suzuki K, Oyane A, Sogo Y, Nakamura K, Matsumura A, Ito A. Enhanced bone formation using hydroxyapatite ceramic coated with fibroblast growth factor-2. Acta Biomater. 2010;6(7):2751-9.
- 9) Mutsuzaki H, Ito A, Sogo Y, Sakane M, Oyane A, Yamazaki M. The calcium phosphate matrix of FGF-2-apatite composite layers contributes to their biological effects. Int J Mol Sci. 2014;15(6):10252-70.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Fujii K, Ito A, Mutsuzaki H, Murai S, Sogo Y, Hara Y, Yamazaki M. Reducing the risk of impaired bone apposition to titanium screws with the use of fibroblast growth factor-2-apatite composite layer coating. J Orthop Surg Res. 12(1):1. 2017
DOI: 10.1186/s13018-016-0501-z.

〔学会発表〕(計 1件)

藤井賢吾, 伊藤敦夫, 原友紀, 六崎裕高, 村井伸司, 柳澤洋平, 長島克弥, 松本佑啓, 野口裕史, 小林文子, 十河友, 山崎正志 . FGF-2 担持アパタイトコーティングチタンスクルーの安定した骨形成作用. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 (福岡) 2016 年 10 月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：原 友紀
ローマ字氏名：(HARA, yuki)
所属研究機関名：筑波大学
部局名：医学医療系
職名：講師
研究者番号(8桁)：30431688

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山崎 正志
ローマ字氏名：(YAMAZAKI, masashi)

研究協力者氏名：伊藤 敦夫
ローマ字氏名：(ITO, atsuo)

研究協力者氏名：村井伸司
ローマ字氏名：(MURAI, shinji)

研究協力者氏名：藤井 賢吾
ローマ字氏名：(FUJII, kengo)

研究協力者氏名：柳澤 洋平
ローマ字氏名：(YANAGISAWA, yohei)

研究協力者氏名：松本 佑啓
ローマ字氏名：(MATSUMOTO, yukei)

研究協力者氏名：長島 克弥
ローマ字氏名：(NAGASHIMA, katsuya)

研究協力者氏名：野口 裕史
ローマ字氏名：(NOGUCHI, hiroshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。