

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16673
研究課題名(和文)ピンサイト感染を予防する創外固定ピンの開発：アパタイトFGF-2コーティングピン

研究課題名(英文)Development of external fixation pin to prevent pin site infection: Apatite FGF-2 coated pin

研究代表者
松本 佑啓 (Matsumoto, Yukei)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：50793725
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：白色家兎を用いて、FGF-2をハイドロキシアパタイトとともに担持したステンレス創外固定固定ピン(Ap-FGFピン)の効果を検証した。コーティングなし(SS群)、アパタイトコーティングのみ(Ap群)、Ap-FGFコーティング(Ap-FGF群)、FGF担持量を増やすために、追加浸漬を行ったFGF+群の4群を用いて検証を行った。抗感染性に関しては各群間で有意差が得られなかったが、Fixation Index(挿入トルクと抜去トルクの比)で力学的な検討を行ったところ、Ap-FGF群は骨固定性の向上に寄与していることが示された。Ap-FGFコーティングはステンレスにおいても有用な可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究では骨形成・軟部組織修復を誘導するFGF-2と表面コーティングし、生体内で徐放作用を発揮するコーティング技術を開発し、チタンインプラントでは有効性・安全性が示されている。外傷治療や変形矯正などに用いられる創外固定インプラントはステンレスピンが広く使用されている。チタンインプラントと同様にステンレスインプラントにおいても同様のコーティング技術により有効性と安全性を示すことができれば、治療の幅は広がる。安定的な治療成績が得られることにより、運動機能の維持・向上により、労働力の損失を最小限とし、高齢者においては介護負担の軽減を図ることで社会貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：The effect verification of the stainless steel external fixation pin coated FGF-2-apatite compsite layer was performed using rabbit. Four groups, Stainless steel pin(SS), apatite coated pin(Ap), FGF-2-apatite coated pin and Ap-FGF pin with additional immersed FGF-2 solution(FGF+) were performed comparison study. No significant difference was found between each groups regarding infection prevention. Ap-FGF group was founded significant difference in fixation index for another three groups. Ap-FGF coating stainless steel implant may be effective in vivo.

研究分野：整形外科

キーワード：生体材料

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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られる。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。我々は、インプラント表面に FGF-2 をハイドロキシアパタイトとともにコーティングすることにより、FGF-2 が徐放され、骨形成を誘導する新規医療材料の開発を行っている。リン酸カルシウム過飽和液内に目的の濃度の FGF-2 を溶解して、金属表面に共沈現象でコーティングを行うことにより、1 μm 未満の薄い被膜上のハイドロキシアパタイト層の表面または隙間に FGF-2 が固定される。先行研究では、セラミック表面に、ハイドロキシアパタイト-線維芽細胞増殖因子-2(Ap-FGF)コーティングを行い、ヒト骨芽細胞(NIHT3T)へ表面コーティングの溶解液を添加することにより、アパタイトだけをコーティングしたものに比べて、2.6 倍の細胞増加作用があることが示されている[1]。動物実験では、ラットの頭蓋骨に Ap-FGF コーティングセラミックボタンを埋植して、骨形成作用が確認されている[2]。高容量(FGF 36 ng/ml)と低用量の FGF-2(5.8 ng/ml)をコーティングし、濃度による骨形成作用を検証し、低用量の Ap-FGF コーティングセラミックボタンで骨形成作用が確認され、高容量では、骨形成作用が低下した。また、ウサギ脛骨に対する創外固定ピンの動物実験モデルを用いて、抗感染効果が示されている[3,4]。FGF-2 濃度 4 μg/ml のリン酸カルシウム溶液に 37、48 時間浸漬したチタンピン(37F4.0)と、FGF-2 濃度 2.0 μg/ml のリン酸カルシウム容積に 25、24 時間浸漬したチタンピン(25F2.0)を比較した。創外固定ピン周囲の感染発生率は、45%(37F4.0)、80%(25F1.0)と感染率が低減された。Ap-FGF-2 コーティングはインプラント表面への骨梁の再生・被覆を促進するとともに、インプラント周囲にシャープー様線維組織が形成され、インプラント挿入部の創傷治癒が促進されたことにより、ピン周囲の感染抑制効果を生じたと考えられた[5]。さらに、ウサギ脛骨において、インプラントの表面の骨形成率について検証を行い、Ap-FGF コーティングインプラントが骨形成促進作用を有すること、Weibull 分析を用いて、骨形成不良となる確率を Ap-FGF コーティングインプラントは低減する効果が示されている[6]。先行研究においては、セラミックおよびチタンに対して Ap-FGF コーティングは骨形成作用、抗感染作用を有することが示されている。臨床で使用されている創外固定ピンはステンレスが多く使用されており、ステンレスにおいても同様の骨形成、抗感染作用を検証することにより、AP-FGF コーティングインプラントの使用の幅が広がることが期待される。

2. 研究の目的

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立し、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。

3. 研究の方法

(1) ステンレスピンに対する FGF-2 コーティング技術を確立する

チタン製ピンに対する FGF-2 コーティング法(従来法)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 担持量を評価した。従来法に対して浸漬溶液の FGF 濃度・pH 値の調整、浸漬回数の変更、高濃度溶液への追加浸漬を行い、Ap-FGF コーティングステンレスピンを作製し、表面コーティングを溶解し、表面コーティングの Ca 担持量、Ca/P 比、タンパク定量およびバイオアッセイを用いてヒト骨芽細胞に対する増殖活性の有無を評価した。

(2) 抗感染効果に最適な FGF-2 濃度の検討(動物実験)

日本白色家兔 65 羽 130 肢を用いて、局所麻酔下に脛骨にステンレスピンを埋植、4 週後に安楽殺を行い、感染・骨固着性を評価することとし、で確立したコーティング方法で、4 群(SS 群:

コーティング無し、Ap 群：ハイドロキシアパタイトコーティング、Ap-FGF 群：従来法、FGF+群：高濃度追加浸漬法)の比較試験を行った。感染評価は肉眼所見により、感染なし、軟部組織感染、スクリューの緩みを伴う骨髄炎の有無を評価した。力学試験はピンの挿入トルクと4週後の抜去トルクを測定し、Fixation Index(抜去トルク/挿入トルク)を測定して評価を行った。

4. 研究成果

(1) ステンレスピンに対する FGF-2 コーティング技術の確立

従来法の溶液濃度および浸漬回数の変更では表面コーティングのタンパク濃度・細胞活性は有意な増加が得られず、高濃度浸漬液への追加浸漬によりタンパク担持量および細胞活性の増加が得られることが判明した(表1)。

	Ap-FGF	5分	10分	15分
Ca 担持量(μg)	225.8	125.6	154.8	154.5
Ca/P	1.77	1.76	1.72	1.76
タンパク担持量(μg)	0.318	0.575	0.612	0.543
バイオアッセイ	○			

抗感染効果に最適な FGF-2 濃度の検討 (動物実験)

図 1

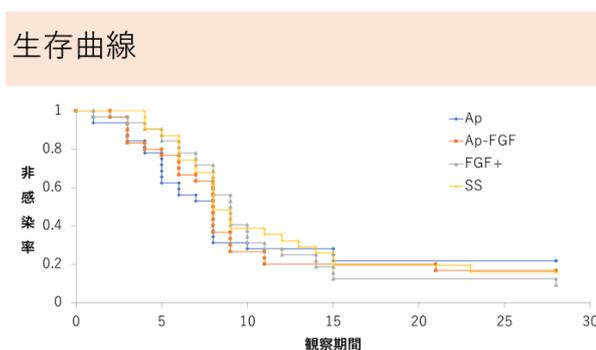
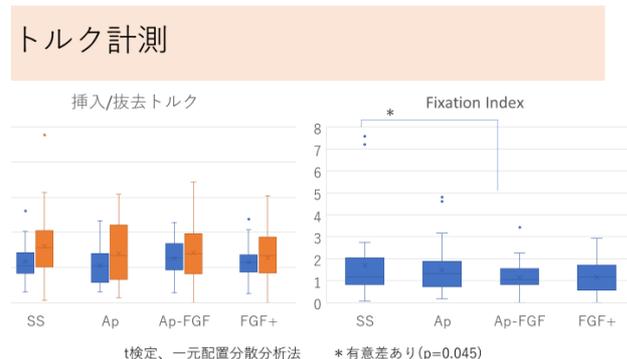


図 2



4週間の観察期間中の4群の感染発症時期を観察して、非感染率に関してカプランマイヤー法で生存曲線を作成した(図1)。4群間で有意差は得られず、ステンレス創外固定ピンにおけるAp-FGFコーティングによる有効性を確認することはできなかった。一方で、骨固着力に関する検討においては、従来法がコーティング無しの創外固定ピンに対して、Fixation Indexの有意な上昇が確認された(図2)。工業製品の不良品発生率を検討するために使用されるWeibull分析を用いて検討を行った(図3)。従来法のAp-FGFコーティングスクリューはコーティング無しのスクリューに比べて、Fixation Indexが良好であることが示されており、Ap-FGFコーティングはステンレスピンにおいても骨固着力向上作用が示された。

(図3)

考察：骨固着性 Fixation Indexのワイブル分析



SS : $y=1.3134x-0.8034$
 Ap : $y=1.5909x-0.767$
 Ap-FGF : $y=1.7109x-0.528$
 FGF+ : $y=1.3581x-0.4403$

傾き: $SS, FGF+ < Ap < Ap-FGF$
 (p=0.041)
 切片: $FGF+ < SS, Ap < Ap-FGF$
 (p=0.0015)

<引用文献>

- [1] Sogo Y, Ito A, Onoguchi M, Oyane A, Tsurushima H, Ichinose N. Formation of a FGF-2 and calcium phosphate composite layer on a hydroxyapatite ceramic for promoting bone formation. *Biomed Mater*. 2007 Sep;2(3):S175-80.
- [2] 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 Jul;6(7):2751-9.
- [3] 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 Aug;86(2):365-74.
- [4] 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 Jun 10;15(6):10252-70.
- [5] 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 Jan;132(1):113-21.
- [6] 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*. 2017 Jan 5;12(1):1.

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
研究協力者	原 友紀 (HARA yuki)		
研究協力者	山崎 正志 (YAMAZAKI masashi)		
研究協力者	伊藤 敦夫 (ITO atsuo)		
研究協力者	六崎 裕高 (MUTSUZAKI hirotaka)		
研究協力者	柳澤 洋平 (YANAGISAWA yohei)		
研究協力者	十時 靖和 (TOTOKI yasukazu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	野口 裕史 (NOGUCHI hiroshi)		
研究協力者	岡野 英里子 (OKANO ERIKO)		
研究協力者	長島 克弥 (NAGASHIMA katsuya)		
研究協力者	俣木 健太郎 (MATAKI kentaro)		