

筑波大学

博士(医学)学位論文

**Ap-FGF コーティングスクリュー
周囲骨形成の
安定性と不良発生率の評価：
Weibull 分析を用いた検討**

2017

**筑波大学大学院博士課程
人間総合科学研究科**

藤井賢吾

目次

第 1 章 本研究の背景	5
1.1 整形外科手術で用いるスクリューのゆるみ	
1.1.1 整形外科インプラントにおける金属と骨との固着の重要性	
1.1.2 脊椎固定術と椎弓根スクリューのゆるみ	
1.1.3 創外固定におけるハーフピンのゆるみ	
1.1.4 骨粗鬆症患者の増加とスクリューのゆるみ	
1.2 インプラントのゆるみに対する工夫	
1.2.1 椎弓根スクリューにおける工夫	
1.2.2 創外固定ピンにおける工夫	
1.3 骨形成の向上に寄与するシグナル分子	
1.4 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)	
1.4.1 FGF-2	
1.4.2 FGF-2 による骨形成作用	
1.5 ハイドロキシアパタイト (HA)	
1.5.1 ハイドロキシアパタイト (HA)	
1.5.2 HA コーティングの臨床利用	
1.6 FGF-2 担持ハイドロキシアパタイトコーティング (Ap-FGF コーティング)	
1.6.1 共沈現象によるコーティング作製と Ap-FGF コーティングの特性	
1.6.2 共同研究者による先行研究	
1.6.2.1 <i>in vivo</i>	
1.6.2.2 <i>in vitro</i>	
1.7 Weibull 分析について	
1.8 本研究の背景のまとめ	
第 2 章 本研究の目的	23
第 3 章 対象と方法	24
3.1 Ap-FGF コーティングスクリューの作製	
3.1.1 使用スクリュー	
3.1.2 過飽和リン酸カルシウム溶液の作製とスクリューの浸漬	
3.1.3 Ap-FGF コーティングの物性評価	
3.2 動物実験モデル	

3.2.1	動物実験	
3.2.2	力学試験(抜去ピークトルク)	
3.3.	組織評価	
3.3.1	炎症を認めない検体の選別	
3.3.2	スクリュー周囲骨形成の評価	
3.4	統計解析	
第4章	結果	29
4.1	Ap-FGF コーティングの物性評価	
4.2	骨被覆率	
4.2.1	骨被覆率 t 検定	
4.2.2	骨被覆率 ヒストグラム、F 検定	
4.2.3	骨被覆率 Weibull 分析	
4.2.3.1	Weibull 係数の比較	
4.2.3.2	不良発生率の比較	
4.3	力学試験(抜去ピークトルク)	
4.3.1	抜去ピークトルク t 検定	
4.3.2	抜去ピークトルク Weibull 分析	
第5章	考察	33
5.1	結果のまとめ	
5.2	Weibull 分析の有用性	
5.3	Ap-FGF コーティングの性質と、コーティングを行ったチタン製スクリューの有用性	
5.4	力学試験に関する考察	
5.5	研究限界	
5.6	Ap-FGF コーティングの特長と今後の展望	
第6章	結論	41
図表		42
引用論文		57
学会発表		76
謝辞		78
参考論文		79

第1章

本研究の背景

1.1 整形外科手術で用いるスクリューのゆるみ

1.1.1 整形外科インプラントにおける金属と骨との固着の重要性

整形外科手術において、多くの金属インプラントが開発され実臨床で用いられている。インプラントと骨とが面で接することで固定される場合と、インプラントと骨をスクリューで固定する場合とがあるが、いずれの場合においてもインプラントと金属との固着が固定性に重要であり、固着が弱い場合にはゆるみや挿入後のインプラントの転位が生じ、臨床上問題になる。これら金属インプラントと生体の固着は臨床成績に直結する重要な課題である[1-3]。

1.1.2 脊椎固定術と椎弓根スクリューのゆるみ

脊椎椎体骨折は、脊椎固定術の適応となる疾患の1つである。骨粗鬆症患者の増加を背景に脊椎椎体骨折患者は増加しており、累積発生率は60歳代男性で5.1%、女性で14%、70歳代男性で10.8%、女性で22.2%と報告されている[4]。脊椎椎体骨折の治療は通常まず保存療法が行われるが、椎体の骨癒合不全による偽関節の発生率が10-35%と高いことが知られている[5-10]。偽関節や変形癒合による疼痛の遷延によって長期臥床をきたす症例は少なくない。また、椎体骨折

に関連して、椎体の圧潰・変形が脊髄・神経根が圧迫され生じる神経障害や歩行障害、脊柱変形による姿勢障害、呼吸機能障害や逆流性食道炎などの続発症が生じる場合がある[11]。そのため、脊椎椎体骨折およびその偽関節症例に対して、手術治療が多く行われており、脊椎固定術はその1つである[7, 11, 12-14]。

椎弓根スクリューのゆるみとは、スクリューと骨との固着が得られなかった場合に、物理的刺激によってスクリューと接触する骨が変形し、スクリューと骨との間に間隙が生じ、スクリュー全体が固定力を失う状態を示す(図 1)[15]。骨粗鬆症患者においては、骨質不良に起因して骨組織が容易に変形するため、スクリューのゆるみが発生しやすいことが知られている[1, 16-19]。

脊椎固定用インプラントの市場規模は、米国では 2012 年に 2500 億円程度、2017 年には 4000 億円、2020 年には 6000 億円に達する見込みと報告されている[20]。本邦と海外を直接比較することはできないが、日本脊椎脊髄病学会が 2011 年度に行った全国調査において、脊椎固定術は年間約 9482 件であった[21, 22]。2009 年度の日本整形外科学会手術報告によると、65 歳以上の高齢者胸椎手術数は年間 1030 件行われており、現在は高齢者人口の増加および脊椎固定術の急激な普及に伴い、更に増えていることが推察される[23]。今後も増加が予想される脊椎固定術の治療成績を改善させることは、医療経済的にも大きなインパクトがあると考えられる。

一方、椎弓根スクリューのゆるみに対する改善策は種々試みられているが、一般的に強く推奨される方法は未だない現況である[24]。

1.1.3 創外固定におけるハーフピンのゆるみ

創外固定とは経皮的に鋼線やハーフピンと呼ばれるスクリューを骨に挿入し、体外に設置する固定器にて鋼線およびハーフピンを把持・固定する手術法であり、主に外傷治療と変形矯正に多く用いられている。創外固定は内固定と異なり骨膜や骨折部、軟部組織への侵襲を最小限にできる利点があり、軟部組織損傷を伴い内固定を行えない骨折や、粉碎骨折などにおいて第一選択となる[25]。また、変形矯正手術においては適時アライメントを修正可能であることと骨延長が可能であることから創外固定法がしばしば選択される。一方、欠点として体外に創外固定器があるため患者への身体的および精神的な負担が大きい点と、固定に用いるワイヤーやハーフピンは経皮的に骨を固定するため、高確率にピンサイト感染を起こす点が挙げられる[25, 26]。

創外固定におけるハーフピンのゆるみには2つの原因が考えられる。1つ目は、物理的な原因によるゆるみである[27]。これに寄与する因子としては、ハーフピン挿入部位の骨質(骨粗鬆症の程度)、挿入されたハーフピンまたはワイヤーの本数の不足などがあげられる。2つ目はピン周囲感染である[25, 28]。ピン周囲感染が軟部組織にとどまれば、局所治療や抗菌薬投与によってピン抜去を免れるが、感染が骨に達してしまうと骨髓炎をきたし、骨組織の破壊によってピンのゆるみが生じる。ピン周囲感染の発生率は非常に高く3-80%と報告されている[26]。また、ピン周囲感

染の増悪により発生する慢性骨髄炎の発生率は0-4%とされる。治療継続が困難になる症例は比較的稀であるが、ピン周囲感染は対策が望まれる問題である [29]。

1.1.4 骨粗鬆症患者の増加とスクリューのゆるみ

高齢化社会に伴い、国内における骨粗鬆症患者は増加しており、2005年のデータで約1280万人存在すると推定されている[4]。また、骨粗鬆症を背景に発生する骨脆弱性骨折の中で、受傷により死亡率が上昇するもの、すなわち生命予後に関わる代表的な疾病として大腿骨近位部骨折および脊椎椎体骨折が挙げられるが、大腿骨近位部骨折の新規患者数は2007年のデータで年間約15万人、脊椎椎体骨折に関しては2004年のデータで103万人と推定されている[4, 11]。

2017年現在は高齢者人口の増加に伴い患者数はさらに増加していると予想される。

特に近年、急速に使用する症例数が増えた椎弓根スクリューに関して、骨粗鬆症患者における術後のスクリューのゆるみが問題視されている。骨粗鬆症患者の脊椎椎体骨折に対して選択される胸腰椎後方固定術は、対象患者が高齢者であることが多いためその不良な骨質を背景に術後にスクリューのゆるみが生じる頻度が高く、使用した60%のスクリューにゆるみが発生したという報告もある。[30, 31]。スクリューのゆるみは骨折椎体の偽関節とそれによる疼痛、続発する神経障害、矯正損失による脊柱変形を引き起こす可能性があり、再手術が必要になる症例もあるため、対策が望まれる。

1.2 インプラントのゆるみに対する工夫

1.2.1 椎弓根スクリューにおける工夫

椎弓根スクリューのゆるみを防止する工夫としてこれまで種々の試みがなされてきた。特に、その生体親和性から広く使われているチタンインプラントの表面を加工またはコーティングし、骨との固着力(骨適合性: osseointegration)を改善させる工夫が数多く報告されている(表 1)[32]。表面形態を変化させる方法としてはポーラス化、ブラスト処理、酸エッチングがある[33, 34]。また、生体中で表面にアパタイト形成を促進させる方法としては陽極酸化被膜形成、ガス処理や NaOH 処理・加熱があり、表面にアパタイトを形成する加工法として熱スプレー、プラズマスプレー法がある[35-37]。更に、コーティング層に骨誘導能または骨伝導能を有する物質として骨形成蛋白質(BMP: Bone Morphogenetic Protein)、コラーゲン、キトサン、1,25-Vitamin D3、アレンドロネート、フィブロネクチン、生体活性ガラス(Bioactive glass)を担持させる方法も数多く検討されており、*in vitro* または *in vivo* での有効性が示されている[37-45]。

その他の工夫としてはスクリュー形状の改良、挿入後にスクリューが膨大することで引き抜き強度を向上させる Expandable screw や、スクリューの先端に作成した小さな孔を通して周囲にポリメタクリル酸メチル樹脂(PMMA: Polymethyl methacrylate) などの骨補填材料を注入する方法が報告されている[24, 31]。

1.2.2 創外固定ピンにおける工夫

創外固定ハーフピンにおいては、ステンレスピン表面にプラズマ溶射による HA コーティングを行った製品が市販されており、固定強度が有意に増大すると報告されている(表 1)[46-50]。一方、このプラズマ溶射 HA コーティングはハーフピンと HA の固着強度が非常に強く、HA と骨組織との固着が強固になった後での抜去困難が臨床使用上問題になる可能性が示唆されている[51]。

本研究で検討を行った線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2: Fibroblast Growth Factor-2) 担持ハイドロキシアパタイトコーティング (Ap-FGF コーティング) は、上記の工夫のうちアパタイトコーティング、および骨誘導物質の担持という 2 種類の方法のコンビネーションを実現する技術である。骨伝導能を持ち、骨との固着を向上させるハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite; HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、以下 HA と略記する) に、骨誘導能を持つ線維芽細胞増殖因子 2 (FGF-2) を担持させることによって、FGF-2 が *in vivo* で徐放されることが示されている[52, 53]。そこで、これをスクリュー表面のコーティングに用いる事で、骨固着力の向上を期待できるのではないかと考えた。

1.3 骨形成の向上に寄与するシグナル分子

骨形成の向上に寄与するシグナル分子として、骨形成蛋白質-2 (BMP-2: Bone Morphogenetic Protein)、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2: Fibroblast Growth Factor-2)、トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β : Transforming Growth Factor - beta) が挙げられる[54-56]。特に BMP-2 は強い骨誘導作用を有し、米国では骨形成を促進する目的で臨床利用されているが、2017 年時点で本邦では未承認である。癌化を誘発する危険性が指摘されており、使用頻度が減っていると報告もある[57-62]。一方、FGF-2 は線維芽細胞に対する作用による難治性皮膚潰瘍治療として本邦で承認されている薬剤である[63]。

1.4 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)

1.4.1 FGF-2

線維芽細胞増殖因子 (FGF) は 1973 年 Armelin によって下垂体抽出物中に発見されたヘパリン結合性タンパク質である[64]。FGF ファミリーはヒトにおいて 22 種類が同定されており、そのうち FGF-2 は塩基性であることが知られ、basic FGF (bFGF) とも表記される。

FGF-2 は発生の過程では、中胚葉誘導・前後軸パターン形成・四肢形成・神経系誘導と神経発生に関与し、成熟組織においては線維芽細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞を遊走・増殖させる作用を有する。FGF-2 は血管新生・角化細胞の組織化・創傷治癒の過程に関与するシグナル分子である[65-74]。

本邦においては、トラフェルミン(遺伝子組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子製剤)の褥瘡、皮膚潰瘍に対する有効性及び安全性が示されたことによりフィブラストスプレー®の販売名で2001年より発売され広く臨床で用いられている[63, 74-76]。また、歯科用の製剤としてであるリグロス®が2017年に発売された。リグロス®は粘稠性の外用液剤であり、歯周組織欠損部の未分化間葉系細胞および歯根膜由来細胞に対し増殖促進作用を示し血管新生を促進することによって、新生歯槽骨の増加および歯根膜の結合組織性付着を増強する効果があると報告されている[77, 78]。

1.4.2 FGF-2による骨形成作用

FGF-2は骨芽細胞の増殖および分化を促進する作用も有し、ナノグラムオーダーの極微量でも骨形成を促進することが、骨折モデルや骨欠損モデルにおいて *in vivo* で示されている[53, 79-84]。また、骨形成および皮膚軟部組織再生を促す成長因子のうち、本邦で臨床承認されているものは FGF-2 のみであり、すでに承認されている材料を本研究に用いることで臨床応用へのハードルが比較的低くなると考えている。

1.5 ハイドロキシアパタイト(HA)

1.5.1 ハイドロキシアパタイト(HA)

ハイドロキシアパタイト(水酸アパタイト、Hydroxyapatite、HA) は化学式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で示される塩基性リン酸カルシウムであり、天然には骨や歯の主成分として、また鉱石として存在する。セラミックス材料は高い生体親和性をもつため、生体材料として用いられており、HA は生体内でわずかに溶解し、早期に骨に親和性を示す生体活性セラミックスの一つである。リン酸カルシウムには、HA の他にリン酸三カルシウム(TCP)、リン酸水素カルシウム(DCPD)、リン酸八カルシウム(OCP)、リン酸四カルシウム(TeCP)などがあるが、HA はこれらリン酸カルシウムの中で最も熱力学的に安定しており、さらに骨伝導能を有するため骨補填材料として広く臨床で用いられている[85]。

1.5.2 HA コーティングの臨床利用

整形外科領域においては、5000–10000°Cのプラズマ炎によってHAを吹き付けて、厚さ30–200 μm のHAコーティングを形成するプラズマ溶射HAコーティングが実用化されている。人工関節や創外固定に使用するハーフピンに対するプラズマ溶射HAコーティングにおいて、骨固着強度の増大が示されている[47–50, 86]。椎弓根スクリューへのプラズマ溶射HAコーティングに関しても、骨固着強度が向上すると報告されている[51, 87, 88]。

現在、臨床利用されているプラズマ溶射HAコーティングが持つ課題について以下に述べる。

1つ目として、プラズマ溶射 HA コーティングは HA 層とインプラントとの固着強度が非常に強く、インプラント抜去を必要としない場合にはこの力学的安定性は非常に優れた性質であるが、ハーブピンの場合には抜去が前提であるため、抜去困難例が問題になる可能性がある。そのため、Sandén らはプラズマ溶射 HA コーティング椎弓根スクリューの適用に関して抜去困難の可能性を指摘した上で、骨粗鬆症例や腫瘍脊椎転移例が良い適応になるだろうと述べた[51]。

2つ目としてプラズマ溶射 HA コーティングは、溶解度が HA より大きな低品質相アパタイトである TeCP やアモルファスリン酸カルシウム (ACP) の含有率が高くなるため、膜そのものの破綻が生じ易くなる可能性が挙げられる[85]。

3つ目はプラズマ溶射 HA コーティングが厚膜であることである。厚膜 HA と薄膜 HA では力学的特性および生体内での反応が異なることが示されている。薄膜ではセラミック層に大きなたわみ量が得られ、金属が塑性変形を起こしてもセラミック層に破壊が起こらないため金属の力学的特性を最大限発揮でき、更に薄膜にはインプラントの表面形状を変化させず、またシグナル分子を担持させる場合にその局所作用を発揮させやすいという優れた特徴があると吉成は報告している。[85, 89, 90]。われわれの Ap-FGF コーティングは薄膜であり、上記のような特性を得られるのが利点であると考えた。

1.6 FGF-2 担持 HA コーティング (Ap-FGF コーティング)

1.6.1 共沈現象によるコーティング作製と Ap-FGF コーティングの特性

低温で HA をインプラント表面にコーティングする手法として、擬似体液を用いる過飽和溶液法が知られている[91]。医療用輸液を混合することにより、擬似溶液に類似する溶液を調整可能であり、われわれは低結晶性の HA コーティングを作製する技術を開発した。低温溶液法の利点として、高温では容易に破壊されるタンパク質や成長因子などのシグナル分子を担持可能である点が挙げられる。共同研究者である十河らは、過飽和リン酸カルシウム溶液に FGF-2 を混和することで、共沈現象を用いて FGF-2 を担持した薄い HA コーティングを様々な基材上に作製できると、また、その HA から FGF-2 が徐放されることを明らかにした[92-95]。共沈現象を用いて作製する Ap-FGF コーティングの利点としては、作製に特殊な機械を必要としない点、既承認薬剤だけで作製可能である点、生物学的活性を持つシグナル分子を担持させることが可能である点、薄膜である点が挙げられる[96]。

共沈現象を用いた HA コーティングとしては、FGF-2 以外にも抗菌薬、コラーゲン、フィブロネクチン、BMP-2、など種々のシグナル分子の担持が報告されている[97, 98]。

1.6.2 共同研究者による先行研究

1.6.2.1 *in vitro*

共同研究者による先行研究で、Ap-FGF コーティングの物理的特性、含有される FGF-2 の生物活性とその徐放性が示された。また、Ap-FGF コーティングにおける Ca と P の含有量の比 (Ca/P モル比) がコーティング層の性質に影響することを過去に報告した。

Ap-FGF コーティングの物理的特性に関して、六崎らは、肉眼では識別できないほどの厚さ 2.9 μ m の薄膜である Ap-FGF コーティングチタンピン表面の Ap-FGF 層を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、ピン表面を Ap-FGF 層が完全に被覆していることを示し、また X 線回折法による評価で、低結晶性アパタイトであることを示した[99]。さらに、Ap-FGF 層のスコッチテープによる引きはがし試験において、Ap-FGF 層の剥離が見られず、コーティング層に一定の固着強度があることを示した[100]。

Ap-FGF コーティングにおいて担持される FGF-2 の生物活性に関しては、Ap-FGF 層から抽出した FGF-2 が線維芽細胞様細胞 (NIH3T3 細胞) を増殖させることが示され、担持後も FGF-2 の活性が保持されることが裏付けられた。

徐放性に関して六崎らは、Synthes 社のチタン製海綿骨スクリュー (径 4.0mm、30mm 長) に Ap-FGF コーティングを作製し、37 $^{\circ}$ C における生理食塩水を用いた徐放試験を蛍光定量法を用いて行った結果、少なくとも 4 日間、50-80ng/日の徐放がみられることを示した[52]。また、鶴嶋らはボタン型の HA に Ap-FGF コーティングを作製し、37 $^{\circ}$ C におけるウシ胎仔血清を含まないダルベッコ改

変イーグル培地を用いた FGF-2 の徐放試験を ELISA 法を用いて行った結果、少なくとも 16 日間にわたって徐放がみられることを示した[53]。

六崎らは Ap-FGF コーティングを創外固定ピンに応用することを念頭にウサギに対する創外固定ピン挿入モデルを作成し、動物実験を行った (Synthes 社チタン製海綿骨スクリュー; 径 4.0mm、30mm 長を使用)。その結果、Ca/P モル比が高い群においてピン周囲感染率が低いことを報告し、HA のそれに近い 1.67 のピンでピン周囲感染抑制の効果が高かったと報告した[100]。Ca/P モル比が Ap-FGF コーティングの性質に影響した機序として、低結晶化アパタイト、アモルファスリン酸カルシウム (ACP: amorphous calcium phosphate、理論的 Ca/P モル比 1.50)、リン酸八カルシウム (OCP: octacalcium phosphate、理論的 Ca/P モル比 1.33) は生理的環境下において物理化学的に HA より不安定であり、Ap-FGF コーティング作製条件の違いによってコーティング中のこれらの含有率が高くなると Ca/P モル比が低くなり、結果としてコーティング層そのものの安定性および FGF-2 の生物活性保持性または徐放性が低下したのではないかと考察した。

1.6.2.2 *in vivo*

六崎らは、ウサギ脛骨への創外固定ピン挿入モデルを使った実験において、未処理チタンピン、HA コーティングチタンピン、および Ap-FGF コーティングチタンピンをそれぞれウサギ脛骨に経皮的に 4 週間挿入し比較したところ、3 群のうち Ap-FGF コーティングチタンピンが有意にピン周囲

感染を抑制するという結果を示した[96, 99, 101]。その機序として、脛骨に経皮的に挿入したピン周囲の皮膚軟部組織の修復が FGF-2 の徐放によって促進されたと考察した。未処理チタンピンや HA コーティングチタンピンでは 94%がピン周囲感染を呈する環境下でも、Ap-FGF コーティングチタンピンはピン周囲感染の発症が 44%であった。また同様の実験にて得られた局所検体の病理学的評価では、ピンと皮膚との界面は血管成分に富み、Ap-FGF チタンピン表面から斜行する線維性組織(シャープ様線維)を認めることが示され、このシャープ様線維の形成によって力学的にも生物学的にも安定した感染防御壁として機能していたと推察した[52]。シャープ様線維は、歯の歯根膜に存在し、歯と顎骨表面間を直行・斜行し結合している組織である。力学的に強く血管や神経が豊富で、免疫細胞を遊走させ感染防御壁としての働きを有していることが報告されている[102]。歯は人体において骨に経皮的に接続する構造をもつ組織であり、この歯根膜の存在によって抗感染性を維持していると考えられている。通常体内で形成されるコラーゲン線維は異物に対し平行に形成されるのに対し、この Ap-FGF コーティングチタンピン周囲に形成されたシャープ様線維が表面から斜行するコラーゲン線維を有していたことで、歯根膜同様に感染防御として機能したと考えられた。以上の先行研究より、Ap-FGF コーティングを行ったチタンピンは、軟部組織に対する FGF-2 の線維芽細胞に対する作用によって、ピン周囲の皮膚軟部組織の修復を促進させ、ピン周囲感染を抑制することがウサギにおいて示された。

FGF-2 の持つもう一つの作用である、骨形成に関する検討に関して、六崎らは、先述のウサギに対する動物実験において、肉眼的に感染がないと判断された HA コーティングチタンピンおよび 4 μ g/mL の FGF-2 を有する過飽和リン酸カルシウム溶液から作製した Ap-FGF コーティングチタンピンが、未処理チタンピンに対し抜去ピークトルクが高値であったことを示した。同時に組織評価で、未処理チタンピンでは髓腔内ピン表面に新生骨を認めなかったのに対し、HA コーティングチタンピンおよび Ap-FGF コーティングチタンピンにおいては髓腔内ピン表面に新生骨を認めたことを定性評価で確認した。以上の結果より、Ap-FGF コーティングチタンピンにおいて、骨形成・骨固着強度の向上がゆるみの発生を低減してピン周囲感染の低減に寄与したと考察した[101]。

また、鶴嶋らは、ボタン型の HA (HA ボタン) に Ap-FGF コーティングを作製し、ラット頭蓋骨に作成した欠損に挿入、HA ボタン周囲の骨形成を観察する動物実験を行った[53]。4 μ g/mL の FGF-2 を有する過飽和リン酸カルシウム溶液から作製した低濃度 FGF 群 (以下 FGF-L 群)、10 μ g/mL の FGF-2 を含む過飽和リン酸カルシウム溶液から作製した高濃度 FGF 群 (以下 FGF-H) および FGF-2 を含まない群 (HAP-N) を比較し、HA ボタン周囲組織 HE 標本の観察において、FGF-L 群で最も多い骨形成を認めたと報告した。鶴嶋らは同時に、HA ボタンに接する新生骨部分における骨形成蛋白質-2 (BMP-2: Bone Morphogenetic Protein)、アルカリフォスファターゼ (ALP: Alkaline phosphatase)、オステオカルシン (OC: Osteocalcin) の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて計測し、FGF-L 群において術後 2 週の BMP-2、術後 4 週の ALP および OC の

mRNA 発現が有意に高値であり、遺伝子レベルでも骨形成能が優れていたことを示した。更に、FGF-L、FGF-H、HAP-N の 3 群において、ウシ胎仔血清を含まないダルベッコ改変イーグル培地に浸漬した際に、FGF-L が最も MG-63 細胞(ヒト骨細胞)の細胞増殖を刺激したことを示した。骨形成作用が FGF-L で強かった点に関して、FGF-2 の骨形成に対する作用が一定範囲の比較的低濃度で最も強いと考えられると考察した。一方、ハムスター線維芽細胞である BHK-21 細胞に対しては FGF-H 群が最も細胞増殖が強かった。

以上の先行研究により、Ap-FGF コーティングを行ったチタン製インプラントでは FGF-2 インプラント周囲に骨形成を認めることがウサギの実験で示され、またウサギ脛骨およびラット頭蓋骨の 2 つの実験結果より、4 μ g/mL の FGF-2 を含むリン酸カルシウム過飽和溶液で共沈させた Ap-FGF コーティングが骨形成に最適であることが示された。さらにラット頭蓋骨の実験においては、FGF-2 の骨形成作用が *in vivo* における組織評価とリアルタイム PCR 評価によって示され、同時に *in vitro* において骨形成が FGF-2 の骨細胞に対する作用であることを直接的に裏付けた。

1.7 Weibull 分析について

先行研究において、スクリューの固着強度を臨床的に意義のある手法で評価するにはどうしたら良いかという点に関しては明らかになっていなかった。本研究において、解析に Weibull 分析を

使用することを着想したのは、Weibull 分析がセラミック製品の品質評価などに用いられている方法であるためである。

Weibull 分析は確率の少ないエラー検体を検出する手法である。Weibull plot と呼ばれる散布図において、近似直線の傾きで表される Weibull 係数が大きいほど、検体の品質が均一で不良発生率が低いこと示す[103]。また、破壊モードの違いによって、Weibull 係数の異なる複数の分布が示されることもあり、破壊モードの違いを検出するためにも用いられる。Weibull plot の X 軸は変数、Y 軸は累積不良発生率を示す。よって、散布図の近似直線を求めることによって、不良発生率を算出することが可能である。

一般的に、インプラントの骨固着強度の検証には骨内埋植後の力学試験が用いられるが、Ap-
FGF コーティングをインプラントに応用するにあたり念頭においたコンセプトは「骨固定不良(イン
プラントゆるみ)の発生率低減」である。スクリューのゆるみの発生率は、通常 10%以下であるが、
臨床では 10%の発生率は解決すべき大きな課題である[5]。しかし、平均値を比較する t 検定等の
統計手法は、膨大な検体数を要するため、このような低確率事象への適用には不向きである。例
えば、埋植4週後に平均抜去トルクで 100Nm を達成するものの 100 本あたり 10 本の割合でゆる
みが発生するスクリューと、平均抜去トルクは 80Nm であるが 100 本あたり 1 本しかゆるみを発
生しないスクリューがあるとすると、当然、後者のスクリューが臨床で有用である。

背景の異なる様々な患者に対して、同じスクリューを使用した際のゆるみが発生する個々の確率を近似直線上にプロットしたものが Weibull プロットであり、実臨床の縮図そのものと考えられることができる。Weibull 分析から得られる不良検体発生率は、すなわち、臨床における治療失敗率を示唆するものである。さらに、Weibull 分析は不良品発生率の少ない新規医療機器の開発においても必要な解析方法であると考えられる。よって、本研究においても不良検体発生率の違いを検出するために Weibull 分析を用いることとした。

1.8 本研究の背景のまとめ

Ap-FGF コーティングが、生物活性を保持した FGF-2 の徐放能を有すること、線維芽細胞への作用により創治癒を促進し、ピン周囲感染の予防効果を示すこと、同時に Ap-FGF コーティングがコーティングの周囲に骨形成をもたらすことが先行研究によって示された。一方で Ap-FGF コーティングの技術の臨床応用を目指すにあたり残る課題は、コーティング周囲の骨形成を定量的に評価すること、そしてスクリューの固着強度に関して不良発生率の違いから検討することであると考えた。それらを明らかにするため、本研究を計画した。

第 2 章

本研究の目的

本研究においては、Ap-FGF コーティングを内固定材料へ応用することを念頭に、特に FGF-2 の骨形成に着目した。インプラント周囲に骨形成が得られれば、固定力が増大し、術後のゆるみが減少するという前提の下で、インプラント周囲への骨形成が Ap-FGF コーティングによってどの程度得られるかを定量すること、骨形成不良検体の出現リスクを明らかにすることを課題とした。

本研究の仮説は、「生体内で FGF-2 を徐放可能である Ap-FGF コーティングは、チタン製インプラント周囲の安定した骨形成に寄与する。また、その骨形成によって、固着強度の低いスクリューの発生率が低減する。さらに、評価方法として、骨形成不良出現のリスクを評価する Weibull 分析を用いることが有用である。」とした。

本研究の目的は、Ap-FGF コーティングを臨床で用いられている内固定材料へ応用するにあたり、現在明らかになっていない以下の点を明らかにすることである。

1. Ap-FGF コーティングにおけるスクリュー周囲の骨形成の効果を日本 白色家兎脛骨経皮スクリュー刺入モデルで検証すること。
2. スクリューのゆるみのような低確率事象に対する Weibull 分析の有用性について検討すること。

第 3 章

対象と方法

3.1 Ap-FGF コーティングスクリューの作製

3.1.1 使用スクリュー

スクリューは Synthes 社のチタン製海綿骨スクリュー(径 4.0mm、30mm 長)を用いた(図 2)。コーティング作製前にスクリューに対してガンマ線滅菌を行った。本スクリューには製品として既に陽極酸化チタン被膜が施されていた。

3.1.2 過飽和リン酸カルシウム溶液の作製とスクリューの浸漬

コーティングを行わなかったスクリューを Ti 群とし、以下作製条件(XFY: X: 浸漬温度, Y: 過飽和リン酸カルシウム溶液に混和した FGF-2 量($\mu\text{g}/\text{mL}$))によって、25F0(Ti 群と 25F0 群を合わせて FGF-2 を含まないこの 2 群を FGF(-)と定義)、25F0.5、25F1、25F2 および 37F4(FGF-2 を含むこの 4 群を合わせて FGF(+))と定義)とした。過飽和リン酸カルシウム溶液の組成と浸漬時間を組成表に示す(表 2)。リンゲル液(大塚製薬)、塩化カルシウム注射液(大塚製薬)、クリニザルツ輸液(アイロム製薬)、リン酸水素二カリウム補正液、生理食塩水(生食注シリンジ;大塚製薬)およびフィブラストスプレー(科研製薬)を混和して過飽和リン酸カルシウム溶液を作製し、メイロン静

注 7%(大塚製薬)をアルカリ化剤として使用した。37F4 群に関しては上記医療用輸液と同じ組成の液体で作製した。また、37F4 群に関してはアルカリ化剤としてメイロン静注 7%(大塚製薬)の代わりにバイフィル(味の素製薬)を使用した。滅菌操作にて FGF-2 を混和した過飽和リン酸カルシウム溶液にスクリューを浸漬し、Ap-FGF コーティングを作製した(図 3)。

3.1.3 Ap-FGF コーティングの物性評価

Ca 量および P 量は高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP: Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer, SPS7800, Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan)を用いて評価し、Ca/P モル比を算出した。FGF-2 担持量は Bradford 法を用いてタンパク定量キット (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)を用いて測定した。クエン酸溶解液中の FGF-2 の活性は NIH3T3 細胞(NIH3T3-3-4, RIKEN BioResource Center, Ibaraki, Japan) によるバイオアッセイ法で評価した[98, 100, 104]。

3.2 動物実験モデル

3.2.1 動物実験

動物実験は筑波大学動物実験取扱い規定に従い、筑波大学動物実験委員会の承認を得て、共同研究者の六崎らが行った。著者は実験のデータおよび組織標本を後ろ向きに評価・分析を行った(承認番号:08-166、09-108)。

14週齢、体重2.5-3.0kgの日本白色家兔の雄70匹の両脛骨に、経皮的に3.1で作製したスクリュー(25F0、25F0.5、25F1、25F2、37F4)をそれぞれ20肢・合計100肢、Tiを40肢に対して挿入し、4週間後に屠殺し、脛骨を全摘出した(図4)。挿入点は膝関節面の1cm遠位、脛骨の前後中央部分をとって骨膜は十字切開し、スクリューはネジ山が手前の骨皮質に完全に隠れるまで挿入した。家兔は、術前術後とも特に制限なくケージ内で飼育され、抗菌薬を含む薬剤の投与は一切行わなかった。力学試験にてスクリューを抜去した脛骨を10%中性緩衝ホルマリンで1週間固定の後、EDTAで脱灰し、パラフィン包埋した。脛骨長軸に垂直な水平断方向で、スクリュー挿入方向に平行に5 μ m厚でHE染色標本を作成した。Tiおよび25F0でコーティングしたスクリューが挿入された検体をFGF(-)群、25F0.5、25F1、25F2および37F4でコーティングしたスクリューが挿入された検体をFGF(+)群とし、2群間での検討を行った。

3.2.2 力学試験(抜去ピークトルク)

屠殺後に、スクリューを抜去する際のピークトルクをHTG2-5Nトルク計(IMADA, Japan)を用いて計測した。抜去ピークトルク計測は全て同一検者が行い、検体を左手に把持し右手でトルク計

を回転させて測定した。計測に先立って本計測法のバリデーション試験を行い妥当性・再現性と安定性を確認した。

3.3 組織評価

3.3.1 炎症を認めない検体の選別

著者を含む 2 名の検者が独立してランダム化した非標識標本を評価した。光学顕微鏡 (Olympus 社 Vanox-T) を用い、倍率 12.5 倍で切片を観察し、炎症所見の有無を評価し、白血球浸潤を認める炎症ありの検体を除外した。スクリュー辺縁およびスクリュー刺入部周囲に白血球浸潤を認める検体を炎症ありと定義した。炎症ありのサンプルを評価対象から除外した理由は、炎症によってスクリュー周囲の骨形成が阻害されスクリューの固着力が低下し、各群間の検討に影響する可能性が高いと考えたからである。また、標本作成時に形態が著しく変形した検体も除外した。2 名とも炎症および変形なしと判断した検体が 67 検体 (50 匹) 選別された (Ti: 22 検体、25F0:10 検体、25F0.5:5 検体、25F1: 7 検体、25F2: 11 検体、37F4: 12 検体)。FGF(-) 群は 32 検体、FGF(+) 群は 35 検体であった。

3.3.2 スクリュー周囲骨形成の評価

2名の検者が独立してランダム化した非標識標本の計測評価を行なった。光学顕微鏡(オリンパス社 Vanox-T)を用い、倍率 12.5 倍で切片スライドを撮像し、デジタルイメージを作成した。Image Jソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて、スクリュー表面に存在する骨組織の長さの合計(骨被覆長:図中の破線)と、スクリュー表面の全長(スクリュー辺縁長:図中の実線)(単位:ピクセル数)をそれぞれ計測した(図5)。骨被覆率 = (骨被覆長の合計)/(スクリュー辺縁長)と定義し、骨被覆率を算出した。数値は2名がそれぞれ計測した値の平均値とした。検者間信頼性 ICC (2.1)は0.73であった。

3.3 統計解析

Weibull 分析は下記の方程式を用いる。

$$\ln \ln [1/(1-S)] = m \ln \sigma - m \ln \xi$$

Sは不良発生率、mはWeibull係数、 σ は計測データ、すなわち今回の検討においては骨被覆率、 ξ は尺度パラメータを示すものである。

骨被覆長およびスクリュー辺縁長、骨被覆率およびWeibullプロットにおける近似直線の群間検定にはスチューデント t検定を用いた。ヒストグラムにおける分布の検定にはF検定を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

第 4 章

結果

4.1 Ap-FGF コーティングの物性評価

Ap-FGF コーティング中の Ca 量、P 量および Ca/P モル比、FGF-2 担持量、および FGF-2 活性を表 3 に示す。Ca/P モル比はそれぞれ 25F0:1.44 ± 0.00、25F0.5:1.55 ± 0.02、25F1:1.56 ± 0.01、25F2:1.56 ± 0.01、37F4:1.67 ± 0.11 であった。37F4 は 25F0.5、25F1、25F2 に対して有意に高値であったが他の群間では有意差を認めなかった(ウェルチの t 検定; 25F0.5: $p = 0.0008$ 、25F1: $p = 0.0024$ 、25F2: $p = 0.0045$) [98]。FGF-2 量はそれぞれ 25F0.5:2.04 ± 1.18 μg 、25F1:3.97 ± 1.14 μg 、25F2:4.62 ± 0.86 μg 、37F4:4.72 ± 1.91 μg であった。25F0.5 では 25F2、37F4 に対し有意に低値だった(ウェルチの t 検定; 25F2: $p = 0.0221$ 、37F4: $p = 0.0229$) [97]。FGF-2 活性に関しては高い順に 25F2、37F4、25F1、25F0.5 の順であり、25F0.5 では 25F2 ($p < 0.0001$)、37F4 ($p < 0.01$) に対し有意に低かった(ウェルチの t 検定)。25F1 と 37F4、25F2 と 37F4 の間では有意差を認めなかった(それぞれ $p = 0.2897$ 、 $p = 0.5373$ 、ウェルチの t 検定) [98]。Ap-FGF コーティングの厚さは Charge Coupled Device (CCD) laser micrometer を用いて計測し、2.9 μm であった [98]。

4.2 骨被覆率

4.2.1 骨被覆率、 t 検定

各群における骨被覆率および、FGF(+)群、FGF(-)群に関する骨被覆率の結果を図6に示す。

骨被覆率は FGF(+)群において FGF(-)群より有意に高値であった(FGF(+)群:88.6 ± 4.4%、FGF(-)群:83.0 ± 9.5%、 $p = 0.017$)。

4.2.2 骨被覆率 ヒストグラム、F 検定

骨被覆率に関するヒストグラムを示す(図7)。FGF(+)群において骨被覆率が75%より高値の狭い範囲に分布しているのに対し、FGF(-)群は幅の広い分布を示した。F 検定において、FGF(-)群では FGF(+)群に対し有意に分散が大きかった($p < 0.0001$)。ここまでの結果より、FGF(+)群において、骨被覆率が不良な検体の発生確率が FGF(-)群と比較して低いことが示された。

4.2.3 骨被覆率 Weibull 分析

4.2.3.1 Weibull 係数の比較

骨被覆率が不良な検体の発生確率を分析するために行った Weibull プロットの結果を図に示す(図8)。

傾きが大きいく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、 $p = 7.3 \times 10^{-34}$)。

4.2.3.2 不良発生率の比較

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。また、仮に FGF(-)群における下位 10%にあたる 68.82%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 0.002、FGF(-)群で 0.1 となった(表 4)。

4.3 力学試験(抜去ピークトルク)

4.3.1 抜去ピークトルク t 検定

各群における抜去ピークトルク、および FGF(+)群、FGF(-)群に関する抜去ピークトルクの結果を図 9 に示す。抜去トルクは FGF(-)群と FGF(+)群の間に有意差を認めなかった(FGF(-)群: $0.27 \pm 0.09\text{Nm}$ 、FGF(-)群: $0.27 \pm 0.11\text{Nm}$ 、 $p = 0.98$)。

4.3.2 抜去ピークトルク Weibull 分析

Weibull 係数は FGF(+)群(0.655)が FGF(-)群(2.700)に対し低値であった。しかし、FGF(+)群の近似直線は外れ値の影響を大きく受けていた。外れ値($x, y = -5.8, -1.7$)を除いた FGF(+)群の

Weibull 係数は 2.036 であった(図 10(C))。少なくとも、FGF(+)群の FGF(-)群に対する抜去ピーク
ルクに関する優位性は認めなかった。

第 5 章

考察

5.1 結果のまとめ

本研究では、日本白色家兔脛骨経皮的スクリュー刺入モデルに、Ap-FGF コーティングを施したチタン製スクリューを埋入し、スクリュー周囲の骨形成に関する評価を行った。挿入 4 週後の HE 染色標本のうち、炎症を認めない 67 検体を分析した結果、FGF-2 を含む Ap-FGF コーティング (FGF(+)) 群では FGF-2 を含まない FGF(-) 群に対し、有意に骨被覆率が高い結果であった。また、「安定した骨形成作用」を示すにあたり、ヒストグラムおよび Weibull 分析が有用であった。一方、力学試験として行った抜去ピークトルクに関しては、FGF-2 を含むコーティングの優位性が認められなかった。

5.2 Weibull 分析の有用性

過去の研究において、FGF-2 による骨形成能を検討した研究の結果では、効果ありとするものと、部分的な効果しか得られなかったとするものがある[76-81]。しかし、これらの検討はいずれも平均値の差の検定をもってなされたものである。今回の結果で FGF-2(+) 群のヒストグラムにおける特徴は FGF(-) 群のヒストグラムに対して骨被覆率が低い部分の分布を認めなかったことであ

り、FGF-2 の効果は、本来骨形成能が乏しい個体における骨形成能を促進・補填したのではないかと推察した。骨形成能が乏しい個体の全体に占める割合が小さければ、平均値の比較には影響が少なくなり、検定によって検出しにくいと思われる。よって、Weibull 分析は低確率事象の発生確率の差を検出する際に有用であると考えた。

本研究の結果において、FGF(+)群と FGF(-)群の骨被覆率の平均値は、2 群間に有意差が認められたもののその差はわずか 5.6%であった (FGF(+)群:88.6 ± 4.4%、FGF(-)群:83.0 ± 9.5%、 $p = 0.017$ 、図 6)。一方、ヒストグラムを見ると、骨形成に関する個体差の幅は非常に大きく、特に FGF(-)群では 60%から 100%までの幅広い分布を示し、これは FGF(+)群では 75%以上の検体のみである点と大きく異なる結果であった(図 7)。また、FGF(+)群で、75%以下の検体を認めなかったことは、骨形成が不良な検体の発生率が少なかった、と言い換えることができる。そこで、今回 Weibull 分析を用いた分析を行った。

Weibull 分析の結果、FGF(+)群において、品質の安定性を示す Weibull 係数は有意差を持って FGF(-)群より高値であることが示された。Weibull 係数が高値であることは分散が小さいこととほぼ同義であるが、Weibull 分析を行うことで累積確率および最低保証値を計算すること、破壊パターンが複数あるかどうかを確認することが可能であり、それらがヒストグラムおよび分散分析だけにとどまらずに Weibull 分析を行う利点である。骨被覆不良発生率に関しては、仮に骨被覆不良を FGF(-)群の下位 5%と定義した場合に、1/142 倍に低減されることが示された(表 4)。これは、個

体差によらず、Ap-FGF コーティングによって安定したスクリュー周囲の骨形成が生じることを示し、「ゆるまないスクリュー」を作製することを目的に臨床応用を目指すにあたり、非常に有用な結果であると考えた。

5.3 Ap-FGF コーティングの性質と、コーティングを行ったチタン製スクリューの有用性

本研究において、スクリュー周囲の骨形成に関して FGF(+) 群の優位性が示された。一方、今回の検討では、抜去ピークトルクに関して FGF(-) 群に対する FGF(+) 群の優位性は示されなかった。しかしながら先行研究において、コーティングなし群(チタンピン)に対してコーティングあり群(HA、および Ap-FGF)では抜去ピークトルクの増大を認めている[101]。先行研究との違いは、先行研究では FGF-2 を含まない HA コーティングである 25F0 はコーティングあり群に含まれ、Ti とそれ以外の群に関して比較している点である。先行研究の結果からは、少なくとも Ap コーティングは抜去ピークトルク増大に寄与していると考えられた。

FGF-2 の線維芽細胞に対する効果(ピンサイト感染抑制効果)と、骨芽細胞に対する効果(インプラント周囲の骨形成)は、線維芽細胞に対しては容量依存性の効果を持つものに対して、骨芽細胞に対しては狭い FGF-2 濃度の範囲でのみ効果を持つ事が知られており、これら 2 つは異なる性質であると考えられる[53]。炎症は骨形成の阻害因子になるため、Ap-FGF コーティングにおけ

る骨形成に関する FGF-2 の効果を真に証明するためには、今後、感染(炎症)のリスクが低い内
固定モデルで評価を行うべきだと考えられる。

5.4 力学試験に関する考察

力学試験には抜去ピークトルクと引き抜き強度の 2 種類が考えられる。ネジ(スクリュー)のゆる
みを評価するにあたり、単独で挿入されたスクリューにゆるみあるか否かを評価する際には抜去ト
ルクが力学試験として多く用いられており、本研究においては抜去ピークトルクの計測を行った。
一方、臨床で用いられる椎弓根スクリューおよび創外固定においては 1 本のスクリューで固定す
るのではなく、スクリューヘッドとロッドを締結することで複数本のスクリューによって固定される。
特に脊椎固定術で用いられる椎弓根スクリューに関しては、バックアウト(引き抜けてしまうこと)に
よる疼痛や変形が臨床症状として問題になるため、引き抜き強度がより臨床成績を反映しやすい
と思われる。今後本モデルにおいても引き抜き試験を行い、力学強度における有用性が示される
可能性があるかと期待している。

また、今回行った抜去ピークトルクを規定する要素としては、骨母床強度、骨と Ap-FGF コーティ
ングの界面強度、Ap-FGF コーティングそのものの強度、Ap-FGF コーティングとインプラントの界
面強度の 4 要素があり、抜去ピークトルクはこれら 4 要素のうちの最低値であると考えられる。本
実験結果において、25F0.5 群は骨被覆率に関して他の FGF(+) 群と同等であったのに対して抜去

ピークトルクに関しては 25F0 群、25F2 群、37F4 群に対して有意差をもって低値であった。膜強度が弱かった可能性が推察されるが、Ap-FGF コーティングの物性評価に関して、25F0.5 群は Ca/P 比が他の FGF(+) 群と同等の値であった。コーティング層の破綻があったかどうかを明らかにするためには抜去後のスクリュー表面の観察や骨組織側に残存した Ap-FGF コーティング層の定量評価が検討される。

5.5 研究限界

本研究における限界を以下に列挙する。

- 除外した検体数が各群によって異なるため、組織評価上炎症を認めなかった検体数が各群で異なること。
- 後ろ向き評価であったため、検体数の不足によりコーティング作製条件ごとの検討が行えなかったこと。
- 力学試験として抜去ピークトルクしか計測されておらず、スクリュー周囲の骨形成の結果として期待される骨固着力の評価としては、引き抜き試験による評価も必要であると推察されたこと。

5.6 Ap-FGF コーティングの特長と今後の展望

本研究にて検討した共沈現象を用いた Ap-FGF コーティングの大きな利点は、既承認薬剤だけで特殊な機械を用いずに作製可能であるということである。創外固定ピンに関しては、本学附属病院にて第 1 相臨床研究が行われ、椎弓根スクリューに関しても早期の臨床応用を目指し、臨床研究の準備を行っている。

整形外科領域の他のインプラントへの応用に関する展望を以下に述べる。ボタン型 HA に対する先行研究結果もあるため、骨補填材料として広く用いられている HA ブロックおよび HA 顆粒に対しても応用可能であると推察される。偽関節発生が問題となる骨粗鬆症性椎体骨折や粉碎骨折の骨欠損部へ、FGF-2 徐放による骨癒合率の改善を期待し、HA ブロックを用いる新たな治療法も考えられる[105]。また椎弓根スクリューの固定力を増大する目的で HA スティックを用いる試みも過去に報告されており、HA スティックから FGF-2 徐放されることによって椎弓根スクリューゆるみの低減が得られる可能性も考えられる[106-108]。また、本研究ではチタン製インプラントを対象に検討を行ってきたが、整形外科インプラント材料として多く用いられるステンレス、ジルコニア、ポリエーテルエーテルケトン(PEEK: polyetheretherketone)など他の材料への作製が可能となれば、骨接合術で用いられるスクリュー、関節手術で広く用いられるスーチャーアンカー、椎体間固定術で用いられるケージ、人工関節への応用も考えられる。また、FGF-2 の徐放による周囲組織再生の促進という効果に期待して、肩腱板や半月板の縫合糸などへの応用も考えられる。いず

れへの応用に際しても、作製に特殊な機械を必要とせず、既承認薬剤だけで作製可能であるという Ap-FGF コーティングの利点が発揮されると思われる。

本研究で示すことが出来なかった、Ap-FGF コーティングスクリューの力学試験での優位性に関して、今後実験モデルの改良により明らかにしていきたい。本実験においてはピン周囲感染や炎症を含むサンプルを除外する必要があるため、組織評価上炎症を認めなかった検体数が各群で異なる状況であった。骨芽細胞に対する FGF-2 の効果による骨形成に関して、より明らかに示すためには内固定モデルでの動物実験を行うべきであることが今回明らかになった。また、生体内における膜そのものの強度の変化と、それによるインプラント固定強度に対する寄与を検討するにあたり、抜去後のスクリュー表面の観察や骨組織側に残存した Ap-FGF コーティング層の定量評価が検討される。

本研究の背景において、骨粗鬆症患者における椎弓根スクリューのゆるみが大きな問題であると述べた。よって、Ap-FGF コーティングが骨粗鬆症の患者あるいは実験動物において骨形成効果を示すかどうかを明らかにするためには、骨粗鬆症モデル動物を用いた実験を行うべきである。

また、Ap-FGF コーティングの骨形成作用を最も強く得るためのコーティング作製条件の検索・検討も必要であると考えている。さらに、Ap-FGF コーティングを内固定材料に応用するにあたり

FGF-2 の徐放性に関して、16 日以降いつまで徐放が継続するのかについてのデータが無いため、徐放継続期間に対する実験の追加で行うべきであることが今回明らかになった。

本研究において、FGF-2 は本来骨形成能が乏しい個体における骨形成能を促進・補填したのではないかと推察した。よって、FGF-2 の効果を評価するためには、今後の研究においても Weibull 分析を加えて行う必要があると考えている。

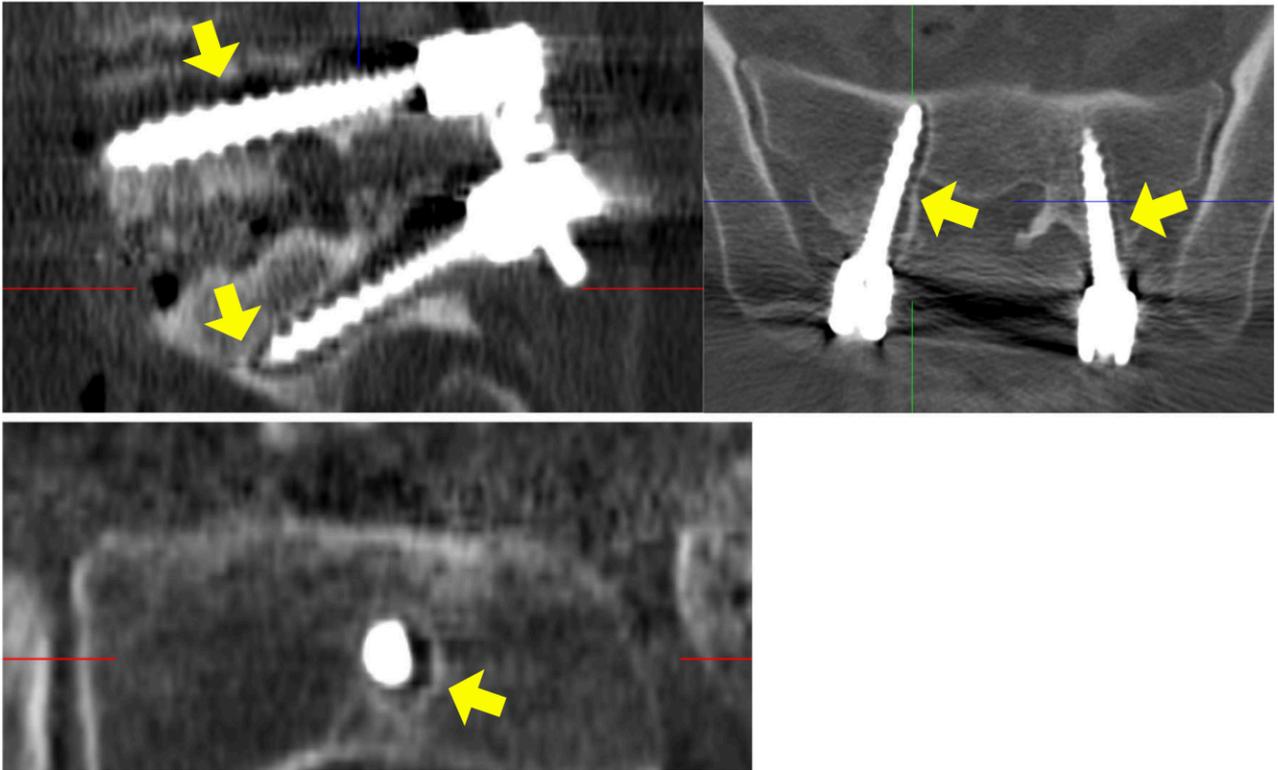
第 6 章

結論

FGF-2 を含む Ap-FGF コーティングでは、骨内での FGF-2 徐放によると推察される安定した骨形成作用があり、インプラント周囲の骨形成不良発生率を低減できる。また、骨形成不良発生率の評価において Weibull 分析は有用であった。Ap-FGF コーティングスクリューの力学試験での優位性に関して、今後実験モデルの改良により明らかにする必要がある。

図表

図 1 椎弓根スクリューゆるみの例



腰椎固定術後の椎弓根スクリューゆるみの CT 画像。スクリュー周囲に CT 値の低い領域

(Radiolucent zone)とその周囲の骨硬化像を認める(矢印)。左上:矢状断像、右上:水平断像、

下:冠状断像。Bredow J et al. Arch Orthop Trauma Surg. 2016 Figure 2 より引用した。

図2 Synthes 社チタン製海綿骨スクリュー

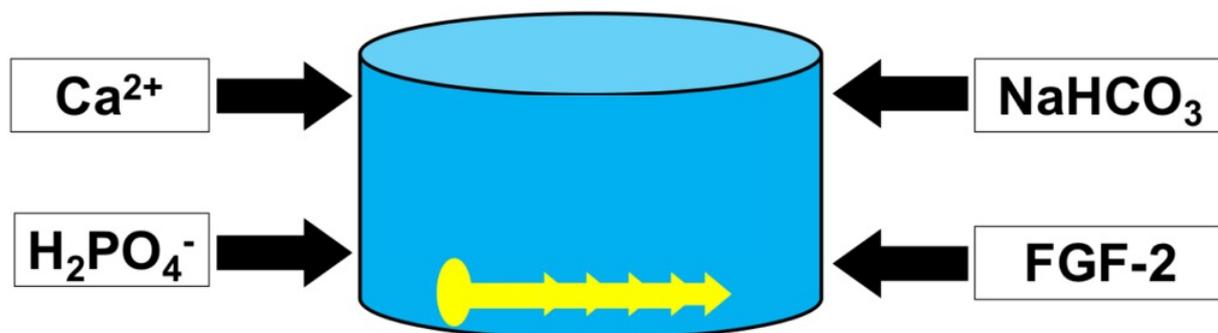


Synthes 社チタン製海綿骨スクリュー

(https://www.depuysynthes.com/hcp/trauma/products/qs/4_5mm-Cannulated-Screw-TRA-

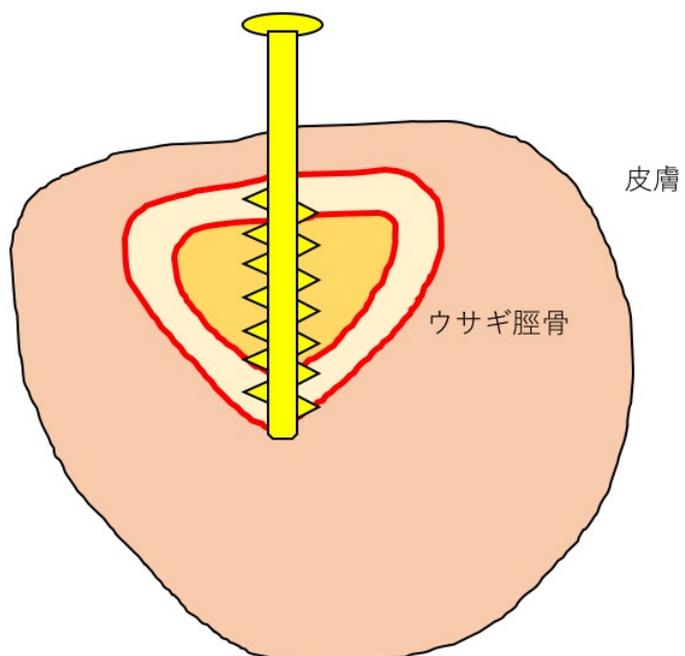
knee より)

図 3 Ap-FGF コーティング作製模式図



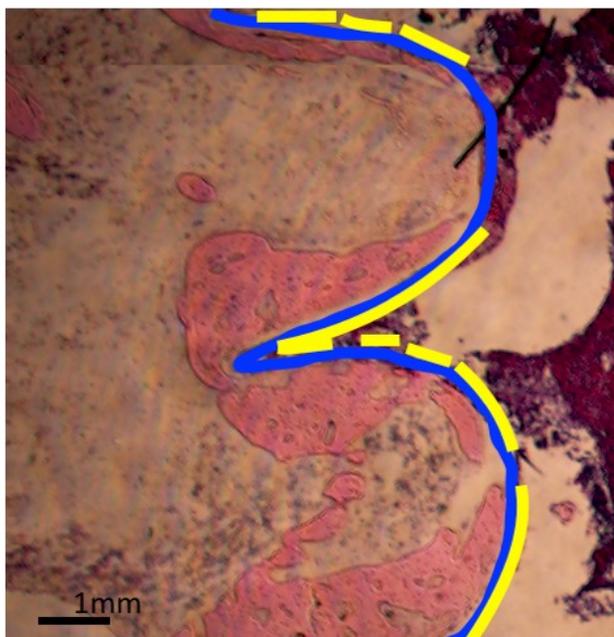
FGF-2 を混和した過飽和リン酸カルシウム溶液へスクリューを浸漬し、Ap-FGF コーティングを作製する。

図4 ウサギ脛骨への経皮的スクリー插入の模式図



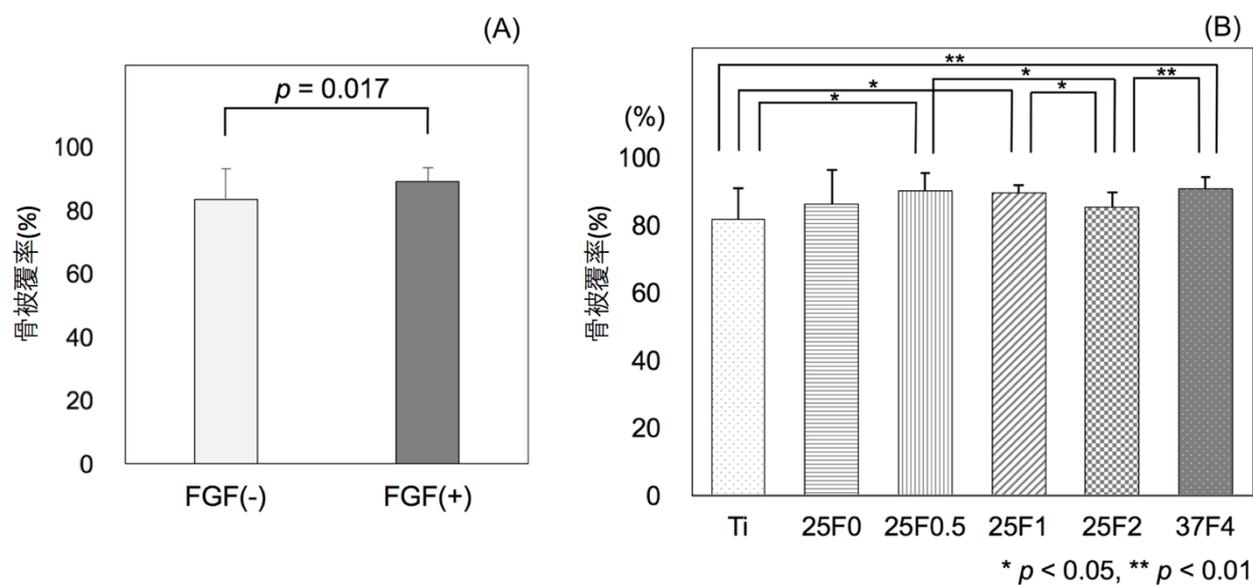
ウサギ下腿横断面の模式図。小切開から経皮的に海綿骨スクリーを刺入し、挿入部はナイロンで1針縫合した。

図 5 スクリュー周囲骨形成の評価



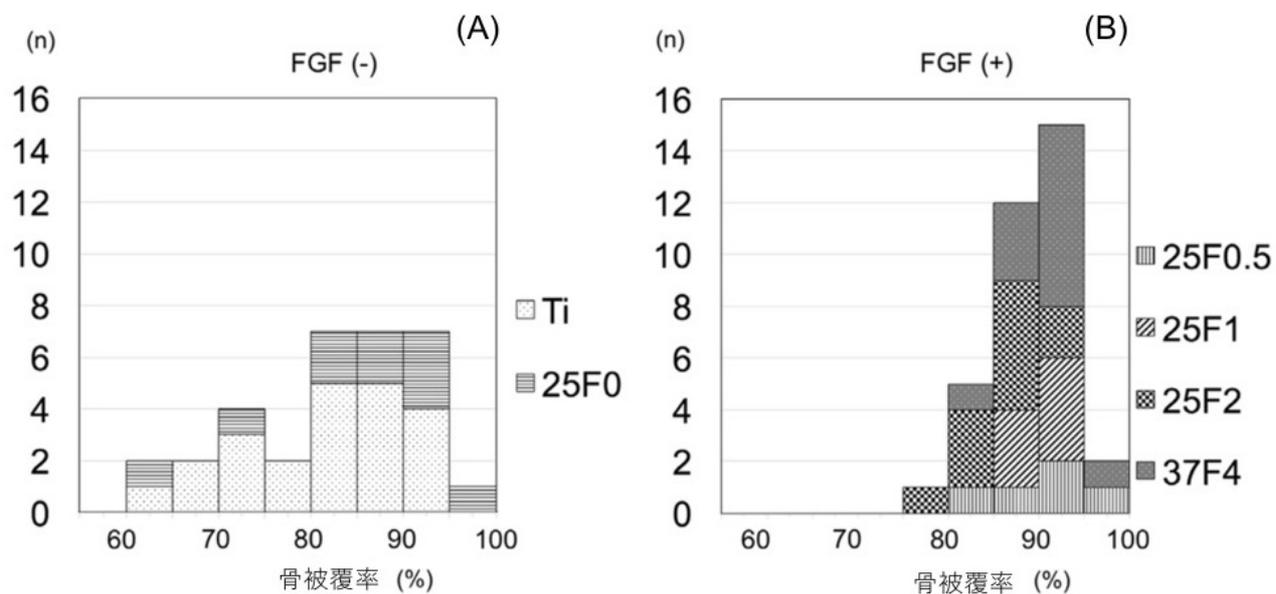
スクリュー表面に存在する骨組織の長さの合計(図中の破線)と、スクリュー表面の全長(図中の実線)(単位:ピクセル数)をそれぞれ計測し、骨被覆率 = (スクリューと接触する骨組織の長さの合計)/(スクリュー表面の全長)と定義し、骨被覆率を算出した。

図 6 FGF(-)群および FGF(+)群における骨被覆率(A)、作製条件の異なる 6 群における骨被覆率(B)



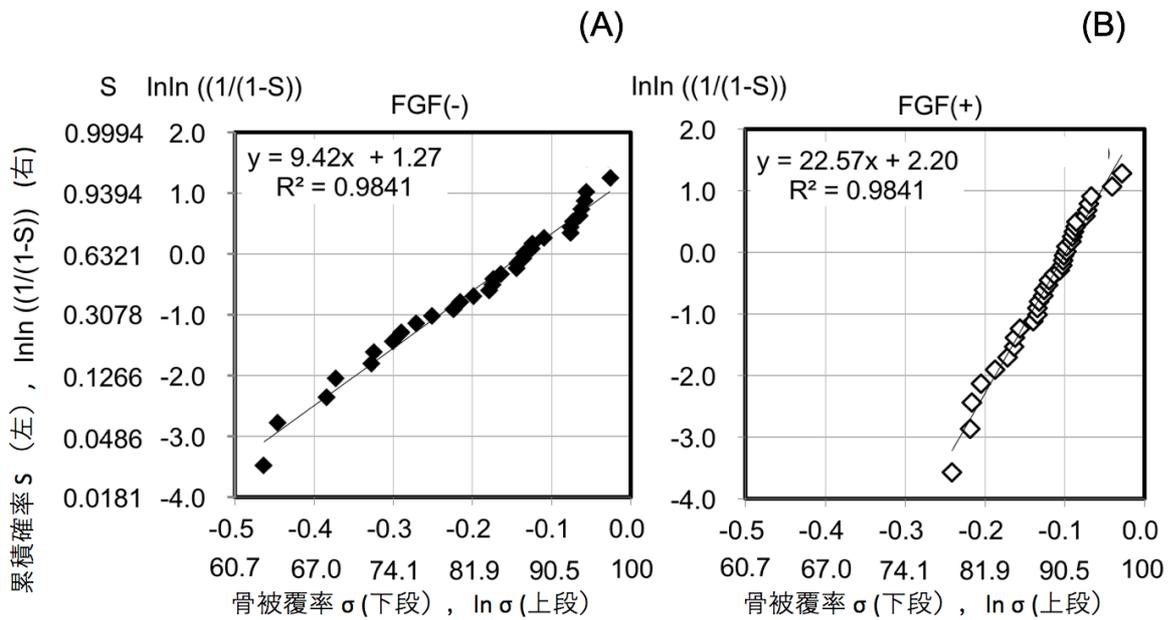
FGF(+)群は FGF(-)群に対して有意に骨被覆率が高値であった。

図7 FGF(-)群 (A) および FGF(+) (B) における骨被覆率のヒストグラム



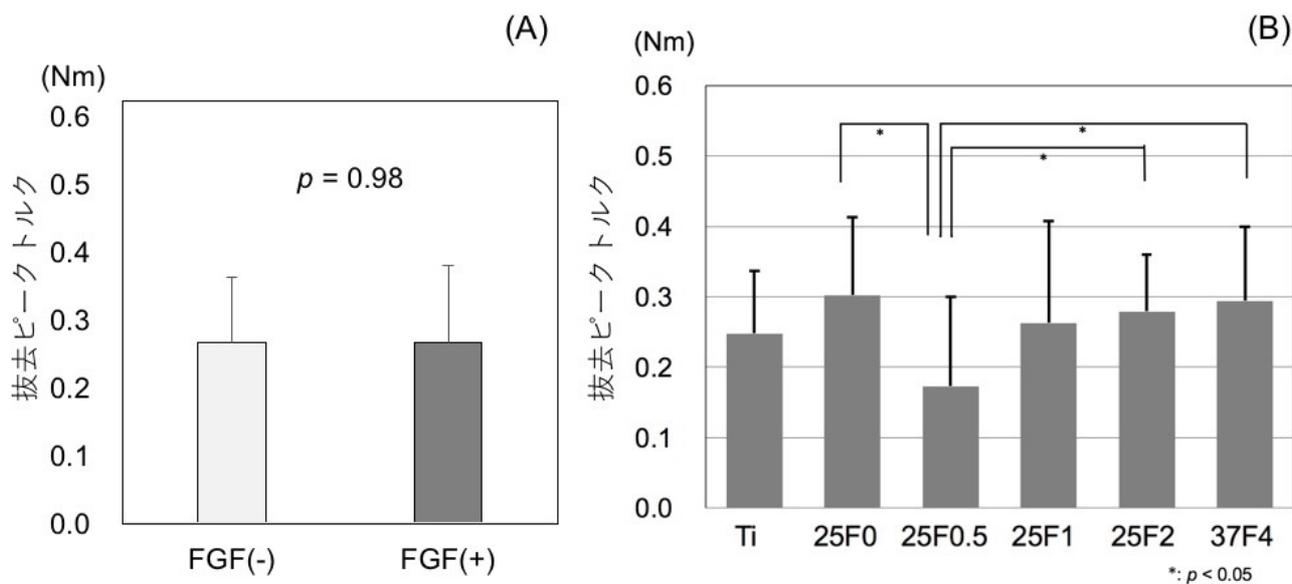
FGF(+)群では骨被覆率 75%以下の検体を認めなかった。

図 8 FGF(-)群 (A) および FGF(+) (B) における骨被覆率の Weibull plot



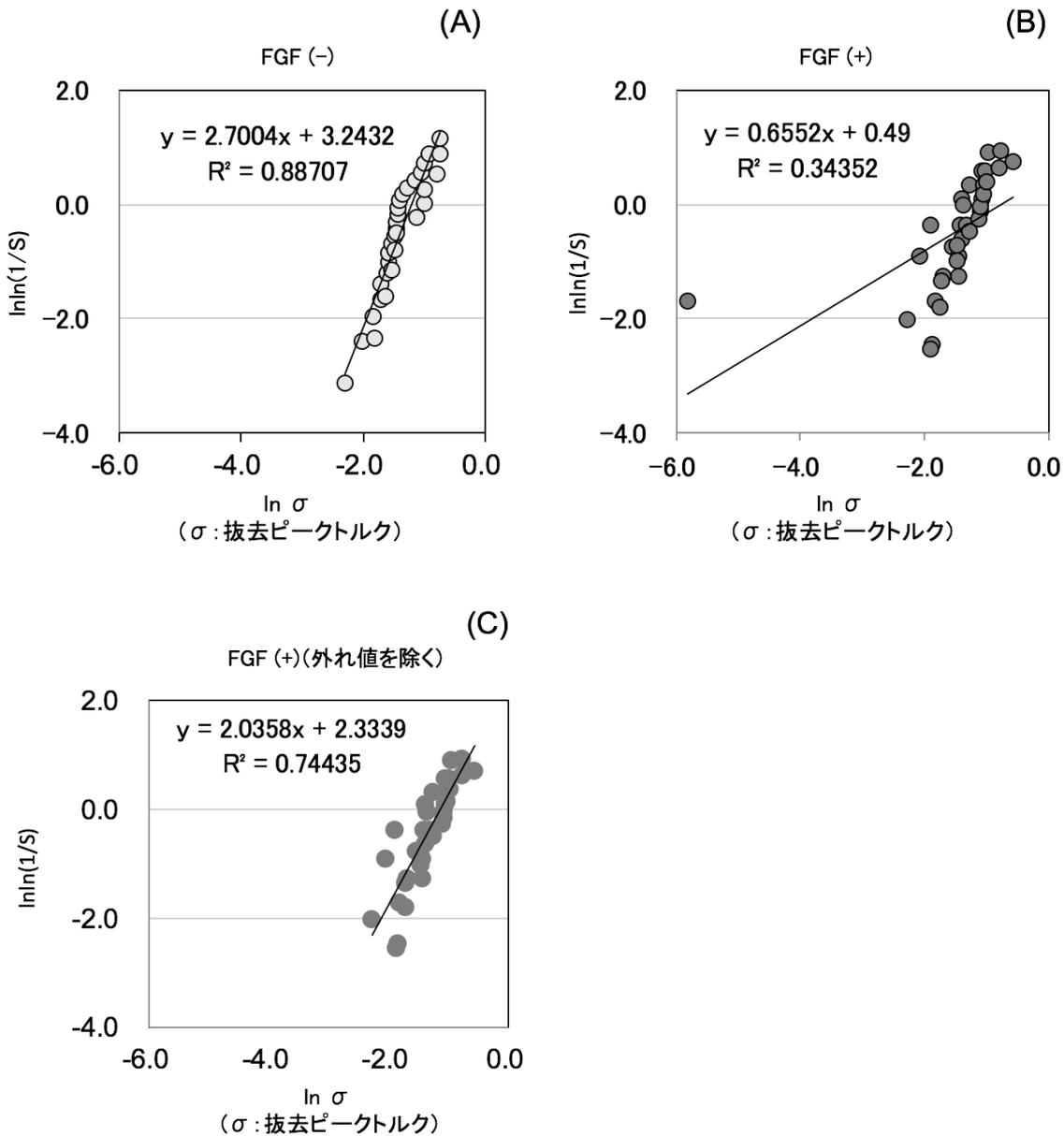
Weibull 係数が FGF(+) 群 (22.57) は FGF(-) 群 (9.42) に対して高値であった。

図9 FGF(-)群およびFGF(+)群における抜去ピークトルク(A)、作製条件の異なる6群における抜去ピークトルク(B)



FGF(-)群とFGF(+)群の両群に有意差を認めなかった。コーティングのないTi群および25F0.5で抜去ピークトルクが低値であった。

図 10 FGF(-)群 (A) および FGF(+) (B) における抜去ピークトルクの Weibull plot



Weibull 係数は FGF(+) 群 (0.655) が FGF(-) 群 (2.700) に対し低値であった。しかし、FGF(+) 群の

近似直線は外れ値の影響を大きく受けていた。外れ値 ($x, y = -5.8, -1.7$) を除いた FGF(+) 群の

Weibull 係数は 2.036 であった。少なくとも、FGF(+)群の FGF(-)群に対する抜去ピークトルクに関する優位性は認めなかった。

表1 インプラントゆるみの対策としてこれまでに検討または実用化されている方法

椎弓根スクリュー	
表面形態の加工	ポーラス化、プラスト処理、酸エッチング
表面に体内でのアパタイト形成を促進させる加工	陽極酸化被膜形成、ガス処理、NaOH処理・加熱
表面へのアパタイト形成	熱スプレー、プラズマスプレー法、擬似体液浸漬法
コーティング層に骨誘導能または骨伝導能を有する物質を担持	BMP: (Bone Morphogenetic Protein)、コラーゲン、キトサン、1.25-Vitamin D3、アレンドロネート、フィブロネクチンなど
スクリュー周囲への骨補填材料の注入	ポリメタクリル酸メチル樹脂 (PMMA: Polymethyl methacrylate)
スクリュー形状の工夫	Expandable screw
創外固定	
表面へのアパタイト形成	プラズマスプレー法 (市販化)

(成島 2008, Matena 2015, Mueller 2011, Pinheiro 2014, Kim 1996, Qiu 2014, Raj 2016, Hacking 2003, Lee 2014, Naito 2014, Fang 2014, Niu 2013, Li 2013 より)

表2 過飽和リン酸カルシウム溶液の成分組成

群	37F4	25F0, 25F0.5, 25F1, and 25F2
浸漬条件		
温度	37° C	25° C
浸漬時間	48時間	24時間
成分	mM	mM
Na ⁺	138.87	147.23
K ⁺	7.89	9.92
Ca ²⁺	3.67	8.92
Mg ²⁺	0.22	0.24
Cl ⁻	134.39	153.46
H ₂ PO ₄ ⁻	0.9	0.95
HPO ₄ ²⁻	0.94	2.02
HCO ₃ ⁻	15.09	15.09
CH ₃ COO ⁻	1.8	1.9
キシリトール	29.93	31.65

表3 Ap-FGFコーティングの組成、FGF-2担持量、FGF-2活性(NIH3T3細胞)

	25F0 (n=10)	25F0.5 (n=5)	25F1 (n=7)	25F2 (n=11)	37F4 (n=12)
Ca (mg/screw)	137.7 ± 6.1	114.5 ± 17.2	149.3 ± 22.7	166.2 ± 35.9	143.4 ± 60.9
P (mg/screw)	73.9 ± 3.1	57.3 ± 8.6	73.9 ± 11.0	82.0 ± 17.4	65.2 ± 25.6
Ca/P モル比	1.40-1.44	1.55 ± 0.02	1.56 ± 0.01	1.56 ± 0.02	1.67 ± 0.11*
リン酸カルシウム相		結晶化の乏しいアパタイト			
FGF -2 担持量 (mg/本)	-	2.04 ± 1.18*	3.97 ± 1.14	4.62 ± 0.86	4.72 ± 1.91
FGF-2 活性 (x 10 ³ cells)	-	16.3 ± 2.0*	23.8 ± 4.7	37.2 ± 7.4	31.1 ± 13.2

* $p < 0.05$

表4 骨被覆率のしきい値と骨形成不良発生率の関係

骨被覆率のしきい値	骨形成不良サンプル発生率	
	FGF(-)	FGF(+)
≤68.82%	0.1	0.002
≤63.75%	0.05	3.5×10^{-4}
≤50%	0.005	1.4×10^{-6}

引用論文

1. Galbusera F, Volkheimer D, Reitmaier S, Berger-Roscher N, Kienle A, Wilke HJ. Pedicle screw loosening: a clinically relevant complication? *Eur Spine J.* 2015;24:1005-16.
2. Apostu D, Lucaciu O, Berce C, Lucaciu D, Cosma D. Current methods of preventing aseptic loosening and improving osseointegration of titanium implants in cementless total hip arthroplasty: a review. *J Int Med Res.* 2017;1:300060517732697. doi: 10.1177/0300060517732697.
3. Mohammad HR, Strickland L, Hamilton TW, Murray DW. Long-term outcomes of over 8,000 medial Oxford Phase 3 Unicompartmental Knees—a systematic review. *Acta Orthop.* 2017;23:1-7.
4. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版:編集 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会 (日本骨粗鬆症学会 日本骨代謝学会 骨粗鬆症財団)
5. Parreira P, Maher CG, Megale RZ, March L, Ferreira ML. An overview of clinical guidelines for the management of vertebral compression fracture: a systematic review. *Spine J.* 2017:S1529-9430(7)30495-3.

6. 大谷和之、中井修、進藤重雄、山浦伊弉吉. 骨粗鬆症性椎体圧潰に対する手術療法. 骨・関節・靱帯 2005;18(5):417-23.
7. Tsujio T, Nakamura H, Terai H, Hoshino M, Namikawa T, Matsumura A, et al. Characteristic radiographic or magnetic resonance images of fresh osteoporotic vertebral fractures predicting potential risk for nonunion: a prospective multicenter study. Spine (Phila Pa 1976). 2011;36(15):1229-35.
8. 種市洋. 骨粗鬆症性椎体骨折の予後と椎体圧潰・偽関節発生のリスクファクター. 関節外科 2010;29:537-42.
9. Kim DY, Lee SH, Jang JS, Chung SK, Lee HY. Intravertebral vacuum phenomenon in osteoporotic compression fracture: report of 67 cases with quantitative evaluation of intravertebral instability. J Neurosurg. 2004;100(1 Suppl Spine):24-31.
10. Wu CT, Lee SC, Lee ST, Chen JF. Classification of symptomatic osteoporotic compression fractures of the thoracic and lumbar spine. J Clin Neurosci. 2006;13:31-8.
11. 原田敦、松井康素、竹村真里枝、伊藤 全哉、若尾 典充、太田 壽城. 総説 骨粗鬆症の医療経済-疫学, 費用と介入法別費用・効用分析-. 日本老年医学会雑誌 2005;43:596-608.

12. Ataka H, Tanno T, Yamazaki M. Posterior instrumented fusion without neural decompression for incomplete neurological deficits following vertebral collapse in the osteoporotic thoracolumbar spine. *Eur Spine J* 2009;18:69–76.
13. Katsumi K, Hirano T, Watanabe K, Ohashi M, Yamazaki A, Ito T. Surgical treatment for osteoporotic thoracolumbar vertebral collapse using vertebroplasty with posterior spinal fusion: a prospective multicenter study. *Int Orthop*. 2016;40:2309–15.
14. Sudo H, Ito M, Abumi K, et al. One-stage posterior instrumentation surgery for the treatment of osteoporotic vertebral collapse with neurological deficits. *Eur Spine J* 2010;19:907–15.
15. Predictive validity of preoperative CT scans and the risk of pedicle screw loosening in spinal surgery. Bredow J, Boese CK, Werner CM, Siewe J, Löhner L, Zarghooni K, et al. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2016;136(8):1063–7. doi: 10.1007/s00402-016-2487-8.
16. Kocak T, Cakir B, Reichel H, Mattes T. Screw loosening after posterior dynamic stabilization: review of the literature. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2010;77:134–9.
17. Wu JC, Huang WC, Tsai HW, Ko CC, Wu CL, Tu TH, et al. Pedicle screw loosening in dynamic stabilization: incidence, risk, and outcome in 126 patients. *Neurosurg Focus*. 2011;31:E9.

18. Okuyama K, Abe E, Suzuki T, Tamura Y, Chiba M, Sato K. Can insertional torque predict screw loosening and related failures? An in vivo study of pedicle screw fixation augmenting posterior lumbar interbody fusion. *Spine*. 2000;25(7):858-64.
19. 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;132:471-6.
20. Med Market Diligence, LLC: Report #M520. Worldwide Spine Surgery: Products, Technologies, Markets & Opportunities, 2010-2020. [http://mediligence.com/rpt/rpt-m520.htm?_ga=2.130261071.1101633598.1502673448-1973601159.1489819820]. 2011
21. 今城靖明、田口敏彦、米和徳、大川淳、大谷晃司、尾形直則ら. 日本脊椎脊髄病学会 脊椎脊髄手術調査報告 2013. *J Spine Res* 2013;4:1367-79.
22. Imajo Y, Taguchi T, Yone K, Okawa A, Otani K, Ogata T, et al. Japanese 2011 nationwide survey on complications from spine surgery. *J Orthop Sci*. 2015;20:38-54.
23. 公益社団法人 日本整形外科学会. 整形外科手術調査 2009 概要報告. [https://www.joa.or.jp/media/comment/pdf/investigation_2009.pdf] 2009.

24. Shea TM, Laun J, Gonzalez-Blohm SA, Doulgeris JJ, Lee 3rd WE, Aghayev K, et al. Designs and techniques that improve the pullout strength of pedicle screws in osteoporotic vertebrae: current status. *Biomed Res Int.* 2014;2014:748393.
25. Bible JE, Mir HR. External fixation: principles and applications. *J Am Acad Orthop Surg.* 2015;23(11):683–90
26. Jennison T, McNally M, Pandit H. Prevention of infection in external fixator pin sites. *Acta Biomaterialia.* Acta Materialia Inc; 2014;10(2):595–603.
27. Donaldson FE, Pankaj P, Simpson AH. Bone properties affect loosening of half-pin external fixators at the pin-bone interface. *Injury.* 2012;43(10):1764–70.
28. Saithna A. The influence of hydroxyapatite coating of external fixator pins on pin loosening and pin track infection: A systematic review. *Injury.* 2010;41(2):128–32.
29. Parameswaran AD, Roberts CS, Seligson D, Voor M. Pin tract infection with contemporary external fixation: how much of a problem? *J Orthop Trauma* 2003;17:503–7.
30. Weiser L, Huber G, Sellenschloh K, Viezens L, Püschel K, Morlock MM, et al. Insufficient stability of pedicle screws in osteoporotic vertebrae: biomechanical correlation of bone mineral density and pedicle screw fixation strength. *Eur Spine J.* 2017. doi: 10.1007/s00586-017-5091-x. [Epub ahead of print]

31. El Saman A, Meier S, Sander A, Kelm A, Marzi I, Laurer H. Reduced loosening rate and loss of correction following posterior stabilization with or without PMMA augmentation of pedicle screws in vertebral fractures in the elderly. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2013;39(5):455–60.
32. 成島尚之. 骨適合性向上を目的としたチタン材料の表面処理. *軽金属* 2008;58(11):577–82.
33. Matena J, Petersen S, Gleseke M, Kampmann A, Teske M, Beyerbach M et al. SLM produced porous titanium implant improvements for enhanced vascularization and osteoblast seeding. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):7478–92.
34. Mueller CK, Thorwarth M, Schmidt M, Schlegel KA, Schultze–Mosgau S. Comparative analysis of osseointegration of titanium implants with acid–etched surfaces and different biomolecular coatings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(6):726–36
35. Pinheiro FA, Mourão CF, Diniz VS, Silva PC, Meirelles L, Santos Junior E, et al. In–vivo bone response to titanium screw implants anodized in sodium sulfate. *Acta Cir Bras.* 2014;29(6):376–82.
36. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res.* 1996;32(3):409–17.

37. Qiu ZY, Chen C, Wang XM, Lee IS. Advances in the surface modification techniques of bone-related implants for last 10 years. *Regen Biomater.* 2014;1:67–79.
38. Raj V, Raj RM, Sasireka A, Priya P. Fabrication of TiO₂–strontium loaded CaSiO₃/biopolymer coatings with enhanced biocompatibility and corrosion resistance by controlled release of minerals for improved orthopedic applications. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;60:476–91.
39. Hacking SA, Harvey EJ, Tanzer M, Krygier JJ, Bobyn JD. Acid-etched microtexture for enhancement of bone growth into porous-coated implants. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(8):1182–9.
40. Lee JS, Yang JH, Hong JY, Jung UW, Yang HC, Lee IS, et al. Early bone healing onto implant surface treated by fibronectin/oxysterol for cell adhesion/osteogenic differentiation: in vivo experimental study in dogs. *J Periodontal Implant Sci.* 2014;44(5):242–50.
41. Lee SW, Hahn BD, Kang TY, Lee MJ, Choi JY, Kim MK, et al. Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2-coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(1):53–60

42. Naito Y, Jimbo R, Bryington MS, Vandeweghe S, Chrcanovic BR, Tovar N, et al. The influence of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 coating on implant osseointegration in the rabbit tibia. *J Oral Maxillofac Res.* 2014;5(3):e3. doi: 10.5037/jomr.2014.5303.
43. Fang K, Song W, Wang L, Jia S, Wei H, Ren S, et al. Immobilization of chitosan film containing semaphorin 3A onto a microarc oxidized titanium implant surface via silane reaction to improve MG63 osteogenic differentiation. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:4649–57.
44. Niu S, Cao X, Zhang Y, Zhu Q, Zhu J. The inhibitory effect of alendronate–hydroxyapatite composite coating on wear debris–induced peri–implant high bone turnover. *J Surg Res.* 2013 Jan;179(1):e107–15. doi: 10.1016/j.jss.2012.02.003.
45. Li Y, Cheng H, Liu ZC, Wu JW, Yu L, Zang Y, et al. In vivo study of pedicle screw augmentation using bioactive glass in osteoporosis sheep. *J Spinal Disord Tech.* 2013;26(4):E118–23. doi: 10.1097/BSD.0b013e31827695e2.
46. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構、医薬品医療機器情報。「内固定用ピン（JMDNコード32854003）オーソフィックス HA コーティングピン」
[http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/md/PDF/290348/290348_22600BZI00021000_A_01_01.pdf] 2015 年.

47. Moroni A, Toksvig-Larsen S, Maltarello MC, Orienti L, Stea S, Giannini S. A comparison of hydroxyapatite-coated, titanium-coated, and uncoated tapered external-fixation pins. An in vivo study in sheep. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80(4):547-54.
48. Moroni A, Faldini C, Marchetti S, Manca M, Consoli V, Giannini S. Improvement of the bone-pin interface strength in osteoporotic bone with use of hydroxyapatite-coated tapered external-fixation pins. A prospective, randomized clinical study of wrist fractures. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A(5):717-21.
49. Moroni A, Aspenberg P, Toksvig-Larsen S, Falzarano G, Giannini S. Enhanced fixation with hydroxyapatite coated pins. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;346:171-7.
50. Moroni A, Cadossi M, Romagnoli M, Faldini C, Giannini S. A biomechanical and histological analysis of standard versus hydroxyapatite-coated pins for external fixation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;86(2):417-21.
51. Sandén B, Olerud C, Johansson C, Larsson S. Improved extraction torque of hydroxyapatite-coated pedicle screws. *Eur Spine J.* 2000;9:534-7.
52. 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;132:113–21.

53. Tsurushima H, Marushima A, Suzuki K, Oyane A, Sogo Y, Nakamura K, et al. Enhanced bone formation using hydroxyapatite ceramic coated with fibroblast growth factor-2. Acta Biomater. 2010;6:2751–9.
54. Nakamura K, Kawaguchi H, Aoyama I, Hanada K, Hiyama Y, Awa T, et al. Stimulation of bone formation by intraosseous application of recombinant basic fibroblast growth factor in normal and ovariectomized rabbits. J Orthop Res. 1997;15(2):307–13.
55. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. Prog Growth Factor Res. 1989;1(4):267–80.
56. Noda M, Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. Endocrinology. 1989;124(6):2991–4.
57. Skovrlj B, Koehler SM, Anderson PA, Qureshi SA, Hecht AC, Iatridis JC, et al. Association between BMP-2 and carcinogenicity. Spine (Phila Pa 1976). 2015;40(23):1862–71.
58. Carragee EJ, Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EL, Weiner BK, Yoon ST, et al. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. J Bone Joint Surg Am. 2013;95(17):1537–45.

59. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.* 2011;11(6):471-91.
60. Devine JG, Dettori JR, France JC, Brodt E, McGuire RA. The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evid Based Spine Care J.* 2012;3(2):35-41.
61. Kelly MP, Savage JW, Bentzen SM, Hsu WK, Ellison SA, Anderson PA. Cancer risk from bone morphogenetic protein exposure in spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(17):1417-22.
62. Guzman JZ, Merrill RK, Kim JS, Overley SC, Dowdell JE, Somani S, et al. Bone morphogenetic protein use in spine surgery in the united states: how have we responded to the warnings? *Spine J.* 2017; 17(9):S1529-9430(17)30187-0.
63. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構、医薬品医療機器情報。「フィブラストスプレー250 / フィブラストスプレー500」
[http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/2699710R1028_1_09/]2010年.
64. Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973;70(9):2702-6.

65. Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev.* 2005;26(1):63–77.
66. Bhang SH, Sun AY, Yang HS, Rhim T, Kim DI, Kim BS . Skin regeneration with fibroblast growth factor 2 released from heparin–conjugated fibrin. *Biotechnol Lett.* 2011;33:845–51.
67. Shi C, Chen W, Zhao Y, Chen B, Xiao Z, Wei Z, Hou X, Tang J, Wang Z, Dai J. Regeneration of full–thickness abdominal wall defects in rats using collagen scaffolds loaded with collagen– binding basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2011;32:753–9
68. Cornwell KG, Pins GD. Enhanced proliferation and migration of fibroblasts on the surface of fibroblast growth factor–2– loaded Fibrin microthreads. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3669–77.
69. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non–thermal plasma through fibroblast growth factor–2 release. *Ann Biomed Eng.* 2010;38:748–57.
70. Hirooka T, Fujiwara Y, Inoue S, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, et al. Suppression of fibroblast growth factor–2 expression: possible mechanism underlying methylmercury– induced inhibition of the repair of wounded monolayers of cultured human brain microvascular endothelial cells. *J Toxicol Sci.* 2009;34:433–9.

71. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellularmatrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009;17:153–62.
72. Nurata H, Cemil B, Kurt G, Uçankuo NL, Dogulu F, Omeroflu S. The role of fibroblast growth factor–2 in healing the dura mater after inducing cerebrospinal liquid leakage in rats. *J Clin Neurosci.* 2009;16:542–4.
73. Xie JL, Bian HN, Qi SH, Chen HD, Li HD, Xu YB, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) alleviates the scar of the rabbit ear model in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16:576–81.
74. Akita S, Akino K, Imaizumi T, Hirano A. A basic fibroblast growth factor improved the quality of skin grafting in burn patients. *Burns.* 2005;31(7):855–8.
75. Akita S, Akino K, Imaizumi T, Tanaka K, Anraku K, Yano H, et al. The quality of pediatric burn scars is improved by early administration of basic fibroblast growth factor. *J Burn Care Res.* 2006;27(3):333–8.
76. Hayashida K, Fujioka M, Morooka S, Saijo H, Akita S. Effectiveness of basic fibroblast growth factor for pediatric hand burns. *J Tissue Viability.* 2016;25(4):220–4
Kitamura M, Akamatsu M, Kawanami M, Furuichi Y, Fujii T, Mori M, et al. Randomized placebo–controlled and controlled non–inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth

factor 2, and enamel matrix derivative in periodontal regeneration in intrabony defects. J

Bone Miner Res. 2015;31(4):806–14.

77. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構、医薬品医療機器情報. 「リグロス歯科用液キット 600 μ g リグロス歯科用液キット 1200 μ g (トラフェルミン(遺伝子組換え)) に関する資料」
[http://www.pmda.go.jp/drugs/2016/P20161018003/200022000_22800AMX00684000_B100_1.pdf] 2016 年.
78. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofujii T, et al. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. J Dent Res. 2010;22;90(1):35–40.
79. Honnami M, Choi S, Liu IL, Kamimura W, Taguchi T, Hojo H, et al. Repair of rabbit segmental femoral defects by using a combination of tetrapod-shaped calcium phosphate granules and basic fibroblast growth factor-binding ion complex gel. Biomaterials. 2013;34:9056–62.
80. Luong LN, Ramaswamy J, Kohn DH. Effects of osteogenic growth factors on bone marrow stromal cell differentiation in a mineral-based delivery system. Biomaterials. 2012;33:283–94.

81. Behr B, Sorkin M, Lehnhardt M, Renda A, Longaker MT, Quarto N. A comparative analysis of the osteogenic effects of BMP-2, FGF-2, and VEGFA in a calvarial defect model. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:1079-86.
82. Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, Ikada Y, Aoyama I, Anzai J, et al. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):875-80.
83. 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.
84. Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res*. 1998;13:942-94.
85. 吉成正雄. インプラント材料とその表面. その 2. インプラント材としてのアパタイト. *歯科学報* 2003;103(6):481-90.
86. 稲垣雅彦, 亀山哲也. 小特集・医療バイオ分野へのプラズマ応用・2. プラズマバイオマテリアルコーティング. *J Plasma Fusion Res* 2007;7:595-600.

87. Hasegawa T, Inufusa A, Imai Y, Mikawa Y, Lim TH, An HS. Hydroxyapatite- coating of pedicle screws improves resistance against pull-out force in the osteoporotic canine lumbar spine model: a pilot study. *Spine J.* 2005;5:239-43.
88. Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis: a review. *Acta Biomater.* 2014;10:557-79.
89. 吉成正雄. インプラント材料とその表面. その 3. インプラント表面と生体. *歯科学報* 2003;103(7):565-72.
90. 吉成正雄. インプラント材料とその表面. その 4. これからのインプラント. *歯科学報* 2003;103(8):637-49.
91. Yang B, Uchida M, Kim HM, Zhang X, Kokubo T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials* 2004;25:1003-10.
92. 特許番号:特許 4654427 号 発明者:小沼一雄、浅香紀子、小林奈央子、伊藤敦夫 発明の名称:骨形成を促進する水溶性タンパク質-リン酸カルシウム複合体およびその製造方法
出願人:産業技術総合研究所 出願日:2002.11.22.
93. 特許番号:特許 4478754 号 発明者:伊藤敦夫、小沼一雄、十河友、一ノ瀬 昇、深沢幸士郎、山崎 淳司、近藤 直 発明の名称:タンパク担持リン酸カルシウム、その製造方法及び

それを用いたタンパク徐放体、人工骨及び組織工学スキャフォールド 出願人：産業技術総合研究所、早稲田大学 出願日：2002.11.25.

94. Sogo Y, Ito A, Fukasawa K, Kondo N, Ishikawa Y, Ichinose N, Yamazaki A. Coprecipitation of cytochrome C with calcium phosphate on hydroxyapatite ceramic. *Curr Appl Phys* 2005;5: 526-30.
95. 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;2:S175-80.
96. 六崎裕高、伊藤敦夫、原友紀、藤井賢吾、柳澤洋平、十河友ら. FGF-2 担持チタンデバイスの開発と整形外科治療への応用. *関節外科* 2017;36(5):18-23.
97. Sørensen JH, Lilja M, Åstrand M, Sørensen TC, Procter P, Strømme M, et al. Co-precipitation of tobramycin into biomimetically coated orthopedic fixation pins employing submicron-thin seed layers of hydroxyapatite. *Curr Drug Deliv.* 2014;11(4):501-10. *Curr Drug Deliv.* 2014;11(4):501-10.
98. Wang X, Ito A, Li X, Sogo Y, Oyane A. Signal molecules-calcium phosphate coprecipitation and its biomedical application as a functional coating. *Biofabrication.* 2011;3(2):022001. doi: 10.1088/1758-5082/3/2/022001.

99. Mutsuzaki H, Sogo Y, Oyane A, Ito A. Improved bonding of partially osteomyelitic bone to titanium pins owing to biomimetic coating of apatite. *Int J Mol Sci.* 2013;14:24366–79.
100. 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;15:10252–70.
101. 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;86:365–74.
102. Roberts WE, Chamberlain JG. Scanning electron microscopy of the cellular elements of rat periodontal ligament. *Arch Oral Biol.* 1978;23:587–9.
103. Weibull W. A statistical distribution function of wide applicability. *J Applied Mechanics.* 1951;8:293–7.
104. Wang X, Ito A, Sogo Y, Li X, Tsurushima H, Oyane A. Ascorbate-apatite composite and ascorbate-FGF-2-apatite composite layers formed on external fixation rods and their effects on cell activity in vitro. *Acta Biomaterialia.* 2009;5(7):2647–56.
105. 松崎浩巳. 骨粗鬆症性椎体骨折に対する HA ブロックを用いた椎体形成術. *日本腰痛会誌* 2005;12(1):99–106.

106. Jang SH, Lee JH, Cho JY, Lee HY, Lee SH. The efficacy of hydroxyapatite for screw augmentation in osteoporotic patients. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53(12):875–81.
107. 杉山誠一、野々村論香、細江英夫、宮本敬、吉田実、清水克時. ハイドロキシアパタイト顆粒を使用した脊柱椎弓根スクリュー固定の生体力学的研究. *整形外科* 2002;53(5):605–610.
108. 松崎浩巳、徳橋泰明、若林健、大川章裕、萩原秀彦、岩橋正樹. 骨粗鬆例に対するハイドロキシアパタイト緻密顆粒(HA stick)充填による pedicle screw の固定性の検討. *臨床整形外科* 2001;36(4):529–534.

学会発表

1. 藤井賢吾、伊藤敦夫、原友紀、六崎裕高、村井伸司、柳澤洋平、十河友、小林文子、山崎正志: FGF-2 担持アパタイトコーティングを行ったチタン製インプラントのフリーズドライ保存法の開発 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会(富山)、10 月、2015
2. 藤井賢吾、村井伸司、六崎裕高、原友紀、十河友、大矢根綾子、柳澤洋平、伊藤敦夫、山崎正志: FGF-2 担持アパタイトコーティングチタンスクリューは局所骨形成とともに安定した骨固着力を発揮する 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会(富山)、10 月、2015
3. 藤井賢吾、村井伸司、六崎裕高、原友紀、十河友、柳澤洋平、小林文子、伊藤敦夫、山崎正志: FGF-2 担持アパタイトコーティングを行った各種チタン製インプラントにおける FGF-2 活性の違い 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会(富山)、10 月、2015
4. 藤井賢吾、伊藤敦夫、原友紀、六崎裕高、村井伸司、柳澤洋平、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のフリーズドライに関する検討 つくば医工連携フォーラム 2016(つくば)、1 月、2016
5. Kengo Fujii, Hirotaka Mutsuzaki, Atsuo Ito, Shinji Murai, Yohei Yanagisawa, Yu Sogo, Yuki Hara, Masashi Yamazaki: Optimal condition of fibroblast growth factor-2-apatite composite layer for superior osteogenesis and mechanical property. Orthopaedic Research Society (ORS)

2016 Annual Meeting, (Orlando, FL, USA), March, 2016 (Poster presentation)

6. **Kengo Fujii, Hiroataka Mutsuzaki, Atsuo Ito, Shinji Murai, Yohei Yanagisawa, Yu Sogo, Yuki Hara, Masashi Yamazaki:** Mitogenic activity of FGF-2 in FGF-2-apatite composite layers formed on titanium-based substrates with different surface chemistry. 10th World Biomaterials Congress (WBC), (Montreal, Canada), May, 2016 (Oral presentation)
7. **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リュ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)、10 月、2016
8. **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:** チタンインプラントの表面組成に依らず FGF-2 活性を保持させるための FGF-2 担持アパタイトコーティング法について 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会(福岡)、10 月、2016
9. **藤井賢吾、六崎裕高、長島克弥、野口裕史、山崎正志:** FGF-2 徐放性を有する FGF-2 担持アパタイトコーティングの椎弓根スクリューへの応用 第 25 回日本脊椎インストゥルメンテーション学会(長崎)、10 月、2016

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導、御校閲を賜りました山崎正志教授に心より感謝いたします。また、疾患制御医学専攻運動器系制御医学分野 原友紀講師、筑波大学附属病院 野口裕史病院講師、産業技術総合研究所 健康工学研究部門 生体材料研究グループ 伊藤敦夫博士(グループ長)、十河友博士、茨城県立医療大学 保健医療学部医科学センター 整形外科 六崎裕高教授のご指導、ご助言、ご協力に対してここに改めて感謝いたします。さらに実験を行うにあたり、多大なるご協力、ご指導をいただいたつくば臨床医学研究開発機構 小林文子様、筑波大学大学院 村井伸司先生、柳澤洋平先生、松本佑啓先生、長島克弥先生に厚く御礼申し上げます。

尚、本研究は革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業、および科研費(JP15H03056)の補助金を受けて実施されました。

参考論文

1. **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;12(1):1. doi: 10.1186/s13018-016-0501-z.
2. **Fujii K, Kawamura N, Ikegami M, Niitsuma G, Kunogi J:** Radiological improvements in global sagittal alignment after lumbar decompression without fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2015;40(10):703-9. doi: 10.1097/BRS.0000000000000708.
3. **Fujii K, Abe T, Kubota S, Marushima A, Kawamoto H, Ueno T, Matsushita A, Nakai K, Saotome K, Kadone H, Endo A, Haginoya A, Hada Y, Matsumura A, Sankai Y, Yamazaki M:** The voluntary driven exoskeleton Hybrid Assistive Limb (HAL) for postoperative training of thoracic ossification of the posterior longitudinal ligament: a case report. *J Spinal Cord Med.* 2016:1-7. doi: 10.1080/10790268.2016.1142056.
4. **Fujii K, Sakane M, Abe T, Nakagawa T, Sakai S, Tatsumura M, Funayama T, Yamazaki M:** Tumor occupation in the spinal canal and clinical symptoms of cauda equina Schwannoma: an analysis of 22 cases. *Asian Spine J.* 2016;10(6):1079-84. doi: 10.4184/asj.2016.10.6.1079

5. **Fujii K, Abe T, Funayama T, Noguchi H, Nakayama K, Miura K, Nagashima K, Kumagai H, Yamazaki M:** Lateral lumbar interbody fusion for ossification of the yellow ligament (OYL) in the lumbar spine: first reported case. *Case Rep Orthop.* 2017;2017:3404319. doi: 10.1080/10790268.2017.1313932.

参考論文