

早期の骨誘導効果のある新しい技術の比較 GRAPE Technology とアルカリ加熱処理の骨誘導能の比較

旭川医科大学整形外科・人工関節講座
谷野弘昌、西田恭博、伊藤浩

はじめに

近年、変形性関節症や関節リウマチにより関節の機能を失った場合、人工関節置換術によりその機能を再獲得する治療が一般的となった。人工関節の骨への固定法のひとつとしてセメントレス人工関節がある。セメントレス人工関節は、人工関節の表面に多孔質を設け多孔質内へ新生骨が侵入して人工関節と骨組織が固定される。セメント固定法と異なり、新生骨が多孔質部に十分に侵入し、安定した固定が得られるまでには時間を要する。そこで、より短期間でセメントレス人工関節を骨に固定するために、材料表面に沿って新生骨の成長を促す骨誘導能を付与する技術の開発が望まれていた。セメントレス人工関節へ骨誘導能を付与し、早期の固定さらには強固な固定を目指す目的で、ハイドロキシアパタイトをプラズマ溶射法により人工関節表面にコーティングする方法が用いられている [1]。しかし、母材とコーティング層との間に明確な界面が存在するため、コーティング層が剥離してしまう可能性、コーティング層自体が消失してしまう可能性や、プラズマ溶射時にハイドロキシアパタイトが高温に曝されるため、その組成や結晶性を変化させる事が懸念されている [2, 3]。一般的に人工材料を骨の欠損部に埋入すると、人工材料は線維性被膜で取り囲まれて

しまい骨から隔離されてしまう。しかし、Bioglass® [3]や A-W ガラス [4]のような生体活性セラミックスでは、被膜を作らず骨と直接結合し骨補填材料として実用化されている。様々な生体活性セラミックスと骨との界面を詳細に調べてみると、生体活性セラミックスと骨との界面には骨類似アパタイトの薄膜が形成されており、この骨類似アパタイト形成には材料表面の結晶相や、Si-OH 基・Ti-OH 基などの親水性官能基が重要な役割を果たす [5]。

本邦で開発されたチタン合金へのアルカリ加熱処理は、従来の人工関節表面へのアパタイトコーティングに比べ、新たなコーティングを施す事無く早期の骨誘導効果があり、2000 年より人工関節表面への臨床治験が開始され、2007 年 10 月から臨床使用されている非常に期待されている新技術である [6]。この方法ではチタン合金を水酸化ナトリウム水溶液浸漬処理後に洗浄し、大気中で 600°C の加熱を行うことにより、擬似体液中および生体内でチタン合金表面に骨と直接結合する骨類似アパタイト層が形成されると報告されている。その機序は、金属表面処理層から Na⁺が溶出するのに伴い金属表面に Ti-OH 基が生成され、その Ti-OH 基に体液中のプラスに帯電したカルシウムイオンが反応し、非晶

質のチタン酸カルシウムが形成される。これと体液中のリン酸イオンが反応してリン酸カルシウムが形成される。この時に体液中の炭酸イオンやマグネシウムイオンが取り込まれ、生体骨の無機成分とほぼ同じ成分のアパタイト層、骨類似アパタイトとなる。同様に、過酸化水素水 [7]や塩化カルシウム水溶液 [8]を用いた処理も提案されており、いずれの方法もチタン系金属にアパタイト形成能を付与する、極めて有効な手法である。

我々の共同研究者は、アパタイトコーティング無しに早期の骨誘導効果がある GRAPE Technology という新しい技術

材料と方法

この研究は、旭川医科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

18羽の骨格の成熟した、オスの日本白色家兎(体重3.5kg~4.0kg)を使用した。インプラントは、純チタン製で長さ25mm、直径4.5mmの円柱形ロッドを使用した。表面にはピッチ2.5mm、幅0.5mm、深さ0.5mmのラウンドボトムの溝を作製した(図1)。機械的試験の為、片面には直径2.5mm、深さ6mmのネジ穴を作製した。GRAPE Technology とアルカリ加熱処理の表面処理を行った2種類のインプラントを用意した。インプラントは、 γ 線滅菌法で滅菌処理した。

GRAPE Technology 処理として、インプラントを空気中で400℃、1時間の熱酸化した[11]。アルカリ加熱処理は、インプラントを60℃の5MのNaOH水溶液に24時間浸漬しアルカリ処理を行い、40℃の蒸留水で48時間の温水処理、その後600℃で1時間の加熱処理を行った[12]。

を近年開発した。GRAPE Technology は純チタンやチタン合金などの表面に溝・多孔質がある場合に熱酸化するだけでチタン表面にルチル型TiO₂が形成され、擬似体液中に浸漬しておくことアパタイトが金属表面に形成されると報告されており、簡易な処理により金属表面と骨が直接結合する可能性を示唆している[9, 10, 11]。

今回我々は、兎を用いた機械的試験と組織学的試験により、早期の骨誘導効果のある新しい技術である、GRAPE Technology とアルカリ加熱処理の骨誘導能の比較を行った。

滅菌法を用いて、インプラントを兎の両大腿骨の遠位側に挿入した。右側にはGRAPE Technology 処理のインプラント、左側にはアルカリ加熱処理のインプラントを挿入した。両大腿骨の顆間切痕部から、髓腔方向を確認しながら、まず1.2mm径のKirschner wire (K-wire)を刺入し、次に1.8mm径のK-wireで刺入部を広げ、最終的に4.5mm径のドリルで穴をあけて髓腔まで通し、プレスフィットでインプラントを挿入した。インプラントの遠位部が挿入部より8mm近位になるようにジグを使用した。

麻酔は、ハロセン吸入後に、塩酸ケタミン(80mg/kg)とキシラジン(8mg/kg)を筋肉内注射した。抗生剤として、セフアズリン(80mg)を手術直前に筋肉内注射した。手術直後にX線写真を撮影し、インプラントの位置と大腿骨骨折が起きていないのを確認した。

兎を術後3、6、12週目で6羽ずつ安楽死させ、両大腿骨を取り出した。各週4

羽は機械的試験に、2羽は組織学的試験に使用した。機械的試験は、インプラントと骨の結合強度を、引き抜き試験で評価した。大腿骨顆部を削り、インプラント遠位表面を露出させた。大腿骨は、リニアモーター式疲労試験機（E3000、INSTRON社製）に取り付けた。ジグ天板下面で全荷重を受けるようにし、インプラントと骨の破断後にインプラントが通るように、ジグ天板には直径5.0mmの穴をあけた（図2）。インプラントの引っ張り速度は、毎秒2mmで行った。機械的試験は全て大腿骨取り出し直後に行った。

インプラントと骨の界面を観察するために、組織学的検査を行った。大腿骨を10%中性干渉ホルマリン溶液に7日間浸して固定し、エタノールに3日間浸し脱水した。エタノール濃度は、80%、90%、95%、100%と順次上昇させた。その後、メタクリル酸メチルに包埋し、マイクロカッティングマシン（BS300、EXAKT社製）を用いて0.5mmの厚さに切断後に、マイクログライディングマシン（MG4000CS、EXAKT社製）を使用して厚さ100 μ mの非脱灰標本作製した。光学顕微鏡検査で観察を行うため、トルイジンブルー溶液で染色した。標本を近位・中位・遠位の3部分に分け、インプラントと骨の界面の観察を行い、インプラント周囲における骨の接している部分の割合であるBone affinity indexを計測した [13]。

結果

<機械的試験>

引き抜き試験の結果の平均値は、術後3週でGRAPE Technology群は423 \pm 23.8N、

アルカリ加熱処理群は559 \pm 54.5N、術後6週でGRAPE Technology群は664 \pm 112N、アルカリ加熱処理群は573 \pm 98.4、術後12週でGRAPE Technology群は875 \pm 72.5N、アルカリ加熱処理群は978 \pm 42.2Nであった（図3）。各週において、両群に有意差は無かった。

<組織学的試験>

Bone affinity indexの結果は、術後3週でGRAPE Technology群は39.9 \pm 9.9%、アルカリ加熱処理群は40.7 \pm 5.5%、術後6週でGRAPE technology群は57.0 \pm 12.5%、アルカリ加熱処理群は57.9 \pm 8.6%、術後12週では、GRAPE technology群は61.5 \pm 10.3%、アルカリ加熱処理群は62.3 \pm 9.8%であった（図4）。各週において、両群に有意差は無かった。

非脱灰標本での組織観察では、術後3週で、両群ともに類骨の形成が認められた。術後6週では、両群ともに更なる新生骨の形成が認められた。術後12週では、両群ともに新生骨の増生が見られた（図5）。

考察

機械的試験の結果、GRAPE Technologyとアルカリ加熱処理では、3週、6週、12週と埋入期間に依存して破断時の荷重の上昇がみられ、その引っ張り荷重に2群間で有意差は無く、インプラントと骨の固着力は同程度であった。また組織学的試験では、GRAPE Technology群とアルカリ加熱処理群ともに、術後3週で新生骨が見られ、ともにインプラント表面と新生骨の間には線維組織がなく、直接固着していることが分かった。6週、12

週と両群ともに新生骨の増生が見られている。Bone affinity index は埋入期間に依存して増加がみられ、その数値は2群間で有意差は無く、インプラントと骨の接触率は同程度であった。

GRAPE Technology はチタン合金のアルカリ加熱処理に比べ、その工程が非常に単純である。水溶液を用いた化学的な手法を用いる事無く、溝加工と熱処理だけでチタン金属に骨誘導能を付与することができる。すなわち、新しい生産設備や技術を必要とせず、従来の生産プロセスにより短期間での骨への固定を可能にするセメントレス人工関節を供給できる。更に、GRAPE Technology によって金属表面に形成されるのは酸化層であるので非常に強固な表面である事が特徴であると言える。その早期の骨誘導能の機序として Sugino らは以下の3つを挙げている [9, 10, 11]。(1)アパタイトの核形成に好適な結晶相 (ルチル相) の形成 (2)Ti-OH 基の残存 (3)局所的なイオン濃度変化および表面電荷を可能とする微小空間の実現である。しかし、GRAPE Technology により作製したチタン金属材料の擬似体液中におけるアパタイト形成機構や、生体内での骨結合機構の詳細はまだ十分実証されているとは言えない。

本研究は、今回の条件下において機械的試験・組織学的試験ともに、GRAPE technology とアルカリ加熱処理の骨誘導能に差が無いこと示している。GRAPE Technology はその簡便さなどから臨床的にも人工関節の生産においても非常に有用である可能性がある。今後は、実際の多孔質表面での動物実験や、臨床に

おける結果がどうであるのか調査していく必要がある。

謝辞

本研究は、公益財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成をもとに行いました。心より感謝いたします。

参考文献

1. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A., Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. J Biomed Mat Res, 58, 570-592, 2001
2. Radin SR, Ducheyne P., Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect on *in vitro* stability. J Mat Sci; Mat Med 3, 33-42, 1992
3. LeGeros RZ, LeGeros JP., In introduction to bioceramics, eds. L. L. Hench and J. Wilson, World Scientific, London and Singapore, 139-180, 1993
4. Kokubo T., In introduction to bioceramics', eds. L. L. Hench and J. Wilson, World Scientific, London and Singapore, 75-99, 1993
5. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, de Groot K., The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. J Biomed Mat Res 28, 7-15, 1994

6. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M., Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 24, 2161-2175, 2003
7. Ohtsuki C, Iida H, Hayakawa S, Osaka A., Bioactivity of titanium treated with hydrogen peroxide solutions containing metal chlorides. *J Biomed Mat Res* 35, 39-47, 1997
8. Hanawa T, Kon M, Ukai H, Murakami K, Miyamoto Y, Asaoka K., Surface modification of titanium in calcium-ion-containing solutions. *J Biomed Mat Res* 34, 273-278, 1994
9. Sugino A, Uetsuki K, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A, Ohtsuki C., Surface topography designed to provide osteoconductivity to titanium after thermal oxidation. *Materials Trans* 49, 428-434, 2008
10. [10]Sugino A, Tsuru K, Hayakawa S, Kikuta K, Kawachi G, Osaka Am Ohtsuki C., Induced deposition of bone-like hydroxyapatite on thermally oxidized titanium substrates using a spatial gap in a solution that mimics a body fluid. *J Ceramic Soc Jpn* 117, 515-520, 2009
11. Sugino A, Ohtsuki C, Tsuru K, Hayakawa S, Nakano T, Okazaki Y, Osaka A., Effect of spatial design and thermal oxidation on apatite formation on Ti-15Zr-4Ta-4Nb alloy. *Acta Biomater* 5, 298-304, 2009
12. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nishiguchi S, Nakamura T., Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment. *J Biomed Mat Res* 45, 100-107, 1999

図表



図 1. インプラント
 (左) GRAPE Technology
 (右) アルカリ加熱処理



図 2. 機械的試験

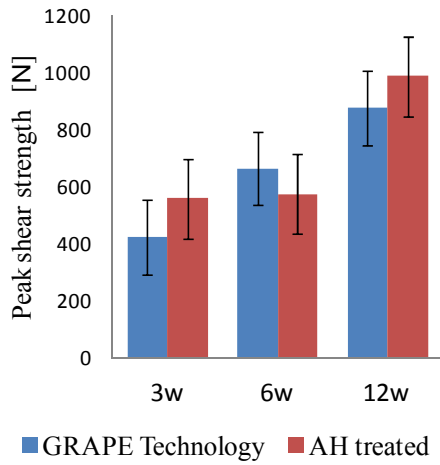


図3. 引き抜き試験結果

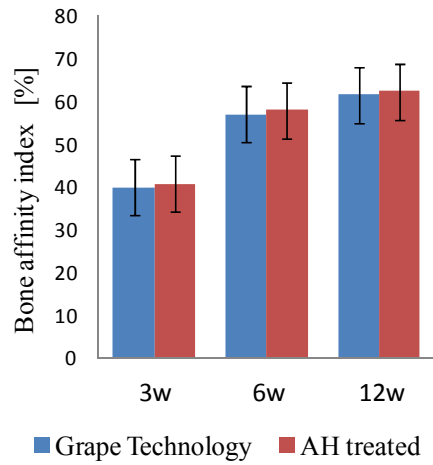


図4. Bone affinity index

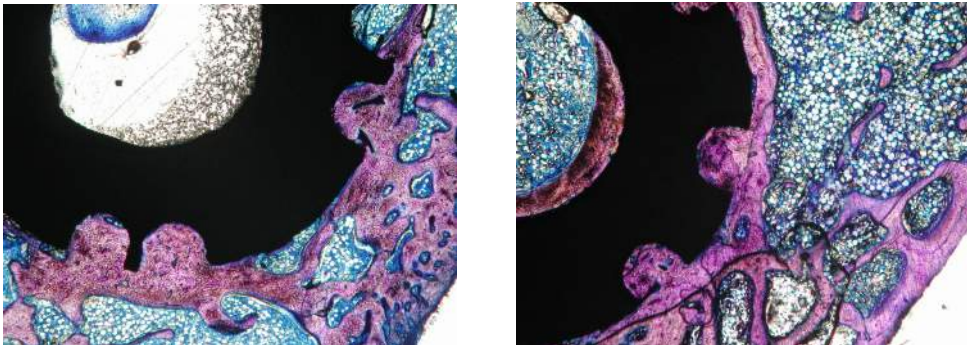


図5. 12週組織標本
 (左) GRAPE technology (右) アルカリ加熱処理