

令和元年6月7日現在

機関番号：34408

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07261

研究課題名(和文) 未来型生体活性チタン人工骨の設計・機械的強度についての研究

研究課題名(英文) Study on design and mechanical strength of future-type bioactive titanium artificial bone

研究代表者

乾 志帆子 (INUI, Shihoko)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：90807695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,160,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、選択的レーザー溶融(SLM)法を用いて作製したチタン(Ti)メッシュを混酸加熱による表面処理を施し、ラット頭蓋骨欠損モデルに埋入した。マクロおよびミクロの観察に基づいて炎症反応を調べることによって、表面上の混酸熱処理の安全性を評価した。埋入後2、4または7週でTiメッシュを取りだし観察を行った結果、SLM法で作製したTiメッシュ埋入群において、炎症反応の悪化は観察されなかった。これらの結果は、混合酸熱処理を受けたSLM調製Tiメッシュが安全であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍や外傷で生じる組織欠損、特に支持組織である骨欠損は、運動障害や整容性障害など社会復帰に大きな影響を与える。骨欠損の再建には、患者自身の自家骨と再建用金属プレートを用いて再建手術を行うのが一般的であるが、採取できる骨量の限界、採取部位の二次的損傷や感染のリスクが問題となる。この問題を解決するためには、ハイドロキシアパタイトなどの人工骨使用が考えられるが、強度不足や術後感染の問題などの困難さがあり、理想的な人工骨ははまだ確立されていない。この研究では、選択的レーザー溶融法(SLM法)を用い、いかなる形態の骨欠損部にも適合可能な造形チタン人工骨を作製する基礎データとする。

研究成果の概要(英文)：In this study, a titanium (Ti) mesh prepared using the Selective Laser Melting (SLM) technique was subjected to surface treatment by mixed acid heating, and it was applied to a rat calvarial bone defect model. Safety of the mixed acid heat treatment on the surface was evaluated by investigating the inflammatory response based on macroscopic and microscopic findings. There was no worsening of inflammatory reactions were observed in the SLM-prepared Ti mesh-embedded group at 2, 4 or 7 weeks. These results suggest that SLM-prepared Ti mesh subjected to mixed acid heat treatment is safe.

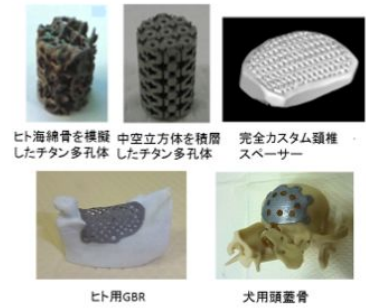
研究分野：生体材料

キーワード：SLM チタン 人工骨

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

1. 研究開始当初の背景

近年、CT/DICOM データを基に金属を溶かす熱源にレーザー光を採用した 0.03mm 厚でチタン人工骨の立体造形が可能である積層造形法(Selective Laser Melting:以下 SLM 法)を用いて、いかなる形態の骨欠損部にも適合可能な自由造形チタン人工骨を作製する技術が可能になり埋め込み型人工骨という新しい概念の人工骨の骨再建への応用が期待されている(右図)。さらに開発分担者 Kokubo, Matsushita, Yamaguchi らが考案した H₂SO₄/HCl 加熱処理がチタン表面に高い骨再生能を与えることが、擬似体液を用いた研究で証明され高い注目を浴びている。われわれは、この2つの技術を組み合わせることで、



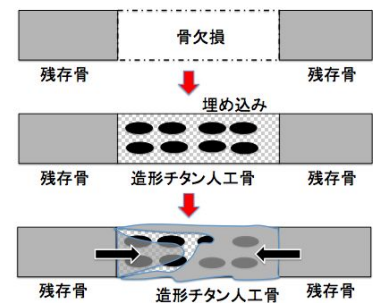
いままでにない発想から生まれたグラフトレスな骨再建材料を開発できるのではないかと考え、生体活性チタン人工骨開発を目指し研究を行っている。

すでに、ラットを使用した動物実験において、SLM 法造形チタンメッシュを使い、SLM 法による造形チタンが骨欠損表面に精密に適合すること、造形チタンに H₂SO₄/HCl 高温処理などの生体活性処理を施し、骨欠損での骨形成に成功している(2016 年硬組織再生生物学会 優秀講演賞受賞)¹⁾。この基礎研究を実施する中で、複雑な形態を持つヒト骨欠損部に対して、この自由造形可能な生体活性チタン人工骨を体内埋め込み型の骨形成能を持つ世界初の人工骨として製品・実用化できる可能性が高いと考えている。



下顎骨離断症例における課題人工骨のイメージ(事前作製し、欠損に埋め込む)

・本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される成果と結果
積層造形チタンによる埋め込み型骨欠損補填人工材については、整形外科領域では頸椎スパーサーなどへの臨床応用が進んでいる。顎顔面領域においても、すでに歯科インプラント治療骨造成術 GBR (=Guided Bone Regeneration) に 10 例臨床応用(大阪医科大学病院倫理委員会承認 # 160912)を行い良好な結果を得ている。しかしながら顎骨の広範な区域切除などへの埋め込み型人工骨としての積層造形チタンを応用した報告は過去にない。加えて、骨形成能を持つ生体活性処理(混酸・加熱処理、アルカリ温熱処理、etc)を行い、いままでにない骨欠損部での組織一体型再生材料である生体活性造形チタン人工骨開発を目指しており、この点に学術的特色と高い独創性がある。



すでに基礎実験としてラット頭蓋骨欠損モデルで造形チタンメッシュによる高い骨形成能と体内安全性を確認しており、埋め込み型のチタン人工骨においても同様に周囲からの高い骨形成や血管新生が期待でき、人工骨内面にも骨が形成され健常骨と同等以上の機械的強度が得られるものと期待する。チタン人工骨が実用化されれば、移植骨採取のために二次的な侵襲や、

採取骨を整形するに費やす長時間手術の必要が大きく軽減され、低侵襲で安全な手術を提供することが可能となり、患者が得る恩恵ははかりしれない。

2. 研究の目的

腫瘍や外傷で生じる組織欠損、特に支持組織である骨欠損は、運動障害や整容性障害など社会復帰に大きな影響を与える。骨欠損の再建には、患者自身の自家骨と再建用金属プレートを用いて再建手術を行うのが一般的であるが、採取できる骨量の限界、採取部位の二次的損傷や感染のリスクが問題となる。この問題を解決するためには、ハイドロキシアパタイトなどの人工骨使用が考えられるが、強度不足や術後感染の問題、骨欠損部へ適合させることの困難さなどがあり、理想的な人工骨ははまだ確立されていない。この研究では、CT/DICOM データを基に 0.03mm 厚で立体造形可能な選択的レーザー溶融法(以下 SLM 法)を用いて、いかなる形態の骨欠損部にも適合可能な造形チタン人工骨を作製、さらに世界初の骨再生能を持つ表面処理を施した生体活性型チタン人工骨の開発を行い実用化に向けたチタン人工骨性状を検討し実用化のための基礎データとする。

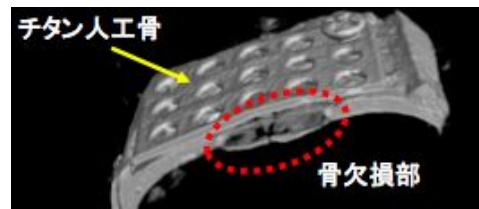
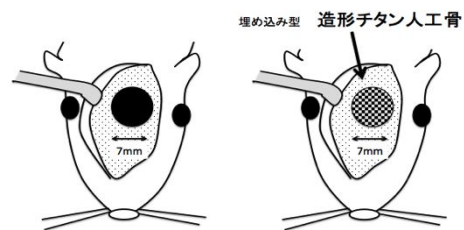
3. 研究の方法

実験方法：11 週齢の Sprague-Rats (雄) 35 匹を用いる。全身麻酔下に頭蓋骨に作製した人工骨欠損にあらかじめ用意した表面を生体活性処理したチタン人工骨を埋植する。埋植後、2 日間隔で、マイクロ CT 観察を行い、術後 2、4、7 週後に摘出し、適合性試験、機械的強度試験、骨形成能評価を下記のように行う。

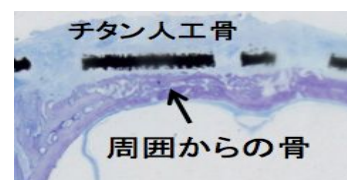
(1)人工骨の STL 情報に基づき、積層造形(SLM)法を用いて人工骨を造形し、目標精度 (寸法精度 $\pm 0.1\text{mm}$)内で、機械的特性(JIS 規格)を満足する造形条件を見出す。造形に用いる材料は純チタンおよび Ti-6Al-4V 合金である。従来までの研究で得られた研究結果から、SLM 法による造形チタンの骨への適合性をマイクロ CT (Latheta® LCT-200: 日立アロカメディカル株式会社)を用いて非侵襲的に再評価する。

(2)欠損部に対するチタンプレートの外形および内面構造の設計を評価し、機械的強度の測定、生体に対しての適合性が妥当か検討を行う。生体内での評価方法を確立する。

(3)生体活性処理を施した造形チタンの骨形成の様相を、非脱灰研磨標本作製し、トルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡で骨欠損部の骨形成状態を観察する。骨の形成量を画像解析で、生体活性処理による骨形成能の評価・判定する。



マイクロ CT による人工骨の適合状態の観察



4. 研究成果

(1)選択的レーザー溶融 (SLM) 法を用いて作製したチタン (Ti) メッシュを混酸加熱による表面処理を施し、ラット頭蓋骨欠損モデルに適用した。マクロおよびミクロの観察に基づいて炎症反応を調べることによって、表面上の混酸熱処理の安全性を評価した。

(2)自家骨移植術および人工骨が一般的に骨再建のために使用される。自家骨の利点は、患者自身の骨を使用するため、高い生体適合性があることである。しかし、収集できる骨の量には制限がある。骨の採取には外科手術が必要であり、外科的侵襲による感染の危険性がある。人工骨の利点は、骨採取のために外科的侵襲を必要としないことであり、患者の負担を軽減することができる。しかしながら、自家骨と比較した場合、生体適合性は低い。

チタン (Ti) は生体適合性の高い金属であることが知られており、生物医学的修復材料として臨床応用されている。Ti は体内の様々な装置に分布しているが、標準的な表面処理方法は確立されていない。この研究では、選択的レーザー溶融 (SLM) 法によって作製された Ti メッシュを混酸加熱処理し、ラットの頭蓋骨に埋入した。次に、Ti メッシュ周辺の組織の炎症性所見を観察することによって、安全性の評価を行った。

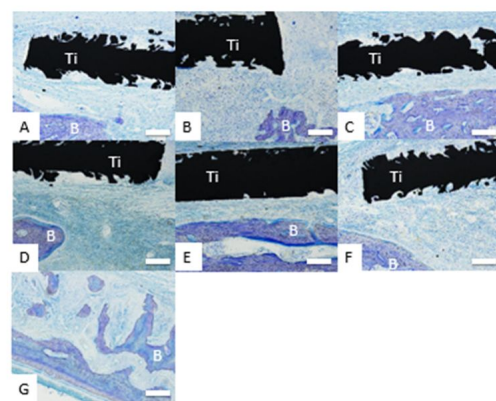
(3)手術の 2、4、および 7 週後に、頭蓋骨を摘出した。炎症反応を評価するために、腫脹および発赤などの肉眼的所見に関して、外科手術部位周辺の組織を炎症反応の有無について観察した。組織サンプルを 20%ホルマリン溶液中で固定し、そしてエタノールおよびアセトンで脱水/脱脂した。組織サンプルをメチルメタクリレート (MMA) に浸漬して MMA 樹脂ブロックを調製した。生じた骨欠損の中心を、マイクロカッティングマシン (BS-300CL/EXAKT、Norderstedt、ドイツ) およびマイクログライディングマシン (MG-400CS/EXAKT、Norderstedt、ドイツ) を使用して切断した。厚さ約 40 μm の研削スライドを用意し、キシレン処理を使用して樹脂およびトルイジンブルー染色を除去し、そして粉碎スライドを密封した。次いで、チタンメッシュの周囲の組織を顕微鏡 (Nikon ECLIPSE Ci、Nikon、日本) で観察した。

(4)観察の結果、いずれの切片においても炎症反応は観察されなかった (右表)。

| | Experimental group | | Control group | |
|--------------------------------|--------------------|-------|---------------|-------|
| | Macro | Micro | Macro | Micro |
| 2 weeks (n=5 in each group) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 weeks (n=3 in each group) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 weeks (n=4 in each group) | 0 | 0 | 0 | 0 |

右図 (A) (B) (C) に示すように、移植後 4 週間で組織中の Ti メッシュの周囲に骨形成が観察された。新しい骨を囲む骨芽細胞様細胞が観察された。骨欠損への炎症細胞の浸潤は観察されなかった。

移植後 7 週目の組織では、4 週目の組織と比較して Ti メッシュの周囲に新骨が見られ (右図 (D)(E)(F))、細胞のような骨芽細胞が新骨を取り囲んでいた。さらに、4 週間後よりも少ない組織が存在し、結合組織が Ti メッシュと新しい骨との間にはっきりと見られた。4 週目のコントロール群の骨欠損部には炎症細胞の浸潤は認められず、欠損部には新たな骨や結合組織が確認された (右図 (G))。



参考文献

1) Yamamoto K, Yamaguchi S, Matsushita T, Mori S, Kitagaki H, Yoshimura H, Sano K, Sunano A, Nakajima Y, Nakano H, Ueno T. Histologic evaluation of bone regeneration using titanium mesh prepared by Selective Laser Melting technique. J Hard Tissue Biol, 2017;26;257-260.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Zeng Y, Yang Y, Chen L, Yin D, Zhang H, Tashiro Y, Inui S, Kusumoto T, Nishizaki H, Sekino T, Okazaki J, Komasa S, Optimized Surface Characteristics and Enhanced in Vivo Osseointegration of Alkali-Treated Titanium with Nanonetwork Structures, Int J Mol Sci, 20(5), 2019, 査読有
DOI: 10.3390/ijms20051127

Shihoko Inui, Kayoko Yamamoto, Nahoko Kato-Kogoe, Yoichiro Nakajima, Kazuya Inoue, Hiroyuki Nakano, Seiji Yamaguchi, Azumi Hirata, Yoichi Kondo, and Takaaki Ueno, Biological safety of mixed acid heat treatment in SLM (Selective Laser Melting Technique) titanium mesh, Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有, vol.16 No.1, 2018, 27-31, 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Inui Shihoko, Kato-Kogoe Nahoko, Yamamoto Kayoko, Inoue Kazuya, Ueno Takaaki, Ochi Ayako, Biological Safety of SLM Titanium Mesh, 24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery, 2018

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：植野 高章

ローマ字氏名：(UENO, Takaaki)

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。