

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：81404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09517

研究課題名(和文) 3Dチタンプリントによる頭蓋・脊椎インプラントの骨誘導性獲得

研究課題名(英文) Osteoinduction of the cranial and spinal 3D-printed implants

研究代表者

菅原 卓 (Sugawara, Taku)

秋田県立循環器・脳脊髄センター(研究所)・医工学研究部・研究部長

研究者番号：80241660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：3Dチタンプリンターで三次元造形されたチタン合金は切削加工したチタン合金と同等以上の機械的強度を持つことが確認されているが、他の特性については不明な点が多い。チタン合金を加熱すると、表面に発生した水酸基がカルシウムイオンを引き寄せることにより骨誘導作用が付与されることが知られているが、3Dチタンプリンターはビーム照射によりチタン粉末を加熱・溶融して造形を行う装置であり、造形物は同様の骨誘導性を獲得している可能性が高い。骨誘導作用はインプラントの最終目的である骨癒合を早期にもたすことで種々の合併症を予防できる特性であり、本研究では造形物の骨誘導作用を評価し、至適な造形条件を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたデータは今後、骨補填・骨癒合を目的とするすべての3Dチタンプリンター造形物に適用できる基礎的なデータとなる。本研究では頭蓋骨・脊椎インプラントを想定しているが、人工歯根や人工関節など早期に強固な骨癒合が求められる他部位のインプラントについても応用可能である。多くの医療機器開発者・三次元造形物開発担当者が利用できるように、得られた研究結果は公開する。

研究成果の概要(英文)：3D-printed titanium alloy has an excellent physical strength, but other characteristics are unclear. Once heated, machine-cut titanium alloy is known to exhibit osteoinductive property by calcium ions attracted by the hydroxyl group on its surface, likewise 3D-printed materials may also have osteoinductive effects. In this study, best 3D-printing condition to induce bone induction is studied.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：チタン合金 骨誘導 3Dプリント

1. 研究開発当初の背景

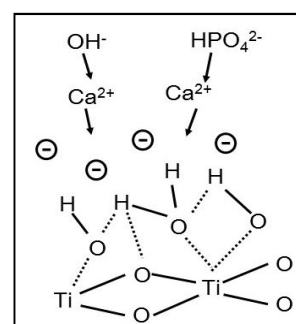
近年の 3D プリンター技術の進歩により、チタン合金製インプラントを造形することが可能となり、脳神経外科領域ではこれまでに頭蓋骨補填用としてクラニオフィット（帝人ナカシマメディカル社）、脊椎の固定・補強用として Tailor-made fixation システム（アムテック社）がそれぞれ薬事承認されている。これらのインプラントは承認申請時に従来の切削したチタン合金製インプラントに対して強度が劣らないこと（機械的安全性）、生物学的に毒性を持たないこと（生物学的安全性）が十分に確かめられているが、その他の特性は不明であった。一方、従来の切削による頭蓋骨・脊椎用チタン製インプラントは約 10% で骨誘導・形成不全による骨癒合不全が生じており、医療上大きな問題であった。

従来、チタン合金は加熱により表面改質を起こすことが知られている。チタン合金切削物を用いた実験で、レーザービームによる加熱で表面に負に帯電した水酸基が形成されると、組織中のカルシウムイオンを引き寄せ、リン酸カルシウムを析出させて骨誘導効果を発揮する。また、ビーム照射により表面に微細な凹凸が形成されることで生じる表面粗さは平滑な表面と比較して骨芽細胞が付着する足場となり、この性質も骨形成を誘導する。

3D チタンプリンターはチタン合金（Ti-6Al-4V、通称 64 チタン）粉末に高エネルギーのレーザービームあるいは電子ビームを照射し、高温で溶融して造形を行う装置であり、理論的には上記のビーム照射による骨誘導性が得られるはずである。しかし、これらの効果は現在までほとんど検討がなされていなかった。本研究ではレーザービーム、電子ビームがこれらの効果を発現するかどうかを評価し、至適なインプラント造形条件を検討することを計画した。

2. 研究の目的

3D チタンプリンターは熱源により電子ビーム方式とレーザービーム方式に大別される。電子ビーム方式は造形前にチタン合金粉末を予熱するため、造形体の熱膨張・収縮を抑制し、残留ひずみを低減させることが可能である。また、真空中で造形を行うので酸化・窒化が起きにくく、造形速度が速い。レーザービーム方式は使用するチタン粉末が細かく、積層厚さも小さく設定が可能であり、精度が高い。この熱源の違いの他に、造形時にはチタン粉末の大きさ、積層厚、走査速度、ビーム電流値といった変更可能なパラメーター数多く存在するが、造形条件と造形物の特性との関係は検討されておらず、本研究の目的とした。



加熱したチタン材の骨誘導

3. 研究の方法

(1) 造形条件の設定

初回の実験では、各熱源の特徴を生かし、電子ビームはやや積層厚を厚くして造形速度を2条件、レーザービームは積層厚の薄い2条件、造形速度を2条件に設定した(下表)。また、対照として切削チタン板を使用する。この条件での骨誘導性の結果をもとに2回目以降の条件を絞り込んだ。

(2) 表面粗さの検討

上記条件で $1 \times 1 \times 0.1\text{cm}$ チタン板をプリント(または切削)し、表面を走査電顕で観察、表面粗さ測定器で評価した。



粗さ測定用
試験片
($1 \times 1 \times 0.1\text{cm}$)

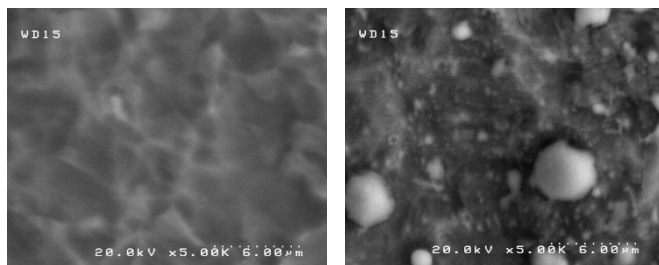
熱源(装置)	粉末粒径	積層厚	造形速度	条件
電子ビーム (Arcam Q20)	45-100 μm	90 μm	55 cm^3/h	A
	45-100 μm	90 μm	80 cm^3/h	B
レーザービーム (Concept Laser M2)	20-45 μm	20 μm	10 cm^3/h	C
	20-45 μm	20 μm	20 cm^3/h	D
	20-45 μm	45 μm	10 cm^3/h	E
	20-45 μm	45 μm	20 cm^3/h	F
切削チタン板				G

初回実験における各パラメーターの設定

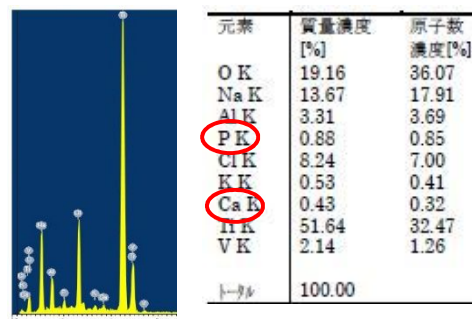
(3) 骨誘導性の検討

i) チタン板上のアパタイト形成能評価

JIS規格チタン板($5 \times 5 \times 0.5\text{cm}$)をプリント(または切削)し、疑似体液への浸漬基盤とする。疑似体液は血漿無機成分を模擬した Kokubo 溶液、Hanks 溶液をベースに溶液中無機イオン濃度を变化させた溶液とした。チタン板を溶液中(恒温培養器 37)で2週間浸漬し、洗浄後に走査電子顕微鏡(SEM)で表面の結晶析出を観察、その組成をX線回折装置(XRD)とエネルギー分散型X線分光法(EDX)で評価し、析出物がアパタイト(リン酸カルシウム)かどうかを確認した。



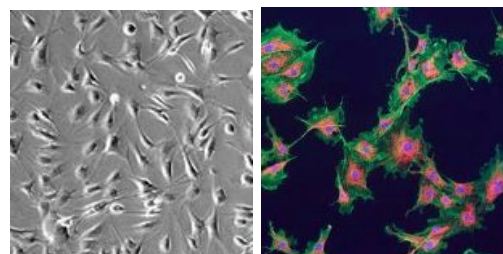
SEM写真($\times 5000$): 左は結晶形成なし、右はあり



EDX分析結果: アパタイト形成あり

ii) チタン板上での骨芽細胞、繊維芽細胞の培養

JIS規格チタン板(5×5×0.5cm)をプリント(または切削)し、板上に骨芽細胞(MC3T3-E1)、繊維芽細胞(L929)を播種し、1, 3, 5日後に蛍光顕微鏡を用いて細胞増殖・接着・伸展性を観察し、細胞生存・増殖率(MTT assay)と骨生成活性(ALP活性)の測定を行った。



繊維芽細胞

(左は顕微鏡、右は蛍光顕微鏡写真)

4. 研究成果

電子ビーム・レーザービーム造形で各条件を設定して64チタン合金板(10×10×1mm)を造形、コントロールとして切削64チタン板を作成した。これらのサンプルの表面粗さを測定し、人工体液中に浸漬して結晶の析出を観察・同定した。疑似体液は血漿無機成分を模擬したKokubo溶液、Hanks溶液をベースに溶液中無機イオン濃度を变化させた溶液を作成、チタン板を溶液中(恒温培養器37℃)で2週間浸漬した。洗浄後に走査電子顕微鏡(SEM)で表面の結晶析出を評価し、結晶の組成をX線回折装置(XRD)とエネルギー分散型X線分光法(EDX)で評価し、析出物がアパタイト(リン酸カルシウム)かどうかを確認した。プリントしたチタン板上には結晶の析出がみられ、リン酸カルシウムであることが確認された。一方、コントロールの切削チタン板では表面結晶の析出はみられなかった。よって3Dチタンプリントにより骨誘導性が獲得される可能性が示されたが、電子ビーム・レーザービーム、粉末粒径、積層厚、造形速度などの条件による骨誘導性の違いに有意な差はみられなかった。また、3Dチタンプリントした試験片はMTT assayで骨芽細胞の生存に影響を与えなかった。

3Dチタンプリントによる試験片はin vitroで骨誘導性を示し、骨芽細胞培養試験で細胞毒性はみられなかった。電子ビーム・レーザービームによるプリントの両方に同様の特性があり、プリント条件による差異に有意差はなかった。今後、体内留置型のインプラント開発に関する基礎データの一部が得られたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Endo Takuro, Sugawara Taku, Higashiyama Naoki	4. 巻 14
2. 論文標題 Sacral plexus disorder caused by a wooden toothpick in the rectum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e238690 ~ e238690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2020-238690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Endo Takuro, Sugawara Taku, Higashiyama Naoki	4. 巻 20
2. 論文標題 Cervical myelopathy due to neurovascular compression syndrome caused by persistent first intersegmental artery: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-020-01976-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiroaki Kamishina, Taku Sugawara, Kohei Nakata, Hidetaka Nishida, Naoko Yada, Toru Fujioka, Yoshihiko Nagata, Akio Doi, Naoyuki Konno, Fujio Uchida, Sadatoshi Maeda	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical Application of 3D Printing Technology to the Surgical Treatment of Atlantoaxial Subluxation in Small Breed Dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLos One	6. 最初と最後の頁 e0216445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216445. eCollection 2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujioka T, Nakata K, Nishida H, Sugawara T, Konno N, Maeda S, Kamishina H	4. 巻 48
2. 論文標題 A Novel Patient-Specific Drill Guide Template for Stabilization of Thoracolumbar Vertebrae of Dogs: Cadaveric Study and Clinical Cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vet Surg	6. 最初と最後の頁 336-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vsu.13140. Epub 2018 Dec 20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Accuracy and Efficacy of a Patient-Specific Drill Guide Template System for Lumbosacral Junction Fixation in Medium and Small Dogs: Cadaveric Study and Clinical Cases	4. 巻 6
2. 論文標題 Fujioka T, Nakata K, Nakano Y, Nozue Y, Sugawara T, Konno N, Maeda S, Kamishina H	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Vet Sci	6. 最初と最後の頁 6494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2019.00494. eCollection 2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugawara T, Higashiyama N, Tamura S, Endo T, Shimizu H.	4. 巻 36
2. 論文標題 Novel wrapping surgery for symptomatic sacral perineural cysts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurosurg Spine	6. 最初と最後の頁 185-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2021.5.SPINE21179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------