

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18463

研究課題名(和文)3次元積層造形で作製し表面処理を施した次世代チタン合金インプラントの開発と応用

研究課題名(英文) Bone Bonding Effect of 3D-Printed Titanium Implant with Chemical Surface Treatment

研究代表者

清水 孝彬 (SHIMIZU, TAKAYOSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50835395

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)：3次元レーザー積層造形によって造形したチタン合金インプラントにストロンチウムを化学結合させた表面の詳細な分析を行った。その結果、ストロンチウム処理によってインプラント表面の親水性が向上し前骨芽細胞の接着を促進することを示した。また、疑似体液中で処理したインプラント表面に良好なリン酸カルシウム層を形成したため生体内での骨結合能があることが示唆された。最後に、平板形状のインプラントをウサギ脛骨に埋入し生体内での骨結合能・骨誘導能の評価(in vivo)の結果では、早期(埋め込み後2週間)からインプラントと骨の強固な結合が起こるだけでなく、より長期間の埋入でも骨結合が維持されていることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

整形外科領域において、外傷や骨腫瘍切除後に生じた大きな骨欠損を再建する際に、従来用いられてきたチタン合金インプラントでは、既存のインプラントサイズの規格に限りがあり患者特有の欠損部に適合しない場合があることや、骨とインプラントの間の緩みとそれによるインプラント破損といった問題点がある。本研究の結果、3次元積層造形によって造形されたチタンインプラントは表面化学処理を施すことによって骨と早期に結合することが明らかになった。この技術を応用し、骨欠損部に適した形状に造形したインプラントの臨床応用への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A detailed surface evaluation of 3D-printed titanium implants with strontium coating was performed. As a result, it was shown that strontium treatment improved the hydrophilicity of the implant surface and promoted the adhesion of osteoblast-like cell. In addition, the implant had a good apatite formation capability on its surface after soaked in the simulated body fluid, and thus had an in-vivo bone binding ability. Finally, a simple plate-shaped implant was placed in the rabbit tibia, and the results of in-vivo evaluation of bone-implant interface showed that the interface was strongly bonded from an early stage (2 weeks after implantation). It was proved that the bone-bonding ability was maintained even after long-term implantation.

研究分野：整形外科

キーワード：3次元積層造形 ストロンチウム 表面化学処理 チタン合金 インプラント 骨欠損

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 高エネルギー外傷による開放・粉碎骨折や骨腫瘍切除後に広範囲の骨欠損を生じた場合、金属インプラントを用いた再建が必要となる。しかし、従来用いられてきたチタン合金インプラントの大きな問題点として、既存のインプラントサイズの規格には限りがあり、患者特有の欠損部に適合しない場合があることと、骨とインプラントの間の緩みとそれによるインプラント破損が挙げられる。インプラントの緩みを解決するためには、これまでにインプラント表面の微細形状の調整、骨と直接結合するハイドロキシアパタイトの表面コーティングなどの表面改変技術が開発されてきたが、大きな欠損部位に使用するインプラントに対して臨床応用された例はない。このように広範囲骨欠損に対する有効な再建術は確立されていない。

(2) 申請者らは、3次元レーザー積層造形を用いて、術前の患者CTデータから患者自身の骨形状と脊椎の椎間板スペースに適したカスタムメイドのチタン製脊椎インプラントをデザイン・作製し、椎体間固定術の際に使用するという形で臨床応用してきた。これと独立して、インプラント表面にSr(ストロンチウム)を化学結合させることによって、Srイオンの骨結合・骨誘導能をインプラント表面に付与することで、骨と強固に結合させる技術(表面化学処理)も開発した(Okuzu Y, Shimizu T et al. Acta Biomaterialia 2017)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、“3次元積層造形”と“表面化学処理”を組み合わせることで、患者それぞれの骨欠損の状況に適したカスタムメイドであり、かつ骨と強固に結合する全く新しいチタン合金インプラントを開発し臨床応用に導くことである。整形外科領域において、外傷や骨腫瘍切除後に生じた大きな骨欠損を再建する際に、従来用いられてきたチタン合金インプラントでは、既存のインプラントサイズの規格に限りがあり患者特有の欠損部に適合しない場合があることや、骨とインプラントの間の緩みとそれによるインプラント破損といった問題点があった。本研究では3次元積層造形によって骨欠損部の形状に適したカスタムメイドインプラントを作製し、さらに骨と直接結合させるために表面化学処理を施したチタン合金インプラントの有用性を、ウサギを用いた埋入試験で評価し、臨床応用への可能性を示唆する。

3. 研究の方法

(1) 3次元レーザー積層造形によるチタン合金インプラントの作製と表面化学処理
大阪冶金興業(株)の協力のもと、同社が保有するレーザー積層造形機器(レーザー光の熱源で金属粉末を3次元造形する技術、Selective Laser Melting: SLM)を用いてチタン合金インプラントを作製した。作製したインプラントは、Sr(ストロンチウム)を表面に化学結合させる処理を施した。具体的には、まず水酸化ナトリウム(NaOH)溶液にインプラントを浸漬し表面にNaイオンを化学結合させる。その後、加熱し塩化ストロンチウム溶液(SrCl₂)に浸漬しNaをSrに置換した。この表面処理法はすでに純チタンインプラントに施すことで強力な骨結合能を付与できることがわかっている。その後、化学処理後の表面の微細形状、粗さ、親水性をチェックし埋入試験に適した処理がなされているかを検査した。

(2) 作成したインプラント上での前骨芽細胞の挙動・反応の評価(in vitro)

生体内での表面化学処理の骨結合能メカニズムの解明のため、in vitroでの前骨芽細胞のインプラント上での挙動を評価した。すなわち、MC3T3-E1(株化骨芽細胞様細胞)を作製したインプラント上で数日間培養し、細胞のインプラントへの接着性、細胞毒性、骨芽細胞への分化能・増殖能を電子顕微鏡、各種アッセイ及びリアルタイムPCRで評価した。

(3) 単純な形状のインプラントの生体内での骨結合能・骨誘導能の評価(in vivo)

単純な平板(2×2cm)形状のインプラントを作成し表面化学処理を施した後に、ウサギ脛骨内に埋入しその骨結合能を評価した。埋入期間は2週・4週(過去の論文から新生骨が結合し始める時期)及び8週とし、骨結合力をインプラントと骨の界面の引き剥がし強度を測定することにより評価した。コントロール群には表面処理なしのインプラントを用いた。また、CTで新生骨量を定量化し、骨組織切片で骨とインプラントの結合比率を定量化した。

(4) 複雑な形状のインプラントの生体内での骨結合能・骨誘導能の評価(in vivo)

荷重のかかる長管骨での本インプラントの有用性を評価するため、ウサギ大腿骨のモデルで評価した。ウサギ大腿骨に、従来は再建が困難と考えられてきた骨軸方向1cmの完全骨欠損部位を作成した。3D-CADソフトウェア上でCT-DICOMデータ(医用画像情報の標準規格)を元に、この骨欠損部位に適合する髄内釘型インプラントを設計した。埋入期間は4週・8週(臨床的に骨癒合が得られる可能性がある時期)とし、レントゲン及びCTで骨欠損部インプラント上の新生骨の状態を評価した。インプラントの緩み・破損の有無を、コントロール群(表面処理なし)と比較することで、骨再建能を評価した。

4. 研究成果

(1) 3次元積層造形によるチタン合金インプラントの作製と表面化学処理

レーザー積層造形機器を用いてチタン合金インプラントを作製する工程を確立した。また、インプラント表面にストロンチウムを化学結合させる処理方法を確立した。表面の微細形状および化学的性質を評価した結果、表面形状はマイクロ・ナノ構造を有し、通常のチタンインプラントの200倍以上の表面積があり骨結合に極めて有利であることが示唆された。また、担持させたストロンチウムの溶出濃度は14日間で11.4 - 14.7ppmであり良好な徐放効果を有していた。

(2) 作成したインプラント上での前骨芽細胞の挙動・反応の評価 (in vitro)

MC3T3-E1 (株化骨芽細胞様細胞) を作製したインプラント上で培養し、細胞のインプラントへの接着性、細胞毒性、骨芽細胞への分化能・増殖能を評価した。その結果、作成したインプラント表面上で細胞骨格が優位に伸展し良好に接着している所見がえられた。また、インプラント上での細胞毒性はみられなかった。さらに、一部の骨関連遺伝子マーカー (アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、オステオポンチン) においてはコントロールより活性が上昇していることがわかった。

(3) 単純な形状のインプラントの生体内での骨結合能・骨誘導能の評価 (in vivo)

単純な平板 (2×2cm) 形状のインプラントを作成し、ウサギ脛骨内に埋入しその骨結合能を評価した。骨結合力をインプラントと骨の界面の引き剥がし強度を測定することにより評価した結果、埋入後2週の早期の段階で、コントロール群より有意に骨結合力が高いという結果を得た。また、骨組織切片で骨とインプラントの結合比率を定量化した結果、2週の段階で優位に高い結合率を示した。さらに、埋入後2週の早期の段階だけでなく長期埋入期間においても、コントロール群より有意に骨結合力が高かった。また、骨組織切片で骨とインプラントの結合率を定量化した結果、埋入期間に比例して結合率は上昇した。

(4) 複雑な形状のインプラントの生体内での骨結合能・骨誘導能の評価

荷重のかかる長管骨での本インプラントの有用性を評価するため、ウサギ大腿骨のモデルで評価を行った。ウサギ大腿骨に、従来は再建が困難と考えられてきた骨軸方向10mmの完全骨欠損部位を作成した。3D-CADソフトウェア上で、この骨欠損部位に適合する髄内釘型インプラントを設計し、そのデータを基にレーザー積層造形機器で造形した (図1)。

造形した髄内釘インプラントをウサギ脛骨骨欠損部に埋入したところ、インプラントと欠損部のフィッティングは極めて良好であった (図2)。埋入期間4週、8週で大腿骨をとりだして力学試験 (引張試験) マイクロCTによる新生骨評価、組織切片による骨とインプラント界面の評価を行った。力学試験の結果、埋入期間8週における引張強度は表面処理を施したインプラントにおいてコントロールよりも有意に優れていた。また、マイクロCTによる新生骨の評価でも、8週の埋入期間で表面処理インプラントが有意に新生骨量が多かった。さらに、組織学的評価では4週・8週のいずれにおいても、表面処理したインプラントが骨との界面の直接接着が確認された。

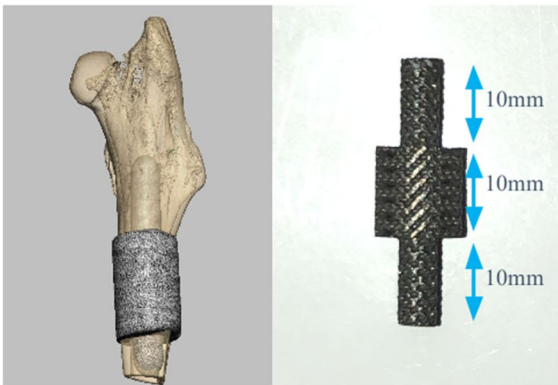


図1：積層造形によるインプラント造形

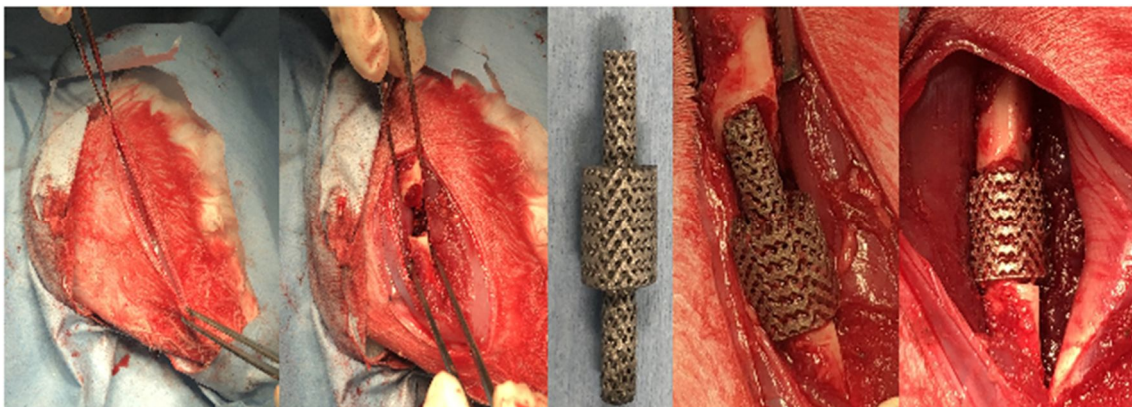


図2：術中写真。骨欠損部とインプラントの良好なフィッティングが得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Yu, Fujibayashi Shunsuke, Yamaguchi Seiji, Mori Shigeo, Kitagaki Hisashi, Shimizu Takayoshi, Okuzu Yaichiro, Masamoto Kazutaka, Goto Koji, Otsuki Bungo, Kawai Toshiyuki, Morizane Kazuaki, Kawata Tomotoshi, Matsuda Shuichi	4. 巻 109
2. 論文標題 Bioactive effects of strontium loading on micro/nano surface Ti6Al4V components fabricated by selective laser melting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 110519 ~ 110519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.msec.2019.110519	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 優, 藤林 俊介, 山口 誠二, 森 重雄, 北垣 壽, 林 信実, 正本 和誉, 川田 交俊, 森實 一晃, 奥津 弥一郎, 清水 孝彬, 河井 利之, 大槻 文悟, 後藤 公志, 松田 秀一
2. 発表標題 積層造形チタン金属の生体活性評価
3. 学会等名 第39回整形外科バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------