

氏名	藤村 (今川) 尚子
(ふりがな)	(ふじむら (いまがわ) なおこ)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲 第54号
学位審査年月日	令和5年1月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Mechanical, Histological, and Scanning Electron Microscopy Study of the Effect of Mixed-Acid and Heat Treatment on Additive-Manufactured Titanium Plates on Bonding to the Bone Surface. (混酸・加熱処理を施した積層造形チタンプレートと骨表面の結合力に及ぼす影響に関する力学的、組織学的、走査型電子顕微鏡観察による研究)
論文審査委員	(主) 教授 根尾 昌志 教授 佐浦 隆一 教授 上田 晃一

学位論文内容の要旨

《研究目的》

口腔外科領域において腫瘍や炎症などの治療で顎骨離断を余儀なくされる場合は、再建用プレート（以下：プレート）を用いて欠損部を再建する。しかし、顎骨は複雑な形状を持つため欠損形態にプレートを適合させることに難渋することが多い。顎が負担する咬合力は極めて強く不適合なプレートで顎再建がなされると咬合不良、プレート破損などの術後トラブルの原因となる。この問題を解決するための一つの方法として、可及的に骨形状に適合し、骨と強い結合力を持つプレートの開発があげられる。

近年、生体親和性の高いチタン (Ti) 粒子から自由に造形することが可能な積層造形法を用いた患者適合型フルカスタムデバイスの臨床応用が注目されている。顎再建においても積層造形法から作製されたプレートの研究が進んでいるが、積層造形で作製されたチタン

やその表面処理による骨結合に関する生体内での詳細な報告はない。

本研究では、積層造形法で作製した Ti プレート（以下：積層造形プレート）に骨との結合力を高める表面処理法の一つである混酸・加熱（mixed-acid and heat：以下 MAH）処理を施し、ラット頭蓋骨を用いて、結合力試験、走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope：以下 SEM）およびエネルギー分散型 X 線分析装置（Energy Dispersive X-ray Spectroscopy：以下 EDX）による観察、非脱解研磨標本による組織学的観察を行い積層造形プレートの骨結合への効果を検証した。

《材料・方法》

80 匹の Sprague-Dawley ラット（8 週齢雌）を用い、MAH 処理群と未処理群（以下：UN 群）の 2 群にわけて実験を行った。各群の埋植期間は 1、4、8、12 週とし、10 匹のうち 8 匹を力学試験、2 匹を組織学的観察に用いた。動物実験に先立ちマイクロ CT を用いてラット頭蓋骨に適合する曲率直径 150mm、縦 10mm×横 10mm×厚さ 1mm の積層造形プレートを作製した。

MAH 処理：積層造形プレートを 66.3% H_2SO_4 、10.6% HCl 溶液の 1:1 混合液 5mL に浸漬し、振とう恒温槽 70°C で 1 時間の混酸処理を行った。取り出した後に超純水で 30 秒間流水洗浄し、600°C、1 時間の加熱処理を行い大気中にて炉冷した。

動物実験：ラット頭蓋骨に骨膜に至る皮膚切開と骨膜剥離を加え、露出させたラット頭蓋骨骨膜下骨表面に積層造形プレートを $\phi 1.0\text{mm}$ マイクロスクリューにて固定した。

力学試験：期間毎に摘出したラット頭蓋骨を専用ジグに固定した。マイクロスクリューを除去し、万能試験機（オートグラフ[®]）を用いて 1.0mm/min の条件で積層造形プレートを牽引し、ラット頭蓋骨から積層造形プレートが引き剥がされた時の Failure Load を計測した。統計処理は SAS 9.4、Mann-Whitney U test ($p < 0.05$) を用いた。

SEM および EDX 観察：力学試験にてラット頭蓋骨から引き剥がされた積層造形プレートの骨接合面を SEM、EDX にて観察した。

標本作製：摘出した組織を固定後に、メタクリル酸メチル（MMA）樹脂ブロックに包埋

した後、作製した非脱灰研磨切片を Villanueva-Goldner 染色し光学顕微鏡を用いて組織学的観察を行った。

《結果》

力学試験では、両群とも経時的に結合力が増加していたが、MAH 処理群では UN 群と比較してより強く結合し、4 週目では MAH 処理群 $16.87 \pm 9.90\text{N}$ 、UN 群 $7.07 \pm 2.91\text{N}$ 、12 週目では MAH 処理群 $49.31 \pm 16.58\text{N}$ 、UN 群 $17.32 \pm 8.86\text{N}$ と有意な骨結合力の増加を認めた。

SEM では剥離した積層造形プレート内面に骨組織の形成が認められた。EDX では、プレート内面にカルシウム (Ca) とリン (P) の存在が観察され、MAH 処理群において経時的に Ca が多く沈着する様子が観察された。

組織学的観察では、4 週目に MAH 群で骨表面から積層造形プレート接合面に向かって活発な新生骨の形成が認められた。8、12 週目には骨表面から積層造形プレート接合面に向かう活発な新生骨の形成が両群ともに認められ、MAH 群ではプレート内部に侵入する新生骨も観察された。

《考察》

本研究では、従来のプレートに比べ適合精度の高い積層造形法で作製したプレートに表面処理を付与することで生体内での骨との結合様式がどのように変化するのかを検証した。

両群とも骨結合力は経時的に向上したが、MAH 群では結合力がより強かった。SEM、EDX を用いたプレート内面の観察では、MAH 群で顕著な Ca 沈着を認め、組織学的観察でも、両群で活発な骨形成を認めた。さらに、MAH 群では 12 週目にプレート内部に到達する形成骨を認めた。これらのことから、MAH 処理によって形成された表面微細構造への新生骨の侵入が結合力の向上に寄与したと考えた。

表面微細構造による骨形成能の向上のメカニズムには不明な点が多いが、チタン表面に微細構造を与えることで、骨形成細胞の接着、骨形成に関連するタンパクなどの吸着が高

まり、骨芽細胞の増殖・分化が促進されることが培養細胞を用いた研究では報告されており、生体内でも積層造形法、MAH 処理による表面微細構造が相加的に骨形成を促進したのではないかと考えた。

今回の研究では、積層造形法で作製されたプレートでは骨結合力と骨形成が増加し、さらに MAH 処理によって骨形成促進能が高まり、結合力が大きくなることが示された。今後は、表面処理された積層造形プレートの顎再建への臨床的有用性の検証や骨形成促進能向上のメカニズムを解明したい。

(様式 甲6)

論文審査結果の要旨

顎再建手術では、複雑な形状を持つ顎骨へ再建プレートを可及的に適合させる必要があるが、実際には不適合なプレートをスクリューで機械的に固定せざるをえないことも多く、骨・プレートギャップによる咬合の異常やプレート破損など、重篤な術後合併症を引き起こすことが少なくない。近年、患者 CT 画像データに合わせて造形が可能なフルカスタムプレートが硬組織の再建で注目されている。

申請者はフルカスタムプレートを作製する技術の一つである積層造形法に着目し、積層造形プレートをチタン粒子から作製した。さらに骨結合力の向上のために、混酸・加熱処理を施し、引き剥がし力学試験による骨結合力の測定、走査型電子顕微鏡によるプレート内面の微細構造、光学顕微鏡による骨形成過程の組織学的観察を行い、積層造形法プレートへの混酸・加熱処理が生体内で骨新生を促し、結果として骨結合力を向上させることを明らかにした。

混酸・加熱処理を施した積層造形チタンの擬似体液中でのアパタイト結晶析出の向上や細胞培養の研究で骨形成能の促進を示した報告はあるが、生体内で混酸・加熱処理を施した積層造形プレートと骨との結合について詳細に検証した報告はなく、今回の結果は、今後の患者適合型フルカスタムプレートや表面処理方法の開発や臨床的応用の基盤となるものであるといえる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Materials

13(22), 5104, 2020 Nov

doi: 10.3390/ma13225104