

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

川瀬 真由

論文題目

三次元積層粉末造形機によって作製した Ti-6Al-4V
合金および純 Ti シート上での各種細胞の増殖能

緒言

近年、Tissue engineering に用いられる金属製スキャフォールドは、selective laser melting (SLM)、electron beam melting (EBM) あるいは、fused deposition modeling (FDM) などの三次元積層造形法によって造形されるようになってきている。これらの積層造形法は、computer-aided design (CAD) により設計した三次元モデルに基づき、金属粉末を用いて一層ずつ造形し、積層することによって、個々の患者に合った移植試料を造形することが可能である。さらに、歯科および整形外科用インプラント材料として造形する際には、骨芽細胞の増殖と骨の増生を促すことによって生体内での定着と安定性が向上するよう、多孔質構造にも造形できるよう工夫されてきている。したがって、生体適合性が良好な Ti と、細胞増殖性が期待される多孔質構造を組み合わせることによって、臨床応用が可能な多孔質スキャフォールドも三次元積層造形法によって造形することができつつある。

三次元積層造形法による造形は、整形外科領域ではすでに膝関節などの造形に臨床応用されており、低出力のレーザービームを用いて Ti 合金から造形がされている。本研究ではまず、Ti-6Al-4V 合金を原材料とし、SLM による造形を試みた。造形する形状はシート状とし、生物学的安全性を担保するため細胞増殖試験等を行った。さらに、in vivo で骨欠損部の再生に応用することを想定して、マウス骨芽細胞様細胞由来の MC3T3-E1 細胞の増殖能

および、その石灰化能について検討した。次に、SLM よりも高エネルギー出力が可能な電子ビームを採用した EBM を用い、造形用材料には生体適合性が良好であり、歯科・医科において頻繁に臨床応用されている純 Ti を用いてシートを造形した。このシートを用いて、SLM の結果を元に同様の実験を行い、各種細胞の増殖能および、石灰化能について評価を行なった。

実験材料および方法

1. 実験材料および試料の準備

SLM によって Ti-6Al-4V 合金シートを、EBM によって純 Ti シートを造形し、試料として用いた。細胞にはマウス線維芽細胞由来の L929 細胞および、マウス骨芽細胞様細胞由来の MC3T3-E1 細胞を各実験に供した。

2. 表面形態の観察

造形した各シートの表面形態を目視および SEM により観察し、さらに、形状解析レーザ顕微鏡を用いて中心線平均粗さ (Ra) の計測および、三次元的な表面形状の観察を行った。

3. ぬれ性試験

液滴法にて測定し、接触角の計測はデジタルソフトウェアを用いた。

4. 細胞増殖試験と細胞形態の観察

各シート上で培養した L929 および、MC3T3-E1 の細胞数を Cell Counting Kit-8 を用いて、マイクロプレートリーダーにて 450 nm における吸光度を測定した。

5. 石灰化能の検討

各シート上で MC3T3-E1 を培養し、アリザリンレッド S にて染色した後、目視により観察した。

6. 統計処理

実験結果における統計学的解析は、Ti-6Al-4V 合金シート上でのぬれ性試験にはスチューデントの t 検定を用い、その他の検定には Tukey の多重比較検定を用いた。有意水準は 5% に設定した。

結果

1. 表面形態の観察

Ti-6Al-4V 合金シートの厚みは約 250 μm で、十分な強度を有していた。同シートのレーザー照射面は比較的滑沢であるのに対し、レーザー非照射面では未融解のチタン合金粉末が無数残留していたため粗造な面を呈していた。また、多孔質状でもあり、ポアサイズは 100~200 μm 程度であった。

一方、純 Ti シートの厚みは約 650 μm で、両面とも未融解の純チタン粉末が残留していたため、粗造であった。

Ti-6Al-4V 合金シートのレーザー照射面の中心線平均粗さ (Ra) は 2.336 μm 、レーザー非照射面は 7.791 μm と粗さに差があった。また、純 Ti シートの Ra は 8.834 μm であった。

2. ぬれ性試験

Ti-6Al-4V 合金シートのレーザー照射面の接触角は約 91.3 $^{\circ}$ 、レーザー非照射面は約 97.9 $^{\circ}$ であった。また、純 Ti シートの接触角は約 103 $^{\circ}$ で、いずれにおいてもやや疎水性を示した。

3. 細胞増殖試験

Ti-6Al-4V 合金シートのレーザー照射面、非照射面での L929 の細胞増殖率は、両面ともコントロールよりも劣るが、いずれも経時的に細胞数の増加がみられた。また、培養 5 日目以外はレーザー照射面、レーザー非照射面に有意な差は観られなかった。MC3T3-E1 の細胞増殖率も L929 と同様に経時的な細胞数の増加がみられ、その増殖傾向に大きな違いは見られなかったが、培養 8 日目のみ有意な差がみられた。

純 Ti シート上での L929 の細胞数は経時的に増加し、培養 1 日目のみ純 Ti シートとコントロール間に有意差がみられた。MC3T3-E1 の細胞増殖率も

L929と同様に経時的な細胞数の増加がみられたが、培養4日目の細胞数は、培養2日目に比べ倍以上増加しており、培養8日目以外、純Tiシートとコントロール間に有意な差がみられた。

4. 細胞形態の観察

Ti-6Al-4V合金シート上よりも、純Tiシート上でのL929、MC3T3-E1はともに、培養初期から細胞骨格がよく発達し、培養日数の経過とともに細胞が三次元的に増殖している様子が観察された。純Tiシート上でのMC3T3-E1は、培養途中から純Ti粒子を覆い隠すように細胞増殖している様子がみられた。

5. 石灰化の検討

Ti-6Al-4V合金シートのレーザー照射面、非照射面、および純Tiシート上において、培養14日目から石灰化が確認され、その度合いは培養日数の経過とともに徐々に強くなっていった。Ti-6Al-4V合金シートおよび、純Tiシートともに、石灰化の度合いに大きな違いはなかった。

考察

三次元造形機により得られる造形体の性質は、鋳造体、鍛造体とは異なることが報告されており、その物理化学的性質、生物学的性質の詳細な検

討が必要となっている。特に生物学的性質の検討は、臨床応用を想定した場合には不可欠であるが、これまでに生物学的安全性評価の報告はきわめて少ない。

そこで本研究では、生体適合性に優れている Ti-6Al-4V 合金粉末を用いて、SLM によりシート状に造形し、細胞増殖能等の生物学的安全性の評価を行なった。さらに、より生体適合性が良好な純 Ti 粉末を用いて、EBM でシートを造形し、SLM と同様の実験、評価を行なった。

コントロールは実験試料を設置していない培養シャーレのプラスチック上での細胞培養としており、細胞の生育環境としてはきわめて好条件であると考えられる。このコントロールと比較した場合、純 Ti の三次元造形体と Ti-6Al-4V 合金の三次元造形体の両者ともに初期の細胞増殖における細胞数はコントロールの方が多い結果となっている。しかしながら、コントロールと同様の増殖傾向をいずれの実験群も示しており、コントロールよりも細胞数は少ないものの、過去の Ti 系金属の細胞培養結果と比較しても同等の結果であり、いずれの実験結果も十分に生体親和性が良好であることを示している。これらの実験結果の中で特に注目すべき結果は、純 Ti の三次元造形体上における MC3T3E1 細胞培養である。実験群の細胞数はコントロールよりも明らかに増加しており、プラスチックシャーレ上での培養よりも純 Ti の三次元造形体上の方が、増殖に適する環境となっていたものと推定される。この実験群の細胞増殖が加速されている時期の SEM 像で

は、細胞増殖の結果と呼応して、MC3T3-E1 細胞が純 Ti 粒子を覆い隠すように増殖している様子が観察される。MC3T3-E1 細胞はコンフルエントに達してから重層的に増殖が進み、石灰化が進行することが知られているが、純 Ti の三次元造形体上においてその増殖が顕著に現れたものと推定される。この結果はアリザリンレッドによる染色結果とも一致しており、この三次元造形体表面は MC3T3-E1 細胞が生存するのにきわめて適した環境であることをさらに示している。

純 Ti の生体適合性は Ti-6Al-4V 合金に勝ることが知られており、本実験結果もその結果を支持しているが、コントロールよりも純 Ti の三次元造形体の方がさらに細胞増殖率が上昇していたことには、単に材料学的な特性以外にも表面の形状など物理的な因子による効果も寄与していた可能性が示唆される。Ti-6Al-4V 合金造形体のレーザー非照射面の粗造面における細胞増殖はレーザー照射面よりも高く、シート表面の形状の粗さが関与する可能性を示している。

このように、本実験では三次元造形により十分に生体適合性を有する造形物を作製することが可能であることが示されているが、その表面改質を行うことにより、さらに細胞増殖率を上昇することが可能であると考え。すなわち、ぬれ性試験結果が示すように本実験群では純 Ti と Ti-6Al-4V 合金ともに接触角が大きく、試験試料表面の表面自由エネルギーが通常の Ti 系金属よりも低いことが示唆されている。このことから、今後はプラズマ

(論文内容の要旨)

No. 8

愛知学院大学

照射あるいは電磁波照射による方法を用いることで、表面自由エネルギーの上昇とぬれ性のさらなる改善を期待することができるものと考えられる。

このように、電子ビームによる純 Ti 粉末の積層造形は作製物を造形する際に、歪みを導入せず、生体親和性が良好な純 Ti を成形することが可能な唯一の方法であり、近い将来の臨床応用への可能性が示唆されている。

平成28年 1 月 14日