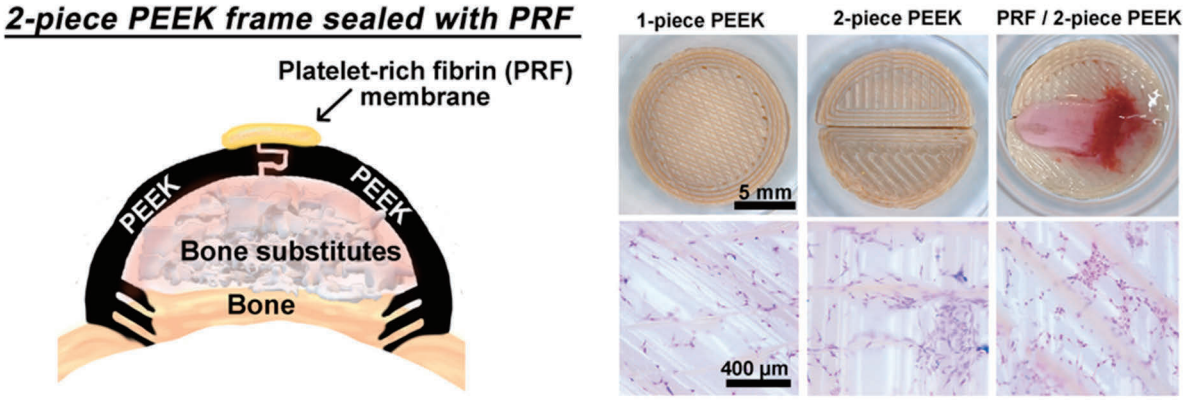
168　2ピースノンスクリューPEEK材料による革新的骨再建	小林　真左子

【目的】口腔外科領域において、顎骨腫瘍切除後等の顎骨骨欠損や萎縮顎骨に対する骨再建には、チタン製のフレームと自家骨や人工骨を使用する手法がある。しかし、チタンの造形付与には一定の限界がある。近年、ポリエーテルエーテルケトン樹脂（PEEK）の医療応用が注目されているが、3D プリントによる造形が可能な PEEK 材料を用いることで、既存のチタンフレームに代わる再建フレーム材料が開発できるのではないかと考えた。さらに、2 ピースの PEEK フレームを設計することにより、顎骨への適合を向上させ、自由に形態を付与することにより骨補填材料を充填しやすい構造を設計できる可能性があると考えた。また、2 ピース PEEK フレームの境界部のシーリングに関しては、barrier membrane の代替材料として Platelet-rich fibrin（PRF）メンブレンが使用できるのではないかと考えた。PRF は自己血由来の組織再生材料であり、簡便に加工が可能である利点がある。そこで、本研究では、3D プリント技術を用いてカスタムメイドした PEEK フレームを開発し、骨再建の材料としての可能性を検索することを目的とし、まず、PEEK 製のディスクを設計、作製、さらに PRF メンブレンを組み合わせ、それらの材料の特性、細胞活性について検討することとした。

【方法】PEEK フィラメントは 3D プリンターを用いてディスク状の PEEK 材料を造形し、アニーリング処理を行った。作製した材料は、実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いて表面性状を観察した。細胞実験では 1）細胞培養プラスチックディスク、2）1 ピース PEEK ディスク、3）2 ピース PEEK ディスク、4）PRF／2 ピース PEEK ディスクの 4 群について、それぞれの材料上でマウス骨芽細胞様細胞（MC3T3E-1 細胞）を播種・培養し、細胞接着能、細胞増殖能、骨芽細胞分化能についてアッセイを行い、比較検討した。

【結果】実験に使用した PEEK 材料は、フィラメントの溶解積層方式による加工のため、規則的な凹凸を伴う積層痕を有する表面性状を有していた。細胞アッセイでは、PEEK ディスク材料上に接着した伸長した細胞が観察され、優れた細胞生存能が示唆された。また、PRF メンブレン自体は優れた生体適合性を有するのは既知であるが、PEEK ディスクと組み合わせると、細胞増殖能は、PEEK ディスク単独群に比較し、やや低下した。MC3T3E-1 細胞によるアルカリフォスファターゼ（ALP）アッセイでは、PEEK ディスク上で、骨芽細胞分化が促進する可能性が示された。しかし、PEEK ディスクと PRF メンブレンを組み合わせた群では、ALP 活性が低下していた。今後は、2 ピース PEEK 材料について、現実的な骨再建材料としての有用性を検討するために、*in vivo* 実験による生体反応を検証する必要があると示唆された。

2 ピース PEEK フレーム実現のための *in vitro* 細胞アッセイ



168. 2 ピースノンスクリューPEEK 材料による革新的骨再建

小林　真左子

日本歯科大学 生命歯学部 口腔外科学講座

Key words：PEEK，ポリエーテルエーテルケトン樹脂，3D プリンター，2 ピース，骨造成

緒　言

口腔外科領域において、顎骨腫瘍切除後等の顎骨骨欠損や萎縮顎骨に対する水平かつ垂直的な骨再建法は未だ自家骨移植を応用した方法が主流である。例えば、チタンメッシュトレーと腸骨海綿骨細片による骨造成は比較的形態を付与しやすく、日常臨床でよく用いられる。しかしながら、チタンの造形付与はシート状のメッシュをベンディングして造形するため、三次元的造形にはある一定の限界があり、術後材料の口腔内露出がしばしば問題となる。

近年、ポリエーテルエーテルケトン樹脂（PEEK）の医療応用が注目されている。PEEK は骨と同等の機械的強度があり、金属アーチファクトや金属疲労現象がなく、かつ生体親和性を有しているため、頭蓋骨欠損や下顎骨欠損に対する再建材料として応用が始まっている。さらに、3D プリンターでの造形が可能な医療用の PEEK フィラメントも開発されている［1］。3D プリンターで造形した PEEK 加工物の特性を理解し、生体適合性、骨形成能を検索することにより、将来的にチタンメッシュトレーに代わる最適なオーダーメイド医療を提供できる可能性がある。

そこで、骨造成を目的とし、嵌合構造を付与した 2 ピースノンスクリューPEEK 材料を設計、加工技術を開発し、その有用性を検討することを考えた。本研究では、その第一段階として、ディスク状の PEEK 材料を 3D プリンターで加工し、*in vitro* 実験にて、材料の特徴を把握し、さらに細胞適合性と骨芽細胞分化能について比較分析を行うこととした。

方　法

1. PEEK ディスクの作製（図 1）

それぞれのディスクの設計は Fusion 360 ソフトウェア（Autodesk）を用いて行った。Miura ら［1］の報告を参考に、PEEK フィラメント（KetaSpire® PEEK Polyether Ether Ketone、Solvay）と、熱溶解積層方式（FDM）3D プリンター（FUNMAT HT、INTAMSYS）を用いて、ディスク状の材料を造形した。さらにインキュベーター（DKN602、Yamato Chemical Co.）を用いてアニーリング処理を行った。

2. Platelet-rich fibrin（PRF）メンブレンの加工

PRF は過去の報告［2］を参考に、ボランティアの末梢静脈血を用い、1 回の遠心分離操作（700×g、8 分間）により作製した。PRF クロットは滅菌済みガーゼにて圧接し、PRF メンブレンを作製した。

3. 表面性状の観察

実体顕微鏡（AXIO Zoom.V16、Zeiss）、走査型電子顕微鏡（SEM、JSM-IT200, JEOL）を用いて材料の表面性状を観察した。

4. 細胞培養

細胞は、マウス骨芽細胞様細胞（MC3T3E-1 細胞、RIKEN）を使用した。1）細胞培養プラスチックディスク、2）1 ピース PEEK ディスク、3）2 ピース PEEK ディスク、4）PRF／2 ピース PEEK ディスクの 4 群について検討した。ディスク上に細胞を播種し、24 時間後の接着した細胞の性状を SEM、ギムザ染色により観察した。細胞増殖能は MTS アッセイ（Promega）にて定量的に比較検討した。また、培養 7 日後にアルカリフォスファターゼ（ALP）染色（Sigma）を行った。

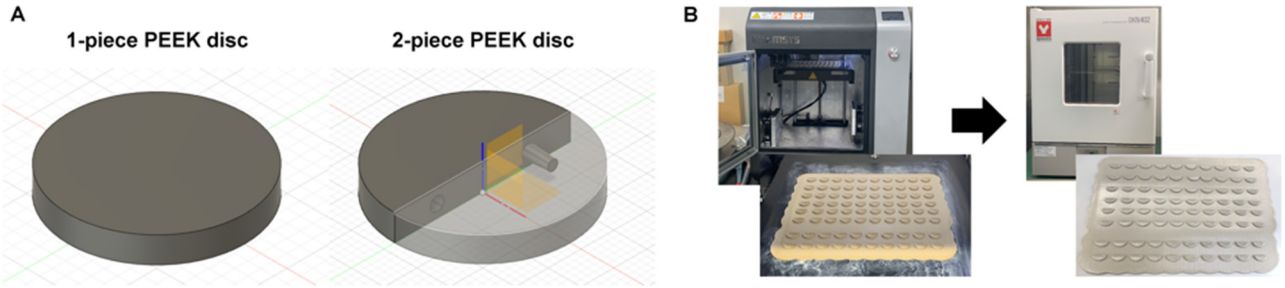


図 1. PEEK 製ディスクの設計と加工

A） 細胞培養プレートに適合するよう、Fusion 360（Autodesk）を用い、ディスクを設計した。

B） 設計した PEEK ディスクは、3Dプリンターで造形し、アニーリング処置を行った。

結果および考察

1. PEEK ディスクの表面性状（図 2）

作製した PEEK 製のディスクは熱溶解積層方式で加工されたため、規則的な積層痕が観察された。

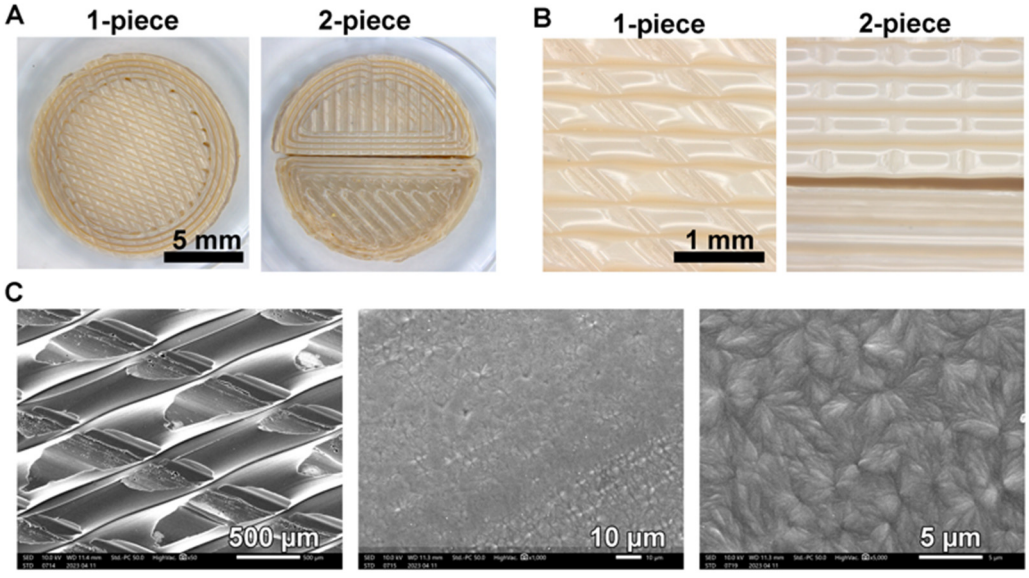


図 2. 作製した PEEK ディスク

A） 細胞培養プレートに適合するように PEEK ディスクを作製した。

B） 実体顕微鏡では滑沢かつ規則的な積層痕を有する表面が観察された。

C） SEM による観察では、低倍率では規則的な積層痕構造、高倍率では結晶様の構造を認めた。

2. PRF メンブレンの性状の検索（図 3）

PRF メンブレンはトリミングし、2 ピース PEEK ディスク中央の境界線上に充填した。SEM による表面観察では、フィブリン網の内部に少数の血球が観察された。

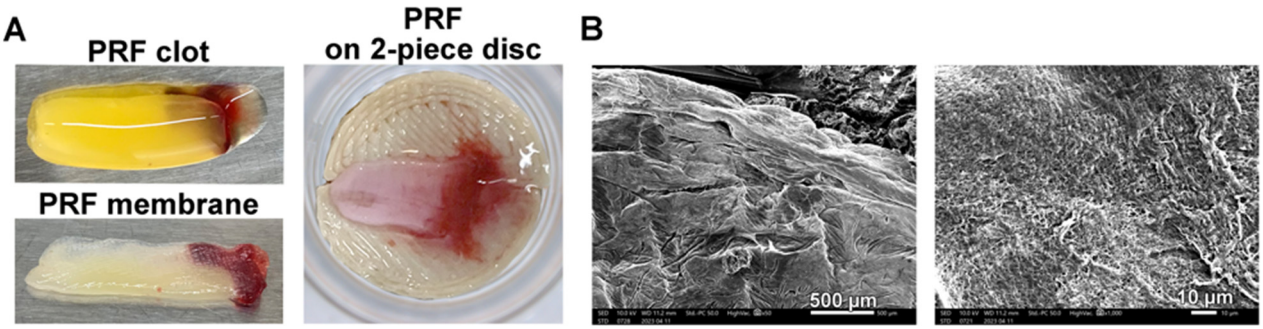


図 3. Platelet-rich fibrin（PRF）メンブレンの作製と表面性状

A） PRF クロットと PRF メンブレン。PRF メンブレンは 2 ピース PEEK 上に充填し、細胞アッセイに使用した。

B） SEM による PRF メンブレンの観察。フィブリン網が観察された。

3. PEEK ディスクの細胞適合性の検索（図 4）

1）細胞培養プラスチックディスク、2）1 ピース PEEK ディスク、3）2 ピース PEEK ディスク、4）PRF／2 ピース PEEK ディスクの 4 群について細胞接着能を観察したところ、いずれの材料上にも接着細胞が観察され、PEEK 材料、PRF メンブレンともに、優れた細胞適合性を有するが示唆された。しかし、PRF／2 ピース PEEK ディスクはやや接着細胞の進展が乏しかった。また、細胞増殖率は、細胞培養プラスチックディスク、1 ピース PEEK ディスク、2 ピース PEEK ディスク、PRF／2 ピース PEEK ディスクの順に優れていた。

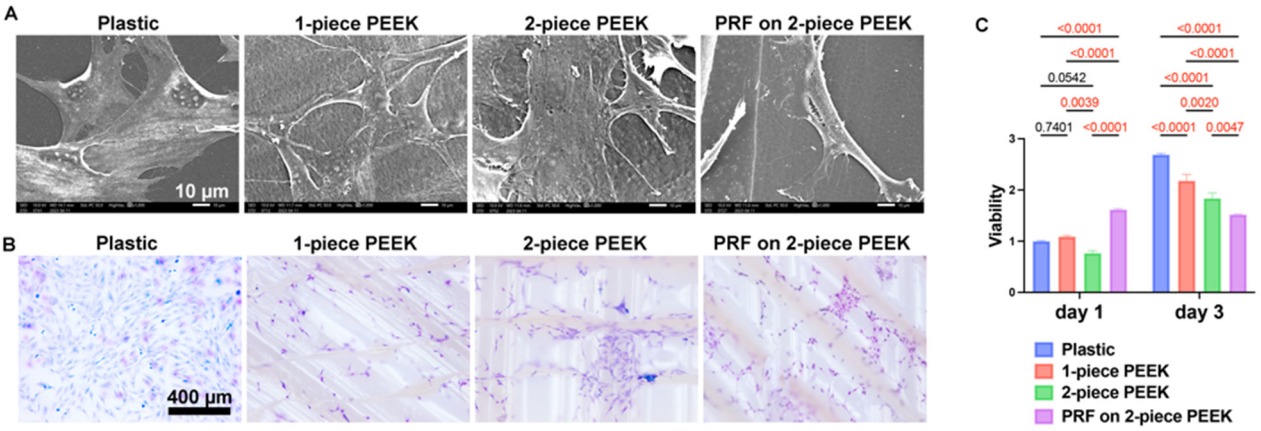


図 4. PEEK ディスク上の骨芽細胞接着・増殖能

A） 各材料における接着細胞の SEM による観察。

B） 各材料における接着細胞のギムザ染色。

C） 各材料における細胞増殖率。グラフ上部の数字は P 値を示す。P＜0.05（赤字）を統計的に有意と判定した（Two-way ANOVA、Tukey test）。

4. PEEK ディスクの骨芽細胞分化能（図 5）

1）細胞培養プラスチックディスク、2）1 ピース PEEK ディスク、3）2 ピース PEEK ディスク、4）PRF／2 ピース PEEK ディスクの 4 群について骨芽細胞分化能をスクリーニングするために、ALP 染色を行ったところ、PEEK 材料上の細胞はコントロールと同様に優れた ALP 活性を示した。しかし、PRF を組み合わせた群は ALP 活性が低下していた。PRF は成長因子の徐放により、細胞遊走能、増殖能を促進することが分かっているが、一方で単独では、骨形成を抑制すると報告されており［3］、本研究においても同様の傾向が得られたと考えられる。今後は、2 ピース PEEK 材料の有用性、また、PRF メンブレンによるシーリング効果、組織治癒能を検討、さらには現実的な骨再建材料としての有用性を検証するために、*in vivo* 実験による前臨床試験が必要であると考えられた。

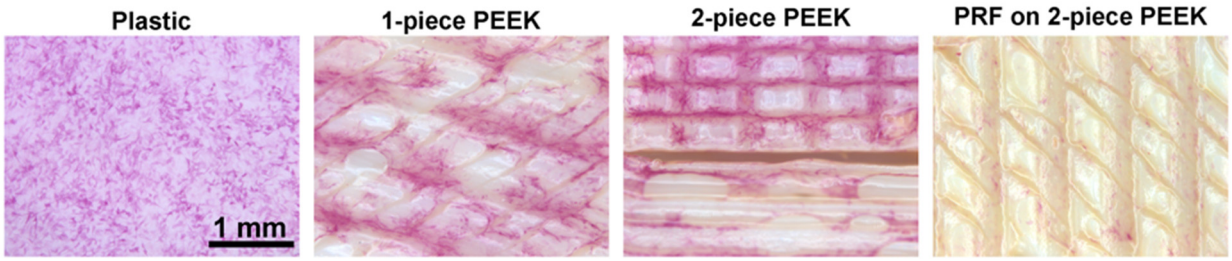


図 5. 各材料上で培養した MC3T3E-1 細胞の ALP 染色像
PEEK 材料上で培養した MC3T3E-1 細胞は優れた ALP 活性（赤色が陽性）を示した。
PRF を PEEK 材料に組み合わせると PEEK 単独に比較し、ALP 活性が抑制された。

謝　辞

本研究は、日本歯科大学生命歯学部歯科理工学講座の三浦大輔講師との共同研究により行った。

文　献

1） Miura D, Ishida Y, Shinya A. The Effects of Different Molding Orientations, Highly Accelerated Aging, and Water Absorption on the Flexural Strength of Polyether Ether Ketone (PEEK) Fabricated by Fused Deposition Modeling. Polymers (Basel). 2023 Mar 23;15(7):1602. doi: 10.3390/polym15071602. PMID: 37050216.

2） Fujioka-Kobayashi M, Kono M, Katagiri H, Schaller B, Zhang Y, Sculean A, Miron RJ. Histological comparison of Platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation. Platelets. 2021 Apr 3;32(3):413-419. doi: 10.1080/09537104.2020.1754382. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32306811.

3） Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Wang HL, Chandad F, Nacopoulos C, Simonpieri A, Aalam AA, Felice P, Sammartino G, Ghanaati S, Hernandez MA, Choukroun J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. Clin Oral Investig. 2017 Jul;21(6):1913-1927. doi: 10.1007/s00784-017-2133-z. Epub 2017 May 27. PMID: 28551729.