

## II. 動脈瘤栓塞材とステントの力学解析法開発

### 1. 研究目的

動脈瘤の治療は開頭しクリップで止める方法の他、近年ではコイルや塞栓物質など血管内治療法が開発されてきている。血管内治療は患者にとって低侵襲性など有利な点が多いが、医師は相当の技術が必要であり、in vitroでの練習が不可欠である。また、新しい治療法の確立などのためにも、物性が血管に近いモデルは必要とされている。これまで血管モデルはシリコンで作製されていたが、シリコンの摩擦係数が高く、また弾性率などの物性値が人体とは著しく異なる。一方、PVA(ポリビニルアルコール) ハイドロゲルは、水を溶媒する摩擦係数が非常に低い、透明性のある材料である。また、非常に柔らかいものから硬い物まで作製することができる。我々はPVAを軟組織の弾性率測定用標準物質として開発してきた経緯がある。そこで、本研究ではPVAハイドロゲルを用いて血管モデルの開発を試みた。

近年、ステントを用いた治療方法は血管内治療法としても侵襲性が少なく、またコイルなどと比べ身体の治療能力を引き出した治療方法といえ、注目を浴びている。しかしながらステントが血流に及ぼす影響はいまだ説明されておらず、血流のコンピュータシミュレーションをすることで、血管および動脈瘤内の血流状態が把握でき、さらに動脈瘤治療法の確立に貢献すると考えられる。従来血管はガラスチューブのような歪みのないものとして計算されてきたが、血管本来の動きをシミュレートしているとは言い難かった。そこで本研究では、血流から受ける血管の拈

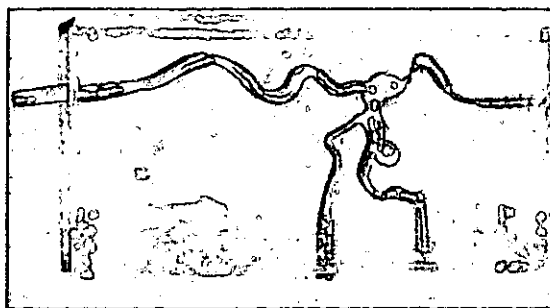


Fig. 1 Wax model of brain artery with aneurysm



Fig. 2 Pouring PVA solution to a box with wax model



Fig. 3 After pouring

張(膨張)を考え、流体(血流)と構造(血管)の相互作用を考慮した計算を行い、血流の違いを調べた。

## 2. 研究方法

10wt%PVA ハイドロゲルの融点は約70℃なので、融点が55℃のワックスを用意した。まず、このワックスで血管モデルを作った(Fig. 1)。PVA(UF-170G, UNITIKALTD.、D.P.=1700, saponification degree =99.5%)を(ジメチルスルホキシド:水=8:2)の溶媒を用いて10wt%に調整し約140度で溶解させた。このPVA溶液を約30℃になるまで空冷し、ワックスモデルに注入した。その後60℃でワックスを溶かし、除去した。

コンピュータシミュレーションには有限要素法を用いてコンピュータシミュレーションを行った。動脈瘤の存在を想定したチューブ状のモデルを構築し、流体と構造の相互作用がある場合と無い場合の計算を行い比較した。

## 3. 研究成果

できあがった血管モデルは人体の弾性率に近く、また透明であった。さらにシリコンモデルと比べると低摩擦係数であった。この結果より、ロストワックス法による血管モデルに関して必要とした技術はほぼ完成することができ、この方法でのモデル作製はほぼ完成したと言える。

コンピュータシミュレーションの結果より、流体と構造の相互作用がある場合と無い場合では結果に差が生じ、この差は考慮するに値するほど大きいと考えられる。今後シミュレーションを進めていく上で相互作用を考慮していく必要があることが分かった。

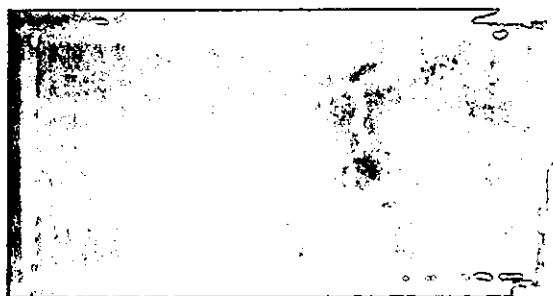


Fig. 4 After heating to remove wax



Fig. 5 Open MRI



Fig. 6 After setting PVA model on the MRI

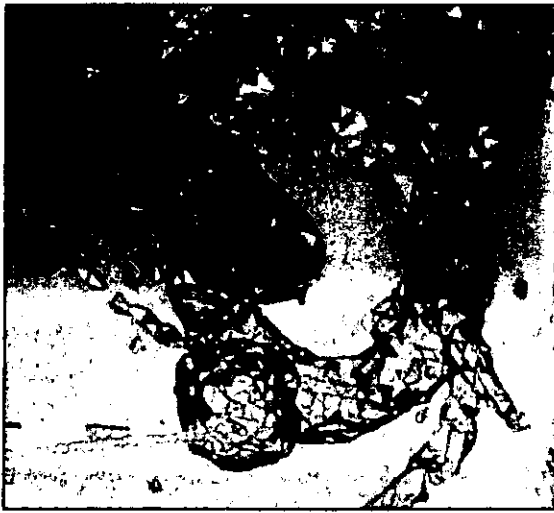


Fig. 7 3D surface data of Blood artery with STL format



Fig. 8 Print out by 3D printer



With interaction



X vel



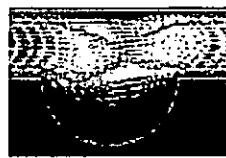
Y vel



Deformation area: Dens:1000,  
Young:5e+6, Poisson:0.3  
Fluid area: Dens:1, Visco:1,  
Young:1, Poisson:0.001

### Ex4: FSI-2

Without interaction



#### 4. 研究発表

(1) 国内 3件

1. 太田 信、半田 明、Rufenacht, D.A., 堤 定美: 脳動脈瘤ステンの力学的

- 試験、「医療材料・医療機器の安全性と適合性」（土屋利江編、シーエムシー出版、東京）：pp.90-96, 2003.
2. 2003/11/17 第19回日本脳神経血管内手術学会、Studying blood flow pattern in cerebral aneurysms: Comparison of computer simulation models with in-vitro silicone vessel models based on 3D-DSA, Makoto Ohta, Stephan Wetzell, Akira Handal, Hiroo Iwata, Sadami Tsutsumi, Pedro Lylyk, Daniel A. Ruefenacht. (脳動脈瘤内への血流方向の解析:3D-DSAからの3次元再構築データを用いた、計算解析とシリコン製血管モデルを用いた比較)
  3. 2003/11/17 第19回日本脳神経血管内手術学会、Impact of stent design and positioning effect onto intra-aneurysmal flow: Study of computer simulation. Makoto OHTA, Miki Hirabayashi, Krisztina Barath, Hiroo Iwata, Sadami Tsutsumi, Daniel. A. Ruefenacht. ステンツのセルデザインが脳動脈瘤内の血流に与える影響:有限要素法による解析
  2. 2003/06/26 Swiss Society of Radiology, IMPACT OF STENT DESIGN ONTO INTRA-ANEURYSMAL FLOW: A COMPUTER SIMULATION STUDY BASED ON FINITE ELEMENT METHOD (FEM). Ohta M, Hirabayashi M, Barth K, Cassot F, Chopard B, Iwata H, Tsutsumi S, Ruefenacht D.
  3. 2003/09/27, Joint meeting of Society of Neurosurgery and Society of Neuroradiology, Validation of flow patterns: 3-D patient modeling of the cerebral vascular based on rotational angiography acquisitions for computational and analog simulation, M. Ohta, P. Lylyk, D. Babic, F. Cassot, H. Iwata, S. Tsutsumi, D. A. Ruefenacht.

(2) 海外 3件

講演発表

1. 2003/05/02 American Society of Neuroradiology, Impact of stent design onto intra-aneurysmal flow: a computer simulation study based on Finite Element Method (FEM). OHTA M, HIRABAYASHI M, BAR?TH K, CASSOT F, CHOPARD B, IWATA H, TSUTSUMI S, RUEFENACHT DA,

## 9. 生体材料, 再生材料の評価試験法開発

富田直秀

厚生科学研究費補助金(医薬品等医療技術等リスク評価研究事業)  
分担研究報告書(15年度)

生体材料, 再生材料の評価試験法開発

分担研究者 富田 直秀 京都大学国際融合創造センター教授

研究要旨

再生軟骨の安全性・有効性評価として引き裂き強度試験, インデンター試験, 粘弾性試験, 摩擦試験, 摩耗試験を行った。再生軟骨の強度と摩擦特性は培養日数とともに成熟するものの, 耐摩耗性, 形状保持性は生体軟骨に遠く及ばず, 今後これらの諸元の測定が重要であろうと思われた。ただし, 今回行った方法は再生軟骨に直接接して測定する方法であるため, 今後は非接触の測定法にて耐摩耗性, 形状保持性を推定しなければならない。

A. 研究目的

再生軟骨の安全性・有効性の評価手法を試行錯誤により開発する。再生軟骨においては特にその力学的性質の成熟を考慮した評価法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. 絹の主要蛋白成分であるフィブロインを担体として軟骨を再生し, その力学特性(引き裂き強度試験, インデンター試験, 粘弾性試験, 摩擦試験, 摩耗試験)を計測した。暫時試行錯誤により計測・評価方法を改善した。
2. 引き裂き強度試験: 再生軟骨の縫合糸による固定を想定し, 二本のピンにて再生軟骨を把持し, 引き裂き試験を行った。
3. インデンター試験: 純チタンビーズによってポーラスなインデンターを作成し, 液体の移動を考慮した試験法とした。測定にあたっては, 一定荷重負荷後にその変形能, 永久変形などを測定した。
4. 粘弾性試験: 市販の粘弾性試験器を用いて再生軟骨の圧縮粘弾性を測定した。
5. 摩擦試験, 摩耗試験: 往復動型摩擦・摩耗試験器を作成し, 比較的軽

荷重における摩擦・摩耗特性を測定した。

C, D. 研究結果及び考察

1. 再生軟骨の引き裂き強度試験, インデンター試験, 粘弾性試験, 摩擦試験, 摩耗試験を行った。特に摩擦摩耗特性では, 培養日数に従う摩擦係数が低下, 摩耗現象の他にも, 再生軟骨の荷重変動に対する適応反応が測定された。また, 引き裂き強度においてもコーゲン合成によると思われる強化を測定できた。しかし, 再生軟骨の耐摩耗性, 形状保持性は生体軟骨に遠く及ばず, 今後これらの諸元の測定が重要であろうと思われた。このような機能は, 正常軟骨が持つ高い耐久性を再生軟骨が獲得していく過程を評価する為の重要な指標になるものと想像される。ただし, 今回行った方法は再生軟骨に直接接して測定する方法であるため, 今後は非接触の測定法にて耐摩耗性, 形状保持性を推定しなければならない。本研究分担者は, 高分子の透明な袋に封入した状態で力学評価を行う新しい評価法を模索中である。その他, 本評価法開発中に得られた副二次的な結果を以下に列挙する。
- 2.

(1)過去の研究によって、絹フィブロインスポンジのもつ軟骨細胞増殖性と細胞分化促進性の高さを確認している。ただし、軟骨組織再生マトリックスとして臨床応用可能となるためには、初期播種濃度を上昇させる工夫、強度評価、永久変形の評価が不可欠である。

(2)フィブロインスポンジ内にて軟骨細胞の培養を行うことにより、軟骨細胞はその分化能力を失うことなく増殖が可能であった。自己軟骨細胞移植の問題点は採取できる軟骨細胞の数に制限があるという点であるが、フィブロインを用いることによってこの問題を克服できる可能性が見いだされた。しかし、フィブロインスポンジにおける得られた硝子軟骨様組織は部分的であり、フィブロインスポンジ全体への広がりには認めなかった。そこで、初期細胞接着を向上させる目的でフィブロインを硫酸化処理し、表面改質を狙った硫酸化フィブロインを作製した。硫酸化フィブロインスポンジ内でも軟骨細胞はその分化能力を失うことなく増殖可能であったが、硫酸化処理によって最終的に高密度の軟骨組織を得ることはできなかった。

(3)組織学的評価にて、従来のフィブロインスポンジおよび硫酸化フィブロインスポンジともに、培養日数にともなう細胞外基質の産生の増加および細胞の増殖がみられ、得られた再生組織ではサフランin O 染色にて異染性が確認できた。硫酸化フィブロインスポンジでは培養後14日目では従来のフィブロインスポンジに比べてやや軟骨様組織の体積が増加したようにみられたが、28日目では両者間に明らかな差を認めなかった。さらにフィブロインスポンジおよび硫酸化フィブロインスポンジともに、産生されたコンドロイチン硫酸量は培養日数にともない増加し、組織学的にみられた細胞外基質の産生の増加を裏付ける結果となった。

(4)フィブロインを用いて作成した再生軟骨の粘弾性試験を行った。その結果、正常な関節軟骨が有する粘弾性特性には劣るものの、培養日数に伴い正常軟骨に近づく傾向がみられた。培養日数に伴う貯蔵弾性率  $E'$  の経時変化は、1 Hz, 10 Hz いずれの周波数においても、2種類のフ

ィブロインスポンジともに培養日数に伴って  $E'$  が増加していた。培養後14日目で一時的に硫酸化フィブロインスポンジの  $E'$  の値が従来のフィブロインスポンジに比べて増加したが、28日目では両者間に明らかな差を認めなかった。また、2種類のフィブロインスポンジともに培養日数に伴って  $\tan \delta$  のピーク値が減少し、かつ低周波域に推移する傾向が見られた。

(5)フィブロインを用いて作成した再生軟骨のインデンテーション試験を行った。その結果、軟骨組織の成熟に従って永久変形量は減少した。しかし、14日の培養後においても正常軟骨に匹敵する形状回復能は得られなかった。

## E. 結論

再生軟骨の耐摩耗性、形状保持性は生体軟骨に遠く及ばず、今後これらの諸元の測定が重要であろうと思われた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yusuke Morita, Naohide Tomita, Hideyuki Aoki, Shigeyuki Wakitani, Yasushi Tamada, Toru Suguro and Ken Ikeuchi : Visco-elastic properties of cartilage tissue regenerated with fibroin sponge , Bio-medical Material and Engineering, 12, 291-298(2002)
- 2) YASUJI HARADA, NAOHIDE TOMITA, SHIGEYUKI WAKITANI, YOSHIO MII, MASANORI OKA and SADAMI TSUTSUMI : Use of Controlled Mechanical Stimulation in Vivo to Induce Cartilage Layer Formation on the Surface of Osteotomized Bone, TISSUE ENGINEERING, 8(6), 969-978(2002)
- 3) Koji Mori, Koji Hattori, Takashi Habata, Shigeo Yamaoka, Hideyuki Aoki, Yusuke Morita, Yoshinori Takakura, Naohide

- Tomita and Ken Ikeuchi : Measurement of the mechanical properties of regenerated articular cartilage using wavelet transformation , Tissue Engineering for Therapeutic Use, 6, 133-142(2002)
- 4) N. Tomita, H. Aoki, Y. Morita, S. Wakitani, Y. Tamada, K. Ikeuchi, K. Hattori and T. Suguro : Reconstruction of Knee Joint Using Total Knee Regeneration System , Tissue Engineering for Therapeutic Use, 6, 41-49(2002)
  - 5) 青木秀之, 園部正人, 勝呂 徹, 富田直秀, 原田恭治, 森田有亮, 服部耕治, 玉田 靖, 脇谷滋之 : フィブリンゲルを用いた軟骨再生の試み, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 23, 13-18(2002)
  - 6) 寺田宏平, 竹中 慎, 池内 健, 富田直秀 : 関節過重下での膝半月板のバイオメカニクス, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 23, 185-190(2002)
  - 7) 森田有亮, 富田直秀, 池内 健, 青木秀之, 脇谷滋之, 玉田 靖 : 培養軟骨再生過程における動的粘弾性特性の変化, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 23, 7-12(2002)
  - 8) 森 浩二, 森田有亮, 富田直秀, 池内 健, 服部耕治, 幅田 孝, 山岡茂雄, 高倉義典, 青木秀之 : 超音波を利用した関節軟骨の力学特性の測定, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 23, 97-105(2002)
  - 9) 園部正人, 青木秀之, 勝呂 徹, 服部耕治, 吉川隆章, 高倉義典, 富田直秀 : 骨髄間質細胞に対するフルバスタチンの骨形成促進効果, 骨折, 25(1), 57-60, (2003)
  - 10) 園部正人, 富田直秀, 青木秀之, 原田恭治, 森田有亮, 池内 健, 服部耕治, 玉田 靖, 脇谷滋之, 勝呂 徹 : 硫酸化フィブリンスポンジを用いた軟骨再生の試み, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 24, 45-51(2003)
  - 11) 森田有亮, 富田直秀, 青木秀之, 園部正人, 脇谷滋之, 玉田 靖, 勝呂 徹, 池内 健 : 再生軟骨の潤滑特性, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 24, 53-58(2003)
  - 12) Hideyuki Aoki, Naohide Tomita, Yusuke Morita, Koji Hattori, Yasuji Harada, Masato Sonobe, Shigeyuki Wakitani and Yasushi Tamada : Culture of chondrocytes in fibroin-hydrogel sponge, Bio-Medical Materials and Engineering, 13(4), 309-316(2003)
  - 13) Yusuke Morita, Naohide Tomita, Hideyuki Aoki, Shigeyuki Wakitani, Yasushi Tamada, Toru Suguro and Ken Ikeuchi : Evaluation of dynamic visco-elastic properties during cartilage regenerating process in vitro, Bio-Medical Materials and Engineering, 13(4), 345-353(2003)
  - 14) Hideyuki Aoki, Naohide Tomita, Yasuji Harada, Koji Hattori, Masato Sonobe and Toru Suguro : The report of the cartilage regeneration using Total Joint Regeneration System(Internal-fixator type), Bio-Medical Materials and Engineering, 13(4), 411-417(2003)
  - 15) 富田直秀 : 最近の生体材料設計に関して, NEW DIAMOND, 19(2), 5-8(2003)

## 2. 解説, 図書

- 1) Naohide Tomita (共同執筆) : Polymeric biomaterials for orthopedic surgery, Recent Research Developments in Biomaterials, 275-287(2002)
- 2) 富田直秀 : 人工膝関節用ポリエチレンの耐久性, 次々世代人工膝関節の提案(特集:TKA の手術成績を向上させるポイント), 関節外科:基礎と臨床, 19(8), 1011-1018(2000)
- 3) 原田恭治, 富田直秀 : 軟骨再生における力学的環境の設定, 骨・関節・靭帯, 14(8), 809-813(2001)
- 4) 富田直秀 : 股・膝関節再生の課題と将来展望, BIO INDUSTRY, 19(7), 44-52(2002)
- 5) 富田直秀 : 植木職人に転職して—材料設計から環境設計へ—, バイオマテリアル, 20(5), 357-358(2002)
- 6) 富田直秀 : III. 最近の話題 生体吸収性材料の現状と展望, 関節外科, 21(10月増刊号),



124-127(2002)

7) 富田直秀:半月板、再生医療工学の最先端,  
第Ⅱ部 再生組織 第6章 四肢部,  
202-207(2002)

8) 富田直秀:軟骨再生のための治療機器開発,  
BME, 16(2), 33-38(2002)

9) 富田直秀:最近の生体材料設計に関して,  
NEW DIAMOND, 19(2), 5-8(2003)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 10. 形状記憶合金の力学試験法開発

小林郁夫

厚生科学研究費補助金(医薬品安全総合研究事業)  
研究分担報告

医療用具の有効性・安全性評価手法の開発に関する研究

分担研究者:小林郁夫(東京医科歯科大学生体材料工学研究所)

1. 研究目的

動脈等の狭窄など、循環器疾患の中でも動脈硬化症や血管閉塞症、動脈瘤など血栓が関わる疾患は多い。動脈硬化による血管狭窄や血管の閉塞に対する治療としては、ステントによる狭窄部の拡張や人工血管への置換などが行われている。ステントとは Fig. 1 に示したような筒状の金属メッシュで、デリバリーカテーテル(Fig. 2)を用い血管の狭窄部や閉塞部に進入させ、そこでステントを拡張させることによって血管を押し広げて血流を回復させるものである。大動脈や末梢血管など、循環器系の様々な部位でステントを用いるが、これとは別に、食道や尿道、胆管などに腫瘍ができた場合にも同様ものを用いて管の機能の確保をはかることもある。

循環器で使うステントには大きく分けて、バルーン拡張型と自己拡張型の2種類がある。前者はステントを半径方向に押し縮め、カテーテルで病変部まで到達した後、ステント内側のバルーンを膨張ることによって必要な管径までステントを押し広げるタイプのもので、主としてステンレス鋼がその素材として使われている。一方後者は、Ti-Ni 超弾性合金製で、カテーテル内に押し込めた状態(Fig. 3)で病変部まで到達し、そこでカテーテルから引き出すことによってもとの形状に戻ることで狭窄部の解消をはかるものである。いずれもチューブ状の素材からレーザー切断等の方法によって

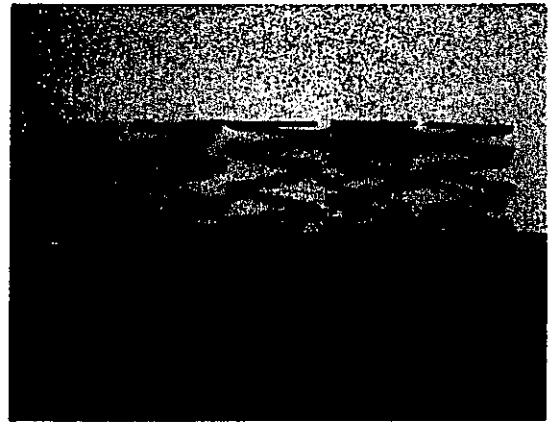


Fig. 1 超弾性 Ti-Ni 合金製冠動脈用ステント( $\phi$  = 約 3 mm).

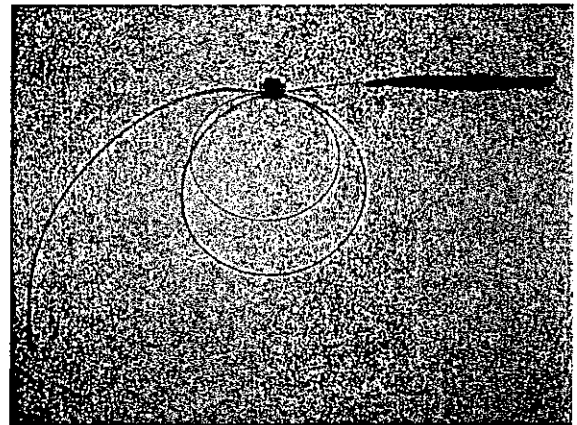


Fig. 2 ステント・デリバリーカテーテル. 左側先端部にステントが設置されている。

切り出して製造されるが、これらの他に、細線をメッシュ状に編んで製作するタイプのものもある。

循環器の中で長期間使用することを考えれば、生物学的安全性に加え、力学的安全性にも優れた者でなければならない。一般に力学

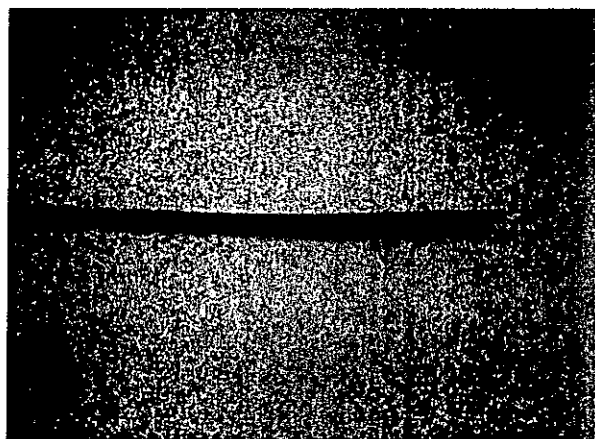


Fig. 3 スtent・デリバリーカテーテル先端(Stentが挿入されている部分の拡大図).

的性質とは、引張試験、硬さ測定、衝撃試験、疲労試験などで材料(素材)の強さ、延性、硬さ、靱性、疲労強さなどを評価するものであるが、必要に応じて製品(部材)に加工したものの強さや延性や疲労寿命などを評価する場合もある。

Stentの承認に関してFDA(米国食品医薬品局)の基準は多岐にわたる。前臨床試験の前半部をなす *in vitro* 試験として要求されているものだけでも 1. Specification Conformance Testing, 2. Stent Integrity および 3. Stent/Catheter System Testing の三者に大別される。素材としての評価、Stent形状に加工してからの評価、ならびにデリバリー用のカテーテルやバルーンなども含めたシステム全体の評価におおむね対応する。それぞれの評価の中でさらにいくつかの試験項目が設定されているが、力学的試験にとくに関連する試験項目は、主として 1. Specification Conformance Testing と 2. Stent Integrity の中に含まれる。以下、両者で規定されている試験項目を列記する。

## 1. Specification Conformance Testing

- (a) Material analysis
- (b) Mechanical properties
- (c) Corrosion

## 2. Stent Integrity

- (a) Stent free-area percentage and dimensional change
- (b) Stent uniformity testing
- (c) Radial (hoop) strength
- (d) Fatigue testing
- (e) Stent recoil
- (f) Magnetic resonance imagine
- (g) Stent expansion
- (h) Dimensional verification

素材の評価を期する 1. Specification Conformance Testing では、試験片を用いた評価を行うとしており、その内容も通常行われている一般的な評価法の範囲内にある。(b) Mechanical properties では試験片を用いて引張試験を行うこととしており、ASTM で規定した一般的な試験法が指示されている。

一方、2. Stent Integrity ではStentとして完成した製品を用いて評価を行うこととしている。Stent形状に関連する(a) Stent free-area percentage and dimensional change および(b) Stent uniformity testing に続く、(c) Radial (hoop) strength, (d) Fatigue testing および(e) Stent recoil の3項目が主として力学的試験に関連する項目である。

(c) Radial (hoop) strength はStentの周囲から圧力を加えたときの変形量を報告することとなっている。(e) Stent recoil はStent拡張後の弾性反動(スプリングバック)の評価を求めている。

Stentを長期にわたって使用する際にもっとも重要な力学的安全性といえるのが(d) Fatigue testing に関連する力学的性質である。ここでは、何億回という応力サイクルを受けようともStentが暴露される動脈/静脈環境中で疲労や腐食がおこらないことを明確にするため、Stentの疲労特性の徹底的な検討が求められている。具体的には以下の2細目が要

求されている。

- (1) 有限要素法あるいはその他の応力解析により、生体環境中で想定されるもっとも過酷な荷重が加わった際のステント内の最大応力を検証すること。残留応力を計算し、安全率を見込んだ上で評価すること。この評価によって、ステントの全使用期間にわたって疲労破壊が生じないことを明らかにすること。
- (2) 想定した最大径まで拡張したステント試料に対して血管内を模擬した条件下で、約 10 年間の使用に相当する *in vitro* 加速試験を行うこと。その試験プロトコルや試料準備を完全に明示すること。

これらの細目（とくに加速試験の方）では、試験条件が具体的に示されていないので試験計画に試験者の裁量の幅があり、加速条件、試験環境などの設定に注意を払わなければならない。

10 年間の使用に相当する加速試験という条件により、およそ 4 億サイクルの試験を行うのが一般的となっているが、試験の周波数に関しては具体的な指示がない。実際の使用環境で起こる現象が単なる疲労ではなく腐食疲労であることを考慮に入れると、サイクル数のみを合わせた単純な加速試験では安全性が十分であるという証にはならない。

たとえば、実際に行われた疲労試験プロトコルの一例を見ると、①ステントをラテックスチューブ上に設置し、②リンゲル液を満たした密閉容器に入れる。③ラテックスチューブを圧力ラインにつなぎ、④空気圧によって最大 20 kPa (150 mmHg)、最小 6.7 kPa (50 mmHg) の拍動負荷をかける。⑤周波数は約 40 Hz、1 億サイクルごとにステントの様子を観察しながら、最大 4 億回まで繰り返すというものである。この方

法によると、上述の腐食疲労の効果が見込まれないだけでなく、圧力ラインやラテックスチューブの圧力応答性にも疑問が持たれ、所期の周波数、圧力の試験が実際に行われているか疑いがある。

さらに、この方法はバルーン拡張型ステントの疲労試験を想定したもので、Ti-Ni 超弾性合金製の自己拡張型ステントの試験に適切な試験方法ではない。基本的に外循環系で構成され、ラテックスチューブの外側に供試体のステントを設置しているのがその理由で、外力を取り除くと元の直径まで広がる自己拡張型ステントではラテックスチューブから遊離してしまい、疲労応力を負荷することが不可能となる。

そこで本研究では、Ti-Ni 超弾性合金製自己拡張型ステントの力学的安全性評価の試験方法を開発することを目的とし、適切な疲労試験をよび腐食疲労試験の試験方法を開発し、その有効性を検討することを目的としている。

## 2. 実験方法

上記の様に、現在使用されている疲労試験方法が、必ずしも超弾性合金製ステントの評価に適切なものでないことに鑑み、新しい疲労試験機を試作し、その評価を行う。具体的には血管を想定したラテックスチューブの内側にステントを設置し、そこに一定の圧力変動を負荷する内循環方式の試験方法である。

また、腐食疲労試験に先立って、ステント素材の Ti-Ni 超弾性合金の擬似生体環境中での静的な耐食性の評価を行った。ステントの素材を想定した直径約 0.35 mm、長さ約 20 mm の超弾性 Ti-Ni 合金線の表面をエメリー紙で表面を研磨した後、310 K の 1.0% 乳酸溶液中で溶出試験を行った。所定時間経過後に新しい溶液に試料を移して試験を続行し、試験を終えた溶液中のイオン濃度を ICP で分析し、その積算値を溶出量とした。

### 3. 超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機の試作

本研究計画で試作した超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機の概観写真を Fig. 4 に示す。この試験機は、①試験部、②拍動ポンプおよび③循環試験溶液タンクからなっている。

試験部は内径 4 mm ラテックスチューブを用い、コネクタと循環用シリコンチューブを経て拍動ポンプおよび溶液タンクに接続し、閉じた内循環系を構成している。Fig. 5 は、循環用シリコンチューブをコネクタから外し、そこから試験部に超弾性 Ti-Ni 合金製ステント(デリバリーカテーテル)を挿入している様子を示している。

循環試験溶液タンクは容量およそ 8,100 ml の塩化ビニール製のタンクで、密封性の高い堅牢な容器(容器壁厚およそ 30mm)となっ

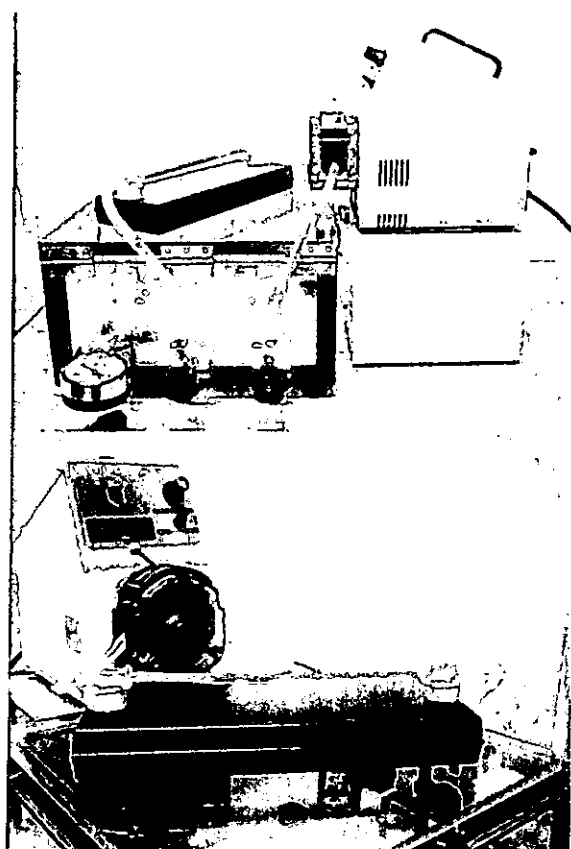


Fig. 4 超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機(試作品)。上:側面からの全体像,下:試験部付近の拡大図

ている。溶液温度を 310 K に保つ温調システムも搭載することができる。

拍動ポンプには市販の定量送液ポンプ(RP-1000, 東京理科器械)を用いた。このポンプの主要諸元は、最大吐出圧:137.3 kPa, 回転速度:0~450 rpm, 流量:0.7~138 l/h である。最大拍動数はおよそ 22.5 Hz となる。

この疲労試験機が、従来型の試験機に比べ優れている点を列記すると、①内循環系を採用していることにより、試験溶液の管理が容易であること、②空気圧駆動方式でないため、圧力負荷の信頼性が高いこと、供試体ステントに負荷する応力が実際の状況により近いことなどがあげられる。

超純水を用いて可動試験を行った後、現在この試験機を使用して疲労試験を行っているところであるが、4億サイクルの疲労試験を行うには 17.8 Ms(約 206 日)の試験時間を要する。そのため、今後はより拍動数の高いポンプを使用した試験機を試作して、疲労試験に供することを計画している。

### 4. 超弾性 Ti-Ni 合金製ステントの耐食性評価

1.0%乳酸水溶液中で 16 Ms(およそ 180 日)まで行った Ti-Ni 超弾性合金の溶出試験の結果を Fig. 6 に示す。同図には比較材として別に試験を行ったステンレス鋼(SUS304)の結も

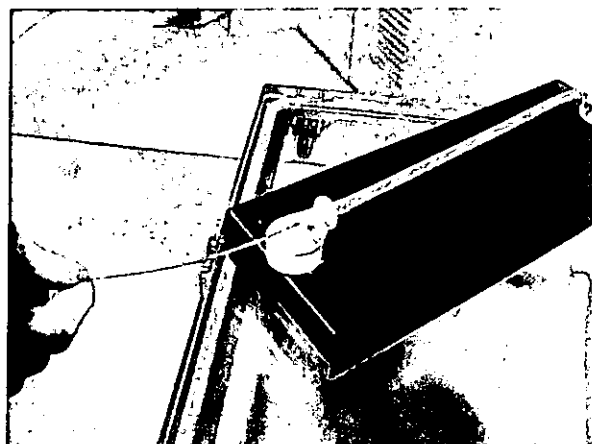


Fig. 5 超弾性 Ti-Ni 合金製ステントを疲労試験機に挿入している様子。カテーテルの先端部に収めたステントを試験機の中央部に設置している。

合わせて示す。

Ti-Ni 超弾性合金の溶出挙動は、溶液浸漬時間の経過にほぼ比例して溶出量が増加した。これに対し、ステンレス鋼では放物線則に従うような溶出挙動を示した。このことから両合金では溶出のメカニズムが異なっていることが示唆される。すなわち前者は界面反応律則の反応、後者は拡散律則の反応であることが考えられる。界面反応律則の場合、保護的な皮膜による溶出の抑制は期待できず、試用期間中引き続いてイオンの溶出が起こることが考えられ、生体内で利用する場合際の懸念材料となる。

本研究の範囲では 1.0%乳酸水溶液を溶出環境として採用しているが、今後より詳細に検

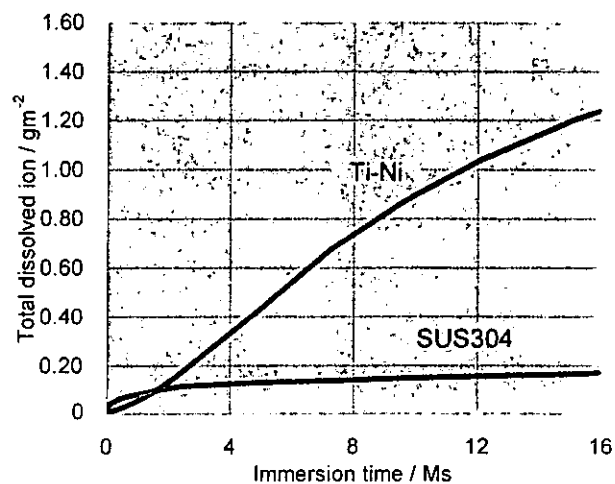


Fig. 5 超弾性 Ti-Ni 合金細線の溶出試験の結果. 1.0%乳酸水溶液中.

討するためには、血清等、異なる環境での耐食性のデータを収集することが必要となるものと考えられる。

# Effect of Laser Micro Welding on Corrosion Behaviour of Biomedical Alloy Wires in a Pseudo-physiological Environment

Kobayashi, E<sup>1</sup>, Takatsugu, M<sup>2</sup>, Uenishi, K<sup>3</sup>, Kobayashi, KP<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

<sup>2</sup> Graduate Student, Osaka University, Osaka, Japan (now with Mitsubishi HI)

<sup>3</sup> Osaka University, Osaka, Japan

## INTRODUCTION

Implantation of stent or stent grafts is one of the most developed technique in the minimally invasive treatments of cardiovascular diseases, such as myocardial infarction, aneurysm. Stent is a tube shaped mesh made of biomedical alloys to expand stenosed blood vessels. Stent graft is an artificial vessel attached onto a stent to support aneurism from inside of vessels. Stainless steels are used for the stents. Recently, new type of stents made of Ti-Ni super-elastic alloy are developed.

In order to expand and hold the stenosed vessels with stainless steel stents, a series of complex manipulation is required. The Stent needs to be contracted once to set into a delivery catheter and a balloon to expand the stent at diseased part should be placed inside of the stent. For the coronary artery, cardiovascular surgeons usually insert the delivery catheter from groin artery and after reached to diseased part the stent pulled out from catheter is expanded by air pressure of the balloon until fixed diameter. On the other hand, manipulation of Ti-Ni stent is simpler than this. Due to its super-elastic deformation, the stent expands to original diameter by pulling out from the delivery catheter.

To ensure expansion and to show the holding strength, the mesh patterns of the stents are carefully designed. Though some stents made as segments and welded, most of the stents are made from tube materials by laser cutting technique. The later exhibit their advantage for reliability on mechanical properties while the former show the advantage on the costs. Stent treatment is known as one of expensive clinical technique now. In general, the materials might be damaged by heat during welding, especially on their corrosion resistance. Not only welded portion where once melted and re-solidified to join, but neighbour area, which is known as heat affected zone (HAZ), is also suffered severe damage. Considering the continuous increasing of total amount of health care budget, development of low-priced stent with safety reliability on both mechanical properties and corrosion resistance is strongly required.

In the present study, aiming to apply weld technique on manufacturing of stents in near future, corrosion resistance of super-elastic Ti-Ni welded wire in a pseudo-physiological environment is investigated. As a reference material, stainless steel is also tested.

## EXPERIMENTAL

The super-elastic Ti-Ni wires (Ti-55.91 mass% Ni) being 3 mm in diameter and 20 mm in length, are prepared by solution treatment followed by cold drawing. For these wire, YAG laser was irradiated with 400 W in average power, 20 Hz in frequency, 5.4  $\mu\text{m}$  in beam diameter under an Ar gas flow atmosphere. As the HAZ length was measured larger than 1 mm in the preliminary study, the laser was irradiated with 2 mm interval to ensure that each part of a specimen showed welded portion or HAZ. After

polishing up to no.2000 emery paper, diameter and length of each specimen was measured. Specimens without laser irradiation were prepared as reference. Specimens made of type 304 stainless steel were also prepared through same procedure.

An immersion test in 1.0% lactic acid (PH 2.5) was carried out to quantify corrosion resistance of the alloys in a pseudo-physiological environment. Five specimens and 10.0 ml of 1.0 % lactic acid were put into a polyethylene test vessel. The liquid temperature was kept at 310 K using isothermal water baths and the vessels were kept shaking at 1.67 Hz during the test. When fixed immersion time was elapsed, amount of ions released into lactic acid were quantified by an inductively coupled plasma emission spectrometer. Estimations were done released ion per unit surface area of specimens. After each ICP measurement, immersion liquids were renewed for the next duration of the test. Amount of released ions was summed up cumulatively in each period of the test. The test continued up to 180 days in total.

## RESULTS AND DISCUSSION

Amount of Dissolved ion (Ti+Ni or Fe+Cr+Ni) during the immersion test is shown in Figure 1. For both materials, dissolved ion from welded wires is comparable to that from virgin material. Within the conditions in the present study, corrosion resistance of Ti-Ni wires was not affected by YAG laser welding. Quick heating and cooling of the laser welding is considered to result in to make less changes in microstructures. It was supported by the anodic polarization test conducted for same alloys.

Total amount of ions from stainless steel was lower than that from Ti-Ni alloy wire. The former shows the parabolic increasing in amount of dissolved ion, the latter exhibit liner increasing. From this difference, it is suggested that two different corrosion mechanisms act on each alloy.

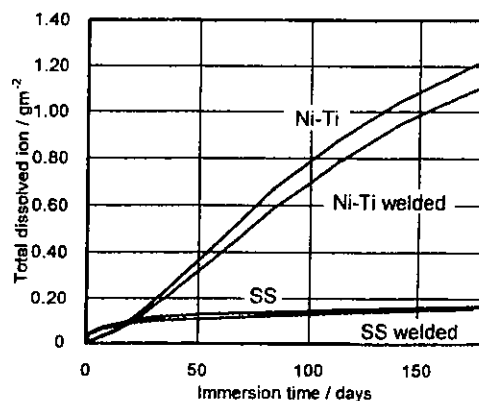


Fig. Immersion curve of Ni-Ti wires in 1.0% lactic acid. Stainless steel (SS) wires show higher corrosion resistance than Ti-Ni wires. Parabolic increasing in amount of dissolved ion is observed while Ni-Ti wires exhibit liner increasing.



11. 正常ヒト骨芽細胞を用いたチタン合金の骨組織適合性評価  
に関する研究

伊佐間和郎

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）  
分担研究報告書

正常ヒト骨芽細胞を用いたチタン合金の骨組織適合性評価に関する研究

分担研究者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所療品部主任研究官

チタン合金は、骨固定材料や人工関節材料として用いられているが、こうした骨に接して埋植される医療材料の有効性や安全性を評価するためには、骨組織適合性を調べるのが不可欠である。本研究では、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として、チタン合金の骨組織適合性を評価した。その結果、従来から一般的に使用されている Ti-6Al-4V は、骨芽細胞の増殖および分化を阻害した。一方、構成元素にバナジウムを含まない他のチタン合金は、Ti-6Al-4V と比べて骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。しかしながら、チタン合金の組成は、骨芽細胞の分化レベルには影響を及ぼさなかった。バナジウムには強い細胞毒性があり、チタン合金からバナジウムを排除することは、チタン合金の骨組織適合性向上が期待できる。

A. 研究目的

チタン合金は、耐腐食性や力学的強度、生体親和性に優れ、骨固定材料や人工関節材料として用いられている。こうした骨に接して埋植される医療材料の有効性や安全性を評価するためには、骨組織との適合性、すなわち骨芽細胞の機能に及ぼす影響を調べるのが不可欠である。しかしながら、従来から行われている細胞毒性試験では、細胞の増殖を指標としているので、骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさず、分化のみを阻害するような物質を検出することができない。したがって、骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を試験する方法の確立が求められている。

従来から医療用チタン合金としては、Ti-6Al-4V が一般的に使用されている。しかしながら、構成元素のバナジウムには強い細胞毒性があることから<sup>1)</sup>、最近

ではその安全性が疑われている<sup>2)</sup>。我々は、金属塩を用いて、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を評価した<sup>3,4)</sup>。その結果、バナジウムは骨芽細胞の増殖を最も強く阻害する金属のひとつであった。さらに、アルミニウムは骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさないが、骨芽細胞の分化を強く阻害することが明らかになった。これらの結果から、Ti-6Al-4V は、バナジウムによる増殖阻害に加え、アルミニウムによる分化阻害を起こす可能性が示唆された。

近年、バナジウムを含まないチタン合金や、バナジウムとアルミニウムを両方とも含まないチタン合金が開発されている。これらの新規チタン合金は、骨芽細胞の増殖を阻害するバナジウムや、分化を阻害するアルミニウムを含まないので、骨組織適合性の向上が期待できる。しかしながら、バナジウムやアルミニウムに

代わって配合される元素の影響も無視できない。そこで本研究では、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として、従来から使用されている Ti-6Al-4V と、これら新規チタン合金の骨組織適合性を比較した。

## B. 研究方法

### 1. 試験材料

チタン合金として、株式会社神戸製鋼所から供与された Ti-6Al-4V、Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo、Ti-15Mo-5Zr-3Al および Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd を用いた。各チタン合金は直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円板状に加工し、表面を研磨処理した。なお、Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd のみ機械加工のままの試料も使用した。試料の一覧および表面粗さ（最大粗さ）を表 1 に示した。試料は、アセトン、エタノールおよび超純水の順に超音波洗浄した後、乾熱滅菌（180℃、2 時間）を施した。

### 2. 骨芽細胞の培養

骨芽細胞には正常ヒト骨芽細胞 NHOst (BioWhittaker, Inc.) を用い、培地には 5 mM β-グリセロリン酸ナトリウムおよび 10% 牛胎児血清を含有する α-MEM 培地を用いた。試料のチタン合金を、24 ウェルマルチプレートのウ

エル内に置き、その上に 10,000 個の NHOst 細胞を播種した。コントロールとして、チタン合金を置いていないウェルにも NHOst 細胞を同様に播種した。培地は週 3 回の頻度で交換し、2 週間培養した。<sup>5,6)</sup>

### 3. 細胞増殖の測定

#### 3-1) 細胞数

培地 1 ml に対して生細胞測定用試薬 TetraColor ONE (生化学工業) 20 μl を加えて 2 時間インキュベートした後、450 nm (対照波長 600 nm) での吸光度を測定して、コントロールに対する相対細胞数を求めた。<sup>5,6)</sup>

#### 3-2) DNA 量

細胞をトリプシン処理して回収した後、0.2% Nonidet P-40 溶液 1 ml を加え、超音波処理して細胞破砕液を調製した。この細胞破砕液 20 μl に、PBS 2 ml 及び 1 μg/ml Hoechst 33258 溶液 100 μl を加えて、室温で 30 分間反応させた後、458 nm (励起波長 356 nm) での蛍光強度を測定して、ウェル当たりの DNA 量を求めた。<sup>6)</sup>

#### 3-3) たんぱく質量

BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Company) を用いて、3-2 で

表 1. 試料の表面粗さ

表記	チタン合金	最大粗さ (μm)
A	Ti-6Al-4V	0.97
B	Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo	0.98
C	Ti-15Mo-5Zr-3Al	1.07
D	Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd	0.68
E	Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd	4.68

調製した細胞破碎液 50  $\mu$ l に、BCA 測定液 400  $\mu$ l を加えて、37°C で 30 分間反応させた後、室温に戻して 562 nm での吸光度を測定して、ウエル当たりのたんぱく質量を求めた。

#### 4. 分化指標の測定

##### 4-1) アルカリホスファターゼ活性

アルカリホスファターゼ (ALP) は、骨芽細胞の分化初期に発現し、石灰化に必要な無機リン酸を遊離する働きのある酵素である。4 mM パラニトロフェニルリン酸、10 mM  $MgCl_2$ 、0.1 mM  $ZnCl_2$  を含有する 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) 1 ml を各ウエルに加え、37°C で 15 分間反応させた後、405 nm (対照波長 600 nm) での吸光度を測定し、パラニトロフェノールの生成量としてウエル当たりの ALP 活性を求めた。<sup>5)</sup>

##### 4-2) カルシウム量

分化後期の骨芽細胞は、細胞外に石灰化物を形成する。細胞を固定した後、Dahl のカルシウム染色法に従ってアリザリンレッド S 染色して、細胞の石灰化を確認した。さらに、0.1 N 塩酸 1 ml を各ウエルに加え、室温で 15 時間放置して塩酸抽出液を得た。カルシウム C-テストワコー (和光純薬工業) を用いて、塩酸抽出液 10  $\mu$ l に、0.88 M モノエタノールアミン緩衝液 (pH 11.0) 1 ml を加え、つぎに 0.63 mM オルトクレゾールフタレインコンプレクソン、69 mM 8-キノリノール 100  $\mu$ l を加えた。室温で 15 分間反応させた後、570 nm での吸光度を測定して、ウエル当たりのカルシウム量を求めた。<sup>5,7)</sup>

##### 4-3) オステオカルシン量

オステオカルシンは、骨中に存在する

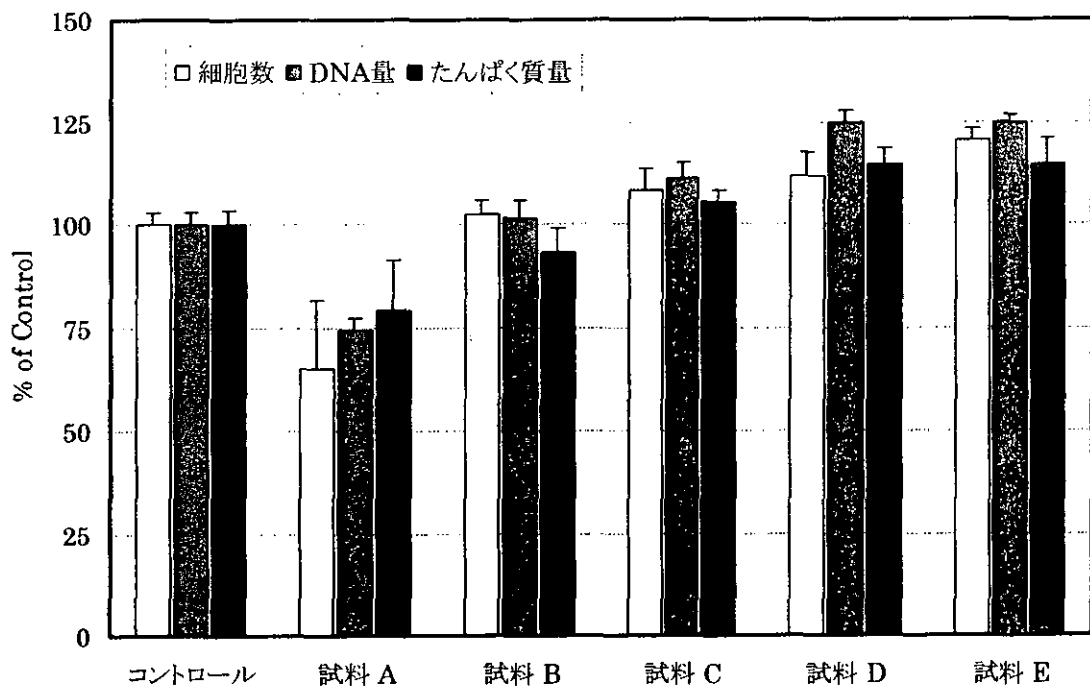


図 1. NHOst 細胞の増殖に及ぼすチタン合金の影響