

図31

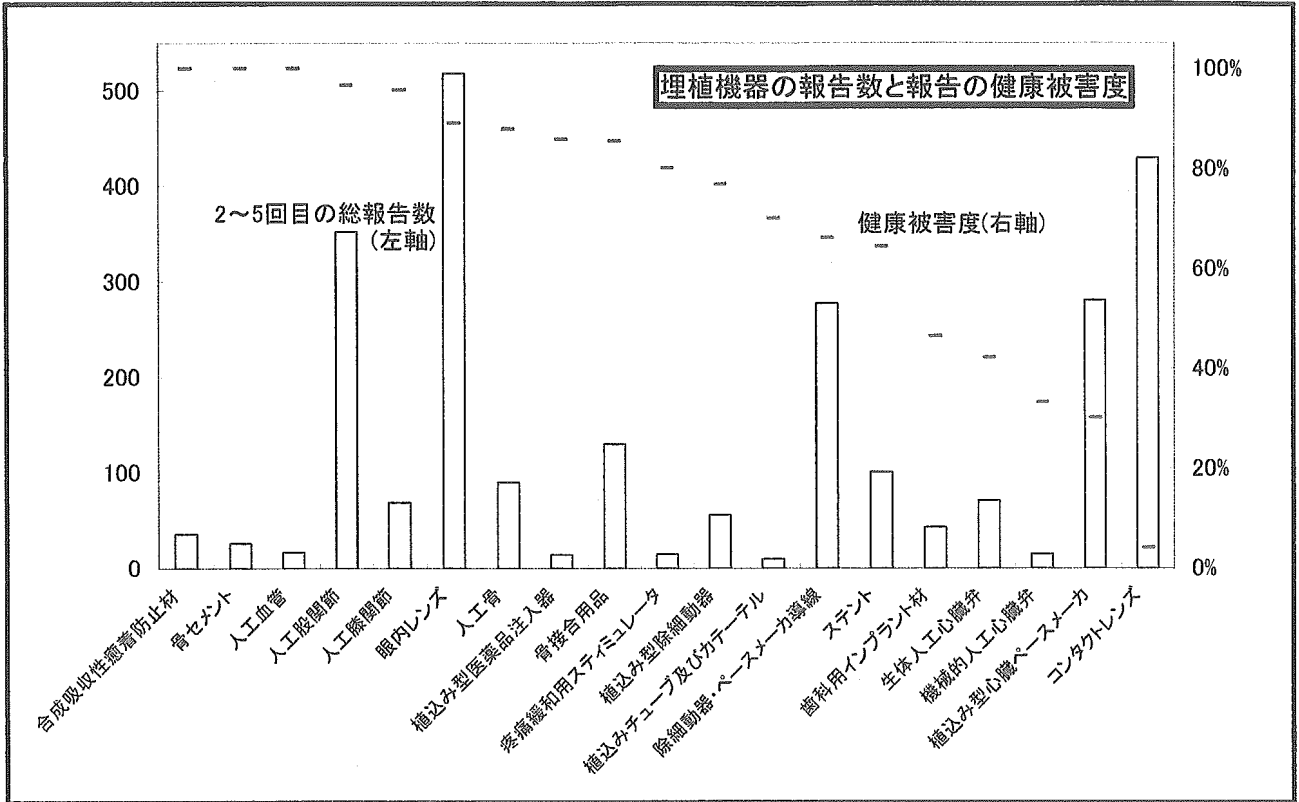


図32

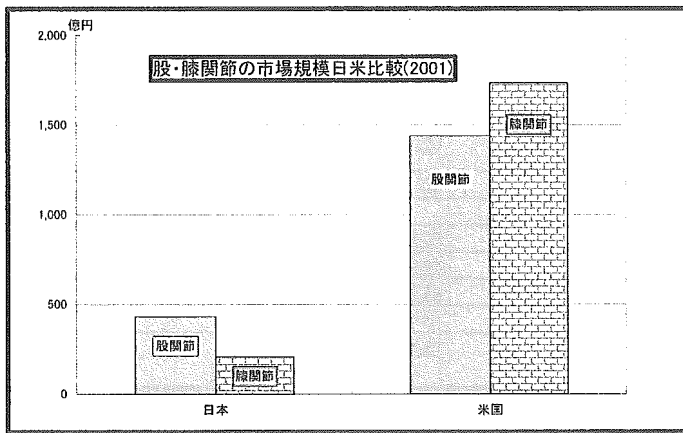


図33

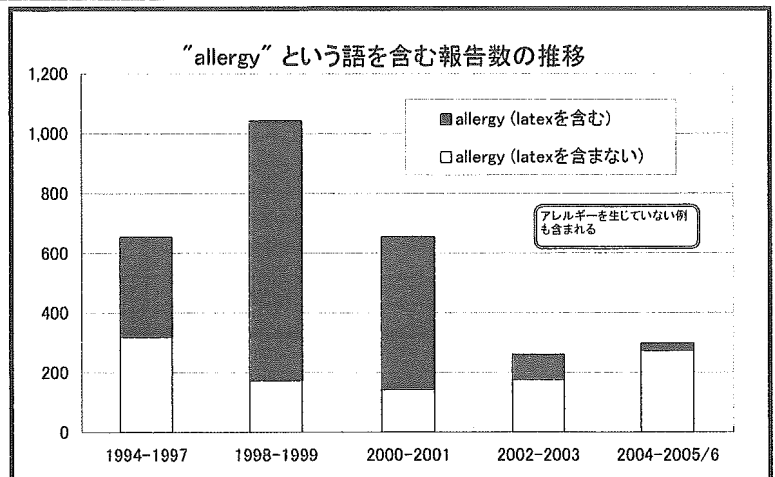


図34

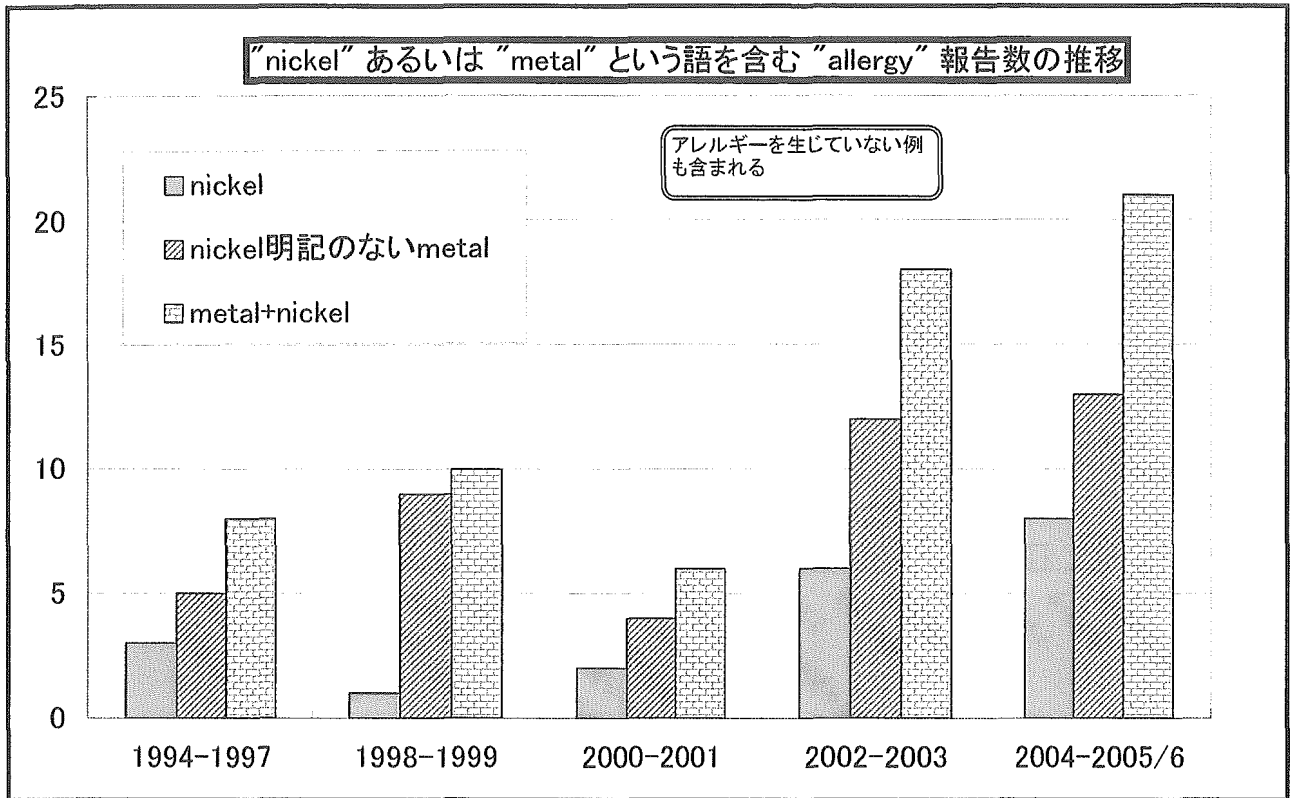


表3

不具合報告の中で「金属」という語を含むもの				
一般的名称	不具合等状況	健康被害状況	発生場所	件数
縫合器及び自動縫合器	吻合用ステーブルの外部フランジの展開不全とデリバリーツール側金属部の離断	なし	国内	1
縫合器及び自動縫合器	アウターフランジの曲がりとデバイス側の金属部の離断	なし		1
骨接合用及び骨手術用器具	金属の体内遺残	なし		1
骨接合用及び骨手術用器具	金属の体内遺残			1
骨接合用及び骨手術用器具	手術器械が破損	金属片が体内に遺留		1
電気手術器	先端部金属板脱落	金属断片の体内遺残		1
内視鏡用非能動処置具	ピンの脱落	金属の体内遺残		1
人工股関節	アルミナ片の影響による金属粉の発生	不明		1
ステント	金属アレルギー	金属アレルギー ステントの外科的抜去	国内	1

表4

不具合報告の中で「アレルギー」という語を含むもの				
一般的名称	不具合等状況	健康被害状況	発生場所	件数
セラミック製人工骨及び補綴材料	不明	アレルギー反応の疑い	国内	1
人工膝関節	不明	疼痛・アレルギー反応・再手術実施	外国	1
合成吸収性癒着防止材	なし	著明な癒着、アレルギー反応、膿瘍、瘻孔		1
合成吸収性癒着防止材	不明	アレルギー反応	国内	1
合成吸収性癒着防止材	不明	アレルギー反応	外国	1
吸着式血液浄化用浄化器	不明	アレルギー		1
ステント	金属アレルギー	金属アレルギー・ステントの外科的抜去	国内	1
人工膝関節	不明	アレルギー反応・再手術実施	外国	1

5. 金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の
開発に関する研究

伊佐間和郎

金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究

分担研究者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所主任研究官

金属は力学的強度が高く、骨接合用品や人工関節の材料として不可欠である。特に、Ti合金は一般的に高強度で、耐食性も高く、広範囲の医療機器に応用できる。今年度は、Nbを添加したTi-Zr基合金について、細胞毒性および骨芽細胞適合性を評価した。細胞毒性は、抽出法によるコロニー法および直接接触法によるコロニー法で試験した。Ti-6Al-4Vに弱い細胞毒性が認められたが、Nb含量にかかわらずTi-Zr基合金にはいずれも細胞毒性が認められなかった。また、純金属のTi、Zr、Nbには細胞毒性が認められなかったが、Alに非常に弱い細胞毒性が認められた。骨芽細胞適合性は、試料の上で直接培養した正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として評価した。Nb含量にかかわらずTi-Zr基合金は、Ti-6Al-4Vと比べて、いずれも骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。純金属のTi、Zr、Nbも骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。一方、Alは骨芽細胞の増殖を抑制し、分化を顕著に阻害した。Nbを添加したTi-Zr基合金は、構成元素の純金属も含めて、いずれも細胞毒性が無く、従来から使用されているTi-6Al-4Vと比べて骨芽細胞適合性にも優れていた。Nbを添加したTi-Zr基合金は力学的性質にも特徴があり、生物学的安全性および有効性の高い金属材料として有望である。

A. 研究目的

金属材料は現在用いられている医用材料の中でも最高レベルの強度を持ち、人工関節や骨固定材、人工歯根などのような高い力学的強度が要求される埋植医療機器の材料として無くてはならない。これらの用途に使用される医用金属材料には、ステンレス鋼（Ni-Cr-Mo鋼）、Co-Cr合金、Ti合金などが一般的であるが、

構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって、不具合の報告件数は年々増加傾向にある^{1,2)}。そのため、現在でも力学的強度や耐腐食性能を高めるための研究が盛んに展開されている。しかしながら、生物学的安全性や有効性を向上させる研究は十分に進んでいないのが現状である。特に近年、優れた力学的特性を持つ金属材料が数多く開発され、臨床

実態を反映するような生物学的安全性および有効性評価手法の確立が強く望まれている。

埋植された医療機器が組織的・構造的のみならず機能的にも生体組織の一部となり得るためには、材料に接触する細胞や組織がその機能を維持することが重要である。金属材料が生体に埋入されると、溶出する金属イオンおよび材料表面そのものが、材料近傍の細胞や組織の機能に影響を及ぼすと考えられる。金属塩については、細胞毒性や骨芽細胞の機能に及ぼす影響が系統的に評価されてきた^{3,5)}。しかしながら、金属材料そのものについては、十分な生物学的評価が行われていない。

従来から埋植医用機器に使用されるTi合金としては、Ti-6Al-4Vが一般的に使用されてきた。しかしながら、構成元素のひとつであるVに強い細胞毒性があることから³⁾、最近ではその安全性が疑問視されている⁶⁾。我々は様々な金属塩の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^{4,5)}。その結果、V塩は骨芽細胞の増殖を最も強く阻害する金属塩のひとつであった。さらに、Al塩は、骨芽細胞の増殖には全く影響を及ぼさない濃度で、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、Vによる骨芽細胞の増殖阻害に加え、Alによる分化阻害を起こす可能性が強く示唆された。

近年、構成元素にVを含まないTi合金や、VとAlを両方とも含まないTi合金が開発されている。さらに、骨芽細胞の増殖および分化を促進させるような元素を配合すれば、Ti-6Al-4Vより骨組織適合性を向上させることも可能だろう。

我々は、培地に添加したNb塩が正常ヒト骨芽細胞の分化を促進させることを明らかにした^{4,5)}。さらに、ハイドロキシアパタイトに添加したNbイオンが、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ(ALP)活性を促進させることも確認した⁷⁾。一方、Nbを添加したTi-Zr基合金が最近開発され⁸⁾、特にNbを8mol%以上添加したβ型Ti-Zr基合金は、Ti系金属材料としては弾性率が小さく、生体用金属材料として力学的に興味がある⁹⁾。

今年度は、Nbを添加したTi-Zr基合金の生物学的安全性および有効性を*in vitro*で総合的に評価するために、構成元素の純金属も含めて、一般的に実施されている細胞毒性試験および正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標とする骨芽細胞適合性試験を実施した。

B. 研究方法

1. 試験材料

Ti-Zr基合金として、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nbを用いた。比較対照としてTi-6Al-4Vを使用した。また、これら合金の構成元素の純金属として、Ti、Zr、Nb、Alを用いた。

試料は直径14.0 mm、厚さ1.0 mmの円板状に加工し、シリコンカーバイド研磨紙を用いてほぼ同じ表面粗さになるように研磨した。その後、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄し、乾熱滅菌(180°C、2時間)または高压蒸気滅菌(121°C、20分)を施した。

2. 細胞毒性試験

試料の細胞毒性は、医療機器の生物学

的安全性評価のための試験法に従い、抽出法によるコロニー法および直接接触法によるコロニー法¹⁰⁾を用いて試験した。

2-1. 抽出法によるコロニー法

2-1-1. 細胞株および培地

細胞株は、チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞由来 V79 細胞 (JCRB 0603) を使用した。培地は、Earle 組成の Eagle's MEM 培地 (Invitrogen Corp.) に、MEM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5% 牛胎児血清を加えた (M05 培地)。

2-1-2. 試験液の調整

試料をスクリーキャップ付き滅菌プラスチック管に入れ、試料の表面積 6 cm² に対して 1 ml の割合で培地を加え、軽く栓をした。37°C の CO₂ インキュベータ内に入れ、24 時間静置した。容器から抽出液のみを取り出し、この溶液を 100% 抽出液とした。100% 抽出液を培地で段階希釈し、試験液とした。

2-1-3. 試験操作

24 ウエルマルチプレートの各ウエルに培地 1 ml に懸濁させた 50 個の V79 細胞を播種した。プレートを 37°C の CO₂ インキュベータ内に入れ、24 時間静置し、細胞をウエルの底面に接着させた。培地を捨て、100% 抽出液および種々の濃度の試験液 0.5 ml を各ウエルに加えた。試験液に交換したプレートを CO₂ インキュベータ内に入れ、6 日間静置培養した。リン酸緩衝生理食塩水で洗った後、10% ホルマリン液を用いて細胞を固定した。ギムザ染色液 (Merck & Co., Inc.) をリン酸緩衝液 (M/15、pH

6.4) で 20 倍に希釈して加え、コロニーを染色した。

2-1-4. コロニー形成率および IC₅₀ の測定

ウエル内に形成したコロニー数を数え、培地のみで培養したウエルをコントロールとして、コントロール群のコロニー数に対する割合 (%) を求めた。100% 抽出液および種々の濃度の試験液におけるコロニー形成率から、コロニー数を 50% 阻害する試験液の濃度 (IC₅₀) をプロビット法により算出した。なお、100% 抽出液でのコロニー形成率が 50% を超える場合は、いずれも IC₅₀ を >100% とした。

2-2. 直接接触法によるコロニー法

2-2-1. 対照材料

直接接触法の陰性対照材料として、組織培養用プラスチックシート、トルエン耐性 (直径 14 mm、和光純薬工業) を使用した。

2-2-2. 細胞株および培地

細胞株は、チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞由来 V79 細胞 (JCRB 0603) を使用した。培地は、Earle 組成の Eagle's MEM 培地 (Invitrogen Corp.) に、10% 牛胎児血清を加えた (MEM10 培地)。

2-2-3. 試験操作

試料を 24 ウエルマルチプレートのウエルの底に密着させ、その上に培地 1 ml に懸濁させた 50 個の V79 細胞を播種した。コントロールとして、試料を入れていないウエルにも直接 50 個の V79

細胞を同様に播種した。37°C の CO₂ インキュベータ内に入れ、6 日間静置培養した。リン酸緩衝生理食塩水で洗った後、10% ホルマリン液を用いて細胞を固定した。ギムザ染色液 (Merck & Co., Inc.) をリン酸緩衝液 (M/15、pH 6.4) で 20 倍に希釈して加え、コロニーを染色した。

2-2-4. コロニー形成率の測定

試料上に形成したコロニー数を数え、コントロール群のコロニー数に対する割合 (%) を求めた。

3. 骨芽細胞適合性試験

試料の上で直接骨芽細胞を培養し、骨芽細胞の増殖および分化をそれぞれ指標として、試料の骨芽細胞適合性を評価した。

3-1. 細胞および培地

骨芽細胞株は、正常ヒト骨芽細胞 NHOst (BioWhittaker, Inc.) を購入した。培地は、 α -MEM 培地 (Invitrogen Corp.) に、5 mM β -グリセロリン酸ナトリウムおよび 10% 牛胎児血清を加えた。骨芽細胞は、良好に増殖し、さらに、顕著な ALP 活性および石灰化ノジュール形成を示すことを確認した上で使用した。

3-2. 骨芽細胞の培養

試料の金属材料を、24 ウェルマルチプレートのウェルの底に密着させ、その上に培地 1 ml に懸濁させた 10,000 個の NHOst 細胞を播種した。37°C の CO₂ インキュベータ内に入れ、培地を週 3 回の頻度で交換しながら、2 週間静

置培養した。^{11,12)}

3-3. 細胞増殖の測定

骨芽細胞の増殖の指標として、細胞数を測定した。

細胞数は、培地 1 ml に対して生細胞測定用試薬 TetraColor ONE (生化学工業) 20 μ l を加え、37°C の CO₂ インキュベータ内に入れ、2 時間静置した。ウェルから培地のみを取り出し、450 nm (対照波長 600 nm) での吸光度を測定して、ウェル当たりの相対細胞数を求めた。^{11,12)}

3-4. 分化指標の測定

骨芽細胞の分化の指標として、ALP 活性および Ca 量を測定した。

3-4-1. ALP 活性の測定

ALP は、骨芽細胞の分化初期に発現し、石灰化ノジュール形成に必須な無機リン酸を遊離する働きのある酵素である。

リン酸緩衝生理食塩水で洗った後、4 mM パラニトロフェニルリン酸、10 mM MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂ を含有する 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) 1 ml をウェルに加え、37°C で 15 分間反応させた。ウェルから反応液のみを取り出し、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ェル当たりの ALP 活性を求めた。¹¹⁾

3-4-2. Ca 量の測定

分化後期の骨芽細胞は、細胞外に石灰化ノジュールを形成する。その形成量として Ca 量を測定した。

リン酸緩衝生理食塩水で洗った後、

10% ホルマリン液を用いて細胞を固定した。石灰化ノジュールの形成を確認するために、Dahl の Ca 染色法に従ってアリザリンレッド S 染色した。その後、0.1 N 塩酸 1 ml をウエル加え、室温で 20 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 μ 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および 69 mM 8-キノリノール混合溶液 100 μ 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 Ca 量を求めた。^{11,13)}

4. 倫理面への配慮

本研究ではより臨床実態に近い評価が得られる骨組織適合性試験の確立を目指している。In vitro 試験で用いる骨芽細胞株として、従来からよく使用されているマウス由来樹立細胞 (MC3T3-E1 細胞など) は、必ずしもヒト由来正常細胞と挙動が一致しない。そのため、本研究においては、ヒトの正常骨芽細胞を使用する必要性があった。

今回用いたヒト骨芽細胞は、米国 BioWhittaker 社から研究用に市販されている細胞を購入したものである。細胞提供企業において提供者等から同意が得られている細胞が頒布されている。また、当該企業から細胞提供者を特定するための情報は、細胞購入者には一切知らされておらず、細胞提供者の人権は擁護されている。

なお、本研究は国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会において承認されている。

C. 研究結果

1. 細胞毒性試験

V79 細胞を用いた抽出法によるコロニー法において、一部の試料でコロニーサイズの小型化が観察されたものの、いずれの試料も IC₅₀ は >100% となり、細胞毒性は無いが非常に弱いことが確認された。

次に、直接接触法によるコロニー法で試験した試料のコロニー形成率を図 1 (Ti-Zr 基合金) および図 2 (純金属) に示した。Ti-6Al-4V のコロニー形成率は 8% で弱い細胞毒性が認められたが、Ti-Zr 基合金のコロニー形成率は 97%~

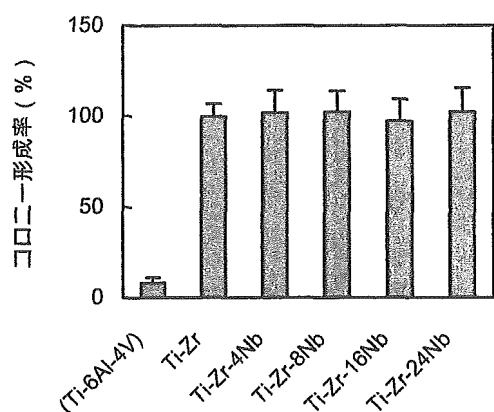


図 1 Ti-Zr 基合金の細胞毒性

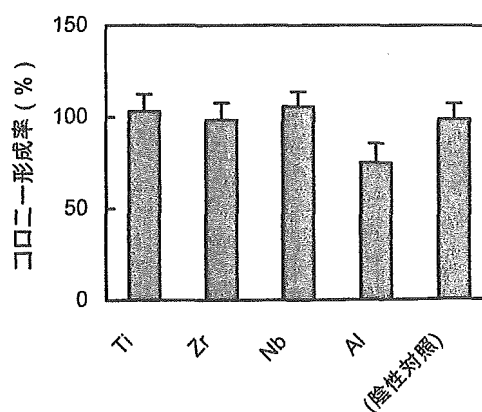


図 2 純金属の細胞毒性

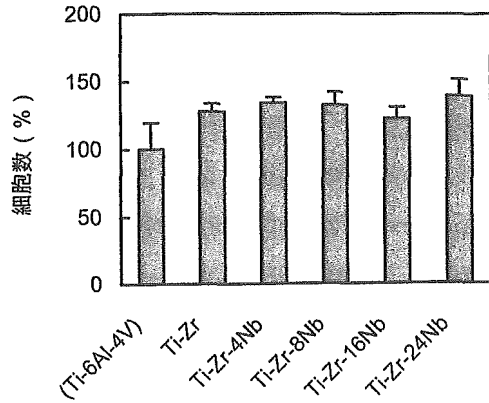


図3 Ti-Zr 基合金上の骨芽細胞の細胞数

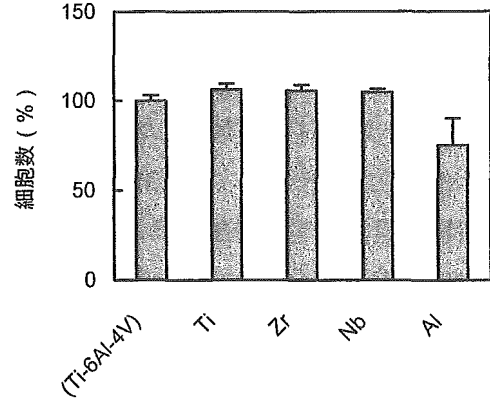


図4 純金属上の骨芽細胞の細胞数

102%の範囲内で、Nb 含量にかかわらずいずれも細胞毒性は認められなかった (図 1)。また、純金属の Ti、Zr、Nb のコロニー形成率はそれぞれ 103%、98%、105%で、いずれも細胞毒性は認められなかった。しかし、Al のコロニー形成率は 74% で非常に弱い細胞毒性が認められた。(図 2)。

2. 骨芽細胞適合性試験

2-1. 骨芽細胞の増殖に及ぼす影響

試料の上で 2 週間培養した NHOst 細胞の細胞数を図 3 (Ti-Zr 基合金) および図 4 (純金属) に示した。いずれも Ti-6Al-4V における細胞数に対する相対

値で示した。Ti-Zr 基合金の上で培養した骨芽細胞の細胞数は、Ti-6Al-4V と比べて、Nb 含量にかかわらずいずれも増加した (図 3)。また、純金属では Al だけが、Ti-6Al-4V と比べて、細胞数が減少した (図 4)。

2-2. 骨芽細胞の分化に及ぼす影響

試料の上で 2 週間培養した NHOst 細胞をアリザリンレッド S 染色したところ、いずれの試料においても暗赤色に染色された石灰化ノジュールが明瞭に観察され、NHOst 細胞は正常な骨分化機能を維持していることが確認された。

Ti-Zr 基合金の上で培養した NHOst

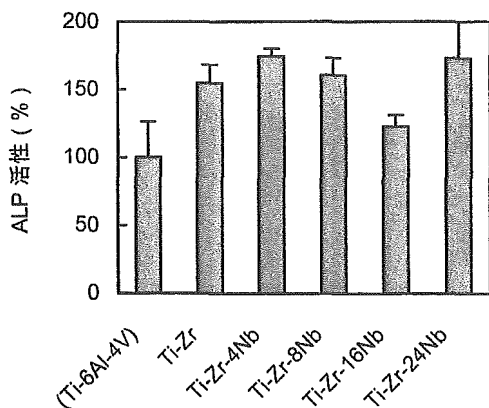


図5 Ti-Zr 基合金上の骨芽細胞の ALP 活性

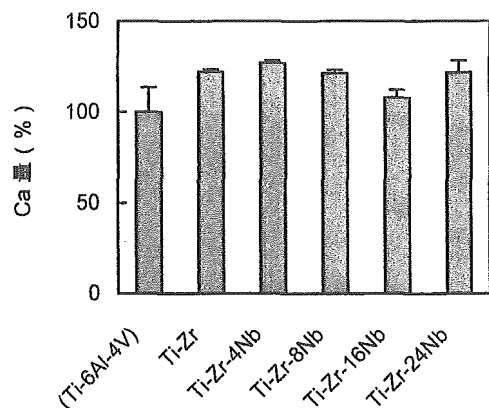


図6 Ti-Zr 基合金上の骨芽細胞の Ca 量

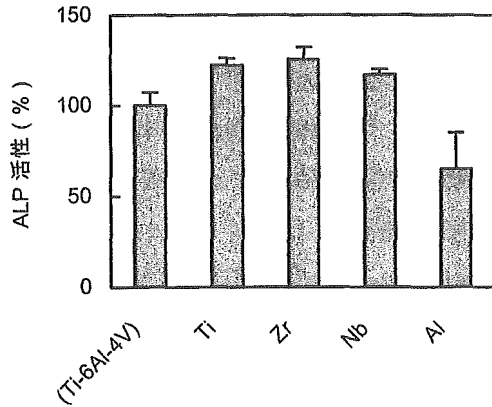


図7 純金属上の骨芽細胞のALP活性

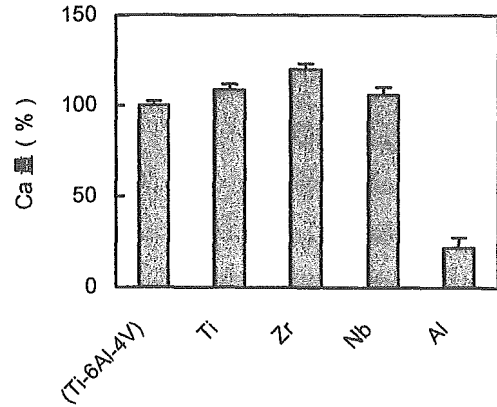


図8 純金属上の骨芽細胞のCa量

細胞のALP活性およびCa量を、図5および図6に示した。いずれもTi-6Al-4VにおけるALP活性およびCa量に対する相対値で示した。Ti-Zr基合金の上で培養した骨芽細胞のALP活性およびCa量は、Ti-6Al-4Vと比べて、Nb含量にかかわらずいずれも増加した。

純金属の上で培養したNHOst細胞のALP活性およびCa量を、図7および図8に示した。Ti-6Al-4Vと比べて、Ti、Zr、Nbの上で培養した骨芽細胞のALP活性およびCa量はいずれも増加したが、Alの上ではALP活性およびCa量はどちらも低下した。特に、AlにおけるCa量の低下が顕著であった。

D. 考察

金属材料は、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 γ ネイル、髄内釘、人工関節、人工歯骨など、高い力学的強度が要求される埋植医療機器に使用されている。機器の構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって、近年、不具合の報告件数は増加傾向にある^{1,2)}。その内、人工関節では約20%、骨接合用品では約70%が機器そのものの破損による不具

合である¹⁾。また、厚生労働省や米国FDAへ報告された不具合の統計的調査から、人工股・膝関節、骨プレート、骨スクリューに留意すべきことが指摘されている²⁾。こうした現状から、現在でも力学的特性や耐腐食性に優れた金属材料の開発研究が盛んに行われている。特にTi合金は、 α 相である純Tiに、 α 相安定化元素(Al、Oなど)と β 相安定化元素(Mo、Nb、Taなど)を適量添加することによって相安定性を変化させ、 α - β 二相組織もしくは β 単相組織を得ることができる^{1,9)}。 α - β 構造は引張強度が高く、疲労特性にも優れ、また、 β 構造は弾性率が低く、加工性に優れるといった特長がある。そのため、Ti合金は様々な種類の埋植医療機器への応用が期待でき、金属材料の中でも特に開発研究が活発である。しかしながら、臨床実態を反映する評価法の不足から、生物学的安全性や有効性を向上させるための研究は十分に進んでいない。本研究では、金属材料のin vivo試験とin vitro試験との相関性を解析し、臨床実態を反映する生物学的安全性および有効性評価手法を確立することを目指している。

コロニー法による細胞毒性試験には、試料の抽出液を用いて細胞を培養する抽出法と、試料の上に直接細胞を播種して培養する直接接触法がある¹⁰⁾。昨年度に実施した直接接触法によるコロニー法を用いた細胞毒性試験において、Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示した¹⁴⁾。一般的に直接接触法によるコロニー法は細胞毒性の検出感度が高いとされており、同材料が抽出法で細胞毒性を示すかどうかを確認する必要があった。

抽出法によるコロニー法では、試験に用いる細胞株および抽出条件によって、試料の細胞毒性強度が異なることがある。実際、歯科鑄造用 Au-Ag-Pd 合金を試料として細胞株および抽出条件について検討したところ、細胞毒性の検出感度は、マウス線維芽細胞由来 L929 細胞 (CCL1) に比べて、V79 細胞の方が高かった。また、抽出条件では、抽出培地 1 ml 当たりの試料表面積は 3 cm² より 6 cm² の方が、抽出時間は 24 時間より 72 時間の方が、いずれも高い細胞毒性強度を示した¹¹⁾。今回の細胞毒性試験は、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、V79 細胞を用いて 6 cm²/ml および 24 時間の抽出条件で試験を行っ

た。その結果、いずれの試料も IC₅₀ は >100% となって、細胞毒性は無いか非常に弱いことしか確認できなかった。抽出条件として 72 時間抽出も行えば、よりの確な結果が得られたであろう。

直接接触法によるコロニー法において、Ti-6Al-4V に弱い細胞毒性が認められたものの、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金にはいずれも細胞毒性が認められなかった。また、純金属の Ti、Zr、Nb にはいずれも細胞毒性が認められなかったが、Al に非常に弱い細胞毒性が認められた。Ti-6Al-4V は細胞毒性が高い V を含むばかりでなく、弱いながらも細胞毒性を示した Al を含んでおり、やはり安全性に問題があると言わざるを得ない。一方、Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、構成元素の純金属を含めて、いずれも細胞毒性が無く、安全性が高いと考えられる。

次に、試料の骨芽細胞適合性を正常ヒト骨芽細胞 NHOst の増殖および分化に及ぼす影響を指標として評価した。Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は、Ti-6Al-4V と比べて、いずれも NHOst 細胞の増殖および分化を促進させた。Ti-6Al-4V は、コロニー法による細胞毒性

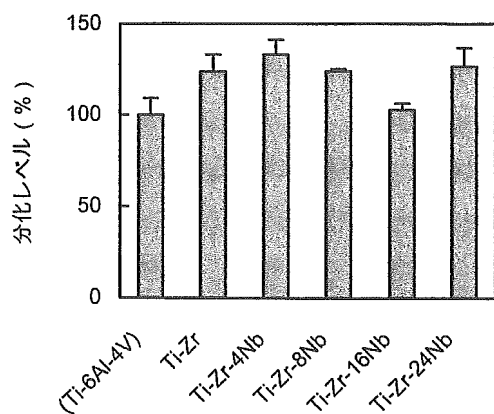


図9 Ti-Zr 基合金上の骨芽細胞の分化レベル

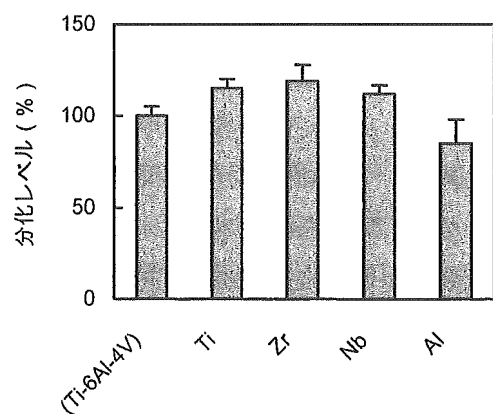


図10 純金属上の骨芽細胞の分化レベル

試験でも示されたように、NH₄Ost 細胞の増殖を抑制していることが確認された。また、純金属では、Ti、Zr、Nb は骨芽細胞の増殖および分化を促進させ、Al はどちらも抑制した。また、骨芽細胞の分化レベル、すなわち細胞数当たりのALP 活性を求めたところ (図 9 および図 10)、Ti-Zr 基合金および Ti、Zr、Nb は、いずれも骨芽細胞の分化レベルを促進させることが分かった。一方、Al 上で培養された骨芽細胞の分化レベルは、顕著に低下することが分かった。これは、Al 塩が骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさない濃度で分化を特異的に阻害したという実験結果^{4,5)} とよく一致している。さらに、Ti-Zr 基合金は Ti より骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。今回試料とした Ti-Zr 基合金に含まれている Zr および Nb は、合金の不動態皮膜中で安定な酸化物となって、不動態皮膜をより強固にする働きがある^{1,15)}。そのため、純 Ti よりも Ti イオンの溶出が抑えられ、骨芽細胞適合性も向上したと考えられる。

Ti-Zr 基合金は、1~5 mol% の Nb を添加すると、 α - β 二相組織が得られ、力学的強度が増す⁸⁾。また、8 mol% 以上の Nb を添加すると、 β 単相組織が得られ、弾性率が小さくなる⁹⁾。このように、Ti-Zr 基合金は、Nb の添加量で力学的性質を制御できるという特徴を有している。特に、Nb を 8 mol% 以上添加した β 型 Ti-Zr 基合金のヤング率は 74~90 GPa と、Ti-6Al-4V の 114 GPa や CP-Ti の 105 GPa より大幅に低い⁹⁾。人工股関節のステム部など大腿骨内に挿入して使用する場合、生体骨との変形ミスマッチを抑制するためには、弾性率の小さい材

料を使用する方が有利である⁹⁾。さらに、今回の試験において、細胞毒性が無く、また、骨芽細胞適合性にも優れていることが確認され、 β 型 Ti-Zr-Nb 合金の応用が益々期待できる。

今回は、Nb を添加した Ti-Zr 基合金の細胞毒性および骨芽細胞適合性を、*in vitro* 試験を用いて評価した。今後、ラットを用いた *in vivo* 埋植実験を実施し、*in vitro* 試験結果と *in vivo* 試験結果との相関性を解析する。そして、金属材料の臨床実態を反映する生物学的安全性および有効性評価手法を確立する。

E. 結論

コロニー法による細胞毒性試験および正常ヒト骨芽細胞を用いた骨芽細胞適合性試験を実施し、Nb を添加した Ti-Zr 基合金の生物学的安全性および有効性について検討した。Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は、いずれも細胞毒性が無く、骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。また、純金属の Ti、Zr、Nb もいずれも細胞毒性が無く、骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。一方、Al は非常に弱い細胞毒性が認められ、骨芽細胞の増殖を抑制し、分化を顕著に阻害した。

Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、構成元素の純金属も含めて、いずれも細胞毒性が無く、従来から使用されている Ti-6Al-4V と比べて骨組織適合性にも優れていた。Nb を添加した Ti-Zr 基合金は力学的性質にも特徴があり、生物学的安全性および有効性の高い金属材料として、埋植医療機器への応用が大いに期待できる。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 伊佐間和郎、小林郁夫、土屋利江：
Ti-Zr 基合金の正常ヒト骨芽細胞を用いた骨組織適合性評価、第 27 回日本バイオマテリアル学会大会（2005.11、京都）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 出願国：欧州
出願番号：05024220.5
出願日：平成 17 年 11 月 7 日
発明の名称：Material for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing material for repairing biological tissues
- 2) 出願国：米国
出願番号：11/270,081
出願日：平成 17 年 11 月 9 日
発明の名称：Material for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing material for repairing biological tissues

H. 参考文献

- 1) 岡崎義光、整形外科用金属材料にみる標準化のメリット、バイオマテリアル、**22**、343-349（2004）
- 2) 佐藤道夫、金属材料の物理的安全性評価手法の開発、平成 16 年度厚生労働科学研究報告書（2005）
- 3) A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells, J.

Biomed. Mater. Res., **39**, 331-340（1998）

- 4) 伊佐間和郎、土屋利江、遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究：金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価、国立衛研報、**121**、111-112（2003）
- 5) 伊佐間和郎、土屋利江、金属イオン等と骨分化、医療材料・医療機器の安全性と生体適合性（土屋利江編集）、シーエムシー出版、東京、230-234（2003）
- 6) 松村英雄、柳田廣明、米山隆之、チタン合金の歯科補綴への応用、バイオマテリアル、**20**、403-407（2002）
- 7) M. Tamai, R. Nakaoka, K. Isama, T. Tsuchiya, Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts, Key Eng. Mater., **309-311**, 97-100（2006）
- 8) E. Kobayashi, S. Matsumoto, H. Doi, T. Yoneyama, H. Hamanaka, Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials, J. Biomed. Mater. Res., **29**, 943-950（1995）
- 9) 高橋正史、小林郁夫、土井寿、米山隆之、浜中人士、ニオブを添加した生体用 β 型チタン-ジルコニウム基合金の相安定性と力学的性質、日本金属学会誌、**64**、1120-1126（2000）
- 10) 厚生労働省医薬局審査管理課、生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について、医療機器審査

No.36 (平成 15 年 3 月 19 日)

- 11) K. Isama, A. Matsuoka, Y. Haishima, T. Tsuchiya, Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells, *Mater. Trans.*, **43**, 3155-3159 (2002)
- 12) K. Isama, T. Tsuchiya, Effect of γ -ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **13**, 153-166 (2002)
- 13) K. Isama, T. Tsuchiya, Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Biomaterials*, **24**, 3303-3309 (2003)
- 14) 伊佐間和郎、金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究、平成 16 年度厚生労働科学研究報告書 (2005)
- 15) Y. Okazaki, E. Gotoh, Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials*, **26**, 11-21 (2005)

[研究協力者]

小林郁夫 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所助手)

6. Ti-Ni 合金の物理的・化学的安全性評価手法の開発

小林 郁夫

厚生科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究

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

研究要旨 Ti/Ni 合金は、形状記憶効果、超弾性特性という性質を有し、歯科矯正用ワイヤーやステントなどの適用範囲が拡大しつつある。しかし、成分元素のおよそ半分が Ni であるため、そのリスクの程度を評価する手法を開発する必要がある。最終的には生体埋入試験を多用せず材料の安全性を評価する簡易な *in vitro* 試験法を開発し、材料の評価を行う際の判断基準のひとつとすることを目指す。

A. 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、PTCAカテーテルを使用した経皮的冠動脈形成術(バルーンによる狭窄部の拡張)などの他、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侵入させ、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、ステントに人工血管を組み合わせたステントグラフトを動脈瘤破裂防止の目的で使用することもある。

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。前者はステントをカテーテル内に納めて病変部まで移動させ、ステント内側のバルーンを膨張

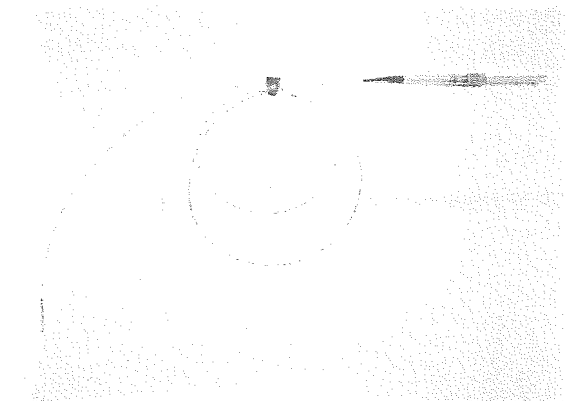
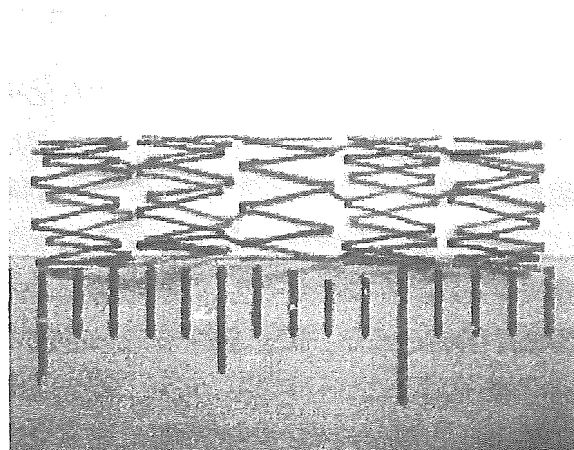


Fig. 2 ステント・デリバリーカテーテル. 左側先端部にステントが設置されている。

させ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。術後のバルーンは縮小させて回収し、ステントだけを病変部に残す。

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超弾性変形が回復することによってステントを拡張し、狭窄部の解消をはかるものである。

前者の素材となるステンレス鋼にはおよそ 8～10mass%の Ni が含まれており、後者の超弾性合金の Ni 濃度は 50%にも及ぶ。Ni の生物学的安全性はアレルギー性、発がん性などが懸念されており、術後も長く血管内に留置されるステントに使用することを不安視するむきもある。

そこで本研究ではステント素材としてNiを含有する Ti-Ni 超弾性合金を使用した際のリスクの程度を評価する手法を開発することを目的として Ti-Ni 超弾性合金を用いた擬似生体環境中での耐食性試験を行い、その生体安全性評価の指針とする。同合金をステント以外の用途に使用することも考慮に入れ、様々な部位に使用した場合の安全性評価に資するデータを蓄積するため、擬似生体環境には多様な環境を模擬することとした。最終的には、こ

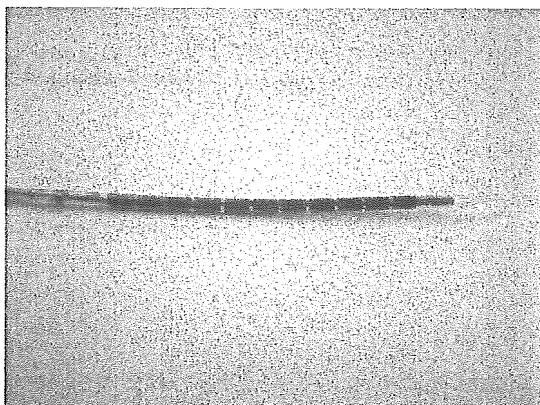


Fig. 3 ステント・デリバリーカテーテル先端(ステントが挿入されている部分の拡大図)。

の試験の結果と、細胞培養試験、生体埋入試験などの結果を総合し、生体埋入試験によらない材料の安全性評価法を開発することを目指す。

B. 研究方法

試料には、Ni 濃度の異なる3種類の試料を用意した。すなわち、純 Ni, Ni をおよそ 50% 含む Ti-Ni 超弾性合金、ならびに Ni を含まないチタン合金 (Ti-4Al-4V 合金) である。純 Ni を生体内で使用することはないが、Ti-Ni 超弾性合金と Ti-4Al-4V 合金は生体用合金として使用例がある。

いずれの合金も圧延材から直径 14mm, 厚さ 1mm の円盤状試験片を切り出し (N=5), 600 番耐水研磨紙で研磨し、溶出試験に供した。溶出試験の溶液は、体液、口腔内、胃液を模擬することとし、それぞれ 310K の 0.9%NaCl 水溶液, 1.0%乳酸, 0.05%塩酸, 10ml 中で溶出試験を行った。溶出試験は、1週間, 2週間, 3週間連続で行うこととし、所定の試験期間経過後溶液中に溶出したイオン濃度を ICP 発光分光分析で定量評価した。各合金の耐環境性は試験片単位表面積あたりの溶出イオン量で評価した。

C. 研究結果

Fig. 4に0.9%NaCl水溶液中での溶出試験の結果を示す。純 Ni からの溶出量は 0.05～0.08 mgm^{-2} であり、2週間溶出のデータに若干の低下が見られるものの、おおむね試験期間の増加に従って溶出量が増加していた。Ti-Ni 合金と Ti-6Al-4V 合金の場合は、ICP の検出感度限界付近の検出量だったため、事実上ほとんど溶出していないことがわかった。

1.0%乳酸中での溶出試験の結果を Fig. 5 に示す。もっとも大きな溶出量を示した純Niと比較すると、Fig. 4の0.9%NaCl水溶液の場合

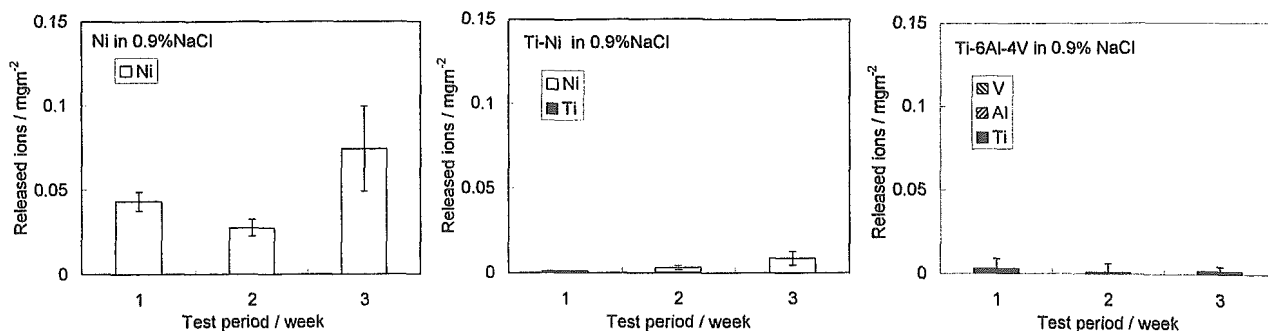


Fig. 4 0.9%NaCl 水溶液中での溶出試験の結果. 左から, 純 Ni, Ti-Ni 合金, Ti-6Al-4V 合金.

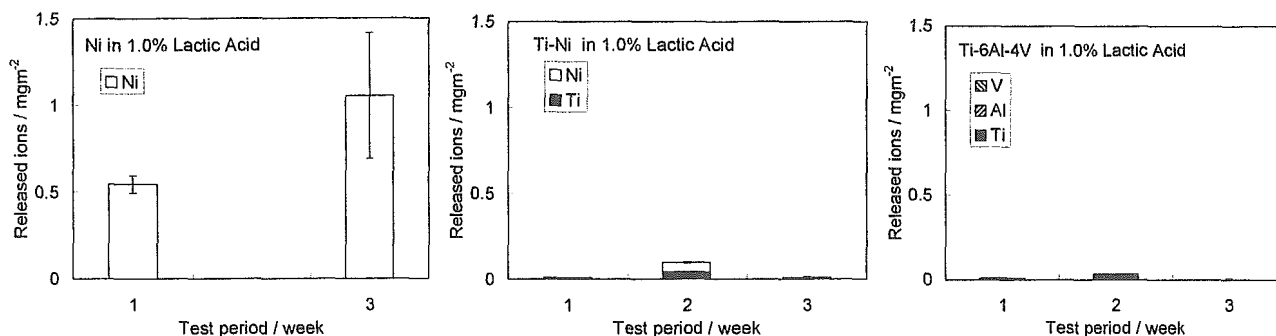


Fig. 5 1.0%乳酸中での溶出試験の結果. 左から, 純 Ni, Ti-Ni 合金, Ti-6Al-4V 合金.

と比べ, 単位表面積あたりの溶出量が一桁大きくなっている. Ti-Ni 合金と Ti-6Al-4V 合金からの溶出量はここでも純 Ni よりも小さかった.

と比べ, 単位表面積あたりの溶出量が一桁大きくなっている. Ti-Ni 合金と Ti-6Al-4V 合金からの溶出量はここでも純 Ni よりも小さかった.

Fig. 6 に 0.05%塩酸中での溶出試験の結果を示す. 純 Ni の溶出量は $1 \sim 1.2 \text{ mgm}^{-2}$ と 3 種類の合金の中でもっとも大きな溶出量を示した. ここでも Ti-Ni 合金と Ti-6Al-4V 合金の耐食性は良好で, 純 Ni と同じスケールの比較ではいずれも 0 に近い. これら Ti-Ni 合金と Ti-6Al-4V 合金を 0.05%塩酸中で溶出試験に供した結果をスケールを拡大して表示すると Fig. 7 のようになる. Ti-Ni 合金に比べ Ti-6Al-4V 合金の耐食性がさらに優れていることが明らかとなる. Ti-6Al-4V 合金の構成元素のうち, 主成分の Ti は検出されたものの, Al や V は検出限界値以下であった.

D. まとめ

以上の結果を総括すると, 3 種類の合金の耐食性の順位は純 Ni < Ti-Ni 合金 < Ti-6Al-4V 合金の順にすぐれていた. Ti-6Al-4V 合金の順にすぐれていた. 溶液別では 0.9%食塩水 < 1.0%乳酸 < 0.05%塩酸の順に溶出量が大きかった.

多様な環境において超弾性 Ni-Ti 合金を使用する可能性を考慮に入れると, 環境などの溶出条件にもっとも敏感に反応して, 溶出試験データに十分な差異が認められたのは 0.9%NaCl 水溶液 / 3 週間の試験, もしくは 0.05%塩酸 / 3 週間の試験であった. 今後, 細胞培養試験, 生体埋入試験などの結果を比較してより有効な試験法を確立するに際しては, これらの条件を参考に試験プロトコルを検討することが有効であることが示唆された.

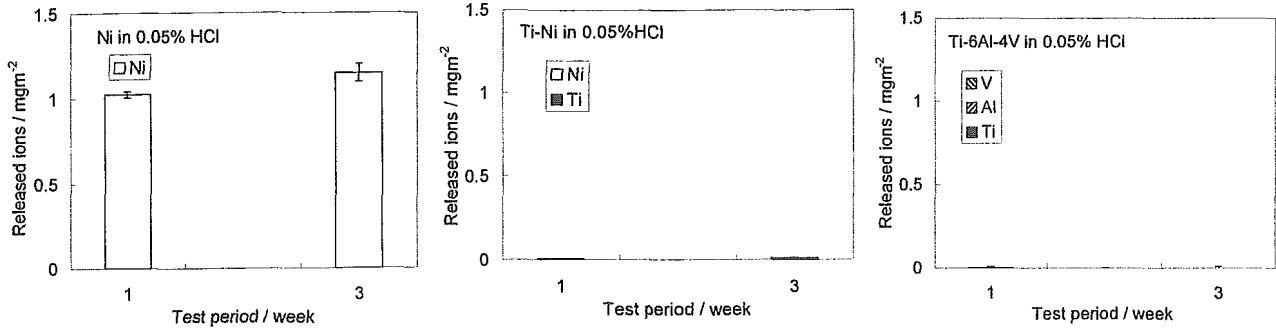


Fig. 6 0.05%塩酸中での溶出試験の結果. 左から, 純 Ni, Ti-Ni 合金, Ti-6Al-4V 合金.

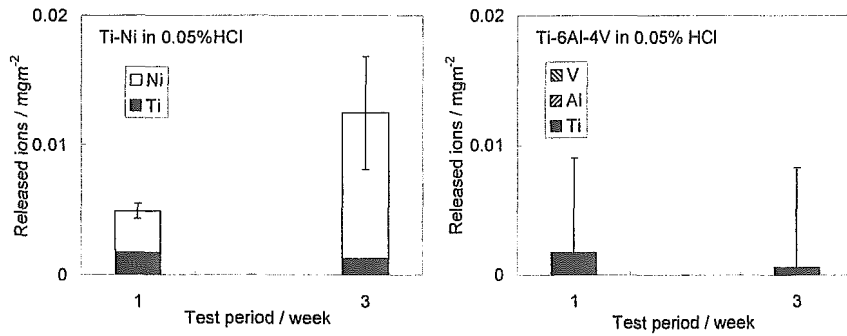


Fig. 7 0.05%塩酸中での溶出試験の結果. 左は Ti-Ni 合金, 右は Ti-6Al-4V 合金.

7. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の
安全性評価手法の開発

松永佳世子