

B. 研究方法

1. 試験材料

Ti-Zr 基合金として、Ti と Zr の原子比が 1:1 である Ti-Zr 並びに主成分である Ti と Zr の原子比を 1:1 に固定し、それに β 相安定化元素のひとつである Nb を添加した Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb および Ti-Zr-24Nb を用いた。Ti-Zr 基合金の化学組成を表 1 に示した。また、純金属として、Ti、Zr、Nb および Al を用いた。

いずれの試料も直径 1.0 mm、長さ 7.0 mm のロッド状に加工し、#400 (Al のみ #1200) のエメリー紙を用いてほぼ同じ表面粗さになるように研磨仕上げを施した。その後、酢酸エチル、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄し、高圧蒸気滅菌 (121°C、20 分) を施した。

2. ラット大腿骨埋植試験

2-1. 埋植操作

フィッシャー系雄ラット (7 週齢) をペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) 麻酔下で腹位に固定し、大腿部皮膚を約 3 cm 切開、さらに内側広筋を切開して大腿骨を露出した後、歯科用エンジンを用いて大腿骨骨幹部に直径 1.0 mm の窩洞を形成し、窩洞部へ試料を挿入した (図 1)。その後、筋肉および皮膚を縫合した。

2-2. 軟 X 線撮影

試料埋植後 1、2 および 4 週で動物を屠殺し、大腿骨を採取して 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。その後、軟 X 線撮影装置を用いて大腿骨を撮影した。

2-3. 病理組織検索

軟 X 線撮影後に大腿骨を脱灰し、通法に従い、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施して病理組織学的に検索した。また、HE 標本像を用いて、骨髓腔に形成された新生骨梁の窩洞部から大腿骨長軸方向に進展した最大長さを測定した。

2-4. 引抜強度の測定

試料埋植後 4 週で動物を屠殺し、大腿骨を採取して 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。その後、精密万能試験機 AUTOGRAPH AG-20kNG および 50 N ロードセル (いずれも島津製作所) を用いて、大腿骨に埋植した試料の引抜速度 1.0 mm/min における荷重変位曲線を測定し、試料の引抜強度を求めた。

3. 統計学的検定

統計学的検定には JSTAT Version 10.0 を用いて、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、有意差が認められた場合には、Tukey-Kramer 法による群間の多重比較を行った。いずれの検定においても有意水準は危険率 5% 未満とした。

4. 倫理面での配慮

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。そのため、本研究においては、動物実験の必要性があった。動物福祉・愛護の精神に基づき、実験に使用する動物数は必要最小限にするとともに、動物に与える苦痛を最小限に抑えた。

C. 研究結果

1. 軟 X 線観察

純金属の埋植後 1、2 および 4 週における軟 X 線撮影像を図 2 に示した。埋植後 1 週において、大腿骨窩洞部骨髓腔に新生骨梁と考えられる軟 X 線不透過域が観察された。また、試料と皮質骨との隣接面には結合組織と考えられる軟 X 線透過層が観察された。埋植後 2 週において、骨髓腔に形成された新生骨梁は埋植後 1 週と比べて減少が認められた。埋植後 4 週において、骨髓腔に形成された新生骨梁はほとんど観察されず、外骨膜側に新生骨と考えられる軟 X 線不透過層が観察された。

Ti-Zr 基合金の埋植後 1、2 および 4 週における軟 X 線撮影像を図 3 に示した。埋植後 1 週において、大腿骨窩洞部骨髓腔に新生骨梁と考えられる軟 X 線不透過域が観察され、試料と皮質骨との隣接面には結合組織と考えられる軟 X 線透過層が観察された。埋植後 2 週において骨髓腔に形成された新生骨梁は埋植後 1 週と比べて減少が認められ、埋植後 4 週において骨髓腔に形成された新生骨梁はほとんど観察されず、外骨膜側に新生骨と考えられる軟 X 線不透過層が観察された。

埋植後いずれの期間においても、金属材料の種類によって軟 X 線撮影像に明らかな相違は認められなかった。

2. 病理組織検索

試料埋植後 1 週における純金属および Ti-Zr 基合金の HE 染色像を図 4 および図 5 に示した。大腿骨窩洞部骨髓腔は内骨面から連続した新生骨梁の形成が認められ、金属材料との隣接面は結合組織層が観察された。この新生骨梁は不規則な

石灰化がみられ、膜内骨化の過程を示す所見であった。隣接面の皮質骨は、外骨膜側に軟骨形成がみられ、窩洞遠位部より軟骨内骨化の像が観察された。いずれの試料においても炎症所見は観察されなかった。

試料埋植後 2 週における純金属および Ti-Zr 基合金の HE 染色像を図 6 および図 7 に示した。骨髓腔内に形成された新生骨周囲に破骨細胞が観察され、1 週のものに比べて明らかな骨量の減少が認められた。外骨膜側は骨化が進行しており、軟骨は殆ど観察されなかった。

試料埋植後 4 週における純金属および Ti-Zr 基合金の HE 染色像を図 8 および図 9 に示した。骨髓腔内に形成された新生骨は減少し、窩洞部と金属材料間に薄い骨組織が観察された。外骨膜面に添加された骨は、成熟した骨組織への発達が認められた。

埋植後いずれの期間においても、金属材料の種類によって病理所見に明らかな相違は認められなかった。

次に、骨髓腔に形成された新生骨梁について、HE 標本のデジタル画像を用いて窩洞部から長軸方向に占有した最大の長さ (図 10) を測定した (表 2)。埋植後 1 週では、密な骨梁の形成がみられたのに対し、埋植後 2 週では多くの標本において骨組織の吸収が進んでおり、散在した残存骨梁での測定であることから、必ずしも占有骨組織量を表しているものではないが、埋植後の経過で顕著な骨組織の減少が示唆された。埋植後いずれの期間においても、金属材料間に新生骨量の有意な差は認められなかった。

3. 引抜強度

大腿骨に埋植した金属試料の引抜速度 1.0 mm/min における荷重変位曲線の一例を図 11 に示した。荷重の最大値を大腿骨からの引抜強度として試料を評価した。純金属試料では、Ti の引抜強度と比べて、Zr の引抜強度は同程度で、Nb の引抜強度は高く、Al の引抜強度は低い傾向が認められた (図 12)。Ti-Zr 基合金試料では、材料間に有意な差は認められなかった (図 13)。

D. 考察

金属材料は、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 γ ネイル、髓内釘、人工関節、人工歯骨などのように高い力学的強度が要求される埋植医療機器に使用される。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)}。不具合の内、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、力学的特性や耐腐食性に優れた金属材料の開発研究が現在でも活発に行われている。特に医用金属材料として有望な 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 構造は強度が高く、疲労特性に優れ、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、医用金属材料の中でも特に開発研究が盛んである。しかしながら、力学的性能を向上させるための研究に比べ、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遅れている。本研究では、金属材料の in vivo 試験成績と in vitro 試験成績との関係を明らかにし、より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の確立を目指している。

ラット大腿骨骨幹部に形成した窩洞への各種金属材料の埋植試験では、いずれの試料においても炎症所見もみられず、材料の違いによる組織変化は認めなかった。埋植後初期の骨髓内損傷部位では膜性骨化の過程で、また、外骨膜部では軟骨内骨化により骨形成が観察された。新生された骨髓内の骨梁は、埋植後の経過で破骨細胞性骨吸収により骨量の減少を生じ、今回観察した埋植後 4 週において金属材料と骨髓組織を隔てる薄い骨組織のみがみられ、これらは骨折の治癒で見られる修復過程と類似した所見である。外骨膜側の骨形成の組織像についても各種金属材料埋植による明らかな相違は認められなかった。

前年度までに、今回対象とした金属材料について、チャイニーズハムスター由来線維芽細胞 V79 を用いた細胞毒性試験および正常ヒト骨芽細胞 NH Ost を用いた骨芽細胞適合性試験を実施してきた。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、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金には細胞毒性が認められなかった。また、純金属の Ti、Zr および Nb には細胞毒性が認められず、Al に弱い細胞毒性が認められた¹¹⁾。さらに、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する骨芽細胞適合性試験において、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は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 および 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を、Ti-Zr 基合金、Ti、Zr および Nb は増加させ、Al は顕著に低下させた¹¹⁾。これらの *in vitro* 試験成績は、今回の埋植試験において、他の材料に比べて、Al の引抜強度が低い傾向を示したこととよく一致した。V79 細胞を用いた直接接触法によるコロニー形成率とラット埋植試験における試料の引抜強度との相関関係 ($r = 0.9006$) について無相関検定を行なったところ、有意性が認められた ($p = 0.0009$)。また、同様にして、試料の上で培養した正常ヒト骨芽細胞 NHOst の石灰化物生成量とラット埋植試験における試料の引抜強度との相関関係 ($r = 0.7282$) についても有意性が認められた ($p = 0.0261$)。試料の引抜強度が繊維芽細胞の増殖とより強く相関したことは、埋植した試料と皮質骨との間に結合組織が介在したことを反映していると考えられる。

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-Nb 合金のヤング率は 74 GPa~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

節のステム部や髓内釘など骨内に挿入して使用する際、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 (生体骨により近い) 材料を使用する方が有利である⁹⁾。また、Ti-Zr-Nb 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り、耐腐食性も向上する^{1,12)}。さらに、今回のラット大腿骨埋植試験において、炎症反応も無く、骨形成にも問題が無いことが確認され、 β 型 Ti-Zr-Nb 合金の応用が益々期待できる。

E. 結論

ラット大腿骨埋植試験を実施し、Nb を添加した Ti-Zr 基合金の骨組織適合性について検討した。Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は、いずれも組織に炎症反応が無く、窩洞部の骨形成も自然であった。また、純金属もいずれも組織に炎症反応が無かったが、Nb において引抜強度の増加傾向および Al において引抜強度の低下傾向がみられた。

埋植試験における試料の引抜強度は、*in vitro* 試験の直接接触法による繊維芽細胞 V79 のコロニー形成率および正常ヒト骨芽細胞 NHOst の石灰化物生成量と相関した。直接接触法による細胞毒性試験および骨芽細胞を用いた適合性試験の有用性が確認された。

Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、構成元素の純金属も含めて、いずれも炎症反応を起こさず、また、骨組織適合性にも全く問題が無かった。Ti-Zr-Nb 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。

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 伊佐間和郎、小林郁夫：有効性・安全性に優れた新規チタン合金の開発と評価手法の開発、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研究成果発表会(2006年3月10日、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 出願国：米国
公開番号：US-2006-0115458-A1
公開日：2006年6月1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 (生体組織補填材および生体組織補填体ならびに生体組織補填材の製造方法)

[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) 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)
- 11) 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17年度厚生労働科学研究報告書 (2006)
- 12) Y. Okazaki, E. Gotoh: Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials*, **26**, 11-21 (2005)

〔研究協力者〕

小園 知（神奈川歯科大学高次口腔科学研究所助教授）

小林郁夫（東京医科歯科大学生体材料工学研究所助手）

表 1 Ti-Zr 基合金の化学組成

Alloy	Chemical composition, mol% (mass%)		
	Nb	Ti	Zr
Ti-Zr	0	50.0 (34.4)	balance
Ti-Zr-4Nb	4.0 (5.3)	48.0 (32.6)	balance
Ti-Zr-8Nb	8.0 (10.4)	46.0 (30.8)	balance
Ti-Zr-16Nb	16.0 (20.3)	42.0 (27.4)	balance
Ti-Zr-24Nb	24.0 (29.7)	38.0 (24.2)	balance

表 2 骨髓腔に形成された新生骨梁の最大長

Alloy	Thickness of new bone, AV±SE / μm		
	1 w	2 w	4 w
Ti	834±160	650±172	22±3
Zr	742±127	355±76	65±24
Nb	773±93	520±154	83±21
Al	800±216	522±176	42±17
Ti-Zr	813±222	560±204	47±15
Ti-Zr-4Nb	898±199	507±120	103±58
Ti-Zr-8Nb	809±238	578±119	33±6
Ti-Zr-16Nb	965±366	602±126	38±9
Ti-Zr-24Nb	760±202	608±163	70±15

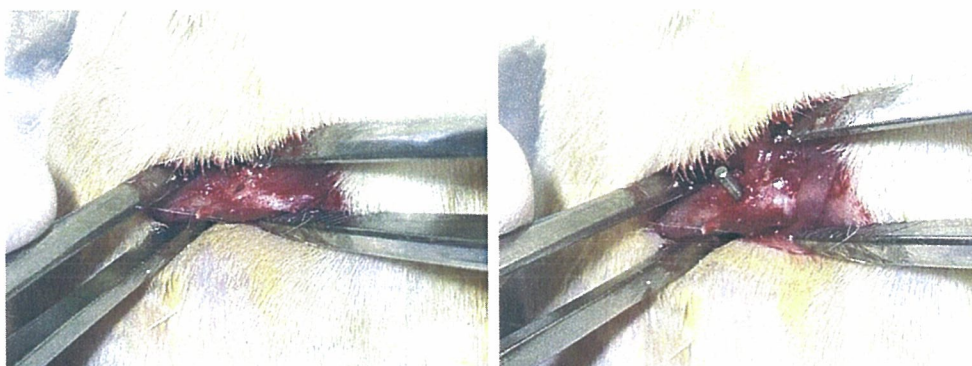


図 1 ラット大腿骨骨幹部に形成した窩洞（左）および窩洞部に挿入した試料（右）

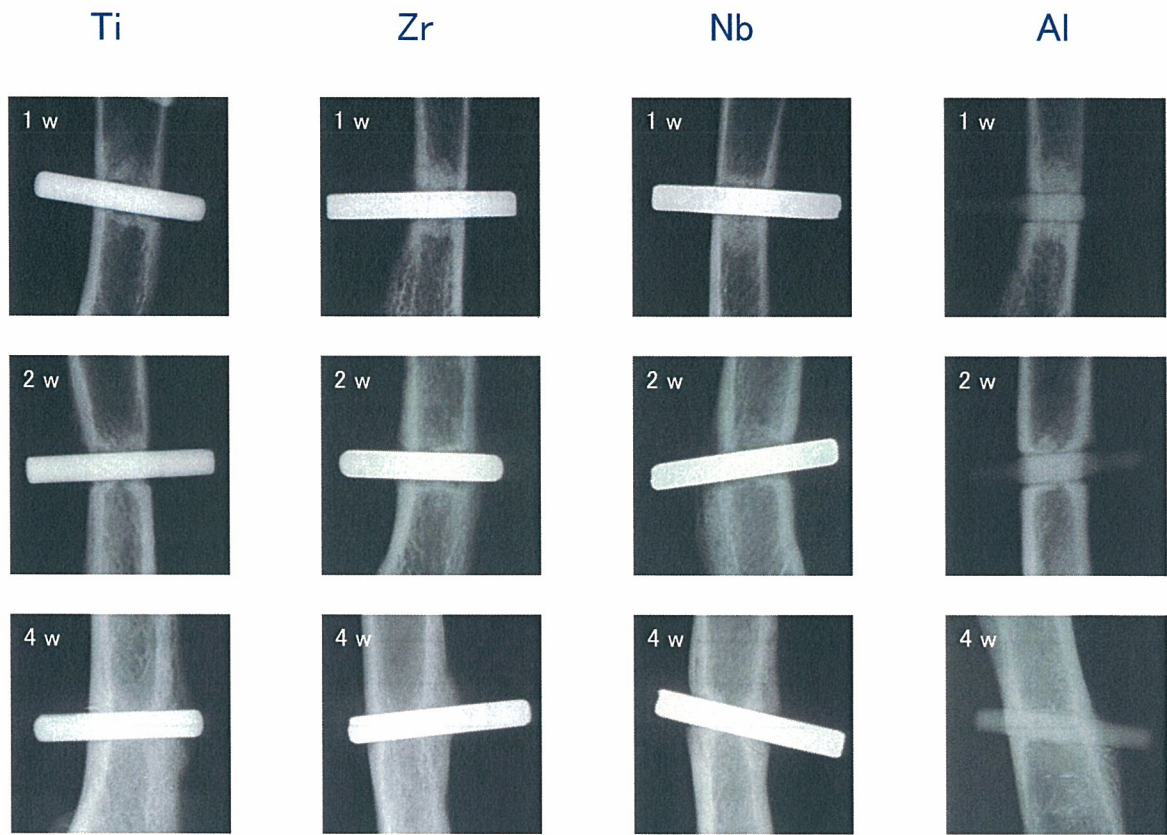


図 2 純金属埋植後の軟 X 線撮影像

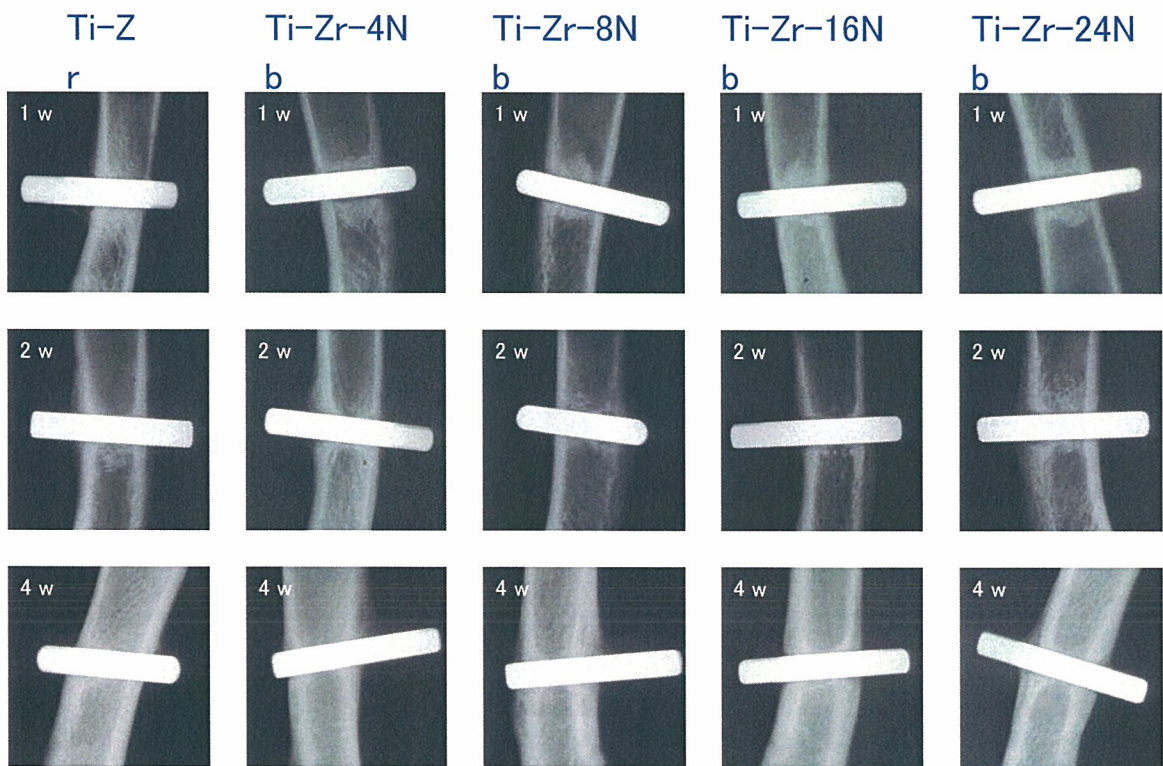


図 3 Ti-Zr 基合金埋植後の軟 X 線撮影像

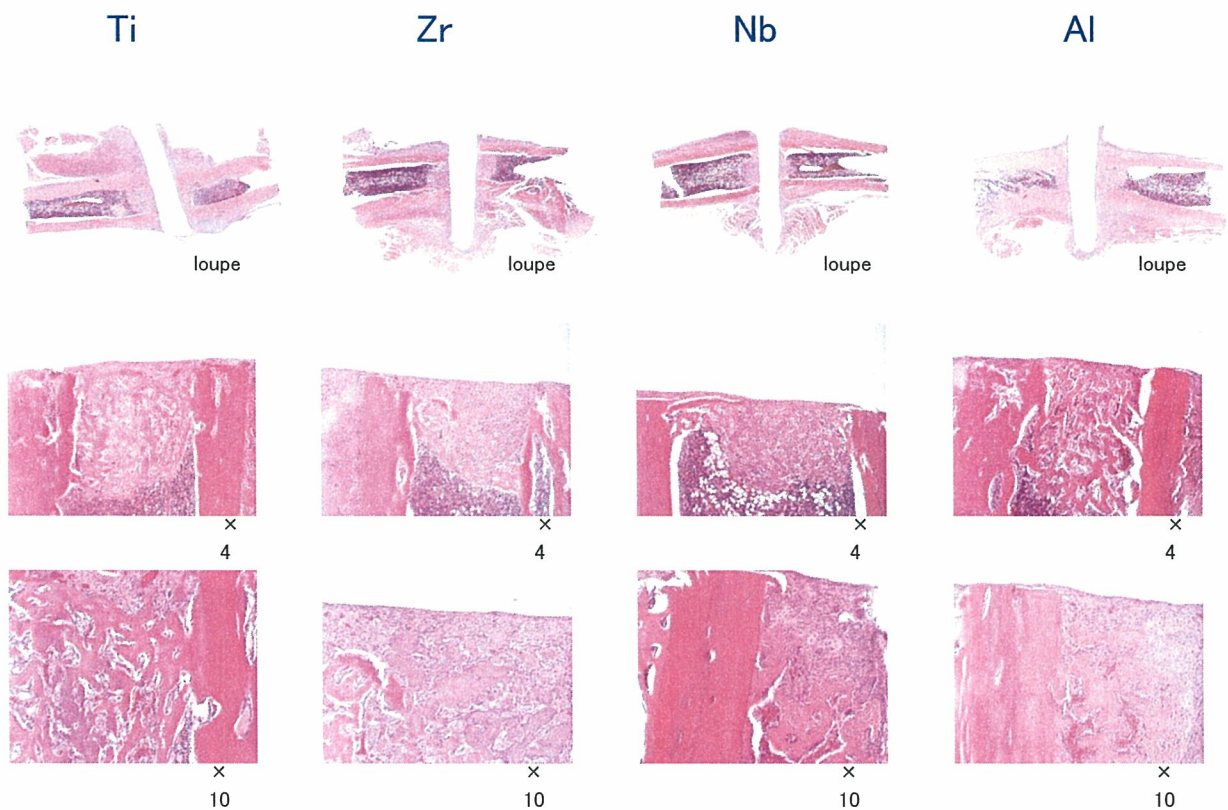


図4 純金属埋植後1週のHE染色像

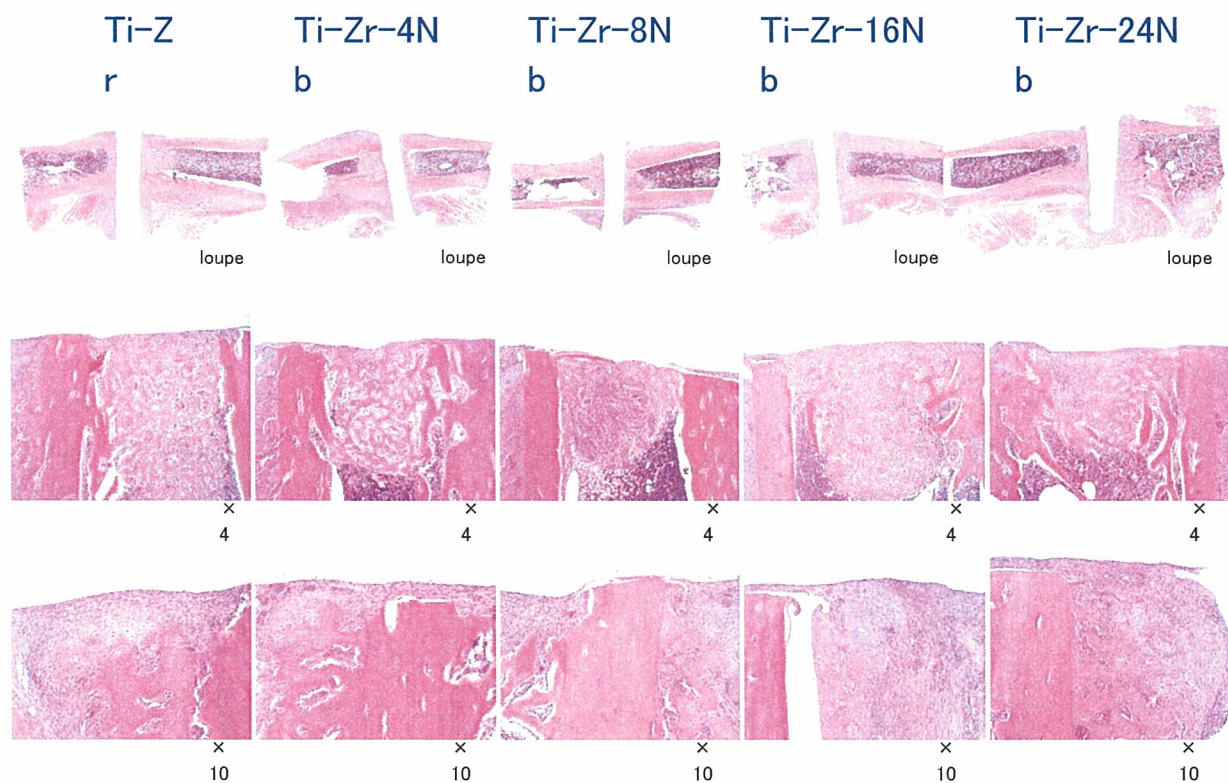


図5 Ti-Zr合金埋植後1週のHE染色像

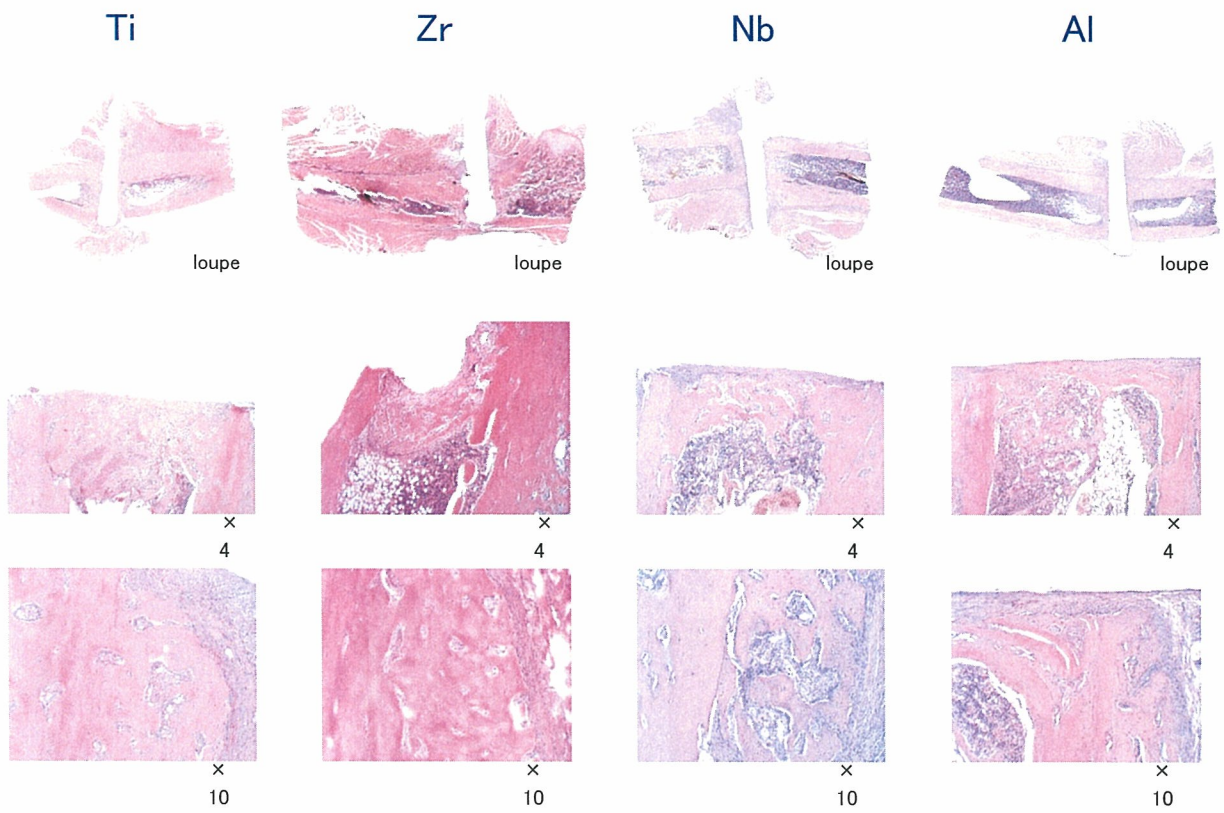


図 6 純金属埋植後 2 週の HE 染色像

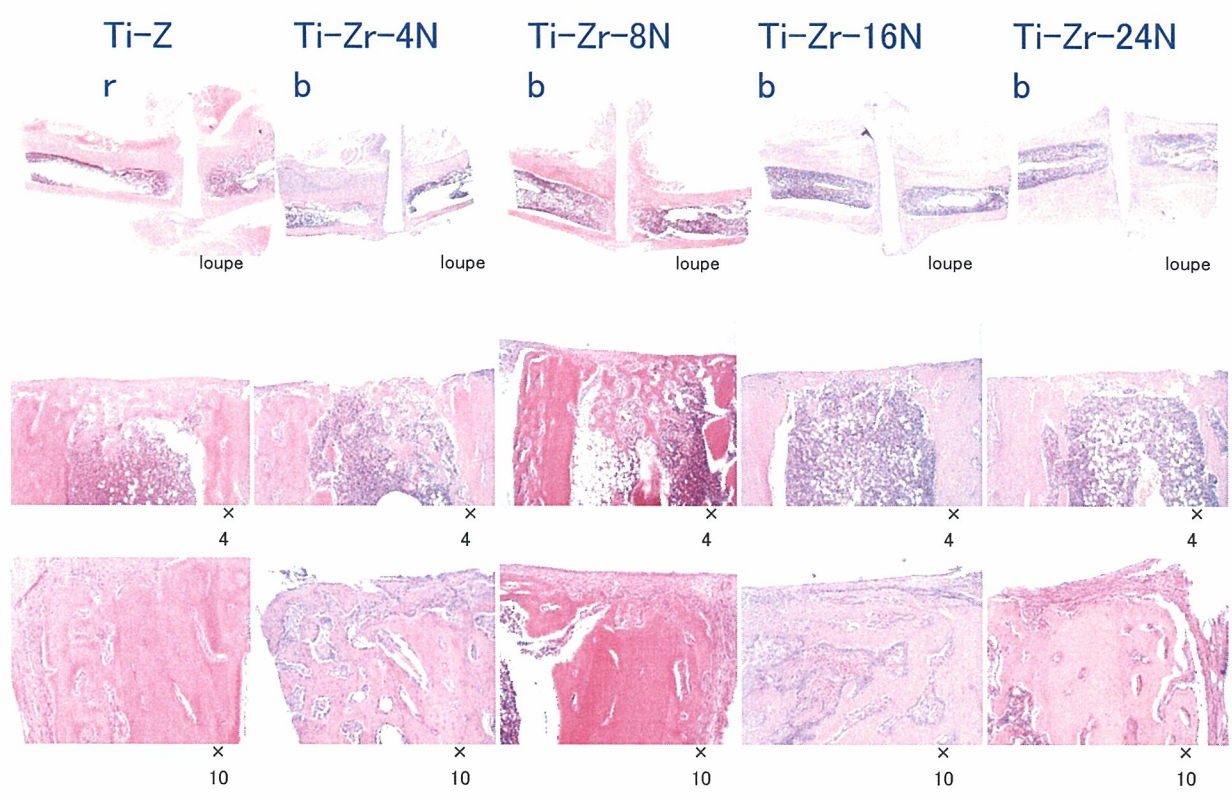


図 7 Ti-Zr 合金埋植後 2 週の HE 染色像

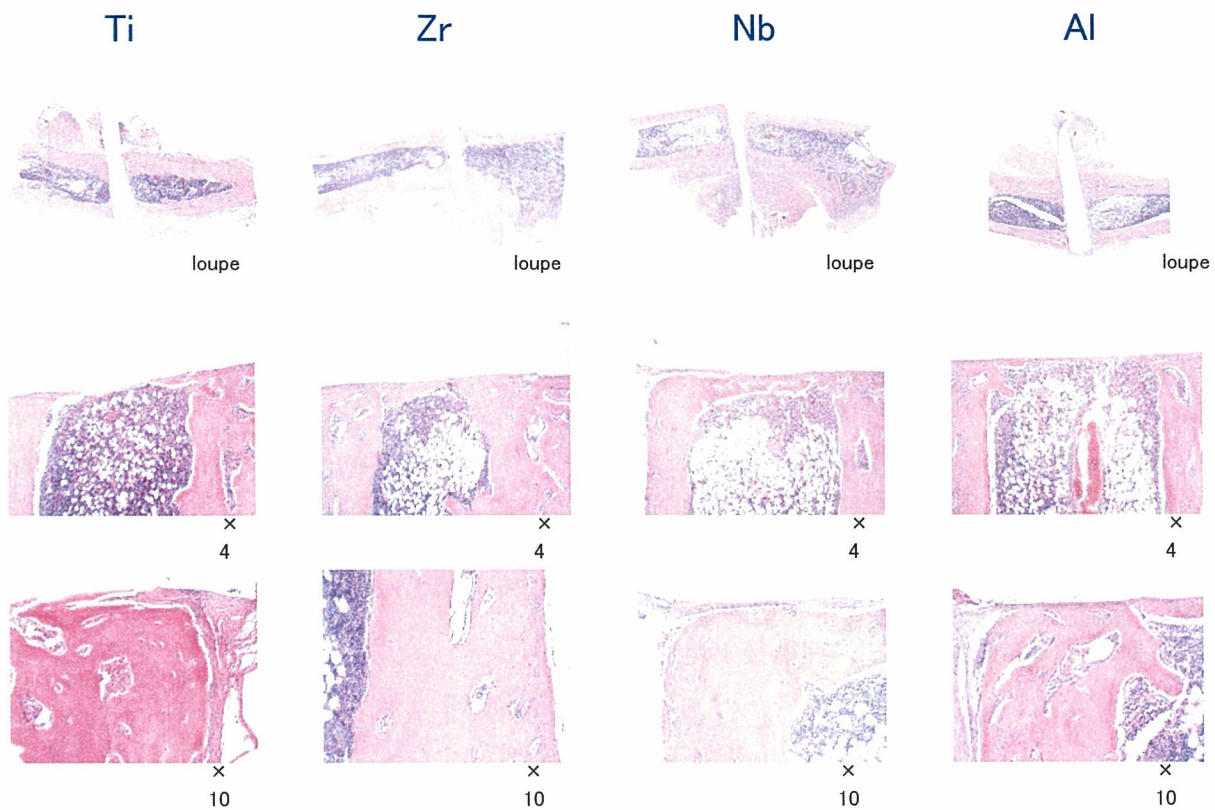


図 8 純金属埋植後 4 週の HE 染色像

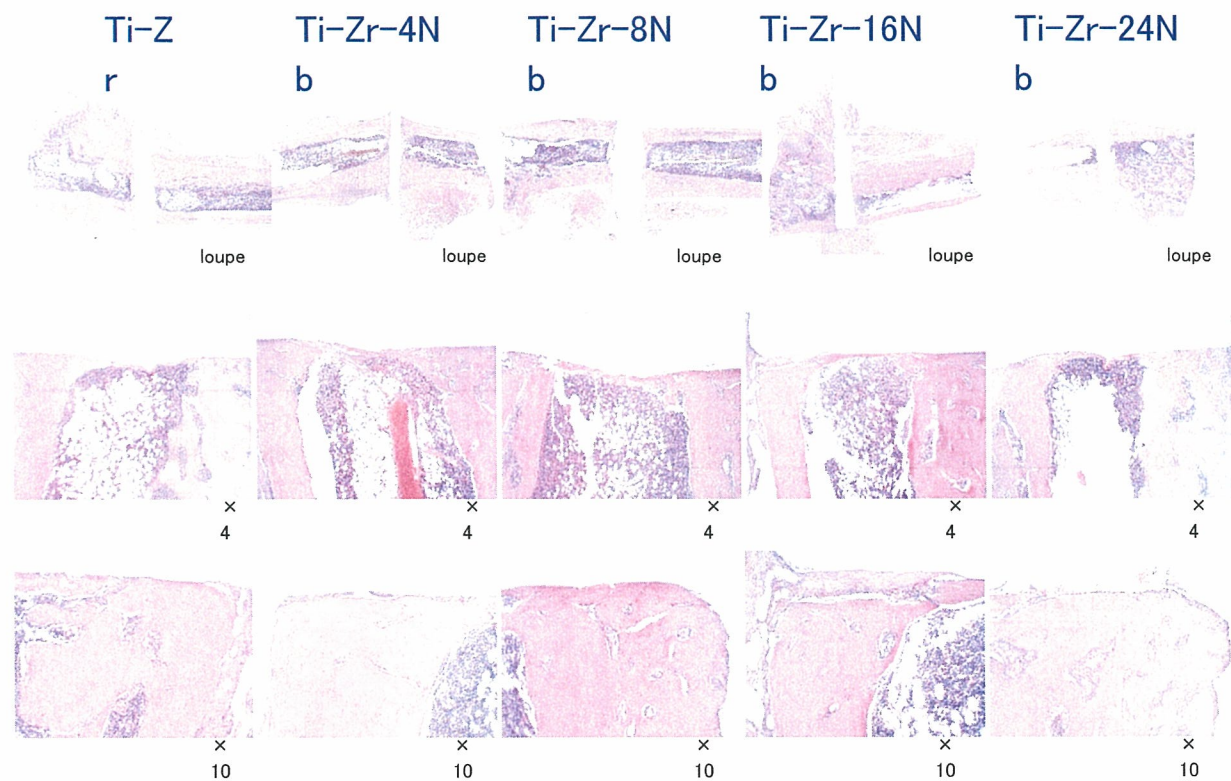


図 9 Ti-Zr 合金埋植後 4 週の HE 染色像

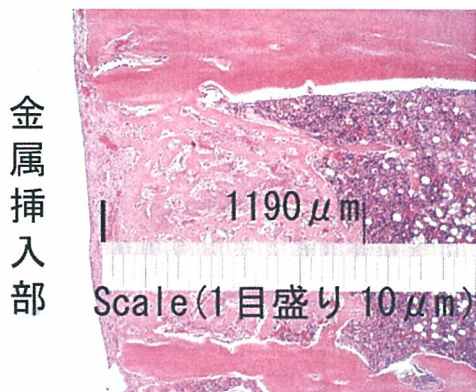


図 10 骨髓腔に形成された新生骨梁の窩洞部から長軸方向の最大長 (Ti、埋植後 1 週)

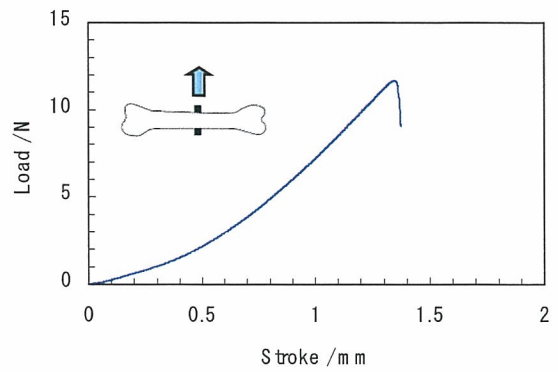


図 11 引抜試験における荷重変位曲線 (Ti-Zr-8Nb)

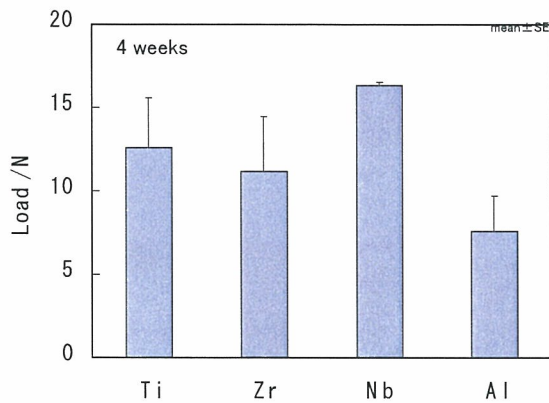


図 12 純金属の引抜強度

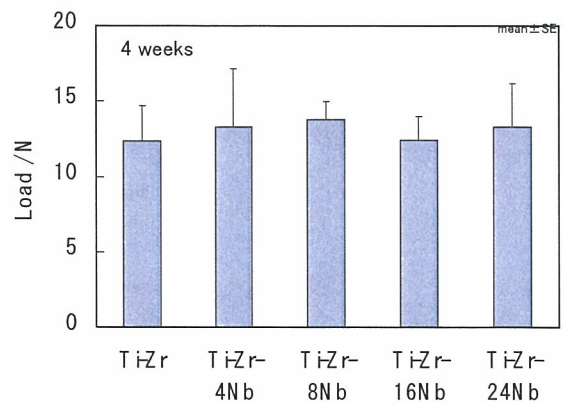


図 13 Ti-Zr 基合金の引抜強度

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

Ti-Ni 合金の物理的・化学的安全性評価手法の開発

分担研究者 小林 郁夫 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所

研究要旨 貴金属合金製ステント用の開発を目指し、ステントに適した合金を開発する。また、開発した貴金属合金の力学的評価、耐食性、生体適合性(血液適合性)などステント素材として必要な特性に関する基礎的な評価を行った。開発した貴金属合金の組成については、以下のような調査、考察に基づいて、Au-8%Pd合金からAu-16%Pd合金までの組成のAu-Pd二元合金、ならびに、それらに1から3%のAgを添加した三元合金を対象とすることとした。(組成はいずれもmol%, 以下同様)。各特性評価の結果、開発した合金が新しいステント用合金の素材として有望であると結論付けた。

A. 研究目的

図1に示したAu-Pd二元系状態図によれば、Au-Pd二元系は全率固溶体を形成するものの、低温にAu₃Pd相、AuPd相、AuPd₃相の三種類のダルトナイド型金属間化合物相が存在するとされている。いずれも高温からの冷却時、不規則固溶体相から規則-不規則変態によって出現する。この系の状態図はAu-Cu二元系のそれに類似しており、Au₃Pd相の結晶構造は、Au-Cu二元系中に存在するAu₃Cu相と同様に、L1₂型規則構造であると報告されている。

L1₂型規則構造はfccを基調とした規則構造で、面心立方晶の面心位置にAu原子が、コーナーの位置にPd原子を配した規則構造である。この結晶構造が高温相(母相)である不規則固溶体のfccに近いと、整合な析出が期待され、市販の歯科用金合金(タイプ3, タイプ4)で熱処理(時効)硬化を担っているAu₃Cu相と同様の効果が期待できる。

この状態図情報は確定的なものではなく、相境界などは破線で示されているが、Au₃Pd相の組成幅は化学量論組成の25%を中心に

Assessed Au-Pd Phase Diagram

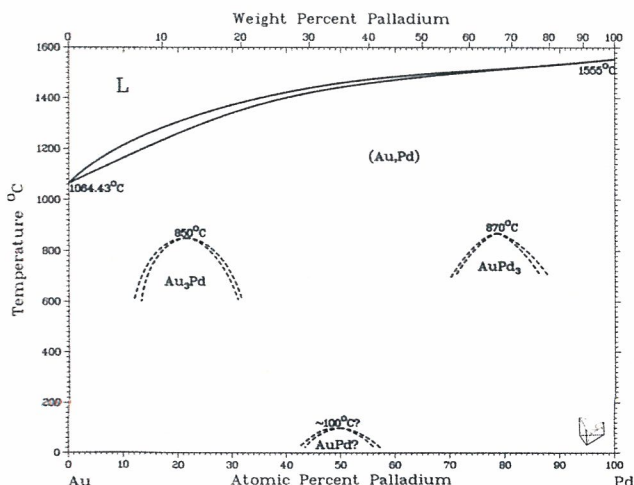


図1 Au-Pd二元系状態図(Binary Alloy Phase Diagram, ASMより)

12～32%まで広がっているとされており、その外側に二相共存領域(不規則固溶体相/Au₃Pd相)がある。本研究計画では母相中にAu₃Pd相が析出した組織の合金開発を目指すので、低Pd濃度側の二相共存領域周辺を研究対象とし、Au-8%PdからAu-16%Pdまでを実験の対象とすることとした。

また、三元合金はAu-10%Pdを基本組成とし、1～3%のAgをAuに置換する形で添加することとした。主としてAgの添加による延性改善を期待している。

本研究で使用するAu-Pd二元合金、ならびにAu-Pd-Ag三元合金の合金組成を表1に示す。

B. 研究方法

B.1. 合金の溶製と試料の作成

Au地金(純度99.99%,石福金属興業),Pd地金(石福金属興業),Ag(石福金属興業)を用いて、所定の合金組成の割合になるよう秤量した。非消耗電極式アルゴンアーク溶解炉を用いて、各合金とも100gのボタン状インゴットを2個ずつ溶製した。各インゴットを厚さ1mmまで冷間圧延し、面積約50cm²の薄板2枚を得る。この薄板から、ワイヤーカット放電加工で引張試験片、溶出試験片、血液適合性試験片を作製した。ボタン状インゴットの外観を図2に、圧延後の外観を図3に、放電加工後の外観を図4に示す。各試験片の寸法を図5に示す。

B.2. 力学的性質の評価

上述のように作製した引張試験片(平行部の幅4mm,同厚さ1mm,同長さ14mm)を用いて、引張試験により力学的性質の評価を行った。引張試験はモデル858卓上型材料試験システム(MTS)をもちいて、クロスヘッド速度1.0mmmin⁻¹で行った。ひずみはアクチュエー



図2 アルゴンアーク溶解で溶製したボタン状インゴット

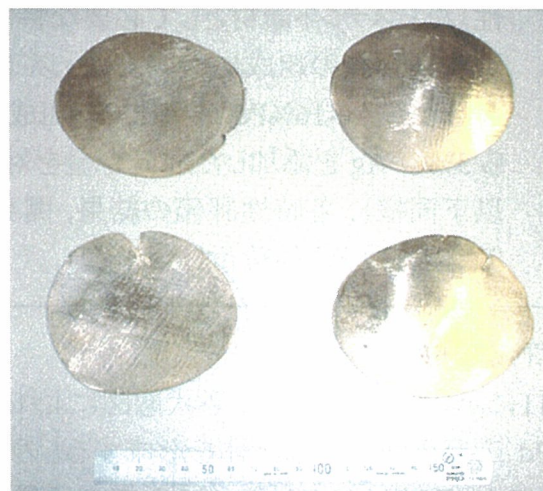


図3 圧延後の試料外観



図4 放電加工後の試料外観

タから出力した変位より、応力はロードセルの出力を試験片断面積で除したものを用いた。

B.3. 溶出試験による耐食性の評価

耐食性評価のための溶出試験は、各合金の溶出試験用試験片(直径10mm,厚さ1mm)を10mlの0.9%NaCl水溶液とともにポリエチレン密封容器中に入れ、37℃恒温槽中で

表1 本研究で開発した合金の目標組成

合金名	8Pd	10Pd	12Pd	14Pd	16Pd
Au (mol%)	残余	残余	残余	残余	残余
Pd (mol%)	8.0	10.0	12.0	14.0	16.0

合金名	1Ag	2Ag	3Ag
Au (mol%)	残余	残余	残余
Pd (mol%)	10.0	10.0	10.0
Ag (mol%)	1.0	2.0	3.0

3週間行った。試験期間中はポリエチレン容器を常時振揺させた。いずれの合金も試料数はN=5とした。比較のため、同じ形状のTi-Ni超弾性合金とTi-6Al-4V合金の溶出試験も行った。前者は自己拡張型ステント用の素材としてすでに市販されており、後者は整形外科用生体材料として多くの使用実績がある。

3週間経過後、溶液から試料を取り出し、残った溶液に溶け出した金属イオンの濃度をICP発光分光分析(PS-1000, Leeman Labs)で測定した。測定したイオン濃度は、単位試料表面積あたりの溶出量に換算して比較した。また、取り出した試料の表面状態を観察した。

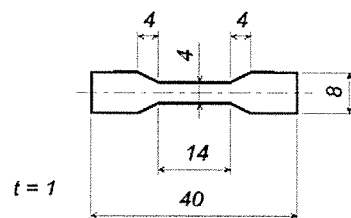
B.4. アノード分極試験による耐食性の評価

溶出試験と平行して、アノード分極試験による耐食性の評価を行った。試料は溶出試験用試験片と同じもの(直径10 mm, 厚さ1 mm)を鏡面研磨して使用し、37°Cの0.9%NaCl水溶液中でアノード分極試験を行った。試験装置の外観と試料を保持する試料ホルダーの様子を図6に示す。N₂ガスバブルで30min脱気後、ポテンシオスタット(HZ-3000, 北斗電工)を用い、掃引速度 $2 \times 10^{-3} \text{ V s}^{-1}$ で分極試験を行った。対極にはPt電極、参照極には飽和カロメル電極(SCE)を用いた。比較のためAu(純金)、Cuの試料も試験に供した。

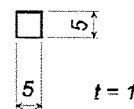
B.5. 血小板粘着試験

健康な被験者から採取した血液(45 ml)に凝固防止剤(クエン酸ナトリウム)を5 ml添加した後、遠心分離(800 rpm, 15 min)して血球成分を分離し、多血小板血漿(PRP: Platelet rich Plasma)を得た。残った血漿をさらに遠心分離機(2500 rpm, 10 min)にかけ、血小板が少量浮遊する血漿(PPP: platelet poor plasma)とし

① 引張試験片



② 血液適合性試験片



③ 溶出試験片



図5 引張試験片, 血液適合性試験片, 溶出試験片の寸法

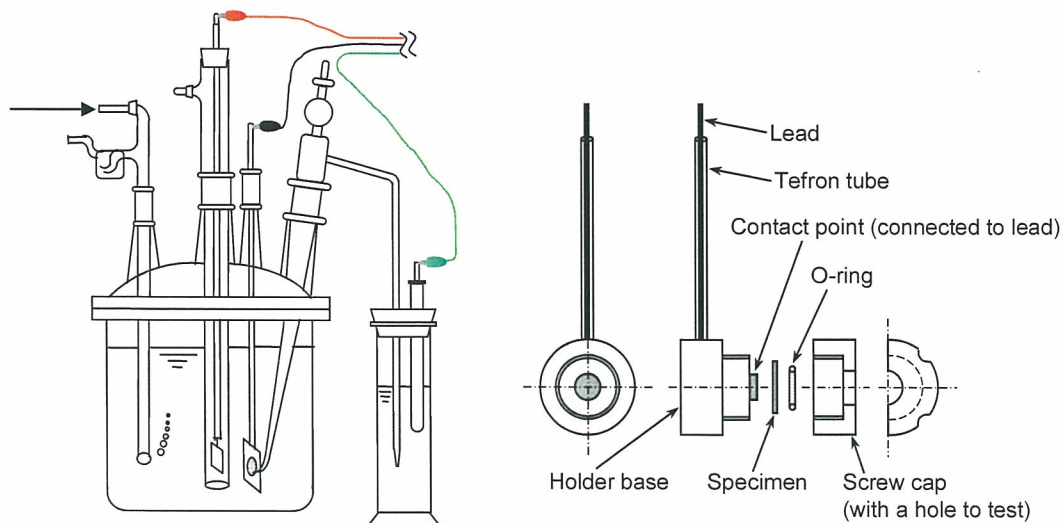


図6 アノード分極試験装置の外観(左)と試料ホルダー

た. 両者の血小板数を計測した後, 両者を適量混合することによって血小板数を 3.9×10^5 個/ μL に調整し, 0.25 mol L^{-1} の塩化カルシウムを添加(混合溶液 2 ml に対して 0.17 ml の塩化カルシウムを添加)した血小板溶液を実験に用いた.

この血小板溶液 $200 \mu\text{L}$ を鏡面研磨した試料 ($5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, 厚さ 1 mm) の上に滴下し, 37°C のインキュベータ中に所定時間 (5 min, 20 min) 保存した. 所定のインキュベーション時間経過後, PBS(-) で洗浄し, グルタルアルデヒドに浸漬して 2 day 固定したものを PBS(-) で再び洗浄し, 乾燥後, 濃度 (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) の異なるアルコールで順次脱水したものに, 厚さ約 25 nm の Au を蒸着して SEM 観察した.

比較材として, ステント合金として使用されている Ti-Ni 超弾性合金と 316L 型のステンレス鋼, ならびに生体用合金として使用されている純 Ti と Co-Cr 合金を同時に試験に供した. (倫理面への配慮)

この研究の一部には, 健康なボランティアから採取したヒト全血から調整した多血小板血漿を使用している. 多血小板血漿を使用した実験については, 東京医科歯科大学生体材料工学研究所の倫理審査委員会に審査を申請し, ヘルシンキ宣言の趣旨を尊重した実施計画書に基づいた実験の実施に関する承認を得ている. この実施計画書の中では, 研究協力者に対して, 文書によって説明し, 同意を得ることが明記されており, 倫理面で最大限の配慮がなされている.

表2 引張試験で評価した各合金の力学的性質

合金名	8Pd	10Pd	12Pd	14Pd	16Pd	1Ag	2Ag	3Ag
最大引張強さ (MPa)	300.0	318.0	329.6	353.2	372.0	294.7	312.8	134.3
破断伸び (%)	10.3	11.3	11.3	10.8	11.8	6.7	7.8	11.1

C. 研究結果

C.1 力学的性質の評価

各合金の最大引張強さ(UTS)と破断伸び(ϵ_r)を表2に示す。

図7に二元系合金の最大引張り強さを示す。Pdの添加濃度が増加するのに従って、最大引張強さが約300 MPaから約370 MPaまで増加しているのが認められた。

図8に三元系合金の最大引張強さのAg濃度依存性を示す。Ag添加による固溶強化は認められず、3mol%Agを添加した合金で強さの低下が認められた。しかしながら、図9に示したように、Ag添加の主たる目的であった延性の改善は認められ、3%のAg添加で二元系合金と同じレベルの延性を得ている。

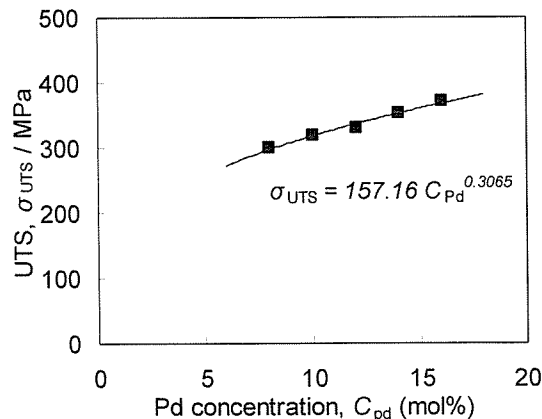


図7 二元系合金の最大引張強さのPd濃度依存性

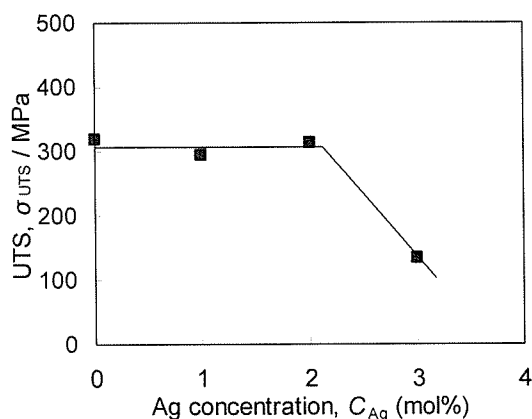


図8 三元系合金の最大引張強さのAg濃度依存性

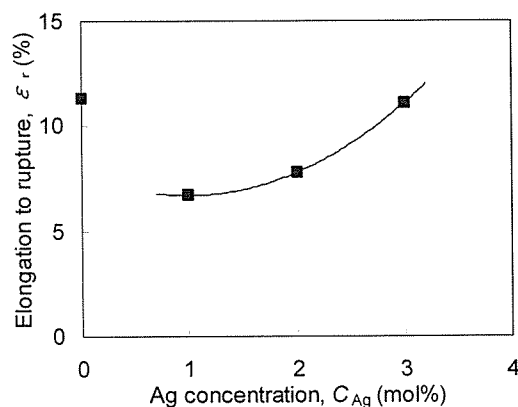


図9 三元系合金の破断伸びのAg濃度依存性

C.3. アノード分極試験による耐食性の評価

本研究の範囲でもっともPd濃度の高い12Pd合金のアノード分極の結果を図11に示す。試料を溶液に浸漬後、自然電極電位に安定するのを確認した後、-1.0 V vs. SCEから1.0 V vs. SCEまで掃引したが、およそ0.8 V vs. SCE付近までアノード電流が計測されなかった。

C.4. 血小板粘着試験

開発したAu-Pd合金の血小板粘着試験のSEM観察結果を図12に示す。5 min インキュ

ベーションした試料では、8Pd合金から12Pd合金までは、血小板の粘着は少なかった。

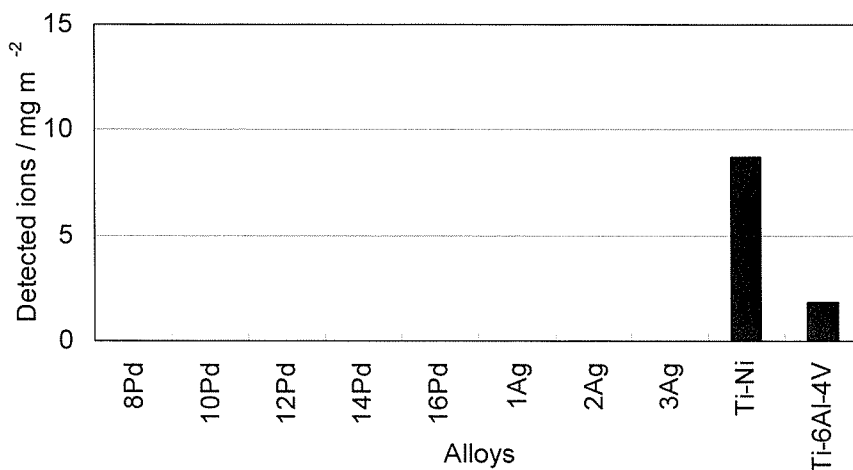


図 10 各合金の 0.9%NaCl 水溶液中での溶出試験の結果(37°C, 3週間).

14Pd 合金と 16Pd 合金で粘着量の増加が認められた。20 min インキュベーションした試料でも同様の傾向が見られた。

比較材のステンレス鋼では、8Pd 合金から 12Pd 合金に比べ血小板の粘着がやや多く、また一般に生体適合性が良好な純 Ti の場合、フィブリン・ネットワークの形成がとくに顕著であった。

D. 考察

D.1 力学的性質の評価

二元系合金では Pd の添加濃度が増加するのに従って、最大引張強さが約 300 MPa から約 370 MPa まで増加しているのが認められた。今回の試験の範囲ではすべての試料はインゴット溶製後、圧延したままの状態、熱処理を行っていないため、Au 固溶体の圧延組織であり、析出強化の影響は見込まれない。このことから、この二元系での強さは主として Pd の固溶体強化によるものだと考えられる。またこの強化にともなう顕著な延性の低下は認められない。

低濃度固溶体の固溶強化理論は合金種によって種々報告されている。たとえば溶質原子濃度の 1/2 乗～1/3 乗に比例するとするものが多いが、ここでは実験データを最小二乗法近

似した結果から、Pd 原子濃度の約 0.3 乗に比例する式に近似できる。その結果を図 7 中に示した。

図 8 に示したように Ag 添加による固溶強化は認められず、3mol%Ag を添加した合金で強さの低下が認められた。しかしながら、図 9 に示したように、Ag 添加の主たる目的であった延性の改善は認められた。

今後は強さと延性のバランスのよい合金設計に資するため、Au-Pd-Ag 三元系の相安定性情報の調査を含め、適切な Ag 添加量の検討が課題のひとつとなる。

以上の結果から、Au-Pd 二元系合金では Pd の添加により、溶質濃度のおよそ 0.3 乗に比例した固溶強化が認められ、Au-Pd-Ag 三元系

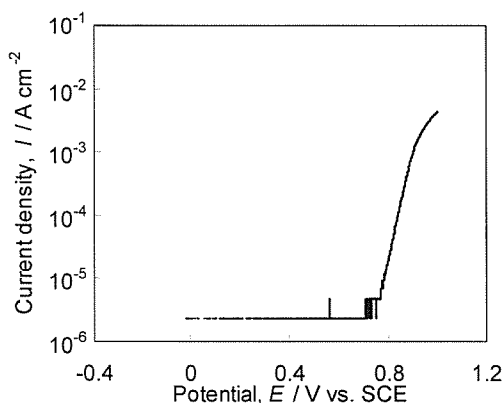


図 11 0.9%NaCl 水溶液中での 12Pd 合金のアノード分極曲線

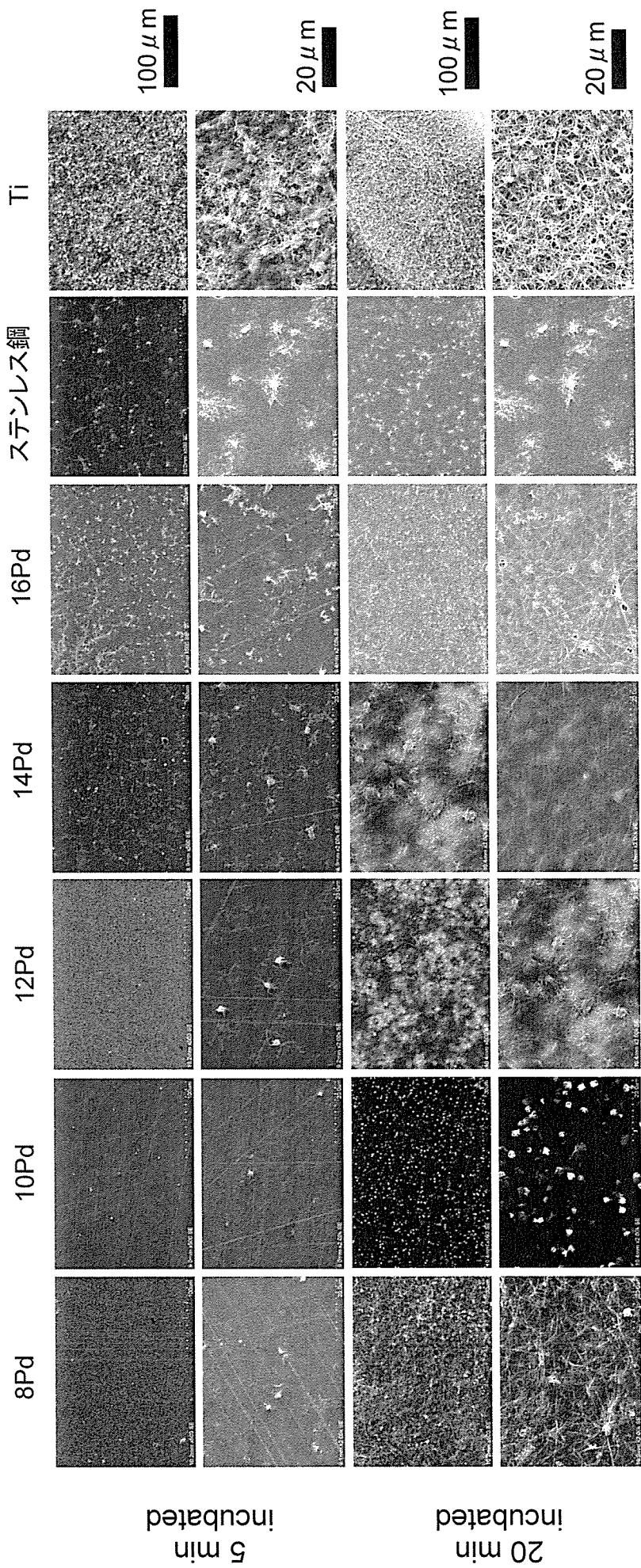


図12 血小板粘着試験の結果