

れている NM もある。

NM と一言にいても、化学組成、結晶構造、形状、サイズの異なるものが開発されてきている。また、親水性のものもあれば、疎水性のものもあり、水への分散様式も異なる。本年度の研究では、カーボン系の NM を試料として選択した。

B. 研究方法

1. ナノマテリアル

1-1. NHas

単層カーボンナノホーン (JST&NEC 湯田坂雅子先生提供)。図 1 の左端模式図のように炭素原子のみからなる先の閉じた形状をしているが、これが単独で存在することはない、中央の写真のように平均直径 50–100 nm の凝集体として存在する。右端の写真が模式図とほぼ同じ大きさで観察される NHas の電顕写真である。

1-2. CNT-1

多層カーボンナノチューブ (中国シンセン・ナノテクノポート社製、ロット CNT-L-1030、図 2 上段参照)。

1-3. CNT-1*

CNT-1 を図 3 に示すハイブリダイザーで高速気流中衝撃法 10 分間処理により表面改質処理を施したもの [3] で、乾燥状態では、平均粒子径 2.8 μm の凝集体となっている (図 2 下段参照)。

1-4. CNT-2

多層カーボンナノチューブ (三井 Lot. 05072001k-28)。

2. 細胞

当研究室で維持している、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 (CHL) を用いた。医薬品をはじめとする各種化学物質の非臨床安全性試験で標準的に使用されている細胞株である。細胞は 10% 牛胎児血清添加 MEM 培地で、5% 炭酸ガス、飽湿 37°C 条件

下で培養した。

3. 細胞毒性試験

24-well プレートに、50 細胞/well の CHL 細胞を播種し、翌日、NM を添加し、そのままさらに 7 日間培養を続け、形成されたコロニーをメタノールで固定、ギムザ染色を行った後カウントした。コントロール群のコロニー数を 100% とした時の、処理群の相対コロニー数 (Survival %, 平均値 \pm SD, $n=4$) で細胞毒性を表示した。

4. 染色体異常試験

直径 60 mm のプラスチックシャーレに 1×10^5 /plate の細胞を播種し、翌日 NM を添加、24 時間または 48 時間処理後に染色体標本作製した。ギムザ染色後、広がりの良い分裂中期細胞 100 個を観察し、染色体構造異常と数的異常を記録した。

5. ナノマテリアル分散液の調製

秤量した NM をそのまま培地に懸濁したが、NHas のみは少量の DMSO (細胞処理時の最終濃度 0.5% 以下) に懸濁後、培地に懸濁した。その後 20 秒間、卓上型超音波洗浄機 (W-113MK-II, 爆洗, 110 W, 本多電子株式会社) にかけた。50 W の投入型超音波発生装置は Vibra cell (Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA) を用いた。200 W の投入型超音波発生装置は、UR-200P (トミー精工) を用いた。いずれも、分散液容器を氷中に保持しながら、温度上昇の影響をうけないように、ナノマテリアルを分散させた。

6. 分散液中のナノマテリアルの粒子径測定

5. の分散方法を用いても、 μm レベルの凝集体が存在することから、レーザ回折/散乱式粒子径分布測定装置 LA-950 (堀場製作所、測定粒子径範囲 10 nm–3 μm , 測定波長

650 nm (半導体レーザー)、405 nm (LED)) を用いた。バッチ式セル (15 ml) で測定した。

7. NHas の細胞内への取込みの可視化

カバーガラス底の 3.5 cm φ プラスチックシャーレ (MatTek Corporation) に CHL 細胞を播種し、翌日 NHas 分散液を添加、20 時間処理後 formalin で固定、Triton X-100 処理、DAPI を含むグリセリン液で封入後観察した。

共焦点顕微鏡 (Olympus Fluoview FV1000) を用いて、細胞への NHas の付着等の観察を行ない、微分干渉像と蛍光像を記録後、三次元断面を再構築することにより、細胞内への粒子の取込みを確認した。

C. 研究結果

1. NHas

強い疎水性を示し、水に添加しても、水をはじき、粒子は水面より上の容器壁に付着し、懸濁液を調製することはできなかった。そこで、DMSO 少量の懸濁液にした後に、水へ添加すると全く問題なく水中に分散した。超音波の出力、処理時間の異なる 6 種の分散液を調製し、粒子径分布を測定した。図 4 に示すように、200 W 30 秒の超音波処理により調製した分散液は、0.32 μm の粒子径にピークをもち、他の分散液より粒子径の小さい分散が得られた。しかしながら、この 6 種の分散液の細胞毒性はほとんど同じで、約 1–5 μm の粒子径の割合を調べた結果、40%から 60%の間で近似していることが判明した (図 5)。また、データは示していないが、染色体異常試験の結果、構造異常も数的異常も誘発しなかった。

NHas の CHL 細胞内への取り込み観察を、招へい外国人研究者 Dr. Önfelt に共焦点顕微鏡を用いて分担してもらった。NHas は蛍光標識されていない黒い粒子であるため、微分干渉画像で解析することにした。

図 6 は、微分干渉像と DAPI 蛍光像を重ね

合わせたもので、細胞内にとりこまれている NHas (黒い凝集体、約 1 μm φ) を観察できる。青くみえるのは、DAPI で染色された核および染色体である。a–d の写真は右の模式図で示した順に底面から上部への水平方向の画像である。ほとんど底面の a では、底面にあるおおきな固まりに焦点が合っており、濃く明瞭に観察される。少し上に移動すると、b でみられるように細胞内にある NHas の凝集体に焦点が合い濃く明瞭に見える。対象細胞は分裂期にあるために典型的な染色体の配列が観察される。さらに上部の c へ行くと、内部の凝集体も観察面からはずれ、ぼやとした画像になる。d では、底面のかたまり、細胞内の凝集体、染色体、いずれも観察面にはないのでぼやとした画像になる。以上の結果、水平面 b の凝集体が細胞内に取り込まれたものであることがわかる。

2. CNT-1 及び CNT-1*

CNT-1*を用いて、3 種の超音波処理による分散液を調製し、粒子径分布を測定した (図 7)。200 W の超音波処理では、30 秒と 1 分の処理時間の粒子径に及ぼす影響は小さかった。3 種の分散液の細胞毒性は図 8 に示すように、粒子径が大きかった超音波洗浄機による分散液が若干弱い細胞毒性を示した。分散液中の 1–5 μm の粒子の存在比は、200 W 処理ではいずれも 80%と高かったが、超音波洗浄機のそれは、40%以下で明らかに低かった。

表面改質処理による細胞への影響の違いを調べるために、CNT-1 及び CNT-1*を 200 W の超音波で分散液を調製し、細胞毒性と染色体異常誘発性を比較した。図 9 に示すように、表面改質処理前の CNT-1 の方が細胞毒性は弱く、12.5 μg/ml で細胞質に空胞が散見された。同じ分散液を用いて、染色体異常試験を実施した結果、図 10 (48 時間処理の結果) に示すように、CNT-1 では数的異常 (倍

数体) が誘発されたが、明確な濃度依存性は認められなかった。CNT-1 及び CNT-1* の最高処理濃度での細胞の位相差顕微鏡写真を表の右に示しているが、CNT-1 では糸玉上に繊維が絡まったような材料が認められるが、CNT-1* では、小さな光る粒のように見える材料の凝集体が観察され、材料の形状が異なることがわかる。

3. CNT-2

CNT-2 は化学組成、鉄量、繊維の長さ等を確認しているが、ロットは異なるが文献 [1] で使用されたものと基本的には同じと考えられる CNT である。

2 種の分散液を調製し、細胞毒性を比較したところ、図 11 に示すように僅かな細胞毒性の違いを認めた。しかし、同様に繊維状の CNT-1 (図 9) よりも明らかに強い細胞毒性を示した。また、染色体異常試験の結果 (表 1)、0.5- 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という低濃度で倍数体を誘発した。

D. 考察

レーザー回折/散乱式粒子径分布測定装置は、測定対象として球を仮定しており、CNT は繊維状の形態のため、観察対象として適当ではないと考えられたが CNT-1* は凝集体が球状に近く、その分散液が当該装置でどのように測定されるかを確認するために測定を行った。図 7 に示すように、粒子径分布は、約 2.8 μm にピークをもち、これは乾燥状態で観察される平均粒子径 2.8 μm の凝集体が分散可能な最小単位であることを示唆していると考えられた。

本年度はカーボン系の 4 種の NM の試験を実施したが、同じ CNT でも細胞毒性には違いがあり、最も細胞毒性が強かったのは CNT-2 であった。カーボンナノホーンは 4 種のうちで最も細胞毒性が弱かった。これらのうち、染色体の数的異常を誘発したのは、

CNT-1 および CNT-2 であったが、細胞毒性との相関は認められなかった。むしろ、材料の形状との相関が認められた。

CNT-2 は 48 時間処理では、処理濃度すべてで倍数体を誘発した。高濃度 10 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で倍数体頻度が低下しているのは、CNT-2 の細胞毒性により細胞周期の遅延がおこり、倍数体を観察できる処理後 2 回目の分裂期細胞の頻度が低下していることによると考えられる。おそらく、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下でも倍数体の誘発は観察されると考えられるが、CNT-2 は、アスベストの 1 種クリソタイル (UICC) の当研究室での未発表データ (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、48 時間処理で 15% の倍数体を誘発) と同程度に強い倍数体を誘発する活性があると考えられる。CNT-2 のロット違いの CNT は、p53 ヘテロノックアウトマウス腹腔内投与で、アスベストの 1 種であるクロシドライトに劣らぬ中皮腫による死亡を発生させている [1]。

これまで 3 年間の研究結果を踏まえ、下記の 3 項目について提言したい。

1) ナノマテリアルの入手

・ 正確な物性情報の入手

材料の規格基準がまだ整備されていない現時点では、製造メーカーからの物性情報もできるだけ入手する必要がある。CNT の毒性は、製造工程で使用される金属触媒に由来するもので、カーボンだけから構成される CNT ではおそらく毒性はないであろうという推測もあるが、現実には純粋な CNT は入手できない。また、NM は一般的には工業製品として製造されているものであり、触媒も毒性のあるものも含めて各種使用される。製造後、触媒を揮発、あるいは洗浄等によって除けば工業製品としては問題はないわけである。工業用分散液が市販されているが、その分散剤についても同様のことがいえ、それらの多く

は毒性が強く、細胞や動物を用いる生物試験にはそのままでは使用できなかった。したがって、NM を入手する時は、分散媒、分散剤、添加剤等の情報を極力入手する必要がある。

2) 生物実験に用いるナノ分散液調製法

NM の *in vitro*, *in vivo* 生物試験の成功は、より小さな粒子径の、より均一な分散液を調製できるか否かに係っていると言っても過言ではない。

・分散媒

細胞を用いる試験系では培地を使用できるが、動物実験では投与経路によっては、培地のもつ粘性が障害になることもある。その場合は水が適切と考えられる。培地は、血清蛋白を含んでおり、これが NM の分散を助けている。一方、本研究中、投入型 200W の超音波発生装置で培地のみを処理し、その培地で細胞を処理すると細胞毒性があることが判明した。超音波の処理時間、および、超音波処理時の液量、容器の大きさについて検討した結果、液量及び容器の大きさに比して過激な超音波処理をすると、培地のみでも毒性を示した。これは、強力な超音波処理により血清蛋白質が変性をうけ、通常の培地に比べて栄養因子が低下したために、見かけ上の細胞毒性を示したのではないかと考えている。

・分散剤

独自で開発した分散剤も含めて、必ずブランク試験（分散媒および分散剤のみの試験）を実施することが必要である。天然物由来の分散剤でも、細胞には強い毒性を示すことがある。市販の分散液を購入する時にも、組成表には記載されていない、あるいは、企業秘密ということで記載されない成分が使用されることもあるため、ブランク試験は必ず実施する。

・DMSO

疎水性の NM の回収に DMSO が有効な場合がある。本研究で使用した NHas は培地に

直接懸濁すると、液の容器の壁や、ピペットの内側、外側に粒子が付着し、材料をすべて、液中に回収することは不可能であった。そこで、DMSO を秤量した材料に滴下すると、材料はきれいに、DMSO 液の中にまとまり、これをさらに培地に移しても、培地の中で均一に懸濁され、材料が容器壁や、ピペットに付着することはなかった。

・生物試験に使用した分散液の分散に関する物理的情報の呈示

高出力の超音波の方が分散効果はあるが、調製された分散液の粒子径分布は必ずしも再現性はよくなかった。NM の分散状態を制御することは容易ではない。そのため、試験に使用した分散液そのものの粒子径等を測定し、分散状態の指標として報告書に記載する必要があると考えられる。NM の分散状態を客観的に示す指標としては、調製分散液の写真、処理液中での粒子の写真（スケール付き）、粒子径分布、その他工学的指標、データ等も考えられ、少なくともいずれか一つのデータを報告書には記載する必要があると考えられる。

・細胞内への NM 取り込み状態

平成 20 年度に報告したように、CHL 細胞が数 μm のポリスチレン粒子を 10 個以上も取り込んでいることを電子顕微鏡写真で確認できた。NM の凝集体も同様に細胞内に取り込まれる可能性は高いと考えられる。平成 20 年度に報告したように、NM での処理後にリンスした細胞の位相差顕微鏡像でも、また、フローサイトメータでの側方散乱光の測定も、取り込みを示す有力な情報となる可能性が高い。特に、後者では半定量的なデータを得られる。

・繊維状の NM の粒子径分布

当考察の最初に記載したように、繊維状 NM の糸玉状になった凝集体であれば、測定は可能であると考えられる。

・分散状態に影響を及ぼす要因

分散液調製濃度、分散時および保管時の温度、超音波の出力、超音波処理時間等が考えられるので、事前に予備検討が必要だと考えられる。超音波発生装置の出力が高ければ短時間の処理で、出力の弱い装置では長時間の処理で、同等の分散効果を示す場合もある。

3) 実験室でのナノマテリアル取り扱い上の注意

一般的な話になるが、現時点では未だ各種NMの安全性が確認されてはおらず、その取り扱いは慎重に行うべきであろう。特に、秤量等で材料そのものを取り扱う時には、防護メガネ、マスク、手袋の着用を習慣づけることが望まれる。

E. 結論

本研究はNMの安全性を簡便にスクリーニングできる評価系の提案を目標としていた。生物試験系とNM分散液調製法を含めてである。NMの物理学的特性の多様さのために、後者について一般的な方法を提案することはできなかった。しかしながら、前者については、一次スクリーニングとしては、従来の試験方法、例えば本研究で用いた、細胞毒性試験、染色体異常試験でも十分対応可能と考えている。

問題は、いかに粒子径の小さな、いかに均一な分散液を調製できるかに係っていると考えられる。さらに、製造時にはNMではあるが、我々の回りでは、凝集体として存在することが多く、その「あり姿」としてのNMの安全性評価も重要であると考えられる。

安全性を評価する「ものさし」となりうる標準的な生物試験法、標準的な分散液調製法を提案するために今後も研究を継続したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuoka, A., A. Önfelt, Y. Matsuda, R. Nakaoka, Y. Haishima, M. Yudasaka, S. Iijima, T. Tsuchiya

Development of an in vitro screening method for safety evaluation of nanomaterials. Bio-Med. Mater. Engineering, 19, 19-27 (2009)

2) 山田貴史、山越葉子、石川烈、石川格、土屋利江、松岡厚子

V79 細胞および正常ヒトアストロサイトに対するフラレーンとカーボンナノチューブおよびその誘導体の細胞毒性
国立医薬品食品衛生研究所報告 127, 39-43 (2009)

3) Yamada, T., R. Nakaoka, R. Sawada, A. Matsuoka, T. Tsuchiya

Effects of intracerebral microinjection of hydroxylated-[60]fullerene on brain monoamine concentrations and locomotor behavior in rats. J. Nanoscience Nanotechnol. 10, 604-611 (2010)

2. 学会発表

1) Matsuoka, A.: In vitro induction of numerical chromosome aberrations by μm -size polystyrene particles

第3回ナノ材料の社会受容プロジェクト研究会 (2009年7月23日 つくば)

2) Matsuoka, A. Y. Matsuda, K. Isama, H. Sakoda, T. Tsuchiya: Polyploidy induction by five size-different polystyrene particles in a Chinese hamster cell line CHL

10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月 イタリア・フィレンツェ)

3) 田中勲、松岡厚子：球状カーボンナノチューブのその後—水中での形状維持・細胞への影響—

第10回表面改質夏季フォーラム (2009年8月28日 山形)

- 4) 松岡厚子 : IANH round robin test の現状と
今後の日本グループの対応について
平成 21 年度 第 4 回ナノ材料の社会受容
プロジェクト研究会 (2009 年 10 月 26 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 文献

- [1] A. Takagi et al., Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, *J. Toxicol. Sci.* 33 (2008) 105-116.
- [2] J. Miyawaki et al. Toxicity of single-walled carbon nanohorns, *ACS Nano* 2 (2008) 213-216.
- [3] I. Tanaka and J. Yana, Enhancing carbon nanotubes dispersion in water using a dry impact blending method, *Mater. Tech.* 25 (2007) 83-87.

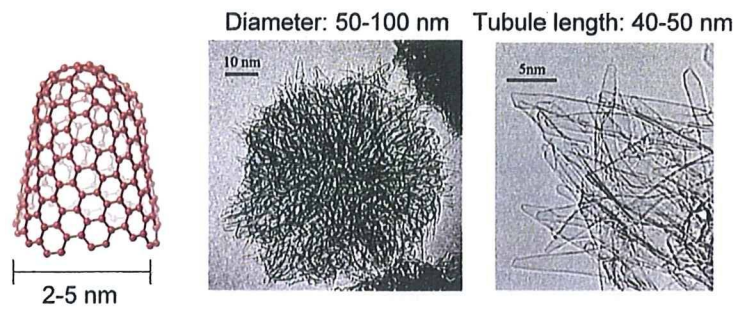


図 1 NHAsの模式図及び電子顕微鏡写真

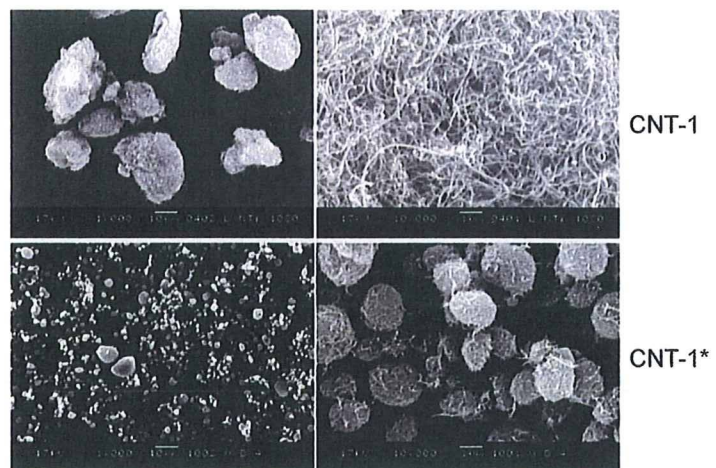


図 2 表面改質処理前後のCNT-1
(上段：表面改質処理前、下段：表面改質処理後)

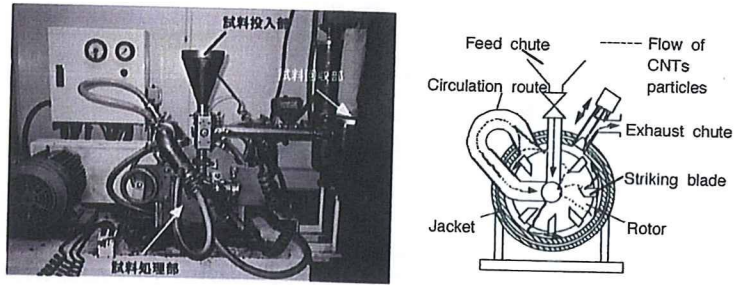
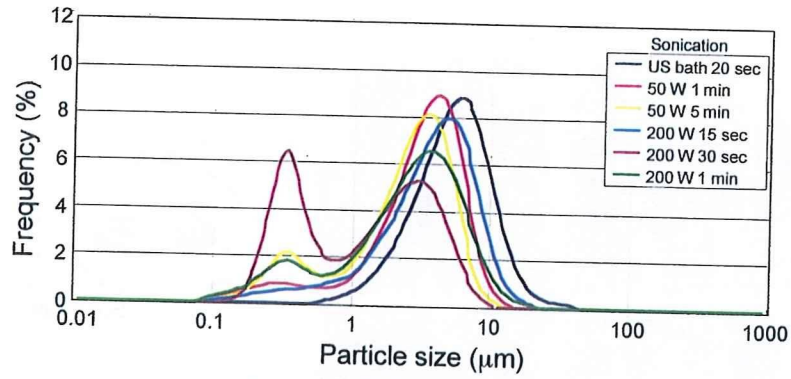


図3 奈良機械製作所製 ハイブリダイザー1型



	Mode (μm)	Median (μm)
US bath 20 sec	5.49	5.10
50 W 1 min	3.66	3.13
50 W 5 min	3.19	2.46
200 W 15 sec	4.77	3.64
200 W 30 sec	0.32	2.05
200 W 1 min	3.64	2.55

図4 NHAsの粒子径分布

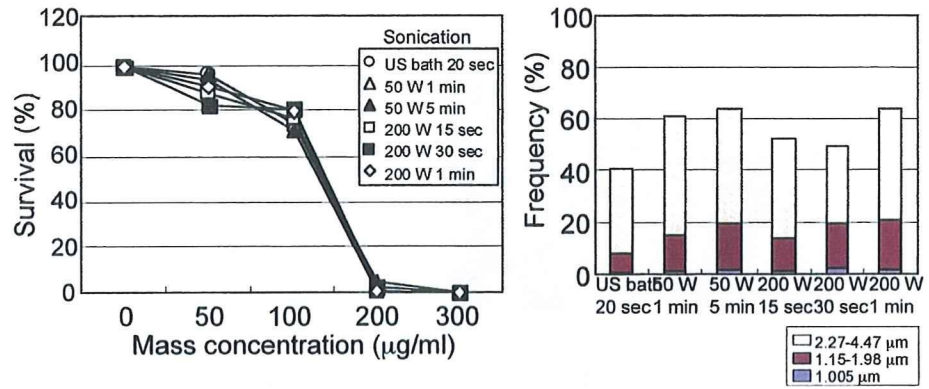


図5 NHasの細胞毒性及び分散液中特定粒子径粒子の存在比

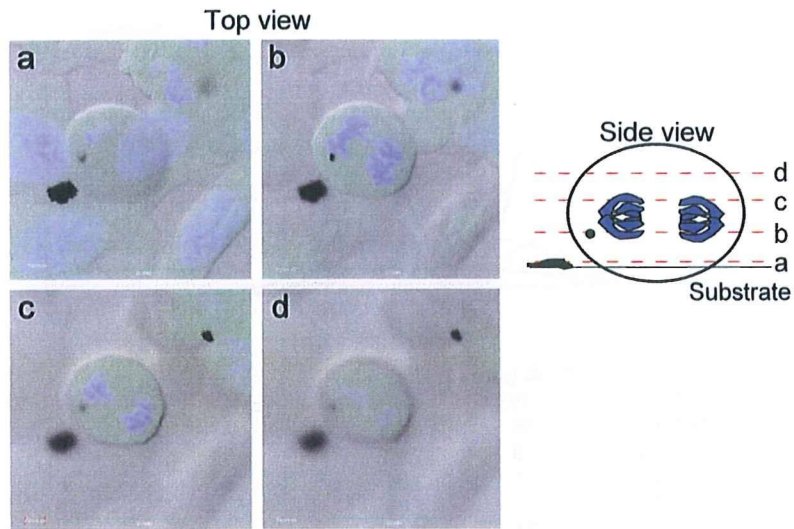
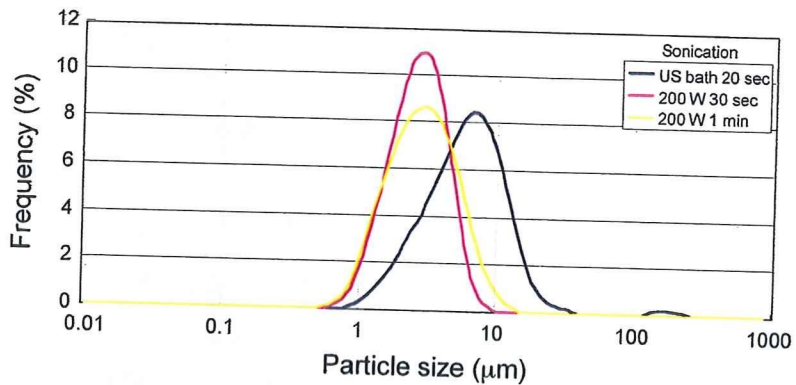


図6 NHasのCHL細胞内への取り込み



Sonication	Mode (μm)	Median (μm)
US bath 20 sec	6.28	5.64
200 W 30 sec	2.77	2.49
200 W 1 min	2.78	2.65

図7 CNT-1*の粒子径分布

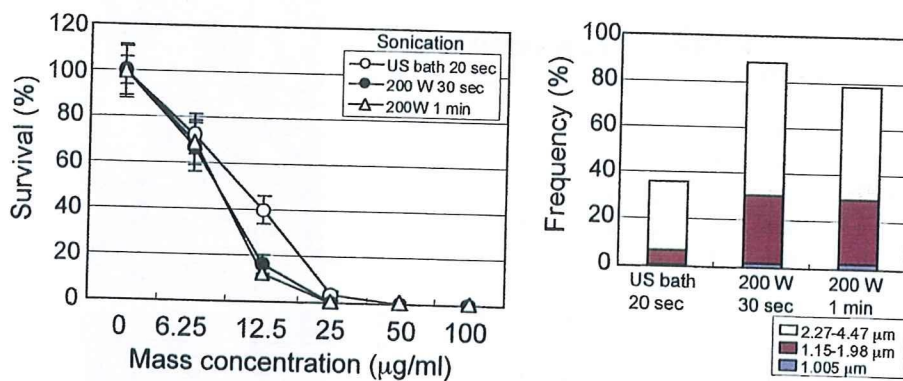


図8 CNT-1*の細胞毒性及び分散液中特定粒子径粒子の存在比

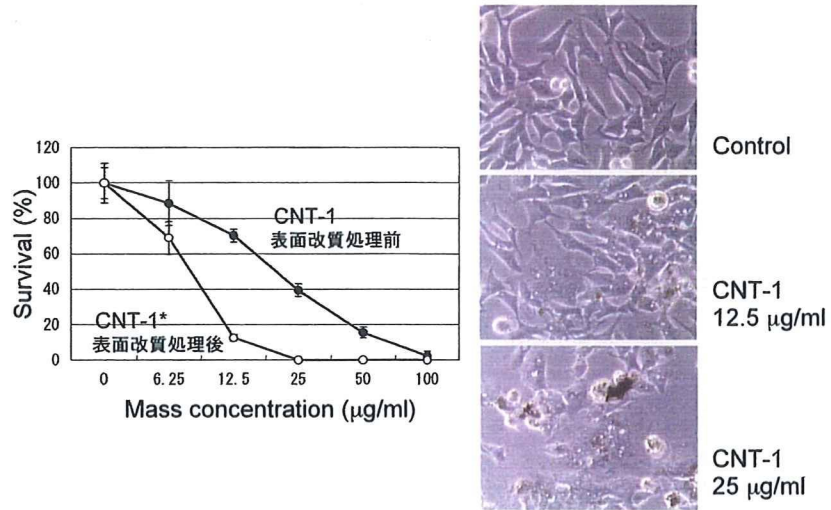


図9 CNT-1及びCNT-1*の細胞毒性並びに細胞形態

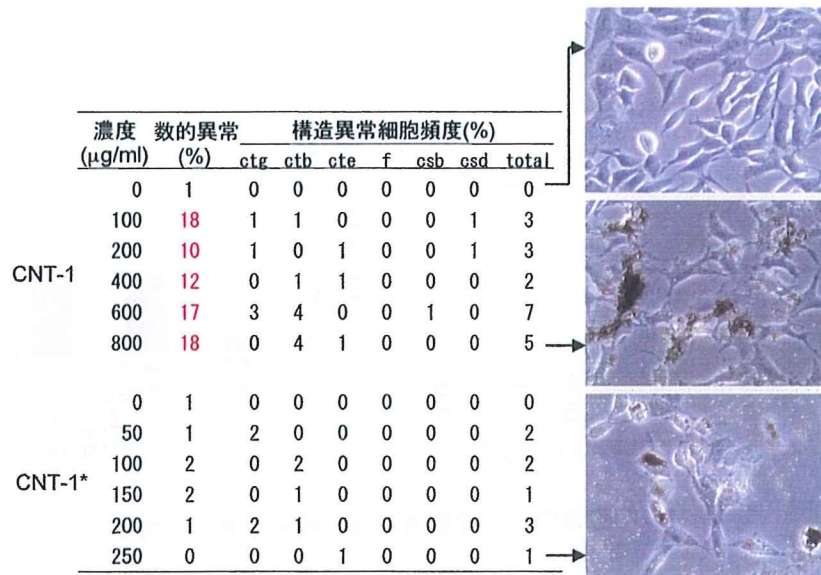


図10 CNT-1及びCNT-1*の染色体異常試験並びに細胞形態

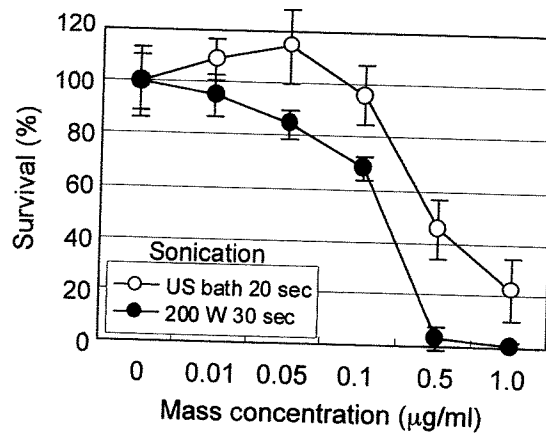


図11 CNT-2 の細胞毒性

表 1 CNT-2 の染色体異常試験 (200 W 30 sec)

T-R ^a (h)	Mass concentration (µg/ml)	Polyploid cells (%)	Cells with chromosome aberrations ^b (%)						Total
			ctg	ctb	cte	f	csb	cse	
24 - 0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	8	0	0	0	0	0	0	0
	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	5.0	3	0	0	0	0	0	0	0
	10	8.2	0	0	0	0	0	0	0
	50	2.6	0	0	0	0	0	0	0
48 - 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	23	0	1	0	0	0	0	1
	1.0	24	0	0	1	0	0	0	1
	5.0	33	1	1	0	0	0	0	2
	10	12.0	0	0	1.3	0	0	0	1.3
	50	17.0	0	4.3	0	0	0	0	4.3

^aTreatment and recovery time. ^bctg, chromatid and chromosome gaps; ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; f, fragmentation; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges. Red figures indicate positive response.

3. 骨系材料の骨結合能による リスクアセスメント手法開発

伊佐間和郎

厚生労働科学研究費補助金
(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

骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

研究分担者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所療品部第二室長
研究協力者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所療品部研究員

A. 研究要旨

アパタイト形成能が高い材料は、生体骨と直接結合でき、リスクの少ない骨系医療機器への応用が期待できる。我々は、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与するために、NaOH 処理後に CaCl_2 処理又は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理を施して、材料表面にカルシウムの導入を試みた。今回は、それら表面処理を施したチタン合金等の細胞毒性試験及び骨芽細胞適合性試験を実施し、カルシウムを導入したチタン合金等の生物学的安全性を評価した。その結果、未処理の Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示すが、NaOH 処理によって細胞毒性は認められなくなった。また、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb 及び Ti では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl_2 処理及び NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理の順に、骨芽細胞の分化レベルを促進させた。NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理は、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与するとともに、骨芽細胞の分化を促進させることが明らかになった。アパタイト形成能の定量的評価は、骨系

医用材料のリスクアセスメントに有用であることが確認された。

B. 研究目的

整形外科領域で使用される骨系埋植医療機器には、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 γ ネイル、髄内釘、人工関節などがあり、高齢者人口の増加などによってこれら骨系医療機器の使用は年々増加している¹⁾。しかし、構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって、これらの機器の不具合は増加傾向にある²⁾。特に、埋植初期に見られる機器の破損や埋植部位近傍の骨折は、埋植した機器と骨との接着不足が原因であるとされており、埋植早期に生体骨と強く結合するような性質を付与した材料が開発されてきた。その代表例として、アルカリ加熱処理を施したチタン合金が開発され、これを実用化した人工股関節は平成 19 年 10 月に製造販売承認された³⁾。今のところ、骨系医用材料の骨結合能は、主に動物実験によって評価されているが、費用や時間、動物愛護などの

観点で問題がある。したがって、動物実験に頼らず、臨床実態を反映するような骨系医用材料の骨結合能の評価法の確立が強く望まれている。

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成することが知られている。擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、埋植後に生体骨と早期に直接結合することが期待できる^{4,5)}。擬似体液を用いる医用材料のアパタイト形成能の評価法は、ISO 23317:2007: Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials として国際標準化されている。この評価法では、試験材料を擬似体液に浸漬し、走査型電子顕微鏡及び薄膜 X 線回折法を用いて、経時的に材料表面に形成するアパタイトを観察する。そのため、試験材料の形態に制限があるとともに、アパタイトが形成されるまでに要した時間での評価に留まっている。そこで、試料の形態を選ばず、定量的な解析が可能なアパタイト形成能の評価法の確立を目指した。さらに、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与する方法を検討するとともに、アパタイト形成能を付与したチタン合金の生物学的安全性を評価した。骨系医用材料のアパタイト形成能の定量的評価は、骨結合能に優れた材料の開発に有用であり、骨系医療機器のリスク低減が期待できる。

平成 19 年度は、擬似体液として

ハंकス平衡塩溶液を用いて、フーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) によるアパタイト形成能の評価を試みた。その結果、FT-IR/PAS 法は、材料表面に形成したアパタイト量を定量的に解析することが可能であった。また、Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、ハंकス平衡塩溶液浸漬によって、Nb 含量の増加と共にアパタイト形成量が減少することを明らかにした⁶⁾。

平成 20 年度は、チタン合金により高いアパタイト形成能を付与する方法として検討されている塩化カルシウムによるカルシウム導入法^{7,8)}及び我々が考案した水酸化カルシウムによるカルシウム導入法をチタン合金に適用し、これらの表面処理がチタン合金のアパタイト形成能に及ぼす効果を FT-IR/PAS 法を用いて定量的に比較した。その結果、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順にアパタイト形成能が高くなった。また、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、NaOH + Ca(OH)₂ 処理においてのみアパタイトを形成した。我々が考案した NaOH + Ca(OH)₂ 処理は、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与する方法として有効であることを明らかにした⁹⁾。

アルカリ加熱処理を施したチタン合金はすでに実用化されており、NaOH 処理したチタン合金の安全性に問題はないと考えられるが、カル

シウム導入したチタン合金の安全性は不明である。そこで、今年度は、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施したチタン合金等の細胞毒性試験及び骨芽細胞適合性試験を実施し、カルシウムを導入したチタン合金等の生物学的安全性を評価した。

C. 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 及び Ti-Zr-24Nb を用いた。各 Ti-Zr 基合金の化学組成を表 1 に示した。また、それらの合金を構成している元素の純金属として、Ti、Zr 及び Nb を用いた。さらに、従来から骨接合材に汎用されているチタン合金として、Ti-6Al-4V を用いた。

いずれの試験材料も直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円盤状に加工した後、#400、#800 及び #1200 の順にシリコンカーバイト製耐水研磨紙を用いて、純水中で表面研磨仕上げを施した。その後、酢酸エチル、アセトン、エタノール及び超純水の順に超音波洗浄した。

2. 表面処理

試験材料をポリプロピレン製容器に入れ、5 mol/l 水酸化ナトリウム溶

液（和光純薬工業株式会社）17.5 ml を加えて、温度 60.0°C で 24 時間静置した（NaOH 処理）。

NaOH 処理した試料をポリプロピレン製容器に入れ、0.1 mol/l 塩化カルシウム溶液 17.5 ml を加えて、温度 60.0°C で 24 時間静置した（NaOH + CaCl₂ 処理）。

前述の NaOH + CaCl₂ 処理とは別に、NaOH 処理した試料をポリプロピレン製容器に入れ、0.01 mol/l 水酸化カルシウム溶液 17.5 ml を加えて、温度 60.0°C で 24 時間静置した（NaOH + Ca(OH)₂ 処理）。

3. 蛍光 X 線分析 (XRF)

三次元偏光光学系を持つエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 PANalytical Epsilon 5（スペクトリス株式会社）を使用した。試料を厚さ 4.0 μm のプロレンフィルム（Chemplex Industries, Inc.）に挟んでサンプルカップに固定し、真空雰囲気中で表 2 に示した条件で測定した。ファンダメンタルパラメーター法を用いて、試料表面のカルシウム濃度を求めた。

4. 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、直接接触法によるコロニー法を用いて試験した。

4-1. 対照材料

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。

4-2. 細胞株及び培地

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 Minimum Essential Medium (MEM 培地、Invitrogen Corp.) に、10% 牛胎児血清を加えた。

4-3. 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 1/15 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.4) で 20 倍に希釈して各ウエルに加え、形成したコロニーを染色した。

4-4. 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 (コロニー形成率、%) を算出した。

5. 骨芽細胞適合性試験

試料の上で直接骨芽細胞を培養し、骨芽細胞の増殖及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。

5-1. 細胞株及び培地

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、Alpha Modified Minimum Essential Medium (α -MEM 培地、Invitrogen Corp.) に、5 mmol/l β -グリセロリン酸ナトリウム及び 10% 牛胎児血清を加えた。購入した NHOst 細胞は、良好に増殖し、さらに、2 週間培養後に顕著な ALP 活性及び石灰化ノジュール形成を示すことを確認した上で実験に使用した。

5-2. 骨芽細胞の培養

試料の金属材料を、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 10⁴ 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^{10,11)}。

5-3. 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。ウエ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、ウエル当たりの相対細胞数を求めた^{10,11)}。

5-4. 細胞分化の測定

骨芽細胞の分化の指標として、ALP 活性を測定した。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 mmol/l パラニトロフェニルリン酸、10 mmol/l $MgCl_2$ 、0.1 mmol/l $ZnCl_2$ を含有する 0.1 mol/l グリシン緩衝液 (pH 10.5) 1 ml をウエルに加え、37°C で 15 分間反応させた。ウエ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エル当たりの相対 ALP 活性を求めた¹⁰⁾。

D. 研究結果

1. カルシウム導入量

XRF 分析を用いて、未処理、NaOH 処理、NaOH + $CaCl_2$ 処理及び NaOH + $Ca(OH)_2$ 処理を施した各試験材料の材料表面のカルシウム濃度を測定した (図 1)。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、NaOH + $CaCl_2$ 処理及び NaOH + $Ca(OH)_2$ 処理により試料表面にカルシウムを導入できたが、NaOH + $CaCl_2$ 処理に比べて、NaOH +

$Ca(OH)_2$ 処理の方がカルシウム導入量は約 2 倍高かった。一方、Zr は、NaOH + $CaCl_2$ 処理ではカルシウムを導入できず、NaOH + $Ca(OH)_2$ 処理ではカルシウムを導入できた。また、Nb はどちらの処理法でもカルシウムを導入できなかった。

2. 細胞毒性

直接接触法によるコロニー法を用いて、未処理、NaOH 処理、NaOH + $CaCl_2$ 処理及び NaOH + $Ca(OH)_2$ 処理を施した各試験材料の細胞毒性を評価した (図 2)。未処理の Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示したが、NaOH 処理、NaOH + $CaCl_2$ 処理及び NaOH + $Ca(OH)_2$ 処理を施した Ti-6Al-4V の細胞毒性は、いずれもほぼ問題のないレベルであった。その他の試験材料は、未処理、NaOH 処理、NaOH + $CaCl_2$ 処理及び NaOH + $Ca(OH)_2$ 処理のいずれにおいても、細胞毒性は認められなかった。試料上に形成したコロニーの大きさにも特段の相違は認められなかった。

3. 骨芽細胞適合性

正常ヒト骨芽細胞用いて、未処理、NaOH 処理、NaOH + $CaCl_2$ 処理及び NaOH + $Ca(OH)_2$ 処理を施した各試験材料の骨芽細胞適合性を評価した (図 3 及び図 4)。

試料の上で 2 週間培養した NHOst 細胞の細胞数を図 3 に示した。細胞数は未処理の Ti-6Al-4V に

おける細胞数に対する相対値で示した。未処理の Ti-6Al-4V と比べて、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した Ti-6Al-4V ではいずれも細胞数が増加した。その他の試験材料では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理のいずれにおいても細胞数に相違は認められなかった。

試料の上で 2 週間培養した NHOst 細胞の ALP 活性を図 4 に示した。ALP 活性は未処理の Ti-6Al-4V における ALP 活性に対する相対値で示した。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順に、ALP 活性の増加傾向が認められた。その他の試験材料では、未処理の Ti-6Al-4V と比べて ALP 活性が高かったものの、処理の有無による ALP 活性の相違は認められなかった。

E. 考察

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¹²⁾。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¹³⁾。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大きな特徴がある。また、Ti-Zr-Nb 合金を構成する元素である Zr 及び Nb は、合金の表面に形成される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、耐腐食性の向上に寄与する^{1,14)}。さらに、我々は、Ti-Zr-Nb 合金は細胞毒性が無く、骨芽細胞適合性も高いことを明らかにした¹⁵⁾。また、ラットを用いた動物実験で、骨に埋植しても炎症反応を起こさず、骨組織適合性にも問題が無いことを確認した¹⁶⁾。

一般に金属は、セラミックスのように骨と直接結合しない。そこで、骨の無機成分に類似したアパタイトコーティングや表面改質などにより、金属に骨と直接結合するような性質を付与する研究が活発に行われている¹⁷⁾。骨と直接結合する材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。したがって、擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる^{4,5)}。実際、動物実験によって、擬似体液中でのアパタイト形成能は、生体内での骨結合性をよく再現できることが確認されている¹⁸⁾。

チタン合金に骨結合性を付与する表面処置法として、アルカリ加熱処理技術が開発され、人工股関節に応用されている³⁾。さらに、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討されている^{7,8)}。チタン合金は、水酸化ナトリウム処理により、チタン酸水素ナトリウムの層が材料表面に形成される¹⁹⁾。その後、塩化カルシウム溶液に浸漬す

ると、ナトリウムイオンがカルシウムイオンと置換してチタン酸水素カルシウムに変化し、アパタイト形成能がより高くなる^{7,8)}。我々は、アルカリ性条件下でカルシウムへの置換が可能な水酸化カルシウム溶液によるカルシウム導入法について検討した⁹⁾。その結果、NaOH + Ca(OH)₂ 処理は、NaOH + CaCl₂ 処理に比べて、材料表面へカルシウムを多く導入することができ、カルシウム導入量が多いチタン合金は高いアパタイト形成能を示した⁹⁾。

未処理の試験材料において、従来の試験結果と同様に、Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示し、その他の試料に比べて骨芽細胞の増殖が低かった。これは、Ti-6Al-4V を構成する元素のひとつであるバナジウムに強い細胞毒性があることに起因する。しかし、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した Ti-6Al-4V は、細胞毒性が弱くなり、骨芽細胞の増殖も増加した（図 2 及び図 3）。Ti-6Al-4V において、バナジウムの細胞増殖への影響が NaOH 処理によって抑制されたものと考えられる。

NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、未処理のそれらと比べて、骨芽細胞の ALP 活性を増加させた（図 4）。さらに、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、カルシウム導入量が

高い試料は、その上で培養した骨芽細胞の分化レベルを促進させる傾向が認められた（図 5）。昨年度の研究で、表面処理によりカルシウム導入量が高い試料は、高いアパタイト形成能を示すことが確認されている。また、生分解性材料のひとつであるポリ乳酸にガンマ線を照射すると、照射線量の増加とともに、アパタイト形成能が増加し、さらに、その上で培養した骨芽細胞の分化は促進した^{20,21)}。チタン合金においても、細胞毒性が無く、アパタイト形成能が高い材料は、骨芽細胞の分化を促進させることが示された。これらのことから、材料のアパタイト形成能は、骨芽細胞の分化に関与すると考えられる。したがって、材料のアパタイト形成能を定量的に評価することは、骨結合性を有する材料の開発に必須であるとともに、骨系医用材料のリクスアセスメントに有用である。

F. 結論

NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施したチタン合金等の細胞毒性試験及び骨芽細胞適合性試験を実施し、カルシウムを導入したチタン合金等の生物学的安全性を評価した。その結果、未処理の Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示すが、NaOH 処理によって細胞毒性は認められなくなった。また、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb 及び Ti では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順