

Table 2. Cytotoxicity of various non-corrective and decorative contact lenses estimated by V79 cell colony assay utilizing a tissue culture insert (All data are expressed as an average percent ratio against that of a control group \pm S.D. (n=3))

Sample No.	Viability of V79 cells (% vs control)
1	119.6 \pm 12.9
2	117.5 \pm 12.4
3	96.9 \pm 9.4
4	101.0 \pm 21.7
5	105.2 \pm 16.4
6	33.0 \pm 19.9 *
7	113.4 \pm 28.6
8	101.0 \pm 12.9
9	113.4 \pm 9.4
10	94.8 \pm 21.7
Negative Reference Material	
Polystyrene	84.5 \pm 7.1
Positive Reference Materials	
ZDEC	0.0 \pm 0.0 *
ZDBC	0.0 \pm 0.0 *
Control	100.0 \pm 18.1

Italic number: Observed colonies are very small compared to that observed in a control group
* p<0.01 against a control group

コロニー形成率の明らかな低下が認められたものはNo.6のみで、その他のコンタクトレンズではコロニー形成率の低下は認められなかった。

No.6のレンズによるコロニー形成率低下の原因に関してさらに検討を加える目的で、No.6を含めていくつかのレンズを選び、それらのレンズから調製した培地抽出液の毒性を検討した (Fig.1)。なお、別に細胞代謝活性評価を行ってその低下が認められなかったレンズ (No.1,

2及び7) は細胞への悪影響がないと判断し (未公開データ)、この検討からは除いている。Fig.1から明らかなように、No.3及び6の抽出液においてコロニー形成率の低下が認められ、算出したそれぞれのIC50は約80%、89%であった。

Table 2に示されるinsertを用いた試験ではNo.3の細胞毒性が検出されなかったが、これはこの試験での抽出条件が3.5から4.2 cm²/mlの表面積/抽出培地比であり、レンズ抽出液調製時と比較して表面積/抽出培地比が小さい抽出条件下であったことが一因と考えられる。Fig.1において、この比に相当する抽出液濃度 (58%) でのコロニー形成率は No.3では同レベルであったが、No.6では高くなっている。このことから、No.6では時間とともに多くの細胞毒性物質が培地中に溶出されており、その結果、Table 2で示されたように毒性が検出されたと考えられる。よって、表面積/培地比を同じにすることが可能であれば、insertを用いた試験法は抽出液を用いた手法よりも感度が高い手法であると考えられるが、insertを用いた試験法で評価する場合、IC50で細胞毒性強度を定量的に示しうる抽出液を用いた試験法との併用が望ましいことも示された。

抽出液でコロニー形成率の低下が認められたNo.3及び6と形成率低下が認められなかったもののうち No.5及び10の保存液の細胞毒性を検討した (Fig.2)。その結果、No.3及び6の保存液でコロニー形成率の減少が認められ、これらの保存液に細胞毒性があることが示された。製品パッケージや説明書にはこの保存液の詳細に関する記述はないが、長期保存を可能にするための防腐剤などが含まれている可能性があり、レンズ中に残存している保存

Fig.1. Cytotoxicity of extracts prepared from various non-corrective and decorative contact lenses. All data are expressed as average percent ratio against that of a control group (without adding the extracts) \pm S.D. (n= 4).

* p<0.01 against the result obtained from a control group

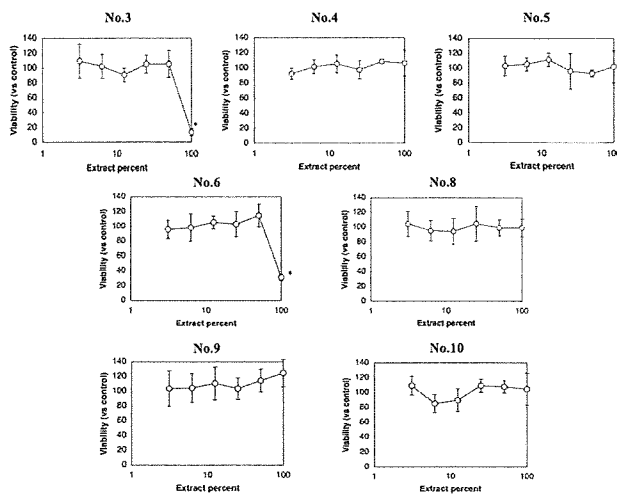
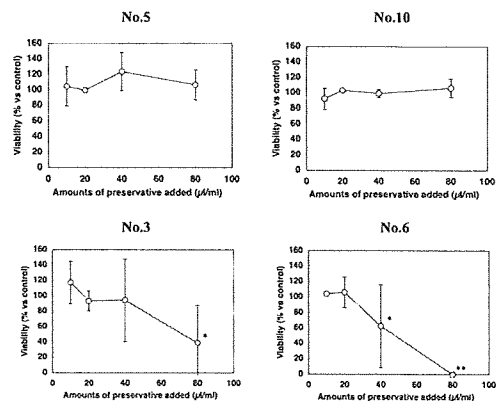


Fig.2. Cytotoxicity of preservatives for various non-corrective and decorative contact lenses. All data are expressed as average percent ratio against that of a control group (without adding preservatives) \pm S.D. (n= 3). Upper figures are results of preservatives of the lenses from which extracts did not show cytotoxicity. Lower figures are results of preservatives of the lenses from which extracts showed cytotoxicity

* p<0.05, ** p<0.01 against the result obtained from a control group



液中の防腐剤に起因した細胞毒性のためにコロニー形成率が低下している可能性は否定できない。このレンズの正確な含水量は不明であるが、今回用いたレンズで含水率が明記されていたもので最も高い含水率 55 % のレンズの場合には、そのレンズ中の保存液量は多く見積もっても 19.9 μl 程度となることが分かっている。抽出液は 10 枚のレンズに対して 6.9 ml の培地を加えて調製していることから、含水率 55 % の 100 % レンズ抽出液中の保存液の濃度は約 28.0 $\mu\text{l/ml}$ と算出できる。No.3 及び 6 のレンズ含水率は 42 % であるため、上述したレンズ抽出液と比べ、保存液濃度は低いと考えて差し支えない。よって、含水率 55 % での最大濃度である 28.0 $\mu\text{l/ml}$ を超えることは考えられず、No.3 及び 6 の保存液濃度がその濃度 (28.0 $\mu\text{l/ml}$) であっても 100 % 抽出液で見られたようなコロニー形成率の大きな低下は認められないことから、No.3 及び 6 の抽出液で示されたコロニー形成率の低下は、保存液中にもともと含まれている可能性のある防腐剤などではなく、レンズ材料から抽出される物質、すなわちコンタクトレンズ自体に起因したものであることが予想される。

では、このコロニー形成率の低下を示した物質は何であろうか？保存液中の溶出物に関して検討した結果、ほぼ全てのレンズの保存液中にメタクリル酸モノマーが検出されること、しかしながら、メタノールを用いた溶出試験からメタクリル酸モノマーのさらなる溶出はなかったこと、一方、細胞毒性が示唆された No.3 及び 6 と細胞毒性が認められなかった No.9 及び 10 ではいずれも色素が溶出することが報告されている¹⁾。Fig.2 の結果と報告されているモノマー量¹⁾との間には相関が見られなかったことから、メタクリル酸モノマーが細胞毒性の原因である可能性は小さい。しかしながら、メタクリル酸やメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルモノマー、あるいはこれらのモノマーからなる低分子量のオリゴマーが培地中に溶出している可能性は否定できない。また、溶出が認められた色素の毒性に関しては全く未知であるが、No.3 及び 6 に使用されている色素が細胞毒性試験中に培地中に溶出してくることによりこれらのレンズが細胞毒性を示している可能性もある。特に、血清含有培地での抽出では、水溶液での抽出に比べてより脂溶性の高い物質が溶出されることもあり、No.3 及び 6 には細胞毒性のある何らかの物質が材料中に残存している可能性が考えられ、さらに詳細な分析を行う必要がある。

以上、本研究に用いた検体中でコンタクトレンズ自体に細胞毒性があると考えられるものは No.3 と 6 であった。おしゃれ用カラーコンタクトレンズの使用に伴う不具合の症状は詳細に報告されているものの、今回用いたレンズが実際に不具合を起こしたものと同じであるかは不明

である。

また、一部のコンタクトレンズ製品中の保存液には細胞毒性が認められた。今回認められたコンタクトレンズの細胞毒性との関連性はほとんどないと判断されたものの、その組成に関する詳細な記載がないことから、保存液で観察された毒性の原因について判断及び考察を行うことができなかった。防腐剤などが添加されていることは、有効期限が数年になるものもあることから容易に想像はできるものの、その化学物質が目への適用が認められているかどうかなどが明らかにされていないことは、規制対象外の製品とはいえ問題である。毒性物質のレンズへの吸着による眼粘膜への毒性作用の持続なども危惧されるため、レンズの保存液に関しても、今後は詳細な記載を要望するなど何らかの対応が必要かもしれない。

おしゃれ用カラーコンタクトレンズによる不具合は、これらの細胞毒性だけでなく材質の様々な特性にも起因する可能性が、本研究で細胞毒性が示されなかったレンズを用いての装用試験によって示唆されている¹⁾。角膜層はデリケートな部位のためレンズの物性や形状によっては簡単に障害を生じることを考慮すると、おしゃれ用カラーコンタクトレンズの使用には様々なリスクが潜在していると思われるため、今回行ったような細胞毒性試験を含む生物学的安全性評価を行うことが望ましいのではないだろうか。

参 考 文 献

- 1) 独立行政法人国民生活センター報道発表資料「おしゃれ用カラーコンタクトレンズの安全性 - 視力補正を目的としないものを対象に -」平成 18 年 2 月
- 2) FDA News for immediate release P02-43, October 21, 2002
- 3) Tsuchiya, T., Arai, T., Ohhashi, J., Imai, K., Kojima, H., Miyamoto, S., Hata, H., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Takahashi, M. and Nakamura, A.: J. Biomed Mater Res., 27, 885-893 (1993)
- 4) Guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices. Ministry of Health, Labour and Welfare memorandum, JIMURENRAKU Iryokiki-Shinsa No. 36 (2003.3.19).
- 5) ISO10933-5: 1999, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
- 6) Tsuchiya, T., Ikarashi, T., Arai, T., Ohhashi, J. and Nakamura, A.: J Appl Biomater., 5, 361-367 (1994)
- 7) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Arai, T., Ohhashi, J., Isama, K. and Nakamura, A.: Clinical Mater., 16, 1-8 (1994)

微小試験片を用いた人工関節用UHMWPEの疲労特性評価

迫田 秀行^{*1} 鄭 徳泳^{*1} 脇谷 滋之^{*2} 天正 恵治^{*3}
佐藤 道夫^{*1} 土屋 利江^{*1}

Fatigue test using small specimens to evaluate the fatigue property of UHMWPE.

Hideyuki SAKODA, PhD., Dukyoung JUNG, PhD., Shigeyuki WAKITANI, MD.,
Keiji TENSHO, MD., Michio SATO, PhD., Toshie TSUCHIYA, PhD.

Abstract

Highly crosslinked polyethylene (HXLPE) was developed to reduce wear on the ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) component of joint prostheses. The manufacturing process of HXLPE includes radiation crosslinking and thermal treatment to eliminate free radicals. Since these processes are known to degrade the fatigue property of UHMWPE, it might become one of the main factors limiting the durability of implants.

The fatigue property of UHMWPE has mainly been evaluated by fatigue crack propagation test using compact tension specimens. However, this cannot be applied to retrieved implants or final products due to required specimen size. Therefore, there is not sufficient data to relate the fatigue property of UHMWPE to clinical outcome. This study investigated a new test method to evaluate the fatigue property of UHMWPE of retrieved implants or final products.

Rectangular specimens were machined from virgin UHMWPE. An initial crack was created at the centre of the specimens and cyclic tensile load was applied at 1Hz by a conventional fatigue test machine. Nominal stress and the number of cycles until fracture were used for analysis. Specimens were also prepared from UHMWPE components of retrieved implants in the same manner.

The results of virgin material were plotted on a straight line showing a typical S-N curve. There were no apparent influences of specimen size, initial crack length or magnitude of applied load. Specimens from retrieved implants showed inferior fatigue property.

Fatigue property of retrieved implants could be evaluated by the new test method developed in this study. Oxidized UHMWPE components showed degraded fatigue property. Further study of failed implants using this test method is expected to demonstrate the relation between the fatigue property of UHMWPE and failure of the implants, contributing to future improvements.

Key words : joint prosthesis, UHMWPE, fatigue, retrieved implants, implant failure.

- ※1 国立医薬品食品衛生研究所 療品部
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
- ※2 大阪市立大学 整形外科
〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3
- ※3 信州大学 整形外科
〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1

Corresponding Author : Hideyuki Sakoda, PhD.

National institute of health sciences, Division of Medical Devices
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, JAPAN
Tel : 03-3700-9264 Fax : 03-3700-1487
E-mail address : sakoda@nihs.go.jp

結 言

人工関節置換術は変形性関節症や関節リウマチの患者のQOLの改善に非常に有効な治療法である。しかし、その寿命は10年から15年程度と言われ、若年の患者では再置換が必要となる可能性が高いことから、その適用をためらうことも多い。

寿命を制限する主な要因として、摺動面材料である超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) の酸化劣化や、摺動面から発生するUHMWPE摩耗粉に起因する人工関節のゆるみが挙げられる。これらの問題に対し1990年代頃より盛んに研究が進められ、滅菌方法の改良や高密度架橋UHMWPE (Highly crosslinked polyethylene, HXLPE) の導入による摩耗量抑制などの対策がとられてきた¹⁾。このような製品の短期臨床成績は良好であり²⁾、今後人工関節の長寿命化が進むことが期待される。

しかし、HXLPEでは、架橋を施すためのガンマ線あるいは電子線の照射や、酸化劣化を抑制するための熱処理が行われ、これらの処理はいずれもUHMWPEの疲労特性を低下させることが知られている^{2), 3), 7), 8)}。人工関節は長期にわたり繰り返し荷重にさらされ、また、人工股関節の寛骨臼側におけるUHMWPEコンポーネントとメタルシェルとの接合部や、PS型人工

膝関節のポスト部などに代表されるように、切欠きや突起が存在する。つまり、疲労特性が問題になる可能性を秘めている。従って、UHMWPEの疲労特性が将来的に人工関節の寿命を制限する要因になる可能性が考えられる。

UHMWPEの疲労特性はcompact tension (CT) 試験片などを用いた疲労き裂成長試験により評価されることが多い¹⁾。この試験法は、繰り返し荷重下におけるき裂先端における応力状態を示す応力拡大係数幅 ΔK に対する疲労き裂の成長速度 da/dN を測定することで、疲労特性を示すパラメータが試験片形状や荷重値に依存しない材料定数として求まることを特徴としている。たとえば、Coleらの報告によると、ガンマ線の照射量が増加するにつれ、き裂が成長を開始する ΔK の下限値 ΔK_{th} が減少し、100kGyを照射した試料ではVirginの試料に比べ約30%低下する³⁾。

しかし、疲労き裂成長試験にも問題が多い。第一に、試験片の寸法が大きく、抜去インプラントや最終製品には適用できない。そのため、臨床成績と疲労特性を結びつけるデータが不足している。第二に、試験片の作製に機械加工が必要なほか、き裂成長を観察するためのカメラなど特殊な装置を必要とするため、通常の疲労試験に比べ追加のコストがかかる。第三に、この試験法は弾性材料を対象とした試験法であ

る。従って、弾塑性体であるUHMWPEは本来適用外である。そのため、文献ごとに試験結果に大きなばらつきがあり、疲労特性パラメータが材料定数として求まり、絶対評価が可能であるというこの試験法の特徴は失われている^{2)~4), 6)~8)}。

本研究の目的は、抜去インプラントや最終製品の試験が可能な小さな試験片を用い、汎用の疲労試験機のみを使用して容易に疲労特性が評価できる方法を開発することである。そのため、まず、UHMWPEのVirgin材を使用し、試験片寸法などの実験条件の影響について検討した。次に、抜去インプラントへ応用し、UHMWPEの臨床成績と疲労特性低下の関連性について検討した。

材料および方法

Virgin群として、シート成型されたUHMWPEのVirgin材 (GUR 1050) を使用した。図1に示すように、3~6mm×6~10mm×24mmの試験片を機械加工により作製し、その中央部に初期き裂を作製した。試験片寸法の影響を調べるため、試験片寸法に幅を持たせた。

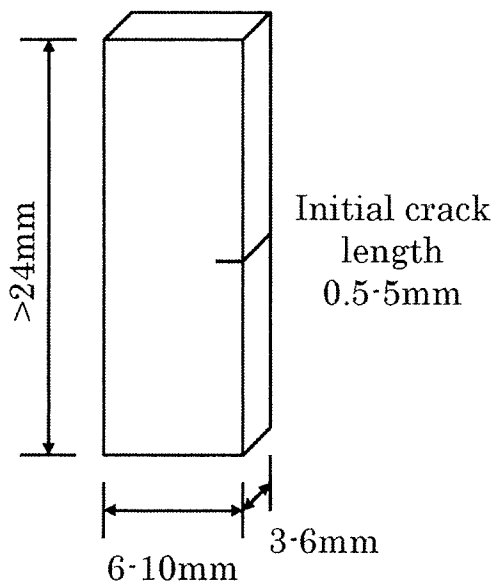


図1. Dimensions of small-sized specimens for evaluation of fatigue property of UHMWPE.

試験片の長軸方向の両端を汎用の疲労試験機 (サーボバルサー EHF-LV010K1-A10, 島津製作所) に固定し、試験片の長さ方向に最大荷重160~640N、応力比0.1、1 Hzの正弦波引張荷重を加えた。試験は10万サイクルまで行い、破断までのサイクル数で評価した。初期き裂の大きさは破断面より測定した。

Retrieved群として、信州大学整形外科において再置換術のため抜去された人工膝関節の脛骨UHMWPEコンポーネントを使用した。およそ5mm幅で矢状面方向に切断し、試験片とした。うち一つの摺動部付近から摺動面に垂直に厚さ約100 μ mの薄片を作製した。フーリエ変換式赤外分光光度計 (FTIR) により酸化度を測定し、摺動部の摺動面から深さ方向の酸化度分布を作成した。本研究では酸化度分布の最大値を用いた。

破断面の観察は光学顕微鏡 (VH-8000C, KEYENCE) および走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-5800LV, 日本電子株式会社) により行った。

結 果

Virgin群では、き裂先端の鈍化が観察された (図2-a)。また、破断面付近でのくびれのため、破断面の変形が見られた (図3-a)。SEMによる破断面観察 (図4-a) では、菱形の模様やき裂成長方向に垂直なストライエーション様の模様が観察され、疲労き裂成長試験による報告^{2)~4), 7)}と同様であった。

Retrieved群のうち酸化劣化が進行している試料では試験片作製の段階で破壊をきたした。本研究では、最大酸化度が4.2であった試料について試験が可能であったため、その結果を示す。Retrieved群では、き裂先端の鈍化は殆ど観察されず (図2-b)、破断面における変形も観察されなかった (図3-b)。SEMによる破断面観察でも、Virginのものと大きく異なり、剥離したような痕跡が見られた (図4-b)。

図5に破断サイクル数を公称応力で整理した結果を示す。Virgin群は一般的なS-N曲線と同様、試験結果は右下がりの直線上に分布した。

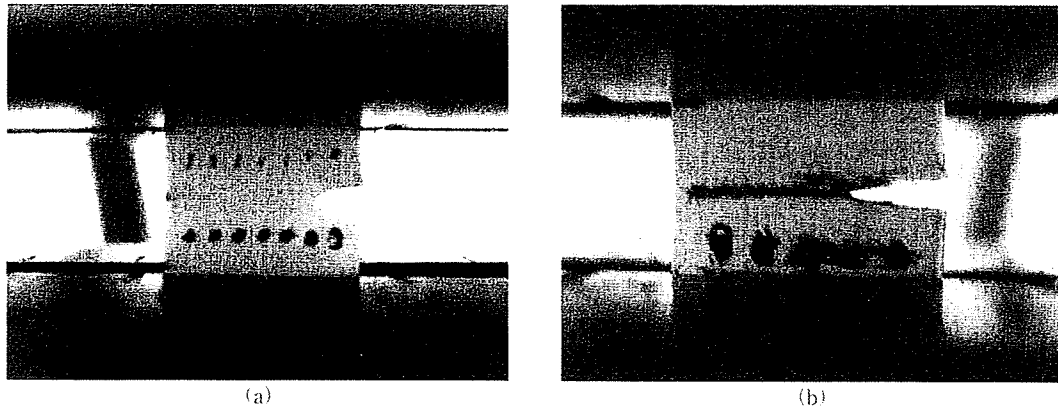


図2. Photographs of specimens during fatigue tests. Crack propagation direction : right to left. (a) Virgin specimen showing fatigue crack tip blunting. (b) Retrieved specimen showing relatively sharp crack tip.

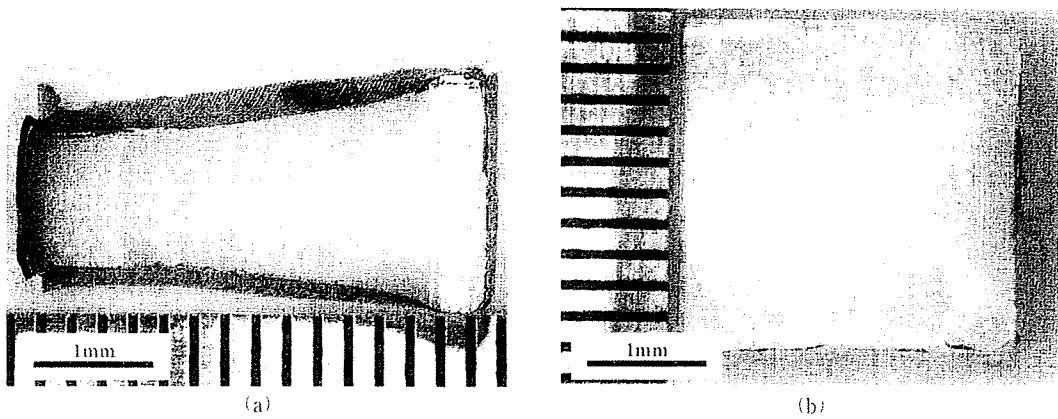


図3. Optical micrographs of fracture surfaces. Crack propagation direction : right to left. (a) Deformed virgin specimen. (b) Retrieved specimen showing little deformation.

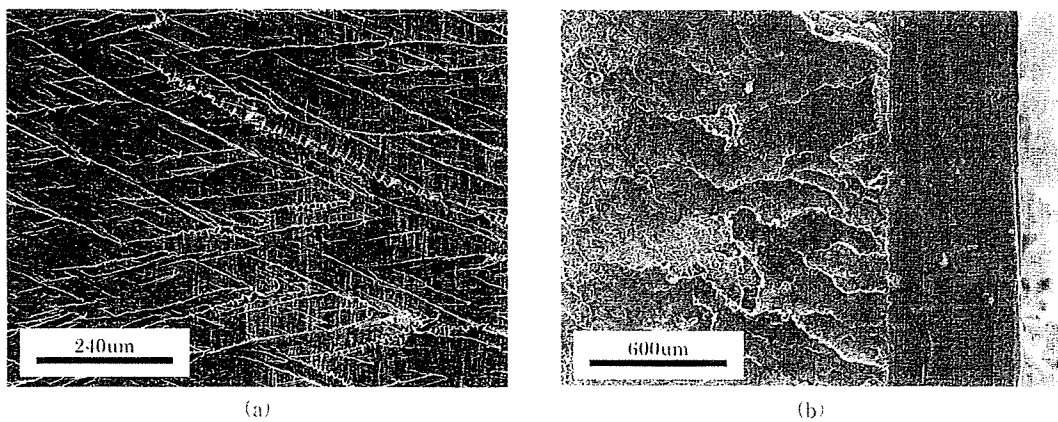


図4. SEM pictures of fracture surfaces. Crack propagation direction : right to left. (a) Virgin specimen showing the same features as fatigue crack propagation tests. Original magnification : $\times 150$. (b) Retrieved specimens showing totally different features from virgin specimen. Original magnification : $\times 60$.

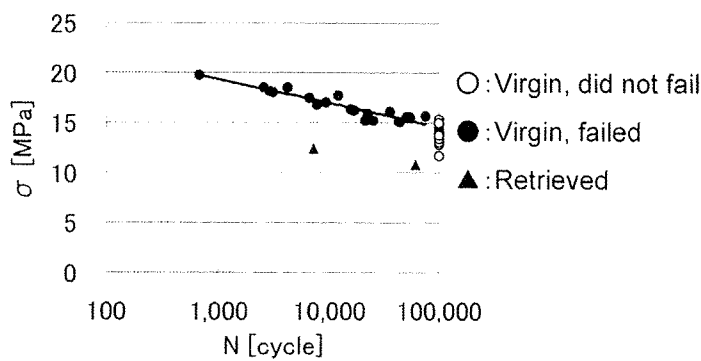


図5. Results of fatigue tests.

また、試験片寸法や初期クラック長、荷重の大きさによる影響はみられなかった。これに対して、Retrieved群は、Virgin群のより下方に分布し、疲労特性の低下を認めた。

考 察

Virgin群で、疲労き裂成長試験と同様の破断面が観察されたため、 ΔK と破断サイクルNの間に関連性があることが考えられた。しかし、 ΔK とNとの相関は σ とNのそれよりも低く、とくに初期き裂が大きい場合などで規則性から大きく外れることがわかった。このことから、本試験法は疲労き裂成長試験として捉えるよりも、切欠きのある疲労試験として捉えるほうが適当であると考えられた。その理由として、き裂先端の鈍化や破断面付近でのくびれで見られるようなUHMWPEの塑性が考えられた。

本研究では機械加工で試験片を切り出したため、表面の仕上げは特に制御しなかった。また、初期き裂の作製はカッターで行い、先端径についても特に制御しなかった。にもかかわらず、比較的良好な結果になったのは、き裂の先端に応力が集中するため、その他の部分の表面仕上げは影響しないことや、き裂先端の鈍化のため、初期き裂の先端径が影響しないことが考えられた。結果的に、非常に簡便な試験法にもかかわらず、相関性の高い結果が得られた。

本研究では、UHMWPEの酸化劣化の程度の表面からの深さによる違いを無視した。この点を考慮して疲労特性の違いを調べる方法として

Small punch test¹⁰⁾があるが、試験片の作製が容易でなく、専用の治具も必要とするため、今回は採用しなかった。多くのインプラントについて簡便に疲労特性を評価し、臨床成績との関連性について効率的に考察するという目的においては、本研究で採用した試験法が有効であると考えられた。

結 論

抜去インプラントや最終製品の試験が可能な小さな試験片を用い、汎用の疲労試験機を使用して疲労特性の評価を行った。UHMWPEのVirgin材の試験結果から、公称応力と破断サイクルの間に高い相関が得られ、試験片寸法などの実験条件の影響も殆ど見られないことがわかった。次に、抜去インプラントから試験片を作製し、同様に試験を行ったところ、疲労特性が顕著に低下していることがわかった。

本試験法は小さな試験片を用い、簡便に抜去インプラントや最終製品の疲労特性を評価することが可能であった。酸化劣化した抜去インプラントでは疲労特性が低下していた。今後、多くの試料を同様の方法で試験することにより、疲労特性の低下と不具合の関連性について考察が可能になると考えられ、新製品の開発や審査へのフィードバックが期待できると思われる。

<謝 辞>

本研究は厚生労働科学研究費および安心安全次世代医療機器事業費による成果である。

文 献

- 1) ASTM E0647-00 : Standard test method for measurement of fatigue crack growth rates.
- 2) Baker DA, Hastings RS et al. : Study of fatigue resistance of chemical and radiation crosslinked medical grade ultrahigh molecular weight polyethylene. J Biomed Mater Res 46 : 573-581. 1999.
- 3) Cole JC, Lemons JE et al. : Gamma irradiation al-

- ters fatigue-crack behavior and fracture toughness in 1900H and GUR 1050 UHMWPE. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 63 : 559-566, 2002.
- 4) Connelly GM, Rinnac CM et al. : Fatigue crack propagation behavior of ultrahigh molecular weight polyethylene. *J Orthop Res* 2 : 119-125, 1984.
 - 5) Digas G, Karrholm J et al. : Clinical performance of highly cross-linked PE with 5 year follow-up. *Trans Orthop Res Soc* 32 : 392, 2007.
 - 6) Elbert KE, Wright TM et al. : Fatigue crack propagation behavior of ultra high molecular weight polyethylene under mixed mode conditions. *J Biomed Mater Res* 28 : 181-187, 1994.
 - 7) Gencur SJ, Rinnac CM et al. : Fatigue crack propagation resistance of virgin and highly crosslinked thermally treated ultra-high molecular weight polyethylene. *Biomaterials* : 27, 1550-1557, 2006.
 - 8) Goldman M and Pruitt L : Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behavior of UHMWPE. *J Biomed Mater Res* : 40, 378-384, 1997.
 - 9) Kurtz SM, Muratoglu OK et al. : Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultrahigh molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20 : 1659-1688, 1999.
 - 10) Kurtz SM : *The UHMWPE handbook : ultrahigh molecular weight polyethylene in total joint replacement*. Elsevier academic press, 301-305, 2004.

人工関節の不具合要因分析

迫田 秀行^{*1} 鄭 徳泳^{*1} 脇谷 滋之^{*2} 天正 恵治^{*3}
佐藤 道夫^{*1} 土屋 利江^{*1}

Factors affecting joint prosthesis failure based on analysis of retrieved components.

Hideyuki SAKODA, PhD., Dukyoung JUNG, PhD., Shigeyuki WAKITANI, MD.,
Keiji TENSHO, MD., Michio SATO, PhD., Toshie TSUCHIYA, PhD

Abstract

Joint arthroplasty is an effective procedure for recovering the quality of life of patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. There is still a strong need to improve the durability of joint prostheses and reduce the failure rate. Long-term clinical study is a very important tool for evaluating implants as in-vitro testing can not fully simulate the biological and biomechanical environment in vivo. Therefore, analysis of failed and retrieved implants and identification of factors related to the failure are very important.

To fully understand the factors promoting implant failure, clinical information is necessary, since the failure can be attributed not only to the implant itself but also to host conditions. However, obtaining clinical information and analyzing it is costly and time-consuming. This study investigated efficient means to identify the factors of implant failure and collect useful information from retrieved implants for the development of future implants.

Eleven retrieved knee implants were obtained without clinical information. After visual inspection, UHMWPE components of the implants were analyzed by FTIR.

Eight cases were considered to have failed due to oxidative degradation of UHMWPE components. This mechanism is well known and is not considered to happen to currently available products as their manufacturing processes have been improved to prevent oxidation of UHMWPE. Three cases were considered to have failed due to factors other than oxidative degradation of UHMWPE components and clinical information was considered necessary to identify the factors related to failure in these implants.

It was possible to extract cases that had failed due to factors other than oxidative degradation of UHMWPE components based on visual inspection and FTIR analysis. It was considered that detailed analysis of these selected cases using clinical information will provide useful information for the development of future implants.

Key words : joint prosthesis, retrieved implants, UHMWPE, implant failure, oxidation.

- ※1 国立医薬品食品衛生研究所 療品部
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
- ※2 大阪市立大学 整形外科
〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3
- ※3 信州大学 整形外科
〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1

Corresponding Author : Hideyuki Sakoda, PhD.

National institute of health sciences, Division of Medical Devices
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, JAPAN
Tel : 03-3700-9264 Fax : 03-3700-1487
E-mail address : sakoda@nihs.go.jp

緒 言

人工関節置換術は変形性関節症や関節リウマチの患者のQOLの改善に非常に有効な治療法である。高齢人口の増加により今後も適用数の増加が見込まれるほか、若年患者への適用拡大のニーズから、人工関節の長寿命化や不具合の低減が求められている。

人工関節の耐久性は関節シミュレータや疲労試験などにより評価されるが、生体内における複雑な力学条件や生体環境を完全に模擬することは困難であり、また、動物実験や臨床試験では長期のデータを得ることが不可能であるから、最終的な評価は臨床による長期成績に頼らざるを得ないのが現実である。そこで、実際の不具合事例を解析し、不具合の要因について考察することが重要となる。

人工関節の不具合は、破損、ゆるみ、脱臼などの事象により分類⁵⁾されることが一般的である。しかし、これらの事象から不具合の要因を推定するためには、インプラントの分析に加え、個々の事例について臨床情報を詳細に分析する必要がある。例えばインプラントの破損の要因としては、製品の設計や品質に起因する強度不足、手術時の不適切な固定方法、患者の転倒など外傷による過度の負荷の可能性が考えられ、それぞれの場合によって施すべき対策はおのずと異なるからである。

インプラントの分析に加え臨床情報の分析を行う際には、分析にかかるコスト、個人情報取り扱い、また、術後経過期間が長いことから情報の質（手術時の情報が得られるかどうか）などの問題が考えられる。また、不具合により抜去されるインプラントの多くは販売から年月を経ており、現在の技術水準と比較すると時代遅れの製品であることが少なくない。例えば、超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)コンポーネントの酸化劣化により、デラミネーションの発生や摩耗量の増大を招くことが知られているが、その原因は空気中におけるガンマ線照射であることが解明され、現在の製品では対策も施されている¹⁾。このように、現在では既知で対策もなされた要因により発生した不具合による抜去インプラントが多数存在することが予想されるが、人工関節の今後の長寿命化・不具合の低減を目指す際には、このような症例について詳細な分析をすることは効率的とは言えない。

そこで本研究では、長寿命化・不具合の低減を目指した次世代型人工関節の開発や承認審査にフィードバックすることを目的とした、効率的な抜去インプラント解析による不具合要因の推定方法について検討を行った。具体的には、不具合により抜去された人工関節を臨床情報のない状態で入手し、どのような情報が得られるのかを検討した。

材料および方法

1994年から2005年までの間に信州大学整形外科において再置換術のため抜去され、入手可能であった人工膝関節12例のうち、UHMWPEコンポーネントを含む11例を対象とした。はじめに、各コンポーネントの破損や傷の状況を観察し、記録した。次に、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) によりUHMWPEコンポーネントを分析した。摺動面に垂直に厚さ約100 μ mの薄片を作製し、透過法により測定を行った。965 cm^{-1} のトランスビニレンに起因するピークを1,370 cm^{-1} 付近のUHMWPEに起因するピークで正規化したトランスビニレン指数²⁾ (TVI) により、ガンマ線照射の有無を判定した。1,720 cm^{-1} 付近のピークを1,370 cm^{-1} 付近のピークで正規化することにより酸化度¹⁾ (OI) を算出した。摺動面から深さ方向に測定を繰り返して行い、材料中でほぼ均一と考えられるTVIは測定値の平均を用いた。OIについては深さ方向のプロファイルを作成し、測定値の最大値を用いた。TVIからガンマ線照射の有無を判定するため、滅菌を想定した照射を行った試料を作製し、TVI値を求めた。また、Controlとして、シート成型された未滅菌のUHMWPE (GUR 1020) を使用した。

結 果

表1に目視観察およびFTIR測定の結果を示す。なお、FTIRの結果は、UHMWPEコンポーネントとして脛骨インサートと膝蓋骨コンポーネントの両方が入手できた場合は脛骨インサートの値を、どちらか一方のみが入手できた場合はその値を示しており、最大OIの大きい順に整理した。

目視観察の結果、11例中9例のUHMWPEコンポーネントでデラミネーションが観察された (図1-a)。そのうち3例では重度の摩耗も観察された。1例ではデラミネーションや重度の摩耗は見られないものの、脱臼あるいは亜脱臼の可能性が疑われる溝状の変形が観察された。金属製コンポーネントでは4例において摩

表1. Results of visual inspection and FTIR analysis.

Sample ID	Visual inspection		FTIR	
	UHMWPE component	Metal component	Ave TVI	Max OI
#8	Delamination	Wear	0.028	31.4
#9	Delamination		0.030	31.2
#3	Delamination	Wear	0.017	20.1
#7	Delamination	Wear	0.041	13.8
#6	Delamination		0.023	10.8
#5	Delamination		0.018	8.8
#1	Delamination		0.013	5.4
#2	Delamination		0.021	4.2
#10	Deformation		0.024	1.6
#4			0.017	1.4
#11	Delamination	Wear	0.003	0.9
Control			0.001	0.0

耗による摺動面の大きな損傷や黒色化が見られた。それらの症例ではUHMWPEコンポーネントの重度の摩耗による大腿骨コンポーネント摺動面と脛骨コンポーネントの接触、または、UHMWPEコンポーネントへの金属片の埋入が観察された。

滅菌を想定した照射を行った試料の照射線量は約37kGyであった。FTIR測定の結果、これらの試料のTVI値は0.016であったため、TVI値が0.010以上の場合にガンマ線照射ありと判定した。その結果、1例を除きガンマ線照射の経験ありと推定された。

OIの最大値は0.9から30以上まで広範に分布していたが、0.9から1.6の低OI群3例と4.2以上の高OI群8例に分けることができた。低OI群では酸化を示すケトン (1,718 cm^{-1}) や酸 (1,712 cm^{-1}) のピークはほとんど観察されず、UHMWPE内に浸入した関節液中の脂質に起因すると思われるエステル³⁾ (1,740 cm^{-1}) のピークのみが観察された。高OI群では、エステルのピークに比べケトンや酸のピークが大きく、エステルのピークのOIへの影響は無視できる程度であった。そこで、OIが4以上の高OI群を酸化ありと判定した。

考 察

11例中8例では、ガンマ線照射、酸化、UHMWPEの損傷の全てが認められた。これらの症例では、ガンマ線照射の結果UHMWPEの

酸化劣化が進行し、デラミネーションの発生や急速な摩耗の発生のため不具合に至ったものと推定された。さらに、デラミネーションや摩耗

によりUHMWPEコンポーネントが薄くなることで、大腿骨コンポーネントと脛骨コンポーネントが直接接触するようになり、金属製コンポーネントの摩耗や金属片の発生に至ったものと思われた。

現在市販の製品では、ガンマ線照射工程が改良され、空気中でのガンマ線照射は行われず、窒素ガスなどの不活性ガス中でのガンマ線照射に切り替えられている。不活性ガス中でガンマ線照射した場合の酸化劣化の進行は、空気中の場合に比べ大幅に改善されることから、これらの事例のような酸化劣化の進行とそれによるデラミネーションの発生は起こりにくいと考えられる。つまり、これらの症例については、そのメカニズムが解明された酸化劣化が不具合の要因と考えられ、現在市販の製品ではその対策も既に施されていることから、臨床情報の解析など追加の分析の必要性は低いものと考えられた。

11例中2例（サンプル# 4, #10, 図1-b）では、ガンマ線照射ありと判定されたものの、酸化は認められなかった。また、デラミネーションや重度の摩耗は観察されなかった。これらの症例では、ガンマ線照射は行われたものの、UHMWPEの酸化劣化には至っておらず、材質が不具合の要因ではないと考えられた。臨床情報の解析により不具合要因が特定できる可能性もあると思われる。

11例中1例（サンプル# 11, 図1-c）では、ガンマ線照射や酸化は認められなかったものの、摩耗が進行しており、一部でデラミネーションも観察された。UHMWPEコンポーネントが摩耗のため擦り切れており、大腿骨コンポーネントと脛骨コンポーネントの直接接触が原因と思われる金属製コンポーネントの摩耗も観察された。この症例は人工膝単顆置換術用のインプラントであり、インプラントのデザインや設置位置などを含めた力学的要因が不具合要因として考えられたが、インプラントの分析だけでは不具合要因の特定には至らなかった。臨床情報の解析により不具合要因の特定が可能と考えられた。

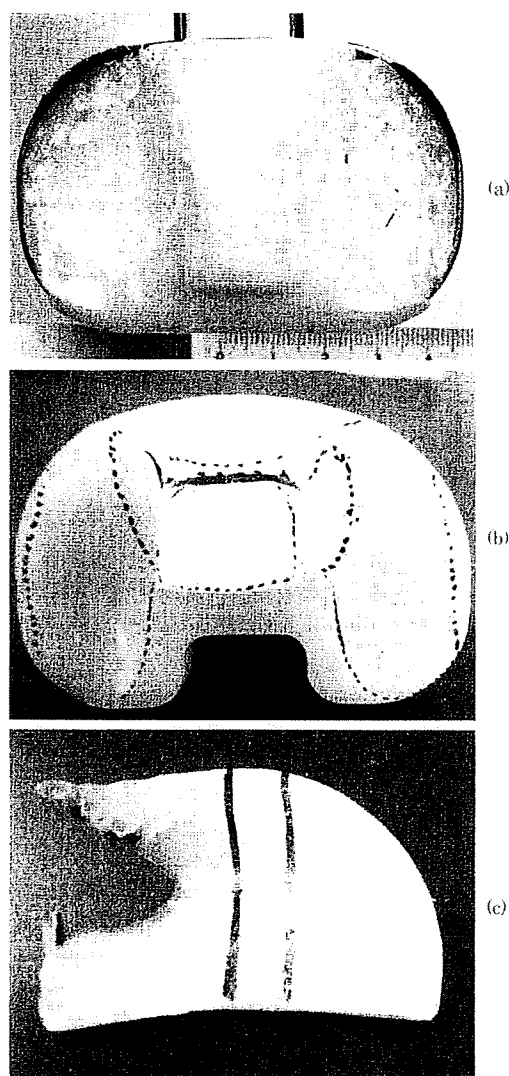


図1. Macroscopic findings of retrieved implants. (a) Sample #7 shows severe delamination due to oxidation. Metal debris is also seen (b) Sample #10, with no oxidation, shows shiny articulating surface due to mild wear. Dotted lines indicate the region where mild wear is seen (c) Sample #11 shows delamination and sever wear. Solid lines indicate the region where FTIR sample is taken.

結 論

今回調査した11例中8例では、ガンマ線照射に起因するUHMWPEの酸化劣化と、それによるデラミネーションの発生や摩耗の進行が原因として考えられた。現在市販の製品ではこの問題に対する対策が施されており、今後使用される製品についてはこのような不具合は起こりにくいと考えられる。

残りの3例では、UHMWPEの酸化以外が不具合要因として考えられた。これらの症例では、不具合要因を推定するに十分な痕跡がインプラントに無く、インプラントの解析だけでは不具合要因の推定ができなかった。これらの症例の臨床情報を解析することにより、不具合要因の推定が可能になると考えられた。これらの症例の不具合要因は、酸化劣化の問題と異なり、現在も対策が不十分である可能性が高いため、その推定を行うことにより今後の不具合低減のために有用な情報が得られると考えられる。

多くの不具合はUHMWPEの酸化劣化に起因することが示唆された。抜去インプラントの目視観察とFTIR測定によりスクリーニングを行い、酸化劣化以外の要因で不具合に至ったと思われる症例を抽出することが可能であった。これらの症例について臨床情報を含めて詳細に解析することで、次世代型人工関節の開発や承認

審査に有益な情報の効率的な収集が可能になると考えられた。

<謝 辞>

本研究は厚生労働科学研究費および安心安全次世代医療機器事業費による成果である。

文 献

- 1) ASTM F2102-01 : Standard guide for evaluating the extent of oxidation in ultra-high-molecular-weight polyethylene fabricated forms intended for surgical implants.
- 2) ASTM F2381-04 : Standard test method for evaluating trans-vinylene yield in irradiated ultra-high-molecular-weight polyethylene fabricated forms intended for surgical implants by infrared spectroscopy.
- 3) Costa L, Bracco P et al. : Analysis of products diffused into UHMWPE prosthetic components in vivo. *Biomaterials* 22 : 307-315, 2001.
- 4) Kurtz SM, Muratoglu OK et al. : Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20 : 1659-1688, 1999.
- 5) Ulrich SD, Seyler TM et al. : Total hip arthroplasties : What are the reasons for revision? *International Orthopaedics*. 2007.

ORIGINAL ARTICLE

Masato Tamai, PhD · Kazuo Isama
Ryusuke Nakaoka, PhD · Toshie Tsuchiya, PhD

Synthesis of a novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties

Abstract To promote the osteogenic properties of osteoblasts, we synthesized a hydroxyapatite (HAp) with β -tricalcium phosphate (β -TCP) biphasic calcium phosphate containing Nb ions (NbTCP/HAp). NbTCP/HAp was prepared by annealing precipitates obtained by coprecipitation of an aqueous solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and a mixture of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and aqueous Nb solution. The precipitates can be regarded as a calcium-deficient HAp, the PO_4 sites of which are partly occupied by Nb ions. NbTCP/HAp was successfully synthesized by thermal decomposition of the precipitates. NbTCP/HAp enhanced the calcification of normal human osteoblasts (NHObst), and the amount of calcified tissue increased in proportion to the Nb ion concentration in the NbTCP/HAp. The alkaline phosphatase (ALP) activity of NHObst was also enhanced by NbTCP/HAp. Because Nb ions significantly enhance the ALP activity of NHObst, calcification by NbTCP/HAp is considered to be due to enhancement of ALP activity induced by Nb ions dissolved from NbTCP/HAp. These results indicate that NbTCP/HAp can be an effective bone repair material.

Key words Tissue engineering · Bone · Osteoblasts · Calcium phosphate · Nb ions

Introduction

Bone tissue engineering offers a promising alternative strategy for healing severe bone injuries by utilizing the body's natural biological response to tissue damage in conjunction with engineering principles. Osteogenic cells, growth factors, and biomaterial scaffolds form the foundation of the many bone tissue engineering strategies employed to achieve regeneration of damaged bone tissue. An ideal bio-

material scaffold will provide mechanical support to an injured site and also enhance osteogenic differentiation to encourage bone growth.¹ To develop biomaterial scaffolds with optimal performance, understanding the interactions between osteoblasts and scaffolds is extremely important.

Hydroxyapatite [HAp , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] and related calcium phosphate ceramics, e.g., β -tricalcium phosphate [β -TCP, β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], have good biocompatibility with bone tissue because their chemical compositions are very similar to the mineral phase of human bone. It is well known that these calcium phosphate ceramics can be biologically bonded to natural bone. In fact, it has been reported that porous materials composed of HAp, β -TCP, or β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate are useful for bone tissue regeneration because of their osteoconductivity.^{2–6} It has also been reported that β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate shows better osteoconductivity than HAp or β -TCP alone.^{7,8} Therefore, this material has been actively studied for use as a scaffold for bone tissue regeneration.

In a previous study, Nb ions were reported to lower cytotoxicity⁹ (IC_{50} of Nb ions for L929 fibroblasts is 3.63×10^3), and we reported that Nb ions significantly promoted the calcification of normal human osteoblasts (NHObst).¹⁰ Furthermore, we succeeded in synthesizing a hydroxyapatite containing Nb ions (NbHAp) and showed that NbHAp has the potential to promote alkaline phosphatase (ALP) activity, an important factor in the generation of new bone, in NHObst.¹¹ In this study, to further promote the cell activity of osteoblasts, we synthesized β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate containing Nb ions and investigated interactions between β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate and NHObst *in vitro*.

Materials and methods

Synthesis and characterization of β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate containing Nb ions

Reagent grade $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, and NbCl_5 (Wako, Osaka, Japan) were used without purification. NbTCP/HAp

Received: May 26, 2006 / Accepted: September 28, 2006

M. Tamai · K. Isama · R. Nakaoka · T. Tsuchiya (✉)
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
Tel. +81-3-3700-4842; Fax +81-3-3707-6950
e-mail: tsuchiya@nihs.go.jp

samples were prepared by annealing precipitates obtained from coprecipitation of an aqueous solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ with a mixture of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and an aqueous solution of Nb as described below. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were completely dissolved in distilled water. The aqueous Nb solution was prepared by mixing distilled water and NbCl_5 dissolved in 5% hydroxyacetone and 5% 2-aminoethanol.¹² A 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ aqueous solution was combined with 0.01 M NbCl_5 and stirred with a magnetic bar at Nb/(Nb + P) molar ratios of 0.0000, 0.0167, or 0.1667. The pH of the mixture was adjusted to 10 using 1 N NaOH throughout the reaction, and 0.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was slowly dropped into the mixture (20 ml/min). The amount of 0.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ solution was adjusted to a Ca/(Nb + P) molar ratio of 1.6 in order to synthesize β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate, followed by stirring the suspension for 24 h at room temperature. The precipitates were centrifuged at 3600 rpm for 5 min and washed with distilled water. The resulting precipitates of Nb/(Nb + P) with molar ratios of 0.0000, 0.0167, and 0.1667 were named NbHAp-0, NbHAp-I, and NbHAp-II, respectively. These precipitates were then annealed at 800°C for 2 h (temperature increase: 5°C/min) and named NbTCP/HAp-0, NbTCP/HAp-I, and NbTCP/HAp-II, respectively. The NbTCP/HAp samples obtained were characterized by X-ray diffraction analysis (XRD, Rint2000, Rigaku, Tokyo, Japan) with $\text{Cu K}\alpha$ radiation (40 kV, 50 mA). The XRD profiles of 2θ angles between 20° and 60° with a step interval of 0.01° were collected at a scanning rate of 4°/min. Also, measurement of the lattice parameter was carried out using the 211, 112, and 300 planes of HAp, and data for the lattice parameter were collected with a scan rate of 0.025°/min. The observed interplanar spacing was corrected using elemental Si as a standard material.

Concentrations of Ca, P, and Nb ions in the precipitate were estimated by inductively coupled plasma analysis (ICP, HP4500, Hewlett-Packard, CA, USA) after the precipitate was dissolved in HNO_3 solution. Microstructural evaluation of the precipitates was performed by scanning electron microscopy (SEM, JSM-5800LV, JEOL, Tokyo, Japan; acceleration voltage: 25 kV) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) (LV5800, JEOL).

Osteogenic effects of NbTCP/HAp

NbTCP/HAp pellets were fabricated to investigate their effects on the osteogenic function of osteoblasts. In total, 100 mg of powdered NbTCP/HAp was put into a stainless steel mold and uniaxially pressed at 30 MPa for 1 min to form a pellet 0.5 mm in thickness and 12 mm in diameter. The pellets were sintered at 800°C for 2 h (temperature increase: 5°C/min).

NHOst were purchased from BioWhittaker (Walkersville, MD, USA) and maintained in d-minimum essential medium (α MEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal calf serum (FCS, Kokusai Sinyakkyu, Tokyo, Japan) in incubators at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO_2 . All assays were performed using α MEM containing 10% FCS supplemented with 10 mM β -glycerophosphate.

Cells were seeded on the pellets as described below. Each NbTCP/HAp pellet was immersed in 1 ml culture medium in a well of a 24-well cell culture plate (Corning, Corning, NY, USA) and incubated at 37°C for 24 h. After discarding the medium, 300 μ l of new culture medium was put into each well, followed by 1 ml of NHOst suspension (4×10^4 cell/ml), and incubation was carried out for 4 h. Finally, the cell-seeded NbTCP/HAp pellet was transferred to a new well of a 24-well plate with 1 ml of the test medium and incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 for 7–14 days.

Extracts from various NbTCP/HAp samples were prepared to investigate their effects on dissolved ions. NbTCP/HAp powder (100 mg/ml) was added to the culture medium (α MEM) containing 10% FCS and immersed at 37°C for 24 h. After changing the medium, the suspensions were stirred by a shaker at 200 rpm for 72 h at 37°C. The suspension was centrifuged at 3600 rpm for 5 min, and the supernatant was collected to use as an extract for an osteogenesis test in vitro. The atomic concentrations of Nb in the extract were measured by ICP.

An NHOst suspension (4×10^4 cells/ml) was added to culture wells and incubated for 4 h. After the NHOst had adhered to the well, the suspension medium was discarded and 1 ml of the extract supplemented with 10 mM β -glycerophosphate was added. The NHOst were incubated at 37°C in a saturated humid atmosphere with 5% CO_2 for 7–14 days.

We also examined the effect of Nb ions on the osteogenesis of NHOst. A solution of 0.2 μ M NbCl_5/α MEM and serial dilutions were prepared. In addition to the experiment using the extracts indicated above, NHOst were cultured in NbCl_5/α MEM supplemented with β -glycerophosphate for 7–14 days.

Proliferation of NHOst cells in each experiment was estimated by a TetraColor One assay (Seikagaku, Tokyo, Japan), which incorporates an oxidation–reduction indicator based on detection of metabolic activity. After a 7-day incubation, the culture medium was discarded and 2% TetraColor One/ α MEM solution was added to each well and was incubated for 2 h. The absorbance of the supernatant at 450 nm was measured using a μ Quant spectrophotometer (Bio-tek, Winooski, VT, USA) to estimate the proliferation of the test cells. After estimating the proliferation, the cells were washed with phosphate-buffered saline [PBS(-)], followed by the addition of 1 ml of 0.1 M glycine buffer (pH 10.5) containing 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 , and 4 mM *p*-nitrophenylphosphate sodium salt. The absorbance of the added buffer at 405 nm after 5 min incubation at room temperature was detected to evaluate the ALP activity of the test cells. After measurement of ALP, the NHOst cultured in the extract were washed with PBS(-) three times and the calcium phosphate deposited by NHOst was estimated. The amount of deposited calcium phosphate dissolved in 0.1 N HCl solution was determined by a Wako Calcium C test kit (Wako), which is based on the *o*-cresolphthalein complex color development method. The NHOst in all assays were stained in 5% Giemsa solution and observed by light microscopy (Nikon, Eclipse TE300, Tokyo, Japan) to confirm

Table 1. Chemical composition and characteristics of the precipitates prepared in this study

Sample	Phase	Annealing temperature	Theoretical composition ^a		Measured composition ^a		Color of precipitate	Lattice parameter ^b	
			Ca/(P + Nb)	Nb/(P + Nb)	Ca/(P + Nb)	Nb/(P + Nb)		a-axis (nm)	c-axis (nm)
NbHAp-0	HAp		1.60	0.000	1.60	–	White	–	–
NbHAp-I	HAp		1.60	0.017	1.56	0.013	Pale yellow	–	–
NbHAp-II	HAp		1.60	0.167	1.56	0.077	Buff yellow	–	–
NbTCPHAp-0	β -TCP + HAp	800°C	1.60	0.000	1.60	–	White	0.939	0.687
NbTCP/HAp-I	β -TCP + HAp	800°C	1.60	0.017	1.56	0.013	White	0.942	0.689
NbTCP/HAp-II	β -TCP + HAp	800°C	1.60	0.167	1.56	0.074	White	0.943	0.690

HAp, hydroxyapatite; NbHAp, hydroxyapatite containing Nb ions; TCP, tricalcium phosphate

^aMolar ratio

^bLattice parameter for HAp

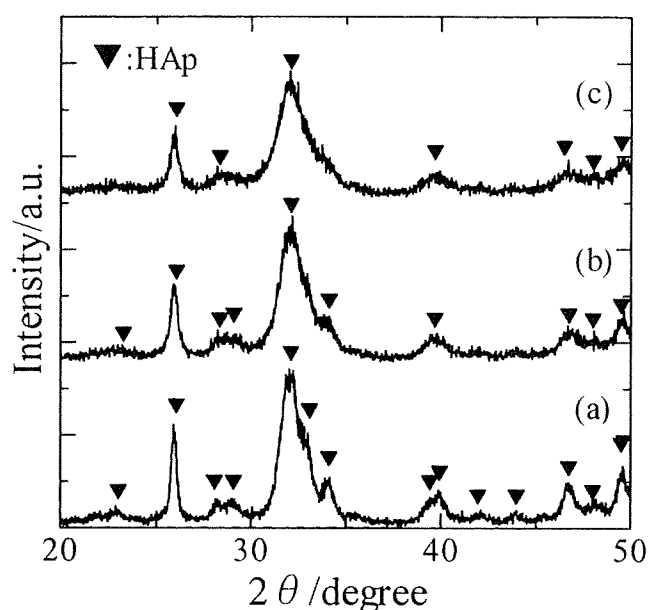


Fig. 1. X-ray diffraction (XRD) patterns of the precipitates with a Ca/(P + Nb) molar ratio of 1.50: a, Nb/(Nb + P) = 0; b, Nb/(Nb + P) = 0.0167; and c, Nb/(Nb + P) = 0.1667. Triangles represent XRD peaks due to the crystal structure of hydroxyapatite (HAp)

their proliferation. All results were expressed as mean values \pm SD and were analyzed statistically with Student's *t* test.

Results

XRD patterns of the precipitates prepared in this study are shown in Fig. 1. The XRD indicated that precipitates with Nb/(Nb + P) molar ratios from 0 to 0.167 had a monolithic apatite structure, irrespective of the Nb/(Nb + P) molar ratio of the starting solution, although the level of crystallite decreased as the Nb content increased. XRD patterns of the precipitates with various Nb/(Nb + P) molar ratios annealed at 800°C are shown in Fig. 2. The level of crystallites of the precipitates was high due to the annealing, and their diffraction peaks were composed of those of both HAp and

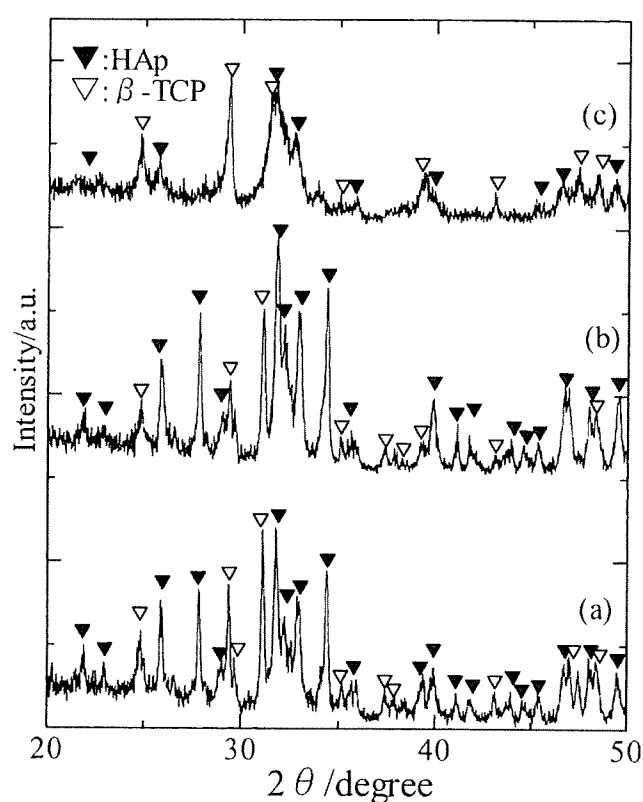


Fig. 2. XRD patterns of the annealed precipitates with a Ca/(P + Nb) molar ratio of 1.50: a, Nb/(Nb + P) = 0; b, Nb/(Nb + P) = 0.0167; and c, Nb/(Nb + P) = 0.1667. These precipitates were annealed at 800°C. β -TCP, β -tricalcium phosphate

β -TCP. Interestingly, the crystallite level decreased when the Nb level increased.

The chemical compositions and characteristics of the precipitates prepared in this study are summarized in Table 1. Both the Ca/(Nb + P) and the Nb/(P + Nb) molar ratios in precipitates measured by ICP approximately agreed with their theoretical values, except for the Nb/(P + Nb) molar ratio of NbTCP/HAp-II: the measured Nb/(P + Nb) molar ratio of NbTCP/HAp-II was 0.074, which is lower than the theoretical value of 0.167. The lattice parameter of the HAp phase in NbTCPHAp increased with increasing Nb content.

Fig. 3. Scanning electron microscopy–energy-dispersive X-ray spectroscopy spectra of NbTCP/HAp-II annealed at 800°C (a) and their mapping images from P-K α , Ca-K α , and Nb-M α lines (b)

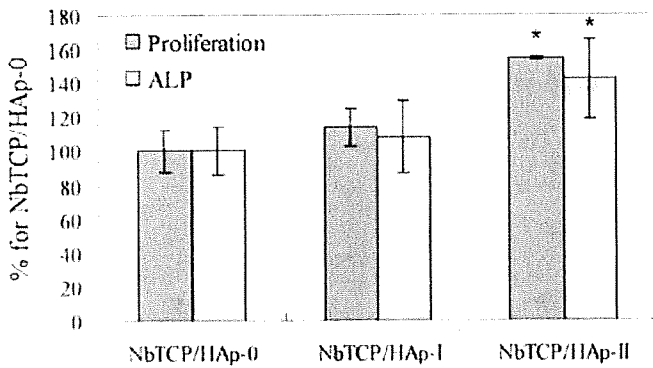
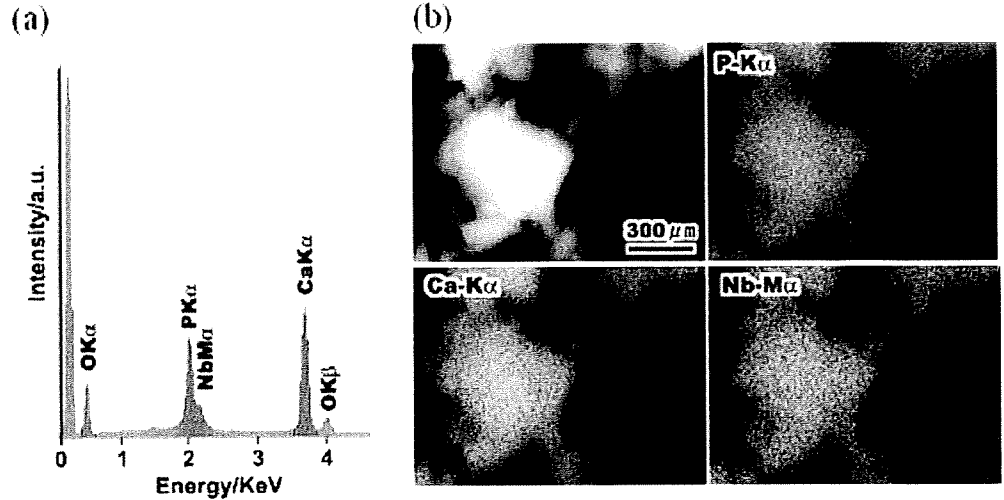


Fig. 4. Proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity of normal human osteoblasts (NHOst) cultured on various kinds of NbTCP/HAp pellets. * $P < 0.01$ against NbTCP/HAp-0 (without Nb ions)

The lattice parameters of NbTCP/HAp-0 without Nb ions were 0.939 nm for the a -axis and 0.687 nm for the c -axis, while those of NbTCP/HAp-II were 0.943 nm for the a -axis and 0.690 nm for the c -axis. In addition, the color of the precipitates became dark yellow as the Nb/(P + Nb) molar ratio increased, while the annealed precipitates of NbTCP/HAp were white.

SEM observation of the precipitates before annealing revealed that all precipitates were present as aggregates composed of primary particles of less than 1 μm in diameter, irrespective of the Nb/(P + Nb) molar ratio. Figure 3a shows SEM-EDX spectra of NbTCP/HAp-II. The EDX spectrum of Nb M α was separated from the P K α line and could be observed at 2.17 KeV, although its intensity was weak. The mapping images of the P-K α , Ca-K α , and Nb-M α lines are shown in Fig. 3b. As shown in Fig. 3b, Nb ions were present at the same site as the Ca and P ions, suggesting that the Nb ions were homogeneously distributed in the aggregates.

The proliferation and ALP activity of NHOst cultured on various kinds of NbTCP/HAp pellets is shown in Fig. 4. The proliferation of NHOst cultured on NbTCP/HAp-II pellets was approximately 60% higher than that on NbTCP/HAp-0 without Nb ions ($P < 0.01$). As shown in Fig. 5, many

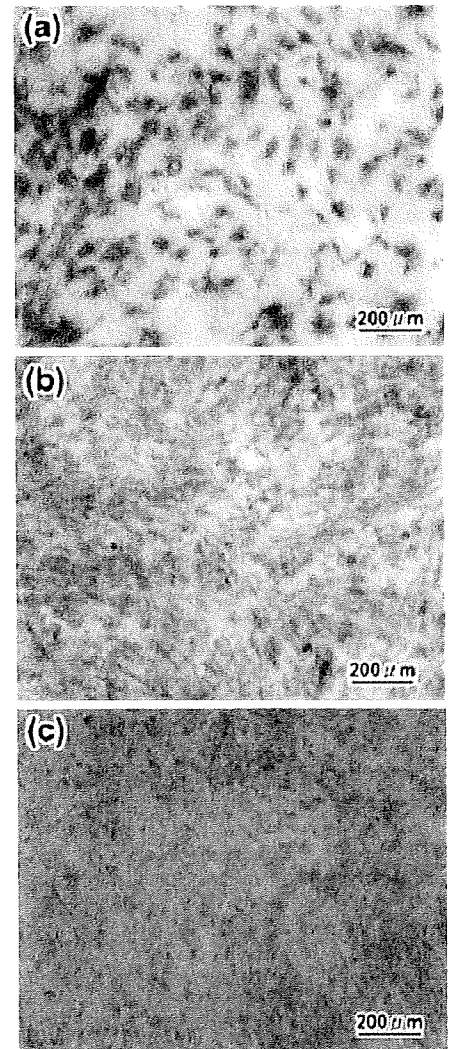


Fig. 5. Light microscopic images of NHOst cultured on various NbTCP/HAp samples for 7 days: a. NbTCP/HAp-0; b. NbTCP/HAp-I; and c. NbTCP/HAp-II. NHOst were stained by Giemsa solution

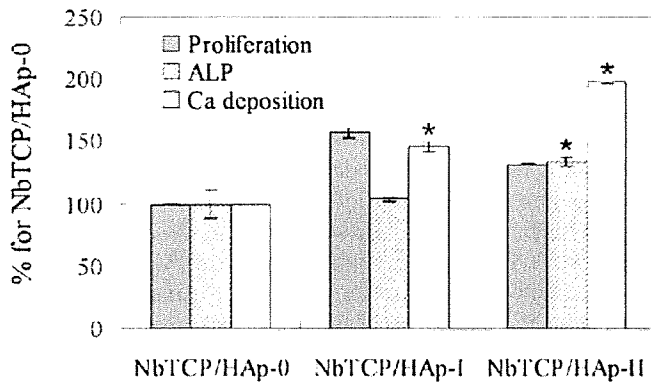


Fig. 6. Osteogenic properties (proliferation, ALP activity, and Ca deposition) of NHOst cultured in extracts from various NbTCP/HAp samples for 14 days. * $P < 0.01$ against NbTCP/HAp-0 (without Nb ions)

NHOst adhered to and spread on NbTCP/HAp-I and -II, while little spreading of NHOst was observed on HAp. In addition, as shown in Fig. 4, NHOst cultured on the NbTCP/HAp-II pellets expressed high ALP activity, compared with those cultured on NbTCP/HAp-0. Figure 6 shows the proliferation, ALP activity, and Ca deposition of NHOst cultured in extracts from various NbTCP/HAp samples for 14 days. Like the NHOst cultured on pellets, NHOst cultured in the extract from NbTCP/HAp-II expressed higher ALP activity than those in the extract from NbTCP/HAp-0. Furthermore, the amount of deposited calcium from NHOst increased with increasing Nb ion concentration in NbTCP/HAp, and the calcium deposition in the extract from NbTCP/HAp-II was twice that in the extract from NbTCP/HAp-0.

Figure 7 shows the concentration of Nb ions in extracts from NbTCP/HAp samples. It was found that Nb ions were released into the cell culture medium at concentrations of the order of 1×10^{-5} mol/l. To investigate the effect of Nb ions on NHOst function, NHOst were cultured in a medium containing Nb ions. The dependence of osteogenesis by NHOst on Nb ion concentration is shown in Fig. 8. Nb ions did not affect the proliferation of NHOst, but the ALP activity and Ca deposition of NHOst proceeded proportionally when the concentration of Nb ions was more than 1×10^{-5} mol/L.

Discussion

Characterization of NbTCP/HAp biphasic calcium phosphate ceramics

As summarized in Table 1, before annealing the precipitates, the NbHAp samples were hydroxyapatite with low levels of crystallite. The hydroxyapatite structure is known to be very tolerant of ionic substitution.¹² Ca^{2+} ions, PO_4^{3-} ions, and OH^- ions can be replaced, partly or completely, by various cationic or anionic ions. Notably, as shown in Table 1, the lattice parameter of HAp increased when the

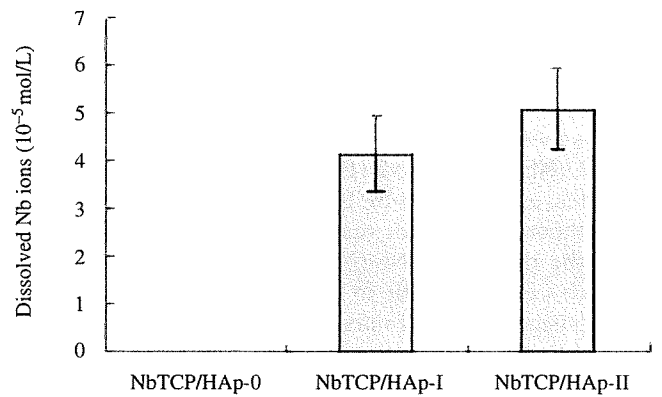


Fig. 7. Concentrations of Nb ions in extracts from various NbTCP/HAp samples. The concentration of Nb ions in cell culture medium was measured by inductively coupled plasma analysis

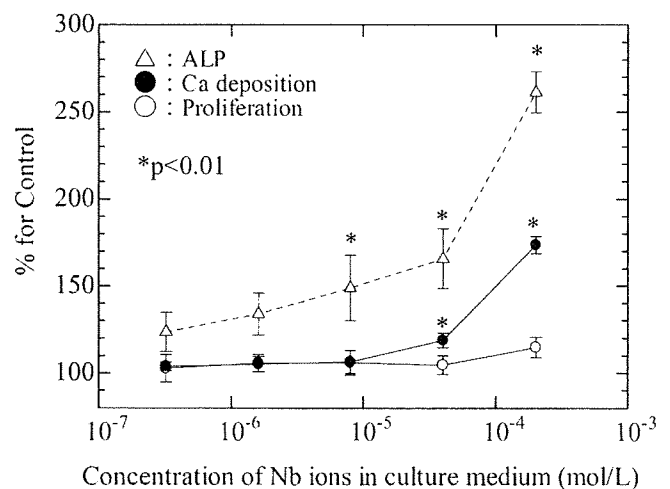


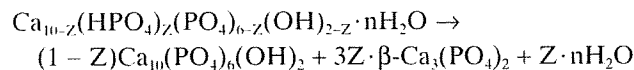
Fig. 8. Relationship between concentration of Nb ions in culture medium and osteogenic properties of NHOst. * $P < 0.01$ against cell culture medium without Nb ions

Nb content in NbTCP/HAp was high. This fact suggests that Nb ions are taken into the apatite lattice. If a substitution of an Nb^{5+} ion for a Ca^{2+} ion in HAp occurred, the lattice parameter should decrease, since the ionic radius of Ca^{2+} and Nb^{5+} are 0.1 nm and 0.064 nm, respectively. Therefore, the possibility of substitution of Nb ions for Ca ions is low. On the other hand, although the structure of Nb ions in aqueous solution is not fully understood at present, it has been reported that Nb ions in solution are not present as Nb^{5+} but as niobumate acid, $\text{H}_x\text{Nb}_6\text{O}_{19}^{(8-x)-}$ ions ($x = 0.1, 2$) for basic conditions,^{14,15} and the niobumate acid cluster ($\text{H}_x\text{Nb}_6\text{O}_{19}^{(8-x)-}$) was polymerized or dissociated depending on the pH and ion concentration.¹⁵ According to these reports, $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$ anionic monomer can exist in basal and low Nb concentrations (< 0.08 M). Since the Nb concentration in this study was 0.01 M, Nb ions would exist as $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$ anionic monomers. $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$ may be substituted at the PO_4 site since the PO_4 site in HAp can be replaced by anionic

atomic groups. In addition, the ionic radius of the $H_2NbO_6^{3-}$ monomer and PO_4 are approximately 0.30 nm and 0.23 nm, respectively, suggesting that an increase in lattice parameter of NbTCP/HAp is ascribed to the substitution of PO_4 sites by this monomer in HAp. Furthermore, the fact that both the $Ca/(Nb + P)$ and $Nb/(P + Nb)$ molar ratios of the precipitates, as measured by ICP, approximately agreed with their theoretical values may support this hypothesis. Despite the theoretical $Nb/(Nb + P)$ ratio being 0.1667, the $Nb/(Nb + P)$ molar ratio in NbTCP/HAp-II was about 0.07, which suggests that the maximum amount of substituted Nb ions at the PO_4 site is around 0.07.

The $Ca/(P + Nb)$ molar ratio in the NbHAp obtained in this study was lower than that of the stoichiometric value of 1.67 for HAp. Hydroxyapatite having a lower Ca/P molar ratio is known as calcium-deficient hydroxyapatite [Ca-def HAp, $Ca_{10-Z}(HPO_4)_Z(PO_4)_{6-Z}(OH)_{2-2Z}$, $Z = 0-1$]. Therefore, NbHAp can be regarded as a Ca-def HAp in which the PO_4 sites are partly occupied by Nb ions.

Ca-def HAp decomposes to stoichiometric HAp and β -TCP at temperatures above 600°C according to the following reaction:^{16,17}



The above thermal decomposition reaction occurred during the annealing of NbHAp, resulting in a lower Ca/P molar ratio than the stoichiometric value of HAp because of partial β -TCP formation. In addition, the homogeneously distributed Nb ions in NbTCP/HAp may result from thermal diffusion of Nb ions during the thermal decomposition process.

Osteogenesis of NHOst cultured on NbTCP/HAp

In this study, NbTCP/HAp showed potential to promote calcification of NHOst. This study indicated that osteogenic behavior of NHOst cultured on NbTCP/HAp pellets was consistent with that of NHOst cultured in extracts from the pellets, suggesting that dissolved ions from the NbTCP/HAp pellets affect calcification of NHOst. As shown in Fig. 7, Nb ions were apparently released from NbTCP/HAp and dissolved in the medium at concentrations of the order of 1×10^{-5} mol/l. When 4×10^{-5} mol/l of $NbCl_5$ was added to the culture medium, Ca deposition clearly increased (Fig. 8). Therefore, the enhancement of Ca deposition is considered to be due to the dissolved Nb ions. One possible mechanism for enhancement of calcification is discussed below.

ALP is known to play an important role in the calcification of bone.¹⁸⁻²⁰ Generally, the calcification of bone mineral occurs in the matrix vesicles budding from the surface of osteoblasts.²¹ The nucleation of biological apatite, which is the initial stage of calcification, occurs due to the reaction between inorganic PO_4^{3-} ions produced by the ALP and calcium ions in matrix vesicles.

NHOst cultured on the NbTCP/HAp pellets containing Nb ions expressed high ALP activity compared with those

cultured on HAp without Nb ion. Similarly, it was found that NHOst cultured in an extract from NbTCP/HAp containing Nb ions expressed higher ALP activity than those in the extract from HAp without Nb ions. These results suggest that Nb ions affect the enhancement of ALP activity. Based on the above calcification mechanism in matrix vesicles, the enhancement of calcification might result from the enhancement of ALP activity due to dissolved Nb ions from NbTCP/HAp. The enhancement of ALP activity increases the production of inorganic PO_4^{3-} ions, and then the inorganic PO_4^{3-} ions produced may be taken into the matrix vesicles. The subsequent nucleation of biological hydroxyapatite occurs due to a reaction of Ca ions and inorganic PO_4^{3-} ions, followed by calcification. Although we cannot deny that Nb ions directly promote calcification by NHOst unrelated with ALP expression, the essence of the calcification enhancement by NbTCP/HAp may be the enhancement of ALP activity by Nb ions dissolved from NbTCP/HAp. The biological effect of Nb ions on NHOst is under investigation. Although further studies are necessary to clarify the mechanism of enhanced calcification by Nb ions, this study strongly suggests that NbTCP/HAp is a more promising material for use as a bone tissue engineering scaffold than HAp.

Conclusion

In order to promote the osteogenicity of osteoblasts, we synthesized a combination of HAp and β -TCP biphasic calcium phosphate containing Nb ions (NbTCP/HAp). The NbTCP/HAp samples were prepared by annealing precipitates obtained by coprecipitation of an aqueous solution of $Ca(NO_3)_2$ with a mixture of $(NH_4)_2HPO_4$ and aqueous Nb solution. The precipitates obtained by the coprecipitation process can be identified as Ca-def HAp, the PO_4 sites of which are partly occupied by Nb ions. NbTCP/HAp samples were successfully obtained by thermal decomposition of the precipitates.

NbTCP/HAp enhanced calcification of NHOst. The enhancement of calcification of NbTCP/HAp was ascribed to the enhancement of ALP activity due to the dissolved Nb ions from NbTCP/HAp.

Acknowledgments This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Labour, Health and Welfare of Japan, and a Grant-in-Aid from the Japan Health Sciences Foundation.

References

1. Service FR. Tissue engineers build new bone. *Science* 2000;289:1498-1500
2. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnected porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002;59:110-117
3. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan IA. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 1989;7:568-578

4. Cheung SH, Haak HM. Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vitro model for biocompatibility study. *Biomaterials* 1989;10:63-67
5. Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W. Growth of bone marrow cells on porous ceramics in vitro. *J Biomed Mater Res* 1987;21: 1-10
6. Ohgushi H, Okumura M. Osteogenic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramics. *Acta Orthop Scand* 1990;61: 431-434
7. Schopper C, Ziya-Ghazvini F, Goriwoda W, Moser D, Wanschitz F, Spassova E, Lagogiannis G, Auterith A, Ewers R. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation - a long term histological study. *J Biomed Mater Res B* 2005;74B:458-467
8. Yuan H, Van DDM, Shihong L, Groot BV, Bruijn DDJ. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:1271-1275
9. Yamamoto A, Honma R, Sumita M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblast and osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 1998;39:331-340
10. Isama K, Tsuchiya T. *Bull Natl Inst Health Sci* 2003;121:111
11. Tamai M, Nakaoka R, Isama K, Tsuchiya T. Novel calcium phosphate ceramics: the remarkable promoting action on the differentiation of normal human osteoblasts. *Key Eng Mater* 2006; 309-311:97-100
12. Ohya T, Ban T, Ohya Y, Takahashi Y. Preparation of concentrated, halogen-free aqueous titanium solution. *Ceram Trans* 2001;112: 47-52
13. Elliott CJ. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Tokyo: Elsevier, 1994
14. Cotton AF, Wilkinson G. *Advanced inorganic chemistry*. Tokyo: Baifukan, 1994
15. Jehng JM, Wachs IE. Niobium oxide solution chemistry. *J Raman Spec* 1991;22:83-89
16. Tamai M, Nakamura M, Isshiki T, Nishio K, Endoh H, Nakahira A. A metastable phase in thermal decomposition process of Ca-deficient hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14: 617-622
17. Gibson IR, Rehman I, Best SM, Bonfield W. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:533-539
18. Genge RB, Sauer RG, Wu YLN, McLean MF, Wuthier ER. Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle-mediated mineralization. *J Biol Chem* 1988;263:18513-18519
19. Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2002;17: 1190-1199
20. Wennberg C, Hessel L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner HU, Millan LJ. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 2000;15:1879-1888
21. Anderson CH. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 1995;314:266-280