

## 5. インプラントの生物学的試験（細胞試験）

### 5-1. CNT 添加 PEEK 材の細胞親和性

#### 5-1-1. 目的

CNT 添加 PEEK 材 (CNT/PEEK) を生体材料として使用するための安全性を評価するため、CNT/PEEK 上での細胞培養を行い、その増殖性を評価した。

#### 5-2. CNT/PEEK への細胞接着・増殖試験

一般的な細胞親和性試験に使用されるチャイニーズハムスター由来の線維芽細胞系 cell line で

ある V79 細胞を用い、CNT/PEEK 上での細胞接着・増殖能を評価した。

#### 5-2-1. CNT/PEEK への細胞接着・増殖試験

径 10mm (図 5-1) の CNT/PEEK をエタノールに数時間漬けて滅菌し、incubator で 24 時間乾燥させた。24well plate に CNT/PEEK と V79 細胞を入れ、10%FBS 含有 MEM 培地中で 1 日間培養して接着させ、細胞増殖能を Alamar blue assay と、蛍光顕微鏡による形態観察により評価した。CNT/PEEK の CNT 含有量は 0wt%、3wt%、5wt%、7wt% で、細胞を入れない well を control とした。



図 5-1 CNT 添加 PEEK 材 (CNT/PEEK) 左 3% 中 5% 右 7%

#### 5-2-2. 結果

Alamar blue assay では細胞増殖能に CNT の有無、含有量による統計学的な有意差は認められなかった (図 5-2)。蛍光顕微鏡による形態観察では、各群で細胞の形態に差を認めず、良好な細胞接着性を確認した (図 5-3)。解析条件として、脊椎ケージは等方線形弾性体と仮定し、その材料特性は steel

の物性値を参考に縦弾性係数 209GPa、ポアソン比 0.3 を与えた。圧縮試験の境界条件は、図 4-7 に示すケージ下面を完全固定し、ケージ上面に 50MPa の圧縮圧力を与えた。外力として一軸の圧縮力を与えた時に発生するケージ表面、あるいは内部に発生する圧力の伝播状態をみるために、構造物強度に対する評価指標である応力の分布を表示させた。

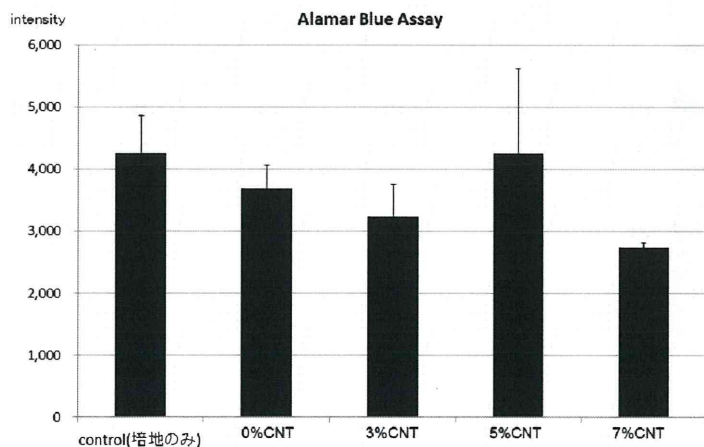


図 5-2 Alamar blue assay では細胞増殖能

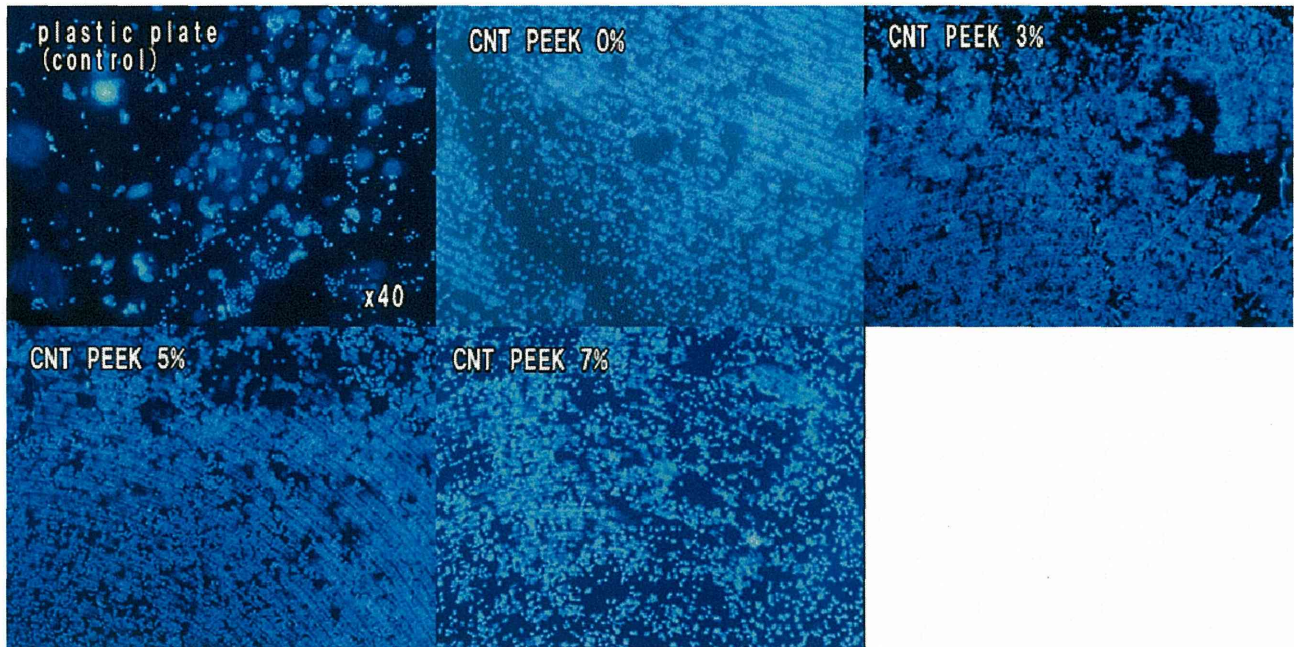


図 5-3 蛍光顕微鏡による形態観察

### 5-3. CNT/PEEK への骨芽細胞の反応

マウス骨芽細胞系 cell line である MC3T3-E1 細胞を CNT/PEEK 上で培養し、その増殖性、細胞形態を観察した。

#### 5-3-1. 方法

CNT/PEEK をエタノールに数時間漬けて滅菌し、incubator で 24 時間乾燥させた。24well plate に  $\phi$  14mm の CNT-PEEK (図 5-4) と MC3T3-E1 細胞を入

れ、10%FCS 含有  $\alpha$  MEM 培地を加え、37°C で 24 時間抽出して抽出原液を調製。CNT/PEEK 上および CNT/PEEK からの溶出液上で培養した。day1 および day4 に Alamar blue assay を行い、day4 に形態観察 (核および細胞質染色・走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察) を行った。CNT/PEEK の CNT 含有量は 0wt%、3wt%、5wt%、7wt% で、トルエン耐性プラスチックシート (Wako  $\phi$  14mm) を positive control、ZDBC 処理ポリウレタンを negative control とした。



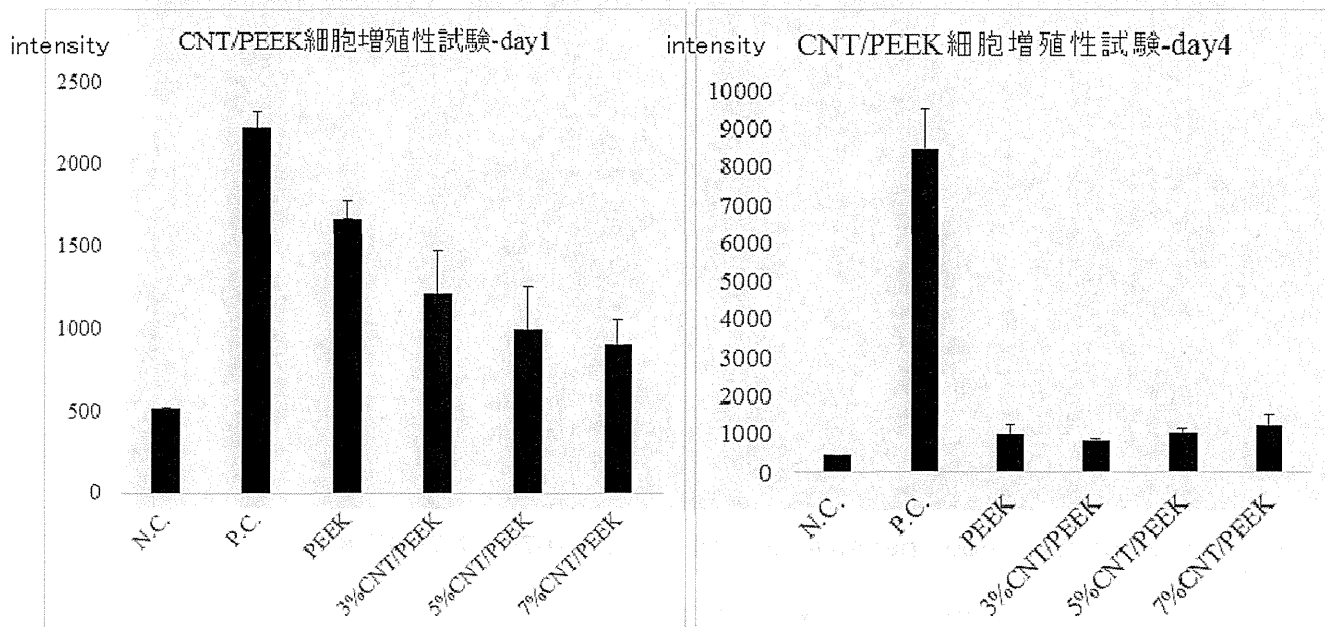
図 5-4  $\phi$  14mm の PEEK (左) と 7%CNT-PEEK (右)



5-3-2. 結果

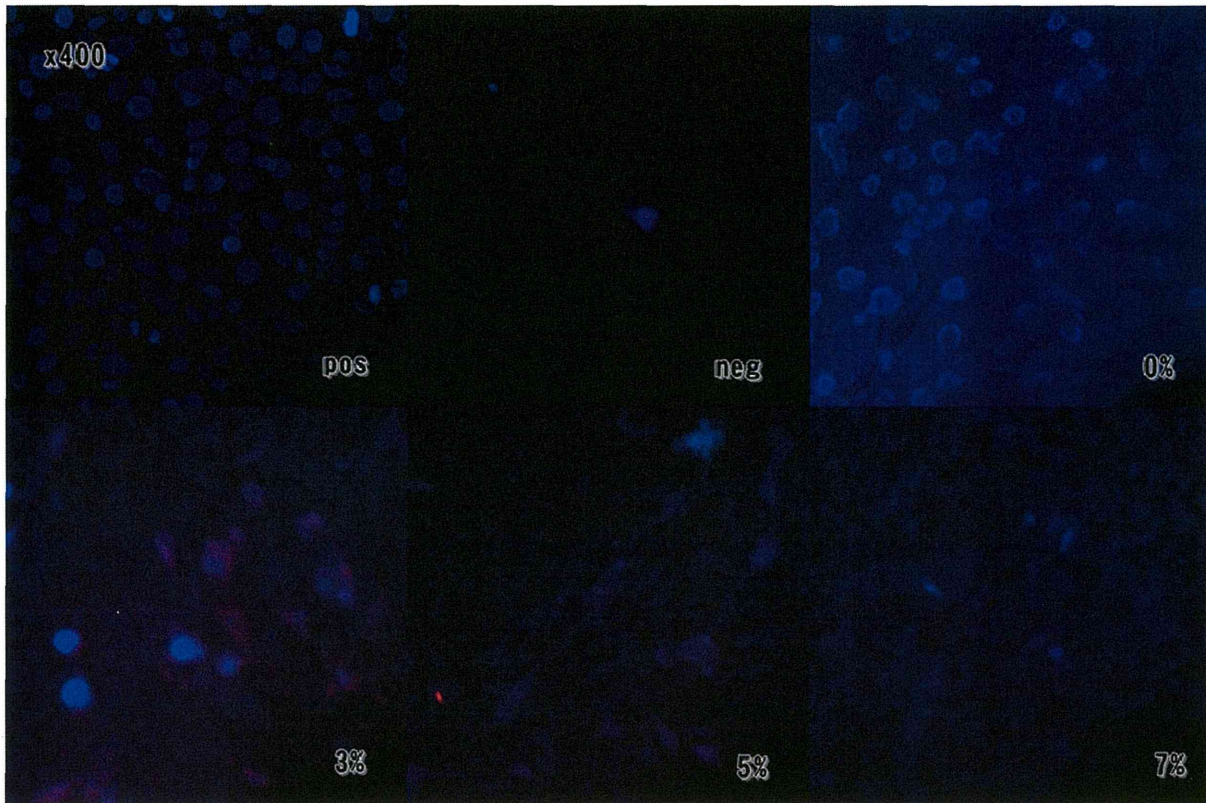
培養後 Day1 の Alamar blue assay では、PEEK/CNT では CNT の割合が増えると徐々に細胞増殖性が低下する結果となった。Day4 では positive control に比較し、PEEK 群では細胞増殖が著明に低下する結果となった(図 5-5)。PEEK 群の中では、CNT の有無、含有量による細胞増殖性の差は認められなかった。蛍光顕微鏡による形態観察では、0%CNT/PEEK の凹凸には一部であるが細胞が張り付いている部分があった。CNT 含有量 3%、5%、7%は細胞が乏し

いか、あっても小さく、変形がみられた(図 5-6)。SEM 観察では、0%CNT/PEEK の表面が粗く波打っており、細胞はあまり貼り付いていなかった。3%CNT/PEEK では 0%PEEK に比べると、表面は滑らかであったが凹凸が認められた。細胞は少しだけ貼り付いていた。細胞に比べ、突出している CNT の大きさはとても小さく見えた。5%および 7%CNT/PEEK の表面にも凹凸が見られ、細胞はあまり観察されなかった(図 5-7)。



N.C.:Negative Control , P.C.:Positive Control

図 5-5 培養後 1 日と 4 日の PEEK および CNT/PEEK 上での細胞増殖性



Pos : positive control , neg : negative control , 0-7% : 0-7%CNT/PEEK

図 5-6 蛍光顕微鏡による形態観察

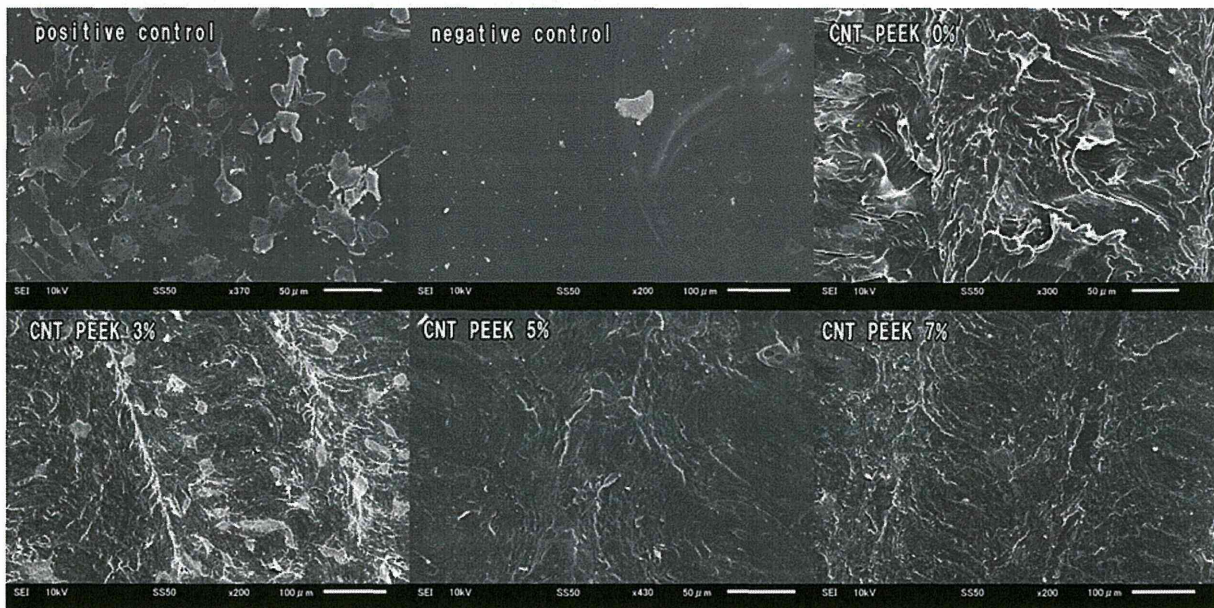


図 5-7 SEM による形態観察



#### 5-4. CNT/PEEK 溶出液による細胞への影響

CNT/PEEK を培養液に浸漬させて溶出液を作成し、CNT/PEEK 溶出液による細胞培養への影響を評価した。

##### 5-4-1. 方法

24well plate に CNT-PEEK を入れ、10%FCS 含有 MEM 培地を加え、37°C で 24 時間溶出して溶出原液を調製。CNT/PEEK 上および、CNT/PEEK からの溶出液上で V79 細胞を培養した。day1 および day4 に Alamar blue assay を行い、day4 に形態観察（核染色・SEM 観察）を行った。CNT/PEEK の CNT 含有量は 0wt%、3wt%、5wt%、7wt% で、トルエン耐性プラスチックシート (Wako φ14mm) を positive control、ZDBC 処理ポリウレタンを negative control とした。

##### 5-4-2. 結果

V79 細胞の増殖は、溶出液を加えない試験片上での培養では control に比べて CNT/PEEK で増殖能が低下していた。溶出液で培養した細胞に関しては増殖能に明らかな差はみられなかった (図 5-8)。蛍光顕微鏡による形態観察では、CNT-PEEK の表面に生着した細胞は control より少なかったが (図 5-9)、SEM 観察では個々の細胞が CNT/PEEK 表面に対し突起を付着させている像がみられた (図 5-10)。PEEK 剤表面に波打つような凹凸がみられ、これが生着性に関連している可能性も考えられた。

##### 5-5. 細胞試験まとめ

CNT/PEEK 上での細胞培養の結果、その増殖性は線維芽細胞 (V79 細胞) は control と各 PEEK 材の間に差を認めず、骨芽細胞 (MC3T3 細胞) は control 上で培養するよりも増殖能は劣るが、PEEK 材の中では CNT の有無、含有量による差を認めなかった。

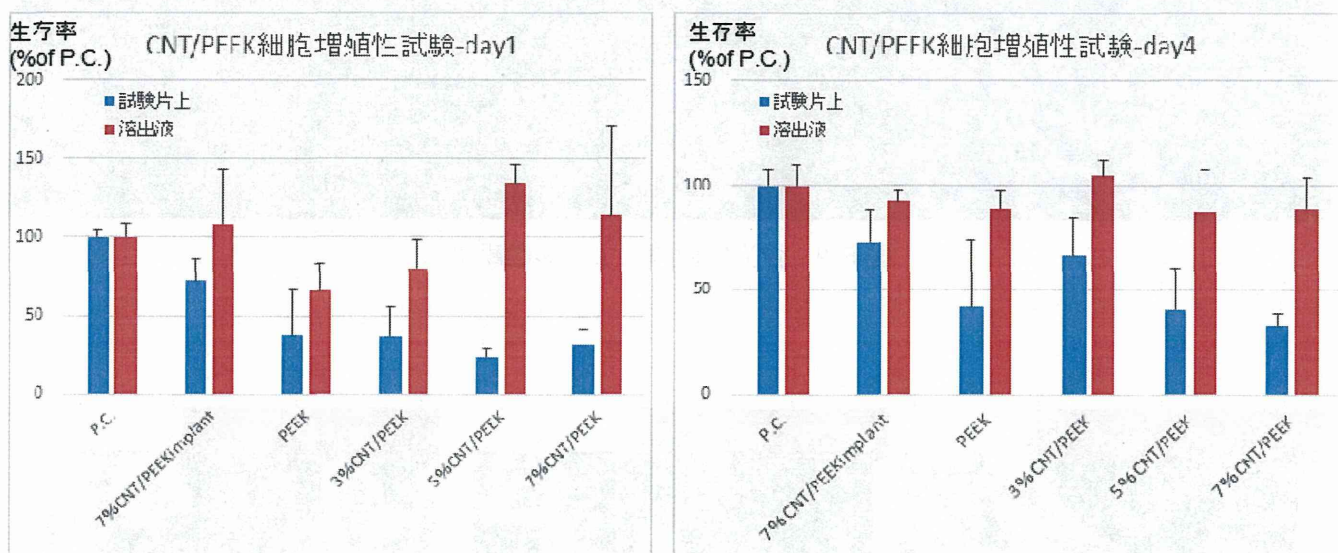


図 5-8 CNT/PEEK からの溶出液上の V79 細胞増殖能



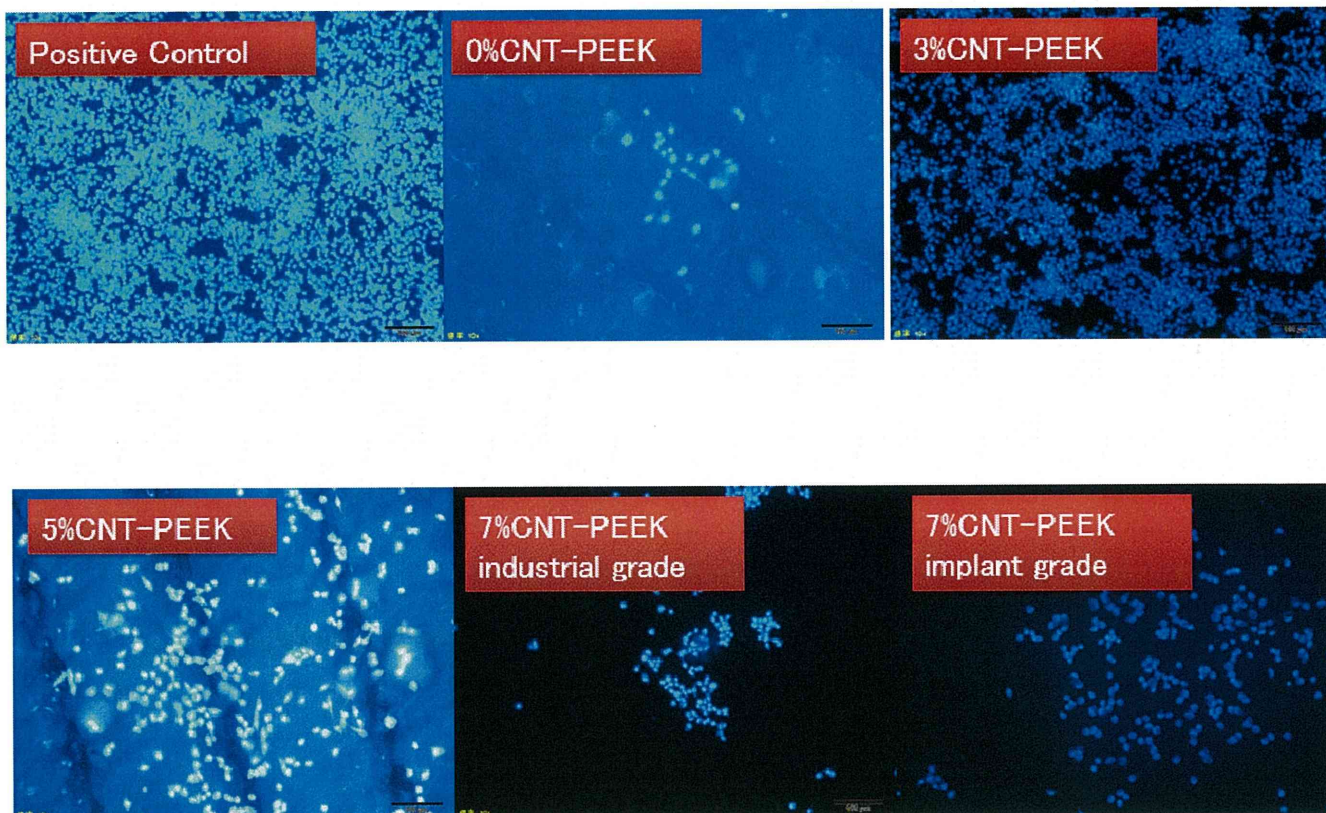


図 5-9 蛍光顕微鏡による形態観察

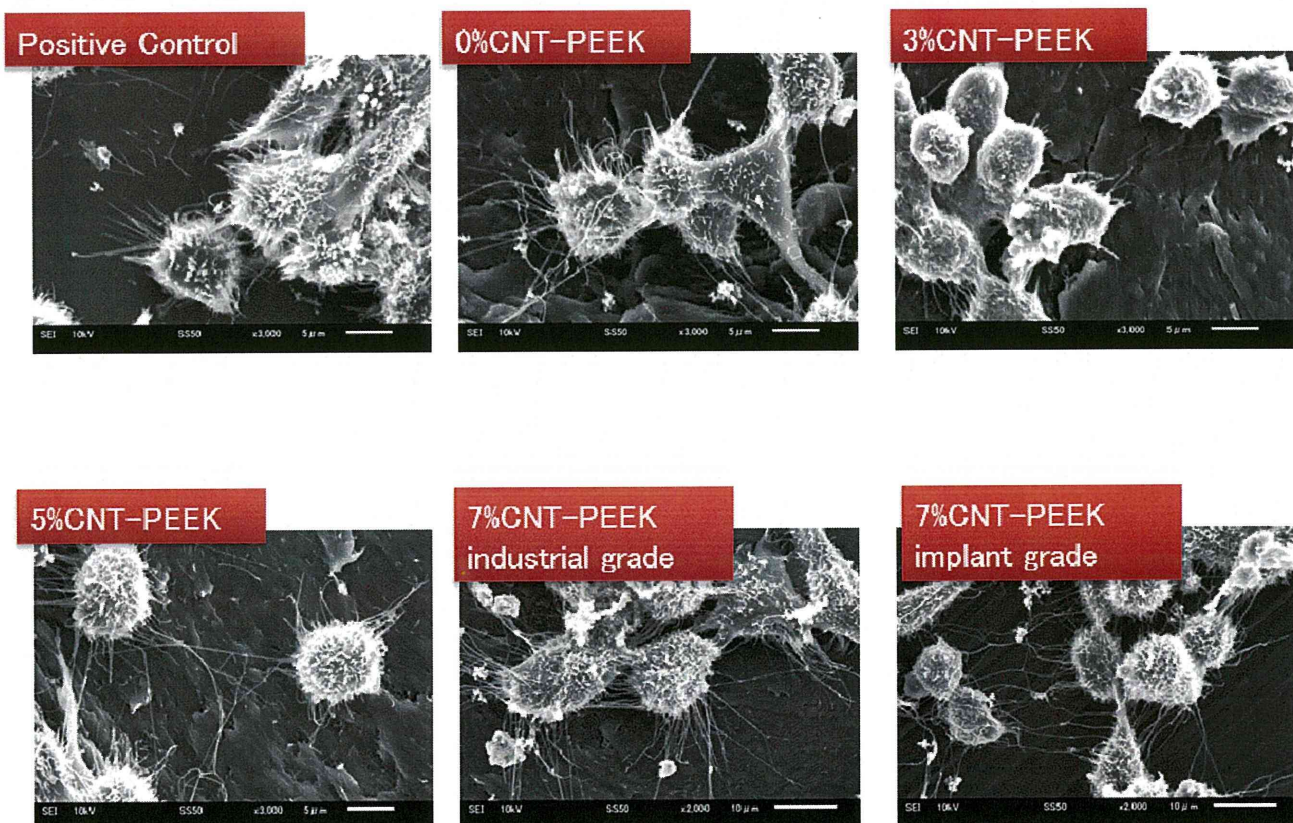


図 5-9 SEM による形態観察



## 6. インプラントの生物学的試験（動物試験）

### 6-1. 目的

CNT 添加 PEEK 材 (CNT/PEEK) を日本白色家兎の大腿骨内に埋植し、脊椎固定用インプラントとして用いるための骨組織親和性、骨固定力を評価する。動物実験は信州大学動物実験実施規定に基づいて行った。

### 6-2. CNT 含有量の違いによる骨組織反応の評価

CNT 含有量の異なる CNT/PEEK を骨組織内に埋植し、その親和性を評価する。

#### 6-2-1. 方法

CNT/PEEK にて、動物試験用インプラントを成形した。使用したインプラントは径 5.0×14.0mm の円柱状(図 6-1)で、組織親和性試験を行うための単純な円柱の物(組織親和性試験用インプラント)と、骨固定力を評価するための底面にネジ穴を空けた物(骨固定力試験用インプラント)を作製した。組織に接する表面の形状は組織親和性試験用インプラントも、骨固定力試験用インプラント(ネジ穴付き)も同様とした。

日本白色家兎(日本エスエルシー株式会社)(オス、体重 2.5~3.5kg)の大腿骨遠位端(大腿骨顆部)に PEEK のインプラントを埋植し、その骨組織親和性、骨固定力の評価を行った。

手術は無菌条件下で行った。麻酔はネプター注射液(ペントバルビタールナトリウム、大日本

製薬、30~40mg/kg)を耳静脈注射した全身麻酔を使用した。膝関節を皮膚上から触診し、膝関節関節裂隙、大腿骨顆部を確認して顆部の外側に大腿骨軸に沿った約 2cm の縦皮膚切開を置いた。大腿外側の筋膜、筋組織を線維方向に切開して大腿骨顆部に達した。径 5.0mm のドリルを用いて大腿骨顆部の外側から内側に向けて骨孔を作製した。骨孔部、創内を無菌の生理食塩水にて洗浄し、ガーゼにて圧迫して止血を行った。止血を確認後にインプラントを骨孔内に挿入した。インプラントは骨内から先端が出ているようにした(図 6-2)。筋膜と皮膚を 4-0 ナイロン糸にて縫合して手術を終了とした。手術は家兎 1 羽につき、両大腿骨にそれぞれ 1 個ずつインプラントを挿入した。各群 4 羽(大腿骨 8 本)の手術を行い、組織親和性試験を n=5、骨固定力試験を n=3 として評価を行った。

試験に使用したインプラントの CNT 含有量は 0wt%、3wt%、5wt%、7wt% で手術用のインプラントはエチレンオキサイドガスにて滅菌した。術後 26 週で家兎を静脈麻酔薬の過料投与にて安楽死させ、大腿骨を採取後にホルマリン固定とし、動物用マイクロ CT (RmCT、Rigaku 社)にてインプラントと骨の状態を観察した。5965 デュアルコラム卓上型万能試験システム(インストロン社製)(図 6-3)を用いて大腿骨からインプラントを引き抜く Pull-out 試験を行った。引き抜き速度は 5mm/分で、検体を固定位置から約 5mm 引き抜いた時点で試験を終了とした。引き抜き時の最大荷重を測定して骨固定力を評価した。

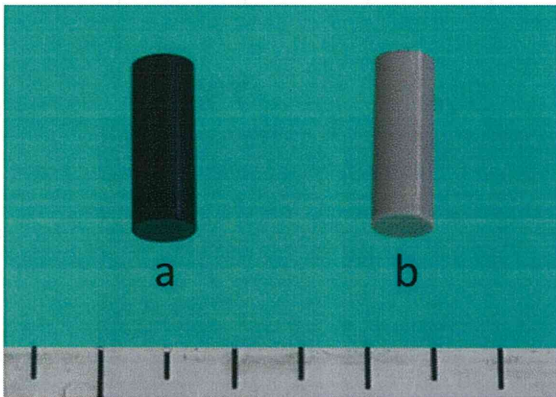


図 6-1 動物試験用インプラント a. CNT/PEEK インプラント b. PEEK インプラント

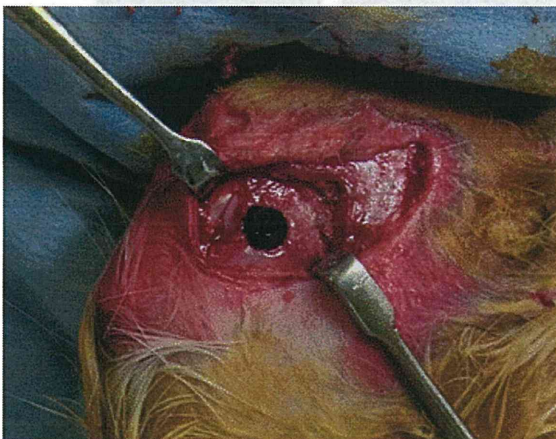


図 6-2 家兎大腿骨への CNT/PEEK 材インプラント埋植手術



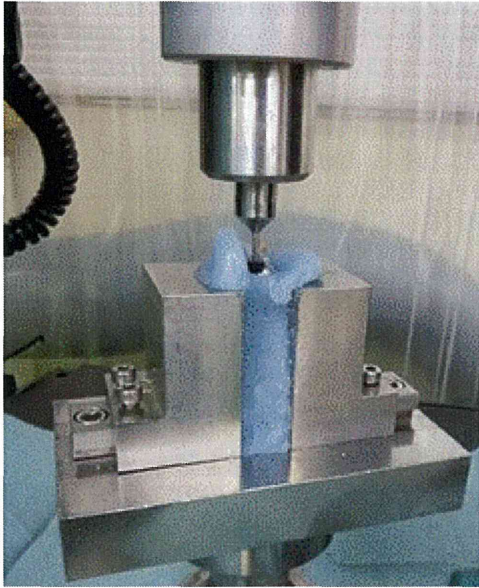


図 6-3 卓上型万能試験システム

6-2-2. 結果

日本白色家兎の大腿骨に埋植した CNT/PEEK インプラントの動物用マイクロ CT による観察では、インプラントの周囲で骨の再生が生じており、辺縁の骨硬化を認めた(図 6-4)。骨溶解反応など明らかな有害事象は認められなかった。CNT の含有量による各群間での差は認められなかった。

引き抜き試験の最大荷重は平均、0%CNT/PEEK で 6.2N、3%CNT/PEEK で 21.0N、5%CNT/PEEK で 17.7N、7%CNT/PEEK で 31.1N であり(図 6-5)、各群間に有意差は認めなかったが、7%CNT/PEEK 群の引き抜き最大荷重が最も大きかった。

CNT含有量

0%

3%

5%

7%

axial

coronal

sagittal

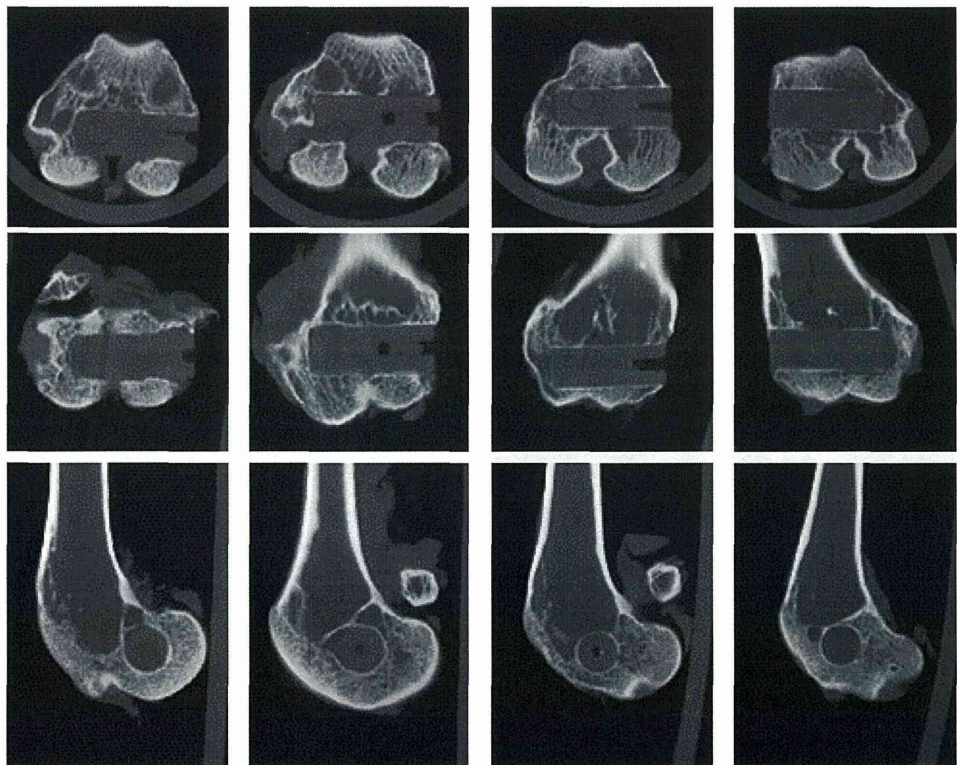


図 6-4 家兎大腿骨への CNT/PEEK インプラント埋植 26 週後の CT 像



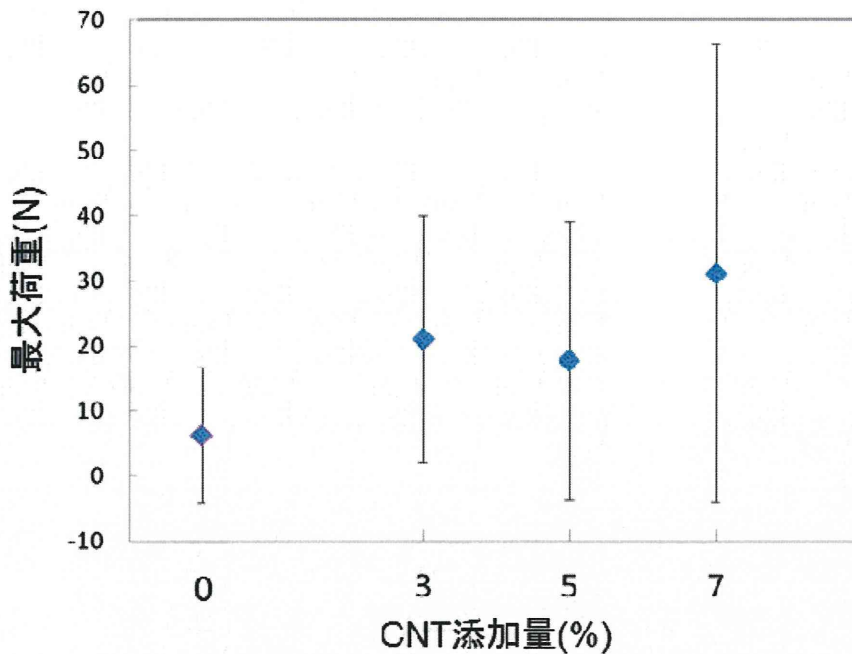


図 6-5 家兎大腿骨埋め込み後 26 週の CNT/PEEK インプラント pull-out 試験

### 6-3. インプラント表面の形状による骨組織親和性、骨固定力の評価

CNT/PEEK インプラントの骨固定力を向上させるために表面に溝を掘ったインプラントを作製し、その骨組織親和性、骨固定力を評価した。

#### 6-3-1. 方法

さらに短期での生体反応、骨固定力を評価するための実験を行った。試験には CNT を 7wt% 複合させた 7% CNT/PEEK を用いた。さらに、骨組織との親和性、骨誘導能を向上させるため、インプラントに溝を掘ったインプラントを作成した(図 6-6)。コントロールとして CNT を複合させない PEEK 材によるインプラントを使用した。インプラントの滅菌はエチレンオキサイドガス滅菌にて行った。

①0% CNT/PEEK 溝(-)

②0% CNT/PEEK 溝(+)

③7% CNT/PEEK 溝(-)

④7% CNT/PEEK 溝(+)

の 4 群で比較試験を行った。

術後 4 週後に家兎を静脈麻酔薬の過剰投与にて安楽死させ、大腿骨を採取後にホルマリン固定とし、動物用マイクロ CT (RmCT、Rigaku 社)にてインプラントと骨の状態を観察した。各群 4 羽(大腿骨 8 本)の手術を行い、組織親和性試験を n=5、骨固定力試験を n=3 として評価を行った。

採取した組織親和性試験用インプラント入り的大腿骨はオステオレジン包埋キット(和光純薬、297-56001)を用いてインプラントを取り出さずにメタクリル酸メチルモノマー(MMA)を浸透させて樹脂包埋を行った。樹脂包埋後に標本を硬組織薄切標本作成用ゼーゲミクロトーム(SP1600、Leica Microsystems)を用いて薄切を行った。標本はヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を行い、光学顕微鏡にて評価を行った。評価は病理組織像にてインプラントと骨の界面を観察し、炎症反応や骨溶解などの有害反応の有無、程度を評価した。

骨固定力の測定は前述の方法と同様に 5965 デュアルコラム卓上型万能試験システム(インストロン社製)を用いた Pull-out 試験にて評価を行った。

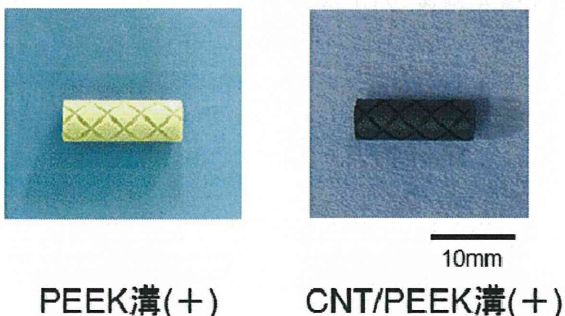


図 6-6 表面に溝を掘ったインプラント

### 6-3-2. 結果

骨との親和性、固定力の向上を目的にインプラントの表面に溝を掘ったインプラントを使用した実験では、大腿骨埋植後、早期の反応を評価した。埋植後4週 of インプラントを含めて採取された大腿骨のCT像では(図6-7)、インプラント周囲の骨は術後26週ほど修復されておらず、骨とインプラントとの間に間隙が観察された。インプラント周囲の骨硬化像はまだ、認められなかった。CNT含有の有無、インプラント表面の溝の有無による、明らかな差は認めなかった。各群とも明らかな骨融解反応は認めなかった。

術後4週で採取された大腿骨の病理組織標本では、インプラント周辺には修復しつつある骨組織を認め、溝(+)群では溝内に骨基質が入り込み、

再生しつつある像が観察された(図6-8)。インプラント周囲の骨組織に、骨融解や炎症像などの明らかな有害反応を認めなかった。CNTの有無によるインプラント周囲の骨修復反応に差異を認めなかった。

Pull-out 試験の結果は、引き抜き時の最大荷重が0%CNT/PEEK溝(-)群で48.4N、0%CNT/PEEK溝(+ )群で87.9N、7%CNT/PEEK溝(-)群で15.4N、7%CNT/PEEK溝(+ )群で178.7Nであり、各群に統計学的有意差は認めなかったが、7%CNT/PEEK溝(+ )での引き抜き最大荷重が最大であった(図6-9)。

術後8週、12週の評価を行うためのインプラントの動物内への埋植も終わっており、順次CT撮影、pull-out 試験、病理組織学的評価を行う予定である。

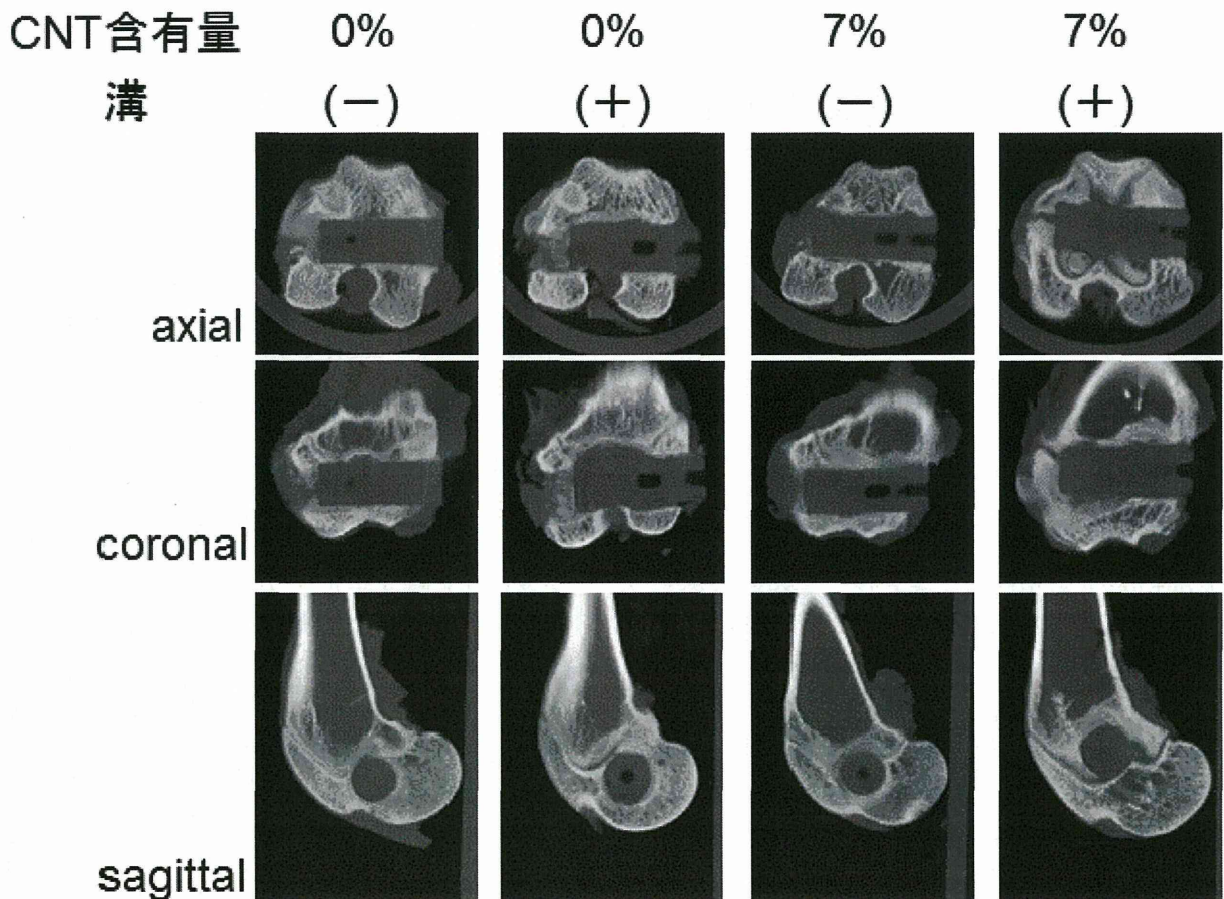


図6-7 家兎大腿骨へのCNT/PEEKインプラント埋植4週後のCT像