

慶応大学[院] ○五藤寛丈 慶応大学[院] 羽田未蘭野
慶応大学 小茂鳥 潤 埼玉大学 森田真史

1 緒言

Ti-Ni 合金は形状記憶効果、超弾性などの優れた機能に加え、耐食性や機械的性質にも優れていることから医療分野への応用が期待されている。しかしながら、合金の主成分である Ni がアレルギー反応を促進することが懸念されており、生体に対する安全性という観点から問題が残されている。

金属材料を生体内で長期間にわたり使用する場合、細胞毒性やアレルギー反応性など、金属材料が生体に与える影響に加え、細胞が金属材料の劣化に及ぼす影響についても検討する必要があると考えられる。しかしながら、細胞毒性試験¹⁾や埋入実験²⁾により Ti-Ni 形状記憶合金の生体適合性を評価した研究は行われているが、金属と生体組織の相互的な影響を考慮して、その安全性を検討した研究は極わずかである³⁾。

そこで本研究は、細胞の活性が金属材料の表面劣化に及ぼす影響と金属材料の存在が細胞の活性に及ぼす影響の両者を調べ、Ti-Ni 形状記憶合金の生体適合性について検討・考察を加えることとした。

2 実験方法

2.1 供試材

供試材としては、Ti-Ni(50.0at.%Ni)形状記憶合金を用いた。また、比較材として純 Ni, Ti-6Al-4V 合金および SUS316L 鋼を準備した。これらの材料を厚さ 3mm、直径 16mm の円盤状に機械加工後、表面を#320-#1200 の耐水研磨紙および SiO₂ 粉末を用いて鏡面状に仕上げた。その後、アセトンによる超音波洗浄を行い、オートクレーブを用いて 121℃、30min の滅菌処理を施し供試状態とした。

2.2 浸漬試験

浸漬は Fig.1 に示すような自作のテフロン製のセルを用いて行った。浸漬試験を行う際の細胞としては、マクロファージ (以下 Mφ) と L929 繊維芽細胞 (以下 L929 細胞) の 2 種類を用いた。培養液としては RPMI1640 培地に 10%FBS (ウシ胎児血清) および L グルタミン、重

炭酸水素ナトリウム、ストレプトマイシン、ペニシリンを加えたものを用いた。培養はすべて 37℃に保持された 5%CO₂、湿度 100%のインキュベータ内で行った。試験を行う際の初期細胞数や浸漬期間などの実験条件を Table1 に示す。Series A は細胞を含まない培養液のみに浸漬する実験で control として行った。Series B は細胞が材料の劣化に及ぼす影響を検討するための実験で、免疫細胞のひとつであるマクロファージを用いた。このシリーズの試験については浸漬後、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて表面を観察した。Series C は生体材料の持つ毒性を検討するための試験で、浸漬細胞としては L929 細胞を用いた。Series C の条件の下で浸漬した試料に対しては、浸漬試験後、付着細胞数の測定および LDH 活性値測定を行った。付着細胞数は培養セルから培養液を回収後、トリプシン 1ml を加えて細胞を試料表面から剥離させ、血球計算盤を用いて測定した。LDH 活性値測定は回収した培養液 50μl あたりに LDH 活性測定用試薬 2ml を加え、形分光光度計を用いて行った。LDH とは、細胞膜内に存在する乳酸脱水素酵素の略で、ピルビン酸と乳酸と間の酸化還元反応に関与する酵素のことをいう。細胞死に伴う細胞膜の破壊により、細胞質内の LDH が細胞外に逸脱することで LDH 活性が増加する。そのため細胞が毒性を受けた指標として近年用いられている。

3 実験結果および考察

3.1 生体細胞が材料の劣化に及ぼす影響

Series A および Series B の条件下で浸漬試験を行い、浸漬後に SEM を用いて試料表面を観察した結果を Fig.2 および Fig.3 に示す。Fig.2 は Ti-Ni 合金、Fig.3 は純 Ni の表面観察結果である。Ti-Ni 合金の場合、Series A および Series B の条件の下で浸漬した試料表面は、試験前の様相と比較して大きな差は認められないこと、また、細胞の存在による差も認められないことがわかる。これに対し、純 Ni においては、Series A, Series B とともに浸漬試験後の表面は粗く腐食跡が観察される。特に Series B に浸漬し

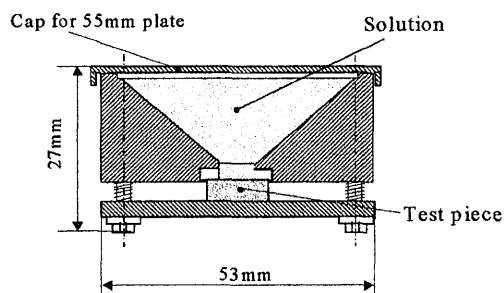


Fig. 1 The cell for soak test with cell-culture

Table1 Details for immersion test

Series	Cell	Samples	The number of cells	Term	
				3days	7days
A	Non cell	Ti-Ni	0.0/1 m		○
		Pure-Ni			○
B	With Mφ	Ti-Ni	1.0 × 10 ⁴ /1 m		○
		Pure-Ni			○
C	With L929	Ti-Ni	4.0 × 10 ⁴ /1 m	○	○
		Ti-6Al-4V		○	○
		SUS316		○	○
		Pure-Ni		○	○

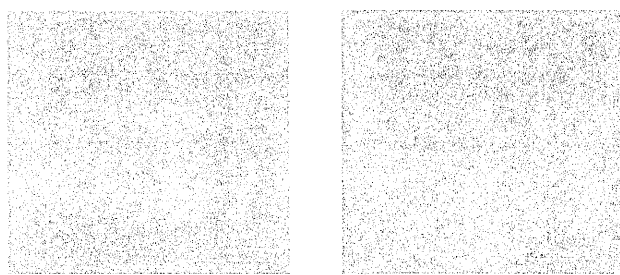


Fig.2 Typical feature of specimen before and after soak test (Ti-Ni)

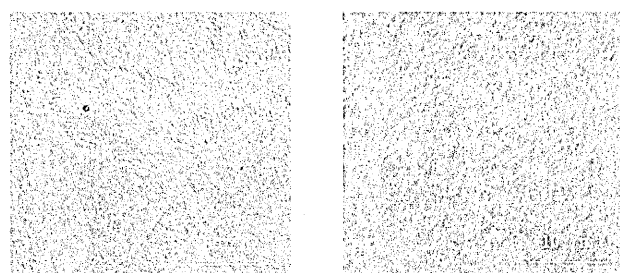


Fig.3 Typical feature of specimen before and after soak test (Pure-Ni)

た試料の表面は、Series A と比較して粗く、腐食跡として極微細な凹凸が数多く確認された。これは、Mφが材料表面に吸着し、Mφと材料との間にできたすきま部において溶液中の濃度が急増し、その部分で腐食が促進したことが原因と考えられる⁴⁾。以上から Ti-Ni 合金は Ni を含有する金属であるが純 Ni とは異なる腐食挙動を示し、細胞の存在により腐食が促進されるような環境中であっても耐食性に優れた表面を有することが明らかとなった。

3.2 材料が生体細胞の活性に及ぼす影響

3.2.1 付着細胞数の測定

Series C の条件で浸漬した各試料の表面に付着した細胞数の測定結果を Fig.4 に示す。浸漬3日後に注目すると、Ti-Ni 合金の付着細胞数は Ti-6Al-4V 合金と比較して少ないものの SUS316L 鋼とは同等の値であることがわかる。また、この時点では、純 Ni に浸漬した場合と Ti-Ni 合金に浸漬した場合とでは大きな差は認められない。それに対して、浸漬7日後では、Ti-Ni 合金の付着細胞数は SUS316L 鋼よりも高い値を示している。これは、SUS316L 鋼と比較して、Ti-Ni 合金の耐食性が優れることに起因するものと考えられる。また、浸漬7日後における純 Ni の付着細胞数は著しく低下していることが確認できる。これは、Fig.3 にも示したとおり、純 Ni における表面の腐食が著しく進行していることが原因と考えられる。

3.2.2 LDH 活性値測定

Fig.5 に吸光度変化により算出した浸漬7日後における LDH 活性値を示す。同図から、Ti-Ni 合金の LDH 活性値は純 Ni と比較して低く、Ti-6Al-4V 合金、SUS316L 鋼と同程度の値を示していることがわかる。細胞がダメージを負った際に、細胞から LDH が逸脱する。したがって、

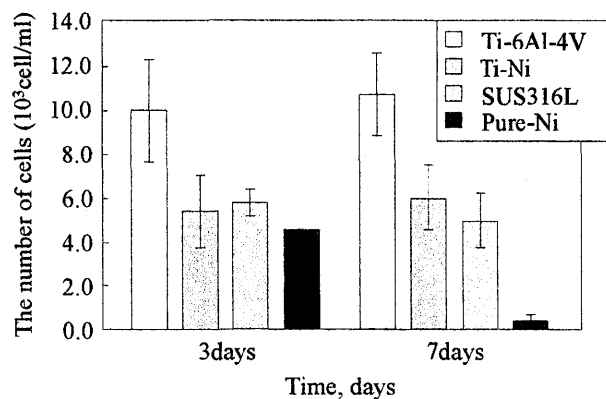


Fig.4 The number of cells after soak test (series C)

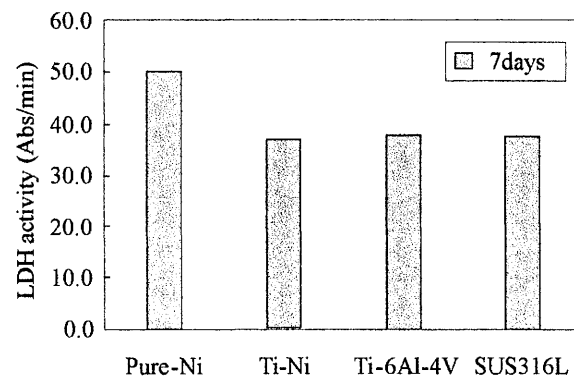


Fig.5 LDH activity (series C)

Ti-Ni 合金を浸漬していた培養液中の細胞は純 Ni を浸漬した細胞と比較して細胞膜が破壊されずに活性を保った状態で存在していたと考えられる。以上から Ti-Ni 合金は生体材料として実際に使用されている Ti-6Al-4V 合金、SUS316L 鋼と同等の生体適合性を有するものと考えられる。

4 結言

本研究で得られた結言を以下に示す。

- (1) 浸漬試験後、Ti-Ni 合金における表面の粗さや性状の変化は、純 Ni のそれと比べはるかに小さく、Ni を含有していても Ti と金属間化合物を形成することで、優れた耐食性を示し、生体へ影響を及ぼすと言われる Ni イオン溶出量が減少するものと考えられる。
- (2) 金属表面への付着細胞数の測定結果から、Ti-Ni 合金の細胞毒性は、実際に生体材料として使用されている SUS316L 鋼に比べ良好であることが明らかになった。
- (3) LDH 活性値測定の結果から、純 Ni と比べ、Ti-Ni 合金に浸漬していた細胞は細胞膜を破壊されずに活性を保った状態で存在していることが明らかとなった。このことは Ti-Ni 合金の良好な生体適合性を示唆するものである。

参考文献

- 1) Denise Bogdanski, *Biomaterials*, **23**, 4549-4555 (2002).
- 2) Chun-CheShih, *J. Biomed. Mater. Res.*, 395-403 (2000).
- 3) 本間, 21 世紀連合シンポジウム論文集, Vol.1, 133-138 (2002).
- 4) 前田, *バイオマテリアル*, Vol.21, No.4, 319-326 (2003).