生体適合性を改良したチタン–ジルコニウム合金：ラット埋植試験におけるチタン–ジルコニウム合金の純チタンおよびジルコニウムと比較した組織反応性と感作性^{*1}

五十嵐良明¹ 豊田和弘^{2,*2} 小林郁夫³ 土居 寿³
米山隆之³ 浜中人士³ 土屋利江¹

¹国立医薬品食品衛生研究所療品部

²国立医薬品食品衛生研究所病理部

³東京医科歯科大学

J. Japan Inst. Metals, Vol. 71, No. 4 (2007), pp. 395–401

© 2007 The Japan Institute of Metals

Improved Biocompatibility of Titanium–Zirconium (Ti–Zr) Alloy: Tissue Reaction and Sensitization to Ti–Zr Alloy Compared with Pure Ti and Zr in Rat Implantation Study

Yoshiaki Ikarashi¹, Kazuhiro Toyoda^{2,*2}, Equo Kobayashi³, Hisashi Doi³,
Takayuki Yoneyama³, Hitoshi Hamanaka³ and Toshie Tsuchiya¹

¹Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158–8501

²Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158–8501

³Department of Metallurgy, Division of Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Dental and Medical University, Tokyo 101–0062

Titanium–zirconium (Ti–Zr) binary alloy has better corrosion resistance and mechanical properties than commercially pure Ti. The present study was designed to determine the biocompatibility of Ti–Zr alloy by an implantation test in animal bodies in comparison with pure Ti, Zr, and chromium (Cr) implants. Sample specimens were placed in a subcutaneous position in rats for 8 months. No significant decreases in body weight, the weight of any organ, or the weight of any organ relative to body weight were found in the implant groups compared to a no-implant control group. On hematological examination, small differences in several parameters were found in some groups, but these changes were not attributable to the materials implanted. Mitogen-induced blastogenesis was observed in similar degrees among all implant groups. These results suggest that the implantation of test samples did not cause systemic toxicity or a decrease in immune activity. The fibrous capsule membranes around the Ti and Ti–Zr alloy implants were thinner than those around Cr implants. The numbers of macrophages, inflammatory cells, and other cells involved in immune responses in and around the fibrous capsules of the Cr- and Ti-implant groups were higher than those of the Ti–Zr alloy- and Zr-implant groups. The Ti–Zr alloy had the lowest total score of tissue responses among the materials tested. None of the animals from the Ti-, Zr-, and Ti–Zr alloy-implant groups exhibited a skin reaction following exposure to Ti or Zr salt solutions. These results indicate the Ti–Zr alloy has better biocompatibility than Ti for use as an artificial surgical implant.

(Received October 13, 2006; Accepted January 12, 2007)

Keywords: titanium alloy, titanium, biocompatibility, inflammation, hypersensitivity

1. 緒 言

ステンレス鋼およびコバルト–クロム (Co–Cr) 合金は、その生体適合性や物理学的性質、および加工の容易さなどから整形外科および歯科用インプラントの材料として広く用いられている¹⁾。これらの合金は優れた耐食性を有しているため、局所的または全身的な生体反応を起こさないとされていたが、生体内では時としてフレッチング腐食が起こり、金属イオンが溶出する。金属インプラントを埋入した患者や動物

で、血中、尿中および組織中の金属イオン濃度が上昇する例が観察されている^{2–6)}。特に、ニッケル (Ni)、Co および Cr は組織傷害や金属アレルギーを起こすことが知られている^{7–13)}。

チタン (Ti) および Ti 合金は現在、整形外科および歯科領域では最も魅力的な金属材料と考えられている。Ti 合金は機械的強度、耐食性および生体適合性が優れていることから使用例が多くなっている^{14–17)}。こうした性質は、主として材料表面に形成される安定な酸化チタン (TiO₂) 層による^{18,19)}。しかしながら、工業用純 Ti の引張強度は人工股関節、釘、あるいはねじとしては不十分であり²⁰⁾、耐摩耗性もステンレス鋼や Co–Cr 合金に劣る²⁰⁾。実際、Ti から発生

^{*1} Mater. Trans. **46** (2005) 2260–2267 に掲載

^{*2} 現在：日本たばこ産業 (Present address: Japan Tobacco Inc.)

した摩耗粉が組織の炎症, 痛み, および骨破壊に関連することが報告されている^{18,19,21-24)}。工業用純 Ti の機械的強度や耐食性を改良しようと, 様々な元素を用いた合金開発が試行されている。Ti-6Al-4V 合金は高強度の Ti 合金であるが, 工業用純 Ti よりも生体適合性, 耐摩耗性および耐食性に劣る。そのため, Ti-6Al-4V 合金は毒性のあるバナジウム(V)を含む摩耗粉やイオンを溶出してしまう¹⁸⁾。現在, 生体内での合金の摩耗および腐食を抑えることは困難とされており, 結果として合金の構成元素が溶出したり, 摩耗粉が発生したりする。したがって, 毒性の強い元素は合金の添加元素として用いないことが望ましい。

ジルコニウム(Zr)は Ti と同じ周期律表の VIa 群に属し, Ti と化学的性質も類似している²⁰⁾。大気中では Zr 表面に不溶性の酸化物(zirconia)が形成され, これが耐食性に関係する。Zr は一般的に局所のおよび全身の毒性は少ないとされている²⁵⁾。このことから, Kobayashi らは Zr を工業用純 Ti の性質を改良するための添加元素として選び, 人工関節や骨プレートのような医療機器の材料として使用できる Ti-Zr 2 元合金を作製した²⁰⁾。Ti-50 原子%Zr(Ti-50%Zr(at%), Ti-Zr 合金)の硬度は工業用純 Ti の 2.5 倍であり, 機械的強度に優れていた²⁰⁾。

材料の機械的強度に加えて生体適合性も, インプラントとして使用できるかどうかを決定する重要な因子である。我々は既に, 腐食しやすい Cr 合金を長期間埋植した動物が Cr に感作することを見出しており²⁶⁾, こうした動物モデルがインプラント材料の生体反応性を調べるのに有用であることを示した。本研究では, ラットへの埋植試験によって Ti-Zr 合金の生体適合性を評価し, Ti および Zr と比較した。純 Cr は陽性対照材料として用いた。8 ヶ月間皮下埋植した後, 血液学的検索および検体周辺組織反応の病理学的検索を行った。また, Ti 製ペースメーカーを入れた患者での感作例が報告されていることから^{27,28)}, 金属塩溶液を塗布して金属への感作の有無を見た。更に, 脾臓細胞の *in vitro* における増殖能を測定し, 免疫系に対する影響についても検討した。

2. 材料と方法

2.1 試験材料

Ti, Zr, Ti-50 原子%Zr(Ti-50%Zr(at%), Ti-Zr 合金)および Cr を試料とした。これらの作製方法は Kobayashi らの報告²⁰⁾にある。簡単に説明すると, スポンジ Ti(純度 > 99.8 mass%), Zr(純度 > 99.5 mass%), または電解 Cr(純度 > 99.98 mass%)を, 水冷銅ハースを使用したアルゴンアーク溶解炉により溶解し, 不十分な混和による組成の偏りを防ぐため, 鋳塊の回転, 再溶解を少なくとも 5 回行った。埋植中の機械的外傷を最小限にするため, 試料の形状は厚さ 1 mm, 直径 14 mm の円板状とした。シリコンカーバイド製ディスクを用いて, ボタン状の鋳塊から切断して試料片をとり, 600 番まで次第に目を細かくしたエメリーペーパーを用いて研磨した後, 0.03 mm アルミナ研磨剤を用いて鏡面仕上げした。各試料は 70%エタノールおよび超純水で洗浄し, 高圧蒸気滅菌した。

2.2 動物

F344/DuCrj 系, 5 週齢, 雌性ラットを日本チャールス・リバー社から購入した。それぞれの試料片を埋植する埋植群として 4 群, および埋植をしない対照群の計 5 つの実験群を準備した。各群とも動物数が 6 匹となるように, 無作為に分けた。動物は空調した施設(室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 5\%$, ライトサイクル 12 時間/日)で飼育した。食餌(F-2, 船橋農場)および飲水は自由に摂取させた。1 週間の馴化の後, 試料の埋植を行った。すべての実験は, 国立医薬品食品衛生研究所「動物実験に関する指針」を遵守し, 動物福祉・愛護の精神に基づいて行った。

2.3 埋植試験^{26,29)}

動物はネンブタール注射液(大日本住友製薬)を 50 mg/kg 腹腔内注射して麻酔した。動物の背部を電気バリカンおよびシェーバーで毛刈りし, 70%エタノールで洗浄した。背部右側皮膚をはさみで切開して, 1 匹に対し試料片 1 片を皮下に埋植した後, 縫合した。対照動物は, 試料を入れず皮膚切開のみ(sham operation)を施した。8 ヶ月間の試験期間中, 定期的に体重測定し, 状態を観察した。

2.4 血液学的および病理学的検索

各試験片をそれぞれ動物に埋植して 8 ヶ月間経過後, 5 つの実験群のすべての動物についてエーテル麻酔し, 腹部大動脈から採血(約 4~5 mL)し, 自動血球計数装置(M-2000, 東亜医用電子)を用いて, 以下の測定を行った。赤血球数(RBC), ヘモグロビン濃度(HGB), ヘマトクリット(HCT), 平均細胞体積(MCV), 平均細胞ヘモグロビン(MCH), 平均細胞ヘモグロビン濃度(MCHC), 血小板数(PLT), 白血球数(WBC)。白血球型別百分率については自動血液分析装置(MICROX HEG-120A, オムロン立石電機)を用いて測定した。脾臓, 肝臓, 腎臓, 胸腺および試料片とその周辺組織を摘出して重量を測定した後, 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し, 常法に従ってパラフィン包埋して薄切標本作製した。試料片はアルコール脱水完了後に摘出した。ヘマトキシリン・エオジン染色を施して顕微鏡による病理学的検索を行った。線維芽細胞, 好中球, 好塩基球, マクロファージ, 巨細胞, リンパ球, 形質細胞の試料片周囲に形成された線維性カプセル(被膜)内への出現頻度, あるいは炎症細胞の被膜周辺への浸潤を, - = なし(0), + = 低頻度(1), ++ = 中頻度(2), +++ = 高頻度(3)にランク分けして, これら 8 項目の合計点を求めた^{26,29)}。また, 線維性被膜の厚さをマイクロメーターで測定した²⁹⁾。厚さは試料片のあった穴と被膜の境界面と垂直方向に 10 ケ所を測定し, その平均値で表した²⁹⁾。

2.5 感作性評価

8 ヶ月間の埋植後, 動物を犠牲死する 72 時間前に, 5 つの実験群すべての動物の背部を毛刈りした。2%塩化チタン(TiCl_4)のエタノール溶液, 10%塩化ジルコニウム(ZrCl_4)の 70%エタノール溶液, および 0.02%重クロム酸カリウム

($K_2Cr_2O_7$) の 25% エタノール溶液をそれぞれ 50 μ L ずつ、すべての動物に塗布し、閉塞用パッチ(鳥居薬品)を貼付した。各金属塩の塗布濃度は別に、未処理の動物を用いた予備刺激性試験により決定し、皮膚刺激反応を引き起こさない最高濃度とした^{26,30)}。塗布溶媒は、決定したそれぞれの濃度で金属塩が溶解し、エタノール濃度が最高になるように調製した。24 時間後、閉塞用パッチを取り去り、更に 24 時間後に皮膚反応(紅斑と浮腫)の程度を観察した。

皮膚反応を観察し、前述のとおり採血が終了した動物から脾臓を摘出した。各動物の脾臓は 200 メッシュのステンレス製金網を置いた 35 mm シャーレに 1 ずつ入れ、Hanks 液(pH 7.4, Sigma-Aldrich 社, USA) 2 mL を加えた後、注射筒のシリンジ部分を用いてつぶし、脾臓リンパ球を遊離した。細胞懸濁液を 15 mL 遠心管に移し、4°C, 1200 rpm で 5 分間遠心し、上清を除いた後、0.83% ammonium chloride-tris solution (pH 7.65) 2 mL を加えて 37°C で 5 分間処理し、混入する赤血球を溶血させた。細胞を洗浄するため、遠心管に Hanks 液を加え、4°C, 1200 rpm で 5 分間遠心して上清を除いた。この洗浄操作をさらにもう 1 回繰り返した後、細胞に 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), ペニシリン 100 units/mL, ストレプトマイシン 100 μ g/mL および 10% 牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地を加え、細胞浮遊液を調製した。各実験群とも動物ごとに調製した細胞浮遊液(5×10^5 cells/200 μ L)を 96 穴プレートに 3 穴ずつ入れ、10 μ L の 10^{-8} mol/L $K_2Cr_2O_7$, 10^{-5} mol/L $TiCl_4$, 10^{-5} mol/L $ZrCl_4$, または 5 μ g/mL Con A 溶液, および 9.25 KBq [3H]methyl thymidine (3H TdR)を加え、37°C, 5%炭酸ガス培養器中で 48 時間培養した。培養終了後、セルハーベスター(Type 11025, SKATRON Instruments AS, Norway)を用いて細胞をガラスフィルター(Type Filter Mat 11731, SKATRON Instruments AS, Norway)に回収し、液体シンチレーションカウンター(LSC-5101, Aloka)で細胞内に取り込まれた 3H TdR 量(counts per minute, cpm)を測定した。

3. 結 果

3.1 体重および臓器重量

埋植 8 ヶ月後、いずれの試験片の表面にもさびやひび等の著しい肉眼的変化は認めなかった。すべての埋植群とも、対照群と比較して体重および臓器重量の低下は認められなかった(Table 1)。Zr 埋植群の体重は対照群よりも高い値を示した。埋植群のうち数匹の動物で胸腺、脾臓、肝臓、腎臓重量の変化が認められたが、各臓器の体重に対する相対比は対照群を含む実験群間で有意な差はなかった。

3.2 血液学的検索

Table 2 に結果を示した。Ti 埋植群で対照群と比べてわずかに RBC, HCT, HGB が減少した。他の埋植群でもいくつかの項目について変化が認められるが、いずれも増加または減少というような明確な傾向はなかった。白血球型別百分率については対照群と埋植群で有意な差は認めなかった。

3.3 病理学的検索

Ti 片周辺組織の病理標本写真を Fig. 1 に示した。中央の空白部は埋植されていた試料片が摘出された跡である。成熟した線維芽細胞が、組織と Ti 片を分離するようにカプセル(被膜)を形成しているのがわかる。Fig. 2 は Ti 片および Ti-Zr 合金片の周辺組織を高倍率($\times 100$)で見た像で、下の空白部は試料片の摘出跡である。Ti 埋植群の 6 匹中 2 匹で中程度の炎症反応が認められた。Fig. 2(a)は Ti 埋植群の動物 No. 3 の像で、種々の細胞が線維性被膜の中に浸潤しているのがわかる。Fig. 3(b)の写真は Ti-Zr 合金埋植群の動物 No. 7 の組織像である。Ti-Zr 合金埋植群はいずれも、ほぼこれと同程度の組織反応を示した。Ti-Zr 合金片の周りにも線維性被膜が形成されるものの、被膜中に浸潤してくる細胞の頻度は他の金属に比べて低かった。Zr 埋植群は Ti-Zr 合金埋植群に比べると試料片周辺組織への細胞の出現頻度は高いものの、Ti 埋植群よりは低かった(写真未掲載)。最も強い組織反応は Cr 埋植群で認められ、多数の炎症細胞が線維性被膜に浸潤しているのが見られた(写真未掲載)。

Table 1 Body and organ weights of rats after implantation of each material for 8 months.

Material	Weight (g) (Mean $\pm$ SD, n = 6)					
	Body	Thymus	Spleen	Liver	Kidney	
					Right	Left
Absolute weight						
Control	213.8 $\pm$ 16.3	0.085 $\pm$ 0.009	0.35 $\pm$ 0.03	5.15 $\pm$ 0.47	0.61 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.04
Ti	223.7 $\pm$ 20.7	0.086 $\pm$ 0.010	0.39 $\pm$ 0.01*	5.63 $\pm$ 0.59	0.65 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.04
Ti-Zr	221.0 $\pm$ 12.4	0.082 $\pm$ 0.013	0.37 $\pm$ 0.01	5.78 $\pm$ 0.32*	0.64 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.03
Zr	231.5 $\pm$ 8.1*	0.091 $\pm$ 0.013	0.38 $\pm$ 0.01*	5.30 $\pm$ 0.39	0.65 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.05
Cr	227.7 $\pm$ 7.4	0.087 $\pm$ 0.012	0.38 $\pm$ 0.02	5.96 $\pm$ 0.26**	0.67 $\pm$ 0.03*	0.65 $\pm$ 0.04
Relative weight (organ/body $\times$ 1000)						
Control		0.40 $\pm$ 0.03	1.66 $\pm$ 0.19	24.2 $\pm$ 2.5	2.88 $\pm$ 0.16	2.90 $\pm$ 0.10
Ti		0.39 $\pm$ 0.03	1.75 $\pm$ 0.13	25.2 $\pm$ 1.8	2.93 $\pm$ 0.08	2.92 $\pm$ 0.20
Ti-Zr		0.37 $\pm$ 0.05	1.67 $\pm$ 0.10	26.2 $\pm$ 0.7	2.88 $\pm$ 0.10	2.92 $\pm$ 0.10
Zr		0.39 $\pm$ 0.05	1.66 $\pm$ 0.10	22.9 $\pm$ 1.1	2.82 $\pm$ 0.15	2.77 $\pm$ 0.20
Cr		0.38 $\pm$ 0.05	1.69 $\pm$ 0.12	26.2 $\pm$ 1.2	2.94 $\pm$ 0.09	2.87 $\pm$ 0.12

*, **: Significantly different from the control group (p < 0.05, p < 0.01).

Table 2 Hematological data of rats implanted with alloys.

Item	Group				
	Control	Ti	Ti-Zr	Zr	Cr
RBC ($\times 10^4/\text{mL}$)	812 $\pm$ 27	729 $\pm$ 13*	765 $\pm$ 24*	779 $\pm$ 37	769 $\pm$ 16*
HGB (g/dL)	14.8 $\pm$ 0.5	13.6 $\pm$ 0.2*	14.4 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 0.6	14.4 $\pm$ 0.2
HCT (%)	41.8 $\pm$ 1.1	38.2 $\pm$ 0.8*	40.0 $\pm$ 1.7	40.3 $\pm$ 1.8	39.9 $\pm$ 0.8*
MCV (fl)	51.5 $\pm$ 0.6	52.4 $\pm$ 0.4*	52.3 $\pm$ 0.8	51.7 $\pm$ 0.3	51.9 $\pm$ 0.2
MCH (pg)	18.2 $\pm$ 0.2	18.7 $\pm$ 0.3*	18.8 $\pm$ 0.2*	18.8 $\pm$ 0.2*	18.8 $\pm$ 0.3*
MCHC (g/dL)	35.4 $\pm$ 0.5	35.6 $\pm$ 0.7	35.9 $\pm$ 0.5	36.4 $\pm$ 0.2*	36.1 $\pm$ 0.5*
PLT ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	61.1 $\pm$ 4.9	65.8 $\pm$ 5.7	66.3 $\pm$ 6.8	70.8 $\pm$ 3.1*	60.0 $\pm$ 4.2
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	20.0 $\pm$ 7.0	14.0 $\pm$ 2.0	18.0 $\pm$ 4.0	19.0 $\pm$ 6.0	15.0 $\pm$ 3.0
Differential cell counts (%)					
Neutrophil-band	0.5 $\pm$ 0.7	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0
Neutrophil-segmented	31.5 $\pm$ 5.8	34.4 $\pm$ 7.7	28.8 $\pm$ 6.6	28.9 $\pm$ 3.8	30.6 $\pm$ 4
Basophil	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Eosinophil	2.5 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 1.3	2.5 $\pm$ 1.2	1.3 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 1
Lymphocyte	63.1 $\pm$ 6.6	61.3 $\pm$ 6.7	65.7 $\pm$ 5.9	67.8 $\pm$ 3.6	65.7 $\pm$ 4
Monocyte	2.4 $\pm$ 1.0	2.1 $\pm$ 1.3	2.8 $\pm$ 1.5	1.9 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 2

Data represent mean values $\pm$ SD (n=6).

* Significantly different from the control at $p < 0.05$.

Fig. 1 Histological section of subcutaneous tissue around Ti (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 16$). The central lumen was the site of the implant, and the tissue surrounding the lumen formed a fibrous capsule. The thickness of the fibrous capsule was expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of 10 spots.

Table 3 は各材料に対する組織反応の病理学的検索結果をまとめたものである。今回 8 ケ月間の埋植で観察された組織反応は、以前、生体内に埋植した Cr 合金が腐食することによって溶出した Cr イオンに対して感作が起こるかどうかを見るため実施した Cr、および各種 Cr 合金の 4 ケ月間埋植試験で認められた反応²⁶⁾よりも弱かった。Cr 埋植群のすべて、および Ti 埋植群の動物のうち数匹について、多数の線維芽細胞が観察された。Zr あるいは Ti-Zr 合金片に比べて、Cr あるいは Ti 片周辺の線維性被膜の中には、主要な炎症細胞であるマクロファージが多数浸潤した。Ti 埋植群および Cr 埋植群では巨細胞が認められたが、Zr 埋植群および Ti-Zr 合金埋植群には認めなかった。Ti-Zr 合金埋植群および Zr 埋植群と比較して特に Cr 埋植群では、好中球、好塩基球、リンパ球数の増加を認めた。Ti-Zr 合金埋植群および Zr 埋植群の合計得点は Cr 埋植群に比べて著しく低い値を示した。

Ti 片周囲に形成された線維性被膜の厚さは Zr 片および

Fig. 2 Histological image of tissue around Ti (a) and Ti-Zr alloy (b) at high magnification ($\times 100$).

Cr 片周囲に形成されたものよりも薄かった。しかし、Ti 片周囲に形成された被膜の厚さは個々の動物ごとによりかなりのばらつきがあり、Ti 埋植群と Ti-Zr 埋植群とで有意な差は認めなかった。Cr 片周囲の被膜の厚さは試験した材料の中では最も厚く ($170 \pm 36 \mu\text{m}$)、Ti-Zr 合金片周囲に形成された被膜の厚さ ($126 \pm 16 \mu\text{m}$) と Student's t-test を用いて検定した結果、有意水準 5% で有意な差が認められた。また、Ti-Zr 合金埋植群と Zr 埋植群との間にも被膜の厚さに有意な差が得られた。

3.4 感作性

各金属に対する感作が成立しているかどうか確かめるため、パッチテストを行った。8ヶ月間の埋植期間終了時に0.02% $K_2Cr_2O_7$, 2% $TiCl_4$, あるいは10% $ZrCl_4$ 溶液を各動物の皮膚に塗布した。これらの金属塩溶液に対していずれの実験群の動物とも紅斑と浮腫といった皮膚反応は示さず、各金属片の埋植でCr, TiあるいはZrに対する感作は起こらなかった。

脾臓リンパ球の増殖能は、免疫機能および感作の有無を*in vitro*で評価する指標の1つである。すなわち、Con Aは

Fig. 3 Con A-induced blastogenesis of spleen lymphocytes in rats implanted with the material for 8 months. Single cell suspension of spleen cells (5×10^5 cells) was cultured with 5 μ g/mL Con A and [3H] methyl thymidine (3H TdR) for 48 h. The culture was terminated by automatic cell harvesting, and the 3H TdR incorporation (cpm) was determined. The data are the mean $\pm$ SD of 6 animals.

非特異的に細胞増殖を引き起こす幼若化因子として一般的に使用されており、Con Aによる増殖反応が正常に起こるかどうかで免疫機能が落ちているかどうかを判断することができる。一方、ある物質(本研究では金属)に感作された個体の場合、脾臓リンパ球は原因物質に対して特異的に反応して増殖反応が促進する。Con Aまたは金属塩を添加しないときの増殖反応は、いずれの試験群もほぼ同程度であった。Cr埋植群の脾臓リンパ球に $K_2Cr_2O_7$ 溶液を添加しても増殖反応は増加しなかった。同様に、Ti, ZrおよびTi-Zr合金埋植群について $TiCl_4$ および $ZrCl_4$ 溶液をリンパ球に添加しても増殖能の刺激指標は1.0と変化はなかった(Table 4)。Con Aによる幼若化反応はCr埋植群で他の群に比べて若干低いものの有意な差は認めなかった(Fig. 3)。

Table 4 Lymphocyte proliferative responses by stimulation with each metal salt.

Sample	Stimulation index (mean $\pm$ SD)		
	$TiCl_4$ 10^{-6} mol/L	$ZrCl_4$ 10^{-6} mol/L	$K_2Cr_2O_7$ 10^{-9} mol/L
Control	1.04 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.07
Ti	1.00 $\pm$ 0.09	ND	ND
Ti-Zr	0.98 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.05	ND
Zr	ND	0.99 $\pm$ 0.02	ND
Cr	ND	ND	0.97 $\pm$ 0.05

Spleen was collected from each animal, and a single cell suspension of spleen cells was prepared. The cells (5×10^5 cells) were cultured with each concentration of metal salt and 25 μ Ci [3H] methyl thymidine (3H TdR) for 48 h, and the 3H TdR incorporation (cpm) into cells was determined. A stimulation index, the ratio of 3H TdR incorporation relative to control wells, was derived for each metal salt. The data are mean $\pm$ SD for 6 animals. ND=not determined.

Table 3 Histological findings of the tissues around materials implanted for 8 months.

Sample	No.	In fibrous capsule							Around fibrous capsule Inflammatory cells	Total score	(mean $\pm$ SD)	Thickness of fibrous capsule (μ m)	(mean $\pm$ SD)
		Fibroblasts	Neutrophils	Eosinophils	Macrophages	Giant cells	Lymphocytes	Plasma cells					
Ti	1	+++	+	+	++	+	++	+++	++	15	9 $\pm$ 6	83	119 $\pm$ 48
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	6		71	
	3	+++	++	+	+++	++	+++	++	+++	19		80	
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	5		170	
	5	++	+	+	+	+	+	+	+	6		179	
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	4		129	
Ti-Zr	7	+	+	+	+	+	+	+	+	5	5 $\pm$ 0	119	128 $\pm$ 16
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	5		121	
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	5		140	
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	5		108	
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	5		153	
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	5		126	
Zr	13	+	+	+	+	+	+	+	+	4	5 $\pm$ 1	141	153 $\pm$ 11
	14	++	+	+	+	+	++	+	+	8		165	
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	5		143	
	16	+	+	+	+	+	+	+	+	5		165	
	17	+	+	+	+	+	+	+	+	5		160	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	4		146	
Cr	19	+++	++	+++	++	+	+++	+	++	15	12 $\pm$ 6	222	170 $\pm$ 36
	20	+++	+	++	++	+	++	+	+	11		161	
	21	++	+	+	+	+	++	+	++	9		167	
	22	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	21		198	
	23	++	+	+	+	+	+	+	+	5		118	
	24	+	+	++	+	+	++	+	+	8		155	

Each parameter was scored as - = no frequency (0), + = low frequency (1), ++ = moderate frequency (2), and +++ = high frequency (3).

4. 考 察

腐食性の環境下では、金属材料の構成元素が表面からイオンまたはその化合物として溶出し、いくつかの元素は局所的に有害な組織反応や金属アレルギーを引き起こすことがある^{1,14)}。工業用純 Ti は生体適合性が良いものの¹⁴⁻¹⁷⁾、人工股関節として使用するには機械的強度が不十分である^{16,20)}。更に、Ti から発生する摩耗粉が組織の炎症反応に関係するとの報告がある^{1,2,31)}。Ti 合金の性質は元素の組成により大きく変化するが、 α あるいはニア α 金属組織を持つ Ti 合金は優れた耐食性を示す一方で、強度は低い。逆に、 $\alpha+\beta$ および β 構造の合金、例えば Ti-6Al-4V 合金は強度が高いものの、耐食性に劣る¹⁸⁾。Kobayashi らは Ti と同様の性質を持つ Zr に着目し、 $\alpha+\beta$ 構造を有し工業用純 Ti よりも機械的性質に優れた Ti-Zr 合金を開発した。彼らは、この Ti-Zr 合金を人工股関節や骨プレートの材料として使用できるのではないかと提案した²⁰⁾。

整形外科用の医療用具は数ヶ月から一生の間腐食性の高い生体内に置かれることが多いため、長期間にわたる安全性を評価しておく必要がある。以前、我々はラットの皮下に耐食性の異なるいくつかの Cr-Fe 合金を 4 ケ月間埋植して、Cr に対する感作が起こるかどうかを検討した²⁶⁾。同様に、Lewin らは 4 ケ月間、モルモットに埋め込んだ骨ねじに対する局所反応を観察した³²⁾。Oron と Alter はラットに 14 ケ月間金属片を埋植して腐食性について検討した結果、埋植期間が長くなるにつれ腐食が進行することを確認した²⁾。本研究では、試験に用いた Ti および Ti-Zr 合金等は耐食性が高く、金属イオンの溶出は少ないと考えられることから、埋植期間は 8 ケ月と長くした。

体重、臓器重量、血液学的検索および Con A による脾臓リンパ球増殖反応の結果は、今回の試験材料が全身毒性や免疫機能の抑制を起こさないことを示した (Tables 1 and 2, Fig. 3)。

Ti-Zr 合金および Ti 片周囲に形成された被膜の厚さは、臨床で使われている 316L タイプのステンレス鋼 (SUS316L) 片に形成されたものとはほぼ同じであった^{8,26)}。Cr 片周囲に形成された被膜の厚さは Ti-Zr 合金片のものよりも著しく厚かった (Table 3)。線維芽細胞はインプラント埋植後の初期の段階でインプラント周りの損傷部に遊走し、細胞密度の増加に伴ってコラーゲン量が増加し、線維が密となった被膜が形成される。その結果、線維性被膜によって被膜内部と外部に生体組織が隔絶された状態となり、体液等の生体物質の循環が阻害され被膜内部の生育環境が悪化し、正常細胞が悪性化することがある。しかし、被膜層の形成には線維芽細胞しか関係せず他の細胞は関与しないため、被膜層の厚さだけを長期埋植による組織反応の指標とすることには議論の余地がある。

組織反応は主として炎症反応に関連づけられ¹⁵⁾、インプラントの周囲組織の形態学的変化あるいは細胞分布を解析することで評価されることが多い^{8,21,22)}。Ryhänen らはステンレス鋼、Ti-6Al-4V、および Ti-Ni 合金をラットに 26 週間

埋植した結果、病理学的に組織反応は差がなかったと報告している⁸⁾。マクロファージは短期間埋植試験による初期の炎症反応において主となる細胞であり、おそらく最終的な生体適合性を決定するのにも重要な役割を演じると考えられている^{33,34)}。マクロファージは種々の炎症誘因物質や増殖因子などの生体活性物質を放出して線維芽細胞、リンパ球など他の細胞に影響を与え^{33,34)}、加えて、多核化した巨細胞を形成し、異物によって引き起こされる特徴的な炎症反応像を与える³⁵⁾。Ti-Zr 合金片および Zr 片周囲の被膜内あるいは周辺へのマクロファージ等の炎症細胞の遊走は、Cr 片や Ti 片周囲よりも少なかった (Fig. 2, Table 3)。Ti および Cr 埋植群では巨細胞が認められた。これらの結果は、Cr および Ti は Ti-Zr 合金や Zr よりも強い炎症反応を引き起こすことを示している。好中球、好塩基球およびリンパ球は免疫反応に関係する^{8,36)}。線維性被膜に浸潤してきたこれらの細胞数は Cr 埋植群で高いものの、他の材料を埋植した群間では細胞数および種類とも大きな違いはなく、感作の成立に関しても明確なことは言えなかった。細胞の出現頻度をスコア化して合計点を算出したところ、Ti-Zr 合金および Zr 埋植群は Cr 埋植群より有意に低い値を示した。Ti-Zr 合金埋植群の合計点は Ti 埋植群や、生体適合性が良いとして以前に試験した SUS316L で得られた得点 (7.3 ± 1.5)²⁶⁾ と同程度以下であった。これらの結果は、Ti-Zr 合金は生体適合性が良い材料であることを示唆する。

金属塩を用いたパッチテストは金属アレルギーの有無を診断するのに最もよく使われる方法である^{30,37)}。生体から得た脾臓リンパ球の *in vitro* における増殖反応を調べることは、その生体がアレルギー状態にあるかどうか、あるいは生体の免疫機能が正常であるかどうかを評価するのに有用とされる^{38,39)}。金属製インプラントを埋入した後、組成元素の金属塩を用いたパッチテストで紅斑などの陽性の皮膚反応を示した場合、そのインプラントが感作に関与した可能性がある。Ti, Zr およびそれらの合金は表面に安定な酸化物を形成し、こうしたイオンの溶出が抑えられるとされる^{16,18,25)}。しかし、Ti 製ペースメーカーへの感作が報告され^{27,28)}、モルモット感作性試験では Ti の塩化物に対する陽性の皮膚反応が得られている³⁸⁾。今回、Ti, Zr および Ti-Zr 合金片を埋植した動物に対し Ti および Zr 塩溶液を塗布したが、いずれの動物とも皮膚反応を認めなかった。また、Ti および Zr 塩溶液は、各試料片を埋植した動物から得た脾臓リンパ球の *in vitro* 増殖反応を刺激することにはなかった (Table 4)。これらの結果は、Ti, Zr および Ti-Zr 合金片を埋植された動物は、Ti あるいは Zr に対して感作が成立しなかったことを示す。これは、Zr および Ti イオンの感作性強度が弱いこと、あるいはそれぞれの金属片からの金属イオンの溶出量が少なく、感作を起こすのに十分な量ではなかったことを示唆する。

以上の結果、Ti-Zr 合金および Zr は Ti や Cr よりも優れた生体適合性を持つと判断した。Zr のもろさを考慮すると、今回試験した中では Ti-Zr 合金が最も良い材料と思われる。整形外科用インプラントにとって金属材料の硬度は重要である。しかし、金属材料の臨床応用には、金属材料が目的とする場所や組織に適しているかどうかを決定する耐摩耗

性、耐フレッチング腐食性、引張強度やヤング率などの機械的特性がより重要である。今後は、Ti-Zr 合金をベースとして、この目的に適うよう、新たな合金設計を検討していく予定である。

本論文は Mater. Trans. **46**(2005) 2260-2267 に掲載されたものを和訳したものである。

文 献

- 1) J. J. Jacobs, J. L. Gilbert and R. M. Urban: J Bone Jt Surg Am. **80**(1998) 268-282.
- 2) U. Oron and A. Alter: Clin Orthop Relat Res. **185**(1984) 295-300.
- 3) S. Hierholzer, G. Hierholzer, K. H. Sauer and R. S. Paterson: Arch Orthop Trauma Surg. **102**(1984) 198-200.
- 4) U. E. Pazzaglia, C. Minoia, L. Cecilian and C. Riccardi: Acta Orthop Scand. **54**(1983) 574-579.
- 5) T. Tsuchiya, Y. Ikarashi, T. Uchima, H. Doi, A. Nakamura A, Y. Ohshima, M. Fujimaki, K. Toyoda, E. Kobayashi, T. Yoneyama and H. Hamanaka: Mater. Trans. **43**(2002) 3058-3064.
- 6) L. Savarino, D. Granchi, G. Ciapetti, E. Cenni, M. Greco, R. Rotini, C. A. Veronesi, N. Baldini and A. Giunti: J. Biomed Mater. Res. A **66**(2003) 450-456.
- 7) A. McNamara and D. F. Williams: Biomaterials. **2**(1981) 33-40.
- 8) J. Ryhänen, M. Kallioinen, J. Tuukkanen, J. Junila, E. Niemelä, P. Sandvik and W. Serlo: J. Biomed Mater. Res. **41**(1998) 481-488.
- 9) M. Uo, F. Watari, A. Yokoyama, H. Matsuno and T. Kawasaki: Biomaterials. **22**(2001) 677-685.
- 10) L. Kanerva, T. Sipilainen-Malm, T. Estlander, A. Zitting, R. Jolanki and K. Tarvainen: Contact Dermatitis. **31**(1994) 304-307.
- 11) W. R. Schriver, R. H. Shereff, J. M. Dommitz, E. F. Swintak and S. Civjan: Oral Surg. **42**(1976) 578-581.
- 12) D. Granchi, G. Ciapetti, L. Savarino, S. Stea, F. Filippini, A. Sudanese, R. Rotini and A. Giunti: Biomaterials. **21**(2000) 2059-2065.
- 13) L. Kanerva and L. Forstrom: Contact Dermatitis. **44**(2001) 103-104.
- 14) C. Schmidt, A. A. Ignatius and L. E. Claes: J. Biomed Mater. Res. **54**(2001) 209-215.
- 15) K. Yamaguchi, H. Konishi, S. Hara and Y. Motomura: Spine J. **1**(2001) 204-208.
- 16) C. E. Wen, Y. Yamada, K. Shimajima, Y. Chino, T. Asahina and M. Mabuchi: J. Mater. Sci. Mater. Med. **13**(2002) 397-401.
- 17) G. D. Krischak, F. Gebhard, W. Mohr, V. Krivan, A. Ignatius, A. Beck, N. J. Wachter, P. Reuter, M. Arand, L. Kinzl and L. E. Claes: Arch Orthop Trauma Surg. **124**(2004) 104-113.
- 18) M. Long and H. J. Rack: Biomaterials. **19**(1998) 1621-1639.
- 19) J. O. Galante, J. Lemons, M. Spector, P. D. Jr Wilson and T. M. Wright: J. Orthop Res. **9**(1991) 760-775.
- 20) E. Kobayashi, S. Matsumoto, H. Doi, T. Yoneyama and H. Hamanaka: J. Biomed Mater. Res. **29**(1995) 943-950.
- 21) F. Katou, N. Andoh, K. Motegi and H. Nagura: J. Craniomaxillofac Surg. **24**(1996) 155-162.
- 22) D. F. Williams: J. Bone Joint Surg. Br. **76**(1994) 348-349.
- 23) S. H. Lee, F. R. Brennan, J. J. Jacobs, R. M. Urban, D. R. Ragasa and T. T. Glant: J. Orthop Res. **15**(1997) 40-49.
- 24) S. D. Rogers, D. W. Howie, S. E. Graves, M. J. Pearcy and D. R. Haynes: J. Bone Joint Surg. Br. **79**(1997) 311-315.
- 25) C. Piconi and G. Maccauro: Biomaterials. **20**(1999) 1-25.
- 26) Y. Ikarashi, T. Tsuchiya, K. Toyoda, E. Kobayashi, H. Doi, T. Yoneyama and H. Hamanaka: Mater. Trans. **43**(2002) 3065-3071.
- 27) M. A. Peters, A. L. Schroeter, H. M. van Hale and J. C. Broadbent: Contact Dermatitis. **11**(1984) 214-222.
- 28) P. A. Laylor, P. A. Revell, A. B. Gray, S. Wright, G. T. Railton and M. A. Freeman: J. Bone Joint Surg. **73**(1991) 25-28.
- 29) Y. Ikarashi, K. Toyoda, N. Ohsawa, T. Uchima, T. Tsuchiya, M. Kaniwa, M. Sato, M. Takahashi and A. Nakamura: J. Biomed Mater. Res. **26**(1992) 339-356.
- 30) Y. Ikarashi, J. Momma, T. Tsuchiya and A. Nakamura: Biomaterials. **17**(1996) 2103-2108.
- 31) H. Benghuzzi: Biomed Sci. Instrum. **32**(1996) 81-86.
- 32) J. Lewin, J. U. Lindgren and J. E. Wahlberg: J. Orthop Res. **5**(1987) 604-608.
- 33) J. M. Anderson and K. M. Miller: Biomaterials. **5**(1984) 5-10.
- 34) D. G. Vince, J. A. Hunt and D. F. Williams: Biomaterials. **12**(1991) 731-736.
- 35) A. R. Murch, M. D. Grounds, C. A. Marshall and J. A. Papadimitriou: J. Pathol. **137**(1982) 177-180.
- 36) M. Thewes, R. Kretschmer, M. Gfesser, J. Rakoski, M. Nerlich, S. Borelli and J. Ring: Arch Orthop Trauma Surg. **121**(2001) 223-226.
- 37) P. Thomas, B. Summer, C. A. Sander, B. Przybilla, M. Thomas and T. Naumann: Allergy. **55**(2000) 969-972.
- 38) S. Torgersen, O. T. Gilhuus-Moe and N. R. Gjerdet: Int. J. Oral Maxillofac Surg. **22**(1993) 246-250.
- 39) N. J. Hallab, K. Mikecz, C. Vermes, A. Skipor and J. J. Jacobs: Mol Cell Biochem. **222**(2001) 127-136.