

# 平成22年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「切削加工プロセスと電気分解を組み合わせた

人工骨表面への多孔質加工法の開発」

研究開発成果等報告書

平成25年 3月

委託者 近畿経済産業局

委託先 公益財団法人滋賀県産業支援プラザ

## 目次

	ページ数
第1章 研究開発の概要	
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	P1
1-2 研究体制	P3
1-3 成果概要	P6
1-4 当該研究開発の連絡窓口	P6
第2章 本論	
2-1 均一多孔質組織を作製するための初期表面粗さ条件の調査	P7
2-2 生体親和性試験にむけた多孔質組織作製条件の選定	P13
2-3 生体親和性試験	P19
最終章 全体総括	P27
用語解説	P28

## 第1章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

高齢者や骨粗しょう症患者の増加とともに人工関節の国内市場は拡大の一途を辿り年間約1000億円規模の市場といわれ、今後も約20%程度の拡大が予想されている。この20年で人工関節を用いた手術は広く普及して一般的に認知されるようになり、それに伴って医師だけでなく患者も人工関節製品の安全性に注目するようになった。人工関節製品の安全性や生体親和性(生体適合性)は20年間で大幅に向上したが、医師・患者からはさらなる高性能化が要求されており、更に安全かつ早期回復の望める人工関節製品が登場することが強く望まれている。

人工関節製品は体内への埋入後に事故を発生させない安全性を守ることが大前提である。そのため、三次元切削加工技術を駆使して母材となるチタン合金を複雑形状に加工することで部品点数を必要最小限に押さえ、機械強度や滅菌性が低下することを防いでいる。

形状加工の後に、セメントレスタイプと呼ばれる人工関節の表面には多孔質処理が施される。この多孔質処理には二つの目的がある。一つは再生骨が入り込んで体内での固定力を得ることである。もう一つは、応力遮蔽効果による再生骨の萎縮を防ぐために、多孔質層によって人工関節表面の剛性率を生体骨に近づけることである。これらの性能は多孔質組織の気孔径と、体積あたりの気孔率に依存する。人工関節の適用箇所によって求められる多孔質組織は変化するため、高い生体親和性を得るためには多孔質組織の制御が重要である。

そんな中、現在主流となっている多孔質形成法は金属粒子を積層させる溶射法である。溶射法は、吹き付ける粒子のサイズ、速度、温度によって気孔率と気孔径を調節することができるが、実際には母材への十分な密着力を得た状態で調節できる気孔率・気孔径の範囲は限られており、広い制御条件が確立されていない状況である。

なお積層型の多孔質組織は、人工関節母材との密着強度がFDA(アメリカ食品医薬品局)の定める強度試験(ASTM-F1044 多孔質金属皮膜層の標準的せん断試験方法)によって20MPa以上の強度を有することを確認した上で製品に適用されているが、長期使用における金属疲労や歩行時の衝撃荷重による界面剥離の可能性も指摘されている(図1)。

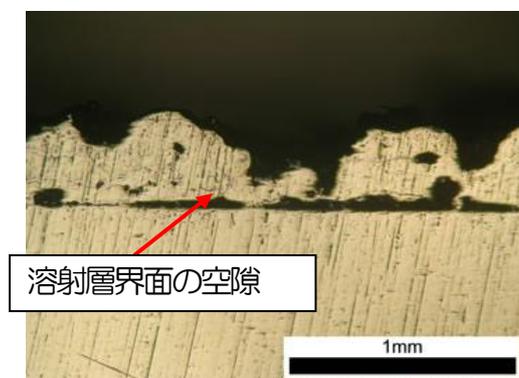


図1 溶射法による多孔質組織の断面写真

人工関節製品の更なる高性能化のために、安全性の観点から「表面に何も足さない」という非積層型で、生体親和性向上のための気孔率と気孔径の広い範囲での制御を両立することのできる多孔質組織形成法を確立する必要がある。そこで、積層とは逆に、母材を溶出させることで多孔質組織の形成を行う。

なお、母材を溶出させて多孔質組織を得る方法として酸を用いる方法があるが、人工関節素材であるチタン合金を溶出させるためには強毒性のフッ酸が必要である上に、溶出パターンのマスクング処理を行う必要がある。廃液処理の工程も必要となるため、設備費だけでなくランニングコストや環境への負荷が非常に高い。一方で、チタン合金は食塩水中の電気分解で溶出する性質を持つ。また、切削加工プロセスで溶出の起点となる表面欠陥を分散させた状態のチタン合金は、マスクング処理無しに特有の多孔質パターンで溶出することが判っている。(図 2)そこで、切削加工プロセスと電気分解による溶出を組み合わせ、気孔率と気孔径を制御した均一分散な多孔質組織を形成させ、生体親和性と安全性に優れた多孔質処理法として確立する。

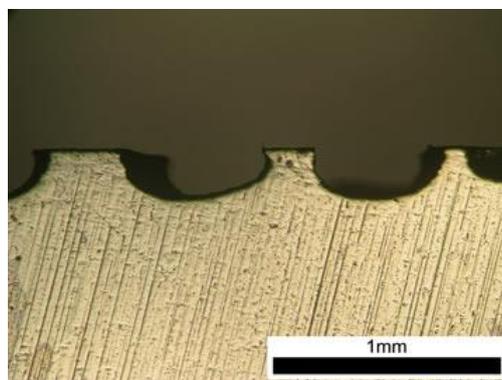


図2 電気分解溶出による多孔質組織の断面写真

なお、高い生体親和性を得るために人工関節表面の多孔質組織が満たすべきとされる項目は、平成 17 年、18 年に NEDO から発表されているインプラントの開発に関する動向調査報告に、

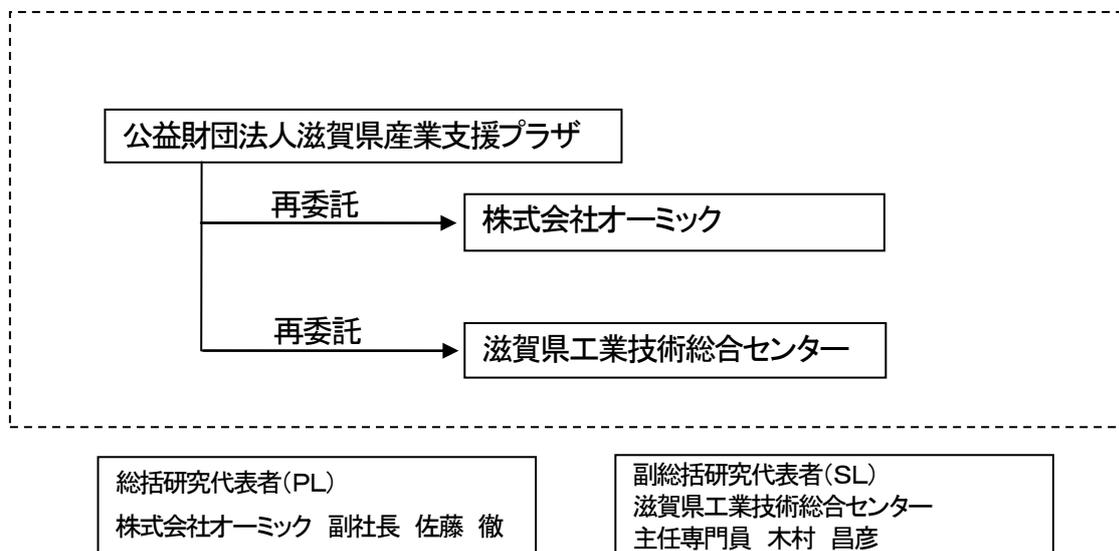
- ・気孔率 35%以上
- ・気孔径が  $100\mu\text{m}$  ~  $1500\mu\text{m}$  の範囲で制御できること
- ・気孔同士が繋がる連通孔であること

と記されている。そこでこれらを具体的な数値目標として、溶出による多孔質組織形成法を確立する。また、生体親和性試験によって本研究で作製される多孔質組織と従来技術を比較し、生体骨との結合強度において優位性を持つことの実証を目指す。

## 1-2 研究体制

### (1) 研究組織及び管理体制

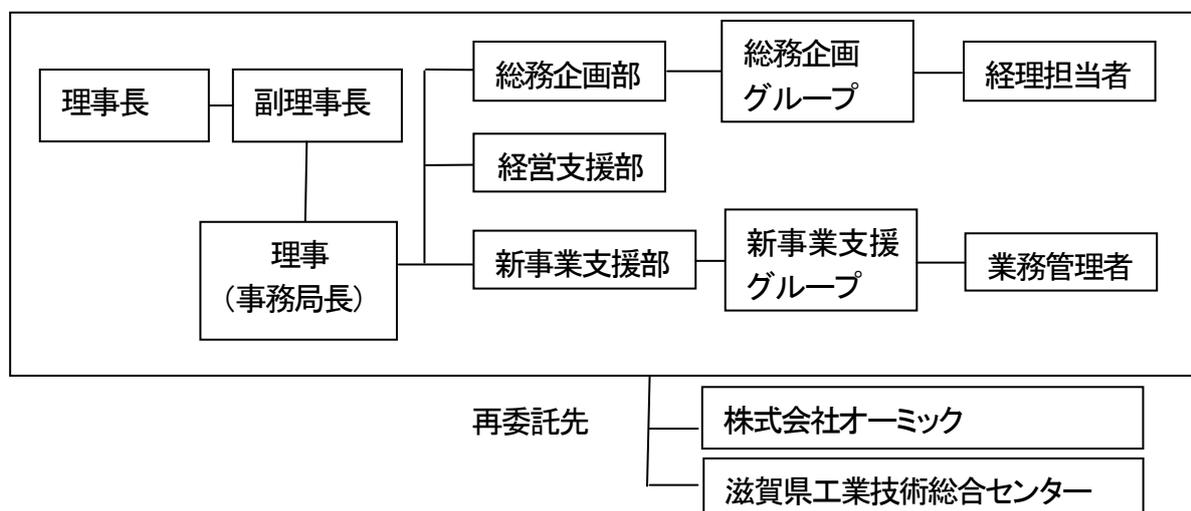
#### 1) 研究組織(全体)



#### 2) 管理体制

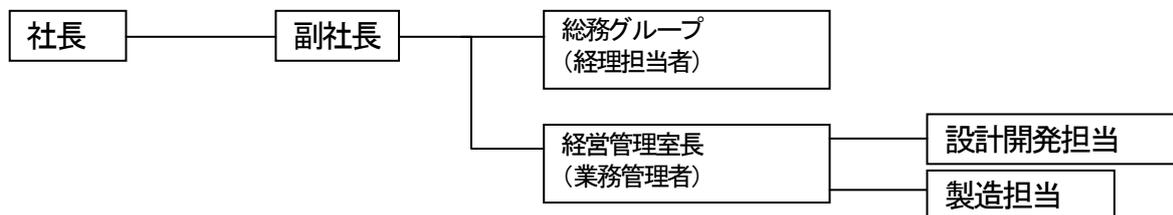
##### ① 事業管理機関

[公益財団法人滋賀県産業支援プラザ]

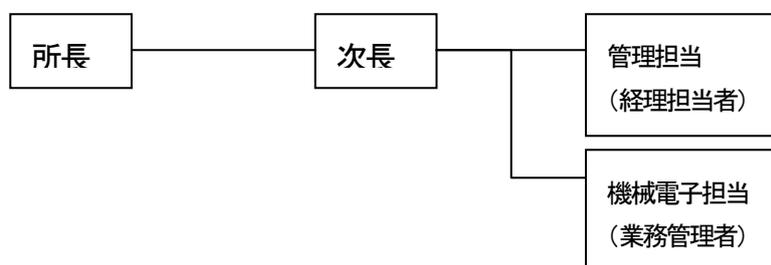


②再委託先

株式会社オーミック



滋賀県工業技術総合センター



(2) 管理員及び研究員

【事業管理機関】公益財団法人滋賀県産業支援プラザ

①管理員

氏名	所属・役職
篠原弘美	新事業支援部新事業支援グループ リーダー
廣田健治	新事業支援部新事業支援グループ 新産業創造スタッフ

【再委託先】※研究員のみ

株式会社オーミック

氏名	所属・役職
佐藤徹	取締役 副社長
菰田恵子	開発部 薬事マネージャー
井元幸司	開発部 部長

坂井文明	開発部 設計開発担当
片岡輝人	開発部 設計開発担当
安富正信	生産技術部 部長

滋賀県工業技術総合センター

氏名	所属・役職
木村昌彦	機械電子担当 主任専門員
井上栄一	機械電子担当 専門員
岡田太郎	機械電子担当 主任技師

【指導協力】

独立行政法人産業技術総合研究所

氏名	所属・役職
岡崎義光	人間福祉医工学研究部門 高機能生体材料グループ

### 1-3 成果概要

#### 1 均一多孔質組織を作製するための初期表面粗さ条件の調査

エアブラスト装置のブラスト処理時間を最適化した試料で電気分解実験を行うことで、多孔質組織の均一分散に必要な表面粗さ条件を得ることができた。多孔質組織のフィレ径比(※1 用語解説へ)の測定の結果から、気孔を均一に分散させるためには4分間以上のブラスト処理を施す必要がある。一般的な粗さパラメータ表記に換算すると、面平均粗さ  $Sa$ (※2)が  $1\mu\text{m}$  以下、最大高さ  $St$ (※3)が  $10\mu\text{m}$  以下という数値が目安となる。

#### 2 生体親和性試験にむけた多孔質組織作製条件の選定

NaCl 水溶液の濃度、電圧について様々な条件下で検討を行った結果、2%NaCl 水溶液において、電圧 12V 以上、電流密度  $0.35/\text{cm}^2$  以上の条件で電気分解を行うことで、均一分散した多孔質組織を得ることができた。また、電圧と通電時間を調節することで、気孔率 45%以上の多孔質組織を得ることができた。

その上で、試料表面の面積・気孔率・気孔径のバランスから、生体試験で用いる試料には、 $\phi$  8mm の試料に 12.5V で 20 分間電気分解を行ったときに発生する気孔率 35%の多孔質組織を採用することとした。

#### 3 生体親和性試験

本研究の多孔質処理品を検体とし、既承認相当の粗ブラスト材を対照品として、検体の骨伝導性(※4)を評価するため、検体及び対照品をウサギ大腿骨骨端部に埋植し、4 及び 12 週後に引き抜き強度測定をした。埋植期間中は、一般状態観察及び体重測定を行った。埋植期間終了後、埋植部位について肉眼検査、引き抜き強度測定を行った。

まず、いずれの個体においても埋植期間を通して一般状態に異常は認められなかった。検体の平均骨結合強度は、埋植期間 4 及び 12 週でそれぞれ 295.0 及び 335.6 N、対照品の平均骨結合強度は、埋植期間 4 及び 12 週でそれぞれ 151.6 及び 252.3 N となり、いずれの埋植期間においても、検体の骨結合強度は対照品と比較し有意に強い(※5)ことが確認された( $p < 0.05$ )。また、統計的な有意差は認められなかったものの、検体及び対照品ともに骨結合強度で経時的な増加傾向も認められた。

以上の結果から、検体は初期結合強度・最終的な結合強度共に優れ、対照品に比べ高い骨伝導性を有することが示された。

### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

公益財団法人 滋賀県産業支援プラザ 新事業支援グループ

〒520-0806 滋賀県大津市打出浜 2 番 1 号 コラボしが 21 内

Tel 077-511-1414 Fax 077-511-1418

## 第2章 本論

### 2-1 均一多孔質組織を作製するための初期表面粗さ条件の調査

本研究までに行ったチタン合金材(Ti-6Al-4V)の鏡面材、ガラスビーズブラスト材、旋削材の電解試験の結果の比較から、マスキングなしに均一分散した多孔質組織を作製するためには溶出の基点となる表面欠陥が分散したガラスビーズブラスト材がもっとも望ましいことが判明している(図3)。ところがブラスト処理は現状では手作業で行われるため、明確な指標が定められないままでは作業者の熟練度や目視判断を原因とした処理のバラツキが大きく、不均一な多孔質形成に繋がる。そこで、グローブボックス内に回転テーブルを設置したエアブラスト装置を用い、回転速度と処理時間を制御することで表面粗さパラメータ Sa、St、Ssk、Sku を調節したテストピースを作製し、めっき試験装置を用いて食塩水中で電気分解を行う。その結果から、気孔の均一分散に適した初期表面粗さパラメータと、それを得るためのブラスト処理時間の特定を行った。

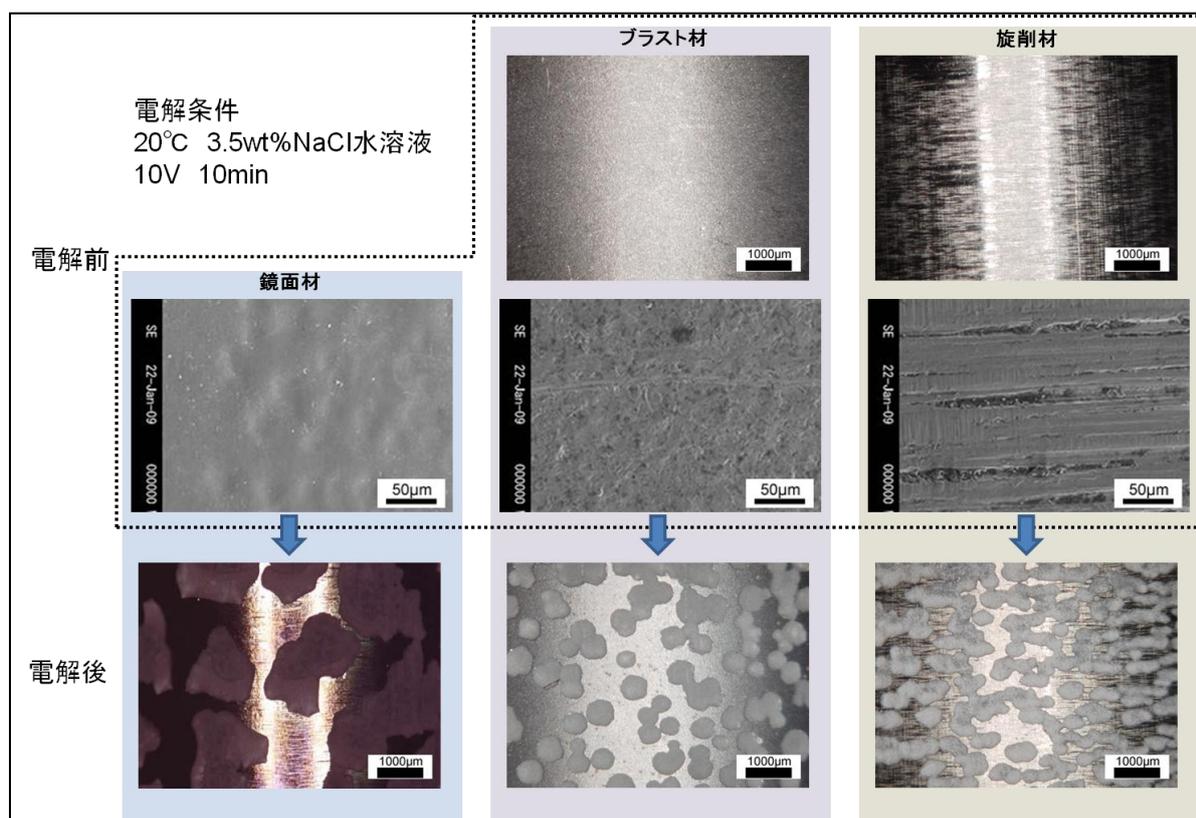


図3 電解試験で発生した多孔質組織の比較(左から鏡面材、ブラスト材、旋削材)

電解用のめっき試験装置は1辺230mmの水槽(容量10L)、電流電圧のプログラムとログの記録が可能な電源装置から成る。作製したチタン合金試料を水槽の中心に配置して陽極とし、四方をステンレス製パンチングメタルで囲い陰極とした(図4)。この装置を用い、チタン合金の特性値を調査するために、2.0%NaCl水溶液で0Vから20Vまで連続的に1分あたり2Vずつ電圧を上昇させて、電流密度の変化についての特性値グラフを得た(図5)。その結果7.5Vから電流が流れ始めることから、チタン合金の溶出は7.5Vから開始するということを確認できた。このとき、ステンレス電極から気泡が発生し、チタン合金からは白色のゲル状物質である酸化チタン水和物の発生が確認された。孔食現象が電氣的に促進され、表面欠陥からチタン合金の溶出が開始したと考えられる(図6)。

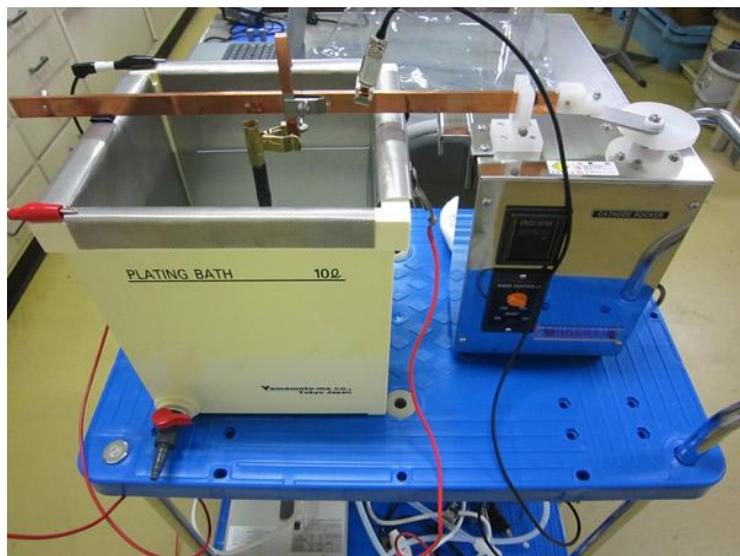


図4 めっき試験装置

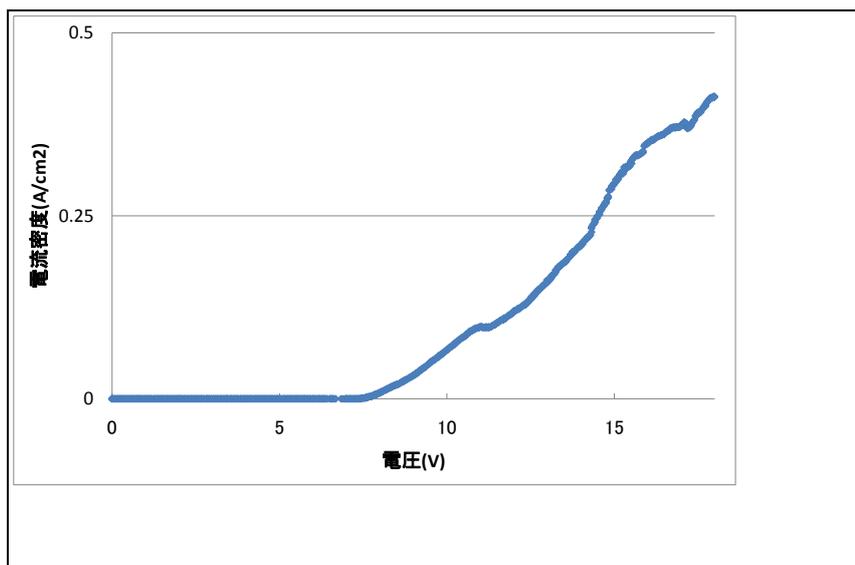


図5 電圧-電流密度の特性グラフ(昇圧時)

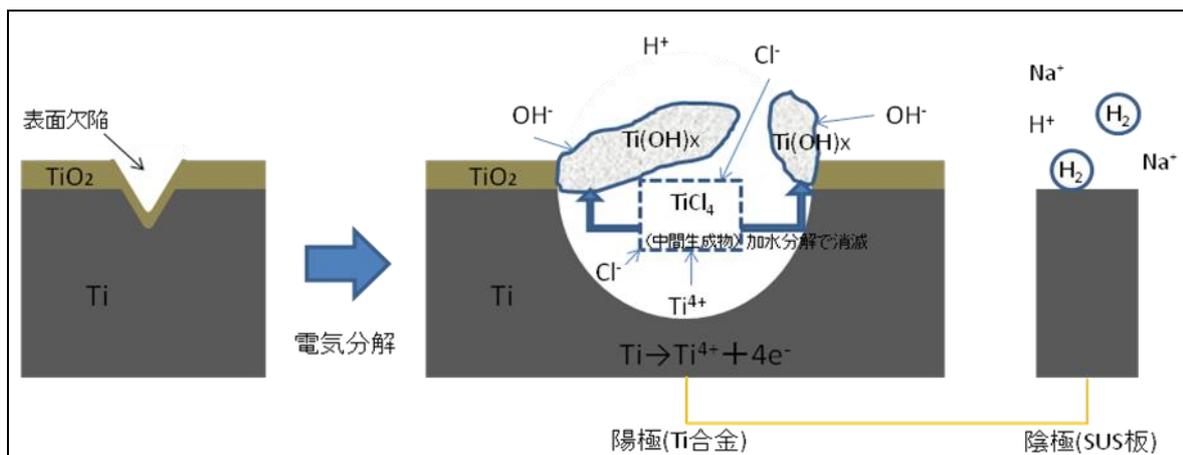


図6 電気分解のモデル図

チタン合金試料への表面欠陥の導入にはエアースラスト装置を用いた。エアガンが首振り機能を有し、回転テーブルと組み合わせることで棒材に対して均一なブラスト処理を行うことが可能である。なお、エアガンから100mmの距離に加工物をセットしたときに高さ200mm、幅40mmの範囲に照射することが可能である。また、エアガンの気圧はメーカー推奨の5気圧、回転テーブルの回転速度は50rpmで使用した(図7)。

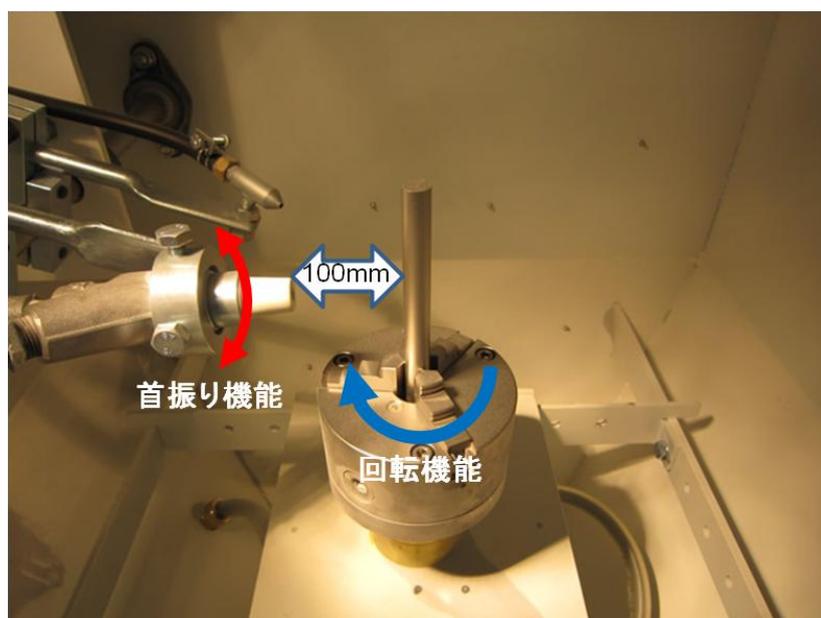


図7 エアースラスト装置の内部構造

このエアースラスト装置の能力を確認するために、長さ150mmのチタン合金棒材に対して0~30minの範囲でブラスト処理を行い、表面粗さのパラメータを測定した。得られた粗さパラメータについて、経過時間を横軸としてプロットした(図8、9)。なお、各数値は50区間測定した結果の平均値である。

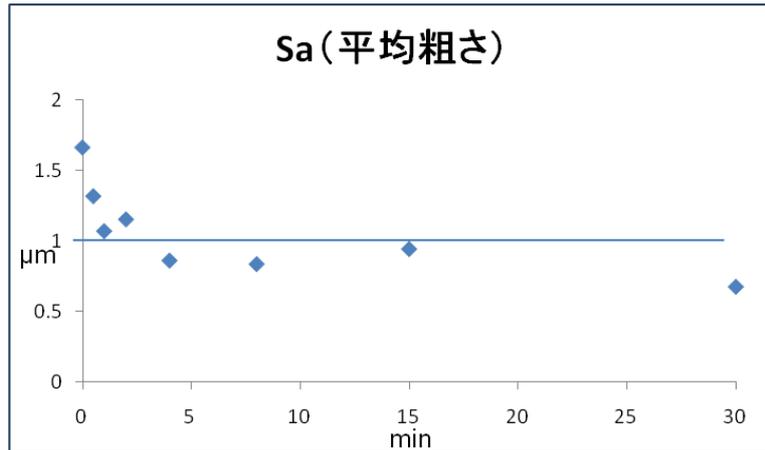


図8 ブラスト処理時間と平均粗さ Sa の関係

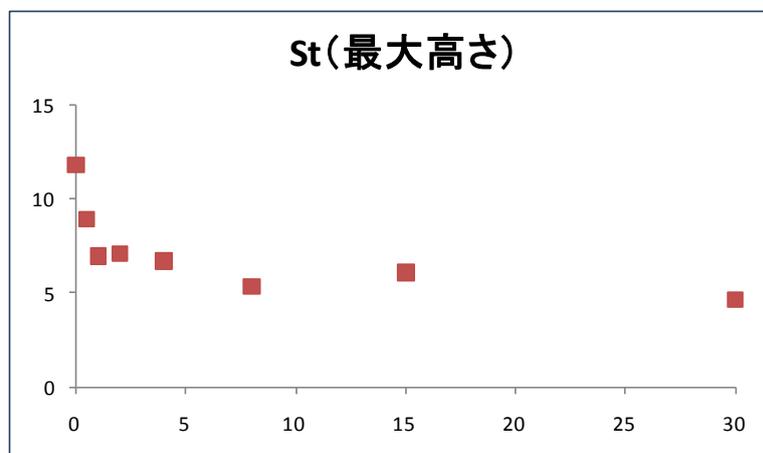


図9 ブラスト処理時間と最大高さ St の関係

まず平均粗さ Sa は、ブラスト処理を施していない状態では  $Sa=1.73\mu\text{m}$  だが最初の 4 分間のブラスト処理で急激に低下し、 $1\mu\text{m}$  を下回り  $Sa=0.86\mu\text{m}$  となる。その後もブラスト処理を続けることで緩やかに低下を続けた。最大高さ St も同様の傾向で、最初の 2 分間で急激に低下し、以降も緩やかに低下を続けるが大きな変化はなくなった。ブラスト処理による表面粗さの大きな変化は 4min までの段階でほぼ完了することが確認できた。

表面粗さパラメータが急激に変化する 0~4 分間のブラスト処理材の三次元粗さの測定を行った(図 10、表 1)。ブラスト処理の時間が長くなるにつれて、切削痕が細かく分断されていくことが確認できる。これらの試料に対して 2.0%NaCl 水溶液中で電圧 17.5V で 5 分間の電気分解を行い、発生した多孔質組織の比較を行った(図 11)。

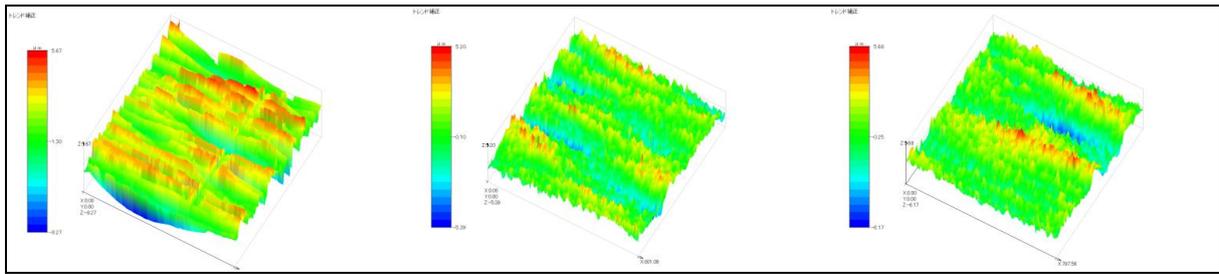


図 10 ブラスト処理による三次元表面粗さの変化(左から、ブラスト処理 0 分、2 分、4 分)

表 1 ブラスト処理による表面パラメータの変化

ブラスト処理時間	処理無し	2 分	4 分
平均粗さ Sa( $\mu$ m)	1.73	1.17	0.88
最大高さ St( $\mu$ m)	13.94	10.59	8.78



図 11 表面粗さの変化による多孔質組織の変化(左から、ブラスト処理無し、2min、4min)

ブラスト処理を施していない試料については切削痕の影響が非常に強く、発生する気孔が切削痕に沿って拡大して、連通孔となりやすいことがわかる。ブラスト処理を 2 分間施した試料についても、独立した気孔が増えつつあるが旋削痕にそって拡大した気孔が散在する。4 分間施した試料については旋削痕の影響がほぼ見られない。

これらの多孔質組織についてフィレ径比を測定して比較したところ、やはり 4 分間以上ブラスト処理を施した試料では  $45^\circ$  以上の値を示していた(図 12)。これらの結果から、気孔を均一に分散させるためには 4 分間以上のブラスト処理を施す必要があるといえる。また、一般的な粗さパラメータとしては、平均粗さ Sa が  $1\mu$  m 以下が目安となる。なお、このとき発生した多孔質組織の平均直径は  $310\mu$  m ( $250\sim 370\mu$  m 平均孔径から  $\pm 20\%$ )であった。

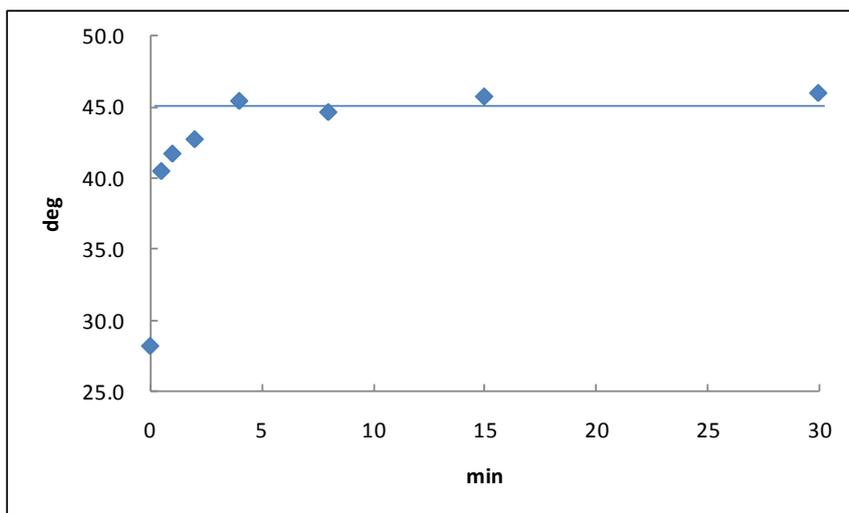


図 12 ブラスト時間と多孔質組織のフィレ径比の関係

## 2-2 生体親和性試験にむけた多孔質組織作製条件の選定

初期表面粗さ条件  $Sa \leq 1.0 \mu m$ 、 $St \leq 10 \mu m$  に整えた  $\phi 8mm$  のチタン合金棒材を用い、多孔質組織の均一分散に必要な電圧の調査を行った。これまでに、2%NaCl 水溶液中では 7.5V から電流が流れ始めて 11V を変曲点として、以降は電圧と電流密度が比例関係に変化することがすでにわかっている。

そこで、変曲点である 11V の前後の電圧でどのような変化が発生しているかを観察するために、9V から 20V の範囲で一定電圧をかけ続けた時の電流密度の変化を記録した(図 13)。その結果、12V 以上の電圧では 100 秒以内の範囲で電流密度が急上昇した後に一定値を示すが、11V 以下の電圧では緩やかに上昇して 300 秒程度で一定値に達することがわかった。

一定電圧をかけた際に発生する多孔質組織を比較するために、9~20V の電圧を 15 分間かけたときに発生した多孔質組織を並べて比較した(図 14)。電圧が高いほど気孔の発生が多く、激しい凹凸の多孔質組織であることがわかる。均一分散性について検討するために変曲点である 11V とその前後の電圧条件の試料について、拡大して観察を行った(図 15~20)。どの組織も大小様々な気孔が存在しているが、9V、10V、11V の組織には気孔単体のサイズに大きなばらつきが見られる。一方で 12V、13V、14V は気孔同士が繋がることで大きな気孔に成長しているものはあるが、気孔単体のサイズにばらつきは小さく、11V 以下に比べて均一に気孔が分散している。このことから、変曲点よりも高い電圧をかけることで均一分散な多孔質組織が得られると判明した。

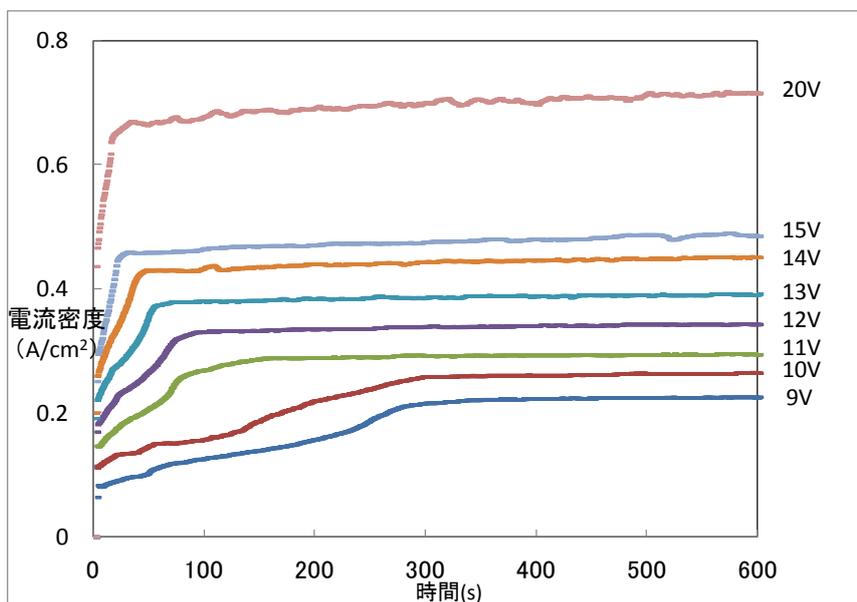


図 13 2%NaCl 水溶液中における、各電圧での時間と電流密度の関係

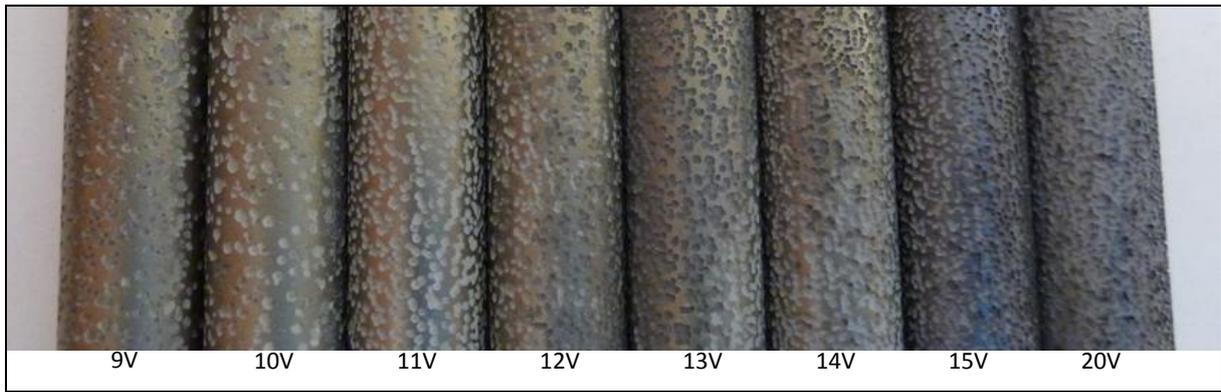


図 14 2%NaCl 水溶液中で 9V~20V の電圧を 15 分間かけたときに発生する多孔質組織の比較

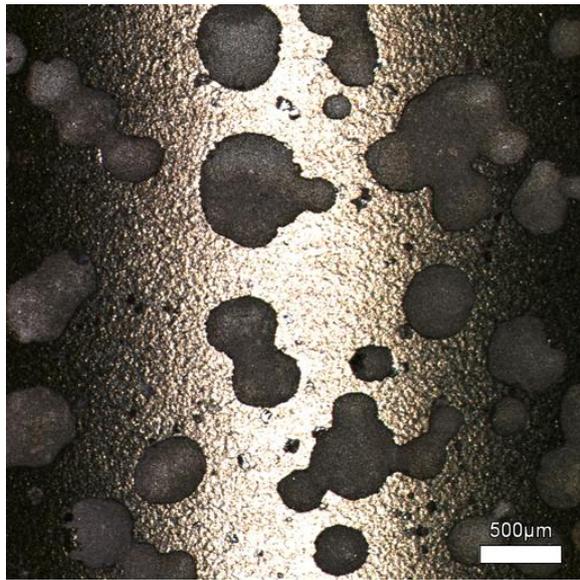


図 15 2%NaCl 水溶液中 9V15 分間

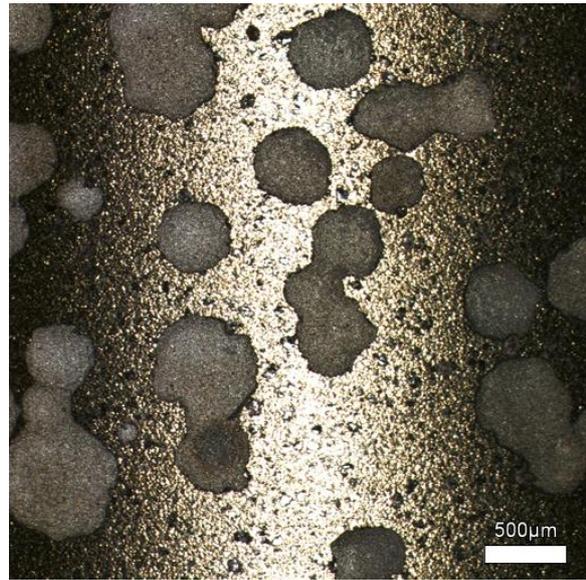


図 16 2%NaCl 水溶液中 10V15 分間

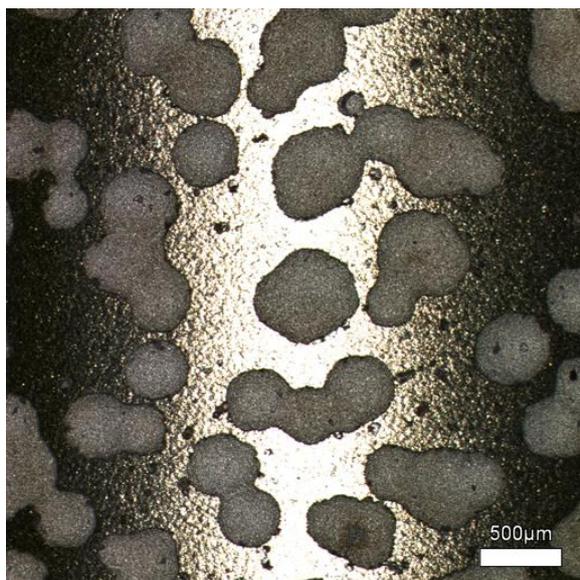


図 17 2%NaCl 水溶液中 11V15 分間

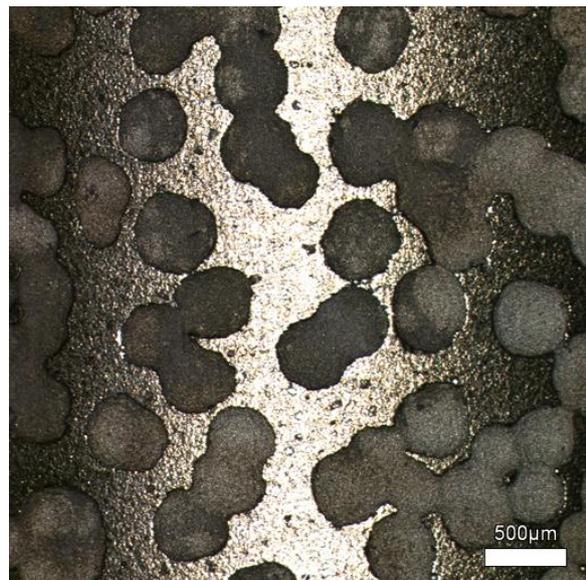


図 18 2%NaCl 水溶液中 12V15 分間

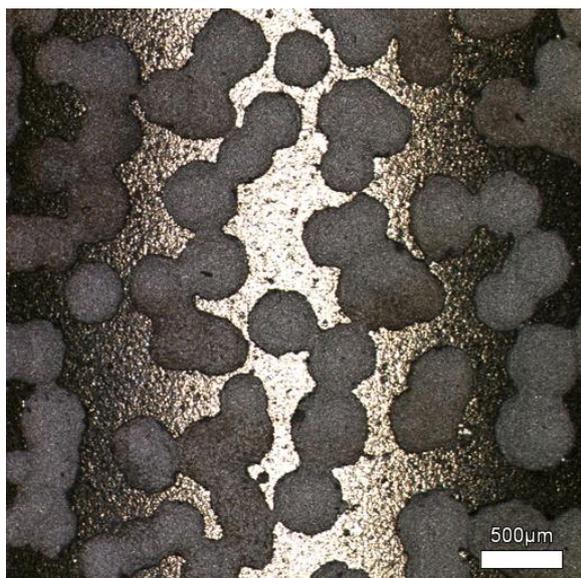


図 19 2%NaCl 水溶液中 13V15 分間



図 20 2%NaCl 水溶液中 14V15 分間

2%NaCl 水溶液を用い、変曲点以上の電圧で発生する多孔質組織について、電圧と時間の変化が与える影響について調査するために組織観察を行った。なお、電圧条件は 12.5V、15V、20V の 3 種類、通電時間は 5 分、10 分、15 分、20 分の 4 種類である(図 21～32)。発生した多孔質組織の間に見られる関係性として、電圧が高いほど発生する気孔が多く、時間が長くなるにしたがって気孔が大きく成長して、互いに繋がる連通路となることがわかる。

研究概要に書いた通り、多孔質組織は気孔率 35%以上の連通路であることが求められている。気孔径については 100～1500 $\mu$  m で調節できることが望ましい。今回発生した多孔質組織の気孔率については表 2 のとおりである。12.5V においては 20 分、15V においては 15 分以上、20V においては 10 分以上の条件で気孔率は 35%以上に達する。なお、20V では気孔数が多いため気孔径は小さく、12.5V では気孔径は大きい。このように電圧と時間を制御することで、気孔径と気孔率を同時に制御することができる。なお、気孔率 35%以上においては、調整できる最小気孔径は 250 $\mu$  m であった。

しかしながら、高气孔率な多孔質組織においては、気孔一つ一つの直径、または気孔の数が多いため、初期の試料表面の面積が減少している。生体骨が多孔質組織に入り込んだ時のアンカー効果を考えると、初期表面をある程度残しつつ大きな最大深さを得ることを考えなければならない。加えて、人体の骨芽細胞の成長には気孔径が 500 $\mu$  m 以上であるほうが良いという報告を取り入れた結果、試料表面の面積・気孔率・気孔径のバランスから、生体試験で用いる試料には、12.5V で 20 分間電気分解を行ったときに発生する多孔質組織を採用することとした。

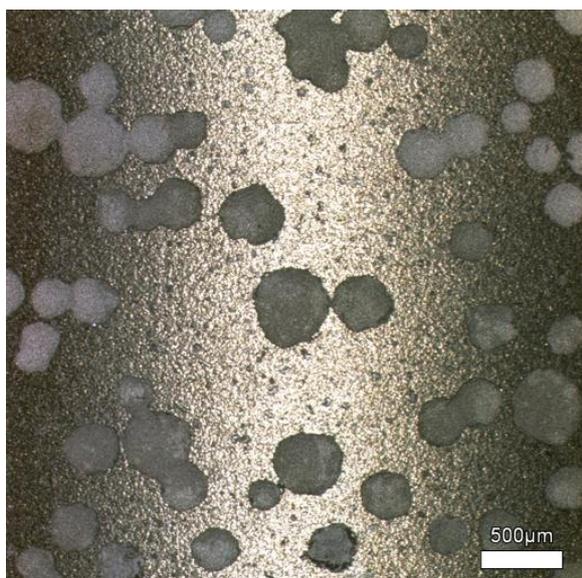


图 21 2%NaCl 水溶液中 12.5V 5 分間

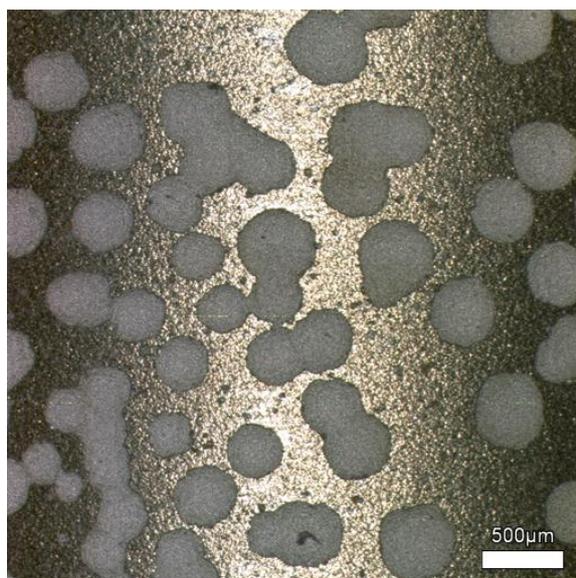


图 22 2%NaCl 水溶液中 12.5V 10 分間

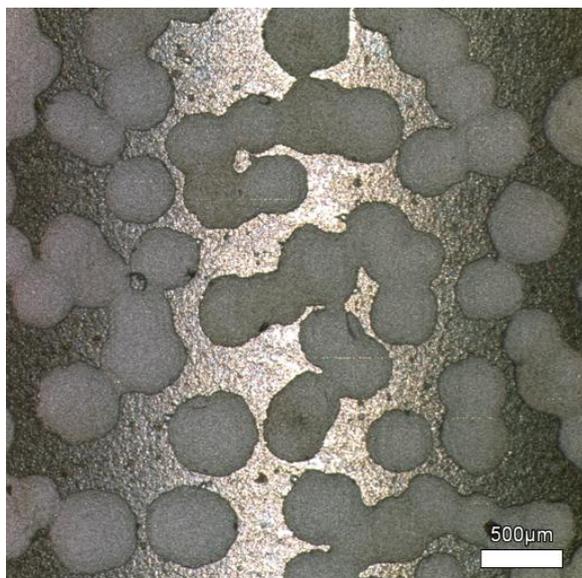


图 23 2%NaCl 水溶液中 12.5V 15 分間



图 24 2%NaCl 水溶液中 12.5V 20 分間

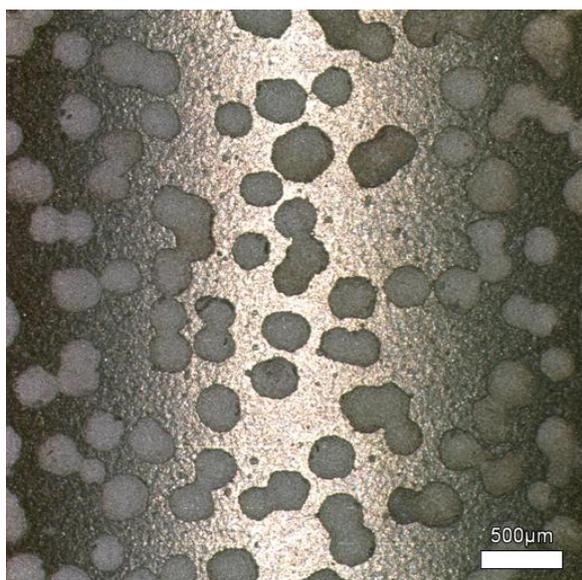


図 25 2%NaCl 水溶液中 15V 5 分間

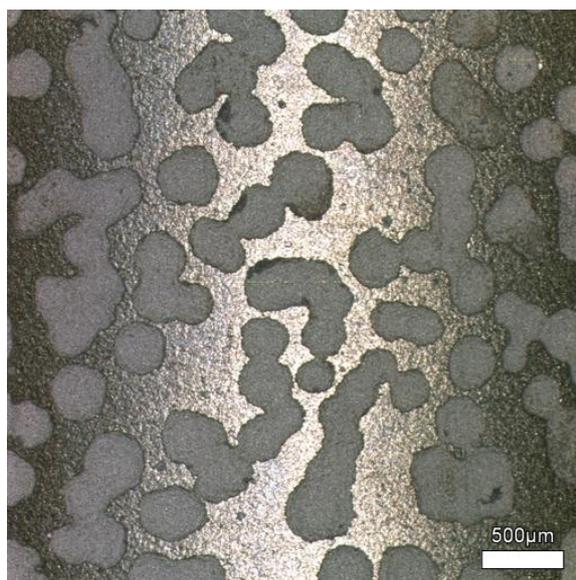


図 26 2%NaCl 水溶液中 15V 10 分間

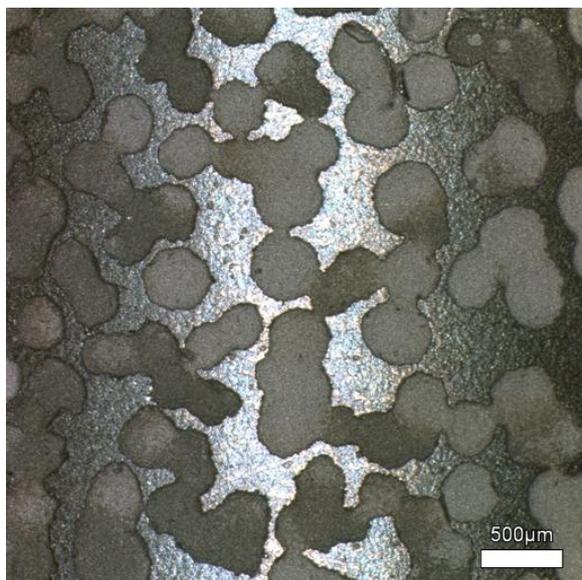


図 27 2%NaCl 水溶液中 15V 15 分間

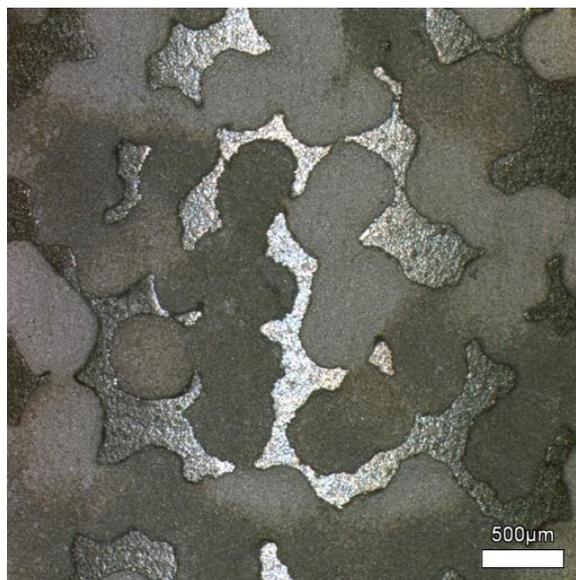


図 28 2%NaCl 水溶液中 15V 20 分間

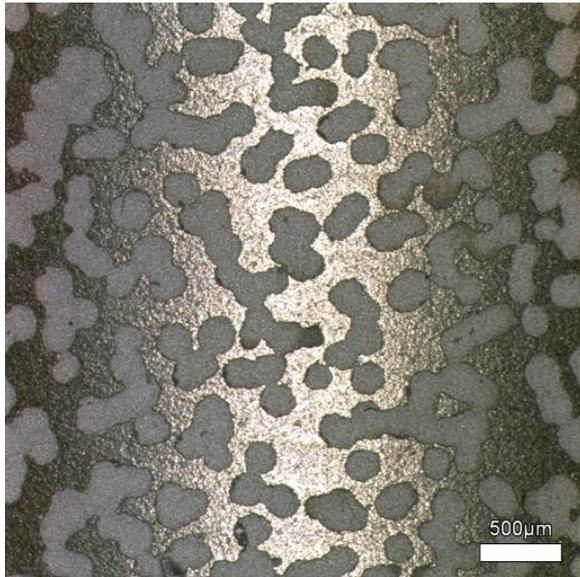


図 29 2%NaCl 水溶液中 20V 5 分間

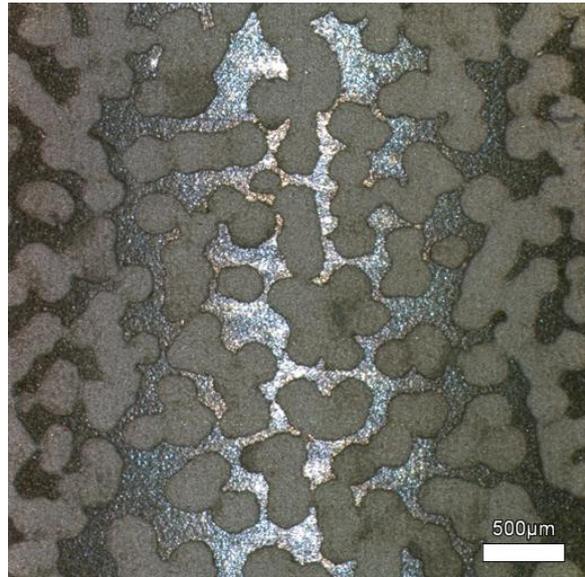


図 30 2%NaCl 水溶液中 20V 10 分間

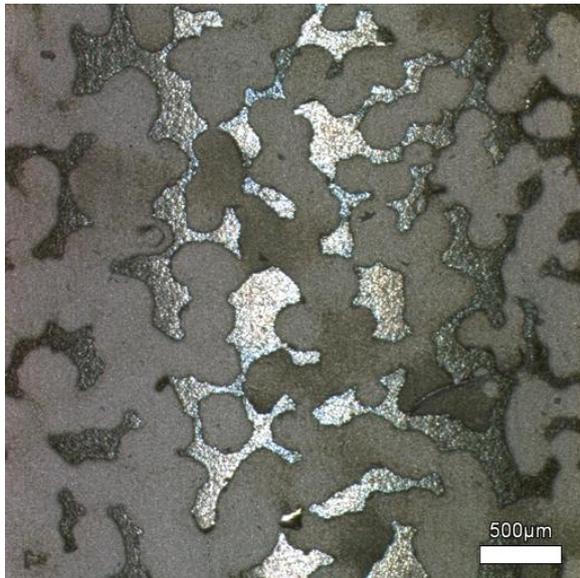


図 31 2%NaCl 水溶液中 20V 15 分間

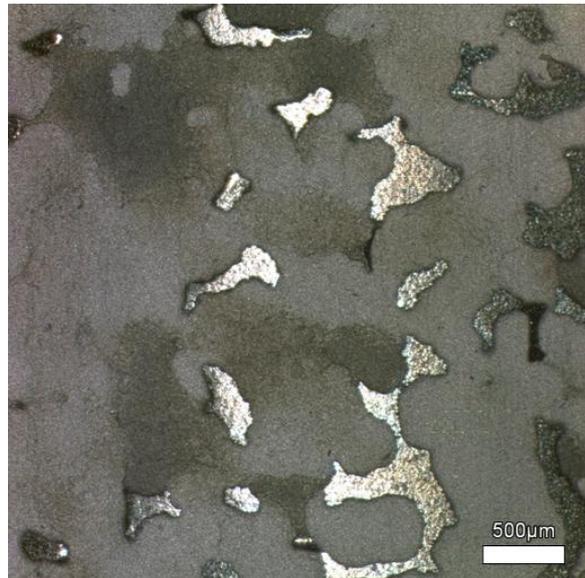


図 32 2%NaCl 水溶液中 20V 20 分間

表 2 2%NaCl 水溶液中で発生する多孔質組織の気孔率

	5min	10min	15min	20min
12.5V	15%	21%	32%	35%
15V	19%	31%	35%	50%
20V	29%	46%	51%	61%

### 2-3 生体親和性試験

本研究で得られた多孔質組織の生体親和性の良否を判断するために骨誘導試験ならびに引抜き強度試験を行った。これらの試験はウサギの大腿骨と脛骨へ試験片を埋入するため、φ 4mm のチタン合金棒材に対して 12.5V (0.35A/cm<sup>2</sup>) 20min で電解処理を行って多孔質組織試験片を作製した。なお、多孔質組織の表面粗さは Ra=65μ m Rzmax=230μ m であった。

生体親和性試験の基準として、粗いブラスト処理を施したφ 4mm の棒材を採用した。このブラスト処理は既に認可されている製品相当の処理であり、比較対照品として妥当と判断した。なお、ブラスト処理によって表面粗さは Ra=5.80μ m Rzmax=50μ m となった。

それぞれ、骨誘導試験片として長さ 6mm、引抜き強度試験片として長さ 15mm に切り揃え、引抜き強度試験片にはワイヤーを通すためにφ 2mm の横穴を開けた(図 33、34)。



図 33 多孔質棒材から切り出した生体試験片(左:骨誘導試験用 右:引抜き試験用)



図 34 粗ブラスト棒材から切り出した生体試験片

骨誘導試験及び引抜き強度試験にて用いられるウサギについては、同様に下記の環境で飼育された。

1.種/系統/性別:ウサギ/日本白色種/雄

2.飼育条件 温度:20~26 °C 相対湿度:30~80 %  
照明時間:12 時間(午前 8 時点灯、午後 8 時消灯)  
ケージ:FRP 製ケージに個別収容  
飼料:ウサギ・モルモット用ガンマ線照射飼料 LRC4 を約 120 g/日給餌  
飲料水:自動給水により水道水を自由摂取

試験片の埋植位置は、体躯より遠位の骨端部(図 35、滑車関節を形成する外側顆のやや骨幹部寄り)に、生理食塩液(日局)による注水下にて電動ドリルを用いて直径約 4 mm、深さ約 10 mm の埋植孔を開けた。ドリル孔内に小孔のない側を先端にして外側顆方向から内側顆方向に、あらかじめ 121°C で 20 分間高圧蒸気滅菌しておいた試験片を挿入した。その後、筋膜及び皮膚を縫合し、術野をヨウ素系の消毒液で清拭した。もう片側の大腿骨には同様の方法で対照品を挿入した。埋植終了後 1 週間は、動物が切開部を舐めたり縫合糸を噛み切らないよう、合成樹脂製のカラーを装着した。

一般状態観察については埋植日から摘出日まで 1 日 1 回行った。なお、埋植当日は、埋植前及び埋植後(麻酔覚醒後)の 2 回行った。体重測定については埋植日及び摘出日に行い、その間は週 1 回行った。

埋植期間終了後は、骨誘導試験の観察及び引抜き強度試験をおこなう下準備として、麻酔後に放血と殺し、両側の大腿骨を摘出し、埋植部位の骨折、変色、出血等の有無とその程度を観察した。また、埋植試料自身の変色、埋植骨からの脱落等の有無も観察した。

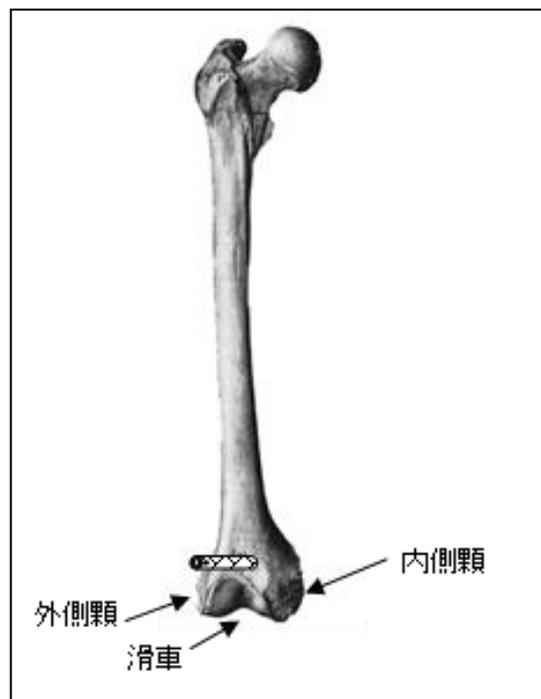


図 35 大腿骨埋植部のイメージ

ウサギの大腿骨・脛骨に長さ6mmに切りそろえた骨誘導試験片を4週および12週埋植し、摘出後に試料周囲の組織反応を肉眼的および病理組織的(※6)に検査した(図36)。なお以降の試験において、多孔質組織棒材から切り出した試験片は「検体」、粗ブラスト棒材から切り出した試験片は「対照品」と呼称する。



図36 摘出時の検体・対照品の様子

肉眼による検査では、いずれの埋植期間においても全ての埋植部位において、骨折、変色及び出血等の異常は認められず、埋植試料自身にも変色及び脱落等の異常は認められなかった。

続けて、病理組織学的検査の結果を下記の表に示す(表3、4)。なお病理組織学的検査所見の凡例についても表に示す(表5)。大きな数字であるほど良好な結果と言える。

埋植後4週の検体埋植部位の大腿骨において、埋植試料周囲への新生骨形成が認められ、新生骨が石灰化し、埋植試料と直接接触する像が観察された。また、埋植試料周囲から伝導した新生骨は、埋植試料の多孔質組織を覆うようアンカーのように発達したのが見られた(図37)。対照品埋植部位においても同様の新生骨形成が見られたが、その程度はわずかに検体埋植部位を下回っていた。また、アンカーのような骨伝導傾向は明らかではなかった(図38)。脛骨では、大腿骨と比較すると新生骨の形成の程度は低かったが、検体埋植部位では、伝導した新生骨が埋植試料の多孔質組織に形成されるものが認められた。脛骨の対照品埋植部位では、新生骨形成状況は検体埋植部位とほぼ同様であったが、形成された新生骨が非常に薄いもの、部分的にしか新生骨形成がないのが見られた。

埋植後12週においても同様の傾向であり、新生骨の形成の程度や石灰化の程度に埋植試料間の差は明らかではなかったものの、検体埋植部位では多孔質組織へのアンカーのような骨伝導と、対照品埋植部位における部分的・菲薄な新生骨形成が特徴的であった。なお、いずれの埋植期間、埋植試料においても、骨髓組織及び骨組織に炎症性細胞の浸潤、変性及び壊死等の組織反応は見られなかった。

ここまでの結果から、本研究で作製される多孔質組織は対照品と比較して骨誘導性が非常

に高いことがわかる。また、多孔質の奥まで新生骨が入り込んでいるためアンカー効果による引抜き強度向上が期待できる。

表3 病理組織学的検査結果(検体)

埋植期間	動物番号	埋植場所	観察所見					細胞浸潤	変性壊死 出血 その他の組織反応
			新生骨の形成	埋植試料と接触する新生骨の割合	埋植試料と直接接触する新生骨の割合	埋植試料と直接接触する新生骨の石灰化度合			
4週	①	大腿骨	3	3	4	3	-	凸部にアンカーのように新生骨が形成されていた。	
		脛骨	2	2	3	4	-	-	
	②	大腿骨	3	3	3	2	-	-	
		脛骨	3	2	3	4	-	凸部に新生骨が形成されていた。	
12週	③	大腿骨	2	2	3	1	-	凸部に新生骨が形成されていた。	
		脛骨	1	1	3	4	-	-	
	④	大腿骨	3	3	3	4	-	凸部に新生骨が形成されていた。	
		脛骨	2	2	4	3	-	-	
	⑤	大腿骨	3	2	3	3	-	-	
		脛骨	2	2	4	4	-	-	

表5 病理組織学的検査所見の凡例

検査項目		凡 例
<b>新生骨の形成</b> (埋植試料と新生骨の間に骨髄組織が介在するものも含む)		0: 試料周囲に新生骨は見られない 1: 試料周囲のごく一部に新生骨が形成 2: 試料周囲の1/2程度に新生骨が形成 3: 試料周囲の1/2以上に新生骨が形成
<b>埋植試料と接触する新生骨の割合</b> (埋植試料と新生骨との接触界面に線維組織が介在するものも含む)		0: 新生骨は試料に接触していない 1: 新生骨が試料周囲のごく一部と接触 2: 新生骨が試料周囲の1/2程度と接触 3: 新生骨が試料周囲の1/2以上と接触
<b>埋植試料と直接接触する新生骨の割合</b>		試料と新生骨の接触界面のうち、試料と新生骨が直接接触している割合  0: 全く又はほとんどない 1: 接触界面の1/4未満 2: 接触界面の1/2程度 3: 接触界面の1/2以上 4: 接触界面のほぼすべて
<b>埋植試料と直接接触する新生骨の石灰化度合</b>		0: 試料と新生骨が直接接触する面は類骨(※7)のみである 1: 試料と新生骨が直接接触する面のうち、1/4未満が石灰化骨で、残りは類骨である 2: 試料と新生骨が直接接触する面のうち、1/2程度が石灰化骨で、残りは類骨である 3: 試料と新生骨が直接接触する面のうち、1/2以上が石灰化骨で、残りは類骨である 4: 試料と新生骨が直接接触する面のうち、ほとんどが石灰化骨であり、類骨はほとんど見られない
細胞浸潤	種類	MΦ : マクロファージ(巨細胞)    Nu: 偽好酸球    Ly: リンパ球 PI : 形質細胞                      Eo: 好酸球        Ma: 肥満細胞
	程度及び範囲	— : なし
		f± : 局所的、限局的で細胞数は10個未満(部位数)
		f+ : 細胞数10個以上30個未満の集簇巣(部位数)
		f++ : 細胞数30個以上の集簇巣(部位数)
		d± : 埋植試料周囲に15個程度が散在する
		d+ : 埋植試料周囲に30個程度が散在する
m : 埋植部位全体に多数の細胞が浸潤		
<b>変性壊死出血</b> その他の組織反応	程度	— : なし、± : わずか、+ : 軽度、++ : 中程度、+++ : 強度
	範囲	f : 局所的(部位数)、d : 散在、m : 広範
	例	f±(3) : わずかな反応が局所的(3箇所)に認められた。

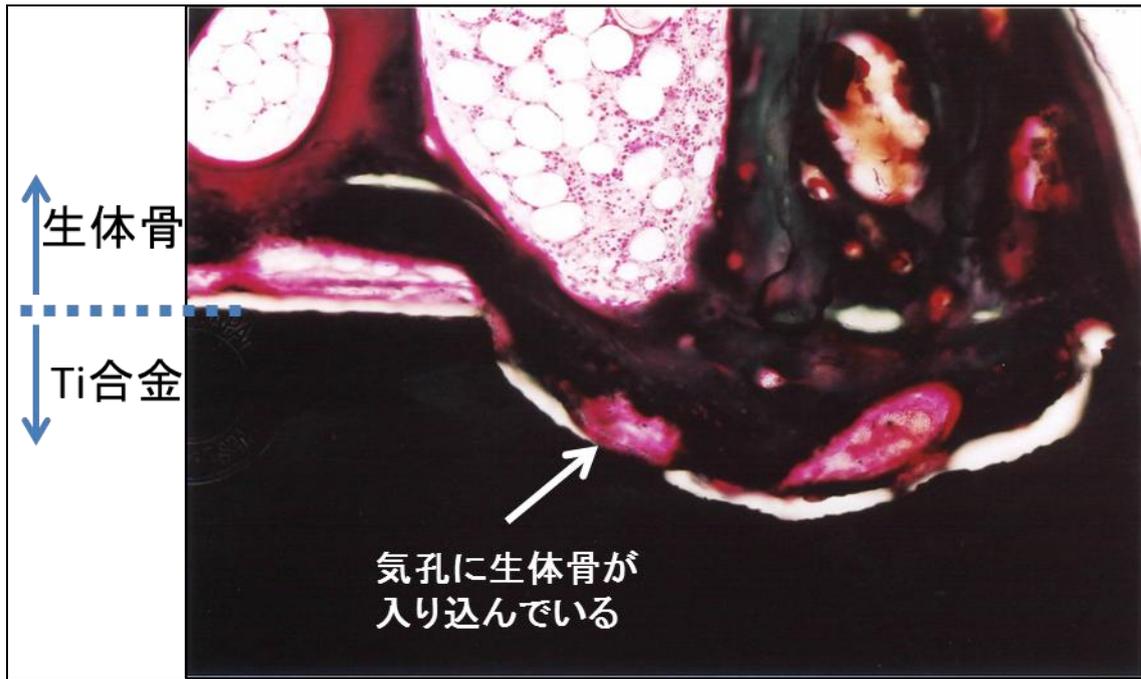


図 37 摘出後の検体の病理検査写真

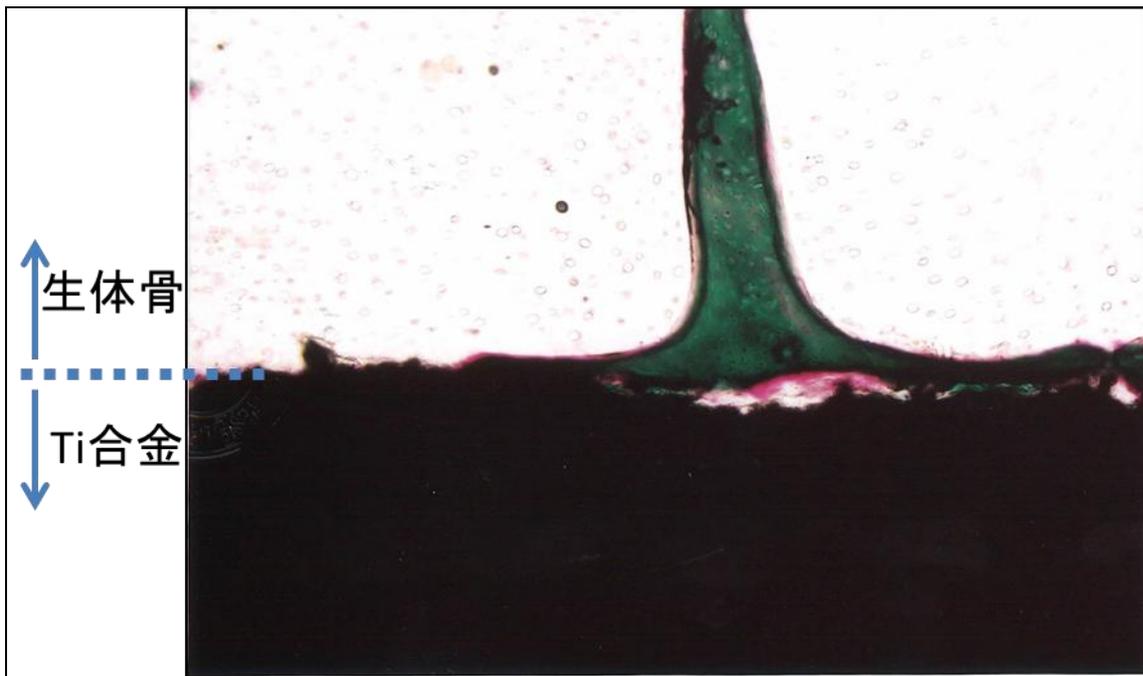


図 38 摘出後の対照品の病理検査写真

ウサギの大腿骨に長さ 15mm の引抜き試験片を 4 週および 12 週埋植し、摘出後に試料周囲の組織反応を肉眼的検査後、当日中に引き抜き強度を測定した。なお、大腿骨は生理食塩液を浸したガーゼで乾燥を防いだ。摘出した大腿骨の骨端部を切り出し、埋植試料(骨から露出した部分)周囲及び埋植試料の小孔内に形成された軟組織等を除去した。埋植試料の小孔にステンレスワイヤーを通した後、引張り強度試験機を用いて引抜き試験を行った。

クロスヘッドスピード 0.5 mm/min にて埋植試料を引き抜き、骨と埋植試料間の引き抜きせん断荷重を測定し(図 39)、引き抜き曲線から得られた最大荷重量を検体又は対照品の骨結合強度(N)とした。なお、測定上限はロードセル容量の関係から 450 N とした。

得られた引抜き強度のデータを、SPSS 11.0.1J for Windows を用いて統計学的解析を行った。等分散性の検定を行い、分散に差が認められない場合、埋植期間(4 週及び 12 週)と埋植試料(検体及び対照品)の 2 つを因子とした二元配置分散分析により比較した。有意水準はいずれも 5%とした。

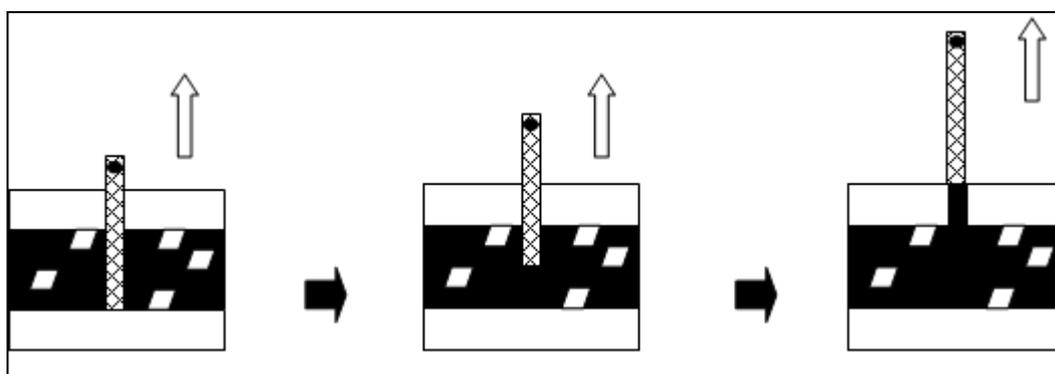


図 39 引き抜きせん断荷重の測定の概念図

引抜き試験を行う前に目視確認したところ埋植期間 4 及び 12 週ともに、全ての検体及び対照品の埋植部位において、骨折、変色及び出血等の異常は認められず、埋植試料自身にも変色及び脱落等の異常は認められなかった。また、全ての埋植部位において、埋植孔の近傍の骨外表面に軟骨及び骨が形成されていた。

引抜き強度試験を行った結果は下表のとおりであった(表 6)。検体の平均骨結合強度は、埋植期間 4 週及び 12 週でそれぞれ 295.0 及び 335.6 N、対照品の平均骨結合強度は、埋植期間 4 週及び 12 週でそれぞれ 151.6 及び 252.3 N となり、いずれの埋植期間においても検体の骨結合強度は対照品と比較して有意に強かった( $p < 0.05$ )。また、検体及び対照品とも経時的な増加傾向が認められたが、こちらには有意差は認められなかった。なお埋植期間 12 週において、検体のうち一つの骨結合強度が測定上限である 450N に達したが、それ以上測定できないため、450N を結果として採用した。

骨と埋植試料の境界面のせん断強度は骨成長(bone ingrowth)の範囲と比例する(参考 1)。本試験では、対照品に比べ、検体で高い骨結合強度が得られたことから、検体は、対照品に比べ骨成長の範囲が広く、骨伝導能が高いと考えられる。以上の結果から、検体及び対照品をウサギの骨内に埋植した場合、経時的に骨結合強度が増加し、対照品に比べ検体は高い骨伝導性を有することが示された。

表 6 検体及び対照品の骨結合強度

埋植期間	動物番号	骨結合強度(N)	
		検体	対照品
4 週	20001	304.4	174.8
	10109	363.7	138.5
	20102	281.5	240.6
	10306	345.4	144.1
	10651	179.9	59.9
	平均値±標準偏差	295.0±72.1	151.6±65.4
12 週	10115	214.7	279.3
	10637	316.6	141.8
	20079	450.0*	346.0
	20082	384.9	206.9
	10571	311.9	287.5
	平均値±標準偏差	335.6±88.1	252.3±79.1

\* 測定上限(450 N)となったため、450.0 Nとして解析した。

## 最終章 全体総括

### 1. 研究開発成果

初年度に行った初期表面粗さ条件についての研究により、エアースラスト装置でTi合金表面をRa=1.0μ m、Rz=10μ m以下の粗さに整えておくことで、食塩水中の電気分解によって均一分散した多孔質組織を得られると判明した。続けて、前年度に行った電気分解条件の研究から、食塩水濃度を1~5%の範囲で調整し、電流密度を0.35~0.5A/cm<sup>2</sup>の範囲で調整することで、気孔率の調節可能な多孔質組織が得られ、特に食塩水濃度2%、電流密度0.35A/cm<sup>2</sup>で20分間通電することで、生体適合性が高いと予想される気孔率35%の多孔質組織を得ることができた。本年度行った生体試験では、本研究の多孔質作成法で作製された35%多孔質組織の試験片が、既承認相当の表面処理の試験片と比較して生体適合性に優れることが示された。

ここまでの3年間の研究成果の集大成として上記内容を、特許出願2013-035185「インプラントおよびその製造方法」として平成25年2月25日に特許出願を行った。今後は、自由曲面への多孔質組織作製についての研究結果と組み合わせることで、あらゆる形状に対応した加工法として確立し、インプラント製品への実装を目指す。

### 2. 研究開発後の課題・事業化展開

これまでの研究開発により、生体親和性の高い多孔質組織形成について一定の知見を得ることができた。

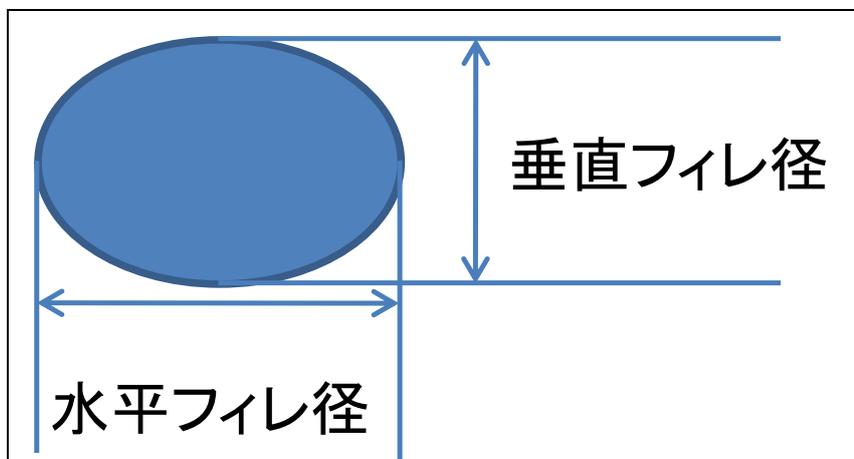
今後の課題・展開としては、先ず整形外科医療現場のニーズに合致したインプラント製品の早期開発および上市ならびに当該製品に対する多孔質組織形成技術の確立である。特に患者本位に立ち市場競争力をもった新製品の開発に全力を傾注しており今後も粘り強く継続するとともに、多孔質組織形成技術を適用した製品開発を目指していく。

また、本研究の主要課題である表面加工処理については、新たな製品開発への適用だけでなく、既承認品への適用、展開について加工法の検証や工夫を加えながら可能性を追求していく。

## 用語解説

※1:フィレ径比…気孔の縦直径と横直径の比率から算出される角度。45°に近いほど真円に近い気孔が発生しているという指標となる。

計算式 フィレ径比(deg)= $180/\pi \times \tan^{-1}$ (垂直フィレ径/水平フィレ径)



※2:平均粗さ Sa…ある面において複数回の表面粗さ測定を行って得られた算術平均粗さ Ra を平均した数値。

※3:最大高さ St…ある面において複数回の表面粗さ測定を行って得られた最大高さ Rzmax の中で最大の数値。

※4: 骨伝導性…生体骨の細胞が定着し、再生しやすいかどうか。さらには、石灰化して強度を保つかどうか。

※5: 有意に強い…強度試験の平均値と偏差から計算された結果、今後同様の強度試験を行っても検体の方が強度が高いと推測される状態。今回の判定基準は  $P < 0.05$  であるため、この推測が覆る可能性は 5%未満である。

※6: 病理学的検査: 生体組織を薄くスライスして専用の薬品で着色し、細胞の定着性や変性・壊死の有無を顕微鏡で観察して確認すること。

※7: 類骨…石灰化して十分な強度をもつ前の成長中の骨組織

## 参考文献

1) Rama K. A. et al.: Trends in Biomaterials & Artificial Organs., 25, 112–118 (2011).