

平成12年度

新エネルギー・産業技術総合開発機構委託業務成果報告書

新規産業支援型国際標準開発事業

生体用ファインセラミックスの 試験評価方法の標準化

平成13年3月

財団法人 ファインセラミックスセンター

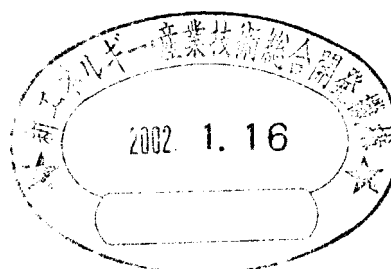
11
68
NEDO 図書・資料室



010019172-5

目 次

1. まえがき	1
2. 要約	4
3. 委託業務実施計画	6
4. 研究開発実施結果	14
4.1 生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討	14
4.2 生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討	34
4.3 生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討	50
4.3.1 ファインセラミックスセンターの研究成果	50
4.3.2 京都大学大学院工学研究科の研究成果（再委託研究）	149
4.3.3 京都大学大学院医学研究科の研究成果（再委託研究）	157
4.4 国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案	174
4.4.1 バイオセラミックス国際標準化に関する海外調査	174
4.4.2 国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案	186
4.4.3 バイオセラミックス材料標準化活動状況	186
4.4.4 国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案	190
5. 結論	197
5.1 技術開発	197
5.1.1 得られた成果	197
5.1.2 当初の目標に照らした達成状況とその要因	198
5.1.3 今後の課題	198
5.2 国際標準化	200
5.2.1 得られた成果	200
5.2.2 当初の目標に照らした達成状況とその要因	200
5.2.3 今後の課題	200
6. あとがき	201
7. 参考文献	202
8. 研究発表・講演、文献、特許等の状況	203
1) 研究発表、講演(口頭発表)	203
2) 文献(業界紙、学会誌等への投稿)	203
3) 特許等	203
4) その他の公表	203
付録	204
1) 添付資料(4.3.1 追加実験データ)	204
2) 第3回技術委員会の議事録	211
3) 第4回技術委員会の議事録	214



1. まえがき

日本は未だ経験したことのない高齢化社会を迎えつつある。この社会構成の急激な変化に対応するために、様々な分野において対応する技術開発が求められている。このような情勢において、関節や骨などの生体代替材料として生体用ファインセラミックスの研究開発が進められている。現状においては、骨折、疾病等により骨・関節を移植する場合に患者の年齢に拘わらず長期間の入院・治療を強いられる。特に高齢者にとっては入院中と術後の運動不足のため、社会復帰が困難になることもある。そのため、生体親和性に優れた生体用ファインセラミックスの研究開発が急務である。

生体用ファインセラミックス材料の開発・産業化のためには、材料特性を評価する基準(規格)が不可欠である。日本と同様高齢化社会を迎えつつある欧米先進国では、生体代替材料の研究開発に歴史をもち、産業化が進んである。それに伴い、生体材料特性に関する米国規格(ASTM)、欧州規格(EN)、さらに世界標準規格(ISO)の制定が進められている。ASTM や EN 規格化を ISO 規格化と連動させ、欧米中心での規格化が生体材料分野では行われているといっても過言ではない。また、規格を征するものが有利であることも、言うまでもない。

一方、日本はこの分野の製品の多くを輸入に頼っており、産業競争力は弱い。しかし、ファインセラミックスの生体用材料開発においては、日本には世界的に技術力に優れたセラミックスのトップメーカーが存在することもあり、欧米企業よりも優位に立っていると言われている。

このような状況において生体用ファインセラミックスに求められる特性の評価方法の規格化を、日本が積極的に進めることは意義あることである。

本研究は平成 11 年度に始まり、13 年度まで 3 年間の予定である。この中で、材料の疲労特性、部材の疲労特性と衝撃特性、及び生体親和性を評価する方法を研究開発する。

それらの

- ① 測定原理、
- ② 測定機器、
- ③ 測定治具、
- ④ 測定手順、
- ⑤ 測定条件、
- ⑥ 測定データ処理方法等、

に関する国際標準化を図ることを目的とする。

平成 11 年度の研究成果を以下に纏める。

- ①国内の生体用アルミナ及びジルコニア焼結体材料を用い、疲労特性と衝撃特性の評価方法を研究・開発し、標準化のための測定条件(応力、周波数、サイクル数)を検討した。ジルコニアの疲労特性における応力誘起相変態の重要性を確認した。
- ②上記①項の疲労特性と衝撃特性の測定値を参考にしながら、同材料より構成される人工骨部材の疲労特性と衝撃特性の評価方法を研究した。室温大気中または生理的食塩水中における疲労特性の評価条件と測定結果から、負荷方式、環境の溶液種類、周波数がの重要性

を確認した。衝撃特性においては生体内衝撃を模擬した方法により試験を行い、骨セメント等でいかに部材を固定するかが標準化に重要であることが分かった。

- ③生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討のため、体液と類似組成の擬似体液(SBF)の組成と調製方法を研究し、これらの標準化を検討した。更に、この SBF を用いて材料の骨形成能評価法を in vivo(生体内)動物実験結果との比較により研究し、動物実験を行うことなく in vitro(試験管内)試験で生体親和性を評価する方法の標準化が可能であることが分かった。
- ④海外・国内調査によりバイオセラミックスに係わる標準化の状況を把握し、上記の研究成果を考慮しながら国際標準化計画を立案した。

平成 12 年度の研究項目を以下に纏める。

①生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討

生体用アルミナおよびジルコニアについて疲労特性の評価方法を検討する。試験は 4 点曲げ疲労試験により行う。室温大気中での試験に加え、導入予定の生体環境チャンバ内で 4 点曲げ疲労試験を行い、大気中のデータとの比較を行う。また、複数の周波数による試験をおこない、4 点曲げ疲労特性の周波数依存性、時間依存性を調べ加速試験の有効性を調べる。さらに、生体用ジルコニアについては、疲労試験における相変態についてラマン分光法により調べる。これらにより評価方法を開発する。

②生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討

生体用ファインセラミックス部材として、上記生体用ジルコニアから作製された人工骨頭について、機械的特性のうち疲労特性および衝撃特性についてその評価方法を検討する。

疲労試験は、ジルコニア骨頭ボールをステムより切り出したテーパー棒に装着したものを試験片として用いる。この試験片に対して生理食塩水中、擬似体液中などの様々な模擬環境下において一軸圧縮疲労試験をおこない、破壊またはき裂の有無を調べる。また、試験後の相変態の有無をラマン分光法により調べる。これらの試験により、疲労特性に及ぼす環境の影響を明らかにする。

衝撃試験に関しては、アルミナおよびジルコニア骨頭ボールをステムより切り出したテーパー棒に装着したものを試験片として用いる。この試験片に対して、落錘落下方式の衝撃試験を行う。試験時の試験片固定方法、緩衝材の種類について検討を行う。これらにより評価方法を開発する。

③生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討

JFCC と再委託先である京都大学大学院工学研究科及び京都大学大学院医学研究科が研究する。

JFCC においては、再委託先である京都大学大学院工学研究科が昨年度開発した体液とほとんど同組成の擬似体液(SBF)調製方法の確立を目的とし、第三者が同 SBF を調製する場合の留意点、問題点を研究する。次にこの SBF を用いて、in vitro で生体親和性を評価するための方法を開発する。

京都大学大学院工学研究科においては、全解離イオン濃度がヒトの血漿のそれに等しい改良

型 SBF 調製方法と保存時のイオン濃度の変化に関する研究を行う。その信頼性を評価するため SBF 溶液中に各種生体用フライセンセラスを浸漬し、経時的な表面構造変化を走査型電子顕微鏡(SEM)により、表面の結晶構造を薄膜X線回折装置により、化学結合を赤外分光分析等により分析し、ハイドロキシアパタイト形成能の評価に適切かどうかを研究する。従来型と改良型 SBF の生体活性特性比較試験を行う。

京都大学大学院医学研究科においては、この SBF に浸漬した生体用フライセンセラスの表面構造変化と動物実験の結果との相関を調べるために、in vivo 動物実験を実施し、両者の表面構造変化を研究する必要がある。この in vivo 実証試験を生体活性の異なるガラス数種類を用いて行う。骨伝導能を形態学的に数値化して評価する方法を検討する。更に、株化骨芽細胞や骨髄細胞を培養し材料表面での骨細胞の増殖、分化の違いを比較検討する。

④国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案

日本から生体用フライセンセラスの試験方法に関する国際規格を提案し、規格化を目指すために、昨年度と今年度の研究成果及び標準化に関する技術情報収集の成果に基づき、国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案を行う。

バイオセラミックスに関する国内・海外調査を行う。平成 12 年度にスウェーデンで開催される ISO/TC150 総会における技術調査、関連機関における技術情報収集、及び国内外における学会・講演会等で技術情報収集を行う。これらにより生体用フライセンセラスの試験方法標準化の研究開発に資する。

高度な専門知識と設備が必要とされる研究の一部を、京都大学大学院工学研究科と京都大学大学院医学研究科に再委託した。

平成 11 年度から 3 年間行われる予定の新規産業支援型国際標準開発事業「生体用フライセンセラスの試験評価方法の標準化」に係わる研究開発結果を、日本から発信する国際標準化推進のための重要な基礎資料として活用する所存である。平成 13 年度の本プロジェクト終了後に、国際標準規格原案を作成する。その後、作成した原案を ISO/TC150 国内対応委員会を通じて ISO 国際標準規格を提案し、ISO 規格化を目指す予定である。

2. 要約

生体用アルミナセラミックスおよびジルコニアセラミックスについて、各種条件下での一軸曲げ疲労試験を行った。その結果、曲げ疲労特性は環境や周波数の影響を大きく受けることが明らかになり、生体内を模擬した環境での評価が必要であることが示された。

生体用アルミナおよびジルコニアセラミックスからなる人工股関節骨頭について、負荷条件の違いによる圧縮強度変化を調べた。その結果、線接触による負荷が望ましいことが明らかになった。生体模擬環境下における一軸圧縮疲労試験をおこなったところ、2.5tの荷重下においても10⁷回まで破断が起こらないことが明らかになった。

生体用アルミナおよびジルコニアセラミックスからなる人工股関節骨頭について、緩衝材の材質、厚みをパラメータとした衝撃試験をおこなった。その結果、骨頭の破壊の有無は下部緩衝材の弾性率および上部緩衝材の厚みに依存することが明らかになった。

改良 SBF(R-SBF)を調製し、調製した R-SBF に生体活性ガラスを浸漬し、基板表面にアパタイトが析出することを薄膜X線回折スペクトルにより確認し、R-SBF 調製方法が適正であった事を実証した。有効性を確認した R-SBF に生体親和性評価用ガラス(5 種類)を浸漬し、浸漬ガラス表面の経時変化を SEM-EDS 観察、薄膜(TF)-X線回折スペクトル(XRD)測定及び高周波誘導結合プラズマ発光分光分析(ICP)等によって評価した。

ヒトの血漿のそれに等しい解離イオン濃度を有する擬似体液(I-SBF)を調製し、同 I-SBF のイオン濃度に 36.5°Cで 4 週間までに変化が生じないこと、バクテリア等の除去に有効なマイクロフィルター濾過処理が、従来の擬似体液(C-SBF)、改良型の擬似体液(R-SBF 及び I-SBF)のいずれの SBF のイオン濃度にも変化が生じさせないこと、及び R-SBF 及び I-SBF 中で生成されるアパタイトは生体骨のアパタイトにほぼ等しい組成を有することが明らかになった。

擬似体液中で異なるアパタイト形成能を示す 5 種類の組成の生体ガラス顆粒を兔大腿骨顆部に埋入し、走査型電子顕微鏡にて埋入後 3 週迄の骨の新生を周辺からの骨深度にて測定した。またガラス顆粒内に新生した骨の総量およびガラス顆粒の溶解率を、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて測定した。新生骨の深度は in vitro でのアパタイト形成能に比例して増加した。後者の観察では標識された新生骨量は in vitro アパタイト形成能にほぼ比例しており、骨形成能とガラスの溶解性も同様の傾向にあった。この結果から生体活性セラミックスの活性を擬似体液中でのアパタイト形成能によって評価できることが示唆された。

ISO/TC150 総会・WG 会議(スウェーデン)に出席し規格案の質疑に参加すると共に、バイオセラミックス国際標準化に関する規格化情報を収集した。イギリスの二大学を訪問し、擬似体液に関する技術情報交換を行った。H14 年度以降に日本から ISO に規格提案を行う内容について検討を行った。

重要語

アルミナ、ジルコニア、疲労、衝撃、相変態、環境、改良擬似体液、生体活性ガラス、生体親和性、In vitro(試験管内実験)、人血漿、水酸アパタイト、SEM-EDS、薄膜-XRD、ICP、In vivo(生体内実験)、動物試験、細胞浸透深さ、国際標準化

SUMMARY

Uniaxial bending fatigue tests are conducted on alumina and zirconia bioceramics at various conditions. The results show that bending fatigue property highly depends on the testing environment and the frequency. Thus, it is necessary to evaluate the fatigue property of such materials under an environment similar in living body. The loading condition dependence on compressive strength is examined on alumina and zirconia femoral head with a taper. The loading by a line contact is better than that by a point contact. Fatigue property is examined on the femoral head with a taper by uniaxial compressive tests at 36°C in physiological saline solution. No fracture occurs even after fatigue of 10^7 cycles under a maximum load of 2.5tf in both materials. Impact tests are conducted on the femoral head with a taper, in which composition and thickness of absorber materials are changed. It is clarified that whether the fracture occurs or not depends on the elastic modulus of lower absorber and the thickness of the upper one.

Revised simulated body fluid (R-SBF) was prepared under the manual prepared by Dept of Prof. Kokubo, Kyoto Univ., and its appropriation was confirmed by the Thin-film X-ray Diffraction spectrum of the apatite formed on the bio-active glass surface. The surface of the bio-glass soaked for various periods into the R-SBF were analyzed by SEM and TF-XRD. After the glass was taken out, inorganic ion of the R-SBF was analyzed by ICP.

A simulated body fluid (I-SBF) which was prepared to have de-ionized ion concentrations equal to those of human blood plasma was found to be unchanged in its ion concentrations, when it was kept in a sealed bottle at 36.5°C up to 4 weeks. Micro-filtering treatment to remove bacteria was found to cause no changes in ion concentrations of conventional SBF (C-SBF), revised SBF (R-SBF) and I-SBF. The R-SBF and I-SBF were found to produce apatite with composition equal to that of bone mineral.

Five kinds of granules, showing different abilities of apatite formation in simulated body fluid, were implanted into the defect at femoral condyle of rabbits. Bone ingrowth behavior was examined with SEM. Quantitative analysis was performed measuring the depth of new bone ingrowth. Total volume of new bone into the particles and dissolution ratio of each glass were examined using CLSM. The depth of bone ingrowth into particles increased in proportion to the inductivity of apatite in vitro. CLSM study showed almost direct proportions between the quantity of labelled new bone and in vitro bioactivity, and also the same tendency between new bone formation and dissolution ratio. This study supports the propriety of the method to evaluate the bioactivity of a material by examining formation of the apatite layer on its surface in SBF.

Information on ISO standardization was obtained by attending the ISO/TC150 meetings and discussing the proposed standards in Sweden. The information exchange was done with two universities in U. K.

KEYWORDS

Alumina, Zirconia, Fatigue, Impact, Phase transformation, Environment, Revised simulated body fluid, Bioactive glass, Biocompatibility, In vitro, Human blood plasma, Apatite, SEM-EDS, TF-XRD, ICP, In vivo, Animal test, Depth of cell penetration, ISO.

3. 委託業務実施計画

3.1 研究開発の目的

人工関節や人工骨など生体代替材料として研究開発が進められている生体用ファインセラミックスについて、これら材料とこれらを用いた人工骨部材が具備すべき機械的特性と生体親和性を評価する方法を確立する。

3.2 実施計画の細目

人工関節や人工骨などの応用が期待できる生体用ファインセラミックスの物理的、化学的、機械的特性の評価法およびこれら材料を用いた人工骨部材の耐衝撃性、疲労強度や生体親和性を評価する方法を研究し、測定原理、測定機器、測定治具、測定手順、測定条件、測定データ処理法等の標準化を目指す。

3.2.1 生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討

生体用ファインセラミックス材料(アルミナとジルコニア)の疲労強度特性評価方法を研究する。4点曲げ試験片、曲げ試験用治具と疲労試験装置を用いて、繰り返し曲げ応力を試料に加え最大負荷荷重(S)と破断繰り回数(N)を測定し、試験結果を S-N プロット図として図示する。最大応力は3水準以上設定する。

3.2.2 生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討

上記アルミナ及びジルコニアから作製された人工骨頭の疲労特性及び衝撃特性の評価法を研究する。疲労試験では、テーパー棒に装着したセラミックボール試験体を大気中及び生理食塩水で満たした容器の中での試験を行う。繰り返し荷重応力は 400 及び 800kgf とし、繰り返し周波数 20Hz で 10^7 サイクルまでの破壊の有無を調べる。衝撃試験では、テーパー棒に装着したセラミックボール試験体を衝撃試験装置に設置し、落錘落下方式にて測定する。

3.2.3 生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討

ファインセラミックスセンター(JFCC)で生体親和性評価方法の研究をすると共に、JFCC から京大工学部(小久保研)及び京大医学部(中村研)に再委託研究を依頼してこの研究を実施する。

京大工学部にて体液とほぼ同組成の擬似体液(SBF)を調製する方法について研究し、JFCC にてこの SBF の調製が可能であることを実証する。更に、動物実験を行わずに生体親和性を評価する方法を、この SBF を用いた *in vitro* 試験により研究する。SBF 溶液中に生体用ファインセラミックスを浸漬し、経時的な表面形態変化、化学組成変化、結晶構造変化を測定することにより、生体親和性を評価できる標準的方法を検討する。

また、この SBF を用いたファインセラミックスの表面構造変化が動物実験とほぼ一致していることを証明することを目的とした *in vivo* での動物実験を京大医学部で実施する。

3.2.4 国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案

バイオセラミックスに関する規格化・標準化及び評価関連技術に関して、国内・海外調査を実施する。2000年9月のスウェーデンのストックホルム市で開催される国際標準化ISO/TC150(外科用インプラント)の総会とワーキンググループ会議に出席し、企画案の質疑に参加すると共に、ISOにおける規格化の情報を収集する。

英国のクイーンメリー大学とケンブリッジ大学を訪問し、バイオセラミックスに関する規格化・標準化及び評価関連技術に関して技術的意見交換を行う。今後擬似体液を用いる評価方法の規格化について協力関係を築く。

生体用ファンセラミックス特性評価に関する国際規格策定のための、国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案を行う。

3.3 研究場所

- (1) (財)ファインセラミックスセンター試験研究所 名古屋市熱田区六野二丁目4番1号
- (2) 再委託先 京都大学大学院工学研究科 京都市左京区吉田本町
再委託先 京都大学大学院医学研究科 京都市左京区聖護院川原町54

3.4 実施期間

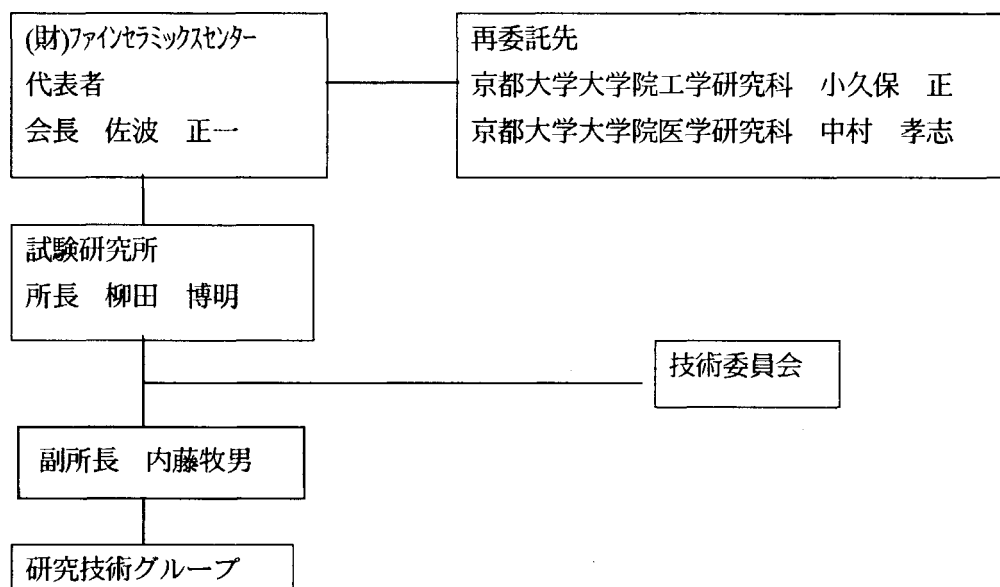
平成12年4月1日から平成13年3月31日まで。

3.5 実施計画日程

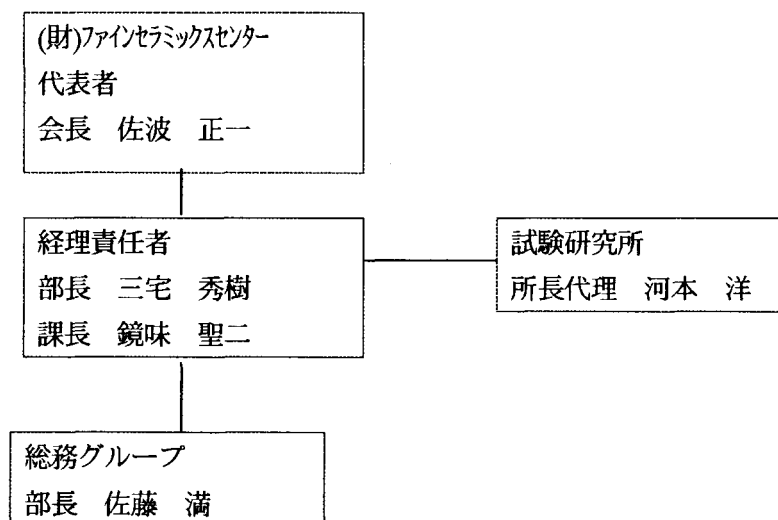
実施事項	平成12年										平成13年		
	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3
①生体用ファインセラミックス材料 特性評価方法の検討													
②生体用ファインセラミックス部材の 機械的特性評価方法の検討													
③生体用ファインセラミックス材料の 生体親和性評価方法の検討													
④国際規格骨子作成並びに国際標準化 活動計画立案													
⑤技術委員会			○									○	

3.6 研究体制

3.6.1 研究組織



3.6.2 管理体制



3.6.3 研究者氏名及び実施計画の細目毎の人員数

(1) 研究者氏名及び人員数(JFCC)

氏 名	所 属・役 職	研究項目番号
金 順一	試験研究所 調査役	①②③④⑤
角岡 勉	試験研究所 主席研究員	①②③④⑤
内藤 牧男	試験研究所 副所長 リサーチマネージャー	①②③④
水野 峰男	// 主席研究員	①②③④⑤
安富 義幸	// 主席研究員 リサーチマネージャー	①②③④⑤
池田 泰	// 主席研究員待遇	①②③
瀧川 順庸	// 研究職	①② ④⑤
黒山 友宏	// 技術職	①②
柳澤 雅明	// 主席研究員	③④⑤
幾原 裕美	// 副主任研究員	③④
柴田 典義	// 主席研究員 リサーチマネージャー	③④⑤
佐々木 優吉	// 主任研究員	③④

番号	研究実施項目	人 数
①	生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討	8 人
②	生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討	8 人
③	生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討	10 人
④	国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案	10 人
⑤	技術委員会	7 人

なお、下記の 1 名の研究者を嘱託契約期間満了のために削除した。

平成 12 年 11 月 30 日付け

削除	
氏名	所属・役職
金 順一	試験研究所 調査役

(2) 研究者氏名及び人員数(再委託先)

1) 京都大学大学院工学研究科

氏 名	所 属・役 職	研究項目番号
小久保 正	京都大学大学院工学研究科 教授(京大工一)	③

番号	研究実施項目	人 数
③	生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討	1 人

2) 京都大学大学院医学研究科

氏 名	所 属・役 職	研究項目番号
中村 孝志	京都大学大学院医学研究科 教授(京大医テ-7)	③

番号	研究実施項目	人 数
③	生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討	1人

3.6.4 経理担当者及び業務管理者

(1)経理担当者

財団法人ファインセラミックスセンター 総務グループ 部長 三宅秀樹
 (組織変更により平成13年2月1日より 課長 鏡味 聖二に変更)
 TEL. 052-871-3500 FAX 052-871-3505

(2)業務管理者

財団法人ファインセラミックスセンター 試験研究所 所長代理 河本 洋
 TEL. 052-871-3500 FAX 052-871-3599

3.7 技術委員会

3.7.1 委員会の目的、構成

研究開発を効率的に推進するために、下部組織として当該分野の学識経験者、国際標準化関係者からなる技術委員会を設置した。この技術委員会にて、本研究開発の計画・実施に対して指導・提案・意見などを得ながら効果的に推進した。

「生体用マイクロセンシング試験評価方法の標準化」技術委員会名簿

区分	氏名	所属及び役職
委員長	小久保 正	京都大学大学院 工学研究科 教授
委員	佐藤 道夫	厚生省 国立医薬品食品衛生研究所 評価室 室長
委員	中村 孝志	京都大学大学院 医学研究科 教授
委員	田中 順三	科学技術庁 無機材質研究所 総合研究官
委員	丹羽 滋郎	愛知医科大学 名誉教授 あいち健康の森館長
委員	亀山 哲也	名古屋工業技術研究所 研究企画官
委員	松下 富春	株式会社神戸製鋼所 医療材料部 理事・部長
委員	松尾 泰史	日本特殊陶業株式会社 研究部 部長
委員	高橋 孝	社団法人日本マイクロセンシング協会 標準部長
委員	立石 哲也	工業技術院 産業技術融合領域研究所 総合研究官
委員	大西 啓靖	厚生省 国立大阪南病院 整形外科 副院長
委員	市原 秋男	通商産業省生活産業局マイクロセンシング室開発振興班長
委員	荻山 久雄	NEDO 基盤技術研究開発室長
委員	山本 修蔵	(財)日本規格協会技術部 部長
事務局	角岡 勉	(財)マイクロセンシング試験研究所 主席研究員
事務局	水野 峰男	// 技術基盤・粉体 G 主席研究員

また、本研究開発は、総合調査を担当する(財)日本規格協会との連携を図りつつ実施する。

3.7.2 議決事項

(1) 第3回「生体用マイクロセンシング試験評価方法の標準化」技術委員会

日時：平成12年6月9日 13:30より15:50

場所：マイクロセンシングセンター 研修室

出席者：委員：小久保正(京大)、中村孝志(京大)、丹羽滋郎(愛知医科大)、横川善之(名工大)、亀山哲也氏の代理、飯島繁(JFCA)、高橋孝氏の代理、松下富春(神鋼)、松尾康史(日特)。

オブザーバ：市原秋男(FC室)、新谷裕和(NEDO)、荻山久雄氏の代理、茶谷正明(日本規格協会)、山村修蔵氏の代理。

事務局・JFCC 研究担当：金順一・角岡勉・水野峰男・安富義幸・瀧川順庸・柳沢雅明・柴田典義(JFCC)。

議決事項：(議事録は付録参照)

平成 12 年度研究開発計画・活動状況について、各担当から説明があり、その後質疑を行った。

①資料確認

②議事録の確認

③平成 12 年度研究開発計画

1) 全体計画と標準化予定(JFCC)

事務局水野が資料 0001-03 を用いて、研究目的、研究開発体制、研究開発スケジュール、国際標準化への展開等について、3 年間の計画全体と 12 年度の研究内容を説明した。ISO/TC150 へ 4 件の提案を計画している。事務局角岡が研究目的、研究開発体制、研究開発スケジュール、国際標準化への展開等について説明し、質疑の上、了承された。

2) JFCC 実施計画

①材料・部材の機械的特性評価

瀧川研究担当より、機械的特性評価に関する研究計画の説明があった(資料 0001-04a 参照)。生体用 FC 材料の疲労特性、同部材の衝撃性、疲労特性の研究内容紹介があった。質疑の上、了承された。

②生体親和性評価

柳沢研究担当より、生体親和性評価に関する研究計画の説明があった(資料 0001-4b 参照)。京大工で H11 に開発した改良型擬似体液の調整法と、生体用 FC 材料として生体活性ガラス b,c,d を用いて行う生体活性ガラスの浸漬実験・評価についての内容紹介があった。質疑の上、了承された。

3) 京大(工)実施計画

小久保委員長より、擬似体液を用いた生体親和性評価に関する研究計画の説明があった(資料 0001-5 参照)。H11 に開発した改良型の R-擬似体液に続き、ヒト血漿と同じ解離イオン濃度をもつ I-擬似体液の開発、バクテリア繁殖防止方法の検討、従来型の C-擬似体液を加えた 3 種類を用いたときに形成する HAp 組成・構造の評価、HAp 形成速度の異なるガラス数種の調製を行い、JFCC と京大医にも供給する。質疑の上、了承された。

4) 京大(医)実施計画

中村委員より、in vitro 評価と in vivo の接着強度の評価を比較して in vitro 評価の妥当性を確認するための研究内容の紹介があった(資料 0001-6 参照)。試験に用いる HAp 形成速度が異なるガラス b,c,d は、小久保委員長から提供を受ける。in vivo 生体活性能を評価するため、H11 に行った引き剥がし試験(剥離強度)の他、100~300 ミクロンメートルのガラス粒をラットに埋め込む試験を行う。形態観察、骨形成化を顕微鏡観察する。質疑の上、了承された。

(2) 第 4 回「生体用ファインセラミックス試験評価方法の標準化」技術委員会

日 時：平成 13 年 2 月 19 日(月) 14:45 ~ 17:10

場 所：JFCC 研修室。

出席者：委員：小久保正(京大)、中村孝志(京大)、丹羽滋郎(愛知医科大)、立石哲也(融合領域研)、

横川善之(名工研；亀山哲也氏の代理)、飯島繁(JFCA；高橋孝氏の代理)、松下富春(神鋼)、松尾康史(日特)。

オブザーバ：権藤浩(FC 室)、新谷裕和(NEDO)、茶谷正明(日本規格協会)。

事務局・JFCC 研究担当：角岡勉・水野峰男・安富義幸・瀧川順庸・柳沢雅明。

議決事項：(議事録は付録参照)

①資料確認

②議事録の確認

③平成 12 年度研究開発成果・活動状況

1) JFCC 研究開発成果

瀧川研究担当が、機械的特性(生体用 FC 材料の疲労特性、同部材の衝撃性、疲労特性)評価に関する研究成果と 13 年度の研究予定について説明し、質疑の上、了承された。

柳沢研究担当が、生体親和性評価に関し、京大工で H11 年度に開発した改良型擬似体液 R-SBF の調整法の確立と、これを用いた生体活性ガラス a,b,c,d,e を用いた浸漬実験、TF-XRD、SEM、EDX 等による評価、SBF 組成の分析評価についての研究成果と 13 年度の研究予定について説明し、質疑の上、了承された。

2) 京大(工)研究開発成果

小久保委員長より、擬似体液を用いた生体親和性評価に関する研究成果の説明があった。H11 年度に開発した改良型の R-SBF に続き、ヒト血漿と同じ解離イオン濃度をもつ I-SBF を開発した。従来型の C-擬似体液を加えたこれら 3 種類の SBF の HAp 形成能を PET を用いて評価した。バクテリア繁殖防止方法、保存日数等の検討も行った。13 年度の研究予定について説明し、質疑の上、了承された。

3) 京大(医)研究開発成果

中村委員より、in vitro 評価と in vivo の接着強度の評価を比較して in vitro 評価の妥当性を確認するための研究成果の紹介があった(資料 0002-5 参照)。HAp 形成速度が異なるガラス b,c,d をウサギの顎骨に埋入し、引き剥がし試験と組織学的観察を行ったが、ガラス表面の剥離の問題があり、引き剥がし試験評価は適当でない場合があることが分かった。また 5 種類の生体ガラスの顆粒を埋入し、周辺骨からの新生骨への深さを測定したところ、材料の生体活性の順序と新生骨深さとの相関が認められた。13 年度の研究予定について説明し、質疑の上、了承された。

4) 海外調査報告

水野研究担当より、スウェーデンで開催された ISO/TC150(外科用インプラント)総会における ISO 標準化の状況と英国クイーンメリー大学及びケンブリッジ大学における生体材料標準化調査に関する報告があった。

4. 研究開発実施結果

4.1 生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討

4.1.1 緒言

ファインセラミック材料は、生体内においても安定でありかつ金属材料と比較して優れた強度特性を有するため、人工関節や人工骨などの大負荷を受ける部分の生体代替材料として活発に使用されている。例えば人工股関節部材に着目すると、骨頭用材料としてアルミナセラミックスが盛んに用いられている。この理由として、アルミナセラミックスが生体内においても溶解、変質などがなく安定でありかつ生物学的に不活性であることから経時変化を考慮する必要がないこと、強度が比較的高いこと、金属材料と比較して組織親和性に優れていること、耐摩耗特性に優れていることなどがあげられる。特に耐摩耗性については、アルミナ部材のみではなくポリエチレン・ソケットの摩耗速度も低減するため、人工股関節としてのシステム全体の耐久性向上につながるものである。さらに、ポリエチレン摩耗粉の有害性についても指摘がおこなわれており、このような観点からもアルミナセラミックスを用いた骨頭の優位性がうかがえる。このような優れた特性を有するアルミナセラミックスに加え、次世代の高強度生体用セラミックスとしてジルコニアセラミックスが注目されている。その理由として、アルミナ骨頭ボールは临床上十分な強度を有してはいるものの、その取り扱いにおいては注意を有する部分があり、より強度の高い材料が求められている点があげられる。ジルコニアセラミックスはアルミナセラミックスの 1.5 倍から 2 倍程度の強度を有しており、他の生体材料として必要な条件も満たしているため、骨頭用材料として今後の使用がますます盛んになるものと思われる。

これらアルミナセラミックスおよびジルコニアセラミックスについては、外科用埋没材料として必要な特性が ISO により規定されている。アルミナにおいては 1994 年に規定された ISO6474 であり、ジルコニアにおいては 1997 年に規定された ISO13356 である。しかしながら、ファインセラミックスの特性は年々向上を続けており、それにとまなう規格の見直しは、常に検討されるべきものである。また、使用する部位により求められる特性は多種多様であり、新たな項目の追加も考慮されるべきである。その中で、現行のアルミナに対する ISO6474 およびジルコニアに対する ISO13356 の問題点として、疲労特性の測定方法および必要な特性値が規定されていない点があげられる。上述したように、アルミナおよびジルコニアセラミックスは人工股関節部材としての実用化がおこなわれており、その使用においては長期間に渡り繰り返し負荷がかかることは明白である。このような繰り返し負荷に対する疲労特性は静的な負荷による強度特性とは異なるものであり、実用に際して材料の特性として明確な規定を与えることが必要不可欠であると考えられる。また、生体内で使用される場合、室温大気中での特性値とは異なる特性値を示す可能性があり、試験環境に対しても明確な規定を与える必要がある。

本研究は、アルミナに対する ISO6474 およびジルコニアに対する ISO13356 に疲労特性の項目を追加する改定案を提案することを念頭に、生体用ファインセラミックス材料としてのアルミナおよびジルコニアセラミックスの疲労特性評価方法の検討、さらに、外科用埋没材料としてのアルミナおよびジルコニアセラミックスに対して必要な疲労特性値を明確にすることを目的としておこなう。

本年度は、基礎的な疲労特性を明らかにするために、1 種類の生体用アルミナセラミックスお

よび2種類のジルコニアセラミックスについて、室温大気中および生理食塩水中 36℃における疲労試験をおこない、データとの比較をおこなった。

4.1.2 試験方法

生体用アルミナセラミックス試料として用いた材料は、セラヘッド A・ジンマーアルミナセラミック製骨頭ネックなどに用いられているものと同様の、日本特殊陶業（株）製生体用アルミナテストピースである。今回のテストピース自身の特性値については実測していないものの、セラヘッド A の実測値と ISO6474 に規定されている特性との比較を表 4.1-1 に、ASTM F603 との比較を表 4.1-2 に示す [1]。いずれの特性値も ISO あるいは ASTM による規定をほぼ満たしていることがわかる。一方、生体用ジルコニアセラミックス試料としては、（財）ファインセラミックスセンター（JFCC）が実用標準物質として頒布しているジルコニア共通焼結体リファセラム ZR1 およびジンマージルコニアヘッドなどに用いられているものと同様の、日本特殊陶業（株）製生体用ジルコニアテストピースを用いた。表 4.1-3 にリファセラム ZR1 における特性値と ISO13356 により規定されている各特性値との比較を示す [2]。リファセラム ZR1 は本来は生体用ファインセラミックスではないが、表に示すように ISO13356 によって規定されている特性を HfO_2 添加量が明確にされていない点を除きすべて満たしており、生体用ファインセラミックスとしての評価に用いるに妥当であると思われる。一方、ジルコニアテストピースについてはその特性は明らかになっておらず、特性値については実測していないものの、1997 年の ISO13356 制定後に開発された材料であり、本規格を満たす特性値を有しているものと思われる。

表 4.1-1 ISO6474 による規定とセラヘッド A の諸特性値 [1] との比較

Property	Unit	Requirement	セラヘッド A
Bulk density	g/cm^3	≥ 3.94	3.96
Chemical composition:			
Al ₂ O ₃	%	≥ 99.5	≥ 99.7
MgO	%	≤ 0.3	-
SiO ₂ +CaO+alkali metal oxides	%	≤ 0.1	≤ 0.03
Microstructure			
Mean linear intercept distance	μm	≤ 4.5	1
Standard deviation		≤ 2.6	-
average biaxial flexural strength	MPa	≥ 250	-
Wear resistance			
Wear volume		≥ 0.1	-

表 4.1-2 ASTM F603 による規定とセラヘッド A の諸特性値 [1] との比較

Property	Unit	Requirement	セラヘッド A
Bulk density	g/cm ³	≥ 3.94	3.96
Chemical composition:			
Al ₂ O ₃	%	≥ 99.5	≥ 99.7
SiO ₂ +Na ₂ O+K ₂ O	%	≤ 0.1	≤ 0.03
Average grain size	μm	≤ 7	1
Flexural strength	MPa	≥ 400	≥ 500
Young's modulus	GPa	≥ 380	≥ 383

表 4.1-3 ISO13356 による規定と ZR1 の諸特性 [2] との比較

Property	Unit	Requirement	ZR1
Bulk density	g/cm ³	≥ 6.00	6.07
Chemical composition:			
ZrO ₂ +HfO ₂ +Y ₂ O ₃	percent	>99.0	>99.65
Y ₂ O ₃	mass	4.5 to 5.4	5.09
HfO ₂	fraction	≤ 5	-
Al ₂ O ₃		<0.5	0.238
Other oxides		<0.5	0.07
Microstructure			
Mean linear intercept distance	μm	≤ 0.6	0.37
Strength:			
4-point bending	MPa	≥ 800	1,100

上記のアルミナおよびジルコニアセラミックスを3×4×40mmの曲げ試験片に加工した。今年度新たに評価をおこなったジルコニアテストピースについては、疲労試験に先立ち強度特性を調べるために室温大気中における4点曲げ試験をおこなった。曲げ試験はJIS R 1601に基づいて、上部支点間距離10mm、下部支点間距離スパン30mm、負荷速度0.5mm/minでおこなった。試験には4880型制御装置を付属した(株)島津製作所製の疲労試験装置SERVO PULSER EHF-FD1を用いた。疲労試験は室温大気中および36℃の生理食塩水中において、1軸の4点曲げによりおこなった。試験はJIS R 1621に基づいて、上部支点間距離10mm、下部支点間距離スパン30mmでおこなった。試験には環境チャンバーを付属したMTS製25kNミニバイオニクスII単軸疲労試験装置および4880型制御装置を付属した(株)島津製作所製の疲労試験装置SERVO PULSER EHF-FD1を用いた。図4.1-1に環境チャンバーを付属したMTS製25kNミニバイオニクスII単軸疲労試験装置の外観を示す。試験は周波数20Hzおよびヒトの歩行時の周波数である周波数1Hzでおこなった。負荷応力条件は公称応力比 $R = \sigma_{\min} / \sigma_{\max} = 0.1$ とし、試験の打ち切り回数は 1×10^7 回とした。

ジルコニアセラミックスについては、試験前後のいくつかの試料について、ラマン分光法による分析をおこなった。これは、ジルコニアセラミックスにおいて、応力により正方晶から単斜晶への相変態が起こることが知られているためである。ラマン分光法には、波長515 nmのArイオンレーザと光学顕微鏡を組み合わせた偏光ラマン分光器(日本分光製, NR-1800型)を用いた。図4.1-2に偏光ラマン分光器の概略図を示す。ラマン散乱の測定に用いられる装置は、光源としてのレーザ、試料にレーザ光を照射するための光学系、ラマン散乱光を集めてモノクロメータに導く光学系、モノクロメータ、検出器、データ処理および記録系によって構成されている。今回用いたシステムにおいては、光学顕微鏡を組み合わせているためにレーザの照射領域を絞ることが可能であり、約1μmφの微小領域の分析をおこなうことができる。本研究においては照射領域を約5μmφをした。いずれの測定に関しても分光器はシングルモノクロメータを使用しており、スリットは $s_1=100$ 、 $s_2=25000$ 、 $s_3=500$ 、 $s_4=500$ 、 $s_5=500$ 、 $s_6=300\mu\text{m}$ である。装置内のレーザ光路模式図を図4.1-3に示す。

4.1.3 試験結果

(1) 生体用ファインセラミック材料の疲労特性

疲労試験に先立ち、今年度新たに評価をおこなうジルコニアテストピースの強度特性を調べるために、室温大気中における4点曲げ試験をおこなった。3本の試験片について試験をおこなったところ、平均強度は993MPaと見積もられた。

次に、曲げ試験の結果に基づき、4点曲げ疲労試験をおこなった。試験は周波数20Hz、公称応力比 $R = \sigma_{\min} / \sigma_{\max} = 0.1$ 、試験の打ち切り回数は 1×10^7 回の条件でおこなった。図4.1-4にジルコニアテストピースにおける最大負荷応力と破断時のサイクル数との両対数プロットを示す。図中の矢印は 1×10^7 回の打ち切り回数まで破断が起こらなかったことを示している。また、図には最小二乗法により近似した直線も示してある。この図より、最大負荷応力が小さくなるに従い破断寿命が長くなる傾向が見られ、疲労が起こっていることがうかがえる。本材料においては、最大負荷応力600MPaにおいて打ち切り回数まで破断が起こらない試料が見られた。一般に、疲労寿命

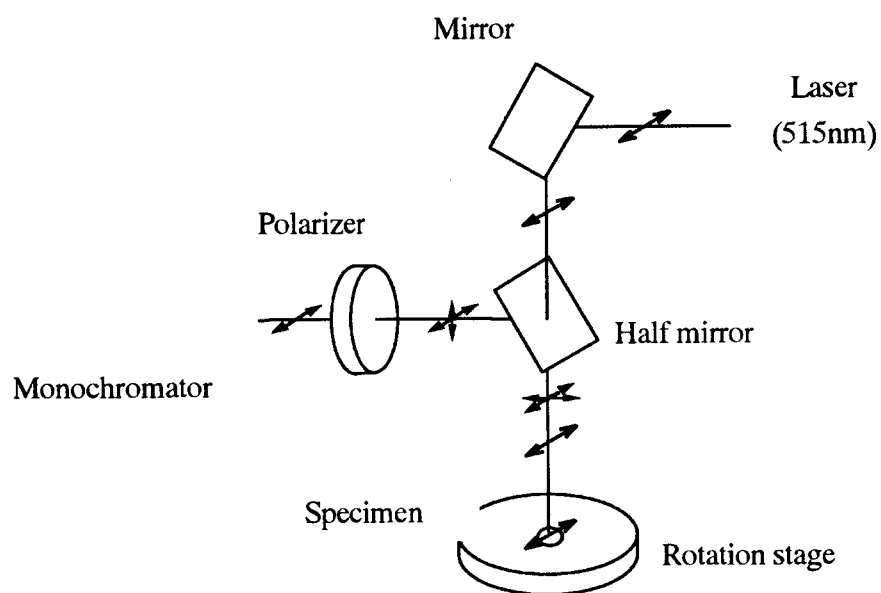


図 4.1-2 偏光ラマン分光器の概略図

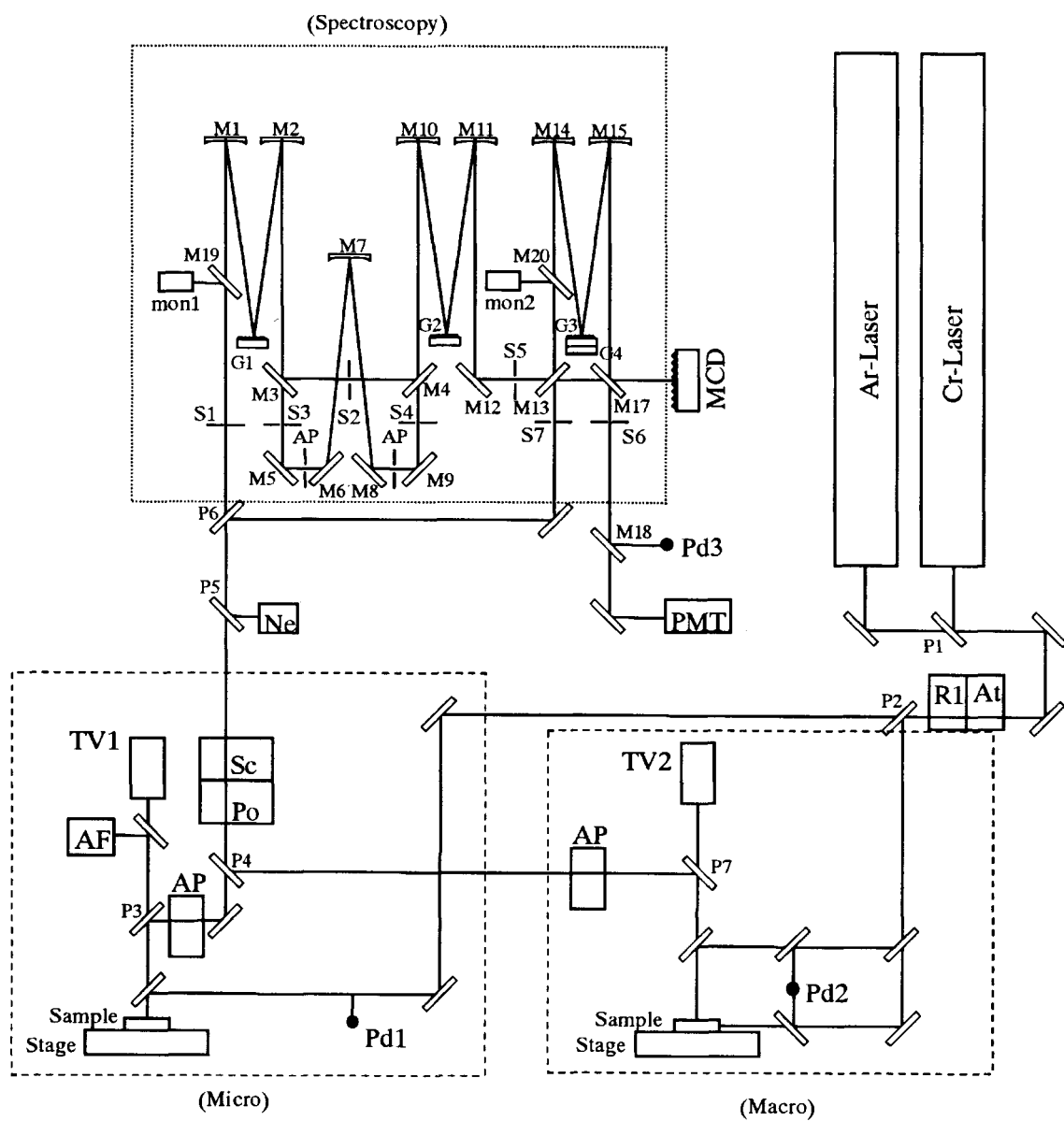


図 4.1-3 偏光ラマン分光器のレーザー光路模式図

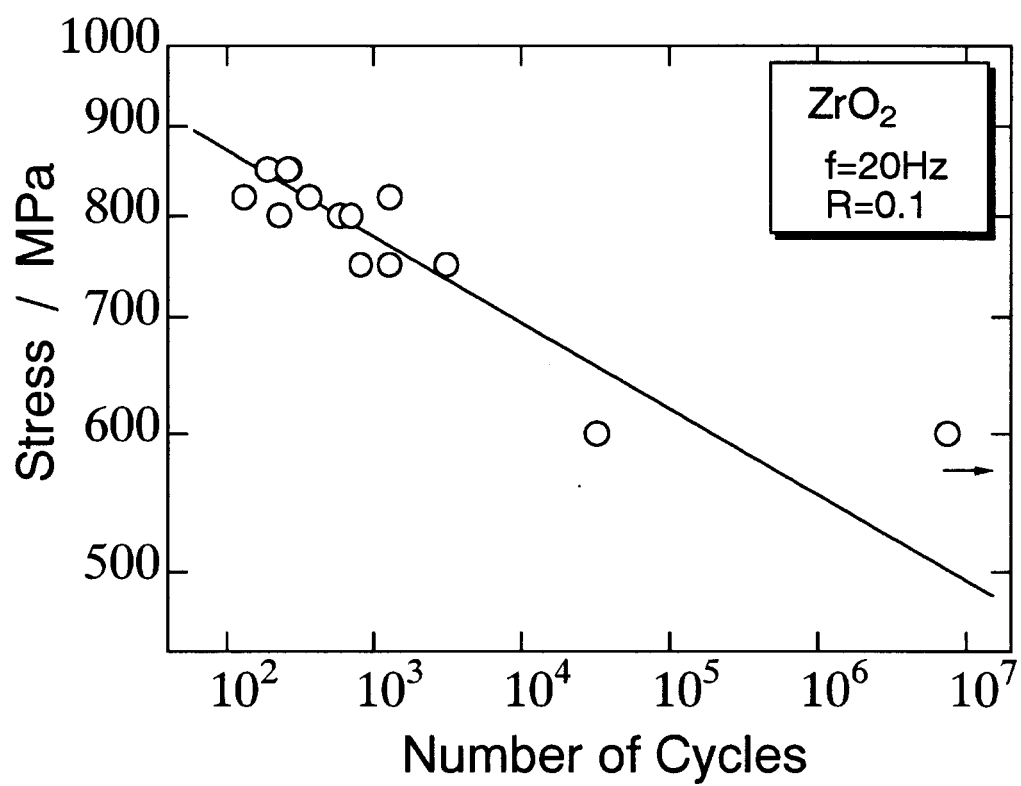


図 4.1-4 ジルコニアテストピースにおける疲労試験結果

が疲労試験中の安定き裂進展量に支配される場合、破断までの繰返し数 N と最大応力 $\sigma_{\max}$ の関係は、

$$\sigma_{\max}^n N = \text{Const.} \quad \dots (4.1-2)$$

と表される。ここでの疲労寿命が安定き裂の進展量に支配されていると仮定すると、図中の直線の傾きから疲労き裂進展パラメータを求めることができる。疲労き裂進展パラメータ n を求めたところ、 $n=22$ と見積もられた。

図 4.1-5 にジルコニアテストピースにおける疲労特性と曲げ強度特性との比較を示す。曲げ試験の本数が少ないため議論が難しいが、本研究の範囲では曲げ強度のばらつきの範囲から若干の強度低下がみられる。しかしながら、 1×10^7 回の打ち切り回数においても 600MPa という高い強度を示している試料もあり、本材料は外科用埋没材料としての十分な特性を有していることがわかる。図 4.1-6 にアルミナセラミックスとジルコニアセラミックスの疲労特性の比較を示す。この図より、アルミナセラミックスと比較してジルコニアセラミックスの強度特性が優れていることがわかる。

これまでの試験はすべて室温大気中でおこなっている。しかしながら、人工股関節部材としての使用を考える場合、生体内という環境の影響を考慮しなければならない。そこで、それぞれの材料において、生体内を模擬した環境として生理食塩水中 36°C での試験をおこなった。図 4.1-7 にアルミナセラミックスの疲労特性に及ぼす環境の影響を示す。生理食塩水中では、大気中での試験結果に比べて、同一応力下における破断寿命が低下していることがわかる。セラミックスにおいて、環境の影響を受けて強度低下が起こることがしばしば観察される。この強度低下は、クラック先端で化学反応を伴った応力腐食が起こりクラックを成長させることによるものと考えられている。このような応力腐食において、特に水の存在下でのクラック成長が著しいことが報告されている [3-5]。本研究における結果はこのような現象と一致しており、生体用セラミックスの機械的特性評価においては環境の影響を考慮することが重要であることが明らかになった。特に、今回は生理食塩水中での試験しかおこなっていないが、体液中の蛋白や脂質がき裂先端に付着した場合にその進展挙動に影響を及ぼす可能性もあり、今後はこれらを含むより生体内に近い環境下での試験も必要であると思われる。

図 4.1-8 はジルコニア（リファセラム）の疲労特性に及ぼす環境の影響を示したものである。図には昨年度おこなった大気中 1 Hz での試験結果もプロットしてある。ジルコニア（リファセラム）においては、20Hz における試験の比較ではそれほど大きな破断寿命の低下が見られない。前述の応力腐食は時間依存型の挙動であり、またヒトの歩行時の周波数は約 1Hz であることから、より厳しい条件として、生理食塩水中 36°C、周波数 1Hz での試験をおこない、室温大気中、周波数 20Hz での結果との比較をおこなった。その結果を図 4.1-9 に示す。本条件においては、アルミナと同様に顕著な破断寿命の低下が観察される。この結果は、生体用セラミックスの機械的特性評価において、環境の影響とともに、周波数の影響も大きいことを示している。すなわち、周波数

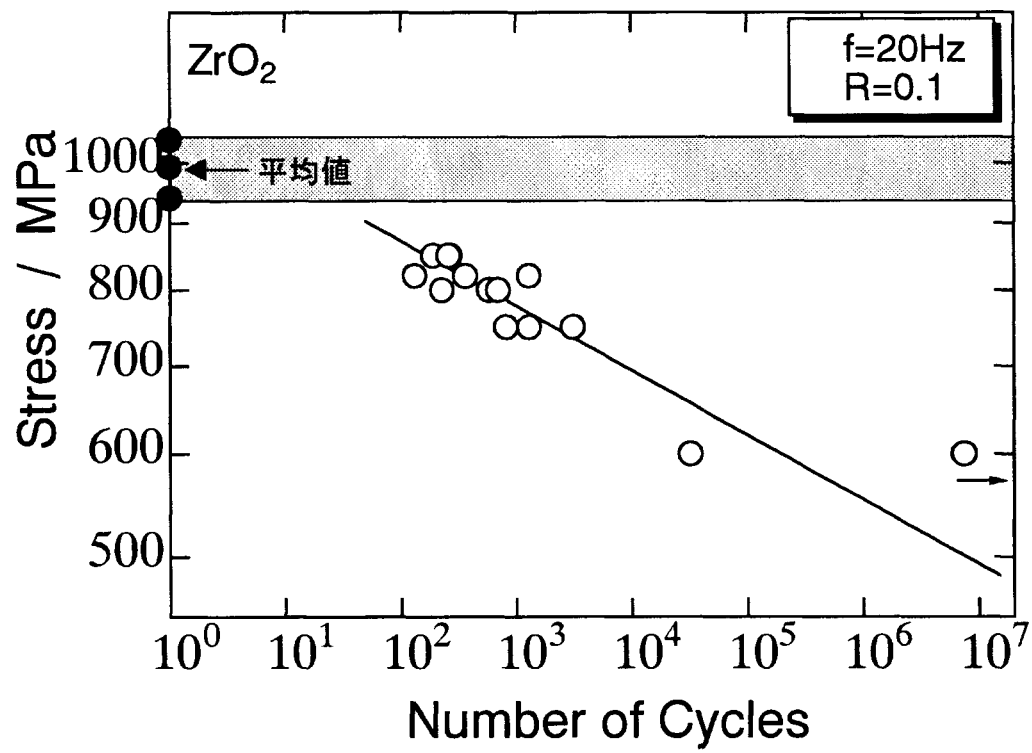


図 4.1-5 ジルコニアテストピースにおける疲労特性の曲げ強度との比較

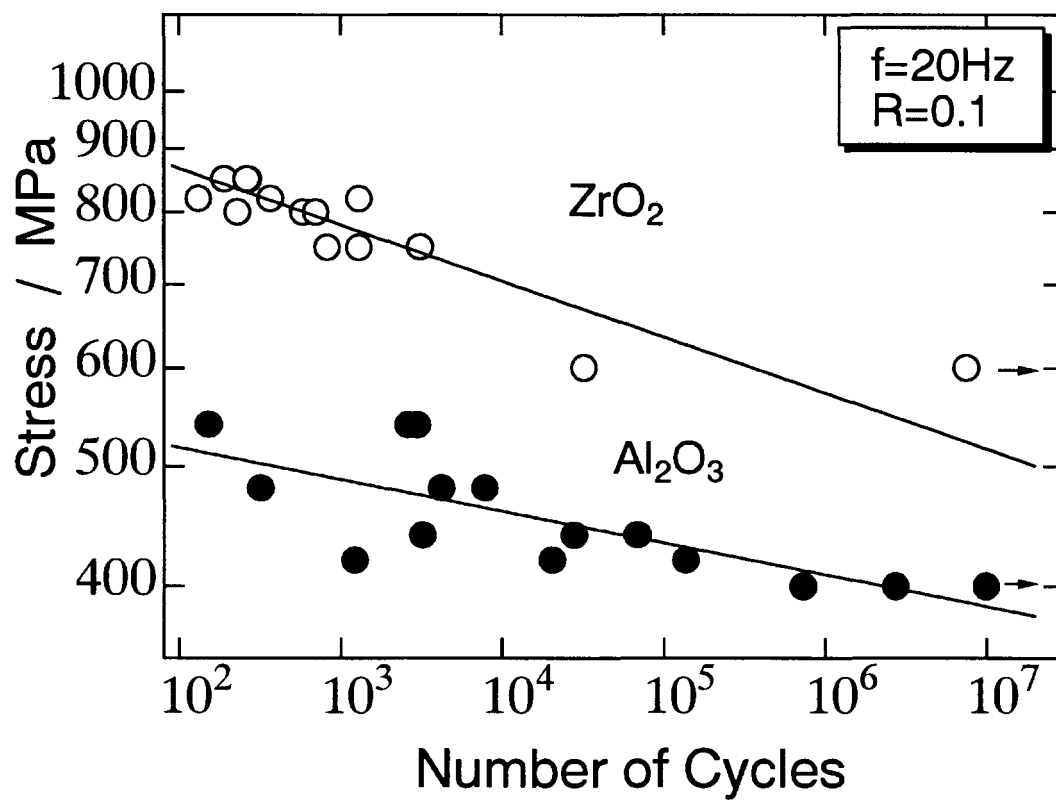


図 4.1-6 アルミナおよびジルコニアセラミックスにおける疲労特性の比較

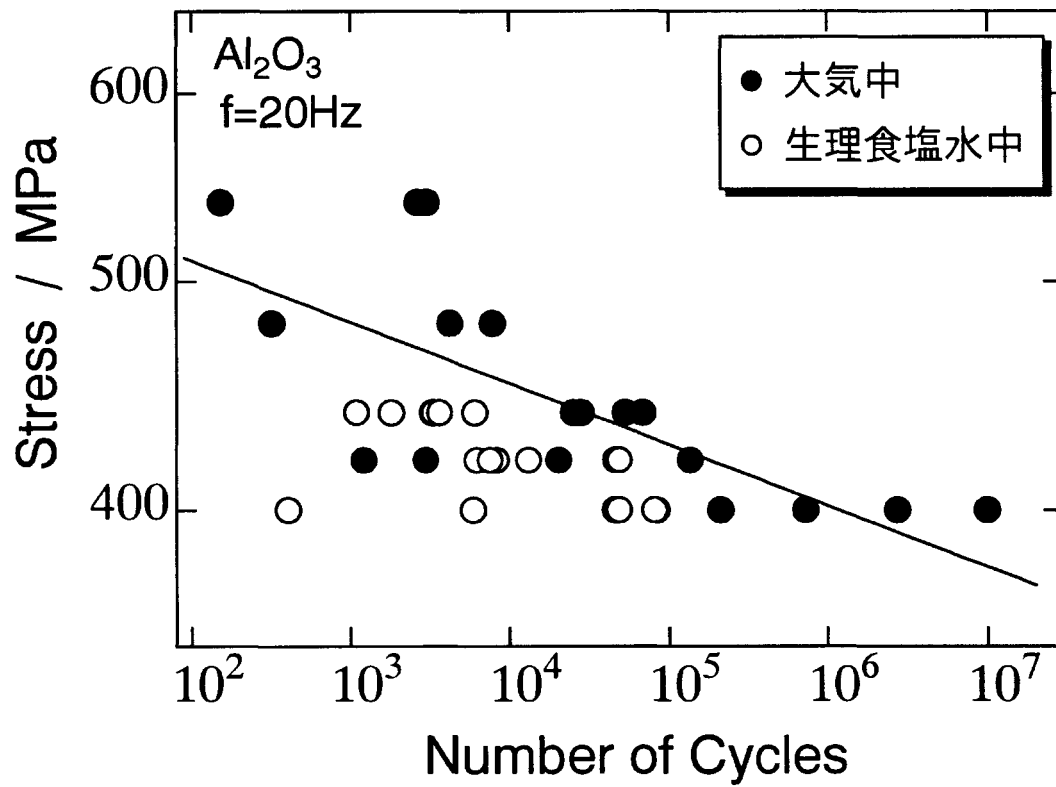


図 4.1-7 アルミナセラミックスの疲労特性に及ぼす環境の影響

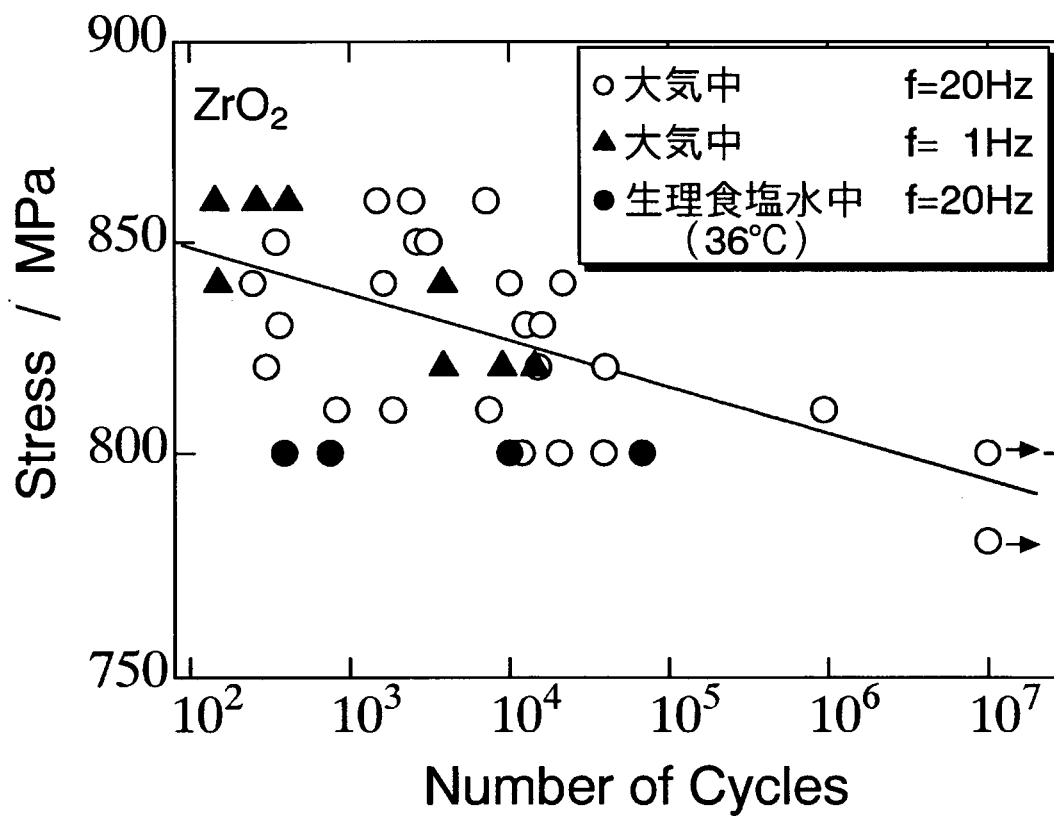


図 4.1-8 ジルコニアセラミックス（リファセラム）の疲労特性に及ぼす環境の影響

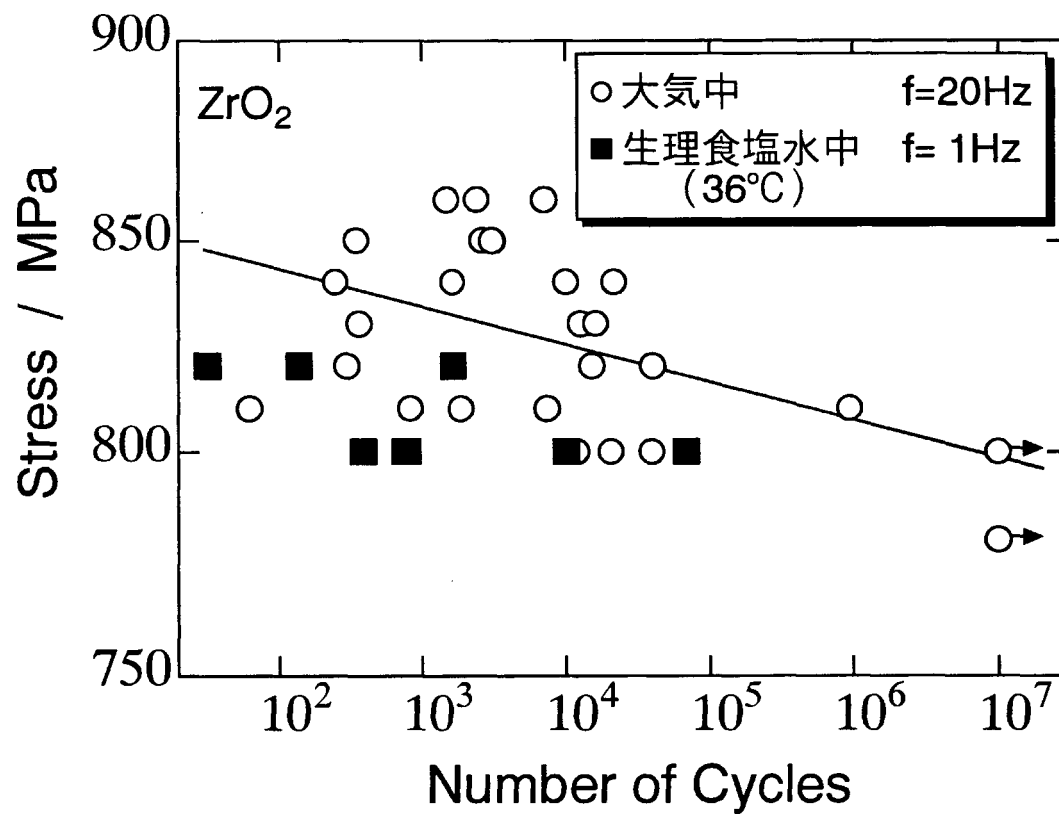


図 4.1-9 ジルコニアセラミックス (リファセラム) の疲労特性に及ぼす環境および周波数の影響

を高くした加速試験は多くのデータを得るためには非常に有効であるものの、特性に周波数依存性が現れる危険性があることが明らかになった。しかしながら、すべての試験を実際の現象と同一周波数でおこなうことは困難であり、今後は周波数の違いによる特性の変化を規格化する手法を明確化することが一つの課題であると思われる。

図 4.1-10 にもう 1 種類のジルコニアであるジルコニアテストピースについて同様の試験をおこなった結果を示す。ジルコニアテストピースにおいては、アルミナと同様に周波数 20Hz での比較において顕著な破断寿命の低下が観察された。このように、同じ外科用埋没材料としての規格を満たすジルコニアについても、その疲労特性は大きく異なることが明らかになった。これらの特性に対して外科用埋没材料として必要な疲労特性を規定するためには、実験による比較だけでは困難であり、部材に必要な強度特性から計算により算出するといった手法も併せておこなうことが必要であると思われる。

(2) 生体用ジルコニアセラミックス材料の疲労試験時の相変態挙動

ジルコニアセラミックスを用いた人工股関節骨頭ボールにおいて、長期間の使用により破壊する事例が観察されている。このような破壊には、長期間の使用によりジルコニアセラミックスの結晶構造が正方晶から単斜晶に相変態することが影響していると考えられている。図 4.1-11 に ZrO_2 - Y_2O_3 系の ZrO_2 側状態図を示す [6]。本研究で用いた Y_2O_3 を 3mol% 程度含むジルコニアセラミックスにおいては、焼結温度 (1500°C 程度) 付近では正方晶 (tetragonal, t 相) と立方晶 (cubic, c 相) の 2 相域に、室温においては単斜晶 (monoclinic, m 相) の領域にある。しかしながら、完全に正方晶からなる粉末を出発原料として焼結をおこなう場合、焼結条件は 1500°C 程度の温度において 1~4h 程度であるため完全な平衡状態に達することなく、正方晶単相の状態で冷却される [7]。本研究で用いたジルコニアセラミックスは、表 4.1-3 に示したように非常に緻密で結晶粒径の微細な材料であり、このようなジルコニアセラミックスにおいては冷却中に正方晶から単斜晶への相変態を起こすことなく、高温相である正方晶が準安定な過冷却状態で室温まで保たれることが報告されている。これは、 Y_2O_3 が正方晶の安定化剤であることおよび焼結体が緻密であるほど、また、結晶粒径が微細であるほど周囲の圧縮応力により正方晶から単斜晶への相変態が抑制されることにより説明されている [8]。すなわち、本研究で用いているジルコニアセラミックスは、室温においても正方晶単相である、正方晶ジルコニア多結晶体 (TZP) である。この正方晶ジルコニア多結晶体が、長期間の使用により負荷応力あるいは時効の効果によって単斜晶に相転移するのであるが、この相転移は変位型相変態の一つであるマルテンサイト変態であると考えられている。マルテンサイト変態はせん断変形による原子の連携運動によって生じる無拡散相転移であり、試料の形状変化および表面起伏を伴う [9]。このマルテンサイト変態は非常に高速な相変態であり、体積膨張を伴うことが知られている [10]。すなわち、正方晶-単斜晶相転移において体積膨張に伴いき裂が発生し、ジルコニアセラミックスの強度を著しく低下させる可能性が考えられる。

ここで、ジルコニアセラミックスの生体模擬環境下における疲労試験時のマルテンサイト変態として、いくつかの可能性が考えられる。一つは応力誘起変態であり、正方晶ジルコニア多結晶

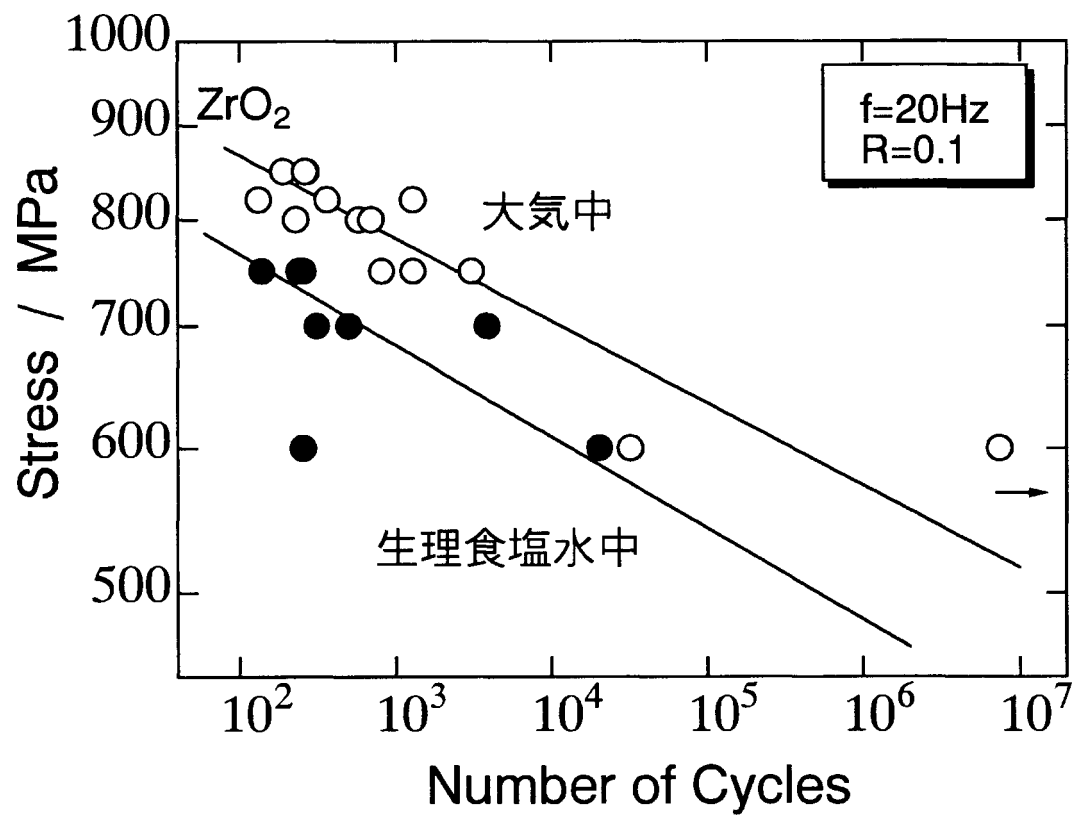


図 4.1-10 ジルコニアテストピースの疲労特性に及ぼす環境の影響

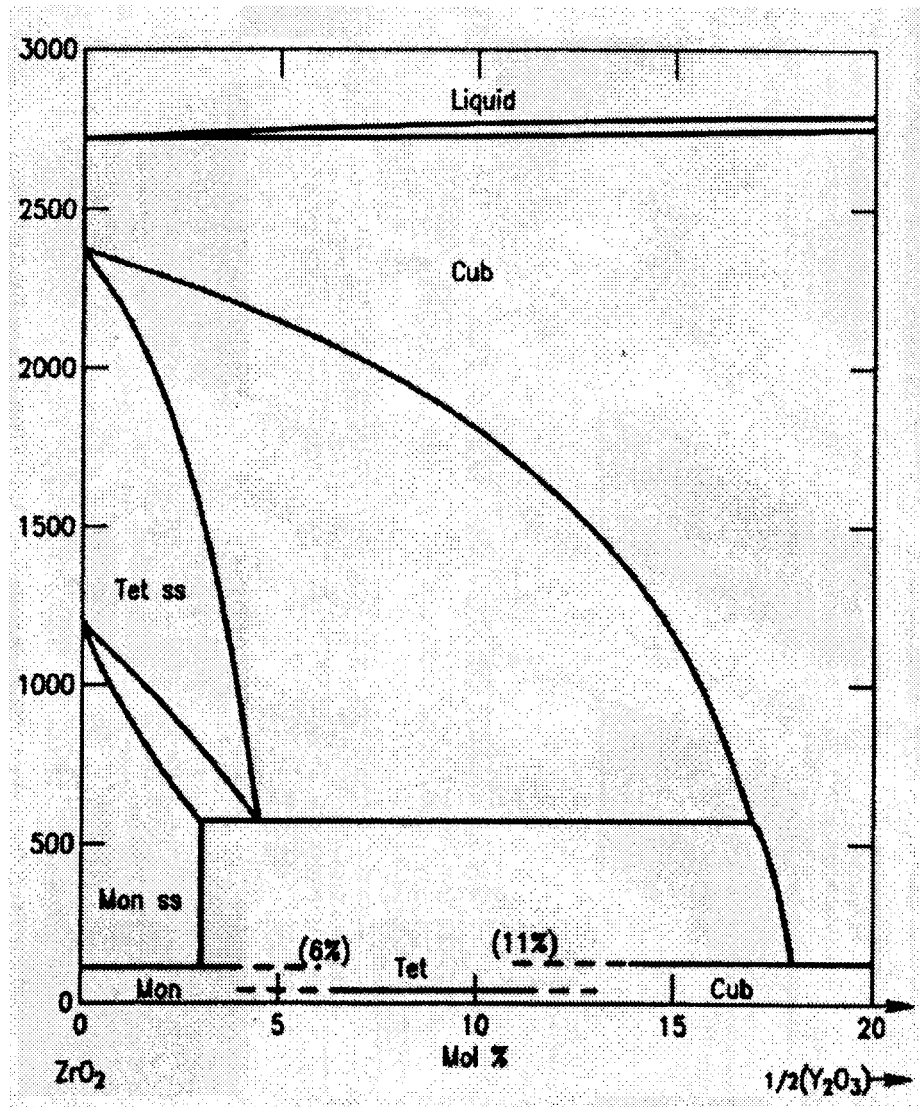


図 4.1-11 ZrO_2 - Y_2O_3 系の ZrO_2 側状態図

体の場合、緻密で結晶粒が微細であるために周囲の圧縮応力により室温においても正方晶から単斜晶への相変態が抑制されているのであるが、引張り応力が付与されると相変態が進行するというものである。このような相転移による体積膨張に伴いき裂が発生し、破壊に至る可能性があるということである。もう一つの可能性は等温マルテンサイト変態である。正方晶ジルコニア多結晶において、水のある環境下では H_2O が表面に化学吸着し、正方晶から単斜相への変態が促進されることが報告されている [11]。このような相変態が大きく進行した場合には、大きな強度低下を引き起こす可能性が考えられる。さらに、イットリウムの溶出も可能性としてあげられる。すなわち、イットリウムの溶出が起こったならば、室温で単斜相が安定になっていくため、上記の相変態と同様の結果につながるものと考えられる。このように、ジルコニアセラミックスの生体模擬環境下における疲労試験時には、様々な要因によるマルテンサイト変態の可能性が考えられ、その評価は非常に重要であると考えられる。そこで、生体用ジルコニアセラミックス材料の疲労試験時の相変態挙動をラマン分光法を用いて調べた。

図 4.1-12 に疲労試験をおこなう前の試験片におけるラマンスペクトルを示す。得られたスペクトルは典型的な正方晶のスペクトルを示しており、本研究で用いたジルコニアセラミックスが正方晶ジルコニア多結晶体であることが確認された。また、加工条件によっては単斜相への相変態を起こす場合があるが、本研究で用いた加工法は相変態を引き起こすことのない充分ソフトなものであることが確認された。

図 4.1-13 には生理食塩水中 $36^{\circ}C$ において、最大負荷応力 $800MPa$ で 1×10^7 回の打ち切り回数まで破断が起こらなかった試験片の最大引張り応力面の中央部から得られたスペクトルを示す。打ち切り回数まで破断しなかった試験片においても、正方晶 (t 相) のスペクトルのみが観察された。すなわち、本条件においては、相変態の影響はほとんどないことが明らかになった。しかしながら、外科用埋入材料としてジルコニアを安心して使用するためには、どのような条件で相変態が起こり、その場合にどの程度の強度低下が起こるのかを明らかにする必要がある。これらの点を明らかにするためには、例えば高温における加速試験をおこない、その結果を室温に外挿するといった実験、あるいは、あらかじめ相変態させたジルコニアについて疲労試験をおこない、相変態の程度と破断寿命の低下の関係を明らかにする実験などをおこなっていく必要があるものと考えられる。

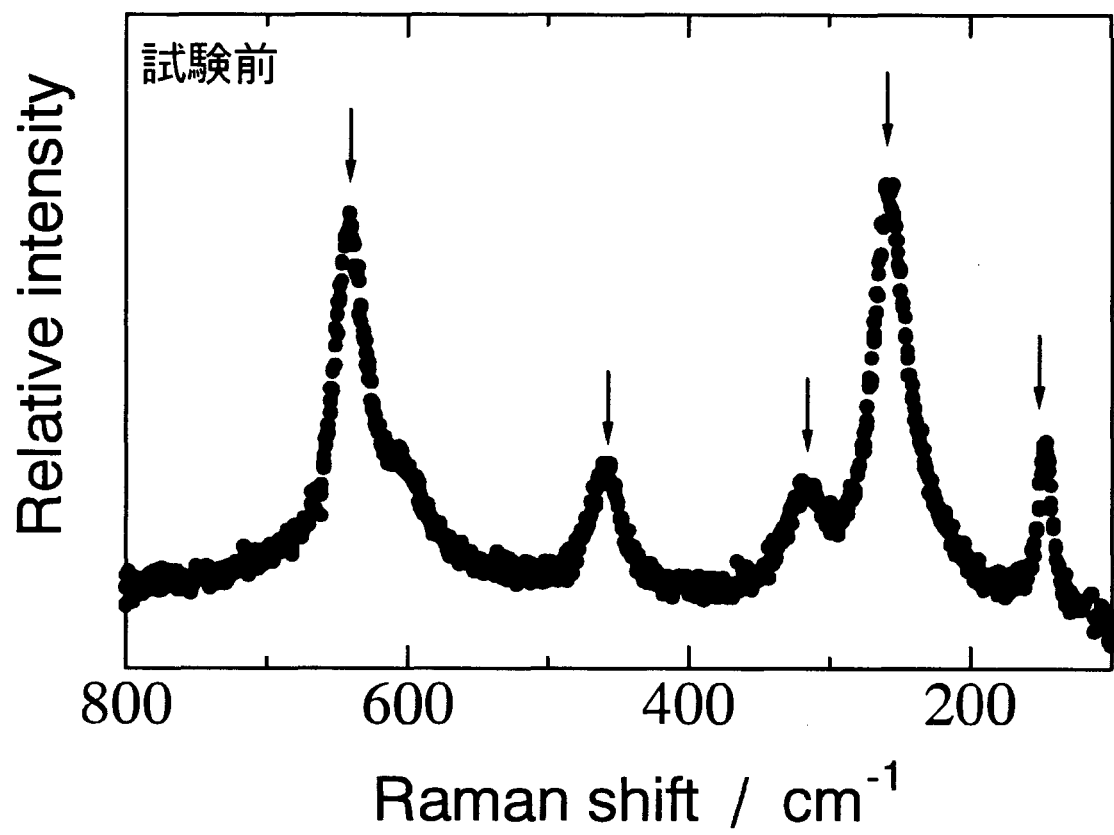


図 4.1-12 試験前のプロファイル

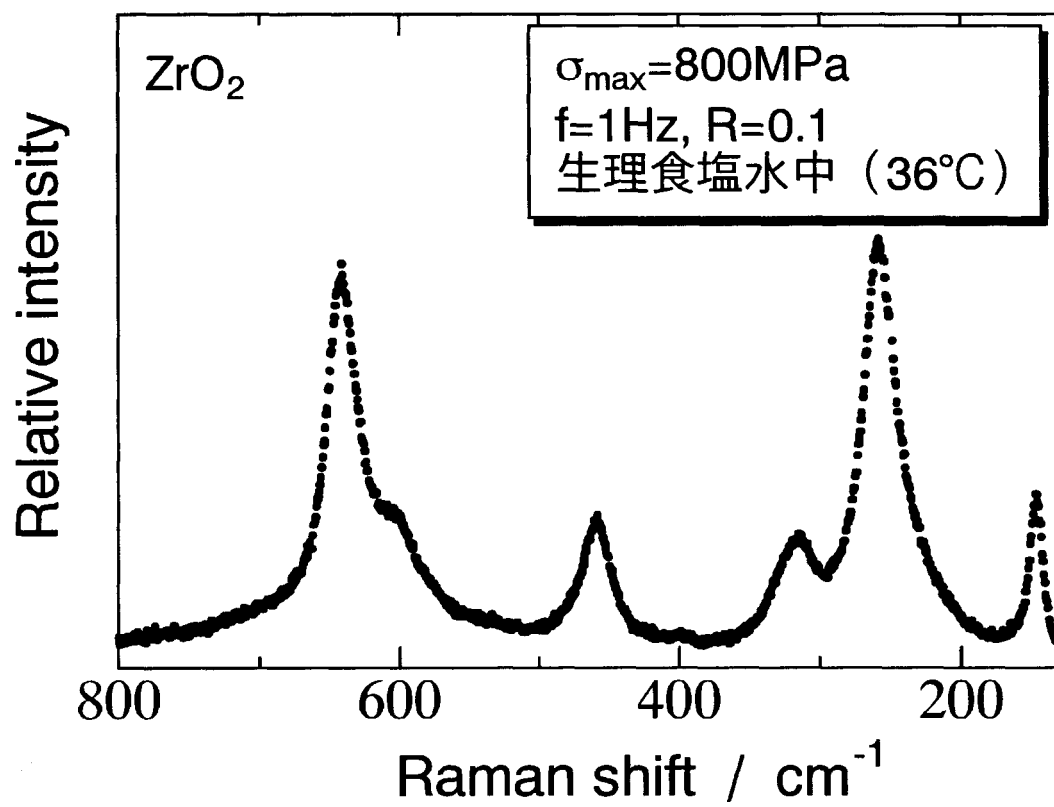


図 4.1-13 打ち切り試験片のプロファイル

4.2 生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討

4.2.1 疲労試験

(1) 緒言

前節においても示したように、人工関節や人工骨などの大負荷を受ける部分の生体代替材料としてファインセラミック材料が盛んに用いられている。例えば、人工股関節部材を例にあげると、アルミナ骨頭ボールにおいてはすでに数万例の臨床実績が存在するほどである。人工股関節部材である骨頭ボールにおいて、ポリエチレン・ソケットとの摩擦・摩耗特性は非常に重要であり、そのために真球度と表面性状が重要なファクターとなる。セラミック骨頭が多く用いられる理由は、このようなファクターに対して材質的優位性を有しているためであると思われる。具体的には、

- ①セラミック骨頭とポリエチレン・ソケットの優れた低摩擦特性
- ②ソケットの摩耗速度の低減による人工関節機構の耐久性の向上
- ③ポリエチレン・ソケットの経時的体積摩耗量の低減

などがあげられる [12]。これまではセラミック骨頭として主にアルミナ骨頭ボールが用いられ、その数万例に及ぶ臨床実績により長期における安全性と有用性が明らかになりつつある。このようなアルミナ骨頭ボールに加え、次世代の高強度セラミック骨頭としてジルコニア骨頭ボールが注目されている。その理由として、アルミナ骨頭ボールは臨床上十分な強度を有してはいるものの、その取り扱いにおいては注意を有する部分があり、より強度の高い材料が求められている点があげられる。ジルコニア骨頭ボールは圧縮強度においてアルミナ骨頭ボールの 1.5 倍の製品強度を有しており [12]、今後の使用がますます盛んになるものと思われる。

このようにセラミック骨頭はすでに盛んに用いられているものの、求められる諸特性値については規定が充分でないのが現状である。例えば、人工股関節部材には歩行により長期間に渡り体重の 5 倍程度の繰り返し負荷がかかることが報告されており、このような繰り返し負荷に対する疲労特性は静的な負荷による強度特性とは異なるため部材の特性として明確な規定を与えることが必要不可欠であると考えられる。また、人工股関節部材にかかる衝撃は体重の 10 倍程度ともいわれており、このような衝撃に対しても部材の特性として明確な規定を与えることが必要不可欠であると考えられる。

本研究は、アルミナおよびジルコニア骨頭ボールの疲労特性および耐衝撃性の国際標準化を念頭に、アルミナおよびジルコニア骨頭ボールの疲労特性および耐衝撃性の評価方法の検討、さらに必要な疲労特性値および耐衝撃性値を明確にすることを目的としておこなう。

本年度は、疲労試験に関しては負荷方式の検討をおこなうとともに、基礎的な疲労特性を明らかにするために、室温生理食塩水中 36℃における 1 軸疲労試験をおこなった。また、衝撃試験に関しては、緩衝材の材質と厚みをパラメータとして、落錘落下方式により試験をおこなった。

(2) 疲労試験

1) 試験方法

生体用ファインセラミックス部材として京セラ（株）製アルミナ・ボールおよびジンマー（株）製ジルコニア・ボールを用いた。アルミナボールは骨頭径 26mm のミディアムネック用ボールであり、ジルコニアボールは骨頭径 26mm のショートネック用ボールである。また、ステムとしてはそれぞれ京セラ（株）製の PERFIX SV カラーコード：#13-M およびジンマー（株）製のアナトミックステムを用いた。試験片として、骨頭ボールにステムよりネック部を切断したものを打ち込んだものを用いた。

疲労試験に先立ち、破壊挙動に及ぼす負荷方式の影響を明らかにするために、点接触および面接触による圧縮試験をおこなった。図 4.2-1 に試験の外観を示す。点接触による試験は、上下に鋼製のスペーサーを用いておこなった。一方、線接触による試験は、90° のテーパーを有する鋼製のコーンを作製し、銅製のリングをスペーサーとして用い試験をおこなった。

疲労試験は一軸圧縮疲労試験を生理食塩水中 36°C でおこなった。試験には環境チャンバーを付属した MTS 製 25kN ミニバイオニクス II 単軸疲労試験装置を用いた。試験は周波数 20Hz、公称応力比 $R = \sigma_{\min} / \sigma_{\max} = 0.1$ でおこない、試験の打ち切り回数は 1×10^7 回とした。圧縮疲労試験後の試験片に対して、インクにより染色しき裂の有無を確認した。

ジルコニア・ボールについては、試験前後のいくつかの試験片について、ラマン分光法による相同定をおこなった。ラマン分光法による相同定はジルコニア・ボール表面および切断面においておこなった。特に切断面に関しては、大きな応力がかかると思われる部位についてマッピングによる等間隔の分析をおこなった。ラマン分光法には、前節で示したものと同様の、波長 515 nm の Ar イオンレーザと光学顕微鏡を組み合わせた偏光ラマン分光器（日本分光製，NR-1800 型）を用いた。照射領域は約 5 mm とし、分光器はシングルモノクロメータを用い、スリットは $s1 = 100$ 、 $s2 = 25000$ 、 $s3 = 500$ 、 $s4 = 500$ 、 $s5 = 500$ 、 $s6 = 300 \mu\text{m}$ とした。

2) 試験結果

疲労試験に先立ち、破壊挙動に及ぼす負荷方式の影響を明らかにするために、点接触および面接触による圧縮試験をおこなった。試験は 2 点ずつおこない、値が大幅にばらついたアルミナの点接触による試験のみ 3 点おこなった。図 4.2-2 に線接触による試験後のアルミナの試料の様子を示す。点接触と線接触で破壊形態に明確な差違を見出すことはできず、破壊メカニズムの違いを明らかにすることはできなかった。表 4.2-1 にそれぞれの材料、接触方式による平均破壊強度の結果を示す。

表 4.2-1 圧縮試験における接触方式と破壊強度との関係

		平均破壊加重 ($\times 10^3 \text{kgf}$)
点接触	アルミナ	4.9
	ジルコニア	6.7
線接触	アルミナ	7.8
	ジルコニア	10.3

圧縮試験の結果、アルミナ、ジルコニアともに点接触による負荷では線接触による負荷よりも破壊荷重が低く見積もられた。また、点接触により試験をおこなったアルミナにおいて、平均破壊強度を大幅に下回る強度を示す試料が見られた。試験数が少ないために明確な結論を得ることはできないが、点接触による試験ではばらつきが大きくなる可能性が示された。これらの結果から、圧縮疲労試験は線接触による負荷においておこなうことが望ましいと思われる。

次に、圧縮試験の結果に基づき、線接触による一軸圧縮疲労試験をおこなった。試験は生理食塩水中 36°C の条件下において、周波数 20Hz、公称応力比 $R = \sigma_{\min} / \sigma_{\max} = 0.1$ 、試験の打ち切り回数 1×10^7 回の条件でおこなった。得られた結果を図 4.2-3 に示す。アルミナボール、ジルコニアボールともに 2tf および試験機の限界である 2.5tf で試験をおこなったところ、いずれの材料、条件においても打ち切り回数まで破壊は起こらなかった。試験後の試料表面をインクにより染色しき裂の有無を調べ結果、いずれの条件においてもき裂は確認されなかった。一般に、人の年間歩行頻度は 10^6 回程度であるといわれている。また、歩行時にかかる最大荷重は体重の 5 倍程度であるといわれている。今回の試験条件は、歩行時の最大荷重における 6 倍の条件下で 10 年使用したのと同程度の条件であり、アルミナボール、ジルコニアボールともに非常に優れた疲労特性を有していることが明らかになった。

前節でも示したように、ジルコニアセラミックスにおいては応力負荷により正方晶から単斜晶への相変態が起こる可能性がある。この相変態は体積膨張を伴うため、き裂が発生し著しい強度低下につながる可能性がある。そこで、ラマン分光法による相同定をおこなった。その結果、負荷荷重 2.5tf において 1×10^7 回の打ち切り回数まで破断が起こらなかった試験片においても、相変態は観察されなかった。

このように、本実験の範囲では、アルミナボール、ジルコニアボールともに破壊を示さず、またジルコニアボールにおいては相変態が観察されず、いずれも非常に優れた疲労特性を有していることが示された。しかしながらアルミナボール、ジルコニアボールともに安心して使用するためには負荷荷重と破壊寿命の関係を明らかにする必要がある。そのためには、既存の他の試験機を用いたより高荷重下での試験が必要であり、治具の検討等が必要である。

本実験のもう一つの課題は負荷方向の問題である。本研究では垂直方向から負荷をおこなっているが、実際に人工股関節が人体に埋入された場合ある程度の角度を持って負荷がかかるため、特性に違いが出る可能性を否定できない。このような問題を解決するために、図 4.2-4 に示すような負荷方向を制御できるような試験片を作製した。この試験片を油圧チャック等で固定することにより、生体内での負荷方向を模擬した試験が可能となる。今後はこのような評価もおこなっていき、標準化をおこなっていく予定である。

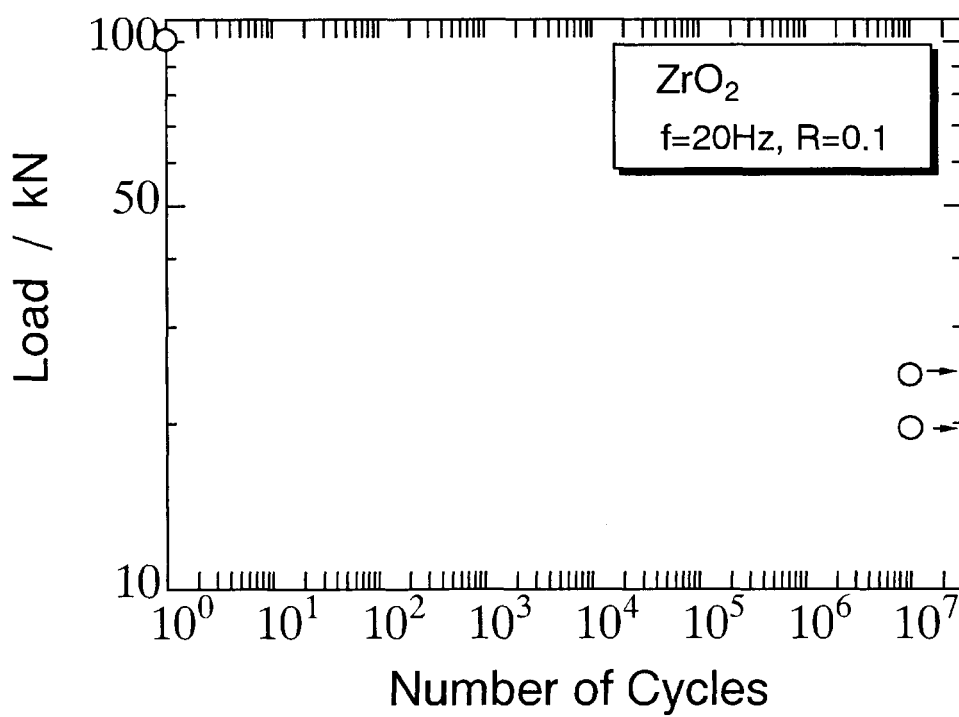
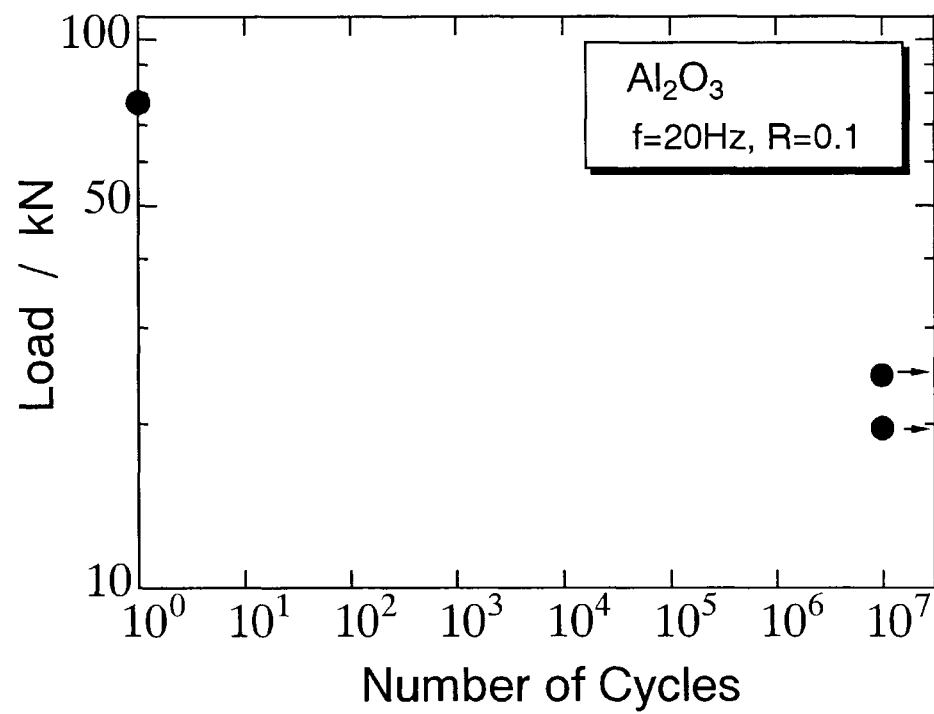


図 4.2-3 アルミナボールおよびジルコニアボールの線接触による一軸圧縮疲労試験結果

(3) 衝撃試験

1) 試験方法

試験は本研究のために設計した落錘落方式の衝撃試験機を用いた。図 4.2-5 に試験機の外観を、4.2-6 に試験片設置部分の拡大写真を示す。本装置はワイヤーによって固定された錘がガイド筒を通して落下する方式である。錘は 3、6、12kgf の 3 種類で、3kg の錘が 2 個あるために最大で 24kgf の荷重をセットすることができる。高さは最大で 1.5m であり、最大で約 350J の衝撃エネルギーを試験片に付与することができる。

衝撃試験に用いた試験片は、疲労試験に用いたものと同様の、京セラ（株）製アルミナ・ボールを京セラ（株）製のステム PERFIX SV カラーコード：#13-M よりネック部を切断したものを打ち込んだものである。本実験では試験片をステンレスの台に置いておこなうが、実際の股関節においては他の関節、筋肉など様々な部分で衝撃が緩衝されることが予想され、それに相当する下部緩衝材が必要であると思われる。そこで、本研究では、厚さ 15mm の Ti および UHMWPE を緩衝材として用い、緩衝材の違いによる耐衝撃性の変化を調べた。また、錘が直接セラミック骨頭ボールに衝突するのを避けるために、UHMWPE カップを上部緩衝材として用いた。その際、カップの外径を 42、52、56mm の 3 種類に変化させることにより上部緩衝材の厚みを変化させ、耐衝撃性に及ぼす影響についても調べた。試験片および緩衝材を図 4.2-7 に示す。衝撃試験後の試験片に対して、インクにより染色しき裂の有無を確認した。

2) 試験結果

予備実験の結果、衝撃試験によって付与するエネルギーが小さい場合には、破壊が起こらないことが明らかになった。そこで、本試験機において付与することができる最大のエネルギーである。24kg の錘を 1.5m の高さから落下させる 353J のエネルギーを付与する条件下で試験をおこなった。これは体重 60kg の人が約 60cm の高さから飛び降りたのと同等の衝撃である。表 4.2-2 に緩衝材の違いによる破壊挙動をまとめたものを示す。下部緩衝材として UHMWPE を用いた場合、上部緩衝材の厚みを変化させても骨頭の破壊は観察されなかった。また、試験後の試料表面をインクにより染色しき裂の有無を調べ結果、いずれの条件においてもき裂は確認されなかった。しかしながら、上部緩衝材の外径を 42mm にした場合には、ソケットが損傷する様子が観察された。一方、下部緩衝材として Ti を用いた場合、上部緩衝材の外径を 42mm にしたところ試験片は破壊した。

表 4.2-2 緩衝材の違いによる破壊挙動の変化

下部緩衝材	上部緩衝材外径 (mm)	破壊の有無	備考
UHMWPE	42	無	ソケット損傷大
	52	無	
	56	無	
Ti 合金	42	有	
	56	無	ソケット損傷

これまでの結果から、衝撃試験において、緩衝材の種類および厚みが重要であることは明らかになった。しかしながら、これを規格化するためには、ある程度定量的な解析が必要となる。そこで、試験片に対して単純なモデル化をおこない、弾性論による解析をおこなった。図 4.2-9 は試験片を単純な積層体にモデル化したときの模式図を示したものである。上から PE カップ、骨頭、テーパー、下部緩衝材の順で、それぞれを表す添え字を C、H、T、A とする。今、変形が弾性変形のみであることを仮定すると、等応力モデルによって記述することが可能であり、系全体のひずみ ε およびエネルギー W はそれぞれの弾性率 E と体積分率 V を用いて、

$$\begin{aligned}\varepsilon &= \frac{\sigma}{E_C}V_C + \frac{\sigma}{E_H}V_H + \frac{\sigma}{E_T}V_T + \frac{\sigma}{E_A}V_A \\ W &= \frac{\sigma^2}{2E_C}V_C + \frac{\sigma^2}{2E_H}V_H + \frac{\sigma^2}{2E_T}V_T + \frac{\sigma^2}{2E_A}V_A\end{aligned}\quad \dots (4.1-1)$$

のように表される。ここで、骨頭のひずみ ε_H に着目すると、カップの厚みを x 倍にした場合には、式 4.1-1 の上式を変形し、定数 C_1 、 C_2 を用いて、

$$\varepsilon_H = \frac{C_1}{x + C_2}\quad \dots (4.1-2)$$

と表される。今、破壊が臨界ひずみ ε_H^C に達した時に起こると仮定すると、カップの厚みとひずみの関係を図 4.2-10 のように表すことができる。同様に、下部緩衝材の弾性率を $1/x$ にした場合には、式 4.1-1 の下式を変形し、定数 C_3 、 C_4 を用いて、

$$\varepsilon_H = \sqrt{\frac{C_3}{x + C_4}}\quad \dots (4.1-3)$$

と表される。同様に破壊が臨界ひずみ ε_H^C に達した時に起こると仮定すると、緩衝材の弾性率とひずみの関係を図 4.2-11 のように表すことができる。

このような解析を定量的におこない、その妥当性を評価するためには、各部材の弾性率を知るとともに、衝撃力を測定することが必要となる。今後は、さらに緩衝材の種類、厚みを変化させた実験をおこなうとともに、衝撃力の測定ほうほうについての検討をおこなう予定である。

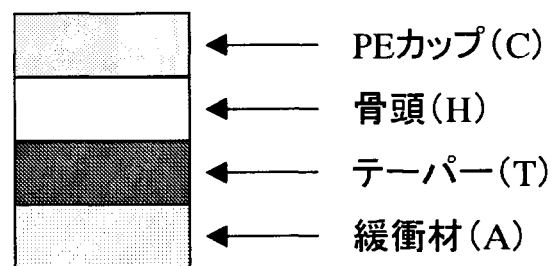


図 4.2-9 試験片を単純な積層体にモデル化したときの模式図

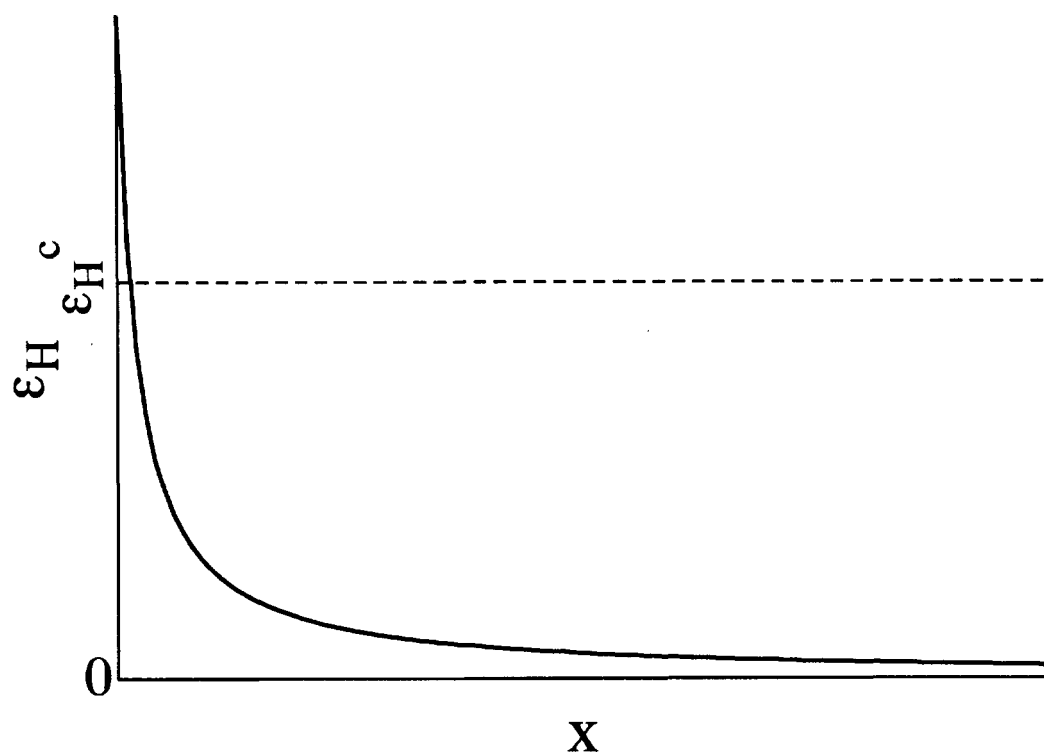


図 4.2-10 カップの厚みを x 倍したときの x とひずみの関係

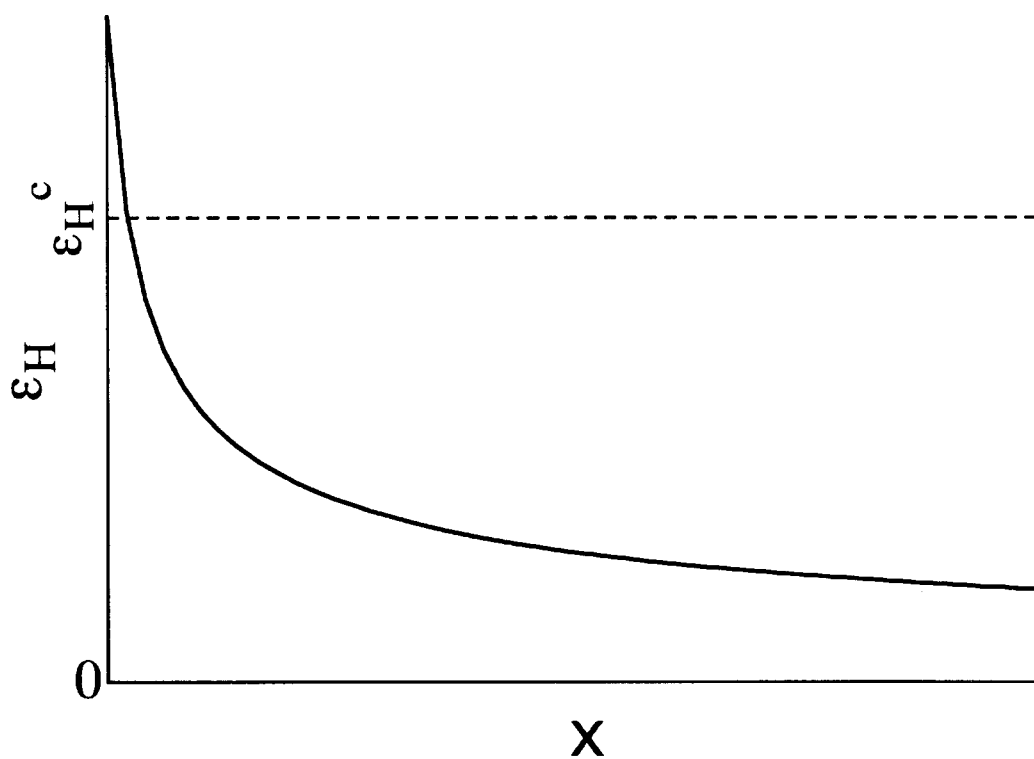


図 4.2-11 下部緩衝材の弾性率を $1/x$ 倍したときの x とひずみの関係

4.3.1 JFCC の研究成果

改良型の疑似体液(Rivised Simulated Body Fluid: RSBF)の調製方法を実証し、調製手順書を作成した(フロー図)。R-SBF の調製方法、調製した R-SBF 中無機イオン濃度の確認方法及び生体活性ガラス浸漬後の R-SBF 中無機イオン濃度変化を高周波誘導結プラズマ発光分析法(ICP-AES)等による測定を実施した。一方、調製した R-SBF 中に 5 種類の $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ 系ガラス及び結晶化ガラスを浸漬し、ガラス表面析出物の組成及び構造変化を薄膜 X 線回折法(TF-XRD)、走査電子顕微鏡観察(SEM)及びフーリエ変換赤外反射スペクトル法(FT-IR)により評価し、新しい人工材料が生体親和性を有するか否かを判定する尺度(標準化)のための基礎データを得た。生体親和性の評価を水酸アパタイトの析出速度から数値化することを試みた。

(1) はじめに

体液中の無機イオン濃度と同組成の疑似体液中に生体活性ガラスを浸漬し、その表面に水酸アパタイトが析出する能力が認められるか否か及びその生成速度を尺度として、任意の材料が生体親和性を有するか否かを判定する。指標として利用する生体活性ガラスには、活性の異なる $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ 系ガラスを用いるのが有効であり、物差しとしての期間をどの程度まで必要とするかによって、生体活性の高い組成のガラスから低いガラスまで目的に合わせて選択することが必要である。迅速な判定には活性の高いガラスの選択が目的に合致すると考えられる。一方、用いる疑似体液については、現在、複数の調製方法が提案されており、最も適切な疑似体液の選択が必要である。疑似体液の調製方法については、その調製手順書を規格化することが必要である。そのために既存の疑似体液及び改良型の疑似体液によって収集された比較データの検討が必要である。

水酸アパタイトの析出の確認には薄膜 X 線回折法による水酸アパタイト固有のスペクトルが検出されることによって決定する方法が標準的に利用されてきている。局所的評価になるが、速い時点で水酸アパタイト特有の鱗片状結晶を観察できる走査型電子顕微鏡観察及びその組成を把握できるエネルギー分散型蛍光 X 線分析法を併用して追認すれば、より確実な判定が可能である。生体活性度については、水酸アパタイトが析出する速度を基準とし、析出速度が速い試験材がより高い親和性を有すると判断される。

(2) 疑似体液(Simulated Body Fluid: SBF)

SBF は、人の体液にほぼ等しい無機イオン濃度を持つ溶液であり、pH 7.25–7.4 の間で生体活性を持つ。この SBF 中に生体活性セラミックスを浸漬すると骨類似アパタイトが形成される^[1-3]。この SBF を構成する無機イオンからの水酸化アパタイトの生成は、次式で与えられる。^[1]



水溶液中のアパタイトのイオン活動度積 IP は、

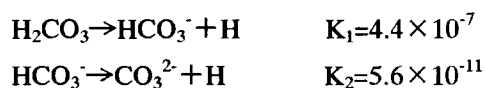
$$\begin{aligned}\text{IP} &= (\alpha \text{Ca}^{2+})^{10} (\alpha \text{PO}_4^{3-})^6 (\alpha \text{OH}^-)^2 \\ &= (\gamma \text{Ca}^{2+})^{10} (\alpha \text{PO}_4^{3-})^6 (\alpha \text{OH}^-)^2 [\text{Ca}^{2+}]^{10} [\text{PO}_4^{3-}]^6 [\text{OH}^-]^2\end{aligned}$$

α は活量、 γ は活量係数、 $[]$ は、各イオンの濃度である。体温と等しい 36.5 °Cでの体液中のアパタイトのイオン活動度積は、 9.4×10^{-98} で、従って擬似体液でも同じである。一方、水溶液中のアパタイトの溶解度積 K_0 は、37°Cで 5.5×10^{-118} である。これは SBF がガラスの浸漬までに既にアパタイトに対して過飽和であることを示す。つまり純水に対するアパタイトの溶解度積を越える濃度のカルシウムとリン酸イオンを含む。それにもかかわらず自然にアパタイトを析出しないのは、緩衝剤を工夫して準安定な過飽和の状態であるためである。この SBF に生体活性セラミックスを浸漬し、SBF の pH やカルシウムイオン濃度が上昇した時、アパタイトに関して SBF の IP/K_0 の過飽和度が上昇し、 IP/K_0 があるレベルに達することにより、結晶アパタイトがガラスの表面上に析出し始め、徐々に結晶化が進行すると推定される。

(3) 既存の疑似体液(Conventional-SBF:C-SBF)及び改良疑似体液(R-SBF)

前述したように SBF は、生体活性セラミックスの生体内での表面変化を体外で比較的再現し得ることがこれまでの研究で確かめられている。^[1]

しかし、これまでに用いられてきた C-SBF 中の各種イオンの内、Ca、P、K、Mg 及び Na は人の血漿と等しい無機イオン濃度を持つが、 Cl^- イオン濃度は高く、反面 HCO_3^- イオン濃度は低い濃度を示す。これは C-SBF 調製時の pH 調整を HCl 添加により行ったために Cl^- イオン濃度が高くなり、この HCl 添加により HCO_3^- イオンの一部は CO_2 として蒸発揮散したことによると考えられた。そのため C-SBF では、血漿とほぼ等しいレベルの炭酸イオン含有まで増加させるために、 CO_2 分圧を 14.8kPa に調整した CO_2 雰囲気下で生体活性セラミックスを浸漬し、アパタイトを生成させる研究がなされた。この CO_2 分圧は、 CO_2 が CO_2/H_2O (体積比)=0.592 の水へ溶解すると想定して、14.8kPa に CO_2 分圧を調整することで、C-SBF 中に HCO_3^- 濃度を 27mM まで増加できることが次式によって見積もられた。^[2]



上記の方法では、 HCO_3^- 濃度を人の血漿のそれと等しくすることができたが、 Cl^- イオン濃度も等しくするには調製用の試薬の変更を伴うために従来の調製方法では困難であった。この C-SBF を用いて形成される骨類似アパタイトは骨のアパタイトよりも Cl^- が多く、 HCO_3^- が少ないという報告がされている。^[2,3]

この問題点の解決のために、R-SBF の調製方法が開発された^[3]。

C-SBF と R-SBF との大きな相違点は、Na 濃度の調整のために試薬の種類と量の変化と SBF 調製時の pH 調整である。C-SBF では、1 M HCl と緩衝剤である Tris(Tris-hydroxymethylaminomethane) を用いて pH 調整を行うが、R-SBF では、NaCl の添加量を減らし、代わりに Na_2CO_3 を新たに加え、更に、1M- NaOH と緩衝剤 Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethane sulfonic acid) を添加して pH 調整を行う。この調製方法によって R-SBF では、 Cl^- イオン濃度及び HCO_3^- イオン濃度をも含めて人の血漿のそれと等しくできた。^[3]本年度は R-SBF の調製方法を実証し、調製した R-SBF の性能を試験する。

(4) SBFの有効性実証試験

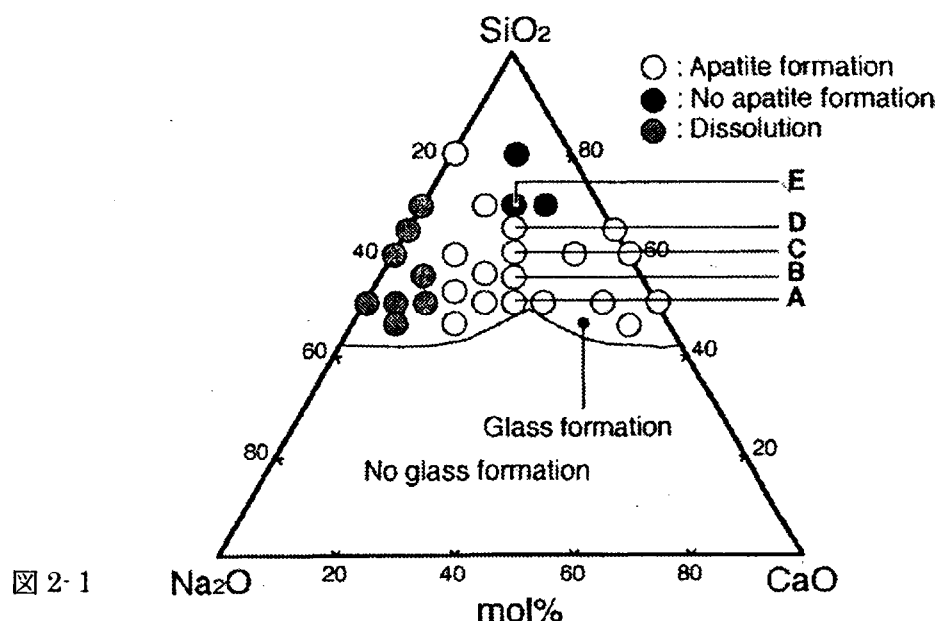
1) 生体親和性評価用ガラスの準備

図 2-1 は SBF に 30 日間浸漬した Na_2O - CaO - SiO_2 成分系ガラス表面でのアパタイト形成の組成依存性を示したものである。図中の A,B,C,D,E で示された $\text{Na}_2\text{O}:\text{CaO}$ 比を 1:1 とし、 SiO_2 比を変えた組成のガラスは、バイオガラスに近いアパタイト形成能(生体活性)を示し、その組成により $A>B>C>D>E$ の順に高い活性を示す^[1]。そのガラス組成を表 2-1 に示す。

本年度は 5 種類(A~E)のガラス($10\times10\times1\text{mm}^3$)の調製を京都大学(小久保研)に依頼し実験に用いることとした。

表 2-1 生体親和性評価用ガラスの組成

ガラス	成 分	モル比(mol%)	適 用
GlassA	$\text{Na}_2\text{O}:\text{CaO}:\text{SiO}_2$	25:25:50	SBF 浸漬 12 時間でアパタイト形成
GlassB	$\text{Na}_2\text{O}:\text{CaO}:\text{SiO}_2$	22.5:22.5:55	
GlassC	$\text{Na}_2\text{O}:\text{CaO}:\text{SiO}_2$	20:20:60	
GlassD	$\text{Na}_2\text{O}:\text{CaO}:\text{SiO}_2$	17.5:17.5:65	
GlassE	$\text{Na}_2\text{O}:\text{CaO}:\text{SiO}_2$	15:15:70	
			アパタイトが 30 日間形成されない



これらのガラスは、次のようにして作製された^[1]。

SiO_2 , Na_2CO_3 , CaCO_3 (試薬特級：ナカライテスク)を白金るつぼ中で 1600°C , 2 時間溶解し, ステンレス鋼プレート上に流し出し, ステンレス鋼板で押さえて厚さ 1mm の板状に成形された。得られたガラスは大きさ $10\times10\times1\text{mm}^3$ に切断し, $3\text{--}4\mu\text{m}$ のダイヤモンドペーストで磨いた後, アセトンで超音波洗浄された。

作製されたガラスは, SBF に浸漬する前に, アセトンと超純水で超音波洗浄し, 乾燥後重量測定を行い SBF に浸漬する。

2) 親和性評価ガラスの組成分析

蛍光 X 線 (XRF) 分析による定性分析

用意された 5 種類の生体親和性評価用ガラスについて、XRF 分析装置 (Rigaku RIX-2000) による定性分析を行い、ガラスの組成を確認した。ガラスは分析前にエタノールにより洗浄を行った。操作条件を表 2-2 に示す。

表 2-2 蛍光 X 線分析操作条件

元素	励起条件	光学系条件
Ti—U	ターゲット : Rh 管電圧(kV) : 50 管電流(mA) : 50 一次フィルター : OUT	アッテネーター : 1/1 分光結晶 : LIF1 検出器 : SC スリット : Coarse
Ca, K, Cl, S P, Si, Al (K α)	同上	同上 分光結晶 : PET 検出器 : PC
Mg, Na, F (K α)	同上	同上 分光結晶 : TAP 検出器 : PC
測定雰囲気	Vac	

化学分析による定量分析

前節で定性分析したガラスの化学分析による定量分析を行った。Na, Si, Ca, Fe, Sr, Pt, Mg, Ni, Cu, Cr 及び P の定量には、高周波誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP-AES ; Nippon Jarrell-Ash, Model ICAP-757V)を用いた。測定波長と操作条件を表 2-3 に示す。

表 2-3 ICP 発光分析測定条件

項 目	適 要
高周波出力	1.25 kW
Ar ガス : 冷却ガス流量	16.0 L/min
プラズマガス流量	0.6 L/min
噴霧ガス流量	0.5 L/min
分光器スリット	25 μ m
トーチ	ファッセル型石英トーチ
観測高さ	コイル上 15mm
噴霧器	石英製 クロスフロー型
測定波長	Na : 589.592 nm Pt : 214.423 nm Si : 251.612 nm Mg : 279.553 nm Ca : 396.847 nm Ni : 221.647 nm Fe : 238.204 nm Cu : 224.70 nm Sr : 407.771 nm Cr : 267.716 nm P : 213.62 nm

Kの定量には、偏光ゼーマン原子吸光分光光度計(AAS;HITACHI, Z-8000)の炎光モードを用い、炎光分析(FES)を行なった。測定波長と操作条件を表 2-4 に示す。

表 2-4 FES 分析測定条件

項 目	適 要
モード	FES
C ₂ H ₂ ガス	2.3 L/min, 0.3kg/cm ²
Air	9.5 L/min, 1.6kg/cm ²
分光器スリット	1.3 nm
バーナー高さ	7.5mm
測定波長	K : 766.5 nm

検量線用標準溶液：ICP-AES 及び FES による定量分析のために、表 2-5、2-6 に示すマトリックスマッチングをした検量線混合溶液を調製した。Na, Ca は市販の原子吸光分析用標準液(1000mg/L：関東化学)を、その他の元素は原子吸光分析用標準液を適宜に希釈した標準溶液を用いた。これらの標準溶液を適量分取・希釈して検量線用混合標準溶液を調製した。検量線混合標準溶液のマトリックスマッチングは、HCl(Merck-Ultrapur, 30%)5mL を用いて定容した。

水は Millipore 社製 Elix10-MilliQ-Synthesis 型超純水システムにより精製した 18M Ω ・cm 以上の超純水を用いた。

表 2-5 ICP-AES 分析のための検量線用混合標準溶液(μ g/ml)

元素	濃 度		
	I	II	III
Na	0	100	200
Ca	0	100	200
Fe	0	0.1	0.2
Sr	0	0.1	0.2
Cu	0	0.03	0.06
Ni	0	0.03	0.06
Cr	0	0.01	0.02
Mg	0	0.01	0.02
HCl(Conc.)	5mL	5mL	5mL
P	0	0.03	0.06
Pt	0	0.03	0.06
HCl(Conc.)	5mL	5mL	5mL
Si	0	10	20

表 2-6 FES 分析のための検量線用混合標準溶液(ng/ml)

元素	濃 度		
	I	II	III
K	0	10	20
HCl(Conc.)	5mL	5mL	5mL

定量分析用試料準備：生体親和性評価用ガラスを、破碎し SiO_2 以外の成分の定量に用いた(～50mg)。更に、めのう乳鉢で粉末状とした粉末試料(～150mg) を SiO_2 定量分析に用いた。何れも 110°C 、2 時間乾燥して分析に供した。

SiO_2 の定量分析

主成分である SiO_2 の化学分析手順を下記のフローに示す。

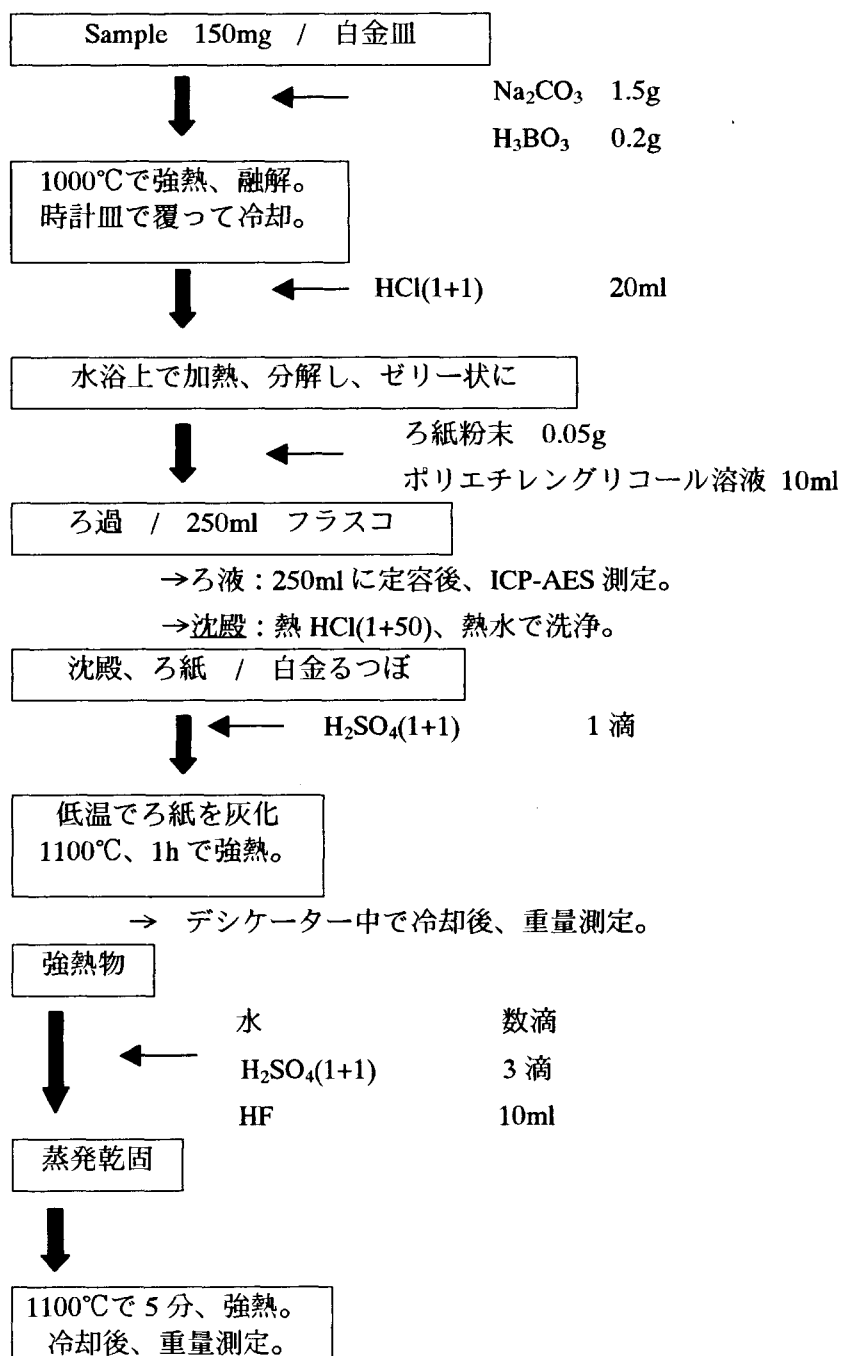
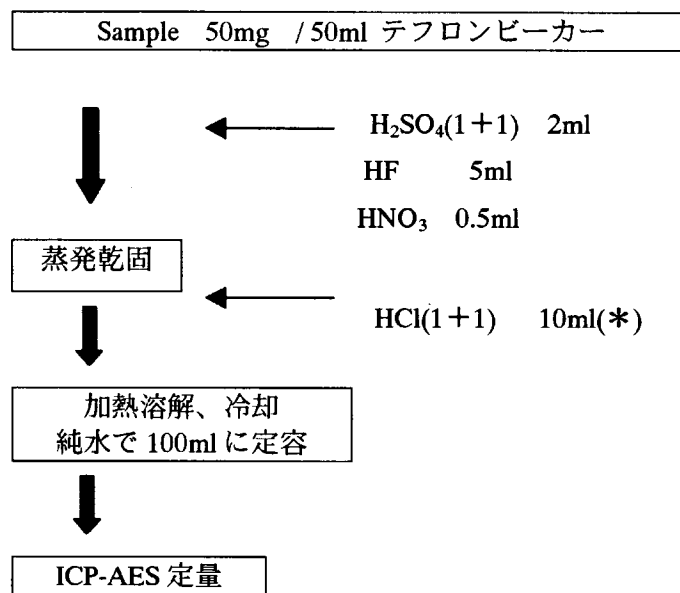


図 2-2 生体親和性評価ガラス中の SiO_2 定量分析手順

SiO₂以外の成分の定量分析

主成分 SiO₂以外の成分の定量分析手順を下記のフローに示す。



(*)加熱溶解時に溶け残りがあった試料には、次の操作を行った。

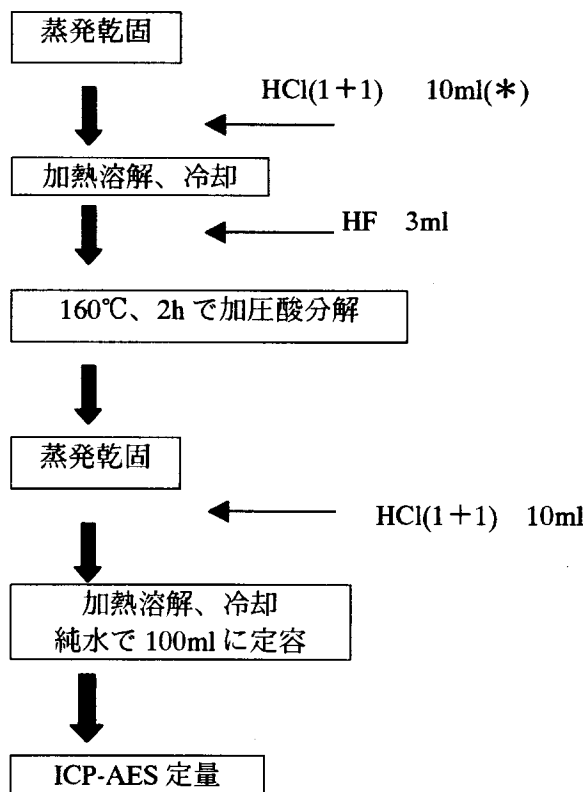


図 2-3 生体親和性評価用ガラス中の SiO₂以外の成分の定量分析手順

3) ガラスの SBF 浸漬

作製されたガラスは、R-SBF に浸漬する前に、アセトンと超純水で超音波洗浄し、乾燥後重量測定を行い R-SBF に浸漬する。

① SBF の調製

SBF のイオン濃度と調製試薬：人の血漿の無機イオンを表 2-7 に示す。C-SBF は、 Cl^- 及び HCO_3^- イオン濃度が人の血漿と異なる。R-SBF はその金属イオンだけでなく、 Cl^- 及び HCO_3^- イオン濃度も人の血漿のそれと等しい。本年度はこの 2 種類の SBF を用いて検討を行う。

表 2-7 人の血漿及び疑似体液(C-SBF 及び R-SBF)中の
無機イオン濃度と pH

イオン	ヒト血漿	イオン濃度(mM)	
		C-SBF	R-SBF
Na^+	142.0	142.0	142.0
K^+	5.0	5.0	5.0
Mg^{2+}	1.5	1.5	1.5
Ca^{2+}	2.5	2.5	2.5
Cl^-	<u>103.0</u>	<u>147.8</u>	<u>103.0</u>
HCO_3^-	<u>27.0</u>	<u>4.2</u>	<u>27.0</u>
HPO_4^{2-}	1.0	1.0	1.0
SO_4^{2-}	0.5	0.5	0.5
pH	7.2-7.4	7.40	7.40

表 2-7 に示すイオン濃度になるように、36.5℃に維持した超純水中に、表 2-8 に示す種類と量の各試薬(試薬特級：ナカライテスク)を表に示した順序で、各試薬が確実に溶解した後、順に次の試薬を加えて溶解させる手順で行った。できるだけ過不足ないように各々の緩衝剤と試薬で pH7.40 に調整することにより 2 種類の SBF を調製した。

表 2-8 SBF 調製 (0.5L)

溶解順序	純 度 (%)	Fe (ppm)	C-SBF (g)	R-SBF (g)
1 NaCl	99.5	2	4.018	2.702
2 NaHCO_3	99.5-100.3	5	0.350	0.370
3 Na_2CO_3	99.5	5	----	1.023
4 KCl	99.5	2	0.224	0.113
5 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	99	10	0.228	0.115
6 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	98	3	0.306	0.156
7 1M-HCl			40ml	----
8 HEPES			----	5.964
9 CaCl_2	95	2	0.278	0.147
10 Na_2SO_4	99	5	0.072	0.036
11 TRIS	99		6.058	----
12 1M-NaOH			----	0.38ml

SBF 調製手順

SBF(0.5L)の調製手順をフロー(図 2-4)に示す。また図 2-5, 2-6 に調製に使用した装置を示す。
C-SBF と R-SBF の調製手順は同様であるが、pH 調整には各々の緩衝剤と試薬を用いた。

pH メーター (Mettler Toledo MA235 pH/イオン分析計, pH:0.001) は SBF の調製を始める前に正確に校正しておく。

器具準備・洗浄

(準備)

ポリプロピレン製柄付きビーカー(0.5L), ガラスメスフラスコ(0.5L),
ポリメチルペンテン製メスシリンダー, ポリプロピレン製はかり瓶

(洗浄)

- ・ ビーカー, メスフラスコ及びメスシリンダー
実験器具洗浄用中性無リン洗浄剤(クリーンエース S), エタノール, 1MHCl 水溶液
及び超純水の順で十分に洗浄。
- ・ はかり瓶
超音波洗浄器中でアセトン及び超純水を用いて, この順で十分に洗浄。洗浄後,
乾燥機中で乾燥させる。クリーンベンチ内で室温まで冷やす。

試薬溶解

- ・ 0.5L ビーカーに 350mL の超純水を入れ, エタノール, 1MHCl 溶液で洗浄した攪拌子
を入れる。このビーカーを写真 2-5 に示すように, マグネチックスターラー(Iuchi
HS-50 型, 50~3000mL 攪拌可)上に置いた恒温槽(Iuchi HT-50N, 室温+5~80°C±0.05°C)
に入れ, 攪拌しながら 36.5°C に保つ。
- ・ 36.5°C に保たれた超純水中に表 2-8 に示す順に溶解させる。それぞれの試薬が完全に
溶けてから次の試薬を順に加える。
- ・ 吸湿性の KCl, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Na_2SO_4 は短時間ではかり取り, 溶解
する。

pH 調整

(C-SBF)

- ・ pH7.35~7.4 の間で, 緩衝剤 TRIS と 1MHCl を交互に加えながら pH7.4 以上にならな
いように慎重に調整し, 最後は 1MHCl で pH7.40 に合わせる。

(R-SBF)

- ・ SBF 調製の最後に 1MNaOH を加えて pH7.40 に調整する。
表 2-8 に示した 1MNaOH 分取量で pH7.40 にならない場合は, 更に 1 MNaOH を加え,
pH7.40 に調整する。この追加量の 1MNaOH は, SBF の Na イオン濃度には影響する
程の濃度ではない。検量線用溶液のマトリックスにこの時の 1MNaOH 量を添加する。

定 容

表 2-10 TF-XRD 装置の操作条件

項 目	適 用
X 線	Cu/50kV/40mA
ゴニオメータ	RINT2000 縦型ゴニオメータ
アタッチメント	薄膜、標準用多目的試料台
スリット	発散スリット : 0.4mm モノクロ受光スリット : 0.8mm 散乱スリット : 5.8mm 発散縦制限スリット : 10mm 受光スリット : 開放
モノクロメータ	固定モノクロメータ
カウンタ	シンチレーションカウンタ
スキャンスピード	2.000° /min
サンプリング幅	0.020°
固定角	1.500°

② 走査型電子顕微鏡 (SEM) による微構造観察

SEM (HITACHI S-4500 型) (図 2-10) で表面形状の変化を観察した。試料はチャージアップを防ぐため、導電性銀ペースト (ドータイト, 藤倉化成) で導電性を良くし金を蒸着 (10nm) した。またエネルギー分散形分析装置 (EDS) (HORIBA EMAX-7000) を用いて定性分析を行った。各装置条件を表 2-11、2-12 に示す。

表 2-11 SEM の操作条件

項 目	適 用
加速電圧	20kV
引き出し電圧	0~6.5kV
電子銃	冷陰極電解放出形電子銃
レンズ系	3 段電磁レンズ縮小方式
対物レンズしぼり	可動しぼり
非点補正コイル	電磁方式
走査コイル	2 段電磁偏向方式

表 2-12 EDS の操作条件

項 目	適 用
Si 検出器	
測定対象元素	Na(Z=11)~U (Z=92)
FWHM	144eV 以下
P/B	10000/1 以上
プリアンプ	Pulsed Optical Field Back
検出器	Be 窓

・検量線マトリックスマッチング用溶液の調製 (Na, K, Ca, Mg, Si)

(C-SBF)： 緩衝剤 Tris 約 0.6g を葉包紙ではかり取り，100mL プラスチックビーカー中で約 50mL の超純水に溶解する。溶液を 100mL フラスコに移し，ビーカー洗液も加えた後，1MHCl (キシダ化学) 4mL を加えて 100mL 定容し，ブランク溶液 (BLK) とした。この BLK 溶液 1mL を検量線溶液に添加すれば SBF 中に含まれる Tris 緩衝剤量及び HCl 量に相当する。

(R-SBF)： 緩衝剤 Hepes 約 1.2g を葉包紙ではかり取り，100mL プラスチックビーカー中で約 50mL の超純水に溶解する。溶液を 100mL フラスコに移し，ビーカー洗液も加えた後，1MNaOH (キシダ化学) を加えて 100mL 定容し，ブランク溶液とした。1MNaOH の量は R-SBF 調製時の pH 調整で添加した量を 100mL に換算し，その量を適宜加え SBF 中に含まれる Hepes 緩衝剤量及び NaOH 量を試料中とほぼ等しくさせる。

・検量線用混合標準溶液の調製 (Na, K, Ca, Mg, Si)

検量線用混合標準溶液を表 2-15 に示す。P は市販の原子吸光分析用標準液 (1000mg/L：関東化学) を用い，その他の元素は原子吸光分析用標準液を適宜に希釈した標準溶液を用いた。

表 2-15-1 C-SBF の ICP-AES 分析のための検量線用混合標準溶液($\mu\text{g/ml}$)

元素	濃 度		
	I	II	III
Na	0	30	60
Ca	0	2	4
Mg	0	0.5	1.0
Si	0	0.5	1.0
BLK	1mL	1mL	1mL
P	0	25	50
Tris(g)	0.6	0.6	0.6
1MHCl(mL)	4	4	4

表 2-15-2 R-SBF の ICP-AES 分析のための検量線用混合標準溶液($\mu\text{g/ml}$)

元素	濃 度		
	I	II	III
Na	0	30	60
Ca	0	1	2
Mg	0	0.5	1.0
Si	0	0.5	1.0
BLK	1mL	1mL	1mL
P	0	25	50
Hepes(g)	1.2	1.2	1.2
1MNaOH(mL)	適宜	適宜	適宜

表 2-15-3 AAS 分析のための検量線用混合標準溶液(ppm)

元素	濃 度		
	I	II	III
K	0	1.5	3.0
BLK	1mL	1mL	1mL

(5) R-SBF 浸漬実験結果

1) 生体親和性評価用ガラスの組成分析結果

① XRF による定性分析

生体親和性評価用ガラス 5 種類(A~E)の XRF による定性分析結果を表 3-1 に示す。

表 3-1 生体親和性評価用ガラスの XRF 定性分析結果(mol%)

ガラス	A	B	C	D	E
Na ₂ O	<u>20.8</u> (25)*	<u>17.2</u> (22.5)	<u>15.5</u> (20)	<u>13.4</u> (17.5)	<u>12.5</u> (15)
SiO ₂	<u>48.8</u> (50)	<u>52.2</u> (55)	<u>58.9</u> (60)	<u>63.2</u> (65)	<u>69.4</u> (70)
CaO	<u>30.3</u> (25)	<u>30.6</u> (22.5)	<u>25.6</u> (20)	<u>23.3</u> (17.5)	<u>18.1</u> (15)
Fe ₂ O ₃	1.18×10 ⁻²	1.37×10 ⁻²	0.976×10 ⁻²	1.75×10 ⁻²	6.34×10 ⁻²
SrO	1.08×10 ⁻²	1.31×10 ⁻²	0.868×10 ⁻²	0.80×10 ⁻²	6.33×10 ⁻²

*()の値はガラス調製時の仕込値。 下線は主成分。

表 3-1 に示すように、主成分のほかに Fe と Sr を含んでいることがわかった。これはガラス調製時による汚染と思われる。主成分である SiO₂ は、仕込値とほぼ一致した分析値が得られた。今回用いた 5 種類のガラスは Na₂O:CaO が 1:1 になるように調製されているが、分析結果では Na₂O は仕込値よりも低値を、CaO は高値を示す傾向が見られた。標準試料を用いない半定量分析値によるとと思われる。

② 化学分析による定量分析

作製された生体親和性評価用ガラスは仕込値に近い値を持つことが XRF 分析によって確認されたが、更に化学分析による定量分析を行った。化学分析による定量分析結果を表 3-2 に示す。

XRF 定性分析結果よりも仕込値に近い分析結果が示された。またアパタイト形成に影響する程の不純物は検出されず、5 種類の生体親和性評価用ガラスの組成が、その仕込値とほぼ一致していることが確認された。

表 3-2 生体親和性評価用ガラス ICP-AES 定量分析結果 (N=2)

ガラス	A	B	C	D	E
(主成分)					(mol%)
Na ₂ O	23.9 (25)*	22.9(22.5)	19.2 (20)	16.2 (17.5)	13.8(15)
SiO ₂	46.8 (50)	54.6(55)	61.0 (60)	66.4 (65)	72.1 (70)
CaO	29.3 (25)	22.5 (22.5)	19.8 (20)	17.5 (17.5)	14.1 (15)
Fe ₂ O ₃	6.83×10 ⁻⁴	2.58×10 ⁻³	5.17×10 ⁻⁴	3.73×10 ⁻⁴	7.14×10 ⁻⁴
SrO	4.62×10 ⁻³	5.99×10 ⁻³	4.49×10 ⁻³	0.39×10 ⁻³	2.68×10 ⁻³
(微量成分)					(ppm)
K	13.6	26.4	16.1	15.4	10.4
Pt	7.3	5.6	8.6	-----	19.1
Mg	4.6	8.3	8.3	8.7	2.7

*()の値はガラス生成時の仕込み値。 下線は主成分。

2) SBFの有効性実証実験結果

生体親和性評価用 GlassA 及び GlassE を図 2-4 のフロー図で示した手順で調製された C-SBF 24mL に浸漬し (図 2-6), CO₂ 濃度を 14.8kPa, 36.5℃ に調整したインキュベーター中で 1 日, 1, 2, 4 及び 8 週間保持した。

① C-SBF の調製

図 2-4 のフローに従い C-SBF を調製した。その pH 変化を以下に示す。
この結果から C-SBF では酸性領域より pH7.40 に収束することが分かる。

表 3-3 C-SBF 調製時の pH 変化 (0.5L)

溶解順序	純 度 (%)	Fe (ppm)	C-SBF (g)	pH
1 NaCl	99.5	2	4.018	5.56
2 NaHCO ₃	99.5-100.3	5	0.350	7.97
3 KCl	99.5	2	0.224	8.05
4 K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	99	10	0.228	8.14
5 MgCl ₂ ·6H ₂ O	98	3	0.306	8.11
6 1M-HCl			40ml	1.55
7 CaCl ₂	95	2	0.278	1.55
8 Na ₂ SO ₄	99	5	0.072	1.55
9 TRIS	99		6.058	7.40

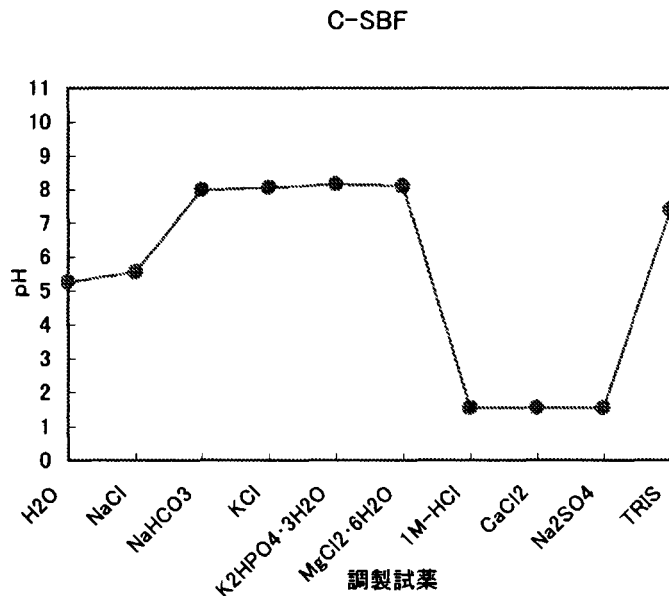
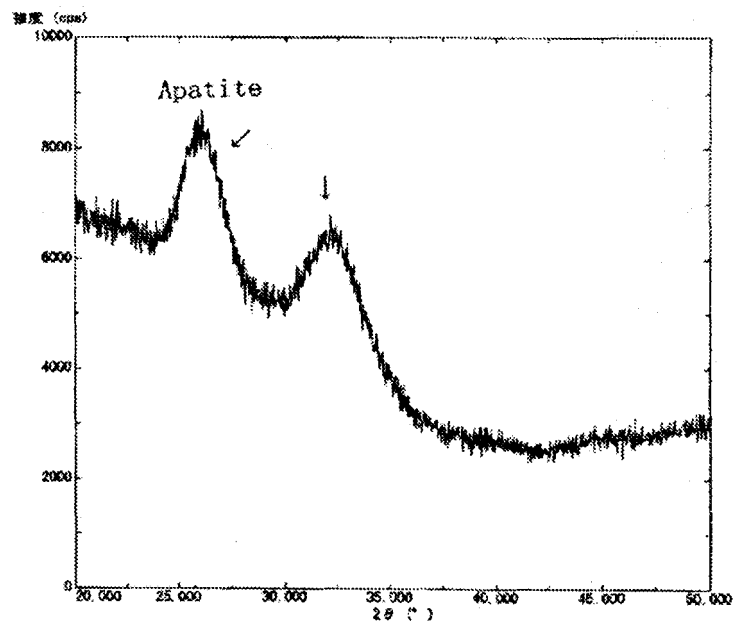


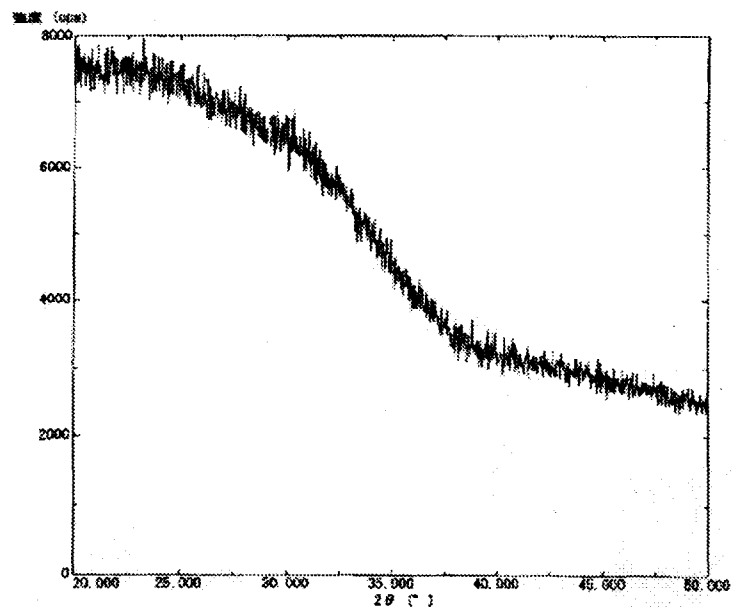
図 3-1 C-SBF 調製時の pH 変化

② 結晶構造解析

1日浸漬後ガラス表面のTF-XRDによる回折パターンを図3-2-1に示す。この結果は信号強度を強くするために前置分光器を外して測定した結果である。



(a) GlassA



(b) GlassE

図3-2-1 浸漬ガラス表面のX線回折パターン（検出器側分光器なしの場合）

(a) 1日浸漬後の GlassA

(b) 1日浸漬後の GlassE

強度

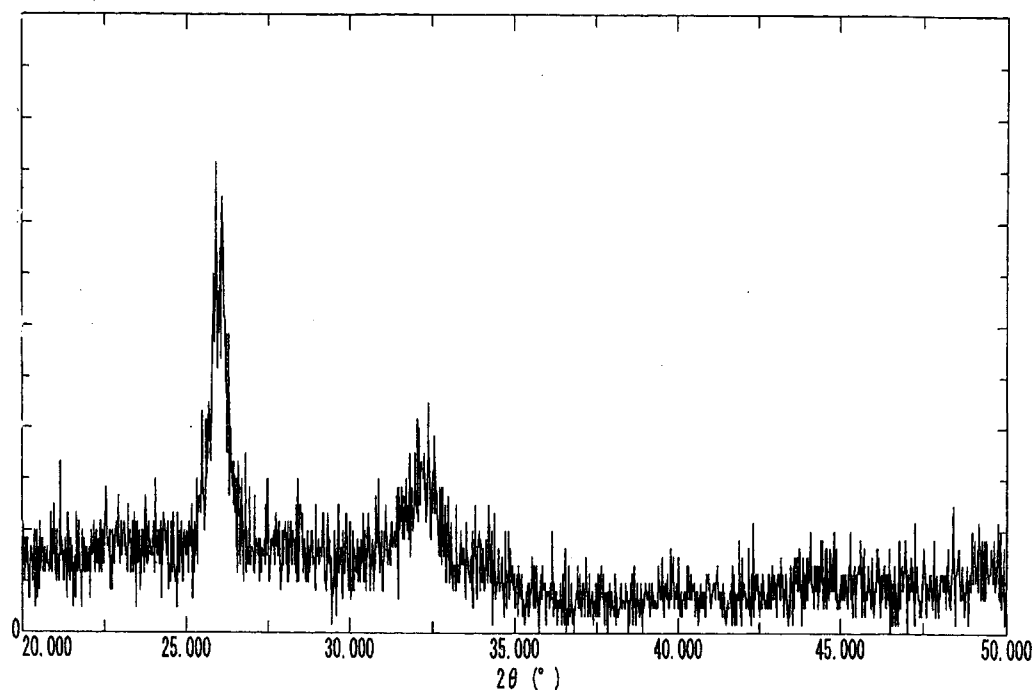


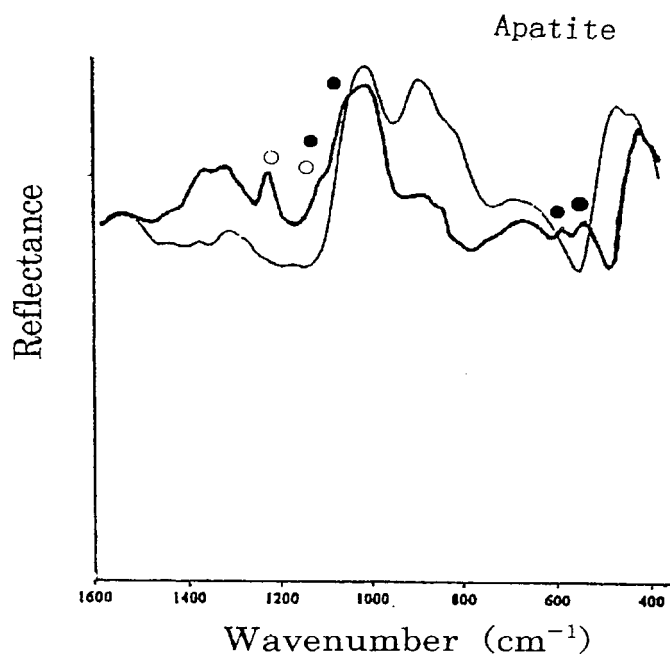
図 3-2-2 1 日浸漬後の A ガラス表面の X 線回折パターン
(検出器側の分光器がある場合)

図 3-2-2 は散乱 X 線の影響が強いために前置分光器を使用した結果である。これらの結果より、1 日浸漬後の A ガラスで $2\theta=27^\circ$ 及び 33° に回折ピークが観察された。この回折ピークはアパタイトに起因するものである。E ガラスにはこの固有の回折ピークは観察されない。E ガラスの回折パターンは浸漬前の original ガラスの状態と同じであった。E ガラスでは浸漬時間を長くしても変化は見られなかった。しかし浸漬時間を長くした A ガラスでは、表面に形成されたアパタイトが剥離を起こしたり、アパタイト膜が基材ガラスから浮き上がる現象が発生し、入射角度の設定が極めて困難であった。

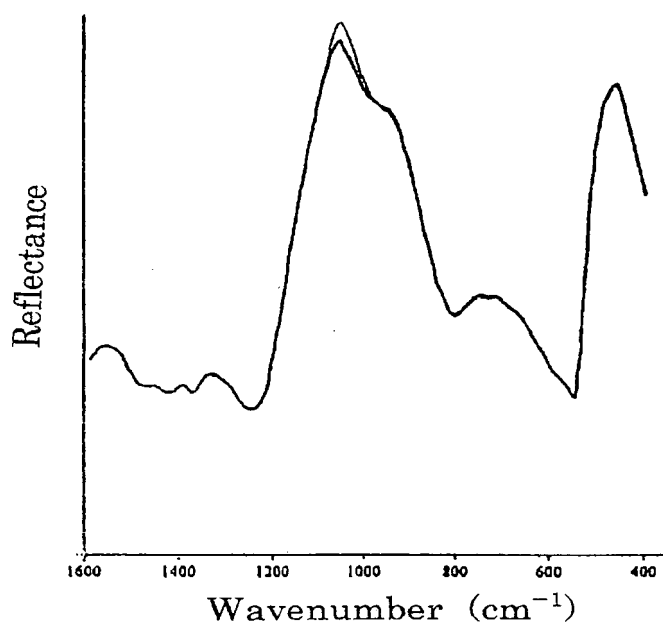
生体活性のある A ガラスで 1 日浸漬後にアパタイトに起因するピークが検出されたことにより、SBF の有効性が実証された。

③ FT-IR 結果

浸漬前と1日浸漬後のガラス表面のFT-IR スペクトル変化を図3-3に示す。



(a) GlassA



(b) GlassE

図3-3 浸漬によるガラス表面の反射FT-IR スペクトル変化

(a) A ガラス (b)E ガラス (細線; 浸漬前、太線; 1日浸漬後)

⑤ 浸漬後 C-SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化
 ガラス浸漬後の C-SBF 中の無機イオン濃度と pH 変化を図 3-6 に示す。

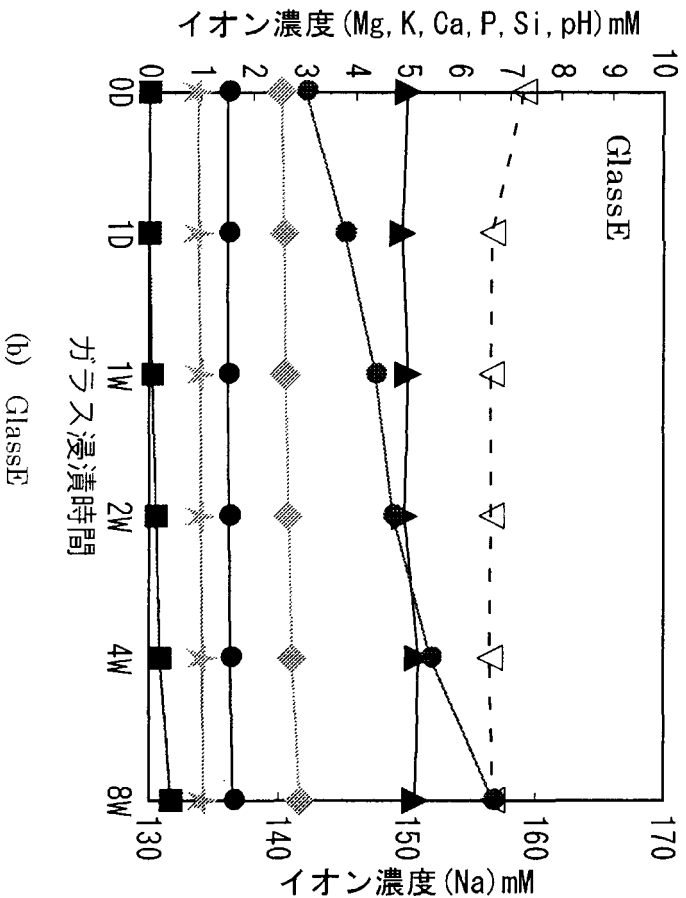
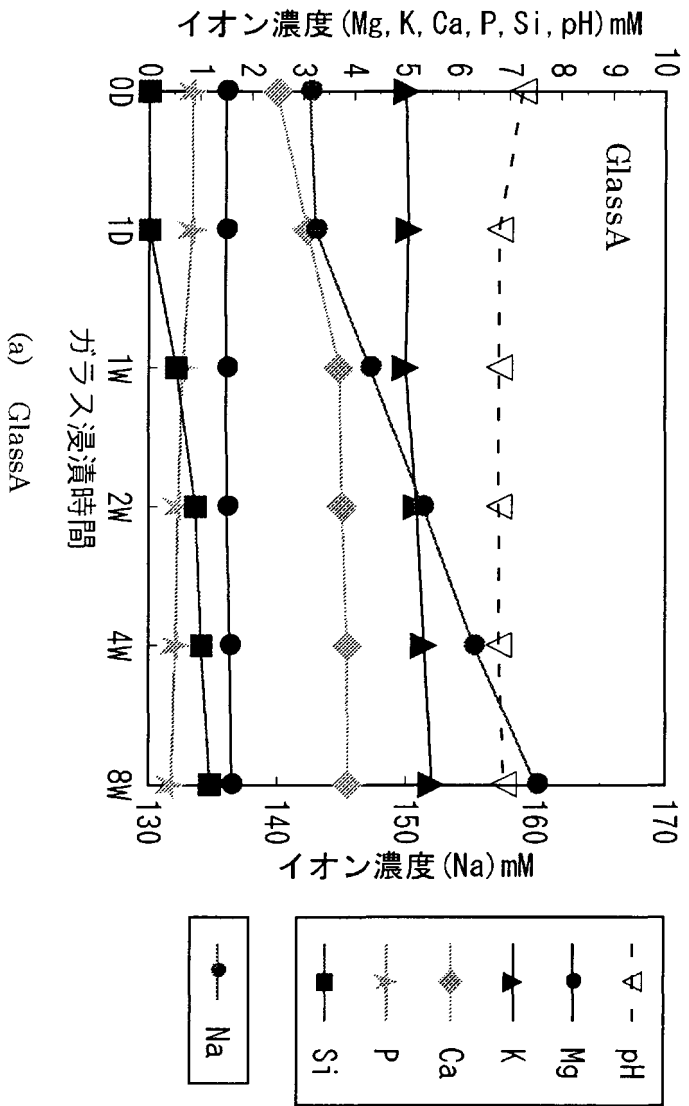


図 3-6 浸漬後 C-SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化
 (a) GlassA (b) GlassE

浸漬後ガラスの重量変化を図 3-7 に示す。

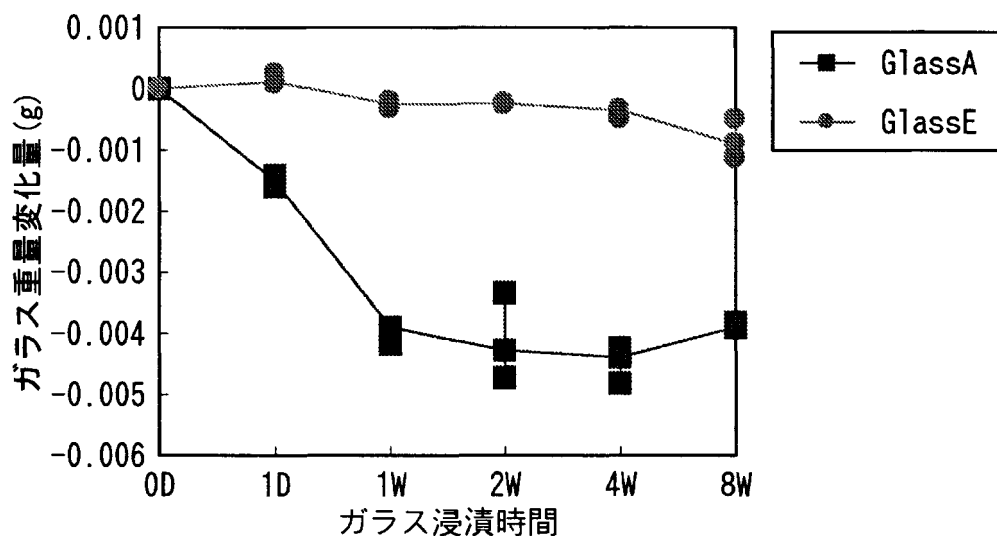


図 3-7 浸漬後ガラス A 及び E の重量変化

図 3-6 のガラス浸漬時間 0 日は、ガラスを浸漬する前の C-SBF の分析値である。この結果から、調製された C-SBF の各元素濃度値は表 7 に示した C-SBF 中の元素濃度値とほぼ一致していることが分かり、調製した C-SBF の成分濃度の信頼性が確認された。

GlassA ではガラスの浸漬時間が長くなるにつれ、C-SBF 中の[Na], [Ca], [Si]は増加, [P]は減少, [Mg], [K]は一定値を示した。GlassE では[Na], [Si]は増加傾向を示すが、他の元素はほぼ一定値を示した。[Na], [Ca], [Si]が増加傾向であるのは、これらの元素がガラスの主成分であるため、SBF 中へ浸漬したガラスから SBF 中に溶解しているものと考えられる。GlassE が GlassA よりもその増加率が低いのは、ガラス成分組成(図 2-1)によるものと思われる。

SBF 中の無機イオンから生体活性ガラス表面にアパタイトが形成されるとすると、溶液中の P と Ca が使われ、その濃度は減少していく。図 3-6 によると GlassA では[P]は減少しているが、[Ca]は増加している。アパタイト形成に使われる Ca イオンよりもガラスから溶解する Ca イオンが多いため[Ca]が増加していると推測される。GlassE では、[P]も[Ca]もほぼ一定値を示し、アパタイト形成していないことが分かった。

図 3-7 で分かるように、ガラス重量は浸漬時間につれ、減少している。アパタイト形成が確認されている GlassA でも重量は減少している。ガラスからの溶出が大きいことが分かる。

⑥ まとめ

C-SBF による SBF の有効性実証実験を行い、その結果から生体活性の高い GlassA において 1 日浸漬後でアパタイト形成を示す XRD スペクトルが検出された。同様に 1 日浸漬後 FT-IR によりアパタイト固有の赤外吸収スペクトルが測定された。また SEM 観察により鱗片状のアパタイト結晶が観察された。一方、全く活性を示さない GlassE では、その浸漬時間が長くなってもその表面解析に変化は見られなかった。これらの結果から、SBF を用いた生体親和性評価法が有効であることが確認された。

今回最もアパタイト形成能が高い GlassA を用いたが、表面構造の経時変化が実際に測定できたのは浸漬 1 日の試料のみであった。浸漬日数が増えると表面生成物が膜状に剥離してしまうためである。この剥離は、基材ガラス表面でシラノール基が生成し、これが凝集・合体してシリカハイドロゲルとなるためと考えられる。生体親和性を評価するためには、アパタイト形成が早いというだけでなく、安定で再現性のある材料を用いて浸漬条件を決める必要がある。GlassA の選択はそのアパタイト形成能は高いが、安定で再現性がある測定条件が得られ難く、生体親和性評価に適するガラス材料の選択が課題であることが判明した。

C-SBF は、人の血漿と Cl^- イオンと HCO_3^- イオン濃度に大きな差がある。新しい調製方法によって調製された、人の血漿と同じ無機イオン濃度を持つ R-SBF の情報が不可欠である。図 2-1 の相図で最も生体活性の高い GlassA と全く示さない GlassE だけでなく、その間の活性を示す GlassB, C, D を用いて検討を行い、ガラス材料を選択することが必要と考えられた。

3) 生体親和性評価用ガラスの SBF 浸漬実験結果

前項の結果を受け、SBF を C-SBF から R-SBF に変更し、生体親和性ガラス A～E の 5 種類を用いて、ガラスの浸漬実験を行った。浸漬期間は 1, 3, 5 日, 1, 2, 3 及び 4 週間とした。R-SBF との比較検討のため、C-SBF への浸漬実験も合わせて行い、浸漬期間は 1, 2 週間とした。R-SBF 及び C-SBF を各浸漬条件に保持し、浸漬期間後ガラスを取り出し、各々の評価を行った。

① R-SBF 及び C-SBF の調製

R-SBF 及び C-SBF を図 2-4 に従い調製し、その pH 変化を測定した。

表 3-4 R-SBF 調製時の pH 変化 (0.5L)

溶解順序	純 度 (%)	Fe (ppm)	R-SBF (g)	pH
1 NaCl	99.5	2	2.702	5.58
2 NaHCO ₃	99.5-100.3	5	0.370	7.93
3 Na ₂ CO ₃	99.5		1.023	10.0
4 KCl	99.5	2	0.113	10.0
5 K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	99	10	0.115	9.99
6 MgCl ₂ ·6H ₂ O	98	3	0.156	9.96
7 Hepes			5.964	7.21
8 CaCl ₂	95	2	0.197	7.20
9 Na ₂ SO ₄	99	5	0.036	7.21
10 1MNaOH			0.36ml	7.40

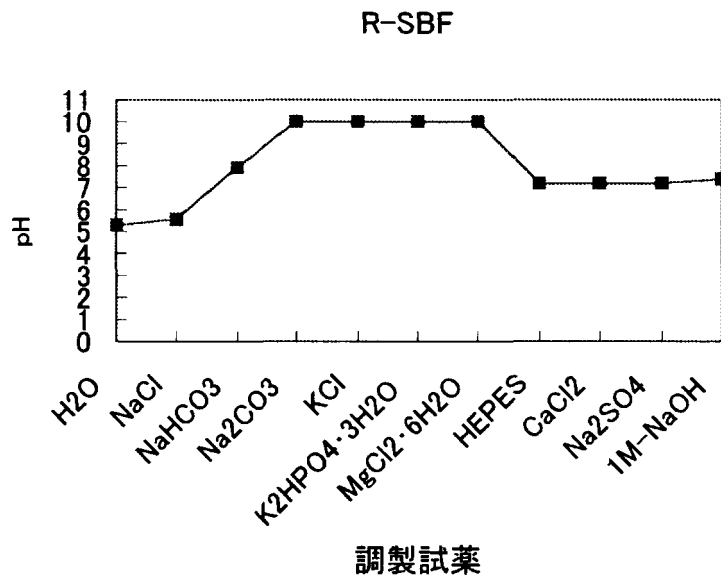


図 3-8-1 R-SBF 調製時の pH 変化

表 3-5 C-SBF 調製時の pH 変化 (0.5L)

溶解順序	純 度 (%)	Fe (ppm)	C-SBF (g)	pH
1 NaCl	99.5	2	4.018	5.56
2 NaHCO ₃	99.5-100.3	5	0.350	7.97
3 KCl	99.5	2	0.224	8.05
4 K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	99	10	0.228	8.14
5 MgCl ₂ ·6H ₂ O	98	3	0.306	8.11
6 1M-HCl			40ml	1.55
7 CaCl ₂	95	2	0.278	1.55
8 Na ₂ SO ₄	99	5	0.072	1.55
9 Tris	99		6.058	7.25

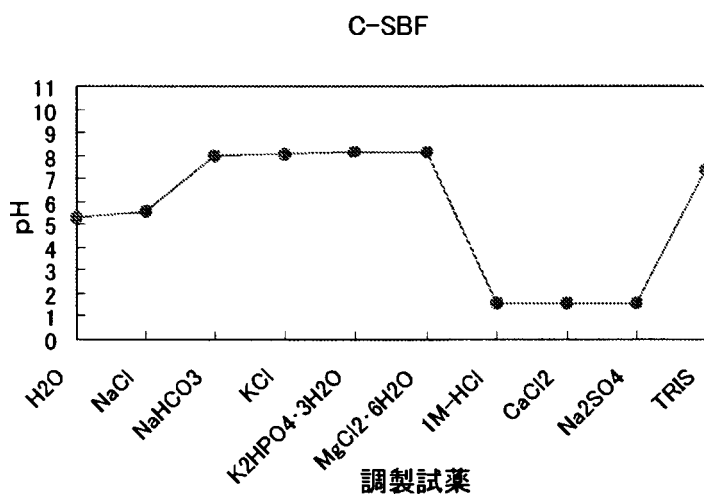


図 3-8-2 C-SBF 調製時の pH 変化

表 3-4, 3-5 及び図 3-8-1, 3-8-2 は、各々 R-SBF と C-SBF 調製時の pH 変化を示す。

この結果から R-SBF は緩衝剤 HEPES と 1 M NaOH を用いて pH を調製するためアルカリ性領域より pH 7.40 に収束し、C-SBF では緩衝剤 Tris と 1 M HCl を用いて pH 調整を行うため、酸性領域より pH 7.40 に収束していることが分かる。つまり R-SBF では Na が多く C-SBF では Cl が多い溶液となり、この溶液の性質の違いがアパタイト形成速度に影響を及ぼす。溶液の性質については次節で考察する。

② TF-XRD による結晶構造解析

R-SBF 及び C-SBF に各期間浸漬した 5 種類(A~E)のガラス表面の TF-XRD 解析を行い、その回折パタンの浸漬期間による変化を以下に示す。TF-XRD 測定には前置分光器を使用した。

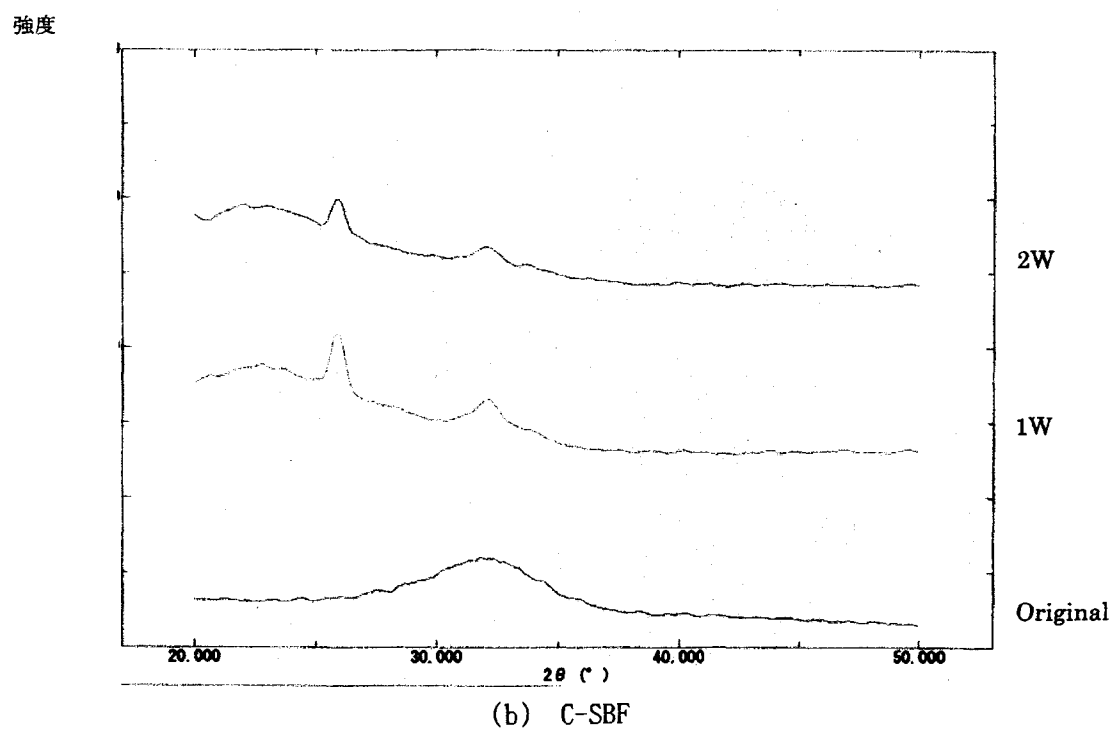
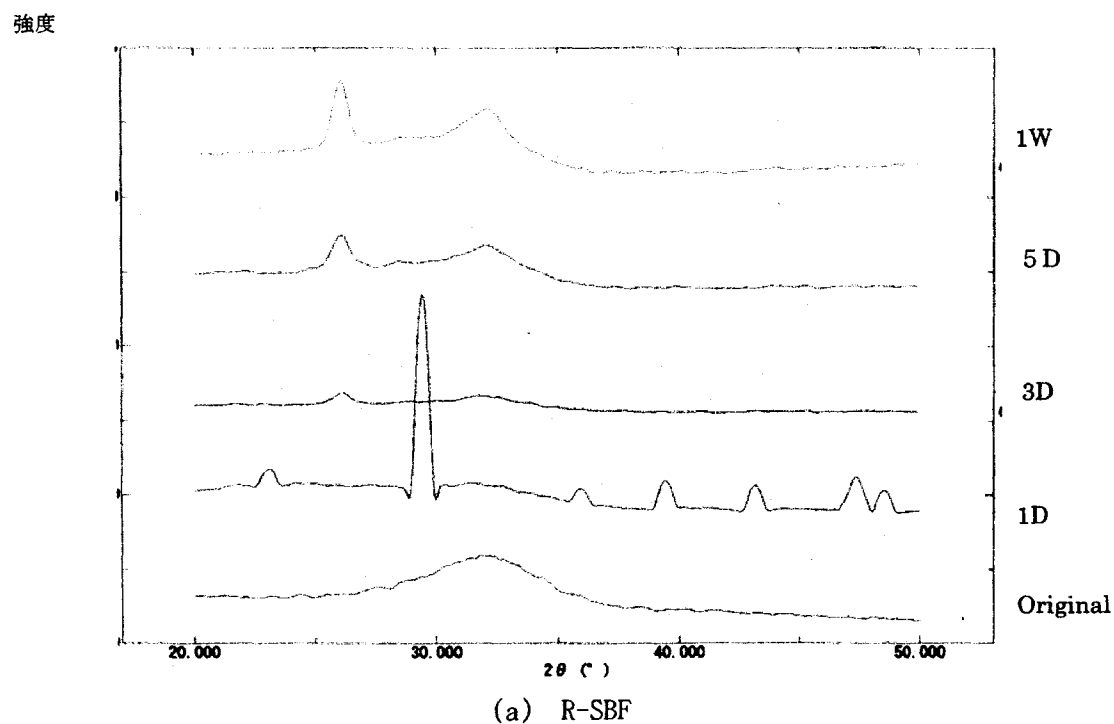


図 3-9-1 GlassA 表面の TF-XRD 回折スペクトル

(a) R-SBF (b) C-SBF

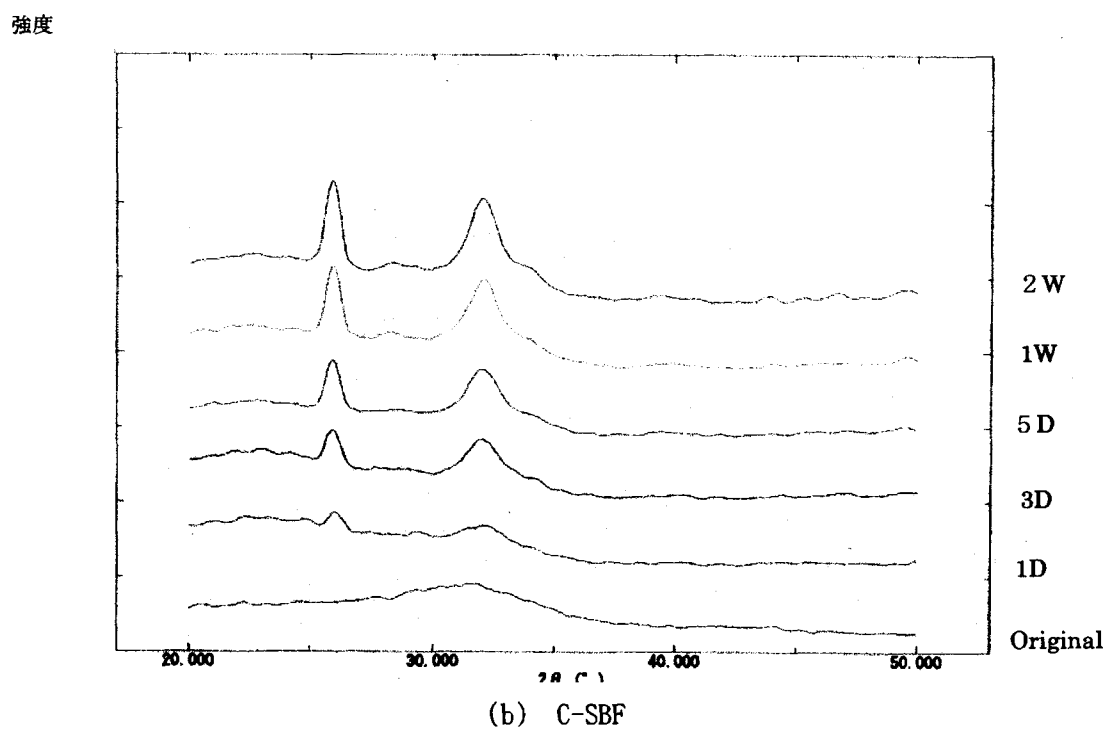
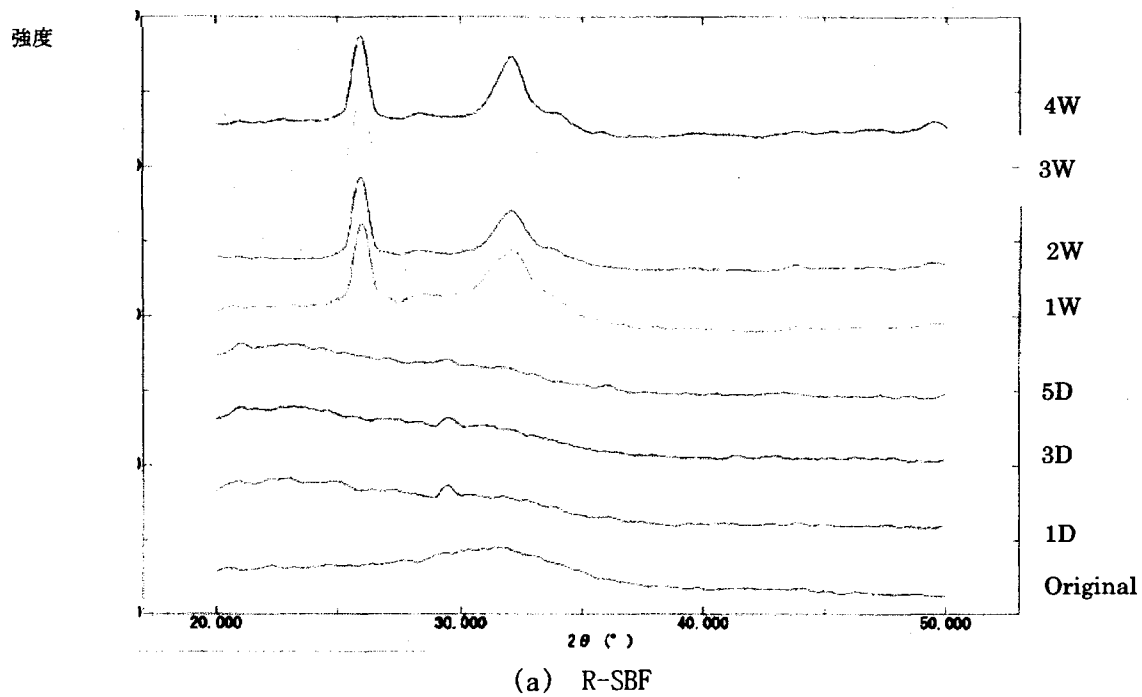
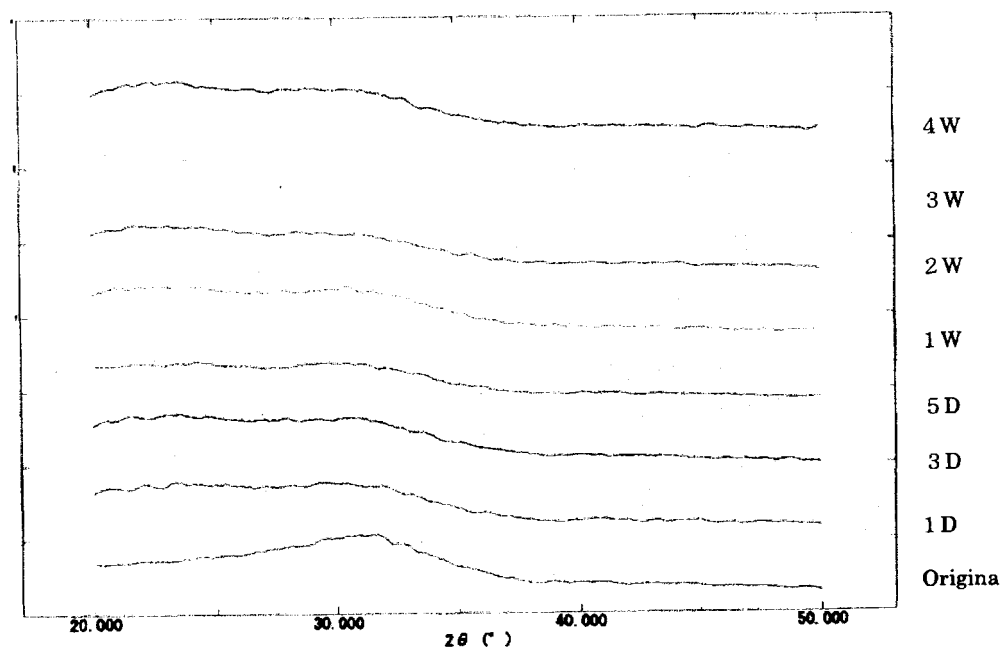


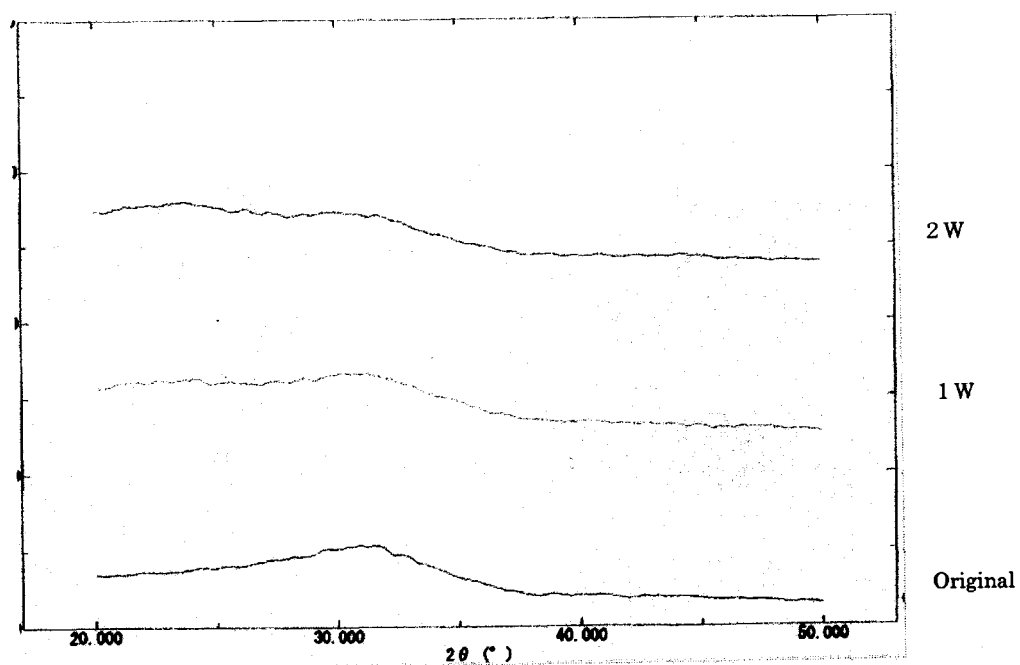
図 3-9-2 GlassB 表面の TF-XRD 回折パターン
(a) R-SBF (b) C-SBF

強度



(a) R-SBF

強度

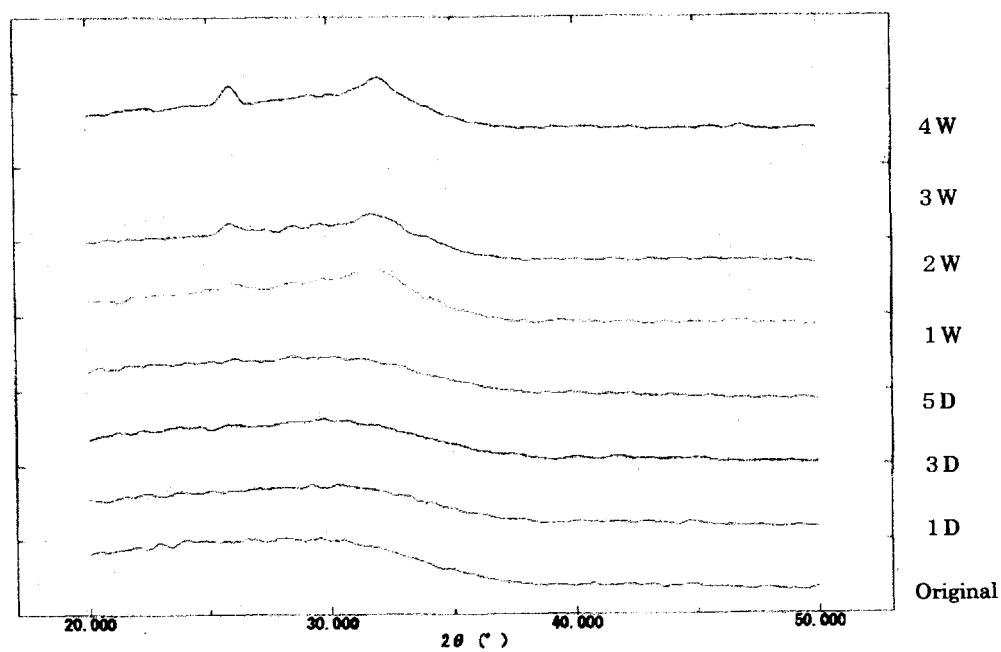


(b) C-SBF

図 3-9-3 GlassC 表面の TF-XRD 回折パターン

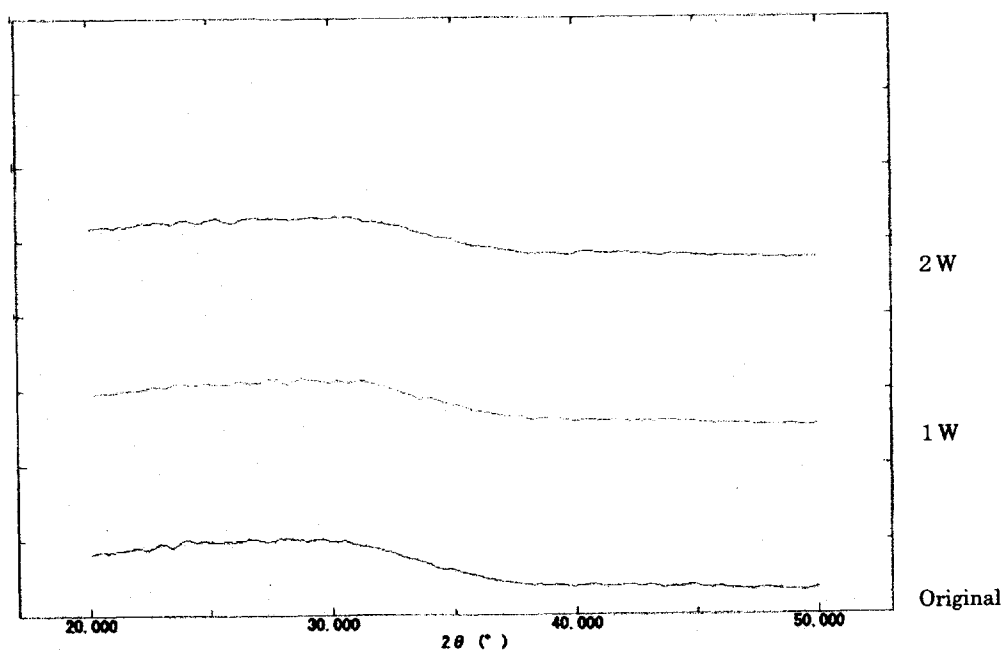
(a) R-SBF (b) C-SBF

強度



(a) R-SBF

強度

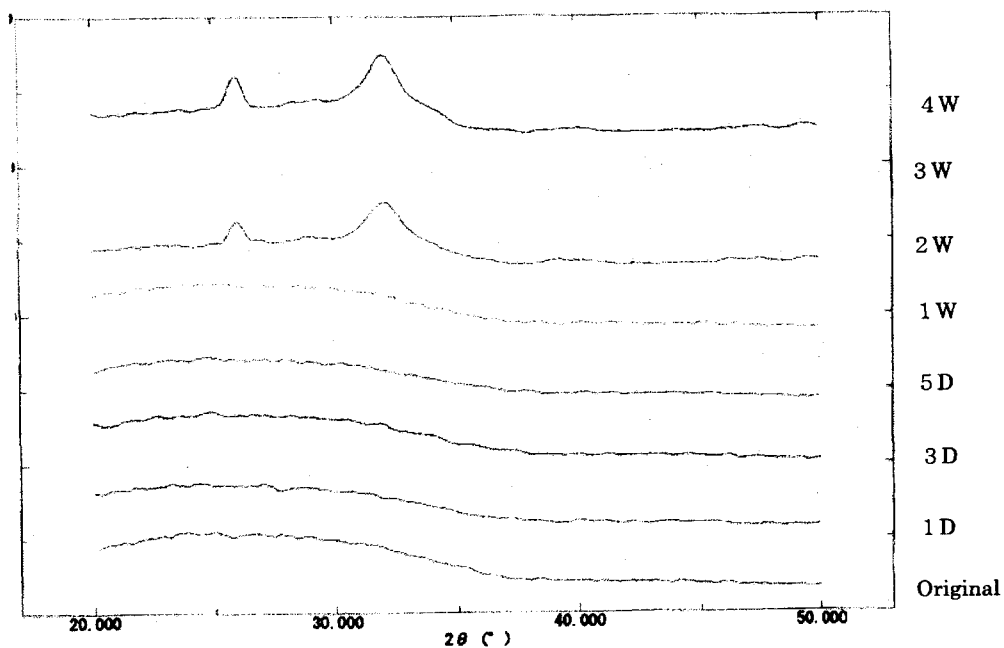


(b) C-SBF

図 3-9-4 GlassD 表面の TF-XRD 回折パターン

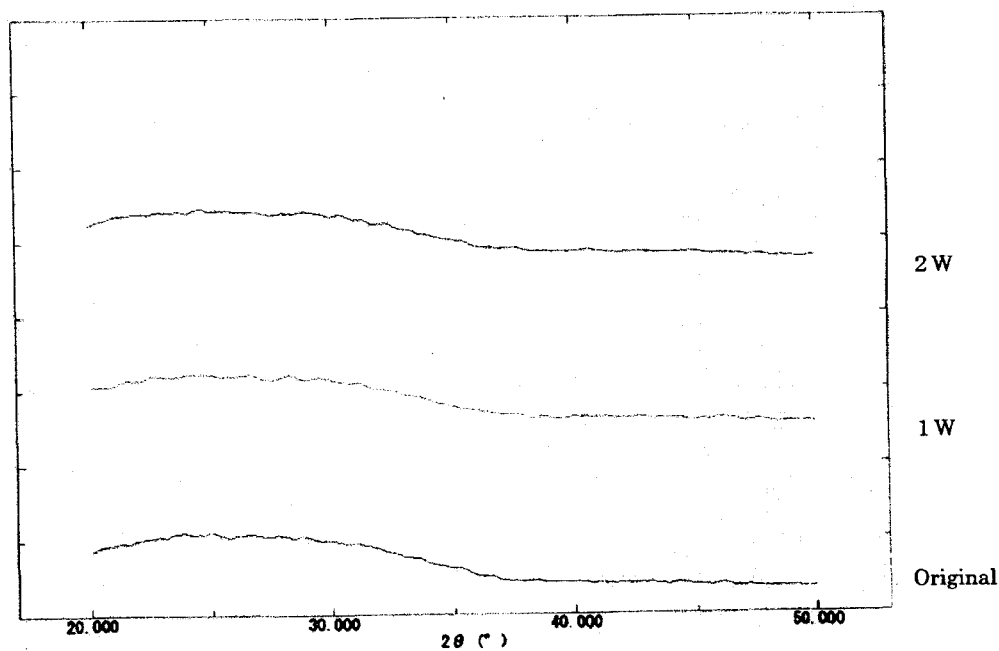
(a) R-SBF (b) C-SBF

強度



(a) R-SBF

強度



(b) C-SBF

図 3-9-5 GlassE 表面の TF-XRD 回折パターン

(a) R-SBF

(b) C-SBF

ハイドロキシアパタイト： 図 3-10 に市販の焼結体ハイドロキシアパタイト(HA；Apaceram40；旭光学)の TF-XRD 回折パターンと R-SBF に 1 及び 2 週間浸漬させた GlassB の TF-XRD 回折スペクトルを示す。

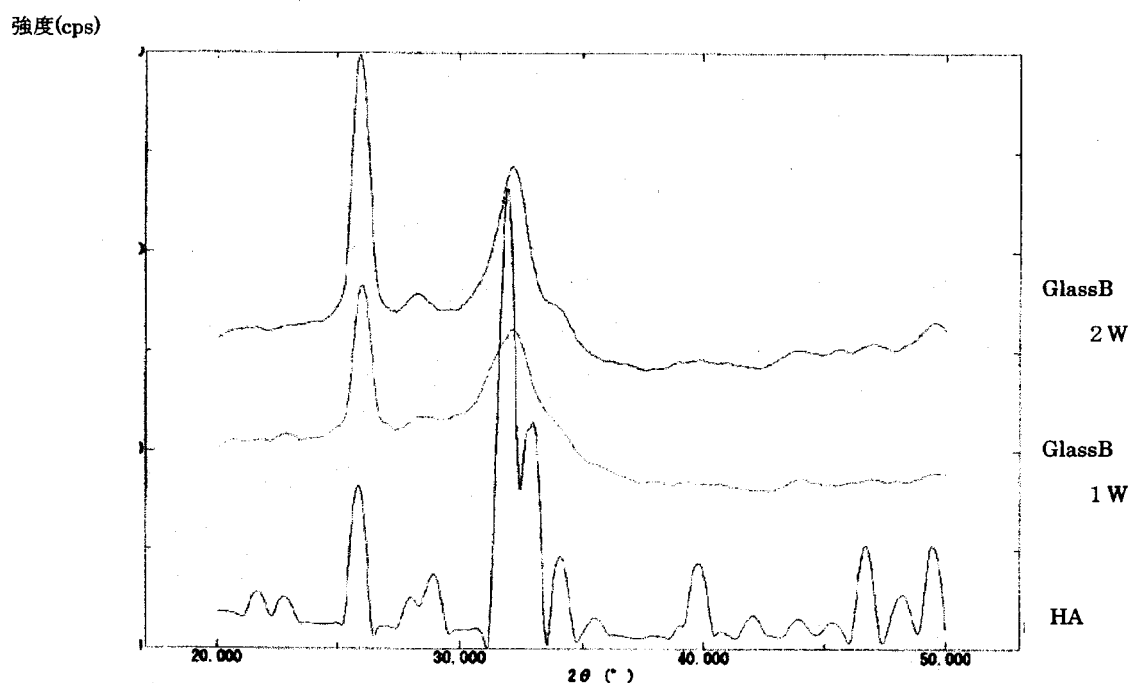


図 3-10 焼結ハイドロキシアパタイト及び GlassB 表面の TF-XRD 回折パターン

$2\theta=27^\circ$ 及び 33° の回折ピークは、図 3-10 の焼結 HA のピークから、HA 結晶の主要ピークと一致していることがわかる。^[8] $2\theta=27^\circ$ 及び 33° の回折ピークは、焼結 HA のピークの中で信号の強いものである。図 3-10 の R-SBF 中で浸漬した GlassB のパターンと焼結 HA のパターンでは、 $2\theta=27^\circ$ 及び 33° のピーク的一致だけでなく、ピークが弱いものや分離は悪いが、他のピーク位置で一致するピークが確認できる。形成されたアパタイトは焼結 HA のように、結晶性の良いものではないと推測され、このため焼結 HA のようなシャープなピークを示さない。しかし $2\theta=27^\circ$ 及び 33° のピークのような強いピークをアパタイト固有のピークとし、アパタイト形成の評価に使用できる。

炭酸カルシウム（カルサイト）の確認： R-SBF に浸漬した GlassA 及び GlassB では、1 週間以内の短い浸漬期間において、 $2\theta=27^\circ$ 及び 33° のアパタイト固有のピークではなく、 $2\theta=29^\circ$ 付近にピークが観測された。浸漬期間が長くなるにつれ、 $2\theta=29^\circ$ のピークは弱くなり、1 週間以上すると $2\theta=27^\circ$ 及び 33° のアパタイト固有のピークを示し始める。

特に 1 日浸漬後の GlassA においては、 $2\theta=29^\circ$ の強いピークだけでなく、他にいくつかのピークが確認された。その結果を図 3-11 に示す。

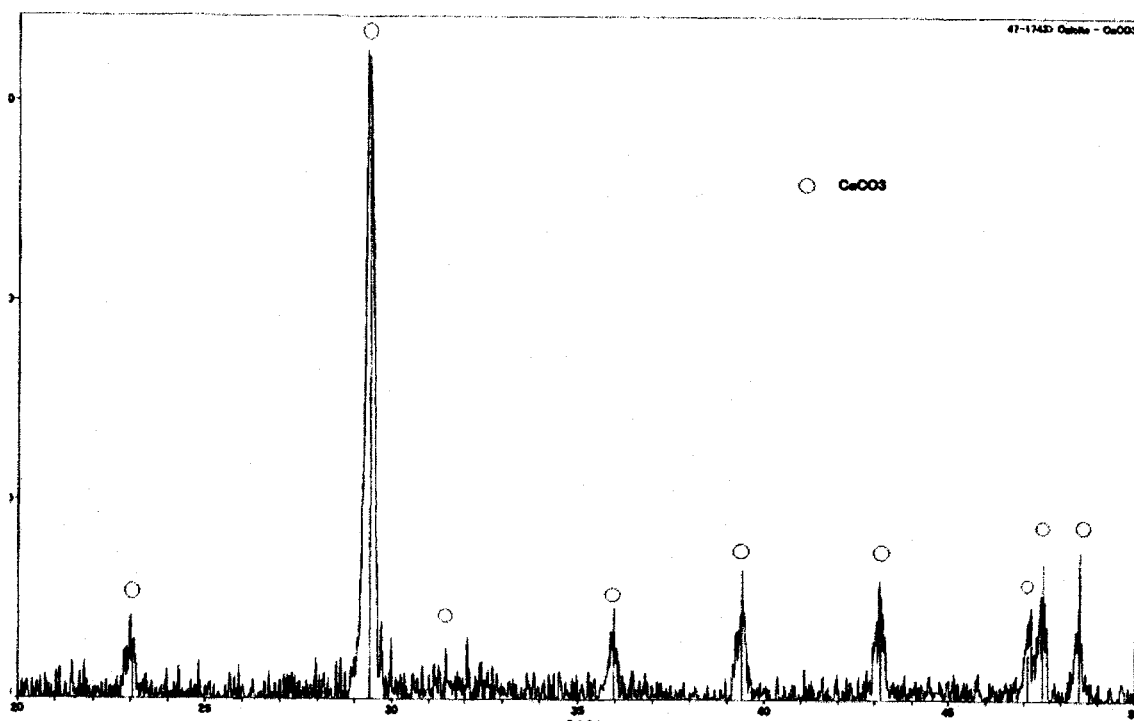


図 3-11 R-SBF に 1 日浸漬後の GlassA の回折パターン

この強いピークはカルサイトが示すピーク(○)であることが確認された。このピークは R-SBF に浸漬された GlassA 及び B のみで確認された。図 3-9-2 で示された GlassB の R-SBF 及び C-SBF の回折ピーク変化が示すように、R-SBF では、浸漬後 1 日目よりカルサイトピークが出現後、1 週間浸漬後からアパタイト固有のピークを示しているが、C-SBF では浸漬後 1 日目よりアパタイト固有のピークを示している。これは C-SBF への浸漬においてアパタイト形成速度が速いことを示している。C-SBF におけるアパタイト固有のピーク出現までの過程を確認するには、1 日以内の短期間での浸漬実験が必要であるが、この形成速度の違いは、R-SBF と C-SBF の溶液の性質の違いが反映していると考えられる。ガラス浸漬後の pH 測定結果から、R-SBF では HCO_3^- イオン濃度及び Na が多く含まれるアルカリ領域の溶液となっており、C-SBF は HCO_3^- イオン濃度が低く、 Cl^- を多く含む酸性領域の溶液となっている。この液性の違いによりアパタイト形成速度が異なると思われる。このため、R-SBF では形成されたアパタイト中に炭酸根を含む形となって析出していると推察される。

TF-XRD による結晶構造解析のまとめ

R-SBF では GlassA 及び B において浸漬後 1 日目よりカルサイトのスペクトルが検出され、約 1 週間でアパタイト固有のスペクトルが検出された。GlassA では浸漬後 2 週間のガラスでは、その生体活性の高さのために XRD 解析に適当な平滑な面が得られず測定できなかった。GlassC では浸漬期間を長くしてもそのスペクトルに変化は見られなかった。しかし GlassC より生体活性の低いはずの GlassD 及び E では、各々 1 週間と 2 週間でアパタイト固有のスペクトルが検出された。この結果は図 2-1 に示した C-SBF により観測された 3 成分相図とアパタイト形成能についての組成依存性と異なった結果となった。

それに対して C-SBF では GlassA 及び B でアパタイト固有のスペクトルが検出され、GlassC, D 及び E では全く検出されなかった。この結果は図 2-1 に示す組成依存性と合致している。

GlassB の結果から、C-SBF に 1 日浸漬後のガラスで既にアパタイト固有のスペクトルが検出され、浸漬時間が長くなるに従い、その強度が強くなることが確認された。この結果は、R-SBF よりも C-SBF の方がアパタイト形成速度が速いことを示すものである。

C-SBF におけるガラス組成依存性は、本来図 2-1 は C-SBF を用いた検討結果であり当然の結果である。しかしそこで位置付けられたガラスが R-SBF では GlassA 及び GlassB を除き組成依存性を明確に示さない原因のひとつは、R-SBF と C-SBF の溶液組成の違いが、過飽和度に影響をあたえているものと推測される。

これらの結果より、R-SBF と C-SBF では生成速度に加えて、析出した水酸アパタイトの組成を分析し、アパタイト形成過程に関する情報を集約することが必要であると考えられる。

骨類似アパタイト形成過程

SBF 中に各ガラスを浸漬し、骨類似アパタイトが形成する過程について次のような報告がされている。^[7] このアパタイト形成過程について SEM 観察を行った。

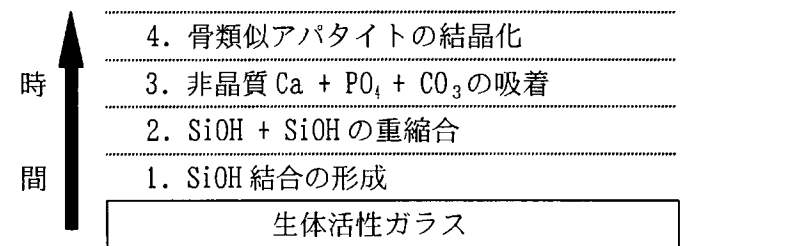


図 3-14 骨類似アパタイト形成過程

1. $\text{Si-O-Na}^+ + \text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{Si-OH} + \text{Na}^+ (\text{溶液}) + \text{OH}^-$
 ・ SBF からの H^+ または H_3O^+ と Na^+ イオン交換。
2. $\text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Si-OH} + \text{OH-Si}$
 ・ 溶液への $\text{Si}(\text{OH})_4$ の形成で可溶の Na_2SiO_3 が減少。
 → Si-O-Si 結合が壊れる。
 → シラノール基(Si-OH)が形成 (ガラス、溶液の界面)
3.
$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{Si}-\text{OH} \\ | \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{HO}-\text{Si}-\text{O} \\ | \\ \text{O} \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ | \quad | \\ \text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O} \\ | \quad | \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array} + \text{H}_2\text{O}$$

 ・ 表面上に SiO_2 -rich layer の縮合と再重合
4. ・ SiO_2 -rich layer を通して表面に Ca^{2+} と PO_4^{3-} が移動する。
 ・ SiO_2 -rich layer の上に $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ -rich film を形成する。
 → 溶液からの可溶のカルシウムとリン酸根を取り込み、
 非晶質の $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ -rich film に成長する。
5. ・ 溶液から OH^- 、 CO_3^{2-} イオンを取りこみ、水酸化物、
 炭酸塩が混合したアパタイト層の形成。
 ・ 非晶質の $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ -rich layer の結晶化。

シリカゲル層の形成後、その上に白い球が出現する(図 3-16-1,3-16-2)。これらの白い球は P と Ca を含み始め、アパタイトの出現であることが確認された。図 3-16-3 はそれら白球が集まって島を作り、その島が更に集団化し膜を形成していくことが観察される。図 3-16-4 でも多数の球が集団化して一つの大きな島を形成していることが観察される。図 3-16-5 では 3-16-4 よりも滑らかな表面になり、浸漬時間に伴い、平滑な一枚の面となっていくと推定される。しかし、この段階ではガラスの種類により形成過程に違いが見られた。形成過程については次節のガラス別による SEM 観察変化によって考察する。図 3-16-5 の段階ではまだ鱗片状のアパタイト固有の結晶は観察されなかった。P と Ca がまだ少ない段階と推測され、浸漬時間経過に伴い、P と Ca が多くなり結晶アパタイトが形成されていくと思われる。図 3-16-6 による一連の EDS 解析結果から CaO-P₂O₅-rich layer が形成されていくと推察される。

前項の SEM 観察により、クラックの入ったアパタイト層が確認されているが、このクラックは、アパタイト膜が脆弱なために乾燥や測定時の剥離に起因するとともに、この一連の観察からアパタイト球が集合し、一つの島となり、更にその島が集団化していく過程がクラック状に観察されることも反映しているものと考えられる。

最上層の白球④は明らかに P と Ca のピークが検出され、図 3-18-4 の結晶観察と併せアパタイト結晶であることが確認される。前節に示したアパタイト白球の EDS 検出ピークよりも Si のピーク強度が強いのは、アパタイトが形成されている部分は厚さ数 μm であり、ガラス観察を垂直方向ではなく、断面方向から観察しているため、下層の影響を受けていると思われる。

白球のすぐ下層⑤では、白球におけるピークと比べ、Si は増加し、P が検出された。⑥層においても P は検出されるがわずかであった。また⑥層以下の深さ方向での EDS 検出ピークでも P はわずかに検出された。この原因は、観察に用いた切断ガラスが、SBF に浸漬する前からその切断面に傷が入っていた試料を利用したために、浸漬中にその傷に SBF 溶液が浸透し、P が深さ方向に析出したものと考えられる。しかし、図 3-18-5 のガラス基材の EDS 検出ピークと比べ、⑤層、⑥層の検出ピークは Na が減少し、O が増加、P が検出された。また⑤、⑥層の SEM による高倍率での観察によっても図 3-18-2 で確認されたガラス基材中の白い粒状物は確認されなかった。これらの結果から、⑤層、⑥層がガラス基材の層でないことがわかる。Si の検出ピークが下層成分に起因している可能性も考慮し、恐らく CaO-P2O5-rich film もしくは P を含む SiO_2 に富む層であると推定される。特に⑤層は図 3-18-4 でも観察されたように、白球④に類似した結晶形が観察され、図 3-17-4 で見られる④層に相当する部分であると推測され、白球の下層のアパタイト層であると考えられる。

小久保らは、アパタイト形成メカニズムは Na がガラス基材より溶出し、そこにシラノール基が形成されシリカゲル層が形成され、Ca、P と反応して骨類似アパタイトを形成すると報告している。このアパタイト形成に関わるシリカゲル層は、前節のアパタイト形成過程の中では確認されているが、断面写真からは明確には確認できなかった。恐らく⑤、⑥層の Na が減少し Si が多く含まれることより、この層がその役割を果たしていると思われるが、更に深さ方向への観測を行なうことが必要と思われる。また、アパタイト形成過程の検討には同一ガラスを二分割し、断面と平面の 2 方向からの観察・解析が必要である。

SEM 観察まとめ

R-SBF では、アパタイト固有の鱗片状の結晶が浸漬後、GlassA で 5 日、GlassB, C, D, 及び E では 1 週間で SEM による観察、また EDS による P, Ca のピークにより確認された。炭酸カルシウム結晶の析出が GlassA 及び B において確認された。これらの結果は GlassC, E を除き、TF-XRD 解析による評価結果と一致した。特に GlassC では XRD 測定では浸漬時間を長くしてもアパタイト特有の回折ピークが検出されなかったが、SEM 観察では浸漬 1 週間以上でアパタイト結晶が観察された。GlassE では、XRD では浸漬後 2 週間でアパタイト固有の回折ピークが確認されたが、SEM 観察では 1 週間で確認された。この結果から SEM-EDS による結晶確認は、部分的な評価になる危険性は否めないが、評価法として最速で確実であると思われる。

R-SBF 浸漬では TF-XRD 解析結果と同様に図 2-1 に示された生体親和性のガラス組成依存と異なる結果となった。この原因は R-SBF の調製方法に起因する溶液の性質によるものと考えられる。また R-SBF ではアパタイト形成過程がガラスにより異なることが観察された。GlassA 及び B では、P を含む球または層が形成され、それが浸漬期間に伴い、成長して P, Ca が増加し結晶性の良いアパタイトが形成されていく傾向が見られた。GlassC, D 及び E では Si が豊富な層の上に結晶性の良いアパタイト球が析出し、それが集団化してアパタイト膜を形成していく傾向が観察された。この R-SBF を用いた、ガラス別によるアパタイト形成過程については更に検討が必要である。

一方、C-SBF ではアパタイト固有の鱗片状結晶が浸漬後、GlassB で 1 日で観察された。GlassA でも 1 日浸漬で観察されている。GlassC, D, E ではアパタイトの結晶は確認されず、P に富む層も検出されなかった。しかし、GlassC, D 及び E ではシリカゲルが形成されることが確認できた。特に GlassC においては浸漬後 1 週間でシリカゲルの塊が形成され、それが集団化して層を形成していくことが確認された。また GlassB では 1 週間浸漬後、C-SBF では 1 日浸漬後にアパタイト結晶が析出することから、R-SBF より C-SBF の方が速くアパタイトを形成することも確認された。この結果は TF-XRD による評価と一致し、TF-XRD 回折と同様に図 1 に示す組成依存性と合致する結果となった。

これらの結果より、R-SBF 及び C-SBF の性質の違いに起因すると考えられるアパタイト形成過程の違いが SEM-EDS 観察によって確認された。C-SBF ではアパタイト形成過程が SEM 観察によって既報の模式図に添う形で進行していることが確認された。SEM-EDS を用いた評価法は局所観察の危険を伴うが、アパタイト結晶生成を最速に確認できることが実証され、TF-XRD の裏付けとして重要であることが確認された。

④ ガラスの重量変化

R-SBF 及び C-SBF に各期間浸漬後のガラス重量の変化を図 3-29 に示す。

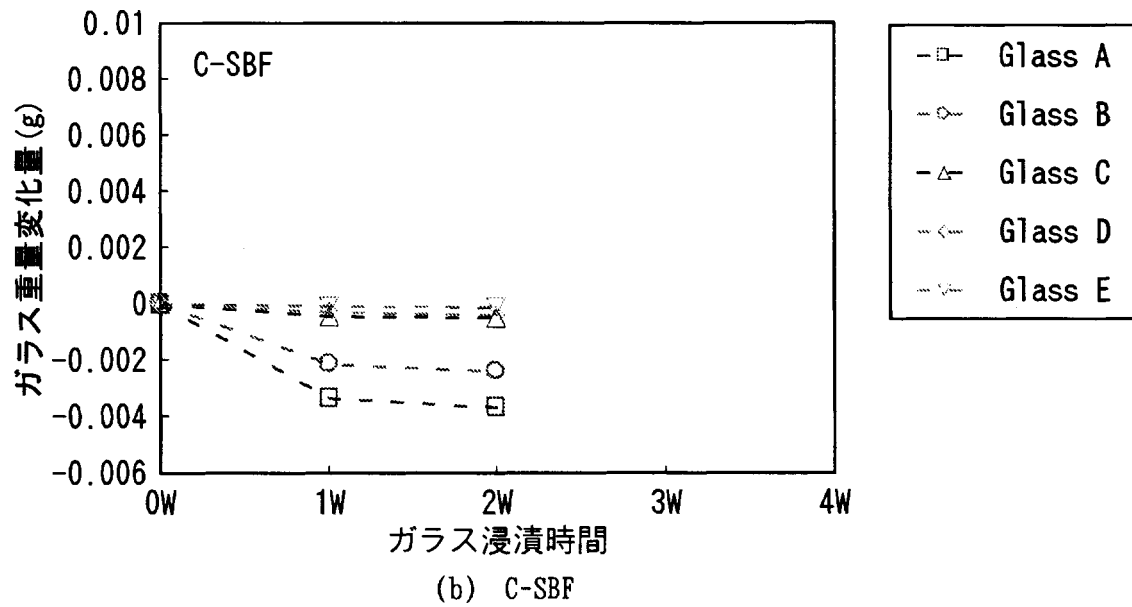
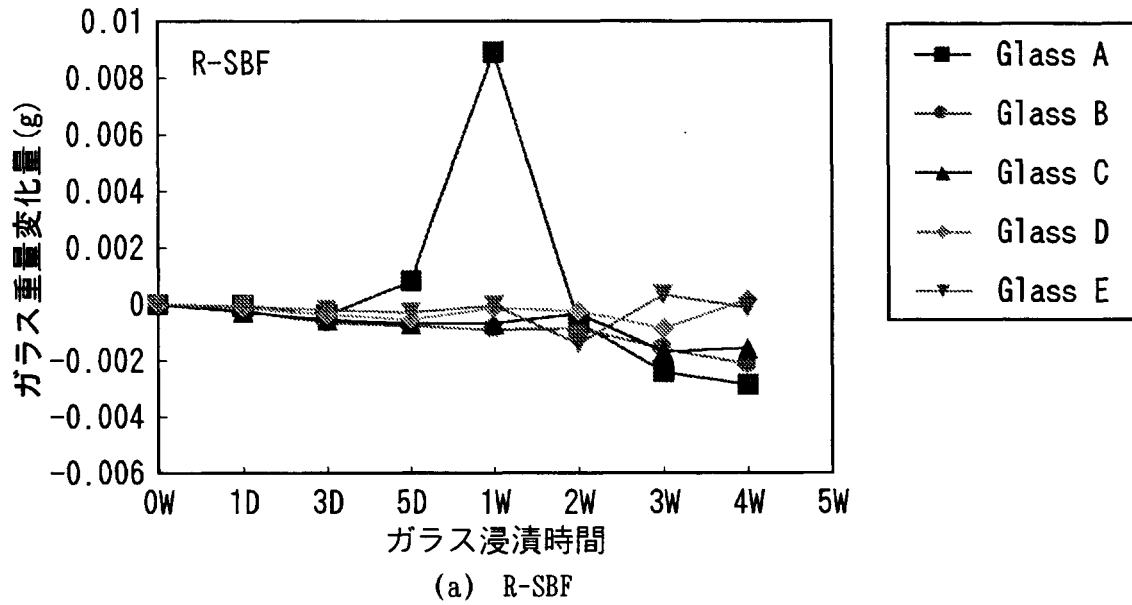


図 3-29 R-SBF 及び C-SBF 浸漬後のガラス重量変化
(a)R-SBF (b)C-SBF

図 3-29 から R-SBF, C-SBF 共に GlassA 及び B の減少が顕著である。ガラスの重量減少量はガラスの組成にほぼ比例し、GlassA 程その減少率が高くなっている。C-SBF ではガラスの組成に比例した結果が確認できるが、R-SBF における重量変化のばらつきは大きいようである。

ガラスの重量減少量は、R-SBF よりも C-SBF の方が短期間で減少することが確認された。これはガラス浸漬後の C-SBF が Cl⁻を多く含む酸性領域の溶液であるため、アルカリ領域の溶液である R-SBF よりもガラスの溶出が著しくなることが原因であると思われる。

このガラスからの溶出により、SBF 中のイオン濃度が変化し、アパタイトの溶解度に関する過飽和度に作用しアパタイトが形成され则认为られるので、このガラスからの溶出はアパタイト形成に影響が大きいと思われる。C-SBF では GlassA 及び B において浸漬後 1 週間の間に大きくその重量が減少している。C-SBF において短期間でガラスからの成分が溶出することと、C-SBF の方がアパタイト形成が速いことは相関していると思われる。

ガラス成分が SBF 中へ溶出することは、アパタイト形成の大きな要因となっているが、溶解によるガラス組成の変化を生じることは、生体親和性評価用の尺度標準材料特性として今後検討の余地を残す課題である。P を含んだ結晶化ガラスのような結合性の高い析出層を形成できる材料の検討も必要と思われる。

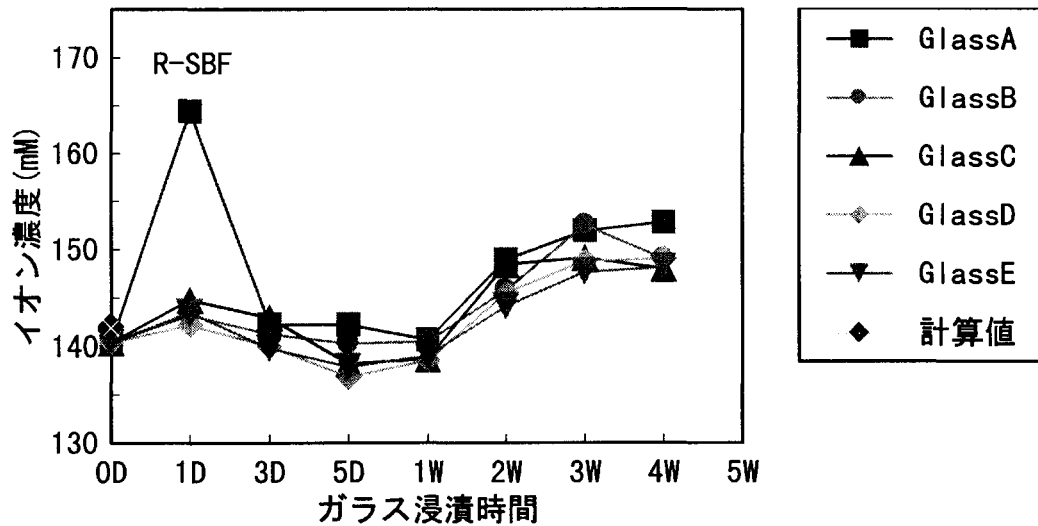
参考として、結晶化ガラスについて検討した結果を添付資料に示す。

⑤ 浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化

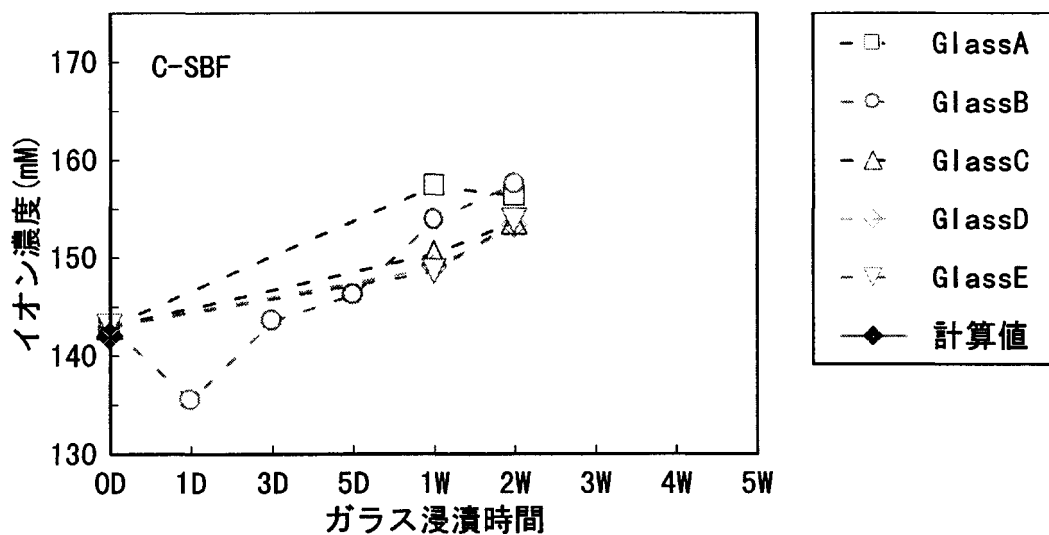
R-SBF 及び C-SBF に 5 種類 (A~E) のガラスを各期間浸漬し、取り出した後の SBF 中の Na, Si, Ca, P, Mg, K の無機イオン濃度及び pH 変化を測定した結果を以下に示す。

(a) 元素別変化

[Na]



(a) R-SBF

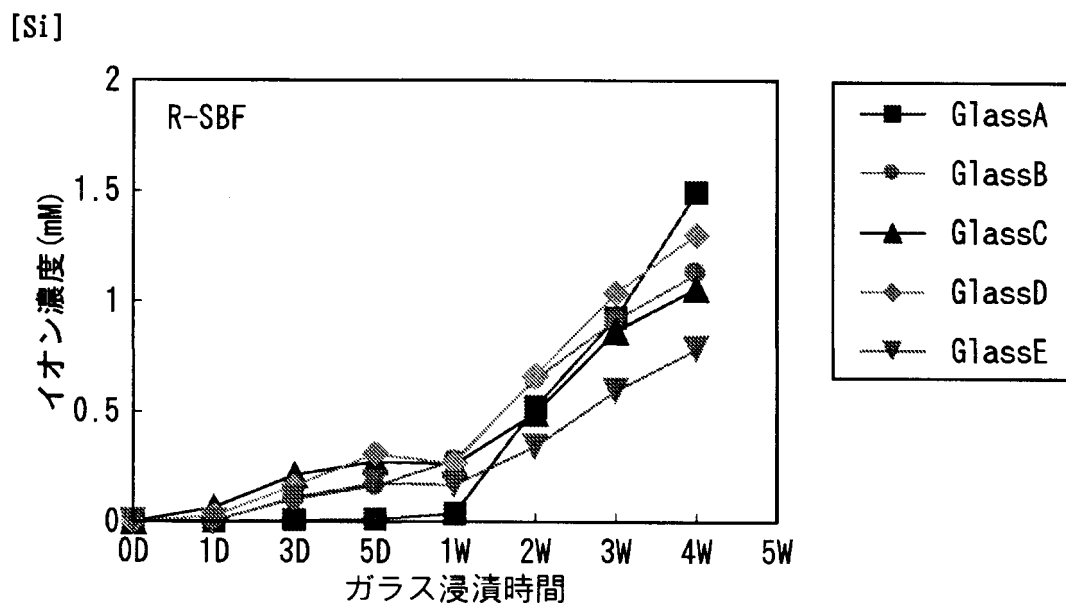


(b) C-SBF

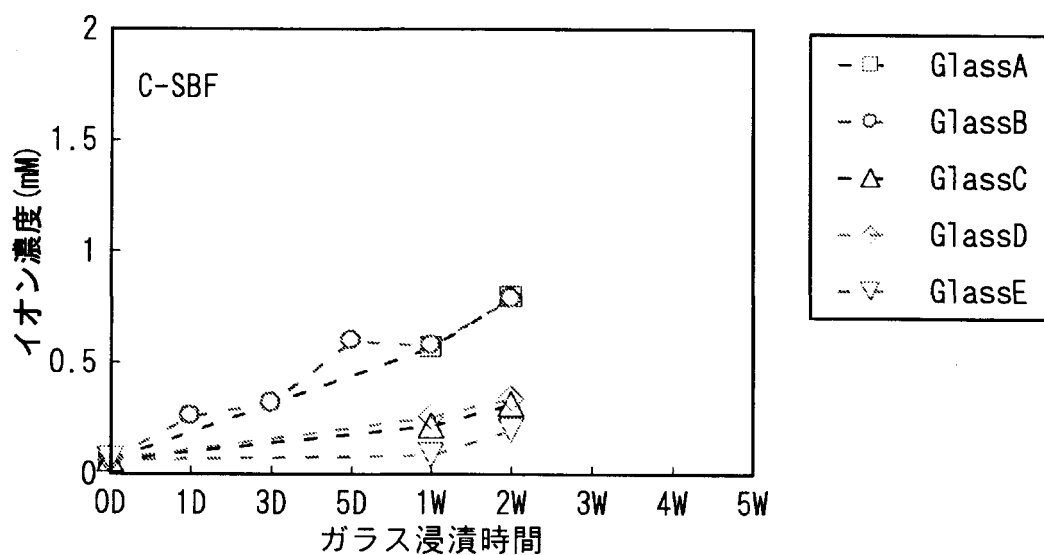
図 3-30-1 浸漬後 SBF 中の Na イオン濃度の変化

(a) R-SBF

(b) C-SBF



(a) R-SBF

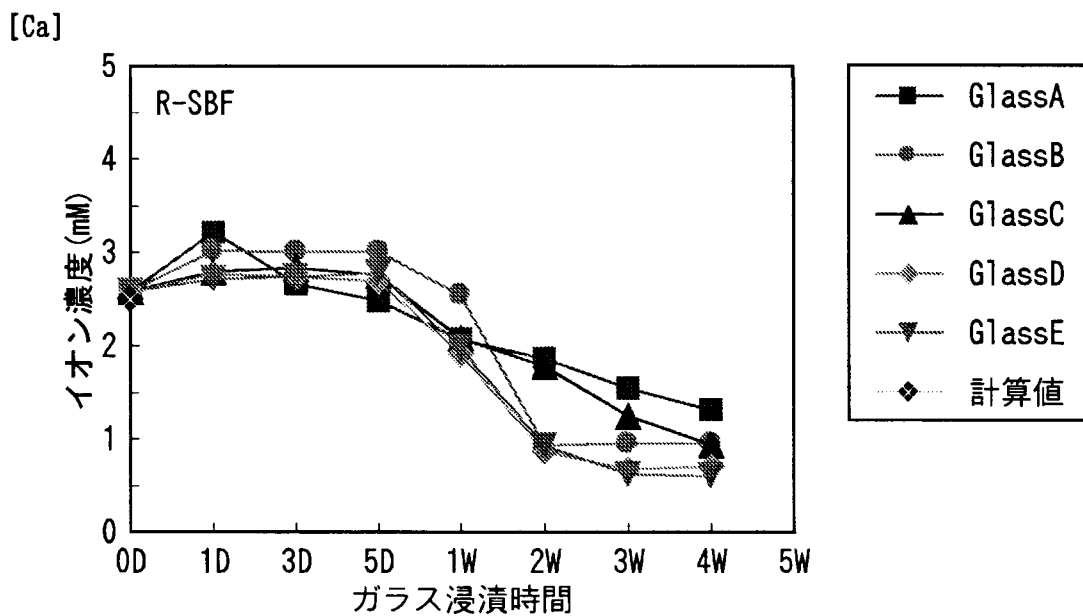


(b) C-SBF

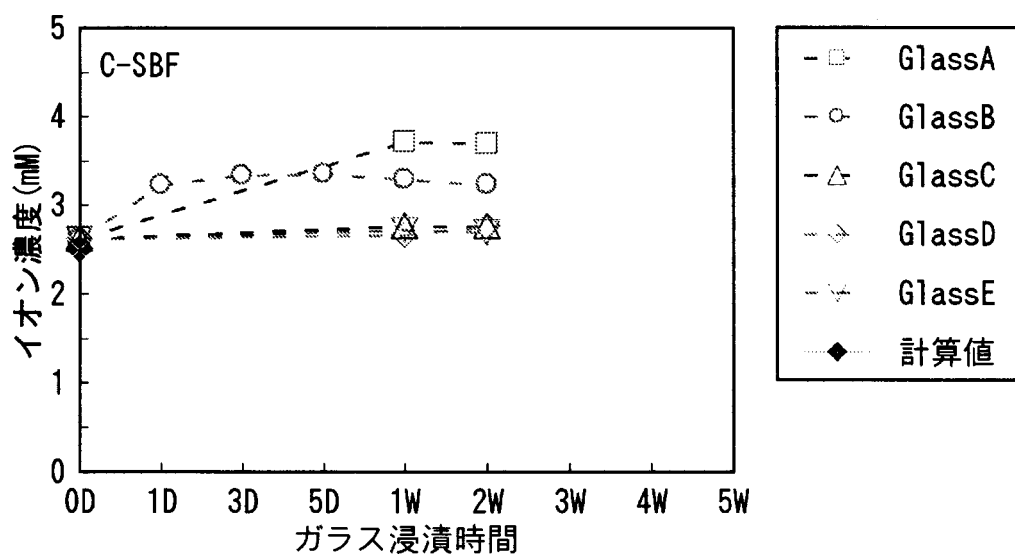
図 3-30-2 浸漬後 SBF 中の Si イオン濃度の変化

(a) R-SBF

(b) C-SBF



(a) R-SBF



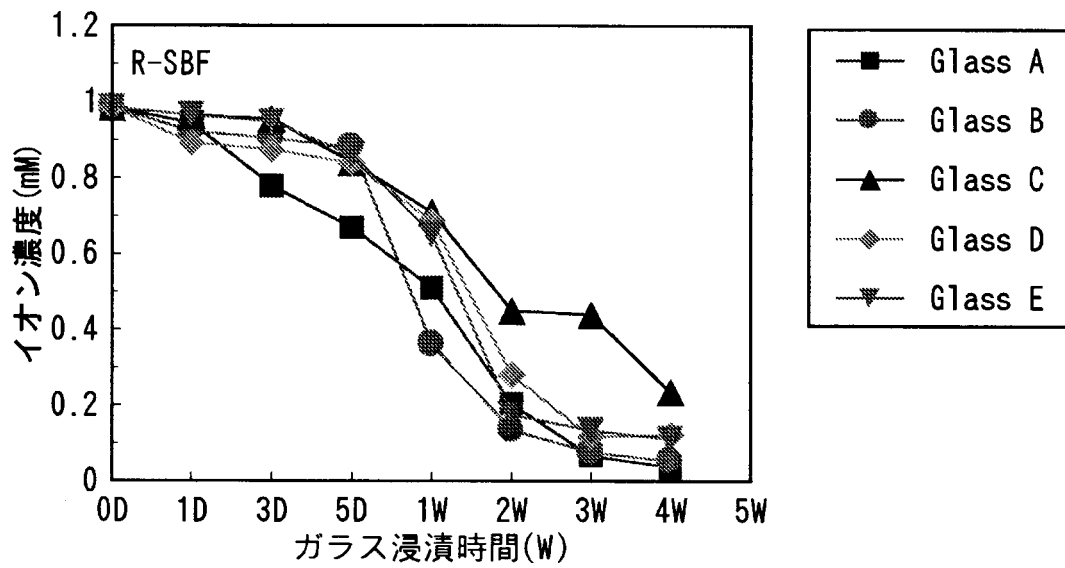
(b) C-SBF

図 3-30-3 浸漬後 SBF 中の Ca イオン濃度の変化

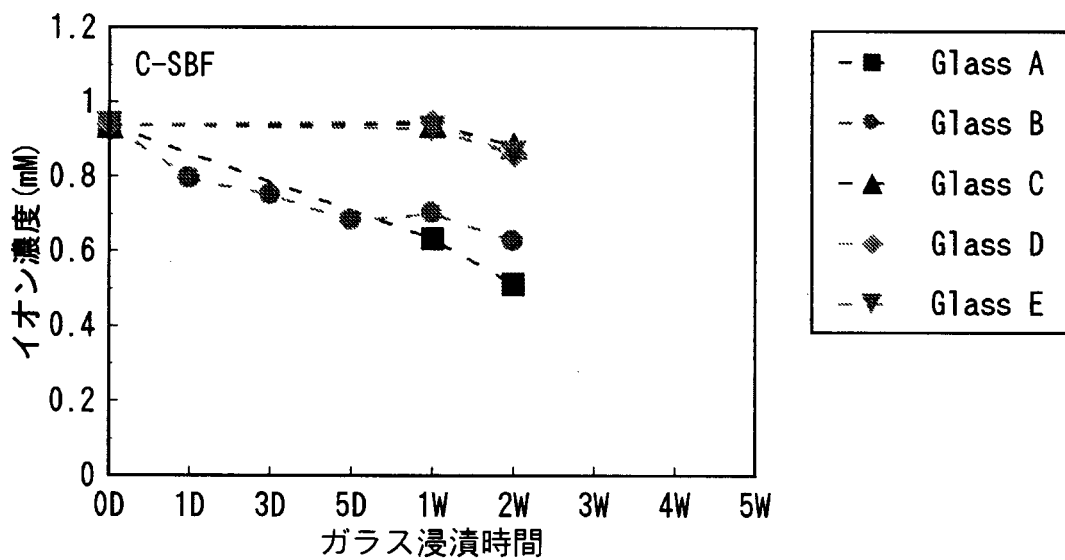
(a) R-SBF

(b) C-SBF

[P]



(a) R-SBF

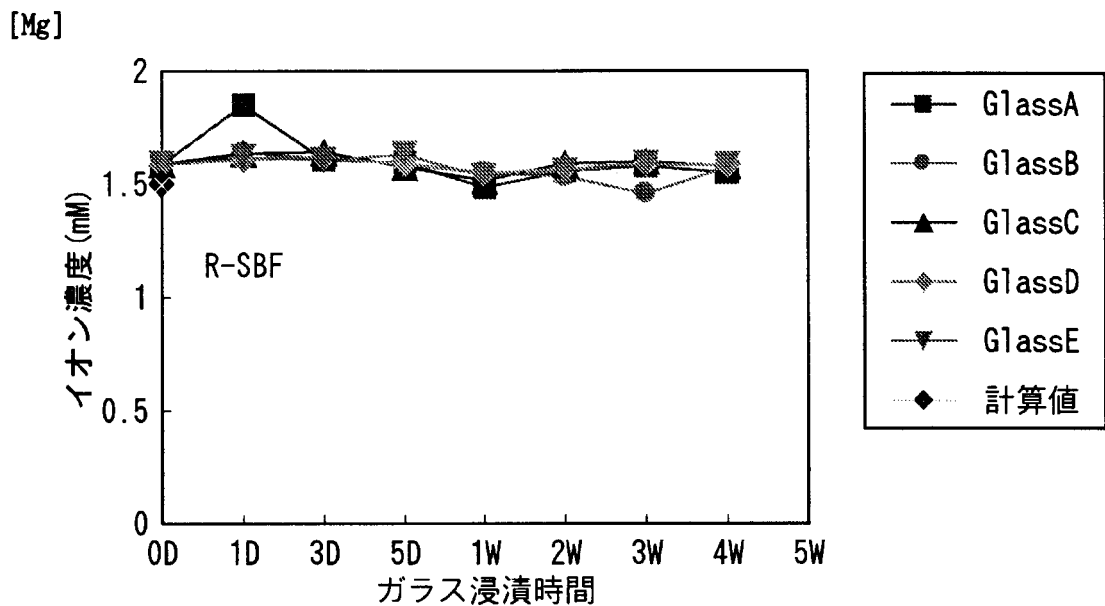


(b) C-SBF

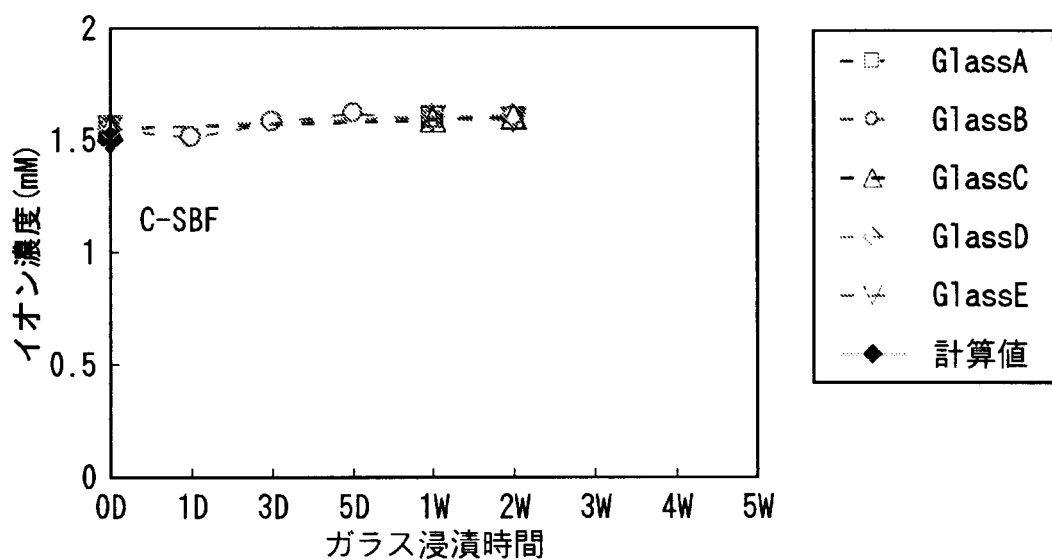
図 3-30-4 浸漬後 SBF 中の P イオン濃度の変化

(a) R-SBF

(b) C-SBF



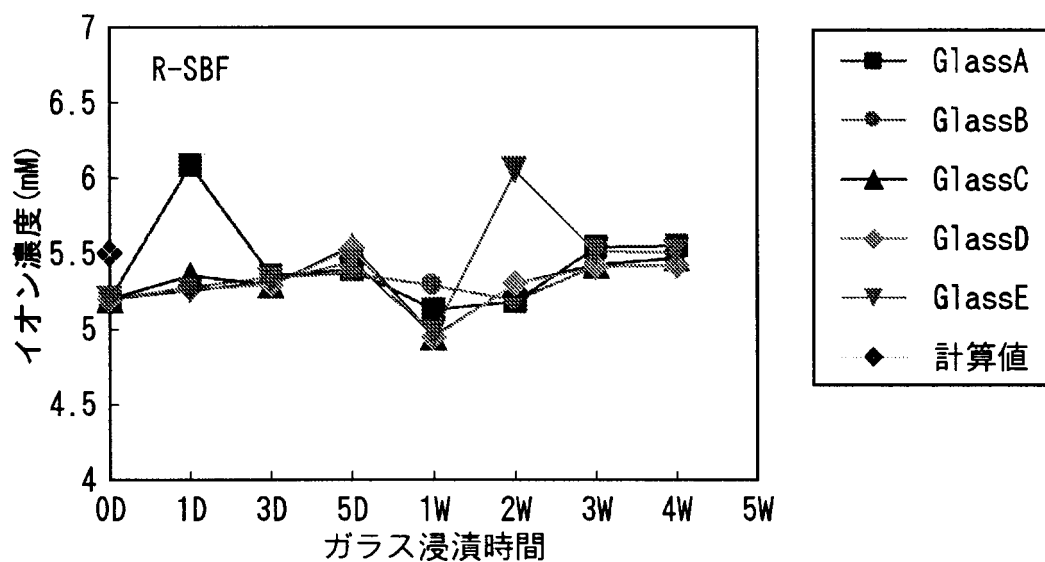
(a) R-SBF



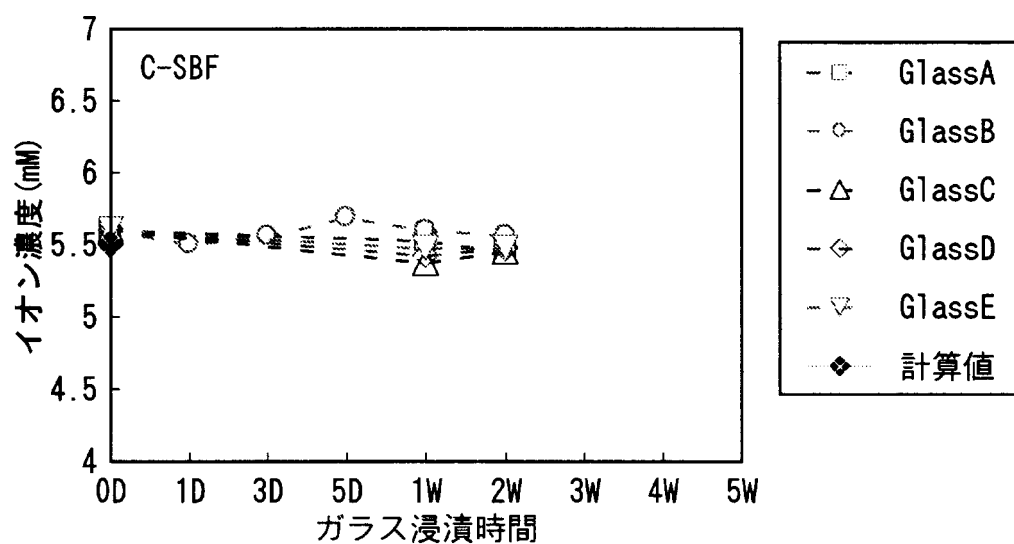
(b) C-SBF

図 3-30-5 浸漬後 SBF 中の Mg イオン濃度の変化
(a) R-SBF (b) C-SBF

[K]



(a) R-SBF



(b) C-SBF

図 3-30-6 浸漬後 SBF 中の K イオン濃度の変化

(a) R-SBF (b) C-SBF

pH

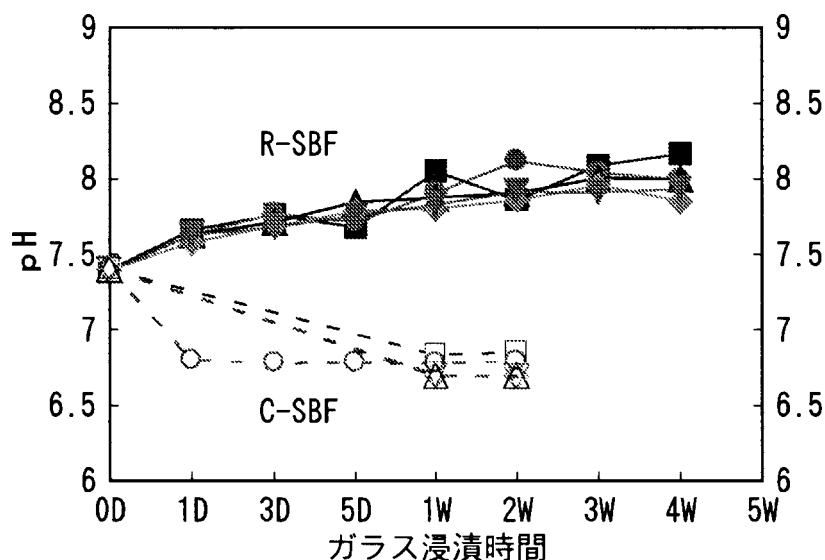


図 3-30-7 浸漬後 SBF の pH 変化

R-SBF と C-SBF 共に, [Na], [Si]は増加, [P]は減少し, [Mg], [K]はほぼ一定値を示していることがわかる。[Ca]は R-SBF では減少し, C-SBF では増加している。これらのイオン濃度の変動は主成分 Na, Si, Ca のガラスからの溶出, そしてアパタイト形成に用いられる P, Ca の減少に起因する。この増加は, C-SBF が酸性領域溶液であるためのガラスの溶出が著しいことにより, アパタイト形成に用いられるよりも Ca が多く溶出しているものと思われる。この SBF の性質の違いは浸漬後 SBF の pH 変化にも現われている。図 3-30-7 に示した結果によると, R-SBF では pH が上昇しアルカリ領域に, C-SBF では pH が下がり酸性領域に変動していることがわかる。この pH 変動もアパタイト形成に影響をしていると思われる。

[Na]は, 浸漬 2 週間までの段階で C-SBF の方が増加している。これは C-SBF が酸性領域溶液の作用だけでなく, R-SBF が pH 調整に 1MNaOH を用い, Na が多い溶液であるためガラスからの Na の溶出の抑制効果もあると思われる。R-SBF では浸漬後 1 週間から活性のある動きを見せていることが図 3-30-1 から確認される。この傾向は[Na]だけでなく, [Si]にも見られる。

アパタイト形成に関わる[P]及び[Ca]は両 SBF においてその相関性があり, P と Ca の変化挙動が類似している。Ca の挙動はガラスからの溶出量の影響があるため, P の方がアパタイト形成を反映した挙動をしていると推測される。R-SBF では, [P]が GlassA において一定の割合で減少する傾向が見られる。この傾向は, 浸漬後 1 日目より P を含む層中の P が浸漬時間と共に増し, 結晶性アパタイトが形成されていった SEM-EDS 結果とも一致する。GlassB でも GlassA と同様の傾向であったが, GlassB では浸漬後 5 日から 1 週間の間でアパタイト形成が著しく, P, Ca の強度が変化したことは, 図 3-30-4 に示した濃度変化にも現われている。また GlassC 以下では, Si に富む層の上に結晶性の高いアパタイト球が1週間を境に析出する傾向は図 3-30-4 に示す濃度変化と相関している。ただし, GlassC においては個体差が大きく, 再現性が悪かったために, 減少の

挙動が他のガラスと異なる結果となった。R-SBF では、図 2-1 のガラス組成依存に関わらず、P が減少しアパタイトが形成されていることが確認された。一方、C-SBF においては、SEM 観察及び TF-XRD の結果と同様に、GlassA, GlassB にのみ濃度変化が見られた。C-SBF では R-SBF と異なり、一定の割合で減少しているようである。Ca は 1 日浸漬の間に増えその後の濃度変化は一定であり、溶解する量と析出で減る量がバランスしていると考えられる。

各イオン濃度の変動結果は、TF-XRD 及び SEM 観察結果と同様に、C-SBF では図 2-1 に依存して変動し、R-SBF では組成依存性とは異なった変動をしていることを示している。またアパタイト形成に関与するイオン濃度の変動は、R-SBF 及び C-SBF の液性等を反映した結果であることが確認された。

(b) ガラス別変化

イオン濃度及びpH変化をGlassA～GlassE別に図3-31にまとめて示す。

<GlassA>

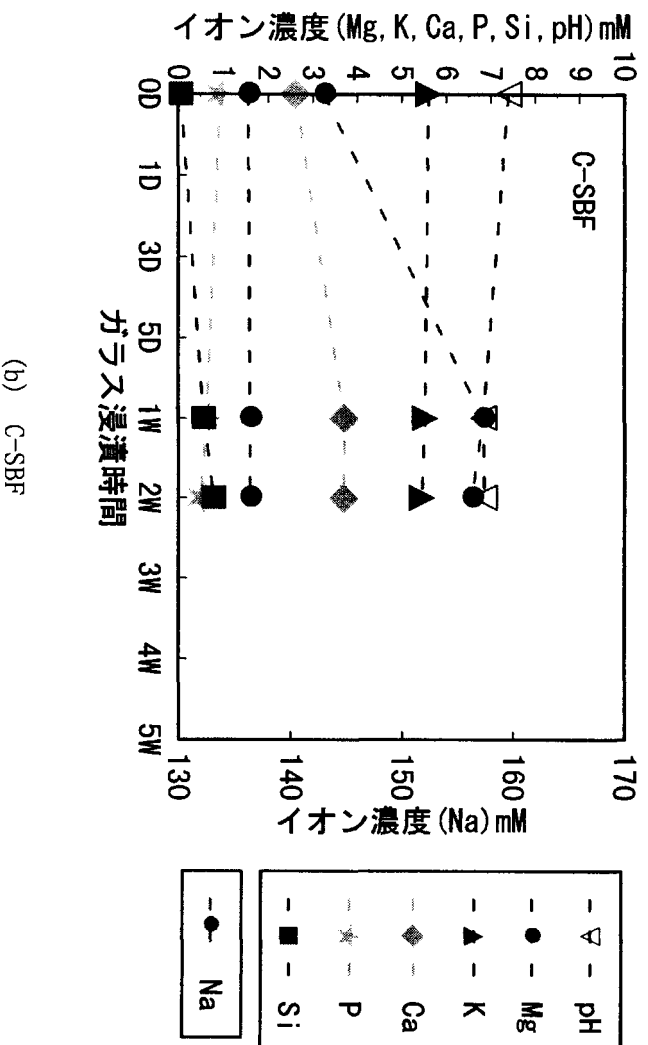
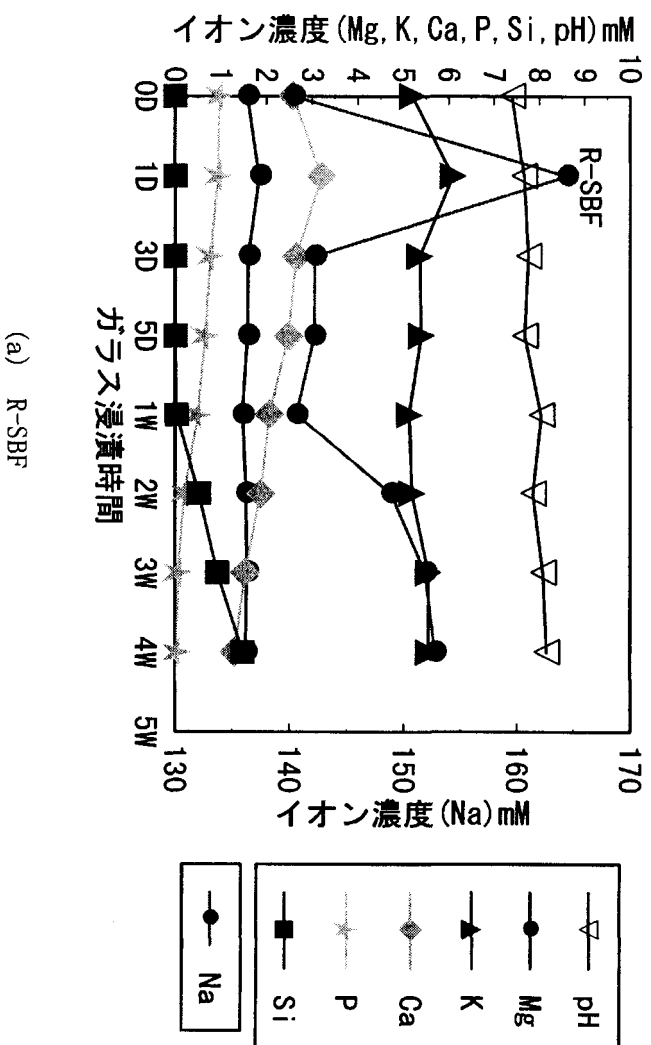
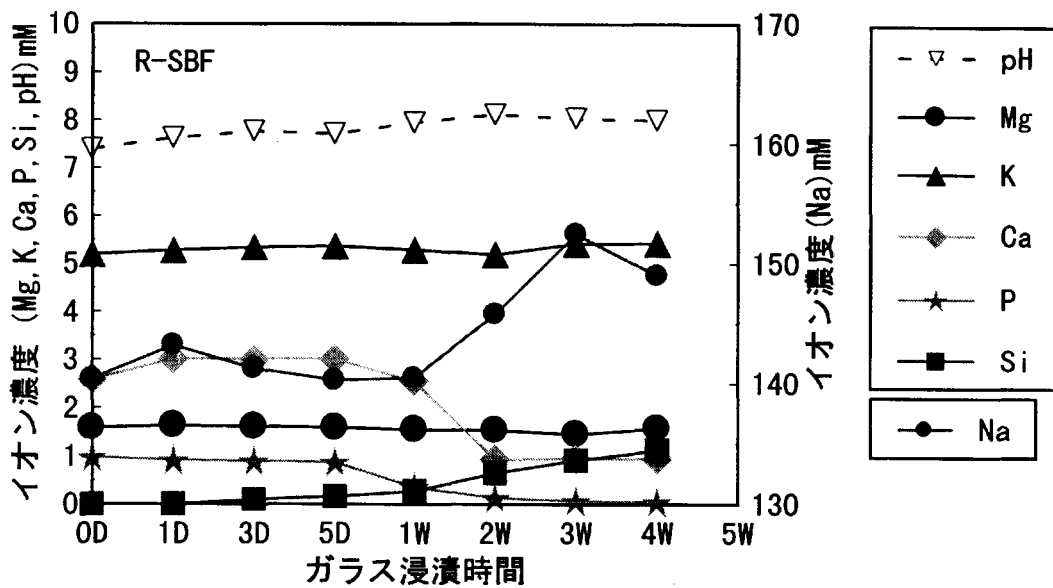


図3-31-1 GlassA浸漬後SBF中の無機イオン濃度及びpH変化

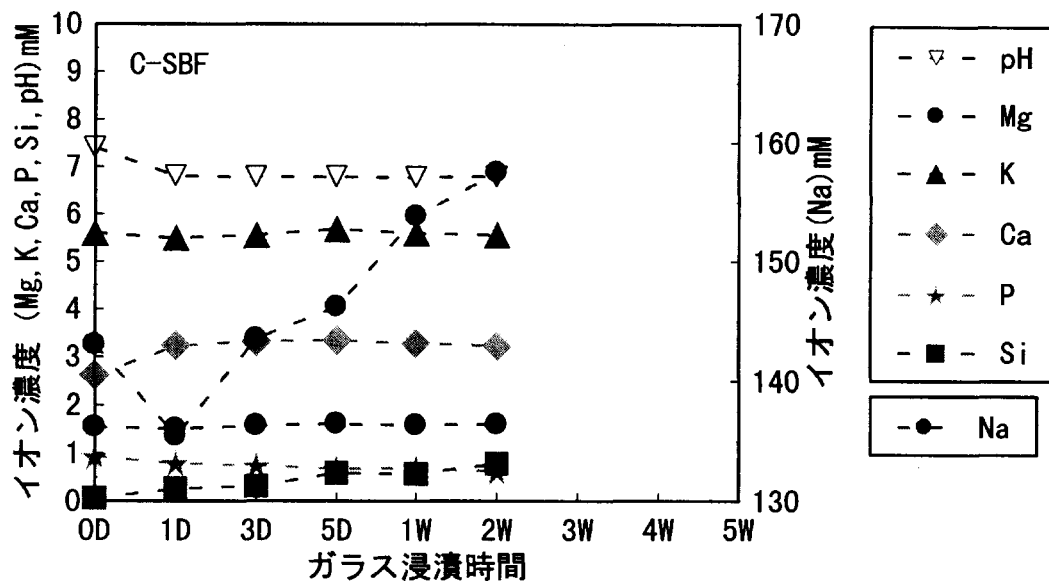
(a) R-SBF

(b) C-SBF

<GlassB>



(a) R-SBF



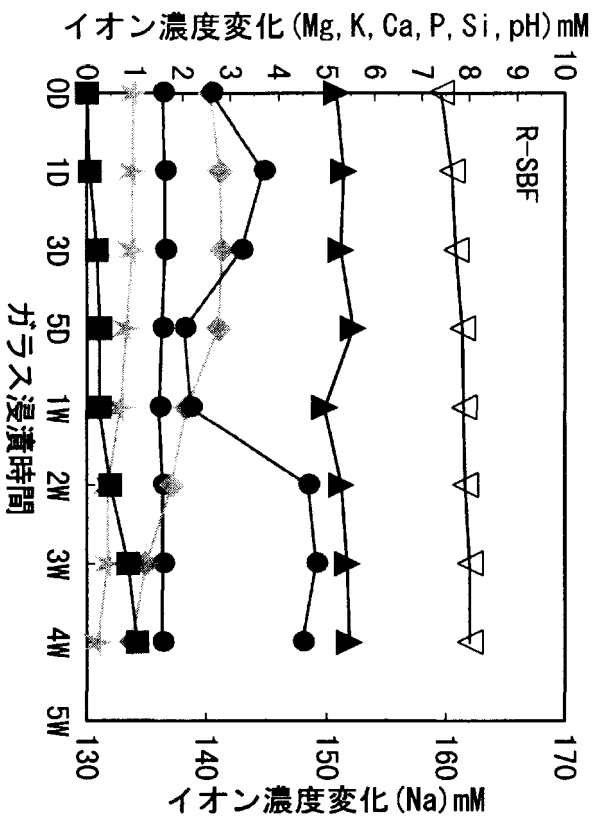
(b) C-SBF

図 3-31-2 GlassB 浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化

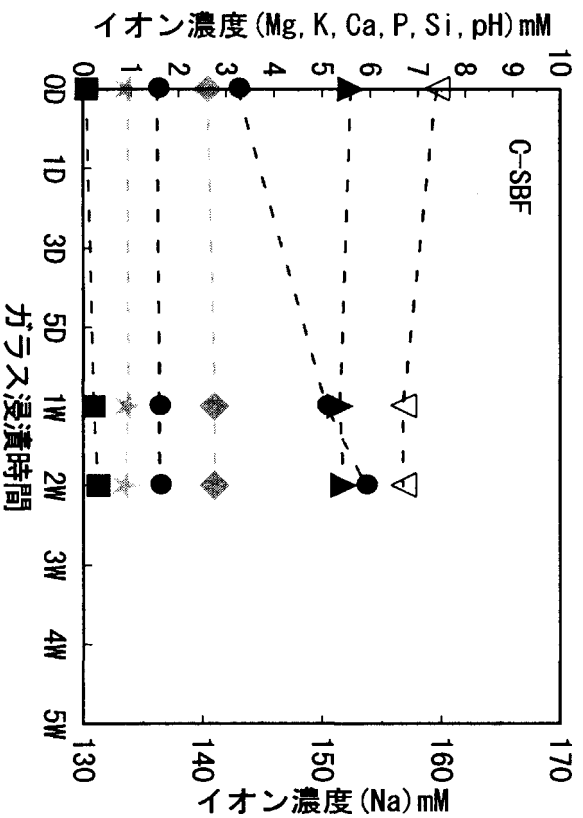
(a) R-SBF

(b) C-SBF

<GlassC>



(a) R-SBF



(b) C-SBF

図 3-31-3 GlassC 浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化

(a) R-SBF

(b) C-SBF

<GlassD>

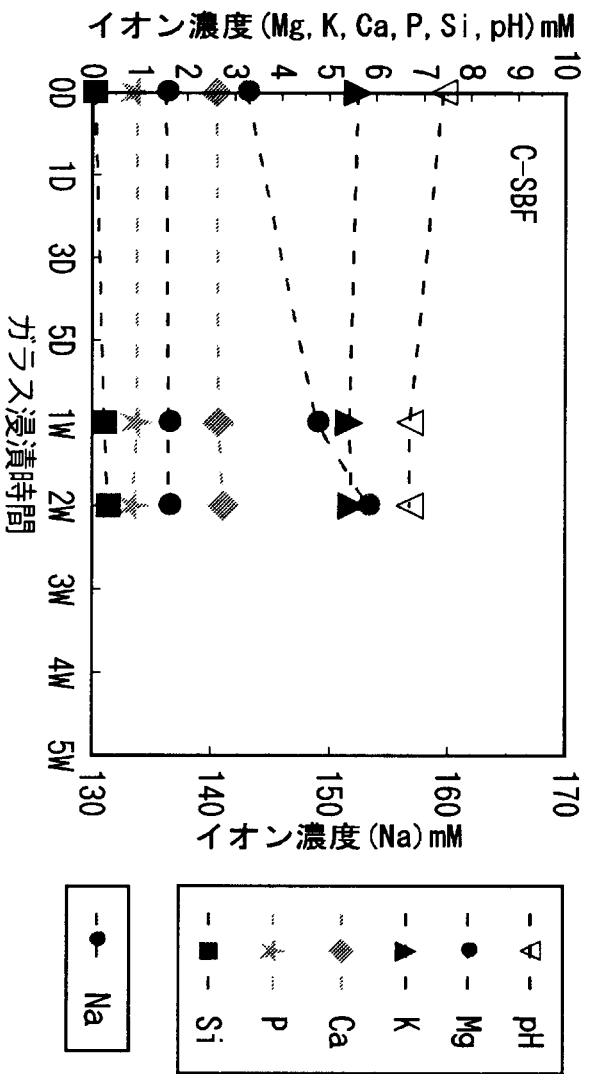
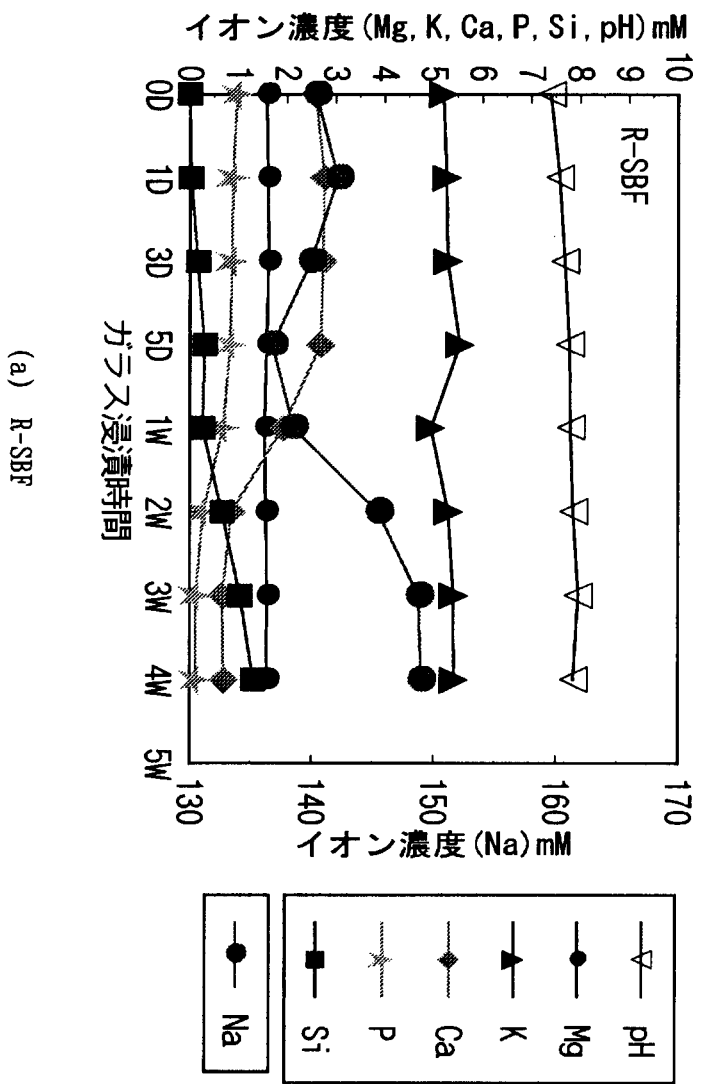
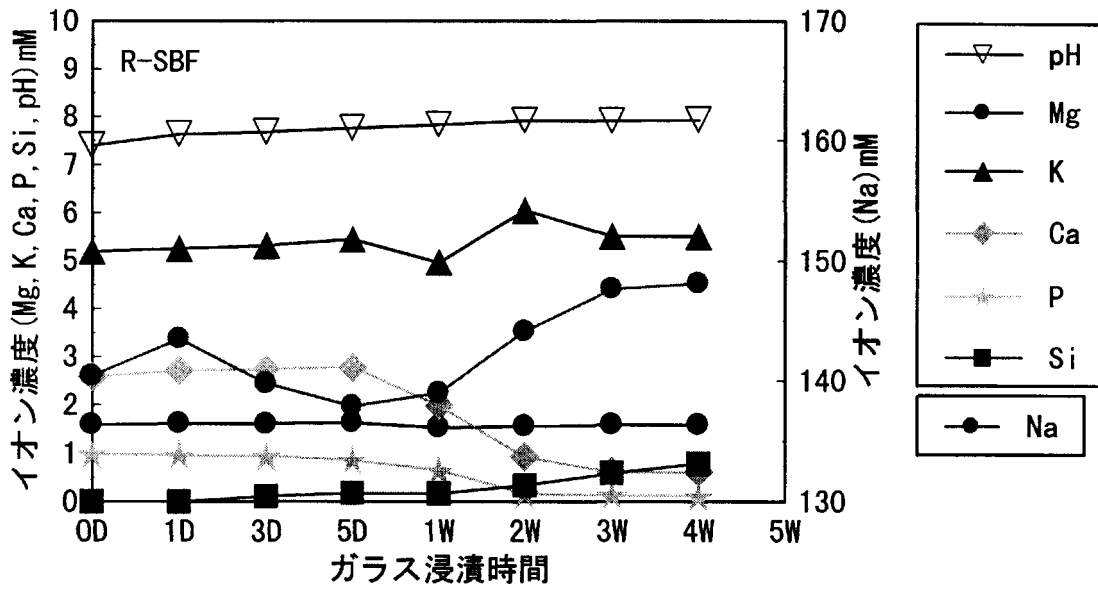
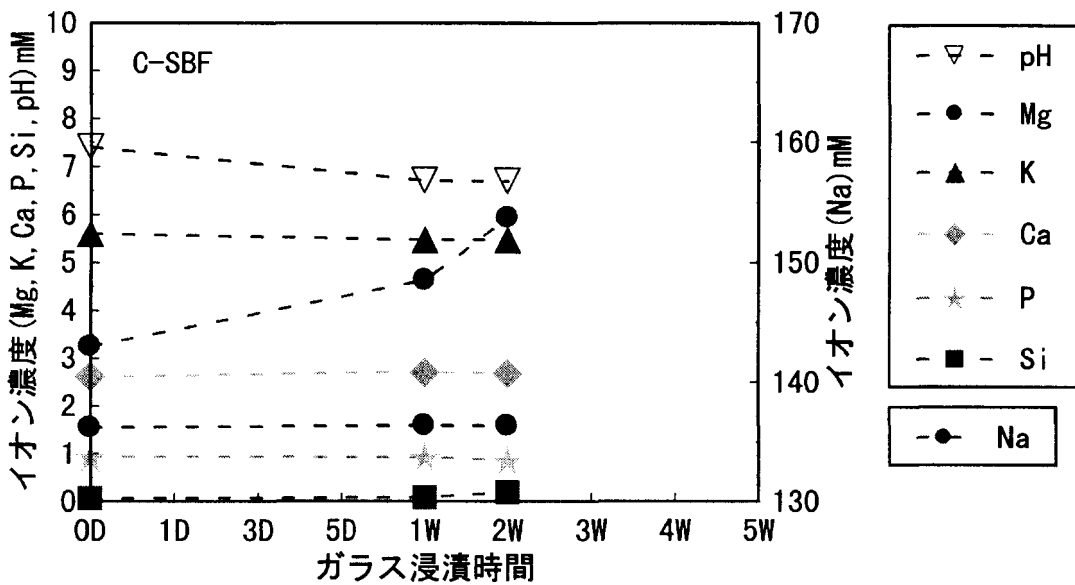


図 3-31-4 GlassD 浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化
(a) R-SBF (b) C-SBF

<GlassE>



(a) R-SBF



(b) C-SBF

図 3-31-5 GlassE 浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化

(a) R-SBF

(b) C-SBF

まとめ： 浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化を測定した。XRD 解析及び SEM 観察と同様に R-SBF では、図 2-1 のガラス組成依存性から外れた結果が得られ、C-SBF ではガラス組成依存に合致する結果が得られた。また、R-SBF の結果には全体にばらつきが見られた。これらの原因は R-SBF と C-SBF の溶液の性質が影響していると推測される。

アパタイト形成は[P]及び[Ca]の変化から確認することができた。このイオン濃度変化は SEM-EDX 観察によるアパタイト形成過程の進行と相関する結果であった。

⑥ 浸漬実験結果のまとめ

R-SBF 及び C-SBF を用いて、生体活性の異なる 5 種類のガラスを浸漬し、アパタイト形成能の評価を行った。その結果、R-SBF では XRD 解析によって GlassA 及び B で炭酸カルシウムの生成が浸漬後 1 日目より観測された。その後、浸漬時間の経過に伴いその信号は弱くなり、GlassA では 3 日、GlassB では 1 週間で消失し、アパタイト固有の信号が出現した。一方、GlassC では浸漬時間に関係なく全くどの信号も現われなかった。しかし、より生体活性が低い GlassD 及び E では浸漬後 1 週間及び 2 週間でアパタイト形成を示すピークが確認された。

SEM 観察では、GlassA で 5 日、GlassB 以下では 1 週間でアパタイトの鱗片状結晶が確認された。また、浸漬後の SBF 中の無機イオン濃度変化とアパタイト形成傾向とは正の相関関係が見られた。これらの結果から、R-SBF では図 2-1 に示されたガラス組成依存性とは異なることがわかった。この原因としては、R-SBF の pH 調整で用いる 1 M NaOH 及び浸漬中の R-SBF の pH の上昇が、アパタイト形成のメカニズムと考えられるガラス成分からの Na の溶出の抑制効果として働き、SBF 溶液とガラス組成との間にアパタイト析出速度に影響を及ぼしたと考えられる。

一方、CO₂雰囲気下の C-SBF では XRD 解析によって GlassA 及び B では浸漬 1 日目でアパタイト固有の信号が得られ、GlassC 以下では 2 週間浸漬では全く信号は検出されなかった。SEM-EDS 結果でも GlassA 及び B では 1 日目よりアパタイト結晶の生成が確認された。GlassC ~E ではシリカゲル層が形成されていた。浸漬後 SBF のイオン濃度変化は GlassA 及び B で大きく、GlassC ~E ではほとんど変化を示さなかった。CO₂雰囲気下の C-SBF では図 2-1 に示されたガラス組成依存性と一致する結果であった。解析の結果から、CO₂ 雰囲気下の C-SBF では R-SBF よりもアパタイト形成速度が速いことが確認された。CO₂雰囲気下の C-SBF 浸漬では、ガラス浸漬後に pH が酸性に変化し、ガラス成分の溶出が早まるためと思われる。

今回の実験により 2 種類の擬似体液、R-SBF 及び CO₂雰囲気下 C-SBF の液性の違いにより、アパタイト形成過程に異なった挙動が確認された。この SBF の液性の違いによるアパタイト形成挙動については検討が必要である。浸漬時の浸漬管内の空隙を無くし、SBF を満たすことによって、SBF 中の HCO₃⁻イオンから CO₂としての揮散を押さえ、pH 変化を抑制することが可能と考えられる。

目的とする材料の生体親和性を評価するには、評価期間が短いという条件だけでなく、簡易で且つ正確で再現性のある方法が重要である。標準的な評価期間を 1 週間以内とした時に、アパタイト形成過程やその再現性及びアパタイト膜の密着性等、信頼性と再現性のある情報が得られる標識材料の選択が求められる。本年度検討した 5 種類のガラスの結果からは GlassB が適していると判定された。次節では GlassB に関する情報をまとめる。

結晶構造解析

R-SBF 及び CO₂ 雰囲気下 C-SBF に浸漬した GlassB の TF-XRD 解析結果を示す。

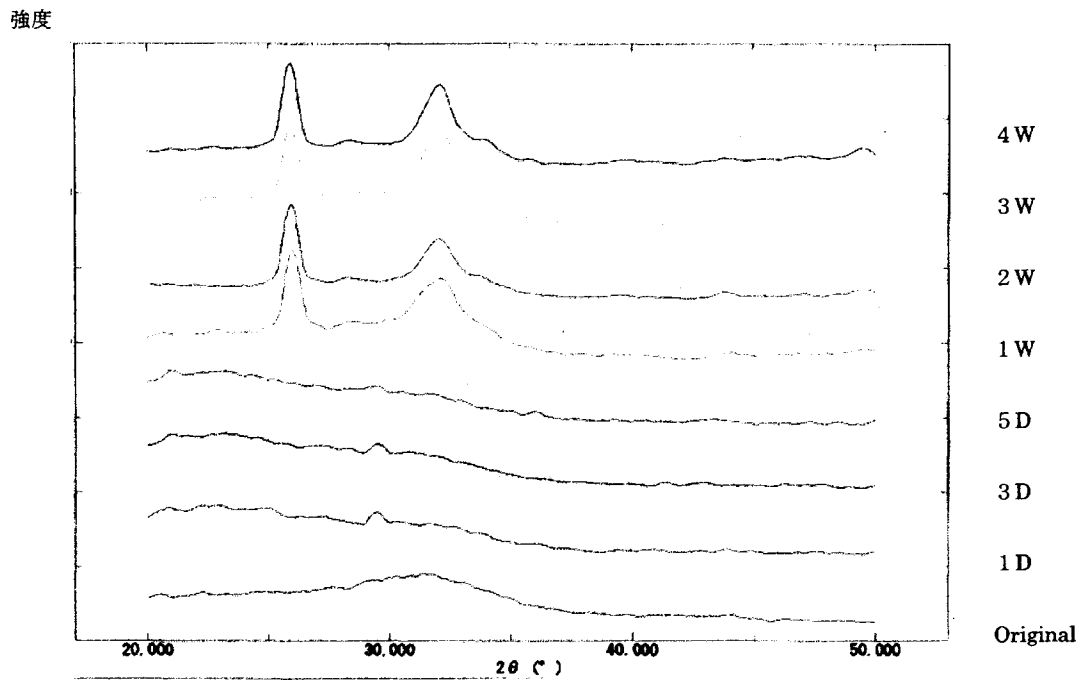


図 3-35-1 R-SBF 浸漬の GlassB の XRD 回折パターン
(1 週間浸漬でアパタイト形成)

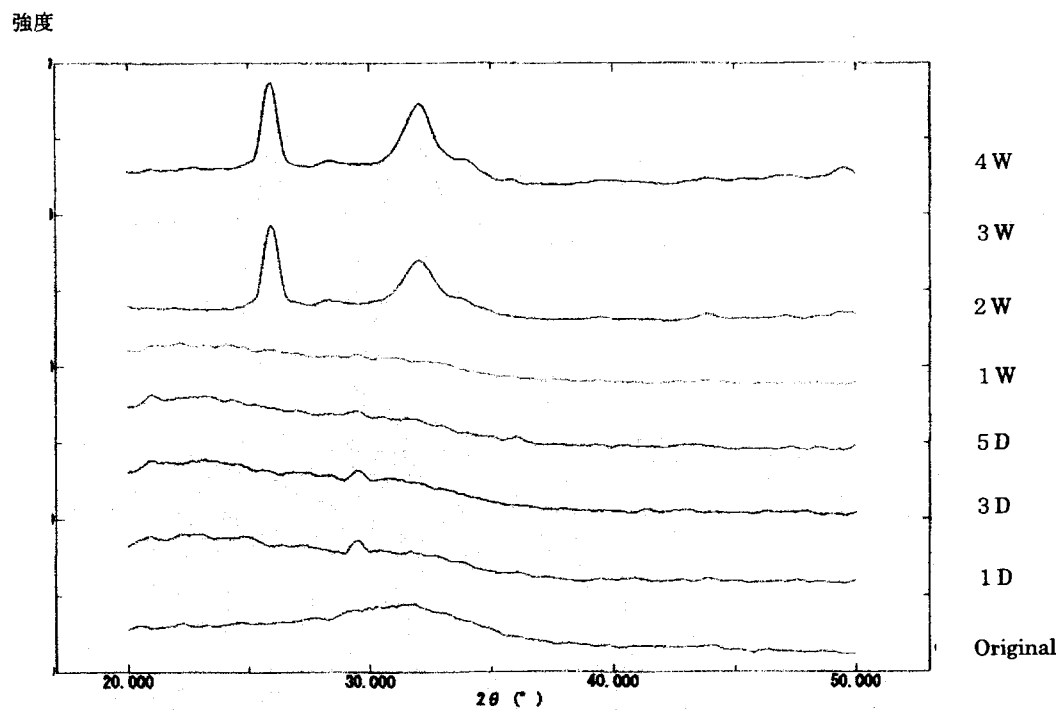


図 3-35-2 R-SBF 浸漬の GlassB の XRD 回折パターン
(1 週間浸漬でアパタイト形成していない)

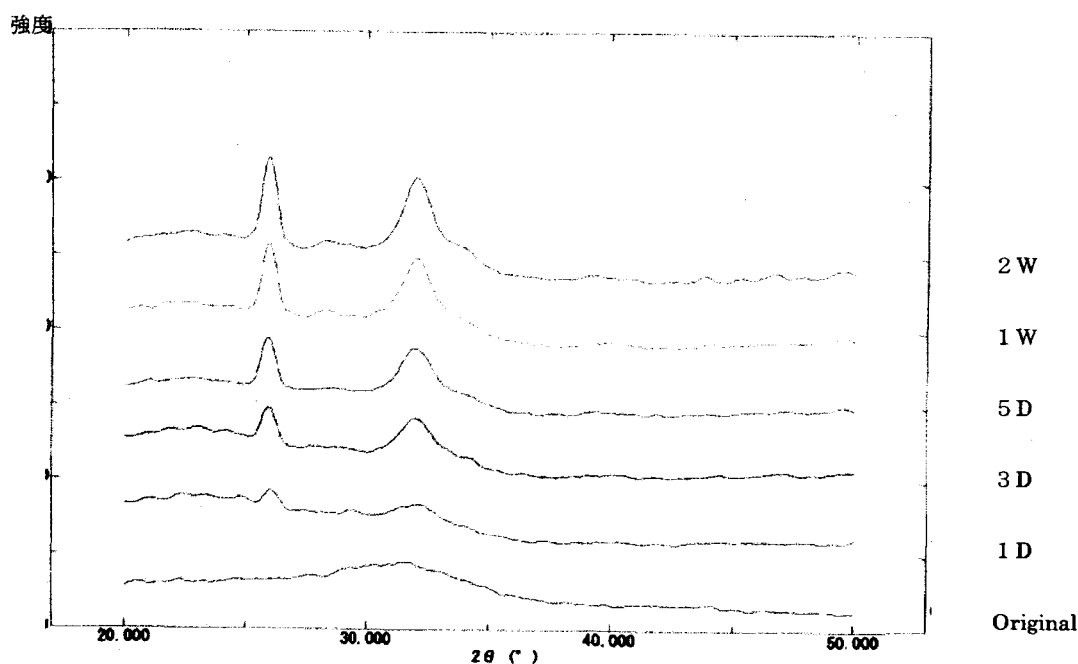


図 3-36 CO₂雰囲気下 C-SBF 浸漬の GlassB の XRD 回折パターン
(1 日浸漬でアパタイトを形成)

図 3-35-1 及び 3-35-2 は R-SBF での回折パターン変化である。1 週間浸漬においてアパタイト固有のピークを示すガラスと、まだ炭酸カルシウムのピークを示しアパタイト固有のピークを示さないガラスが確認されたことを示している。CO₂雰囲気下 C-SBF に浸漬した GlassB の XRD 回折パターン結果を図 3-35-3 に示す。アパタイト固有のスペクトルが 1 日浸漬で現われていることが確認された。

この結果より GlassB を用いた CO₂雰囲気下 C-SBF 浸漬における XRD によるアパタイトの判定は、浸漬期間が 1 週間で十分であることがわかる。CO₂雰囲気下 C-SBF を用いた GlassA では 1 日浸漬でアパタイト固有のピークが得られ、GlassB においても短期間での判定が可能であることが予測される。

R-SBF を用いた GlassB での浸漬においては、XRD によるアパタイト形成評価の結果、浸漬時間が 1 週間を境にアパタイト形成が活性になっていることが確認された。浸漬期間 1 週間を生体活性評価の目安とし、再現性の検討を行った。再現性の検討実験結果を次節に示す。

・ガラス重量変化

浸漬後 GlassB の重量変化を測定した。その結果を図 3-37 に示す。

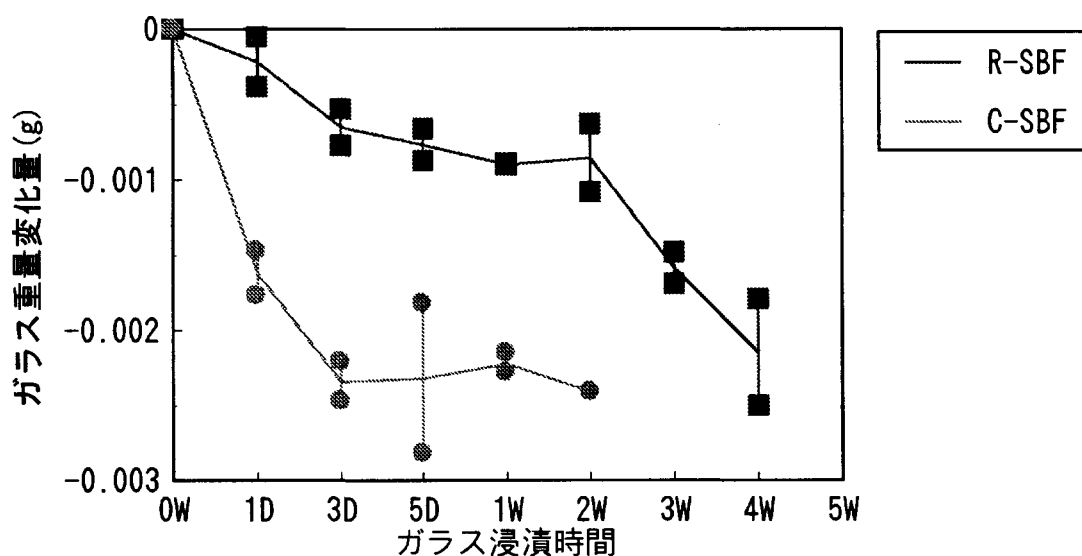
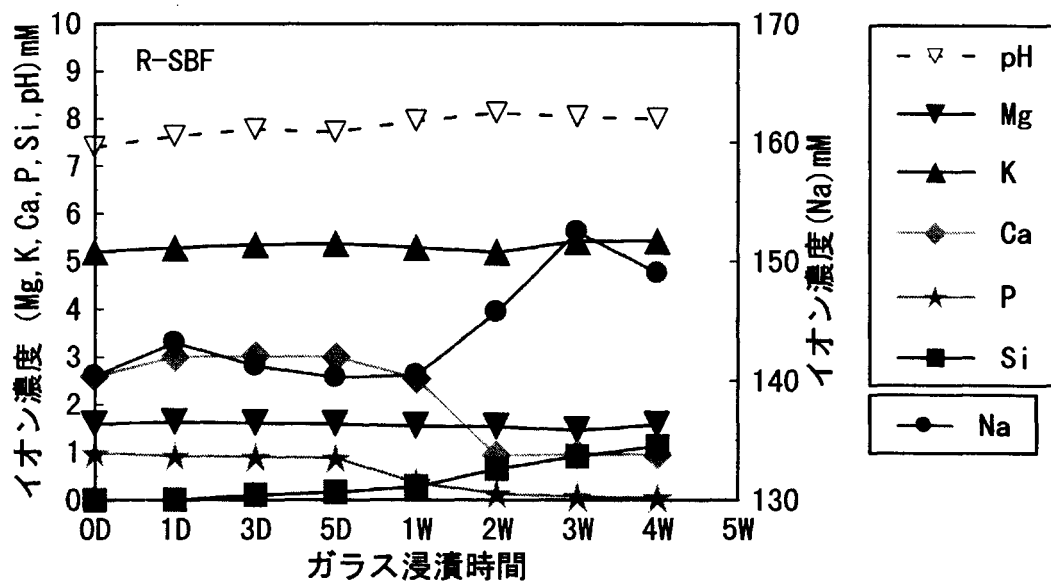


図 3-37 R-SBF 及び CO₂雰囲気下 C-SBF 浸漬による GlassB の重量変化 (N=2)

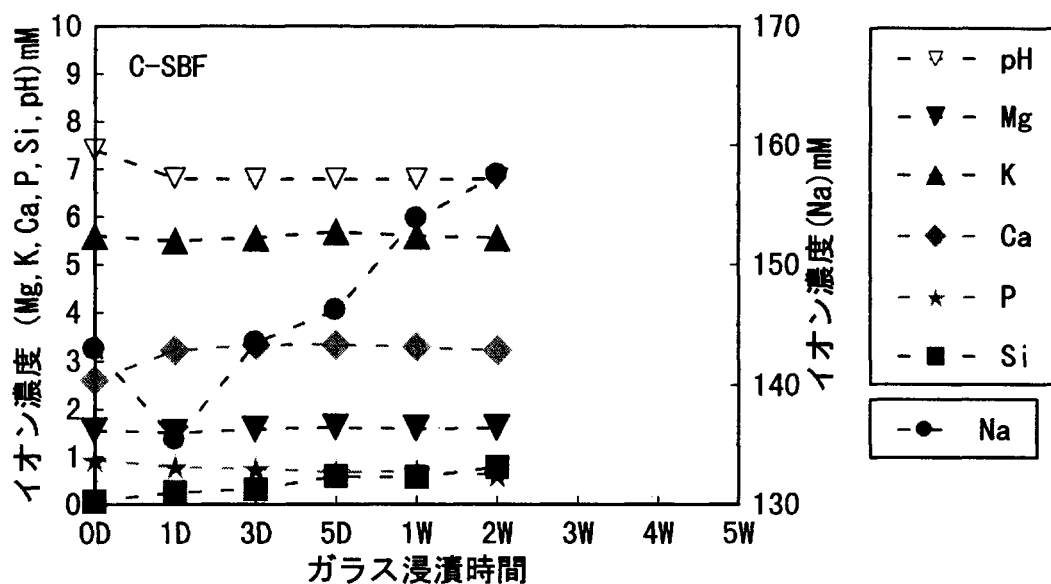
図 3-37 の結果より、R-SBF 及び CO₂雰囲気下 C-SBF 共に浸漬時間が長くなるにつれ、その重量は減少していく。CO₂雰囲気下 C-SBF では浸漬 3 日までの間の減少率が著しくその後はほぼ安定し、R-SBF ではゆっくりと減少し 2 週間以降に減少していることがわかる。前述したように CO₂雰囲気下 C-SBF の pH がガラス浸漬後酸性領域に変化し、ガラスからの溶出が著しくなると考えられ、ガラス重量の減少率に影響していると考えられる。R-SBF では、ガラス浸漬後に pH がアルカリ側に変化するため、ガラスからの Na の溶出が抑制されていることが推測される。R-SBF 及び C-SBF 何れも、各浸漬期間の 2 試料間でのその再現性は悪くない。

・浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化

GlassB 浸漬による無機イオン濃度及び pH の経時変化を図 3-38 に示す。



(a) R-SBF



(b) CO₂ 雰囲気下 C-SBF

図 3-38-1 GlassB 浸漬後 SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化

(a) R-SBF

(b) CO₂ 雰囲気下 C-SBF

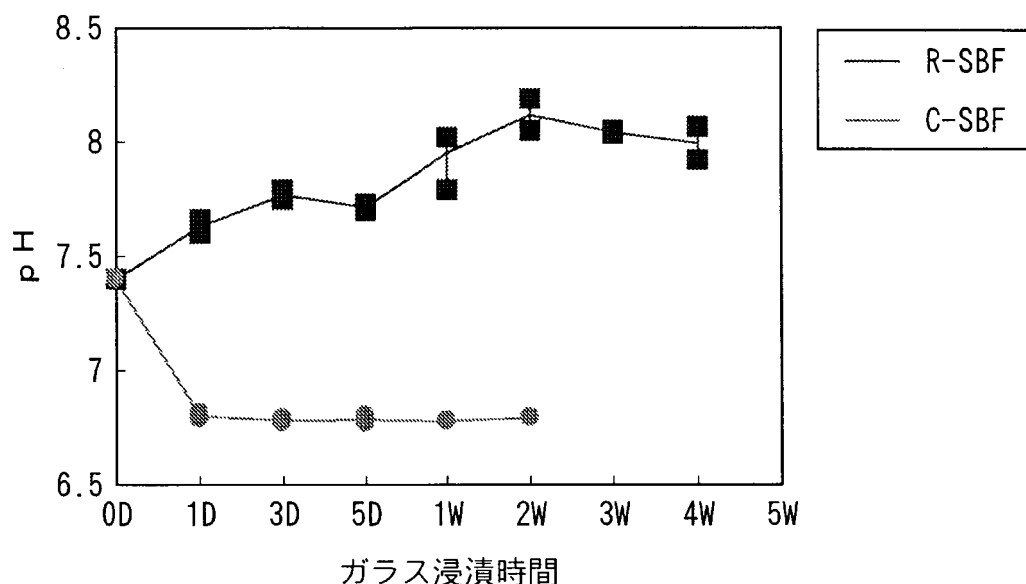


図 3-38-2 GlassB 浸漬後 SBF の pH 変化 (N=2)

R-SBF では 1 週間を境とし [Na], [Si] が増加し, [P], [Ca] は 5 日浸漬後から減少し始め, 1 週間より減少が著しくなることが確認された。これは R-SBF 中でのガラス溶出が 1 週間を境に活性になっていることを示し, このガラス成分の溶出により, 溶液とガラス間のネットワークが活性化され, アパタイト形成が促進されることを示している。また pH の挙動は増加傾向にあり, その再現性には若干のばらつきがみられた。

一方, CO₂ 雰囲気下 C-SBF では, [Na] が 1 日浸漬により一度減少し, その後増加していることが確認された。これは GlassA の時の挙動とは異なる。この点に関しては検討が必要であるが, [Na] の増加は R-SBF よりも顕著である。これは CO₂ 雰囲気下 C-SBF が酸性溶液であることによるものであろう。このため [Ca] はアパタイト形成に用いられるよりもガラスからの溶出が多いため, [P] の減少にも関わらず 1 日浸漬で増加する。CO₂ 雰囲気下 C-SBF では 1 日でのアパタイト形成が確認され, 1 日以内の短期間でアパタイト形成が進行していることが GlassB において確認された。pH の変化は 1 日で減少し, その後はほぼ一定値を保っている。14.8kPa の CO₂ 雰囲気下で平衡状態になっているためであり, その再現性は良い。

・TF-XRD 回折結果

TF-XRD の解析結果を以下に示す。

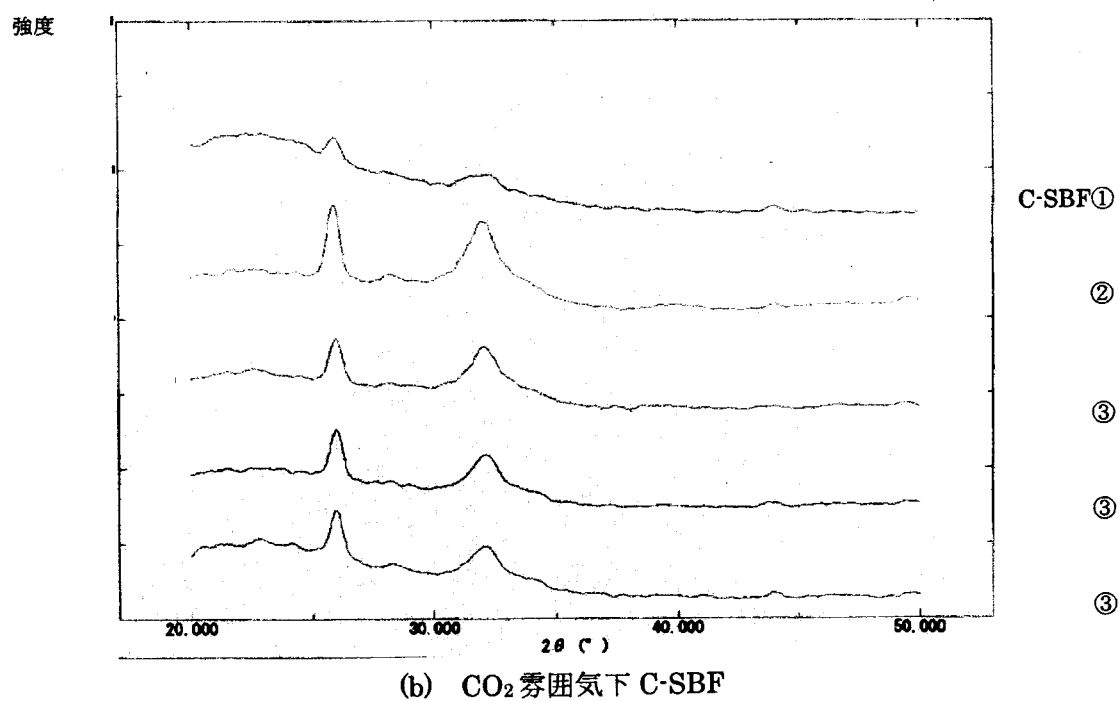
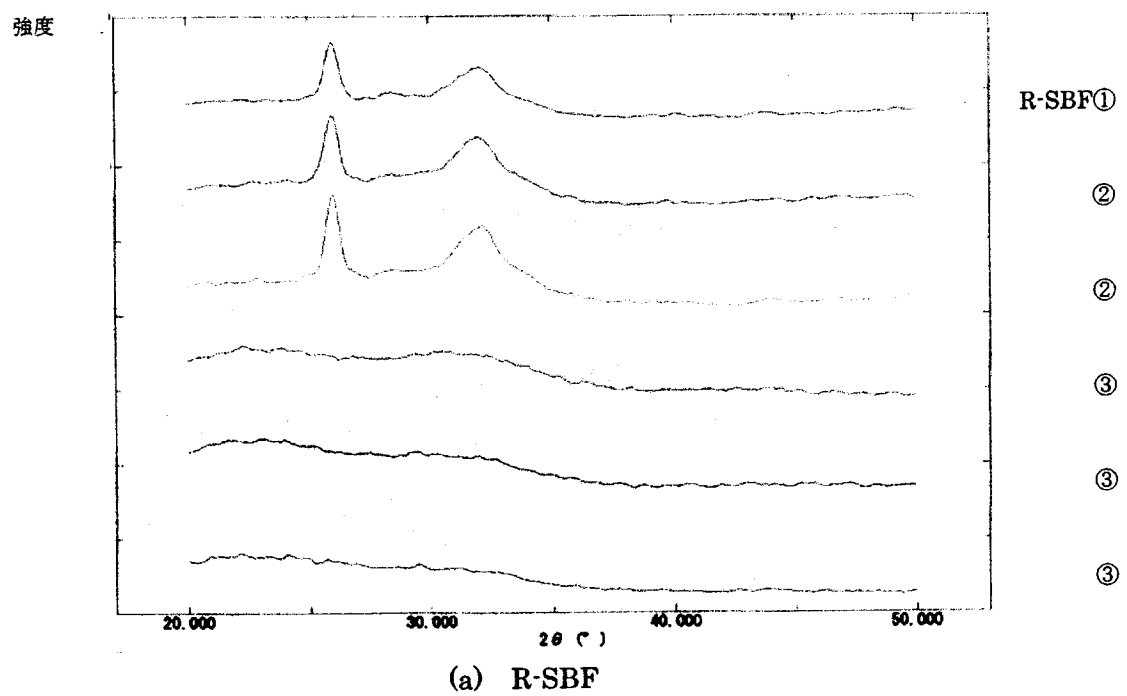


図 3-40 R-SBF 及び CO₂雰囲気下 C-SBF 1 週間浸漬での再現性

(a) R-SBF (b) CO₂雰囲気下 C-SBF

表 3-9 R-SBF の再現性

(R-SBF)	①	①	②	③	③	③
試 料	1	2	3	4	5	6
重量変化(g)	+0.00016	-0.00006	-0.00090	-0.00091	-0.00075	-0.00103
pH	7.65	7.69	7.60	7.73	7.91	7.95
[P] (mM)	0.381	0.367	0.328	0.666	0.748	0.908
[Ca](mM)	1.91	1.70	2.01	3.10	2.81	2.80

(C-SBF)	①	②	③	③	③
試 料	1	2	3	4	5
重量変化(g)	-0.00270	-0.00215	-0.00221	-0.00236	-0.00228
pH	6.80	6.78	6.78	6.79	6.79
[P] (mM)	0.706	0.633	0.699	0.701	0.683
[Ca] (mM)	3.28	3.27	3.21	3.38	3.29

図 3-40 中の SBF①, ②, ③は, 各 SBF を時期の異なる時に調製し, 1 週間の浸漬実験を行ったことを示している。R-SBF 及び CO₂ 雰囲気下 C-SBF 共に, ①, ②, ③の同一の SBF 間で得られたガラス試料の再現性は良いことが確認された。しかし, R-SBF では R-SBF③の溶液でアパタイト固有の XRF 回折パターンを示さない結果が得られた。R-SBF③の浸漬後 SBF のイオン濃度及び pH 変化については, P と Ca の濃度及び pH の減少の度合いが少ないことを除き, R-SBF ①及び②と大きな差は認められなかった。R-SBF と GlassB とのガラスネットワーク間が R-SBF ①, ②と異なったためにアパタイト形成速度が遅いものと思われる。R-SBF では 6 試料のうち 3 試料が 1 週間浸漬ではアパタイト固有の XRF 回折パターンを示さなかった。

これに対して, CO₂ 雰囲気下 C-SBF では, そのピーク強度の差はあるが, 全ての試料について 1 週間浸漬でアパタイト固有のピークを示した。

XRD によるアパタイト形成の判定では, R-SBF の再現性が低い結果であった。

SEM 観察結果では, GlassB を R-SBF と CO₂ 雰囲気下 C-SBF に浸漬させた結果, アパタイト結晶特有の鱗片状結晶の確認に R-SBF で 1 週間, CO₂ 雰囲気下 C-SBF で 1 日という大きな差が見られた。CO₂ 雰囲気下 C-SBF 中ではアパタイト形成速度が速いため, 浸漬後 1 週間のガラス表面の XRD 回折測定で, 確実にアパタイト固有のスペクトルが確認されるためと考えられる。

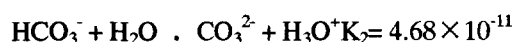
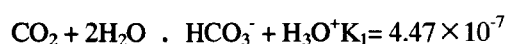
4.3.2 京都大学大学院工学研究科の研究成果(再受託研究)

(1) ヒトの血漿に等しい解離イオンの濃度を有する擬似体液(I-SBF)の調製と評価

1) 実験方法

表 4.3.2-1 に示す通り、ヒトの血漿の解離イオン濃度に有するように、表 4.3.2-2 に示す種類と量の特級試薬を蒸留水中に溶解し、pH を HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethane sulfonic acid)及び 1M-NaOH を用いて 7.40 に調整することにより、I-SBF を調製した。同 I-SBF 10 mL を、体積 15 mL、滅菌済みの polystyrene 瓶に入れ密封し、5℃または 36.5℃に保った空気中において 8 週間までの種々の期間保持した。

調製後及び保存後の I-SBF の pH、元素及びイオン濃度を高周波誘導結合プラズマ(ICP)発光分光装置及びイオン・pH メーター(東亜電波、IM-55G)により測定した。なお、 HCO_3^- イオン濃度を求める際には、イオンメーターによる CO_2 の測定値について下記の平衡式が成り立ち、 CO_2 は水 1 に対し 0.592 の体積比で溶解すると仮定した。



I-SBF を 3 回調製し、溶液毎に 3 回測定した結果から、平均値と標準偏差を求めた。

表 4.3.2-1 ヒトの血漿、C-SBF、R-SBF 及び I-SBF のイオン濃度

イオン	濃度 / mM				
	血漿		C-SBF	R-SBF	I-SBF
	全量	解離量			
Na^+	142.0	142.0	142.0	142.0	142.0
K^+	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mg^{2+}	1.5	1.05	1.5	1.5	1.05
Ca^{2+}	2.5	1.33	2.5	2.5	1.33
Cl^-	103.0	103.0	148.8	103.0	103.0
HCO_3^-	27.0	27.0	4.2	27.0	27.0
HPO_4^{2-}	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
SO_4^{2-}	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

表 4.3.2-2 C-SBF、R-SBF 及び I-SBF の調製に用いた試薬の純度及び溶解量

試薬 ¹	純度	溶解量		
		C-SBF ⁴	R-SBF ⁵	R-SBF ⁵
NaCl	99.5 %	8.036 g	5.403 g	5.585 g
NaHCO ₃	99.5 %	0.352 g	0.736 g	0.965 g
Na ₂ CO ₃	99.5 %	-	2.036 g	1.765 g
KCl	99.5 %	0.225 g	0.225 g	0.225 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	99.0 %	0.238 g	0.238 g	0.230 g
MgCl ₂ ·H ₂ O	98.0 %	0.311 g	0.311 g	0.217 g
1M-HCl	-	20 mL	-	-
HEPES ²	99.9 %	-	11.928 g	11.928 g
CaCl ₂	95.0 %	0.293 g	0.293 g	0.191 g
Na ₂ SO ₄	99.0 %	0.072 g	0.072 g	0.072 g
TRIS ³	99.0 %	6.118 g	-	-
1M-NaOH	-	-	0.75 mL	0.75 mL

¹ 溶解順に表記

² TRIS = tris-hydroxymethyl aminomethan

³ HEPES = 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethane sulfonic acid)

⁴ 36.5°CでTRIS及び1M-HClを用いてpH 7.40に緩衝

⁵ 36.5°CでHEPES及び1M-NaOHを用いてpH 7.40に緩衝

2) 結果と考察

図 4.3.2-1 及び図 4.3.2-2 に、5°C及び 36.5°Cで種々の期間保存した I-SBF の元素及びイオン濃度を示す。I-SBF のイオン濃度の参考のために、ヒトの血漿及び C-SBF 及び R-SBF のイオン濃度を共に示した。調製直後の I-SBF の元素及びイオン濃度は、C-SBF 及び R-SBF と同様に試薬溶解量とほぼ同じく、血漿の解離イオン濃度に等しいことが分かる。R-SBF の場合と同様、I-SBF の元素及びイオン種の中、Na⁺、K⁺、Mg、Ca²⁺、Cl⁻、P は、5°C、36.5°Cのいずれの保存温度においても 8 週までその濃度が変化しなかった。一方、HCO₃⁻濃度は 4 週以後低下し、pH は 4 週以後上昇した。こうした 4 週以後の HCO₃⁻濃度の低下、及び pH の上昇は、5°Cより 36.5°Cで著しく大きかった。

上記した水溶液中における HCO₃⁻イオンの平衡式から計算すると、R-SBF 及び I-SBF 中の HCO₃⁻イオン濃度を 27.0 mM に保ち続けるためには、同液を雰囲気中の CO₂分圧を大凡 15.0 kPa に高めた雰囲気中に保存しなければならない。すなわち、R-SBF 及び I-SBF 中の HCO₃⁻は空気雰囲気において保存する限り、いずれ脱気すると予測できる。実測した結果によれば、同 HCO₃⁻イオンの脱気は 4 週以後生じることがわかり、同じ平衡式から同期間以後の pH の上昇は同 HCO₃⁻イオンの脱気によるものと説明される。この結果から、R-SBF 及び I-SBF の空気中での使用期間は調製後 4 週以内に限るものと考えられる。

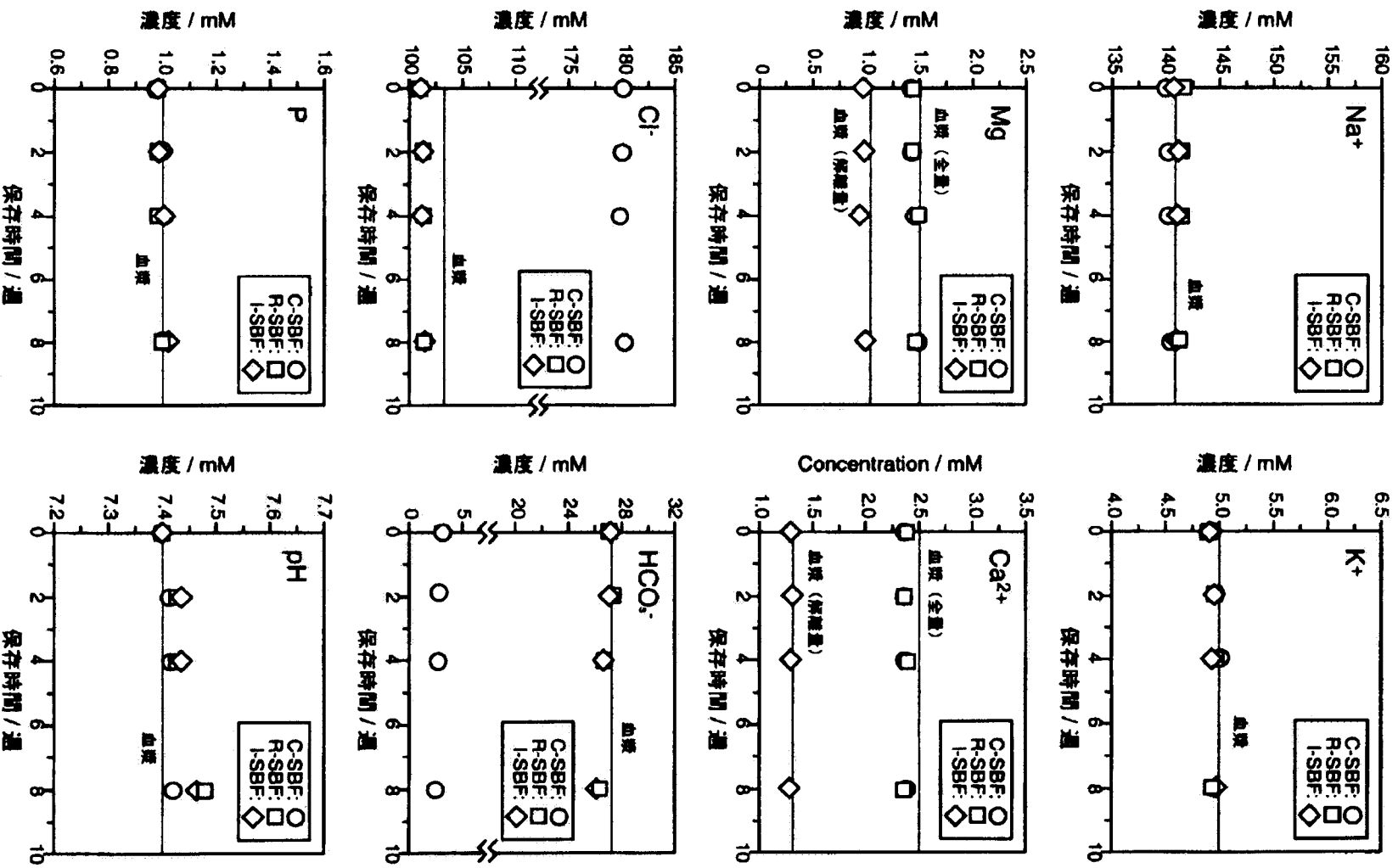


図 4.3.2-1 5°Cでの保存期間による C-SBF、R-SBF 及び I-SBF の元素及びイオン濃度の変化

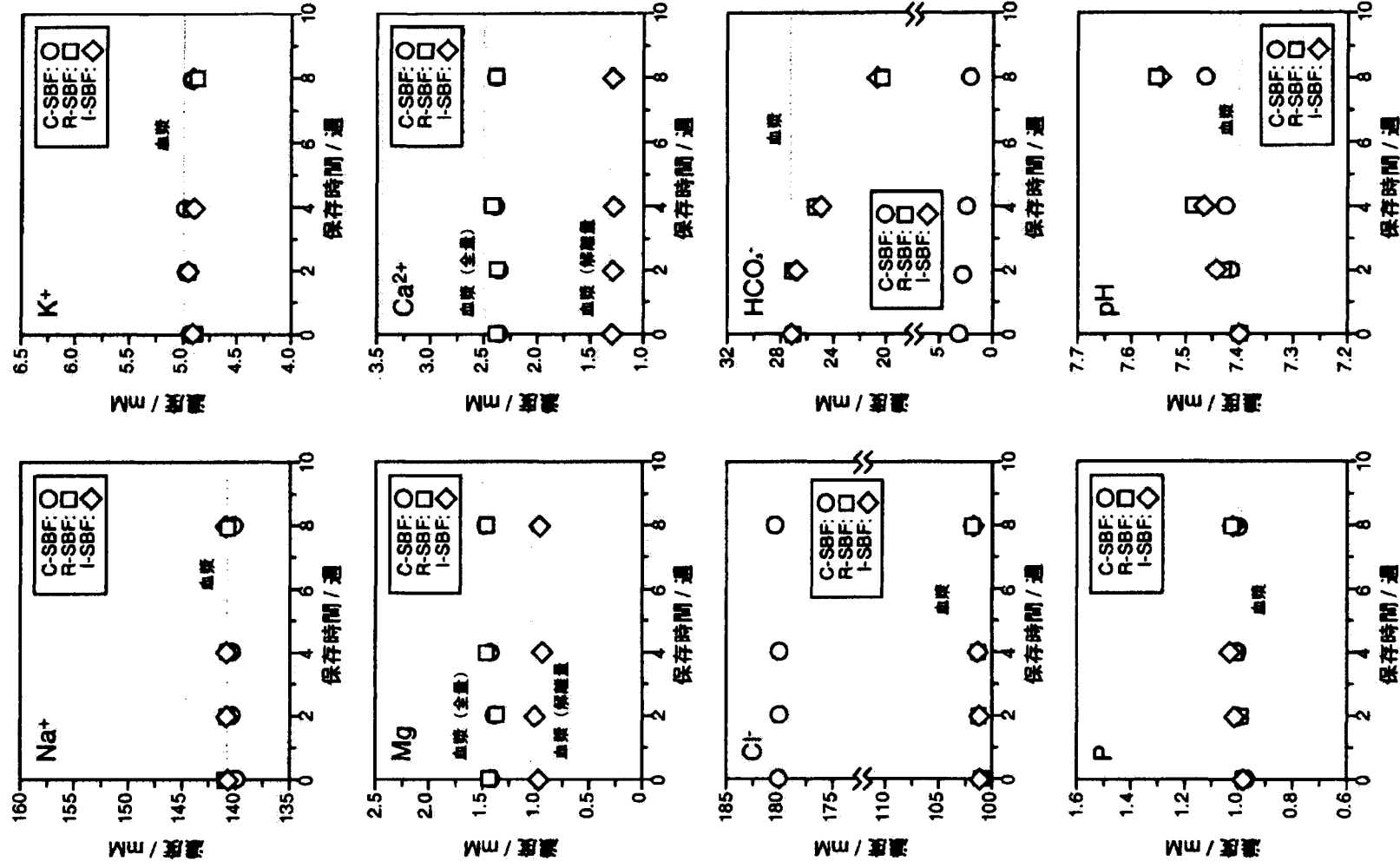


図 4.3.2-2 36.5°Cでの保存期間によるC-SBF、R-SBF及びI-SBFの元素及びイオン濃度の変化

(2) 超微細過膜濾過処理による C-SBF、R-SBF 及び I-SBF のイオン濃度の変化の評価

1) 実験方法

表 4.3.2-1 に示すイオン濃度に有するように、表 4.3.2-2 に示す種類と量の特級試薬を蒸留水中に溶解し、pH を TRIS (tris-hydroxymethylaminomethane) 及び 1M-HCl、あるいは HEPES 及び 1M-NaOH を用いて 7.40 に調整することにより、C-SBF、R-SBF 及び I-SBF を調製した。これらの SBF を直径 0.22 μ m の微細開気孔を有するポリスチレンスルホン製のマイクロフィルタ(滅菌済み、Millex[®]-GX, Millipore Co., USA)に通し濾過した。

マイクロフィルタ濾過処理前後の調製後の SBF の pH、元素及びイオン濃度を、2.1.1 に記述したのと同じ方法で調べた。また、SBF 濾過前後のマイクロフィルタを走査型電子顕微鏡(SEM)により調べた。

2) 結果と考察

図 4.3.2-3 に、マイクロフィルタによる濾過処理前後の C-SBF、R-SBF 及び I-SBF の元素及びイオン濃度を示す。C-SBF、R-SBF 及び I-SBF のいずれの SBF についても、マイクロフィルタによる濾過処理後、その元素及びイオン濃度が変化しないことが分かる。SEM 観察によれば、いずれの SBF 濾過後にもマイクロフィルタ表面に濾過物はなかった。

以上の結果から、バクテリア等の除去を目的とするマイクロフィルタ濾過処理により、SBF の元素及びイオン濃度が変化しないことが分かった。

(3) C-SBF、R-SBF 及び I-SBF 中で生成されるアパタイトの組成及び構造の評価

1) 実験方法

先に Kokubo らにより報告されているバイオミメテック方法に従い、通常の溶融法に調製した重量組成 4.6MgO 44.7CaO 34.0SiO₂ 16.2P₂O₅ 0.5CaF₂ のガラス(ガラス G)をアパタイトの核形成剤とし、ポリエチレンテレフタレート(PET)基板をアパタイト形成の基板とし、C-SBF、R-SBF 及び I-SBF 中でアパタイトを生成させた。図 4.3.2-4 に示すように、各 SBF 20mL をポリスチレン製の瓶に入れ、その底に粒径 150-300 μ m のガラス G 1 g を沈め、その上に PET 基板を置き、36.5℃で 1 日間静置し、基板表面にアパタイトの核を形成させた。その後、基板のみを種々の SBF 20mL 中に 36.5℃で、SBF を 2 日毎に交換しながら 6 日間浸漬し、基板表面のアパタイト核を成長させた。

アパタイト形成後の PET 基板表面を薄膜 X 線回折(TF-XRD)、フーリエ変換赤外反射分光分析(FT-IR)及び SEM により調べた。基板表面からアパタイトのみを削り取り、その炭酸含有率を炭素/水素/水分・加熱赤外分光分析により調べた。また、基板表面のアパタイトを 6M の塩酸及び 0.05M のフタル酸水素カリウム水溶液に溶かし、同溶液の Ca、P、Mg、Na 及び Cl の元素及びイオン濃度を ICP 及びイオン・pH メータにより測定し、アパタイトの組成を分析した。

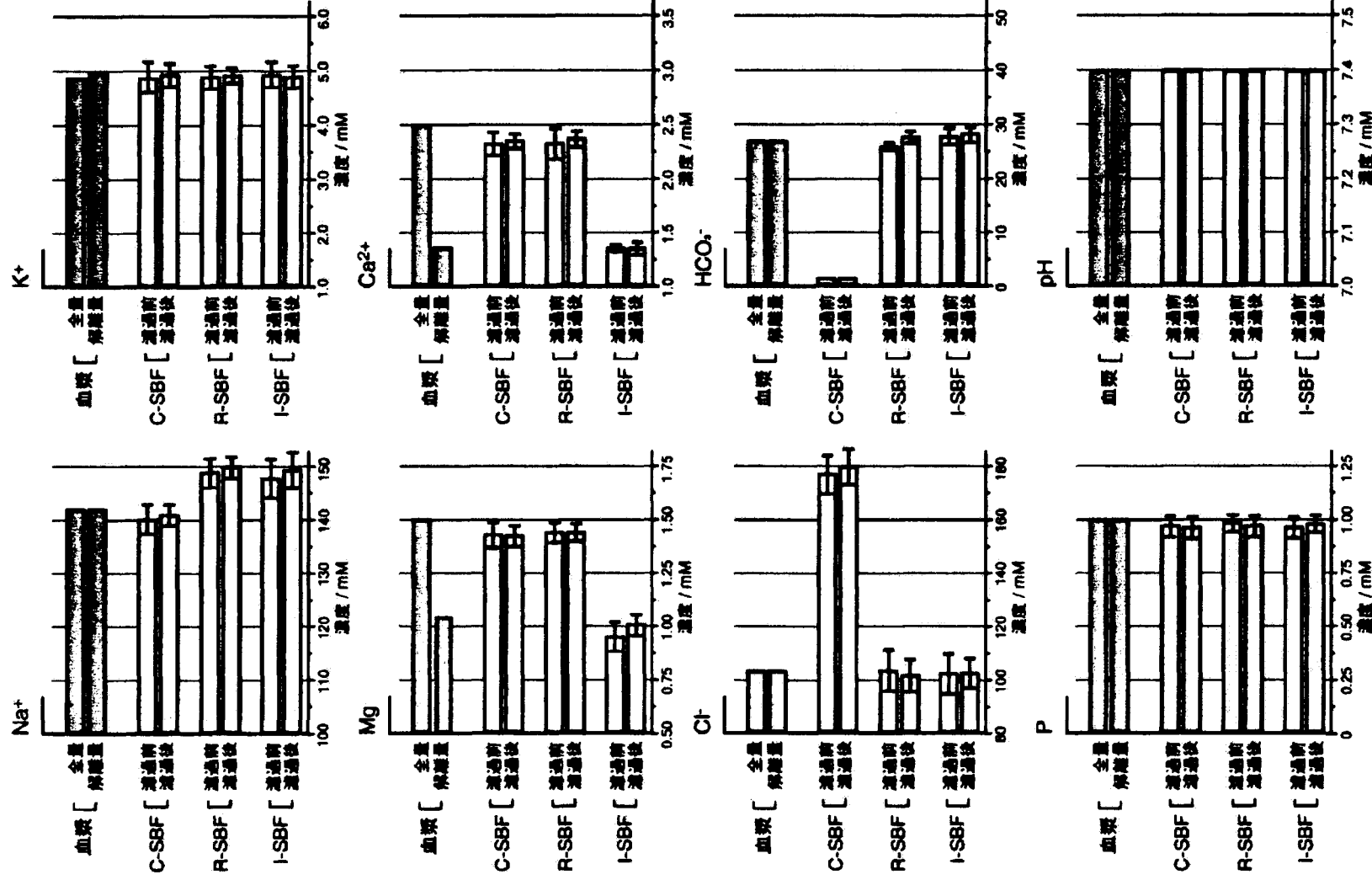


図 4.3.2.3 マイクロフィルタによる濾過処理前後の C-SBF、R-SBF 及び I-SBF の元素及びイオン濃度

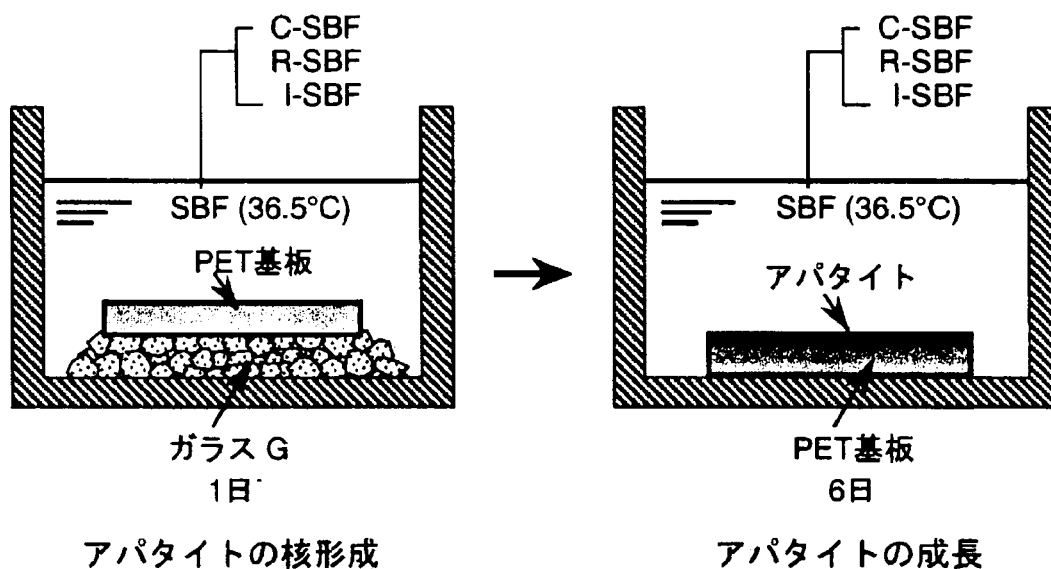


図 4.3.2-4 バイオミメティック方法による PET 基板表面へのアパタイト形成

2) 結果と考察

図 4.3.2-5 及び図 4.3.2-6 に、C-SBF、R-SBF 及び I-SBF を用いてバイオミメティック方法によりアパタイト形成を行った後の PET 基板表面の TF-XRD パターン、FT-IR スペクトル及び SEM 写真を示す。いずれの SBF 中に置いた PET 上にも微細な鱗片状の結晶からなるアパタイト層が形成されたことが分かる。

表 4.3.2-3 に、化学量論の水酸アパタイト、骨アパタイト、ならびに C-SBF、R-SBF 及び I-SBF 中で形成されたアパタイトの組成を示す。C-SBF 中で形成されたアパタイトは、骨アパタイトより低い Ca/P 原子比、高い塩素含有率、及び低い炭酸含有率を示すのに対し、R-SBF 及び I-SBF 中で生成されたアパタイトは共に、骨アパタイトにほぼ等しい組成を示すことが分かる。

R-SBF 及び I-SBF は C-SBF に比べ、体液同様に高い炭酸イオン濃度を有する。そのために、これらの SBF 中で生成されるアパタイトは、骨アパタイトとほぼ等しい量の炭酸イオンをその PO_4 サイトに含有する結果、骨アパタイトに等しい組成を示したと考えられる。

以上の結果より、炭酸イオン濃度を体液のそれに等しくした SBF は、その他のイオン濃度を全量値、解離値のいずれに等しくしても、骨アパタイトとほぼ等しい組成及び構造を有するアパタイトを生成することが分かった。

4.3.3 京都大学大学院医学研究科の研究成果(再受託研究)

生体活性ファインセラミックスの生体活性評価方法の標準化に関する研究を行った。

(1) 研究開発の目的

ファインセラミックスの生体活性は主に動物実験によって評価されている。しかしこの方法は長い期間と費用、さらに多量の犠牲が必要となる。共同研究者の小久保等が生体活性セラミックスの生体内での表面構造変化を *in vitro* で再現し得る水溶液として、ヒトの血漿にほぼ等しいイオン濃度を有する擬似体液(Simulated Body Fluid, SBF)を用いた *in vitro* の評価方法を確立しつつある。本研究ではファインセラミックスの持つ骨結合性(生体活性)を動物実験を用いずに *in vitro* で評価する標準的な方法を開発することを目的とし、骨と結合することが知られているセラミックスについて生体活性を骨との結合性、組織学的検索にて *in vivo* で評価し、*in vitro* 評価と比較し、*in vitro* 評価の妥当性を立証し、骨結合性の生体内評価を代替できる評価法として国際標準化されることを目標とする。

(2) 平成 11 年度の研究成果および問題点

実験には *in vitro* で高い生体活性を示す組成の $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ ガラス(ガラス A : Na_2O 25.0%、 CaO 25.0%、 SiO_2 50.0%)と生体活性を示さない組成のガラス E (Na_2O 15.0%、 CaO 15.0%、 SiO_2 70.0%)を用いた。組成の異なる 2 種類の $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ ガラスプレートを兔脛骨に埋入し、術後 4 週、8 週で取り出し、引き剥がし試験(Detaching Test)にて骨との結合強度を測定し、SEM 観察、光学顕微鏡観察、共焦点レーザー顕微鏡観察により骨と材料の界面の観察を行った。引き剥がし試験ではガラス A がガラス E に比べて有意に高い骨結合強度を示した。SEM 観察ではガラス A は反応層を介し骨と直接結合していたが、ガラス E では骨との界面に介在層を認めた。共焦点レーザー顕微鏡観察では両群ともにカルセインで標識された新生骨が骨からガラス表面に向けて成長しており、高い骨親和性を示していた。ガラス A はガラス E に比べて有意に高い骨との結合強度を示したものの、材料表面の脆弱性および厚い反応層の形成により結合強度は低い値となった。しかし総合的に判断すると *in vitro* の評価を裏づける *in vivo* での結果となった。今回の実験に用いたような生体活性は非常に高いが脆弱なセラミックスの生体活性を力学的に評価をする場合は本 *in vivo* 評価方法の限界点と考えられる。今後このような材料の生体内力学的接着強度を定量化できる方法の再検討を要する。

1) 破断荷重の結果

引き剥がし試験では、肉眼的にはすべてのサンプルが骨とガラスの界面で剥がれた。failure load は、ガラス A 群、ガラス E 群、それぞれ 4 週で 0.57 ± 0.52 、 $0.03 \pm 0.06 \text{kgf}$ 、8 週で 0.81 ± 0.47 、 $0.12 \pm 0.18 \text{kgf}$ とガラス A 群が有意に高い値を示した。4 週群、8 週群ともにガラス A 群とガラス E 群間に $p < 0.05$ で統計学的有意差を認めた。ガラス A 群 8 週の値は Bioglass 8 週の値より低いものの、 SiO_2 ガラス 8 週より高い値を示した。

2) 組織学的観察の結果

ガラス A は 4 週、8 週ともに骨と直接結合していることが観察された。また界面には帯状の反応層が観察された。元素分析で Si を多く含む反応層と Ca と P を多く含む反応層がガラス表面から骨に向けて形成されていた。これらの反応層は脆弱で、内部に多くの亀裂を認めた。また反応層の厚みは 4 週に比べて 8 週でより厚くなる傾向にあった。一方ガラス E では、ガラス表面近くまで多くの骨が成長しているが、骨とは直接結合せずの界面には薄い介在層を認めた。またガラス A で認めた反応層は認めなかった。引き剥がし試験後のガラス表面の観察では、ガラス A ではガラス表面の層の著しい剥離が認められたが、ガラス E では平滑なガラス面が保持されていた。以上の結果よりガラス A は強い生体活性を示していたがガラス表面の反応層の脆弱性が判明し、ガラス E では骨親和性は認めたものの生体活性を示さないことが判明した。また光学顕微鏡観察ではガラス A は骨と軟部組織を介さず直接結合していた。しかしガラス表面には多くの亀裂が認められた。これは引き剥がし試験の際あるいは組織切片作成中に生じたものと思われる。ガラス E では骨との界面に薄い軟部組織が介在していた。共焦点型走査型レーザー顕微鏡観察ではガラス A、ガラス E ともにガラスと骨との間に蛍光発色する多くの新生骨が観察され、この結果はこれらガラスの高い生体親和性を示すものであった。

(3) 平成 12 年度の研究計画

【実験 1】 平成 11 年度に埋入したガラス(ガラス A と E)とは組成の異なる 3 種類の Na_2O -CaO- SiO_2 ガラスの生体活性を同じ実験方法で、ガラスと骨との結合強度と、ガラスと骨との界面を組織学的に評価し、*in vitro* での評価と比較検討する。

1) インプラント

2 種類の Na_2O -CaO- SiO_2 ガラスプレートを作成する(15×10×2mm)。

①ガラス B : Na_2O 22.5%、CaO 22.5%、 SiO_2 55.0% (mol%)

②ガラス C : Na_2O 20.0%、CaO 20.0%、 SiO_2 60.0% (mol%)

③ガラス D : Na_2O 17.5%、CaO 17.5%、 SiO_2 65.0% (mol%)

図 1 の組成図の中で *in vitro* でのアパタイト形成能は $A > B > C > D > E$ である。ガラス A から E の擬似体液中でのアパタイト形成にかかる時間を表 1 に示す。

2) 動物実験

体重 2.8、3.3kg の成熟日本白色家兎を用いる。麻酔はネンブタール 0.5mg/kg 静脈内投与およびケタラル 10mg/kg 筋肉内投与を用い、局所にはキシロカインを注射して除痛を行う。脛骨近位骨幹端部に内側皮質骨を 15×2mm 大の大きさにデンタルドリルを用いて開窓し、そのまま外側皮質骨も同様に開窓する。ガラスプレートを両側の骨皮質を貫くように前額面に平行に挿入する。操作は両側脛骨に対して行う。術後 4 週および 8 週で各群 4 羽ずつ屠殺し(計 24 羽)、プレートを含む脛骨近位部を摘出し、引き剥がし試験用に準備する。

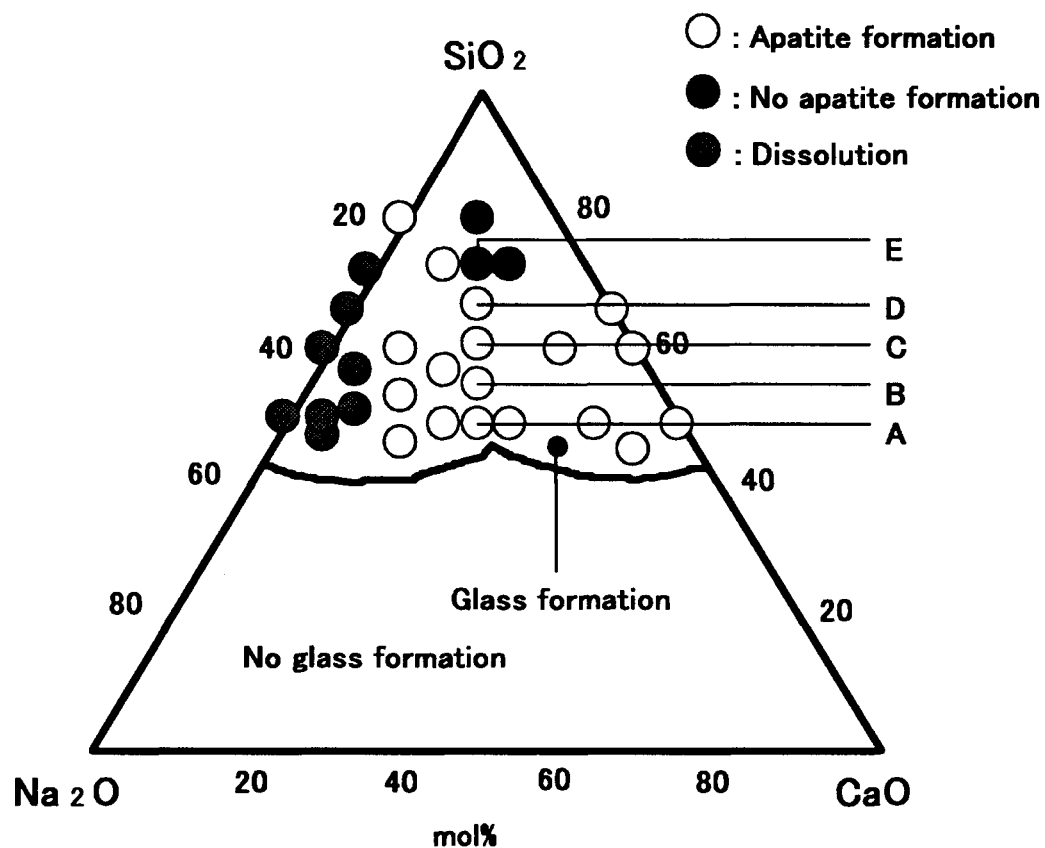


図 4.3.3-1 擬似体液中における Na₂O-CaO-SiO₂系ガラスのアパタイト形成の組成依存性

表 4.3.3- 1

Glass	Composition / mol%			Induction period for apatite formation
	Na ₂ O	CaO	SiO ₂	Apatite formation / day in SBF
A	25	25	50	0.5 d
B	22.5	22.5	55	3 d
C	20	20	60	7 d
D	17.5	17.5	65	21 d
E	15	15	70	None within 28 d

3) 引き剥がし試験

プレートを含む脛骨近位部を摘出し、骨皮質のみを介してプレートと前方と後方の骨皮質が結合している状態になるよう余分な骨を削除する。引き剥がし試験では、自動測定器 (Autograph Model S500, Shimadzu Seisakusho Co., Ltd., Kyoto, Japan) に接続した特殊なフックに前方および後方の骨皮質を掛け、プレート面に垂直な方向にそれぞれ反対方向に 35mm/min のクロスヘッドスピードで牽引する。プレートが骨から剥がれたときの failure load を測定する。また、test 用に準備している際にプレートと骨が剥がれたときには failure load は 0kgf とする。各期間の各群の値は、平均±標準偏差で表し、unpaired t-test を用いて、統計学的に有意差を検討する(各群 n=8)。

4) 組織学的検索

引き剥がし試験後、硬組織標本を作成し 3 種類の組織学的検索を行う。

①走査型電子顕微鏡観察：標本を 10%ホルマリンで固定した後、エタノールで脱水し、スチレンにて脱脂して、ポリエステル樹脂に包埋する。バンドソー(BS-3000, EXAKT, Hamburg, Germany)にて切片(500 μ m)を切り出して、ダイヤモンドペーパーで片面研磨する。カーボンコーティング後、走査型電子顕微鏡(Hitachi S-800, Tokyo, Japan)にて骨とガラスの界面を観察する。

引き剥がし試験後の材料表面の SEM 観察は、標本をホルマリン固定、エタノール脱水した後、臨界点乾燥を行い、白金蒸着し観察する。

②光学顕微鏡観察：同様の方法で切片を切り出し、80、100 μ m の厚さにグラインディングマシン(マルトー ML150DC)にて研磨し、表面ギムザ染色した後、光学顕微鏡にて観察する。

③共焦点レーザー走査顕微鏡：術直後および屠殺 3 日前にカルセイン 10mg/kg を筋注し、共焦点レーザー顕微鏡観察用にラベリングする。標本を 70%エタノールで固定した後、villaneuva 液にて染色し、その後脱水および脱脂し、ポリエステル樹脂に包埋する。バンドソーにて切片 (500 μ m)を切り出して、120 μ m の厚さにグラインディングマシンにて研磨し、共焦点レーザー顕微鏡(LSM-GB200, OLYMPUS, Tokyo, Japan)にて界面での石灰化を観察する。

【実験 2】 平成 11 年度の実験で問題となった、非常に生体活性は高いが材料表面が脆弱で、厚い反応層を形成し、Detaching test では生体活性を評価することが困難な材料の in vivo 生体活性能を評価する方法として、実験 1 に本実験を補足追加する。

図 1 の A から E の 5 種類のガラスを用いる。板状のガラスをジルコニアボールで粉碎し、ふるいにかけ 100、300 μ m の顆粒にしたものを兔大腿骨顆部に挿入し、顆粒周囲への骨新生および顆粒の吸収度を組織形態学的に評価し、in vitro の生体活性能と比較検討する。

1) インプラント

5種類の Na₂O-CaO-SiO₂ ガラス顆粒を作成する(100, 300 μ m)。

- ①ガラス A : Na₂O 25.0%、CaO 25.0%、SiO₂ 50.0% (mol%)
- ②ガラス B : Na₂O 22.5%、CaO 22.5%、SiO₂ 55.0% (mol%)
- ③ガラス C : Na₂O 20.0%、CaO 20.0%、SiO₂ 60.0% (mol%)
- ④ガラス D : Na₂O 17.5%、CaO 17.5%、SiO₂ 65.0% (mol%)
- ⑤ガラス E : Na₂O 15.0%、CaO 15.0%、SiO₂ 70.0% (mol%)

2) 動物実験

体重 2.8, 3.3kg の成熟日本白色家兎を用いる。実験 1 同様に麻酔を行った。両側大腿骨顆部内側皮質骨を直径 6mm 大の大きさにデンタルドリルを用いて開窓する。骨髓腔からの出血を十分止血した後、十分量の顆粒を骨孔に圧縮挿入する。術後 1 週、2 週、3 週、6 週、12 週で屠殺し、ガラス挿入部を含む大腿骨顆部を摘出する。またテトラサイクリン(アクロマイシン)を 100mg 術当日より連日経口投与し術後 1 週間で屠殺し共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察し、各群でテトラサイクリンにて標識された新生骨量を比較する。

3) 組織形態学的評価

摘出した大腿骨顆部を包埋し、硬組織標本を作成し 3 種類の組織学的検索を行う。

- ①走査型電子顕微鏡観察：実験 1 と同様の方法で組織切片を作成する。切片は骨孔に垂直に厚さ約 200 μ m で切り出す。切り出した切片を 4000 番のサンドペーパーまで表面研磨し、金コーティングした後、走査型電子顕微鏡(Hitachi S-4700)を用い、Back scattering image にて骨孔内への周辺骨からの骨新生の深度および骨孔内顆粒周辺の新生骨を経時的に比較する(深度には大西らの方法を用い、骨孔を同心円状に 10 層に分け測定した)。また同時に SEM-EDX による元素分析も行う。
- ②光学顕微鏡観察：実験 1 と同様の方法で切片を切り出し、切片を厚さ 80, 120 μ m まで研磨し、ギムザまたはトルイジン青にて表面染色した後、光学顕微鏡にて観察する。
- ③共焦点レーザー走査顕微鏡観察：実験 1 と同様の方法で villaneuva 染色した後に切片を切り出し、120 μ m まで研磨し、共焦点レーザー走査顕微鏡(LSM-GB200, OLYMPUS, Tokyo, Japan)にて観察する。テトラサイクリンにて標識された新生骨の骨孔全体に占める領域の比率を算出し 5 種類のガラスで比較する。統計処理には NIH-image ソフトを用いる。同時に骨孔全体に占めるガラス顆粒の面積を算出し 5 種類のガラスの溶解度を比較する。

(4) 結果

【実験 1】

- 1) 引き剥がし試験 (単位：ニュートン)

上記表および、グラフに示すように、本年度に埋入したガラス B、C、D はいずれも低い値を示し、in vitro でのアパタイト形成能を結合強度に反映することはできなかった。

2) 組織学的検索

ガラスはいずれも表面が脆弱で引き剥がし試験での剥離はガラス表面で起こっていた。しかし界面の観察では平成11年度に行ったガラス A ほど厚い反応層は形成されておらず、剥離後のガラス表面の破壊像は観察されたものの、骨側へのガラスの付着は観察されなかった。以上の結果より今回の3種類のガラスはガラス A に比べ生体内での活性は低く、ガラス表面はガラス A と同様に脆弱であり、引き剥がし試験での評価には適当でない材料であると考えられた。

【実験 2】

1) 走査型電子顕微鏡観察及び光学顕微鏡観察結果

SEM 観察において5種類のガラス顆粒間に新生骨形成の差異が観察された。周辺骨から最も深い部位での新生骨の距離(深度)を測定した。

① 1 週での観察：

ガラス A; 骨孔辺縁部では幼弱な骨がガラス顆粒間に観察された。ガラスは約 10 μm の反応層を形成しており、新生骨深度は 1200 μm (4.5 layer)であった。骨孔中心部では新生骨は観察されなかったが、ガラスには約 2.3 μm の反応層が観察された。

ガラス B; 辺縁部にも幼弱な新生骨は観察されなかった。しかし骨孔辺縁部の顆粒には約 10 μm の反応層が観察された。

ガラス C、D、E; いずれも新生骨は観察されず、ガラス顆粒の反応層も観察されなかった。

② 2 週での観察

ガラス A; 幼弱な骨は骨孔中心部まで達し、ガラス顆粒の反応層は約 20 μm に広がっていた。辺縁に形成された骨はやや成熟していた。新生骨深度は 3000 μm (10 layer)であった。

ガラス B; 辺縁から骨が新生し新生骨深度は 1300 μm (5 layer)であった。骨孔中心部への骨新生は観察されなかった。

ガラス C; 約 1100 μm (4 layer)までの骨新生が観察された。

ガラス D; 約 800 μm (3 layer)までの骨新生が観察された。

ガラス E; 骨新生は観察されなかった。

③ 3 週での観察

ガラス A; 約 3000 μm (10 layer)の深度までの骨新生。中心部の骨は幼弱だが辺縁で

の骨は成熟していた(図 4.3.3-3a,b)。

ガラス B; 骨孔中心部に顆粒間に淡い骨様の像が認められた。この骨様組織は SEM-EDX にて Ca と P を含んでおり幼弱な新生骨と推測された(図 4.3.3-4a,b)。

ガラス C; 約 1000 μm (4 layer)の深度までの骨新生。辺縁部の骨は成熟(図 4.3.3-5a,b)。

ガラス D; 約 800 μm (3 layer)の深度までの骨新生。辺縁部の骨は成熟(図 4.3.3-6a,b)。

ガラス E; 骨新生なし(図 4.3.3-7a,b)。

表 4.3.3-3 引き剥がし試験結果の統計解析

Depth (Layers) of Bone Ingrowth from Periphery					
	Glass-A	Glass-B	Glass-C	Glass-D	Glass-E
1week	4-5 layers				
2weeks	10 layers	5 layers	4 layers	3 layers	
3weeks	10 layer	10 layers	4 layers	3 layers	

考察：3週までの観察の結果、上記表 4.3.3-3 に示すような in vivo 骨形成に 5 種類のガラスで差異を認め、SEM 観察における新生骨の深度では in vitro でのアパタイト形成能にほぼ比例した骨新生を示した。ガラス A およびガラス B ではガラス表面に 10、20 μ m の厚い反応層が形成され、その反応層は経時的に顆粒中心部に向かい拡大し、新生骨はガラス表面に密着し形成されていた。これは骨がガラス表面の反応により形成されていることが考えられる。つまりガラス A および B は Hench らの提言する Bioglass 同様に Class A の骨形成能を有する bioactive implant であることが考えられる。一方ガラス C および D では骨形成は周辺骨より始まり、ガラスと骨との間にわずかな間隙を認めた。また観察期間中にガラス C、D および E では顆粒表面に反応層は観察されなかった。

2) 共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察結果

表 4.3.3-4 引き剥がし試験結果の統計解析

基本統計量 : Bone Ingrowth

効果: 列 1

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
GA	12	11.424	4.225	1.220
GB	12	16.514	5.699	1.645
GC	12	11.131	4.188	1.209
GD	12	6.127	1.476	.426
GE	12	2.198	1.094	.316

交互作用棒グラフ : Bone Ingrowth

効果: 列 1

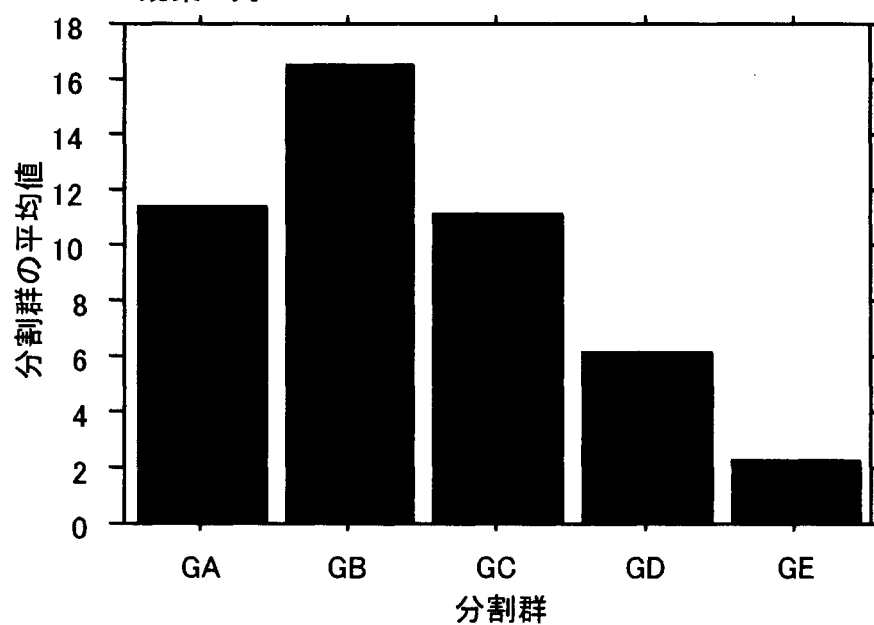


図 4.3.3-8 引き剥がし試験結果

表 4.3.3-5 引き剥がし試験結果の統計解析

基本統計量 : %Glass area

効果: 列 1

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
GA	12	33.050	7.615	2.198
GB	12	33.523	10.720	3.095
GC	12	38.910	7.302	2.108
GD	12	56.085	6.810	1.966
GE	12	75.513	6.650	1.920

交互作用棒グラフ : %Glass area

効果: 列 1

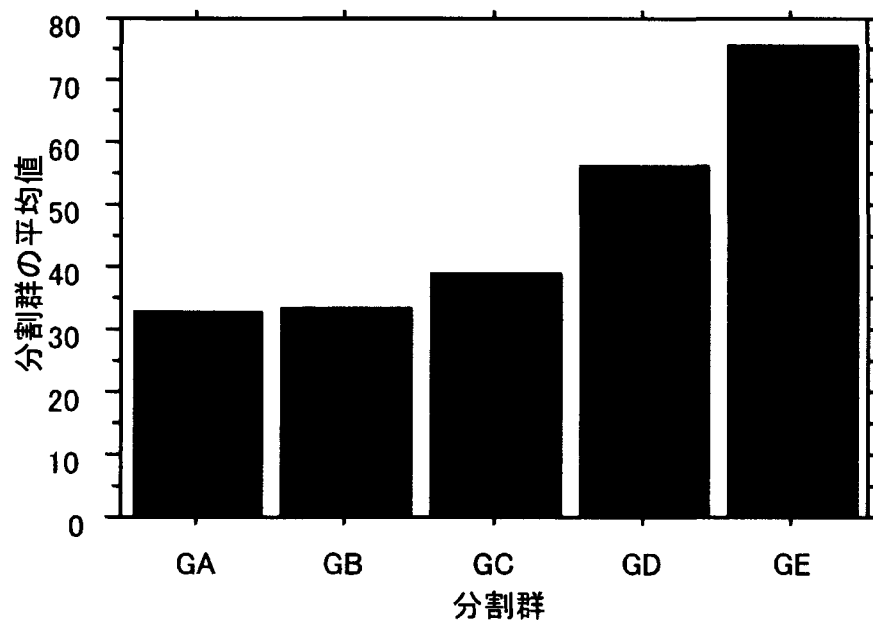


図 4.3.3-9 引き剥がし試験結果

上記表およびグラフに示すように、NIH-image による統計処理により、骨孔に占めるガラス顆粒の面積率(%)を算出した。

統計処理の結果より新生骨量およびガラス顆粒の残存量は 5 種類のガラスで差異を認めた。

ガラス A の新生骨形成量がやや低いものの、in vivo での骨新生量と in vitro でのアパタイト形成能に弱い相関関係を認めた。また残存するガラスの面積の計測でガラスの生体活性と、溶解性の間にも弱い相関関係を認めた。つまり溶解性の高いガラスほど新生骨量が多い結果となった。

今後、6 週および 12 週の観察、カルセインでの 3 週、6 週までの標識の結果を加え、最終的な結果をまとめていく予定である。

4.4 国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案

4.4.1 バイオセラミックス国際標準化に関するに海外調査

調査員として水野研究担当は2000年9月10日～21日、スウェーデンで開催されたISO/TC150総会とSC、WG会議に日本代表団の一人として出席し、TC150に関する質疑と情報収集を行った。また、英国のケンブリッジ大学のボンフィールド研究室およびクィーンメリー大学IRCのタナー研究室を訪問した。

(1)目的

「生体用ファインセラミックスの試験評価方法の標準化」に係わる最新の情報を収集する目的で海外調査を行った。この調査の目的は、バイオセラミックスに関する規格化・標準化および関連技術の情報を収集することにある。特に国際標準化(ISO)/TC150(替えか用インプラント)における規格化に関する情報を収集するとともに、関係する著名な研究者との接触を通じての情報交換を行い、研究開発に資する。

(2)スウェーデンでのISO/TC150会議出席と情報収集。

・日 時：9月11日(月)～9月15日(金)

・場 所：スウェーデン健康規格研究所(Swedish Healthcare Standards Institution; HSS)Hornsgatan 20, 10726 Stockholm, Sweden

1) 出席者：米国33、英国8、ドイツ4、スウェーデン4、日本3、豪州3、カナダ2、フランス2、オーストリア2、スイス2、ベルギー1、ルーマニア1、タイ1、の計66名程度。

日本からは、堤 定美 京大教授、井街 東大教授と水野の3名。

(堤氏と水野はSC1,4に、井街氏はSC2,6に登録)

本年はスウェーデンがホストとなった。

出席者は、米国がその1/2を占め非常に多く、次いで英国の8名、ドイツとスウェーデンの4名、日本と豪州は3名(資料1;出席者名簿)。規格関係機関以外に、関連企業関係者も多く、TC150が企業戦略の一環として位置付けられているように感じた。

2) TC150の組織構成

今回の総会後のTC150組織構成を、以下に示す(括弧内は日本の担当機関) (図4.4-1参照)。

SC1	材料	(日本ファインセラミックス協会)
SC2	心臓血管系インプラント	(人工臓器工業会)
WG1	心臓バルブ	
WG3	血管	
WG4	血液酸素供給器 blood oxygenators	
SC4	骨・関節置換体	(日本ファインセラミックス協会)
WG1	部材の機械的試験	
SC5	骨接合 Osteosynthesis	

- WG1 一般的骨合成
- WG2 脊椎用インプラント
- SC6 動的なインプラント
- WG3 内耳渦巻管用インプラント
- WG4 インプラントできる注入ポンプ
- WG5 インプラントできる神経刺激器 (剤)
- WG11 再生医工学分野(Tissue engineered Implants)

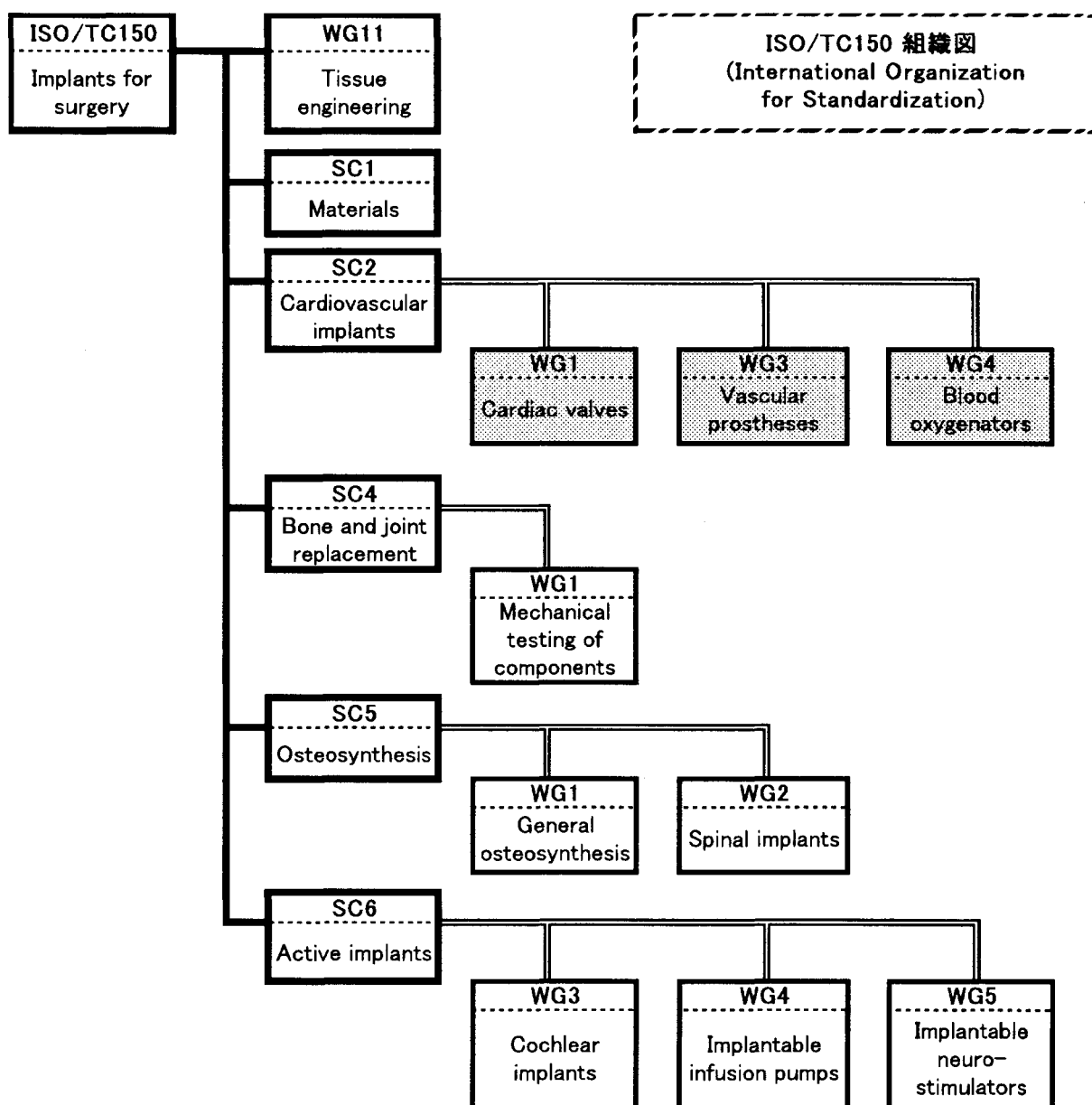


図 4.4-1 総会後の TC150 の組織構成

3) 会議内容
表 4.4-1 に今回の会議の全体スケジュールを示す。

Revised program of meetings of ISO/TC 150 and its subcommittees on 11th to 15th September 2000 in Stockholm/Sweden

Group	Title	Monday 11 th Sept.		Tuesday 12 th Sept.		Wednesday 13 th Sept.		Thursday 14 th Sept.		Friday 15 th Sept.	
		9.30 am	14.00 pm	9.00 am	14.00 pm	9.00 am	14.00 pm	9.00 am	14.00 pm	9.00 am	14.00 pm
TC 150	Implants for surgery	Stora Hörsalen								Stora Hörsalen	Stora Hörsalen
SC 1	Materials				Stora Hörsalen	Stora Hörs. +Cafeteria	Stora Hörsalen				
SC 2	Cardiovascular implants								Stora Hörsalen		
WG 1	Cardiac valves		Room 4	Room 4	Room 4	Room 4	Room 4	Room 4			
WG 3	Vascular prostheses		Styrelse room	Styrelse room	Styrelse room	Styrelse room					
WG 4	Blood oxygenators				Room 3	Room 3	Room 3	Room 3			
SC 4	Bone and joint replacements							Room 1			
WG 1	Mechanical testing of components		Stora Hörsalen	Stora Hörsalen							
SC 5	Osteosynthesis		Rum 1			Rum 1					
WG 1	General osteosynthesis			Rum 1							
WG 2	Spinal implants				Rum 1						
SC 6	Active implants							Stora Hörsalen			
WG 4	Implantable infusion pumps		Sjöfartsh Biljarden	Sjöfartsh Biljarden	Sjöfartsh Biljarden	Sjöfartsh Biljarden					
WG 5	Implantable neurostimulators		Sjöfartsh Kabyss	Sjöfartsh Kabyss	Sjöfartsh Kabyss	Sjöfartsh Kabyss					
ad hoc	Ventricular assist devices					HSS 7th floor					
	Secretariat's room	Room 2	Room 2	Room 2	Room 2	Room 2	Room 2	Room 2	Room 2	Room 2	Room 2

Meeting (am): 9:00 - 13:00
Coffee break: 10:30 - 11:00

Lunch break: 13:00 - 14:00
Meeting (pm): 14:00 - 17:00
Coffee break: 15:30 - 16:00

総会が最初と最後の日にあり、それらに挟まれる形でサブコミッテイ（SC）会議、SCにぶら下がる形でワーキンググループ（WG）会議がある。SCとWG会議は並行して行われるため、出席者が会議を選択する必要がある。堤委員長と相談の上、日本は手分けして出席をした。

ISO/TC150 総会は9月11日と15日に行われ、12日から14日はSCとWG会議が行われた。

9月11日は開会挨拶、各国委員の紹介の後、N472rev アジェンダを承認した。

国際幹事レポート、WG・SCのレビューにより、これまでの活動のまとめの報告があった。TC150のビジネスプランの紹介、TC285とのコーディネーション、国際機関とのリエゾンに関して説明と審議があった。

最終日の9月15日は今回会議のまとめとして、SCとWG会議の報告があり、レゾリュション（決議）の作成を行った。

審議概要は以下の通り。

- ① 今後は文書による通信を止め、ISO ホームページ：<http://isotc.iso.ch> に TC、SC、WG レベルの審議事項を公開し、パスワード管理下で情報開示ができるシステムとし、直接文書を各自が印刷する。TC150 レベルでは各国の代表組織宛に、SC レベルでは参加委員宛に情報が送られ、その後の各国内の扱いは各国に任せることになった。

- ② WG11 として Tissue Engineered Implants を新設する。委員長は豪州のブランドウッド教授を選出した。今後扱うべきインプラントの特定や定義を議論し、TC194、ASTM などの他組織との連携を深めて活動を開始することになった。

- ③ SC1 のレゾリュションまとめ。

2000 年 9 月 12 / 13 日に行われた。

10 ケ国の 30 名の委員が出席。議長は P.G.Laing 教授：

Resolution 288：アジェンダ採択

Resolution 289：ドラフト委員の任命

Mrs.Villermoux（仏）と Mr.Crosbie（英）を任命。

Resolution 290：幹事レポート

ISO/TC150SC1 は幹事レポート N374 とオランダが P メンバーとなることを受入。

Resolution 291：ISO 5832-5 の定期見直し

SC1 はこれを改訂することとし、幹事からの NWIP を待つ。

（Metallic materials .Part 5- Wrought cobalt-chromium-tungsten-nickel alloy）

Resolution 292：ISO 5832-9 の定期見直し

SC1 はこれを改訂することとし、ドイツからの NWIP を待つ。

（Metallic materials .Part 9- Wrought high nitrogen stainless steel）

Resolution 293：ISO/TC194 とのリエゾン

SC1 は TC194 とのリエゾンの重要性を理解するが、非公式のリエゾン関係とする。

Resolution 294：ISO/DIS 5833 の改訂

SC1 は 2ndDIS を ISO 中央幹事に送ることに決定。（Acrylic resin cements）

Resolution 295 : タスクフォース TF ” UHMWPE”

TF” UHMWPE” の設置で合意し、Dr.Kurtz (米) の指導でコメントのレビューを行う。

Resolution 296 : ISO 5834-2 の改訂

TF リーダーの Dr.Kurtz (米) のレポートを受入、合意したコメントを組み入れた CD を回覧する。(UHMWPE Part 2 . Moulded forms)

Resolution 297 : ISO/ AWIs 5834-XX (2 種 : 酸化。加速劣化)

TF リーダーの Dr.Kurtz (米) のレポートを受入、TF 会議での議論に基づく WD を待つ。

Resolution 298 : タスクフォース TF” アクリルセメントの疲労試験”

Harper (英) がリーダーとなり TF 設置で合意し、RRT 実施について議論。

Resolution 299 : ISO16402 ラウンドロビン

TF リーダー Harper (英) のレポートを受入、種々測定法の比較のための RRT 結果を待つ。

Resolution 300 : TF ” MRI”

Dr.Woods (米) がリーダーとなり、TF ミーティング設置で合意。

Resolution 301 : ISO/ AWI 20159-1

TF リーダー Dr.Woods (米) のレポートを受入、TF ミーティングの基づく WD を待つ。(MRI effects . Part 1: Test method for measurement of radio--)

Resolution 302 : ISO/ AWI 20159-2

TF リーダー Dr.Woods (米) のレポートを受入、TF ミーティングの基づく WD を待つ。(MRI effects . Part 2: Test method for measurement of magnetically---)

Resolution 303 : ISO/ AWI 20159-3

TF リーダー Dr.Woods (米) のレポートを受入、TF ミーティングの基づく WD を待つ。幹事は適切な ISO 委員会に接触し重複しないかどうかを調査。

(MRI effects – Part 3: Test method for evaluation of MR image--)

Resolution 304 : ISO/ AWI 20160

この AWI の投票結果はポジティブであり、WD 作成で合意。版權は ISO が持つ。

Pohler 教授が適当な行動を行う。

(Metallic materials- classification of microstructures for alfabeta titanium alloys)

Resolution 305 : TF ” Alumina ceramic”

Mr. Huber (ドイツ) のリーダーシップにより、TF ミーティングを設置する。

Resolution 306 : ISO 6474 の改訂

SC1 は TF リーダー Mr. Huber (ドイツ) のレポートを受入、TF ミーティングの議論に基づく CD を待つ。

(ISO 6474 高純度アルミナ材料規格案は NWI となり、日本も検討に参加。スウェーデンの会議では水野がタスクフォース会議に出席し、水野がその内容を説明した。日本は 2 軸曲げより、TC206 の規格と整合する一軸曲げ方式を主張。ドイツのフーバーがリーダーとして改正案をまとめる予定。)

Resolution 307 : NWIP との関連

SC1 は SC4 に、“テーパー連結部” が NWIP “Wear and fretting corrosion testing of prosthetic

modular implant interfaces of femoral head bores and neck tapered cones”に含まれるかどうかを明らかにするようにとの要求をした。

Resolution 308 : ISO5832 規格の、生体親和性と MRI compatibility に関するドイツ提案

N377 文書中にドイツの示唆があったが、SC1 はこれを受け入れなかった。これらの特性が単なる構成材料というよりはデバイスの特性であるため。

④ SC4 のレゾリューションまとめ。

2000 年 9 月 11/14 日に行われた。

10 ケ国の 34 名の委員が出席。議長は J.P. Paul 教授。

Resolution (SC4 Stockholm 1: 2000) 169:

アジェンダ(SC4 N271)採択

Resolution (SC4 Stockholm 2: 2000) 170:

ドラフト委員の任命

K. Brummitt (英) と G. Reinisch (オーストリア) を任命。

Resolution (SC4 Stockholm 3: 2000) 171 : 幹事レポート

ISO/TC150SC1 は幹事レポート(SC4 N272)を受入。

Resolution (SC4 Stockholm 4: 2000) 172: ISO 7206-1 の定期見直し

コメント(SC4 N273, 287)を考慮し、ISO 7206-1 を改訂し、ISO/CS に連絡する予定。

(Partial and total hip joint prostheses, Part 1 Classification and designation of dimension)

Resolution (SC4 Stockholm 5: 2000) 173: ISO 7206-8 の定期見直し

コメント(SC4 N274)を考慮し、ISO 7206-8 を改訂し、ISO/CS に連絡する予定。

(Partial and total hip joint prostheses, Part 8 Endurance performance of stemmed femoral components with application of torsion)

Resolution (SC4 Stockholm 6: 2000) 174 : ISO 7206-10 の定期見直し

投票用に回覧された 2nd CD(SC4 N275)を、この会議での合意の基づき修正(SC4 N286)の上、DIS とする。

(Partial and total hip joint prostheses, Part 10 Determination of resistance to static load of modular femoral heads)

Resolution (SC4 Stockholm 7: 2000) 175 : ISO/TC150/SC 4/WG 1 とプロジェクトグループの進捗(SC4 N288)

9 月 11/12 日の SC4/WG1 会議の決議文を受入。

1. Resolution (SC4/WG1 Stockholm 1:2000) 97: SC4 Stockholm 1: アジェンダ(SC4 WG1 N108)採択

2. Resolution (SC4/WG1 Stockholm 2:2000) 98 ドラフト委員に K. Brummitt(英) と G. Reinisch (オーストリア) を任命。

3. Resolution (SC4/WG1 Stockholm 3:2000) 99: ISO/CD17853 (Method for the isolation, characterization and quantification of polymer and metal wear debris)

1st CD (SC4 N270)にこの会議で議論した修正を加え CD (SC4 N276)、投票用の CD を作

成へ。

4. Resolution (SC4/WG1 Stockholm 4:2000) 100: 次回ミーティング

TC150/SC4 と連動し、次回はオーストラリアで開催。

Resolution (SC4 Stockholm 8: 2000) 176 : 議長の再選任

SC4 議長に Paul 教授を再選。

Resolution (SC4 Stockholm 9: 2000) 177: ISO/TC159/SC3 (Ergonomics-Anthropometry and biomechanics)とのリエゾン

ISO/TC159/SC3 のワークプログラムを検討した結果、ISO/TC150/SC4 はリエゾン不要との決定。

Resolution (SC4 Stockholm 10: 2000) 178: 次回ミーティング

TC150 と連動し、次回はオーストラリアで開催 (2001 年 9 月のキャンベラ、または 11 月のシドニー) と決議。望ましくは 11 月 19-23 日に。

⑤摩耗・疲労試験規格:

- (1)SC4; Wear and fretting corrosion testing of prosthetic modular implant interfaces of femoral head bores and neck tapered cones. に新規規格案。
- (2)ISO 7206-8:1995 (人工股関節の捻りを考慮した疲労試験) は、定期見直しの結果、存続と決まった。
- (3)ISO 7206-10 (人工股関節の大腿骨頭部品の静的強度) は、DIS に昇格。
- (4)ISO 17853 (高分子と金属の摩耗粉の分離、同定、定量法) は、CD に昇格し、投票に回す。摩耗粉に関しては比重による分類のみでなく、形態の影響を考慮すべきであり、巨大粒子 1 個と微細粒子多数個との比率の扱い、粒子分布の偏在やサンプル数などの統計的問題が議論された。
- (5)ISO WD14243-3 (人工膝関節の摩耗試験における荷重と変位条件) に関して、各国からの意見を 12 月 11 日まで募集する。
- (6)昨年日本が提案した人工関節用材料の摩耗試験案 (JIS 対応) は各国投票の結果、NWI とはならず否決された。試験液に生理食塩水 (牛血清も可) を使用する点と一方向回転で反対された。
- (7) 摩耗特性を含む材料規格である ISO 6474 (高純度アルミナ材料規格案) は NWI となり、日本も審議に参加。スウェーデンの会議では水野がタスクフォース会議に出席し、水野がその内容を説明した。日本は 2 軸曲げより、TC206 の規格と整合する一軸曲げ方式を主張。ドイツのフーバーがリーダーとして改正案をまとめる予定。

⑥次回 TC150 総会

2001 年 9 月キャンベラ、または 11 月シドニーで開催されることになった (未確定)。

(3) クイーンメリー&ウェストフィールド大学でのバイオ標準化のための意見交換

・日 時: 9 月 19 日

- ・場 所：クィーンメリー&ウェストフィールド大学 生体医学材料業際研究センター
(Interdisciplinary Research Center (IRC)in Biomedical Materials)
- ・面会者：E.タナー教授、I.レーマン上級講師、I.ギブソン博士。

クィーンメリー大学 IRC にタナー教授等を訪問し、バイオ標準化のための意見交換を行った。

IRC は教授数名、講師他で 30 名程度、テクニシャンが 8 名、学生 38 名、客員研究員として姫路工大 Ogawa 氏、大阪市大 Tohdoh 氏、ヘルシンキ工科大 Mrs.リッチが在籍している。研究所はクィーンメリー&ウェストフィールド大学を中心に、聖バーソロミュー&王立ロンドン医学部・歯学部、王立自由大学医学部のキャンパスと整形外科研究所にある研究所群から構成される。全部で 100 名以上のスタッフと大学院生が、研究所を横断的にチームを組んで研究している。チームには生物学、化学、歯科、工学、材料科学、整形外科医、病理学と物理学の研究者が入っている。

始めに、JFCC の紹介と JFCC におけるバイオセラミックス研究プロジェクトの紹介を行った。更に、JFCC が計画しているバイオセラミックスに関する 4 件の ISO/TC150 規格提案について説明し、協力して規格を進めることで一致した。これは IRC が小久保京大教授、大槻奈良先端科学技術大学助教授等と関係が深く、擬似体液の有効性について熟知していることが背景にある。

タナー教授より IRC の概要説明があった。IRC は英政府が異例にも、10 年間資金（1800 万ポンド；約 30 億円）を得て、1992 年 12 月に設立された。これに大学と企業からの資金を得て運営されている。あと国からは 2 年間の予算はあるが、それ以後はうち切られるため予算源（研究予算の獲得）を考える必要がある。

IRC には 4 プログラムがある。

- ・骨・関節置換材料プログラム
生体活性複合材、バイオセラミックス、骨セメント
- ・整形外科システムプログラム
関節部材、移植実験とインプラントの再生解析
- ・歯科応用プログラム
歯科用ポリマー強化材、薬剤徐放システム、軟質部材材料
- ・再生医工学プログラム
軟骨のキャラクタリゼーションと修復、靱帯修復と取替、細胞工学と生体親和性

このように IRC は生物材料の開発・製造、生物学的システムのキャラクタリゼーション、及びインプラントのバイオメカニクスを融合させた組織、研究テーマ設定をして活動している。

前ディレクターのボンフィールド教授は企業化を重視して IRC を育成してきた。IRC 内のクリーンルーム(8×25 メートル程度)には人工耳小骨(HAPEX®)の製造プラント(原料混合、攪拌、成形)があり、アペネックス社の社員が製品を製造している。25 万ポンドかかった。

摩耗試験機では MTS 社の Hip シミュレータ MTS8-station (8 ヘッド)があり、1995 年より牛血清を含む液中での人工骨頭の摩耗試験を行っている(資料 5)。臼蓋は下部にある形式をとる。径 22~60mm の骨頭を治具に固定し、0~120rpm の回転数、最大負荷 5kN の仕様になっている。牛血清は 2 日間毎に取替る。月 300 万回転できる。試験中の部材はステンレスヘッドとポリエチレン臼蓋の組み合わせであったが、傍らには日本特殊陶業のジルコニアヘッド(セラヘッド)が 7 個あり、今後試験する予定である。この試験機

はボンフィールド教授と MTS の共同開発である。この試験機の使用はその 75% が企業の依頼試験である。これは摩耗測定が経験を要すること、装置が高価なこと、信頼性あるデータは公的な機関が良いことによるとの説明があった。

生体材料の機械的特性測定用に、MTS858、MTS830、MTS810 (疲労用)があった。

レーニエ講師がバイオ標準化の装置を IRC 内に導入した。X線スペクトロメータ、蛍光X線化学分析、マッススペクトル分析、FT-IR、X線回折、熱分析装置、ラマン分光分析、BET 等の装置が揃っていた。

以下、IRC の研究例を示す。

① SBF・K-7 による生体親和性評価

大槻博士が滞在したときに SBF・K-7 製造法を伝えた。K-7 は重要であり、材料の生体親和性を液中での HAp 形成能により評価できる。FT-IR、SEM、XRD で評価する。

② 摩耗粉毒性試験

ヒト骨芽細胞(H3)を使って股関節の摩耗粉毒性を、国立病院と共同研究している。摩耗粉は実際のヒトから取り出し、顕微鏡等で観察・研究する。

③ in vivo 試験

王立自由病院で動物試験をしている。

④ Na^+ 、 CO_3^{2-} 含有 HAp の合成

Ca/P 比 1.62 の Ca プアの HAp は、1.67(理論比)の HAp より生体親和性が劣る。

⑤ Si 含有 HAp

Ca/(P+Si)比を変えた Si 入り HAp を合成し、細胞試験を行った。Si が入ると細胞成長速度が速くなった。これは擬似体液中で生体ガラスから Si が溶出し HAp が生成するとは異なるメカニズムと考えられ、現在研究中である。

⑥ 実摩耗粉

Yamac 博士が、人体の中の人工関節から発生した摩耗粉のポリエチレン分を採取し、その形状によりグループ化し、更にその細胞毒性試験を行っている。

⑦ 人工耳小骨 (HAPEX®)

ボンフィールド教授が 1984 年に特許をとり、スミス&ネヒューに供与。現在までの 6 万件の手術が行われている。HAp を混ぜたポリエチレンのため、患者に合わせて手術中に加工できる。

は企業化を重視して IRC を育成してきた。IRC 内のクリーンルーム(8×25 メートル程度)には

⑧ エンスタタイト

バイオイナート材料ではあるが、有望な材料として研究中。

⑨ Hing 博士の HAp 研究

メルク社の HAp 粉末を用い、気孔率 60、70、80% の 3 種で試験をした。気孔率 80% が良かった。これは連結気孔率が重要であると考えられた。

また動物体内に植え込んだ後、強度試験をすると、気孔率 60% の材料強度は一定であるが、気孔率 80% 材料では埋入前は強度が低いものの埋入期間が長くなるにつれ上昇し、気孔率 60% のものと強度が同じとなる。

外科医の意見では HAp 自体の強度が充分ではなく、強度は他から補完するため、骨細胞が成長しやすいことを望む。

(4) 英国ケンブリッジ大学でのバイオ標準化のための意見交換

- ・日 時：9月20日
- ・場 所：ケンブリッジ大学 材料科学・冶金学部。
- ・面会者：セレナ・ベスト講師(ボンフィールド研究室)。米山隆之(東京医科歯科大)。

ボンフィールド研究室のセレナ・ベスト博士を訪問し、バイオ標準化のための意見交換を行った。

始めに、JFCC の紹介と JFCC におけるバイオセラミックス研究プロジェクトの紹介を行った。

ベスト博士よりボンフィールド研究室の概要説明があった。ボンフィールド教授と彼女は本年4月にクィーンメリー大学より移ったばかりで、粒度分析装置、試験片加工装置、擬似体液関連装置はあるが、wet-SEM、共焦点レーザー顕微鏡、他の装置は現在発注をしているか、検討中であるとのことであった。摩耗装置も購入予定であり、MTS 社の装置を導入する予定である。

研究費の25%は企業から得ている。デラー、ゴードン研究所、ロールスロイス社から研究費と研究員の提供を受けている。

クィーンメリー大学 IRC とは共同研究を行っている。IRC には研究設備が揃っており、ここではアイデアを出していく。細胞培養は Adderbrook's 病院、他2病院と共同で研究を行う(ウサギ、羊を用いる)。in vivo 試験はニール教授(Rushton)が行う。

擬似体液関係の ISO 標準化に関して、今後は意見交換を行い協力して進めることで合意を得た。

(5) Bioceramics13でのバイオ標準化のための情報収集

- ・日 時：11月23日(木)～11月26日(日)
- ・場 所：Dept. of Orthopaedic Surgery Bologna University, ISTITUTI ORTOPEDICI RIZZOLI

本会議では13のセッションにおいて、138件の口頭発表と152件のポスターによる発表がおこなわれた。そのうちの人工関節のセッションでは31件の口頭発表と6件のポスターによる発表がおこなわれた。人工関節の分野では股関節に関する発表が大部分を占めた。特に臨床成績に関するシンポジウムがおこなわれ、人工股関節に関する多くの臨床成績が報告された。臨床成績としては人工股関節の10～25年程度の成績が報告されており、アルミナ／アルミナの組合せの優位性を報告する発表が注目された。また、ジルコニアに関しては臨床成績は報告されず、生体内を模擬した使用環境での特性評価結果がいくつか報告されていた。全体的に観ると、人工股関節の組合せとして、アルミナ／ポリエチレンの組合せからアルミナ／アルミナの組合せへの転換の指向が見られた。本会議がセラミックスに関する会議であることを割り引いても、この点は本プロジェクトの耐衝撃性の評価に考慮すべき点である。また、ジルコニアに異方性を有する粒子を分散させて強度および靱性を向上した新材料なども報告されており、このような新たな材料についても念頭においた規格作りが必要であることを感じた。主な発表を以下に示す。

Long Term Clinical Results of Total Joint Replacement with Alumina/Alumina Articulation (*keynote lecture*)

L. Sedel, P. Bizot, R. Nizard, M. Hammadouche, D. Hannouche (France)

Metal-on-Metal Articulation in Total Hip Arthroplasty (*keynote lecture*)

P.G. Marchetti, R. Binazzi, V. Vaccari, A. Manca, R. Rossi, A. Campagna, M. Magnani, M. Baldarelli, E. Pasini (Italy)

Outcome of Modular Press-Fit Acetabular Components in Total Hip Arthroplasty. A Comparative Clinical Trial Using Polyethylene and Alumina Liners

R.P. Pitto, D. Schwammlein, M. Schramm (Germany)

Total Hip Prostheses with Cup and Ball in Ceramic and Metal Sockets (*student presentation*)

P. Gardelin, J.P. Seminario, C. Corradini, J. Fenollosa Gomez (Italy, Spain)

Ceramic on Ceramic Couplings – Twenty Years Experience

G. Gualtieri, P. Calderoni, A. Ferruzzi, S. Gnudi, P. Frontali, F. Calista, I. Gualtieri (Italy)

Comparison of Ceramic on Ceramic to Ceramic on Polyethylene Total Hip Replacement (*student presentation*)

B.R. Roy, A.B. Nevelos, E. Ingham, D.L. Shaw, J. Fisher (U.K.)

Histological and Ultrastructural Analysis of Alumina Wear Debris

E. De Santis, G. Maccauro, L. Proietti, G. Falcone, V. De Santis (Italy)

Al₂O₃ Particles from Blasted Ti-Based Total Hip Implants Contaminate Metal on Metal Articulations and Increase Wear

H. Plenk jr, M. Bohler, K. Knahr, I. Steffan, A. Walter (Austria)

3 to 18 Year Clinical Results of Total Knee Replacement with Ceramic Components

H. Oonishi, N. Murata, M. Saito, S. Wakitani, K. Imoto, S. Kin, Y. Che, H. Nakaya, M. Tanaka, H. Amino (Japan)

(6) 英国ケンブリッジ大学でのバイオ標準化のための意見交換

・日 時：11月20日(月)

・場 所：ケンブリッジ大学エマニュエルカレッジ

・面会者：Prof. Bonfield, Prof. Hamphreys, Dr. Best, 小久保教授、中村教授（京大）、山下教授（東京医歯大）、大槻助教授（奈良先端大）、尾野、浅岡（三菱マテリアル）、松下、由利（神戸製鋼所）、日高、平山（旭光学）、大蔵（日特）、山本（JFCA）、瀧川

JFCAの調査団の一員として、ケンブリッジ大学を訪問し、バイオ標準化のための意見交換をおこなった。当日は、“To Survey Present and Future Prospects for Bioceramics” という目的のもと、日英双方の代表者による8件の講演がおこなわれた。

最初にケンブリッジ大学における生体材料に関する研究の説明がおこなわれた。ケンブリッジ大学では材料工学科を中核として、他の組織であるBone Research UnitやOrthopedic Research Unitなどと強い連携を持つCambridge Center for Medical Materialsという組織を作り研究開発をおこなっている。このCCMMでは13の具体的テーマを設定しており、第2世代の生体材料の開発と再生工学に集中している。また、生体材料の開発には次の2テーマを中心におこなっている。

1. ハイドロキシアパタイトの一部元素をCO₃、Si、Na、Mg、Fなどで置換し、生体適合性をさらに高める。

2. ポリエチレンとハイドロキシアパタイトの複合体の組成を制御し、力学的特性や生体適合性を向上させる。

他の講演では、イギリスおよび日本における生体材料の現状が報告された。講演をもとにした意見交換の中では、現在の生体材料では解決すべき問題が多く残っており、自家骨に匹敵するものを人工的に作り上げるのが目標であるとの共通認識が確認された。また、その過程で評価法の標準化は一つの重要なテーマであることが確認された。

(7) キーンメリー&ウェストフィールド大学でのバイオ標準化のための意見交換

・日 時：11月21日（火）

・場 所：キーンメリー&ウェストフィールド大学 生体医学材料業際研究センター
(Interdisciplinary Research Center (IRC) in Biomedical Materials)

・面会者：Dr. Hing、

キーンメリー大学 IRC に Dr. Hing を訪問し、バイオ標準化のための意見交換を行った。主な議論の内容を以下に示す。

①生体用ジルコニアセラミックス

生体用ジルコニアセラミックスに関する議論をおこなった。標準化のポイントは相変態の取扱いであるということ意見が一致した。医療現場においてもオートクレーブで処理した場合の相変態が問題にある場合があることから、処理条件と相変態量の関係、相変態量と強度の関係などを定量的に評価することが重要であるとの結論が得られた。

②疲労特性の標準化

Dr.Hingらのグループでは骨セメントの疲労特性の標準化をおこなっている。その際の問題点などを議論した。関連論文数点の紹介も受け、人工股関節部材の標準化において非常に有意義な議論であった。

その他、ポリエチレンとハイドロキシアパタイトの複合体の作製プロセス、人工股関節の摩耗特性の評価法などの説明も受けた。金属人工股関節の評価に関しては非常に多くの蓄積があり、今後こちらのセラミックスのデータと情報交換しながら協力していくことを約束した。

4.4.2 国際標準へのアプローチ

今回までの海外調査を通じて、規格案が ISO 規格として成立する必要条件は

- 1.社会にその規格を必要とするニーズがあること
- 2.現存の ISO 規格体系の空白部を埋めるものであること(改善も含む)
- 3.SC、WG のメンバーから規格案の検討に入るように支持されること

であることが重要であることを確認した。

生体用ファインセラミックスの試験評価方法を国際標準として制定するためのアプローチ方法(案)は、以下と考えられる。

1. 国際規格原案の作成
2. TC150 の P メンバー国(会議への参加国)ならびに O メンバー国(会議には参加しないが投票権を持つ国)の専門家と意見を交わし賛成／異議を再評価する
3. TC150 の会議、その他の国際会議に出席し、成果を発表・議論する
4. TC150 国内対応委員会を通じて、TC150 へ提案する

これらのプロセスの中で、規格案を提案し制定するには提案前後の”国際根回し”が肝要であり、規格案を ISO 規格として成立させるための必要条件であると考えられる。ISO 国際会議では、米国、欧州と比べて日本からの参加者数が少ないこと、提案前に支持者を確保することが重要であること、会議においていわゆる顔の売れた委員であり仲間がいること、国益を護る押しの強さをソフトな外交官の物腰でくるんだスマートな論理性を備えること、提案から制定まで数年の長丁場を覚悟すること、等の要件を、迅速な日本からの国際規格化のために整える必要があり、そのための人材育成が急務である。現在の日本の ISO/TC150 業務は京都大学教授の堤定美氏の尽力によるところが大きいですが、業界、団体から日本の標準化をリードする人材を出すことも必要と考えられる。

4.4.3 バイオセラミックス材料標準化活動状況

「生体用ファインセラミックスの試験評価方法の標準化」研究の成果は、国際標準化に資する必要がある。生体用ファインセラミックス特性評価に関する国際規格策定のために、バイオセラミックスに係わる ISO を含めた規格化の状況の調査を行った。

1) 標準化活動概要

内外のセラミックス材料に係わりのある標準化活動状況を、図 4.4-2 に示す。

国内の生体用フラインセラミックスに係わる標準化活動は、通産省(工業技術院、日本工業技術調査会、フラインセラミックス室)、日本規格協会(JSA)、日本セラミックス協会(CSI)、フラインセラミックス国際標準化推進協議会(JFIS)、日本フラインセラミックス協会(JFCA)、フラインセラミックスセンター(JFCC)、国立研究所(名工研等)等で行われている。

海外では米国材料試験協会(ASTM)規格と欧州標準化委員会規格(CEN)が生体用フラインセラミックスに係わる標準化活動に携わっている。その上に、国際標準化機構(ISO)があり、そのなかの TC150(外科用体内埋没材)で生体用フラインセラミックスの標準化が行われている。VAMAS は 1982 年のフラインス・ヘルサイユサミットのときに先進 7ヶ国と CEC(欧州共同体)が合意して始めた先進材料のフレ標準化研究活動である。現在 16 の技術作業部会(TWA)が活動し、TWA7 はバイオマテリアルを扱っている。

2) 日本工業規格(JIS)

日本規格協会が関わり、平成 9 年 8 月 1 日に三件の標準情報(TR)がタイフ II として公表された。タイフ II とは近い将来の JIS 規格化に必要な規格情報のことであり、平成 11 年 4 月 20 日に通商産業省、厚生省共管として JIS となった。

①JIS T0301 金属製インプラント材料の細胞適合性評価方法。

②JIS T0302 金属製インプラント材料の耐食性の電気化学的評価方法。

③JIS T0303 人工関節用材料の耐摩耗性試験方法。

セラミック関連は JIS T0303 であり、ISO の TC150/SC1 の NW1 として回覧された。使用する摩耗試験機の限定はなく、標準試験片として超高密度ポリエチレンとステンレスの組み合わせが採用されている。押しつけ荷重は 2.5MPa 以上、摺動速度 20mm/秒の条件で、リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.0-7.4, 37±2℃)に浸漬した環境下での試験を行うという内容である。

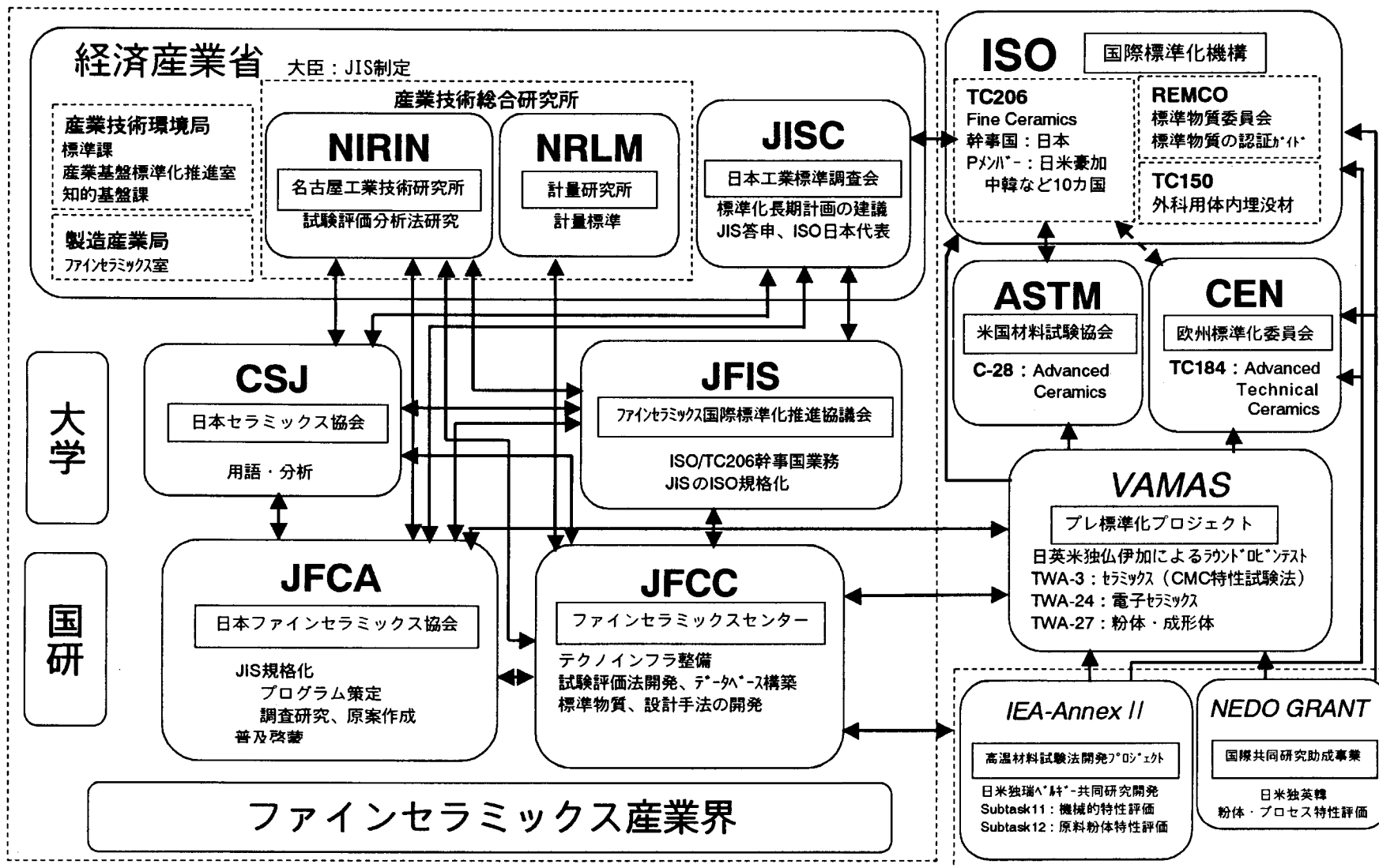


図 4.4-2 セラミックス材料に係わりのある内外の標準化活動状況

3) JFCA 規格

日本ファインセラミックス協会規格として、以下の 11 件が制定されている。

- ①EC4-001 バイオセラミックスの気孔率及び比重の試験方法。
- ②EC4-002 バイオセラミックスの粒度の試験方法。
- ③EC4-003 バイオセラミックスの細孔分布試験方法。
- ④EC4-004 バイオセラミックスの比表面積試験方法。
- ⑤EC4-005 バイオセラミックスのビッカース硬さ試験方法。
- ⑥EC4-006 バイオセラミックスの結晶構造試験方法。
- ⑦EC4-007 バイオセラミックスの曲げ強さ試験方法。
- ⑧EC4-008 バイオセラミックスの圧縮強さ試験方法。
- ⑨EC4-009 バイオセラミックスの弾性率試験方法。
- ⑩EC4-010 バイオセラミックスの破壊靱性試験方法。
- ⑪EC4-011 バイオセラミックスの溶出物試験方法。

JIS にあるモノリシックセラミックスのための規格を、バイオセラミックス用に改訂した形式の規格といえる。

4) 米国 ASTM 規格

ASTM として制定済みの規格には、以下の 3 件がある。

アルミナセラミックス ASTM F603

リン酸カルシウム ASTM F1088

水酸アパタイト ASTM F1085

進行中の規格は、アルミナ単結晶とセラミックスコーティングがある。

5) 国際標準化・ISO 規格

(a) TC150

生体用ファインセラミックスに関連する ISO の TC は 150 である。

国際幹事はドイツ DIN である。TC150 のスコープは「外科用及びそのために必要な埋没材に係わる標準化活動で、用語の定義、規定と試験方法に係わる。総ての種類の埋没材、及び製造と応用に関連する基材と複合材を対象とする。外科用埋没材とは、治療を目的として一時的または永久的に生体内に埋め込まれる物体または装置をいう。」とある。

(2)TC194

ISO/TC194(医療用デバイスの生物学的評価【<http://dmd.nihs.go.jp/isetc194>】)の国際幹事は、TC150 と同様に、ドイツ DIN である。そのスコープは「医科歯科用材料及びデバイスに適用可能な生物学的試験方法の標準化に伴う、これら材料及びデバイスの生物学的評価をするための標準化」とある。生物学的評価は、生体用セラミックスの実用化、応用を進める上で不可欠な分野である。

以下の 15 のワーキンググループに分かれている。

- WG1 生物学的評価方法と用語の体系的アプローチ
- WG2 生物学的試験における劣化
- WG3 動物保護
- WG4 ヒトに対する臨床調査
- WG5 細胞毒性
- WG6 変異原性、発ガン性、reproductive toxicity(催奇形性)
- WG7 全身毒性(systemic toxicity)
- WG8 刺激、感作性
- WG9 血液への影響
- WG10 埋没試験
- WG11 殺菌処理残留物
- WG12 試料作成と標準物質
- WG13 毒性動的研究 (toxicokinetic study)
- WG14 材料のキャラクタリゼーション
- WG15 生物学的評価の戦略的アプローチ

4.4.4 国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案

本年度までのバイオセラミックス材料・部材の評価技術研究成果とバイオセラミックスに関する規格化・標準化及び評価関連技術に関する国内・海外調査結果に基づき、国際規格骨子の作成並びに国際標準化活動計画立案を行った。

その結果、以下の4種の規格特性を対象にそれらの国際規格骨子作成並びに国際標準化活動計画立案を行うこととした。

- ①生体用イットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TPZ)[改定版]
- ②生体用イットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TPZ)ヘッドを用いた人工股関節の疲労特性評価方法[改定版]
- ③生体用ファインセラミックスの生体親和性評価用擬似体液の調製方法(新規)
- ④生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法(新規)

これら規格の標題、規格の適用範囲、目的と理由、引用規格・関連文書、予定 TC/SC/WG、国内審議団体名、他団体との関係、及び規格の技術内容について、表 4.4-2～5 に纏めた。

上記①規格案は ISO/TC150、外科用体内埋没材小委員会 SC1(材料)に提案して審議を受ける予定である。

上記②の規格案は ISO/TC150、外科用体内埋没材小委員会 SC4(人工関節)に提案して審議を受ける予定である。

上記③、④の規格案は ISO/TC150、外科用体内埋没材小委員会に新 SC(生体親和性)新設を提案し、そこで審議を受ける予定である。

現在考えられる国際標準化活動スケジュールを以下に示す。

- 1) 平成 11 年度からの 3 カ年計画により評価方法を開発する。
- 2) ISO/TC150、SC1 及び同 SC4 国内対応機関である(社)日本ファインセラミックス協会の標準化専門委員会(EC-4)が、開発した評価方法の標準化調査研究を平成 13 年度より 2 年間行う。
- 3) 平成 14 年度に国際規格原案を作成する。
- 4) 平成 15 年度までに ISO/TC150 へ提案し、国際規格化を目指す。

表 4.4-2 ISO 提案予定規格まとめ(生体用イットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TZP))

規格の表題(Subject) 生体用イットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TZP) (改訂版) Implants for surgery --- Ceramic materials based on yttria-stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP).
規格の適用範囲(Scope) この規格は外科用体内埋没用材料としての、生体適合性がありかつ安定なセラミックスであるイットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TZP)の特性に疲労特性を追加し、疲労特性試験方法についての規定を追加する。
目的と理由(Purpose & Justification) 外科用体内埋没用材料において、繰り返し荷重のかかる部位で使用される材料がある。その場合疲労特性が問題となる。特にジルコニアにおいては疲労負荷条件により相変態がおこる場合があり、これが材料強度に影響を及ぼすことが知られている。しかしながら現行の ISO13356 には疲労特性の項目が含まれておらず、規格としてこの項目を追加する必要があると思われる。
引用規格・関連文書(Normative Reference) ISO 13356:1997, Implants for surgery– Ceramic materials based on yttria-stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP). ISO/FDIS 14704: Flexural strength of monolithic ceramics at room temperature. ASTM C 1161:1990, Determination of the strength of advanced ceramics in 4point bending. EN 843-1:1995, Advanced technical ceramics– Monolithic ceramics– Mechanical properties at room temperature– Part 1:Determination of flexural strength. JIS R 1621:1995, Testing methods for bending fatigue of fine ceramics at room temperature.
予定 TC/SC/WG ISO/TC150/SC1 (材料)
国内審議団体名 「ISO/TC150(外科用体内埋没材)、SC1(材料)及び SC4(人工関節及び人工骨)国際回答調査作成」委員会(財団法人日本規格協会、社団法人日本ファインセラミックス協会)。
他の国際的な団体の活動との関係、連携機関、ISO/IEC 内の調整の必要性 米国材料試験協会(ASTM)、欧州標準化委員会(EN)における規格化の動きを調査し、規格作成に向けての技術的情報交換と調整が必要である。
規格の技術的内容 試験方法については JIS R 1621 に規定されている方法を主体とし、ISO/FDIS 14704 の規定を参考とする。曲げ疲労試験の試験片サイズについては、ISO 13356、ISO/FDIS 14704、ASTM C 1161 及び EN 843-1 による規定を参考とする。

表 4.4-3 ISO 提案予定規格まとめ(生体用イットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TZP)ヘッドを用いた人工股関節の疲労特性評価方法)

規格の表題(Subject) 生体用イットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TZP)ヘッドを用いた人工股関節の疲労特性評価方法。 Implants for surgery — Hip joint prostheses— Fatigue test of zirconia heads— Part 1 : Test method.
規格の適用範囲(Scope) この規格は、イットリア安定化正方晶ジルコニア(Y-TZP)ボールと金属のネックからなる人工股関節の骨頭部分の疲労特性を評価する試験方法について規定する。
目的と理由(Purpose & Justification) 人工股関節の骨頭部分には歩行時に繰り返し荷重がかかることが知られている。特にジルコニアにおいては疲労により相変態が起こり破壊に至る場合があり、静的強度だけでなく疲労特性を調べることが重要である。そこで、1999年にISOのNWIとして採択され、日本が参加を予定するその表記疲労特性規格に関するWGにおいて、「生体用ファインセラミックスの試験評価方法の標準化」研究の成果を活用し、疲労特性規格内容を充実させる。
引用規格・関連文書(Normative Reference) ISO/TC150/NWI:1999, Implants for surgery — Hip joint prostheses— Fatigue test of zirconia heads— Part 1 : Test method. ISO/TC150/NWI:1999, Implants for surgery— Hip joint prostheses— Fatigue test of zirconia heads— Part 2 : Requirements. ISO 7206-1:1995, Implants for surgery – Partial and total hip joint prostheses— Part 1: Classification and designation of dimensions
予定TC/SC/WG ISO/TC150/SC4 (対象；骨・関節置換)に決定。
国内審議団体名 「ISO/TC150(外科用体内埋没材)、SC1(材料)及びSC4(人工関節及び人工骨)国際回答調査作成」委員会(財団法人日本規格協会、社団法人日本ファインセラミックス協会)。
他の国際的な団体の活動との関係、連携機関、ISO/IEC内の調整の必要性 この規格は既に1999年8月、NWIとしてフランスがISO/TC150に提案し、日本はこれに賛成すると共にWGに参加する旨の投票を1999年11月に行った。今後は「生体用ファインセラミックスの試験評価方法の標準化」研究の成果を、ISO規格化の過程において活用し、規格内容を質的に充実させることが必要である。
規格の技術的内容 試験材料に関する一般的な要求は、1999年に承認されたNWIとISO 7206-1により規定されている内容に準ずる。試験雰囲気は大気中、または生体内環境を模擬した約37℃の溶液中とする。溶液としては擬似体液、生理的食塩水、血清等を検討・比較する。疲労試験は最小/最大応力比0.1の一軸の圧縮によりおこない、最大周波数20Hz、打ち切り回数10⁷回とする条件の妥当性を研究した結果を基に、日本の規格案をWGに提案する。

表 4.4-4 ISO 提案予定規格まとめ(生体用ファインセラミックスの生体親和性評価用擬似体液の調製方法)

規格の表題(Subject) 生体用ファインセラミックスの生体親和性評価用擬似体液の調製方法 Implants for surgery --- Preparation of simulated body fluid for biocompatibility test.
規格の適用範囲(Scope) この規格は生体用ファインセラミックス材料の生体親和性(骨結合性)評価用の、ヒトの血漿と同等の無機イオン濃度を有する溶液の調製方法及びその溶液の化学組成を規定する。
目的と理由(Purpose & Justification) 生体用ファインセラミックス材料と生体組織との親和性を調べるために、動物実験による評価試験が行われているが、動物実験は長い期間と多くの費用がかかり、かつ犠牲を伴うことから、動物実験によらない簡便な生体親和性評価方法が望まれている。擬似体液は人の血漿と同等の無機イオン濃度を有する無機溶液である。試験材料をこの擬似体液に浸漬し材料上への骨類似アパタイトの形成の度合い等を測定することにより、in vitro で材料の生体親和性を測定することができる。擬似体液の使用により、多くの動物実験を省くことができる。
引用規格・関連文書(Normative Reference) 1.T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamoto, Bio. Mater. Research, 24, 331-343(1990). 2.T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, J. Bio. Mater. Research, 24, 7211-734(1990). 3.M. R. Filgueiras, G.L. Torre, and L.L.Hench, J. Bio. Mater. Research, 27, 445-453(1993). 4.H. M. Kim, F. Miyaji and T. Kokubo, C. Ohtsuki, T. Nakamura, J.Am.Ceram.Soc.,78 [9] 240511(1995). 5.S. B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, J. Am. Ceram. Soc., 78[7]1769-74(1995). 6. H. M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, T. Nakamura, J. Bio. Mater. Research (accepted).
予定TC/SC/WG ISO/TC150/新設 SC(対象 ; in vitro 生体親和性)/新設 WG(対象 ; 擬似体液調製)
国内審議団体名 「ISO/TC150(外科用体内埋没材)、SC1(材料)及び SC4(人工関節及び人工骨)国際回答調査作成」委員会(財団法人日本規格協会、社団法人日本ファインセラミックス協会)。
他の国際的な団体の活動との関係、連携機関、ISO/IEC 内の調整の必要性 米国材料試験協会(ASTM)、欧州標準化委員会(EN)における規格化の動きを調査し、規格作成に向けての技術的情報交換と調整が必要である。
規格の技術的内容 生体用ファインセラミックス材料の生体親和性を動物実験によらず簡便に評価するために、人の血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する無機質擬似体液の調製方法を規定する。使用容器の材質と洗浄・乾燥方法、使用試薬の純度・使用量、試薬の溶解・混合方法、最終溶液の pH を 7.40 に調製する方法、及び調製した擬似体液の保管方法と使用期間を標準化する予定。

表 4.4-5 ISO 提案予定規格まとめ(生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法)

規格の表題(Subject) 生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法 Implants for surgery--- Biocompatibility testing.
規格の適用範囲(Scope) この規格はヒトの血漿と同等の無機イオン濃度を有する無機質の擬似体液を用いて、生体用ファインセラミックス材料の生体親和性を評価するために、試験材料の擬似体液への浸漬方法、生成する骨類似リン酸カルシウムの生成・定量方法について規定する。
目的と理由(Purpose & Justification) 生体用ファインセラミックス材料と生体組織との親和性を調べるために、動物実験による評価試験が行われているが、動物実験は長い期間と多くの費用がかかり、かつ犠牲を伴うことから、動物実験によらない簡便な生体親和性評価方法が望まれている。擬似体液としては人の血漿と同等の無機イオン濃度を有する無機溶液を用いる。本擬似体液の使用により、多くの動物実験を省くことができる。 試験材料をこの擬似体液に浸漬すると、材料のもつ生体親和性の程度に従って材料表面に骨類似リン酸カルシウムが形成されることが知られている。生成するリン酸カルシウムを定性的・定量的に測定することにより、in vitro で材料の生体親和性を評価する標準的な方法を規定する。
引用規格・関連文書(Normative Reference) 1.T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamoto, Bio. Mater. Research, 24, 331-343 (1990). 2.T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, J. Bio. Mater. Research, 24, 721-734 (1990). 3.M.R. Filgueiras, G.L. Torre, and L.L. Hench, J. Bio. Mater. Research, 27, 445-453 (1993). 4.H.M. Kim, F. Miyaji and T. Kokubo, C. Ohtsuki, T. Nakamura, J. Am.Ceram.Soc.,78 [9] 2405-11 (1995). 5.S. B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, J. Am. Ceram. Soc., 78 [7] 1769-74(1995). 6. H. M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, T. Nakamura, J. Bio Mater. Research, in press.
予定 TC/SC/WG ISO/TC150/新設 SC(対象 ; in vitro 生体親和性)/新設 WG(対象 ; 擬似体液による生体親和性評価試験)
国内審議団体名 「ISO/TC150(外科用体内埋没材)、SC1(材料)及び SC4(人工関節及び人工骨)国際回答調査作成」委員会(財団法人日本規格協会、社団法人日本ファインセラミックス協会)。
他の国際的な団体の活動との関係、連携機関、ISO/IEC 内の調整の必要性 米国材料試験協会(ASTM)、欧州標準化委員会(EN)における規格化の動きを調査し、規格作成に向けての技術的情報交換と調整が必要である。

規格の技術的内容

生体用ファインセラミックス材料の生体親和性を動物実験によらず簡便に評価するために、人の血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する無機質擬似体液に、材料を浸漬することによって評価する。擬似体液の金属イオン、陰イオン濃度変化は高周波誘導結合プラズマ発光分析及びイオン電極による化学分析法により、骨類似リン酸カルシウムの析出速度は薄膜X線回折法、赤外線反射法、走査型電子顕微鏡観察法による迅速測定法を検討する。

5 結論

5.1 技術開発

5.1.1 得られた成果

1) 生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討

- ・アルミナセラミックス、ジルコニアセラミックスともに、疲労特性は試験環境、周波数などの試験条件の影響を大きく受けることが明らかになった。
- ・ジルコニアセラミックスの疲労試験において、生理食塩水中 36°C、最大負荷応力 800MPa で 1×10^7 回まで破断が起らなかった試験片においても、正方晶から単斜晶への変態が起っていないことが確認された。

2) 生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討

- ・生体用アルミナおよびジルコニアセラミックスからなる人工股関節骨頭について、負荷条件の違いによる圧縮強度変化を調べた結果、点接触よりも線接触による負荷が望ましいことが明らかになった。
- ・上記部材について、生体模擬環境下における一軸圧縮疲労試験をおこなったところ、2.5t の荷重下においても 10^7 回まで破断が起らないことが明らかになった。
- ・生体用アルミナおよびジルコニアセラミックスからなる人工股関節骨頭について、緩衝材の材質、厚みをパラメータとした衝撃試験をおこなった結果、骨頭の破壊の有無は下部緩衝材の弾性率および上部緩衝材の厚みに依存することが明らかになった。

3) 生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討

- ・生体用材料の骨結合性を評価するために、人の体液とほぼ等しい無機イオン濃度を持つ擬似体液を調製し、調製した SBF 中に生体活性の異なるガラスを浸漬し、その表面にアパタイトが形成される程度を *in vitro* で評価した。擬似体液の有効性及び *in vitro* 法での評価の実証性を確認した。
- ・2 種類の擬似体液、C-SBF と R-SBF を比較した。CO₂ 雰囲気下 C-SBF は生成速度が速く、再現性も良好であった。R-SBF は CO₂ 雰囲気下 C-SBF より生成速度が遅く、ガラス組成との親和性についてもばらつきが認められた。
- ・ヒトの血漿の解離イオン濃度を有する擬似体液 (I-SBF) の調製法を確立し、使用期間は調整後 4 週間であることが分かった。I-SBF、C-SBF と R-SBF の 3 種 SBF のバクテリア除去のためのマイクロフィルター濾過処理の元素およびイオン濃度の影響はない。3 種 SBF のアパタイト形成能をバイオメテック法により研究し、骨アパタイトにほぼ等しいアパタイトを形成させるには SBF 中の炭酸イオンの濃度が重要であることが分かった。
- ・ガラス組成を変え生体活性の異なる 5 種類のガラスをウサギ体内に埋植し、埋植期間と引き剥がし強度との関係の解析および材料への骨新生の組織形態学的な観察を行い、*in vitro* での生体活性の度合いは骨新生の組織形態学的な観察結果と相関性を示すことが分かった。

5.1.2 当初の目的に照らした達成状況とその要因

1) 生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討

環境チャンバー内での疲労試験、歩行時の周波数での疲労試験、ラマン分光法による相変態の影響解析など、生体内模擬環境下での疲労特性評価方法の開発をおこない、当初の目標を達成している。

2) 生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討

疲労試験については、環境チャンバー内での疲労試験、ラマン分光法による相変態の影響解析など、生体内模擬環境下での疲労特性評価方法の開発をおこない、当初の目標を達成している。

衝撃試験についても落錘落下式衝撃試験における緩衝材の種類および厚みを変化させた評価方法を開発しており、当初の目標を達成している。

3) 生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法の検討

生体親和性の尺度として、簡易で再現性があり安定に水酸アパタイトの析出情報を得る必要がある。結晶構造解析(TF-XRD)、形態観察(SEM-EDS)、化学結合解析(FT-IR)及び SBF 中のイオン濃度及び pH 変化(ICP 及び pH 計)という総合的観点から評価することが理想的である。本年度の結果からは、SEM 観察によるアパタイト結晶の確認が最速で確実であると思われるが、部分的な評価となる危険性がある。このことから TF-XRD による試料表面の広い領域の情報からアパタイト形成の判定を行えることから、TF-XRD による評価が推奨される。

本年度は、生体活性ガラス B ($\text{Na}_2\text{O}:\text{CaO}:\text{SiO}_2=22.5:22.5:55$) を用いて、SBF に浸漬し、TF-XRD によりアパタイト特有の XRF 回折信号 ($2\theta=27^\circ, 33^\circ$) の検出速度から生体親和性を数値化して表示することを試みた。SEM-EDS により裏付けることによりより確実な評価法が確立できると考えられる。

二大学への再委託研究に関しては、I-SBF の調製法が確立し三種 SBF のアパタイト形成能を学術的に明らかにし、また in vitro で活性の異なる材料の動物試験により、生体活性の度合いは骨新生の組織形態学的な in vivo 観察結果と相関性を示すことが分かった。

これらの評価方法の開発成果はいずれも、当初の目標を達成している。

5.1.3 今後の技術的課題

1) 生体用ファインセラミックス材料特性評価方法の検討

- ・周波数依存性の明確化および周波数の違いを規格化する手法の考案。
- ・ジルコニアセラミックスにおける疲労破壊と相変態との関係の明確化。
- ・より生体に近い条件下での疲労試験。
- ・部材の疲労特性との相関の明確化。

2) 生体用ファインセラミックス部材の機械的特性評価方法の検討

- ・高荷重下での疲労試験。
- ・生体内負荷方向での圧縮または疲労試験。

図 5-1 に示した SBF 連続流速モデルでは、ペリスタリックポンプにより試料容器には常に新しい SBF が循環し、分析溶液を採取することが可能である。溶液量は任意量を一定に保つことができる。この連続法を用いた浸漬実験では、流速は 1mL/min の SBF 交換により、その SBF 中の無機イオン濃度と pH がほぼ一定を維持していることが確認され、人の血漿により近い状態を保つことが可能にしている。また形成されるアパタイト結晶がよりサイズの大きなものが得られることも確認されている。しかし、実際の体内においては人血流速は約 5L/min で、圧力も検討する必要がある。SBF を用いた in vitro 法が更に生体内に近い状態を保つことができるためにはこの条件に近くなるよう検討することが必要である。今後この条件を保つことが可能な連続法を適用する方向での検討が必要となろう。

5.2 国際標準化

5.2.1 得られた成果

- ・ バイオセラミックス国際標準化に関する海外調査として、スウェーデンで開催された ISO/TC150 総会・WG 会議に出席し規格案の質疑に参加すると共に、規格化情報を収集した。イギリスの二大学を訪問し、擬似体液に関する技術情報交換を行った。
- ・ バイオセラミックスの標準化の現状を調査した。
- ・ 本研究終了後の H14 年度以降に日本から ISO に規格提案を行う内容について検討を行った。

5.2.2 当初の目的に照らした達成状況とその要因

- ・ ISO/TC150 総会・WG 会議に出席することにより、バイオセラミックスの ISO 国際標準化を図る上で必要な情報を入手でき、今後の戦略を練る資料となり、当初の目的を達成した。またイギリスの二大学訪問により、今後の協力関係が築かれ当初の目的を達成した。
- ・ 研究成果を解析し、H14 年度以降に日本から ISO に規格提案を行う内容について検討を行い、当初の目的を達成した。

5.2.3 今後の技術的課題

- ・ バイオセラミックスの ISO 国際標準化を図るためには、毎回 ISO/TC150 総会・WG 会議に出席し、産業界の意向を ISO 規格に反映させる活動の積極的な継続が重要である。
- ・ ISO/TC150 及び 194 に提案されている規格の進行状況、標準化活動の計画・内容・進行状況の調査の継続が必要である。
- ・ 本研究の成果を受けて日本から ISO 規格化を提案する 4 規格案の作成が必要である。
- ・ 国際会議・学会での積極的な学術発表と情報交換が必要である。

6. あとがき

3カ年計画で始まった本研究開発事業の2年間が終了した。

本年度は平成11年度の研究から引き続き、生体用のアルミナとジルコニアセラミックス材料および部材の機械的特性評価方法、生体用ファインセラミックス材料の生体親和性評価方法をより高度に研究した。

京都大学大学院の工学系と医学系への再委託研究も実施し、ヒトの血液の解離イオン濃度に近い改良型擬似体液の調製とそれを用いたアパタイト形成能の研究、および生体親和性評価に関する動物実験による *in vivo* 研究の成果を含め、ファインセラミックスセンターにおける研究成果と合わせて、国際規格提案内容を立案していくことになる。昨年度に立案した4件のISO提案予定内容を修正しながら、研究データを更に積み重ねて平成14年度以降、日本からの提案を行う予定である。

国内外の標準化に係わる状況をみると、国際標準化情報の把握と関係者・関係機関との情報・意見交換が重要である。特にバイオセラミックスのISO国際標準化を図るためには、毎回ISO/TC150総会・WG会議に出席し、産業界の意向をISO規格に反映させる活動の積極的な継続が重要である。欧米は企業の積極的な参加があり、ISOの専門家がいるように見受けられ、日本もそのような専門家を時間をかけて育成する必要がある。さもないと日本からの規格提案が速やかに規格として採択されにくいことになる懸念がある。これに関連し、ISO/TC150のみならず、TC194、ASTM、CEN等の規格化進行状況、標準化活動の計画・内容・進行状況の調査継続が必要である。

平成13年度の研究終了までには多くの課題が残っているが、本年度までの研究成果を基に一層努力し、「日本から提案する国際標準化計画を立案し、そのISO規格化を実現する」という最終目的に向けて努力する必要がある。これにより社会的要請に応える研究開発成果の達成を目指したい。

7. 参考文献

4.1 章, 4.2 章,

- [1]セラヘッド A ジンマーアルミナセラミック製骨頭ネックカタログ, ブリストル・マイヤーズスクイブ (株) .
- [2]JFCC 実用標準物質シリーズ ジルコニア共通焼結体リファセラム ZR1 カタログ, (財) ファインセラミックスセンター.
- [3]A. G. Evans, J. Mater. Sci., 7 (1972) .1137.
- [4]塩野剛司, 太田陸夫, 曾我直弘, 材料, 32 (1983).1254-59.
- [5]若井史博, 桜本久, 坂口修司, 松野外男, 材料, 35 (1986) .898-903.
- [6]H. G. Scott, J. Mater. Sci., 10 (1975) 1527-35.
- [7]吉澤友一, 東京大学博士論文 第2章 (1993).
- [8]T. K. Gupta, J. Mater. Sci., 13 (1978) .1464.
- [9]E. C. Subbarao, H. S. Maiti and K. K. Srivastava, Phys. Stat. Sol., (a) 21 (1974) 9.
- [10]佐久間健人, セラミック材料学, 海文堂 (1990).
- [11]K. Nakajima, K. Kobayashi and Y. Murata, Advances in Ceramics, Vol.12, Science and Technology of Zirconia II, Ed. by N. Claussen, M. Ruhle and A. H. Heuer, The American Ceram. Soc., Columbus, OH (1985) 399-407.
- [12]人工股関節総合カタログ Ver.2.3, 京セラ (株) .

4.3.1 章

- [1] H-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, C. Ohtsuki and T. Nakamura, J.Am.Ceram.Soc., 78, 2405-11(1995)
- [2] H-M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka and T.Nakamura, J.Mater.Sci.:Mater.Med., 11 (2000) 421-426
- [3] H-M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, T.Nakamura, Y. Suetsugu, and J. Tanaka, J.Biomd Mater.Res. 46 (1999),p228
- [4] K.Ohura, T.Yamamuro, T.Nakamura, T.Kokubo, Y.Ebisawa, Y.Kotoura, and M.Oka, J.Biomed. Mater. Res.,25, 357-65 (1991)
- [5] M.Ogino and L.L.Hench, J.Non-Cryst. Solids., 38-39, 673-78 (1980)
- [6] H-M. Kim, T.Miyazaki, T.Kokubo and T.Nakamura, Bioceramics 13, Nov.22-26 Bologna,(2000)
- [7] L.L.Hench, J.Am.Ceram.Soc., 74, 1487-510 (1991)
- [8] ファインセラミックス事典 リン酸塩 生体生化学材料 p539
- [9] C.Ohtsuki, T.Kokubo, K.Takatsuka, and T.Yamamuro, J.Ceram.Soc.Jpn., 99,1-6 (1991)
- [10] C.Ohtsuki, T.Kokubo, K.Takatsuka, and T.Yamamuro, J.Biomed. Mater. Res.,25, 1363-70 (1991)

- [11] T.Kokubo, J. Non Cryst. Solids, 120, 138-51 (1990)
- [12] Izquierdo-Barba I, Salinas AJ, Vallct-Regi M,

4.3.3 章

- [1] Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Ohtsuki C, Nakamura T “Bioactivity of NaO-Cao-SiO₂ Glasses” J. Am.Ceram. Soc., 78(9),2405-11(1995)
- [2] Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T “Particulate Bioglass Compared with Hydroxyapatite as a Bone Graft Substitute” Clin. Orthop. Rel. Res., 334,316-325(1997)

8. 研究発表・講演、文献、特許等の状況

8.1 研究発表、講演（口頭発表）

- 1. 古家拓郎、金鉉敏、小久保正、宮崎敏樹、中村孝志、” 擬似体液の改良と評価、” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2000、横浜、2000 年 11 月 7-8 日
- 2. H.-M. Kim, T. Miyazaki, T. Kokubo and T. Nakamura, "Revised simulated body fluid," 13th International Symposium on Ceramics in Medicine, Bologna, Italy, November 22-26, 2000.
- 3. 古家琢郎、金鉉敏、小久保正、宮崎敏樹、中村孝志、” 擬似体液中で生成されるアパタイトの組成と構造、” 日本セラミックス協会 2001 年会、東京、2001 年 3 月 21-23 日

8.2 文献

- 1. H.-M. Kim, T. Miyazaki, T. Kokubo and T. Nakamura, "Revised simulated body fluid," pp.47-50 Bioceramics Vol.13, ed. by S. Giannini and A. Moroni, Trans Tech Pub., Switzerland, 2000.

8.3 特許等

なし。

8.4 その他の発表

なし。

9. 付録（国際規格案、調査資料まとめ、委員会等の議事録など）

添付資料(4.3.1 追加実験データ)

第 3 回「生体用ファインセラミックス試験評価方法の標準化」技術委員会議事録。

第 4 回「生体用ファインセラミックス試験評価方法の標準化」技術委員会議事録。

C-SBF 及び R-SBF への結晶化ガラス浸漬実験結果

薄膜 X 線回折スペクトル

2 種類の SBF(C-SBF ; tris 及び R-SBF ; Hepes)に 2 種類の結晶化ガラスを 1-8 週間浸漬した表面の薄膜 X 線回折スペクトルを図 A-2 に示す。

(1) 45S5 (Na_2O 24.4, CaO 26.9, SiO_2 46.1, P_2O_5 2.6 mol%)

(2) 60S5 (Na_2O 17.7, CaO 19.6, SiO_2 60.1, P_2O_5 2.6 mol%)

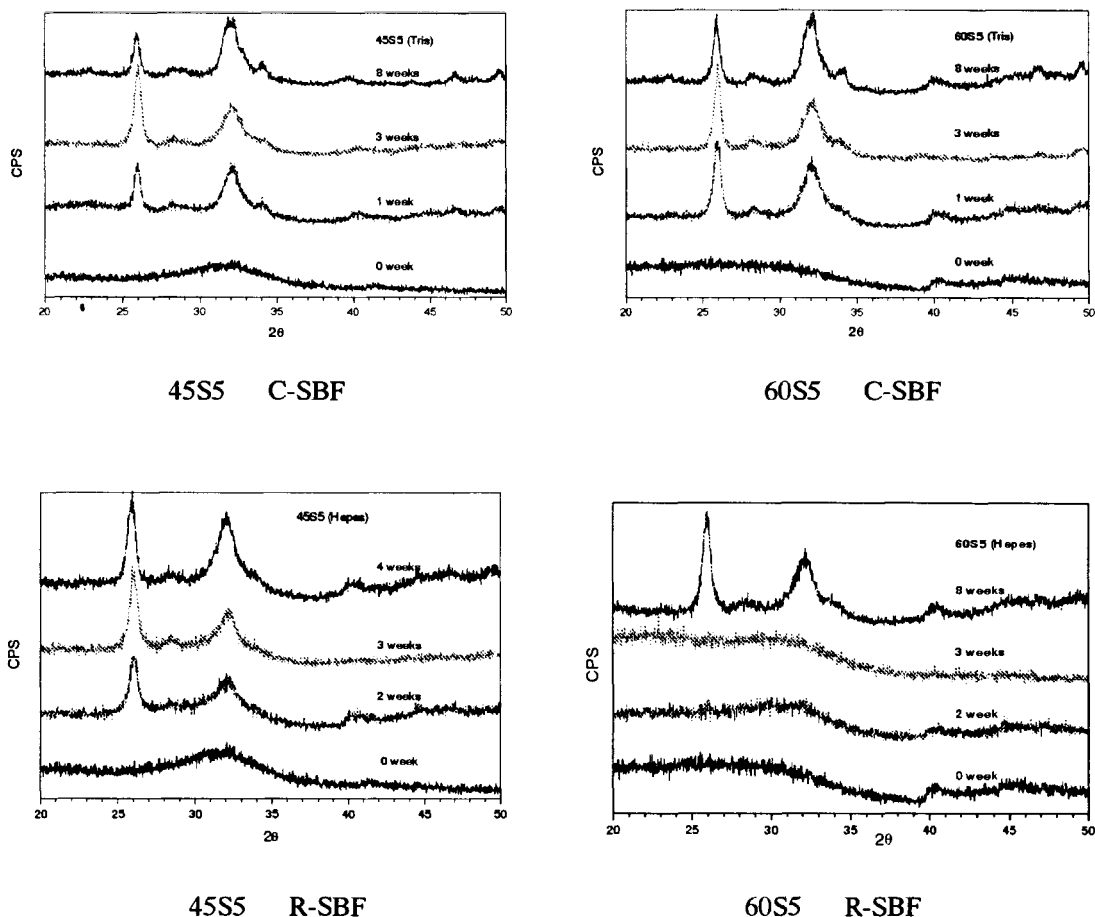


図 A-2 薄膜 X 線回折スペクトル

図 A-2 に示した薄膜 X 線回折スペクトルの出現速度から明らかのように、比較した 2 種類の結晶化ガラスのうち、 SiO_2 含有量の低い 45S5 ガラスの生体活性が高い。既存の C-SBF に浸漬した試料では 1 週間の浸漬で両者の表面に水酸アパタイト固有のスペクトルが強く観測されている。一方、R-SBF に浸漬した試料では両者とも C-SBF 浸漬の試料よりも遅く、45S5 では 2 週間浸漬で水酸アパタイトのスペクトルが出現するが、60S5 では 3 週間浸漬でも XRD スペクトルは出現せず (SEM 観察では確認された)、8 週間浸漬の試料においてスペクトルが出現した。

SBF 中の無機イオン濃度及び pH 変化

以下の 2 種類の結晶化ガラスを 2 種類(C-SBF ; Tris, R-SBF ; Hepes)の SBF 中に浸漬, 各浸漬期間後に取り出し, SBF 中の無機イオン濃度変化を測定した結果を図 A-4 に pH 変化と共に示す。2 種類の結晶化ガラスの組成は以下のとおりである。

- (1) 45S5 (Na_2O 24.4, CaO 26.9, SiO_2 46.1, P_2O_5 2.6 mol%)
- (2) 60S5 (Na_2O 17.7, CaO 19.6, SiO_2 60.1, P_2O_5 2.6 mol%)

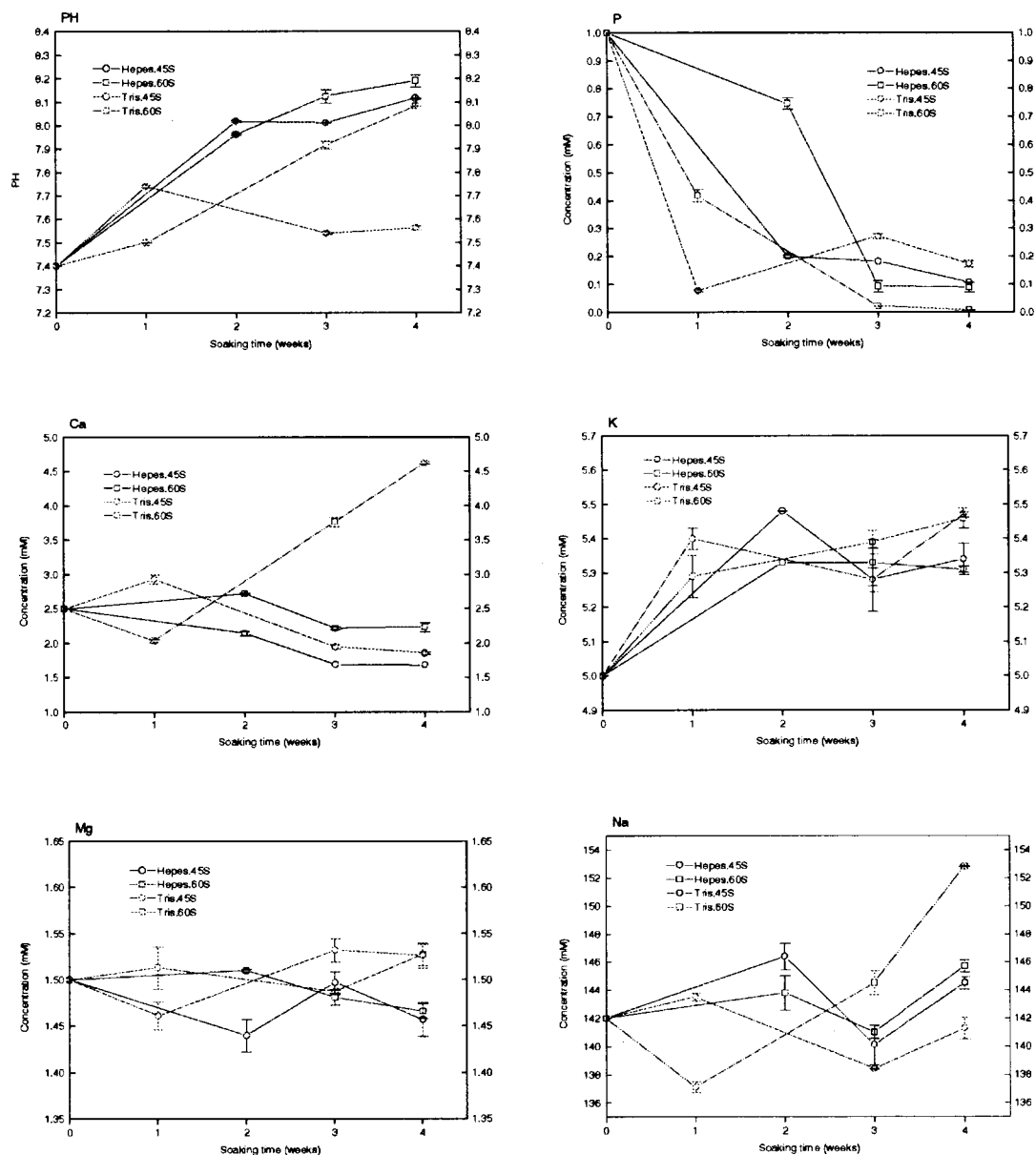


図 A-1 浸漬後の SBF 中の無機イオン濃度変化

Na の含有量の多い 45S5 の pH 上昇の変化が大きい。P の濃度変化から C-SBF におけるアパタイト生成速度が早いことが示唆される。3 週浸漬以後の P の濃度変化(残存量が低い)から, C-SBF 中では 60S5 ガラスから溶出の Ca が遊離イオンとして存在していると考えられる。

付録：第3回「生体用ファインセラミックス試験評価方法の標準化」技術委員会議事録。

日 時：平成12年6月9日 13:30より15:50

場 所：ファインセラミックスセンター 研修室

出席者：委員：小久保正（京大）、中村孝志（京大）、丹羽滋郎（愛知医科大）、横川善之（名工研；亀山哲也氏の代理）、飯島繁（JFCA；高橋孝氏の代理）、松下富春（神鋼）、松尾康史（日特）。

欠席：大西啓靖（大阪南病院）、佐藤道夫（医薬品食品衛生研）、田中順三（無機材研）、立石哲也（融合領域研）。

オブザーバ：市原秋男（FC室）、新谷裕和（NEDO；荻山久雄氏の代理）、茶谷正明（日本規格協会；山村修蔵氏の代理）。

事務局・JFCC研究担当：金順一・角岡勉・水野峰男・安富義幸・瀧川順庸・柳沢雅明・柴田典義（JFCC）。

議事内容

小久保委員長の司会により本委員会は進行した。

1. 挨拶

FC市原班長から、国際標準化ISO/TC150を目指して成果を出してほしい等の挨拶があった。

NEDO新谷主査から、この国際標準創成事業は新規産業支援が目的の一つであり成果を期待する等の挨拶があった。

2. 資料確認

配付資料を確認した。

3. 議事録の確認

第2回技術委員会議事録（資料資料0001-02）を承認した。

4. 平成12年度研究開発計画・活動状況

1) 全体計画と標準化予定(JFCC)

事務局水野が資料0001-03を用いて、研究目的、研究開発体制、研究開発スケジュール、国際標準化への展開等について、3年間の計画全体と12年度の研究内容を説明した。ISO/TC150へ4件の提案を計画している。

2) H12年度委託業務実施計画(JFCC)

①材料・部材の機械的特性評価

瀧川研究担当より、機械的特性評価に関する研究計画の説明があった（資料0001-04a参照）。

生体用FC材料の疲労特性、同部材の衝撃性、疲労特性の研究内容紹介があった。

中村委員より「資料中・図4のセラミック骨頭への負荷角度を、使用時に合わせて傾斜（ISO

規格は 10°) とすべきではないか」、松下委員より「神鋼では、材料強度をみる場合は垂直負荷試験をするが、部材としての試験には傾斜させて試験している」との質問・コメントがあり、「治具設計を含め、検討して試験を進める」との回答があった。

松下委員より、「ステムの材質がコバルト合金系か Ti-Cr 系かとでは部材特性が異なる。標準化試験には材質が異なるデータをとった方がいい」とのコメントがあり、「検討して試験を進める」との回答があった。

丹羽委員より、「生体内における材料劣化をどう評価するか？破壊が起きる程の過酷な条件を見つけ出しこれを設定することも必要では？現在行われている条件ではほとんど異常値が得られないのではないか。このような研究を行うことにより、新素材が開発される可能性があるのでは？」とのコメントがあり、「厳しい条件のテストは可能であるが、長期間生体中での影響を加速試験する方法が難しい」との回答があった。

小久保委員から「寿命予測、信頼性保証が必要である。擬似体液の場合は 60℃まで加温した場合の試験データから、室温におけるデータを予測する手法がある」とのコメントがあり、「検討して試験を進める」との回答があった。

中村委員より「マルテンサイト変態したジルコニア量をラマンスペクトルから定量したデータがみたい」とのコメントがあり、「大凡の定量は可能であり、検討する」との回答があった。

②生体親和性評価

柳沢研究担当より、生体親和性評価に関する研究計画の説明があった（資料 0001-4b 参照）。京大工で H11 に開発した改良型擬似体液の調整法と、生体用 FC 材料として生体活性ガラス b,c,d を用いて行う生体活性ガラスの浸漬実験・評価についての内容紹介があった。

中村委員より、「擬似体液浸漬時間はどこまで長く試験をするか？はじめに形成される HAp と、その後の HAp の組成は異なるか？」との質問があり、小久保委員長から「1 週間で HAp 析出がない材料は、生体中試験においても生体親和性を示さない。3 日間の浸漬で評価は可能であり、最長は 1 ヶ月でいい。HAp 組成は時期により変動する。これは生体内でも起こっている」とのコメントがあった。

丹羽委員より「環境としての、擬似体液と血清との差はあるか？」との質問があった。小久保委員長から「擬似体液に蛋白を加えて試験をすると、HAp 形成に要する時間は少し長くなるが、形成は行われ評価はできる」とのコメントがあった。

小久保委員長から「大西先生が出された生体内の材料親和性試験データは、擬似体液による材料親和性試験データと相対的には同傾向を示した」とのコメントがあった。

3) H12 年度再委託業務実施計画(京大工)

小久保委員長より、擬似体液を用いた生体親和性評価に関する研究計画の説明があった（資料 0001-5 参照）。H11 に開発した改良型の R-擬似体液に続き、ヒト血漿と同じ解離イオン濃度をもつ I-擬似体液の開発、バクテリア繁殖防止方法の検討、従来型の C-擬似体液を加えた 3 種類を用いたときに形成する HAp 組成・構造の評価、HAp 形成速度の異なるガラス数種の調製を行い、JFCC と京大医にも供給する。

中村委員から「Ca 解離イオンという表現は、イオン化 Ca が普通」とのコメントがあった。

小久保委員長より「根拠が明確な骨アパタイトの化学組成データがない」とのコメントがあった。

水野事務局から「擬似体液試験に用いる試験片形状と、多孔質材料の場合の形成 HAp の評価方法は？」との質問があり、小久保委員長から「緻密材の場合の試験片表面はきれいな平面（粗面は良くない）が良く、HAp の形成は X 線回折、FTIR で検出できる。多孔材の場合の HAp 形成は、SEM で試験片断面観察をすると良い」との回答があった。

4) H12 年度再委託業務実施計画(京大医)

中村委員より、in vitro 評価と in vivo の接着強度の評価を比較して in vitro 評価の妥当性を確認するための研究内容の紹介があった（資料 0001-6 参照）。試験に用いる HAp 形成速度が異なるガラス b,c,d は、小久保委員長から提供を受ける。in vivo 生体活性性能を評価するため、H11 に行った引き剥がし試験（剥離強度）の他、100～300 ミクロンメートルのガラス粒をラットに埋め込む試験を行う。形態観察、骨形成化を顕微鏡観察する。

5) 総合討論

擬似体液中の細菌に関する議論があり、小久保委員長から「HAp を食べることがあるため、数ミクロン孔のフィルターで真空濾過することにより簡単に滅菌できる」とのコメントがあった。

6) その他

次回の委員会は 2001 年 2 月 19 日（月）午後、名古屋（JFCC）で行う予定。

以上。

付録：第4回「生体用ファインセラミックス試験評価方法の標準化」技術委員会議事録。

日 時：平成13年2月19日（月）14：45～17：10

場 所：ファインセラミックスセンター 研修室（2階）

出席者：委員：小久保正（京大）、中村孝志（京大）、丹羽滋郎（愛知医科大）、立石哲也（融合領域研）横川善之（名工研）、亀山哲也氏の代理）、飯島繁（JFCA；高橋孝氏の代理）、松下富春（神鋼）、松尾康史（日特）。

欠席：大西啓靖（大阪南病院）、佐藤道夫（医薬品食品衛生研）、田中順三（無機材研）。

オブザーバ：権藤浩（FC室）、新谷裕和（NEDO）、茶谷正明（日本規格協会）。

事務局・JFCC 研究担当：角岡勉・水野峰男・安富義幸・瀧川順庸・柳沢雅明。

議事内容

小久保委員長の司会により本委員会は進行した。

1. 挨拶

FC室権藤氏から、日本の誇るFC技術を基に標準化をリードすることを期待する等の挨拶があった。NEDO新谷氏から、来年度は最終年度であり、標準化のアウトプットを期待する等の挨拶があった。日本規格協会茶谷氏より、ISO関係の情報を集めて関係者に流したい等の挨拶があった。

2. 資料確認

配付資料を確認した。

3. 議事録の確認

第3回技術委員会議事録（資料0002-02）を承認した。

4. 研究開発成果説明

4. 1 H12年度委託業務成果報告（JFCC） 【Q：質問、A：返答、C：コメント】

①材料部材の機械的特性評価

瀧川研究担当より、機械的特性評価（生体用FC材料の疲労特性、同部材の衝撃性、疲労特性）に関する研究成果の説明があった（資料0002-03a参照）。

Q（中村氏）：「試験期間が5日間では短い。10年、15年のデータがほしい。加速試験が必要ではないか？京セラは動物試験3年間のデータをもっている」

A：「加速試験の重要性はわかっており、行う予定である」

Q（小久保氏）：「股関節の場合、破壊する確率が問題である。ワイブル係数の測定方法が問題であり、それをどう見積もるか？生体環境下で測定する必要がある」

A：「部材の破壊しやすい箇所を調べ、その場所を中心に非破壊検査を行うことも含めて、評価したい」

C（松尾氏）：「ターボチャージャーローターの場合は、全数検査を行う」

C (松下氏) ; 「ZrO₂ の加速試験条件は、現実にある例えば摺動面状況を模擬した条件で行うといい」

A : 「高温試験後と相変態させた後の試験片を用いて、試験をすることを考えている」

C (中村氏) ; 「ZrO₂ が使われるようになって5年たったが、骨片が入って割れた例がある。相転移で割れた論文がある。」

C (松下氏) ; 「ZrO₂ の事故がこれから起こる可能性がある」

②生体親和性評価

柳沢研究担当より生体親和性評価に関し、京大工で H11 年度に開発した改良型擬似体液 R-SBF の調整法の確立と、これを用いた生体活性ガラス a,b,c,d,e を用いた浸漬実験、TF-XRD、SEM、EDX 等による評価、SBF 組成の分析評価についての研究成果の説明があった (資料 0002-3b 参照)。

Q (小久保氏) ; 「ガラスの分析法は？ガラス a の方が b よりも HAp が出にくいのか？」

A : 「Na と Ca は加圧酸分解後、ICP 分析をした。Si は重量法で測定した。ガラス a の方が HAp 生成が早い。おそらく 12Hr 程度、b は 1 日かかる」

C (小久保氏) ; 「1 日以下の時間単位の試験を行う必要がある」

Q (小久保氏) ; 「R-SBF 浸漬 2 週間でガラス c,d,e 上に生成したものは炭酸塩ではないか？」

A : 「確認する」

Q (小久保氏) ; 「C-SBF 浸漬すると時間とともに PH が下がっている理由が分からない。試験条件は？」

A : 「CO₂ 含有雰囲気で試験した。」

C (小久保氏) ; 「C-SBF は大気中で使用するよう設計されている。CO₂ 雰囲気下で試験をすると、SBF に CO₂ が溶解込み、炭酸イオンが増えて PH が低下する」

C (小久保氏) ; 「ガラス c 表面にシリカゲルが生成 (3 ページ) するとあるが、その中に HAp が含まれている可能性がある。溶液中に剥がれて落ちたものを集めて分析する必要がある」

4. 2 H12 年度再委託業務成果報告(京大工)

小久保委員長より、擬似体液を用いた生体親和性評価に関する研究成果の説明があった (資料 0002-4 参照)。H11 年度に開発した改良型の R-SBF に続き、ヒト血漿と同じ解離イオン濃度をもつ I-SBF を開発した。従来型の C-擬似体液を加えたこれら 3 種類の SBF の HAp 形成能を PET を用いて評価した。バクテリア繁殖防止方法、保存日数等の検討も行った。

C (中村氏) ; 「バクテリア繁殖防止のためには、SBF 中にアザイドを 0.1% 入れればフィルター濾過は不要となる可能性がある」

Q (水野) ; 「R-SBF と I-SBF 中で生成した HAp の炭酸イオン濃度が、3.97、3.43%とあるが、これは優位の差といえるのか？」

A : 「優位の差とは断定できない。C-SBF の 2.45% とは差があるといえる」

4. 3 H12 年度再委託業務成果報告(京大医)

中村委員より、in vitro 評価と in vivo の接着強度の評価を比較して in vitro 評価の妥当性

を確認するための研究成果の紹介があった(資料0002-5参照)。HAp形成速度が異なるガラスb,c,dをウサギの頸骨に埋入し、引き剥がし試験と組織学的観察を行ったが、ガラス表面の剥離の問題があり、引き剥がし試験評価は適当でない場合があることが分かった。また5種類の生体ガラスを顆粒を埋入し、周辺骨からの新生骨への深さを測定したところ、材料の生体活性の順序と新生骨深さとの相関が認められた。

Q (水野)：「新生骨深さは in vivo で材料の生体親和性評価用としていい指標といえるか？」
A：「引き剥がし強度は接着面積、個体差等の誤差要因がある。新生骨深さは、バルク、顆粒と
いう材料形態にかかわらず測定が可能であり、良い指標といえる」

4. 4 海外調査・生体材料標準化活動報告 (JFCC)

水野研究担当より、スウェーデンで開催された ISO/TC150 (外科用インプラント) 総会における ISO 標準化の状況と英国クイーンズ大学及びケンブリッジ大学における生体材料標準化調査に関する報告があった(資料0002-6参照)。

C (小久保氏)：「10年ほど前、大学と企業が出資する IBC プロジェクトをボンノールド教授が提案し、英国政府がこれを採用した。彼は現在ケンブリッジに移動し、米国 MIT と共同研究を行っている。ISOTIS 社は EU の資金援助で設立され、実商品はないが株式上場をしている。米国は骨研究はやっていない。欧州の生体材料は日本のまねが多い」

5. その他

次回の委員会は2001年5月29日(火) 11:00-14:00、JFCC (名古屋) で行う。

以上。

本報告書の内容を公表する際は、あらかじめ
新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究開発業務部研究業務室 にご連絡ください。
TEL 03-3987-9389
FAX 03-3987-9394