

学位論文題名

バイオイメージングにより評価したIVa, Va族  
高融点金属の生体適合性

学位論文内容の要旨

【緒言】金属の細胞毒性はイオン化傾向の順位に一致せず、元素周期律表上の位置と密接な関係があるといわれている。歯科用インプラント材料として現在最も頻繁に使用されているチタンはIVa族の高融点金属である。高融点金属には他にもIVa族のジルコニウム、ハフニウムやVa族のバナジウム、ニオブ、タンタル等があるが、生体材料としての研究は多くはなく、特にハフニウムの生体適合性に関する研究は皆無である。また、近年、X線分析顕微鏡(XSAM)、電子プローブマイクロアナライザー(EPMA)、共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)、原子間力顕微鏡(AFM)などの新顕微鏡が現れ、組成や様々な機能性に関する情報を2次元あるいは3次元的にイメージングすることが可能になった。本研究では、IVa, Va族高融点金属のインプラント材料としての可能性を検討するため、動物実験を行い、各種バイオイメージングおよび高感度分析可能な誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP)を用いて、各金属の生体適合性を評価した。

【材料と方法】チタン(Ti)、ジルコニウム(Zr)、ハフニウム(Hf)、バナジウム(V)、ニオブ(Nb)、タンタル(Ta)の金属試料(1φ×7mm)を用意し、AFMにより表面粗さを測定した。次に各試料をラット腹部皮下内に2, 4週、大腿骨骨髓腔内に2, 4, 8, 16, 24週間埋入し、光学顕微鏡による組織観察、画像解析による骨形成の定量評価(新生骨量と骨接触率の計測)、XSAM、EPMAによる金属の溶出分布表示、EPMAによる骨の成熟度の評価、CLSMによる骨形成の経時的変化の追跡を行った。なお、8週間金属試料を埋入したラットについてはCLSMで観察するため、骨標識として埋入時にオキシテトラサイクリン(以下、Tc.)、4週にアリザリンコンプレクソン(以下、Alc.)、屠殺前日にカルセイン(以下、Cal.)の蛍光試薬を腹腔内に投与した。さらに擬似体液5ml中に各金属を10, 30日間浸漬し、ICPによる高感度分析を行い、各

金属の単位面積当たりの溶出量を求めた。また、対照群として金属を浸漬しないものも用意した。

【結果と考察】表面粗さは各金属いずれも150nm前後であり、ほぼ同等な表面性状の試料が作製されていた。

軟組織内への埋入の結果、Ti, Zr, Hf, Nb, Ta埋入後2週では、埋入部位は線維芽細胞や間葉細胞に富む線維性結合組織で被包されており、強い炎症反応は認められなかった。XSAMでも埋入部位周囲組織内に埋入金属元素は検出されなかった。4週では、2週と比べて細胞成分の少ない薄い線維性結合組織で被包されていた。一方、Vでは線維性結合組織はほとんど見られず、リンパ球を中心とした円形細胞浸潤や毛細血管の拡張を伴う肉芽組織で被包されており、やや強い炎症反応が認められた。さらに、XSAMにより埋入部位周囲組織内にVが検出された。

また、硬組織内への埋入の結果、Ti, Zr, Hf, Nb, Ta埋入後4週では試料表面に直接接触する厚さ15~30 $\mu$ m程度の新生骨が認められた。また、埋入後16, 24週では7, 8層の層板構造が観察され、骨の成熟がかなり進行していた。しかし、V埋入後4週では金属表面と新生骨の間に50~80 $\mu$ mの厚い結合組織が介在し、V表面と直接接触する新生骨は全く観察されなかった。

組織計量の結果、新生骨面積比率（新生骨量）について、Ti, Zr, Hfでは2週から4週にかけて減少傾向を示し、V, Nb, Taでは増加する傾向を示した。しかし、各金属の2週と4週の新生骨量に有意差は認められず、金属間における有意差も認められなかった。また、Tiでは4週から8週にかけて有意に増加する傾向にあった。一方、骨接触率について、Vは2, 4週ともに全く新生骨と接触せず、他の金属と比べ有意に小さかった。2週から4週にかけては、Ti, Hf, Taで有意な増加が認められた。

CLSMにより同一個体での骨形成の経時的変化を観察した結果、皮質骨部位ではTc., Alc., Cal.の明瞭な3層の蛍光標識線が見られたが、試料周囲の新生骨では層状にはならず、不規則な標識線が断片的に現れた。これは皮質骨部位では外側面に骨の添加が起きているのに対して、試料周囲の新生骨では複雑な骨の添加と吸収が起きているためと考えられた。

EPMAによる元素カラーマッピングの結果、Ca, P強度の強い領域は皮質骨部位と一致し、金属試料周囲にはやや強度の低い領域が認められ、これは光学顕微鏡で観察された新生骨部位と一致した。

試料周囲の新生骨は皮質骨よりも低いCa, P強度を示しており、Caと

Pのマッピング像は非常に類似していた。埋入後4, 8週のCaマッピング像を比較すると, 8週では4週と比べてCaが検出された部位の面積が大きく, 新生骨量が増加していることがわかった。また, 新生骨部位のCa強度は4週では皮質骨におけるCa強度の70%前後であったのが, 8週では皮質骨とほぼ同程度までに増加していた。

以上のように, CLSMで観察された新生骨での複雑な蛍光標識線やEPMAで検出された新生骨中のCa強度の増加は試料周囲の新生骨の改造と石灰化が進行したことを示唆した。

また, EPMAでは各金属試料の周囲組織内に金属元素は検出されなかった。骨形成に対して強い為害作用を示したVでも, EPMAでVの溶出は検出されなかった。その理由の一つとして, EPMAの検出限界(100~1000ppm)以下の溶出量でも骨形成を阻害したとも考えられる。そこで, *in vivo*と*in vitro*の違いはあるものの, 擬似体液中に金属試料を一定期間浸漬し, 高感度分析可能なICPを用いて擬似体液中における各金属の単位面積当たりの溶出量を求めた。

その結果, Vは他の金属と比較して, 単位面積当たりの溶出量が10日間で78ng/mm<sup>2</sup>(イオン濃度では0.69ppm), 30日間で350ng/mm<sup>2</sup>(3.04ppm)と高い値を示した。

一方, Ti, Zr, Hf, Nb, Taは4~130ppbの値を示し, これらの値はICPの検出限界付近であり, Vと比較して著しく低かった。以上の点を考慮すると, VはFe, Ni, Cuなどに比べて耐食性に優れているものの, 少量ながらもVの溶出は生じており, 骨形成阻害の原因となったと考えられる。また, Vの為害作用が軟組織に比べ, 硬組織において強く現れたのは線維芽細胞と骨芽細胞の感受性の違いもその一因と考えられるが, 今後さらなる検討が必要である。

#### 【結論】

各種バイオイメーキングと高感度分析可能なICP発光分析により, Vは生体適合性に劣り, Zr, Nb, Taおよび生体材料としての研究が皆無であったHfはいずれもTiとほぼ同等に耐食性と生体適合性に優れ, 生体材料として使用可能であることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生  
副 査 教 授 亘 理 文 夫  
副 査 教 授 大 畑 昇

学 位 論 文 題 名

## バイオイメージングにより評価したIVa, Va族 高融点金属の生体適合性

審査は大畑、亘理および川崎審査委員全員が出席のもとに、まず論文提出者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

金属の細胞毒性はイオン化傾向の順位に一致せず、元素周期律表上の位置と密接な関係があるといわれている。歯科用インプラント材料として現在最も頻繁に使用されているチタンは、IVa族の高融点金属である。高融点金属には他にもIVa族のジルコニウム、ハフニウムやVa族のバナジウム、ニオブ、タンタル等があるが、生体材料としての研究は多くはなく、特にハフニウムの生体適合性に関する研究は皆無である。また、近年、X線分析顕微鏡(XSAM)、電子プローブマイクロアナライザー(EPMA)、共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)、原子間力顕微鏡(AFM)などの新顕微鏡が現れ、材料の組成、金属の溶出分布状態、表面構造の定量的評価などの様々な機能性に関する情報のイメージングが可能になった。本研究では、IVa、Va族高融点金属のインプラント材料としての可能性を検討するため、動物実験を行い、これらの新顕微鏡によって得られた各種イメージングと高感度分析可能な誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP)を用いた結果から、各金属の生体適合性を評価した。

### 【材料と方法】

チタン(Ti)、ジルコニウム(Zr)、ハフニウム(Hf)、バナジウム(V)、ニオブ(Nb)、タンタル(Ta)の金属試料(1φ×7mm)を用意し、AFMにより表面粗さを測定した。次に各金属試料をラット腹部皮下内と大腿骨骨髓腔内に埋入し、光学顕微鏡による組織観察、画像解析による骨形成の定量評価(新生骨量と骨接触率の計測)、XSAM、EPMAによる金属の溶出分布表示、EPMAによる骨の石灰化の評価、CLSMによる同一個体における骨形成の経時的变化の追跡を行った。さらに擬似体液5ml中に各金属を10、30日間浸漬し、ICPにより各金属の単位面積当たりの溶出量を求めた。

## 【結果と考察】

AFM 測定の結果、表面粗さは各金属いずれも 150nm 前後であり、ほぼ同等な表面性状の試料が作製されていた。動物実験の結果、軟組織内への埋入において、Ti、Zr、Hf、Nb、Ta では炎症反応を示さなかったが、V では若干強い炎症反応が認められ、XSAM により周囲組織への V の溶出が検出された。硬組織内への埋入において、組織計量の結果、各金属ともに埋入後 2 週から 4 週にかけて新生骨量はあまり変化しなかったが、骨接触率は Ti、Hf、Ta で著しく増加していた。CLSM により明瞭な 3 層の蛍光標識線が皮質骨表面に見られたが、試料周囲の新生骨では不規則な標識線が断片的に現れた。これは皮質骨部位では外側面に骨の添加が起きているのに対して、試料周囲の新生骨では複雑な骨の添加と吸収が起きているためと考えられた。また、EPMA による埋入後 8 週の新骨の Ca 強度は 4 週と比べ増加していた。CLSM、EPMA による結果は新生骨の骨改造と石灰化が進行したことを示唆した。一方、V は骨形成に対して強い有害作用を示し、ICP により擬似体液中での V の溶出が認められた。V は Fe、Ni、Cu などに比べて耐食性に優れているものの、少量ながらも V の溶出は生じており、骨形成阻害の原因となったと考えられる。また、V の有害作用が軟組織に比べ、硬組織において強く現れたのは線維芽細胞と骨芽細胞の感受性の違いもその一因と考えられるが、今後さらなる検討が必要である。

## 【結論】

各種バイオイメーキングと高感度分析可能な ICP 発光分析により、V は生体適合性に劣り、Zr、Nb、Ta および生体材料としての研究が皆無であった Hf はいずれも Ti とほぼ同等に耐食性と生体適合性に優れ、生体材料として使用可能であることが示唆された。

以上の論述に引き続き実験方法、結果、考察、今後の展望および関連分野についての質疑応答を行い、論文提出者はいずれにも明快な回答と説明を行った。

本研究は最近現れた様々な顕微鏡や分析装置を駆使して、金属の表面性状、骨形成量や骨接触率、同一個体での骨形成の経時的変化、金属の溶出の有無や溶出分布状態、骨の石灰化などの観点から高融点金属の生体適合性を総合的に評価している。また、チタンと同族元素であり、生体材料としての研究が皆無であったハフニウムについても生体適合性に優れることを言及した。さらに、チタンの耐磨耗性の改善として、窒化チタン、窒化ハフニウムの応用を考えており、今後の展望に関してもしっかりとした研究立案をもっている。本研究の将来性の点においても高く評価されるものであった。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。