

第1部 (12) NiTi合金の臨床応用と生体適合性評価

Biocompatibility Evaluation of NiTi Alloy for Medical Device

○正 森田真史¹ 非 江原悠子¹ 非 近藤映子 (北里大)¹ 学 本間貴昭²学 鈴木啓子² 正 木村雄二² (工学院大)Masafumi Morita, Yuko Ehara, Eiko Kondo, Takaaki Honma, Keiko Suzuki, and Yuji Kimura
¹Kitasato University, Kitasato 1-15-1, Sagami-hara-shi, Kanagawa, 228-0829 Japan, ²Kogakuin University, Nishishinjuku1-24-2, Shinjuku-ku, Tokyo, 163-8677 Japan

When NiTi alloys are thought as candidates for use in implantable medical devices, they must be able to fulfill functional requirements related not only with their mechanical reliability but also with their corrosion resistance and biological safety. The authors carried out an electrochemical test under friction and some kinds of *in vivo* / *in vitro* toxicity tests to evaluate the biocompatibility of NiTi bone fracture fixation devices with reference to FDA guideline (ISO 10993). As the result, NiTi alloy showed the excellent corrosion resistance, wear proof, and biocompatibility compared with that of Ti-6Al-4V alloy and/or SUS316L S.Steel.

Key Words: ISO10993, NiTi alloy, Orthopedics, Implant, Biocompatibility

I. はじめに

NiTiは形状記憶、超弾性、高い耐摩耗性など優れた機械的特徴を有し、主に胸部外科、歯科領域で医療用機器としての使用実績がある。しかし、整形外科用機器としての臨床使用例は稀有である。使用が躊躇される最大の原因は、NiTi合金には多量のNiが含まれ、Niイオン溶出による生体刺激、毒性反応が懸念されるためである。

NiTiが整形外科材料としての適正に欠けるかを骨折固定器具を例に、ISO10993試験法を参考に生物学的安全性評価を試行した。また、摩

擦下での電気化学的試験と金属溶出が生体に与える影響等の整形外科独自の試験項目を追加し、NiTi合金安全性について検討した。

II. 生物学的安全評価と試験方法

医療用具の製造又は輸入の承認申請には生物学的試験ガイドライン¹⁾(ISO10993に準拠)に沿った評価が必要である。Table 1は医療用具の安全性評価に関する米国FDAの指針である。我国の評価基準もこれにほぼ等しく、医療用具の接触部位と接触時間によって必要な試験項目が定められている。

Table 1 FDA guideline of biocompatibility evaluation for medical devices in 1995

Device categories		Biological effect							
Body contact		Contact duration A-limited (<24h), B-prolonged (24h to 30days), C-permanent	Cytotoxicity	Sensitisation	Irritation of intracutaneous reactivity	Systemic toxicity (acute)	Subchronic toxicity	Genotoxicity	Implantation
Surface devices	Skin	A	X	X	X				
		B	X	X	X				
		C	X	X	X				
	Mucosal membrane	A	X	X	X				
		B	X	X	X	O	O		O
		C	X	X	X	O	X	X	O
External communicating devices	Breached or compromised surface	A	X	X	X	O			
		B	X	X	X	O	O		O
		C	X	X	X	O	X	X	O
	Bloodstream, indirect	A	X	X	X	X			X
		B	X	X	X	X	O		X
		C	X	X	X	O	X	X	O
External communicating devices	Tissue/bone/dentine communicating	A	X	X	X	O			
		B	X	X	O	O	O	X	X
		C	X	X	O	O	O	X	O
	Circulating blood	A	X	X	X	X			X
		B	X	X	X	X	O	X	O
		C	X	X	X	X			X
Implant devices	Tissue/bone	A	X	X	X	O			
		B	X	X	O	O	O	X	X
		C	X	X	O	O	O	X	X
	Blood	A	X	X	X	X			X
		B	X	X	X	X	O	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X

Device categories		Biological					
Body contact		Contact duration A-limited (<24h), B-prolonged (24h to 30days), C-permanent	Chronic toxicity	Carcinogenicity	Reproductive/developmental	Biodegradation	
Surface devices	Skin	A					
		B					
		C					
	Mucosal membrane	A					
		B					
		C	O				
External communicating devices	Breached or compromised surface	A					
		B					
		C	O				
	Bloodpath, indirect	A					
		B					
		C	X	X			
External communicating devices	Tissue/bone/dentine communicating	A					
		B					
		C	O	X			
	Circulating blood	A					
		B					
		C	X	X			
Implant devices	Tissue/bone	A					
		B					
		C	X	X			
	Blood	A					
		B					
		C	X	X			

1. 細胞毒性試験 ISO 10993-5

- (1) 培地抽出コロニー法
- (2) 間接／直接接触コロニー法

2. 感作（アレルギー反応）試験 ISO 10993-10
抽出物 0.1ml を皮内注射及び体表皮膚閉塞貼付

- (1) Maximization test
- (2) Adjuvant and Patch test

3. 遺伝毒性試験 ISO 10993-3

- (1) DNA 障害性を検出（エームス法）
- (2) 染色体異常を検出
- (3) 細胞悪性化（ガン化）を検出

4. 埋植試験 ISO 10993-6

- (1) 短期筋肉内埋植試験

5. 刺激性試験 ISO 10993-10

- (1) 皮内反応試験
- (2) 皮膚刺激性試験（口腔，膈粘膜刺激を含む）

6. 全身毒性試験 ISO 10993-11

- (1) 急性毒性
- (2) 亜急性毒性

7. 発熱性物質試験 ISO 10993-11

※投与後に，体温上昇 0.6℃以上で陽性と判断

8. 血液適合性試験 ISO 10993-10

検査項目：血栓，血小板数，溶血性，免疫検査

III. NiTi 合金の生物学的適合性試験

NiTi 合金は毒性の強い Ni を多く含み，生物学的安全性（Table 2 参照）が危惧されるために，我が国では整形外科の使用はない．そこで，実際に整形外科領域での使用を想定し，骨折固定用具の生物学的安全性について検討した．

1. 整形外科用生体材料（骨折固定器具：体内埋め込み用具）としての NiTi 合金を Table 1 の FDA 指針に沿って評価を試みた．

生物学的評価として，接触期間カテゴリーは C，必要な試験項目は以下の如くである．試験方

Table 2 Toxicity of Ni

F.Sunderman, New toxicology, 1970

Ni (Metal, Corrosion)		
Corrosion	dog	Intravenous injec. LD ₁₀₀ = 10 ~ 20mg/kg
Metal particle	dog	Oral admi. proof 1 ~ 3g/kg
Ni salt (Cl, NO ₃ , SO ₄ , O)		
Intravenous injec.	dog	LD ₁₀₀ = 10 ~ 20mg/kg
Subcutaneous trans.	rabbit	LD ₁₀₀ = 1.3g/kg
Oral admi.	rat	LD ₅₀ = 2.0mg/kg
Oral admi.	cat	25mg/kg/day 200 days
Ni carbonyl (Ni(CO) ₄ vapor)		
Aspiration	mouse	LD ₅₀ = 0.067mg/L 30 min
Aspiration	rat	LD ₅₀ = 0.24mg/L 30 min
Ni skin sensitiveness		
NiCl ₂ diluted solution (×10000)		Positive

法の詳細は ISO 10993 シリーズを参照されたい．

1) 細胞毒性試験²⁾

L929線維芽細胞，U937マクロファージを用いた LDH 活性測定による細胞の損傷度判定

2) 感作試験³⁾

U937マクロファージを用いたサイトカイン IL-1 β の産出量の測定

3) 遺伝毒性試験⁴⁾（*未評価のため文献参照）
サルモネラ菌を用いた変異原性，染色体異常試験

4) 埋植試験

ラット大腿骨骨膜・筋肉内埋植による組織学的評価

5) 慢性（亜急性）毒性試験^{5, 6)}

金属抽出液をラット腹腔内投与による臓器内残留と尿・糞からの排泄量の測定とそれに伴う組織学的，全身毒性反応の生化学的評価

6) 臨床評価

膝蓋骨骨折の治療 3 例，鎖骨骨折 1 例
運動器系代用臓器には更に以下の機械的作用の生物学的評価に与える影響を検討する必要があると思われたので，次の試験項目を追加した．

7) 摩擦環境下における電気化学的評価

インプラント金属の多くは体内で不動態化して電気化学的安定を得る．絶えず金属表面が摩擦される環境では不動態膜が損傷され，耐食性が低下する．擬似体内環境下でのアノード腐食試験を実施し，耐食性の維持能について評価した．

8) 摩耗毒性試験

摺動作用，フレッチング，等の摩擦現象は表面不動態膜を損傷し，摩耗粉，腐食化合物（金属酸化・水酸化物，その他），金属イオンを産生する．このような摩耗産物に対する細胞毒性，全身毒性試験を総合して摩耗毒性試験と呼んでいる．試験方法は上記の 1～5 に準拠した．

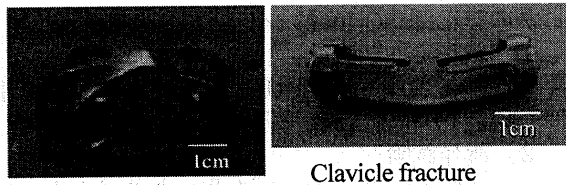
2. NiTi 合金製骨折固定用具の評価の実際

1) NiTi 形状記憶骨折固定用具

Fig. 1 に示す骨折治療用固定具について生物学的安全性をガイドラインに沿って評価した．使用方法は骨折部を切開し，0～4℃の滅菌した冷生理食塩水中で装着し易い形に変形し，装着後は体温近い 35℃で形状回復し，骨折面を引き寄せて圧迫固定させる．（Fig.18 参照）抜去の際は装着部を Af 点以下に冷やし，軟らかくして骨からはずす．

2) 摩擦による耐食性低下に対する評価

Fig.2 の Pin-on-Disk 摩擦試験機で金属 Pin 試験片を同種金属または UHMWPE Disk 試験片で 4 時間摩擦・摩耗した．試験期間中 Pin 試験片に定電位または走査電位（アノード分極電位）を負荷する 3 電極法，および自然分極電位状態で電流密



Patella fracture

Clavicle fracture

Fig. 1 Bone fracture fixing devices

度を測定する 2 電極法を用いた。腐食環境は Table 3 の如くであった。

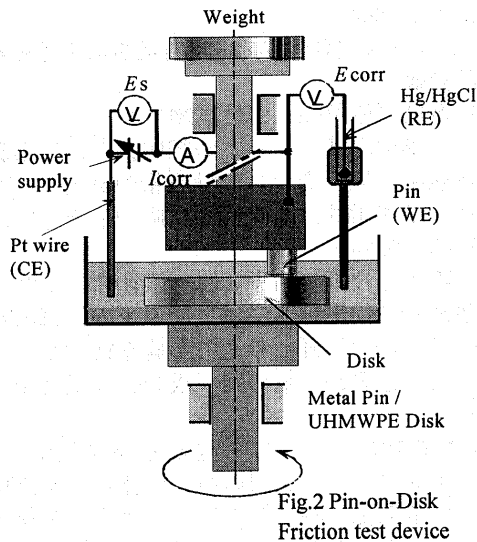


Fig.2 Pin-on-Disk Friction test device

Table 3 Experimental conditions for Pin on Disk Friction Test

Environmental liquid: PBS(-) 70ml
Sliding speed: 3.5, 8.5, 10.8 cm/sec
Weight: 50N
Temperature: 23 ± 2°C

① NiTi 合金のアノード分極特性 (Fig.3 参照) 摩擦を伴う環境 (Table 3) で, 64AT は 5V, NiTi 合金は 0.8V(vs SCE) で過不動態域に達した。ターフェル外挿法による腐食電位と電流密度は, 64AT が 0.13V(vsSCE), 0.08uA/cm², NiTi が 0.12V(vsSCE), 0.06uA/cm² であった。従って自然分極電位下の腐食速度 (腐食電流密度) は, 現在, 整形外科領域で臨床使用経験のある 64AT に匹敵する耐食性を示した。

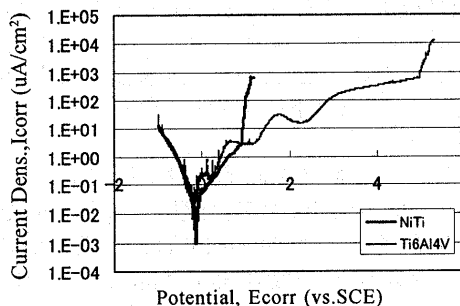


Fig.3 Anodic polarization curves

② 連続摩擦における腐食電流密度の変化 摩擦開始直後の初期摩耗期は腐食電流密度が高値を示すが, 時間の経過と共に電流密度は減少した。(Fig.4 参照) NiTi は摩擦開始後 30 分でほぼ電流密度は 0.5uA/cm² 以下となり摩擦の影響は軽減された。64AT よりその傾向は顕著であった。

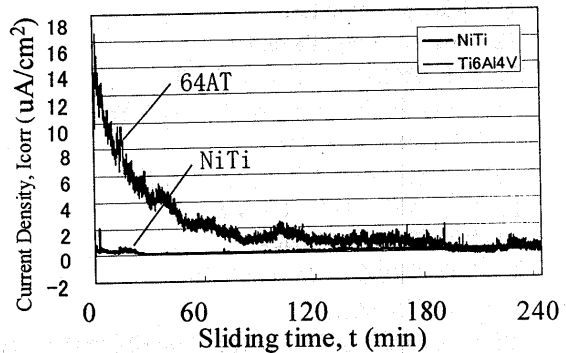


Fig.4 Current changes with continuous sliding

③ 繰り返し摩擦と腐食電流密度の変化

30 分ごとに摩擦荷重の on/off を繰り返し, 2 電極法で自然電位下の腐食電流を測定した。(Fig.5-1 参照) 64AT は摩擦時には 4 ~ 8uA/cm², NiTi は 0.7 ~ 1.3uA/cm² であり, 金属溶出が 64AT に比べて少ないことが示唆された。また, 摩擦速度の増加と共に腐食電流密度の積算値は上昇した。(Fig.5-2 参照) 以上の摩擦試験の結果から, 摩擦環境においても, NiTi 合金は 64AT と比べて優れた耐食性を維持することが確認された。

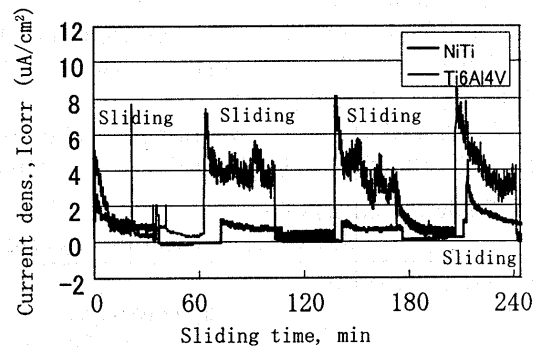


Fig.5-1 Comparison of current densities with and without sliding

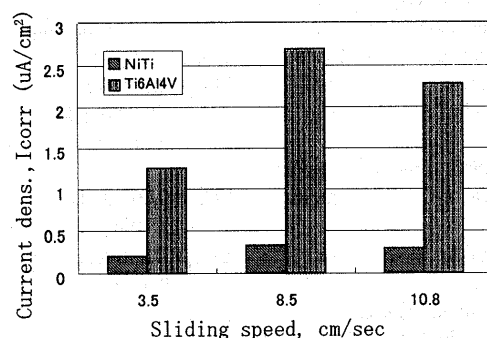


Fig.5-2 Comparison of total currents per unit surface area depending on sliding speed

3. 細胞毒性試験

1) LDH 活性による細胞損傷度

擬似体液 PBS(-) 中で金属を溶解した抽出液, または金属片を Fig.6 の培養細胞に投与した. 2 日間培養後に培地中の LDH 濃度を分光光度計で測定した. 試薬は LDH ワコーテストキットを用いた. 結果を Fig.7 に示す. 64AT は 30ppm 濃度で細胞は完全に死滅したが, NiTi は同濃度で細胞損傷度は 20 % 程度であった.

Cells were cultured in RPMI1640 in an incubator at 5%CO₂, 37°C.



L929 Fibroblast
U937 Macrophage
Cells density
0, 2, 11, 31 × 10⁴ cells/well

Test Specimen
Pure Ni: 10mm × 10mm × 1mm
NiTi: 12mm × 12mm × 3mm

Fig.6 Cell culture and Cytotoxicity test methods

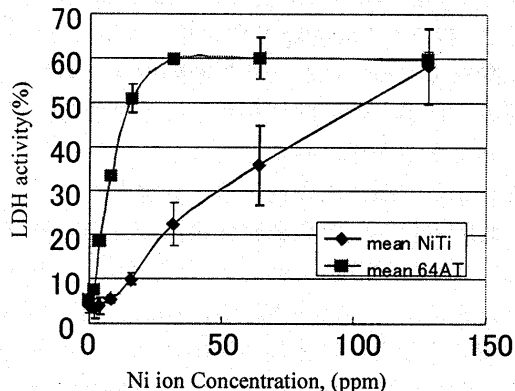


Fig.7 LDH activity changes with Ni ion concentration in the culture medium

2) IL-1 β の産生量

試験方法は 3 と同様である. 培地中の IL-1 β をエライザ法で測定した. 64AT が 30ppm 以上で下降するのは細胞が死滅したためであると解される. (Fig.8 参照)

以上, NiTi の細胞毒性試験と感作試験の結果は現在臨床使用されている 64AT よりも優れていた.

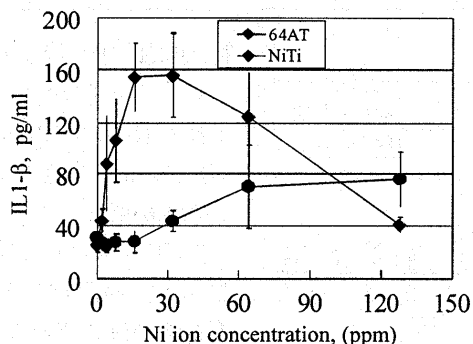
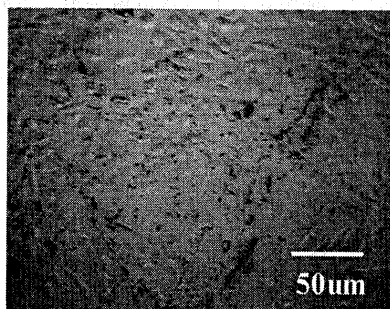


Fig.8 IL-1β production by U937 macrophage

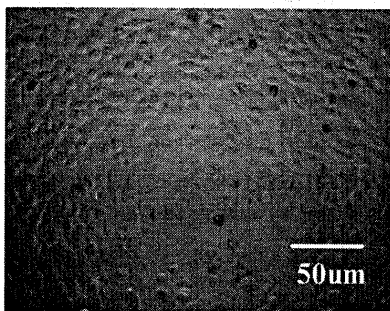
3) 細胞接着の耐食性に与える影響

細胞毒性評価の際, 抽出液を試料に用いるかまたは直接接触法を用いることになっている. 後者は細胞の何らかの作用により金属イオンの溶出を加速する. NiTi の耐食性低下について検討した.

4 日間金属板の上で細胞を培養し, 培養液を回収して金属溶出量を ICP 分析した. 培養後の試験片表面の写真と Ni 溶出量を Fig.9, 10 に示す. Ni 表面には黒い斑点状の腐蝕痕が現れたが, NiTi は変化は見られなかった. 以上の結果から, 生きた細胞の存在や生体内では金属の耐食性は著しく損なわれる恐れがあり, *in vitro* の実験では接着細胞の影響に配慮する必要があることが示唆された.



Pure Ni surface incubated for 4 days



NiTi surface incubated for 4 days

Fig.9 Optical Micrographs of the metal surfaces after incubation test

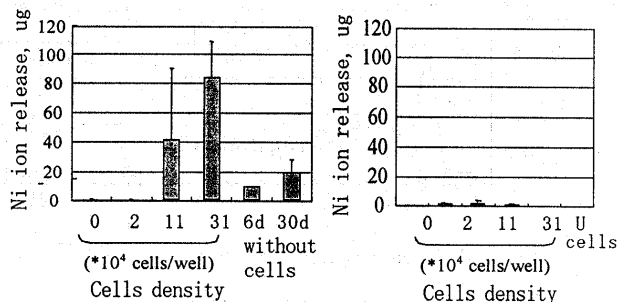


Fig.10 Ni ion release depending on cell density

3) 遺伝子毒性試験

遺伝子毒性試験には, 遺伝子障害, 染色体異常, 発癌性試験がある. D.J.Weber らの文献を参照する. Table 4 は S.Steel316L を対照に NiTi の抽出液 (腐食液) を細胞に投与して培養し, 細胞の染色体異常を生化学的に検出した結果である. S.Steel 316L に比べて遺伝子毒性は低い.

Table 4 Chronic toxicity

	Mean % aberrant cells ^a	
	NiTi extracts	AISI 316 LVM-extracts
Negative control	2.0	2.0
Extract 6%	0.0	1.5
Extract 8%	0.0	1.0
Extract 10%	3.0	3.5
Positive control	16.0	16.0

^aRecorded in two cultures.

Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy, D.J.Weaver, A.G.Veldhuizen, M.M.Sanders, et al., Biomaterials, 18,1115-1120, 1997.

4. 動物毒性試験

1) 金属腐蝕物の腹腔内投与試験

ラット腹腔内に1.0mgのNi, Ti, NiTi腐食化合物を注入し、代謝ケージ内で17日間通常飼育して、定期的に尿、糞、血液を採取した。それぞれの検体に対して、

1) 尿検査 (ウロペーパー; 栄研化学)

肝機能検査; 総ビリルビン (基準値0.2-

1.2mg/ml), 尿蛋白 (基準値75-150mg/ml)

2) 血液検査 (フジトライケム V55 - 5.1)

肝・腎機能検査; GPT (基準値5-40U/L),

BUN (基準値10-20mg/dl)

3) 尿中および臓器内金属含有量を施行・測定した。

を施行・測定した。

1) 尿検査所見: 両金属腐食物を投与した後に、一時的なビリルビン、蛋白濃度上昇が見られるが、時間経過と共に基準値の範囲に収まった。

2) 血液検査所見: GPTはやや高値であり、時間経過と共に増加傾向を示した。BUNは正常範囲であった。

以上の生化学検査の結果では、Ni, NiTi共にGPT肝機能に障害を認めた。しかし、Table2のコ

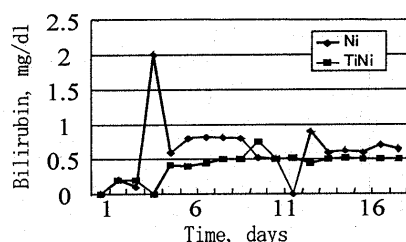


Fig. 11 Bilirubin contents in urin

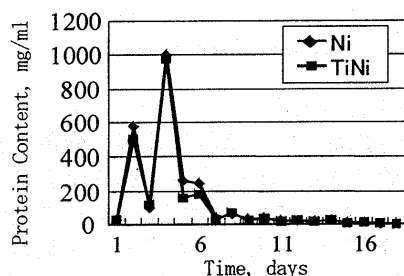


Fig. 12 Protein contents in urin

Table 6 Strage and excretions of Ni and Ti (n=7)

	Strage in Organs (ug)	Excretion in Urin (ug)	Excretion in feces (ug)
Ni	12.6	221.7	56.9
±SD	4.9	50.6	37.9
Ti	21.6	3.1	5.6
±SD	8.5	0.5	1.1

Table 7 Recovery ratio

	Recovery (%)
Ti	6.1
Ni	58.2

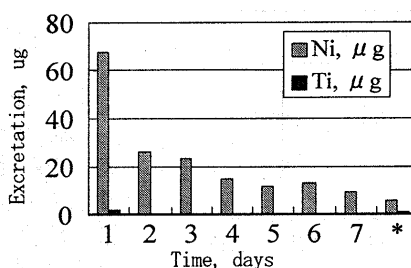


Fig. 15 Metal excretion in urin

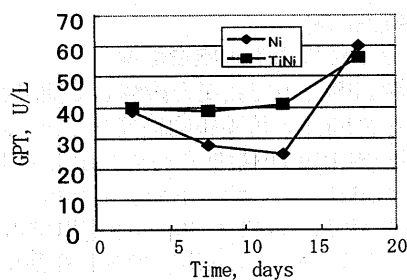


Fig. 13 GPT changes

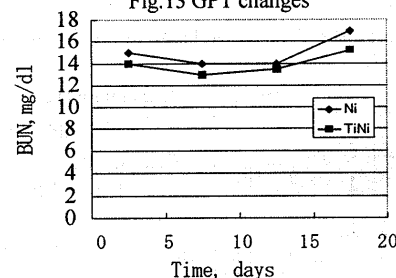


Fig. 14 BUN changes

ロイド静注の際のLD₁₀₀=10~20mg/kgを参照すると、投与量4.0mg/kgは致死量には至らないが、小動物にとってはかなりの過剰投与であり、金属の生体適合性の評価をするには更なる検討が必要であると思われる。

3) 金属の臓器内残留と尿・糞排泄

腹腔内投与した金属腐食物は一旦腸間膜を介して血中に取り込まれ、肝・腎を經由して糞・尿と一緒に体外へ排除される。また、一部は毛髪、皮膚の代謝と共に体外へ排出される。体内残留と排泄能は腸間膜に吸収され易いか否かで決まる。ラット腹腔に各金属腐食物を0.5mg投与、代謝ケージ内で7日間普通食飼育し、24時間おきに採尿、採糞した。最終日に屠殺し、肝、腎、小

腸、脾臓、腸管膜を回収した。同回収検体に含まれるNi,TiをICP分析した。Niは投与直後から尿排泄が盛んであった。一方、Tiはほとんど排泄されず、腹腔内に残留するのが確認された。

2) 金属試験片埋植試験

医療用具または材料を軟部組織に埋植した場合に埋植材がどのような組織反応を惹起するか、その強さを評価するのが本試験の目的である。

評価の方法は埋植後、マクロファージ系の炎症細胞の浸潤に始まり、多核化した異物巨細胞による埋植材料の取り囲みや、更には材料の周辺に肉芽・被包を形成するなどの一連の生体反応が現れる。その反応の程度によって生体適合性が評価される。

肉眼的所見としては、

- 埋植材料周辺組織における出血、被包形成、変色の有無とその程度
- 埋植材料自身の変色および変質の有無。例えば、色、ひび割れ、硬さ、等。
- その他に認められた異常所見。

Table 8は被包化した炎症性被膜の厚さによる評価を示す一方法である。

Fig.16は $\phi 1\text{mm} \times 15\text{mm}$ の純Ni, NiTi合金製ワイヤーをラット大腿骨骨幹軸に沿って骨膜上に8週間埋植した後の脱灰HE標本である。純Niを取り囲む炎症性被包形成は1.5mmであり評点は3, NiTiの周囲には顕著な被包化は認められず評点は0と判定された。整形外科医用材料は上記の筋肉内埋植試験以外に骨との親和性も評価する必要がある。Fig.17は、SUS316L S.SteelとNiTi合金製ワイヤーを骨膜を剥がして直に骨組織と試験材料を接触させた。骨組織反応をピラヌエバ骨染色とテトラサイクリン取込みにより評価した。埋植後8週では炎症反応は終息し、両金属でわずかに線維性膜の形成があるが、取り囲むように試験材料と直接接触し、良好な親和性を示した。

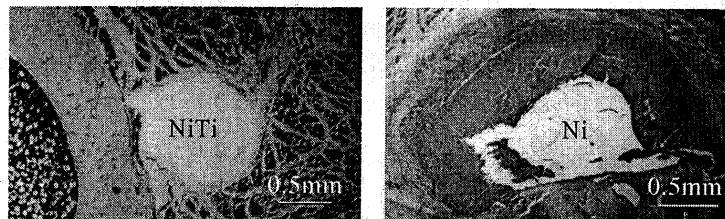


Fig.16 Comparison of the histological change by HE stain images.

NiTi or Pure Ni wire was implanted along the longitudinal axis of Rat's femur. Pure Ni wire was enveloped in the thick inflamed membrane. But, no histological changes were occurred in the peripheral tissue contacted with the NiTi wire.

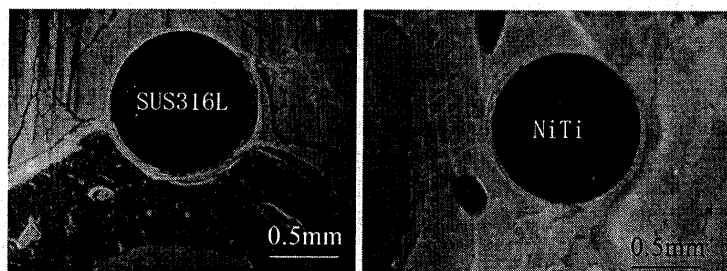


Fig.17 Vilanueva bone stain and Tetracycline labelled images.

Table 8 Evaluation of inflamed membrane

Membrane thickness	Score
not observed	0
0.5mm and less	1
0.6 through 1.0mm	2
1.1 through 2.0mm	3
2.0mm or more	4

5. 臨床試験 吉林大学中日聯誼病院 (中国)

上記施設において新鮮膝蓋骨骨折3例, 新鮮鎖骨骨折1例に対してFig.1に示すNiTi形状記憶合金製固定器による骨折固定術を施行した。埋植期間中にアレルギー症状, 金属が原因と思われる発熱, 急性・亜急性の金属毒性反応はなく, 全例3~6ヶ月で骨癒合した。従来の固定方法に比べて, 手術時間が大幅に短縮された。

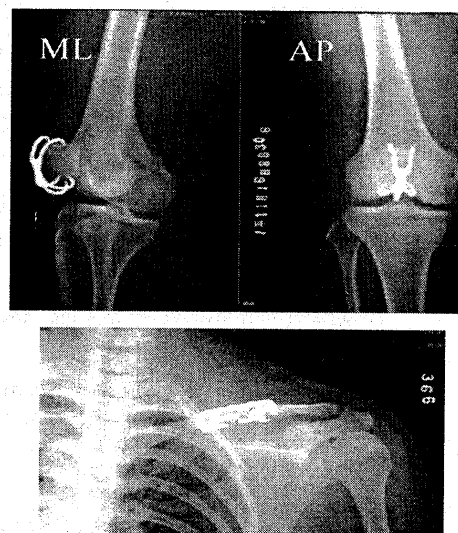


Fig.18 X-ray photographs of bone fracture fixing devices made by NiTi shape memory alloy

文献

- 医療用具の生物学的評価 第1部: 評価および試験, ISO10993-1, 1997.
- 日本組織培養学会編: 細胞トキシコロジー試験法, 朝倉書店, 1991.
- 医療用具の生物学的評価 第5部: 細胞毒性の試験: インビトロ法過敏症とアレルギー性感作の試験, ISO10993-5, 1999.
- 医療用具の生物学的評価 第3部: 遺伝毒性, 癌原性および生殖毒性の試験, ISO10993-3, 1992.
- 医療用具の生物学的評価 第11部: 全身の毒性の試験, ISO10993-11, 1993.
- 医療用具の生物学的評価 第17部: 浸出物質の許容限度設定, ISO10993-17, 2002.