

家兎組織内におけるチタンの溶出と生体親和性に関する研究

関 克 典

岩手医科大学歯学部口腔外科第一講座

(主任: 工藤 啓吾 教授)

(受付 1992年10月28日)

(受理 1992年11月5日)

Abstract : Metallic plates and screws made of stainless steel, pure titanium, titanium alloy and titanium nitride were implanted in the dorsal subcutaneous tissue and femur of 64 rabbits, and elution of metallic elements and tissue reaction in surrounding tissues were comparatively investigated at the 2nd, 4th, 8th, and 12th weeks after implantation. Using an inductively coupled plasma spectrometer, the metallic elements eluted in the subcutaneous tissues were quantitatively analyzed. The amount of iron from the stainless steel decreased with time. The amount of titanium eluted from pure titanium, titanium alloy and titanium nitride, increased with time, although only slightly in all cases. However, the amount of aluminum eluted from the implanted titanium alloy was considerably higher than that of titanium. Histological examination of the reaction of subcutaneous tissue, revealed encapsulation of pure titanium, titanium alloy and titanium nitride plates by dense fibrous connective tissues from the 2nd week after implantation, whereas the stainless steel plate was encapsulated by thin fibrous tissue. Using an energy dispersed X-ray microanalysis on the metal- bone interface, it was found that the element of titanium accumulated in the bone area about 5 μ m from the metallic screw, but there was no such finding for titanium alloy and titanium nitride. From stainless steel, no elution of iron, chromium and nickel was detected. Histological examination of the reactions of bone tissue to pure titanium, titanium alloy and titanium nitride, showed the formation of new bone between the metallic screw and bone tissue from the 4th week, and it gained a close and dense contact with normal bone at the 12th week after implantation. All experimental materials used in this study exhibited excellent resistance to corrosion and materials of titanium had better biocompatibility compared with stainless steel. Above all, the results of this study suggest that titanium nitride is useful as a biomaterial the same as pure titanium and titanium alloy.

Key words : titanium nitride, elution of metallic element, tissue biocompatibility

緒 言

生体材料は生体内の複雑な環境下に埋入されても、長期的に安定し、なおかつ機能すること

が求められる。そのためには優れた耐食性、機械的強度とともに生体親和性を具備することが要求されており、生体用チタン材料はこれらの点においてもきわめて良好な性質を有すること

Elution and biocompatibility of titanium in the rabbit tissue.

Katsunori SEKI

(First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

が報告されている^{1,2)}。チタン材料の耐食性は、金属表面を不動態化させる酸化皮膜の存在によるものと考えられている^{3,4)}。しかしながら、純チタン材は他の生体用金属材料に比べて強度が小さく、展延性の大きいことが欠点とされている⁵⁾。そこでこの欠点を改良するために各種チタン合金材が開発され、機械的強度の向上がはかられてきた⁶⁾。

また、Ni や Cr などある種の金属では組織内に埋入された場合、金属材料が腐食し、金属イオンが溶出することによって、生体側にアレルギー反応や発癌性、催奇形性などの問題を生じる⁷⁾可能性のあることが示唆されている。このことより、金属イオンの溶出の有無は、生体用金属材料としての良否を決定する上で重要な因子の一つにあげられている。このような金属イオンの溶出を抑制するためには、金属表面に薄く安定した不動態酸化皮膜を形成することが効果的であると考えられている⁸⁾。

そこで著者は、表面を窒化処理した純チタン材の生体材料としての有用性について検討を試みた。窒化層は非常に硬く(約2,000Hv)、耐摩耗性に優れ、黄金色を呈するなどの特性を有している⁹⁾。このように大きな利点がみられることから、口腔外科領域でも窒化処理を施したチタン製の顎骨再建用プレートや歯科インプラント材が臨床に応用されている^{10,11)}。しかしながら、窒化チタンについてはin vitroでの溶出試験がわずかに行われているのみであり^{12,13)}、生体組織反応に関する研究はきわめて少ない^{14,15)}。

本研究は、生体内局所における金属材料の耐食性ならびに組織親和性を追究する目的で、ステンレス鋼、純チタン、チタン合金および窒化チタンの4種類を家兔の背部皮下および大腿骨内に埋入し、周囲組織への溶出金属の元素分析ならびに組織学的観察によって、これら金属材料の比較検討を行った。

実験材料および方法

1. 実験動物

日本白色種雄性家兔(体重2.5kg以上)を岩手

医科大学歯学部動物舎において固形飼料と水にて1週間以上予備飼育し、健康状態に異常が認められなかった64羽を使用した。

2. 埋入実験

1) 埋入材料

(1) 316 L ステンレス鋼(以下、ステンレス鋼)

化学組成は Fe 67.44%, Ni 12%, Cr 18%, Mo 2.5%, C 0.06% である。

(2) 純チタン(以下、純 Ti)

純度は Ti > 99.5% で、残りの化学組成は Fe < 0.02%, Cl 0.06%, Mn 0.05%, N 0.005%, Si 0.02%, C 0.02%, Mg 0.01%, H 0.002%, O 0.006% である。

(3) チタン合金(以下、Ti 合金)

化学組成は Ti 90%, Al 6%, V 4% である。

(4) 窒化処理チタン(以下、窒化 Ti)

窒化 Ti の作製は 99.5% の純チタン表面に窒化層を形成するため、真空電気炉を用いて 300 Torr に減圧した後、700 ~ 880°C 程度まで加熱し、純粋な窒素ガスを導入して所定時間保持し、窒化処理を行ったものである¹⁶⁾。

以上、4種類の生体用金属材料(オハラ社製)を使用した。これら金属材料の表面は鏡面研磨に近い状態であった。なお、皮下埋入用には幅5.5mm、長さ18mm、厚さ1.0mmの2穴ミニプレートを、また大腿骨内埋入用にはスクリュー体部の長さ6mm、直径2.2mm、スクリュー頭部の直径4mmのスクリューを、それぞれ用いた(Fig. 1)。

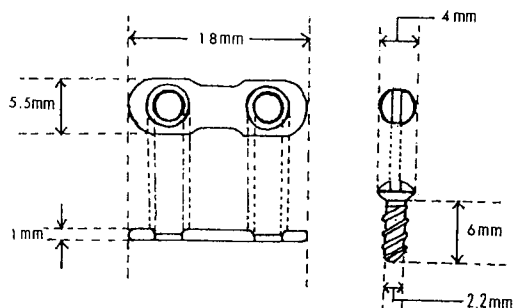


Fig. 1 Dimensions of metallic plate and screw.

各種材料は、99% トリクロロエチレンで超音波洗浄器内で10分間洗浄後、無水アルコールで3回すすぎ、さらに無水アルコールで10分間超音波洗浄を行い、重量を測定した後、オートクレーブで20分間高圧蒸気滅菌(121℃, 1.2気圧)を施した。

2) 埋入方法

(1) 皮下埋入

各々2羽の左右側背部皮下の上下方4カ所へ、計4枚の同種金属プレートを入れた。埋入時には、麻酔のため家兎の耳介静脈にペントバルビタール(ネプタール®) 25 mg/kgを注射し、さらに8万分の1エピネフィリン加2%リドカインを局所浸潤麻酔に用いた。背部皮膚を切開剥離し、ポケットを形成して筋膜上に金属プレートを入れた後、3-0絹糸で皮膚を縫合閉鎖した。また、術後感染予防のためにペニシリンGカリウム(10万単位/日)を4日間筋注投与した。

(2) 大腿骨内埋入

各々2羽の左右側大腿骨骨幹中央部の上下方4カ所へ、計4本の同種金属スクリューを入れた。埋入手術は前述同様の麻酔下で、大腿骨の骨膜下まで切開剥離し、直径1.9mmのツイストドリルを用い、注水下に大腿骨の皮質骨外側にねじ穴を2カ所に形成し、次いで直径2.2mmの金属スクリューをそれぞれ片側に2本ずつ埋入し縫合閉鎖した。なお、前述同様、術後に抗生剤を投与した。

3. 観察方法

各々2羽の家兎は埋入後、2, 4, 8, 12週目に、それぞれペントバルビタールの過剰投与によって屠殺した。採取した試料は、以下のように処理し、皮下組織ならびに大腿骨組織における溶出金属の元素分析ならびに組織学的観察に供した。

1) 溶出金属の元素分析

(1) 皮下埋入例における inductively coupled plasma spectrometer (ICP) 発光分析

4種類の各金属プレートを前述のごとく、計32羽へ埋入した。分析部位はステンレス鋼では

各週例ごとに1羽のうちの1カ所を、各チタン材料では1羽目の1カ所および2羽目の2カ所を、それぞれ無作為に用いた。屠殺後、直ちに埋入した金属プレートとともに周囲軟組織を切除した。さらに金属材料を除去し、材料周囲を被包していたおよそ10mmの範囲の組織を採取した。真空凍結乾燥機 FDU-540 (東京理化) にて軟組織片の凍結乾燥を12時間行い、乾燥重量を測定した。この乾燥組織片をケルダールフラスコに入れ、原子吸光分析用過塩素酸(Cica-Merk)を5ml加えて煮沸し、溶液が透明になってから、さらに20分間加熱した。冷却後に蒸留水5mlで希釈し、Na5Bの濾紙を用いて濾過し、25mlに定容したものを分析用試料溶液とした。溶出金属の元素分析には、シーケンシャル形高周波プラズマ発光分析装置 ICPs 1000 型 (島津社製) を用い、プロファイル強度測定比較法により、定量分析を行った。なお、ブランクには過塩素酸5mlを蒸留水で25mlに希釈した溶液を用いた。これら試料溶液中の各金属元素の濃度は、乾燥組織試料1g当たりの重量(μg)に換算した。その換算式は以下のようであった。

$$X = \frac{A \cdot B}{C}$$

X: 乾燥組織試料1g当たりの溶出量(μg/g)

A: ICPによる分析値(μg/l)

B: 試料溶液の定容量(25ml)

C: 乾燥試料組織の重量(g)

(2) 大腿骨内埋入例における energy dispersed X-ray microanalyzer (EDX) 分析

4種類の各金属スクリューを前述のごとく、計8羽に埋入した。分析には1羽につき1カ所を無作為に用いた。埋入12週目に屠殺し、埋入した金属材料とともに大腿骨を摘出後、10%中性緩衝ホルマリン溶液中に1週間浸漬固定した。その後、エタノール上昇系列にて脱水し、アセトンに置換した後、ポリエステル系樹脂(マルトー社製)に包埋した。各包埋試料はバンド・ソー(Exakt社製BS-3000)を用い、埋入スクリューの長軸と平行に厚さ1mmに切断後、

鏡面研磨した。大きさ 3×3 mm の試料を作製後、カーボン蒸着し、分析用試料とした。分析には、日立 H-600 型電子顕微鏡に併設された日立 H-6010 A スキャンシステムを用いて分析部分を確認後、エネルギー分散型 X 線分析装置 (Kevex 8000) により、加速電圧 25 KeV、照射電流 30 pA、分析時間 200 sec の条件で、各金属元素について面分析ならびに線分析を行った。なお、Ti 合金では Ti の $K\alpha$ 線と V の $K\alpha$ 線が重複するため、V については $K\beta$ 線で分析した。

2) 組織学的観察

(1) 皮下埋入例

4 種類の各金属プレートを前述のごとく、計 32 羽へ埋入した。なお、各個体に埋入した同種金属プレートは 4 カ所のうち、前述の ICP 分析に用いなかった部位を組織学的観察に使用した。金属プレートとともに周囲の背部皮下組織を採取し、生理食塩水にて洗浄後、pH 7.4 の 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液で 1 週間固定した。アルコール上昇系列にて脱水後、アセトン置換法によりポリエステル樹脂 (マルト社製) にて金属とともに包埋し、研磨標本作製した。これらにヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施して鏡検した。

(2) 大腿骨内埋入例

4 種類の各金属スクリューを前述のごとく、計 32 羽へ埋入した。なお、各個体に埋入した同種金属スクリューは 4 カ所のうち、前述の EDX 分析に用いなかった部位を組織学的観察に使用した。金属スクリューを含む大腿骨組織を周囲筋組織とともに採取し、前述のごとく樹脂包埋した。次いで、バンド・ソー (Exakt 社製) を用いて注水下に約 300 μ m 厚に薄切した。この標本を HT 式硬組織研磨装置 N-100 と耐水研磨紙の 240 番、800 番、1500 番にて片面を研磨した後、濾紙に挟んで乾燥させ、スライドガラスに瞬間接着剤を用いて標本を貼付した。これをさらに片面研磨して約 70 ~ 90 μ m 厚の非脱灰研磨標本作製し、H-E 染色を施して鏡検した。なお、研磨標本の厚さの測定には、ダイヤルゲージ (G-5 ϕ) を使用した。

実験結果

1. 溶出金属の元素分析

1) 皮下埋入例における ICP 発光分析

(1) ステンレス鋼

ステンレス鋼プレートを埋入した皮下周囲組織からは、Fe のみが検出され、Cr、Ni および Mo はいずれも検出限界値以下であった。Fe の溶出量は、埋入後 2 週目には平均 603.2 ± 22.8 μ g/g と最高値を示したが、経日的に減少傾向がみられ、8 週目には平均 104.4 ± 23.2 μ g/g に、さらに 12 週目では平均 98.3 ± 47.7 μ g/g にまで減少した (Table 1, Fig. 2)。

(2) 純 Ti

純 Ti プレートにおける組織中の Ti の溶出量は、埋入後 2 週目では平均 3.4 ± 1.0 μ g/g、4 週目および 8 週目ではこれの 2 倍となり、12 週目では平均 11.5 ± 4.9 μ g/g と明らかに増加した。純 Ti からの Ti の溶出量はステンレス鋼からの Fe の溶出量に比較してきわめて少なく、また埋入後 4 週目では Ti の溶出を検出できない試料もあった (Table 1, Fig. 3)。

(3) Ti 合金

Ti 合金プレートでは、Ti および Al が検出されたが、V はすべての試料において検出限界値以下であった。Ti 合金からの Ti の溶出量は、埋入後 2 週目では平均 5.8 ± 3.2 μ g/g、4 週目では平均 5.8 ± 4.1 μ g/g、8 週目では平均 2.6 ± 2.3 μ g/g に減少したが、12 週目では平均 14.4 ± 2.1 μ g/g と著しい増加傾向がみられた。なお、この実験材料でも埋入後 8 週目に Ti の溶出を検出できない試料があった (Table 1, Fig. 3)。

一方、Ti 合金からの Al の溶出量は、埋入後 2 週目では平均 275.9 ± 181.8 μ g/g であったが、12 週目には平均 231.6 ± 16.9 μ g/g と次第に減少した (Table 1, Fig. 2)。

(4) 窒化 Ti

窒化 Ti プレートにおける周囲組織中の Ti の溶出量は、埋入後 2 週目では平均 4.5 ± 2.2 μ g/g、4 週目では平均 4.4 ± 4.0 μ g/g、8 週目では平均 8.6 ± 1.2 μ g/g、12 週目では平均 8.1 ± 6.4

Table1 Amount of eluted elements in subcutaneous tissue around implanted metallic plates.

Metallic plates	No. of samples	Detected elements	Periods after implantation (Weeks)			
			2	4	8	12
Stainless steel (SUS 316 L)	1	Fe	587.1	172.6	88.0	132.0
	2	Fe	619.3	212.1	120.8	64.6
	mean±SD		603.2±22.8	192.4±27.9	104.0±23.2	98.3±47.7
Pure titanium (Ti)	1	Ti	4.0	0.0*	10.5	15.8
	2	Ti	2.9	11.6	7.9	12.6
	3	Ti	3.4	10.5	4.5	6.1
	mean±SD		3.4±0.5	7.4±6.8	7.6±3.0	11.5±4.9
Titanium alloy (Ti-6 Al-4 V)	1	Ti	9.4	5.2	4.1	12.5
	2	Ti	4.9	10.2	3.8	14.0
	3	Ti	3.1	2.1	0.0*	16.7
	mean±SD		5.8±3.2	5.8±4.1	2.6±2.3	14.4±2.1
	1	Al	229.6	553.7	137.6	250.0
	2	Al	121.7	256.0	231.6	228.1
	3	Al	476.4	51.6*	122.0	216.7
	mean±SD		275.9±181.8	287.1±252.5	163.7±59.3	231.6±16.9
Titanium nitride (TiN)	1	Ti	4.0	5.3	9.9	9.9
	2	Ti	2.5	7.8	7.9	13.3
	3	Ti	6.9	0.0*	7.9	1.0
	mean±SD		4.5±2.2	4.4±4.0	8.6±1.2	8.1±6.4

Amount of eluted elements is shown in unit of $\mu\text{g/g}$ dry weight.

*: No rejectional data in Smirnov's rejection test ($p < 0.05\%$).

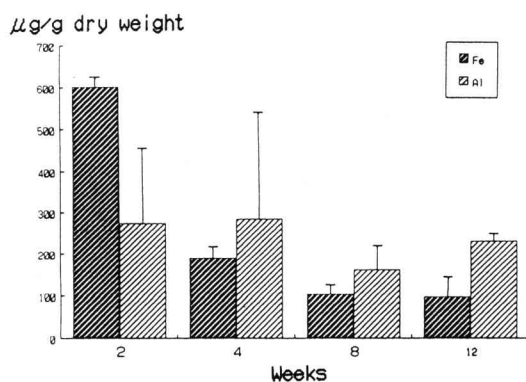


Fig.2 Graphic representation of the amount of iron element (Fe) eluted from stainless steel (SUS 316 L) and the amount of aluminum element (Al) eluted from titanium alloy (Ti-6Al-4V).

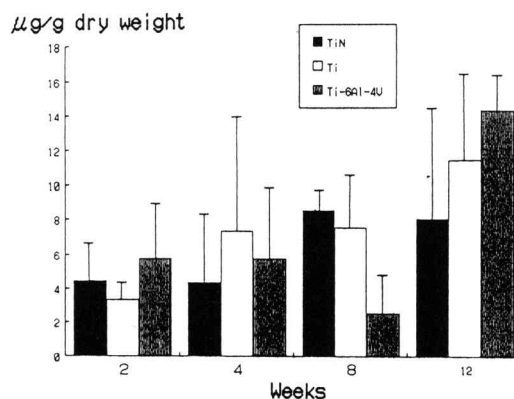


Fig.3 Graphic representation of the amount of titanium element eluted from pure titanium (Ti), titanium alloy (Ti-6Al-4V) and titanium nitride (TiN).

$\mu\text{g/g}$ と微増傾向を示した。一方、埋入後4週目においても窒化TiからTiの溶出が検知できなかった試料があった (Table 1, Fig. 3)。

2) 大腿骨内埋入例におけるEDX分析

EDX装置による埋入後12週目の金属スクリューと骨との界面部における溶出元素の分析結果は、以下のようであった (Fig. 4-8)。

(1) ステンレス鋼

スクリューと骨との界面部におけるFe, NiおよびCrの溶出について線分析を行った結果、いずれの元素も骨組織への溶出は検知できなかった (Fig. 4 a-d)。

(2) 純Ti

面および線分析ともに、金属表面に沿って約 $5\mu\text{m}$ 離れた骨組織中にTiのわずかな溶出が認められた (Fig. 5 a, bの矢印)。

(3) Ti合金

Ti, AlおよびVについての面分析によると、いずれの元素も溶出は認められなかった (Fig. 6 a, b, c)。また、線分析でもTiの骨組織への溶出は認められなかった (Fig. 6 d)。

(4) 窒化Ti

面および線分析では、いずれもTiK α 線としてスクリュー部分に検出されるが、骨組織にはTi溶出の徴候を検知することができず、純Tiとは異った様相がみられた (Fig. 7 a, b)。

2. 組織学的観察

1) 皮下埋入例における組織所見

(1) 埋入2週目

ステンレス鋼ではプレート表面付近に遊走細胞が散見されたが、扁平な核をした線維芽細胞は少なく、比較的粗な無構造の線維性組織による被包化が認められ、その厚さは約 $200\mu\text{m}$ 程度であった (Fig. 8 a)。純TiとTi合金ではプレート周囲には約 $100\sim 150\mu\text{m}$ 程度の厚さの線維性被膜の層が認められたが、線維の構成は疎であった (Fig. 8 b, 8 c)。窒化Tiでも線維性被膜の厚さは純TiやTi合金と同程度であり、プレートをとり囲むように扁平な核をした密な線維性組織が並走して配列していた (Fig. 8 d)。

(2) 埋入4週目

ステンレス鋼では埋入2週目に比較してプレート周囲はより密で、厚さが約 $150\mu\text{m}$ の線維性被膜によって被包されていた。純Ti, Ti合金および窒化Tiでは、埋入2週目と同様にプレート表面の全周囲は厚さ約 $150\mu\text{m}$ の線維性被膜によって被包されていたが、その周辺には太い膠原線維からなる交織線維性結合組織が出現し、線維性被膜を被包するようになっていた (Fig. 9 a)。

(3) 埋入8週目

プレート周囲の線維芽細胞の多い線維性被膜の厚さは、ステンレス鋼では純Ti, Ti合金および窒化Tiに比較して薄い、線維性被膜を被包する交織線維性結合組織が発達し、ステンレス鋼においても著明となり (Fig. 9 b)、いずれの金属プレート周囲の結合組織の構造にも著しい差異は認められなくなっていた。

(4) 埋入12週目

埋入8週目と比較して、組織学的には大きな差異は認められないが、全体として埋入プレートを囲む線維性組織の厚さは減少傾向を示していた。ステンレス鋼ではプレート周囲は新生血管に乏しい線維性組織によって被包され、その厚さは約 $100\mu\text{m}$ 程度であった。純Tiでは線維性組織の厚さは埋入8週目に比較して減少傾向がみられ、ステンレス鋼に比較すると血管の分布は多かった。Ti合金では約 $100\mu\text{m}$ の厚さの依然として密な線維性被膜によって囲まれ、埋入8週目との間には大きな変化は認められなかった (Fig. 10 a)。窒化Tiではプレート周囲の線維性被膜は薄くなり、その周囲は血管の多い結合組織によって被包されていた (Fig. 10 b)。埋入8週目と12週目を比較すると、ステンレス鋼とTi合金では大きな変化はなく、純Tiと窒化Tiでは一段と周囲結合組織と密に接していた。

2) 大腿骨内埋入例における組織所見

(1) 埋入2週目

ステンレス鋼では骨削した骨組織とスクリュー体部との間には線維性組織の侵入が認め

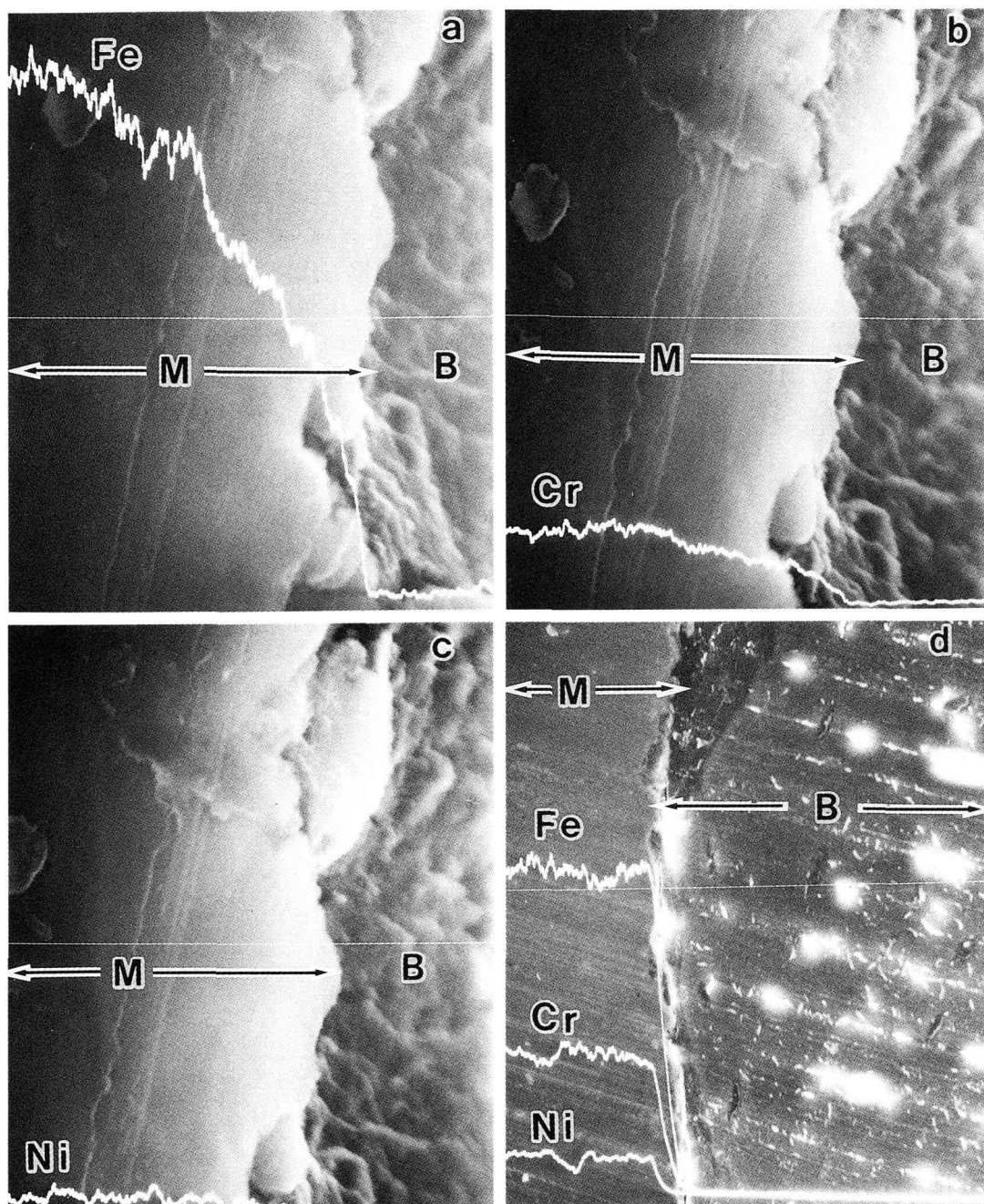


Fig.4 Scanning electron micrographs of stainless steel screw at the 12th week after implantation in rabbit femur.

a : Line analysis of Fe ($\times 15,000$)

b : Line analysis of Cr ($\times 15,000$)

c : Line analysis of Ni ($\times 15,000$)

d : Line analysis of 3 elements ($\times 100$)

Eluted Fe, Cr and Ni are not dispersed from metallic screw (M) to bone tissue (B).

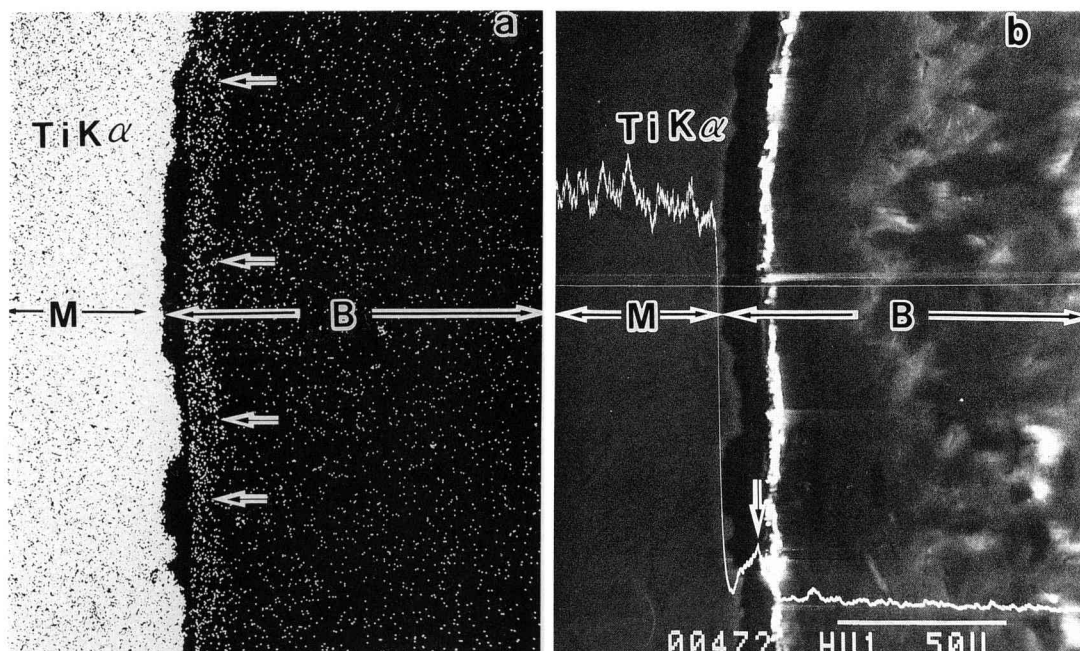


Fig.5 Scanning electron micrographs of pure titanium screw at the 12th week after implantation in rabbit femur.

a: Mapping of Ti-K α ($\times 500$)

b: Line analysis of Ti-K α ($\times 500$)

Elated Ti is detected from metallic screw (M) to bone tissue (B) (arrows). (White line and spot show Ti element.)

られ、骨髓内にあるスクリュー周囲は線維組織によって取り囲まれていた (Fig. 11 a)。純 Ti ではスクリューと骨組織との間の線維組織の侵入は窒化 Ti よりも多いが、骨削した骨組織とスクリューとの間に骨梁の形成が認められた。しかしながら、骨髓内腔のスクリュー周辺に化骨形成は認められなかった (Fig. 11 b)。Ti 合金ではスクリューと骨組織との間に化骨形成は認められないが、骨髓腔内のスクリュー基部に骨梁の形成が認められた (Fig. 11 c)。窒化 Ti ではスクリューと骨組織の間に一部線維組織の侵入がみられるものの、スクリュー体部に沿って骨髓側から梁状の化骨形成がみられ、骨髓内のスクリュー周辺の一部にも化骨形成がみられた (Fig. 11 d)。

(2) 埋入 4 週目

ステンレス鋼ではスクリューの埋入された骨組織の外側と内側に化骨形成がみられ、とくに外側ではそれが著明であった。骨髓内のスクリューには薄い線維性組織が介在し、化骨形成

はみられなかった (Fig. 12 a)。純 Ti ではスクリューと骨組織内側との間に新生骨の形成が認められた (Fig. 12 b)。Ti 合金ではスクリュー体部と骨組織の外側と内側との間に新生骨の形成がみられるが、骨髓内腔のスクリュー周囲には化骨形成は認められなかった (Fig. 12 c)。窒化 Ti ではスクリューが埋入された骨組織の外側と内側に、とくに突出したスクリュー頭部に著明な化骨形成が認められ、さらに骨髓内スクリューの一部にも化骨形成がみられた (Fig. 12 d)。

(3) 埋入 8 週目

ステンレス鋼ではスクリューと骨組織の間には薄い線維性組織が介在し、骨髄側では線維性組織による被包化が認められ、全体的にチタン材料よりも新生骨の形成は少なかった (Fig. 13 a, b)。窒化 Ti ではステンレス鋼に認められた線維性組織の介在は認められず、スクリュー体部に沿って形成された骨との固い結合を推測させる所見が得られた (Fig. 13 c,

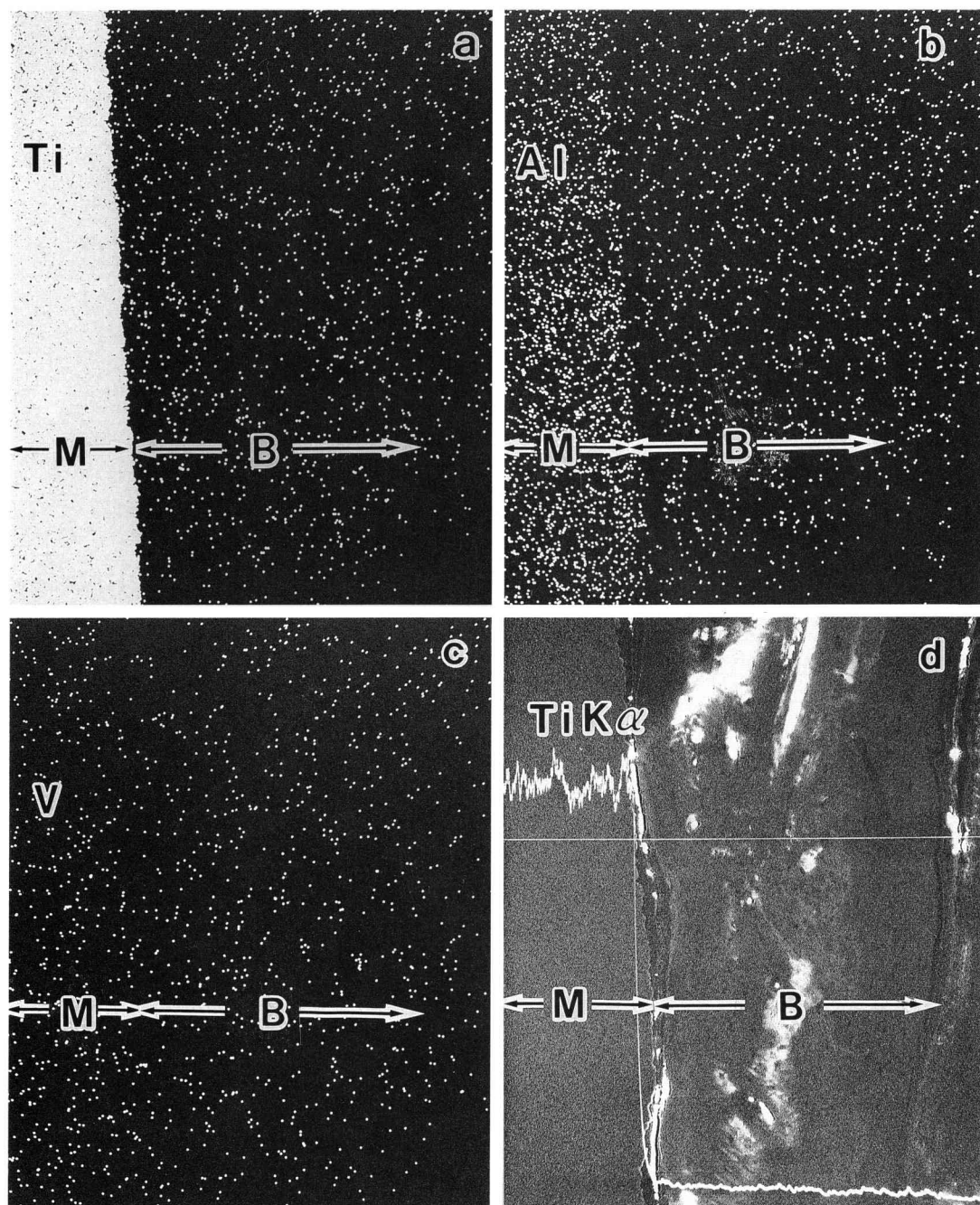


Fig. 6 Scanning electron micrographs of titanium alloy (Ti-6Al-4V) screw at the 12th week after implantation in rabbit femur.

a : Mapping of Ti-K α ($\times 100$)

b : Mapping of Al-K α ($\times 100$)

c : Mapping of V-K β ($\times 100$)

d : Line analysis of Ti-K α ($\times 100$)

Eluted metallic elements are detected, but Al is eluted in a larger amount than Ti, and V is not detected by mapping.

(White spot shows each metallic elements.)

Line analysis shows that eluted Ti element is not dispersed.

(White line shows Ti element.)

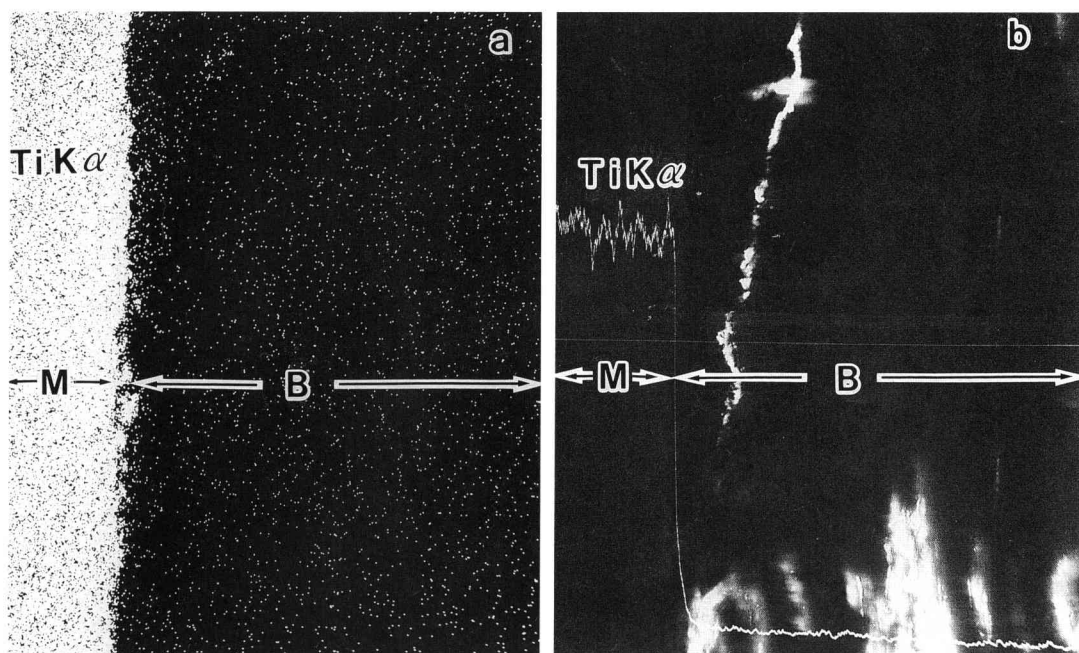


Fig. 7 Scanning electron micrographs of titanium nitride screw at the 12th week after implantation in rabbit femur.
a : Mapping of Ti-K α ($\times 500$)
b : Line analysis of Ti-K α ($\times 500$)
Eluted Ti is not detected from metallic screw (M) to bone tissue (B). (White line and spot show Ti element.)

d)。純 Ti および Ti 合金では、窒化 Ti とほぼ同様の所見が認められた。

(4) 埋入 12 週目

ステンレス鋼ではスクリューと骨組織との接触部位では新生骨の形成がみられた。しかし、チタン材料に比較すると、形成された骨量は少なく、骨との接触は疎であった (Fig. 14 a)。純 Ti ではスクリュー体部と骨組織の間に少量の線維性組織の介在がみられた。しかし、大部分は新生した層板状の成熟骨との接触が認められ、スクリュー頭部を覆うように骨形成の伸展がみられた (Fig. 14 b)。Ti 合金では骨組織との接触は比較的良好であったが、接触面への線維組織の侵入は純 Ti よりも多く、骨形成は少なかった (Fig. 14 c)。窒化 Ti ではスクリュー体部と骨組織の間に新生した層板状の成熟骨が密に認められ、スクリュー頭部を覆うように骨形成の伸展している様相がみられた (Fig. 14 d)。

考 察

1. 生体材料からの金属溶出について

生体材料として使用される金属や、その合金の含有成分には、Cr, Co, Ni, Ti, Fe, Zn, Al などがあり、発癌性に関する動物実験の報告がみられる¹⁷⁾。また、骨折治療に使用したステンレス鋼やバイタリウム (Co-Cr 合金) の長期間埋入例では、肉腫や悪性リンパ腫などの発生が報告されている¹⁸⁾。このようなことから、最近、生体材料として使用される金属の溶出に関する研究報告が待たれている。

そこで、著者はまず皮下埋入例における溶出金属の定量分析を行った結果、窒化 Ti 埋入後 12 週目における Ti の溶出量は、純 Ti や Ti 合金に比較して少なく、また各週例ごとにおける増加傾向もわずかであった。このことは、窒化 Ti の表面に存在する窒化層が安定しているため、Ti の溶出を抑制するものと推察される。純 Ti における Ti の溶出量は各週例ごとに増加傾

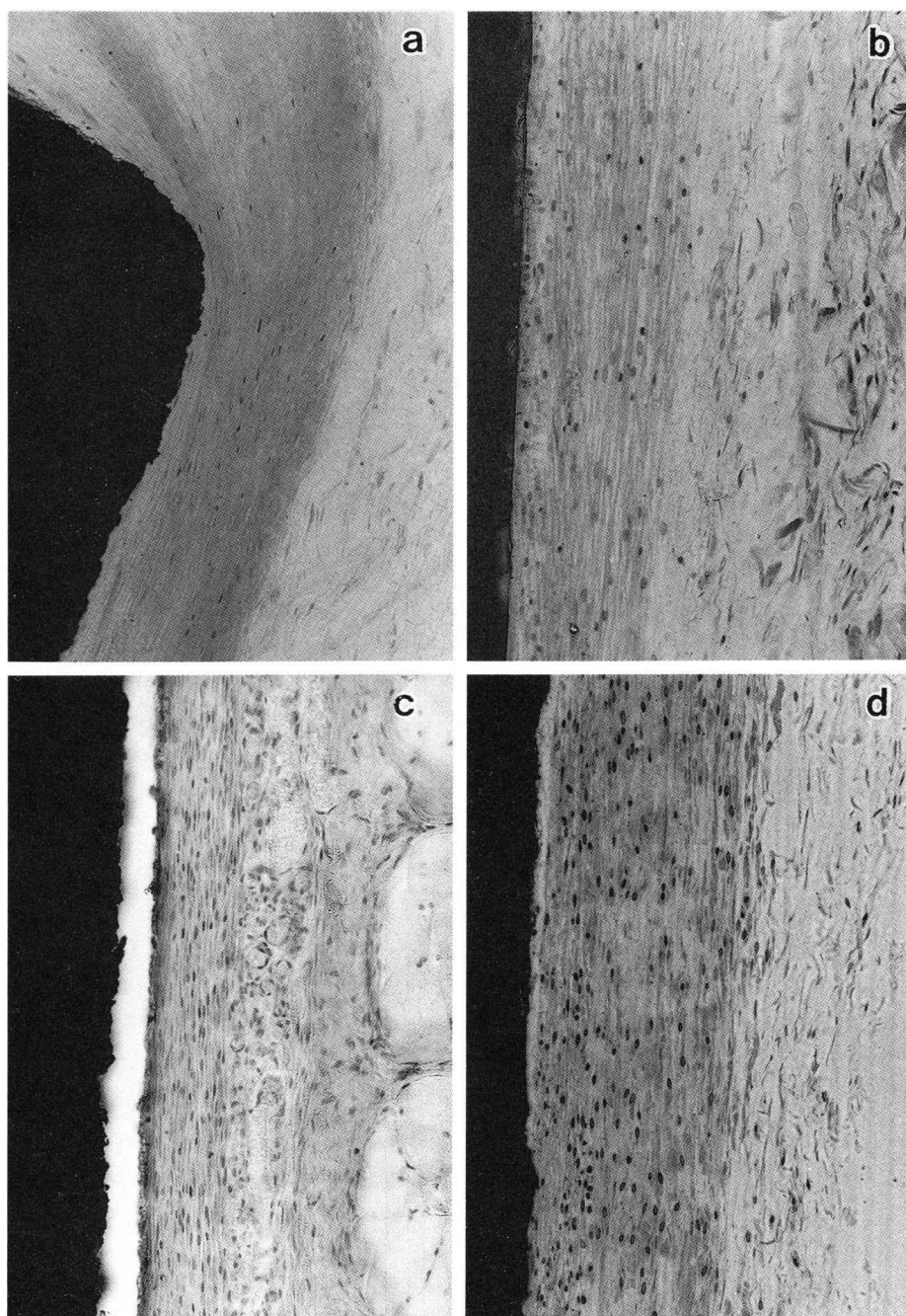


Fig. 8 Photomicrograph of subcutaneous tissue surrounding metallic plate at the 2nd week after implantation (HE stain, $\times 50$).

a : Stainless steel

b : Pure titanium

c : Titanium alloy

d : Titanium nitride

Histological examination of the reaction of surrounding tissue reveals that stainless steel is encapsulated around its surface by lower fibrous tissue layers (a) , and that pure titanium, titanium alloy and titanium nitride are encapsulated by dense fibrous tissue layers at the 2nd week after implantation (b-d) .

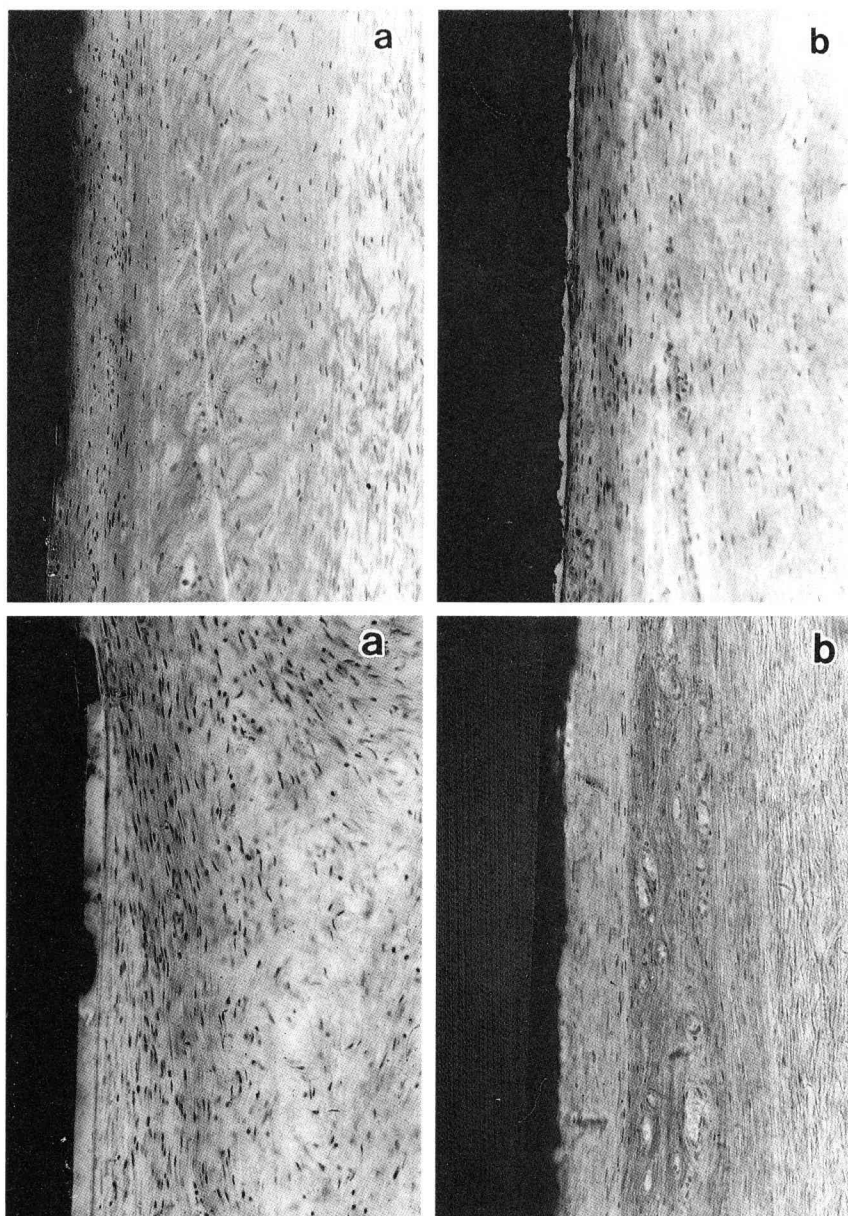


Fig.9 Photomicrographs of subcutaneous tissue surrounding metallic plate at the 4th and 8th weeks after implantation (HE stain, $\times 50$) .
a : Titanium nitride at the 4th week after implantation.
b : Stainless steel at the 8th week after implantation.
Histological examination of the reaction of surrounding tissue shows that titanium nitride is also encapsulated by dense connective tissue, almost as are pure titanium and titanium alloy, at the 4th week after implantation (a), and that encapsulation of stainless steel by fibrous tissue is followed by development of dense connective tissue at the 8th week after implantation (b) .

Fig.10 Photomicrographs of subcutaneous tissue surrounding metallic plate at the 12th week after implantation (HE stain, $\times 50$) .
a : Titanium alloy
b : Titanium nitride
Histological examination of the reaction of surrounding tissue shows that titanium alloy is also encapsulated by dense fibrous tissue layers (a), and that titanium nitride is encapsulated by dense fibrous tissue layers with rich vasculature at the 12th week after implantation (b) .

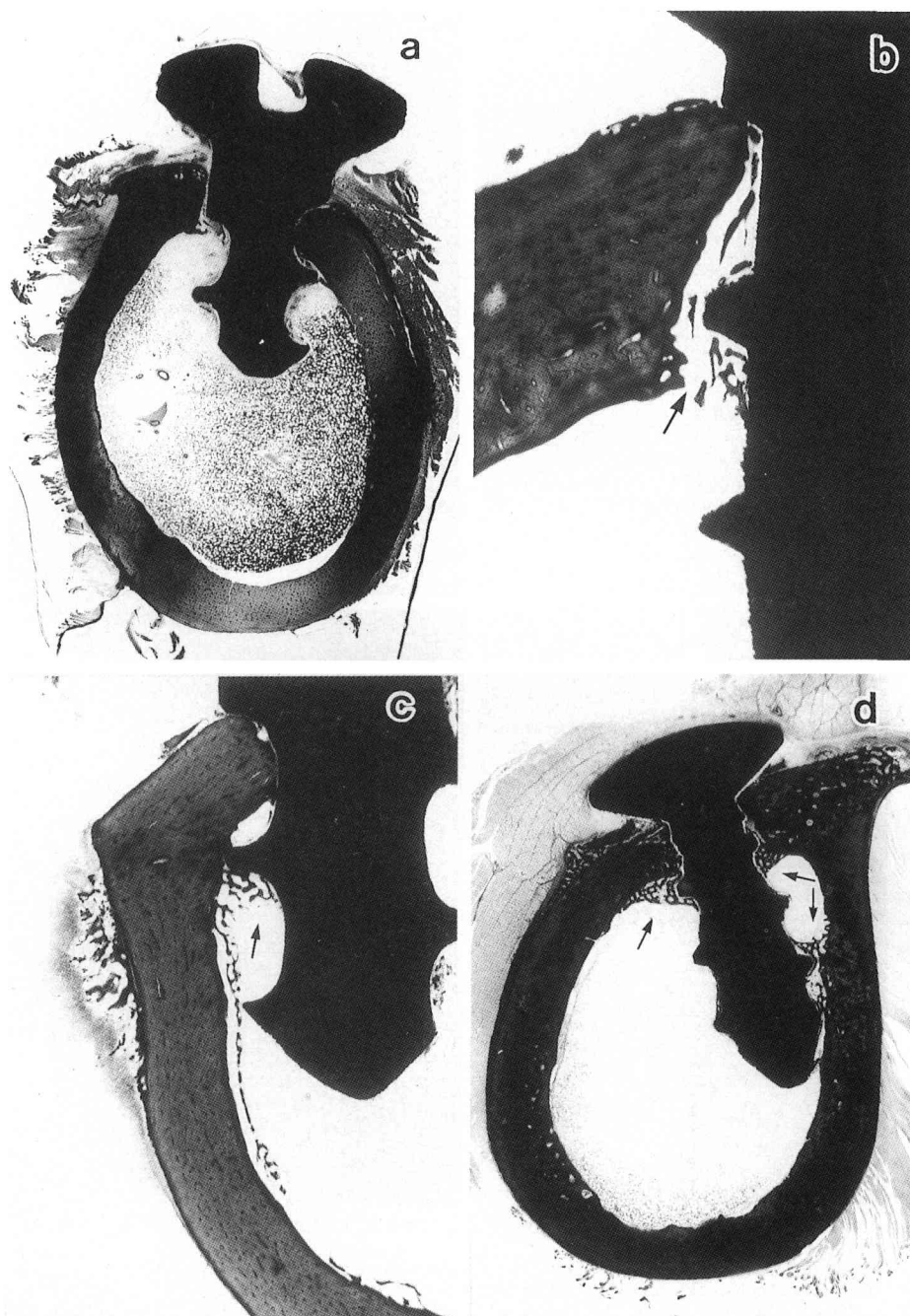


Fig.11 Photomicrographs of femur at the site of metallic screw at the 2nd week after implantation (HE stain) .
 a : Stainless steel ($\times 2.5$)
 b : Pure titanium ($\times 25$)
 c : Titanium alloy ($\times 25$)
 d : Titanium nitride ($\times 2.5$)
 New bone formation is observed at the area of bone defect around the screws (arrows) .

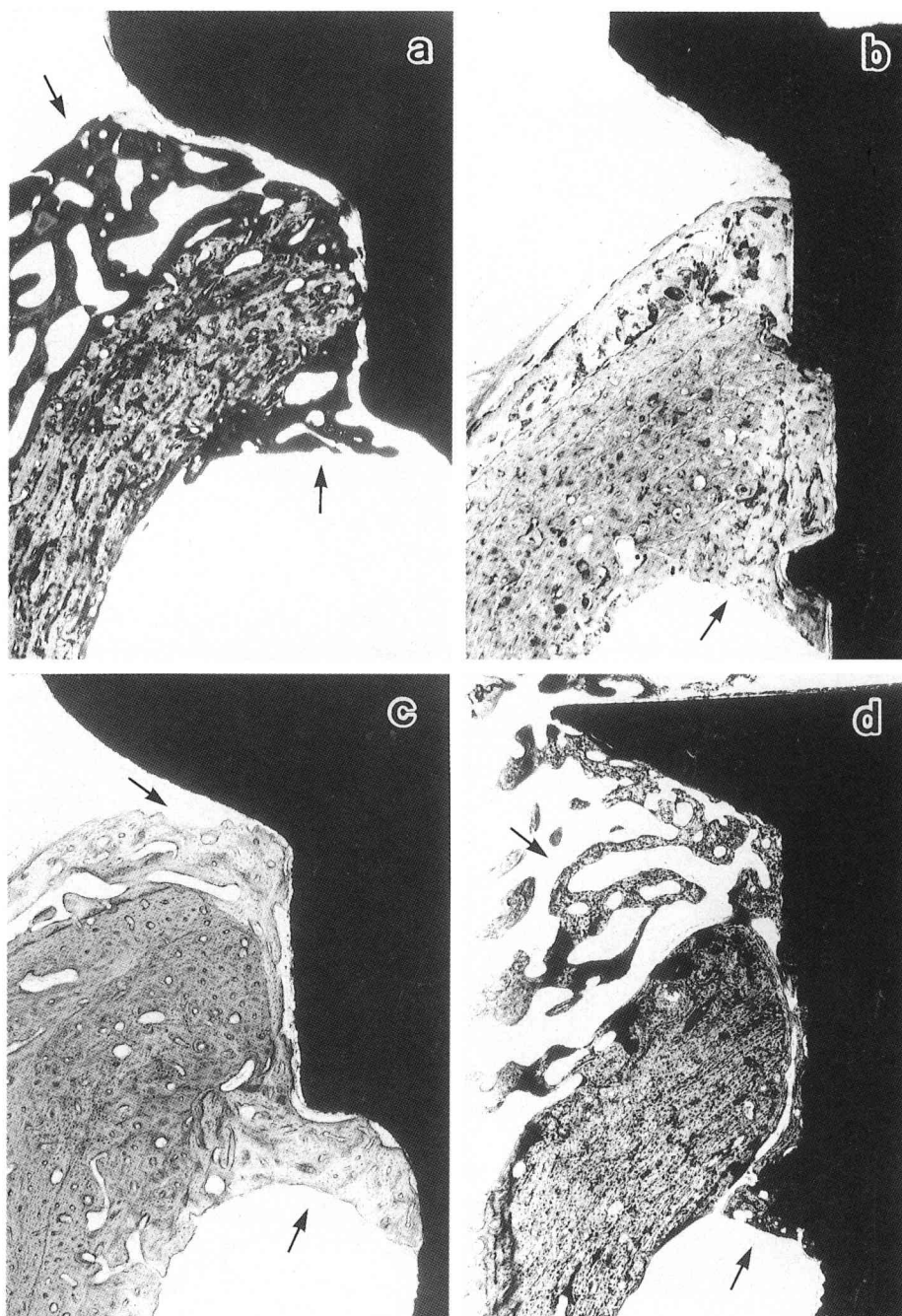


Fig.12 Photomicrographs of femur at the site of metallic screw at the 4th week after implantation (HE stain, $\times 25$) .
a : Stainless steel
b : Pure titanium
c : Titanium alloy
d : Titanium nitride
New bone formation is observed at the area of bone defect around the screw (arrows) .

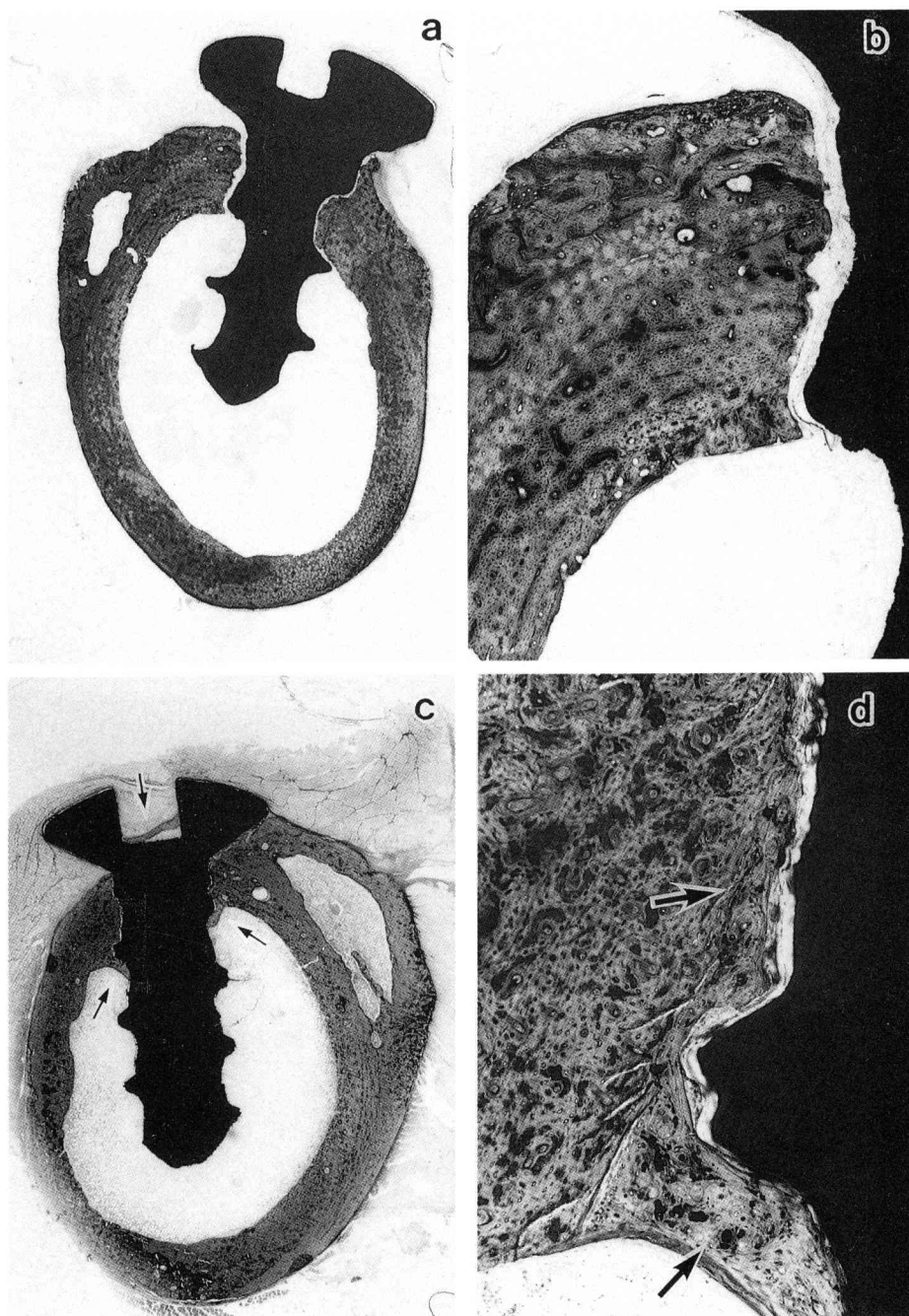


Fig.13 Photomicrographs of femur at the site of metallic screw at the 8th week after implantation (HE stain) .
 a : Stainless steel ($\times 2.5$)
 b : Magnification of a ($\times 25$)
 c : Titanium nitride ($\times 2.5$)
 d : Magnification of c ($\times 25$)
 New bone formation is observed at the area of bone defect around the screw (arrows) .

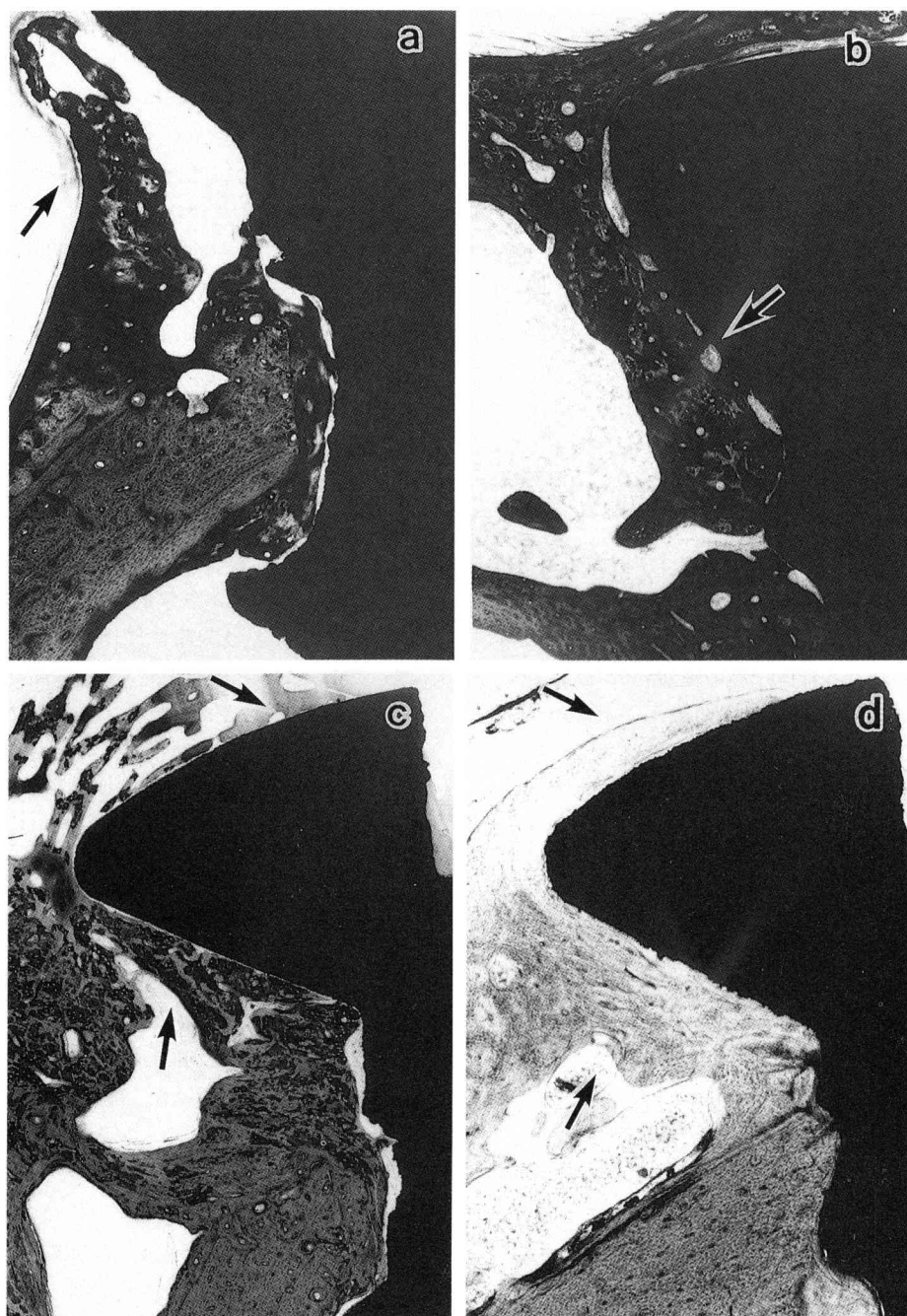


Fig.14 Photomicrographs of femur at the site of metallic screw at the 12th week after implantation (HE stain, $\times 10$) .
a : Stainless steel
b : Pure titanium
c : Titanium alloy
d : Titanium nitride
The screw head is covered by new bone formation (arrows) .

向を示した。したがって、純 Ti の耐食性がいかに優れていても、生体内での Ti の溶出は避けられず、長期間埋入後の生体への影響についても、今後追究していく必要がある。Ti 合金における Al の溶出量は Ti よりも多く、V は検出限界値以下であった。とくに、Al は溶出量が多く、かつ各試料によってかなりの差がみられた。これは主として金属プレート周囲軟組織を一定量に採取することがきわめて困難であったことに起因するものと思われる。Ti 合金は純 Ti よりも機械的強度に優れており、生体材料としての利点がある。しかしながら、Al の体内毒性が問題となっており¹⁹⁾、Al の溶出による生体への影響が懸念される。

本実験では、ステンレス鋼は埋入後 2 週目に Fe の溶出量が多く、それ以降は減少傾向を示した。別所ら²⁰⁾は Champy のステンレス製ミニプレートによる骨折固定の短期間例では、Fe、Cr および Ni は周囲線維組織から検出されなかったが、約 3 年間の埋入例ではこれらが検出されたと述べている。本実験は短期間例のため Ni や Cr の溶出は認められなかったものの、いずれは Ni、Cr も溶出し、生体組織に何らかの有害作用を及ぼす可能性のあることも考えられた。

Willems ら²¹⁾は純 Ti と Ti 合金を犬の大腿骨に 12 カ月間埋入後、骨を分離して Ti^{4+} と V^{5+} の定量分析が可能であったと報告している。著者の実験では、スクリューが骨に強固に固定されており、骨と分離することが困難であったので、スクリューと骨とを分離することなく定性分析の可能な EDX 装置を使用した。なお、EDX 分析は硬組織における元素分析に適しており^{22,23)}、また原子吸光分析の結果ともほぼ一致している²⁴⁾。大腿骨内埋入後 12 週目における溶出金属の元素分析によると、窒化 Ti では骨組織への Ti の溶出が認められなかった。これは窒化処理によって、純 Ti よりも金属表面の耐摩耗性および耐食性が強化されたためと考えられた。一方、純 Ti ではスクリュー表面に接している骨組織に、わずかな Ti の溶出が認め

られた。これは川原²⁵⁾の報告と一致し、耐食性に優れた純 Ti であっても、Ti の微量な溶出は避けられないことを示している。また、純 Ti の表面は比較的軟らかく、スクリューをねじ込む際やプレートの屈曲によって酸化皮膜が損傷を受けやすいため、窒化処理によって表面をより硬化させることが臨床的により望ましいものと考えられる。Ti 合金に対しては、面分析によって成分元素の溶出を比較したところ、Ti に比べて Al の方が強く検出され、また皮下埋入 12 週目には Al の溶出量が Ti の約 15 倍も多く認められた。このように、Al が高濃度のときには骨組織を軟化させる作用のあることが報告¹⁹⁾されている。今後この点については十分に検討する必要がある。V の溶出は本実験では認められなかったが、整形外科領域では Ti 合金をヒトの人工股関節に使用し、金属摩耗によって Ti、Al、V の溶出元素が認められたという報告がある²⁶⁾。このように、Ti 合金に機械的刺激が加わると V が溶出し、強い細胞毒性を示すため²⁷⁾、V は長期的には生体内の代謝を障害することも考えられる。

Ferguson ら²⁸⁾は金属材料を家兎の筋組織内に 16 週間埋入し、溶出金属の体内循環について追究した。その結果、ステンレス鋼の周囲筋組織には Cr と Ni が、肺、肝臓および脾臓には Ni が増加し、また純 Ti では周囲筋組織、肺ならびに脾臓において Ti の増加が認められたと述べている。したがって、窒化 Ti についても埋入時における Ti の臓器内蓄積に関する追究が必要である。

2. 埋入実験における組織所見について

埋入材料周囲の被包化は、非免疫学的炎症による異物反応と免疫学的炎症による過敏性反応の 2 つに大別されている^{29,30)}。本実験の皮下組織所見では、すべての埋入材料において線維性組織による被包化が観察された。しかし、類上皮細胞が認められなかったことから、これは過敏性反応によるものではなく、異物反応によって形成された線維性被膜であると考えられた。また、使用したこれら金属プレート間における

経日的な線維性被膜の厚さには著明な増大傾向は認められず、かつ検出された Ti, Al および Fe の溶出量はいずれも微量であったことから、線維性被膜の厚さに影響を与える程ではないように思われた。

生体内における溶出金属に対する組織反応は金属の溶出量のみならず、金属の細胞毒性の強さによっても影響を受ける³¹⁻³³⁾。強い細胞毒性のある Ni, Cr および V などの金属材料では、組織内に埋入しても被包化は起こらず、周囲組織に非細菌性膿瘍の形成や壊死が生じ、いずれも生体にさまざまな障害を引き起こす原因になるものと考えられ、ときには腫瘍を発生させることも報告されている³³⁾。しかし本実験では、いずれの金属材料も埋入 2 週目には急性炎症性反応はほとんど認められず、それ以降もとくに異常なく経過したことから、とくに問題がないものと思われた。

一方、大腿骨内埋入例におけるステンレス鋼では、スクリューと骨組織との間には薄い線維性組織が介在し、埋入 12 週目になっても骨形成量はチタン材料に比較して少なかった。3 種類のチタン材料ではスクリューと骨組織との界面部に大きな組織学的差異は認められなかったが、窒化 Ti では骨組織内外に骨形成のみられるものもあった。また、いずれの金属材料においても骨髓腔内のスクリュー部は薄い線維性被膜によって囲まれていたが、骨髓内のスクリュー部に骨形成のみられたものは一部の窒化 Ti のみであった。このように、ステンレス鋼はスクリューと骨との間に薄い線維組織が介在していたことから生体許容性素材³⁴⁾に、また窒化 Ti, 純 Ti および Ti 合金はスクリューと骨との間隙に層板状の新生骨が形成され、互いに接していたので生体安定性素材³⁴⁾に相当するものと思われる。またチタン材料は、ステンレス鋼と比較して新生骨の形成が速く、骨組織に対する親和性が良好であるものと考えられた。

結 論

生体内局所における金属材料の耐食性と組織

親和性を追究するため、ステンレス鋼, 純 Ti, Ti 合金, 窒化 Ti のプレートおよびスクリューを家兎の皮下および大腿骨内へ埋入し、金属の周囲組織への溶出ならびに周囲組織の反応を比較検討し、以下のような結果が得られた。

1) 皮下埋入例における ICP 発光分析によると、ステンレス鋼では Fe の溶出量は認められたが、経日的に減少傾向にあった。これに対し、純 Ti, Ti 合金および窒化 Ti では Ti の溶出量はいずれも経日的に増加傾向を示したが、それは微量であった。しかし、Ti 合金における Al の溶出量は、Ti の溶出量に比べてかなり多く認められた。

2) 皮下埋入例の組織所見では、いずれの金属材料も経日的にプレート周囲の線維性被膜の厚さは増大傾向を示さなかった。しかし、純 Ti, Ti 合金および窒化 Ti はその被膜の周辺が密性結合組織に移行したが、ステンレス鋼は疎性結合組織のままであった。

3) 大腿骨内埋入 12 週目における EDX 分析によると、純 Ti では新生骨面の表層に Ti の溶出がわずかに認められた。しかし、ステンレス鋼, Ti 合金, 窒化 Ti からは成分元素の溶出は認められなかった。

4) 大腿骨内埋入例の組織所見では、純 Ti, Ti 合金, 窒化 Ti は埋入 4 週目からスクリューと既存骨との間に新生骨が形成され、埋入 12 週目になると成熟骨と密な接触が認められた。しかし、ステンレス鋼では埋入 12 週目においても、なお一部に線維組織の介在が認められた。

5) 本研究に用いた金属材料はいずれも構成元素の溶出が比較的少なく、耐食性に優れていた。また、いずれのチタン材料もステンレス鋼に比べて組織親和性がより良好であった。したがって、窒化 Ti も他のチタン材料と同様に生体材料としての有用性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔外科学第 1 講座

藤岡幸雄名誉教授, 工藤啓吾教授, 同歯科理工学講座亀田 務教授, 同第2口腔解剖学講座名和橙黄雄教授, 同教養部化学中館興一教授に謹んで感謝の意を表します。また, ご指導ご鞭撻をいただきました同口腔外科学第1講座大屋高德助教授に謝意を表します。さらに, 元素分析にご協力いただきました岩手県工業試験場化学部, 本学電顕室のスタッフの皆様, 金属材料を作製していただいた㈱オハラ, ならびに関係教室各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は, 第36回日本口腔外科学会総会(1991年10月3日, 大阪)において発表した。

引用文献

- 1) 柴田寛一, 亀谷明秀: チタンの生体適合性について, 三浦維四, 井田一夫編: チタンの歯科利用, 第1版, クインテッセンス出版, 東京, 35-41ページ, 1988.
- 2) 埴 隆夫, 太田 守: チタンの生体適合性, 金属, 12: 16-21, 1991.
- 3) 埴 隆夫: 電解質溶液中においてチタン表面に生成する皮膜の解析, 歯材器, 8: 832-844, 1989.
- 4) Ellingsen, J.E.: A study on the mechanism of protein adsorption to TiO_2 , *Biomaterials* 12: 593-596, 1991.
- 5) 平林 真: IV非鉄金属材料, 日本金属学会編: 金属データブック, 初版, 丸善, 東京, 147-188ページ, 1974.
- 6) 道 健一: 口腔外科への応用と問題点—人工骨, 人工歯根について—, 歯医学誌 10: 171-175, 1991.
- 7) 和田 攻: 金属とヒト, —エコトキシコロジーと臨床—, 初版, 朝倉書店, 東京, 3-19ページ, 1986.
- 8) Kasemo, B.: Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects, *J. Prosthet. Dent.* 49: 832-837, 1983.
- 9) 吉成正雄: イオンプレATINGの歯科修復物への応用に関する研究, 第1報 TiN イオンプレATINGについて, 歯材器, 3: 71-78, 1984.
- 10) Ohya, T. and Ohara, I.: Pure titanium reconstruction plate and screw system in reconstruction of the mandible, *Asian J. Oral Maxillofac. Surg.* 3: 49-56, 1991.
- 11) 大屋高德, 関 克典, 福田喜安, 渋井 暁, 石川義人, 青村知幸, 八木正篤, 檀上 達, 工藤啓吾, 藤岡幸雄, 田中久敏, 石橋寛二, 小原伊佐夫: 下顎骨再建用窒化チタニウムプレートシステム (オハ

- ラ®) の開発と臨床的検討, 日口外誌, 38: 918-927, 1992.
- 12) Wisbey, A., Gregson, P.J. and Tuke, M.: Application of PVD TiN coating to Co-Cr-Mo based surgical implants, *Biomaterials* 8: 477-480, 1987.
- 13) Kummer, F.J., Ricci, J.L. and Blimenthal, N.C.: RF plasma treatment of metallic implant surface, *J. Appl. Biomaterials* 3: 39-44, 1992.
- 14) Gizatullin, R.G. and Khairullin, D.N.: Biological evaluation of titanium nitride used for coating dental prothesis, *Stomatologia (Mosk)* 65: 50-51, 1986.
- 15) 鈴木香奈子, 大野康亮, 高堀哲雄, 代田達夫, 松井義郎, 道 健一: チタンインプラント周囲の組織反応について—窒化処理と非処理の比較—(抄), 口科誌, 40: 1178-1179, 1991.
- 16) 中村精三, 筒井義一: チタン製品の窒化処理装置, 特許公報, B2: 143-147, 1988.
- 17) 矢野英雄: 生体材料の腐食, 人工股関節の腐食と摩耗による破損, 金属, 2: 45-51, 1992.
- 18) Lee, Y.S., Robert, W.H. and Nather, A.: Malignant fibrous histiocytoma at site of metal implant, *Cancer* 54: 2286-2289, 1984.
- 19) 真鍋重夫: Al はアルツハイマー病の原因か?, 金属, 9: 55-61, 1991.
- 20) 別所和久, 平野吉雄, 石浜信之, 吉田正彦, 村田睦男: 金属製顎修復インプラントについての検討—Champer のミニプレートの生体内における変化と為害作用を中心に—, 日口外誌 34: 1406-1413, 1988.
- 21) Willems, G.J., Palmans, R.A., Colard, J., Ducheyne, P. and Martens, M.: The simultaneous determination of titanium and vanadium in bone tissue, In: *Biomaterials and Biomechanics*, ed. Ducheyne, P., Perre, G. Van der. and Aubert, A. E. pp 237-242, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1983.
- 22) 藤本和久: インプラント材料としての Ti-Ni 2元合金に関する実験的研究, インプラント誌, 7: 25-55, 1986.
- 23) 日景 盛, 森末裕行, 小沢和子, 佐藤温重: 器官培養した鶏胚大腿骨による生体材料の生物評価法について (第2報), 歯材器, 5: 475-478, 1986.
- 24) 加我正行, 久田 洋, 小野木正章, 大川昭次, 太田 守: Ni-Ti 系合金の研究 (第4報) ラット皮下組織に及ぼす影響, 歯材器, 5: 115-121, 1986.
- 25) Kawahara, H.: Cellular responses to implant materials: Biological, physical and chemical factors, *Int. Dent. J.* 33: 350-375, 1983.
- 26) Agins, H.J., Alcock, N.W., Bansal, M., Salvati, E.A., Wilson, P.D., Jr., Pellicci, P.M. and Bullough, P.G.: Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis, *J. Bone Joint Surg.* 70

A: 347 - 356, 1988.

- 27) 川原春幸, 越智茂三, 種谷克巳, 加藤邦雄, 磯貝満彦, 水野善雄, 山本広之, 山上哲賢: 歯科材料の生物学的考察. I. 株細胞に対する純金属の影響 (in vitro), 歯理工誌, 4: 65 - 85, 1963.
- 28) Ferguson, A.B., Jr., Akahoshi, Y., Laing, P. G. and Hodge, E.S.: Characteristics of trace ions released from embedded metal implants in the rabbit. *J. Bone Joint Surg.* 44 A: 323 - 336, 1962.
- 29) Coleman, D.L., King, R.N. and Andrade, J.D.: The foreign body reaction. A chronic inflammatory response. *J. Biomed. Mater. Res.* 8: 199 - 211, 1974.
- 30) 佐藤温重: 異物炎症反応の細胞生理, 病態生理, 3: 359 - 365, 1984.
- 31) Steinemann, S.G.: Corrosion of surgical implants - *in vivo* and *in vitro* tests, In: Evaluation of biomaterials, ed. Winter, G.D., John Wiley and Sons Ltd., New York, pp 1 - 34, 1980.
- 32) 保志信男: 諸種金属の生体内腐蝕の病理組織学的並びに組織化学的研究. I 純金属並びにその合金の生体組織に及ぼす病理学的研究, 阪大歯誌, 4: 283 - 339, 1959.
- 33) 今井庸二: 医用材料の安全性. 日本化学会編: 化学総説, No.21 医用材料の化学. 初版, 学会出版センター, 東京, 70 - 77 ページ, 1978.
- 34) Strunz, V., Gross, U.M. und Männer, K.: Ergebnisse histologischer Untersuchungen an den Grenzflächen zwischen Knochen-gewebe und Gläseramik (Ceravital) mit Apatitstruktur, In: Der heutige Stand der Implantologie, ed. Franke, J., Carl Hanser Verlag. ss 49 - 75, München Wien, 1980.