

# バイオセラミックス分野における標準化の取り組み

## ～ ISO 提案を中心に

Efforts on Standardization in Bioceramics Field-Focusing on ISO Proposals from Japan

**Key-words** : Porous bioactive ceramics, Mechanical property, Pore structure, Solubility, Cell migration property

菊池 正紀

Masanori KIKUCHI (National Institute for Materials Science)

### 1. はじめに

一般工業製品に関しては、性能評価の基準（測定法や基準性能値）や部品の互換性に関する基準は、輸出入を含めた販売・流通の促進や製品開発の目標値の設定などとして有効活用が可能となる。

一方、薬品を除く医療用製品に関しては本質的に多品種少量生産であること、性能評価が最終的にはヒトや動物に対する反応を見ることであることなどが多く、各国内においてさえ標準的な評価手法が確立されていない部分も多く見受けられる。また、バイオセラミックスにおいては各メーカーの製品はようやく第2世代の製品に置き換わってきたところであるため、いずれのメーカーも標準試料を作製し、比較対象とされてしまうデメリットの方が大きい。その一方、研究型の独立行政法人などが自前で標準試料を作製する事も、人手と資金の面で今のところ対応は不可能と言ってよい。このような状況から、製品の実用化にあたって必要とされる生体活性セラミックスの評価手法として、気孔構造評価法・強度試験などは一般工業製品に対する評価法がそのまま使用されている。しかし、本来は生体内という実際の使用環境下のことを正しく考慮した上でバイオセラミックスを評価しなければ、最終的な生物学的機能評価を含めた総合的な性能評価に瑕疵を生じる可能性がある。例えば、既に市販されている水酸アパタイトとコラーゲンの複合体からなる多孔質骨補填材は、ほとんどの場合乾いた状態では強度の余り高くないセラミックスにしか見えないが、湿潤状態という実際に使用する条件下ではスポンジ状の粘弾性を示すものや、ふにゃふにゃの状態になるもの、逆にあま

り柔らかくならないものなどさまざまなものがある。多孔質セラミックスであっても、構造、化学組成や焼結の度合いによって、実使用条件下では乾燥状態とは全く異なる挙動を示すものは多いと考えられている。しかしながら、必要最低限の生体模倣環境を試験法ごとに検討し、標準的な手法を提案した例は、国内はもちろん国際的にもほほない。また、骨補填材としても、再生医療用足場材料としても重要な特性である細胞侵入性については、手法そのものがどこにも提案されていない。

本稿では、これらの状況を考慮しつつここ5～6年で進められた、日本における生体活性セラミックスおよびバイオセラミックスの国際標準化活動について解説する。

### 2. 多孔質生体活性セラミックスの測定法

通常、骨補填材として用いられている生体活性セラミックスは多孔質であり、これらの特性評価項目として気孔の構造・気孔径・気孔率・使用時の強度・溶解特性などがあげられる。これらのうち、気孔率測定や気孔径測定は既にさまざまな手法が規格として成立している。しかし、細胞や組織の侵入性に影響を及ぼすと考えられる気孔構造の評価手法、術者が骨補填材を患者の体内に埋入する時や、その後骨が材料内に侵入するまでの数ヶ月間にわたる使用時の材料強度等の測定法は定まっていなかった。さらに、生体溶解性と言われる材料に関して生体内における破骨細胞による吸収を考慮した溶解特性はいくつかの研究が提示されているだけだった。そこで、溶解特性以外は「経済産業省基準認証研究開発事業“生体活性セラミックスの特性評価に関する標準化（プロジェクトリーダー：堤定美日本大学特任教授）”」内で、溶解特性については「科学技術振興調整費重要課題解決型研究事業および産業技術総合研究所標準基板研究（プロジェクトリーダー：伊藤敦夫産業技術研究所室長）」の助成を受けて上述の特性に加え、気孔径の測定を含めた試験法の検討した。なお、ISO化、JIS化についてはすべてが上記“生体活性セラミックスの特性評価に関する標準化”の支援を受けて進められた。

気孔径について、体液の循環に関わるであろう10 $\mu$ m以下の微小気孔は、走査型電子顕微鏡（SEM）で撮影した気孔断面をISO 13383-1に従って計測する手法を検討した。一方、10 $\mu$ m以上の気孔は、上記手法に従った気孔径測定法に加え、X線マイクロコンピュータトモグラフィ（ $\mu$ CT）を用いた観察が適用可能かどうかを確認した。その結果、 $\mu$ CTでは空間

解像度：6 $\mu$ m/pixel, 試料サイズ：直径 5mm×高さ 10mm, FOV：直径 3mm×高さ 1.5mm の条件で測定することで、再現性よく気孔径分布の相対評価ができることが明らかとなった。また、細胞や組織の侵入に必須の連通孔径の測定については、ISO 15901-1 の水銀ポロシメータで計測する手法を主とし、追加で $\mu$ CT の 2 次元および 3 次元像を利用することとした。これにより、細胞や組織の侵入に影響のある、一般的な水銀ポロシメータのレンジ外になるような 100 $\mu$ m 以上の連通孔径の測定で有用な情報が得られることが明らかとなった<sup>2)</sup>。

溶解速度については、生体内での溶解速度と生体外における生体模倣条件下、すなわち破骨細胞直下の pH に近い pH5.5 の酢酸緩衝溶液を中での溶解速度試験を比較し検討した。材料の初期溶解速度を連続測定して比較することで、リン酸カルシウム系材料の生体内溶解速度と相関した溶解速度を測定できることを明らかにした<sup>3)</sup>。

生体模倣環境下の機械的強度試験については、浸漬液・浸漬時間・浸漬手法・浸漬温度・測定環境が測定結果に影響を与える因子として考えられる。そこで、実験室レベルで整えることが可能な生体に近い環境と一般の実験環境に近い環境の両者をラウンドロビンテスト参加機関で分担して測定することで、測定条件を洗い出した。浸漬液についてはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) および純水を、浸漬時間については 1 時間および 24 時間を、浸漬手法については試料を脱気後浸漬液添加するものおよび試料を浸漬後脱気するものを、浸漬温度については室温 (25℃) および体温 (37℃) を、測定環境については浸漬液中および空气中 (浸漬液から取り出し、軽く表面の液滴を拭き取る) をそれぞれ比較した。これらの結果、浸漬液を PBS にした方が、純水にした場合に比べ強度の低下が大きい例があり、体液に近い条件を選択するのが妥当であると考えられた。また、浸漬時間も同様に 24 時間後測定とした方が、1 時間浸漬よりも試料の強度低下を確実にとらえることができたため、24 時間浸漬を浸漬時間として選ぶことが妥当であると考えられた。一方、浸漬温度の違いや、測定環境の違いは測定値に有意差が認められなかったもので、より単純で特殊な装置が必要ない、25℃ (室温) 浸漬、空气中測定が妥当であると考えられた。また、さまざまな気孔をもつ材料の気孔内に確実に浸漬液を満たすには、試料の脱気を行った後に浸漬液を添加する手法がより有効であると考えられた。これらをまとめると、試料の前処理条件として最も合理的な手法は、「試料を真空デシケータ中で脱

気後、試料に PBS を加え、25℃で 24 時間静置し、測定直前に試料を PBS から取り出して表面の液滴をキムワイプで拭う」となった<sup>4)</sup>。なお、圧縮試験時のクロスヘッド速度はセラミックス材料で一般的な 500 $\mu$ m/s とした。これに加えて、当時多孔体の強度試験として JIS 提案されていた 3/8 インチのベアリングボールを圧子とした球圧子押込試験を行ったところ、圧縮試験よりも測定値のばらつきが小さく、押込強さと圧縮強さとの間に相関が認められた。そこで、生体活性セラミックス多孔体についても強度試験は球圧子押込試験を推奨する事とした。一方で、これまでのデータの蓄積との比較が容易なことから圧縮試験も試験法として残した。力学試験用の試料サイズは本来できるだけ大きい方が望ましいが、生体用セラミックス部材の場合一般に余り大きなものは使用されないこともあり、企業にとって準備のしやすい直径 10mm 高さ 10mm の円筒とした。ただし、球圧子押込試験においては、製品形状に近く準備しやすい一辺 10mm の立方体であっても、前述の円筒を資料とした場合と遜色ないデータが得られることから、立方体も試料として許容することとした<sup>5)</sup>。

これらのラウンドロビンテストを行っている期間に、フランスを初めとする海外の標準化関連研究機関を訪問して日本が多孔質生体活性セラミックスに関する試験法を ISO に提案する件について意見調整を行い、協力を依頼したところ、同時期に ISO 提案を図っていたフランスから、多孔質生体活性セラミックスに関する試験法を提案されてしまった。幸いなことに、提案がほぼ他の ISO を引用するのみという、日本案に比べて稚拙な内容であったため、各種測定手法を日本から提案予定であった案に変更することを提案した。フランスがこの提案を全面的に受け入れたため、気孔構造測定、強度試験についてはすべて、溶解性試験については初期溶解速度の測定について完全に日本提案となり、2012 年に ISO 13175-3:2012 Implants for surgery—Calcium phosphates—Part 3: Hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate bone substitutes として発行された。また、これらの JIS も昨年 10 月に発行された (JIST0330-1 から 3、生体活性バイオセラミックス—第 1 部：多孔質バイオセラミックスの気孔構造の分析方法、第 2 部：多孔質バイオセラミックスの強度試験方法、第 3 部：溶解速度試験方法)。なお、溶解性試験の JIS 案では当初の予定通り生体内溶解速度を生体外試験で評価する手法となっている。

### 3. リン酸カルシウム骨ペースト<sup>6)</sup>

リン酸カルシウム骨ペーストの特性評価手法は確立されていなかった。そのため、文献ごとに測定手法がばらばらであり、データの比較が困難であった。そこで、上記“生体活性セラミックスの特性評価に関する標準化”ではリン酸カルシウム骨ペーストに関する標準測定法も検討された。骨ペーストの場合、物性が練和条件に依存する事が多いので、まず推奨練和条件を製造者の推奨する方法ではなく、すべての骨ペーストに応用可能な方法を標準手法として挙げることにした。これは、試験に充分な量のペーストを必要な時間までに十分に準備できるようにするという目的である。(なお、ISO化に際して、この点は製造者推奨混練法を主とする可能性も残っている) この手法で練和した骨ペーストに対して硬化時間、pH 変化、崩壊率、力学的強度の測定条件を検討した。

検討された条件(詳細は下記 JIS を参照)で、市販の2種類の骨ペーストに対してラウンドロビテストを行った結果、各試験機関での測定値は標準試験法として充分な程度揃っていると判断できた。先に述べた練和条件の統一と、各試験における硬化条件の統一による影響が大きかったと考えられる。なお、血液中のイオンや生体分子の影響を考慮して、予め型枠に純水あるいは牛血を注いでおき、そこに練和した骨ペーストを注入して硬化試験を試みたが、牛血を使用した事による影響はなかった。このため、入手、管理などが面倒になる牛血などを試験に用いる必要はないと判断した。

本試験方法は、2012年度のISO/TC150/SC1にてNP提案され、新規業務項目(ISO/AWI 18531 Implants for surgery—Calcium phosphate bioceramics—Characterization of hardening bone paste materials)として承認された。現在、各国のコメントへの対応を進めている。承認されれば3年以内にISとして発行される。一方、JISとしては昨年10月にJIST0330-4 生体活性バイオセラミックス—第4部：リン酸カルシウム骨ペーストの物理化学的特性の測定方法として発行された。

### 4. 多孔質バイオセラミックスへの細胞侵入性評価法<sup>7), 8)</sup>

生体活性な多孔質バイオセラミックスは、主として骨充填材として使用されており、移植用の自家骨が不足する場合などは増量材としての使用も多い。また、近年では骨を中心とする再生医工学(組織工学)用細

胞足場材料として数多く検討されている。これらの用途においては、多孔質バイオセラミックスへの細胞や組織の侵入性は重要な特性の一つであるが、残念なことに現時点では生体外における統一的な細胞侵入性評価法は存在しない。一般には、細胞懸濁液を材料表面に滴下し、数時間から数日後に多孔体内の細胞数を測定したり、組織染色によって、細胞の侵入を確認する方法や、細胞懸濁液中に多孔体を添加後脱気し、さらに数時間から数日振とう攪拌した後、上面滴下法と同じように測定したりする方法がとられている。しかし、上面滴下法で測定しているのは、重力による細胞懸濁液の多孔質内への浸透と、多孔質構造と材料の化学組成による物理化学的な懸濁液の滞留による、多孔体内部への細胞の付着であり、細胞の活動による多孔体への侵入を測定しているわけではない。これは、懸濁液との攪拌による手法でも同様で、重力エネルギーの代わりに振とうによるエネルギーが使われているだけである。これでわかるのは、気孔構造による液体の浸透性の良否と、材料に対する細胞の接着特性であり、細胞担持能力を検討するためには一定の意義があるものの、生体内における細胞や組織の侵入を模倣していない。そこで、平成22年度から24年度まで経済産業省の国際標準共同研究開発事業“バイオセラミックスの再生医療用特性評価法に関する標準化事業(プロジェクトリーダー：堤 定美日本大学特任教授)”において、細胞侵入性を測定できる標準的な試験法として筆者が考案した新しい細胞侵入性評価法<sup>7)</sup>について検討を進めた。その手法は、6-wellの細胞培養プレートに骨芽細胞様の株化細胞(標準化案では入手のしやすさや培養のしやすさなどからヒト由来のMG63とマウス由来のMC3T3-E1に限っているが、理論上は他の細胞でも利用可能であると思われる)をコンフルエントになるまで培養して(3日程度)培地交換をした後、脱気して培地を満たした試料を細胞の上に静置し、3日間培養する。その後、試料を取り出し、2%グルタルアルデヒド溶液で細胞を固定後、ギムザ染色を行う。染色された底面を観察しながら、細胞が付着している領域をできるだけ長く横断できるよう眼科用メスにて半割し、その破断面の気孔内で、細胞が試料下面からどのくらい侵入したかを直線距離で測るだけである。図1に気孔構造の異なる水酸アパタイト多孔質セラミックス試料を用いた細胞侵入試験の結果を示す。この手法は至って簡単であり、一般的な細胞培養が行える機関・人員であれば十分に細胞侵入性が測定できるため、従来の日本提案に比べてハードルが低い。一方、妥当性と再現性について確認を要したので、



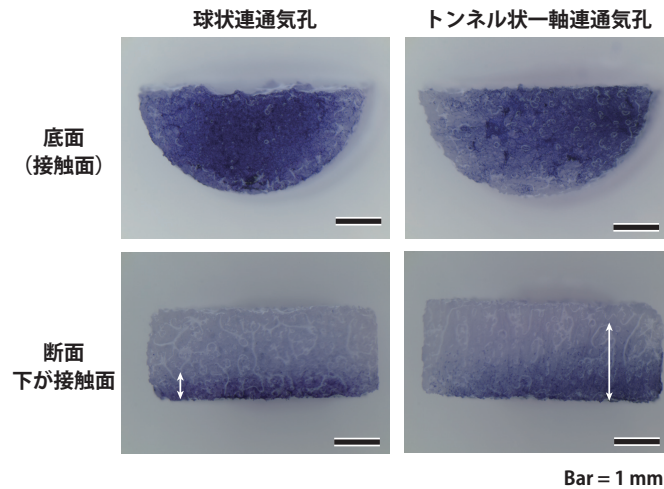


図1 気孔率がほぼ等しく気孔構造の異なる2種の多孔質水酸アパタイトセラミックスへの細胞の侵入の様子。細胞はギムザ染色によって青く染まっている。上が細胞との接触面で、青く染色されていることから細胞が培養皿からセラミックスに移動していることがわかる。気孔構造によって侵入距離（矢印：印刷ではわかりにくいですが、矢印の先まで細胞が侵入している）が違ってくる。

複数機関による市販および研究中のバイオセラミックス多孔体6種を用いて検討を重ねた。

試料のサイズは、直径10mm、厚さ2mmとした。直径については、他の試験（強度試験など）に使用を推奨しており、製品のサイズに近い直径の方がより準備しやすくなることなどから10mmを選択した。厚さについては、余り厚くなると（一般に5mm以上）多孔体内部でのガス交換、栄養の供給、老廃物の排出に関わる培地の移動が十分でなくなり、細胞の侵入性や生存性に関わってくることがわかっているため、2mmとした。

培養期間については、3日間に加えて7日間について検討した。しかし、期間が長くなると細胞の侵入距離もそれに応じて長くなるだけであり、試料によっては下から上まで細胞が到達してしまい、正確な細胞侵入距離を測定できなくなる可能性が見いだされた。

一方で、細胞と試料の接触が不安定であるため、それを改善する手法を検討した。細胞と試料の接触不安定性の原因としては主に下記の二つがあげられる。

一つは培養容器の移動や培地交換に伴う培地および試料にかかる慣性力である。現在使用されている多孔質バイオセラミックスは、ほとんどが75%程度以上の気孔率を持ち、クリーンベンチから細胞培養用インキュベータへの移動時や培地の交換時に起きる培地の動きや材料に直接かかる慣性力で簡単に試料が移動してしまう。この試料の移動が細胞と試料の接触を不安定にする要因となる。これは、最初に試料を細胞上に

静置した後の移動や培地交換をなくすことで解決できる。幸い、試験期間（培養期間）は3日で充分であることから、培地交換なしでの細胞培養が可能である。培地交換をしないということは、培地交換時の培地の流れがなくなるだけでなく、最初にインキュベータに移動した後に、試料を採取するまでプレートの移動に伴う試料の動きもなくなることになるので、非常に都合がよいことになる。

もう一つは、試料の面出しである。多孔体であるため、正確な面出しはそもそも不可能と言えるため、気孔壁からなる試料端面のほぼすべてが細胞と接触していることが、細胞を気孔内に侵入させるための必要条件となる。幸い、細胞（および細胞から成る層）はある程度の柔軟性があるため、数 $\mu\text{m}$ 程度の距離であれば、試料の重量によって沈み込む分で補償できると考えられる。そこで、それ以上の距離の開きがあっても、物理的にその距離を縮めることができればよいと考え、①試料上にSUS316製の二重リングを重しとしておく方法と②細胞側の柔軟性を高めるため、細胞播種前にコラーゲンをコートし、その上で細胞を増殖させることでより柔軟性の高い、試料形状に追随しやすい状況を作るという二つの方法を試みた。その結果、いずれの手法でも、細胞と試料の接触性が向上し、試験初期から細胞が試料側に移動しやすくなったためか、細胞の侵入深さが深くなった。そこで、安価で入手しやすい重しを標準手順として採用し、コラーゲンコートはオプションの形で試験手順に加えた。

さらに、ここで得られた侵入深さと、 $\mu$ CTのその場観察によるラット頭蓋骨への4週目の試料埋入部における骨形成量（組織侵入量と相関性があると考えられる）との間にある程度の相関性が認められ、本細胞侵入性測定手法は生体内における細胞あるいは組織の侵入性を評価する事ができることが示唆された。一方、研究機関間での細胞侵入距離は使用細胞種、使用血清のロット、あるいは手技の習熟度などのために必ずと言ってよいほどばらついてしまうが、これは、市販品の一つを用いて規格化する事でばらつきをほぼ解決することができた。

これらの結果を国際会議で発表し、さらにイギリス標準局、スウェーデン標準局、ドイツ標準局、米国FDA等における意見調整を行ったところ、2012年前半には国内4機関（（独）物質・材料研究機構、（独）産業技術総合研究所、日本大学、東京大学）、英国1機関（University of Cambridge）、スウェーデン1機関（University of Gothenburg）で国際ラウンドロビンテストを実施して、この手法の有効性を確認することができた。さらに、日本国内で明治大学、九州大学、松本歯科大学においても追加で限定的なラウンドロビンテストを行い、その有効性を確認した。本手法は、2013年7月31日を締切として新規業務項目提案としてISO/TC150/SC7/WG3にて投票にかけられた。残念ながらこの投票ではエキスパート1名の不足で新規業務項目として採択されなかったが、現在米国（反対であるがエキスパートは出す予定。内容の修正次第では賛成するとのコメント）と摺り合わせ中である。また、英国やドイツなど各国の標準局、研究者の関心も高いため、いずれは標準的な手法として登録されることになるであろう。

## 5. おわりに

今回紹介した以外にもイットリア部分安定化ジルコニア人工骨頭の衝撃試験などバイオセラミックスに関する標準化の日本提案は積極的に進められている。また、TC150では、組織工学製品のsubcommitteeであるSC7の国際幹事を国立衛生研の中岡竜介室長が、SC1（材料）/WG3（セラミックス）のコンビーナを筆者が、SC7/WG3（骨格系）のコンビーナを（独）産業技術総合研究所の廣瀬志弘博士がそれぞれ務めており、米英仏と並んで積極的な標準化活動を進めている。今

後は、中国や韓国の標準化活動もさらに活発化してくるような動きがあり、日本はさらに標準化活動を強化し、国益を保護する必要があると考える。

**謝 辞** 本文中にも述べたが、本稿で紹介した事業のほとんどは経済産業省の基準認証研究開発事業ならびに国際標準共同研究開発事業による。また、本稿で紹介した成果はこれらの事業に関わった先生方全員のご尽力によることはいうまでもない。プロジェクトリーダーを務められた日本大学の堤 定美特任教授・（独）産業技術総合研究所の伊藤敦夫室長をはじめ、大学、研究機関、各企業の皆様方にはここに深甚なる感謝の意を表したい。最後に、標準化事業の事務局としてご尽力いただいた（一社）日本ファインセラミックス協会の駒木秀明氏、阿部 豊氏、田辺隆一氏に感謝したい。

## 文 献

- 1) <http://www.jisc.go.jp/std/index.html>, 2012/6/15
- 2) 名井 陽, 川崎健史, 森本健司, 服部昌晃, 浅岡伸之, 井上晃, 井村浩一, 宮路史明, 植松敬三, 橋本雅美, 川瀬知之, 菊池正紀, “第32回日本バイオマテリアル学会大会予稿集”, (2010), p.70.
- 3) 伊藤敦夫, 十河 友, 山崎淳司, 相澤 守, 尾坂明義, 早川聡, 菊池正紀, 赤羽郁子, 山下仁大, 田中優実, 大串 始, 田所美香, “第32回日本バイオマテリアル学会大会予稿集”, (2010), p.72.
- 4) M. Kikuchi, *Journal of International Society for Ceramics in Medicine*, 1, doi:10.4303/bda/D101201, (2011).
- 5) 菊池正紀, 松村 隆, 横川善之, 早川 聡, 城崎由紀, 尾坂明義, 川崎健史, “第32回日本バイオマテリアル学会大会予稿集”, (2010), p.71.
- 6) 梅田智宏, 土井 豊, 服部友一, 相澤 守, 浅岡伸之, 服部昌晃, 橋本雅美, 伊藤敦夫, “第32回日本バイオマテリアル学会大会予稿集”, (2010), p.73.
- 7) M. Kikuchi, *Key Engineering Materials*, 493-494, 836-839 (2012).
- 8) M. Kikuchi, I. Akahane, M. Hirose, Y. Kobayashi, T. Ushida, M. Yokoi, Y.-B. Kang, Y. Arai and S. Tsutsumi, “Abstract of 2012 TERMIS World Congress”, (2012), CD.

## 筆者紹介



菊池 正紀（きくち まさのり）

（独）物質・材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点ナノライフ分野生体機能材料ユニットバイオセラミックスグループ グループリーダー 博士（工学）。1995年早稲田大学大学院理工学研究科資源および材料工学専攻博士後期課程修了。同年早稲田大学理工学総合研究センター客員研究員、科学技術庁無機材料研究所（現（独）物質・材料研究機構）重点研究支援協力員、1997年研究員、2003年主任研究員（2002～2004年ハーバードメディカルスクールリサーチフェロー）を経て2007年グループリーダー、現在に至る。

〔連絡先〕 〒305-0044 茨城県つくば市並木1-1（勤務先）