

令和元年6月17日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04138

研究課題名(和文) 環境浄化および生体適合性に優れた二酸化チタンの研究

研究課題名(英文) Study on titanium dioxide with environmental purification and biocompatibility

研究代表者

正橋 直哉 (Masahashi, Naoya)

東北大学・金属材料研究所・教授

研究者番号：20312639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：応力遮蔽を抑制する低ヤング率TiNbSn合金に骨伝導性を付与するために、高電場印加下で強酸中にて陽極酸化を施した。TiNbSn合金の表面に生体活性に優れ、結晶性の高いチタン酸化物を担持することができ、骨伝導性を確認した。In vivo試験から引抜強度は、未処理材より有意な増加を確認でき、TiO₂表面に形成された新しい骨組織によりTiNbSn合金との密着が強固になったと考察できる。In vitro試験後の試料のTEM-EDX分析から、多孔質のTiO₂中にCaやPの多量の浸透を確認し、骨伝導性は生体活性の高い多孔質TiO₂担持と骨構成元素の浸透によるモデルを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工股関節インプラント用の大腿骨側ステム部は、骨と同程度の低弾性率(10-30 GPa)が求められる。これは高い弾性率の素材を使用すると材料に荷重が偏り、大腿骨近位部において廃用性骨萎縮が生ずることによるインプラント周囲の骨折やゆるみを引き起こすためである。骨に近い弾性率をもつ素材が求められ、筆者等は約40 GPaの低弾性率のTiNbSn合金を開発した。本研究ではこの低ヤング率TiNbSn合金に骨伝導性を付与するため、生体親和性に優れたTiO₂を陽極酸化で担持し、安全で安心なインプラント治療に資する材料の提供に社会的意義が、歴史の浅い生体材料の学術を深めることに学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In order to impart osteoconductivity to a low Young's modulus TiNbSn alloy which suppresses stress shielding, anodic oxidation was applied in a sulfuric acid electrolyte under high voltage application. The crystallinity of the titanium oxide formed on the surface was controlled under the electrolytic conditions, and the osteoconductivity was confirmed in the TiNbSn alloy with high crystallinity TiO₂. The pull-out strength of anodized TiNbSn alloy increased significantly as compared with the untreated material after in vivo test, and it was considered that the adhesion with the TiNbSn alloy was strengthened by the new bone tissue formed on the TiO₂. TEM-EDX analysis after in vitro test confirmed the penetration of large amounts of Ca and P into porous TiO₂, and proposed a model that osteoconductivity is attributed to the bioactive TiO₂ loading and penetration of bone constituent elements into porous TiO₂.

研究分野：金属組織学

キーワード：陽極酸化 インプラント チタン合金 骨伝導性 生体適合性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

人工股関節インプラント用の金属素材には、ステンレス、Co-Cr 合金、Ti 合金が実用に供されるが、大腿骨近位部では骨より高強度の金属ステム部において荷重の偏りが起こり（応力遮蔽）、骨が委縮して骨折や緩みなどの固定不良をおこしやすい（廃用性骨萎縮）、骨と近い弾性率のインプラント金属へのニーズが高い。申請者等は細胞毒性のない元素から構成され、低ヤング率と高強度を備えたインプラント用 TiNbSn 合金を開発した。ニアーβ相の組成の合金に溝ロール圧延とスウェーピング加工を施してα”を析出安定化し、β<110>とα”<010>の方位を揃えてからステムを製造後、遠位部の低ヤング率を変えずに近位部を局所加熱することでα相を微細析出して高強度化し、低ヤング率と高強度を兼備するステムを開発した¹⁾。2019年1月に治験を終了し、現在薬事審査の準備中である。

ステムの骨への固定にはセメントを使用する場合とセメントレスの場合があるが、手技の簡便性とステムデザインや表面改質により術後の経過が良好であるため、セメントレス手術が増えている。セメントレスの場合、骨との早期固着が不可欠だが、金属には骨形成を誘導する機能が無い。そのためステム表面上で骨形成を促すために、ステム表面へのブラスト処理等による表面粗化と、骨の主成分であるハイドロキシアパタイト（以後 HAp）担持が施されるが、最近、アルカリ処理と約 600℃の熱処理により骨類似アパタイトのチタン酸ナトリウム形成が利用され始めている²⁾。しかし、表面粗化は金属イオンの溶出や fretting 摩耗腐食をおこすために細胞への悪影響が懸念され、細胞毒性のない金属といえどもには細胞への為害性が少なからずあるため、金属露出は好ましくない。一方、HAp 担持では、担持の際の HAp の改質や、HAp が金属と密着性に劣るため十分な骨伝導性が得られない。そして、アルカリ処理での約 600℃の熱処理は、TiNbSn 中に ω 相を析出させると同時に、逆変態がおこるためヤング率を増加させる。以上のことから、骨伝導性を付与するための新規技術が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は申請者グループが開発した低ヤング率・高強度 TiNbSn 表面に陽極酸化法で TiO₂ をコーティングし、骨伝導性を付与することである。TiO₂ は Ti ならびに Ti 合金の表面に熱力学的に平衡して共存し、基板と高い密着性を有することから、基材の剥離や金属イオン溶出を抑制できる。また TiO₂ をはじめとした酸化物はインプラント材の生体活性や生体適合性を促進することが知られている。そこで、生体への安全性を鑑み、これまでの研究³⁾を参考に、酢酸水溶液を電解浴に陽極酸化を行い、TiNbSn 合金表面に TiO₂ を担持後に HAp 生成に効果的とされる温水処理を施し、組織培養液に利用されるハンクス液中での HAp 生成挙動を *in vitro* にて、さらに同じ処理を施した TiNbSn 製ロッドを日本白色家兎大腿骨の骨髓腔に埋め込み、所定の期間保持後の骨組織形成新生を *in vivo* にて調査する。上記の一連の実験から、さらなる骨伝導性の改善とその指導原理（メカニズム）を提唱し、歴史の浅いバイオマテリアル科学への寄与と、安全で安心なインプラント治療を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

陽極酸化（以後 A0 と称する）の電解浴に使用する酢酸は解離定数が 4.76 の弱酸であるため、成膜にあたっては通常使用する硫酸やリン酸よりも高電位印加が必要となる。また、成膜時の電流変化は酢酸濃度依存性が強く、電源の設定電圧を一定とすると、酢酸濃度が 1~2M 前後で電流の流れる時間が最長で、それより低濃度でも高濃度でも電流は短時間で流れなくなり、定性的には 1~2M 前後で最も電気化学反応が進むと考えられる。本実験では、直径 10 mm、厚さ 2 mm に円板状に切り出した TiNbSn 合金（弾性率は 45.6 GPa）に、SiC にて #1000 まで機械研磨を施した後に洗浄を施した試料を基板とした。電位は 200 V、電流密度は 50 mA/cm² に設定し、A0 時間を 30 分として成膜を行う。A0 制御は設定電位に到達するまでは定電流、設定電位に到達後は定電圧に切り替わるようにした。温水処理（以後 HW と称する）は、上述の A0 を施した円板試料を蒸留水 15 ml 中に浸漬し、80℃で 48 時間保持後、36.5℃のドライインキュベーター内に 24 時間放置して行った。

In vitro 試験では HW 処理を施した試料を、細胞培養実験に使用する等張緩衝塩溶液であるハンクス液に浸漬した。ハンクス液はヒト血漿のイオン組成と類似し、疑似体液として生体活性実験に利用されている。試料は 36.5℃に保持したハンクス液 25 ml 中に 7 日間浸漬後に、試料を蒸留水で洗浄し、ドライインキュベーター内で 24 時間乾燥させた。

一方、*in vivo* 試験では 8 mm 径の TiNbSn 合金の丸棒から、4.5 mm 径で 32 mm 長さのロッドを旋盤加工で切り出し、一端に 4 mm 径で 6 mm 長さの突出部（最先端は 3 mm 径で 1 mm 長さ）をあらかじめ加工し、突出部には引き抜き試験時の治具装着用の丸穴加工を施した。このロッドを 2 M 酢酸電解浴中で、化成電圧 500 V、電流密度 50 mA/cm²、処理時間 30 分の A0 処理を行った後に、前節と同様の HW 処理を施した。この試料を白色家兎大腿骨の髓管に埋め込み、温度 22 ± 2 °C、湿度 40 ± 20 % の個別ゲージ (60 × 51 × 35 cm) で 3 週間あるいは 6 週間飼育後に屠殺し、インプラント材と骨との接合性を調査した。続いて、成膜反応の促進と陽極酸化 TiO₂ の結晶性向上を狙って、電解浴に強酸である硫酸を用いて、TiNbSn 基板対し、0.01 ~ 1M の硫酸水溶液中で同様の A0 処理実験を行い、*in vitro* と *in vivo* 試験から骨伝導性の評価を行った。*in vivo* 試験後に、骨とインプラント材の界面近傍を FIB にてサンプリングし、TEM にて観察ならびに分析を行った。以上の実験を通して、骨伝導性の発現機構を提案した。

4. 研究成果

(1) 酢酸電解浴により成膜した処理材の *in vitro* 試験

1M 酢酸電解浴で成膜した AO 膜の SEM 像を図 1(a)に、FIB-TEM 法で観察した断面像を(b)に示す。(a)から表面はサブミクロンサイズのクレーター状の微細組織が観察でき、金属イオンの溶出がうかがえるが、HW 材も同様の組織を呈した。(b)から AO 膜の膜厚は約 370 nm で、細詳細に観察すると、膜は 5 層から構成されていることが判り、電子線回折からどの層もアナタース構造の TiO_2 である。図 2 は AO 材と HW 材の $0\ 1s$ XPS であるが、スペクトルは酸化物、水、水酸基の各成分スペクトルに分離でき、半定量分析から AO 材では水酸基イオン濃度が高いが、HW 処理を施すと水酸基イオン濃度は低下し、逆に水濃度が高くなる。また、 O/Ti 比は、AO 材では 1.97 と化学量論組成に近いが、HW 処理を施すと、酸化物由来のスペクトル強度の増加により 2.64 と増加する。

HW 処理の効果を考察するために、365 nm の UV 照射下での酸化膜表面の接触角を測定した。図 3 は、電解浴の酢酸濃度を、1M、2M、6M の三種類で成膜した試料についての接触角の変化を 100 msec ごとに測定した時の経時変化である。AO 材と HW 処理材を比較すると、後者の接触角が前者より小さく、HW 処理により表面は親水性となっていることが判る。AO 材の TiO_2 で超親水性を確認できなかった理由として、AO 材では、 TiO_2 の結晶性が低いためと考察する。一方、HW 処理は湿潤環境下とは言え、 80°C での低温熱処理を施しており、元々存在していた AO 処理の TiO_2 と HW 処理により生成した新たな TiO_2 の結晶性増加により、*in-situ* で親水性が増加したと考察する。また 6M 酢酸電解浴で成膜した HW 処理材の接触角が最小の理由として、表面粗度がこの試料が最大で、Wenzel 理論から接触角が低下したと考察する。

図 4 に AO 材と HW 材を所定の時間、ハンクス液に浸漬した後の、試料表面の SEM 像を示す。HW 処理を施すことで、クラックを伴う酵母状の組織が観察できるが(D)、AO 材(B)では観察されない。また、同様の実験を純チタン(cp-Ti)に対しても行ったが、TiNbSn と同様に AO 材に HW 処理を施すことで酵母状組織を観察できるが(C)、AO 材では酵母状組織は観察できない(A)。HW 処理材の基材による違いは観察できないが、クラックは析出相の脆性に起因し、別途行った、薄膜 X 線回折ならびに EPMA 分析から、この酵母状組織がハイドロキシアパタイトであることが明らかとなった。すなわち、*in vitro* 試験から酢酸電解浴で成膜した陽極酸化膜は、HW 処理を施すことで生体活性を示すが、HW 処理を施さないと生体活性を示さないと結論できる。

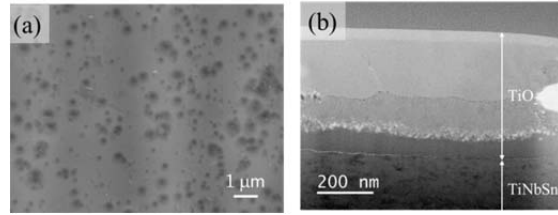


図 1 酢酸電解浴で成膜した AO 膜の SEM 像(a)と断面 TEM(b)像:表面はサブミクロンのクレータ(a)が、(b)から TiO_2 層は 5 層に分離できることが判る。

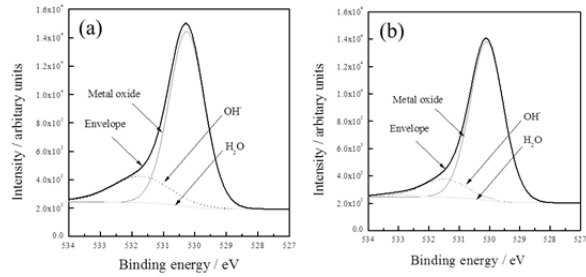


図 2 AO 材(a)と HW 材(b)の $0\ 1s$ XPS : スペクトル分離から AO 材は HW 材よりも水酸イオン帰属のスペクトル強度が高く、 H_2O 帰属のスペクトル強度は低い。

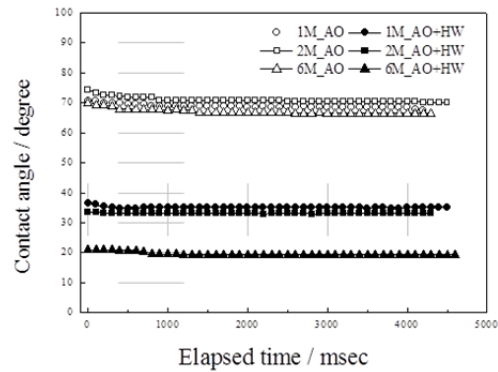


図 3 AO 材と HW 材の接触角: 電解浴の酢酸濃度に関わらず、HW 処理を施すことで接触角は低下することが判る。

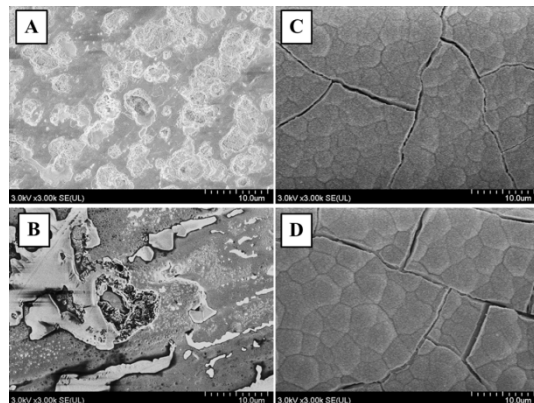


図 4 Ti (A, C)と TiNbSn (B, D)上 AO (A, B)と HW の (C, D) *in vitro* 試験後の SEM 組織: HW 処理材ではハイドロキシアパタイトの形成が観察できるが、AO 材では観察できない。

(2) 酢酸電解浴により成膜した処理材の *in vivo* 試験

TiNbSn 製ロッドに *in vitro* 試験でハイドロキシアパタイトの形成を確認できた電気化学条件で A0 膜を担持後に、HW 処理を施して *in vivo* 実験を行った。図 5 に *in vitro* 試験後の SEM 組織と、*in vivo* 試験後のインプラント材の引抜強度を示す。HW 処理を施すことで、引き抜き強度は未処理材よりも増加し、処理を施すことでインプラント材表面に形成された新しい骨組織とインプラント材との密着が強固になっていることがうかがえる。またインプラント後の経過時間が長いほど引抜強度が増加していることから、経過と共にインプラント表面での骨組織の形成が促進されていることがうかがえる。図 6 に HW 材 (A, C) と未処理材 (B, D) の近位部 (A, B) と遠位部 (C, D) の、インプラント材と骨との界面近傍の組織を示す。図の中心の黒い部分がインプラント材であるが、骨との界面近傍に注目すると、HW 材の方が未処理材よりも顕著な新生骨組織を形成していることが判る (A の赤矢印部)。すなわち、図 5 で明らかとなった HW 処理材の高い引抜強度は、インプラント材と骨との間での新生骨形成によることが考察できる。そこで、インプラント 6 週間後の HW 処理材からインプラント材と骨の界面近傍を FIB にてサンプリングし、元素マッピングを行った (図 7)。元素マッピング像からインプラント材と骨との間にある TiO₂ 層中に Ca と P が局所的に濃化していることが確認できる。左上 SEM 像中の TiO₂ 層のマーカ一部を EDX で組成分析したところ、Ti、O、そして不純物 C 以外に、原子濃度で 8.2% Ca と 3.5% P が検出された。一方、基材の TiNbSn 部からは Ca や P は検出されなかったことから、図 5 で得られた高い引抜強度は、生体活性の高い TiO₂ 表面での HAp 形成促進と、骨の構成元素である Ca や P が TiO₂ 中に浸透したことに起因すると考察する。

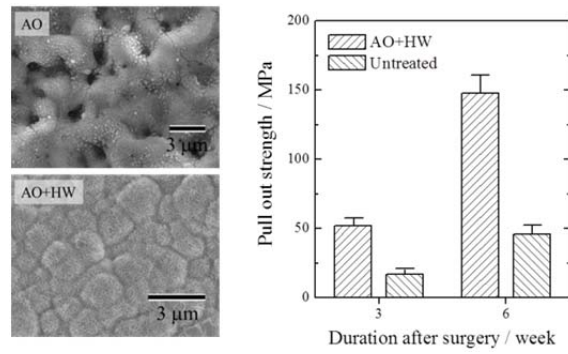


図 5 A0 材および HW 材の *in vitro* 後の SEM 組織と、*in vivo* 試験後のインプラント材の引抜強度

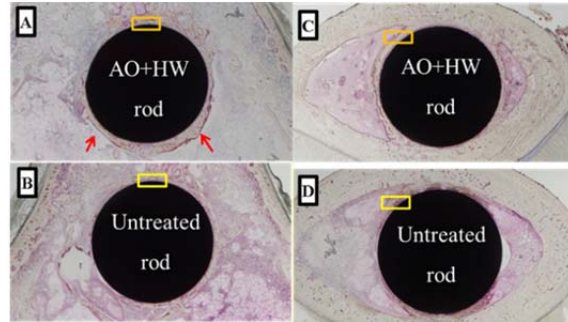


図 6 *In vivo* 試験後の HW 材 (A, C) と未処理材 (B, D) の近位部 (A, B) と遠位部 (C, D) の組織

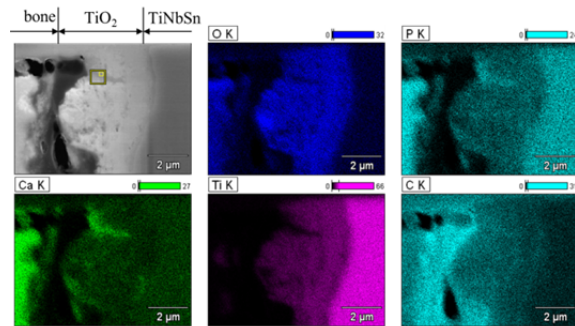


図 7 *In vivo* 試験後の HW 処理 TiNbSn インプラント材と骨の界面近傍の元素マッピング

(3) A0 材の骨伝導性改善と機能発現メカニズム

申請者等は潜在的に生体活性を有する TiO₂ の活性を更に高めるには、表面粗度を上げて多孔質化を施すことが有効で、特に多孔質化は体液の構成元素の浸透により骨伝導性の改善に繋がるといふ仮説を立てた。陽極酸化法により成膜する TiO₂ の内部ポアは電解浴中の水の分解により生成する水酸基イオンにから解離した酸素イオンに起因した酸素分子のトレースと考えられる。すなわち、多孔質 TiO₂ を創製するためには、解離定数が大きい酸を使用することが有効と考え、電解浴には弱酸である酢酸 (解離定数は 4.76) の代わりに、強酸である硫酸 (解離定数は 1.99) を用いることを試みた。硫酸は解離して硫酸イオンに起因した硫黄が TiO₂ 中にて混入するため、生体安全性が危惧されるため、MC3TC と L929 細胞による細胞毒性試験を行った。その結果、A0 膜に存在する程度の微量の硫黄は、細胞毒性を示さないことが明らかとなり安全性を確認した。図 8 は、1M 硫酸水溶液で成膜した A0 膜の断面 TEM 組織であるが、(a) で観察できるように矢印で示したポアを多量に含有し、膜厚は 7.8 μm と、酢酸電解浴で成膜した場合 (370 nm) より厚く成膜できることが判る。この A0 膜と HW 処理材の *in vitro* 試験を行ったところ、図 9 の様に電解浴の

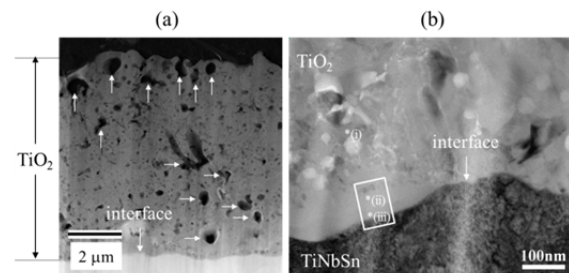
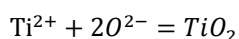


図 8 硫酸電解浴で成膜した A0 膜の断面 TEM 組織：矢印で示した箇所にポアが多数観察でき (a)、基板と TiO₂ 界面近傍は非晶質を示す (b)

硫酸濃度に関わらず、また HW 処理の有無に関わらず、多量の HAp 析出を確認できた。HW 処理無しで HAp を析出させることができることは、TiNbSn の near β 相の相安定性や低ヤング率を維持できることになり、力学的性質を安定に保つ点で好都合である。そこで、1M 硫酸電解浴で成膜した A0 材に対して *in vivo* 試験を行った。インプラント後 3 週間、あるいは 6 週間後のインプラント材の引抜試験を行ったところ、図 10 のように、酢酸電解浴で成膜した HW 材より、硫酸電解浴で作製した A0 材の方が、3 週間では 4 倍近く、6 週間では 2 倍近く高い引抜強度を示すことが明らかとなった。この結果は、骨とインプラント材との界面での強固な結合を意味し、図 6 の様に、TiO₂ 表面での新生骨の形成を示唆する。この *in vivo* 試験後のインプラント材と骨との界面近傍のサンプリングを FIB で行い、図 7 と同様の EDX による元素マッピングを行った (図 11)。その結果、やはり TiO₂ 中のポア (矢印) に Ca や P が濃化していることが確認できた。

以上から、骨伝導性の改善には生体活性に優れ多孔質状の TiO₂ 担持が効果的で、骨伝導性の発現は体液の構成元素である Ca や P の膜中ポアへの浸透と TiO₂ 表面での HAp 形成促進に起因すると考える。図 12 は以上の実験結果をもとに提案する、骨伝導性発現モデルである。電解浴中の硫酸の水素イオンはカソードへ、硫酸イオンはアノードに移動するが、同時に水の電解で生成した水素イオンもカソードへ水酸イオンはアノードに移動する。アノードに移動した酸素を含むイオンの酸素は Ti²⁺ と以下の反応を起こし、TiO₂ を形成する。



Ti²⁺イオンと反応しない O²⁻イオンは電子を解離して (酸化)、膜中で O₂ となりポアを形成する⁴⁾。体液中の Ca²⁺ や P⁵⁺ (H₂PO₄⁻として) は、酸素発生に起因して生成したポアに溶液との濃度差を駆動力に浸透すると共に、体液側の主要アニオンである H₂PO₄⁻ は電気的中性を満たすためにポア内部で濃化する。また Ca²⁺ や P⁵⁺ は TiO₂ に移動する過程で、表面でポアを形成した O₂ あるいは水電解で生成した O²⁻イオンと反応して、HAp を形成する。このモデルに立脚すると、骨伝導性の付与には TiO₂ 中の酸素空孔形成が有効で、酸素原子を皮膜内部に O²⁻ や OH⁻ として侵入させるために、陽極酸化時の高電場印加が効果的と考える。

本研究により陽極酸化法で TiO₂ を担持することで、TiNbSn 合金に骨伝導性を付与することができ、現在薬事申請を準備中の TiNbSn 合金のさらなる高機能化に繋がると考える。

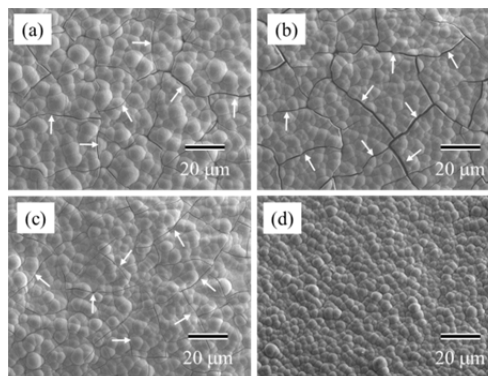


図 9 0.01M(a)、0.1M(b)、1M(c、d) 硫酸浴で成膜した HW 材 (a-c) と A0 材 (d) の SEM 組織

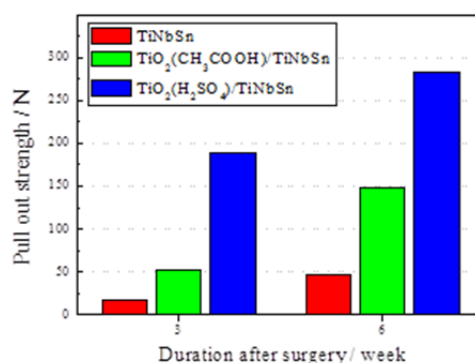


図 10 表面層の無い TiNbSn、1M 酢酸浴で成膜した HW 材、1M 硫酸浴で成膜した A0 材の引抜強度

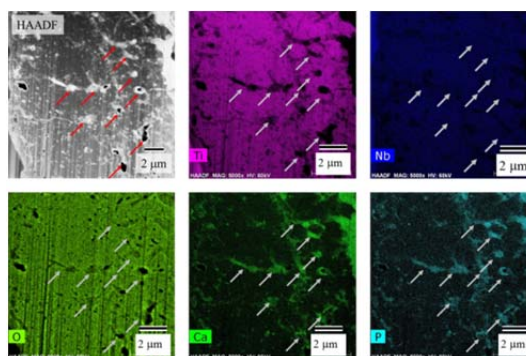


図 11 *In vivo* 試験後のインプラント材と骨の界面近傍の元素マッピング

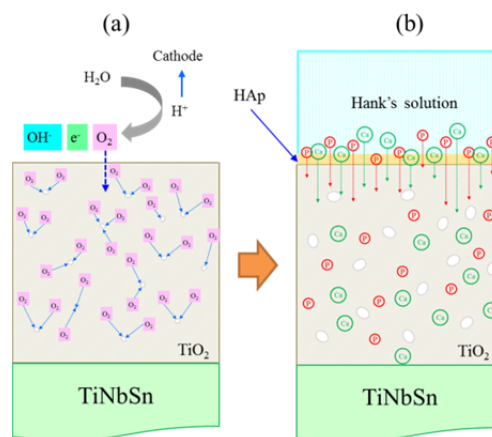


図 12 骨伝導性発現モデル: TiO₂ 中のポア形成 (a)、Ca と P のポアへの濃化と TiO₂ 表面での HAp 形成 (b)

<引用文献>

- ① T-K. Jung, et al., A new concept of hip joint stem and its fabrication using metastable TiNbSn alloy, J. Alloys Compd., 536 (2012) S582-S585
- ② T. Kokubo, et al., Novel bioactive materials with different mechanical properties, Biomater., 24 (2003) 2161-2175
- ③ X. Cui, et al., Effect of hot water and heat treatment on the apatite-forming ability of titania films formed on titanium metal via anodic oxidation in acetic acid solutions, J. Mater. Sci. Mater. Med., 19 (2008) 1767-1773
- ④ H. Habazaki, et al., Crystallization of anodic titania on titanium and its alloys, Corros. Sci., 45 (2003) 2063-2073

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① N. Masahashi, Y. Mori, H. Tanaka, A. Kogure, H. Inoue, K. Ohmura, Y. Kodama, M. Nishijima, E. Itoi, S. Hanada, Bioactive TiNbSn alloy prepared by anodization in sulfuric acid electrolytes, Mat. Sci. Eng. C 査読有、98(2019)753-763.
DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.033
- ② N. Masahashi, Y. Mori, H. Tanaka, A. Kogure, H. Inoue, K. Ohmura, Y. Kodama, M. Nishijima, E. Itoi, S. Hanada, Study of bioactivity on a TiNbSn alloy surface, Thin Solid Films, 査読有、639(2017)22-28
DOI: 10.1016/j.tsf.2017.08.023
- ③ H. Tanaka, Y. Mori, A. Noro, A. Kogure, M. Kamimura, N. Yamada, H. Hanada, N. Masahashi, E. Itoi, Apatite Formation and Biocompatibility of a Low Young's Modulus Ti-Nb-Sn Alloy Treated with Anodic Oxidation and Hot Water, PLoS One, 査読有、11(2016) e0150081
DOI: 10.1371/journal.pone.0150081
- ④ N. Masahashi, Y. Mizukoshi, H. Inoue, K. Ohmura, T. Moroishi, Photo-induced properties of anodic oxide on Ti-Pd alloy prepared in acetic acid electrolyte, J. Alloys Compd., 査読有、669(2016)91-100
DOI: 10.1016/j.jallcom.2016.01.220

[学会発表] (計 8 件)

- ① 正橋直哉「東北大学金属材料研究所における産学官連携活動の紹介：生体材料の研究」第 82 回 知の拠点セミナー (招待講演)、2019 年 1 月 18 日、東京大学
- ② 井上博之、正橋直哉、花田修治「濃厚硫酸中の純 Ti 電極の高電位域での分極挙動と陽極酸化皮膜の表面形能」2018 年電気化学会春季大会、2018 年 3 月 9 日、東京理科大学
- ③ 正橋直哉、森優、井樋栄二、田中秀達、小暮敦史、井上博之、花田修治「TiNbSn インプラント材の骨伝導性」バイオマテリアル学会東北地区講演大会(招待講演)、2017 年 9 月 25 日、東北大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等

<http://polar.tohoku.ac.jp/pg176.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

森 優 (MORI YU)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70634541

(2) 研究協力者

水越 克彰 (MIZUKOSHI YOSHITERU)

東北大学・金属材料研究所・特任准教授

研究者番号：60342523

千星 聡 (SEMBOSHI SATOSHI)

東北大学・金属材料研究所・准教授

研究者番号：00364026