

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26249111

研究課題名(和文) 表面形態・構造のナノスケール制御に基づく医療用金属材料の長期信頼性設計

研究課題名(英文) Long-term reliability design of metallic biomaterials based on the nano-scale control of morphology and structure of their surfaces

研究代表者

藤本 慎司 (Fujimoto, Shinji)

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：70199371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,800,000円

研究成果の概要(和文)：医療用金属材料の長期信頼性評価を細胞培養を伴う模擬生体環境下で実施した。培地の腐敗を防ぎ長期の試験を実施するため、新たな実験システムを構築した。その結果2週間程度まで培地が腐敗することなく、繰り返し変形試験を実施できた。金属表面にタンパク質や細胞が接着すると、変形時の金属溶解は抑制されるが、再不働態化が阻害されることが分かった。またタンパク質や細胞は溶解・再不働態化だけでなく、き裂発生・進展にも影響を及ぼすことが明らかとなった。表面改質を行うと変形による劣化を抑制できる可能性を見出した。さらに電流制御分極試験により表面皮膜の組成・構造が皮膜損傷時に起こるカソード過程に影響することも分かった。

研究成果の概要(英文)：The present work achieved the evaluation of long-term reliability of metallic biomaterials in simulated body fluids. In order to perform long-term experiments without any degradations of medium, a new experimental setup was developed. As a result, cyclic deformation tests could be carried out up to 2 weeks without the degradation. The results obtained in the tests revealed that the presence of proteins and cells on metallic biomaterials suppressed the metal dissolution during deformation on one hand, but the repassivation was hampered by proteins and cells on the other hand. Furthermore, proteins and cells affected not only the metal dissolution and repassivation during deformation but also resulting crack initiation and propagation. Surface modification could suppress the degradation caused by deformation. It was also found that in a current-controlled polarization experiment, the composition and structure of passive films strongly affected cathodic reaction.

研究分野：環境材料学

キーワード：電気化学プロセス 生体材料 再不働態化 生体親和性 表面改質 ナノ構造

## 1. 研究開始当初の背景

医療用金属材料は、強度、耐食性、耐摩耗性、生体適合性などが要求される。これらの因子のうち、強度や耐摩耗性などの力学機能は金属材料の組成や組織に依存する。一方で、耐食性や生体適合性を合金組成や組織によって向上させるには限界があるため、表面処理が注目されている。

研究代表者らは電気化学プロセスである陽極酸化において、用いる電解液の組成を最適化することにより、チタン・チタン合金やステンレス鋼など医療用金属材料を含む、様々な金属表面に自己規則化したポーラス構造を生成することができることを報告してきた。ポーラス化した表面の生体適合性として、アパタイト生成能や細胞増殖・分化が調査されるとともに、その表面細孔を薬剤担持のプラットフォームとする薬剤徐放(DDS)などが検討されてきた。一方で、実際の体内環境では、医療用金属材料は変形し、金属材料表面にある酸化皮膜が破壊して金属溶解を引き起こす可能性があるが、これまで変形の影響はほとんど検討されていなかった。そこで研究代表者らは、細胞培養した模擬生体環境下で金属材料が急速に変形した際に生じる金属溶解を電流変化として計測できるシステムを独自に構築し、金属変形に伴う溶解・再不働態を検討してきた。

医療用金属材料は体内環境では、歩行などの運動の周期に対応する繰り返し荷重が長期に渡って負荷されうるため、その際の溶解・再不働態化ならびにそれらに付随して起こりうる材料劣化の調査が必要とされうる。しかしながら、細胞培養を伴う模擬生体環境下において長期の繰り返し変形が金属材料に及ぼす影響を長期間に渡って評価する研究はこれまでに例がなかった。

## 2. 研究の目的

医療用金属材料の長期信頼性評価をこれまでに例のない細胞培養を伴う模擬生体環境で行うために、これまでに研究代表者らが独自に構築した実験システムを改良し、Type 316L ステンレス鋼および Ti-6Al-4V 合金を用いて長期信頼性を模擬生体環境下での腐食疲労挙動から調査するとともに、金属材料の再不働態化に及ぼす表面形態および表面皮膜の役割を検討することを目的とした。また、体内環境での医療用金属材料の表面皮膜の破壊は、変形だけでなく材料の摺動によっても生じるため、本研究では摩擦摩耗中における溶解・再不働態化挙動を電気化学測定により検討した。

## 3. 研究の方法

### 3. 1 試料準備

Type316L ステンレス鋼およびTi-6Al-4V 合金の薄板より放電加工機を用いて引張試験片を切り出したのち、表面研磨を行い、アセトン、メタノール、蒸留水中で超音波洗浄し

た。その後、模擬体液との接触を避けるためゲージ部以外をテフロンテープで被覆し、121°Cで15分間オートクレーブ滅菌をした後、繰り返し変形試験に供した。また摩擦摩耗試験では、20mm角に切り出したType316L ステンレス鋼ディスク試料をアセトン、メタノール、蒸留水で超音波洗浄および滅菌したのち使用した。

模擬生体環境下での繰り返し変形試験および摩擦摩耗試験には、上記の試験片を模擬体液に1日もしくは1週間浸漬し、表面にタンパク質を堆積させて、実験を行った。また細胞の影響を調査するため、試料表面に骨芽細胞様細胞を1週間培養した試料も準備した。初期細胞播種密度を $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>とし、試験開始前にコンフルエントとした。

表面ポーラス構造の影響を調査する試験では、Type316L ステンレス鋼の引張試験片ゲージ部またはディスク試料表面を過塩素酸を含むエチレングリコール中で陽極酸化することにより自己組織化ナノホールを生成した。

### 3. 2 模擬生体環境における繰り返し変形に伴って生じる溶解・再不働態化挙動

繰り返し変形試験では、タンパク質や細胞を含んだ模擬体液の腐敗を防ぐため、模擬体液に接触するパーツがすべて滅菌できるようにガラスおよびテフロンからなる電気化学測定系を構築するとともに、さらに模擬体液を簡易クリーンルームに設置したフローポンプを通じて電気化学測定系に循環させた。その結果、少なくとも2週間程度は模擬体液を腐敗させることなく繰り返し変形試験を実施することが出来た。電気化学測定系を滅菌したのち、3. 1で述べた引張試験片を設置しセル内部を模擬体液で満たした。試験片の両端はサーボパルサーに接続し、応力比0.1、周波数10Hzの引っ張り応力を試験片に付与した。試験中に試験片に印加した応力変化、変位および腐食電位変化を記録した。

### 3. 3 模擬生体環境での摩耗に伴う電気化学反応の評価

3. 1にて準備したステンレス鋼ディスク試料を摩擦摩耗試験機に設置した電気化学セル内にセットし、ディスク試料および超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)製のピン試料がともに浸漬するように、模擬体液を入れた。1時間浸漬したのち、回転半径20mm、速度20mm/s、回転角40°にて試料に回転往復運動させる摩擦摩耗試験を実施した。試験時間は6時間とし、その間の摩擦係数と腐食電位の変化を同時計測した。

### 3. 4 ステンレス鋼不働態皮膜が再不働態化に及ぼす影響

ステンレス鋼表面に生成する不働態皮膜が破壊されると、下地金属の溶解が起こり局部腐食に至る可能性があるため、速やかに再

不働態化する必要がある。従来の研究では、不働態皮膜損傷時のアノード過程について注目され様々な成果が報告されているが、不働態皮膜表面で起こるカソード過程についてはほとんど検討されてこなかった。そこで、皮膜損傷時に生じるアノード過程に起因する電流に対応するカソード電流を不働態皮膜に印加することにより、不働態皮膜の表面で生じるカソード過程の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 4.1 模擬体液中で繰り返し応力を付与した際の電気化学挙動

模擬体液中に1日浸漬した Type 316L ステンレス鋼に最大応力 300 MPa の繰り返し応力を付与する試験において、3 サイクル目および 4 サイクル目に計測された応力および腐食電位変化を図 1(a) に示す。図より腐食電位は引張試験片の変形に応じて変化したことが分かる。応力が増加し試験片に変形が加わると、ステンレス鋼表面にある不働態皮膜が破壊され、その結果、下地金属(新生面)が模擬体液中に暴露し金属溶解が生じたため腐食電位は卑にシフトした。一方、印加応力が減少すると、皮膜破壊直後から生じる再不働態化による新生面上での不働態皮膜の自己再生が起こり金属溶解は抑制され腐食電位は貴に

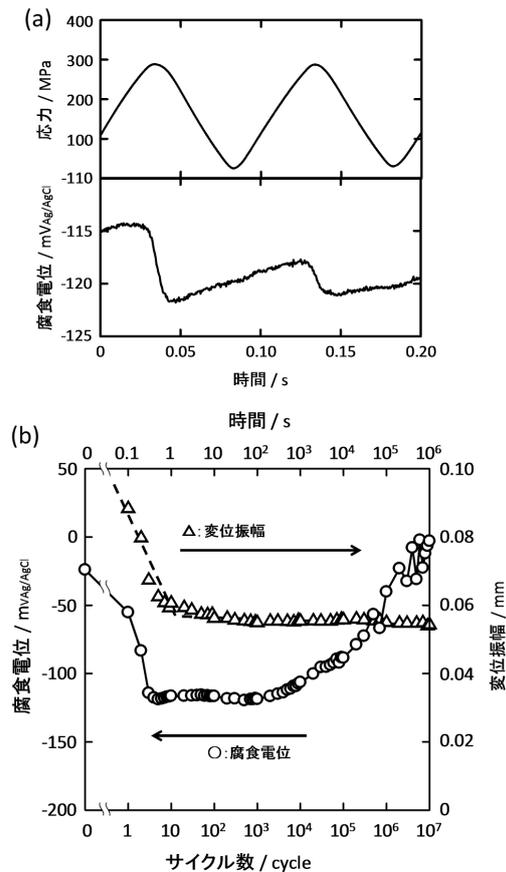


図 1 (a) 模擬体液中に 1 日浸漬させた Type 316L ステンレス鋼の繰り返し変形試験 3 サイクルおよび 4 サイクル目の応力・腐食電位変化, (b) 繰り返し変形試験における腐食電位および変位振幅の経時変化。

シフトした。図 1(b) に  $10^7$  サイクルに至るまでの腐食電位変化および変位振幅変化を示す。図から、試験開始直後には、不働態皮膜が破壊され金属溶解が生じたため腐食電位は低下するが、約 10 サイクルから腐食電位は貴にシフトしたことが分かる。サイクル数の増加に伴い、試験片は加工硬化し 1 サイクルに生じるひずみ量が減少する結果、1 サイクル毎に模擬体液中に暴露される新生面の面積が減少したため、腐食電位の低下が抑制され、さらに露出した新生面上では再不働態化が生じるため金属溶解は抑制される。すなわち、加工硬化による模擬体液中に暴露される新生面面積の減少と再不働態化による金属溶解の抑制が 10 サイクル以降に腐食電位が上昇した要因であると考えられる。

模擬体液中に 1 日または 1 週間浸漬、ならびに 1 週間浸漬中に表面に細胞を培養した Type 316L ステンレス鋼を最大応力 300 MPa にて繰り返し変形試験した際に  $10^5$  サイクルまで計測した腐食電位変化を図 2 に示す。図から、模擬体液中に 1 週間浸漬した試料、細胞を培養した試料ともに、腐食電位の変化は 1 日浸漬した試料と同様に、試験開始後に低下し、その後はサイクル数の増加とともに上昇することが分かる。 $10^5$  サイクルまでの腐食電位変

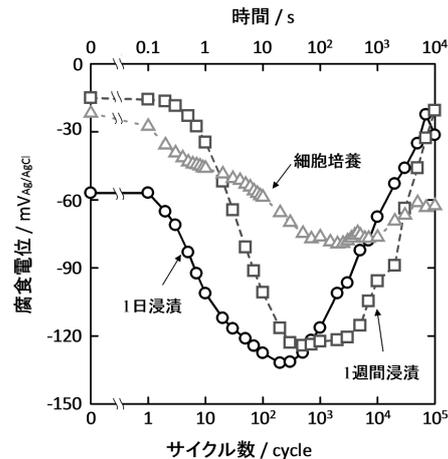


図 2 繰り返し変形試験における Type 316L ステンレス鋼の腐食電位変化に及ぼす表面状態の影響。

化において最も卑な電位 ( $V_m$ ) および一旦低下後に再び電位が上昇し始めるサイクル数 ( $N$ ) に着目した。上述したように、不働態皮膜が破壊された際に、新生面が体液中に暴露され金属溶解が生じた結果、腐食電位は卑にシフトする。しかしながら、不働態皮膜の破壊後に再不働態化が進行するため金属溶解は抑制され腐食電位は貴にシフトする。すなわち、 $V_m$ 、 $N$  は金属溶解と再不働態化のバランスによって決定されると考えられる。図 2 より得た各試料における  $V_m$ 、 $N$  の変化を図 3 に示す。図 3(a) から明らかなように、模擬体液中に 1 日浸漬した試料が最も低い  $V_m$  を示し、細胞を培養した試料で  $V_m$  が最も高くなった。したがって、1 日浸漬した試料において、より大きな

金属溶解が生じていることを示しており、試

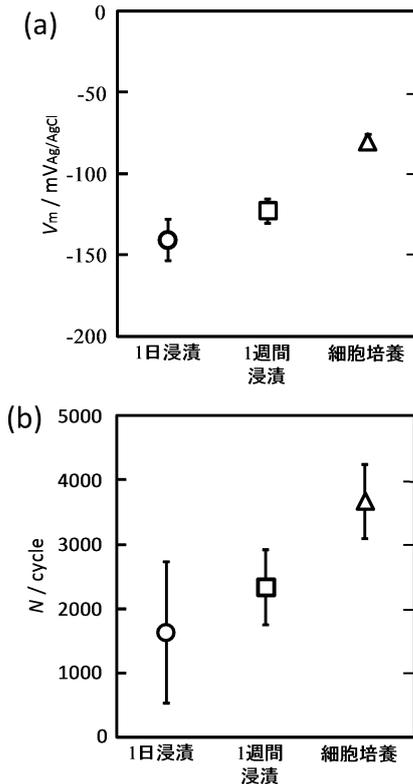


図3 (a)  $V_m$ および(b)  $N$ に及ぼす表面状態の影響.

料表面に接着したタンパク質や細胞が金属変形に伴う不働態皮膜破壊によって生じる金属溶解を抑制しうることが明らかとなった。一方、図3(b)より、 $N$ は細胞培養した試料において最も大きくなり、模擬体液に1日浸漬した試料において最も小さくなった。タンパク質や細胞がステンレス鋼表面に接着すると再不働態化が生じるまでにより時間がかかり、新生面上での不働態皮膜の修復が遅く、1日浸漬した試料よりも長期的に金属溶解が生じていることが明らかとなった。すなわち、タンパク質や細胞には再不働態化を阻害する働きがあることが明らかとなった。

模擬体液中でのステンレス鋼の繰り返し変形試験において、タンパク質や細胞が試験中の金属溶解や再不働態化に影響することが明らかとなったが、タンパク質や細胞が材料の劣化にどのような影響を及ぼすのかが不明であった。そのため、同様の試験をTi-6Al-4V合金において行った。Ti-6Al-4V合金において1サイクルの間に計測された応力および腐食電位の変化およびサイクル数の増加に伴う変位振幅の変化はそれぞれ図1(a)および図1(b)に示したType 316Lステンレス鋼と同様であった。しかしながら、腐食電位の変化はステンレス鋼とは異なっていた。最大応力を500 MPaで実施したTi-6Al-4V合金の繰り返し変形試験中の腐食電位変化を図4に示す。図より分かるように、すべての試料において、繰り返し変形試験中の腐食電位の変化は3つの領域に分割できる。第1

番目の領域では、サイクル数の増加とともに腐食電位は卑にシフトする。1日浸漬試料では1サイクル目がこの第1領域にあたり、1週間浸漬試料および細胞培養試料では約 $10^3$ サイクルまでに相当する。第2番目の領域では、試験片の加工硬化および新生面上での再不働態化により金属溶解が抑制され腐食電位は貴にシフトする。そして第3番目の領域では、試料の変位振幅が変化していないにもかかわらず、腐食電位は再び低下し続け破断に至る。図4中の(a)点および(b)点において

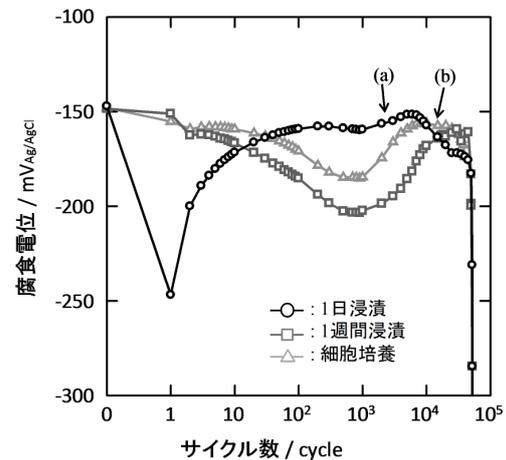


図4 繰り返し変形試験中のTi-6Al-4V合金の腐食電位変化.

繰り返し変形試験を停止し、試料表面をSEMにて観察すると、第3領域に入る直前の(a)点ではき裂は全く認められず、第3領域に入った直後の(b)点では、多数の微小き裂が確認された。最大応力を400 MPaから800 MPaの範囲で繰り返し変形試験を実施したが、いずれの最大応力においても、これら3領域が認められた。図5にこれら試料の腐食疲労寿命(S-N曲線)を示す。図から明らかなように、

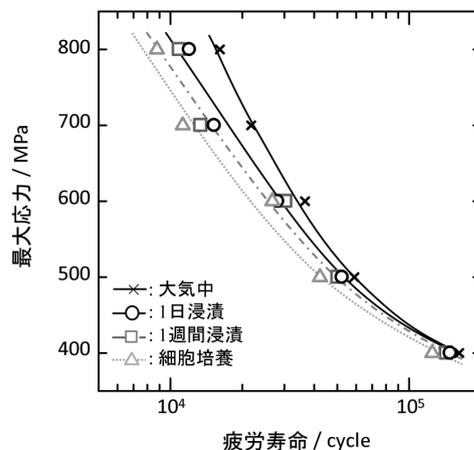


図5 Ti-6Al-4V合金のS-N曲線.

腐食疲労寿命は表面状態に大きく影響される。いずれの最大応力においても、最も腐食疲労寿命が長かったのは1日浸漬試料で、浸漬期間を長くすると寿命は低下した。細胞培

養試料では最も疲労寿命が短くなった。すなわち、Ti-6Al-4V 合金の表面にタンパク質や細胞が接着すると、腐食寿命を低下させることが明らかとなった。上述したように、図4に示した腐食電位変化において、第3領域直前、すなわち電位ピークより前では、き裂は認められず、第3領域に入った電位ピークより後では、微小き裂が多数確認された。このことより、第2領域まではき裂が発生するまでの期間であり、第3領域は発生したき裂が進展する期間であるとみなすことができる。図5に示した腐食寿命を、き裂が発生するまでの期間と発生したき裂が進展し破断に至るまでの期間に分割した結果、き裂が発生するまでの期間は1日浸漬試料が最も短く、細胞培養試料において最も長くなった。一方、き裂発生してから破断するまでの期間は細胞培養試料で最も短く、1日浸漬試料で最も長くなった。これらは、試料表面にタンパク質や細胞が接着すると、き裂発生は抑制されるが、き裂進展は促進されることを意味する。以上より、医療用金属材料表面に接着するタンパク質や細胞は変形時に起こる溶解・再不働態化だけでなく、その結果としてき裂発生およびその進展にも影響を及ぼし得ることが本研究により初めて明らかとなった。

本研究では、腐食疲労特性に及ぼす表面ナノポーラス構造の影響についての検討も行った。ステンレス鋼を過塩素酸を含むエチレンジグリコール溶液中で陽極酸化することにより Type 316L ステンレス鋼表面に自己組織化ナノホール構造を形成し、生理食塩水溶液環境で繰り返し変形試験を行った。比較として、機械研磨または電解研磨を施し表面平滑化した試料も併せて検討した。その結果、繰り返し変形中の電位変化は表面状態により異なったが、最大応力レベルの影響はそれほど見られなかった。疲労寿命は最大応力が高い場合、ナノホール構造を形成した試料において最も長く、機械研磨試料で最も短くなった。しかしながら最大応力が低い場合には、電解研磨試料で疲労寿命は最も長くなった。これらの結果より、ステンレス鋼の腐食疲労寿命は表面状態により改善される可能性が示唆されたが、応力レベルにより表面の効果が異なることも分かった。一方、チタンにおいても、腐食疲労特性に及ぼす表面ポーラス構造の影響を検討した。チタンでは、フッ化物を含む電解液での陽極酸化により、厚いチタニアナノチューブ層を形成し、その剥離によるバリア層の形状のチタン基板への転写によりチタン表面にナノホール構造を付与し、繰り返し変形試験を行った。その結果、機械研磨で得られる平滑な表面と比較して、ナノホール構造付与により疲労寿命が長くなる結果が得られた。

#### 4. 2 模擬生体環境下での摩擦により生じる Type 316L ステンレス鋼の溶解・再不働態化挙動

本研究では、模擬生体環境での Type 316L ステンレス鋼の摺動による劣化挙動を、電気化学測定を同時に行うことのできる摩擦摩耗試験システムを構築し検討した。計測された摩擦係数は試験開始直後に、急激に増加し、

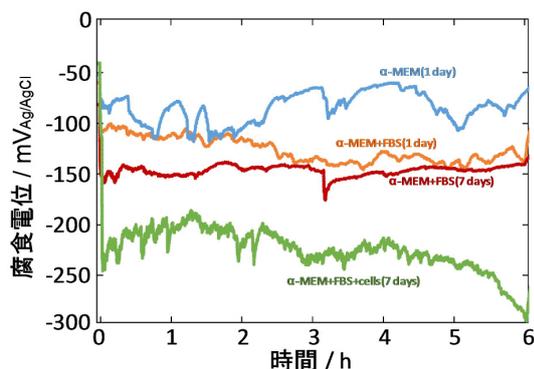


図 6 316L ステンレス鋼の模擬生体環境下での摩擦摩耗試験中の腐食電位の経時変化。

その後、時間の経過とともに減衰する傾向を示した。タンパク質を含まないα-MEM 中で摩擦係数は最も大きく、模擬体液に1日浸漬もしくは1週間浸漬した試料が最も小さく浸漬時間の影響は小さかった。試験中に測定した腐食電位の経時変化を図6に示す。図から明らかなように、試験開始直後に、全ての試料において腐食電位は不働態皮膜の破壊に伴い卑にシフトした。タンパク質を含まないα-MEM 中では、変動は大きい、腐食電位が時間の経過とともに回復する傾向にある。一方で、タンパク質を含む培地中では、変動は小さいが腐食電位の回復が抑制され、特に細胞培養を行った場合に、電位の回復が顕著に抑制された。タンパク質を含まない模擬生体環境では、摩擦による不働態皮膜の破壊に伴い、金属溶解が促進されるとともに、摩擦を付与するための試料の往復運動による溶液の攪拌により酸素の供給が促進されカソード反応も増加する。その結果として、腐食電位が決定されると考えられる。一方、タンパク質を含む溶液では、試料表面をタンパク質が覆うため、摩擦部位の外では酸素の供給が抑制されるためカソード反応が阻害され腐食電位が低下し、細胞が表面に接着している場合にはカソード反応がさらに生じにくくなり腐食電位が顕著に卑にシフトしたと考えられる。

#### 4. 3 不働態皮膜のカソード反応特性評価

各種条件で不働態化したステンレス鋼に硫酸ナトリウム水溶液中で、皮膜破壊により生じるカソード反応電流を不働態皮膜に印加した際に生じる電位変化を図7に示す。図から明らかなように、電流印加により電極電位は低下し、ピークを示した後、元の電位へと回復する挙動を示した。また、電位降下幅は不働態化条件により変化することが分かった。この電位がより卑となる場合には、局

部腐食が抑制されると考えられるため、電位降下幅を大きくするための不働態化条件を検討した。その結果、皮膜容量が小さく、酸素還元反応抵抗が大きい試料で降下幅が大きくなることが分かった。すなわち、不働態皮膜の電子構造を最適化することによりカソード反応特性を改善し、局部腐食耐性を向上させることが示唆された。

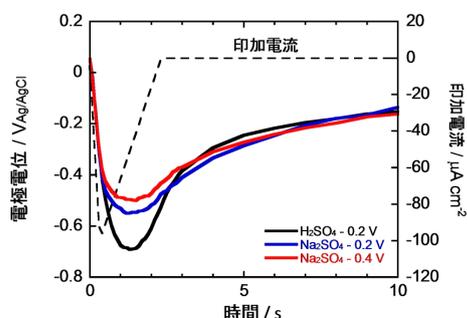


図7 電流制御分極試験におけるステンレス鋼の電極電位の経時変化。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

① S. Miyabe, T. Suehiro, Y. Fujinaga, H. Tsuchiya, S. Hiromoto, S. Fujimoto, “Cell Activity on Type 316L Stainless Steel with Self-Organized Nanopores Formed by Anodic Polarization”, *Materials Transactions*, 57 (2016) 2065-2071.

10. 2320/matertrans. MI201516

② K. Doi, S. Miyabe, H. Tsuchiya, S. Fujimoto, “Degradation of Ti-6Al-4V alloy under cyclic loading in a simulated body environment with cell culturing”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 56 (2016) 6-13.

10. 1016/j. jmbbm. 2015. 10. 032

③ 土井康太郎、宮部さやか、藤本慎司, “バイオメカノケミカル環境における種々の医療用金属材料の不働態皮膜破壊に伴う溶解と再不働態化”, *材料*, 64 (2015) 81-988. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jms/64/12/64\\_981/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jms/64/12/64_981/_pdf)

④ 土井康太郎、宮部さやか、藤本慎司, “タンパク質および細胞を含んだ模擬体液中で繰り返し応力を付与した Type 316L ステンレス鋼の溶解と再不働態化”, *日本金属学会誌*, 79 (2015) 303-307.

10. 2320/jinstmet. J2015007

⑤ K. Doi, S. Miyabe, S. Fujimoto, “Electrochemical Behavior of Type 316L Stainless Steel during Cyclic Deformation under Cell Culturing”, *Materials Transactions*, 55 (2014) 1890-1894.

10. 2320/matertrans. M2014301

⑥ 藤本慎司、中嶋英雄、伏屋実、Kelly Alvarez, 玄丞均, “ロータス型ポーラス・ステンレス鋼の腐食挙動と生体親和性”, *材料と環境*, 63 (2014) 365-370.

10. 3323/jcorr. 63. 365

[学会発表] (計 17 件)

① 小田原雅司、藤本慎司, “すき間内での鉄の腐食に伴う電流及び化学種の分布数値シミュレーション”, 日本金属学会春期講演大会, 2017年3月15日~17日, 首都大学東京(東京都八王子市).

② N. Yamada, K. Doi, H. Tsuchiya, S. Fujimoto, “Influence of Surface Nanoporous Structure on the Corrosion Fatigue of Type 316L Stainless Steel in Sodium Chloride Solution”, Prime2016, 2016年10月2日~7日, Hawaiian Convention Center, & Hilton Hawaiian Village(アメリカ合衆国、ハワイ).

③ C. Toji, S. Miyabe, H. Tsuchiya, S. Fujimoto, “Triborocorrosion of Type 316L stainless steel with nanopore arrays in stimulated body fluid”, Prime2016, 2016年10月2日~7日, Hawaii Convention Center & Hilton Hawaiian Village(アメリカ合衆国、ハワイ).

⑤ 長谷川翔平、土谷博昭、藤本慎司, “ステンレス鋼上での急速な酸素還元挙動に及ぼす不働態皮膜の影響”, 材料と環境討論会 2015, 2015年11月4日~6日, 福岡工業大学(福岡県福岡市).

⑥ 藤本慎司, “医療用材料の腐食理論と測定技術”, 腐食防食学会関西支部第7回腐食防食セミナー, 2014年8月1日, 大阪大学(大阪府吹田市).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 慎司 (FUJIMOTO Shinji)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70199371

(2) 研究分担者

土谷 博昭 (TSUCHIYA Hiroaki)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50432513

宮部 さやか (MIYABE Sayaka)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50584132

廣本 祥子 (HIROMOTO Sachiko)

独立行政法人物質・材料研究機構・研究員

研究者番号：00343880