

令和元年6月12日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10883

研究課題名(和文) Ti-Ta-Snのインプラント材料としての耐食性評価と細胞接着性向上に関する研究

研究課題名(英文) Research on corrosion resistance evaluation and cell adhesion improvement as implant material of Ti-Ta-Sn

研究代表者

三木 将仁 (MIKI, masahito)

埼玉大学・研究機構・専門技術員

研究者番号：90515066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、表面の親水性を改善し生体親和性を高める目的でTi-23Ta-3Sn(at%)合金に紫外線照射による表面改質を行った。Ti-Ta-Sn合金基材上の細胞親和性は、ウシ肺動脈血管内皮細胞を用いて、細胞播種後5時間における初期細胞接着数、および播種後6時間におけるずり応力を用いた細胞接着強度試験によって評価した。初期細胞接着段階において、24時間紫外線照射された基材上では超親水性表面となることにより他の基材と比較して多くの細胞が接着していた。一方で、ずり応力を用いた細胞接着強度試験では、紫外線照射された表面と未照射表面とに細胞残留率に有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ti-Ta-Sn合金は、アレルギー反応を起こす頻度の高い金属元素は含まれておらず、ヤング率は約45GPaと低ヤング率である。さらに、高弾性ひずみ限界・非磁性・X線非透過性を有しているため、優れた整形外科用インプラント材料になる可能性を秘めている。本研究で、初期細胞接着段階において、24時間紫外線照射された基材上では超親水性表面となることにより他の基材と比較して多くの細胞が接着していた。これらのことから、整形外科用のみならず、胸部外科、心臓血管外科、消化器外科、歯科などの医療分野での利用の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied ultraviolet (UV) irradiation on a Ti-23Ta-3Sn (at %) alloy to improve surface hydrophilicity and biocompatibility. The in vitro cell affinity of the Ti-Ta-Sn metal plate was tested by measuring cell adhesion on the plate surface by WST-8 assay after cell culturing for 5 h. Apart from this, strength of cell adhesion was determined by a shear stress loading test after 6 h of cell culturing. With respect to cell landing, more cells were measured on the surface that was UV irradiated for 24 h because of the improvement in its super-hydrophilicity. In the shear stress loading test, no difference was observed in cell adhesion between the untreated and UV irradiated surfaces.

研究分野：生体工学

キーワード：生体材料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在使用されている金属系生体材料には、Co-Cr-Mo や Ti-6Al-4V、Ti-Ni、SUS316L 等がある。これらの金属には、金属アレルギーを起こす頻度の高い金属元素である、Ni、Hg、Co、Cr、Cu、Al、V 等が含まれているため、長期体内に埋入する整形外科用インプラント材料として使用した場合、金属イオン溶出によるアレルギー反応を示すことが示唆されている。また、ヤング率は Co-Cr 合金が 230 GPa、SUS316L が 205 GPa、Ti-6Al-4V が 110 GPa である。しかしながら、大腿骨皮質骨 (10 ~ 30 GPa) と比べると高く、応力遮蔽 (Stress Shielding) による骨萎縮等が生じる問題がある。

そこで、現在使用されている金属材料よりも耐食性が良く、たとえ金属イオンが溶出したとしてもアレルギー反応を引き起こさない金属材料が求められている。また、整形外科用の金属材料としては比較的低ヤング率の材料が求められている。Ti-Ta-Sn 合金は、アレルギー反応を起こす頻度の高い金属元素は含まれておらず、ヤング率は約 45GPa と低ヤング率である。さらに、高弾性ひずみ限界・非磁性・X 線非透過性を有しているため、優れた整形外科用インプラント材料になる可能性を秘めている。

### 2. 研究の目的

現在使用されている金属系生体材料には、金属アレルギーを起こす頻度の高い金属元素である Ni や V などが含まれている。また、骨と金属材料とのヤング率の違いによる応力遮蔽 (Stress Shielding) による骨萎縮等が生じる問題があるため、整形外科用インプラント材料には、比較的低ヤング率の材料が求められている。新たに開発した Ti-Ta-Sn 合金は、金属アレルギーを起こす元素が含まれておらず、低ヤング率である。しかし、整形外科領域で使用されるインプラントは絶えず負荷を受け、不動態膜は表面ひずみにより破壊されるため、繰返し荷重環境下での耐食性を評価する必要がある。また、金属材料との細胞接着性や接着力が向上すれば、整形外科用インプラント材料のみならず、胸部外科、心臓血管外科、歯科などの医療分野への利用が可能である。

### 3. 研究の方法

試験片は Ti-23Ta-3Sn(at%)合金(以下 Ti-Ta-Sn 合金)を用いた。同材を円板形状(12.8 mm × t1.5 mm および 4 mm × t0.9 mm)に機械加工した後、耐水エメリー紙(#320 - #2000)を用いて片方の端面を研磨した。研磨後にアセトン、エタノール、超純水で順次 10 分間ずつ洗浄し、60℃ で乾燥させた。細胞培養に使用するものは 180℃、2 時間で乾熱滅菌した。紫外線照射には、UV-03 洗浄改質装置(あすみ技研, ASM401N)にて、低圧水銀ランプ出力 40 W、紫外線照度 10.0 mW/cm<sup>2</sup>、波長 184.9、253.7 nm、照射距離 3 cm で試験片に対して UV を照射した。

本実験では、ウシ肺動脈正常血管内皮細胞(CPAE: Bovine pulmonary artery endothelial cells)を用いて種々の評価を行った。培地は、Eagle's MEM 溶液(日水製薬, 東京)100 mL に対し、ウシ胎児血清(FBS)(東京バイオ研究, 東京)10 mL、L-グルタミン(日水製薬, 東京)0.03 g、NEAA(gibco, NY, USA)0.1 mM、炭酸水素ナトリウム(和光純薬, 大阪)0.42 g 添加したものをを使用した。また、培養は 37℃、湿度 100%、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で行った。

#### (1) 親水性の評価

液体面が固体面と成す角度を接触角といい、表面の親水性はこの接触角によって定量的に測ることができる。本実験では接触角測定装置(エキシマ, Simage02B)を用いて超純水の水滴 4 μL を試験片(12.8 mm × t1.5 mm)表面に静置し、その水滴をカメラで撮影し接触角を計測した。

#### (2) 初期細胞接着試験

96 穴マイクロプレート上にて、滅菌した試験片(Untreated)、5 分間 UV 照射した試験片(UV5)、30 分間 UV 照射した試験片(UV30)、24 時間 UV 照射した試験片(UV1440)、4 種類各 5 点(n = 5) に対し CPAE を 5 × 10<sup>3</sup> cells/well(1.5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>)になるように播種し、5 時間培養した。試験片のサイズは 96 穴マイクロプレートの形状を考慮し 4 mm × t0.9 mm とした。培養後の各試験片を PBS(-)(タカラバイオ, 滋賀)にて洗浄後、細胞数を WST-8 (Cell Counting Kit-8, 同仁科学研究所, 東京)による比色法を用いて測定した。また、吸光度測定は波長 450 nm で行い、参考波長を 620 nm で測定した。なお、本研究で用いた CPAE における assay 値の信頼性および細胞数との相関を検証するために、市販の 96 穴マイクロプレートで培養された CPAE を用いて assay 値と細胞数の検量線の作成を行った。

#### (3) ずり応力を用いた細胞接着強度試験

試験片上に付着している細胞の接着強度を調べるために、回転式粘度計の原理を利用したずり応力負荷装置を構築した。静止している円板試験片と回転している円錐に挟まれた間の流体には層流が発生する。本装置はこれを利用し試験片上に播種された接着細胞表面に、理論上一様なずり応力を加えることができるものである。本装置は回転部の回転数を変化させることで動脈壁面の平均ずり応力である 10 ~ 20 dyn/cm<sup>2</sup> を再現できる仕様となっている。24 穴プレート上で、滅菌した試験片(Untreated)、24 時間 UV 照射した試験片(UV1440)、2 種類各 3 点(n =

3) に対し CPAE を  $3 \times 10^4$  cells/well ( $1.6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) になるように播種し 6 時間培養した後, 15, 20, 25 dyn/cm<sup>2</sup> のずり応力を細胞に負荷した. 試験片のサイズは 12.8 mm × t1.5 mm とし, ずり応力の負荷は培養容器とは別の 24 穴プレート内で行なった. 平面と円錐面のなす角を 1° とし, 流体は 37 の Eagle 's MEM 培地 (FBS 不含, 粘性係数 0.001 Pa·s) 0.5 mL を用いて加圧時間は 3 分間とした. また, 負荷後の残留細胞数は WST-8 によって計数し, 各ずり応力負荷時における残留細胞数を負荷前の付着細胞数 で除した値の百分率 (細胞残留率) を求めた. これにより, 細胞の剥離率とずり応力との相関を調べた.

#### 4. 研究成果

##### (1) 親水性の評価

図 1 に UV 照射時間と超純水に対する接触角の推移を示す. 照射 5 分後から親水性の向上に効果が見られ始め, 照射時間が長くなるほど接触角は小さくなり, 13 時間以上の照射で接触角の大きさは 1° を切り, 24 時間の照射で接触角 0° の超親水性表面となった. Ti-Ta-Sn 合金表面の親水性を超親水性まで高めることで, 血管内皮細胞に対する初期細胞接着性が向上する可能性が示唆された.

##### (2) 初期細胞接着試験

図 2 に CPAE を用いた WST-8 による assay の検量線を算出し, 細胞数との相関および信頼性を検証した結果を示す. これより細胞数と WST-8 による assay 値は比例関係にあることがわかる. また, Ti-Ta-Sn 合金による WST-8 のバックグラウンド上昇は認められなかった. したがって, 本研究で用いた細胞においては, WST-8 による assay 値を計測することにより細胞数ならびに細胞の増減を評価することが可能であると言える. 図 3 に各試験片上での培養後の初期細胞付着数を示す. 有意差検定は, 分散が等しくないと仮定した 2 標本 (対応の無い場合) の t-検定により, 有意水準は  $\alpha = 0.05$  とした. UV1440 表面では, Untreated ならびに UV5, UV30 表面と比較して, 初期細胞付着数が有意に増加していた. しかし, Untreated ならびに UV5, UV30 表面上の初期細胞付着数に差は見られなかった. Ti-Ta-Sn 合金基材に対して血管内皮細胞は 15 dyn/cm<sup>2</sup> のずり応力ではほぼ剥離せず, 50 % 接着強度は 20 ~ 25 dyn/cm<sup>2</sup> 付近であることが判明したが, 内皮組織の足場材として利用するためにはさらに接着安定性を高める必要がある.

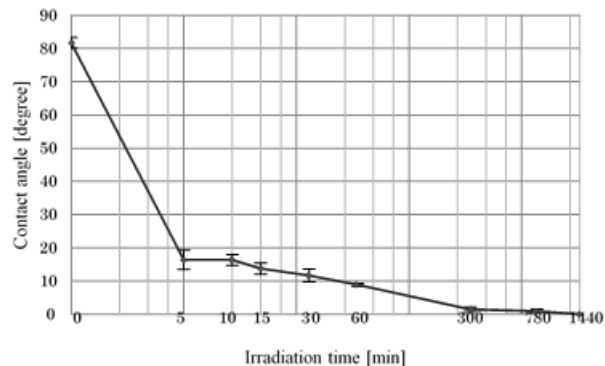


図 1 Ti-Ta-Sn 表面への UV 照射時間と接触角の推移

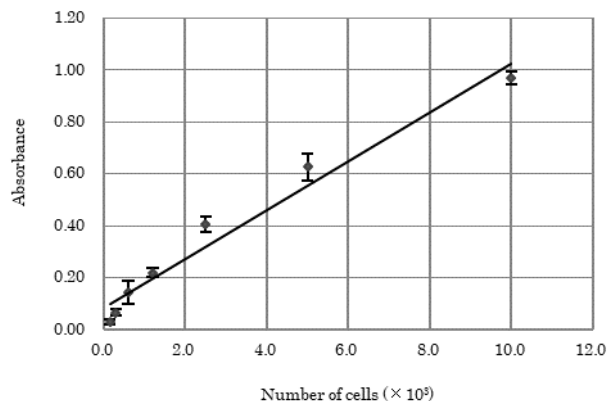


図 2 CPAE を用いた WST-8 による assay の検量線を算出し, 細胞数との相関および信頼性の検証

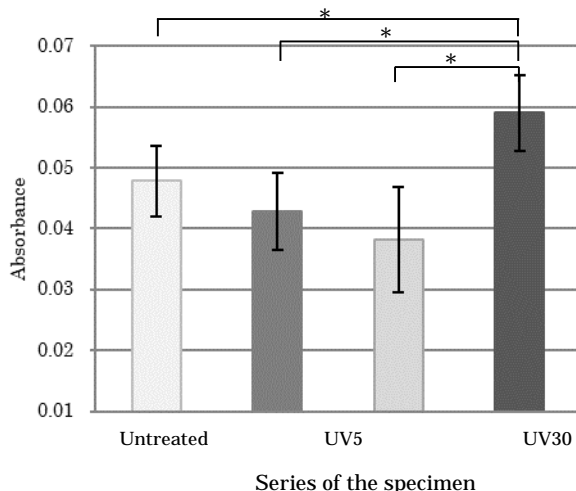


図 3 各試験片上での培養後の初期細胞付着数

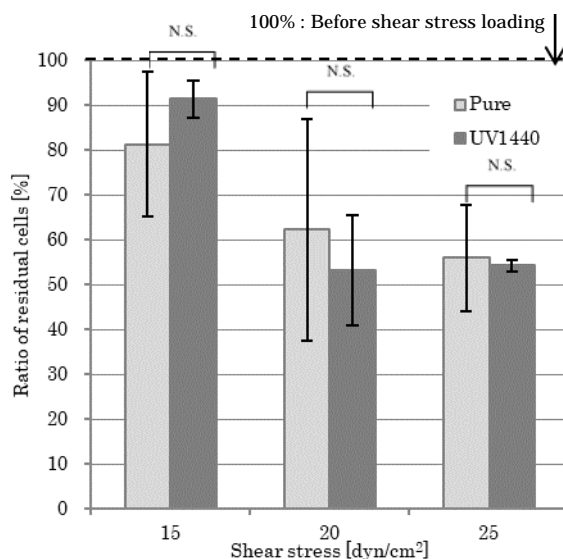


図 4 細胞接着強度試験

### (3) ずり応力を用いた細胞接着強度試験

図4に細胞接着強度試験の結果を示す。有意差検定は初期細胞接着試験と同様の方法による。15 dyn/cm<sup>2</sup>のずり応力ではUntreatedならびにUV1440群両者においてほぼ剥離せず接着状態を維持していた。20~25 dyn/cm<sup>2</sup>では細胞がUntreatedならびにUV1440両者において60%程度残留しており、シリーズ間に有意な差は認められなかった。さらに、残留率50%となるずり応力の値を細胞の接着強度とみなすと、本条件下では20~25 dyn/cm<sup>2</sup>付近がこれに相当すると推察される。Untreated表面およびUV1440表面との間に細胞初期接着段階における接着強度に有意な差は認められず、UV照射による親水性の向上が必ずしも接着強度に反映されないことを示唆する結果となった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

木山洸士朗, 三木将仁, 森田真史: Ti-Ta-Sn合金における紫外線照射による親水性改善と血管内皮細胞の初期接着性の向上, 材料の科学と工学, Vol.54, No.2, 75-79 (2017) 査読有  
木山洸士朗, 三木将仁, 玉内秀一, 森田真史: Ti-Ta-Sn合金における紫外線照射による糖タンパク吸着性の変化, 材料の科学と工学, Vol.54, No.2, 80-82 (2017) 査読有

### 〔学会発表〕(計1件)

木山洸士朗, 廣瀬賢吾, 三木将仁, 森田真史, 石川佳樹: Ti-Ta-Sn合金の紫外線照射による濡れ性改善と血管内皮細胞の接着性の向上, 第1回日本福祉工学会九州支部大会講演論文集, p.42-43 (2016)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 森田 真史

ローマ字氏名: (MORITA, masafumi)

所属研究機関名: 埼玉大学

部局名: 理工学研究科

職名: 名誉教授

研究者番号(8桁): 20112667

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 木山洸士朗

ローマ字氏名: (KIYAMA, koshiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。