

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14421

研究課題名（和文）長距離作用により骨再生を助ける人工骨用合金の開発

研究課題名（英文）Development of alloys for artificial bone helping bone regeneration with long-range interaction

研究代表者

小林 千悟（Kobayashi, Sengo）

愛媛大学・理工学研究科（工学系）・教授

研究者番号：10304651

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：生体内で使用できる感温磁性材料（体温付近で磁気的特性が変化する材料）の開発を目指し、Fe-(20-31)at%Ti-(0-11)at%Cr合金（以降、組成はat%）ならびにFe-31Zr-(11-24)Cr合金の細胞適合性、耐食性ならびに磁気変態温度の調査を行った。
その結果、合金中のCr添加量を増加することによって、細胞適合性ならびに耐食性が向上し、Fe-11Cr-xTi合金は生体内で使用できる感温磁性合金の候補材といえる。また、体温付近で磁気的特性変化が期待できるFe-31Zr-16Cr合金が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した材料を、より詳細な生体適合性確認の後で、人工骨用材料などに適用することによって、材料から積極的に良質な骨組織形成を促す治療法開発へとつながることが期待される。また、本開発合金のような感温磁性材料のがん焼灼治療への応用は、材料が自主的に温度制御を行うため、周囲の正常細胞に最小のダメージで癌細胞のみを死滅させる新しい技術となりうる。また、材料の励磁発熱によって血管や生体内管状臓器の狭窄・閉塞部を局所加熱する治療などへも応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Fe-(20-31)Ti-(0-11)Cr (in at%) alloys and Fe-31Zr-(11-24)Cr (in at%) alloys were examined to develop temperature-sensitive magnetic materials whose magnetic properties change near body temperature. The cytocompatibility, corrosion resistance, and magnetic transformation temperature were investigated for these alloys.

By increasing the amount of Cr added to the alloy, cytocompatibility and corrosion resistance were improved, making it a candidate alloy that would be used in vivo. Fe-31Zr-16Cr alloy was found as a candidate alloy for biocompatible temperature-sensitive magnetic materials that can be expected to change magnetic properties near body temperature.

研究分野：金属生体材料

キーワード：生体材料 感温磁性材料 骨再生 長距離相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

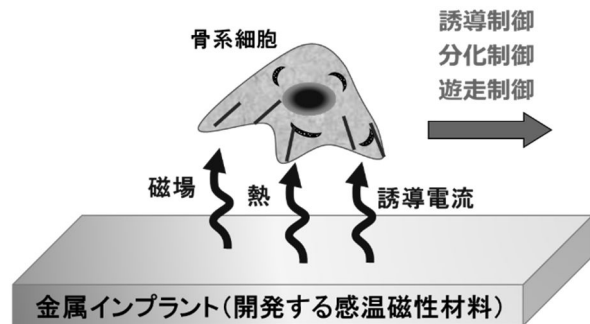
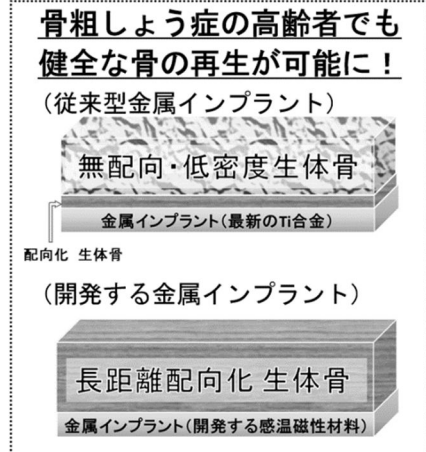
高齢者は骨粗しょう症や加齢で骨が弱くなっており、転倒しただけでも大腿骨頸部を骨折することが多い。その場合、自然治癒が望めないケースが多く、Ti合金やCo合金製人工骨による人工股関節置換術治療が行われる。合金製人工骨表面には、生体骨との接合性を向上させるために、酸化処理などの表面処理が施されるが、なぜ表面処理により接合状態を改善できるかは明確ではない。最近、申請者のグループでは、表面処理(酸洗処理と酸化処理)が施されたTi合金上に再生した骨の結晶学的解析を行い、表面処理により骨の主成分のヒドロキシアパタイト(HAp)結晶の配向化(HApの配向化は骨強度向上に繋がる)ならびに骨再生促進が生じ、その結果、合金と骨との接合強度が向上することを報告した。しかし、骨の配向化は人工骨表面近傍の数10nm程度の領域しか存在せず、それ以上合金表面から離れると骨配向性は低下することも明らかにした。健常者であれば骨再生初期の配向性の低い骨は、日常生活の中で骨に適切な応力が負荷され、応力負荷下での骨の吸収・再生の過程で応力負荷方向に配向化した骨に置き換わる。しかし、骨粗しょう症などを発症した高齢者や寝たきり状態となった高齢者では、骨への適切な応力負荷がなく、応力負荷による骨の配向化つまり強い骨の形成は期待できない。

そこで、本研究では、生体組織に積極的に材料側から働きかけることにより、必要な骨量の確保ならびに骨配向化を目指し、新しいコンセプトの人工骨用材料の開発を行った。積極的に材料から生体組織に働きかける方法としては、特に、長距離にわたる骨組織の制御を目指し、長距離作用である磁場・誘導電流・熱を合金人工骨から生体組織・骨系細胞に発し、それによって骨の再生を促すとともに、配向化した強い骨を形成させることが本研究の最終的な目標である。長距離作用を材料側から発する方法として、生体内で利用可能な金属系「感温磁性材料」を開発することによりその実現を図る。骨再生促進は、温度上昇や電流の存在による細胞活性化が重要と考えられ、さらに骨配向化を導く骨系細胞の遊走方向の一樣化には、磁場・熱・電流の勾配が重要といえる。本開発材料に外部から磁場や熱などの信号を送り、それをトリガーとして材料から発せられる磁場・熱・電流により材料上の細胞を制御する。これまで、金属系の生体用ではない感温磁性材料は何百度といった高温で作動するものが多く開発されているが、生体内で利用でき生体温度付近で強磁性・非磁性変態を示して人工骨として利用可能な合金は開発されていない。

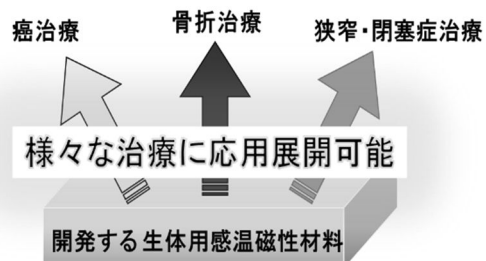
本研究では、生体内に埋入した材料から積極的に良質な骨組織を形成させるという考え方であり、このような着想は他の疾患の治療にも利用できるといえる。本研究で開発する感温磁性材料の非磁性・強磁性変態温度は体温より低い温度に設定するが、合金組成を少し変え変態温度を上昇させれば、癌細胞(熱に弱い)を焼灼する治療にも応用できる。本開発合金のような感温磁性材料は、低温の強磁性状態では外部から誘導加熱され、変態温度以上になり非磁性となれば誘導加熱されなくなるので正確に自主的に材料が温度制御し、周囲の正常細胞に最小のダメージで癌細胞のみを死滅させるハイパーサーミア(温熱療法)を実施する材料となりうる。また、血管等のステント治療用の材料として利用すれば、励磁発熱によって血管や生体内管状臓器の狭窄・閉塞部を局所加熱して治療する用途にも利用できると考えられ、様々な治療に本研究成果は利用されるといえる。

2. 研究の目的

本研究では、合金人工骨周囲の骨再生促進ならびに骨配向化を応力負荷なしで実現させる合金の開発を目指し、以下の3項目について検討することとした。生体用感温磁性合金の開発：生体温度より少し低い35℃付近で強磁性・非磁性変態が生じるような感温磁性合金を開発する。生物学的適合性評価：開発した感温磁性合金の骨系細胞への影響を明らかにする。臨床的評価：開発した感温磁性合金の生体組織への影響を調査するとともに、骨再生促進ならびに骨配向化への効果を明確にする。



長距離に良質な骨組織を作り出す材料
(MRI診断にも悪影響を及ぼさない)



3. 研究の方法

本研究では、生体用に利用でき、かつ、良質な骨の再生を図ることが可能な感温磁性材料を開発するために、

- ☞ 材料学的アプローチ：合金の結晶構造・内部組織制御
- ☞ 生物学的アプローチ：骨系細胞の接着・増殖・分化評価
- ☞ 医学的アプローチ：再生骨ならびに周辺生体組織の病理学的評価

による生体用感温磁性材料の包括的な設計指針を明らかにする。

具体的には、材料学的アプローチとして、組成ならびに熱処理による合金の結晶構造・内部組織変化を X 線回折測定や電子顕微鏡法等により解析し、磁気特性変化との相関を調査するとともに、磁気変態温度や機械的特性を最適化する。また、生物学的アプローチとして開発した合金上の骨系細胞の接着性や増殖性等を細胞数評価や細胞形態から解析する。さらに、医学的アプローチとして、骨への埋入状態によって開発合金の機能が生体内でどのように発現し、周辺生体組織に及ぼす影響が与えられるかを動物実験から解明する。以上のように、材料学・生物学・医学という広い視点で“生体用感温磁性材料”の開発を目指す。

本研究では、“生体用感温磁性合金”の設計指針を明らかにするために、磁気特性や機械的特性といった工学的知見はもちろんのこと、材料が細胞や生体組織へ及ぼす影響を与えるかという生物・医学的知見が必要となり、最終的にはそれらを総合して生体工学的な判断が必要になる。そのために当研究では、材料学、生物学、医学に精通した研究者の共同研究にて遂行する。

(1) 材料学的アプローチ（合金設計、構造・組織評価、磁気的特性評価、耐食性評価）

研究当初は、Co-Ti-B, Hf-Ta-Fe 合金の検討を行ったが、Co の生体為害性や Hf が生体用にあまり使われていないことなどを勘案し、別の合金系の可能性を調査した。生体用の感温磁性合金として作動温度であるキュリー温度 (T_c) を体温付近に設定する必要がある。Fe-Ti 2 元系合金においては、 $TiFe_2$ 型 Laves 相単相の組成領域において、体温付近に T_c をもつことが報告されていたので、まずは Laves 相単相合金となる Fe-31at%Ti (以降、組成はすべて at% で表し、記載は省略する) 合金を作製し、材料の構造・組織評価を行った。結果の項目のところで述べるが、Fe-Ti 2 元系合金では、細胞適合性がないため、それを改善するために Cr を添加する合金設計を行い、Fe-Ti-Cr 合金の組織解析、磁気的特性評価、耐食性評価を行い、生体用の感温磁性材料として最適な合金設計・熱処理方法を模索した。また、磁気変態温度を体温付近で調整するために、Fe-Zr-Cr 合金に対しても Fe-Ti-Cr 合金同様に検討を行った。

(2) 生物学的アプローチ（骨芽細胞を用いた細胞接着・増殖性評価）

開発した生体用感温磁性材料上において、MC3T3-E1 骨芽細胞様細胞等を用いた細胞培養試験を実施して、細胞増殖や接着形態等を蛍光顕微鏡を用いた染色試験によって評価する。特に、磁場印加中ならびに印加前後における細胞挙動の違いを念入りに調査して、骨再生促進に最適な合金を模索した。

(3) 医学的アプローチ（生体埋入時の新生骨の病理検査および骨接触性評価）

上記の(1)と(2)のアプローチが完了した後、開発した生体用感温磁性材料をマウスに埋入する。種々の期間経過後、新生骨や結合性組織を解析するために HE 染色や各種免疫染色を施した病理標本を観察する。

4. 研究成果

Fe-Ti 2 元系合金において、 $TiFe_2$ 型 Laves 相単相の Fe-31Ti 合金に対して骨芽細胞を用いた細胞適合性の評価を行った結果を図 1 に示す。純 Ti 板上(図 1 左の写真)では、骨芽細胞が材料上に接着しているが、Fe-31Ti 合金(図 1 右の写真)上にはほとんど細胞接着が認められず、接着していても細胞の形態に異常が起きていた。この結果から、Fe-31Ti 合金は生体適合性がない材料といえる。この原因としては、Fe-31Ti 合金は耐食性が低く、材料から Fe イオンが多量に溶出し、細胞毒性を引き起こしたためと考えられる。

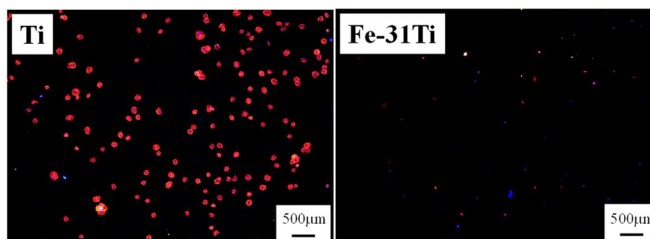


図 1 純 Ti 板と Fe-31Ti 合金上の骨芽細胞培養結果

(培養時間 1 時間：蛍光顕微鏡観察)

そこで、Fe-31Ti 合金に Cr を添加して耐食性の改善を図ることを考え、当初計画にはなかった 3 元系 Fe-Ti-Cr 合金の開発に取り組んだ。添加元素として Cr を選択した理由は、Fe の耐食性を上げるためには、Cr 添加が有効である事実による(いわゆるステンレス化)。Fe-31Ti-(0, 5, 11)Cr 合金をアーク溶解炉にて溶製し、X 線回折 (XRD) 測定による相の同定、細胞播種試験による 1 h 培養における接着細胞数の評価、培養液中でのアノード分極試験による耐食性評価、振動試料型磁力計 (VSM) による磁化測定から磁気特性の評価を行った。なお、細胞播種試験には骨芽細胞 (MC3T3E-1) を用いた。

Fe-31Ti-(0, 5, 11)Cr 合金の XRD 測定の結果を図 2 に示す。すべての合金が $TiFe_2$ 型の Laves 相構造を有することが分かり、Fe-31Ti 合金に Cr を 11at% まで添加しても Laves 相構造を維持できることが明らかとなった。図 3 には Fe-31Ti-(5, 11)Cr 合金上への細胞播種試験結果を示す。図 3 から、Cr の添加量を増加することによって接着細胞数が増加し、細胞適合性が向上することが明らかとなった。さらに、図 1 と比較することにより、Fe-31Ti-11Cr 合金は純 Ti と同程度の優れた細胞適合性を有することが明らかとなった。図 4 に Fe-31Ti-(0, 5, 11)Cr 合金 (0Cr, 5Cr, 11Cr と表示) ならびに純チタン(Ti)、そして SUS304 と SUS316L ステンレスの耐食試験結果を示す。Fe-31Ti-(0, 5, 11)Cr 合金では、Cr の含有量が増加することによって合金の耐食性は向上し、Fe-31Ti-11Cr 合金は SUS304、SUS316L よりも耐食性が良く、Ti と同程度の耐食性を有していることが分かった。細胞播種試験、耐食試験の結果から、Cr を添加することによって合金の耐食性が向上し、Fe イオンの溶出が抑えられた結果、合金表面の接着細胞数が増加して生体適合性が向上したといえる。VSM 測定結果から、Cr を添加することによって合金の磁化は下がり、Fe-11Cr-31Ti 合金では室温で常磁性になることが分かった。また、印可磁場 0.1 T におけるキュリー温度 (T_c) を評価した結果、Fe-31.8Ti 合金では T_c が -54、Fe-5Cr-31.5Ti 合金では -75 であることが分かり、Fe-11Cr-31.5Ti 合金では -153 であった。過去の研究結果でも示されているように、この Fe-Ti 合金系は、Ti 添加量により大きく T_c が変化し、1%Ti が変化するだけで T_c が 50 以上も変化する。したがって、合金組成の制御が今後の課題といえる。以上の結果から、Fe-31Ti 合金に 11at% の Cr を添加することで耐食性が向上し、生体適合性が向上したが、室温において非磁性となり、 T_c は体温よりかなり低温となってしまった。

細胞培地中における耐食性を確保して細胞適合性を担保するためには、Fe に 11% 以上の Cr を添加しておく必要があるといえるが、Fe-31.5Ti 合金に 11Cr を添加すると室温よりかなり低い温度でも常磁性の状態となる。体温付近で強磁性 常磁性変化が起きる合金を設計するために、Fe-11Cr をベースとして Ti 添加量を変化させることで T_c の調整を試みた。Fe-11Cr-(20, 25, 27, 31)Ti 合金の XRD 測定の結果、Fe-11Cr-20Ti 合金では $TiFe_2$ 型 Laves 相と $-Fe$ の 2 相共存状態となり、Fe-11Cr-(25, 27)Ti 合金では Laves 相と $Ti_5Cr_8Fe_{16}$ と考えられる化合物の 2 相共存状態となった。印可磁場 0.1 T における磁化の温度依存性を測定した結果、Fe-11Cr-20Ti 合金では T_c は 4.7 となったが、 T_c 以上でも磁化が残ってゼロにならなかった。この原因は、組織中に $-Fe$ 相が存在するためといえる。Fe-11Cr-(25, 27, 31) Ti 合金は T_c 以上で合金の磁化がゼロになったが、 T_c が Fe-11Cr-25Ti 合金では -25.6、Fe-11Cr-27Ti 合金では -31.7 と室温より低温であった。以上の結果から、Fe-11Cr-xTi の合金系において T_c を体温付近に持つてくるためには、Ti 濃度のより詳細な調整が必要であり、さらには第 4 元素の添加を考えていく

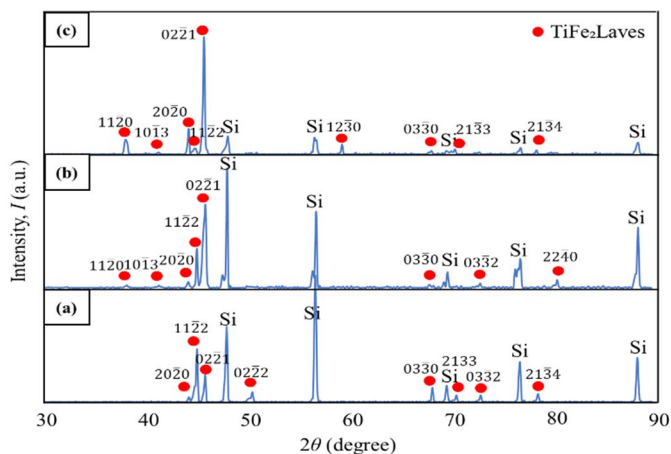


図 2 Fe-Ti-Cr 合金の X 線回折測定結果
(a) Fe-31Ti, (b) Fe-31Ti-5Cr and (c) Fe-31Ti-11Cr alloys.

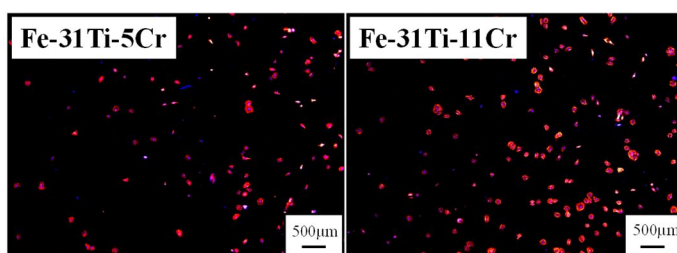


図 3 Fe-31Ti-5Cr と Fe-31Ti-11Cr 合金の細胞適合性試験結果 (蛍光顕微鏡による骨芽細胞染色写真)

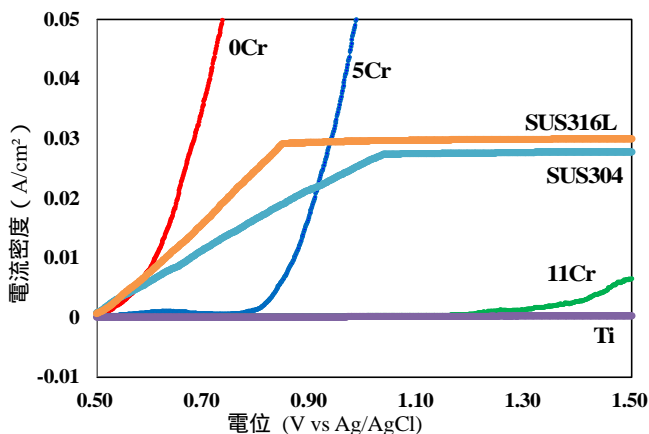


図 4 各種合金の耐食試験結果
(細胞培地中にてアノード分極測定を実施)

必要があるといえ、今後も研究を続けていく。一方、Fe-Zr 2 元系における Tc の Zr 濃度依存性を示した過去の文献から、Fe-Ti 2 元系よりも Tc が高温側に位置するので、Fe-Zr-Cr 合金の Tc は Fe-Ti-Cr 合金よりも高温側に位置する可能性が高い。そこで、Fe-31Ti-xCr 合金の実験結果を参考に、Fe-31Zr に Cr 添加量を変化させた合金を作製して、Tc を測定した結果を図 5 に示す。Fe-31Zr-(11, 18, 24)Cr 合金における Tc は 88 , 14 , -140 であった。この結果から、体温付近に Tc を持つてくるには Cr 濃度を約 16% に設定すればよいといえる。今後、Fe-31Zr-(15, 16, 17)Cr 合金について、Tc 測定や耐食性試験、細胞適合性試験等を行い、生体内で利用でき体温付近で強磁性・常磁性変化が生じる合金の開発を進める予定である。Fe-Ti-Cr 合金ならびに Fe-Zr-Cr 合金において磁気特性ならびに細胞適合性が十分な材料が出来た後に、本研究で計画をしていた動物実験等にも取り組み、感温磁性合金の生体・医療利用を目指す。

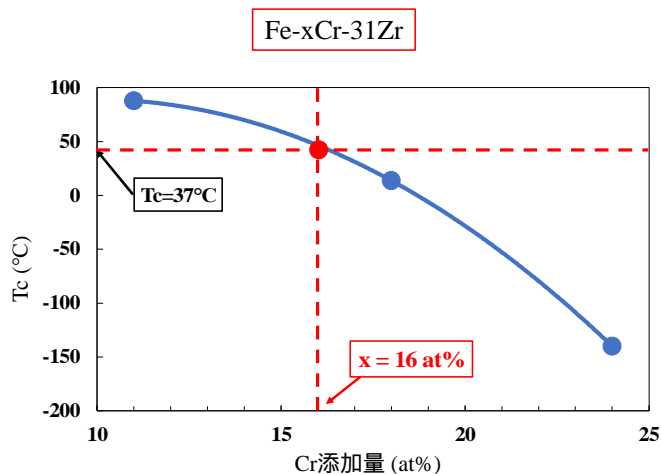


図 5 Fe-31Zr-(11, 18, 24)Cr 合金の Tc 測定結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 未釜雄太、小林千悟、岡野聡
2. 発表標題 Fe基感温磁性合金の生体適合性評価
3. 学会等名 日本金属学会第4分野研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 未釜雄太、小林千悟、岡野聡
2. 発表標題 Fe基感温磁性合金の生体適合性に及ぼすCr添加の影響
3. 学会等名 日本金属学会 春期講演大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 未釜雄太、小林千悟
2. 発表標題 Ti-Fe合金のLaves相構造に及ぼすCr添加の影響
3. 学会等名 軽金属学会 中国四国支部講演大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林千悟
2. 発表標題 低コスト医療・生体用合金の組織制御と細胞適合性
3. 学会等名 第4回流氷セミナー -金属生体材料研究の最前線- (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sengo Kobayashi, Yuriko Kiyokane, Satoshi Okano, Takeaki Okamoto, Tatsuaki Sakamoto
2. 発表標題 Effects of surface treatments of a Ti alloy on the behavior of osteoblast-like cell and on the initial stage of regenerate bone
3. 学会等名 9th Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM9) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	間島 直彦 (Mashima Naohiko) (70274321)	愛媛大学・医学系研究科・寄附講座教授 (16301)	
研究分担者	平岡 耕一 (Hiraoka Koichi) (00199043)	愛媛大学・理工学研究科(工学系)・教授 (16301)	
研究分担者	岡本 威明 (Okamoto Takeaki) (20398431)	愛媛大学・教育学部・准教授 (16301)	