

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23246128

研究課題名(和文) 金属表面における自己組織化ナノホールアレイの生成過程と医療材料への展開

研究課題名(英文) Formation process of self-organized nano-pore arrays on metal substrates and their applications to metallic biomaterials

研究代表者

藤本 慎司 (FUJIMOTO, SHINJI)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70199371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円、(間接経費) 10,950,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では電気化学プロセスによる医療用金属材料表面への自己組織化ナノホールアレイ形成とその生体適合性評価を行った。ナノホールアレイ形成はステンレス鋼、チタン及びコバルト・クロム合金において確認されたが、最適条件は基板の種類により異なった。ナノホールアレイを形成したType316Lステンレス鋼において細胞増殖は平滑なステンレス鋼表面より促進された。また変形により生じる下地金属溶解の抑制に重要な再不働態化能はナノホールアレイ形成により向上した。以上より、ステンレス鋼表面にナノホールアレイを形成することにより、ステンレス鋼の生体適合性と変形時の耐食性を同時に向上させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present work examined the electrochemical formation of self-organized nano-porous structures on metallic biomaterials and evaluates their biocompatibility. Self-organized nano-porous structures were formed on stainless steels, titanium and cobalt-chromium alloy although optimized condition for the pore formation was different depending on the substrates. Cell proliferation was enhanced on porous Type316L stainless steel surfaces compared to a flat stainless steel surface. Repassivation that is one of the most essential factors to suppress metal dissolution induced by deformation was facilitated by the presence of nano-porous structures on stainless steel surface. These findings demonstrated that the formation of self-organized nano-porous structure on stainless steel surface can improve the biocompatibility as well as corrosion resistance during the deformation of stainless steel.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学 材料加工・処理

キーワード：ナノホールアレイ 自己組織化 生体材料 生体適合性 腐食防食 電気化学

1. 研究開始当初の背景

電気化学プロセスによる金属基板表面のポーラス化に関しては、主に酸性水溶液中での陽極酸化によりアルミニウム基板上に形成するポーラスアルミナが半世紀以上前より発展してきた。アルミニウム以外のバルブ金属・合金に関しても、同様の溶液を用いた陽極酸化による表面ポーラス酸化物層形成が検討されていたが、ポーラスアルミナのような規則配列細孔の形成には至っていなかった。

研究代表者らはフッ化物を添加した溶液中で陽極酸化を行うことにより、アルミニウム以外のバルブ金属やその合金表面に規則配列したチューブ状酸化物からなる酸化物ナノチューブ層が形成し、その径や長さを陽極酸化条件の制御によりコントロールできることを報告してきた。バルブ金属の酸化物、特に酸化チタンは様々な機能性を有するため、国内外で追従研究が行われてきた。医療用チタン合金についても、フッ化物を含む溶液中での陽極酸化により酸化物ナノチューブ層の形成が可能であるため、酸化物ナノチューブ層による表面コーディングは医療用金属材料の表面処理として検討され、酸化物ナノチューブ層上での細胞増殖・活性やアパタイト生成能など生体適合性の評価が行われている。

陽極酸化により形成した酸化物ナノチューブ層はその形成に高電圧を必要とし、生体内へ適用されたのちの日常生活で負される動的ひずみによって表面酸化物層が破壊された場合、形状の回復、すなわち機能の回復は不可能であることが懸念される。一方、研究代表者らは有機溶媒中で電気化学条件を最適化することにより、通常の陽極酸化とは異なり、酸化物層がほとんど成長せずに表面がポーラス化する自己組織化メタルナノホールアレイが Type316 ステンレス鋼表面に形成できることを見出した。この自己組織化メタルナノホールアレイの場合、基板表面に形成する酸化物層は非常に薄く、動的ひずみ負荷により酸化物層が破壊された場合でも直ちに修復(再不動態化)することが期待されるため、医療用金属材料の表面形状として、より適しているのではないかと着想した。

2. 研究の目的

自己組織化メタルナノホールアレイの形成に及ぼす電気化学条件及び材料因子の影響を検討することで電気化学プロセスによる金属表面ポーラス化に関する理解を深めるとともに、自己組織化ナノホールアレイを医療用金属材料の新規表面として応用展開するための基礎的検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 自己組織化ナノホールアレイ形成

供試材には Type316 ステンレス鋼など様々

なステンレス鋼、純チタン及びコバルト・クロム合金を用いた。電解プロセスは、電解液にエチレングリコールなど有機溶媒に過塩素酸、過塩素酸ナトリウムなどを添加した溶液を使用し、白金板を対極とした2電極セル内で行った。電圧を0Vから所定の電解処理電圧まで1V/sの掃引速度で増加させ、電解処理電圧に達した後は、その電圧で所定の時間、保持した。プロセス処理後の試料表面形態をSEM、AFMにて評価した。

3.2 生体適合性評価

3.2.1 静的環境での評価

静的環境下での生体適合性評価として、自己組織化ナノホールアレイ形成したステンレス鋼表面における細胞増殖挙動とALP活性の評価を行った。様々な電圧で電解プロセスを行うことにより径・深さが異なる自己組織化ナノホールアレイを形成した Type316L ステンレス鋼表面に -MEM(Minimum Essential Medium)と10 vol.%FBS(Fetal Bovine Serum)からなる培地中でマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞を播種し、一定期間、インキュベータ内で培養した。所定期間培養後、試料表面の細胞にギムザ染色を施し、光学顕微鏡での表面観察により、細胞数を計測した。また各試料表面上で培養された細胞のALP活性測定も併せて行った。測定は、21日間細胞培養したのちに行った。

また、自己組織化ナノホールアレイのDDS(Drug Delivery System)の薬剤担持基板としての評価も行った。薬剤放出モデルとしてウシ血清由来アルブミンを用いた。アルブミンを蒸留水に溶解した溶液中に、自己組織化ナノホールアレイを形成した Type316L ステンレス鋼を所定の期間、浸漬し、その後、溶液から取り出し乾燥させた。この浸漬・乾燥の操作を3回繰り返した。薬剤担持後、試料をリン酸緩衝液(PBS)に浸漬し、溶液中への薬剤放出実験をインキュベータ内で行った。所定の期間経過後、溶液に放出された薬剤量を溶液の吸光度測定にて定量評価を行った。

これら2つの測定は自己組織化ナノホールアレイを形成したステンレス鋼とともに、比較として、機械研磨により表面平滑化したステンレス鋼を用いた。

3.2.2 動的環境での評価

医療用金属材料の動的環境での評価として、変形に伴い金属表面にある酸化物層が破壊された際に生じる下地金属の溶解と酸化物層の修復過程(再不動態化)を調査した。測定方法には、金属の溶解挙動と再不動態化挙動を区別して、検討することができる急速ひずみ電極法を用いた。模擬生体環境のひとつである培地中に浸漬した試料に非常に大きな速度でひずみを印加し、その際に発生した電流を計測した。測定は、細胞を表面に播種した試料についても実施した。

自己組織化ナノホールアレイを形成した試料とともに、医療用金属材料の基礎的な溶解・再不動態化学動の把握のため自己組織化ナノホールアレイを形成しない試料も検討した。

4. 研究成果

4.1 自己組織化ナノホール形成

過塩素酸を加えたエチレングリコール中で Type316 ステンレス鋼の電解を行うと、電流は 1.0 V までは電圧の増加とともに増大し、1.0 V 付近でピークを示した後、電圧を増加させるにしがたい減少した。また電圧一定条件に切り替わった後、電流は保持時間の経過とともに徐々に減衰した。しかし、電圧を 7.0 V 以上まで増加させると、試料表面から気泡が発生するとともに電流は急激に増大して安定に電解を行えなかった。

電解終了後、電解電圧が 2.0 V から 6.0 V の範囲では、表面は金属光沢を示し、さらに SEM 観察及び AFM 測定より図 1 に示すような自己組織化ナノホールアレイの形成が確認され、その径・深さは電解電圧の増加とともに増大することが明らかとなった。一方、電解が安定に行えなかった 7.0 V 以上の電解電圧においても、ナノホールアレイの形成は見られたが、電解電圧が 6.0 V 以下の場合とは異なり、形成したナノホールの径の均一性は非常に低くなった。

本研究で用いた電解プロセスは基本的には電圧増加と電圧保持を組み合わせた方法を用いたが、電圧保持を行わない電圧の掃引だけでも試料表面には自己組織化ナノホールアレイの形成が確認された。すなわちナノホールアレイは電圧掃引中の数十秒というごく短時間で形成することが分かった。無水過塩素酸ナトリウムを添加して同様の測定を行った場合でも、ステンレス鋼表面への自己組織化ナノホールアレイの形成は確認されたが、径・深さは明らかに減少した。したがって、電解プロセスによる自己組織化ナノホールアレイ形成速度には溶液に含まれる水分が著しく影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、水分量が多すぎた場合は、ナノホールの形成は見られず平滑な表面であった。

自己組織化ナノホールの形成はエチレングリコールに硫酸を添加した場合にも確認できた。一方、溶媒をエチレングリコールからその他の溶媒に変えた際にも、過塩素酸の添加により自己組織化ナノホールアレイが形成することが分かった。形成が確認された溶媒はジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、エタノール、酢酸などであり、形成した自己組織化ナノホールアレイの径・深さは溶媒の種類により変化した。

過塩素酸を含むエチレングリコール中での電解プロセスによる自己組織化ナノホー

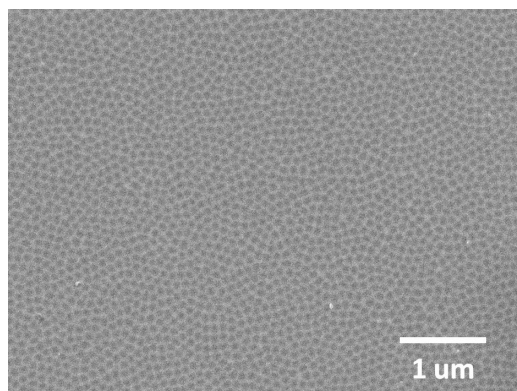


図1 ステンレス鋼ナノホールアレイ表面像の一例。

ルアレイ形成は Type316 ステンレス鋼だけでなく、Fe-11Cr など低クロム鋼や Fe-30Cr-2Mo など様々な組成の Fe-Cr 合金において確認された。

一方、ステンレス鋼と同条件でチタン及びコバルト・クロム合金の電解を行ったところ、チタンでは酸化層のブレイクダウン現象を伴う局所ナノチューブ層形成が、コバルト・クロム合金では試料表面の形態に変化が見られなかった。電気化学プロセスによるナノポーラス酸化層・ナノチューブ酸化層形成には酸化層/基板界面での酸化層形成速度と酸化層/溶液界面での酸化層溶解速度のバランスが重要であることが知られている。したがって、ステンレス鋼と同様の電解条件では、チタンやコバルト・クロム合金に対して、そのバランスが崩れていたためナノホールアレイ形成が見られなかったと考え、溶液温度や溶液組成を調整を行った結果、チタンやコバルト・クロム合金表面においても自己組織化ナノホールアレイの形成が確認できた(図2参照)が、形成する電解条件の範囲はステンレス鋼と比べ、非常に狭いことが分かった。

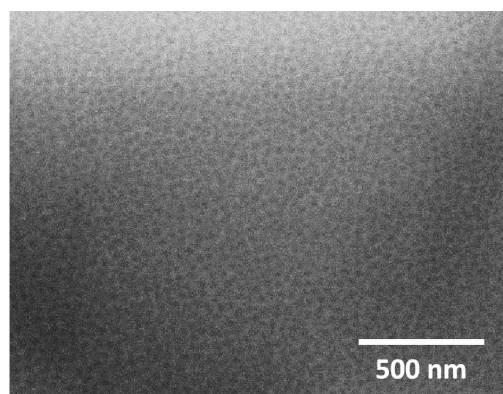


図2 コバルト・クロム合金に形成したナノホールアレイ。

4.2 生体適合性評価

4.2.1 静的環境での評価

電解プロセスを用いて様々なサイズのナノホールアレイを Type316L ステンレス鋼表面に形成し、その表面での細胞増殖を検討した結果、ステンレス鋼表面に自己組織化ナノ

ホールアレイを形成することにより、機械研磨により表面平滑化した試料と比較して、細胞増殖は促進され、ナノホール径が小さいほど細胞増殖は促進される傾向を得た。試料表面に接着した細胞をSEM観察することにより、細胞接着箇所が主にナノホールの縁であったことから、ナノホール径が小さくなることによりナノホールの縁部分の面積が増加し細胞の接着箇所が増加したことが細胞増殖を促進したと考察した。

ステンレス鋼表面の自己組織化ナノホールアレイは細胞の形態にも影響し、自己組織化ナノホールアレイを形成した表面上では、ナノホールアレイを形成していない表面と比較して、細胞の仮足がより多く、より伸展した形態となった。これらの傾向は、陽極酸化により形成する酸化チタンナノチューブ層上でも研究代表者らを含めた様々なグループにより報告されている。またALP測定においても、自己組織化ナノホールアレイを形成したステンレス鋼表面において、ALP活性は有意に向上した。以上の結果より、自己組織化ナノホールアレイは陽極酸化により形成した酸化チタンナノチューブ層と同様に、静的環境下での生体適合性を向上させることが明らかとなった。

自己組織化ナノホールアレイが形成したステンレス鋼の薬剤担持基板としての評価では、ステンレス鋼表面に担持した薬剤の放出速度の測定を行った。その結果、薬剤放出は、試料表面形態によらず、リン酸緩衝液に浸漬初期に起こる急速放出過程とそれに続く徐放過程からなることが分かった。また自己組織化ナノホールアレイを形成した試料では、平滑試料と比較して、急速放出過程での放出量が抑えられ、その後続く徐放過程期間が延び、自己組織化ナノホールアレイは薬剤徐放により適した表面であることが示唆された。しかしながら、自己組織化ナノホールアレイ表面試料の薬剤担持量は平滑試料と同程度であったため、薬剤担持量の増加が今度の課題である。

4.2.2 動的環境での評価

動的環境での評価として、本研究では、金属材料の変形に伴い生じる金属表面酸化層の破壊による下地金属の溶解とその修復過程である再不働態化挙動を検討した。模擬生体環境下でチタンにひずみを付与した場合、図3に示すように、弾性変形領域で電流が発生し始め、塑性変形領域に推移すると電流は急激に増大した。したがって、チタンの場合、ひずみ量がそれほど大きくない弾性領域においても、表面酸化層が下地チタン基板の変形に追従できず破壊し、下地チタン基板の溶解に至ったと考えられる。また塑性変形領域では、変形により下地基板が溶液と接する新生面がより多く形成し、生じた新生面で起こる下地基板の溶解により電流が増大したと考えられる。

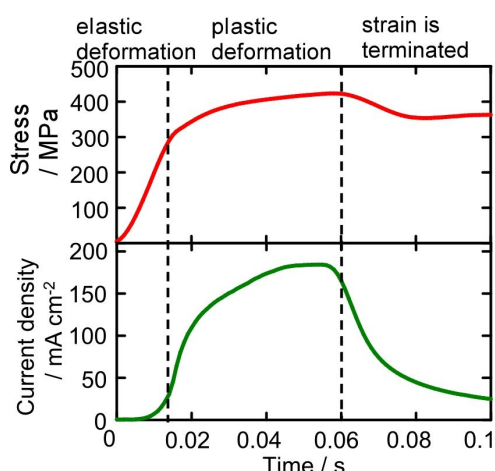


図3 チタンの急速ひずみ試験におけるの応力変化と電流変化。

一方、ステンレス鋼においては、図4に示すように弾性変形領域では電流の発生は見られず、塑性変形領域に入ったところで電流が生じ始め、その後はひずみの増加とともに増大した。生じた電流はチタンと比較して、非常に小さくなった。変形により生じた電流から算出した電気量もステンレス鋼よりチタンにおいて大きいこと、すなわち同じひずみを付与した場合、チタンの方がより溶解する可能性があることが示唆された。またひずみ付与中、すなわち変形中に生じる電気量は、試料表面に細胞が存在する場合、細胞が存在しない場合と同程度であったが、変形を終了した酸化層の修復過程である再不働態化過程で発生する電気量は試料表面に細胞が存在する場合に増加した。すなわち模擬体液中のタンパク質や細胞により再不働態化が阻害されることが明らかとなった。さらに細胞が表面に存在することにより再不働態化阻害は孔食などの局部腐食を誘発しうること、すなわち、動的ひずみが付与される環境では、再不働態化速度が医療用金属材料にとって非常に重要な役割をもつことが分かった。

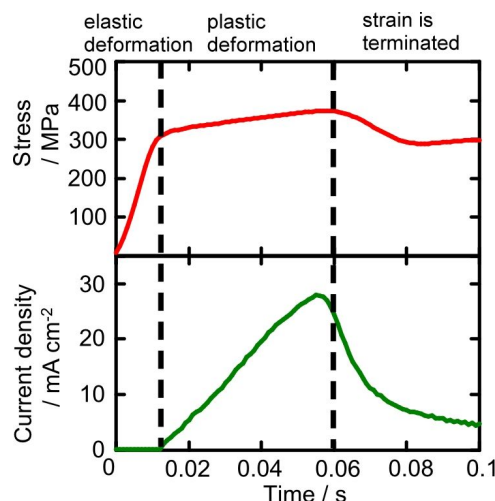


図4 ステンレス鋼の急速ひずみ試験におけるの応力変化と電流変化。

電解プロセスにより、表面に自己組織化ナノホールアレイを形成した Type316L ステンレス鋼では、機械研磨を施した平滑表面のステンレス鋼と比較して、変形中に生じる電気量、再不働態化過程で生じる電気量ともに減少した。特に、再不働態化過程での減少が顕著であった。すなわち、電解プロセスによるステンレス鋼表面への自己組織化ナノホールアレイ形成により、ステンレス鋼の再不働態化速度を著しく増加させることが明らかとなった。以上より、Type316L ステンレス鋼表面に自己組織化ナノホールアレイを形成することにより、ステンレス鋼の生体適合性を向上させるだけでなく、再不働態化速度の増大によりステンレス鋼インプラントが変形した際に生じる溶解量も抑制し動的環境下での耐食性も向上させうることが明らかとなった。

以上の結果は、動的ひずみが単発で試料に印加された際の結果であるが、通常は歩行などの運動の周期に対応する繰り返しひずみが長期に渡って繰り返し付与される。その際の医療用金属材料の信頼性評価のために、細胞培養した模擬生体環境下での長期に渡りひずみを付与する繰り返し荷重試験を行えるように電気化学システムを改良し、今後の長期の信頼性評価試験のための礎を確立した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Kotaro Doi, Sayaka Miyabe, Shinji Fujimoto, "Breakdown of Passive Films and Repassivation of Ti-6Al-4V Alloy with Rapid Elongation in Simulated Body Fluid including Osteoblast-like Cells", Journal of the Electrochemical Society, 160 (2013) C576-C580.
10.1149/2.085311jes

Hiroaki Tsuchiya, Takahiro Suzumura, Yoshiyuki Terada, Shinji Fujimoto, "Formation of self-organized pores on type 316 stainless steel in organic solvent", Electrochimica Acta, 82 (2012) 333-338.
10.1016/j.electacta.2012.06.048

[学会発表](計 22 件)

藤永悠志、宮部さやか、土谷博昭、藤本慎司、"ステンレス鋼ナノホールアレイを用いた薬剤徐放システムの検討"、日本金属学会、2014年3月21~23日、東京工業大学

Kotaro Doi, Sayaka Miyabe, Shinji Fujimoto, "Repassivation on Type 316L

Stainless Steel with Cyclic Deformation in Simulated Body Fluid including Cells", 224th Meeting of the Electrochemical Society, 27th October 2013~1st November 2013, The Hilton San Francisco Hotel

土井康太郎、宮部さやか、藤本慎司、"模擬体液中で繰返し応力を付与した SUS316L ステンレス鋼の溶解・再不働態化挙動"、日本金属学会、2013年9月17~19日、金沢大学

Kotaro Doi, Sayaka Miyabe, Shinji Fujimoto, "Metal Dissolution and Repassivation Behavior of Ti6Al4V Alloy during Rapid Straining in Simulated Body Fluid", 222nd Meeting of the Electrochemical Society, 7th October 2012~12th October 2012, The Hilton San Francisco Hotel

中尾拓哉、末廣隆史、宮部さやか、土谷博昭、藤本慎司、"ナノホール構造を付与した 316L ステンレス鋼の生体適合性"、日本金属学会、2012年9月17~19日、愛媛大学

土井康太郎、宮部さやか、土谷博昭、藤本慎司、"ナノホール表面を有する SUS316L 鋼の急速ひずみに伴う変形・溶解挙動"、日本金属学会、2012年9月17~19日、愛媛大学

鈴村貴大、土谷博昭、藤本慎司、"電解処理によるステンレス鋼表面ナノポーラス化に及ぼす電気化学条件の影響"、電気化学学会、2011年9月7~9日、朱鷺メッセ

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

(3)連携研究者

廣本 祥子 (HIROMOTO Sachiko)
独立行政法人物質・材料研究機構
研究者番号：00343880