



Title	バイオメカノケミカル環境における医療用金属材料の電気化学挙動
Author(s)	土井, 康太郎
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52205
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

バイオメカノケミカル環境における
医療用金属材料の電気化学挙動

土井 康太郎

2014年12月

大阪大学大学院工学研究科

マテリアル生産科学専攻

目次

第 1 章 序論

1.1 医療用金属材料	1
1.2 医療用金属材料を用いることで生じる問題点	2
1.2.1 金属アレルギー	2
1.2.2 腐食	3
1.2.3 力学的破壊	4
1.3 生体内における医療用金属材料の長期信頼性の従来評価	4
1.4 バイオメカノケミカル環境	7
1.5 バイオメカノケミカル環境における医療用金属材料の評価法	9
1.5.1 急速ひずみ電極試験法	9
1.5.2 繰返し応力試験法（腐食疲労試験法）	10
1.6 本論文の構成	10
参考文献	12

第 2 章 模擬生体環境における種々の金属材料の急速ひずみ付与に伴う溶解・再不働態化

2.1 緒言	20
2.2 実験方法	21
2.2.1 供試材	21
2.2.2 試験溶液	22
2.2.3 急速ひずみ電極試験	22

2.3 結果および考察	24
2.3.1 模擬体液中で急速変形させた種々の金属材料の アノード電流変化	24
2.3.2 模擬体液中で急速変形させた種々の金属材料の 再不働態化	30
2.4 結言	33
参考文献	34

第3章 タンパク質および細胞を含んだ模擬生体環境で急速ひずみを付与した Ti-6Al-4V 合金の不働態皮膜破壊と再不働態化

3.1 緒言	37
3.2 実験方法	38
3.2.1 供試材	38
3.2.2 急速ひずみ電極試験	39
3.2.3 統計学的処理	40
3.3 結果および考察	41
3.3.1 ひずみ付与中およびひずみ付与終了後のアノード電流変化	41
3.3.2 材料上に接着したタンパク質、細胞が溶解および再不働態化に及ぼす影響	43
3.3.3 再不働態化の極端な阻害および局部腐食の発生	45
3.4 結言	50
参考文献	51

第 4 章 タンパク質および細胞を含んだ模擬体液中で繰返し応力を付与した Type 316L ステンレス鋼の溶解、再不働態化

4.1 緒言	55
4.2 実験方法	56
4.2.1 供試材	56
4.2.2 模擬体液中における繰返し応力付与	57
4.2.3 統計学的処理	58
4.3 結果および考察	58
4.3.1 模擬体液中で繰返し応力を付与した際の電気化学挙動	58
4.3.2 材料表面に接着したタンパク質や細胞が繰返し応力付与時の溶解・再不働態化に及ぼす影響	63
4.4 結言	65
参考文献	66

第 5 章 タンパク質および細胞を含んだ模擬体液中で繰返し応力を付与した Ti-6Al-4V 合金の長期信頼性

5.1 緒言	69
5.2 実験方法	71
5.2.1 供試材	71
5.2.2 繰返し応力付与（腐食疲労試験）	72
5.3 結果および考察	73
5.3.1 繰返し変形による金属溶解と再不働態化	73
5.3.2 模擬体液中における Ti-6Al-4V 合金の腐食疲労寿命	78
5.4 結言	83

参考文献	85
------	----

第6章 模擬生体環境で Type 316L ステンレス鋼に発生した疲労き裂の結晶学的解析

6.1 緒言	89
6.2 実験方法	91
6.2.1 供試材	91
6.2.2 繰返し応力付与試験	91
6.2.3 電子線後方散乱回折法 (EBSD) を用いた結晶方位解析	92
6.2.3.1 EBSD の概要	92
6.2.3.2 EBSD 測定	92
6.3 結果および考察	93
6.3.1 各繰返し応力環境におけるき裂の発生頻度	93
6.3.2 き裂の発生数と結晶粒のすべりやすさの関係	94
6.3.3 き裂発生とすべり方向の関係	100
6.4 結言	104
参考文献	105

第7章 Type 316L ステンレス鋼表面への自己組織化ナノホール構造の生成による細胞親和性向上と金属溶解抑制

7.1 緒言	107
7.2 実験方法	108
7.2.1 ナノホール表面の生成	108
7.2.2 細胞増殖試験	109
7.2.3 急速ひずみ電極試験	109
7.2.4 疲労試験	110

7.2.5 統計学的処理	110
7.3 結果および考察	111
7.3.1 ナノホール表面における細胞挙動	111
7.3.2 ナノホール表面を生成した Type 316L ステンレス 鋼の急速ひずみ付与に伴う溶解・再不働態化	112
7.3.3 ナノホール表面を生成した Type 316L ステンレス 鋼の疲労強度	116
7.4 結言	117
参考文献	119
第 8 章 総括	120

第1章 序論

1.1 医療用金属材料

老化や疾病、事故により失われたり、あるいは低下した身体機能の再建のため、多くの材料が生体材料として医療に活かされている。生体材料とは、「生体組織に接触して用いられる治療用材料」と定義されている^[1]。高齢者人口の増加に伴い^[2]、医療の高度化が推進されるようになり、生体材料に関する研究の重要性は増すばかりである。

現在、生体材料として用いられている材料は、金属・合金やセラミックス、高分子である。セラミックスや高分子は優れた生体組織適合性や生体機能性を有しており、多くの医療用金属材料がセラミックスや高分子で代替されつつある。しかし、セラミックスや高分子は破壊靱性などの力学特性の面で金属材料に劣っているため、体内埋入型医療用デバイス（インプラント）に限れば80%以上が金属材料を用いて作製されている^[3]。セラミックスや高分子が使用可能なデバイスの多くはすでにこれらの材料に置換されているため、現在金属材料が使用されているデバイスを、今後セラミックスや高分子で置換することは難しい。したがって、金属材料がこれからも医療分野において使用され続けることは確実である。

医療用金属材料には純TiやTi合金、Co-Cr合金、ステンレス鋼などの表面に薄い酸化皮膜（不働態皮膜、第1章1.2.2）を形成する金属・合金や、AuやAgなどの貴金属およびその合金が使用されている^[4-6]。さらに最近では、生体内で分解し、骨形成後には生体内に吸収されるMg合金の開発も進められている^[7]。これらの材料は、使用部位において求められる特性に応じて選択されている。例えば、純TiおよびTi-6Al-4V合金などのTi合金は優れた骨親和性から、骨と接触する人工歯根や人工関節のステム部に^[8]、Co-Cr合金は耐摩耗性に優れているため人工関節の骨頭などの摺動部に^[9]、またType 316Lステンレス鋼は安価であり、優れた延性および加工性を持つことからステントや髄内釘などの体内埋入型デバイス、

さらにはピンセットや鉗、メスなどの医療器具にも多く用いられている^[10]。

一方、Au や Ag, Pt などの貴金属およびその合金は铸造性と展延性に富み、さらに意匠性にも優れるためクラウンやインレーなどの歯科補綴材として使用されている^[11]。

1.2 医療用金属材料を用いることで生じる問題点

生体材料として使用される金属材料には、可能な限り生体に悪影響を及ぼさないことが必須条件として求められるが、優れた力学特性、耐食性、生体適合性を有する金属材料を選定しても、長期にわたる埋入の際には様々な問題が生じ得る。以下に、生体内に金属材料を埋入した際に生じ得る問題を概説する。

1.2.1 金属アレルギー

体内に埋入された医療用金属材料やその摩耗粉が体液と接触すると金属イオンが溶出し金属アレルギーを引き起こすことがある。各種金属の毒性の高さは、金属材料が表面に形成する酸化物の耐食性に大きく左右されるが、パッチテストの結果ではおおよそ Ni, Hg, Co, Pd, Cr, Sn, Mo, Pt, Au, Cu, In, Zn, Ir, V, Mn, Ti, Fe, Al, Ab, Ba, Ag, Nb, Rh の順になると報告されている^[12]。このうち、毒性の高い金属とされている Ni, Co, Cr は医療用金属材料として広く用いられている Co-Cr 合金、ステンレス鋼の主成分である。これらの金属イオンは生体にとって必須であり、生体中にある程度の量が必要であるが、ほとんどが経口的に摂取されており金属材料から補う必要は全くない。さらに、過度の金属イオン濃度の上昇は細胞の増殖を阻害し、形態にも影響を与え、やがて死滅させる^[13]。金属アレルギーの予防法、治療法は未だ確立されておらず、対症療法に頼っているのが現状である^[13]。

1.2.2 腐食

インプラント材として使用される金属材料は、表面に不働態皮膜と呼ばれる厚さ数 nm の緻密で安定な酸化皮膜を形成する^[15]。例えば、純 Ti および Ti 合金では不働態皮膜の主成分は Ti 酸化物および Ti 水酸化物であり^[16]、ステンレス鋼や Co-Cr 合金では主に Cr 酸化物および Cr 水酸化物である^[17, 18]。不働態皮膜は局部腐食の起点となるピットの発生や材料変形により破壊されても、ただちに下地金属が酸化することで自己再生する。これを再不働態化と呼ぶ^[19]。再不働態化の容易さ、および再不働態化により再形成した不働態皮膜の質は耐食性に直結するため、生体内におけるインプラント材の再不働態化挙動を検討することは非常に重要である。

不働態皮膜は電気化学的に安定であり、下地金属が体液などの水溶液と接触することを防ぐため、インプラント材は非常に良好な耐食性を有する。不働態皮膜は下地金属が腐食する水溶液環境中で自発的に生成し成長するため、腐食環境である生体内においても良好な耐食性の維持が可能である^[20]。しかし、生体内においては様々な外的要因により不働態皮膜が破壊され、水溶液/下地金属界面で電気化学的反応により金属溶解が生じて材料は腐食し得る。例えば、インプラント材が接する体液は、pH7.0~7.4 の緩衝作用を持った中性水溶液であり比較的腐食の生じにくい環境であるが、海水の 1/3~1/2 程度の塩化物イオンを含んでいるため孔食が発生・成長する^[21]。さらに、生体環境特有の要素として、アミノ酸や糖などの分子量の小さな有機物やタンパク質や細胞が存在する。特に、タンパク質や細胞などの高分子が材料表面に接着することで、高分子と材料表面の間がすき間腐食環境となり、局部腐食が発生する事例が報告されている^[22]。加えて、白血球やマクロファージは細菌などを取り込み分解する過程で活性酸素を生成し殺菌する生体防御メカニズムを有する^[23]。活性酸素とは過酸化水素のことであり、酸化剤として働き金属材料の腐食を促進させる。

1.2.3 力学的破壊

金属材料はセラミックスや高分子材料と比較して引張強度や靱性などの機械的性質に優れている。よって、静的荷重下でインプラント材が破損することは非常にまれである。しかし、体内では、歩行などの運動により常に動的荷重が付与されるため、疲労、摩耗、フレッキング、曲げ、引張圧縮などによる破損が生じる^[24]。また、力学的負荷は不働態皮膜の破壊にもつながるため、相乗的に腐食を誘発する。この際、付与される動的荷重はほとんどが金属材料の弾性限以下の繰返し応力であるため、インプラント材の力学的な破損原因のほとんどが疲労、フレッキング疲労と腐食の組み合わせである腐食疲労、フレッキング腐食疲労である。

1.3 生体内における医療用金属材料の長期信頼性の従来評価

1.2 節で述べた金属材料を生体に埋入した際の問題点、すなわちインプラント材の耐久性について古くからさまざまな検討が行われてきた。まず、1967 年に Greene らによって、実験用のイヌの体内に電極を差し込んだ後電流を印加し、電位変化と重量変化を測定することで *in vivo* での電気化学測定が初めて行われている^[25]。この研究を機に、1960 年代後半から 1970 年代まで *in vivo* および *in vitro* で医療用金属材料の耐食性の評価が電気化学的に行われるようになった。Revie と Greene は 304 ステンレス鋼と純 Ti をそれぞれ実験用のイヌおよびウサギの体内 (*in vivo*) と生理食塩水中 (*in vitro*) で定電位分極し、得られた電流変化から *in vivo* と *in vitro* の腐食速度の差を調査した。その結果、304 ステンレス鋼では *in vivo* と *in vitro* で腐食速度に大きな差は見られないが、純 Ti では *in vitro* と比較して *in vivo* で大きく腐食が抑制されることを明らかにした^[26]。さらに 1970 年代、同グループや Galante, Lemons らによって滅菌したインプラント材や表面形状を変化させたインプラント材の耐食性、応力腐食割れや孔食の発生条件など、金属材料を体内へ埋入する際に生じるであろう腐食の基礎的知見が報告された^[27-30]。いずれも

研究も実験用のイヌやウサギを用い、*in vivo*で行われているが、生体内環境のどのような要素が耐食性に影響を及ぼしているか、すなわち耐食性に寄与する要素が力学的な要素、生物学的な要素、電気化学的な要素のいずれであるのか、もしくはこれらの要素の複合によるものなのかというところまでは述べられていない。

1970年代後半から1980年代には、*in vivo*および条件を簡略化した*in vitro*での両方の実験を行い、お互いの結果を比較することで生体内における電気化学的挙動を体系的にまとめた研究が行われるようになった^[31-33]。Escuderoらはアルミナを被覆した316Lステンレス鋼を実験用イヌに埋入し、60日間に及ぶ長期間の腐食電位変化およびアノード電流変化を測定した。その結果、生体内では腐食電位は-350~100 mV、アノード電流は約 $0.1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^2$ でほぼ一定であり、Hanks液を用いた実験でも同様の結果が得られており、急激な腐食が生じていないことを報告している^[32]。さらにNakayamaらは実験用ウサギに3電極（参照電極、対極、試料極）を埋入し、腐食電位付近から純Ti、Ti合金、316L鋼、Co-Cr合金のアノード動電位分極試験を行った。また比較として、リンゲル液中で同様の試験を行った。ウサギ体内とリンゲル液中で同様の分極曲線が得られたが、リンゲル液中で行った試験はよい再現性が得られたのに対し、ウサギ体内では少しバラつきが認められた。これは、生体内の生物学的環境（体液やタンパク質）が試験ごとに一定でないためと考えられる^[33]。

1970年代後半からは生体内を複合環境として捉える研究が行われ始めた^[34-37]。Cornetらは模擬体液中における316Lステンレス鋼、Co-Cr合金、Ti-6Al-4V合金の長期信頼性を腐食試験および腐食疲労試験を行うことにより検討した^[38]。また、Bundyらはすでに構造材料の腐食研究として行われていた、水溶液環境での力学試験における電気化学的測定を生体材料研究に応用し、定荷重下における316Lステンレス鋼の腐食電位変化を測定した^[39]。そして、静的応力下では不動態皮膜の再生が抑制され、腐食が促進されることを見出した。さらに、Tairaらは316Lステンレス鋼の腐食疲労試験中の定電位分極にともなうアノード電流の変化を測

定した^[40]。その結果、繰返し応力下では孔食電位よりもはるかに卑な電位でアノード電流の急増が確認され、アノード電流の急増が始まるまでの時間は付与した最大応力が大きいほど短くなった。これらの研究により、金属材料の耐食性は水溶液と応力の複合により著しく低下することや、金属材料の再不働態化特性が耐久性に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、これらの研究で用いられた水溶液（模擬体液）は、0.9%生理食塩水、リンゲル液（塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム濃度を体液と等しくした模擬体液）など、生体内の塩化物濃度のみを模擬したものであり、アミノ酸、タンパク質、細胞などの生体由来の有機物が金属材料に及ぼす影響は全く考慮されていない。

1990年代以降には、これまでの金属材料の耐食性評価のみならず高耐食性を有する新たな合金や表面処理法の開発、生体適合性を高める表面修飾の研究が盛んに行われるようになった^[41-45]。また、インプラント材の高耐食性を担う不働態皮膜の構造および機能の検討が行われるようになった。構造解析についてはX線光電子分光法（XPS）を、機能については不働態皮膜が半導体的性質を有することからインピーダンス測定をそれぞれ行うことでこれまで明らかにされてこなかった生体環境での不働態皮膜の新たな性質が明らかとなった^[46-49]。

さらに、同時期よりフレッキング腐食疲労や摩耗腐食などの新たな金属変形と腐食の関係が検討されるようになった。Narayananらは純TiおよびTi-6Al-4V合金のリンゲル液中におけるフレッキング腐食挙動を検討した。そして、フレッキングが生じている間は純Ti、Ti-6Al-4V合金のいずれも腐食電位が無応力時と比較して卑化し腐食が促進されていること、フレッキングの周波数が増加するほど腐食電位の卑化は抑制されることを見出した^[50, 51]。また、Vieiraらは純Tiの模擬体液における摩耗腐食挙動を検討した^[52]。さらにLeinenbachらは応力振幅が変化する繰返し応力下での純Ti、Ti合金の腐食疲労特性を調査した^[53, 54]。このように生体環境におけるインプラント材の耐食、耐久性の検討が多様に行われる中で、2000年代後半からは複合環境において生体由来の有機物（アミノ酸や

タンパク質、細胞など) が金属材料の劣化に及ぼす影響が検討され始めた。Maruyama らは、クエン酸を含んだ模擬体液中でステンレス鋼のフレッティング疲労特性を調査し、クエン酸がフレッティング疲労寿命を低下させることを見出した^[55]。また、Mischler らはタンパク質を含んだ模擬体液中で Ti-6Al-4V 合金の摩耗特性を調査し、タンパク質の中でも特にコラーゲンが摩耗特性を低下させることを報告した^[56]。しかしこれまでの研究において、タンパク質、細胞を含んだ限りなく *in vivo* に近い環境で溶液を長期間劣化させることなく医療用金属材料の耐食・耐久性を検討した例は国内外を問わず報告されていない。

1.4 バイオメカノケミカル環境

1.2.2 項で述べたとおり、医療用金属材料の高耐食性は不働態皮膜により維持されている。しかし、Fig. 1-1 に示すように、生体内環境では主に 2 種類の要因により不働態皮膜は破壊される。1 つは体液に含まれる塩化物イオンとタンパク質・細胞などの生物学的要因^[57,58]、もう 1 つは荷重による変形や疲労、磨耗などの力学的要因である^[59,60]。不働態皮膜が破壊されることで暴露した新生面から金属溶解が生じ、溶出した金属イオンには生体にとって一定の濃度を超えると有毒性を

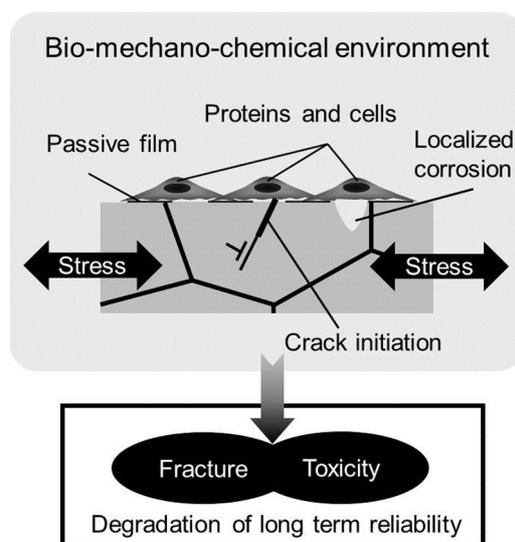


Fig. 1-1 Model of Bio-Mechano-Chemical Environment.

発揮するものも含まれるため、不働態皮膜破壊による炎症の惹起が懸念される^[61]。さらに、2つの環境の複合的な作用により、き裂や局部腐食が生じ、金属材料の劣化に繋がる。また、不働態皮膜破壊後にはただちに再不働態化による自己修復が生じ金属溶解は抑制されるが、溶液の組成やpH、不働態皮膜破壊時の電位により再不働態化挙動が変化することが報告されている^[62,63]。したがって、生体内における金属材料評価には、これら2つの環境をバイオメカノケミカル環境として複合的に考慮することが必須である。バイオメカノケミカル環境で生じる金属材料劣化メカニズムの説明として、腐食疲労を例として挙げる。腐食疲労では応力繰返し数の増加とともに材料表面での微小な塑性変形が蓄積し、き裂が発生する。き裂内部の不働態皮膜はき裂進展とともに破壊されるため、き裂内部は腐食が促進される環境となる。また、応力繰返し数の増加とともに生じる塑性変形時にも不働態皮膜は破壊されるので、腐食がき裂発生 of 要因となることも考えられる。このような腐食疲労発生 of メカニズムに、生体内ではさらにタンパク質や細胞などの生物学的要因が加わる。タンパク質や細胞は静的環境においてすき間腐食環境を形成したり、代謝によって酸化剤として腐食を促進させる過酸化水素を生じることがあるが、これらが応力下でインプラント材 of 長期信頼性に及ぼす影響は国内外問わずほとんど明らかにされていない。その理由の一つとして、実験が困難であることが挙げられる。バイオメカノケミカル環境における生体金属材料 of 評価で、実験環境を実環境に近づけるため、タンパク質や細胞を用いることが望まれるが、長期間試料に応力を付与し続ける試験ではコンタミネーション(雑菌混入)が避けられないため、細胞培養環境での金属材料 of 腐食疲労強度 of 検討は非常に困難で、溶液には0.9% NaCl やリンゲル液、ハンクス液などの体内 of 無機イオンのみを模擬した溶液を用いるのが一般的である。他にも、水溶液環境における金属材料 of 破壊 of 検討には、不働態皮膜破壊と再不働態化 of 検討を行うことが重要であるが、従来、酸化物 of 自己修復機能(再不働態化) of 評価法として用いられてきたマイクロインデンテーション法^[64]やスクラッチ法^[65,66]は、不働態皮膜破壊

時の金属溶解と再不働態化を混同して観測している。すなわち、観測される溶解速度は、新生面曝露により生じる金属溶解挙動を再不働態化挙動により抑制された値となり、新生面が生じてから再不働態化が開始されるまでに生じる溶解速度を捉えきれていない。また、スクラッチ試験法や磨耗試験法は材料の弾性変形、塑性変形に伴う不働態皮膜破壊挙動の観測が困難であり、一方、マイクロインデンテーション試験法では実際に曝露した新生面面積の計測が困難であるなど、バイオメカノケミカル環境における金属材料の長期信頼性評価には数々の問題点が存在する。

1.5 バイオメカノケミカル環境における医療用金属材料の評価法

バイオメカノケミカル環境での医療用金属材料の長期信頼性評価における数々の問題点を解決するため本研究では2種類の試験法を用いた。

1.5.1 急速ひずみ電極試験法

模擬生体環境における金属材料の電気化学挙動の基礎的知見を得るために急速ひずみ電極試験法を用いた。これにより、金属材料が体内に埋入された際の材料変形と金属溶解、再不働態化および体内のタンパク質や細胞の関係を電気化学的に評価することが可能となった。急速ひずみ電極試験法では材料に引張ひずみを付与することで、弾性変形時、塑性変形時における不働態皮膜破壊挙動をアノード電流の経時変化として捉え、付与するひずみを急速にすることで再不働態化が開始するまでの溶解挙動を捉えている。この急速ひずみ電極試験法は1980年代より高温高圧下でのステンレス鋼の不働態皮膜破壊と再不働態化の検討および応力腐食割れの検討に用いられてきた^[67,68]。さらに、近年では、応力腐食割れの検討のみならず、生体材料の耐食性評価に急速ひずみ電極試験法を世界で始めて導入し、これまで純TiおよびTi合金、超弾性を示すNiTi合金の変形時における電気化学挙動を解明してきた^[69,70]。しかし、いずれの研究においてもタンパク質を含

む模擬体液中や細胞の存在下などの実際の生体環境に近い模擬生体環境での検討は不十分である。

1.5.2 繰返し応力試験法（腐食疲労試験法）

模擬生体環境において弾性限以下の繰返し応力を付与された医療用金属材料の電気化学挙動を検討するために模擬体液中で繰返し応力試験を行った。また、破断に至るまで繰返し応力を付与することで、医療用金属材料の腐食疲労特性も評価した。タンパク質や細胞などの有機物を含んだ環境で長期的な試験を行う際には、コンタミネーションを防止する必要がある。そこで、溶液である模擬体液および引張試験片を内包する電気化学セルをガラス筒および PTFE で作製することでオートクレーブ滅菌が可能であるようにし、模擬体液は循環することで所定時間経過後、交換できるようにしている。また、電気化学セル内は外気と完全に遮断し、温度および CO₂, O₂, N₂ 濃度を生体内と同様の条件に保持している。これらにより、電気化学セル内はインキュベータ(培養器)内と同様の環境となり、長期間応力を付与しながらの細胞培養が可能となった^[71](第 4 章)。

1.6 本論文の構成

本論文は以下に示す全 8 章により構成されている。

第 1 章は序論であり、インプラント材として用いられている金属材料の特徴と問題点、これまでに行われてきた力学的・電気化学的な評価について述べた。そして、生体内をバイオメカノケミカル環境という複合環境として捉え、タンパク質や細胞を含んだ模擬生体環境で力学的負荷を付与した際の医療用金属材料の電気化学挙動の検討の意義について述べた。

第 2 章では、不働態皮膜破壊による金属溶解および再不働態化に関する基礎的な知見を得るのに適した手法である急速ひずみ電極試験法を用いて、模擬生体環境における医療用金属材料の変形に際しての電気化学的挙動を検討した。供試材

は現在、医療用金属材料として広く使用されている Ti, Ti 合金, Co-Cr 合金, ステンレス鋼とし、それぞれの金属溶解、再不働態化の違いを比較した。

第 3 章では、タンパク質および細胞を表面に接着させた Ti-6Al-4V 合金に模擬生体環境で急速ひずみを付与することで、タンパク質や細胞などの生体由来の有機物が、材料変形時の金属溶解、再不働態化に及ぼす影響を検討した。

第 4 章では、長期間の試験中に模擬体液がコンタミネーション(雑菌混入)を生じないように独自に開発したシステムを用い、実際に生体内で付与されるであろう弾性限以下の繰返し応力を付与した際の Type 316L ステンレス鋼の電気化学的挙動を検討した。

第 5 章では、第 3 章で得た Ti-6Al-4V 合金の変形に際した電気化学的挙動の基礎的な知見をもとに、第 4 章で開発したシステムを用いて、生体内における Ti-6Al-4V 合金の腐食疲労挙動を検討した。その際、疲労き裂の発生を電気化学的測定により捉え、腐食疲労寿命をき裂の発生までの時間とき裂進展に費やした時間に分割することで、タンパク質や細胞がき裂の発生・進展それぞれに及ぼす影響を明らかにした。

第 6 章では、これまでの電気化学的測定に加え、結晶学的検討を行うことで、体液中に含まれるタンパク質や試料表面に接着した細胞が疲労き裂の発生に及ぼす影響を、結晶粒のすべり系と金属溶解の観点から検討した。

第 7 章では、これまでに得られた知見から、生体内での長期信頼性および生体適合性を向上させる新規表面処理法として、陽極酸化法により得られるナノホール表面を提案した。この際、疲労強度向上の検討に繰返し応力付与を、再不働態化速度向上の検討に急速ひずみ電極試験を、生体適合性向上の検討に様々な表面粗さを有する試料上での細胞増殖の検討をそれぞれ行った。

第 8 章では、本研究により得られた知見および成果を総括した。

参考文献

- [1] 角田 方衛、筏 義人、立石 哲也 編著: 金属系バイオマテリアルの基礎と応用、アイピーシー、(2000).
- [2] 総務省: 平成 22 年国勢調査、(2011).
- [3] 埜 隆夫 編: 医療用金属材料概論、日本金属学会、(2010).
- [4] T. Narushima: Surface Modification for Improving Biocompatibility of Titanium Materials with Bone, *Journal of Japan Institute of Light Metals*, **58**(11), 577-582 (2008).
- [5] B.R. Levine, S. Sporer, R.A. Poggie, C.J. Della Valle, J.J. Jacobs: Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopedic surgery, *Biomaterials*, **27**(27), 4671-4681 (2006).
- [6] 埜 隆夫、米山 隆之 共著: 金属バイオマテリアル、コロナ社、(2007).
- [7] S. Hiromoto, M. Tomozawa: Hydroxyapatite coating of AZ31 magnesium alloy by a solution treatment and its corrosion behavior in NaCl solution, *Surface and Coatings Technology*, **205**(19), 4711-4719 (2011).
- [8] F. Yildiz, A.F. Yetim, A. Alasaran, I. Efeoglu: Wear and corrosion behaviour of various surface treated medical grade titanium alloy in bio-simulated environment, *Wear*, **267**(5-8), 695-701 (2009).
- [9] Y. Yan, A. Neville, D. Dowson: Biotribocorrosion of CoCrMo orthopaedic implant materials—Assessing the formation and effect of the biofilm, *Tribology International*, **40**(10-12), 1492-1499 (2007).
- [10] R.D.K. Misra, W.W. Thein-Han, S.A. Mali, M.C. Somani, L.P. Karjalainen: Cellular activity of bioactive nanograined/ultrafine-grained materials, *Acta Biomaterialia*, **6**(7), 2826-2835 (2010).

- [11] P. Churnjitapirom, S. Goto, H. Ogura: Effects of Heat Treatments and Sn, Ga and In Additives on Mechanical Properties of 35Ag-30Pd-20Au-15Cu Alloy, *Dental Materials Journal*, **23**(4), 474-489 (2004).
- [12] 松村光明: 金属アレルギーの治療の流れとメタルフリー修復の現状、日本歯科医師会雑誌、**60**(8), 732-745 (2007).
- [13] N.J. Hallab, S. Anderson, M. Caicedo, A. Brasher, K. Mikecz, J. J. Jacobs: Effects of soluble metals on human peri-implant cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **74A**(1) 124-140 (2005).
- [14] K. Jomova, M. Valko: Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, **283**(2-3), 65-87 (2011).
- [15] 伊藤 伍郎 著: 腐食科学と防食技術、コロナ社、(1969).
- [16] A.W.E. Hodgson, Y. Mueller, D. Forster, S. Virtanen: Electrochemical characterization of passive films on Ti alloys under simulated biological conditions, *Electrochimica Acta*, **47**(12), 1913-1923 (2002).
- [17] M.F. Montemor, M.G.S. Ferreira, N.E. Hakiki, M. Da Cunha Belo: Chemical composition and electronic structure of the oxide films formed on 316L stainless steel and nickel based alloys in high temperature aqueous environments, *Corrosion Science*, **42**(9), 1635-1650 (2000).
- [18] N.E. Hakiki, S. Boudin, B. Rondot, M. Da Cunha Belo: The electronic structure of passive films formed on stainless steels, *Corrosion Science*, **37**(11), 1809-1822 (1995).
- [19] G.T. Burstein, P.I. Marshall: Growth of passivating films on scratched 304L stainless steel in alkaline solution, *Corrosion Science*, **23**(2), 125-137 (1983).
- [20] 杉本 克久 著: 金属腐食工学、内田老鶴圃、(2009).
- [21] D.B. Cheek: Extracellular volume: its structure and measurement and the influence of age and disease, *The Journal of Pediatrics*, **58**(1), 103-125 (1961).

- [22] S. Hiromoto, T. Hanawa: Electrochemical properties of 316L stainless steel with culturing L929 fibroblasts, *Journal of The Royal Society Interface*, **3**(9), 495-505 (2006).
- [23] A. Montague, K. Merritt, S. Brown J. Payer: Effects of Ca and H₂O₂ added to RPMI on the fretting corrosion of Ti6Al4V, *Journal of Biomedical Materials Research*, **32**(4), 519-526 (1996).
- [24] M. Niinomi: Mechanical properties of biomedical titanium alloys, *Materials Science and Engineering Part A*, **243**(1-2), 231-236 (1998).
- [25] V. J. Colangelo, N. D. Greene, D. B. Kettelkamp, H. Alexander, C. J. Campbel: Corrosion rate measurements *in vivo*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **1**(4), 405-414 (1967).
- [26] R.W. Revie, N.D. Greene: Comparison of the *in vivo* and *in vitro* corrosion of 18–8 stainless steel and titanium, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **3**(3) 465-470 (1969).
- [27] R.W. Revie, N.D. Greene: Corrosion behaviour of surgical implant materials: I. effects of sterilization, *Corrosion Science*, **9**(10), 755-762 (1969).
- [28] R.W. Revie, N.D. Greene: Corrosion behaviour of surgical implant materials: II. Effects of surface preparation, *Corrosion Science*, **9**(10), 763-770 (1969).
- [29] J. Galante, W. Rostoker, Corrosion-related failures in metallic implants: an experimental study, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **86**, 237-244 (1972).
- [30] J. E. Lemons, K. M. W. Niemann A. B. Weiss: Biocompatibility studies on surgical-grade titanium-, cobalt-, and iron-base alloys, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **10**(4), 549-553 (1976).
- [31] N. Ramasamy, P.N. Sawyer: Interfacial reactions and thrombosis, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **4**(2), 137-154 (1997).

- [32]M.L. Escudero, J. Ruiz, J.A. González, J. Ruiz: *In vivo* measurement of electrical parameters with alumina-covered stainless steel electrodes, *Biomaterials*, **7**(3), 197-200 (1986).
- [33]Y. Nakayama, T. Yamamuro, Y. Kotoura, M. Oka: In vivo measurement of anodic polarization of orthopaedic implant alloys: comparative study of in vivo and in vitro experiments, *Biomaterials*, **10**(6), 420-424 (1989).
- [34]R.B. Waterhouse: Fretting in hostile environments, *Wear*, **34**(3), 301-309 (1975).
- [35]M.H. Richman, J.K. Weltman, A. Cole: A metallurgical examination of fractured stainless-steel ASIF tibial plates, *Injury*, **8**(1), 13-19 (1976).
- [36]M. Semlitsch, M. Lehmann, H. Weber, E. Doerre, H.G. Willert: New prospects for a prolonged functional life-span of artificial hip joints by using the material combination polyethylene/aluminium oxide ceramic/metal, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **11**(4), 537-552 (1977).
- [37]G.W. Hastings: Bio-Materials Science and Technology, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, **7**(1), 1-22 (1979).
- [38]A. Cornet, D. Muster, J.H. Jaeger: Fatigue - Corrosion of Endoprosthesis Titanium Alloys, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, **7**(1), 155-167 (1979).
- [39]K.J. Bundy, M.A. Vogelbaum, V.H. Desai: The influence of static stress on the corrosion behavior of 316L stainless steel in Ringer's solution, *Journal of Biomedical Materials Research*, **20**(4), 493-505 (1986).
- [40]M. Taira, E.P. Lautenschlage: *In vitro* corrosion fatigue of 316L cold worked stainless steel, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **26**(9), 1131-1139 (1992).
- [41]K. Hayashi, K. Uenoyama, N. Matsuguchi, Y. Sugioka: Quantitative analysis of in vivo tissue responses to titanium-oxide- and hydroxyapatite-coated titanium alloy, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **25**(4) 515-523 (1991).

- [42] S. Venkatraman, F. Boey: Release profiles in drug-eluting stents: Issues and uncertainties, *Journal of Controlled Release*, **120**(3), 149-160 (2007).
- [43] J. Park, S. Bauer, K. von der Mark, P. Schmuki: Nanosize and Vitality: TiO₂ Nanotube Diameter Directs Cell Fate, *Nano Letters*, **7**(6), 1686-1691 (2007).
- [44] R.D.K. Misra, W.W. Thein-Han, T.C. Pesacreta, K.H. Hasenstein, M.C. Somani, L.P. Karjalainen: Cellular response of preosteoblasts to nanogained/ultrafine-grained structures, *Acta Biomaterialia*, **5**(5), 1455-1467 (2009).
- [45] E. De Giglio, D. Cafagna, M.A. Ricci, L. Sabbatini, S. Cometa, C. Ferretti, M. Mattioli-Belmonte: Biocompatibility of Poly(Acrylic Acid) Thin Coatings Electro-synthesized onto TiAlV-based Implants, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **25** (4), 374-391 (2010).
- [46] J. Pan, D. Thierry, C. Leygraf: Electrochemical and XPS studies of titanium for biomaterial applications with respect to the effect of hydrogen peroxide, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **28**(1), 113-122 (1994).
- [47] Y. Okazaki, T. Tateishi, Y. Ito: Corrosion Resistance of Implant Alloys in Pseudo Physiological Solution and Role of Alloying Elements in Passive Films, *Materials Transactions, JIM*, **38**(1), 78-84 (1997).
- [48] J. Pan, D. Thierry, C. Leygraf: Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application, *Electrochimica Acta*, **41**(7-8), 1143-1153 (1996).
- [49] V. Vignal, C. Valot, R. Oltra, M. Verneau, L. Coudreuse: Analogy between the effects of a mechanical and chemical perturbation on the conductivity of passive films, *Corrosion Science*, **44**(7), 1477-1496 (2002).
- [50] S. Kumar, T.S.N. Sankara Narayanan, S. Ganesh Sundara Raman, S.K. Seshadri: Evaluation of fretting corrosion behaviour of CP-Ti for orthopaedic implant applications, *Tribology International*, **43**(7), 1245-1252 (2010).

- [51] B. Sivakumar, S. Kumar, T.S.N. Sankara Narayanan: Comparison of fretting corrosion behaviour of Ti–6Al–4V alloy and CP-Ti in Ringer’s solution, *Tribology - Materials, Surfaces & Interfaces*, **5**(4), 158-164 (2011).
- [52] A.C. Vieira, A.R. Ribeiro, L.A. Rocha, J.P. Celis: Influence of pH and corrosion inhibitors on the tribocorrosion of titanium in artificial saliva, *Wear*, **261**(9), 994-1001 (2006).
- [53] C. Leinenbach, D. Eifler: Fatigue and cyclic deformation behaviour of surface-modified titanium alloys in simulated physiological media, *Biomaterials*, **27**(8), 1200-1208 (2006).
- [54] C. Leinenbach, B. Schwilling, D. Eifler: Cyclic deformation behaviour and fatigue induced surface damage of titanium alloys in simulated physiological media, *Materials Science and Engineering: C*, **25**(3), 321-329 (2005).
- [55] N. Maruyama, D. Mori, S. Hiromoto, K. Kanazawa, M. Nakamura: Fatigue strength of 316L-type stainless steel in simulated body fluids, *Corrosion Science*, **53**(6), 2222-2227 (2011).
- [56] S. Hiromoto, S. Mischler: The influence of proteins on the fretting–corrosion behaviour of a Ti6Al4V alloy, *Wear*, **261**(9), 1002-1011 (2006).
- [57] S. Xulin, A. Ito, T. Tateishi, A. Hoshino: Fretting corrosion resistance and fretting corrosion product cytocompatibility of ferritic stainless steel, *Journal of Biomedical Materials Research*, **34**(1), 9-14 (1997).
- [58] S. Virtanen, I. Milošev, E. Gomez-Barrena, R. Trebše, J. Salo, Y.T. Konttinen: Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions, *Acta Biomaterialia*, **4**(3), 468-476 (2008).
- [59] T. Akahori, M. Niinomi, H. Fukui, A. Suzuki: Fatigue, Fretting Fatigue and Corrosion Characteristics of Biocompatible Beta Type Titanium Alloy Conducted with Various Thermo-Mechanical Treatments, *Materials Transactions*, **45**(5), 1540-1548 (2004).

- [60] N. Maruyama, S. Hiromoto, E. Akiyama, M. Nakamura: Fretting fatigue behaviour of Ni-free high-nitrogen stainless steel in a simulated body fluid, *Science and Technology of Advanced Material*, **14**(2), 025002(1-9) (2013).
- [61] 佐藤 温重、石川 達也、桜井 靖久、中村 晃忠 共著: バイオマテリアルと生体—副作用と安全性、中山書店、(1998).
- [62] B. Sivakumar, S. Kumar, T.S.N. Narayanan: Fretting corrosion behaviour of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva containing varying concentrations of fluoride ions, *Wear*, **270**(3-4), 317-324 (2011).
- [63] P.I. Marshall, G.T. Burstein: The effects of pH on the repassivation of 304L stainless steel, *Corrosion Science*, **23**(11), 1219-1228 (1983).
- [64] T. Yamamoto, K. Fushimi, H. Habazaki, H. Konno: Depassivation–repassivation behavior of a pure iron surface investigated by micro-indentation, *Electrochimica Acta*, **55**(3), 1232-1238 (2010).
- [65] R.S. Lillard, G. Vasquez Jr., D.F. Bahr: The Kinetics of Anodic Dissolution and Repassivation on Stainless Steel 304L in Solutions Containing Nitrate, *Journal of the Electrochemical Society*, **158**(6), 194-201 (2011).
- [66] E-A. Cho, C-K. Kim, J-S. Kim, H-S. Kwon: Quantitative analysis of repassivation kinetics of ferritic stainless steels based on the high field ion conduction model, *Electrochimica Acta*, **45**(12), 1933-1942 (2000).
- [67] T. Shibata, S. Fujimoto: Breakdown of Passive Film on Ni-Cr Alloys in High-Temperature High-Pressure Water Containing Sulfate Ions, *Corrosion*, **46**(10), 793-798 (1990).
- [68] S. Fujimoto, T. Shibata: The step response function of anodic reaction induced by rapid straining on passive metals, *Corrosion Science*, **31**, 643-648 (1990).

- [69] S. Fujimoto, H. Yamamoto: Passivity Breakdown and Repassivation on TiNi during Rapid Straining Accompanying Martensitic Phase Transformation, *ECS Transactions*, **16**(52), 233-238 (2009).
- [70] S. Fujimoto, H. Kusu, S. Katsuma, M. Sakamoto, Y.-C. Tang: Electrochemical characterization of Ti and Ti base alloys under simulated body fluid environment, *Materials Science Forum*, **512**, 249-254 (2006).
- [71] K. Doi, S. Miyabe, S. Fujimoto: Electrochemical Behavior on Type 316L Stainless Steel during Cyclic Deformation in Simulated Body Fluid including Proteins and Cells, *Materials transactions*, **55**(12) (2014) *in press*.

第 2 章 模擬生体環境における種々の金属材料の急速ひずみ付与に伴う溶解・再不働態化

2.1 緒言

現在、生体金属材料として使用されている純 Ti および Ti 合金、ステンレス鋼、Co-Cr 合金は、表面に不働態皮膜を形成しているため非常に良好な耐食性を有しており、金属イオン溶出や局部腐食発生を抑制している^[1-4]。しかし、生体内では Cl⁻を含む体液や細胞などの生物学的要因による腐食や、歩行などの力学的要因による材料変形により不働態皮膜破壊が生じ新生面からの金属溶解が懸念される。水溶液環境では不働態皮膜は破壊後ただちに再不働態化により自己再生するが^[5, 6]、模擬体液中、すなわち有機物を含んだ中性塩化物環境における生体用金属材料の再不働態化を検討した例は少ない。

不働態皮膜破壊と再不働態化の検討方法として、ひずみ電極法^[7-9]、スクラッチ法^[10]、摩擦法^[11]、マイクロインデンテーション法^[12]などが挙げられる。Contu らは摩擦法を用いて、模擬体液中で純 Ti の再不働態化が Ti-6Al-4V 合金よりも早く進行することを見出した^[11]。さらに Fushimi らはマイクロインデンテーション法を用いて Type 316L 鋼の不働態皮膜破壊、再不働態化を検討し、試料が塑性変形した際に金属溶解量が増加することを報告している^[12]。しかし、これら過去の研究では、ほぼ同時に開始する金属溶解と再不働態化を混同して計測することになり、正確な電気化学挙動を捉えられていない。

本章では、細胞培養用の培地として用いられる α -MEM + 10 vol% FBS 中で、生体用金属材料として広く用いられている純 Ti および Ti 合金、ステンレス鋼、Co-Cr 合金に急速ひずみを付与し、不働態皮膜を破壊した際の金属溶解・再不働態化をアノード電流値変化として解析した結果および、得られたアノード電流変化と応力変化との関係や、再不働態化における電流の減衰挙動、発生

した電気量を比較することで、生体内における生体用金属材料の電気化学挙動の検討を行った結果を述べる。

2.2 実験方法

2.2.1 供試材

供試材は純 Ti (The Nilaco Corporation)、Ti-6Al-4V 合金 (Furuuchi Chemical Corporation)、Type 316L ステンレス鋼 (Furuuchi Chemical Corporation)、および Co-Cr 合金 (Yoneda Advanced Casting Co., Ltd.) とした。各材料の化学組成を Table 1 に示す。純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Type 316L ステンレス鋼は購入した板材を放電加工により引張試験片(ゲージ部寸法: 15×4×1 mm³)に加工した。Co-Cr 合金は鋳造材を購入後、放電加工により厚さ約 2 mm の板材に切り出し、熱間圧延を施した後、引張試験片(ゲージ部寸法: 15×4×1 mm³)に加工した。さらに、試験片を真空封入した後、1260°C で 6 時間熱処理を施し、氷水で急

Table 2-1 Chemical composition of pure Ti, Ti-6Al-4V alloy, Type 316L stainless steel and Co-Cr alloy (mass%).

Ti					
C	H	O	N	Fe	Ti
0.004	0.0032	0.075	0.002	0.052	Bal.

Ti-6Al-4V							
Al	V	Fe	C	Y	O	N	Ti
0.16	3.99	0.14	0.013	0.0004	0.19	0.004	Bal.

Type 316L stainless steel								
Cr	Ni	Mo	C	Si	Mn	P	S	Fe
17.35	12.18	2.07	0.011	0.63	1.2	0.03	0.001	Bal.

Co-Cr									
Cr	Mo	Ni	Fe	C	Si	Mn	Al	N	Co
27.55	5.48	0.11	0.16	0.1	0.56	0.57	0.001	0.1	Bal.

冷した^[13]。その後 EBSD を用いて、熱処理を施した Co-Cr 合金が fcc 単相であることを確認した。得られた試料表面を機械研磨した後、アセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ 300 秒間超音波洗浄した。その後、試料表面と溶液との接触を防ぐため、ゲージ部以外を PTFE テープ（テフロンテープ）で被覆し絶縁し、121 °C で 900 秒間オートクレーブ滅菌を施した。滅菌後、腐食電位を安定させるため、試料を α -MEM + 10 vol% FBS (Fetal Bovine Serum) に 1 日間浸漬した。浸漬環境は 37°C, 5% CO₂ に保持した。

2.2.2 試験溶液

FBS (Fetal Bovine Serum) はウシ胎仔血清であり、最小必須培地である α -MEM (Minimum Essential Medium, MP Biomedicals) に添加することで最適な細胞培養環境が得られる。第3章以降では、細胞培養だけでなく試料上にタンパク質を堆積させる目的でも α -MEM + 10 vol% FBS を用いた。 α -MEM + 10 vol% FBS は、まず α -MEM 粉末培地 3.00 g を蒸留水に溶解させ全量を 300 ml とした後、ろ過滅菌し、NaHCO₃ 溶液 7.40 ml、FBS 33.1 ml、抗生物質である Kanamycin を加え作製した。保存する際には 20~40 ml ずつ遠沈管に分注し、-20 °C に保持した冷凍庫内で保存した。

2.2.3 急速ひずみ電極試験

本研究に供された試料は、表面に薄い酸化皮膜である不働態皮膜を形成している。この試料を定電位分極し急速変形させると、表面の不働態皮膜が破壊され暴露した新生面（下地金属）から金属溶解が生じる。試料を定電位分極しているため、金属溶解はアノード電流の増加として計測される。また、不働態皮膜は破壊後ただちに再不働態化と呼ばれる自己再生を始めるため、時間とともに金属溶解は抑制され、アノード電流の減衰として計測される。急速ひずみ電極試験法はこのように材料変形時の不働態皮膜破壊による金属

溶解および再不働態化をアノード電流変化として計測する試験法である。本試験法はこれまで高温高压水中におけるステンレス鋼の応力腐食割れの検討などに用いられてきた^[14, 15]が、材料を急速変形させることにより金属溶解と再不働態化を独立して観測できる、引張変形を加えるため新生面面積の測定が容易であるなどの利点があり、新生面露出の際の金属溶解・再不働態化の検討に非常に適しているので、本研究では生体用金属材料の溶解・再不働態化を検討するために用いることとした。

本研究で行った急速ひずみ電極試験法の概要を Fig. 2-1 に示す。前処理として α -MEM + 10 vol% FBS に 1 日浸漬させた試料を電気化学セル内に設置し、電気化学セル内部を α -MEM + 10 vol% FBS で満たした後、1 時間 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ の通気および腐食電位測定を行った。電気化学セルには、参照電極として Ag/AgCl (3 M NaCl)、対極として Pt ワイヤ、作用極として試料、温度管理用の熱電対、混合ガスの通気および排出口が設置されている。参照電極、対極、試料につながっているポテンショスタットおよびレコーダーに

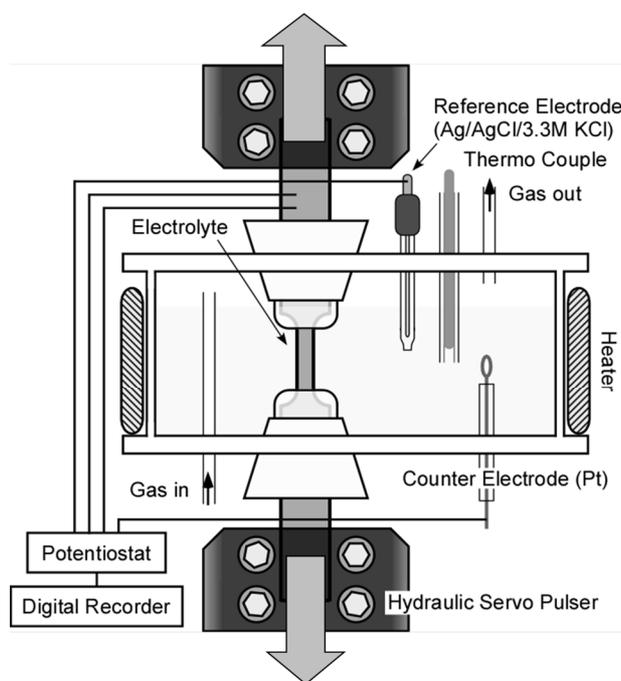


Fig. 2-1 Schematic illustration of rapid straining electrode test apparatus.

より腐食電位およびアノード電流変化の測定、記録が可能である。腐食電位測定開始から 1 時間後、その時点での腐食電位で試料を定電位分極し、試料に油圧式サーボパルサ (Shimadzu Corporation) を用いて 4%, 0.67 /s の急速引張ひずみを付与した。このときの、試料表面の不働態皮膜破壊による金属溶解および再不働態化による皮膜の自己再生をアノード電流の増減として測定した。さらに同時に得られた試料のひずみ変化、応力変化とアノード電流変化を対応させることで、試料変形に際する生体用金属材料の電気化学的挙動を検討した。試験後の試料表面は FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope, JEOL Ltd.)、SPM (Scanning Probe Microscope, Shimadzu Corporation) を用いて観察した。

2.3 結果および考察

2.3.1 模擬体液中で急速変形させた種々の金属材料のアノード電流変化

Figure 2-2(a)~(d)に α -MEM + 10 vol% FBS に 1 日浸漬させた後、腐食電位において急速変形させた純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Type 316L ステンレス鋼、Co-Cr 合金のひずみ変化、応力変化、アノード電流変化を示す。本研究では、試験前後でのゲージ部長さ変化、幅変化、厚さ変化より新生面面積を求め、新生面におけるアノード反応をアノード電流密度として規格化した。いずれの試料においても変形量の増加に応じてアノード電流の増加が認められたが、アノード電流変化の概形は試料により異なった。応力変化から、急速ひずみ電極試験結果は、弾性変形域、塑性変形域およびひずみ付与終了後の試料変形が生じていない領域(0.06 s~)に分けられる。純 Ti, Ti-6Al-4V 合金においては弾性変形域でのアノード電流の増加が認められた。このアノード電流は塑性変形開始直後に急増した。一方、Type 316L ステンレス鋼および Co-Cr 合金においては、弾性変形域でのアノード電流の増加は認められず塑性変形開始直後からアノード電流の増加が開始した。Co-Cr 合金の不働態皮膜の主成分は Type

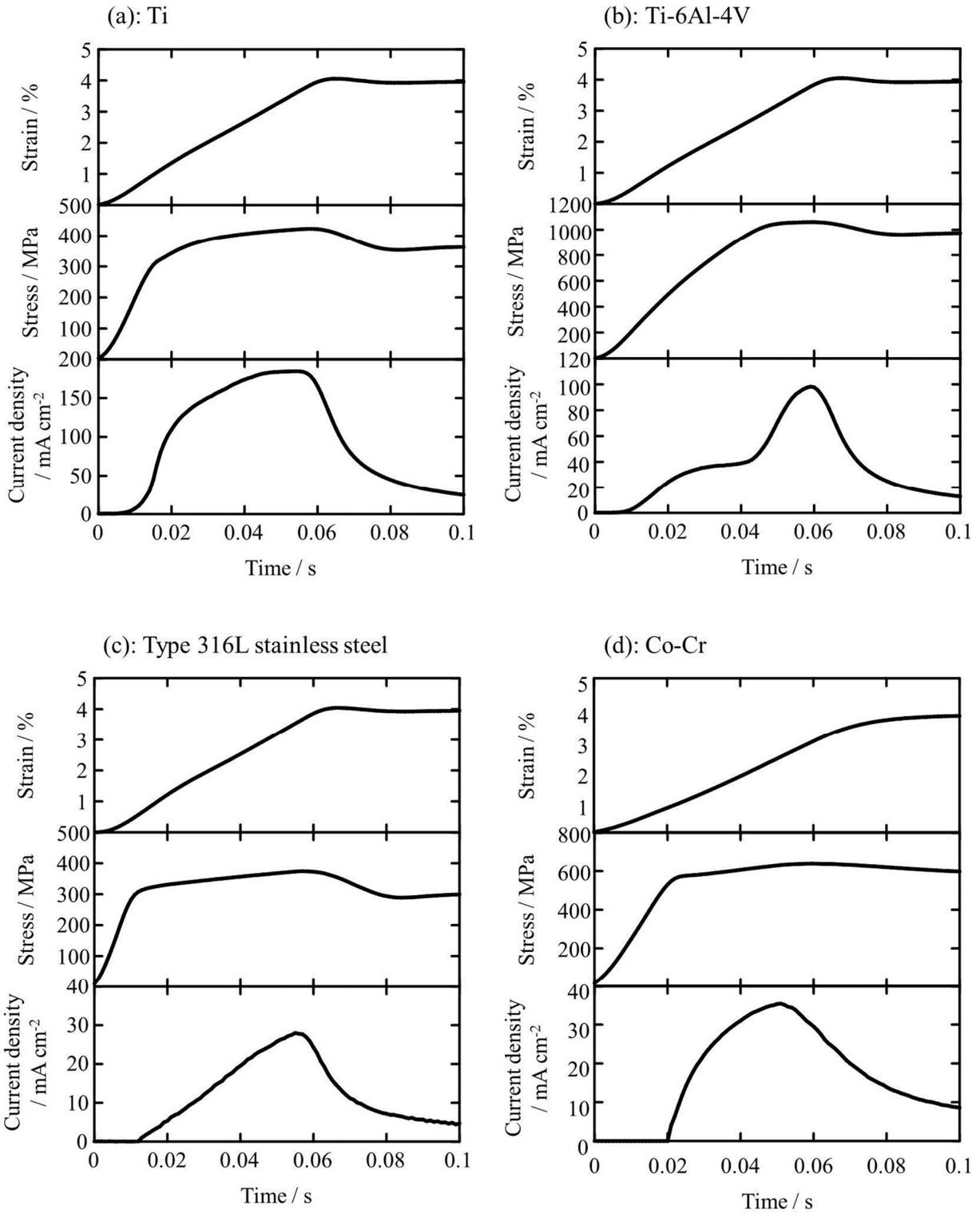


Fig. 2-2 Typical transients of strain, stress and current with time during and after elongation of four materials: (a) pure Ti, (b) Ti-6Al-4V alloy, (c) Type 316L stainless steel and (d) Co-Cr alloy.

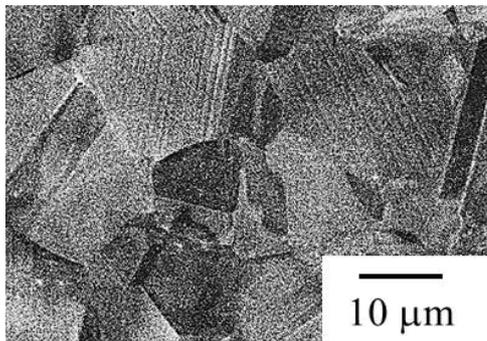


Fig. 2-3 SEM image of Type 316L stainless steel surface after rapid elongation.

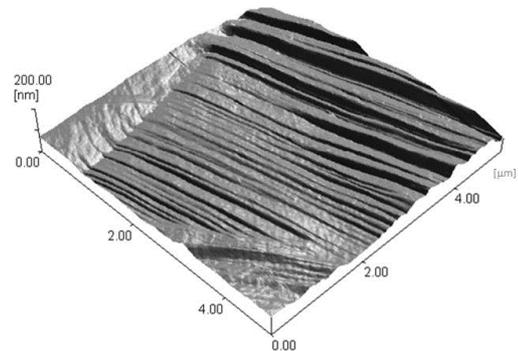


Fig. 2-4 3D imaged surface of Type 316L stainless steel by SPM observation.

316L ステンレス鋼の不働態皮膜の主成分と同じ Cr 酸化物である^[16]。一方で、純 Ti、Ti-6Al-4V 合金の不働態皮膜の主成分は Ti 酸化物である^[17]。Fushimi らは、マイクロインデンテーション法を用いた材料変形時の不働態皮膜破壊に関する研究を行い、ステンレス鋼の不働態皮膜が延性を持つと考察している^[12]。同様に、本研究で弾性変形域でのアノード電流の微増が純 Ti、Ti-6Al-4V 合金にのみ認められたことは、不働態皮膜の機械的特性が影響していると考えられる。

次に、弾性変形域と塑性変形域でのアノード電流挙動の違いについて考察する。Figure 2-3 に 4%ひずみを付与した際の Type 316L ステンレス鋼の表面 SEM 像を示す。試料表面にすべり帯が形成された結晶粒が存在している。さらに、Fig. 2-4 に示した同じ試料の表面 SPM 像より、形成されたすべり帯によって試料表面に段差が生じていることがわかる。弾性変形から塑性変形に移行した際には、試料表面の新生面の現れ方が変化する。弾性変形時には結晶内の原子配列を変えることなく原子間距離が変化するように変形するため、試料表面の変化は非常に少ない。一方、塑性変形時には原子配列を変化させるため、試料表面にはすべり線が蓄積しステップを形成する。よって、種々の金属材料の変形にともなう溶解挙動は Fig. 2-5 のモデル図のように説明さ

れる。Ti、Ti-6Al-4V 合金のように引張強度の低い不働態皮膜を形成する金属材料は弾性変形時に不働態皮膜が破壊され微量の金属溶解を生じる。一方、Type 316L ステンレス鋼やCo-Cr合金のような延性を有する不働態皮膜を形成する金属材料は、弾性変形時には不働態皮膜が破壊されず金属溶解を生じな

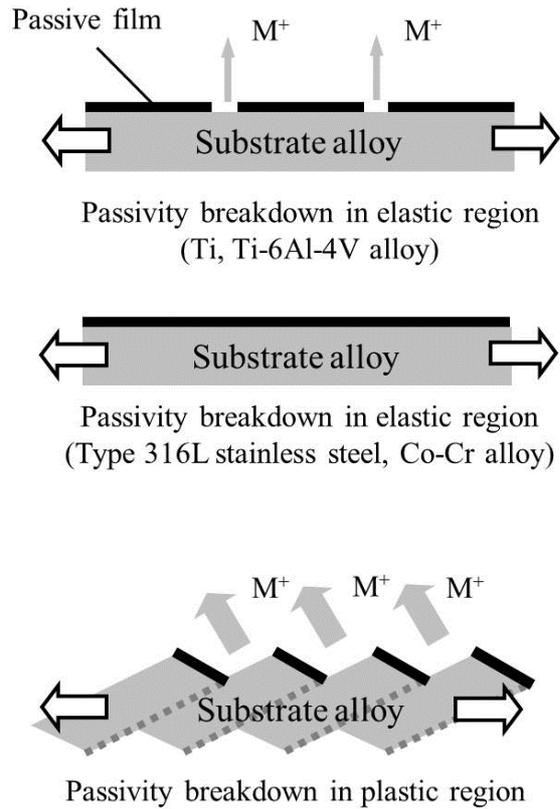


Fig. 2-5 The model of metal dissolution of pure Ti, Ti-6Al-4V alloy, Type 316L stainless steel and Co-Cr alloy with elastic and plastic deformation.

い。しかし、いずれの金属材料においても、塑性変形域に達した直後にすべりステップにより新生面面積が急増し、弾性変形時よりも多量の金属溶解が生じる。

次に、ひずみ付与時に流れたアノード電流の最大値（以下、最大電流密度）に着目する。最大電流密度は純 Ti において最も大きな値（約 200 mA/cm^2 ）を示し、次いで Ti-6Al-4V 合金（約 100 mA/cm^2 ）となった。Type 316L ステンレ

ス鋼および Co-Cr 合金の最大電流密度は純 Ti、Ti-6Al-4V 合金と比較して小さく、いずれも約 30~40 mA/cm² であった。不働態皮膜破壊時の金属溶解は下地金属の溶解であるため、下地金属の平衡電位と急速ひずみ付与時の分極電位に大きく依存する。Ti の平衡電位を Nernst の式より求めると、-2.01 V (vs. Ag/AgCl) となり、同様に Type 316L ステンレス鋼の主成分の Fe は-0.82 V (vs. Ag/AgCl)、Co-Cr 合金の主成分の Co は-0.66 V (vs. Ag/AgCl) となる^[18]。ただし、それぞれの金属イオン濃度を 10⁻⁶ mol/l としている。一方、急速ひずみ付与時の分極電位（腐食電位）は純 Ti および Ti-6Al-4V 合金が約-0.2~-0.15 V (vs. Ag/AgCl)、Type 316L ステンレス鋼は約-0.05 V (vs. Ag/AgCl)、Co-Cr 合金は約-0.08 V (vs. Ag/AgCl) であった。よって、不働態皮膜が破壊された際、Ti および Ti 合金は約+1.8 V 分極されたことになり、Type 316L ステンレス鋼、Co-Cr 合金では、それぞれ約+0.8 V, +0.6 V 分極されたことになる。すなわち、Ti、Ti-6Al-4V 合金はよりアノード反応が促進され、最大電流密度が大きくなったと考えられる。

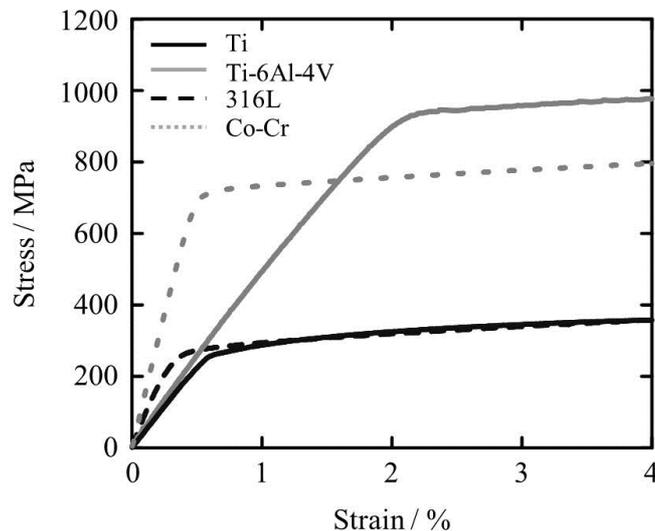


Fig. 2-6 The stress-strain curve of pure Ti, Ti-6Al-4V alloy, Type 316L stainless steel and Co-Cr alloy elongated for 4%.

また、試料ごとの塑性変形量の差も最大電流密度に影響を及ぼしたと考えられる。Figure 2-6 に示した各材料の 4%までの応力ひずみ曲線 (S-S 曲線) からわかるとおり、純 Ti と比較して Ti-6Al-4V 合金の弾性変形域は広いいため、4%の急速ひずみを付与した際に塑性変形量に差が生じ最大電流密度が変化したと考えられる。そこで、4%の急速ひずみを付与した後、変位を保持し、さらに 2%の塑性変形のための急速ひずみを付与する実験を行った。その際に得られた最大電流密度を Fig. 2-7 に示す。Ti および Ti-6Al-4V 合金はどちらも約 350 mA/cm^2 を示したことから、同一変形量のひずみが付与された際の金属溶解挙動は下地金属の主成分に依存することが明らかとなった。また、Type 316L ステンレス鋼と Co-Cr 合金はどちらも約 50 mA/cm^2 であった。Fe と Co の標準電極電位および不働態皮膜に覆われた際の腐食電位にそれほど差がないために、ひずみ付与時のアノード電流にも差が現れなかったと考えられる。

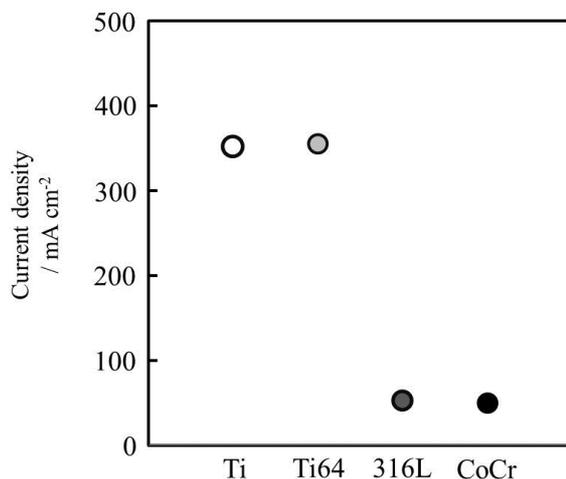


Fig. 2-7 The maximum current densities of pure Ti, Ti-6Al-4V alloy, Type 316L stainless steel and Co-Cr alloy measured during 2% plastic elongation without elastic deformation.

2.3.2 模擬体液中で急速変形させた種々の金属材料の再不働態化

ひずみ付与停止後、すなわち Fig. 2-2 の 0.06 s 以降の領域では、新生面上で再不働態化が生じ金属溶解が抑制されたためアノード電流が減衰している。Figure 2-8 にひずみ付与終了時の時間を 0 とした際の各試料の電流減衰曲線を示した。横軸縦軸ともに対数プロットすることで、ひずみ付与終了後約 0.01 秒後から時間と電流値の間の直線関係が得られた。この直線的な減衰挙動は Burstein らにより次式 (2-1) で近似できることがすでに報告されている^[19]。

$$I = a \cdot t^{-n} \dots\dots\dots (2-1)$$

ここで I は電流密度 (mA/cm^2)、 a は定数、 t はひずみ付与停止後の時間 (s)、 n は減衰率である。 n 値が大きいほど電流減衰が早く、再不働態化が早く完了することを示している。Table 2-2 に各材料の n 値を示す。純 Ti の再不働態化

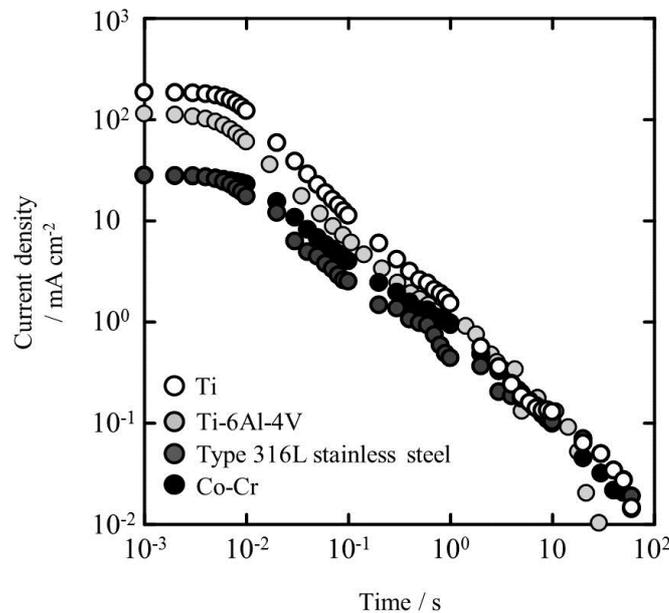


Fig. 2-8 The current decay as $\log i - \log t$ plot during repassivation of pure Ti, Ti-6Al-4V alloy, Type 316L stainless steel and Co-Cr alloy.

Table 2-2 The decay rate of anodic current density after elongation was terminated (n value).

Ti	0.942 ± 0.028
Ti-6Al-4V	0.794 ± 0.011
Type 316L	0.669 ± 0.019
Co-Cr	0.717 ± 0.018

が最も早く、次いで Ti-6Al-4V 合金、Co-Cr 合金となり、Type 316L ステンレス鋼の再不働態化が最も遅いという結果が得られた。

ひずみ付与による金属溶解量を検討するため、ひずみ付与により発生した電気を Fig. 2-9 に示す。電気量はアノード電流密度の積分値として求め、ひずみ付与中 (~0.06 s)、ひずみ付与終了から 10 秒間、ひずみ付与終了から 100 秒間の電気量を解析した。ひずみ付与中に発生した電気量は純 Ti において最も多く、次いで Ti-6Al-4V 合金となった。Type 316L ステンレス鋼と Co-Cr 合金で発生した電気量は少なく、Type 316L ステンレス鋼と Co-Cr 合金の間に差はほとんどなかった。急速ひずみ付与中の電気量はひずみ付与中の最大電流密度に大きく依存している。ひずみ付与終了後 10 秒までの電気量に着目すると、純 Ti における電気量が最も大きいことに変化はないが、ひずみ付与中で約 6 倍の差がある純 Ti と Type 316L ステンレス鋼における電気量の差は約 2 倍にまで縮まっている。これは、純 Ti の再不働態化速度が Type 316L ステンレス鋼の再不働態化速度よりも早いことに起因する。式 (2-1) より得られた n 値から、ひずみ付与時の最大電流密度が 1/10000 に減衰する時間を求め比較すると、Type 316L ステンレス鋼では純 Ti の約 50 倍の時間を要することが明らかとなった。さらに、100 秒までに発生した電気量を比較すると純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Co-Cr 合金では 10 秒の時点からほとんど電気量が増加していないにもかかわらず Type 316L ステンレス鋼の電気量は約 3 倍に増加してい

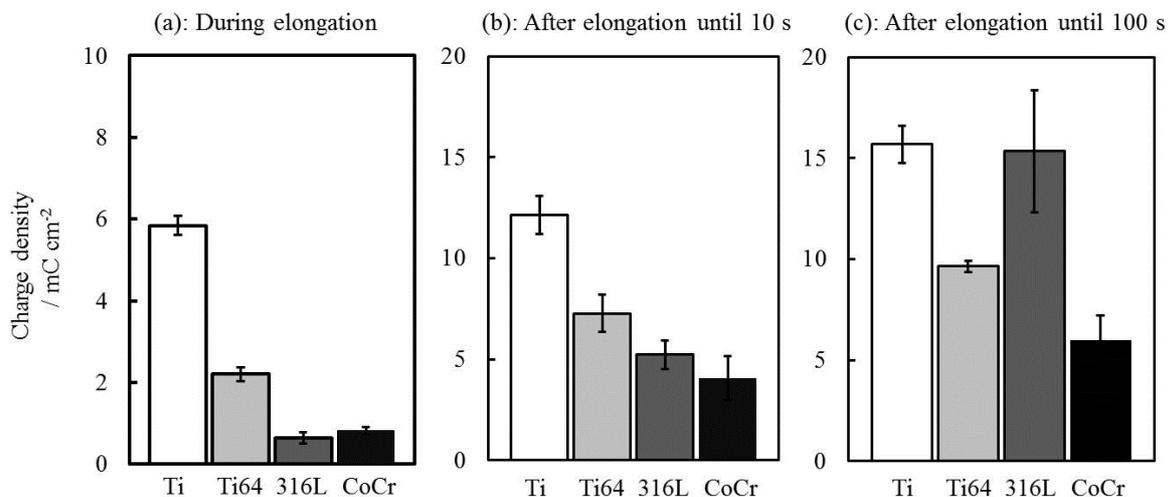


Fig. 2-9 Charge densities generated during and after elongation of pure Ti, Ti-6Al-4V alloy, Type 316L stainless steel and Co-Cr alloy: (a) during elongation, (b) from termination of elongation until 10 s, and (c) from termination of elongation until 100 s.

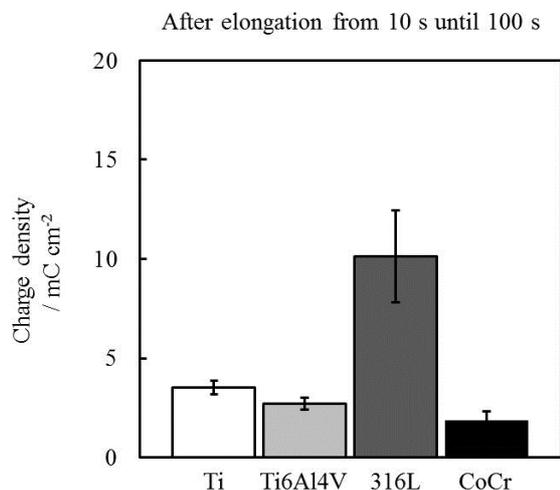


Fig. 2-10 Charge densities calculated as integral value of anodic current from 10 s to 100 s after elongation.

る。Figure 2-10 に各試料の急速ひずみ付与後 10 秒から 100 秒の間に発生した電気量を示す。この結果から、純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Co-Cr 合金の再不働態化はひずみ付与 10 秒の時点ではほぼ完了していると考えられる。しかし、Type

316L ステンレス鋼の再不働態化は完了しておらず、さらなる時間の経過とともに Type 316L ステンレス鋼の金属溶解量は増加すると考えられる。

2.4 結言

本章では、純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Type 316L ステンレス鋼、Co-Cr 合金に模擬体液中で急速ひずみを付与することで、生体内で動的荷重が加えられた際の生体用金属材料の溶解・再不働態化を検討した。その結果、以下のような結論を得た。

1. 純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Type 316L ステンレス鋼および Co-Cr 合金にひずみが付与された際に、純 Ti、Ti-6Al-4V 合金においては弾性変形域で不働態皮膜が破壊され金属溶解が開始する。一方、Type 316L ステンレス鋼、Co-Cr 合金においては、弾性域では不働態皮膜は破壊されず金属溶解は生じない。いずれの材料においても、塑性変形域にまで変形が達した際に、すべりステップ形成により新生面面積が増大し金属溶解量が急増する。
2. ひずみ付与時に発生する金属溶解、すなわちアノード反応の大小は下地金属の平衡電位と、不働態皮膜に保護された状態における腐食電位の差に依存する。
3. いずれの材料においてもひずみ付与終了後ただちに再不働態化により不働態皮膜は自己再生し金属溶解は抑制される。純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Type 316L ステンレス鋼および Co-Cr 合金では純 Ti の再不働態化が最も早く、Type 316L ステンレス鋼の再不働態化が最も遅い。

参考文献

- [1] J. Pan, D. Thierry, C. Leygraf: Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application, *Electrochimica Acta*, **41**(7-8), 1143-1153 (1996).
- [2] Y. Okazaki, T. Tateishi, Y. Ito: Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application, *Materials Transactions, JIM*, **38**(1), 78-84 (1997).
- [3] R.J. Solar, S.R. Pollack: In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys: An approach to understanding titanium release from implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **13**(2), 217-250 (1979).
- [4] A. Kocijan, I. Milošev, B. Pihlar: Cobalt-based alloys for orthopaedic applications studied by electrochemical and XPS analysis, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **15**(6), 643-650 (2004).
- [5] M. Aziz-Kerrzo, K.G. Conroy, A.M. Fenelon, S.T. Farrell, C.B. Breslin: Electrochemical studies on the stability and corrosion resistance of titanium-based implant materials, *Biomaterials*, **22**(12), 1531-1539 (2001).
- [6] T. Hanawa: Metal ion release from metal implants, *Materials Science and Engineering: C*, **24**(6-8), 745-752 (2004).
- [7] A. Nishikata, J. Yamamuro, T. Tsuru: Application of a Straining Electrode to High-Temperature Corrosion, *Journal of The Electrochemical Society*, **151**(5), B245-B251 (2004).
- [8] S. Fujimoto, H. Yamamoto: Passivity Breakdown and Repassivation on TiNi during Rapid Straining Accompanying Martensitic Phase Transformation, *ECS Transactions*, **16**(52), 233-238 (2009).

- [9] D.G. Kolman, M.A. Gaudett, J.R. Scully: Modeling of Anodic Current Transients Resulting from Oxide Rupture of Plastically Strained $\beta + \alpha$ Titanium, *Journal of The Electrochemical Society*, **145**(6), 1829-1840 (1998).
- [10] R.S. Lillard, G. Vasquez Jr., D.F. Bahr: The Kinetics of Anodic Dissolution and Repassivation on Stainless Steel 304L in Solutions Containing Nitrate, *Journal of the Electrochemical Society*, **158**(6), C194-C201 (2011).
- [11] F. Contu, B. Elsener, H. Bohni: A study of the potentials achieved during mechanical abrasion and the repassivation rate of titanium and Ti6Al4V in inorganic buffer solutions and bovine serum, *Electrochimica Acta*, **50**(1), 33-41 (2004).
- [12] T. Yamamoto, K. Fushimi, H. Habazaki, H. Konno: Depassivation–repassivation behavior of a pure iron surface investigated by micro-indentation, *Electrochimica Acta*, **55**(3), 1232-1238 (2010).
- [13] S.-H. Lee, E. Takahashi, N. Nomura, A. Chiba: Effect of Heat Treatment on Microstructure and Mechanical Properties of Ni- and C-Free Co–Cr–Mo Alloys for Medical Applications, *Materials Transactions*, **46**(8), 1790-1793 (2005).
- [14] S. Fujimoto, T. Shibata: The step response function of anodic reaction induced by rapid straining on passive metals, *Corrosion Science*, **31**, 643-648 (1990).
- [15] T. Shibata, S. Fujimoto: Breakdown of Passive Film on Ni-Cr Alloys in High-Temperature High-Pressure Water Containing Sulfate Ions, *Corrosion*, **46**(10), 793-798 (1990).
- [16] N.E. Hakiki, S. Boudin, B. Rondot, M. Da Cunha Belo: The electronic structure of passive films formed on stainless steels, *Corrosion Science*, **37**(11), 1809-1822 (1995).

- [17]A.W.E. Hodgson, Y. Mueller, D. Forster, S. Virtanen: Electrochemical characterization of passive films on Ti alloys under simulated biological conditions, *Electrochimica Acta*, **47**(12), 1913-1923 (2002).
- [18]A.J. Bard, R. Parsons, J. Jordan: Standard Potentials in Aqueous Solution, *CRC Press* (1985).
- [19]G.T. Burstein, P.I. Marshall: Growth of passivating films on scratched 304L stainless steel in alkaline solution, *Corrosion Science*, **23**(2), 125-137 (1983).

第 3 章 タンパク質および細胞を含んだ模擬生体環境で急速ひずみを付与した Ti-6Al-4V 合金の不働態皮膜破壊と再不働態化

3.1 緒言

Ti-6Al-4V 合金は優れた力学特性、生体適合性のみならず、高い耐食性をも兼ね備える医療用金属材料として広く用いられており、これまで Ti-6Al-4V 合金の生体内における耐食性に関して多くの研究が行われてきた^[1-7]。しかし、これまで行われてきた研究は静的環境、すなわち運動による繰返し変形^[8]、摩耗^[9]、フレタィング^[10]などの材料変形を考慮しない環境での耐食性に関してである。生体内では、金属材料が体液・生体組織と接しており、材料変形が加わった際には腐食を生じやすい。よって、生体内での耐食性の検討には、材料変形が電気化学反応に及ぼす影響を考慮する必要がある^[11, 12]。

医療用金属材料の耐食性は、不働態皮膜と呼ばれる金属材料表面に形成される厚さ数 nm の酸化皮膜によって保持されている。不働態皮膜は金属・合金と生体環境の接触を妨げることで金属溶解を抑制する。しかし、力学的作用により材料が変形する際には、金属酸化物である不働態皮膜は破壊され、露出した新生面から金属溶解が生じる。溶出した金属イオンには生体にとって一定の濃度を超えると有毒性を発揮するものも含まれるため、アレルギー等の免疫反応が懸念される^[13]。多くの場合、不働態皮膜が破壊され新生面が露出しても皮膜は再不働態化と呼ばれる自己再生を行う。無機イオンやアミノ酸等の分子量の小さな有機物を含んだ模擬体液中における金属材料の変形に伴う不働態皮膜破壊と金属溶解、その後の再不働態化に関しては既に多くの知見がある^[14-18]。しかし、生体内には腐食を促進させるタンパク質や細胞などの分子量の大

きな有機物が存在しており、これらが不働態皮膜破壊および再不働態化に及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。よって、生体内における医療用金属材料の耐食性を検討するうえで、材料変形と生体組織の複合作用を考えることが必須である。

不働態皮膜破壊と再不働態化の検討方法として、ひずみ電極法^[19-21]、スクラッチ法^[22]、摩擦法^[23]、マイクロインデンテーション法^[24]などが挙げられる。Contuらは摩擦法を用いて模擬体液中で純Tiの再不働態化がTi-6Al-4V合金よりも早く進行することを見出した^[23]。さらにFushimiらはマイクロインデンテーション法を用いてType 316Lステンレス鋼の不働態皮膜破壊、再不働態化を検討し、試料が塑性変形した際に金属溶解量が増加することを報告している^[24]。しかし、これら過去の研究では、ほぼ同時に開始する金属溶解と再不働態化を混同して計測することになり、正確な電気化学挙動を捉えられていない。そこで本研究では、急速ひずみ電極試験法^[25]を用いた。本試験法では、試料を溶液中で急速に変形させることで、得られるアノード電流変化を金属溶解時と再不働態化時に分離し解析することが可能である。本章では、生体内におけるTi-6Al-4V合金の耐食性を調査するため、タンパク質および細胞を含んだ模擬体液に所定時間浸漬させたTi-6Al-4V合金に急速ひずみを付与し、その際の電気化学挙動を検討した結果を述べる。

3.2 実験方法

3.2.1 供試材

本研究で用いたTi-6Al-4V合金の組成をTable 3-1に示す。Ti-6Al-4V合金の薄板をゲージ部寸法15×4×1 mm³の引張試験片に加工し、試料表面をSiC研磨紙で#800まで機械研磨した。その後、アセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ300秒間超音波洗浄した。超音波洗浄した後、

Table 3-1 Chemical composition of Ti-6Al-4V alloy (mass%).

Al	V	Fe	C	O	N	Y	Ti
6.16	3.99	0.14	0.013	0.19	0.004	0.0004	Bal.

ゲージ部以外を溶液との接触を防ぐため PTFE テープ (テフロンテープ) で被覆し絶縁した。その後 121 °C で 900 秒間オートクレーブ滅菌を施し、急速ひずみを付与する前に、前処理として α -MEM + 10 vol% FBS (ウシ胎児血清) に試料を浸漬した。浸漬時間は 1 日または 1 週間とした。また、試料表面に接着した細胞が Ti-6Al-4V 合金の変形に際した溶解・再不働態化に及ぼす影響も検討するため、マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1, (RCB1126、RIKEN Bioresource Center)) を試料上に播種し 1 週間培養することで、細胞がゲージ部全面を被覆した試料を作製した。細胞培養の際、細胞培養溶液には α -MEM + 10 vol% FBS を用い、培養環境は 37°C, 5% CO₂ に保持した。

3.2.2 急速ひずみ電極試験

Figure 3-1 に急速ひずみ電極試験の概略図を示す。内部を 37°C に保持した α -MEM + 10 vol% FBS で満たした電気化学セル内に 3.2.1 項で用意した試料をセットし、油圧式サーボパルサ (Shimadzu Co.) のつかみ部に試料の両端を固定した。電気化学セルは 3 電極セルとなっており、参照電極に Ag/AgCl (3 M NaCl)、対極に Pt ワイヤ、作用極に試料がそれぞれ用いられている。

次に、急速ひずみ電極試験の手順を示す。まず、試料を電気化学セルおよびサーボパルサにセットした後、腐食電位がほぼ定常に達するまで 1 時間 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ を通気した。1 時間後、その時点での腐

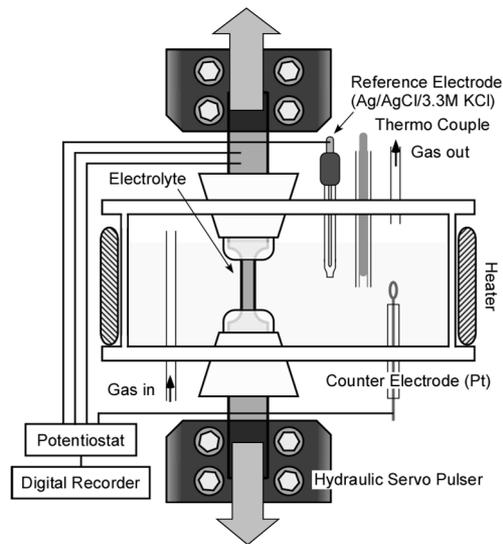


Fig. 3-1 Schematic illustration of rapid straining electrode test apparatus.

食電位で試料を定電位分極し、試料に 4%, 0.67 /s の急速ひずみを付与した。このときに、試料表面に形成された不働態皮膜が試料変形により破壊され、露出した新生面から金属溶解が生じアノード電流が増加する。その後ただちに再不働態化により新生面上の酸化皮膜の自己再生が生じアノード電流は減少する。この不働態皮膜破壊および再不働態化によるアノード電流の増減をひずみ変化および応力変化と対応させて解析する手法が急速ひずみ電極試験法である。

3.2.3 統計学的処理

本研究では、サンプル数を $n=3$ とし、グループ間の有意差を Student の t 検定を用いて統計学的に算出した。あらかじめ F 検定（等分散性の検定）を行うことで、等分散性が仮定できるデータ群と等分散性が仮定できないデータ群（Welch の検定）に分け、各データに適した t 検定を選択し、両側検定を実施した。なお、有意水準は $p=0.05$ とし、 $p<0.01$ で特に強い有意差とした。

3.3 結果および考察

3.3.1 ひずみ付与中およびひずみ付与終了後のアノード電流変化

不働態皮膜破壊前であっても皮膜を通して微量の金属溶解（アノード反応）が生じており、Ti-6Al-4V 合金においては、急速ひずみ付与前のアノード電流は数 $10 \text{ nA} \cdot \text{cm}^{-2}$ であった。急速ひずみが付与され不働態皮膜が破壊されると新生面が溶液に暴露され金属溶解が生じる。本研究では、新生面面積を試験前後のゲージ部幅、厚さ、長さより算出し、得られたアノード電流変化を規格化した。

Figure 3-2 に試料を α -MEM + 10 vol% FBS に 1 日浸漬した後、急速ひずみを付与した際のひずみ変化、応力変化、アノード電流変化を示す。

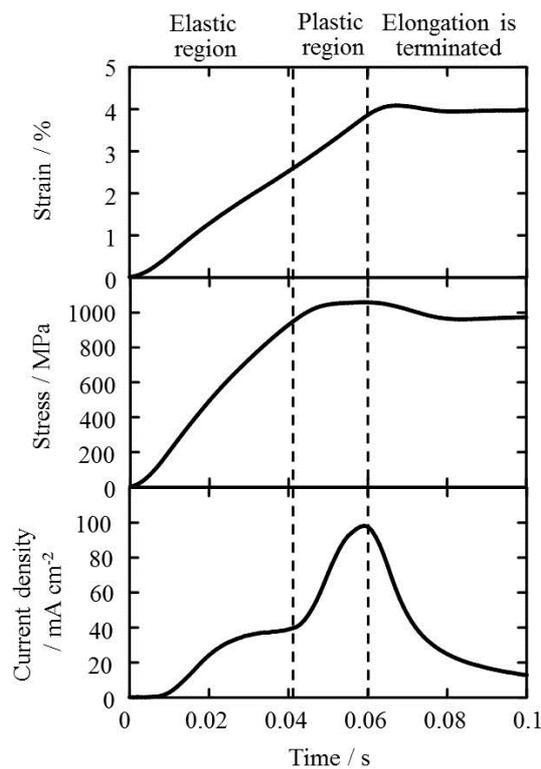


Fig. 3-2 Typical transients of strain, stress and current with time during and after elongation of Ti-6Al-4V alloy immersed in α -MEM +10% FBS for 1 day.

Figure 3-2 は試料の変形挙動により 3 つの領域に分割することが可能である。すなわち、弾性変形域、次いで生じる塑性変形域、ひずみ付与終了後の試料変形が生じていない領域である。Ti-6Al-4V 合金においては、弾性変形中にアノード電流の増加が認められた。これは弾性変形中に不働態皮膜が破壊され金属溶解が生じたことを表している。また、不働態皮膜破壊直後から再不働態化が開始し、金属溶解は抑制されるため、弾性変形域の途中からアノード電流の傾きが緩やかになった。次いで、塑性変形開始直後にアノード電流は急増した。弾性変形時には結晶内の原子配列を変えることなく原子間距離が変化するように変形するため、試料表面の変化は非常に少ない。一方で、塑性変形時には、原子配列の変化、すなわちすべり変形が生じるために試料表面における新生面面積は急増する。その結果、塑性変形開始直後の急激なアノード電流の増加が生じたと考えられる。

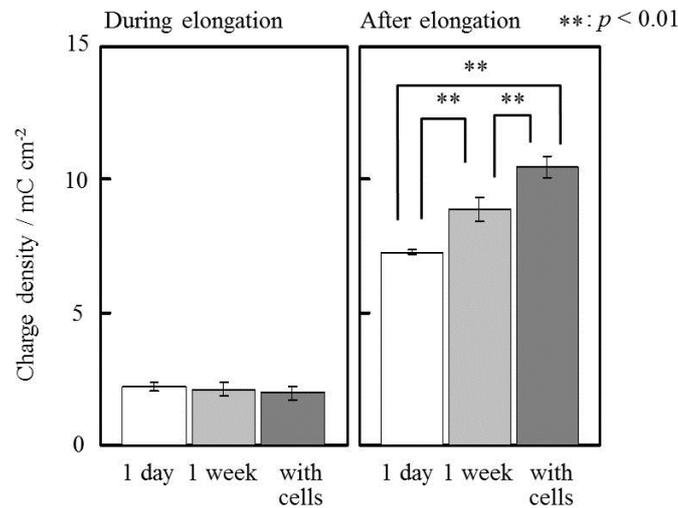


Fig. 3-3 Charge density generated during and after elongation of Ti-6Al-4V alloy immersed in α -MEM +10% FBS for 1 day without cells, for 1 week without cells and for 1 week with cells.

3.3.2 材料上に接着したタンパク質、細胞が溶解および再不働態化に及ぼす影響

材料表面に接着したタンパク質および細胞が、変形に際した金属溶解、再不働態化に及ぼす影響を定量的に評価するため、ひずみ付与中およびひずみ付与終了後に発生した電気量をひずみ付与開始から 10 秒間のアノード電流の積分値として求めた。Figure 3-3 に各条件の電気量を示す。発生した電気量は各試料の金属溶解量に相当する。ひずみ付与中では、前処理として α -MEM + 10 vol% FBS に 1 日浸漬させた試料（以下、1 日浸漬試料）、 α -MEM + 10 vol% FBS に 1 週間浸漬させた試料（以下、1 週間浸漬試料）、 α -MEM + 10 vol% FBS に 1 週間浸漬させながら表面で細胞を培養した試料（以下、細胞試料）それぞれに発生した電気量の間には有意差は認められなかった。一方で、ひずみ付与後の再不働態化中に発生した電気量は、1 日浸漬試料よりも 1 週間浸漬試料でより多く発生し、細胞試料において最も大きくなった。3 条件の試料の再不働態化を

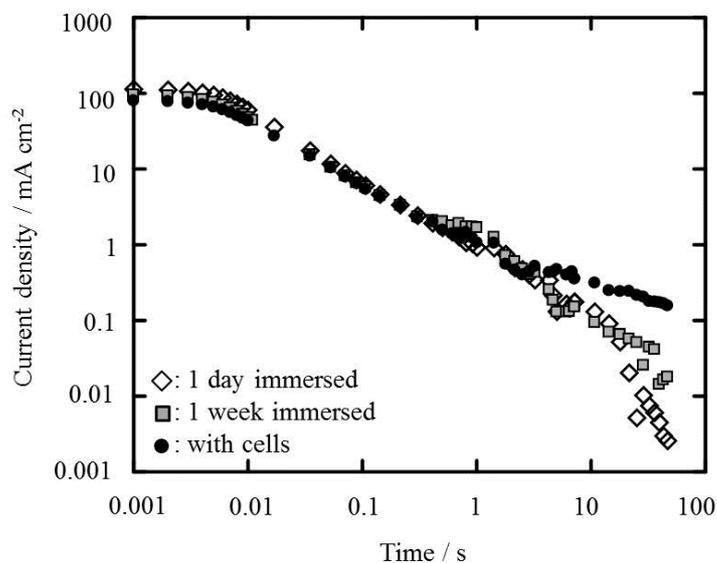


Fig. 3-4 The current decay during repassivation of Ti-6Al-4V alloy immersed in α -MEM +10% FBS for 1 day without cells, for 1 week without cells and for 1 week with cells as log i – log t plot.

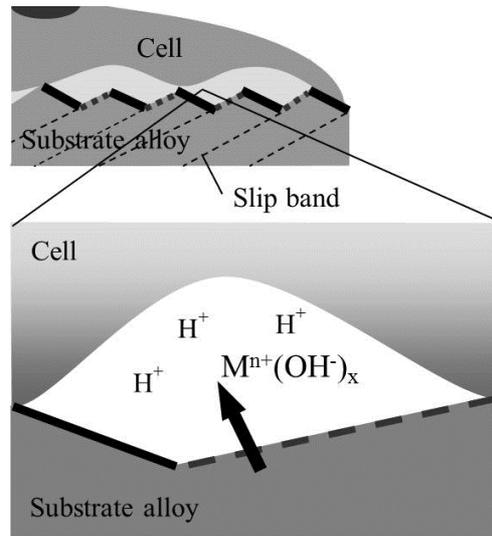


Fig. 3-5 The model of metal dissolution with cells adhered on the substrate alloy.

比較するため、ひずみ付与停止時の時間を 0 とし、横軸を時間の対数、縦軸をアノード電流密度の対数とした電流減衰曲線 (log t-log i プロット) を Fig. 3-4 に示す。電流減衰曲線の傾きが 1 日浸漬試料、1 週間浸漬試料、細胞試料の順に緩やかになっていることから、試料表面に接着したタンパク質や細胞により再不働態化が抑制されていることがわかる。Figure 3-5 に細胞が試料表面に接着し、すべり変形が試料に付与された際の再不働態化モデルを示す。細胞やタンパク質などの大きな高分子が試料表面に接着した際には、細胞やタンパク質と試料表面の間に小さなすき間構造が生じる。材料変形により不働態皮膜が破壊されると新生面と溶液が接触し、以下の (3-1) 式および (3-2) 式に示す金属溶解と加水分解が生じる。



すき間内部では溶質の拡散が遅くなるため、加水分解で生じた H^+ イオンの濃度が上昇し、すき間内の pH が低下する。その結果、金属溶解度が上昇し^[26]、金属溶解が促進されたと考えられる。1週間浸漬試料においては1日浸漬試料よりも長期間模擬体液に浸漬させたことで、表面上により多量のタンパク質が堆積しすき間環境を形成している。その結果、急速ひずみにより発生した電気量すなわち金属溶解量が増大した。さらにすき間内では細胞による酸素の消費および溶液側からの酸素供給の抑制も生じる。よって、細胞試料ではさらなる再不働態化の阻害が生じたと考えられる。タンパク質や細胞による再不働態化の阻害はすき間腐食^[27]と原理は同じであるが、材料変形による不働態皮膜破壊を起点としているため、静的環境で発生するすき間腐食よりもさらにシビアな腐食であると言える。

3.3.3 再不働態化の極端な阻害および局部腐食の発生

Figure 3-6(a), (b)では、どちらも表面に細胞を接着させ、細胞培養環境 (37°C, 5% CO₂) で模擬体液α-MEM + 10 vol% FBS に1週間浸漬させた

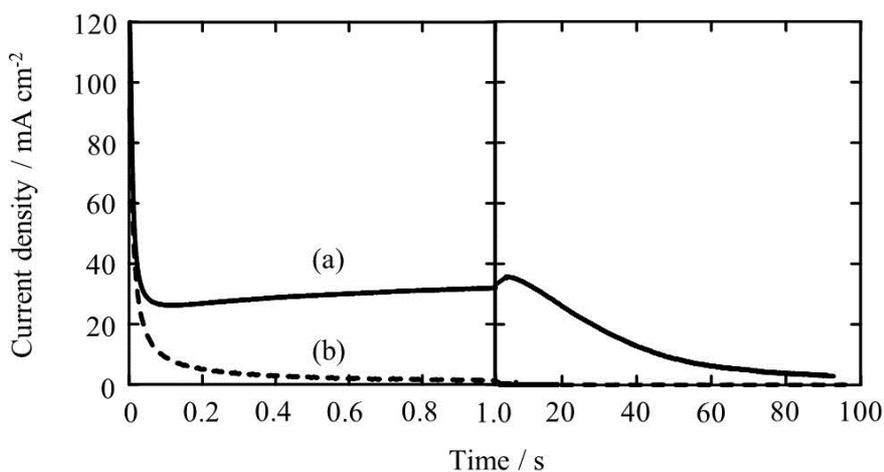
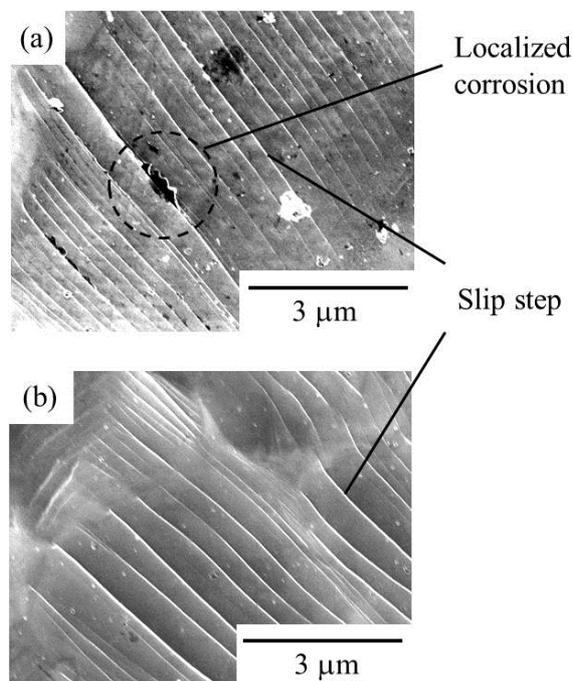


Fig. 3-6 Current decay of Ti-6Al-4V alloy with cells during repassivation:
 (a) repassivation was hindered and current decay was retarded,
 (b) repassivation finished immediately.

試料の電流挙動を示している。通常、タンパク質や細胞により再不働態化が阻害された試料表面においても、再不働態化は進行し測定されるアノード電流は時間とともに減衰する(Fig. 3-6(b))。しかし、一部の細胞を接着した試料において、再不働態化速度が低下するだけでなく減衰途中にアノード電流が停滞する現象が認められた(Fig. 3-6(a))。電流の停滞が認められた試料においては、アノード電流はまず約 30 mA/cm^2 まで減少し、その後約 5 秒間同程度の電流密度を保持した。その後、再び減衰を始めたが、減衰速度は停滞を生じなかった試料と比較して非常に遅かった。電流の減衰が認められた試料の表面を試験後に SEM にて観察すると、Fig. 3-7(a)に示したとおり、すべりステップに沿った局部腐食が認められた。一方で、Fig. 3-7(b)に示したように、アノード電流減衰の停



*Fig. 3-7 SEM images of Ti-6Al-4V alloy surface after rapid elongation:
(a) repassivation was hindered and localized corrosion grew,
(b) repassivation finished immediately.*

滞が生じなかった試料においてはこのような局部腐食は認められなかった。前述のとおり、試料に急速ひずみを付与する際にはその時点で計測された腐食電位において定電位分極を行った。その際の各試料の腐食電位を Fig. 3-8 に示す。再不働態化中に電流の停滞が生じなかった試料では、急速ひずみ付与前の浸漬条件(1 日浸漬、1 週間浸漬、細胞接着の有無)にかかわらず、約-200 mV (vs. Ag/AgCl) であった。一方、電流の停滞が生じた細胞試料では腐食電位は約-60 mV (vs. Ag/AgCl) と他の試料と比較して有意に貴にシフトしていた。よって、再不働態化中に生じるアノード電流の停滞は確率論的な現象ではなく、ひずみ付与前の試料の腐食電位が貴にシフトした際に生じる現象であると考えられる。Hiromoto らは、FBS を添加した模擬体液に浸漬した純 Ti の腐食電位が、FBS を添加しない模擬体液に浸漬した試料と比較して上昇することがあり、加えて浸漬の際に試料上に細胞が接着していると腐食電位はさらに上昇すると報告している^[28]。これは、試料表面に接着したタンパク質や細胞が溶出金属イオンの拡散を阻害した結果、アノード反応が抑制されたためである。本研究で用いた Ti-6Al-4V 合金においても同様の機構で腐食電位が上昇したと考えられる。

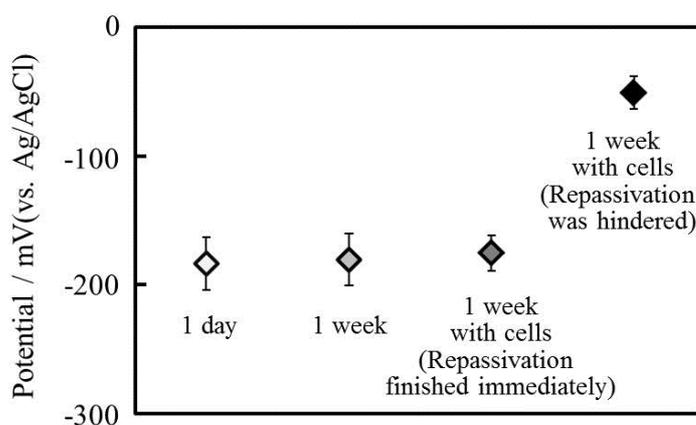


Fig. 3-8 The corrosion potentials at which the samples were polarized.

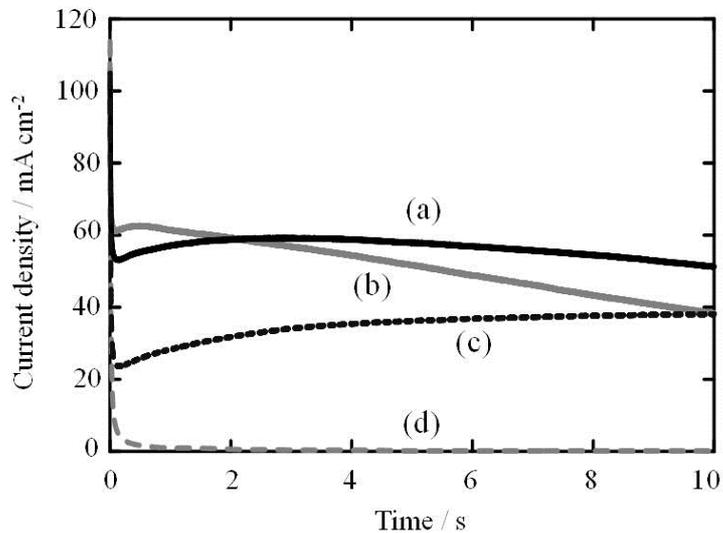


Fig. 3-9 Current transients of Ti-6Al-4V alloy during repassivation:

(a) polarized at corrosion potential +200 mV (0 mV vs. Ag/AgCl) with cells, (b) polarized at corrosion potential +200 mV (0 mV vs. Ag/AgCl) without cells, (c) polarized at corrosion potential (-60 mV vs. Ag/AgCl) with cells and (d) polarized at corrosion potential (-200 mV vs. Ag/AgCl) with cells.

試料表面に接着した細胞および分極時の電位が再不働態化及ぼす影響を検討するため、Fig. 3-9 に各電位で急速ひずみを付与した際の再不働態化時の電流減衰挙動を示す ((a): 腐食電位より 200 mV 貴 (0 mV vs. Ag/AgCl)) に分極、細胞接着あり、(b): 腐食電位より 200 mV 貴 (0 mV vs. Ag/AgCl)) に分極、細胞接着なし、(c): 腐食電位 (-60 mV vs. Ag/AgCl)) に分極、細胞接着あり、(d): 腐食電位より 200 mV 卑 (-200 mV vs. Ag/AgCl)) に分極、細胞接着あり)。電流の停滞は(a), (b)および(c)の本来の腐食電位 (約-200 mV vs. Ag/AgCl)) よりも貴な電位にて定電位分極された試料で生じており、細胞接着の有無にかかわらなかった。一方で、細胞が接着していても-200mV (vs. Ag/AgCl) に分極された試料

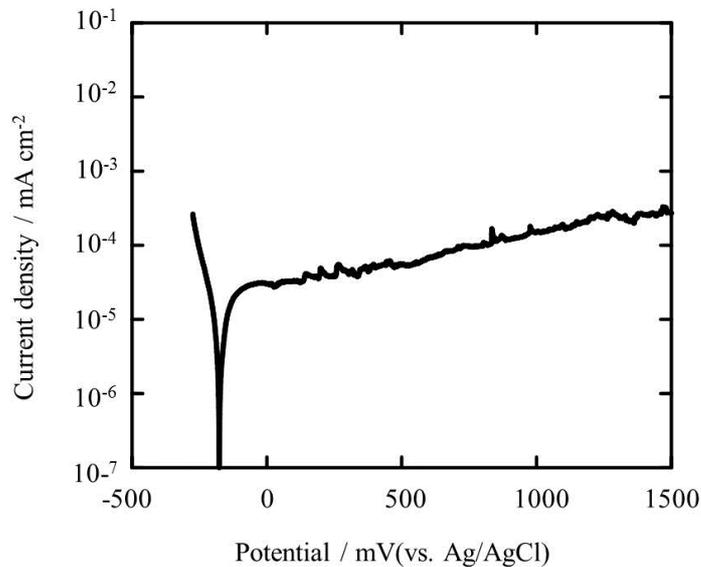


Fig. 3-10 Polarization curve of Ti-6Al-4V alloy with cells.

では電流の停滞は生じなかった。このことから、再不働態化時の電流の停滞、すなわち再不働態化の極端な阻害は材料の腐食電位が高くなったために生じたことが明らかである。さらに高電位に分極された試料の中でも細胞が接着した試料(a), (c)では細胞の接着のない試料(b)と比較して電流停滞の時間が増加した。これは、3.3.2項で述べた細胞による再不働態化の阻害の影響である。通常、Ti-6Al-4V合金は非常に高い耐食性を有し電流の停滞が生じた電位域(0 mV (vs. Ag/AgCl) 付近)では不働態皮膜を形成し塩化物中性環境でも局部腐食を生じない (Fig. 3-10)。しかし、細胞接着下で材料変形が生じることで、次のプロセスをたどり再不働態化の極端な阻害およびすべりステップに沿った局部腐食 (Fig. 3-8(a)) が生じると考えられる。

- (1) 試料表面にタンパク質や細胞が接着し、腐食電位が上昇する。
- (2) 上昇した腐食電位において材料に変形が生じ、すべりステップにて新生面が露出。
- (3) すべりステップに沿って金属溶解が生じる。

(4) 新生面とタンパク質や細胞との間に生じたすき間腐食環境において、再不働態化が阻害され局部腐食が成長する (Fig. 3-5)。

本章で示されたタンパク質や細胞による再不働態化の阻害および局部腐食の発生は、生体内をバイオメカノケミカル環境として捉えた結果であり、従来試験環境、試験方法では得られなかった特筆すべき知見であると言える。

3.4 結言

本章では、タンパク質および細胞を含んだ模擬体液中で Ti-6Al-4V 合金に急速ひずみを付与し、得られたアノード電流の増加および減衰挙動を解析することで、生体内における医療用金属材料の金属溶解、再不働態化について以下の結論を得た。

1. タンパク質や細胞が Ti-6Al-4V 合金上に接着し、変形が生じた際には、再不働態化時の金属溶解量が増加する。これは、タンパク質や細胞と新生面の間にすき間腐食環境が形成されるためである。
2. 細胞が接着した Ti-6Al-4V 合金では、再不働態化時に極端な再不働態化の阻害が生じることがある。極端な再不働態化の阻害が生じた材料では、新生面上での金属溶解量が増加するため、すべりステップに沿って局部腐食が生じることが懸念される。

参考文献

- [1] Y. Okazaki, E. Gotoh: Comparison of metal release from various metallic biomaterials *in vitro*, *Biomaterials*, **26**(1), 11-21 (2005).
- [2] M. Aziz-Kerrzo, K.G. Conroy, A.M. Fenelon, S.T. Farrell, C.B. Breslin: Electrochemical studies on the stability and corrosion resistance of titanium-based implant materials, *Biomaterials*, **22**(12), 1531-1539 (2001).
- [3] M.G. Shettlemore, K.J. Bundy: Toxicity measurement of orthopedic implant alloy degradation products using a bioluminescent bacterial assay, *Journal of Biomedical Materials Research*, **45**(4), 395-403 (1999).
- [4] S. Hiromoto, T. Hanawa, K. Asami: Composition of surface oxide film of titanium with culturing murine fibroblasts L929, *Biomaterials*, **25**(6), 979-986 (2004).
- [5] Y.-C. Tang, S. Katsuma, S. Fujimoto, S. Hiromoto: Electrochemical study of Type 304 and 316L stainless steels in simulated body fluids and cell cultures, *Acta Biomaterialia*, **2**(6), 709-715 (2006).
- [6] D.C. Hansen, K.M. Hansen, T.L. Ferrell, T. Thundat: Discerning Biomolecular Interactions Using Kelvin Probe Technology, *Langmuir*, **19**(18), 7514-7520 (2003).
- [7] T. Hanawa, Y. Kohayama, S. Hiromoto, A. Yamamoto: Effects of Biological Factors on the Repassivation Current of Titanium, *Materials Transactions*, **45**(5), 1635-1639 (2004).
- [8] C. Leinenbach, D. Eifler: Fatigue and cyclic deformation behaviour of surface-modified titanium alloys in simulated physiological media, *Biomaterials*, **27**(8), 1200-1208 (2006).

- [9] S.R. Goldberg, J.L. Gilbert: Transient electric fields induced by mechanically assisted corrosion of Ti-6Al-4V, *Journal of Biomedical Materials Research*, **56**(2), 184-194 (2001).
- [10] C.R. Ramos-Saenz, P.A. Sundaram, N. Diffort-Carlo: Tribological properties of Ti-based alloys in a simulated bone–implant interface with Ringer’s solution at fretting contacts, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **3**(8), 549-558 (2010).
- [11] M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia: Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review, *Progress in Materials Science*, **54**(3), 397-425 (2009).
- [12] J.J. Jacobs, J.L. Gilbert, R.M. Urban: Corrosion of metal orthopaedic implants, *Journal of Bone and Joint Surgery – Series A*, **80**(2), 268-282 (1998).
- [13] S. Fujimoto, H. Kusu, S. Katsuma, M. Sakamoto, Y.-C. Tang: Electrochemical characterization of Ti and Ti base alloys under simulated body fluid environment, *Materials Science Forum*, **512**, 249-254 (2006).
- [14] S. Virtanen, I. Milošev, E. Gomez-Barrena, R. Trebše, J. Salo, Y.T. Konttinen: Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions, *Acta Biomaterialia*, **4**(3), 468-476 (2008).
- [15] T. Akahori, M. Niinomi, H. Fukui, A. Suzuki: Fatigue, Fretting Fatigue and Corrosion Characteristics of Biocompatible Beta Type Titanium Alloy Conducted with Various Thermo-Mechanical Treatments, *Materials Transactions*, **45**(5), 1540-1548 (2004).
- [16] N. Maruyama, D. Mori, S. Hiromoto, K. Kanazawa, M. Nakamura: Fatigue strength of 316L-type stainless steel in simulated body fluids, *Corrosion Science*, **53**(6), 2222-2227 (2011).

- [17] S. Xulin, A. Ito, T. Tateishi, A. Hoshino: Fretting corrosion resistance and fretting corrosion product cytocompatibility of ferritic stainless steel, *Journal of Biomedical Materials Research*, **34**(1), 9-14 (1997).
- [18] S. Hiromoto: Evaluation of Corrosion Behaviour of Metals under Cell Culture Environments, *Zairyo-to-Kankyo*, **59**(8), 278-284 (2010).
- [19] F.M. Song, K.S. Raja, D.A. Jones: A film repassivation kinetic model for potential-controlled slower electrode straining, *Corrosion Science*, **48**(2), 285-307 (2006).
- [20] S. Fujimoto, T. Shibata: The step response function of anodic reaction induced by rapid straining on passive metals, *Corrosion Science*, **31**(C), 643-648 (1990).
- [21] T. Shibata, S. Fujimoto: Breakdown of Passive Film on Ni-Cr Alloys in High-Temperature High-Pressure Water Containing Sulfate Ions, *Corrosion*, **46**(10), 793-798 (1990).
- [22] R.S. Lillard, G. Vasquez Jr., D.F. Bahr: The Kinetics of Anodic Dissolution and Repassivation on Stainless Steel 304L in Solutions Containing Nitrate, *Journal of the Electrochemical Society*, **158**(6), C194-C201 (2011).
- [23] F. Contu, B. Elsener, H. Böhni: A study of the potentials achieved during mechanical abrasion and the repassivation rate of titanium and Ti6Al4V in inorganic buffer solutions and bovine serum, *Electrochimica Acta*, **50**(1), 33-41 (2004).
- [24] T. Yamamoto, K. Fushimi, H. Habazaki, H. Konno: Depassivation-repassivation behavior of a pure iron surface investigated by micro-indentation, *Electrochimica Acta*, **55**(3), 1232-1238 (2010).

- [25] S. Fujimoto, H. Yamamoto: Passivity breakdown and repassivation on TiNi during rapid straining accompanying martensitic phase transformation, *ECS Transactions*, **16**(52), 233-238 (2008).
- [26] A.E. Smith: A study of the variation with pH of the solubility and stability of some metal ions at low concentrations in aqueous solution. Part I, *Analyst*, **98**(1162), 65-68 (1973).
- [27] J.W. Oldfield, W.H. Sutton: Crevice Corrosion of Stainless Steels: I. A Mathematical Model, *British Corrosion Journal*, **13**(1), 13-22 (1978).
- [28] S. Hiromoto, K. Noda, T. Hanawa: Development of electrolytic cell with cell-culture for metallic biomaterials, *Corrosion Science*, **44**(5), 955-965 (2002).

第 4 章 タンパク質および細胞を含んだ模擬体液中で繰返し 応力を付与した Type 316L ステンレス鋼の溶解、再 不働態化

4.1 緒言

生体内は、細胞や体液からなる生物学的環境と、動的荷重や摩擦が常に付与される力学的環境の複合環境である^[1-4]。細胞や体液は局部腐食および金属溶解の原因となり^[5-8]、一方でひずみや疲労、摩耗はインプラントの機械的損傷を惹起する^[9-12]。生体内でインプラントに付与される応力は、ほとんどが降伏応力以下の繰返し応力であるため、腐食疲労がインプラント破損に特に大きな影響を及ぼす^[13, 14]。

一般に、医療用金属材料は表面に不働態皮膜と呼ばれる厚さ数 nm の酸化皮膜を形成するため高い耐食性を有する^[15, 16]。しかしながら、生体内ではインプラントに常に動的荷重が付与され、生じた変形により不働態皮膜が破壊された際には新生面が露出し体液と接触するため、金属溶解および局部腐食が発生する。多くの場合、局部腐食の成長は再不働態化と呼ばれる酸化皮膜の自己再生により抑制されるが^[17, 18]、再不働態化が阻害された際は局部腐食が成長し、体内のような動的荷重に晒される環境では疲労により生じたき裂の進展を加速させ、腐食疲労破壊につながる事が懸念される^[19]。

著者らはタンパク質や細胞を接着させた Ti-6Al-4V 合金に模擬体液中で急速ひずみを付与することで、タンパク質や細胞が再不働態化を阻害し、再不働態化中に発生する電気量を増加させること、すなわち金属溶解量を増加させることを明らかにした^[20, 21]。弾性限以下の繰返し応力がインプラントに付与された際も、タンパク質や細胞は同様に再不働態化を阻害するものと考えられる。タンパク質や細胞による再不働態化の阻

害は、腐食を促進させ腐食疲労き裂の発生や進展に影響を及ぼすと考えられるが、タンパク質や細胞を含む模擬体液中での腐食疲労の検討は国内外を問わずほとんど行われていない。その理由として、生体内環境の模擬の困難さが挙げられる。腐食疲労試験のような長期間の試験では、タンパク質や細胞が含まれた模擬体液は大気に接触することで容易に腐敗する。そこで本研究では、まず、模擬体液を腐敗させず、長期間の試験が行えるシステムの作製を行った。

本章では、動的荷重下における医療用金属材料の耐食性にタンパク質や細胞が及ぼす影響を検討するため、タンパク質や細胞を含んだ模擬体液中で Type 316L ステンレス鋼に繰返し応力を付与し、不働態皮膜破壊および再不働態化を電気化学手法により解析した結果を示す。

4.2 実験方法

4.2.1 供試材

本研究で使用した Type 316L 鋼の組成を Table 4-1 に示す。Type 316L ステンレス鋼の薄板を引張試験片(ゲージ部寸法: 8×4×1 mm³)に加工後、鏡面研磨し、アセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ 600 秒間超音波洗浄した。その後、模擬体液との接触を避けるためゲージ部以外を PTFE テープで被覆した。試料を 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した後、模擬体液 (α -MEM (alpha Modification of Eagle's Minimum Essential Medium, MP Biomedicals) + 10 vol.% FBS (Fetal Bovine Serum)) に 1 日

Table 4-1 Chemical composition of type 316L stainless steel (mass%).

Cr	Ni	Mo	C	Si	Mn	P	S	Fe
17.35	12.18	2.07	0.011	0.63	1.20	0.03	0.001	Bal.

または 1 週間浸漬させた。FBS を含んだ模擬体液に浸漬する時間を変化することで、1 週間浸漬させた試料上に堆積したタンパク質量は 1 日浸漬させた試料よりも増加している。さらに模擬体液に浸漬させた試料表面で骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を 1 週間培養した試料も準備した。細胞播種密度を $2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-2}$ とし、1 週間培養することで試料ゲージ部全面を細胞が被覆した状態 (コンフルエント) にした。細胞培養環境は 37°C , 5% CO_2 に保持した。

4.2.2 模擬体液における繰返し応力付与

模擬生体環境における Type 316L ステンレス鋼の電気化学挙動を検討するため、4.2.1 項で示した方法により準備した試料に模擬体液中で繰返し応力を付与した。一般的に金属材料の疲労強度を評価する指標である 10^7 回の繰返し変形を試料に付与するには、日常生活でインプラントに付与される応力の周波数を想定した値である 2 Hz ^[22] の 5 倍の 10 Hz

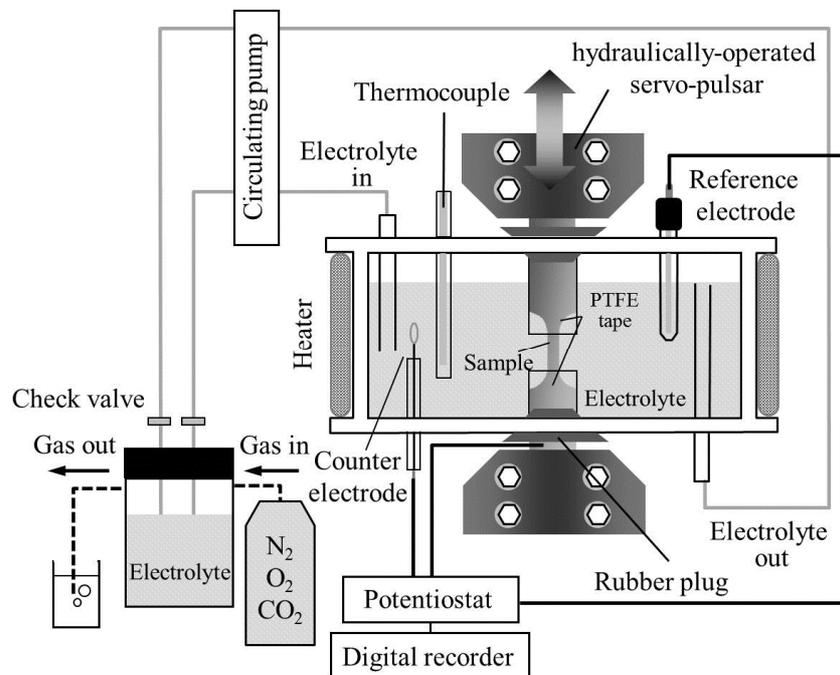


Fig. 4-1 Schematic illustration of cyclic deformation test apparatus.

で加速試験を行っても約 2 週間を要する。そこで、タンパク質や細胞を含んだ模擬体液の腐敗を防ぐため、Fig. 4-1 に示すような滅菌した環境で試験が実施できるシステムを構築した。ガラスチューブおよび PTFE 製の電気化学セルをオートクレーブで滅菌した後、細胞培養条件に保持した模擬体液で満たし内部に試料を設置した。試料の両端は油圧式サーボパルサ (Shimadzu Co.) に接続し、試料に応力比 0.1 ($R=0.1$)、周波数 10 Hz、最大応力 300 MPa の繰り返し引張応力を付与した。この際、付与した最大応力は、Type 316L ステンレス鋼の 0.2%耐力以下の応力である。試験中に測定した試料の応力変化、変位と腐食電位変化を対応させることで繰り返し応力下の Type 316L ステンレス鋼の電気化学的挙動を検討した。

4.2.3 統計学的処理

本研究では、サンプル数を $n=3$ とし、グループ間の有意差を Student の t 検定を用いて統計学的に算出した。あらかじめ F 検定 (等分散性の検定) を行うことで、等分散性が仮定できるデータ群と等分散性が仮定できないデータ群 (Welch の検定) に分け、各データに適した t 検定を選択し、両側検定を実施した。なお、有意水準は $p=0.05$ とし、 $p<0.01$ で特に強い有意差とした。

4.3 結果および考察

4.3.1 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

模擬体液に 1 日浸漬させた試料 (1 日浸漬試料) に繰り返し応力を付与した際の、3 サイクル目および 4 サイクル目の応力変化、変位、腐食電位変化を Fig. 4-2 に示す。腐食電位は応力変化すなわち試料変形に応じて変化した。応力が増加すると、試料には引張変形が加わり、不働態皮

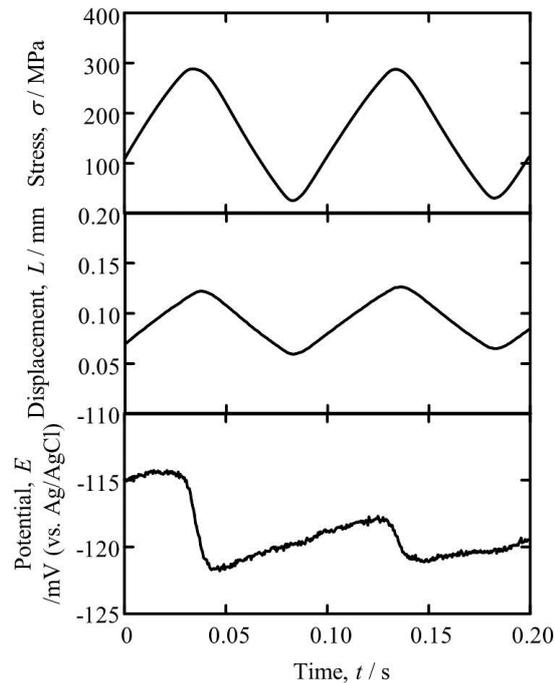


Fig. 4-2 An example of the changes in stress, displacement and corrosion potential in third and fourth cycle under cyclic of sample immersed in simulated body fluid for 1 day prior to the test.

膜が破壊される。その結果、新生面が模擬体液に暴露し、アノード溶解が生じたため腐食電位は卑にシフトした。一方で、応力の減少時には不働態皮膜破壊直後から開始する再不働態化により新生面上の不働態皮膜が自己再生したため、アノード溶解は抑制され腐食電位は貴にシフトした。Figure 4-3 に、同試料の 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。試験開始直後には不働態皮膜が破壊されアノード溶解が生じたために腐食電位は低下した。しかし、約 10 サイクル後には腐食電位は貴にシフトした。サイクル数が増加するに伴い、試料は疲労硬化を起こし付与されるひずみ量が減少する。その結果、1 サイクルごとに暴露する新生面面積が減少したため腐食電位の低下が抑制

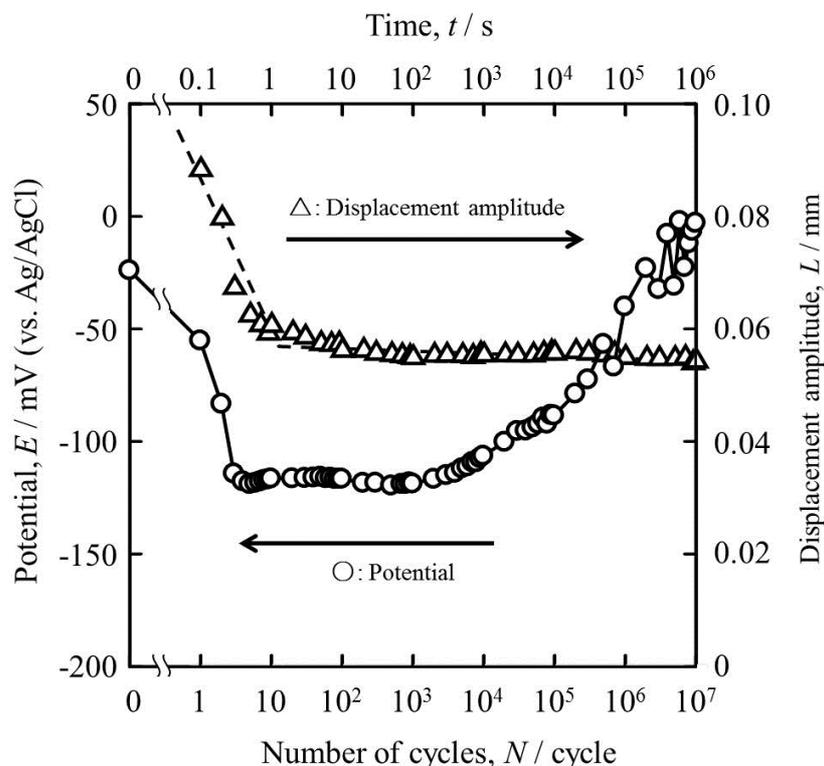


Fig. 4-3 Typical transients of corrosion potential and amplitude of displacement until 10^7 cycles under cyclic deformation of sample immersed in simulated body fluid for 1 day prior to the test.

されたと考えられる。さらに、すでに露出した新生面上ではただちに再不働態化が生じるためアノード溶解は抑制される。すなわち、加工硬化による1サイクルごとの新生面暴露面積の減少と再不働態化によるアノード溶解抑制が腐食電位上昇の原因である。

約 10^6 サイクル経過後、加工硬化による変位振幅に変化がないにもかかわらず再び腐食電位は低下し、その後 10^7 サイクルまでは貴化および卑化を繰り返した。Figure 4-4 に 10^7 サイクル経過後の試料表面 SEM 像を示す。本研究で付与した応力の最大値は Type 316L ステンレス鋼の 0.2%耐力以下であったにもかかわらず、き裂周囲にすべり帯が観察された。すべり帯はき裂周囲で塑性変形が生じたことを示している。第2章で述

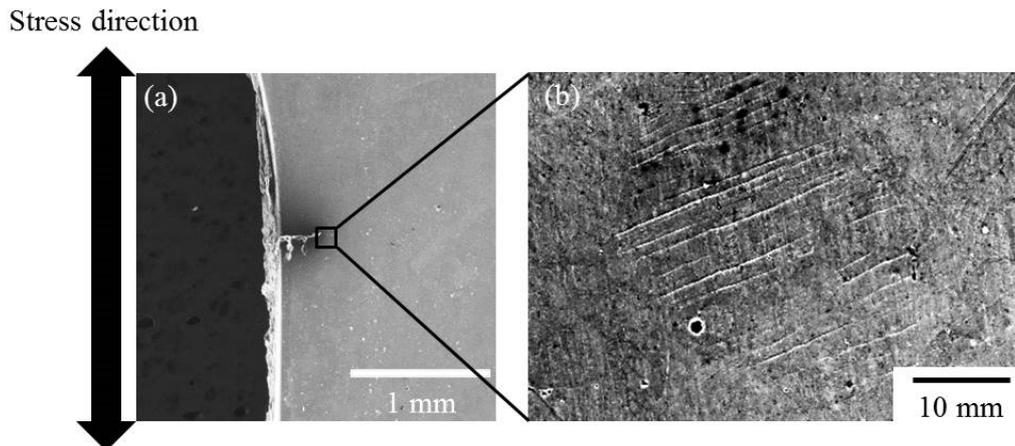


Fig. 4-4 SEM images of 316L stainless steel surface after cyclic deformation: (a) a crack on the gauze section, (b) slip steps near the crack tip.

べたように、弾性変形時と塑性変形時の金属溶解の違いを急速ひずみ電極試験により検討した。急速ひずみ試験法は、溶液中で定電位分極した試料に急速引張を付与することで、不働態皮膜破壊による金属溶解をアノード電流変化として捉える手法である。急速ひずみを付与することで金属溶解と再不働態化を独立して観測することが可能である^[20, 21, 23]。1日浸漬試料を腐食電位において定電位分極し、伸びひずみ量 4%、ひずみ速度 0.67 s^{-1} の急速ひずみを付与した。その際の応力およびアノード電流変化を Fig. 4-5 に示す。Type 316L ステンレス鋼において、アノード電流は塑性変形開始時に増加した。よって、弾性変形時にはほとんど不働態皮膜は破壊されていないと考えられる。塑性変形時にはすべりステップが形成されるため、より多くの新生面が生じる。繰返し応力を付与した試料では、き裂周囲において弾性変形と塑性変形の両方が生じているが、急速ひずみ電極試験の結果より、金属溶解はほとんどが塑性変形により露出した新生面上でのみ生じていることがわかる。Ayyub らは、弾性限以下の繰返し応力が加わった際に、介在物や試験片の端部におい

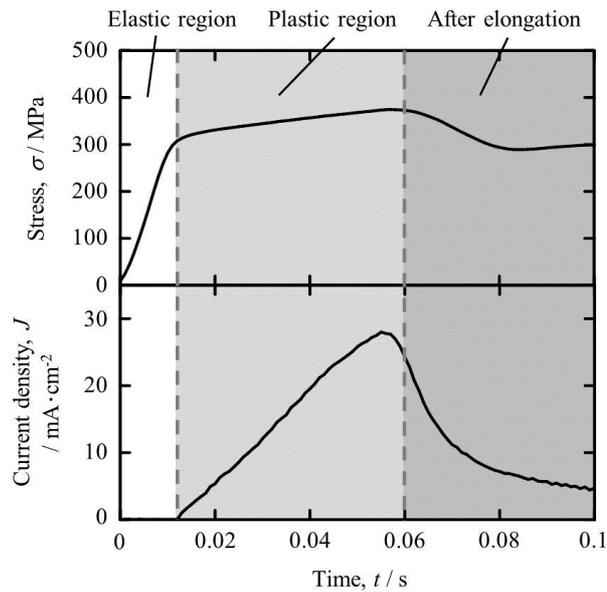


Fig. 4-5 Typical transients of stress and current density with time during and after rapid elongation of 316L stainless steel immersed in simulated body fluid for 1 day.

て応力集中により局所的な塑性変形が生じ得ると述べている^[24]。本研究でも介在物および試験片の端部において生じた微小な塑性変形を起点とし疲労き裂が発生したと考えられる。疲労き裂が発生すると、き裂先端部に応力集中するため、より大きな塑性変形が生じる。 10^6 サイクル経過後の腐食電位の卑化および貴化の繰返しは、疲労き裂の発生および進展、それに準じた塑性変形による新生面の露出と、再不働態化の繰返しであり、さらにサイクル数を重ねることでき裂内部の局部腐食がき裂の進展を促進させ破断に至ると考えられる。

4.3.2 材料表面に接着したタンパク質や細胞が繰返し応力付与時の 溶解・再不働態化に及ぼす影響

Figure 4-6 に模擬体液に 1 日浸漬させた試料、1 週間浸漬させた試料、1 週間浸漬させながら表面で細胞を培養した試料に模擬体液中で繰返し応力を付与した際の 10^5 サイクルまでの腐食電位変化を示す。 10^5 サイクルまでの最も卑な電位(以下 V_m)および再び腐食電位が貴化し始めるまでに要する時間 (以下 t_N)に着目した。既に述べたとおり、不働態皮膜が破壊された際、新生面が模擬体液に暴露し金属溶解が生じる。その結果、腐食電位は卑化する。しかし、不働態皮膜破壊後にただちに再不働態化が進行するためアノード反応は抑制され腐食電位は貴化する。よって、 V_m および t_N は金属溶解と再不働態化のバランスで決定されることが考えられる。繰返し応力付与により得られた各試料の V_m および t_N を Fig. 4-7 および Fig. 4-8 に示す。Figure 4-7 に示したとおり、模擬体液に 1 日浸漬させた試料が最も低い V_m を示し細胞を接着させた試料の V_m が最も高くなった。このことから、1 日浸漬させた試料でより大きなアノード溶解が生じており、試料表面に接着したタンパク質や細胞はアノード溶解を抑制することが明らかである。一方で、Fig. 4-8 より細胞試料の t_N は 3 種類の試料の中で最も長くなり、1 日浸漬試料で最も短くなった。このことは、タンパク質や細胞が接着した新生面上の不働態皮膜の再生が遅く、1 日浸漬試料よりも長期的な金属溶解が続いていることを示しており、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わかる。1 日浸漬試料と 1 週間浸漬試料に生じた V_m , t_N の差は試料表面に堆積したタンパク質量により生じていると考えられ、よりタンパク質が堆積した 1 週間浸漬試料においてアノード溶解の抑制および再不働態化の阻害が生じている。第 3 章で述べたように、タンパク質や細胞による再不働態化の阻害は、Ti-6Al-4V 合金でも急速ひずみ電極試験を用いて著

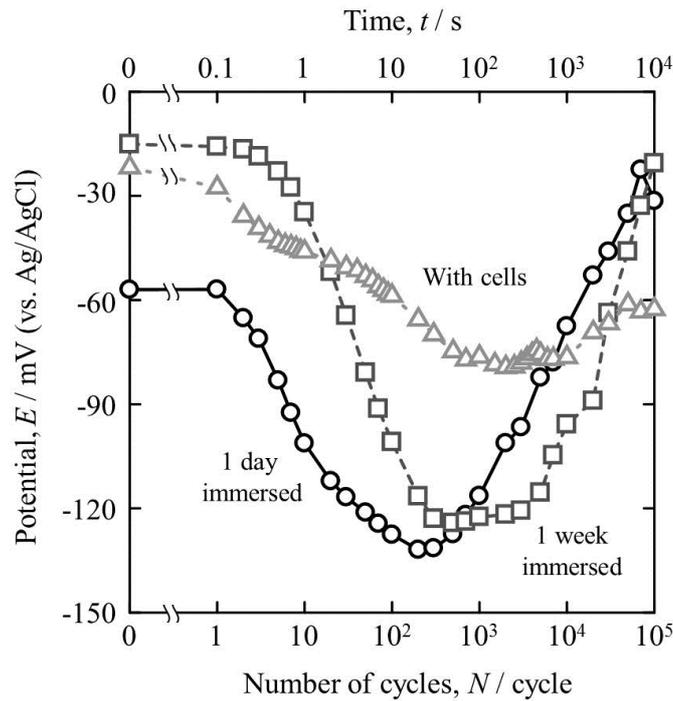


Fig. 4-6 The changes in corrosion potential until 10^5 cycles under cyclic deformation of samples immersed in simulated body fluid for 1 day, 1 week and 1 week with cells culturing.

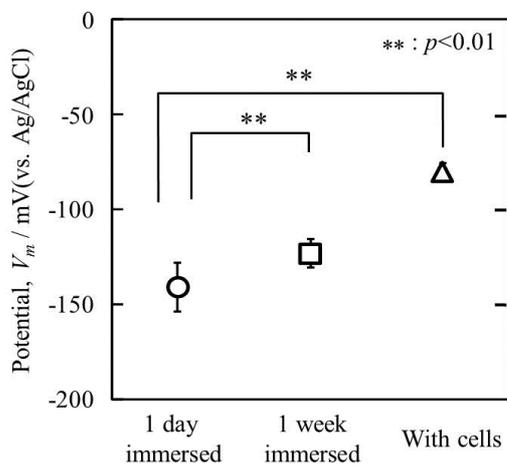


Fig. 4-7 The lowest potentials until 10^5 cycles under cyclic deformation of samples immersed in simulated body fluid for 1 day, 1 week and 1 week with cells culturing.

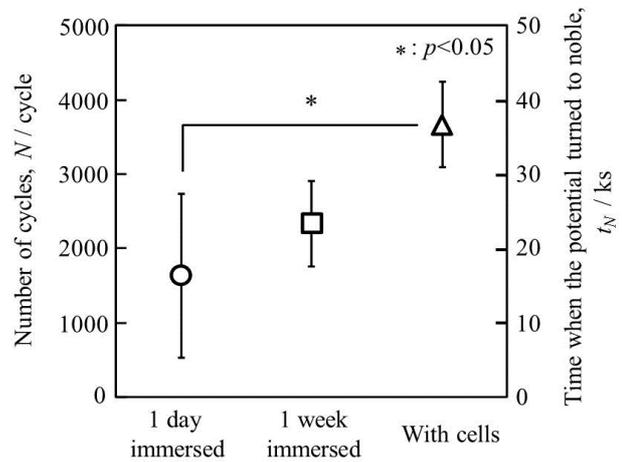


Fig. 4-8 The time when potentials turned to noble under cyclic deformation of samples immersed in simulated body fluid for 1 day, 1 week and 1 week with cells culturing.

者らによって明らかにされている^[20]。本研究では、このように弾性限以下の繰返し応力下でのタンパク質や細胞による金属溶解の抑制と再不働態化の阻害の2つの相反する性質を明らかにした。タンパク質や細胞が材料表面に接着すると、不働態皮膜破壊により生じた新生面と模擬体液の接触が妨げられる。その結果、金属溶解が妨げられると考えられる。一方で、疲労によりき裂が発生するなどして、模擬体液がタンパク質および細胞の間に流入する際には、タンパク質や細胞と材料表面の間にすき間腐食環境が形成される。すき間内部では、溶質の拡散が阻害されるため、溶出金属イオン濃度およびその加水分解により生成される H^+ イオン濃度が上昇する。その結果、すき間内部のpHが低下し再不働態化が阻害されたと考えられる^[21]。

4.4 結言

本章では、タンパク質や細胞を含んだ模擬体液中で Type 316L ステンレス鋼に繰返し応力を付与することで、動的環境における医療用金属材料の溶解および再不働態化挙動に及ぼすタンパク質や細胞などの有機物の影響を調査した。繰返し応力付与時には、腐食電位の変化に着目し、 10^5 サイクルまでの最低電位と再び腐食電位が貴化し始めるまでに要する時間を検討した。得られた結論を以下に示す。

1. 材料表面に接着したタンパク質や細胞は、不働態皮膜が破壊され新生面が露出した際の体液と新生面の接触を妨げることで、金属溶解を抑制する。
2. 疲労き裂の発生などによりタンパク質や細胞と試料表面の間に体液が流れ込んだ際には、すき間環境が形成され再不働態化が阻害される。その結果、き裂進展が促進されることが考えられる。

参考文献

- [1] S. Virtanen, I. Milošev, E. Gomez-Barrena, R. Trebše, J. Salo, Y.T. Konttinen: Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions, *Acta Biomaterialia*, **4**(3), 468-476 (2008).
- [2] J. Xie, A.T. Alpas, D.O. Northwood: A mechanism for the crack initiation of corrosion fatigue of Type 316L stainless steel in Hank's solution, *Materials Characterization*, **48**(4), 271-277 (2002).
- [3] V. Swaminathan, J.L. Gilbert: Fretting corrosion of CoCrMo and Ti6Al4V interfaces, *Biomaterials*, **33**(22), 5487-5503 (2012).
- [4] M. Taira, E.P. Lautenschlager: *In vitro* corrosion fatigue of 316L cold worked stainless steel, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **26**(9), 1131-1139 (1992).
- [5] Y.-C. Tang, S. Katsuma, S. Fujimoto, S. Hiromoto: Electrochemical study of Type 304 and 316L stainless steels in simulated body fluids and cell cultures, *Acta Biomaterialia*, **2**(6), 709-715 (2006).
- [6] S. Hiromoto, T. Hanawa: Electrochemical properties of 316L stainless steel with culturing L929 fibroblasts, *Journal of The Royal Society Interface*, **3**(9), 495-505 (2006).
- [7] S. Karimi, T. Nickchi, A. Alfantazi: Effects of bovine serum albumin on the corrosion behaviour of AISI 316L, Co-28Cr-6Mo, and Ti-6Al-4V alloys in phosphate buffered saline solutions, *Corrosion Science*, **53**(10), 3262-3272 (2011).
- [8] I. Gurappa: Characterization of different materials for corrosion resistance under simulated body fluid conditions, *Materials Characterization*, **49**(1), 73-79 (2002).

- [9] S. Nemat-Nasser, W.G. Guo, J.Y. Cheng: Mechanical properties and deformation mechanisms of a commercially pure titanium, *Acta Materialia*, **47**(13), 3705-3720 (1999).
- [10] P.S. Christel, A. Meunier, D. Blanquaert, J. Witvoet, L. Sedel: Role of stem design and material on stress distributions in cemented total hip replacement, *Journal of Biomedical Engineering*, **10**(1), 57-63 (1988).
- [11] P. Sevilla, C. Aparicio, J.A. Planell, F.J. Gil: Comparison of the mechanical properties between tantalum and nickel–titanium foams implant materials for bone ingrowth applications, *Journal of Alloys and Compounds*, **439**(1-2), 67-73 (2007).
- [12] A. Chiba, K. Kumagai, N. Nomura, S. Miyakawa: Pin-on-disk wear behavior in a like-on-like configuration in a biological environment of high carbon cast and low carbon forged Co–29Cr–6Mo alloys, *Acta Materialia*, **55**(4), 1309-1318 (2007).
- [13] C.J. Goodacre, G. Bernal, K. Rungcharassaeng, J.Y.K. Kan: Clinical complications with implants and implant prostheses, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, **90**(2), 121-132 (2003).
- [14] N. Maruyama, M. Sanbe, Y. Katada, K. Kanazawa: Fatigue Property of Nickel-Free High-Nitrogen Austenitic Stainless Steels in Simulated Body Fluid, *Materials Transactions*, **50**(11), 2615-2622 (2009).
- [15] M.P. Licausi, A.I. Muñoz, V. Amigó Borrás: Influence of the fabrication process and fluoride content on the tribocorrosion behaviour of Ti6Al4V biomedical alloy in artificial saliva, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **20**, 137-148 (2013).
- [16] S. Karimi, T. Nickchi, A.M. Alfantazi: Long-term corrosion investigation of AISI 316L, Co–28Cr–6Mo, and Ti–6Al–4V alloys in simulated body

- solutions, *Applied Surface Science*, **258**(16), 6087-6096 (2012).
- [17] J.W. Schultze, M.M. Lohrengel: Stability, reactivity and breakdown of passive films. Problems of recent and future research, *Electrochimica Acta*, **45**(15-16), 2499-2513 (2000).
- [18] P. Schmuki: From Bacon to barriers: a review on the passivity of metals and alloys, *Journal of Solid State Electrochemistry*, **6**(3), 145-164 (2002).
- [19] S. Zhang, T. Shibata, T. Haruna: A HSAB concept applied to inhibition effect of anions on IGSCC of sensitized type 304 stainless steel, *Corrosion Science*, **42**(6), 1071-1081 (2000).
- [20] K. Doi, S. Miyabe, S. Fujimoto: Metal dissolution and repassivation of Ti-6Al-4V alloy during rapid elongation in simulated body fluid including osteoblast-like cells, *ECS Transactions*, **50**(16) 1-10 (2012).
- [21] K. Doi, S. Miyabe, S. 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**(11), C576-C580 (2013).
- [22] N. Maruyama, S. Hiromoto, E. Akiyama, M. Nakamura: Fretting fatigue behaviour of Ni-free high-nitrogen stainless steel in a simulated body fluid, *Science and Technology of Advanced Materials*, **14**(2), 025002(1-9) (2013).
- [23] S. Fujimoto, T. Shibata: The step response function of anodic reaction induced by rapid straining on passive metals, *Corrosion Science*, **31**, 643-648 (1990)
- [24] B.M. Ayyub, I.A. Assakkaf, D.P. Kihl, M.W. Siev: Reliability-Based Design Guidelines for Fatigue of Ship Structures, *Naval Engineers Journal*, **114**(2), 113-138 (2002).

第5章 タンパク質および細胞を含んだ模擬体液中で繰返し 応力を付与した Ti-6Al-4V 合金の長期信頼性

5.1 緒言

生体内に金属材料を埋入する際は、溶出金属イオンによるアレルギー反応^[1]や腐食により発生したピットやき裂が材料の長期信頼性を低下させる^[2, 3]ことを考慮し、高耐食性を有する材料の選定が必要不可欠である。現在、医療用金属材料として用いられている Ti 合金やステンレス鋼、Co-Cr 合金は表面に不働態皮膜を形成するため水溶液環境で腐食により材料劣化を引き起こすことはほとんどない^[4-6]。しかしながら、生体内は、変形や疲労、摩耗などの力学的要因と体液や細胞などの生物学的要因が相乗作用を及ぼす複合環境である^[7-10]。特に、生体内では金属材料の降伏応力以下の繰返し応力が付与されることがほとんどであるため、力学的要因の中でも金属疲労がインプラント破損に最も大きな影響を及ぼす。加えて、生体内には局部腐食の発生・成長を促進させる塩化物イオンを含んだ体液が存在するため、繰返し応力付与により不働態皮膜が破壊された際には新生面が暴露し金属溶解および局部腐食が生じる。よって、生体内で生じる金属材料の長期信頼性の低下の代表的な原因は腐食疲労である^[11, 12]。

医療用金属材料の中でも、Ti 合金は人工関節のステム部など歩行などにより降伏応力以下の繰返し応力に曝されることが多い箇所に特に用いられている。それ故に、古くから多くの研究者により Ti 合金の機械的性質および耐食性に関して研究が行われてきた。Niinomi は Ti 合金の降伏応力およびヤング率に着目し、 α 型よりも $\alpha+\beta$ 型の2相構造にすることで降伏応力が著しく増大することや、 β 型にすることでヤング率を実際の骨に近づけられることを報告している^[13]。これは、Ti 合金の力学的要

困に対する耐性を検討した例である。また、Rondelli らや Hiromoto らにより生物学的要因が医療用金属材料の耐食性に及ぼす影響の検討が行われている。Rondelli らはタンパク質や細胞を含む模擬体液中ではステンレス鋼の耐食性が低下することを報告しており^[14]、Hiromoto らは細胞がステンレス鋼表面を被覆することで孔食電位が低下し局部腐食が生じやすくなることを見出している^[15]。これらの結果は、生物学的要因が医療用金属材料の耐食性を低下させる可能性を示唆しているが、生体環境における生物学的環境という一側面しか捉えていない。医療用金属材料の長期信頼性を検討するうえで、力学的要因と生物学的要因を複合的に考慮した腐食疲労の研究が必要である。

腐食疲労において、疲労き裂は常に不働態皮膜破壊により露出した新生面上で生じる^[16]。通常、不働態皮膜が破壊され新生面が露出しても、不働態皮膜は再不働態化と呼ばれる自己再生を行い再び新生面上を被覆する^[17, 18]。純 Ti および Ti 合金は酸素との親和性が非常に強いため、ステンレス鋼や Co-Cr 合金と比較して再不働態化が早い^[19]。しかしながら、第 3 章で述べたとおり、著者らは急速ひずみ電極試験法^[20, 21]を用いて、タンパク質や細胞により再不働態化が阻害される場合があり、本来局部腐食が生じない電位域で材料表面に形成したすべりステップに沿って局部腐食が生じ得ることを見出した^[22, 23]。生体内における繰返し変形下においてもタンパク質や細胞による再不働態化の阻害は生じ^[24]

(第 4 章)、その際には発生した局部腐食がき裂の発生や進展を促進することで材料の腐食疲労強度を低下させると考えられる^[19]。しかしながら、タンパク質や細胞が金属材料の腐食疲労特性に及ぼす影響は全く明らかになっていない。その理由の 1 つとしてタンパク質や細胞を含んだ模擬体液中で、腐食疲労試験のような長期間に渡る試験を行う際には、模擬体液が腐敗してしまうということが挙げられる。著者らは、第 4 章

で述べたように、細胞培養を行いながら腐食疲労試験のような長期の力学試験を行えるシステムの開発に成功した^[24]。本章では、第3章、第4章で得られた知見をもとに、タンパク質や細胞が繰り返し応力下におけるTi-6Al-4V合金のき裂発生、き裂進展および腐食疲労寿命に及ぼす影響を検討した結果を述べる。

5.2 実験方法

5.2.1 供試材

本研究で用いたTi-6Al-4V合金の組成をTable 5-1に示す。Ti-6Al-4V合金の薄板をゲージ部寸法 $8 \times 4 \times 1 \text{ mm}^3$ の引張試験片に加工し、試料表面を鏡面研磨し、アセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ600秒間超音波洗浄した。その後、模擬体液との接触を避けるためゲージ部以外をPTFEテープで被覆した。試料を 121°C で900秒間オートクレーブ滅菌した後、模擬体液(α -MEM + 10 vol.% FBS)に1日または1週間浸漬させた。FBSを含んだ模擬体液に浸漬する時間を変化することで、1週間浸漬させた試料上に堆積したタンパク質量は1日浸漬させた試料よりも増加している。さらに模擬体液に浸漬させた試料表面で骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を1週間培養した試料も準備した。細胞播種密度は $2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-2}$ とし、1週間培養することで試料ゲージ部全面を細胞が被覆した状態(コンフルエント)にした。試料浸漬環境および細胞培養環境は 37°C , 5% CO_2 に保持した。

Table 5-1 The chemical composition of Ti-6Al-4V alloy (mass%).

Al	V	Fe	O	C	N	Ti
6.25	4.07	0.15	0.122	0.024	0.003	Bal.

5.2.2 繰返し応力付与（腐食疲労試験）

5.2.1 項で示した方法で準備した試料を用いてアミノ酸やタンパク質を含んだ模擬体液中で繰返し応力付与（腐食疲労試験）を行った。タンパク質を含んだ模擬体液は大気と接触することで数時間で腐敗する。しかし、著者らが開発した装置を用いることで、溶液を劣化させることなく細胞培養環境での腐食疲労試験を行うことが可能となった^[24]。本研究で用いた装置の概略図を Fig. 5-1 に示す。電気化学測定を可能とするため、3 電極セルを用いた。参照電極に Ag/AgCl (3M NaCl)、対極に Pt ワイヤ、作用極に試料を用いている。前処理の模擬体液への浸漬、細胞培養を終えた試料を電気化学セル内に配置し、両端を油圧式サーボパルサ (Shimadzu Co.) にセットした後、応力比 0.1 ($R=0.1$)、周波数 10 Hz、最大応力 400~800 MPa の繰返し応力を付与した。付与した最大応力は Ti-6Al-4V 合金の 0.2%耐力以下の応力である。試験中は試料の変位、応力変化とそれに伴う腐食電位変化を測定した。

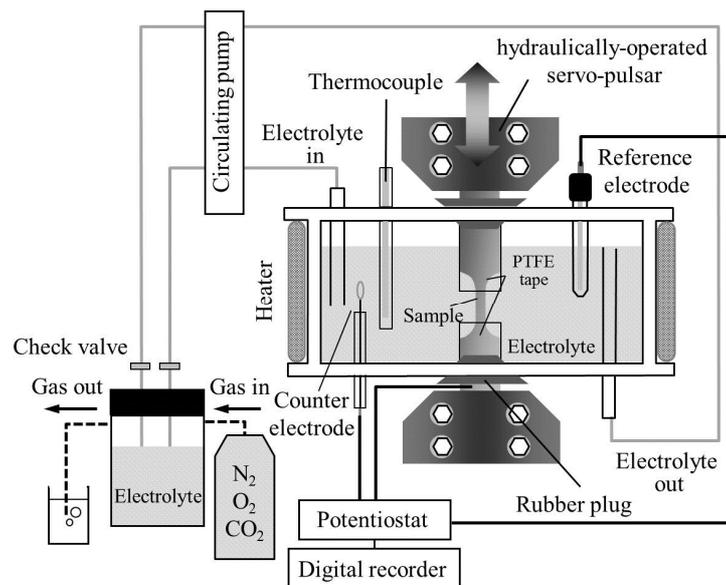


Fig. 5-1 Schematic illustration of the cyclic deformation test apparatus.

5.3 結果および考察

5.3.1 繰返し変形による金属溶解と再不働態化

Figure 5-2 に最大応力 500 MPa で繰返し応力を付与した際の 1 サイクル中 (1000 サイクル目) における、試験前に α -MEM + 10 vol.% FBS に 1 日浸漬させた試料(以下、1 日浸漬試料)の変位、応力変化、腐食電位変化を示す。第 4 章で述べた Type 316L ステンレス鋼の繰返し応力下における電位変化と同様に、Ti-6Al-4V 合金においても応力の増加とともに試料には引張変形が加わり、不働態皮膜が破壊されるため腐食電位は低下している。一方で、応力が低下すると、不働態皮膜の破壊が生じなくなり、新生面上で再不働態化が生じるためアノード反応は抑制され電位は貴にシフトした。

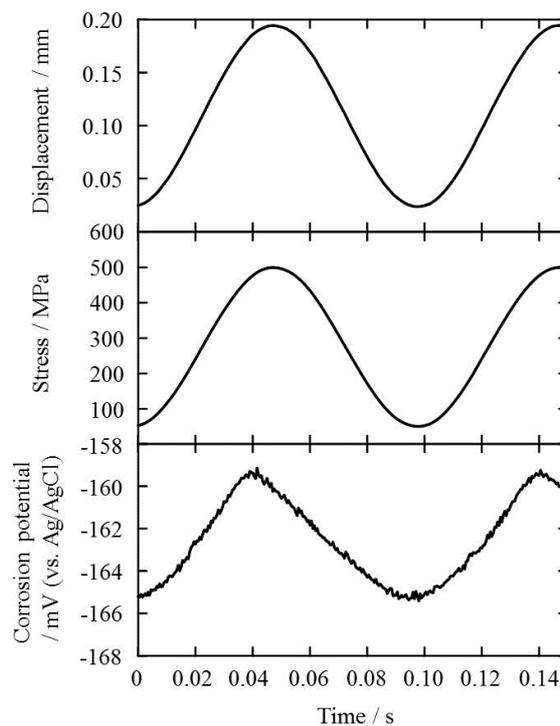


Fig. 5-2 Changes in stress, displacement and corrosion potential in 1000th deformation cycle of a sample immersed in simulated body fluid for 1 day prior to the test.

次に、腐食疲労が生じる過程における腐食電位の変化を検討するため、試験開始から破断に至るまでの腐食電位変化と変位振幅の変化に注目する。Figure 5-3 に 1 日浸漬試料に最大応力 500 MPa で繰返し応力を付与した際の腐食電位変化および変位振幅を示す。試験開始直後から不働態皮膜破壊が生じたために、腐食電位は 1 サイクル目に約 -150 mV (vs. Ag/AgCl) から約 -250 mV (vs. Ag/AgCl) まで低下した。しかしその後 2 サイクル目から貴にシフトし、サイクル数の増加とともに緩やかに上昇した。変位振幅は 1 サイクル目が最も大きく、繰返し数の増加とともに試料の加工硬化により徐々に減少した。その結果、1 サイクルごとに露出する新生面面積が減少し、サイクル数の増加とともに新たに開始する金属溶解は抑制された。さらに、すでに露出した新生面上では再不働態化により金属溶解が抑制されるため、2 サイクル目以降の腐食電位が貴にシフトしたと考えられる。また、約 10^4 サイクルを越えたあたりで腐

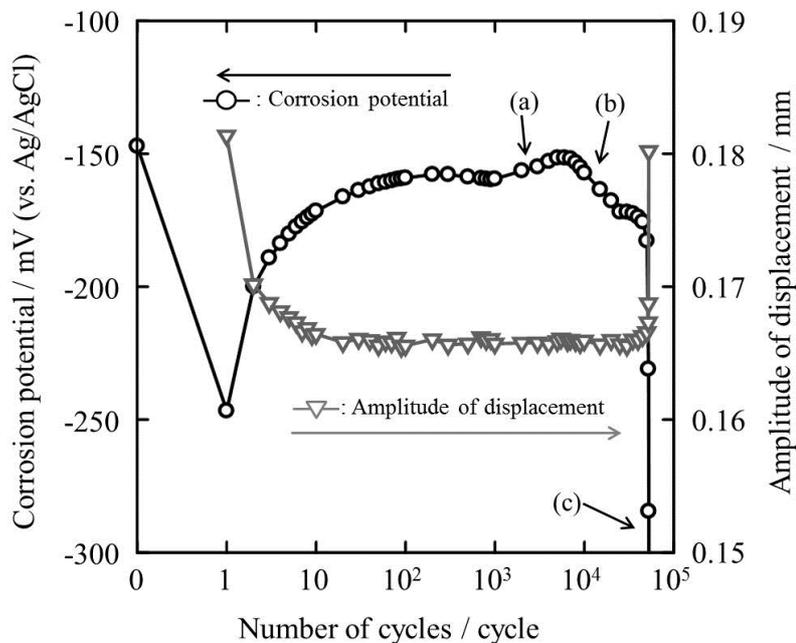


Fig. 5-3 Typical changes of corrosion potential and displacement amplitude until fracture of a sample immersed in simulated body fluid for 1 day prior to the test.

食電位は再び低下し、その後は上昇することなく試料が破断に至るまで低下し続けた。

前処理として α -MEM + 10 vol.% FBS に 1 週間浸漬させた試料（以下、1 週間浸漬試料）および α -MEM + 10 vol.% FBS に 1 週間浸漬させながら表面で細胞を培養した試料（以下、細胞試料）も同様に繰返し応力付与試験に供した。Figure 5-4(a), (b)に試験前および試験後の細胞試料表面をギムザ染色した光学顕微鏡像を示す。細胞試料上の細胞は、試料に破断に至るまで応力を付与した後も試料上をくまなく覆っており、応力付与中の電気化学反応はすべて細胞に覆われた試料表面上で生じたと考えられる。1 日浸漬試料、1 週間浸漬試料、細胞試料に最大応力 500 MPa で繰返し応力を付与した際の腐食電位変化を Fig. 5-5 に示す。1 日浸漬試料の腐食電位変化は Fig. 5-3 に示した腐食電位変化と同じである。1 週間浸漬試料および細胞試料も 1 日浸漬試料と同様の腐食電位変化を示した。よって、すべての試料において繰返し応力付与中の腐食電位変化は 3 つの領域に分けられる。1 つ目の領域（以下、第 1 領域）では、繰返し応力付与により腐食電位は卑にシフトする。1 日浸漬試料では 1 サイクル目がこれに相当し、1 週間浸漬試料および細胞試料では約 10^3 サ

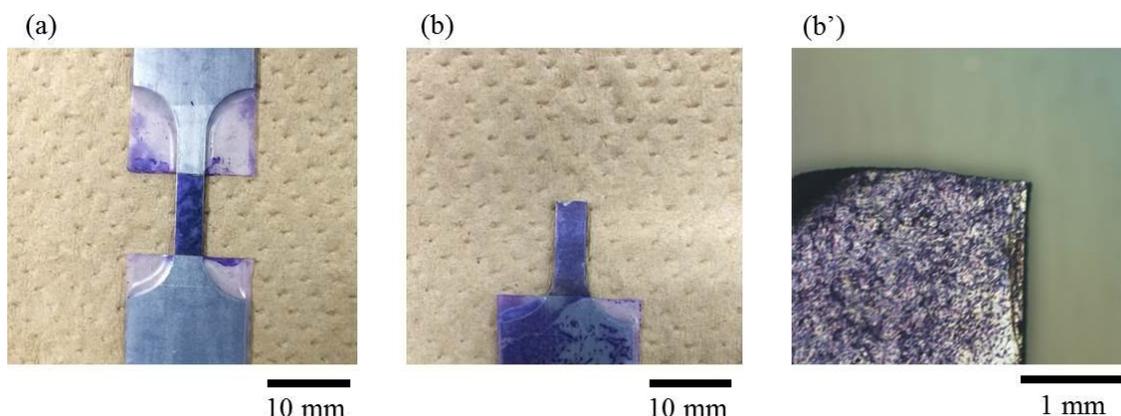


Fig. 5-4 Surface of the cell-cultured sample: (a) before cyclic deformation test, (b) after cyclic deformation test and (b') a magnified image of (b).

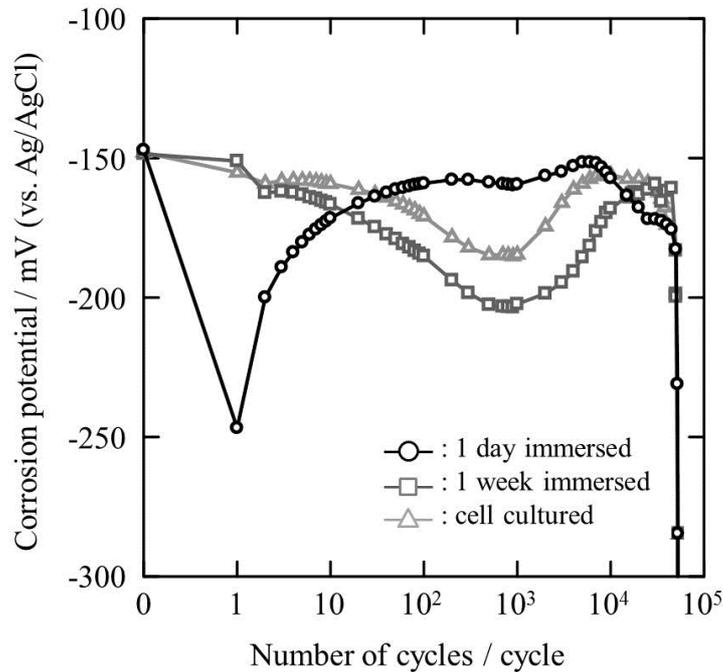


Fig. 5-5 Typical changes of corrosion potential until fracture of samples immersed in a α -MEM + 10% FBS for 1day or 1 week prior to the cyclic deformation test and immersed in a α -MEM + 10 % FBS for 1week with cell culturing prior to the cyclic deformation test.

イクルまでが相当する。2つ目の領域（以下、第2領域）では、試料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。3つ目の領域（第3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、腐食電位が再び卑にシフトし、試料が破断するまで低下し続ける。本研究で付与した最大応力 400, 500, 600, 700, 800 MPa すべての応力においてこれら3つの領域が認められた。

腐食疲労の進行に伴う腐食電位変化を検討するため、繰返し応力付与中および付与後の試料表面観察を行った。Figure 5-6 に試験中および試験後の表面 SEM 像を示した。図中の(a)~(c)は Fig. 5-3 の(a)~(c)と対応している。Figure 5-6(a)に見られるとおり、腐食電位変化が第3領域に入

るまでは試料上にき裂は全く認められなかった。このことから、第1領域での腐食電位の卑化および第2領域での貴化は新生面の露出および再不働態化によるもので、疲労き裂の発生とは関係ないことがわかる。第2領域の終わり（以下、電位ピーク）より後（Fig. 5-3(b)）では、多数の微小なき裂が観察された（Fig. 5-6(b)）。Figure 5-6(c)に破断後の試料表面のき裂を、Fig. 5-6(c')にき裂先端の拡大図を示す。付与した最大応力がTi-6Al-4V合金の0.2%耐力以下の応力であったにもかかわらず、き裂先端部には塑性変形によるすべりステップが観察された。Ayyubらは降伏応力以下の応力であっても、介在物周辺や材料の角において応力集中が生じ局所的な塑性変形が起こると報告している^[25]。SEM像および腐食電位変化より、電位ピークにおいて疲労き裂が発生し、き裂先端部において応力集中が生じた結果、降伏応力以下の最大応力においても塑性変形が生じたと考えられる。また、塑性変形によりすべりステップが生じ

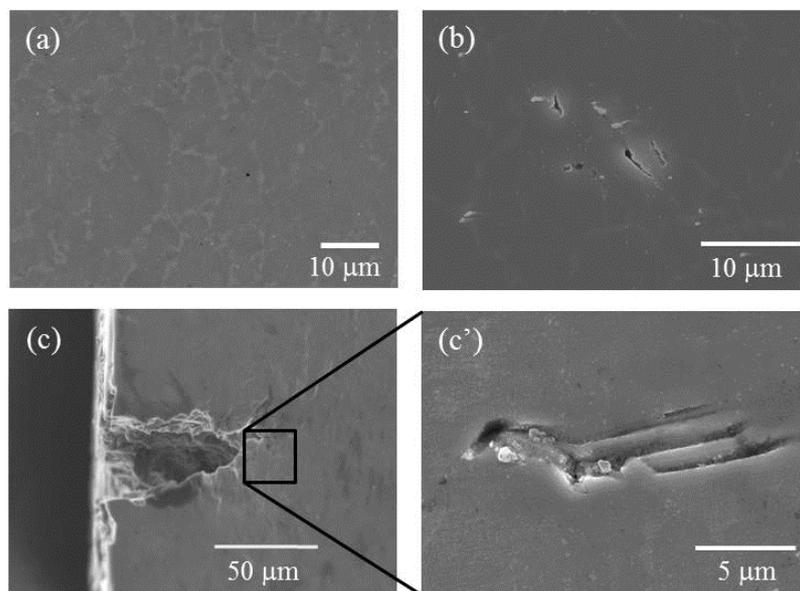


Fig. 5-6 SEM images of Ti-6Al-4V alloy during and after cyclic deformation: (a) a SEM image of sample surface before the potential peak after 10^4 cycles, (b) a SEM image of sample surface after the potential peak, (c) a SEM image of sample surface after fracture and (c') a magnified image near the crack chip.

た箇所では金属溶解量が急増することがこれまでの研究で明らかになっている（第 2 章）。よって、き裂先端部では腐食によるき裂進展の促進が生じたと考えられる。1 日浸漬試料、1 週間浸漬試料、細胞試料いずれにおいても 3 領域での腐食電位変化が認められ試料は破断に至ったが、Fig. 5-3 に見られるように第 1 領域における腐食電位の降下幅や各領域に費やした時間は試料ごとに異なった。

5.3.2 模擬体液中における Ti-6Al-4V 合金の腐食疲労寿命

Figure 5-7 に 1 日浸漬試料、1 週間浸漬試料、細胞試料に α -MEM + 10 vol.% FBS 中で繰返し応力を付与した際の各試料の腐食疲労寿命（S-N 曲線）を示す。図からわかるとおり、腐食疲労寿命は繰返し応力を付与する前の模擬体液への浸漬条件に大きく影響される。すべての最大応力

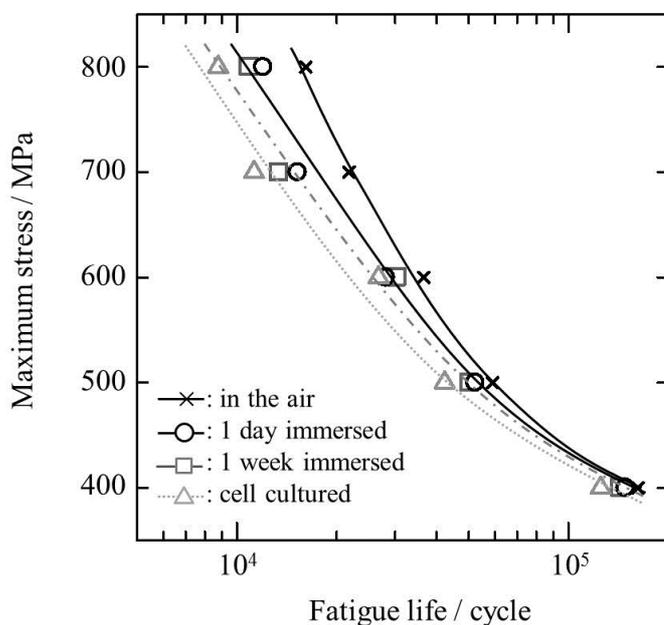


Fig. 5-7 The fatigue lives of samples immersed in a α -MEM + 10% FBS for 1 day or 1 week prior to the cyclic deformation test and immersed in a α -MEM + 10% FBS for 1 week with cell culturing prior to the cyclic deformation test.

において、最も腐食疲労寿命が長かったのは1日浸漬試料であり、浸漬期間を増加させることで腐食疲労寿命は低下した(1週間浸漬試料)。さらに、最も腐食疲労寿命が短かったのは細胞試料であった。これらの結果から、試料上に接着したタンパク質や細胞がTi-6Al-4V合金の腐食疲労寿命を低下させることが明らかとなった。

Figure 5-3, Fig. 5-6 に示したとおり、電位ピークより前では疲労き裂は確認されず、電位ピークより後の領域では小さなき裂が多数確認されている。ここから、第1領域および第2領域は疲労き裂が発生するまでの期間であり、第3領域はき裂進展が生じる期間であると定義できる。腐食電位変化に基づくき裂発生・進展の定義は過去にも応力腐食割れ(SCC)や

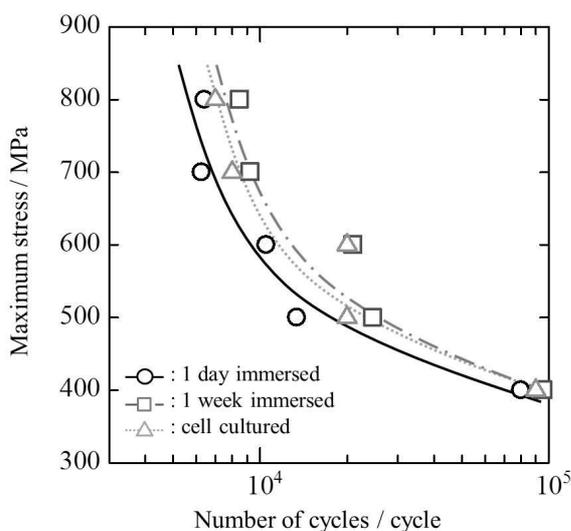


Fig. 5-8 The number of cycles until crack initiation of samples immersed in a α -MEM + 10% FBS for 1 day or 1 week prior to the cyclic deformation test and immersed in a α -MEM + 10% FBS for 1 week with cell culturing prior to the cyclic deformation test.

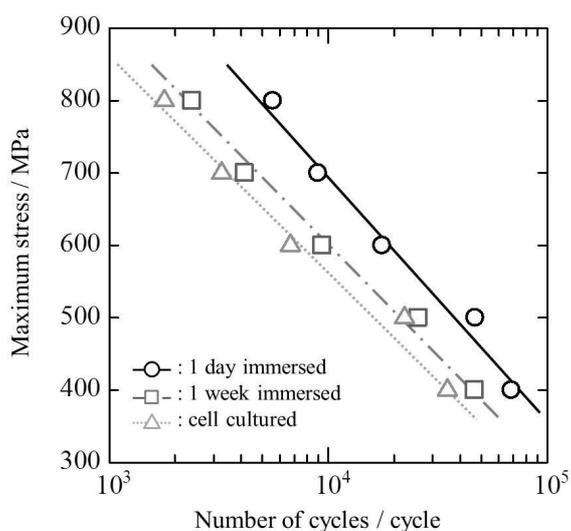


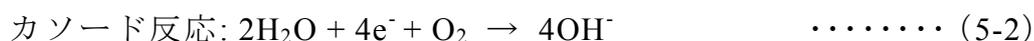
Fig. 5-9 The number of cycles after crack initiation until fracture of samples immersed in a α -MEM + 10% FBS for 1 day or 1 week prior to the cyclic deformation test and immersed in a α -MEM + 10% FBS for 1 week with cell culturing prior to the cyclic deformation test.

腐食疲労の研究で行われている^[26, 27]。よって、Fig. 5-7 の各試料の腐食疲労寿命はき裂発生までに費やした時間とき裂進展に費やした時間に分割することができる。Figure 5-8 に試験開始から電位ピークまでの時間、すなわちき裂発生に費やした時間を、Fig. 5-9 に電位ピークから破断に至るまでの時間、すなわちき裂進展に費やした時間を試料ごとにプロットした。Figure 5-8 に示すように、き裂発生に費やした時間は1日浸漬試料が最も短くなり、ついで1週間浸漬試料で細胞試料の時間が最も長くなった。これは試料上に接着したタンパク質や細胞がき裂発生を抑制したことを表している。一方で、Fig. 5-9 より、き裂進展に要した時間は1日浸漬試料が最も長くなり、ついで1週間試料で細胞試料の時間が最も短かった。このことから、試料上に接着したタンパク質や細胞はき裂の進展を促進させることがわかる。すなわち、タンパク質や細胞はき裂の発生のみならず、き裂の進展にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

Figure 5-10 にタンパク質や細胞が金属材料表面に接着し、繰返し応力が付与された際の電気化学挙動のモデル図を示す。腐食電位変化における第1領域および第2領域では疲労き裂が発生していないため、不働態皮膜破壊は主に弾性変形によって引き起こされる。すでに述べたとおり、Ti-6Al-4V 合金の不働態皮膜は弾性域でも破壊されることが明らかとなっている（第2章、第3章）。さらに、介在物や試料の角など応力集中を生じやすい部分では局所的な塑性変形も生じたと考えられる^[25]。不働態皮膜が破壊されると新生面が模擬体液と接触し、金属溶解が生じる。しかしながら、Fig. 5-10(a)に示したように、タンパク質や細胞が試料表面に接着した際には新生面と体液との接触がタンパク質や細胞により妨げられる。よって、金属溶解は抑制されることが考えられる。Figure 5-3 に見られるように、第1領域における腐食電位の降下幅が、細胞試料で

最も小さく、1日浸漬試料で最も大きくなったことからタンパク質や細胞により金属溶解が抑制されたことが明らかである。

また、タンパク質や細胞によるき裂発生の抑制のもう1つの原因としてカソード反応の抑制が挙げられる。不働態皮膜が破壊され金属溶解が生じた際、発生した電子を消費するために酸素還元が起こる(式5-1, 5-2)。



タンパク質や細胞が試料表面を覆うことで溶液中の溶存酸素の試料表面への拡散が阻害されカソード反応が抑制、結果としてアノード反応である金属溶解も抑制されたと考えられる。

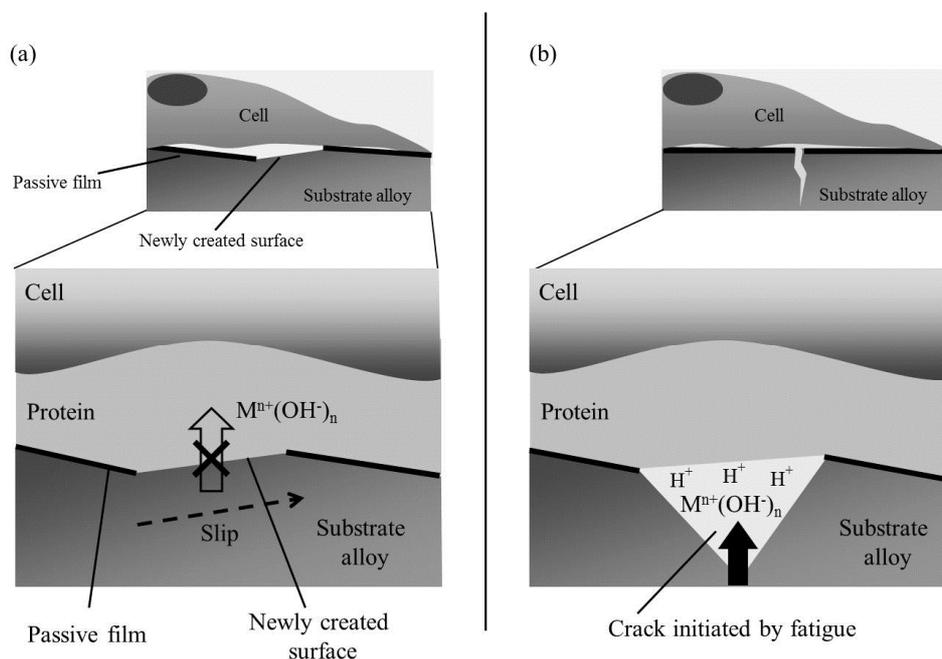


Fig. 5-10 (a): The model of metal dissolution when proteins and cells adhering on the metal surface before crack initiation.
 (b): The model of metal dissolution when proteins and cells adhere on the metal surface after crack initiation.

第2領域では、疲労硬化により試料の変位振幅は徐々に減少した。これにより金属溶解は抑制され、同時に開始した再不働態化が金属溶解をさらに抑制した結果、腐食電位が上昇したと考えられる。Figure 5-5 より1週間浸漬試料および細胞試料では1日浸漬試料よりも第2領域の開始が遅れていることがわかる。第4章で述べたとおり、繰返し応力下においてタンパク質や細胞は再不働態化を阻害することが明らかになっており、Ti-6Al-4V合金でもステンレス鋼同様、再不働態化の阻害が腐食電位変化に現れたと考えられる。

疲労き裂が発生した後の第3領域では、これまで溶液との接触が妨げられていた新生面に疲労き裂が発生し、き裂内部に模擬体液が流入する。その結果、き裂の内壁とタンパク質および細胞に囲まれた空間はすき間腐食環境となる。すき間内部においては溶質の拡散の阻害、加水分解による H^+ イオンの増加、金属溶解度の上昇が起こるため、金属溶解が促進され再不働態化は阻害される^[22, 23]（第3章）。その結果、Fig. 5-10(b)に示したようにき裂進展の促進が生じたと考えられる。

本研究では、材料表面に接着したタンパク質や細胞がTi-6Al-4V合金の腐食疲労寿命に及ぼす影響を検討した。タンパク質や細胞は金属溶解を抑制する一方で、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。繰返し応力付与初期においては金属溶解を抑制することで疲労き裂発生を抑制するが、疲労き裂が発生した後はき裂内部に体液が流れ込みすき間腐食環境を形成することでき裂の進展を促進する。金属材料において、疲労き裂は疲労寿命の初期に発生し、破断までの時間の大半がき裂の進展に費やされることが知られている^[29]。Figure 5-7より、タンパク質や細胞を接着させることでTi-6Al-4V合金の疲労寿命は低下したが、これはタンパク質や細胞による再不働態化の阻害、すなわちき裂進展の促進がより強く作用した結果であると考えられる。

5.4 結言

本章では電気化学的測定法を用いてタンパク質や細胞を含んだ模擬生体環境における Ti-6Al-4V 合金の溶解、再不働態化、疲労き裂の発生や進展、腐食疲労寿命を検討した結果を述べた。試料の腐食電位変化から、Ti-6Al-4V 合金の腐食疲労寿命をき裂発生までの時間とき裂進展に要した時間に分割することに成功した。そして、材料表面に接着したタンパク質および細胞が疲労き裂の発生と進展両方に影響を及ぼすことを明らかにした。得られた結論は以下のとおりである。

1. 繰返し応力付与中、不働態皮膜破壊により新生面は体液に暴露し金属溶解が生じるため、腐食電位は卑にシフトする。しかしながら、材料の加工硬化および再不働態化により金属溶解は抑制されるため、腐食電位は貴にシフトし徐々に繰返し応力付与前の電位にまで回復する。
2. 腐食疲労き裂が発生した際には、き裂により生じた新生面が体液と接触するため金属溶解が生じ腐食電位は降下する。腐食疲労き裂が発生するとき裂先端部において応力集中が生じるため、き裂は進展し腐食電位は破断まで降下し続ける。
3. 材料表面に接着したタンパク質や細胞は、材料表面と繰返し応力によって露出した新生面との接触を妨げることで金属溶解を抑制する。結果として、腐食疲労き裂の発生が抑制される。
4. 繰返し応力を受け続けることで、腐食疲労き裂がタンパク質や細胞の下で発生する。き裂とタンパク質や細胞で囲まれた空間には体液が流れ込みすき間腐食環境となるため、再不働態化が阻害される。結果として腐食疲労き裂の進展は促進される。

5. 表面にタンパク質や細胞が接着した Ti-6Al-4V 合金に体液中で繰返し応力が付与された際には、き裂発生抑制と進展促進の相反する 2 つの影響が現れるが、Ti-6Al-4V 合金においては疲労寿命の大半を進展が占めるため、再不働態化の阻害すなわち進展促進が強く働き腐食疲労寿命は低下する。

参考文献

- [1] N.J. Hallab, C.V.C. Messina, K.A. Roebuck, T.T. Glant, J.J. Jacobs: Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **60**(3), 420-433 (2002).
- [2] M. Sivakumar, U. Kamachi Mudali, S. Rajeswari: Investigation of failures in stainless steel orthopaedic implant devices: pit-induced fatigue cracks, *Journal of Materials Science Letters*, **14**(2), 148-151 (1995).
- [3] H. Amel-Farзад, M.T. Peivandi, S.M.R. Yusof-Sani: In-body corrosion fatigue failure of a stainless steel orthopaedic implant with a rare collection of different damage mechanisms, *Engineering Failure Analysis*, **14**(7), 1205-1217 (2007).
- [4] R. Chaves, I. Costa, H.G. de Melo, S. Wolyneć: Evaluation of selective corrosion in UNS S31803 duplex stainless steel with electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochimica Acta*, **51**(8-9), 1842-1846 (2006).
- [5] Y. Okazaki, T. Tateishi, Y. Ito: Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application, *Materials Transactions, JIM*, **38**(1), 78-84 (1997).
- [6] M. Sharma, A.V. Ramesh Kumar, N. Singh, N. Adya, B. Saluja, Electrochemical Corrosion Behavior of Dental/Implant Alloys in Artificial Saliva, *Journal of Materials Engineering and Performance*, **17**(5), 695-701 (2008).
- [7] S. Virtanen, I. Milošev, E. Gomez-Barrena, R. Trebše, J. Salo, Y.T. Konttinen: Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions, *Acta Biomaterialia*, **4**(3), 468-476 (2008).

- [8] R. L. Reis, F. J. Monteiro, G. W. Hastings: Stability of hydroxylapatite plasma-sprayed coated Ti-6Al-4V under cyclic bending in simulated physiological solutions, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(6-7), 457-462 (1994).
- [9] F. J. Gil, L. Delgado, E. Espinar, J. M. Llamas: Corrosion and corrosion-fatigue behavior of cp-Ti and Ti-6Al-4V laser-marked biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **23**(4), 885-890 (2012).
- [10] J. Xie, A.T. Alpas, D.O. Northwood: A mechanism for the crack initiation of corrosion fatigue of Type 316L stainless steel in Hank's solution, *Materials Characterization*, **48**(4), 271-277 (2002).
- [11] N. Maruyama, S. Hiromoto, E. Akiyama, M. Nakamura: Fretting fatigue behaviour of Ni-free high-nitrogen stainless steel in a simulated body fluid, *Science and Technology of Advanced Materials*, **14**(2), 025002(1-9) (2013).
- [12] A. Chandra, J.J. Ryu, P. Karra, P. Shrotriya, V. Tvergaard, M. Gaisser, T. Weik: Life expectancy of modular Ti6Al4V hip implants: Influence of stress and environment, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **4**(8), 1990-2001 (2011).
- [13] M. Niinomi: Mechanical properties of biomedical titanium alloys, *Materials Science and Engineering Part A*, **243**(1-2), 231-236 (1998).
- [14] G. Rondelli, P. Torricelli, M. Fini, R. Giardino: In vitro corrosion study by EIS of a nickel-free stainless steel for orthopaedic applications, *Biomaterials*, **26**(7), 739-744 (2005).

- [15]S. Hiromoto, T. Hanawa: Electrochemical properties of 316L stainless steel with culturing L929 fibroblasts, *Journal of The Royal Society Interface*, **3**(9), 495-505 (2006).
- [16]B. M. Souto, G. T. Burstein: A preliminary investigation into the microscopic depassivation of passive titanium implant materials *in vitro*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **7**(6) 337-343 (1996).
- [17]Z. Cai, T. Shafer, I. Watanabe, M.E. Nunn, T. Okabe: Electrochemical characterization of cast titanium alloys, *Biomaterials*, **24**(2), 213-218 (2003).
- [18]F. Di Quarto, S. Piazza, C. Sunseri: The photoelectrochemistry of thin passive layers. Investigation of anodic oxide films on titanium metal, *Electrochimica Acta*, **38**(1), 29-35 (1993).
- [19]K.H.W. Seah, R. Thampuran, S.H. Teoh: The influence of pore morphology on corrosion, *Corrosion Science*, **40**(4-5), 547-556 (1998).
- [20]S. Fujimoto, H. Yamamoto: Passivity Breakdown and Repassivation on TiNi During Rapid Straining Accompanying Martensitic Phase Transformation, *ECS Transactions*, **16**(52), 233-238 (2009).
- [21]T. Shibata, S. Fujimoto: Breakdown of Passive Film on Ni-Cr Alloys in High-Temperature High-Pressure Water Containing Sulfate Ions, *Corrosion*, **46**(10), 793-798 (1990).
- [22]K. Doi, S. Miyabe, S. Fujimoto: Metal dissolution and repassivation of Ti-6Al-4V alloy during rapid elongation in simulated body fluid including osteoblast-like cells, *ECS Transactions*, **50**(16) 1-10 (2012).

- [23]K. Doi, S. Miyabe, S. 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**(11), C576-C580 (2013).
- [24]K. Doi, S. Miyabe, S. Fujimoto: Electrochemical Behavior of Type 316L Stainless Steel during Cyclic Deformation under Cell Culturing, *Materials Transactions*, (2014); in press.
- [25]B.M. Ayyub, I.A. Assakkaf, D.P. Kihl, M.W. Siev: Reliability-Based Design Guidelines for Fatigue of Ship Structures, *Naval Engineers Journal*, **114**(2), 113-138 (2002).
- [26]T. Shibata, S. Fujimoto, A. Asada, J. Nakata: Effect of CaCl₂ Concentration on the Probability Distribution of Stress Corrosion Cracking Failure Time of Type 304 Stainless Steel, *Key Engineering Materials*, **20-28**(1-4), 1897-1904 (1987).
- [27]T. Shibata, S. Fujimoto: Application of the Scanning Vibrating Electrode Technique to Corrosion Fatigue, *Boshoku Gijutsu*, **35**, 566-573 (1986).
- [28]W.A. Wood, S.McK Cousland, K.R. Sargent: Systematic microstructural changes peculiar to fatigue deformation, *Acta Metallurgica*, **11**(7), 643-652 (1963).
- [29]D.B. Dawson: Fatigue crack growth behavior of Ti-6Al-6V-2Sn in methanol and methanol-water solutions, *Metallurgical transactions. A, Physical metallurgy and materials science*, **12**(5), 791-800 (1981).

第 6 章 模擬生体環境で Type 316L ステンレス鋼に発生した 疲労き裂の結晶学的解析

6.1 緒言

生体内は体液や生体組織などの生物学的要因と運動などによる力学的負荷が組み合わさった複合環境であり^[1-4]、力学的要因の中でも、金属材料の降伏応力以下の繰返し応力がインプラント材料に付与される負荷のほとんどであるため、インプラント破損の代表的な原因は腐食疲労である^[5,6]。インプラント材の腐食疲労破壊に関する研究が始まったのは 1970 年代前半である^[7]。しかし、模擬生体環境として溶液にリンゲル液などの無機成分のみを含む環境が用いられたのみで、構造材料評価の域を超えてはいなかった。2000 年代に入り、ようやく生体内を生物学的要因と力学的要因の複合環境として捉え、動的環境下において生体組織が材料に及ぼす影響が検討され始めた。Mischler らはタンパク質を含んだ模擬体液中での Ti-6Al-4V 合金の摩耗特性評価に成功している^[8]。しかし、タンパク質および細胞を含んだ模擬生体環境におけるインプラント材料の腐食疲労特性、疲労き裂の発生、疲労き裂の進展を検討した例はほぼない。

金属材料の疲労破壊は、繰返し応力のサイクル数の増加とともに材料表面に塑性変形が蓄積し、き裂が発生、さらにき裂の進展、最後に破断というプロセスをたどる。生体内で付与される応力はほとんどの場合が弾性変形域を超えない低い応力であるが、材料表面に存在する介在物や傷の周囲、材料の角では応力集中が生じわずかな塑性変形が発生する。この塑性変形は繰返しサイクル数の増加とともに蓄積され、材料表面上に突出しと入り込みと呼ばれる凹凸を形成する。この凹部分でさらなる応力集中が生じることで疲労き裂が発生する^[9]。水溶液腐食環境では、各サイクルでの不動態皮膜破壊による新生面上での金属溶解および疲労き裂発生後のき裂内部における腐食が腐

食疲労寿命を低下させる要因となる^[10]。生体内では体液に含まれる塩化物イオンやマクロファージ、タンパク質や細胞が腐食を促進させるため^[11-13]、腐食疲労寿命はさらに低下する (Fig. 6-1)。著者らはこれまで、試験片に接着した細胞が再不働態化 (酸化皮膜の自己再生) を阻害し、金属溶解を促進することで腐食疲労寿命を低減させることを明らかにした (第 3 章、第 4 章、第 5 章)。しかし、多結晶体である金属材料の表面のどこで疲労き裂が発生するのか、すなわち結晶粒ごとの疲労き裂の発生しやすさは、これまで用いてきた電気化学的な手法では決定できない。

そこで本章では、結晶のすべり方向に着目した。Type 316L ステンレス鋼は fcc 構造を有するため、1 つの結晶粒に互いに等価である 12 のすべり系が存在する。単結晶では、12 のすべり系のうち最も変形の生じやすいすべり系ですべりが生じ、疲労き裂が発生する^[14]。しかし、多結晶では周囲の結晶の影響により応力状態が変化する。その結果、疲労き裂が発生する条件は単結晶と比較して複雑になる^[15]。さらに、表面が水溶液と接している場合には腐食が生じる。インプラント材料の腐食疲労き裂の発生メカニズムを、多結晶体のすべりと腐食を複合的にとらえた観点から検討した例はいまだ報告されていない。本章では、体液中に含まれるタンパク質や試料表面に接着した細胞が疲労き裂の発生に及ぼす影響を、結晶粒のすべり系と金属溶解の観点から検討した結果を述べる。

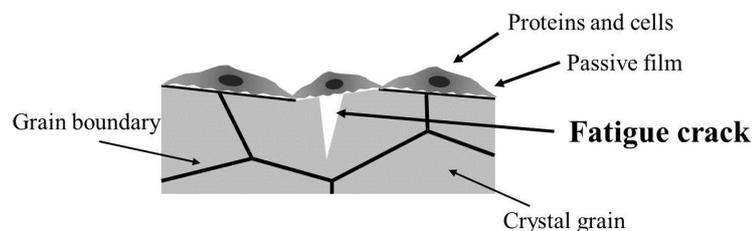


Fig. 6-1 Model of crack initiation in body environment.

6.2 実験方法

6.2.1 供試材

本研究で用いた Type 316L ステンレス鋼の化学組成を Table 6-1 に示す。SUS316L ステンレス鋼薄板をゲージ部寸法 $8 \times 4 \times 1 \text{ mm}^3$ の引張試験片に加工し、試料表面を鏡面研磨し、アセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ 600 秒間超音波洗浄した。その後、ゲージ部以外を PTFE テープで被覆し、 121°C で 900 秒間オートクレーブ滅菌した。その後、(1)大気中で繰返し応力を付与するため、前処理を行わない試料(大気中試料)、(2)模擬体液 (α -MEM (Minimum Essential Medium, MP Biomedicals)) に 1 週間浸漬させた試料 (α -MEM 試料)、(3) α -MEM + 10 vol.% FBS (Fetal Bovine Serum) に浸漬させた試料表面で骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を 1 週間培養した試料 (細胞試料) の 3 種類の試料を作製した。細胞播種密度を $2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-2}$ とし、1 週間培養することで試料ゲージ部全面を細胞が被覆した状態 (コンフルエント) にした。試料浸漬環境および細胞培養環境は 37°C , 5% CO_2 に保持した。

6.2.2 繰返し応力付与試験

6.2.1 項で準備した試料を用いて繰返し応力付与試験を行った。模擬体液への浸漬、細胞培養を終えた試料は、前処理時と同種類の模擬体液で内部を満たした電気化学セル内に配置し、両端を油圧式サーボパルサ (Shimadzu Co.) にセットした。前処理を行わなかった試料は、大気中でサーボパルサに固定した。その後、試料に応力比 0.1 ($R=0.1$)、周波数 10 Hz、最大応力 300 MPa、繰返しサイクル数 10^7 回の繰返し応力を付与した。付与した最大応力は Type

Table 6-1 Chemical composition of type 316L stain steel.

Cr	Ni	Mo	C	Si	Mn	P	S	Fe
17.35	12.18	2.07	0.011	0.63	1.20	0.03	0.001	Bal.

316L ステンレス鋼の 0.2%耐力以下の応力であり、いずれの試料も疲労限の目安とされる 10^7 サイクル後も破断には至っていない。

6.2.3 電子線後方散乱回折法 (EBSD) を用いた結晶方位解析

6.2.3.1 EBSD (Electron Back Scatter Diffraction) の概要

EBSD は SEM 内で約 70° 傾斜した試料に電子線を照射した際に、電子線後方散乱回折により発生する反射電子回折模様 (Kikuchi パターン) を蛍光スクリーンに投影して TV カメラなどで取り込み、さらに Kikuchi パターンの指数付けにより照射点における結晶方位を決定して試料のマイクロ組織等を調べる手法である。EBSD の利点として、結晶方位情報とともに試料表面の地理的情報を得られることが挙げられる。試料表面の 1 点に電子線を入射することにより、EBSD 像が得られ、一定間隔で試料表面に電子線を走査させることで測定面内の結晶粒の方位情報のマッピングが可能である。これは 1993 年に Adams らによって提唱された Orientation Imaging Microscopy (OIM) という概念であり^[16]、OIM により試料表面のひずみの蓄積やすべり、き裂の解析が可能となった。

6.2.3.2 EBSD 測定

試料の結晶方位解析は、FE-SEM (日本電子製、JSM-7001FA) に組み込まれた EBSD 装置 (EDAX-TSL 製、OIM Crystallography) を用いて行なった。繰返し応力付与後、試料からゲージ部を切り出し、アセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ 600 秒間超音波洗浄した。細胞試料においては Trypsin, EDTA \cdot 2Na を用いて試料表面の細胞を剥がし、その後アセトン、メタノール、蒸留水中で超音波洗浄した。EBSD 測定条件は加速電圧を 25 kV とした。測定範囲は $250 \times 250 \mu\text{m}$ 、ステップサイズは $0.5 \mu\text{m}$ で行い、同一の試料表面で 6 箇所測定を行った。EBSD 測定後、同領域の SEM 像を取得し (Fig. 6-2)、



Fig. 6-2 An example of a crack initiated on Type 316L stainless steel.

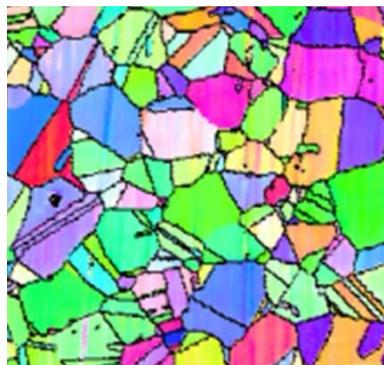


Fig. 6-3 An example of IPF map based on EBSD measurement.

EBSM 測定結果から得られる逆極点図 (Inverse Pole Figure, IPF map, Fig. 6-3) と重ね合わせるにより、疲労き裂が生じた結晶粒における結晶粒のすべり方向を同定し、結晶方位解析を行った。また、解析には TSL 社の解析ソフトである OIM-Analysis ver. 5.3 を用いた。

6.3 結果および考察

6.3.1 各繰返し応力環境におけるき裂の発生頻度

Figure 6-4 に 10^7 サイクル繰返し応力を付与した各試料の 1 mm^2 あたりに観察されたき裂数を示す。大気中で応力付与した試料に観察されたき裂が最も少なく、 α -MEM 試料では大気中試料と比較して約 1.5 倍のき裂が観察された。さらに細胞試料で観察されたき裂が最も多く、大気中と比較して約 3 倍であった。溶液中で応力を付与された際には不働態皮膜が破壊され新生面から金属溶解が生じる。よって、 α -MEM 試料および細胞試料ではき裂数が増加したと考えられる。さらに細胞試料においては、第 4 章、第 5 章で述べたとおり再不働態化の阻害によるき裂進展の促進が生じたため、き裂数が増加したと考えられる。

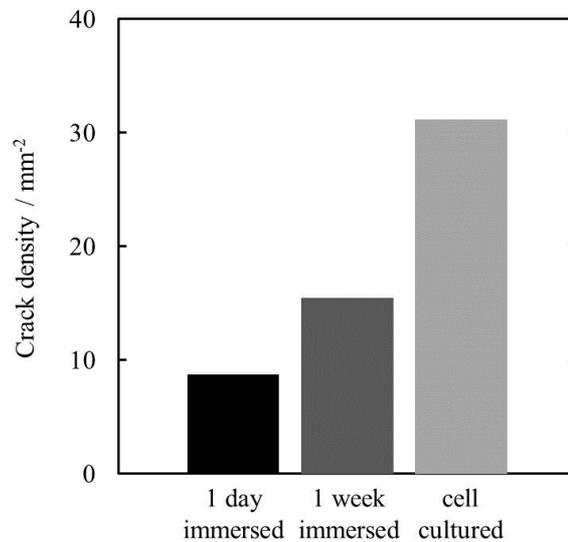


Fig. 6-4 The number of cracks per mm² initiated on the sample surface.

6.3.2 き裂の発生数と結晶粒のすべりやすさの関係

本研究では繰返し応力付与試験後の試験片表面の EBSD 解析を行った。IPF マップにおいて結晶方位差が 15° 以下の粒界は低角度粒界として無視し、15° 以上の粒界を結晶粒界と定義した。き裂の発生しやすさと結晶粒のすべりの関係を検討するため、き裂が観察された結晶粒のすべり系を以下の手順で決定した。

- (1) EBSD 測定により得られた IPF マップより、き裂が発生した結晶粒の結晶格子の試料表面に対する回転角度 (orientation) を決定。
- (2) 回転角度から回転行列を求め、各結晶粒の 4 種類のすべり面を決定。
- (3) 応力軸とすべり面のなす角から Schmidt factor (※1) を算出し、結晶粒それぞれが有する 12 のすべり系のうち、最大の Schmidt factor を有するすべり系を第 1 すべり系、2 番目に大きな Schmidt factor を有するすべり系を第 2 すべり系、・・・n 番目に大きな Schmidt factor を有するすべり系を第 n すべり系として順序付け。

(4)各すべり系ですべりが発生した際に、表面に形成されるすべり線と応力軸のなす角度を Slip angle と定義し (Fig. 6-5)、SEM 像より得られた Crack angle と最も近い Slip angle を有するすべり系を実際にすべりが生じたすべり系と決定。

(※1) Schmid factor

すべり面に作用する臨界せん断応力 τ は

$$\tau = \sigma \cos\phi \cdot \cos\lambda \quad \dots\dots\dots (6-1)$$

で表される。(τ : 臨界せん断応力、 σ : 応力、 ϕ : 応力軸とすべり面法線のなす角度、 λ : 応力軸とすべり方向のなす角度)

この時、 $\cos\phi \cdot \cos\lambda$ を Schmid factor と呼び、そのすべり面を有する結晶粒のすべりやすさを表す (Fig. 6-6)。

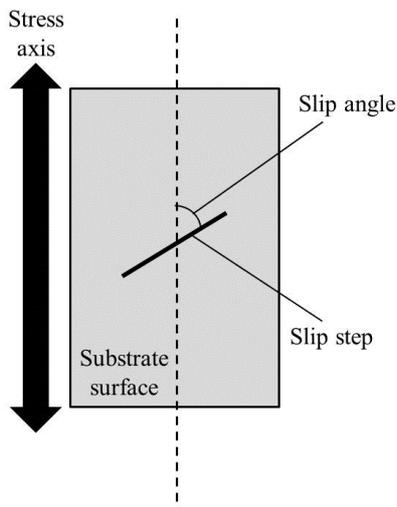


Fig. 6-5 Schematic illustration of slip angle.

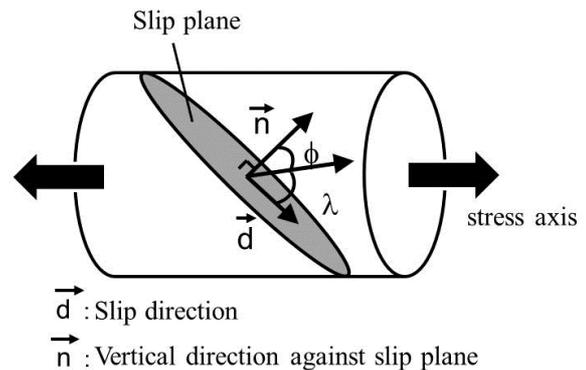


Fig. 6-6 Schematic illustration of the relationship between stress axis and slip direction.

結晶構造が fcc 構造をとる単結晶金属では、結晶粒中の Schmid factor が最も大きいすべり系が変形の起点となる。しかし、多結晶金属では隣接する結晶粒により必ずしも Schmid factor が最大のすべり系ですべりが生じるわけではない。そこで本研究では、発生したき裂から運動したすべり系を特定し、そのすべり面における Schmid factor を新たに計算した。

Figure 6-7 に、Schmid factor と、き裂数が全き裂数に対して占める割合の関係を示す。大気中試料では、70%以上のき裂が Schmid factor 0.4~0.5 の結晶粒において観察され、残りのき裂もほとんどが Schmid factor 0.3~0.4 の結晶粒で観察された。このことは、大気中で繰返し応力が付与された際には、大多数のき裂はすべりの生じやすいすべりを有する結晶粒で生じる、すなわち疲労

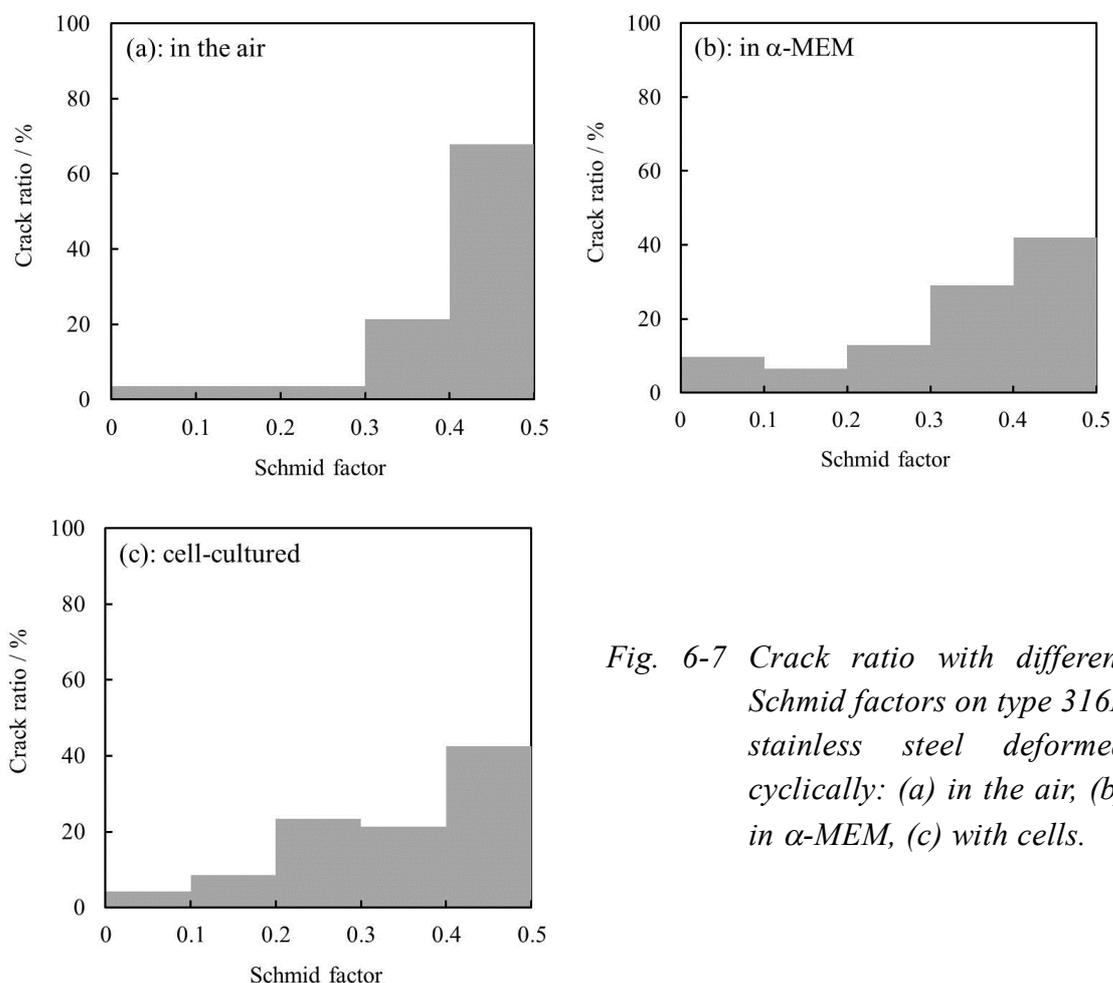


Fig. 6-7 Crack ratio with different Schmid factors on type 316L stainless steel deformed cyclically: (a) in the air, (b) in α -MEM, (c) with cells.

き裂の発生が力学的要因のみに起因することを意味している。一方で、 α -MEM 試料および細胞試料では、大気中試料と比較して観察されたき裂数は多いが、Schmid factor 0.4~0.5 の結晶粒で観察されたき裂は全体の約 40%であり、大気中試料と比較して Schmid factor 0~0.3 の結晶粒で観察されたき裂の割合が多い。この結果から、塩化物を含んだ中性溶液中で繰返し応力が付与された際には、力学的要因のみならず新生面における腐食が作用し、相対的にすべりの生じにくい結晶粒でも疲労き裂を発生し得ることが明らかとなった。

さらに結晶のすべりやすさと疲労き裂の関係を検討するため、Schmid factor とき裂の発生率の関係 (Fig. 6-7) のうち、第 1 すべり系ですべりが生じた結晶粒で観察されたき裂を黒色で示した (Fig. 6-8)。また、第 2 すべり系ですべりが生じた結晶粒で観察されたき裂を濃い灰色で示した (Fig. 6-9)。いずれの試料においても Schmid factor が大きい結晶粒では、ほぼ第 1 すべり系もしくは第 2 すべり系ですべりが生じ、き裂が発生したことがわかる。特に、大気中試料で観察されたき裂は、ほぼ全てが第 1 または第 2 すべり系で生じていた。一方、 α -MEM 試料および細胞試料の Schmid factor 0~0.3 の結晶粒では第 1 または第 2 すべり系ですべりが生じない場合が多く、特に細胞試料では第 3 すべり系以降のすべり系ですべりが生じた結晶粒においても多くのき裂が観察された。これらのことから、多結晶金属では Schmid factor が最大ではない系であってもすべりを生じ、さらに腐食環境では、そのようなき裂の発生数が多いことが明らかとなった。

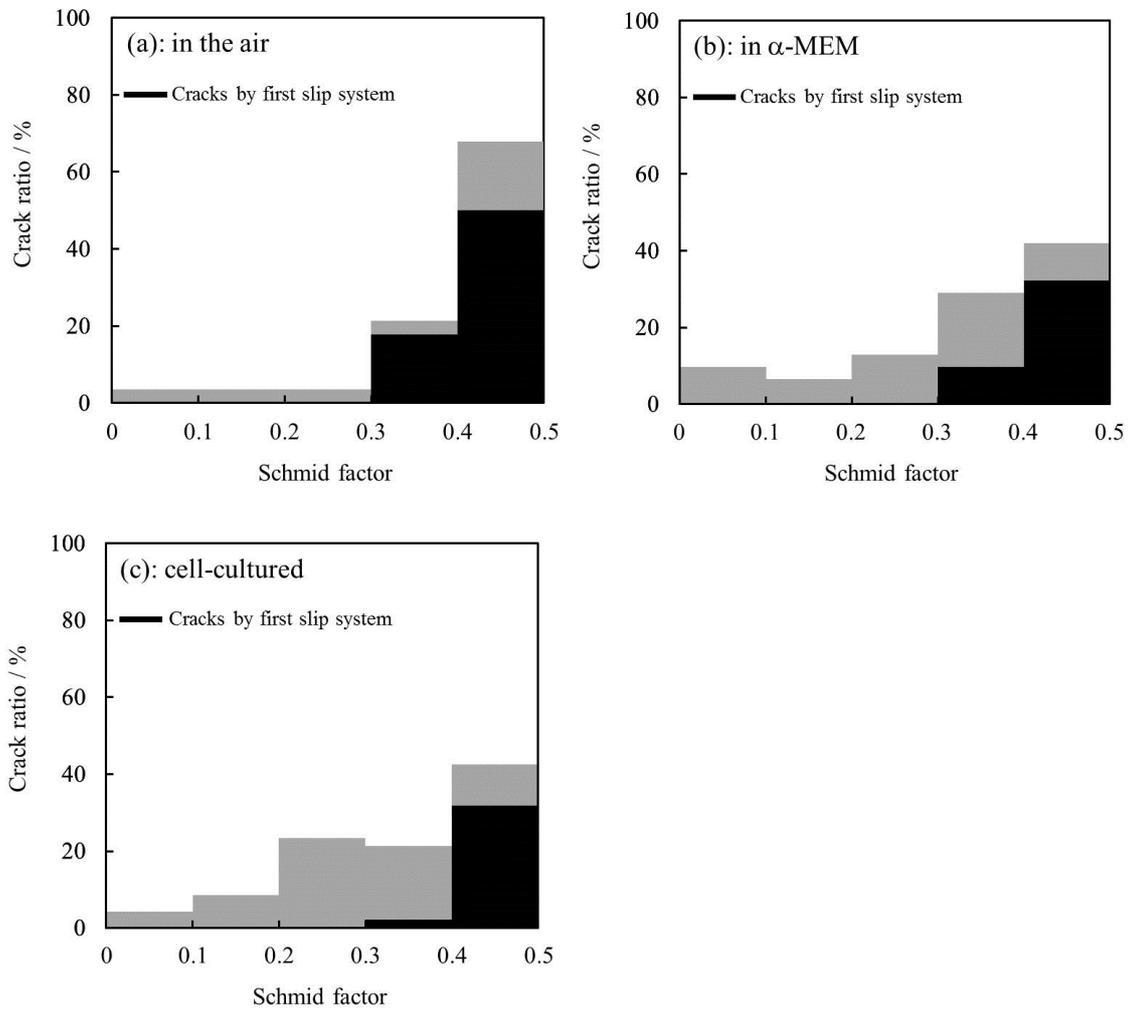


Fig. 6-8 Crack initiated on the first slip system ratio with different Schmid factors on type 316L stainless steel deformed cyclically: (a) in the air, (b) in α -MEM, (c) with cells.

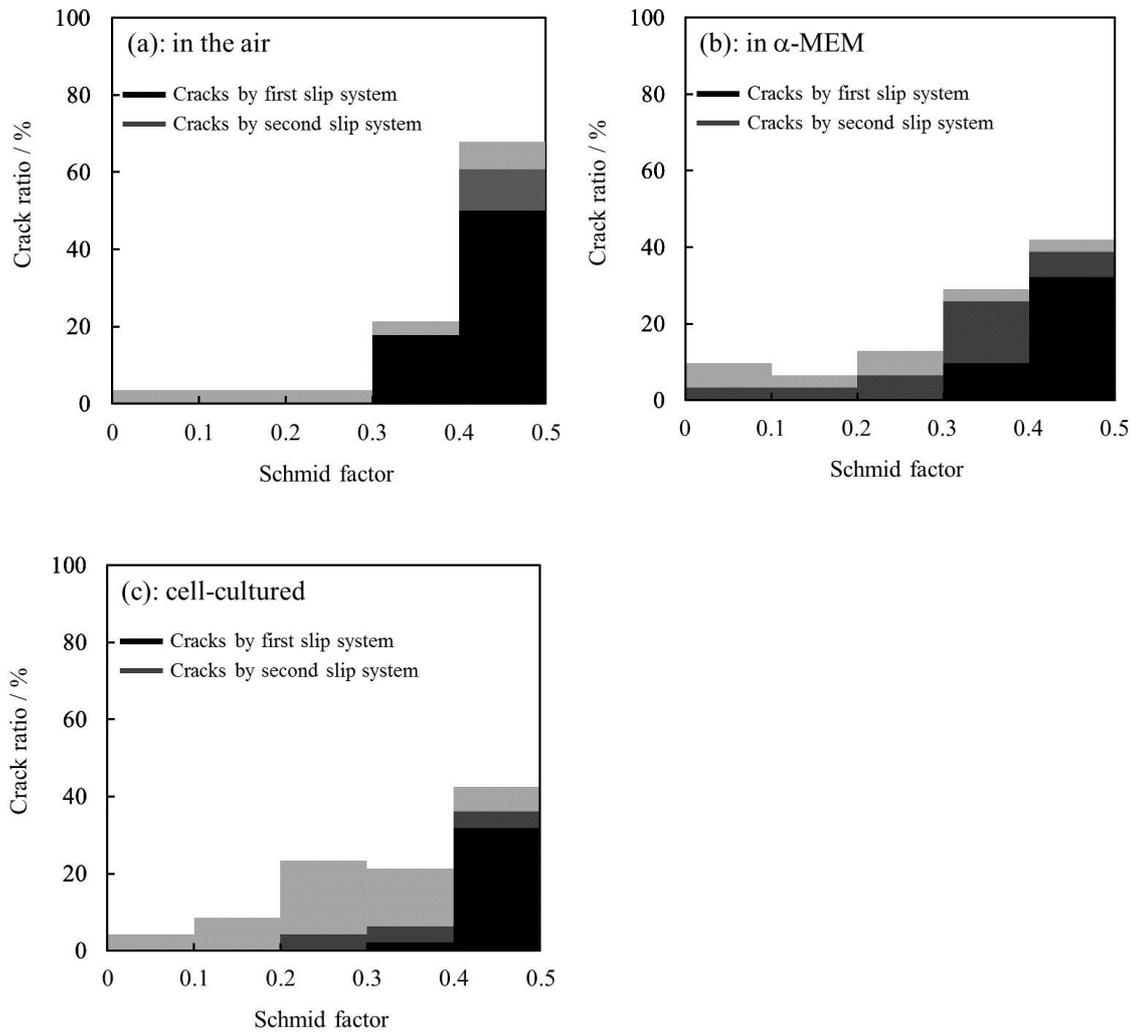


Fig. 6-9 Crack initiated on the second slip system ratio with different Schmid factors on type 316L stainless steel deformed cyclically: (a) in the air, (b) in α -MEM, (c) with cells.

6.3.3 き裂発生とすべり方向の関係

き裂が観察された結晶粒のすべり方向がき裂の発生に及ぼす影響を検討するため、すべり方向を（式 6-2）のように 2 成分に分解した。

$$\vec{d} = s \cdot \vec{a} + t \cdot \vec{b} \quad (s^2 + t^2 = 1) \quad \dots\dots\dots (6-2)$$

\vec{d} : すべり方向、 \vec{a} : 試料表面に平行な成分、 \vec{b} : 試料内部方向への成分
 s, t : 係数

Figure 6-10 に示すように、ベクトル \vec{a} はすべり方向のき裂開口線に平行なベクトル成分、すなわち、試料表面に平行なベクトル成分を表している。また、図中のベクトル \vec{b} はすべり方向のき裂開口線に垂直なベクトル成分、すなわち、試料内部方向へのベクトル成分を表している。Figure 6-11 に、き裂が観察された結晶粒の Schmid factor とベクトル \vec{b} の係数 t の関係をプロットした。大気中試料においては、き裂の大多数は t 値の大小にかかわらず Schmid factor の大きな結晶粒で観察された。一方、 α -MEM 試料では、Schmid factor の大きな結晶粒でき裂は多く観察されたが、加えて t 値が 1 に近い場合に Schmid factor の小さな結晶粒でもき裂が観察された。 t 値が 1 に近いほど、すべりは

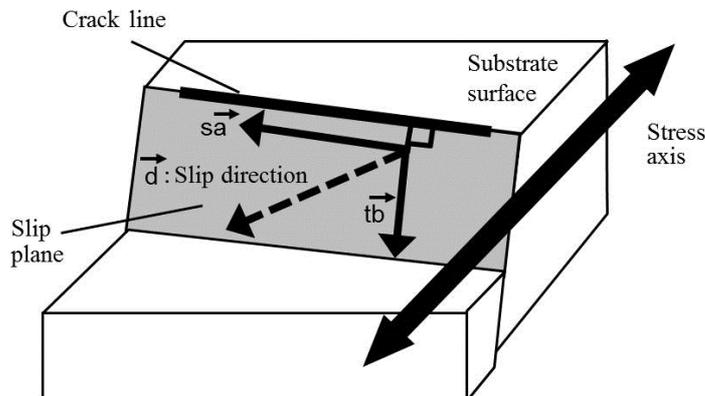


Fig. 6-10 Schematic illustration of the definition decomposing the slip direction vector on the slip plane.

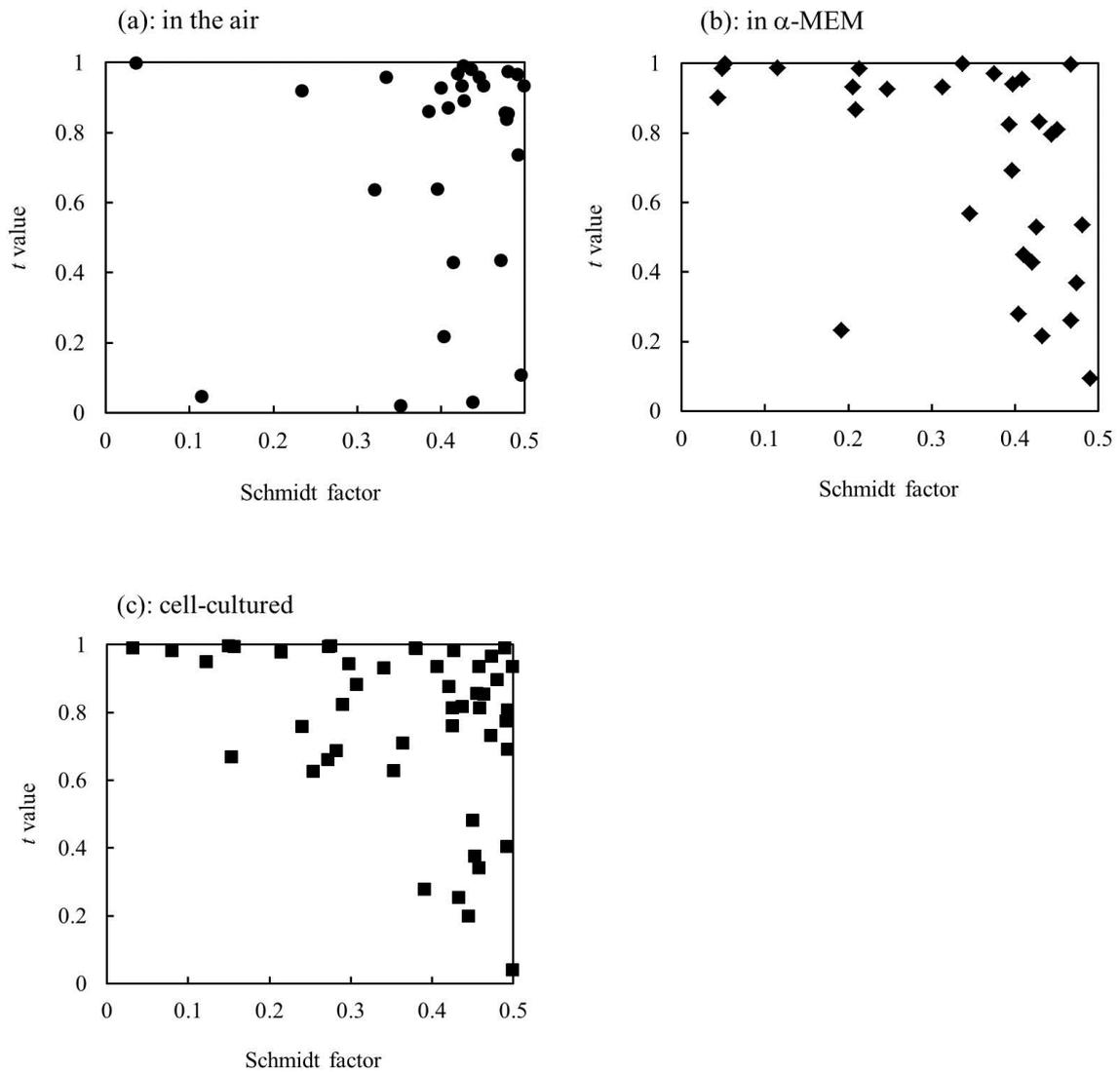


Fig. 6-11 Distribution of vertical component vs. Schmid factor on the slip plane that initiates of the cracks obtained for type 316L stainless steel deformed cyclically: (a) in the air, (b) in α -MEM, (c) with cells.

結晶粒内部方向へと生じ、より多くの新生面が露出したことになる。細胞試料においては、 α -MEM 試料と同様の傾向が認められ、 t 値の大小にかかわらず Schmid factor の大きな結晶粒でき裂が多く観察され、 t 値が 1 に近い場合に Schmid factor の小さな結晶粒でもき裂が観察された。さらに、 t 値が 0.6~0.8 の相対的に小さな領域においてもき裂の発生が認められた。これらの結果より、大気中および溶液中で繰返し応力を付与された Type 316L ステンレス鋼に発生する疲労き裂は Fig. 6-12 に示すような 3 通りに分けられる。

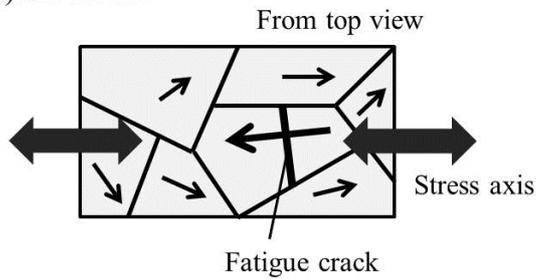
(1) Fig. 6-12(a) に示すように、Schmid factor が大きい(=力学的に変形しやすい)結晶粒で生じる疲労き裂。大気中、溶液中にかかわらず、最も変形量の大きな結晶粒で塑性変形を起点として発生する。

(2) Fig. 6-12(b) に示すように、Schmid factor が相対的に小さくても生じる疲労き裂。

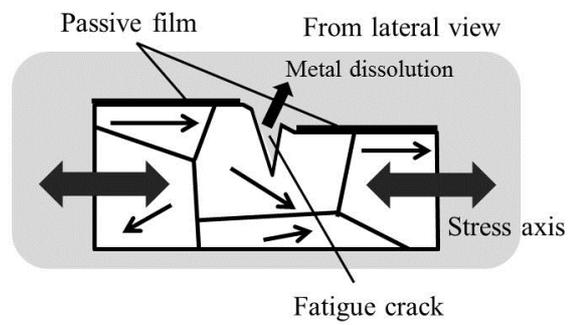
第 3 すべり系以降のすべり系ですべりが試料内部方向に生じた際に、不働態皮膜破壊により暴露された新生面上で生じた局部腐食を起点として応力集中しき裂が発生する。

(3) Fig. 6-12(c) に示すように、不働態皮膜破壊により暴露された新生面上にタンパク質や細胞などの生体由来の高分子が接着している際に生じる疲労き裂。第 4 章で述べたとおり、試料表面に接着したタンパク質や細胞はすき間腐食環境を形成することで Type 316L ステンレス鋼の再不働態化を阻害する。その結果、より局部腐食が生じやすくなり、 α -MEM 試料と比較して t 値の小さな結晶粒でもき裂が発生したと考えられる。

(a): In the air



(b): In the simulated body fluid



(c): Under cell culturing

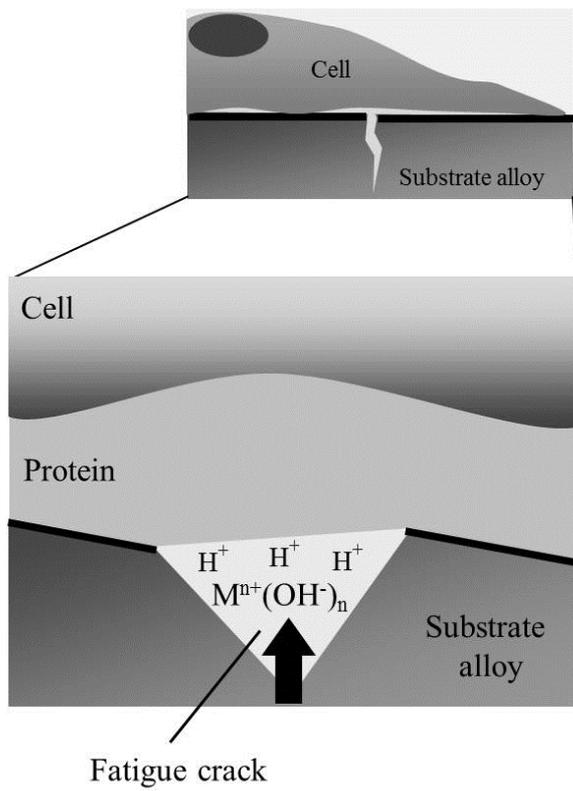


Fig. 6-12 Model of crack initiation in the situation of type 316L stainless steel deformation: (a) in the air, (b) in α -MEM, (c) with cells.

6.4 結言

本章では、fcc 構造を有する Type 316L ステンレス鋼に大気中および模擬生体環境中で繰返し応力を付与し、生体内におけるステンレス鋼の腐食疲労き裂の検討を行った。その際、結晶粒のすべりやすさおよびすべり方向に着目し、き裂の発生条件について以下の結論を得た。

1. 大気中では Schmid factor の大きな結晶粒、すなわち変形が生じやすい結晶粒において疲労き裂が発生する。
2. 模擬体液中では、上記の条件に加え、相対的に Schmid factor の小さな結晶粒でも新生面が多く露出するように変形した際、すなわち材料内部方向へすべりが生じた際に疲労き裂が発生する。
3. 試料上にタンパク質や細胞が接着することでタンパク質や細胞と材料表面の間がすき間腐食環境となるため、新生面が露出した際の再不働態化が阻害され、さらにき裂数は増加する。

参考文献

- [1] S. Virtanen, I. Milošev, E. Gomez-Barrena, R. Trebše, J. Salo, Y.T. Kontinen: Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions, *Acta Biomaterialia*, **4**(3), 468-476 (2008).
- [2] J. Xie, A.T. Alpas, D.O. Northwood: A mechanism for the crack initiation of corrosion fatigue of Type 316L stainless steel in Hank's solution, *Materials Characterization*, **48**(4), 271-277 (2002).
- [3] V. Swaminathan, J.L. Gilbert: Fretting corrosion of CoCrMo and Ti6Al4V interfaces, *Biomaterials*, **33**(22), 5487-5503 (2012).
- [4] M. Taira, E.P. Lautenschlager: *In vitro* corrosion fatigue of 316L cold worked stainless steel, *Journal of Biomedical Materials Research*, **26**(9), 1131-1139 (1992).
- [5] N. Maruyama, S. Hiromoto, E. Akiyama, M. Nakamura: Fretting fatigue behaviour of Ni-free high-nitrogen stainless steel in a simulated body fluid, *Science and Technology of Advanced Materials*, **14**(2), 025002(1-9) (2013).
- [6] A. Chandra, J.J. Ryu, P. Karra, P. Shrotriya, V. Tvergaard, M. Gaiser, T. Weik: Life expectancy of modular Ti6Al4V hip implants: Influence of stress and environment, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **4**(8), 1990-2001 (2011).
- [7] K.R. Wheeler, L.A. James: Fatigue behavior of type 316 stainless steel under simulated body conditions, *Journal of Biomedical Materials Research*, **5**(3), 267-281 (1971).
- [8] S. Hiromoto, S. Mischler: The influence of proteins on the fretting–corrosion behaviour of a Ti6Al4V alloy, *Wear*, **261**(9), 1002-1011 (2006).

- [9] J.C. Grosskreutz: Fatigue Crack Propagation in Aluminum Single Crystals, *Journal of Applied Physics*, **33**(5), 1787-1792 (1962).
- [10] V.J. Colangelo, N.D. Greene: Corrosion and fracture of type 316 SMO orthopedic implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **3**(2), 247-265 (1969).
- [11] X. Li, J. Wang, E.-H. Han, W. Ke: Influence of fluoride and chloride on corrosion behavior of NiTi orthodontic wires, *Acta Biomaterialia*, **3**(5), 807-815 (2007).
- [12] P. Tengvall, I. Lundström: Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial, *Clinical Materials*, **9**(2), 115-134 (1992)
- [13] S. Hiromoto, T. Hanawa: Electrochemical properties of 316L stainless steel with culturing L929 fibroblasts, *Journal of The Royal Society Interface*, **3**(9), 495-505 (2006).
- [14] N.K. Arakere, G. Swanson: Effect of Crystal Orientation on Fatigue Failure of Single Crystal Nickel Base Turbine Blade Superalloys, *Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, **124**(1), 161-176 (2002).
- [15] V.P. Bennett, D.L. McDowell: Polycrystal orientation distribution effects on microslip in high cycle fatigue: *International Journal of Fatigue*, **25**(1), 27-39 (2003).
- [16] B.L. Adams: Orientation imaging microscopy: application to the measurement of grain boundary structure, *Materials Science and Engineering: A*, **166**(1-2), 59-66 (1993).

第7章 Type 316L ステンレス鋼表面への自己組織化ナノホール構造の生成による細胞親和性向上と金属溶解抑制

7.1 諸言

生体材料には金属・合金やセラミックス、高分子が用いられている。金属材料は生体適合性や生体機能性ではセラミックスや高分子より劣るものの、優れた機械的性質を有するためインプラント材料の80%以上を占めている^[1]。近年、金属材料の機能性向上のため、様々な研究が行われており、その中でも機械的性質を損なわず、性質の向上や新たな機能の付与が可能な表面処理・改質が盛んである^[2-4]。2007年にSchmukiらが陽極酸化法により作製した約15 nmの直径を有するTiO₂ナノチューブ上で、鏡面試料上と比較して細胞活性が向上することを報告した^[5]。この研究により、材料表面のマイクロスケールの凹凸のみならず、ナノスケールの凹凸が細胞活性に影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、TiO₂ナノチューブは、チューブ全体が酸化物で構成されているため脆く、引張圧縮、摩耗、曲げ、疲労、腐食、腐食疲労など様々な外的因子に晒される生体内では破壊が懸念されるため、使用部位が限定される。一方、著者らのグループは、新たなナノスケール表面処理として、医療用金属材料として広く使用されているType 316L ステンレス鋼表面に陽極酸化法を用いて規則正しいナノホール配列を生成することに成功している^[6, 7]。ナノホールは約20~200 nmのナノオーダーの直径を有しており、金属基板に直接発現するため、優れた生体適合性と耐久性を兼ね備えることが期待される。

そこで本章では、ナノホールを形成した試料上での細胞培養を行うとともに、試料に模擬体液中で応力を付与することで、生体内におけるナノホール表面の細胞活性評価と溶解・再不働態化挙動、疲労挙動の検討を行った結果を述べる。

7.2 実験方法

7.2.1 ナノホール表面の生成

本研究で用いた Type 316L ステンレス鋼の化学組成を Table 7-1 に示す。本研究では、表面にナノホール構造を有する Type 316L ステンレス鋼の細胞活性評価と溶解・再不働態化および疲労寿命評価を行うため、陽極酸化法を用いて試料表面にナノホール構造を生成した。細胞増殖試験に用いる試料形状は円盤状とし、溶解・再不働態化および疲労寿命評価には引張試験片を用いた。対極に Pt 板を用い、溶液: 2.01 M NaClO₄+エチレングリコール、電解電圧: 20, 30, 40 V、掃引速度: 1 V/s、保持時間: 300 s の条件で陽極酸化を行うことで、試料表面にナノホール構造を生成した。Type 316L ステンレス鋼表面上に生成したナノホール構造の例として、電解電圧 40 V で陽極酸化を行った際に得られたナノホール構造の SEM 像を Fig. 7-1(a)に示す。

Table 7-1 Chemical composition of Type 316L stainless steel.

Cr	Ni	Mo	C	Si	Mn	P	S	Fe
17.35	12.18	2.07	0.011	0.63	1.20	0.03	0.001	Bal.

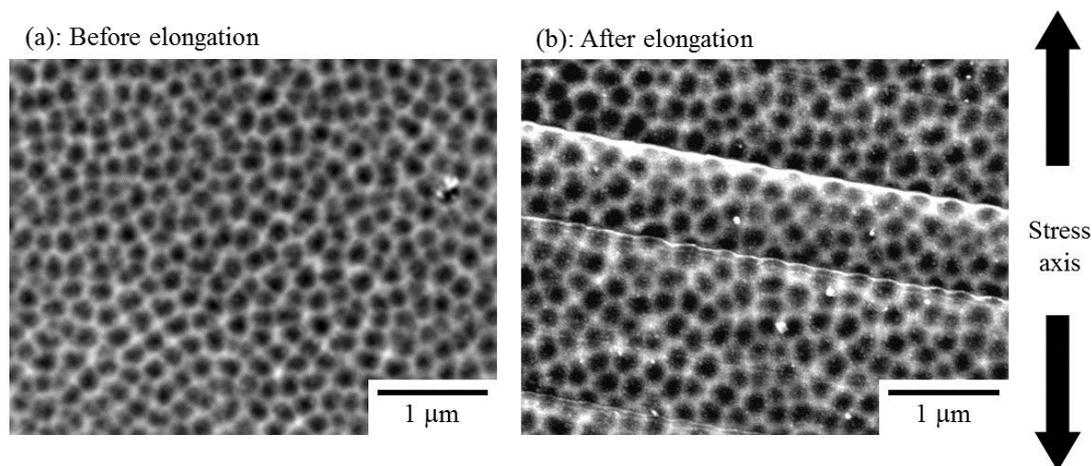


Fig. 7-1 SEM images of Type 316L stainless steel surface:
(a) before elongation, (b) after elongation.

7.2.2 細胞増殖試験

試料表面での細胞活性を検討するために細胞増殖試験を行った。細胞培養には 24 well マルチプレートを用いた。直径 15.5 mm、厚さ 1 mm の円盤状に切り出した Type 316L ステンレス鋼薄板を、(1)電解電圧 20 V でナノホールを作製した試料(以下、20 V ナノホール試料)、(2) 電解電圧 30 V でナノホールを作製した試料(以下、30 V ナノホール試料)、(3)電解電圧 40 V でナノホールを作製した試料(以下、40 V ナノホール試料)、(4) 機械研磨により鏡面とした試料(以下、機械研磨試料)の 4 種類に加工した。各種表面処理を施した試料を、アセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ 300 s ずつ超音波洗浄した後、オートクレーブ処理(121 °C、900 s)した。その後、初期細胞密度が 5000 個/cm² になるように骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を播種した。培養期間は 4 日間とし、染色後の細胞数を計測することにより、試料表面の細胞活性を検討した。計測の際には、細胞の接着した試料をプレートから取り出し、細胞をメタノールで固定後、ギムザ染色した。染色後は光学顕微鏡で試料表面を観察し、細胞数を計測した。

7.2.3 急速ひずみ電極試験

Type 316L ステンレス鋼の薄板を放電加工により引張試験片(ゲージ部寸法 15×4×1 mm³)に加工した後、(1)20 V ナノホール試料、(2)40 V ナノホール試料、(3)機械研磨試料および(4)電解研磨により鏡面とした試料(以下、電解研磨試料)の 4 種類の表面処理を行った。陽極酸化および電解研磨の際には、ゲージ部以外を PTFE テープで被覆し、絶縁した後、ゲージ部のみに電解処理を施した。電解研磨は、溶液: 42 vol.%リン酸+47 vol.%グリセリン+11 vol.%蒸留水、電流密度: 0.5 A/cm²、電解時間: 600 s の条件で行った。前述の 4 種類の試料をアセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ 600 s ずつ超音波洗浄した後、オートクレーブ処理(121 °C、900 s)し、 α -MEM + 10 vol.% FBS に 1 日浸漬し

た後、試験に供した。浸漬後の試料を電気化学セル内に設置し、電気化学セル内部を α -MEM + 10 vol% FBS で満たした後、溶液を 37 °C に保持し 1 時間 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ の通気および腐食電位測定を行った。腐食電位測定開始から 1 時間後、その時点での腐食電位で試料を定電位分極し、試料に油圧式サーボパルサ(Shimadzu Corporation)を用いて 4%, 0.67 /s の急速引張ひずみを付与した。ひずみ付与中およびひずみ付与停止後のアノード電流変化、ひずみ変化、応力変化をそれぞれ測定した。また、ひずみ付与後の試料表面を FE-SEM を用いて観察した。

7.2.4 疲労試験

生体内では腐食以外に歩行などによる力学的負荷が常にかかる。表面にナノホール構造を生成した Type 316L ステンレス鋼の疲労強度を検討するため、大気中で繰返し応力を付与した。Type 316L ステンレス鋼の薄板を放電加工により引張試験片(ゲージ部寸法 8×4×1 mm³)に加工した後、(1)40 V ナノホール試料、(2)機械研磨試料、(3)電解研磨試料の 3 種類の表面処理を行った。これらの試料をアセトン、メタノール、蒸留水中でそれぞれ 600 s ずつ超音波洗浄した後、オートクレーブ処理(121 °C、900 s)し試験に供した。疲労試験では、応力比 0.1(R=0.1)、周波数 10 Hz、最大応力 500, 525, 550 MPa の繰返し応力を付与し、10⁷ サイクルまでを疲労試験を行った。

7.2.5 統計学的手法

本研究では、細胞増殖試験および急速ひずみ電極試験においてサンプル数を $n=3$ とし、グループ間の有意差を Student の t 検定を用いて統計学的に算出した。その際、 t 検定に先んじて F 検定(等分散性の検定)を行うことで、等分散性が仮定できるデータ群と等分散性が仮定できないデータ群(Whelch の検定)に分け、各データに適した t 検定を選択し、両側検定を実施した。なお、

有意水準は $p=0.05$ とし、 $p<0.01$ で特に強い有意差とした。

7.3 結果および考察

7.3.1 ナノホール表面における細胞挙動

Figure 7-2 に 20 V ナノホール試料、30 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料および機械研磨試料表面上で骨芽細胞様細胞を 4 日間培養した後の細胞密度を示す。20 V ナノホール試料上の細胞密度が、他の試料上の細胞密度と比較して有意に増大した。このことから、TiO₂ ナノチューブと同様に、ステンレス鋼においても特定の径を有するナノホール配列上で細胞活性の向上が可能であることが明らかとなった。Figure 7-3 に各電解電圧で陽極酸化処理を行った際にステンレス鋼表面に生成されるナノホールの平均直径および平均深さを示す。細胞活性の向上が認められた 20 V ナノホール試料のナノホールの平均直径は約 20 nm であり、これは Schmuki らが報告した、細胞活性を向

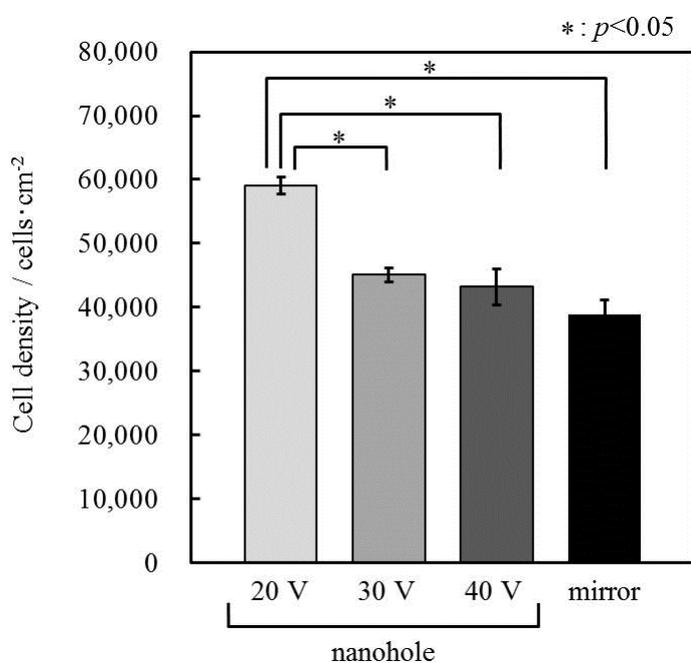


Fig. 7-2 Cell density of MC3T3-E1 cells cultured for 4 days on nanohole surface and mechanically polished surface of Type 316L stainless steels.

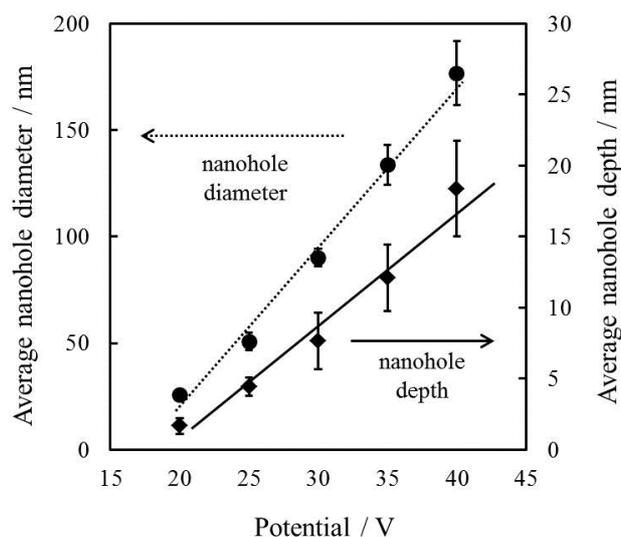


Fig. 7-3 Potential dependence of average nanohole diameter and average nanohole depth.

上させる TiO₂ ナノチューブの平均直径が約 15 nm であることとほぼ一致する^[5]。Schmuki らは、TiO₂ ナノチューブの平均直径が小さいほど試料の表面積が増大するため、接着タンパク質であるインテグリンの接着サイトが増大し、細胞活性が向上したと考察している。ナノホール表面においても、平均直径の小さなナノホールが得られる 20 V ナノホール試料において、インテグリンの接着サイトが増大した結果、細胞活性が向上したと考えられる。

7.3.2 ナノホール表面を生成した Type 316L ステンレス鋼の急速ひずみ付与に伴う溶解・再不働態化

急速ひずみを付与した後の 40 V ナノホール試料の表面 SEM 像を Fig. 7-1(b) に示す。すべりステップ形成箇所においてナノホールの破壊が認められたが、それ以外の箇所では破壊は認められず、動的環境においてもほとんどのナノホールは形状を維持していることが明らかとなった。すべりステップはナノホールの凹部分に発生していた。ナノホールの凹部分で応力集中が生じたためと考えられる。

Figure 7-4 に 40 V ナノホール試料と機械研磨試料の急速ひずみ付与時の応力変化およびアノード電流変化を示す。いずれの試料も塑性変形開始時からアノード電流の増加が認められたが、40 V ナノホール試料では約 13 mA/cm^2 までアノード電流密度が増加した後、電流増加の傾きが減少し、ひずみ付与終了時のアノード電流密度は機械研磨試料のおよそ半分となった。このことから、ナノホール試料ではひずみ付与時の金属溶解が抑制されていることが明らかとなった。電解研磨試料、20 V ナノホール試料においても 40 V ナノホール試料と同様のアノード電流変化が認められた。よって、金属溶解の抑制は試料表面形状ではなく、試料作製の際の電解プロセスに影響を受けたと考えられる。また、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料どちらにおいても、ひずみ付与停止後、ただちに電流は減衰を始め、ひずみ付与前の値にまで戻った。ナノホール表面でも不働態皮膜が破壊された後には再不働態化は進行し、再び不働態皮膜を維持できることが明らかとなった。

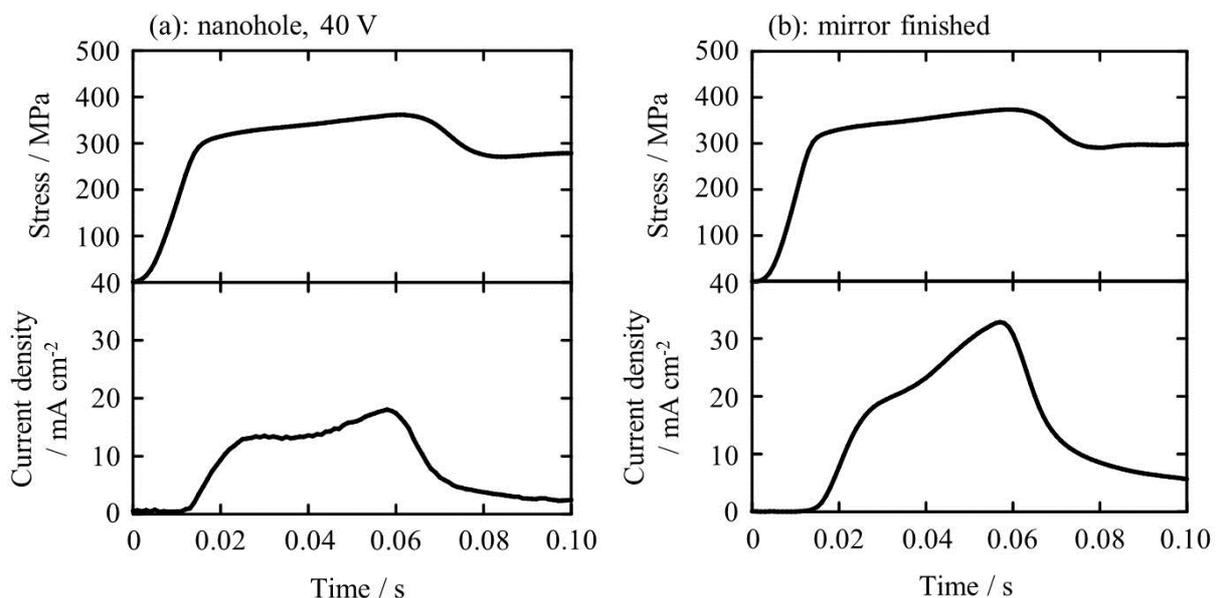


Fig. 7-4 Typical transients of strain, stress and anodic current with time during and after elongation of Type 316L stainless steel with surface: (a) nanohole, 40 V, (b) polished mechanically.

次に、ナノホール構造を付与した試料の再不働態化挙動を検討するため、Fig. 7-5 に急速ひずみを付与し得られたアノード電流の積分値すなわち電気量を示す。電解研磨試料、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料のひずみ付与時に発生した電気量は、機械研磨試料の電気量よりも少なかった。これは、ひずみ付与中の最大電流密度(ひずみ付与中に得られたアノード電流の最大値)が電解研磨試料、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料において機械研磨試料と比較して低いことに起因する。さらに、ひずみ付与終了後、すなわち再不働態化時に発生した電気量も電解研磨試料、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料において少なかった。しかし、ひずみ付与時には電解研磨試料、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料で発生した電気量は機械研磨試料の約 6 割であったのに対し、ひずみ付与後には約 2 割にまで低下したため、電解研磨試料、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料では

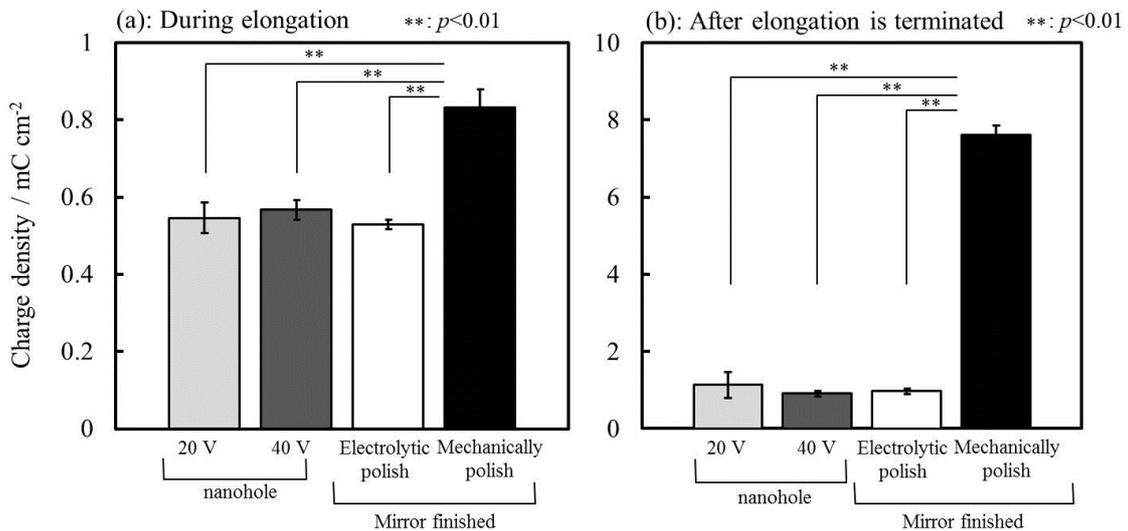


Fig. 7-5 Charge density generated during and after elongation of Type 316L stainless steel with nanohole surface, electrolytic polished surface and mechanically polished surface.

ひずみ付与時の金属溶解抑制のみならず、再不働態化の促進が生じたことがわかる。電解研磨試料、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料におけるひずみ付与時の金属溶解抑制および再不働態化の促進について考察するため、電解研磨および陽極酸化による材料の表面変化を考える。Figure7-6 に陽極酸化によるナノホール構造付与のモデル図を示す。ナノホール構造は、特定の溶液、特定の電解電圧でステンレス鋼を電解研磨した際に得られる^[8]。すなわち、酸化皮膜の溶解から下地金属の溶解を経てナノホールが形成される。ステンレス鋼を圧延した際には表面に加工層が残存することが知られており、機械研磨した際には、研磨紙によって試料表面が力学的に削られるため加工層が残存する。この加工層は再不働態化を阻害することが知られている。電解研磨およびナノホール生成の際には、下地金属を溶解して加工層を電気化学的に除去するため、研磨後に加工層が残存しない。よって、電解研磨試料、

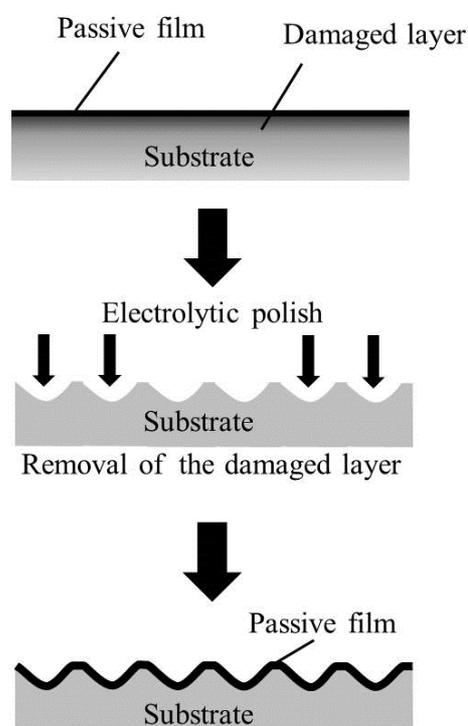


Fig. 7-6 The model of nanohole formation by anodization.

20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料では加工層による再不働態化の阻害が生じず、機械研磨試料と比較して再不働態化が促進されたと考えられる。ひずみ付与中においても、電解研磨試料、20 V ナノホール試料、40 V ナノホール試料では促進された再不働態化により新生面上での金属溶解が抑制されるため、途中からアノード電流の増加がゆるやかになったと考えられる。

7.3.3 ナノホール表面を生成した Type 316L ステンレス鋼の疲労強度

医療用金属材料には生体適合性、耐食性のみならず優れた機械的性質が要求される。特に生体内では、運動により繰返し応力が常に付与されるため、材料には高い疲労強度が必須である。ナノホール表面を付与した Type 316L ステンレス鋼と平滑面を有する材料の疲労強度を比較するため、各表面処理を施した試料に大気中で繰返し応力を付与した。Figure 7-7 に機械研磨試料、電解研磨試料、40 V ナノホール試料の応力-破断までのサイクル数(S-N 曲線)

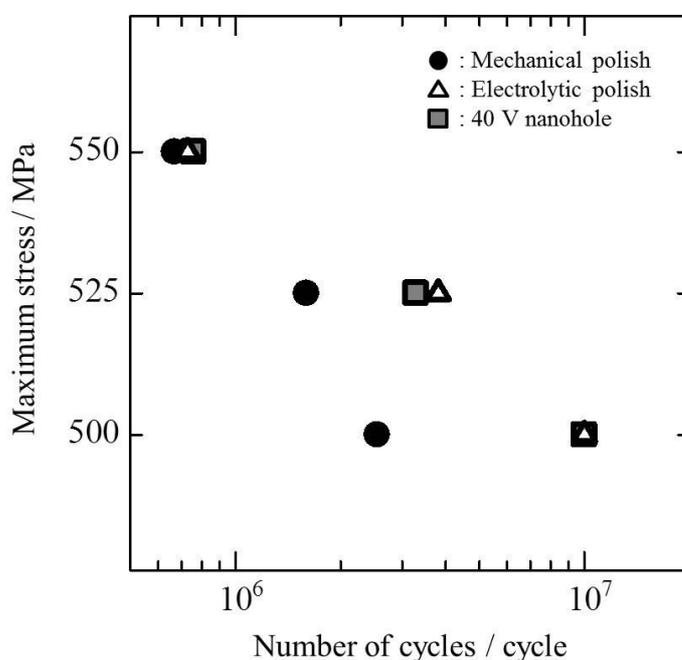


Fig. 7-7 The fatigue lives of Type 316L stainless steel with nanohole surface, electrolytic polished surface and mechanically polished surface.

を示す。最大応力 500, 525 MPa において、電解研磨試料、40 V ナノホール試料の疲労寿命が機械研磨試料の疲労寿命と比較して長くなった。また、550 MPa においてもナノホール構造を付与した試料の疲労寿命は他の試料と比較して短くなることはなかった。第 5 章でも述べたとおり、試料表面上に存在する介在物は応力集中をまねき疲労寿命を低下させる原因となる^[9]。Figure 7-6 に示したとおり、電解研磨を施した試料およびナノホールを形成した試料では、下地金属の溶解が生じるため表面の介在物も同時に剥離し、応力集中のサイトが減少したために疲労寿命が向上したと考えられる。

7.4 結言

本章では、生体内で用いられる Type 316L ステンレス鋼の新規表面処理法として、陽極酸化法を用いたナノホール表面を提案し、ナノホール表面を有する試料の細胞活性、変形時の耐食性、耐久性を検討し以下のような結論を得た。

1. 直径 20 nm 程度のナノホール表面を有する Type 316L ステンレス鋼は細胞活性を向上させる。
2. ナノホール表面を有する Type 316L ステンレス鋼に変形が加えられた際、ナノホールの破壊はすべりステップ形成箇所のみで生じ、ほとんどのナノホールは形状を維持できる。
3. ナノホール表面を有する Type 316L ステンレス鋼は機械研磨した材料と比較して変形時の金属溶解量を抑制し、再不働態化を促進する。
4. ナノホール表面を有する Type 316L ステンレス鋼は機械研磨した材料と比較して疲労寿命が改善される。また、電解研磨した材料と比較しても疲労寿命の低減は生じない。

以上から、ナノホール表面は生体内において十分な耐久性、耐食性および生体適合性を有するため、今後の医療用金属材料の新規表面処理法として期待できる。

参考文献

- [1] 塙 隆夫、米山 隆之 共著: 金属バイオマテリアル、コロナ社、(2007).
- [2] K.C. Popat, E.E. Leary Swan, V. Mukhatyar, K.-I. Chatvanichkul, G.K. Mor, C.A. Grimes, T.A. Desai: Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response, *Biomaterials*, **26**(22), 4516-4522 (2005).
- [3] S. Venkatraman, F. Boey: Release profiles in drug-eluting stents: Issues and uncertainties, *Journal of Controlled Release*, **120**(3), 149-160 (2007).
- [4] E. De Giglio, D. Cafagna, M.A. Ricci, L. Sabbatini, S. Cometa, C. Ferreti, M. Mattioli-Belmonte: Biocompatibility of Poly(Acrylic Acid) Thin Coatings Electro-synthesized onto TiAlV-based Implants, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **25**(4), 374-391 (2010).
- [5] J. Park, S. Bauer, K. von der Mark, P. Schmuki: Nanosize and Vitality: TiO₂ Nanotube Diameter Directs Cell Fate, *Nano Letters*, **7**(6), 1686-1691 (2007).
- [6] H. Tsuchiya, T. Suzumura, Y. Terada, S. Fujimoto: Formation of self-organized pores on type 316 stainless steel in organic solvents, *Electrochimica Acta*, **82**, 333-338 (2012).
- [7] H. Tsuchiya: Formation of self-organized pore arrays on metallic substrates by anodization and their applications, *Materials Science Forum*, 783-786, 2034-2039 (2014).
- [8] V. Vignal, J.C. Roux, S. Flandrois, A. Fevrier: Nanoscopic studies of stainless steel electropolishing, *Corrosion Science*, **42**(6), 1041-1053 (2000).
- [9] B.M. Ayyub, I.A. Assakkaf, D.P. Kihl, M.W. Siev: Reliability - Based Design Guidelines for Fatigue of Ship Structures, *Naval Engineers Journal*, **114**(2), 113-138 (2002).

第 8 章 総括

生体内への埋入を目的とした医療用金属材料の長期信頼性に関してこれまで多くの研究がなされてきた。しかし、これまでの研究において、タンパク質、細胞などの分子量の大きな有機物を含んだ環境から医療用金属材料が受ける影響はほとんど検討されてこなかった。本研究では、生体内をバイオメカノケミカル環境という複合環境として捉え、タンパク質や細胞を含んだ模擬生体環境で力学的負荷を付与した際の医療用金属材料の溶解・再不働態化や、腐食疲労寿命、疲労き裂の発生や進展の結晶学的・電気化学的検討を行った。さらに、これまでに得られた知見より、生体適合性および耐食性を向上させる新規表面処理法の提案を行った。本論文は全 8 章からなる。以下に各章ごとに得られた成果を総括する。

第 1 章では、インプラント材として用いられている金属材料の特徴と問題点、これまでに行われてきた力学的・電気化学的な評価について述べた。そして、生体内をバイオメカノケミカル環境という複合環境として捉え、タンパク質や細胞を含んだ模擬生体環境で力学的負荷を付与した際の医療用金属材料の電気化学挙動の検討の意義について述べた。

第 2 章では、不働態皮膜破壊による金属溶解および再不働態化に関する基礎的な知見を得るのに適した手法である急速ひずみ電極試験法を用いて、模擬生体環境における医療用金属材料の変形に際しての電気化学的挙動を検討した。供試材は現在、医療用金属材料として広く使用されている Ti, Ti 合金, Co-Cr 合金, ステンレス鋼とし、それぞれの金属溶解、再不働態化の違いを比較した。その結果、ひずみ付与時に発生する

金属溶解、すなわちアノード反応の大小は下地金属の平衡電位と、不働態皮膜に保護された状態における腐食電位の差に依存することが明らかとなった。また、いずれの材料においてもひずみ付与終了後ただちに再不働態化により不働態皮膜は自己再生し金属溶解は抑制されるが、純 Ti、Ti-6Al-4V 合金、Type 316L ステンレス鋼および Co-Cr 合金では純 Ti の再不働態化が最も早く、Type 316L ステンレス鋼の再不働態化が最も遅いことが明らかとなった。

第 3 章では、タンパク質および細胞を表面に接着させた Ti-6Al-4V 合金に模擬生体環境で急速ひずみを付与することで、タンパク質や細胞などの生体由来の分子量の大きな有機物が、材料変形時の金属溶解、再不働態化に及ぼす影響を検討した。タンパク質や細胞が Ti-6Al-4V 合金上に接着し、変形が生じた際には、再不働態化時の金属溶解量が増加した。これは、タンパク質や細胞と新生面の間ですき間腐食環境が形成され、再不働態化が阻害されたためであると考察した。Ti-6Al-4V 合金の表面に細胞が接着することで、不働態皮膜破壊時に極端な再不働態化の阻害が生じ、すべりステップに沿って局部腐食が生じ得ることが明らかとなった。

第 4 章では、長期間の試験中に模擬体液がコンタミネーション(雑菌混入)を生じないように独自に開発したシステムを用い、実際に生体内で付与されるであろう弾性限以下の繰返し応力を付与した際の Type 316L ステンレス鋼の溶解および再不働態化挙動に及ぼすタンパク質や細胞などの有機物の影響を調査した。その際、繰返し応力付与時の腐食電位変化に着目し、 10^5 サイクルまでの最低電位と再び腐食電位が貴化し始めるまでに要する時間を検討した。繰返し応力付与中、不働態皮膜破壊によ

り新生面は体液に暴露し金属溶解が生じるため、腐食電位は卑にシフトするが、材料の加工硬化および再不働態化により金属溶解は抑制されるため、腐食電位は貴にシフトし徐々に繰返し応力付与前の電位にまで回復した。また、材料表面に接着したタンパク質や細胞は、不働態皮膜が破壊され新生面が露出した際の体液と新生面の接触を妨げることで金属溶解を抑制することと、タンパク質や細胞と試料表面の間に体液が流れ込んだ際には、すき間環境が形成され再不働態化が阻害されることが明らかとなった。

第5章では、タンパク質や細胞を含んだ模擬生体環境におけるTi-6Al-4V合金の溶解、再不働態化、疲労き裂の発生や進展、腐食疲労寿命を検討した。試料の腐食電位変化から、Ti-6Al-4V合金の腐食疲労寿命をき裂発生までの時間とき裂進展に要した時間に分割し、材料表面に接着したタンパク質および細胞が疲労き裂の発生・進展に及ぼす影響を検討した。腐食疲労き裂が発生した際には、き裂により生じた新生面が体液と接触するため金属溶解が生じ腐食電位は降下した。腐食疲労き裂が発生するとき裂先端部において応力集中が生じるため、き裂は進展し腐食電位は破断まで降下し続けた。材料表面に接着したタンパク質や細胞は、材料表面と繰返し応力によって露出した新生面との接触を妨げることで金属溶解を抑制し、腐食疲労き裂の発生を抑制することが明らかとなった。また、き裂とタンパク質や細胞で囲まれた空間には体液が流れ込みすき間腐食環境となるため、再不働態化が阻害され、腐食疲労き裂の進展は促進されることが明らかとなった。表面にタンパク質や細胞が接着したTi-6Al-4V合金に体液中で繰返し応力が付与された際には、き裂発生の抑制とき裂進展の促進の相反する2つの影響が現れるが、Ti-6Al-4V合金においては疲労寿命の大半をき裂進展が占めるため、再

不働態化の阻害、すなわちき裂進展の促進が強く働き腐食疲労寿命は低下するという結論を得た。

第 6 章では、fcc 構造を有する Type 316L ステンレス鋼に大気中および模擬生体環境中で繰返し応力を付与し、生体内におけるステンレス鋼の腐食疲労き裂の検討を行った。その際、結晶粒のすべりやすさおよびすべり方向に着目し、き裂の発生条件について整理を行った。その結果、模擬体液中において疲労き裂は、

- (1) Schmid factor の大きな結晶粒、すなわち変形が生じやすい結晶粒において発生する疲労き裂。
- (2) 相対的に Schmid factor の小さな結晶粒において新生面が多く露出するように変形した際、すなわち材料内部方向へすべりが生じた際に腐食が促進され発生する疲労き裂。
- (3) 試料上にタンパク質や細胞が接着することで、タンパク質や細胞と材料表面の間がすき間腐食環境となり、さらに腐食が促進されることで発生する疲労き裂。

以上の 3 種類に大別できることが明らかとなった。

第 7 章では、生体内で用いられる Type 316L ステンレス鋼の新規表面処理法として、陽極酸化法を用いたナノホール表面を提案し、ナノホール表面を有する試料の細胞活性、変形時の耐食性、耐久性を検討した。直径 20 nm 程度のナノホール表面を有する Type 316L ステンレス鋼は細胞活性を向上させることや、機械研磨した材料と比較して変形時の金属溶解量を抑制し、再不働態化を促進すること、機械研磨した材料と比較して疲労寿命が改善され、電解研磨した材料と比較しても疲労寿命の低減は生じないことを明らかとし、ナノホール表面は生体内において充分

な耐久性、耐食性および生体適合性を有するため、今後の医療用金属材料の新規表面処理法として期待できることを述べた。

本論文では、タンパク質や細胞が接着した医療用金属材料の再不働態化の阻害や局部腐食の発生、疲労き裂進展の加速による疲労寿命の低下など、これまでの医療用金属材料の長期信頼性評価では得られなかった様々な知見が得られ、バイオメカノケミカル環境における医療用金属材料の長期信頼性評価の有用性が示された。本論文の成果が、これからの医療用金属材料の長期信頼性に関する研究に大きく貢献することを願う。

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、学部4年から現在に至るまで直接ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 工学博士 藤本慎司教授に心より感謝し、お礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、副査として本論文をご査読いただき、多くの有意義なご助言を賜りました、大阪大学大学院工学研究科 博士(工学) 中野貴由教授、大阪大学大学院工学研究科 博士(工学) 安田弘行教授に深く感謝し、お礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、数々のご指導、ご助言を賜りました、大阪大学大学院工学研究科 博士(工学) 宮部さやか助教、大阪大学大学院工学研究科 博士(工学) 土谷博昭准教授に深く感謝し、お礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、実験における技術面などのご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科 中田淳二技術専門職員に深く感謝し、お礼申し上げます。

本研究に関して、様々なご助言を賜りました(株)日新製鋼 河野明訓特任助教、(株)日新製鋼 斉藤実招聘教授に深く感謝し、お礼申し上げます。

第7章における実験に協力いただきました、大阪大学大学院工学研究科 博士前期課程 藤永悠志氏に深く感謝し、お礼申し上げます。

様々な形でご協力いただきました研究室の諸先輩、後輩の皆様をはじめとしてお世話になった全ての方に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究は、大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻「卓越した大学院拠点形成支援補助金」の支援のもとに実施されました。お礼申し上げます。

本論文に関する研究発表

投稿論文（査読有り）

- 1) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and Shinji Fujimoto: **Metal Dissolution and Repassivation of Ti-6Al-4V Alloy during Rapid Elongation in Simulated Body Fluid including Osteoblast-like Cells**, *ECS Transactions*, **50**(16) 1-10 (2013).
- 2) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and 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**(11) C576-C580 (2013).
- 3) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and Shinji Fujimoto: **Electrochemical Behavior on Type 316L Stainless Steel during Cyclic Deformation in Simulated Body Fluid including Proteins and Cells**, *Materials transactions*, **55**(12) 1890-1894 (2014).
- 4) Sayaka Miyabe, **Kotaro Doi**, Hiroaki Tsuchiya and Shinji Fujimoto: **Evaluation of the effect of surface treatments on the biocompatibility of 316L stainless steel using osteoblast-like cells**, *Proceedings of ECO-MATES 2011 November 28-30, Osaka, Japan*, **2**, pp. 263-264 (2011).
- 5) **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返し応力を付与したType 316Lステンレス鋼の溶解、再不働態化**、*日本金属学会誌* 投稿中
- 6) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and Shinji Fujimoto: **Degradation of Ti-6Al-4V Alloy under Cyclic Loading in Simulated Body Environment with Cell Culturing** 投稿中

解説

- 1) 藤本慎司、土井康太郎、宮部さやか: 金属材料表面の電気化学反応と解析, バイオマテリアル—生体材料—, **32**(3), 207-216 (2014)

国際会議における発表 (口頭発表)

- 1) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and Shinji Fujimoto: **The Role of Surface Adhering Organic Substances on Metal Dissolution and Repassivation during Cyclic Deformation of Ti-6Al-4V Alloy**, 225th *The Electrochemical Society Meeting C1 Corrosion General Session*, Orland, FL, USA, May 2014
- 2) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and Shinji Fujimoto: **Passivity Breakdown and Repassivation of Ti-6Al-4V Alloy during Cyclic Deformation in Simulated Body Fluid**, *The 4th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials '13 Session 1 Innovative Biomaterials and Biomedical Materials*, Nagoya University, December 14 2013
- 3) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and Shinji Fujimoto: **Repassivation on Type 316L Stainless Steel with Cyclic Deformation in Simulated Body Fluid Including Cells**, 224th *The Electrochemical Society Meeting D5 Oxide Films A Symposium in Honor of Clive Clayton on his 65th Birthday*, San Francisco, California, USA, October 2013
- 4) **Kotaro Doi**, Sayaka Miyabe and Shinji Fujimoto: **Metal Dissolution and Repassivation Behavior of Ti6Al4V Alloy during Rapid Straining in Simulated Body Fluid**, *the 222nd Meeting of ECS-The Electrochemical Society*, Honolulu USA, October 2012