

ELID 研削を施した金属系生体材料の細胞毒性評価

慶應義塾大学[院] ○水谷正義 慶應義塾大学 山田藍, 小茂島潤
理化学研究所 片平和俊, 大森整 埼玉大学 森田真史

1 緒 言

チタン合金やステンレス鋼などの金属系生体材料をインプラントとして利用する場合, 高い形状精度や部位によっては平滑な面の実現が要求される。またそれに加えて, これらは『生体内』という人工的な材料にとっては厳しい環境のもとで使用されるため, 耐食性のみならず, 耐疲労性, 耐摩耗性などの優れた特性を兼ね備えている必要がある⁽¹⁾⁽³⁾。

これらを解決するための加工法の一つとして電解インプロセスドレッシング(Electrolytic In-process Dressing, ELID)研削⁽⁴⁾⁽⁷⁾がある。ELID研削を施すことにより, その加工プロセスで安定な酸化皮膜が表面に付与され, その存在により, 良好な耐食性を示すことが著者らの研究において明らかとなっている⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾。したがって優れた耐食性が必要となる生体材料のための加工法としてその実用化の可能性が期待されている。

このような, ELID研削を生体材料に対する表面仕上げ法として実用するためには, 耐食性などの化学的な特性や機械的特性の向上のみならず, 安全性という観点から生体適合性について分析することが重要であると考えられる。

そこで本研究では, 金属系生体材料として広く用いられているステンレス鋼(SUS316L)にELID研削を施し, その加工面に対して細胞を用いた毒性評価を行った。その際, 研磨仕上げを施した試験片と比較することで, かかる研削技術の生体材料に対する加工法としての優位性・有効性について検討・考察を加えた。

2 実験方法

2.1 供試材 供試材には, 骨固定材料や手術用ワイヤーなどに使用されているSUS316L鋼を用いた。同材を放電加工機により, 厚さ1.5mm, $\phi 15\text{mm}$ に加工後, その一方の端面に対して#325, #1200, #4000の各砥石を用いてELID研削を施した(以下, 325 series, 1200 series, 4000 series)。また比較材として, SiO₂砥粒によるバフ研磨を施した試験片を準備した(以下, Polished series)。

これらの試験片に対して, エタノールによる超音波洗浄を15min行い, さらにオートクレーブを用いて121°C, 30min滅菌処理を施し供試状態とした。

2.2 L929細胞を用いた浸漬試験および試験条件 生体適合性を評価するために用いる細胞としてはL929線維芽細胞を用いた。L929細胞は, 体内での異物を感知し炎症を起こした組織に集まり, コラーゲン繊維を生成し異物を包む働きをする。またその際に炎症性サイトカインなどのタンパク質を排出するため, 細胞毒性評価に適している。

細胞の浸漬試験は, 図1に示す培養システムを用いて, 37°C,

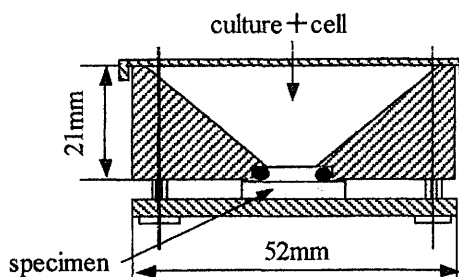


Fig. 1 Cell culture system

5%CO₂, 湿度 100%の環境で行った。その際, 初期細胞数は10mlの培養液中に 4×10^4 個とし, 浸漬期間は5日間とした。

3 結果および考察

各試料表面の粗さを触針式粗さ計を用いて測定した。その結果を図2に示す。同図より, ELID研削を施したものについては, 加工に使用する砥粒径の微細化にともない, 平均表面粗さRaの値は減少していることがわかる。また, #4000の砥石を用いてELID研削を行った4000 seriesとSiO₂によるバフ研磨を施したPolished seriesは同程度の粗さの値を示している。

次に, 各試料の生体適合性について調べるため, 付着細胞数を計測した。その結果を図3に示す。ここで付着細胞数とは, 試料表面に接着している細胞の個数であり, その数が多いほど細胞との親和性が高い表面であるということがいえる。

この点を踏まえた上で各試料を比較すると, 4000 seriesにおいて, 他のseriesと比較して, 付着細胞数が最も高くなっていることがわかる。また, 同図を図2の表面粗さ測定の結果と合わせて考察すると, ELID研削を施した試料においては, 加工面の表面粗さの減少とともに, 付着細胞数が多くなっていることがわかる。これは, 細胞の生存が加工面の粗さに大きな影響を受けていることを示唆するものである。

さらに, 4000 seriesとPolished seriesで比較すると, 両者は同程度の表面粗さであるのにも関わらず, 付着細胞数には有意な差が認められる。以上の結果は, ELID研削を施すことにより, 通常の研磨処理を施したものと比較して, 細胞の生存に適した表面を創製することが可能であることを示している。

各試料の細胞に対する毒性について調べるため, 吸光度から算出したLDH活性値を測定した。その結果を図4に示す。ここでLDHとは, 細胞膜内に存在する乳酸脱水素酵素の略で, その活性値が大きいほど細胞に対する毒性が高いことを示すものである。同図より, Polished seriesはELID seriesのどの供試材よりも毒性が強いことが認められる。これは前述の付着細胞

胞数計測の結果と同様、ELID研削を施すことにより、細胞の毒性が抑制されていることを示すものである。とくに4000 seriesにおいては、その毒性が最も低いということがわかる。以上の結果は、付着細胞数の計測により得られた結果を裏づけるものであり、細胞毒性という観点からもELID研削を施すことは有効であるといえる。

ELID研削を施すことによる生体親和性の向上の原因について調べるため、浸漬試験後の各試料の表面についてSEMIによる観察を行った。その結果、全ての試料表面において腐食ピットの存在が確認された。このようなピットは試験前の表面には認められなかったことから、細胞の存在により表面の腐食反応が促進されたために形成されたものと考えられる。ただし、その個数を比較すると4000 seriesにおけるピットの個数は他の試料に比べて明らかに少なかった。この原因としては各試料の耐食性の違いが考えられる。過去の研究から、ELID研削を施すことにより研磨を施したものと比較してその表面に厚い酸化皮膜を形成させることが可能であり、この酸化皮膜の存在により耐食性が向上することが知られている⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾。また、ELID研削を施したものの中でも4000 seriesは表面粗さの値も低く、本研究で用いた試料の中で最も優れた耐食性を示したのと考えられる。

すなわち、ELID研削を施すことにより耐食性を向上させることで、表面のピットの個数の減少、およびそれに伴う金属イオンの溶出を抑制し、このような生体親和性の向上をもたらしたのと考えられる。

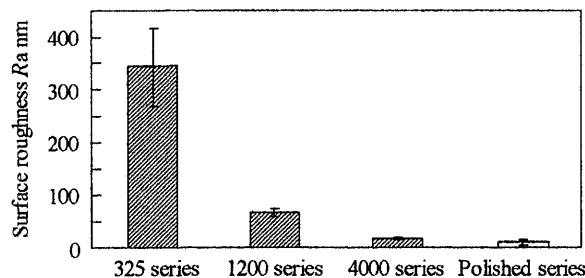


Fig. 2 Comparison of the surface roughness

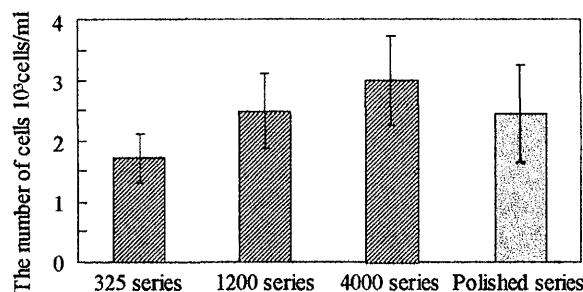


Fig. 3 The number of cells after soak test

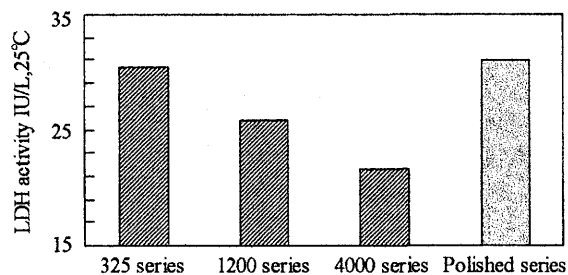


Fig. 4 The LDH activity

4 結 言

ステンレス鋼(SUS316L)に対して ELID 研削および研磨を施し、各試料表面の生体適合性について調べた。その結果、ELID 研削を施すことで、生体親和性の向上および細胞毒性の低下が認められた。これは、かかる研削を施すことにより形成される厚い酸化皮膜の存在により耐食性が高くなり、金属イオンの溶出が抑制されたためであると考えられる。すなわち、ELID 研削を施すことにより生体適合性に優れた表面を創製することが可能であり、生体材料に対する加工法として有効であるということがいえる。

参考文献

- (1) 山本礼子, ほか, 材料化学 (生体用金属材料の体内における損傷と生体反応), Vol.35 No.6, (1998), 264-270.
- (2) 塙隆夫, ほか, 工業材料 (金属系生体材料) Vol.50 No.2, (2002), 26-29.
- (3) 塙隆夫, ほか, 工業材料 (整形外科用チタン材料) Vol.50 No.2, (2002), 30-34.
- (4) 大森整, ほか, ELID 研削加工技術, 工業調査会, (2000), 9-351.
- (5) 大森整, ほか, 精密工学会誌, 9(1993), 59.
- (6) H. Ohmori and T. Nakagawa, Annals of CIRP, 39, (1990), 329.
- (7) H. Ohmori and T. Nakagawa, Annals of CIRP, 44/1, (1995), 287.
- (8) Mizutani M., Katahira K., Komotori J., Nagata J., and Ohmori H.: Surface finishing for biomaterials -Application of the ELID grinding method-, International Journal of Modern Physics B, 17, 1&2, 259-264, (2003).
- (9) H. Ohmori, K. Katahira, J. Nagata, M. Mizutani, and J. Komotori.: Improvement of Corrosion Resistance in Metallic Biomaterials by a New Electrical Grinding Technique, Annals of the CIRP, 51,1, (2002), 491-494.
- (10) 片平和俊, 永田仁, 大森整, 小茂鳥潤: 金属系生体材料 (SUS316) の ELID 研削特性と耐食性評価, 砥粒加工学会誌, 46, (2002), 245-249.