

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2017年度 博士論文

多軸鍛造法を用いた超微細粒純チタンの機械的特性と
生物学的応答
Mechanical properties and biological responses of
ultrafine-grained pure titanium fabricated
by multi-directional forging

2018年3月2日

伊東 佑輔
Yusuke Ito

神奈川歯科大学歯学研究科
咀嚼機能制御補綴学講座
木本克彦教授 指導

要 旨

現在、チタン材料は優れた材料特性から医療用材料として広く用いられている。しかし、チタン材料は物性や生体適合性での問題が報告されている。本研究では、MDF（多軸鍛造）法を用いた純チタンがインプラント材料として有効であるかを新たな表面酸処理法の開発と共に機械的特性及び生物学的な面より検討した。

材料は Grade 2 純チタンと、これに MDF 加工した 2 種類を用意し、機械的特性、表面性状、ならびに細胞親和性の検討を行った。

MDF 純チタンは、表面組織観察より超微細構造をとっており、ビッカース硬度、引張り強さが高かく、弾性率は低値を示した。MDF 純チタンは新たな酸処理法により、表面粗さが小さくなり、超親水性を示した。更に、SEM 像では MDF 純チタンは1つ1つの孔が円形で規則性を持つ微細構造が観察された。次に細胞増殖の結果、純チタンよりも MDF 純チタンは有意に増殖を示し、特にその傾向は酸処理で顕著であった。

以上の事から、MDF 純チタンは、高強度、低弾性率の機械的特性を持ち、新たな酸処理法により細胞増殖に有効であったことから、インプラント体として優れた機械的特性と生体適合性を併せ持つ新たなインプラント材料となりうる可能性が示唆された。

本審査委員会は申請者が博士(歯学)の学位に十分値するものと認めた。

2017 年 3 月 2 日

主 査:二瓶 智太郎

副 査:児玉 利朗

副 査:松尾 雅斗

緒 言

現在、チタン材料は、優れた機械的特性、生体適合性ならびに耐腐食性などの特性から、整形外科領域や歯科用インプラント材料として広く使用されている¹⁻³⁾。純チタンは、生体適合性に優れるが強度（引張強さ：約 340~510 MPa）が劣ることが知られており、そのため、チタン合金の開発が進められてきた。Ti-6Al-4V や Ti-6Al-7Nb は、純チタンに比べ機械的特性が優れているため（引張強さ：約 860~1000 MPa）、主に生体医科用チタン合金として使用されている¹⁻⁴⁾。しかしチタン合金は、有毒な合金元素を含んでいる⁵⁾。例えば、バナジウムは細胞傷害性物質であり、発癌性物質として知られており、アルミニウムは神経毒性およびアルツハイマー病などの神経変性疾患が報告されており、生体適合性で問題がある^{6,7)}。

更に、チタン合金は、弾性率にも問題がある。皮質骨の弾性率は約 10~30 GPa であるが、Ti-6Al-4V チタン合金の弾性率は約 110 GPa であると報告されている⁸⁾。これらの差異は、“応力遮蔽”と呼ばれるインプラント材料への不均一な応力伝達を引き起こし、この不均一な負荷がインプラントの弛緩や骨折等を引き起こすことが知られている^{9,10)}。Sumitomo らは¹¹⁾、3つの異なる骨プレート（SUS316L、Ti-6Al-4V および Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ)）をウサギの脛骨に固定し骨への影響を検討した。つまり、SUS316L（ステンレス鋼）の弾性率は3つの金属の中で最も高く（約 160 GPa）、TNTZ の弾性率（約 60 GPa）は Ti-6Al-4V の弾性率（約 110 GPa）の約半分と低い。この3つの金属の中で TNTZ では良好な骨応答が得られ、骨の弾性率が骨組織反応に影響を及ぼす事を報告している。

しかし、TNTZ は組成物中に毒性元素を有さないが、TNTZ の引張強さは Ti-6Al-4V より低く、物性に問題が考えられた。したがって、より高い強度、および骨と同等の低い弾性率を有する生体適合性に優れた新たな純チタンのインプラント材料の開発が望まれている。

近年、金属材料分野では Hall-Petch の関係から、金属材料の強度は粒径の減少と共に増加することが発見されてから¹²⁻¹⁴⁾、粒径が 100 nm 未満の超微細結晶粒金属の開発が注目されている。

結晶粒微細化は、合金化元素を添加することなく高強度化することができ、所望の強度を得られることが報告されており¹⁵⁾、超微細結晶粒金属材料は、粗粒な従来のものとは著しく異なる表面性状特性を示すことが知られている。超微細粒結晶構造を造り出すための方法として、巨大ひずみ加工(Severe Plastic Deformation/SPD)法が知られており、SPD および超微細粒結晶構造に関する多くの研究が行われている。その中でも、繰り返し重ね接合圧延 (Accumulative Roll-Bonding/ARB) 法¹⁶⁾、高圧ねじり加工 (High Pressure Torsion/HPT) 法¹⁷⁾、側方押し出し (Equal Channel Angular Pressing/ECAP) 法¹⁸⁾、多軸鍛造 (Multi-Directional-Forging/MDF) 法^{19, 20)} が一般的に用いられている。特に MDF 法は、大量の試料作製のために最も適した方法の一つとして知られている。Miura らは、六方最密結晶構造を有する塑性変形可能な純チタン及びマグネシウム合金を、MDF 法を用いることで、超微細粒結晶構造の獲得および高強度化を達成しており^{19, 20)} Grade 2 純チタンの場合では、1 GPa を超える引張強さが得られたと報告しており²⁰⁾、機械的特性をコントロール出来る可能性が示唆されている。

一方で、インプラント体への骨芽細胞の接着，増殖，分化を促す環境を作ること
は、オッセオインテグレーションを成功させる重要な因子の一つである。これに
は、表面形状や表面性状が影響することが知られており、ブラスト加工，酸また
はアルカリ処理，UV 照射およびハイドロキシアパタイトコーティングなどの
様々な表面改質技術が，現在でも検討されている²¹⁻²⁴。特に，大きな粗粒のブラ
ストと酸エッチングの組み合わせで知られている SLA 処理は，インプラントに
用いられる有効な表面改質技術として広く知られている²⁵。SLA 処理は，酸エ
ッチングによって粗造になった表面上に，ブラストを行うことでマイクロピッ
トを有するマクロ粗面を造り出す事が可能な処理である。同様に濃酸を用いた
チタンのエッチング法も，表面を粗面化するために有益な方法である²⁶。

近年では，硫酸エッチングと UV 照射との組み合わせの有効性が報告されて
いるが²⁷，どの先行研究でもチタンの表面性状，表面形態が骨芽細胞を主体と
した生体に影響すると報告されている²⁸。

そこで本研究では，機械的特性をコントロール出来る MDF 法を用いた超微細
結晶粒純チタンのインプラント体として適切な機械的特性と，その微細粒化に
よる表面特性から，優れた生体適合性を併せ持つ可能性について検討を行った。
また，チタン表面のさらなる表面改質としての新たな酸処理法の開発とその有
効性を，骨芽細胞様細胞を用いた細胞実験により検討し，歯科インプラント体材
料として超微細粒純チタンとそれに適した表面酸処理法が有効性についても検
討を行った。

材料および方法

試料作製と表面形態

本研究では、i) 粒径が約 20 μm の従来の純チタン（以下 CCG-Ti，東邦チタニウム，神奈川，日本）と ii) MDF 加工によって製造された超微細粒純チタン（以下 UFG-Ti，川本重工，兵庫，日本）の 2 種類（Grade 2）の試料を用意した。

初めに表面形態として，光学顕微鏡（PME3，オリンパス，東京，日本）を用いて，両試料の表面組織を観察した。また，電界放出型透過電子顕微鏡（TEM，JEM-2100F Jeol，加速電圧 200 kV，日本電子，東京，日本）を用いて，UFG-Ti の内部微細構造を観察した。

次に両試料による $33.0 \times 15.0 \times 0.4 \text{ mm}^3$ の試験片を，引張強さと弾性率測定のために作製した（図 1a）。また，表面性状と細胞実験のために，両試料とも直径 20.0 mm，厚さ 1.0 mm のディスクをラッピング装置と Al_2O_3 懸濁液を用いて鏡面研磨した（図 1b）。

1. 機械的特性

引張強さ及び弾性率は，精密万能試験機（AG-X plus，島津製作所，京都，日本）で，初期ひずみ速度 1 mm/s で行った。(n=10)

ビッカース硬度は，マイクロビッカース硬度計（HMV-G20，島津製作所，京都，日本）で，9.8 N の荷重および 10 秒の保持時間によって測定した。(n=10)

2. 硫酸処理後の表面形態と接触角

新たに確立した酸処理は，過去の研究報告の方法を改変し，以下の方法および条件の下で行った²⁷⁾。まず，テフロンビーカー内の 68 %硫酸（硫酸，和光純薬

工業, 大阪, 日本) を 120 °C に加熱し, チタンディスクを浸漬して 40 秒間および 75 秒間処理した. 酸処理後, 超純水で 30 秒間洗浄し 2 回洗い, その後メタノール (メタノール, 特級, 和光純薬工業, 大阪, 日本) で 30 秒間洗浄し 2 回洗い, 乾燥を行った. 表 1 に示すように, 40 秒間および 75 秒間に浸漬した試料を A-1 および A-2 とする. 比較対象として, メタノール洗浄を行わない従来の酸処理方法を, CCG-Ti および UFG-Ti 試料 (表 1 A-2B) に対して 75 秒間処理した.

酸処理したチタンディスクに金蒸着 (QUICK AUTO COATER / SC-701AT, サンヨー電子, 東京, 日本) を行った後, 走査型電子顕微鏡 (SEM, JEOL JSM-5600LV, 加圧電圧: 10, 15 kV, 日本電子, 東京, 日本) にて表面組織観察を行った. 試料表面の算術平均粗さ (Ra) は, 測定長さ 5 mm, カットオフ値 0.8 μm で, 表面粗さ試験機 (Handy Surf E-40A, 東京精密, 東京) を用いて測定した. (n=6)

酸処理直後に, 動的接触角計 (DCA-VZ, 協和界面科学, 東京, 日本) を用いて, 液滴 (1.5 μl) を用いて各処理表面の純水に対する濡れ性 (接触角) を測定した. (n=6)

3. 細胞培養

培養細胞として, 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を用いた. 培地は, MEM- α (with L-Glutamin, Sodium Pyruvate and Nucleosides) (和光純薬工業, 大阪, 日本) に牛胎児血清 (FBS, HyClone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) を 15 %, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid (Sigma Aldrich Corp., Saint Louis, MO), 10 mM Na- β -glycerophosphate (Sigma Aldrich Corp., Saint Louis, MO),

10⁻⁸ M dexamethasone (Sigma Aldrich Corp., Saint Louis, MO, 抗生物質 (antibiotic/antimycotic solution, gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) を添加して用いた。細胞を 37 °C, 5 %CO₂ の環境下にてインキュベーター内で培養した。細胞は 100 mm ディッシュ (Falcon, Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) で培養した。培地は 2~3 日ごとに交換した。80 %コンフルエント時に, 0.25 %トリプシン-1mM EDTA-4Na (和光純薬工業, 大阪, 日本) を用いて細胞を分離し, 1500 rpm で 5 分間遠心分離し, 継代を行った。次に各チタン試料に, 細胞を 1.6×10⁵ cells/cm² で播種し, 35 mm ディッシュ (Falcon, Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) 上で, 37 °C, 5 %CO₂ の環境下にてインキュベーター内で培養した。その後, 細胞を 3 時間での細胞接着および 3 日, 7 日での増殖を評価するために細胞数を測定した。非接着性細胞を除去するためにリン酸緩衝生理食塩水 (pH = 7.4) で洗浄した後, 100 μl の WST-1 (Roche, Basel, Switzerland) を加え, 細胞を 37 °C, 5 %CO₂ の環境下で 1 時間インキュベートし, 次いで, マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm で吸光度を測定した。(n=4)

4. 統計分析

統計的分析は SPSS (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を使用して行った。引張強さ, 弾性率およびビッカース硬さは Non-paired *t* 検定を用いた。表面粗さ, 接触角, 細胞接着および増殖は二元配置分散分析 (ANOVA) および多重比較のための Tukey-Kramer 法を用いて評価した。有意水準は 5 %とした。

結 果

CCG-Ti および UFG-Ti の表面形態

CCG-Ti および UFG-Ti の光学顕微鏡観察の結果を図 2 に示す。CFG-Ti 中の粗初期粒子は、MDF 加工中に機械的雙晶形成によって断片化され、UFG-Ti 中でより微細な粒状構造を有するように観察された。さらに UFG-Ti の内部構造を観察するために、TEM 観察を行った結果を制限視野電子回折とともに図 3 に示す。UFG-Ti では組織が均一な超微細粒結晶によって構成されていることが明らかとなった。平均粒径は 100 nm 以下であった。また、高強度化に寄与する転位密度も高いことが分かった。したがって、CCG-Ti と UFG-Ti の粒径の大きな差が確認された。

1. 機械的特性

CCG-Ti および UFG-Ti の引張試験による応力ひずみ曲線を図 4 に示す。UFG-Ti の引張り強さは CCG-Ti よりも有意に高く、延性は低下していた。また、UFG-Ti の弾性域の傾きが CCG-Ti よりも低く、UFG-Ti の弾性率の低下を示した。

引張り強さ、弾性率およびビッカース硬度の結果を表 2 に示す。UFG-Ti の引張り強さは CCG-Ti よりも有意に高く ($p < 0.01$)、約 2.1 倍に上昇した。UFG-Ti は、このような高い引張り強さにもかかわらず、平均約 6 % の中程度の延性を示した。UFG-Ti の弾性率は、CCG-Ti の弾性率よりも有意に低かった ($p < 0.01$)。また、UFG-Ti のビッカース硬度は、CCG-Ti のビッカース硬度よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。UFG-Ti のビッカース硬度は Ti-6Al-4V 合金と同等であることが分か

った。

2. 酸処理後の表面形態

酸処理後に得られた SEM 画像を図 5 に示す。SEM 観察の結果, CCG-Ti の表面に現れるディンプルは, 不規則な配向を示したのに対し (図 5 g~i), UFG-Ti の 1 つ 1 つのディンプルは, 規則性があり微細で均一な配向を示し, 表面にフラクタル構造が規則的かつ均一に存在していることが確認された (図 5 m~o)。より高倍率で観察してみると, UFG-Ti のマイクロスケールディンプルの中にさらに微細なナノスケールディンプルの存在を確認した (図 5 p~r)。CCG-Ti のディンプル (図 5a, d) は, UFG-Ti (図 5j, m) のディンプルよりも浅く, より平坦に見える。より複雑で規則的なディンプル構造が UFG-Ti の表面に均一に確認された。

酸処理時間による効果は, A-1 と A-2 を比較すると, 酸処理時間の増加に伴い, ディンプルと小孔がより鮮明に観察された (図 5 d, e, m, n)。また, A-2 と A-2B (図 5 e, f, n, o) から酸処理法の違いによる表面形態を比較すると, A-2 の処理法の方が表面内部にエッジ構造を有する明瞭な孔が認められた。

未処理, 酸処理後の表面粗さの結果を図 6 に示す。未処理では, CCG-Ti, UFG-Ti 共に極めて低い粗さを有する鏡面状の表面を示した。酸処理後では, A-2B 処理の UFG-Ti を除いて, 表面粗さを有意に増加させた ($p < 0.05$)。エッチング時間が 40 秒 (A-1) から 75 秒 (A-2) ($p < 0.05$) まで増加するに伴い, CCG-Ti の粗さは有意に増加したが, UFG-Ti では有意に減少した ($p < 0.05$)。酸処理後の UFG-

Ti の表面粗さは、CCG-Ti の表面粗さに比べて有意に小さくなった ($p < 0.05$)。

各酸処理面の純水に対する接触角測定結果を図 7 に示す。酸処理前の CCG-Ti および UFG-Ti の接触角は疎水性を示し、酸処理した全試料は超親水性を示した。酸処理後、酸処理条件やチタンの種類にかかわらず接触角が急激に低下した。A-1 の酸処理をした UFG-Ti の接触角は、同酸処理の CCG-Ti の接触角よりも有意に小さかった ($p < 0.05$)。酸エッチング時間に伴い、CCG-Ti の接触角は有意に低くなった ($p < 0.05$) が、酸エッチング時間の延長では UFG-Ti の接触角には有意差を生じなかった ($p > 0.05$)。CCG-Ti および UFG-Ti どちらも、メタノール洗浄の有無にかかわらず、(A-2 対 A-2B の間に) 有意差はなかった。 ($p > 0.05$)

3. 細胞接着および増殖

骨芽細胞様細胞の接着および増殖の結果を図 8 に示す。

3 時間後では、CCG-Ti は、未処理の場合を含めて、全ての酸処理条件で接着細胞の数が有意に高かった ($p < 0.05$)。一方、UFG-Ti 上は、未処理を含め、全ての酸処理条件において 3 日および 7 日で CCG-Ti 上の細胞数よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。また、A-2B は、A-2 よりも UFG-Ti ($p < 0.05$) において付着細胞数が有意に少なかったが、CCG-Ti では有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。CCG-Ti、UFG-Ti どちらも細胞増殖は、3 日間と比較して 7 日間で有意に増加していた ($p < 0.05$)。

考 察

MDF 法を用いて作製された、UFG-Ti の機械的特性および *in vitro* 生体適合性を、CCG-Ti と比較し検討した。その結果、UFG-Ti は、CCG-Ti と比較して、引張強さ、ビッカース硬度で高い強度を示し、さらに低弾性率を有することが明らかになった。また、純水およびメタノール洗浄による新たな硫酸処理は、骨芽細胞様細胞の増殖を促進させた。

今回我々は、鍛造パス歪みを制御することによって室温で巨大ひずみを生み出し、純金属中に超微細粒結晶構造を生成した。その結果、表 2 に示す様に CCG-Ti の引張強さは MDF 加工による均一な超微細粒化により (=UFG-Ti) 増加した¹²⁻¹⁴⁾。UFG-Ti の引張り強さおよびビッカース硬度は、Ti-6Al-4V と同等と高いものであった。一般に、高い強度を有する材料は、高い弾性率を示す。しかし、UFG-Ti の弾性率は低下し、CCG-Ti の弾性率のほぼ半分であった。これは、UFG-Ti の特徴的な特性で、(超微細粒結晶構造が低弾性率を示したにもかかわらず、高い引張り強さを示した) そのメカニズムは現在金属材料分野でも未だ明らかになっておらず今後の研究課題とされている。

次に UFG-Ti は酸処理後にフラクタル構造を示した。これは、UFG-Ti の超微細粒結晶構造によるものである。SEM 画像は、CCG-Ti が不規則な構造を有するのに対し、UFG-Ti は均一で規則的な小孔を有する微細構造を有することを示した (図 5 n)。さらに、UFG-Ti の各小孔の中に、より複雑な微細構造が観察された (図 5 q)。UFG-Ti の (フラクタル構造を有する) 酸処理表面は、CCG-Ti よりも低い表面粗さを示したが、UFG-Ti のディンプル構造が細かく均一になるため

に表面粗さが一見小さくなったと推測される (図 6)。

Miura ら²⁹⁾ は、低弾性率で強度の高い Ti-Nb-Sn 合金の生体適合性を報告している。これに対して、MDF 法は、あらゆる種類の元素を添加することなく、純チタンの弾性率を低下させ、機械的強度を向上させることができる。このため MDF 加工後の純チタンの化学組成に変化はない。したがって、チタンの生体適合性は維持され、元素を添加することによる生物学的なリスクはないと考えられる。

一方 Iwaya ら³⁰⁾ によると、硫酸を用いた酸処理は、骨芽細胞様細胞の増殖に悪影響を与えない事を報告している。この事から、我々は酸処理法によりチタンの生体適合性を損なう事なく更なる表面改質を可能に出来るのではないかと考えた。過去の報告によると、酸処理による骨芽細胞の増殖の増強は、主に表面粗さの増加によってもたらされると言われている³¹⁾。しかし、UFG-Ti は、CCG-Ti と比較して A-2 処理による表面粗さの減少にもかかわらず、細胞増殖は有意に増加した。さらに、ぬれ性は表面粗さ以外の生体材料の組織応答を制御する要因の 1 つであることはよく知られている³²⁾。しかし、CCG-Ti は、A-1 処理を除いて、UFG-Ti とほぼ同じ超親水性の接触角であるのに、細胞増殖に顕著な効果を示さなかった。これは、UFG-Ti の超微細構造によるフラクタル構造が影響していると考えられ、1 つ 1 つの孔の中にさらに複雑な微細構造を呈しており、CCG-Ti と異なる、UFG-Ti 表面の 3 次元的フラクタル構造が、親水性及び骨芽細胞様細胞の増殖に影響したと考えられる。

Park ら³³⁾ は ECAP (Equal Channel Angular Pressing) 法を用いた純チタン

を作製し、*in vitro* での生体適合性を報告している。ECAP 処理した純チタンは、何も行わない純チタンおよび Ti-6Al-4V と比較して、有意な細胞の広がり、接着性、生存率および ALP 活性を示したと報告している。彼らは、ECPA 処理による親水性の改善が、純チタンおよびチタン合金表面と比較して急速な骨芽細胞様細胞の広がりにも寄与し、ECPA 処理された純チタンの表面の結晶粒界の増加が、細胞表面への接着をより最適に出来る可能性があることを示唆した。今回我々が用いたメタノール洗浄は、金属産業において一般的な技術である。表面に水分が多すぎると、表面を乾燥させるのに時間がかかり、表面汚染の危険性がある。メタノール洗浄は、その揮発性のために水分をより除去し、より速く乾燥させることができ、表面を清浄化することが出来る。その結果、MDF 法による超微細化した表面構造にメタノール洗浄を行い表面を清浄化する事で、細胞増殖に有効に働いたと考えられるが、骨分化の影響に関しては今後の課題である。

今回用いた MDF 法の先行研究では、Suzuki ら³⁴⁾ は、ウサギの脛骨の骨欠損への移植実験による UFG-Ti の皮質骨応答を評価しており、UFG-Ti および CCG-Ti の表面を機械研磨し、サンドブラスト処理を行った結果、UFG-Ti は、CCG-Ti と同等の皮質骨応答を示したことが報告されている。

以上の事から、MDF 法を用いる事で UFG-Ti は CCG-Ti の生体適合性を損なわずに高強度、低弾性率という機械的特性が得られ、さらに特異的な超微細粒結晶構造に新たな酸処理を行うことで、細胞増殖に有効である可能性が示唆された。今後は、酸処理後の UFG-Ti の *in vitro* 下の分化と *in vivo* での骨応答の検討が望まれる。

結 論

超微細粒結晶 (UFGed) 構造を有する Grade 2 純チタンは、より高い引張強さおよび低弾性率などの優れた機械的特性を有することが明らかになった。さらに、新規に開発した酸処理により、フラクタル構造からなるディンプルに規則性があり、微細で複雑な表面形態が確認され、それは効果的に細胞増殖を促進させることが明らかになった。

以上の結果から、優れた生体適合性を持つインプラント体材料としての UFG-Ti の高い可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました咀嚼機能制御補綴学講座 木本克彦教授に深甚なる感謝の意を表します。

また本研究に対し多くの御教授頂いた、鶴見大学歯学部 歯科理工学講座 早川徹教授、鶴見大学歯学部 有床義歯補綴学講座 大久保力廣教授、豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 三浦博巳教授に深く感謝の意を示します。ならびに本研究の遂行に対し、御指導と御鞭撻を戴いた咀嚼機能制御補綴学講座 星憲幸准教授、咀嚼機能制御補綴学講座の皆様感謝いたします。

文 献

1. Elias CN, Lima JHC, Valiev R, Meyers MA. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM* 60:46–49, 2008.
2. Niinomi M. Metallic biomaterials. *J Artif Organs* 2008;11:105-110
3. Hanawa T. Research and development of metals for medical devices based on clinical needs. *Sci Technol Adv Mater* 13(6): 064102, 2012. doi:10.1088/1468-6996/13/6/064102
4. Kirmanidou Y, Sidira M, Drosou ME, Bennani V, Bakopoulou A, Tsouknidas A, Michailidis N, Michalakis K. New Ti-alloys and surface modifications to improve the mechanical properties and the biological response to orthopedic and dental implants: a review. *Biomed Res Int* 2908570, 2016.
5. Park YJ, Song YH, An JH, Song HJ, Anusavice KJ. Cytocompatibility of pure metals and experimental binary titanium alloys for implant materials. *J Dent* 41:1251-1258, 2013.
6. Domingo JL. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod Toxicol* 10:175-182, 1996.
7. Bondy SC, The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *Neuro Toxicology* 31:575-581, 2010.
8. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement-a materials science perspective. *Biomaterials* 19:1621-39, 1998.
9. Niinomi M, Hattori T, Morikawa K, Kasuga T, Suzuki T, Fukui H, Niwa S. Development of low rigidity β -type titanium alloy for biomedical applications. *Mater Trans* 43:2970-2977, 2002.
10. Glassman AH, Bobyn JD, Tanzer M. New femoral designs: do they influence stress shielding? *Clin Orthop Relat Res* 453:64-74, 2006.

11. Sumitomo N, Noritake K, Hattori T, Morikawa K, Niwa S, Sato K, Niinomi M. Experiment study on fracture fixation with low rigidity titanium alloy: plate fixation of tibia fracture model in rabbit. *J Mater Sci Mater Med* 19:1581-1586, 2008.
12. Hall EO. The deformation and ageing of mild steel: II characteristics of the Leuders deformation. *Proc Phys Soc* 64:742-747, 1951.
13. Petch NJ. The cleavage strength of polycrystals. *J Iron Steel Inst* 1953;174:25-28.
14. Pande CS, Cooper KP. Nanomechanics of hall–petch relationship in nanocrystalline materials. *Prog Mater Sci* 54:689-706, 2009.
15. Kamikawa N, Xiaoxu H, Tsuji N, Niels H. Strengthening mechanisms in nanostructured high-purity aluminium deformed to high strain and annealed. *Acta Mater* 57:4198-4208, 2009.
16. Tsuji N, Ito Y, Saito Y, Minamino Y. Strength and ductility of ultrafine grained aluminum and iron produced by ARB and annealing. *Scripta Mater* 47:893-899, 2002.
17. Valiev RZ, Maxim MY, Bobruk EV, Raab GI. Grain refinement and mechanical behavior of the Al alloy, subjected to the new SPD technique. *Mater Trans* 50:87-91, 2009.
18. Furukawa M, Horita Z, Nemoto M, Valiev RZ, Langdon TG. Microstructural characteristics of an ultrafine grain metal processed with equal-channel angular pressing. *Materials Characterization* 37:277-283, 1996.
19. Miura H, Yu G, Yang X. Multi-directional forging of AZ61Mg alloy under decreasing temperature conditions and improvement of its mechanical properties. *Mater Sci Eng A* 528:6981-6992, 2011.
20. Miura H, M. Kobayashi. Development of ultrafine grained and high strength MDF pure titanium, expected applications as biocompatible implants. *Titanium Japan* 62:31-33, 2014.

21. Nishio K, Neo M, Akiyama H, Nishiguchi S, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res* 52:652-661, 2000.
22. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83:529-533, 2004.
23. Bagnò A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 15:935-949, 2004.
24. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effect of implant surface coating and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res* 20:185-206, 2009.
25. Chambrone L, Shibli JA, Mercúrio CE, Cardoso B, Preshaw PM. Efficacy of standard (SLA) and modified sandblasted and acid-etched (SLActive) dental implants in promoting immediate and/or early occlusal loading protocols: a systematic review of prospective studies. *Clin Oral Implants Res* 26:359-370, 2015.
26. Ban S, Iwaya Y, Kono H, Sato H. Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid. *Dent Mater* 22:1115-1120, 2006.
27. Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials* 30:1015-1025, 2009.
28. Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res* 15:683-692, 2004.
29. Miura K, Yamada N, Hanada S, Jung TK, Itoi E. The bone tissue compatibility of a

- new Ti-Nb-Sn alloy with a low Young's modulus. *Acta Biomater* 7:2320-2326, 2011.
30. Iwaya Y, Machigashira M, Kanbara K, Miyamoto M, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium. *Dent Mater J* 27:415-421, 2008.
31. Kakehi S, Takeda S, Nakamura M. Effect of titanium surface roughness on the cytocompatibility of osteoblast-like cells. *J Oral Tissue Engin* 4(2);77-88, 2006.
32. Ponsoonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, Martelet C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mat Sci Eng C* 23:551-560, 2003.
33. Park JW, Kim YJ, Park CH, Lee DH, Ko YG, Jang JH, Lee CS. Enhanced osteoblast response to an equal channel angular pressing-processed pure titanium substrate with microrough surface topography. *Acta Biomater* 5:3272-3280, 2009.
34. Suzuki H, Hirota M, Amemiya T, Ohkubo C, Hoshi N, Kimoto K, Hayakawa T, Miura H. Cortical bone response of MDF titanium implant. *J Oral Tissue Engin* 13:117-124, 2016.

付図説明

図 1. 試験試料

- a) チタン試料片：厚さ 0.4mm, a-1:幅 15.0mm, a-2:長さ 33.0mm
- b) チタンディスク試料：厚さ 1.0mm, 直径 20.0mm

図 2. 光学顕微鏡観察

- a) CCG-Ti, b) UFG-Ti

UFG-Ti は, CCG-Ti を MDF 加工し作製した。

図 3. 電界放出型透過電子顕微鏡 (TEM) 観察

CCG-Ti を, MDF 加工し作製した UFG-Ti の TEM 観察と制限視野回析 (SAD) 像。

図 4. CCG-Ti および UFG-Ti の引張試験によって得られた応力-ひずみ曲線

図 5. 各倍率での酸処理後の電界放出形走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

CCG-Ti (a~i) と UFG-Ti (j~r) の表面形態の変化を示す。

倍率 a~c, j~l: $\times 5000$ d~f, m~o: $\times 10000$ g~i, p~r: $\times 20000$

図 6. CCG-Ti および UFG-Ti の表面粗さ

異なる文字は有意差を認める (Tukey-Kramer 法: $p < 0.05$)。

図 7. CCG-Ti および UFG-Ti の接触角

異なる文字は有意差を認める (Tukey-Kramer 法 : $p < 0.05$)。

図. 8 CCG-Ti および UFG-Ti の細胞接着および増殖

a) 3 時間, b) 3 日および c) 7 日後の細胞接着, 増殖の吸光度。異なる文字は有意差を認める (Tukey-Kramer 法 : $p < 0.05$)。

表 1. 酸処理条件

表 2. CCG-Ti および UFG-Ti の引張り強さ，弾性率およびビッカース硬度

異なる文字は有意差を認める (t 検定: $p < 0.05$)。データは平均値を示す。() 内の値は標準偏差である。

図 1

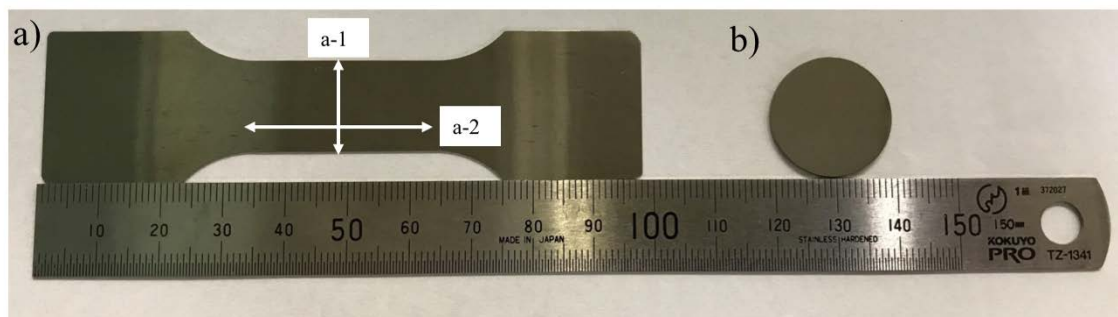


图 2

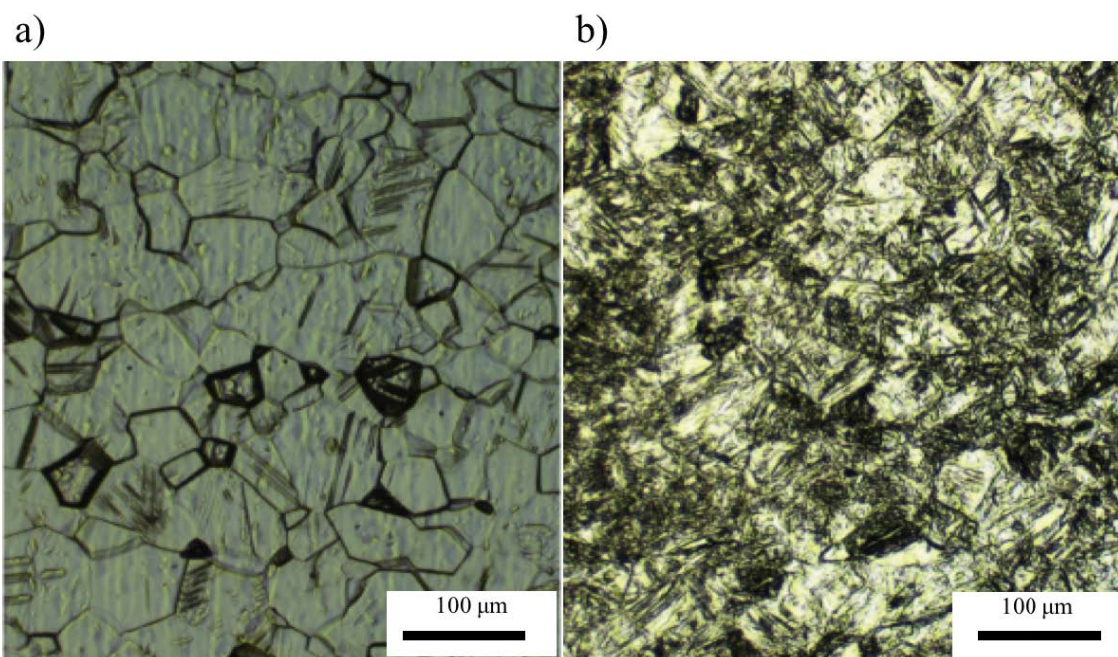


图 3

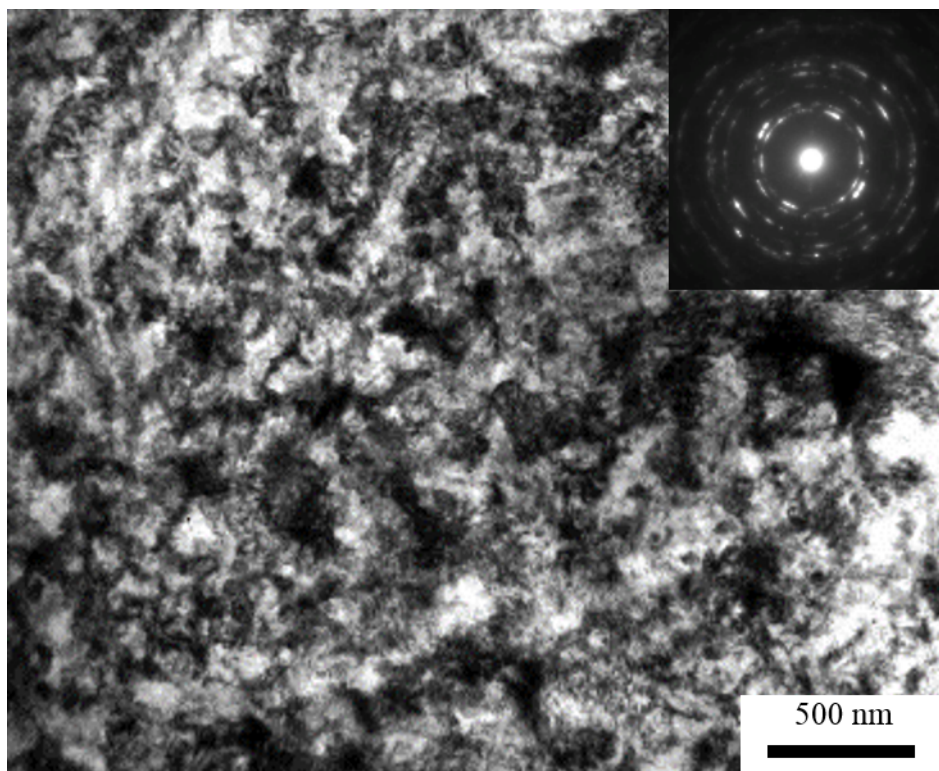
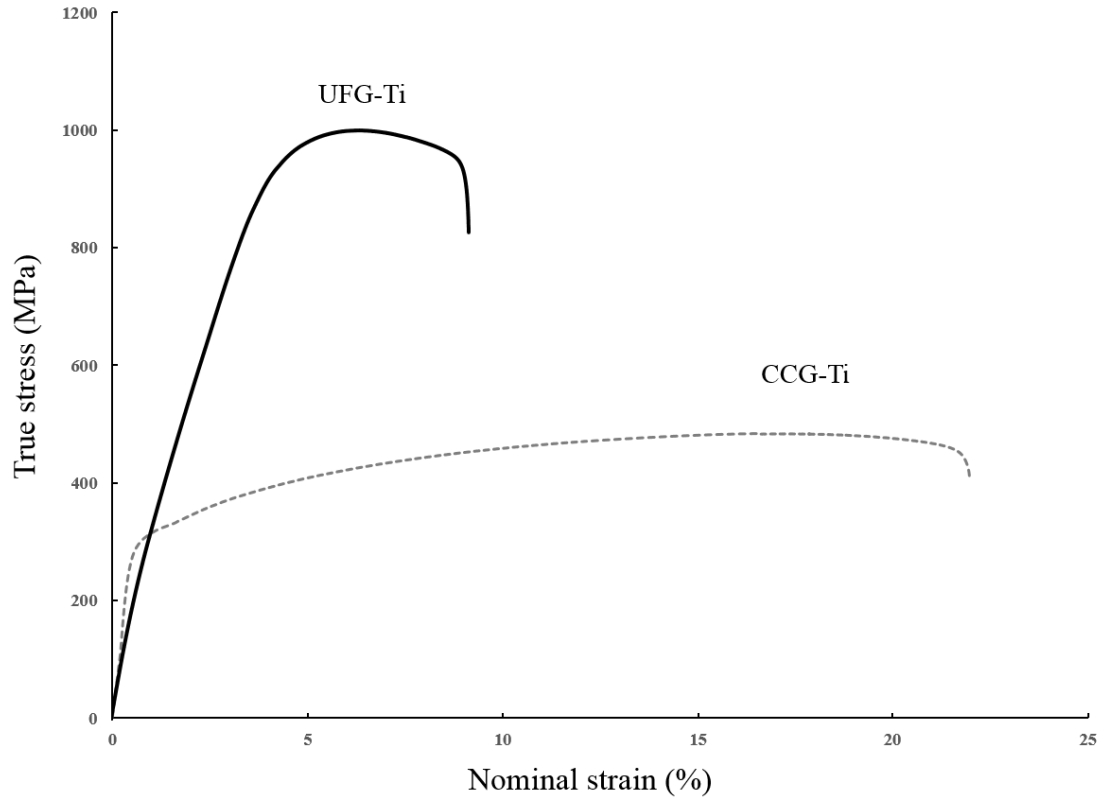
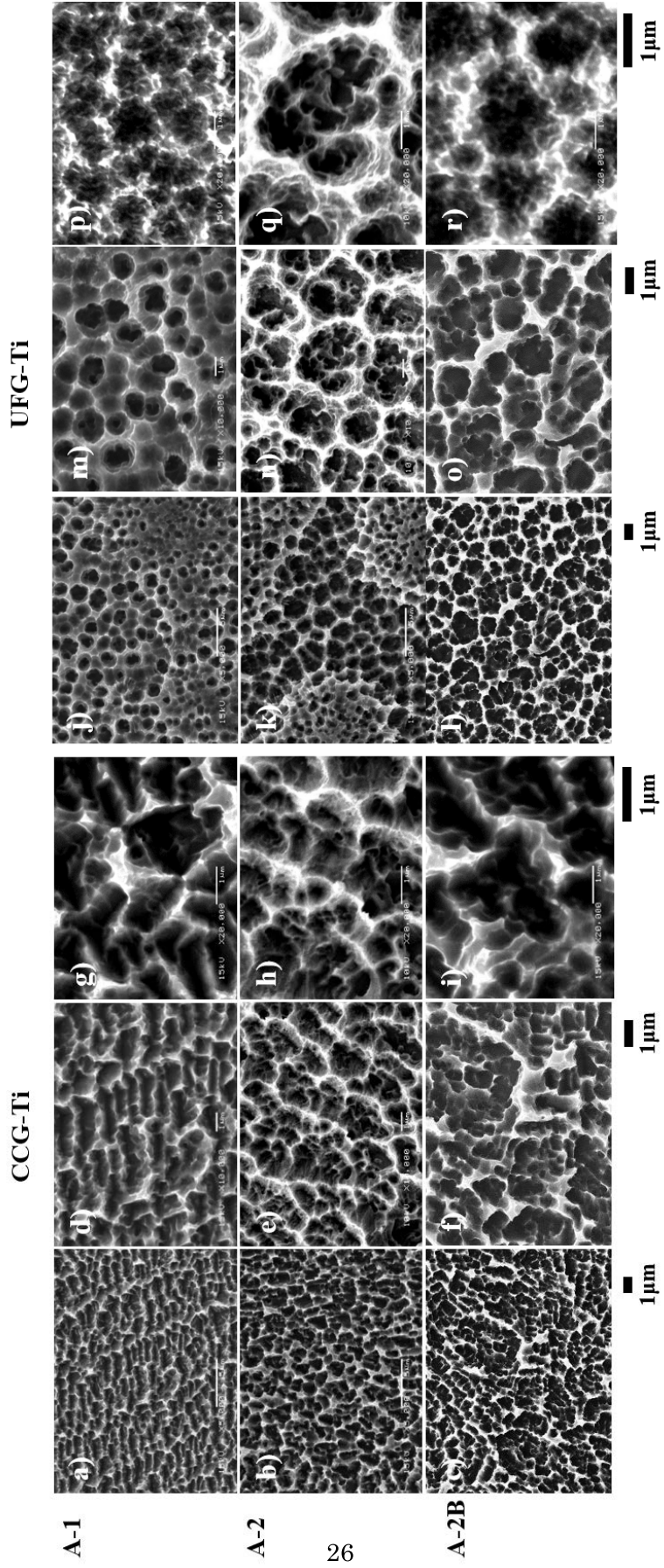
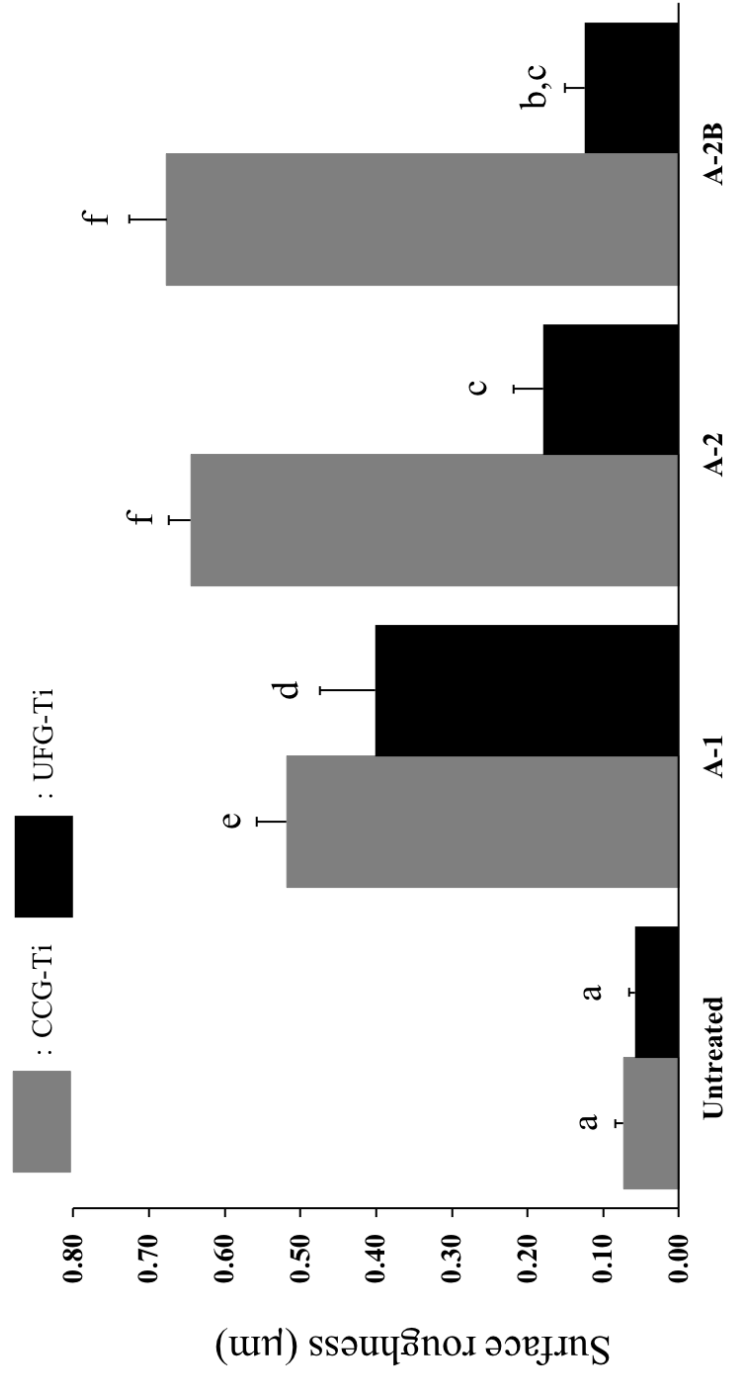
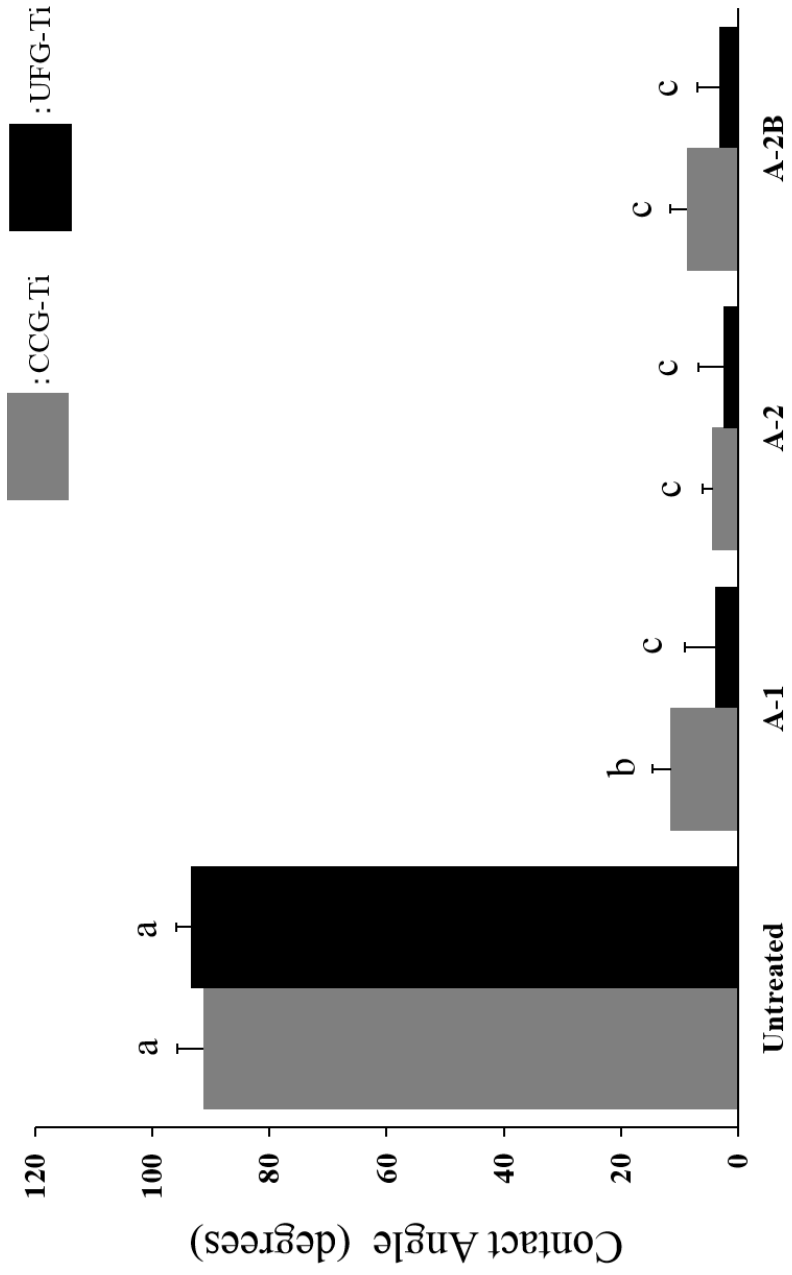


图 4









☒ 8

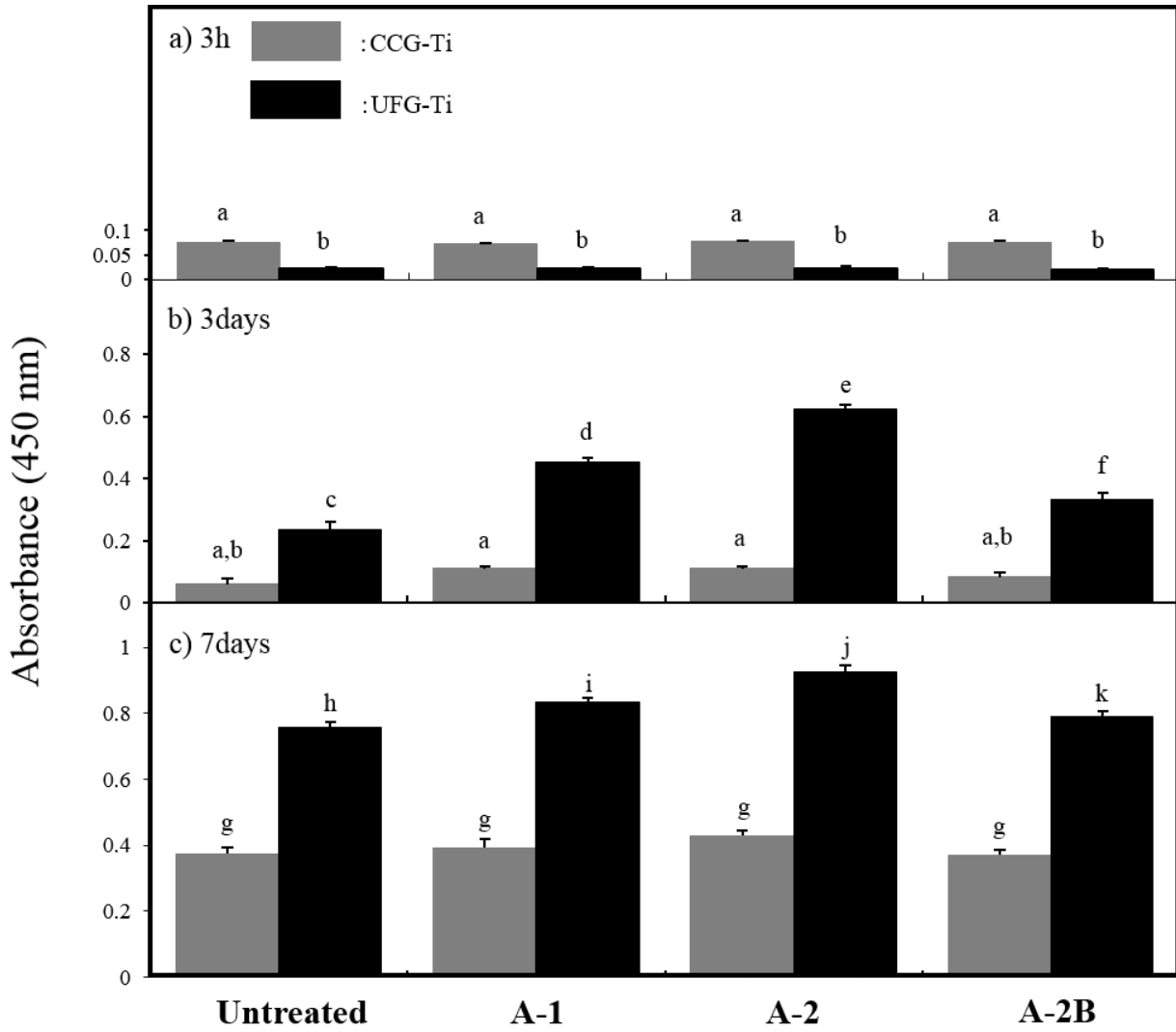


表 1

Code	Acid treatment time (s)	Washing method
A-1	40	pure water and methanol
A-2	75	pure water and methanol
A-2B	75	pure water

表 2

	Ultimate tensile strength (MPa)	Elastic modulus (GPa)	Vickers hardness (Hv)
CCG-Ti	468.4 (17.8) ^a	100.3 (20.4) ^a	176.8 (2.8) ^a
UFG-Ti	995.3 (11.8) ^b	51 (0.29) ^b	293.5 (2.9) ^b