

図 16 T4(160k 塩基対)と λ (64k 塩基対)ピラー中の分離結果

できないが、図 15 に示すように、ピラーがあると、ピラーに引っかかりながら伸縮を繰り返す、大小の DNA の電気泳動速度に差が生じて分離される。図 16 は、T4(160k 塩基対)と λ (64k 塩基対)ピラー中の分離結果を示し、20%の速度分離が 20 秒で行われた。ちなみに通常のゲル中では半日ほど掛かり、ナノテクの威力が発揮された。

6. 将来展望

我々の研究への取り組みは、無痛針より微量血液を採取して、健康・疾病に関する生体物質を可能な限り分離・分析し、計測する安価・使い捨て型バイオチップを創製し、医療の高度化に貢献することにある。この開発には半導体微細加工・量産技術が不可欠であり、さらに異分野との密接な連携により、近い将来、病院の検査機能をワンチップで実現できることも夢ではない。多項目同時計測がワンチップで可能になると、モバイル端末と IT ネットワークを通じて診療機関に蓄えられた多くの人のデータとの参照により、在宅で日々の健康・病状を診断できる時代が到来すると期待される。これは正に、今まで独立して発展してきたエレクトロニクスとバイオテクノロジーの融合を意味し、「Healthtronics」と名づけた。新学術・産業分野の早急な立ち上げに努力したい。

文 献

- 1) A. Oki, et al.; 2001 Intern. Conf on Solid State Devices and Materials, Tokyo, p. 460 (2001)
- 2) K. Ishihara, et al.; *J. Biomat. Mat. Res.*, 26, 1543 (1992)
- 3) A. Oki, et al.; *Jpn. J. Appl. Phys.*, 42 (3B), L 342 (2002)
- 4) Y. Takamura, et al.; *Electrophoresis*, 24, 185 (2003)

*Plant
and
Process*

化学装置

9

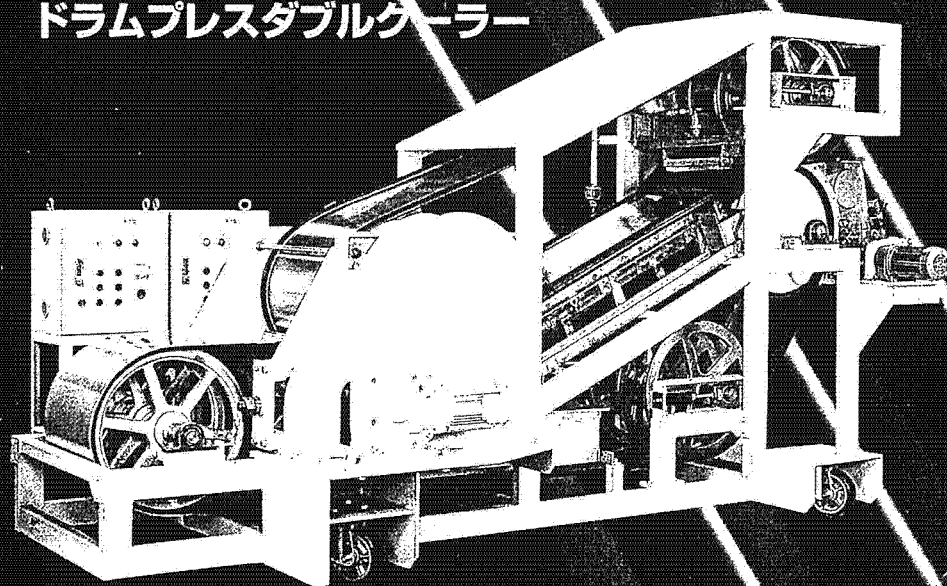
2004

特集1 バッチプロセスの新展開

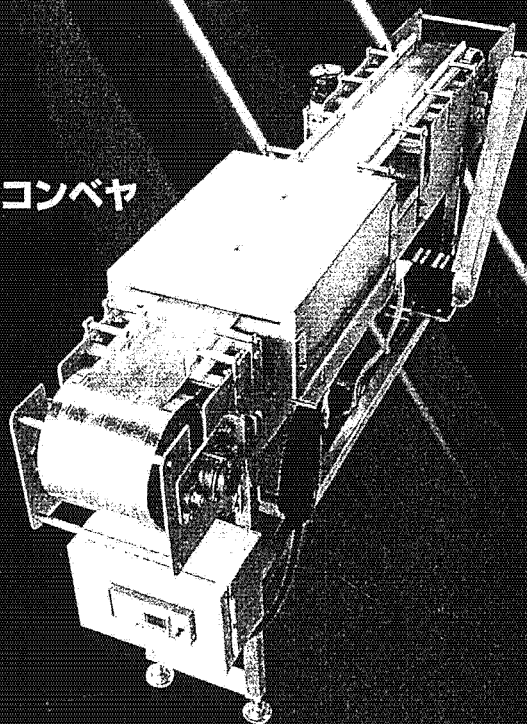
特集2 実用化迫るマイクロ化学システム

—— スチールベルトマシン ——

ドラムプレスダブルクーラー



スチールベルトハンディコンベヤ
ニスコン



NISCO 日本スチールコンベヤ株式会社

ヘルスケアチップの開発

小川 洋輝*, 新橋 里美**
 沖 明男***, 高井 まどか†
 長井 政雄††, 堀池 靖浩†††

21世紀は「生命」の時代と言われている。ヒトゲノムの解読以来、昨今のバイオテクノロジーはナノテクノロジーと融合し始め、研究・開発は堰を切ったように猛烈な速度で進み始めている。その目指すところは、「最大公約数的な医療」を脱して、個々の症状にあった適切な治療を施す「高度医療化社会」の実現である。とくにわが国においては近年の少子化に伴い総人口が早晩減少することによる近未来での労働力の不足と、高齢化の進行とそれにリンクした医療費の増大による国家予算への圧迫とともに、われわれへの負担増が強いられるといった事情がある。

この包括的解決の一策は、高齢者が働く意欲のある限り働き、培った知恵と経験を社会に還元できるよう元気で毎日を送れる「健康立国」を世界に先駆けわが国に創り出すことである。このためには予防が大切であり、在宅で簡便・確実な大量・同時多項目を診断できるバイオセンシング技術を早急に確立しなければならない。現在、このための有力な手段として各種バイオチップ化の取り組みが本格化している。バイオチップ創製には、工学、医学、薬学の融合によって初めて実現し、その結果派生する新科学・

技術・産業が大いに期待される。

本稿では、各人が家庭で手軽に健康診断を行うことを目指し、現在開発途上にあるヘルスケアチップについて述べる。

1. ヘルスケアチップの開発の歴史

ヘルスケアチップは、ヒトから極微量血液を採取する無痛針、全血分離のためのU字型流路を含む液体の微細流路、電気化学バイオセンサなどの要素から構成されるチップ状血液分析装置であり、とくに開発初期には血液引き込み用の電気浸透流(EOF)ポンプも含まれていた。現在のところNa⁺やK⁺などの電解質イオン、糖尿病の管理指標であるグルコース、腎機能の指標である尿素窒素(BUN)、クレアチニンなどの検出を目標としている。

図1に2001年9月に試作したEOFポンプ内蔵型のヘルスケアチップの概観写真と構造模式図を示す。チップ基板は安価、使い捨てを考慮して大部分はPET(ポリエチレンテレフタレート)などの樹脂を用いている。一方の基板をドライエッチングにより作製した石英の反転流路パターンに押し当てるモールディングによって、深さ100μmの流路パターンを転写している。もう一方の基板にはイオン感応型電界効果トランジスタ(Ion Sensitive Field Effect Transistor: ISFET)を埋め込んである。この両基板を貼り合わせ、EOFポンプとなる微細流路を形成した石英基板をはめ込んだ後、最後に外径100μm、内径50μmのステンレス(SUS)製の無痛針を取り付け完成となる。なお、チップ内

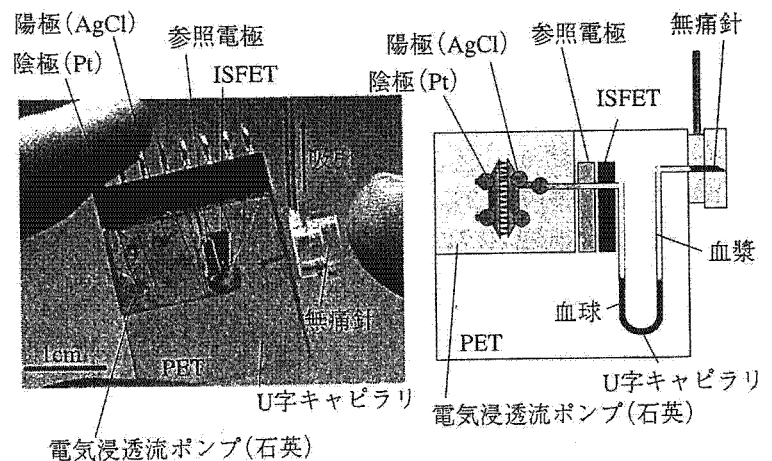


図1 ヘルスケアチップ(EOFポンプ内蔵型)

* Hiroki OGAWA; 科学技術振興機構 (Tel. 029-851-3354)

** Satomi SHIMBASHI; 同上

*** Akio OKI; 物質・材料研究機構

† Madoka TAKAI; 東京大学大学院工学研究科

†† Masao NAGAI; 科学技術振興機構

††† Yasuhiro HORIIKE; 物質・材料研究機構

流路表面は血球などの付着を抑制し、生態適合化を図るために MPC ポリマー²⁾ を塗布してある。

ISFET のゲート絶縁膜上には Bis (12-crown-4) と Bis (benzo-15-crown-5) などのイオン感応性化合物を PVC で固定化しており、それぞれ Na^+ 、 K^+ イオンセンサとして動作する。また参照電極は銀薄膜上に塩化銀を塩化処理により形成したもので、上記イオンセンサの出力電位の基準電位を出力する。まず無痛針を介しヒトから採取された全血は U 字キャピラリーに EOF ポンプにより引き込まれる。その後チップを回転させて遠心力を印加することにより、全血中の血球成分を U 字キャピラリー下部へ、また血漿成分を血球成分の上へと分離し、この血漿成分を再度 EOF ポンプにより ISFET 上へと導き血漿中の Na^+ と K^+ イオン濃度を測定する。

しかしながら、① 能力は十分ではあるが使い捨てのヘルスケアチップに高価な石英基板を用いた EOF ポンプを採用している、② 同様に高価な ISFET をセンサとして採用している、③ U 字流路の片側分の血漿しか利用していない、などの問題が明らかになった。

これらを解決するために U 字流路の途中で血球溜めを配置し、そこに遠心分離の際に血球成分をすべて蓄積し、また得られたすべての血漿成分を外部ポンプでバイオセンサへと導く血漿移送型ヘルスケアチップを 2002 年 9 月に開発した (図 2)。本チップはオールポリマー製であり、バイオセンサはスクリーン印刷法で形成したカーボンや Ag/AgCl 電極上に作製した。またバイオセンサには Na^+ 、 K^+ のほかに、pH、グルコース、BUN も加わった。これに伴いセンサ間の相互作用を抑制するために分岐流路途中でセンサを配置した。たとえば図 3 に示すように、BUN センサは被検査溶液中の尿素 (NH_2CONH_2) がセンサ上のウレアーゼの酵素反応で水素イオンを消費するためにセンサ近傍での pH が上昇することでこれを検出して BUN 濃度を求めているが、図 3(a) に示すように pH と BUN センサを同一流路内に形成して種々の尿素濃度のリン酸緩衝液 (PBS) に浸すと BUN センサは当然尿素濃度に依存してセンサ出力の pH は上昇していく。しかしながら被検査溶液の pH は尿素濃度に依存せず一定の値であるが、尿素濃度の上昇に伴い pH センサの出力 pH 値が上昇していつている。

これは流路内のセンサ同士が近接していることと

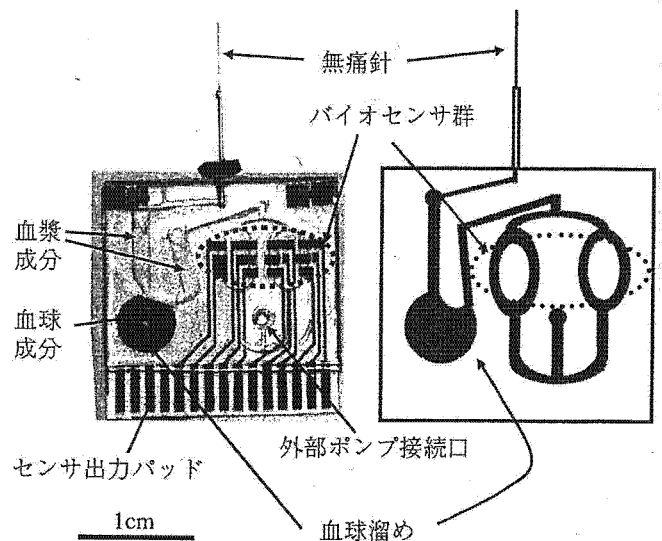


図 2 ヘルスケアチップ (血漿移送型)

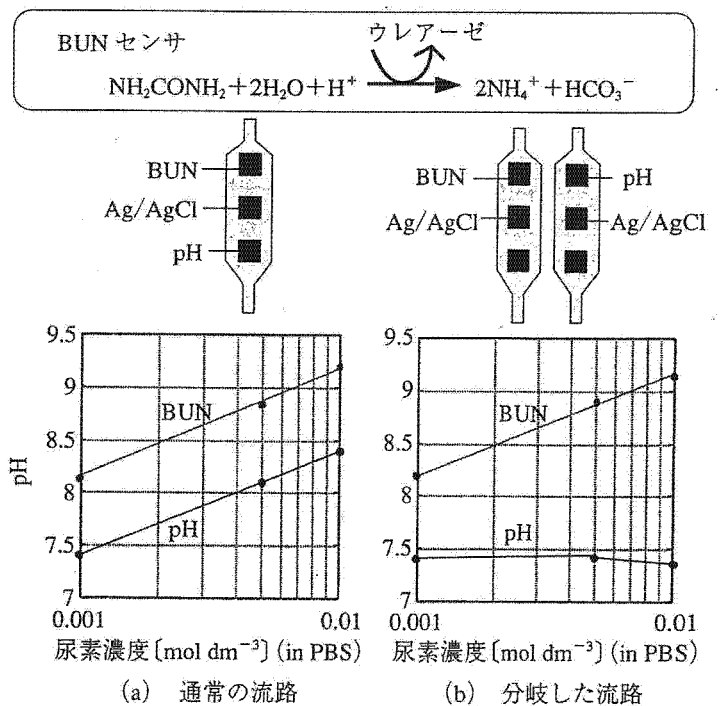


図 3 分岐流路の効果

流路内の被検査溶液体積が $1 \mu\text{l}$ 前後と少ないために、BUN センサで水素イオンが消費された影響が近接する pH センサに及んでいることを示している。そこで図 3(b) に示すように、流路を分岐してそれぞれの流路に BUN と pH を配置した場合のそれぞれのセンサの指示 pH の尿素濃度依存は、BUN センサの場合、尿素濃度に依存して上昇しているが、pH は尿素濃度に依存せずほぼ一定の値を示すことが分かる。

このように分岐流路にすることでセンサ間の相互作用を緩和できるという効果が確認できたが、これ

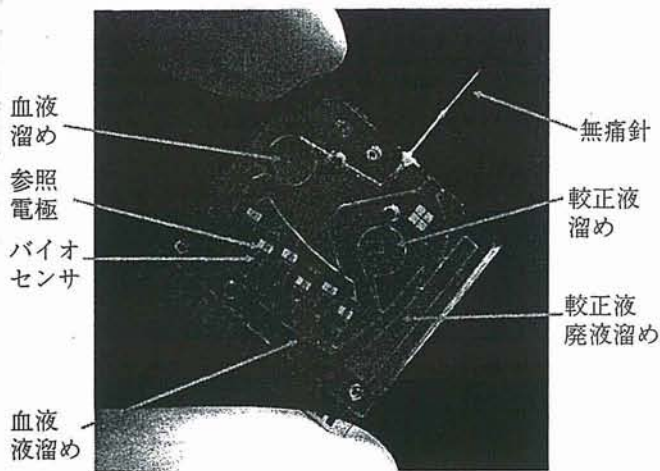


図4 ヘルスケアチップ (遠心移送型)

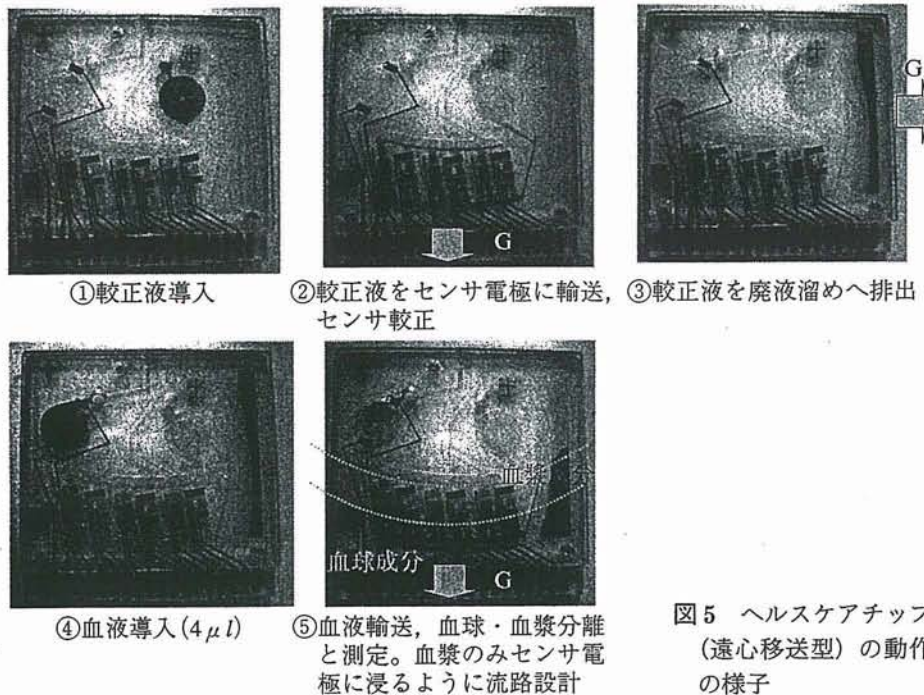
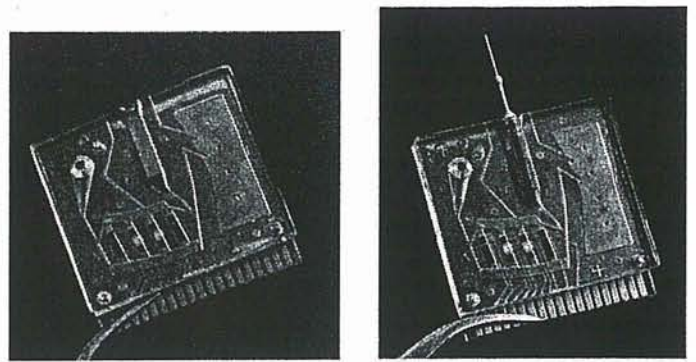


図5 ヘルスケアチップ (遠心移送型) の動作の様子

が原因で新たな問題が発生した。それは分岐流路に均等に溶液を導くことが難しいということである。図2で示したチップの場合4流路へと分岐されているが、たとえばそのうちの1本に溶液が優先的に導かれてしまうと、そのほかの流路にはもはや溶液が導かれることはない。本チップ構造では微量の液体を微細流路内で制御することの難しさを痛感した。このような問題を克服すべく2003年6月に図4に示すような遠心移送型のヘルスケアチップを試作した。本チップの特徴はポンプなどを用いず、チップを回転させたときに生ずる遠心力のみで溶液の移送を行うことである。このチップの動作の様子を図5に示す。まず①では較正液溜めに較正液を満たし



(a) 採血筒未装着のチップ (b) 血液を蓄積した採血筒を装着したチップ
図6 最新のヘルスケアチップ (遠心輸送・針分離型)

(4 μ l), 次に②で矢印の方向に遠心力が印加されるようにチップを回転させる。すると写真のように較正液は移動し、バイオセンサは較正液で満たされる。この状態でバイオセンサの較正を行う。較正完了後、③の矢印方向に遠心力が印加されるようにチップを回転させると較正液はバイオセンサ部から移動し、廃液溜めへと導かれる。次に④のように血液溜めに被検査血液を導入し、⑤矢印の方向に遠心力が印加されるようにチップを回転させると血液はバイオセンサの方へと移動するとともに血球と血漿成分に分離され、血漿成分のみがバイオセンサを覆うようになる。そしてこの血漿中の被検査物質濃度をバイオセンサで測定し、一連の動作が完了

する。

最新チップのデザインは図6に示すようにほとんど図5に示したものと同一である。異なる点は滅菌のために採血用針をチップと分離し、採血して血液を蓄積した採血筒をそのままチップに装着できるように改良した点である。

2. 微量血液採取方法

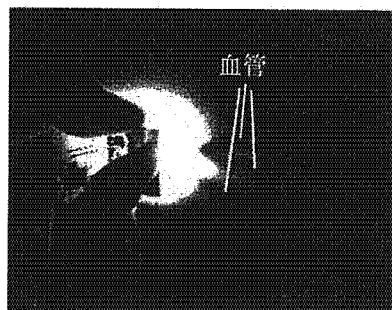
ヘルスケアチップの大きな特徴の1つに採血用の無痛針を装備していることが挙げられる。われわれは、蚊の針やその吸血機構を参考に無痛針の作製や採血機構を検討した。初期のヘルスケアチップでは、チップを採血ホルダにマウントして無痛針をヒトの

静脈上に設置し、針の周囲を覆うシリンダ内を減圧として皮膚を隆起させて、このとき針を自動的に皮膚に穿刺して血管へと導き、外部ポンプによりチップ流路内を陰圧としてチップ上に血液を導入していた(図1参照)。このようにシリンダを皮膚に押し当てて圧迫することやシリンダ内を陰圧として均等に皮膚を盛り上げることにより、穿刺時の疼痛をより緩和することができる。しかし、このようにして採血を行った場合、採血

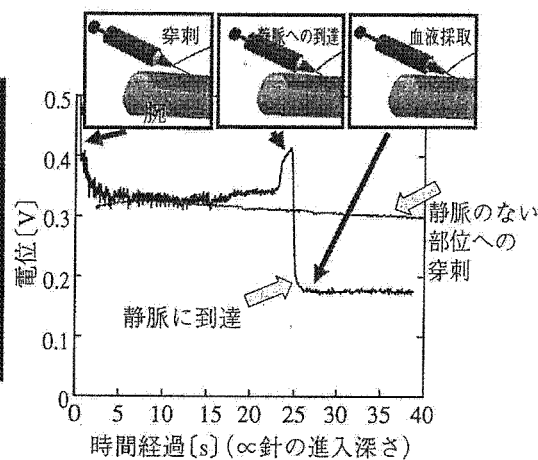
成功率はそれほど高いものではなかった。その原因はチップをセットしたホルダを適切に血管上に導くことが難しいためであった。

そこで血管位置を確実に確認しながら針の位置を決定するために、血管の可視化機構の検討を新たに行った。一般的に700~1,000 nm程度の波長域の近赤外光(Near Infrared: NIR)は、そのほかの波長域の光と比較して、体を構成する水やヘモグロビン、また皮膚のメラニンなどによって吸収されにくく、体内を透過しやすい³⁾。このような光を体内へと導き、体内で拡散、反射を繰り返しながら伝播して再度体外へと放射される時、その放射される部位表面直下の血管中の水やヘモグロビンにより光は吸収されて、それ以外の部分では比較的吸収されることなく体外へと放射される。このため、この部分をCCDなどの撮像素子で観察すると血管部分からの光強度は弱いため血管は暗く浮かび上がる。図7(a)は中心発光波長850 nmのLEDから光を皮膚表面に対し斜めに入射したときに反射してくる光の像をCCDカメラで捉えたものである。光源の近傍に血管が暗く浮かび上がっていることが分かる。

このような方法で血管の2次元的位置を確認できるが、採血針をどの程度の深さまで導くかということは明瞭ではない。そこで血液を採取する際には必ず採血針を皮膚に穿刺し、これを血管まで導いていくことになるのでこの採血針を積極的にプローブに用いるということを考えた。すなわち針はステンレスのような金属で構成されているので、これを体内へと侵入させていったときの電位は血管の内外的電解質イオン濃度や水分濃度に依存して変化し、これにより針先端が血管内に到達したかどうかを判断できると推察した。



(a) 近赤外像



(b) 血管到達検知機構

図7 血管可視化と検知機構

図7(b)には針を静脈へと導いていったとき、血管のないところに導いていったときの針の電位の変化を示している。血管のないところに針を導いていっても針の電位はほとんど変化しないが、静脈へと導いていったときにはその電位があるところで大きく変化することが分かる。そしてこの変化が現れた直後に注射筒内を陰圧としてみたところ、血液が容易に採取できることが分かった。このことからこのような電位の変化は針の先端が血管に到達したか否かを反映したものであり、これにより針をどの程度侵入すればよいのかが明らかとなった。なお、このような針の侵入深さの判定は、針に微弱な交流電流を流したときの応答から得られるインピーダンスと位相の変化からもできることを確認している。

最新の無痛針は採血時の剛性を確保し得る最小限の径に近い外径150 μm 、内径100 μm のステンレスパイプの端面を3面カット、電解研磨などの方法で先鋭化し作製している(図8(a))。また針を作製する前のステンレスパイプの内壁は同図(b)に示すように冷管延伸加工を施しているために凹凸が激しい。パイプ内壁が細いため、これでは採血時に血球を破壊する恐れがあるため新たな内壁研磨法を開発した。写真で示すように研磨後は内壁が非常に平滑化されていることが分かる。

また、このような平滑化はそのほかの利点があることが分かった。図8(c)には採血の様子を示しているが、実際に採血を行っている間はコンピュータ画面上に示される近赤外血管像と針の電位変化を観察しながら行っており、穿刺部を直接見ることはほとんどない。そして内壁研磨の効果は針を血管に導いたときに血圧のみで血液を針に接続されている採血筒へと導けるということであり、これにより何ら

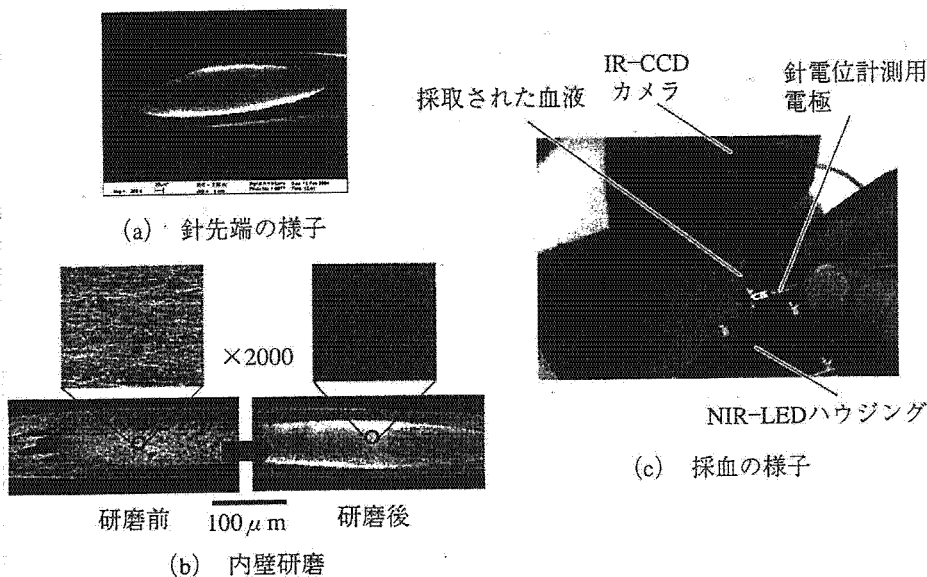


図8 無痛針による採血

ポンプを用いる必要はなくなった。このように採血した採血筒はそのままチップにはめ込み遠心輸送でチップ内部へと導くことができる。現状では以上のような方法により採血成功率はほとんど100%近くを達成している。

3. バイオセンサ

バイオセンサはヘルスケアチップの正に心臓部であり、開発当初から精力的に開発を行ってきた。電気化学センサは大別してpH, Na⁺, K⁺などのイオンセンサのように電位計測を行うポテンシオメトリと電圧を印加したときの電流計測を行うアンペロメトリとに分けられる。具体的にはpHセンサとして電解重合によりカーボン電極上に絶縁性ポリピロールを形成したものを、Na⁺, K⁺イオンセンサとしてBis(12-crown-4), Bis(benzo-15-crown-5)などのイオン感応膜をPVCで固定化している。

またBUNセンサは図3で述べたようにpHセンサとウレアーゼを組み合わせて構成している。すなわちカーボン電極上に絶縁性ポリピロールを形成した後にポリイオンコンプレックス法によりウレアーゼを塗布しその上からポリ-L-リシン膜で覆い固定して形成している。しかしながら血液や校正液は緩衝液であることから、酵素反応で水素イオンが消費されてpHが増加したとしても、すぐさま元の中性へと戻ろうとする性質がある。このために、現在は酵素反応で生成されたアンモニアを検知する型に変更しつつある。グルコースセンサはアンペロメトリ型であり、グルコースオキシダーゼをポリイオンコンプレックス法でカーボン電極上に固定化し、同

時にメディエータとしてフェロセンを含ませ構成している。またポテンシオメトリ型の場合には、とくに電位計測時の基準電位となる参照電極は重要である。通例に従ってわれわれもAg/AgCl電極を用い、その電極直上の塩素イオン濃度が溶液に依存せず一定になるように(Ag/AgCl電極の電位は塩素イオン濃度に依存する)疎水性の膜で覆っている。

現状の電極面積はポテンシオメトリ型で約0.5 mmφ、アンペロメトリ型でその3倍程度となっている。今後チップのさら

なる縮小を考えたときに、どの程度まで電極を小さくできるかを見きわめる必要がある。センサ構造、組成を含むこのような評価は、単にセンサを作製して計測するのみではなく、長時間の保管後、あるいは保管条件などを含めて評価しなくてはならない。このため非常に地道な努力が必要とされるが実用化のためには避けて通ることができない。

現在実用化を目指しているヘルスケアチップ開発の歴史を簡単に紹介させていただいた。どのような思想で現在のようなデザインとなっていくのかがお分かりいただけたと思う。さらに採血機構については微細ステンレスパイプの加工から始まり、血管可視化、検知手法の開発など、素人ならではの発想で試行錯誤を繰り返しながら改良を繰り返す、現在では100%近くの採血成功率を達成することができた。将来的にはこれらの機構により自動採血装置ができると確信している。

バイオセンサはヘルスケアチップの心臓部であり、長期信頼性を含めて地道な努力が求められる。直近の目標は、電解質イオン、血糖、腎機能の評価を可能とすることであるが、将来的には肝機能、脂質検査のためのバイオセンサにも着手したいと考えている。

参考文献

- 1) A. Oki, et al., Jpn J Appl. Phys. 42 (2003) 3722
- 2) K. Ishihara, et al., J. Biomat. Mat. Res, 26 (1992) 1543
- 3) Handbook of Optical Biomedical Diagnostics V.V. Tuchin ed. SPIE press p. 425

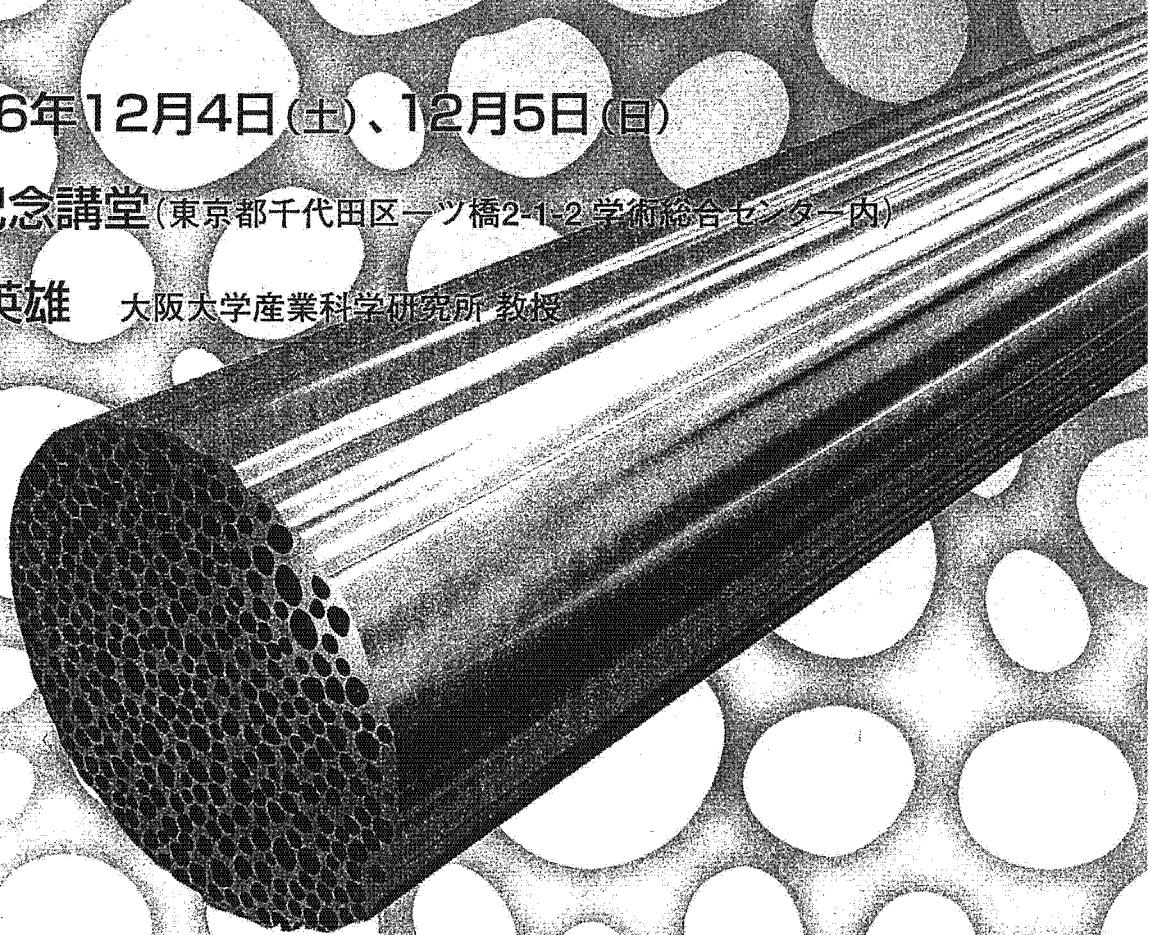
予稿集

人体にやさしい 医療材料

開催日 平成16年12月4日(土)、12月5日(日)

会場 一橋記念講堂(東京都千代田区一ツ橋2-1-2 学術総合センター内)

代表 中嶋 英雄 大阪大学産業科学研究所 教授



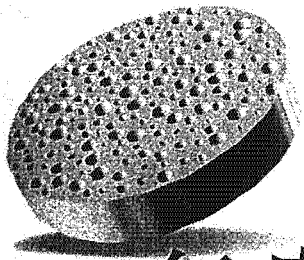
後援

(社)軽金属学会/(社)資源・素材学会/(社)日本アルミニウム協会/(社)日本化学会/(社)日本鋼構造協会/(社)日本機械学会/(社)日本金属学会/(社)日本材料学会/(社)日本セラミックス協会/(社)日本塑性加工学会/(社)日本タン協会/(社)日本鋳造工学会/(社)日本鉄鋼協会/(社)日本表面科学会/(社)表面技術協会/(社)先端科学技術協会/(社)溶接学会/(財)大阪科学技術センター/(財)金属系材料研究開発センター/国際歯科研究学会日本部会(JADR)/銅及び銅合金技術研究会/日本医学会/日本口腔インプラント学会/日本再生医療学会/日本材料科学会/日本歯科医学会/日本歯科麻酔学会/日本歯科理工学会/日本人工臓器学会/日本バイオマテリアル学会/日本複合材料学会/日本補綴歯科学会/日本マグネシウム協会/日本老年歯科医学会/(株)日本経済新聞社



UNIVERSITY SCIENCE

明日の文化と産業を支える独創的・先端的研究の成果



無痛針採血による在宅健康診断チップ

独立行政法人物質・材料研究機構 フェロー 堀池 靖浩

はじめに

わが国では、近年、高齢者層の医療費が増大し社会問題となっている。高齢者が元気で毎日を送るためには予防が大切である。そのためには、微量の採血から在宅で簡便・確実に同時多項目を診断できる種々の診断用バイオチップの開発に大きな期待が寄せられている。この取り組みの一貫として、本稿では、ヘルスケアチップと肝機能診断チップについて私たちの最近の開発状況を述べる。

ヘルスケアチップ

ヘルスケアチップとは、無痛針を介して血管から極微量血液を採取し、チップ上で遠心分離によって全血の血球成分と血漿成分の分離を行い、血漿成分を電気化学バイオセンサに導いて、pH、Na⁺、K⁺などの電解質イオンおよびグルコース、尿素窒素(BUN: blood urea nitrogen)、クレアチニン、乳酸などの生活習慣病健康マーカーを検出・計測して、在宅で私たちの健康状態を診断するチップシステムである。

まず、在宅で健康を診断できるためには、痛みを伴わずに素人にも採血できることが不可欠である。痛みは、針を皮膚に穿刺する際、神経網を切断するときに感じる。そこで、外径0.15mmのステンレス製管の先端を10°に研磨し、端面を3面カットし、最後に電解研磨をした。従来の針の外径の1/4程度なので、腕に刺しても痛みは感じない。さらに、粗い管の内壁を特殊な方法で超平滑化した結果、針を皮膚に刺すと自分の血圧だけで採血可能になった。採血量は6 μ L(1mm³×6)。しかし、静脈から採血する際、その所在が見えない場合が多い。そこで、近赤外光(波長850nm)を照射して血管を可視化した。さらに、針と皮膚表面との間に生じる電位を測定し、針が血管に到達したことを検出できるようにした。これらを組み合わせて、液晶ディスプレイ画面を見ながら私たちでも採血できるようになった。図1は、無痛針でディスプレイ画面を見ながらいわば電子的に採血している様子である。

図2は、ヘルスケアチップの写真であり、材料は安価・使い捨て可能なポリカーボネート製である。本チップは、無痛針、校正液の導入・排出、血液溜め、カーボンやAg/AgClのスクリーン印刷で形成したバイオセンサと参照電極からなり、各部はマイクロ流路で結合している。なお、チップ内流路表面は血球などの付着を抑制し、生体適合化を図るために生体膜表面を覆っているリン脂質膜を人工的に合成したMPCポリマーを塗布してある。図中の×(1)を中心に回転して校正液をセンサ群へ導入し、排出はチップを×(2)を中心に回転して行う。次に図1の採血後の血液溜めをチップに挿入し、元の×(1)を中心に回転するとチャンネルの下部に血球が、上部に血漿が分離され、血漿中のマーカをバイオセンサで計測する。現在、pH、Na⁺、K⁺、グルコース、BUNが検出可能である。



図1 採血者がディスプレイ画面を見ながら無痛針で採血している様子

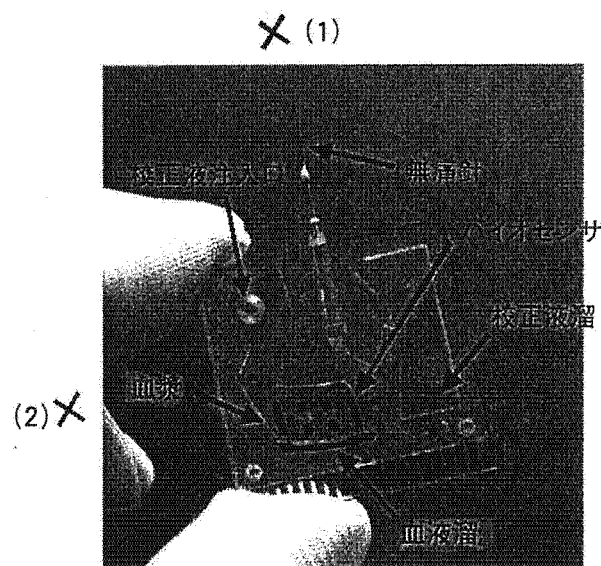


図2 採血針から遠心力で血液を送り、血球分離後のヘルスケアチップ

肝機能診断チップ

肝機能診断チップは、アルコール性肝障害や肝炎など肝機能障害を起こすと、壊れた肝細胞から血液中に流出する γ -GTP、GOT、GPTの酵素の活性値を血漿から測定する。測定法は、現在の自動血液検査の大部分を占める測定法の比色法を用いた。比色法では、血清または血漿を基質緩衝液と混合し、たとえば、 γ -GTPの場合は本来含有されている色素の光吸収(405nm)を、GOTとGPTの場合は基質緩衝液に含まれているNADH(ニコチンアミドジヌクレオチド)の光吸収(340nm)を各酵素活性値に対して測定する。そのため、血漿と基質緩衝液を正確に秤量し、均一に混合することが必須である。しかし、一般にマイクロ流路内では、溶液は層流(流体が層をなして秩序正しく流れる状態)となり、混合は困難である。そこで多段マイクロミキサという新混合法を開発した。本方法は、2種の溶液を壁と衝突させ、狭い流路で効率よく分子拡散を行い、さらに流体の進行方向を急激に変化させることにより流れを乱すことにある。これを何回も繰り返す。図3に作製したこの3マーカの検査を行う肝機能診断チップを示す。測定は、0.1~0.4 μ Lの血漿とそれに応じた1~4 μ Lの基質緩衝液をそれぞれ注入口に滴下し、マイクロミキサで混合後、検出流路に導入し、3種類の酵素の活性値を測定する。比色測定に用いる光量の減少を防止するため、検出流路の内壁はAl膜でコートした。測定は、チップを37°Cに温度制御し、光源には、重水素やハロゲンランプを用い、帯域濾過フィルターで405nmまたは340nmに単色光化し、光ダイオードを用いて光の減衰率を測定した。その結果、 γ -GTP、GOT、GPTの活性値の正常値から異常値まで広範囲にわたって検量線を得ることができた。

図3のチップはあらかじめ採取した血漿を導入したが、実用化には、無痛針採血、血球分離、秤量、混合、測定を1つのチップで実現する必要がある。図4は、 γ -GTPの一項目であるが、その測定チップを示す。まず、U字流路に導入した血液を図中の×(1)を中心に回転し血球を血球溜めに収め、U字流路内に血漿を満たす。次に×(2)を中心に回転し、血漿秤量する。元の×

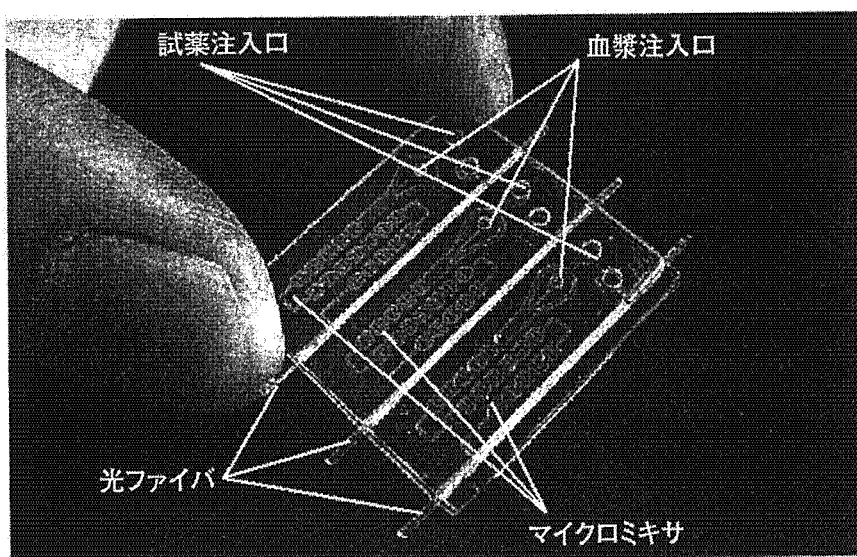


図3 3項目の肝機能マーカの肝機能検査用比色チップ

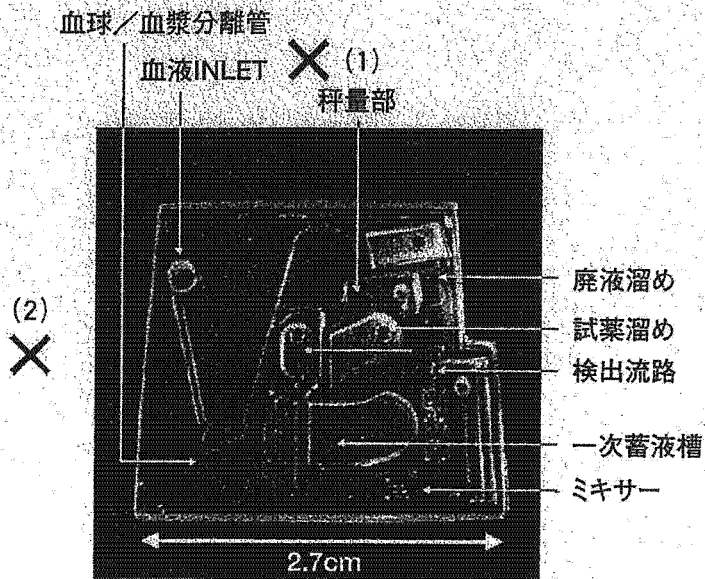


図4 採血から測定までの一連の工程を1チップで実現した γ -GTP用測定チップ

(1)を中心に回転し、あらかじめ秤量された基質緩衝液の部屋に導入する。その後この2液を、図示した引き口から減圧して、ミキサーの中に導入し、検出流路に入れて測定する。現在、3マーカーを測定できるチップを開発中である。

今後の展望

在宅診断で重要な無痛採血は古くて新しい人類の夢であり、個人差、年齢差にかかわらず100%の採血率の達成を今後共追求し、最終的には自動採血を実現する。紹介した両チップの実用化は間近であるが、本チップで生活習慣病の予防が可能となり、コレステロール、中性脂肪などの他の検査項目も追加していく。さらに、現在廃棄している血球成分から免疫検査、DNA解析などを行うため基礎研究もしている。種々のバイオチップによって診断機関と直結した医療ネットワークを介して在宅診断が実現すると、医療、さらには社会システムを大きく変革すると期待される。

謝辞：ヘルスケアチップ開発は、小川洋輝(JST)、新橋里美(JST)、長井政雄(JST)、肝機能診断チップ開発は、沖明男(物材機構)、横川昭徳(ローム)の各氏の努力の賜物であり、またヘルスケアチップ開発は、JSTのペレベンチャー事業の支援を受けた。紙面を借りて深く感謝の意を表します。



Cytocompatibility evaluation of Ni-free stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment

Akiko Yamamoto*, Yuko Kohyama, Daisuke Kuroda, Takao Hanawa

Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan

Received 1 June 2004; received in revised form 15 July 2004; accepted 11 August 2004

Available online 2 October 2004

Abstract

Cytocompatibility of nickel-free austenitic stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment, Fe–Cr–Mo–N, was evaluated and compared with a conventional austenitic stainless steel, 316L, and nickel-free ferrite stainless steel, Fe–Cr–Mo, before nitrogen adsorption treatment. Two types of cytotoxicity tests were performed; static and dynamic conditions. In static conditions, human normal diploid fibroblast HEL299 was cultured on the disks of the three materials and cell growth was examined. In dynamic conditions, the disks were rotated in extracting medium with zirconia balls at 37 °C for 14 days, and the collected extracting medium was added into HEL299 culture to examine its inhibitive effect on cell growth. Quantification of metallic elements in collected extracting medium was also performed. As a result, Fe–Cr–Mo–N had higher cell growth than 316L in static and dynamic conditions. Nickel was detected in the extracting media of 316L and Fe–Cr–Mo, whereas no nickel was detected in that of Fe–Cr–Mo–N. These facts indicate that Fe–Cr–Mo–N has higher cytocompatibility than 316L and that the nitrogen adsorption treatment contributes to the higher corrosion resistance of Fe–Cr–Mo–N in the presence of wear.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nickel-free austenitic stainless steel; Nitrogen adsorption treatment; Cytotoxicity evaluation; Nickel ion release; Biomaterials

1. Introduction

Stainless steel is one of the representatives of metallic biomaterials and is widely used as dental and orthopedic devices as well as cardiovascular stents because of its low cost, good mechanical property, and high contrast in X-ray images. Metallic biomaterials implanted in the human body are exposed to aggressive environments, including a body fluid containing chloride ion, amino acids, and various proteins, at lower partial pressure of oxygen than in air [1]. Therefore, the implanted devices of stainless steels are sometimes reported to be corroded [2–5]. When stainless steels are corroded inside the human body, they may release metal ions into surrounding tissues, which may cause toxic effects on the tissues. Since 316L austenitic

stainless steel contains about 12% of nickel as a component element, it is often reported the release of nickel ion from the stainless steel specimens [2,3,6]. Nickel and its compounds are classified to the substances which cause cancer to humans by IARC [7], and their chromosomal effect is easily detected [8,9]. Nickel and its compounds are one of the major causes for metal allergic contact dermatitis [10].

To avoid the toxic effect of released nickel ion and compounds from the conventional stainless steels, nickel-free austenitic stainless steels, such as Fe–(19–23)Cr–(10–12)Mn–(3–6)Mo–(0.85–1.1)Ni (BioDur® 108), Fe–15Cr–(10–15)Mn–4Mo–0.9N, Fe–18Cr–18Mn–2Mo–0.9N, Fe–(15–18)Cr–(10–12)Mn–(3–6)Mo–0.9N, and Fe–23Cr–2Mo–1.5N in mass% are developed [11–15]. However, these nickel-free austenitic stainless steels are hard to work to form fine foils and wires [16]. To conquer this, a new manufacturing process was developed to produce nickel-free austenitic stainless steel

* Corresponding author. Tel.: +81 29 860 4169; fax: +81 29 860 4714.
E-mail address: yamamoto.akiko@nims.go.jp (A. Yamamoto).

by nitrogen adsorption treatment [16]. This manufacturing process enables us to produce fine wires by working corresponding ferric stainless steel and then applying nitrogen adsorption treatment for austenitization. However, the biocompatibility of the nickel-free austenitic stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment has never been evaluated *in vitro* or *in vivo*.

Recently, biocompatibility of materials is increasingly evaluated using cultured cells because of their lower cost, shorter term, higher reproducibility, and reliability than *in vivo* evaluation. Cytotoxicity evaluation has been performed for the specimens of pure metals and alloys [17–24], metal salts [25–27], particulate metals [28–31], and metallic debris [32,33]. In this study, the cytocompatibility of nickel-free austenitic stainless steels manufactured by nitrogen adsorption treatment is evaluated using human normal diploid fibroblasts in static and dynamic conditions. In dynamic conditions, the nickel-free austenitic stainless steel was soaked into cell culture medium with zirconia balls and rotated at 300rpm to cause wear. Then, the cell culture medium was collected for cytotoxicity test as well as quantification of metallic elements by high resolution inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS).

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

The materials used are 316L austenitic stainless steel (JIS G4303 1988), and Fe–24Cr–2Mo (mass%) alloy. The chemical compositions of 316L steel and the ingot of Fe–24Cr–2Mo alloy are summarized in Table 1. The Fe–24Cr–2Mo specimens were prepared and applied to the nitrogen adsorption treatment as described in the previous study [16]. Briefly, the ingot of the Fe–24Cr–2Mo alloy was prepared by a vacuum high-frequency induction melting process, and applied 64% hot-forging followed by 46% cold forging to be a cylinder as a diameter of 12 mm. The cylinder was sliced into the thickness of 1.5mm. Then, the specimens were polished with #600 SiC paper in water and ultrasonically rinsed in acetone. The specimens were separately located onto a 304 steel reticular stage and inserted into the nitrogen adsorption furnace. The pressure of the inside of the furnace was reduced to 2 Pa, and nitrogen gas flew into the furnace to be the pressure of 101.3 kPa. The temperature of the furnace was kept at 1473 K for 86.4 ks, and then, the specimens were quenched into water. The scale generated on the specimen

was removed with #600 SiC paper in water and rinsed with acetone as described above. The Fe–24Cr–2Mo specimen after nitrogen adsorption treatment is abbreviated as Fe–Cr–Mo–N. The disks of Fe–24Cr–2Mo alloy before nitrogen adsorption treatment (abbreviated as Fe–Cr–Mo as the followings) are also applied to the cytocompatibility evaluation. The specimens of 316L steel (abbreviated as 316L) were prepared from the commercial 316L cylinder as the diameter of 12 mm by slicing into the disks with the thickness of 1.5 mm. Then, the disks were polished with #600 SiC paper in water and rinsed with acetone as described above.

2.2. Cytotoxicity test in static conditions

The disks of Fe–Cr–Mo, Fe–Cr–Mo–N, and 316L were sterilized by the irradiation of ultra-violet light (UV) for 5min or autoclaving at 121 °C for 20 min. Then, these disks were separately located into the bottom of 24-well microplate. Human normal diploid fibroblast HEL299 was cultured onto each disk at the concentration of 4000 cells/well in 1 mL culture medium; Eagle's minimum essential medium (E-MEM) with non-essential amino acid (NEAA), 0.1 M sodium pyruvate (N-Pyr), 0.1% lactalbumin hydrolysate (LAH), and 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were cultured at 37 °C in CO₂ incubator for 1, 4, and 7 days. Then, the cells were fixed by 25% glutaraldehyde solution for 10 min and stained by 10% Giemsa's staining solution for 10 min. The stained cells were observed by microscope and their images were captured via CCD camera onto a Power Macintosh 8500 computer as an image of 640×480 pixels.

2.3. Cytotoxicity test in dynamic conditions

The disks of Fe–Cr–Mo, Fe–Cr–Mo–N, and 316L were sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. Then, two disks of each material were separately attached to the glass weight to control their total weight as 2.00 ± 0.05 g in sterile condition. Then, two disks were placed into a Teflon vessel which was filled with 2 mm \varnothing zirconia balls as a single layer on its bottom and sterilized by autoclaving in advance. Then, 20 mL of the extracting medium, E-MEM with NEAA, 0.1 M Na-Pyr, 0.1% LAH and 20 mM HEPES, were poured into the vessel. The vessel was rotated at 300 rpm being kept at 37 ± 2 °C over a sheet-type heater for 14 days. The extracting medium was collected aseptically and used for the cytotoxicity test and quantitative analysis of metallic elements. In advance to the cytotoxicity test, the

Table 1
Chemical composition of 316L steel and Fe–24Cr–2Mo alloy (mass%)

	C	Si	P	S	Ni	Cr	Mo	O	N	Fe
SUS316L	0.019	1.18	0.038	0.13	12.1	16.72	2.05	–	–	Bal.
Fe–24Cr–2Mo	0.002	<0.01	<0.002	0.0002	<0.01	25.80	2.04	0.016	<0.001	Bal.

extract was diluted with the extracting medium as the ratio of 0.5, 0.25, 0.125, and 0.0625.

About 3.0×10^2 HEL299 cells were seeded in 100 μL of E-MEM with NEAA, 0.1 M Na-Pyr, 0.1% LAH, and 10 vol.% FBS into each well of a 96-well microplate. Based on the results of the pretests performed under the same procedure, the number of cells inoculated was determined. The same amount of the medium without cells was added to the blank well. The plate was kept for 20 min at room temperature before it was put into the CO_2 incubator in order to prevent the difference in cell growth of 36 outside wells to other inner wells. Then, cells were cultured for 4 h and a 100- μL portion of extracts or its diluted solutions was added into the well. The same amount of extracting medium unused to the dynamic extraction was added to the control well. Five concentrations were tested for each extract of three materials. Six replicate wells were prepared for each concentration of the extracts. After the second incubation of 9 days, the cells were fixed by 25% glutaraldehyde solution for 10 min and stained by 0.4% crystal violet solution in methanol for 30 min. The absorbance at 595nm was measured by a microplate reader. The relative viability of the cells (RVC) was calculated by the following equation:

$$\text{RVC}(\%) = [(a - b)/(c - b)] \times 100$$

where a was the absorbance of the sample well, b was the absorbance of the blank well, and c was the absorbance of the control well.

The obtained RVC data were plotted as a function of the extract fraction to draw a “dose–response curve”.

2.4. Quantitative analysis of metallic elements

The quantification of metallic elements in each extract of three specimens was performed by ICP-MS at Mitsui Chemical Analysis and Consulting Service. Quantification was performed for five metallic elements such as Cr, Fe, Mn, Mo, and Ni under the optimum condition for each element.

3. Results

3.1. Cytotoxicity test in static conditions

The microscopic images of the cells cultured on three disks sterilized by UV-irradiation for 1, 4, and 7 days are shown in Fig. 1 and their magnified images are shown in Fig. 2. After 1-day incubation, the cells were observed as scattered black dots because of the dye while the cells grew spread to cover almost all surface area of the disks of Fe–Cr–Mo and Fe–Cr–Mo–N after 7-day incubation. At the magnified images (Fig. 2), most of the cells were observed to spread along the polishing marks especially after 4- and 7-day incubations. The number of the cells on three disks was almost same after 1-day incubation whereas after 4- and

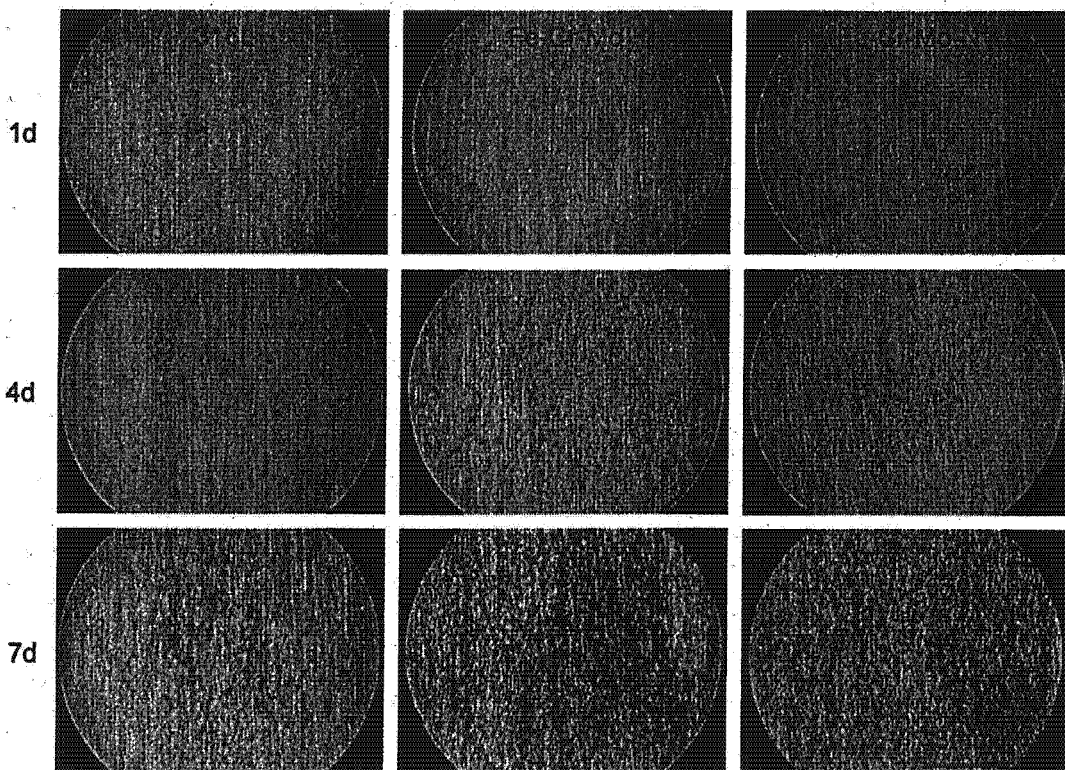


Fig. 1. Microscopic images of the cells cultured on the disks of 316L, Fe–Cr–Mo, and Fe–Cr–Mo–N sterilized by UV-irradiation.

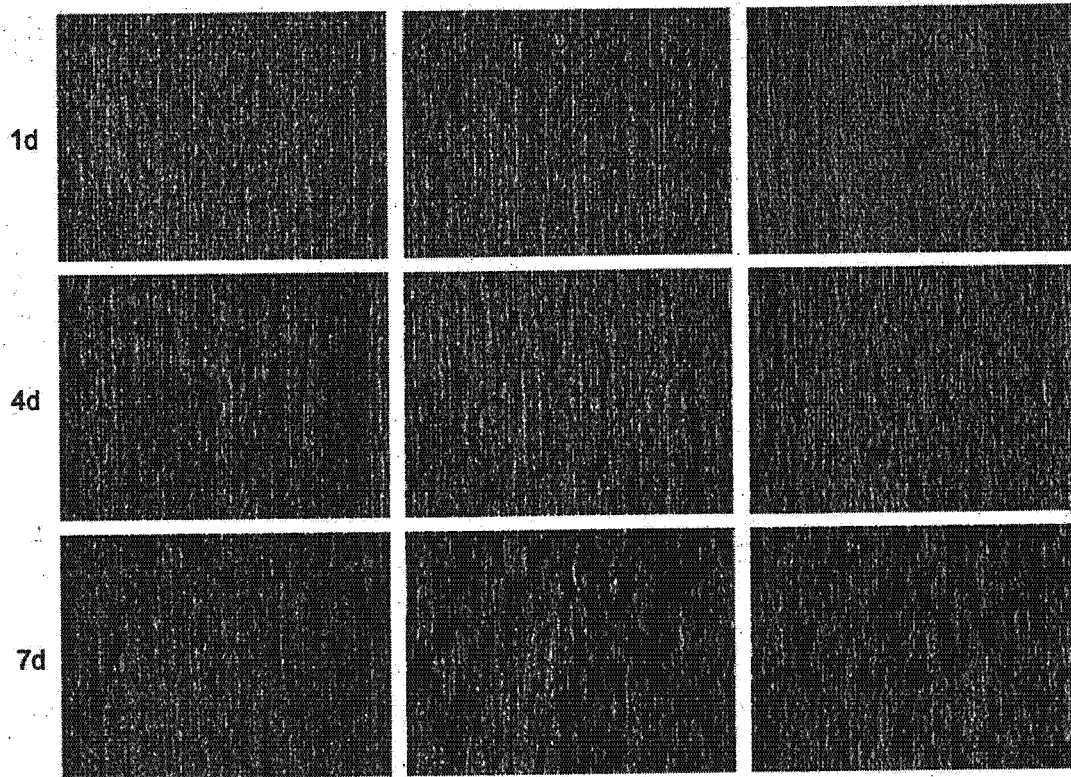


Fig. 2. Magnified images of the cells cultured on the disks of 316L, Fe–Cr–Mo, and Fe–Cr–Mo–N sterilized by UV-irradiation.

7-day incubations, the number of the cells on 316L was obviously smaller than Fe–Cr–Mo and Fe–Cr–Mo–N. The images of the cells cultured on three disks sterilized by

autoclaving for 1, 4, and 7 days are shown in Fig. 3 as well as their magnified images are shown in Fig. 4. Again, the cells were scattered dots on the disks after 1-day incubation,

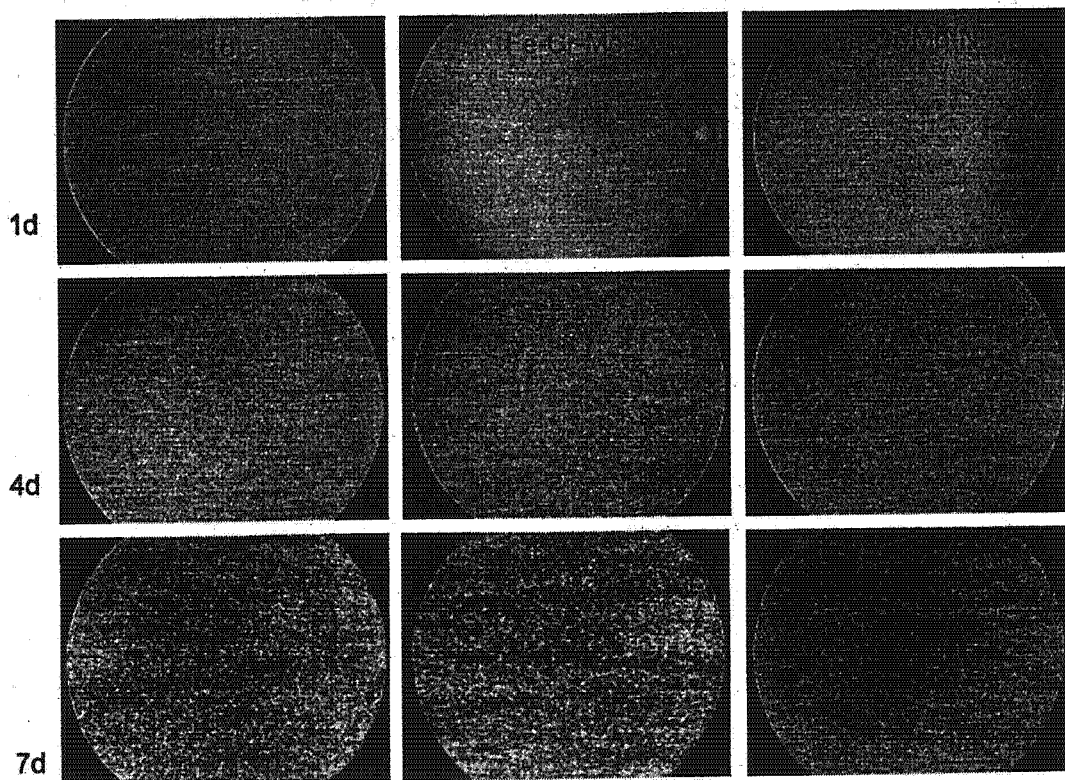


Fig. 3. Microscopic images of the cells cultured on the disks of 316L, Fe–Cr–Mo, and Fe–Cr–Mo–N sterilized by autoclaving.

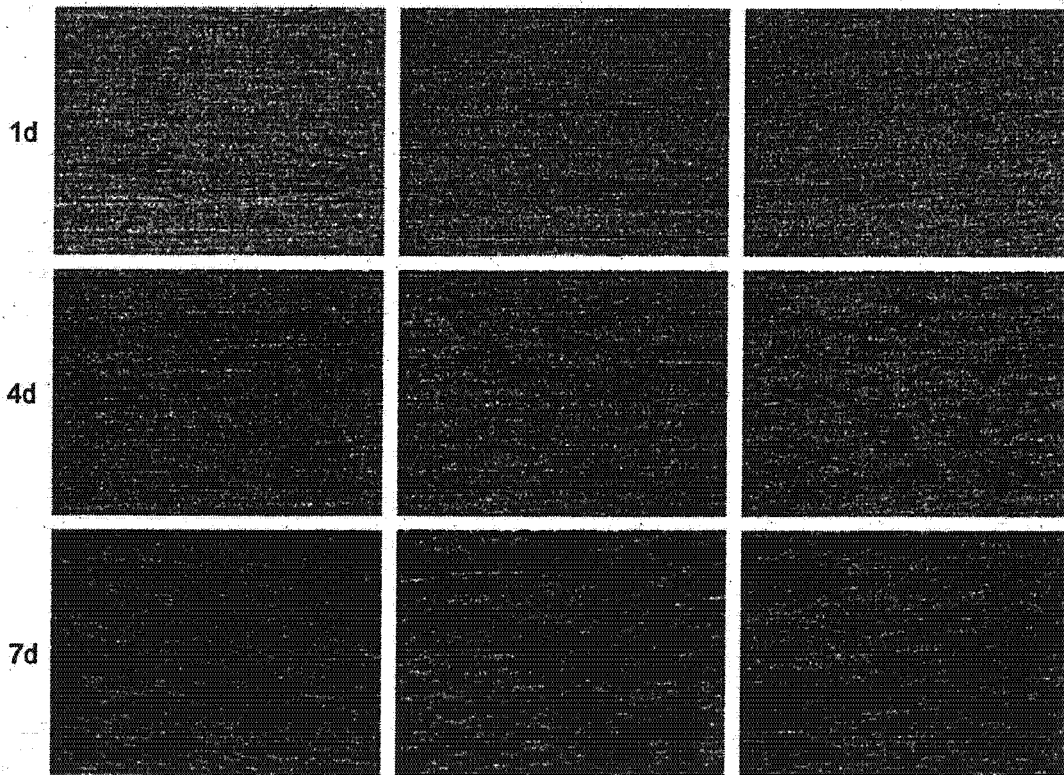


Fig. 4. Magnified images of the cells cultured on the disks of 316L, Fe–Cr–Mo, and Fe–Cr–Mo–N sterilized by autoclaving.

whereas they grew and covered the most of the disks after 7-day incubation. The magnified images (Fig. 4) showed the tendency that the cells spread along the polishing marks, especially on the disks after 4-day incubation. No difference was observed in the number of the cells on three disks after 1-, 4-, and 7-day incubations. No sign of corrosion such as discoloration, pitting, or precipitation of corrosion products were observed on all disks sterilized by UV-irradiation and autoclaving in naked eye.

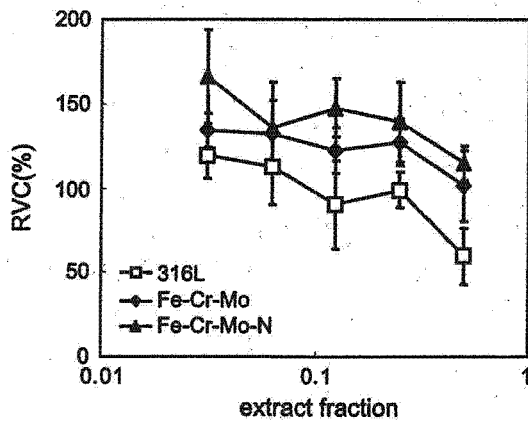


Fig. 5. Results of the cytotoxicity tests of 316L, Fe–Cr–Mo, and Fe–Cr–Mo–N in dynamic conditions. Relative viability of the cells (RVC) was calculated by the following equation: $RVC (\%) = [(a - b) / (c - b)] \times 100$, where a was the absorbance of the sample well, b was the absorbance of the blank well, and c was the absorbance of the control well at 595 nm.

3.2. Cytotoxicity test in dynamic conditions

Cytotoxicity test of the extracts of three materials under wear conditions is shown in Fig. 5. On all of three disks, the RVC decreases when the fraction increases. However, the RVC of Fe–Cr–Mo–N was the highest among the three disks at all concentrations tested, followed by Fe–Cr–Mo.

3.3. Metallic elements in the extracts under dynamic conditions

The concentrations of each metallic element detected in the extracts of three materials after 14 days under dynamic conditions are shown in Table 2. In the extract of 316L, Ni was detected at the concentration of 14 ppb whereas Ni was not detected in the extracts of Fe–Cr–Mo–N. In the extract of Fe–Cr–Mo, Ni as well as Cr was detected at the concentration of 20 and 22 ppb, respectively.

Table 2
Quantification of metallic elements in the extracts

Samples	Metallic elements				
	Cr	Fe	Mn	Mo	Ni
316L	<10	<10	<10	<10	14
Fe–Cr–Mo	22	<10	–	<10	20
Fe–Cr–Mo–N	<10	<10	–	<10	<10

Unit: ppb(=ng/g); -: not analyzed.

4. Discussion

4.1. Cytotoxicity in static conditions

In this study, cytotoxicity evaluation in static conditions was performed for the disks sterilized in two ways; UV-irradiation and autoclaving. For Fe–Cr–Mo and Fe–Cr–Mo–N, no difference was observed in the two sterilization methods; both disks showed good cell growth. 316L, one of the conventional metallic biomaterials, showed different effect on cell proliferation depending on the sterilization methods. The disks of 316L sterilized by UV-irradiation inhibited cell proliferation whereas the disks sterilized by autoclaving did not inhibit it. In the cytotoxicity test in static conditions, two factors may influence cell growth on the disks: released metal ions from the disks and adsorbing protein onto the disks. The XPS analysis revealed that the composition of the surface oxide layer of 316L specimen is basically the same before and after autoclaving, that is, mixture of iron and chromium oxide [34]. This fact suggests that the behavior of adsorbing proteins does not differ between autoclaved and UV-irradiated disks of 316L. The thickness of the surface oxide layer of 316L specimen, however, increases by autoclaving [34], which will contribute to the higher corrosion resistance of the autoclaved specimen than polished, non-autoclaved one in cell culture condition. Furthermore, the concentration of nickel in the oxide layer is 0.3 (at.%) at autoclaved specimen whereas it is 0.5 (at.%) at polished, non-autoclaved one [34], which may reduce the amount of released nickel ion to cell culture medium. Therefore, the difference in the cell proliferation on 316L disks by sterilizing methods may be attributed to the difference of the corrosion resistance of the surface oxide as a passive film on the disks. As mentioned before, 316L has already been used in clinical cases as the devices for operation and medical treatment. Most of these devices are sterilized by autoclaving; therefore, the use of 316L in the clinical cases does not cause any trouble in the corrosion resistance and biocompatibility.

Concerning the nitrogen adsorption treatment, no difference was observed on cell growth between Fe–Cr–Mo and Fe–Cr–Mo–N disks despite the sterilization methods. This fact suggests that the nitrogen adsorption treatment has no effect on cytocompatibility in static conditions as well as the ferric stainless steel, Fe–Cr–Mo, has enough corrosion resistance and cytocompatibility in static conditions.

4.2. Cytotoxicity evaluation in dynamic conditions

In the dynamic conditions of this study, wear or fretting will occur at the interface between the disk and zirconia ball. Most of the implanting devices were used in dynamic conditions facing to the wear such as the sliding surface of an artificial joint and to the fretting (wear in small amplitude) such as the interface between the screw and the hole of the plate on bone fixing devices. It is well known that the wear and fretting accelerate the corrosion of

metallic materials in a biological environment such as body fluid and cell culture medium [35–37]. Therefore, the cytotoxicity evaluation in static conditions is not enough to estimate the risks on biocompatibility of metallic materials for the devices facing to wear and fretting. Furthermore, the released metal ions in a small quantity can cause toxic reaction from cells [35,36]. In this study, the extraction of metal ions and debris from three kinds of disks was performed in dynamic conditions with cell culture medium at 37 °C. The extracting condition of this study is quite close to the actual environment of the implanted devices.

Cytotoxicity test of the extracts of Fe–Cr–Mo, Fe–Cr–Mo–N, and 316L resulted in the order of the inhibition of cell proliferation as 316L followed by Fe–Cr–Mo and Fe–Cr–Mo–N from the highest. The quantification of the metallic elements in the extracts revealed the release of Ni from 316L and Fe–Cr–Mo. These results indicate that Fe–Cr–Mo–N has superior cytocompatibility than the conventional metallic biomaterial, 316L. They also confirmed that the nitrogen adsorption treatment increases corrosion resistance of Fe–Cr–Mo with the existence of wear. The addition of nitrogen to a stainless steel influences the corrosion resistance of the steel; a solute nitrogen gives higher resistance to pitting and crevice corrosion whereas nitride accelerates intergranular corrosion [38]. In our previous study, the nitrogen adsorption treatment of Fe–Cr–Mo results in the change of its microstructure from ferrite to austenite without forming CrN or Cr₂N [16], giving higher Vickers hardness. These facts suggest that austenitization by adsorbed nitrogen contribute to higher corrosion and wear resistance, resulting in the higher cytocompatibility.

In the extracts of 316L, only Ni was detected whereas the content of Ni in 316L is much less than that of Cr. This suggests the preferential release of Ni from 316L under dynamic conditions in cell culture medium. The preferential release of Ni was also observed in Fe–Cr–Mo in which the nickel content is less than 0.01 mass%. The preferential release of Ni was reported on Ti–6Al–4V where the nickel is not contained as a component element but contained as impurity at the concentration less than 0.01 mass% [36]. Iron and chromium oxides are the main component of the surface oxide on 316L and Fe–23.5Cr–2Mo–1.5N (mass%) but small contents of nickel, molybdenum, and manganese oxides are also observed in the surface oxide layer [34,39]. However, the stability of nickel oxide is relatively low rather than chromium and other oxide, thus the preferential release of nickel could occur.

Though the concentration of released Ni in Fe–Cr–Mo extract is higher than that of 316L extract, the extract of Fe–Cr–Mo less inhibited cellular growth than that of 316L. One of the possible explanations is the Cr release in Fe–Cr–Mo extract. An addition of slight amount of Cr, which is one of the essential elements for human, may contribute to cell proliferation, resulting in higher cell growth of Fe–Cr–Mo than that of 316L.

5. Conclusions

Cytotoxicity tests of Fe–Cr–Mo, Fe–Cr–Mo–N, and 316L in static and dynamic conditions were performed to evaluate biocompatibility of Fe–Cr–Mo–N, a nickel-free austenitic stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment and comparing to 316L, one of the conventional metallic biomaterials. As a result, Fe–Cr–Mo–N had higher cell growth than 316L in static and dynamic conditions. In dynamic conditions, the extract of Fe–Cr–Mo, which is the specimen before the nitrogen adsorption treatment, contained nickel, whereas no nickel was detected in the extract of Fe–Cr–Mo–N in dynamic conditions. This fact suggests that the nitrogen adsorption treatment contribute to the higher corrosion resistance of Fe–Cr–Mo–N in the presence of wear. Based on the results obtained in this study, Fe–Cr–Mo–N has a high possibility for the application in biomedical field; however, further research will be necessary to confirm its good biocompatibility in vivo.

References

- [1] K. Hayashi, *Biomaterial Science*, in: JSME (Ed.), Ohmu-sha, Tokyo, 1993, p. 1.
- [2] K. Nielsen, *Br. Corros. J.* 22 (1984) 272.
- [3] P. Laffargue, H.J. Brems, J.A. Helsen, H.F. Hildebrand, *Metals as biomaterials*, in: J.A. Helsen, H.J. Brems (Eds.), John Wiley and Sons, Chichester, 1998, p. 467.
- [4] K. Endo, K. Matsuda, Y. Abiko, H. Ohno, T. Kaku, *Zairyo to Kankyo* 46 (1997) 682.
- [5] E. Tsuji, in: Y. Ikada (Ed.), *Introduction for Biomaterials*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1993, p. 125.
- [6] A.B. Ferguson Jr., P.G. Laing, E.S. Hodge, *J. Bone Jt. Surg.* 42A (1960) 77.
- [7] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Chromium, Nickel and Welding*, vol. 49, IARC, Lyon, 1990.
- [8] S. Kawanishi, in: R.A. Goyer, G. Cherian (Eds.), *Toxicology of Metals; Biochemical Aspects*, Springer-Verlag, Berlin, 1995, p. 349.
- [9] T.G. Rossman, *Toxicology of Metals; Biochemical Aspects*, in: R.A. Goyer, G. Cherian (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1995, p. 373.
- [10] I. Kimber, D.A. Basketter, in: L.W. Chang (Ed.), *Toxicology of Metals*, CRC Press, Boca Raton, 1996, p. 827.
- [11] J. Menzel, W. Kirschner, G. Stein, *ISIJ Int.* 36 (1996) 893.
- [12] P.J. Uggowizer, R. Magdowski, M.O. Speidel, *ISIJ Int.* 36 (1996) 901.
- [13] R.C. Gebeau, R.S. Brown, *Adv. Mater. Process.* 159 (2001) 46.
- [14] Y. Katada, M. Sagara, S. Iwasaki, K. Sakuraya, T. Kodama, *Curr. Adv. Mater. Process.* 13 (2000) 116.
- [15] Y. Katada, H. Uno, M. Sagara, M. Ogawa, H. Baba, S. Iwasaki, K. Sakuraya, K. Hiroka, T. Kodama, C. Shiga, *J. Mater. Process. Technol.* 117 (2001) CD-ROM Section B1.
- [16] D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibarui, S. Kuroda, M. Kobayashi, T. Kobayashi, *Mater. Trans.* 44 (2003) 414.
- [17] H. Kawahara, A. Yamagami, M. Nakamura, *Int. Dent. J.* 18 (1968) 443.
- [18] H. Kawahara, *Bull. Jpn. Inst. Metals* 31 (1992) 1033.
- [19] M. Seyama, *J. Jpn. Soc. Biomater.* 8 (1990) 73.
- [20] M. Kaga, M. Onogi, M. Ohta, *J. Jpn. Soc. Biomater.* 2 (1984) 117.
- [21] H. Kobayashi, *J. Jpn. Soc. Biomater.* 2 (1984) 165.
- [22] M. Nakamura, Y. Kawada, H. Sakae, S. Saeki, K. Imai, H. Kawahara, *Shikai Tenbo* 64 (1984) 451.
- [23] S. Yoshioka, *J. Jpn. Dent. Mater. Devices* 8 (1989) 324.
- [24] S. Takeda, H. Kosugi, K. Takimoto, N. Tsutsumi, M. Nakamura, *J. Jpn. Dent. Mater. Devices* 9 (1990) 825.
- [25] J.C. Wataha, C.T. Hanks, R.G. Craig, *J. Biomed. Mater. Res.* 25 (1991) 1133.
- [26] J.C. Wataha, C.T. Hanks, R.G. Craig, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 427.
- [27] A. Shedle, P. Samorapoompichit, X.H. Rausch-Fan, A. Franz, W. Fureder, W.R. Sperr, W. Sperr, A. Ellinger, R. Slavicek, G. Boltz-Nitulescu, P. Valent, *J. Dent. Res.* 74 (1995) 1513.
- [28] T. Rae, *J. Bone Jt. Surg.* 57B (1975) 444.
- [29] T. Rae, *J. Bone Jt. Surg.* 63B (1981) 435–440.
- [30] M.J. Maloney, R.L. Smith, F. Castro, D.J. Schuman, *J. Bone Jt. Surg.* 75A (1993) 835.
- [31] W.J. Maloney, F. Castro, D.J. Schuman, R.L. Smith, *J. Appl. Biomater.* 5 (1994) 109.
- [32] T. Sasada, T. Imaizumi, M. Morita, K. Mabuchi, *Junkatsu* 33 (1988) 288.
- [33] A.M. Pappas, J. Cohen, *J. Bone Jt. Surg.* 50A (1968) 535.
- [34] T. Hanawa, S. Hiromoto, A. Yamamoto, D. Kuroda, K. Asami, *Mater. Trans.* 43 (2002) 3088.
- [35] A. Yamamoto, T. Kobayashi, N. Maruyama, M. Sumita, *J. Jpn. Soc. Biomater.* 14 (1996) 158.
- [36] A. Yamamoto, T. Kobayashi, N. Maruyama, K. Nakazawa, M. Sumita, *J. Jpn. Inst. Metals* 59 (1995) 463.
- [37] H. Doi, S. Takeda, *J. Jpn. Dent. Mater. Devices* 9 (1990) 375.
- [38] K. Osozawa, *Netsu Shori* 36 (1996) 206.
- [39] D. Kuroda, T. Hanawa, S. Hiromoto, Y. Katada, K. Asami, *Mater. Trans.* 43 (2002) 3093.

Torsion and Tensile Properties of Thin Wires of Nickel-Free Stainless Steel with Nitrogen Absorption Treatment

Daisuke Kuroda¹, Takao Hanawa¹, Takaaki Hibiru², Syuji Kuroda² and Masaki Kobayashi²

¹Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba 305-0047, Japan

²Steel Research Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba 305-0047, Japan

A new manufacturing process for nickel-free austenitic stainless steel has been developed by authors. In combination with machining and a nitrogen absorption treatment, this process makes it possible to form small precise devices with a maximum thickness or diameter of 4 mm. The refinement of grains of Fe-24Cr-2Mo in mass% was attempted by thermo-mechanical treatment before nitrogen absorption treatment in order to increase the mechanical properties after nitrogen absorption treatment. Torsion and tensile properties and microstructures of Fe-24Cr-2Mo before and after nitrogen absorption treatment were evaluated to understand the effects of grain refinement on nitrogen absorption. The thin wire of the alloy is completely austenitized with nitrogen absorption at 1473 K for over 7.2 ks. The mean grain size of the alloy with nitrogen absorption decrease with the grain refinement process attempted in this study. The values of ultimate tensile strength and elongation in the alloy with and without nitrogen absorption increase with the grain refinement process. The torsional stress and rotation angle to fracture of the alloy increase with the grain refinement process and nitrogen absorption. According to the results of the torsion and tensile tests, the thin wire of the alloy with nitrogen absorption is expected to have good mechanical properties than conventional austenitic stainless steels.

(Received July 22, 2003; Accepted November 5, 2003)

Keywords: nickel-free austenitic stainless steel, nitrogen absorption, thin wire, grain refinement, torsion properties, tensile properties

1. Introduction

A new manufacturing process for nickel-free austenitic stainless steel has been developed by authors.¹⁾ In combination with machining and a nitrogen absorption treatment, this process makes it possible to form small precise devices with a maximum thickness or diameter of 4 mm.¹⁾ Ingot of ferritic stainless steel, Fe-24Cr-2Mo in mass%, is worked to various dimensions such as round bar, thin plate, and thin wire.¹⁻³⁾ The balance between strength and elongation in each test specimen with nitrogen absorption is the same as that in conventional austenitic stainless steel such as 316L.

However, the temperature for nitrogen absorption, 1473 K, is sufficiently high for grain growth, and the coarsening is observed after nitrogen absorption.¹⁻³⁾ The grain growth and coarsening causes decrease in the mechanical properties. Therefore, a nitrogen absorption treatment that allows the retention of strength and ductility is performed with a grain refinement process before nitrogen absorption treatment.

In this study, we attempted the refinement of grains by thermo-mechanical treatment before nitrogen absorption treatment in order to increase the mechanical properties after nitrogen absorption treatment. The torsion and tensile properties and microstructures of Fe-24Cr-2Mo in mass% with fine grains generated by hot forging and cold forging were evaluated both before and after nitrogen absorption treatment to understand the effects of grain refinement on nitrogen absorption. The results were compared to those of the alloy in the previous study¹⁻³⁾ and conventional austenitic stainless steel.

2. Experimental Procedure

2.1 Specimen preparation

Ingot with 20 kg of Fe-24Cr-2Mo in mass% was prepared by a vacuum high-frequency induction melting process. Table 1 shows the chemical composition of the alloy. The ingot was then cut into three equal parts. Figure 1 shows a schematic diagram of the forging process. Hot radial forging, followed by 99% cold radial forging, was conducted in the previous study.³⁾ In this study, 84% hot radial forging and 99.99% cold radial forging were conducted to obtain finer grains than in the previous study.³⁾ Thin wires (1.0 mm in diameter) were obtained through hot and cold radial forging. Specimens for the torsion and tensile tests (1.0 mm in diameter and 10 mm in gage length) and hardness test (1.0 mm in diameter and 10 mm in length) were prepared from the thin wires. The tensile axis was along to the radial forging direction in specimens for the tensile test.

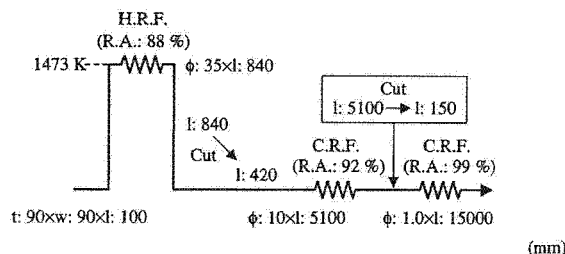


Fig. 1 Schematic diagram of the forging process of a thin wire. H.F.: hot forging, C.F.: cold forging, R.A.: reduction of area, t : thickness, w : width, ϕ : diameter, and l : length.

Table 1 Chemical composition of Fe-24Cr-2Mo (mass%).

C	Mn	P	S	Si	Ni	Cr	Mo	O	N	Fe
0.002	<0.01	<0.002	0.0002	<0.01	<0.01	25.80	2.04	0.016	<0.001	Bal.