

液相レーザープロセスによる チタン金属のオンデマンド生体親和化技術

独立行政法人産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門

主任研究員 大矢根 綾子

(平成 20 年度一般研究開発助成 AF-2011209)

キーワード：レーザー、チタン、リン酸カルシウム

1. 研究の目的と背景

生体には、体内に侵入した異物を排除しようとする自己防御機能が備わっている。このため、一般的な人工材料を生体内に埋入しても、生体はそれを線維性の皮膜で取り囲むことにより生体から隔離しようとし、材料と一体化することはない。人工材料の表面に生体親和性に優れたリン酸カルシウム（歯や骨の主成分である水酸アパタイトやその前駆体など）を形成すると、上記のような異物反応を回避し、周囲の生体組織との一体化を促すことができる（生体親和化）。医療現場において必要とされる時に、生体材料表面の必要とされる部位に、簡便かつ迅速にリン酸カルシウムを形成することができれば、外科や歯科などにおける治療向上に役立つと期待される。

従来のリン酸カルシウムの表面形成技術は基本的に部位特異的でない上、システムのスケールや処理時間の点から医療現場での実施は困難であった。筆者らは近年、Lee らの液相レーザープロセス¹⁾を改良して、エチレンビニルアルコール共重合体（EVOH）基材に対する部位特異的なリン酸カルシウム形成技術を開発した²⁾。このプロセスでは、リン酸カルシウム過飽和溶液（CP 液）中に設置された EVOH 基材表面に非集光の低エネルギーパルスレーザー光を 30 分間照射するだけで、照射面のみでリン酸カルシウムを形成することができる。

本研究の第 1 の目的は、上述の液相レーザープロセスを利用して、チタン金属表面の目的の部位に、簡便かつ短時間内にリン酸カルシウムを形成するための技術を確認することである。チタン金属は、優れた力学的性質と化学的耐久性を併せ示すことから、人工骨や人工歯根などのインプラントの材料として、外科や歯科医療において古くから臨床応用されている。本研究の第 2 の目的は、同プロセスを応用して、リン酸カルシウム中に薬効成分を担持させる技術を確認することである。本研究では、骨形成を促進する生体微量元素である亜鉛を CP 液中に添加して液相レーザープロセスを実施することにより、チタ

ン基材表面に亜鉛担持リン酸カルシウムを形成させることを試みた。

2. 実験方法

2・1 基材と反応液の準備

厚さ 1 mm のチタン板（ニラコ製、純度 99.5%）から、大きさ 10 mm × 10 mm の基材を切り出し、アセトンおよびエタノールで洗浄した後、乾燥させて基材とした。

CP 液は、Uchida らのプロトコール³⁾に基づき、攪拌下、超純水に NaCl (142 mM)、CaCl₂ (3.75 mM)、HCl (40 mM)、K₂HPO₄ · 3H₂O (1.5 mM) を順に添加・混合した後、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (50 mM) および必要量の 1M-HCl を用いて、溶液 pH を 7.40 (25 °C) に調節することにより調製した。この CP 液、および CP 液に ZnCl₂ (100 μM) を添加した液 (ZCP 液) を反応液とした。

2・2 液相レーザープロセス

図 1 に、本液相レーザー照射システムの概要図を示す。恒温水槽を用いて 25°C に保持された反応液（CP 液または ZCP 液）中にチタン基材を設置し、同基材の表面に、Nd-YAG ナノ秒パルスレーザー（Spectra-Physics 製 Quanta-Ray LAB-150-30、30 Hz）の第三高調波（355 nm）を 30 分までの種々の時間照射した。レーザー光のフルエンスは 4 W/cm² (133 mJ/pulse/cm²) とし、集光せずに金属製蓋の孔（直径 5 mm）を通して基材表面に照射した。

レーザー照射後のチタン基材を過飽和溶液から取り出し、超純水で洗浄した後、風乾した。

2・3 基材の表面構造評価

液相レーザープロセスによる基材の表面構造変化を、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX)、薄膜 X 線回折分析 (TF-XRD)、および X 線光電子分光分析 (XPS) により調べた。

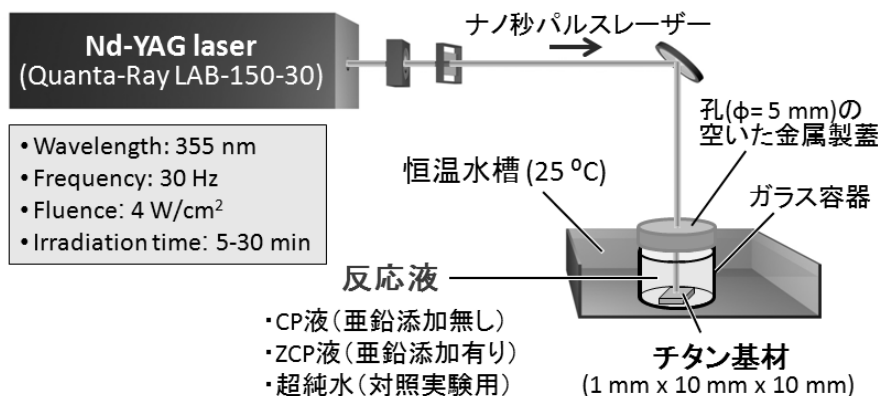


図1 本研究で用いた液相レーザー照射システムの概要図

また、基材の表面生成物を 6M-HCl 中に完全溶解し、同溶解液中の亜鉛を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP) により定量した。

2・4 機構解明のための対照実験

本液相レーザープロセスにおいては、基材のレーザー光吸収が、溶液環境と基材の表面構造の両方に影響を与えると考えられる。そこで、溶液環境への影響を調べるため、恒温槽を用いずに 2・2 と同様の液相レーザープロセスを実施し、CP 液の温度を経時的に計測した。

また、下地であるチタン基材の表面構造変化を調べるため、CP 液や ZCP 液ではなく、超純水中で 2・2 と同様の液相レーザープロセスを実施した。同プロセスによるチタン基材の表面構造変化を SEM 観察、TF-XRD、および対水接触角測定により調べた。

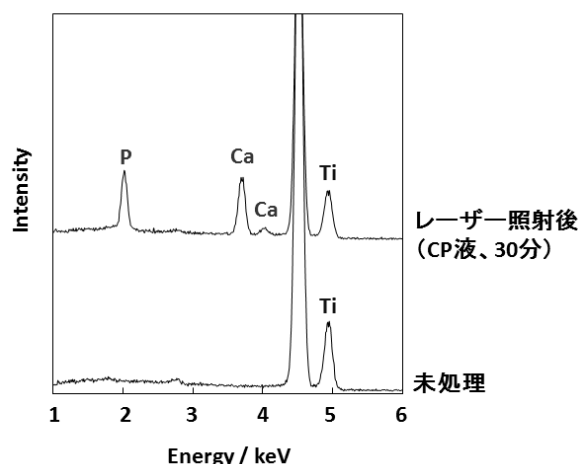


図2 未処理のチタン基材および CP 液中で 30 分レーザー照射されたチタン基材表面の EDX スペクトル

3. 研究成果

3・1 チタン基材へのリン酸カルシウム形成

図 2 に、未処理のチタン基材、および CP 液中で 30 分レーザー照射されたチタン基材表面の EDX スペクトルを示す。レーザー照射後の基材表面には、新たにリンおよびカルシウムが検出された。この結果は、本プロセスによって、チタン基材表面にリン酸カルシウムが形成されたことを示唆している。

次に、同条件下で、レーザー照射時間を 5 分、10 分、30 分と変化させた。SEM 観察の結果 (図 3) から、レーザー照射後には、チタン基材の表面にマイクロスケールの凹凸が形成されることが分かった。また、EDX の結果によれば、チタン基材表面におけるリン酸カルシウム形成は照射 5 分以内に開始され、照射時間と共にその形成量が増大していくことが分かった。

図 4 に、CP 液中で 30 分レーザー照射されたチタン基材

の全体像(左)、および表面 SEM 像(右)を示す。SEM 観察および EDX の結果によれば、リン酸カルシウムはレーザー照射面(右上)のみに形成され、非照射面(右下)には全く形成されなかった。これらの結果から、本液相レーザープロセスによれば、EVOH の場合²⁾と同様に、チタン金属基材に対しても部位特異的なリン酸カルシウム形成が可能であることが分かった。

3・2 リン酸カルシウム形成機構

基材のレーザー光吸収が溶液環境に与える影響を調べるため、恒温槽を用いずに本プロセスを実施したところ、レーザー照射に伴い CP 液の温度が上昇した (図 5)。チタン基材に吸収されたレーザー光エネルギーの一部が熱に変換され、溶液温度を上昇させたものと推察される。この推察は、チタン基材を CP 液から除くと温度上昇が認められなくなったことから裏付けられる。実際の液

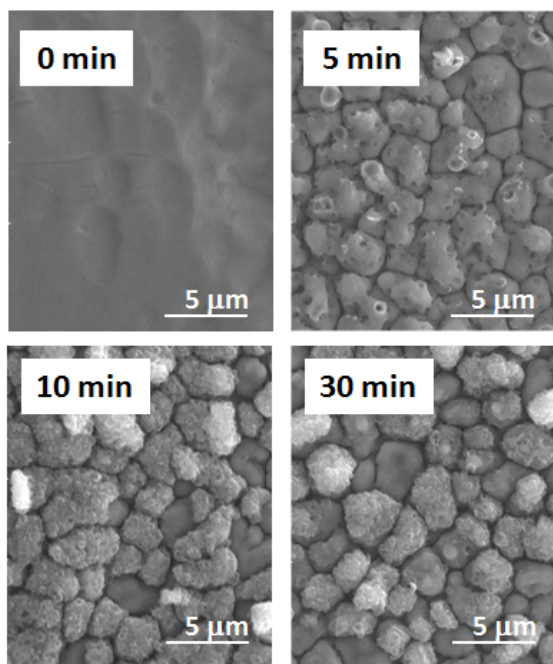


図3 未処理のチタン基材（左上）、および CP 液中で 5 分（右上）、10 分（左下）、または 30 分（右下）レーザー照射されたチタン基材表面の SEM 像

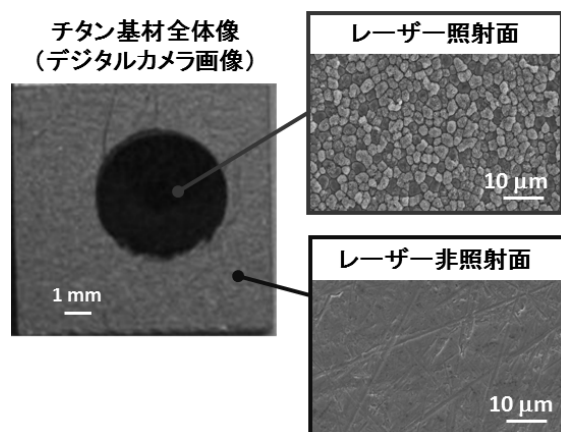


図4 CP 液中で 30 分レーザー光を照射されたチタン基材の全体像（左）および表面 SEM 像（右上：レーザー照射面、右下：レーザー非照射面）

相レーザープロセスにおいては温度調節のために恒温水槽が使用されるが、そのような条件下でも、基材の表面近傍においては局所的に液温が上昇すると考えられる。溶液温度の上昇は、リン酸カルシウムに対する溶液の過飽和度をさらに増大させるとともに、物質移動速度を加速することで、リン酸カルシウムの核形成・結晶成長を促進する効果を有すると考えられる。

次に、下地のチタン基材の表面構造変化を調べるため、

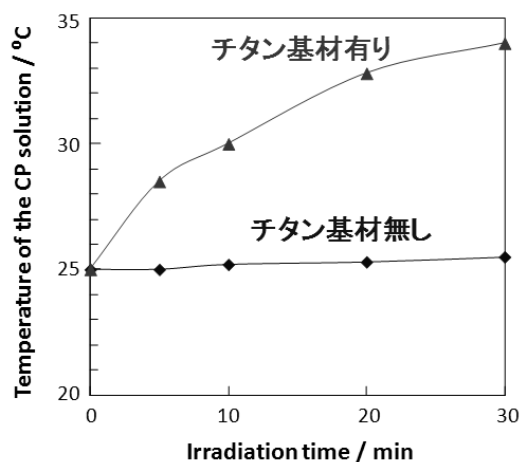


図5 恒温水槽による温度調節を行わずに CP 液中でチタン基材表面にレーザー照射した際の液温変化

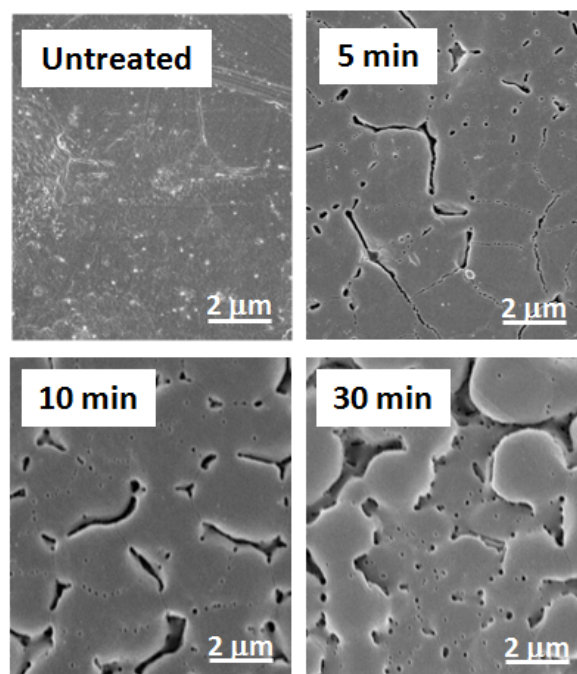


図6 未処理のチタン基材（左上）、および超純水中で 5 分（右上）、10 分（左下）、または 30 分（右下）レーザー照射されたチタン基材表面の SEM 像

本液相レーザープロセスを CP 液に替えて超純水中で実施した。SEM 観察の結果、照射時間ともに基材の表面粗さが増大し、マイクロスケールの凹凸が形成された(図6)。これは、レーザー光吸収によるチタン基材表面の熱変形、あるいはレーザーアブレーション現象によるものと考えられる。

接触角測定の結果、超純水中でのレーザー照射(30分)により、チタン基材の対水接触角が約 95°から 13°にまで低下した。この結果から、レーザー照射後には水ぬれ性の高

い親水性表面が形成されることが分かった。また、レーザー照射前後のチタン基材の表面を TF-XRD により調べたところ、照射後にはルチルに帰属される回折ピークが検出された(図 7)。以上の結果から、本液相レーザープロセスにおいては、マイクロスケールの凹凸構造と親水性を有するルチル層が、チタン基材表面に形成されると考えられた。この表面ルチル層が、リン酸カルシウムの核形成に対するエネルギーバリアを低減し、リン酸カルシウムの不均一核形成を促したと考えられる。

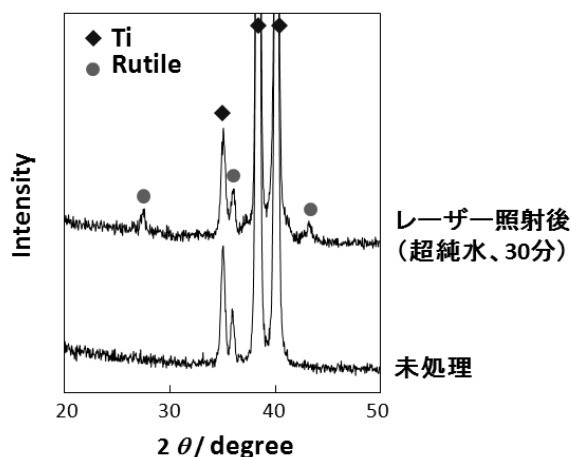


図 7 未処理のチタン基材、および超純水中で 30 分レーザー照射されたチタン基材表面の TF-XRD パターン

3・3 リン酸カルシウムへの亜鉛担持

本液相レーザープロセスを応用して、骨形成を促進する生体微量元素の亜鉛をリン酸カルシウム中に担持することを試みた。そのために、ZCP 液（塩化亜鉛を添加した CP 液）を反応液として使用した。

EDX の結果から、反応液として ZCP 液を用いた場合にも、CP 液を用いた場合と同様に、チタン基材の表面にリン酸カルシウムが形成されることが確認された。このリン酸カルシウムの表面化学組成を XPS により調べたところ、亜鉛の共存が確認された(図 8)。亜鉛は、カルシウムサイトへの置換によりリン酸カルシウム中に担持されていると推定される。

次に、基材表面の亜鉛担持リン酸カルシウムを 6M-HCl 中に完全溶解し、同溶解液中の亜鉛濃度を ICP で測定した。その結果によると、リン酸カルシウム中の亜鉛担持量は $0.16 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、*in vitro* での骨原生細胞の増殖と分化に最適な亜鉛担持アパタイト層中の亜鉛担持量⁴⁾とほぼ同等であった。

以上の結果から、塩化亜鉛を添加したリン酸カルシウム過

飽和溶液中で液相レーザープロセスを実施することにより、亜鉛担持リン酸カルシウムを形成できることが分かった。

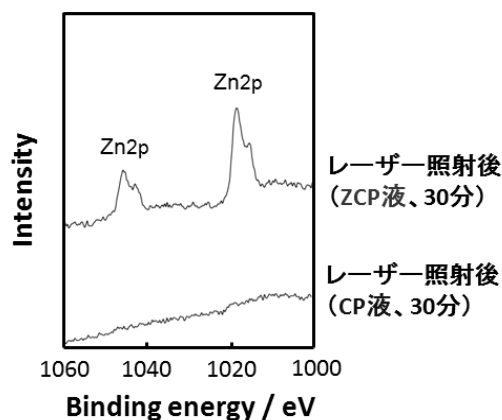


図 8 CP 液または ZCP 液中で 30 分レーザー照射されたチタン基材表面の Zn_{2p} XPS スペクトル

4. 結び

本液相レーザープロセスによるリン酸カルシウム形成技術が、有機高分子材料だけでなくチタン金属にも適用可能であることが確かめられた。また、過飽和溶液中に亜鉛を添加することにより、亜鉛担持リン酸カルシウムを形成できることも分かった。

本プロセスは簡便、迅速、かつ部位特異的であり、生成するリン酸カルシウムへの元素添加が可能であるので、生体材料のオンデマンド生体親和化技術としての応用が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、(独)産業技術総合研究所の坂巻育子氏、山形大学の松岡奈央氏、鶴沼英郎教授、その他関係各位にご協力を頂いた。また、多大なご支援を頂いた公益財団法人天田財団に感謝の意を表す。

参考文献

- 1) Lee BH, Oyane A, Tsurushima H, Shimizu Y, Sasaki T, Koshizaki N. ACS Appl Mater Interfaces, 1 (2009) 1520.
- 2) Oyane A, Sakamaki I, Shimizu Y, Kawaguchi K, Koshizaki N, J Biomed Mater Res A, 100A (2012) 2573.
- 3) Uchida M, Oyane A, Kim HM, Kokubo T, Ito A, Adv Mater, 16 (2004) 1071.
- 4) Wang X, Ito A, Sogo Y, Li X, Oyane A, Acta Biomater, 6 (2010) 962.