

レーザー誘起ナノ周期構造の表面形状制御による 高付加価値生体材料の創成

岡山大学 大学院自然科学研究科
助教 篠永 東吾
(平成 29 年度 奨励研究助成 A AF-2017239)

キーワード：超短パルスレーザー，ナノ周期構造，細胞伸展方向制御

1. 研究の背景と目的

チタン (Ti) や Ti 合金などの Ti 系金属材料は耐食性や機械的性質に優れることから人工関節などの生体用インプラント材料として最も広く用いられている。しかしながら、Ti は金属材料であるがゆえに、材料表面へ自発的に骨成分を形成することができない生体不活性な材料であるため、人工関節を人体に埋入した際、骨が完全に固定されるまでには数ヶ月以上を要する。高齢化社会が問題視されている我が国にとって、早期の骨再生は必須の課題であり、Ti 表面への新機能付与が必要である¹⁾。

ここで、Ti 表面への早期骨形成を実現するための新機能付与の一種に、骨芽細胞が伸展する方向を一方向に制御する細胞伸展方向制御 (細胞配向性の付与) がある²⁾。骨折時における人工関節上での骨再生過程について着目すると、最初の数週間で人工関節上において骨密度が増加し、その後、数週間で生体骨の強度が必要な方向に骨配向性が生じ、骨再生が完了する²⁾。ここで、人工関節に対して予め骨配向性を付与することができれば、骨密度が増加した段階で骨配向性の付与が完了していることになるため、早期の骨再生が実現可能となる。

Ti 系金属材料表面で細胞伸展方向制御を行うためには、材料表面へ周期的な溝形状を形成することが有効な手段の一種である。ここで、細胞伸展には、細胞の接着斑と基板の表面形状との関係が重要であると考えられている。一般的に細胞の大きさは数 10 μm 程度であるのに対して、接着斑の大きさや幅は数 10 nm から数 100 nm 程度である³⁾。すなわち、図 1 に示すように、優れた配向性を有する細胞伸展方向制御を実現するためには周期や深さのスケールが数 10 nm から数 100 nm である周期的微細構造 (ナノ周期構造) の形成が有効である可能性がある。J. lu⁴⁾ は、プラズマドライエッチングにより Ti 表面にナノ周期構造を形成できることを示している。本手法においては周期 750 nm \sim 10 μm を有する表面形状を得ることができるが、エッチング処理を行う上で複数の工程を要する。また、骨芽細胞の細胞伸展方向性制御に有効な表面形状については未だ明らかになっていない。

筆者らは、ナノ周期構造の形成には超短パルスレーザーが有効であると着想した。超短パルスレーザー光を材料表面に集光照射すると、レーザー照射スポット内部に自己組織的にナノ周期構造の形成が可能である。ナノ周期構造は金属⁵⁾

や半導体⁶⁾などの様々な材料に形成することができる。さらに、形成される溝方向は、レーザーの偏光に対して垂直な方向に形成される場合が多いことから、集光スポットの走査中に偏光方向を制御することで溝方向の制御も比較的容易に行うことができる。

レーザーによりナノ周期構造が形成されることが発見されて以来、その形成メカニズムについては現在も多く議論がなされている。金属に対するナノ周期構造の形成メカニズムの 1 つにレーザー誘起表面プラズマ波に起因するといった報告がある⁷⁾。レーザー誘起表面プラズマ波はレーザー波長、パルス幅、レーザー強度などのレーザー照射パラメータによって変化すると予想されるため、適切なレーザー照射パラメータによりナノ周期構造の表面形状を制御できる可能性がある。一方で、実際のインプラント表面では、電解研磨を行った鏡面だけではなく、機械研磨面などを使用している場合がある。すなわち、生体材料表面の加工面性状は用途に応じて様々であり、それらの加工面は形成するナノ周期構造の形状に影響を及ぼすと考えられる。

本研究では、レーザー誘起ナノ周期構造による高付加価値生体材料の創成を目指し、超短パルスレーザー光により Ti 基板上へ形成されるナノ周期構造の表面形状制御を試みた。そして、細胞配向性の向上に有効な表面形状としてナノ周期構造の周期、深さおよび連続性に着目し、それらが

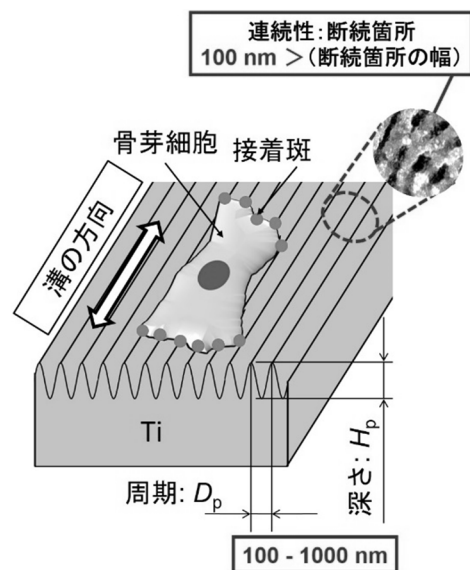


図 1 細胞伸展方向制御とナノ周期構造の表面形状

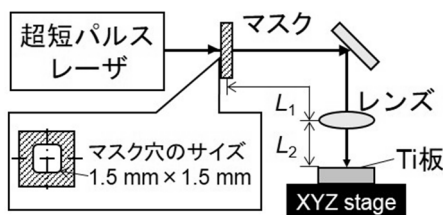
細胞伸展に与える影響について実験的に調べた。最後に、Ti の初期表面形状がナノ周期構造の表面形状に及ぼす影響について調べた。

2. 実験方法

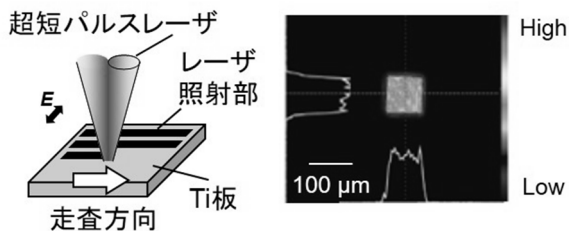
2・1 ナノ周期構造形成

ナノ周期構造形成のための実験試料として、 $8 \times 8 \times 0.5$ mm の純 Ti 基板を用いた。Ti 表面には電解研磨を施し、その表面粗さを $Ra=0.01 \mu\text{m}$, $Rz=0.06 \mu\text{m}$ とした。図 2 に、ナノ周期構造形成のための超短パルスレーザー照射セットアップ概略図を示す。中心波長 $\lambda=790 \text{ nm}$ および繰り返し周波数 $R_p=1.0 \text{ kHz}$ の超短パルスレーザー光を用いた。ビームスポット内で均一な形状を有するナノ周期構造を形成するため、矩形の穴 ($1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$) を有する厚さ 0.08 mm のマスクを用い、Ti 基板表面で図 2(c) のようなトップハット型のビームプロファイルが得られるようにした。この際、マスクとレンズ間の距離 $L_1=2790 \text{ mm}$ およびマスクから試料間の距離 $L_2=159 \text{ mm}$ とし、ビームスポットサイズ約 $82 \times 82 \mu\text{m}$ を得た。図 2(b) のように XYZ ステージを用いて集光ビームスポットを Ti 基板表面で走査し、走査速度を $V_s=5.47 \text{ mm/s}$ とすることでビームスポットあたりの照射回数が $N=15 \text{ shots}$ で一定となるようにした。

はじめに、レーザーフルエンスを一定としパルス幅 t_p を 0.2 ps から 5.0 ps へと変化させ、ナノ周期構造の表面形状 (周期 D_p および深さ H_p) の変化を調べた。レーザー照射前後の表面形状はプローブ顕微鏡で測定し、アスペクト比 $\alpha=H_p/D_p$ を算出した。次に、パルス幅を一定とし、レーザーフルエンスがナノ周期構造の連続性に与える影響を調べた。不連続点は走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察像から計測した。ここで、細胞の接着斑のサイズより 100 nm 以上断続している箇所を不連続点として定義し、溝長さ $1 \mu\text{m}$ あたりの不連続点の数を算出することで連続性を評価した。



(a) セットアップ概略図



(b) 照射方法

(c) ビームプロファイル

図 2 超短パルスレーザー光照射方法

2・2 細胞試験

ナノ周期構造を形成した Ti 基板において、ヒト骨芽細胞 (MG-63) を 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 濃度のインキュベーター内で 3 時間培養した。その後、細胞を Ti 基板上で組織固定し、免疫染色を行うことで細胞のアクチンを赤色、核を青色となるように染色し、細胞伸展の様子を蛍光顕微鏡で観察できるようにした。そして蛍光顕微鏡観察画像から、溝の方向に対する伸展角度および細胞数を計測することで、細胞配向性を評価した。ここで、細胞伸展角度 θ_{cell} は、図 3 に示すように、溝の方向に対して垂直な方向に対する角度として定義し、細胞伸展角度 θ_{cell} が 90° の場合、溝の方向に沿った細胞伸展を示し、細胞の伸展方向が定義できないランダムな方向に進展している細胞は $\theta_{\text{cell}}=\text{Random}$ とした。

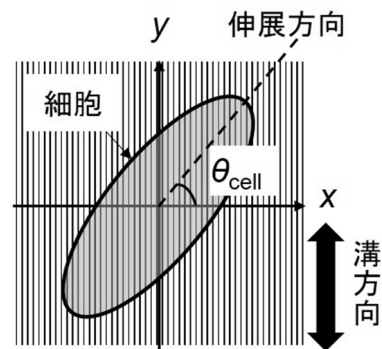


図 3 細胞伸展角度の定義

3. 実験結果および考察

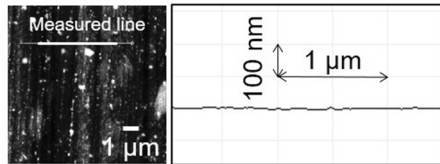
3・1 ナノ周期構造の表面形状制御

図 4 にレーザーフルエンスおよび照射回数を一定とし、パルス幅 t_p を 0.2 ps から 5.0 ps へと変化させて、超短パルスレーザー光を照射した場合における Ti 基板表面のプローブ顕微鏡観察画像および表面プロファイルを示す。図より超短パルスレーザー光を照射することで、レーザーの偏光 E に対して垂直な方向に溝を有するナノ周期構造が Ti 基板上に形成されていることがわかる。表面プロファイルよりパルス幅の増加とともに、形成されるナノ周期構造の周期は減少し、深さは増加している。すなわち、パルス幅の長い場合は凸部と凹部の高低差が比較的大きな構造が得られ、パルス幅の短い場合は凸部と凹部の高低差が比較的小きな構造が得られている。表面プロファイルよりアスペクト比 α を算出すると、図中に示すようにパルス幅の増加とともに、アスペクト比が増加することが明らかになった。パルス幅が 5.0 ps の場合、 0.2 ps と比較して約 1.6 倍のアスペクト比が得られている。本結果は、パルス幅によってレーザー強度が変化することに起因していると考えられる。実験ではレーザーフルエンスを統一してパルス幅を変化させているので、パルス幅 0.2 ps のレーザー強度は 5.0 ps のパルス幅と比較して 25 倍レーザー強度が高い。超短パルスレーザー光は凸部において電界集中が生じることが知られ

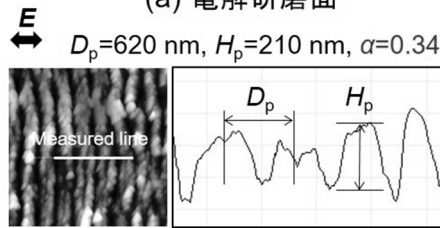
ている⁸⁾。よって、高いレーザー強度を有するフェムト秒の
パルス幅では凸部の優先的な除去を引き起こしアスペク
ト比の小さな表面形状となったと考えられる。

次に、パルス幅を高アスペクト比が得られるパルス幅
 $t_p=5.0$ ps で一定とし、レーザーフルエンス F を $0.25-0.45$ J/cm²
へと変化させた場合における、ナノ周期構造の単位長さあ
たりの不連続点の数とアスペクト比の関係性を図 5 に示
す。レーザーフルエンスを 0.25 J/cm² から 0.45 J/cm² へと変

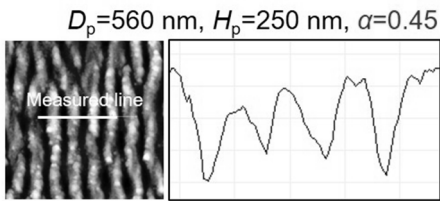
$\lambda=790$ nm, $R_p=1$ kHz, $F=0.25$ J/cm², $N=15$ shots



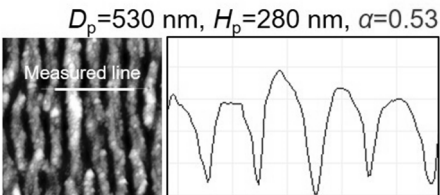
(a) 電解研磨面



(b) $t_p=0.2$ ps



(c) $t_p=1.0$ ps



(d) $t_p=5.0$ ps

図 4 ナノ周期構造のアスペクト比制御

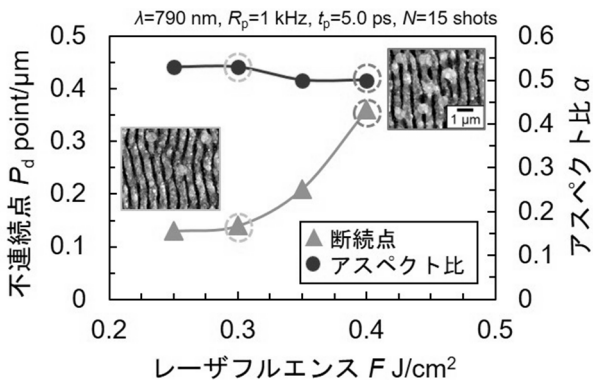


図 5 レーザーフルエンスによるナノ周期構造の
連続性変化

化させるとアスペクト比 α は 5.0 程度に維持されるが、単
位長さあたりの不連続点の数 P_d が 0.13 から 0.36 μm
points/ μm へと増加することがわかる。すなわち、レーザ
フルエンスの増加によりナノ周期構造の連続性が低下す
ることが示された。

3・2 ナノ周期構造のアスペクト比が細胞配向性に与 る影響

パルス幅 t_p を 0.2 から 5.0 ps へと変化させることでアス
ペクト比を変化させたナノ周期構造形成領域をそれぞれ
Ti 基板表面に形成し、細胞試験を行った。レーザー未照射部
および各アスペクト比を有するナノ周期構造上において、
細胞配向性を評価した結果を図 6 に示す。レーザー光を照射
していない場合、 $\theta_{\text{cell}}=\text{Random}$ における細胞数が約 60%
となり、 $\theta_{\text{cell}}=0^\circ-90^\circ$ においては約 5% と一様である。すなわ
ち、レーザー未照射面ではランダムに細胞が伸展しており細胞
配向性がないことがわかる。一方で、ナノ周期構造上では、
どのアスペクト比の場合でも $\theta_{\text{cell}}=\text{Random}$ における細
胞数は 20% 以下に減少し $\theta_{\text{cell}}=0^\circ-90^\circ$ にかけて細胞数が増
加する傾向が得られており、細胞配向性が生じている。
 $\theta_{\text{cell}}=75^\circ$ 以上の細胞数の割合を合計すると $\alpha=0.34$ および
 0.44 では約 70% であるのに対し、 $\alpha=0.57$ のときは約 80%
以上の細胞配向性が得られている。以上より、高アスペク
ト比を有するナノ周期構造によって、細胞配向性が向上す
ることが明らかとなった。

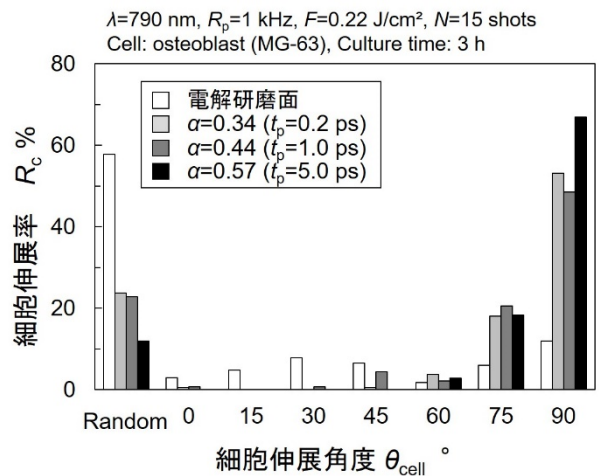


図 6 高アスペクト比による細胞配向性の向上

3・3 ナノ周期構造の連続性による細胞配向性変化

各レーザーフルエンスにより連続性を変化させたナノ周
期構造において、前項と同様にヒト骨芽細胞による細胞試
験を行った。 $\theta_{\text{cell}}=75^\circ$ 以上に配向した細胞数の割合を測定
し、単位長さあたりの不連続点の数 P_d と細胞配向性との
関係性をまとめた結果を図 7 に示す。図より、単位長さあ
たりの不連続点の数が 0.14 から 0.36 μm points/ μm へと増
加すると細胞配向性が約 80% から約 50% へと低下するこ
とがわかる。これまでに得られた結果より、細胞配向性の
向上には 5.0 ps 程度のパルス幅で高アスペクト比のナノ

周期構造を形成し、適切なレーザーフルエンスにより連続性の良い表面形状とすることが有効であることが示唆された。

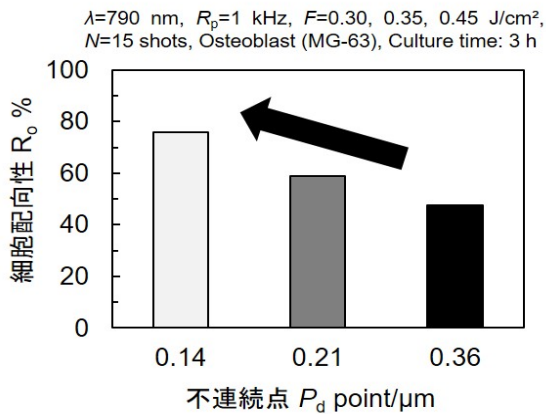


図7 ナノ周期構造の連続性と細胞配向性の関係

3・4 初期表面形状がナノ周期構造へ及ぼす影響

前項までに示したとおり、純 Ti 基板表面に形成したレーザー誘起ナノ周期構造は細胞配向性の付与に有効であることが明らかになった。ここで、インプラント表面の加工面性状は様々であり、それらの初期表面形状に対してナノ周期構造を形成した場合、ナノ周期構造の表面形状に影響を及ぼすと考えられる。本項では機械研磨を行った Ti 基板の初期表面粗さがナノ周期構造の形状に及ぼす影響について実験的に調べた。さらに、その影響を低減させる方法について検討した。

はじめに、電解研磨を行った純 Ti 基板表面に超短パルスレーザー光を照射することで試料の除去深さを調べた。図2で示したレーザー照射セットアップを用い、 $4 \times 8 \text{ mm}$ の領域にナノ周期構造を形成した。ここで、1回の走査でナノ周期構造形成領域を形成した場合を走査面回数 1scan と定義し、同一箇所を 1scan から 20scans まで走査した。図8に示すように、レーザー光未照射領域からナノ周期構造形成領域までを触針式表面粗さ計を用いてプローブを走査し、断面プロファイルを測定した。ここで、プローブの走査方向はナノ周期構造の溝方向に対して垂直方向とした。得られた断面プロファイルより、レーザー光未照射および照射領域の平均高さの差を除去深さ D_{rem} と定義した。

図9に除去深さとレーザー光走査面回数の関係を示す。1 scan 時の照射回数は 15shots としている。図より 1 scan 時の除去深さは約 60 nm であり、走査面回数を増加させるほどその除去深さは線形的に増加している。走査面回数 20 scans 時には約 $1.1 \mu\text{m}$ の除去厚さが得られている。

初期表面粗さがナノ周期構造に及ぼす影響を検討するため、1 scan 時の除去深さより大きな $0.72 \mu\text{mRz}$ の初期表面粗さを有し、研磨痕が一定方向のチタン試料表面に対してレーザー光を同一箇所にも多数回走査する実験を行った。この際、レーザー光照射セットアップおよび条件は図2で示した通りで、レーザー走査回数は 1 scan から 20 scans へと変化

させた。また、初期表面粗さを有した試料の研磨方向に対して、レーザー光の走査方向は約 15° 変化させた。

図10にレーザー未照射およびレーザー照射後の SEM 観察画像を示す。図より走査回数 1 scan の場合、機械研磨面上では電解研磨面に形成したナノ周期構造よりも幅および周期が短く、また形成される溝構造の方向は走査方向に対して右に約 15° 傾いた形状が形成されていることがわかる。20 scans の条件では溝構造の連続性に違いはあるが、電解研磨面に形成したナノ周期構造に近い幅と周期、かつレーザー光走査方向に沿ったナノ周期構造が形成されている。

図11にプローブ顕微鏡を用いた表面形状測定結果を示す。図より超短パルスレーザー光を 1scan 走査することで形成されたナノ周期構造は凸部高さ 220 nm、周期間隔 470 nm となっている。一方、走査回数を 20 scans とした場合、凸部高さは 240 nm、周期間隔は 540 nm となり、電解研磨面に形成したときに近い形状(凸部高さ 260 nm、周期 580

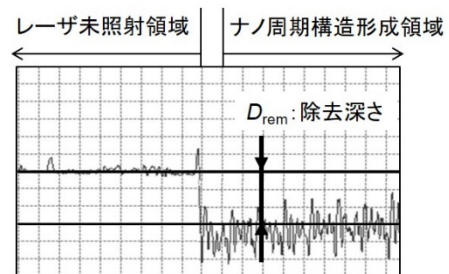
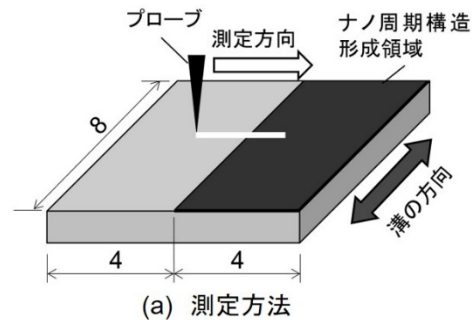


図8 除去深さの測定方法

$\lambda=786 \text{ nm}$, $t_p=5.0 \text{ ps}$, $F=0.25 \text{ J/cm}^2$, $R_p=1.0 \text{ kHz}$, $N_s=15 \text{ shots}$
電解研磨面 ($R_a=0.01 \mu\text{m}$, $R_z=0.06 \mu\text{m}$)

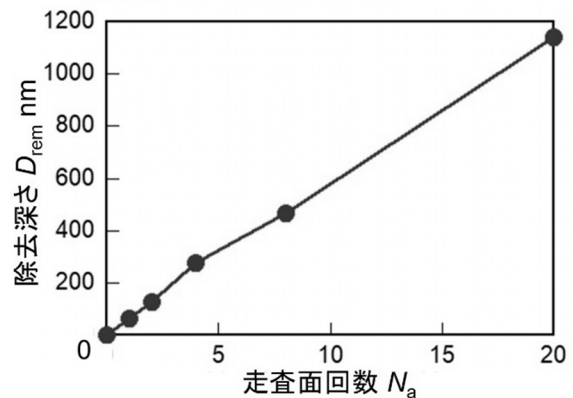


図9 走査面回数による除去厚さの変化

nm)になっている。以上の結果より、走査回数の増加により、ナノ周期構造表面形状が初期表面粗さから受ける影響を低減できることが明らかとなった。

$\lambda=786\text{ nm}$, $t_p=5.0\text{ ps}$, $F=0.25\text{ J/cm}^2$, $R_p=1.0\text{ kHz}$, $N=15\text{ shots}$
 機械研磨面 ($Ra=0.08\text{ }\mu\text{m}$, $Rz=0.72\text{ }\mu\text{m}$)
 電解研磨面 ($Ra=0.01\text{ }\mu\text{m}$, $Rz=0.06\text{ }\mu\text{m}$)

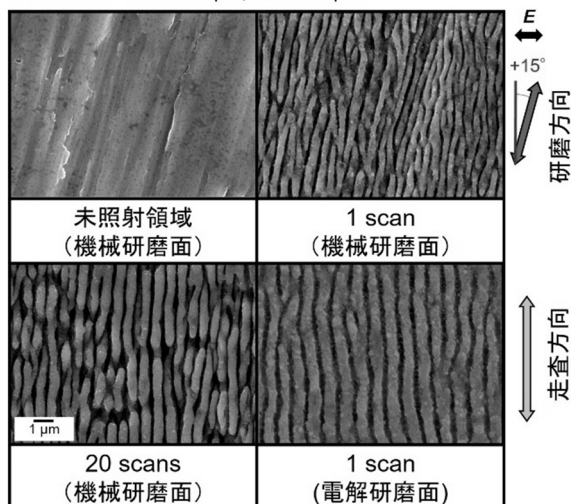


図10 初期表面によるナノ周期構造の形状変化

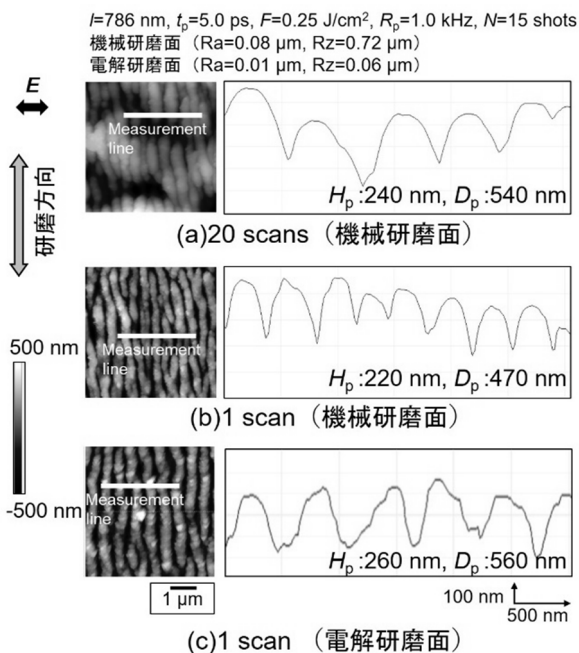


図11 走査回数の増加による初期表面形状に影響を受けたナノ周期構造の表面形状改善

4. まとめ

本研究ではレーザー誘起ナノ周期構造の形成による高付加価値生体材料の創成を目指し、ナノ周期構造の表面形状制御を試みた。さらに、細胞配向性の向上に有効なナノ周期構造の表面形状を明らかにすると共に、Tiの初期表面形状がナノ周期構造に及ぼす影響について示した。本研究で得られた主な成果は以下のとおりである。

- (1) 同一レーザーフルエンスの場合、フェムト秒と比較してレーザー強度の低いピコ秒程度のパルス幅を用いることで凸部と凹部の高低差のある高アスペクト比を有するナノ周期構造が得られる。
- (2) 同一パルス幅の場合、レーザーフルエンスが増加すると連続性が低いナノ周期構造となる。
- (3) 細胞配向性の向上には高アスペクト比のナノ周期構造を形成し、適切なレーザーフルエンスにより連続性の良い表面形状とすることが有効である。
- (4) ナノ周期構造の表面形状は初期表面粗さの影響を受けるが走査回数を増加させることで初期表面の影響を低減することが可能であり、電解研磨面に形成したときと同等の溝幅と周期で形成することができる。

謝辞

本研究の一部は公益財団法人 天田財団（平成29年度奨励研究助成 A, AF-2017239）より助成を受けたものである。細胞試験では大阪大学接合科学研究所の塚本雅裕教授、東京医科歯科大学生体材料工学研究所の埴隆夫教授、陳鵬助教にご協力を頂いた。ここに記して感謝の意を表する。

参考文献

- 1) T. Hanawa: Biofunctionalization of titanium for dental implant, *J. Dent Sci. Rev.*, (2010), 46, 93.
- 2) 中野貴由, 馬越佑吉: 骨組織における生体アパタイト結晶とその力学機能, *生体医工学*, (2006), 44, 4, 503.
- 3) M. Goto, T. Tsukahara, K. Sato, T. Kitamori: Micro- and nanometer-scale patterned surface in a microchannel for cell culture in microfluidic devices, *Anal Bioanal Chem.*, (2008), 390, 93, 817.
- 4) J. Lu, M.P. Rao, N.C. MacDonald, D. Khang, T.J. Webster: Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features, *Acta Biomater.*, 4, (2008), 192.
- 5) T. Shinonaga, M. Tsukamoto, T. Kawa, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa: Formation of periodic nanostructures using a femtosecond laser to control cell spreading on titanium, *Appl. Phys. B: Lase. and Opt.*, (2015), 119, 493.
- 6) T. Shinonaga, M. Tsukamoto and G. Miyaji, Periodic nanostructures on titanium dioxide film produced using femtosecond laser with wavelengths of 388 and 775 nm: *Opt. Express.*, (2014), 22, 12, 14696.
- 7) M. Hashida, T. Nishii, Y. Miyasaka, H. Sakagami, M. Shimizu, S. Inoue, S. Sakabe: Orientation of periodic grating structures controlled by double-pulse irradiation, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, (2016), 122, 484.
- 8) K. Miyazaki, G. Miyaji: Nanograting formation through surface plasmon fields induced by femtosecond laser pulses, *J. Appl. Phys.*, (2013), 114, 153108.