

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06444

研究課題名(和文)超小型・高機能バイオセンシングを実現するハイドロキシアパタイト薄膜の配向制御技術

研究課題名(英文)Orientation control of crystalline hydroxyapatite film that realize ultra-compact and highly functional bio-sensing.

研究代表者

楠 正暢 (Kusunoki, Masanobu)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20282238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クロマトグラフィーチップやバイオセンサの高感度化、高分解能化などを旨し、ハイドロキシアパタイト(HA)結晶膜の配向制御技術を確立し、そのデバイス応用の可能性について調べた。完全なa面配向とc面配向のHA膜を作り分ける手法を新たに開発し、その結晶成長メカニズムも明らかにした。ここで得られた配向制御膜を用いて、酸性タンパク・塩基性タンパクの選択的吸着が可能であることを示唆する結果が得られた。これを電気的に検出するため水晶振動子マイクロバランスセンサへの適用を試みたが、HAの結晶化に必要な熱処理に起因する歪により正常動作するには至らず、さらなる改良が必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：For high sensitivity and high resolution of chromatography chip and biosensor, orientation control technique of hydroxyapatite crystal film was established and the possibility of device application was investigated. We developed a crystal growth technique to separately obtain a-axis oriented and c-axis oriented films. We also revealed its crystal growth mechanism. It was suggested that the obtained a-/c- oriented film enables selective adsorption of acidic and basic proteins. In order to electrically detect the protein, the hydroxyapatite film was applied to the quartz crystal microbalance sensor, however, it did not show normal operation due to thermal distortion caused by heating process for crystallization of hydroxyapatite.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ハイドロキシアパタイト 結晶膜 配向制御 クロマトグラフィーチップ バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシアパタイト [HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] に代表されるリン酸カルシウム系セラミクスは、骨や歯の主成分であり、生体親和性、イオン交換性、電気的異方性などを有するため、歯科を含む医療分野において、外科用インプラント、骨補填材、歯磨材等に応用され、国内外で広く研究が行われてきた。これらの分野では多くの場合、HA は焼結したバルク体、粒子、ペーストなどの状態で用いられている。これに対し、我々は HA を薄膜化する技術、ならびに強固に密着するコーティング技術を独自に開発し、機械的強度等が要求される母材の諸特性を活かしつつ、表面のみに HA の生体親和性を付与できる、新しい歯科治療用素材、人工骨、バイオセンサ等の提案を行ってきた。

一方、HA はタンパク質の分離・精製(クロマトグラフィー: ChGr)にも古くから用いられてきた歴史がある。様々な種類の ChGr の中で、アパタイト ChGr (HA, ChGr) は他の方法では分離が困難なタンパク質を扱えるため、特に、抗体、DNA、ウイルス、アイソザイムなどの分離に現在でも多く利用され、免疫治療、再生医療、新薬開発等の最先端を支えるプロテオーム解析においては不可欠の手法となっている。この HA, ChGr の特殊性は、六方晶の結晶構造を有する HA の電気的異方性によってもたらされるものであり、正に帯電した a 面、負に帯電した c 面それぞれに、カルボキシル基(-COOH)を持つ酸性タンパクと、アミノ基(-NH₂⁺)を持つ塩基性タンパクが選択的に吸着する原理に基づいている。

従来、人工的に作られる HA セラミクスは、nm ~ μm オーダーの寸法を持つ結晶粒、もしくは非晶質粒子の集合体であり、バルク体として使用する場合にはこれらを焼結したものが多く用いられてきた。六角板状結晶、針状結晶、球状結晶等が報告されており、いずれの場合も結晶粒ごとに見た場合には a 面、c 面を有するが、マクロ的には、a, c 面が混在した状態として使用されているのが現状である。我々は a 面のみ、および c 面のみからなる平滑で広い表面を持った HA 薄膜を作り分けることができれば、タンパク質の分離効率を飛躍的に向上することができ、超微量しか採取できない検体に対しても目的のタンパク質を取り出すことができる ChGr チップや、高感度バイオセンサ等が実現可能であると考え、a, c 配向制御 HA 膜作製法の開発を着想するに至った。

電子工学的観点から考えた場合には、「薄膜」という形状と製造方法はマイクロチップ化、エレクトロニクス化と相性が良く、将来、新たなアプリケーションを提供できることが予想される。従来の HA, ChGr は、HA 粒子が充填された円筒状のカラムを用い、熟練した化学的技法を必要とするものであったが、これをオンチップの電子的な分析方法へ

と発展させることができれば、極微量しか採取できない検体の分析や、分析時間の劇的な短縮等の高性能化が可能になる。また、相互に選択的結合で成り立つ抗原 - 抗体反応の動的な吸着/脱離を、リアルタイムでセンシングするデバイス等への応用にも期待できる。さらに、吸着効率の向上は、従来、感度が不十分で検出できなかった、分子量の小さいタンパク質のセンシングにも有用であると考えられる。そのほか、生体内で c 面配向しているエナメル質(歯質)や、a 面配向している骨などの表面現象に関する生化学的研究、硬組織形成メカニズムの解明、組織再生技術開発などにも活用できる。

2. 研究の目的

ハイドロキシアパタイト(HA)薄膜の配向制御技術を確立することにより、クロマトグラフィーチップやバイオセンサ等に対し、超小型化、高感度化、高分解能化、極微量の検体検出、分析時間の短縮などを実現し、高機能な新デバイスを創出することを全体構想としているが、本研究では、まず「完全に a 面配向する HA 成膜法」を新たに開発し、既に開発済みの c 面配向 HA 成膜技術と組み合わせることにより、酸性タンパク・塩基性タンパクの選択的吸着/分離ができることを化学的・生物学的手法で確認を行う。さらに、その結果をバイオセンサに適用し、タンパク質の選択的吸着/分離を電気的手法でも検出可能であるかについても検討する。

3. 研究の方法

c 面配向 HA 薄膜作製にも用いてきた、Pulse Laser Deposition (PLD)法を活用し a 面配向 HA 薄膜作製を試みた。光源は、波長 248nm の KrF エキシマレーザー (COMPEX Pro 205、Coherent Co.) を用いた。エネルギー 130mJ、繰り返し周波数 5Hz のパルスレーザをレンズと窓を通して真空チャンバに導入し、ターゲット表面に焦点を合わせてアブレーションを行った。到達真空度を 4×10^{-4} Pa 以下にした後、水蒸気を含む酸素ガスを雰囲気ガスとしてチャンバ内に導入し、圧力を 20Pa とした。アブレーション時のドロップレットを避ける目的で、基板表面をブルームに垂直な向きで成膜するオフアクシス法を用いて堆積を行った。膜の結晶性は、X 線回折 (XRD) の 2θ 法および、極点解析を用いて測定した。

次に、得られた a 面配向 HA 膜、および c 面配向 HA 膜に対し、酸性タンパク、塩基性タンパクが選択的吸着することを実験的に確認する。ここでは、予め異なる色で蛍光染色した自明なタンパクを混合した溶液を準備し、a, c 面配向 HA 膜に滴下した後、一定時間経過したものを洗浄し蛍光顕微鏡にて観察する。

次の段階では、配向制御膜をバイオセンサ表面に作製し、上記のタンパク質吸着現象を電気的な信号として検出可能であることを

確認する。用いるセンサは取り扱いが容易な市販の水晶振動子マイクロバランス(QCM)センサを用いる。

4. 研究成果

(1) 完全な a 面配向 HA 薄膜作製法の確立

従来の研究で c 面配向膜は六方晶の単結晶基板や一軸結晶性バッファ層上にエピタキシャル成長させることで得られているため、同様な類推から、まずは直交格子単結晶基板に対する a 面配向 HA 膜のヘテロエピタキシーの可能性について検討を行った。HA の単位格子は、図 1(a)のように示され、a 面配向膜を形成するための単位格子の寸法は $0.6877\text{nm} \times 1.6311\text{nm}$ である。これに適応する格子を準備することは容易ではないので、まずは直交格子を有する $\text{MgO}(100)$ 、 $\text{SrTiO}_3(100)$ 、R 面 Al_2O_3 で a 面配向する兆候が見られ、エピタキシーの可能性があるかの検討を行った。その結果、全ての場合において、(300)ピークは現れたが、回折強度は極めて小さく、さらに、(012)、(212) および (222) 面や $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ などのグレインからなる膜が得られた。この結果から完全な a 面配向膜をエピタキシーで得ることは容易でないと結論付けた。

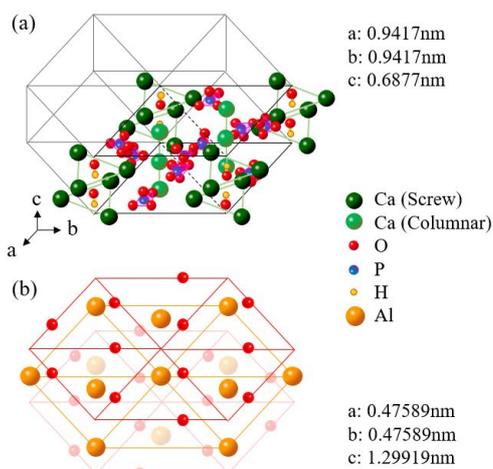


図 1. 結晶構造. (a)HA, (b) Al_2O_3

これに対し、バイオセンサ作製を想定した別の実験として、 ZnO バッファを使用せずに Au 上で直接 c 面配向 HA 膜を成長できるかを調べることを試みた。これまでに用いた Au 膜は、基板によらず(111)配向の三角格子を形成していることから、六方晶 HA の c 面配向との相性は比較的良好と考えられたためである。しかし、実験結果は予想に反し一軸配向の a 面配向膜が得られた。図 2(a)は、すでに開発済みの c 面配向膜、図 2(b)は今回 a 面配向した基板温度 680°C の場合の HA 膜の XRD パターンである。ヒータ温度を 840°C から 560°C まで変化させたとき、 760°C および 840°C では小さな(211)ピークが現れたが、それ以外のいずれの試料でも完全な a 面配向を示していた。

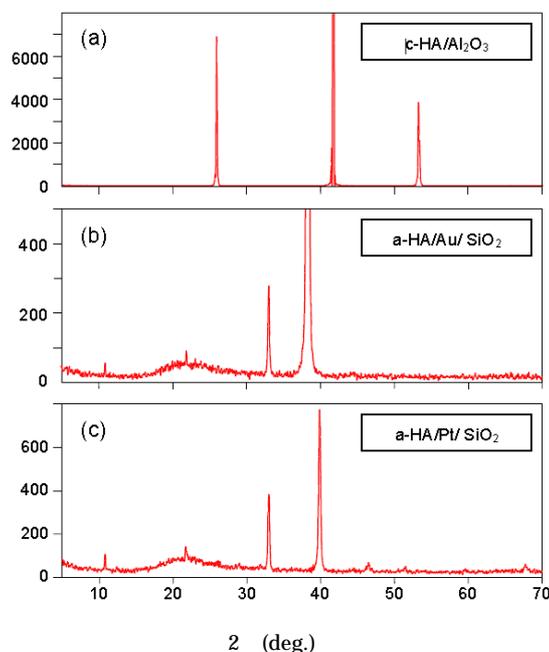


図 2 HA 配向制御膜の XRD. (a)単結晶 Al_2O_3 上の c 面配向 HA, (b)Au 上の a 面配向 HA, (c)Pt 上の a 面配向 HA

(2) a, c 配向制御膜の結晶成長メカニズム (2-1) 極点解析による HA の基板面内配向の検討

上記(1)のように、実験的には a, c 面配向膜を作り分けることができ製造技術としては確立することができたが、その結晶成長メカニズムを明らかにすることも学術的な観点から重要である。そこで、XRD 極点解析により結晶方位の基板面内配向に関する情報を得ることを試みた。以下、回折角 θ に対し、基板面内の回転角を ϕ とする。図 3(a1)および (b1)は、 $\text{Al}_2\text{O}_3(001)$ 単結晶上に成膜した c 面配向 HA 膜の スキャンの結果を示す。単結晶基板の面内方位は $\text{Al}_2\text{O}_3(104)$ 面を測定することで求めた。これが、図 3(b1)のように 3 回対称性を持った典型的なコランダム構造を示したのに対し、HA(112)面は図 3(a1)のように 6 回対称性を示し、六方晶の HA 膜の面内配向も膜内で均一であることを示した。図 3(a2)および(b2)の青色および黄色のベクトルは、HA(112)面および $\text{Al}_2\text{O}_3(104)$ 面の法線ベクトルの基板表面への投影を表す。図(a1), (b1)の関係から、c 面配向 HA が当初の予想通りエピタキシャル成長したことを示している。ところが、HA と Al_2O_3 の面内配向の実際の関係は想定していた結果と異なっていた。計画段階では、HA と Al_2O_3 の格子定数の整合性から図 3(c1)のように、基板と HA の六角格子の a 軸の向きは一致すると考えていたが、スキャンの実験結果は、図 3(c2)のように各 a 軸の向きが 30° 回転していることを意味していた。

一方、Au 膜上の a 面配向 HA 膜の極点図はピークのないリング状のパターンを示し、面内には配向しておらず、エピタキシャル成長とは異なる成長過程をとっていることが明らかとなった。

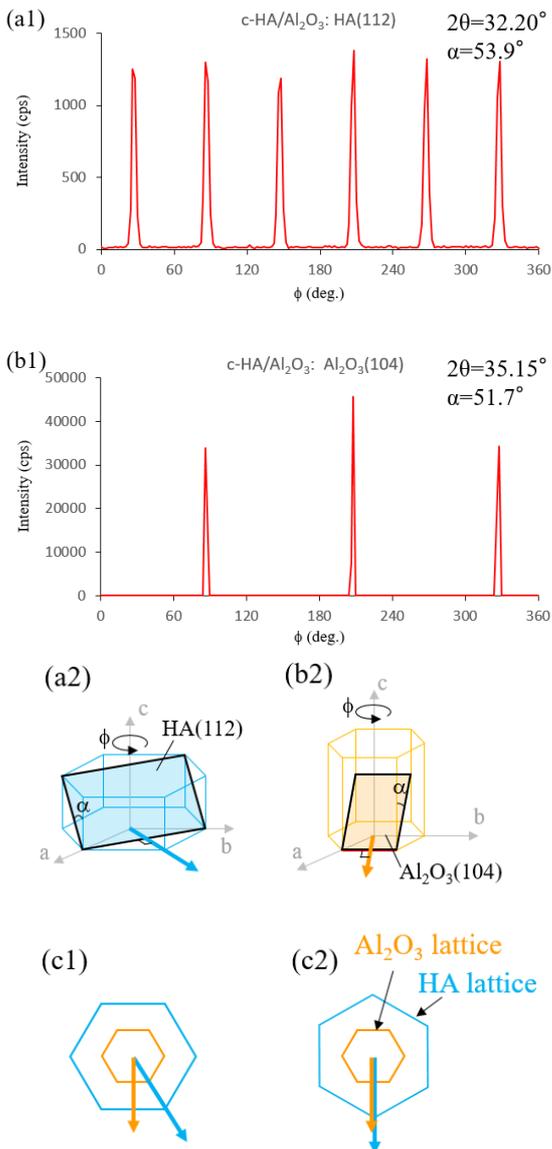


図 3. X 線極点解析 スキャンの結果. (a1) 単結晶 Al_2O_3 上の c 面配向 HA(112)面のピーク, (b1) 単結晶 Al_2O_3 の(104)面のピーク, (a2) HA(112)面の法線ベクトルの基板表面への投影, (b2) Al_2O_3 の(104)面の法線ベクトルの基板表面への投影, (c1) HA と Al_2O_3 の a 軸方位が一致する場合, (c2) HA と Al_2O_3 の a 軸方位が 30° 回転する場合

(2-2) c 面配向 HA 膜の成長メカニズム

上記(2-1)のような面内配向を取った理由について考察するため、HA 膜と基板界面での原子配列についてコンピュータによる計算を用いて検討を行った。図 4(a)と図 4(b)は、HA と Al_2O_3 の a 軸が一致するとき、2つの軸が互いに 30° 回転したときのそれぞれの場合について計算し、コンピュータでプロッ

トした格子点を示している。黄色と青色の点は、それぞれ Al_2O_3 と HA の六方格子の頂点を示す。図 4(a)が比較的良好な一致を示していることは、両者の格子整合性から予想したとおりであり、(b)に短周期で一致する格子点は殆ど見られず、スキャンの結果にこれらが反することは直感的には奇妙に感じられる。そこで、単位格子の頂点ではなく、 Al_2O_3 と HA との界面で結合に参与する原子配列に着目し再検討した。 Al_2O_3 表面が酸素原子で終端されていると仮定すると、酸素と結合する可能性が最も高いのは Ca である。図 1(a)の HA の単位格子を見ると、底面内に columnar-Ca サイトに位置する Ca の六角格子が存在する。一方、 Al_2O_3 の 0 層の原子は図 1(b)のように三角格子を形成している。これを踏まえてそれぞれの関係を再度コンピュータでプロットしたものが、図 4(c), (d)である。図 4(c)は図 4(a)に対応し、回転角が 0° であることを意味する。図 4(d)は、この columnar-Ca と 0 が図 3 の スキャンの結果を満たす 30° 回転した方向にプロットした場合を示す。図 4(d)では 0 と Ca が一致する点は非常に少ないが、巨視的に秩序化したエネルギーの低い状態であることを示唆している。一方、図 4(c)の 10.61%の格子不整合は、長周期の格子不整合をもたらしている。六角格子は図の中心付近でよく一致して見えるが、図 4 の端に近づくにつれずれが生じてくるのがわかる。つまり、図 4(d)の HA 膜の膜全体の格子歪みは図 4(c)のそれよりも小さくなることを実験結果が示している。(c), (d)を俯瞰的に見ると、前者は中心部が凸の球面状のモアレ模様が浮かび上がって見えるのに対し、後者は平面的に規則正しく織り込んだ繊維模様のように見える。つまり、前者はこのモアレ模様に対応した放射状の応力を有したひずみが基板と膜の界面に存在していることを読み取ることができる。

この成長プロセスを結晶学的分類と照らし合わせれば、基板と膜材料との間の結合が強い Frank-van der Merer 型に対応させることができる。このモデルでは、基板面に対し垂直成長速度が速いため、第 1 層の形成後に優先的な c 面配向が生じる実験結果と一致する。

(2-3) a 面配向 HA 膜の成長メカニズム

a 面配向膜について実験を繰り返す中で、HA 膜形成前後における Au 膜の光沢度の変化から、HA の膜形成中に真空チャンバ内で Au が液化していることに気づいた。Au の融点は大気圧で 1063 であるが、真空中では低下したと考えられる。これが正しいことを確認するため、HA 膜形成と同一条件下で 5 時間加熱したときの Au 膜厚の減少を調べた。(図 5) この結果、ヒータ温度が 300 であっても膜厚が減少し、Au が蒸発していることがわかった。すなわち、Au は HA 膜形成中は液状であり、さらにイオン化傾向が小さい材料であるため、HA の構成元素と結合せず、それぞれ独

立に存在しようとする。Au 上で何の制限もなくマイグレーションし、表面張力により Au と HA との接触面が最小になるように凝集体を形成する。つまり、液-液界面における表面エネルギーを最小にする結晶方位が六方晶の側面で Au に接触する a 面配向であったと考えられる。

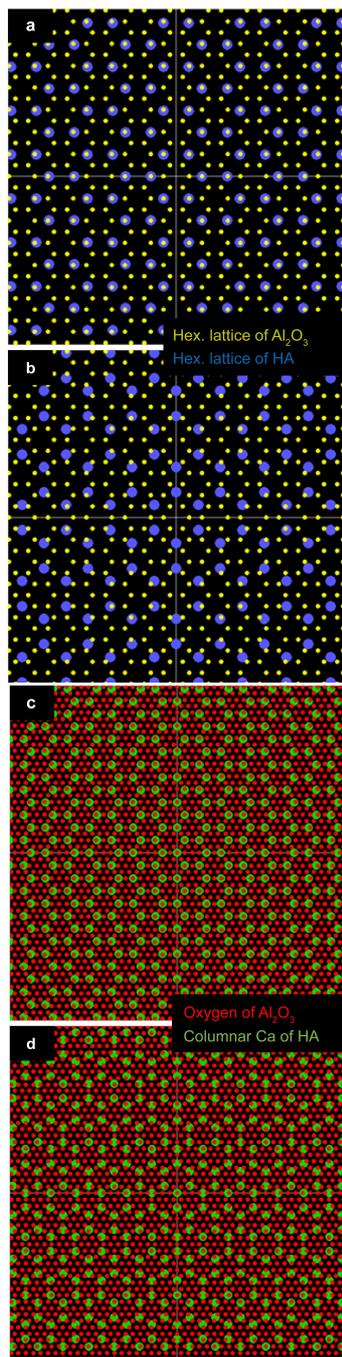


図4 HA と Al_2O_3 界面での格子配列の関係. (a) HA と Al_2O_3 が回転 0° の場合を単位格子点でプロット, (b)同 30° の回転の場合, (c) HA と Al_2O_3 が回転 0° の場合を O と Ca でプロット, (d)同 30° の回転の場合

我々は、Au の代わりに Pt 膜上で a 面 HA 膜を成長させることによって、この仮説の妥当性について検証を行った。Pt は Au の次にイオン化傾向の低い金属元素であり、Au の場合

と同様な現象がみられれば、上述の仮定がほぼ妥当であることを示すことができる。その結果を図 2(c) に示す。(n00) に由来するピークのみが観察され、上述の成長モデルがほぼ正しいことが確認できた。

この成長プロセスを結晶学的に分類すれば Volmer-Weber 型に相当すると考えられる。この場合、基板と膜材料との結合は極めて弱く、基板面内方向の成長速度が速くなるため、a 面配向 HA 膜となる実験結果と良い一致を示す。

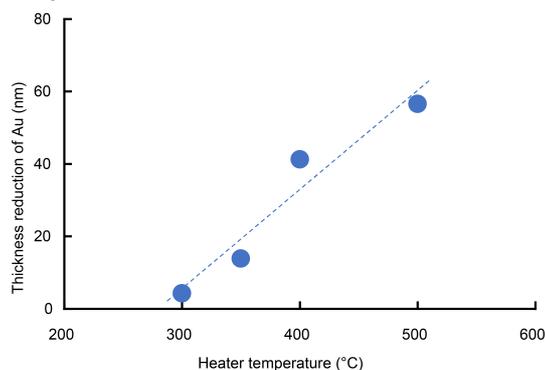


図5 .真空中で5時間加熱したときのAu膜厚の減少

(3) 配向制御 HA へのタンパク質選択吸着

作製した a 面、c 面に配向制御した HA 薄膜を用いて、タンパク質吸着の実験を行った。酸性タンパク質はアルブミン、塩基性タンパク質はリゾチームを使用した。タンパク質の検出を容易にするため、予めアルブミンとリゾチームに、赤と緑の蛍光標識をそれぞれ修飾したものをを用いた。a 面、c 面配向 HA 薄膜をそれぞれのタンパク質を溶解させたリン酸緩衝液に 30 分間浸漬させた後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、想定していたような明確な吸着量の差は確認できなかったが、蛍光色素の濃淡の差から a 面にはアルブミンが多く吸着し、c 面にはリゾチームが多く吸着する傾向がみられた。タンパク質分離吸着が明確でなかった原因については次のように考察した。1 つ目の可能性として、HA 膜の表面が十分平滑でなかったことが原因で、凸部の側面に表面と a/c 逆の方位面が露出してしまい、そこに相対するタンパク質が吸着したことで、結果的に酸性、塩基性両方のタンパク質がいずれの膜にも観測されたと考えられる。2 つ目の可能性としては、今回用いた膜が XRD では検出されないアモルファス領域を含んでいた可能性がある。それらにタンパク質が吸着したことが選択性を著しく低下させた可能性も考えられる。今後、HA 膜の平滑化や、高結晶化を進めた上で再検討する必要がある。

(4) QCM センサを用いたタンパク質の検出

上記(3)で、蛍光染色したタンパク質を顕微鏡で観察することにより、配向制御 HA に分離吸着する傾向にあることが示されたが、

センサとして電氣的に検出できるかを調べるため、水晶振動子マイクロバランス(QCM)センサを例として実験を行った。QCM センサを用いた理由は、本課題の予備実験としてアモルファス HA を用いて、その検出感度向上が確認できているため、それとの比較ができるからである。しかし今回、配向制御 HA を市販の水晶振動子上に形成し動作確認を行ったところ、安定した共振状態が得られず、タンパクの分離吸着までを確認するには至れなかった。その理由として、HA を結晶化させる際の熱処理により、HA 結晶膜が膨張・収縮し、極めて薄い(数 $10\mu\text{m}$)水晶振動子に反りが生じ、共振状態に影響したためであると考へた。これを確認するため、光テコを用いて水晶振動子の反りの測定を行った。図 6 のように入射角度、位置を固定したレーザー光に対し、X-Y ステージを設け、その上に置いた QCM センサの直径方向に 0.5mm 間隔で測定を行った。

HA の膜厚 d が 100nm と 200nm の場合のセンサ歪みの測定結果を 2 次関数でフィッティングした結果が図 6 のようになり、HA 膜が厚い方が水晶板の反りが増大しており、予想通り HA 結晶膜によるひずみが影響していることが読み取られた。そこで、HA 膜にスリット加工を施すことにより応力が緩和できるかを調べた。フォトレジストをマスクとしてメッシュパターンに HA 膜をエッチングし、加工前後の歪みを上記と同様な方法で比較した。その結果、加工による緩和は殆ど認められなかった。今回の実験では、スリットの幅が $0.5\mu\text{m}$ に対し、ドットの 1 辺が $3.8\mu\text{m}$ で加工を行ったため、膜の面積が歪みを緩和するには十分小さな寸法になっていない可能性が考へられる。今後、スリットとドットの寸法を最適化することで改善できる可能性があると思へられる。

一方、今回は実験の簡便性と先行研究との比較を期待して QCM を用いた実験を行ったが、これは HA 結晶膜の歪の影響を最も大きく受ける構造でもあることが明らかとなった。今後は、表面プラズモン型センサなど基板が十分厚く、歪の影響を受けない動作原理のバイオセンサに適用することが好ましいと思へられる。

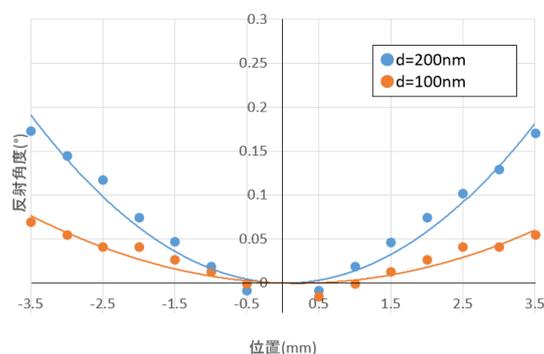


図 6 . HA の膜厚が異なる場合の振動子の反りの違い

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Naoki Fujita, Takayuki Makino, Yasuhiro Sakoishi, Katsuya Asano and Masanobu Kusunoki, " Pulsed laser deposition of pure fluoroapatite film without OH groups ", Crystal Research and Technology, Vol. 51, p. 215 (2016).

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 岡田悠希, 楠正暢, " c 面配向ハイドロキシアパタイトの結晶性に対するフッ化アパタイトバッファ膜質依存性 ", 日本バイオマテリアル学会大会 (2017.11.20, 東京都江戸川区, タワーホール船堀).
2. 岡田悠希, 楠正暢, " アモルファス基板への c 面配向ハイドロキシアパタイト膜作製方法の検討 ", 日本セラミックス協会第 30 回秋季シンポジウム (2017.9.19, 神戸市, 神戸大学).
3. 常峰知也, 岡田悠希, 楠正暢, " c 面配向ハイドロキシアパタイト結晶膜の低温成長に関する検討 ", 生体医工学シンポジウム (2016.9.17, 旭川市, 旭川市大雪クリスタルホール国際会議場).
4. 常峰知也, 岡田悠希, 楠正暢, " 配向制御ハイドロキシアパタイト結晶膜の低温成長に関する検討 ", 日本セラミックス協会第 29 回秋季シンポジウム (2016.9.8, 東広島市, 広島大学).
5. 田村将一, 常峰知也, 岡田和真, 柿添海登, 楠正暢, 速水尚, " チタンスパッタ膜を用いたハイブリッド人工骨の開発 ", 日本真空学会第 148 回定例研究会 (2016.6.1, 大阪市, 近畿大学会館).
6. 牧野隆之, 常峰知也, 楠正暢, " フッ素濃度と結晶性にグラデーション構造を有するアパタイトシート作製法の検討 ", 生体医工学シンポジウム (2015.9.26, 岡山市, 岡山国際交流センター).
7. 常峰知也, 牧野隆之, 楠正暢, 速水尚, " チタン/プラスチックハイブリッド人工骨への応用を目的としたチタン薄膜の内部応力に関する研究 ", 生体医工学シンポジウム (2015.9.26, 岡山市, 岡山国際交流センター).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

楠 正暢 (KUSUNOKI, Masanobu)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号: 20282238

(2) 研究分担者

岡井 大祐 (OKAI, Daisuke)
兵庫県立大学大学院・工学研究科・助教
研究者番号: 60336831