

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月 2日現在

機関番号：34310
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23560104
研究課題名 (和文) 新規無鉛圧電材料 MgSiO_3 を用いた電荷刺激誘発型骨再生スキャホールドの開発
研究課題名 (英文) Development of Piezoelectric Scaffold using Lead-Free Piezoelectric Material MgSiO_3 for bone regeneration
研究代表者
片山 傅生 (KATAYAMA, Tsutao)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：70161065
交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要 (和文)：

新規無鉛圧電材料 MgSiO_3 (MSO) による骨再生用スキャホールドの開発を目指し、MSO 薄膜の創製技術開発を行った。RF マグネトロンスパッタ法により Si 基板上に成膜した 1,2,3 層の MgSiO_3 薄膜の結晶方位は X 線回折によりいずれも (111) 方位であることが確認され、全ての試験片の圧電定数は約 100 pm/V であった。自然分極により MgSiO_3 薄膜には表面電位が誘起され、その値は積層数が増えるほど低下した。MSO 薄膜に繰り返し 4 点曲げを与えながら薄膜上で細胞培養が行える培養装置を作製した。MSO 薄膜表面には繰り返し曲げ負荷周期に応じて両振りの電位が誘起され、電位のピーク値は積層数が増えるほど上昇した。したがって、創製した MSO 薄膜は骨形成を促進するコーティングに適していることが示唆された。

圧電材料の圧電効果による骨形成への影響を検討するため、繰り返し圧縮変形を負荷した BaTiO_3 (BTO) 基材上で骨芽細胞様細胞を培養した。試験片として、分極処理した polarized BTO および分極処理しない non-polarized BTO を準備した。自然分極による表面電位には分極の有無による違いはなく、polarized BTO 表面には繰り返し圧縮変形に応じて両振りの電位が誘起された。変形を与えた polarized BTO 上で培養した場合の ALP 活性がもっとも高くなった。一方、変形を与えない場合は ALP 活性に分極の有無の影響は見られなかった。これより、繰り返し圧縮変形に伴う polarized BTO の表面電位が骨芽細胞様細胞の骨分化を促進することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

MgSiO_3 (MSO) thin film was fabricated by RF magnetron sputtering to develop new scaffold to accelerate bone formation. Single-layer, double-layer and triple-layer MSO thin film were fabricated on Cu/Ti/Si (100) substrate by RF magnetron sputtering. According to X-ray diffraction analysis, crystal growth along (111) orientation was confirmed for all MSO thin films. The surface potential was induced due to spontaneous polarization, and it decreased with increasing the number of layer. The culture system was developed to culture bone cells on the MSO thin film with 4-point cyclic bending deformation. Alternative sinusoidal waveform of the electric potential was observed for all MSO thin films, when pulsating cyclic bending deformation was applied to the MSO thin film by 4-point cyclic bending deformation. The peak value increased with the number of layer. These results showed that generated MSO (111) thin film can be used as coating material to enhance bone formation.

In order to investigate the effects of cyclic surface potential of BaTiO_3 (BTO) induced with its deformation on osteogenic differentiation of osteoblast-like cells *in vitro*, osteoblast-like cells were cultured on BTO with or without compressive deformation. Polarized BTO and non-polarized BTO were prepared as specimen. Cyclic compressive load was applied to the BTO by a fatigue testing machine. The surface potential of polarized BTO due to spontaneous polarization was almost same as that of non-polarized BTO. Alternative sinusoidal waveform of the surface potential was observed on the BTO with frequency of deformation. ALP activity of osteoblast-like cells cultured on polarized BTO with compressive deformation was highest, whereas there were no significant differences in ALP activity of osteoblast-like cells cultured on polarized BTO and non-polarized BTO without compressive deformation. These results showed that the surface potential induced on piezoelectric material surface with deformation enhanced osteogenic differentiation.

研究分野： 工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械材料・材料力学

キーワード： ①薄膜創製②シリコン酸バリウム③チタン酸バリウム④骨再生⑤スキャホールド

1. 研究開始当初の背景

現在、関節疾患や骨折等の骨損傷に対し広く使用される人工関節材料や骨代替材の生体骨との早期かつ強固な接合を促進させる表面形態や表面処理の開発が進んでいる。しかし、患者の QOL の早期回復や医療費軽減の視点より患者の早期社会復帰を考えると、生体骨－生体材料間での骨再生をさらに短縮させるという現実的な要求がある。したがって、生体骨に移植する骨組織再生用足場（スキャホールド）に対する新規の開発要求は非常に高い。これらのスキャホールド開発における主要課題のひとつは、界面での骨形成を促進するよう生体内から供給される骨髄細胞のスキャホールド表面への生着および骨芽細胞への分化の促進といった再生促進機能を有するスキャホールドの開発にある。一般に、生体骨は圧電特性を有しており、骨の変形に伴う圧電効果により骨芽細胞活性の調整や骨のリモデリングが行なわれていることが知られている。これらより、圧電特性を有する PLA や分極処理したハイドロキシアパタイト(HAp)を用いたスキャホールドの試作と *in vitro* 実験による細胞再構成運動の実験観察は数多く見受けられる。しかし、PLA は剛性の低い材料であるため、荷重支持部への移植は困難であり、HAp の混合は骨芽細胞の密着性を良くする生体活性効果を狙ったものであるが、能動的な骨細胞増殖を狙ったものではない。また、HAp もしくは HAp・BaTiO₃ 複合材に分極処理を施し、表面電荷の効果による生体骨との接着促進が試みられているが、材料の圧電特性を利用して日常運動に伴うスキャホールドからの動的な刺激負荷による周囲の骨細胞の活性化を狙ったものではない。圧電定数の高い圧電セラミクスとして PZT が挙げられるが、PZT は鉛を含み生体材料としては適さない。我々はこれまでに生体適合圧電材料としてペロブスカイト型正方晶構造を持つ MgSiO₃ 単層極薄膜の創製に成功し、現在広く使用されている有鉛圧電材料 PZT に匹敵する圧電特性を得た。本研究では、骨が圧電特性を有する材料である点に着目し、患部における骨再生機能を模倣するためには、この電気力学特性を採用することが必要であり、圧電薄膜とチタン合金の積層による人工スキャホールドを用いることで生体模倣の骨組織再生システムが完成すると考える。

2. 研究の目的

本研究は、人工関節や骨代替材移植後に、生体骨－材料界面における骨再生を促進す

るための電荷刺激誘発型新規スキャホールドの開発を目指す。

本研究では、MEMS 技術により開発した生体適合圧電材料としてペロブスカイト型正方晶構造を持つ新規無鉛圧電材料 MgSiO₃ をシリコン基材表面に積層成膜することで、骨細胞活性を促進する 3 次元構造スキャホールドの創製技術開発を行う。

また、BaTiO₃ を用いて繰り返し変形により圧電材料表面に誘起された電位が骨芽細胞様細胞の骨形成に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 骨形成促進のための圧電材料 MgSiO₃ 薄膜の創製技術の開発

試験片として、RF マグネトロンスパッタリング装置を用いて、Si (100) 基板 (20×36×0.3 mm) にバッファ層として創製した Cu/Ti 層上に (111) 方位の 1 層の MSO 薄膜 (MSO1)、2 層の MSO 薄膜 (MSO2) および 3 層の MSO 薄膜 (MSO3) を創製した。MSO 薄膜の創製後、X 線回折装置による結晶構造解析、原子間力顕微鏡による圧電定数測定、および α -step IQ による膜厚測定を行った。また、MSO 薄膜の自然分極による表面電位を走査型プローブ顕微鏡を用いて測定した。測定部位は MSO 薄膜と Si 基板境界部であり、Si 基板表面を基準として電位を測定した。

本研究では、MSO 薄膜に繰り返し変形を与えながら薄膜上で細胞培養が行える培養装置を作製した (図 1)。

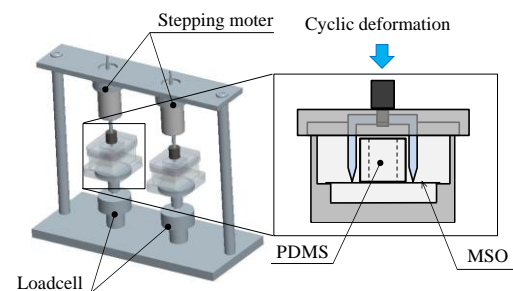


図 1 培養装置概略図

培養装置に設置した MSO 薄膜に 4 点曲げにより繰り返し圧縮ひずみを与えながら細胞培養が行える構造となっている。本装置により MSO 薄膜表面に誘起される電位を測定した。MSO 薄膜表面に新たに創製した Cu 膜を上部電極とし、バッファ層の Cu 膜を下部電極とした。1 Hz の周期で押込み量 0.04 mm の繰り返し曲げを MSO 薄膜に与え、MSO 薄膜表面に誘起された電位をオシロスコープに

より測定した。

(2) 繰り返し圧縮変形により誘起される圧電材料 BaTiO₃ の表面電位が骨芽細胞様細胞の骨形成に及ぼす影響

Polarized BTO および non-polarized BTO を用意した。BTO のサイズは、10 mm×20 mm×1 mm とした。それぞれの BTO を自作の培養 dish に固定し、図 2 に示す培養装置に設置した。油圧サーボ式横型疲労試験機により正弦波 1 Hz で、圧縮ひずみのピーク値が 65 με となるように BTO に繰り返し圧縮荷重を与えた。繰り返し圧縮変形に伴う BTO の表面電位を、表面電位計 (541A-2, トレック社) を用いて測定した。また、走査型プローブ顕微鏡 (SPM-9700, SHIMADZU) を用いて、自発分極による BTO の表面電位を、BTO 底面を基準として測定した。

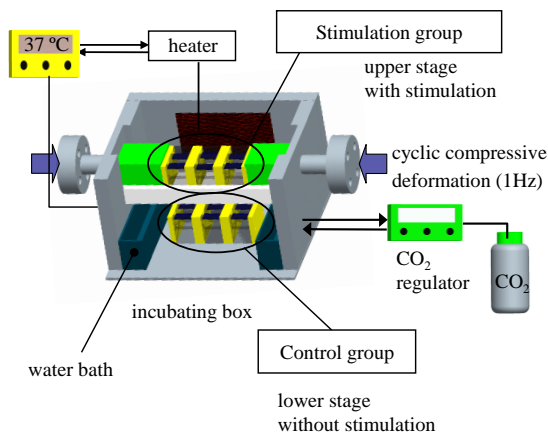


図 2 培養器の概略図

BTO 上に細胞密度 1.0×10^4 cells/cm² で MC3T3-E1 細胞 (骨芽細胞様細胞) を播種した。培養液には、10% 牛胎児血清および抗生物質を含む α-MEM を用いた。圧縮変形を与えた BTO および圧縮変形を与えていない BTO 上で骨芽細胞様細胞を 6, 9 および 12 日間培養した後、Alkaline Phosphatase (ALP) 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 骨形成促進のための圧電材料 MgSiO₃ 薄膜の創製技術の開発

各試験片の結晶構造を解析した結果、図 3 に示すように回折角 45.1°付近に回折強度のピークが確認され、いずれの MSO 薄膜にも (111) 方位への結晶成長が確認された。圧電定数を測定した結果、いずれの試験片も 100 pm/V 程度の圧電定数が得られ、ほぼ同じ値を示した。膜厚を測定した結果、1 層の厚さは約 600 nm あり、積層数におおむね比例して膜厚は増加した。

MSO2 薄膜の自然分極による表面電位の分

布を図 4 に示す。図は MSO 薄膜と Si 基板の境界での膜厚形状を示すとともに、表面のカラー分布が表面電位を示している。Si 基板に対する MSO1, MSO2 および MSO3 の表面電位はそれぞれ 1.25V, 0.65V および 0.23V であった。これは MSO 薄膜が強誘電体であるために、自発分極による表面電位が生じたと考えられる。

繰り返し変形を与えた MSO 薄膜の上下電極間に生じた電位を測定した結果を図 5 に示す。繰り返し変形の負荷周期に応じて MSO1, MSO2 および MSO3 の薄膜には、それぞれ ±2.37 mV, ±2.82 mV および ±3.22 mV の両振りの電位が誘起された。そのため、本研究で創製した MSO 薄膜は骨形成を促進するコーティングに適していることが示唆された。

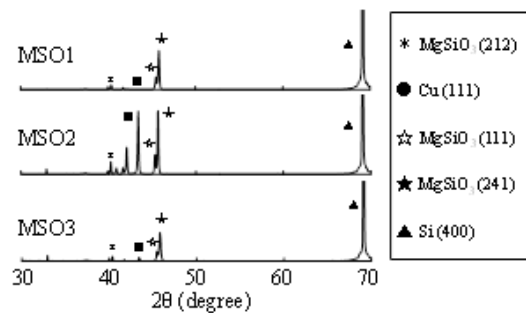


図 3 MSO 薄膜の XRD 解析結果

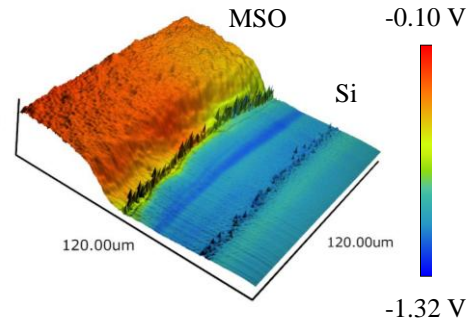


図 4 自然分極による MSO2 の表面電位

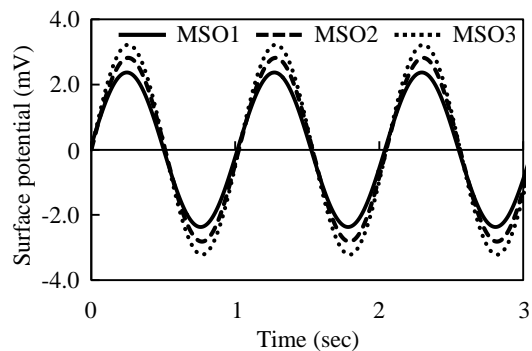


図 5 変形により MSO に誘起された電位

(2) 繰り返し圧縮変形により誘起される圧電材料 BaTiO₃ の表面電位が骨芽細胞様細胞の骨形成に及ぼす影響

図 6 に示すように、Polarized BTO および non-polarized BTO の自発分極による表面電位はそれぞれ -1.54 および -1.44 V であり、変形を与えていない両者の表面電位はほぼ同じであった。

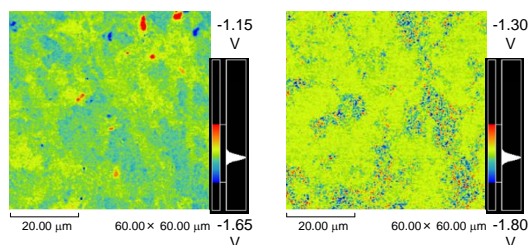


図 6 自然分極による BTO 表面電位

繰り返し圧縮変形に伴う polarized BTO の表面電位は負荷周期に応じた正弦波の波形を示し、その最大値および最小値は 16.2 V および -17.8 V であった。一方、non-polarized BTO の表面電位も負荷周期に応じた正弦波の波形を示したものの、その最大値および最小値は 1.82 V および -2.17 V と polarized BTO の値と比べて非常に小さい値であった。

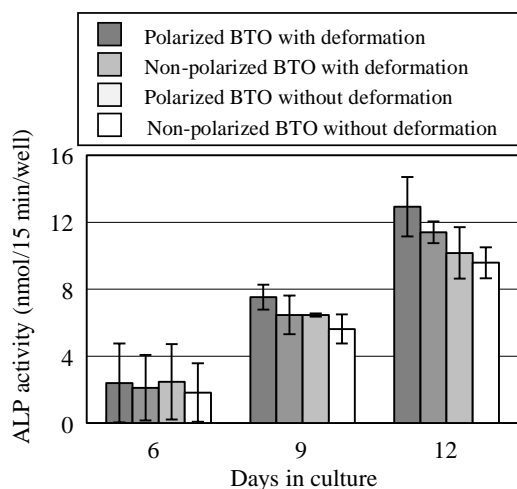


図 7 生化学分析

図 7 に ALP 活性の測定結果を示す。変形を与えない場合は、ALP 活性に分極の有無の影響は見られなかった。培養 9 日目以降において、変形を与えた polarized BTO 上で培養した場合の ALP 活性がもっとも高くなった。変形を与えた non-polarized BTO 上で培養した場合の ALP 活性も変形を与えなかった non-polarized BTO 上で培養した場合より高くなったが、変形を与えた polarized BTO 上で培養した場合の ALP 活性より低かった。このことから、繰り返し圧縮変形に伴う polarized

BTO の表面電位が骨芽細胞様細胞の骨分化を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 奥田裕加里, 森田有亮, 仲町英治, MgSiO₃ 圧電薄膜コーティングがラット骨髄細胞に与える影響, 平成 23 年度関西学生会学生員卒業研究発表講演会, 2012 年 3 月 15 日, 関西大学千里山キャンパス
- ② 加藤優喜, 森田有亮, 仲町英治, 繰り返し圧縮荷重下における圧電材料 BaTiO₃ がラット骨髄細胞に及ぼす影響, 平成 23 年度関西学生会学生員卒業研究発表講演会, 2012 年 3 月 15 日, 関西大学千里山キャンパス
- ③ 中崎真太郎, 森田有亮, 加藤優喜, 仲町英治, 圧電材料 MgSiO₃ の表面電位がラット骨髄細胞に及ぼす影響, 平成 24 年度日本機械学会関西学生会学生員卒業研究発表講演会, 2013 年 03 月 15 日, 大阪工業大学
- ④ 加藤優喜, 森田有亮, 仲町英治, 変形に伴う BaTiO₃ の表面電位がラット骨髄細胞の骨芽細胞への分化に及ぼす影響, 日本機械学会関西支部第 88 期定時総会講演会, 2013 年 03 月 17 日, 大阪工業大学
- ⑤ Yuki Kato, Yusuke Morita, Eiji Nakamachi, Effects of Surface Potential Induced by Cyclic Deformation of BaTiO₃ on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Cells, ESB 2013 - 25th European Conference on Biomaterials, Madrid, 2013
- ⑥ 加藤優喜, 森田有亮, 仲町英治, 片山傳生, 繰り返し圧縮変形により誘起される圧電材料 BaTiO₃ の表面電位が骨芽細胞様細胞の骨形成に及ぼす影響, 日本機械学会 関西支部第 89 期定時総会講演会, 2014 年 3 月 18 日, 大阪府立大学
- ⑦ 中崎真太郎, 森田有亮, 片山傳生, 仲町英治, 骨形成促進のための圧電材料 MgSiO₃ 薄膜の創製技術の開発, 日本機械学会 関西支部第 89 期定時総会講演会, 2014 年 3 月 18 日, 大阪府立大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 傅生 (KATAYAMA, Tsutao)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：70161065

(2) 研究分担者

森田 有亮 (MORITA, Yusuke)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：80368141

仲町 英治 (NAKAMACHI, Eiji)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：60099893

田中 和人 (TANAKA, Kazuto)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：50303855