

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420777

研究課題名(和文)フェムト秒レーザーを用いた新機能生体適合材料の創製

研究課題名(英文)Development of new functional biomaterials with femtosecond laser

研究代表者

塚本 雅裕 (TSUKAMOTO, MASAHIRO)

大阪大学・接合科学研究所・准教授

研究者番号：90273713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化チタン膜上に第2高調波のフェムト秒レーザーを照射すると基本波の17%を有するナノ周期構造を形成することができた。酸化チタン膜上において異なる周期を有するナノ周期構造で細胞培養試験を行い、最も細胞伸展制御しやすい周期について明らかにした。偏光制御によるチタンあるいは酸化チタン膜上の溝方向を局所的に制御することができた。当サンプル上において細胞培養試験を行い、空間的に細胞伸展を制御できることを示した。曲率半径を小さくして細胞の伸展が追従できる曲率について調べた。

研究成果の概要(英文)：Periodic nanostructures on TiO<sub>2</sub> film were formed using a femtosecond laser with wavelengths of 258 nm (third harmonics), 388 nm (second harmonics) and 775 nm (fundamental), respectively. When the TiO<sub>2</sub> film was irradiated with the femtosecond laser at 388 nm, the nanostructures with the period of 132 nm, 17% of the fundamental wavelength of the femtosecond laser, was produced. Influence of the periodicity of the nanostructures on cell spreading was investigated. By changing the direction of the grooves of the nanostructures, cell spreading could be controlled. Effect of the curvature radius of the nanostructures' grooves on cell spreading was also investigated.

研究分野：工学 材料工学 材料加工・組織制御工学 加工・熱処理 レーザー加工

キーワード：フェムト秒レーザー 酸化チタン膜 エアロゾルビーム 周期的微細構造 偏光制御 生体適合性 細胞試験

1. 研究開始当初の背景

細胞の伸展(細胞の定着および成長方向)制御技術開発が望まれている。これまでに、チタン材等の表面(足場)形状を変化させると細胞の定着性が向上することが示唆されている。細胞の伸展は、足場である溝の方向と間隔に依存していると考えられている。フェムト秒レーザーによってチタン材に微細構造を形成したところ、細胞の定着性向上に加え、細胞の伸展が溝方向によって制御できる可能性があることが示唆された。細胞の定着性向上に効果のある酸化チタン膜表面にフェムト秒レーザーを照射することによって周期的微細構造(溝)形成が可能であることがわかった。溝方向は、レーザーの偏光制御によって変えることができる。これらの結果を基にチタン材および酸化チタン膜にフェムト秒レーザーを集光及び集光位置を走査する際、レーザーの偏光方向を走査中に変化させることで、溝の方向を制御し、細胞の伸展を制御することができるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

チタンおよびチタン合金(チタン材)は、生体適合材料として使われているが、さらなる高機能化が望まれている。従来は、細胞のチタン材料への定着性が議論されてきたが、本研究では、フェムト秒レーザーで形成した微細構造(細胞の足場)による定着性の向上とともに細胞の伸展(細胞の成長する方向)の制御というチタン材への新機能付加技術開発を推進する。これにより、チタン材の生体適合材料としての応用範囲を広げる。具体的には、チタン材に加え、エアロゾルビーム成膜法によりチタン材表面にコーティングした『酸化チタン膜』にもフェムト秒レーザーを集光照射、偏光を制御することによって周期的微細構造の溝の方向を制御し、細胞の伸展を制御するための基礎技術開発を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 周期的微細構造形成のためのフェムト秒レーザー照射

チャープパルス増幅を行っているチタンサファイアフェムト秒レーザーシステム(Clark-MXR社製, CPA2110)を使用した。実験に用いたフェムト秒レーザーの波長, パルス幅および繰り返し周波数は, それぞれ 775 nm, 150 fs 及び 1 kHz である。1/2 波長板と偏光子で構成した減衰器によってレーザーエネルギーを調節した。レーザーエネルギーはレーザー光をミラーで導き, 焦点距離 80 mm の合成石英単レンズを用いて純チタン基板表面に集光照射した。基板表面上のレーザービームスポット径は 60 μm (レーザーピーク強度の 1/e<sup>2</sup>) を有する円形とした。実験では XY ステージを操作することで図 1 のように純チタン基板上の集光スポットを移動させ, 4mm のラインを掃引照射した。その際, フルーエンスは 0.04J/cm<sup>2</sup> から 1.4 J/cm<sup>2</sup> の範囲, 各フルー

エンスの条件においてステージのカバレッジは 20 から 700 の範囲で変化させた。

フェムト秒レーザーはパルスレーザーであるため, 掃引速度によって集光スポットあたりに重なるパルス数(カバレッジ)が変化する。ここでカバレッジを  $N$  [shots], 繰り返し周波数を  $x$  [Hz], レーザスポットの直径を  $y$  [m], 掃引速度を  $v$  [m/s] とするとカバレッジは次式で表される。

$$N = \frac{xy}{v} \quad (2.1)$$

レーザー照射後の試料は試料表面に堆積すると考えられるデブリ等を除去するためアセトンを用いた超音波洗浄を行なった。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて表面観察を行い, 周期的微細構造の形状および周期を測定した。

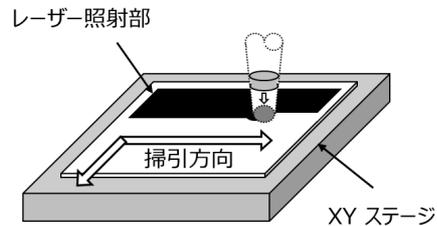


図 1 レーザ掃引照射概略図

上記の実験において周期的微細構造が形成できた条件のうちの1つを用いて環状周期的微細構造を形成した。その手法を以下に記す。フェムト秒レーザー照射実験装置概略図を図 2 (a)に示す。フェムト秒レーザーは上記の実験と同じものを用いている。実験では図 2 (b)に示すように回転ステージを操作することで純チタン基板上的集光スポットを移動させ円を掃引照射した。円の曲率半径 200 μm とし, 掃引速度 2.0mm, フルーエンスは 0.35J/cm<sup>2</sup> とした。このときのカバレッジは 30 である。レーザー照射後の試料はアセトンを用いた超音波洗浄を 3 分間行なった。図 3 に形成された環状周期的微細構造の SEM 観察像を示す。

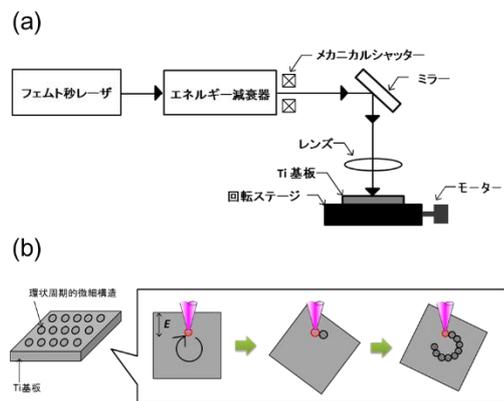


図 2 (a) フェムト秒レーザー照射実験装置概略図 (b) 環状周期的微細構造形成概略図

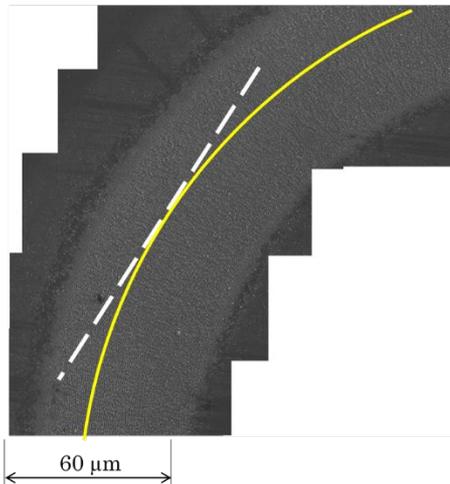


図 3 フェムト秒レーザー照射により形成された環状周期的微細構造の SEM 観察像

(2) 環状周期的微細構造による細胞伸展制御

次に、純チタン表面に形成したナノ周期構造上に骨芽細胞を用いて細胞培養試験を行い、表面の形状が細胞挙動に及ぼす影響を明らかにする。細胞培養試験では、細胞挙動の初期過程である細胞伸展方向を生体適合性の指標として細胞挙動の評価を行う。試料には溝の曲率半径が 300, 200, 100, 50 μm の 4 種類の環状周期的微細構造を用いた。細胞には、人工関節への応用を考え、ヒト骨芽細胞 (MG-63) を用いた。培養していた骨芽細胞をインキュベーター (培養器) から取り出し、クリーンベンチ内で、0.25 %トリプシン EDTA を用いてシャーレから細胞を剥がした。その後 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 一定としたインキュベーター内で約 5 分インキュベートした。インキュベート後は細胞が浮遊した状態になっていることを確認後、0.25 %トリプシン EDTA と同じ量の培養液を追加した。そこに洗浄済みの実験試料をいれ 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 一定としたインキュベーター内で 3 時間インキュベートを行なった。インキュベート後の細胞は 8 % のパラホルムアルデヒドとリン酸バッファーを用いて組織固定した。細胞試験後の試料は蛍光顕微鏡を用いて細胞の伸展方向について評価した。細胞伸展方向の角度は周期的微細構造の溝の接線方向 (x 軸) に対して垂直な方向 (y 軸) となす角を測定した。

=90° に環状ナノ周期構造の接線方向に溝を形成し、伸展の角度が 75° ~ 90° あるいは 90° ~ 135° のときナノ周期構造の溝方向に細胞が進展したと定義し、全細胞の内、ナノ周期構造に沿って伸展した細胞の割合を求めた。

4. 研究成果

細胞培養試験の結果を記す。図 4 に各曲率半径における細胞伸展方向の角度と細胞総数の割合をまとめたグラフ、図 5 に曲率半径

200 μm の環状周期的微細構造の蛍光顕微鏡像を示す。

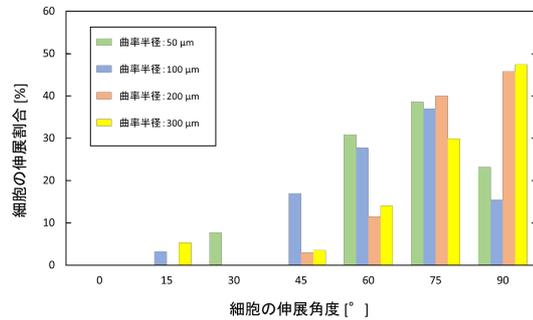


図 4 曲率半径 50~300 μm における細胞伸展方向の角度と細胞数の割合

図 5 より環状微細構造の溝に対する接線方向に細胞が伸展していることがわかる。また角度が 75° 以上のものは曲率半径 50, 100, 200, 300 μm のとき、それぞれ約 61, 52, 86, 77 % となり多くの細胞が溝の接線方向に伸展していることが観察された。特に、曲率半径が 200, 300 μm のときには、それぞれ 86 %, 77 % の細胞がそれぞれ溝の接線方向に伸展しており、細胞の伸展方向割合が曲率半径に依存することを示唆する結果を得た。

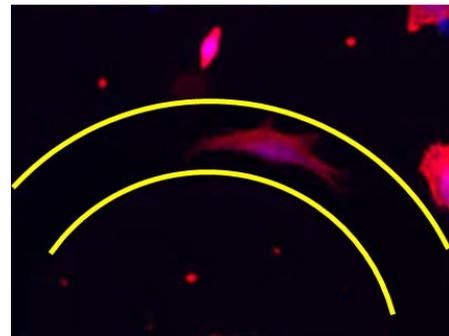


図 5 曲率半径 200 μm の環状周期的微細構造の蛍光顕微鏡観察像

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 9 件)

1. Yuji Sato, Masahiro Tsukamoto, Togo Shinonaga, Takuya Kawa、Femtosecond laser-induced periodic nanostructure creation on PET surface for controlling of cell spreading、Applied Physics A Materials Science & Processing、(2016)、査読有、Vol.122、184-189、DOI 10.1007/s00339-016-9716-4

2. M. Tsukamoto, T. Kawa, T. Shinonaga, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa、Cell spreading on titanium periodic nanostructures with periods of 200, 300 and 600 nm produced by femtosecond laser irradiation、Applied Physics A Materials Science & Processing、(2016)、査読有、Vol.122、120-123、DOI

- 10.1007/s00339-016-9626-5
3. 佐藤 雄二, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 原 一之, 河 拓弥, 笹木 隆一郎、細胞伸展制御のためのPETフィルム表面へのナノ周期構造の形成、レーザー学会誌、(2015)、査読有、Vol.43, No.11、772-776
4. 篠永 東吾, 塚本 雅裕, 陳 鵬, 埴 隆夫、波長 388 nm 及び 775 nm のフェムト秒レーザーにより形成した周期的微細構造が細胞伸展に与える効果、電気学会論文誌 A、(2015)、査読有、Vol.135, No.10、587-591
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、Applied Physics B Lasers and Optics、(2015)、査読有、online
6. 篠永 東吾, 塚本 雅裕、細胞伸展制御のためのフェムト秒レーザーを用いた表面構造制御、レーザー加工学会誌、(2014)、査読有、Vol.21, No.3、147-151
7. T. Shinonaga, M. Tsukamoto and G. Miyaji、Periodic nanostructures on titanium dioxide film produced using femtosecond laser with wavelengths of 388 and 775 nm、Optics Express、(2014)、査読有、Vol.22, No.12、14696-14704
8. SHINONAGA Togo, TSUKAMOTO Masahiro, PENG Chen, NAGAI Akiko, HANAWA Takao、Variation of Cell Spreading on Titanium Dioxide Film by Periodic Nanostructures Formation with Femtosecond Laser、Trans.JWRI、(2014)、査読無、Vol.43、7-10
9. T. Shinonaga, M. Tsukamoto, A. Nagai, K. Yamashita, T. Hanawa, N. Matsushita, G. Xie, N. Abe、Cell spreading on titanium dioxide film formed and modified with aerosol beam and femtosecond laser、Applied Surface Science、(2014)、査読有、Vol.288、649-653

〔学会発表〕(計 35 件)

1. 三宅 正誉志, 河 拓弥, 中畔 哲也, 大賀隆寛, 福永 二三佳, 佐藤 雄二, 塚本 雅裕、フェムト秒レーザー誘起ナノ周期構造による細胞伸展制御 - 酸素雰囲気ナノ周期構造表面の濡れ性に与える影響 -、第 84 回レーザー加工学会、2016.1.19、名古屋
2. 河 拓弥, 塚本 雅裕, 佐藤 雄二, 橋田昌樹, 三宅 正誉志, 大賀 隆寛, 福永 二三佳、フェムト秒レーザー誘起周期的微細構造における雰囲気依存性、レーザー学会学術講演会第 36 回年次大会、2016.1.9、名古屋
3. 大賀隆寛, 塚本 雅裕, 佐藤雄二, 河拓弥, 三宅正誉志, 中畔哲也, 福永二三佳、細胞伸展方向制御のためのフェムト秒レーザーを用いた PET 表面への周期的微細構造形成、レーザー学会学術講演会第 36 回年次大会、2016.1.9、名古屋
4. 福永二三佳 河拓弥 三宅正誉志 中畔

- 哲也 大賀隆寛 塚本 雅裕 佐藤雄二 小川圭二、フェムト秒レーザー照射によって形成されたチタン基板の溝の曲率に依存した細胞伸展方向の変化、レーザー学会学術講演会第 36 回年次大会、2016.1.9、名古屋
5. 塚本 雅裕, 河 拓弥, 篠永 東吾, 陳 鵬, 永井 亜希子, 埴 隆夫, 黒田 健介、細胞伸展制御のためのフェムト秒レーザー照射による周期的微細構造形成、特異構造金属・無機融合高機能材料開発共同研究プロジェクト 第 6 回研究所連携プロジェクト公開討論会、2015.11.20、仙台
6. 三宅正誉志, 塚本 雅裕, 佐藤雄二, 河拓弥, 中畔哲也, 陳 鵬, 永井 亜希子, 埴 隆夫、雰囲気制御下におけるチタン基板へのフェムト秒レーザーアブレーション、第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、2015.9.13、名古屋
7. 中畔 哲也, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 佐藤 雄二, 河 拓弥, 陳 鵬, 永井 亜希子、フェムト秒レーザーにより形成されたナノ及びマイクロ周期構造の細胞伸展への影響、(一社)溶接学会 平成 27 年度秋季全国大会、2015.9.2、札幌
8. Yuji Sato, Masahiro Tsukamoto, Togo Shinonaga, Takuya Kawa、Femtosecond laser induced periodic nano-structure on PET surface for controlling of cell elongation、The 13th Conference on Laser Ablation (COLA-2015)、2015.8.31、Cairns, Australia
9. T. Kawa, M. Tsukamoto, T. Shinonaga, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa、Periodic Nanostructures Produced on Ti Substrate with Femtosecond Laser for Controlling of Cell Spreading in Multi Direction、The 13th Conference on Laser Ablation (COLA-2015)、2015.8.31、Cairns, Australia
10. M. Tsukamoto, T. Shinonaga, T. Kawa, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa、Control of Cell Elongation on Titanium Materials by Femtosecond Laser Irradiation、The 6th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-6)、2015.6.9、Tokyo, Japan
11. T. Kawa, M. Tsukamoto, T. Shinonaga, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa、Control of Cell Spreading on Ti Substrate with Periodic Nanostructures Formed by Femtosecond Laser Irradiation、The 7th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (LAMP2015)、2015.5.26、Kitakyushu, Japan
12. 河 拓弥, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 原 一之, 宮川 和也, 徐 賢先, 陳 鵬, 永井 亜希子, 埴 隆夫、フェムト秒レーザー照射による周期的微細構造形成がチタン基板の細胞伸展に与える効果、第 62 回応用物理学会春季学術講演会、2015.3.11、神奈川
13. 河 拓弥, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 原 一

之, 宮川 和也, 徐 賢先, 陳 鵬, 永井 亜希子, 塙 隆夫、細胞伸展方向制御のためのフェムト秒レーザーを用いた純 Ti 基板への周期的微細構造形成、第 82 回レーザー加工学会講演会、2015.1.13、東京

14. 宮川 和也, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 河 拓弥, 陳 鵬, 永井 亜希子, 塙 隆夫、フェムト秒レーザー照射により Ti 上に形成したナノ及びマイクロ周期構造の細胞伸展への影響、レーザー学会学術講演会第 35 回年次大会、2015.1.12、神奈川

15. T. Shinonaga, M. Tsukamoto, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa、Periodic nanostructures produced with femtosecond laser for control of cell spreading、The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5) 2014.11.19、東京

16. 塚本 雅裕、フェムト秒レーザー照射で形成された周期的ナノ構造を用いた細胞伸展制御、第 15 回量子科学研究シンポジウム(招待講演) 2014.11.14、JAEA 関西量子科学研究所(京都)

17. T. Shinonaga, M. Tsukamoto, K. Miyagawa, K. Hara, T. Kawa, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa、Effect of periodic nanostructures produced with femtosecond laser on cell spreading、The 33rd International Congress on Applications of Lasers & Electro-Optics(ICALEO 2014)、2014.10.22、San Diego, USA

18. Kazuya Miyagawa, Masahiro Tsukamoto, Togo Shinonaga, Kazuyuki Hara, Peng Chen, Akiko Nagai, Takao Hanawa、Femtosecond laser induced periodic nanostructures and microstructures on Ti plate for control of cell spreading、The 33rd International Congress on Applications of Lasers & Electro-Optics(ICALEO 2014)、2014.10.22、San Diego, USA

19. T. Shinonaga, M. Tsukamoto, K. Miyagawa, K. Hara, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa、Controlling Cell Spreading on TiO<sub>2</sub> film modified with Femtosecond Laser、The 15th International Symposium on Laser Precision Microfabrication (LPM 2014)、2014.6.18、Vilnius, Lithuania

20. M. Tsukamoto, T. Shinonaga, P. Chen, A. Nagai and T. Hanawa、Biocompatibility of Titanium Dioxide Film Irradiated with Femtosecond Laser、The 13th International Ceramics Congress 2014(CIMTEC2014)、2014.6.13、Montecatini Terme, Italy

21. 河拓弥, 塚本 雅裕, 佐藤雄二, 篠永 東吾, 原一之、雰囲気制御下フェムト秒レーザー照射による Si 基板上への周期的微細構造形成、第 81 回レーザー加工学会講演会、2014.5.27、大阪

22. 篠永 東吾, 塚本 雅裕, 宮川 和也, 原

一之, 伊藤 雄一郎, 陳 鵬, 永井 亜希子, 塙 隆夫、フェムト秒レーザー照射により形成した周期的微細構造の周期が TiO<sub>2</sub> 膜上の細胞進展に与える影響、第 61 回応用物理学会春季学術講演会、2014.3.19、神奈川

23. 宮川和也, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 原一之, 伊藤 雄一郎, 陳 鵬, 永井 亜希子, 塙 隆夫、フェムト秒レーザー照射により TiO<sub>2</sub> 膜上に形成したナノ及びマイクロ周期構造の細胞進展への影響、第 61 回応用物理学会春季学術講演会、2014.3.19、神奈川

24. Masahiro Tsukamoto, Togo Shinonaga, Yuji Sato, Peng Chen, Akiko Nagai and Takao Hanawa、Variation of cell spreading on TiO<sub>2</sub> film modified by 775 nm and 388 nm femtosecond laser irradiation、SPIE PhotonicsWest2014、2014.2.1、San Francisco, CA, USA

25. 伊藤 雄一郎, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 宮川 和也, 原一之, 陳 鵬, 永井 亜希子, 塙 隆夫、チタンの生体適合性に対するフェムト秒レーザー用いた周期的微細構造形成の効果、レーザー学会学術講演会第 34 回年次大会、2014.1.22、北九州

26. Togo Shinonaga, Masahiro Tsukamoto, Yuichiro Ito, Kazuya Miyagawa, Peng Chen, Akiko Nagai, Takao Hanawa、Improving the Biocompatibility of TiO<sub>2</sub> Film Formed and Modified with Aerosol Beam and Femtosecond Laser、ISETS '13 and AMDI-4、2013.12.14、Nagoya, Japan

27. Yuichiro Ito, Masahiro Tsukamoto, Togo Shinonaga, Kazuya Miyagawa, Peng Chen, Akiko Nagai, Takao Hanawa、Improving biocompatibility of titanium by periodic nanostructure formation with femtosecond laser、International Symposium on EcoTopia Science 2013 ( ISETS'13) and The 4th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials ( AMDI-4 )、2013.12.14、Nagoya, Japan

28. 宮川和也, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 伊藤 雄一郎, 陳鵬, 永井亜希子, 塙隆夫、TiO<sub>2</sub> 膜上に形成したフェムト秒レーザー誘起ナノ周期構造の細胞伸展への影響、第 80 回レーザー加工学会講演会、2013.12.4、東京

29. M. Tsukamoto, T. Shinonaga, A. Nagai, K. Yamashita, T. Hanawa, N. Matsushita, X. Guoqiang and N. Abe、Biocompatibility of titanium dioxide film modified by femtosecond laser irradiation、The 8th international conference on advanced materials ( THERMEC2013 )、2013.12.3、Las Vegas, USA

30. 宮川 和也, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 伊藤 雄一郎, 陳 鵬, 永井 亜希子, 塙 隆夫、フェムト秒レーザー照射による生体適合性向上のためのチタン材への周期的微細構造

形成、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、  
2013.9.17、京都

31. 篠永 東吾, 塚本 雅裕, 宮川 和也, 伊藤 雄一郎, 陳 鵬, 永井 亜希子, 埴 隆夫、  
TiO<sub>2</sub> 膜上の細胞伸展におけるフェムト秒レーザーを用いた周期的微細構造形成の効果、  
第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、  
2013.9.16、京都

32. 篠永 東吾, 塚本 雅裕, 西井 諒介, 永井 亜希子, 山下 仁大, 埴 隆夫, 松下 伸広, 謝 国強, 阿部 信行、酸化チタン膜の生体適合性に対するフェムト秒レーザーを用いた周期的微細構造形成の効果、(一社)溶接学会 平成 25 年度秋季全国大会、2013.9.2、岡山

33. 伊藤雄一郎, 塚本 雅裕, 篠永 東吾, 宮川 和也, 陳 鵬, 永井 亜希子, 山下 仁大, 松下 伸広, 謝 国強, 埴 隆夫、フェムト秒レーザーを用いた周期的微細構造形成によるチタン材料の生体適合性向上、(一社)溶接学会 平成 25 年度秋季全国大会、2013.9.2、岡山

34. T. Shinonaga, M. Tsukamoto, Y. Ito, A. Nagai, K. Yamashita, T. Hanawa, N. Matsushita, X. Guoqiang and N. Abe, Cell Spreading on Titanium Dioxide Film with Periodic Nanostructures Produced by Femtosecond Laser Irradiation, The 6th International Congress on Laser Advanced Materials Processing( LAMP2013 ), 2013.7.25、Niigata, Japan

35. 篠永 東吾, 塚本 雅裕, 永井 亜希子, 山下 仁大, 埴 隆夫, 松下 伸広, 謝 国強, 阿部信行、フェムト秒レーザーを用いた酸化チタン膜上への周期的微細構造形成による細胞伸展方向変化、第 79 回レーザー加工学会講演会、2013.5.7、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚本 雅裕 (TSUKAMOTO MASAHIRO)

大阪大学・接合科学研究所・准教授

研究者番号：9 0 2 7 3 7 1 3