

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25820348

研究課題名(和文) 表面特性制御による骨形成を促進あるいは抑制するチタン合金表面の創製

研究課題名(英文) Fabrication of titanium surfaces which promote or inhibit bone formation by modification with various functional groups

研究代表者

稗田 純子(Hieda, Junko)

東京工業大学・理工学研究科・助教

研究者番号：40566717

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)：本研究では、種々の官能基で表面修飾することで、表面エネルギーや表面電荷の異なるチタン表面を作製し、チタンの表面特性と骨形成能との関係を明らかにすることを目指した。COOH基で修飾したチタン表面は、本研究で作製した試料の中で最も高い表面エネルギーと大きいゼータ電位の値を示し、骨形成能の評価のために擬似体液浸漬試験を行った結果、擬似体液に1週間浸漬後、表面に水酸化アパタイトが析出した。したがって、表面電位が負に大きく、表面エネルギーが高い表面において水酸化アパタイトの析出が促進され、ゼータ電位が正に大きく、表面エネルギーが低い表面において水酸化アパタイトの析出が抑制されるという知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to investigate the relationships between surface properties, such as surface energy and surface charge, and HAp formability in vitro, we prepared Ti surfaces with various surface energy and surface charge through modification of Ti surfaces with various functional groups.

After immersion in 1.5 SBF for 7 days, only on the COOH modified Ti surface, many spherical precipitates were observed. The peaks attributed to HAp were present in XRD pattern, which indicated that the spherical precipitates on the COOH-modified Ti surface were HAp. The surfaces with high surface energy such as COOH-modified Ti surface exhibited high Ca²⁺ absorption amount and Ca/P ratio. In the case of the surfaces with low surface energy such as CH₃, CH=CH₂-modified Ti surface, which were hydrophobic surfaces, the Ca/Ti and Ca/P ratios were higher than those of untreated, SH and NH₂-modified Ti surfaces. These results suggest that COOH-modified Ti surface promotes the precipitation of HAp.

研究分野：生体用金属材料

キーワード：チタン 表面官能基 表面エネルギー 表面電荷 骨形成

1. 研究開始当初の背景

疾病や事故で失った骨や歯の機能を補うために、人工関節や歯科インプラントが用いられ、骨との接合部には、チタンおよびチタン合金が使用されている。これら骨との接合部では、骨との接着、すなわち、表面での骨形成が必要である。現在、チタン表面と骨とを早期に接合させるために、骨の無機成分であるハイドロキシアパタイト(HAp)によるチタン表面の被覆が行われている。一方、骨折固定具では、治癒後、再手術により固定具を体内から取り出すため、骨と接着しない表面が必要とされている。現在、HAp膜とチタン合金との接着性向上に関する研究を行っており、膜厚数 μm のHAp膜とチタンおよびチタン合金との接着性に関して、HAp膜中および界面での複合破壊による剥離など、まだ多くの課題がある。そのため、チタンおよびチタン合金の表面そのものに、目的に応じた性質を持たせることができれば、接着性の問題はなくなる。

材料表面への骨形成は、生体内において、カルシウムイオンやリン酸イオンが材料表面へ吸着し、HApが形成されることによって進むとされている。材料表面へのイオンの吸着には、材料表面の表面電荷や表面エネルギーが重要な因子となる。ゆえに、これらの表面特性と骨形成能との関係を明らかにすることが、材料表面での骨形成の制御には必要である。

2. 研究の目的

本研究では、骨形成を制御可能なチタンおよびチタン合金表面の創製のために、どのような表面電荷量、表面エネルギーの大きさを持つチタン表面が、骨の形成を促進あるいは抑制するのか、を明らかにすることを目的とした。そのために、チタン表面を様々な化学官能基で修飾することにより、様々な表面電荷量、表面エネルギーの大きさを持つチタン表面を作製し、生体模擬環境下での骨形成能との相関について研究を行った。

3. 研究の方法

[1] 各化学官能基で修飾したチタンの作製

表面電荷量および表面エネルギーの大きさが異なるチタン表面を作製するために、ピラニア溶液への浸漬後、シランカップリング法を用いて、各官能基(OH基、COOH基、NH₂基、CH₃基、CH=CH₂基やSH基)でチタン表面を修飾した。各化学官能基で修飾したチタンの表面電荷量をゼータ電位測定により、表面エネルギーを水滴接触角から算出した。

[2] 擬似体液への浸漬試験

通常用いる擬似体液(SBF)に対して、各イオン濃度を1.5倍にした1.5SBF中に、各

官能基で修飾したチタンを、一定期間浸漬させた。各化学官能基で修飾したチタン表面へのHApの析出の有無および析出形態を調べ、表面電荷量および表面エネルギーの大きさにより、どのように変わるのかを検討した。析出したHApの確認は、X線回折法(XRD)を用いて、析出形態の観察は、走査電子顕微鏡(SEM)により行った。さらに、1.5SBFに7日間浸漬後の各官能基で修飾したチタン基板上におけるCa/Ti比およびCa/P比をX線光電子分光法(XPS)により調査・検討した。

4. 研究成果

[1] 各種官能基で修飾したチタンの表面特性

未処理のチタン基板、ピラニア溶液に浸漬したチタン基板および各官能基で修飾したチタン基板表面における蒸留水、ジヨードメタン、ヘキサデカンの接触角を図1に示す。未処理の水滴接触角は約53 deg.となった。ピラニア溶液に浸漬し表面にOH基を付加させたチタン基板の水滴接触角は26 deg.に減少した。シランカップリング処理によってチタン基板をSH基、CH₃基、CH=CH₂基で修飾した場合、水滴接触角は、それぞれ約67 deg.、102 deg.、113 deg.に増加した。一方、NH₂基で修飾した場合は42 deg.に減少した。また、KMnO₄、NaIO₄によりCH=CH₂基を酸化させることにより、COOH基で修飾したチタン基板は水滴接触角が5 deg.以下となり、超親水性を示した。ジヨードメタンの接触角は、未処理のチタン基板と比較して、OH基、SH基、COOH基で修飾した基板では、約32 deg.からそれぞれ10 deg.、24 deg.、13 deg.に減少し、CH₃基、CH=CH₂基で修飾した基板ではそれぞれ約51 deg.、37 deg.に増加した。ヘキサデカンの接触角は、CH=CH₂基で修飾した基板以外では5 deg.以下の接触角となった。CH=CH₂基で修飾した基板のヘキサデカンの接触角は、約8 deg.であった。3種類の液滴の接触角から算出した各種官能基で修飾したチタン基板の表面エネルギーを図2に示す。表面エネルギーの分散力成分 γ_d はすべての基板で約27.6 mJ/m²と

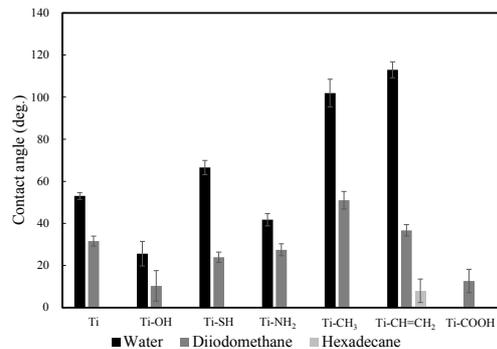


図1 各官能基で修飾したチタン基板表面の水滴接触角

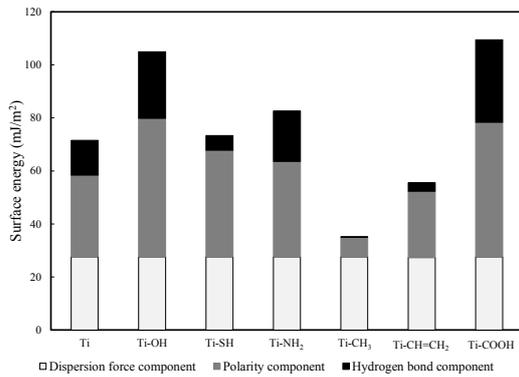


図 2 各官能基で修飾したチタンの表面エネルギー

なった。また、接触角測定で親水性を示した OH 基、COOH 基で修飾したチタン基板の表面エネルギーはそれぞれ 104.9 mJ/m^2 、 109.5 mJ/m^2 となり、未処理のチタン基板と比較して高い値を示した。疎水性を示した CH_3 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基で修飾したチタン基板の表面エネルギーはそれぞれ 35.2 mJ/m^2 、 40.0 mJ/m^2 となり、未処理のチタン基板と比較して低い値となった。COOH 基、OH 基は極性を持つため、表面エネルギーの極性成分が高い値となった。また、COOH 基、OH 基、 NH_2 基は水素結合を形成するため、表面エネルギーの水素結合成分が高い値となった。 CH_3 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基は極性を持たず、かつ水素結合を形成しないため、表面エネルギーの極性成分と水素結合成分が低い値となった。

未処理のガラス基板、ピラニア溶液に浸漬したガラス基板、シランカップリング処理により SH 基、 NH_2 基、 CH_3 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、COOH 基で修飾したガラス基板表面のゼータ電位を図 3 に示す。COOH 基で修飾したガラス基板のゼータ電位は -60.57 mV となり、未処理のガラス基板と比較して大きい値を示した。SH 基、 NH_2 基、 CH_3 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基で修飾したガラス基板のゼータ電位はそれぞれ -37.52 、 -16.04 、 -25.83 、 -27.52 mV となり、未処理のガラス基板と比較して小さい値を示した。また、OH 基で修飾したガラス基板のゼータ電位は -49.74 mV となり、未処理のガラス基板と同程度の値となった。基板表面の官能基の種類によって、基板の表面電荷が異なり、チタン基板に官能基修飾を行なった場合も同様の傾向になると推察される。COOH 基は溶液中において COO^- となり、負の電荷を帯びるため、負のゼータ電位を示す。また、 NH_2 基は溶液中において NH_3^+ となり正の電荷を帯びるため、未処理のガラス基板と比較して、ゼータ電位の値が小さかったと考えられる。

[2] 各種官能基で修飾したチタン表面での HAp の析出

1.5SBF に 7 日間浸漬した各官能基で修

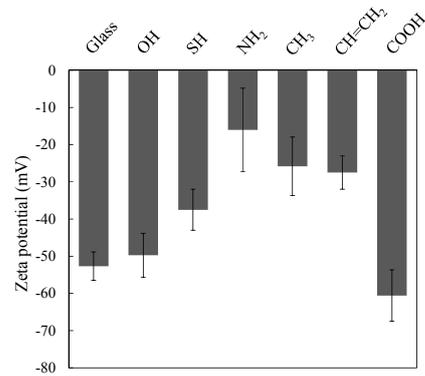


図 3 各官能基で修飾したガラス基のゼータ電位

飾したチタン基板の SEM 像から COOH 基で修飾したチタン基板の表面に直径 $2 \mu\text{m}$ 程度の球状の析出物が確認された。

さらに、1.5SBF に 7 日間浸漬した COOH 基で修飾したチタン基板表面の Ti、O、C、Ca、P の元素マッピングを、図 4 に示す。SEM 像の析出物と Ca、P、C および O の分布が一致することから、析出物が Ca、P、C および O を含むことが示された。

1.5SBF に 30 日間浸漬後の COOH 基で修飾したチタン基板の XRD プロファイルを図 5 に示す。約 25.9 、 28.1 、 31.8 、 32.2 、 32.9 、 46.7 、 49.5 deg に回折ピークが見られ、これらの回折ピークは ICDD [9011098] より、それぞれ $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ の (002)、(102)、(211)、(112)、(300)、(222)、(213) に帰属された。また、 35.1 、 38.4 、 40.2 、 53 deg にも回折ピークが確認され、これらの回折ピークは ICDD [9008517] より、Ti の (100)、(002)、(101)、(102) に帰属された。これらの結果から、1.5SBF に

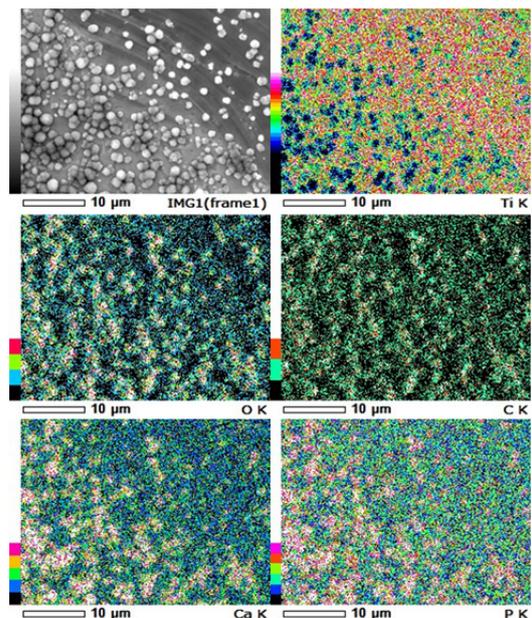


図 4 1.5SBF に 7 日間浸漬した COOH 基で修飾したチタン基板上の析出物の元素マッピング

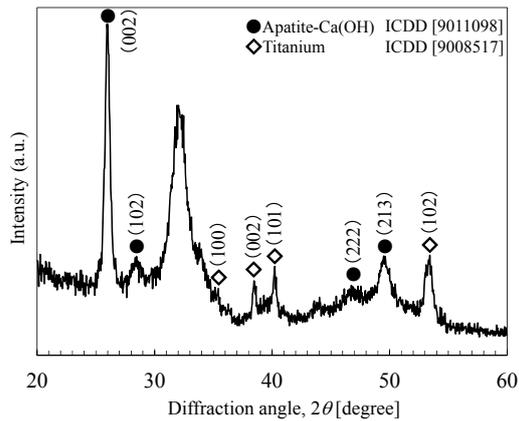


図 5 1.5SBF に 30 日間浸漬後の COOH 基で修飾したチタン基板上的析出物の XRD プロファイル

浸漬後、COOH 基で修飾したチタン基板上に析出した析出物が HAp であると分かった。また、HAp の析出形態から、COOH 基を修飾したチタン基板表面においては HAp が不均質核生成により析出し、CH₃ 基、CH=CH₂ 基を修飾したチタン基板の表面においては溶液中で均質核生成した HAp が付着したと考えられる。

[3] 各種化学官能基で修飾したチタンの表面特性と HAp 析出能との相関

体内において、Ca²⁺や PO₄³⁻がチタン表面へ吸着後、HAp が核生成して成長することで、チタン表面に HAp が析出する。そのため、材料表面のゼータ電位が Ca²⁺や PO₄³⁻の吸着に影響すると考えられる。

各官能基で修飾したガラス基板表面のゼータ電位と、同じく各種化学官能基で修飾したチタン基板表面への Ca²⁺の吸着量 (Ca/Ti 比)、Ca/P 比の関係をそれぞれ図 6、7 に示す。ゼータ電位が負に大きいほど、Ca/Ti 比および Ca/P 比が増加した。試料表面が負に帯電し、その表面電荷が大きいほど、Ca²⁺の吸着量が増加し、HAp が析出しやすくなると考えられる。一方、表面電荷が小さいと、Ca²⁺が吸着しにくいと考えられる。

各官能基で修飾したチタン基板の表面エネルギーと Ca²⁺の吸着量、Ca/P 比の関係をそれぞれ図 8、9 に示す。表面エネルギーが高いチタン基板 (COOH、OH 基) では、Ca²⁺の吸着量が増加するとともに、Ca/P 比が増加した。一方、表面エネルギーが低いチタン基板 (CH₃、CH=CH₂ 基) では、表面エネルギーが高いほど、Ca²⁺の吸着量、Ca/P 比ともに減少した。

これらの結果より、表面エネルギーが高い、すなわち、親水性表面ではゼータ電位が負に大きいほど、Ca²⁺の吸着量が増加することがわかった。一方、表面エネルギーが低い、すなわち、疎水性表面では、チタン表面への水和したイオンの吸着が抑制され、極性の小さい HAp のク

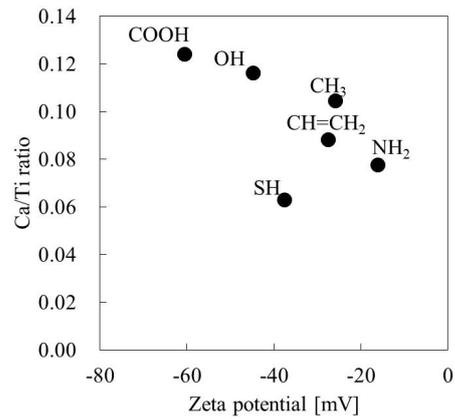


図 6 各官能基で修飾したガラス表面のゼータ電位とチタン表面への Ca²⁺の吸着量の関係

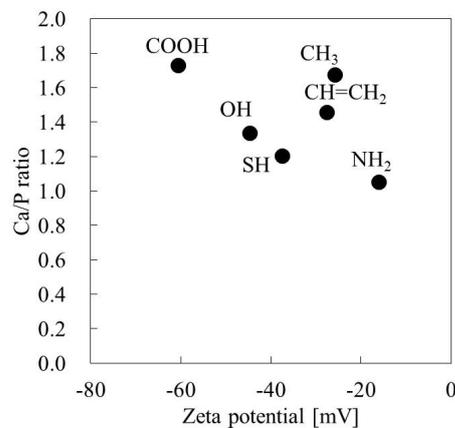


図 7 各官能基で修飾したガラス表面のゼータ電位とチタン表面へ析出した HAp の Ca/P 比の関係

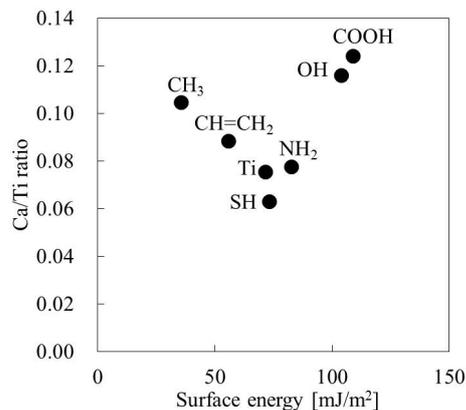


図 8 各官能基で修飾したチタン基板の表面エネルギーと Ca²⁺の吸着量の関係

ラスターが吸着したと考えられる。

本研究で作製した試料中で、COOH 基で修飾したチタン基板表面においてのみ、1.5SBF に 7 日間浸漬後、HAp が析出した。COOH 基で修飾したチタン基板は、表面エネルギーが高いため、不均質核生成の臨界エネルギーが他の基板と比較して小さくなり、Ca²⁺や PO₄³⁻の吸着後、HAp の不均質核生成したと考えられる。一方

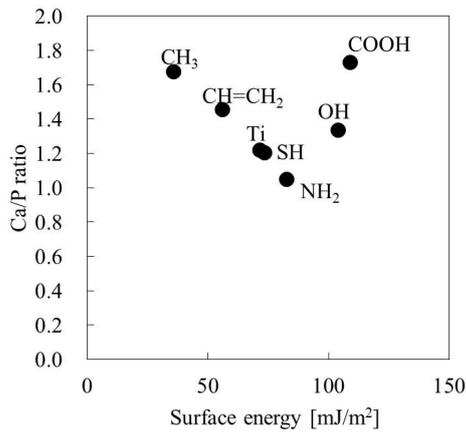


図9 各官能基で修飾したチタン基板の表面エネルギーとCa/P比の関係

で、OH基で修飾したチタン基板は、COOH基で修飾したチタン基板と同様に高い表面エネルギーを示したが、HApの析出は確認されなかった。OH基で修飾したガラス基板のゼータ電位はCOOH基で修飾したガラス基板と比較して小さく、Ca²⁺の吸着量は多いが、Ca/P比がHApの理論値である1.67よりも低い値であった。そのため、HApの核生成するためには、析出前のCa/P比が1.67により近い値である必要があると考えられる。基板の表面電荷は、基板表面へのイオンの誘引に影響する。最初に、負に帯電した基板表面にCa²⁺が吸着する。次に、基板表面に吸着したCa²⁺を介してPO₄³⁻が吸着する。基板表面でCa²⁺およびPO₄³⁻が飽和濃度に達すると、HApの核生成が起こる。さらに、基板表面で生成したHApの核が成長し、HApが析出する。基板の表面電荷が負に大きいほど、基板表面に吸着するCa²⁺量が増加するとともに、PO₄³⁻の吸着量が増加し、基板表面近傍の溶液の過飽和度が上昇する。溶液の過飽和度が上昇すると、不均質核生成の臨界自由エネルギーが減少するので、基板表面での不均質核生成が生じやすくなる。一方で、表面電荷が小さい場合は、Ca²⁺、PO₄³⁻の吸着量が少なく、不均質核生成に必要な過飽和度にまで達しないため、HApが析出しなかったと考えられる。また、表面エネルギーが高いほど、不均質核生成の臨界自由エネルギーが減少するので、基板表面での不均質核生成が起こりやすくなる。一方、表面電荷が小さくかつ表面エネルギーが低い場合は、Ca²⁺、PO₄³⁻が吸着せず、核生成が起こりにくいと考えられるが、本研究ではCH₃およびCH=CH₂で修飾したチタン表面では、Ca²⁺の吸着量が多く、Ca/P比が高かった。擬似体液中では、HApがクラスターとなって存在していることが報告されている。表面エネルギーが低い場合は、水和したイオンが疎水性表面に接近できない。そのため、極性の小さいHApのクラスターが表面に吸着したと

推察される。その後、表面エネルギーが低い表面では不均質核生成の臨界自由エネルギーが大きくなるため、基板表面では不均質核生成が生じず、HApが析出しなかったと考えられる。

4. まとめ

本研究では、どのような表面電荷、表面エネルギーを持つチタン表面が形成を促進あるいは抑制するのかを明らかにするために、チタン表面をOH基、COOH基、NH₂基、CH₃基、CH=CH₂基、SH基で修飾し、擬似体液中に浸漬することで、表面特性と骨形成能との相関について調査・検討を行った。

COOH基で修飾したチタン表面の表面エネルギーが最も高く、かつゼータ電位の値が負に最も大きく、1.5SBFに7日間浸漬後、その表面にHApが析出した。

XPSによる各官能基で修飾したチタン基板上へのCaおよびPの吸着量の調査から、ゼータ電位が負に大きく、表面エネルギーが高いほど、Ca²⁺の吸着量が増加し、不均質核生成が起こりやすいことが明らかとなった。これらの結果から、表面電荷が負に大きく、表面エネルギーが高い表面においてHApの析出が促進され、ゼータ電位が正に大きく、表面エネルギーが低い表面においてHApの析出が抑制されることが示唆された。本研究で得られた知見は、有機シラン分子によるチタン表面への官能基修飾だけでなく、その他のコーティングや熱処理などの表面処理への応用も期待できる。

チタン表面での骨形成では、表面へのHApの析出だけでなく、骨性タンパク質や骨芽細胞の吸着等も考慮しなければならない。骨芽細胞は骨性タンパク質を介してチタン表面に接着し、チタンと骨組織の界面では時間経過とともに、CaやPを含む無定形構造層が形成される。したがって、今後、さらに、骨性タンパク質や骨芽細胞の吸着を評価し、表面電荷および表面エネルギーとの相関について調査することで、チタン表面での骨形成プロセスの解明が期待できる。

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 1 件)

坂口晃、中野雅之、稗田純子、赤坂大樹、大竹尚登、種々の官能基で修飾したチタン表面の骨形成能評価、2016年度精密工学会春季大会学術講演会、2016年03月15日、東京理科大学、口頭発表

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稗田 純子 (HIEDA、JUNKO)
東京工業大学 理工学研究科・助教
研究者番号：40566717