

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870410

研究課題名(和文) 金属バイオマテリアルのナノ構造複合表面処理による生体・金属界面最適化

研究課題名(英文) Optimization of interfaces between metallic implants and tissues by nano structure formation and surface treatment

研究代表者

宮部 さやか (Miyabe, Sayaka)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50584132

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)：本研究は、生体適合性を向上させる規則的ナノ構造を付与した生体用金属材料に対し、骨親和性向上のためアパタイト被覆あるいはナノ構造中に薬剤固定を行うことにより、さらなる金属バイオマテリアルの生体・金属界面最適化を試みた。アパタイト被覆は、陽極酸化によって表面にナノホール構造を付与したステンレス鋼に対し、陰極電解法により実施した。その後、SBF(模擬体液)浸漬試験によって骨親和性向上を確認した。ナノ構造中への薬剤固定のプラットフォームとして、陽極酸化によって構造制御したTiO₂ナノチューブを作製した。インドメタシンを用いた薬剤放出速度試験により、構造制御したTiO₂ナノチューブの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried the optimization of interfaces between metallic implants and tissues by nano structure formation and surface treatment. Specifically, two types of surface treatments were carried out. One is hydroxyapatite coating by cathodic deposition on self-assembled nanopores on type 316L stainless steel formed by anodic polarization to improve bone compatibility. The other is drug induction to TiO₂ nanotube with self-assembled tapered structure for LDDS (Localized Drug Delivery System). Regardless of the surface shapes (with/without nanopores), needle-like depositions were observed. The depositions were identified as carbonate containing apatite by XRD and FT-IR analysis. In the drug release test, TiO₂ nanotube with self-assembled tapered structure reduced initial burst release rate than conventional TiO₂ nanotube formed at 60 V. It is suggested that TiO₂ nanotube with self-assembled tapered structure is useful to control drug release for drug delivery system.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 インプラント 表面改質 ナノチューブ DDS 金属材料 陽極酸化 生体親和性

1. 研究開始当初の背景

インプラントの表面処理に関する研究はマイクロ・ミクロレベルに渡り盛んに行われており、さらに近年、ナノスケール構造がミクロスケールの細胞の接着や増殖、活性に影響を与えていることが明らかになってきた[1-3]。このナノスケール構造の付与は従来法では困難であったが、研究代表者の属するグループでは、電気化学的手法、具体的には陽極酸化法を用い、ナノ構造を非常に簡便に作製することに成功している。さらに、陽極酸化法による TiO₂ ナノチューブおよびステンレス鋼ナノホール構造作製に関しては規則的なナノ構造の径、および長さの制御をも可能としている。これらナノ表面構造は、孔径が十数ナノメートルである場合に細胞増殖や接着性が優れることが報告され、細胞への最適サイズが明らかになりつつある。こうした金属自身の表面構造変化の研究とは別に、金属上に細胞にとって有用な物質をコートし、細胞にとって適した足場の形成、ひいては薬剤を固定化することによってドラッグデリバリーシステム(DDS)を実現する研究も盛んに行われている。本研究課題では生体用金属材料を対象とし、ナノ構造の付与と生体親和物質コーティングを組み合わせることにより、金属インプラント表面の改質を行い、金属インプラント表面と生体との界面の最適化を試みることとした。

2. 研究の目的

(1) 陰極電解によるステンレス鋼ナノホールアレイ上へのアパタイト被覆

ステンレス鋼は生体材料として広く利用されているが、骨結合能を有する Ti 系合金と比較し骨親和性が低い。Ti 系インプラントは更なる骨親和性向上のため表面にハイドロキシアパタイト(HAp)被覆を行うことがあるが、ステンレス鋼への HAp 被覆は困難なためほとんど行われていない。現在、HAp 被覆はプラズマ溶射法が主流であるが、アモルファス相を多く含むなどの問題点があり、近年、電気化学的手法を用いた陰極電解による HAp 被覆が注目されている[4]。HAp を被覆させる基板は、HAp を基板表面に均一に形成させるために、表面積が大きくかつ規則的な構造であることが望ましいと考えられる。近年、我々の研究グループで陽極酸化によりナノホールアレイを形成したステンレス鋼は、表面に規則的な細孔を有しており本条件を満たす。そこで本研究では、ステンレス鋼の骨親和性向上を目指し、ナノホール構造を有するステンレス鋼に陰極電解によって HAp 被覆を行う際の最適条件を検討した。

(2) 構造制御したテーパ型 TiO₂ ナノチューブの薬剤放出特性

インプラント埋入時には細菌感染や炎症などの合併症の予防あるいは治療のため、経口や静脈注射による薬剤投与が行われる。しかし、これらは血管を介した輸送であるので薬

剤効率が低く、また目的組織外への副作用のリスクがある。そこでインプラントから薬剤を放出することで局所的な投与を可能とする LDDS (Localized Drug Delivery System) が注目されている。生体材料として広く用いられている Ti を陽極酸化して得られる TiO₂ ナノチューブは高表面積および高アスペクト比であるため、LDDS のプラットフォームへの応用が検討されている[5, 6]。TiO₂ ナノチューブの径および長さは電圧に比例することが知られており、従来の TiO₂ ナノチューブは印加電圧を一定に保持することで垂直方向に直線的に成長した構造を有する。高電圧で作製したチューブは径が大きく長いいため多くの薬剤を担持可能であるが初期に大量の薬剤放出が発生する。一方で、低電圧で作製したチューブは径が小さく短いため初期の薬剤放出は抑制できるものの薬剤担持量は少量となる問題があった。そこで本研究では、チューブ作製過程の印加電圧を任意に変化させることで、チューブ底部の径を大きく、開口部の径を小さくするように構造制御したテーパ型 TiO₂ ナノチューブを作製し、その薬剤放出特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 陰極電解によるステンレス鋼ナノホールアレイ上へのアパタイト被覆

試料には SUS316L ステンレス鋼を用いた。SiC 耐水研磨紙で#2000 まで研磨後、所定の条件(電解溶液:過塩素酸ナトリウムを含むエチレングリコール, 電解電圧: 20~40 V, 挿引速度: 0.1 V/s, 保持時間: 5 分)で定電位保持し、ナノホール構造を付与した。形成したナノホールの径及び深さは SEM 及び AFM を用い測定した。その後、ナノホール構造を付与した試料、鏡面仕上げ試料、及び研磨まま試料をリン酸水素二カリウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウムを含む水溶液に浸漬し、定電流で陰極析出を行うことにより種結晶を析出させた。その際、保持電流密度、保持時間などを変化し、析出量に及ぼす影響を調査した。陰極析出後の試料を 37 の模擬体液(SBF)に所定の期間浸漬し、析出物の成長挙動を観察した。析出量は重量変化として計測し、析出物の同定は EDX 及び XRD、FT-IR により行った。

(2) 構造制御したテーパ型 TiO₂ ナノチューブの薬剤放出特性

純 Ti を供試材とし、15.5 mmφの円盤状試料の表面を鏡面研磨した後、超音波洗浄を行った。陽極酸化は、NH₄F および少量の水を含む有機溶媒を電解液として使用し、白金板を対極とした 2 電極セルを用いて行った。印加電圧を 20 V まで 1 V/s で増加させた後所定時間保持し、さらに 0.1 V/s で 60 V まで増加させた後所定時間保持した先端部にのみテーパ構造を有する top tapered 試料および 0.01 V/s で 60 V まで増加させたチューブ全

体にわたってテーパ構造を有する full tapered 試料の 2 種類のテーパ状 TiO₂ ナノチューブ試料を作製した。また、比較のため従来構造を有する定電位保持ナノチューブ試料 (20 V 試料、60 V 試料) および鏡面仕上げまま試料 (mirror 試料) を作製した。陽極酸化終了後、試料表面を蒸留水で洗浄、乾燥させ、FE-SEM を用いて形態評価した。薬剤放出特性評価のための薬剤モデルにはインドメタシンを用いた。薬剤導入後、37 に保たれた保温庫内で PBS に試料を浸漬させ、所定の時間間隔で UV-Vis を用いて PBS 中の薬剤濃度を測定することで薬剤放出特性を評価した。

4. 研究成果

(1) 陰極電解によるステンレス鋼ナノホールアレイ上へのアパタイト被覆

図 1 に陰極析出を施した試料表面の SEM 像を示す。陰極析出により、全ての基板表面において白い針状の析出物が観察された。EDX 解析の結果、基板の構成元素である鉄、クロムの他に、カルシウム、リンが検出された。析出物の XRD 解析結果 (図 2) および FT-IR 解析結果より、析出物は炭酸含有の HAp であることが確認された。陰極析出を行う際の保持電流密度の増加に伴い HAp 析出量は増加したが、保持電流密度がある値以上になると、試料表面付近での水素発生の影響により、試料表面に均一に HAp 被覆を行うことが困難となった。また、保持時間の増加に伴い、HAp 析出量は増加し、次第に一定値に収束する傾向が認められた。陰極析出後の試料を

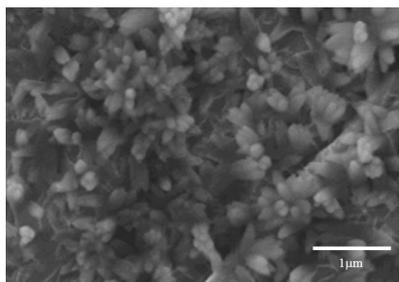


図 1 陰極析出後の試料の表面 SEM 像

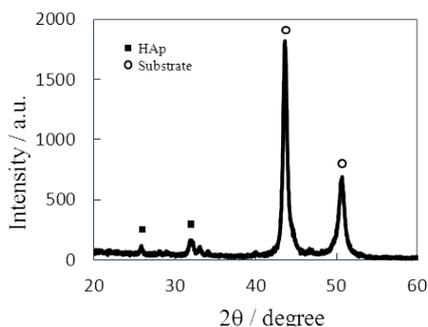


図 2 陰極析出後の試料の XRD 解析結果

SBF に浸漬させると、陰極析出による析出物が核となってさらに析出物が成長し、浸漬期間の増加に伴い、被覆量は増加した。被覆物、被覆量ともにナノホールの有無による差は認められず、ナノホール形状を有した基板であっても、被覆される HAp は平滑基板同様となることが明らかになった。

(2) 構造制御したテーパ型 TiO₂ ナノチューブの薬剤放出特性

図 3 (a) に top tapered 試料、(b) に full tapered 試料の断面 SEM 像を示す。チューブ長さはそれぞれ約 10 μm および約 6 μm であり、2 種のテーパ型試料の最表面の径はいずれも 60 V 試料の半分程度であった。両テーパ型試料ともに 20 V 部分から 60 V 部分に移行するにしたがって径は連続的に増大している。top tapered 試料では 20 V から 60 V への移行部である先端から 1.5 μm 程度の部分にて、full tapered 試料では先端から底部までのどの部分においても成長が止まったチューブを確認した。各試料の薬剤放出結果を図 4 に示す。全ての試料で初期の急激な放出とそれに続く緩やかな放出の 2 段階の放出が見られた。いずれのテーパ型試料も 60 V 試料より初期の薬剤放出を有意に抑制しており、テーパ型試料間では有意差は認められなかった。初期の薬剤放出は主に表面付近に担持された薬剤によるもので、60 V 試料と比較し両テーパ型試料は表面付近の径が小さいために放出が抑制されたと考えられる。その後測定終了までの放出量を比較すると、top tapered 試料が最も多く、持続的な放出が認められた。これは初期での薬剤放出抑制により径の大きな部分に多くの薬剤

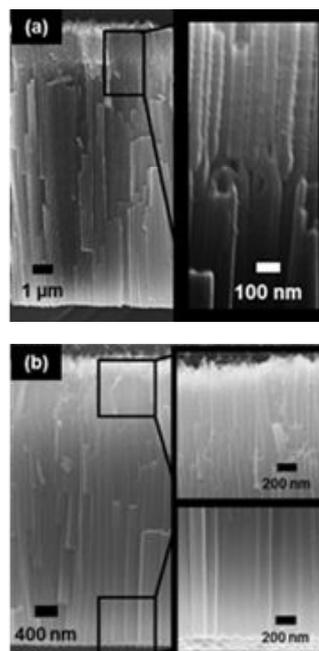


図 3 断面 SEM 画像

(a) top tapered, (b) full tapered

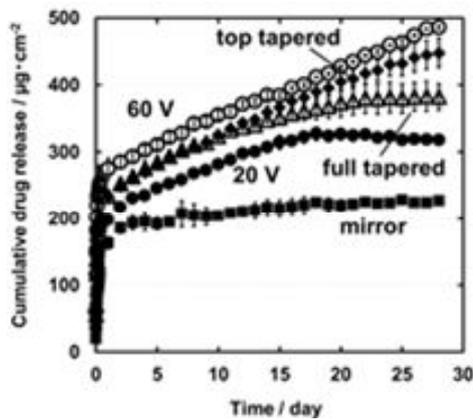


図 4 各試料の薬剤放出曲線

が残存し、溶液との濃度差が他の試料よりも大きくなるためだと考えられる。以上で述べたように、構造制御したテーパ型 TiO_2 ナノチューブの作製に成功し、薬剤放出制御を実現した。

<引用文献>

- [1] J. I. Rosales-Leal et. al.; Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp., 365, (2010), pp.222-229.
- [2] E. A. Cavalcanti-Adam et al.; Biophys. J., 92, (2007), pp.2964-2974.
- [3] M. J. Dalby et. al.; Biomaterials, 27, (2006), pp.2980-2987.
- [4] J. Redepenning et al., Chem. Mater. 2, (1990), pp.625-627.
- [5] C. Moseke et al. Appl. Surf. Sci. 258, (2012), pp.5399-5404.
- [6] D. Losic et al. Expert Opin. Drug Deliv. 12, (2015), pp.103-127.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 12 件)

宮部さやか、朝倉直哉、中尾拓哉、藤本慎司，“パルス電解によるステンレス鋼へのアパタイト被覆の電気化学的条件の検討”日本金属学会 2015 年春期講演大会(第 156 回) 2015 年 3 月 19 日 東京大学(東京都・目黒区)

宮部さやか、中尾拓哉、藤本慎司，“方形波電流を用いた陰極電解による金属基板へのアパタイト被覆”第 36 回 日本バイオマテリアル学会 2014 年 11 月 17 日 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

S. Miyabe, Y. Fujinaga, H. Tsuchiya and S. Fujimoto, “Cell Behaviour on Self-assembled Nanohole Arrays on Type 316L Stainless Steel Formed by Anodic Process”, European Society of Biomaterials 2014, 31 August - 3 September, 2014, ACC Liverpool (the Liverpool Echo Arena and Convention Centre), Liverpool (UK)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮部 さやか (Sayaka Miyabe)

研究者番号 : 50584132