

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19360301

研究課題名 (和文) 自己組織化型セラミックナノロッド配列構造の創製と医用工学的応用

研究課題名 (英文) Preparation of nanometer-scale rod array and biomedical application

研究代表者

早川 聡 (HAYAKAWA SATOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20263618

研究成果の概要：

無機ナノ材料の創製には多くの化学的手法があるが、医用インプラントの様な大型材料に高生体機能性表面層を創製するにはコスト面で厳しいだけでなく、基材との固着力、機械的強度の不足が大きな課題となっている。本研究では、医用インプラント材料の組織結合性の改善のために、医用金属チタンや医用ガラスセラミックス表面に、自己組織化的な結晶の配向性とサイズを制御した、基材に対する固着力の高い酸化チタン、または、歯のエナメル質に類似した高結晶配向性の水酸アパタイトのナノ・サブマイクロ粒子配列構造を創製することにより、高い生体活性と細胞接着性の発現に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：無機材料化学

科研費の分科・細目：材料工学・無機物性

キーワード：酸化チタン、ヒドロキシアパタイト、生体活性、ナノ結晶、自己組織化、金属チタン、細胞接着性、ロッド配列構造

1. 研究開始当初の背景

無機ナノマテリアルの化学的創製には、ソフト溶液反応、ゾルーゲル法、固相反応法、メカノケミカル反応、水熱ソフト化学法、電気

泳動析出法、光電気化学的方法等が報告されている。しかし、医用インプラントデバイスの様な大型材料の生体機能性表面層を創製す

るにはコスト面で厳しいだけでなく、基材との固着力、すなわち、機械的強度の不足が大きな課題となっている。

申請者はホウ酸ナトリウムガラス粒子層を用いた“マイクロフラックス法”によって金属基材表面に強固に固着した単結晶性のナノ・マイクロロッドアレーを創製するプロセスを開発した。(Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 845, Warrendale, PA, 2005, AA6. 9, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 112[10], pp. 567-571, 2004.) さらに申請者らは、“反応性基材”を金属基材から“ガラス基材”に展開し、水溶液反応系にて単結晶性水酸アパタイトのナノ・マイクロロッド配列構造を作製することに成功した。(日本セラミックス協会秋季シンポジウム講演番号1H06, p. 223, 池谷科学技術振興財団による研究業績)したがって、従来の合成プロセスでは達成できなかった、自己組織化的な結晶の配向性とサイズを同時に制御しながら、ナノ・マイクロ粒子配列構造を作製できることを特徴とする。

2. 研究の目的

上述の技術の新規性と有効性を踏まえ、医用インプラント材料の組織結合性の改善のために、医用金属やガラスセラミックス表面に酸化チタン、または、水酸アパタイトロッド配列構造を創製することを本申請研究の目的とする。

3. 研究の方法

医用金属チタンの表面に水熱処理によって反応性金属塩の層を形成し、同層あるいはガラスセラミックスを反応性基材として用いて、水溶液中で同層から溶解した化学種が、同層の極表面で水溶液中の化学種と化学結合することによって結晶核を形成し、自己組織的に配向しながら結晶成長したナノ・マイクロ粒子配列構造を創製する。すなわち、

酸-塩基反応、加水分解反応、結晶成長を熱力学的に調節するため、反応性金属塩の化学組成と溶解度、水溶液組成-温度-pHでナノあるいはマイクロメートルサイズの結晶の自己組織化的配向性を制御し、微細構造(結晶異方性の強い結晶の配向性制御)-高生体機能性発現(細胞活性)の相関を学術的に追究した。ソーダ石灰シリカガラス($\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$)はそれ自体が水溶液中で加水分解・水和反応をする化学的に活性であることを利用して、リン酸塩水溶液中で加水分解反応・水和反応を進行させることで、ガラスから溶出するカルシウムイオンとリン酸イオン種のガラス表面に形成する水和シリカゲル層内の相互拡散によって、結晶配向性の高いヒドロキシアパタイト結晶の成長を制御し、歯のエナメル質構造以上の結晶配向性を有するアパタイトのロッド配列構造を創製した。

4. 研究成果

(1) 酸化チタンナノ・マイクロロッド配列構造およびマイクロドメイン起伏構造の創製
①自己組織化的酸化チタンロッド配列構造の創製、細胞接着性および増殖性の評価

大気中雰囲気下400~600°Cで1時間から24時間の熱処理を施した金属チタンの表面に金属結晶粒(グレイン)の大きさを反映したマイクロドメイン起伏構造を創製した。熱処理温度と熱処理時間を変化させて、X線回折法により酸化チタン(ルチル相)の結晶子径の変化を調べ、600°Cの条件が結晶径の制御に最適な温度であることがわかった。酸化チタンの結晶子径の大きさと平均表面粗さは比例関係になったことに基づき、平均表面粗さ; Raを15~70nmの範囲内で調節した。このことは、熱酸化という簡単な処理方法により、ナノメートルスケールの表面粗さの制御ができることを示す。その起伏構造を有する所定の表面

粗さを有する基板表面で骨芽細胞様細胞の培養実験を実施して、細胞接着性と増殖性を調べた。その結果、平均表面粗さが40nm(Ra)付近で優れた細胞増殖性と増殖性の発現を確認した。国内外の多くの研究者は骨組織結合性の発現に重要な細胞応答反応を促進するため、ナノメータースケールのトポグラフィの制御が重要であると認識しているが、肝心のナノメータースケールの起伏構造を種々の形を持つ大型デバイスに容易かつ戦略的に作製する技術がなかった。本技術は、いろいろな形状を有するインプラントデバイスに適用できることから有望である。

②ガラスからの水酸アパタイトロッド配列構造の創製

CaOとNa₂O比の異なるソーダライムシリカ系ガラスを作製し、pH9付近の0.01Mのリン酸塩水溶液に80°Cの条件で最大28日間浸漬した。浸漬後のガラスを蒸留水で洗浄、自然乾燥し、ガラス試片の微細構造をX線回折法で評価し、走査型電子顕微鏡(SEM)により表面及び断面の形態を観察した。リン酸塩水溶液のイオン濃度変化を高周波誘導結合型プラズマ発光分光法で調べ、リン酸塩水溶液のpH変化を調べた。pH及び元素濃度変化に基づき、アパタイトロッド配列構造の形成機構を次のように考察した。ソーダライムシリカ系ガラスはリン酸塩水溶液中で加水分解反応して、Na(I)イオン、Ca(II)イオンを溶出する。豊富なシラノール基で構成される水和シリカゲル層は水酸化物イオンによるSi-O-Si結合の切断を受け、水和シリカゲル層は分解して、Si(IV)イオンが溶出する。ガラスとリン酸水溶液界面でのCa(II)とOH⁻濃度の増加は近傍のP(V)と反応してアパタイト形成に有利に働くため、アパタイトが形成する。本研究により作製したアパタイトのロッド配列構造は歯のエナメル質

のc軸配向性を超えるほど結晶配向性が高いことがわかった。国内外の多くの研究者は一次元の結晶成長(配向成長)を制御することはできていたが、結晶の配向成長と同時に結晶配列を“自己組織化的に制御する”ことには成功していなかった。本研究の成果は新規生体機能性材料の合成手法に波及するのみならず、他の化学組成の無機ナノ結晶材料の合成技術に展開することが期待される。

(2) ナノ結晶性酸化チタン層への酸化物層の創製およびMgイオン、Caイオンの導入および細胞適合性の向上

金属チタン基板を3mass%の過酸化水素水溶液に浸漬して、80°Cで3時間処理し、表面にサブミクロンスケールの酸化チタン結晶(アナターゼ相)を析出させた後、Ca(OH)₂水溶液またはCa(OH)₂/Mg(NO₃)₂水溶液中で150°C、24時間水熱処理した。作製した試片の表面構造を薄膜X線回折法、表面形態を走査型電子顕微鏡観察、表面化学組成をエネルギー分散型X線分析により調べた。また、作製した試片を36.5°C、pH7.4のSBFに3、7および14日間浸漬し、*in vitro*アパタイト形成能をTF-XRDおよびSEM観察により調べた。水熱処理に用いるCa(OH)₂水溶液中のMgの有無により、金属チタン板表面に結晶構造および形態の異なる修飾層が形成した。また、得られた修飾層は*in vitro*アパタイト形成能を有しており、その形成能は水和結晶相が形成したCT₁₀Ca/8Mg試片の方が高いことが分かった。骨芽細胞様細胞を用いた*in vitro*細胞増殖性評価を行った。ポジティブコントロール(プラスティック)と比較して、CT₁₀CaおよびCT₁₀Ca/8Mg試片の増殖性に変化は見られないことから、CT₁₀CaおよびCT₁₀Ca/8Mg試片に細胞毒性がないことが分かった。

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 7件)

- ① S. Hayakawa, Y. Li, K. Tsuru, A. Osaka, E. Fujii, K. Kawabata, Preparation of Nanometer-scale Rod Array of Hydroxyapatite Crystal, *Acta Biomaterialia*, (2009), doi:10.1016/j.actbio.2009.02.018. (査読有り)
- ② T. Shozui, K. Tsuru, S. Hayakawa, Y. Shirosaki, A. Osaka, “XPS study on potential suppression factors of suppressing in vitro apatite formation on anatase films prepared on various substrates,” *Surface and Coatings Technology*, Vol. **203**[16], (2009), pp. 2181-2185. (査読有り)
- ③ T. Shozui, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, Enhancement of in vitro apatite-forming ability of thermally oxidized titanium surfaces by ultraviolet irradiation, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, Vol. **116**[4], (2008), pp. 530-535. (査読有り)
- ④ Jia Ming Zhao, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, Modification of Ti implant surface for cell proliferation and cell alignment, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. **84A**[4], (2008), pp. 988-993. (査読有り)
- ⑤ Y. Liu, W. Chen, Y. Yang, J.L. Ong, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, Novel fabrication of nano-rod array structures on titanium and in vitro cell responses, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*,

Vol. **19**[7], (2008), pp. 1-7. (査読有り)

- ⑥ T. Asano, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, Bilirubin adsorption property of sol-gel-derived titania particles for blood purification therapy, *Acta Biomaterialia*, Vol. **4**[4], (2008), pp. 1067-1072. (査読有り)
- ⑦ T. Shozui, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, Enhanced in vitro apatite-forming ability of sol-gel derived titania films by ultraviolet irradiation, *Key Engineering Materials*, Vols. 361-363, (2008), pp. 601-604., 2008 Trans Tech Publications, Switzerland. (査読有り)

[学会発表] (計 11件)

- ① 金田治樹, 城崎由紀, 早川聡, 尾坂明義, 植月啓太, 結晶性酸化チタン層のアパタイト形成能に及ぼす紫外線照射の影響2, 講演番号 3G08, 日本セラミックス協会 2009 年年会, 千葉(2009 年 3 月 16 日(月) ~18 日(水))
- ② K. Kawanishi, A. Kaeriyama, Y. Shirosaki, S. Hayakawa, A. Osaka, E. Fujii, K. Kawabata, Osteoblastic cell adhesion on micro-patterned titania layers, 日本セラミックス協会基礎科学部会第 47 回セラミックス基礎科学討論会, 講演番号 1D6 国, 2009.1.9. グランキューブ大阪 (大阪国際会議場)
- ③ S. Hayakawa, H. Kazama, K. Tsuru, A. Osaka, E. Fujii, K. Kawabata, Formation of Nano- and Micrometer-scale Hydroxyapatite Rod Array Structure on Ca-containing Glass, at 062 - Glasses and glass ceramics, 8th World Biomaterials Congress, 2008, May

- 28-June 1, 2008.
- ④ 勝瑞哲也・都留寛治・早川 聡・尾坂明義・藤井英司・川端浩二，結晶性酸化チタン層のアパタイト形成能に及ぼす紫外線照射の影響，講演番号 1K28，日本セラミックス協会 2008 年年会，長岡（2008 年 3 月 20 日（木）～22 日（土））
- ⑤ 歸山亜弓・勝瑞哲也・都留寛治・早川 聡・尾坂明義・藤井英司・川端浩二，酸化チタン層の物理的及び化学的パターンニングと *in vitro* アパタイト形成，講演番号 2B02，日本セラミックス協会基礎科学部会第 46 回セラミックス基礎科学討論会，名古屋（2008 年 1 月 10 日（木），11 日（金））
- ⑥ 正岡伸孝，川西孝治，関川彩子，都留寛治，早川 聡，尾坂明義，酸化チタンナノ-ロッド配列構造の構築と血液適合性の評価，講演番号 K70，日本セラミックス協会中国四国支部主催第 14 回ヤングセラミスト・ミーティング in 中四国，岡山理科大（2007 年 12 月 8 日（土））
- ⑦ 安東民雄，都留寛治，早川 聡，尾坂明義，“温水処理によるガラスからの酸化亜鉛マイクロファイバーの形成”，講演番号 2B03，日本セラミックス協会ガラス部会第 48 回ガラス及びフォトンクス材料討論会，豊橋（2007 年 11 月 29 日（木），30 日（金））
- ⑧ T. Shozui，K. Tsuru，S. Hayakawa，A. Osaka，Enhanced *in vitro* apatite-forming ability of sol-gel derived titania films by ultraviolet irradiation，Key Engineering Materials，Vols. 361-363，(2008)，pp. 601-604.，2008 Trans Tech Publications，Switzerland.
- ⑨ 早川 聡・風間 洋・都留寛治・尾坂明義・藤井英司・川端浩二，“ガラス表面でのアパタイトロッド配列構造の形成”，講演番号 2G05，日本セラミックス協会第 20 回秋季シンポジウム，名古屋（2007 年 9 月 12 日（水）～14 日（金））
- ⑩ H. Kazama，K. Tsuru，S. Hayakawa，A. Osaka，E. Fujii，K. Kawabata，“Formation of Micro-scale Rod Array of Hydroxyapatite on Glass Surface，” Y6，XXIst International Congress on Glass (ICG2007)，Strasbourg，France，July 6，2007.
- ⑪ S. Hayakawa，H. Kazama，Y. Nomura，K. Tsuru，A. Osaka，E. Fujii，K. Kawabata，“Formation of Nano-scale Rod Array of Hydroxyapatite on Glass Surface，” Y9，XXIst International Congress on Glass (ICG2007)，Strasbourg，France，July 4-5，2007.
- 〔図書〕（計 2 件）
- ① 早川 聡，尾坂明義，城崎由紀，医用金属チタンの生体親和性の制御，未来材料第 9 巻，5 月号，38-44 頁，（株）エヌ・ティー・エス，2009 年
- ② S. Hayakawa，K. Tsuru，A. Osaka，“Part 3: The microstructure of bioceramics and its analysis，” in *Bioceramics and their clinical applications*: edited by Tadashi Kokubo，pp. 53-77，Woodhead Publishing in Materials，2008. 4.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況（計 2 件）
- ① 特願 2007-132708，早川 聡，尾坂明義，都留寛治，勝瑞哲也，国立大学法人岡山大学，“生体親和性インプラントの製造方法” 出願 2007 年 5 月 18 日，国内

- ②_r PCT/JP2008/059149, W02008/143219A1, 早川 聡, 尾坂明義, 都留寛治, 勝瑞哲也, 国立大学法人岡山大学, “生体親和性インプラントの製造方法” PCT出願: 2008年11月27日, 国外

[その他]

- ①_r 科学技術振興機構 (JST) 新技術説明会
2009年1月20日発表
- ②_r 日経産業新聞 人工関節・歯根チタン
2009年2月5日掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 聡 (HAYAKAWA SATOSHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号: 20263618

(2) 連携研究者

尾坂明義 (OSAKA AKIYOSHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 20033409

都留寛治 (TSURU KANJI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号: 50314654

(3) 研究協力者

藤井英司 (EIJI FUJII)
岡山県工業技術センター・技術員

城崎由紀 (SHIROSAKI YUKI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号: 40533956