

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18245

研究課題名(和文)フェムト秒レーザーを用いた表面構造制御による次世代生体材料の創製

研究課題名(英文)Creation of next generation biomaterial by control of surface profiles with femtosecond laser

研究代表者

篠永 東吾 (Shinonaga, Togo)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：60748507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：次世代生体材料の創成のため、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上の細胞伸展制御を試みた。はじめに、チタン材料上に形成する周期的微細構造の周期をレーザー波長により変化させることが可能であることを明らかにした。次に、周期的微細構造を形成したチタン材料に対してヒト骨芽細胞を用いて細胞試験を行った結果、細胞伸展制御に有効な周期が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Titanium alloys are the most used biomaterials. However, they have insufficient bioactivity. Therefore, it is required to add new function to titanium alloys. One method to add new function is the creation of periodic nanostructures on the surfaces, which can control cell spreading. Then, femtosecond laser is one of the useful tools to create periodic nanostructures which can be created on various metals by self-organizing in the laser focusing spot. In this study, control of cell spreading on titanium material was examined by periodic nanostructures formation with femtosecond laser. It is clarified that period of the periodic nanostructures can be varied by laser wavelength. Then, cell test was conducted by using the titanium material which have periodic nanostructures with different periods. Results of cell test show that periods of about 300 and 600 nm are useful for control of cell spreading on titanium material surface.

研究分野：レーザー加工、電子ビーム加工

キーワード：フェムト秒レーザー 周期的微細構造 生体材料 チタン 骨芽細胞 細胞伸展制御

1. 研究開始当初の背景

チタン (Ti) や Ti 合金等の Ti 材料は機械的性質に優れていることから、現在最もインプラント材料として使用されている生体材料の一種である。しかし、Ti 材料そのものは金属材料であるが故に生体不活性であるため、Ti 材料への新機能付与が必須の課題である。Ti 材料への新機能付与の一種に、細胞が伸展する方向を一方向に制御する細胞伸展制御がある。骨には骨形成しやすい方向があるが、骨形成に起因する骨芽細胞を骨形成しやすい方向へ伸展制御できれば、早期の骨形成が期待される。上述した細胞伸展制御には、材料表面へ周期的微細構造を形成することが有効な手法の一つであると知られている。国内・国外の研究における細胞伸展制御を目指した周期的微細構造形成方法としては、プラズマドライエッチングや、CO₂ アシストエンプス加工などが挙げられるがこれらの手法では真空雰囲気や複雑な工程が必要であるといった点を有している。

そこで、大気中であつレーザーの集光スポット内部に自己組織的に周期的微細構造が形成可能なフェムト秒レーザーが細胞伸展制御のための周期的微細構造形成に有効ではないかと着想するに至った。先行研究において、Ti 基板上へエアロゾルビームを用いて成膜した酸化チタン (TiO₂) 膜上に対して、波長 775 nm のフェムト秒レーザーを照射すると、レーザーの偏光 E に対して垂直な方向に溝を有する周期 230 nm 程度の周期的微細構造が形成可能であることを明らかにした。骨芽細胞を用いて 3 時間細胞培養を行ったところ、細胞が溝に沿って伸展することが明らかになった。これらの結果は、TiO₂ 膜上での細胞伸展制御を世界で初めて成功した例である。ここで、実際の生体応用を考慮した場合、Ti や Ti 合金に対して周期的微細構造を形成する技術が必要である。これら Ti 材料へのレーザーを用いた周期的微細構造形成による細胞伸展制御は明らかになっていない。細胞が伸展するためには、細胞と材料表面の相互作用が重要である。細胞のサイズは数 10 μm であるのに対し、細胞が接着する足 (接着斑) の幅は 100-1000 nm 程度である。すなわち、周期を 100-1000 nm の範囲で制御できれば、細胞伸展制御に最適な周期を明確化することが期待される。フェムト秒レーザーによる周期的微細構造はレーザーの波長に依存することが知られているため、Ti 材料上においてもレーザーの波長により周期を制御した周期的微細構造が形成できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、次世代生体材料の創製のため、生体材料として広く使用されている Ti や Ti 合金に対してフェムト秒レーザーを用いて周期的微細構造の形成を行い、Ti 材料上での細胞伸展制御を試みる。この際、高効率な細胞伸展制御を目指し、従来では明らかにされて

いなかった周期が細胞伸展に与える影響について調べ、細胞伸展制御に有効な周期を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) フェムト秒レーザー照射による周期的微細構造形成セットアップの設計・構築

図 1 に本研究で構築したレーザー照射セットアップの概略図を示す。レーザーとして平均出力 1 W、繰り返し率 1 kHz、パルス幅 150 fs、基本波長 775 nm のフェムト秒レーザーを使用した。形成する周期的微細構造の周期の変化が可能ないように、レーザー照射セットアップに波長変換器を組み込み、3 つのレーザー波長 (基本波 775 nm、第二高調波 388 nm 及び第三高調波 258 nm) で照射可能にした。また、周期的微細構造形成領域の作成のため、二軸駆動 XY ステージを用いてレーザー集光スポットを掃引照射できるようにした。

(2) Ti 及び Ti 合金へのフェムト秒レーザー照射による周期的微細構造形成

はじめに、ステージを一軸方向へ走査することで、集光スポットの走査照射を行った。レーザー波長、レーザーフルエンス及びスポット径あたりに照射される回数 (照射パルス数) などを変化させて周期的微細構造が形成される条件を明らかにした。レーザー照射後の試料表面は走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、各レーザー波長で形成される周期について詳細に観察した。次に、図 1(b) に示すようにステージを二軸方向に動かし各レーザー波長によって Ti 基板上に対して周期的微細構造形成領域を作成した。

(3) 周期が細胞伸展へ与える影響

基本波、第二高調波および第三高調波で形成した周期的微細構造が細胞伸展に与える影響について調べた。細胞試験ではヒト骨芽細胞 (MG-63) を用いて 37 °C、5% CO₂ 濃度のインキュベーターの中で 3 時間培養を行った。

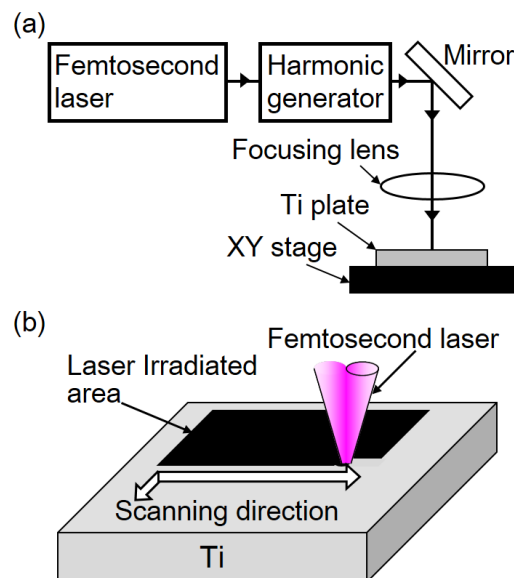


図 1 (a) レーザー照射セットアップ外略図、(b) 集光スポットの走査方向

その後、組織固定を行い、試料上の細胞伸展の様子が蛍光顕微鏡によって観察できるよう免疫染色を行った。この際、細胞の核を青、アクチンを赤、接着斑を緑色に染色した。細胞伸展に有効な周期を定量的に明らかにするため、細胞伸展の角度と細胞数について測定した。

4. 研究成果

(1) フェムト秒レーザー照射による Ti 上の周期的微細構造形成

レーザー波長を 258 nm、388 nm および 775 nm へと変化させ、純 Ti 基板に対してそれぞれ集光照射した後の試料表面 SEM 観察像を図 2 (b)、(c)、及び(d)に示す。また、比較としてレーザーを照射していない場合の Ti 基板表面を図 2(a)に示す。

図 2 から、レーザーの偏光 E に対して垂直な方向に溝を有する周期的微細構造がそれぞれのレーザー波長で照射した場合において明確に形成されていることがわかる。また、得られる周期はレーザー波長によって変化している。SEM 観察像から隣接する溝の間隔を周期として測定した結果、各レーザー波長(258 nm、388 nm および 775 nm)により Ti 基板上に得られる周期的微細構造の周期はそれぞれ約 200、300 および 600 nm となった。すなわち、レーザー波長が増加すると、形成される周期も線形的に増加することが明らかになった。また、今回のレーザー照射条件において Ti 基板上に形成される周期は用いたレーザー波長の約 80%程度となることが示された。以上の結果より、レーザーの波長により周期を制御した周期的微細構造が Ti 材料上へ形成可能であることを明らかにした。

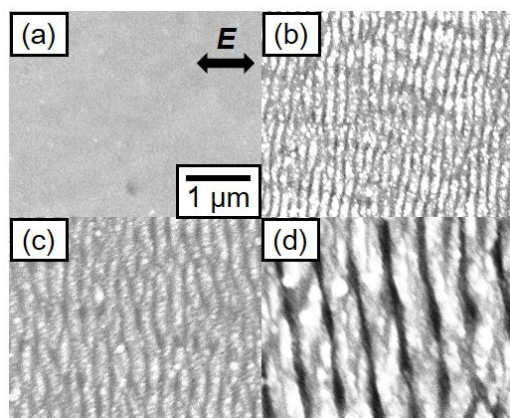


図 2 Ti 基板表面の SEM 観察像：(a)レーザー照射無し、(b)波長 258 nm、(c)388 nm および(d)775 nm でレーザー照射後

(2) 周期が細胞伸展に与える影響

細胞試験によって細胞伸展の評価を行うため、XY ステージを走査し Ti 基板に対して周期的微細構造形成領域を作成した。その際、周期約 200、300 および 600 nm の周期的微細構造を Ti 基板上の約 10×2 mm の範囲へ

形成した。周期的微細構造を形成した Ti 基板上においてヒト骨芽細胞を用いて 3 時間、細胞試験を行った。レーザーを照射していない細胞試験後の試料表面における蛍光顕微鏡観察像を図 3(a)に、周期約 200、300 および 600 nm を有する周期的微細構造上における蛍光顕微鏡観察像を図 3(b)、(c)および(d)にそれぞれ示す。

周期的微細構造を形成していない場合、細胞はランダムな方向に伸展していることがわかる。本結果は周期約 200 nm の周期的微細構造上でも観察された。一方で、周期約 300 nm および 600 nm の周期的微細構造上においては、細胞が周期的微細構造の溝方向に沿って伸展する箇所が存在することが明確に観察された。本結果は、細胞が伸展した角度と細胞数を測定することによっても示されている。本結果より、約 300 nm 及び 600 nm の周期を有する周期的微細構造を形成することが Ti 基板上での細胞伸展制御に有効であることが示唆された。得られた成果は、高齢化社会を見据えた次世代生体材料の創成のために重要な知見となると考えられる。

今後は、より高効率な細胞伸展制御を目指し、レーザーを用いた高精度な表面形状制御技術の確立を目指す予定である。また、細胞伸展制御メカニズムの解明についても試みる。

本研究で得られた成果は 5 章に示すように英文の雑誌論文や、国際会議にて世界に向けて報告した。

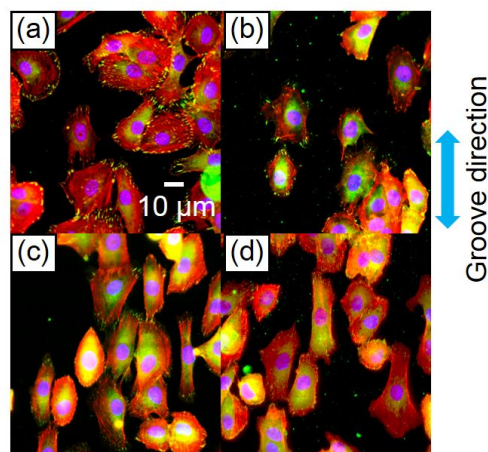


図 3 細胞試験後の Ti 基板表面における蛍光顕微鏡観察像：(a)レーザー照射無し、(b)周期約 200 nm、(c)300 nm および(d)600 nm の周期的微細構造

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

T. Shinonaga, S. Kinoshita, Y. Okamoto, M. Tsukamoto, and A. Okada, Formation of periodic nanostructures produced with femtosecond laser for creation of new functional biomaterials, *Procedia CIRP*, 査読有, Vol. 42, 2016, pp.57-61.

Y. Sato, M. Tsukamoto, T. Shinonaga,

T. 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, p.184.

DOI 10.1007/s00339-016-9716-4

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

DOI 10.1007/s00339-016-9626-5

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形成, レーザー研究. 査読有, Vol. 43, No. 11, 2015, 772-776.

K. Nozaki, T. Shinonaga, N. Ebe, N. Horiuchi, M. Nakamura, Y. Tsutsumi, T. Hanawa, M. Tsukamoto, K. Yamashita, A. Nagai, Hierarchical Periodic Micro/nano Structures on Nitinol and Their Influence on Oriented Endothelialization and Anti-thrombosis, Materials Science and Engineering C, 査読有, Vol. 57, 2015, pp.1-6.

DOI 10.1016/j.msec.2015.07.028

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, 査読有, Vol.135, No.10, 2015, pp.587-591.

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, 査読有, Vol. 119, 2015, pp.493-496.

[学会発表](計7件)

T. Shinonaga, Control of Surface Profile in Periodic Nanostructures Produced with Ultrashort Pulsed Laser, ICALEO2016 (35th International Congress on the Applications of Lasers & Electro-optics), October 19th, 2016, San Diego (USA) 【招待講演】

木下 奨之, 篠永東吾, レーザ照射パラメータによる超短パルスレーザー誘起ナノ周期構造の形状変化, 第85回レーザー加工学会講演会, 2016年6月9日, 大阪大学(大阪府・茨木市)

T. Shinonaga, Shape Change of Periodic Nanostructures Produced with Ultrashort Pulsed Laser on Titanium Surface, SLPC2016 (The 2nd Smart Laser Processing Conference), May 19th, 2016, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

T. Shinonaga, Formation of periodic nanostructures produced with femtosecond laser for creation of new functional biomaterials, 18th CIRP Conference on Electro Physical and Chemical Machining (ISEM XVIII), April 19th, 2016, 東京大学(東京都・文京区)

【招待講演】

木下 奨之, 篠永東吾, 純Ti基板に形成した超短パルスレーザー誘起ナノ周期構造にレーザー照射パラメータが及ぼす影響, 日本機械学会 中国四国支部 第54期総会・講演会, 2016年3月9日, 愛媛大学(愛媛県・松山市)

篠永東吾, 細胞伸展制御機能付与のための超短パルスレーザーを用いたナノ周期構造形成に関する研究, 2015年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2015年9月5日, 東北大学(宮城県・仙台市)

T. Shinonaga, Influence of periods of periodic nanostructures formed with femtosecond laser on cell spreading, LAMP2015 (LPM2015: The 16th International Symposium on Laser Precision Microfabrication), May 27th to 28th, 2015, 北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠永 東吾 (SHINONAGA Togo)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号: 60748507

(2) 研究協力者

塚本 雅裕 (TSUKAMOTO Masahiro)

大阪大学・接合科学研究所・教授
研究者番号: 90273713