

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592270

研究課題名（和文） フェムト秒レーザーによるチタンインプラントのナノ表面改質

研究課題名（英文） Nano-surface modification of titanium with femtosecond laser

研究代表者

武田 昭二（TAKEDA SHOJI）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20067186

研究成果の概要：

歯科医療において高齢化社会の到来とともにチタンインプラントの需要は増加しつつある。患者の QOL（Quality of Life）を高めるためには安定した骨とも結合が可能なインプラントの開発が望まれる。骨内に埋入されたインプラントが骨と結合するには、インプラント表面の化学的性質、表面性状や表面エネルギーなどが影響する。本研究は表面性状に注目し、チタン表面に分子レベルであるナノの表面構造を付与し、骨との結合性を高めようとしたものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科理工学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：インプラント，チタン，表面改質，レーザー，周期構造

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来とともに歯科インプラントの重要性は日ごとに増している。チタンインプラントと骨との結合は、埋入骨内の骨芽細胞とインプラント表面との相互作用に依存している。インプラントが骨芽細胞に影響を与える因子として、材料表面の化学的性質、表面性状や表面エネルギーなどが考えられている。その中で、表面あらしが *in vitro* において骨芽細胞の接着・増殖及び分化に影響を及ぼすことが報告されている。一方、ナノフェーズの表面は、ナノレベルの大きさである接着性タンパクなどの吸着によって望

ましい環境であり、骨芽細胞の接着にとって有意であることが報告されている。他方、生体内で骨や腱などの組織が配向した構造である点にならって、インプラント表面に groove を付与して細胞を配向させて、組織の望む方向へ配向させようとする試みがある。すでに、高分子材料やシリコンウエファーに作製されたナノ groove を有する表面での細胞反応が研究されており、規則的なナノスケールの groove は、細胞の contact guidance となり、骨組織を望む方向に形成させるのに有効であると考えられている。これらの結果は、チタンインプラント表面にナノレベルの

grooveを形成することができれば、チタンと骨との結合にとって有意ではないかと考えられる。しかし、チタン表面に直接ナノレベルのgrooveを形成することは難しい。そこで、本研究ではフェムト秒レーザーを用いてナノレベルでのgrooveを形成を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、チタン表面にナノレベルでの周期構造を形成するためにフェムト秒レーザーを用いた。直線偏光のフェムト秒レーザーを加工閾値近傍の照射エネルギーで材料表面に集光して照射すると、入射光と表面散乱光の干渉により照射レーザーの波長と同程度の周期間隔、半分以下の凸凹深さをもった微細な周期構造が偏光方向と直交する方向に自己組織的に形成されることが知られている。さらに、フェムト秒レーザーは材料加工において、そのパルス幅の短いためにレーザーパルスのエネルギーが熱に変換される前に照射が終了し、熱影響が少ないなど多くの利点を有している。

本研究では、チタン基板に対してフェムト秒レーザー照射によってナノレベルの微細周期構造、格子構造および数ミクロンのgrooveを形成し、表面形状の観察を行った後、その基板上で骨芽細胞様細胞による細胞適合性の評価を行い、次世代のチタンインプラントの創製への提言を行う。

## 3. 研究の方法

(1) フェムト秒レーザー照射による表面改質

本実験には直径20 mm、厚さ1.5 mmの円板状cpチタンを最終0.06 μmのコロイダルシリカ溶液を用いてバフ研磨仕上げしたものを用いた。

周期構造の形成には、チタンサファイヤ再生増幅器からのレーザーパルス（パルス幅120 fs、繰り返し周波数1 kHz）で焦点距離100 mmの平凸シリンドリカルレンズによってチタン基板表面に集光した。Fig.1には実

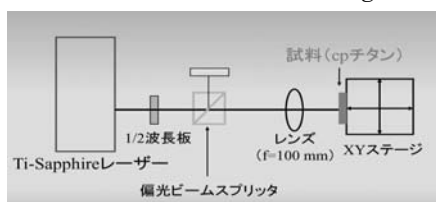


Fig.1 フェムト秒レーザーの模式図

験装置の模式図を示した。試料は電動XYステージにより一定速度で移動させながら走査照射した。まず最初に、パルスエネルギーおよび試料の移動速度を変化させて周期構造への影響を調べた。次いで、レーザー波長の影響を調べるために、中心波長を400 nmと800 nmの2波長を用いて周期構造の幅を調整した。さらに、同位置に照射するショット数を変化させて周期構造の深さを調整し

た。また、格子構造は、800 nmの波長で周期構造を形成した後、それとは直交方向に400 nmと800 nm波長のレーザーを照射することによって作製した。また、直接フェムト秒レーザーを用いてチタン基板表面にミクロンレベルのgrooveを作製し、比較した。

作製された試料は、走査電子顕微鏡(SEM)および原子間原子顕微鏡(ATM)で表面観察した。

(2) 骨芽細胞様細胞による細胞生存率とアクチン染色

### ①細胞生存率

骨芽細胞様細胞のMG-63細胞を、1%グルタミンと10%ウシ胎児血清を含む、MEMで $2 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞浮遊液を調製し、滅菌済みの各試料と鏡面研磨チタン基板を入れた6ウエルのマルチプレートの各ウエル当たり1 mlずつ分注後に、7日間培養した。その後、MTS法によって540 nmの吸光度を測定し、対照のプラスチックシャーレに対する百分率で細胞生存率を求めた。

### ②アクチン染色

$5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>に調製したMG-63細胞浮遊液を各ウエル当たり1 mlずつ分注後に、1時間、4時間、24時間および4日間培養した。各期間培養後にPBS(-)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定した後、0.1% Triton X-100で透過性を持たせた。その後、PBS(-)で洗浄し、ファロイジン(Alexa Fluor 488 phalloidim)でアクチンを蛍光染色した後に、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

なお、培養1時間後については、NIH imageによって細胞数と細胞占有面積を求めた。

また、画像解析ソフトによって周期構造の方向と細胞の長軸がなす角を求めた。

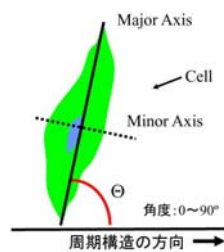


Fig.2 細胞の角度

## 4. 研究成果

(1) フェムト秒レーザーによる表面加工の観察

Fig.3に照射エネルギーと試料の移動速度を変化させて周期構造を形成したチタン基板を示した。いずれも回折による分光能力が認められ、一定の間隔で周期構造が形成されていることが確認された。

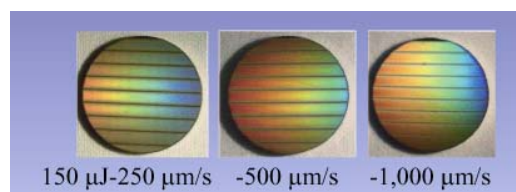


Fig.3 試料の外観

Fig.4 に周期構造の SEM 像を示した。周期構造は刃状を呈していた。SEM 及び AMF の観察結果から、試料の移動速度を落としてレーザーの照射回数を増加させたり、パルスエネルギーを増加させるとレーザー照射面の全体が加工され、周期構造の乱れや析出物が生じた。なお、electron probe micro-analysis によるチタン表面の酸素濃度分析と X-ray photoelectron spectroscopy による窒素分析からレーザー照射による酸化の進行や窒化物の生成などは認められないことが確認された。

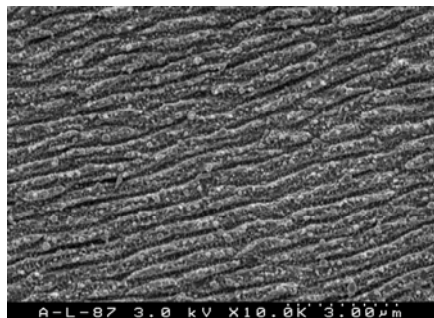


Fig.4 周期構造の SEM 像

次に、照射波長の影響を見てみると、周期構造は各照射波長に近い間隔で形成されていた。すなわち、400 nm 波長では平均で約 315 nm の周期構造を示し、800 nm 波長では平均で約 688 nm と間隔が広がった。また、深さも 800 nm 波長では約 300 nm を示し、400 nm 波長の約 90 nm より深くなった。ショット数を少なくすると 800 nm 波長では約 100 nm、400 nm 波長では約 50 nm と各波長とも深さは浅くなり、輪郭も不明瞭になった。

800 nm 波長を直交させた場合の格子構造の SEM 像を Fig.5 に示した。格子構造を付与した場合、400 nm 波長を直交させた条件では、800 nm 波長を直交させた条件に比較して明瞭な格子構造が観察された。

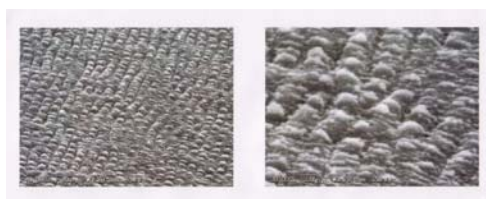


Fig.5 格子構造の SEM 像 (800 nm)

直接フェムト秒レーザー照射によってチタン表面に groove を形成した場合の SEM 像を Fig.6 に示した。周期構造に比べて一定の間隔で直線的な groove 構造が形成された。形成された groove の幅は約 10  $\mu\text{m}$  で、深さが約 6  $\mu\text{m}$  であり、熱の影響によるエッジの融解などは認められなかった。

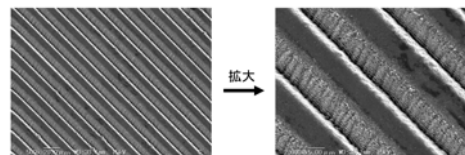


Fig.6 フェムト秒レーザーによる groove の形成

## (2) 骨芽細胞様細胞による評価

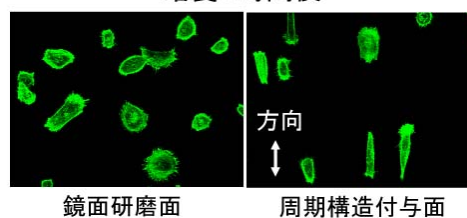
### ①細胞生存率

培養 7 日後の細胞生存率は、周期構造、格子構造および groove 構造のいずれにおいても鏡面研磨面との間に有意差は認められなかった。このことから、周期構造、格子構造および groove 構造の形成による細胞増殖への影響はないと考えられた。表面分析からも明らかなようにフェムト秒レーザー照射によってチタン基板表面が加工されたとしても化学的性質の変化がほとんど認められないためと考えられた。

### ②アクチン染色

培養 1 時間後のアクチン染色の結果を見ると、鏡面研磨面では細胞はほとんどが球形を呈していた。しかし、周期構造を付与した面では、周期構造の方向に沿って長く伸展を始めている細胞が見受けられた (Fig.7)。

### 培養 1 時間後

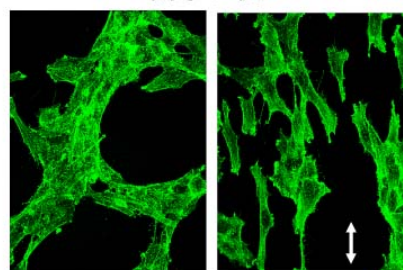


鏡面研磨面

周期構造付与面

Fig.7 培養 1 時間後の細胞の配向性

### 培養 4 日後



鏡面研磨面

周期構造付与面

Fig.8 培養 4 日後の細胞の配向性

培養 4 時間後の細胞の方向性を周期構造と細胞の長軸との間の角で見ると、800 nm 波長において平均で約 20°と鏡面研磨面の約 50°に比べて小さく、周期構造との平行性が確認された。この傾向は培養期間が増加するとともに顕著になった。

Fig.8 に培養 4 日後のアクチン染色の結果



を示した。培養4日後では、細胞は周期構造に沿って連続的に連なっていた。

照射波長の影響を見ると、400 nm と 800 nm との間で細胞の配向性にほとんど差は認められなかった。しかし、ショット数を減らして凹みの深さを浅くした場合には、両波長とも深い場合に比べて細胞の配向性は著しく低下し、明確な方向性が認められなくなった。このことは、チタン基板表面上での細胞の配向にとって周期構造の間隔と深さの両者が関与していると考えられた。一方、groove を形成した面においても細胞は groove の方向に沿って伸展し、配向していた。そして、その配向性は周期構造よりも顕著であった。この相違は、SEM 像からも明らかなように周期構造は groove 構造に比べて乱れが認められ、直線性に劣っていたためと考えられる。このことから、周期構造の形成において如何に直線性を確保するかということと深さが波長の約 30%であり、深さをどれだけ制御できるかという2つの問題を解決することが今後の課題である。

格子構造では、細胞は鏡面研磨面と同様にあらゆる方向に伸展していた。しかし、その伸展が鏡面研磨面に比べて抑制される傾向にあった (Fig.9)。

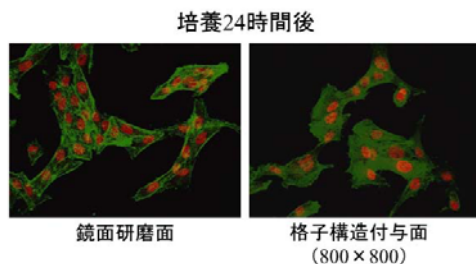


Fig.9 格子構造上での細胞の伸展

培養1時間後の細胞数と細胞の占有面積を調べると、格子構造を付与した面と鏡面研磨面で細胞数にはほとんど差が認められなかった。しかし、細胞の占有面積は格子構造を付与した面で小さかった。このことから、格子構造では細胞の伸展が抑制されていることが確認された。

以上の結果から、本研究で用いたフェムト秒レーザーはチタン表面に熱による酸化や窒化などの変化を受けることもなく、自己組織的にナノレベルでの周期構造を付与し、細胞を配向させることが可能であることが明らかになった。今後は *in vivo* における骨の増殖が周期構造に沿って配向するか確認することによって次世代のチタンインプラントの可能性を追求する必要がある。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 武田昭二、大島 浩、沢田博司、川原公介、フェムト秒レーザーによるチタン表面の加工、チタンと歯科臨床、7、36、2009
- ② 武田昭二、人工歯根材料の表面改質について、イオン・プラズマフォーラム-第23回イオン工学特別シンポジウム-、2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武田 昭二 (TAKEDA SHOJI)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：20067185

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

中村 正明 (NAKAMURA MASAOKI)  
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授  
研究者番号：3440860226