

## 論文

# 高エネルギーイオン照射とスパッタコーティングによる チタン基板上リン酸カルシウム膜の形成

谷口昌平<sup>\*1)</sup> 関口正之<sup>\*1)</sup> 金城康人<sup>\*1)</sup> 宮崎則幸<sup>\*1)</sup> 加沢エリト<sup>\*2)</sup>

## Formation of Ca-P-O Coating on Titanium Substrate by High Energy Ion Irradiation and Sputter Deposition.

Shohei Taniguchi<sup>\*1)</sup>, Masayuki Sekiguchi<sup>\*1)</sup>, Yasuhito Kinjo<sup>\*1)</sup>, Noriyuki Miyazaki<sup>\*1)</sup>, Elito Kazawa<sup>\*2)</sup>

Ca-P-O coating was formed on pure Ti substrates by sputter deposition. After coating the substrates were irradiated with silicon ions using a high energy (3MeV) ion accelerator. The characterization of coated substrates was examined by a scratch tester, scanning electron microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and transmission electron microscopy (TEM). Compatibility of substrates with bone tissue was examined using the mouse osteoblast cell line MC3T3-E1. The results of the analyses (SEM, XPS and TEM) indicated that the microstructure of sputter deposition coating is amorphous of Ca, P, O and metals. On the other hand, nano-particles were formed in the ion-irradiated coating on Ti substrates. It was found that the scratch strength of coating was increased by ion irradiation. The results of MC3T3-E1 cell growth suggested that biocompatibility can be maintained after coating by sputter deposition and ion irradiation. One side of the substrate was treated with coating and ion irradiation, and this was implanted into rat tibia. Two and three weeks after implantation, larger new bone formation on the treated side was observed compared with that on the untreated side. The results indicated that treatment by high energy ion irradiation after Ca-P-O coating is superior for early bone formation on Ti substrate.

キーワード: イオン照射, リン酸カルシウムコーティング, 生体親和性  
Keywords: Ion-irradiation, Ca-P-O coating, Biocompatibility

### 1. はじめに

チタン材料は、生体親和性が良好であることから、歯科インプラントや人工関節部材として広く使用されている<sup>1)</sup>。骨の成分であるCa-Pをチタンにコーティングし、骨との接合を向上させる試みが広く行われており、良好な結果が報告されている。当初、プラズマ溶射法による厚膜コーティングが使用されたが、残留応力の影響や祖造構造であることから、剥離が生じるという問題があった<sup>2)</sup>。そこで、マイクロメータオーダーの薄膜コーティングが試みられており、スパッタコーティングやイオンビームアシストスパッタコーティング<sup>3)</sup>、などの報告例がある。また、カルシウムイオン注入により、生体内におけるチタン基板上の骨形成を促進させると報告されている<sup>4)</sup>。

ここではスパッタリングによるリン酸カルシウムコーティングに対して、高エネルギーシリコン(Si)イオン照射による表面処理を行い、それによる薄膜強度強化と骨形成促進向上について検討した結果について報告する。

### 2. 方法

2.1 表面処理法 チタン基板は純度99.9%の純チタン(フルウチ化学株式会社)をアセトン洗浄した後、ECRスパッタコーティング装置(株式会社エリオニクス)により、ターゲットを $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (フルウチ化学株式会社)とし、約 $1\mu\text{m}$ 成膜した。スパッタリングにはアルゴンイオンを用い、2kVの加速電圧でコーティングした。コーティングした基板にタンデム型イオン加速器(HVEE社)により、Siイオンを3MeVのエネルギーで照射した(図1)。照射に用いるイオン種を選択条件は、生体に毒性がないことが第一条件となる。

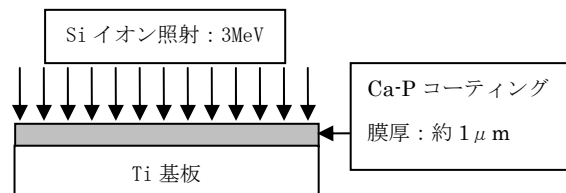


図1. 表面処理法

Siは、形成外科材料として使用されているシリコーン樹脂や、生体活性性材料として知られているBioglass®( $\text{SiO}_2$ - $\text{Na}_2\text{O}$ - $\text{CaO}$ - $\text{P}_2\text{O}_5$ 系)、A-W結晶化ガラス( $\text{SiO}_2$ - $\text{CaO}$ - $\text{MgO}$

<sup>\*1)</sup>ライフサイエンスグループ, <sup>\*2)</sup>城南支所

- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>系) などに含まれる元素であるため、少量含まれていても生体毒性は極めて低いと考えられることや、タンデム型イオン加速器で高密度束のビームを発生でき、照射時間の短縮に繋がるため選択した。

**2. 2 処理基板の評価** 基板のコーティング強度を頂角120° ロックウェル円錐形圧子を用いたマイクロスクラッチ試験機 (CSEM 社) により評価した。チタン基板前面にコーティングを施した後、マスク越しのイオンを照射し、同一基板に照射部と未照射部を形成し、その境界を3N 一定荷重、速度を10mm/min に設定し、スクラッチ試験を行った。スクラッチ時のアコースティックエミッション (AE) 信号と摩擦力を測定した。測定後、スクラッチ痕を走査型電子顕微鏡・X線分析 (SEM/EDX) により観察およびTi のマッピングを行った。

表面形状や成分分析、構造解析を走査型電子顕微鏡 (SEM)、X線光電子分光分析 (XPS)、透過型電子顕微鏡 (TEM) により評価した。

**2. 3 骨芽細胞試験** イオン照射した基板の生体親和性については、マウス骨芽細胞由来 MC3T3-E1 を用い、基板上の形態観察、細胞接着性、細胞増殖度について評価した。細胞は、10% - Fetal Calf Serum (FCS) を含む Modified Eagle's Medium (MEM) 培地中、5%CO<sub>2</sub>-95%空気、37°C で培養した。

コーティング後イオン照射した基板の上で、それぞれ7日間培養し、表面をSEMにより観察した。SEM観察用試料は、2.5% グルタルアルデヒド固定-臨界点乾燥後に白金-パラジウムを蒸着し作製した。

細胞接着性について調べるために、骨芽細胞を未処理のTi基板とコーティング後イオン照射した基板上でそれぞれ6時間培養後、オートピペッターで2回試料板を洗い、基板に残った細胞をカウントした。基板上に播種した細胞数と洗浄後そこに残った細胞数の比を接着率として算出した。

細胞増殖曲線により、表面処理した基板の細胞毒性を調べた。チタン基板は、サイズ: 20mm x 20mm x 1mm<sup>3</sup> を使用した。骨芽細胞を6時間培養した後、培地を加え、そこから3日目、6日目、8日目、10日目、13日目に基板上の細胞数をカウントした。

**2. 4 ラットによる基板骨形成実験** 基板は、2mm×5mm×0.2mm<sup>3</sup> のチタン基板 (99.9%) を用い、片面にリン酸カルシウムコーティング+Si イオン照射 (エネルギー: 3MeV, 照射量: 1.3x10<sup>16</sup> ions/cm<sup>2</sup>) を行い、ラットの頸骨に埋植した。ラットは9週齢の雄15匹を用い、両足頸骨の前面中央部を切開し、チタン基板を両足に1枚ずつ埋植した。それらを5匹ずつ3群に分け、1週目、2週目、3週目に埋植部を採取した。採取したブロックを箔片化しスライド標本を30枚 (15

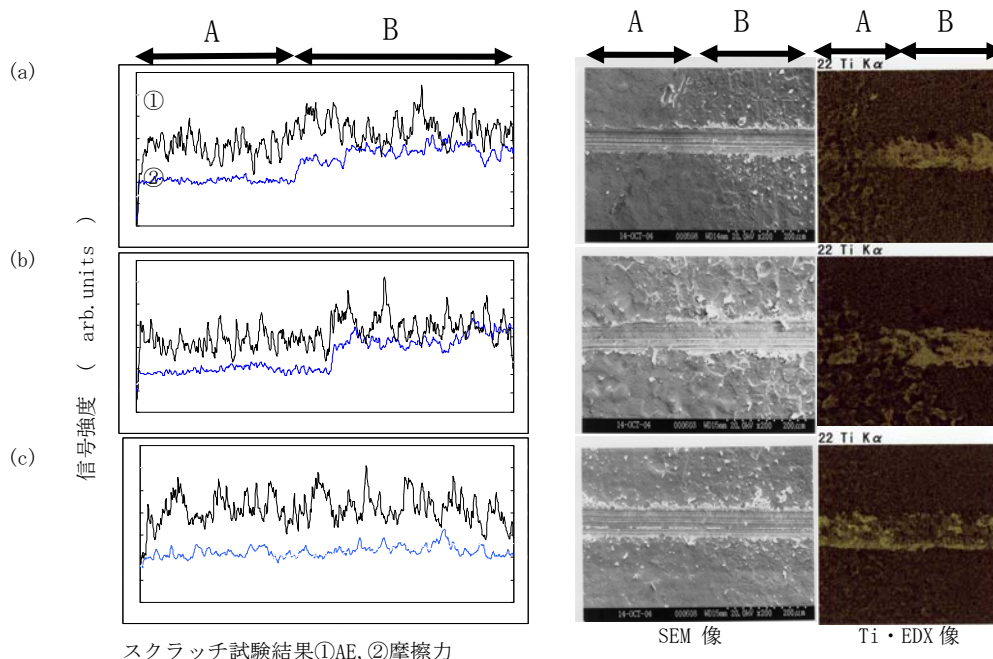


図2. スクラッチ試験結果とSEM/EDX像

エネルギー: 3MeV, 照射量: (a) 2x10<sup>16</sup> ions/cm<sup>2</sup>, (b) 1x10<sup>16</sup> ions/cm<sup>2</sup>, (c) 5x10<sup>15</sup> ions/cm<sup>2</sup>, A:イオン照射部, B: 未照射部

チタン基板表面の細胞形態は、コーティングのみの基板、

匹×両足) 作製し、Villanueva Goldner 染色を施した。こ

の操作により, 石灰化骨は緑, 類骨や骨髄は赤に染色される。

### 3. 結果と考察

**3.1 スクラッチ強度と構造** 図2にコーティング後, Si イオン照射したチタン基板のスクラッチ試験結果を示す。マスキングにより, 同一基板に照射部Aと未照射部Bを作成し, 境界付近を試験した。基板(a), (b)は, 照射部と未照射部でA.E. 信号と摩擦力に有意差があり, 照射部では両者とも信号強度が下がった。(c)では有意差がなかった。SEM/EDX 像において(a)および(b)の照射部では顕著なコーティングの剥離がみられず, Ti も検出されなかったが, 未照射部ではコーティングの剥離がみられ, Ti が検出された。(c)ではSEM像とEDXによるTiのマッピング結果から, コーティングが剥がれていることが明らかになった。以上の結果から, イオン照射量が少ない基板(c)は照射部・未照射部共にコーティングが剥離し, 有意差はないが,  $1 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 以上の照射量で, 照射部のコーティング強度が向上することが示唆された。

図3にXPSにより深さ方向分析した結果を示す。Tiが検出されない深さ(スパッタリング時間: 40~100分)におけるコーティング中元素の割合は, 平均するとO:59%, Ca:32%, P:9%, イオン照射(照射量:  $2 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>)を行ったものでは, O:59%, Ca:34%, P:7%であった。このことから, 元素比率はイオン照射により大きく変化しないことが明らかになった。

図4に(a)コーティング後と(b)イオン照射後(照射量:  $2 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>)の基板表面のSEM像を示す。コーティングはTi基板の表面形状に沿ってコートされているが, イオン照射を行うと表面形状が変化し, 粒子状の形成物がみられるようになった。この粒子はCa-Pの成分で構成されていることがEDXの結果から明らかになっている。

図5に断面TEM像を示す。コーティングの断面を観察すると, 結晶粒等は観察されず, 電子線回折パターンからアモルファス構造であることが明らかになった。イオン照射したコーティングでは, ナノメートルオーダーの微粒子が観察された。

**3.2 骨芽細胞による生体親和性評価** 図6にMC3T3-E1を基板上で1週間培養したときのSEM像を示す。(a)はコーティングのみ, (b)はコーティング後にSiイオン照射(照射量:  $2 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>)した基板である。

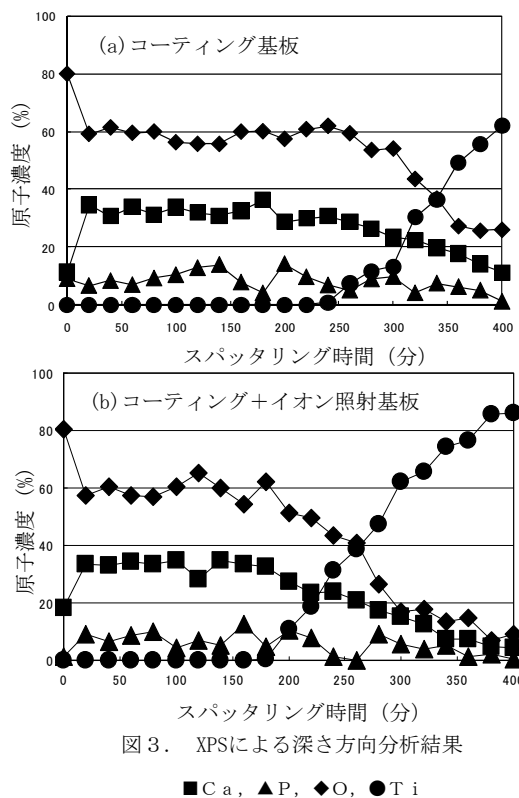


図3. XPSによる深さ方向分析結果

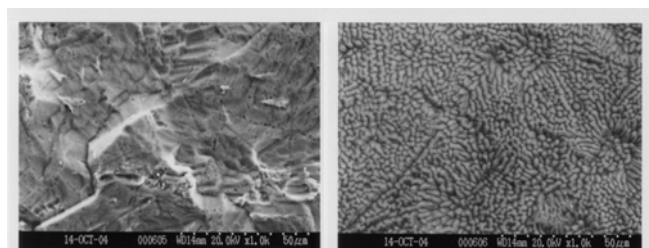


図4. 表面のSEM像

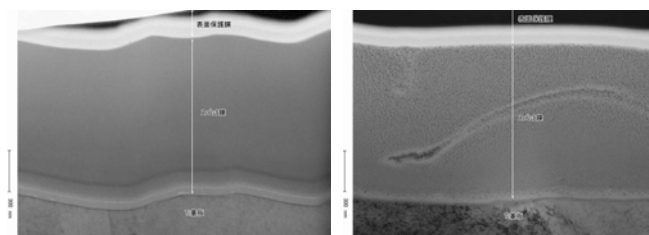


図5. 断面TEM像

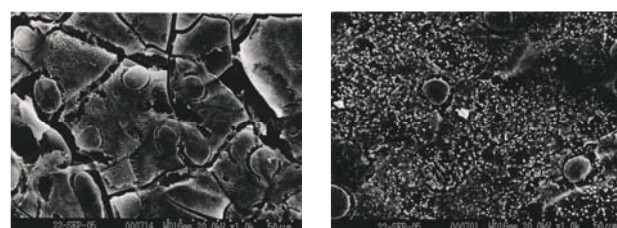


図6. 骨芽細胞増殖後の基板表面SEM像

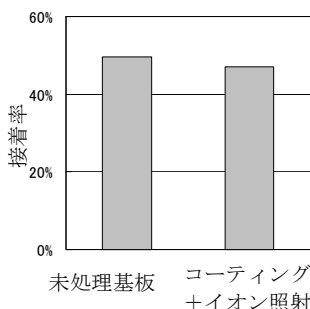


図7. 骨芽細胞の接着試験

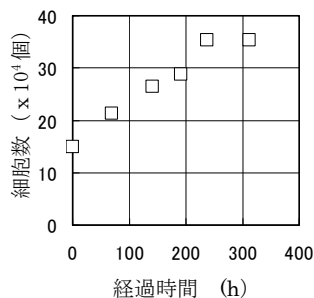


図8. 骨芽細胞増殖曲

(a)ではコーティングにクラックが発生し、細胞もコーティングと共に剥離が観察された。(b)のイオン照射した基板では、コーティングのクラックや剥離はみられず、安定して細胞が付着し増殖していた。コーティングのクラックは、培養や観察試料作製のプロセスの間に、膜の膨張や収縮が起これり発生したと考えられる。実際に人工関節などの使用時には、体内に埋植した後は、乾燥や温度変化の影響は小さいので、コーティングにクラックが発生する可能性は少ないと考えられる。しかし、機械的圧力が長期に加わることから、コーティングの強度や密着性の向上が要求される。イオン照射した基板では、クラックの発生が観察されないことから、コーティングのみよりも高強度であると考えられる。そのため、骨芽細胞もコーティングと共に剥離せず安定して増殖すると思われる。

図7に骨芽細胞接着試験の結果を示す。未処理とコーティング後イオン照射した基板では、細胞接着性に有意な差はなかった。

図8に骨芽細胞増殖曲線を示す。細胞増殖試験の結果、コーティング後イオン照射した基板は細胞増殖が認められた。この結果からコーティングとイオン照射による表面処理法は細胞増殖を阻害しないことが示された。

**3. 3 ラットによる基板上骨形成評価** 図9にラット埋植試験のスライド標本写真の一部を示す。スライド標本は、全部で30枚ありそれぞれの標本について石灰化骨形成の有無を観察した結果を表1に示す。石灰化骨の形成は、1~3週を合計すると処理面に18検体、未処理面に11検体と未処理面よりもコーティング後イオン照射した面(処理面)に多く認められた。また、石灰化骨の形成が処理面のみの検体は10検体、未処理面にのみの検体は3検体であり、コーティングとイオン照射を併用した表面処理を行う方が未処理よりも早期に骨形成がみられた。

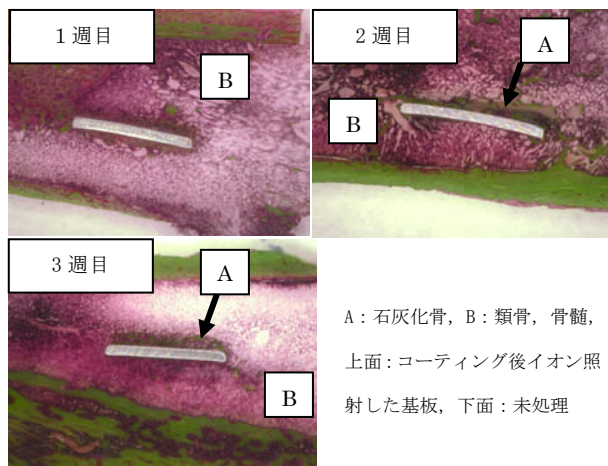


図9. ラット埋植試験結果

表1. ラット頸骨へのTi基板埋植試験結果  
石灰化骨の形成 ○: 観察された。×: 観察されなかった。  
グレー: 処理面のみに石灰化骨がみられる検体

埋植週	ラット No.	左足頸骨		右足頸骨	
		処理面	未処理面	処理面	未処理面
1週	1	×	×	×	×
	2	×	×	×	×
	3	○	×	×	×
	4	×	×	×	×
	5	○	○	○	○
○の合計		2	1	1	1
2週	6	×	○	○	×
	7	○	×	○	×
	8	×	×	○	×
	9	○	×	×	○
	10	○	○	○	○
○の合計		3	2	4	2
3週	11	○	×	×	×
	12	×	○	○	○
	13	○	○	○	○
	14	○	○	○	×
	15	○	×	○	×
○の合計		4	3	4	2

4. まとめ

チタン基板にCa-P-Oコーティングを行い、さらに高エネルギーSiイオン照射することにより、膜強度が向上し、骨芽細胞が安定して付着・増殖することが明らかになった。さらに石灰化骨が早期に形成されることが動物実験の結果、明らかになった。

(平成20年7月4日受付, 平成20年8月8日再受付)

文献

- (1) 塙隆夫, 米山隆之:「金属バイオマテリアル」, コロナ社
- (2) 吉成正雄, 井上孝:「人工歯根の表面改質」, 表面科学, Vol.20, No.9, pp.613-620(1999)
- (3) A.M.Ekessabi: "Surface modification of biomedical implants using ion-beam-assisted sputter deposition", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, Vol.127/128, pp.1008-1014(1997)
- (4) T.Hanawa, Y.Kamiura, S.Yamamoto, T.Kohgo, A.Amemiya, H.Ukai, K.Murakami, K.Asaoka: "Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia", Journal of Biomedical Materials Research, Vol.36, No.1, pp.131-136(1997)