

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 鯉江 信
論文題目 原子層堆積により各種酸化物を成膜した 純チタン上での細胞増殖能の評価	

I. 緒言

純チタン (Ti) は優れた機械的性質、生体適合性、および高いオッセオインテグレーション能を有することから、歯科用インプラント材料として広く臨床応用されている。そして、Ti はオッセオインテグレーション能をより高めるために様々な表面改質が行われている。

原子層堆積 (Atomic Layer Deposition : ALD) は金属酸化物あるいは金属の薄膜を物質表面上に成膜可能とするナノテクノロジーの一種であり、既に工業分野で応用されている。ALD は、原料物質であるプレカーサーと酸化剤の化学反応による自己限定的な表面反応を利用した薄膜形成技術であり、高アスペクト比の構造を有する材料の表面、多孔質表面、および複雑なナノ構造に対して均一でピンホールフリーな薄膜を得ることができるといった様々な優れた特徴を持っている。これらの特徴から、現在ではバイオメディカル分野においても応用展開が望まれる成膜技術の一つとして ALD が注目されている。そこで本研究では、ALD による成膜が Ti の新たな表面改質法となり得るかを検討するために、Ti 板上にジルコニア (ZrO_2)、シリカ (SiO_2)、および酸化亜鉛 (ZnO) の薄膜をそれぞれ成膜し、同試料上でマウス線維芽細胞の増殖試験を行いその増殖能を評価した。さらに、*in vivo* で骨内に埋入することを想定し、骨芽細胞との親和性を確認することを目的に、マウス骨芽細胞様細胞の増殖能を評価した。

II. 材料および方法

1. 実験材料および試料作製

1) Ti 板の調整

本実験では、厚さ $500\mu m$ の Ti 板を直径 10 mm のディスク状に打ち抜いた。次に、この Ti 板をバレル研磨機を用いて、表面粗さが均一になるように研磨した。

2) ALD による各種元素の成膜

本実験で用いた試料への ALD 成膜は、ALD ジャパン株式会社に委託した。ALD 成膜には At-400 (Anric Technologies, Massachusetts, USA) を使用した。各種成膜厚が 50nm となるように、先に調整した Ti 板上に ZrO_2 薄膜 (ZR)、 SiO_2 薄膜 (SI)、 ZnO 薄膜 (ZN) をそれぞれ成膜した。

ALD 成膜後、エチレンオキサイドガス滅菌を行い、各実験に使用した。

2. 表面性状の観察

成膜状態の観察は目視、およびエネルギー分散型分光分析装置 (EDS) を備えた走査型透過電子顕微鏡 (STEM) を用いて、試料の成膜厚の測定と元素マッピングを作成した。

3. 溶出試験

溶出試験に際し、各試料は超純水 40 ml の入った遠沈管に浸漬した ($n=3$)。試料を $37^\circ C$ の温度に設定した恒温槽に入れ、最長 4 週間静置した。その後、誘導結合プラズマ発光分析装置 (Inductively coupled plasma : ICP) を使用して溶出した元素の定量分析を行なった。

4. 細胞培養

細胞培養には、マウス線維芽細胞由来細胞 (L929) および、マウス頭蓋骨骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いた。L929 は Minimum Essential Medium に 5% ウシ胎仔血清および、100U/ml

Peniciline-100 μ g/ml Streptomycin を添加し、濾過滅菌したものを培養液として用いた。MC3T3-E1 は α -Minimum Essential Medium に 10%ウシ胎仔血清および、100U/ml Peniciline-100 μ g/ml Streptomycin を添加し、濾過滅菌後、培養液として用いた。

5. 細胞増殖試験

各種元素を ALD 成膜した Ti 板および、コントロールである未成膜の Ti 板を 48 ウェルプレートに配置後、培養液中に懸濁した 1×10^5 cells/ml の L929、または MC3T3-E1 を 200 μ l ずつ播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター中で培養した。L929 は培養 1、3、5 日後、MC3T3-E1 は培養 1、4、7 日後に細胞数を計測した。測定する各ウェルの培養液を新しい培養液と交換し、Cell Counting Kit-8 を 20 μ L 添加、攪拌後、インキュベーター内で 1 時間静置した。続いて、各培養液を 96 ウェルマルチプレートに 100 μ L ずつ移し、マイクロプレートリーダーにて 450 nm における吸光度を測定した (各 n=3)。

6. 細胞形態の観察

細胞形態の観察は、L929 は培養 1、3 および 5 日後の試料に対し、MC3T3E-1 は、培養 1、4、および 7 日後の試料に対して前処理を行い、SEM 観察を行った。

7. 統計処理

細胞増殖試験の結果に対する統計解析には Tukey 法による多重比較検定を行った ($p < 0.05$)。

III. 結果

1. 表面性状の観察

成膜後の試料は、ZR は紫色に、ZN はやや茶色味があった色相を呈していた。一方 SI は、淡い黄土色を呈しており、全ての試料において成膜されていることが肉眼的に確認された。

STEM 像においては全ての Ti 上に約 10-15 nm の自然成膜された TiO₂ 層が確認され、その上にそれぞれ 49.1 nm、47.5 nm、50.7 nm の各種成膜が確認された。EDS 分析では、ZR と SI の層は平坦で均一な成膜が観察されたが、Zn の表層は波状を示し、疎な粒子状部分も認めた。

2. 溶出試験

いずれの試料からも Ti の溶出はなく、また、ZR と SI の成膜試料は浸漬 1 週、2 週、4 週間において成分検出限界値以下であった。一方、ZN からは浸漬 1 週後に 0.471 ppm、浸漬 2 週後に 0.471 ppm、浸漬 4 週後に 0.503 ppm の Zn の溶出を認めた。

3. 細胞増殖試験

L929 の細胞増殖試験の結果は、ZR および SI において有意差はないものの、コントロールと同等にいずれも経時的に細胞数の増加がみられた。一方、ZN においては、培養 1 日目から細胞の生着、増殖は認められなかった。

MC3T3E-1 の細胞増殖試験の結果は、ZR および SI において L929 と同様経時的に細胞数の増加がみられた。また、ZN についても L929 と同様に、培養 1 日目から細胞の生着、増殖は認められ

なかった。

4. 細胞形態の観察

SEM 観察による L929 の細胞形態は、ZR、SI においてコントロールと同様に多角形または紡錘形を示し、培養初期から細胞骨格がよく発達している様子が観察された。一方、ZN については明らかに萎縮した細胞をわずかに認めるのみであった。MC3T3E-1 の細胞形態は L929 と類似しており、多角形または紡錘形を呈していたが、ZN は L929 と同様に明らかに萎縮した細胞をわずかに認めるのみであった。

IV. 考察

ALD はプレカーサーと酸化剤による 2 つの連続した自己限定的な表面反応に基づいており、不純物のない薄膜を一原子層ごとに成膜することができる。そのため、高い精度を持って膜厚を制御可能であることが ALD の最大の利点と言える。本研究で ZR、SI、ZN の成膜厚は目標成膜厚である 50 nm に近似していた。

ICP 分析において、いずれの試料からも Ti は溶出されず、また ZR、SI からは Zr、Si、いずれの成分元素も検出限界値以下であった。このことから、ZR、SI はいずれも化学的に安定した薄膜が成膜されたと考えられる。

臨床応用を想定し、L929 および MC3T3E-1 の細胞増殖試験を行い生物学的安全性の評価と、骨芽細胞との親和性の評価を行なった。その結果、ZR、SI 上で培養した L929 細胞は培養 5 日目に、MC3T3E-1 細胞は培養 7 日目にコンフルエントに達した。培養期間中、同一測定日において Ti、ZR、SI の間で増殖率に有意な差は見られず、過去の Ti 系金属上での細胞培養結果と比較しても同様の増殖傾向を示し、ZR と SI は Ti と同様に良好な細胞適合性を示した。一方で、ZN は両細胞ともに培養 1 日目から生着・増殖が認められず、発達した細胞骨格を有さない萎縮した細胞を認めるのみであった。その理由として ZN の成膜状態が関係すると考える。STEM および EDS 分析画像において、ZN の表層は波状を呈しており、また、ZN の溶出試験では、浸漬 1 週間後から Zn の溶出を認めたことから、ZN は化学的に安定して成膜されなかった可能性が考えられる。また、ZN 上で L929、MC3T3E-1 とも生着・増殖しなかったのは、培養液中に溶出した Zn によるものなのか、あるいは、Ti 上に残存する ZnO によるものなのか、さらに、ZnO の水への溶解性は 1.6 ppm であり、飽和濃度には満たないものの、成膜された ZnO 全てが培養液中に溶出したのかということも含めてさらなる検討が必要である。

本研究は、Ti 上に各種酸化物の薄膜を成膜したいずれかの試料が、Ti 上での細胞増殖能を上回ること、さらには *in vivo* での実験を行った際に、Ti よりも高いオッセオインテグレーション能を示す成膜試料が得られることを期待して着手したが、細胞増殖試験において何れも Ti 上での増殖を有意に上回る結果は得られなかった。しかしこれらの結果は、ZrO₂ および、SiO₂ 成膜試料は Ti と同等の良好な細胞適合性を有することが示されたとも考えられる。

ALD は Ti 表面を機能化するための強力なアプローチとなり得る可能性があり、また、ALD の成膜性能から、マイクロあるいはナノオーダーで形状が制御された Ti インプラント体表面にも均一な薄膜を成膜できる技術の一つになり得ることから、近い将来の臨床応用への可能性が示唆された。