博　士　論　文

医療機器用無機材料の生体機能向上を目的とする表面改質法に関する研究

平野 満大

目次

1 章 序論 1
1-1 医療機器の役割 1
1-2 医療機器および応用される材料の分類と特徴 2
1-3 医療機器用無機材材料 4
1-3-1 金属材料の利用状況 4
1-3-2 セラミックス材料の利用状況 10
1-4 外科治療がおける合併症 13
1-5 表面改質の必要性 14
1-5-1 骨形成能向上を目的とした従来の表面改質法と問題点 15
1-5-2 抗菌活性付与を目的とした従来の表面改質法と課題 17
1-6 スラリー埋没加熱処理およびプラズマ表面改質法の特徴 18
1-6-1 スラリー埋没加熱処理 18
1-6-2 プラズマ表面改質法 19
1-7 研究課題と目的 21
1-8 本論文の構成 22

2 章 材料特性の分析および評価手法 24
2-1 材料表面の分析手法 25
2-1-1 X 線光電子分光法 25
2-1-2 X 線回折法 27
2-1-3 蛍光 X 線分析 28
2-1-4 走査型電子顕微鏡 29
2-1-5 走査型プローブ顕微鏡. 30
2-1-6 接触角測定 31
2-2 材料表面の生体機能性評価手法 32
2-2-1 骨形成能評価試験 32
2-2-2 抗菌活性評価試験 38
2-2-3 統計分析手法 40

3 章 スラリー埋没加熱処理によるジルコニウム金属材料表面の骨形成能向上 41
3-1 緒言 41

3-2 試料作製及び実験方法 43
3-2-1 試料作製.....43
3-2-2 特性評価.....44
3-3 実験結果及び考察 45
3-3-1 スラリー処理における熱処理温度が Zr 基板の表面特性に与える影響.....45
3-3-2 スラリー処理した Zr 基板のアパタイト沈着性能 53
3-3-3 スラリー処理した Zr 基板表面での骨芽細胞様細胞の細胞接着および石灰化挙動.....56
3-4 結言 58

4 章 ジルコニアセラミックス材料へのスラリー埋没加熱処理の応用検討.....59
4-1 緒言 59
4-2 試料作製及び実験方法 61
4-2-1 試料作製.....61
4-2-2 特性評価.....62
4-3 実験結果及び考察 63
4-3-1 スラリー処理による YSZ 基板への HAp 粒子の固定.....63
4-3-2 スラリー処理した YSZ 基板のアパタイト沈着性能.....71
4-3-3 スラリー処理した YSZ 基板表面での骨芽細胞様細胞の細胞応答.....75
4-4 結言 77

5 章 アルゴン/酸素混合ガスプラズマ親水化処理した Ti 表面の親水性保持方法の検討.....78
5-1 緒言 78
5-2 試料作製及び実験方法 80
5-2-1 試料作製.....80
5-2-2 特性評価.....82
5-3 実験結果と考察 83
5-3-1 放電形式およびガス組成が表面特性に及ぼす影響 83
5-3-2 保存方法が親水性の持続性に及ぼす影響 88
5-4 結論 91

6 章 アルゴンプラズマエッチングによるステンレス鋼表面への抗菌ナノピラーの創製....92
6-1 緒言 92
6-2 試料作製及び実験方法 94

6-2-1 試料作製.....94
6-2-2 特性評価.....96
6-3 実験結果および考察.....97
6-3-1 Ar プラズマエッチングによるナノピラーの形成.....97
6-3-2 プラズマ発生時の印加電流がナノピラーの寸法に及ぼす影響.....103
6-3-3 Ar プラズマエッチングに形成されたナノピラーの抗菌活性.....109
6-4 結論.....113

7 章 結言.....114

参考文献.....117

謝辞.....130

業績一覧.....132

1 章 序論

近年では、老化や疾患により損傷した硬組織（骨および歯）の代替として、無機材料に含まれる金属またはセラミックス材料製の医療機器を損傷部に埋入することで、人体機能を回復させる外科治療が行われている。本研究では、この外科治療の更なる治療成功率向上を目的に、「医療機器を構成する金属およびセラミックス材料表面の生体機能、即ち骨形成能および抗菌活性向上」を可能とする表面改質法の研究開発を行ったので、その成果を述べる。

1-1 医療機器の役割

医療技術の飛躍的な発展により、老化、疾患、事故などで低下もしくは損失した人体機能を治癒、再建することが可能となり、本邦の救命や治療活動、健康寿命（介護などを必要とせず、自立した生活を送れる期間）の向上に貢献している。この要因の一つとして医療機器の高性能化が挙げられ、それらを構成する様々な材料は医療技術の発展において重要な役割を果たしてきた。

人体機能を再建するための治療は大きく分けて 3 つに分類されるが、近年では人工材料による治療が増加している（図 1-1）。保存的治療や再生医療は生体が有する治癒能力を高めることで人体機能の再建を目指すが、人工材料による治療では医療機器を体内に埋入することで、損傷した生体組織が本来発揮するべき人体機能を補うことができる。人工材料による治療の一例としては、骨折により大きく変形した大腿骨や股関節を人工股関節に取り換える人工股関節置換術、損失した歯の代替として人工歯根を顎骨に埋入する歯科インプラント治療が挙げられ、それぞれ身体の運動機能および咀嚼（食べ物を噛み砕く）機能の再建が可能である。このため、特に治癒能力が低下した高齢者に対しては、他の治療法と比較して早期に人体機能を再建することができ、超高齢化社会となった本邦では更なる治療の発展が望まれている。

図 1-1 治療法の分類

1-2 医療機器および応用される材料の分類と特徴

本邦では、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に基づき、人体へ与えるリスクを考慮して医療機器が 4 種類に分類されている（図 1-2）[1)]。人工股関節、ペースメーカーなどの体内埋入型の医療機器は、不具合が生じた際の人体へのリスクが比較的高い、もしくは生命の危機に直結することが懸念されており、高度管理医療機器（クラス III、IV）に規定されている。一方で、埋入手術を行う際に用いるメスなどの外科手術機器などは不具合が生じてもリスクが極めて低いと考えられ、一般医療機器（クラス I）に分類されている。

このため、人体に与えるリスクの軽減、埋入型医療機器においては長期にわたり機能を発揮させるため、構成する材料の選択が重要となる。医療機器用材料としては、大きく分けて有機材料および無機材料が挙げられる（図 1-3）[2,3)]。有機材料では、セルロースやキチンなど天然高分子、シリコーンやポリエチレンなどの合成高分子が用いられている。しかし、有機材料は機械的強度が小さいため、大きな荷重が負荷されると容易に破壊する恐れがある。また、体内での長期間の留置や炎症反応などによる突発的な pH 変化に伴い、材料自体が分

解することも懸念される。このため、人工材料による治療においては医療機器用材料としての採用率は低い。一方で、無機材料は金属材料とセラミックス材料に分類される。金属材料は機械的強度および靭性が高いことから、破壊しにくいという長所がある。また、セラミックス材料は金属材料と比較して靭性は乏しいが、耐摩耗性に優れている。このため、多くの医療機器は金属材料およびセラミックス材料が応用されている。

図 1-2 医療機器の分類と定義 [1)]

1-3 医療機器用材料の分類とその特徴

1-3 医療機器用無機材材料

前節にて、無機材料である金属およびセラミックス材料が様々な医療機器として応用されていることを述べた。本節では、本研究で主な研究対象である人工股関節、骨折固定器具、歯科インプラントなどの硬組織の代替となる埋入型医療機器、並びにそれらに付随する医療機器を構成する金属およびセラミックス材料を中心に述べる。

1-3-1 金属材料の利用状況

医療機器として応用される金属材料には人体に対する安全性が不可欠であり、毒性を示す材料は使用することができない。金属材料は生体組織と接触した状態では毒性を示さないが、腐食により表面から溶出した金属イオンが毒性を示す[2)]。故に、医療機器を構成する金属材料には高耐食性が求められ、主にチタン基材料、ステンレス鋼、コバルト-クロム合金が応用されており、さらに近年ではジルコニウム基材料も注目されている。表 1-1 に主に医療機器として応用されている金属材料を示す[4,5)]。

表 1-1 医療機器に応用されている主に金属材料[4,5)を基に作成]

金属	医療機器
チタン基材料	・人工股関節, 骨固定用プレート, 骨接合用ネジ ・歯科インプラント ・人工心臓弁, ペースメーカーケース ・ステント
ステンレス鋼	・手術用鋼製小物(メス, 鉗子, 膿盆,万能壷 等) ・骨固定用プレート ・ステント
コバルト-クロム合金	・人工股関節, 骨固定用プレート ・人工心臓弁 ・ステント
金, パラジウム, プラチナ	・歯科用補綴物 ・人工内耳

1-3-1-1 チタン基材料

チタン（Ti）基材料は人工股関節、骨固定用プレート、歯科インプラントなどの硬組織の代替となる埋入型医療機器の材料として一般的に応用されている。Ti は極めて酸化しやすいため、その表面は酸化物である酸化チタン（TiO_2）皮膜に覆われている。形成される TiO_2 皮膜は緻密かつ化学的安定性が高いために不働態皮膜として機能し、腐食の進行を抑制する[2,5]。また、TiO_2 皮膜が物理的に破壊されたとしても、周辺環境の O_2 と反応することで皮膜が早期に再生し、耐食性が維持される。

さらに、Ti ならではの特性として、オステオインテグレーションを示すことが挙げられる。オステオインテグレーションとは Brånemark らに提唱された概念であり、「硬組織と材料表面が光学顕微鏡レベルで直接密着し、持続した結合状態を呈し、インプラント体に加わった力が骨組織に直接伝達されること」と定義される[6]。故に、Ti 基材料を骨や歯である硬組織に埋入すると、他の金属材料と比較して新生骨の形成が促される。

一方で、Ti は後述のステンレス鋼と比較して機械的強度に劣る。特に人工股関節や骨接合用ネジなど生体内で大きな荷重が負荷される部位に埋入する医療機器において、純 Ti 製では機械的強度が不足し、実際に生体内で破損する医療事故が相次いだ[3]。故に、耐食性に加え、機械的強度に優れた Ti 合金の検討が進められた。現在では航空機材料として有名な Ti-6Al-4V 合金が医療機器材料としても主要な材料の 1 つとして応用されている[2,3]。しかし、Ti-6Al-4V 合金に含まれる V は生体毒性が高い元素であるため、欧州では Ti-6Al-4V 合金の代替として、Ti-6Al-7Nb 合金が使用されている。表 1-2 及び図 1-4 に Ti 基材料が応用された医療機器の例を示す[5, 7-9]。

表 1-2 医療機器に応用されている主なチタン基材料 [7]を基に作成

医療分野	医療機器	チタン基材料
整形外科	人工股関節・頭骨	Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, Ti-15Mo-5Zr-3Al, Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo
	骨固定器具 (プレート, ネジ, ワイヤー)	純Ti, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb
	脊椎固定器具	純Ti, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb
心臓血管外科	埋込型人工心臓	純Ti
	人工心臓弁	Ti-6Al-4V
	ペースメーカー	純Ti, Ti-6Al-4V
	ステント	Ti-Ni
	ガイドワイヤー	Ti-Ni
歯科	歯科インプラント	純Ti, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb
	クラウン・ブリッジ	純Ti, Ti-6Al-7Nb
外科全般	手術器具 (メス, ピンセット, ハサミ)	純Ti
	カテーテル	Ti-Ni

人工股関節

ボーンプレート

歯科インプラント

図 1-4 チタン基材料製医療機器の一例 [5, 8, 9]

1-3-1-2 ステンレス鋼

ステンレス鋼（Steel Use Stainless; SUS）とは 12～13%以上のクロム（Cr）を添加した鉄（Fe）基合金である。SUS 鋼の耐食性は材料最表面に形成される酸化クロム（Cr_2O_3）皮膜に起因する。Cr_2O_3 は化学的に安定性が高く、前述した TiO_2 と同様に不働態皮膜として機能し、耐食性を維持する。しかし、SUS 鋼の不働態皮膜は塩化物イオンが存在する環境下では局所的に破壊され、その部位が溶解することで孔食や隙間腐食が進行する。このため、生体環境下における耐食性は Ti 基材料と比較すると劣る [2,5]。

SUS 鋼は化学組成から Cr 系および Cr-ニッケル（Ni）系の 2 種類に分類されるが、実際は耐食性、耐熱性、機械的強度などの特性改善を目的に、Cr および Ni の組成比の調整や微量のモリブデン（Mo）や Ti などが添加されている。また、結晶構造からはオーステナイト系、マルテンサイト系、フェライト系の 3 種類に分類され、オーステナイト系は Cr-Ni 系、マルテンサイトおよびフェライト系が Cr 系に該当する [3,5]。

医療機器用材料としては、オーステナイト系およびマルテンサイト系が用いられている。オーステナイト系 SUS 鋼は 3 種類の中で最も耐食性が高く、特に Fe-18Cr-12Ni-2.5Mo の組成を有する SUS316、不純物である炭素（C）を低減させることで耐粒界腐食性を向上させた SUS316L が主流となっている。上述の通り、耐食性は Ti 基材料より劣るが、抜去を前提とした治療では埋入型医療機器として使用されている。また、機械的強度やねじり特性が高いため、骨折固定用ワイヤーの他に、医療用バット（膿盆）やタンク（万能壺）など鋼製小物に応用されている。一方で、マルテンサイト系は SUS 鋼の中で最も高い硬度を示し、Fe-13Cr の組成である SUS420J1 はメスや鉗子などの外科手術術用鋼製小物として幅広く用いられている。表 1-3 および図 1-5 にステンレス鋼が応用された医療機器の例を示す [5]。

表 1-3 医療機器に応用されている主なステンレス鋼 5)を基に作成

鋼種	医療分野	医療機器
オーステナイト系	整形外科	短期間用インプラント
・SUS316	歯科	歯科用印象トレー, カニューレ
・SUS316L	外科全般	ガイドピン, 注射針, 開胸器,
		医療用バット・タンク, 蒸気滅菌機,
		医療用ストレージキャビネット, 作業台
マルテンサイト系	外科全般	メス, 鉗子, 開創器, 骨用キュレット, 骨ノミ
・SUS420J1		
・SUS430		

手術器具(メス，鉗子など)

医療用バット

図 1-5 ステンレス鋼製医療機器の一例

1-3-1-3 ジルコニウム基材料

ジルコニウム（Zr）は周期表において第 4 族であり、Ti と類似した物理的、および化学的性質を示す。また、表面に不働態皮膜である酸化ジルコニウム（ZrO_2）を形成するため耐食性にも優れており、Ti と同様に生体毒性をほとんど示さない[5, 10, 11]。さらに、Zr の特性として磁化率が低いことが挙げられ、主要な医療機器用金属材料と比較すると Ti の 1/2、ステンレス鋼の 1/30、Co-Cr 合金の 1/8 である[12]。

低磁化率は、近年になって普及してきた核磁気共鳴画像法（MRI）の精度向上に繋がる可能性がある。MRI は人体に強磁場を照射することで体内の断面図を撮像する技術である。既に臨床応用された医療機器用金属材料は、撮影中に発生する磁場によって磁化され、それに伴い撮影した画像上で欠損や歪み（アーチファクト）が確認される。図 1-6 に Zr 基材料製および Co-Cr 合金製人工膝関節の MRI 画像を示す。Zr 基材料製では人工膝関節がはっきり撮像されているが（図 1-6 (a)）、Co-Cr 合金製では像の一部にゆがみが生じている[13]。このため、Zr 基材料の医療機器への応用は上記の課題克服が期待され、近年研究開発が進められている。

図 1-6 （a）Zr 基材料、および（b）Co-Cr 合金製人工関節周辺の MRI 像[13]

1-3-2 セラミックス材料の利用状況

セラミックス材料は一般に金属材料と比較して化学的安定性が高い。このため、生体毒性を示す金属イオンの溶出がないことから安全性が高いことが知られている。医療機器として応用されているセラミック材料は、生体活性セラミックスと生体不活性性セラミックスの 2 つに大別される [14)]。生体活性セラミックスは、生体組織、主に骨組織と直接強固に結合することができ、代表的な材料としてハイドロキシアパタイトが挙げられる。一方で、生体不活性セラミックスは、耐摩耗性、耐薬品性など機械的特性や化学安定性に優れているが、生体組織との反応性は乏しい。この様な材料としては、ZrO_2 や酸化アルミニウム（Al_2O_3）が知られている。表 1-4 に医療機器として応用されているセラミックス材料の例を示す [4)]。

表 1-4 医療機器に応用されている主にセラミックス材料 [4)を基に作成]

種別	セラミックス	医療機器
生体活性 セラミックス	リン酸カルシウム (ハイドロキシアパタイトなど)	整形外科・歯科インプラント被覆材 骨充填剤
生体不活性 セラミックス	酸化ジルコニウ （ジルコニア）	歯科インプラント アバットメント クラウンブリッジ 人工骨頭
	酸化アルミニウム （アルミナ）	インプラント被覆材 アバットメント クラウンブリッジ 人工頭骨

1-3-2-1 ハイドロキシアパタイト（Hydroxyapatite; HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$）

HAp はリン酸カルシウム化合物の一種であり、骨の約 70%、歯のエナメル質においては約 97%を構成している [14]。このため、生体内に埋め込んだ際に、骨組織と直接結合し、強固に固定される。しかし、HAp は生体不活性セラミックスや金属材料と比較して機械的強度が劣るため、生体内に大きな荷重が負荷される部位では破壊されることが容易に予想される。このため、HAp は事故等で欠損した骨の修復に用いる骨補填剤や、人工股関節や歯科インプラントの骨への早期固定を促すために被覆材料として活用されている。図 1-7 に HAp が応用された医療機器の一例を示す [15]。

図 1-7 HAp が応用された医療機器 [15]

1-3-2-2 酸化ジルコニウム（ジルコニア, ZrO_2）

ZrO2 は高強度と耐食性を有するため、主に産業用機械や製造装置用部品として利用されている。一般的に ZrO2 は靭性が乏しく、大きな荷重が加わる部位での適用は困難である。しかし、酸化イットリウム（イットリア, Y_2O_3）を約 3%固することで ZrO2 の靭性を向上することが可能であり、この様な ZrO2 はイットリア部分安定化ジルコニア（Yttria partially stabilized zirconia; YSZ））として知られている。

純粋な ZrO_2 は室温下においては単斜晶、1170℃以上で正方晶となるが、YSZ では Y_2O_3 の固溶により高温安定相である正方晶を室温下で準安定状態として保持される [16)]。YSZ に荷重が加わることで亀裂が生じると、その先端での応力集中に伴う応力誘起マルテンサイト変態が起こり、正方晶が単斜晶へ相転移し、体積膨張が生じる [17)]。このため、亀裂の進展が抑制され、結果的に靭性の向上につながる。

以上より、YSZ は高機械的強度、高靭性、高耐食性を有する材料であり、このため近年では Ti 基材料に代わり歯科インプラント材料として応用されるようになってきた [14)]。加えて、YSZ は歯の様に白色外観であるため審美性が高く、インプラントを埋入した際に歯肉の変色を防止することができる [18)]。さらに、耐食性が高いことから、医療機器用金属材料では避けることができない金属アレルギー反応の発症リスクを軽減することも可能である [19, 20)]。

図 1-8 YSZ 製歯科インプラント [21)]

1-4 外科治療がおける合併症

これまで述べてきたように、金属またはセラミックス材料製の医療機器を生体内に埋入する外科治療は、損傷した人体機能を再建することができる有効な治療法である。しかし、医療機器埋入に伴う外科手術により、術後に様々な合併症が引き起こされ、医療機器が果たすべき機能が発揮することができなくなる。

一例として表 1-5 に人工股関節置換術における再置換理由を示す [22)]。本治療において医療機器に起因する主な合併症は、(1) 埋入した医療機器のゆるみ、およびそれに伴う骨吸収、または（2）感染症が挙げられる。（1）埋入した医療機器のゆるみは、医療機器と硬組織の固定不良が原因である。医療機器を埋入した後、その表面でのオステオインテグレーションの進行が乏しいと硬組織と強固に結合されず、ゆるみが誘発される。また、オステオインテグレーションが有利である Ti 基材料であっても、強固な固定を達成するには 6 から 8 週間が必要となるため、固定に至る前に埋入部に過大な荷重が負荷されると結果的にゆるみに繋がる。医療機器のゆるみが生じると、周囲の硬組織と摩耗が激しくなり、摩耗粉が発生する。摩耗粉は免疫反応に基づきマクロファージに貪食され、炎症性サイトカインの放出に伴い骨吸収が生じる [2)]。

一方で、(2) 感染症は外科手術を通した生体への細菌混入が原因となる。大気中には空中浮遊菌として細菌が漂っており、また皮膚組織表面では常在菌が細菌叢を形成している。このため、手術中にて医療機器への細菌付着が懸念され、これを完全に防止することは困難である。細菌が付着した医療機器を介して手術部位から細菌が生体内に混入し、増殖することで感染症の発症に至る。これに伴い、免疫反応により炎症性サイトカインが放出され、骨吸収にも至る。

いずれも合併症が発生すると、医療機器と骨との強固な固定は達成されず、再度医療機器を交換する手術（再置換手術）が余儀なくされ、治療失敗に至る。

表 1-5 人工股関節置換術における再置換理由 [22)]

再置換手術の理由	発生件数
ゆるみ	**4312**
骨吸収	**1716**
感染	**1330**
ポリエチレン摩耗	1001
人工股関節の破損	650
骨折	576
脱臼	1143
その他	818
全数	8051

1-5 表面改質の必要性

前述の合併症を防ぎ、外科治療におけるリスクの軽減により、治療成功率を向上するには、医療機器用金属およびセラミックス材料の (1)「新生骨の形成を促す能力、即ち骨形成能」、および (2)「細菌を不活性化する能力、即ち抗菌活性」を含めた生体機能の向上が求められる。

骨形成能の向上により、材料表面で骨形成を促進することで早期のオステオインテグレーションが達成され、結果として医療機器は硬組織に強固に固定される。また、抗菌活性の向上は、材料表面に付着した細菌を不活化することで、生命活動を停止させることができる。故に、生体内に細菌が混入しても増殖することはなく、感染症の発症を防止することができる。

しかし、これらの生体機能は材料の製造プロセスを通して向上することは困難である。金属材料の場合、原料の溶解、鋳造、鍛造、加工、熱処理を経る。組成の改良による生体機能の向上は見込めるが限界があり、組成変化に伴い機械的特性に悪影響を及ぼす可能性が考えられる [2)]。一方で、セラミックス材料では、原料粉体の混合、成型、焼結を経る。このた

め、生体活性セラミックスを混合することで焼結体の生体機能を向上することができる。実際に、生体不活性セラミックス材料である ZrO_2 に HAp を添加して複合セラミックス材料を作製することで、ZrO_2 の骨形成能を向上できることが報告されているが、同時に機械的特性の低下を引き起こす[23,24]。いずれも、製造プロセスからのアプローチでは、生体機能向上と材料の機械的特性はトレードオフの関係となる。

このため、生体機能の向上には表面改質法が有効である。表面改質とは、材料表面の組成や構造を変化させ、材料の特性を改良することであり、材料自体の機械的特性に影響しない。また、生体機能は材料表面と生体組織または細菌との間で働く相互作用により発揮されるため、表面改質法による材料表面の特性制御が重要となる。

以降では、従来の骨形成能および抗菌活性の向上を目的とした表面改質法とその問題点について述べていく。

1-5-1 骨形成能向上を目的とした従来の表面改質法と問題点

材料表面の骨形成能向上を目的とした表面改質法として、硬組織の主成分ある HAp の被覆技術の研究開発が最も進んでおり、実際に本邦でも HAp 被覆された埋込型医療機器が既に臨床応用されている[25]。

代表的な埋込型医療機器への HAp 被覆技術としては、プラズマ溶射法が挙げられる。図 1-9 にプラズマ溶射法の模式図を示す[26]。熱プラズマジェットを発生させ、被覆材料である HAp 粒子を投入する。約 10000℃のプラズマ中で HAp は溶融状態となり、溶融した粒子はプラズマジェットによって材料表面に吹き付けられことで HAp が堆積し、皮膜形成に至る。本手法で得られる HAp 皮膜は比較的材料表面との密着強度が高く、皮膜の形成速度も速いため短時間での施工が可能であるため、既に産業的に応用されている。

図 1-9 プラズマ溶射法の概略図 [26)]

[本改質法の課題]

プラズマ溶射により形成される HAp 皮膜の膜厚は約 200 から 300 μm と比較的厚い。このため、生体内で荷重が加わることで HAp 皮膜自体の破壊が生じ、発生した破片がマクロファージに貪食され、炎症性サイトカインの放出により骨吸収が生じることが懸念される [27, 28)]。また、約 10000℃という高温下では HAp が熱分解反応を起こし、リン酸三カルシウム（Tricalcium phosphate; TCP）が生成される。TCP は溶解性が高いため、骨形成能向上を目的に形成した皮膜は生体内で消失する可能性がある [29)]。

1-5-2 抗菌活性付与を目的とした従来の表面改質法と課題

抗菌活性の向上を目的とした表面改質法としては、銀や銅、抗生物質を含めた抗菌物質を含有した皮膜形成技術の研究開発が主に進められている[30, 31]。

例えば、Dong らは SUS 鋼および銀（Ag）で構成されたスクリーンを活用したアクティブスクリーンプラズマ法を用いることで SUS316 LVM 表面に Ag 含有窒化皮膜の形成に成功し、その表面では大腸菌が約 93%減少することを報告した（図 1-10 (a)）[32]。また、Kruszewski らは、SUS316L 表面に抗生物質であるゲンタマイシンおよびバンコマイシンを固定化させた自己組織化単分子膜を形成し、その表面で黄色ブドウ球菌が 99%減少したことを報告している（図 1-10 (b)）[33]。

以上の表面改質法により形成された材料表面の抗菌活性は、皮膜から放出された抗菌物質が細菌の代謝に関わる酵素と化学的に反応し、不活化されることで発揮される。

図 1-10 抗菌活性を目的とした改質法の一例

(a) アクティブスクリーンプラズマ法[32]　(b) 抗生物質固定化ポリマーコーティング[33]

[本処理の課題]

表面改質により形成された皮膜から放出される抗菌物質は、時間経過に伴い減少するため、抗菌活性を持続性的に発揮させることが困難である[30, 34]。また、近年では抗生物質への耐性を修得した薬剤耐性菌が問題となっており、抗生物質の使用が制限されつつある[35]。

1-6 スラリー埋没加熱処理およびプラズマ表面改質法の特徴

本研究では、前節で述べた各課題を克服できる可能性のある表面改質法として、(1) スラリー埋没加熱処理、(2) プラズマ表面改質法に注目した。以下に、詳細を述べる。

1-6-1 スラリー埋没加熱処理

スラリー埋没加熱処理（以下、スラリー処理）は Ohtsu らが金属材料の骨形成能向上を目的に開発した独自の HAp 被覆表面改質法である。図 1-11 に概略図を示す [36]。

本処理は、リン酸カルシウム粉末と蒸留水で調製したスラリー状処理剤に金属材料を埋め込み、そのまま大気中で加熱する処理である。これまでの研究にて、スラリー処理を工業用純 Ti に応用した場合、基板表面には厚さ約 300 nm の HAp 含有 TiO_2 皮膜が形成され、その表面で骨芽細胞様細胞を培養すると未処理材と比較して骨の基となる石灰化物の形成が促進されることが報告されている [37, 38]。さらに、動物試験においてラットの脛骨に埋入した場合でも、スラリー処理した Ti 表面にて骨形成が増進されることが確認されており、本処理は材料の骨形成能を向上させる有効な表面改質法であることが明らかとなっている [36]。

図 1-11 スラリー埋没加熱処理の概略図 [36]

[本処理の利点]

本処理により形成される皮膜の膜厚は数百ナノメートルオーダーと極めて薄いため、プラズマ溶射法で問題となる皮膜自体の破壊を防ぎことができ、外科治療の治療成功率向上に貢献できると考えられる。また、本処理では専用の装置など特別な機器が必要ないため、従来プロセスと比較して初期投資コストの低減が期待できる。

1-6-2 プラズマ表面改質法

1-6-2-1 プラズマ親水化処理

骨形成能向上に関わる特性の一つとして、材料表面の親水性が挙げられる。

生体内において材料表面で新生骨が形成されるまで下記の過程を経る。(1) 材料表面にタンパク質が吸着する。(2) タンパク質を介して細胞が接着する。(3) 細胞が増殖、分化する。(4) 分化した細胞が骨の基となる石灰化物を形成する。この過程の中で、親水性は（1）タンパク質吸着および（2）細胞接着を促進するため、結果として細胞増殖および分化が早められ、骨形成能の向上に繋がると報告されている[40, 41]。

親水性表面を得る表面改質法としては、プラズマ親水化処理が挙げられる。本処理は Ar、O_2、またはこれらの混合ガスを用いて発生させてプラズマ中に材料を曝すことで、プラズマ中に含まれる活性種（Ar^+、O_2^+、O など)の物理的または化学的エッチング作用により、材料表面に吸着した炭化水素が除去し、親水性が向上することができる（図 1-12）[42]。

図 1-12 (a) Ar プラズマ、および(b) O_2 プラズマによる親水化メカニズム[42]

[本処理の利点]

材料表面を親水化させる表面改質法としては、プラズマ親水化処理の他に紫外線照射法や化学薬品を用いたエッチング法が挙げられる。これらと比較して、短時間で親水化表面を得ることができ[43]、また人体に危険な薬品を用いないため医療分野での活用に有利である。

1-6-2-2 プラズマエッチング法

近年、材料表面の構造制御することで抗菌活性が向上することが発見され、新たな分野として盛んに研究されるようになってきた。

抗菌活性と表面構造の関係性は、セミやトンボなどの昆虫の翅表面に形成された表面構造に関する研究から発見された（図 1-13）[44,45]。翅表面はナノレベルの柱状物（以下、ナノピラー）により表面全体が均一に覆われている。この様な表面に細菌が付着すると、細菌がナノピラーにより物理的に貫かれ、死滅することが明らかにされた。このため、表面構造に起因する抗菌活性は「物理的抗菌活性」として定義され、従来の抗菌物質に起因する「化学的抗菌活性」と大別される。

図 1-13 昆虫の翅表面に形成されたナノピラーによる抗菌メカニズムの概略図

この様な表面構造を模倣し、材料表面の抗菌活性を向上させるための表面改質法が研究開発されている[46]。その一つとしてプラズマエッチング法が挙げられ、この分野で最も研究

が進んでいる[47-49]。Ivanova らは、六フッ化硫黄（SF_6）/O_2 混合ガスプラズマを利用した反応性イオンエッチング（RIE）によりシリコン（Si）基板表面にナノピラーを模倣し、その表面は昆虫の翅表面と同様の抗菌メカニズムに基づき抗菌活性を示すことを報告した[50]。本処理では、プラズマ中のフッ素原子（F）が Si と反応することで揮発性の SiF_4 が生成され、それに伴い化学的エッチングが進行することでナノピラーの形成に至る[51]。

[本処理の利点]

物理的に細菌を不活化するため、抗菌物質に耐性を有する薬剤耐性菌などに対しても抗菌活性を示す。また、材料表面にナノピラーが存在する限り、常時抗菌活性を示す。

1-7 研究課題と目的

人体機能を再建する外科治療にて用いられる医療機器には無機材料である金属材料およびセラミックス材料が応用されており、材料の高機能化が治療成功率向上において必要不可欠である。しかし、本治療では、治療過程で生じる合併症の発症リスクが治療成功率向上の障壁となっており、材料合成に基づくアプローチでは限界がある。そこで本研究では、主な合併症である（1）埋入した医療機器のゆるみ、および（2）感染症の発生リスク軽減に伴う治療成功率向上を目的に、金属材料およびセラミックス材料の骨形成能または抗菌活性を向上する新規表面改質法の研究を行った。

1-8 本論文の構成

第 1 章

本章では、研究背景として医療機器に応用される無機材料、およびその表面改質法について概説し、これらを踏まえて研究目的について示した。

第 2 章

本章では、本研究で用いた材料表面の分析および評価手法について示した。

第 3 章

本章では、工業用純 Zr 材料にスラリー埋没加熱処理を適用させることで、骨形成能向上を試みた。種々の熱処理温度で Zr 材料に対してスラリー埋没加熱処理を施し、その表面特性を調査することで骨形成能の向上が最も見込まれる最適処理条件を検討した。また、これまで研究されてきた工業用純 Ti 材料と比較して、Zr 材料表面での皮膜形成メカニズムについて考察した。最後に、最適処理条件で作製した Zr 材料表面で細胞を培養し、実際に細胞が骨の基となる石灰化物を形成するかを評価した。

第 4 章

本章では、第 3 章での工業用純 Zr 材料の研究成果を基に、YSZ セラミックス材料へのスラリー埋没加熱処理の応用を試みた。YSZ の化学的安定性を考慮し、Zr 材料適用時より高温下でスラリー埋没加熱処理を実施し、表面特性を調査することで YSZ に最適な処理条件を明らかにした。

第 5 章

本章では、プラズマ親水化処理により工業用純 Ti 材料の親水性向上、およびその持続性について検討した。プラズマの発生条件である放電形式およびガス混合比を変化させるこ

とで表面特性への影響、および親水性の持続性について調査した。また、得られた親水性を持続させるために処理後の試料保存方法についても検討し、親水性の持続要因について考察した。

第 6 章

本章では、Ar プラズマを用いたプラズマエッチング法により、SUS316 鋼表面にナノピラーを形成させ、抗菌活性の向上を試みた。エッチング時間およびプラズマ発生時の印加電流がナノピラーの形成および寸法に与える影響を調査し、ナノピラーの形成メカニズムについて考察した。また、形成されたナノピラーが抗菌活性を示すかを評価した。

第 7 章

本論文の結論を示した。

2 章 材料特性の分析および評価手法

本研究では、金属または無機材料の表面改質、作製した材料の表面分析、生体活性評価の順で行っており、一貫している（図 2-1）。そこで本章では、本研究で用いた分析および評価手法の詳細を述べ、以降の章では概略に留める。

図 2-1 本研究における研究過程

2-1 材料表面の分析手法

2-1-1 X 線光電子分光法 [52,53)]

X 線光電子分光法（X-ray Photoelectron Spectroscopy; XPS）は、材料表面に X 線を照射することで光電効果により光電子を発生させ、その運動エネルギーを測定することで元素の定性や化学状態を分析する手法である。

X 線を材料表面に照射した際の光電子放出過程は以下の式で表すことができる。

$$\mathbf{E_b = h\nu - E_{kin} - \phi \quad (2\text{-}1)}$$

ここで、E_b は電子の結合エネルギー、hν は X 線のエネルギー、 E_{kin} は光電子の運動エネルギー、ϕ は分光器の仕事関数である。なお、E_b は元素固有のエネルギー値を有している。hν および ϕ は装置ごとに予め固定されているため、E_{kin} を測定することで E_b を求めることができ、材料表面に存在する元素の定性が可能となる。また、光電子の脱出深さ、および非弾性平均自由行程は表面から深さ約 10 nm 以下であるため、材料の最表面を分析することができる。

また、同じ元素であっても、その化学結合状態によって内殻準位の電子の結合エネルギーは変化する。これは、内殻準位の電子の結合エネルギーが原子核の正電荷による引力作用、またはその周辺に配置された電子の負電荷による反発作用が変動することに基づく。例えば、金属元素が酸素と共有結合し、酸化物を形成すると金属元素の最外殻電子が酸素に引き付けられ、内殻準位の電子に対して原子核からの引力作用が強くなるため、結合エネルギーは増大する。故に、結合エネルギーの変化から、最表面に存在する元素の化学状態を分析することができる。

本研究における XPS 測定はアルバック・ファイ株式会社製 PHI 5000 VersaProbe を用い、作製した材料表面の化学状態分析を行った。X 線源は単色 AlKα 線（hν = 1486.8 eV）であり、光電子の取り出し角度は 45°に設定した。 また、表面汚染炭化水素に帰属される C 1s

の結合エネルギー (284.8e V) を基準にして、スペクトル全体の結合エネルギーを補正した。さらに、スペクトルのバックグラウンドは、シャーリー法を使用して差し引いた。得られたXPS スペクトルはカーブフィッティング法によりピーク分離し、化学状態の同定を行った。

図 2-2 光電子の発生原理 [53)]

2-1-2 X 線回折法 [54, 55]

X 線回折法（X-ray diffraction; XRD）は、材料表面に X 線を照射した際に生じる回折現象を利用し、材料表面の結晶構造を分析する手法である。

結晶性の材料は三次元的に規則正しく原子が配列している。この様な材料表面に X 線を照射すると、原子を構成する電子によって散乱が生じる。この時、散乱前後で X 線の波長が変化しない散乱をトムソン散乱と呼ぶ。トムソン散乱による散乱 X 線は、下記のブラッグの条件を満たすと互いに干渉し強め合い、回折 X 線が観察される。

$$2\,d\sin\theta = n\lambda \quad (2\text{-}2)$$

ここで、d は材料の格子面間隔、θ は X 線の回折角（ブラッグ角）、λ は入射 X 線の波長である。故に、λ を固定し、回折 X 線が確認できる角度 θ を測定することで、d が求められる。d は材料または結晶構造固有の値であるため、定性分析および結晶構造を同定することができる。

本分析は、第 3 章の研究において Bruker AXS 社製 D8 ADVANCE を用いて実施し、作製した材料の定性および結晶構造の同定を行った。実際の測定は集中法光学系で行い、入射 X 線には Cu Kα 線を用いた。

図 2-3 X 線回折の原理 [55]

2-1-3 蛍光 X 線分析法 [54, 56)]

蛍光 X 線分析法（X-ray fluorescence analysis; XRF）は材料表面に X 線を照射し、励起により発生する蛍光 X 線を検出することで、元素の定性および定量を行う手法である。

X 線を材料表面に照射すると、光電効果により内殻準位の電子が放出されるため、電子軌道に空孔が生じる。この空孔に外殻の電子軌道に配置された電子が遷移すると、内殻および外殻の電子軌道間のエネルギー差に相当する電磁波が放出される。この時に放出される電磁波が蛍光 X 線であり、そのエネルギーは元素ごとに固有の値を示す。このため、蛍光 X 線の波長またはエネルギーを測定することで、元素の定性分析、またその X 線強度から定量分析を行うことができる。

XRF には波長分散型（Wave-length Dispersive X-ray Fluorescence; WDXRF）とエネルギー分散型（Energy-dispersive X-ray Fluorescence; EDXRF）の 2 種類に分類される。WDXRF では、材料表面から発生した蛍光 X 線をソーラースリットで平行にし、分光結晶に入射させる。この時、前述したブラッグの条件（式 2-2）を満たす波長を有する蛍光 X 線が回折され、シンチレーション検出器で検出される。一方、EDXRF では、蛍光 X 線を半導体検出器で検出し、エネルギーと強度を同時に測定する。

本分析は、第 3 および 4 章の研究において WDXRF である Bruker AXS 社製 S8 Tiger を用いて実施し、表面改質法により材料表面に形成された HAp の膜重量を算出した。なお、膜重量の算出には、薄膜ファンダメンタルパラメーター法を用いた。

図 2-4 蛍光 X 線の発生原理 [56)]

2-1-4 走査型電子顕微鏡 [55, 57)]

走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope; SEM）は、材料表面に電子線を照射し、放出された二次電子を検出し、材料表面の形態を観察することができる分析手法である。

SEM では電子銃から発生した電子線を集光レンズで細かく絞り、走査コイルの磁界により材料表面上で電子線を走査する。この時に発生する二次電子を検出し、発生する二次電子量に基づき、像のコントラストが決定される。また、二次電子の発生量は入射電子線の角度に依存し、観察試料表面の突起部分では大きくなる性質がある。このため、観察表面の微細な凹凸を反映した立体像を得ることができる。

本研究における SEM 観察は、電解放出型走査型顕微鏡（FE-SEM）である日本電子株式会社製 JSM-6701F を用い、作製した材料表面の表面形態の観察を行った。

図 2-5 走査型電子顕微鏡の測定原理 [55)]

2-1-5 走査型プローブ顕微鏡 [58, 59)]

走査型プローブ顕微鏡（Scanning Probe Microscope; SPM）は、材料表面と探針の間に作用する原子間力を検出することで、表面形態の観察および表面粗さの測定を行う分析手法である。

SPM では先端に探針が形成されたカンチレバーを使用し、材料表面との距離が一定になるように振動させ、表面を走査する。また、カンチレバーにはレーザー光が照射されており、反射された光はフォトディテクターで検出される。探針と材料表面との間には原子間力が働き、それによりカンチレバーの振動が変化するため、フォトディテクターによるレーザー光の検出位置も変化する。故に、XY 方向に対してレーザー光の位置変化を検出することで、材料表面の表面形状の観察、および表面粗さを算出することができる。

本分析は、第 5 章の研究において島津製作所株式会社製 SPM-9700 を用いて実施し、プラズマ親水化処理した材料表面の表面形態および表面粗さを測定した。

図 2-6 走査型プローブ顕微鏡の原理 [59)]

2-1-6 接触角測定 [60)]

接触角は「静止液体の自由表面が、固体壁に接する場所で、液面と固体面とのなす角」であり、その角度を測定することで親水性を評価することができる。

図 2-7 に接触角の定義を示す。ここで、γ_{ls} は固液界面の界面エネルギー，γ_{lv} は気液界面の界面エネルギー（表面エネルギー，表面張力），γ_{sv} は固気界面の界面エネルギーを表す。液滴と固体となす角度 θ が接触角であり，親水性の程度を表す。故に、接触角が小さいほど親水性が高いと評価される。

本分析は、第 5 章の研究において協和界面科学株式会社製 DM-CE1 を用いて実施し、プラズマ親水化処理した材料表面における接触角を測定することで親水性を評価した。

図 2-7 接触角の定義 [60)]

2-2 材料表面の生体機能性評価手法

2-2-1 骨形成能評価試験

医療機器用材料の骨形成能は一般的に（1）擬似体液浸漬試験、（2）細胞培養試験、（3）動物試験の順に実施されている。本研究では、第 3 章および 4 章にて（1）および（2）を行ったので、以下に述べる。

2-2-1-1 擬似体液浸漬試験

ヒト血漿に含まれる無機成分とその組成を模擬した擬似体液に材料を任意期間で浸漬し、材料表面での骨類似アパタイトの沈着挙動により、骨形成能を評価する試験である。アパタイトの沈着が促進される材料は、細胞培養試験や動物試験においても良好な結果が得られる傾向にあり、本評価は骨形成能評価の第 1 段階として用いられている [61)]。

擬似体液中では、カルシウムイオン（Ca^{2+}）、およびリン酸イオン（PO^{4-}）は過飽和状態となっている。このため、材料表面から Ca^{2+}や PO^{4-}などのイオンが溶出すると、局所的にアパタイトに対する過飽和度が上昇し、アパタイトの不均一核形成が生じる。

本研究では、擬似体液浸漬後に材料表面に形成されたアパタイトを SEM 観察、および WDXRF にて定量することでアパタイト沈着挙動の調査を通して骨形成能を評価した。なお、擬似体液は様々な組成の溶液が報告されいるが、本研究では比較的調製が簡便な Hanks' Balanced Salt Solution（HBSS）を採用した。以下に擬似体液浸漬実験の手順を示す。

図 2-8 擬似体液浸漬試験の概要

[試験手順]

（1）擬似体液の調製

1. 調製に用いる器具（1000 mL ポリプロピレン製ビーカー、1000 mL メスフラスコ、100 ml ポリプロピレン製保存容器）を事前に 1M HCl に浸漬する。

2. 各器具を取り出し、蒸留水にて HCl を洗い流した後、乾燥させる。

3. ポリプロピレン製ビーカーに約 700 ml 蒸留水と撹拌子を加える。

4. 表 2-1 に示す試薬を順にビーカーに加え、スターラーにて溶解する。※

5. 試薬を全て溶解した後、溶液をメスフラスコに移し、蒸留水で 1000 ml にメスアップする。

6. メスフラスコを十分撹拌した後、溶液を保存容器に分注し、冷蔵庫内で保存する。

（2）試料浸漬

1. 浸漬に用いる器具（テフロン容器）を事前に 1M HCl に浸漬する。

2. 蒸留水にてテフロン容器の HCl を洗い流した後、乾燥させる。

3. ウォーターバスを用いて擬似体液を 30~40℃まで加温する。

4. テフロン容器に浸漬する試料を静置する。

5. 浸漬する試料の総表面積の 2 倍量の擬似体液をテフロン容器に加える。

6. テフロン容器を 37℃に設定したインキュベーター内で 3 日間保持する。

7. 3 日後、試料を擬似体液から取り出し、蒸留水で洗浄した後に、40℃で乾燥させる。

（3）評価方法

1. 表面形態は Pt スパッタした後、FE-SEM で観察する。

2. 試料表面に形成したアパタイトの定量は WDXRF により得られた蛍光 X 線強度から薄膜ファンダメンタル・パラメータ法（薄膜 FP 法）にて予め設定した構造モデルに基づいて計算することで定量した [62)]。

表 2-1 HBSS の調製試薬および添加量

試薬	添加量 (g)
NaCl	8.0
$CaCl_2$	0.14
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.06
KH_2PO_4	0.06
KCl	0.4
$NaHCO_3$	0.35

※蒸留水1000 mlに溶解

表 2-2 HBSS とヒト血漿のイオン濃度の比較

	HBSS (mM)	ヒト血漿 (mM)
Na^+	142	142
K^+	5.8	5.0
Mg^{2+}	0.81	1.5
Ca^{2+}	1.3	2.5
Cl^-	145	103
HPO_4^{2-}	0.81	1.0
SO_4^{2-}	4.12	0.5

2-2-1-2 細胞培養試験

人工股関節などの医療機器を生体内に埋入すると、その表面での細胞の接着、増殖、分化を通して骨の基となる石灰化物を形成する。医療機器の骨への固定化には、形成される石灰化物を介して達成されるため、医療機器として応用される材料表面にて細胞挙動を評価することは必須である。

ここで、図 2-9 に材料表面への細胞接着から石灰化物形成の過程の概略図を示す[2, 14)]。本試験では、動物の体内から取り出した細胞を表面改質した材料表面で培養し、細胞接着性、増殖性、および石灰化物形成挙動を通して、細胞レベルで生体安全性および骨形成能を評価した。なお、本評価で用いた細胞は、理化学研究所バイオリソース研究センターから購入したヒト由来骨芽細胞様細胞 Saos-Ⅱを用いた実施した。Saos-Ⅱ細胞はガン化した細胞であり、アポトーシスせずに増殖し続けるため、正常細胞と比較して扱いやすいことから、材料の生体機能性評価を目的とした細胞培養試験で一般的に使用されている。

細胞培養試験の手順を以下に示す。

図 2-9 材料表面への細胞接着から石灰化物形成までの過程[2, 14)]

図 2-10 細胞培養試験の概要

[試験手順]

(1) 材料表面への細胞播種

1. McCoy's 5A 培地を用いて、細胞培養用ポリスチレンディッシュ上で Saos-II細胞を 90%コンフルエント状態になるまで 37℃，5%CO_2，100 %RH に設定したインキュベーターで予め培養しておく。

2. 試料を 70%エタノールに 30 分間浸漬することで滅菌する。

3. 24 穴ウェルプレートに滅菌した試料を配置する。

4. 1 で培養した細胞を用いて細胞懸濁液を調製し、5×10^5 cells / cm^{-2} となるように細胞を材料表面に播種する。

5. 4 を 37℃，5%CO_2，100 %RH に設定したインキュベーターで任意期間で培養する。

(2) 材料表面の細胞接着性および細胞増殖性の評価

1. 24 穴ウェルプレートに静置した試料表面で任意期間培養した細胞を回収する。

2. 1 で回収した細胞懸濁液とトリパンブルー染色液を混濁させ、細胞を染色する。なお、死細胞では細胞膜が損傷しているため、染色液が細胞膜を透過して青く染色されるが、生細胞は染色されない。

3. 2 の混濁液を血球計算に注入し、光学顕微鏡を用いて生細胞のみを計測する。

4. 計測した細胞数は、下記の式を用いて比細胞数とて算出する。

$$\text{比細胞数} = \frac{\text{任意の期間で培養後に計測した細胞数}}{\text{材料表面に播種した細胞数}}$$

(3) 材料表面で細胞により形成された石灰化物量の評価

1. 24 穴ウェルプレートに静置した試料表面に細胞を播種し、100%コンフルエント状態に達するまで 37℃，5%CO_2，100 %RH に設定したインキュベーターで培養する。

2. 分化誘導培地（2 mmol / L の β-グリセロリン酸、および 50 μg / ml の L-アスコルビン酸を含む McCoy's 5A 培地）に交換し、37℃，5%CO2，100 %RH に設定したインキュベーターで任意期間培養する。なお、分化誘導培地は 3 日間毎に交換する。

3. 培養後、0.1 M HCl を添加した後、4℃環境下で一晩放置し、細胞に形成された石灰化物を溶解する。

4. カルシウム定量用キットであるカルシウム E テストキット和光（富士フィルム和光純薬株式会社）を用いて、3 を発色させる。

5. 4 で発色した溶液を波長 600 nm で吸光度を測定し、予め作製した吸光度とカルシウム濃度の関係を示す検量線から、カルシウム濃度を算出しすることで石灰化物形成量として評価する。

2-2-2 抗菌活性評価試験

本研究では、第 5 章にて表面改質した材料表面の抗菌活性評価および細菌形態観察を行ったので、以下に述べる。

図２-11 抗菌活性評価試験の概要

2-2-2-1 抗菌活性評価（フィルム密着法）

材料の抗菌活性評価として様々な評価方法が提案されているが、特に金属材料に対しては JIS Z 2801（抗菌加工製品–抗菌性試験方法・抗菌効果）に規格されたフィルム密着法が適用されている。本試験は、表面改質した材料表面に細菌を付着させ、その表面での細菌数の増減を調査することで、抗菌活性を評価する。なお、本試験で用いた細菌はグラム陰性菌である大腸菌（Escherichia coli; E. coli, ATCC 25922）、およびグラム陽性菌である表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis; S. epidermidis, ATCC 14990)）であり、製品評価技術基盤機構から購入した。細菌はグラム陰性菌およびグラム陽性菌に 2 種に大別され、特に細胞膜の構造が異なる。このため、抗菌物質によっては菌種間で抗菌活性に差が生じる場合あるため、試験菌として両種が採用されている。本手法の試験手順を以下に示す。

[試験手順]

1. 各細菌を普通寒天培地上にて 35℃で保持したインキュベーターで培養し、細菌の集合体であるコロニーを形成させる。

2. 試料を 70%エタノールに 30 分間浸漬することで滅菌する。

3. 1 で培養したコロニーを 500 倍希釈普通ブイヨン培地に懸濁し、1×10^6 CFU / ml となるように細菌懸濁液を調整する。

4. 細菌懸濁液を 50 μL ずつ材料表面に播種し、15×15 mm のポリエチレンフィルムで覆う。

5. 各試料を 95Rh%、35 ℃に設定した恒温恒湿槽で 4 時間静置する。

6. SCALP 培地を用いて、細菌を回収する。

7. 6 で回収した細菌懸濁液を 500 倍希釈普通ブイヨン培地で 10, 100, 1000 倍と希釈する。

8. 希釈した細菌懸濁液を普通寒天培地表面に塗布し、35℃に保持したインキュベーターで 24 時間培養する。

9. 形成したコロニーを計測する。

10. 計測したコロニー数を用い、下記の式により細菌生存率を算出することで抗菌活性を評価する。

$$\text{細菌生存率}(\%) = \frac{\text{4 時間培養後に形成されたコロニー数}}{\text{材料表面に播種した細菌懸濁液から形成したコロニー数}} \times 100$$

2-2-2-2 細菌形態観察

抗菌活性の要因を調査するために、材料表面に付着した細菌形態を FE-SEM により観察した。なお、観察した細菌は前述の大腸菌（Escherichia coli; E. coli, ATCC 25922）、および表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis; S. epidermidis, ATCC 14990)）である。

細菌形態の手順を以下に示す。

[試験手順]

1. 抗菌活性評価の手順 5 までを行う。
2. 細菌形態の変化を防止するために 4%グルタルアルデヒド溶液で 1 時間固定する。
3. アルデヒド溶液を回収後、30、50、70、80、90、95、100%エタノールに 15 分間ずつ浸漬し、細菌を脱水する。
4. デシケーター内で 24 時間静置し、乾燥させる。
5. スパッタコーターで Pt コーティングし、FE-SEM で観察する。

2-2-7 統計分析

細胞または細菌培養による試験から得られたデータを比較する際に、平均値の差が小さい場合や、ばらつきを示す標準偏差が異なる場合は、安易に差があると結論づけることができない。そこで、本研究では、各試料の平均値の間に統計学的に有意な差異があるかを確認するために、Student's t-test、または分散分析(ANOVA)および多重比較検定である Student–Newman–Keuls 分析（SNK 分析）で統計分析を行った。

3 章 スラリー埋没加熱処理による

ジルコニウム金属材料表面の骨形成能向上

3-1 緒言

ジルコニウム(Zr)基材料は機械的強度および耐食性が高い、生体毒性が低いことに加え、人工股関節などの埋込型医療機器として応用されているチタン（Ti）基材料と比較して磁化率が低い[5, 10-12]。低磁化率材料は、核磁気共鳴画像法（MRI）でのアーチファクトを軽減できるため、Zr 基材料は新しい医療機器材料として研究開発されている[13]。

しかし、Zr 基材料表面に不働態皮膜として形成される酸化ジルコニウム（ジルコニア, ZrO_2）皮膜は生体不活性であるため、その表面では骨形成が十分に進行しないことが報告されている[63-65]。故に、生体内での医療機器の固定に長期間を要し、治療の長期化さらには失敗に至ることが懸念される。

このため、Zr 基材料表面での骨形成の促進を目的に様々な表面改質法が研究されている。特に、骨や歯の主成分であるハイドロキシアパタイト（HAp; $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$）を活用した被覆技術はその有効性が認められており、既にプラズマ溶射法が産業的に応用されているが、皮膜の膜厚はマイクロオーダーと比較的厚いため、埋入後に生体内で破壊が生じ、炎症反応などを誘発する可能性がある[25-29]。

上記の課題を克服するために、Ohtsu らは金属材料表面に HAp 皮膜を形成するため表面改質法としてスラリー埋没加熱処理（以下、スラリー処理）を開発した[37, 38]。本処理は、リン酸カルシウム粉末と蒸留水で調製したスラリー状処理剤に金属材料を埋め込み、そのまま大気中で加熱する処理である。これまでの著者らの研究にて、スラリー処理を工業用純 Ti に応用した場合、基板表面には HAp 含有 TiO_2 皮膜が形成され、その表面で培養された骨芽細胞様細胞は骨の基となる石灰化物の形成が促進されたことが報告されている[37-39]。さらに、動物試験においてラットの脛骨に埋入した場合でも、処理 Ti 表面にて骨形成が増進さ

れることが明らかとなっており、スラリー処理は材料の骨形成能を向上させる有効な表面改質法である[36)]。

本研究では、骨形成向上を目的にスラリー処理を用いることで Zr 基材料表面への HAp 皮膜の形成を試みた。まず、種々の熱処理温度でスラリー処理を Zr 基材料に施し、それらの表面特性を調査することで最適熱処理温度を検討した。その後、最適熱処理温度で作製した材料を用いて細胞培養試験を行い、骨芽細胞様細胞の石灰化挙動を調査した。以上の結果を踏まえて、Zr 基材料の骨形成を向上する表面改質法として、スラリー処理の有効性について議論した。

3-2 試料作製及び実験方法

3-2-1 試料作製

3-2-1-1 基板準備

本研究では、基板として工業用純 Zr (純度：99.2%)を使用した。基板の寸法は 1 mm × 10 mm × 10 mm、および 1 mm × 15 mm ϕであり、それぞれ表面分析用、細胞培養試験用として準備した。スラリー処理を行う前に Zr 表面をエメリー紙#240, 600 の順で研磨し、その後エタノール中で超音波洗浄を行った。

3-2-1-2 スラリー埋没加熱処理

スラリー状処理剤は、セラミックス製坩堝に試薬特級のリン酸三カルシウム粉末（3Ca3(PO4)2・Ca(OH)2; Sigma Aldrich Inc.）を 1 g、蒸留水を 1.5 ml 加え、混合することで調製した。なお、使用したリン酸三カルシウム粉末の平均粒径は約 50 nm だった。その後、Zr 基板をスラリー処理剤に埋め込み、そのまま大気雰囲気で 2 時間の熱処理を行った。ここで、熱処理温度は 200、350、500、650℃に設定した。熱処理後、Zr 基板をスラリーから回収し、蒸留水中で 10 分間超音波洗浄した。

3-2-2 特性評価

3-2-2-1 表面特性の評価

材料表面の特性評価では、第 2 章に記述した装置を用いて行った。スラリー処理した Zr 材料表面の化学状態を XPS、表面形態を FE-SEM、処理により形成された HAp 皮膜の膜重量を WDXRF、結晶構造を XRD にてそれぞれ分析した。

3-2-2-2 擬似体液浸漬によるアパタイト沈着性能

スラリー処理した Zr 基板の骨形成能評価の第 1 段階として、第 2 章に記述した HBSS を用いた擬似体液浸漬によるアパタイト沈着性能を評価した。本研究では、37℃に保持した Hanks' Balanced Salt Solution（HBSS）中で試料を 3 日間浸漬させ、材料表面に沈着したアパタイトを FE-SEM で、その沈着量を WDXRF にて定量評価した。

3-2-2-3 骨芽細胞様細胞の細胞接着性と石灰化評価

骨形成能評価の第 2 段階として、第 2 章に記述した細胞培養試験に実施し、スラリー処理で作製した Zr 材料表面において、骨芽細胞様細胞である Saos-II細胞の細胞接着性と石灰化挙動を評価した。なお、得られたデータは Student's t-test を使用して、試料間での統計的有意差を判定した。

3-3 実験結果及び考察

3-3-1 スラリー処理における熱処理温度が Zr 基板の表面特性に与える影響

（1）XPS による表面化学状態分析

650℃でスラリー処理した Zr 表面を XPS で測定したところ、 Zr および O に加え、Ca および P が検出された。このため、スラリー処理により Zr 表面が改質されたことが考えられることから、XPS ナロースペクトルを解析することで表面化学状態を明らかにした。。

図 3-1 に Ca 2p、P 2p、Zr 3d、O 1s XPS ナロースペクトルを示す。まず、結合エネルギー 324.0 eV から 356.0　eV の範囲では、Ca 2p および Zr 3p スペクトルが重複している（図 3-1 (a)）。このことに留意してカーブフィッティング法によりピーク分離を行うと、Ca $2p_{3/2}$ の結合エネルギーは 347.1 eV であることが分かった。また、P 2p の結合エネルギーは 133.3 eV であった（図 3-1 (b)）。これらの Ca $2p_{3/2}$ および P 2p の結合エネルギーはいずれも HAp の化学状態の値と一致した [37]。さらに、Ca $2p_{3/2}$ および P 2p スペクトルから算出した各原子濃度から、Ca と P の組成比を求めると約 1.7 であり、HAp の化学量論比 1.67 とほぼ一致した。

Zr $3d_{5/2}$ の結合エネルギーは 182.2 eV であり、ZrO_2 に帰属された（図 3-1 (c)）[66]。O 1s スペクトルは O^{2-}（529.8 eV）、OH^- および PO_4^{3-}（531.2 eV）、および H_2O（532.8 eV）は 3 つのピークに分離された [67, 68]。以上の分析結果から、スラリー処理された Zr 表面は HAp と ZrO_2 で構成されていることが考えられる。

図 3-1　熱処理温度 650℃でスラリー処理した Zr 材料の

（a）Ca 2p and Zr 3p、（b）P 2p、（c）Zr 3d、（d）O 1s XPS ナロースペクトル

（2）FE-SEM による表面形態観察

図 3-2 に未処理およびスラリー処理した Zr 表面の FE-SEM 像を示す。ここで、スラリー処理した Zr 表面として、熱処理温度 250℃および 650℃で作製した試料を観察した。スラリー処理した Zr 表面では、約 50 nm の微小粒子が確認されたが、粒子の粒経は熱処理温度によって変化しなかった（図 3-2 (b), 矢印部分）。しかし、650℃でスラリー処理した Zr 表面では、250℃と比較して粒子量が増加しており、粒子同士が凝集する傾向にあった。さらに、エネルギー分散型蛍光 X 線分析（EDXRF）により粒子の定性分析を行うと、Ca と P が検出された。よって、XPS 分析および FE-SEM 観察の結果から、スラリー処理により Zr 表面に微小な HAp 粒子が固定化された ZrO_2 皮膜を形成できることが明らかとなった。

図 3-2 (a) 未処理および熱処理温度 (b) 200℃、(c) 650℃でスラリー処理した Zr 表面の FE-SEM 像、(d) 650℃で処理した表面に固定された粒子の EDS スペクトル

（3）XRF による Zr 表面に固定化された HAp 粒子の定量分析

WDXRF を用いて、スラリー処理により Zr 表面に固定化された HAp 粒子量を膜重量（μg/cm^2）として評価した（図 3-3）。Zr 表面の粒子量は熱処理温度 350℃まで一定だったが、500℃以上では増加に転じた。この結果は、スラリー処理の熱処理温度を上昇させることで、HAp 粒子の固定化が促進することが示唆する。

図 3-3 スラリー処理の熱処理温度による HAp 粒子固定量の変化

(4) XRD による結晶構造解析

図 3-4 は未処理および熱処理温度 200℃から 650℃でスラリー処理した Zr 表面の XRD パターンを示す。ここで、図 3-4 (b)は回折角 27°から 31°の範囲を拡大したパターンである。XRD パターン上で確認されたピークは、単斜晶 ZrO_2 (PDF No. 37-1484)、正方晶 ZrO_2 (PDF No. 50-1089)、および六方最密充填構造である α 相の金属 Zr (PDF No. 05-0665) に帰属されたが、HAp に対応するピークは検出されなかった。単斜晶および正方晶 ZrO_2 のピークは 350℃でスラリー処理した Zr 表面で確認され始め、ピーク強度は熱処理温度の増加に伴い増加した。同時に、金属 Zr のピーク強度は減少し、特に 650℃では顕著に減少した。この結果から、熱処理温度が増加するにつれ Zr 表面上で ZrO_2 皮膜が成長し、650℃では急激に成長が進行したことが示唆される。、

図 3-4 種々の熱処理温度でスラリー処理した Zr 材料の XRD パターン

（5）スラリー処理による Zr 基板表面への HAp 固定化メカニズム

前節までで、スラリー処理を Zr 基板に施すことで、その表面に微小な HAp 粒子が固定化された ZrO_2 皮膜を形成でき、HAp 粒子の固定量および ZrO_2 皮膜の膜厚は熱処理温度に依存することが分かった。一方で、スラリー処理により Ti 表面には HAp が傾斜的に含有した TiO_2 皮膜が形成されるため、Zr と Ti では形成される皮膜構造が明らかに異なる。

スラリー処理による Ti および Zr 表面への HAp 皮膜形成および HAp 固定化メカニズムを図 3-5 に示す。温度の上昇つれてスラリー処理剤中の水分が蒸発し、それに伴いリン酸三カルシウム粒子が凝集、および基板に密着する。Ti の場合、熱処理温度に達すると密着した粒子から Ca および P が基板に熱拡散することで、HAp が傾斜的に含有する TiO_2 皮膜の形成に至る [37)]。故に、スラリー処理による皮膜形成は熱拡散に基づいており、Ca の原子半径は P の約 1.8 倍であることを考慮すると、特に Ca の熱拡散が主要因となることが考えられる [69)]。一方で、650℃における ZrO_2 中での Ca の拡散係数は TiO_2 と比較して約 1/100 倍であるため [70, 71)]、 Zr 表面では処理中に形成された ZrO_2 により Ca の熱拡散が抑制される。故に、Ti 表面に形成される傾斜皮膜は Zr 表面では形成されず、HAp 粒子は固定化に留まったことが示唆される。

図 3-5 スラリー処理による Ti および Zr 材料表面への

HAp 皮膜形成および HAp 固定化メカニズム

3-3-2 スラリー処理した Zr 基板のアパタイト沈着性能

（1）HBSS 浸漬した Zr 表面の FE-SEM 観察および XRF 分析

図 3-6 に HBSS に 3 日間浸漬した未処理および熱処理温度 200℃でスラリー処理した Zr 表面の FE-SEM 像を示す。未処理表面では沈着物は観察されなかったが、スラリー処理した Zr 表面では全体的に沈着物で覆われていた。なお、熱処理温度に関わらず、全てのスラリー処理した Zr 表面で同様の沈着物が確認された。

図 3-6 HBSS に 3 日間浸漬後の

（a）未処理および熱処理温度（b）200℃でスラリー処理した Zr 材料の FE-SEM 像

HBSS 浸漬後の Zr 表面を WDXRF で定性分析を行ったところ、検出された Ca および P の原子濃度比は約 1.7 であったため、沈着物はアパタイトであることが示唆された。沈着物の膜重量を算出すると、熱処理温度 200℃でスラリー処理した Zr 表面で最も大きく、350℃以上で処理した表面での膜重量は 200℃の約半分であった（図 3-7）。以上の結果から、熱処理温度 200℃でスラリー処理した Zr 表面が最も高いアパタイト沈着性能を有することを示唆される。

図 3-7 HBSS に 3 日間浸漬後にスラリー処理した Zr 材料表面上のアパタイト沈着量

（2）スラリー処理の熱処理温度と HBSS 浸漬後のアパタイト沈着量の関係性

擬似体液中でのアパタイト沈着は核成長に基づくため、その成長の起点である HAp 粒子が増加すれば沈着性能も向上することが考えられる。しかし、本研究では HBSS 浸漬後のアパタイト沈着性能は熱処理温度 200℃でスラリー処理された Zr 表面で最も高かく、固定化された HAp 粒子量は最も少なかった。

これは、スラリー処理より Zr 表面に形成される ZrO_2 皮膜が関与している可能性がある。Oishi らは、ZrO_2 セラミックス基板を HBSS 溶液に浸漬すると、その表面にリン酸ジルコニウムが形成されることを報告した [72)]。リン酸ジルコニウムは化学的安定性の高い物質であり、擬似体液中でのアパタイト沈着を抑制する [73)]。本研究では、XRD パターン（図 3-4）から熱処理温度 350℃以上のスラリー処理により ZrO_2 皮膜の形成されたことから、HBSS 溶液中におけるアパタイトの沈着が抑制されたことが示唆される。

3-3-3 スラリー処理した Zr 基板表面での骨芽細胞様細胞の細胞接着および石灰化挙動

（1） スラリー処理した Zr 材料表面の細胞接着性

擬似体液浸漬試験の結果に基づき、細胞培養試験では骨形成を最も促進する可能性が高い熱処理温度 200℃でスラリー処理した Zr 基板を評価した。図 3-8 は未処理およびスラリー処理した Zr 表面で 2 時間培養後に接着した細胞数を示す。ここで、縦軸は 2 時間培養後に接着した細胞数を播種した細胞数で除した比細胞数を示している。細胞数を計測した結果、各試料表面に接着した細胞数に統計的有意差は確認されなかった。この結果は、スラリー処理された Zr 表面は細胞接着を阻害しないことが示唆される。

本評価では、スラリー処理は Zr 基板の細胞接着に影響を及ぼさなかったが、処理中に形成される ZrO_2 皮膜はその後の細胞増殖に影響を与える可能性がある。Hempel らは本評価でも用いた Saos-II細胞を ZrO_2 基板上で培養したところ、24 時間後の細胞数は 2 時間後と比較して有意に増加することを報告している [74]。さらに、Pandey らは骨芽細胞様細胞である MG-63 細胞を ZrO_2 基板および細胞培養用ポリスチレンプレートで 8 日間培養したが、細胞数に統計的有意差が確認されなかったこと報告している [75]。以上の先行研究に基づくと、スラリー処理により形成される ZrO_2 皮膜は細胞の増殖挙動に影響を与えないことが示唆される。

図 3-8 2 時間培養後の未処理およびスラリー処理した Zr 表面の Saos-II細胞の接着数

（2） スラリー処理した Zr 材料表面の細胞石灰化挙動

図 3-9 は骨芽細胞様細胞の分化誘導を開始してから未処理およびスラリー処理した Zr 表面上で 5 日および 14 日間培養した Saos-II細胞が形成した石灰化物量を示す。5 日後では、各試料間で石灰化物形成量に統計的有意差は確認されなかった。一方で、14 日後ではスラリー処理した Zr 基板上でのみ石灰化物形成量が増加し、その量は 5 日後と比較して約 6 倍であった。また、14 日後の石灰化物形成量について統計分析を行うと、未処理表面と比較してスラリー処理した Zr 表面での石灰化物形成量が有意に高いことが分かった。以上の結果は、Zr 表面上の骨芽細胞様細胞の石灰化物形成がスラリー処理により大幅に促進されたことが示唆された。

スラリー処理で作製された HAp 固定化 ZrO_2 皮膜、即ち HAp と ZrO_2 の複合材料による骨芽細胞の分化挙動は数多くの研究者によって報告されている。まず、本研究で評価した細胞により形成される石灰化物は、分化後期マーカーとして知られている。その他の分化マーカーとして、初期および中期マーカーであるアルカリホスファターゼ（ALP）、後期マーカーとしてはオステオカルシンが挙げられる [76]。Kong らは、ZrO_2-Al_2O_3 複合セラミックス材料の調製時に HAp を添加することで、MG63 細胞の ALP 活性が増強されることを報告している [77]。さらに、An らは、骨髄間質細胞によるオステオカルシンの生成は ZrO_2 材料と比較して HAp-ZrO_2 複合材料で促進されることを報告した [78]。以上の先行研究は、ZrO_2 材料への HAp 複合化は細胞分化挙動の促進に対して有効であることを示し、本研究で得られた実験結果と一致する。さらに、細胞の石灰化物形成を促進する材料表面は、動物埋入時に新生骨の形成も同様に促進されることが報告されている [36]。以上より、スラリー処理は Zr 材料表面にて骨細胞への分化促進が期待でき、骨形成能を向上できる有効な表面改質法であると結論づける。

図 3-9 分化誘導開始後、未処理およびスラリー処理した Zr 表面上で

5 日および 14 日間培養した Saos-II細胞の石灰化物形成量

3-4 結言

スラリー処理を Zr 材料に応用することで、その表面に微小な HAp 粒子が固定化された ZrO_2 皮膜を形成することができた。HAp 粒子の固定化量と ZrO_2 皮膜の膜厚は、スラリー処理の熱処理温度の上昇に伴い増加した。HBSS 中でのアパタイト沈着性能はスラリー処理によって向上したが、熱処理温度が最も低く、かつ HAp の固定量が最も少ない試料にて沈着性能が最も向上した。この結果は、スラリー処理で同時に形成される ZrO_2 皮膜が HBSS 中での HAp の核成長を阻害したと推察される。故に、本研究ではスラリー処理により骨形成能の向上が最も見込まれる熱処理温度は 200℃であることが示唆された。骨芽細胞様細胞である Saos-II細胞を Zr 表面上で培養すると、未処理およびスラリー処理した Zr 表面間で細胞接着数に統計的有意差は確認されなかった。しかし、細胞の石灰化物形成量は未処理表面と比較してスラリー処理した Zr 表面で有意に増加した。以上の研究結果から、スラリー処理は Zr 基板の骨形成能を向上することができる有効な表面改質法であると結論づける。

4 章 ジルコニアセラミックス材料への

スラリー埋没加熱処理の応用検討

4-1 緒言

イットリア部分安定化ジルコニア（YSZ）は機械的強度、靭性、耐食性が高く、また生体毒性が低いことから、近年では金属材料に代わり歯科インプラント材料として応用され始めている [14)]。また、YSZ は歯の様な白色外観であるため審美性に優れており、インプラントを埋入した際に歯肉の変色を防止することができる [18)]。さらに、化学的安定性に優れているため、金属材料で懸念される溶出した金属イオンによるアレルギー反応の発症リスクを軽減することも可能である [19,20)]。このため、YSZ の応用は歯科治療における治療効果向上に繋がることが期待されている。

しかし、YSZ は生体不活性材料であるため、一般的なインプラント材料である Ti 基材料と比較して骨形成の進行が乏しい [63, 65, 79)]。故に、インプランを固定するために現状以上の期間が必要であり、さらなる治療の長期化が懸念される。

骨形成能の向上には前章でも述べたように、ハイドロキシアパタイト（HAp）を活用した被覆技術が挙げられるが、YSZ 表面に HAp を被覆することは困難であり、実際に報告事例も少ない。これは、YSZ の物理的および化学的特性が原因である。まず、YSZ は約 1000℃で体積変化を伴う相転移が生じ、機械的強度が低下する [80-82)]。故に、産業的に応用されているプラズマ溶射法では材料表面を約 10,000℃のプラズマに曝すことになるため、YSZ の表面改質法として適用することは困難である。一方で、ゾル-ゲル法や電気化学処理法など化学反応に基づく HAp 被覆も検討されているが、YSZ は化学的に極めて安定であるため、YSZ と HAp の間の化学反応が進行せず、HAp が被覆されたとしてもその密着性は乏しい [83, 84)]。

そこで、この課題を解決するために、前章にて金属ジルコニウム（Zr）材料の骨形成能向上を目的に研究したスラリー埋没加熱処理（以下、スラリー処理）に注目した。ここで、金

属 Zr 材料を大気中で放置すると、大気中の酸素と反応し、その表面に不働態皮膜として極薄 ZrO_2 皮膜が形成する。この金属 Zr 材料表面に形成した極薄 ZrO_2 皮膜の化学的安定性は、YSZ 材料と比較すると劣る。前章では、スラリー処理により極薄 ZrO_2 皮膜を有する金属 Zr 表面に HAp を固定化できることを示し、細胞培養試験を通して HAp を固定化した金属 Zr 表面は、高い骨形成能を持つことを確認している。これらの研究成果を基に、スラリー処理を用いることで、より化学的に安定な YSZ 表面であっても HAp を固定化できる可能性があると考えた。

本研究では、骨形成能の向上を目的に、YSZ 材料へのスラリー処理の応用を検討した。まず、種々の熱処理温度でスラリー処理を YSZ 材料に施し、それらの表面特性を調査することで最適熱処理温度を決定した。その後、細胞培養試験を行い、スラリー処理で作製した YSZ 表面にて骨芽細胞様細胞の石灰化挙動を調査した。以上を踏まえて、スラリー処理が YSZ 材料の骨形成を向上する有効な表面改質法であるか議論した。

4-2 試料作製及び実験方法

4-2-1 試料作製

4-2-1-1 基板準備

本研究では、基板として YSZ（Y_2O_3 含有量 3 mol%）を使用した。基板の寸法は 1 mm × 10 mm × 10 mm、および 1 mm × 15 mm ϕ であり、それぞれ表面分析用、細胞培養試験用として準備した。スラリー処理を行う前に YSZ 表面をダイヤモンド研磨紙#240、600、1200 の順で研磨し、その後エタノール中で 10 分間超音波洗浄を行った。

4-2-1-2 スラリー埋没加熱処理

スラリー処理は前章と同様の方法、試薬にて実施した。ただし、本研究では熱処理温度を 650、800、950、1100℃に設定した。スラリー処理は処理剤に含まれる Ca および P の基板への熱拡散が重要である。一般的に、セラミックス材料中での元素の熱拡散係数は金属材料と比較して小さいため、熱処理温度を高温に設定した [69, 85, 86]。

4-2-2 特性評価

4-2-2-1 表面特性の評価

表面特性の評価は前章と同様に行い、スラリー処理した YSZ の表面形態を FE-SEM、表面化学状態を XPS、表面に固定化された HAp の膜重量を WDXRF により分析を行った。

4-2-2-2 擬似体液浸漬によるアパタイト沈着評価

前章と同様に、37℃に保持した HBSS に 3 日間浸漬後、YSZ 表面に沈着したアパタイトを SEM で、その沈着量を WDXRF にて定量評価した。

4-2-2-3 骨芽細胞様細胞の細胞接着性と石灰化評価

前章と同様に、スラリー処理で作製した Zr 材料表面で骨芽細胞様細胞である Saos-II細胞を培養し、細胞接着性、細胞増殖性、および石灰化挙動を評価した。なお、得られたデータは Student's t-test を使用して、試料間での統計的有意差を判定した。

4-3 実験結果及び考察

4-3-1 スラリー処理による YSZ 基板への HAp 粒子の固定

（1）FE-SEM による表面形態観察

図 4-1 に未処理およびスラリー処理した YSZ 表面の FE-SEM 像を示す。熱処理温度 650℃でスラリー処理した YSZ 表面には、粒径が約 50 から 100 nm の微小粒子が観察された（図 4-1 (b)、矢印部分）。また、熱処理温度の増加に伴い、表面に存在する粒子量および個々の粒子の粒径は増加した。同時に、YSZ 基板の結晶粒も粗大化した。

図 4-1 （a）未処理および熱処理温度（b）650℃、（c）800℃、（d）950℃、（e）1100℃でスラリー処理した YSZ 表面の SEM 像

EDXRF を用いて元素の定性分析を行うと、粒子が密集した領域では Ca および P が検出されたが（図 4-2 (a), (b) Point 1）、粒子が存在しない領域では検出されなかった（図 4-2 (a), (b) Point 2）。以上の結果から、スラリー処理により YSZ 表面に Ca と P で構成された粒子が固定化されたことが分かった。

図 4-2 （a）熱処理温度 1100℃でスラリー処理した YSZ 表面の元素分析箇所、および（b）その EDS スペクトル

（2）XPS による表面化学状態分析

スラリー処理した YSZ 表面を XPS で測定したところ、Zr および O に加え、Ca および P が検出されため、各元素の化学的状態を明らかにするために XPS ナロースペクトルの解析を行った。

図 4-3 に Ca 2p、P 2p、Zr 3d、および O 1s XPS ナロースペクトルを示す。なお、熱処理温度が 950℃以下でスラリー処理した YSZ 表面から得た XPS ナロースペクトルの形状はほぼ同じであったため、ここでは 950 および 1100℃から得られた XPS スペクトルのみを示す。Ca 2p スペクトルは Zr $3p_{1/2}$ スペクトルと重複するため、複合スペクトルから Zr $3p_{1/2}$ を差し引き、Ca 2p スペクトルを抽出した（図 4-3 a）。なお、Zr$3p_{1/2}$ のスペクトル形状は、未処理の YSZ 表面から得られた Zr 3p スペクトルを標準スペクトルとし、スラリー処理した YSZ 表面の Zr $3p_{3/2}$ のピーク強度および Zr $3p_{3/2}$ と 3p $_{1/2}$ の理論ピーク強度比に基づいて決定した。抽出した Ca 2p スペクトルをカーブフィッティング法でピーク分離を行うと、熱処理温度 950℃でスラリー処理した YSZ 表面では、Ca $2p_{3/2}$ の結合エネルギーは 347.1eV であり、リン酸カルシウム化合物に帰属された [87)]。一方、1100℃では、Ca $2p_{3/2}$ スペクトルは 2 つのピークで構成されており、それぞれリン酸カルシウム化合物（347.1 eV）および酸化カルシウム（CaO; 346.5 eV）に帰属された [87, 88)]。 また、P $2p_{3/2}$ の結合エネルギーは熱処理温度に関係なく 133.2 eV であり、リン酸カルシウム化合物に帰属された（図 4-3 (b)）[87)]。さらに、Ca $2p_{3/2}$ および P 2p スペクトルから算出した各原子濃度から Ca と P の組成比を求めると、950℃では約 1.7、1100℃では約 1.5 であり、それぞれ HAp およびリン酸三カルシウム（TCP）の化学量論比に一致した。

熱処理温度 950℃の Zr $3d_{5/2}$ の結合エネルギーは 182.3eV であり、ZrO_2 に帰属された [72)]。一方、1100℃の Zr 3d スペクトルは全体的に低エネルギー側にシフトしており、2 つのピークで構成されていた（図 4-3 (c)）。また、950℃において O1s スペクトルは 2 つのピークで分離され、O^{2-}（530.1eV）、OH^-および PO_4^-（531.4 eV）に帰属されたが、1100℃では Zr 3d 同様に低エネルギー側へのシフトが確認された（図 4-3 (d)）[72, 89)]。

ここで、CaO は ZrO_2 セラミックス材料の相転移を抑制する安定化剤として知られている。CaO と YSZ を約 1100℃で焼結した場合、CaO が熱拡散することで YSZ の結晶構造は正方晶から立方晶に相転移し、完全安定化される [90]。また、Majumdar らは、純粋な ZrO_2 材料に安定化剤を添加することで、Zr 3d および O 1s XPS スペクトルの結合エネルギーが低エネルギー側にシフトすることを報告している [91]。故に、熱処理温度 1100℃でスラリー処理した YSZ 表面で確認された Zr 3d および O 1s スペクトルのシフトは、YSZ 基板への CaO の熱拡散が原因であると考えられ、低エネルギー側のピークは CaO が拡散した ZrO_2 に由来すると推察される。

以上の XPS 分析結果から、熱処理温度 950℃以下で処理された表面に固定化された粒子は HAp であり、1100℃では TCP と CaO の複合体であることが示唆される。

図 4-3　熱処理温度 950 および 1100℃でスラリー処理した YSZ 材料の（a）Ca 2p および Zr 3p、（b）Ca 2p　（c）P 2p、（d）Zr 3d、（e）O 1s XPS ナロースペクトル

（3）XRF による YSZ 表面に固定化された HAp 粒子の定量分析

図 4-4 に WDXRF を用いて算出したスラリー処理により YSZ 表面に固定化された粒子の膜重量（μg/cm^2）を示す。膜重量は熱処理温度 800℃までは一定であったが、950℃以上では増加に転じた。この結果は、スラリー処理の熱処理温度を上昇させることで、粒子の固定化が促進されることを示唆し、金属 Zr 材料をスラリー処理した場合と同様の傾向を示した。

図 4-4 スラリー処理の熱処理温度による HAp 粒子固定量の変化

（4）スラリー処理おける熱処理温度が表面特性に及ぼす影響

以上の実験結果から、スラリー処理により HAp 粒子を YSZ 表面に固定するには、少なくとも熱処理温度を 650℃にする必要があることが分かった。これは、金属 Ti および Zr 材料に対してスラリー処理を適用する場合と比較して 300 から 700℃高い温度である。スラリー処理では、スラリー処理剤を構成する Ca および P が材料表面に熱拡散することで、HAp 粒子の固定化が達成される。しかし、YSZ 中での Ca および P の拡散係数は、金属 Ti および Zr 材料中での拡散係数と比較して、約 1/100 と低い [92-94]。故に、YSZ 表面への HAp 粒子の固定には熱拡散の促進が必須であるため、より高い熱処理温度が必要であると考えられる。一方、金属基板においてもより高い熱処理温度を用いることで粒子の固定量が増加することが推察されるが、同時に脆弱な酸化物皮膜の成長が促進され、皮膜自体の破壊が懸念される [38]。このため、高温でのスラリー処理はセラミックス材料にのみ適用可能である。

熱処理温度の上昇に伴い、YSZ 基板の結晶粒が約 500 nm まで粗大化したため、機械的特性に影響を与える可能性がある（図 4-1）。ここで、Ruiz らは YSZ の機械的特性に及ぼす熱処理温度の影響を調査している。1750℃にて結晶粒が約 5μm に粗大化したものの、弾性率および硬度の低下は確認されなかった一方で、1850℃以上では急速に劣化することを報告した。[82]。これは、固溶した Y_2O_3 が粒界に熱拡散することで、正方晶相から単斜晶相への体積変化を伴う相転移が誘発され、基板表面にクラックが形成されたためである [82, 95]。これらの先行研究に基づくと、本研究における最大熱処理温度は 1100℃であるため、スラリー処理は YSZ 基板の機械的特性の低下を引き起こさないと考えられる。

4-3-2 スラリー処理した YSZ 基板のアパタイト沈着性能

（1）HBSS 浸漬した Zr 表面の FE-SEM 観察および XRF 分析

未処理のおよびスラリー処理した YSZ 基板を HBSS に 3 日間浸漬し、アパタイト沈着性能を調査した。図 4-5 に HBSS に 3 日間浸漬した YSZ 表面の SEM 像を示す。熱処理温度 650℃でスラリー処理した YSZ 表面では、微小な沈着物が観察されたが、表面全体を覆うには至らなかった（図 4-5 (b)）。800 および 950℃では、YSZ 表面は沈着物で覆われており、特に 950℃ではクラックが確認されるほど、厚く沈着していた（図 4-5 (c), (d)）。一方で、1100℃では 950℃で確認されたようなクラックは観察されず、部分的に YSZ 基板表面が観察された（図 4-5 (e), 矢印部分）。

図 4-5 HBSS に 3 日間浸漬後の（a）未処理および熱処理温度（b）650℃、（c）800℃、（d）950℃、（e）1100℃でスラリー処理した YSZ 表面の SEM 像

WDXRF で HBSS 浸漬後のスラリー処理表面を分析したところ、Ca と P が検出され、それらの原子濃度比は約 1.7 であったため、沈着物はアパタイトであることが分かった。沈着物の膜重量を算出すると、熱処理温度の増加に伴い膜重量は増加したが、1100℃では減少に転じた（図 4-6）。以上の結果は、熱処理温度 950℃でスラリー処理した YSZ 表面が最も高いアパタイト沈着性能を有することを示す。

図 4-6 HBSS に 3 日間浸漬後にスラリー処理した YSZ 材料表面上のアパタイト沈着量

（2）スラリー処理の熱処理温度がアパタイト沈着性能に及ぼす影響

スラリー処理における熱処理温度の増加に伴い、YSZ 表面上への固定される粒子量も増加した。このため、HBSS 中でのアパタイト沈着性能も熱処理温度温度の増加に伴い向上することが予想されたが、実際は熱処理温度 950℃でスラリー処理した YSZ で最大となり、1100℃では減衰した。これは、高温下での HAp の分解反応が原因であると考えられる。

HAp は約 1100℃で以下の様な分解反応が進行し、TCP と CaO が生成されること報告されている [96, 97]。

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightarrow Ca_3(PO_4)_2 + CaO + H_2O \quad (1)$$

TCP および CaO は HAp と比較すると溶解性が高いため、HBSS 浸漬中に溶解することで、アパタイト沈着の起点が減少し、1100℃で処理された表面では沈着性能が減衰したと考えられる。

図 4-7 熱処理温度がスラリー処理した YSZ 表面におけるアパタイト沈着に及ぼす影響

4-3-3 スラリー処理した YSZ 基板表面での骨芽細胞様細胞の細胞応答

（1） スラリー処理した YSZ 材料表面の細胞接着および細胞増殖

擬似体液浸漬試験の結果に基づき、細胞培養試験では骨形成を最も促進する可能性が高い熱処理温度 950℃でスラリー処理した YSZ 基板を評価した。

図 4-7 に未処理およびスラリー処理した YSZ 表面で 6 または 72 時間培養後に計測した Saos-II細胞の細胞数を示す。ここで、縦軸は各培養後に計測した細胞数を播種した細胞数で除した比細胞数を示している。6 または 72 時間培養後、いずれも各試料表面の細胞数に統計的有意差は確認されなかった。この結果は、スラリー処理は YSZ 表面の細胞接着および増殖を阻害しないことを示唆する。

先行研究にて、エアロゾルデポジション法によって HAp 被覆された YSZ、および HAp と YSZ を焼結して調製された複合セラミック表面において、ポジティブコントロールである細胞培養用ポリスチレンと同等の細胞接着および増殖を示したことが報告されている[98, 99]。故に、HAp および YSZ 自体は細胞接着と増殖に影響を与えないことが示唆され、本研究の細胞培養試験の結果と一致する。

図 4-7 6 および 72 時間培養後の未処理およびスラリー処理した Zr 材料表面の細胞接着数

(2) スラリー処理した YSZ 材料表面での細胞の石灰化挙動

図 4-8 は Saos-II細胞の分化誘導を開始してから 6 日培養後において、未処理およびスラリー処理した YSZ 表面上の細胞が形成した石灰化物量を示す。スラリー処理した YSZ 表面上で形成された石灰物量は未処理表面と比較して増加したことが分かり、統計分析により有意差も確認された。故に、スラリー処理により YSZ 表面上で骨芽細胞様細胞の石灰化物形成が促進されるが明らかとなった。

スラリー処理により HAp 粒子が固定化された YSZ 表面上での骨芽細胞様細胞の石灰化は、スラリー処理を金属 Zr に適用した場合と同様の傾向を示した。このため、YSZ 上でも固定された HAp が細胞の分化を促進したため、石灰化物の形成量が増加した。以上の研究結果を踏まえ、スラリー処理は骨形成能向上を目的とした表面改質法として、金属材料のみでなく、セラミックス材料である YSZ に対しても応用可能であると結論づける。

図 4-8 分化誘導 6 日後に未処理およびスラリー処理した Zr 材料表面上の細胞の石灰化物形成量

4-4 結言

YSZ 基板へのスラリー処理を応用することで、その表面にリン酸カルシウム粒子を固定することができた。粒子の固定量はスラリー処理の熱処理温度の増加に伴い増加した。また、固定された粒子は熱処理温度 950℃以下では HAp であり、1100℃では TCP と CaO の複合物であった。HBSS 浸漬によるアパタイト沈着性能は、熱処理温度の増加に伴い向上し、950℃で最も高かったが、1100℃では減衰した。これは、熱処理温度 1100℃では HAp の熱分解反応により生成された TCP および CaO が HBSS 浸漬中での溶解に伴いアパタイト沈着の起点が失われ、結果として減衰に至ったと推察される。故に、本研究では YSZ 表面の骨形成能の向上が最も見込まれる熱処理温度として 950℃が有効であると示唆された。

骨芽細胞様細胞である Saos-II細胞を未処理およびスラリー処理した YSZ 表面で培養すると、各試料間で細胞接着数および増殖数に統計的有意差は確認されなかった。一方で、細胞による石灰化物形成は未処理表面と比較してスラリー処理した YSZ 表面上で促進された。以上の研究結果から、スラリー処理により YSZ の骨形成能が向上することが明らかとなり、本処理はセラミック材料である YSZ にも応用可能であると結論づける。

5 章 アルゴン/酸素混合ガスプラズマ親水化処理した Ti 表面の親水性保持方法の検討

5-1 緒言

チタン（Ti）基材料は機械的強度および耐食性が高く、また細胞毒性が低いことから、人工股関節や人工歯根などの埋込型医療機器に応用されている[5,7]。しかし、Ti 基材料は人体に埋入した後、早期にオステオインテグレーションが進行しないため、治療の長期化や失敗に繋がることが懸念される。

前章で述べた HAp 被覆技術を始め、オステオインテグレーションを促進させる表面改質法が研究開発されているが、近年では材料表面の親水性を向上させる改質法も注目されている[40, 41, 43]。親水性表面はフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質の吸着を促進するため、その後の細胞接着、増殖、分化が増進し、最終的にオステオインテグレーションを早期に達成されることが示唆されている。

親水化処理法としては、プラズマ親水化処理が挙げられる。この処理法は、産業的に応用されている酸エッチングと比較して有害な化学薬品を使用しないため環境負荷がなく、人体に対して安全な処理である[42]。 Ar、O_2 またそれらの混合ガスで発生させたプラズマに材料表面が曝されると、その表面に吸着した汚染炭化水素の除去や水酸基（OH^-）の付加に伴い、親水性が向上する。しかし、プラズマ親水化処理に得られた親水性は、大気中で保存すると炭化水素が材料表面に再吸着するため、時間経過に伴い急速に失われる[101-103]。このため、人工股関節など埋入型医療機器の表面改質法として適用するには、”親水性の持続性”が求められている。

ここで、プラズマ親水化処理において、放電形式やガス組成がプラズマの特性に影響を及ぼすことが知られている。たとえば、直流（DC）放電プラズマと比較して、高周波（RF）放電プラズマではイオン密度および電子密度が高くなる。さらに、プラズマ中の Ar および

O_2 ガス組成は材料表面で反応するプラズマ活性種に関係する。これら放電形式およびガス組成比は、プラズマ親水化処理による材料表面への水酸基（OH^-）の付加に影響することが報告されている[104, 105]。これに伴い表面電荷が変化するため、炭化水素の再吸着挙動にも影響することが示唆される[106, 107)]。故に、プラズマ親水化処理により得られた親水性の持続性に関与することが考えられるが、これまでに体系的な研究結果の報告はされていない。

したがって、本研究では、プラズマ親水化処理条件において放電形式とガス組成が Ti 表面における親水性の持続性に及ぼす影響を調査した。さらに、親水性の持続可能な保存方法の検討も行った。

5-2 試料作製及び実験方法

5-2-1 試料作製

5-2-1-1 基板準備

本研究では、基板として 1 mm×10 mm×10 mm に切断した工業用純 Ti (純度：99.5%)を使用した。プラズマ親水化処理を行う前に、Ti 表面をエメリー紙#240, 600, 1200, コロイダルシリカの順で研磨することで鏡面仕上げし、エタノール中で 10 分間超音波洗浄を行った。

5-2-1-2 プラズマ親水化処理

本研究では、研究室で作製された平行平板型プラズマ発生装置を用いて実施した。図 5-1 に装置の概略図を示す。陰極には Ti 板材、陽極には Cu 板材を用い、各電極は平行に設置されている。また、陰極と陽極間の距離は 20 mm で固定した。真空チャンバーにはロータリーポンプが取り付けられており、プラズマ発生装置内の真空度を 10^{-1} Pa レンジまで下げることができる。

陰極の中心部に Ti 鋼基板を設置し、チャンバー内が 6.0×10^{-1} Pa に到達するまで真空引きを行った。その後、Ar、O_2、またはそれらの混合ガスを 300 Pa まで封入し、定電力 50 W を印加させることで DC および RF プラズマを発生させ、基板表面を 10 分間処理した。ここで、放電形式および導入したガス組成の組み合わせに基づいて試料名を決定した（表 5-1）。プラズマ親水化処理後、チャンバーから基板を回収し、10 分以内に表面分析を行った。

5-2-1-3 プラズマ親水化処理した試料の保存方法

プラズマ親水化処理後、Ti 基板を大気雰囲気での静置、蒸留水またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に浸漬と 3 種類の方法で保存した。なお、PBS は予め個別包装された粉末（富士フィルム和光純薬株式会社）を蒸留水 1000 ml に溶解し、調製した。蒸留水および PBS 中保存した Ti 基板に関しては、各保存液から取り出してから蒸留水で洗浄を行い、60°C で 30 分間乾燥させた後、10 分以内に表面分析を行った。

印加電力	50 W
電極間距離	20 mm
ガス圧	100 Pa
処理時間	10 min

印加電力	50 W
周波数	13.56 MHz
電極間距離	20 mm
ガス圧	100 Pa
処理時間	10 min

図 5-1 プラズマ発生装置の概略図および処理条件

表 5-1 プラズマ発生条件およびサンプル名

放電形式	Ar流量 (%)	O_2流量 (%)	サンプル名
DC	100	0	DC100:0
	97	3	DC97:3
	70	30	DC70:30
	0	100	DC0:100
RF	100	0	RF100:0
	97	3	RF97:3
	70	30	RF70:30
	0	100	RF0:100

5-2-2 特性評価

5-2-2-1 表面特性の評価

材料表面の特性評価では、第 2 章に記述した装置を用いて行った。プラズマ親水化処理した Ti 表面の親水性は接触角計にて測定した。また、プラズマ親水化処理において放電形式およびガス組成が表面化学状態および表面粗さに及ぼす影響を調査するために、それぞれ XPS および SPM を用いて分析した。

5-3 実験結果と考察

5-3-1 放電形式およびガス組成が表面特性に及ぼす影響

（1）XPS による表面化学状態分析

図 5-2 に XPS Ti 2p および O 1s ナロースペクトルを示す。ここで、XPS スペクトルは最も高い強度を 1 として、規格化した。未処理表面の Ti $2p_{3/2}$ スペクトルでは、458.8 eV および 453.7 eV にピークが確認され、それぞれ TiO_2 および金属 Ti に帰属された [109, 110]。一方で、DC97：3 および RF97：3 では金属 Ti は検出されなかったため、プラズマ親水化処理によって基板上に酸化物層が成長したことが示唆される。O 1s スペクトルでは、530.3 eV にメインピークが確認されたが、高エネルギー側において未処理表面ではスペクトルが盛り上がっており、また DC97：3 および RF97：3 では緩やかな裾引きが確認された。カーブフィッティング法にてピーク分離を行ったところ、O 1s スペクトルは O^{2-}（530.3 eV）、OH^-（531.9 eV）、および H_2O（533.3 eV）の化学状態に起因する 3 つのピークに帰属されることが分かった [37, 110]。故に、高エネルギー側で確認されたスペクトル形状の変化は、真空下でのプラズマ親水化処理により未処理表面に吸着した H_2O が蒸発したためだと考えられる。また、DC97：3 および RF97：3 に注目すると、OH^-に帰属されるピーク強度は DC97：3 の方が高いことが分かった。（図 5-2 (b)；矢印部分）。なお、他のガス組成で処理した表面において、OH^-のピーク強度を放電形式間で比較したところ、いずれも DC 放電を使用した場合の方が高かった。以上の結果から、プラズマ親水化処理において放電形式およびガス組成は、処理表面における OH^-の比率に影響することが示唆される。

図 5-2　未処理、DC97:3、RF97:3 表面の（a）Ti 2p、および（b）O 1s XPS ナロースペクトル

（2）SPM による表面形態および表面粗さ測定

図 5-3 に未処理、DC97 : 3、RF97 : 3 の SPM 像を示す。プラズマ親水化処理により、DC97 : 3、RF97 : 3 表面には微小な凹凸が形成されたが、放電形式による明確な差異は観察されなかった。また、SPM 像から未処理、DC97 : 3、RF97 : 3 の平均粗さ（Ra 値）を算出すると、それぞれ 2.0、3.2、および 3.3 nm であり、プラズマ親水化処理により表面粗さの顕著な増加は確認されなかった。さらに、ガス組成の変化は表面形態および表面粗さに影響を及ぼさなかった。以上の結果から、プラズマ親水化処理による表面形態および表面粗さの変化は放電形式およびガス組成には依存せず、それらの変化は僅かであるため親水性向上および持続性には影響しないことが示唆される。

図 5-3　（a）未処理、（b）DC97:3、（c）RF97:3 表面の SPM 像

（3）プラズマ親水化処理表面の親水性およびその持続性

プラズマ親水化処理直後、および大気雰囲気下で 24 時間静置後に計測した基板表面の接触角を図 5-4 に示す。ここで、図内の点線は未処理表面の接触角であり、83.5°であった。プラズマ親水化処理表面の接触角は、放電形式およびガス組成に関係なく約 5°まで低下し、親水性を示した。しかし、大気雰囲気に 24 時間静置した後では、全ての表面の接触角は約 50°まで増加しており、親水性が失われたことが分かった。

XPS 分析から、放電形式およびガス組成比は表面における OH^-の比率が変化することが明らかとなったが、大気雰囲気下での保存においては親水性の持続性に対して影響を及ぼさないことが示唆される。

図 5-4　プラズマ親水化処理直後および大気雰囲気下で 24 時間静置後の Ti 表面の接触角

5-3-2 保存方法が親水性の持続性に及ぼす影響

（1）各保存方法で保存後におけるプラズマ親水化処理表面の親水性

大気雰囲気下における保存では親水性を持続できなかったため、プラズマ親水化処理した Ti 基板の保存方法を検討した。

図 5-5 はプラズマ親水化処理後に大気雰囲気下、蒸留水、PBS 中で保存した Ti 表面の接触角の経時変化を示す。ここで、プラズマ親水化処理した試料として DC97 : 3 および RF97 : 3 を選択した。大気雰囲気下で保存すると、処理直後に 5℃以下を示した接触角は 3 時間後には約 35°まで急激に増加し、その後は時間経過に伴い緩やかに増加し続けた。また、蒸留水中に保存した場合でも時間経過に伴い接触角は増加したが、その増加幅は大気雰囲気下と比較すると小さかった。さらに、プラズマ親水化処理した試料間で比較すると、DC97 : 3 にて接触角の増加は抑制された。一方で、PBS 中で保存した場合では、24 時間保存した後でも接触角の顕著な増加は確認されず、10°以下であった。以上の結果から、プラズマ親水化処理により得られた親水性を持続させるには、PBS 中での保存が有効であることが分かった。なお、蒸留水中で保存した DC97 : 3 は RF97:3 と比較して親水性の劣化を抑制されたため、放電形式が親水性の持続性に影響することが示唆されるが、保存方法の違いによる影響と比較すると僅かである。

図 5-5　各保存方法での 24 時間保存に伴う C97:3 および RF97:3 の接触角変化

（2）保存後のプラズマ親水化処理表面の化学組成

PBS 中保存による親水性の持続性要因を明らかにするために、各保存方法で 24 時間保存したプラズマ親水化処理表面の XPS 測定を行った。なお、前節と同様にプラズマ親水化処理した試料として DC97：3 および RF97：3 を用いた。

図 5-6 に 24 時間保存した DC97：3 および RF97：3 の表面組成を示す。DC97：3 では、保存方法に関わらず C の原子濃度は処理直後と比較して顕著な増加は確認されなかった。一方で、RF97 : 3 の C の原子濃度は、特に蒸留水および PBS 中で保存した場合に増加した。この結果から、DC97:3 では炭化水素の再吸着が抑制されたことが示唆される。

図 5-6　各保存方法で 24 時間保存した後の DC97:3 および RF97:3 の表面組成

また、PBS 中で保存した試料表面のみから Na および Cl が検出されている。Na 1s および Cl $2p_{3/2}$ ナロースペクトルから、それぞれの結合エネルギーは 1071.9eV および 198.5 eV であったため、検出された Na および Cl の化学状態は Na^+および Cl^-に帰属された（図 5-7 (a), (b)）[111, 112]。PBS の主成分は塩化ナトリウム（NaCl）であり、主に Na^+と Cl^-が含まれているため、PBS 中での保存を通してプラズマ親水化処理表面に Na^+および Cl^-が吸着したことが示唆される。

図 5-7　各保存方法で 24 時間保存した後の DC97:3 および RF97:3 の（a）Na 1s および（b）Cl 2p XPS ナロースペクトル

（3）PBS 中での保存による親水性の持続要因

前節にて、放電形式に DC 放電を用いることでプラズマ親水化処理表面の OH^-の比率が RF 放電より増加することを明らかにした。故に、DC97:3 における C の原子濃度増加の抑制は、OH^-の存在が要因であることが示唆される。

しかし、RF97：3 において PBS 保存後に C の原子濃度が増加したにも関わらず、親水性は持続された。この結果から、PSB 中保存における親水性の持続性は、炭化水素の再吸着に起因しないことが考えられる。ここで、Hurwitz らは材料表面に吸着したカチオンおよびアニオンは、双極子である H_2O 分子の配向を促進し、それに伴い表面エントロピーを減少させることを報告している [113]。エントロピーの減少は表面自由エネルギーを増加させるため、材料表面の親水性が向上する [114]。故に、PBS 中での保存を通して Na^+および Cl^-が表面に吸着することで、プラズマ親水化表面の表面自由エネルギーが増加し、親水性の持続に至ったと推察される。

5-4 結論

本研究では、プラズマ親水化処理における放電形式およびガス組成、および処理後の試料保存方法が親水性の持続性に及ぼす影響について調査を行った。処理により得られる親水性は、放電形式およびガス組成に関係なく、大気雰囲気下および蒸留水中で保存することで失われることが分かった。一方、PBS 中で保存することで、24 時間保存後でも処理直後と同等の親水性を示した。この要因として、保存中での Na^+および Cl^-の吸着に伴い、Ti 表面の表面自由エネルギーが増加したためだと考えられる。以上の結果から、プラズマ親水化処理により向上した親水性を持続させるためには、プラズマ発生条件である放電形式およびガス組成ではなく、保存方法を最適化することが重要であると結論づける。

6 章 アルゴンプラズマエッチングによる
ステンレス鋼表面への抗菌ナノピラーの創製

6-1 緒言

SUS 鋼は Ti 材料と比較して耐食性は劣る一方、機械的強度が高いためメスや鉗子を始めとした手術用鋼製小物として応用されている [3,5]。しかし、SUS 鋼には抗菌活性が備わっていないため、その表面での細菌接着や増殖を抑制することができない。故に、細菌が接着した手術器具を介して生体内に混入し、結果として術後感染症の発症リスク増加、さらには治療失敗に繋がる。

この様な課題を解決する方法として、表面改質法を用いて銀、銅、抗生物質などの抗菌物質を含む皮膜を SUS 鋼表面に形成することが研究されてきた [30-33]。これらは皮膜から溶出する抗菌物質が細菌に取り込まれ、代謝に関わる酵素などと化学的に結合することで不活性化し、抗菌活性が発揮される。

一方で、直近 10 年間で材料表面にナノレベルの凹凸表面を形成することで抗菌活性を向上できることが発見され、盛んに研究されるようになってきた。この様な研究は、セミやトンボなどの昆虫の翅が有する表面構造から着想を得ている。翅表面はナノメータースケールの柱状物(以下、ナノピラー)で均一に覆われており、その表面に付着した細菌は物理的に貫かれることで死滅するため、抗菌活性を示す [44, 45]。翅表面で発現される抗菌活性は従来のメカニズムとは異なることから「物理的抗菌活性」として定義され、抗菌物質に起因する「化学的抗菌活性」と大別される。

これまでに、ナノピラーを材料表面に模倣する表面改質法として六フッ化硫黄（SF_6）や四フッ化メタン（CF_4）などのフッ化物ガスプラズマを使用した”反応性イオンエッチング（RIE）が報告されており、シリコン（Si）基板表面にナノピラーを高密度かつ最短 5 分間で形成することができる [47-50]。しかし、プラズマ中のフッ素原子は金属表面の腐食を誘発

するため、RIE を SUS 鋼に応用してもナノピラーの形成には至らない[115, 116]。

SUS 鋼上にナノピラーを形成する表面改質法としては“アルゴン（Ar）プラズマエッチング”が挙げられる[118, 119]。先行研究として、高周波（RF）放電によって発生した Ar プラズマで SUS 鋼表面をエッチングすると、ナノピラーが形成されることが報告されている。一方で、表面全体に高密度でナノピラーを形成するためには 360 分間と長時間のエッチング時間が必要となる[119]。さらに、SUS 鋼表面に形成されたナノピラーの抗菌活性はこれまでに調査されていない。

抗菌活性を有するナノピラーの形成を目的に、Ar プラズマエッチングを産業的に応用するには、処理時間の短縮化とナノピラー形状の最適化という 2 つの課題を克服する必要がある。これらを同時に解決するために、Ar プラズマの発生方法として直流（DC）放電に注目した。DC プラズマのバイアス電圧は一般的に RF プラズマと比較して約 2 倍であるため、Ar^+の運動エネルギーが増強される[120]。このため、DC プラズマではエッチングが促進されるため、処理時間の短縮化が見込まれる。さらに、プラズマ発生時の印加電流を変更することでエッチングの進行を制御できるため、様々な形状を有するナノピラーの形成が可能であると考えた。

そこで、本研究では DC 放電を用いた Ar プラズマエッチングにより、SUS 鋼表面にナノピラーを高密度かつ短時間で形成することを試みた。次に、エッチング条件が形成されるナノピラーの形状に及ぼす影響について調査した。さらに、種々のナノピラー表面の抗菌活性をグラム陽性菌株およびグラム陰性菌株で評価し、ナノピラーの形状が抗菌活性に与える影響について検討した。

6-2 試料作製及び実験方法

6-2-1 試料作製

6-2-1-1 基板準備

本研究では、SUS 基板として AISI 316 Stainless steel (以下、316SS)を使用した。基板の寸法は 1 mm×10 mm×10 mm、および 1 mm×20 mm×20 mm であり、それぞれ表面分析用、抗菌活性評価用として準備した。Ar プラズマエッチングを行う前に、ステンレス鋼表面をエメリー紙#240, 600, 1200, コロイダルシリカの順で研磨することで鏡面仕上げし、エタノール中で 10 分間超音波洗浄を行った。

6-2-1-2 Ar プラズマエッチング

本研究では、Ar プラズマエッチングは第 5 章の研究でも用いた平行平板型プラズマ発生装置を改良して実施した。陰極には SUS304 板材、陽極には Cu 板材を用い、高真空下で処理が行えるようにターボ分子ポンプを取り付けた（図 6-1)。この改良により、プラズマ発生装置内の真空度は 10^{-4} Pa レンジに到達した。

陰極の中心部に 316SS 基板を設置し、チャンバー内が 4.0×10^{-4} Pa 以下に到達するまで真空引きを行った。その後、Ar ガス(純度 99.9995%)を 300 Pa まで封入し、表 6-1 に示したプラズマ発生条件にて DC プラズマを発生させ、基板表面を処理した。なお、本研究では処理時間と印加電流について検討を行っている。プラズマ発生中の印加電圧は 450～850 V であり、陰極温度は最大で約 350℃まで上昇した。プラズマ処理後、大気酸化を防止するために試料を真空化で静置し、陰極温度が約 40℃になるまで冷却してから試料を取り出した。

図 6-1 プラズマ発生装置の概略図

表 6-1 プラズマエッチング条件

ガス種	Arガス (純度：99.9995%)
ガス圧	300 Pa
処理時間	**10～60 分**
電流	**0.05～0.20 A**
電極間距離	20 mm

6-2-2 特性評価

6-2-2-1 表面特性の評価

材料表面の特性評価では、第2章に記述した装置を用いた。プラズマエッチングした316SSの表面形態および形成されたナノピラーの形状は、FE-SEM で観察を行った。なお、観察は試料を 20°傾けて行った。また、観察されたナノピラーの寸法、および密度は画像解析ソフト ImageJ(米国国立衛生研究所)を用いて測定した。ここで、ナノピラーの寸法は、先端直径、底部直径、および高さの 3 項目として定義する（図 6-2）。各 SEM 像から総数 250 本を測長し、その平均値を算出した。なお、高さは SEM 像上から得られた高さを sin20°を除することで求めた。密度は SEM 像上で 4 × 4 μm 四方内に存在するピラーの総数を計測し、計 16 カ所の平均を算出することで 1 μm^2 当たりの本数として求めた。さらに、XPS により表面化学状態を分析し、Ar プラズマエッチングが化学状態に及ぼす影響をも調査した。

図 6-2 ナノピラーの寸法を定義した概略図

6-2-2-2 抗菌活性および細菌形態の評価

抗菌活性評価は第 2 章に記述した”JIS Z 2801:抗菌加工製品−抗菌性試験方法・抗菌効果”で規格されたフィルム密着法に基づき、グラム陰性菌である大腸菌(ATCC 25922)、およびグラム陽性菌である表皮ブドウ球菌(ATCC 14990)の 2 種に対して行った。また、抗菌カニズムを考察するために、Ar プラズマエッチング表面に接着した細菌の形態観察も行った。

6-3 実験結果および考察

6-3-1 Ar プラズマエッチングによるナノピラーの形成

（1）試料の外観写真、および表面形態

印加電流 0.10 A でプラズマを発生させ、10, 30, 60 分間エッチングした 316SS 基板の外観写真を図 6-3 に示す。10 分間エッチングした基板は全面が金色であったが、時間経過に伴い黒色部分が増加し、60 分後には全面が黒色となった。

図 6-3 Ar プラズマエッチングの処理時間経過に伴う試料外観の変化

Ar プラズマエッチングの時間経過に伴う表面形態の変化を調査するために、FE-SEM にて観察を行った（図 6-4）。10 分間エッチングした表面では、直径約 100 から 200nm の球状突起物が形成された（図 6-4 (a), (b)）。エッチング 30 分後では、突起物は円錐状に変化し、その周囲に小さな突起物が形成された（図 6-4 (c), (d)）。さらにエッチングが進行すると、最終的に 60 分後では突起物は高さ約 600 nm の柱状となった（図 6-4 (e), (f)）。以上の SEM 観察から、エッチング 10 分時に形成された突起物の高さおよび直径はエッチング時間の増加に伴い増加したが、高さの増加が優先的に進行することでナノピラーの形成に至ることが分かった。同様にナノピラーの数もエッチング時間の経過に伴い増加し、エッチング 60 分後では表面全体を覆うに至った。また、ナノピラーの形成により基板表面に入射した光は散乱されるため、エッチング 60 分間後の試料外観は黒色に変化したと考えられる。

図 6-4 （a,b）10 分、（c,d）30 分、（e,f）60 分間 Ar プラズマエッチングした SUS316 表面の FE-SEM 像

（2）XPS による表面化学状態分析

図 6-5 に Fe2p、Cr 2p、O 1s XPS ナロースペクトルを示す。カーブフィッティング法によりピーク分離を行った結果、Fe $2p_{3/2}$ スペクトルは金属 Fe（706.9 eV）、酸化鉄（Fe_2O_3, 710.4 eV）、およびオキシ水酸化鉄（FeOOH, 711.9 eV）の 3 つに帰属された [121-123]。金属 Fe 由来のピーク強度は、未処理表面と比較してエッチング表面で減少した。また、Fe_2O_3 と FeOOH のピーク面積比を算出すると、未処理表面と比較してエッチング表面では約 2 倍に増加した。未処理表面の Cr $2p_{3/2}$ スペクトルは金属 Cr（574.1 eV）、Cr_2O_3（576.3 eV）、および $Cr(OH)_3$（577.6 eV）の 3 つのピークに帰属されたが、プラズマエッチングされた表面では金属 Cr に起因するピークは確認されなかった [121,123]。O 1s スペクトルは、O^{2-}（530.2 eV）、OH^-（531.6 eV）、および H_2O（533.2 eV）は 3 つのピークで構成されており、OH^-および H_2O のピーク強度はエッチング表面で減少した [110, 124]。

以上の XPS 分析の結果から、プラズマエッチングは 316SS 表面の酸化が僅かに進行したのみで、表面化学状態の顕著な変化は確認されなかったことを示す。表面酸化の原因は Ar ガス中に不純物として微量に含まれる O_2 ガスであることが考えられる。また、形成されたナノピラーは主に金属 Fe および Cr で構成され、極薄い酸化皮膜で覆われていることが示唆された。

図 6-5　未処理および Ar プラズマエッチングした 316SS 表面の（a）Fe 2p、（b）Cr 2p、（c）O 1s XPS ナロースペクトル

(3) ナノピラーの形成メカニズム

FE-SEM および XPS の分析結果から、DC 放電を用いた Ar プラズマエッチングによる 316SS 表面でのナノピラーは、先行研究で報告された RF 放電によるプラズマエッチングと同様のメカニズムで形成されたと考えられる [125-127]。図 6-6 にナノピラーの形成メカニズムの模式図を示す。この図はプラズマエッチング開始直後からナノピラーの形成に至るまでを 5 段階で示したものである。

プラズマエッチング開始直後では、Ar^+の衝突により 316 基板表面の温度が上昇し、これに伴い基板に固溶した C が主に粒界に熱拡散する（図 6-6 (a)）。拡散した C は Cr と結合することで球状の炭化クロムを析出する(図 6-6 (b))。この現象は SUS 鋼を熱処理した際に生じる“鋭敏化”として知られている。エッチングが進行すると、炭化クロムが表面に現れる（図 6-6 (c)）。一般的に炭化物のエッチングレートは単体金属と比較して低い。このため、炭化物が“エッチングマスク”の役割を果たし、素地部分のエッチングが優先的に進行することで、円錐状の突起物に変化する（図 6-6 (d)）。さらにエッチングが進行すると突起物の先端上に存在する炭化物は除去されるが、柱状物は残るため結果としてナノピラーの形成に至ったと考えられる（図 6-6 (e)）。

また、RF 放電によるエッチングにてナノピラーを形成さるには最短でも 120 分間必要であったが、本研究では DC 放電を用いることで 60 分に短縮することができた [119, 128]。これは、DC プラズマのバイアス電圧が RF プラズマの約 2 倍であるため、前述のナノピラーの形成過程が促進されたことが示唆される [120]。

図 6-6 Ar プラズマエッチングによる 316SS 表面でのナノピラー形成メカニズム

6-3-2 プラズマ発生時の印加電流がナノピラーの寸法に及ぼす影響

（1）表面形態およびナノピラー形状

エッチングの進行を制御するパラメーターとしてプラズマ発生時の印加電流が挙げられる。そこで、種々の印加電流で発生させた Ar プラズマで 316SS 表面をエッチングし、表面形態およびナノピラーの形状に及ぼす影響を調査した。なお、本検討ではエッチング時間は 60 分間に固定した。

印加電流 0.05 から 0.20 A でプラズマを発生させ、60 分間エッチングした 316SS 基板表面の FE-SEM 像を図 6-7 に示す。印加電流の大小に関わらず、ナノピラーは表面全体に形成された（図 6-7 (a), (c), (e), (f)）。印加電流 0.05A では、形成されたナノピラーの高さは比較的短く、不均一であった（図 6-7 (b)）。0.10、0.15 A と印加電流の増加に伴いナノピラーの成長が促進され、ピラーの高さ、底部および先端直径が増加した（図 6-7 (d), (f)）。印加電流を 0.20 A まで増加させるとナノピラーの寸法は最大となったが、一方でピラーが形成されていない平坦な部分も観察された（図 6-7 (h)）。

図 6-7 （a,b）0.05、（c,d）0.10、（e,f）0.15 A、（g,h）0.20 A で Ar プラズマエッチングした 316SS 表面の FE-SEM 像

各表面に形成されたナノピラーの寸法および密度を数値化するために、画像解析ソフトImageJ を用いて FE-SEM 像上のナノピラーを測長した。図 6-8 (a)にナノピラーの高さ、底部および先端直径、(b)に密度を示す。0.05 A でエッチングした表面上に形成されたナノピラーの高さ、底部および先端直径はそれぞれ 251.0、81.9、および 44.7 nm であり、セミやトンボなどの昆虫の翅表面に形成されたナノピラーと類似していた [44, 45]。印加電流の増加に伴いナノピラーの高さは増加し、0.20A では 2014.0nm に達した。同様の傾向で端部直径も変化し、最大で 600.8nm まで増加した。先端直径も 81.9 から 167.9nm へ増加したが、高さおよび底部直径と比較すると増加幅は僅かであった。対照的に、ナノピラーの密度は印加電流の増加に伴い減少し、0.15A におけるナノピラーの密度は 0.05A の表面の約 10 分の 1 であった。

図 6-8 Ar プラズマエッチングした 316SS 表面に形成されたナノピラーの（a）高さ、底部および端部直径、(b）密度の変化

（2）ナノピラーの寸法変化における主要因

ナノピラーの寸法、特に高さと底部直径はプラズマ発生時の印加電流を調整することで制御することができたが、同時にその密度も低下した。これらは印加電流の増加に伴い変化する印加電圧および陰極温度が関係したことが考えられる。

種々の印加電流を用いて形成されたナノピラーの平均高さをエッチング開始 60 分後に計測した印加電圧に対してプロットすると正の相関関係が得られた（図 6-9 (a)）。電極間に印加される電圧は荷電粒子を加速させるため、印加電圧が増加に伴いプラズマ中の Ar^+の運動エネルギーが増加する。故に、エッチングの促進されたため、ナノピラーの高さが増加したと考えられる [120]。

また、平均底部直径をエッチング開始 10 分後に計測した陰極温度に対してプロットすると、同様に正の相関関係が得られた（図 6-9 (b)）。基板に固溶した C と Cr の拡散速度は温度上昇に伴い増加するため、炭化クロムの成長が促進される [129, 130]。また、前節で述べたように炭化物は“エッチングマスク”として機能するため、析出した炭化物の大きさはナノピラーの底部直径に関与する可能性が示唆される。一方で、炭化物の成長は析出物の凝集により生じるため、表面上に存在する炭化物の総数は減少し、ナノピラーの密度低下に至ったと考えられる。

図 6-9（a）ナノピラーの高さと印加電圧、および（b）底部直径と陰極温度の相関関係

6-3-3 Ar プラズマエッチングに形成されたナノピラーの抗菌活性

（1）ナノピラー表面における細菌生存率

Ar プラズマエッチングされた 316SS 表面の大腸菌および表皮ブドウ球菌に対する抗菌活性を評価した。本評価では、印加電流 0.05 から 0.15 A で発生させてプラズマで 60 分間エッチングした基板を用い、ナノピラーの寸法が抗菌活性に及ぼす影響についても検討した。なお、0.20 A でエッチングした表面ではナノピラーの密度が最も低く、抗菌活性の発揮に不利であると考えられたので評価から除外した。

図 6-10 にエッチングおよび未処理 316SS 表面上で 4 時間培養後の細菌生存率を示す。大腸菌生存率は未処理表面において 140%であったが、全てのエッチング表面では 10%未満であった。さらに、ANOVA により統計分析を行ったところ、未処理表面との間に統計的有意差が確認された。一方で、エッチング表面間では大腸菌生存率に統計的有意差は確認されなかった。以上の結果から、Ar プラズマエッチングにより 316SS 表面に形成されたナノピラーは大腸菌に対して高い抗菌活性は示すことが明らかとなり、さらにその活性はナノピラーの寸法に依存しないことが分かった。

表皮ブドウ球菌生存率は 0.05 A 表面においては約 100%であり、未処理表面と同等であった。印加電流の増加に伴い表皮ブドウ球菌生存率は低下し、0.15 A 表面では約 45%まで減少した。故に、表皮ブドウ球菌に対する抗菌活性は印加電流の増加、即ちナノピラーの寸法が大きくなるに伴い増強された。しかし、表皮ブドウ球菌生存率が大腸菌生存率より高かったことから、ナノピラーの抗菌活性は表皮ブドウ球菌に対しては減衰することが示唆された。

図 6-10 4 時間培養後の未処理および Ar プラズマエッチングした 316SS の細菌生存率

（2）ナノピラー表面に接着した細菌の形態観察

Ar プラズマエッチングした表面に接着した細菌の形態を FE-SEM にて観察した（図 6-11）。未処理表面に接着した大腸菌は棒状の形態であることが確認された（図 6-11 (a)）。一方で、0.05 A でエッチングした表面では大腸菌はナノピラーにより引き延ばされていた（図 6-11 (b)）。0.10 A 表面では、大腸菌はより顕著に引き延ばされており、0.15 A 表面ではナノピラーにより貫かれていた（図 6-11 (c), (d)）。

表皮ブドウ球菌に関しては、未処理およびエッチング表面にて球状であることが確認された。大腸菌の場合とは異なり、表皮ブドウ球菌はエッチング表面にて顕著な形態変化は観察されなかった。

図 6-11　(a,b) 未処理、(c,d) 0.05、(e,f) 0.10 A、(g,h) 0.15 A で Ar プラズマエッチングした 316SS 表面に接着した大腸菌 (a,c,e,g) および表皮ブドウ球菌 (b,d,f,h) の形態

(3) ナノピラー表面の抗菌メカニズム

抗菌活性評価および細菌形態の観察から、ナノピラー形成に伴う 316SS の抗菌活性の向上は、ピラーにより細菌に対して物理的応力が負荷されたことが要因であると考えられる。

細菌がナノピラー表面に接着すると、ナノピラーにより細胞膜は物理的に引き延ばされる。細菌の自重により、ナノピラーは細胞膜により深く差し込まれ、細胞膜の引張が進行する。弾性限界に達すると細胞膜の損傷が生じ、結果的にナノピラーが細胞膜を貫通する。この現象に伴い、細胞膜内の内容物が流出し、細菌が死滅する [44, 50]。

上記の抗菌メカニズムおよび FE-SEM 観察の結果に基づくと、ナノピラー表面の大腸菌に対する抗菌活性は、ナノピラーによる細胞膜の物理的な引張または貫通により発現したと考えられる。対照的に、表皮ブドウ球菌ではナノピラーにより細菌形態の変化が生じなかったため、大腸菌と比較して抗菌活性が減衰した。その原因として、細胞膜を構成するペプチドグリカン層の厚さが挙げられる。グラム陽性菌の細胞膜はグラム陰性菌と比較して約 5 倍の厚さであり、弾性率も約 2 倍である [44, 131]。このため、グラム陽性菌である表皮ブドウ球菌では、ナノピラーによる細胞膜の変形が抑制されるため、抗菌活性が減衰したことが示唆される。

一方で、表皮ブドウ球菌に対する抗菌活性は、ナノピラーの寸法が増加するに伴い増強された。Michalska らは Si 基板表面に 400 から 6700 nm の高さを有するナノピラーを形成し、各表面でグラム陽性菌に対する抗菌活性を評価すると、高さが増加するに伴い活性も増強されることを報告している [48]。さらに、Li はナノピラーの高さと細胞膜に負荷される物理的応力との間に正の相関関係があることを報告している [132]。これらの先行研究に基づくと、ナノピラーの抗菌活性はピラーの高さに依存することが示唆されている。故に、ナノピラーの寸法、即ち高さの増加に伴い表皮ブドウ球菌に負荷される物理的応力が大きくなったため、本研究でも抗菌活性の増強に至ったと考えられる。

以上の結果から、Ar プラズマエッチングはナノピラーの形成に伴い、316SS 基板の抗菌活性を向上が可能な表面改質法であると結論づける。

6-4 結論

本研究では、DC 放電を用いた Ar プラズマエッチングにより、316SS 表面にナノピラーを比較的短い処理時間で高密度に形成することができ、それに伴い抗菌活性の付与に成功した。抗菌活性に影響を及ぼすナノピラーの高さは、プラズマ発生時の印加電流を変化させることで制御できた。また、形成されたナノピラーは大腸菌および表皮ブドウ球菌に対して抗菌活性を示したが、表皮ブドウ球菌ではその活性は減衰した。しかし、表皮ブドウ球菌に対する抗菌活性はナノピラーの高さを増加させることによって強化することができた。以上の結果から、DC 放電を用いた Ar プラズマエッチングは 316SS に抗菌活性を付与する表面改質法として有力ではあるが、グラム陽性菌に対する抗菌活性の改善が必須であると考えられる。

7 章 結言

医療機器を生体内に埋入することで人体機能を再建する外科治療では、治療の過程で生じる合併症の発症リスクが治療成功率向上の障壁となっている。そこで、本研究では、主な合併症である（1）埋入した医療機器のゆるみ、および（2）感染症の発生リスクを軽減し、治療の成功率向上を目的に、医療機器用金属材料およびセラミックス材料の骨形成能または抗菌活性を改善する新規表面改質法の研究を行った。

以下に本研究により得られた知見を改めてまとめ、各表面改質法の今後の展望について述べる。

第 3 章および第 4 章では、近年医療機器用材料として注目されている工業用純 Zr 材料および YSZ セラミックス材料の骨形成能向上を目的に、スラリー埋没加熱処理の適用に取り組んだ。本処理は、リン酸カルシウム粉末と蒸留水で調製したスラリー状処理剤に基板を埋め込み、そのまま熱処理を行う表面改質法である。各材料表面に HAp 粒子を固定化でき、また処理表面で動物細胞を培養すると、未処理材料と比較して骨の基となる石灰化物の形成が促進されることが示された。一方で、ZrO_2 表面への HAp 粒子固定化には Zr と比較して処理温度を約 500℃以上上昇させる必要があった。本処理では、スラリー状処理剤中の Ca や P が熱処理中に基板へ熱拡散が HAp 固定化において重要なファクターである。一般的にセラミックス材料中での元素の拡散係数は金属材料と比較して小さいため、ZrO_2 の場合ではより高い熱処理温度が必要であることが示唆された。

以上の研究成果から、スラリー埋没加熱処理は金属材料およびセラミックス材料の骨形成能を向上できる有効な表面改質法であるが、処理プロセス、特に熱処理温度は熱拡散の観点から材料によって取捨選択しなければならないことが示唆される。今後の展望としては、細胞培養試験にて骨形成能が向上することが明らかになったので、最終評価である動物試

験を行い、免疫系などが機能した生体環境下でも骨形成が促進されるかを評価する必要がある。

第 5 章では、プラズマ親水化処理で工業用純 Ti 材料を処理し、処理条件が得られた親水性の持続性に与える影響の調査、および親水性の持続可能な保存方法の検討を行った。Ar/O_2 混合ガスプラズマ処理を行うと、処理直後の Ti 表面は親水性を示したが、大気中また蒸留水中で保管すると時間経過に伴いその特性は減衰した。一方で、PBS 中で保存すると、保存後でも処理直後と同等の親水性が確認された。最表面の化学組成を分析すると PBS 中で保存した Ti 表面では、吸着した炭化水素量がプラズマ処理直後と差がない一方で、PBS 中に含まれる Na^+と Cl^-が検出された。故に、これらが親水性保持の要因であることが示唆された。

以上の結果から、プラズマ親水化処理で得られた親水性の持続性は、処理条件ではなく処理後の保存方法が重要であることが示唆された。今後の展望としては、PBS 中保存した親水化 Ti 表面が細胞応答に影響があるかを調査する必要がある。また。PBS は細胞培養試験では一般的な試薬ではあるが医療現場では用いられていないため、保存液の検討も引き続き必要である。

第 6 章では、Ar プラズマエッチングにより 316SS 鋼表面にナノピラーを形成し、それに伴い抗菌活性の向上を試みた。Ar プラズマにより 316SS 表面を処理することで、表面全体にナノピラーを形成でき、併せてプラズマ発生条件を変化させることでナノピラーの形状を制御できることを明らかにした。また、処理表面で細菌を培養すると、未処理材料と比較して細菌の生存率が減少した。さらに、処理表面に付着した細菌の形態観察を行ったところ、細菌はナノピラーによって貫かれていることが確認された。よって、処理表面での細菌生存率の減少は、プラズマエッチングにより形成されたナノピラーが細菌に対して物理的な損傷を与えたことが要因であると示唆された。

以上の結果から、Ar プラズマエッチングは 316SS 鋼の抗菌活性を向上させる有効な表面改質法である可能性を示唆したが、産業的に応用するには少なくとも 2 つの課題を克服することが必須である。

1 つ目は抗菌活性の更なる増強である。抗菌活性評価法を規格した JIS Z 2801 では、抗菌材料を「24 時間以内に生存率を 1%未満に低下させることができる材料」として定義している。プラズマエッチングにより形成されたナノピラー表面では、グラム陰性菌である大腸菌の生存率は 4 時間以内に 10%未満に低下したため、JIS 規格の基準を満たすことが予想される。しかし、グラム陽性菌である表皮ブドウ球菌の生存率は最低でも 40%を超えているため、現状では抗菌活性が不十分であると考えられる。本研究にて、グラム陽性菌に対する抗菌活性の増強には、ナノピラーの高さを増加させることが有効であることを見出した。しかし、ナノピラーの高さ増加に伴い、ピラー自体の機械的強度が低下することが懸念され、もう 1 つ目の課題となる。実際に、エッチング表面は触れるだけでナノピラーが倒壊することを確認している。

故に、ナノピラーの寸法の最適化とピラーの強度向上を同時に達成する必要がある。1 つの案としては、Ar/N_2 混合ガスプラズマによりエッチングによるナノピラー形成とピラーの窒化を同時に行う処理プロセスが有効であると考えられ、今後の研究開発が期待される。

参考文献

1. 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 医療機器審査管理室, 医療機器の薬事承認等について, (2014) https://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/02/dl/s0227-5h_0012.pdf

2. 塙隆夫, 米山隆之, 金属バイオマテリアル, コロナ社, (2007)

3. 角田方衛, 筏義人, 立石哲也, 金属系バイオマテリアルの基礎と応用, アイピーシー, (2000)

4. S. Bauer, P. Schmuki, K. von der Mark, J. Park, Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces, Prog. Mater. Sci., 58 (2013) 261-326

5. Q. Chen, G. A.Thouas, Metallic implant biomaterials, Mater. Sci. Eng. R Rep., 87 (2015) 1-57

6. P. I. Brånemark, B. O. Hansson, R. Adell, U. Breine, J. Lindström, O. Hallén, A. Ohman, Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period, Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 16 (1977) 1-132

7. T. Hanawa, Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment, Front. Bioeng. Biotechnol., 7 (2019) 170

8. Materials evolution of bone plates for internal fixation of bone fractures: A review, J. Mater. Sci. Technol., 36 (2020) 190-208

9. S. R. Paital, N. B. Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies, Mater. Sci. Eng. R Rep., 66 (2009) 1-70

10. L. Saldaña, A. Méndez-Vilas, L. Jiang, M. Multigner, J.L. González-Carrasco, M.T. Pérez-Prado, M.L. González-Martín, L. Munuera, N. Vilaboa, In vitro biocompatibility of an ultrafine grained zirconium, Biomaterials, 28 (2007) 4343-4354

11. R. Kondo, N. Nomura, Y. Tsutsumi Suyalatu, H. Doi, T. Hanawa, Microstructure and mechanical properties of as-cast Zr–Nb alloys, Acta Biomater., 7 (2011) 4278-4284

12. N. Suyalatu, R. Kondo, Y. Tsutsumi, H. Doi, N. Nomura, T. Hanawa, Effects of phase constitution on magnetic susceptibility and mechanical properties of Zr-rich Zr–Mo alloys ,Acta Biomater., 7 (2011) 4259-4266

13. B. Raphael, A. H. Haims, J. S. Wu, L. D. Katz, L. M. White, K. Lynch, MRI comparison of periprosthetic structures around zirconium knee prostheses and cobalt chrome prostheses, Am. J. Roentgenol., 186 (2006) 1771-1777

14. 岡崎正之, 山下仁大, 尾坂明義, 石川邦夫, 大槻主税, 井奥洪二, 中村美穂, 上高原理暢, セラミックバイオマテリアル, コロナ社, (2009)

15. S. V. Dorozhkin, Bioceramics of calcium orthophosphates, Biomaterials, 31 (2010) 1465-1485

16. G. Soon, B. Pingguan-Murphy, K. W. Lai, S. A. Akbar, Review of zirconia-based bioceramic: Surface modification and cellular response, Ceram. Int., 42 (2016) 12543-12555

17. C. Piconi, G. Maccauro, Zirconia as a ceramic biomaterial, Biomaterials, 20 (1991) 1-25

18. G. I. Benic, D. Scherrer, M. Sancho-Puchades, D. S. Thoma, C. H. F. Hämmerle, Spectrophotometric and visual evaluation of peri-implant soft tissue color, Clin. Implant Dent. Relat. Res., 28 (2017) 192-200

19. M. Kitagawa, S. Murakami, Y. Akashi, H. Oka, T. Shintani, I. Ogawa, T. Inoue, H. Kurihara, Current status of dental metal allergy in Japan, J. Prosthodont. Res., 63 (2019) 309-312

20. B. Gökçen-Röhlig, A. Saruhanoglu, E. D. Çifter, G. Evlioglu, Applicability of Zirconia Dental Prostheses for Metal Allergy Patients, Int. J. Prosthodont., 23 (2010) 562-656

21. J. Han, J. Zhao, Z. Shen, Zirconia ceramics in metal-free implant dentistry, Adv. Appl. Ceram., 116 (2017) 138-150

22. 日本人工関節学会 日本人工関節登録制度事務局, THA レジストリー統計, (2018), https://jsra.info/pdf/THA20180331.pdf

23. T. J. Matsumoto, S. H. An, T. Ishimoto, T, Nakano, T. Matsumoto, S. Imazato, Zirconia–hydroxyapatite composite material with micro porous structure, Dent. Mater., 27 (2011) 205-212

24. K. Castkova, H. Hadraba, A. Matousek, P. Roupcova, Z. Chlup, L. Novotna, J. Cihlar, Synthesis of Ca,Y-zirconia/hydroxyapatite nanoparticles and composites, J. Eur. Ceram. Soc., 36 (2016) 2903-2912

25. R. A. Surmenev, M. A. Surmeneva, A. A. Ivanova, Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review, Acta Biomater., 10 (2014), pp. 557-579

26. R. A. Surmenev, A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication, Surf. Coat. Technol., 206 (2012) 2035-2056

27. F. Velard, D. Laurent-Maquin, C. Guillaume, S. Bouthors, E. Jallot, J.-M. Nedelec, A. Belaaouaj, P. Laquerriere, Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction, Acta Biomater., 5 (2009) 1708-1715

28. F. Velard, J. Braux, J. Amedee, P. Laquerriere, Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: An overview, Acta Biomater., 9 (2013) 4956-4963

29. R. B. Heimann, Plasma-Sprayed Hydroxylapatite-Based Coatings: Chemical, Mechanical, Microstructural, and Biomedical Properties, J. Therm. Spray Technol., 25 (2016) 827-850

30. L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, Antibacterial coatings on titanium implants, J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater., 91 (2009) 470-480

31. D. Sun, M. B. Shahzad, M. Li, G. Wang, D. Xu, Antimicrobial materials with medical applications, Mater. Technol., 30 (2015) 90-95

32. Y. Dong, X. Li, R. Sammons, H. Dong, The generation of wear-resistant antimicrobial stainless steel surfaces by active screen plasma alloying with N and nanocrystalline Ag, J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater., 93 (2010) 185-193

33. K. M. Kruszewski, L. Nistico, M. J. Longwell, M. J. Hynesc, J. A. Maurer, L. Hall-Stoodley, E. S. Gawalt, Reducing Staphylococcus aureus biofilm formation on stainless steel 316L using functionalized self-assembled monolayers, Mater. Sci. Eng. C, 33 (2013) 2059-2069

34. J. A. Lyndon, B. J. Boyd, N. Birbilis, Metallic implant drug/device combinations for controlled

drug release in orthopaedic applications, J. Control. Release, 179 (2014) 63-75

35. I. Roca, M. Akova, F. Baquero, J. Carlet, M. Cavaleri, S. Coenen, J. Cohen, D. Findlay, I. Gyssens, O. E. Heure, G. Kahlmeter, H. Kruse, R. Laxminarayan, E. Liébana, L. López-Cerero, A. MacGowan, M. Martins, J. Rodríguez-Baño, J.-M. Rolain, C. Segovia, The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention, New Microbes New Infect., 6 (2015) 22-29

36, T. Ito, N. Ohtsu, M. Tomozawa, M. Hirano, H. Takita, T. Iizuka, A. Yokoyama, Promotion of bone regeneration on titanium implants through a chemical treatment process using calcium phosphate slurry: Microscopic analysis, cellular response, and animal experiment, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater., 106 (2018) 2716-2724

37. N. Ohtsu, Y. Nakamura, S. Semboshi, Thin hydroxyapatite coating on titanium fabricated by chemical coating process using calcium phosphate slurry, Surf. Coat. Technol., 206 (2012) 2616-2621

38, N. Ohtsu, T. Takahara, M. Hirano, H. Arai, Effect of treatment temperature on the biocompatibility and mechanical strength of hydroxyapatite coating formed on titanium using calcium phosphate slurry Surf. Coat. Technol., 239 (2014) 185-190

39. N. Ohtsu, M. Hirano, H. Arai, Response of osteoblast-like MC3T3-E1 cells on bioactive titanium fabricated by a chemical treatment process using a calcium-phosphate slurry, J. Biomed. Mater. Res. A, 102 (2014) 3838-3845

40. R. A. Gittens, L. Scheideler, F. Rupp, S. L. Hyzy, J. Geis-Gerstorfer, Z. Schwartz, B. D. Boyan, A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects, Acta Biomaterialia, Acta Biomater., 10 (2014) 2907-2918

41. H. Aita, N. Hori, M. Takeuchi, T. Suzuki, M. Yamada, M. Anpo, T. Ogawa, The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone, Biomaterials, 30 (2009) 1015-1025

42. A. Bogaerts, E. Neyts, R. Gijbels, J. Van Der Mullen, Gas discharge plasmas and their applications, Spectrochim. Acta. B Atom. Spectros., 57 (2002) 609-658

43. F. Rupp, L. Liang, J. Geis-Gerstorfer, L. Scheideler, F. Hüttig, Surface characteristics of dental

implants: A review, Dent. Mater., 34 (2018) 40-57

44. E. P. Ivanova, J. Hasan, H. K. Webb, V. K. Truong, G. S. Watson, J. A. Watson, V. A. Baulin, S. Pogodin, J. Y. Wang, M. J. Tobin, C. Löbbe, R. J. Crawford, Natural bactericidal surfaces: mechanical rupture of Pseudomonas aeruginosa cells by cicada wings, Small, 8 (2012) 2489-2494

45. K. Nowlin, A. Boseman, A. Covell, D. LaJeunesse, Adhesion-dependent rupturing of Saccharomyces cerevisiae on biological antimicrobial nanostructured surfaces, J. R. Soc. Interface, 12 (2014) 20140999

46. Y. Luan, S. Liu, M. Pihl, H. C. van der Mei, J. Liu F. Hizal, C. H. Choi, H. Chen, Y. Ren, H. J. Busscher, Bacterial interactions with nanostructured surfaces, Curr. Opin. Colloid. Interface Sci., 38 (2018) 170-189

47. G. Hazell, P. W. May, P. Taylor, A. H. Nobbs, C. C. Welch, B. Su, Studies of black silicon and black diamond as materials for antibacterial surfaces, Biomater. Sci., 6 (2018), pp. 1424-1432

48. M. Michalska, F. Gambacorta, R. Divan, I.S. Aranson, A. Sokolov, P. Noirot, P.D. Liable, Tuning antimicrobial properties of biomimetic nanopatterned surfaces, Nanoscale, 10 (2018), pp. 6639-6650

49. E. Vassallo, M. Pedroni, T. Silvetti, S. Morandi, S. Toffolatti, G. Angella, M. Brasca, Bactericidal performance of nanostructured surfaces by fluorocarbon plasma, Mater. Sci. Eng. C, 80 (2017) 117-121

50. E. P. Ivanova, J. Hasan, H. K. Webb, G. Gervinskas, S. Juodkazis, V. K. Truong, A. H. F. Wu, R. N. Lamb, V. A. Baulin, G. S. Watson, J. A. Watson, D. E. Mainwaring, R. J. Crawford, Bactericidal activity of black silicon, Nat. Commun., 4 (2013) 2838

51. H. Jansen, M. de Boer, R. Legtenberg, M. Elwenspoek, The black silicon method: a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control, J. Micromech. Microeng., 5 (1995) 115-120

52. 日本表面科学会, X 線光電子分光法, 丸善株式会社, (1998)

53. B. Gianangelo, H. BodilSurface, Science Techniques, Springer, (2013)

54. 中島憲一郎, 早川和一, 最新機器分析学, 南山堂, (2000)

55. G. Huebschen, I. Altpeter, R. Tschuncky, H. G. Herrmann, Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods, Woodhead Publishing, (2016)

56. M. Uo, T. Wada, T. Sugiyama, Applications of X-ray fluorescence analysis (XRF) to dental and medical specimens, Jpn. Dent. Sci. Rev., 51 (2015) 2-9

57. 日本顕微鏡学会関東支部, 新・走査電子顕微鏡, 共立出版, (2011)

58. 秦信宏, 走査型プローブ顕微鏡入門, オーム社, (2013)

59. A. Deshpande, B. J. LeRoy, Scanning probe microscopy of graphene, Physica. E. Low Dimens. Syst. Nanostruct., 44 (2012) 743-759

60. M. Edalatpour, L. Liu, A. M. Jacobi, K. F. Eid, A. D. Sommers, Managing water on heat transfer surfaces: A critical review of techniques to modify surface wettability for applications with condensation or evaporation, Appl. Energy, 222 (2018) 967-992

61. T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, Biomaterials, 27 (2006) 2907-2915

62. K. Satoh, M. Komata, M. Mizuhira, K. Wagatsuma, N. Ohtsu, Direct and Rapid Quantification of Calcium Phosphate Precipitate on Titanium by X-Ray Fluorescence Analysis Using Fundamental Parameter Method. Mater. Trans., 54 (2013) 817-824

63. I. Rocchietta, F. Fontana, A. Addis, P. Schupbach, M. Simion, Surface-modified zirconia implants: tissue response in rabbits, Clin. Oral Implants Res., 20 (2009) 844-850

64. L. Sennerby, A. Dasmah, B. Larsson, M. Iverhed, Bone Tissue Responses to Surface-Modified Zirconia Implants: A Histomorphometric and Removal Torque Study in the Rabbit, Clin. Implant Dent. Relat. Res., 7 (2005) 13-20

65. V. Chappuis, Y. Cavusoglu, R. Gruber, U. Kuchler, D. Buser, D. D. Bosshardt, Osseointegration of Zirconia in the Presence of Multinucleated Giant Cells, Clin. Implant Dent. Relat. Res., 18 (2016) 686-698

66. S. Tsunekawa, K. Asami, S. Ito, M. Yashima, T. Sugimoto, XPS study of the phase transition in pure zirconium oxide nanocrystallites, Appl. Surf. Sci., 252 (2005) 1651-1656

67. T. F. Stoica, C. Morosanu, A. Slav, T. Stoica, P. Osiceanu, C. Anastasescu, M. Gartner, M. Zaharescu, Hydroxyapatite films obtained by sol–gel and sputtering, Thin Solid Films, 516 (2008) 8112-8116

68. S. Kaciulis, G. Mattogno, L. Pandolfi, M. Cavalli, G. Gnappi, A. Montenero, XPS study of apatite-based coatings prepared by sol–gel technique, Appl. Surf. Sci., 151 (1999) 1-5

69. G.M. Hood, POINT DEFECT DIFFUSION IN α-Zr, J. Nucl. Mater., 159 (1988) 149-175

70. B. Demri, M. Hage-Ali, M. Moritz, J. L. Kahn, D. Muster, X-ray photoemission study of the calcium/titanium dioxide interface, Appl. Surf. Sci., 108 (1997) 245-249

71. M. Matsuda, J. Nowotny, Z. Zhang, C. C. Sorrell, Lattice and grain boundary diffusion of Ca in polycrystalline yttria-stabilized ZrO_2 determined by employing SIMS technique, Solid State Ion., 111 (1998) 301-306

72. M. Oishi, Y. Tsutsumi, P. Chen, M. Ashida, H. Doi, T. Hanawa, Surface changes of yttria-stabilized zirconia in water and Hanks solution characterized using XPS, Surf. Interface Anal., 50 (2018) 587-591

73. Y. Tsutsumi, D. Nishimura, H. Doi, N. Nomura, T. Hanawa, Difference in surface reactions between titanium and zirconium in Hanks' solution to elucidate mechanism of calcium phosphate formation on titanium using XPS and cathodic polarization, Mater. Sci. Eng. C, 29 (2009) 1702-1708

74. U. Hempel, T. Hefti, M. Kalbacova, C. W. Brandstetter, P. Dieter, F. Schlottig, Response of osteoblast-like SAOS-2 cells to zirconia ceramics with different surface topographies, Clin. Oral. Implants Res., 21 (2010) 174-181

75. A. K. Pandey, F. Pati, D. Mandal, S. Dhara, K. Biswas, In vitro evaluation of osteoconductivity and cellular response of zirconia and alumina based ceramics, Mater. Sci. Eng. C, 33 (2013) 3923-3930

76. 松口徹也, 骨芽細胞分化と JNK シグナル, 生化学 81 (2009) 703-705

77. Y. M. Kong, C. J. Bae, S. H. Lee, H. W. Kim, H. E. Kim, Improvement in biocompatibility of ZrO_2–Al_2O_3 nano-composite by addition of HA, Biomaterials, 26 (2005) 509-517

78. S. H. An, T. Matsumoto, H. Miyajima, A. Nakahira, K. H. Kim, S. Imazato, Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction, Dent. Mater., 28 (2012) 1221-1231

79. R. Depprich, H. Zipprich, M. Ommerborn, C. Naujoks, H. P. Wiesmann, S. Kiattavorncharoen, H. C. Lauer, U. Meyer, N. R. Kübler, J. Handsche, Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study, Head Face Med., 4 (2008) 30

80. B. Stawarczyk, M. Özcan, L. Hallmann, A. Ender, A. Mehl, C. H. F. Hämmerlet. The effect of zirconia sintering temperature on flexural strength, grain size, and contrast ratio, Clin. Oral. Investig., 17 (2013) 269-274

81. J. Moon, H. Choi, H. Kim, C. Lee, The effects of heat treatment on the phase transformation behavior of plasma-sprayed stabilized ZrO2 coatings, Surf. Coat. Technol., 155 (2002) 1-10

82. L. Ruiz, M. J. Readey, Effect of heat treatment on grain size, phase assemblage, and mechanical properties of 3 mol% Y-TZP, J. Am. Ceram. Soc., 79 (1996) 2331-2340

83. M. Stefanic, K. Krnel, T. Kosmac, Novel method for the synthesis of a β-tricalcium phosphate coating on a zirconia implant, J. Eur. Ceram. Soc., 33 (2013) 3455-3465

84. N. M. Zain, R. Hussain, M. R. A. Kadir, Surface modification of yttria stabilized zirconia via polydopamine inspired coating for hydroxyapatite biomineralization, Appl. Surf. Sci., 322 (2014) 169-176

85. C. Argirusis, M. A. Taylor, M. Kilo, G. Borchardt, F. Jomard, B. Lesage, O. Kaïtasov, SIMS study of transition metal transport in single crystalline yttria stabilized zirconia, Phys. Chem. Chem. Phys., 6 (2004) 3650-3653

86. K. Kowalski, A. Bernasik, A. Sadowski, Bulk and grain boundary diffusion of titanium in yttria-stabilized zirconia, J. Eur. Ceram. Soc., 20 (2000) 951-958

87. C. C. Chusuei, D. W. Goodman, M. J. V. Stipdonk, D. R. Justes, E. A. Schweikert. Calcium Phosphate Phase Identification Using XPS and Time-of-Flight Cluster SIMS, Anal. Chem., 71 (1999) 149-153

88. B. Demri, D. Muster, XPS study of some calcium compounds, J. Mater. Process. Technol., 55 (1995) 311-314

89. J. E. Arce. A. E. Arce, Y. Aguilar, L. Yate, S. Moya, C. Rincón, O. Gutiérrez, Calcium phosphate–calcium titanate composite coatings for orthopedic applications, Ceram. Int., 42 (2016) 10322-10331

90. J. M. Wu, T. S. Yeh, Sintering of hydroxyapatite-zirconia composite materials, J. Mater. Sci. Mater., 23 (1988) 377I-3777

91. D. Majumdar, D. Chatterjee, X-ray photoelectron spectroscopic studies on yttria, zirconia, and yttria-stabilized zirconia, J. Appl. Phys., 70 (1991) 988-992

92. B. Demri, M. Hage-Ali, M. Moritz, J. L. Kahn, D.Muster, X-ray photoemission study of the calcium/titanium dioxide interface, Appl. Surf. Sci., 108 (1997) 245-249

93. H. Nakajima, J. Nakazawa, Y. Minonishi, M. Koiwa, Diffusion of phosphorus in α-titanium, Philos. Mag. A, 53 (1986) 427-437

94. K. Kowalski, A. Bernasik, A. Sadowski, Bulk and grain boundary diffusion of titanium in yttria-stabilized zirconia, J. Eur. Ceram. Soc., 20 (2000) 951-958

95. H. G. Scott, Phase relationships in the zirconia-yttria system, J. Mater. Sci., 10 (1975) 1527-1535

96. J. M. Wu, T. S. Yeh, Sintering of hydroxyapatite-zirconia composite materials, J. Mater. Sci. Mater., 23 (1988) 377I-3777

97. E. Adolfsson, P. A. Henning, L. Hermansso, Phase analysis and thermal stability of hot isostatically pressed zirconia-hydroxyapatite composite, J. Am. Ceram. Soc., 83 (2000) 2798–802

98. Y. Cho, J. Hong, H. Ryoo, D. Kim, J. Park, J. Han, Osteogenic Responses to Zirconia with Hydroxyapatite Coating by Aerosol Deposition, J. Dent. Res., 94 (2015) 491-499

99. G. Peñarrieta-juanito, M. Cruz, M, Costa, G. Miranda, J. Marques, R. Magini, A. Mata, J. C. M.

Souza, J. Caramês, F. S. Silva, A novel gradated zirconia implant material embedding bioactive ceramics: Osteoblast behavior and physicochemical assessment, Materialia, 1 (2018) 3-14

101. J. Katz, S. Gershman, A. Belkind, Optical emission spectroscopy and contact angle study of plasma cleaning of titanium alloy surfaces: argon plasma, Plasma Med., 5 (2015) 5 223- 236.

102. J. H. Park, R. Olivares-Navarrete, R. E. Baier, A. E. Meyer, R. Tannenbaum, B. D. Boyan, Z. Schwartz, Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. Acta Biomater., 8 (2012) 1966-1975

103. W. Atta, N. Hori, M. Takeuchi, J. Ouyang, Y. Yang, M. Anpo, T. Ogawa, Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: An implication of biological aging of implant materials. Biomaterials, 30 (2009) 5352-5363

104. V. Paredes, E. Salvagni, E. Rodríguez-Castellón, J. M. Manero, Comparative Study of Surface Chemical Composition and Oxide Layer Modification upon Oxygen Plasma Cleaning and Piranha Etching on a Novel Low Elastic Modulus Ti25Nb21Hf Alloy. Metall. Mater. Trans., 48 (2017) 3770-3776

105. W. C. Chou, R. C. C. Wang, C. Liu, C. Y. Yang, T. M. Lee, Surface Modification of Direct-Current and Radio-Frequency Oxygen Plasma Treatments Enhance Cell Biocompatibility. Materials 10 (2017) 1223

106. X. Chen, M. Farber, Y. Gao, I. Kulaots, E. M. Suuberg, R. H. Hurt. Mechanisms of surfactant adsorption on non-polar, air-oxidized and ozone-treated carbon surfaces. Carbon 41 (2003) 1489-1500

107. Z. Yang, Y. Xia, F. Guo, Y. Xing, X. Gui. Interaction characteristics between diesel and coal with different hydrophilicity: Kinetic and force effects. Sep. Purif. Technol. 232 (2020) 115958

108. M. Hirano, M. Yamane, N. Ohtsu, Surface characteristics and cell-adhesion performance of titanium treated with direct-current gas plasma comprising nitrogen and oxygen. Appl. Surf. Sci. 354 (2015) 161-167

109. N. Ohtsu, T. Kozuka, M. Hirano, H. Arai, Electrolyte effects on the surface chemistry and cellular

response of anodized titanium. Appl. Surf. Sci. 349 (2015) 911-915

110. M. Hiran, T. Kozuka, T. Asano, Y. Kakuchi, H. Arai, N. Ohtsu, Effect of sterilization and water rinsing on cell adhesion to titanium surfaces. Appl. Surf. Sci. 311 (2014) 498-502

111. V. I. Nefedov, Y. V. SalynInstitute, G. Leonhardt, R. Scheibe, A comparison of different spectrometers and charge corrections used in X-ray photoelectron spectroscopy. J. Electron. Spectros. Relat. Phenom. 10 (1977) 121-124

112. A. Křepelová, T. Huthwelker, H. Bluh, M. Ammann. Surface Chemical Properties of Eutectic and Frozen NaCl Solutions Probed by XPS and NEXAFS, Chem. Phys. Chem. 11 (2010) 3859-3866

113. G. Hurwitz, G. R. Guillen, E. M. V. Hoek. Probing polyamide membrane surface charge, zeta potential, wettability, and hydrophilicity with contact angle measurements. J. Membr. Sci. 349 (2010) 349-357

114. M. A. Butkus, D. Grasso. Impact of Aqueous Electrolytes on Interfacial Energy. J. Colloid. Interface Sci. 200 (1998) 172-181

115. D.A. Bell, C.M. McConica, J.L. Falconer, Z. Lü, Corrosion of reactor wall surfaces by WF6 J. Electrochem. Soc., 141 (1994), pp. 2884-2888

116. N. Hara, S. Mukuhara, K. Ohtomo, Y. Shimizu, K. Sugimoto, Corrosion behavior of stainless steel and aluminum in a downstream environment of CF4/O2 microwave plasma, J. Electrochem. Soc., 149 (2002) B297-B305

117. K. Nakasa, S. Gao, A. Yamamoto, T. Sumomogi, Plasma nitriding of cone-shaped protrusions formed by sputter etching of AISI 420 stainless steel and their application to impression punch to form micro-holes on polymer sheets, Surf. Coat. Technol., 358 (2019) 891-899

118. S. Maeda, M. Mohri, T. Yamashina, M. Kaminsky, Scanning auger microanalysis study of 304 stainless steel surface irradiated with helium and argon ions, J. Nucl. Mater., 123 (1984) 1470-1474

119. T. Bai, Q. Zhang, The effects of the sputter-etching parameters on the formation of conical protrusions on the surface of SUS304 stainless steel, Adv. Mater. Res., 535-537 (2012) 764-767

120. X. Zhang, K. Wagatsuma, Comparative investigation of the emission characteristics between 6.78MHz radio-frequency and direct-current glow discharge plasmas for atomic emission spectrometry, Spectrochim. Acta B Atom. Spectros., 147 (2018) 109-114

121. A. Weddeling, K. Lefor, E. Hryha, S. Huth, L. Nyborg, S. Weber, W. Theisen, Nitrogen uptake of nickel free austenitic stainless steel powder during heat treatment—an XPS study, Surf. Interface Anal., 47 (2015) 413-422

122. N.S. McIntyre, D.G. Zetaruk, X-ray photoelectron spectroscopic studies of iron oxides, Anal. Chem., 49 (1977) 1521-1529

123. T. Sonmez, M.F. Jadidi, K. Kazmanli, O. Birer, M. Ürgen, Role of different plasma gases on the surface chemistry and wettability of RF plasma treated stainless steel, Vacuum, 129 (2016) 63-73

124. X. Cheng, Z. Feng, C. Li, C. Dong, X. Li, Investigation of oxide film formation on 316L stainless steel in high-temperatureaqueous environments, Electrochim. Acta, 56 (2011) 5860-5865

125. K. Nakasa, R. Wang, A. Yamamoto, Superhydrophobicity produced by vapor deposition of a hydrophobic layer onto fine protrusions formed by sputter-etching of steels Surf. Coat. Technol., 210 (2012) 113-121

126. K. Nakasa, Q. Zhang, R. Wang, M. Kato, Nano-indentation characteristics of surface layer with fine conical protrusions formed by sputter etching of W-Cr tool steel, J. Jpn. Inst. Metals, 73 (2009) 870-877

127. K. Nakasa, A. Yamamoto, R. Wang, T. Sumomogi, Formation of fine protrusions by sputter etching of martensitic stainless steels, Tetsu-to-Hagané, 100 (2014) 647-655

128. K. Watanabe, S. Maeda, T. Yamashina, A.G. Mathewson, Changes in roughness factors of 304 and 316 L + N stainless steels with ion bombardment and discharge cleaning, J. Nucl. Mater., 93-94 (1980), pp. 679-685

129. G. Chakraborty, C.R. Das, S.K. Albert, A.K. Bhaduri, V.T. Paul, G. Panneerselvam, A. Dasgupta Study on tempering behaviour of AISI 410 stainless steel, Mater. Char., 100 (2015) 81-87

130. S.Y. Lu, K.F. Yao, Y.B. Chen, M.H. Wang, X. Liu, X. Ge, The effect of tempering temperature on the microstructure and electrochemical properties of a 13 wt.% Cr-type martensitic stainless steel, Electrochim. Acta, 165 (2015) 45-55

131. A. Elbourne, J. Chapman, A. Gelmi, D. Cozzolino, R. J. Crawford, V. K. Truong, Bacterial-nanostructure interactions: The role of cell elasticity and adhesion forces, J. Colloid Interface Sci. 546 (2019) 192-210

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かい激励とご指導ご鞭撻を賜りました指導教官の北見工業大学地球環境工学科先端材料物質工学コース 大津直史 教授に心より感謝申し上げます。研究者としてご尊敬申し上げる大津教授から、研究に対する基本姿勢や考え方を学ぶことができ、大変有意義な研究生活を送ることができました。また、一度は就職した私に研究者への道に挑戦できる場を与えてくださったことに対し、重ねて御礼申し上げます。

ご多忙の中、博士論文の審査をお引き受け頂いた北見工業大学地球環境工学科先端材料物質工学コース 大野智也 教授、同大学地域未来デザイン工学科機械知能・生体工学コース 星野洋平 教授、同大学同学科バイオ食品工学コース 菅野亨 准教授、並びに佐藤利次 准教授に心よりお礼申し上げます。

研究を推進する上で XPS 測定、および FE-SEM 観察に際して技術支援を賜りました北見工業大学共通設備センター　山根美佐雄 様、並びに徳田奨 様を始め、センターのスタッフ皆様に感謝致します。皆様のご助言から、機器分析において分析条件の設定が何よりも重要であることを学ぶことができました。

研究でのサンプル作製において、基板の機械加工やプラズマ発生装置の設計に関してご助言頂きました北見工業大学ものづくりセンター 山田忠永 様、並びに石澤真也 様に感謝申し上げます。実際の機械加工を見越した設計が重要であることを学ばせて頂きました。

一社員であったにも関わらず、研究者への夢を追うために退職して再度学生に戻ることを快諾して頂いたヱビナ電化工業株式会社 海老名伸哉 社長に感謝申し上げます。

研究室生活を共に過ごした大津研究室の学生、並びに卒業生の皆様にお礼申し上げます。特に、一緒に実験を進めて頂いた三浦公陽 君、橋本雅功 君、並びに武田慎也 君には公私共に大変お世話になりました。お三方の協力や議論なくして、研究を進めることはできませんでした。

最後に、自分が決めた道を進むことに対して温かく見守り、支援して頂いた家族に感謝致します。

業績一覧

1. 学位論文に関係する内容の原著論文

（1）**M. Hirano**, Y. Yokoiwa, S. Komai, N. Ohtsu, Enhanced calcification of osteoblast-like cells on zirconium through calcium-phosphate slurry processing, Applied Surface Science (IF=6.182) 478 (2019) 567-573

（2） **M. Hirano**, M. Yamane, N. Ohtsu, Effects of discharge mode and gas composition for plasma-hydrophilized titanium surface on hydrophilic sustainability, Surface and Interface Analysis (IF=1.665) 52 2020 835-839

（3）**M. Hirano**, M. Hashimoto, K. Miura, N. Ohtsu, Fabrication of antibacterial nanopillar surface on AISI 316 stainless steel through argon plasma etching with direct current discharge, Surface and Coatings Technology (IF=3.784) 406 2021 126680

（4）**M. Hirano**, Y. Konaka, N. Ohtsu, Bioactivation of yttria-stabilized tetragonal zirconia surface via a chemical treatment processing using a calcium-phosphate slurry, Journal of Biomedical Materials Research Part A (IF= 3.525) under review

2. その他、共著論文

（5）N. Ohtsu, T. Kuji, **M. Hirano**, K. Yamasaki, Predominant surface property of an anodized titanium that enhances the cell respons, Biointerphases (IF=2.009) 14 (2019) 041002

（6）S. Komai, **M. Hirano**, N. Ohtsu, Spectral analysis of Sr 3d XPS spectrum in Sr-containing hydroxyapatite, Surface and Interface Analysis (IF=1.665) 52 2020 823-828

（7）K. Sakamoto, F. Hayashi, K. Sato, **M. Hirano**, N. Ohtsu, XPS spectral analysis for a multiple oxide comprising NiO, TiO_2, and $NiTiO_3$, Applied Surface Science (IF=6.182) 526 2020 146729

（8）K.Yamasaki, **M. Hirano**, S. Komai, H. Taniho, N. Ohtsu, Cell responses on Ni-free anodized

layer of NiTi alloy with various surface morphologies, Applied Surface Science (IF=6.182) 531 2020 147351

3. 学会発表

3-1 国際学会

（9）**M. Hirano**, M. Yamane, N. Ohtsu, Hydrophilic properties of plasma-treated titanium surface: Effect of gas composition and discharge modes, 18th European Conference on Applications of surface and Interface Analysis，17 September 2019

（10）**M. Hirano**, S. Takeda, K. Miura, M. Yamane, N. Ohtsu, Fabrication of antibacterial nanopillars on stainless steel surface via argon plasma etching process, NANOSMAT 2020 "14th International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials", 8 September 2020 (Online)

（11）**M. Hirano**, K. Miura, M. Yamane, N. Ohtsu，Antibacterial property of nanopillars fabricated on stainless steel 316 through Ar plasma etching, WBC 2020 Virtual "11th World Biomaterials Congress", 11-15 December 2020 (Online)

（12）S. Komai, **M. Hirano**, N. Ohtsu, Preparation of strontium-doped apatite layer on titanium substrate through calcium phosphate slurry processing and ion release from the layer， The 2019 International Symposium for Advanced Materials Research, 24 August 2019

（13） S. Komai, **M. Hirano**, N. Ohtsu, Characterization of strontium-contained apatite layer fabricated using calcium-phosphate slurry processing, 18th European Conference on Applications of surface and Interface Analysis, 17 September 2019

3-2 全国大会

（14）**平野 満大**，三浦 公陽，山根 美佐雄，大津 直史， Ar プラズマエッチングを用いた SUS316 表面への抗菌性ナノピラーの創製，日本金属学会 2019 年秋期(第 165 回)講演大会，2019 年 9 月 12 日

（15）**平野 満大**, 橋本 雅功, 三浦 公陽, 山根 美佐雄, 大津 直史, 生体模倣ステンレスナノピラーの抗菌活性に対する表面構造依存性, 日本金属学会 2020 年春期(第 166 回)講演大会, 2020 年 3 月 19 日

（16）**平野 満大**, 武田 慎弥, 三浦 公陽, 山根 美佐雄, 大津 直史, 生体模倣ステンレスナノピラーの形状変化が及ぼす抗菌活性への影響, 日本金属学会 2020 年秋期(第 167 回)講演大会, 2020 年 9 月 17 日

（17）駒井 しおり, **平野 満大**, 大津 直史, スラリー埋没加熱処理による Sr 含有アパタイト被膜の形成とその骨芽細胞石灰化促進効果, 第 40 回 日本バイオマテリアル学会大会, 2018 年 11 月 12 日

（18）三浦 公陽, 山根 美佐雄, **平野 満大**, 大津 直史, SUS316 鋼のプラズマ窒化処理におけるプラズマ放電法の影響, 日本鉄鋼協会 第 178 回秋季講演大会, 2020 年 9 月 12 日

（19）山﨑 華子, 瀧口 功大, 駒井 しおり, **平野 満大**, 大津 直史, 陽極酸化 NiTi 合金の生体適合性, 日本金属学会 2019 年秋期(第 165 回)講演大会, 2019 年 9 月 12 日

（20）古仲 雄亮, **平野 満大**, 大津 直史, 簡便な表面処理を用いた ZrO2 材料の生体適合性向上, 日本金属学会 2019 年秋期(第 165 回)講演大会, 2019 年 9 月 13 日

3-3 **支部大会**

（21）**平野 満大**, 山根 美佐雄, 大津 直史, プラズマ処理における放電法とガス混合比がチタン材料の親水性向上に与える影響, 日本分析化学会北海道支部 第 36 回 分析化学緑陰セミナー, 2019 年 6 月 29 日

（22）**平野 満大**, 山根 美佐雄, 大津 直史, グロー放電プラズマ処理におけるガス混合比と放電法がチタン表面の親水性向上に与える影響, 2019 年度日本金属学会・日本鉄鋼協会両北海道支部合同サマーセッション, 2019 年 7 月 5 日, 日本金属学会北海道支部奨励賞受賞

（23）**平野 満大**, 三浦 公陽, 橋本 雅功, 山根 美佐雄, 大津 直史, Ar プラズマエッチング

により SUS316 表面に形成したナノピラーの抗菌活性, 第 2 回 日本金属学会 第 7 分野講演会, 2019 年 12 月 8 日, 最優秀ポスター賞受賞

（24）**平野 満大**, 三浦 公陽, 山根 美佐雄, 大津 直史, Ar プラズマエッチングによる SUS316 鋼表面へのナノピラーの創製とその抗菌性評, 2019 年度日本鉄鋼協会・日本金属学会両北海道支部合同冬期講演大会, 2020 年 1 月 16 日, 日本金属学会北海道支部奨励賞受賞

（25）駒井 しおり, **平野 満大**, 大津 直史, スラリー埋没加熱処理による Sr 含有アパタイト被膜の作製とその特性評価, 日本分析化学会北海道支部 第 36 回 分析化学緑陰セミナー, 2019 年 6 月 29 日

（26）古仲 雄亮, **平野 満大**, 大津 直史, スラリー埋没加熱処理を用いた ZrO2 インプラントへの生体活性付与, 日本分析化学会北海道支部 第 36 回 分析化学緑陰セミナー, 2019 年 6 月 29 日

（27）駒井 しおり, **平野 満大**, 大津 直史, スラリー処理で作製した Sr 含有アパタイト被膜からの Sr 溶出挙動, 2019 年度日本金属学会・日本鉄鋼協会両北海道支部合同サマーセッション, 2019 年 7 月 5 日

（28）古仲 雄亮, **平野 満大**, 大津 直史, スラリー埋没加熱処理を用いた ZrO2 材料の生体活性向上, 2019 年度日本金属学会・日本鉄鋼協会両北海道支部合同サマーセッション, 2019 年 7 月 5 日

（29）橋本 雅功, **平野 満大**, 三浦 公陽, 山根 美佐雄, 大津 直史, ステンレスナノピラーの抗菌効果に対する構造依存性, 化学系学協会北海道支部 2020 年冬季研究発表会, 化学系学協会北海道支部, 2020 年 1 月 28 日

（30）三浦 公陽, 山根 美佐雄, 安東 航希, **平野 満大**, 大津 直史, 放電法および N2-Ar ガス組成による SUS316 鋼プラズマ窒化の高効率化, 化学系学協会北海道支部 2020 年冬季研究発表会, 2020 年 1 月 29 日