

LCVD 加工によるケイ酸カルシウムの作製

および細胞接着への影響

電気・化学専攻 医用工学領域 2181214 大形 瑠

(主査：桃沢愛准教授 副査：和多田雅也教授，小林千尋講師)

1. はじめに

事故や老化により骨が欠損した際、骨の代替としてインプラントや人口骨が用いられる。インプラント等に用いられる生体材料は生体親和性が高く、拒絶反応を起こしにくいという利点がある。材料には、有機材料、無機材料、金属材料の3つがある。生体材料は、生体内に安全に埋入する必要があるため、生体組織や器官と親和性があり、拒絶反応を起こさない性質である“生体適合性”の高さが求められている。

有機材料や無機材料は、生体内に存在する成分であるため、生体と馴染みやすいという利点がある。近年、生体活性ガラス等のケイ素を含んだ生体活性材料が骨の代替インプラントとして注目されている。ケイ酸カルシウムは、ケイ素とカルシウムを含んだ材料であり、コンクリート分野ではセメントの主成分として良く知られている。さらに、近年、硬組織の修復や置換のための生体材料として生体活性ガラス等とともにケイ酸カルシウムセメントの研究がされている。ケイ酸カルシウムには、カルシウムとケイ素の組成比が異なる、カルシウムシリケート (CaSiO_3 , CS), ジカルシウムシリケート (Ca_2SiO_4 , C2S), トリカルシウムシリケート (Ca_3SiO_5 , C3S) の3種類が存在する (図1)。CSとC2Sは、1817 Kと2405 Kの融点まで安定であるが、C3Sは1737 K以下と1522 Kから2391 Kの間でのみ安定である。また、セメントの主成分として使用されている、C2SやC3Sは液相と反応し、水和・硬化する性質を有している。¹⁻²⁾一方、CSは水和・硬化はしないが、生体適合性がある事が証明されており³⁾、生体材料として注目されている。生体活性ガラスや、ケイ酸カルシウムに含まれているケイ素という元素は、骨形成の初期段階において、骨芽細胞分化の刺激に寄与している可能性が報告されている。CaO-SiO₂を含む生体材料を移植すると、移植された材料表面に生体アパタイト層が形成されることによって生きた骨や軟組織に結合できるようであることが示されている。¹⁻²⁾そのため、ケイ酸カルシウムがバイオマテリアルとして注目されている。ゾルゲル法や焼結法によってCSの研究は盛んに行われているが³⁾、C2SやC3Sは高融点であるため、単相の合成が困難であるため、バイオマテリアルとしての研究があまり行われていない。

一方、生体材料の中でも、金属材料は、耐荷重強度、破壊靱性が優れている点からインプラント材料の約8割に使用されている。しかし、金属材料は、体液により腐食がおき、その際に溶出する金属イオンによる生体内への毒性の危険性が存在する。生体材料として使用される金属材料の代表例としてチタン(Ti)が挙げられる。チタンは、表面に作られる酸化チタン(TiO₂)の不導体被膜を作るため、体液による腐食が起

きにくく、金属イオンの溶出が起きないことから安全性が高いとされている。⁴⁾さらに、チタンには、オッセオインテグレーションという性質があるため、生体と材料が何の介在もなしに結合することができ、生体-材料間の結合が強力になる利点がある。

しかし、生体との結合を強固にするオッセオインテグレーションの獲得には長期間を要し、下顎骨で約 3~4 か月、上顎骨で約 5~6 か月の期間を必要とする。チタンと完全に結合していない間に、欠損部位との隙間から、細菌が埋入し、感染症に罹患するリスクや、チタンが脱落するリスクに曝される。そのため、材料と生体が早期に結合するための、研究が多くされている。

先行研究により、微粒子ショットピーニング法や、プラズマ処理により、材料の表面に粗さを付与する事や、官能基を付与することで、細胞が早期に材料に接着する事が分かっている。本研究では、材料表面に薄膜を作製する化学気相成長(Chemical Vapor Deposition ; CVD)法に着目した。CVD 法では、凹凸のある薄膜を作製する事や、結晶構造を変化させる事が可能である。

今までの研究で、ケイ酸カルシウムの作製においてレーザーを励起エネルギーとして用いたレーザーCVD 法 (LCVD 法) で作製した例は無く、また、チタン上に成膜した研究は行われていない。さらに、異なる組成比によるケイ酸カルシウムが細胞に与える影響についても、あまり研究が行われていない。

そこで、本研究では、レーザーCVD 法を用いて、ケイ酸カルシウムの薄膜を作製し、CVD 法での生成条件を調査する。また、組成比や表面形状の異なるケイ酸カルシウムの薄膜上で骨芽細胞を培養し、ケイ酸カルシウムの組成比や表面形状が与える影響について調査する。

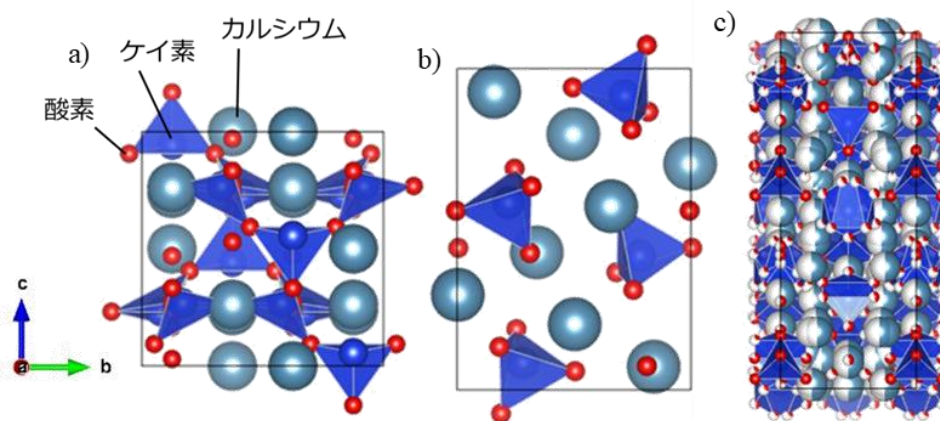


図 1. a) CaSiO_3 (CS), b) Ca_2SiO_4 (C2S), c) Ca_3SiO_5 (C3S) の結晶構造

2. 原理

化学気相成長(Chemical Vapor Deposition ; CVD)法はコーティング技術の 1 つである。CVD 法は、気体状にした原料に励起エネルギーを加え化学反応により分解し、固体薄膜を基板上に成膜する方法である。初めに、炉内に気体状にした原料を放出する。次

に，原料ガスが基板付近で気相拡散される．拡散された原料ガスは基板に付着する．最後は基板上で化学反応が起き，成膜される⁵⁾．励起エネルギーの役割は，主に基板上で化学反応を促進し，成膜速度を向上させることである．CVD法の中で，レーザーを励起エネルギーとして使用し，薄膜を製膜する方法をレーザーCVD(LCVD)法と呼ぶ．

3. 研究方法

3.1 LCVD法による基板の作製

ケイ酸カルシウムの成膜にはCO₂レーザー(波長：10.6 mm)を使用したLCVD装置を使用した．基板には鏡面加工が施されたチタン2種(5×5×1 mm)およびアルミナ基板(10×10×1 mm)を使用した．気化材料には，テトラエトキシシラン(TEOS: Si(OC₂H₅)₄)およびカルシウムのdpm錯体(Ca(dpm)₂: Ca(C₁₁H₁₉O₂)₂)を用いて行った．加工する前処理として，基板はアセトンにより5分間超音波洗浄を行い，十分に乾燥させてから使用した．

図2に，LCVD装置の概略図を示す．原料ガスを炉の中に運ぶためのキャリアガスにアルゴン(Ar)を使用した．Ca(dpm)₂は，10分間蒸らした後，気化温度(T_{Ca})を250°Cから280°Cまで変化させ，TEOSは，気化温度(T_{Si})を40°Cから50°Cまで変化させ成膜をおこなった．

表1にチタン基板およびアルミナ基板へのLCVD加工条件を示す．初めに，原料ガスの気化温度をCa(dpm)₂を260°C，TEOSを40°Cに固定し，レーザー出力を変化させケイ酸カルシウム薄膜が成膜されるレーザー出力強度を調査した．次にCa(dpm)₂の気化温度を260°Cから280°Cまで変化させた．Ca(dpm)₂を260°C，TEOSを40°Cに固定し，圧力(P)を260 Paで一定にさせ，レーザー出力(L)を16 mAから20 mAまで，ヒーター(H)を0 Vから25 Vまで変化させ，基板を加熱した．基板温度(T_{sub})は，放射温度計により測定した．

次に，原料ガスの気化温度，レーザー出力，電圧を固定し，炉内の圧力を260 Paから3000 Paまで変化させた．各条件で10分間または15分間成膜し，ケイ酸カルシウム膜を作製した．

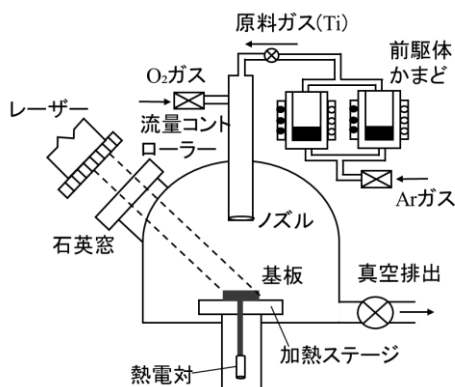


図2. LCVD装置の概略図

表1. LCVD法の成膜条件

レーザー出力 L (mA)	11, 18, 20, 21
圧力 P (Pa)	240, 250, 260, 270 800, 1500, 3000
ヒーター H (V)	0, 10, 25
Ca(dpm) ₂ の気化温度 T_{Ca} (°C)	260, 270, 280
TEOSの気化温度 T_{Si} (°C)	40, 45, 50
成膜時間 T_{dep} (s)	600, 900

3.2 薄膜の分析

初めに、LCVD 加工を施した後の基板の上に成膜された薄膜を調べるために、XRD 装置(X-ray diffraction;XRD, D2 Phase, Bruker AXS)を使用した。得られた XRD のデータは PDIndexer のアプリを用い結晶相の同定を行った。

次に、LCVD 加工により成膜されたケイ酸カルシウム膜の表面形状を観察するために電界放射型走査電子顕微鏡装置(Scanning Electron Microscope;SEM, SU-8230, (株)日立ハイテクノロジーズ)を用いた。SEM 画像により LCVD 加工で成膜された薄膜の違いを観察した。また、成膜されている事が分かるように未処理のチタン基板およびアルミナ基板の表面形状を撮影した。

最後に、LCVD 加工により成膜されたケイ酸カルシウム膜、未処理のチタン基板および、アルミナ基板の表面に形成された凹凸の状態は白色干渉顕微鏡(BW-S507, (株)ニコン インステック)により観察した。算術平均面粗さ S_a は、粗さ計で測定した輪郭曲線の一部を基準長さで抜き出し、その区間の平均線に対する凹凸の絶対値を平均した値を面に拡張した値である。

3.3 ケイ酸カルシウム膜上での培養実験

3.3.1 細胞増殖性の評価

細胞には、マウス頭蓋由来の MC3T3-E1 細胞を用いた。コントロール試料として、鏡面チタン基板(5×5×1 mm)および、アルミナ基板(5×5×1 mm)を用い、LCVD 加工を施した基板(5×5×1 mm)と比較した。基板は、20 分間オートクレーブにより滅菌処理したものを使用した。処理後、48 ウェルプレート(底面積 95 mm²/well)に各基板を配置し、各ウェルに 0.5 ml/well ずつ培地を入れ、基板の上に 1.0×10^4 cells/well 播種した。その後、インキュベーター内(37 °C, CO₂5%)で 96 時間まで培養した。

細胞の回収は、新たに 48 ウェルプレートを用意し、PBS により基板を洗浄した。洗浄は、付着していない細胞を取り除くために行った。PBS 洗浄後、トリプシンを用いて 24 時間毎に細胞を回収し、血球計算盤を用いてカウントした。

3.3.2 細胞接着形態の観察

細胞の接着形態を観察するために、細胞を基板の上に固定した。初めに、LCVD 基板、鏡面チタン基板及び、アルミナ基板を 20 分間オートクレーブにより滅菌を行った。処理後、ディッシュに各基板を配置し、0.5, 3, 6, 24 時間培養した。最後に、基板を処理液に浸漬させ、細胞の固定、脱水、乾燥を行った。

細胞の接着形態は SEM を用いて観察した。観察倍率は 100, 200, 300, 1000, 3000, 5000, 10000 倍とし、試料表面に対し 60°斜め方向から観察した。

4. 結果および考察

4.1 LCVD 法によるケイ酸カルシウム薄膜の成膜

図 3 にケイ酸カルシウムの薄膜が生成された際の温度とカルシウムとケイ素のモル比および圧力の関係を示す。図 3 (a) より、レーザー出力が 16 mA の場合、基板温度は 600°C 程度となり、酸化カルシウムが生成され、ケイ酸カルシウムは生成されない事

が分かった。また、レーザー出力を上げるほど、基板表面の温度は高くなり、ケイ酸カルシウムが生成された。さらに、カルシウムの気化温度を変化させることで、Ca/Si のモル比が変化し、Ca/Si のモル比が 0.2 以上になると、ケイ酸カルシウムだけの薄膜が得られた。260 Pa 付近の圧力では、主に、 Ca_2SiO_4 の組成のケイ酸カルシウムが生成され、温度や Ca/Si のモル比の違いにより他の組成比を持つケイ酸カルシウムのピークが同定され、混合相となっていた。これらのことから、LCVD 法では温度 800°C 以上、Ca/Si のモル比 0.2 以上の際に、ケイ酸カルシウムだけの薄膜を生成する事が可能となると考えられる。また、圧力が 260 Pa 程度では、ケイ酸カルシウムの中でも、 Ca_2SiO_4 の組成が生成されやすく、基板表面の温度 940°C より高くなると、他の組成比も生成されやすくなり、混合相を成膜することができる事が示唆された。基板温度が 940°C 以上の際、Ca/Si のモル比が 0.4 程度の場合は、 CaSiO_3 の組成が生成され、Ca/Si のモル比が 0.6 程度の場合は、 Ca_3SiO_5 の組成が Ca_2SiO_4 の組成とともに生成された事から、成膜される際に、カルシウムがケイ素より少ないと、 CaSiO_3 の組成が生成されやすく、多いと、 Ca_3SiO_5 の組成が生成されやすい事が示唆された。

一方、圧力を変化させると、生成されやすくなるケイ酸カルシウムの組成が変化した。図 3 (b), (c) より圧力が 800 Pa 以上になると、 CaSiO_3 の組成が主に生成される事が分かった。800 Pa では、260 Pa の際と同様に、温度と Ca/Si のモル比によって生成される組成が変化していた。Ca/Si のモル比が 0.4 以下の場合、 Ca_3SiO_5 の組成または、 CaSiO_3 の組成と Ca_3SiO_5 の組成の混合相が生成された。さらに、基板温度が 1000°C 以上になると、 CaSiO_3 の組成と Ca_2SiO_4 の組成の混合相が生成された。また、1500 Pa では、基板温度が 700°C から 930°C、Ca/Si のモル比が 0.3 から 0.6 までの範囲で CaSiO_3 の組成を有する単相のケイ酸カルシウムの薄膜が成膜された。さらに、3000 Pa では、基板温度が約 700°C の際に、Ca/Si のモル比によって生成される組成が変化した。圧力で、生成されやすいケイ酸カルシウムの組成が変化したのは、各組成の結晶構造の違いが影響していると考えられる。Ca-Si-O はケイ酸のつながりの隙間に、Ca が入り込みイオン結合して繋がっている事から、高圧になるほど Si-O の隙間が小さくなり Ca が入り込みにくくなることで、Ca の数が少ない CaSiO_3 が生成されやすくなったと考えられる。以上のことから、LCVD 加工によりケイ酸カルシウム薄膜を成膜すると、圧力毎に成膜されやすい組成が変化し、圧力毎に組成変化の条件が変わる事が示唆された。

4.2 LCVD 法によるケイ酸カルシウム薄膜の表面形状

図 4 にチタンおよびアルミナ基板と各試験片上に成膜したケイ酸カルシウム薄膜の表面形状の SEM 画像を示す。基板温度が増加するほど、結晶が成長し、結晶性が良くなっていた。また、チタン基板上のケイ酸カルシウムの薄膜は、260 Pa までは、角ばった結晶が存在していたが、800 Pa 以上になると丸みを帯びた結晶が多く存在するようになっていた。一方、アルミナ基板では、チタン基板と異なり基板表面の温度が上昇しにくく、260 Pa の圧力では、結晶性の良い薄膜を得ることが困難であった。また、800 Pa と 1500 Pa では、丸みを帯びた円柱形状の結晶が成長し、チタン基板上とアルミナ基板上の両方の薄膜で確認できた。さらに、3000 Pa では、チタン基板上では、円盤

のような大きな結晶が成長し、アルミナ基板上では、モコモコとした形状の薄膜が成膜されていた。以上のことより、圧力が変化する事で、結晶の形状が丸みを帯びた形状に変化する事が示唆された。

培養実験は、**図 4** のアルミナ基板上に成膜されたケイ酸カルシウム薄膜を培養基板として使用した。260 Pa で成膜した基板を A ($Sa : 0.710 \mu\text{m}$)，800 Pa で成膜した基板を B ($Sa : 0.390 \mu\text{m}$)，1500 Pa で成膜した基板を C ($Sa : 0.749 \mu\text{m}$)，3000 Pa で成膜した基板を D ($Sa : 0.390 \mu\text{m}$) とした。

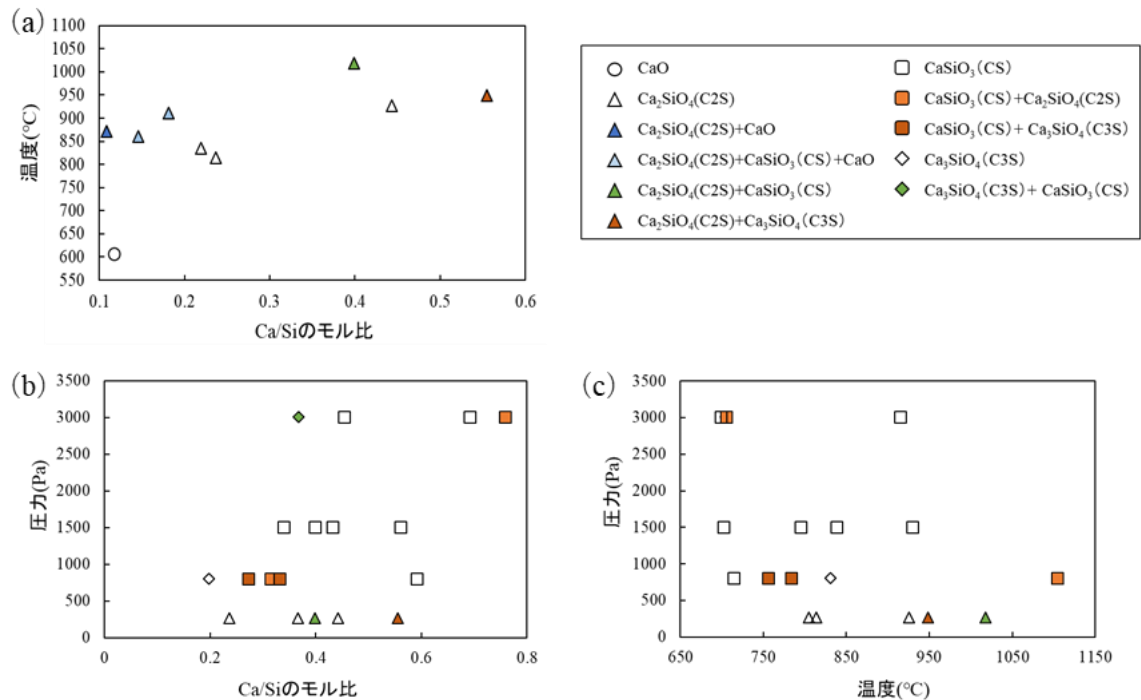


図 3. LCVD 法によるケイ酸カルシウムが生成される際の温度，圧力および Ca/Si のモル比の関係 (a) 240 Pa から 260 Pa までの温度と Ca/Si のモル比，(b) 圧力と Ca/Si のモル比，(c) 圧力と温度の関係

4.3 ケイ酸カルシウム薄膜が与える骨芽細胞への影響

4.3.1 ケイ酸カルシウム薄膜上の接着細胞数

図 5 にチタン基板，アルミナ基板およびケイ酸カルシウム上での 24 時間毎の単位面積当たりの細胞数を示す。すべての基板で細胞は増殖した。培養後 24 時間後の細胞では，D の基板で接着している細胞が最も多く，A の基板で最も少ない結果となった。**図 6** にチタン基板，アルミナ基板およびケイ酸カルシウム上での細胞の比増殖速度を示す。増殖速度は，アルミナ基板で最も大きく，B の基板で最も小さい結果となった。

ケイ酸カルシウムの組成で比較すると， Ca_2SiO_4 と CaSiO_3 の混相， Ca_3SiO_5 の単相， CaSiO_3 の単相の順で 24 時間後の細胞数が多く接着していた。また，C と D は同じ CaSiO_3 の単相であるが，C 上の 24 時間後の細胞接着数は D 上のそれより，同じ表面形状を有している B 上のそれと同程度の数が付着していた。増殖速度は， Ca_3SiO_5 の単相， Ca_2SiO_4 と CaSiO_3 の混相， CaSiO_3 の単相の順で大きい値をとった。以上のことか

ら、初期接着の細胞数は、表面形状に影響され、細胞増殖は、組成比に影響されている可能性が示唆された。

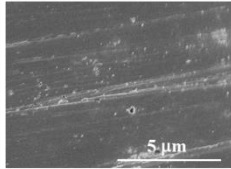
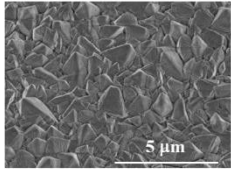
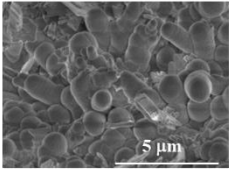
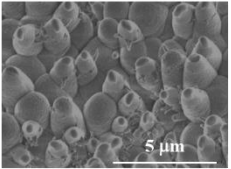
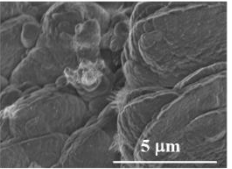
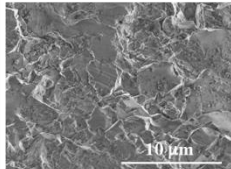
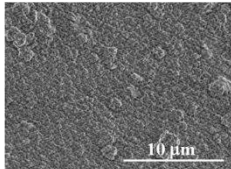
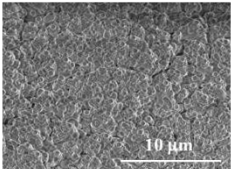
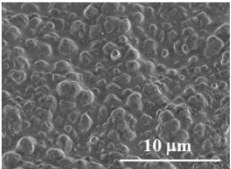
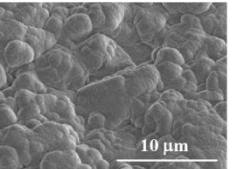
Ti	Ti-260 Pa	Ti-800 Pa	Ti-1500 Pa	Ti-3000 Pa
				
Tiの单相	Ca ₂ SiO ₄ の单相	Ca ₂ SiO ₄ とCaSiO ₃	CaSiO ₃ の单相	CaSiO ₃ の单相
-	$T_{sub} : 926^{\circ}\text{C}$	$T_{sub} : 1105^{\circ}\text{C}$	$T_{sub} : 930^{\circ}\text{C}$	$T_{sub} : 915^{\circ}\text{C}$
-	Ca/Si : 0.44321769	Ca/Si : 0.3146929	Ca/Si : 0.39946838	Ca/Si : 0.45444645
Al ₂ O ₃	Al ₂ O ₃ -260 Pa	Al ₂ O ₃ -800 Pa	Al ₂ O ₃ -1500 Pa	Al ₂ O ₃ -3000 Pa
				
Al ₂ O ₃ の单相	Ca ₂ SiO ₄ とCaSiO ₃	Ca ₃ SiO ₅ の单相	CaSiO ₃ の单相	CaSiO ₃ の单相
-	$T_{sub} : 866^{\circ}\text{C}$	$T_{sub} : 831^{\circ}\text{C}$	$T_{sub} : 839^{\circ}\text{C}$	$T_{sub} : 699^{\circ}\text{C}$
-	Ca/Si : 0.45438056	Ca/Si : 0.19854898	Ca/Si : 0.43196137	Ca/Si : 0.69252334

図 4. チタン基板およびアルミナ基板上で成膜されたケイ酸カルシウム薄膜の表面形状の SEM 画像

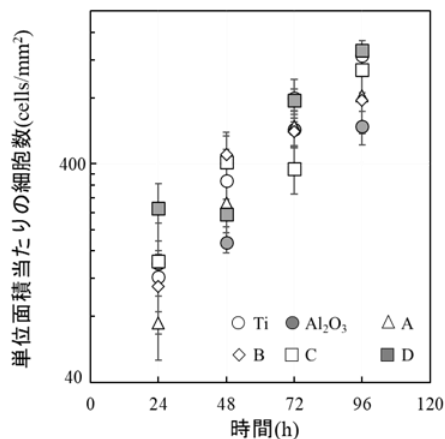


図 5. チタン基板，アルミナ基板およびLCVD加工基板上の単位面積当たりの細胞数 (n = 3, S.D.)

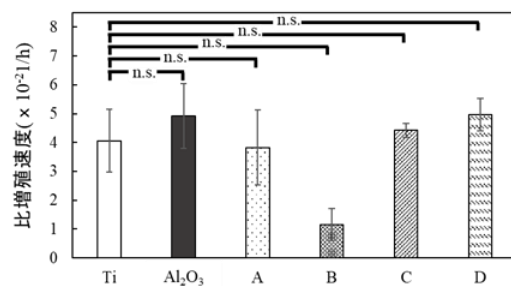


図 6. チタン基板，アルミナ基板およびLCVD加工基板上の比増殖速度 (n = 3, S.D.)

4.3.2 ケイ酸カルシウム薄膜上細胞接着形態

図 7 にチタン基板、アルミナ基板およびケイ酸カルシウム薄膜上に接着している細胞の SEM 画像を示す。培養 0.5 時間後の細胞は、チタン基板上と D の基板上の細胞だけが、球状ではなく、仮足を伸ばしている形態をとっていた。また、チタン基板および

ケイ酸カルシウム薄膜上では、培養 3 時間後に糸状の細い仮足（糸状仮足）を伸展させている様子が確認できた。以上のことから、ケイ酸カルシウム薄膜は、細胞の糸状仮足を早期に伸展させ、細胞接着を促進させていると考えられる。また、D の基板では、培養 0.5 時間後に細胞が球状の形態を崩していたことから、D の表面形状が細胞の早期接着に適している事が示唆された。

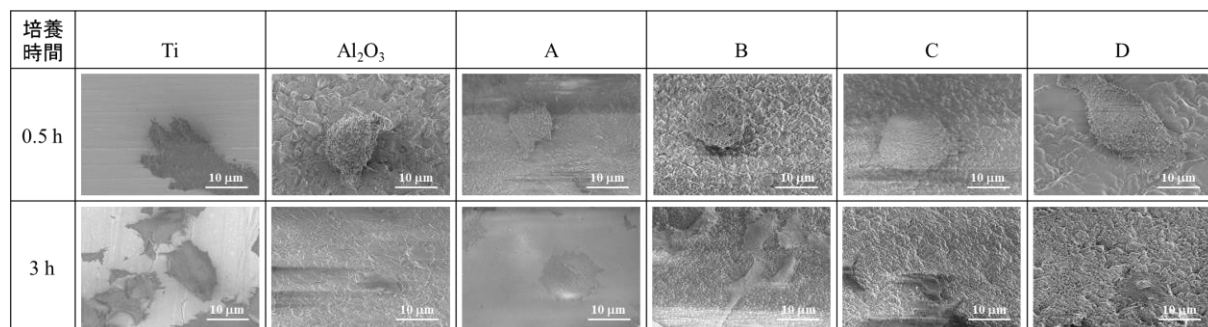


図 7. チタン基板、アルミナ基板およびケイ酸カルシウム薄膜上の培養 0.5 時間後と 3 時間後の細胞接着形態の SEM 画像

5. 結論

本研究では、チタン基板およびアルミナ基板に LCVD 法を施し、ケイ酸カルシウムの薄膜を成膜し、異なる組成比のケイ酸カルシウム膜上で培養実験を行い以下の結果を得た。

- (1) LCVD 法では、ケイ酸カルシウムは、温度 700 度以上、Ca/Si のモル比が約 0.2 以上の際に単相を成膜することが可能となる。
- (2) LCVD 法によるケイ酸カルシウムの組成は、圧力により大きく変化し、260 Pa では Ca₂SiO₄ の組成が生成されやすく、800 Pa 以上では、CaSiO₃ の組成が生成されやすくなる傾向がある。また、基板温度や Ca/Si のモル比の変化の影響により組成の割合が変化する。
- (3) ケイ酸カルシウムの薄膜上では、細胞は接着増殖し、CaSiO₃ の組成を有し、粗さが小さいモコモコの表面形状で培養後 24 時間後の細胞数が最も接着した。
- (4) CaSiO₃ の組成を有する基板上で、比増殖速度が大きくなったため、CaSiO₃ の組成のケイ酸カルシウムは細胞の増殖も促進させる可能性がある事が示唆された。
- (5) CaSiO₃ の組成を有し、Sa : 0.390 μm 粗さを持つモコモコした表面形状は細胞を早期に接着させる可能性がある。

参考文献

- 1) P. Singh, X. Yu, A. Kumar et al, *J Mater Sci*, 57, (2022) 13110
- 2) E. P. Ghamor-Amegavi, et al, *Society For Biomaterials*, 108, (2020) 377
- 3) S. Ni, J. Chang, et al, *Journal of Biomedical Materials*, 17, (2006) 174
- 4) A. MATSUGAKI, Y. NAKANO, *Zairyo-to-Kankyo*, 63, (2014) 290 (in Japanese)
- 5) S. MIYAZAKI, *JSAP*, 69, (2000) 689 (in Japanese)