

表 1 各収差補正条件

	Stigmatic	Rose	3次
e_2	-1/4	-1	-1
b_2	0	-0.750	-0.750
e_3	0	-0.375	0.555
b_3	0	0	0.188
e_4	0	0	-0.180
b_4	0	0	0

こうした高次を収差を調整するためには、Wien filter を多極子化することで達成できる。12極のWien filter を用いることで、3 次の収差まで補正可能であることがわかった。

そこで、われわれは、図2に示すようにこの装置を作製した。装置は、一番下にサンプルが入っている。その上にinputレンズがのり、太くなっているところが多極子Wien filterである。その上には投影レンズをもうけ、Wien filterで結像した回折面を像面に変換している。さらに、X線としては、図3に示す超高輝度回転対陰極X線源を作り、サンプルに照射した。

C. 研究結果

多極子のWien filterは内部にかかる電圧や磁場を変化することで、収差の補正係数を変化させることができる。したがって、擬似的にStigmatic(

収差補正なし)、Rose(2次収差補正)、3次収差補正と段階的に収差を補正していくことができる。図4は、その実験を行った物である。サンプルはTa上に25ミクロン間隔でAuのドメインを蒸着した物である。(1)は、Wien条件のみを満たした物であり、収差補正を行っていない。(2)は、2次収差を行っており、画像がかなりはっきりしている。(3)は3次収差を行った。現状では、2次収差の補正を行えば、十分であるが、将来高分解能測定を行うためには、3次収差補正を進めていく必要があると考えられる。Wien filterでは、このように、像を見ながら、収差補正を高次まで施すことが可能であり、他の多くのエネルギー分析器にない特徴といえる。次にAuとTaの光電子を用いて結像を行った。Auの4f5/2のピ

ークエネルギーにWien filterをあわせて、結像を行うと図5(a)の様な像を得ることができる。Auの領域が明るくなっている。一方、Ta4f5/2を用いて、結像すると、今度は、Au領域が暗くなる。これは、周りにあるTaからの光電子がAuの光電子よりも多くなった性であり、Taの光電子による選別像の取得ができた物といえる。以前測定した放射光よりもより鮮明な測定ができた。これは、Wien filterの改良による物である。

D. 考察

EXPEEMは、元素分析能を有し、ナノオーダーの空間分解能を持つ分析装置として、幅広い応用が期待される。特に、SEMでは低ダメージのSEMが開発されつつあるものの、X線は電子線源と比べて、格段とダメージが小さい。また、XPSの豊富な情報もあり、化学分析はオージェ分光法や蛍光法よりも多くの情報量を有する。さらに、絶縁体サンプルに対しても測定が用意である点も特徴の一つと考えられる。こうした特徴は、電子ではダメージの大きなソフトマテリアルへの応用が期待される分野である。現在、有機物を用いたデバイス開発が進められている。有機物のナノ領域デザインにはナノ領域の顕微鏡とその化学状態解析が望まれる。例えばAg(DM)₂(DM=2,5-dimethyl N,N'-dicyanoquinonediimine)という電気伝導性の物質があるが、これは、光を照射することにより、半導体に変化する。そこで、片方だけに光を照射するとダイオード特性を示すようになり、有機デバイスとして注目されている。この物質をマイクロ領域の状態分析をすると、金属、半導体領域で、Agの電子状態が大きく異なることがわかる。同じ物質を電子で調べるとダメージが生じてしまい、意味のあるデータを得ることが難しい。このようにEXPEEMは、有機デバイスのその場観察や製造過程の観察に利用可能と考えられる。

E. 結論

ナノ化学顕微鏡である新型EXPEEMを開発し、化学選別像の取得に成功した。今後は本装置で生体等のソフトマテリアルの研究を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 T. Naito, H. Sugawara, T. Inabe, T. Miyamoto, H. Niimi, and K. Asakura, *J.Non-crystalline solids* **352**, 2628 (2006).
- 2 T. Naito, H. Sugawara, T. Inabe, Y. Kitajima, T. Miyamoto, H. Niimi, and K. Asakura, *Journal of Low Temperature Physics* **142**, (3-4), 383-386 (2006).
- 3 T. Naito, H. Sugawara, T. Inabe, T. Miyamoto, H. Niimi, and K. Asakura, *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **455**, 311-316 (2006).
- 4 M. Ushiro, K. Uno, T. Fujikawa, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, W. J. Chun, Y. Koike, and K. Asakura, *Phys.Rev.B* **73**, 144103-1,11 (2006).
- 5 M. Uo, K. Asakura, T. Kohgo, and F. Watari, *Chem. Lett.* **35**, 66 (2006).
- 6 S. Suzuki, Y. Koike, K. Fujikawa, M. M. Nakamura, W.-J. Chun, M. Nomura, and K. Asakura, *Topic in Catal* **117**, 80 (2006).

2. 学会発表

- 1 Hironobu Niimi, Makoto Kato, T. Kawasaki, T. Miyamoto, S. Suzuki, W.-J. Chun, M. Kudo, N. Kawahara, M. Doui, K. Tsukamoto, and K. Asakura, in *International Microscopy Congress*, Sapporo, 2006.
- 2 Testuya Tsutsumi, H. N. Takeshi Miyamoto, Yoshinori Kitajima, M. K. Yuji Sakai, and K. Asakura, in *LEEM-PEEM V*, Himeji, 2006.
- 3 Hironobu Niimi, Makoto Kato, Takahiro Kawasaki, Takeshi Miyamoto, Shushi Suzuki, Wang-Jae Chun, Masato Kudo, Naoki Kawahara, Makoto Doi, Katsumi Tsukamoto, Kiyotaka Asakura

G. 知的所有権の取得状況

無し。

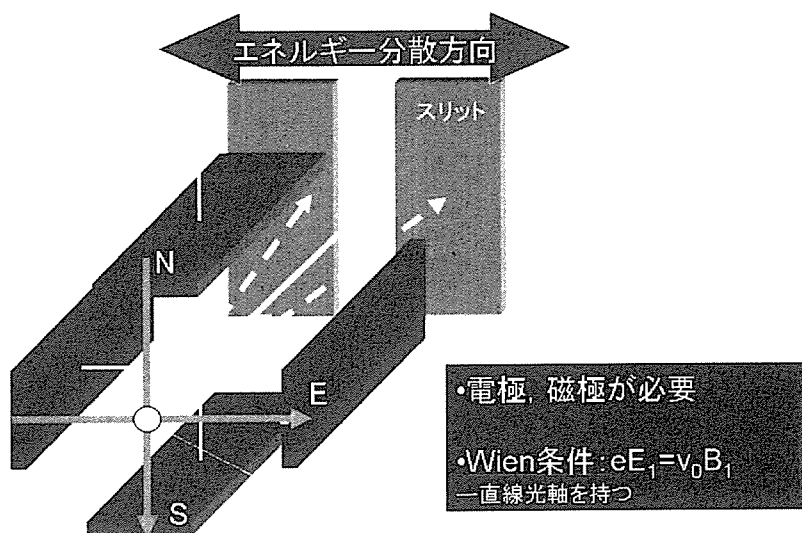


図1 Wien filter 型エネルギー分析器

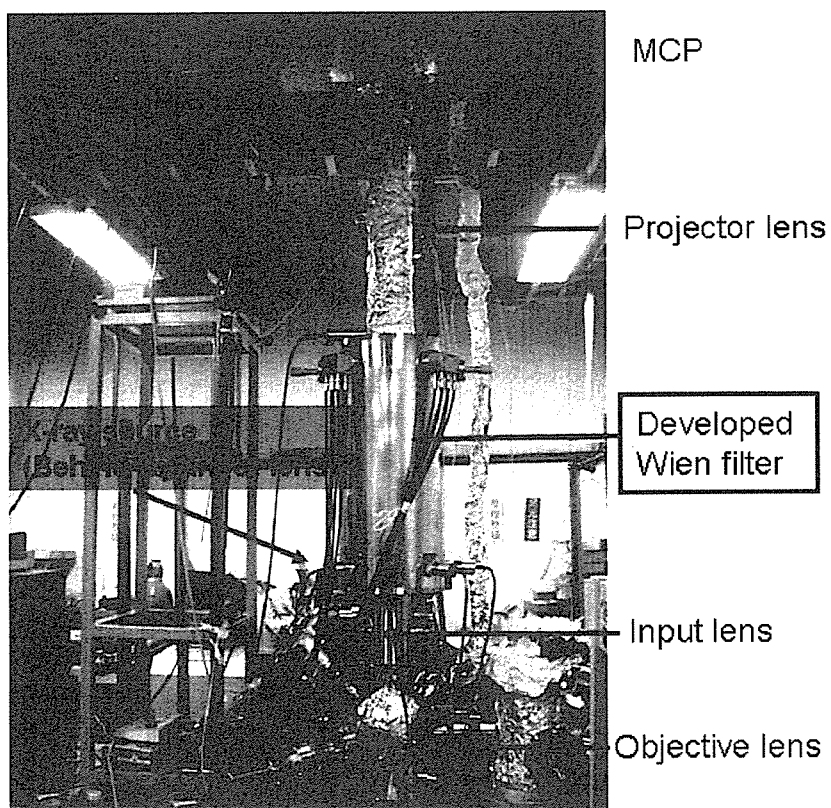


図2 実験室 EXPEEM 装置

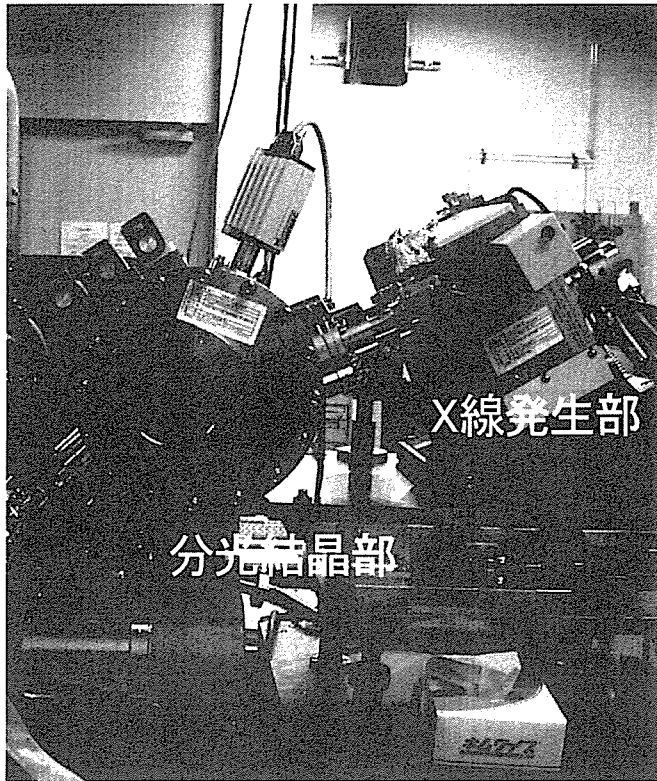


図3 超強力 X 線源

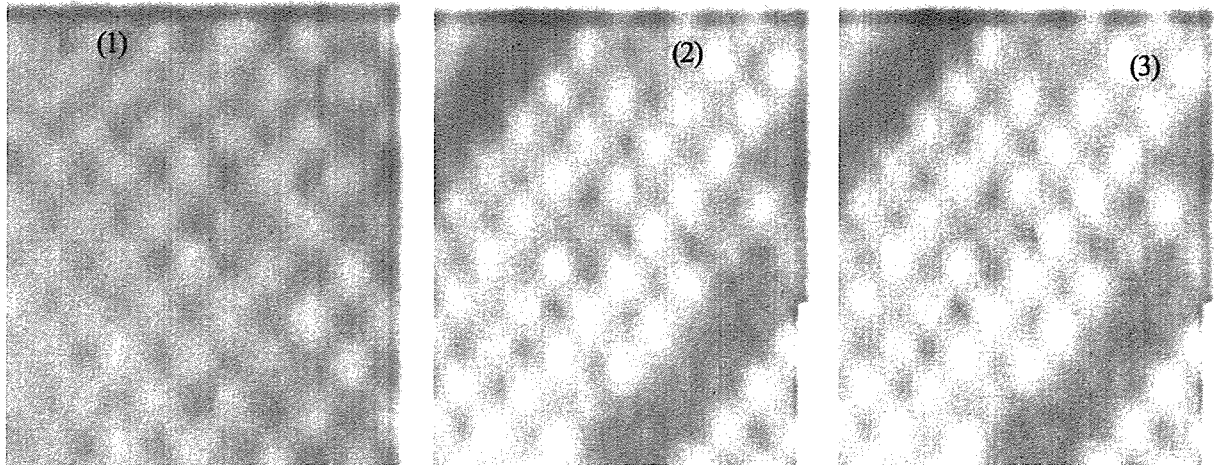


図4 Wien filter の3つの異なる収差条件で結像した。(1) Orthogonal 条件 (2) 2次収差補正 (3)3次収差補正

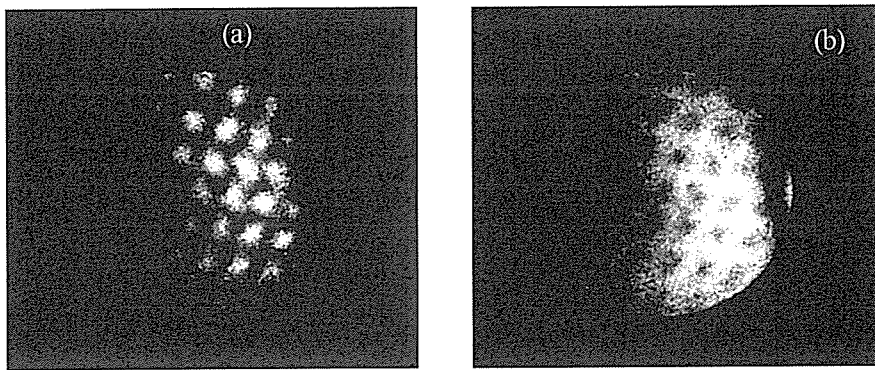


図5 Au Ta の選別像 Au 3f_{7/2}(a)および Ta3f_{7/2}(b)を用いて結像した EXPEEM

生体観察を目指した TEM エンバイロメンタルセルの開発

分担研究者 大貫惣明

北海道大学工学研究科教授

研究要旨 本研究においては、生体の含水組織の透過電子顕微鏡観察の方策として、いわゆる環境セル（エンバイロメンタルセル）を作成し、それをいくつかの試料に適用し、さらにエンバイロメンタルセルに改良を加えた。環境セルは現在までに種々の試みがあるが、十分な成果が得られてはいなかった。これは電子ビームに対する透過性で強度の高い真空隔膜の開発が鍵となっているためである。我々は、空気中あるいは高反応性のガス環境での観察を可能とするべく改良を行い、大気圧でも観察可能な装置を開発するにいたった。本報告はこの開発の状況を概説し、含水性の物質を観察するための方法などについても報告する。

A. 研究目的

生体の含水組織の透過電子顕微鏡観察の要望は高く、その方策として、いわゆる環境セル（エンバイロメンタルセル）の作成が試みられてきた。しかしながら、十分な成果が得られてはいない。これは電子ビームに対する透過性でかつ高強度の真空隔膜の開発が鍵となっているためである。我々は、反応性の高いガス環境での透過電顕観察、さらには含水性の生体試料の観察を目的としてエンバイロメンタルセルの作成・改良を行っている。その結果、大気圧でも観察可能な装置を開発するにいたっている。本報告ではこの開発の状況を概説し、含水性の生体を観察するための方途について、その経過について報告する。

B. 研究方法

図1は新たに開発した環境セルシステムの概観である。基本的には200kVの透過型電子顕微鏡（日本電子製 JEOL2010FAST-EM）の機能を損ねることなく、真空隔膜を備えたサイドエントリーホルダーを挿入している。また、ガス環境を制御するために、ここでは反応性のガスとして水素ガスを供給するシステムとつないでいる。このガス系を切り離すと、

基本的には大気圧の空気中での観察が可能となる。

図2-1は作成したクローズ型環境セルホルダー（室温型）の外観である。グリップ部分にガス導入口とコックがあることを除けば、通常の一軸ホルダーの寸法と全く同じである。図2-2はクローズ型環境セルホルダーと対物レンズや真空系の関係を示した概念図である。オープン型に比べて、電子顕微鏡本体の構造を変える必要がなく、ガス層厚が薄いため、電子散乱による像ボケが最小ですむという特徴があるものの、試料回りの構造が複雑になり、また、電子線透過能の高い真空隔膜の開発が重大問題であるとのデメリットもある。本研究のハード面でもっとも難しい部分は隔膜の開発とあって過言ではない。

図3は環境セルホルダーの先端部でセルの構成要素と試料とガス流入口を示したものである。試料は3mmφ×0.1mmのディスク状かナノ、ミクロンレベルの微粒子を選択できるが、本研究では微粒子を主に用いた。問題の隔膜は特注の200μm厚さのCuグリッド（中央部のみの60μm穴が集中する）の上に、15-20nm厚さのトリアセチロセルローズ膜を張り、その上を50nmのカーボン蒸着で補強した。したがって、電子線に対しては非晶質の2重構造膜が上下に1組あることになる。

上記の室温型の改良型として、200℃まで加熱でき

る加熱型のホルダーを作成した。図4はこの改良型の加熱クローズ環境セルホルダーの概観寸法図とヒーターなどの位置関係を示したものである。技術的課題は耐熱度の高い隔膜、真空シール、それからガスの放出であった。現時点では十分ではないが、隔膜を予備加熱することにより、耐熱性が改良された。発熱体はやや大きめにし、試料位置では十分な熱容量で熱伝達がある構造とした。熱電対は試料に出来るだけ近く配置した。これらの工夫により、約200℃まで安定した観察が可能であった。

①ガス化反応を見るため、代表的試料として水素反応性の高いMgの微粉末を用いた。まず、MgH₂粉末を真空中で約250℃、30分程度保持して脱水素化した後、活性な粉末表面を観察するために、Ar雰囲気グローブボックス中で室温型環境セル内に装填した。その後、TEMにより室温で最大0.1MPaの水素雰囲気中で連続的に写真撮影を行った。なお、水素以外にも1気圧の大気中でも観察は可能であった。

②大気水分との反応を見るために、代表的試料として石膏微粒子を用いた。これを同様に加熱型環境セルに装填した。この場合の環境は1気圧の大気である。

C. 研究結果

図5-1は水素導入前(左)と水素を導入して約30分後(右)のMg粒子の様子である。水素化に伴い粒子は10%程度膨張することが判明した。また、水素化微粒子には10-20nmの白いスポット構造が現れている。

図5-2は図5-1左右に対応する電子回折像である。水素化の進行によりリングの径が減少していることから、水素化によって格子間隔が増加したことがわかり、粒子が膨張した図5-1に対応する結果となった。また、MgH₂に対応するスポットパターンが現れることから、環境セルを用いてMgの水素化過程を直接観察できたと判断した。

図6は加熱型環境セルホルダーの応用例として、石膏微粒子を加熱型環境セルで観察したものである。図6-1は1気圧の大気中での室温の結果である。微粒子の明確な内部構造と結晶水を含んだ構造特有の楕円型の回折図形が観察できた。図6-2は150℃の大気中で観察した結果である。室温で観察された国

点状組織は消滅し、また、回折パターンも通常のリング状となった。これは加熱により結晶水を含む構造が分解したためと推定した。

D. 考察

1 気圧の大気中でも使用できる環境セルを開発することが出来た。また、200℃まで加熱可能なホルダーを製作することが出来た。この主たる理由は、薄く耐熱性のある隔膜を作成できたためである。セル内のガスによる電子散乱や隔膜構成元素による電子散乱は比較的軽微であり、十分な分解能が得られた。これはセル層の厚さを提言し、隔膜と支持グリッドに工夫をした結果と判断される。一方ではコンタミネーションもおおい場合があり、この対策は今後の課題である。

水素ガス雰囲気のほか、大気環境での観察が出来たのは含水性試料の観察を目的とする場合は、大きな進歩であった。今後は、生体への適用を試みたい。

E. 結論

生体の含水組織の透過電子顕微鏡観察の方策として、いわゆる環境セルを作成し、それをMgの水素化物形成過程や石膏の分解反応の観察に適用した。隔膜やグリッドの改良により、大気圧でも観察可能なシステムを開発することが出来た。Mgの水素化や大気加熱中で石膏の分解過程の観察に適用し、十分な分解能で観察できることを確かめた。今後は、隔膜の改良を重ね、また、低温ホルダーの作成を含めて、生体への適用を試みたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. S.Ohnuki, K.Takase, K.Yashiki, K.Hamada, T.Suda, S.Watanabe, In-situ Observation of Hydride Stability of Vanadium Alloys in Electron Microscope, Korean J. Electron Microscopy Special Issue 1,57-61 (2006)
2. S.Ohnuki, T.Yasuda, K.Yashiki, T.Suda, S.Watanabe, Dynamic and Static Hydrogen Effects on the Mechanical Properties in Vanadium Alloys Hydrogen in Matter: Second International Symposium on

2. 学会発表

1. S.Ohnuki, S.Ukai, ODS technology for developing new structural materials, 2nd Japan-Korea Workshop on "Fusion Material Engineering Toward Next Generation of Fusion Devices", Sapporo, 2006, 8/2-8/4
2. T.Nagai, N.Shiomi, K.Hamada, T.Suda, S.Ohnuki, S.Yamashita, N.Akasaka, S.Ukai, Effect of Minor Alloying Element on Dispersing Nano-particles in ODS Steel, The 16th International Microscopy Congress, Sapporo, 2006, 9/3-9/8
3. K.Okudera, N.Shiomi, K.Hamada, T.Suda, S.Ohnuki, Y.Kawai, Y.Kojima, In-situ Observation for Reaction of MgH₂-(Ni) Hydrogen Storage Material, The 16th International Microscopy Congress, Sapporo, 2006, 9/3-9/8
4. Wang, T.Suda, S.Hayashi, S.Ohnuki, T.Narita, Cross-cut Structure and Phases of Thermal Barrier Coating Layer in High Temperature Resistant Alloys, The 16th International Microscopy Congress, Sapporo, 2006, 9/3-9/8
5. S.Ohnuki, N.Shiomi, K.Washio, K.Hamada, Y.Kawai, Y.Kojima, In-Situ High-Resolution Observation for Decomposition of MgH₂-(Ni) Hydride, MRS Fall Meeting, Boston, 2006, 11/27-12/1
6. K.Washio, Y.Munekata, S.Ohnuki, H.Arashima, H.Itoh, Role of Annealing for Improving Hydrogen Storage Properties of T-Cr-V Alloy, MRS Fall Meeting, Boston, 2006, 11/27-12/1
7. Ohnuki, T.Nagai, Y.Uchida, K.Hamada, S.Ohtsuka, T.Yoshitake, Effect of Minor Alloying Element on Dispersing Nano-particles in ODS Steel, MRS Fall Meeting, Boston, 2006, 11/27-12/1
8. Okudera, K.Hamada, T.Suda, S.Ohnuki, Development of Environmental Cell and its Application to Hydrogen Storage Materials, MRS Fall Meeting, Boston, 2006, 11/27-12/1

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無

2. 実用新案取得

無

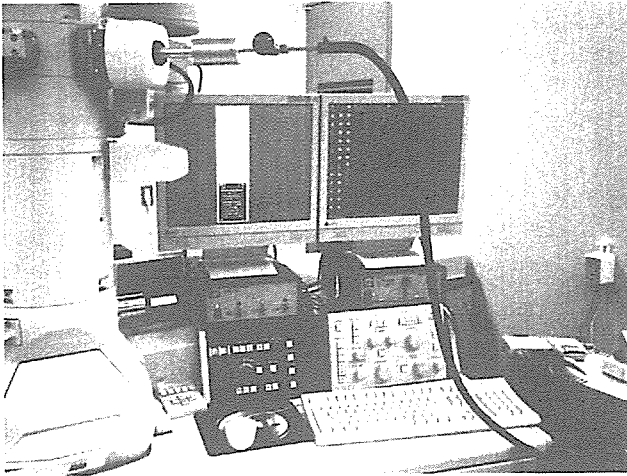


図 1-1

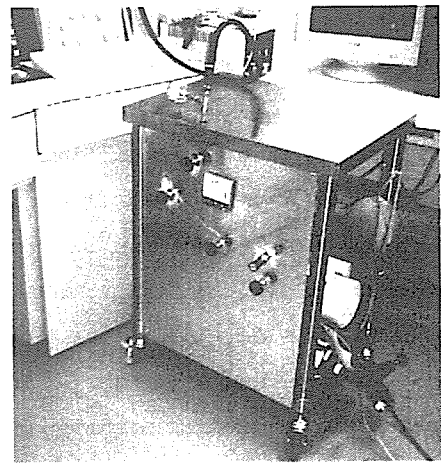


図 1-2

図 1 新たに開発した環境セルシステム (1-1: 200 kV 透過電子顕微鏡への挿入した概観、1-2: 水素供給システム)

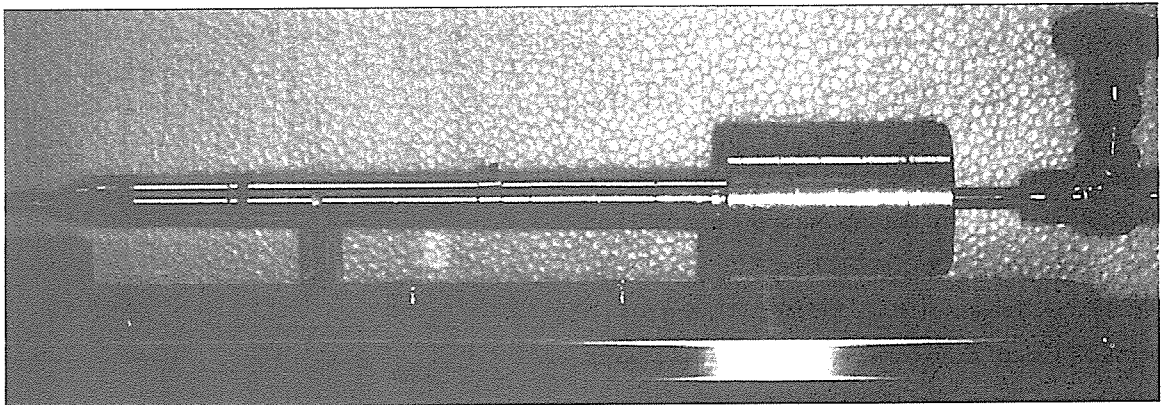


図 2-1

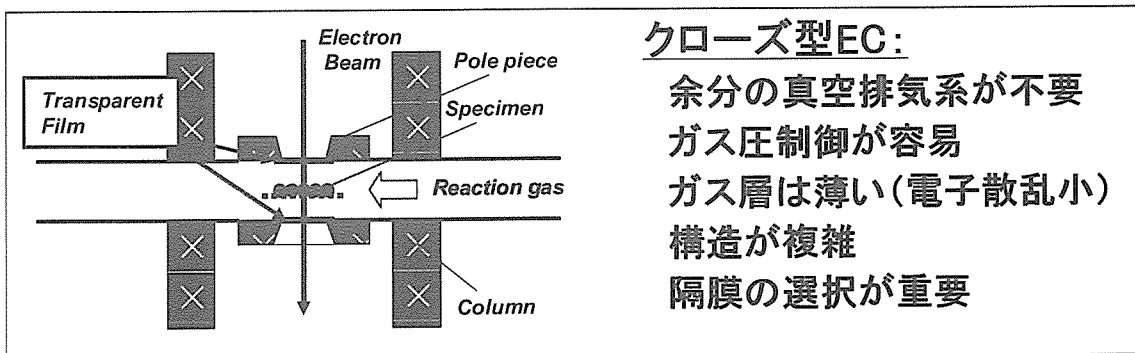


図 2-2

図 2 新規作成のクローズ型環境セルホルダー (2-1: 室温型ホルダーの概観、2-2: クローズ型環境セルホルダーの概念図)

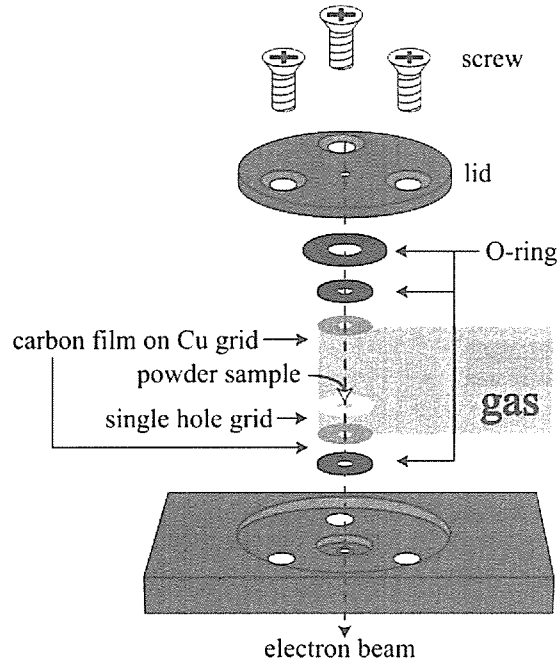


図 3-1

カーボン補強膜（厚さ約50nm）
 トリアセチルセルローズ膜（厚さ15～20nm）
 Cuグリッド（厚さ約200nm）

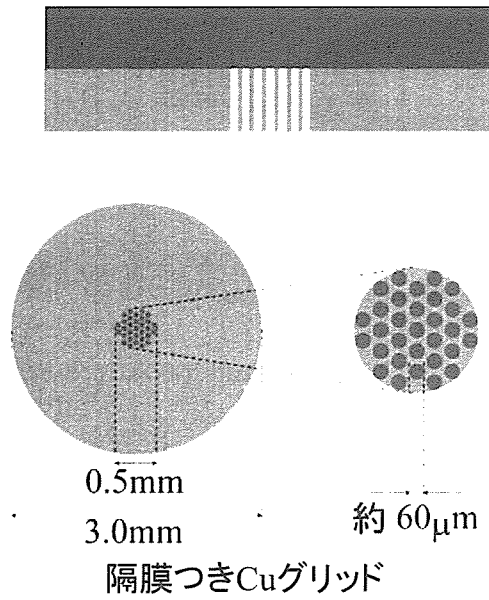


図 3-2

図 3 新規作成のクローズ型環境セルホルダーの先端部（3-1：セル構成要素と試料とガス流入口、3-2：隔膜形状と構成成分）

加熱ECホルダー設計図(全体)

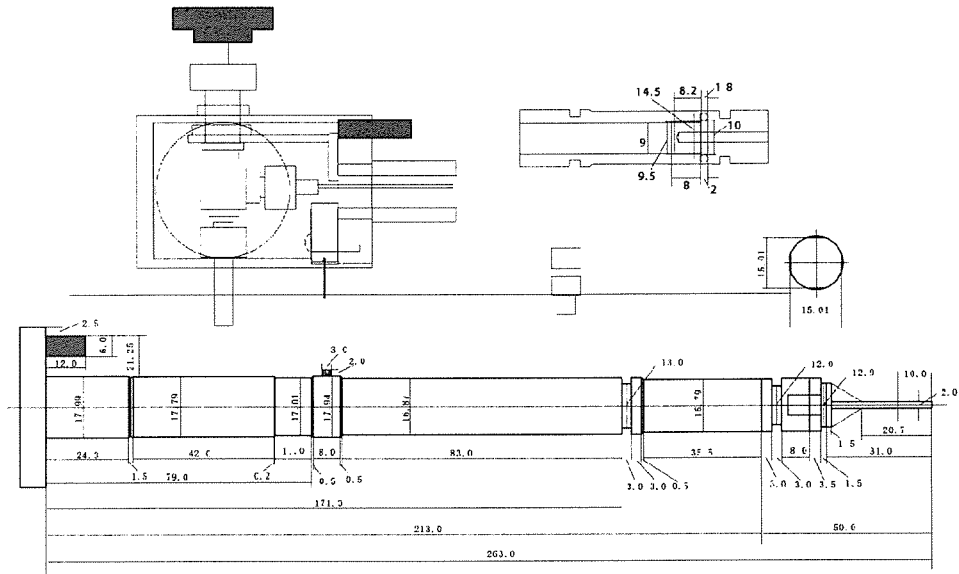


図 4-1

加熱ECホルダー設計図(先端部)

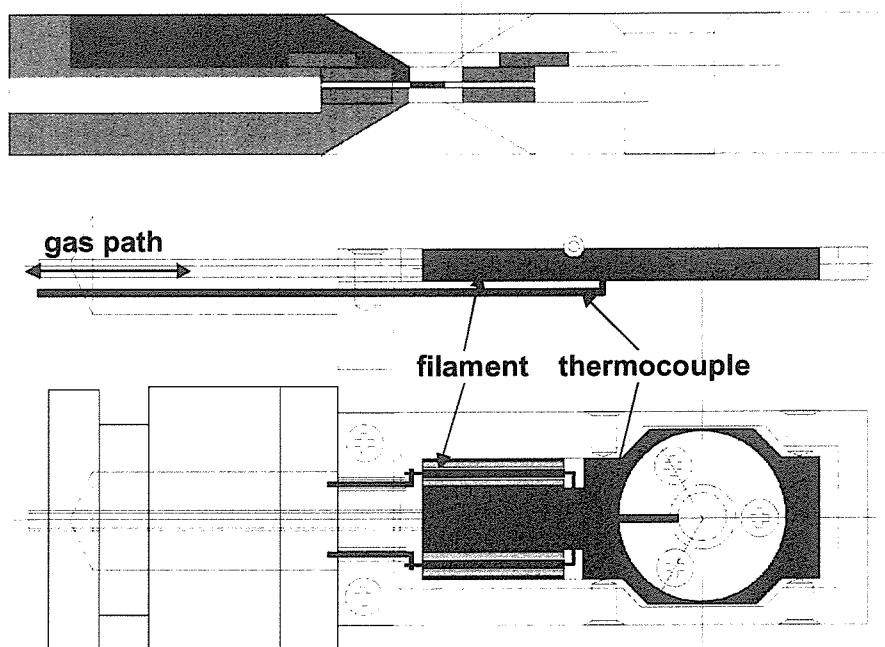


図 4-2

図 4 改良型の加熱クローズ環境セルホルダーの設計 (4-1: 概観寸法図、4-2: ヒーター、試料、熱電対の位置関係)

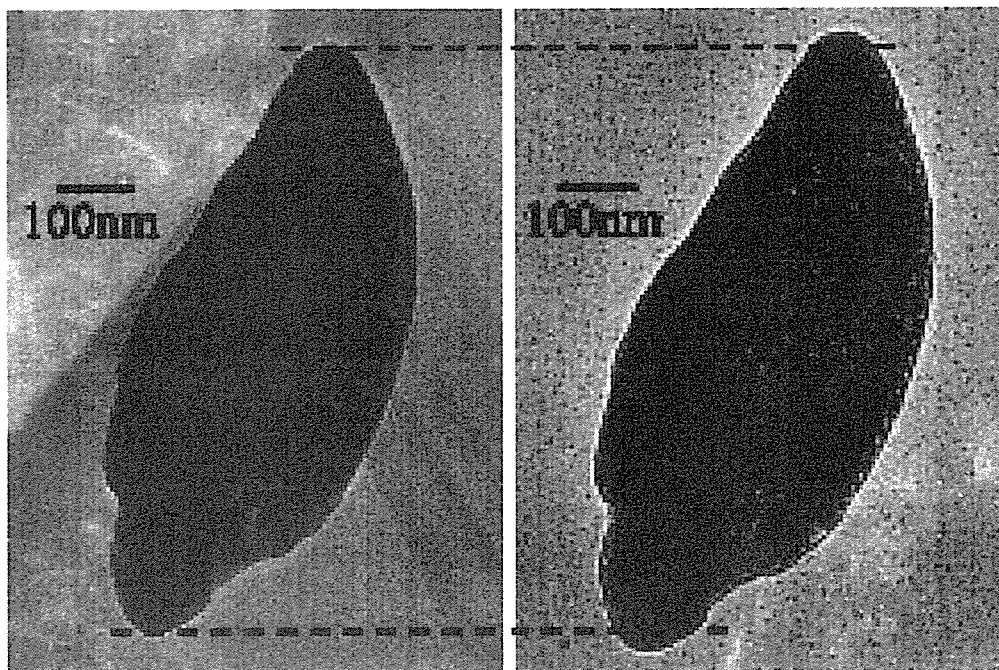
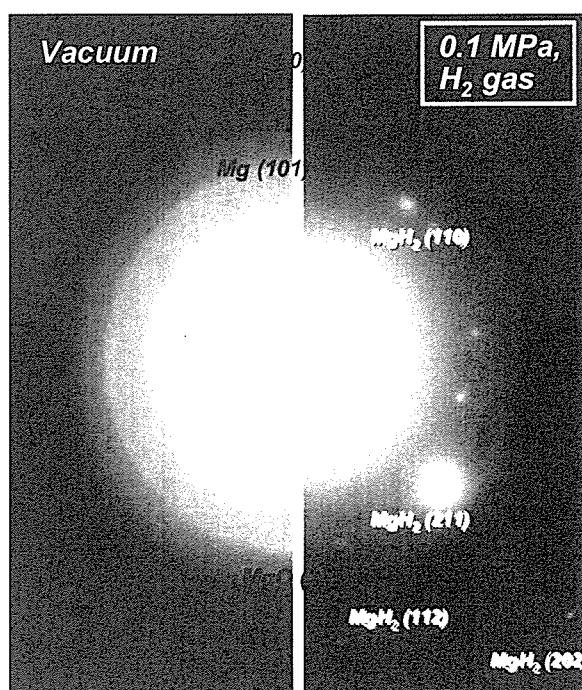


図 5-1



+ development of MgH_2 spots

+ successively confirmed the formation of MgH_2

図 5-2

図 5 室温型環境セルホルダーの応用例 (5-1: 脱水素化した Mg 微粒子の再水素化状態、5-2: 対応する電子線回折パターン)

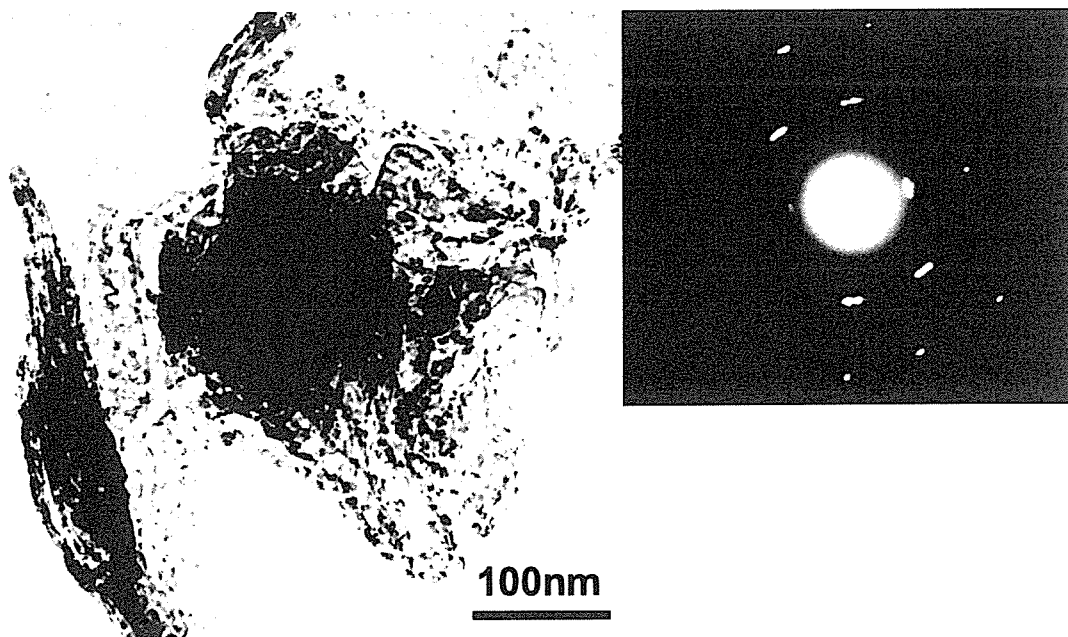


図 6-1

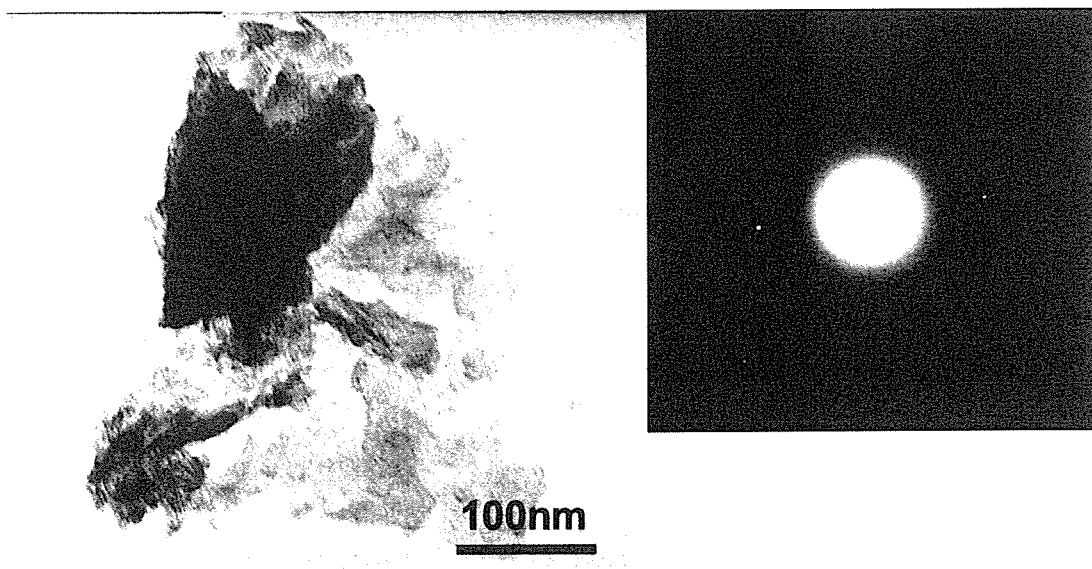


図 6-2

図 6 加熱型環境セルホルダーの応用例 (6-1: 空気環境の室温での石膏微粒子と電子線回折パターン。結晶水を含む構造である。6-2: 空気環境の 150°Cでの構造と電子線回折パターン)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

アパタイト修飾マイクロチタン粒子に関する研究

分担研究者 浅岡憲三

徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部教授

研究要旨 生体内移植器具は、先端医療の中で重要な役割を果たしている。現状の器官を対象としたデバイスから生体組織や細胞をターゲットにしたマイクロ・ナノマテリアルを新たに開発することが革新的低侵襲医療、予防医学の普及に欠かせない。この目的を達成するために、本研究では、金属系のマイクロバイオマテリアルとしてアパタイト被覆マイクロチタン粒子の作製とチタン微粒子焼結体を作製することを試みた。

これまでチタンが骨と融和する機構が生体内で、その表面にアパタイトを析出することにあることを明らかにし、融和を促進する方法を開発してきた。すなわち、チタンの表面特性に注目し、化学的な溶液浸漬法による表面処理法を開発した。本研究ではチタンの比表面積が大きくなれば、チタンの表面機能がより有効に発現することをチタン多孔体を用いて明らかにした。こうした一連の研究から、アパタイトをコーティングしたチタン微粒子が開発できれば、歯や骨のようなマクロな器官を対象としたデバイスではなく、組織や細胞をターゲットとしたマイクロ材料が開発でき、しかも極めて速い骨との反応が期待できる。また、アパタイト被覆チタン多孔体は、生体機能を付与した移植材料として、薬物やタンパクを徐放できる基礎素材として期待できる。

チタン粉末のアパタイトコーティングの方法については、化学的な前処理と擬似体液浸漬法によるプロセスが確立している。次年度以降、修飾したアパタイトの組成解析、アパタイトに添加する薬剤・タンパクの吸着、徐放特性を調べる。また、安全性の評価を、これまでの研究手法を踏襲しながら、実施する。治療に有効に寄与するタンパクや薬剤をアパタイト修飾チタンマイクロ粒子に含浸する方法とその評価の確立を今後の研究目標としている。

A. 研究目的

現用の移植治療、歯科治療は、局所的、微細な疾患がであっても器官、広い範囲の組織をターゲットとしたマクロな領域を対象とした治療であり、器官、組織への侵襲が大きい。生体の組織や細胞をターゲットにできるマイクロ材料が開発できれば、ある種の疾患は少ない侵襲で治療できる可能性がある。そ

こで、骨代替材料に利用されているチタンの比表面積が増大すると、表面特性が顕著に発現することに着目し、アパタイトで表面を修飾したマイクロチタン粒子を開発し、骨組織、骨細胞をターゲットとし、骨と短期間で融和する新規材料の開発を企画した。

他方、チタン多孔体の成形加工について、表面形状設計から、骨進入や骨との機械的吻合による安定

を目的とした多孔表面をもつ材料を焼結法により作製した。その後、放電プラズマ焼結により、生体機能物質（タンパクや薬剤）を含浸できる材料の開発を目標に、チタン焼結多孔体を作製する技術を開発した。また、チタンの表面修飾技術については、カルシウムイオンを含む溶液に浸漬する化学的前処理を施したチタンを、擬似体に液浸漬することにより、アパタイトで被覆する方法を開発した。

本研究では、チタンが生体親和性など特異な機能をもつことに着目し、チタン微粒子の表面をアパタイトで修飾した粒子を創る。アパタイトは物質吸着能をもつことから、この材料は薬剤やタンパクを乗せることができる担体となる。こうした材料の応用例は、例えば象牙細管や骨梁に運ばれると、添加物質を徐放しながら微視組織の疾患を治癒したり、組織と一体化したり、あるいは微細空間を閉鎖・結合する材料としての応用が考えられる。

本研究で目指しているようなチタンのマイクロ粒子が、細胞・組織に対して安全であるのか否かは、重要な問題であり、細胞培養試験、動物移植実験により基礎的なデータを獲得することが必要である。ここでの材料開発の研究に引き続き、今後、細胞培養試験、動物移植実験により基礎的なデータを獲得すると同時に、開発した材料の細胞毒性、骨内、皮下組織埋入試験により、その安全性を調べる計画である。特に、細胞、組織への影響を、粒子の大きさ、表面修飾物質との関係で研究を進める。

B. 研究方法

チタン多孔焼結体の作製

ガスアトマイズ法によって製造された粒度 $150\ \mu\text{m}$ アンダーの球状純チタン粉末(TIOP-150、住友チタニウム、尼崎)を、篩によって $100\sim 125\ \mu\text{m}$ に篩い分けし、実験に供した。篩には、遊星回転運動と電磁振動によって粉末を篩い分けることのできる電磁プラネットシェーカー (PS-200、株式会社タナカテック、大阪) を用いた。純チタン粉末の組成は、O:0.099%、Fe:0.033%、N:0.029%、H:0.009%、C:0.008% である。供試料粉末の粒度をレーザ回折・散乱式粒度分布測定装置 (LA-920、株式会社堀場製作所、京都) により、分散媒 (0.2%NaHMP+界面活性剤) 中において測定した。焼結体は直径 $5\ \text{mm}$ の貫通孔

を 10 個もつ炭素ブロック($\phi 50\times 30$)を用い、放電プラズマ焼結装置(SPS-511S、住友重機、新居浜)により焼結した。焼結条件を表1に、放電プラズマ装置、炭素ブロック、そして製作した試料を図1に示す。また、SPS 焼結体の焼結度を評価する目的で、試料の半数を真空高温焼鈍炉(HIT-2300SG、東京真空株式会社、東京)により 1000°C 、 10^3Pa の真空中で 24 時間焼結した。気孔率は、焼結試料の重量 (精度 0.1mg) と形状寸法から見掛けの体積を計算し、チタンの密度 ($4.53\text{g}/\text{cm}^3$) から見掛けの気孔率を求めた。焼結体の弾性係数、耐力および圧縮強度は、万能試験機(DDS-5000、島津、京都)を用いて測定した。

アルカリ・加熱処理と SBF 浸漬試験

チタン表面の化学修飾が擬似体液中でのアパタイト形成能を促進することを明らかにする目的で、焼結体にアルカリ処理をほどこした。すなわち、焼結体をアセトンとエチルアルコール中で約 15 分間超音波洗浄し、真空デシケータ内に約 24 時間保持し乾燥した。その後、試料を $5\ \text{mol}$ の水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) に浸漬し、 60°C に保った恒温槽内において 24 時間保持した。処理後、試料を蒸留水で洗浄し、電気炉を用いて大気中 600°C 、 1 時間加熱処理した。

市販純 Ti 円板 (直径 33mm 、厚さ 1mm) を参照試料として、アパタイト析出データを評価した。円板は #800 SiC 耐水ペーパーで研磨し、アセトンとエチルアルコール中で約 15 分間超音波洗浄、真空デシケータ内に約 24 時間保持し乾燥した。この円板に同様のアルカリ処理を施し、アパタイト析出に対する化学処理の効果を評価した。

アルカリ処理、およびアルカリ処理を施していない試料は体液の無機成分を模倣した擬似体液 (SBF) の一種である Hanks 液 (pH7.4) を使用し、各試料を 37°C に保った恒温槽内で 4 週間浸漬した。なお、pH の変化を防ぐために Hanks 液は 3 日ごとに交換した。ヒトの体液と SBF のイオン濃度を表2に示す。SBF 浸漬後、試料は蒸留水によって洗浄し、真空デシケータ内で乾燥した。その後、アパタイト析出による重量変化を 0.1mg の精度で測定した。試料表面は走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。なお、SEM 観察において、試料にはイオンスパッタにより金を蒸着させて観察した。

粒度と表面機能の関係

球状純チタン粉末(TIOP-45、TIOP-150、TIOP-250、住友チタニウム、尼崎)を供試料とした。粒度は篩を用いて $45\mu\text{m}$ 、 $100\sim 125\mu\text{m}$ 、 $212\sim 250\mu\text{m}$ の3種に篩い分けし、その後レーザ回折・散乱式粒度分布測定装置を用い、分散媒(0.2%NaHMP+界面活性剤)中において、粒度分布を測定した。前実験と同様の焼結条件で、直径5mmの貫通孔を10本もつ炭素ブロック($\phi 50\times 30$)を型とし、放電プラズマ焼結装置により焼結を行った。試料の気孔率を測定し、万能試験機により圧縮強度、弾性係数を求め、機械的性質を評価した。

試料にはアルカリ処理をほどこし、SBFに最大4週間浸漬し、アパタイトの析出と比表面積の関係について調べた。

C. 研究結果

機械的性質

チタン粉末の粒度分布測定結果を図2に示す。チタン粒子の直径は $34.3\sim 262.4\mu\text{m}$ の範囲にわたって粒度が分布していた。体積基準で測定した場合、最大頻度粒子径は $88.6\mu\text{m}$ であり、個数基準で測定した場合、最大頻度粒子径は $77.3\mu\text{m}$ であった。すなわち、篩い分けしても、所望する粒径以外の粒子が多く混在していた。

焼結試料の気孔率、弾性係数、および圧縮強度を表3に示す。各試料の気孔率は、ほぼ等しい値であった。SPS焼結試料の圧縮強度は110MPa前後であり、皮質骨(110-170MPa)よりわずかに低い値であった。しかし、焼きなました試料は大幅に強度が向上し、硬組織代替生体材料として十分に高い強度を持つことがわかった。この結果から、SPS焼結だけでは粒間の結合層を完全には形成できないことが示唆された。生体組織とチタンの力学的生体適合性を決める弾性係数は7~9GPaであり、皮質骨(17~20GPa)に近い値を示した。なお、純チタンの弾性係数は105~110GPaである。気孔率が弾性係数に影響し、熱処理によっては著しく影響されないため、この研究で行なった焼鈍では試料の弾性係数には直接影響しなかった。

SBF浸漬試験結果

SBF浸漬における試料の重量変化を、表4に示す。未処理の試料の重量増加はSPS試料で0.05%前後、焼きなまし試料で0.03%前後であったが、アルカリ処理を施すことで大幅に増加した。試料表面のSEM写真を図3、4に示す。焼きなますことにより、表面拡散による粒成長が見られ、チタン粉末の表面形態が変わっていることがわかる。焼きなましの有無、アルカリ処理の有無によるアパタイト析出については、アルカリ処理をほどこしていない試料は表面への析出物は観察されなかった。アルカリ処理をほどこした試料は、2週間浸漬の時点では試料表面への析出物少ないが、4週間浸漬することで試料表面へ多くの析出物が観察され、これが重量増加につながるということが明らかになった。薄膜X線回折法(TF-XRD)およびX線光電子分光分析装置(XPS)のデータから、この析出物は、骨類似のアパタイトであることが確認された。アルカリ処理をほどこすことでチタン表面にNaClのような他の析出物が付着する可能性が指摘されているが、本研究でアパタイト以外の析出物はみられなかった。

表5にアルカリ処理をほどこした各試料の、SBF浸漬による重量変化率を示す。比較のため、チタン円板を加えた。焼結体の重量変化は、円板の約100倍であり、優れたアパタイト析出能を有することが確認された。また、表5の結果から、アルカリ処理をほどこした試料をSBFに浸漬すると、4週目での重量増加が2週目より少ないことがわかる。すなわち、SBF浸漬中への溶出が起こっている可能性が示唆された。そこで、アルカリ処理をほどこした試料を蒸留水に浸漬して経過を観察した。その結果を表6に示す。重量変化率は0.3~0.4%であり、SBFに浸漬したときのアパタイトの析出量に較べれば少なく、大幅な差は観察されなかった。しかし、無処理およびカルシウムイオン水熱処理のSPS試料をSBF浸漬したときのアパタイト析出による重量増加量よりもここでの重量減は大きく、SBF中でのアルカリ処理後の修飾物の溶出についての検討が必要であると考えられた。

粒度と機械的性質の関係

チタン粉末の粒度分布測定結果を図5、6に示す。なお、 $150\mu\text{m}$ の粉末は図2に示してある。 $45\mu\text{m}$ の粉末の場合、 $4.5\sim 200\mu\text{m}$ の範囲にわたって粒度

が分布していた。体積基準で測定した場合、 $22.8\ \mu\text{m}$ であった。個数基準で測定した場合、最大頻度粒子径は $8.8\ \mu\text{m}$ であった。 $250\ \mu\text{m}$ の粉末の場合、 $88.6\sim 592.4\ \mu\text{m}$ の範囲にわたって粒度が分布していた。体積基準で測定した場合、最大頻度粒子径は $229.1\ \mu\text{m}$ であり、個数基準で測定した場合も、最大頻度粒子径は超音波の有無にかかわらず $229.1\ \mu\text{m}$ であった。

焼結試料の気孔率、弾性係数、および圧縮強度を表7に示す。気孔率は粒径が小さくなるにつれて減少し、圧縮強度は粒径が小さくなるにつれて増加した。また、どの試料も人間の皮質骨($110\text{--}170\ \text{MPa}$)と同等の圧縮強度を有することが確認された。弾性係数は $6\ \text{GPa}$ 前後であり、皮質骨 ($17\sim 20\ \text{GPa}$) よりも低い値を示した。すなわち、本実験で得られた気孔率の範囲では、弾性係数に大きく影響しないことが明らかとなった。

チタン粒子の粒度と SBF 浸漬試験

SBF 浸漬における試料の重量変化を表8に示す。粒径の減少とともに重量変化量は増大し、 $250\ \mu\text{m}$ の試料に対して、 $45\ \mu\text{m}$ の試料は6~8倍の重量変化を示した。各試料の SEM 写真を図7に示す。どの試料表面へも析出物が見られ、重量増加につながる事が明らかになった。 $150\ \mu\text{m}$ の試料は2週目までは表面への析出物が確認されなかったが、4週目では最も顕著な析出がみられた。また、薄膜 X 線回折法(TF-XRD)および X 線光電子分光分析装置(XPS)を使用した過去の研究データから、この析出物は、骨類似のアパタイトであることが確認された。

D. 考察

チタン焼結体の強度について

焼結体の弾性係数は、 $7\sim 9\ \text{MPa}$ であり、緻密骨よりも若干低い。焼きなましにより焼結を進めても弾性係数は $9\sim 12\ \text{GPa}$ とあまり高くならなかった。しかし、弾性係数は気孔率と関係することから、気孔率を下げるにより高くすることができる。また、骨よりも弾性係数が若干低いことは、骨置換材料として利用したときに、骨のリモデリングを考えると骨と調和をもった応力状態になり利点であると考えられる。曲げの弾性係数は圧縮の弾性係数より高く、

ほぼ骨と同じであった。一方で、強度は焼結を進めることにより飛躍的に高くなった。チタン多孔体は金属の優れた機械的性質を併せ持つところから骨置換材料としては十分な強度と結論した。SPS のみでは、均一な焼結体にはなっておらず、強度と延性が若干不足するが、SPS 後の焼きなましにより、優れた機械的をもつ焼結体を製作することが出来た。今後は、疲労強度について検討する予定である。

チタン焼結体の生体適合性について

チタンの SBF 浸漬において、チタン表面に骨類似アパタイトが析出するのは、チタン表面に形成されている酸化チタンの電気特性によるとされている。本研究ではこの表面特性を引き出すため、多孔体とすることで比表面積を増大させ、アパタイト析出量との関係性を評価した。粒子間の接合面積を考慮しない場合、多孔体の緻密体に対する比表面積 C 、粒子1個の表面積 p 、多孔体中の粒子の数 N 、見掛けの表面積 S とすると、チタン粉末の粒度と表面積との関係は以下ようになる。

$$C = \frac{p \cdot N}{S} \quad (1)$$

粒子の直径を m とすると、

$$p = 4\pi\left(\frac{m}{2}\right)^2 = \pi \cdot m^2 \quad (2)$$

見掛けの体積を V とすると、気孔率 $(1-k)$ は、

$$1-k = \frac{\omega \cdot N}{V} \quad (3)$$

ここで、 ω は粒子1個の体積である。表面積と体積の比を形状係数とすると、粒子1個に対して形状係数 z は、

$$z = \frac{p}{\omega} = \frac{6}{m} \quad (4)$$

であり、直径 d 、高さ h の円柱形の試料全体の見掛けの形状係数 H は、

$$H = \frac{2 \cdot (d + 2h)}{hd} \quad (5)$$

すなわち、

$$C = \frac{p \cdot N}{\omega \cdot S} (1-k) = \frac{z}{H} (1-k) = \frac{3hd}{m \cdot (d + 2h)} (1-k) \quad (6)$$

となる。

気孔率 30、50%に対する粒子直径と比表面積 C の

関係を図8に示す。ここで、焼結体の直径は5 mm、高さは10 mmとして計算した。粒子直径は比表面積Cを定める有効な因子であることがわかる。粒径が100 μm 以下になると、C値は急激に増加する。これは、100 μm 以下の粒径をもつ粉末を焼結体を使用した場合、チタンの表面機能が効果的に反映することを示している。

本研究において、焼結体の気孔率と粒度分布測定による粉末の平均直径は、それぞれ25~28%、約80 μm であった。試料の実表面積は、同サイズのチタン緻密体表面積の約40倍であり、約8000 mm^2 になっている。焼結体、焼きなました焼結対を2、4週間浸漬すると、単位面積当たりの重量変化はそれぞれ、 2.1×10^3 、 $2.0 \times 10^3 \text{mg/mm}^2$ 、 1.1×10^3 、 $1.1 \times 10^3 \text{mg/mm}^2$ となった。この値は4週間浸漬したチタン円板 ($7 \times 10^4 \text{mg/mm}^2$) の約3倍であった。図9は、アルカリ処理をほどこしSBF浸漬した試料のSEM写真(高倍率)である。チタン多孔体に多量のアパタイトを析出させることができ、これが重量増加につながったのではないかと考えられる。また、この写真より、アパタイトがチタンの表面のみならず、気孔の中にも析出していることがわかる。アパタイトはタンパク質や抗生物質などの薬剤を吸着する性質を持つため、チタン表面に修飾したアパタイトに抗生物質を含有させ、術後の周囲組織に抗感染能を付与させることが可能である。また、チタン多孔体を利用すればタンパク質や薬剤を、緻密体に比べて数百から数千倍含有させることになると考えられる。

SPS 試料と焼きなました試料で析出したアパタイト量に違いが出てきていることは、アルカリ処理前の多孔体粒子表面酸化チタンの構造が原因である。すなわち、SPS 試料は、低真空中で焼結していることから表面被膜が厚いルチル構造であり、SBF 浸漬によって表面エネルギーが高くなり、水酸基が増大したことが原因と考えられる。一方、高真空中で焼きなました試料は表面の酸化チタン被膜が薄く、アルカリ処理による表面改質が不十分であったことが原因であると推測できる。したがって、生体適合性を有効に発現するためには、チタン表面にルチル構造の被膜を作る酸化熱処理が有効であると結論した。

チタン焼結体の粒度と強度の関係

焼結体の圧縮強度は、粒径が減少するにつれて若干増大する。これは、粒径の減少によって気孔率も減少し、より緻密体に近くなったためである。一方で、焼結体の弾性係数は6 GPa 前後であり、皮質骨よりも若干低く、気孔率の違いによる変化は見られなかった。すなわち、SPS による焼結では粒間の結合が完全でないことが示唆された。しかし、骨よりも弾性係数が若干低いことは、骨置換材料として利用したときに、骨のリモデリングを考えると骨と調和をもった応力状態になり利点であると考えられる。また、SPS 後に焼きなますことにより、機械的性質は制御が可能である。

チタン焼結体の生体適合性について

理論式から、粒径が100 μm 以下になると、比表面積が急激に増加することがわかる。これは、100 μm 以下の粒径をもつ粉末を焼結体を使用した場合、チタンの表面機能が効果的に反映されると考えられる。粒子直径と比表面積の関係を示したグラフに、本研究で用いた粉末の粒径を重ね合わせたものを図10に示す。粒径が45 μm 未満である場合、気孔率によって比表面積が急激に増加しているのがわかる。粒径が212~250 μm の場合、気孔率による違いはほとんど見られない。これら三種類の試料の比表面積と重量変化率を検証することによって比表面積とアパタイト析出量の関係の評価し、優れた生体適合性を得るために有効な粒径を考察した。理論式より求めた単位面積あたりの重量増加率を表9に示す。ここでは、前章同様に参考試料として#800 SiC 紙で研磨し、アルカリ処理をほどこした市販のチタン円板を加えて評価している。その結果、チタン焼結多孔体はチタン円板に対して2倍以上の重量増加が明らかとなった。チタン焼結多孔体のみで比較した場合、粒径が100~125 μm の試料が最も高い重量増加率を示し、表面積の最も大きい45 μm の試料を上回った。すなわち、粒径が小さくなれば表面積が増大するが、アパタイト析出量の増加には影響しないことが明らかとなった。粒径が小さくなると粒間の結合部が増加し、気孔サイズが小さくなる。そのため、SBF の浸透が困難になり、完全にアパタイトが析出しないと考えられる。逆に粒径が212~250 μm の場合は、表面積が小さくなってアパタイト析出量も減少する。

酸化膜がアナターゼで厚さが均一であると仮定した場合の被膜の厚さ(t)を、重量増加率($\Delta w/S$)から、 $t = (\Delta w/S)/(\rho \text{O}_2/\text{TiO}_2)$ の式を用いて計算した。その結果を図11に示す。計算結果から、どの試料も0.3 μm ~0.5 μm の膜厚を持っていることが分かった。膜厚は100~125 μm の試料が最も厚く、表面酸化被膜の電気特性が顕著に現れたため、アパタイトが多量に析出したと考えられる。したがって、アパタイトの析出を促進し、優れた生体適合性を得るためには、粒径100~125 μm が最も有効であると結論した。

E. 結論

チタンの表面修飾はその表面酸化被膜に依存するため、多孔構造であるチタンの比表面積の増加によって、SBF浸漬におけるアパタイトの析出が促進される。チタン粉末をSPSによって焼結することで、骨に近い弾性係数を持ち、高強度で多量のアパタイトを修飾、含浸可能であることが実証された。その結果、力学的生体適合性と生物学的生体適合性を兼ね備えた多孔焼結体を製作することができた。アパタイトはタンパク質、あるいは抗生物質のような薬剤を吸着できるため、本研究で製作した多孔焼結体を使用し、大量のタンパク質あるいは抗生物質を吸着・含浸したインプラント基材ができることが明らかになった。

チタンの生体適合性の付与には、表面酸化被膜が重要な役割を果たしている。そこで、チタンの比表面積が生体適合性におよぼす影響を検討するため、異なる粒径をもつ三種類のチタン粉末を使用し、チタン焼結多孔体を製作した。その結果、機械的性質については製作したチタン焼結多孔体は骨と同等の圧縮強度、弾性係数を有し、生体材料として十分な強度をもっていることがわかった。SBF浸漬による試料の表面積とアパタイト析出量の関係についての実験結果は、チタン焼結多孔体でチタン円板の2倍以上の重量増加を示し、優れたアパタイト析出能を持つことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kenzo Asaoka and Kunimitsu Maejima : Effect of surface oxide films on degradation of titanium, *Materials Science Forum*, Vol.539-543, pp.3649-3654, 2007

2. Y Sakamoto, K Asaoka, M Kon, T Matsubara and K Yoshida: Porous titanium compacts as biomaterials for hard tissue replacement. *Porous Metals and Metal Foaming Technology (JIMIC4)*, pp.55-58, 2006
3. 坂本裕紀, 瀬崎英孝, 吉田憲一, 浅岡憲三: チタンの耐食性と機械的性質に及ぼす熱処理の影響. *日本歯科産業学会誌* 20(2) 3-13, 2006.
4. K Yokoyama, T Ogawa, K Asaoka and J Sakai: Hydrogen Absorption of Titanium and Nickel-Titanium Alloys During Long-Term Immersion in Neutral Fluoride Solution. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 78B(1) 204-210, 2006.
5. T Ogawa, K Yokoyama, K Asaoka and J Sakai: Effects of moisture and dissolved oxygen in methanol and ethanol solutions containing hydrochloric acid on hydrogen absorption and desorption behaviors of Ni-Ti superelastic alloy. *Materials Science and Engineering A* 22(1-2) 218-226, 2006.
6. K Yokoyama, T Ogawa, K Asaoka and J Sakai: Fracture of sustained tensile-loaded Ti-0.2% Pd alloy in acid and neutral fluoride solutions. *Materials Science and Engineering A* 419(1-2) 122-130, 2006.
7. Y Sakamoto, K Asaoka, M Kon, T Matsubara and K Yoshida: Chemical surface modification of high-strength porous Ti compacts by spark plasma sintering. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 16(2) 83-91, 2006.

2. 学会発表

1. 浅岡 憲三: マイクロチタン粒子のキャラクタリゼーション. ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発研究班会議、鳴門、2007
2. 和田 晃, 吉田憲一, 浅岡憲三: チタン補綴物の研削に関する基礎的研究 日本機械学会中国四国支部 第45期総会・講演会予稿集、徳島、2007
3. 浅岡 憲三: 生体内のチタンと水素, 材料における水素有効利用研究会, Vol.18, p27, 沖繩、2006
4. 浅岡 憲三: アパタイト修飾マイクロチタン粒子の開発, ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会、札幌 2006
5. 浅岡 憲三: チタン摩耗粉・微粒子と体内動態, ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発研究班会議, 支笏湖、2006
6. 浅岡 憲三: 金属系バイオマテリアルの機能設計, 歯科における産学連携講演会、大阪、2006
7. 浅岡 憲三: 10年後の歯科医療への提言、— 歯科理工学と関連領域とのコラボレーション: 歯科理工学の立場から: 金属材料は—, *日本歯科理工学会近畿・中四国支部夏期セミナー*, 2006
8. 林 裕史, 吉田 憲一, 浅岡 憲三: チタン粉末の比表面積とアパタイト修飾特性に関する研究, *日本歯科産業学会誌*, Vol.20,

No.1, 57 頁, 北九州, 2006

9. 坂本 裕紀, 瀬崎 英孝, 吉田 憲一, 浅岡 憲三: チタンの熱処理, 腐食と機械的性質に関する研究, *日本歯科産業学会誌*, Vol.20, No.1, 56 頁, 北九州, 2006

10. 横山 賢一, 浅岡 憲三: 中性フッ化ナトリウム水溶液に長期間浸漬した Ti 合金の水素吸収, *歯科材料器械* Vol.25, No.2, 174 頁, 東京 2006

11. 浅岡 憲三: チタンと水素, *チタンと歯科臨床*, Vol.4, No.1, 39 頁, 郡山, 2006

12. 藤原 江美, 今 政幸, 浅岡 憲三: リン酸カルシウムセメント中へのストロンチウムアパタイトの導入, *日本バイオマテリアル学会大会予稿集* Vol.28, 東京, 2006.

13. Kenzo Asaoka and Kunimitsu Maejima: Effect of surface oxide films on degradation of titanium, *International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials (THERMEC 2006)*, Vancouver, July 2006.

14. Akira Wada, Kenichi Yoshida and Kenzo Asaoka: Grinding efficiency of titanium by dental abrasive. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 65, Awaji, 2007.

15. Emi Fujihara, Fumiaki Kawano, Kenichi Hamada and Kenzo Asaoka: Preparation of strontium-containing Hydroxyapatite bone cements mixed with strontium. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 66, Awaji, 2007.

16. Yuki Sakamoto, Hidetaka Sezaki, Kenichi Yoshida and Kenzo Asaoka: Relationship between corrosion and mechanical properties of annealed titanium. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 67, Awaji, 2007.

17. Yoshihito Naito, Daisuke Nagao, Kenichi Hamada, Kenzo Asaoka and Tetsuo Ichikawa: High formability of newly developing biomedical porous titanium. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 68, Awaji, 2007.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特記すべき事項なし

2. 実用新案取得

特記すべき事項なし