Bio-MEM 用チタン合金マイクロ針のスパッタ創製と評価*

仲町 英治^{*1}, 神人 智^{*2}, 上辻 靖智^{*1}
槌谷 和義^{*3}, 山本 英毅^{*4}Sputter Generating and Characterization of
a Titanium Alloy Microneedle for Applying to Bio-MEMEiji NAKAMACHI^{*5}, Satoshi JINNINN, Yasutomo UETSUJI,
Kazuyoshi TSUCHIYA and Hidetake YAMAMOTO^{*5}Department of Mechanical Engineering, Osaka Institute of Technology,
5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585 Japan

The purpose of this study is to generate and characterize a microneedle that can be equipped in Bio-MEM which is applied to a developing HMS (Health Monitoring System) for the blood sugar level measurement. One of the most important subject to Bio-MEM is a microneedle with a inner diameter of 25 μm and a outer one of 50 μm , which mimics female mosquito's painless blood extraction mechanism. In this study, the microneedle generation was performed through (1) selection of a biocompatible material from titanium alloys by the cytotoxic assay, (2) RF magnetron sputter generating of the microtubes with a inner diameter of 25 μm , a outer one of 50 μm and a length of 2 mm, and (3) evaluation of the stiffness and strength by the bending tests. Consequently, the Ti-15 Mo-5 Zr-3 Al alloy microneedle generated by sputtering is not cytotoxic and possessed the practical stiffness and strength.

Key Words: Bio-MEM, Biomaterials, Microneedle, Biocompatibility, Nonferrous Metal, Titanium Alloy, Material Design, Sputter Forming, Material Testing

1. 緒 言

従来の医療用注射針は、針の外径が数百 μm 以上と大きく穿刺時に皮膚組織を損傷するため、患者に肉体的および精神的苦痛を与えている。また、注射針の材料として剛性、強度および耐食性に優れた SUS304 (Fe-18Cr-8Ni) が一般的であるが、主元素の鉄(Fe)には細胞毒性があるため⁽¹⁾、生体適合性に問題を残す。そこで「低侵襲」と「生体適合性」を満足する医療用マイクロ針の創製技術の開発が進んでいる。例えば、低侵襲の観点から岡野工業(株)とテルモ(株)は、プレス加工に基づき量産可能な SUS304 マイクロ針(先端部外径 200 μm 、内径 100 μm)を開発した。また、生体適合性の観点から、青柳⁽²⁾は体内で加水分解するポリ乳酸を用いたマイクロ針の開発を手掛けている。

そこで、本研究では、血糖値計測用マイクロマシン(Bio-MEM)への実装を目指し、低侵襲と生体適合性が両立可能なマイクロ針の創製を目指した。低侵襲では

雌蚊の採血機構に着目した極小針の寸法設計を行い、また生体適合性では細胞毒性がほとんどないチタンを主元素とした合金(Ti-15Mo-5Zr-3Al)をマイクロ針用材料に選択した。しかしながら、慣用注射針創製法ではチタン合金製マイクロ針の加工は困難である。そのため本研究では、寸法形状の制約を受けず、異種金属の積層成形が可能な RF マグネトロンスパッタリングを用いたスパッタ堆積法に基づくマイクロ針の創製技術の開発を行った。さらに、創製したチタン合金マイクロ針の剛性および強度の曲げ試験による評価を行った。

2. 生体模倣設計

2.1 寸法設計 マイクロ針設計の第 1 の要件は低侵襲による無痛採血であり、それは皮膚組織と針寸法に關係する。人皮膚の断面構造概略を図 1 に示す。人皮膚は表面から表皮(scarfskin)、真皮(corium)および皮下組織(subcutaneous organization)の三層構造であり、皮下組織中 2mm 程度の深さには外径 100 μm 以上の末梢血管(peripheral blood vessel)がある。触覚(Meissner's corpuscle and Merkel's disc)と圧覚(Pacinian corpuscle)は 1 cm^2 当り 25 個程度、痛覚(free nerve end)は 1 cm^2 当り 100 個から 200 個程度分布する。朝倉らは市販注射針を用いて外径と長さが小さいほど痛みを感じにくいことを報告している⁽³⁾⁽⁴⁾。しかし、針の寸法低下は採血

* 原稿受付 2005 年 7 月 11 日。

^{*1} 正員、大阪工業大学工学部(☎ 535-8585 大阪市旭区大宮 5-16-1)。^{*2} 学生員、大阪工業大学大学院工学研究科。^{*3} 正員、東海大学工学部(☎ 259-1292 平塚市北金目 1117)。^{*4} 正員、(財)京都高度技術研究所(☎ 600-8813 京都市下京区中堂寺南町 134)。

E-mail: nakamati@med.oit.ac.jp

時の管路抵抗の上昇を招く。針の寸法設計の制約条件は血液中の血球成分が容易に通過可能な内径である。血液は血球成分と血漿(plasma)が液体中に分散する懸濁液(suspension)であり、正常人血液では血球成分が全体積の35%から50%を占めており⁽⁹⁾、赤血球の直径は $8\mu\text{m}$ から $10\mu\text{m}$ である⁽⁹⁾。以上のことから、針の内径は最低 $10\mu\text{m}$ 以上を必要とすると考えた。

Fig. 1 Sectional structure of human skin.

さらに、本研究では自然界の無痛採血機である蚊の針を模倣しマイクロ針の寸法設計を行った。雌アカイエ蚊の針の SEM 写真を図 2 に示す。図 2 の計測値によりマイクロ針の内径を $25\mu\text{m}$ とし、強度を考慮して外径を $50\mu\text{m}$ とした。また、皮膚穿刺の必要ストロークを末梢血管への到達可能距離の 2mm とし、取り付け寸法を考慮して針の長さを 3mm とした。

Fig. 2 SEM images of a female mosquito's labium (microneedle).

2.2 材料選択 マイクロ針設計の第 2 の要件は長期間の生体内使用の場合にも組織に悪影響を及ぼさない生体適合性であり、評価としては細胞毒性試験の結果を採用する。マイクロ針材料は皮膚組織を貫通する穿刺力に耐える剛性と強度を持つ必要があり、それらについては、金属材料を用いることにより設計目的

に適合すると考える。本研究で採用する合金材料の生体適合性評価では、材料からの溶出物および溶出量が問題となる。さらに、生体に及ぼす毒性、刺激性、発癌性および血液成分の非破壊性等の生物学的な安全性も課題である。そのため溶出した金属イオンの毒性が問題であり、鉄(Fe)、バナジウム(V)、コバルト(Co)、ニッケル(Ni)等の細胞毒性元素⁽⁷⁾を含まないことを選択基準とした。そこで本研究では、生体適合性に優れたチタン(Ti)を主元素とし生体適合元素のみで構成されたチタン合金^(8, 9)をマイクロ針材料とした。現在すでに市販あるいは研究開発が進んでいる医療用チタン合金^{(10) (14)}を表 1 に示す。医療用合金の主流は V を含む Ti-6Al-4V ELI 合金であるが、アルミニウム(Al)、ジルコニウム(Zr)、モリブデン(Mo)およびニオブ(Nb)等の生体適合元素のみにより構成された合金も人工関節用材料として臨床応用されつつある^{(15), (16)}。本研究では、表 1 より細胞毒性元素を含む合金を除外し、熱処理による強度向上が最も期待できる β 型結晶構造を持つ合金である Ti-15Mo-5Zr-3Al をマイクロ針材料に選択した。

Table 1 Properties of titanium and its typical alloys for medical use

Material	Crystal structure	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)
Ti	α type	102	735
Ti-6Al-4V ELI	$\alpha + \beta$ type	125	976
Ti-6Al-4V	$\alpha + \beta$ type	112	860
Ti-6Al-6V-2Sn	$\alpha + \beta$ type	110	1060
Ti-6Al-7Nb	$\alpha + \beta$ type	115	900
Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo	$\alpha + \beta$ type	120	815
Ti-5Al-2.5Fe	$\alpha + \beta$ type	110	1020
Ti-15Zr-4Nb-2Ta-0.2Pd	$\alpha + \beta$ type	100	671
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd	$\alpha + \beta$ type	105	883
Ti-15Mo-5Zr-3Al	β type	80	1250
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr	β type	82	975
Ti-29Nb-13Ta-2Sn	β type	78	650
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	β type	75	1000

2.3 細胞毒性の評価 2.2 節のとおり選択したチタン合金(Ti-15Mo-5Zr-3Al)について、L929 細胞(マウス線維芽組織由来細胞)を用いた細胞毒性試験を行った。試料は培地(control)、標準材料 A, B および Ti-15Mo-5Zr-3Al の 4 種類を用いた。なお標準材料 A, B は「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験

のガイドライン」⁽¹⁷⁾に基づいた。初期細胞数を 2000 個とし、細胞計測期間を計測開始日、1 日後、3 日後、5 日後、および 7 日後の一週間とした。なお、control は細胞実験に使用した培地 (Eagle's MEM + 7.5% NaHCO₃ + 3% Glutamine + FBS) より、製造した抽出液を用いた細胞実験値である。各材料の細胞数の変化を図 3 に示し、それに対応する細胞の顕微鏡写真を図 4 に示す。図 3、図 4 より、Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金は培地および標準材料 B とほぼ同じ細胞数の変化を示していることがわかる。よって、Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金に細胞毒性はなく、生体適合性に優れていることが確認できた。

Fig. 3 Growth curves of L929 cells.

Fig. 4 Actual states of L929 cells by a microscope (x300).

3. 創製技術の開発

3.1 スパッタ創製法 チタン合金(Ti-15Mo-5Zr-3Al)は難加工材であるため、引拔や圧延等の慣用の冷間鍛加工法によるマイクロ針の創製が困難である。そこで本研究では

異種材料の積層構造によるマイクロ針の強度向上の可能性に期待して、薄膜創製法の中では材質や形状による制約が少なく、ハイブリッド積層構造が創製可能なスパッタ堆積法^(18, 19)を用いマイクロ針の創製技術を開発した。スパッタ堆積法には、イオンビームスパッタおよび2極スパッタ等もあるが、他のスパッタ堆積法に比べて高成膜速度を得ることができるRFマグネトロンスパッタ法を用いた。RFマグネトロンスパッタ装置の真空チャンバ内に取り付けたマイクロ針創製機構の概要を図5に示す。

Fig. 5 Apparatus for sputter generating of microneedles.

本研究の Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金マイクロ針の創製法はつぎのとおりである。

(1) 基板材である銅心線上にエッチング用の被覆材として純チタンを 10 分間(1.0 μm)成膜した。スパッタ装置チャンバ内で銅心線を回転させて成膜を行った。成膜条件は出力電圧 300W、ガス雰囲気: Ar、およびチ

チャンバ内圧力 2Pa であった。

(2) 上記(1)と同じ成膜条件で、Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金を 2 時間成膜した。

(3) 上記(1)と同じ成膜条件で、Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金の外表面被覆材として再び純チタンを 10 分成膜した。

(4) 溶体化時効処理として、電気炉により 735℃で 20 分間加熱し水中で急冷(溶体化処理)した後、真空炉により 500℃で 5 時間加熱し炉中で徐冷(時効処理)した。

(5) 硝酸を用いて銅心線を除去することにより、マイクロ針を中空状態にした。

以上の創製過程において、工程(1), (2), (4), (5)による創製品と工程(1), (4), (5)による創製品(ただし成膜時間 2 時間)の表面品位を比較した。すなわち、Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金表面の SEM 像を純チタンのそれとの比較を図 6 に示す。純チタンマイクロ針と比較すると表面が滑らかで、成膜時の基板材料である銅心線も除去されていることがわかる。

Fig. 6 SEM images of microneedles generated by sputtering.

3.2 成膜組成の検証 スパッタ堆積法によって成膜した Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金の薄膜組成を検証した。ガラス基板上に表 2 に示す条件で合金を成膜し、ターゲット材と成膜試料の組成を蛍光 X 線分析装置(XFS)により計測した。その結果、各元素のスパッタ率の違いのため、成膜合金の組成がターゲット材の組成から大きく変動した。そこで成膜中に合金組成を補正するため、ペレット材を図 7 に示すとおり配置した。不足元素のペレット材面積は、式(1)、式(2)により求めた。ターゲット材、ペレット材無しスパッタおよびペレット材有りスパッタによる合金薄膜の組成を表 3 に示す。

Table 2 Sputtering conditions

Input power	300W
Pressure (Ar : O ₂ = 20 : 0)	2Pa
Substratum	SiO ₂
Sputtering target	Ti-15Mo-5Zr-3Al

$$P(A \cup B) = P(A) + P(B) - P(A \cap B) \quad (1)$$

$$P(A \cap B) = P(B) P(A/B) = P(A) P(B/A) \quad (2)$$

P(A) : Area of metal after sputtering

P(B) : Area of pellet

P(A ∩ B) : Duplication area of P(A) and P(B)

Fig. 7 Arrangement of additional pellets on sputtering target.

表 3 より、ペレット材による補正はターゲット材の組成をほぼ満足した。

Table 3 Composition of titanium alloy analyzed by XFS

Material	Sputtering target material (%)	Sputtering without pellets (%)	Sputtering with pellets (%)
Ti	77.4	89.57	78.5
Mo	15.4	5.25	14.8
Zr	4.34	2.32	3.84
Al	2.41	2.57	2.04

3.3 成膜速度の検証 内径 25μm、外径 50μm のマイクロ針を創製するため、スパッタ堆積法によって成膜する Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金の薄膜厚さは 12.5μm になる。合金の成膜時間を決定するため、成膜時間と膜厚の関係を計測した。ガラス基板上に表 2 と同じ条件で合金を成膜し、触針型膜厚計測器による計測結果を図 8 に示す。図 8 より、外径 50μm を得るための成膜時間は 2 時間であることがわかった。

Fig. 8 Relationship between film thickness and sputtering time of titanium alloy.

3・4 熱処理温度の検証 Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金は溶体化時効処理により高強度を得る。森口ら⁽²⁰⁾は、735℃で溶体化処理を行い、その後 500℃で時効処理を行うことにより表 1 に示す高強度の Ti-15Mo-5Zr-3Al が得られるとしている。そこで本研究では、膜厚 10 μ m 程度でのこの溶体化時効処理の有効性を検証するため、溶体化処理温度と、ヤング率および硬さの関係を調べた。表 2 と同条件で銅基板に 2 時間の成膜を行い、電気炉により溶体化処理を行った。溶体化処理温度は 680℃, 730℃, 780℃, 830℃の 4 条件とし、ナノインデントを用い負荷荷重 1000N で Ti-15Mo-5Zr-3Al 薄膜のヤング率および硬さを計測した。計測結果を図 9 に示す。図 9 より、溶体化処理温度 730℃付近においてヤング率 87.5GPa、硬度 8.3GPa でともに最大値になり、溶体化処理温度 735℃に従う結果を得た。そこで本研究においても溶体化処理温度を 735℃とした。

Fig. 9 Relationship between Young's modulus, hardness and treatment temperature of titanium alloy.

3・5 エッチング処理の検証 湿式エッチングの検証として、内径 25 μ m と 50 μ m の純チタンマイクロ針(肉厚 12.5 μ m, 長さ 3mm)を用いた硝酸(濃度 60%)による銅心線の除去時間を計測した。エッチング時間と銅心線の残量の関係を図 10 に示す。エッチング開始直後は、銅心線の断面積が大きい内径 50 μ m の針の方がエッチング速度は速い。銅の表面のみが酸化し安定な酸化銅になるためと考えられる。その後、エッチング速度は著しく減少する。しかし、酸化銅を取り除くと再びエッチング速度は回復した。純チタンで被覆すればチタン合金の結果も同じと考え、エッチング時間を 48 時間とした。湿式エッチングによる銅心線除去確認のための円管内流水実験概要を図 11 に示す。マイクロマニピュレータを操作し、マイクロピペット(外

径 10 μ m の極細ガラス管)の先端を両面接着テープで固定したマイクロ針内に挿入し、マイクロインジェクタで注水して他端からの排水を確認した。

Fig. 10 Relationship between remaining weight of copper and etching time by HNO_3 .

Fig. 11 Verification of midair state of microneedle after etching by the water flow, injected by the micropipette of a 10 μ m diameter.

4. 剛性と強度の評価

本スパッタ創製法で製作したマイクロ針が穿刺時に折損しないことの評価として、より大きな許容応力を用いて安全を期すため穿刺力(法線方向反力)の 20%の反力が皮膚表面との摩擦に伴い接線方向に作用することを仮定して⁽²¹⁾、曲げ試験により、最大曲げ応力およびヤング率を推定した。除振台上にマイクロ天秤とマイクロマニピュレータを設置

した曲げ試験装置を図 12 に示す。マニピュレータのアーム部先端(固定端)にマイクロ針を接着剤で固定し手動で降下させマイクロ針の自由端にたわみを与えた。一方、マイクロ針天秤上にカッターの刃先(自由端)を固定し、マイクロ針との接触によりマイクロ針天秤に生じる反力を計測した。マイクロ針の境界条件を図 13 に示す。マイクロスコープで確認しながらマイクロ針のスパンを 2mm に設定した。

Fig. 12 Experimental setup for bending of a microneedle.

P: Reaction force [N]
 y: Applied deflection [m]
 L: Span [m]
 I: Moment of inertia of area [m⁴]
 Z: Modulus of section [m³]

Fig. 13 Boundary conditions for bending of a microneedle.

$$E = PL^3 / 3Iy \quad (3)$$

$$\sigma = PL / Z \quad (4)$$

反力-たわみ線図の線形部分に式(3)を用いヤング率を算出し、反力の最大値に式(4)を用い曲げ強度を算出した。スパッタ装置真空チャンバ内の試料支持面上のマイクロ針創製用銅心線配置を図 14 に示す。図 14 に示すとおり、試料支持面上でマイクロ針の創製域を中央部と外周部に区別した。計測結果を表 4 に示す。中央部ではヤング率 67.6GPa、曲げ強度 612MPa を得たが、外周部ではヤング率が約 70%、曲げ強度が約 65% にそれぞれ低下した。これはチャンバ内のスパッタ率が均一でないため、チャンバ中央部のみにヤング率および曲げ強度に良好な成膜条件を得たと考えられる。

Table 4 Measured mechanical properties

Young's modulus E [GPa]		Bending strength σ [MPa]	
Inner region	Outer region	Inner region	Outer region
67.6	47.7	612	397

Fig. 14 Relationship between sputtering regions of microneedles on sample folder and sputtering target.

そこで、SUS304 製のマイクロ針(外径 100 μ m、内径 50 μ m、長さ 4.0mm、先端 12.0deg 研磨)を用いた皮付き生鶏肉に対する穿刺実験結果⁽²²⁾による穿刺時最大曲げ応力 594MPa(穿刺深さ 1.5mm)を曲げ応力の評価基準として、本マイクロ針の曲げ強度 612MPa は満足する結果を得た。さらに、穿刺荷重値の実験式より外径 50 μ m、内径 25 μ m の円管では推定値として 10mN を得、横荷重の推定値は 2mN となった。曲げ試験における破断時の横荷重は 3.5mN であった(平均たわみ量 310 μ m)。以上の結果から、本チタン合金マイクロ針は穿刺に十分耐えうると判断した。

5. 結 言

雌蚊の無痛採血を模倣した Bio-MEM 用チタン合金マイクロ針を創製・評価し、以下の知見を得た。

- (1) 細胞毒性試験を行い、非鉄金属の候補材料の中で生体適合性に優れたチタン合金 Ti-15Mo-5Zr-3Al をマイクロ針用材料に選択した。
- (2) RF マグネトロンスパッタ装置を用いた試作を行い、スパッタ創製法による内径 25 μ m、外径 50 μ m のチタン合金マイクロ針が製作可能になった。
- (3) スパッタ創製法により製作したチタン合金マイクロ針の曲げ試験を行い、曲げ強度として皮膚への穿刺に十分な 612MPa を得た。

謝 辞

本研究は、科学技術振興機構・京都市地域結集型共同研究事業「ナノメディシン拠点形成の基盤技術開発」の腕時計型デバイスの創製に関する成果の一部である。

参考文献

- (1) Kawahara, H., Yamagami, A. and Nakamura, M., Biological Testing of Dental Materials by Means of Tissue Culture, *Int. Dent. J.*, **18-2**, (1968), 443-467.
- (2) Aoyagi, S., *Medical Technology*, **32-3**, (2004), 232-233, (in Japanese).
- (3) Asakura, T., Ishikawa, Y., Yasue, N., Nozaki, S., Kiyono, H. and Abe, R., *Practice*, **15-4**, (1998), 428-432, (in Japanese).
- (4) Asakura, S., Nozaki, S., Kiyono, H. and Abe, T., *Jpn. Soc. of Hospital Pharmacists*, **36-4**, (2000), 37-40, (in Japanese).
- (5) Hayashi, K., *Biomechanics*, Corona Publishing, (2000), 120, (in Japanese).
- (6) *Biomechanics*, Jpn. Soc. of Mech. Eng., (1991), 65, (in Japanese).
- (7) Kawahara, H., *Jpn. Inst. Met.*, **31**(1992), 1033-1039.
- (8) Kawahara, H., Ochi, S., Tanetani, K., Kato, K., Isogai, M., Mizuno, Y., Yamamoto, H. and Yamagami, A., *Shika Rikogaku Zasshi*, **4-6**, (1963), 65-85.
- (9) Okazaki, Y., Ito, A. and T. Tateishi, T., *Annual report of mechanical engineering laboratory*, **46-5**, (1992), 397-416.
- (10) Kawabe, Y., *Materia Japan*, **37-1**, (1998), 17-21, (in Japanese).
- (11) Nishimura, T., *Metal*, **65-7**, (1995), 78-81, (in Japanese).
- (12) Shinya, M., *Sokeizai*, **43-10**, (2002), 8-14, (in Japanese).
- (13) Okazaki, Y., Moto, K., Ito, Y. and Tateishi, T., *The J. Jpn. Institute of Metals*, **59-10**, (1995), 1078-1083, (in Japanese).
- (14) Niinomi, M., Fukui, H., Hattori, Y., Kyo, K. and Suzuki, A., *Materia Japan*, **41-3**, (2002), 221-223, (in Japanese).
- (15) Matsushita, T., *Titanium*, **51-1**, (2003), 29-32, (in Japanese).
- (16) Okazaki, Y., *DE*, **142**, (2002), 13-16, (in Japanese).
- (17) Supervised by Medical Devices Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Japan Ministry of Health and Welfare, *Guidelines on basic biological tests for medical instruments and biomaterials*, (1996), Yakujinippou Publishing, (in Japanese).
- (18) Wasa, K. and Hayakawa, S., *Handbook of sputter deposition technology*, Noyes Publications (1992).
- (19) Cuomo, J.J., Rossnagel, S.M. and Kaufman, H.R., *Handbook of ion beam processing technology*, Noyes Publications (1989).
- (20) Nishimura, T., Nishigaki, M. and Moriguchi, Y., *R&D Kobe Steel Engineering Reports*, **32-1**, (1999), 52-55, (in Japanese).
- (21) Maeno, T., Kobayashi, J. and Yamazaki, N., *Trans. Jpn. Soc. Mech. Eng. Reports (C)*, **63-607**, (1997), 881-888, (in Japanese).
- (22) Tsuchiya, K., Nakanishi, N., Kometa, T., Uetsuji, Y., Mori, K. and Nakamachi, E., *Trans. Jpn. Soc. Mech. Eng. Reports (C)*, **71-702**, (2005), 603-609, (in Japanese).