

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592915

研究課題名(和文)紫外線によるアパタイトの高機能ナノバイオ界面制御法の開発

研究課題名(英文) Development of a high-performance nanobiological interface control method for bioactive surface modification of hydroxyapatite with UV/ozone

研究代表者

阿部 泰彦 (Abe, Yasuhiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：00253097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、アパタイトの生体活性化表面改質への紫外線オゾン処理法の有用性を検証し、高機能ナノバイオ界面制御法を開発することである。5分間の紫外線オゾン処理は、生体活性化表面の汚染除去およびぬれ性を向上させ、その効果は7日間維持でき、さらに、骨芽細胞の接着・増殖を向上させることが明らかとなった。したがって、紫外線によるアパタイトの高機能ナノバイオ界面制御法を開発できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the effect of UV/ozone treatment on hydroxyapatite and establish the high-performance nanobiological interface control method for bioactive surface modification of hydroxyapatite. The 5-minute UV/ozone treatment could validate for the surface decontamination, the improvement and 7-day maintenance of wettability, and the acceleration of the adhesion and proliferation of MC3T3-E1 cells. Therefore, the UV/ozone treatment for the interface control between hydroxyapatite and bone was developed.

研究分野：歯科補綴学，生体材料学

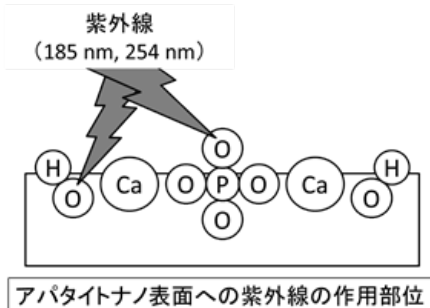
キーワード：生体材料 セラミックス ナノバイオ 表面・界面物性 アパタイト 紫外線

1. 研究開始当初の背景

アパタイトは、生体骨と直接結合する生体活性を有する特徴から、骨補填材としての用途のみならず、組織工学や再生医療の足場材料 (scaffold) として再生医工学分野で高く評価されている。また、リン酸三カルシウム (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 以下, β -TCP) は、アパタイトに比較して強度は劣るものの、溶解度が高いことから生体吸収性を有し、骨と置換されるためアパタイトと同様に臨床応用されている。近年、これら両者の特徴を有するアパタイト/ β -TCP 複合体による生体骨との骨結合を促進させる研究が盛んに行われているものの、臨床では骨との置換よりも空間保持能を優先する観点からアパタイト単体で応用されている現状がある。

紫外線における 100 ~ 280 nm の短波 (UV-C) は、金属、高分子、セラミックス材料に対して、表面洗浄や表面改質の作用を有することから、近年、医工学分野での応用が盛んである。なかでも、チタンインプラントへの紫外線照射は、表面の汚染除去のみならず、表面の水酸基を増加させる表面改質によってぬれ性を向上させ、早期のオッセオインテグレーションの獲得に寄与するとの報告もある。しかしながら、アパタイトに対する紫外線照射では表面洗浄効果に関する報告が僅かにみられるだけで、表面改質としての効果に関する研究はなく、未だその作用メカニズムは明らかでない。

我々は、アパタイト表面の Ca/P 比を変化させ溶解性を高めるナノバイオ表面改質法 (生体活性化表面改質法) を確立し、その際、254 nm の紫外線を照射することでその改質表面の活性が安定化し維持されることを X 線光電子分光法 (ESCA) にて確認した。そこで、紫外線 UV-C には、オゾン生成する 185 nm のオゾン線とオゾンを分解する 254 nm の殺菌線が含まれることに着目し、これら紫外線を連続照射することで発生する原子状の酸素は強力な酸化作用を有するため、この酸素がアパタイトナノ表面へ与える影響について、下図のごとく作用部位 ($-\text{OH}$, $-\text{PO}_4$) の仮説を立て検索することで作用メカニズムを解明することとした。



2. 研究の目的

(1) アパタイトナノ表面への紫外線 (185 nm, 254 nm) 作用メカニズムを解明する。

(2) アパタイトナノ表面の Ca/P 比を改質し、そのナノ表面を紫外線で制御することが、骨芽細胞の動態へどのように影響するかを解析し、表面改質法を確立する。

以上より、紫外線によるアパタイトの高機能ナノバイオ界面制御法を開発する。

3. 研究の方法

(1) アパタイト (以下, iHAP) プレート (10 mm × 10 mm × 2 mm; APP-101, Pentax, 東京, 日本) に対して、紫外線オゾン (以下, UV/O₃) 処理法にて、0 (コントロール), 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60, 120 分処理したものを試料とした。各処理時間における試料表面について、ESCA により表面元素分析、接触角計によるぬれ性を評価した。また、ぬれ性について、3, 5, 10, 30, 60, 120 分の各処理における 1, 3, 5, 7 日後のぬれ性を評価し、UV/O₃ 処理法の効果の持続性についても検証した。

次に、HAP を 30% リン酸溶液 (H_3PO_4 ; Sigma-Aldrich Japan, 東京, 日本) にて、25 分間処理し、超純水 (MilliQ water) で洗浄した生体活性化表面改質アパタイト (以下, HAP-30%PA) に対して、UV/O₃ 処理法にて、0 (コントロール), 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60, 120 分処理したものを試料とした。各処理時間における試料表面について、同様に、表面元素分析、ぬれ性評価を行った。また、ぬれ性について、5 分処理における 1, 3, 5, 7 日後のぬれ性を評価し、UV/O₃ 処理法の効果の持続性についても検証した。

得られたデータは、one-way ANOVA および多重比較 Tukey 法を用い、有意水準 5% で統計学的分析を行った。また、同一文字で有意差なしを示した。

(2) HAP-30%PA を 5 分間 UV/O₃ 処理した試料 (UV/O₃ 処理群) と未処理の試料 (コントロール) 上に、MC3T3-E1 細胞を播種、37 °C, 5% CO₂ 下にて培養した。培養期間は 1, 3, 5 日とし、Cell counting kit-8 assay (Dojindo Lab., 熊本, 日本) を用いて、接着・増殖を解析した。

得られたデータは、Student's *t*-test を用いて、有意水準 1% で統計学的分析を行った。

4. 研究成果

(1) UV/O₃ 処理の作用メカニズム

iHAP の Ca/P 比は、UV/O₃ 処理により変化しなかった。また、コンタミネーション由来の C 量は、処理時間の増加に従い漸減し、処理時間 1 分、4 分、10 分、60 分で有意に変化した (図 1)。さらに、処理時間 10 分以降で、C 量は 10.0 at.% 以下となり汚染除去の効果が認められた。

ぬれ性は、処理時間の増加に従い向上し、処理時間 5 分以降で有意な変化

はなく安定した(図2)。また、処理時間60分以降で、ぬれ性は7日間有意な変化なく効果は持続していた(図3)。

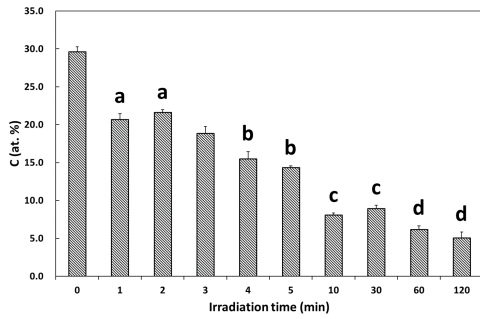


図1 iHAPのUV/O₃処理後のC量

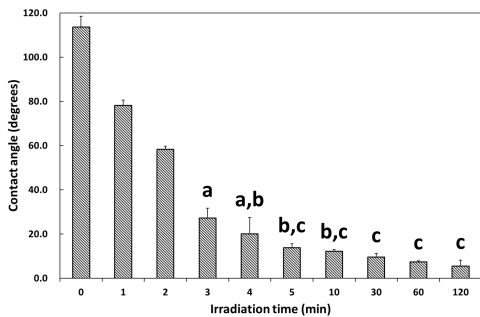


図2 iHAPのUV/O₃処理後の接触角

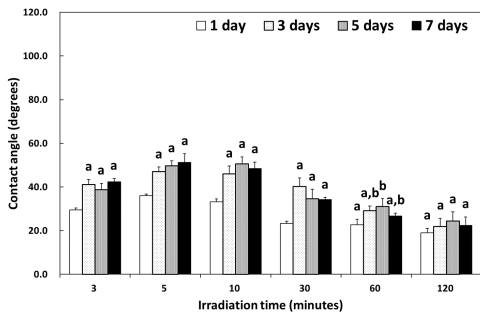


図3 iHAPのUV/O₃処理後7日間の接触角

HAP-30%PAのCa/P比は、UV/O₃処理により変化しなかった。また、コンタミネーション由来C量は、処理時間の増加に従い漸減し、処理時間5分以降で、C量は10.0 at.%以下となり汚染除去の効果が認められ、有意な変化なく安定した(図4)。

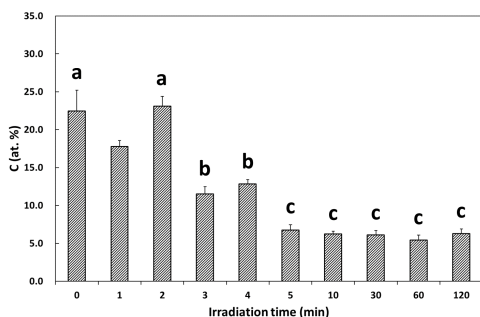


図4 HAP-30%PAのUV/O₃処理後のC量

ぬれ性は、処理時間の増加に従い向上

し、処理時間3分以降で有意な変化はなく安定した(図5)。また、処理時間5分で、ぬれ性は7日間有意な変化なく効果は持続していた。

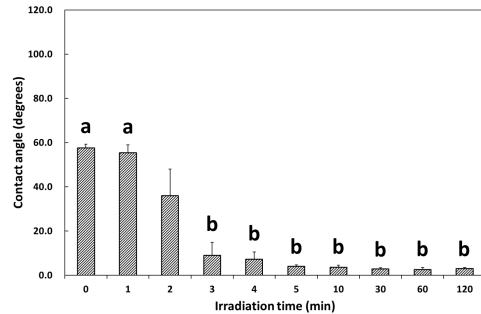


図5 HAP-30%PAのUV/O₃処理後の接触角

以上よりHAP-30%PAに対するUV/O₃処理法における適切な処理時間は5分であることが明らかとなった。

(2) UV/O₃処理HAP-30%PAに対するMC3T3-E1細胞の接着・増殖

UV/O₃処理群およびコントロールのいずれにおいても、培養期間の経過に従って接着・増殖が認められた(図6)。また、培養3,5日においてUV/O₃処理群はコントロールに比べ有意に増加し、特に、培養5日ではその差が大きくなった。UV/O₃処理法は、MC3T3-E1細胞の接着・増殖において有用であることが明らかとなった。

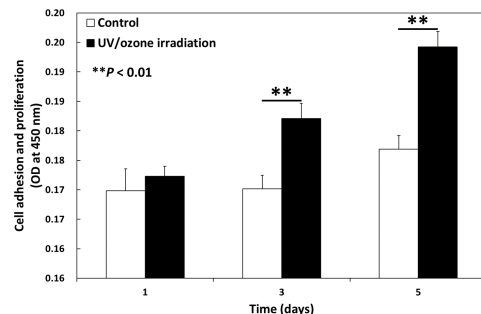


図6 MC3T3-E1細胞の接着・増殖

以上の(1)および(2)の結果より、紫外線によるアパタイトの高機能ナノバイオ界面制御法を開発できた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- Okazaki, Y., Abe, Y., Yasuda, K., Hiasa, K. and Hirata, I., Osteoclast response to bioactive surface modification of hydroxyapatite, Open Journal of Stomatology, 査読有, 4, 2014, 340-344, DOI: 10.4236/ojst.2014.47047
- Abe, Y., Okazaki, Y., Hiasa, K., Yasuda, K., Nogami, K. Mizumachi, W. and Hirata, I., Bioactive surface

modification of hydroxyapatite,
BioMed Research International
(Journal of Biomedicine and
Biotechnology), 査読有, 2013, 2013,
Article ID 626452, 9 pages,
DOI:10.1155/2013/626452

〔学会発表〕(計1件)

1. 保田啓介, ハイドロキシアパタイトの生体活性化表面改質への紫外線オゾン処理の効果, 第123回日本補綴歯科学会学術大会, 2014年5月24-25日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 泰彦 (ABE YASUHIKO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授
研究者番号: 00253097

(2) 研究分担者

平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号: 40346507