

令和元年5月23日現在

機関番号：83906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06786

研究課題名(和文) 骨芽細胞活性の高い表面電荷制御型超親水性チタンの開発

研究課題名(英文) Development of surface potential-controlled Ti with high osteoblast activity and hydrophilicity

研究代表者

橋本 雅美 (Hashimoto, Masami)

一般財団法人ファインセラミックスセンター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：20450851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素分圧下の窒素雰囲気中で純チタンを熱処理するだけで、生成したルチル型酸化チタンの表面がpH7付近の水溶液中で正、負またはゼロに帯電していることを確認している。また、これらの正または負に電位を有する表面上では、HAp形成能と骨芽細胞分化能の両方が、未処理やゼロ電荷の酸化チタンより向上することを確認した。これは、細胞接着性のタンパク質であるフィブロネクチンの吸着だけでなく、水酸化アパタイトの構成成分であるCaおよびPの吸着が生じているためと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

純チタンの生体活性に関しては、酸素分圧を制御した窒素雰囲気中での熱処理によって酸化チタン中の窒素含有欠陥を制御した報告例は無く、窒素含有欠陥の有効電荷を変化させる取り組みも我々のグループ以外には無い独創的なものである。さらに純チタンに吸着するタンパク質の形態も表面電位の違いによって異なると考えられ、純チタンの窒素含有欠陥制御 表面電位制御 タンパク質吸着形態解明といった一連の生体分子の吸着課程の経時変化が明確となり、生体活性の本質を理解した材料設計を可能にした。

本技術は、健康寿命を延伸し、生活の質を生涯にわたり保つことが可能になるばかりでなく、医療費、介護サービス費の削減が期待できる。

研究成果の概要(英文)：MC3T3-E1 cell differentiation and related surface potentials of rutile-type TiO₂ scales formed on Ti are controlled by varying the Ti heat treatment conditions in a N₂ atmosphere containing a trace amount of O₂. The zeta potentials of the samples heated at 873 and 973 K for 1 h show large negative and positive values, respectively, while cell differentiation on the surface is enhanced in both cases (14 days incubation). In the case of untreated Ti, the cell differentiation diminishes and the zeta potential becomes more neutral. Protein detection and Ca and P detection, rather than an adhesive protein such as fibronectin, predominantly adsorbed on the scales formed in 1 h at 873 and 973 K, respectively. In the case of untreated Ti, fibronectin, but no Ca and P were detected. The present findings illuminate the relationship between charged surfaces and MC3T3-E1 cellular response.

研究分野：材料工学

キーワード：表面電位 酸化チタン 窒素含有欠陥 骨芽細胞 水酸化アパタイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、歯科用インプラントや椎体用の人工骨材料等として使用されている純チタン表面の親水性が空気中で長期間保管しても劣化せず、加えて、持続して骨芽細胞活性を高い状態に保つための表面処理技術の確立を行う。純チタン表面の親水性の劣化は、空気中での保管時に炭素等の有機物質が吸着するためと考えられる。そのため、現状では、純チタンは生理食塩水に浸漬した状態で保管し、出荷されている。

純チタンの表面が超親水性を発現するためには、表面に存在する酸化膜に水分子が吸着する酸素欠損サイトが存在することが必要である。また、一般に生体材料を体内に埋入すると、体液中の水分、無機イオン(Ca, P等)、生体分子(タンパク質等)および細胞と接触するが、まず材料表面に吸着した水の構造(order か disorder、赤外可視和周波発生分光測定で評価可能)の違いによって、タンパク質の種類や構造も異なり、そのため細胞接着能に影響を与えることが報告されている。しかし、純チタンの表面電荷を制御することにより、高い親水性を長期間持続させ、さらに優れた骨芽細胞活性を発現させる表面処理技術に関しては全く報告されていない。これまでの研究で我々は、低酸素分圧下の窒素雰囲気中で純チタンを熱処理するだけで(酸窒化処理)、生成したルチル型酸化チタン層(窒素固溶)の表面が、pH7 付近の水溶液中で正に帯電していることを確認している。これは、電子エネルギー損失分光法および第一原理計算結果から、窒素が酸化チタン中の酸素サイトを置換した $N_2(o)$ として存在し、有効電荷が+2 であるためと考えられた。一方、この酸窒化処理を酸化チタン粒子に適用した場合には、水溶液中(pH7 付近)で粒子表面は負に帯電していた(平成 25~27 年度基盤 C(一般)25420767)。これは電子スピン共鳴法の結果から、酸化チタン中の Ti^{4+} が Ti^{3+} に変化し、酸素空孔が生成し、その酸素空孔と水との反応によって表面が酸性になるためと考えられた。また、酸化チタン中に窒素は含まれていなかった。また、水接触角は、酸窒化処理チタン上では 15° と純チタンの 50° と比較し、高い親水性を示すことを確認している。

このように、純チタンの表面電荷を低酸素分圧下での熱処理によって制御可能であり、このことによって、水溶液中での水との相互作用が変化することによる親水性の発現、また吸着水の構造の変化さらにはその表面に吸着するタンパク質の種類や構造が変化することによって、骨芽細胞の接着、増殖に変化が生じることを期待した。

2. 研究の目的

本研究では、純チタンを低酸素分圧下で熱処理することにより、多くの酸素空孔を導入し、加えて表面電荷を制御(正、負、ゼロ)することで、親水性および細胞接着性を飛躍的に向上させ、さらにその機能が長期間持続可能な純チタン表面を作製することを目的とした。低酸素分圧下の窒素またはアルゴン雰囲気中で、純チタンを熱処理して得られる表面において、水接触角、表面電位、吸着水の構造および吸着タンパク質の種類および構造に及ぼす酸素空孔および表面電荷の影響を評価する。同時に、酸素空孔を導入し、異なる表面電荷を有する純チタン表面での骨芽細胞の接着と増殖を評価する。以上の知見を融合し、純チタン表面に優れた親水性および骨芽細胞活性を発現させ、その機能が長期間持続する表面処理技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

【28年度】(1)低酸素分圧下での窒素またはアルゴン雰囲気中において純チタンを熱処理、表面電荷(正、負、ゼロ)の異なる酸化膜を形成(2)接触角の経時変化を評価、(3)吸着水の構造を評価し、表面電荷が純チタンの親水性に与える影響を明らかにした。(4)表面電荷の異なる純チタン上での骨芽細胞活性を評価した。

【29年度以降】上記超親水性を発現した純チタンを作製し、(1)吸着タンパク質の種類および構造を評価し、表面電荷の影響を調べる。(2)骨芽細胞活性を評価し、細胞毒性、細胞増殖等と与える影響を評価する。(3)以上実験と細胞実験で得られた知見を融合することで、生体分子吸着過程の本質を理解した骨芽細胞活性の高い超親水性純チタン生成のための表面処理技術を確立した。

4. 研究成果

国内外における位置づけ: 生体活性を持たせるために、純チタンを酸素分圧を制御した窒素雰囲気中での熱処理を行うだけで、酸化チタン中の窒素含有欠陥の種類および有効電荷を制御することを狙っており、このような報告例は無く、我々のグループ以外には無い独創的なものである(図1)。純チタンの親水性に関しては、未だ純チタンの表面電荷を制御した報告例は無く、また低酸素分圧下での熱処理により、優れた骨芽細胞活性を発現させる取り組みも我々のグループ以外には無い独創的なものである(図2)。さらに純チタンに吸着する水の構造も表面電荷の違いによって異なると考えられることから、純チタンの表面電荷制御 吸着水の構造変化 吸着タンパク質の種類および構造変化 骨芽細胞の接着・増殖の制御といった一連の生体内での生体分子の吸着課程の経時変化が明確となり、生体活性の本質を理解した材料設計を可能とした。

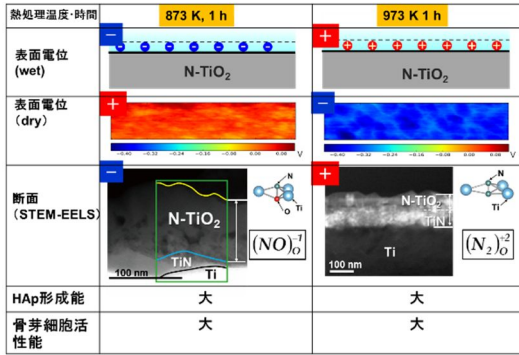


図 1 純チタン上に形成した酸化チタンスケールの表面電位、窒素含有欠陥の種類および生体活性能の関係

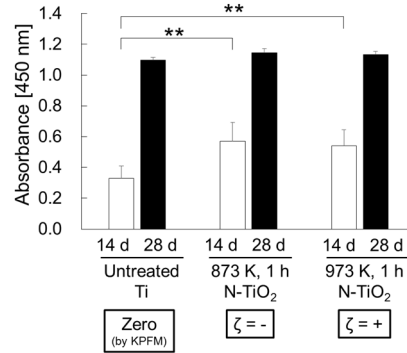


図 2 正、負またはゼロの表面電位上での骨芽細胞分化能(培養期間 14 および 28 日) ** $P < 0.01$

これは、正または負の表面電位を有する表面上では、細胞接着性のタンパク質であるフィブロネクチンの吸着だけでなく(図 3)、水酸化アパタイトの構成成分である Ca および P の吸着が生じているためと考えられた(図 4)。

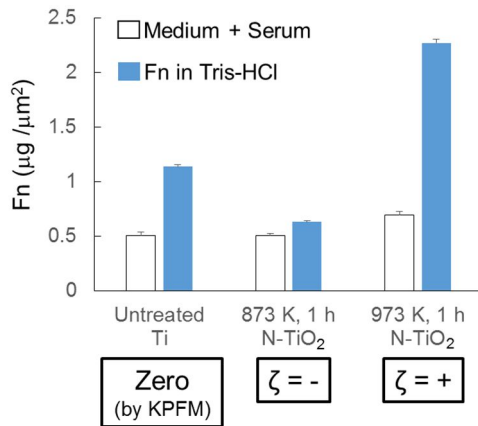


図 3 正、負またはゼロの表面電位を有する酸化チタンスケール上でのフィブロネクチンの吸着量(血清を含む培養液またはフィブロネクチン含有溶液, 310 K, 1 分)

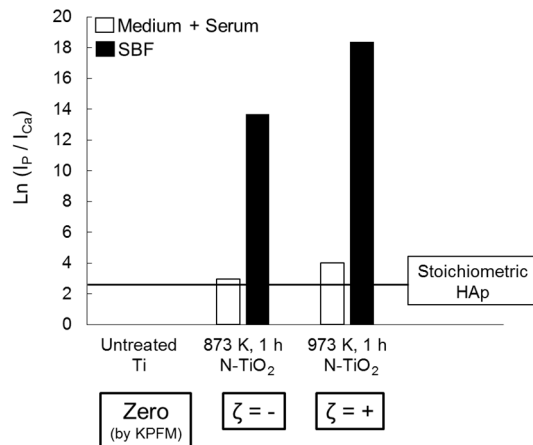


図 4 正、負またはゼロの表面電位を有する酸化チタンスケール上での Ca および P の吸着量(血清を含む培養液または擬似体液, 310 K, 1 分)

また、吸着したフィブロネクチンの構造を高速原子間力顕微鏡にて観察すると、フィブリル状のフィブロネクチンに特徴的な構造の観察に成功し(図 5)、また、吸着サイトは side-on 配位であることが考えられた(図 6)。よって、今後はフィブロネクチンの配位状態と表面電位の関係を明らかにし、骨芽細胞活性向上のメカニズムの更なる解明が可能になると考えられる。

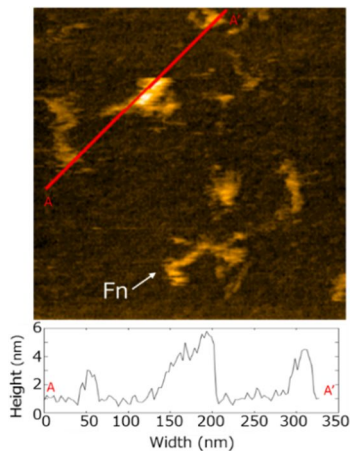


図5 高速原子間力顕微鏡によって観察されたフィブロネクチンおよびラインプロファイル

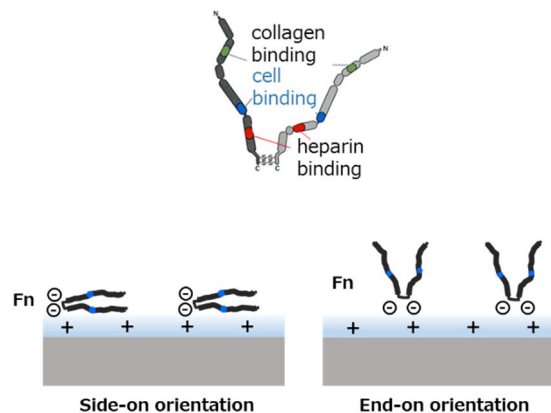


図6 フィブロネクチンの構造(上図)およびその吸着形態(下図)

インパクト: 国民生活調査によると、支援・介護を必要とする約475万人のうち要支援者の33%、要介護者の16%において、認知症が原因となっており、認知症予防の重要性は高まっている。生涯にわたり歩くことや、歯との認知症予防との関係は強く、脳の神経細胞が活性化し、認知症予防になるだけでなく、記憶力の回復の可能性も高まると考えられている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

1. “MC3T3-E1 cellular response and protein detection on surface potential-controlled TiO₂ scale in serum-containing medium”, M. Hashimoto, T. Ogawa, S. Kitaoka, S. Muto, M. Furuya, H. Kanetaka, M. Abe and H. Yamashita, Key Eng. Mat., 782, pp. 218-223 (2018).
2. “Control of surface potential and hydroxyapatite formation on TiO₂ scales containing nitrogen-related defects”, M. Hashimoto, T. Ogawa, S. Kitaoka, S. Muto, M. Furuya, H. Kanetaka, M. Abe and H. Yamashita, Acta Materialia, 155, pp. 379-385 (2018).
3. “Wear resistance of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted carbon fiber reinforced poly(ether ether ketone) liners against metal and ceramic femoral heads”, S. Yamane, M. Kyomoto, T. Moro, M. Hashimoto, Y. Takatori, S. Tanaka, and K. Ishihara, Journal of Biomedical Materials Research: Part B, 106, pp. 1028-1037 (2018).
4. “A phospholipid polymer graft layer affords high resistance for wear and oxidation under load bearing conditions”, M. Kyomoto, T. Moro, S. Yamane, K. Watanabe and M. Hashimoto, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 79, pp. 203-212 (2018).
5. “Control of HAp formation and osteoconductivity on nitrogen-doped TiO₂ scale formed by oxynitridation of Ti”, M. Hashimoto, S. Kitaoka, Y. Obata, S. Muto, T. Ogawa, M. Furuya and H. Kanetaka, Key Engineering Materials, 758, pp. 86-89 (2017).
6. “PMMA 骨セメント用高生体活性酸化チタン粒子の開発”, 橋本雅美, 金高弘恭, FC レポート 35, pp. 78-81 (2017)
7. “バイオセラミックスの最新の研究動向と将来展望”, 橋本雅美, 澤村武憲, 早川聡, セラミックス 51, pp. 836-840 (2016).
8. “Effect of fibronectin adsorption on osteoblastic cellular responses to hydroxyapatite and alumina”, M. Kawashita, M. Hasegawa, T. Kudo, H. Kanetaka, T. Miyazaki and M. Hashimoto, MSEC 69, pp. 1268-1272 (2016).
9. “Effect of surface charge of TiO₂ particles on hydroxyapatite formation in simulated body fluid”, M. Hashimoto, S. Kitaoka and H. Kanetaka, 27, pp. 2409-2415 (2016).
10. “Fibronectin adsorption on osteoconductive hydroxyapatite and non-osteoconductive -alumina”, M. Hasegawa, T. Kudo, H. Kanetaka, T. Miyazaki, M. Hashimoto and M.

Kawashita, Biomed. Mater., 11, pp. 45006 (2016).

11. "Adsorption of laminin on hydroxyapatite and alumina and the MC3T3-E1 cell response", H. Fujita, T. Kudo, H. Kanetaka, T. Miyazaki, M. Hashimoto and M. Kawashita, ACS Biomater. Sci. Eng, 2, pp. 1162-1168 (2016).
12. "The microstructure of scale formed by oxynitriding of Ti and exhibiting significant apatite-forming ability", M. Hashimoto, S. Kitaoka, S. Muto, K. Tatsumi and Y. Obata, Journal of Materials Research, 31-8, pp. 1004-1011 (2016).
13. "Effects of extra irradiation on surface and bulk properties of PMPC-grafted cross-linked polyethylene", S. Yamane, M. Kyomoto, T. Moro, K. Watanabe, M. Hashimoto, Y. Takatori, S. Tanaka and K. Ishihara, Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 104A, pp. 35-45 (2016).

[総説](計2件)

1. 橋本雅美, 金高弘恭, PMMA 骨セメント用高生体活性酸化チタン粒子の開発, FC レポート 35, 78-81, 2017
2. 橋本雅美, 澤村武憲, 早川聡, バイオセラミックスの最新の研究動向と将来展望, セラミックス 51, 836-840, 2016

[学会発表](計13件)

1. M. Hashimoto, T. Ogawa, S. Kitaoka, M. Furuya, H. Kanetaka, S. Muto, M. Abe, H. Yamashita, "Differentiation behavior of osteogenic cell on surface potential-controlled TiO₂ scale formed by oxynitridation of Ti", 43rd international conference and exposition on advanced ceramics and composites, Hilton Daytona Beach Oceanfront Resort (アメリカ合衆国、デイトナビーチ), 2019年1月31日, 招待講演
2. M. Hashimoto, T. Ogawa, S. Kitaoka, S. Muto, M. Furuya, H. Kanetaka, M. Abe and H. Yamashita, "MC3T3-E1 cellular response and protein detection on surface potential-controlled TiO₂ scale in serum-containing medium", Bioceramics30, 名古屋大学(愛知県名古屋市), 2018年10月27日
3. 橋本雅美, 小川貴史, 北岡諭, 古谷真衣子, 金高弘恭, 武藤俊介, 阿部真之, 山下隼人, 血清含有培養液中における表面電位制御チタン上でのタンパク質の吸着, 日本セラミックス協会第31回秋季シンポジウム, 名古屋工業大学(愛知県名古屋市), 2018年9月7日
4. 橋本雅美, 金高弘恭, PMMA 骨セメント用の高生体活性酸化チタン粒子の開発, JFCA テクノフェスタ, メルパルク東京(東京都港区), 2018年1月22日
5. M. Hashimoto, S. Kitaoka, T. Ogawa, S. Muto, M. Furuya, H. Kanetaka, M. Abe and H. Yamashita, Control of Bioactivity of Ti Metal by intervening TiO₂ Scale Containing Nitrogen-related Defects, International Symposium on Biomedical and Environmental Materials, 名古屋工業大学(愛知県名古屋市), 2017年11月1~2日
6. M. Hashimoto, S. Kitaoka, Y. Obata, S. Muto, T. Ogawa, M. Furuya and H. Kanetaka, Control of HAp formation and osteoconductivity on nitrogen-doped TiO₂ scale formed by oxynitridation of Ti, Bioceramics29, Pierre-Paul Riquet Hospital (フランス、トゥールーズ), 2017年10月25日
7. 橋本雅美, 小川貴史, 北岡諭, 武藤俊介, 古谷真衣子, 金高弘恭, 阿部真之, 山下隼人, 窒素含有欠陥を含む酸化チタンスケールを介した金属チタンの生体活性制御, 日本セラミックス協会第30回秋季シンポジウム, 神戸大学(兵庫県神戸市), 2017年9月21日
8. M. Hashimoto, S. Kitaoka, Y. Obata, S. Muto, M. Furuya and H. Kanetaka, HAp formation and osteoconductivity of nitrogen-doped TiO₂ scale formed by oxynitridation of Ti exhibiting different surface charge, IUMRS, 京都大学(京都府京都市), 2017年8月29日
9. 橋本雅美, 北岡諭, 小幡佳弘, 武藤俊介, 古谷真衣子, 金高弘恭, 酸窒化処理による骨芽細胞活性の高い表面電荷制御チタンの開発, 日本材料学会第66期学術講演会, 名城大学(愛知県名古屋市), 2017年5月28日
10. M. Hashimoto, S. Kitaoka, S. Muto and K. Tatsumi, Comparison of apatite forming ability appeared by heat treatment TiO₂ and Ti under P₀₂-controlled nitrogen atmosphere, AMTC5, ウィンクあいち(愛知県名古屋市), 2016年5月11日
11. 橋本雅美, 山根史帆里, 京本政之, 渡辺健一, 茂呂徹, 高取吉雄, 田中栄, 石原一彦, ガスプラズマ滅菌が人工股関節用リン脂質ポリマー処理架橋ポリエチレンの特性に与える影響, 第33回疲労シンポジウム, 第1回生体・医療材料シンポジウム, 赤穂ハイツ(兵庫県赤穂市), 2016年11月11日~12日
12. 川下将一, 長谷川蒔, 林純平, 工藤忠明, 金高弘恭, 宮崎敏樹, 橋本雅美, フィブロネクチンを吸着させた水酸アパタイトおよびアルミナに対するMC3T3-E1細胞の応答, 日本セラミックス協会2016年会, 早稲田大学(東京都新宿区), 2016年3月16日

13. 橋本雅美, 北岡諭, 金高弘恭, 表面電荷を制御した酸化チタン粒子表面における HAp 形成能の向上, 日本セラミックス協会 2016 年会, 早稲田大学 (東京都新宿区), 2016 年 3 月 14 ~ 16 日

〔その他：賞〕

1. 橋本雅美, 澤村武憲, 重松貴, 中島武彦, ニューセラミックス懇話会 バイオ関連セラミックス分科会 骨補填材データベース作成プロジェクトチーム 日本ファインセラミックス協会地域賞 2017 年 10 月 26 日
2. 橋本雅美, 表面電位制御による高生体活性チタンの開発, 永井科学技術財団技術賞 2019 年 3 月 6 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金高弘恭

ローマ字氏名：Hiroyasu Kanetaka

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 50292222