

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03177

研究課題名(和文) 微量元素ドーブ酸化チタン層を形成させた光機能性抗菌チタンの創製

研究課題名(英文) Development of optical functional titanium with trace metal-doped titania layer

研究代表者

川下 将一 (Kawashita, Masakazu)

東北大学・医工学研究科・准教授

研究者番号：70314234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、銀および/あるいは銅をドーブしたチタンを作製し、それらの擬似体液(SBF)中でのアパタイト形成能、金属元素の溶出挙動、暗所下および可視光照射下での抗菌性、および活性酸素種(ROS)発生の評価を行った。いずれの試料もSBF中でアパタイト形成能を示し、可視光照射によって抗菌性が向上することが分かった。溶出特性試験において銀および/あるいは銅の溶出が認められたこと、また可視光照射によって試料からヒドロキシルラジカルや過酸化水素といったROSが発生していることが確認されたことから、可視光照射下での試料の抗菌性は、金属元素の溶出および可視光応答型光触媒効果によって発揮されたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、NaOH水溶液処理後に銀や銅を含む水溶液で処理し、さらに加熱処理すれば、銀や銅を微量含む酸化チタン(TiO₂)層をチタン表面に形成させることができることが明らかとなった。また、このようにして得られたチタンは、体液環境下でその表面にアパタイトを形成、すなわち骨結合性を示す可能性を示し、30分間の可視光照射によって優れた抗菌性を示した。本研究の成果は、可視光下での抗菌性と生体内での骨結合性を併せ示す、次世代の人工関節や歯科インプラントの実現に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, titanium samples doped with silver and / or copper was prepared, and their apatite-forming ability in simulated body fluid (SBF), metal-releasing behavior, antibacterial activity in dark place or under visible light irradiation, and generation of reactive oxygen species (ROS) were investigated. All samples showed apatite-forming ability in SBF, and antibacterial activity of samples were improved by visible light irradiation. Since dissolution of silver and / or copper and generation of ROS such as hydroxyl radical and hydrogen peroxide by visible-light irradiation were observed, antibacterial activity of samples under irradiation with visible light can be attributed to the elution of doped metal element and visible light-responsive photocatalytic effect.

研究分野：無機生体材料学

キーワード：チタン 酸化チタン 光触媒 可視光 抗菌性 生体活性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

チタン (Ti) およびその合金は、人工関節や歯科インプラントとして広く用いられている。しかし、それらはそのままでは骨と強固には結合せず、また人工関節の場合は術後感染症が生じ、最悪の場合は人工関節の抜去に至り、患者に大きな負担となる。歯科インプラントにおいても、インプラントに付着した細菌が引き起こすインプラント周囲炎が問題となっている。Ti およびその合金に水酸化ナトリウム (NaOH) および加熱処理を施すと、それらは骨結合性を示すようになるが、抗菌性は示さない。また、最近、銀を担持させた水酸アパタイトをコートした人工関節が実用化されたが、銀の持続的徐放が生体組織に及ぼす影響が懸念される。歯科インプラントの場合は、硫化銀の生成による着色の問題もある。

一方、窒素などの微量元素をドーピングした酸化チタン (TiO_2) は可視光応答型光触媒活性による抗菌性を示す可能性がある。また、NaOH-温水-加熱処理により Ti 表面に形成された TiO_2 は良好な骨結合性を示す。従って、何らかの化学処理により Ti 表面に微量元素ドーピング TiO_2 層を形成させることができれば、同 Ti は手術室の无影灯などの可視光にตอบสนองして抗菌性を示し、生体内では TiO_2 による骨結合性を示すと期待される。そこで申請者は、微量元素として銀、銅、亜鉛に着目し、「これらを含む TiO_2 層を Ti 表面に形成させれば、目的の Ti を実現できるのではないか？」との着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、Ti を NaOH 水溶液で処理した後、銀、銅あるいは亜鉛を含む水溶液に浸漬し、それを加熱処理することにより、同 Ti に微量金属元素ドーピング TiO_2 層の形成を試み、得られた試料の表面構造、可視光下での抗菌性、活性酸素種 (ROS) 発生さらに細胞適合性を調べることにより、手術室などの可視光照射下では抗菌性を示し、生体内では骨結合性を示す Ti を創製することを目的とする。本報告書では、特に NaOH 水溶液で処理した後、銀あるいは銅を含む水溶液に浸漬し、それを加熱処理した試料に関する研究成果を述べる。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

チタン板 ($10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$) を 5 mL の 5 M NaOH 水溶液に 60°C で 24 時間浸漬し、続いて 7 mL の 0.1 M の硝酸銀あるいは硝酸銅水溶液に 80°C で 48 時間浸漬した。その後、試料を洗浄、乾燥させ、 600°C で 1 時間加熱処理した。このようにして得られたサンプルをそれぞれ AL-Ag-HT および AL-Cu-HT とする。また、参照試料として、未処理チタン (サンプル名: 未処理 Ti) および NaOH-加熱処理チタン (サンプル名: AL-HT) も作製した。

(2) 試料の構造解析

得られた試料をヒトの体液とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液 (SBF) 30 mL に 36.5°C で 1 週間浸漬した。得られた試料の表面構造を走査型電子顕微鏡 (SEM)、薄膜 X 線回折 (TF-XRD) および X 線光電子分光法 (XPS) により調べた。

(3) 試料の可視光下での抗菌性評価

セルストレーナーの中心部に試料 ($n=4$) の表面を上にして乗せ、試験菌液 (約 10^7 CFU/mL) を 10 μL 滴下し、試料表面を OHP フィルムで覆って密着させた。可視光照射時の熱や乾燥による菌への影響を減らすため、ウェル内に 1.5 mL の純水を加え、6 ウェルプレートの下に保冷剤を敷いたのち、可視光 (波長 460 nm、放射照度 250 W/m^2) を 30 分間照射した。その後、SCDLP 培地 2 mL 中に試料をフィルムごと回収し、十分に攪拌させて菌を洗い出した。洗い出した培地を、SCDLP 培地を用いて 10 倍および 100 倍に希釈し、それぞれ 100 μL ずつニュートリエント寒天培地に播種した。これらの培地を 37°C で 48 時間培養し、コロニー数を集計し、生菌数を算出した。

(4) 試料の可視光下での ROS 発生の測定

300 mM の 5, 5'-ジメチル-1-プロリン-N-オキサイド (DMPO) 水溶液 500 μL に試料を浸漬し、(3) の抗菌性試験と同条件で可視光を 30 分間照射した。その後、DMPO 水溶液を 200 μL 取り出し、電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて ROS の一つであるヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) の測定を行った。また、 $\cdot\text{OH}$ と同じく ROS の一つである過酸化水素 (H_2O_2) の発生量を過酸化水素比色定量法により測定した。

4. 研究成果

図 1 に各試料表面の SEM 写真を示す。いずれの試料においても、微細な網目構造が形成されていることが確認された。

図 2 に各試料の XPS スペクトルを示す。AL-HT の Na_{1s} スペクトルにおいては、1017 eV 付近にチタン酸ナトリウムによるピークが観察された。AL-Ag-HT の Ag_{3d} スペクトルにおいては 367.6 eV、373.6 eV 付近にピークが現れた。367.6 eV 付近のピークは、炭酸銀 (Ag_2CO_3) や酸化銀 (Ag_2O や AgO) 等の非常に近い位置に表れるピークが重なっている可能性がある。酸化銀が高温で不安定であること、 Ti_{2p} スペクトルが TiO_2 ではなく Ti と O およびその他の物質との結合を示唆す

るピークを有することから、銀はチタン酸銀として存在している可能性がある。AL-Cu-HT の Cu_{2p} スペクトルにおいては、932.2 eV、952.5 eV 付近に Cu、934.0 eV、953.5 eV 付近に CuO に帰属されるピークが現れた。ただし、これらのピークは 1 価または 2 価の Cu として他の物質と結合した状態を示すピークにも近い。また、AL-Ag-HT 同様に Ti_{2p} スペクトルが TiO_2 ではなく Ti と O およびその他の物質との結合を示唆するピークを示したことから、銅はチタン酸銅として存在している可能性がある。

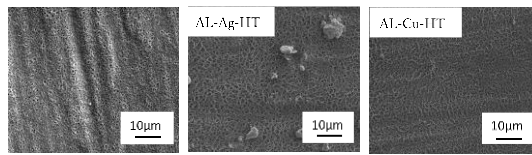


図 1 各試料の SEM 写真

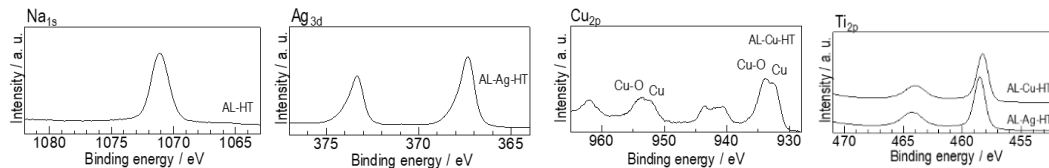


図 2 各試料の XPS スペクトル

図 3 に各試料の TF-XRD パターンを示す。AL-HT にはルチル型 TiO_2 およびチタン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{Ti}_9\text{O}_{19}$) のピークが確認され、AL-Ag-HT にはルチル型 TiO_2 、アナターゼ型 TiO_2 および Ag のピークが確認された。AL-Ag-HT 表面には微粒子が存在していたが (図 1)、TF-XRD パターンでは Ag が確認されたことから、この微粒子は金属銀からなると考えられる。AL-Cu-HT にはルチル型 TiO_2 、アナターゼ型 TiO_2 の回折ピークは観察されたが、Cu に関する回折ピークは確認できなかった。このことは、Cu や CuO の結晶性が低いか、その他の結晶性の高いチタン系のピークに埋もれた、またはその両方の理由のためであると考えられる。以上より、AL-HT の表面構造は主に TiO_2 と $\text{Na}_2\text{Ti}_9\text{O}_{19}$ 、AL-Ag-HT は TiO_2 と Ag、AL-Cu-HT は TiO_2 と Cu および CuO によって、それぞれ形成されていると考えられる。また、AL-Ag-HT 表面にはチタン酸銀、AL-Cu-HT 表面にはチタン酸銅といった Ti と O とドープ金属元素の固溶が生じている可能性もある。

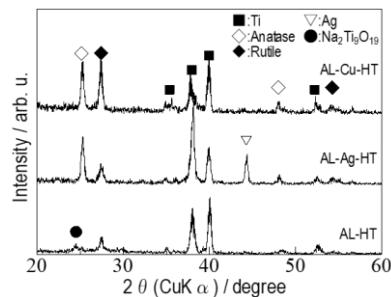


図 3 各試料の TF-XRD パターン

図 4 に SBF 浸漬後の各試料表面の SEM 写真を示す。いずれの試料においても、アパタイトの形成が確認された。ただし SEM 写真から確認できる表面を占めるアパタイトの割合には差があり、AL-HT および AL-Ag-HT においては表面全体がアパタイトで覆われたが、AL-Cu-HT では網目構造が露出しており、アパタイトが形成されている部分が点在していた。アルカリ-加熱処理チタンにおけるアパタイト形成には、チタン表面から SBF 中への Na の溶出が重要であることから、AL-Ag-HT および AL-Cu-HT におけるアパタイト形成に関しても、Ag または Cu の SBF 中への溶出が重要であると考えられる。従って、AL-Cu-HT のアパタイト形成能が AL-Ag-HT のそれよりも高かったことから、Ag の方がより SBF 中へ溶出したと考えられる。

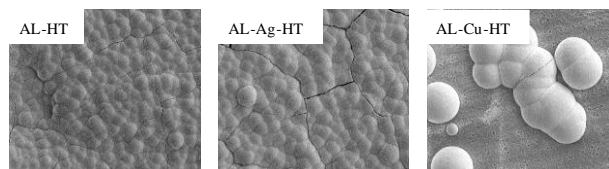


図 4 SBF 浸漬後の各試料の SEM 写真

図 5~7 に大腸菌を用いた抗菌性試験の各結果を示す。各試料には試験菌液 (約 10^7 CFU/mL) を 10 μ L ずつ滴下したため、滴下直後の試料上の大腸菌数は約 10^5 CFU と見積もられた。

可視光照射無しの場合 (図 5)、未処理 Ti 上の生菌数はほとんど減少しなかったが、未処理 Ti 以外の試料 (AL-HT、AL-Ag-HT、AL-Cu-HT) においては、生菌数が有意に減少した。AL-Ag-HT および AL-Cu-HT において生菌数の減少が生じたのは、微量の Ag および Cu の菌液中への溶出によるものと考えられる。AL-HT においても生菌数が減少したのは、他の試料に比べて菌液を滴下した際の親水性が高かったことや、表面に存在するナトリウムが影響した可能性がある。

可視光照射有りの場合 (図 6)、いずれの試料でも生菌数の減少が見られた。これは光照射による熱や乾燥が菌にダメージを与えたことが主な原因と考えられる。また、未処理 Ti と AL-HT、または AL-Ag-HT、または AL-Cu-HT 間で有意差が生じたことに加え、AL-HT と AL-Ag-HT、または AL-Cu-HT 間でも有意差が生じた。AL-Ag-HT、AL-Cu-HT における可視光照射の有無による抗菌性の差を検討すると (図 7)、いずれも可視光を照射した場合生菌数が顕著に減少しており、抗菌性が向上したと考えられる。

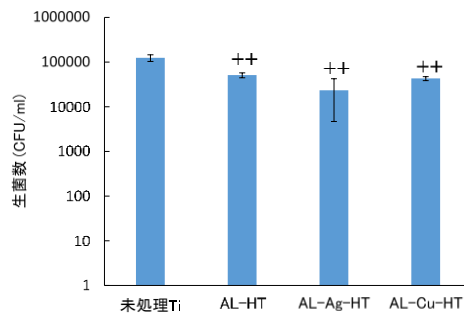


図 5 各試料の大腸菌生菌数 (可視光照射無し)
(mean \pm SD, n=4, ++ P <0.01 vs. 未処理 Ti)

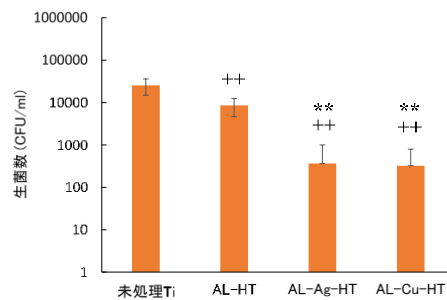


図 6 各試料の大腸菌生菌数 (可視光照射有り)
(mean \pm SD, n=4, ++ P <0.01 vs. 未処理 Ti, ** P <0.01 vs. AL-HT)

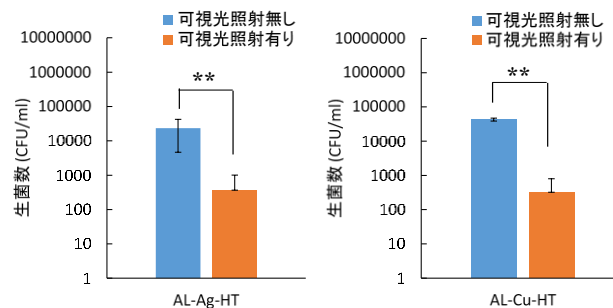


図 7 金属元素ドーパチタンの大腸菌生菌数
(mean \pm SD, n=4, ** P <0.01)

図 8 に各試料の ESR 測定結果を示す。AL-HT、AL-Ag-HT、AL-Cu-HT においては DMPO-OH のピーク (●) が観察されたことから、可視光照射によって \cdot OH が発生したと考えられる。各試料から発生した \cdot OH の濃度は、それぞれ AL-HT : 1.5287、AL-Ag-HT : 1.3439、AL-Cu-HT : 2.4869 (μ M) となった。いずれも低濃度であるが、特に AL-Cu-HT が高い濃度を示した。なお、AL-Cu-HT においては、DMPO-OH とは異なるピーク (▼) も確認された (図 8)。このピークと近いピーク位置をもつ活性酸素種は、メチルラジカル等の炭素中心ラジカルであるため、今回測定された不

明ピークも炭素に起因すると推測される。

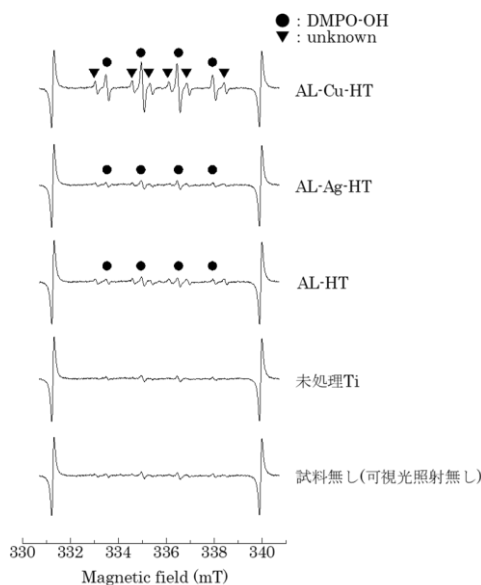


図8 各試料の ESR スペクトル

図9に可視光を照射した各試料から発生した H_2O_2 の濃度を示す。いずれの試料からも極めて低濃度の H_2O_2 が検出されたが、 H_2O_2 濃度の試料間の差はほぼ無く、いずれも H_2O_2 単体で細胞に対して抗菌性を示すほどの濃度では無かった。 $\cdot OH$ 濃度には試料間の差があるが、 H_2O_2 濃度には試料間の差が無いことから、検出された $\cdot OH$ は水酸化物イオンと正孔の反応、すなわち直接的な光触媒効果によってできたものである可能性が高い。

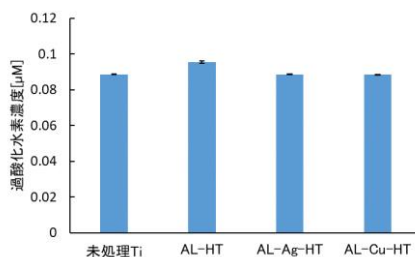


図9 可視光を照射した各試料から発生した H_2O_2 の濃度 (mean \pm SD, n=3)

以上より、チタンを NaOH 処理後、銀や銅を含む水溶液で処理し、さらに加熱処理すれば、チタンの表面に銀や銅を微量含む TiO_2 層を形成させることができること、また、そのようなチタンは体液環境下でその表面にアパタイトを形成し、可視光の照射によって $\cdot OH$ を発生して抗菌性を示すことが明らかとなった。本研究の成果は、生体外では抗菌性を示し、生体内では骨結合性を示すチタンの設計の基礎的指針となり得る。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① M. Iwatsu, H. Kanetaka, T. Mokudai, T. Ogawa, M. Kawashita and K. Sasaki, Visible light-induced photocatalytic and antibacterial activity of N-doped TiO_2 , J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 査読有, 印刷中.
DOI: 10.1002/jbm.b.34401
- ② T. Miyazaki, T. Sasaki, Y. Shirosaki, K. Yokoyama and M. Kawashita, Effect of metallographic structure and machining process on the apatite-forming ability of sodium hydroxide- and heat-treated titanium, Bio-Med. Mater. Eng., 29, 109-118 (2018).
DOI: 10.3233/BME-171716
- ③ M. Kawashita, Y. Iwabuchi, K. Suzuki, M. Furuya, K. Yokota and H. Kanetaka, Surface structure and in vitro apatite-forming ability of titanium doped with various metals, Colloids Surf. A, 査読有, 555, 558-564 (2018).
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.07.027

〔学会発表〕（計10件）

- ① 鈴木香苗、川下将一、岩津美里、目代貴之、金高弘恭、「銀または銅をドーブしたチタンのアパタイト形成能と可視光照射による抗菌性の向上」、第40回日本バイオマテリアル学会大会、2018年11月12日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）。
- ② M. Kawashita, Y. Iwabuchi, K. Suzuki, M. Furuya, K. Yokota and H. Kanetaka, Surface structure and in vitro apatite-forming ability of copper-, zinc-, or silver-doped titanium, 30th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 30), October 28, 2018, Nagoya (Japan).
- ③ M. Iwatsu, T. Mokudai, M. Kawashita, T. Watanabe, T. Ogawa, H. Kanetaka and K. Sasaki, Visible light-induced antimicrobial activity of nitrogen-doped TiO₂ on Ti treated with NaOH, hot water, and ammonia atmospheric heat treatment, 30th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 30), October 27, 2018, Nagoya (Japan).
- ④ M. Iwatsu, T. Ogawa, T. Mokudai, H. Kanetaka, M. Kawashita, T. Watanabe and K. Sasaki, Visible light-induced antimicrobial activity of N-doped TiO₂ on Ti substrates, 27th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, October 11, 2018, Vienna (Austria).
- ⑤ 鈴木香苗、川下将一、岩津美里、目代貴之、金高弘恭、「微量金属元素ドーブチタンのアパタイト形成能と抗菌性」、東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ 日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会、2018年8月24日、東北大学金属材料研究所（宮城県・仙台市）。
- ⑥ Y. Iwabuchi and M. Kawashita, Surface structure, apatite-forming ability and zinc-releasing profile of titanium metal subjected to NaOH, Zn(NO₃)₂ and heat treatments, 12th International Workshop on Biomaterials in Interface Science, August 5, 2017, Sendai (Japan).
- ⑦ Y. Iwabuchi, T. Miyazaki, H. Kanetaka and M. Kawashita, Measurement of Ti-OH groups effective for apatite formation on titanium under simulated body environment, 16th Asian BioCeramics Symposium (ABC2016), December 6, 2016, Brisbane (Australia).
- ⑧ M. Kawashita, Development of bioactive titanium with visible-light induced antibacterial activity, 10th Asian-Australasian Conference on Composite Materials (ACCM-10), October 18, 2016, Busan (Korea).
- ⑨ 岩渕雄太、宮崎敏樹、金高弘恭、川下将一、「擬似体液環境下でのアパタイト形成に有効なチタン表面の水酸基の評価」、日本セラミックス協会第29回秋季シンポジウム、2016年9月8日、広島大学東広島キャンパス、（広島県・東広島市）
- ⑩ M. Kawashita, N. Endo, T. Watanabe, T. Miyazaki, M. Furuya, K. Yokota, H. Kanetaka, Y. Abiko and N. Takahashi, Bioactive titanium with visible-light induced antibacterial activity, 10th World Biomaterials Congress, May 18, 2016, Montreal, (Canada).

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究協力者氏名：金高 弘恭
ローマ字氏名：(KANETAKA, Hiroyasu)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院歯学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50292222

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。