

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11816

研究課題名(和文) 生体親和性と抗菌性を有する傾斜機能型バイオセラミックスの開発

研究課題名(英文) Development of bioceramics with biocompatibility and antibacterial properties

研究代表者

横井 由紀子 (Yokoi, Yukiko)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60469012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、傾斜機能型バイオセラミックスの開発である。アナターゼ型TiO₂を700℃、800℃および900℃で焼結体を作製し、焼成温度と骨芽細胞様細胞の増殖とアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の関係を検討した。強い触媒能が存在する700℃、800℃では細胞数の増殖はわずかであり、細胞形態が萎縮した像が観察された。アナターゼ型TiO₂およびルチル型TiO₂が混在する900℃では良好な細胞増殖とALP活性が認められ、触媒能も残存していた。抗菌作用などが期待できる触媒能と細胞増殖やALP活性を促す生体親和性の両方の特色を持つ新しい生体材料の創製についての可能性が示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント体のような歯科生体材料の開発を想定した場合、口腔内と生体内という異なる環境で機能を発揮する材料が必要である。それぞれの環境に適した機能を有することが必要だと考えた。セラミックスTiO₂は、これらの環境に必要な傾斜機能を付与することができる材料であることを検証するための研究を行った。焼結温度を調整しTiO₂焼結体を作製することにより、良好な細胞増殖を示し且つ触媒能も残存していた。抗菌作用などが期待できる触媒能と細胞増殖やALP活性を促す生体親和性の両方の特色を持つ新しい生体材料の創製についての可能性が示唆できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is creation of biomaterials from titanium dioxide (TiO₂). This TiO₂ has known for photocatalysis and osteogenesis. The cell proliferation and ALP were examined. TiO₂ were sintered at 700 °C, 800 °C and 900 °C for use as samples. The mouse osteoblast-like cell line, MC3T3-E1 was cultured on sintered each TiO₂ samples in order to evaluate the cell proliferation and ALP. For the samples sintered at 700 °C, the crystalline phase of anatase-type TiO₂ was confirmed. 800 °C, 900 °C was both anatase-type and rutile-type. In the test of MC3T3-E1 cell proliferation, sintered at 700 °C, 800 °C and 900 °C samples was less than to control samples. 700 °C TiO₂ was about 40% compared with control. ALP activity of cells on 900 °C TiO₂ sample, the values were 83% on days 14 of culture, respectively. Thus, 900 °C TiO₂ showed good compatibility and increase in the ALP activity in MC3T3-E1 cells.

研究分野：歯科理工学

キーワード：二酸化チタン 傾斜機能 バイオセラミックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

純チタンやチタン合金は、歯科生体材料として応用され、その良好な生体親和性は移植体表面に形成される二酸化チタン (TiO_2) の不働態被膜に依存するとされている。一方、ジルコニア (ZrO_2) などのセラミックスは、生体材料・歯科材料として近年需要が増加傾向にある。しかし、セラミックス TiO_2 そのものの生体材料としての需要は多くない。セラミックス TiO_2 の生体親和性に関する研究は少ない。インプラント体のような歯科生体材料の開発を想定した場合、口腔内と生体内という異なる環境で機能を発揮する材料が必要である。それぞれの環境に適した機能を有することが必要だと考えた。セラミックス TiO_2 は、化学的に安定な物質である。それぞれの環境に必要な傾斜機能を付与することができる材料の開発を目指すための基礎研究である。

2. 研究の目的

この研究の目的はセラミックス TiO_2 を原料とした生体材料の創製である。目的の環境に合わせた傾斜機能を保持し、その機能をコントロールできる材料の検討を進めている。現在までに、アナターゼ型 TiO_2 とルチル型 TiO_2 の焼結体上でのマウス線維芽細胞の増殖を検討した。同じ TiO_2 であるにもかかわらず結晶相が異なることで、ルチル型 TiO_2 はマウス線維芽細胞の増殖を認め、生体親和性に優れていることを報告した。さらに、ルチル型 TiO_2 焼結体上での骨芽細胞様細胞の増殖とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の関係を検討した。本研究の目標は、生体親和性と抗菌性を有する傾斜機能型バイオセラミックスの開発である。このため、アナターゼ型 TiO_2 を焼成して焼結体を作製し、焼成温度と骨芽細胞様細胞の増殖とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の関係を検討することが目的である。

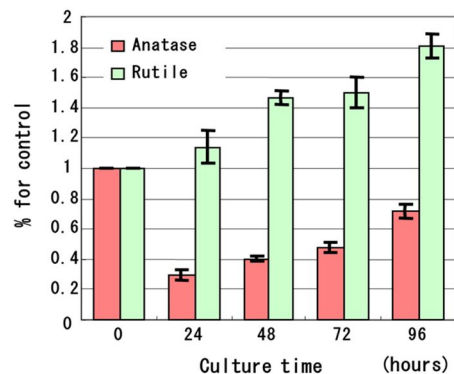


図. 1 アナターゼ型、ルチル型焼結体上のマウス線維芽細胞の増殖。アナターゼ型では細胞は増殖せず、コントロール群と比較して24時間後では29.5%、96時間後では71.7%ですべての値はコントロールより下回った。ルチル型では、24時間後は114.1%、96時間後では180.1%と、いずれもコントロールより値は上回っていた。

3. 研究の方法

(1) TiO_2 焼結体の作製

平均粒径 7nm であるアナターゼ型 TiO_2 粉末を 0.5g、蒸留水 0.3mL を計量・混和し、内径 15mm の金型に充填した後、15kN の荷重を 1 分間加え、厚さ約 3mm の試料を作製した。成形試料は電気炉にて焼成は大気中で 700 ~ 900 の各温度で係留し焼成した。

(2) TiO_2 焼結体の X 線回折分析

出発原料および 1300 で焼成した TiO_2 焼結体は、X 線回折装置 (Rad-rC, リガク) を使用し、結晶相の同定を行った。測定条件は管電圧 40kV、管電流 60mA、管球 CuK α 、Ni フィルターで回折角 20 度から 60 度の範囲で行った。

(3) TiO_2 焼結体の光触媒作用 (色素分解能試験)

各試料を 1ml のメチレンブルー水溶液の中に加え、12、24、48、72 時間後の水溶液を microplate reader 波長 490nm で吸光度を測定した。

(4) TiO_2 焼結体上で細胞増殖とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の検討

細胞増殖試験はマウス骨芽細胞様細胞を用い、 α -Minimum Essential Medium に 10% のウシ胎仔血清、100U/ml Penicillin と Streptomycin 100 μ g/ml を加えて細胞調整した。 TiO_2 焼結体試料を、24 ウェルマイクロプレート内に配置し、 2.0×10^4 cells/ml に細胞浮遊液を調整後、各ウェルに 600 μ l ずつ播種した。培養は 37 $^\circ$ C、5% CO_2 条件下にて行った。各試料上で増殖した細胞数を測定するために、各試料は、培養液を 600 μ l ずつ入れた新しい 24 ウェルマイクロプレートに移し換えた。生細胞数を測定は CellTiter 96 AQ Aqueous One Solution Reagent を使用し 37 $^\circ$ C にて 30 分酵素反応させ、microplate reader の吸光度 (波長 492nm) を測定した。ALP 活性の測定は、TRACP&ALP Assay Kit を使用し、吸光度 (波長 405nm) を測定した。

(5) 細胞形態の観察

細胞形態の観察は各試料上で 24、72 時間培養後に行った。即ち、各試料を 99.8% メタノールで 10 分間固定し、自然乾燥させ、蒸留水で 20% に希釈したギムザ染色液 (メルク) に 30 分間浸漬し、流水水洗、自然乾燥後、倒立金属顕微鏡下で試料上の細胞を観察した。

4. 研究成果

(1) 各 TiO_2 焼結体試料の表面性状

各 TiO_2 焼結体の結晶粒の形状と大きさは焼成温度により異なり、低温であるほど若干気孔が存在し、高温になるにつれ平坦な状態を呈した。700、800 では、わずかに結晶粒子の融合がみられた。900 結晶粒子の成長が見られ、融合が焼成温度の上昇とともに観察された。

(2) TiO₂ 焼結体の X 線回折分析

焼結温度 700°C はアナターゼ型 TiO₂ の結晶相のみが現れた。焼結温度 800°C, 900°C ではアナターゼ型 TiO₂ とルチル型 TiO₂ の結晶相が確認された。

(3) TiO₂ 焼結体の光触媒作用 (色素分解能試験)

光触媒作用 (色素分解試験) のでは、メチレンブルー水溶液の色の変化を観察した。色素分解能がある場合は、紺色の溶液の色が薄くなり、透明に近づくため、吸光度を測定した。

各試料とも継時的にメチレンブルー水溶液の吸光度の値が減少し、強い色素分解能力を呈した。メチレンブルー水溶液は透明に近づき、本材料は強い光触媒作用を有する可能性が示唆された。

(4) TiO₂ 焼結体上で細胞増殖とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

培養 14 日目では 700 °C ではコントロールの 40% ほどの細胞数と ALP 活性を認めた。900 °C の細胞数はコントロールより増加し (p<0.01), ALP 活性は比較的良好であった (図 2)。触媒能は 700, 800, 900°C の順に強く示された。

強い触媒能が存在する 700°C, 800°C では細胞数の増殖はわずかであり、細胞形態が萎縮した像が観察された (図 4)。時間経過とともに緩やかな細胞増殖が認められ、ALP 活性も確認できた。しかし、対照群 (培養シャーレ) より低い値を示した。焼結温度を比較すると、アナターゼ型 TiO₂ およびルチル型 TiO₂ が混在する 900°C では良好な細胞増殖が認められた。900°C は良好な細胞増殖を示し、且つ触媒能も残存していた。

(5) 結論

アナターゼ型 TiO₂ を 700 °C, 800 °C および 900 °C で焼成し、焼結体を作製した。強い触媒能が存在する 700 °C, 800 °C 焼結体では細胞数の増殖はわずかであり、生体適合性が劣るが生細胞は存在し、ALP 活性も認められた。また 700 °C, 800 °C の TiO₂ 焼結体は、光触媒作用 (色素分解能) を大きく示した。

900 °C に焼結した TiO₂ は、良好な細胞増殖を示し ALP 活性をも認められ、且つ触媒能も残存していた。

セラミックス TiO₂ は、口腔内と生体内という異なる環境で機能を発揮する傾斜機能を付与することができる可能性示された。抗菌作用などが期待できる触媒能と細胞増殖など生体親和性の両方の特色を持つ新しい生体材料の開発の可能性が示唆された。



図. 2 触媒能の評価

700°C, 800°C の試料は、顕著な触媒能を示し、12 時間後にはメチレンブルー吸光度の約 25%, 48 時間後には約 18% の値となり、時間の経過とともにほぼ同等の傾向を呈した。900°C においても触媒能を有し、48 時間後にはメチレンブルー吸光度の約 20% を示した。

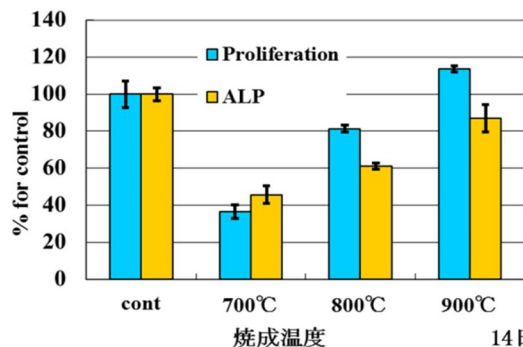


図. 3 各試料上での骨芽細胞細胞の増殖とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性。700°C と 800°C は、コントロールよりも細胞および ALP 活性が劣っていた。アナターゼ相が存在する試料では、900°C の試料が最も良好であった。700°C ではコントロールの 40% ほどの細胞数と ALP 活性を認めた。900°C の細胞数はコントロールより増加したが、ALP 活性の値は低下していた。

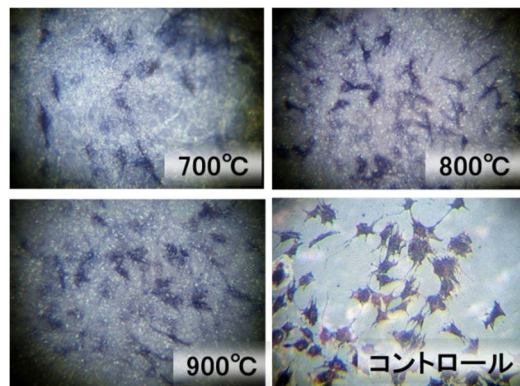


図. 4 各試料上の細胞形態の写真。

700°C では細胞数はわずかであり、その形態も萎縮していた。800°C 以上の焼成温度の試料上では、紡錘形、三角形、球形の細胞が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横井由紀子, 永澤 栄, 黒岩昭弘
2. 発表標題 ルチル型二酸化チタン焼結体上でのマウス骨芽細胞様細胞のALP活性
3. 学会等名 第71回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井由紀子, 横井寛之, 笠原隼男, 山口正人, 内田啓一, 永沢栄, 黒岩昭弘
2. 発表標題 アナターゼ型TiO ₂ 焼結体上でのマウス骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性
3. 学会等名 第48回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井由紀子, 永澤 栄, 黒岩昭弘
2. 発表標題 ルチル型二酸化チタン焼結体上でのマウス骨芽細胞様細胞のALP活性
3. 学会等名 第71回日本歯科理工学会春期学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井由紀子, 山木貴子, 山川洋子, 山川喜子, 松田紗衣佳, 正村正仁, 大須賀直人
2. 発表標題 水溶性二酸化チタン溶液の小窩裂溝充填材への応用
3. 学会等名 第55回 日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	荒井 敦 (Arai Atsushi) (00532772)	松本歯科大学・歯学部・准教授 (33602)	
研究 分担者	大須賀 直人 (Osuga Naoto) (80247535)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	