

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890244

研究課題名（和文）熱プラズマ CVD によるジルコニア系傾斜化複層機能材料の開発

研究課題名（英文）Development of zirconia based function material with heat plasma CVD

研究代表者

西田 尚敬（NISHIDA HISATAKA）

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70448116

研究成果の概要：ジルコニア材料に新機能の付与を目的として様々な方法で複合化させた。複合化には CVD 法、スパッタリング法、粉末冶金的手法を用いた。まず、チタニアナノチューブの生体親和性および骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討し、骨芽細胞分化に有利に働くことを明らかにした。CVD 法およびスパッタリング法では複合化が困難であり、粉末冶金的手法を検討したところ、ジルコニアとチタニアナノチューブの複合化に成功した。チタニアナノチューブが骨芽細胞分化に有効であることも明らかにした。このことにより、金属アレルギー患者に対して、骨と加速的に結合する歯科用セラミックインプラント体としての応用が期待できる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,280,000	0	1,280,000
2008 年度	1,320,000	396,000	1,716,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	396,000	2,996,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学

キーワード：セラミックス、ジルコニア、インプラント

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯科臨床において患者の審美性に対する意識の高まりや金属アレルギーへの対応の必要性の増加から、オールセラミック修復が注目されている。セラミックス材料に関しては、最近では従来のセラミックスよりもはるかに高い強度をもつジルコニア系の材料をクラウンに用いることにより、臼歯部でも破折しにくいオールセラミック修復が可

能になっている。しかし、歯科用インプラントのように顎骨と直接接する部位に大きな歪が生じる部位で使用するには信頼性が低く、金属がもつ優れた機械的特性をセラミックスで補うには不十分な点が残るのが現状である。そのため、より高強度で骨との強固な固定が可能な材料が求められる。そこで骨と迅速的に結合する高強度セラミック材料の開発を考えた。

## 2. 研究の目的

近年、2つ以上の異なる材料の複合化によってその材料に従来の新機能を付与あるいは向上させる研究が行われている。また、材料のナノ化や様々な形態を利用し従来の新機能を見出そうとする研究も盛んに進められている。後者のひとつに酸化チタンのナノチューブ化 (TNT) があげられる。酸化チタンは、チューブ化することにより高いイオン吸着能および超親水性を示すようになる。チタン金属表面の親水性を向上することで細胞伸展・接着増殖が亢進することや、アパタイトの核形成を誘起する官能基をチタン金属表面に形成させれば新生骨が形成し易くなることが報告されている。現在臨床で用いられている歯科用インプラント材料であるチタン金属表面および今後歯科用インプラント材料として普及されるであろうジルコニア系セラミックスに TNT を析出し複合化すれば超親水性が付与され、また Ca イオン吸着により官能基が形成され易くなる。そのため、新生骨の生成を早めることが期待でき、信頼性の高いジルコニアインプラント治療が可能となる。

そこで本研究では、まず、TNT 粉末の生体適合性および骨芽細胞分化に及ぼす影響、チタン金属上における析出条件および骨芽細胞挙動を検討した。そして応用展開としてジルコニア基板上における TNT 析出条件を検討し、複合化を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) TNT 粒子が骨芽細胞分化に及ぼす影響

TNT 粉末の生成には量産可能な低コストプロセスとして注目されている化学合成法を用いた。市販の酸化チタン粉末 (高純度科学研究所製、アナターゼ、100nm) 3 g を 200 ml の 10 M の水酸化ナトリウム水溶液中に分散させ、110°C 程度の比較的低い温度および大気圧条件下で 20 時間還流させた。得られた白色スラリーに超純水を加えよく攪拌し、吸引ろ過により固液分離を行った。この超純水での洗浄をろ液の導電率が  $70 \mu\text{S/cm}$  以下になるまで繰り返した。その後、この生成物に 0.1 M の塩酸を加え、再び吸引ろ過により洗浄作業を行った。ろ液の導電率が  $5 \mu\text{S/cm}$  以下になるまで行った。その後、超純水をエタノールで置換し、得られた白色沈殿を 70°C のオーブンをういて乾燥し、酸化チタンナノチューブ (TNT) を作製した。

つぎに成体ラットの大腿骨骨腔より取り出した骨髄細胞を細胞培養プレートに播種し、15% FBS およびペニシリン/カナマイシン/アンフォテリシン B を添加した Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification ( $\alpha$ -MEM) 中で 37°C、5 % 二酸化炭素気相下で

培養した。翌日、非付着細胞を洗い流し、プレートに付着した細胞群が約 70% コンフルエントまで増殖した時点で継代培養を行い、分離培養し、ラット骨髄由来間質細胞 (rBMSC) を得た。次に ALP 染色を行った。骨系細胞分化誘導培地に 1 ppm の濃度で TNT 粒子を混合し、得られた rBMSC をその培地中で 14 日間培養後、Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄し、10 % 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。固定した細胞に 1.8 mM Fast red、0.9 mM Naphthol AS-MX phosphatase を添加した 120 mM 2-amino-2-hydroxy methyl 1, 3-propanedial 溶液を加え、37°C で 30 分間反応させた後に蒸留水で洗浄し、観察した。

### (2) チタン金属上における TNT の析出および細胞挙動

市販のチタン金属を 10 M の水酸化ナトリウム水溶液中に浸漬し、以下 TNT 粒子生成方法と同じ方法でチタン金属上に TNT 膜を生成した。水酸化ナトリウム水溶液中における反応時間 1、2、4、6、24、48、72 時間毎にチタン金属サンプルを取り出した。各反応時間におけるチタン金属表面の微細構造を走査型電子顕微鏡 (日立製作所製 S-5000) を用いて観察した。

次に、成体ラットの大腿骨骨髄から間葉系幹細胞を単離し、72 時間の反応時間で TNT を析出したチタン金属上にこれを播種した。骨系細胞分化誘導培地で培養し 1、2、3 週間毎にサンプルを取り出し、各サンプルにおける細胞観察および元素分析にて Ca と P の定量を行った。細胞観察および元素分析には走査型電子顕微鏡 (日立製作所製 S-5200) および付属の EDAX (元素分析装置) を使用した。

### (3) ジルコニア基板上における TNT の析出

ジルコニア基板には出発原料として、ジルコニア粉末 (TZ-3Y-E、東ソー) と酸化チタン粉末 (P-25、日本エアロジル社) を用いた。ジルコニア粉末に 10 wt% 酸化チタン粉末を加え、24 時間湿式ボールミリングおよび乾式ボールミリングを行い、混合粉末を得た。直径 15 mm、高さ 2 mm のペレット状に成型し、昇温速度  $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$  で 1400°C まで上げ、係留時間 5 時間、冷却速度  $20 \text{ }^\circ\text{C/min}$  の条件で焼成し、ジルコニア/酸化チタン複合体サンプルを得た。得られたサンプルを 10 M の水酸化ナトリウム水溶液中に浸漬し、以下 TNT 粒子生成方法と同じ方法でチタン金属上に TNT 膜を生成した。水酸化ナトリウム水溶液中における反応時間 1、2、4、6、24、48、72 時間毎にチタン金属サンプルを取り出した。各反応時間におけるチタン金属表面の微細構造を走査型電子顕微鏡 (日立製作所製 S-5000) を用

いて観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 生体毒性および生体適合性を調べるために TNT 粒子を 1 ppm 含有させた骨系細胞分化誘導培地で 14 日間間葉系幹細胞を培養した結果 (図 1)、何も含有させていないコントロール培地および球状の酸化チタン粉末を 1 ppm 含有させた培地で培養した細胞と比較して、アルカリフォスファターゼ (ALP) 陽性細胞が多く検出された (図 2)。これは骨芽細胞に分化した速度が迅速であることを示し、TNT が新生骨生成に有効であることが示された。生体適合性を持つことが明確になることで、TNT の特異的構造や特性を活かして骨修復材料への応用展開が期待できる。

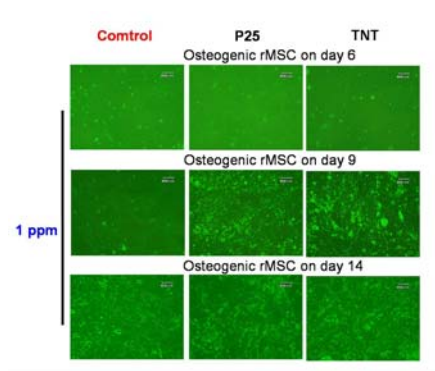


図 1 培養細胞の位相差顕微鏡観察

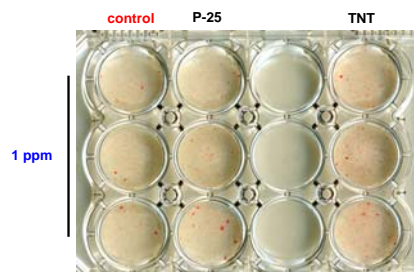


図 2 アルカリフォスファターゼ染色

(2) 酸化チタン粉末から TNT を合成する化学合成法を用いてチタン金属表面に TNT を合成することに成功した。24h 以上反応させると高度な縦横比を示すチューブ状構造がみられた。72h 以上の反応時間で、チタン金属表面は完全に TNT 層で覆われた (図 3)。低温化学合成法を用いて TNT を直接チタン金属上に合成することが可能であり、TNT の析出量は反応時間に影響されることが示された。

また、培養開始 2 週間後の無処理チタン金属と TNT 析出チタン金属を比較すると、TNT 析出チタン金属の方に Ca と P が大きく検出され、TNT が骨芽細胞分化に影響し、新生骨の生成に有効であることが示された (図

4a、b)。また、ナノチューブという形状が影響していることも考えられ、今後検討する必要がある。

チタン金属表面上に TNT を直接合成の合成条件を最適化した報告はなく本実験は生体材料への展開において有効な新しい知見を得られたと思われる。

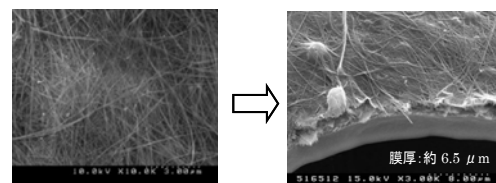


図 3 72 時間反応させた TNT 膜の SEM 像

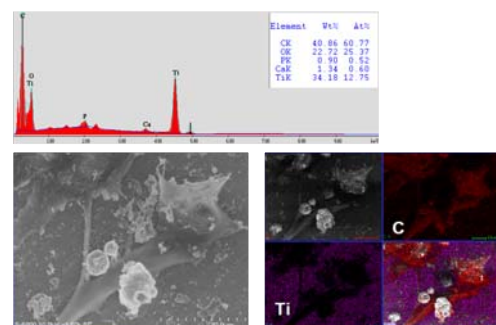


図 4a 培養 14 日のコントロールチタン金属表面における EDX 分析

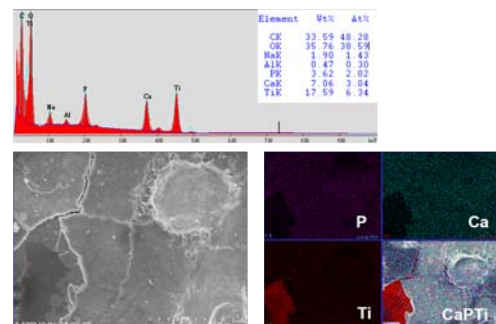


図 4b 培養 14 日の TNT 析出チタン金属表面における EDX 分析

(3) ジルコニアに酸化チタンを複合させたバルク体を TNT を合成する化学合成法を用いてチタン金属表面に TNT を合成することに成功した (図 5)。しかし、ジルコニア表面における TNT 析出量は、チタン金属に析出させた場合と比較して少なく、また TNT 膜が剥がれやすかった。TNT 量は反応時間も依存していると考えられるが、水酸化ナトリウム水溶液中で還流させて反応しているために、その過程で剥がれていることも考えられる。ジルコニア基板における TNT の合成条件を最適化する必要がある。しかし、ジルコニア基板上に TNT を析出させる研究報告はされておらずナノ構造体との複合によりセラミックス生体材料開発における更なる伸張が期待できる。

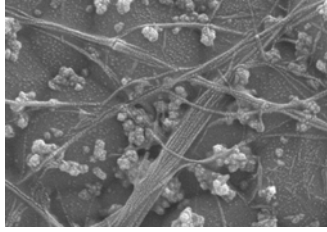


図5 ジルコニア基板における TNT の合成

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計2件)

- ① 西田尚敬、Ceria-stabilized Zirconia/Alumina Nanocomposite Suitable for Electrophoretic Deposition in the Fabrication of Dental Restorations.、The 9th International Symposium on Ceramic Materials and Components for Energy and Environmental Applications、2008.11.12、上海
- ② 西田尚敬、チタニアナノチューブの歯科用インプラントへの応用、日本セラミックス協会2009年年会、2009.3.17、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 尚敬 (NISHIDA HISATAKA)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：70448116