

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10196

研究課題名（和文）チタニアナノチューブ粒子へのアパタイト被覆による骨誘導能の高度化

研究課題名（英文）Improvement in osteoinduction ability by apatite formation on titanium oxide nano-tubes

研究代表者

西田 尚敬（NISHIDA, Hisataka）

大阪歯科大学・歯学部・講師（非常勤）

研究者番号：70448116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：チタニアナノチューブ（TNT）はチタン酸レピドクロサイト構造の多層チューブ状であり、多量の分子やイオンを吸着する特徴を持っている。この吸着能を活かし、高度な骨誘導材料としての展開を期待し、擬似体液（SBF）を用いてTNTとヒドロキシアパタイト（HAp）の複合体を作製した。SBF溶液中でのUV照射によりTi³⁺に酸素欠損が生じ、水分子が解離してTNT表面に吸着し、新たなヒドロキシル基を形成してアパタイトの核生成を誘導することに成功した。また、この複合材料は、高骨誘導能を有することがわかり、ナノ構造チタニアが生体材料へ展開できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工骨補填材の研究はHApとβ-TCPがほとんどであり、光触媒担体であるチタニアとナノチューブ構造を掛け合わせた材料を応用する研究は少なく、世界を見ても先駆けていると考えられる。高比表面積であることや、イオンあるいは分子の優れた吸着能などのチタニアナノチューブ特有の特徴を活かしつつ、アパタイトと複合化することによりこれまでにない骨誘導能を付与することに成功した。この結果は、まだ解明できていないナノオーダー物質の生体材料展開への可能性を示した。本研究での知見をもとに、ナノ材料科学を医科歯科学に融合した学際領域において新しい学問体系の構築に前進したと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Titania Nanotubes (TNTs) are in the form of a multilayer tube with a lepidocrocite titanate structure and have a feature of adsorbing a large amount of molecules and ions. In this study, Taking advantage of its adsorptive ability, we expected to develop it as an advanced osteoinductive material, and prepared a composite of TNT and hydroxyapatite (HAp) using simulated body fluid (SBF). UV irradiation in SBF solution caused oxygen deficiency in Ti³⁺, and water molecules dissociated and adsorbed on the TNTs surface, forming new hydroxyl groups and inducing apatite nucleation. This composite material was found to have high osteoinductive ability, and we discovered the possibility of developing nanostructured titania as a biomaterials.

研究分野：ナノ材料科学

キーワード：酸化チタン 生体材料 光触媒 骨誘導

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体の骨の主成分であるヒドロキシアパタイト（以下 HAp）の安全性は周知のものであり、様々なヒドロキシアパタイト人工骨補填材が開発されている。しかしその多くは治癒までの期間が長くなり、治癒中の患者の QOL の低下や、骨形成が完了するまでの強度が低いことによる骨折が生じてしまうことが課題となっており、少しでも速く骨が形成される人工骨補填材が求められている。既存の人工骨補填材として HAp と β -TCP が広く用いられており、この材料をベースとして骨形成速度の促進を目的とした様々な複合化研究が行われているが、ベースを異なる材料にして骨形成能を促進させるアプローチはほとんどない。

溶液化学法により合成したナノチューブ構造チタニア（以下 TNT）はナノ粒子であり、極めて高い分子やイオン吸着能を持ち、また、多量の OH 基を有しており、形状、性質、性状において人工骨補填材として有利な条件が備わっていると考えられる。生体インプラント体周囲における骨再生研究では、インプラント表面における形状、性状、性質における研究は盛んに行われている。しかし、人工骨補填材における研究ではこのような試みは少ない。生体安全性があることを前提に、骨芽細胞の早期接着・増殖・分化を促す最適な環境をもつ材料であれば、HAp や β -TCP よりも迅速的に骨を形成するのではと考えた。HAp や β -TCP に代わる人工骨補填材を発見し、知見を得ることができれば革新的な骨再生研究の進展が期待できると考える。

2. 研究の目的

本申請研究では、特異的チューブ構造と高い生体適合性をもつ TNT と HAp を生体模倣環境下で複合化させ、TNT の生体親和性と骨誘導能の向上および選択的タンパク吸着能を付与し多機能化を図る。そして、チタニアのもつ骨形成のポテンシャルを明らかとし、既存材料よりも迅速的な骨形成を誘導する人工骨補填材として応用することを目的とする。

これまでの骨補填材に関する研究は HAp や β -TCP を用いているものが多く、その材料に対する有機/無機あるいは無機/無機複合化がほとんどである。ナノオーダー物質が生体に及ぼす影響に関する研究は行われているものの不明な点が多いため、そこで、ナノ構造チタニア(TNT)における骨形成に及ぼす知見を得ることで、『ナノ材料科学と医科歯科学を融合した学際領域における新しい学問体系の構築』を図った。

3. 研究の方法

(1) 擬似体液 (SBF) を用いた TNT への HAp 複合化及び TNT 表面における HAp 析出条件の確立

TNT 及び SBF 溶液の作製

出発原料として TiO_2 粉末 (P25) を用いて、溶液化学法により単結晶 TNT 粒子を合成した (図 1)。次にイオン濃度の異なる、1.0 及び 1.5 SBF を作製した (表 1)。

	イオン濃度 (mol/m ³)								pH
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	
1.0 SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5	7.40
1.5 SBF	213.0	7.5	2.3	3.8	221.7	6.3	1.5	0.8	7.40

表 1 . 1.0 及び 1.5 SBF におけるイオン組成

HAp/TNT 複合粒子の作製

作製した 1.0 及び 1.5 SBF 溶液を用いて、SBF 溶液中に合成した TNT を添加し、室温で攪拌しながら紫外光 (UV) 照射を 5h おこなった。UV 照射後、37℃ に設定し攪拌しながら 3 日間浸漬させた。そして、TNT 粒子を吸引濾過にて回収し、60℃ で乾燥して試料を得た (図 2)。また、Ca イオンをドープした TNT においても同様に複合化を試みた。作製した試料の表面構造を超高分解能電界放出型走査電子顕微鏡 (SEM) にて観察し、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) にて構成組成分析をおこなった。また、X 線光電子分光法 (XPS) にて試料表面における水酸基の分析もおこなった。

(2) HAp/TNT 複合粒子における In-vitro での骨形成能評価

成体ラットの大腿骨骨髄から間葉系幹細胞を単離し、骨芽細胞分化誘導培地中に TNT/HA 複合粒子を添加し、骨芽細胞分化マーカーである Runk2、ALP、osteocalcin (OCN) の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて解析、Ca 析出量を評価した。

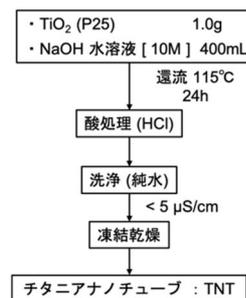


図 1 . 溶液化学法による TNT 合成方法

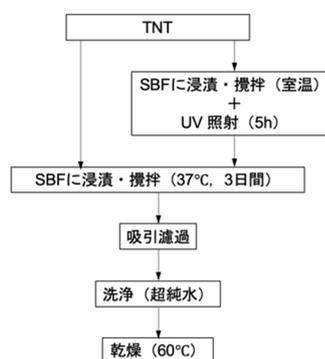


図 2 . HAp/TNT 複合粒子作製方法

4. 研究成果

(1) 擬似体液 (SBF) を用いた TNT への HAp 複合化及び TNT 表面における HAp 析出条件の確立

図3は、溶液化学法により合成した TNT の SEM 及び TEM 画像を示す。内径約 8 nm、外径約 10nm のチューブ構造が観察できる。図4は、1.0 及び 1.5SBF 中で 3h 照射し、その後、溶液中で 37 で 3 日間保持した試料における XRD スペクトルを示す。その結果、1.0 と 1.5SBF を用いて UV 照射をおこなった試料でのみアパタイトに起因すると考えられるピークが認められた。FT-IR スペクトルでは、炭酸アパタイト由来の $1000\sim 1100\text{cm}^{-1}$ の PO_4^{3-} 基と $1350\sim 1550\text{cm}^{-1}$ の CO_3^{2-} 基によるピークがみられた (図5)。

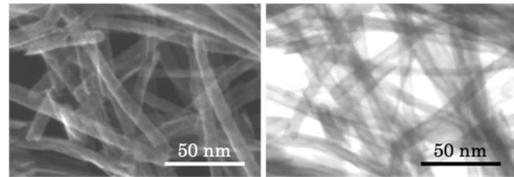


図3. 溶液化学法により合成した TNT 粒子

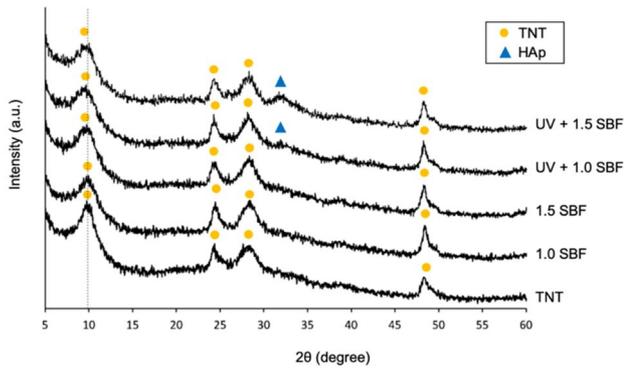


図4. SBF 浸漬後の TNT 粒子における XRD 回折スペクトル

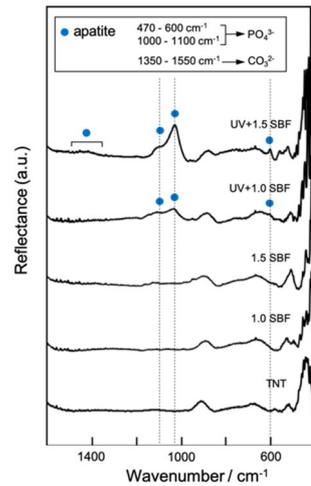


図5. SBF 浸漬後の TNT 粒子における FT-IR スペクトル

図6に各 SBF 濃度で、UV 照射した試料としなかった試料における SEM 画像を示す。UV を照射しなかった TNT 表面には析出物が観察されなかったが、1.0 及び 1.5SBF どちらも UV 照射をおこなった TNT では表面にシート状の析出物が確認された。また、図7に 1.5SBF を用いて UV 照射をおこなった試料の SEM 画像を示す。溶液化学法による合成直後の TNT と比較して明らかな析出物を認めた。図8の EDX の結果から、この析出物上から Ca と P が検出され、析出物はリン酸カルシウム化合物であると考えられる。また、XRD や FT-IR スペクトルからも骨類似アパタイトと推測される。TNT 上の骨類似アパタイトの形成は、SBF 中での UV 照射によって促進されたと考えられる。

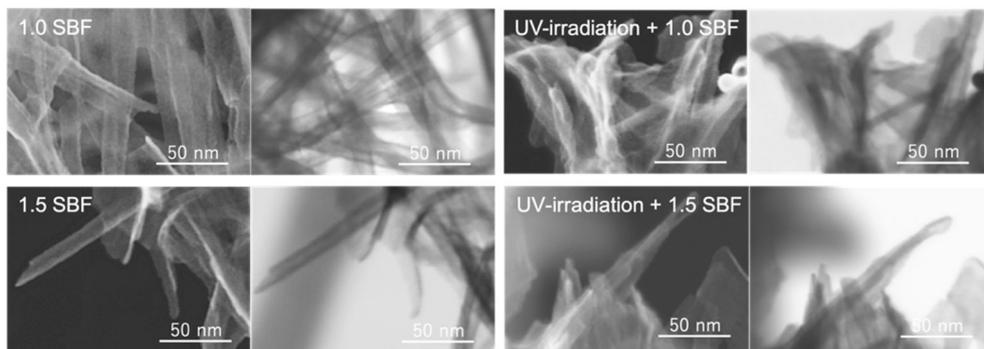


図6. SBF 浸漬後の TNT 粒子における SEM/STEM 画像

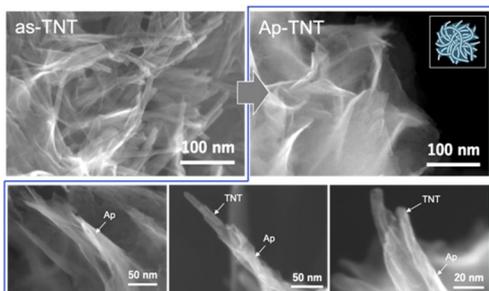


図7. UV 照射 5h 後に 1.5 SBF に浸漬した TNT 粒子における SEM/STEM 画像

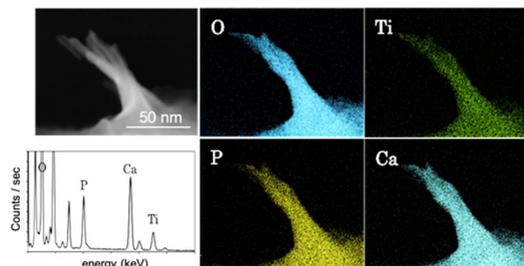


図8. UV 照射 5h 後に 1.5 SBF に浸漬した TNT 粒子における元素マッピング (EDX)

図9は、UV照射前後の試料のXPS(O1s)スペクトルを示す。529.5eVのピークは格子中の酸素(Ti-O: TiO₂)、531.4eVは酸性TiOH基及び物理吸着水によるOH基(Bridge OH)中の酸素、532.2eVは塩基性Ti-OH基(Terminal OH)における酸素を示す。O1sピーク面積の相対比を表2に示す。UV照射前の試料ではTiOH及びTi-OHともに低く、UV照射後にはピーク強度が上昇した。

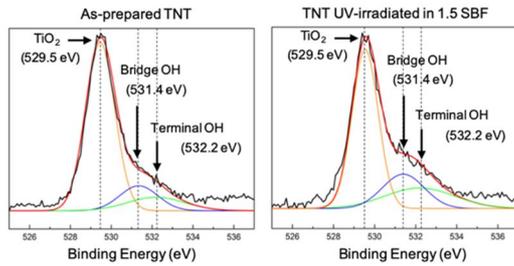


図9 . SBF 浸漬前と浸漬後におけるXPS(O1s)スペクトル

試料	ピーク面積相対比 (%)		
	TiO ₂ (529.5eV)	TiOH (531.4eV)	Ti-OH (532.2eV)
TNT (1.5 SBF 浸漬前)	74.10	14.29	11.61
TNT (1.5 SBF 浸漬 + UV照射後)	59.19	20.41	20.40

表2 . XPS(O1s)スペクトルのピーク面積相対比

TNTをSBF溶液中に浸漬すると表面に水が吸着し、多くの水酸化チタンが形成され、さらにUV照射をおこなうことでアパタイトの核形成を引き起こすとされる塩基性Ti-OH基が表面に多量に形成されたためUV照射群の試料でアパタイトが析出されたと考えられる。表面にアパタイトを形成させるためには、表面水酸基の量が大きく関与している。このような酸化チタンの表面水酸基の光誘起構造変化は、光励起によって電子正孔対が生成されることは従来の光触媒反応と同じだが、一部の電子、正孔が酸化チタン自身の結晶格子と反応していると考えられる。電子が四価の格子チタンを還元すると同時に、正孔が格子酸素を酸化して、酸素欠損を生じる。生成されたTi³⁺は、空気中の酸素により酸化されるが、水溶液中での反応であるため酸素ではなく解離した水分子と結合したと考えられる(図10)。酸化チタン表面において、酸素欠陥は水分子の吸着サイトになりやすいと言われており光照射により水酸基が多量に形成されたものと思われる。

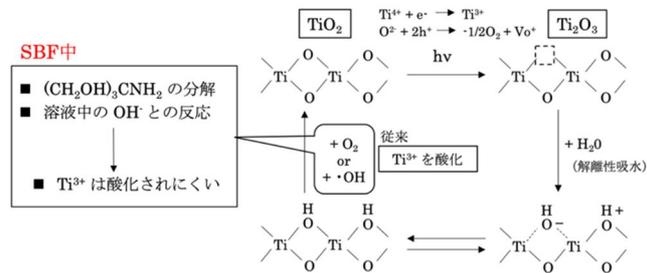


図10 . 表面水酸基形成メカニズム

Tiインプラントの骨形成能を促進する目的で表面へのCaイオン注入やスパッタ蒸着を行うと、骨伝導能、骨形成能が促進されると言われている。そこで、予めCa²⁺をTNT表面へ取り込んでおくことで、リン酸イオンを吸着しやすくし、アパタイトの核形成を促進させることを期待して、CaドーピングTNTを作製した。作製方法は、従来のTNTの合成に準じ、酸処理に酢酸カルシウム((CH₃COO)₂Ca·H₂O)を用いて合成した。EDXの結果から作製した試料(Ca-TNT)上から均一にCaが検出され、Caがドーピングされていることがわかる(図11)。

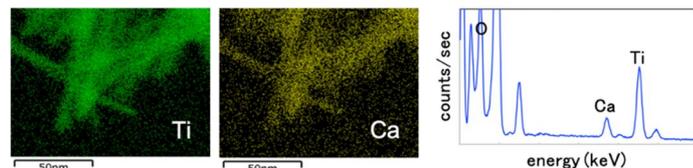


図11 . CaドーピングTNTにおける元素マッピング(EDX)

合成したCa-TNTを37℃で1.5SBFに1日間、3日間、7日間浸漬した。その結果、SEM観察で、析出物が確認され、また、XRDピークにアパタイトのピークがみられた(図12)。光照射をおこなわなくても試料表面に簡単にアパタイトを析出することに成功した。また、SBF浸漬時間も短縮することができた。新たに表面官能基(OH基)を形成しなくとも、予め試料表面にCaイオンを存在させることで、SBF中のHPO₄²⁻イオンが表面へ吸着しやすくなり、アパタイトの核形成速度を促進させることが

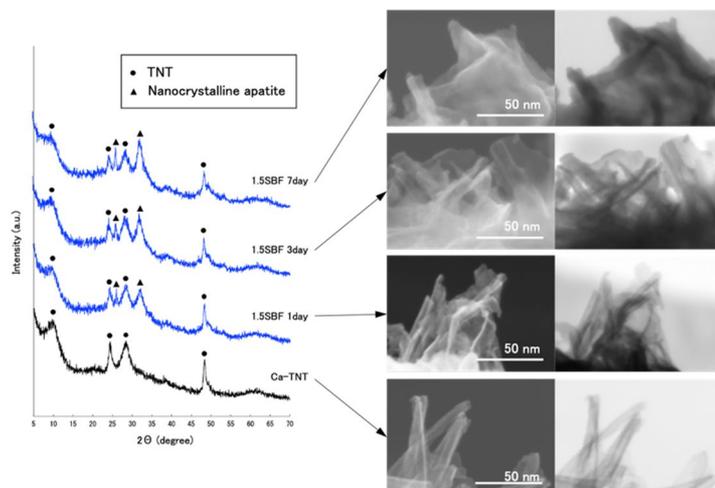


図12 . CaドーピングTNTにおけるXRDピークおよびSEM/STEM画像

可能であることが示唆された（図13）。

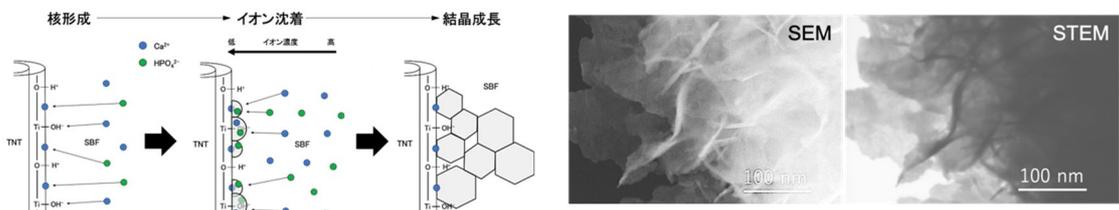


図13 . アパタイト形成メカニズムと Ca-TNT/HA 複合粒子の SEM/STEM 画像

TNT とアパタイトとの複合化に成功したことにより、暗所でもアパタイトが有害物質を吸着することが可能であり、また、繊維などに混合しても基材を分解しにくくなる。このような機能化により、骨再生材料だけでなく高機能光触媒材料としても期待ができる。

(2) TNT/HA 複合粒子における In-vitro での骨形成能評価

本課題で TNT 粒子および HA と複合化した TNT 粒子における骨再生材料への応用展開を検討し、In-Vitro での骨生成能評価をおこなった。溶液化学法により合成した TNT を濃度を変えて培地に添加したところ、添加量 1ppm における培地で培養 2 週目における ALP 活性が有意に高くなり、骨分化誘導能が高いことが明らかとなった。また、骨芽細胞の分化に必須の転写因子である Runx2、Ca 量および骨代謝マーカであるオステオカルシン (OCN) それぞれにおいて 1ppm の濃度で有意に高くなり、濃度の最適化ができた（図14）。このことから TNT に骨誘導能及び骨形成能を持つことが示唆された。

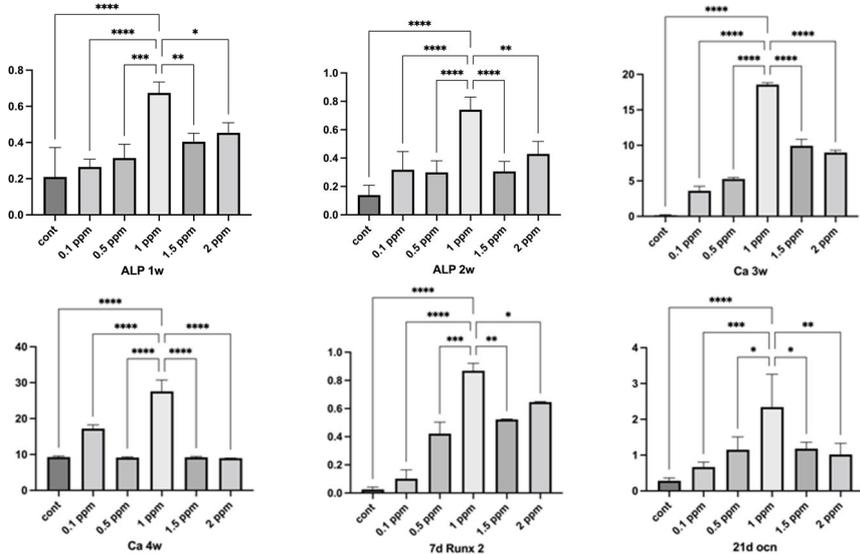


図14 . TNT 添加濃度変化による ALP 活性、Ca 析出量、Runx2 遺伝子発現および OCN 産生量評価

骨形成能の高度化を期待して TNT とアパタイトを複合させた粒子における、培養評価では、TNT にアパタイトを複合させた粒子を添加した培地において有意に ALP 活性及び Ca 析出量が高くなった。その中でも Ca ドープ TNT にアパタイトを析出させた試料においては、高い骨誘導能及び骨形成能を有することが明らかとなり、アパタイトと複合化することによる骨形成能の高度化に成功した（図15）。

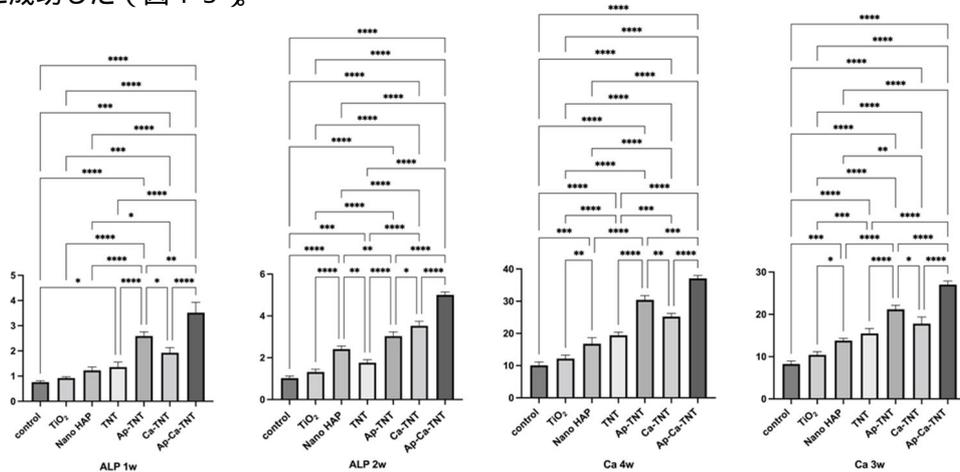


図15 . 各試料（添加濃度 1ppm）による ALP 活性、Ca 析出量評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komasa Satoshi, Kusumoto Tetsuji, Hayashi Rina, Takao Seiji, Li Min, Yan Sifan, Zeng Yuhao, Yang Yuanyuan, Hu Hui, Kobayashi Yasuyuki, Agariguchi Akinori, Nishida Hisataka, Hashimoto Yoshiya, Okazaki Joji	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Argon-Based Atmospheric Pressure Plasma Treatment on Hard Tissue Formation on Titanium Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7617 ~ 7617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22147617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小正聡、西田尚敬、関野徹
2. 発表標題 化学合成法によって生成されたチタニアナノチューブの生体適合性の検討
3. 学会等名 日本歯科理工学会 第79回春期学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hisataka NISHIDA, Satoshi KOMASA, Tohru SEKINO
2. 発表標題 Fabrication of apatite coated titanium oxide nano-tubes in SBF
3. 学会等名 INTERNATIONAL DENTAL MATERIALS CONGRESS 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田尚敬、山本一世、関野徹
2. 発表標題 チタニアナノチューブへの光還元による Cu ₂ O 担持が光触媒特性へ及ぼす影響
3. 学会等名 第78回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田尚敬、関野徹、山本一世
2. 発表標題 光還元法によるチタニアナノチューブへの Ag ナノ粒子担持
3. 学会等名 日本歯科理工学会 近畿・中四国地方会 令和 2 年度冬期セミナー 併催: 第 76 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田尚敬、関野徹
2. 発表標題 体液模倣環境におけるチタニアナノチューブ粒子へのアパタイト被覆
3. 学会等名 日本歯科理工学会 第73回春期学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田尚敬、山本一世
2. 発表標題 擬似体液中におけるチタニアナノチューブ表面でのアパタイト核形成の誘起
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisataka Nishida, Tomoyo Goto, Sunghun Cho, Tohru Sekino
2. 発表標題 Apatite Formation on Titanium Oxide Nano-tubes under a Condition Mimicking Body Fluid
3. 学会等名 The 23rd SANKEN International Symposium The 18th SANKEN Nanotechnology International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020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	関野 徹 (SEKINO Tohru) (20226658)	大阪大学・産業科学研究所・教授 (14401)	
研究 分担者	本田 義知 (HONDA Yoshitomo) (90547259)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------