

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792303

研究課題名（和文）低次元酸化物ナノ構造体の高次構造設計によるナノバイオマテリアルの開発

 研究課題名（英文）Application of Low-dimensional Oxide Nanotubes to Biomaterials by  
Advanced Functionalization

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（和文）：TiO<sub>2</sub> ナノチューブに Ca<sup>2+</sup> を修飾し、吸着した Ca<sup>2+</sup> が周囲の液と反応して溶出され、骨補填材の周囲および内部において水酸アパタイトに対する過飽和度が上昇し水酸アパタイトの核形成を促進すると考えられる。そこで、骨類似アパタイトの核形成を誘起する官能基を表面に形成させれば、骨類似アパタイト層が形成されやすくなると予想し、細胞の接着や増殖、分化などの機能を促進させ、組織の再生を迅速に誘導する因子となる材料の開発を目指し、酸化チタンナノチューブ（TNT）の内外表面へ Ca の修飾を検討した。また、酸化チタンナノシート（TNS）における生体適合評価も検討した。

研究成果の概要（英文）：Noting the high ion adsorption of TiO<sub>2</sub> nanotubes, we speculated that TNTs modified with Ca<sup>2+</sup> would allow the elution of adsorbed Ca<sup>2+</sup> after its reaction with surrounding fluid, which would increase the degree of hydroxyapatite supersaturation in the surrounding and internal areas of bone-filling materials, promoting hydroxyl apatite nucleation. The aim of this study was to develop the materials that promote the cell bonding, proliferation and differentiation by making Ca modified TiO<sub>2</sub> nanotube. And the surface properties of an implant influence osseointegration. To shorten the period of dental implant treatment, we investigated the direct synthesis and biocompatibility of the nanostructure using low-temperature chemical synthesis on a titanium plate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：セラミックス・酸化チタン・ナノチューブ・生体材料

## 1. 研究開始当初の背景

Ti-OH はアパタイトの核形成を誘起すること、アナターズ構造の Ti-OH 基は高いアパタイト形成能を示すことや、骨類似アパタイトの形成メカニズムは、OH 基に先ず Ca<sup>2+</sup> が吸着し、さらにそこに HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> が吸着することで骨類似アパタイトが形成することが報告されている。代表者はこれまでの実験により酸化チタンナノチューブ（TNT）が細胞と接着し、生化学因子を加えなくても細胞の骨芽細胞

活性が高くなるという知見を得ている。また、Ca イオンを高濃度に吸着するという通常の TiO<sub>2</sub> にはない機能を有していることも見出している。そのため、骨類似アパタイトの核形成を誘起する官能基（Ca）を表面に形成させれば、骨類似アパタイト層が形成しやすくなると予想される。また、近年、歯科治療においてインプラント治療は必須の選択肢の一つとなった。そのため、インプラント治療にも QOL の概念が浸透し、快適性、審美性、咀

嚼満足度が強く求められるようになってきた。しかし、顎骨内に埋入されたインプラントが良好な状態を維持するためには、インプラント体への早期機能負担および長期的咬合支持が重要となる。そのためにはオッセオインテグレーション獲得までの期間は早期であることが望ましい。本研究代表者は実験過程で、チタン金属を 10M の水酸化ナトリウム水溶液に室温・大気開放圧力下で 24 時間攪拌・浸漬することで表面にナノシート構造 (TNS) が形成されることも発見している。オッセオインテグレーションの獲得期間短縮にはインプラント体の表面性状が関与し、その構造は細胞接着・硬組織への分化誘導に影響を与えるという報告がある。TNT 粉体のみならず、チタン金属上における TNS 合成により、迅速的骨形成インプラントとしての応用も可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 自己組織化的に低次元酸化チタンナノ構造体を合成し、様々な方法で表面や中空空間に新生骨生成因子を修飾し、徐放性を明らかにし、従来の生体適合性材料にはない迅速かつ高機能な骨形成生体適合材料を創製する。そして、これら生体材料創製にとどまらず、次世代型の生物デバイスの設計に必要な有効となる知見を得ることを目的とする。

(2) ラット大腿骨骨髓細胞を使用し、チタン金属上に合成したナノ構造 (酸化チタンナノシート構造) の生体活性について比較・検討し、知見を得て、迅速的骨形成インプラント材料としての開発指針を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) 低温化学合成法によりチタニアナノチューブを作製した。市販の  $\text{TiO}_2$  粉末 (高純度化学研究所製、アナターゼ、100nm) を 10M NaOH 水溶液に加え、110°C で 24 時間攪拌還流させた。得られた白色のスラリーにイオン交換水を加えよく攪拌し、ろ過により固液分離を行った。この洗浄を  $70 \mu\text{S}/\text{cm}$  以下になるまで繰り返した。この生成物に 0.1M 塩酸を加え、再び洗浄作業を  $5 \mu\text{S}/\text{cm}$  以下になるまで行い乾燥させた。次に、作製した TNT を  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$  を溶解した水溶液に浸漬し、24 時間攪拌還流を行い、 $\text{Ca}^{2+}$  ドープの TNT (Ca-TNT) を作製した。

まず、TEM および EDS により Ca-TNT における構造解析と表面 Ca の定量を行った。

次に、Ca-TNT を PTFE 容器に入れ塩酸およびフッ化水素酸を加えて密閉し、180°C で 10 時間加熱分解を行い、放冷後、分解液に水を加え ICP 発光分光分析装置にて Ca の含有量を測定した。

そして、Ca-TNT を超純水に分散させ、37°C

で静置し、数時間おきにサンプリングを行ない、ろ過したものを溶出液とし、イオンクロマト分析によりカルシウムイオンを定量し溶出試験とした。また、全カルシウムを ICP 発光分光分析により定量した。

(2) 実験材料として #2000 まで研磨した市販の純チタンを使用し、実験群として TNS を析出させたものを対照群として研磨した純チタンを使用した。TNS の析出には、各試料を 10 M の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌した状態で室温・大気圧条件下で 24 時間反応させた。その後、試料を取り出し、イオン交換水にて導電率が  $5 \mu\text{S}$  以下になるまで洗浄を行った。そして、自然乾燥させチタン金属表面に TNS を析出させた。試料は実験群、対照群ともにアセトン、エチルアルコール、イオン交換水で各 10 分間超音波洗浄を行い、その後乾熱滅菌を行った。

生後 7 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から骨髓間葉細胞を採取し初代培養を確立し、その 3 代目を実験に供した。実験群および対照群共に 24 穴プレート上に設置したチタン金属表面に 1 穴あたり  $4 \times 10^4$  個ずつ播種し、培地に 10 mM  $\beta$ -グリセロン酸ナトリウム、82  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アスコルビン酸および  $10^{-8}$  M デキサメタゾンを含む分化誘導培地を用い、培養開始後 14、21 日のアルカリフォスファターゼ活性、培養開始 28 日のオステオカルシン量およびカルシウム量を測定した。また、培養開始 3 日後の Runx-2 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて分析した。各測定値は Student の t 検定を用いて統計解析を行い、有意水準を 5% 以下とした。

## 4. 研究成果

(1) Ca ドープ後も TEM 写真では、直径 8nm、長さ約 200nm のナノチューブ構造が維持されていることが確認できた (図 1)。EDS では、チューブ中壁は約 5 vol% の Ca イオンが検出されたが、先端は約 3 vol% とやや吸着量が少なくなっていた (図 2)。IPC による定量結果では、114042  $\mu\text{g}/\text{g}$  もの多量の Ca イオンが吸着することがわかった (図 3)。また、イオンクロマト分析では、計測直後に全 Ca 吸着量の約 14% の Ca イオンが溶出し、その後はほとんど Ca イオンの溶出は見られなかった。しかし、直後の溶出からわずかではあるが Ca イオンが徐々に溶出することが明らかとなった (図 4)。溶媒との平衡反応により浸漬直後に Ca イオンが多量に溶出したものと思われる。また、数時間後には一度解離したイオンが再度吸着していると考えられる。

徐放性はほとんどないものの通常の酸化チタンにない高イオン吸着能を有しており、多量の Ca を保持することが可能であること

がわかった。ユニークな低次元ナノ構造と機能を持つナノチューブが生体材料への応用展開へと繋がる可能性があることが示唆された。

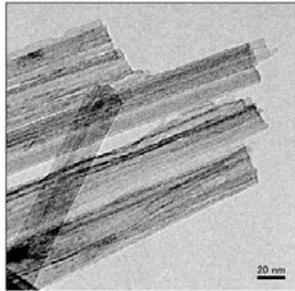
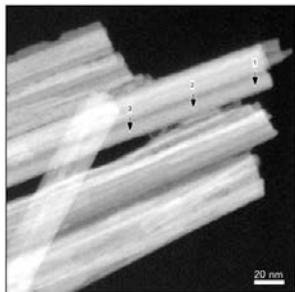


図1 TEM画像

Caイオン吸着後もチューブ構造を維持している



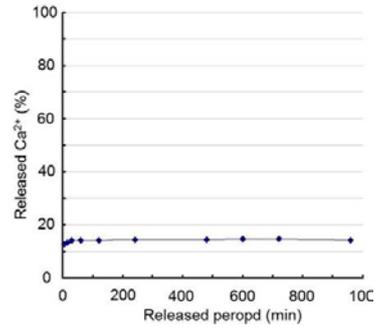
【atom%】	O-K	Ca-K	Ti-K
spot 1	39.85	2.98	57.16
spot 2	37.76	4.66	57.57
spot 3	40.81	5.18	54.01

図2 EDS分析（3スポット）

	Units	Results	
		Before Ca adsorption	After Ca adsorption
<b>Ca</b>	wt %	<b>0</b>	<b>11</b>
	μg/g	<b>0</b>	<b>114042</b>

図3 IPC分析（TNTへのCa吸着量測定）

a)



b)

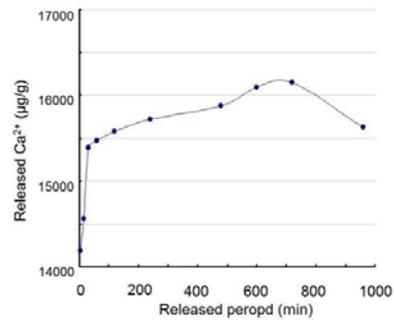


図4 イオンクロマト分析（Caイオン徐放試験）

- a) 全Ca吸着量における徐放量
- b) 徐法されたCa量

(2) 14、21日目のアルカリフォスファターゼ活性、28日目のオステオカルシン量(図5)、カルシウム量(図6)、3日目のRunx2 mRNAの発現についてはすべての実験群の値が対照群よりも有意に高かった。すでに多くの報告でなされている純チタン金属表面におけるナノ構造修飾が硬組織への分化誘導における初期の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性・Runx2mRNAの遺伝子マーカー、中後期の分化・石灰化のマーカーであるオステオカルシン量、石灰化のマーカーであるカルシウム量に強く起因するという結果は、本実験でのTNS構造においても同一のことがいえると思われる。TNS構造がチタンネットワーク層を有しナノメートルレベルのネットワーク構造を有することをすでに報告しているが、細胞との接着メカニズムについてはまだ明らかではないことも多い。今後は本実験の結果を踏まえてin vivo、in vitroの両面から新規インプラント材料の開発に向けて更なる実験を行う予定である。

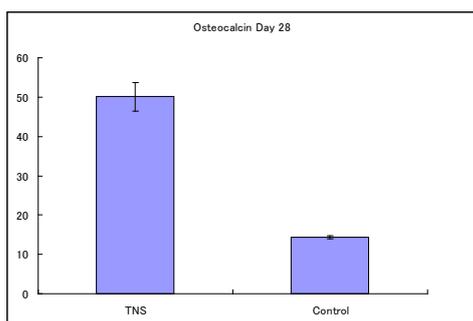


図5 培養28日後におけるオステオカルシン量

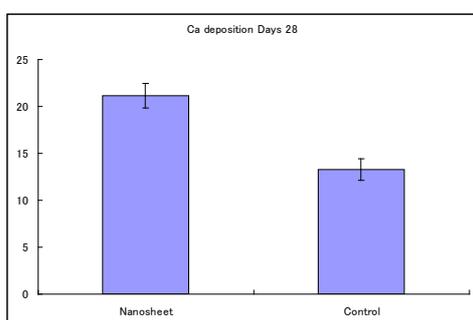


図6 培養28日後におけるカルシウム量

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) 西田尚敬、江草宏、関野徹、田口洋一郎、小正聡、楠本哲次、田中昌博、山本一世、酸化チタンナノチューブがラット骨髄由来間質細胞に及ぼす影響、日本口腔リハビリテーション学会雑誌、査読有、24 巻、1 号、2011、52-57

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西田尚敬、酸化チタンナノチューブの機能化による応用展開。第7回ナノ・バイオメディカル学会。2013.1.24, 京都市
- ② 西田尚敬、酸化チタンナノチューブの高次構造設計による歯科用バイオマテリアルへの応用。第12回東北大学多元物質科学研究所研究発表会。2012.12.10, 仙台市
- ③ Nishida H. Titanium Oxide Nanotube: The potential for the application to biomaterial. The 29th International Korea-Japan Seminar on Ceramics. 2012.11.22, Deagu, Korea

- ④ 西田尚敬、チタニアナノチューブの機能化：カルシウムイオンの吸着および除放性。第60回日本歯科理工学会。2012.10.14, 福岡市
- ⑤ Nishida H. Making Calcium Titanate Nano-Tubes by Hydrothermal Synthesis. 14th meeting of the International college of Prosthodontists. 2011.9.10, Hawaii, USA

## 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