

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282139

研究課題名(和文) ex vivo抗菌性とin vivo骨結合能を示すTi金属の開発

研究課題名(英文) Development of titanium with ex vivo antibacterial activity and in vivo osteoconductivity

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) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：水酸化ナトリウム水溶液 - 温水処理後、アンモニア雰囲気中で600℃で1あるいは3時間加熱処理したチタンは、擬似体液(SBF)中で7日以内にアパタイトを形成した。同チタンは、可視光下でメチレンブルーを分解し、大腸菌に対して優れた殺菌効果を示した。本研究の処理によってチタン表面に形成された窒素ドープ酸化チタン(TiO₂-xNx)が、SBF中でのアパタイト形成と可視光応答型抗菌性に寄与していると考えられる。これらの基礎的知見は、可視光応答型抗菌性を示す、革新的な生体活性チタンの創製に繋がるものであり、感染リスクを低減する整形外科インプラントや歯科インプラントに応用され得る。

研究成果の概要(英文)：Ti treated with NaOH, hot water, and heated in an ammonia gas atmosphere for 1 or 3 h showed in vitro apatite formation within 7 days when soaked in simulated body fluid (SBF). The treated Ti decomposed methylene blue and showed excellent bactericidal activity against Escherichia coli under visible light irradiation. A fine network of N-doped anatase-type titania (TiO₂-xNx) formed on the Ti surface due to the surface treatment and was responsible for both the apatite formation in SBF and the visible-light induced antibacterial activity. These preliminary results suggest a simple method for producing novel bioactive Ti with visible light-induced antibacterial activity, which can be applied in orthopaedic and dental implants without the risk of infection.

研究分野：生体材料学

キーワード：チタン 窒素 可視光応答光触媒 抗菌性 生体活性

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等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 0.3~3% の確率で感染症が生じ、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、インプラント周囲炎が 2~14% の確率で発生する。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が、抗菌性を示さない。また、銀を表面担持させた Ti が提唱されているが、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、窒素ドープ TiO₂ (N-TiO₂) は可視光応答型光触媒活性による抗菌性を示す。また、化学処理により Ti 表面に形成された多孔性 TiO₂ は良好な骨結合性を示す。従って、何らかの処理により Ti 表面に N-TiO₂ 層を形成させることができれば、手術室などの生体外 (*ex vivo*) では抗菌性を示し、生体内 (*in vivo*) では骨結合性を示す Ti が得られる可能性がある (図 1)。

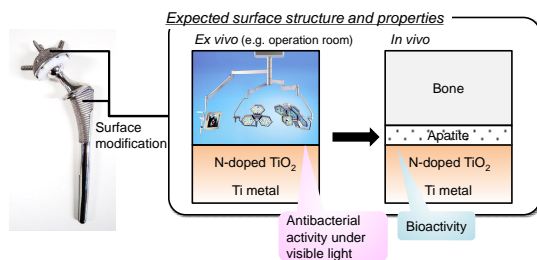


図 1 本研究において開発を目指す、生体外 (*ex vivo*) では抗菌性を示し、生体内 (*in vivo*) では骨結合性を示す Ti

N-TiO₂ は、TiO₂ をアンモニア雰囲気中で加熱処理することにより得られる。そこで申請者は、「NaOH 処理した Ti を温水処理することによって多孔質アナターゼ型 TiO₂ 層を Ti 表面に一旦形成させ、それをアンモニア雰囲気中で加熱処理すれば、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 水溶液および温水処理した後、さらにアンモニア雰囲気中で加熱処理することにより、同 Ti に N-TiO₂ 層の形成を試み、得られた試料の表面構造、可視光下での光触媒活性 (抗菌性)、細胞適合性さらに骨結合性を調べることにより、手術室などの生体外では抗菌性を示し、生体内では骨結合性を示す Ti を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

金属チタン (10×10×1 mm³) 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 の純水に 80°C で 48 時間浸漬した。その後、試料を洗浄、乾燥させ、アンモニア雰囲気中、600°C で 1-5 時間加熱処理した。

(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光触媒活性評価

試料を 5 mL の 0.01 mM メチレンブルー (MB) 水溶液に浸漬し、蛍光灯 (照射強度: 30 W/m²、波長 400-700 nm) を 6 時間照射した後、MB 濃度を可視紫外分光光度計により調べた。

(4) 試料の可視光下での抗菌性評価

試料をウェル内に置き、10⁶ コロニー形成単位 (CFU) の大腸菌を含む菌液 1 mL を加え、上方より LED 光 (照射強度: 110 mW/cm²、波長 415-650 nm) を 1 時間照射した後、段階希釈した菌液を寒天培地に塗抹し、翌日に CFU を算出することにより、試料の抗菌性を評価した。

4. 研究成果

図 2 に試料の SEM 写真を示す。いずれの加熱処理時間の場合も、Ti 表面に NaOH-加熱処理の場合と同様の微細な網目構造が形成された。

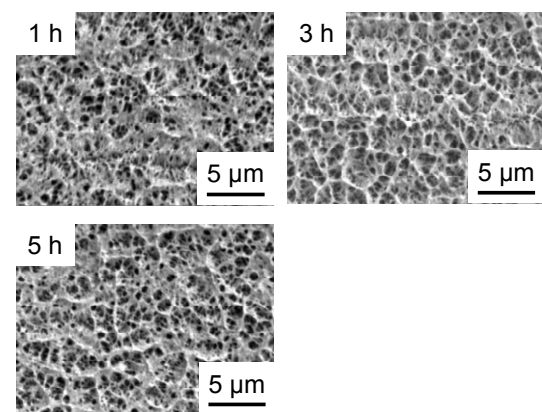


図 2 試料の SEM 写真

図 3 に試料の TF-XRD パターンを示す。いずれの加熱処理時間の場合も、Ti 表面にはアナターゼ型 TiO₂ と少量のルチル型 TiO₂ が形成された。

図 4 に試料の Na_{KLL}、Ti_{2p}、O_{1s} および N_{1s} XPS スペクトルを示す。いずれの加熱処理時間の場合も、Na-0 結合に帰属されるピークが 496 eV 付近に検出され、そのピーク強度から、試料表面には 3.5~4.2 atom% 前後の Na が存在していると見積もられた。また、TiO₂ に帰属

される Ti_{2p} ピーク (458 および 464 eV) および O_{1s} ピーク (529 eV) が検出された。

さらに、1 時間加熱処理した試料では、N-Ti (TiO_2 のアニオンサイトにドーパされた窒素: $TiO_{2-x}N_x$) および N-O-Ti に帰属されるピークが 396 および 400 eV 付近に観察され、その窒素存在率は 2.3 atom% であった。また、3 時間加熱処理した試料では、N-Ti に帰属されるピークの強度が増大し、N-O (NO_2 化合物) に帰属されるピークが 404 eV 付近にわずかに検出され、その窒素存在率は 4.7 atom% であった。さらに、5 時間加熱処理した試料では、N-Ti に帰属されるピークがやや減少し、代わって N-O に帰属されるピークの強度が増大し、その窒素存在率は 4.9 atom% であった。

以上より、本法によれば窒素アニオンがドーパされたアナターゼ型 TiO_2 ($TiO_{2-x}N_x$) を Ti 表面に形成させることが可能であり、また、窒素アニオンのドーパ量は 3 時間のアンモニア雰囲気中での加熱処理の場合に最大に達することが分かった。

図 5 および 6 に SBF 浸漬後の試料の SEM 写真および TF-XRD パターンをそれぞれ示す。いずれの試料も、SBF 中でその表面にアパタイトを形成したが、5 時間加熱処理した試料のアパタイト形成能は、1 あるいは 3 時間加熱処理した試料のそれよりもやや劣っていた。

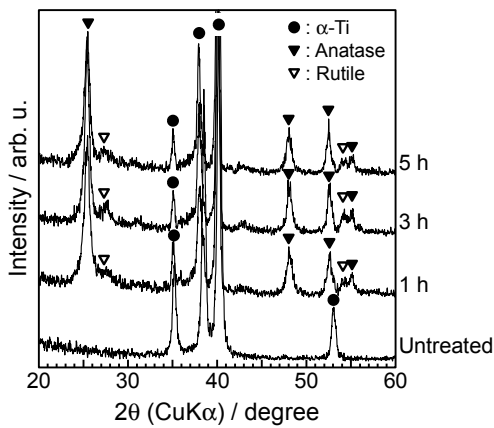


図 3 試料の TF-XRD パターン

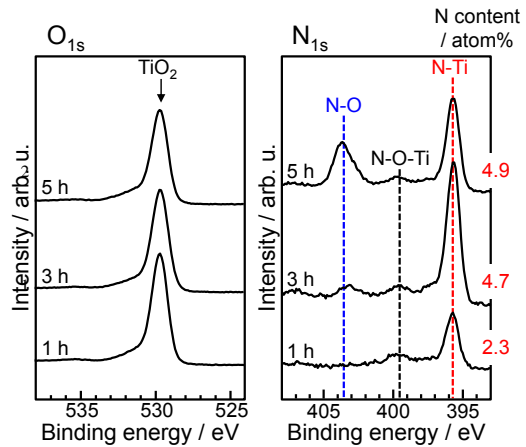
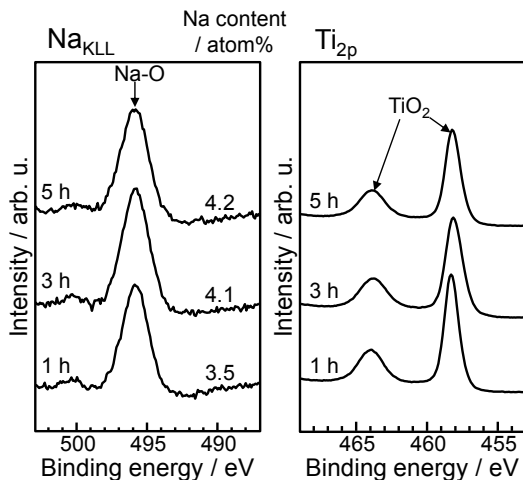


図 4 試料の XPS スペクトル

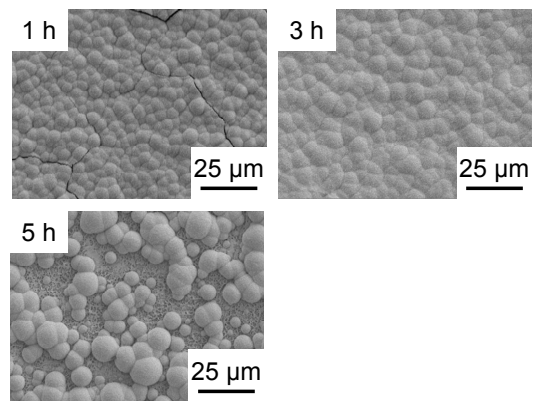


図 5 SBF 浸漬後の試料の SEM 写真

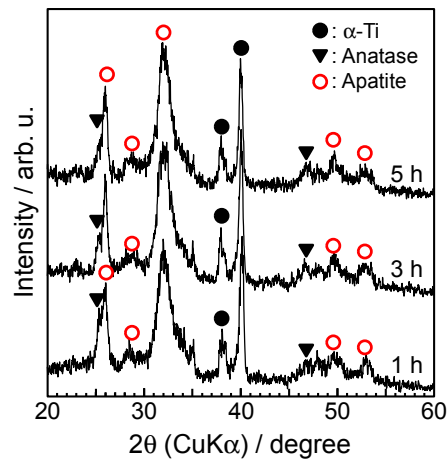


図 6 SBF 浸漬後の試料の TF-XRD パターン

Ti 系材料表面でのアパタイト形成には、微細構造、 TiO_2 の結晶構造、Ti-OH 基などの表面性状が寄与しているといわれているが、統一した見解は未だに存在していない。本研究においては、図 2 および 3 に示したように、Na 含有量を含めた微細構造や TiO_2 の結晶構造には顕著な差はなく、窒素の存在状態のみが異なっている。図 4 の N_{1s} XPS スペクトルによれば、アンモニア雰囲気中での加熱処理によって、試料表面では、以下のような反応が起こったと考えられる。

Ti-O-Ti Ti-N-Ti
 および/あるいは
 Ti-OH Ti-NH₂

さらに、5 時間加熱処理した試料では、N-O (NO₂ 化合物) に帰属される XPS ピークが顕著になった (図 4) ことから、アンモニア雰囲気中での加熱処理によって、以下のような反応が進行したと考えられる。

Ti-O-Ti Ti-O-N=O

詳細は不明であるが、この反応によって、5 時間加熱処理した試料のアパタイト形成能がやや低下したと考えられる。

図 7 に可視光下における試料の MB 分解率を示す。興味深いことに、MB 分解率は、窒素含有量の最も低い、1 時間加熱処理試料が約 12 % と最も高い MB 分解率を示し、加熱処理時間が長くなるにつれ、試料中の窒素含有量は増すにも関わらず、MB 分解率は低下した。このことは、N-TiO₂ の可視光応答型光触媒活性の発現には、窒素の存在量よりもむしろ存在状態が重要であることを示唆している。

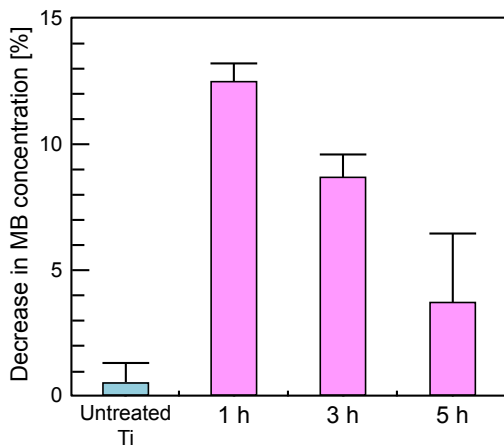


図 7 試料の可視光下における MB 分解率

図 8 に試料の抗菌性を大腸菌の生存率として示す。可視光を照射しない場合は、いずれの試料も抗菌性を示さなかったが、NaOH および温水処理後、アンモニア雰囲気中で 1 あるいは 3 時間加熱処理した試料は、可視光の照射によって大腸菌をほぼ完全に死滅させた。一方、NaOH および温水処理後、アンモニア雰囲気中で 5 時間加熱処理した試料は、可視光照射によっても抗菌性を示さなかった。

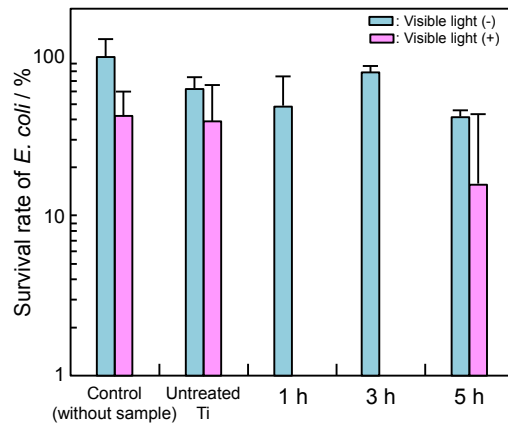


図 8 試料の抗菌性

以上より、Ti を NaOH および温水処理後、アンモニア雰囲気中、600°C で 1 あるいは 3 時間加熱処理すれば、Ti 表面に N を 2.3 あるいは 4.7 atom% 含む N-TiO₂ (TiO_{2-x}N_x) 層が形成され、同層が体液環境下における優れたアパタイト形成能と可視光下での優れた抗菌性を発現することが明らかとなった。

今後、動物実験等を行う必要があるが、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 Ti 設計の基礎的指針となり得る。

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 4 件)

M. Kawashita, N. Endo, T. Watanabe, T. Miyazaki, M. Furuya, K. Yokota, Y. Abiko, H. Kanetaka and N. Takahashi, Formation of bioactive N-doped TiO₂ on Ti with visible light-induced antibacterial activity using NaOH, hot water, and subsequent ammonia atmospheric heat treatment, *Colloid. Surf. B*, 査読有, Vol. 145, 285-290 (2016).

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.017

M. Kawashita, Y. Yokohama, X. Y. Cui, T. Miyazaki and H. Kanetaka, *In vitro* apatite formation and visible-light photocatalytic activity of Ti metal subjected to chemical and thermal treatments, *Ceram. Int.*, 査読有, Vol. 40, 12629-12636 (2014).

DOI: 10.1016/j.ceramint.2014.04.109

川下将一, がんや骨疾患の治療に貢献する医用材料の設計, 粉体および粉末冶金, 査読有, Vol. 60, 503-509 (2013). https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjspm/60/12/60_503/_pdf

M. Kawashita, N. Matsui, T. Miyazaki and H. Kanetaka, Effect of ammonia or nitric acid treatment on surface structure, *in vitro* apatite formation,

and visible-light photocatalytic activity of bioactive titanium metal, Colloid. Surf. B, 査読有, Vol. 111, 503-508 (2013).

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.06.049

〔学会発表〕(計 4 件)

M. Kawashita, N. Endo, T. Watanabe, T. Miyazaki, M. Furuya, K. Yokota, Y. Abiko, H. Kanetaka and N. Takahashi, Bioactive titanium with visible-light induced antibacterial activity, 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), December 10, 2015, M&D Tower, Yushima Campus, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, (Japan).

川下将一、遠藤真子、渡邊友亮、宮崎敏樹、古谷真衣子、横田琴音、安彦友希、金高弘恭、高橋信博、「窒素ドーパ酸化チタンを形成させたチタンのアパタイト形成能と可視光下での抗菌性」、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、2015 年 11 月 10 日、京都テルサ(京都府・京都市)

川下将一、表面化学処理および加熱処理によるチタンへのアパタイト形成能と可視光応答型抗菌性の付与、粉体粉末冶金協会平成 27 年度秋季大会、2015 年 11 月 11 日、京都大学百周年時計台記念館(京都府・京都市)

M. Kawashita, Bioactive titanium with visible-light induced photocatalytic activity, 5th International Conference on Recent Advances in Materials, Minerals & Environment (RAMM) & 2nd International Postgraduate Conference on Materials, Mineral and Polymer (MAMIP), August 5, 2015, Penang (Malaysia).

川下将一、古川崇、宮崎敏樹、目代貴之、庭野吉己、金高弘恭、チオ尿素水溶液中での水熱処理が NaOH 処理チタンの表面構造と特性に及ぼす影響、日本セラミックス協会 2015 年年会、2015 年 3 月 19 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

古川崇、川下将一、崔新宇、宮崎敏樹、金高弘恭、チオ尿素を利用した水熱処理がチタンのアパタイト形成に与える影響、第 23 回アパタイト研究会、2014 年 12 月 11 日、富山県民共生センター(富山県・富山市)

S. Furukawa, M. Kawashita, X. Cui, T. Miyazaki and H. Kanetaka, Formation of bioactive sulfur-doped titanium dioxide with visible-light photocatalytic activity on titanium by hydrothermal treatment, 14th Asian BioCeramics Symposium (ABC2014), October 30, 2014, Shanghai (China)

川下将一、可視光応答型光触媒活性を示

すバイオアクティブチタンの開発、東北大学金属材料研究所ワークショップおよび日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会、2014 年 10 月 6 日、東北大学金属材料研究所(宮城県・仙台市)
川下将一、遠藤真子、渡邊友亮、宮崎敏樹、金高弘恭、アンモニア雰囲気中で加熱処理した生体活性チタンのアパタイト形成能および可視光誘起光触媒特性、日本セラミックス協会 2014 年年会、2014 年 3 月 19 日、慶応義塾大学日吉キャンパス(神奈川県・横浜市)

X. Cui, M. Kawashita, T. Xiong, Y. Yokohama, S. Furukawa and H. Kanetaka, Preparation of bioactive titanium metals with photocatalytic activity via anodic oxidation, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), December 4, 2013, Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto (Japan).

川下将一、松井真子、宮崎敏樹、渡邊友亮、崔新宇、金高弘恭、可視光誘起光触媒特性を示す生体活性チタン金属の開発、第 23 回日本 MRS 年次大会、2013 年 12 月 9 日、横浜情報文化センター(神奈川県・横浜市)

横浜優人、川下将一、崔新宇、宮崎敏樹、金高弘恭、可視光応答型抗菌性窒素ドーパチタン金属の作製とそのアパタイト形成能評価、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013 年 11 月 26 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

古川崇、川下将一、崔新宇、宮崎敏樹、金高弘恭、チタン金属表面への可視光応答型光触媒硫黄ドーパ酸化チタンの形成、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013 年 11 月 25 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

川下将一、がんや骨疾患の治療に貢献する医用材料の設計、粉体粉末冶金協会平成 25 年度春季大会、2013 年 5 月 27 日、早稲田大学国際会議場(東京都・新宿区)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: チタン金属又はチタン合金からなる基体を有する生体インプラントおよびその製造方法

発明者: 川下将一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2015-073673

出願年月日: 2015 年 3 月 31 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川下 将一 (KAWASHITA, Masakazu)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号：7031423

(2)研究分担者

金高 弘恭 (KANETAKA, Hiroyasu)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50292222