

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：83906

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420767

研究課題名(和文) 高生体活性を有する酸化チタン微粒子の開発およびPMMA骨セメントへの応用

研究課題名(英文) Development of highly bioactive TiO₂ particles for PMMA bone cement

研究代表者

橋本 雅美 (Hashimoto, Masami)

一般財団法人ファインセラミックスセンター・その他部局等・研究員

研究者番号：20450851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸化チタン粒子を極微量の酸素を含む窒素雰囲気中で熱処理することによって、従来の空気中で熱処理したものより、格段に水酸化アパタイト形成能の高いTiO₂粒子の作製に成功した。これは、ルチル型の酸化チタン中のTi⁴⁺がTi³⁺に還元し、同時に電気的中性条件を保つために酸素空孔が生成、表面が負に電荷を帯びるためと考えられる。

上記酸化チタン粒子を骨セメント組成物に混合するだけで、市販品の骨セメントよりも圧縮強度が高く、骨と結合する可能性の有る生体活性骨セメントを作製した。

研究成果の概要(英文)：TiO₂ particles that were formed by heat treatment in a nitrogen atmosphere with an extremely low oxygen partial pressure exhibited high hydroxyapatite (HAp)-forming ability in simulated body fluid (SBF). X-ray diffraction (XRD), and scanning transmission electron microscopy (STEM) combined with electron energy loss spectroscopy (EELS) indicated that the particles were rutile-type TiO₂, which scarcely contains nitrogen. Electron spin resonance (ESR) spectra revealed the reduction of Ti⁴⁺ in TiO₂ to Ti³⁺ and the simultaneous introduction of oxygen vacancies to maintain charge neutrality. The enhanced HAp-forming ability of the TiO₂ particles was likely related to their negatively charged surface, induced by water adsorption on oxygen vacancies, which resulted in acidic point formation. The compressive strength of PMMA-TiO₂ bone cement was higher than that of commercial cement. Therefore, PMMA-TiO₂ bone cement is considered to be useful for bone-repairing material.

研究分野：生体材料

キーワード：酸化チタン粒子 水酸化アパタイト 擬似体液 酸窒化

1. 研究開始当初の背景

人工関節の寿命に大きく関係するものに、“摩耗の低減”と“骨との固着”の2つが有るが、本研究では、骨との固着に関して研究を行う。骨との固着方法には、(1)骨セメントを用いる固着と(2)骨セメントを用いない固着がある。特に骨セメントを用いる場合には、セメントに骨と直接結合する性質がないため、15~20年経過すると、骨の老化とともに骨粗鬆症が進行し、人工関節の弛みに繋がる。また、骨セメント原料の一つであるメチルメタアクリレートモノマーが生体内に溶け出し、血圧降下などを起こす安全性の問題がある。

そこで我々は、以前、酸化チタン微粒子を骨セメント(アクリル系高分子重合型医療用接着剤)に混合することで、機械的強度が高く、しかも骨と結合する生体活性骨セメントを開発した(Key Engineering Materials, 2006, J. Mat. Sci. Mat. Med., 2008)。これによって、弛みの問題や安全性の問題を解決できる可能性があり、現在も企業によって研究が進められている。

しかし、骨セメントに生体活性能を発現させ、機械的強度を上昇させるために使用する酸化チタン微粒子に関しては、粒径の制御等を行い、骨セメントとの混練性を上昇させるといった工夫が施されているのみである。そのため、生体骨との骨結合性を向上させるために、酸化チタン微粒子自体の表面構造を制御し、生体活性能を向上させる研究は全く行われていない。

我々は、最近、純チタンを極微量の酸素を含む窒素雰囲気中で熱処理するだけで(酸窒化処理)、生成したルチル型酸化チタン層(窒素固溶)の表面が、従来には無い高いアパタイト形成能を有することを発見した(J. Mat. Sci. Mat. Med., 2011, Mat. Sci. Eng., 2011)。しかも、3ヶ月空気中で保存後も、その高いアパタイト形成能が持続することを確認した($P_{O_2}=10^{-14}$ Pa)。熱処理後の表面状

態を X 線光電子分光法(XPS)、飛行時間型二次イオン質量分析法(ToF-SIMS)、ゼータ電位等で解析した結果、生体活性能が向上した原因の一つとしては、酸化チタン表面近傍への窒素固溶(格子間窒素を形成)に伴い、酸素空孔が表面近傍に偏在し、表面が正に帯電するためと推察している。すなわち、擬似体液中では、表面近傍に優先的にリン酸イオン(-)を引き寄せ、続いてカルシウムイオン(+)を取り込んで、アパタイト生成を促進したものと想定している。

また、Rat-1 前骨芽細胞株を用いた培養試験の結果、酸窒化処理チタン上では旺盛な増殖が観察されていることを確認している(図2)。このように酸素分圧を厳密に制御した窒素雰囲気中で熱処理することにより、単なる空気中での熱処理では得られない表面特性を得ることができる。

上記技術を酸化チタン微粒子に適用し、酸窒化処理によって生体活性能を飛躍的に向上させた酸化チタン微粒子を開発できると考えたのが着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、酸化チタン(非晶質)の酸窒化処理によって生体活性能を飛躍的に向上させた酸化チタン(TiO_2)微粒子を新規に創成し、骨セメント組成物に混合するだけで、高い機械的強度を示し、骨と結合する生体活性骨セメント(PMMA- TiO_2)を作製することである。

酸素分圧を厳密に制御した窒素雰囲気中で、酸化チタン微粒子を熱処理して得られる微粒子において、生体活性能に及ぼす窒素の影響を評価する。同時に窒素を導入した酸化チタン微粒子と骨セメント組成物の混合物の骨形成能を *in vitro*(細胞学および分子生物学的手法)により評価した。以上の知見を融合し、PMMA- TiO_2 骨セメントに優れた生体活性能を発現させる酸化チタン微粒子の表

面処理技術を確立する。

3. 研究の方法

平成 25 ~ 27 年度の三年間で、(1)酸素分圧を制御した窒素雰囲気中において酸化チタン(TiO_2)微粒子(非晶質)を熱処理、酸化チタン表面に窒素を取り込んだ酸化膜を形成(2)ヒトの体液の無機イオン濃度とほぼ等しい擬似体液に浸漬し、酸化膜表面のapatite形成能を評価、生体活性に及ぼす酸化膜中の窒素の効果を明らかにする。

(3) 細胞学的および分子生物学的手法によって、まず窒素を導入した TiO_2 微粒子の骨形成能を評価し、窒素導入が細胞毒性、細胞増殖等に与える影響を評価する。

具体的には、チタニウム塩の中和加水分解により生成した前駆体粒子を、まずマイクロオーダーの粒径にまで造粒した。次に、その粒子をロータリーキルン炉に設置したガラス管内に投入し、雰囲気を窒素ガス(200 cc/min)で置換した。その際、酸素ポンプを用いて窒素ガス中に不純物として極微量含まれる酸素の P_{O_2} を下げた。その後、1073 K、 $\text{P}_{\text{O}_2}=10^{-13}$ Pa の窒素ガス中(低 P_{O_2} 下)にて、6 時間熱処理した。比較として、空気中においても熱処理を行った(高 P_{O_2} 下)。

得られた酸化チタン粒子の透過型電子顕微鏡 - 電子エネルギー損失分光法(TEM-EELS)分析、電子スピン共鳴(ESR)分析、並びに、粒子表面のゼロ電荷点を計測するとともに、SBF 浸漬により粒子表面に吸着する Ca、P 量の経時変化を飛行時間型二次イオン質量分析法(ToF-SIMS)により測定した。また、純チタン粒子の酸化処理により形成した酸化チタンスケールにおいても同様の評価を行い、優れた HAp 形成能の発現機構の違いについて検討した。

平成 26 年度以降には、(1) PMMA- TiO_2 骨セメントを用い、上記と同様の分析を継続 (2)以上実験と細胞実験で得られた知

見を融合することで、生体活性発現の本質を理解した TiO_2 微粒子の表面処理技術を確立する。

4. 研究成果

(1) 高生体活性 TiO_2 粒子の開発

チタニウム塩の中和加水分解により生成した前駆体粒子を低 P_{O_2} 下の窒素雰囲気中で熱処理することによって、SBF 中で高い HAp 形成能を有する TiO_2 粒子の開発に成功した。

図 1 に SBF に 1 日間浸漬後の TiO_2 粒子断面の SEM-EDS 像および HAp 被覆率と SBF 浸漬時間の関係を示す。低酸素分圧下で熱処理した TiO_2 粒子表面には、SBF に 1 日間浸漬するだけで HAp 粒子が形成しているのがわかる。また低 P_{O_2} 下で形成した TiO_2 粒子は、高 P_{O_2} 下で形成した場合より HAp 形成能を高くすることが出来た。

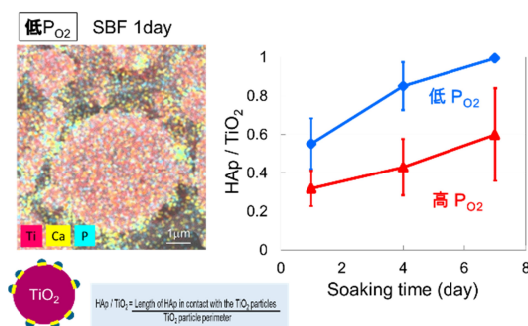


図 1 SBF に 1 日間浸漬後の TiO_2 粒子断面の SEM-EDS 像(左図)および HAp 被覆率と SBF 浸漬時間の関係(右図)

低酸素分圧下で熱処理した TiO_2 粒子の HAp 形成能が高かった原因を明らかにするために、まず TiO_2 粒子の TEM-EELS 分析を行った。図 2 に示すように、低および高 P_{O_2} 下で熱処理した酸化チタン粒子の表面および内部には窒素の存在が確認できなかった。

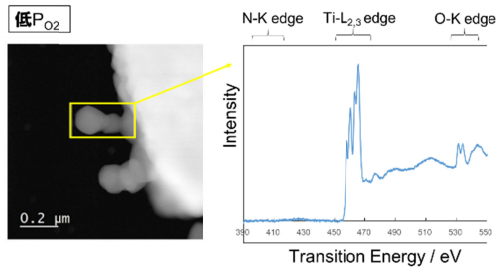


図2 TiO₂ 粒子の TEM-EELS 解析結果

次に、酸化チタン粒子の ESR 分析結果(図3)から、低 P_{O2} 下で熱処理した場合のみ Ti³⁺ に相当する g=1.96 のピークが確認できたため、粒子中の Ti⁴⁺ が Ti³⁺ に還元し、それに伴い酸素空孔が形成したと考えられた。

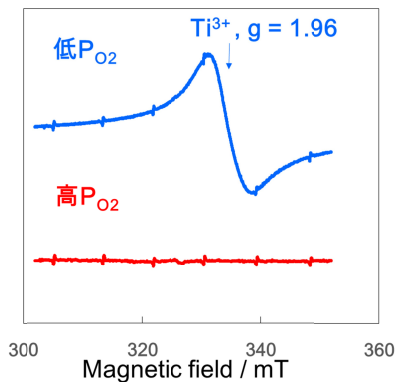


図3 TiO₂ 粒子の ESR スペクトル

図4にTiO₂粒子のゼロ電荷点の結果を示す。粒子の場合、低 P_{O2} 下では 5 であるのに対し、高 P_{O2} 下では 8 であった。一方、Ti 粒子を酸化して形成させたスケールの場合には、低 P_{O2} 下でも 9 であった。この理由として、粒子の場合には、水溶液中で酸化チタン粒子表面の酸素空孔に水が吸着・解離し、酸性点である OH ラジカルが生成したためと考えられる。一方、スケールの場合には、その表面に濃化した N_{2(o)}²⁺ イオンに OH⁻ が優先的に吸引したためと考えられる。従って、pH7.4 の SBF 中においては、低 P_{O2} 下で熱処理した粒子表面は負に、スケール表面は正に帯電していると考えられた。

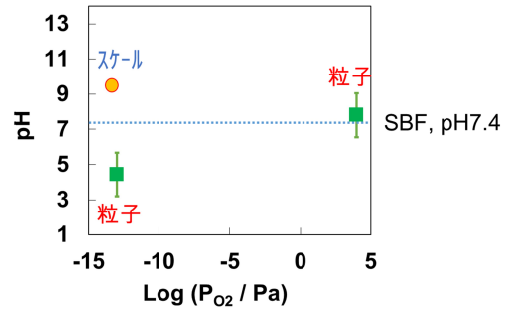


図4 TiO₂ および Ti 粒子のゼロ電荷点

その結果、SBF に浸漬初期の粒子表面の ToF-SIMS 解析の結果(図5)より、粒子表面では正に帯電したカルシウムイオンが、スケール表面では負に帯電したリン酸イオンが優先的に吸着した。以上より、酸化チタン表面の電荷を正または負に帯電させることによって、反対の電荷を有するイオンの優先的な吸着が促進され、その結果として、その後の HAp の核形成と成長が促進されたと考えられた。

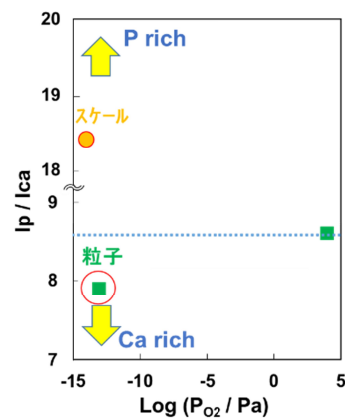


図5 SBF に浸漬初期の TiO₂ および Ti 粒子表面の ToF-SIMS 解析結果

図6にTiO₂粒子上におけるDNAの抽出量を示す。何れのTiO₂粒子上でも、MC3T3-E1細胞の増殖がわずかに見られ、有意差はないが低 P_{O2} 下で熱処理したTiO₂粒子上でのDNA抽出量が高い傾向を示した。

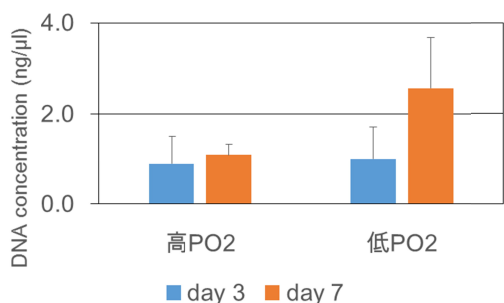


図6 増殖3および7日後におけるDNA濃度推移

(2)高生体活性TiO₂粒子を混合したPMMA骨セメントの開発(PMMA-TiO₂)

(1)で示したように、低P₀₂下の窒素雰囲気中で熱処理したTiO₂粒子は、高P₀₂下で熱処理した場合より、高いHAp形成能を示し、MC3T3-E1細胞が増殖することを確認した。よって、低P₀₂下で熱処理したTiO₂粒子をPMMA粒子と混合し、PMMA-TiO₂骨セメントを作製した。

まず、PMMA-TiO₂セメント(TiO₂:8 vol%)の圧縮強度の評価を行った。PMMA骨セメントの圧縮強度は、104 MPaであるのに対し、PMMA-TiO₂骨セメントの場合は118 MPaであり、約1.13倍上昇することがわかった。

次に、上記PMMA-TiO₂セメントのHAp形成能をSBF中にて評価を行うと、3日間浸漬でセメント表面にHApが形成した。一方、PMMAセメントの場合は7日間SBFに浸漬してもHApは形成しなかった。

さらに、MC3T3-E1細胞分化能の評価を行った結果(図7)、TiO₂粒子混合の有無に関わらず、ALP酵素活性は変わらなかった。以上より、TiO₂の混合は、骨芽細胞の分化には影響を及ぼさないことがわかった。

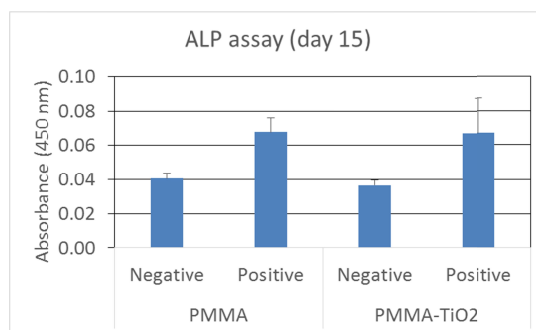


図7 培養15日目におけるPMMAおよびPMMA-TiO₂上でのALP活性

以上の結果より、低P₀₂下で熱処理したTiO₂粒子を混合したPMMA骨セメントは、生体内でも骨と結合する可能性が示唆され、股関節固定用の骨セメント等として有効であると考えられる。

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 5 件)

1. “The Microstructure of Scale Formed by Oxynitriding of Ti and Exhibiting Significant Apatite-Forming Ability”, M. Hashimoto, S. Kitaoka, S. Muto, K. Tatsumi and Y. Obata, Journal of Materials Research, 31(8), pp. 1004-1011 (2016). 査読あり
2. “Adsorption Characteristics of Bovine Serum Albumin onto Alumina with a Specific Crystalline Structure”, M. Kawashita, J. Hayashi, Z. Li, T. Miyazaki, M. Hashimoto, H. Hihara and H. Kanetaka, J. Mat. Sci: Mater Med, 25, pp. 453-459 (2014). 査読あり
3. “Enhanced Apatite Formation on Ti Metal Heated in P₀₂-controlled Nitrogen Atmosphere”, M. Hashimoto, K. Hayashi and S. Kitaoka, Materials Science Engineering C, 33, pp. 4155-4159 (2013). 査読あり
4. “骨と結合しやすいチタンを作製するための熱処理”, 橋本雅美, チタン 61(4), pp. 314-317 (2013). 査読なし
5. “長寿命型人工股関節の開発と実用化”, 橋本雅美, 京本政之, 茂呂徹, 石原一彦, FCレポート 31(4), pp. 120-124 (2013). 査読なし

[学会発表](計 10 件)

1. 橋本雅美, 北岡諭, 金高弘恭, 表面電荷

を制御した酸化チタン粒子表面における HAp 形成能の向上、日本セラミックス協会 2016 年会、早稲田大学(東京都新宿区)、2016 年 3 月 14 日～16 日

2. M. Hashimoto, S. Kitaoka, "Preparation of Highly Bioactive TiO₂ Particles for Polymethylmethacrylate Bone Cement", JK-Ceramics 32, ホルニコ-オーケ長岡(新潟県長岡市)、2015 年 11 月 18 日～21 日
3. 橋本雅美、北岡諭、金高弘恭、酸窒化処理した酸化チタン表面における水酸化アパタイト形成機構、日本セラミックス協会第 28 回秋季シンポジウム、富山大学(富山県富山市)、2015 年 9 月 16 日～18 日
4. 小幡佳弘、巽一蔵、武藤俊介、橋本雅美、北岡諭、水酸化アパタイト形成のために作製された Ti 酸化層中の N の化学状態分析、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、国立京都国際会館(京都府京都市)、2015 年 5 月 13 日～15 日
5. M. Hashimoto, S. Kitaoka, "Preparation of High Bioactive TiO₂ Particles for Polymethylmethacrylate Bone Cement", Pac Rim 11, ICC Jeju(韓国、済州市)、2015 年 8 月 30 日～9 月 4 日
6. 橋本雅美、北岡諭、PMMA 骨セメント用高生体活性酸化チタン粒子の開発、日本セラミックス協会 2015 年会、岡山大学(岡山県岡山市)、2015 年 3 月 18 日
7. 橋本雅美、北岡諭、松平恒昭、武藤俊介、巽一蔵、純チタンの酸窒化処理により形成した高生体活性スケールの微細構造、日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)、2014 年 9 月 9 日～11 日
8. M. Hashimoto, S. Kitaoka, T. Matsudaira, S. Muto, K. Tatsumi, "High Hydroxyapatite-Forming Ability on TiO₂ Scale Fabricated by Heat Treatment of Ti", AMTC4, 浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)、2014 年 5 月 9 日
9. 橋本雅美、北岡諭、松平恒昭、武藤俊介、巽一蔵、チタンの酸窒化処理による水酸化アパタイト形成能の向上、日本材料学会東海支部第 8 回学術講演会、名城大学名駅サテライト(愛知県名古屋市)、2014 年 3 月 3 日
10. 橋本雅美、林一美、北岡諭、金高弘恭、酸窒化処理チタンに対する Rat-1 線維芽細胞の応答、日本セラミックス協会第 26

回秋季シンポジウム、信州大学(長野県長野市)、2013 年 9 月 4 日～6 日

〔図書〕(計 1 件)

1. “酸窒化処理による骨と結合しやすい人工股関節部材の開発” 橋本雅美、骨研究最前線、pp. 309-315、2013 年 10 月 14 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 雅美 (HASHIMOTO, Masami)

ファイナセラミックスセンター・材料技術研究所・上級研究員

研究者番号：20450851

(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

(3)連携研究者

()

研究者番号：