

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870674

研究課題名(和文) 二酸化チタンバイオセラミックスの傾斜機能調節機構の確立

研究課題名(英文) Establish the Adjusting Mechanism of titanium dioxide bio-ceramics.

研究代表者

横井 由紀子 (YOKOI, YUKIKO)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60469012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞培養系におけるTiO₂の影響を調べることにした。ルチル型TiO₂を用いて、1300℃TiO₂焼結体を用いて細胞培養実験を行った。MC3T3-E1細胞を試料上で培養し、7、14、21、28日間後の生細胞数ならびに細胞形態像を観察し、以下の結果を得た。1300℃TiO₂焼結体では、焼成前と比較し、結晶粒子の増大、気孔の減少が観察された。培養時間の増加は、細胞増殖の増大を示し、生細胞数はおよびALP活性は対照群と比較し、1300℃TiO₂焼結体の方が高い値を呈した。以上のことより、1300℃TiO₂焼結体はMC3T3-E1細胞に対し良好な親和性およびALP活性の上昇を示した。

研究成果の概要(英文)：This TiO₂ has known for photocatalysis and osteogenesis. For the purpose of applying this function, the relationship between surface of sintered and cell proliferation were examined. Rutile TiO₂ as a starting material was sintered at 1300 °C and subjected to a cell culture experiment in which MC3T3-E1 cells were cultured on the sample, followed by viable cell counting and cell morphology observation on days 7, 14, 21, and 28 of culture. The following results were obtained: In 1300 °C sintered TiO₂, an increase in crystal grains and a decrease in the number of pores were observed when compared with the material prior to sintering. An increase in the duration of culture resulted in an increase in cell proliferation. The number of viable cells and ALP activity showed higher values in the experimental group with TiO₂ sintered at 1300 °C compared with the control group. Thus, TiO₂ sintered at 1300 °C showed good compatibility and increase in the ALP activity in MC3T3-E1 cells.

研究分野：歯科材料学

キーワード：セラミックス 二酸化チタン 光触媒 傾斜機能 焼結体

1. 研究開始当初の背景

純チタンあるいはチタン合金は、近年歯科生体材料として応用され、多くの臨床成績が報告されている。その良好な生体親和性は移植体表面に形成される二酸化チタン(以下TiO₂)の不動態被膜に依存するとされている。しかしながら、実際にはTiO₂そのものの生体親和性についての報告例は少ない。TiO₂を歯科生体材料として応用することを想定した場合、基本的な生体安全性を確認することは不可欠であり、焼結体の表面性状は生体への直接的な影響を与える因子として特に考慮するべきであると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの得た申請者の成果を発展させ、傾斜機能付与させた二酸化チタンの基礎的データを追究し、生体親和性と抗菌性の割合を随時容易にコントロールする手法の確立し、患者さん各自に適合したテーラーメイドの二酸化チタン焼結体を作製することである。

3. 研究の方法

(1)実験材料および試料作製

実験材料は、平均粒子 0.3 μ m、長さ 5.0 μ m のルチル型 TiO₂ 粉末 (FTL-100, 石原) を使用した。成形体の作製は TiO₂ を 0.5g、蒸留水 0.3ml を計量・混和し、内径 12mm、厚さ 15mm の金型に充填した後、150kN の荷重を 1 分間加え、厚さ約 3mm の試料を作製した。成形試料は電気炉 (LP-907, 光洋サーモシステム) にて、室温から 100 まで 30 分かけて昇温、試料を乾燥後、所定の焼成温度まで 120 分かけて昇温し焼成した。焼成は大気中で行ない、焼成温度は 1300 とした。所定の温度で 30 分間係留後、炉内冷却し実験に供した。試料の滅菌はオートクレーブにより 120、15 分間行った。各培養日数に対し 5 個ずつ試料作製した。

対照群として、ポリスチレンシャーレ (セルディスク LF1, 住友ベークライト) をほぼ同等の大きさとなるように成形し試料に供した。

(2)TiO₂ 焼結体の X 線回折分析

出発原料および 1300 で焼成した TiO₂ 焼結体は、X 線回折装置 (Rad-rC, リガク) を使用し、結晶相の同定を行った。測定条件は管電圧 40kV、管電流 60mA、管球 CuK α 、Ni フィルターで回折角 20 度から 60 度の範囲で行った。

(3)TiO₂ 焼結体の表面観察

各焼成温度で焼成後の TiO₂ の表面性状を SEM (Scanning electron Microscope 走査型電子顕微鏡) (JSM-6000, 日本電子) で観察した。加速電圧 20kV とした。

(4)TiO₂ 焼結体上で細胞増殖の検討

マウス骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 細胞 (大日本住友製薬) を用い、培養液は最小必須培地 α -Minimum Essential Medium (GIBCO)

に 10% のウシ胎仔血清 (EQUITECH-BIO), 100U/ml Penicillin (GIBCO) と 100 μ g/ml Streptomycin を加えて、細胞調整した TiO₂ 焼結体試料を、24 ウェルマイクロプレート (Falcon) 内に配置し、2.0 \times 10⁴ cells/ml に細胞浮遊液を調整後、各ウェルに 600 μ l ずつ播種した。培養は 37、5%CO₂ 条件下にて 7, 14, 21, 28 日間行った。各試料上で増殖した細胞数を測定するために、各試料は、培養液を 600 μ l ずつ入れた新しい 24 ウェルマイクロプレートに移し換えた。さらに各ウェルに CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (Promega) を 120 μ l 加え 2 時間培養後、microplate reader (MPR-A4i, 東ソー) を使用し、吸光度 (波長 492nm) を測定することにより、試料上の生細胞数を算定した。ALP 活性の測定は、14 日、28 日培養後の試料を TRACP&ALP Assay Kit (TaKaRa) を 37 にて 30 分酵素反応させ、microplate reader を使用し、吸光度 (波長 405nm) を測定した。統計処理は一元配置分散分析を行い、ボンフェローニ法による多重比較検定を行った (p<0.05)。

(5)細胞形態の観察

細胞形態の観察は各試料上で 24, 72 時間培養後に行った。即ち、各試料を 99.8%メタノール (関東化学) で 10 分間固定し、自然乾燥させ、蒸留水で 20%に希釈したギムザ染色液 (メルク) に 30 分間浸漬し、流水水洗、自然乾燥後、倒立金属顕微鏡下 (PME3, OLYMPUS) で試料上の細胞を観察した。

4. 研究成果

(1)X 線回折

焼成後の TiO₂ の X 線回折像を図 1 に示した。出発材料およびそれぞれの温度で焼成した焼結体より得られた X 線回折のピークはいずれもルチル型 TiO₂ のピークと同定された。

(2)表面観察

各 TiO₂ の結晶粒の形状と大きさは焼成温度により異なり、未焼成の試料 (下記図 B) では、長径約 5 μ m の針状に TiO₂ が各方向に重なり合った状態でその間に多数の気孔が存在した。未焼成試料では針状の TiO₂ が折り重なるように圧接され、その間に気孔が存在していた。1300 (下記図 C) では小さい気孔が多数存在した。

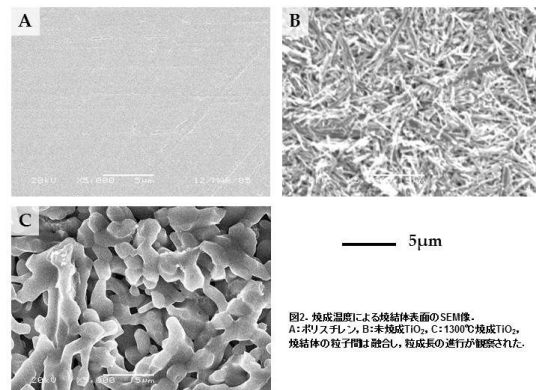


図2. 焼成温度による焼結体表面のSEM像。
A: 未焼成TiO₂, B: 1300°C焼成TiO₂, C: 1300°C焼成TiO₂.
焼結体の粒子間は融合し、粒成長の進行が観察された。

(3)細胞増殖およびALP活性

培養7日目から14日目での細胞増殖は、対象群および実験群ともに顕著であったが、それ以降21日から細胞数は減少し、28日ではコンフルエントに達した。21日および28日は統計学的に有意に増大した(下記図)。

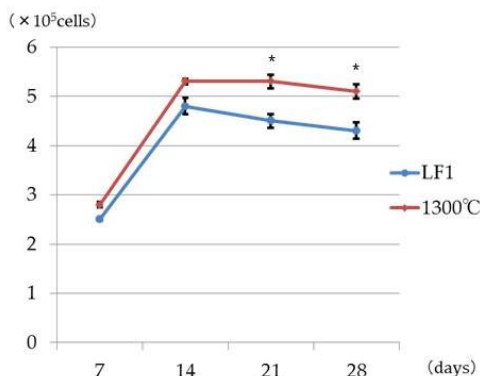
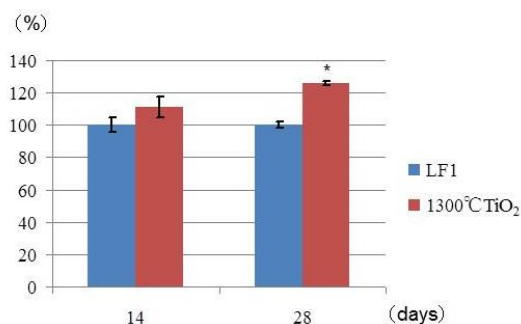


図3. 培養時間と細胞数

ALP測定では、LF1を基準とし1300 TiO₂試料の変化を算出した。培養14日目では110%、28日目では126%といずれも多い値を示した。1300 TiO₂試料の方がALP活性は高い値を示した(下記図)。



(4)細胞形態の観察

LF1および1300 TiO₂試料上ともに、細胞の壊死は見られず、各試料上で、良好に細胞が生着している様子が観察された。

焼成温度と細胞増殖およびALP活性との関係本実験でTiO₂の生体親和性を評価するために、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞を使用した。MC3T3-E1細胞を用いた細胞培養試験は歯科生体材料の評価において一般的に用いられており、その細胞増殖は再現性が高くかつ迅速に行える評価法である。ALP活性は骨芽細胞様細胞の分化の指標であり、骨芽細胞用細胞の活性化の有無を評価できる。本実験のようにセラミックスとしてのTiO₂の生体親和性を評価する報告は少ない。本実験では、実験群は対照群より良好な細胞増殖およびALP活性を示した。これより本実験に使用したルチル型TiO₂は生体材料として化学的性質および物理的性質が安

定していることが示唆された。今回、細胞の増殖が良好であった理由の1つとしては、おそらく対照群と表面の粗さの違いではないかと考えられる。金属チタンに表面処理を施した材料あるいはハイドロキシアパタイトなどのセラミックスの表面粗さはシャーレなどのポリスチレンよりも大きく、これらの試料上での細胞増殖は対照群よりも良好であったと報告されており、本実験と同様の結果を示している。今後、表面粗さ細胞増殖との関係を検討するため、試料の表面粗さを変え、細胞増殖の変化を観察していくことを考えている。ALP活性はいずれの日数でも1300 TiO₂が対象群より大きな値を示し、ALP活性を促し骨芽細胞様細胞の分化に影響を与える可能性が示唆された。

焼成温度と細胞形態について、試料上の細胞は紡錘形あるいは三角形を呈し、突起を細胞周囲に放射状に伸ばしながら、表面に生着している状態が観察された。実験群の細胞形態に変化は認められず、対象群と同じであり、1300 TiO₂は細胞形態に影響を与えないことが示唆された。毒性のある試料では、試験片周囲の細胞は死滅、空胞変性、細胞膜の破壊、壊死が認められるが、今回の実験では、これらの細胞形態は認められず、分裂期の円形の細胞、紡錘形、多角形の細胞が観察され、これはアパタイトあるいはリン酸三カルシウム上の培養における細胞形態と同様の傾向であり、TiO₂と培養細胞との親和性はきわめて良好であることが示唆された。

結論

出発材料としてルチル型TiO₂を用いて、1300 TiO₂焼結体を用いて細胞培養実験を行った。MC3T3-E1細胞を試料上で培養し、7、14、21、28日間後の生細胞数ならびに細胞形態像を観察し、以下の結果を得た。

1. 1300 TiO₂焼結体では、焼成前と比較し、結晶粒子の増大、気孔の減少が観察された。
2. 培養時間の増加は、細胞増殖の増大を示し、生細胞数はおよびALP活性は対照群と比較し、1300 TiO₂焼結体の方が高い値を呈した。

以上のことより、1300 TiO₂焼結体はMC3T3-E1細胞に対し良好な親和性およびALP活性の上昇を示した。

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)

Proliferation and Alkaline Phosphatase Activity of Osteoblast-like Cells on the Sintered Rutile Form of Titanium Dioxide. Yukiko Yokoi, Tomoko Uozumi, Saeka Matsuda, Masahito Shoumura, Norimasa Okafuji, Naoto Osuga. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

水溶性二酸化チタン溶液の小窩裂溝填塞材への応用 - ぬれ性についての検討 - .
横井由紀子, 山川洋子, 山川祐喜子, 松田紗衣佳, 森山敬太, 正村正仁, 大須賀直人.
第 54 回日本小児歯科学会 (東京, 東京ドームホテル, 2016 年 5 月 26 ~ 28 日)

二酸化チタンの色素分解能 . 横井由紀子, 山川洋子, 山川祐喜子, 松田紗衣佳, 森山敬太, 正村正仁, 大須賀直人 . 第 34 回日本小児歯科学会中部地方会 (愛知県, 穂の国とよはし芸術劇場 PLAT, 2015 年 11 月 23 日)

水溶性二酸化チタンコーティング剤の色素分解とぬれ . 横井由紀子, 永澤栄, 福井壽男 . 第 66 回日本歯科理工学会学術講演会 (東京, タワーホール船堀, 2015 年 10 月 3 ~ 4 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

横井 由紀子 (YOKOI YUKIKO)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 60469012

(2) 研究分担者

()
研究者番号 :

(3) 連携研究者

()
研究者番号 :

(4) 研究協力者

福井 寿男 (FUKUI HISAO)

愛知学院大学・特殊基礎研究・教授
研究者番号 : 50090147

林 達秀 (HAYASHI TATSUhide)

愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号 : 70367621