

解説

窒素含有欠陥を用いた表面電位制御による高生体活性酸化チタンの開発

橋本 雅美*

一般財団法人ファインセラミックスセンター材料技術研究所, 〒456-8587 名古屋市熱田区六野 2-4-1.

Development of Titanium Oxide with High Bioactivity by Controlling Surface Potential Using Nitrogen-Doped Deficient

Masami HASHIMOTO*

Japan Fine Ceramics Center, 2-4-1 Mutsuno, Atsuta-ku, Nagoya 456-8587, Japan.

Received November 22, 2019; Revised February 6, 2020; Accepted February 7, 2020

ABSTRACT

The hydroxyapatite (HAp) formation ability after soaking in a simulated body fluid, MC3T3-E1 cell differentiation and related surface potentials of rutile-type TiO₂ surfaces formed on Ti are controlled by varying the Ti heat treatment conditions in a N₂ atmosphere containing a trace amount of O₂. The zeta potentials of the samples heated at 873 and 973 K for 1 h are large negative and positive values, respectively. Scanning transmission electron microscopy, electron energy loss spectroscopy, and calculations of defect formation energies reveal that nitrogen atoms incorporated into TiO₂ during surface formation produce the charged defects (NO)_o⁻¹ and (N₂)_o⁺² for the scales formed in 1 h at 873 and 973 K, respectively. HAp formation and MC3T3-E1 cell differentiation is more pronounced on charged nitrogen-doped TiO₂ surfaces compared to on an untreated, neutral Ti surface. An adhesive protein such as Fn adsorbs equally on charged and untreated Ti surfaces in culture medium. However, the adsorption of Ca and P was only detected on charged nitrogen-doped TiO₂ surfaces. The enhanced adsorption of inorganic ions and Fn is probably responsible for promoting initial stage of osteoblast differentiation. The present findings lead to physical models of surface charge distributions that elucidate the relationship between nitrogen-related defects, charged surfaces and cell differentiation mechanisms.

KEY WORDS

TiO₂ surface, surface potential, hydroxyapatite, cellular response

1 緒 言

純チタンは、人工股関節、歯科用インプラント、人工椎体等として使用されている。これらは、骨と接触して生体に埋入されるが、純チタンには骨と直接結合する生体活性能がないために、10~15年経過すると、弛みが生じる問題がある。すでに、チタン合金等に生体活性能を付与するために実用化されている技術があるが、この方法では高濃度のアルカリ溶液を使用する点¹⁾や熱処理後に細胞毒性のあるアナタース型の酸化チタン²⁻⁴⁾を形成する点が問題であるために積極的に使用されていない。そのため、簡便な表面処理方法で、細胞毒性が低く、高い生体活性能を有する表面処理層の形成が望まれている。酸化チタンの多型の違いによる細胞毒性に関

しては多く報告されており、ルチル型に関してもアナタース型より毒性が高い内容の報告がある⁵⁾。しかし、日本で、(医薬品医療機器総合機構) PMDAの認可を取得した骨セメントには、ルチル型の酸化チタンが使用されている⁶⁾。そこで、熱処理によって純チタン表面に形成させる酸化チタンをルチル型とし、また、熱処理を低酸素分圧下での窒素雰囲気中で行うことによって、酸化チタン層の表面電位を制御し、高い生体活性能の付与を試みた研究内容を紹介する。

2 表面電位制御酸化チタン層の構築

著者らは、低酸素分圧下の窒素雰囲気中で純チタンを873または973 Kで熱処理するだけで、生成したルチル型酸化チタンの表面がpH7付近の水溶液中で負または正に帯電していることを初めて明らかにした⁷⁻¹²⁾。負または正の電位を有

* Corresponding author, E-mail: masami@jfcc.or.jp

する場合、電子エネルギー損失分光法 (STEM-EELS)¹³⁾ および第一原理計算^{14,15)} 結果から、窒素の酸化チタン中での存在状態を解析した結果、窒素が酸化チタン中の酸素サイトを置換した $(NO)_O^{-1}$ 、 $(N_2)_O^{+2}$ の形でそれぞれ固溶しているためと考えられた (873 および 973 K, 1 h (Fig. 1)). 一方、ゼロの電位の場合 (873 K, 20 h (Fig. 2)) には、酸化チタン中に窒素が含まれていなかったことから、表面電位の起源は窒素含有欠陥であると考えられた。また、Ti のエネルギー損失吸収端微細構造 (ELNES) スペクトルの結果から、短時間の熱処理 (1 h) の場合には Ti の価数は 4 価であるが、長時間 20 h の場合には Ti が還元されていた (Fig. 2 右図)。

また、酸化チタン表面に $(N_2)_O^{+2}$ 、 $(NO)_O^{-1}$ 等の窒素含有欠陥が形成した理由を考察するために、第一原理計算で明らかにした欠陥形成エネルギーとフェルミレベルの関係を Fig. 3 に示した¹¹⁾。酸化チタン層内に形成した $(N_2)_O^{+2}$ および $(NO)_O^{-1}$ の欠陥形成エネルギーは、フェルミレベルが 1.6~3.2 eV の範囲では他の窒素含有欠陥である¹⁶⁻¹⁸⁾ $(NO)_O^{-1}$ と比較してかなり高く、準安定な欠陥であることがわかる^{9,11)}。また、酸化

チタン中で形成する可能性のある他の欠陥種 Ti_{Ti}^{-1} 、 V_O^{+2} 、 V_O^{+1} 、 Ti^{+4} と比べても欠陥形成エネルギーが高いため、準安定な欠陥種であると考えられる。このような準安定な欠陥種

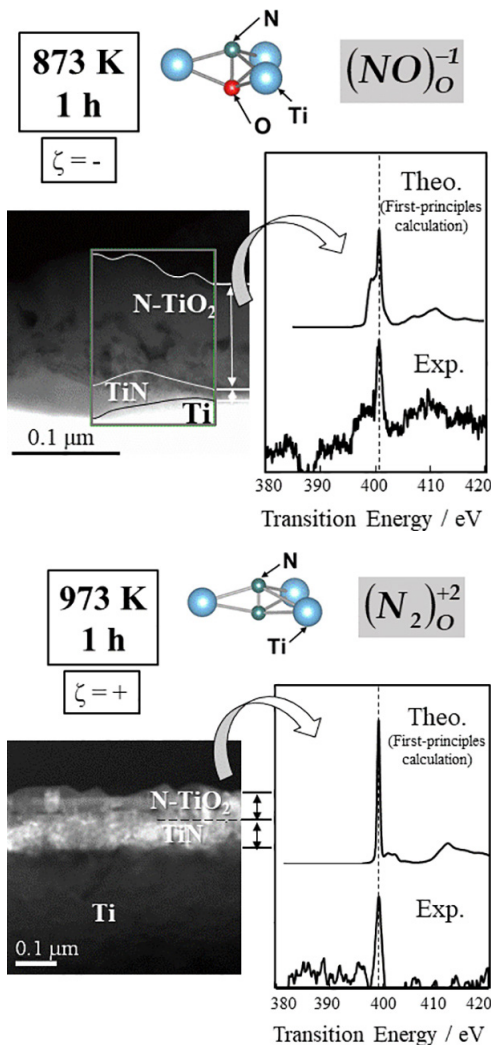


Fig. 1 STEM image and N-K edge ELNES spectra of the cross-section of a TiO_2 scale formed by heat treatment of Ti at 873 and 973 K for 1 h (in N_2 , $P_{O_2} = 10^{-14}$ Pa).

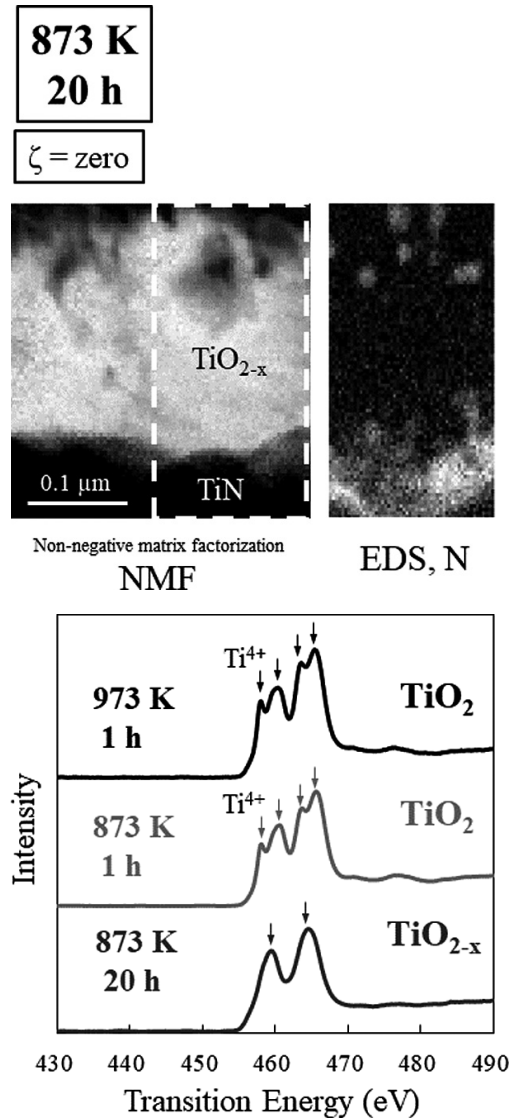


Fig. 2 NMF analysis, EDS mapping of N-K edge ELNES spectra, and Ti- $L_{2,3}$ edge ELNES spectra of the cross-section of a TiO_2 scale formed by heat treatment of Ti at 873 K for 20 h (in N_2 , $P_{O_2} = 10^{-14}$ Pa).

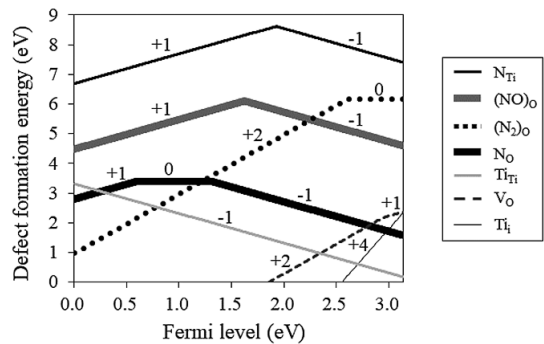


Fig. 3 Relationship between the defect formation energy of nitrogen-related defects with various effective charges in rutile-type TiO_2 and the fermi level (873 K, $P_{O_2} = 10^{-14}$ Pa).

であるにも関わらず、 $(N_2)_o^{+2}$ および $(NO)_o^{-1}$ が形成されたのは、低酸素分圧下の窒素雰囲気中での熱処理 (1 h) では、Ti と O の相互拡散が生じる際に、非常に大きな酸素欠配にさらされるために、酸化チタン層が形成する時に Ti の還元を伴わずに N が取り込まれたためと考えられる¹¹⁾。また、長時間熱処理 (20 h) するとこれらの窒素含有欠陥が消失した原因は、準安定な欠陥種であるために、より安定な状態に変化し、結果的に Ti が還元された酸化チタン層が形成されたと考えられる。以上のように、酸化チタン中に窒素含有欠陥が存在することによって、結果的に酸化チタン層に表面電位が発現していると考えられる。

ここで表面電位に関しては、水溶液中で測定するゼータ電位が一般的に測定されている。特に体内では、生体液で材料表面も満たされているため、ゼータ電位の測定をまず行っていると考えられる。しかし、材料表面自体の電位の測定には、水溶液中ではなく、ドライな環境で行う必要がある。ケルビンプローブフォース顕微鏡 (KPFM) は、カンチレバーを材料表面に接触させるが、このカンチレバーのタッピング技術や周波数変調フィードバック技術を駆使して、材料自体の電位の評価が可能である。水溶液中で正または負に電位を有する表面を KPFM で測定すると、表面電位は欠陥電荷と逆符号になることがわかった。欠陥形成に伴い生成した電子やホールが酸化チタン表面に濃化したものと考えられた^{11,12)}。以上のように、酸化チタン表面の形成条件を変化させることによって、有効電荷の異なる窒素含有欠陥を酸化チタン中に導入し、その結果、有効電荷と逆符号の電子やホールが最表面に存在することによって、水溶液中では水素または水酸化物イオンが吸着し、表面電位の違いが生じると考えられた (Fig. 9 の材料断面図の部分)。

3 表面電位制御酸化チタン上における水酸化アパタイト (HAp) 形成能および骨芽細胞活性評価

正または負に電位を有する酸化チタン表面上で、生体活性性能 (HAp 形成能と骨芽細胞活性性能) の両方が、未処理の純チタン等に比べてどのように異なるかを調べた⁷⁻⁸⁾。まず HAp 形成能の評価は、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 (Na^+ 142.0, K^+ 5.0, Mg^{2+} 1.5, Ca^{2+} 2.5, Cl^- 147.8, HCO_3^- 4.2, HPO_4^{2-} 1.0, SO_4^{2-} 0.5 mM)^{19,20)} 30 ml に 168 h 浸漬し、材料表面に形成した HAp の被覆率 AR を下記 (1) 式から求めた。HAp 形成能に関しては、定量的な評価を行うと他の研究者のデータとも比較可能と考えられる。

$$AR = (A / S) \times 100 \quad (1)$$

ここで、A は HAp の析出面積、S は SEM 画像の全面積である。

HAp 被覆率は、表面電位が正または負の大きな値を示す酸化チタン表面では、HAp 形成能が高く、特に 973 K で 1 h 熱処理した場合には 100% の被覆率であり、HAp が全面に形成されていた (Fig. 4 右図)。熱処理時間が長くなると、表面電位はゼロに近づく傾向があり、それとともに HAp 被覆率も減少した。

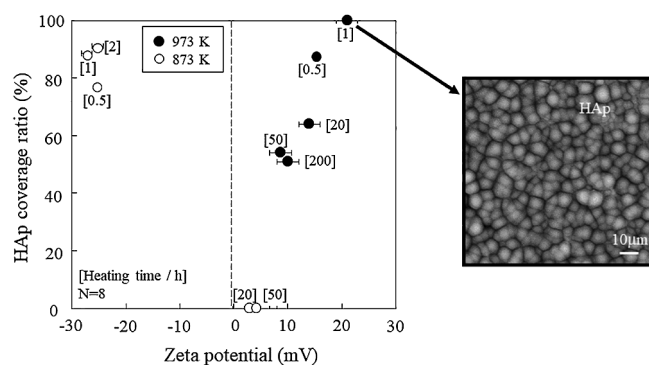


Fig. 4 Relationship between HAp coverage ratio and zeta potential of TiO_2 scales formed by heat treatment of Ti at 873 and 973 K for various periods. Eight samples for each experiment were analyzed to acquire the data (mean \pm SD).

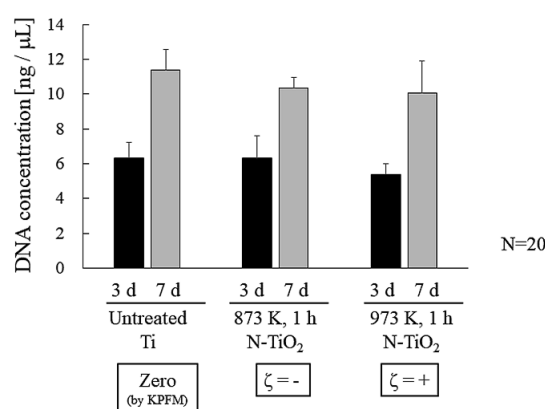


Fig. 5 Proliferation of MC3T3-E1 cells on untreated Ti, and on negatively- and positively-charged N- TiO_2 surfaces.

次に、骨芽細胞活性を調べるために、MC3T3-E1 前骨芽細胞葉細胞を用いて、正または負の表面電位を示す酸化チタン表面 (873 K, 1 h または 973 K, 1 h) およびゼロの表面電位の純チタン表面での上記細胞の増殖および分化能を評価した。その結果、増殖能に関しては、3 および 7 日間の培養後も何れの表面上でもほぼ同等であった (Fig. 5)²¹⁾。一方、分化能に関しては、14 日間の培養後では正または負の表面電位を有する酸化チタン表面が未処理の純チタンより約 1.5 倍分化能が高かった。28 日間まで培養を続けると、何れの表面上での分化能はほぼ同等になった (Fig. 6)²¹⁾。以上の結果から、HAp 形成能と骨芽細胞活性性能も、表面電位が正または負の酸化チタン表面の方が高いことがわかった。

4 生体分子の初期吸着過程説明

正または負の表面電位を有する酸化チタン表面上では、HAp 形成能および骨芽細胞活性性能が促進されることが明らかとなった。その原因を解明するために、細胞を含まない培養液中に材料を浸漬し (1 分間浸漬)、反応の初期過程で吸着する生体分子の解析を行った。培養液中には血清も含まれるため、その中には無機イオン以外にタンパク質や脂質等が存在する。非常に限定的ではあるが、骨の成分である HAp はリン酸カルシウムの一種であることまた細胞の接着の際に

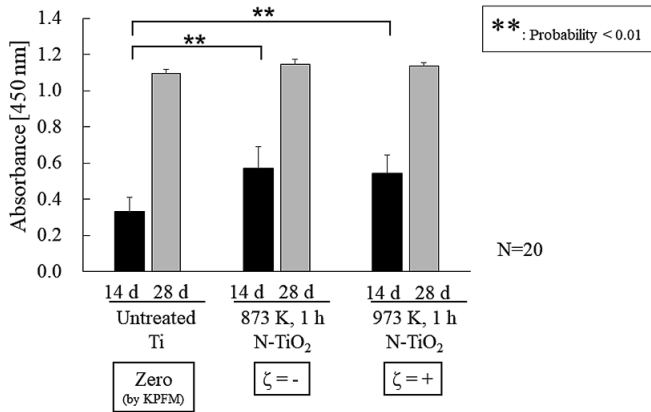


Fig. 6 Differentiation of MC3T3-E1 cells on untreated Ti, and on negatively- and positively-charged N-TiO₂ surfaces.

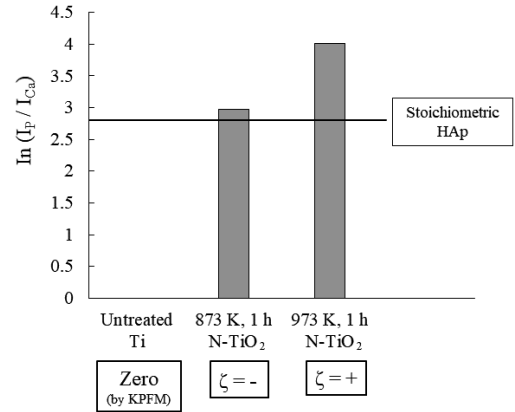


Fig. 8 Ln (Ip/Ica) of untreated Ti, and negatively- and positively-charged N-TiO₂ samples after incubating in serum-containing medium for 1 min at 310 K (n = 3).

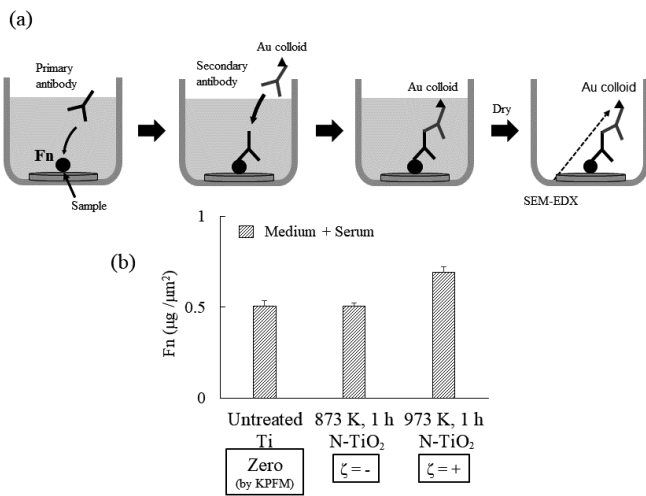


Fig. 7 Immunogold labelling technique for detecting Fn (a) and adsorption of Fn on untreated Ti, and on negatively- and positively-charged N-TiO₂ surfaces after incubating in serum-containing medium for 1 min at 310 K (n = 3) (b).

は細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン (Fn) が接着することから、無機イオンのCaおよびPの吸着および細胞接着性タンパク質Fnの吸着をそれぞれ飛行時間型二次イオン質量分析法 (ToF-SIMS) および金コロイド標識二次抗体検出法 (Fig. 7 (a)) を用いて評価した。正または負の表面電位を有する酸化チタン上では、細胞を含まない培養液に1分間浸漬するだけでCaおよびPの吸着を確認したが、未処理の純チタン上では吸着していなかった (Fig. 8)。一方、細胞接着性タンパク質Fnは、何れの表面上でも吸着していることがわかった (Fig. 7 (b))。この理由としては、正または負の表面電位を有する酸化チタン表面上では、まずPまたはCaが吸着し、続いてCaまたはPがそれぞれ吸着することによって、リン酸カルシウムの核が形成し、その上にFnが吸着していくと考えられる。一方、未処理のチタン上では、Fnのみが吸着し、細胞がその上に接着していくと想像できる (Fig. 9)。以上の結果から、FnだけでなくCaとPが初期に材料表面に吸着することが、HAp形成能および骨芽細胞活性能が上昇する原因の一つと考えられた²¹⁾。

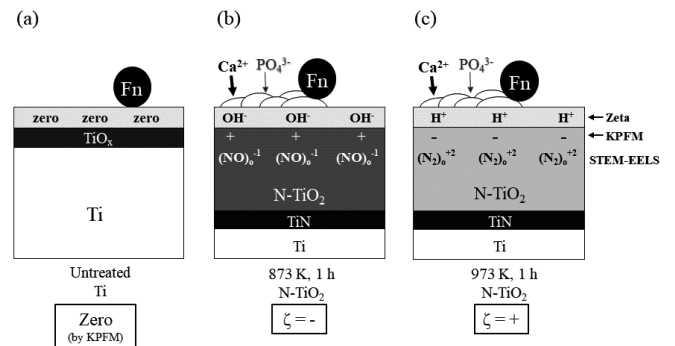


Fig. 9 Charged surface model and Fn adsorbing mechanism on the various charged TiO₂ scale contained nitrogen-related defects ((a) Untreated Ti, (b) 873 K, 1 h, (c) 973 K, 1 h).

5 おわりに

人工股関節、人工歯根および椎体等に使用されている純チタンの生体活性能を向上させるために、低酸素分圧下での窒素雰囲気中での熱処理を行い、その可能性に関して評価した。熱処理後にルチル型の酸化チタンを形成させる研究は他にも存在するが、本研究では酸化チタン中に有効電荷の異なる窒素含有欠陥を導入することによって、酸化チタン表面の電位を制御することができた点が新しいと考えられる。酸化チタン表面の電位を正または負に制御可能であると、正でも負でもHAp形成能および骨芽細胞活性能が向上しており、より活性な表面構築には電位の制御が有効であることがわかった。

謝 辞

本研究は、JSPS 科研費 25106008 および 16K06786 の助成を受けたものです。

本研究の成果は、以下の先生方のご指導の基に得られました。STEM-EELS 解析では名古屋大学教授の武藤俊介氏に、細胞評価では東北大学大学院歯学研究科准教授の金高弘恭氏と古谷真衣子氏に、第一原理計算では名古屋大学准教授 (共同研究当時) の巽一蔵氏と JFCC の小川貴史氏に、KPFM 測

定では、大阪大学教授の阿部真之氏と助教の山下隼人氏にご評価頂きました。またJFCC北岡諭氏には、解析結果の考察に関してご指導頂きました。ここに感謝の意を示します。

文 献

- 1) T. Kokubo, D. K. Pattanayak, S. Yamaguchi, H. Takadama, T. Matsushita, T. Kawai, M. Takemoto, S. Fujibayashi, T. Nakamura: *J. R. Soc. Interface*, **7** (2010) 503-513.
- 2) T. Uchino, H. Tokunaga, M. Ando, H. Utsumi: *Toxicol. Vitro*, **16** (2002) 629-635.
- 3) J. Petković, T. Kuzma, K. Rade, S. Novak, M. Filipič: *J. Hazard. Mat.*, **196** (2011) 145-152.
- 4) K. Hattori, K. Nakadate, A. Morii, T. Noguchi, Y. Ogasawara, K. Ishii: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492** (2017) 218-223.
- 5) R. D. Baby, S. Subramaniam, I. Arumugam, S. Padmanabhan: *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.*, **151** (2017) 678-684.
- 6) Japan science and technology agency, Ishihara sangyo kaisha, Ltd, and Japan fine ceramics center, Japanese patent 54619 (2007).
- 7) M. Hashimoto, K. Kashiwagi, S. Kitaoka: *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **22** (2011) 2013-2018.
- 8) M. Hashimoto, K. Hayashi, S. Kitaoka: *Mat. Sci. Eng. C*, **33** (2013) 4155-4159.
- 9) M. Hashimoto, S. Kitaoka, S. Muto, K. Tatsumi, Y. Obata: *J. Mater. Res.*, **31** (2016) 1004-1011.
- 10) M. Hashimoto, S. Kitaoka, Y. Obata, S. Muto, T. Ogawa, M. Furuya, H. Kanetaka: *Key Eng. Mat.*, **758** (2017) 86-89.
- 11) M. Hashimoto, T. Ogawa, S. Kitaoka, S. Muto, M. Furuya, H. Kanetaka, M. Abe, H. Yamashita: *Acta Materialia*, **155** (2018) 379-385.
- 12) M. Hashimoto, T. Ogawa, S. Kitaoka, S. Muto, M. Furuya, H. Kanetaka, M. Abe, H. Yamashita, *Key Engineering Materials*, **82** (2018) 218-223.
- 13) S. Muto, K. Tatsumi: *Microscopy*, **66** (2017) 39-49.
- 14) J. B. Varley, A. Janotti, C. G. Van de Walle: *Adv. Mater.*, **23-20** (2011) 2343-2347.
- 15) H. Chen, J. A. Dawson: *J. Phys. Chem., C* **119** (2005) 15890-15895.
- 16) T. Yoshida, S. Muto, J. Wakabayashi: *Mater. Trans.*, **48** (2007) 2580-2584.
- 17) T. Yoshida, E. Kuda, S. Muto: *Surf. Interface Anal.*, **46** (2014) 1236-1239.
- 18) J. Senga, K. Tatsumi, S. Muto, T. Yoshida: *J. Appl. Phys.*, **118** (2015) 115702.
- 19) T. Kokubo, H. Takadama: *Biomaterials*, **27** (2006) 2907-2915.
- 20) International Organization for standardization (ISO), *Implants for Surgery – In Vitro Evaluation for Apatite-forming Ability of Implant Materials (ISO 23317:2014)*
- 21) M. Hashimoto, S. Kitaoka, M. Furuya, H. Kanetaka, K. Hoshikaya, H. Yamashita, M. Abe: *J. Ceram. Soc. Japan*, **127** (2019) 636-641.