

チタニア薄膜の高次構造制御と歯科用コーティング材への応用

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科生体補綴歯科学分野 野崎浩佑

Highly Oriented TiO₂ Nanosheet Coating for Dental Application

Kosuke Nozaki

Department of Advanced Prosthodontics, Graduated School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

口腔内疾患は主に細菌感染により生じることから、歯科治療後の再感染を予防する抗菌性歯科材料の開発が急務とされている。結晶方位を制御することにより得られるチタニアナノシートはその優れた光触媒活性により、抗菌性材料としての応用が加速している。本研究では、チタニアナノシートの高機能化のため、既存のチタニアナノシートを数 nm サイズで合成することに成功し、30 nm 前後のものと比較し、優れた光触媒活性を有することが明らかとなった。また、チタニアナノシートの抗菌活性は、紫外線非照射下においても細菌の細胞膜及び細胞質内での酸化反応を引き起こすことから、紫外線が到達しない口腔内での使用の可能性が示唆された。また、チタニアは歯科用インプラント材料に応用されており、優れた骨伝導能を示す。生体不活性材料である歯科用ジルコニアに骨伝導能を付与するために、作製したチタニアナノシートのコーティングを試み、結晶面特異的にコーティングすることに成功した。今後、その生体活性の評価を行う予定である。

Since oral diseases are mainly caused by bacterial infection, there is an urgent need to develop antibacterial dental materials that prevent reinfection after dental treatment. Highly oriented titania nanosheets are accelerating their application as antibacterial materials due to their excellent photocatalytic activity. In this study, we succeeded in synthesizing titania nanosheets with a size of several nm in order to improve the functions of titania nanosheets, and it was clarified that they have excellent photocatalytic activity compared to those around 30 nm. In addition, the antibacterial activity of titania nanosheets causes an oxidative reaction in the cell membrane and cytoplasm of bacteria even under non-irradiation with ultraviolet rays, suggesting the possibility of use in the oral cavity where ultraviolet rays do not reach. In addition, Titania has been applied to dental implant materials because of its excellent conductivity. In order to impart bone conductivity to dental zirconia, which is a bio-inert material, we tried to coat the prepared titania nanosheets and succeeded in coating them specifically on the crystal facet. In the future, we plan to evaluate its biological activity.

1. はじめに

チタニア (TiO₂) の抗菌活性は、光触媒作用による酸化還元反応によるものと考えられている。365 nm 前後の紫外線照射によりチタニア内部で生成した電子と正孔により液相中では、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種 (ROS) が生成し、

細胞膜の破壊や細胞質での生理活性物質の阻害を生じることが報告されている。我々は、チタニアの結晶面と大きさを制御することを試み、{101}面と{001}面の割合と大きさが制御されたチタニアナノシートの開発に成功している。一般的に生体材料で利用されているアナターゼ型チタニア粒子の結晶面は、主に{101}面が95%を占めており、{001}面と比較して優位に表面に露出している。

{101}面と{001}面のそれぞれの面では、紫外線照射時の電子と正孔の生成と、再結合時の経路が異なることが報告されており、チタニアの高機能化には結晶面の制御が有効であることが示唆されている。そこで、高機能化が期待される結晶面を制御したチタニアナノシートを抗菌性歯科用材料へ応用するため、我々は口腔内細菌に対する抗菌活性を評価したところ、四辺の長さが約30nmで、{001}面が約50%露出しているチタニアナノシートが最も優れていることを明らかとした。しかしながら、近年、数nmのチタニアナノ粒子を基礎とした高機能化チタニアが利用されていることから、チタニアナノシートのさらなるサイズ制御が必要と考えられる。また、チタニアナノシート粉体は、義歯洗浄剤や歯の漂白などの応用に期待できるが、さらに、口腔内に装着される補綴装置に高次構造制御チタニアナノシートをコーティングすることにより、さらなる生体活性および抗菌性を有した生体材料の応用が可能になると考えられる。そこで本研究では、ナノメートルサイズのチタニアナノシートおよびそのコーティング方法の開発し、その光触媒活性および抗菌性を評価し、臨床応用に展開するための基礎的研究を行う。

2. 実験方法

2.1 高次構造制御チタニアナノシートの合成

チタニアナノシートの出発原料として、ヘキサフルオロチタン酸アンモニウムとチタンブトキシドを使用した。出発原料中のF/Ti比が0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0(以下, NS0.3, NS0.5, NS0.8, NS1.0, NS1.5, NS2.0とする)となるようにチタンブトキシドを混和した。得られた前駆体を180℃, 6時間で水熱合成した後に、洗浄, 凍結乾燥を行った。得られた粉体はX線回折(XRD)装置および紫外可視(UV-vis)分光光度計, 透過型電子顕微鏡(TEM)を用いてキャラクタリゼーションを行った。

2.2 光触媒活性

光触媒活性の評価のため、メチレンブルー溶液(MB)を用いた脱色試験を行った。0.3mM MBに対して10mg/mLになるよう各チタニアナノシートを混和した。なお本研究では、対照群としてチタニアナノ粒子(酸化チタン(IV), アナターゼ型, 富士フィルム和光純薬)を用いた。高圧水銀ランプ(HL100G, セン特殊光源)を用いて、2.5mW/cm²になるよう試料を静置し、20℃にて30, 60, 120, 180, 240, 480分間紫外線(UV)照射を行った。なお、対象群として、同様に静置した試料にアルミホイルを用い遮光し、UV照射を行った。既定の時間UV照射を行った後に、一定量試料を採取し13000rpm, 10分間遠心分離した後に、上清を10倍に希釈し、630nmにおける吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。

2.3 抗菌活性

抗菌活性の評価には *Streptococcus mutans* (MT8148) を用いて行った。前培養を行い、濁度計を用いて濃度調整を行った菌液に作製したチタニアナノシートを混和し、波長 365nm, 2.5mW/cm² にて 30 分間 UV 照射を行った。UV 照射後、ATP 法 (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, Promega) により生細菌数を測定した。また、UV 非照射群として、アルミニウム箔にて遮光した菌液にチタニアナノシートを混和し、上記の方法にて抗菌活性を評価した。チタニアによる抗菌活性は、主に ROS によるものと考えられていることから、ROS の活性を阻害する抗酸化物質を用いた抗菌活性評価を行った。上記と同様の方法にて前培養を行い、菌液を調整した。菌液に抗酸化物質である L-histidine (20mM) を混和し、同様の条件のもと、抗菌活性を評価した。

次に、細胞質内および細胞膜における酸化状態の評価を行う為に、同条件にて UV 照射を行った細菌の LIVE/DEAD 染色、H2DCFDA 染色、BODIPY 染色を行った。LIVE/DEAD 染色は、細胞膜を透過可能な色素である SYTO9 と損傷を受けた細胞膜のみ等加可能な PI の色素を用いることにより、細胞の膜損傷を評価することが可能である。また、H2DCFDA は、細胞質内の核を染色し、酸化反応を受けると緑色蛍光を示すプローブである。また、C-11BODIPY は細胞膜を特異的に染色し、酸化反応を受けることにより、赤色から緑色の蛍光を示すプローブである。それぞれのプローブを用いて染色を行い、蛍光顕微鏡にて蛍光画像を得たのちに、二値化を行い、陽性面積を算出した。

2.4 歯科用材料へのコーティング

歯科用インプラント材料には、チタンやチタン合金が用いられており、その優れた生体活性が報告されているが、金属色を有していることから審美性が要求される症例に対しては歯科用ジルコニアが利用されつつある。しかしながら、歯科用ジルコニアは生体不活性であり、生体活性の向上が望まれている。そこで、歯科用ジルコニア試料上に生体活性を有する高次構造制御チタニアナノシートのコーティングを試みた。ジルコニア基板に {001} 面を優位に露出させるために、静電吸着複合法により、主種の条件の基コーティングを試み、その形態を SEM にて観察を行った。

3. 結果と考察

3.1 チタニアナノシートの光触媒活性

作製した粉体を XRD にて解析した結果、いずれの試料もアナターゼ型チタニアに一致するピークを有していた。また、NS0.3 になるに従い、ピーク幅の増加が認められた。TEM 観察の結果、F/Ti 比の減少に伴い、長さおよび厚みが減少し、NS0.3 では長さ 6.3nm 厚み 4.9nm となり細小となった。UV-vis による吸光度の結果より、Tauc plot を作製し、光学的バンドギャップを求めたところ、いずれのチタニアナノシートとも 3.2eV であった。

MB の吸光度を求めたところ、いずれの試料も経時的に吸光度が減少し、MB の分解が促進していることが明らかとな

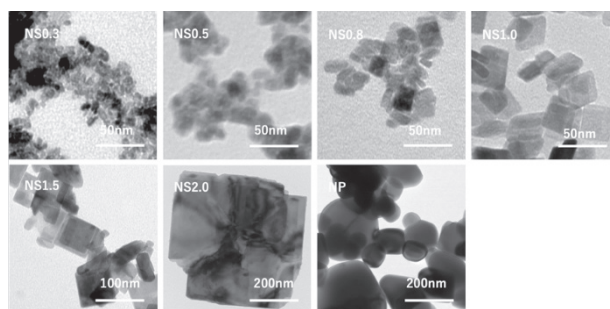


図 作製したチタニアナノシートの TEM 像

った。また、480分後では、NS0.3が最も優れ、次いでNS0.5、NS1.0、NS0.8、NS1.5、NS2.0、チタニアナノ粒子の順で分解効率が減少した。

3.2 チタニアナノシートの抗菌活性

抗菌活性の評価には、ナノシートの大きさが約30nm(NS1.0)から約550nm(NS2.0)の試料を用いた。なお、コントロール群としてチタニアナノ粒子(NP, STS-01, 石原産業)を用いた。試料の抗菌活性を評価したところ、すべての試料において濃度依存的に生菌数の減少が認められ、NS1.0が低濃度で最も効果が高かった。また、NSはUV非照射下においてもNSの増加に伴い生菌数は減少したが、UV照射によりその効果が増強した。また、L-histidine存在下では、生菌数の増加が認められ、抗酸化物質はチタニアの抗菌活性を減弱することが示唆された。NSにおいては、UV非照射下においても、抗菌活性が発揮され、L-histidineにより細胞数が増加したが、NPにおいてはUV非照射下では細胞数は減少せず、UV照射下によりのみ細胞数が減弱し、L-histidineにより細胞数が増加した。

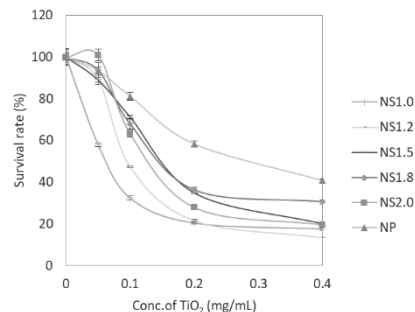


図 3 チタニアによる抗菌活性

C-11BODIPY染色およびH2DCFDA染色によるリン脂質膜および細胞内酸化を評価した。UV照射下においてNS1.0およびNS2.0においてリン脂質膜の酸化が認められ、UV非照射下においてはNS1.0のみリン脂質膜の酸化が認められた。また、UV照射下においては、NS1.0、NS2.0、NPにおいて細胞内酸化が認められ、UV非照射下においてはNS1.0、NS2.0において細胞内酸化が認められた。

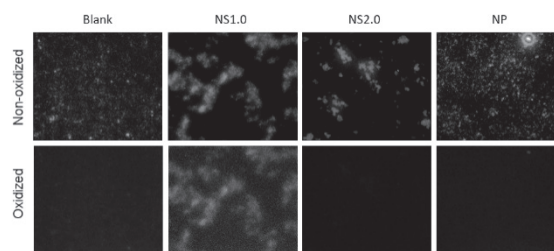


図 4 UV非照射時におけるリン脂質膜の酸化

LIVE/DEAD染色による細胞膜破壊を評価したところ、NSおよびNPにおいてUV照射にかかわらず細胞膜破壊が認められた。このことは、チタニアナノ粒子とチタニアナノシートは光触媒活性のみならずナノサイズ化による細胞死が引き起こされたと考えられる。

以上より、NS1.0は最も抗菌活性が優れており、ナノシート化による高次構造制御は光触媒活性の向上のみならず、暗所での抗菌活性の向上に寄与することが示唆された。また、ナノシートは、細胞質およびリン脂質膜の両部位において酸化反応を誘起しており、特にNS1.0においては、紫外線非照射下においても酸化反応が引き起こされていることから、本手法によりチタニアの高機能化が期待される。本実験結果では、ナノシートの暗所での電子伝達メカニズムは不明であったが、将来的にメカニズムを解明することにより、より優れた抗菌性生体材料を開発することが可能と言える。

3.3 チタニアナノシートのコーティングの試み

高次構造制御されたチタニアナノシートの機能を効率的に利用するためには、{001}面または{101}面の選択的コーティング法の検討が必須である。静電相互作用を利用した複

合粒子の作製には、正電荷または負電荷を有する高分子電解質溶液を用いて、チタニアナノシートのみかけの表面電荷を、正または負に帯電させる。また、ジルコニア表面の見かけの表面電荷を制御し、様々な条件でコーティングを試みたところ、{001}面または{101}面を優位に露出する歯科用ジルコニアの開発に成功した。しかしながら、コーティングの均質性に改善の余地があり、今後の検討課題となっている。

4. 結論

チタニアナノシートの結晶面およびサイズ制御により、高活性なチタニアナノシートを得ることが可能となった。また、チタニアナノシートは、細菌の細胞膜と細胞質のいずれにおいても酸化反応を引き起こし、細胞死を誘導していることが明らかとなり、既存のナノ粒子と比較して優れた抗菌活性を有することが示唆された。このようなチタニアナノシートを歯科用材料に応用するためのコーティング法を検討し、静電相互作用を利用して{001}面または{101}面を優位に露出するコーティング法を明らかにした。

5. 謝辞

本研究は、2019年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝いたします。

6. 参考文献

- [1] Liu N, Chang Y, Feng Y, Cheng Y, Sun X, Jian H, et al. { 101 }-{ 001 } Surface Heterojunction-Enhanced Antibacterial Activity of Titanium Dioxide Nanocrystals Under Sunlight Irradiation. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017;9(7):5907-15.
- [2] Tan Z, Sato K, Takami S, Numako C, Umetsu M, Soga K, et al. Particle size for photocatalytic activity of anatase TiO₂ nanosheets with highly exposed {001} facets. *RSC Advances* 2013;3(42):19268-71.
- [3] Yang HG, Sun CH, Qiao SZ, Zou J, Liu G, Smith SC, et al. Anatase TiO₂ single crystals with a large percentage of reactive facets. *Nature* 2008;453(7195):638-41.
- [4] Laxma Reddy PV, Kavitha B, Kumar Reddy PA, Kim K-H. TiO₂-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. *Environmental Research* 2017;154:296-303.
- [5] Liu J, Liu J, Attarilar S, Wang C, Tamaddon M, Yang C, et al. Nano-Modified Titanium Implant Materials: A Way Toward Improved Antibacterial Properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2020;8.