

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11815

研究課題名(和文) オッセオインテグレーション理解のためのQCM法による基礎的アプローチ

研究課題名(英文) Basic approach for understanding the osseointegration by QCM method

研究代表者

早川 徹 (Tohru, Hayakawa)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：40172994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯科治療において、チタン(Ti)インプラントは顎骨と結合することによって機能している。顎骨と結合するためには、まずTiへのタンパク質の吸着が重要である。本研究では、微量なタンパク質の吸着挙動をその場で観察できる水晶発振子マイクロバランス(QCM)法を用いてタンパク質のTiに対する吸着を検討した。その結果、カルシウムイオンによる修飾がTiに対するタンパク質の吸着を高めること、および異なったタンパク質の2段階吸着において吸着順序によってTiへの吸着挙動が異なることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tiインプラントの顎骨との結合、いわゆるオッセオインテグレーション獲得のメカニズムを理解するために、生体内を模倣した状態でのタンパク質の吸着という観点から検討を試みた。その結果、タンパク質吸着に関する新たな知見が得られ、オッセオインテグレーション獲得のメカニズムに関して貴重な示唆を得ることができた。さらに、歯科用Tiインプラント表面の特性についてより詳細に明らかにすることができ、新たな歯科用Tiインプラント表面の創製に繋がるのが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Titanium (Ti) implants function by bonding to jawbone. For getting the bonding to jawbone, the adsorption of proteins onto Ti is important. In the present study, we investigated the adsorption of proteins to Ti by using quartz crystal microbalance (QCM) method which can detect the adsorption of small amounts of proteins in situ. As results, it revealed that the modification of Ca ion enhanced the adsorption of proteins onto Ti and that adsorption orders of the proteins influence the adsorption behaviors in the case of two-step adsorption for different proteins..

研究分野：歯科理工学

キーワード：チタンインプラント オッセオインテグレーション 水晶発振子マイクロバランス タンパク質吸着  
フィブロネクチン アルブミン カルシウムイオン 2段階吸着

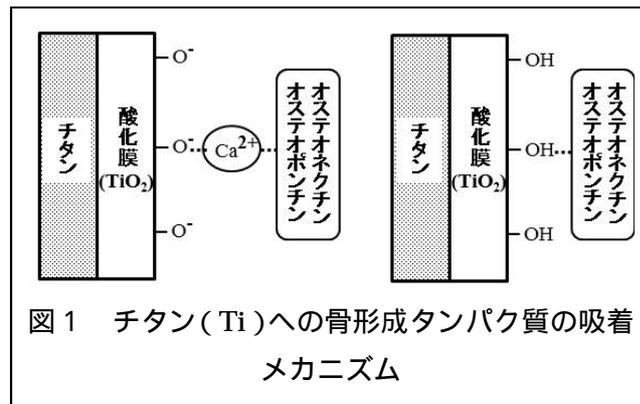
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

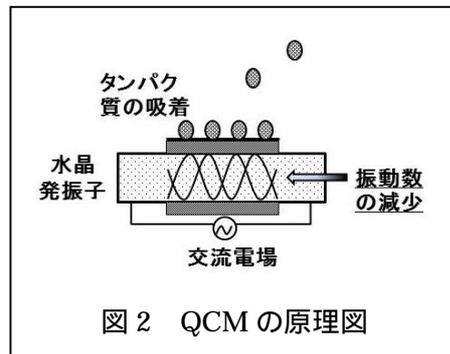
歯科用チタン (Ti) インプラントは骨とオッセオインテグレーションする事が知られている。臨床的にはオッセオインテグレーションをいかに早く、確実に獲得するかがインプラント治療の成績を左右しており、そのためにサンドブラスト処理や UV 処理など様々な Ti の表面改質処理が報告されている。一方、オッセオインテグレーションの形成メカニズムについては Ti 表面の酸化膜の関与が指摘されているものの、未だに不明な点が多い。

オッセオインテグレーションの形成メカニズムについては、まず、Ti 表面にオステオポンチン、オステオネクチンなどの骨形成に關与するタンパク質が吸着し、この吸着したタンパク質が骨芽細胞の遊走を高め、骨芽細胞と結合するとされている。Ti および骨形成タンパク質は中性領域では通常負に帯電している。吸着のメカニズムとして、カルシウム (Ca) イオンが仲立ちをして結合する様式または正の電荷をもつターミナル OH 基と結合する様式が考えられている (図 1)。またオッセオイン



テグレーションの初期には血液細胞の浸潤・遊走を伴うことから、マクロファージの走化性因子であるケモカインの関与が指摘されている。

従って、オッセオインテグレーションのメカニズムを理解するためには、まず、Ti への各種タンパク質の吸着挙動に関する知見を得ることが必須であると考えられる。タンパク質の吸着挙動の解明には幾つかの手法があるが、水晶発振子マイクロバランス (quartz crystal microbalance) 法は微量のタンパク質の吸着挙動をその場で観察できるという他の測定方法にはない利点を有している。一定周波数で振動している水晶発振子にタンパク質などが吸着すると、物質の量に比例して振動数が減少する (図 2)。この振動数の減少挙動からタンパク質の吸着量や吸着速度などを求めることができる。



今までに Ti センサーに対するフィブロンectin (Fn)、アルブミン (Alb) などの吸着挙動について QCM 法で検討してきた。その結果、Fn の吸着が Alb の吸着より有利に進行することを見出した。また、Ti とステンレス鋼への Fn の吸着について検討し、Ti の方がステンレス鋼より Fn の吸着量が多い事を見出した。生体内では、各種タンパク質が混合しており、タンパク質の競争的吸着が起こり、吸着順序がそれぞれのタンパク質の吸着に影響することが考えられる。

Ti のオッセオインテグレーションメカニズムを理解するために、今までに細胞培養実験や動物実験などが主に報告されているが、タンパク質の吸着という観点からの報告はほとんどない。本研究による、オッセオインテグレーション形成のメカニズムに関する基礎的な知見が得られ、Ti 表面の特性についてさらに明らかにすることができ、新たな Ti 表面の創製に繋がる事が期待できる。

### 2. 研究の目的

QCM 法を用いて生体内を模倣した条件下で Ti へのタンパク質の吸着について検討する。まず、Ca イオンの有無が Ti に対するタンパク質の吸着に与える影響について QCM 法にて検討し、タンパク質吸着における Ca イオンの役割に関する知見を得る。タンパク質としては細胞接着タンパク質である Fn を用いる。次に、Fn と細胞接着制御タンパク質である Alb の Ti への 2 段階吸着を同様に QCM 法により検討する。

以上の検討によって、Ti のオッセオインテグレーション獲得に関する基礎的な理解をはかる。

### 3. 研究の方法

#### (1) QCM 装置

27MHzQCM 装置 (AFFINIX Q<sub>N</sub>μ) を用いた。本 QCM 装置の外観図を図 3 に示す。本装置はフロー方式ではなく、センサーセル内でタンパク質の吸着反応を測定する方式である。センサーとしては分離型センサーセルを用いた。Ti センサーを組み込んだ分離型センサーセルを QCM 装置内のセルソケットに固定した。タンパク質の吸着挙動の測定は Ti センサーセル内を毎秒 1000rpm の攪拌子で攪拌しながら、温度 25 ± 1 °C の条件で行った。Ti センサーは UV ozone cleaner を用いて出力 19mW/cm<sup>2</sup> の条件で 20 分間、紫外線照射を行った後に測定に使用した。

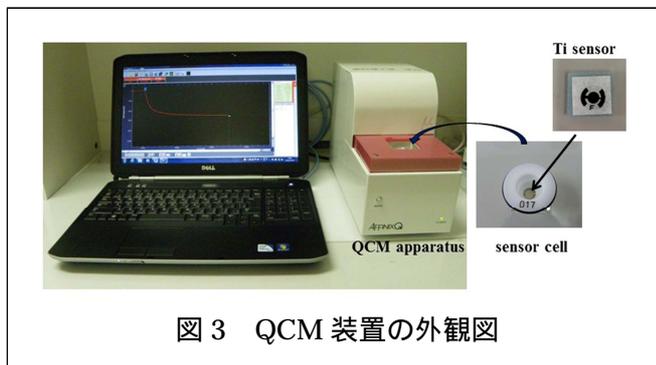


図 3 QCM 装置の外観図

## (2) タンパク質

細胞接着タンパクであるヒト血漿由来 Fn および細胞接着制御タンパク質である牛血清 Alb を 0.5 mg/mL の濃度でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH=7.4) に溶解して用いた。

## (3) AFM および接触角測定

UV 照射処理を施した Ti センサーに 1wt%CaCl<sub>2</sub> 水溶液を塗布し、室温で 24 時間保存した。その後、さらに 37 °C で 24 時間保存し、Ca イオン修飾 Ti (Ca-Ti) センサーを得た。

Ti センサー、Ca-Ti センサーおよびタンパク質吸着 Ti センサー表面を原子間力顕微鏡 (AFM) にて観察した。測定はタッピングモードで行った。また、AFM 像の解析から表面粗さである算術平均高さ (Sa) を求めた。Ti センサーおよび Ca-Ti センサーへの純水に対する接触角も測定した。

また、Fn および Alb の Ti に対する親和性を評価するために、Fn および Alb 吸着後の Ti センサーを蒸留水で 20 秒間洗浄し、同様にしてセンサー表面の AFM 観察を行った。

## (4) X 線光電子分光法 (xps) による表面分析

xps を用いて、Ti センサーおよび Ca-Ti センサーの表面分析を行い、Ca2p, Ti2p および O1s のピークについて解析した。

## (5) Ca イオン修飾 Ti へのタンパク質吸着の QCM 測定

Ca-Ti センサーおよびコントロールである Ti センサーをそれぞれ分離型センサーセルに組み込み、QCM 装置にセットした。QCM センサーセル内に PBS, 500μl を注入し、その後、5μl の Fn 溶液を注入した。Fn 溶液の注入と同時に Fn の吸着が始まり、センサーの振動数が減少する。Saubrey の式に従い Fn 注入 60 分後の Fn の吸着量を求めた。本 27MHzQCM 装置では 1 Hz の振動数の減少が約 0.61 ± 0.1ng/cm<sup>2</sup> の吸着に相当する。また、振動数減少曲線のカーブフィッティングから Fn 注入 5 分後および 10 分後の見かけの吸着速度定数、*K<sub>obs</sub>* を求めた。*K<sub>obs</sub>* は、 $\Delta F_t = \Delta F_\infty (1 - e^{-K_{obs}t})$  の式で表せられる。ここで、*F<sub>∞</sub>* は無限大時間での振動数変化である。本実験では、吸着初期の *K<sub>obs</sub>* を比較検討した。

## (6) Fn と Alb の Ti への 2 段階吸着の QCM 測定

上記と同様にして、Ti センサーセルを QCM 装置にセットする。この場合、Ti センサーに Ca イオンの修飾は行わない。センサーセルに 500μl PBS を注入し、その後、以下の 2 通りの方法でタンパク質の 2 段階吸着を測定した。

a) Fn-Alb 系列: まず、Fn 溶液 5μl を注入する。注入 60 分後に Alb 溶液 5μl を注入する。Alb 注入 60 分後まで、すなわち Fn 注入から 120 分後までの振動数減少を測定する。

b) Alb-Fn 系列: まず、Alb 溶液 5μl を注入する。注入 60 分後に、Fn 溶液 5μl を注入する。Fn 注入 60 分後まで、すなわち Alb 注入から 120 分後までの振動数減少を測定する。

同様にして、それぞれのタンパク質注入 60 分後の吸着量、およびそれぞれのタンパク質注入 5 分後および 10 分後の見かけの吸着速度定数、*K<sub>obs</sub>* を求めた。

(7) 各々の測定は n=3 とし、結果は平均値 ± 標準偏差で表した。Origin Pro 2017J を用いて一元配置分散分析を行った後に、Tukey の多重比較を行った。なお、有意水準は α=0.05 とした。

## 4. 研究成果

### (1) Ca イオン修飾 Ti への Fn 吸着の QCM 測定

図 4 に Ti センサーおよび Ca-Ti センサーの AFM 像を示す。どちらのセンサー表面にも 0.2-0.3μm の球状粒子の存在が確認され、形態的に大きな違いは見られなかった。

Ti センサーおよび Ca-Ti センサーの Sa 値 (nm/4μm<sup>2</sup>) はそれぞれ 3.3 ± 0.1, 3.3 ± 0.3, 接触

角は  $10.4 \pm 2.9$ ,  $7.1 \pm 1.3$  であり,  $S_a$  値および接触角とで両者に統計学的に有意差はなかった ( $p > 0.05$ ).

図5にTiおよびCa-Tiセンサーのxps解析結果を示す. TiセンサーではTi 2pおよびO1sのピークが確認された. 一方, Ca-Tiセンサーではそれ以外に修飾されたCaイオンに由来するCa2pのピークが確認された. xps解析の結果, Caのアトミック%は約2%であった.

図6にQCM測定の結果を示す. Ca-Tiセンサーの方がTiセンサーよりも振動数の減少が大きかった. 振動数の減少から求めた60分後のFnの吸着量はTiセンサーで  $729.7 \pm 79.0$  ng/cm<sup>2</sup>, Ca-Tiセンサーで  $1005.1 \pm 55.3$  ng/cm<sup>2</sup> となり, Ca-Tiセンサーの方が統計学的に有意に多い吸着量を示した ( $p < 0.05$ ). 振動数減少曲線から5分後および10分後の  $K_{obs}$  を求めた. 5分後ではTiセンサーで  $3.96 \pm 1.83$  ( $\times 10^{-3}$ ), Ca-Tiセンサーでは  $6.84 \pm 2.63$  ( $\times 10^{-3}$ ) となり, Ca-Tiセンサーの方が有意に大きい値であった. 10分後の  $K_{obs}$  の値はTiセンサーで  $4.19 \pm 0.58$  ( $\times 10^{-3}$ ), Ca-Tiセンサーでは  $5.78 \pm 1.52$  ( $\times 10^{-3}$ ) となり統計学的な有意差は見られなかった. この事から, Fnの初期の吸着速度がCa-Tiセンサーで早い事が分かった.

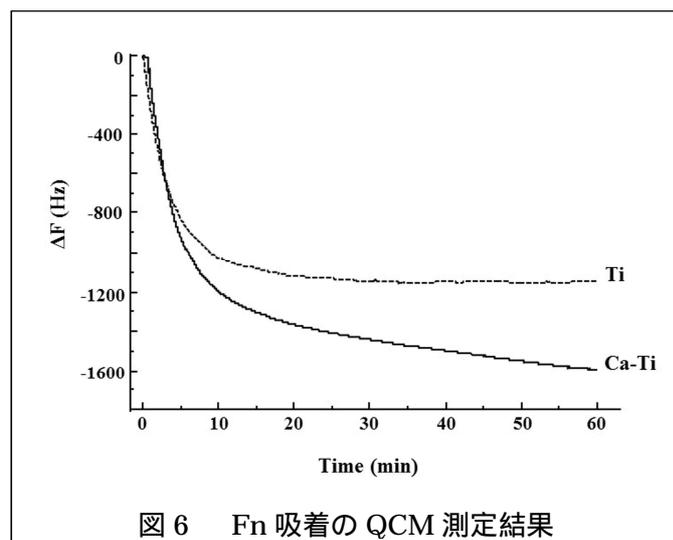
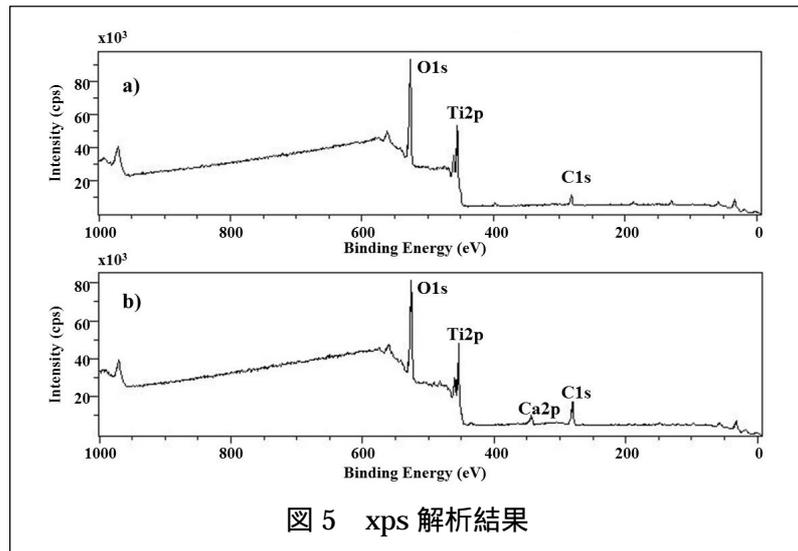
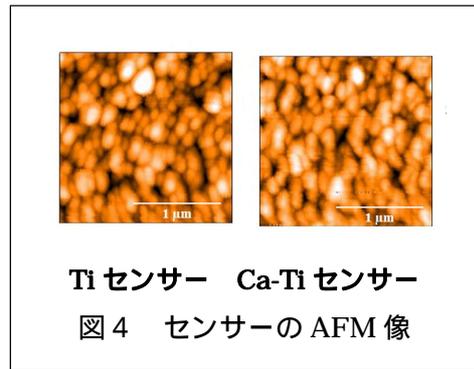
以上の結果から, TiへのCaイオンの修飾はFnの吸着量および初期の吸着速度を向上させることが判明した. Fnの等電点は約5~6であり, pH=7.4の条件下で負に帯電している. Tiのゼータポテンシャルを測定した結果, pH=7.4で-87mVでありやはり負に帯電している. 従って, FnとTiとの間では静電反発が生じる. 一方, Tiは表面に正に帯電している塩基性水酸基を有している. TiへのFnの吸着はこの塩基性水酸基を介して進行する事が推察される. Ca-Tiセンサーでは, 負に帯電しているTi表面が正に帯電しているCaイオンで修飾されている. 従って, 負に帯電しているFnは正に帯電しているCa-Ti表面により吸着しやすくなる. その結果, Fnの吸着量および初期の吸着速度を向上したものと考えられる.

Fnは細胞接着タンパク質として良く知られている. 生体内でTiインプラントが埋入されるとまずCaイオンがTi表面に吸着し, その結果Fnの吸着が促進され, 良好なオッセオインテグレーションの獲得に至る事が推察される.

生体内にはCaイオン以外にもマグネシウムイオンなどの多価イオンが存在している. これらのイオンもFnや他のタンパク質に吸着に関与し, オッセオインテグレーションの獲得に寄与しているものと思われる. 今後, 他のイオンの効果およびFn以外のタンパク質でさらに詳細に検討する予定である.

## (2) FnとAlbのTiへの2段階吸着のQCM測定

生体内では様々なタンパク質が競争的に吸着している. 生体内のタンパク質吸着を模倣する



単純な系として、細胞接着タンパク質である Fn と細胞接着阻害タンパク質である Alb の 2 段階吸着について検討した。

図 7 に QCM 測定の結果を、図 8 に 2 段階吸着過程における Fn および Alb の吸着量を示す。

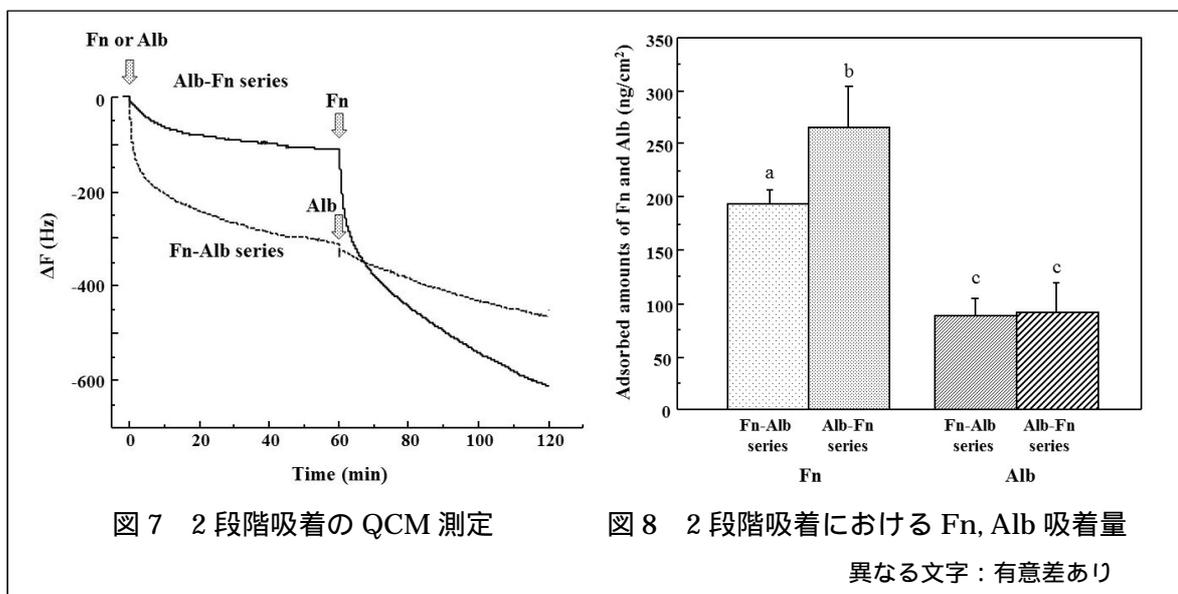


図 7 2 段階吸着の QCM 測定

図 8 2 段階吸着における Fn, Alb 吸着量

異なる文字：有意差あり

タンパク質吸着の順番を変えると、全体の吸着量が異なる事が分かった。すなわち、Alb-Fn 系列の方が Fn-Alb 系列よりも大きな振動数の減少を示した。

それぞれの段階でのタンパク質の吸着量を調べてみるとさらに興味深い事が分かった。第 1 段階吸着では、Fn-Alb 系列の Fn 吸着量が Alb-Fn 系列の Alb 吸着量よりも有意に多かった ( $p < 0.05$ )。さらに Fn 吸着を見てみると、Fn-Alb 系列の第 1 段階 Fn 吸着量よりも Alb-Fn 系列での第 2 段階 Fn 吸着量の方が有意に多くなっていた ( $p < 0.05$ )。すなわち、Alb の第 1 段階吸着が第 2 段階の Fn 吸着量を増加させることが判明した。Alb に関しては、第 1 段階吸着量と Fn 吸着後の第 2 段階吸着量とでは統計学的に有意な差は見られなかった ( $p > 0.05$ )。

次に、振動数減少曲線から 5 分後および 10 分後の  $K_{obs}$  を求めた Fn-Alb 系列でみると、Fn 吸着の 5 分後の  $K_{obs}$  と 10 分後の  $K_{obs}$  とでは有意な差が見られ ( $p < 0.05$ )、初期の吸着速度は速くなっていた。一方、Alb 吸着においては 5 分後と 10 分ごとで有意な差は見られなかった ( $p < 0.05$ )。Alb-Fn 系列においては、Fn 吸着、Alb 吸着どちらも 5 分後と 10 分後で有意な差が見られた ( $p < 0.05$ )。

この様にタンパク質吸着の順番を変えると吸着量や吸着速度に影響することが判明した。タンパク質吸着には表面粗さや接触角、ゼータ電位など様々な因子が存在する。また、タンパク質同士の相互作用やそれぞれのタンパク質のチタンへの親和性などが影響することが考えられる。そこで Fn および Alb 吸着 Ti センサーを蒸留水で洗浄後の表面状態を AFM にて観察した。その結果、Fn 吸着 Ti では蒸留水で洗浄後、表面に残存する Fn はほとんど観察されなかった。それに対して、Alb 吸着 Ti では洗浄後も Alb が残存している様子が観察された。すなわち、Alb の方が Fn よりも Ti に対する親和性が高いことが示唆された。

タンパク質の段階的吸着においては、より高い親和性を持つタンパク質が最初に吸着したタンパク質に置き換わって吸着する Vroman 効果が起こることが報告されている。本実験においても、Ti に対してより親和性の高い Alb が Fn に置き換わって吸着する現象が起きている可能性が考えられ、このことが Fn-Alb 系列と Alb-Fn 系列とでのタンパク質吸着の違いに影響したと推察される。

生体内では、Fn や Alb 以外に様々なタンパク質が存在している。Ti へのオッセオインテグレーション獲得にはサイトカイン CXCL12 の関与も指摘されている。オッセオインテグレーション獲得のメカニズムの解明には、骨形成に関与するその他のサイトカインも含めて、多段階吸着系においてさらに詳細な検討が必要である。

以上、オッセオインテグレーション獲得に関する基礎的な検討を行った本研究課題において Ca イオンは Ti への Fn の吸着において重要な役割を果たしており、Ca イオンによる修飾は Fn の Ti の吸着量を増加させるだけでなく、初期の吸着速度も向上させることが判明した。また、Ti 表面へ Fn および Alb を 2 段階吸着させた結果、吸着順序によって吸着挙動が異なり、Fn の吸着量は Alb 吸着によって増大することを見出した。

本研究の成果は、生体内でのチタンへのタンパク質吸着に関する基礎的な知見を与えるものであり、オッセオインテグレーションの理解につながるものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideki Imagami, Hideki Nomoto, Tomoyoshi Nomura, Shyuichiro Maekawa, Naoyuki Mishima, , Hideki Oikawa, Isao Ohashi, Tohru Hayakawa	4. 巻 33
2. 論文標題 Analysis of two-step adsorption of proteins onto a titanium surface using a quartz crystal microbalance method.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hajime Suzuki, Koh Tsukagoshi, Akira Takahashi, Nobuaki Furuya, Hiroki Furuya, Kouji Enami, Yasufumi Yamanishi, Tohru Hayakawa	4. 巻 32
2. 論文標題 Fibronectin adsorption onto titanium surface with or without calcium ion modification.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 222-229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11237/jsoi.32.222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鈴木 一, 高橋 璋, 三島弘幸, 早川 徹	4. 巻 33
2. 論文標題 DNA/プロタミン複合体ペーストによるラット抜歯窩の骨形成	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯科産業学会誌	6. 最初と最後の頁 15-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagahiro Miyamoto, Rina Yamachika, Toshitsugu Sakurai, Tohru Hayakawa, Noriyasu Hosoya	4. 巻 -
2. 論文標題 Bone response to titanium implants coated with double- or single-stranded DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/9204391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 三嶋直之, 栗山壮一, 柴垣博一, 吉成正雄, 早川 徹	4. 巻 30
2. 論文標題 紫外線照射チタンの親水性の経時的変化がタンパク質吸着に与える影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 86 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11237/jsoi.30.86	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 廣田正嗣, 早川 徹
2. 発表標題 QCM法によるフィブロネクチンおよびアルブミンのチタンへの二段階吸着解析
3. 学会等名 令和2 (2020) 年度春期第75回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田正嗣, 吉田英史, 早川 徹
2. 発表標題 QCM法による義歯床用金属材料への唾液糖タンパク吸着解析
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早川 徹
2. 発表標題 シンポジウム 口腔から始めるバイオマテリアル 歯科用インプラントの表面改質
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----