

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390513

研究課題名（和文）

サイトカイン光固定化によるチタンインプラントの高機能化と細胞接着・増殖・分化制御

研究課題名（英文）

High Performance Ti implant by photo-immobilization of cytokine and its effect on cell adhesion, proliferation and differentiation

研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90281162

研究成果の概要：

インプラント周囲の組織再生能を向上すべく、様々な表面改質法が考案されている。しかし生体分子の固定化に関しては、未だ実用的な手法は報告されていない。本研究では、光反応性ゼラチンによるチタン表面への生体分子固定化法を新たに開発し、その結果、チタン表面にゼラチンを微細構造状に光固定化できることが明らかとなった。様々な生体分子を共固定化することにより、チタン表面への生体機能性付与が可能となると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯科理工学、歯科材料学、生体材料学、歯科インプラント学、サイトカイン、チタン、光固定

1. 研究開始当初の背景

チタンは生体親和性に優れていることから、インプラント材料として多用されている。しかし、チタン自体は組織再生能を有しておらず、治癒期間短縮と適応症拡大を目指しさらなる技術開発が続けられている。インプラント周囲の骨再生を促進すべく、近年、成長因子などサイトカインの併用も試みられているが、成長因子の生体内寿命は短く不安定であ

り、また、必要な因子をインプラント周囲に長期間留めておくことができないことから、未だ期待するような組織再生促進効果は得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが開発したチタン表面への生体分子の固定法（特願

2005-220869) をもとに、(1)成長因子などのサイトカインをインプラント表面に必要な期間、活性を維持したまま光固定する技術を確認するとともに、(2)生理活性の異なる複数のサイトカインを共固定することにより、インプラントの周囲組織再生に関わる各種細胞の接着や増殖、分化の制御を試みた。

3. 研究の方法

チタンを400Åの厚さで被覆したガラス板を作製し、エキシマUV照射器 (UER20-172B、ウシオ電機) にて表面の有機物汚染を可及的に除去した後、n-オクタドデシルトリメトキシシラン (ODS) で処理を行うことにより表面を有機化した。ここに、光反応性ゼラチンを被覆した。光反応性ゼラチンは、ゼラチン水溶液にアジド安息香酸を加え、水溶性カルボジイミドを用いてカップリング反応により調製した (図1)。この時、ゼラチン中のリシン残基のアミノ基のほぼ100%にフェニルアジド基が導入された。このようにして合成した光反応性ゼラチンを溶解した水溶液を調製し、これをチタンコーティングしたガラス板上にキャストし、風乾した。乾燥後、光マスク存在下あるいは不在下で紫外線を照射し、光反応性ゼラチンを硬化させた (図2)。

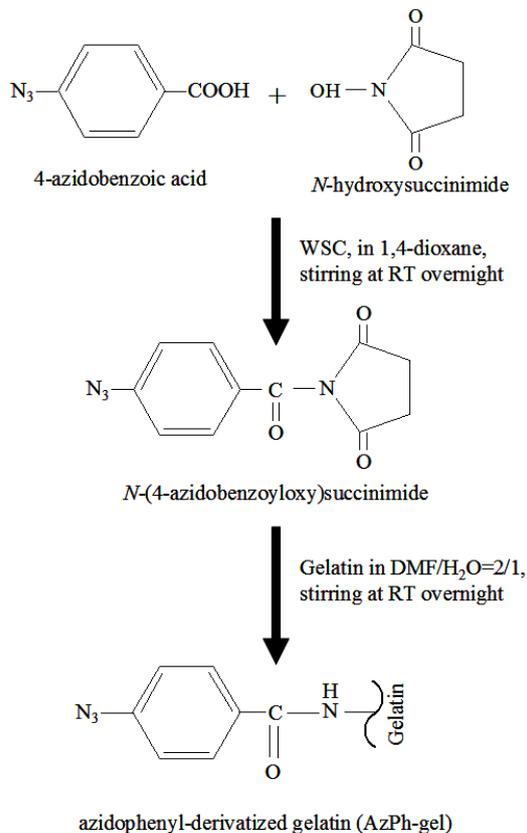


図1 光反応性ゼラチンの合成

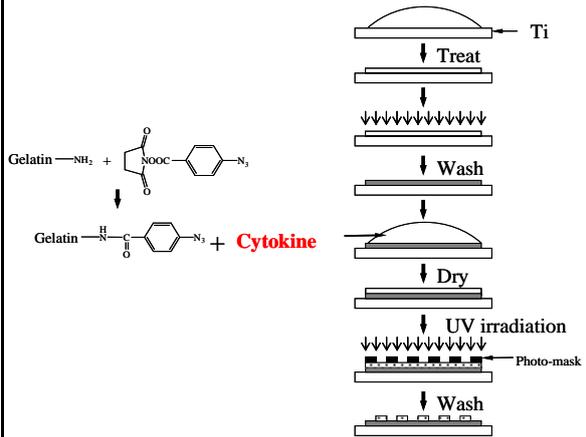


図2 チタン表面への光反応性ゼラチンのマイクロパターン光固定法。サイトカインなど様々な生体分子を共固定することにより、チタン表面への生体機能性付与が可能となる。

1) 各種処理面の化学的通常の検討

エキシマUV照射器にて表面の有機物による汚染を可及的に除去したチタン表面、ODS処理面ならびに光反応性ゼラチンによる処理面について、接触角計 (協和界面科学)、XPS (AXIS-HS, Kratos) およびTOF-SIMS (TFS-2000, Physical Electronics) を用いて化学的に分析した。

2) 細胞接着試験

光反応性ゼラチンを光マスク存在下で硬化させた試料について、水洗および70%エタノール滅菌を行った後、マウス繊維芽細胞STOあるいはアフリカミドリザル腎臓細胞COS-7を播種し、5%CO₂存在下、37°Cで培養を行った。調製したサンプル板上への細胞接着特性は光学顕微鏡にて形態学的に観察することにより評価した。

3) 動物実験

光反応性ゼラチンを固定したチタン板をラット皮下に埋入し、組織学的に評価した。

4. 研究成果

接触角測定から、チタンをODS 処理すると疎水性になり、その後のゼラチン固定化により親水性になることが明らかとなった (表1)。

表1 チタン処理面における水接触角

表面処理	接触角
TiO ₂	0 ± 0.2°
TiO ₂ -ODS (UV 照射前)	105 ± 0.5°
TiO ₂ -ODS (UV 照射後)	100 ± 0.7°
TiO ₂ -ODS-Photoreactive Gelatin (UV 照射なし)	54.5 ± 5.8°
TiO ₂ -ODS-Photoreactive Gelatin (UV10 秒照射)	46.1 ± 2.9°

XPS 測定より、ゼラチン固定化表面には窒素が検出されたが、チタンは検出されず、表面が完全にゼラチンで覆われていることが示唆された (図 3)。

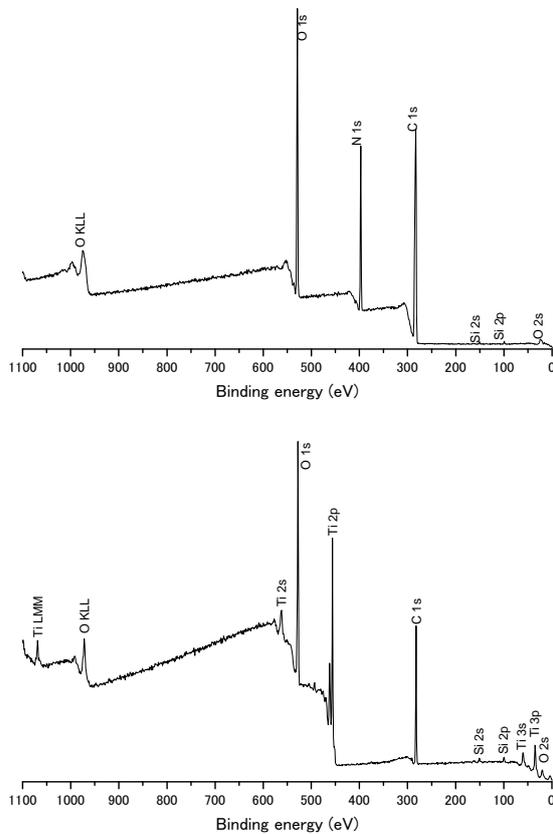


図 3 (a)ODS処理後のチタン、ならびに (b)ODS処理後に光反応性ゼラチンを固定したチタンのXPSワイドスキャン。ゼラチン固定化表面にはNが検出されたが、Tiは検出限界以下であった。

さらにTOF-SIMSから、光マスクを用いた試料ではゼラチンがマイクロパターン状に固定化されているのが観測された (図 4)。

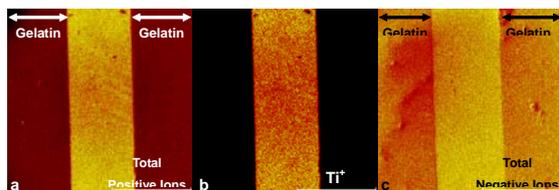


図 4 TOF-SIMSによるマッピング像。ゼラチンがマイクロパターン状に固定化されている。

また、細胞実験よりゼラチン固定化領域でのみ細胞接着が起こり、非固定化領域には細胞が接着しにくいことが明らかとなった (図 5)。

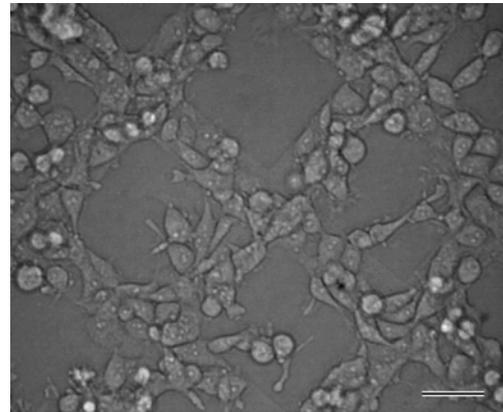


図 2 ゼラチンのマイクロパターン (格子状) 固定化チタン表面でのCOS-7細胞の接着
Bar = 50 μ m

さらに、動物実験の結果、チタン板のみの埋入に比べて過度の炎症も認められず、本材の生体親和性の高さが伺えた。また、光反応性ゼラチンは生体内にて吸収されることも明らかとなった。

以上の結果から、チタン表面にゼラチンを微細構造状に光固定化できることが明らかとなった。様々な生体分子を共固定化することにより、チタン表面への生体機能性付与が可能となると期待される。

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13件)

本研究により得られた主要な成果として記載した研究内容(4. 研究成果を参照)を報告した論文

1. Heydari, M., Hasuda, H., Sakuragi, M., Yoshida, Y., Suzuki, K., Ito, Y. (2007). Modification of the titan surface with photoreactive gelatin to regulate cell attachment. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 83:906-914.

本研究の主要な成果としては記載していないが、得られた知見をもとに着想にいたった研究論文

1. Maekawa, K., Shimono, K., Oshima, M., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B., Suzuki, K., Kuboki, T.* (2009). Polyphosphoric acid treatment promotes bone formation around titanium implants. *Journal of Oral Rehabilitation*, 36:362-367.
2. Maekawa, K., Yoshida, Y., Mine, A., Van Meerbeek, B., Suzuki, K., Kuboki, T. (2008). Effect of polyphosphoric-acid pre-treatment of titanium on attachment, proliferation and differentiation of osteoblast like cells (MC3T3-E1). *Clinical Oral Implants Research*, 19:320-325.
3. Ono, M., Kubota, S., Fujisawa, T., Sonoyama, W., Kawaki, H., Akiyama, K., Oshima, M., Nishida, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Takigawa, M., Kuboki, T.* (2008). Promotion of hydroxyapatite-associated, stem cells-based bone regeneration by CCN2. *Cell Transplantation*, 17:231-240.
4. Maekawa, K., Yoshida, Y., Mine, A., Fujisawa, T., Van Meerbeek, B., Suzuki, K., Kuboki, T. (2007). Chemical interaction of polyphosphoric acid with titanium and its effect on human bone marrow derived mesenchymal stem cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 82A:195-200.
5. Ono, M., Kubota, S., Fujisawa, T., Sonoyama, W., Kawaki, H., Akiyama, K.,

- Oshima, M., Nishida, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Takigawa, M., Kuboki, T.* (2007). Promotion of attachment of human bone marrow stromal cells by CCN2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357:20-25.
6. Tsuchimoto, Y., Yoshida, Y., Mine, A., Nakamura, M., Nishiyama, N., Van Meerbeek, B., Suzuki, K. (2006). Effect of 4-MET-and 10-MDP-based primers on resin bonding to titanium. *Dental Materials Journal* 25:120-124.
7. Tsuchimoto, Y., Yoshida, Y., Takeuchi, M., Mine, A., Yatani, H., Tagawa, Y., Van Meerbeek, B., Suzuki, K., Kuboki, T. (2006). Effect of surface pre-treatment on durability of resin-based cements bonded to titanium. *Dental Materials* 22:545-552.

本研究の主要な成果としては記載していないが、同様の研究技術を用い研究期間中に掲載された論文

8. Namba, N., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Takashima, S., Matsuura-Yoshimoto, K., Maeda, H., Van Meerbeek, B., Suzuki, K., Takashiba, S. (2009). Antibacterial effect of bactericide immobilized in resin matrix. *Dental Materials*, 25:424-430.
9. Van Landuyt, K.L., Yoshida, Y., Hirata, I., Snauwaert, J., De Munck, J., Okazaki, M., Suzuki, K., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B. (2008). Influence of the chemical structure of functional monomers on their adhesive performance. *Journal of Dental Research*, 87:757-761.
10. Coutinho, E., Yoshida, Y., Inoue, S., Fukuda, R., Snauwaert, J., Nakayama, Y., De Munck, J., Lambrechts, P., Suzuki, K., Van Meerbeek, B.* (2007). Gel phase formation at resin-modified glass-ionomer/tooth interfaces. *Journal of Dental Research*, 86:656-661.
11. Van Landuyt, K.L., Snauwaert, J., De Munck, J., Coutinho, E., Poitevin, A., Yoshida, Y., Suzuki, K., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B.* (2007). Origin of interfacial droplets with one-step self-etch adhesives. *Journal of Dental Research*, 86:739-744.
12. Fukeygawa, D., Hayakawa, S., Yoshida, Y., Suzuki, K., Osaka, A.,

Van Meerbeek, B. (2006). Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *Journal of Dental Research* 85:941-944.

[学会発表] (計 6 件)

本研究により得られた主要な成果として記載した研究内容 (4. 研究成果を参照) を報告した発表

1. 吉田靖弘, 鈴木一臣. 光反応性ゼラチンによるチタン表面の生物学的改質. 第 48 回日本歯科理工学会学術講演会. 平成 18 年 10 月 28-29 日, 愛知学院大学歯学部, 名古屋.

以下に記した国際シンポジウムにて、本研究の成果を紹介

2. Yoshida, Y. Nano-interfacial control for functional reconstruction of human hard tissues Global Center of Excellence Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases.: G-COE 1st International Symposium "Strategies to create the super tooth", Tokyo Gakusei Kaikan, Jan 22, 2009, Tokyo, Japan.
3. Yoshida, Y. Interfacial control for functional reconstruction of human hard tissues. The International Symposium of the 117th Scientific Meeting of Japan Prosthodontic Society in Nagoya, The International Congress of Prosthodontics 2008 in Nagoya, The 1st Biennial Joint Congress of Chinese Prosthodontic Society, Japan Prosthodontic Society and Korean Academy of Prosthodontics, "Tissue-Biomaterial Interface Research for Prosthodontic Dentistry", Nagoya Congress Center, 6-8 Jun, 2008, Nagoya, Japan.
4. Yoshida, Y. Nano-interfacial control for hard tissue reconstruction. The Annual Scientific Meeting of the Association for Dental Sciences of the Republic of China. The Taipei International Convention Center, Nov. 16-18, 2007, Taipei, Taiwan.
5. Yoshida, Y., Suzuki, K. Surface modification of Ti implants for promotion of bone regeneration. The 6th International Symposium on Titanium in Dentistry. June 5-6, 2007., Kyoto International Conference Center, Kyoto,

Japan.

6. Yoshida, Y. Nano-interfacial control for functional reconstruction of human hard tissues. The 9th International Symposium on Biomimetic Interfaces. Recent trends of nanobiotechnology in medical and dental research. February 1, 2007, Seoul National University, Seoul, Korea.

[その他]

1. 第 48 回日本歯科理工学会学術講演会発表優秀賞 (2007 年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 90281162

(2) 研究分担者

鈴木 一臣 (SUZUKI KAZUOMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 30050058
山本 敏男 (YAMAMOTO TOSHIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 30107776
長岡 紀幸 (NAGAOKA NORIYUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 70304326
伊藤 嘉浩 (ITO YOSHIHIRO)
独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・研究員
研究者番号 : 40192497

(3) 連携研究者

なし