

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592258
 研究課題名（和文） 機能生体材料としての天然高分子ゲルの膨潤/収縮挙動と物質動態の定量的解析
 研究課題名（英文） Quantitative analysis of swelling-shrinking nature accompanying molecular transfer found in natural polymers gel as potential functional biomaterials
 研究代表者
 根津 尚史 (NEZU TAKASHI)
 岩手医科大学・歯学部・講師
 研究者番号：40264056

研究成果の概要：

生体由来の高分子のゲルが膨潤・収縮する現象を利用して、薬物等を必要に応じて吸収、放出させる機能を生体材料に付与する研究を行った。水晶発振子マイクロバランスという分析方法を主体に、固体表面に形成されたコラーゲン（生体高分子の一種）のゲルが pH などの環境の変化によってねらい通りに膨潤・収縮することを明らかにした。また、中性 pH でゲルに抗菌物質を取り込ませた後、pH を酸性に変化させて放出させることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：高分子生体材料学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：生体高分子ゲル、膨潤収縮、放出制御、環境応答型デバイス、吸着、粘弾性、QCM-D

1. 研究開始当初の背景

高分子の網目間が液体の連続相で満たされたゲルは、化学物質濃度、電気刺激等にตอบสนองして膨潤、収縮し得る。この性質は、創薬分野ではドラッグ・デリバリー・システムで活用を図る研究が進められている。これに対して歯科医学分野では印象材、裏装材などの在来材料から細胞培養の足場のような新しい材料まで、ゲルは主として固体としての性質（静的性質）を利用することが多かった。しかし、ゲルに特徴的な膨潤/収縮現象（動的性質）を利用することで、さらに高付加価値な歯科用ゲル材料の創製が可能と考えた。

一方、歯科治療で歯に接着を施す際、象牙質表面に露出するコラーゲンや、歯型（印象）を採るアルジネート印象材のアルギン酸も水を含んだハイドロゲルとなる。これらは収縮によって接着材成分の浸透が阻害されたり、型の寸法が変化したりするなどの問題があり、ハイドロコロイドの収縮、膨潤は歯科治療の場面でも重要な現象である。そのため、物質の出入りを伴う天然高分子のハイドロコロイドの膨潤/収縮現象を物理化学的見地から追究することは非常に意義深い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、象牙質コラーゲン層への接着材成分の浸透を制御し、象牙質接着性の向上を図る技術や、糖タンパク質を基材とするペリクルの形成過程とゲル物性を解明する技法を支えるハイドロゲル材料の基礎研究として、

- (1) 天然高分子ハイドロゲルの膨潤/収縮に伴うゲルの物性変化を、水晶発振子マイクロバランス (QCM-D 法) を用いて、定量的に解析すること
- (2) ゲルの膨潤/収縮に伴う、物質の浸透、移動挙動を、分光学的手法を用いて定量的に解析すること
- (3) 速度、規模の両面で定量的にゲルを膨潤/収縮させる条件を追究し、医用生体材料、創薬支援材料に供する高分子ゲルの力学的性質の制御、物質移動制御の基本技術を確立すること

である。

3. 研究の方法

(1) 材料

物質の取り込み、放出を担うハイドロゲル担体として、コラーゲン、ゼラチンおよびヒアルロン酸を用いた。また、モデルドラッグとして塩基性タンパク質のリゾチーム、可視部波長に吸収を持つアクリフラビン類 (色素) を用いた。各高分子溶液は、原則として緩衝液を用いずに蒸留水で必要濃度に調製し、溶液の pH は塩酸または水酸化ナトリウム溶液を、塩濃度は塩化ナトリウムを用いて調節した。

(2) 方法

①QCM-D による吸着量測定と吸着状態評価
 QCM-D の原理 (図 1): 一定の高周波数 f_0 で発振しているクォーツ (水晶発振子) に物質が吸着すると、重量増加に応じて周波数が低下する ($f < f_0$) 特性を利用して、固体表面の物質吸着量を計測するのが QCM の基本原理である。硬く吸着している場合には f の低下は吸着重量増加に比例し、十数 ng 程度の極微量の吸着を定量できる。一方、軟らかい吸着層では、周囲の媒質との摩擦により吸着層の振動が抑制され、振動の位相が遅れるとともに、振幅の自由減衰が速くなる (減衰の時定数 τ が小さくなる)。 $D = 1/\pi f \tau$ で定義されるエネルギー消散 (dissipation) は、吸着層の軟らかさの指標となる。QCM-D は、吸着量、吸着状態の変化に伴うクォーツセンサーの f および D の変化を測定し、吸着量と吸着層の粘弾性を考察する方法である。
 測定: 金、シリカ、酸化チタン、またはアパタイト表面を持つクォーツセンサーを装着した QCM-D 装置の測定セル内に高分子溶液

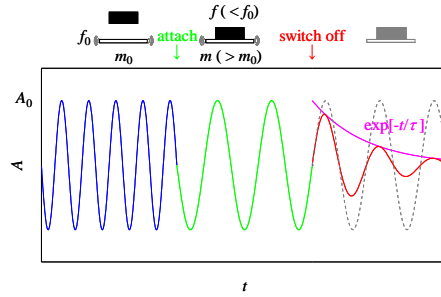


図 1 QCM-D の原理

(0.01~0.02 g/L) を導入し、厳密な恒温条件下で f と D の変化を平衡に達するまで測定した。必要に応じて、異種高分子の多層吸着を行った。

被覆センサーの調製: 担体高分子表面でのモデルドラッグ吸脱着挙動を調べるため、市販のクォーツセンサー表面を、a) 装置に取り付けて担体用高分子を流す *in situ* 吸着または、b) スピンコーティングによる被覆の 2 方法で処理して被覆センサーとし、両者を比較した。

②SEM, AFM による吸着面の観察

高分子の吸着状態を確認するため、センサー表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) による二次電子像、反射電子像観察およびコンタクトモード/ノンコンタクトモードでの原子間力顕微鏡 (AFM) による観察を行った。

③ゲル化に関わる高分子溶液の粘度測定

不溶性の腱コラーゲンをベースとしたモデルドラッグ担体のバルク体を調製するための「つなぎ」 (binder matrix) 材料として用いるゼラチンまたはヒアルロン酸溶液の粘度の濃度および温度依存性を、音叉型粘度計を用いて調べた。

④ゲルからの放出色素の吸光度測定

担体からの色素放出のカイネティクスを調べるため、色素を含有させた担体ゲルを分光セル底部に沈め、種々の条件下でのゲル外液への拡散を紫外可視分光光度計で測定、定量することを計画した。種々の深さ x と時刻 t で吸光度 $A(x, t)$ を測定し (図 2)、拡散方程式から色素の拡散係数を求めることとした。

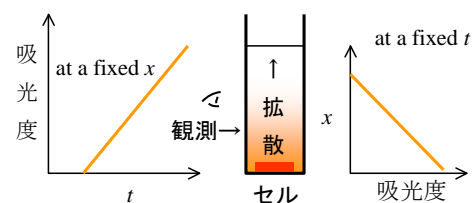


図 2 吸光度測定による拡散の評価

4. 研究成果

(1) 分子形態と吸着

高分子ゲルの膨潤／収縮に伴い、ゲルの密度、硬さが変化すると考えられる。硬さに関係すると思われる分子形態が互いに著しく異なるコラーゲンとリゾチームが形成する吸着層の粘弾性を、QCM-Dにより調べた。

繊維状のコラーゲンは吸着平衡到達に長時間を要し、継続的に増大する吸着が起ること、吸着層は非常に柔らかいことが明らかになった(図3左)。pH 3の無塩系では吸着は二段階で進行し、センサー表面への硬い初期付着(一次吸着)に続いて、一次吸着層上で柔らかい凝集的な付着(二次吸着)が起ると推測された。これに対して、pH 7または添加塩条件下では吸着は一段階で完了した。これとは別に、コラーゲンはpH 7および添加塩条件下ではpH 3無塩系とはわずかながら異なる凝集構造(状態)にあることが分光分析および熱分析により示唆され、この違いが吸着挙動に反映されたと考えられた。

これに対し、コンパクトな球状(4.5 nm×3 nm×3 nm)のリゾチームは添加直後に吸着平衡に達し、吸着層は硬いことが明らかになった(図3右)。また、酸化物表面に対しては、異符号の電荷を持つpHでのみ吸着が促進され、塩を添加すると吸着が阻害されたことから、リゾチームの吸着には静電結合が関与していると結論された(図4)。更に、QCM-Dのデータ(f および D)のフィッティング解析から吸着層は単分子の厚さと見積もられ、算出された吸着重量と併せセンサー表面が100%被覆されていると推定された。

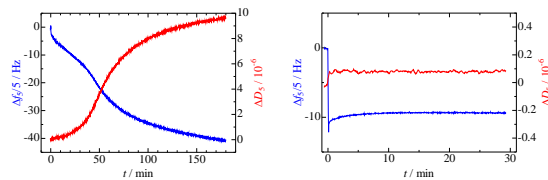


図3 金センサーへのコラーゲン(左)とリゾチーム(右)の吸着(pH 3)

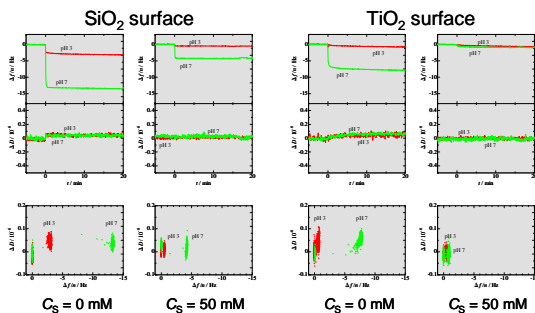


図4 酸化物センサーへのリゾチームの吸着

(2) コラーゲン-リゾチーム相互作用の制御

金表面のQCM-Dセンサー上にコラーゲン吸着層を形成させた後にリゾチームを添加すると、中性pHではリゾチームはコラーゲン層上に吸着することがQCM-D測定から確かめられた(図5)。リゾチームの吸着による f 変化は、硬い基板への吸着と同程度であった(図3右、図4)。また、リゾチームの吸着層は、硬い基板上に比べてコラーゲン層の様な柔らかい表面上では揺らぎの大きい状態(D 値の大きい状態)にあることも見出され、その場合には容易に脱離しうることが予想された。一方、塩を添加した条件下では吸着は認められなかった。

コラーゲン層上にリゾチームが吸着した状態からpHを酸性に変化させると、吸着していたリゾチームが速やかに脱離することが示された(図5)。ただし、pHジャンプの影響にはリゾチームの脱離の他にコラーゲンの膨潤も含まれるため、定性・定量の両面でお慎重な解釈が必要である。しかしながらこの結果は、コラーゲンのような荷電高分子を基材として環境のpH変化に呼応しリゾチームなど塩基性の抗菌物質を取り込み、放出する、制御可能な生体材料の設計に応用できることを強く示唆した。

pH以外に媒質の塩濃度や誘電率の変化で膨潤／収縮する高分子ゲルもあるが、口腔内では細菌の活動で局所的にpHが大きく低下することがあるという点で、pH変化に応答するゲル材料は抗菌歯科材料として利用価値が高いと考えられた。

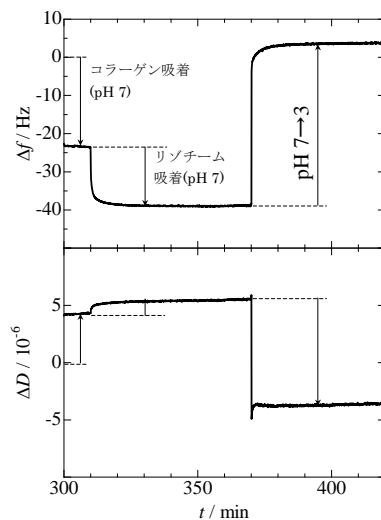


図5 コラーゲン吸着層上へのリゾチームの吸着(pH 7)とpHジャンプによる脱離(pH 3)

(3) 象牙質表面をモデル化したセンサーの作製と評価

センサー表面へのコラーゲンの安定な吸着の特性を利用して、アパタイト表面を有する市販のQCM-Dセンサーにコラーゲンを部分的に吸着させ、アパタイトとコラーゲンの双方を表面に持つ複合センサーを、象牙質表面モデルとして調製することを試みた。QCM-D測定によるコラーゲンの吸着過程の観察および吸着層の粘弾性解析から、アパタイトセンサー上でコラーゲンは多層吸着していることが示唆された(図6左)。また、SEM観察により、アパタイトセンサー表面にコラーゲンが離散的、かつ凝集的に吸着していることが確かめられた(図7)。吸着コラーゲンは媒質交換程度の通常の洗浄ではセンサーから脱離せず、センサーは長時間安定に発振した。また、吸着はリン酸緩衝液中で大きく促進され、無塩系に比べ硬い吸着層となった(図6右)。

コラーゲンの吸着したこのセンサーには、リゾチームが静電吸着することが見出され(図8)、その挙動は上記(2)節で示した金基板上的コラーゲン層へのリゾチーム吸着の応答と類似していた。なお、SEM像からはコラーゲンに覆われていないアパタイト領域も多く残っていることから、リゾチームはアパタイト部分にも吸着していることが考えられる。得られた結果は、象牙質接着時のコラーゲン処理において、塩基性の抗菌物質をプライマー成分に含有させることで二次齲蝕に罹りにくい樹脂含浸層を形成させる技術につながると期待される。

また、コラーゲン層に HEMA を作用させると、吸着層がやわらかくなったと解釈される粘弾性の変化が見出された(図9)。象牙質接着時のプライマーである HEMA は露出した象牙質コラーゲンを膨潤させることでボンディングレジン浸透性を高めるという従来

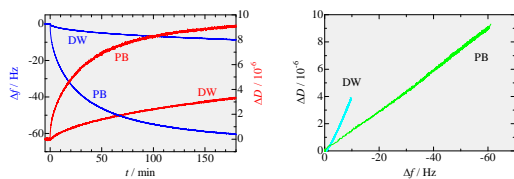


図6 アパタイトセンサーへのコラーゲンの吸着(pH 7)

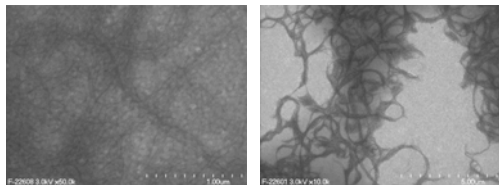


図7 アパタイトセンサー上のコラーゲン(左)とアパタイト/コラーゲンのパッチ構造(右)のSEM像

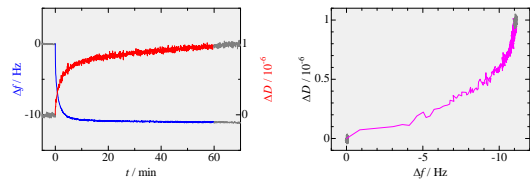


図8 コラーゲン層へのリゾチームの吸着(PB, pH 7)

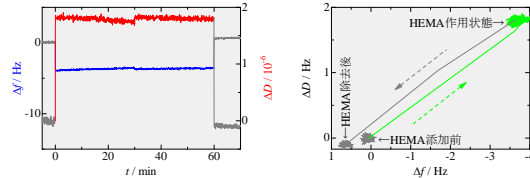


図9 コラーゲン層への HEMA の可逆的な作用(pH 7)

の説を支持する結果であった。

以上より、調製されたセンサーはアパタイト/コラーゲン複合センサーとして接着に関わる研究に利用できる見通しが得られた。

(4) 物質放出制御可能な複合ゲルの調製

既存の腱コラーゲン(高度に架橋したコラーゲン)に、親和性の高い粘稠な高分子溶液をバインダーとして加えた複合ゲルを調製した。バインダー高分子としてはコラーゲンと親和性の高いゼラチンとヒアルロン酸を選択した。

ゼラチンは濃度および pH に応じてゾル/ゲル転移温度が変化した(図10)。ゾル状態では10%の高濃度でも粘性は比較的良かった(10 mPa s)が、ゲル化の過程では10000 mPa s以上の非常に高い粘性を示した。ゼラチンをバインダーとした複合ゲルは、中性 pH に比べ酸性 pH で著しく膨潤・崩壊した。酸の影響で大量に物質を放出し、ゲル自身の分解・代謝も促進される特性が予想された。

ヒアルロン酸は10~45°Cの温度範囲で一定の粘性を示し、0.5%の低濃度でも100 mPa sという高い粘性を示した(図10左)。これを腱コラーゲンのバインダーとして調製した複合ゲルは、3ヶ月の水浸漬後も目立った膨潤やゲルの崩壊は認められなかった。コラーゲンの膨潤/収縮が抑制される性質と高い形状維持性から、長期にわたって物質を徐放する用途に適していると考えられた。

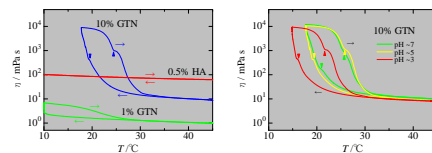


図10 バインダーとしてのゼラチン(GTN)およびヒアルロン酸(HA)の粘性

(5) 総括

- ①QCM-D 法により、形状の異なる天然高分子（コラーゲン：繊維状、リゾチーム：球状）の固体表面への吸着のカイネティクスと吸着層の粘弾性の違いが明らかにされた。とりわけ、媒質の pH および添加塩によるコラーゲン吸着層（ハイドロゲル）の膨潤／収縮が特徴的な粘弾性の変化に反映されることが示された。すなわち、ゲルの膨潤、収縮の評価法としての QCM-D の有用性が示された。
- ②コラーゲンを基材とするゲル材料は、pH 変化に応じて静電相互作用に基づいて塩基性抗菌物質を取込／放出する性質を持つことが、QCM-D を主体とした表面分析により示された。さらに、pH 低下による膨潤（粘弾性の変化）がそれらの吸着状態に影響し、放出を促進していると推測された。この現象の定量的な精密制御は課題として残された。
- ③既製のセンサーに高分子をパッチ状に吸着させることで、本来のセンサー面と高分子の双方をセンシング表面とする複合センサーに相当するものを得ることができた。
- ④ミクロゲル（腱コラーゲン）に適切なバインダー（ゼラチンまたはヒアルロン酸）を加えて成形性、形態維持性を持たせた複合ゲル（ヘテロゲル）の調製の基礎技術を得た。
- ⑤一方、QCM を用いた多糖の吸着測定と粘弾性解析、分光法を用いた複合ゲルからの色素の放出についての定量的な検討を期間内に完了することができなかつた。当研究の成果とはならないが、これらは今後完遂すべき課題と考える。当初の計画の妥当性を再度検討し、現実的なエフォート値の設定と併せ、以後の計画研究にこの反省を活かしたい。

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 3 件）

- ①根津尚史、荒木吉馬、BTC (Bench to Clinic) 研究室から臨床へ 歯科生体材料の表面インテリジェント化を目指す研究、DE (査読無) 169, 24-26 (2009).
- ②根津尚史、「歯科材料表面の物質吸着と吸着層のレオロジーの同時分析」、日本歯科産業学会会報 (査読無) No. 39, 3-4 (2009).
- ③Nezu T, Masuyama T, Sasaki K, Saitoh S, Taira M, Araki Y. Effect of pH and Addition of Salt on the Adsorption Behavior of Lysozyme on the Gold, Silica and Titania Surfaces Observed by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation

Monitoring, Dent Mater J (査読有) 27 (4), 573-580 (2008).

〔学会発表〕（計 6 件）

- ①○根津尚史、増山知之、佐々木かおり、齋藤設雄、平 雅之、荒木吉馬、コラーゲン-リゾチーム相互作用の pH 依存性の QCM-D を用いた解析、第 52 回日本歯科理工学会学術講演会 (平成 20 年 9 月 20 日、大阪市)
- ②○根津尚史、荒木吉馬、QCM-D を用いた球状および棒状タンパク質吸着層の粘弾性解析、第 61 回コロイドおよび界面化学討論会 (平成 20 年 9 月 9 日、福岡市)
- ③○根津尚史、佐々木かおり、齋藤設雄、平雅之、荒木吉馬、コラーゲンハイドロゲルの膨潤／収縮と物質の取込／放出 — 複合ゲルの調製とその特性—、第 51 回日本歯科理工学会学術講演会 (平成 20 年 4 月 26 日、横浜市)
- ④*Nezu T, Sasaki K, Saitoh S, Taira M, Araki Y. Adsorption of an Antibacterial Protein onto Dental Material-Related Surfaces Investigated by QCM Method. International Dental Materials Congress 2007 (Nov. 24, 2007, Bangkok)
- ⑤○根津尚史、荒木吉馬、QCM-D を用いた球状および棒状タンパク質の吸着挙動の解析、第 60 回コロイドおよび界面化学討論会 (平成 19 年 9 月 22 日、松本市)
- ⑥○根津尚史、荒木吉馬、水晶発振子マイクロバランスを用いた歯科材料質基板への抗菌タンパク質吸着の測定、第 49 回日本歯科理工学会学術講演会 (平成 19 年 5 月 12 日、札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根津 尚史 (NEZU TAKASHI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：40264056

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

荒木 吉馬 (ARAKI YOSHIMA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：20005036

平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：60179398