

平成22年 5月17日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791467

研究課題名（和文）サイトカインを固定化した機能性チタンインプラントの開発

研究課題名（英文）Development of functional titanium implant for bone attachment

研究代表者

平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40346507

研究成果の概要（和文）：

本研究は申請者がこれまで培った表面処理技術ならびに解析技術をもとに、耐加水分解性にすぐれたアルキルホスホン酸とチタン接着性能を有する骨接着・再生ペプチドを用いて長期間にわたり組織接着性・骨再生能を有するチタンインプラント表面の改質法を確立することを目指している。これらの固定化技術は、チタンインプラントの組織接着性と骨再生能を著しく向上することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

This study, based on surface treatment and analysis technology acquired from the applicant, used alkylphosphonic acids and biomineralization peptide onto titanium substrates and then established a method of reforming the surface of titanium implant bone adhesion. These immobilization techniques can be expected to improve significantly the ability of the titanium implant bone regeneration and tissue adhesive.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：チタン・アルキルホスホン酸・表面改質・表面プラズモン・生体適合性・バイオミネラリゼーション

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会へと急速に向かいつつある我が国において、介護費や医療費の増大はすでにさけることができない状況である。加えて、近年における『寝たきり老人』の急激な増加は、これらの社会福祉費をさらに押し上げる深刻な問題であり、早急に対処すべき課題となっている。特に、骨・関節の疾患や歯牙喪失は『寝たきり』と強い相関があることが報告されており、今後、これらの硬組織疾患に対する人工関節、人工歯根などのインプラント治療の需要拡大は益々増加するものと予想される。

チタンは生体親和性に優れ、なおかつ硬組織に必要な諸性質を有した生体材料であることから、インプラント医療の場で幅広く用いられている。しかし、チタン表面と生体との間には化学的な結合は起こらないため、一部が粘膜を貫通して生体外とつながった状態になっている口腔インプラント（人工歯根）では、インプラント周囲炎の原因になるなど臨床的にも大きな問題となっている。また、オッセオインテグレーション獲得に必要な治癒期間の短期化も求められているものの、現在行われている材料学的な表面改質のみでは限界がある。以上の経緯から、チタンインプラント表面に長期間安定した生体組織接着性と骨再生能を付与する表面改質法の確立が強く望まれているが、未だ有用な手法は実用化されておらず、今後の進展が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では申請者がこれまで培った表面処理技術ならびに解析技術をもとに、長期間にわたり組織接着性・骨再生能を有するチタンインプラント表面の改質法を確立することを目指す。

チタン表面処理として、耐加水分解性にすぐれたアルキルホスホン酸とチタン接着性骨接着・再生ペプチドを用いた。

3. 研究の方法

(1) アルキルホスホン酸を用いたチタン表面処理

耐加水分解性にすぐれたアルキルホスホン酸を用いて、長期間にわたり組織接着性・骨再生能を有するチタンインプラント表面の改質法を確立する。

アルキルホスホン酸は加水分解しない C-P 結合を有しており、生体内で分解されず長期間安定してチタン表面上に結合し留まると

考えられる。

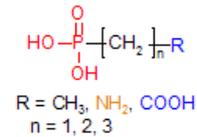


図 アルキルホスホン酸の構造

① SingleSpot SPR の改良

チタン表面の相互作用を原子レベルかつリアルタイムで観察するためには、SPR 測定に最適な光学条件・SPR 測定ユニット・制御プログラムの改良を行う必要がある。特に、本研究では SPR の感度を安定して高める必要があった。そこで、SPR 測定基板ホルダー部に α 軸 β 軸の調整部および基板自体の θ 回転軸も微調整できるように、装置を改良し、測定感度の向上と安定性を行えるようにした。

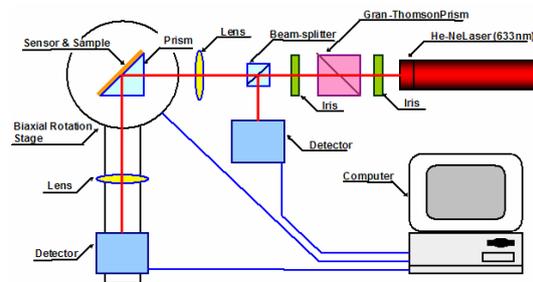


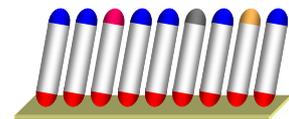
図 SPR 解析装置の概略図

② チタン基板の酸処理条件

Ph2.0, 1.5, 1.0 の HCl/KCl 緩衝液を Ti コーティングした基板に流し、Ti 面の SPR 変化を見た。まず、pH6.86 の緩衝液を 1 分間流した。次に、pH2.0 の HCl/KCl 緩衝液を 20 分間流した。再度、pH6.86 の緩衝液を 19 分間流した。また、HCl/KCl 緩衝液を pH1.5, pH1.0 のものでも同様に上記の手順で測定した。また、この実験は 25°C の条件下で行った。

③ チタンの酸条件下でのアルキルホスホン酸処理

種々なアルキルホスホン酸を pH1.5 の HCl/KCl 緩衝液に溶かし



て濃度を 0.01M としたものを Ti でコーティングした基板に流し、Ti 面の SPR 変化を測定した。各種の粉末を pH1.5 HCl/KCl 緩衝液にとかして、濃度を 0.01M として実験に用いた。流す手順は、まず pH6.86 の緩衝液を SPR 角度が安定するまで流し、次に 1M NaCl を 3 分流し、最後に pH6.86 の緩衝液を安定するまで流し、測定準備を行った。次に、pH1.5 の

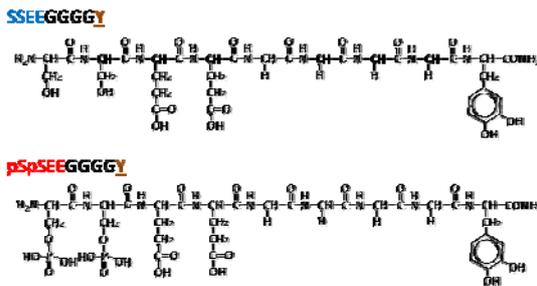
HCl/KCl 緩衝液で調整した 0.01M の各種アルキルホスホン酸化合物溶液を 20 分間流し、次に pH6.86 の緩衝液を 19 分間流し、最後に校正用に 1M NaCl を流した。この間、全ての SPR 角度変化を 1 秒単位で測定を行った。なお、この実験も 25°C の条件下で行った。

(2) チタン接着性接着・再生ペプチドを用いた酸化チタン表面処理

酸化チタン表面の表面接着性に優れたカテコール基を有する骨接着・再生ペプチドを用いて、リン酸カルシウム付着・成長を観察する。

①チタン接着性ペプチドのチタン表面処理

チタン接着性骨接着・再生ペプチドとして SSEE $\overline{\text{GGGGY}}$ と pSpSEE $\overline{\text{GGGGY}}$ を用いた。それぞれのペプチドを超純水中に、0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5mg/ml の濃度になるように溶かした。また、ペプチド未溶解のコントロールとして、超純水を用いた。



酸化チタン基板は、シリコン基板上に二酸化チタンを 17nm の厚さに蒸着した物を用いた。

ペプチド溶液による表面処理は、二酸化チタン被覆基板を 1ml のペプチド溶液に 24 時間浸漬し、蒸留水で十分洗浄し、窒素ガスでしっかり乾燥させて行った。

②Ellipsometry でのペプチド吸着の観察

ペプチド溶液での表面処理前後の二酸化チタン蒸着基板を Ellipsometry で測定し、ペプチド吸着厚を求めた。

まず、未処理に酸化チタンを 55°, 60°, 65°, 70°, and 75° の条件で測定し、ペプチド処理後の基板も同条件で測定した。ペプチド吸着厚はこれらの差より求めた。

③XPS でのペプチド吸着表面の観察

XPS を用いてペプチド吸着表面の C, O, N, P, Ti の元素比を測定した。

まず B.E. 0-1100eV で wide scan 測定後、C 1s, O 1s, N 1s, P 2p, Ti 2p の Narrow Scan を測定し、それぞれの元素比および C 1s のスペクトル分離による C 組成比を求めた。

④ペプチド吸着表面のカルシウム吸着

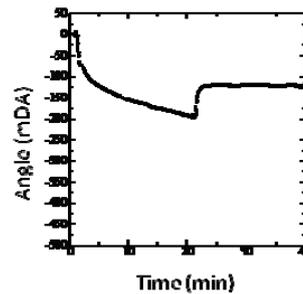
ペプチド処理した酸化チタン上でのリン酸カルシウム吸着状態を観察した。

pH 7.4 に調整した 1.3 M 酢酸アンモニウム緩衝液、30 mM リン酸アンモニウム溶液、50 mM 酢酸カルシウム溶液を調整した。これらの溶液を 2:1:1 に混合したカルシウム過飽和水溶液 20ml に、ペプチド処理基板を浸漬し、7 日間 37°C の条件下で維持した。その後、基板を超純水と窒素ガスで 3 回洗浄し、観察を行った。

4. 研究成果

(1) アルキルホスホン酸を用いたチタン表面処理

①酸処理によるチタン表面のエッチング過程を SPR を用いて測定したところ、pH 2.0 において約 90mDa、pH 1.5 では 120mDa、pH 1.0 では 170mDa と SPR 角度が低角度側にシフトした。これより、チタン表面は酸処理することにより pH1.5 だと約 0.3nm 程エッチングもしくは、表面組成が変化していると想定される。



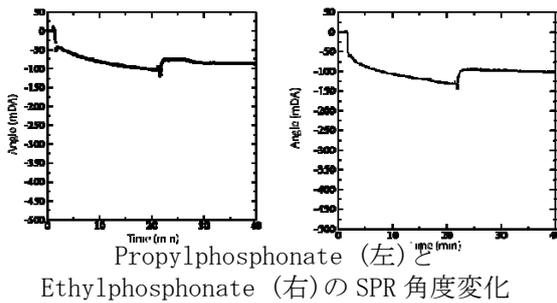
pH1.5 緩衝液で処理中のチタン基板の SPR 角度変化

酸性領域におけるエッチング効果もしくは表面特性変化がチタン表面で起こることより、この効果を利用してアルキルホスホン酸をチタン表面に処理することが可能となる。pH 1.0 は効果が高いが処理後の表面安定性が悪いいため、pH 1.5 の緩衝溶液中でアルキルホスホン酸処理を行うこととした。

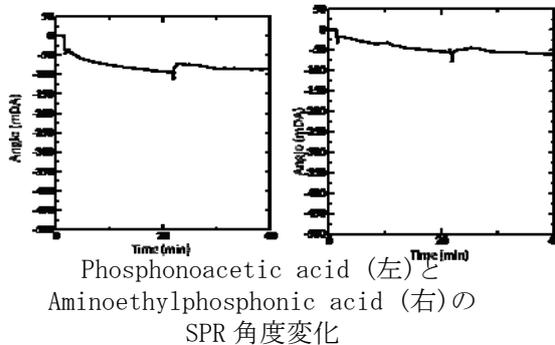
②チタンの酸条件下でのアルキルホスホン酸処理

アルキルホスホン酸処理において、アルキル鎖の長さは表面吸着量に反映されると考えられる。そこで、末端がメチル基のアルキルホスホン酸を用いたところ、アルキル鎖が長いほど表面吸着量が増加することが示された。アルキル鎖が長い方が自己組織下端分子膜と同様、表面安定性が優れていると考えられることより、なるべくアルキル鎖の長い

アルキルホスホン酸をチタン表面処理に用いた方が良いと思われる。



また、アルキル鎖長が Propylphosphonate と同様である、Phosphonoacetic acid と Aminoethylphosphonic acid を表面処理剤として同様の測定を行ったところ、どちらも Ethylphosphonate よりも多く表面に吸着することが示された。



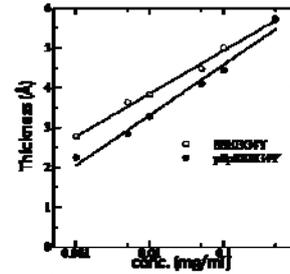
これらの結果より加水分解耐性を有し、末端にメチル基・カルボキシル基・アミノ基を有するアルキルホスホン酸を用いて、チタン表面に様々な表面官能基を導入することが示された。

酸緩衝液中に混合したアルキルホスホン酸が、チタン表面が酸でエッチングされることにより、エッチングにより活性化しているチタン表面に結合していることが示された。これらの結果より、アルキルホスホン酸を用いたチタン表面改質は物理的・化学的方法によるサイトカインの長期間固定化技術と組み合わせることによりチタンインプラントの組織接着性と骨再生能を著しく向上することが期待できる

(2) チタン接着性接着・再生ペプチドを用いた酸化チタン表面処理

①ペプチド吸着層の厚さ

チタン接着性ペプチドである SSEE $\overline{\text{GGGGY}}$ と pSpSEE $\overline{\text{GGGGY}}$ を処理した酸化チタン基板を Ellipsometry で測定したところ、ペプチドが表面に吸着し、またペプチド濃度に対応してペプチド吸着量が増加することが示された。



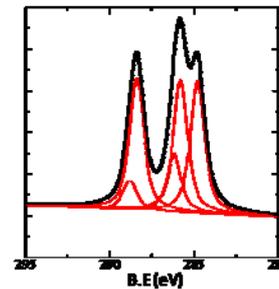
ELM で測定したペプチドの厚さと濃度

②ペプチド処理表面の元素比

ペプチド処理した二酸化チタン表面を XPS 測定したところ、[N]の強いピークが観察されたことよりペプチドが表面に吸着していることが示された。また pSpSEE $\overline{\text{GGGGY}}$ 処理した表面のみ、phosphoserine 由来の [P] が観察された。

[N]/[Ti]比はペプチド溶液濃度と比例したが、[C]/[Ti]は相関関係に乏しかった。これは[C]にはコンタミネーションの影響が強く出ているからと考えられた。

これらのペプチドの理想的な C 1s のスペクトルは [C*-C, C*-H]: [C*-N]: [C*-O]: [N-C*=O]: [O-C*=O] = 9:9:4:9:2 となると予想される。



ペプチドの理想的な C 1s スペクトル

この予想値と、実際に測定した C 1s スペクトルをピーク分割して比較することにより、ペプチド処理表面のコンタミネーションの割合が測定可能となった。これよりコンタミネーションの影響を受けにくくかつ、必要最小限のペプチド濃度を想定することができた。

③ペプチド処理表面へのカルシウム塩の沈着



カルシウム沈着: (左)コントロール, (中)SSEE $\overline{\text{GGGGY}}$, (右)pSpSEE $\overline{\text{GGGGY}}$
カルシウム沈着はコントロールよりも SSEE $\overline{\text{GGGGY}}$, さらに pSpSEE $\overline{\text{GGGGY}}$ が多く現れ

た。これはペプチドの SSEE 部がカルシウム塩を沈着させやすく、さらに pSpSEE になるとそれが強化されるからだと考えられる。

このように、チタン接着能を有するカテコール基を持つこれらのペプチドはバイオミネラリゼーションを有し、骨接着・再生能をチタン表面に付与する効果が期待できる。

これらの結果より、本研究でのチタン表面改質技術は、チタンインプラントの組織接着性と骨再生能を著しく向上することが期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40346507

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：