

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656424

研究課題名(和文)軟組織接着性金属表面の創出

研究課題名(英文)Creation of metal surface adhesive to soft tissue

研究代表者

埴 隆夫 (Hanawa, Takao)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：90142736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン分子の電着処理前の自己組織化を抑制し、チタン基材表面に均一にコーティングするための条件として、アノード電流とカソード電流を繰り返し印可する、交流電位による処理が最も効率的にコラーゲン分子を固定化できることを見いだした。そこで、コラーゲン固定化を行ったチタンについて、線維芽細胞の培養試験によって、軟組織適合性を評価した。繊維芽細胞の初期接着、進展および増殖を阻害せず、コラーゲン固定化チタン表面に軟組織適合性があることが示された。一方、軟組織と基材との接着強度の測定は困難であり、今後も再現性・信頼性の高い評価法を確立することが課題となることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To immobilize collagen uniformly to titanium surface without self-assembly of collagen, electrodeposition technique with alternative current, repetition of anodic current and cathodic current charge, was the most effective. The soft tissue compatibility of titanium immobilized collagen was evaluated by cell culture of fibroblast. The results revealed that initial adhesion, expansion, and proliferation of cells were not inhibited on the surface. On the other hand, it was difficult to evaluate the bonding strength between soft tissue and substrate material. Further research to obtain reproducible and reliable evaluation of soft tissue compatibility protocol is necessary.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・構造・機能材料

キーワード：チタン 軟組織 コラーゲン 電着 固定化

## 1. 研究開始当初の背景

軟組織接着材料としては、手術時に軟組織同士を接合するフィブリン系の接着剤などが一部で実用化されているに過ぎず、金属のような固体材料と軟組織とを長期間に渡り耐久性を保持して接着させる技術は、未だ開発されたことがない。

金属材料は優れた強度と靱性から多くの医療用デバイスに使用され、体内埋入型デバイス(インプラント)の約80%を占めており、その必要性はますます増加している。特にTiおよびTi合金は、比強度、耐食性、硬組織適合性に優れるため、歯科インプラントなど体内埋入部材として広く使用されており、その利用は今後も拡大することは確実である。

歯科インプラントや経皮デバイスと軟組織との接着は、細菌侵入を防ぐうえで、極めて重要な課題である。申請者らは、機能分子や生体分子の電着を応用することで細胞接着性の向上に成功しており、この技術を基に軟組織接着金属の創出という困難な分野に挑戦したいと考えた。

## 2. 研究の目的

金属のような凝縮系固体材料と軟組織とを長期間に渡り耐久性を保持して接着させる技術の開発を目指す。歯科インプラントや経皮デバイスなどと軟組織との接着は、細菌侵入を防ぐうえで、極めて重要な課題である。金属表面に機能分子や生体分子を金属表面に固定化する際の結合と固定化による軟組織接着発現のメカニズムを、分子の空間的配置に着目し、表面科学的及び分子生物学的手法によって明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

### (1) すでに獲得している要素技術の高度化と先端化

電着機能分子鎖上への細胞接着性ペプチドの固定による軟組織適合性の獲得と生体分子電着及びこれと同時のハイドロゲル固定化による軟組織適合性の獲得。

### (2) 軟組織接着発現機構の解明と普遍的原理・一般的理論への拡張

電着時の電荷移動と結合機構、遊離未固定電荷の挙動の解明、固定分子の空間的配置の解析、細胞培養による細胞機能性評価、分子生物学的评价、及び生体機能発現条件の探索と発現機構の解明。これらに基づく普遍的原理・一般的理論の獲得。

### (3) 汎用的技術の開発

上記の結果の機能分子・生体分子固定化技術へのフィードバックによる汎用的な技術の提案。

末端をアミンで修飾したPEGは、右図に示した原理によって、Ti表面に電着で

きる。

両末端をアミンで修飾したPEGをTi表面に電着固定すると、左図のようにU字型に固定化される[2-3]が、固定化されない遊離電荷が残存することが明らかになっている。この遊離電荷が細胞接着性あるいはペプチドの固定化に影響を及ぼすため、カルボキシル基を持つ分子あるいはペプチド結合を作る分子との反応で、遊離電荷を消失させる方法を探索する。

片末端をアミン、もう片方の末端をカルボキシル基で修飾した双性イオンPEG(分子量2000、3000、5000)を準備する。PEG分子鎖長が細胞接着性に影響するため、3種類の分子量のPEGを使用する。

これらの双性イオン末端とチタン表面は、右図に示すように、pHによって電離状態が異なる。各pHでの電離状態とPEG電着量、結合様式、結合状態を表面分析によって明らかにし双性イオン電着機構を明らかにする。

上記の双性PEGイオン上に細胞接着に関与することが知られているRGDペプチド及びGDGDSペプチドを各条件で固定化し、双性イオンとペプチドの結合様式を明らかにする。また、各ペプチドの空間的分布を明らかにする。

PEG分子長の相違による電着様式、電着密度、電着効率の相違を明らかにし、これらの因子とRGDペプチド及びGDGDSペプチドの固定化量、固定化様式との関係を明らかにし、ペプチド固定化の際の理想的分子長を明らかにする。上記試料の培養細胞接着性、遊走能、伸展、細胞増殖を測定しRT-PCRによる遺伝子発現解析を行う。

コラーゲンは正負両方の電荷を持つため、カソード直流よりも交流電流によって効果的に電着でき、しかも水中での結合耐久性が高い。前出のようにコラーゲンが網目状にチタンに密着して固定化される機構及び電着条件と固定化様式との関係を明らかにする。また、結合機構を解明する。

コラーゲン電着後にハイドロゲルを固定化する。コラーゲンとハイドロゲルの空間的配置及びこれらの結合を明らかにする。

固定化の耐久性評価を行う。PEGの電着条件(時間、濃度)を変化させた試料を純水中で一定時間振とうし、振とう前後の固定化層の見かけ上の厚さの変化をエリプソメータで測定し、耐久性を評価する。同様の操作を、水晶振動微小天秤(QCM)によって行い、脱着した分子の重量変化から固定化分子の耐久性を評価する。以上の測定を最大3ヶ月程度まで行う。

軟組織接着発現機構の解明と一般的理論への拡張を行う。

電着技術をインテグリン、フィブリノーゲン、ゼラチンなどの生体分子に応用し、電着条件と固定化様式、固定化による分子の変化などを明らかにする。また、前年度と同様に培養細胞による評価とその機構解明を行う。

これらの結果から、さらに軟組織接着に有効な技術及び電着条件を導出する。軟組織接着機構解明には多くの困難が予想されるが、表面の厳密な解析、結合状態の解明、細胞培養解析によって、普遍的原理を見つけ出す。

以上の結果を試料作製技術にフィードバックし、汎用的技術の創出に繋げる。成果は、学会発表、論文投稿によって公表する。

#### 4. 研究成果

電着技術の高度化と先端化を目指し、ポリエチレングリコール(PEG)電着機構の詳細な検討とPEG分子鎖長の最適化を行った。片方の末端をアミノ基、もう一方の末端をカルボキシル基で修飾した双性イオンPEGを用いて、その分子鎖長の相違による電着様式、電着密度、電着効率について検討を行った。次いで、これらの因子と細胞接着性を有するRGDペプチドの固定化量、固定化様式との関係を明らかにし、細胞実験によってペプチド固定化の際の理想的分子長を決定した。その結果、分子量3000のPEGが最も優れた細胞接着性を示すことが明らかとなった。また、コラーゲンをはじめとするタンパク質の電着機構の解明にも着手した。タンパク質のように水溶液中で正負両方の電荷を持つ分子の場合、カソード電位よりも交流電位を印加することによってチタン上に効果的に固定化されることを明らかにした。さらに、この電着機構、条件について詳細に検討を行った。その結果、 $\pm 3V$ の交流電位を印加することにより最も効率的にコラーゲン分子を電着できることを明らかにした。長の最適化を行った。また、コラーゲンをはじめとするタンパク質電着機構の解明にも着手し、コラーゲン溶液の濃度、pH、電着電位、電着時間が、電着固定化層の厚さ及び耐久性に及ぼす影響について検討し、タンパク質のように水溶液中で正負両方の電荷を持つ分子の場合、カソード電位よりも交流電位を印加することによってチタン上に効果的に固定化されることを明らかにした。さらに、この電着機構、条件について詳細に検討を行った。その結果、 $\pm 3V$ の交流電位を印加することにより最も効率的にコラーゲン分子を電着できることを明らかにしている。コラーゲン電着チタンについては、線維芽細胞の培養によって、軟組織適合性に及ぼす効果を明らかにした。

軟組織接着に効果が認められたコラーゲ

ンの電着を中心に検討を行った。コラーゲン分子の電着処理前の自己組織化を抑制し、チタン基材表面に均一にコーティングするための条件として、アノード電流とカソード電流を繰り返し印可する、交流電位による処理が最も効率的にコラーゲン分子を固定化できることを見いだした。そこで、コラーゲン固定化を行ったチタンについて、線維芽細胞の培養試験によって、軟組織適合性を評価した。線維芽細胞の初期接着、進展および増殖を阻害せず、コラーゲン固定化チタン表面に軟組織適合性があることが示された。一方、軟組織と基材との接着強度の測定は困難であり、今後も再現性・信頼性の高い評価法を確立することが課題となることがわかった。3年間で、生体機能性を持たない金属材料に対し、十分な耐久性をもつ組織適合性表面に改質する手法を確立したことから、目的は概ね達成できた。これらの研究成果については、複数の国際学会、国内学会(招待講演を含む)で講演を行い、成果を発信した。

#### 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)

1. Tsutsumi Y, Kobayashi E, Ogo M, Suyalatu, Migita S, Doi H, Nomura N, Noda K, Hanawa T. Accelerated calcium phosphate formation on titanium utilizing galvanic current between titanium and gold in hanks' solution. *Materials Transactions* 54: 149-155, 2013.
2. Hieda J, Niinomi M, Nakai M, Kamura H, Tsutsumi H, Hanawa T. Improvement of adhesive strength of segmented polyurethane on Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy through  $H_2O_2$  treatment for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research* 101B: 776-783, 2013.
3. Hanawa T. Research and development of metals for medical devices based on clinical needs. *Science and Technology of Advanced Materials* 13: 064102, 2013
4. Hanawa T. Research and development of metals for medical devices based on clinical needs. *Science and Technology of Advanced Materials* 13: 064102, 2013
5. 塙 隆夫. 高分子配列制御による金属表面高機能化. *機能材料* 33(9): 19-25, 2013
6. 塙 隆夫. チタンの優れた生体組織適合性. *チタン* 61(2): 36-42, 2013
7. Hastuty S, Tsutsumi Y, Nishikata A,

- Tsuru T. Pitting corrosion of type 430 stainless steel in the process of drying of chloride solution layer. *ISIJ International* 52(5):863-867, 2012.
8. Nagai A, Tsutsumi Y, Suzuki Y, Katayama K, Hanawa T, Yamashita K. Characterization of air-formed surface oxide film on a Co-Ni-Cr-Mo alloy (MP35N) and its change in Hanks f solution. *Applied Surface Science* 258(14):5490-5498, 2012.
  9. Hieda J, Niinomi M, Nakai M, Kamura H, Tsutsumi H, Hanawa T. Effect of terminal functional groups of silane layers on adhesive strength between biomedical Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy and segment polyurethanes. *Surface and Coatings Technology* 206(13):3137-3141, 2012.
  10. 塙 隆夫. チタンの生体適合性-チタンの何が優れているか. *軽金属* 62(7):285-290, 2012.
  11. 塙 隆夫. 金属系バイオマテリアルの開発. *日本歯科理工学会誌* 31(1):5-8, 2012.
  12. Nyan M, Tsutsumi Y, Oya K, Doi H, Nomura N, Kasugai S, Hanawa T. Synthesis of novel oxide layers on titanium by combination of sputter deposition and micro-arc oxidation techniques. *Dental Materials Journal* 30: 754-761, 2011.
  13. Park JW, Kurashima K, Tustusmi Y, An CH, Suh JY, Doi H, Nomura N, Noda K, Hanawa T. Bone healing of commercial oral implants with RGD immobilization through electrodeposited poly(ethylene glycol) in rabbit cancellous bone. *Acta Biomaterialia* 7: 3222-3229, 2011.
  14. 塙 隆夫. 金属バイオマテリアルの現状と課題, *金属*, 81: 377. 2011.
- 〔学会発表〕(計76件)  
招待
1. Hanawa T. Development of new alloys and functional surfaces meeting clinical demands. The 4th Asian Biomaterials Congress, Hong Kong, June, 2013
  2. Hanawa T. Biofunctionalization of metallic materials. The 8th Pacific Rim International Congress on Advanced Materials and Processing (PRICM-8), Hawaii, USA, August, 2013
  3. Hanawa T. Development of new alloys and surface treatment techniques meeting clinical demands. 2013 Research Center for Oral Disease Regulation of the Aged International Symposium, Gwangju, Korea, November, 2013
  4. Hanawa T. Current and future metal-based biomaterials. The 30th Taiwan and Japan Engineering Symposium, Kaohsiung, Taiwan, November, 2013
  5. Hanawa T. Recent researches on surface modification of metals for biomedical use. The 30th Taiwan and Japan Engineering Symposium, Kaohsiung, Taiwan, November, 2013
  6. Hanawa T. Biofunctionalization of metallic materials meeting clinical demands. TMDU-TMU Symposium on Advances of Biomaterials and Regenerative Medicine, Taipei, Taiwan, November, 2013
  7. Hanawa T. Materials for dental implant. Lecture and Seminar in School of Stomatology "New Technologies and Materials in Dentistry." Brno, Czech, December, 2013
  8. Hanawa T. Research and development of metallic biomaterials meeting clinical demands. 5th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues (ICMoBT 2013), Barcelona, Spain, December, 2013
  9. Hanawa T. Development of new alloys and surface modification techniques based on clinical demand. International Symposium on EcoTopia Science 2013 (ISETS '13) -Innovation for Smart Sustainable Society-, Nagoya, Japan, December, 2013
  10. 塙 隆夫. チタンと生体組織との界面反応. 2013年春期講演大会(第152回)日本金属学会, 東京理科大学, 東京, 2013年3月
  11. 塙 隆夫. 医療ニーズに基づいた金属材料の生体機能化. 科学技術フォーラム第133回セミナー, 品川区立総合区民会館 きゅりあん, 東京, 2013年7月
  12. 塙 隆夫. 生体材料の表面処理. 表面技術協会めっき部会7月例会, ルーテル市ヶ谷センター, 東京, 2013年7月
  13. 塙 隆夫. 金属材料を再生医療に応用するための生体機能化. 京都リサーチパーク「再生医療の全体像を見わたせるわかりやすい解説講座」, 京都リサーチパーク, 京都, 2013年11月
  14. 塙 隆夫. 金属材料の医療応用と研究最前線. 加工プロセスによる材料新機能発現第176委員会第24回研究会, 神田エッサムホール, 東京, 2013年11月
  15. Hanawa T. The Institue of

- Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University. International Joint symposium between TMDU IBB and KNU IBRD. Kyungpook National University, Busan, Korea, June, 2012.
16. 塙 隆夫, 福島 修, 堤 祐介, 土居 壽, 野村直之. チタン表面への PEG の電着機能. 東北大学金属材料研究所ワークショップ, 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会, 東北大学金属材料研究所講堂, 2012年9月
  17. 塙 隆夫. 歯科医療を革新する金属系バイオマテリアルのイノベーション. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012 サテライトシンポジウム, 東北大学歯学研究科大会議室, 2012年11月
  18. Hanawa T. Comprehensive Biofunctionalization Technique of Titanium. 2011 Spring Scientific Meeting of Korean Academy of Periodontology, Daegu, May, 2011.
  19. Hanawa T. Implant Surface Treatments. The International Dental Materials Congress 2011, Seoul, May, 2011
  20. Hanawa T. Effect of PEG chain length on tissue compatibility of RGD/PEG/Ti material. The 11th International Symposium on Biomaterials, Daegu, May, 2011.
  21. Hanawa T. Creation of Biofunctional Metal Surface. The 3rd Asian Biomaterials Congress, Busan, Sep, 2011.
  22. Hanawa T. Tsutsumi Y. Surface Modification of Titanium with Functional and Bio-Molecules by Electrodeposition to Add Biofunctions. 220th ECS Meeting & Electrochemical Energy Summit, Boston, Oct, 2011.
  23. 塙 隆夫. 金属系バイオマテリアルの開発. 平成 22 年度材料科学基礎講座 / 医用・生体材料分科会講演会, 「医用・生体材料の分析・解析技術」「骨・軟骨の材料科学と再生医療への応用」, 東京, 2011年4月.
  24. 塙 隆夫. 医療用金属材料の生体適合性評価, うつくしま次世代医療福祉機器集積プロジェクト, 平成 23 年度第 3 回福島県医療福祉機器研究会, 郡山, 2011年8月.
  25. 塙 隆夫. 金属材料の生体組織適合性-化学的適合 vs 機械的嵌合, 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会, 仙台, 2011年9月.
  26. 塙 隆夫. 金属材料の生体機能化と再生医療への展開, 京都市リサーチパーク H23 年度再生医療分野の産業化を目指した

- 実用セミナー, 京都, 2011年11月.
27. 塙 隆夫. 金属バイオマテリアルと表面改質技術. 第 33 回日本バイオマテリアル学会, 京都, 2011年11月.
  28. 塙 隆夫. 金属材料の汎用的生体機能化技術. 第 33 回日本バイオマテリアル学会, 京都, 2011年11月
  29. 塙 隆夫. 高分子機能化による金属の生体機能化. 東京歯科大学第 337 回大学院セミナー, 千葉, 2011年11月.

一般発表 4 7 件省略

〔図書〕(計 3 件)

1. Hanawa T. Metal-polymer composite biomaterial, Polymeric Biomaterials. Structure and Function, Volume 1, ( S. Dumitriu, V. Popa Eds. ), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2013
2. 塙 隆夫. 7-1 硬組織適合性向上を目的とした表面処理, 未来型人工関節を目指して(吉川秀樹, 中野貴由, 松岡厚子, 藤本孝一編), 日本医学館 283-287, 2013
3. Hanawa T. Electrochemical techniques to obtain biofunctional materials, In: Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine I, Ed. Eliaz N, Modern Aspects of Electrochemistry No. 52, Chap. 5, 377-423, Springer, New York, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/>

6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 塙 隆夫 (Hanawa, Takao)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授  
研究者番号：90142736

(2)研究分担者

野村 直之 (Nomura, Naoyuki)  
東北大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：90332519

土居 壽 (Doi, Hisashi)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教  
研究者番号：30251549

堤 祐介 (Tsutsumi, Yusuke)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授  
研究者番号：60447098

右田 聖 (Migita, Satoshi)  
山形大学・大学院理工学研究科・助教  
研究者番号：00512302