

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630345

研究課題名(和文)硬組織と軟組織のいずれにも適合する金属・セラミックス・有機系生体材料の開発

研究課題名(英文)Development of bio-compatible implants of metals, ceramics, and polymers

研究代表者

黒田 健介 (Kuroda, Kensuke)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・准教授

研究者番号：00283408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：工学と医学が独自に検討してきた技術を融合させた「バイオインプラント」の作製技術を構築した。タンパク質を金属、セラミックス、ポリマーに吸着させるには、材料表面を親水化することが極めて重要である。本研究では、これらの生体材料を超親水化し維持する技術ならびに超親水化表面に各種のタンパク質を吸着させたバイオインプラントを作製する技術を開発した。さらに、タンパク質を吸着させたバイオインプラントの動物埋植試験を行い、骨伝導性向上に重要なタンパク質の決定などを行った。

研究成果の概要(英文)：We developed the formation technique for “Bioimplants”, integrating medical experiences into engineering techniques. It is important to produce the hydrophilic surface in order to adsorb the several kinds of protein on the metallic, ceramics, and polymer implants. In this research, we found hydro-techniques for the super-hydrophilicity of these implants and for keeping the super-hydrophilicity. Several kinds of protein were adsorbed on the super-hydrophilic implants surfaces (bioimplant). Important proteins were found for the improvement of the osteoconductivity by the implantation of the protein-adsorbed samples in rats' tibia.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 組織適合性 表面吸着 タンパク質 チタン アルミナ ジルコニア PEEK

1. 研究開始当初の背景

現在の生体材料の開発では、表面に骨硬組織が生成しやすい材料と、軟組織が生成しやすい材料の二種類が主流となっており、これらは相反する逆の性質と考えられている。一般に、骨伝導性能の低いTiやTi合金表面の骨伝導性を向上させる従来の手法として、金属表面に、マクロ凹凸を形成する手法のほか、表面にTiO₂等の生体活性物質をコーティングする手法が試みられ、申請者らも、Ti表面へのこれらの湿式コーティングによる高骨伝導化を進めてきた。しかしインプラントの多くは硬組織と軟組織に跨った部位に埋植される場合が多いにもかかわらず、硬組織と軟組織のいずれにも適合する材料表面は全く研究・開発されていない。よって、一部が体外に露出して使用されるインプラントにおいても、軟組織適合性はほとんど加味されていないため、生体埋植後、骨形成速度が十分である場合にも、軟組織との接着・適合が不十分なため、雑菌の混入による炎症などの症例が報告されている。

2. 研究の目的

本申請では、申請者らが開発した手法によって骨伝導性を著しく向上させた金属インプラントに対して、軟組織適合性を *in vitro* ならびに *in vivo* 評価によって調べることを手始めに、対象材料をセラミックス、有機材料まで拡大し、各種の表面処理によって硬組織と軟組織のいずれにも適合する金属・セラミックス・有機系の『硬組織・軟組織同時適合材料』を創出することを最終目的とする。本研究では、インプラントへのタンパク質吸着などのメカニズム解明も執り行う。

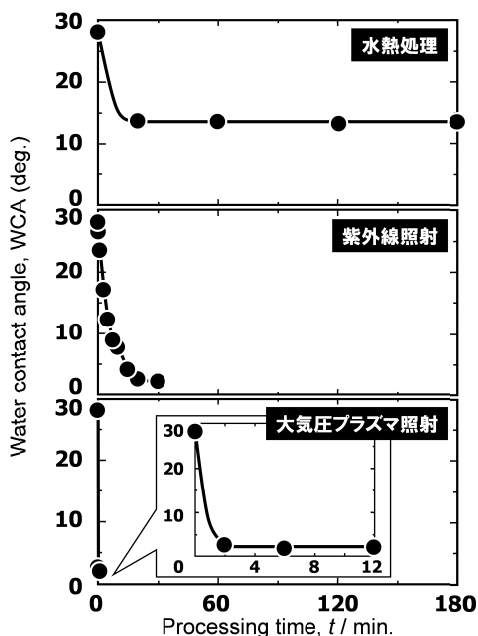


図1 金属Ti材料の親水化処理によるWCA変化

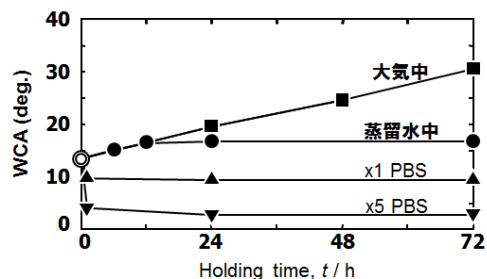


図2 親水化金属Ti材料の保存環境によるWCA変化(水熱処理後)

3. 研究の方法

(1) 試料

実験には、金属としてTi、セラミックスとしてAl₂O₃ならびにZrO₂、ポリマーとしてPEEKを取り上げた。いずれも表面をRa<0.1μmに研磨した後、以下の手法によって親水化表面処理を行い、水滴接触角を制御した。

(2) 親水化処理

金属Ti、セラミックス(Al₂O₃, ZrO₂)

親水化の手法として、蒸留水中水熱処理(180℃, 180分)、紫外線照射(173nm, 10分)、大気圧プラズマ照射(N₂, 500W, 60秒)を採用した。その後、水滴接触角を制御するために、5倍濃度PBS(-)中保存、室温大気中保存、25℃大気中保存によって、水滴接触角を0~110deg.まで制御し、評価に供した。

ポリマー(PEEK)

一段階の処理では親水性表面を得ることができなかったため、二段階の処理により親水化を行った。一段階目の処理として、18N H₂SO₄に10秒浸漬し、PEEK表面近傍の結合を切断した。水洗・乾燥させた後、173nm紫外線を照射することにより、切断結合部に親水性官能基(主としてカルボキシル基)を生成させ、表面を親水性とした。

(3) 評価の方法

各種材料の表面処理後の評価には、SEM, XRD, FT-IR, XPSを用いた。表面親水性の評価には、2μL水滴接触角測定を行った。表面粗さの評価には、非接触レーザー顕微鏡を用いた。

タンパク質吸着評価には、細胞接着性タンパク質としてフィブロネクチンを、非接着性タンパク質としてアルブミンを用いた。表面親水性を制御した試料表面に、蒸留水に溶解したタンパク質を滴下し、タンパク質を吸着させた。吸着後の試料は超音波洗浄により剰余のタンパク質を完全に除去した後、FT-IR分析(ATR)によって、C=O結合のピーク面積から吸着濃度を定量した。一部の試料については、QCM(水晶振動子微小質量秤量)装置を用いて吸着質量のその場測定を行った。

動物埋植評価には、8週齢の雄性ラットを用い、骨伝導性評価には脛骨埋植による材料

表面での硬組織生成量評価 (BIC), 軟組織適合性評価には背中皮下埋植を行い, 繊維状組織生成量評価ならびに炎症性評価を行った。いずれも埋植期間は 14 日間とした。

4. 研究成果

(1) 表面親水化

金属材料 (金属 Ti)

各表面処理による表面親水性変化ならびにその後の保存方法の検討結果を図 1, 2 に示す。いずれの処理によっても急速に Ti 表面は親水化するものの, 親水性表面を大気中に保存することによって親水性は急速に失われ, 水溶液中保存, 中でも 5 倍濃度の PBS (-) 中保存が最も有効に親水性が維持されることがわかる。あわせて, 一部の試料では, PBS (-) 中保存によって, 親水化処理後よりさらに WCA が低下している場合も見受けられる。これは, 各処理段階後の XPS 分析によって, 親水化処理によって材料表面から有機系汚染物質 (hidrocarbon, CH と略す) が除去され, 親水性の清浄表面 (OH が表面官能基主成分) に, PBS 中の金属イオンが静電吸着したためであるものと考えられる。

セラミックス材料 (Al_2O_3 , ZrO_2)

Al_2O_3 ならびに ZrO_2 も, 金属 Ti と全く同様の挙動を示した (図 3)。すなわち, 親水化処理によって表面汚染物質 CH が除去され親水性となったのち, PBS 中浸漬保存によって親水性が維持された。この場合にも, 表面 OH 基によって親水化し, イオン吸着によって親水性が維持されたものと考えられる。

ポリマー材料 (PEEK)

PEEK に対してと同様の処理を施すと, わずかな WCA 低下が認められたものの, 超親水性 (WCA < 10 deg.) を示さなかった。そこで耐薬品性を考慮し, 濃 H_2SO_4 への浸漬を試みた。FT-IR 分析から, 薬品処理によって結合の切断は確認されたものの, WCA にはほとんど変化は認められなかった。すなわち, 切断した結合部に意図的に親水基を導入しなければ親水性にはならないものと判断し, 検討の結果, 濃 H_2SO_4 浸漬 UV 照射が適当であるとの結論に至った (図 4)。この処理によって, 表面にカルボキシル基が導入され, 親水性を示したことがわかった。

(2) タンパク質吸着性

各種の WCA を有する金属 Ti ならびに PEEK 表面でのタンパク質 (アルブミン, フィブロンネクチン) 吸着性を評価した。一例として金属 Ti のタンパク質吸着結果を図 5 に示す。これより, 親水性表面, 疎水性表面ほどいずれのタンパク質も吸着しやすいことがわかる。アルブミン吸着の場合には, WCA が 65 deg. 近傍, フィブロンネクチンの場合は 45 deg. 近傍で吸着量が最低となった。さらに, どのような WCA を有する材料表面であっても, タンパク質吸着量が変化することによって, 吸着後の WCA は, これらの値に収束することもわ

かった。表面処理セラミックスならびにポリマーへのタンパク質吸着試験でも, これとほぼ同様の結果が得られ, 材料へのタンパク質吸着性は, その表面親水性・疎水性に依存することがわかった。

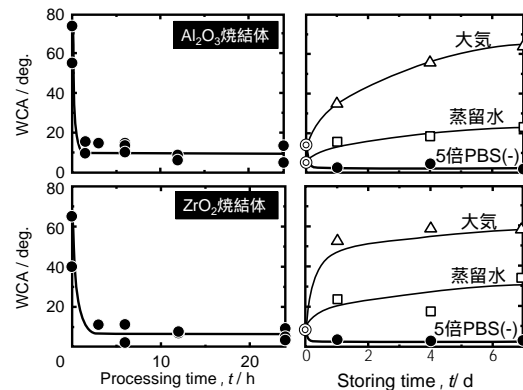


図 3 セラミックス材料の親水化と保存環境による WCA 変化

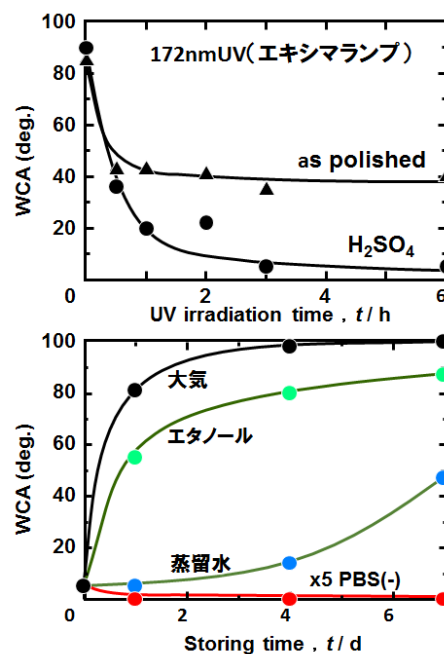


図 4 PEEK 親水化と維持方法

(3) 動物埋植評価

金属 Ti ならびに PEEK 表面処理材のラット脛骨埋植試験結果を著者らの先行研究の結果と合わせて図 6 に示す。これより, 材料の骨伝導性を表すグラフはアルブミン吸着線図と極めて良い一致を示しており, 材料のアルブミンの吸着量が生体適合性に極めて強い影響を与えていることを示唆している。また, 材料表面にタンパク質を吸着させた材料をラットに埋植したところ, タンパク質種に差は認められず, いずれのタンパク質を吸着

させた材料でも、骨伝導性が著しく向上していることがわかる。これは、タンパク質吸着が骨伝導性に多大な影響をおよぼしていることのみならず、従来から考えられてきた細胞接着性タンパク質、非接着性タンパク質の考え方とは大きく異なり、生体適合性向上のためには、必ずしも細胞接着性タンパク質は必要なく、体内に多量に存在するアルブミンで十分であるとの結論に至った。さらに、超親水性 PEEK の骨伝導性が低いことも興味深い。すなわち、材料表面を単純に親水化すれば十分であるとの結論から逸脱しており、表面官能基の種類やポリマーに含まれる阻害性因子の存在などの相違によって、骨伝導性が変化した可能性がある。今後の更なる研究によって、タンパク質が有効に吸着する表面官能基についても検討を進める必要がある。

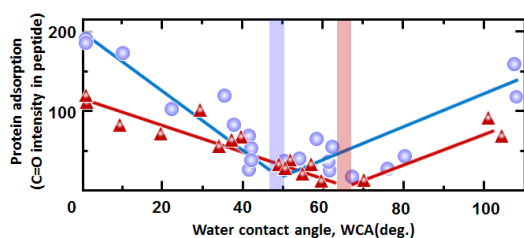


図5 表面親水性とタンパク質吸着量 (○: フィブロネクチン, △: アルブミン)

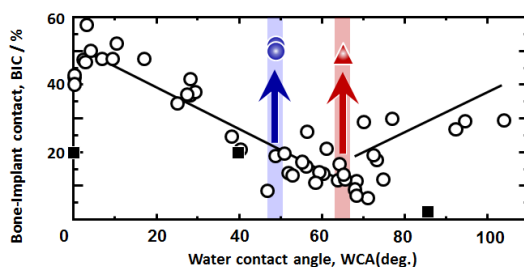


図6 タンパク質吸着材の骨伝導能 (○: Ti, □: PEEK, △: フィブロネクチン吸着材, ■: アルブミン吸着材)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

M. Zulfdesmi, A. Waki, K. Kuroda, M. Okido: "Hydrothermal Treatment of Titanium Alloys for the Enhancement of Osteoconductivity", 査読あり, Mater. Sci. Eng.: C, 49(2015), pp. 430-435, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.031>

M. Zulfdesmi, K. Kuroda, M. Okido, M. Ueda, M. Ikeda: "Osteoconductivity of Hydrophilic Surface of Zr-9Nb-3Sn Alloy with Hydrothermal Treatment", J. Biomater. Nanobiotech., 査読あり, 6(2015),

pp. 126-134, <http://dx.doi.org/10.4236/jbnb.2015.63012>

M. Omori, S. Tsuchiya, K. Hara, K. Kuroda, H. Hibi, M. Okido, M. Ueda, "A New Application of Cell-Free Bone Regeneration: Immobilizing Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth-Conditioned Medium onto Titanium Implants by Using Atmospheric Pressure Plasma Treatment", Stem Cell Res. & Therapy, 査読あり, 6(2015), pp. 124-136, DOI 10.1186/s13287-015-0114-1

〔学会発表〕(計24件)

K. Igarashi, K. Kuroda, M. Okido, "Formation of hydrophilic surface of PLGA and PEEK polymer biomaterials", 24th PFAM, 2015年12月18日~20日(Osaka)

五十嵐健太, 黒田健介, 興戸正純, 「二段階処理によるPLGAならびにPEEKの親水化」, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11月09日~10日(京都)

山口勇氣, 黒田健介, 興戸正純, 「表面親水性を制御したTiのタンパク質吸着能ならびに骨伝導能」, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11月09日~10日(京都)

山口勇氣, 黒田健介, 興戸正純, 「表面親水性・疎水性を制御した金属Tiのタンパク質吸着量と骨伝導能」, 日本金属学会 秋期講演大会, 2015年9月16日~18日(福岡)

K. Kuroda, M. Okido, "Formation of hydrophilic and hydrophobic Ti surface using hydroprocessing and their osteoconductivity", 13th World Conf. on Titanium (Ti-2015), 2015年08月17日~20日(SanDiego, USA)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 樹脂材料およびその製造方法
発明者: 黒田健介, 五十嵐健太, 興戸正純
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-167882
出願年月日: 2015年08月27日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://f2.numse.nagoya-u.ac.jp/theme01B.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田健介 (KURODA, Kensuke)

名古屋大学 未来材料・システム研究所・准教授

研究者番号: 00283408

(2)研究分担者

日比英晴 (HIBI, Hideharu)

名古屋大学 医学系研究科・教授

研究者番号： 90345885

土屋周平 (TSUCHIYA, Shuhei)

名古屋大学 医学部附属病院・助教

研究者番号： 20569785