

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25289248

研究課題名(和文)工学的・生物学的表面処理の融合によるバイオインプラント製造プロセスの構築と評価

研究課題名(英文) Construction and evaluation of manufacturing processing of Bio-implant by the combination of engineering and biological surface treatment

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：従来技術の融合により、コーティング層を有せずとも高い骨伝導性を有する「タンパク質吸着型バイオインプラント」の作製技術を構築した。フィブロネクチンやアルブミンを材料表面に個別吸着させたバイオインプラントを作製し、ラット生体内での骨形成能評価に供し、生体外評価との相関関係を明らかにした。その結果、材料表面への吸着タンパク質種の骨伝導性におよぼす差異は認められず、極めて高い骨伝導性を示した。さらに、材料表面の親水性・疎水性が大きく影響するタンパク質のごく初期の吸着速度が骨伝導性と強い相関を示すことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Manufacturing processing of "Protein-adsorbed Bio-implant" was constructed by the combination of engineering and biological techniques. Protein-adsorbed bio-implant did not have any surface coating layers, and the proteins, such as fibronectin, decorin, and albumin, adsorbed to implant surface directly. The protein-adsorbed bio-implants were subjected to in vivo testing using rats. The correlation between in vivo results and in vitro was examined. The kind of adsorbed protein to the bio-implants did not influence the osteoconductivity and the implants with any kinds of protein had high osteoconductivity. Protein adsorption rate to the implant surface at very early stage, which was affected by the hydrophilicity/hydrophobicity of implant surface, showed the strong correlation with the osteoconductivity.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 骨伝導性 タンパク質 吸着速度 親水性 疎水性 表面改質

1. 研究開始当初の背景

世界的に急速な高齢化が進む中、歯科や整形外科領域においてインプラント治療が激増している。しかし骨形成能の低い高齢者には、インプラント治療が困難な場合が多く、低い骨形成能患者に対して適用できるインプラントの開発が急務である。本研究では、工学と医学が独自に検討してきたインプラントへの有効な表面処理(金属表面の親水化処理と金属表面へのタンパク質吸着処理)を融合させ、コーティング層を有せずとも高い骨伝導性を有する「タンパク質吸着型バイオインプラント」の作製技術を構築する。作製したバイオインプラントを動物生体内での骨形成能評価に供し、学術的観点から吸着タンパク質種の特異性や定量評価、吸着メカニズムの解明など生体外評価も積極的に行い、これらの相関関係を明らかにする。さらに、合金インプラント表層からの脱合金元素処理やバイオインプラントへのタンパク質と薬剤の同時吸着性・徐放性制御などの応用研究も試みる。

2. 研究の目的

本申請では、申請者らが開発した金属材料表面親水化手法と材料表面へのタンパク質吸着処理を組み合わせることによって骨伝導性などの生体適合性を向上させた「タンパク質吸着型バイオインプラント」の作製技術の構築を第一の目的とした。その上で、作製したタンパク質吸着型バイオインプラントを *in vivo* ならびに *in vitro* 評価に供し、インプラントへのタンパク質吸着(その種類や吸着量、吸着速度など)と動物埋植結果との相関関係を明らかにすることを最終目的とした。あわせて、抗炎症薬剤や抗菌イオンの吸着・放出や、基材としてセラミックスやポリマーへの展開も試みた。

3. 研究の方法

(1) 試料

実験には、金属 Ti を主の材料として取り上げた。その他、Ti 合金 (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb) やステンレス鋼 (SUS304, SUS316L) などの金属材料、 Al_2O_3 ならびに ZrO_2 のセラミックス、ポリマーとして PEEK を取り上げた。いずれも表面を $Ra < 0.1 \mu m$ に鏡面研磨した後、以下の各手法によって親水化表面処理を行い、表面の水接触角 (WCA) を制御した材料を作製した。その後、以下の生体外評価、生体内評価の各実験に供した。ただし、後述のタンパク質吸着評価など工学的な評価には、10 mm 程度の円形平板を、動物埋植試験には 2 mm、長さ 5 mm の円柱の基材を用いた。

(2) バイオインプラントの作製

表面親水化処理と WCA 制御

金属ならびにセラミックス試料の親水化には、蒸留水中水熱処理 (180, 180 分)、

紫外線照射 (173 nm, 10 分)、大気圧プラズマ照射 (N_2 , 500 W, 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、250 大気中保存によって、WCA を 0~110 deg. まで制御し、タンパク質吸着処理に供した。

ポリマー (PEEK) 試料については、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、18 N H_2SO_4 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、173 nm 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。

タンパク質吸着処理

タンパク質吸着には、細胞接着性タンパク質としてフィブロネクチンならびにデコリンを、非接着性タンパク質としてアルブミンを用いた。表面の WCA を制御した試料上に、蒸留水に溶解したタンパク質を滴下し、最大量まで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、各種評価に供した。

薬剤吸着処理

吸着薬剤として、抗炎症効果を有するインドメタシンとイブプロフェンを選定した。吸着処理の方法は、上記のタンパク質吸着と同様とし、吸着後の試料は超音波洗浄により剰余の薬剤を完全に除去した後、各種評価に供した。

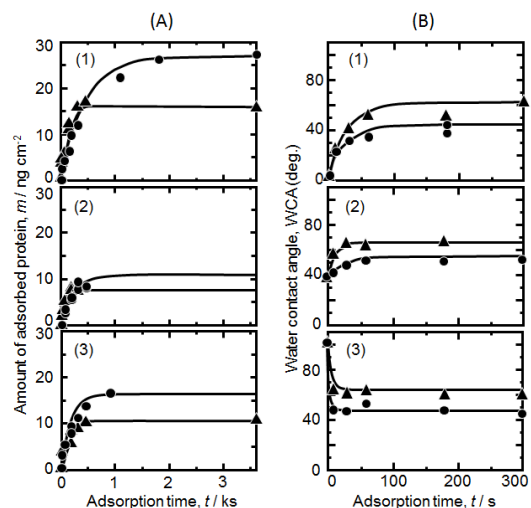


図1 初期 WCA を制御した Ti 試料表面へのタンパク質吸着量の経時変化(A)ならびに吸着後の WCA の経時変化(B).

(1) WCA = 0 deg., (2) WCA = 35deg.,

(3) WCA = 100 deg.

●: フィブロネクチン, ○: アルブミン

(3) 評価の方法

工学的評価 (in vitro 評価)

各種材料の表面処理後の評価には、SEM, XRD, FT-IR, XPS, QCM を用いた。表面親水性の評価には、2 μ L 水滴を用いた WCA 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。吸着タンパク質ならびに薬剤の定量評価には、超音波洗浄により剰余のタンパク質、薬剤を完全に除去した試料に対して、FT-IR 分析 (ATR モード) によって、ピーク面積から算出した。タンパク質のごく初期の吸着速度の決定には、QCM (水晶振動子微小質量秤量) 装置を用いた。

動物埋植評価 (in vivo 評価)

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)、炎症性評価には背部による繊維状組織生成量評価を行った。いずれも埋植期間は 14 日間とした。

4. 研究成果

(1) 親水性・疎水性表面のタンパク質吸着

図 1 に WCA を制御した Ti 試料表面へのタンパク質吸着量の経時変化(A)ならびに吸着後の WCA の経時変化(B)を示す。タンパク質種としてフィブロネクチンならびにアルブミンを用いた。吸着に使用したタンパク質水溶液の濃度は、0.5 mg mL⁻¹ フィブロネクチンならびに 25 mg mL⁻¹ アルブミンとし、37 において静置吸着させた後、十分に超音波洗浄した後の吸着結果を示す。これより、いずれの WCA を有する試料でも、2 ks で最大吸着量に達するが、分子量の大きいフィブロネクチンの方が吸着速度が遅いことがわかる。しかし WCA 測定からは、100 s 以内にほぼ一定の WCA 値に達することがわかる。すなわち、試料表面へのタンパク質吸着は、ほぼ 100 s 以内で完了し、これ以降はタンパク質の積層吸着が進行したものと考えられる。さらに、いずれの WCA を有する試料においても、フィブロネクチンを吸着させた場合には 47 deg.、アルブミンを吸着させた場合には 65 deg. 程

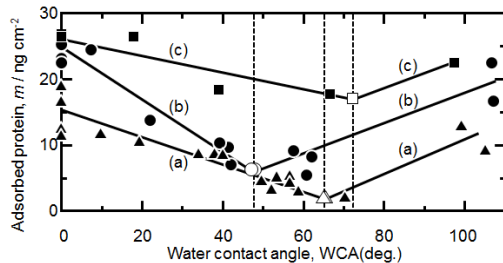


図 2 WCA を制御した Ti 表面へのタンパク質の最大吸着量
(a)アルブミン, (b)フィブロネクチン, (c)デコリン

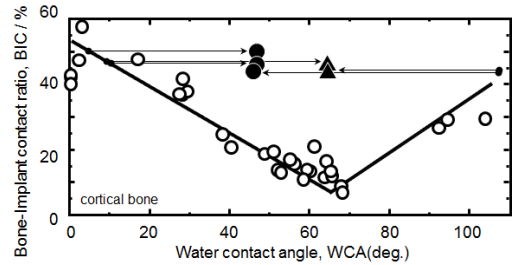


図 3 タンパク質吸着型バイオインプラントの WCA と BIC
●:フィブロネクチン, ○:アルブミン

度に収束し、初期 WCA に依存しないことがわかる。同様に、表面改質 PEEK を用いた場合でも、タンパク質吸着後の WCA は Ti の場合と同様の値を示したものの、最大量の吸着に達するまでの時間が大幅に延長されることもわかった。タンパク質の吸着量や吸着速度の差はあるものの、材料表面の WCA をあらかじめ制御しておくことにより、吸着タンパク質の量を制御したバイオインプラントが作製可能であることを意味している。

(2) WCA によるタンパク質吸着量の変化

図 2 に初期 WCA を制御した Ti 試料表面へのタンパク質吸着量 (最大値) を示す。(a) はアルブミン, (b) はフィブロネクチン, (c) はデコリンを示す。これより、タンパク質の最大吸着量は、試料表面の WCA に依存していることがわかり、吸着の最低値は(1)で示した収束値 ((a) 65 deg., (b) 47 deg., (c) 72 deg.) に一致している。また、タンパク質の最大吸着量はいずれも、上記 WCA を境界として、親水性あるいは疎水性になるほど増加することがわかる。一方、抗炎症薬であるインドメタシンとイブプロフェンの吸着実験においても、それらの吸着量は初期 WCA に依存したものの、親水性・疎水性表面ほど多く吸着するタンパク質とは異なった傾向を示したことから、吸着させる基材表面に存在する官能基と水中での薬剤の存在状態の兼ね合いによって、吸着量が変化することが示唆された。

(3) バイオインプラントの BIC

初期 WCA を制御した Ti インプラントにタンパク質を吸着させたバイオインプラントを作製し、ラット脛骨に埋植し、骨伝導性を評価した(図 3)。はタンパク質未吸着材を、はフィブロネクチン吸着材、はアルブミン吸着材を示す。これより、タンパク質を吸着させた試料は、WCA が初期値とは異なっているにもかかわらず、高い BIC を示し、おおむねタンパク質吸着前の BIC とほぼ同様の値を示していることがわかる。すなわち、試料表面の WCA が直接 BIC に影響をおよぼしてい

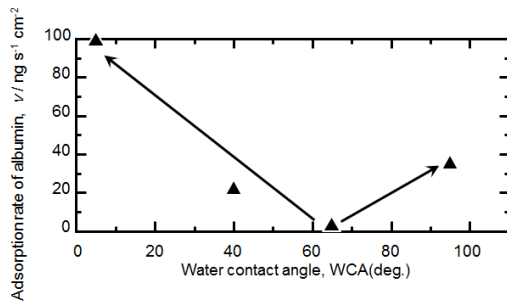


図4 初期 WCA の異なる Ti 試料表面へのアルブミン吸着速度 (初期 10 s 間の平均値)

るのではなく、試料表面のタンパク質種や量の影響を受けているものと考えられる。しかし、吸着量の多少や吸着タンパク質の種類、さらには吸着前の試料表面 WCA に違いがある場合や PEEK などの基材材質が異なる場合でも、同様の BIC 値を示していることから、吸着タンパク質の種類や量とは異なるその他の因子が BIC 値、すなわち骨伝導性に強い影響を与えているものと考えられる。

さらに、BIC 値が低い材料表面ほど、炎症性が強く発現する傾向が認められた。このことから、BIC 値の高い材料表面を創出すれば、抗炎症薬剤を使用せずとも自動的に炎症性が低減されることを意味している。

(4) タンパク質の初期吸着速度

QCM を用いて、WCA の異なる試料表面へのアルブミンの初期吸着速度を測定した(図4)。ただし、WCA を制御した Ti 試料表面にアルブミン水溶液を滴下し、10 s 後までの吸着量から、ごく初期における平均吸着速度を算出した。これより、WCA = 65 deg. 試料には、ほとんどアルブミンは吸着しないのに対して、より親水性あるいは疎水性の表面ほど、吸着速度が増加することがわかる。これは、図3中の で示すタンパク質未吸着材の BIC 値とよい一致を示していることから、インプラントを生体内に埋植後、ごく初期に吸着するタンパク質に強い影響を受けているものと考えられる。すなわち、材料表面の WCA によって BIC が変化する理由の一つとして、WCA が埋植直後に表面に吸着するタンパク質の量に影響を与えていることが挙げられる。

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3件)

(1) K. Kuroda, M. Okido: "Osteoconductivity of Protein Adsorbed Titanium Implants using Hydrothermal Treatment", Mater. Sci. Forum,

査読有, Vol. 879, 1049-1052, (2017)

(2) M. Okido, K. Kuroda: "Osteoconductivity of Superhydrophilic Ti- and Zr- Alloy for Biomedical Application", Mater. Sci. Forum, 査読有, Vol. 879, 2524-2527, (2017)

(3) K. Sugimoto, S. Tsuchiya, M. Omori, R. Matsuda, M. Fujio, K. Kuroda, M. Okido, H. Hibi: "Proteomic Analysis of Bone Proteins Adsorbed onto the Surface of Titanium Dioxide", Biochemistry and Biophysics Reports, 査読有, Vol. 7, 316-322, (2016)

〔学会発表〕(計33件)

(1) 五十嵐健太, 黒田健介, 興戸正純:「PEEKの化学的表面改質による生体適合性改善」, 日本金属学会春期講演大会, 2017年3月15-17日, 東京

(2) 山口勇氣, 黒田健介, 興戸正純:「表面親水性を制御した生体材料 Ti のタンパク質吸着能ならびに骨伝導能」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 2016年11月21-22日, 博多

(3) 大森正裕, 土屋周平, 原 憲史, 杉本圭佑, 黒田健介, 日比英晴:「チタン表面上で骨芽細胞様細胞は Na⁺/Ca²⁺交換輸送体および細胞膜 Ca²⁺-ATPase を発現する」, 第46回日本口腔インプラント学会学術大会, 2016年9月16-18日, 名古屋

(4) K. Kuroda, Y. Yamaguchi, M. Okido: "Formation of Protein Adsorbed Titanium Implants and Their Osteoconductivity", PRICM-9, Aug. 1-5, Kyoto

(5) K. Kuroda, M. Okido: "Osteoconductivity and Protein Adsorbability of Surface Modified Titanium Implants using Hydroprocessing", World Biomaterials Congress (WBC2016), May 18-22, 2016, Montreal (Canada)

〔図書〕(計1件)

黒田健介, 新家光雄:「超親水・超撥水化のメカニズムと品質向上」分担執筆(第4章第3節第5項)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 医科歯科用材料およびその製造方法

発明者: 黒田健介, 山口勇氣, 興戸正純

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-099824

出願年月日: 2016年5月18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