

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22240059

研究課題名(和文) 機能分子・生体分子電着による金属の汎用的生体機能化

研究課題名(英文) Generic biofunctionalization of metals with electrodeposition of functional and biomolecules

研究代表者

埴 隆夫 (Takao, Hanawa)

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) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：PEG電着によって、チタンへの細菌付着及びバイオフィーム形成が抑制される機構を明らかにした。また、PEGを介してRGDを固定化したチタンでは、ウサギ頸骨に埋入した際に、硬組織適合性向上に有効であることがわかった。さらに、電解液中NH₂-PEG-NH₂の濃度が大きいほど電流密度が大きいことから、チタン表面近傍ではNH₂-PEG-NH₂は電離と非電離を繰り返し、末端アミノ基をチタン表面に接し規則的なU字構造に配列していくことが明らかになった。一方、電着によりチタン表面にMPCポリマーを固定化できること、MPCポリマー電着試料においてフィブリンネットワークの形成が抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of the inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on titanium with electrodeposition of PEG was elucidated. RGD-immobilized through electrodeposited PEG on titanium is effective to improve the hard tissue compatibility of titanium when the material was implanted into rat tibia. Moreover, the current density was large when concentration of NH₂-PEG-NH₂ in electrolyte. This indicated that NH₂-PEG-NH₂ electrically dissociated and undissociated repeatedly near titanium surface during electrodeposition and finally the amino terminals bond to titanium surface, generating the immobilization with U-shape. On the other hand, MPC polymer is also electrodeposited to titanium surface by electrodeposition and the surface inhibited the adhesion of fibrin network formation.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 インプラント 表面改質 生体機能 機能分子 電着 固定化

1. 研究開始当初の背景

金属材料は典型的な人工材料であり生体機能がないにも関わらず、優れた強度と靱性から依然として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70%以上を占めており、その必要性はますます増加している。ステント、クリップ、塞栓コイル、ガイドワイヤーなどの循環器系デバイス、人工関節、骨固定材、脊椎固定器具などの整形外科デバイス、歯科修復物、義歯床、歯科矯正用ワイヤー、歯科インプラントなどの歯科デバイス、診断・治療器具、医療器械の躯体として、金属材料は必須であり、これらの医療用デバイスでは、力学的信頼性の点から金属を他の材料で代用することはできない。また、再生医療の実現には相当な時間がかかることも明らかになっているうえに、短期間での機能再建には人工材料による治療が将来にわたって必須であるという認識が広まり、現実的な問題として金属材料の重要性が再認識されている（以上上図参照）。しかし、金属は人工材料であるが故に、生体適合性、生体機能性の面での課題が多い。したがって、これを解決することが治療効果・効率の大幅な改善、患者の負担軽減、低侵襲性の確保、QOLの向上に不可欠であり、最終的には超高齢社会における医療費の低減に確実につながる。その達成のためには、金属材料に生体機能を付与するための新たな科学と技術が必要となる。

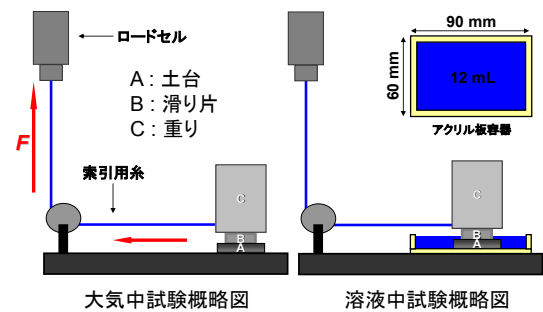
2. 研究の目的

本研究では、金属表面に機能分子や生体分子を固定化する際の結合と固定化による生体機能発現のメカニズムを、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とともに、これを一般的理論に拡張し、汎用性の高い技術とすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 材料上に吸着したタンパク質の定量を行うために、タンパク質を材料上から剥離する技術の開発を行った。
- (2) PEG 電着によるチタン表面への細菌付着及びバイオフィーム形成が抑制されることを明らかにした。
- (3) 双性イオン PEG を介して RGD ペプチドを固定化したチタンを創出し、骨形成能を明らかにした。
- (4) 機能分子・生体分子の電着条件の探索を行った。

(5) PEG 電着チタンの摩擦係数の変化を測定



した (図1)。

図1 引張試験機を利用した摩擦係数の測定方法

(6) 金属を生体機能化するための機能分子電着固定化の効果とその機構の解明、さらに電着機構を解明した。

(7) PEG 以外の機能分子への応用を試みた。細胞膜類似構造の MPC ポリマー及びポリロタキサンをチタン表面に電着し、その効果を検証した。

4. 研究成果

(1) PEG 電着チタン上でタンパク質吸着が抑制されることを明らかにできた。これにより、機能分子固定化材料の性能評価を定量的に行えるようになった (図2)。

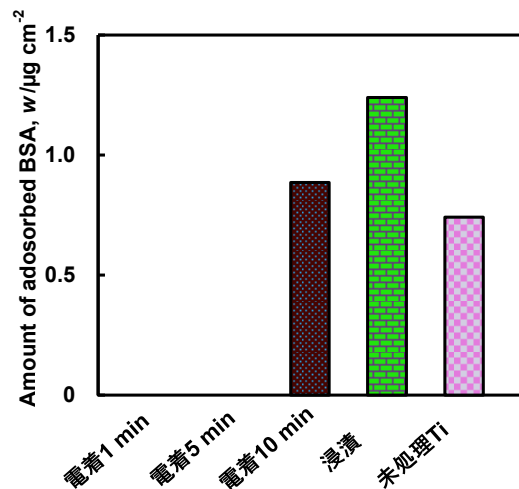


図2 NH₂-PEG-NH₂をチタン表面に各時間電着したときのウシ血清アルブミンの吸着量

(2) PEG 電着によって、チタンへの細菌付着及びバイオフィーム形成が抑制されることとその機構を明らかにした (図3)。

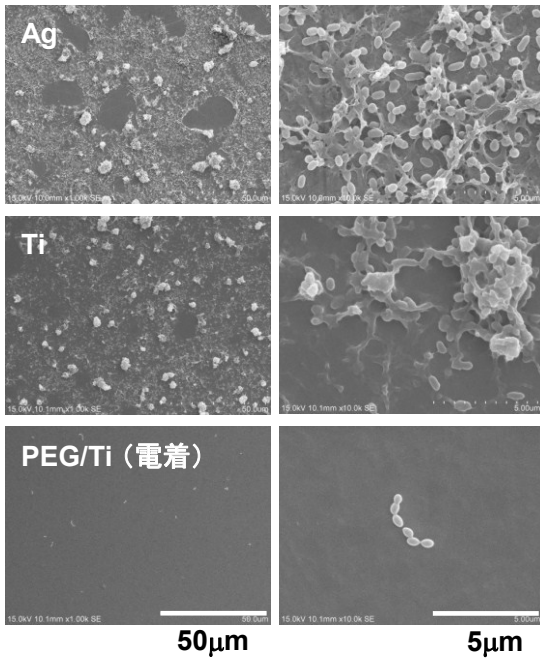


図3 *S. mutans* MT8148 の付着抑制に及ぼす PEG 電着の効果

(3) 細胞接着性ペプチド RGD を電着 PEG 双性イオンを介して固定化した際の、PEG 鎖長の影響を骨芽細胞及び線維芽細胞による評価で明らかにした。片末端をアミン、他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) について、線維芽細胞による細胞接着発現について検討を行った。さらに、最適鎖長 (分子量 3000) の PEG を介して RGD を固定化したチタンでは、ウサギ頸骨に埋入した際に、硬組織適合性向上に有効であることがわかった (図4)。

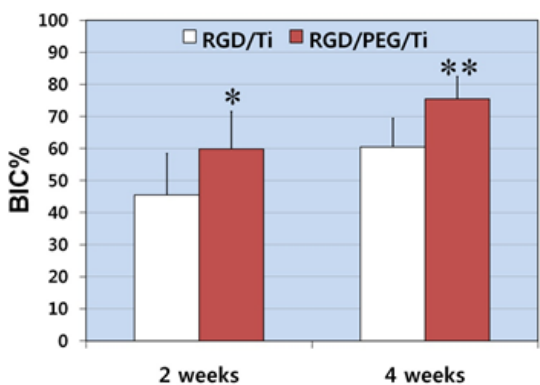


図4 Ti 表面に直接 RGD を固定化した試料 (RGD/Ti) と電着双性 PEG を介して固定化した試料 (RDG/PEG/Ti) を2週及び4週ウサギ頸骨に埋入したときの骨接触率 (BIC%)

(4) チタン、コバルトクロム合金など、材料の

相違による電着条件の相違を明らかにした。

(5) 分子固定化のメカニズムを解明するために、水溶液中で測定できる電解槽を備えたエリプソメーターによる電着 PEG 厚さ変化のその場測定、電気化学水晶発振微小天秤による固定化 PEG 量のその場測定を可能とする測定系を構築した。特に、分子固定化のメカニズムを解明するために、サイクリックボルタンメトリーによる PEG 電着中の電荷移動を補足し解析を行い、機能分子電着の際に電荷の移動が起こることを明らかにした。サイクリックボルタンメトリーにより電着中の両末端アミン修飾 PEG ($\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$) の動的挙動を解析した。その結果、電解液中 $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ の濃度が大きいほど電流密度が大きいことから、チタン表面近傍では $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ は電離と非電離を繰り返し、末端アミノ基をチタン表面に接し規則的な U 字構造に配列していくことが明らかになった。図5 および図6 に $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ の電着機構を示す。

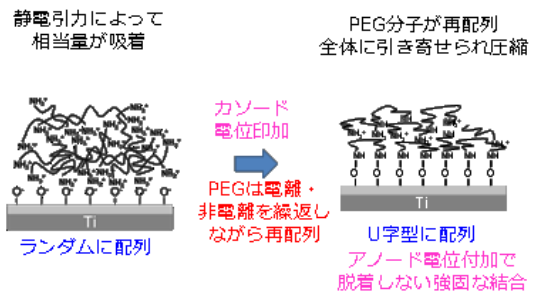


図5 $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ 電着機構模式図

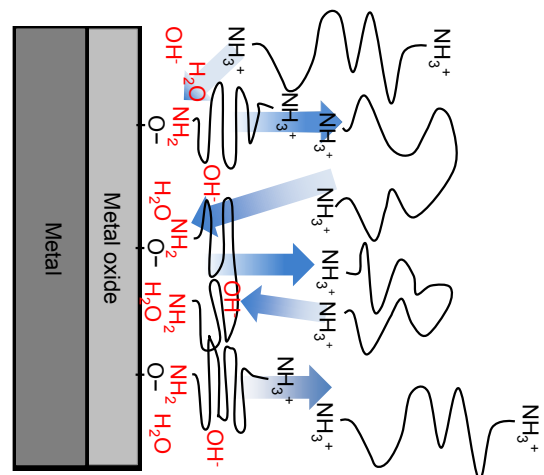


図6 $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ 電着機序模式図

(6) PEG 電着表面は摩擦形成の減少に効果があると考えられるため、PEG 電着チタン同士の大気中、タンパク質含有水溶液中での摩擦係数の測定を行い、PEG 電着金属の摩擦特性についても検討した。PEG の分子量の増加に伴い摩擦係数は増加し、PEG の固定化様式の組み合わせによっても摩擦係数が変化することが明らかになった (図7)。

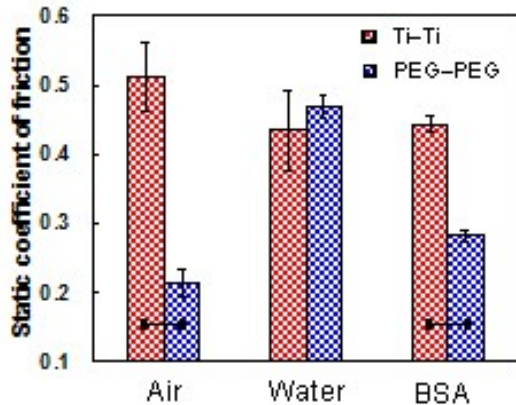


図7 大気中、水中、ウシ血清アルブミン中のチタン同士と PEG 電着チタン同士の静止摩擦係数

(7) 細胞膜類似機能分子である MPC ポリマーについても金属表面への電着の可能性を検討した。その結果、電着サイトであるアミンをランダムに分子中に配置するよりも、末端に配置 (図8) したほうが、電着効率が高いことが明らかとなった。MPC ポリマー電着チタンは、タンパク質の吸着を抑制することを確認した。電着によりチタン表面に MPC ポリマーを固定化できること、MPC ポリマー電着試料においてフィブリンネットワークの形成が抑制されること (図9)、ポリマー分子量、電着条件の相違が表面特性に及ぼす影響、MPC を電着した効果が大きく MPC unit の数はその性能に影響しないことを明らかにした。また、ポリロタキサンについても電着を行い、その機能について明らかにした。

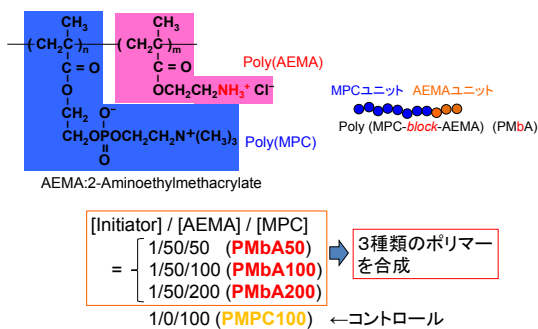


図8 研究に使用した MPC ポリマーの種類

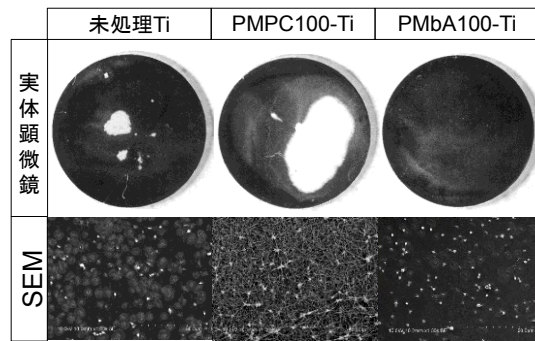


図9 未処理のチタン及び電着能のない PMPC100-Ti と比較して、MPC ポリマーが電着された PMbA100-Ti ではフィブリンネットワークの形成が抑制された。

以上より、本研究では、金属を生体機能化するための機能分子電着固定化の効果とその機構の解明、さらに電着機構を解明した。これらの成果は、今後の金属材料機能化・生体適合化を支援する重要な基盤となるものである。

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 24 件) すべて査読あり

1. Fukuhara Y, Kyuzo M, Tsutsumi Y, Nagai A, Chen P, Hanawa T: Phospholipid polymer electro-deposited on titanium inhibits platelet adhesion, J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater., DOI: 10.1002/jbm.b.334, 2015.
2. Seo JH, Tsutsumi Y, Kobari A, Shimojo M, Hanawa T, Yui N: Modulation of friction dynamics in water by changing the combination of the loop- and graft type poly(ethylene glycol) surfaces, Soft Mater., 11, 936-942, 2015. DOI: 10.1039/C4SM02082K.
3. Nagai A, Suzuki Y, Tsutsumi Y, Nozaki K, Wada N, Katayama K, Hanawa T, Yamashita K: Anodic oxidation of a Co-Ni-Cr-Mo alloy and its inhibitory effect on platelet activation, J. Biomed. Mater. Res., B Appl. Biomater., 102B, 659-666, 2014. DOI: 10.1002/jbm.b.33044.
4. Kwabe A, Nakagawa I, Kanno Z, Tsutsumi Y, Hanawa T, Ono T: Evaluation of biofilm formation in the presence of saliva on poly(ethylene

- glycol)-deposited titanium, *Dent. Mater. J.*, 33, 638-647, 2014. DOI: 10.4012/dmj.2014-025.
5. Shinonaga T, Tsukamoto M, Nagai A, Yamashiata K, Hanawa T, Matsushita N, Xie G, Abe N: Cell spreading on titanium dioxide film formed and modified with aerosol beam and femtosecond laser, *Appl. Surf. Sci.*, 288, 649-653, 2014. DOI: 10.1016/j.apsusc.2013.10.090
 6. Shimogishi M, Tsutsumi Y, Kuroda S, Munakata M, Hanawa T, Kasugai S: Effects of acidic sodium fluoride-treated, commercially pure titanium on periodontal pathogens and rat bone marrow cells, *Dent. Mater. J.*, 33, 70-78, 2014. DOI: 10.4012/dmj.2013-158.
 7. Tsutsumi Y, Niinomi M, Nakai M, Tsutsumi H, Doi H, Nomura N, Hanawa T: Micro-arc treatment to improve the hard tissue compatibility of Ti-12Nb-13Ta-4.6Zr alloy, *Appl. Surf. Sci.*, 262, 34-38, 2012. DOI:10.1016/j.apsusc.2012.01.024.
 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' solution, *Appl. Surf. Sci.*, 258, 5490-5498, 2012. DOI:10.1016/j.apsusc.2012.02.057.
 9. Ma C, Nagai A, Yamazaki Y, Toyama T, Tsutsumi Y, Hanawa T, Wang W, Yamashita K: Electrically polarized micro-arc oxidized TiO₂ coatings with enhanced surface hydrophilicity, *Acta Biomater.*, 8, 860-865, 2012. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.09.021.
 10. Nam K, Tsutsumi Y, Yoshikawa C, Tanaka Y, Fukaya R, Kimura T, Hanawa T, Kishida A: Preparation of novel polymer-metal oxide nanocomposites with nanophase separated hierarchical structure, *Bull. Mater. Sci.*, 34, 1289-1296, 2012. DOI: 10.1007/s12034-011-0317-8
 11. 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 Biomater.*, 7, 3222-3229, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.04.015.
 12. Tanaka Y, Matin K, Gyo M, Okada A, Tsutsumi Y, Doi H, Nomura N, Tagami J, Hanawa T: Effects of electrodeposited poly(ethylene glycol) on biofilm adherence to titanium, *J. Biomed. Mater. Res.*, 95A, 1105-1113, 2010. DOI: 10.1002/jbm.a.32932.
 13. Kamata H, Suzuki S, Tanaka Y, Tsutsumi Y, Doi H, Nomura N, Hanawa T, Moriyama K: Effects of pH, potential, and deposition time on the durability of collagen electrodeposited to titanium, *Mater. Trans.*, 52, 81-89., 2011. DOI:10.2320/matertrans.M2010311.
- 他 11 件
- [学会発表] (計 48 件)
1. T. Hanawa: Biofunctionalization of metallic materials and its application to dental treatment, 62th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Symposium 3: The New Horizon for Dental Treatment opened up by Biomaterials Research, 2014.12.5, KKR Hotel Osaka, Osaka.
 2. T. Hanawa: Research and development of metallic biomaterials meeting clinical demands, Key Note Lecture, 5th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues (ICMoBT 2013), 2013.12.9, Sitges, Barcelona, Spain.
 3. T. Hanawa: Current and future metal-based biomaterials, Invited Lecture, The 30th Taiwan and Japan Engineering Symposium, 2013.11.28, Kaohsiung, Taiwan.
 4. T. Hanawa: Development of new alloys and surface treatment techniques meeting clinical demands, Invited Lecture, 2013 Research Center for Oral Disease Regulation of the Aged International Symposium, 2013.11.21, Gwangju, Korea.
 5. T. Hanawa: Biofunctionalization of metallic biomaterials, Invited Lecture,

The 8th Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM8), 2013.8.6, Waikoloa, Hawaii, USA,.

6. 塙 隆夫: 生体材料の表面処理, 表面技術協会めつき部会 7 月例会, 2013.7.31, ルーテル市ヶ谷センター, 東京.
7. 塙 隆夫: チタンと生体組織との界面反応, 日本金属学会第 152 回講演大会 S8 ライフ・グリーンイノベーションのための Ti 合金, 2013. 3. 27, 東京理科大学, 東京.
8. 塙 隆夫: 生体機能分子固定化による抗菌・血小板粘着抑, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 「シンポジウム 5 メタルベースハイブリッドバイオマテリアル」, 2012.11.27, 仙台国際センター, 仙台.
9. 塙 隆夫: 生体機能を妨げず生体組織となじむ材料, 第 22 回日本歯科医学会総会シンポジウム 13 「身体にやさしい材料を創る」, 2012.11.11, 大阪国際会議場, 大阪.
10. 塙 隆夫: 金属バイオマテリアルと表面改質技術, ランチョン講演, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011.11.21, 京都テルサ, 京都.
11. Hanawa T, Tsutsumi Y: Surface modification of titanium with functional and bio-molecules by electrodeposition to add biofunctions, Invited Lecture, 220th Meeting of The Electrochemical Society, 2011.10.10, Boston, MA, USA.
12. Hanawa T: Implant surface treatment, Invited Lecture, The International Dental Materials Congress 2011 (IDMC2011), 2011.5.28, Seoul, Korea.
13. Hanawa T: Biofunctionalization of metals for medical devices with functional garded surface layer, Plenary Lecture, 11th International Symposium on Multiscale, Multifunctional and Functionally Graded Materials, 2010.9.29, Guimarães, Portugal.

他 35 件

[図書] (計 6 件)

1. T. Hanawa: Biofunctionalization of metallic materials: Creation of biosis-abiosis intelligent interface, In:

Interface Oral Science 2014, Innovation Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface, Eds. Sakaki K, Suzuki O, Takahashi N, Springer, New York, 2015, pp. 53-64.

2. T. Hanawa: Metal-Polymer Composite Biomaterial, Polymeric Biomaterials: Structure and Function, Volume 1, S. Dumitriu, V. Popa (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2013, pp.343-375.

他 4 件

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://reins.tmd.ac.jp/html/100007188_ja.html

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

土井 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

蘆田 茉希 (ASHIDA MAKI)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号 : 研究者番号 : 50708386

堤 祐介 (TSUTSUMI YUSUKE)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号 : 60447498

陳 鵬
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・特任助教
研究者番号 : 70708388

(3) 連携研究者

なし