機能分子による金属の生体機能化

埜 隆夫*

Journal of Japan Institute of Light Metals, Vol. 58, No. 11 (2008), pp. 583-587

Biofunctionalization of metals with functional molecules

Takao HANAWA*

Keywords: titanium, biomaterial, biofunction, electrodeposition, polymer

1. はじめに

生体機能を持つバイオマテリアルを開発するためには、生体構成成分である生体組織や生体分子を使用することが効率的なことは、容易に察せられよう。しかし、生体組織や生体分子の取扱いは難しく、また目標どおりの性質を得るためには、地道な研究が必要となる。生体組織を材料として利用する究極の技術である再生医療の実現には、今後相当な時間がかかることが明らかになっているように、生体組織や生体分子によるバイオマテリアルの開発には相当な困難が伴うことも事実である。そこで、次善の策として、人工材料に対する生体機能の付与が行われることになる。その際にも、人体組織の構成要素に近い組成のセラミックスや高分子を使用すれば、生体機能性バイオマテリアルを創出できるはずである。事実、これらの材料は医療用デバイスへの幅広い応用が行われており、金属製医療用デバイスはセラミックスや高分子で代替されてきた。それにもかかわらず、金属材料は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、その必要性はまったく衰えていない。ステント、クリップ、塞栓コイル、ガイドワイヤ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、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。

しかし、金属は人工材料であるがゆえに、金属の中で最も生体組織適合性に優れるチタンであっても、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、患者の負担軽減に不可欠となる。生体機能性とは、生体適合性よりも一歩進んで、生体の機能を補助する、あるいは生体と同様な機能を発揮する性質とを指す。ここでは、金属材料を生体機能化する必要性とその方法について考える。

2. 金属材料における生体機能

生体組織、生体分子は主に高分子によって構成されているため、これを材料として利用するか、これと類似の高分子を合成することで、比較的容易に生体機能材料を得ることができる。高分子では生体機能を有する官能基やセグメントを重合させることで、生体機能を発現させることができる。また、骨や歯質といった硬組織の無機成分はハイドロキシアパタイトであるので、ハイドロキシアパタイトとりん酸カルシウムによって、骨形成あるいは骨結合という生体機能を得ることができる。つまり、このようなセラミックスは、その組成が硬組織の無機成分であったり、成分元素の溶出が容易に起こったりするために骨形成を促進し骨組織と融合する機能を示す。翻って、金属材料にはその製造プロセス、すなわち溶解、鋳造、鍛造、加工、熱処理といった工程で生体機能を付与することはできない（図1）。これは、バイオマテリアルとしての金属材料の最大の弱点であり、生体適合性や生体機能性を付与するためには、表面処理、表面改質を行わねばならない。

すでに本誌で述べたように¹⁾、金属材料、特に生体組織適合性に優れるチタンおよびチタン合金に対する多くの表面処理法が研究されており、そのほとんどは、骨形成促進と骨との結合促進を目的としている。しかしながら、金属材料に要

図1 各材料における生体機能性付与方法の相違

* 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所（〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10）。Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062).

E-mail: hanawa.met@tmd.ac.jp

受付日：平成20年5月12日 受理日：平成20年6月17日

求される性質は、骨形成や骨結合性にとどまらず、近年下記の性質が必要とされている。

(1) 力学的機能

①低弾性率（骨固定材，脊柱固定器具：ストレスシールドによる骨吸収防止）

②超弾性・形状記憶（多目的：力学的適合性向上）

③耐摩耗性（人工関節：摩耗粉発生防止，耐久性向上）

(2) 界面化学的機能

④生分解性（ステント，人工骨：治癒後の材料消失）

⑤骨形成・骨接合（人工股関節のステム，歯科インプラント：骨内固定維持の確保）

⑥骨非癒合（骨固定材：摘出時再骨折防止）

⑦軟組織接着（歯科インプラント，経皮デバイス：軟組織内固定，細菌感染防止）

⑧抗血栓性（血液接触デバイス：血栓形成防止）

⑨バイオフィルム非形成（すべての体内埋入デバイス，手術器具：感染症防止）

(3) 磁氣的機能

⑩MRIアーチファクト低減（すべての体内埋入デバイス，手術器械・器具：造影性の確保）

これらのうち，①，②，③，④，⑩は合金組成，金属組織に依存する性質であり，合金設計および加工熱処理プロセスの開発によって，達成しうる性質である。これに対して，③，⑤～⑨の機能は，表面処理あるいは表面改質によるアプロー

チが有効な機能である。これらの生体機能すべてを単一のプロセスで付与することは不可能である。金属材料は多くの医療用器械・器具，インプラントに使用されており，強度，特に韌性に優れ，長期間にわたる耐久性も有している。しかし，金属をステント，ガイドワイヤ，人工弁，人工歯根などに使用するためには，血小板粘着抑制，血液中潤滑性，細菌付着抑制などの生体機能性が要求され，生体機能金属材料が必要である。血液接触材料や血液診断チップにおいては，タンパク質吸着や細胞接着を抑制する表面を創出することが重要である。これを実現するためには，機能分子の金属表面への固定化が必要となる。

これまで人工物である金属材料と生命体の一部としての生体組織とは，別個の性質を持つものとして扱われており，力学的にも化学的にも明確な界面を持ち，これらの機能的融合は不可能と考えられてきた。近年，これらの生体機能を金属に付与するために，生体機能分子あるいは生体分子を金属表面に固定化し，これらの分子の機能を利用する考え方が出てきた。一方，高分子材料は，柔軟性，製品形状への加工の容易さに加えて，素材自体の生体機能化および表面修飾による機能化が比較的容易なため，また生体分子や生体組織自体が高分子であるため，多くの医療用デバイスに利用されている。したがって，高分子や機能分子と金属とを複合化すれば，高分子の機能性と金属の強度とを併せ持つ材料の開発が可能である。

3. 機能分子の固定化

金属への機能分子固定化法としては，金表面のチオール基を介したものが早くから知られており，現在では金ナノ粒子へポリエチレングリコール（PEG）の固定化などが多くの分野で利用されている。PEGは図2に示す化学式で表せる物質でたんぱく質の吸着を抑制する性質を持ち，そのため固体表面に固定化できれば，細胞接着抑制など多くの波及的効果が期待できる機能分子である。しかし，このチオール基を介する方法は貴金属表面のみに有効なため，非貴金属合金が主体であるインプラントには使えない。貴金属系以外の金属表面は表面酸化物に覆われており，高分子固定化には貴金属とは異なった手法が必要である。金属表面を合成高分子や生体分子で修飾する技術については，1990年代後半から研究が始まっているが，いずれも確立した手法とは言いがたい。たと

図2 ポリエチレングリコール（PEG）の化学式
nは繰返し数

図3 金表面へのチオール基による高分子固定化と酸化チタン表面への機能分子固定化方法。Ψは生体機能を付与するために分子末端に修飾したペプチドを示す

例えば、シランカップリング剤である (3-aminopropyl) triethoxysilane をチタン表面のチタノール基 (Ti-OH) と反応させる方法や末端にりん酸基を有するアルキルポリマを Ti^{5+} に配位させる方法、ポリエチレングリコールとリジンの共重合体を Ti-O と静電的な作用によって結合する研究が行われている。金属表面への従来の高分子固定化はグラフトやコーティング法によって行われているが、これらの方法は物理吸着によるため高分子が脱離しやすい。最近、非貴金属表面が酸化物に覆われていることを利用し酸化物と高分子との結合を得る方法が考えられている。血液と接触する材料のバイオマテリアルやバイオセンサへの応用を目的として、アミノ末端 ($-NH_2$) を有するリジンを骨格として PEG をグラフトした分子 (poly(L-lysine)-g-poly (ethylene glycol); PLL-g-PEG) を金属酸化物に吸着させている。また、薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) への応用を目指して、末端がアミノ基とエトキシシラン ($-Si(OCH_2CH_3)_3$) を有する (3-アミノプロピル) トリエトキシシランを TiO_2 と反応させた後、PEG-ポリ乳酸ミセルで修飾しているが、いずれもシリコンや酸化物に対する固定化であり、金属表面にたんぱく質などの生体分子を直接修飾、固定化した例はこれまでにない。また、PEG を TiO_2 などの金属酸化物表面に固定化し、血小板、たんぱく質、ペプチド、抗体、DNA の吸着を制御する研究が行われている²⁾。また、金属表面の酸化物に何種類かのりん酸をグラフトする方法が考案されており、これは末端のアルキルリン酸を用いて、金属酸化物上に自己組織化膜を作製するものである^{3,4)} (図3)。各合金の特性を生かし金属材料の応用範囲を広げるためには、金属材料全般に利用できる固定化法の開発が必要である。

4. 電着によるチタンへの PEG の固定化

PEG をチタン表面に固定化する方法として、電着の例を示す。図4に示す両末端および片末端をアミンで修飾した PEG を NaCl 水溶液に溶解すると、アミンが電離し末端が NH_3^+ になる。そこで、チタン板をカソード、Pt 板をアノードとして $-5V$ で 300s 通電すると、アミンが電気泳動によってカソードとなったチタン板に引き寄せられ、固定化される⁵⁾。末端をカルボキシル基で修飾し、アノード電流をかけた場合には、チタン表面の酸化皮膜が成長するために電流が消費され効率がわるい。エリプソメータによって、固定化層厚さを測定すると、図5に示すように、浸漬によって固定化したときよりも、電着による固定化の効率が著しくよいことがわかる。しかし、24h 浸漬すると浸漬でも多量の PEG が固定化される。これは、PEG 末端の NH_3^+ とチタン表面の $Ti-O^-$ との静電引力によって、徐々に固定化したものである。固定化様式を X 線光電子分光および高周波グロー放電発光表面分析により決定したところ、図6のように、浸漬ではランダムに静電的に固定化しているのに対し、電着では NHO の結合で片末端修飾の場合にはブラシ状に、両末端修飾の場合には U 字形に固定化される⁶⁾。

電着には、チタン表面酸化物上の活性な水酸基が重要な役割を果たしている。過酸化水素水に浸漬することで、チタン表面酸化物上の活性な水酸基濃度を変化させ、PEG 固定化層厚さを測定すると、表面水酸基濃度の増加に伴って、固定化層厚さも増加する⁷⁾。異なる材料の間でも同様の傾向がみら

図4 ポリエチレングリコール (PEG) 末端のアミン修飾とチタン表面への電着による PEG 固定化模式図

図5 両末端および片末端アミン修飾 PEG を電着および浸漬によって固定化したときの固定化層厚さ (エリプソメータにより決定)

図6 両末端および片末端アミン修飾 PEG を電着および浸漬によって固定化したときの固定化様式 (X 線光電子分光およびグロー放電発光表面分析により決定)

れる。チタン、Co-Cr-Mo 合金、SUS316L ステンレス鋼の表面水酸基濃度と PEG 固定化層厚さを比較すると (図7)、PEG 固定化量に表面水酸基濃度が影響することがわかる。

PEG を電着固定したチタン上では、図8に示すように、たんぱく質の吸着が抑制され、抗血栓性の指標となる血小板粘着が抑制される。また、細菌付着も抑制できることが明らかになっている。この技術の応用として、たとえば、片末端をアミンで修飾し、反対側の末端をカルボキシル基で修飾すれば、ブラシ状に固定化した PEG に骨形成や軟組織接着といっ

図7 チタン (cp-Ti), SUS316L ステンレス鋼 (SUS), Co-Cr-Mo 合金 (Co-Cr-Mo) 表面の活性な水酸基濃度と両末端アミン修飾 PEG を各材料に電着固定化したときの固定化層厚さ (エリブソメータにより決定)

図8 非処理チタン (A,C) および両末端アミン修飾 PEG 固定化チタン (B,D) へ血小板粘着 (A,B) およびアルブミン吸着 (C,D)

た生体機能を持つ分子を固定化できる。また、コラーゲンのようなたんぱく質は電荷を持っているため、電着技術はその固定化に直ちに应用できる。

5. 高分子複合化

人工腱、人工筋肉などの運動機能器官の再建材料には柔軟性、耐久性、生体組織接着性が要求される。高分子材料は、柔軟性、製品形状への加工の容易さに加えて、素材自体の生体機能化および表面修飾による機能化が比較的容易なため、また生体分子や生体組織自体が高分子であるため、これらの部材の基盤材料として期待されている。ポリエチレンベースのハイドロゲルなどはその有力な候補とされているが、構造体として使用する場合には、機械的強度、長期間の耐久性を向上させる必要がある。したがって、高分子と金属とを複合化すれば、高分子の機能性と金属の強度とを合わせ持つ、強度、韌性、耐久性に優れた材料の開発が可能である。一方、金属を高分子で強固に被覆できれば、生体機能を持つ高分子による被覆あるいは高分子表面の修飾によって生体機能を獲得することができる。

一例としてシランカップリング剤 γ -MPS を介して、チタン

図9 シランカップリング剤を介したチタンとセグメント化ポリウレタンの接合様式 (a), 紫外線 (UV) 照射しない場合 (b) とした場合 (c) の界面構造の相違, それらの剪断破壊後の界面 (c,d)

とセグメント化ポリウレタン (SPU) を複合化したところ、 γ -MPS 層が厚くなると接合強度が上昇することがわかった⁸⁾。これは、 γ -MPS の分子ユニットが直立して、分子ユニット密度が増加し、ユニット間の Si-O-Si 結合が強固になるためと考えられる。さらに、適当なタイミングで紫外線照射を行う

図 10 シランカップリング剤とチタン表面酸化物上の水酸基との反応模式図：水和前 (a) と水和後 (b) のシランカップリング剤，水和したシランカップリング剤がチタン表面水酸基と反応 (c)，脱水・縮合し結合 (d,e)

と，SPU の架橋により重合度が増加し， γ -MPS との絡み合いが増え結合強度が増加する (図 9)⁹⁾。 γ -MPS とチタンは，チタン表面の水酸基を介して結合する (図 10)。したがって，過酸化水素水に浸漬することで，チタン表面酸化物上の活性な水酸基濃度を変化させると，表面水酸基濃度の増加に伴って，接合強さは増加する¹⁰⁾。

6. 再生医療への応用

再生医療に使用される足場材料としては，これまで生分解性高分子，生体由来高分子，りん酸カルシウム系セラミックスとこれらの複合材料が研究されている。これらは生体組織の再生が完了した後あるいは再生過程で消失するか生体組織と一体化するものである。このように，金属材料は再生医療とは無縁のものと考えられてきたが，生体組織を再建する際

に強度のある材料を使用した方が再生の容易な場合があり，歯周組織の再生でチタンの繊維や多孔体を表面処理し，生体分子を修飾した上で，再生医療の足場材料として応用する研究が始まっている¹¹⁾。金属材料は半永久的に体内に残るため，比較的体組織適合性の高いチタンが使用される。足場材料として金属を使用するためには，細胞接着性，組織適合性などが要求される。

7. おわりに

チタンおよびチタン合金は，高い比強度，耐食性，生体組織適合性から，医療用デバイスの素材として使用量は拡大し続けている。しかし，チタンといえども，金属である限り生体機能を持つことはない。チタンの医療用途拡大のためには，生体機能化が必須であり，そのために，どのようなアプローチが行われているかを紹介した。機能分子の固定化や高分子との複合化が行われれば，これまで高分子の分野で確立されてきた手法をそのまま利用して，多くの機能をチタンに付与することができる。

参考文献

- 1) 堀 隆夫：軽金属，**55** (2005)，553-556.
- 2) N. P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. L. Elbert, J. A. Hubbel and N. D. Spencer: Langmuir, **17** (2001), 489-498.
- 3) M. Textor, L. Ruiz, R. Hofer, A. Rossi, K. Feldman, G. Hahner and N. D. Spencer: Langmuir, **16** (2000), 3257-3271.
- 4) S. Tosatti, R. Michel, M. Textor and N. D. Spencer: Langmuir, **18** (2002), 3537-3548.
- 5) Y. Tanaka, H. Doi, Y. Iwasaki, S. Hiromoto, T. Yoneyama, K. Asami, H. Imai and T. Hanawa: Mater. Sci. Eng., **C27** (2007), 206-212.
- 6) Y. Tanaka, H. Doi, E. Kobayashi, T. Yoneyama and T. Hanawa: Mater. Trans., **48** (2007), 287-292.
- 7) Y. Tanaka, H. Saito, Y. Tsutsumi, H. Doi, H. Imai and T. Hanawa: Mater. Trans., **49** (2008), 805-811.
- 8) H. Sakamoto, H. Doi, E. Kobayashi, T. Yoneyama, Y. Suzuki and T. Hanawa: J. Biomed. Mater. Res., **82A** (2007), 52-61.
- 9) H. Sakamoto, Y. Hirohashi, H. Doi, Y. Tsutsumi, Y. Suzuki, K. Noda and T. Hanawa: Dent. Mater. J., **27** (2008), 124-132.
- 10) H. Sakamoto, Y. Hirohashi, H. Saito, H. Doi, Y. Tsutsumi, Y. Suzuki, K. Noda and T. Hanawa: Dent. Mater. J., **27** (2008), 81-92.
- 11) J. W. M. Vehof, A. E. de Ruijter, P. H. M. Spauwen and J. A. Jansen: Tissue Eng., **7** (2001), 373-383.