

平成23年 3月31日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500405

研究課題名（和文）慢性閉塞性血管病変に対する血管再生医療に有用な医用材料の開発

研究課題名（英文）Fabrication of composite materials based on polarized bioceramics for vascular regeneration.

研究代表者

永井 亜希子（NAGAI AKIKO）

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：40360599

研究成果の概要（和文）：

分極バイオセラミックスと、有機材料や金属材料との複合材料（スラリー、薄膜）を作製した。血管平滑筋細胞培養や血管内膜肥厚モデルを用いた動物実験の結果より、これらの材料が持つ電気シグナルは、閉塞性血管病変の血管リモデリングを抑制して、内膜の肥厚を減少させる可能性が示唆された。分極バイオセラミックスの複合材料の研究は、安価で永続的効果を持つ血管再生医療に有用な医用材料の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We fabricated new hybrid composite materials based on polarized bioceramics. Intimal hyperplasia in injured arteries of rabbit suppressed and phenotypic conversion of smooth muscle cells stimulated in response to electrical signals which were generated by the polarized materials in this study. We expect that the new materials should be useful as vascular regenerative materials with long-lasting use and low cost.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：再生医工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料

キーワード：再生医工学材料、バイオセラミックス、分極、アパタイト、チタニア、血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

我が国においては、高齢化社会が今後さらに進行し、慢性閉塞性血管病変の患者が急増することが予測される。しかし、本疾患の重症例に対する治療はまだ決定的でないため、その開発は急務である。現在の内科的治療法としては、骨髄よりの幹細胞移植による方法や、タンパク質や薬物による方法、特に徐放に関

して、新しい技術が開発されているが、前者は骨髄穿刺や細胞濃縮などかなり特殊な技術を要すること、後者は長期の持続効果が得られないことや全身への影響など解決しがたい問題点も含んでいる。就中、自己修復能力を利用した血管再生医療の実現が期待されているところである。ハイドロキシアパタイトは分極操作を加えることにより、表面に

電荷が誘起された分極ハイドロキシアパタイトを得ることができる。我々はこの分極アパタイトを骨欠損部に埋め込むと、周囲の新生血管の形成が促進され、新生骨形成が加速されることを見出した。そのメカニズムは充分には明らかにはされていないが、この事象が骨再生促進の一端を担っているのではないかと推測している。そこで、閉塞性血管病変に対して、この分極セラミックスの血管新生促進能を利用した血管再生療法を開発できないかと考えた。

2. 研究の目的

分極セラミックスを用いた血管再生促進用の医用材料の開発と、それを用いた閉塞性血管病変部の治療への応用を目的とした。この血管再生材料の開発は、使用部位が局限できるため全身への影響が少なく、またこの分極セラミックスの特性上、半永続的な効果が期待されるため、途中交換の必要のない治療法の一つになることが期待される。

3. 研究の方法

(1)分極セラミックス材料の作製と、その基礎物性の検討

セラミックスの合成と、他材料（有機材料や金属材料）との複合化。

分極処理を行う。

高温処理時の熱刺激脱分極電流測定(TSDC)のなど、材料化学的に分析する(X線回折、赤外吸収スペクトル測定)。

(2)培養細胞系にて、これら材料との相互作用をみる。

培養細胞の増殖速度の変化などにより、細胞毒性の有無を検討する。

培養細胞の接着能、遊走能を観察することで、細胞への修飾の様子を検討する。

(3)分極セラミックス含有材料の実験動物系にて検討する。すでに確立されているウサギの血管内膜肥厚のモデル動物を作成し、血管病変部周囲に材料をアプライし、その生体内における効果を下記の方法で判定する。

生理学的評価；新鮮血管標本のメカニカルレスポンスを、生理的条件下(緩衝液、温度、酸素分圧などの環境を整えて)で測定する。

組織学的評価；血管固定標本より組織切片を作成し、HE染色にて内膜肥厚の程度などを観察し、内膜/中膜比(I/M)で評価する。

分子生物学的評価；血管標本より mRNA やタンパク質を抽出して、血管再生のバイオマーカーを選択し、その変動を測定する。免疫組織学的評価を行う。

(4)研究の総括をし、学会発表や論文、報告書の作成などを行う。

4. 研究成果

(1)スラリー状分極ハイドロキシアパタイトの作製と応用の検討

スラリー状のハイドロキシアパタイト誘電体を作製した。既報の方法で、ハイドロキシアパタイト誘電体をバルクで作製後、パウダー状に調整した後、基剤との混合比率などの最適化をはかった。基礎物性についての評価は、X線回折及び赤外吸収スペクトル測定にて確認を行った。

細胞毒性評価

培養細胞を用いて、パウダー状アパタイトの細胞への影響を調べた。MTTアッセイを用いて細胞の代謝活性を調べて材料による細胞障害及び細胞静止作用の解析を行った。またアポトーシスアッセイを行い材料細胞死への影響について調べた。この材料による細胞毒性はないことを確認した。

動物実験系（ウサギ）による評価

血管内膜肥厚モデルを用いた動物実験を行った。このモデルは内頸動脈の内皮細胞に人為的な機械的障害を与え、その後の血管リモデリングの過程を観察するものである。モデル血管の周囲に作製した未分極、および分極アパタイト含有スラリー（HA、HAE）を塗布し、その後1ヶ月間に渡り、血管病変の変化を観察した。少なくとも1ヶ月、術後に生じる内膜肥厚を抑制することが分かり、さらに生理学的評価により、この血管が拡張機能も保持することが分かった。分極アパタイト複合材料は、病変部の血管リモデリングを正常化させたことが示唆された。

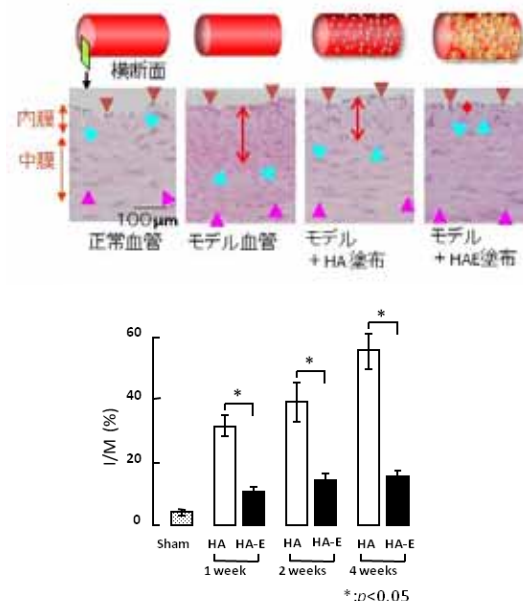


図 1：組織標本（上）より算出した I / M 比（下）

材料と細胞の相互作用

動物実験により観察された分極セラミックス含有材料により引き起こされていると推定される血管リモデリングへの影響について、細胞のキャラクター変化に着目し解析した。血管平滑筋細胞がキャラクター変化について、細胞生物学的及び分子生物学的手法を用いて検討したところ、細胞が増殖型から収縮型へフェノタイプ変換を起こしていると考えられた。この結果から、分極アパタイト複合材料は血管リモデリング時の血管平滑筋の異常増殖を抑制すると考えられ、慢性閉塞性血管病変の進展予防に効果を発揮すると考えられた。

(2)他の分極バイオセラミックスの作製 炭酸アパタイト(CAp)の作製

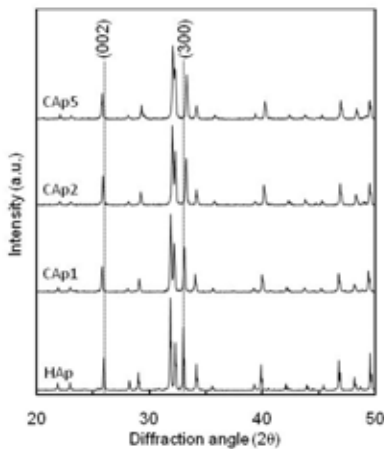


図 2 : HAp と CAp1-5 の X 線回折

分極セラミックス複合材料の主成分であるハイドロキシアパタイトは、リン酸基を炭酸基へイオン置換を行うことにより、より生体硬組織の無機成分に近い化学組成となる。

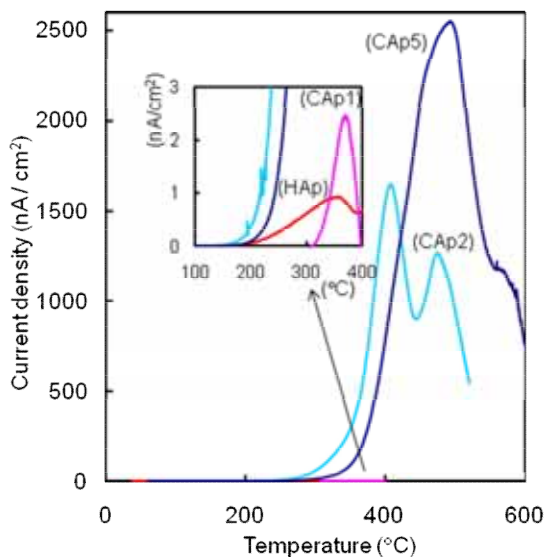


図 3 : HAp と CAp1-5 の TSDC

炭酸置換の濃度を増加させる (CAp1, CAp2, CAp5) と溶解性が向上し、分極処理により蓄積電荷量が飛躍的に大きくなることが分かった。

チタニア薄膜の作製

バイオセラミックスは生体親和性に優れるが、生体内で活用する場合に高硬度と低靱性という特性により形づくりの難しさが問題となる。血管外から血管内アプローチの材料を作製するために、金属とバイオセラミックスの複合化材料の作製とその表面改変を行った。チタン表面にマイクロアーク陽極酸化法(MAO)にて作製したチタニア薄膜は、多孔質で、電解質溶液や印加する電圧によりその厚さや化学組成を変化させることができることが分かった。

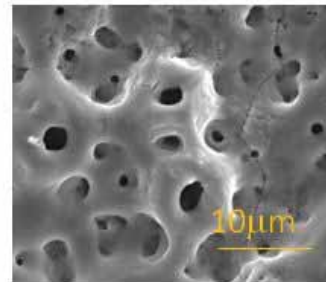


図 4: MAO 法により作製したチタニア薄膜 (SEM 観察)

チタニアへの紫外線照射や分極処理により、コーティング表面の親水性を増加させることができ、この親水性の亢進で、材料のタンパク質や細胞との相互作用を増加させ、生体親和性が向上した。

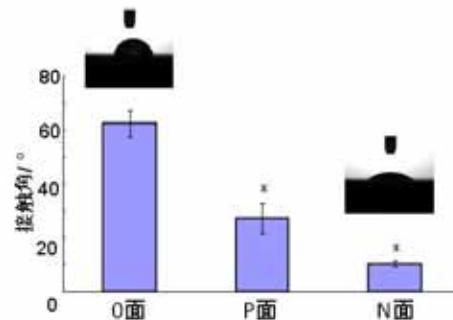


図 5 : 未分極 (O 面) 及び分極 (P 面、N 面) の水接触角測定

生体不活性である金属酸化物バイオセラミックスも物理的・化学的・表面修飾を施すことで、増殖因子などを用いずに生体親和性を増強させることができることを示せたことは意義がある。

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 23 件)

Nagai A, Tanaka K, Yanaka Y, Nakamura M, Hashimoto K, Yamashita K. Electrical polarization and mechanism of B-type carbonated apatite ceramics. J Biomed Mater Res A D0133131 査読有

Wang W, Ito S, Tanaka Y, Nagai A, Yamashita K. Comparison of enhancement of bone ingrowth into hydroxyapatite ceramics with highly and poorly interconnected pores by electrical polarization. Acta Biomater 5, 2009, pp3132-3140 査読有

Nagai A, Yamashita K, Imamura M, Azuma H. Hydroxyapatite electret accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia occurring after endothelial removal of the rabbit carotid artery. Life Sci 82, 2008, pp1162-1168 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

Nagai A, Yamashita K, et al. The influence of the polarized titania coating on MG63 Cells. 3rd international Congress on ceramics, Nov/2010, Osaka, Japan

Nagai A, Nakamura M, Yamashita K, et al. Hydroxyapatite Electret suppresses proliferation of vascular smoothmuscle cells *in vitro* by modulation of their phenotypic conversion Society for Biomaterials San Antonio, U.S.A. Apr/2009

Nagai A, Yamashita K, et al. Hydroxyapatite electret suppresses intimal hyperplasia in a rabbit model of vascular injury. 8th World Biomaterial Congress, May 2008, The Netherlands

〔図書〕(計 5 件)

永井亜希子他、バイオマテリアルの基礎、日本医学館、2010, pp54-60

永井亜希子他、生体材料(日本セラミックス協会編)日刊工業新聞社、2008, pp183-189

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 金属酸化物、金属材料、生体親和材料、および金属酸化物の製造方法

発明者: 山下仁大、永井亜希子、馬楚凡

権利者: 東京医科歯科大学

種類: PCT/JP2011

番号: 051672

出願年月日: 2011 年 1 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: セラミックスの分極処理方法及び分極処理したセラミックスを含む生体材料

発明者: 山下仁大、伊藤聡一郎、永井亜希子

権利者: 東京医科歯科大学

種類: PCT /JP2009

番号: 059433

出願年月日: 2009 年 5 月 22 日

国内外の別: 国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/material/index2.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井 亜希子 (NAGAI AKIKO)

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: 40360599

(2)研究分担者

山下 仁大 (YAMASHITA KIMIHIRO)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号: 70174670

中村 美穂 (NAKAMURA MIHO)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号: 40401385

王 巍 (OU GI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号: 60451944

田中 優実 (TANAKA YUMI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号: 00436619

(H 2 0 - 2 1)