

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月28日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500435

研究課題名（和文）ナノテクノロジーを利用した部位選択的骨伝導能を有する人工関節軟骨の開発

研究課題名（英文）Development of artificial articular cartilage with a region selective osteoconduction using a nanotechnology

研究代表者

速水 尚（HAYAMI TAKASHI）

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20173057

研究成果の概要（和文）：関節軟骨の病変部だけを人工軟骨に置換するための材料開発とそれを骨組織に永続的に固定する方法を研究した。人工軟骨であるポリビニールゲルが生体軟骨と摩擦する面は生体不活性、骨との接触面は強く接着できる部位選択組織融合型接着方法を研究した。接着層としてハイドロキシアパタイト積層超薄膜（厚さ 350 nm）を利用することとし、ゲルとアパタイト薄膜の生体適合性ならびに材料学的・力学的特性の向上方法を検索した。

研究成果の概要（英文）：We studied on a partial replacementable artificial articular cartilage, composed of polyvinyl alcohol hydrogel (PVA-H), or a composite osteo-chondral device (COD). The COD is able to replace the local lesion of natural articular cartilage. A long-term fixation technique between the COD and osseous tissues was studied. The COD surface must have bio-inert function. On the other hand, in the boundary between the COD and living bone, the osteoconductive adhesion is necessary. That is, the partial selective adhesion function (PSAF) was investigated. We have materialized PSAF in the COD by integration the PVA-H and several kinds of apatite thin film. Biocompatibility, mechanical strength and material property of both PVA-Hs and the thin films were studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体機能材料、人工関節軟骨

1. 研究開始当初の背景

特定疾患である特発性大腿骨頭壊死症をはじめとする多くの関節疾患では、病変は少なくともその初期において局在している。し

かし、外科的治療法として多用される人工関節置換術は、周囲の健康な骨軟骨組織までも大量に削除しなければならない。そこで、病巣部のみを人工材料に置換できる人工関節

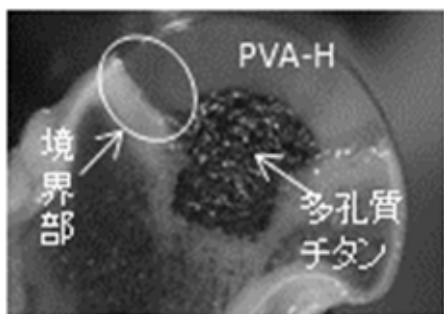


図1 イヌ大腿骨頭にインプラントした人工関節軟骨

軟骨が求められてきた。

図1は我々が開発したポリビニルアルコールハイドロゲル (PVA-H) 型人工関節軟骨デバイスをイヌ大腿骨頭に12ヶ月間インプラントした後の断面である。この研究開発の過程では、特に、バイオイナート材料であるPVA-Hを骨床へ固定するという困難な問題に対して、多孔質チタンブロックの空孔にPVA-H側ではPVA溶液を含浸後ゲル化することによって、骨組織側では空孔への自然な骨侵入によって両者を機械的に締結する方法を考案して解決してきた。これらの研究によって、一気にこの人工関節軟骨は臨床応用に近づいた。

このように、本人工関節軟骨に関する研究は現在、実用化研究の段階に至っており、今後実際の臨床使用で想定される信頼性保証に関する問題に対策すれば実用化することができる。すなわち、図1に示す骨軟骨組織とPVA-Hの境界部、特に接触面積が大きい骨組織との直接接着ないしは骨伝導能を誘導して人工関節軟骨と骨軟骨組織の完全な一体化を図る必要がある。このために最近我々は、ナノメートル厚さのハイドロキシアパタイト (HA) 超薄膜をPVA-Hに被覆できるレーザーアブレーション法 (PLD法) を利用して、バイオアクティブな表面を表面位置選択的に形成することに成功している。

2. 研究の目的

バイオイナート材料であるPVA-Hの骨軟骨組織との固定性について、接着と機械的な締結を区別して、本課題では「組織融合型の接着」ないし「骨伝導能」を追求することを目的としている。

(1) HA被覆PVA-Hを培地としたマウス骨芽細胞培養実験を通して、HA超薄膜被覆が骨芽細胞の増殖能だけでなく骨伝導能の指標である細胞分化能の誘導性を研究する。PLD法を用いると様々な組成のHA薄膜を容易に成膜・被覆できる。合成HAに対する骨形成促進因子であるMgを置換したHAおよび疑似体液由来HAの骨伝導能を比較して、

最も効果が大きい被覆組成を明らかにする。

(2) HA薄膜の細胞接着性を最大限に引き出す方法として、これまで全く検討されてこなかった合成HAと生体由来HAの2層薄膜被覆法を開発し、その骨伝導効果を検証する。その手始めとして、手術操作が容易な2層HA被覆チタン人工歯根をイヌ脛骨に埋入して、その効果を組織学的方法によって確認する。

(3) PVA-HとHA超薄膜の密着強さの保証も極めて重要である。前記各種HA超薄膜の組成と厚さの違いがPVA-Hとの密着強さに及ぼす影響を検索して、人工関節軟骨の固定性に関する信頼性を確保する。

(4) 多孔質チタンブロックを介さず、PVA-Hと骨軟骨組織をHA薄膜被覆だけで直接接着しても実用に耐え得るかを明らかにする。多孔質チタンブロックの不使用は、術後のMRI検査を可能にしたり万一の再置換手術時の手術手技的な不便さを解消できたりするので、術後における各種の制限を回避できる。

(5) PVA-Hの耐摩耗性の向上と表面性状を細胞接着性の向上に適合させる方法を検索する。

3. 研究の方法

(1) 各種HAを被覆したPVA-Hの製作と生物学的実験

① 合成HAおよび合成HAにMgを置換したHA (例えば、 $\text{Ca}_{10-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) を100~300 nmの厚さで被覆した試験片を製作し、これらを培地としたマウス骨芽細胞の培養実験を行う。そして、細胞増殖と分化レベルを評価するためアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性やオステオカルシン (OCN) 産生を測定して比較し、有効性が高いHA組成を決定する。

② 動物実験のために、各種HAを被覆した人工歯根を製作する。これらをビーグル犬脛骨に2~24週間インプラントして各種HA薄膜の骨伝導能を確認する。

(2) PVA-Hと各種HA薄膜の密着強さの評価など力学的信頼性向上のための実験

① ナノメートル厚さの超薄膜の密着強さを測定できるナノスクラッチ試験機を用いて、被膜と基材間の密着強さを測定する。また、ナノスクラッチ試験では把握し得ない被膜の剥離挙動を知るため、引っ張り密着強さも評価する。

② PVA-Hの耐摩耗性向上のために、ゲル化後におけるPVA-Hの熱処理方法を研究する。ゲル化後の試験片に加熱しながら20~40%の圧縮ひずみを与え、PVA-H表面に結晶配向性を与える工夫を試みる。

4. 研究成果

(1) 生物学的観点

マウス骨芽細胞を PVA-H 表面で 3 週間培養した。細胞増殖数は PVA-H 単体に比べて HA を被覆した PVA-H の方が有意に大きかった。また、細胞増殖能は PVA-H の含水率にも影響された。

図 2 は播種 2 週と 3 週間後の ALP 活性を例示する (雑誌論文④)。含水率 30%PVA-H に合成 HA を厚さ 300 nm で被覆した場合が最も大きな活性を示した。OCN についても同様の結果を得た。すなわち、HA 被膜は骨芽細胞の増殖を促進するだけでなく骨分化も促進して、生体不活性材料である PVA-H に骨伝導能を与え得ることを示した。PLD 法は被覆する部位や被覆の形状を容易に制御可能である (Hayami, T., Mater Lett 2007;61:2667-2670) ので、本方法によって研究課題目である部位選択的骨伝導能を人工関節軟骨 PVA-H に付与できる一拠を示した。

図 3 は合成および生体由来 HA を人工歯根に 2 層被覆して、イヌ脛骨に埋入後 4 週間時の横断面組織観察像を例示する (雑誌論文①)。HA 被覆無しではインプラントと骨組織は連結しなかった。溶射 HA 被覆の場合、被膜と骨組織は結合したが、一旦厚い被膜が破損すると連結は破綻することが示された。これらに比べ、2 層 HA 被覆はあたかもインプラントと骨組織が直接結合しているかに見える

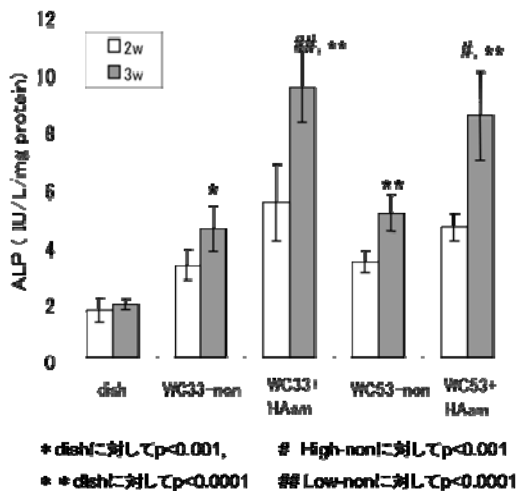


図 2 HA を被覆した各種 PVA-H 表面上での MC3T3-E1 細胞の ALP 活性

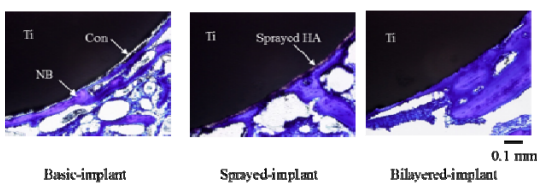


図 3 イヌ脛骨にインプラントした HA 被覆人工歯根の骨伝導状態

る状態を呈し、溶射被膜のような膜の破損の確率は非常に低く、信頼性に富んだ組織結合膜となることがわかった。また、骨との結合速度も、合成 HA 単体より 2 層 HA 被膜の方が高速で、術後早期の骨固定性をインプラントに与え得ることが示唆された。

以上の事実を総合して、本研究の目的としていた骨組織と PVA-H の境界に HA 薄膜を介在させることで組織融合性の接着が可能となり、関節液の侵入や感染防止なども可能となり人工関節軟骨デバイスの信頼性を向上する手法を開発できた。

(2) 材料学・力学的観点

生物学的観点から HA 薄膜の有効性を確認する一方で、人工関節軟骨デバイスとしてその構造の材料学および構造学的信頼性も確保する必要がある。各種 HA 薄膜の結晶構造と組成を X 線回折と X 線分光測定等で検討した。

図 4 は HA 薄膜の X 線回折パターンを示す。同図 (a) は PLD 前の原材料のパターンを示す。同図 (b) は無垢 PVA-H、(c) は PVA-H に厚さ 300 nm の HA 薄膜を被覆した場合の X 線回折パターンを示す。HA 薄膜は、薄膜組成の違いによって結晶構造が幾分異なり、熱処理をしない場合は非晶質に近い構造であった。図 4 (c) に見られるように、PVA-H に被覆した HA 薄膜 (非熱処理) には結晶性は認められなかった。非晶質構造の HA 薄膜は、体液中に溶解し易く接着性の観点で問題があるが、溶解によって骨芽細胞の誘導速度を加速する利点もある。上述の HA 薄膜の 2 層被覆の上層を非晶質に富む被膜、下層を結晶性が大きい被膜として構成することで早期接着とその維持を狙った高機能被膜を作製できる根拠を示した。

図 5 は疑似体液由来 HA 薄膜のナノスケラッチ実験結果を例示する (学会発表④)。膜

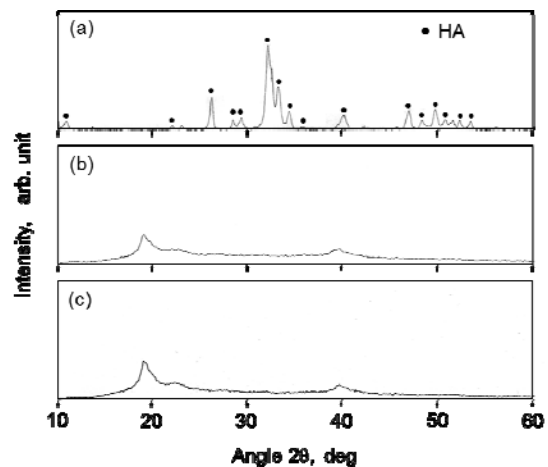


図 4 HA の X 線回折パターン、(a) 原材料、(b) 無垢 PVA-H、(c) HA 被覆した PVA-H

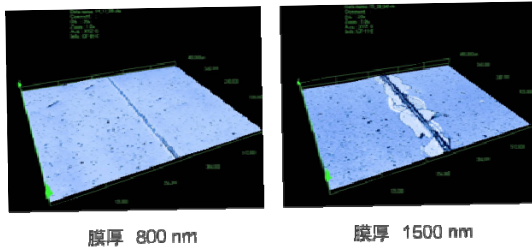


図5 疑似体液由来HA薄膜の膜厚が剥離に及ぼす影響 ナノスクラッチ痕の状況

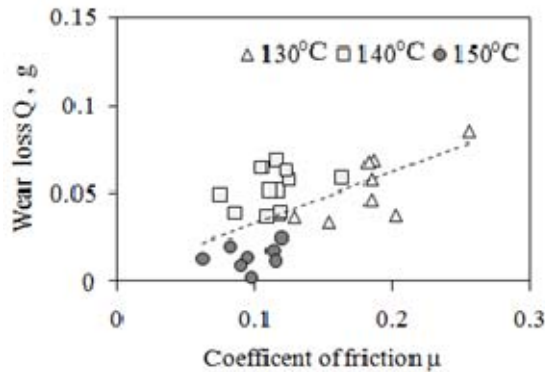


図6 PVA-Hの回転摩擦モードにおける摩擦係数と摩耗量の関係

厚 1500 nm では、スクラッチ痕の周囲の薄膜が劈開して密着強さが低下した。一方、膜厚 800 nm 以下では薄膜の損傷は生じず、他の HA 薄膜も含めて人工関節軟骨デバイスの設計における HA 被覆設計規準を設定することができた。

また、薄膜の単軸引っ張りにおける密着強さは 2.5~5 MPa であったが、引っ張り荷重作用面の全面の剥離が困難であり、正確な測定ができなかったため今後検討を要する。

図 6 は含水率 45% の PVA-H に温度 130~150°C のもと圧縮ひずみ 20% を 20 min 与えた PVA-H 試験片の摩擦係数と摩耗量の関係を示す。摩擦距離は 30 m である (学会発表③)。温度 130°C に比べて温度 150°C の場合、明らかに摩擦係数と摩耗量が低下しており、加熱圧縮処理が PVA-H の耐摩耗性を改善する方法のひとつであることを実証し、人工関節軟骨デバイスの耐摩耗性向上に資するデータを提示し得た。

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 6 件)

- ① T. Hayami, S. Hontsu, Y. Higuchi, H. Nishikawa, M. Kusunoki, Osteoconduction of a stoichiometric

and bovine hydroxyapatite bilayer-coated implant, Clin Oral Implants Res, 査読有、Vol. 22, No. 7, 2011, 774-776

- ② 本津茂樹、速水尚、樋口裕一、大橋芳夫、橋本典也、2 層アパタイト被覆インプラントの開発、日本口腔インプラント学会誌、査読有、23 巻 4 号、2010、697-708

- ③ M. Kusunoki, Y. Kawakami, T. Matsuda, H. Nishikawa, T. Hayami, S. Hontsu, Fabrication of a large hydroxyapatite sheet, Applied Physics Express, 査読有、Vol. 3, No. 1, 2010, 107003-1-3

- ④ K. Matsumura, T. Hayami, S-H, Hyon, S. Tsutsumi, Control of proliferation and differentiation of osteoblasts on apatite-coated poly(vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage material, J Biomed Mater Res, 査読有、92A, 2009, 1225-1232

[学会発表] (計 3 2 件)

- ① 藤原孝俊、松村和明、玄丞休、澤井徹、廣川敬康、速水尚、人工関節軟骨 PVA ハイドロゲルの配向結晶化による耐摩耗性の向上、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、2011. 11. 22、京都

- ② S. Hontsu, N. Kato, N. Nishikawa, M. Kusunoki, T. Hayami, Y. Hashimoto, Fabrication of Fluoridated Hydroxyapatite Thin Film and Sheet by Pulsed Laser Deposition Technique, The 11th Asian BioCeramics Symposium in conjunction with the 15th Symposium on Ceramics in Medicine, Biology and Biomimetics and 22nd Symposium on Apatite, 2011. 11. 30, Tukuba

- ③ T. Hayami, H. Nishikawa, T. Shibue, K. Fujii, T. Otsuru, Improvement of Lubrication Properties of Artificial Cartilage by Crystallization Control, 24th European Conference on Biomaterials, 2011. 9. 4, Dublin

- ④ T. Hayami, H. Nishikawa, M. Kusunoki, K. Matsumura, S. Hontsu, M. Ohmasa, T. Sawai, Scratch Test of Simulated Body Fluid-derived Hydroxyapatite Film on Biomedical Titanium Substrates, The 3rd International Congress on Ceramics, 2010. 11. 16, Osaka

- ⑤ 速水尚、松村和明、本津茂樹、疑似体液由来アパタイト超薄膜の骨芽細胞接着性および基材密着特性、第 37 回日本臨床バイオメカニクス学会、2010. 11. 1、京都

- ⑥ T. Hayami, H. Nishikawa, M. Kusunoki, K. Matsumura, S. Hontsu, N. Hirokawa, T.

Shibue, Deposition of hydroxyapatite thin films on titanium substrates and assessment of interfacial adhesion using a scratch test, The 11th International Conference on Ceramic Processing Science 2010. 8. 30, Zurich

- ⑦ 松村和明、速水尚、西川博昭、濱畑あかり、本津茂樹、疑似体液由来ハイドロキシアパタイト薄膜コートへの骨芽細胞への影響、第31回バイオマテリアル学会大会、2009. 11. 17、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

速水 尚 (HAYAMI TAKASHI)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：20173057

(2) 研究分担者

楠 正暢 (KUSUNOKI MASANOBU)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：20282238

(3) 連携研究者

松村 和明 (MASTUMURA KAZUAKI)
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授
研究者番号：00432328

以上