

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500540

研究課題名(和文) 静電気力を用いた次世代コーティングステントの開発

研究課題名(英文) Surface modification of cardiovascular metal stents

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ステント金属基板であるコバルトクロム合金とチタン合金に、それぞれ陽極酸化法とフェムト秒レーザーを用いた表面改変法にてセラミックスコーティングを作製することができた。これらの表面は、ステント挿入後の再狭窄を予防する働きを持つ血管内皮細胞の接着を促し、塞栓の原因となる血小板の粘着を抑制することが分かった。材料表面の静電気力が細胞接着に及ぼすメカニズムについて、原子間力顕微鏡や水晶発振子マイクロバランス測定法、蛍光顕微鏡を用いて調べた。細胞に先んじて材料表面に吸着する体液中のタンパク質の吸着形態の変化が、その後の細胞の接着や伸展といった初期挙動へ影響することが分かった。

研究成果の概要(英文)：We report on the surface modifications of metal substrates for stent, such as cobalt-chrome alloy and titanium alloy, for endothelialization at their surfaces by anodic oxidation treatment and femtosecond laser irradiation, respectively. We evaluated the surfaces using endothelial cells attachment test and platelet adhesion test in vitro. These results show their possibilities to be useful stent surfaces which promote attachments of endothelial cells for inhibiting restenosis and suppress adhesion of platelet inducing thrombogenesis. Next, we investigated the mechanism of interactions between electrostatic force of the material surfaces and cell behaviors using an atomic force microscopy, a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, and a fluorescence microscope. The conformational changes of the serum protein modulate its configuration when adsorbed to the material surfaces and the initial cell behavior of cells on the surface with pre-adsorbed the protein.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオマテリアル 表面改変 ステント材料 静電気力 血管内皮細胞 血小板

1. 研究開始当初の背景

人体は、神経伝達や骨の圧電性を介した骨形成刺激など、多彩な電気信号を用いた生命活動の制御を行っている。すでに多彩な生体電気現象が知られてはいるが、生体が電気シグナルを認識した後、どのような応答をしているのかなどはよく分かっていない。応募者の研究室では、生体親和性に優れたバイオセラミックスに電場を印加し、分極という非平衡状態を作り出すことに成功している。この分極材料は静電気力を持ち、動物実験で骨再生や血管リモデリングの治癒過程を促進できることを見出してきた。

現在の血管ステントは、再狭窄を予防するため薬剤による中膜細胞増殖の抑制に主眼を置いているため、本来体内で狭窄を予防する働きを持つ内皮細胞もダメージを与えている。本研究では、血管内皮細胞の再生に着目し、体外で制御しうる静電気力を持ち、内皮細胞をリクルートしてくれるようなセラミックスコーティングステント材料を作製することを目標とした。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、動脈硬化などの閉塞性血管病変の治療に用いるステントに用いられている金属基板に、静電気力を持ったセラミックスコーティングを作製する。このコーティングにより、ステント表面への血小板の粘着を予防して塞栓を低下させ、内皮細胞の接着を促進して再狭窄が予防されることが期待できる材料を開発することが目的である。

(2) 材料の静電気力を制御下に用いるために、電気シグナルと生体との間に生じる相互作用の性質や、それらが引き起こされるメカニズムについての研究を行う。

3. 研究の方法

(1) バイオセラミックスコーティングの創製：ステント金属としてよく用いられるコバルトクロム金属とニッケルチタン金属を基盤として用い、前者には陽極酸化法にて、後者にはフェムト秒レーザー法にて、コーティング膜を作製した。また、ゾルゲル法にてアパタイト薄膜を金膜やチタン膜上に作製した。

(2) 静電気力量の制御：薄膜セラミックスは導電性を示すため、下記に示す特許5414021に示した手法により、分極処理を行った。

(3) 物性評価：表面形態を走査型電子顕微鏡や走査型プローブ顕微鏡で観察した。表面性状や化学組成を、接触角測定やX線光電子分光法で測定した。

(4) 表面特性：体液中に存在するタンパク質の吸着量を水晶発振子マイクロバランス測定法で、吸着形態を原子間力顕微鏡にて観察した。

(5) 細胞応答の検討：上記手法にて作製した材料上で、血管内皮細胞等の培養細胞を用いた静置培養と、血小板を用いた血小板粘着試験をin vitroで行った。材料-細胞相互作用の初期挙動である接着伸展リモデリングを水晶発振子マイクロバランス測定法や蛍光免疫染色、走査型電子顕微鏡にて調べた。

4. 研究成果

(1) コバルトクロム合金に、陽極酸化法を用いた表面改変法を行った。試料に印加する電流量を変化させることにより、表面コーティング膜の厚さを制御することができた。膜の化学組成は、生体親和性を有する酸化クロムが主体であり、コバルトクロム合金に対するアレルギーの原因となるNiやCoの原子濃度を大きく減少させた表面を作製することができた(図1)。

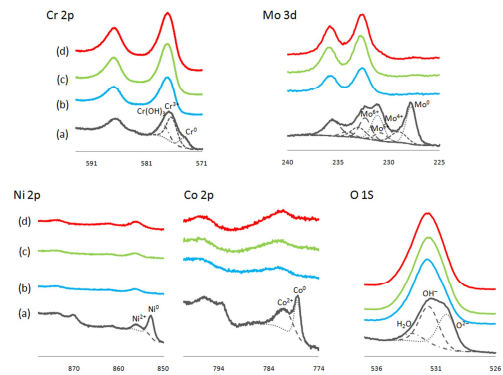


図1 クロム(Cr2p)、モリブデン(Mo3d)、ニッケル(Ni2p)、コバルト(Co2p)、酸素(O1s) X線光電子分光スペクトル。黒線：金属基板、赤・緑・青線：コーティング膜。(文献)

得られた材料表面上で、血管内皮細胞培養と、血小板粘着試験を行ったところ、血小板の粘着を抑え、内皮細胞の接着伸展を促す表面であることが分かり、ステント材料の表面改変として利用できる可能性があることが示唆された。

(2) フェムト秒レーザーを用いたチタン金属およびチタン合金の新しい表面加工方法について、大阪大学と共同研究を行った。レーザーの出力を変化させることにより、材料表面にナノ～マイクロサイズのパターンニングを行うことができた。この基板表面上で細胞を培養し、培養細胞の接着を観察すると、上記のパターンにより細胞の配向性を制御できることが示された(図2)。

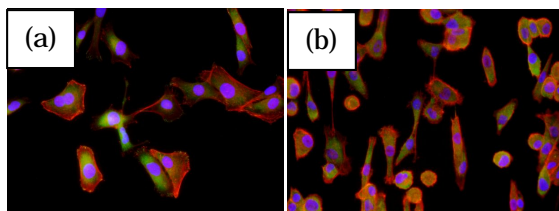


図2 材料上で培養した細胞の免疫染色後の蛍光染色画像。(a)未処理のチタン金属上 (b)フェムト秒レーザー加工後(文献)

血管内では、内皮細胞は血流方向に配向することが分かっている。このパターンを用いたバイオメテック材料はステントの表面改変として応用できる可能性があると考えられた。

(3) 材料表面の静電気が細胞接着に及ぼすメカニズムについて、原子間力顕微鏡や水晶発振子マイクロバランス測定法、蛍光顕微鏡を用いて調べた(東京大学との共同研究)。まず、アパタイト材料表面に吸着する体液中タンパク質であるフィブロネクチンの、吸着総量および吸着形態の変化を調べた(図3)。溶液中のタンパク濃度により、吸着形態が変化することが示された。

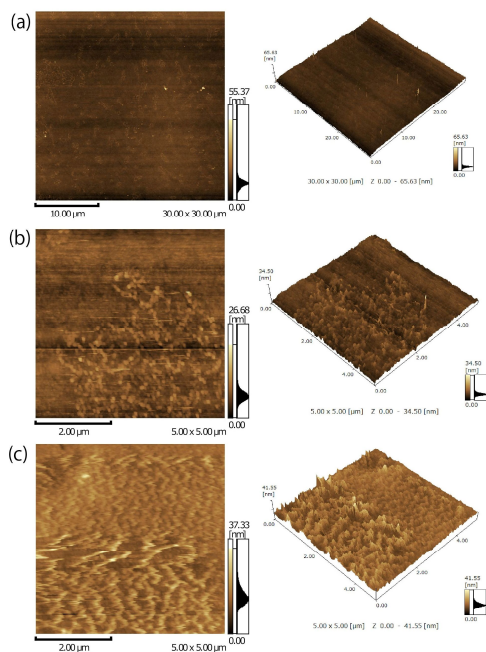


図3 原子間力顕微鏡像。(a)未処理のアパタイト膜、(b)フィブロネクチン0.5 μg/ml 吸着後 (c) フィブロネクチン5 μg/ml 吸着後(論文submit中)

次に、タンパク吸着に引き続いて起こる細胞の、接着数や伸展挙動を調べ、材料表面のタンパク吸着が細胞接着に及ぼす影響を調べた。細胞接着は、先に生じるタンパクの吸着形態により変化することが分かった。材料表面を制御することでタンパク質の吸着形態が変化することが材料への細胞接着をコントロールしていることが示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計12件)

- Nagai A, Hattori T, Hirose M, Ogura A, Nozaki K, Aizawa M, Yamashita K. Mouse embryonic stem cells cultured under serum- and feeder-free conditions maintain their self-renewal capacity on hydroxyapatite. *Mater Sci Engineer C*, 34, 214-220, 2014. 査読有 10.1016/j.msec.2013.09.012
- 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: Part B: Appl Biomater*. 102B; 659-666, 2014. 査読有 10.1002/jbm.b.33044
- Nozaki K, Wang W, Horiuchi N, Nakamura M, Takakuda K, Yamashita K, Nagai A. Enhanced osteoinductivity of titanium implant by polarization-induced surface charges" *J Biomed Mater Res A* 2014. 査読有 10.1002/jbm.a.34980
- Shinonaga T, Tsukamoto M, Nagai A, Yamashita 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. 査読有 10.1016/j.apsusc.2013.10.090
- Horiuchi N, Endo J, Wada N, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Katayama K, Yamashita K. Dielectric properties of stoichiometric and defect-induced hydroxyapatite. *J. Appl. Phys.*, 113; 134905, 2013. 査読有 10.1063/1.4799130
- Nakamura M, Hentunen T, Salonen J, Nagai A, Yamashita K. Characterization of bone mineral-resembling biomaterials for optimizing human osteoclast differentiation and resorption. *J Biomed Mater Res A*. 101A; 3141-3151, 2013. 査読有.10.1002/jbm.a.34621
- Nagai A, Horiuchi N, Nozaki K, Nakamura M, Yamashita K. Quantitative evaluation of the hydrophilic properties of polarized hydroxyapatite. *Ceram Trans*, 242; 103-112, 2013. 査読有 10.1002/9781118751015.ch12
- 谷川大地、塚本雅裕、篠永東吾、永井亜希子、埴隆夫、山下仁大、升野振一郎、高橋謙次郎、藤崎晃、阿部信行、高繰り返しナノ秒ファイバーレーザーを用いたTi-6Al-4V合金への微細周期構造形成レーザー加工学会誌., 20; 124-129, 2013. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40019824582> 査

読有.

Nagai A, Yamazaki Y, Ma C, Nozaki K, Toyama T, Yamashita K. Response of osteoblast-like MG63 cells to TiO₂ layer prepared by micro-arc oxidized and electric polarization. *J Euro Ceram Soc* 32, 2647-2652, 2012. 査読有.10.1016/j.jeurceramsoc.2012.03.002
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. 査読有.10.1016/j.actbio.2011.09.021
Nagai A, Tsutsumi Y, Suzuki Y, Katayama K, Hanawa T, Yamashita K. Characterization of the 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. 査読有 . 10.1016/j.apsusc.2012.02.057
Nagai A, Ma C, Kishi S, Inuzuka M, Nakamura M, Horiuchi N, Nishio K, Yamashita K. Surface properties of Al₂O₃-YSZ ceramic composites modified by a combination of biomimetic coatings and electric polarization. *Appl Surf Sci* 262, 45-50, 2012. 査読有 10.1016/j.apsusc.2012.01.038

〔学会発表〕(計 6 件)

永井亜希子 他、生体活性チタニアエレクトロレット . 日本金属学会 2014 年春期講演大会、2014.3.22, 東京工業大学
Nagai A, et al. Recent advances of carbonated apatite. 2013 Asian Bioceramics Symposium, 2013. 12. 6. 京都大学
Matsui N, et al. QCM-D assisted micro analysis of cell behaviors on hydroxyapatite films. 2nd International Symposium on Inorganic and Environmental Materials. 2013.10.25. Rennes, France.
鈴木雄太 他、陽極酸化による Co-Cr 合金の表面改質と生体適合性評価 . 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、2012.11.26、東北大学
永井亜希子 他、分極炭酸アパタイト多孔体の作製 . 日本セラミックス協会年会 2012.3.20. 京都大学
Nagai A, et al. Surface properties of electrically polarized Al₂O₃-YSZ ceramic composites. 3rd International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials. 2011.7.1. 北海道大学

〔図書〕(計 2 件)

野崎浩佑、山下仁大、永井亜希子 . 生体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件 .2013.34-38. Horiuchi N, Nakamura M, Nagai A, Yamashita K. Biological interactions with surface charge biomaterials, RSC Nanoscience & Nanotechnology. Royal Society of Chemistry.2012. 262 pages

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 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:国立大学法人 東京医科歯科大学
種類:特許
番号:PCT/JP/2011/051672
出願年月日:2011.5.11
国内外の別:外国

○取得状況(計 1 件)

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:国立大学法人 東京医科歯科大学
種類:特許
番号:5414021
取得年月日:2013.11.22
国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/inorg/index.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・
准教授
研究者番号:40401385

堀内 尚紘 (HORIUCHI Naohiro)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
助教
研究者番号:90598195