

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700538

研究課題名（和文） 血管内皮誘導を狙った金属性マイクロポーラス表面修飾法の開発

研究課題名（英文） Development of metallic micro-porous surface modification techniques for promoting neointimal endothelium

研究代表者

関根 一光 (SEKINE KAZUMITSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50447182

研究成果の概要（和文）：チタンマイクロ粒子混合体の焼結により、様々な形状や寸法、厚さを持つチタンマイクロポーラス体の作製をおこなった。また、作製した試料の多孔質性状の評価や機械的性質、また細胞播種や生体内埋入による生物学的評価においても、血管内皮創生の足場となる毛細血管の侵出、早期癒着を促進する結合組織の創生など、今後の臨床への有効性を示唆する結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We have developed and fabricated the titanium(Ti) micro-porous specimens with the several variation of the shape, the size and the thickness, by sintering the Ti micro powder and their binder. These specimens were evaluated their characteristics of porous, several mechanical strength, and cell compatibility and morphology. These results indicated that the Ti micro-porous could show the good performance of porous character, mechanical strength and neointimal growth as the scaffold.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：人工臓器工学・再生医工学・複合生体材料

### 1. 研究開始当初の背景

重度の心疾患患者への治療について、今後は補助人工心臓が重要な選択肢の一つになるものと予想される。その人工心臓の施術においては、例えば左室補助型人工心臓について言えば心尖部等の生体心から大動脈へと血液をバイパスする生体の侵襲部位とその送血管である脱血カニューレによる“生体組織と人工材料でのつなぎ目”ができる。このような部位では血液流れの激みが起こり易く、また生体血管とは異なる表面性状の人工

物であるため、微小血栓の形成や付着が容易に起こる。この微小血栓の血中への飛散は全身での心源性血栓塞栓症の引き金となり、また血液バイパス路での血栓堆積による塞栓を引き起こすため、出来る限り抑制する必要がある。その手法の一つがヘパリンや MPC ポリマーなどの化学的な抗血栓性表面処理である。またそれ以外の手法として、人工物の血液接触表面を粗面とし、その粗面への生体の自己的な新生内膜形成による血栓抑制効果であり、これらは Thoratec 社製の補助

型人工心臓に一部応用されている。

本課題では、上述後者の自己内膜の誘導形成を目的として、金属微粒子の焼結体によるマイクロポーラス（微細多孔質）血液接触表面を、補助人工心臓用金属製血管カニューレの先端周囲や血管との接合部位、血液の澱みが想定される部位などの、特定の表面や複雑形状表面に修飾する技術を目的とした、薄くてかつ微細なポーラス表面の作成をおこなう。マイクロポーラスは“微少血栓の取り込み”と、“血中や血管からの血管内皮（前駆）細胞、また心室などの近接生体内皮からの内皮細胞等による内皮新生のための scaffold”の基質材料となることを目的としている。

将来的には患者様自己の脂肪組織や血液から採取した血管内皮前駆細胞や血管平滑筋細胞をマイクロポーラス表面修飾したカニューレ上に *in vitro* で培養、播種、そして新生内皮化した cultured カニューレを術式へ応用する“人工臓器学+再生工学”研究を目指す。

## 2. 研究の目的

本課題では、自己的な血管内皮の誘導形成を目的として、金属微粒子の焼結体による微細多孔質（マイクロポーラス）表面を、人工心臓用金属製脱血管や血液カニューレの先端周囲や血管との接合部位、および血液の澱みが想定される部位など、材料の特定表面に修飾する技術を目的とする。

オーダーメイド的に円筒表面など複雑形状に作製したマイクロポーラス体の有効性の評価は、*in vitro* 試験として焼結体上への繊維芽細胞及び血管内皮細胞の播種により、ポーラス体への血管内皮細胞の早期での侵入と微少血管新生の確認を目標に各試料を評価する。また *in vivo* 試験として、試料を小動物の皮下、筋層および大腿部動脈へ植え込み、皮下及び筋層では毛細血管の新生を、また動脈ではポーラス体表面及び内部への血管内皮の誘導の確認を目標に各試料を評価する。

## 3. 研究の方法

血管内における自己的な血管内皮の誘導形成を目的とした、金属微粒子の焼結体による微細多孔質表面を、人工心臓用金属製脱血管や血液カニューレの先端周囲や血管との接合部位および血液の澱みが想定される部位などに修飾する技術を目的として、近年、補助型人工心臓に多く用いられているところのチタンを基材として、チタンマイクロ粒子焼結体による自己内膜化チタン多孔体の

作成とその評価をおこなった。

本法では、マイクロポーラス体への血管内皮細胞及び前駆細胞の侵食による毛細血管創生を目的として作製肉厚 0.2~1.0mm、血管内皮細胞の大きさを基準に気孔径 30~70  $\mu\text{m}$ 、また、球形の単純立方~体心立方格子での充填を想定して気孔率 32~50%、の各値を焼成後試料の目標値とした。

超音波ふるい機（PS-200/D, 田中テック）によって 150 $\mu\text{m}$ ~180  $\mu\text{m}$  に粒径調整したチタンマイクロ粒子（TIL0P150, 大阪チタニウムテクノロジー）を 10%重量比の熱可塑性樹脂（インレーワックスソフト、GC）と混合した。混合体は約 50 $^{\circ}\text{C}$  に調整したホットプレート上のシリコン製耐熱容器内で練和し、適切な鋳型に入れて冷却した。冷却後に型から取り外し、約 380 $^{\circ}\text{C}$  に設定した炉内で結合材である熱可塑性樹脂を焼却し、その後約 1, 100 $^{\circ}\text{C}$ 、Ar ガス環境にて 1 時間焼成をおこなった。各々のチタンマイクロ粒子が焼成により隣接する粒子同士で結合することにより、チタンマイクロ粒子による多孔体が作成できた。

焼成後の試料はガス式密度計による空孔体積の算出、実体顕微鏡および電子顕微鏡（SEM）による表面性状の観察評価、 $\phi 6 \times 10\text{mm}$  試験片による機械的圧縮性試験および 3mm x 8mm x 2mm 試験片による機械的曲げ強さ試験による機械的強度の評価、NIH3T3 細胞播種による *in vitro* 性状評価および細胞親和性評価、また 8 週間までの雄性ラット脂肪層および筋層への埋入試験に加え、4 ヶ月までのウサギ頸部血管内への埋入をおこない、摘出後の組織切片剖検による評価をおこなった。なお、動物実験に関しては、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部で定める「徳島大学動物実験委員会」の規約指針を遵守して実験をおこなった。

マイクロ粒子の焼成結合体の利点には多孔質化による内部空隙への軟組織侵出の誘導を目的とする一方、組織液や細胞などに接触可能となる表面積が同寸法や同形状のバルク材と比較して飛躍的に増大することが挙げられる。この利点を活かすため、焼成後表面への薬物塗布や浸漬に依る生化学的誘導因子の付与を目的として、チタン表面水酸化処理についても可能性を評価した。

適当な形状にて焼成後のマイクロポーラスチタン試料およびコントロールとして同寸法のバルクチタン材をアセトン、エタノール、純水の順で超音波洗浄した後に充分乾燥し、60 $^{\circ}\text{C}$  恒温環境下にて 30%過酸化水素水に浸漬し、48 時間静置した。取り出した試料は

脱水デシケーター内で一昼夜間、十分に乾燥した。乾燥後の試料は実体顕微鏡およびSEM観察をおこなった。また、チタン表面の水酸化効果の確認として、アルブミン溶液に浸漬し、十分に風乾後に塩酸水溶液で洗浄し、その洗浄溶液へ遊離したアルブミンをタンパク質として定量し、差分算出することで、各試料へ固定されたアルブミン量の定量を吸光度測定により定量した。

#### 4. 研究成果

乾式密度計による空孔体積について、チタンマイクロ粒子サイズと熱可塑性樹脂の混合比による理論的目標値32~50%に対し、焼成試験片35.9% (n = 19) であり、ほぼ推測通りの孔率で作成を確認できた(図1)。また、実体顕微鏡像およびSEM像観察からも、チタンマイクロ粒子同士の無数の焼成ネックが確認出来、粒子の集合体が理想的なマイクロポーラス体として一体化出来ていることが確認出来た。チタン粒子間に生じる空孔に関しても、設計時点での値の範囲内に多くが当てはまることから、本法はマイクロ粒子空孔サイズや空孔体積の調整について適切な手法であることが確認できた。

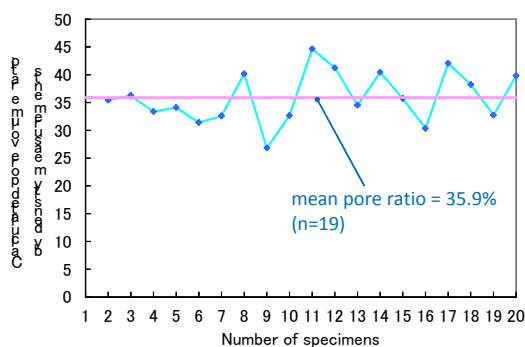


図1 乾式密度計による空孔体積評価

機械的性質の評価においては、対照群としてバルクTi材を用いたが、こちらは予想通りにバルク材よりも低い圧縮強さおよび曲げ強さを示し、多孔質体としたために機械的性質が低下したことがわかった。しかしそれらの結果はによるウシ皮質骨における文献値(Head WC他, 1985)とほぼ同等であり、本法での試験片では圧縮性試験および曲げ強さ試験共に、生体骨組織と同程度の強度を示すことが確認出来た。

試験片上への繊維芽細胞播種の3週間後、試験片表面および切断をおこなった後に固定・脱水・オスミウムコーティングをおこな

い、SEM観察をおこなった。図1に観察像を示す。試験片表面およびマイクロ粒子間空孔には多くの細胞が広がり、一部コラーゲン様塊も確認出来た。切断像においては内部でも多くのコラーゲン様塊が確認出来、マイクロポーラス化の狙いであるところの細胞の空孔内への侵入と接着が充分におこなわれていることが確認出来た。

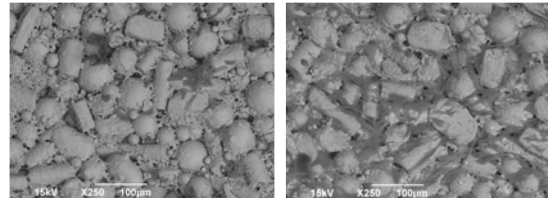


図2 NIH3T3細胞播種後3週でのチタンマイクロポーラス表面  
(左) 試料表面 (右) 試料断面

ラット脂肪層および筋層への埋入試験より、8週目までに十分な結合組織の侵食が確認できた。また、どちらも2週での短期埋入試験片において周囲結合組織の侵入が確認できたことから、マイクロポーラス体としての試験片内部への侵食に関しての有効性を示す結果であった。また、筋層への埋入については一部試験片で毛細血管の侵入が確認できた。

ウサギ血管内への埋入試験についてはTiバルク材埋入の対照群の術後経過が芳しくなかったため、短期にて犠牲死させた。そのため、本研究期間内においてはTiマイクロポーラス体の試験群結果と比較評価が出来ない結果となったが、試験群においては孔内への十分な結合組織様の侵食を確認出来たため、今後の評価への足がかりとすることが出来た。

Tiマイクロポーラス体への水酸化処理をおこなった試料について、適切な乾燥処理をおこなった。その後のSEM像観察により、Ti(OH)膜の乾燥後亀裂であると思われる剥離様表面を一部マイクロ粒子表面で確認できた。また、試験片へ固定したアルブミンの塩酸中への遊離測定により、対照群となる未処理バルクTi試験片と比較して、水酸化処理バルクTi試験片、未処理Tiマイクロポーラス試験片、水酸化処理Tiマイクロポーラス試験片の順に塩酸水溶液中への遊離アルブミン量が減少していることが確認出来た。試験片体積当たりの固定化アルブミン量は未処理に対して2倍程度の固定量となることが

確認出来た(図3)。この結果は本法のようなマイクロポーラス体においては、バルク材と比した際の表面積の増大、という利点を十分に活かし、また表面修飾法の有効性を示す結果でもあった。これらは今後のマイクロポーラス体の幅広い用途での応用性を示唆する結果であった。

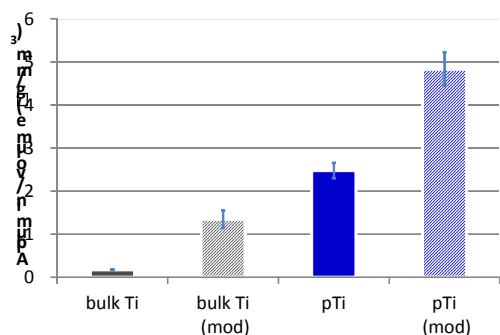


図3 単位体積当たりでのアルブミン固定量  
 bulkTi: Ti バルク材, bulk Ti(mod): 水酸化処理バルク Ti, pTi: Ti マイクロポーラス,  
 pTi(mod): 水酸化処理 Ti マイクロポーラス

図4に本課題により作製出来た最小寸法および最大寸法のカニューレ様円筒管を示す。本課題においては最終的な応用方法としてバルク Ti 円筒管への焼結による表面修飾を目標としているが、Ti マイクロポーラス体のみによる円筒管についても作製限界により作製の可能性を模索した。最小寸法試験片はφ2.5mm x 高さ6mm、厚み0.2mm、また最大寸法試験片はφ12mm x 高さ12mm、厚み1.5mmであった。外径10mm程度までの円筒管であれば、十分に作製および焼成が可能であることがわかった。そのため、術式や生体内留置の観点から、カニューレ型部品に剛性が必要になるような用途において、また従来心疾患外科手術に多く用いられてきたテフロン性人工血管のような、孔質性材料の代替においては、本法のような剛性があり、なおかつ多孔質形態を示す材料は有用であると考えられる。また、本法はオーダーメイド的に、用途に応じた形状や孔質性状にも対応可能であり、マイクロポーラス体による円筒管の応用について幅広い応用用途にも対応可能であることを補足しておく。

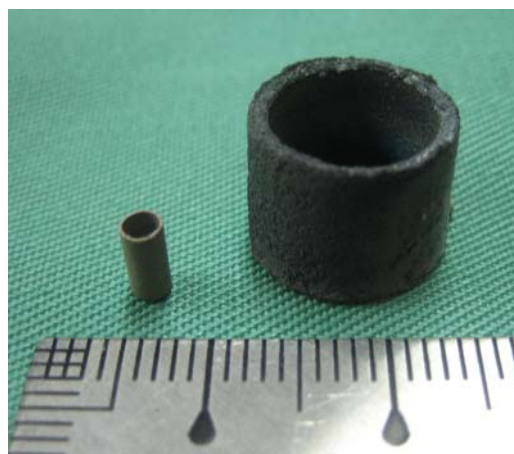


図4 本法にて作製できた最小および最大のカニューレ様円筒  
 (左) φ2.5mm x 高さ6mm、厚み0.2mm  
 (右) φ12mm x 高さ12mm、厚み1.5mm

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

① 関根一光、金属粉末を用いた微細ポーラス表面の作成によるオーダーメイド加工可能な Biolized 血液接触表面の作成、第50回日本人工臓器学会大会、2012年11月23日、福岡国際会議場 (福岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関根 一光 (SEKINE KAZUMITSU)

徳島大学・大学院

ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 50447182