

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750162

研究課題名(和文)チタン性マイクロポーラスとチタニアゲル化表面改質による複合型scaffold

研究課題名(英文)Development of hybrid-scafflod by titanium micro-porous structures and modified titaniumu gel surfaces

研究代表者

関根 一光 (SEKINE, Kazumitsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：50447182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：チタン材を基材とした任意形状で作成可能なマイクロポーラス構造と、チタン材のチタニアゲル化とタンパク製剤固定化処理による、複合性チタンscaffoldの作成と検討をおこなった。

ポーラス構造の構造学的な優位性を確認するため、繊維芽細胞侵入性、小型動物への埋込による結合組織侵入性に関する引き抜き試験をおこなった。またチタニアゲル化について、過酸化水素水への浸漬による水酸化化処理とタンパク製剤塗布後のイソシアネート処理によるタンパク製剤固定化手法を確立し、水酸化およびタンパク固定に関する面分析および細胞生着性により評価した。以上の両手法を複合的な足場材料として応用するための有益な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The main theme of this project was the development of hybrid titanium scaffold, with the customizing process of micro-porous structure and the surface modification of titanium-gel and amino acid fixation.

To show the advantage of porous structures, we have studied the cell compatibility tests with fibroblast cell, and the pull-out study against the connective tissue by animal experiments. About the titanium-gel's specifications study, we've arranged adequate acidifications and the amino acid fixative protocol, and then evaluated by the spectroscopy and in vitro cell adhesion studies. Those results indicated the possibility and usefulness of these structural and chemical modified applications for the scaffold devices.

研究分野：人間医工学

キーワード：スキャフォールド 多孔性材料 表面改質 生体親和性

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湍みが起こり易く、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。

我々はこれまで、硬組織と親和性の高い Ti による硬組織用ポーラス体でのオーダーメイド治療を目的に進められてきた。硬組織については Ti そのもののオッセオインテグレーション効果が高く、多孔質表面のみならず他の表面修飾法は骨 - 金属間での機械的嵌合と凹凸面内部への骨成長に利点が多いことが機械的にも生物学的にも確認することができた。これらの背景を活かし、数十 μm サイズの金属粒子を用いた多孔質体の作成が出来ることが確認できたため、本課題における血液接触表面としての修飾技術への派生に至った。

これまでの検討では細胞の侵入と組織化を狙う血管内皮前駆細胞や赤血球のサイズおよび毛細血管塞栓の起因となる微小血栓のサイズを基に、多孔質表面の厚み 0.2mm、孔径 15~30 μm 、孔率 30%を目標仕様として、約 40 μm の微小金属粒子を用いた直径 3mm、厚み 0.2 mm でのミニチュア円筒形状が作成できる段階までに至った。

2. 研究の目的

本課題では、自己内膜の誘導形成を狙った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、血液の湍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“微小血栓の取り込み”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。

具体的な手法としては、金属微粒子の焼結体単体、及び同種金属板(or 管)表面への焼結性の優劣や必要となるポーラス仕様(孔径・孔率など)が作成可能かどうか、についても明らかにする。また、ポーラス体の有効性については、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小血管新生の確認を目標に各試料を評価する。さらに in vivo 試験として、平板試料を小動物の皮下脂肪層及び筋層へ植え込み、一定期間後の引き抜き試験によりマイクロポーラス構造体中への結合組織侵入性を評価する。

3. 研究の方法

[材料および方法]

チタン微粒子からなるマイクロポーラス構造体に関する材料および方法を(1)、またチタン材のチタニアゲル化とタンパク製剤固定化処理に関する材料および方法を(2)として以下に述べる。

(1)マイクロチタン微粒子(大阪チタニウムテクノロジー, TILOP150)を平均粒径約 180 μm となるよう超音波ふるい機により分粒し、歯科用熱可塑性樹脂(GC)との混合比 9:1として約 45 $^{\circ}\text{C}$ で加熱し、各評価に応じた形状で作成した。これを真空加熱炉において Ar ガス置換下で 1,100 $^{\circ}\text{C}$ で焼成し、チタン製マイクロポーラス試料を得た。

直径 10mm \times 厚み 2 mm の円盤状マイクロポーラス試料を作成し、EOG 滅菌後に細胞播種用の試料とした。細胞株にはマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1、およびマウス繊維芽細胞様細胞 NIH3T3 を用いた。細胞浮遊液として調整後に 5×10^4 個/試料をウェルプレート中で播種し、隔日での培地交換をおこないながら 1 週間および 2 週間の培養をおこなった。培養後の試料は生顕用固定およびコーティングをおこなった後に電子顕微鏡(JCM5700, 日本電子)での観察をおこなった。

10mm \times 10 mm \times 厚み 2mm の平板状マイクロポーラス試料を作成し、対照群とする同寸法のチタン材円盤と共に EOG 滅菌後に、ラット皮下脂肪層および腹部筋層ポケットに埋込み、1 週間および 2 週間生育した。期間経過後に麻酔において、ロードセルを用いた引き抜き試験をおこなった。

(2)任意形状のチタン材試料を 15 mL/片の過酸化水素水に浸漬し、60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温環境で 48 時間保持した。超純水での超音波洗浄後に風乾した後、0.5 mg/L に調整した酸性 Type-I コラーゲン溶液(KOKEN)を過酸化水素水処

理群および未処理群の各試料に 200 μ L を滴下し、風乾させた。H2O2 処理群の試料は 3 mL/片の 5% トリレンジイソシアネート-ベンゼン溶液に浸漬し、60 $^{\circ}$ C 恒温環境で 3 時間保持することで滴下したコラーゲンの固定を試みた。冷却後に Benzene 溶液および超純水で洗浄し、風乾させた。これを OH-CoI 群とした。

以下 ~ の各評価において、研磨のみの Control 群、過酸化水素水処理群 (OH 群)、未処理試料へのコラーゲン溶液塗布群 (CoI 群)、および OH-CoI 群とした。

10 mm \times 10 mm \times 厚み 2 mm の純チタン片の評価対象表面を #400 湿式研磨し、上記手法により各試料群とし、蒸留水により洗浄後に乾燥した。各試料表面への蒸留水滴の滴下 30 秒後の接触角測定による親水性評価をおこなった。

10 mm \times 10 mm \times 厚み 2 mm の純チタン片の評価対象表面を #400 湿式研磨し、上記手法により各試料群とし、蒸留水により洗浄後に乾燥した。各試料の表面性状を赤外分光測定 (FT-IR IR Prestige21, 島津) により評価した。

バルクのチタン棒より直径 8 mm \times 厚み 2 mm に切り出した各試料を、上記手法により各試料群とした。蒸留水で洗浄後、各試料を塩酸により 30 分浸漬し、浸漬液中に遊離したコラーゲン量のタンパク質での換算として色素呈色法による分光測定により定量した。

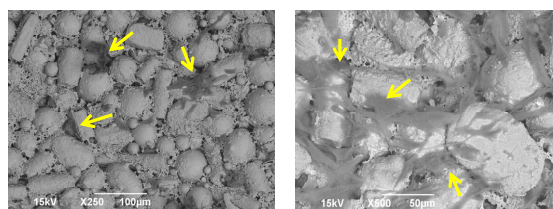
10 mm \times 10 mm \times 厚み 2 mm の純チタン片の評価対象表面を #400 湿式研磨し、上記手法により各試料群とした。各試料を緩衝液で複数回洗浄後に、試料上にマウス繊維芽細胞様細胞 NIH3T3 およびマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3 を 5×10^4 個/試料となるようにウェルプレート中で試料表面に播種し、24 および 48 時間後に緩衝液で洗浄し、細胞内脱水素酵素の呈色法により生細胞数定量した。またファロイジンによる F-actin の蛍光染色および DAPI による核の蛍光染色をおこない、蛍光顕微鏡 (TE2000U, Nikon) による生細胞数確認と F-actin 伸展性の確認と評価をおこなった。

4. 研究成果

(1) のチタン製マイクロポラス構造体に関する評価結果について、以下に結果を示す。

図 1 にチタンマイクロポラス試料へ NIH3T3 を播種し、2 週間培養後の生顕固定した試料断面の電子顕微鏡像を示す。繊維芽細胞が多く見られること、また繊維芽細胞由来と推測するコラーゲンマトリックスが多く局在することからも、ポラス構造体の表面に播種した細胞が構造体内部へ十分に侵入し、脱離せずに組織化へ繋がる確かな生着性を示すことが確認できた。同様に骨芽細胞でも構造体内への十分な細胞侵入性を確認した。

チタン製マイクロポラス試料のラットへの埋入後、1 週間後および 2 週間後に麻



(a) (b)
図 1 チタンマイクロポラス構造体への NIH3T3 細胞播種後 2 週間での SEM 像
 (a) 弱拡大像 (b) 強拡大像

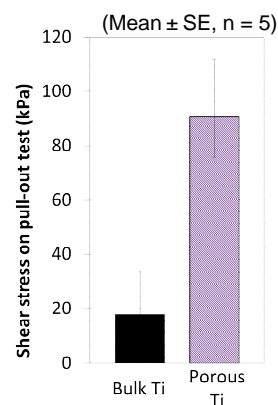
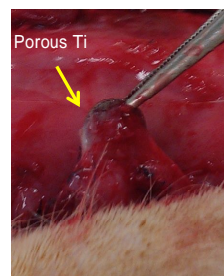


図 2 ラットへのチタンマイクロポラス体埋入 1 週間後の引き抜き性試験の様子と結果

酔下で腹部筋層からの引き抜き性試験をおこなったところ、1 週間後では対照群で 19 \pm 10 kPa、マイクロポラス群で 91 \pm 12 kPa であった (図 2)。また 2 週間後ではそれぞれ 29 \pm 14 kPa, 241 \pm 28 kPa であった。1 週間後でも 4 倍強の強度を示したが、これは埋入後早期からマイクロポラス構造へ細胞が十分に侵入し、また組織化することでこのような結果が得られたと考察する。この結果は のマイクロポラス構造への細胞侵入性の結果を裏付ける結果であった。なお、脂肪層への埋入試料については 1 週間および 2 週間では測定可能な癒合が確認できなかったが、脂肪層中に存在する血管内皮前駆細胞による微細血管などの創生を狙うことを考慮し、埋入期間や (2) に示す表面処理による癒合性強化なども含めて今後の検討課題とした。

(2) のチタニアゲル化とタンパク製剤固定化処理について、以下に結果を示す。

測定結果を表 1 に示す。親水性度としては、上位から OH 群 > CoI 群 > OH-CoI 群 > Control 群となった。均質に研磨されたバルクのチタン材は、過酸化水素水処理により劇的に親水性が向上したが、コラーゲンの塗布もしくは固定化により親水性は低下した。ただし、対照群と比べれば親水性は向上しており、チタニアゲル化とタンパク製剤の固定は親水性向上において有効であることが確認できた。

表 1 各種の化学的処理をおこなったチタン材表面の液滴接触角による親水性評価結果

	Control	OH	Col	OH-Col
Contact angle (mean±SD) n = 5	77.2 ±1.1	17.7 ±3.7	40.0 ±5.9	53.3 ±0.81

FTIR での分光分析結果より、バルク材では認めなかった $1,645\text{ cm}^{-1}$ 付近における $\text{C}=\text{O}$ 伸展の amide I ピーク、および $1,535\text{ cm}^{-1}$ 付近における $\text{H}-\text{N}-\text{C}=\text{O}$ の amide II ピークはタンパク質に起因すると思われるが、OH-Col 群で確認できた(図 3)。よって、水酸化処理後のタンパク製剤塗布、そしてイソシアネート処理によるウレタン化固定が確かにチタン材上にされていると推測できる。

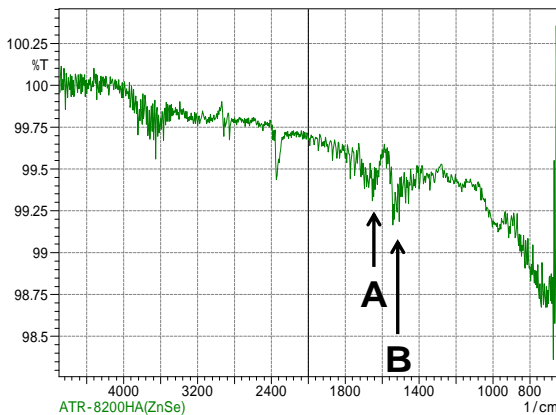


図 3 FTIR による OH-Col 群の分光分析結果 (A:amide-I, B:amide-II)

Col 群および OH-Col 群での比較結果を図 4 に示す。塩酸中に遊離したコラーゲンはタンパク質として定量してそれぞれ $249 \pm 25\ \mu\text{g}$ 、 $17.4 \pm 1.2\ \mu\text{g}$ であった。OH-Col 群では 15 倍弱の Type-I コラーゲンが固定されたと推定されることから、OH-Col 群では水酸化処理およびイソシアネート処理を経てアミノ基をウレタン化することで、優位にコラーゲンを固定化できていることが確認できた。

図 5 に 5×10^4 cell で NIH3T3 細胞を播種し、24 時間後および 48 時間後に試料上に残存生存した細胞濃度の酵素比色法による結果を Control 群に比して示す。OH-Col 群では優位に細胞濃度が増加することを確認した。以上の結果は MC3T3 でも、細胞数には差があるものの、同様な傾向を示した。

DAPI による蛍光染色後の蛍光像観察およびその画像解析より、DAPI による核数計測から換算される生細胞数 (n=10 画像) は上記の比色法による結果と同様の結果を得た。このことから、試料全域および局所的な観察結果の両結果での整合性を得た。また、フロロイジンによる蛍光染色像については、Col 群お

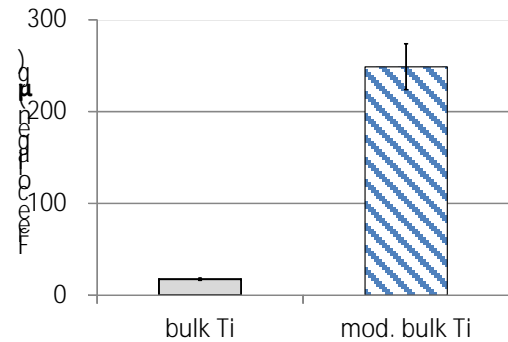


図 4 塩酸中への遊離タンパク質の定量結果

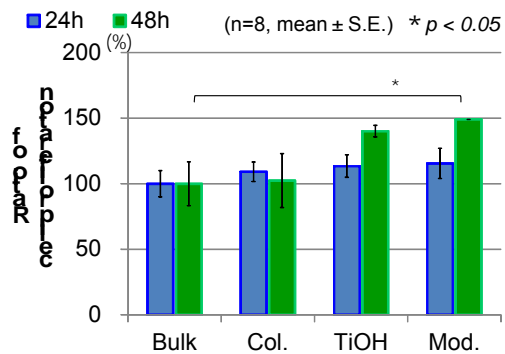


図 5 NIH3T3 細胞の比色法による生細胞数測定結果

よび OH-Col 群では、Control 群と比べて Actin 繊維の広がり定性的な差が出ていることを認めたが、統計的にはいずれも有意差は無かった。ただし、アクチン繊維の走方向に顕著な変化を認めたため、初期接着性に関しては今後も評価検討していく予定である。

チタンマイクロ粒子の焼結体からなるマイクロポラス試料は、本評価におけるような軟組織を対象とした足場材料として応用するにあたり、その構造の有意な特徴を見出すことが出来た。またマイクロポラス構造は、体液などの循環液や細胞等に接触する面積がバルク材と比較して大きく拡大するため、その接触面を細胞親和性の高い表面性状とすることは、両方の技術が相乗的に足場効果を向上させることに繋がる。その点に着目して検討をおこなったチタン基材へのコラーゲン固定法は、優位な細胞賦活効果を示した。以上の結果は“構造学的足場効果”と“化学的足場効果”の複合的な足場材料の応用の可能性を示すものであった。また対象とする組織や臓器、術式などに応じたタンパク製剤と組み合わせることにより、軟組織や硬組織といった対象を問わないチタン製インプラントデバイスへの、その幅広い応用性についての可能性を示すものであった。

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 1 件)

(1) 関根 一光, 細胞賦活効果を狙ったチタン表面処理法, 四国歯学会雑誌(査読あり), 26:49-54, 2014

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) 遠見 蓉子, 内藤 禎人, 神保 良, 神野 洋平, 関根 一光, 浜田 賢一, 三次元多孔性チタン織物の機械的特性と骨伝導能, 第 4 回日本バイオマテリアル学会中四国シンポジウム, 2016.2.16, 徳島大学(徳島県・徳島市)

(2) 関根 一光, 斐 志英, 内藤 禎人, 市川 哲雄, 浜田 賢一, 早期内膜新生を狙ったチタン多孔質スキャフォールドの作成と評価, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015.11.10, 京都テルサ(京都府・京都市)

(3) 遠見 蓉子, 内藤 禎人, 神保 良, 関根 一光, 浜田 賢一, 骨欠損部に充填する三次元多孔性チタン織物の開発, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015.11.10, 京都テルサ(京都府・京都市)

(4) Sekine K, Bae JY, Naito Y, Tetsuo Ichikawa T, Hamada K, Development of micro-porous Titanium scaffold for promoting the early neointimal growth., Materials Today Asia 2014, 2014.12.9, Kowloon(Hong Kong)

(5) 関根 一光, 斐 志英, 内藤 禎人, 市川 哲雄, 浜田 賢一, チタン微粒子焼結と表面改質による血管内皮誘導を目的としたチタン多孔質体の開発, 第 52 回日本人工臓器学会大会, 2014.10.19, 京王プラザホテル札幌(北海道・札幌市)

(6) 関根 一光, 内藤 禎人, 市川 哲雄, 斐 志英, 浜田 賢一, Development and evaluation of micro-porous titanium scaffold for promoting neointimal growth as the blood contacting surface, 第 53 回日本生体医工学会大会, 2014.6.25, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

(7) 関根 一光, 徳島大学歯学部でのバイオマテリアル開発研究, 第 2 回日本バイオマテリアル学会中四国シンポジウム, 2014.2.28, 岡山大学(岡山県岡山市)

(8) Sekine K, Bae JY, Naito Y, Ichikawa T, Hamada K, Fundamental studies of micro-porous titanium scaffold for obtaining the neointimal formation., Joint congress of 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and 5th Congress of the International Federation for Artificial Organs, 2013.9.27, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(9) Sekine K, Naito Y, Hamada K, Fundamental studies and development of micro-porous titanium blood contacting surface obtaining the neointimal

formation., 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2013.7.6, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 一光 (SEKINE, Kazumitsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号: 50447182