

機関番号：34310
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21760087
 研究課題名（和文） 角膜移植用羊膜の信頼性確保と生体薄膜材料の機械的特性評価手法の確立
 研究課題名（英文） Establishment of evaluation methods for mechanical properties of thin bio materials to investigate amniotic membrane
 研究代表者
 田中 和人 (TANAKA KAZUTO)
 同志社大学・生命医科学部・准教授
 研究者番号：50303855

研究成果の概要（和文）：胎児を包む羊膜は、再生医療における細胞培養の基質として使用されるなど、その有用性は医療の様々な分野で注目されている。しかしながら、生体薄膜材料の機械的特性評価手法が確立されていないこともあり、その機械的特性は十分には明らかになっていない。そこで、本研究では、羊膜を対象にして、生体薄膜材料の機械的特性評価手法を確立し、その手法を用いて羊膜の機械的特性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The amniotic membrane has attracted attention as a surgical biomaterial for regenerative medicine in various medical fields. Because the evaluation method for mechanical properties of thin bio materials are not standardized, however, its mechanical properties have not been revealed yet. In this study, evaluation methods for mechanical properties of thin bio materials have been established and the mechanical properties of amniotic membrane are investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械材料・材料力学

キーワード：羊膜、生体薄膜、引張試験、試験片形状、ダンベル状試験片、チャッキング方法、非接触ひずみ測定、画像相関法

1. 研究開始当初の背景

胎児を包む羊膜は3層の構造を持つ膜であり、羊膜には血管成分がないために拒絶反応が起こりにくいとされている。そのため、羊膜は再生医療における細胞培養の基質として使用されるなど、その有用性は医療の様々な分野で注目されている。特に、角膜再建のための細胞の基質として適正であることから、様々な接眼面病を治療するに有効な機能を有しているとして注目を集めている。羊膜

は帝王切開の時点で同意を得た患者から入手し、滅菌処理した後に使用される。しかし、生体由来の材料である限り、細菌の存在の危険性を完全に排除することはできない。また、羊膜の主成分であるコラーゲン繊維を用いたコラーゲンシートも開発されているが、コラーゲンシートは羊膜に比べて剛性が高いため、角膜の再生医療には適していない。そのため、羊膜のように剛性が低く強度の高い材料の開発が待たれているが、羊膜自体の

機械的特性も十分には明らかになっていないのが現状であった。もちろん、これまでも機械的特性評価を実施した研究はあるが、試験手法には解決すべき課題が多い。例えば、これまでに使用されている試験片形状は、帯状であるため、チャック部の応力集中により破断していると予想され、引張強度を正確に求められていない可能性がある。また、試験片の試験機への固定においても、羊膜を直接クリップで挟み込んで試験を行っている場合には、引張試験の途中で羊膜が抜けてしまうといった問題が発生しているはずであるが、文献などの報告には詳細は記載されておらず、材料特性の正確な把握のためには、試験片の作製方法も含めた生体薄膜材料の機械的特性評価手法の確立が求められている。また、機械的特性評価において重要であるひずみ計測については、試験片が微小かつ薄膜であるため、測定自体行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、羊膜を対象として、生体薄膜材料の機械的特性評価に適した試験片の形状や試験片作製方法、さらには試験片チャッキング方法を提案し、機械的特性評価手法を確立するとともに、この手法を用いて羊膜の機械的特性評価を実施した。

具体的には、試験片形状としては、帯状試験片とダンベル状試験片の2種類を用い、試験機への取り付け方法としては、挟み治具とピン治具の2種類を用いて引張試験を行い、これらの試験条件が、引張特性に及ぼす影響を検討し、羊膜の引張試験に適した手法を提案する。ひずみ計測については、画像相関法によりひずみ計測を行うことが可能な非接触材料変形測定システムを羊膜に適用するために、ひずみ測定に必要なまだら模様を試験片に塗布する塗料の種類を検討し、塗料が羊膜のひずみ測定に及ぼす影響について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 試験材料、試験片形状、試験片作製方法

本研究は、再生医療支援機構から所定の手続きを経て提供された研究用ヒト羊膜組織を用いて、同志社大学倫理委員会で承認された研究計画に従って行った。羊膜は約 30×30mm の大きさのシートに切り分け、-80℃の条件で保存した。本研究では、羊膜上皮細胞を取り除いた羊膜(AM(-))を用いた。また、医師によって透明度で判別された透明度の優れた A と透明度に劣る B の羊膜があり、これらを AM(-)A、AM(-)B と称し、試験に供した。羊膜は試験前に常温下にて解凍し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて洗浄した。試験片は図1に示すような帯状試験片とダンベル状試験片の2種類の形状に、抜き型を用

いて切り出した。帯状試験片の寸法は 5×20mm とし、ダンベル状試験片の寸法は、幅 5mm、長さ 20mm、中央平行部の幅は 3mm、平行部の長さは 4mm とした。

試験片の作製手順としては、ポリエステル製のタブを作製し、シアノアクリレート系の接着剤でタブへ固定した試験片と、接着剤とカーボンテープを用いて固定を行った試験片の2種類を用いた。

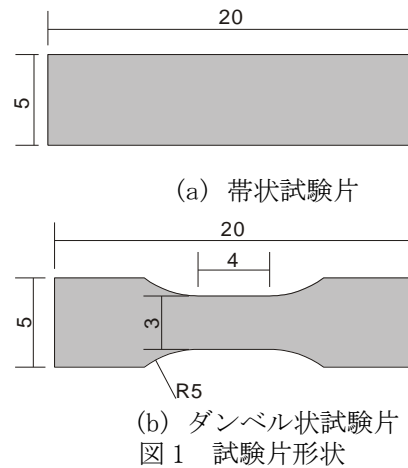
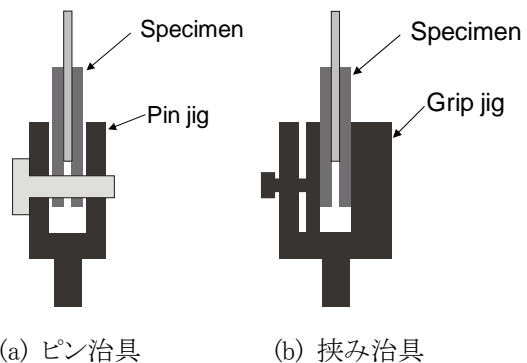


図1 試験片形状

(2) 試験片チャッキング方法と試験条件

試験機片のチャッキングには、図2に示すようなピン治具と挟み治具を用いた。試験は、卓上万能試験機(Ez-graph, 島津製作所製)を用いて行い、容量 100N のロードセルにより荷重を計測した。引張速度は 0.05mm/sec とし、初期荷重 0.01N を与えた状態から試験を行った。試験中は羊膜が乾燥しないように、試験片全体をアクリル容器で覆い、水蒸気を充満させた。



(a) ピン治具

(b) 挟み治具

図2 試験片チャッキング方法

(3) ひずみ測定システム

羊膜の引張時のひずみ計測には、非接触 3 次元変形解析システム (ARAMIS, GOM 製) を用いた。本システムは、画像相関法を用いて試験片のひずみ分布を解析しており、試験片表面には、まだら模様を塗布する必要がある。通常、有機溶剤の含まれた塗料を使用するが、本研究で対象とする羊膜の剛性に影響する可能性があるため、有機溶剤の含まれた塗料と炭酸カルシウムと親水性の低いインクを混ぜた塗料の 2 種類を用いて評価した。なお、試験片には、エアースプレーを用いて塗料を塗布した。

4. 研究成果

(1) 最適試験方法

带状試験片とダンベル状試験片の破断時の様子を図 3 に示す。带状試験片ではタブの先端近傍からき裂が入り始めている。これは、接着剤で固定した部分の応力集中により、き裂が発生したものと考えられる。一方、図 3(b) に示すようにダンベル状試験片では試験片中央部のゲージ平行部で破断した。つまり、引張試験に用いる試験片形状としては、ダンベル状試験片が適していることが分かる。

挟み治具を用いて、接着剤でタブへ固定した試験片と、接着剤とカーボンテープを用いて固定を行った試験片の 2 種類に対して行った引張試験の荷重-変位曲線を図 4 に示す。接着剤のみを用いて固定した試験片では、試験途中にすべりが生じ破断まで至らなかった。これは、接着剤のみではタブと羊膜の間で生じたせん断力に耐えられないことが考えられる。接着剤とカーボンテープを用いた試験片では、すべりが生じることなく破断まで引張試験を継続することが出来た。これより、羊膜をタブに固定する方法として、接着剤とカーボンテープの両方を用いて接着する方法が適していることが分かる。

ピン治具と挟み治具を用いて行った引張試験の荷重-変位曲線を図 5 に示す。ピン治具を用いた試験片では引張試験の途中で接着部にすべりが発生し、羊膜がタブから剥がれた。一方、挟み治具を用いた試験片では、試験片中央のゲージ平行部で破断するまで引張試験を継続することが出来た。挟み治具では、薄膜である試験片をタブを介しているものの、直接グリップするために把持部での破断が懸念されたが、本試験片の範囲では、挟み治具が試験片の取り付け方法として適していることが分かる。

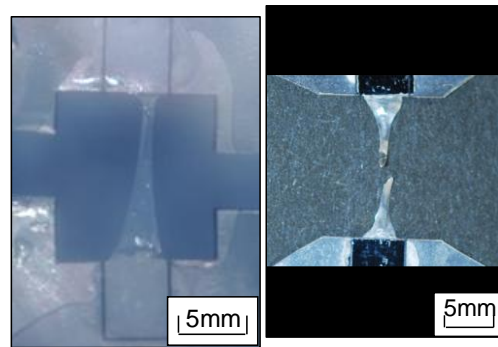
(2) ひずみ測定に適したまだら模様塗布方法

羊膜の表面に有機溶剤の含まれた塗料と、炭酸カルシウムと親水性の低いインクを混ぜた塗料の 2 種類を塗布した試験片の断面を、走査型電子顕微鏡で観察した結果を図 6 に示

す。有機溶剤の含まれた塗料では羊膜の上に薄膜を形成しているのに対して、炭酸カルシウムと親水性の低いインクを混ぜた塗料では、羊膜の上に炭酸カルシウムが付着している様子が観察できた。また、引張試験中の試験片表面の観察結果を図 7 に示す。有機溶剤の含まれた塗料では羊膜の変形に追従できず、塗料の膜が破壊しているのが観察された。これより、画像相関法に用いる塗料としては、炭酸カルシウムとインクを混ぜた塗料が適していることが分かる。

(3) 羊膜の機械的特性評価

上記のように確立した引張試験方法を用いて AM(-)A, AM(-)B の両試験片に対して行った引張試験から求めた引張強度と破断ひずみを図 8 に示す。AM(-)A の引張強度は $5.55 \pm 2.41 \text{MPa}$ 、破断ひずみは $22.3 \pm 3.95\%$ 、AM(-)B の引張強度は $5.03 \pm 1.54 \text{MPa}$ 、破断ひずみは $19.2 \pm 5.11\%$ となり、両者に有意差は見られず、羊膜の透明性と機械的特性に関連は見られなかった。



(a) 带状試験片 (b) ダンベル状試験片
図 3 破断時の試験片の様子

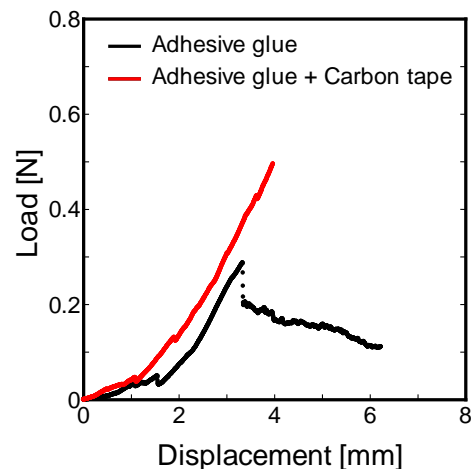


図 4 引張試験における荷重-変位曲線 (試験片のタブへの接着方法による相違)

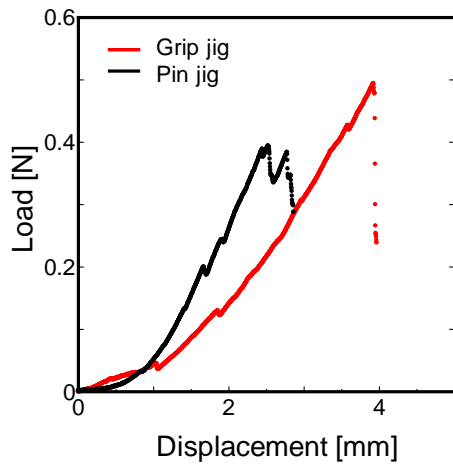
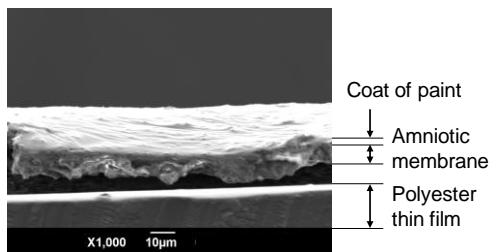
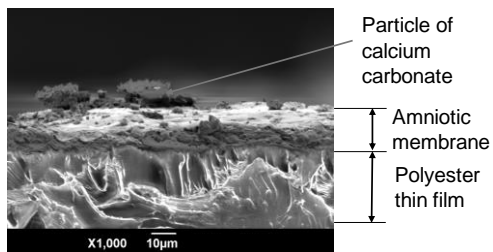


図5 引張試験における荷重-変位曲線（試験片チャッキング方法による相違）

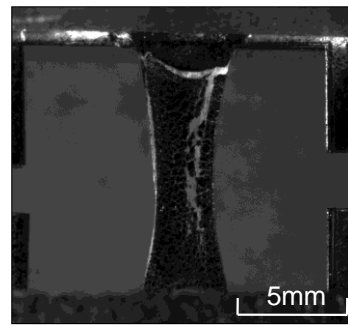


(a) 有機溶剤の含まれた塗料

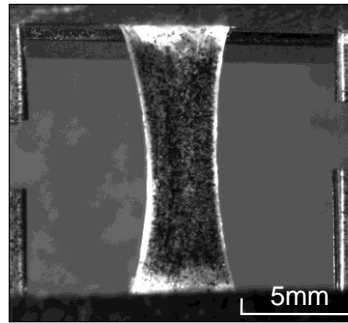


(b) 炭酸カルシウムと親水性の低いインクを混ぜた塗料

図6 まだら模様を塗布した試験片の断面の電子顕微鏡観察結果

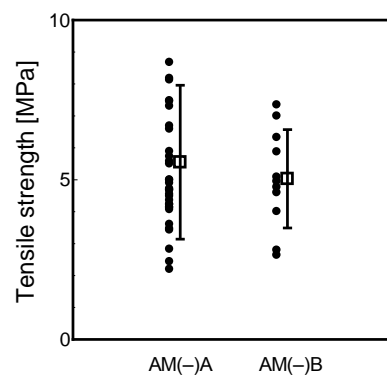


(a) 有機溶剤の含まれた塗料

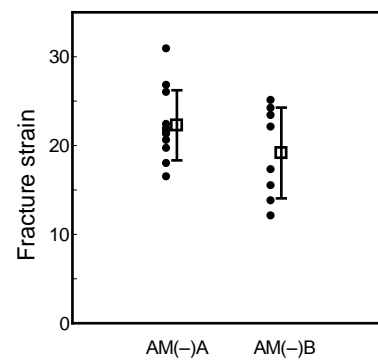


(b) 炭酸カルシウムと親水性の低いインクを混ぜた塗料

図7 引張試験中の試験片表面の様子



(a) 引張強度



(b) 破断ひずみ

図8 引張試験結果

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 K. Tanaka, T. Nagayama, T. Katayama & N. Koizumi, Tensile properties of amniotic membrane, WIT Transactions on the Built Environment, 査読有, Vol.112, 2010, 197-206

[学会発表] (計 2 件)

① 永山貴士, 田中和人, 片山傳生, 小泉範子, 細胞の培養基質に用いる羊膜の機械的特性評価, 日本材料学会第 59 期通常総会・学術講演会, 2010 年 5 月 22 日, 北海道大学工学部(札幌市)

② 永山貴士, 田中和人, 片山傳生, 小泉範子, 引張試験における羊膜の非接触ひずみ測定, 社団法人日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会, 2011 年 1 月 8 日, 熊本大学(熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 和人 (TANAKA KAZUTO)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号: 50303855