
基礎系教育講演

細胞賦活効果を狙ったチタン表面処理法

関根 一光

キーワード：titanium materials, functional materials, surface modification, neointima

Development of Titanium Surface Treatment for Promoting Cell-activation

Kazumitsu SEKINE

Abstract : Thromboembolism events around the cannula and cardiac periventricular were oftenly reported after implanting ventricular assist devices. To assist preventing these problems, we have studied the surface structural modification, based on the titanium (Ti) micro-porous structure, the chemical modification, and the hydro-oxidization treatment. The purpose of this study is the fabrication and evaluation of their fundamental modification that would be the factor of the neointimal growth *in vivo*.

Titanium powder was mixed with melted thermoplastic wax as the plastic compound method, and with calcium phosphate paste as the ceramics compound method. From each paste, adequate specimens were manufactured after sintering. Specimens were measured the porosity and the pore size, and were also evaluated in several mechanical properties. Compared to two methods for manufacturing the Ti micro-porous materials, the plastic compounds showed the fine characteristics in mechanical properties. But for applying as the scaffold for neointimal and blood compatible materials, these specimens would be better for promoting the blood vessel neointima.

For the chemical modification of Ti materials surface, bulk Ti specimens were operated with the hydroxide treatment for modification. For promoting the cell growth, type I collagen were put on as the amino group rich container, and fixed with isocyanate for deriving the urethane bonding on the surface. After these treatments, specimens were measured their fixed collagen. Specimens were also observed by SEM, and analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy. Fibroblast cells were also harvested on specimens' surface for studying the performances as the scaffold. Our hydroxide treatment showed the favorable performance for the stability of hydroxyl gel surface and modified collagen, and also indicated as the fine scaffold.

Our results indicated the possibility of application for perivascular position and blood contacting situation, by promoting the cell-activation depending on micro-porous structure and modified titanium surface. Especially by choosing and trying the adequate cell activating factor concerning among the multiple organs and implantable devices, these treatment would be widely applicable for them.

はじめに

近年、チタンを基材とした生体内埋込材料や埋込型デバイスは歯科のみに限らず、多くの医療領域において使用されていることは既知であるが、チタンそのものの性質を生体反応に有効に活用した最たる事例は、Osseointegrationによる硬組織再建術と言える¹⁻³⁾。チタンの臨床での応用はOsseointegrationに頼る面だけではなく、表面の不動態化による強い耐食性から安定性の求められる多くの用途で用いられており、軟組織や血液との接触表面部材にも幅広く応用されている^{4,5)}。我々はこれまで、チタンの性質について、生体内環境における水素や微量通電などによる腐食化現象及び脆性化現象などについて研究を進めると共に⁶⁻⁸⁾、上述のようなチタンの高い生体親和性という利点を促進する基材の検討などをおこなってきた。今回、“血液接触表面”として、また血管内での“細胞賦活化表面”として、チタン製人工心臓用大口径人工血管の開発を目的とした要素研究について紹介する。

本邦では2011年より、補助型人工心臓が保険適用のもとで使用が開始された。そもそも1997年には臓器移植法が制定され、重症心疾患患者への治療方法の最適解である臓器移植を本邦でおこなえることで、臓器移植対象者への治療効果だけでなく、他国の臓器移植ネットワークでのrecipientとしての長期待機や海外渡航等の経済的負担なども改善されるものと考えられていた。しかし実数を見てみると、心臓移植例は1997年から2012年において156件（心肺同時移植も含む）であり、臓器移植先進国である米国と比較すると総人口の差を考慮しても非常に少ない件数である^{9,10)}。このような背景から、従来までは臓器移植までのつなぎ“Bridge to transplantation”とされてきた人工心臓の需要は、近年の補助型人工心臓の性能や耐久性の向上も相まって、長期生存を期待する治療選択肢“destination therapy”として期待されている^{11,12)}。しかし、destination therapyとして人工物、人工材料である補助人工心臓の埋込を考慮した際に、重要なのが生体反応である。前述の通り、チタンの生体親和性はチタンの不動態化によるものが多く、異物反応という生体反応においては良好と言える。その一方、それら生体反応を長期的観点で見た際、Osseointegrationのような良好な生体と人工物の結合関係とは異なり、補助人工心臓のような循環器系デバイスを想定でチタン表面に介在してくるのは、血液を含む体液やその血球成分またはそれらの複合体である。これらは血液接触表面での血栓形成因子となり、結果的には大小血管の塞栓や肥大化血栓の形成を引き起こすため、destination therapy 対応を謳う補助人工心臓においては致命的な問題である。事例でも、本邦企業初の補助人工心臓であるEVA HEART（株）サンメディカル技術研究所においても術後フォローによる血栓塞栓トラブルから脱血管の改良と医療機器承認の再申請がおこなわれた経緯

がある。

1. 血液と大口径人工血管材料の関係と現状

血液の血栓形成や血液凝固反応は正常な血液と正常な血管内皮表層では起こりにくく、血液性疾患や循環器系疾患、もしくは異物のような外乱を起因としてそのリスクは高まる。補助人工心臓などの脱血管や送血管も人工材料という異物であり、血栓形成や血液凝固の誘導因子となるため、何かしらの抗血液凝固対策および抗血栓対策の必要性が生じる。

補助人工心臓を含む循環器系外科術において、管理や処理が容易な方法の一つに抗血液凝固療法が挙げられる。抗血液凝固療法は患者への術中ヘパリン注射や術後ワーファリン投与などで対応し、血液凝固時間などの管理により任意の抗血液凝固対策がおこなえる。しかし、抗血液凝固療法の不安要素として脳や皮下末梢などにおける出血リスクの増大がある。補助人工心臓適用患者などの場合には血液性トラブルを抱えていることも多く、血管老化や動脈硬化などのいわゆる“血管年齢”が高く、出血リスクは更に高まる¹³⁾。

血液接触表面での血栓形成は接触表面に対する異物反応、また血流流れ場における剪断応力と表面張力バランス、さらには血液脂質異常などにより血栓形成リスクは増大する。そのため、血液流れ場における人工材料の使用においては抗血栓性表面の作成は不可欠である。現在の臨床と同様に、その対策手段としてはディスプレイナブルなカニューレやチューブなど高分子材料に広く用いられるヘパリンコーティングがある^{14,15)}。その血栓形成の抑制効果から人工材料表面に対して効果が高いが、ヘパリンコーティング層は有限であり、血液流れ場に曝され続けることによってやがてその性能を失う。それに対し、材料表層へのタンパク付着抑制効果を備えるコーティング法としてMPC (2-Methacryloylolethyl Phosphoryl Choline) ポリマーコーティングが挙げられる。MPCポリマーは生体膜に類似したリン脂質極性基膜を作成することで、タンパク質や脂質の接着を抑制する¹⁶⁻¹⁹⁾。性質上、有機材料には非常に友好であり、ヘパリンコーティング同様にディスプレイナブルな医療デバイスに広く普及してきている^{20,21)}。この技術も血液接触表面修飾として非常に優れた面を見せるが、MPCポリマーの長期有効性については、現状の応用用途はディスプレイナブル材料が大半であるため、destination therapy を目的とした長期埋込デバイスへの応用については未知な部分が多い。

2. 細胞賦活化基材としてのチタン多孔体の作成

以上のような現状を踏まえ、細胞賦活化による生体内膜の創生を目的として、任意に作成した“チタン多孔体表面”に“チタニアゲル化と細胞賦活化因子の固定処理”，つまりは基材の物理的改質と化学的改質による機能性材料表面について検討した（図1）。現在、金

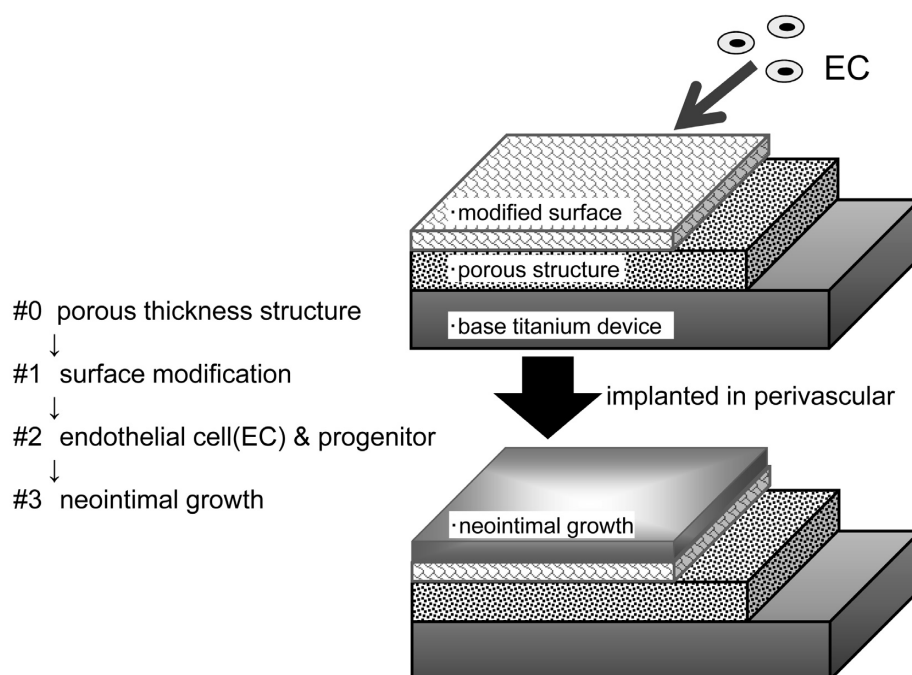


図1 多孔体および化学的細胞賦活効果による内皮化の模式図

属製送血脱血管として臨床でも用いられているものの多くは、微少血栓の堆積による大血栓の形成の抑制を目的に表面を鏡面加工している。例えば使用部位近傍に生体軟組織がある場合には軟組織細胞誘導による生体被覆が起こるが、チタン多孔体のような粗造な表面では微薄なフィブリン膜形成が表面積の増大によって強固になるため、鏡面加工のような滑沢表面よりも被覆が進行し易く、その結合力も強固となる。このような効果はとりわけ、血流下のような剪断応力場において重要となる。この体液由来膜組織は繊維素血栓様組織となり、ほど近い周囲の宿主動脈壁からの内皮細胞や繊維芽細胞の侵入を容易にする^{22, 23)}。このような現象は、人工血管のような多孔質構造体の開発においても実証されている。また、作成する多孔体の孔径を操作することにより、初期埋込時における wedge thrombus をトラップしながら内皮被覆するような用途を視野に入れている。

チタン多孔体の表面作成については、チタン微粒子粉体をカーボンなどの鋳型へ充填した真空プラズマ放電焼結（SPS：spark plasma sintering）法²⁴⁾、PMMA やワックスなどの熱可塑性樹脂との混合体の焼結による樹脂混合法などがある^{25, 26)}。基材とするチタン微粒子粉体は球形にアトマイズされたものを用い、またそれらを六方細密充填構造として格子内充填することを想定し、必要平均孔径、必要孔率を基準としたチタン微粒子粉の平均径および充填率を求めた。必要平均孔径は血管内皮細胞や繊維芽細胞の侵入を想定して 50 μm ~ 100 μm に設定し、また必要孔率は最薄で 0.5 mm の多孔体表面の作成を視野に入れた際の作成手技と強度の関係から 30% に

設定した。本研究では焼成におけるコストの点から樹脂混合法と、新たに新型リン酸三カルシウム（TCP：tricalcium phosphate, α -TCP）ペーストを結合材としたセラミクス混合法にて評価試料の作成を試みた。なお、使用したチタン微粒子粉体の平均粒径は 120 μm である。

樹脂混合法は Naito ら^{25, 26)} の手法を参考に、適切な加熱により融解した歯科用インレーワックスをチタン微粒子粉体と適切な比率で混合し、流動性を保った状態でモールドへ充填することで、冷却後に硬化体として取り出せる。これを 380 $^{\circ}\text{C}$ で 1.5 時間加熱して余剰なワックス体を焼却し、1,100 $^{\circ}\text{C}$ に設定した真空焼成炉にてアルゴン置換環境で 2 時間焼成することでチタン多孔体を得た。

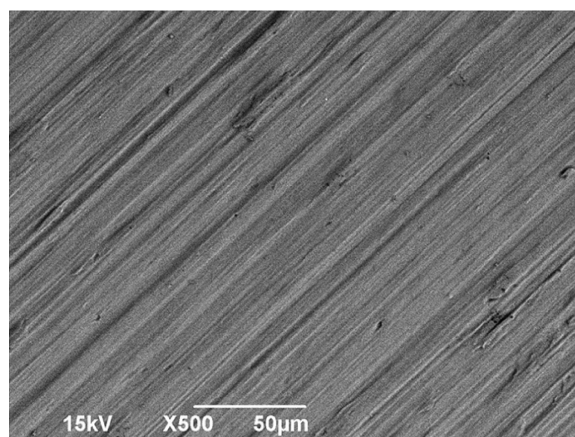
セラミクス混合法では、平均粒径 2 μm に粉碎した α -TCP を専用練和液で練和し、同じくチタン微粒子との適切比率での混合体としてモールドへ充填した。結合材とした TCP 成分をアパタイト転換させるためにこれを 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% の低温転換法環境下にて 10 日間保持し、その後同じく 1,100 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間焼成した。焼成後試料は 1N HCl 水溶液中に浸漬し TCP 結合材より転換したアパタイトを溶解し、チタン多孔体を得た。

2 種類のチタン多孔体の諸性質については、ほぼ同様なチタン微粒子間での焼成による necking を電子顕微鏡（SEM）像から確認し、また乾式密度計および顕微鏡面分析の結果からは樹脂混合法、セラミクス混合法の平均孔率は 32 ~ 36% の範囲で作成出来ており、目標値に近似した作成が可能であることがわかった。また、同じく面分析より、平均孔率はおおよそ 50 μm ~ 90 μm の範囲

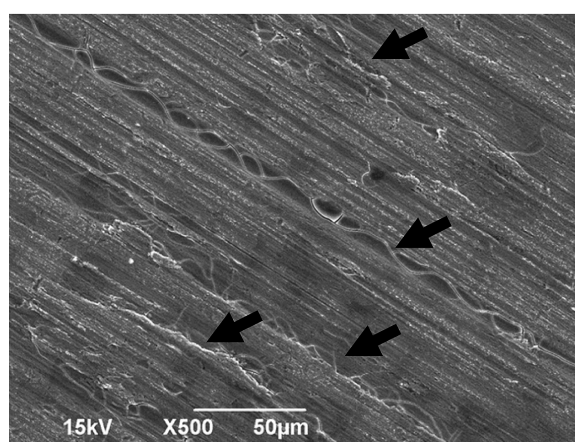
で作成出来ていることも確認した。圧縮強度については樹脂混合法のほうが約10%高い結果となった。これは、セラミクス混合法ではアパタイト溶解に用いたHClによるチタンの水素脆性類似の影響であると考えている。これらは予想される結果であったが、チタン表面にあえてアパタイト層を残すことにより、新規生体内埋込材料としての応用とその効果を検討しており、今後も継続していく予定である。

3. チタン表面処理による細胞賦活効果の試み

チタンの生体適合性については不動態化による不活性寄りの性質から、表面での腐食耐性が向上している。しかし、生体内という体液潤沢な環境においては表面粗さ性状に依存して脂質やタンパク質などの付着が起り、特に血管内では、これらを起因とした塞栓症や末梢血管梗塞が destination therapy の妨げとなっている。これらはチタン表面の鏡面加工でも解決出来ておらず、新たな機能性材料の応用が望まれる。我々の機能性材料表面としての試みは、チタン表面を水酸基リッチなチタニアゲルとした後、水酸基と結合が容易なアミノ基を付与し、これをさらにカルボキシル基を介すことで安定なウレタン結合を備えた、血液接触表面の作成をおこなう。本報告においては、チタン材を適切な過酸化水素処理によりチタニアゲル化し、タイプIコラーゲン溶液を細胞誘導因子となるタンパク質製剤として塗布し、さらにイソシアネート処理によりウレタン化をおこなった。過酸化水素処理、およびコラーゲン付与とウレタン化をおこなったチタン試料のSEM像を図2に示す。過酸化水素処理後のSEMに関わる脱水処理により、試料表面に多くのクラックが確認出来た。これらはOH基潤沢な表面の脱水処理後に非常に類似している。また、試料表面のX線光電子分光分析結果の波形分解により、Ti-OHと帰属されるピークも確認出来たことから、チタン表面へのチタニアゲル層生成が証明された。また、洗浄後ウレタン化表面のSEM像より、イソシアネート処理試料では試料表面への広いコラーゲン固定が確認できた。また、細胞誘導因子としたコラーゲン塗布の後に緩衝液にて洗浄ののち、固定されたコラーゲン量を遊離脱離定量したところ、未処理チタンと比較して処理試料では10倍以上のコラーゲンを固定出来ていることが確認出来たため、イソシアネートまでの処理を経た試料では十分なコラーゲン修飾がおこなえることが確認出来た。さらに、未処理チタン、および各処理過程を踏んだチタン試料の各試料上でのヒト繊維芽細胞 WI38 の1週間培養においては、未処理チタンと全ての処理をおこなったチタンでは約3倍の細胞密度となり、各処理による細胞毒性などを考慮しても細胞賦活効果が有意であったことが確認出来る結果であった(図3)。



(a)



(b)

図2 乾燥および固定化処理後のTi試料SEM像

(a) 未処理Ti

(b) 水酸化表面処理Ti

矢印で示す部分に典型的な乾燥後の水酸化物亀裂が確認できる。

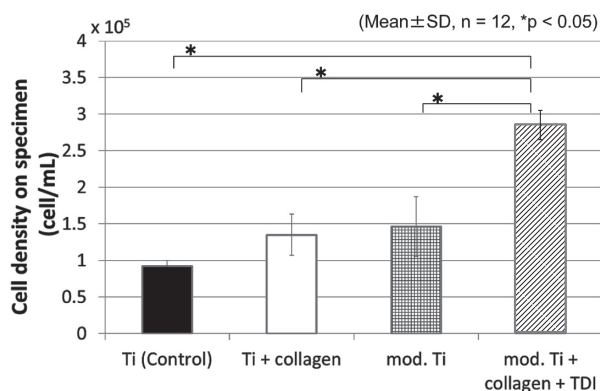


図3 各試料上へのヒト繊維芽細胞 WI38 播種後、1週間培養後の細胞濃度

Collagen: type-Iコラーゲン塗布, mod.Ti: 水酸化表面処理, TDI: イソシアネート表面処理

4. チタン多孔体への表面処理法の応用と効果

以上のチタン多孔体, および過酸化水素処理から誘導因子修飾を経たイソシアネート表面処理の両機能を複合的要素として試料作成をおこなった。バルクチタンへの表面処理の有無, またチタン多孔体への表面処理の有無の計4種類の試料について, コラーゲン修飾処理と洗浄後の固定コラーゲン量を試料体積あたりで換算した結果を図4に示す。試料構造上, チタン多孔体は試料表面積が広いいため, バルクチタンと比較して高い値を示す一方, バルクチタンでも表面処理によって固定されるコラーゲン量が増大していることがわかった。チタン多孔体の表面処理試料で最も高い値を示し, チタン多孔体および表面処理による固定化が非常に有効であることが示される結果となった。以上の結果より, 細胞賦活化を目的としたチタン多孔体とチタニアゲル化表面処理法は複合的に用いることで相乗効果を示し, チタン製血液接触表面材料としての応用に十分な可能性を示すと考えている。現在, 小型動物の大血管内への埋込実験をおこなっており, 今後の成果報告の場において報告したい。

また, 本研究の応用用途, とりわけチタニアゲル化表面処理法は血液接触表面だけでなく, 例えば人工透析患者のブラッドアクセス皮膚端子, 胃瘻患者など皮膚貫通型デバイスの皮膚ボタンなど, 結合組織による早期癒着が望まれるチタン製材料にも幅広く応用できる可能性がある。歯科領域においても歯科用インプラントのフィクスチャーや顎顔面用の各プレートなどにおいて, 早期の骨結合を期待した誘導因子の付与なども応用範囲として考えられる。チタンの医療分野での応用は多岐におよぶため, 今後も幅広い領域での応用を視野に入れた検討をおこなっていく。

参考文献

- 1) Branemark PI: Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 50, 399-410 (1983)
- 2) Davies JE: Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11, 391-401 (1998)
- 3) Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parisis NA, Desiris AK and Lazzara RJ: Osseointegration of Osseotite and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 15, 54-61 (2004)
- 4) Nose Y: Blood contacting surface of titanium: is it the metal or the water? *Artif Organs* 22, 1003-1004 (1999)
- 5) Chen J, Chen C, Chen Z, Chen J, Li Q and Huang N: Collagen/heparin coating on titanium surface improves the biocompatibility of titanium applied as a blood-contacting biomaterial. *J Biomed Mater Res A* 95, 341-349 (2010)
- 6) Yokoyama K, Kaneko K, Miyamoto Y, Asaoka K, Sakai J and Nagumo M: Fracture associated with hydrogen

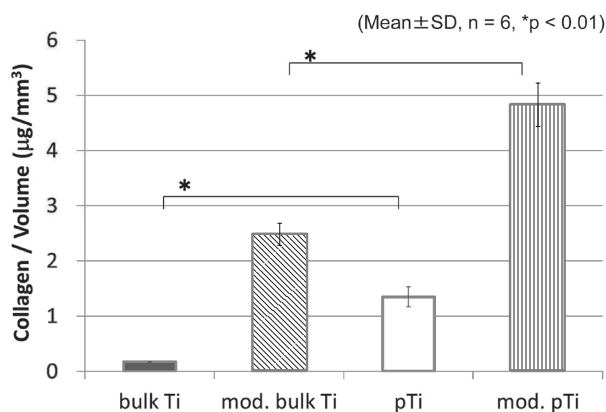


図4 遊離法による固定コラーゲン量測定
mod.: 表面改質処理, pTi: Ti 多孔体

absorption of sustained tensile-loaded titanium in acid and neutral fluoride solutions. *J Biomed Mater Res A* 68, 150-158 (2003)

- 7) Ogawa T, Yokoyama K, Asaoka K and Sakai J: Hydrogen absorption behavior of beta titanium alloy in acid fluoride solutions. *Biomaterials* 25, 2419-2425 (2004)
- 8) Yokoyama K, Ogawa T, Asaoka K and Sakai J: Hydrogen absorption of titanium and nickel-titanium alloys during long-term immersion in neutral fluoride solution. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 78, 204-210 (2006)
- 9) 公益社団法人日本臓器移植ネットワーク <http://www.jotnw.or.jp/>
- 10) United network for organ sharing <http://www.unos.org/>
- 11) Brancaccio G, Filippelli S, Michielon G, Iacobelli R, Alfieri S, Gandolfo F, Pongiglione G, Albanese S, Perri G, Parisi F, Carotti A and Amodio A: Ventricular assist devices as a bridge to heart transplantation or as destination therapy in pediatric patients. *Transplant Proc* 44, 2007-2012 (2012)
- 12) Tsiouris A, Brewer RJ, Borgi J, Neme H, Paone G and Morgan JA: Continuous-flow left ventricular assist device implantation as a bridge to transplantation or destination therapy: racial disparities in outcomes. *J Heart Lung Transplant* 32, 299-304 (2013)
- 13) Hata M, Hayasaka M, Sezai A, Niino T, Yoda M, Unosawa S, Taoka M, Osaka S, Furukawa N, Kimura H and Minami K: Proton pump inhibitors may increase the risk of delayed bleeding complications after open heart surgery if used concomitantly with warfarin. *Thorac Cardiovasc Surg* 56, 274-277 (2008)
- 14) Barbucci R and Magnani A: Physicochemical characterization and coating of polyurethane with a new heparin-adsorbing material. *Biomaterials* 10, 429-431 (1989)

- 15) Nakayama Y, Yamaoka A, Nemoto Y, Alexey B and Uchida K: Thermoresponsive heparin bioconjugate as novel aqueous antithrombogenic coating material. *Bioconjug Chem* 22, 193-199 (2011)
- 16) Kihara S, Yamazaki K, Litwak KN, Litwak P, Kameneva MV, Ushiyama H, Tokuno T, Borzelleca DC, Umezu M, Tomioka J, Tagusari O, Akimoto T, Koyanagi H, Kurosawa H, Kormos RL and Griffith BP: In vivo evaluation of a MPC polymer coated continuous flow left ventricular assist system. *Artif Organs* 27: 188-192 (2003).
- 17) Hirota K, Murakami K, Nemoto K and Miyake Y: Coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) co-polymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 248, 37-45 (2005)
- 18) Katakura O, Morimoto N, Iwasaki Y, Akiyoshi K and Kasugai S: Evaluation of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer-coated dressing on surgical wounds. *J Med Dent Sci* 52, 115-121 (2005)
- 19) Sawada S, Iwasaki Y, Nakabayashi N and Ishihara K: Stress response of adherent cells on a polymer blend surface composed of a segmented polyurethane and MPC copolymers. *J Biomed Mater Res A* 79, 476-484 (2006)
- 20) Iwasaki Y, Nakabayashi N and Ishihara K : In vitro and ex vivo blood compatibility study of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) copolymer-coated hemodialysis hollow fibers. *J Artif Organs* 6, 260-266 (2003).
- 21) Wang N, Trunfio-Sfarghiu AM, Portinha D, Descartes S, Fleury E, Berthier Y and Rieu JP: Nanomechanical and tribological characterization of the MPC phospholipid polymer photografted onto rough polyethylene implants. *Colloids Surf B Biointerfaces* 108, 285-294 (2013)
- 22) Recum AF, Shannon CE, Cannon CE, Long KJ, Kooten TG and Meyle J: Surface roughness, porosity, and texture as modifiers of cellular adhesion. *Tissue Eng* 2, 241-253 (1996)
- 23) Chen J, Mwenifumbo S, Langhammer C, McGovern JP, Li M, Beye A and Soboyejo WO: Cell/surface interactions and adhesion on Ti-6Al-4V: effects of surface texture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82, 360-373 (2007)
- 24) Sakamoto Y, Asaoka K, Kon M, Matsubara T and Yoshida K: Chemical surface modification of high-strength porous Ti compacts by spark plasma sintering. *Biomed Mater Eng* 16, 83-91 (2006)
- 25) 内藤禎人：モールドレスで成形と焼成が可能なポラスチタンの開発. 四国歯学会雑誌 21, 213-226 (2008)
- 26) Naito Y, Bae J, Tomotake Y, Hamada K, Asaoka K and Ichikawa T: Formability and mechanical properties of porous titanium produced by a moldless process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101, 1090-1094 (2013)