

2019年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

「骨と軟組織の接合を誘導する生体内分解性純マグネシウムインプラント材の開発」

[関西大学・准教授] [柿木 佐知朗]

[山口県産業技術センター・コーディネーター] [浜本 俊一]

1. はじめに

高齢者の運動器症候群は、常時大きな荷重の加わる関節や腰椎の加齢に伴う摩耗や変形を原因とする場合が多く、身体的・経済的負担を最小限に抑えるための新たな低侵襲外科的治療が望まれる。QOLの早期回復には一時的埋入デバイス、特に抜去手術を要しない生体内分解性デバイスによる再建治療が好ましい。変形性関節症など運動器疾患の再建治療に用いられる骨・靭帯固定具や人工関節などのデバイスには硬組織(骨)のみならず軟組織(靭帯や腱)との親和性やこれらを接合する特性が要求される。さらに、完治に至るまでの間、患部組織の機能を代替できる生理的・力学的な機能をもつ基材を選択しなければならない。生体内分解性ポリマーや動物由来タンパク質は軟組織再生スキャホールドのように加わる荷重の小さいデバイスの基材には有用だが、強度や靭性が乏しく硬組織再生用スキャホールドには適さない。これまでに、リン酸カルシウムなどの生体吸収性セラミクスやポリ乳酸などの生体内分解性高分子でなる骨再生用多孔質スキャホールドが数多く報告されているが、いずれも組織再生性と力学的特性の更なる向上が課題である。

マグネシウム(Mg)およびその合金は、生体内で分解し、かつ高強度・高靭性の金属材料であることから、生体内分解性医療デバイス基材として世界的に注目されている。Mgの分解によって生じるMgイオンは、プラスミノゲン活性化抑制因子の抑制による抗血液凝固作用や、フリーラジカルスカベンジャーとしての抗炎症作用、一酸化窒素産生促進による血管拡張・血管新生促進作用を有することから、医療デバイスの埋入が惹起する生体防御反応の早期鎮静化にも有効と期待されている。しかし、純Mgは体液に接触すると早期に腐食分解されるため、アルミニウムや希土類との合金化による分解の遅延が検討されているが、その効果は充分ない上に添加金属の毒性も懸念されている。また、純Mgおよびその合金は、軟組織/硬組織(骨)再生を強く誘導するような性質を有していない。

そこで本研究では、骨再生治療用整形外科デバイスへの応用を志向し、コンドロイチン硫酸を被覆した純Mg多孔質体の開発をその機能評価を試みた。

2. 概要

本研究の特徴は、純Mgワイヤで形成される多孔質体に軟組織および骨との親和性が高いグリコサミングルカンの一種であるコンドロイチン硫酸(CS)を安定に被覆することで、軟組織と骨との接合性を持つ骨再生治療用整形外科デバイスの創出を目指す点である。

純Mgは加工性に優れており、本研究開発に参加したジャパンファインスチール株式会社は、独自のワイヤ技術を駆使して様々な形状の純Mgワイヤ多孔質体(圧縮成形体)の開発に成功している(図1)。研究代表者らが開発したヒドロキシフェニル基の直接酸化を介した生体分子固定化反応を利用し(Bioconj. Chem., 26(2015)639、特許6041132)、純Mgワイヤ多孔質体にCSを被覆するための基盤技術を構築することが本研究の目的である。

本研究で用いた固定化反応は、ヒドロキシフェニル基を過酸化水素と遷移金属触媒を用いた穏和な条件下でキノンへ直接酸化し、その高い反応性を利用してバイオマテリアルに生体分子を固定化するというも



図1. 様々な形状の純Mgワイヤ多孔質体
(ジャパンファインスチール(株)提供)

純 Mg プレート(ジャパンファインスチール株式会社より提供)の両面を鏡面に研磨し、NaOH 水溶液(1 mol/l)に浸漬して75°Cで24時間静置した。このアルカリ処理後の純 Mg プレート表面をフーリエ変換赤外分光法(FTIR-ATR)で分析したところ、ヒドロキシル基由来の吸収が検出されたことから、Mg プレート表面に水酸化マグネシウムの不動態被膜が形成されていることが分かった。さらに、アルカリ処理後のMgプレート試料をCS-Tyr水溶液に浸漬させ、酸化剤の過酸化水素と触媒の塩化銅(II)を添加して50°Cで24時間振盪した。各工程の純 Mg プレート表面をX線光電子分光法(XPS)で分析したところ、CS-Tyr 反応後に基材由来のMg2pのピークは減弱し、CS-Tyr 由来のN1sのピークが検出されたことから、試料表面にCS-Tyrが被覆されたことが示唆された(図4)。

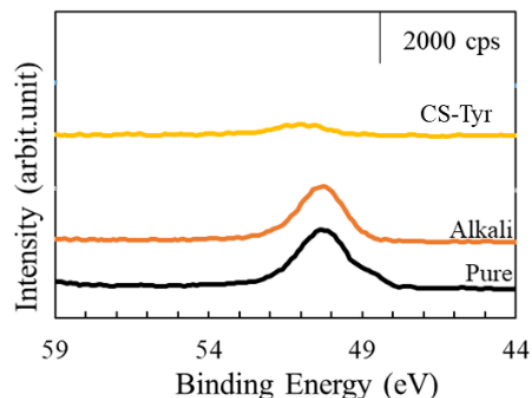


図4. 純 Mg プレート表面の XPS(Mg2p)

(3)CS-Tyr 複合体被覆純 Mg プレート基材の細胞培養用培地での分解性挙動の観察

未修飾、アルカリ処理および CS-Tyr 被覆それぞれの純 Mg プレート(5 mm×5 mm)を 0.5 mL の DMEM 培地(10%ウシ血清、抗生物質含有)に浸漬して37°Cで静置した。21時間後に観察したところ、未修飾およびアルカリ処理純 Mg プレート試料は部分的に腐食している様子が認められ、CS-Tyr 被覆は水素を伴って完全分解していた(図5)。すなわち、CS-Tyr を被覆することによって、腐食分解の遅延はおろか、その速度を早める結果となった。CS-Tyr 被覆後の純 Mg 試料表面を3次元レーザー顕微鏡で観察したところ、被覆反応前と比較して凹凸が顕著に大きくなっていった。また、CS-Tyr 被覆反応に用いた水溶液の pH が 4.9 と弱酸性であった。これらの結果から、CS-Tyr 被覆反応中に純 Mg プレート試料の腐食も拮抗していることが示唆された。最終的には、CS-Tyr 被覆反応時の溶液の pH をコントロールすることによって、この反応中の Mg 試料の腐食分解をある程度抑制することに成功し、その表面でヒト由来軟骨肉腫細胞の接着が促進されることを示唆する結果を得た。

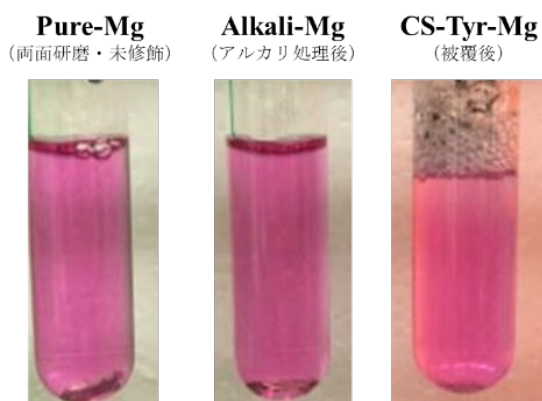


図5. 細胞培養用培地中での純 Mg プレートの腐食分解(21時間後)

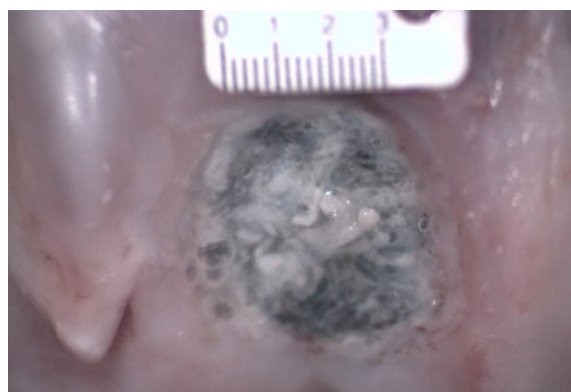


図6. ウサギ大腿骨に移植した純 Mg ワイヤ多孔質体(1か月後)

(4)純 Mg ワイヤ多孔質体(未被覆)のウサギ大腿骨への移植実験

最後に、純 Mg ワイヤ多孔質体(未修飾)をウサギ(日本白色種)の大腿骨に移植し、1か月後に外観を観察して周辺の軟・骨組織への影響を簡易的に評価した(図6)。その結果、純 Mg ワイヤ多孔質体は21日後も形状を維持し、周辺骨組織に顕著な悪影響を及ぼさないことが分かった。病的にも評価したとこ

ろ、純 Mg ワイヤ多孔質体の一部が分解し、その周囲には破骨細胞が浸潤している様子も観察された。しかし、多孔質体内部への組織の浸潤は認められず、何らかの方法で表面を機能化することの有用性を明確にできた。今後は、CS-Tyr 被覆純 Mg ワイヤ多孔質体の移植実験によって CS-Tyr 被覆効果を検証したい。

4. おわりに

本研究では、骨再生治療用整形外科デバイスへの応用を志向してコンドロイチン硫酸を被覆した純マグネシウム(Mg)多孔質体の開発を目指して種々検討を実施した。当初の予定をすべて達成するには至らなかったものの、CS-Tyr 複合体の合成に成功し、純 Mg プレート試料の CS-Tyr 複合体の被覆、さらに純 Mg ワイヤ多孔質体(未修飾)のウサギ大腿骨移植実験の実施まで進捗し、今後の研究で取り組むべき課題を明確にできたことは大きな収穫であった。本研究の動物実験は、大阪医科大学にて承認を得て、同学整形外科教室・池田邦明先生と大槻周平先生に多大なご協力を頂いて実施した。両先生には深く御礼申し上げる。

5. 本研究の今後の計画

本研究の結果を踏まえて、今後は以下の項目に取り組む計画である。

- (1) CS-Tyr 複合体の収量の向上
- (2) CS-Tyr 被覆反応中の純 Mg 基材の分解を抑制できる条件の検討
- (3) CS-Tyr 被覆純 Mg ワイヤ多孔質体の軟・骨組織親和性と再生性の評価

これら一連の基礎評価で CS-Tyr 被覆純 Mg ワイヤ多孔質体の生理的機能が立証されれば、パートナー企業と共に前臨床試験なども視野に入れてさらなる評価を計画する。

6. その他

- (1) 出願特許(タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

該当なし

- (2) 投稿論文(タイトル・学会名等)

杉山みのり, 大谷奈央, 平野義明, 柿木佐知朗, コンドロイチン硫酸-チラミン複合体の合成と骨再生用スキャホールド表面修飾剤としての応用, 第 41 回日本バイオマテリアル学会大会(つくば, 2019 年 11 月 24-26 日):ポスター発表

- (3) 本研究会の参加企業・団体名

ジャパンファインスチール株式会社



競輪の補助事業

この事業は、競輪の補助を受けて実施しました。

<https://www.jka-cycle.jp/>