

分担研究報告書

システム設計：無機・有機複合体の設計及び合成

分担研究者 宮武 邦夫（国立循環器病センター・副院長）

研究要旨

グラフトの早期内皮細胞被覆を目的として、グラフト基材として用いられるポリエチレンテレフタレート（PET）繊維表面のナノアパタイトコーティングを行った。まず、共有結合を介してハイドロキシアパタイト（HAp）と PET 繊維を強固にコーティングさせるために、PET 繊維表面へのアルコキシシリル基含有ポリマーの導入を行い、その最適導入条件を検討した。アルコキシシリル基を導入した PET 表面に高分散性 HAp をコーティングすることで、ナノ HAp が PET 繊維上にほぼ単分散で結合した HAp/PET 複合繊維の調製に成功した。

A. 研究目的

市販のグラフトには組織親和性を高めるためコラーゲン/ゼラチンがコートされているが、近年、牛海綿状脳症（BSE）の発生により生物由来タンパク質の使用が懸念されている。そのため、人工物のみでの新規グラフト創出は生物学的安全性確保の上で大きな意味がある。

本研究の目的は、生体親和性の高いハイドロキシアパタイト（HAp）とグラフト基材を有機的に結合させた新規なグラフトの創出である。基材表面を HAp で修飾する方法として、生体模倣反応、プラズマプレー法、共沈法、交互浸漬法などがこれまでに提案されているが、これらの方法により得られる HAp は、生体中での分解・吸収性が高いアモルファス体である。我々が提起した新規な方法論は、まず生体内での分解性および吸収性の低い HAp 結晶（仮焼体）から成るナノ粒子を調製し、それを高分子基材表面上で複合化させることで無機ナノセラミック

ス/高分子界面複合体を構築するものである。内シャント不全の治療に用いるグラフト表面に HAp を強固にコーティングすることでグラフト表面に内皮細胞を早期に被覆でき、自己血管内シャントの長期維持が可能となる。

今回の検討では、HAp とグラフト基材とを有機的に結合させるために、グラフト基材である PET 繊維表面を前処理することで HAp と共有結合可能な部位を導入した。その際の最適導入条件について検討を行った。次に、高分散性 HAp 結晶を用いて、PET 繊維表面を HAp コーティングした HAp/PET 複合繊維の作製を試みた。

B. 研究方法

1. 試薬

基材である PET 繊維は NBC 株式会社から購入し、ソックスレー抽出による洗浄を行った後に用いた。PET 表面の前処理に用いた γ -methacryloxypropyl triethoxy-silane (MPTS) は信

越化学工業株式会社から提供されたものを使用した。その他の化学試薬は、ナカライテスク株式会社から購入した試薬特級品を使用した。

2. 高分散性ナノ HAp 結晶の調製

連続オイル相としてドデカン、非イオン性界面活性剤としてペンタエチレングリコールドデシルエーテルを用いた。室温で上記の界面活性剤 0.5 g を含有した連続オイル相 40 mL を調製した後、Ca(OH)₂ 水懸濁液 (2.5 M) を 10 mL 添加した。十分に攪拌後、水/オイル (W/O) 溶液に 1.5 M の KH₂PO₄ 水溶液を 10 mL 添加し、室温にて 24 時間反応させた。得られた反応物を遠心分離により分離・洗浄することにより、HAp 粒子を得た。Ca(OH)₂ を約 1.0 g 含む Ca(OH)₂ 飽和水溶液 600 mL に HAp 粒子 1.0 g を分散させ、40°C にて乾燥後、800°C にて 1 h 仮焼した。仮焼後に得られたものを純水中に添加し、pH が中性付近になるまで蒸留水で遠心洗浄を行い、60°C において乾燥を行った。比較として、Ca(OH)₂ を添加せずに同条件の仮焼を行った。

3. PET 繊維の前処理

まず、60°C の 0.2N の KOH 水溶液中において PET 繊維を 30 分間アルカリ処理することで、PET 表面にカルボキシレートおよび水酸基を導入した。アルカリ処理後の PET 繊維を三口フラスコ内に静置し、窒素を 30 分流すことでフラスコ内の酸素および水分を除去した。その後、MPTS を 10% 含むベンジルアルコールをフラスコ内に加え、反応容器内の温度が 80°C になった後に、重合開始剤として用いた過酸化水素を加えた。所定の時間重合を行い、エタノールによる洗浄を行った後に、70°C において乾燥を行った。MPTS の

PET 表面への導入の確認は重量法および X 線光電子分光分析 (XPS) を用いて行った。

4. PET 表面の HAp コーティング

まず、調製した HAp をエタノールに分散させ、その分散液中に前処理を行った PET 繊維を浸漬した。1 時間後、PET 繊維を取りだし、エタノールを用いて洗浄を行った後、減圧条件下 80°C において 1 時間、HAp 表面に存在する水酸基と PET 表面に導入したアルコキシシリル基の固相縮合反応を行った。反応後、PET 表面に結合していない HAp 粒子を除去するために、超音波洗浄機 (20 kHz; 35W) を用いて洗浄した。

C. 研究結果および考察

1. PET 繊維の前処理

まず、PET 表面の共有結合を介した HAp コーティングを行うために、PET 表面を前処理することでアルコキシシリル基の導入を試みた。このアルコキシシリル基は HAp 表面の水酸基と直接反応し、共有結合を形成することが知られている。HAp 表面にアルコキシシリル基を導入するために、PET 繊維存在下においてアルコキシシリル基を有するモノマーである MPTS のグラフト重合を行った。図 1 にはその際の重合時間と PET 繊維の重量増加率の関係を示した。重合時間の増加とともに PET 繊維の重量増加率は増加し、PET 表面に MPTS が導入されていることが示唆される。その重量増加率は重合時間 4 h で最大値を示し、その後重合時間を増加させても一定値であった。以後の実験では、重量増加率が最大値を示す重合時間 4 h で作製したものをを用いた。

次にこの前処理後の PET 表面に MPTS が導入

されていることを確認するために、XPS 測定を行った。XPS は深さ数十Åの表面測定が可能な元素分析法である。図2および表1に MPTS を用いた重合前後の PET 表面の XPS 測定結果を示した。重合前の未処理 PET 表面には Si 元素のピークがほとんど観察されていないが、重合後において MPTS のアルコキシシリル基中の Si 元素に由来するピークが観察された。このことから上記方法で前処理した PET 表面に、HAp と共有結合可能なアルコキシシリル基が導入できたことが確認できた。

2. PET 表面の HAp コーティング

図3には、MPTS で前処理した PET を用いて HAp コーティングした後の表面の SEM 写真を示した。ここで、MPTS による前処理を行っていない PET 繊維を用いた場合では、HAp 粒子を表面に吸着させた後、超音波で洗浄した際にほとんどすべての HAp 粒子が脱離していた。一方、MPTS で前処理した PET の場合、HAp 粒子が凝集無く単層にて表面に結合していることが観察された。このことから HAp と PET 繊維表面が強く相互作用し、強固に HAp コーティングできていることが確認できる。

ここで上記の結果は、融着防止剤を使用して調製した高分散性 HAp 粒子を用いて PET 繊維の複合化を行ったものである。融着防止剤を使用せずに調製した HAp 粒子を用いた場合では、複数の HAp 粒子が積層（凝集）した状態で PET 繊維表面に結合することから、高分散性 HAp を使用することで表面状態の制御が可能であることを示している。また、図3b 中の HAp 粒子はある程度粒子間距離が広い状態で結合したものである。その粒子間距離が PET 自体の物性およ

び細胞接着性に大きく影響を与えるものと予想されることから、この点を今後詳細に検討し、PET 繊維の機械的性質および細胞接着性の最適化を行う予定である。

D. 結論

グラフト基材として用いられる PET 繊維表面に生体親和性の高い HAp を強固にコーティングした新規な HAp/PET 複合繊維の作製に成功した。まず PET 繊維表面へのアルコキシシリル基含有ポリマーの導入を試み、その最適導入条件を確立した。アルコキシシリル基を導入した PET 表面に高分散性 HAp をコーティングすることで、ナノ HAp が PET 繊維上にほぼ単分散で結合した HAp/PET 複合繊維の調製に成功した。今回作製した新規なグラフト基材は人工物のみで作製したものであり、生物学的安全性に優れた新規グラフトとして高い価値がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Masuda, M. Okada, S. Yasuda, H. Kadono, R. Tanaka, K. Miyatake and T. Furuzono, "Improvement of cell adhesiveness of poly(ethylene terephthalate) by surface modification with hydroxyapatite nanocrystals through covalent bonding", J. Mater. Sci. Mater. Med., in contribution

2. 学会発表

1) 益田美和、古菌 勉「グラフト表面のハイドロキシアパタイト加工法の検討」第一回国循環ステントグラフト研究会、2004年11月2日

2) 益田美和、安田昌司、岡田正弘、田中良一、稲永 隆、宮武邦夫、古菌 勉「過酸化水素処理によるポリエステル繊維への焼成アパタイト複

合化と細胞接着性の検討」第 54 回高分子学会年次大会（パシフィコ横浜）2005 年 5 月 25 日～27

3) M. Masuda, M. Okada, S. Yasuda, H. Kadono, R. Tanaka, K. Miyatake and T. Furuzono,

“Improvement of cell adhesion property of poly(ethylene terephthalate) by surface modification with nano-sized hydroxyapatite crystals through covalent bonding” The 8th International Polymer Conference (IPC2005)、(福岡国際会議場) 2005 年 7 月 26～29 日

4) S. Yasuda, M. Okada, J. Tanaka, T. Furuzono

“A Novel Percutaneous Device Having Soft-Tissue Compatibility and Flexibility Fabricated from a Nano-Scaled Hydroxyapatite Crystals/Polymer Composite ” European Society for Biomaterials 19th European Conference on Biomaterials, University of Naples "Federico II" (Naples, Italy), 2005 年 9 月 11～15 日

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) (出願人) 国立循環器病センター総長他(発明人) 古菌 勉、宮武邦夫、田中良一、安田昌司、益田美和(発明の名称)「アパタイト複合化人工血管」、出願準備中

表1. 未処理 PET 繊維および γ -methacryloxypropyl triethoxy-silane (MPTS) を用いた前処理後 PET 繊維表面に存在する元素の割合 (X 線光電子分枝測定結果)

元素 (%)	C	O	Na	Si	Ca
未処理 PET 繊維	69.5	29.5	0.12	0.64	0.15
MPTS 導入 PET 繊維	60.7	29.5	-	9.76	-

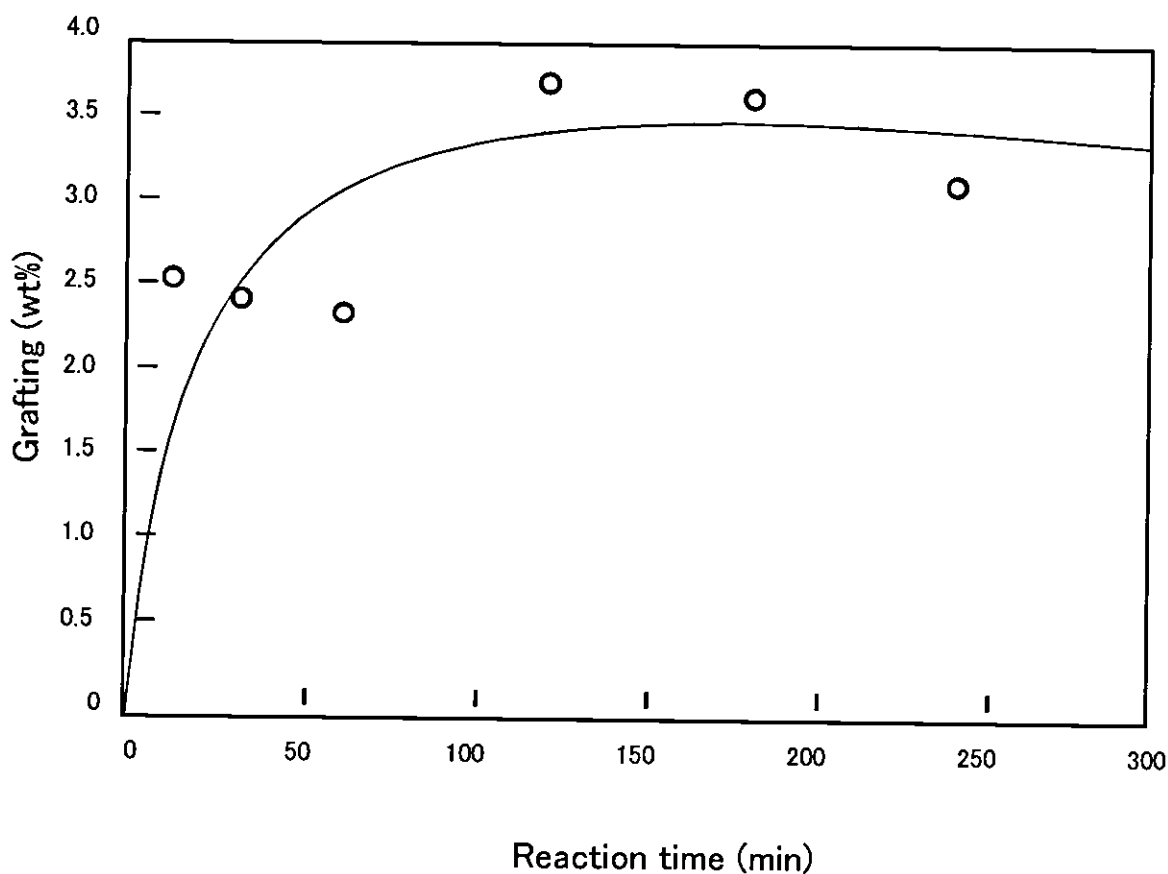


図1. γ -methacryloxypropyl triethoxy-silane (MPTS) の重合時間と PET 繊維の重量増加率の関係

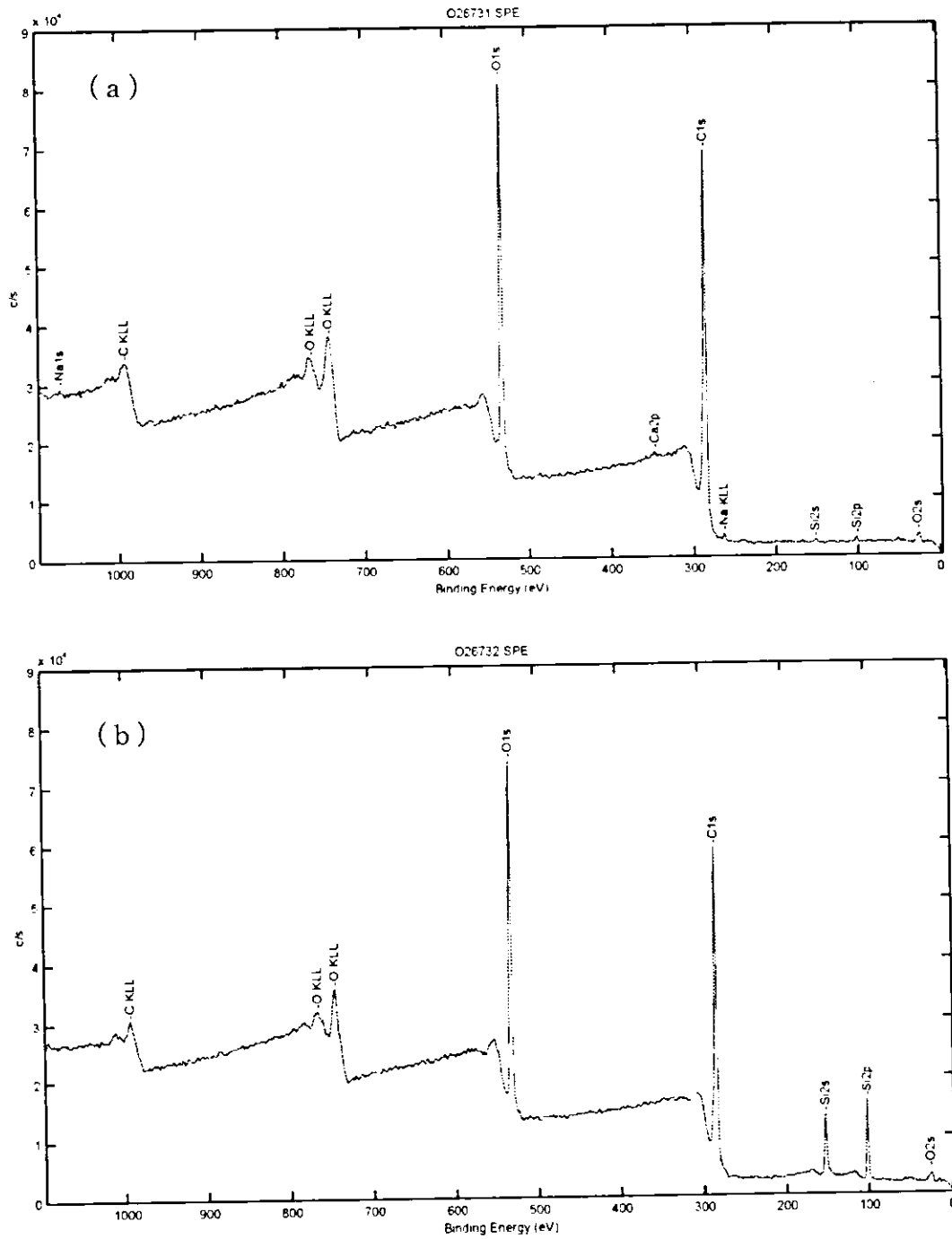


図2. 未処理 PET 繊維 (a) および MPTS を用いた前処理後 PET 繊維表面 (b) のX線光電子分光分析測定結果

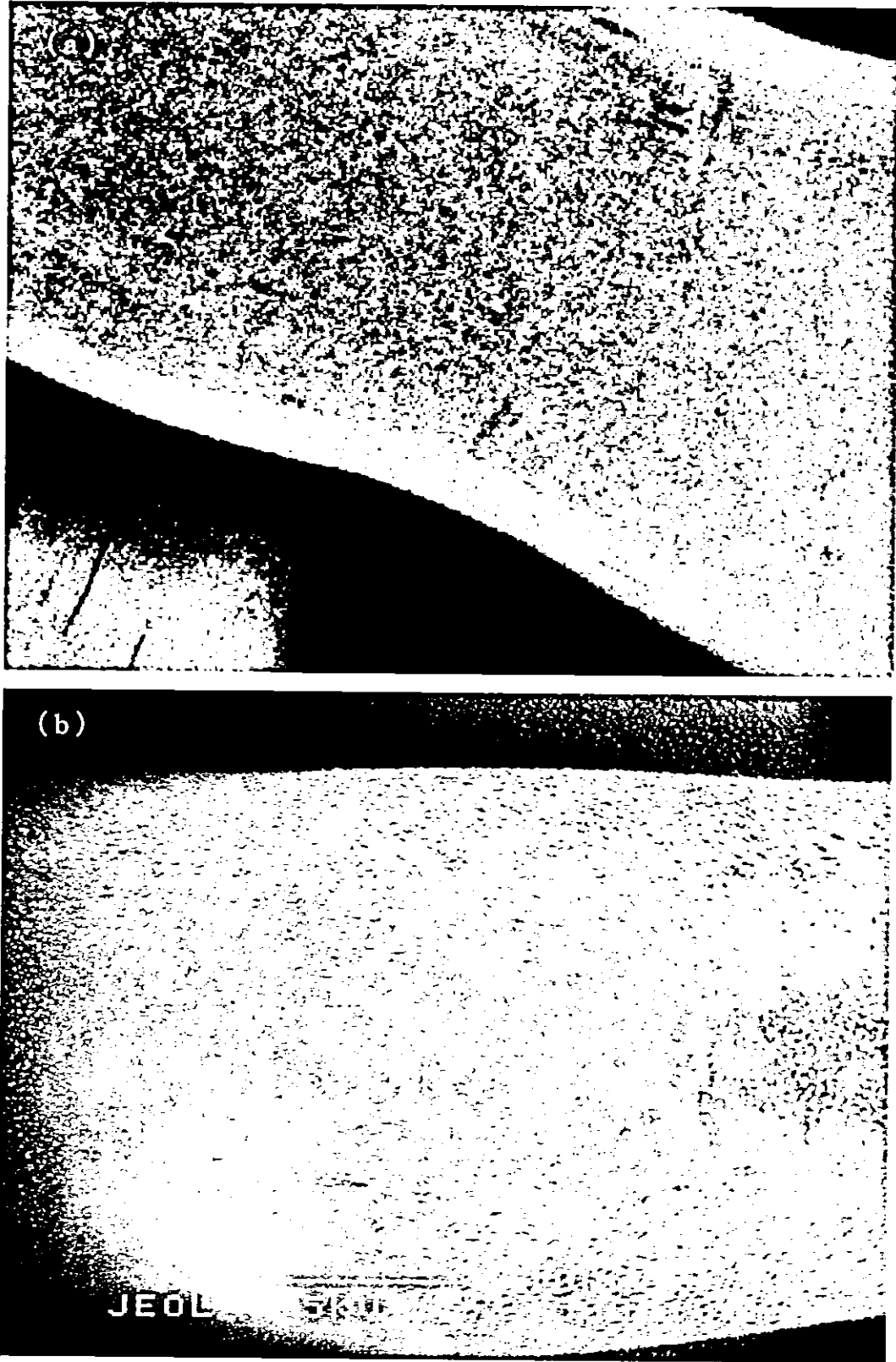


図3. 未処理のPET繊維 (a) およびMPTSで前処理したPET繊維を用いてHApコーティングしたHAp/PET複合繊維表面 (b) の走査型電子顕微鏡写真

分担研究報告書

ステントグラフト設計：コバルトクロム及びニッケルチタン製ステントの設計・加工

分担研究者 稲永 隆（日本海員掖済会門司病院内科腎センター・内科部長）

研究要旨

ハイドロキシアパタイトコーティング法を応用した高性能グラフトを開発するために、遺伝的アルゴリズムに基づく最適形状設計ソフトを用いたステント形状設計を行った。さらに、CoCr 及び NiTi 製ステントを試作し、物性評価を行った。また、グラフトへのアパタイトコーティングの前処理として、フッ素ガス処理を提起し、その有用性について検討した。

A. 研究目的

第二年目に計画されているステント金属素材へのナノアパタイトコーティング技術を早期に実現するために、ステント設計・加工の検討を前倒して行った。(株)日本ステントテクノロジーと委託契約を行い、同社独自のステント形状設計ソフトに基づき内シャントステントに最適な物性を探索する。

内シャント治療に用いられるステントグラフトは臨床現場では NiTi 製の胆道ステントが代替使用されているのが現状で、科学的手法により設計され且つ必要な物性を有するものが存在しない。そこで、今年度は遺伝的アルゴリズムに基づく最適形状設計ソフト（特願 2004-351974）を応用して、透析グラフトとしての必要物性を備えたステントを開発する為の基盤技術を構築する。更に、外径 2.5mm の動物実験用 CoCr 及び NiTi 製ステントを作製して物性評価をし、次年度以降にステントグラフトとして必要物性を有する高性能 NiTi 製ステントを研究開発するための基礎データを集積する。

さらに、ポリエステル製人工血管を入手すると共に、人工血管のモデル物質であるポリエステル不織布に対し、材料劣化を軽減してヒドロキシアパタイトを蒸着する前処理手段としてフッ素系ガス表面処理（特願 2002-64507）を取り上げてその有効性を確認する。ガス処理後に無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体の部分エチルエステルをコーティングしてその有効性を評価した。

B. 研究方法

1. ステント形状最適設計および加工・研磨

図1の概念図で示したソフトを用いて形状設計をした。ステント形状最適設計ソフトを用いて設計したファイルを米国ステントOEM加工会社に送付してステントを作製した。次年度からの加工・研磨の為に、NiTi チューブの入手先の選定及び治具の設計・作製等の加工・研磨の基盤技術構築を推進した。研磨前後の表面を光学顕微鏡（島津製実体顕微鏡 STZ-168）、3次元表面構造解析顕微鏡（zygo New View 5000）を用

いて測定した。さらに、E S C A, 接触角およびパイレックス法により表面分析を行った。

2. ステント物性評価

半径方向の剛性（血管支持力）は図2のようにロードセルをセットし、1.5 mm 圧縮して反力を測定して求めた。また、柔軟性は図3に示した測定装置を用いて回転モーメントから算出した。尚、本物性評価装置は冠状動脈ステントを研究開発する過程で作製されたものである。

3. 人工血管

ウベ循環から動物用試験研究品として、外径 2.5 mm 及び 3.5 mm ポリエステル製の人工血管を入手した。ヒドロキシアパタイトの複合化を促進する為に、人工血管素材と同一のポリエステル不織布を用いて下記の方法により表面機能化方法の基礎実験を行った。

- ・フッ素及び窒素または酸素混合ガスによる常温での表面処理

- ・上記混合ガス処理後、無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体によってコーティングを施した。共重合体の組成分析はNMRにより同定し、開環率は 36.4%であった。(添付資料—1 参照)

C. 研究結果および考察

1. ステント形状設計

次年度以降に NiTi 系ステントの本格的形状設計をする為に、既に、ステンレス製冠状動脈ステントの研究開発の過程で得た成果を基に、CoCr およびNiTiの形状を冠状動脈ステントと同一（セル長/リンク長≒0.6）に設計してステントを作製した（図4）。更に、NiTi 材料については図5

および6に記載した 2 形状のファイルを作成して加工研磨を行った。

2. 加工・研磨基盤技術の確立

NiTi 系ステントを加工するために、ステントのレーザ加工時に必要なチューブ選定と治具 2 種を設計・作製した。NiTi チューブは品質管理・品揃え等を考慮して、仏国 Minitube 社から購入すると共に、これらの外径に合わせた 2.438mm および 2.497mmの治具を作製した。部品を調達して研磨装置を組み立てて、研磨の基礎試験ができる体制を構築して実験を開始した。

3. 加工・研磨ステントの表面観察

外注作製 CoCr ステント（形状；KW39）

研磨前のステント内面には、粒状の異物が付着しているが、研磨により滑らかな表面に加工されていることが分かった。粒状異物を電解研磨前に前処理により除去する必要性が示唆されたので、来期に取り組む NiTi ステント加工・研磨においても前処理を検討する必要がある。

更に、表面研磨後ステントのリンク部がセル部に比較して、過剰に研磨されていることが判明したので、加工ファイル作成時にこのことを考慮する重要性が示唆された。

SUS に比較して CoCr 表面は滑らかさが劣る傾向にあることが分かった。研磨前後の表面の凹凸を 3 次元表面構造解析顕微鏡（zygo New View 5000）を用いて観察したが、定量的な分析方法を確立するにはいたっていない。(添付資料—2 参照) 今後、NiTi 系ステントについても研磨条件と表面平滑さの関係を明らかにして、工程の確立をすることが重要と考えられる。

4. ステント物性評価

外径 3.0mmの種々の金属材料からなるステントの物性評価を行い表1の結果を得た。CoCr ステントの物性は、ガイダント社の SUS 製マルチリンクステントとほぼ同等である。CoCr が SUS に比較して剛性が勝ることを考慮すると、CoCr 製ステントの物性が今回の結果では予想値より劣る結果になっている。SUS と異なる物性を有する金属材料のステント形状を設計するには、それぞれの物性を考慮して設計する必要があることを示唆していると推論される。従って、今後ステントグラフトの金属材料として NiTi 系合金を用いることになるので、上記の推論を考慮して形状最適設計を進めることが重要と考えられる。尚、KW39 型の NiTi は予想通りの結果を今回は得ているが、その他の形状のものについては評価方法を含めて検討中である。

NiTi 系ステント物性評価方法の基盤技術確立のために、今期は冠状動脈の外径に該当する 3.0 mm のステントを作製して検討したが、透析ステントグラフトの外径は 3.0mm より大であるので、市販胆道ステントを用いて半径方向の剛性をまず評価することにより、従来の冠状動脈ステント評価方法の問題点を把握することにした。評価結果を図 9 に示す。胆道ステントの場合端部が広がっているものもあり外径が不均一である。ステントグラフトの物性測定を定量的に行う為に、従来の冠状動脈ステントの評価方法を見直す必要があることが判明した。

5. 人工血管表面機能化基盤技術の確立

表 2 に種々の条件においてフッ素系混合ガスで、人工血管のモデル材料である PET 不織布を処理したときの不織布の濡れ性をパイレック法で測

定した結果である。接触角による表面親水化の評価を試みたが不織布の平滑さの不足により測定が不可能であった。表 2 に示すようにフッ素系混合ガス処理の条件により不織布の濡れ性が異なる結果を得たが、今後、ヒドロキシアパタイトの蒸着結果を参考に処理条件を決定する必要がある。

更に、ESCA で表面分析を行った結果を添付資料 3-7 に示す。測定は不織布 4 枚を重ねて行った。定量的な考察をする為にはフィルム状の平滑な面を測定する必要があるので、考察は以下に記述する定性的なものにとどめる。炭素、酸素及びフッ素のピークはそれぞれ 285、532 及び 686 eV に現れている。従って、フッ素原子の導入はフッ素ガス/窒素ガスの混合ガスが酸素/フッ素ガスで処理した場合に比較してフッ素原子の PET への導入量が大きい傾向にある。また、混合ガス処理後に水に浸漬することにより、フッ素原子の脱離と酸素の含有量が相対的に増加していることから加水分解が起こっていることが示唆される。今後、ヒドロキシアパタイトの吸着のし易さとの関係を確認してフッ素系ガス処理条件を決定すると共にアルカリ加水分解による親水化との比較（アパタイトの蒸着のし易さ、処理による劣化、溶出物等）により PET 表面の機能化方法を決定する必要がある。

フッ素/窒素混合ガスで PET 不織布を処理した後、無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体の部分エチルエステル化物のメチルエチルケトン溶液でコートした。表面を観察したところ PET 不織布表面を均一にコーティングできていないことが明らかになった。均一コートができるガス処理及びコーティング条件を更に詰める必要があると判断した。

D. 結論

本年度において実施した研究開発の項目を以下に示す。

- ・ステント形状の設計

CoCr 製ステント 1 パターン及び NiTi 系ステント 3 パターンの計 4 種の設計を行った。

- ・レーザ加工用ファイルの作成

4 種のパターンの DXF ファイルを作成した。

- ・レーザ加工

CoCr ステント 10 個 (研磨・非研磨各 5 個)、NiTi ステント 3 パターン各 5 個の合計 15 個 (全て研磨品)、総計 25 個のステントを外注にて作製した。NiTi については、拡張後、超弾性熱処理を施した。面観察・物性等の測定後、CoCr ステント 3 個及び NiTi ステント 9 個を用いた。

- ・研磨

非研磨 CoCr ステント 5 個を用いて研磨の基礎実験を行い、研磨試験機を組み立てた。

- ・検査・物性測定

作製した全ステントを検査 (表面粗さ、厚み、長さ、リンク・セル幅、形状) し、CoCr ステント 2 個、NiTi ステント 6 個を物性評価に供して、半径方向・長さ方向の剛性等を測定した。更に、市販胆道ステント 7 種の物性測定をした。

- ・ステント加工用

NiTi チューブの購入先として仏 Minitube 社を選定し、チューブを購入した。

- ・レーザ加工時の固定治具作製

2 種の治具を設計して作製した。

- ・拡張用バルーン

ステント拡張及び動物実験用のバルーン 5 本を購入した。

- ・人工血管素材の PET 不織布の表面機能化

フッ素系混合ガス及びガス処理後に親水性高分

子でコートした表面機能化 PET 不織布を作製した。

今期の成果としては、まず来期以降の本確定研究開発推進に必要な NiTi 形状設計方法、加工・研磨、チューブ入手先の選定等の基盤技術の構築ができた。次に、外径が 3.0mm より大きい NiTi 系ステントについて、定量的に測定するには測定装置を改良する必要があることが判明した。さらに、PET 製不織布のフッ素系ガス処理による表面機能化により、アパタイトの蒸着を促進できる可能性を見出した。

今後は、臨床医のニーズを適確に把握し、それを実現するステント形状を科学的手法によりシミュレーション・最適設計することにより、透析ステントグラフトとして世界に通用する医療器具との認知を得ることを目標とする。更に、アパタイト蒸着を促進する表面機能化技術の完成を目指す。

E. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1) (発明者) 古菌 勉、田中順三、岡田正弘、安田昌司 (発明の名称) 官能基導入無機化合物およびその製造法、複合体およびその製造方法、医療材料、特願 2004-274148

表一 1 外径 3.0mmの種々のステントの物性評価

ステントの種類	半径方向の剛性 (N/mm)	曲げ剛性(N/mm ²)
CoCrKW39	0.87	69.3
NiTiKW39	0.20	7.15
NiTiModify_Z_one	-	-
NiTiModify_Z_onehalf	-	-
SUSKW39	1.0	21.4

表一 2 フッ素系混合ガス処理による PET 不織布の親水化

No	Blank	3	4	5	A	B	C	D
ガス組成	None	F ₂ O ₂	F ₂ O ₂	F ₂ O ₂	F ₂ N ₂	F ₂ N ₂	F ₂ N ₂	F ₂ N ₂
パイルック*(mm)	0	1.0	2.0	3.0	0.5	1.5	1.8	2.0

*25mm 幅の短冊状サンプル下端 3mm を蒸留水に 10 分間浸漬した後、水面から水が上昇した高さを測定。

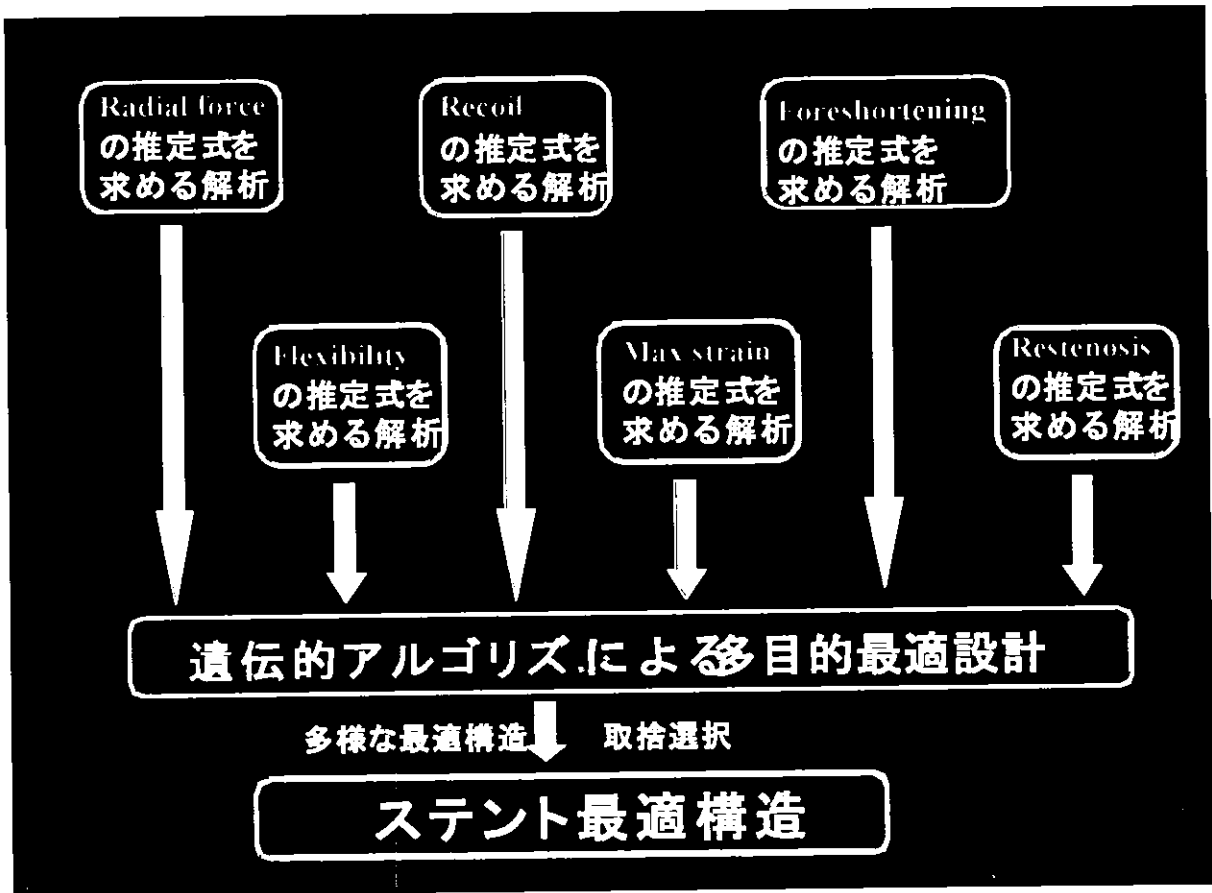


図1. ステント形状最適設定ソフト

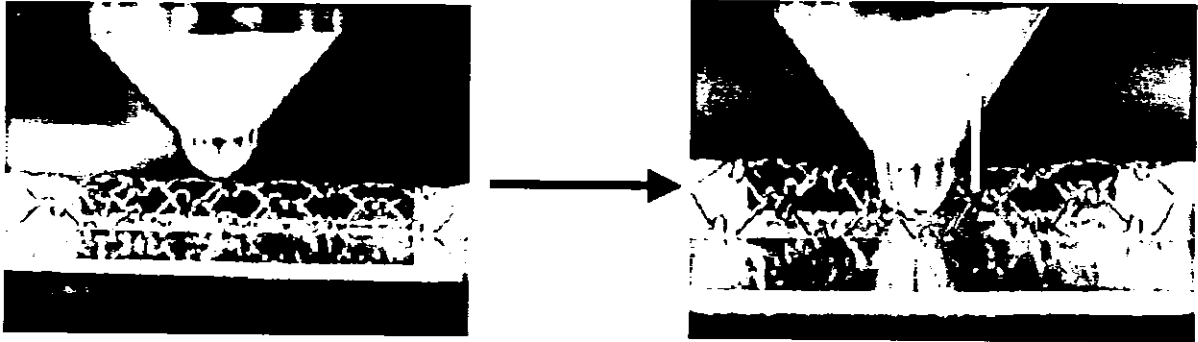


図2. ラジアルフォース測定法

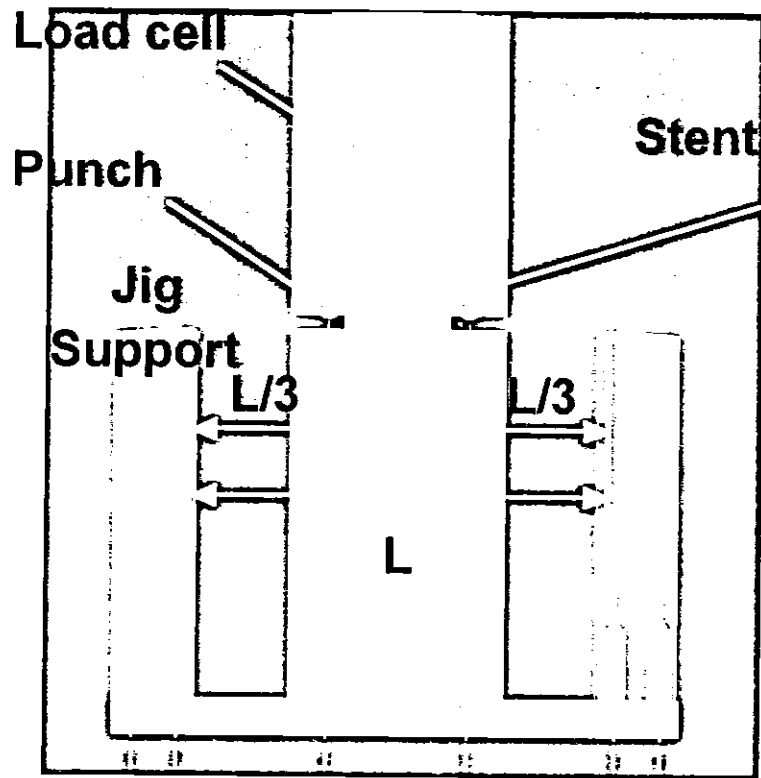


図3. 柔軟性測定装置

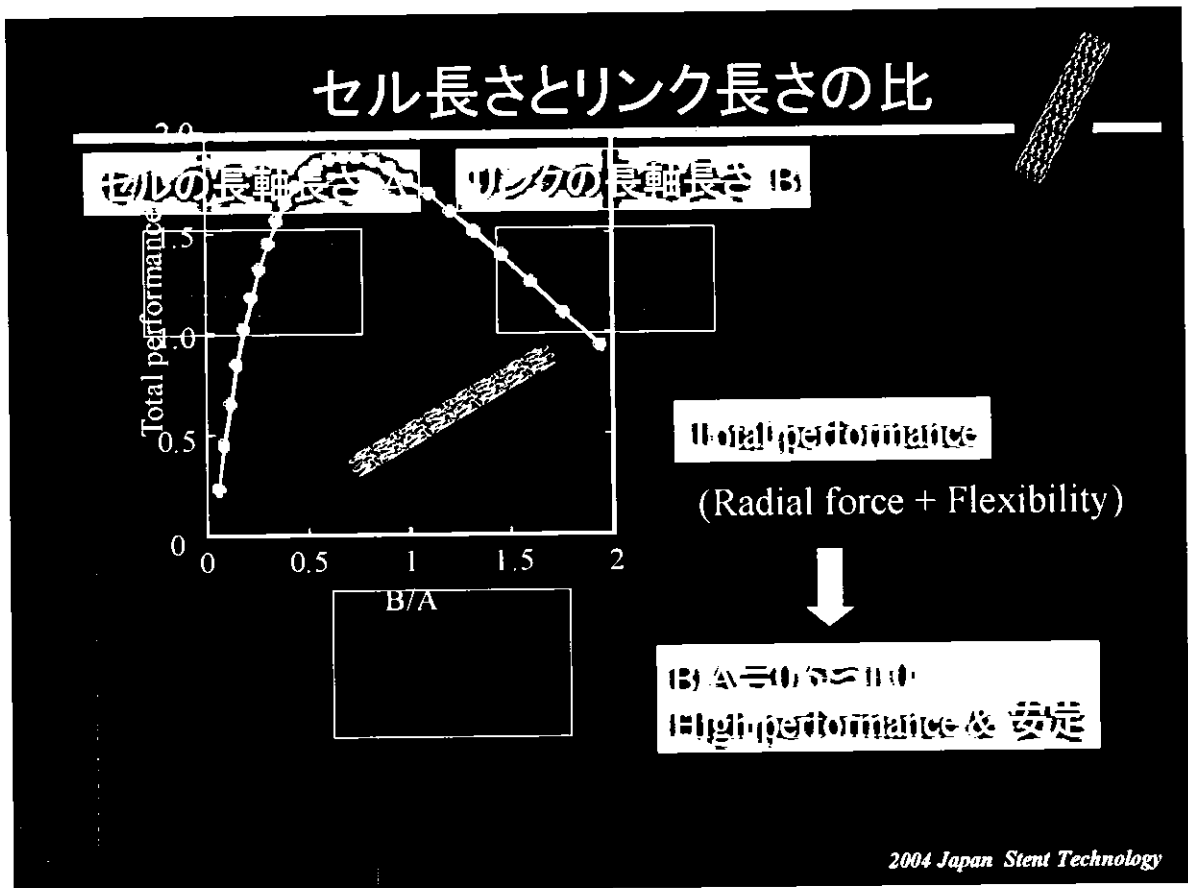


図4. セル長/リンク長とステント総合性能の関係

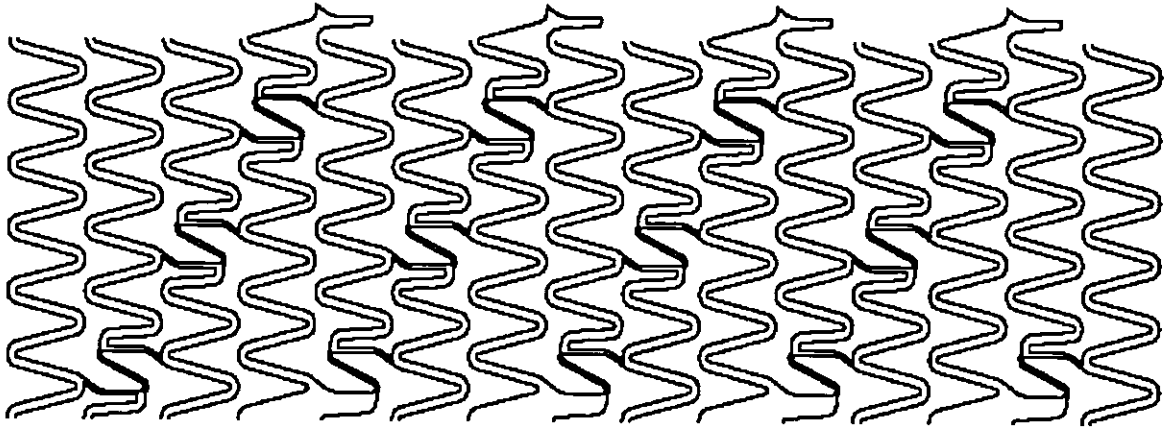


図5. NiTi 系ステント (Modify_Z_one)

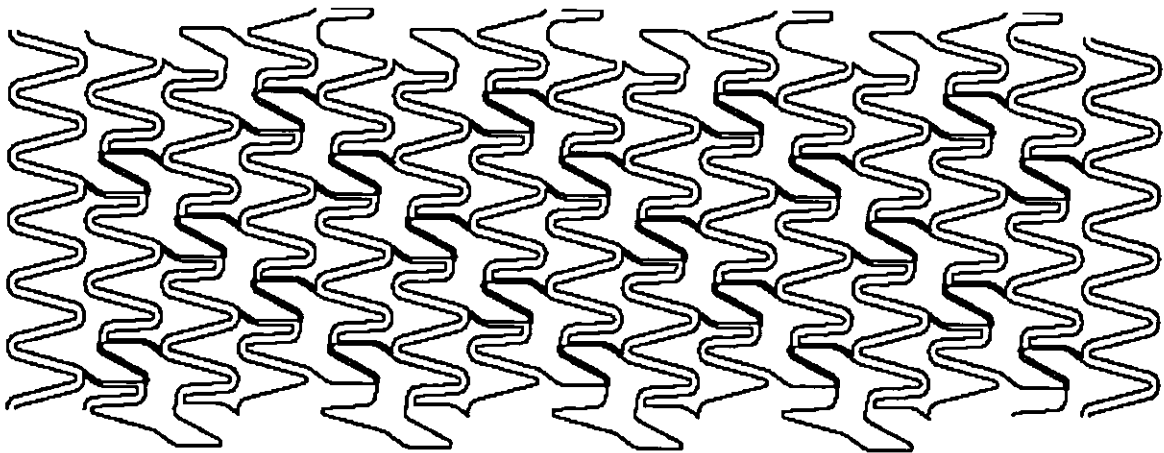


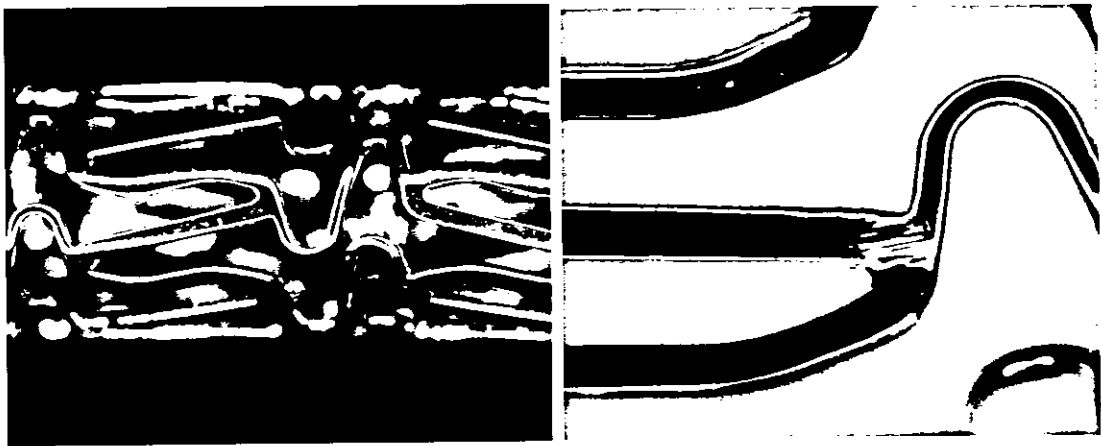
図6. NiTi 系ステント(Modify_Z_onehalf)



表面

内面

図7. レーザー加工後のステント（材質：CoCr合金）



表面

内面

図8. バリ取り、電解研磨後のステント（材質：CoCr合金）

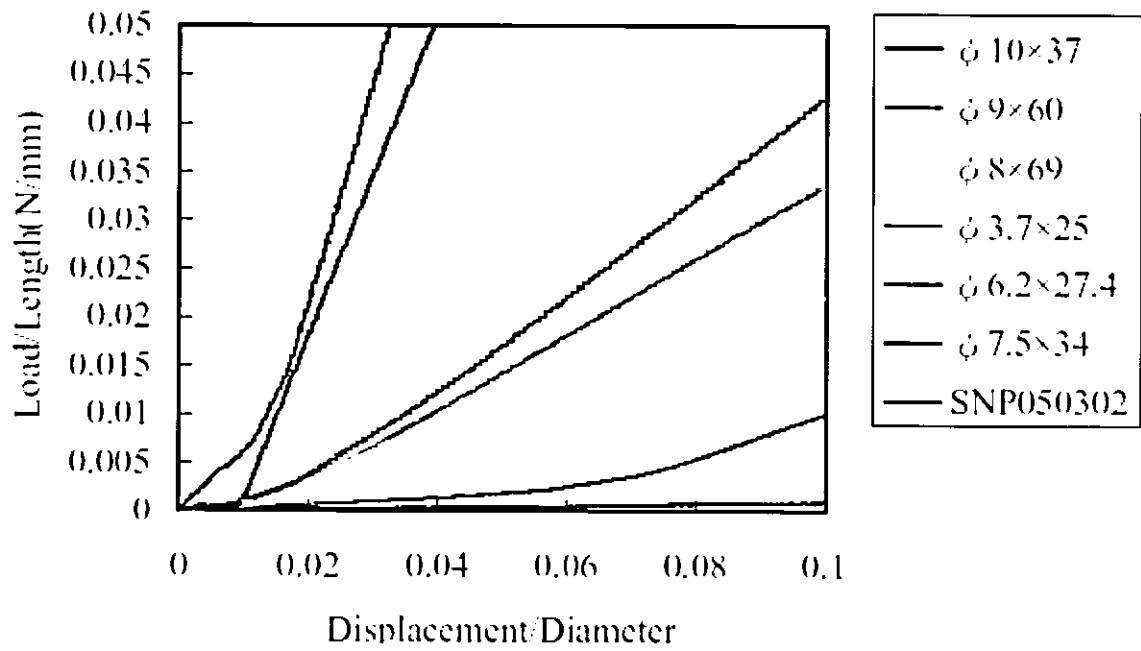


図 9. NiTi 製市販胆道ステントの物性評価