

Z00500548A

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患等総合研究事業

内シャント狭窄治療を目的としたナノセラミックス複合化  
ステントグラフトの開発

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 古菌 勉

平成18年(2006年)4月

## 別添 2

### 目 次

I. 総括研究報告	
内シャント狭窄治療を目的としたナノセラミックス複合化 ステントグラフトの開発 .....	1
古菌 勉 (国立循環器病センター研究所生体工学部・室長)	
II. 分担研究報告	
1. ハイドロキシアパタイトナノコーティングの 吸着制御・結合強度の定量化 .....	9
古菌 勉 (国立循環器病センター研究所生体工学部・室長)	
2. アパタイトナノコーティングステントの創出 .....	27
宮武 邦夫 (国立病院機構大阪南医療センター・院長)	
3. ナノアパタイトを薬物担体とする Drug-Eluting Stent の創出 .....	39
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)	
4. アパタイトナノコーティンググラフトの埋植試験 .....	51
田中 良一 (国立循環器病センター放射線診療部・医員)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	71
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	75

## 総括研究報告書

研究課題 内シャント狭窄治療を目的としたナノセラミックス複合化ステントグラフトの開発

課題番号 H16-循環器（生習）-015

主任研究者 古菌 勉（国立循環器病センター研究所生体工学部・室長）

## 研究要旨

シャント不全の治療に用いるステントグラフトにナノアパタイトセラミックス複合法を適用することで、自己血管内シャントを長期維持可能とする新規なナノセラミックス複合化ステントグラフトを開発する。新規ステントグラフトの臨床応用により、再狭窄防止システムの構築の実現、および長期透析患者の安定した血液透析の実現と QOL の向上が期待できる。本年度の検討では、高分散性ナノアパタイト微粒子製造法の創出、新規ナノアパタイト複合化グラフトの創出、およびステント設計・加工・試作品製造を行った。

## A. 研究組織

研究分担者	所属施設・役職
宮武 邦夫	国立循環器病センター・副院長
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
田中 良一	国立循環器病センター放射線 診療部・医員

## B. 研究目的

日本透析医学会統計調査委員会による 2003 年末における統計調査によると、我が国の透析人口は 237,710 人であり、1983 年から増加の一途をたどっている。透析導入時のブラッドアクセスと生命予後との関係から、長期生存のためには自己血管内シャントの保持が非常に重要であることが分かる。これまでシャント不全に対して様々な治療法が試みられているが、再狭窄・再閉塞を来す

症例が多く、最終的に人工血管、カテーテルおよび外シャントの留置、さらには腹膜透析へ移行される例も少なくない。

当該研究課題は、内シャント不全の治療に用いるステントグラフト表面に、生体親和性の高いハイドロキシアパタイト (HAp) セラミックスをナノスケールで強固にコーティングした新規なステントグラフトの開発を目的とする。その効能は、ステントグラフト内外にコートされた HAp ナノ結晶による短期間での血管内皮細胞の被覆、およびステント内側に内膜増殖抑制物質を担持させた再狭窄防止システムを主とする。新規ステントグラフトの臨床応用により、再狭窄防止システムの構築が実現でき、さらに、長期透析患者の安定した血液透析の実現と QOL の向上が期待できる。

前年度である平成 16 年度の検討では、媒体中で高い分散性を示す新規な HAp ナノ結晶の製造技術の開発を行った。さらに、グラフト基材の表

面処理条件について検討を行い、開発した高分散性 HAp ナノ結晶を用いることで、グラフト基材への HAp ナノコーティング法を確立した。さらに、同 HAp ナノコーティンググラフトの細胞接着性について *in vitro* で検討を行い、未処理グラフトに比べて高い血管内皮細胞接着性を示し、その接着性は従来のコラーゲンコーティンググラフトと同程度であることを明らかとした。

本年度の検討では、まず、基材表面への HAp ナノコーティングを精密制御するために、HAp ナノ結晶の基板表面に対する吸着挙動・結合強度について検討を行った。また、高分散性 HAp ナノ結晶をステント基材（ステンレス SUS316L）表面に結合させたナノアパタイトコーティングステントの開発を目指し、その細胞接着性について検討を行った。さらに、HAp ナノコーティングステントへの Drug-eluting 機能の付与について検討を行った。また、前年度に開発した HAp ナノコーティンググラフトの有用性について、動物実験により評価を行った。

### C. 研究方法および研究結果

#### 研究成果（1）：ハイドロキシアパタイトナノコーティングの吸着制御・結合強度の定量化（古菌）

ステントおよびグラフト基材表面への HAp ナノ結晶のナノコーティングを精密制御することを目的として、モデル基板表面への HAp ナノ結晶の吸着挙動および結合状態を、水晶振動子マイクロバランスおよび原子間力顕微鏡を用いてそれぞれ定量的に評価した。この際、アニオン性を示す親水性のカルボキシル基、イオン性を示さない疎水性のメチル基、カチオン性を示す親水性のアミノ基をそれぞれ導入した金基板をモデル基

板として用いた。その結果、HAp ナノ結晶をロッド状に形態制御することで、結晶 *a* 面に存在するカチオン性電荷とアニオン性を示す基板表面とにより高い相互作用を示した。つまり、アニオン性を示す基板表面により高密度に吸着し、より高い結合強度を示すことが明らかとなった。

以上の結果は、内シャント不全の治療に用いるステントグラフト表面への HAp ナノコーティングの精密制御に非常に有効な知見であり、今後は、HAp ナノ結晶のコーティング状態と細胞・組織接着性の関係についての検討を行う予定である。

また、これまで得られた結果をもとに、現在3報の論文を欧文誌へ投稿し、さらに1報を投稿準備中である。投稿中の論文のうち1報は印刷中の状態である（J. Nanosci. Nanotech 誌）。

#### 研究成果（2）：アパタイトナノコーティングステントの創出（宮武）

ステント表面への早期内皮細胞の被覆を目的として、ステント基材として用いられるステンレス（SUS316L）表面への HAp ナノコーティングについて検討を行った。まず、共有結合を介して HAp ナノ結晶をステンレス表面に強固にコーティングさせるために、ステンレス表面へのアルコキシシリル基含有ポリマーの導入（グラフト処理）を行った。グラフト処理を行ったステンレス表面および高分散性 HAp ナノ結晶を用いることで、HAp ナノ結晶をステンレス表面に単分散で強固にコーティングすることに成功した。また、HAp ナノコーティングステンレスの細胞接着性は未処理ステンレスと比較して有意に高いことが確認できた。さらに、同様の手法を市販のステンレス製ステントに適用することで、ナノアパタイトコーティングステントを創出した。今後は、

動物実験を行うことでその有用性を評価する予定である。

以上の結果をまとめ、現在欧文誌への投稿を準備中である。

### 研究成果（3）：ナノアパタイトを薬物担体とする Drug-Eluting Stent の創出（稲永）

HAp ナノコーティングステントへの Drug Eluting 機能付与を行うために、HAp ナノ結晶への薬物モデル化合物の吸着・放出挙動について検討を行った。薬物に対するモデル化合物としては、アニオン性、中性、カチオン性を示す水溶性の色素化合物をそれぞれ用いた。HAp ナノ結晶の形状および結晶表面の電荷状態をイオンの吸着により制御することで、各種色素化合物の吸着特性を制御できることを明らかとした。さらに、その放出挙動は媒体中のイオン種によって影響されることを明らかとした。

今後、抗炎症性作用あるいは血管平滑筋細胞増殖抑制作用を有する薬物と HAp ナノ結晶との相互作用について検討を進める予定である。

### 研究成果（4）：アパタイトナノコーティンググラフトの埋植試験（田中）

グラフト表面への HAp ナノコーティングの効果について評価するために、犬の正常頸動脈に人工血管を2週間あるいは4週間置換し、未処理人工血管との比較を行った。HAp ナノ結晶を人工血管表面にコーティングすることで、内皮細胞の早期伸展が観察され、また内膜組織および外膜組織の早期成熟が確認された。これは、HAp ナノコーティング層による自己組織マトリックス形成促進によるものと考えられる。

HAp ナノコーティンググラフトは、凝血効果

を有するコラーゲンや仮性内膜が肥厚するフィブロネクチンを用いないため、血流が阻害される恐れが無い。このため、当該コーティング技術は、大口径のみでなくより内径の小さい中小口径の人工血管にも好適と期待できる。さらに、上記のような動物由来タンパク質を用いないことから、安全性、保存性、滅菌性に優れた新規なグラフトとして期待できる。

現在、以上の結果をまとめた論文が ASAIO J. 誌に印刷中の状態である。

### （倫理面への配慮）

動物に対する動物的爱護上の配慮は国立循環器病センター動物管理規則に則り、十分に注意を払う。動物実験は麻酔および清潔下にて外科的操作を行う。術後は鎮静剤を投与し、毎日経過観察を行い、観察記録簿をつける。使用数が最小限になるように計画を立案する。臨床応用は当該研究期間中に含まれず、研究終了後に検討する予定である。

### D. 考察

従来技術によるステントは円筒形で側面がメッシュ状またはコイル状で一定ピッチのものからなり、血管内狭窄部の開存を得るための機械的支持のみを目的としていた。そのピッチを調整して血流速度の抑制、壁ずれ速度を制御することにより細胞過増殖を抑制する技術があるが、形態からのみのアプローチでは効果に限界があった。また、シロリムスなどの免疫抑制剤をステントにコートし、薬剤を徐放することによって内膜増殖を押さえる方法があるが、長期間にわたる持続的な薬物放出の結果、血流中にステント基材が長期間露出し続けるため、慢性期にステントの血栓閉塞

の引き金となる危険性がある。さらに、細胞増殖抑制遺伝子を用いた遺伝子治療とステント治療の組み合わせも開発されているが、現在研究開発段階であり社会的・倫理的な検討が不十分である。

当該研究課題は、HAp セラミックスをステントグラフト表面にコーティングした新規なステントグラフトの開発を行うものである。当該研究課題で用いる HAp セラミックスは生体親和性が高く、良好な接着性タンパク質の吸着および細胞の単層接着が実現できる (Furuzono et al., J. Biomed. Mater. Res. Part B, Appl. Biomater., 65B, 217(2003))。このため、グラフト内部へのナノセラミックスコートによって、短期間で血管内皮細胞が被覆されることで、長期血管開存の発現が可能である。さらに、ステントへの HAp コーティングによって DDS システムを付加することで、内膜増殖抑制物質を担持させた再狭窄防止システムを構築する。ここで、当該研究課題で用いる HAp セラミックスは焼成体であるため生体内で溶解しにくく、また、構成がカルシウムとリン酸からなるため副作用の心配がない。このように、アパタイトコーティング技術を適応することで、留置早期における内皮細胞単層被覆と平滑筋細胞過増殖の抑制を兼ね備えたステントグラフトが構築できる。

当該研究課題の達成によって、さらに以下の成果が期待される。(1) 本デバイスは人工物のみから構築されているため、現在用いられている牛由来コラーゲンのような異種タンパク質を用いる必要がなく、生物学的に安全である。(2) シェント不全およびシェント作成に伴う合併症の低減。

(3) 在宅化および社会復帰による透析患者の QOL の向上と医療費削減。(4) 他の循環器病疾患にも応用可能。(5) 当該課題に用いる手法は国

立循環器病センターにて開発され、特許化されたものである。当該課題が達成されることにより、厚生労働省から国内さらに国外に向けて発信される産業活性化のモデルとなり得る。

## E. 結論

本年度の検討では、まず、HAp ナノコーティングを精密制御するために、HAp ナノ結晶の基板への吸着・結合について検討を行った。HAp ナノ結晶をステント基材 (ステンレス SUS316L) 表面に結合させたナノアパタイトコーティングステントを創出し、未処理のグラフトに比べて細胞接着性を向上させることに成功した。また、HAp ナノコーティングステントへの Drug-eluting 機能の付与について検討を行った。さらに、前年度に開発した HAp ナノコーティンググラフトの動物実験を行い、内皮細胞の早期伸展および内膜・外膜組織の早期成熟という有用性を示した。

次年度である平成 18 年度では、これまでの検討によって開発した HAp ナノコーティンググラフトおよび HAp コーティングステントを組み合わせた新規なステントグラフトを創出し、その *in vivo* 効能試験を行うことで、長期維持可能な自己血管内シャントの開発を目指す。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Furuzono, M. Masuda, M. Okada, S. Yasuda, H. Kadono, R. Tanaka and K. Miyatake, Increase of cell adhesiveness on poly(ethylene

- terephthalate) fabric by coating of sintered hydroxyapatite nanocrystals for development of an artificial blood vessel, ASAIO J., in press
- 2) M. Okada and T. Furuzono, Nano-sized ceramic particles of hydroxyapatite calcined with an anti-sintering agent, J. Nanosci. Nanotech., in press
  - 3) M. Okada and T. Furuzono, Fabrication of high-dispersibility nanocrystals of calcined hydroxyapatite, J. Mater. Sci., in contribution
  - 4) M. Okada and T. Furuzono, Highly dispersed rod-like nanocrystals of calcined hydroxyapatite fabricated by calcination with an anti-sintering agent surrounding the crystals, J Nanoparticle Res., in contribution
  - 5) M. Okada, M. Masuda, R. Tanaka, K. Miyatake, D. Kuroda and T. Furuzono, Fabrication of calcined hydroxyapatite nanocrystals-coated stainless steel and morphological influence of nanocrystals on cell activity, J. Biomed. Mater. Res., in preparation
  - 6) H. Kadono, M. Masuda, M. Ueki, M. Okada, S. Yasuda, R. Tanaka, K. Miyatake and T. Furuzono, Development of poly(ethylene terephthalate) vascular prostheses by coating of sintered hydroxyapatite nanocrystals, J Artif. Organs, in preparation
  - 7) M. Okada, K. Furukawa, H. Tanaka, T. Kawai and T. Furuzono, Interaction between hydroxyapatite nanocrystal and substrate through ionic interactions and covalent bonding, Langmuir, in preparation
2. 総説、その他
- 1) 田中良一, 座談会 末梢動脈に対する血管内治療, pp. 1-13, メディコン (2005)
  - 2) 田中良一, 血管内治療, 松尾汎 (編): 血管疾患を知る 新目でみる循環器病シリーズ 17, pp. 188-193, メジカルビュー社 (2005.09)
  - 3) 古菌 勉, 新しい生体/人工臓器インターフェイスとしてのナノ無機・有機複合材料, 許俊鋭ら (編): 人工臓器・再生医療の最先端 先端医療シリーズ 37, pp. 296-300, 先端医療技術研究所 (2005.11)
  - 4) 田中良一, 腸骨動脈におけるインターベンション, Vascular Lab., Vol. 2 (No. 4), pp. 62-67, メディカ出版 (2006.1)
  - 5) T. Furuzono, S. Yasuda and M. Okada, Nanofabrication of Inorganic-Organic Composites by Chemical Bonding for Medical Devices, K. Ariga and H.S. Nalwa (Eds): BOTTOM-UP NANOFABRICATION: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films, in press
3. 学会発表
- 1) 益田美和, 安田昌司, 岡田正弘, 田中良一, 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, 神奈川県 (2005.5.25-27)
  - 2) 岡田正弘, 古菌 勉, ポリアクリル酸を融着防止助剤として用いたナノアパタイト仮焼体の作製, 第 54 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 神奈川県 (2005.5.25-27)
  - 3) M. Okada and T. Furuzono, Calcined Hydroxapatite Nanocrystals Disapensible in

- Liquid Media as Single Crystals, International Symposium on Soft-Nanotechnology, 北海道大学会議場, 北海道 (2005.6.20-21)
- 4) 古菌 勉, ナノテクノロジーによる細菌感染防止デバイスの開発, 第 50 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会, パシフィコ横浜, 神奈川 (2005.6.24-26)
  - 5) M. Okada, T. Furuzono, Calcination of hydroxapatite nanoparticles with poly(acrylic acid, calcium salt) as an anti-sintering agent surrounding the particles, The 8th SPSJ International Polymer Conference (IPC2005), 福岡国際会議場, 福岡 (2005.7.26-29)
  - 6) M. Masuda, S. Yasuda, M. Okada, R. Tanaka, K. Miyatake, and T. Furuzono, Improvement of cell adhesiveness of poly(ethylene terephthalate) by surface modification with hydroxapatite nanocrystals through covalent bonding, The 8th SPSJ International Polymer Conference (IPC2005), 福岡国際会議場, 福岡 (2005.7.26-29)
  - 7) M. Okada, T. Furuzono, Preparation of Nano-Sized Hydroxyapatite Single-Crystal Particles by Calcined with an Anti-Sintering Agent Interposed among the Particles, 19th European Conference on Biomaterials, Sorrento, Italy (2005.9.11-15)
  - 8) 岡田正弘, 益田美和, 安田昌司, 植木光樹, 角野弘幸, 田中良一, 宮武邦夫, 古菌 勉, ハイドロキシアパタイトナノ単結晶体のポリエステル繊維へのコーティング, 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 京都 (2005.11.28-29)
  - 9) 小粥康充, 岡田正弘, 益田美和, 安田昌司, 植木光樹, 角野弘幸, 田中良一, 宮武邦夫, 古菌 勉, 人工血管を指向したナノアパタイト複合化 PET 繊維の創製, 第 43 回日本人工臓器学会, 日本都市センター, 東京 (2005.11.30-2005.12.2)
  - 10) 古川敬子, 河原豊, 芹澤武, 岡田正弘, 古菌 勉, アパタイトナノ結晶-基板間の界面相互作用の究明, 日本セラミックス協会 2006 年年会, 東京大学駒場 I キャンパス, 東京 (2006.3.14-16)
  - 11) 植木光樹, 益田美和, 角野弘幸, 安田昌司, 岡田正弘, 田中良一, 宮武邦夫, 古菌 勉, ナノアパタイトを被覆したポリエステル製人工血管の開発, 日本医工学治療学会 第 22 回学術大会, 福岡, 福岡国際会議場 (2006.4.21-23)
  - 12) M. Masuda, M. Okada, S. Yasuda, H. Kadono, R. Tanaka, K. Miyatake, T. Furuzono, Increase of cell adhesiveness on poly(ethylene terephthalate) fabric by coating of sintered hydroxyapatite nanocrystals, Society for Biomaterials 2006 Annual Meeting, Pittsburg, Pennsylvania, USA (2006.4.26-29)
  - 13) 益田美和, 植木光樹, 角野弘幸, 岡田正弘, 安田昌司, 田中良一, 宮武邦夫, 古菌 勉, ナノアパタイト/ポリエステル複合体からなる医療デバイスと血液接触界面の組織学的特性, 第 55 回高分子学会年次大会, 愛知, 名古屋国際会議場 (2006.5.24-26)
  - 14) 古川敬子, 河原 豊, 芹沢 武, 岡田正弘, 古菌 勉, 新規なアパタイトナノ単結晶体を用いた高分子界面複合体の微細構造制御, 第 55 回高分子学会年次大会, 愛知, 名古屋国際会議場 (2006.5.24-26)



- 15) 岡田正弘, 益田美和, 植木光樹, 角野弘幸, 安田昌司, 田中良一, 宮武邦夫, 古菌 勉, セラミックス-高分子-金属三元複合化による生体親和材料の開発, 第 52 回高分子研究発表会, 兵庫, 兵庫県中央労働センター (2006.7.21)
- 16) R. Tanaka, T. Furuzono, M. Masuda, M. Okada, S. Yasuda, M. Ueki, H. Kadono, K. Miyatake, Sintered hydroxyapatite nanocrystals coated devices for development of an artificial blood vessel, Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe (CIRSE) 2006, Rome, Italy (2006.9.9-13)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 特許取得

- 1) 特願 2005-203517『人工血管およびその製造方法』, (出願人) 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, (発明者) 古菌 勉, 宮武邦生, 田中良一, 岡田正弘, 安田昌司, 角野弘幸, 益田美和
- 2) PCT 出願 PCT/JP2005/016837『セラミックス粒子群およびその製造方法、並びにその利用』, (出願人) 科学技術振興機構, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, (発明者) 古菌 勉, 岡田正弘

## 分担研究報告書

## ハイドロキシアパタイトナノコーティングの吸着制御・結合強度の定量化

主任研究者 古菌 勉（国立循環器病センター研究所生体工学部・室長）

## 研究要旨

各種基板表面へのハイドロキシアパタイト（HAp）結晶のナノコーティングを精密制御することを目的として、モデル基板表面への HAp ナノ結晶の吸着挙動および結合状態を定量的に評価した。アニオン性を示す親水性のカルボキシル基、イオン性を示さない疎水性のメチル基、カチオン性を示す親水性のアミノ基をそれぞれ導入した金基板をモデル基板として用いて、HAp ナノ結晶の吸着挙動を水晶振動子マイクロバランスにより評価し、その結合強度を原子間力顕微鏡により評価した。その結果、HAp ナノ結晶の結晶  $a$  面に存在すること考えられるカチオン性電荷によって、アニオン性を示す基板表面に対してより高密度に吸着し、より高い結合強度を示すことが明らかとなった。以上の結果を内シャント不全の治療に用いるステントグラフト表面への HAp ナノコーティングに適用し、細胞・組織接着性の制御を行う。

## A. 研究目的

当該研究課題は、内シャント不全の治療に用いるステントグラフト表面に、生体親和性の高いハイドロキシアパタイト（HAp）結晶をナノオーダーで強固にコーティングした新規な HAp ナノコーティングステントグラフトの創出を最終目的としている。

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あるいはゼラチンなどがコーティングされているが、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と考えられる。

HAp は骨や歯の主成分であり、硬組織への親和性が高いことが知られてきたが、最近では、軟

組織に対しても親和性があることが明らかされている。この軟組織親和性の全容は明らかにはなっていないが、生体内へのインプラント初期に接着性タンパク質や成長因子などが HAp 表面に強く吸着することが要因であることは容易に推察される。

そのような生体親和性の高い HAp をコーティングする方法として、生体模倣反応、プラズマスプレー法、共沈法、交互浸漬法、ゾルゲル法、電氣的析出法などがこれまでに提案されているが、以上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、生体内での分解性および吸収性の低い HAp 結晶（焼成体）から成るナノ粒子をまず調製し、それを基材表面に化学結合を介してコーティングした無機ナノセラ

ミックス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およびステント表面に 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ことが予想される。

ここで、当該研究課題で用いる HAp ナノコーティング法は、分散媒体中における HAp 結晶の被コーティング基板への吸着および結合形成からなり、その吸着・結合挙動を制御することができれば、より生体親和性に優れたコーティングが創出できると考えられる。

本研究では、HAp ナノコーティングの精密制御を目的として、前年度の検討において開発した高分散性 HAp ナノ結晶のモデル基板表面への吸着挙動および結合状態を定量的に評価した。この際、吸着挙動は水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法を用い、結合強度は原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

HAp の出発原料および融着防止剤として用いた水酸化カルシウムは炭酸カルシウムの加水消化法により作製した。炭酸カルシウムおよびリン酸二水素カリウム、オイル相として用いたドデカン、非イオン性界面活性剤として用いたペンタエチレングリコールモノドデシルエーテルはナカライテスク (株) から購入した試薬特級品を使用した。融着防止助剤として用いたポリアクリル酸 (PAA ; 重量平均分子量 12,000)、チオール化合物はそれぞれシグマ・アルドリッチ社製のものを使用した。その他の化学試薬はナカライテスク (株) 製のものを用いた。

### 2. 高分散性ナノ HAp 結晶の作製

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、以下に示すエマルション法により低結晶 HAp を得た。上記の非イオン界面活性剤 0.5 g を含有した連続オイル相 40 mL を調製した後、Ca(OH)<sub>2</sub> 水懸濁液 (2.5 M) を 10 mL 添加し、室温あるいは 80°C で攪拌した。所定の温度において十分に攪拌後、水/オイル (W/O) 溶液に 1.5 M の KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液を 10 mL 添加し、室温にて 24 時間反応させた。得られた反応生成物は遠心分離により分離・洗浄した。

得られた低結晶性 HAp を融着防止剤存在下において焼成することで高分散性 HAp ナノ結晶を調製した。この際、融着防止剤として用いた Ca(OH)<sub>2</sub> と HAp とを混合する際に、融着防止助剤として PAA を添加した。具体的な手順は以下の通りである。まず、上記のエマルション法により調製した HAp 1.0 g を含む懸濁水中に 35% PAA 水溶液 (pH, 10) 2.9 g を加え、超音波 (20 kHz; 35W) を照射することで HAp 粒子を単分散させた。その HAp 分散水中に、Ca(OH)<sub>2</sub> を約 1.0 g 含む Ca(OH)<sub>2</sub> 飽和水溶液 600 mL を添加し、得られた沈殿物を濾過により回収、60°C において乾燥した。その後、800°C にて 1 時間仮焼を行った。この際の昇温速度は 10°C/min とした。仮焼後に得られたサンプルを 10 mM 硝酸アンモニウム水溶液中に添加し、pH が中性付近になるまで蒸留水で遠心洗浄を行い、最終的にエタノールに再分散させた。

### 3. 水晶振動子の表面修飾

モデル基板表面として用いた水晶振動子の表

面修飾を図2に示す手順で行った。なお、水晶振動子は共振周波数9 MHz、電極部φ5.0 mmのものを使用した。水晶振動子は、ピランハ溶液（濃硫酸/過酸化水素 = 3/1）による洗浄、純水による洗浄を行った後、窒素気流下において乾燥させた後に使用した。エタノール中に各種チオール化合物（1-propanthiol、3-mercaptopropionic acid、2-aminoethanethiol）をそれぞれ1 mg/mlの濃度で溶解させ、室温において同エタノール溶液中に水晶振動子を浸漬させることで、金-チオール反応により各種官能基を表面に導入した。反応後、各基板はエタノールにより洗浄し、窒素気流下において乾燥させた。

官能基の導入の確認は、水滴の接触角測定およびゼータ電位測定により行った。接触角計は、協和界面科学(株)製CA-Xを用い、室温において測定を行った。ゼータ電位測定装置は大塚電子(株)製ダイナミック光散乱光度計ELS-8000を用い、20℃において約10 ppmの粒子濃度、散乱角90°にて測定した。

#### 4. HAp ナノ結晶の吸着挙動

QCM は (株) ユーエスアイシステム製 UQ-200 を用い、Hewlett Packard Co.製 HP53131A ユニバーサルカウンタにより周波数の経時変化をカウントした。

官能基を導入した水晶振動子をエタノール 10 ml を含む測定用容器に入れ、所定の温度において共振周波数が安定するまで放置した。周波数が安定した後、一定濃度の HAp 分散エタノール溶液を添加し、共振周波数変化の測定を開始した。ここで、周波数変化と吸着量との関係は次式 (1) で与えられる：

$$\Delta F = -2.3 \cdot F^2 \cdot \Delta W / S \text{ ----- (1)}$$

ここで、 $\Delta F$ , 共振周波数変化量； $F$ , 基準共振周波数； $\Delta W$ , 重量変化； $S$ , 電極面積、である。つまり、共振周波数変化と吸着量とは比例関係にある。

#### 5. HAp ナノ結晶-基板間の結合強度

結合強度の測定用の基板として、シリコン基板（山中セミコンダクター(株)製 AK-Y19533）を用いた。シリコン基板は、エタノール中で超音波を照射することで洗浄し、窒素雰囲気下において乾燥させた。その後、スパッタコータ ((株) Elionix 製 SC-700) を用いてシリコン基板表面に金を蒸着し (7 mA ; 3.5 分)、前述の手技と同様に金-チオール反応により各種官能基を導入した。

各種官能基を導入したシリコン基板表面に HAp ナノ結晶をエタノール中で吸着させ、AFM を用いて HAp ナノ結晶-基板間の結合強度を測定した。測定は室温、大気圧下で行い、AFM は日本ビーコ(株)製 DI3100AFM を用い、カンチレバーは MikroMasch 製 CSC37/ALBS/15 を用いた。

#### C. 研究結果および考察

##### 1. HAp ナノ結晶の作製

当該研究課題で用いる HAp は、生体内における溶解性の低減を目的とし、800℃で焼成を行った後に用いている。しかし、高温で焼成することで粒子同士が融着するという問題があった。前年度の研究では、融着防止剤を用いる新規焼成方法を開発し、HAp ナノ結晶の単分散化に成功している。

本研究では、前年度の検討において得られた知見をもとに、エマルション法の温度を変化させることで球状またはロッド状に形態を制御し、新規

焼成方法により結晶性を高めた HAp ナノ結晶を用いた (図 1)。球状 HAp ナノ結晶は約 80 nm の平均粒子径をもち、ロッド状 HAp ナノ結晶の *c* 軸 (長軸) 方向の平均粒子径は約 600 nm、*a* 軸 (短軸) 方向の平均粒子径は約 90 nm であった。

## 2. HAp ナノ結晶の吸着挙動

QCM は、小型でかつ簡易な測定システムであり、ナノグラムオーダーの重量変化が測定できることから様々な研究分野で定着している測定法である。また、水晶振動子表面の金電極に、金-チオール反応を用いることで様々な官能基を修飾できる (図 2)。本研究では、アニオン性を示す親水性のカルボキシル基、中性を示す疎水性のメチル基、カチオン性を示す親水性のアミノ基を導入した基板をモデル基板として使い、検討を進めた。

金-チオール反応後の基板/水滴の接触角を図 3 に示した。ここで、接触角が高いほど疎水性を示し、接触角が低いほど親水性を示す。1-propanthiol と反応させた後、接触角が増加したことから疎水性のメチル基が導入されたことが確認できる。一方、3-mercaptopropionic acid と反応させた場合、接触角が低下したことから、親水性のカルボキシル基が導入されたことが確認できる。2-aminoethanethiol と反応させた場合では反応前後での接触角の変化は観察されなかった。これは、ピランハ溶液で洗浄した金基板表面とアミノ基を導入した際の基板表面の親水性がほぼ等しいためと考えられる。

金-チオール反応後の基板のエタノール中におけるゼータ電位を図 4 に示した。ゼータ電位は基板の表面電位とよく一致する値である。3-mercaptopropionic acid と反応させた場合、ゼー

タ電位はマイナスの値を示したことから、アニオン性のカルボキシル基が導入されたことが確認できる。1-propanthiol と反応させた後、ゼータ電位はほぼ 0 であり、中性のメチル基が導入されたことが確認できる。また、2-aminoethanethiol と反応させた場合では、プラスの電荷を示したことから、カチオン性のアミノ基が導入されたことが確認できる。

以上の接触角測定およびゼータ電位測定の結果から、水晶振動子の金電極表面への官能基導入が確認できた。

次に、官能基を導入した水晶振動子への HAp ナノ結晶の吸着挙動を QCM を用いて測定した。ここで、HAp ナノ結晶を分散させる媒体として、分散性が良好であったエタノールを用い、温度は 20°C で測定した。

まず、測定時の QCM 測定の安定性を調べるために、HAp を含まないエタノール媒体のみを添加し、その共振周波数変化を経時的に測定した (図 5)。エタノールのみを添加することで共振周波数は約 100 Hz 変化した。後述する結果から、HAp 含むエタノール媒体を添加した場合の周波数変化は約 2000 Hz 程度であり、媒体による影響はほぼ無視できることが確認できた。

図 6 には、ロッド状 HAp ナノ結晶を用い、各種官能基を導入した基板表面への吸着挙動を示した。HAp ナノ結晶の吸着量および吸着速度はアミノ基、メチル基、カルボキシル基の順に増加した。これは、HAp 結晶 *a* 面に存在するカチオン性のカルシウムイオンサイトによってロッド状 HAp ナノ結晶がカチオン性を示しているためと考えられる。つまり、同じカチオン性であるアミノ基や電荷示さないメチル基との相互作用は弱く、アニオン性であるカルボキシル基との相互

作用は強いため、ロッド状 HAp 結晶はカルボキシル基を導入した基板により多く吸着したと考えられる。

次に、球状 HAp ナノ結晶について同様に吸着量を測定した。その結果を図 7 示す。それぞれの官能基表面に対する吸着量は、ロッド状粒子に比べて増加していることが分かる。また、ロッド状ナノ結晶では吸着量が小さかったアミノ基表面への吸着量が大幅に増加した。これは、HAp の形態が球状であるため、粒子表面の電荷の偏りが小さくなったためと考えられる。

図 8 には、カルボキシル基を導入した基板へのロッド状 HAp ナノ結晶の吸着挙動を温度を変化させて測定した結果を示した。最終的な吸着量はほぼ変化が無かったが、測定温度の上昇によって吸着速度が増加した。これは、HAp ナノ結晶表面に吸着したエタノールが温度の上昇とともに脱着することで、エタノール分子による静電遮蔽効果が弱まったものと考えられる。

以上の結果から、HAp ナノ結晶の形態およびその表面状態、基板表面の状態を制御することで HAp ナノ結晶の吸着挙動を制御できることが明らかとなった。

### 3. HAp ナノ結晶の結合強度

これまで、HAp-基板間の結合強度は、超音波処理による HAp の脱落など、定性的に評価を行ってきた。今回は AFM のコンタクトモードを用いることで、HAp ナノ結晶-基板間の結合強度を定量的に評価した。これまでに、カンチレバー先端をシリカ微粒子などで修飾し、同カンチレバーのフォースカーブを測定することでシリカ微粒子-基板間に働く力を直接測定した報告がある。しかし、当該研究課題で用いるコーティング

法では HAp ナノ結晶と基板とを接触した後に化学反応を介して固定化するものであるため、上記の方法による結合強度の直接測定は困難である。このため本研究では、結合強度の新しい測定方法の開発を試みた。本研究で行った測定方法は以下の通りである。まず、AFM のカンチレバーのたわみ変位を一定とすることで基板に加わる力を一定に保ち、カンチレバーを走査した。この際、HAp ナノ結晶に加わる力が HAp ナノ結晶-基板間の結合力より小さい場合には HAp ナノ結晶は移動しないが、結合力よりも大きい場合に移動する (図 9)。結晶が移動した際にカンチレバーに加えた力は HAp ナノ結晶-基板間の結合強度をそのまま示すものではないが、同結合強度に相関する値である。本研究では、カンチレバーに加えた力を用いて結果を示した。今後、AFM による解析をすすめ、結合強度の絶対値を解析する予定である。

図 10 には、本研究で使用したカンチレバー (MikroMasch 製 CSC37/ALBS/15 ; たわみバネ定数  $k$ , 0.3 N/m) の走査型電子顕微鏡像とフォースカーブを示した。フォースカーブの傾きから、 $dZ/dD = 211.6 \times 10^{-9}$  m/V であり、カンチレバーに加わる力は次式 (2) で得られる :

$$F [N] = k [N/m] \cdot d [m] \\ = k [N/m] \cdot dZ/dD [m/V] \cdot D [V] \quad (2)$$

ここで、 $k$ , バネ定数 [N/m];  $Z$ , 高さ方向の変位 [m];  $D$ , レーザ検出器から求めたたわみ変位 [V], である。

図 11 には、各官能基を導入した基板とロッド状 HAp 結晶間の結合強度を示した。結合強度はアミノ基、メチル基、カルボキシル基の順にわずかながら増加した。この結果は、前述の吸着挙動と同様に、ロッド状 HAp ナノ結晶はアニオン性

を示すカルボキシル基と静電的な引力によって結合したことを示すものである。

#### D. 結論

本研究では、各種基板表面へのハイドロキシアパタイト (HAp) 結晶のナノコーティングを精密制御することを目的として、モデル基板表面への HAp ナノ結晶の吸着挙動および結合状態を定量的に評価した。アニオン性を示す親水性のカルボキシル基、イオン性を示さない疎水性のメチル基、カチオン性を示す親水性のアミノ基をそれぞれ導入した金基板をモデル基板として用いて、HAp ナノ結晶の吸着挙動を水晶振動子マイクロバランスにより評価し、その結合強度を原子間力顕微鏡により評価した。その結果、HAp ナノ結晶の結晶 a 面に存在すること考えられるカチオン性電荷によって、アニオン性を示す基板表面に対してより高密度に吸着し、より高い結合強度を示すことが明らかとなった。

今後は、内シャント不全の治療に用いるステントグラフト表面への HAp コーティングの精密制御を行い、コーティング状態が細胞・組織接着性に与える影響について検討を進める予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M. Okada and T. Furuzono, Nano-sized ceramic particles of hydroxyapatite calcined with an anti-sintering agent, J. Nanosci. Nanotech., in press
- 2) M. Okada and T. Furuzono, Fabrication of high-dispersibility nanocrystals of calcined hydroxyapatite, J. Mater. Sci., in contribution
- 3) M. Okada and T. Furuzono, Highly dispersed

rod-like nanocrystals of calcined hydroxyapatite fabricated by calcination with an anti-sintering agent surrounding the crystals, J Nanoparticle Res., in contribution

- 4) M. Okada, K. Furukawa, H. Tanaka, T. Kawai and T. Furuzono, Interaction between hydroxyapatite nanocrystal and substrate through ionic interactions and covalent bonding, Langmuir, in preparation

##### 2. 学会発表

- 1) 岡田正弘, 古菌 勉, ポリアクリル酸を融着防止助剤として用いたナノアパタイト仮焼体の作製, 第 54 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 神奈川 (2005.5.25-27)
- 2) M. Okada and T. Furuzono, Calcined Hydroxyapatite Nanocrystals Dispersible in Liquid Media as Single Crystals, International Symposium on Soft-Nanotechnology, 北海道大学会議場, 北海道 (2005.6.20-21)
- 3) M. Okada, T. Furuzono, Calcination of hydroxyapatite nanoparticles with poly(acrylic acid, calcium salt) as an anti-sintering agent surrounding the particles, The 8th SPSJ International Polymer Conference (IPC2005), 福岡国際会議場, 福岡 (2005.7.26-29)
- 4) M. Okada, T. Furuzono, Preparation of Nano-Sized Hydroxyapatite Single-Crystal Particles by Calcined with an Anti-Sintering Agent Interposed among the Particles, 19th European Conference on Biomaterials, Sorrento, Italy (2005.9.11-15)
- 5) 古川敬子, 河原豊, 芹澤武, 岡田正弘, 古菌 勉, アパタイトナノ結晶-基板間の界面相互作用の究明, 日本セラミックス協会 2006

年年会，東京大学駒場 I キャンパス，東京  
(2006.3.14～16)

- 6) 古川敬子，河原 豊，芹沢 武，岡田正弘，  
古菌 勉，新規なアパタイトナノ単結晶体  
を用いた高分子界面複合体の微細構造制御，  
第 55 回高分子学会年次大会，愛知，名古屋  
国際会議場 (2006.5.24～26)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) PCT 出願 PCT/JP2005/016837『セラミックス  
粒子群およびその製造方法、並びにその利  
用』，(出願人) 科学技術振興機構，財団法  
人ヒューマンサイエンス振興財団，(発明者)  
古菌 勉，岡田正弘



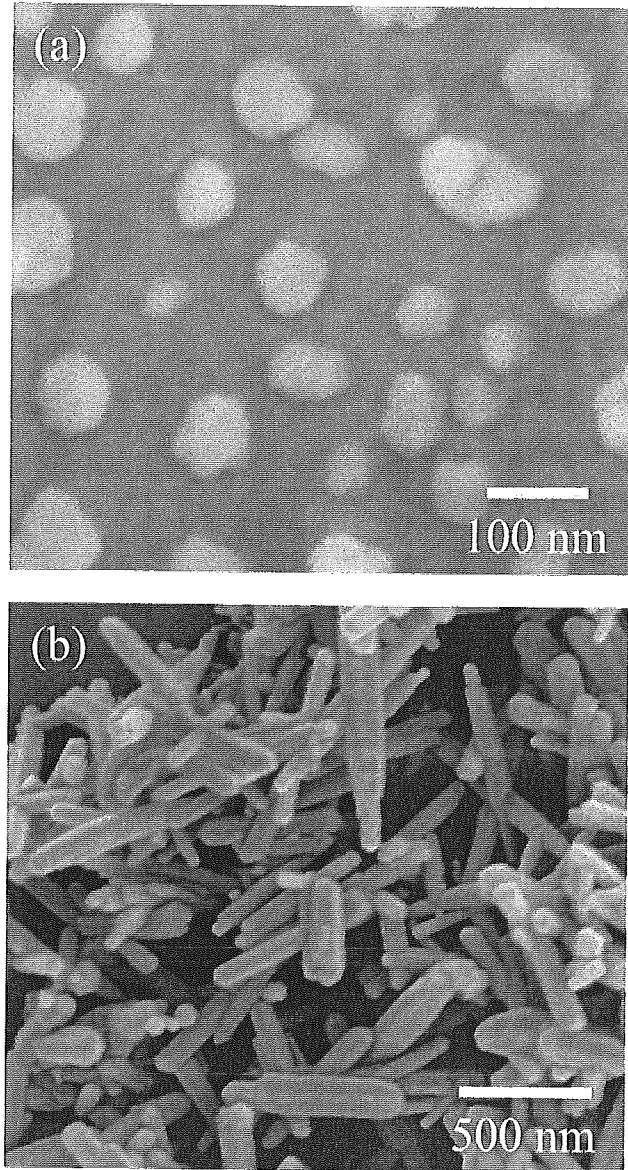


図 1. 融着防止剤を添加して仮焼した球状 HAp ナノ結晶 (a) とロッド状 HAp ナノ結晶

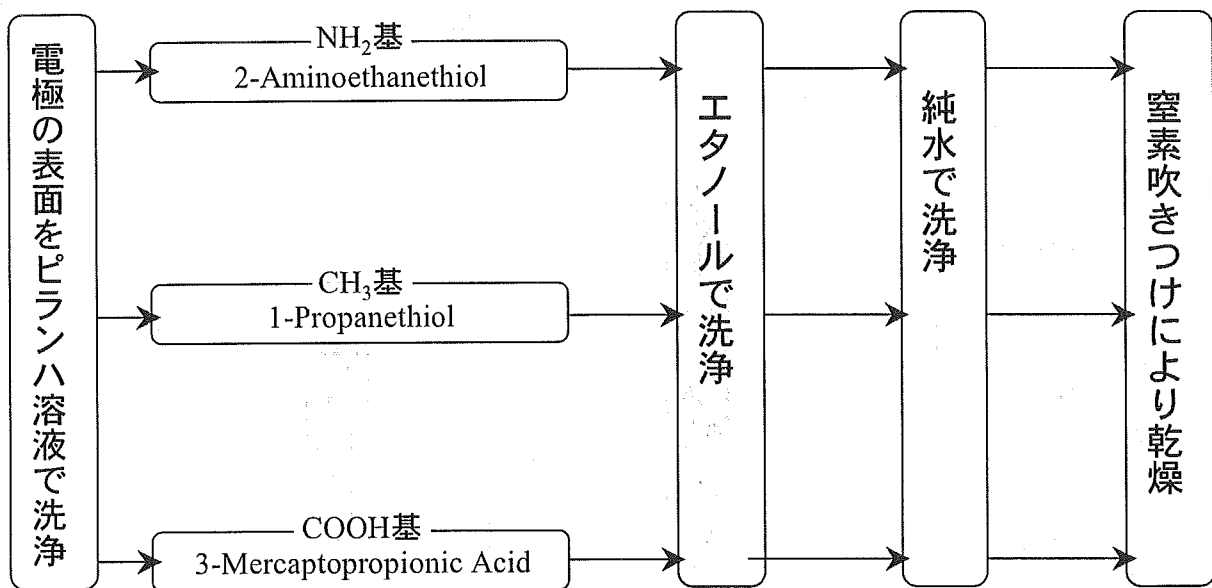


図2. モデル基板の調製方法。QCM 用水晶振動子の金電極表面に、金-チオール反応を利用して、アミノ基、メチル基、カルボキシル基の Self-Assembled monolayer を導入した。

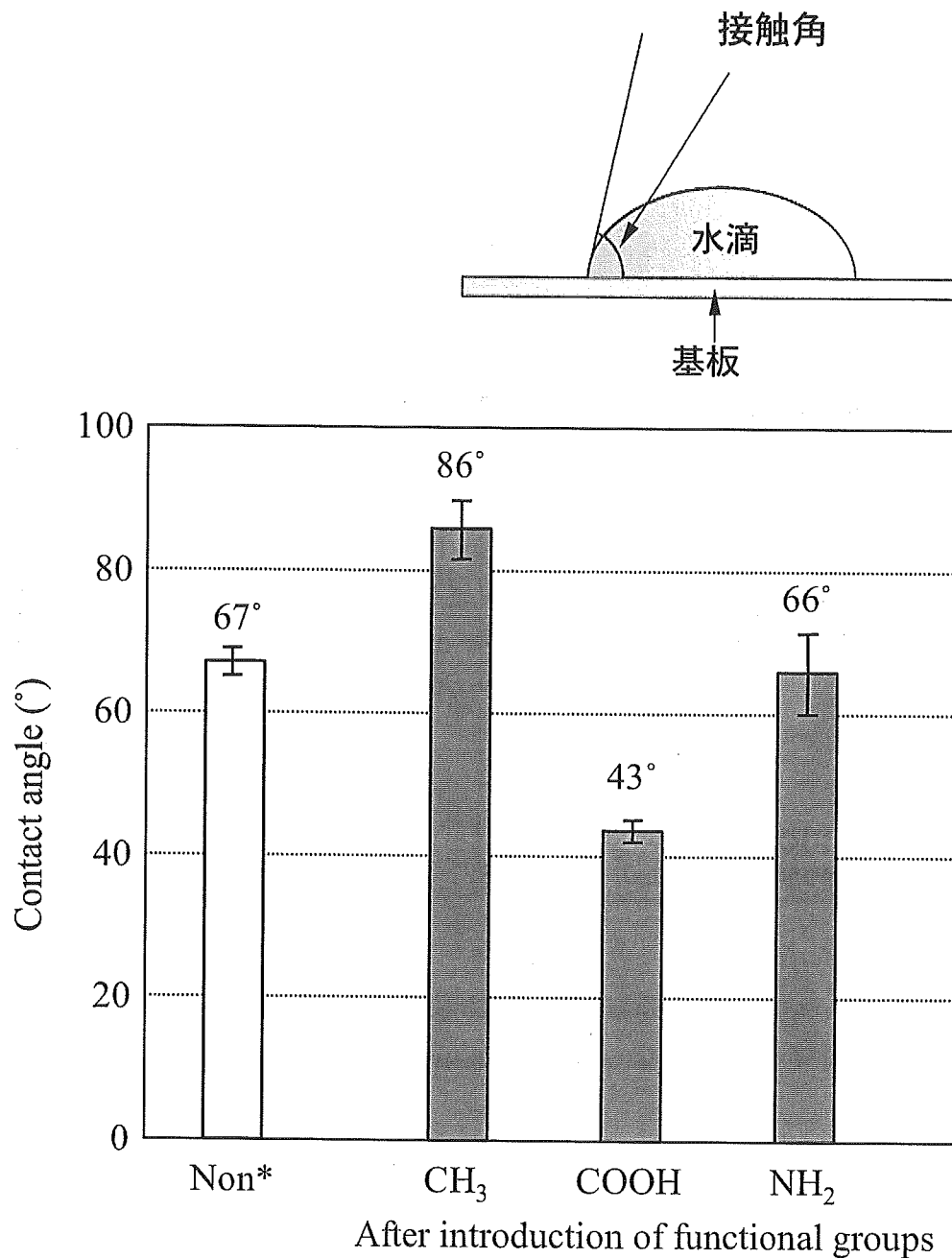


図3. 官能基導入前後の金基板と水滴との接触角。接触角が高いほど疎水性を示し、接触角が低いほど親水性を示す。1-propanthiol と反応させた後、接触角が増加したことから疎水性のメチル基が導入されたことが確認できる。一方、3-mercaptopropionic acid と反応させた場合、接触角が低下したことから、親水性のカルボキシル基が導入されたことが確認できた。2-aminoethanethiol と反応させた場合では反応前後での接触角の変化は観察されなかった。これは、アミノ基の親水性があまり高くないためと考えられる。

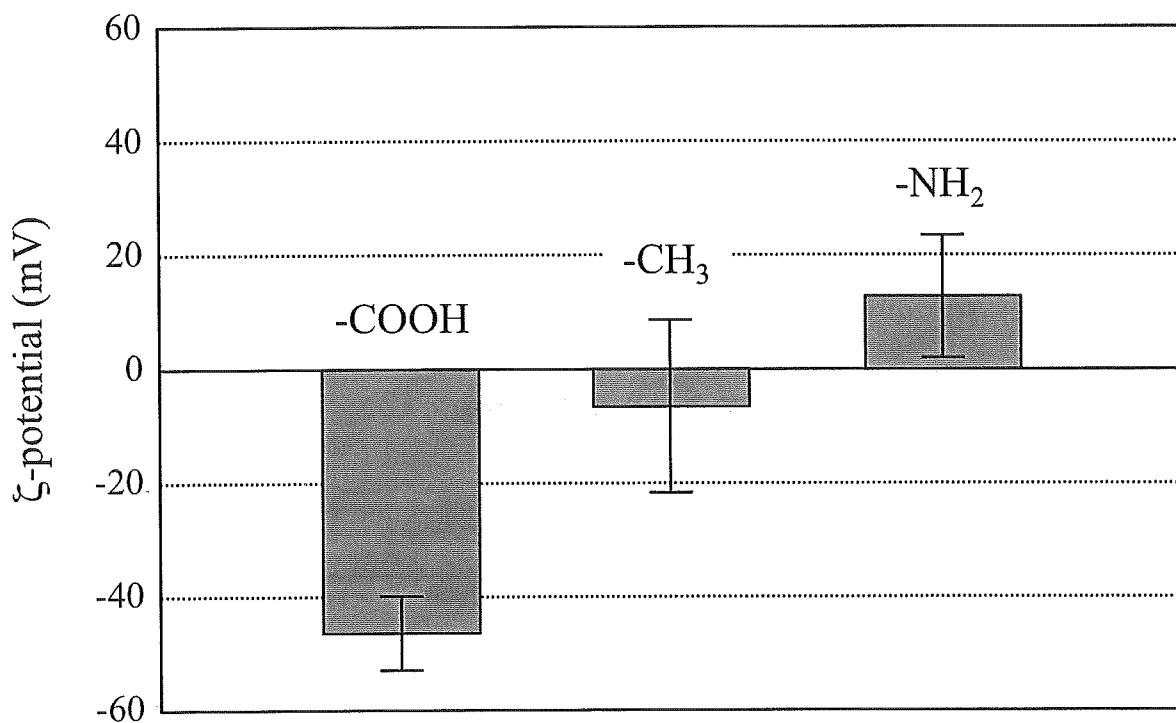


図 4. 官能基導入後の金基板のゼータ電位。ゼータ電位は基板の表面電位とよく一致する値である。3-mercaptopropionic acid と反応させた場合、ゼータ電位はマイナスの値を示したことから、アニオン性のカルボキシル基が導入されたことが確認できた。1-propanthiol と反応させた後、ゼータ電位はほぼ0であり、無電荷のメチル基が導入されたことが確認できる。また、2-aminoethanethiol と反応させた場合では、プラスの電荷を示したことから、カチオン性のアミノ基が導入されたことが確認できる。