

厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業

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 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 古菌 勉

平成 19 年（2007 年）4 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業

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 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 古菌 勉

平成 19 (2007) 年 4 月

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. ナノアパタイト複合材料の結合強度の定量化	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. ナノアパタイト複合化グラフト、ステントおよび ステントグラフトの動物実験	19
宮武 邦夫 (国立病院機構大阪南医療センター・院長)	
3. 薬物担持複合材料の機能	49
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. 薬物担持ステントの動物実験	63
田中 良一 (岩手医科大学放射線医学講座・助手)	

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）-0660

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アパタイト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って、再狭窄防止システムの構築による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、ナノセラミックス複合法の精密制御のために結合強度の定量化を行い、さらに、これまでに開発してきたナノアパタイト複合化ステントおよびステントグラフトの動物実験を行った。また、薬物溶出機能を付与したステントの創出を目指して検討を行った。

A. 研究組織

研究分担者 所属施設・役職

宮武 邦夫 国立病院機構大阪南医療センター・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 岩手医科大学放射線医学講座
・助手、附属循環器医療センター兼務

B. 研究目的

日本透析医学会統計調査委員会による 2005 年末における統計調査によると、我が国の透析人口は 257,765 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・再閉塞をきたす症例が多く、最終的にグラフト、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、長期透析患者の安定した血液透析の実現と Quality of Life (QOL) の向上を最終目標とし、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細胞・組織接着性の高いハイドロキシアパタイトセラミックスをナノスケールで強固にコーティング（複合化）した新規なステントグラフトの創出を目的としたものである。ステントグラフト内外にコートしたアパタイトの細胞・組織接着性によって短期間で新生内膜を被覆させ、さらに、ステント内側に内膜過形成抑制薬物を担持・放出させることで、優れた再狭窄防止システムが実現できると

考えられる。また、この複合法は、凝血効果を示すコラーゲンなどを用いる必要がないために血流障害の恐れが少なく、このため、大口徑のみでなく中小口径のグラフトにも好適であると期待される。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、滅菌性に優れると考えられる。

平成 16 年度から平成 17 年度までの検討では、まず、媒体中で高い分散性を示す新規なハイドロキシアパタイト材料の開発を試み、融着防止剤存在下での焼成法（マトリックス支援焼成法）を開発することで、ナノサイズで分散可能なアパタイト焼成体（ナノアパタイト）の作製に世界にさきがけて成功した。さらに、複合化させる基材表面に対するナノアパタイトの吸着挙動について検討することで、ナノアパタイト複合法を精密制御するための基礎的知見を得た。

次に、グラフト基材（ポリエステル）の表面処理条件の最適化を行い、さらに、高分散性ナノアパタイトを用いることで、単層かつ均一にナノアパタイトが複合化したグラフト基材の作製に成功した。このナノアパタイト複合化グラフト基材の細胞接着性について *in vitro* で検討を行った結果、未処理基材と比較して高い血管内皮細胞接着性を示し、さらに、その接着性は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。また、ステント基材（ステンレス SUS316L）のナノアパタイト複合化に関しても同様に検討を行い、ナノアパタイト複合化ステントの作製に成功した。このナノアパタイト複合化ステント基材の細胞接着性について *in vitro* で検討を行った結果、未処理基材に比べて高い血管平滑筋細胞接着性を示すことを明らかとした。

また、グラフト表面へのナノアパタイト複合

化の効果を評価するために、イヌ正常頸動脈にグラフトを 2 週間あるいは 4 週間置換し、未処理グラフトと比較した。その結果、ナノアパタイトをグラフト表面に複合化することで、内皮細胞の早期被覆および内膜・外膜組織の早期成熟が確認された。これは、ナノアパタイト複合化表面によって自己組織マトリックスの形成が促進されたためと考えられる。

さらに、ナノアパタイト複合化ステントに薬物溶出機能を付与するために、モデル化合物として用いた色素化合物のナノアパタイトへの吸着・放出挙動について検討を行った。その結果、ナノアパタイトの形状および結晶表面の電荷状態を制御することで、各種色素化合物の吸着特性を制御できることが明らかとなった。さらに、その放出挙動は媒体中のイオン種によって大きく影響されることが明らかとなった。

本年度の検討では、まず、ナノアパタイト複合化を精密制御するために、ナノアパタイト-基材間の結合強度の定量化に関してさらなる検討を行った。また、これまでに作製してきたナノアパタイト複合化グラフト、ステントおよび両者を一体化したステントグラフトの動物実験を行った。さらに、平滑筋細胞の増殖を抑制する薬物であるシロリムスをナノアパタイト複合化ステントに担持させた新規ステントの開発を行い、その機能の *in vitro* 評価および *in vivo* 評価を行った。

C. 研究方法および研究結果

研究成果（1）：ナノアパタイト複合材料の結合強度の定量化（古菌）

各種基材表面へのナノアパタイト複合化を精密制御することを目的として、ナノアパタイト-基材間の結合強度について原子間力顕微鏡を用

いて定量的に評価した。この際、基材としてステンレスを対象とし、前年度に検討した低分子反応による官能基導入と高分子重合反応による官能基導入とを比較した。その結果、高分子重合反応によって官能基を導入した基材を用いた場合には有意に高い結合強度を示したことから、ナノアパタイト表面と基材との表面ラフネスの一致性が結合形成に重要であることが示唆された。さらに、基材表面に導入する官能基の種類の影響について検討を行った。その結果、官能基としてカルボキシル基を用いた場合よりもアルコキシシリル基を用いた場合の方が有意に高い結合強度を示したことから、カルボキシル基とアパタイト表面に存在するカルシウムイオンとのイオンの相互作用による結合に比べて、アルコキシシリル基とアパタイト表面との水酸基とのカップリング反応による共有結合はより安定に形成することが明らかとなった。

研究成果（２）：ナノアパタイト複合グラフト、ステントおよびステントグラフトの動物実験（宮武）

これまでの検討によって創出したナノアパタイト複合化グラフト、ステント、および両者を一体化したナノアパタイト複合化ステントグラフトの動物実験を行った。

グラフトに関しては、これまでの検討においてイヌの正常頸動脈に2週間あるいは4週間置換した結果、ナノアパタイト複合化グラフトを用いることで内皮細胞の早期被覆および内膜・外膜組織の早期成熟を確認している。今回、より長期的な3ヶ月間の置換実験を行った結果、ナノアパタイト複合化グラフトを用いることで、埋植初期に薄く形成した内膜が長期間安定に存在することが

明らかとなった。

次に、ステンレス（SUS316L）製ステントの留置試験を行った。その結果、ナノアパタイト複合化ステントを用いることで、留置後初期の炎症、異物巨細胞の出現および血栓形成の抑制が観察され、さらに、薄く安定した新生内膜が形成した。

さらに、ナノアパタイト複合化ステントおよびグラフトの両者を一体化したステントグラフトの留置試験を行った結果、前述したような薄い新生内膜の形成に加え、内膜とグラフトとの接触部における接着性が確認でき、安定したステントグラフトの留置が実現できた。

以上の結果は、ステントおよびグラフトに強固に複合化したナノアパタイトの表面に血漿タンパク質が吸着性することで、血液細胞などに対して良好な足場として働いたためと考えられる。

研究成果（３）：薬物担持複合材料の機能（稲永）

新しい薬物溶出ステントを創出することを目的として、ナノアパタイト複合化ステントへの薬物の担持・放出について検討を行った。まず、新生内膜の過形成を抑制可能な薬物であるシロリムスがナノアパタイト表面に吸着し、さらに徐放されることを確認した。次に、ナノアパタイト複合化を透明なポリエステル基材に対して行うことで、光学顕微鏡による血管平滑筋細胞増殖挙動の直接観察を可能とした。さらに、同透明基材上で血管平滑筋細胞の増殖挙動を直接観察し、シロリムス担持による増殖抑制作用を確認した。この増殖抑制作用は、ナノアパタイトの表面性状および表面電位によって薬物放出挙動を制御することでさらに最適化が可能であると考えられる。

研究成果（４）：薬物担持ステントの動物実験（田中）

ナノアパタイト複合化ステントにシロリムスを担持させ、イヌ大腿動脈および両側総頸動脈への留置試験を行った。その結果、留置２週後における内膜の厚さは、未処理ステント、ナノアパタイト複合化ステント、シロリムス担持-未処理ステント、シロリムス担持-ナノアパタイト複合化ステントの順に薄くなった。このことから、ナノアパタイト複合化ステントに担持した薬物の短期（治癒期間）での放出、および、薬物放出後に露出するアパタイト表面の細胞接着性によって内皮細胞を被覆させることで、新生内膜過形成および血栓閉塞防止を可能とする新しいステント創出の可能性を見出した。

（倫理面への配慮）

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。動物実験は、国立循環器病センター動物管理規則に則り、動物愛護を十分に配慮して行った。使用数が最小限になるように計画を立案し、外科的操作は麻酔および清潔下にて行った。術後は鎮静剤を投与し、毎日経過観察を行い、観察記録簿をつけた。

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あるい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、壁すり速度を制御することによって細胞の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

トに担持・徐放することによって内膜過増殖を抑制する方法があるが、血流中に生体適合性の低い基材が長期間露出し続けるため、慢性期に血栓閉塞の引き金となる危険性がある。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、ハイドロキシアパタイトセラミックスをステントグラフト表面に複合化した新規なステントグラフトの創出を目的としたものである。アパタイト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報告されている。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アパタイト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。このような性質をもつハイドロキシアパタイトセラミックスをナノスケールでグラフト内部に複合化することで、短期間の血管内皮細胞被覆が実現できた。これにより血管開存の長期発現が可能となると期待される。ここで、当該研究課題で用いたアパタイト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と考えられる。

また、ナノアパタイト複合化ステントへ薬物担持・徐放機能の付与に成功し、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した。前述したように、現在の薬物溶出ステントは血流中に生体適合性の低い基材が長期間露出し続けるため、慢性期にステント血栓症の引き金となる危険性がある。当該研究課題によって創出したナノアパタイト複合化ステントは、担持した薬剤の短

期（治癒期間）での放出、および、その後に露出するアパタイト表面の細胞接着性によって内皮細胞の被覆が期待できる。

以上のナノアパタイト複合化ステントおよびナノアパタイト複合化グラフトを一体化したステントグラフトを臨床応用することで、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。また、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) シヤント不全およびシヤ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、ナノアパタイト複合材料の結合強度の定量化についてさらに検討を行うことで、基材に導入する官能基の種類および導入方法がナノアパタイト-基材間の結合形成に大きく影響を与えることを明らかとした。次に、これまでに作製してきたナノアパタイト複合化グラフト、ステントおよび両者を一体化したステントグラフトの動物実験を行った結果、埋植初期に薄く安定した内膜が形成し、さらに、内膜とグラフトの接触部において良好な接着性が確認でき、安定したステントグラフトの留置が実現でき

た。また、平滑筋細胞の過増殖を抑制可能な薬物であるシロリムスを担持したナノアパタイト複合化ステントの作製に成功し、動物実験によって留置初期の内膜過形成を抑制することに成功した。新規ステントグラフトの臨床応用によって再狭窄防止システムが実現でき、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。

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, T. Inenaga, 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.*, **52**, 315-320 (2006)
- 2) T. Furuzono, Development of Nano-Ceramic Coating on a Substrate through Covalent Linkage and Its Biological Properties, *Adv. Sci. Tech.*, **49**, 37-44 (2006)
- 3) M. Okada and T. Furuzono, Fabrication of high-dispersibility nanocrystals of calcined hydroxyapatite, *J. Mater. Sci.*, **41**, 6134-6137 (2006)
- 4) M. Okada and T. Furuzono, Nano-sized ceramic particles of hydroxyapatite calcined with an anti-sintering agent, *J. Nanosci. Nanotech.*, **7**, 848-851 (2007)
- 5) M. Okada and T. Furuzono, Calcination of

rod-like hydroxyapatite nanocrystals with an anti-sintering agent surrounding the crystals, *J. Nanoparticle Res*, Published Online on 22 July 2006

- 6) M. Okada, M. Masuda, R. Tanaka, K. Miyatake, D. Kuroda, and T. Furuzono, Preparation of hydroxyapatite-nanocrystals-coated stainless steel, and its cell interaction, *J. Biomed. Mater. Res.*, in contribution.
- 7) 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
- 8) 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. 解説、総説

- 1) 田中良一, 腸骨動脈領域閉塞性疾患 血管内治療, *Angiology Frontier* (メディカルレビュー社), **5** (2), 18-22 (2006)
- 2) 田中良一, 画像診断と病理 大動脈疾患, *画像診断* (秀潤社), **26** (10), 1192-1193 (2006)
- 3) 田中良一, 座談会 10年後の循環器イメージング, *CARDIAC PRACTICE* (メジカルビュー社), **17** (4), 85-96 (2006)
- 4) 古菌 勉, 岡田正弘, 医療機器の素材としての有機-ナノ無機ハイブリッド材, *高分子*, **56**, 129-132 (2007)

3. 書籍

- 1) 田中良一, 腹部大動脈瘤ステントグラフト治療において重要な側副血行のCT診断, 田林 暁一, 栗林 幸夫編: 大動脈瘤・大動脈解離診療のコツと落とし穴 (中山書店), pp. 60-61 (2006)
- 2) 田中良一, 骨盤下肢動脈の PTA/ステント, 臨床放射線編集委員会編: *Interventional radiology* のコツ (金原出版), pp. 1641-1645 (2006)
- 3) 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

4. 学会発表

- 1) 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, 第22回日本医工学治療学会大会, 福岡国際会議場, 福岡 (2006.4.21-23)
- 2) M. Masuda, M. Okada, S. Yasuda, H. Kadono, R. Tanaka, K. Miyatake, and 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)
- 3) 田中良一, 益田美和, 岡田正弘, 安田昌司, 植木光樹, 角野弘幸, 宮武邦夫, 古菌 勉, ナノセラミクス複合化人工血管および金属

- ステントの開発, 第35回日本IVR学会総会, 大阪国際会議場, 大阪 (2006.5.19)
- 4) 植木光樹, 古菌 勉, ステントグラフト実験計画, 第1回国循ステントグラフト班会議, 国立循環器病センター研究所, 大阪 (2006.5.19)
- 5) 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, 名古屋国際会議場, 愛知 (2006.5.24-26)
- 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, 名古屋国際会議場, 愛知 (2006.5.24-26)
- 7) 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, 兵庫県中央労働センター, 兵庫 (2006.7.21)
- 8) 田中良一, 古菌 勉, ステントグラフト一体化、留置法のレクチャー, 第2回国循ステントグラフト班会議, 国立循環器病センター研究所, 大阪 (2006.7.21)
- 9) 岡田正弘, 古菌 勉, Drug-Eluting Stent の開発, 第3回国循ステントグラフト班会議, 国立循環器病センター研究所 (2006.10.20)
- 10) 植木光樹, 古菌 勉, 動物実験の進歩状況, 第3回国循ステントグラフト班会議, 国立循環器病センター研究所, 大阪 (2006.10.20)
- 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, 小山富久, 高久田和夫, 海本浩一, 古菌 勉, 早期安定内膜の形成を目的としたナノアパタイトコーティング人工血管, 第44回日本人工臓器学会大会, パシフィコ横浜, 神奈川 (2006.10.31-11.2)
- 12) 角野弘幸, 益田美和, 植木光樹, 岡田正弘, 安田昌司, 田中良一, 宮武邦夫, 小山富久, 高久田和夫, 古菌 勉, 高分散性ナノハイドロキシアパタイト複合化ポリエステル製人工血管の生体内反応, 第28回日本バイオマテリアル学会大会, アルカディア市ヶ谷, 東京 (2006.11.27-28)
- 13) 古菌 勉, 益田美和, 植木光樹, 角野弘幸, 小粥康充, 田中良一, 小山富久, 高久田和夫, 岡田正弘, 人工血管素材としてのナノ無機複合体と *in vivo* 評価, 第56回高分子学会年次大会, 国立京都国際会館, 京都 (2007.5.29-31)
- 14) 岡田正弘, 益田美和, 小粥康充, 古菌 勉, アパタイト/高分子系ソフトナノセラミック・プロセッシングの精密制御, 第56回高分子学会年次大会, 国立京都国際会館, 京都 (2007.5.29-31)

分担研究報告書

ナノアパタイト複合材料の結合強度の定量化

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

各種基材表面へのナノアパタイト複合化を精密制御することを目的として、原子間力顕微鏡を用いてナノアパタイト-基材間の結合強度を定量的に評価した。ステンレス基材を対象とし、まず、前年度に検討を行った低分子反応による官能基導入と高分子重合反応による官能基導入とを比較した。その結果、高分子重合反応によって官能基を導入した基材を用いた場合に高い結合強度を示したことから、ナノアパタイト表面と基材との表面ラフネスの一致性が結合形成に重要であることが示唆された。さらに、基材表面に導入する官能基の種類の影響について検討を行った。その結果、官能基としてカルボキシル基を用いた場合よりもアルコキシシリル基を用いた場合の方が有意に高い結合強度を示したことから、カルボキシル基とアパタイト表面に存在するカルシウムイオンとのイオンの相互作用による結合に比べて、アルコキシシリル基とアパタイト表面との水酸基とのカップリング反応による共通結合はより安定に形成することが明らかとなった。

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結晶をナノオーダーで強固に複合化した新規なステントグラフトの創出を最終目的としている。

アパタイト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報告されている。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アパタイト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アパタイトを複合化する方法として、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、以上の方法によって得られるアパタイトは、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アパタイト焼成体（単結晶体）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（複合化）した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ナノアパタイトを強固に複合化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ナノアパタイト複合化法は、ナノアパタイト結晶の基材への吸着および結合形成過程からなり、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材料が創出できると考えられる。

本研究では、ナノアパタイト複合化の精密制御を目的として、これまでの検討において開発した高分散性ナノアパタイトとモデル基材表面との結合状態に関して原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて定量的に評価を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

アパタイト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 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 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 (KH_2PO_4)、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)、低分子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。基材の高分子重合反応に用いた γ -methacryloxy-propyl triethoxysilane (MPTS) は信越化学工業株式会社から提供されたものを減圧蒸留後に使用した。3-mercaptopropyltrimethoxy-silane はシグマ・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. 高分散性ナノアパタイトの作製

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アパタイト粒子を得た。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、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 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_2PO_4 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。

得られた低結晶性アパタイト粒子を融着防止剤存在下において焼成することで高分散性ナノアパタイトを調製した。この際、融着防止剤として用いた $\text{Ca}(\text{OH})_2$ とアパタイトとを混合する際に、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アパタイト粒子 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) を照射することでアパタイト粒子を単分散させた。そのアパタイト分散水中に、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を約 1.0 g 含む $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 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. 基材表面への官能基の導入

ステンレス基材をアセトン中に浸漬し、超音波洗浄を行った。洗浄後のステンレスを濃硝酸中に

室温で30分浸漬し、純水で洗浄することで表面の不動態を安定化させた。

3-mercaptopropyltrimethoxysilane を溶解させたエタノール中にステンレスを3時間浸漬し、エタノールで洗浄後に110°Cにおいて1時間熱処理を行うことでステンレス表面にチオール基を導入した。同ステンレスを用い、以下の手順に従って高分子重合反応を行った。まず、100 ml のフラスコ中にステンレスを静置し、媒体として用いたトルエンあるいはエタノールを注入し、70°Cにおいて窒素置換を行った。その後、モノマーであるMPTSあるいはアクリル酸を注入し、ラジカル開始剤である2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN)を溶解した媒体を注入することで高分子重合反応を開始させた。高分子重合反応は2時間行い、その後、エタノールで洗浄を行った。

4. ナノアパタイト-基材間の結合強度測定

調製したナノアパタイトをエタノールに分散させ、その分散液中に高分子重合反応を行ったステンレスを浸漬した。1時間後、ステンレスを取りだし、エタノールを用いて洗浄を行った。高分子重合反応でMPTSを用いてアルコキシシリル基を導入した場合には、アパタイト表面に存在する水酸基とアルコキシシリル基の固相縮合反応を減圧条件下110°Cにおいて2時間行った。反応後、ステンレス表面に結合していないナノアパタイトを除去するために、超音波洗浄機(20 kHz; 35W)を用いて洗浄した。

ナノアパタイト-基材間の結合強度は室温、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. ナノアパタイトの作製

当該研究課題で用いるアパタイトは、生体内における溶解性の低減を目的として、800°Cで焼成した後に用いている。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。これまでの検討によって、融着防止剤を用いる新規焼成方法を開発し、アパタイト焼成体(単結晶体)の単分散化に成功している。

本研究では、エマルション法の温度を変化させることで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ナノアパタイト結晶を用いた(図1)。ロッド状ナノアパタイトの*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. ナノアパタイト-基材間の結合強度測定

これまで、ナノアパタイト-基材間の結合強度は、超音波処理によるナノアパタイトの脱落の確認など、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、ナノアパタイト-基材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-基材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複合法は、ナノアパタイトと基材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、これまでに開発を行ってきた結合強度測定方法を用いて検討した。この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材に加わる力を一定に保ち、カンチレバ

一を走査した。この際、ナノアパタイトに加わる力がナノアパタイト-基材間の結合力より小さい場合にはナノアパタイトは移動しないが、結合力よりも大きい場合に移動する (図 2)。ナノアパタイトが移動した際にカンチレバーに加えた力はナノアパタイト-基材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。ここでは、カンチレバーに加えた力を用いて結果を示した。

図 3 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 (1) で得られる :

$$F \text{ [N]} = k \text{ [N/m]} \cdot d \text{ [m]} \\ = k \text{ [N/m]} \cdot dZ/dD \text{ [m/V]} \cdot D \text{ [V]} \quad (1)$$

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 4 には、官能基としてカルボキシル基を導入した基材とロッド状ナノアパタイトとの結合強度を示した。カルボキシル基を導入する方法として、低分子反応による方法を用いた場合では未処理基材を用いた場合の結合強度と有意差は認められなかった。一方、高分子重合反応によってカルボキシル基を導入した場合には、結合強度が約 5 倍に上昇した。この結果は、ナノアパタイトのラフネスと基材のラフネスとが一致していないため、鎖長の短い低分子化合物を用いた場合には接触面積が不十分であるために結合強度が小さくなることを示している。また、高分子の鎖長および密度を制御することでナノアパタイト-基材間の表面ラフネスの不一致をさらに相補できる

ことが予想され、より高い結合強度を得ることが可能であると考えられる。

図 5 には、官能基としてアルコキシシリル基を導入した基材を用いた結果を示した。未処理の場合と比較して、高分子重合反応によってアルコキシシリル基を導入することで結合強度が約 13 倍に上昇した。また、移動後のナノアパタイトを再度移動させた場合、結合強度が大幅に減少していることから、化学結合を介して固定化されていることが示された。また、官能基としてカルボキシル基を導入した基材と比較した結果、有意に高い結合強度を示した。このことから、アパタイト表面に存在するカルシウムイオンとカルボキシル基とのイオンの相互作用による結合に比べて、水酸基とアルコキシシリル基とのカップリング反応による共有結合はより安定に形成されることが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、各種基材表面へのハイドロキシアパタイト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、モデル基材表面とナノアパタイト間の結合状態を定量的に評価した。その結果、高分子重合反応によって官能基を導入した基材を用いることでナノアパタイトとの結合が有意に高くなったことから、ナノアパタイトと基材との表面ラフネスの一致性が結合形成に重要であることが示唆された。さらに、基材表面に導入する官能基の種類の影響について検討を行った結果、水酸基とアルコキシシリル基とのカップリング反応を行うことでナノアパタイト-基材間の結合がより安定に形成されることが明らかとなった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Furuzono, Development of Nano-Ceramic Coating on a Substrate through Covalent Linkage and Its Biological Properties, *Adv. Sci. Tech.*, **49**, 37-44 (2006)
- 2) M. Okada and T. Furuzono, Fabrication of high-dispersibility nanocrystals of calcined hydroxyapatite, *J. Mater. Sci.*, **41**, 6134-6137 (2006)
- 3) M. Okada and T. Furuzono, Nano-sized ceramic particles of hydroxyapatite calcined with an anti-sintering agent, *J. Nanosci. Nanotech.*, **7**, 848-851 (2007)
- 4) M. Okada and T. Furuzono, Calcination of rod-like hydroxyapatite nanocrystals with an anti-sintering agent surrounding the crystals, *J. Nanoparticle Res*, Published Online on 22 July 2006
- 5) 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. 解説、総説

- 1) 古菌 勉, 岡田正弘, 医療機器の素材としての有機-ナノ無機ハイブリッド材, *高分子*, **56**, 129-132 (2007)

3. 書籍

- 1) 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

4. 学会発表、その他

- 1) 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, 名古屋国際会議場, 愛知 (2006.5.24-26)
- 2) 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, 兵庫県中央労働センター, 兵庫 (2006.7.21)
- 3) 岡田正弘, 益田美和, 小粥康充, 古菌 勉, アパタイト/高分子系ソフトナノセラミック・プロセッシングの精密制御, 第56回高分子学会年次大会, 国立京都国際会館, 京都 (2007.5.29-31)

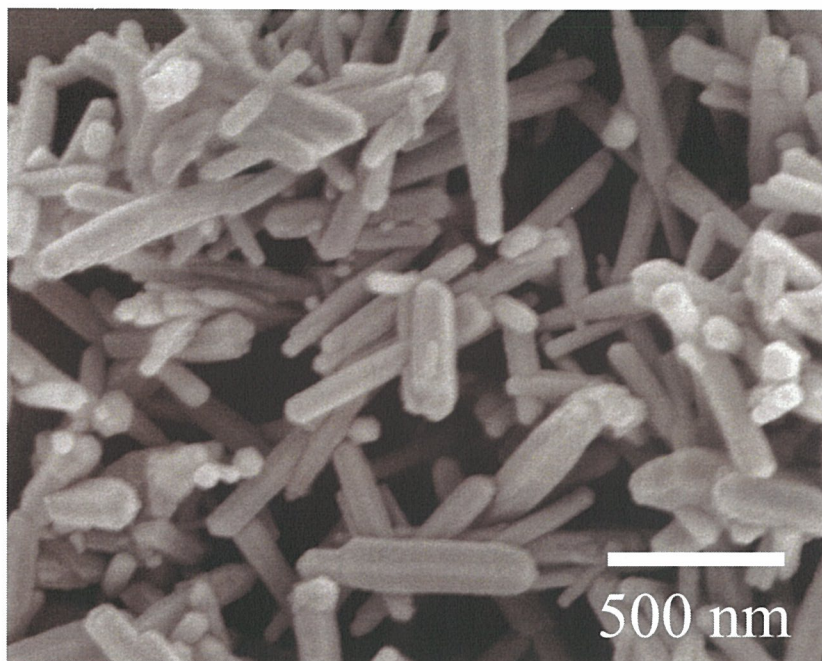


図 1. 融着防止剤を添加して焼成したロッド状ナノアパタイト

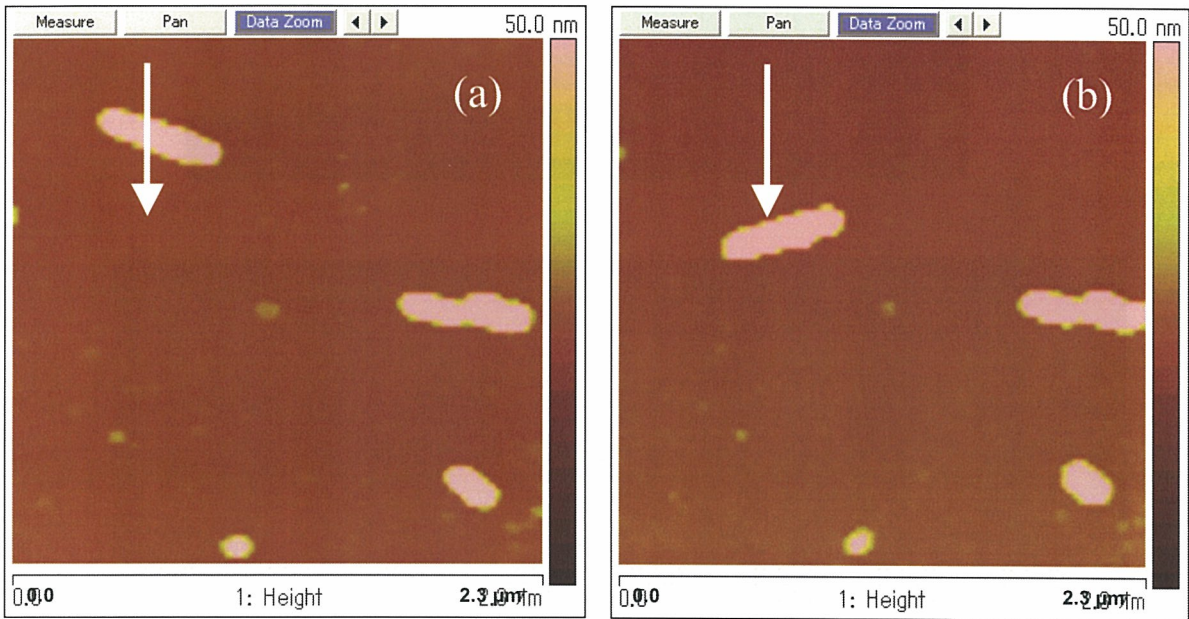


図 2. 原子間力顕微鏡 (AFM) のカンチレバーを走査する前後の AFM 像。カンチレバーに加える力が、ナノアパタイト/基材間の結合強度よりも弱い場合、ナノアパタイトは移動しない (a)。一方、カンチレバーに加える力が強い場合には移動する (b)。この際にカンチレバーに加えた力を結合強度として測定した。

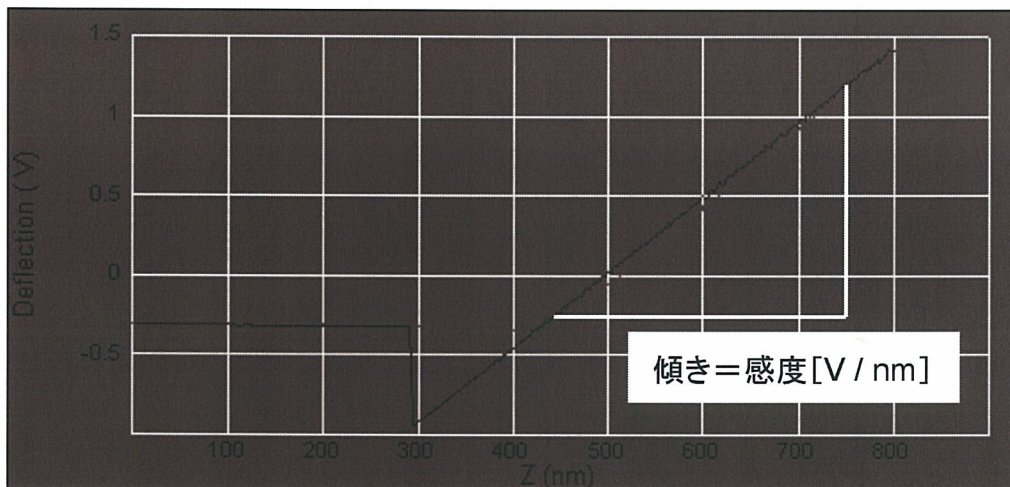
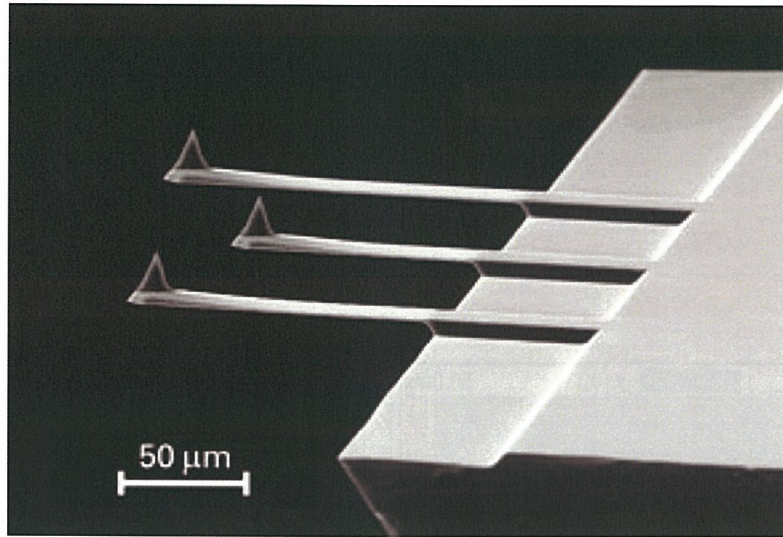


図 3. 本研究で使用したカンチレバーの走査型電子顕微鏡像とフォースカーブ。フォースカーブから、傾き $dZ/dD = 211.6 \times 10^{-9} \text{ m/V}$ であり、カンチレバーに加わる力は次式で得られる：

$$\begin{aligned}
 F \text{ [N]} &= k \text{ [N/m]} \cdot d \text{ [m]} \\
 &= k \text{ [N/m]} \cdot dZ/dD \text{ [m/V]} \cdot D \text{ [V]}
 \end{aligned}$$

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]

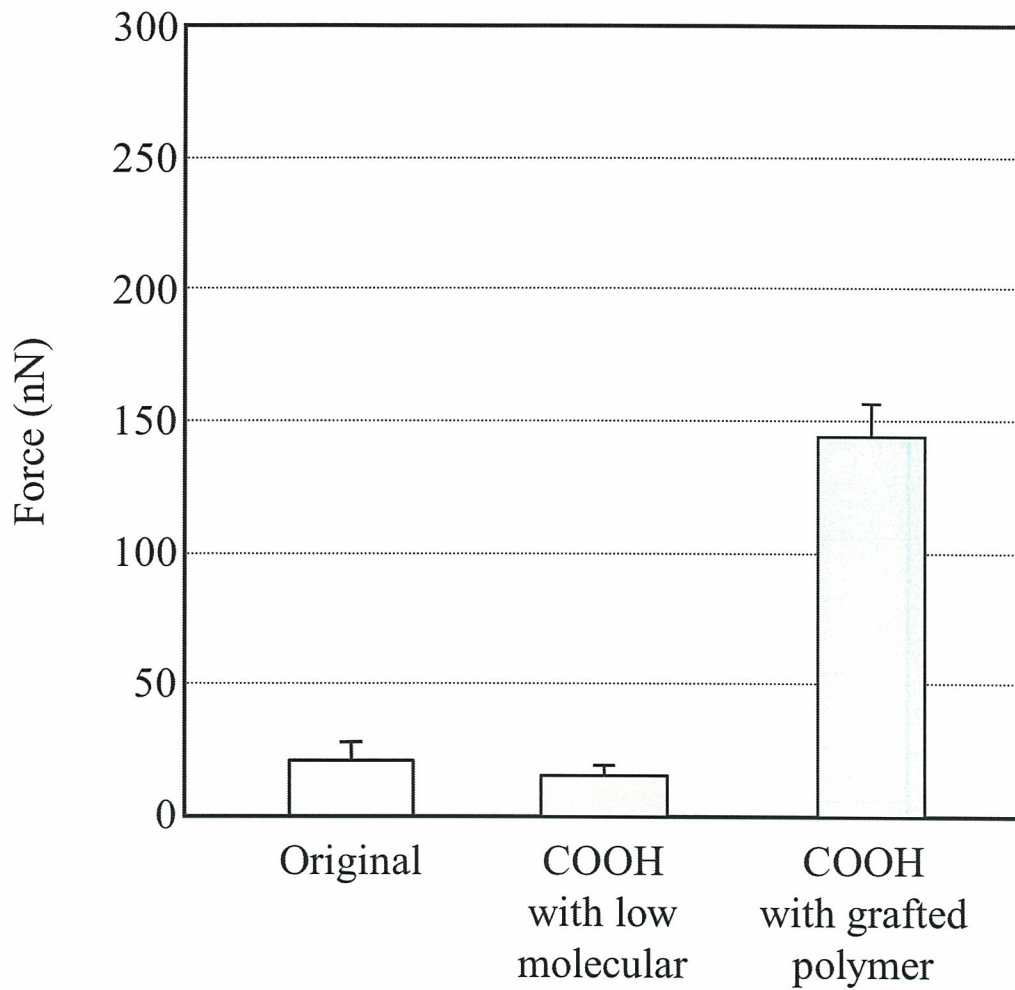


図4. 未処理ステンレス、カルボキシル基を低分子反応によって導入したステンレス、および、カルボキシル基を高分子重合反応によって導入したステンレス表面にナノアパタイトを吸着・結合させた後の結合強度。

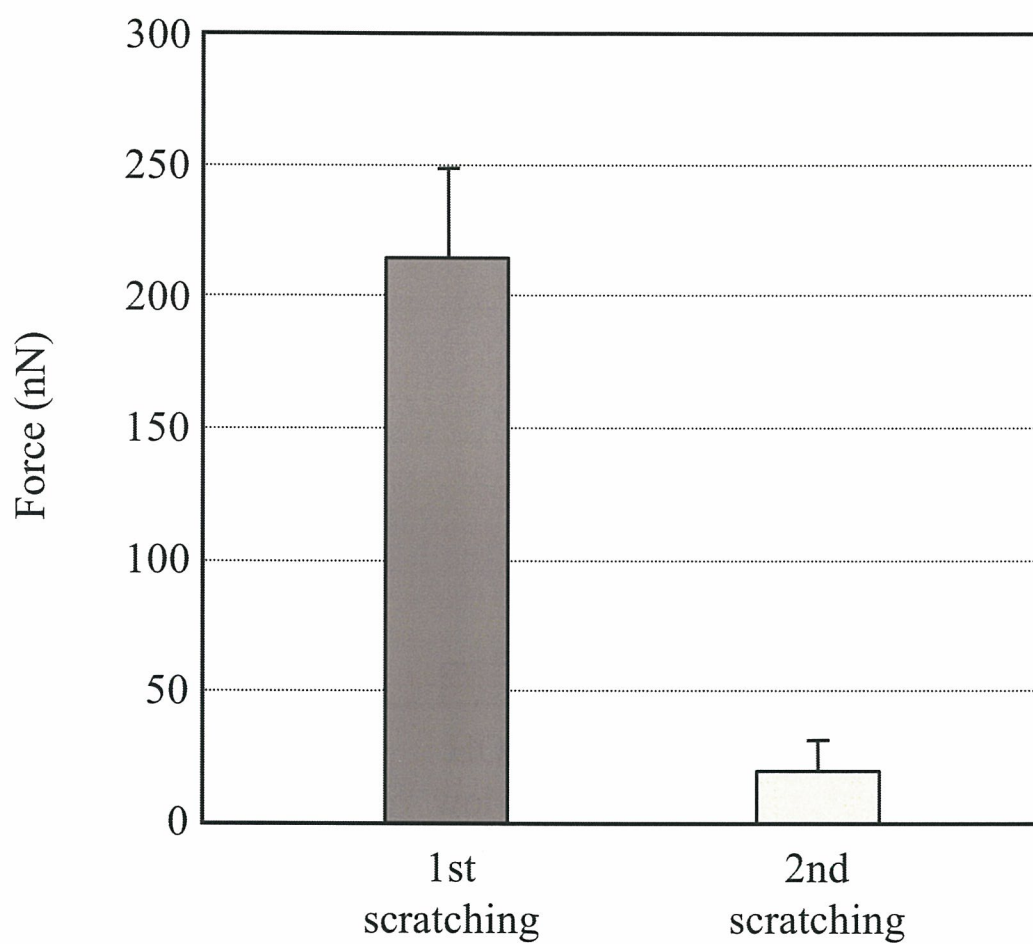


図 5. アルコキシシリル基を高分子重合反応によって導入したステンレス表面にナノアパタイトを吸着・結合させた後の結合強度。移動後のナノアパタイトを再度移動させた場合（2nd scratching）、結合強度が大幅に減少していることから、化学結合を介して固定化されていることが示された。