

2006年度第二回ステントグラフト班会議

『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』

日時：平成18年7月21日（金）13：00～14：40

場所：国立循環器病センター研究所 先進医工学センター2F 203号室

（司会）益田 美和 （国立循環器病センター研究所 生体工学部）

13:00-13:15 開会の挨拶と研究スケジュール（最終年度）の説明

（15分） 古菌 勉 （国立循環器病センター研究所 生体工学部・室長）

13:15-13:30 <発表>プロジェクト進捗状況報告

（15分） 角野 弘幸 （動物メディカルセンター・副院長）

13:30-13:45 質疑応答

（15分）

13:45-14:00 <説明>ステントグラフト一体化、留置法のレクチャー

（15分） 田中 良一 （岩手医科大学 放射線医学講座・助手）

14:00-14:15 質疑応答

（15分）

14:15-14:35 <総合討論>

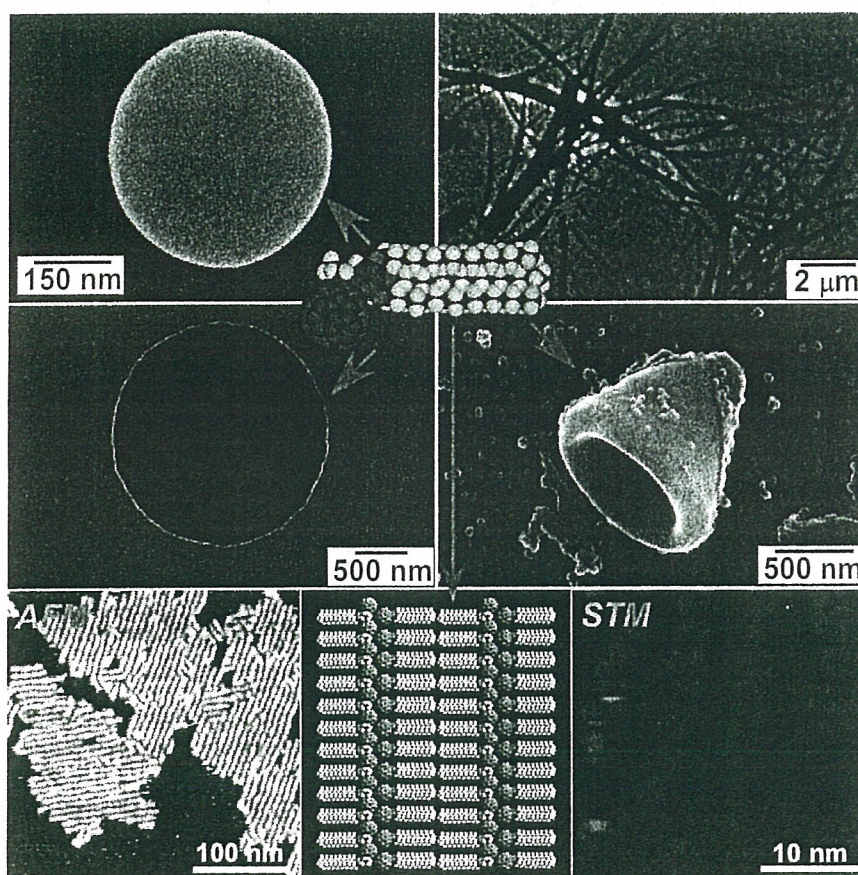
（20分） 古菌 勉

14:35-14:40 閉会の挨拶

（5分） 古菌 勉

第52回 高分子研究発表会 (神戸)

予稿集



日時 平成18年7月21日(金)

会場 兵庫県中央労働センター

主催 高分子学会
高分子学会関西支部

共催 日本化学会近畿支部

国循セ¹・東医歯大 生体²・岩医大 医³・大医セ⁴○岡田正弘¹, 益田美和¹, 植木光樹¹, 角野弘幸^{1,2}, 安田昌司¹,
田中良一³, 宮武邦夫⁴, 古蘭 勉¹

【緒言】リン酸カルシウム系セラミックスであるハイドロキシアパタイト [HAp; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] は歯や骨の主成分であり、生体組織接着性に優れるが、「硬く脆い」という欠点がある。我々はこの欠点を克服するため、シリコンなどの柔軟な高分子表面にナノサイズの HAp を固定化した新規な複合材料を創出した¹。この材料は、基材である高分子の機械的物性を保ったものであり、表面に導入した HAp によって優れた軟組織接着性を示すことを確認している。

本研究では上記 HAp 複合化法の応用範囲の拡大を目指し、優れた機械的特性をもつ金属材料への HAp 複合化を試みた。ステンレス (SUS 316L) を基材として選択し、まず、基材と HAp を結合させるために、HAp 表面の OH イオンとカップリング反応できるアルコキシシリル基を有する高分子をステンレス基材表面へグラフト化した。さらに、HAp を複合化したセラミックス-高分子-金属三元複合体の細胞の接着性を評価した。

【実験方法】既報²に従って、予め 800°C で焼成したナノサイズの HAp セラミックスを作製した。 γ -メタクロキシプロピルトリエトキシシラン (MPTS) をステンレス基材表面にグラフト化し、HAp を吸着させ、シランカップリング反応を行うことで三元複合体を作製した。ヒト臍帯血由来血管内皮細胞 (HUVEC) を複合体表面に播種し、24 時間培養後の SEM 観察を行った。

【結果と考察】ステンレス基材表面への MPTS のグラフト化は、FT-IR および XPS により確認した。また、HAp は基材表面に単層で複合化された。図 1 には、細胞接着試験の結果を示した。未処理の基材と比較して、三元複合体は優れた HUVEC 接着性を示した。

これまで、プラズマプレー法などで金属基材表面に HAp がコーティングされているが、得られる HAp の結晶性は低く、基材との結合は弱い。このため、コーティング後に高温 (800°C-) で熱処理を行う必要があったが、高熱処理時に基材の物性が低下することが報告されている。本 HAp 複合化法は高熱処理を行う必要がないため、基材の物性を損なうことなく生体組織接着性を付与できる方法であるといえる。

【参考文献】1) T. Furuzono ら, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **15**, 19 (2004); 2) M. Okada ら, *J. Mater. Sci.*, in press

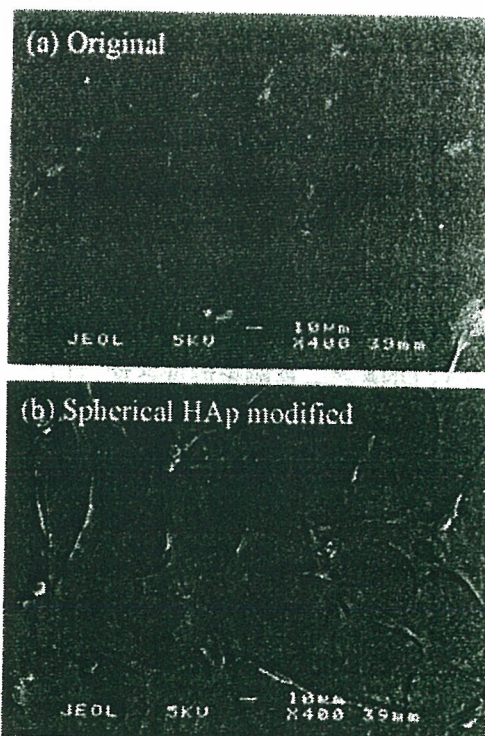


Fig. 1 SEM photographs of HUVEC adhering on the original (a) and spherical HAp-modified (b) stainless steels after incubation in 24-well multiplates (1×10^5 cells/well) at 37°C for 24 h.

Development of ceramics-metal-polymer composite having biocompatibility

Masahiro OKADA¹, Miwa Masuda¹, Mitsuki Ueki¹, Hiroyuki Kadono^{1,2}, Shoji Yasuda¹, Ryoichi Tanaka³, Kunio Miyatake⁴, Tsutomu FURUZONO¹ (¹Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute; ²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University; ³Department of Radiology, Iwate Medical University; ⁴National Hospital Organization Osaka Minami Medical Center); Tel: +81-6-6833-5004 (ext. 2623), Fax: +81-6-6872-7485, E-mail okada04@ri.ncvc.go.jp

第3回国循環ステントグラフト班会議

日時：平成17年10月20日（木）午後6時
場所：国立循環器病センター研究所
研究所本館2階 203号室

2006年度第3回ステントグラフト班会議

『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』

日時：平成18年10月20日（木）18：00～19：50

場所：国立循環器病センター研究所 本館2階 大会議室

（司会）岡田 正弘 （国立循環器病センター研究所 生体工学部・流動研究員）

18:00-18:15 開会の挨拶・研究スケジュール（最終年度）の説明

（15分） 古菌 勉 （国立循環器病センター研究所 生体工学部・室長）

18:15-18:30 Drug-Eluting Stent の開発

（15分） 岡田 正弘 （国立循環器病センター研究所 生体工学部・流動研究員）

18:30-18:45 アパタイト複合体の界面接着について

（15分） 古川 敬子 （国立循環器病センター研究所 生体工学部・研修生）

18:45-19:00 ステントグラフトのフロック加工について

（15分） 小粥 康充 （研究成果活用プラザ大阪・研究員）

19:00-19:15 動物実験の進捗状況

（15分） 角野 弘幸 （動物メディカルセンター・副院長）

19:15-19:45 総合討論

（30分） 古菌 勉 （国立循環器病センター研究所 生体工学部・室長）

19:45-19:50 閉会の挨拶

（5分） 古菌 勉 （国立循環器病センター研究所 生体工学部・室長）

平成17年度厚生労働省科学研究費

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

新規な Drug-Eluting Stent の開発



国立循環器病センター研究所 生体工学部 岡田正弘

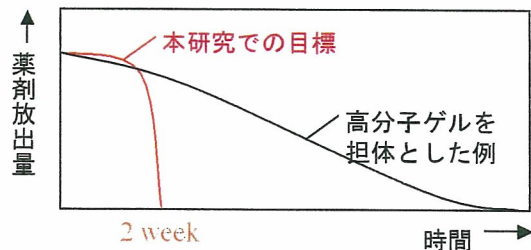
ナノアパタイトを薬物担体として用いたDrug-Eluting Stentの開発

現在のDrug-Eluting Stentの問題点

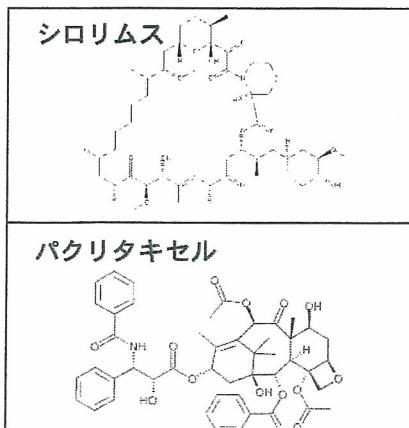
- ・長期間にわたる薬物 (免疫抑制剤) の放出
 - 正常内膜の被覆も抑制するため、長期間血管内に基材が露出し続ける
 - 慢性期にステントの血栓閉塞の引き金：長期間、抗血小板薬を服用する必要

新しい概念のDrug-Eluting Stentの創出

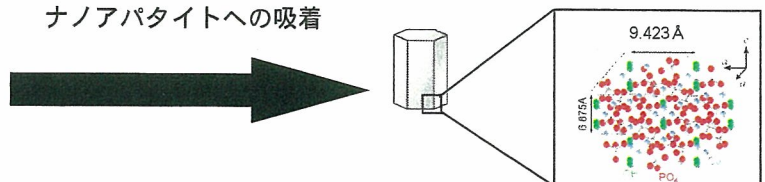
- ・薬物をナノアパタイト表面に少量担持させ、2週間程度で放出させる。(手術による傷は2週間程度で治癒するため)
- ・薬物放出後に、内皮細胞が被覆することで再狭窄防止を可能とする。



Drug-Eluting Stent用薬剤の例



ナノアパタイトへの吸着



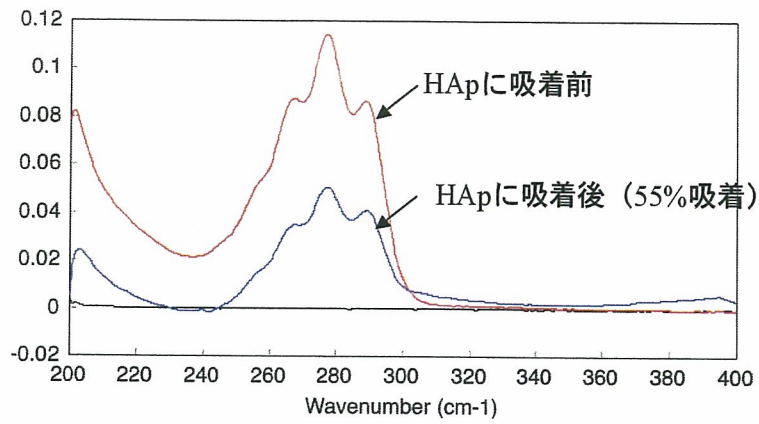
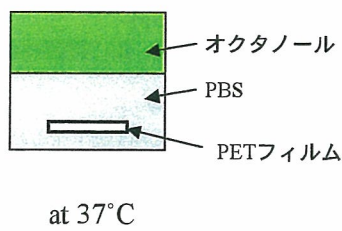


図. ラパマイシンのUVスペクトル(ラパマイシン, 5 $\mu\text{g/ml}$)
HApへの吸着条件: ロッド状HAp, 0.5 mg/ml, 室温, 1 h

ラパマイシンのHApへの放出挙動



N.M.M. Pires *et al*, *Biomaterial*, 26, 5386 (2006)より

ラパマイシンを加えたPLAフィルムからの
ラパマイシンの放出挙動

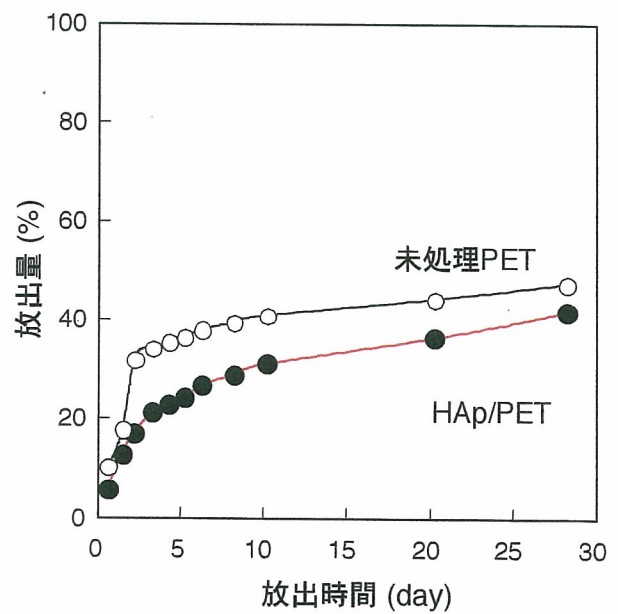
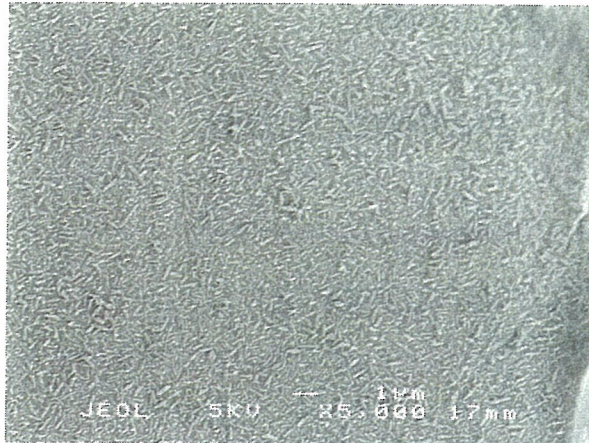


図. ラパマイシンの放出挙動

再現性を確認中

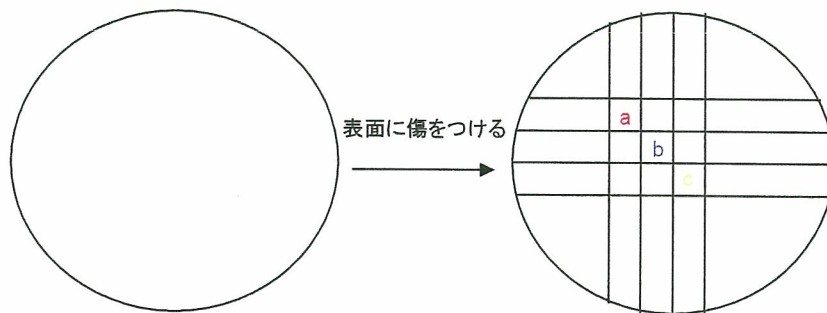
ラパマイシン吸着によるHAp/PET上の平滑筋細胞(SMC)挙動 (光学顕微鏡)

サンプル：透明PETフィルム (評価を簡単にするため)



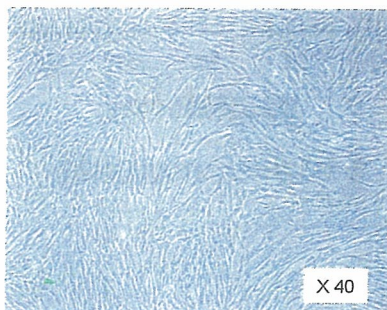
- ・コロナ放電 (80V; 10 sec; 両面)
- ・グラフト重合 (アクリル酸; 10% aq.; 60°C; 45 min)
- ・HAp吸着 (ロッド状 No. 157; 1% ethanol; 5 min)

直径14 mm のPET film



- メリット
毎回、同じ視野を観察できる
- デメリット
細胞が移動するので同じ細胞を観察できない

平滑筋細胞培養条件



培養7日目ー1代目

Cell数
 1×10^4 cells / mL
容器
24well plate

ラパマイシン吸着条件

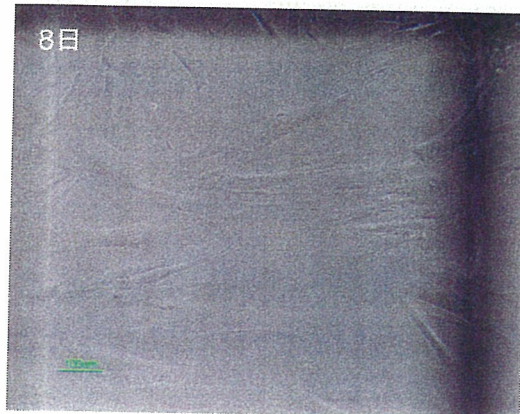
1 mg / 500 μ L ethanol

25 μ L



Dry

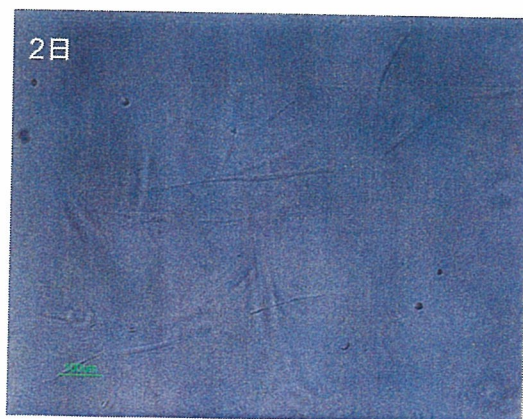
培養シャーレ



15日目で死細胞が観察された。

よく接着・伸展・増殖している

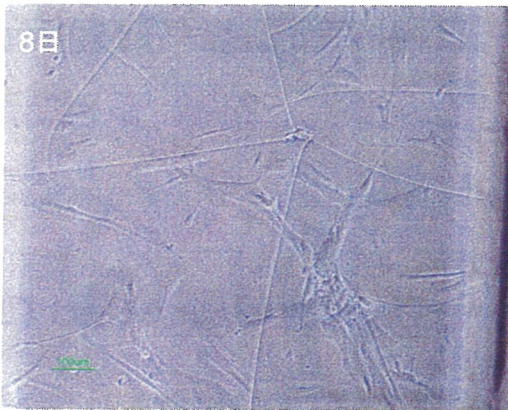
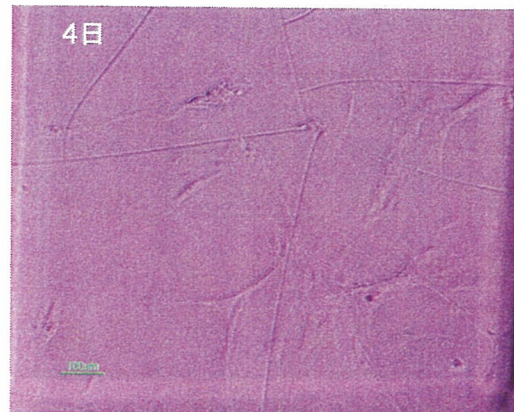
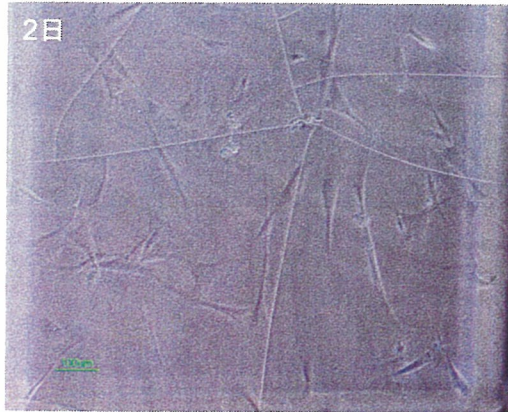
未処理PET



15日目で死細胞が観察された。

ほとんど接着・伸展・増殖していない

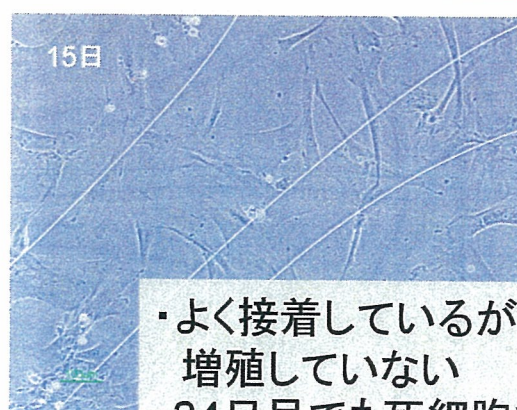
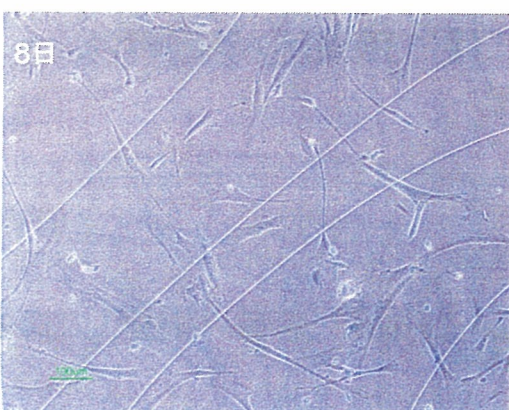
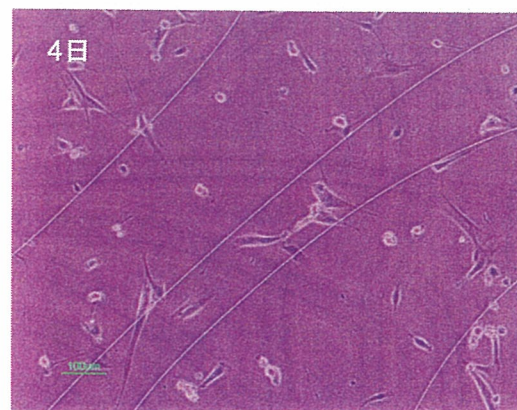
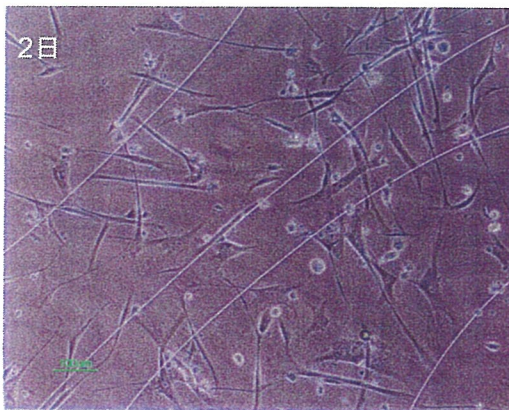
HAp/PET



15日目で死細胞が観察された。

よく接着・増殖している
(培養シャーレと比べると、
少ない)

Rapamycin吸着-HAp/PET



- ・よく接着しているが、増殖していない
- ・24日目でも死細胞なし

今後の予定

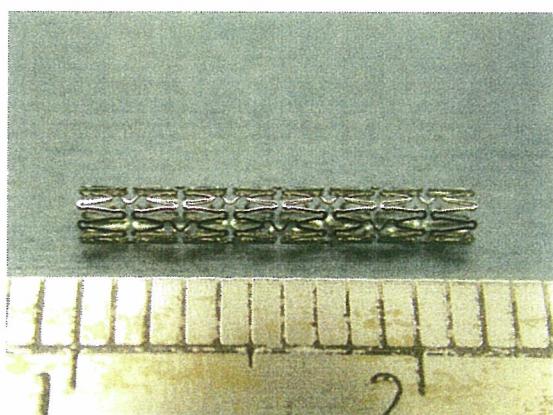
- ・再現性チェック
- ・セルカウティングキットによる定量化
- ・ラパマイシン濃度の影響



高分散性ナノアパタイト複合化 ステントグラフトの展望

国立循環器病センター研究所 生体工学部
角野 弘幸 植木 光樹

ステントの外観



バルーン拡張型ステンレスステント

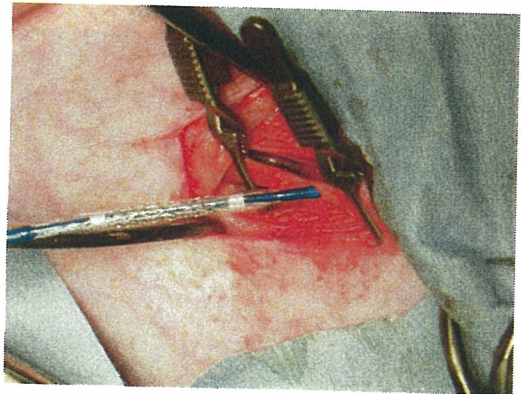
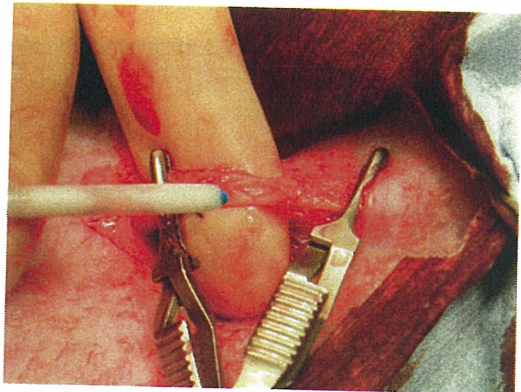
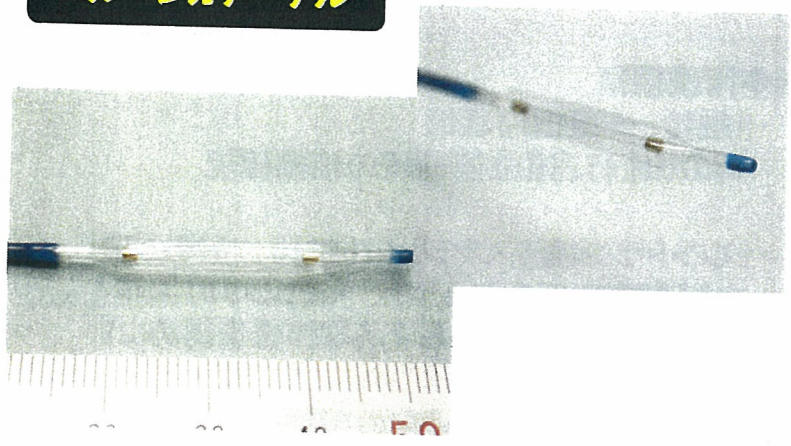
長さ: 12mm

収縮時: 直径 1.5mm

拡張時: 直径 5mm

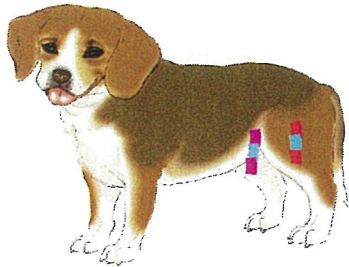
バルーンカテーテル

バルーン:長さ:20mm、
拡張直径 5mm
5Fr、135cm
シース:7Fr

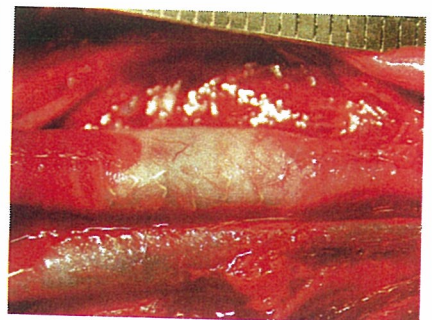
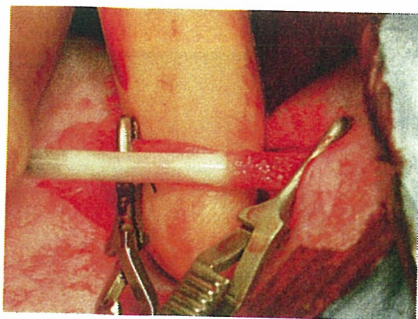
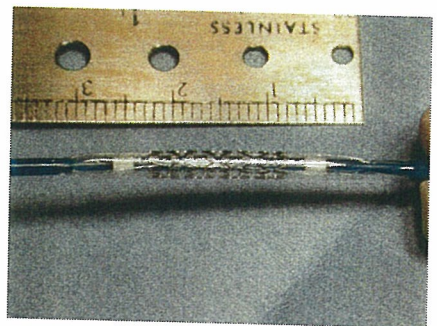


ステント~犬への留置試験

・両側大腿動脈
留置期間:1週、2週、4週間留置



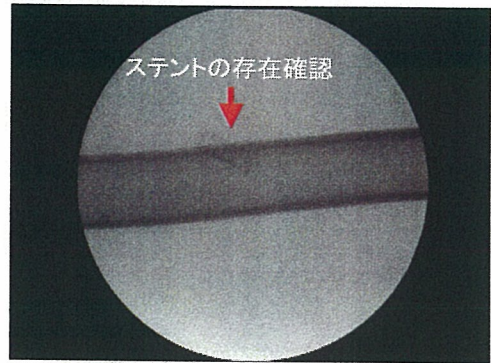
実験犬:雑種、25~30kg
大腿動脈径:5mm
留置部位:内股部大腿動脈
切開部から約10cm遠位



ステント～犬への留置試験

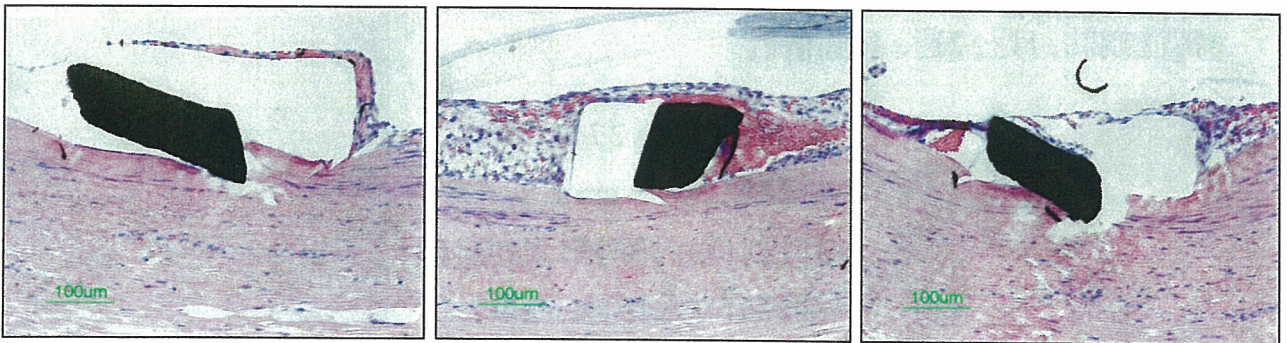
◆術後観察

- ・触診、一般健康状態
脚の血行、遠位側動脈の拍動確認
- ・レントゲン検査:ステントの拡張、位置の確認
大腿骨のほぼ中央部にてステントの拡張を確認
1、2週目においても著名な変位を認めない
- ・超音波検査:ステント開存の確認
再現性がわうずかに乏しい



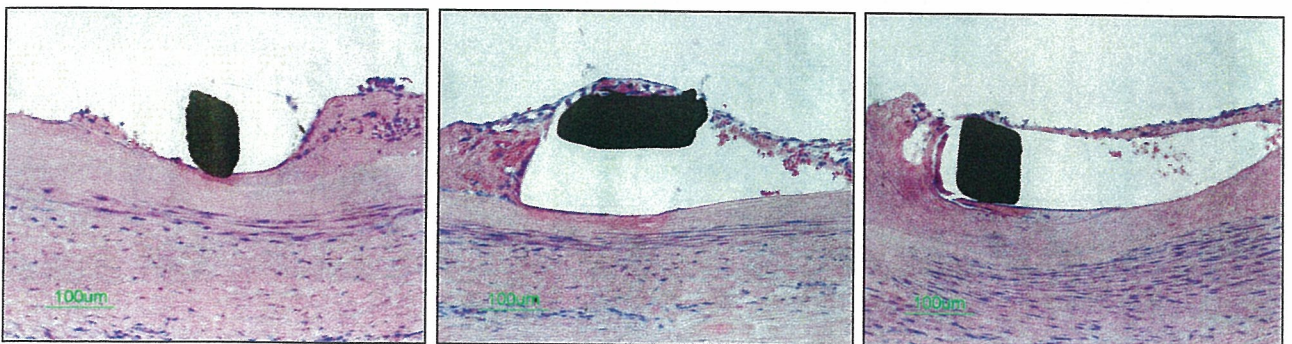
ステント～犬への留置試験～1週間 (hematoxylin-eosin staining)

Original/Stent



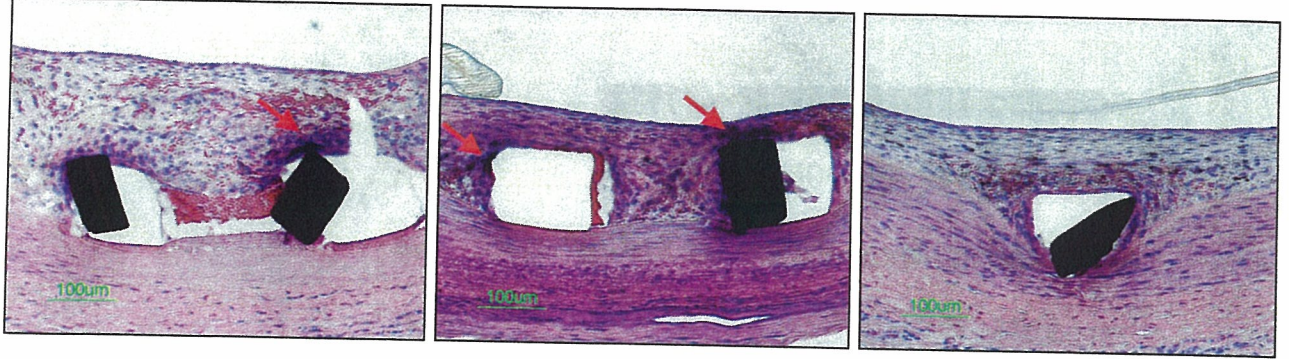
← 近位 ————— 中央 ————— 遠位 →

HAp/Stent



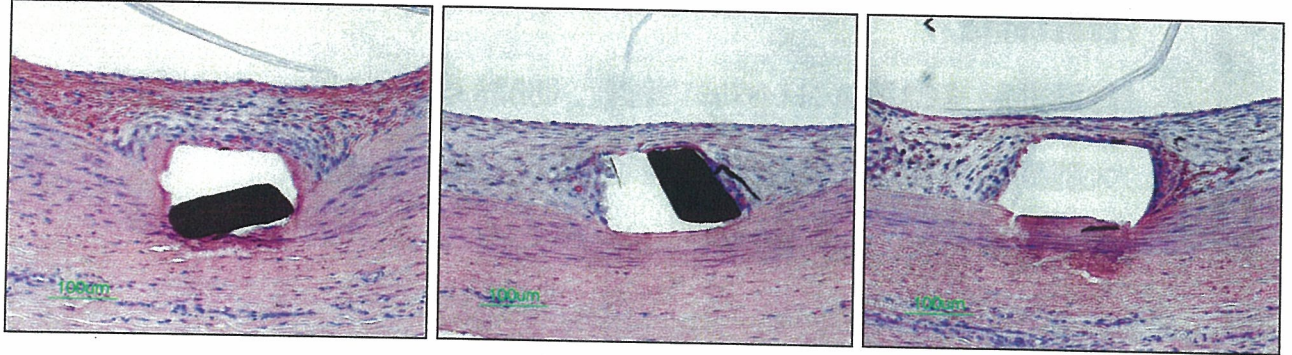
ステント～犬への留置試験～2週間 (hematoxylin-eosin staining)

Original/Stent

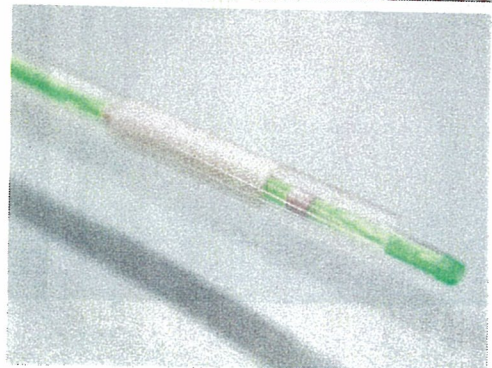
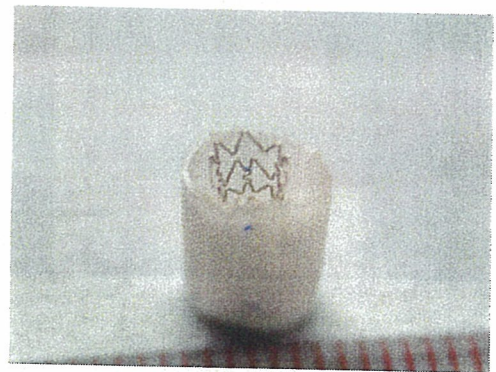
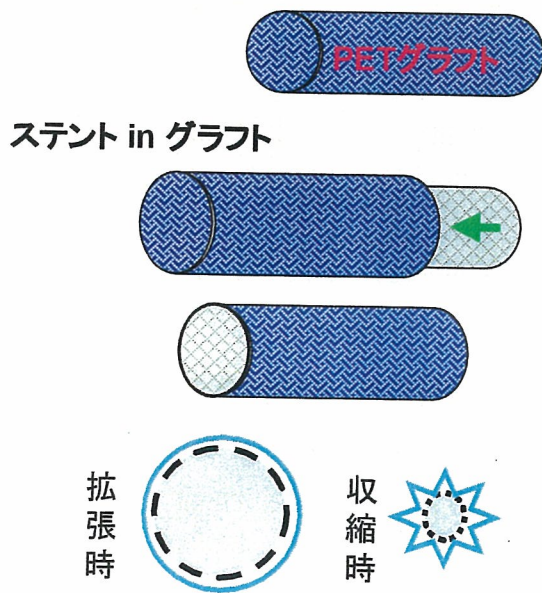


← 近位 ————— 中央 ————— 遠位 →

HAp/Stent



ステントグラフトの作製



- ・収縮したままのステントへのグラフトの逢着
- ・収縮直径の維持

ステントグラフト～犬への留置試験

◆両側大腿動脈、頸動脈への留置

実験犬：雑種、20～30kg

総頸動脈径：5mm

大腿動脈径：5mm



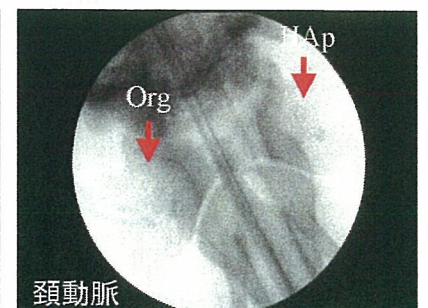
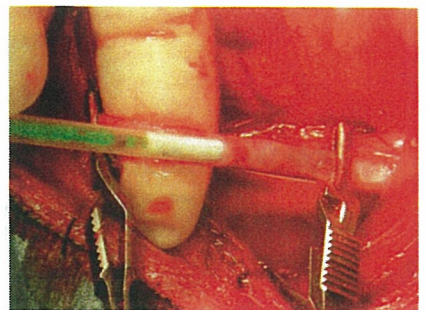
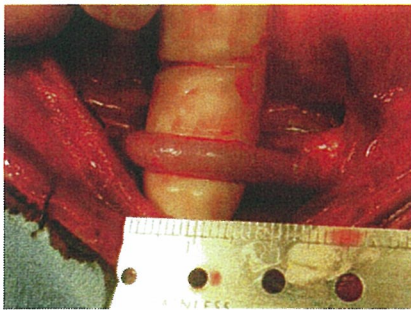
【留置部位】

総頸動脈：第3頸椎のレベルに留置、切開部よりやや10cm遠位（頭側）

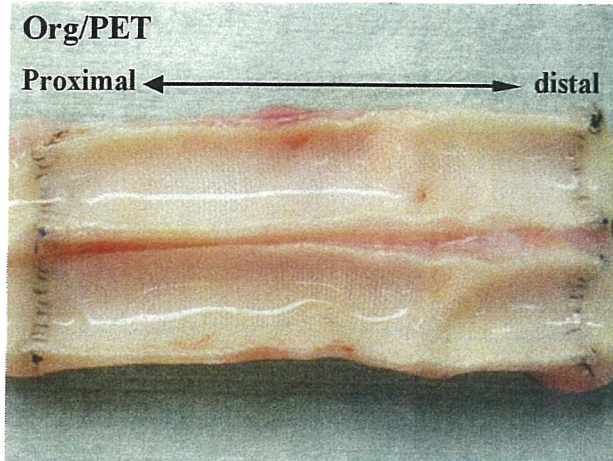
大腿動脈：内股部大腿動脈血管切開部から約10cm遠位

観察期間：1週、2週、4週間

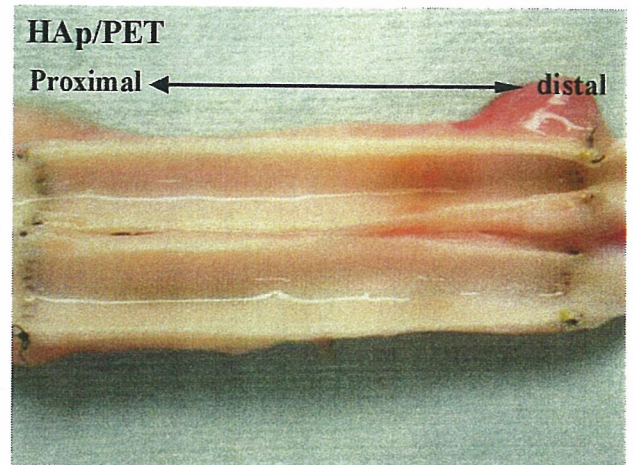
ステントグラフト～犬への留置試験



置換後の人工血管内腔～3ヶ月



- ・3cmグラフト 置換
- ・内膜は光沢で覆われている
- ・内膜に血栓形成無し
- ・人工血管に若干のよれ有り



- ・3cmグラフト 置換
- ・内膜は光沢で覆われている
- ・内膜に血栓形成無し
- ・内膜に黄色帯びたモノを確認

今後の計画

1. 人工血管の論文化
2. ステント1ヶ月留置(実験済み)→組織評価
3. ステントグラフト留置
 - ・1週間留置
 - ・2週間留置
 - ・1ヶ月留置(実験済み)

第44回

日本人工臓器学会大会

The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs

プログラム集

会期 2006年10月31日(火)~11月2日(木)

会場 パシフィコ横浜 会議センター

大会長 野一色 泰晴

(横浜市立大学大学院医学研究科人工臓器科学)

G-055 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

大阪電気通信大学¹⁾, 国立循環器病センター研究所²⁾, 東京医科歯科大学³⁾, 岩手医科大学⁴⁾, 大阪南医療センター⁵⁾

植木 光樹^{1), 2)}, 益田 美和²⁾, 角野 弘幸^{2), 3)}, 安田 昌司²⁾, 岡田 正弘²⁾, 田中 良一⁴⁾, 宮武 邦夫⁵⁾, 小山 富久³⁾, 高久田 和夫³⁾, 海本 浩一¹⁾, 古菌 勉²⁾

【はじめに】生体親和性に優れるハイドロキシアパタイト(HAp)は単独で用いた場合、硬く脆いという欠点がある。これまで当研究室ではナノサイズのHAp単結晶を高分子基材に複合化することで、基材の柔軟性を保持したまま、長期に渡って優れた組織接着性を示すことを報告してきた。本研究ではナノHAp複合法の応用範囲拡大を目指し、ナノHApを単層均一に複合化したポリエステル製人工血管を調製し、生物学的特性を評価することによって、当該人工血管の有用性を確認したので報告する。【実験方法】内径5mmのポリエステル製人工血管に共有結合によりナノHAp単結晶を複合化した。その細胞接着性をヒト臍帯血由来血管内皮細胞を用い、4時間培養後の電顕(SEM)観察及び核染色により評価した。さらに犬の頸動脈に2週間及び1ヶ月置換後、外観および病理学的所見(HE、vWF、 α -SMA染色)にて評価した。【結果及び考察】人工血管表面にナノHAp単結晶はほぼ単層均一に固定化されていることをSEMにより確認した。細胞接着性試験において、ナノHAp複合繊維は未処理繊維と比較して高い接着性を示した。ナノアパタイト人工血管は2週間及び1ヶ月置換の動物実験において早期に新生内膜の形成が確認され、偽内膜の肥厚も比較的薄い状態で維持されていた。これは基材上に強固に結合したナノHApに血清タンパク質およびそれに続く血液細胞、血栓吸着が強固に生じ、血流下においても剥離することなく安定した血液界面を形成することによると考えられた。【まとめ】人工血管表面にナノHAp単結晶を複合化し、新規な人工血管を創出した。人工血管への新生内膜の形成と血管内皮細胞の早期伸展がインプラント後早期に生じた。ナノHApコーティング人工血管は牛海綿状脳症(BSE)などの感染が危惧される動物由来タンパク質であるコラーゲン等を用いることなく、細胞・組織接着性を向上できる。つまり人工物のみで構築されていることから、生物学的安全性、滅菌性、輸送性、保存性に優れていると考えられる。【謝辞】当該研究は厚生労働科学研究(循環器疾患等総合研究事業)により実施された。

G-056 成長因子融合タンパクを固定した人工血管の内皮組織化

有限会社ベセル¹⁾, 九州工業大学大学院生命体工学研究科²⁾, (財)神奈川科学技術アカデミー³⁾, 久留米大学医学部心臓血管外科⁴⁾

児玉 亮^{1), 2)}, 山田 洋平²⁾, 軸丸 真名²⁾, 藤延 幸代²⁾, 北嶋 隆³⁾, 中村 栄司⁴⁾, 岡崎 悌之⁴⁾, 明石 英俊⁴⁾, 青柳 成明⁴⁾

人工血管の内皮組織化には多大の問題があることが指摘されている。特に内径4ミリ以下の小口径人工血管はまだ、実際の医療には用いられていないのが現状である。この原因として、低い内皮組織化と耐久性、そして低い抗血栓性が指摘されている。今回、PAU(ポリアミノ酸・ウレタン共重合体)による親水化処理をしたePTFE人工血管をさらに、EGFおよびHGFの成長因子融合タンパクを遺伝子工学的に調整したものをその表面にコーティングして、早い内皮組織化を誘起する人工血管を開発した。ラットと犬に移植し、成長因子融合タンパクの固定による効果を確認できたので、報告する。

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

○植木光樹^{1,2}, 益田美和², 角野弘幸^{2,3}, 安田昌司², 岡田正弘², 田中良一⁴,
 宮武邦夫⁵, 小山富久³, 高久田和夫³, 海本浩一¹, 古菌 勉²

¹大阪電気通信大学; ²国立循環器病センター研究所; ³東京医科歯科大学
⁴岩手医科大学; ⁵大阪南医療センター

ハイドロキシアパタイト(HAp)について

- **特徴**
 - ・リン酸カルシウム的一种
 - ・歯や骨を構成する無機物の主成分
 - 【長所】優れた軟組織親和性、歯・骨の成分
 - 【短所】セラミックの性質(硬い・脆い)
- **性質**
 - ・生体親和性
細胞・組織接着性; 骨結合性
 - ・吸着性
タンパク質; 核酸; ウイルス
 - ・イオン交換性

ナノアパタイト

c-axis
 α -plane
 a面(Ca²⁺リッチ)
 c面(PO₄³⁻リッチ)
 100 nm

○生体親和性 ×硬い、脆い

拡大図
 800°Cで焼成したナノアパタイト

HAp
 共有結合
 Si
 O
 シルク繊維

例) シルク、ポリ乳酸
 シリコン、ポリエステル、金属