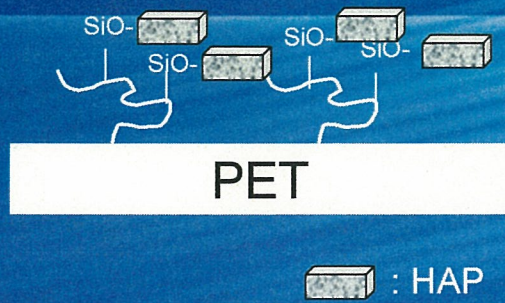


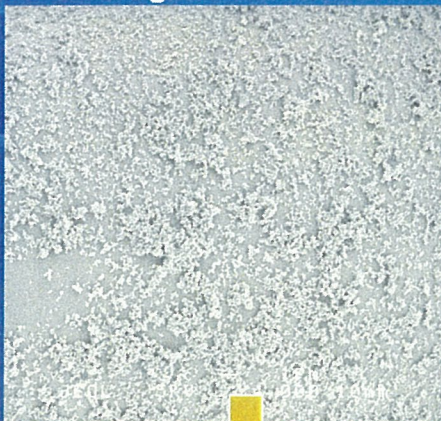
実験. PET-ハイドロキシアパタイト(HAP)吸着



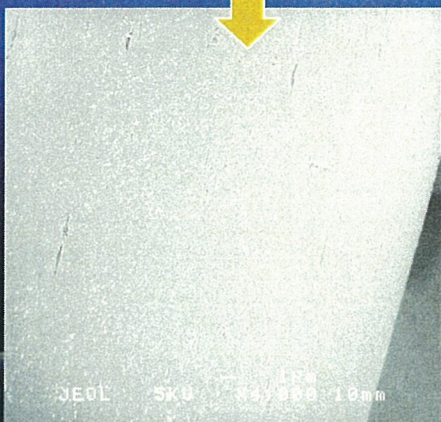
- 高分散性HAP溶媒中に試料を入れて攪拌
- 80°C 減圧下 30分乾燥
- エタノール中で3分間超音波処理

FIG. 1

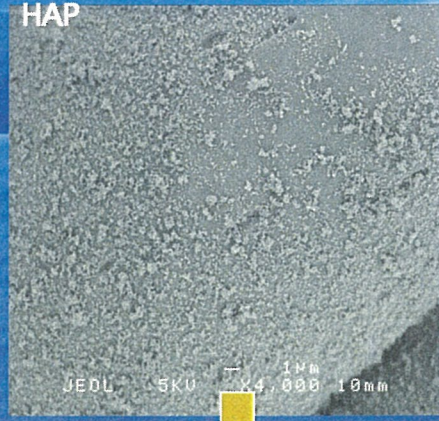
Original PET+HAP



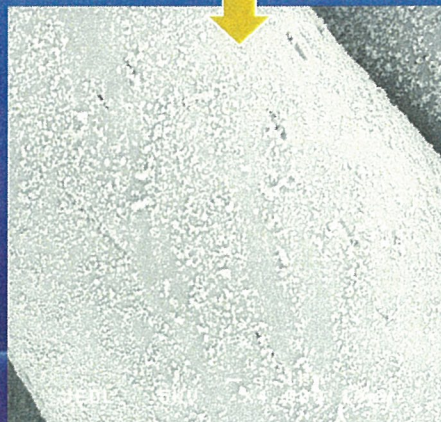
超音波照射



KBEをグラフト化したPET+HAP



超音波照射



今後のプロジェクトを進行 するための予定 1

・グラフト率の増加 → 4%以下なので10%が妥当



HAPの安定な結合力

PETのエステル結合を切断して、表面にOH基を出し、そこを足場にして高分子化を行う

STEPHANE ROUX et al., *J. Poly Sci: Part A: Poly Che.*, 41, 1347-1359 (2003)

今後のプロジェクトを進行 するための予定 2

- 1 HAP複合体に血管内皮細胞が接着するか検討する
- 2 現実の人工血管の複合化
- 3 人工血管複合化に血管内皮細胞が接着するか検討する

第2回国循環ステントグラフト研究会

日時：平成16年11月15日（月）午後7時
場所：国立循環器病センター研究所
先進医工学センター3F，カンファレンス室

第2回ステントグラフト会議 ウベ循研及び中浜医長を加えた説明会

出席者

【国 循】

- ・ 田中医師（放射線診療部）
- ・ 中浜医長（高血圧・腎部門）
- ・ 角野獣医師（動物メディカルセンター）
- ・ 古菌室長（生体工学部）

【企 業】

- ・ ウベ循研
- ・ 山下社長（日本ステントテクノロジー）
- ・ 益田研究員（同上）

平成16年度厚生労働科学研究費

課題名：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

研究代表者：古菌 勉

分担者1：宮武邦夫（副院長）

分担者2：稲永 隆（高血圧・腎臓部門医長）

分担者3：田中良一（放射線診療部医員）

研究協力者：中浜 肇（高血圧・腎臓部門医長）

依託会社：日本ステントテクノロジー（株）

研究協力会社：（株）ウベ循研

-1-

研究の概要

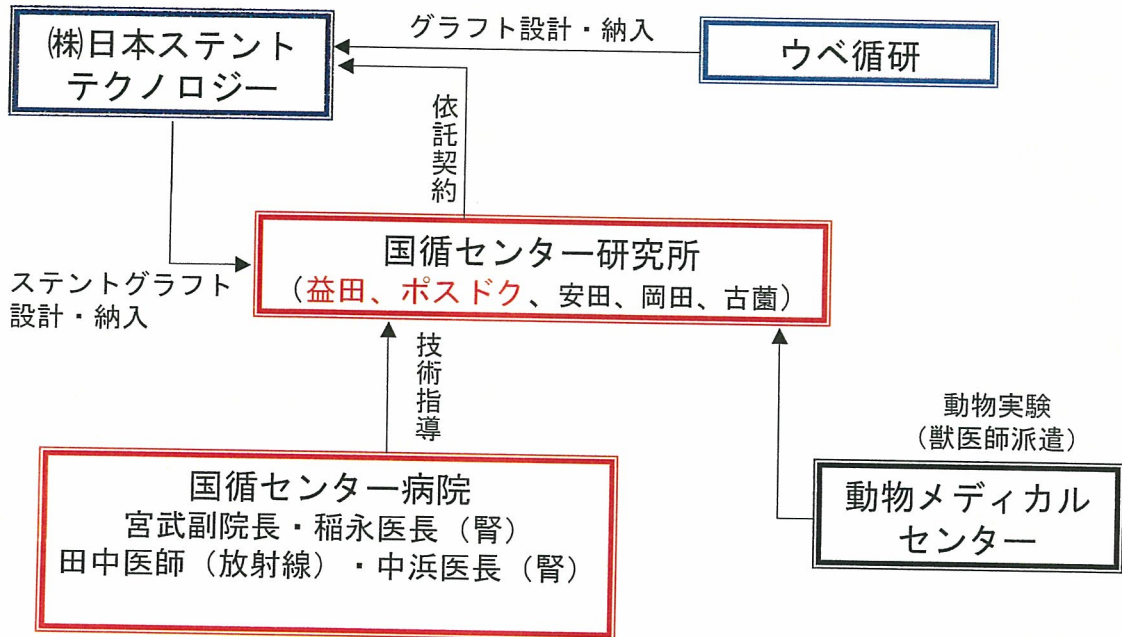
日本透析医学会による2001年末による統計調査によると、我が国の透析人口は219,183人であり、人口100万人当たりの透析人口が1,721.9人と1983年から増加の一途をたどっている。本統計学的調査において、透析導入時のブラッドアクセスと生命予後との関係を解析すると、人工血管内シャント、外シャント、カテーテル留置にて透析導入した患者は、自己血管内シャントを用いて透析導入した患者よりも有意に高い死亡リスクを認めている。これは、導入時に自己血管内シャント以外を選択した場合の生命への危険性が高いことと同時に、長期生存のためには自己血管内シャントの保持がいかに重要であるかの証でもある。

当該研究課題は、独自に開発したナノスケールのハイドロキシアパタイトセラミックスをシャント不全の治療に用いるステントに共有結合にて強固にコーティングした新規なナノセラミックス複合化ステントグラフトの開発を目的とする。

本デバイスの長期血管開存の発現機序は、¹⁾早期に血管内皮細胞を材料表面に完成させて生体親和性を高め、局所の血液凝固および石灰化を抑制することによってもたらされる。また²⁾ナノセラミックスコートにより自己血管内壁側での血流によるグラフトのずれを抑制し、さらにグラフト内側ではステント金属部から内膜増殖抑制物質を担持させた再狭窄防止システムを装備した高機能ナノステントグラフトの開発を目指す。

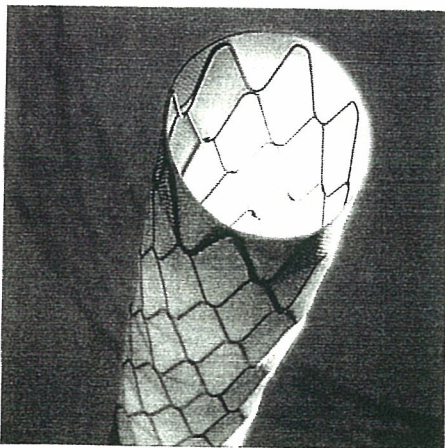
-2-

研究組織図

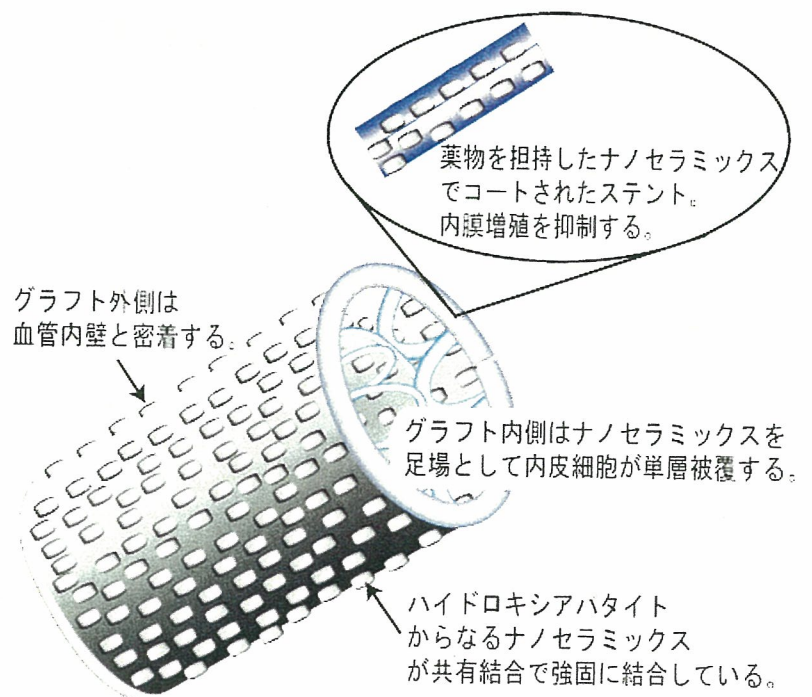


-3-

グラフトステントの外観



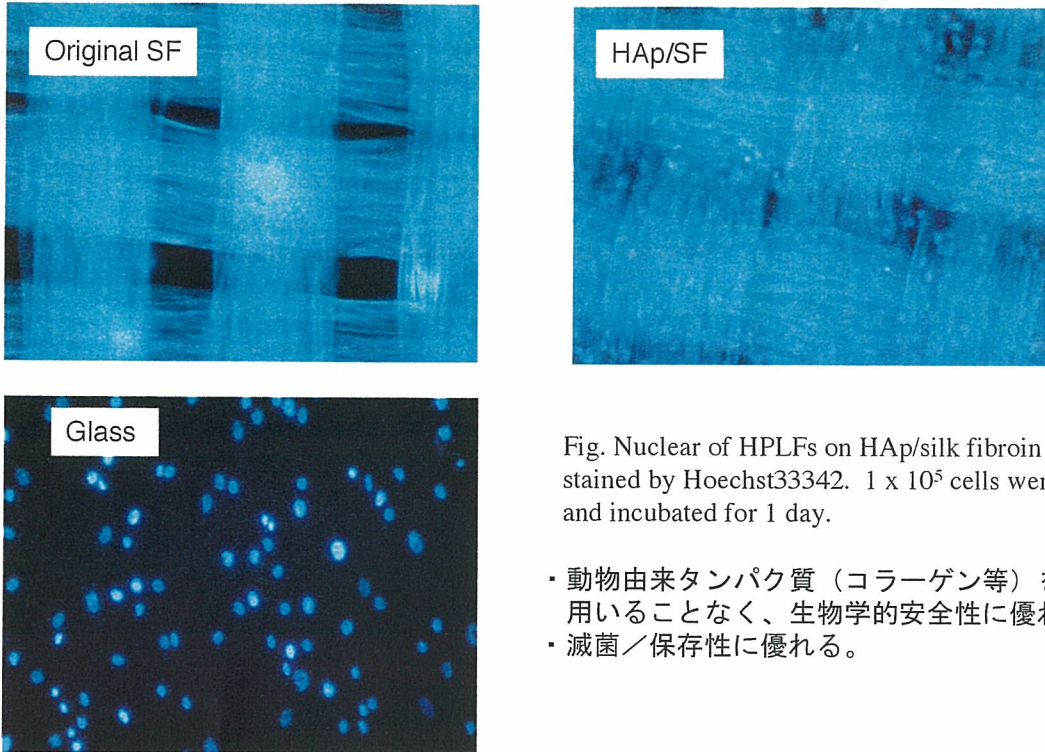
目的とするグラフトステントの模式図



-4-

人工血管としての可能性

Nuclear of HPLFs on HA/SF Fabrics



-5-

線維芽細胞／複合材料の界面像

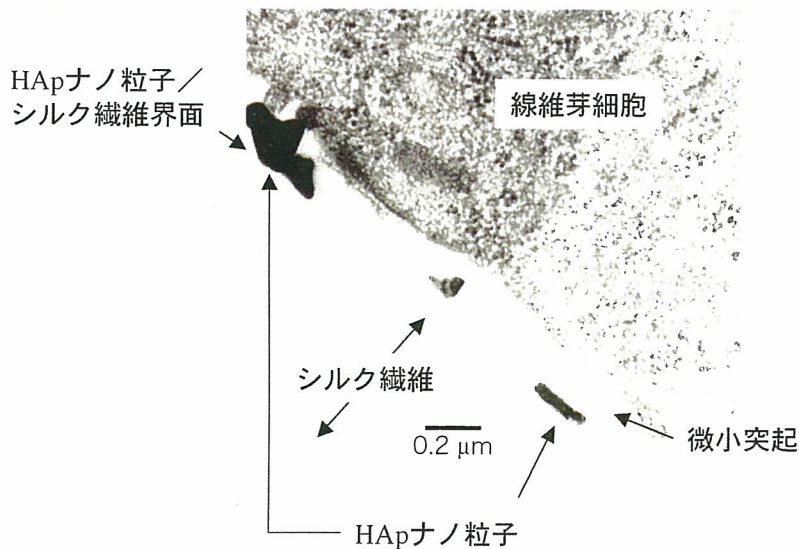


図. 線維芽細胞が接着した複合材料界面のTEM像。
オスミウム酸にて固定、ウラン／鉛にて染色した超薄片をTEM観察した。

-6-

実験計画

【平成16年度】

1. HApナノ粒子の合成・形態制御：粒径の最適化--->OK
2. グラフト基材へのHapコーティング--->現在進行中
3. チューブ状グラフト設計・作製--->ウベ循環研（株）交渉中
(動物実験対象ウサギ腹部大動脈内径2.5mmに合わせて；グラフト外径3.0mm, 厚さ?mm)
4. 血管内皮細胞による培養実験*in vitro*（増殖挙動）--->未
5. ステント設計・作製--->日本ステントテクノロジー(株)
(ウサギ腹部大動脈内径2.5mmに合わせて；
材質：コバルトクロム自己拡張型, ステント拡張時内径3.5mm, 厚さ0.07mm, 長さ20mm)
6. 第一次ステントグラフトプロトタイプの完成（2005年1月15日）
7. 平成16年度成果発表会（2005年2月22日）

第3回国循ステントグラフト研究会

日時：平成17年2月7日（月）午後7時
場所：国立循環器病センター研究所
 研究所本館2階 カンファレンス室

第3回ステントグラフト会議

「第1年目厚生労働科研成果報告会（2/22）に向けた説明会」

【研究課題名】

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

研究代表者：古菌 勉（国立循環器病センター研究所生体工学部室長）

研究分担者：宮武邦夫（国立循環器病センター副院長）

同 上：田中良一（国立循環器病センター国循放射線診療部医員）

同 上：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）

研究協力者：中浜 肇（国立循環器病センター腎・高血圧部門医長）

同 上：角野弘幸（動物メディカルセンター副院長）

委託会社：山下修三（日本ステントテクノロジー（株）取締役社長）

【本会議のスケジュール】

1. 古菌 勉・・・第3回会議の概要説明
第1年目実験計画「ナノアパタイト複合化グラフト製造法の確立」について
2. 岡田正弘（生体工学部流動研究員）
「高分散性ナノアパタイト微粒子の創出」
3. 益田美和（生体工学部外来研究員）
「ナノアパタイト複合化グラフトの製造法と*in vitro*評価」
4. 角野弘幸（動物メディカルセンター副院長）・・・第2年目計画前倒し
「動物実験によるグラフト機能評価：手術法の検討を中心に」
5. 山下修三（日本ステントテクノロジー（株）社長）・・・第2年目計画前倒し
「ステント製造法と進捗状況：内シャント用ステントグラフト設計」
6. 総合討論
7. 宮武副院長「終わりの挨拶」

【目的】

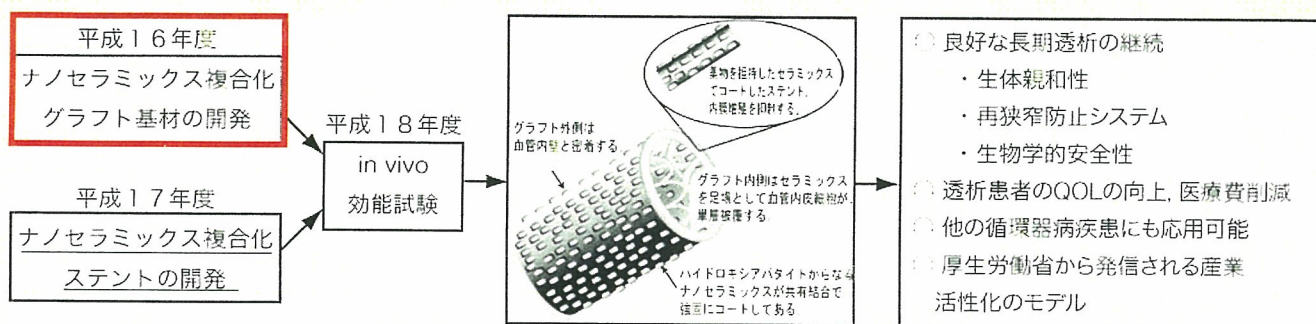
透析導入時のブラッドアクセスと生命予後との関係から、長期生存のためには自己血管内シャントの保持が非常に重要である。当該研究課題は、シャント不全の治療に用いるステント表面に、独自に開発したナノスケールのハイドロキシアパタイトセラミックスを強固に結合させた新規なナノセラミックス複合化ステントグラフトの開発し、血管内デバイスのズレ、血管内皮早期被覆及び内膜肥厚抑制を目指す。

【ナノアパタイト表面修飾による効果】

①血管内ズレ抑制：ナノアパタイトによる組織接着性効果

：ナノアパタイト表面トポロジー（凹凸）によるアンカリング

②血管内皮早期被覆：ナノアパタイトによる細胞接着性



説明の概要

第1年目実験計画「ナノアパタイト複合化グラフト製造法の確立」

【本年度の研究成果】

本年度は媒体中で高い分散性を示すナノアパタイトの製造技術およびナノアパタイト複合化グラフト（合成繊維製人工血管）の製造法の確立を目指した。

【研究成果（一）：高分散性ナノアパタイト微粒子の創出】

ナノスケールのアパタイト微粒子は製造過程において凝集した二次粒子化することが知られており、分散媒体中で単分散することは困難とされてきた。我々は新規に溶融防止剤を開発しこれを製造工程に添加することにより、**世界で初めて媒体中で単分散するナノアパタイト微粒子の製造技術を確立した**（*Nature Materials*投稿準備中、特許国内優先権出張準備中及びPCT出願準備中）。現在、大手セラミックス製造メーカーへ当該新技術のライセンス契約に向けて調整中である。

【研究成果（二）：ナノアパタイト複合化グラフトの創出】

グラフトの血管内での早期内皮細胞被覆および血管内でのズレ抑制を目的として、ナノアパタイトコーティングを行った。また市販のグラフト（合成繊維製人工血管）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ことから人工物のみでの新規グラフト創出は、当該技術のみで生物学的安全性確保の上で大きな意味がある。言い換えれば**生物学的安全性に優れた新規グラフト（人工血管）**として高い価値がある。

グラフト基材（ポリエステル）へのアルコキシシリル基含有ポリマーの導入後、研究成果（一）にて製造したナノアパタイト微粒子を共有結合で強固に結合コーティングしたナノアパタイト複合化グラフトを創出した。ナノアパタイトはポリエステル繊維上にほぼ単分散で結合していることが走査型電子顕微鏡観察で確認された。また*in vitro*において**ヒト血管内皮細胞を播種したところ、未処理ポリエステル繊維に比較して有意に接着・増殖が確認された**（*J. Mater. Sci. Mater. Med.* 投稿準備中、特許申請準備中）。現在、動物を用いてその有効性の確認を急いでいる。

【研究成果（三）：コバルトクロム及びニッケルチタン製ステントの設計・加工の検討】

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で行っている**。日本ステントテクノロジー（株）と委託契約を行い、当社独自に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物性を有する探索している。一部試作品が供給され表面加工の初期検討を行っている。

高分散性ナノアパタイト微粒子の創出

岡田 正弘

国立循環器病センター研究所
 先進医工学センター 生体工学部



2005.1.7

ナノセラミックス粒子/高分子基材の界面複合化 による生体融和材料の創出

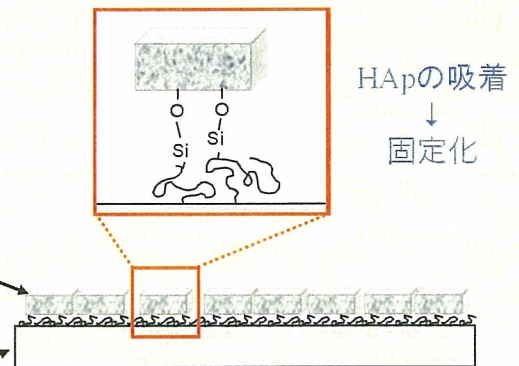
基盤技術 1. 微小セラミックス粒子の形態制御
 基盤技術 2. 共有結合による無機・有機の複合化

・ハイドロキシアパタイト (HAp)

○組織接着性
 ×固い, 脆い

・シルクフィブリン、シリコーン

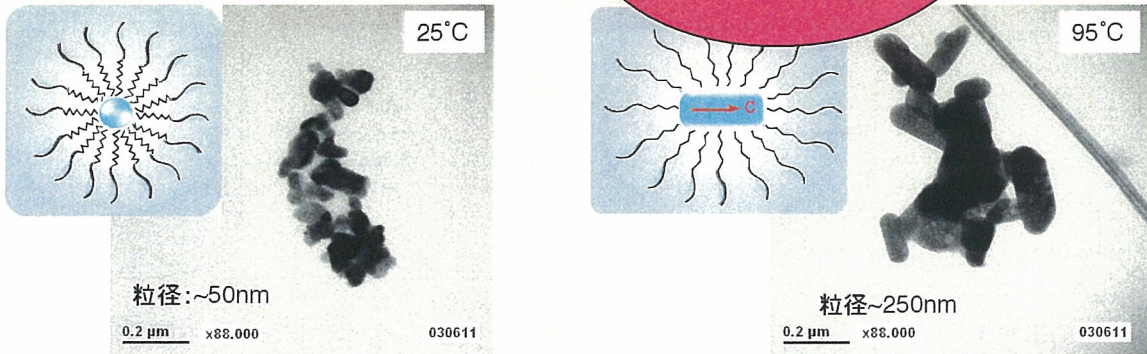
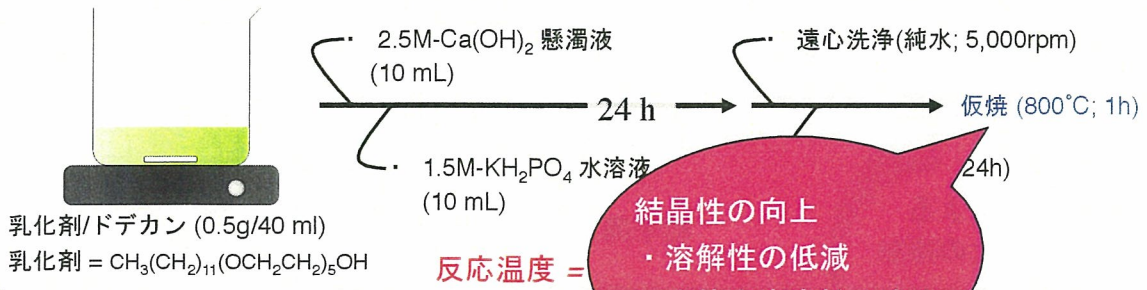
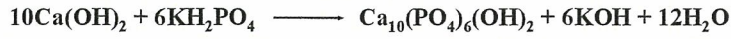
○柔軟
 ○加工性
 ○安定性



ナノセラミックス / 高分子
 界面複合化材料

○柔軟
 ○組織接着性

エマルジョン法によるHApナノ粒子の形態制御



T. Furuzono *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **56**, 9 (2001)

高分散性ハイドロキシアパタイト単結晶粒子の開発

○ 従来法

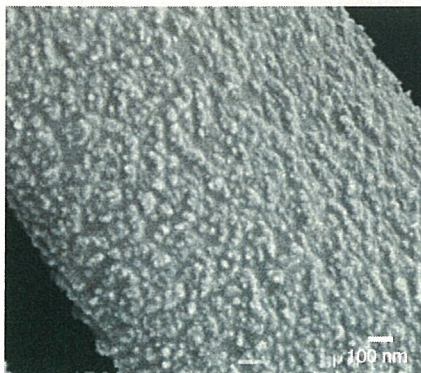


図. HAp/シルク複合体表面の走査型電子顕微鏡像

被覆率: 65%

状態: 数個の粒子が固まって
被覆した箇所もある

粒子の
高分散化

被覆状態の制御
(単層・細密充填)

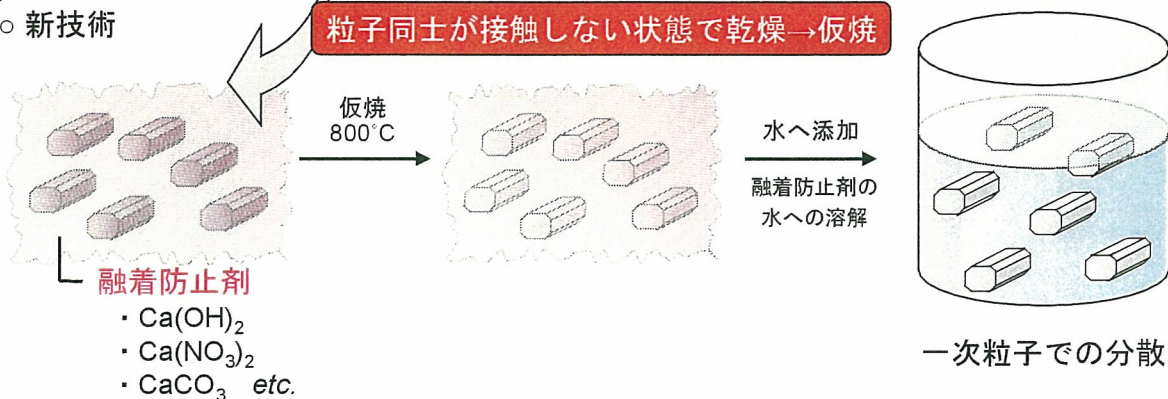
↓
複合体の性能向上

高分散性ハイドロキシアパタイト単結晶粒子の開発

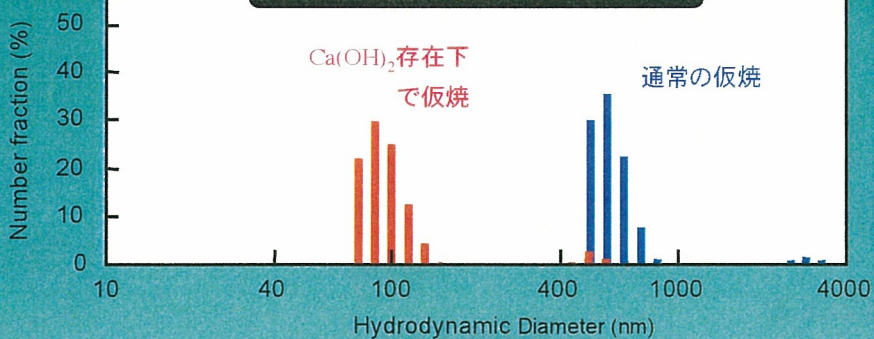
従来法



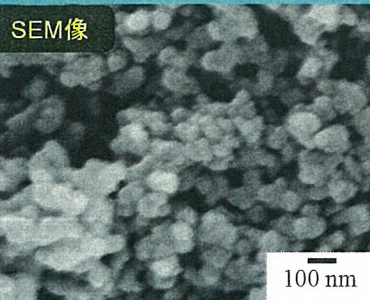
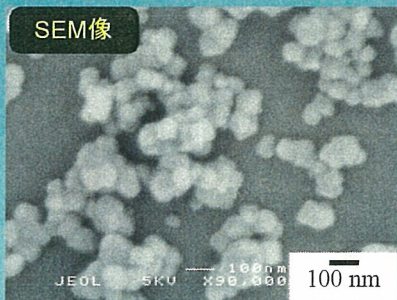
新技術



エタノール分散時の粒子径分布



Ca(OH)₂存在下
で仮焼



通常の仮焼

図. エマルション法 (25°C) で作製したHAp粒子の仮焼 (800°C; 1h) 後の走査型電子顕微鏡像および動的光散乱により測定した粒子径分布(エタノール中)

シルク繊維との複合化

操作

- 1) HAp分散液の調製
 - ・ HAp, 10 mg
 - ・ アルコール, 1.0 ml
- 2) グラフト化SF (10 mg) の浸漬
- 3) 洗浄
- 4) カップリング反応
(140 C, 20 min, 1 mmHg)
- 5) プローブ型超音波にて洗浄
(20 kHz, 35 W, 3 min)

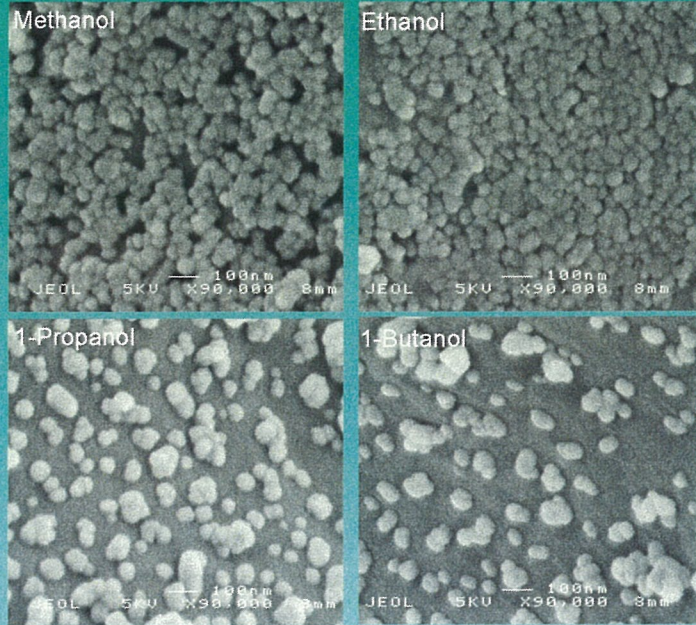
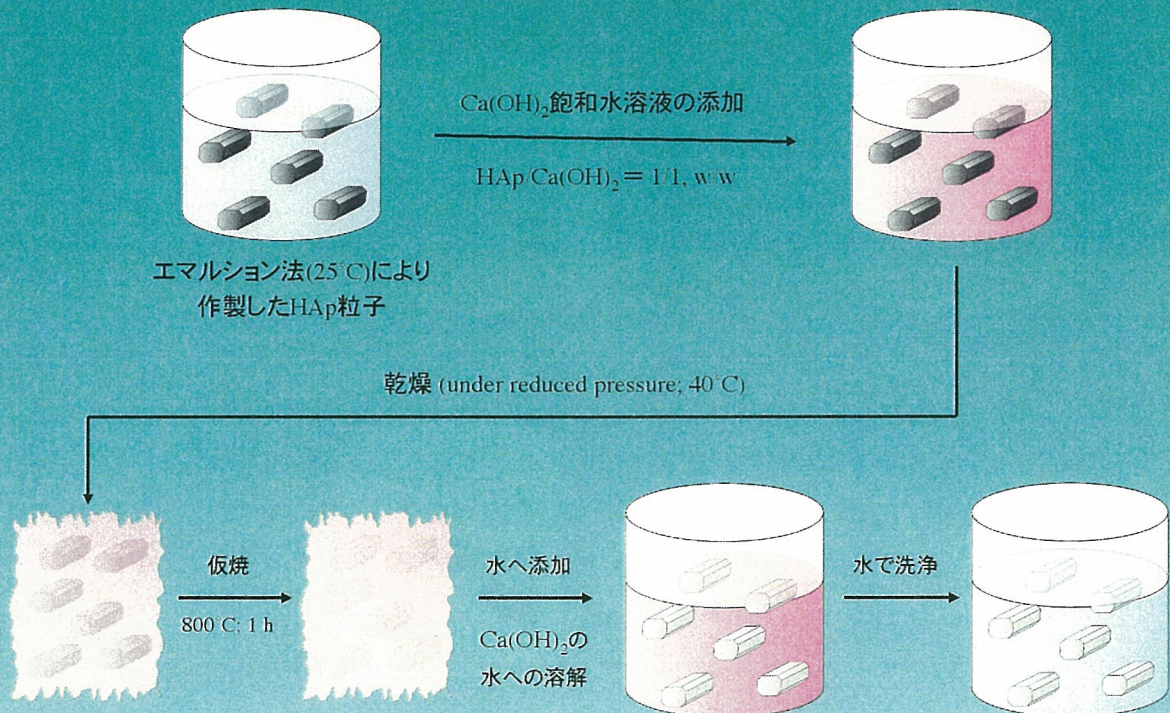


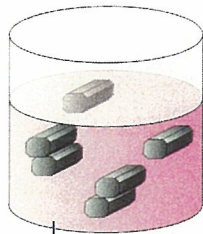
図. 各種アルコール媒体中でHApナノ粒子を繊維に吸着させて作製した複合体のSEM写真

実験方法 (前プロジェクト)



改良法の開発(厚生科研プロジェクト)

・問題点 ~HAp/Ca(OH)₂ 混合物作製時~



減圧乾燥

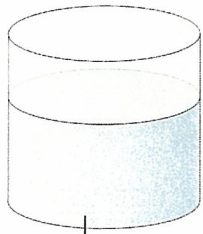
約 6 h



- ・時間がかかる
- ・少量
- ・HAp粒子同士の集合

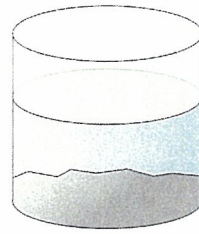
Ca(OH)₂ 飽和水溶液 (濃度, 0.17 wt%)

注目: ポリアクリル酸 (PAA)

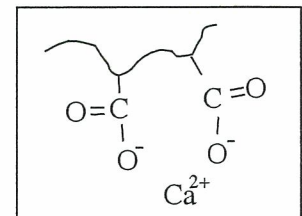


Ca(NO₃)₂ aqの添加

pH 10



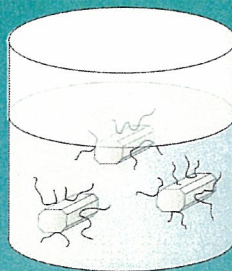
白濁→沈殿



PAA-Caの生成

改良法の開発(厚生科研プロジェクト)

・改良法



Ca(NO₃)₂ aq

pH 10



濾過



HAp表面へのPAAの吸着
→HAp粒子の分散安定化

仮焼

800°C

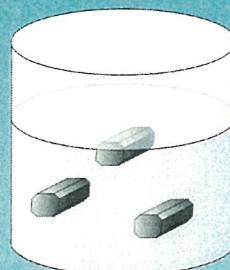
1 h



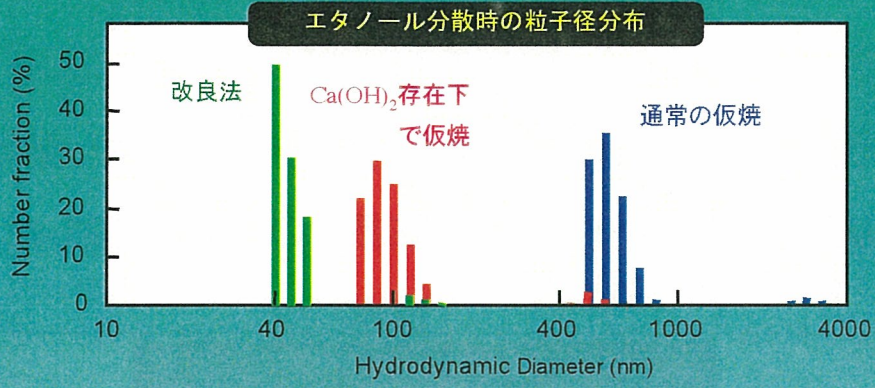
PAA 分解
CaOの残存

洗浄

NH₄NO₃ aq



HAp/PAA = 1/1, w/w
PAA/Ca(NO₃)₂ = 1/2, w/w



改良法

SEM像

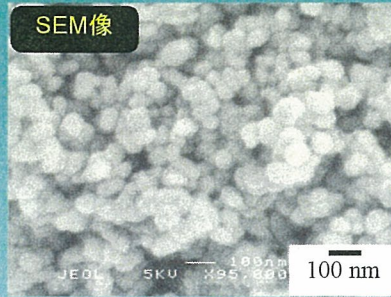
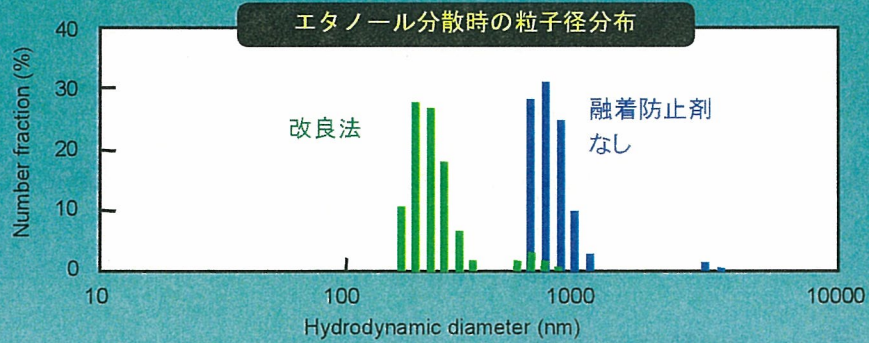


図. エマルション法 (25°C) で作製したHAp粒子の仮焼 (800°C; 1 h) 後の走査型電子顕微鏡像および動的光散乱により測定した粒子径分布(エタノール中)

・ **ロッド状HAp粒子の場合 (95°Cのエマルション法)**



改良法

SEM像

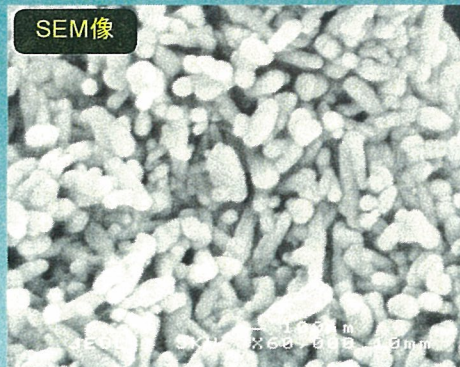


図. エマルション法 (95°C) で作製したHAp粒子の仮焼 (800°C; 1 h) 後の走査型電子顕微鏡像および動的光散乱により測定した粒子径分布(エタノール中)

まとめ

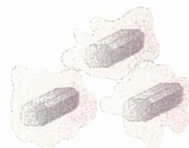
- ・ ポリアクリル酸を融着防止助剤として用いることで、効率よく、より分散性の高いHApナノ単結晶体の作製に成功した。

○ 新技術

粒子同士が接触しない状態で乾燥→仮焼

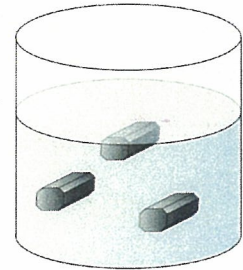


仮焼
800°C



水へ添加・洗浄

融着防止剤の
水への溶解



一次粒子での分散

融着防止剤

- ・ $\text{Ca}(\text{OH})_2$
- ・ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ etc.

融着防止助剤

- ・ ポリアクリル酸

まとめ

- ・ ポリアクリル酸を融着防止助剤として用いることで、効率よく、より分散性の高いHApナノ単結晶体の作製に成功した。

応用 ~ HAp粒子の応用~

- 骨充填剤
- 歯科材料
- カラム用充填剤
- イオン交換体
- 固定化担体
- 触媒 etc.



- ・ 高分散性
- ・ 高比表面積
- ・ 高結晶性

ナノアパタイト複合化グラフトの製造法とin vitro評価

益田 美和

国立循環器病センター研究所
生体工学部 先進医工学センター

平成17年2月7日

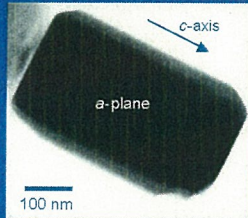
担当プロジェクトの内容

ナノセラミックス複合化グラフトの開発

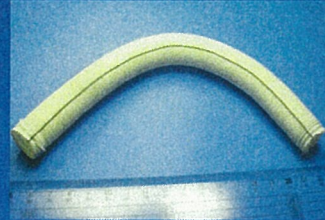
ナノサイズのハイドロキシアパタイトセラミックス (HAP) をステントグラフト、特に今回はグラフト(人工血管、ポリエステル)に複合化することにより、
①血管内皮細胞の早期被覆と②血管内でのズレを抑制し、動物由来タンパク質を用いることなく③生物学的安全性に優れた新規グラフトを開発する。

プロジェクト内で分担された研究の目的

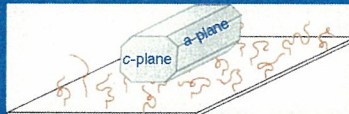
1. グラフト基材(PET)への
ハイドロキシアパタイト(HAP)の複合化
2. 線維芽細胞及び血管内皮細胞(HUVEC)による細胞接着性



組織接着性の高いHAP

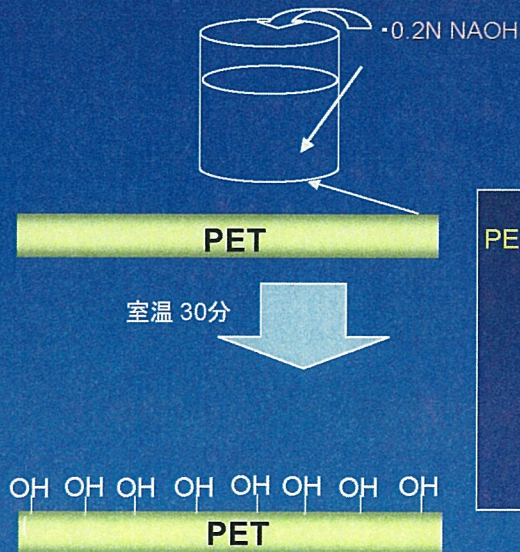


グラフト基材として多く用いられているPET



血管内でのズレを防止したグラフトをつくる。

1-1. PET表面の前処理



PET繊維表面は化学的に不活性

加水分解

表面処理(高分子グラフト修飾)するための足場となる官能基を立ち上げる