

ナノアパタイトコーティングの吸着制御・結合強度の定量化

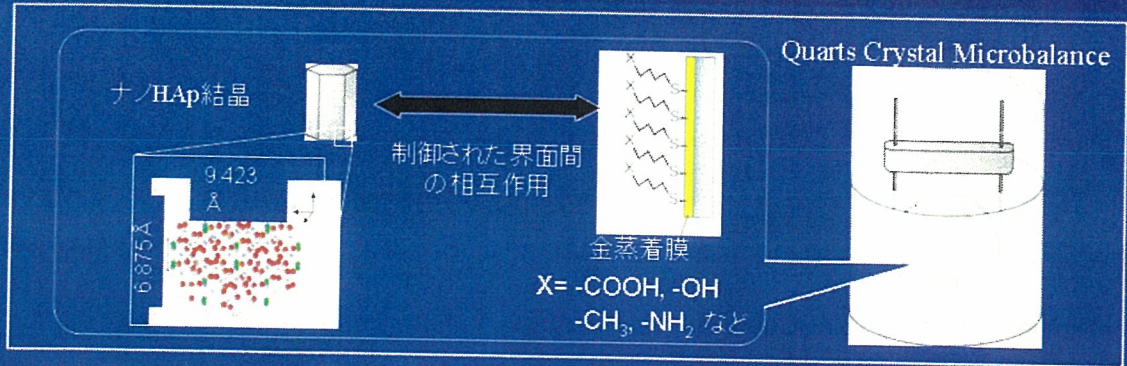


図. ナノアパタイトの電子顕微鏡像

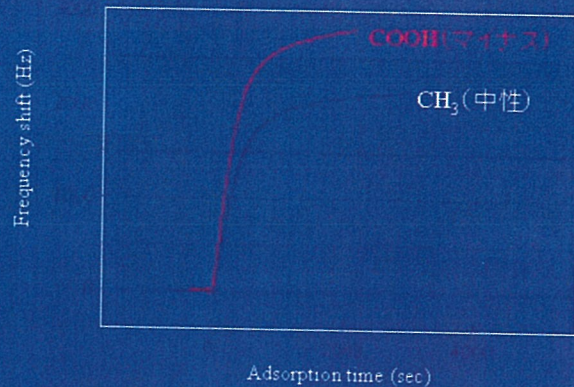


図. 異なる電荷をもつ基板へのナノアパタイトの吸着挙動

基板表面の電荷状態とナノアパタイト結晶の形態によって吸着挙動を制御できることを明らかにした。

アパタイト-基板間の結合強度の定量化 -AFMによる検討-

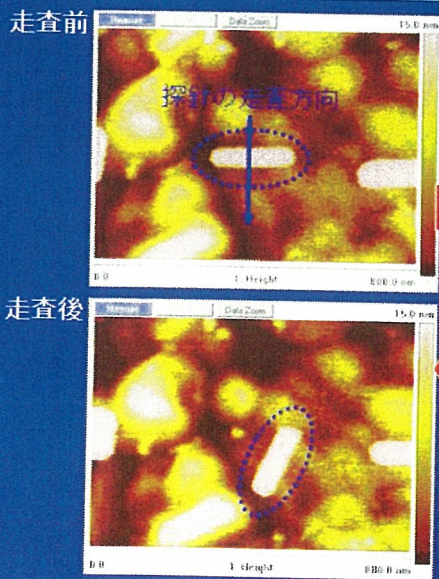
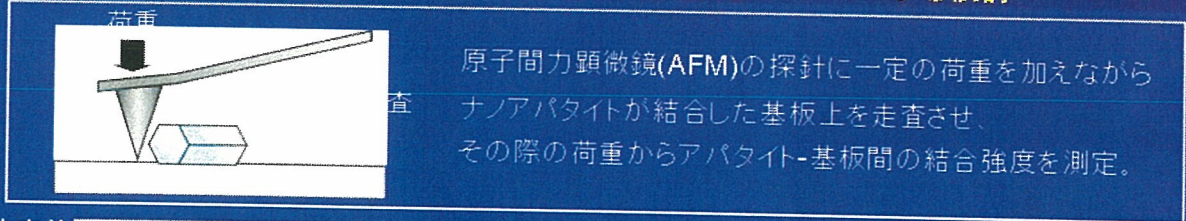


図. 走査前後のAFM像

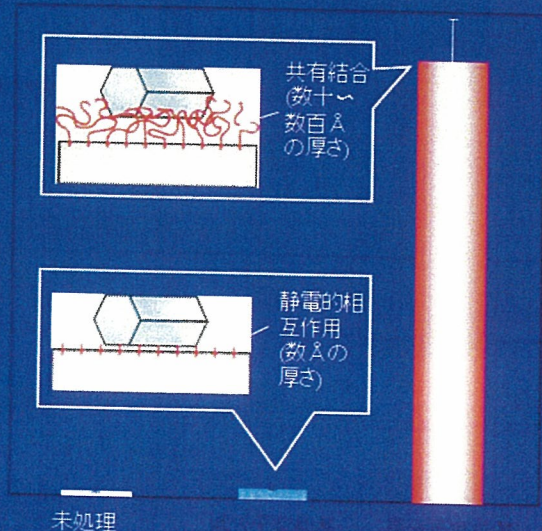
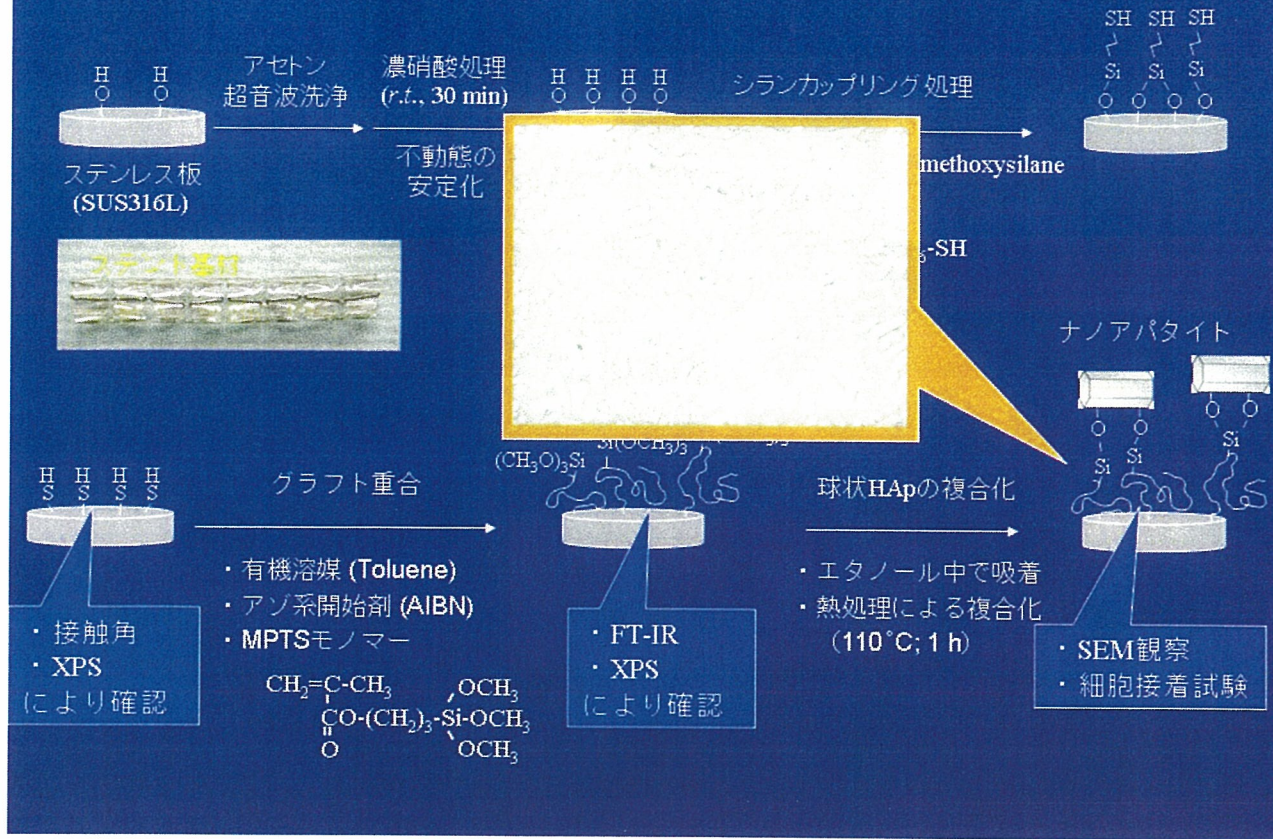


図. 基板表面処理による結合強度の変化

材料界面にグラフト鎖および共有結合を導入することによる高い結合強度の実現

ナノアパタイトコーティングステントの開発



ナノアパタイトコーティングステントの細胞接着性とアンカリング効果

未処理ステント

ステンレス表面の電子顕微鏡像

細胞接着試験後

• HUVEC (1x10⁵ cells/well)
• 4 h; 37°C

ナノアパタイトコーティングステント

ステンレス表面の電子顕微鏡像

細胞接着

トリプシン処理後

- 単層、均一なナノアパタイトコーティングに成功した。
- オリジナルと比較して、アパタイトコートステントには高い初期細胞接着性が確認できた。
- トリプシン処理でも細胞が脱離しないことから、細胞の強固なアンカリング効果が認められた。

ナノアパタイトコーティンググラフト(人工血管)の埋植試験

【動物種・薬剤投与】

- ・犬(HBD:交雑犬) ♂ 8ヶ月齢 25~30Kg
- ・麻酔前投与
ジアセパム注射液(セルシン) 10mg/2ml
硫酸アトロピン注射液(硫酸アトロピン) 1mg/2ml
塩酸ケタミン(ケタラール): 10mg/Kg
注射用アンピシリンナトリウム(注射用ビクシリン)1g/4ml
- ・持続吸入麻酔剤としてエスカイン(インフルラン)

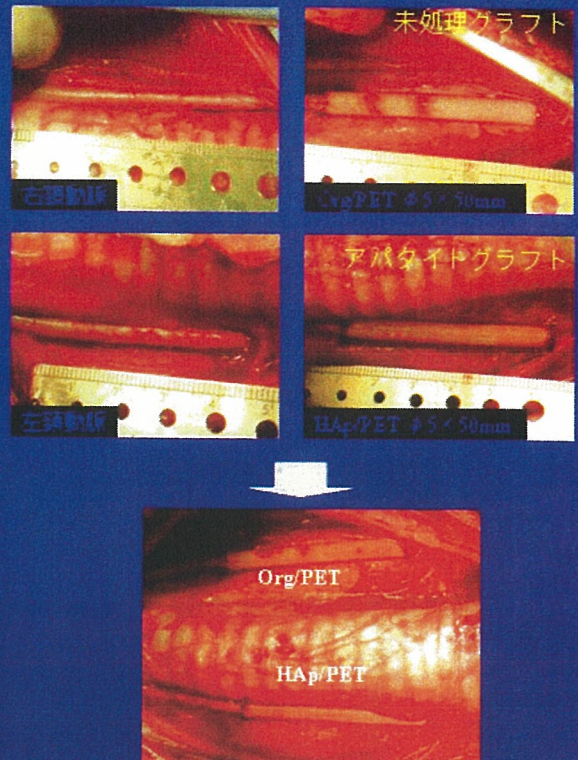
【手術手技】

- ・頸部腹側正中切開
- ・ヘパリン(100IU/Kg)
- ・右頸動脈分離50mm切除
- ・グラフト(φ5mm×50mm)
縫合(7-0ナイロンにて単純吻合)
- ・左頸動脈分離50mm切除
- ・グラフト(φ5mm×50mm)縫合(7-0ナイロンにて単純吻合)
- ・筋、皮下をVicryl(4-0)にて連続縫合
- ・皮膚を(2-0)ナイロンにて結節十字縫合
- ・終了

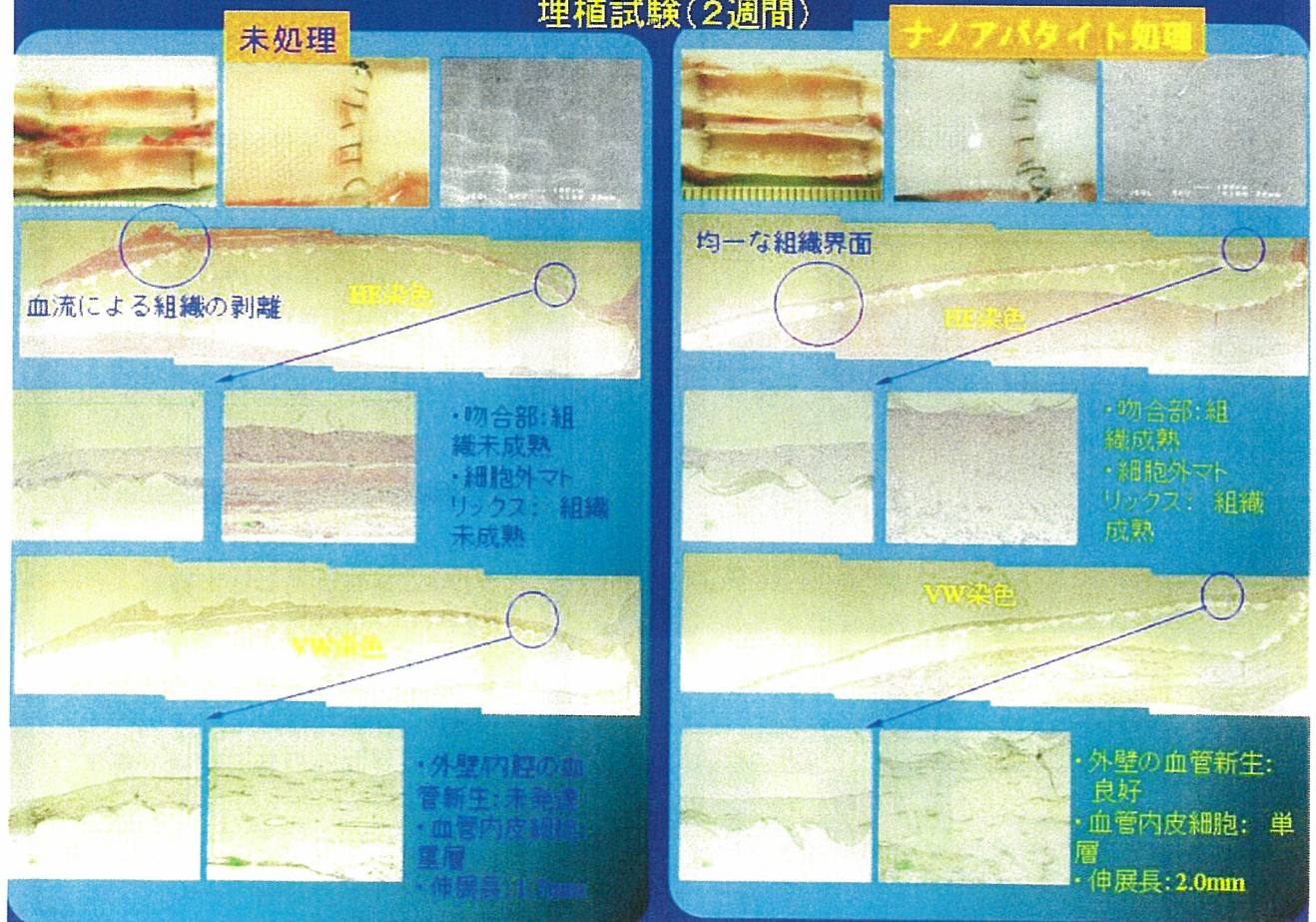
【評価方法】

- ・外観撮影
- ・走査型電子顕微鏡(SEM像)
- ・Hematoxylin-Eosin(HE染色)
- ・Von Willebrand factor

【外観写真】



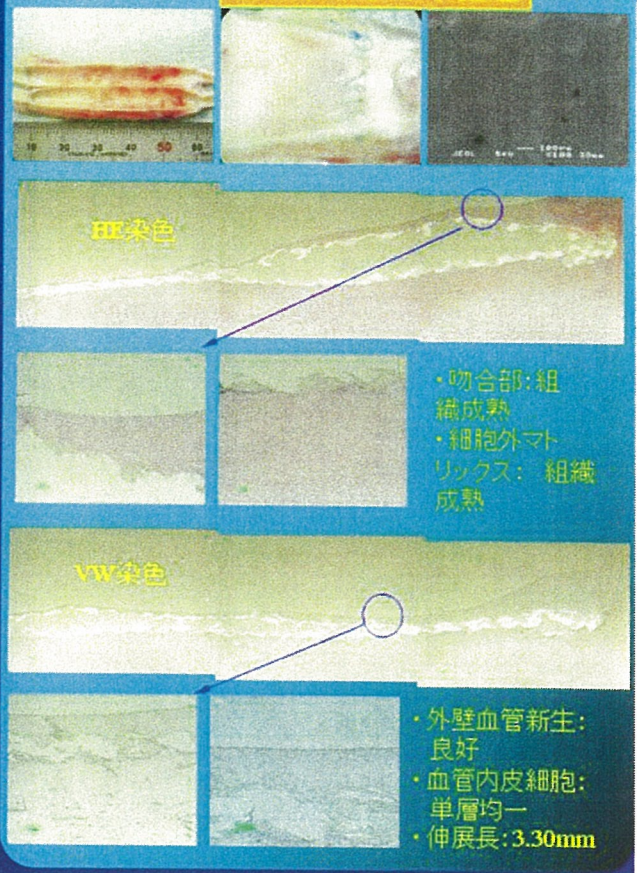
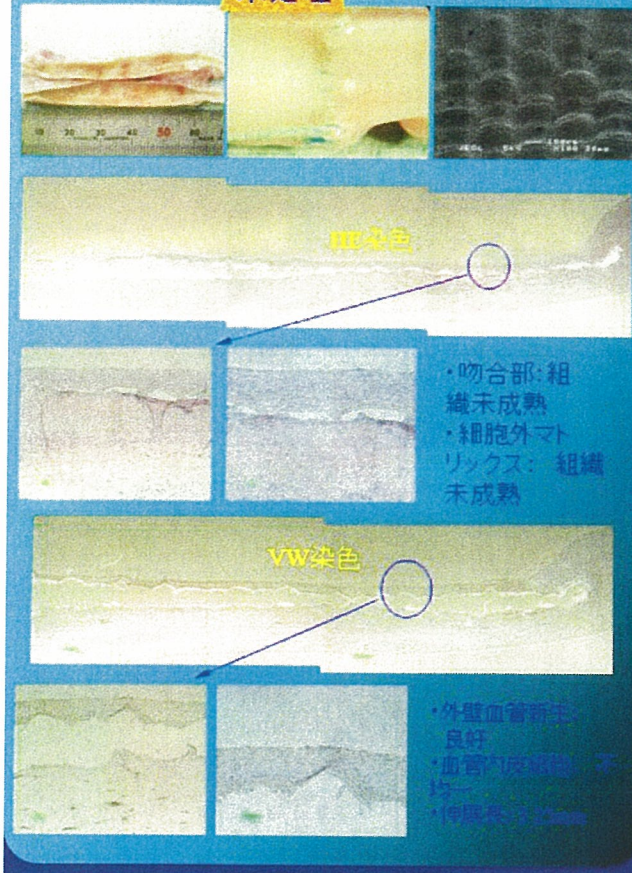
埋植試験(2週間)



埋植試験(4週間)

未処理

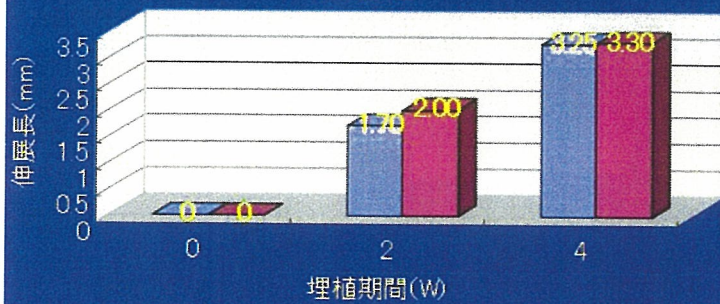
ナノアパタイト処理



内皮細胞伸展距離・血栓形成厚さの比較

血管内皮細胞伸展距離の比較

■ 未処理 ■ アパタイト



未処理

(2W): 重層被覆

(4W): 重層, 凸凹有り

アパタイト

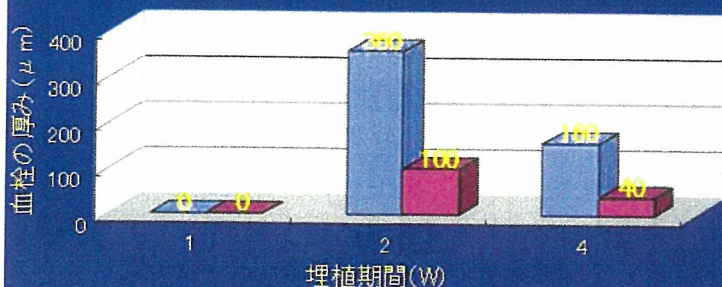
(2W): 単層被覆

(4W): 単層, 滑らか

ナノアパタイトによる
細胞の足場としての効果

血栓(フィブリン)形成の厚さの比較

■ 未処理 ■ アパタイト



未処理

(2W): 血球成分主体の血栓

(4W): 炎症性細胞の増加

アパタイト

(2W): 比較的少ない血栓

(4W): 界面への自己組織の侵入

血栓剥離無アパタイトの効果
基材界面への自己組織の侵入抑制

まとめ

- 1) ナノアパタイト/基材界面の結合強度定量評価:
ナノアパタイト/基材界面へグラフト鎖/共有結合を導入することにより、高い結合強度を実現。
- 2) ナノアパタイトコーティングステントの創出:
金属へのナノアパタイトコーティング法を確立
コーティングステントの製造。
- 3) ナノアパタイトグラフトの効能:
吻合部の潤滑面早期形成
血管内皮細胞の早期被覆効果
血栓・組織剥離無く高いアンカリング効果
感染性のあるコラーゲン等動物由来タンパク質に代替する材料(生物学的安全性の担保)
滅菌の容易性
輸送・保存の容易性。

結語

- ナノアパタイトの精製, グラフト・金属へのコーティング技術を確立した。
- ナノアパタイトコート後のグラフトでは内皮細胞による被覆の距離は変わらないものの, 成熟した血管内皮細胞の早期被覆効果が認められた。
- ナノアパタイトコート後のグラフトでは血栓・組織剥離無く高いアンカリング効果が認められた。

第1回国循ステントグラフト班会議

日時:平成18年5月19日(金)午後1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2F, 203号室

2006年度第一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5月19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） 植木 光樹 （国立循環器病センター研究所）

13:30-13:45 質疑応答

（15分）

13:45-14:00 <説明>ステントグラフト実験計画

（15分） 植木 光樹 （国立循環器病センター研究所）

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

高分子学会予稿集

第55回(2006年)

高分子学会年次大会 5月24日～26日 名古屋国際会議場

55 卷 **1** 号

プログラム、招待講演・若手招待講演・受賞講演
研究発表者名索引、高分子分析測定機器・書籍展示目録

Polymer Preprints, Japan
Vol. 55, No. 1



高分子学会 THE SOCIETY OF POLYMER SCIENCE, JAPAN

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
(京工繊大) ○古川敬子・河原 豊、(東大先端研) 芹沢 武、(国循セ) 岡田正弘・古菌 勉

<緒言>

これまで我々は、ナノサイズの水酸化アパタイト (HAp) 単結晶を医用高分子材料表面に吸着後、化学反応により粒子を結合させた新規複合材料の開発を行ってきた。複合状態を制御することで、基材の機械的性質を保持したまま、表面に存在する HAp による生体親和性を付与することが可能となる。本研究では界面複合法を用いた HAp/高分子複合体の表面微細構造を精密制御することを目的とし、基板表面への HAp ナノ単結晶の吸着・結合挙動の解析を行った。

<実験>

モデル基板として用いた金基板表面に3種類の低分子官能基 (NH_2 , CH_3 , COO^-) の自己組織化単分子層 (Self-Assembled Monolayer, SAM) を形成させた。同基板表面にロッド状および球状 HAp ナノ単結晶を吸着させ、その際の吸着挙動を水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance, QCM) を用いて解析した。また、HAp と化学結合すると考えられるアルコキシル基をグラフト重合させた基板表面へ HAp ナノ単結晶を結合させ、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) を用いて HAp-基板間の結合強度を評価した。

<結果・考察>

Fig. 1 に示したように、ロッド状 HAp ナノ単結晶の初期吸着速度および吸着量は NH_2 , CH_3 , COO^- の順に増加した。これは、HAp 表面のカルシウムイオンによって HAp ナノ単結晶の a 面が正電荷に帯電しているため、負電荷密度の高い COO^- 表面に強い相互作用を示したためと考えられる。一方、電荷を持たない CH_3 や正電荷である NH_2 表面との相互作用は弱かったと考えられる。また、AFM を用いて HAp-基板間の結合強度を測定したところ、単に HAp を吸着させたものに比べ、化学結合により結合させたものは優位に高い値を示した。以上の結果から、HAp/高分子複合体表面の HAp ナノ単結晶の複合状態を精密制御するための重要な指針が得られた。

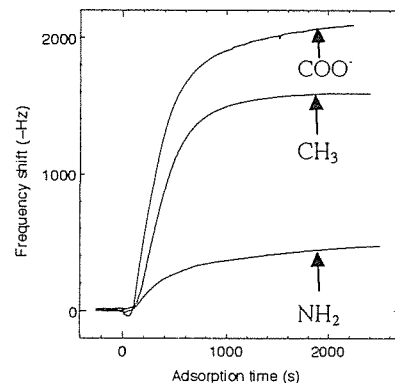


Fig. 1 Relationships between adsorption times in ethanol at 20°C and the amounts of hydroxyapatite nanocrystals adsorbed on a QCM substrate having different functional groups: NH_2 ; CH_3 ; COO^-

A study on the control of the nanoscale structure of a novel hydroxyapatite/polymer composite

Keiko FURUKAWA^{1,2}, Masahiro OKADA², Takeshi SERIZAWA³, Yutaka KAWAHARA¹, Tsutomu FURUZONO² (¹Kyoto Institute of technology, ²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita-shi, Osaka 565-8565, Japan, ³RCAST, The University of Tokyo)

²Tel: +81-6-6833-5012 ext 2623, Fax: +81-6-6872-7485, E-mail: furuzono@ri.ncvc.go.jp

Key Word: hydroxyapatite / nanoscale / single crystal / composite / adsorption

Abstract: The adsorption behavior of hydroxyapatite nanocrystals onto a model substrate was investigated using a Quartz Crystal Microbalance (QCM) technique. Self-assembled monolayers (SAMs) of alkanethiol having NH_2 , CH_3 , COO^- and terminal groups were formed on a QCM substrate via sulfur attachment. The frequency shift of QCM increased in the following order: $\text{NH}_2 < \text{CH}_3 < \text{COO}^-$. The adhesion properties were tested by Atomic Force Microscopy (AFM) where peeling forces were evaluated. These studies on adsorption behavior and bond strength between HAp and substrates will be applied to the control of the surface morphology of hydroxyapatite/polymer composite.

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

国循セ ○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

<緒言>

我々は硬組織および軟組織親和性に優れるハイドロキシアパタイト (HAp) ナノ粒子を医用高分子基材と複合化することで、高分子の機械的特性を保持したまま組織親和性を発現する新規な複合材料を開発してきた。本報告ではナノアパタイト複合法の応用範囲の拡大を目指し、汎用医用高分子材料であるポリエステルとナノアパタイト単結晶を共有結合でコートしたポリエステル製人工血管基材を開発した。そして、得たポリエステル製人工血管基材表面への血管内皮細胞の単層での被覆・伸展を電子顕微鏡(SEM)観察及び組織学的に検討した。

<実験>

表面に水酸基を導入したポリエステル製グラフト基材にナノサイズ(粒径 50~100nm)の HAp 単結晶体を複合化した。In vitro 試験として、得られたポリエステル/HAp 複合体へヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を播種・培養を行い、基材への細胞接着性を評価した。さらに、In vivo 試験として、未処理のポリエステルとポリエステル/HAp 複合化を雑種犬両側頸動脈へ完全置換を行った。HUVEC の被覆・伸展状態は肉眼的観察、SEM、組織切片観察によって評価を行った。

<結果・考察>

ポリエステル製人工血管基材の表面に HAp 単結晶体を複合化した SEM 写真を Fig.1 に示す。HAp 単結晶はポリエステル表面上に単層で、分散した状態で結合していた。未処理のポリエステルに物理吸着させた HAp は超音波洗浄にてほぼ脱離した。一方、表面処理を施したポリエステルの場合は脱離しないことから、基材と HAp の強固な結合が示唆された。

In vitro 試験では未処理ポリエステルに比べ HAp 複合化ポリエステルでは有意に高い細胞接着性を示し(Fig.2)、また in vivo 試験での短期間の雑種犬頸動脈への完全置換の結果は HUVEC が単層でより早く伸展していることを確認した。

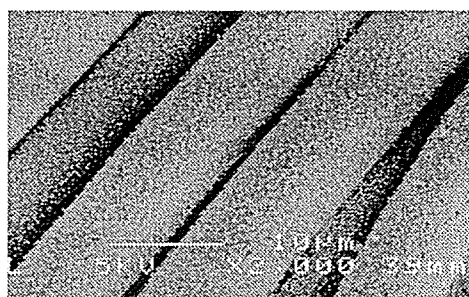


Fig.1 A SEM photograph of the surface of hydroxyapatite/ polyester composite.

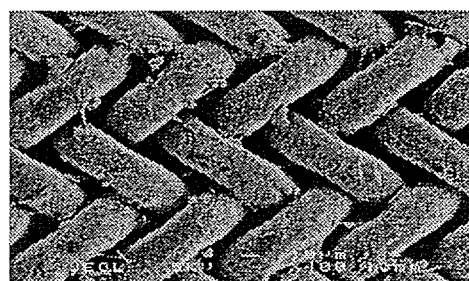


Fig.2 A SEM photograph of HUVEC On the surface of composite after incubation for 4 hr.

Development and histological observations of nano-apatite coated polyester contacted with blood

Miwa MASUDA¹, Mitsuki UEKI¹, Hiroyuki KADONO^{1,2}, Masahiro OKADA¹, Shoji YASUDA¹, Ryoichi TANAKA¹, Kunio MIYATAKE³, and Tsutomu FURUZONO¹ (¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita-shi, Osaka 565-8565, Japan ²Tokyo medical and dental university, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyodaku, Tokyo 101-0062, Japan ³National Hospital Organization Osaka Minami Medical Center, 2-1 Kidohigashimachi, Kawachinagano, Osaka 565-8521, Japan)
¹Tel: +81-6-6833-5012 ext 2623, Fax: +81-6-6872-7485, E-mail: furuzono@ri.ncvc.go.jp

Key Word: Hydroxyapatite / nano-scaled particle / polyester / histological

Abstract: In this report, a novel composite for a soft-tissue-compatible material was developed. A surface of polyester was modified with nano-sized hydroxyapatite (HAp) crystals through covalent bonding. The cell adhesion on the HAp/polyester was more plentifully compared to the non-coated materials in vitro, and confirmed cell spreading earlier as well as monolayer in vivo. The interface of a graft implanted in dogs was evaluated by histological observations.

第2回国循環ステントグラフト班会議

日時:平成18年7月21日(金)午後1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2F, 203号室

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>

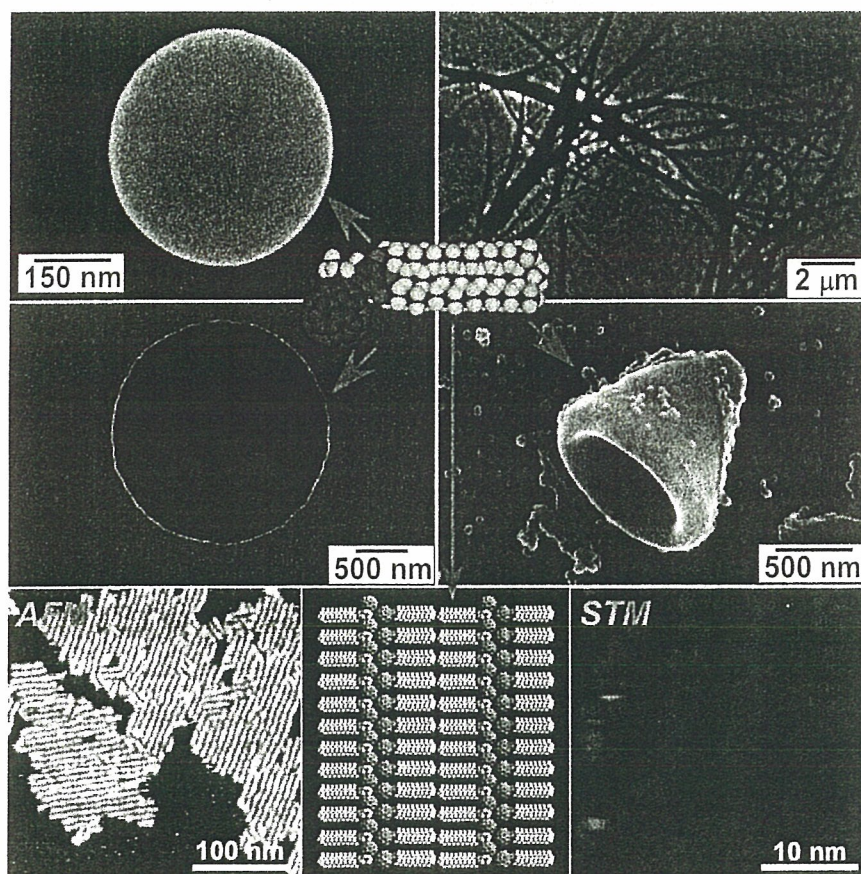
（20分） 古菌 勉

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

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

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, 古菌 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、シリコー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 -メタクリ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

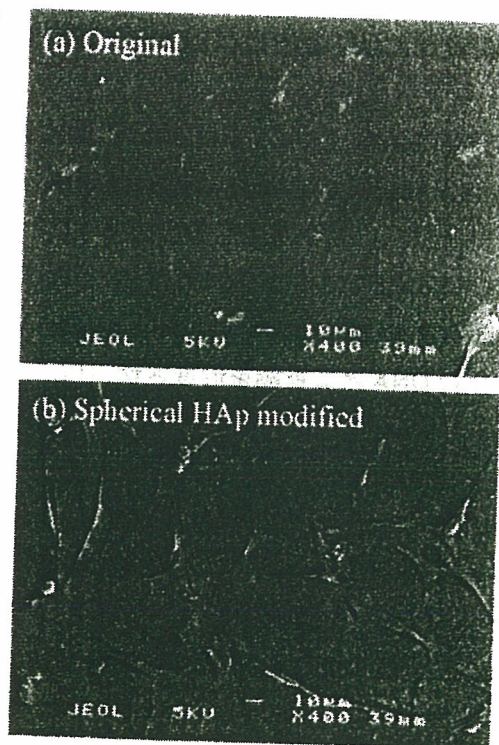


Fig. 1 SEM photographs of HUVEC adhering on the original (a) and spherical HAp-modified (b) stainless steels after incubation in 24-well multiplates (1×10^5 cells/well) at 37°C for 24 h.

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

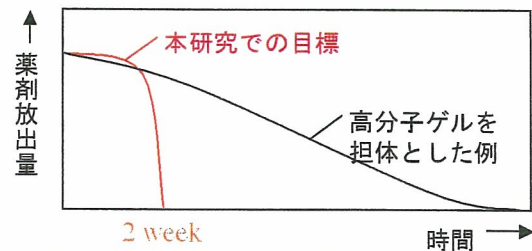
ナノアパタイトを薬物担体として用いたDrug-Eluting Stentの開発

現在のDrug-Eluting Stentの問題点

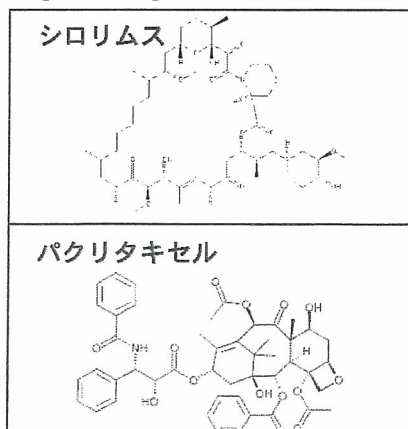
- ・長期間にわたる薬物 (免疫抑制剤) の放出
→ 正常内膜の被覆も抑制するため、長期間血管内に基材が露出し続ける
→ 慢性期にステントの血栓閉塞の引き金：長期間、抗血小板薬を服用する必要

新しい概念のDrug-Eluting Stentの創出

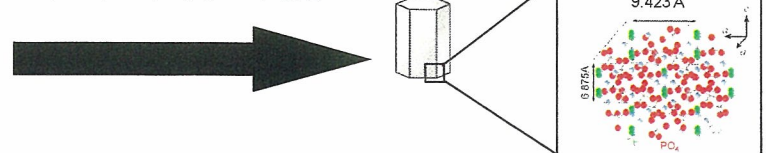
- ・薬物をナノアパタイト表面に少量担持させ、2週間程度で放出させる。
(手術による傷は2週間程度で治癒するため)
- ・薬物放出後に、内皮細胞が被覆することで再狭窄防止を可能とする。



Drug-Eluting Stent用薬剤の例



ナノアパタイトへの吸着



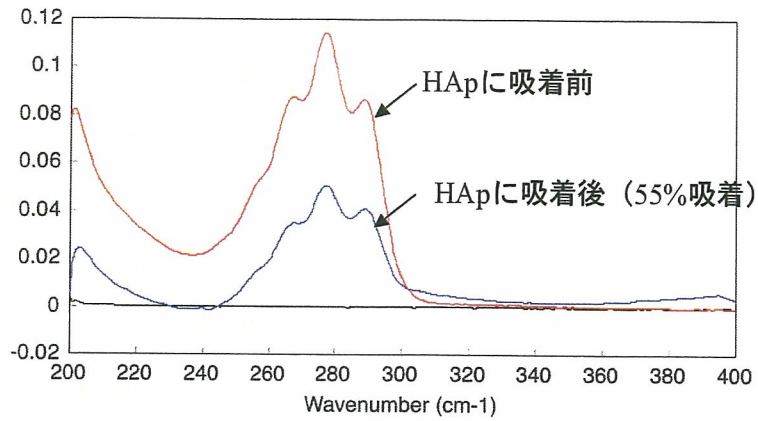
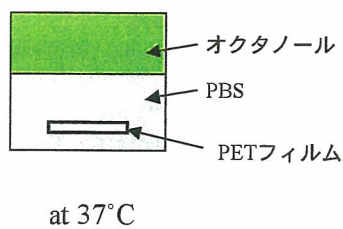


図. ラパマイシンのUVスペクトル(ラパマイシン, 5 $\mu\text{g/ml}$)
HApへの吸着条件: ロッド状HAp, 0.5 mg/ml, 室温, 1 h

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

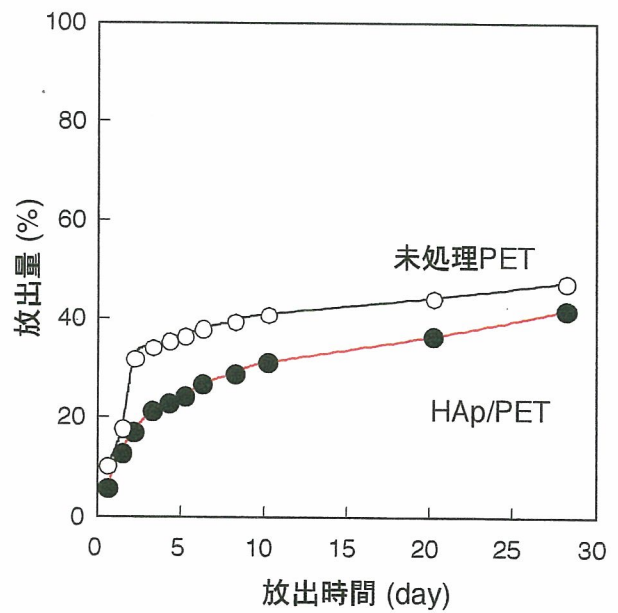
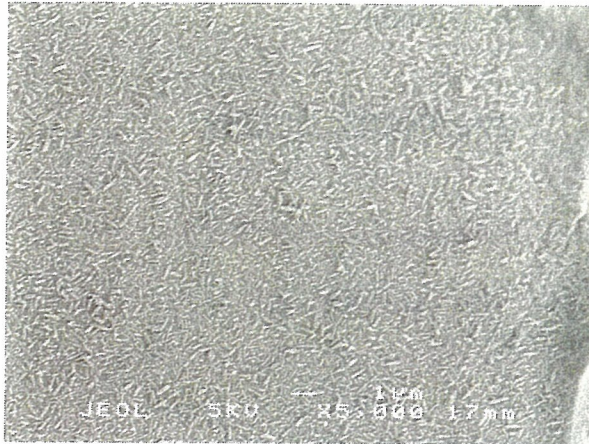


図. ラパマイシンの放出挙動

再現性を確認中

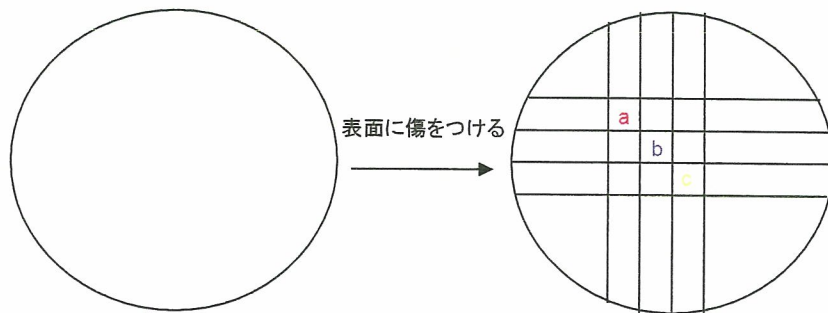
ラパマイシン吸着によるHAp/PET上の平滑筋細胞(SMC)挙動 (光学顕微鏡)

サンプル：透明PETフィルム (評価を簡単にするため)



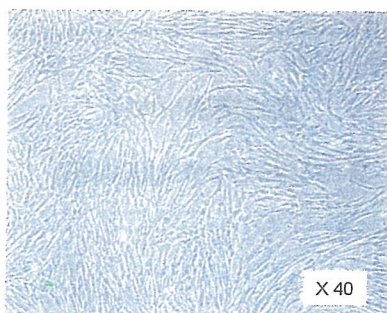
- ・コロナ放電 (80V; 10 sec; 両面)
- ・グラフト重合 (アクリル酸; 10% aq.; 60°C; 45 min)
- ・HAp吸着 (ロッド状 No. 157; 1% ethanol; 5 min)

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—1代目

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

ラパマイシン吸着条件

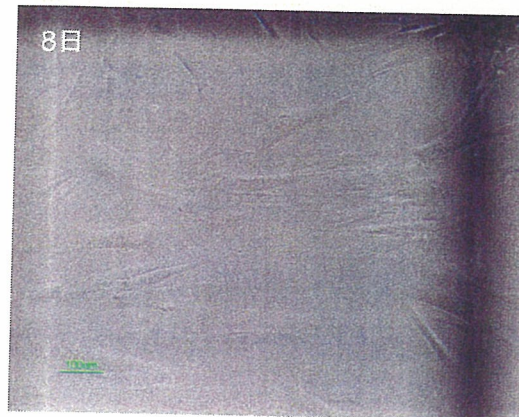
1 mg / 500 μ L ethanol

25 μ L



Dry

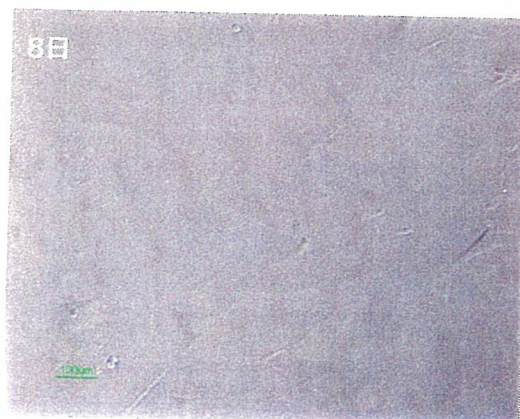
培養シャーレ



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