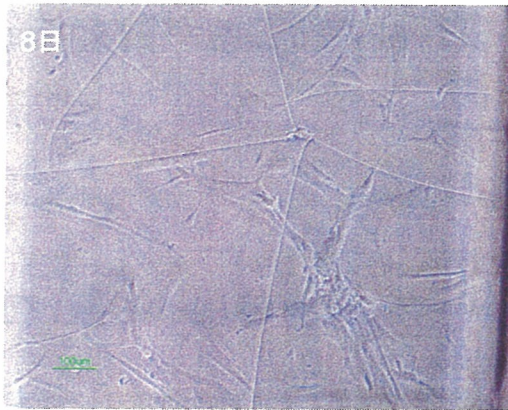
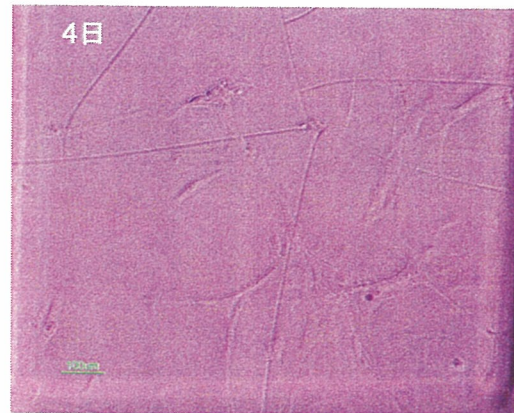


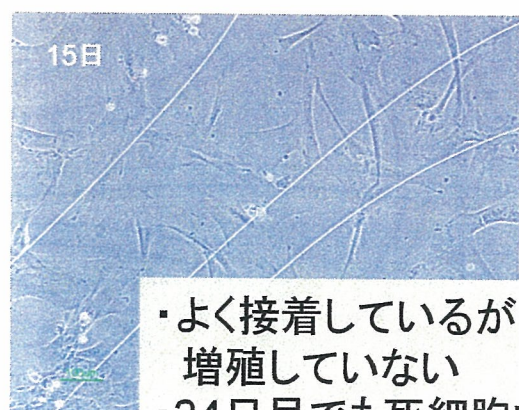
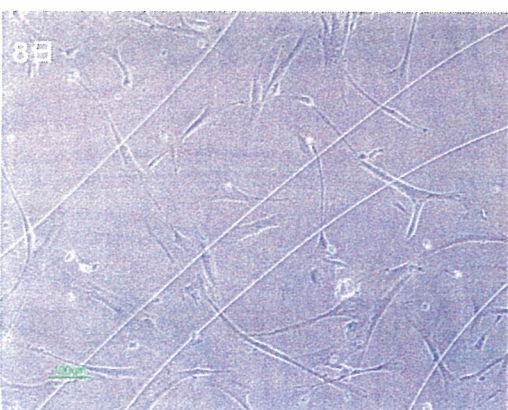
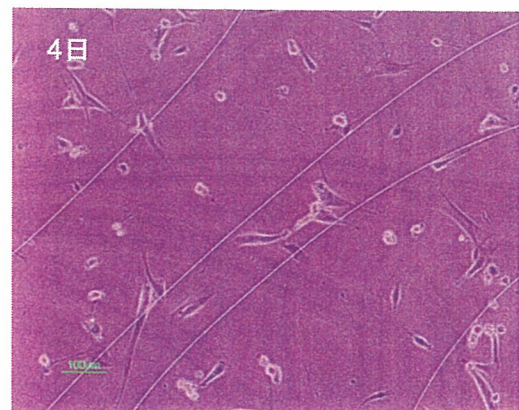
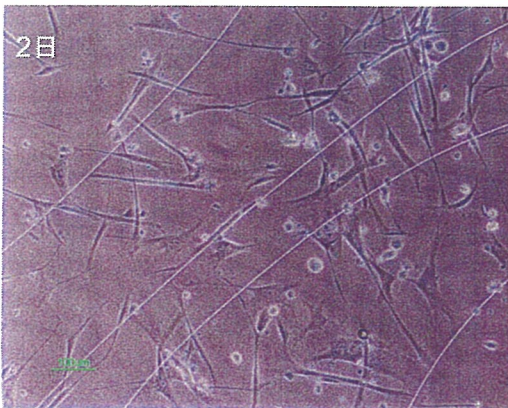
HAp/PET



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

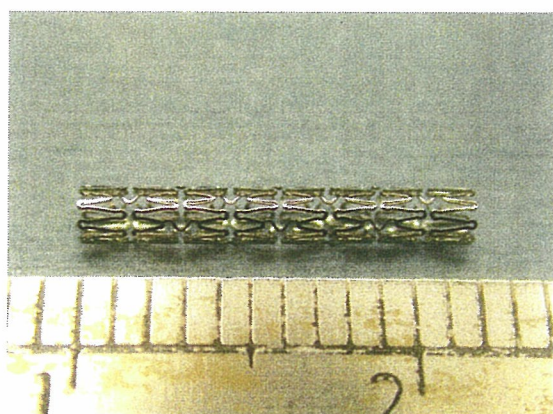
- ・再現性チェック
- ・セルカウティングキットによる定量化
- ・ラパマイシン濃度の影響



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

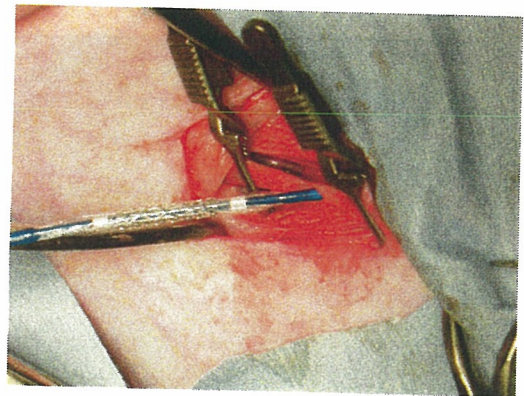
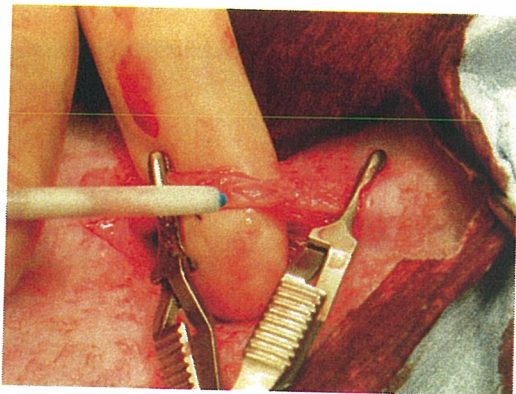
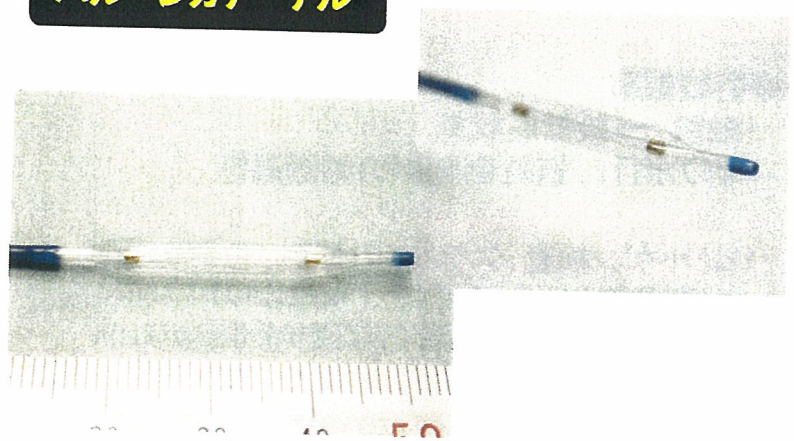
長さ: 12mm

収縮時: 直径 1.5mm

拡張時: 直径 5mm

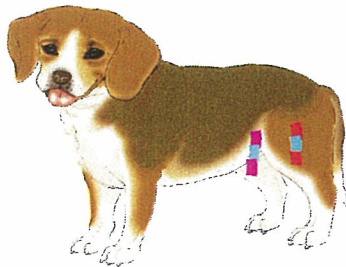
バルーンカテーテル

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

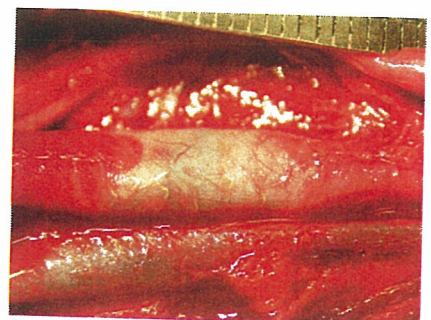
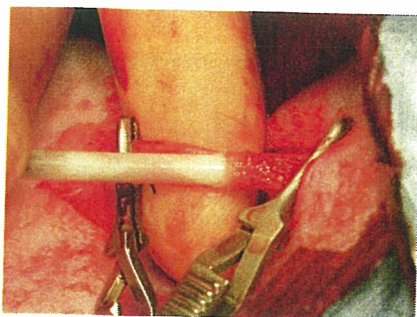
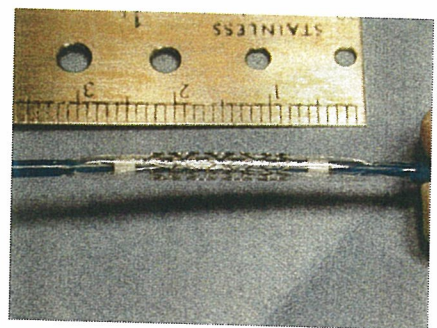


ステント～犬への留置試験

・両側大腿動脈
 留置期間:1週、2週、4週間留置



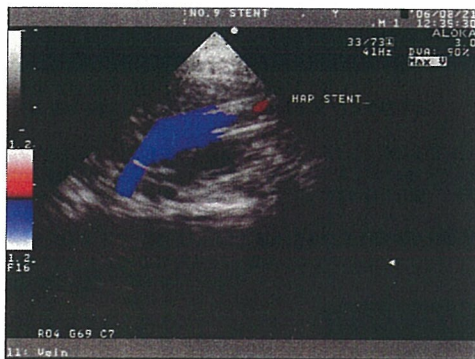
実験犬:雑種、25～30kg
 大腿動脈径:5mm
 留置部位:内股部大腿動脈
 切開部から約10cm遠位



ステント～犬への留置試験

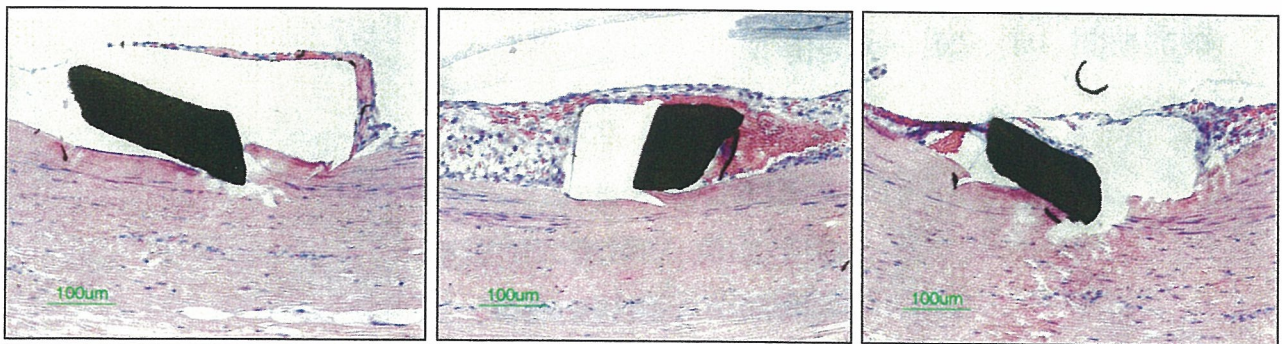
◆術後観察

- ・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



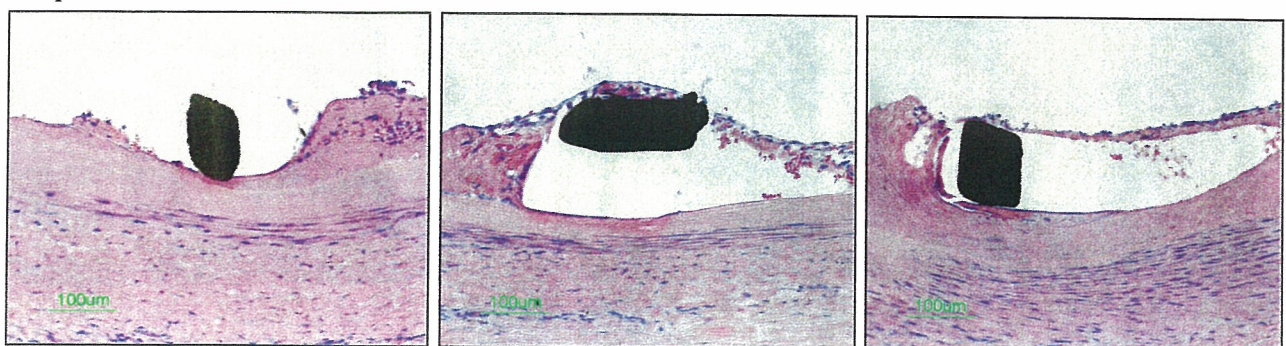
ステント～犬への留置試験～1週間 (hematoxylin-eosin staining)

Original/Stent



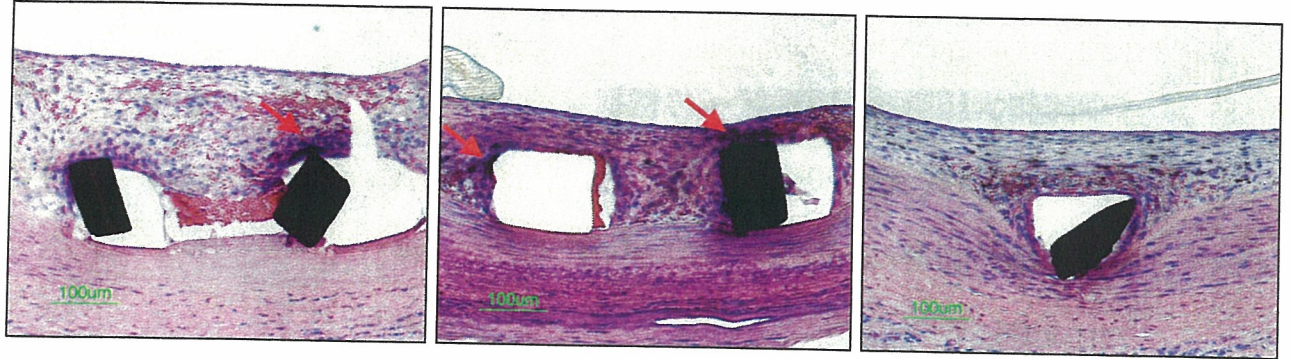
← 近位 ————— 中央 ————— 遠位 →

HAp/Stent



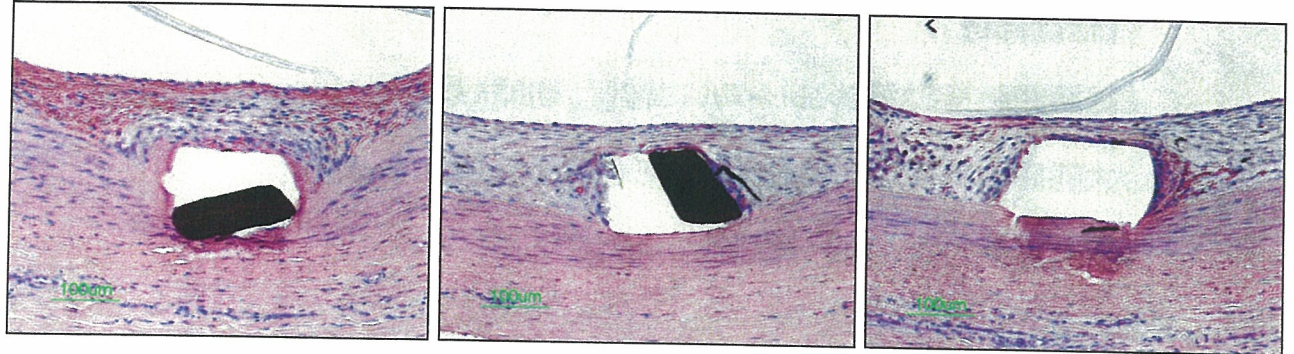
ステント～犬への留置試験～2週間 (hematoxylin-eosin staining)

Original/Stent

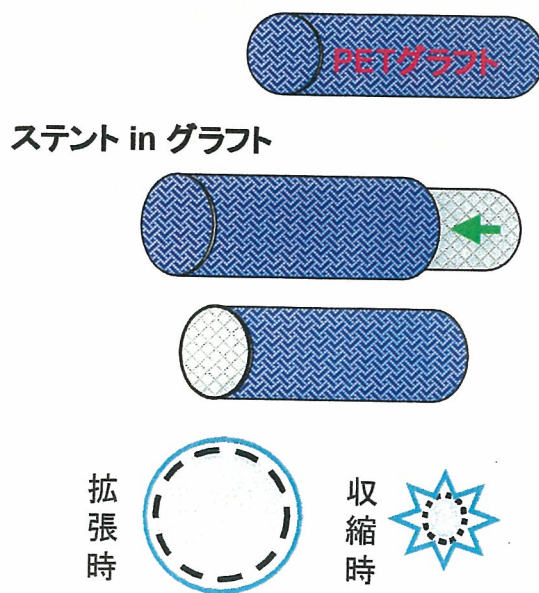


← 近位 ————— 中央 ————— 遠位 →

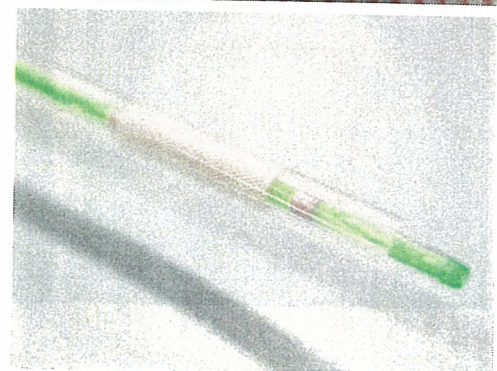
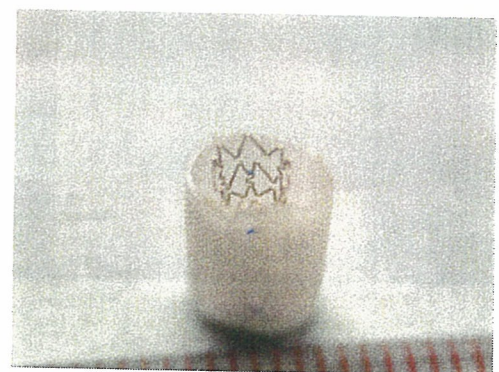
HAp/Stent



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



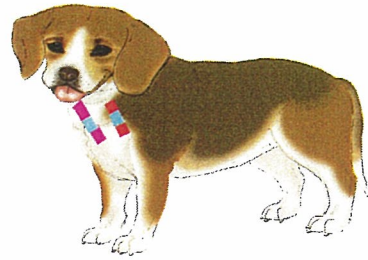
ステントグラフト～犬への留置試験

◆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



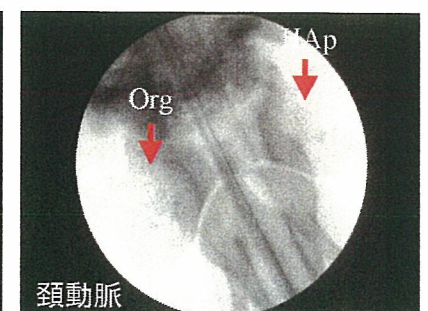
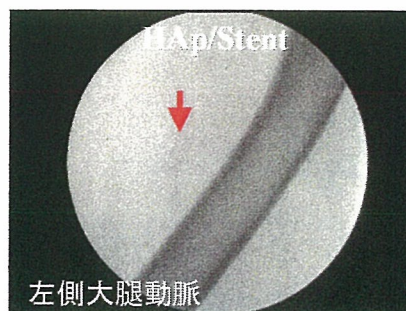
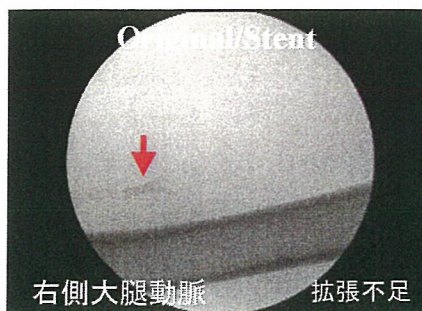
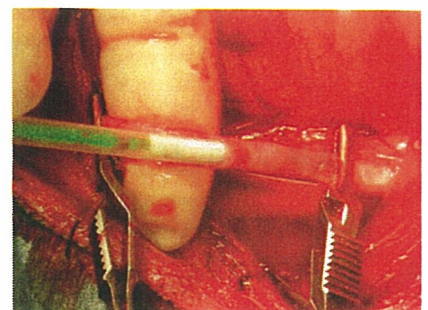
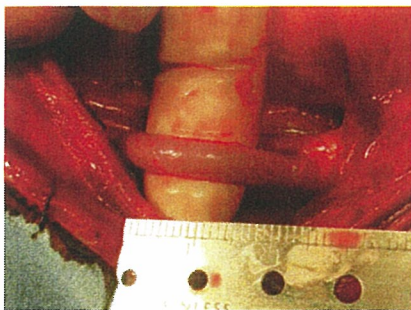
【留置部位】

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)

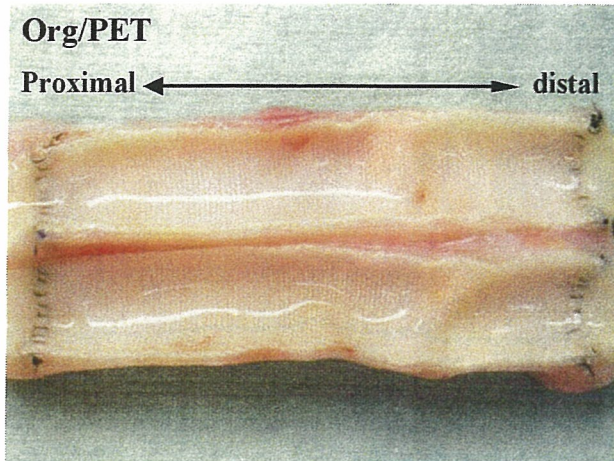
大腿動脈: 内股部大腿動脈血管切開部から約10cm遠位

観察期間: 1週、2週、4週間

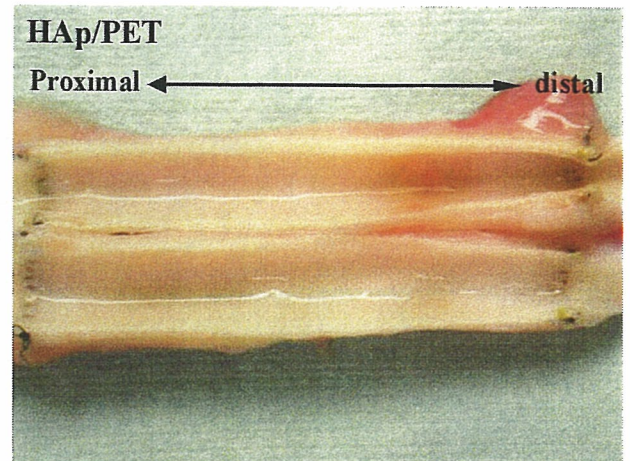
ステントグラフト～犬への留置試験



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tent1ヶ月留置(実験済み)→組織評価

3. スtent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。

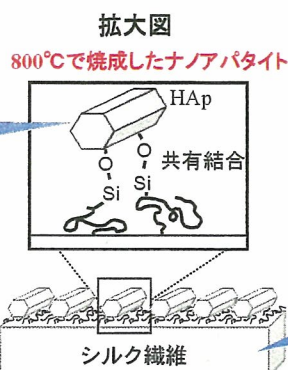
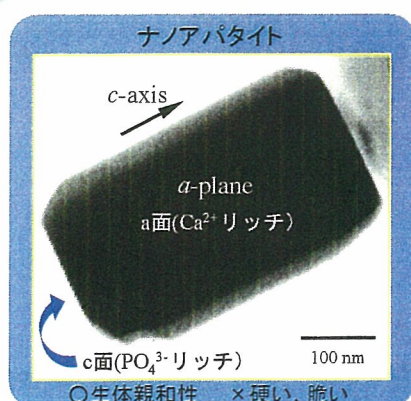
早期安定内膜の形成を目的とした ナノアパタイトコーティング人工血管

○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, 古藺 勉²

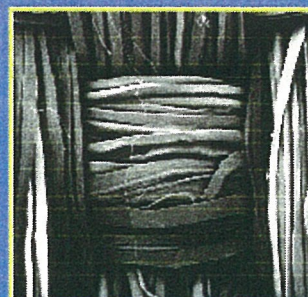
¹大阪電気通信大学; ²国立循環器病センター研究所; ³東京医科歯科大学
⁴岩手医科大学; ⁵大阪南医療センター

ハイドロキシアパタイト(HAp)について

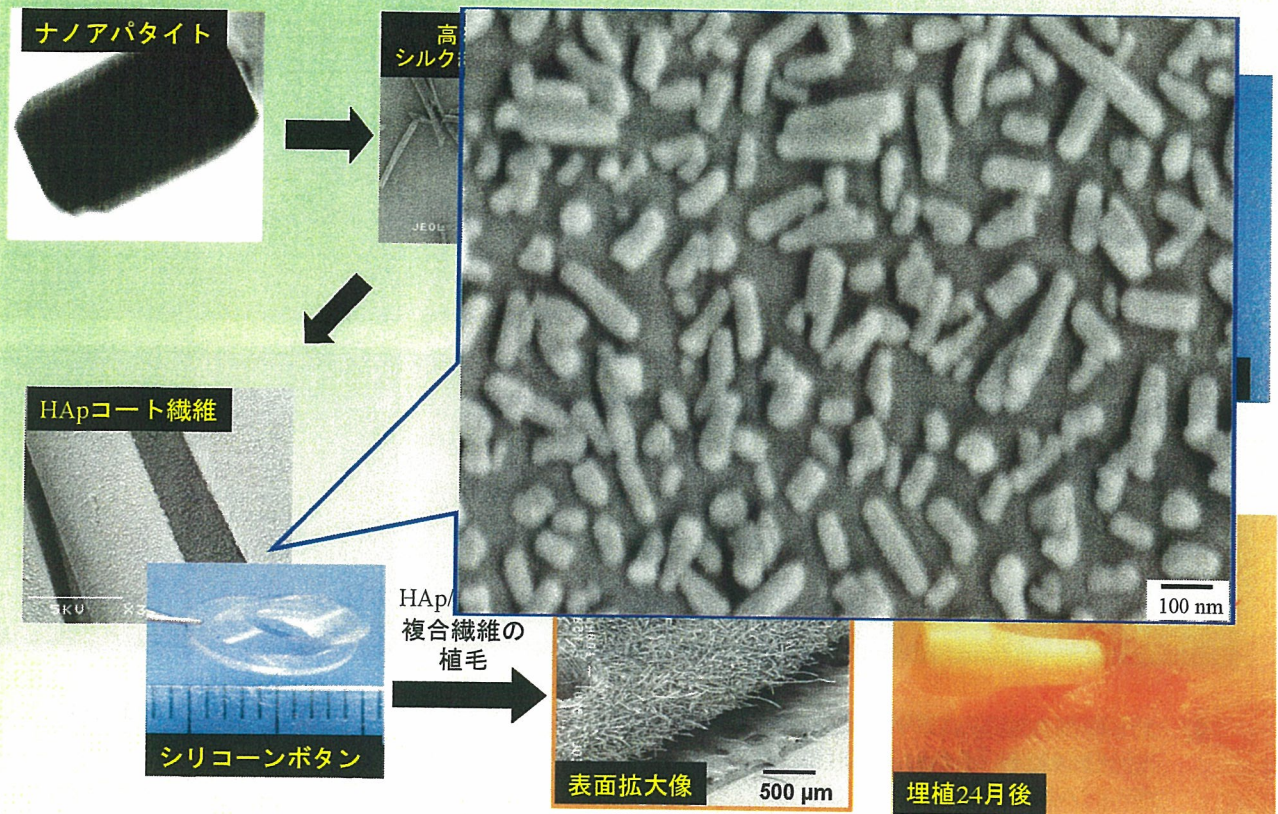
- **特徴**
 - ・リン酸カルシウム的一种
 - ・歯や骨を構成する無機物の主成分
 - 【長所】優れた軟組織親和性、歯・骨の成分
 - 【短所】セラミックの性質(硬い・脆い)
- **性質**
 - ・生体親和性
細胞・組織接着性; 骨結合性
 - ・吸着性
タンパク質; 核酸; ウイルス
 - ・イオン交換性



例) シルク、ポリ乳酸
シリコン、ポリエステル、金属



HAp/シルク(縫合糸)複合繊維を用いた新規経皮デバイスの作製



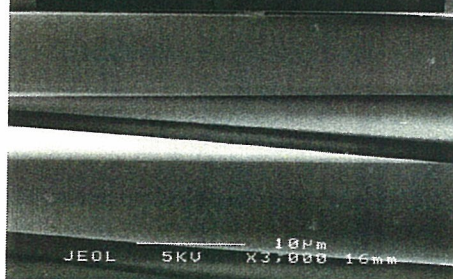
目的

ナノアパタイトコーティング法の応用範囲の拡大と人工物のみで新規人工血管の開発を試みる。

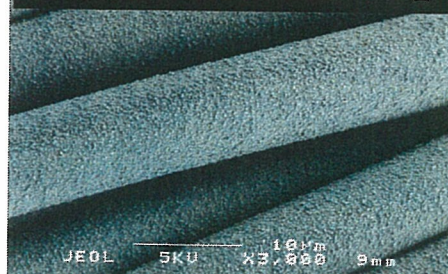
期待される効果

- ・薄い内膜/偽内膜の早期形成
- ・取り扱いの簡便性
- ・滅菌性・保存性・輸送性の向上

未処理人工血管(ポリエステル製)



ナノアパタイトコーティング人工血管



ヒト臍帯血由来血管内皮細胞(HUVEC)の接着性

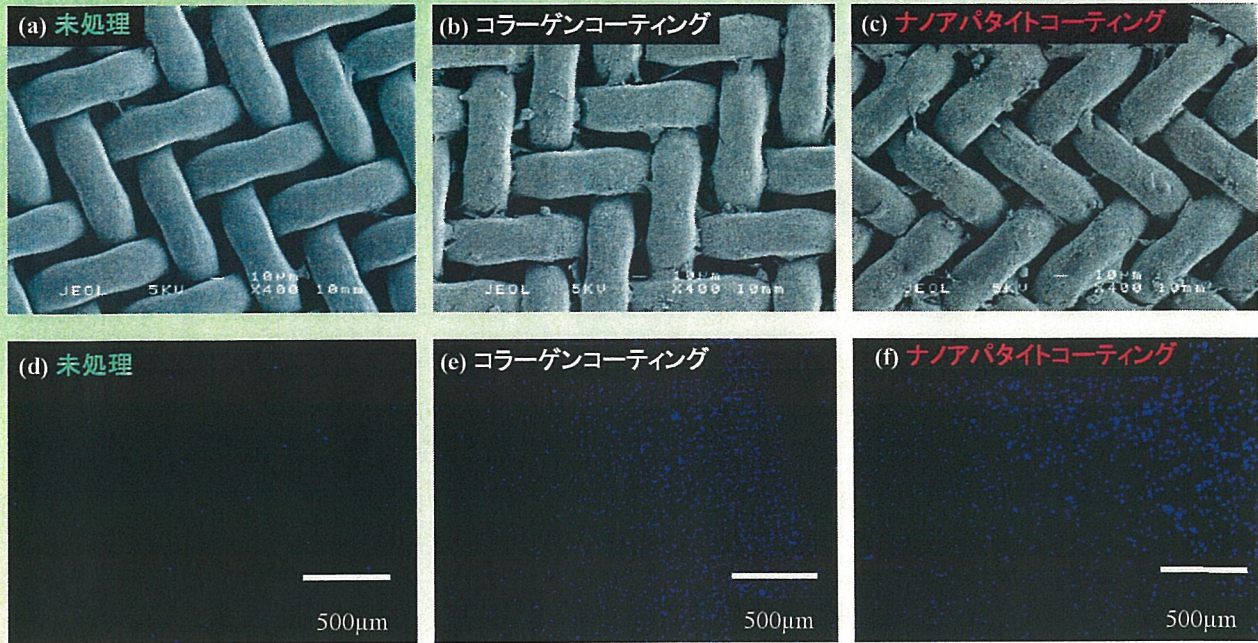


図. ヒト臍帯血由来血管内皮細胞を 1×10^5 個播種し、**4時間培養**した後のSEM像 (a-c) および蛍光顕微鏡像 (d-f)。 (a, d) 未処理PET; (b, e) コラーゲンコーティングPET; (c, f) HApコーティングPET

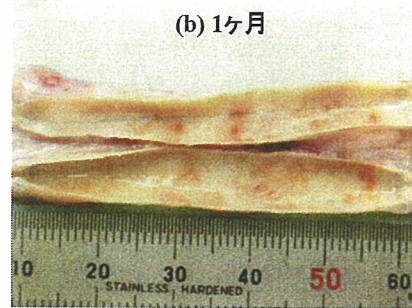
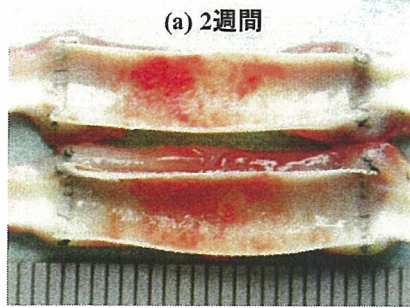
動物実験



- ・交雑犬(♂; 8ヶ月齢: 25~30 kg) n=8
- ・人工血管の透水率: 31.0 ml/cm²/min
- ・麻酔前投与:
 - ・セルシン: 10mg (in 2ml)
 - ・硫酸アトロピン: 1mg (in 2ml)
 - ・塩酸ケタミン: 10 mg/kg
 - ・アンピシリンナトリウム: 1g (in 4ml)
- ・持続吸入麻酔剤:
 - ・エスカイン(イソフルラン)
 - ・ヘパリン(100IU/Kg)
- ・頸部腹側正中切開
- ・右頸動脈分離切除
- ・グラフト(φ5mm×30または50mm)
縫合(7-0ナイロンにて単純吻合置換)
- ・左頸動脈分離切除
- ・グラフト(φ5mm×30または50mm)
縫合(7-0ナイロンにて単純吻合置換)
- ・筋、皮下をVicryl(4-0)にて連続縫合
- ・皮膚を(2-0)ナイロンにて閉創

置換後の人工血管内腔

未処理人工血管



ナノアパタイトコーティング人工血管

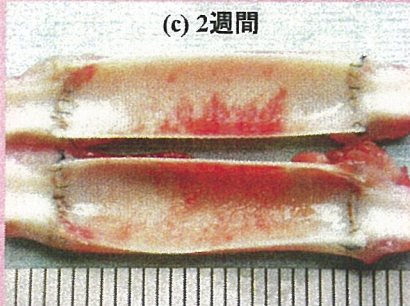
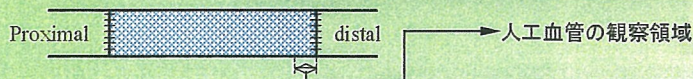
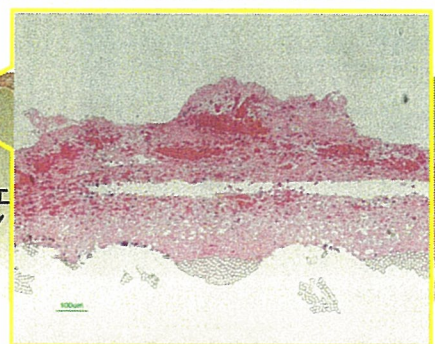
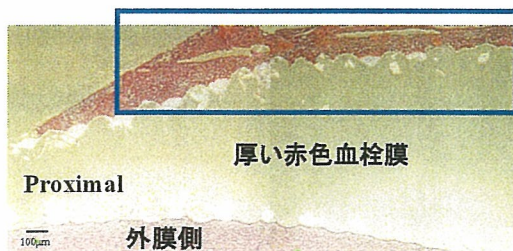


図. 置換後の人工血管内腔の外観 : (a, b) 未処理人工血管; (c, d) HApコーティング人工血管

人工血管の血栓形成の比較 (置換後2週間)



未処理人工血管



ナノアパタイトコーティング人工血管

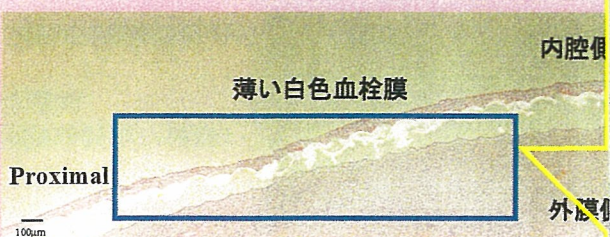
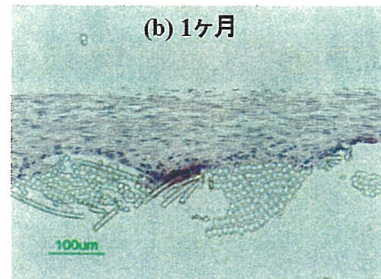
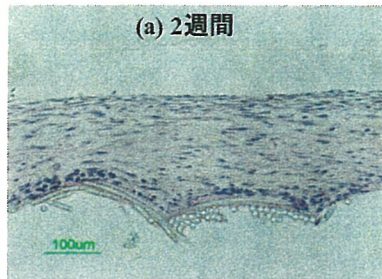


図. 人工血管の血栓形成の比較: 置換後2週間

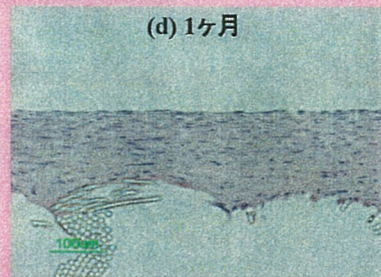
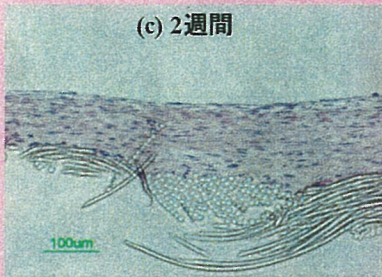
Hematoxylin-Eosin (HE) 染色

未処理人工血管



炎症性細胞の持続

ナノアパタイトコーティング人工血管



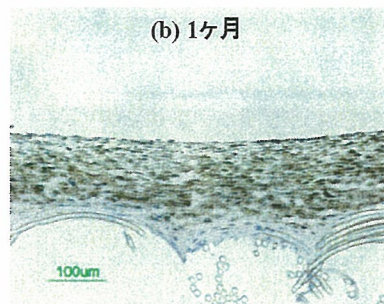
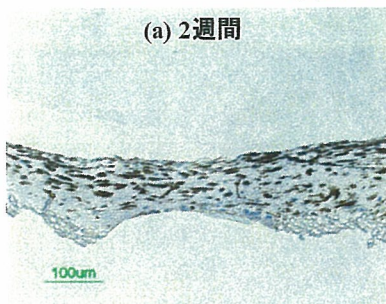
炎症性細胞の早期消退

図. 人工血管内腔の HE 染色の組織切片像：

(a,b) 未処理人工血管; (c,d) HApコーティング人工血管

Smooth Muscle α -Actin (α -SMA) 染色

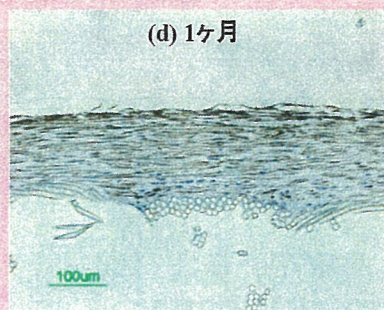
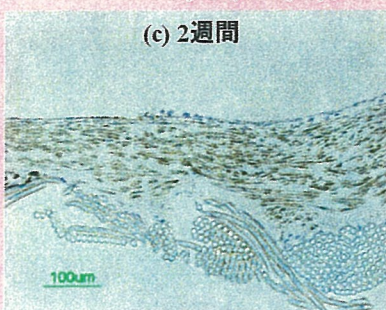
未処理人工血管



平滑筋細胞の発現: 弱い

↓
未成熟な内膜の形成

ナノアパタイトコーティング人工血管



平滑筋細胞の発現: 強い

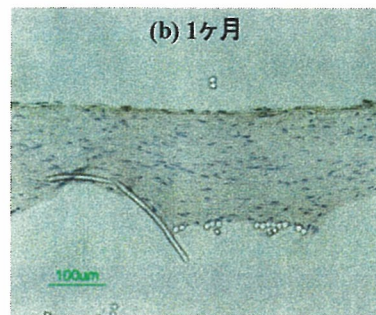
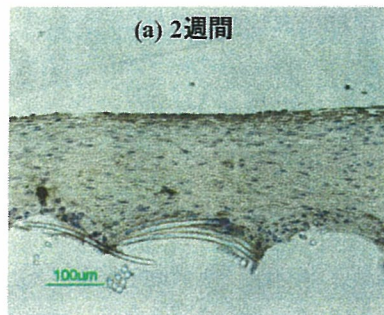
↓
より成熟した内膜の形成
(良好な平滑筋細胞の配向)

図. 人工血管内腔の α -SMA 染色後の組織切片像：

(a, b) 未処理人工血管; (c, d) HApコーティング人工血管

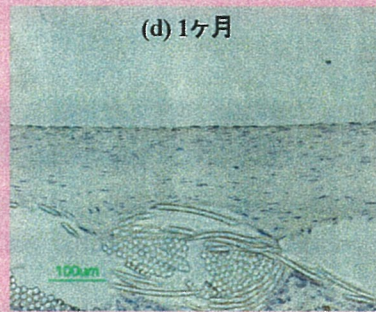
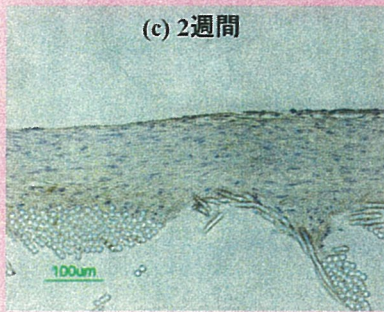
von Willebrand Factor (vWF) 染色

未処理人工血管



血管内皮細胞
↓
凹凸の形成

ナノアパタイトコーティング人工血管



血管内皮細胞
↓
平滑化

図. 人工血管内腔の vWF 染色後の組織切片像：
(a, b) 未処理人工血管; (c, d) HApコーティング人工血管

吻合部からの細胞伸展距離の比較

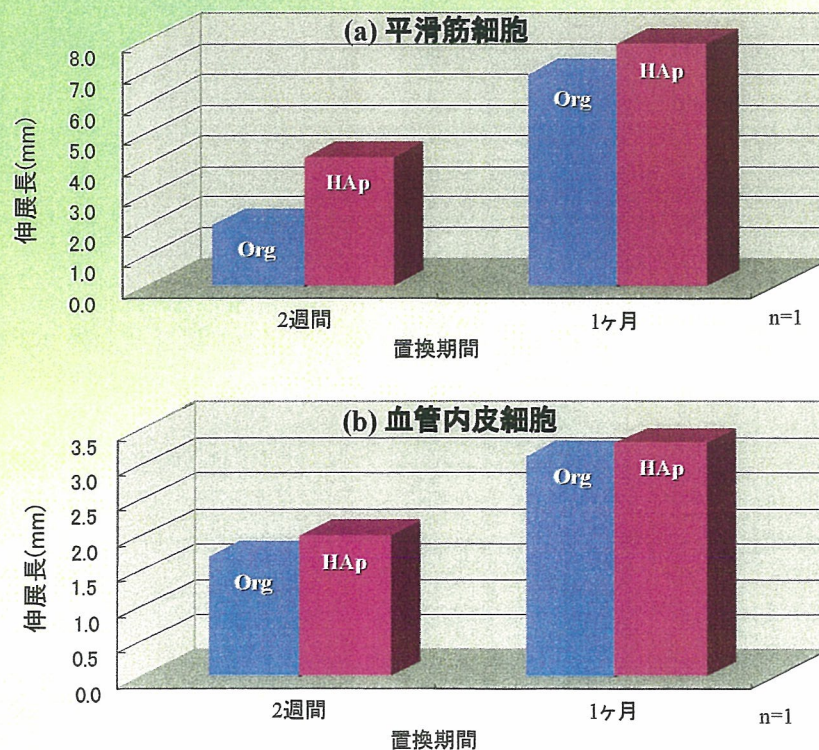


図. 吻合部からの細胞伸展距離の比較: ■ ナノアパタイトコーティング; ■ 未処理(Org)

まとめ

1. 新規人工血管の創出:
ナノアパタイトをコートしたポリエステル製人工血管を創出した。
2. *in vitro* 試験:
ナノアパタイトコーティングを行うことで、コラーゲンコーティングと同等の高い細胞接着性を付与することができた。
3. *in vivo* 試験:
 - ・ ナノアパタイト人工血管は未処理人工血管と比較して偽内膜層が薄く形成した。
 - ・ 早期内膜肥厚が見られず、未処理人工血管と比較してナノアパタイトコーティング人工血管への新生内膜の形成は早く、血管内皮細胞はより平滑に被覆した。

ナノアパタイトコーティングの利点

生体由来材料を用いることなく、人工物のみで構築しているため、滅菌性、保存性、輸送性などに優れている。

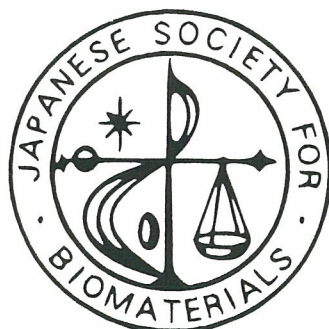
謝辞

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。

第28回

日本バイオマテリアル学会大会

予稿集



JSB

■ 2006年11月27日～28日

■ アルカディア市ヶ谷（私学会館）

第28回大会長 岡野光夫

日本バイオマテリアル学会

金属材料への化学結合を介したナノアパタイト コーティング

○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, 黒田大介³, 田中良一⁴, 宮武邦夫⁵, 古蘭 勉¹

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 鈴鹿工業高等専門学校, ⁵ 大阪南医療センター

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。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（ステンレス SUS 316L）への HAp 複合化を試み、さらにその細胞接着性を評価した。

2. 実験

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複合体を作製した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を複合体表面に播種し、24 時間培養後の接着細胞数を測定した。

3. 結果と考察

ステンレス SUS 316L を金属基材として選択し、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にグラフト重合した。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 によって確認した。また、HAp は基材表面に単層で複合化されたことを電子顕微鏡観察によって確認している。

図 1 には、細胞接着試験の結果を示した。未処理のステンレス基材と比較して、HAp を複合化することで有意に高い 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 へ) の熱処理などを行う必要があったが、高温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 複合法は高温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。

4. 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）により実施された。

Coating of nano-sized hydroxyapatite crystals on metal through covalent bonding

M. Okada¹, M. Masuda¹, M. Ueki¹, H. Kadono^{1,2}, S. Yasuda¹,
D. Kuroda³, R. Tanaka⁴, K. Miyatake⁵, T. Furuzono^{1,2}

¹National Cardiovascular Center Research Institute; ²Tokyo Medical and Dental University; ³Suzuka National College of Technology; ⁴Iwate Medical University; ⁵Osaka Minami Medical Center

Tel: +81-6-6833-5012 (ext. 2623), Fax: +81-6-6872-7485, E-mail: okada04@ri.ncvc.go.jp

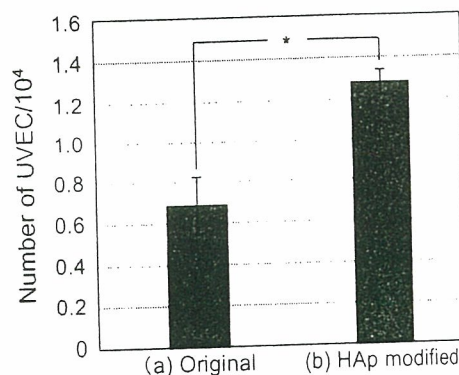


Fig. 1 HUVEC numbers adhered on the original (a) and HAp modified (b) and stainless steels, after incubation in 24-well multiplates at 37°C for 24 h.

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

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

¹東京医科歯科大、²国立循環器病センター、³岩手医科大、⁴大阪南医療センター

1. 緒言

ハイドロキシアパタイト (HAp) は硬組織または軟組織への生体親和性に優れた生体材料であるが、硬くて脆いという欠点を持つ。われわれは、ナノサイズの高分散性 HAp 焼成体を高分子素材に共有結合により複合化させる技術を用いることで、柔軟性や加工性に優れた高分子材料の特性を温存したまま、生体親和性に優れた HAp の表面性質を示す複合体を開発してきた。今回、ポリエチレンテレフタレート (PET) 製人工血管にナノ HAp 粒子を単層均一に複合化した新規人工血管を作製し、これらの生体内反応を評価した。

2. 実験

PET 人工血管をコロナ放電後、水酸基を誘導するために 2-ハイドロキシチルメタクリレートグラフト化し、さらにアルコキシシル基を側鎖にもつ γ-メタクリロキシプロピルトリエトキシシランをグラフト化した。グラフト化 PET 材料表面に高分散性ナノ HAp を共有結合させ、新規複合化人工血管を作製した。直径 5mm の高分散性ナノ HAp 複合化 PET 人工血管と未処理 PET 人工血管を犬頸動脈の左右にそれぞれ置換し、2 週、4 週、3 ヶ月後にそれぞれ検体を採取し外観、組織学的評価 (HE、Elastica van Gieson、vWF、αSMA 染色) を行った。

3. 結果および考察

図 1 および 2 には、置換 2 週後の HAp 複合化 PET 人工血管と未処理 PET 人工血管の中央部内腔の組織切片像 (HE 染色) を示した。未処理 PET 製人工血管の場合、緩く沈着凝集した赤色血栓が観察された。一方、HAp 複合化 PET 人工血管では過剰な赤色血栓の凝集が少なく、早期に薄い偽内膜形成の誘導をしめす平滑筋細胞、血管内皮細胞の浸潤、細胞外マトリックスの構築を促進する徴候が得られた。また、置換後 4 週、3 ヶ月においても同様の結果が得られた。

以上より、高分散性 HAp 複合化人工血管はその治癒過程を促進し、早期内膜形成、開存性へ大きく作用し、また動物由来タンパク質 (コラーゲン) などを用いず人工材料のみで構成されているため、生物学的安全性、滅菌性、輸送性、保存性にすぐれた新規人工血管として期待される。



図 1. 置換 2 週後の HAp 複合化 PET 人工血管の中央部内腔 (HE、×100)。過剰な血栓が認められず、早期偽内膜形成を誘導

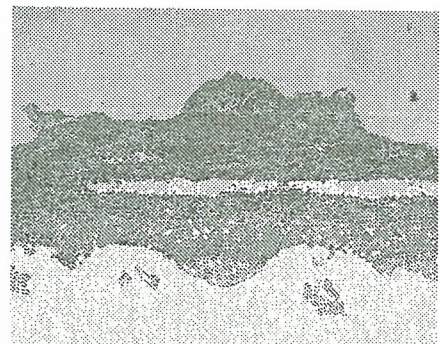


図 2. 置換 2 週後の未処理 PET 人工血管の中央部内腔 (HE、×100)。緩く沈着凝集した赤色血栓

In Vivo Response Evaluation of Poly(ethylene terephthalate) Artificial Vascular Graft Coated with Calcined Hydroxyapatite Nanocrystals.

H. KADONO^{1,2}, M. MASUDA², M. UEKI², M. OKADA², S. YASUDA², R. TANAKA³,
K. MIYATAKE⁴, T. KOYAMA¹, K. TAKAKUDA¹ and T. FURUZONO²

¹Department of Biomechanical Engineering, Institute of Biomaterial and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University; ²Department of Bioengineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center, Research Institute; ³Iwate Medical University; ⁴National Hospital Organization Osaka Minami Medical Center

Tel: +81-6-6833-5012 (ext 2623), Fax: +81-6-6872-7485, E-mail: hiro@dmcgroup.co.jp