

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500512

研究課題名(和文) ポリウレタン - 絹複合材料を用いた新規小口径人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of silk fibroin-polyurethane composite material for small diameter vascular graft

研究代表者

中澤 靖元 (Nakazawa, Yasumoto)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20456255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シルクフィブロイン(SF)は高い強度や生体適合性を有することから人工血管等の材料として期待されているが、伸縮性や弾性などに乏しい。そこで本研究では、ポリウレタン(PU)をSFと複合させた新規素材の開発を目標とし、複合化した各分子の物性および構造・運動性について検討した。本研究では、SFと混合する2種のPUを発見し、強度、伸縮性ともに向上する結果を得た。さらに、上記複合材料について、固体NMR法を用いた詳細な構造・相溶性解析を行った結果、すべての複合材料について、PU濃度依存的な相溶状態を支持する結果が得られた。本成果は、人工血管のみならず、様々な医用材料への応用に展開が可能である。

研究成果の概要(英文)：A novel tissue-engineered vascular graft composed of silk fibroin was developed by the electrospinning method. In this study, silk fibroin was combined with several functional materials such as polypeptides and polyurethane to enhance the functionality of elasticity and cellular affinity. Each vascular grafts were characterized with SEM, solid-state NMR, compressive elastic modulus and permeability. These result of solid state NMR measurement indicated that this composite material exists independently each other in molecular level. Nevertheless, it showed compatible behavior between silk fibroin and polyurethane. Moreover, these grafts were implanted to inferior vena cava of dog. At 6 month after implantation. As a result, the histological stain evaluation revealed that the endosporium is formed on the implanted patch at 10 months after implantation. This study will give basic information on development of new silk-like materials for tissue-engineered vascular grafts.

研究分野：組織工学

キーワード：組織工学 ポリウレタン 絹フィブロイン

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化や虚血性疾患等の血管に関係する病気の発症率は先進国において上位を占めており、患者の予後の改善は現代医学の重要な課題の一つである。この問題のひとつの打開策として、現在、数多くの人工血管の開発が行われている。内径 10mm 以上の大口径に分類される人工血管においては、ポリエステルやダクロン、内径 6mm~10mm の中口径人工血管においては e-PTFE を中心として製品化されており、良好な結果が得られている。

しかしながら、内径 6mm 以下の小口径人工血管に関しては、市販されているものの、開存率の低さから良質な人工血管が無く、患者自身の血管(自家グラフト)を使用しているのが現状である。自家グラフト採取には様々な制限があり、開存率の高い新たな人工血管材料が求められている。

このような背景のもと、弾力性、抗血栓性、生体適合性に優れた材料として検討されてきた材料がポリウレタンである。中でも、ソフトセグメントとハードセグメントから構成され、ミクロ相分離構造を形成する「セグメント化ポリウレタン」は高い耐疲労特性と血液適合性を有しており、人工血管への応用が古くから期待され、多くのポリウレタン材料が提案されてきた。生体適合性ポリウレタンの例としては、ソラロン(THORALON)、バイオスパン(BIOSPAN)、バイオネート(BIONATE)、エラストン(ELASTHANE)、パーシル(PURSIL)およびカーボシル(CARBOSIL)が挙げられ、いずれもアメリカのメーカーが開発している。

セグメント化ポリウレタンを材料とした人工血管の例としては、人工透析のためのブラッドアクセス用人工血管をソラテックコーポレーションが発売し、我が国でも認可されている。この人工血管は内径 6mm を中心とした中口径人工血管である。しかしながら、この人工血管の術後 12 ヶ月の一次開存率(無処置で開存し、使用可能な状態)は 44% であり、半数以上が狭窄、またはグラフト内血栓を起こしている。

事実、ポリウレタンを用いた小口径人工血管についての移植実験による所見では、異物反応や発熱、炎症性などの生理的問題点に加え、体内での分解によるグラフト強度の著しい低下に伴う動脈瘤の生成など、耐久性の面においても多くの課題を残しているため、さらなる改良が必要である。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、抗血栓性・血液適合性に加え、人工血管に最適な物性を有する人工血管材料を提案することを

最終的な目標とした。

本研究の目的を達成するためには、これまでに検討されてきたポリウレタンのみの人工血管では限度がある。そこで本研究では、絹フィブロインとの複合化を試みる。絹フィブロインは、アラニン、グリシンを主成分とする繊維タンパク質であり、形状加工の容易さ、高い力学特性に加え、生体適合性があるとされる優れた性質を有する天然材料である。さらに、研究代表者のグループでは固体 NMR 法を駆使した絹フィブロインの構造決定を達成しており、分子構造を立脚点とする材料設計が可能となる。

3. 研究の方法

絹フィブロインは図 1 に示すとおり、様々な処理法により、成形加工を行う事が可能である。本研究では、絹フィブロインを臭化リチウム水溶液に溶解後、透析することで絹水溶液とし(図 1C)得られた水溶液を、凍結乾燥して SF スポンジを得た(図 1D)。

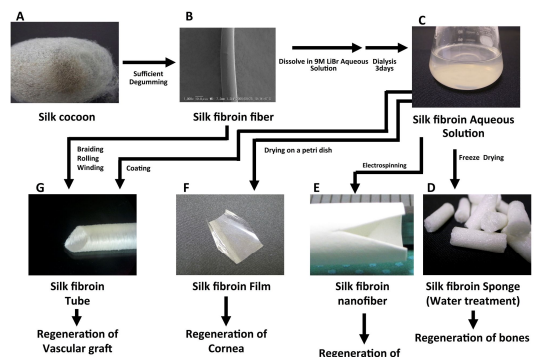


図 1 絹フィブロインの加工例

セグメント化ポリウレタン(sPU)(宇部興産(株)提供、NKY-26、Mn=80,000/160,000)と SF スポンジの重量比を 10:0、7:3、1:1、3:7、0:10 として、6%(w/v) ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)溶液を調整し、エレクトロスピンニング装置(Esplayer、フューエンス社製)により、印加電圧 22 kV、吐出スピード 15 μ l/min、ターゲット距離 100 mm の条件にて 25mm \times 100mm の不織布を作製した。得られたシートを、37 $^{\circ}$ C、100%RH の条件下にて 24 時間静置することで不溶化を施し、不織布とした。得られた各種不織布の SEM 観察(VE-7800(キーエンス社製))、引張試験測定(EZ Graph(島津社製))および動的粘弾性測定(DVA-205(アイティー計測機器社製))を行い、形状及び物性を評価した。また 13 C CP/MAS NMR、 $T_{1\rho}$ 、 T_{1H} 測定(UNITY 400 MHz(AGILENT 社製))を行い固体構造およびダイナミクス解析を行った。オートクレーブ滅菌した SF:sPU 重量比 5:5 の不織布を用いビーグル成犬の下大静脈への移植を行

い、移植 6 ヶ月の X 線 CT 診断及び移植後 10 ヶ月の摘出後の組織評価に用いた。

同様の実験を、他の熱可塑性ポリウレタン (Pellethane[®]) についても行った。

4. 研究成果

図 2 には、絹フィブロインのみ、絹フィブロイン：セグメント化ポリウレタン=1:1、セグメント化ポリウレタンのみで作成した不織布の SEM 像を示す。観察の結果より、各不織布は直径 1 μm 程度の長繊維により形成されていることを確認した。

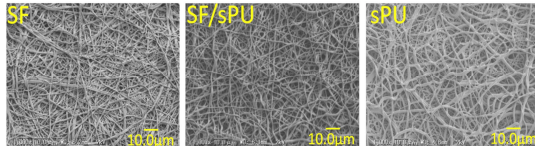


図 2 絹フィブロイン/セグメント化ポリウレタン不織布の SEM 像

引張試験においては、絹フィブロイン/セグメント化ポリウレタン混合系不織布の破断伸度が絹フィブロイン単体不織布と比較して 2 倍以上に上昇することを確認した。他の合成高分子も試みたが、絹フィブロインに対し不織布に必要な柔軟性を付与方法として、ポリウレタンの複合化が有効であることが示唆された (図 3)。

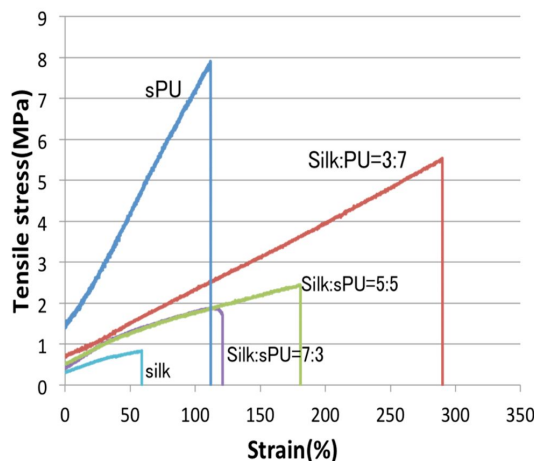


図 3 シルク/セグメント化ポリウレタン複合化不織布の応力-ひずみ曲線

さらに本研究では、シルク/セグメント化ポリウレタン複合化不織布の構造-物性相関解明のため、固体 NMR 法による詳細な構造および相溶性解析を実施した。得られた各比率における不織布の ¹³C CPMAS NMR スペクトルを図 4 に示す。高次構造依存性の高い Ala Cβ ピークより、絹フィブロイン基盤不織布は、37%RH、100%RH にて 24 時間静置した「高湿度処理」を行うことで、水に対する不溶性を有する。処理前後のスペクトルを比較すると、Ala Cβ ピークは一部低磁場シフトしている。よって、絹フィブロインは、高湿度処理によ

って β-sheet 構造への転移を引き起こしていることがわかる。また、ポリウレタンの比率を増加させても、β-sheet 構造の形成にはほぼ変化がないことから、フィブロインの β-sheet 構造への転移は不織布の強度向上と深く関わっている。

絹フィブロイン/セグメント化ポリウレタン混合系では、絹フィブロインの構造が β-sheet 構造へ転移することで強度を担っているが、セグメント化ポリウレタンが β-sheet 構造の形成阻害を起こすことなく、混合されていることが示唆される。

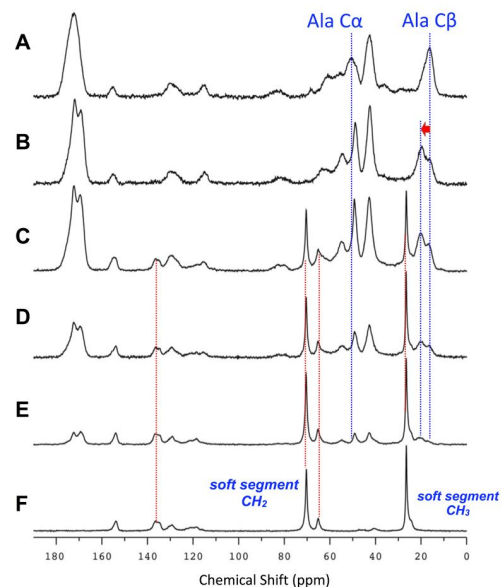


図 4 絹フィブロイン (SF)/セグメント化ポリウレタン (sPU) 複合化不織布の ¹³C CP/MAS NMR スペクトル (A)SF のみ (未処理) (B)SF のみ (高湿度処理) (C)SF:sPU=7:3, (D) SF:sPU=5:5 and (E) SF:sPU=3:7 (F)sPU のみ (未処理)。

また、絹フィブロイン/セグメント化ポリウレタンの相溶状態を評価するため、各不織布における、絹フィブロイン AlaC=O 由来ピーク (173 ppm) 及びセグメント化ポリウレタンの芳香環由来ピーク (71 ppm) について、T₁^H 測定を行ったところ、絹フィブロインとセグメント化ポリウレタンを複合化することにより、各々の分子のスピンの拡散距離が 50~60 nm であることを決定した。以上のことから、絹フィブロイン分子とセグメント化ポリウレタン分子は分子鎖 1 本 1 本が混ざり合っている状態ではなく、50~60 nm 程度の距離まで近接した相溶状態、すなわち、各分子のドメインが混合した状態にあることが示唆された。

さらに、絹フィブロイン：セグメント化ポリウレタン重量比 1：1 の不織布に関して、ビーグル成犬に対する後大静脈移植実験を行った。移植時における術中操作ハンドリン

グ、縫合針の通過具合、縫合部の止血程度は、既存のゴアテックス不織布と比較しても遜色なく行うことができた。図5には移植後6ヶ月に撮影したX線CT像を示す。

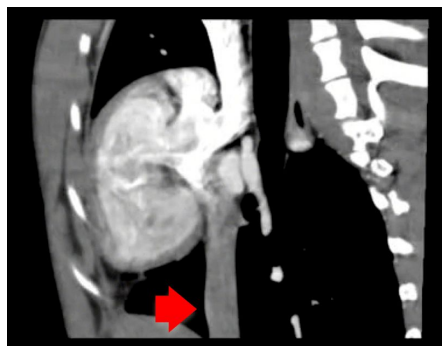


図5 移植後6ヶ月経過したビーグル犬のCT像(矢印は移植部位)

不織布移植部位(矢印)に狭窄および瘤状変化は確認されなかつ、良好に機能していることが示唆される。さらに、移植後10ヶ月経過した不織布を摘出したところ、内膜の形成が良好であり、不織布および周囲組織の適合は良好である上、血液接触面である内腔側では周囲からの内膜の形成が認められた。

以上より、本研究課題では、組織工学材料を指向した絹フィブロイン/セグメント化ポリウレタンの複合化材料を作製した。不織布における相溶性解析の結果、分子レベルでの相溶はないが、一定の大きさを形成したドメインの集合体を形成していることが明らかとなった。得られた材料は、小口径人工血管をはじめとする血管外科材料において、物性面や機能面から期待される材料を提案することができた。今後は、構造-物性相関の徹底解明を行うとともに、本知見を活かして、様々な組織工学材料への応用展開を図る。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Miyamoto, S.; Koyanagi, R.; Nakazawa, Y.; Nagano, A.; Abiko, Y.; Inada, M.; Miyaoura, C.; Asakura, T. “*Bombyx mori* silk fibroin scaffolds for bone regeneration studied by bone differentiation experiment” *J. Biosci. Bioeng.* 115, 575-578(2013) 査読有
DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.11.021

鈴木悠; 中澤靖元; デルヤ・アイテムズ; 小松珠実; 宮崎京子; 山崎静夫; 朝倉哲郎 「エレクトロスピンニング法による絹/ポリウレタン小口径人工血管の開発」
成形加工 25, 181-187 (2013) 査読有
DOI:なし

Aytemiz, D.; Sakiyama, W.; Suzuki, Y.; Nakaizumi, N.; Tanaka, R.; Ogawa, Y.; Takagi, Y.; Nakazawa, Y.; Asakura, T.

“Small-diameter knitted silk vascular grafts (3mm diameter) with a double-raschel knitted silk tube coated with silk fibroin sponge” *Adv. Health. Mater.* 2, 361-368(2013) 査読有
DOI: 10.1002/adhm.201200227

Nakazawa, Y.; Asano, A.; Nakazawa, C.; Tsukatani, T.; Asakura, T. “Structural characterization of the silk-polyurethane composite material for the biomaterials using solid-state NMR” *Polymer Journal*, 44, 802-807 (2012) 査読有

DOI: 10.1038/pj.2012.119

Nagano, A.; Sato, H.; Tanioka, Y.; Nakazawa, Y.; Knight, D.; Asakura, T., “Characterization of a Ca binding-amphipathic silk-like protein and peptide with the sequence (Glu)₈(Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)₄ with potential for bone repair.” *Soft Matter*, 8, 741-748 (2012) 査読有
DOI:10.1039/C1SM06646C

Yazawa, K.; Yamaguchi, E.; Aoki, A.; Nakazawa, Y.; Suzuki, Y.; Asakura, T.

“A two dimensional spin diffusion NMR study on the local structure of a water soluble model peptide for *Nephila clavipes* dragline silk (MaSp1) before and after spinning” *Polymer Journal*, 44, 913-917 (2012) 査読有

DOI: 10.1038/pj.2012.98

Asakura, T.; Nishi, H.; Nagano, A.; Yoshida, A.; Nakazawa, Y.; Kamiya, M.; Demura, M “NMR Analysis of the Fibronectin Cell-Adhesive Sequence, Arg-Gly-Asp, in a Recombinant Silk-Like Protein and a Model Peptide.” *Biomacromolecules*, 12, 3910-3916 (2011) 査読有
DOI:10.1021/Bm2011196

[学会発表](計20件)

下川床遼・小材祐介・深山俊治・田中綾・瀬筒秀樹・桑原伸夫・中澤靖元・朝倉哲郎、高機能化絹を用いた小口径人工血管の開発とNMR解析、第63回高分子討論会、2014年9月26日、長崎大学文教キャンパス(長崎県長崎市)

中澤靖元・根本慎太郎・島田亮・早乙女俊樹・上杉昭二・杉本真理・佐倉康太・朝倉哲郎、絹フィブロインを基盤とした外科手術用心臓組織修復不織布の開発、平成26年度繊維学会年次大会、2014年6月12日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

中澤靖元・根本慎太郎・島田亮・早乙女俊樹・上杉昭二・杉本真理・佐倉康太・朝倉哲郎、絹フィブロインを基盤とした機能性シート材料の開発と手術用心臓修復不織布への応用、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 29 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

中澤靖元・佐倉康太・久保亮太・根本慎太郎・島田亮・早乙女俊樹・上杉昭二、シルクフィブロインを基盤とした組織再生型心臓修復不織布の開発、第 61 回日本シルク学会研究発表会プログラム、2014 年 5 月 16 日、蚕糸科学研究所（東京都新宿区）

中澤靖元・デリヤアイテミズ・藤田陽子・高木義秀・芳賀真・山本諭・岡本宏之・小材祐介・深山俊治・田中綾・朝倉哲郎、絹を基盤とした小口径人工血管の作製と動物実験評価、第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 13 日、金沢大学（石川県金沢市）

早乙女俊樹・中澤靖元・杉本真理・佐倉康太・塚谷才英・根本慎太郎・朝倉哲郎、絹/ポリウレタン混合系による心臓修復用不織布の開発、第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 12 日、金沢大学（石川県金沢市）

中澤靖元・奥下慶子・宮澤健太・鈴木悠・朝倉哲郎、エリ蚕絹フィブロインの固体 NMR による精密構造解析、平成 25 年度繊維学会年次大会、2013 年 6 月 12 日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

中澤靖元、シルク構造解析を基にしたシルク人工血管の開発、日本シルク学会シルクシンポジウム 2013、2013 年 5 月 30 日（招待講演）蚕糸会館（東京都千代田区）

中澤靖元・鈴木悠・林達也・北山香澄・朝倉哲郎、絹中に導入された人工血管用各種機能性ペプチドとその評価、第 62 回高分子学会年次大会、2013 年 5 月 29 日、京都国際会館（京都府京都市）

奥下慶子・小川達也・鈴木悠・宮澤健太・中澤靖元・朝倉哲郎、絹の多様な ^{13}C ラベル化と固体 NMR によるシート構造の解析、第 51 回 NMR 討論会、2012 年 11 月 8 日、ウインクあいち（愛知県名古屋市）

中澤靖元・浅野敦志・中澤千香子・塚谷才英・鈴木悠・岩井若菜・朝倉哲郎、小口径人工血管への応用を目指した絹フ

イプロイン-ポリウレタン複合材料の開発と固体 NMR 精密解析、第 61 回高分子討論大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋工業大学（愛知県名古屋市）

岩井若菜・中澤靖元・村山智・高城圭祐・田中綾・朝倉哲郎、ポリウレタンコーティングを施した小口径絹人工血管の開発と in vivo 評価、第 61 回高分子討論大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋工業大学（愛知県名古屋市）

宮澤健太・佐藤佑哉・矢澤宏次・中澤靖元・朝倉哲郎、 ^{13}C ラベルエリ蚕絹の構造と延伸に伴う構造変化に関する固体 NMR 研究、第 61 回高分子討論大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋工業大学（愛知県名古屋市）

鈴木悠・中澤靖元・伊藤健治・大橋一宏・田中綾・岡本宏之・朝倉哲郎、小口径絹人工血管の開発、平成 24 年度繊維学会年次大会、2012 年 6 月 7 日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

中澤靖元・浅野敦志・中澤(田中)千香子・塚谷才英・朝倉哲郎、絹を基盤とする小口径人工血管への応用に向けた絹-ポリウレタン複合材料の開発、平成 24 年度繊維学会年次大会、2012 年 6 月 7 日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

中澤靖元・浅野敦志・中澤(田中)千香子・朝倉哲郎、生体材料への応用を目指した絹-ポリウレタン複合材料の開発、第 61 回高分子学会年次大会、2012 年 5 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県西区)

岩井若菜・八木剛仁・アルテミズデルヤ・中澤靖元・伊藤健治・田中綾・佐田正隆・朝倉哲郎、絹ダブルラッセル編み管状構造物へのポリウレタンコーティングによる小口径絹人工血管の作製と in vivo 評価、平成 23 年度繊維学会年次大会、2011 年 6 月 9 日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

中澤靖元・八木剛仁・岩井若菜・アルテミズデルヤ・川部雅章・渡邊理恵・田中綾・朝倉哲郎、エレクトロスピンング法による小口径絹人工血管の作製と in vivo 評価、平成 23 年度繊維学会年次大会、2011 年 6 月 9 日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

Yasumoto Nakazawa, Wakana Iwai, Seiko Sato, Shizuo Yamasaki, Toshihide Tsukatani, Yu Suzuki, Atsushi Asano, Tetsuo Asakura
“Structural characterization of the silk-polyurethane composite material for the

vascular graft using solid-state NMR”
第 60 回高分子学会年次大会、2011 年 5
月 25 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

林達也・林寛之・中澤靖元・岸田晶夫・
朝倉哲朗、絹ならびに TG 絹を基盤とす
る人工血管に関する基礎的知見の集積、
第 60 回高分子学会年次大会、2011 年 5
月 25 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 3 件)

Asakura, T.; Suzuki, Y.; Nakazawa, Y.;
Yazawa, K.; Holland, G.; Yager, J.、Silk
Structure with Nuclear Magnetic Resonance、
Prog. NMR Spec.、69、23-68 (2013)
総ページ数 68 ページ

Asakura, T.; Suzuki, Y.; Nakazawa, Y.;
Holland, G.; Yager, J.、Elucidating silk
structure using solid-state NMR、Soft
Matter、9、11440-11450 (2013)
総ページ数 291 ページ

Asakura, T.; Suzuki, Y.; Nakazawa, Y.、
"The Silk I and Lamella Structures of
(Ala-Gly)₁₅ as the Model of *Bombyx mori*
Silk Fibroin Studied with Solid State NMR"
Biologically-Inspired Systems、Volume 5,
Biotechnology of Silk, Springer 49-68
(2013) 総ページ数 272 ページ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中澤 靖元 (NAKAZAWA, Yasumoto)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：2 0 4 5 6 2 5 5

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

朝倉 哲郎 (ASAKURA, Tetsuo)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：3 0 1 3 9 2 0 8