

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22659255

研究課題名（和文） NC ヒドロゲルを用いた自己治癒機能を有する新規高機能性人工血管、人工弁の開発

研究課題名（英文） Development of a implantable medical device with the self-curable NC-hydrogel.

研究代表者

水野 敏秀 (MIZUNO TOSHIHIDE)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40426515

研究成果の概要（和文）：我々が新規開発したハイドロゲル（ナノコンポジット型ヒドロゲル：NC ゲル）は、クレイナノ粒子を用いた有機・無機ネットワークの形成によりハイドロゲルの欠点であった力学的脆弱性を克服し、安全性の高い新規医療材料として、人工弁などのインプラント材用への応用が期待されている。(1) 本実験により、すべての埋め込まれた NC ゲル周囲に、壊死や強い炎症など周囲皮下組織への不可逆的な影響は認めず、更にゲル自体の崩壊や変性も認められなかった。組織学的評価においては、力学的に堅い表面を有するゲルは、埋め込み後 1 ヶ月より膠原繊維を主体とする菲薄な結合組織膜に覆われ、炎症細胞の浸潤は少なく、安定した状態であることが観察された。(2) 人工心臓や人工肺などの循環器系人工臓器の開発において、血液接触面への抗血栓性処理は、その機器の性能や安全性に大きく関与する技術要素の一つとなっている。本研究では、トロンボエラストメトリー法を応用し、従来検討が困難であった抗血栓性表面処理技術の抗血栓性評価と抗血栓性機序の解析を行うことが可能となった。(3) 最終年度の研究では、NC ゲルを医療部材として実用化するために、ゲルの生物学的安全性および滅菌保存性を検証した。

研究成果の概要（英文）：Recently, the demand of wet soft materials for bio-related applications has been increasing. Thus far, we have developed a novel nanocomposite hydrogel (NC gel) with extraordinary mechanical, optical, and swelling/deswelling properties by extending the concept of organic/inorganic NCs to soft hydrogels. In this study, we aimed to develop novel NC gel materials and devices for biomedical applications, such as an implantable material with long-term durability, by improving the functions of the NC gel (e.g. extensibility, absorption of plasma, biological safety, nonconcrecence, and asepsis) and fabricating it in various forms. We succeeded in improving its mechanical, surface, and swelling/deswelling properties by modifying its network. (2) With regard to the development of new devices, we used NC gel-medical materials. We concluded that NC gels comfortably were able to use as the durable implanted material while simultaneously preventing the formation of intractable granulomatous tissues. Further, we carried out an *in vivo* investigation of the interaction of living tissue with the NC gel by implantation in goats. We found that neither inflammation nor concrecence occurred around the NC gels. (3) With regard to the safety and product design of medical devices, we carried out biological testing of medical devices, which involved a sensitization test, irritation test, intracutaneous test, and *in vitro* cytotoxicity test. We confirmed the safety of the NC gel in all these tests.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	540,000	3,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科

キーワード：ヒドロゲル，人工血管，人工弁

1. 研究開始当初の背景

近年，医療分野での治療技術の進歩に対応して，その技術に対応した新たな材料開発が求められている．たとえば，外科的治療分野では，難治性潰瘍や褥瘡に対する高機能性創傷被覆材や，手術時に使用する癒着防止材，組織保護材および長期間使用可能なインプラント材などが求められている．

高分子ヒドロゲルは，高分子の造る三次元網目構造の中に，媒体として水を安定的に含んだものであり，最も一般的には，高吸収性樹脂やソフトコンタクトレンズなどがよく知られ，水を主成分とするソフトマテリアルとして，医療材料のみに限らずセンサー，触媒担体，アクチュエーターなどの工業製品や振動吸収材料としてヘルスケア用など数多くの産業分野での展開が期待されている．しかし，従来の高分子ゲルは，力学的に弱くて脆い，架橋密度の増加や合成条件によって，架橋構造が不均一になりやすい(図1-1)，多数の架橋点により高分子鎖の持つ機能が抑制されるなど，医療分野では特に実用に耐えうるものが少なかった．かかる問題に対し，我々は有機あるいは無機ナノコンポジット高分子ゲルを開発した．本高分子ゲルは，優れた機械的性質(超延伸性，屈曲性，圧縮性，抗破壊エネルギー性)，機能的性質(刺激応答性，高膨潤性，吸収性，選択的吸着性，環境変化対応摩擦特性)を併せ持つ全く新しいタイプの高分子ゲル(ナノコンポジット型ヒドロゲル，NCゲル)である(図1-2)．本研究の要素技術となるNCゲルは，優れた構造均一性，力学物性，機能性に加えて，環境的にも優れた新規材料である．すなわちNCゲルは，水を主成分とするヒドロゲルで，合成においても加熱や攪拌が不要で，高重合率で，複雑な形状にも成形が容易であるなどの特徴を有し，高強度，高タフネスを有するソ

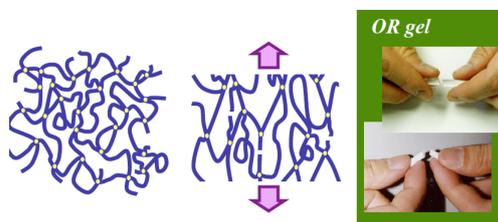


図1-1 有機架橋ゲル(ORゲル)及びそのネットワーク構造と延伸時の破壊

フトマテリアルとして，医療，健康福祉，スポーツなどに役立つ先端材料としての高い可能性を有し，また環境，エネルギー，建築，ロボットなど他分野への波及効果も併せ持つことから，新しい可能性を秘めた素材として期待されている．これら新規開発されたNCゲルは，成分の大部分は水で構成され，生体組織に非常に近い性質を有すると考えられ，その適合性も十分に予測された．本研究では，生体に対する生体適合性，低刺激性，液体吸収性などNCゲルの医療材料としての適用性を検討した．

2. 研究の目的

(1) 新規開発素材の構造制御による生体適合性と長期耐久性の向上に関する研究

本研究は，新規NCゲルの特異的なネットワーク構造に基づく，滑り摩擦，平滑度，微細凹凸性の評価と解析を行い，表面構造について詳細な知見を得て，高強度でフレキシブルな特徴を有する延伸力学物性，圧縮力学物性を備えた生体適合性材料の組成，ネットワーク構造を決定することを目的とした．

(2) 新規医療素材の抗血栓性評価方法に関する研究

血液接触面を有する循環器系人工臓器の

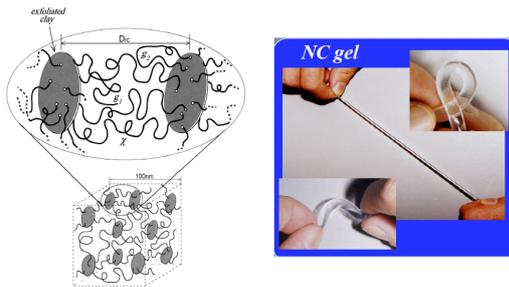


図1-2 有機(ポリマー)/無機(クレイ)ネットワーク構造と力学物性(高タフネス)

開発において、器材表面の抗血栓性処理は、近年では必須とされており、優れた抗血栓性処理技術は、かかる開発段階において重要な要素技術となっている。本研究は、抗血栓性コーティングについて、より有用な評価法を確立するために、現在、医療機器に使用されているヘパリンコーティングおよびポリマーコーティングを対象に、その抗血栓性特性を詳細に検討し、その抗血栓性機序を解明することを目的とした。

(3) 新規開発素材の安全性、無毒性、品質安定性に関する研究

本研究では、新規医療材料として、有効に用いられるために必要なNCゲルの物性、機能性の制御技術を確立し、また新規NCゲルの安全性および安定性を評価することを目的とした。

3. 研究方法

(1) 我々が新規開発したハイドロゲル(ナノコンポジット型ヒドロゲル:NCゲル)は、クレイナノ粒子を用いた有機・無機ネットワークの形成によりハイドロゲルの欠点であった力学的脆弱性を克服し、安全性の高い新規医療材料として、人工弁などのインプラント材用への応用が期待されている。本研究では、NCゲルの長期埋め込み時における周囲組織への影響を検討することを目的とし、成ヤギでのNCゲル長期皮下埋入試験を行った。

(2) 本評価では、現在、実際に医療機器に使用されているヘパリンコーティング(T-NCVCコーティング)およびポリマー(Pコーティング(MPCコーティング)の2種について、その抗血栓性特性について解析を行った。

① トロンボエラストメリー (TEM) 法による抗血栓性特性解析

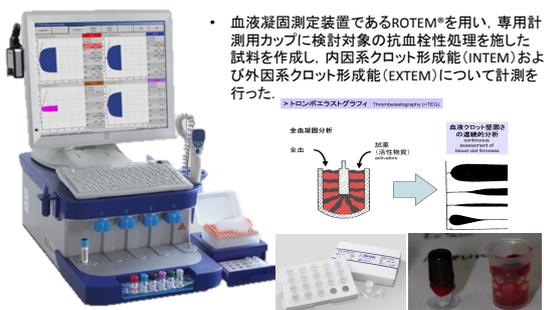
本研究では、血液凝固測定装置として

ROTEM® (Munich, Germany)を使用し、本装置専用の計測用カップおよびピンに検討対象の抗血栓性コーティングを施した試料を作成し、内因系クロット形成能 (INTEM) および外因系クロット形成能 (EXTEM) について計測を行った。本測定に使用する血液は、同一ボランティアから採取された3.8%クエン酸加ヒト新鮮血液を使用した。計測項目は、血液凝固時間を示すClotting Time(CT)、カップ壁に付着するクロットの最大抵抗性をしめすMAX clot firmness (MCF) およびその最大値に至るまでの計測時間 (MCF+t) とし評価を行った。

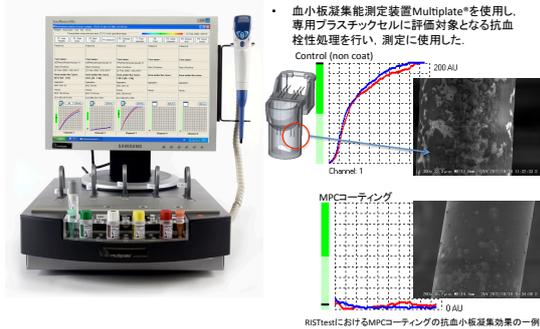
② 電気的インピーダンス (MEA) 法による抗血栓性特性評価

本評価では、本測定で使用するサンプルは、Multiplate® (Dynabyte informationssystem GmbH, Munich Germany)専用プラスチックセル(測定電極部は、銀コーティングした直径0.3mmの銅線)にultiplate® (Munich Germany)専用プラスチックセルに評価対象となるコーティング塗布したものを使用した。測定に使用する全血液は、21G注射針を用いて橈骨静脈より採血したヒルジン添加(最終濃度15mg/mL)新鮮ヒト血液を使用した。測定は、被検セルを測定器に設置し、セル内で生理食塩水300mLにてヒルジン加全血300mLを希釈し、37°Cで3分間インキュベートした。次に、血小板を活性化させるアゴニストとして1. Adenosine diphosphate (ADP, ADPtest 試薬, 6.5mM), 2. アラキドン酸 (ASPItest 試薬, 0.5mM), 3. コラーゲン (COLtest 試薬, 3.2mg), 4. リストセチン (RISTtest 試薬, 0.77mg/mL), Thrombin receptor activating peptide (TRAP-6, TRAPtest 32mM)を添加し、専用スターラーにて1000 rpmで攪拌した状態で測定を開始した。本検討での血小板凝集能測定は15分間とし、セル内に設置された電極に活性化血小板が付着することによってお

トロンボエラストメリー法による抗血液凝固特性評価



電氣的インピーダンス(MEA)法による 抗血小板凝集能特性評価



この電極間の電氣的インピーダンスの増加を経時的に測定し、その増加曲線より area under curve (AUC)値を算出し、コーティング表面に対する血小板凝集の指標として評価した。計測は同一の血液で4回行い、同時に計測した未処理セルおよび過去に同一血液提供者より得られたデータを対照として、T-test で比較検定を行った。有意水準は0.05とした。

(3) 本研究では、新規開発された NC ゲルの生物学的安全性および滅菌安定性評価を行った。各評価法は、ISO10993-5 (JIS T-0993-1)による細胞毒性試験に沿って行われ、また、121°C、2気圧、30分の条件で、オートクレーブ滅菌を実施し、滅菌後のゲル性質の変化と、Bucillus stearothermophilus を指標菌とした滅菌性について検討を行った。

3. 研究結果および考察

(1) 本実験により、すべての埋め込まれた NC ゲル周囲に、壊死や強い炎症など周囲皮下組織への不可逆的な影響は認めず、更にゲル自体の崩壊や変性も認められなかった (図3-1)。組織学的評価においては、力学的に堅い表面を有するゲルは、埋め込み後1ヶ月より膠原繊維を主体とする菲薄な結合組織膜に覆われ、炎症細胞の浸潤は少なく、安定した状態であることが観察された (図3-2)。このような周囲組織の組織学的所見は6ヶ月後の評価においても同様であった。また比較的柔らかな表面を有するゲルにおいては、堅い表面を有するゲルと比較し、埋め込み初期にゲルとの境界部に異物性炎症が認められ、ゲル内へのマクロファージや線維芽細胞の乳頭状の浸潤像が認められた。6ヶ月後の評価では、ゲル内の大部分を繊細な線維性結合組織で置換されているのが観察され、周囲組織との境界は不明瞭であった。新規開発された NC ゲルは、非常に優れた力学的特性に加え、体内埋め込み時における長期安定性も優れ



(a) D-NC 8ゲル (b) D-NC 15ゲル

図3-1 埋雑3ヶ月後：取り出し時のD-NCゲル (成ヤギ背部)

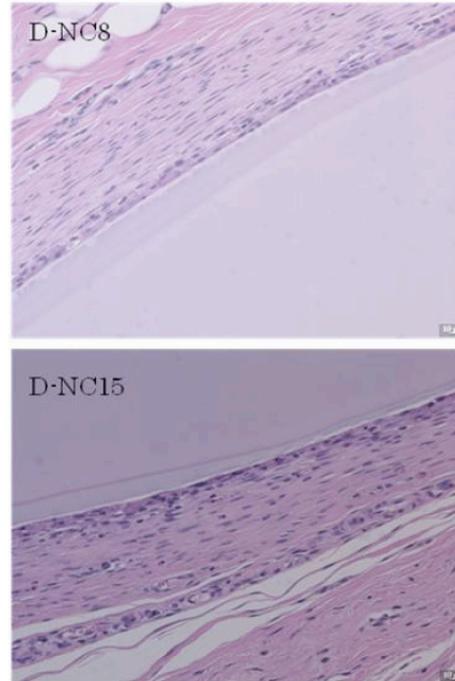


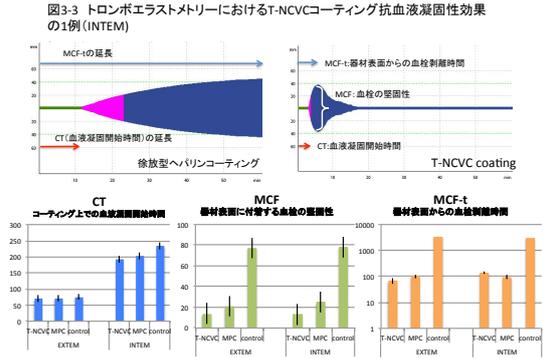
図3-2 D-NCゲルと周囲組織境界部の組織所見

表3-1 NCゲルの埋雑時の生体適合性と周囲組織の変化

	膨潤性	癒着性	周囲組織の変性	その他
D-NC2	+++	+	-	
D-NC8	+	-	-	
D-NC15	+	-	-	
N-NC3	-	-	-	
N-NC10	-	-	-	

ていることが示され、周囲組織に影響の少ない体内埋め込み材料として有用な材料と考えられた。また、力学的に柔らかい性状のゲルにおいては、6ヶ月の観察で生体組織と融合している所見が認められ、新しい生体材料としての可能性も示唆された (表3-1)。

(2) TEM 法による抗血液凝固特性解析では、CT について、両コーティング共に無処理カップと差異を認めなかった。一方で、試験カップ壁へのクロット付着性については、T-NCVC コーティングカップで、INTEM,

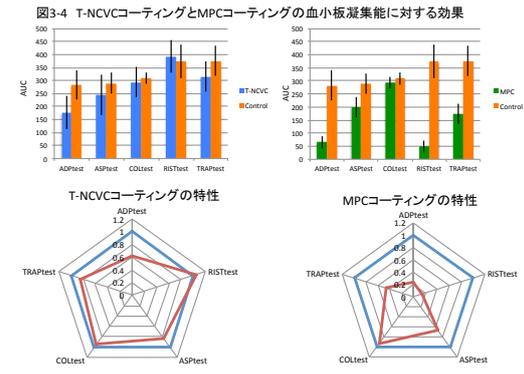


EXTEM とともに約 80%減少し、MPC コーティングカップでは、約 70%減少していた(図 3-3)。また、MEA 法では、T-NCVC コーティングで無処理セルと比較し、ADP 凝集能およびアラキドン酸系凝集能は、約 20%減少し、コラーゲン、TRAP およびリストセチンによる凝集には変化が認められなかった。一方、MPC コーティングセルにおいては、ADP 凝集能は約 95%、リストセチン凝集が約 90%、コラーゲン凝集が約 60%および TRAP 凝集が約 70%抑制していることが観察された(図 3-4)。本実験の結果より、T-NCVC コーティングおよび MPC コーティングの抗血栓性効果は、血液凝固に対する抑制作用は少なく、形成されたクロットが速やかにコーティング表面より剥離することが主な効果であると考えられた。また、血小板凝集に対しては、T-NCVC コーティングでは、血小板凝集の二次凝集系を主に抑制していることに対し、MPC コーティングは、一次凝集系を顕著に抑制し、各コーティングのそれぞれ異なる血小板凝集抑制効果を有すると考えられた。

(3) 本年度の研究では、NC ゲルを医療部材として実用化するために、ゲルの生物学的安全性および滅菌保存性を検証した。

①細胞毒性試験：V79 細胞を用いた細胞毒性試験を医療部材用に調製した NC ゲルについて実施し、スクリーニングを行った。結果、NC ゲルは細胞毒性試験に対して陰性(適合)であることが明らかとなり、医療部材としての可能性を有することが確認できた(図 3-5)。

②その他の安全性試験：細胞毒性試験でスクリーニングした NC ゲルについて、皮膚感作性試験、皮内反応試験、刺激性試験の安全性試験を実施した。皮膚感作性試験、皮内反応試験、刺激性試験の結果、NC ゲルはいずれも陰性(適合)であることを確認した(図 3-4)。以上により、ナノコンポジットゲルは医療部材としてクラス IV に相当する医療材料として薬事申請上、必要な安全性試験を全てクリアしていることを確認した。



③滅菌保存性試験：本研究において、NC ゲルにかかる必要なガンマ線照射を行った場合、有機・無機ネットワーク中の高分子鎖の間に化学架橋が形成され、極めて脆いゲルと変化してしまうことが明らかとなった。また EOG 滅菌については、使用した EOG ガスが長い期間ゲル中に保持され除去されないことから、安全性が担保されず、NC ゲルの滅菌法としては不適切であると考えられた。かかる問題に対し、我々は、NC ゲルの滅菌についてオートクレーブ滅菌を実施した。NC ゲルをオートクレーブ処理滅菌を行った結果、指標菌(*Bacillus stearothermophilus*)を用いた実験で素材の滅菌が完了することを確認した。

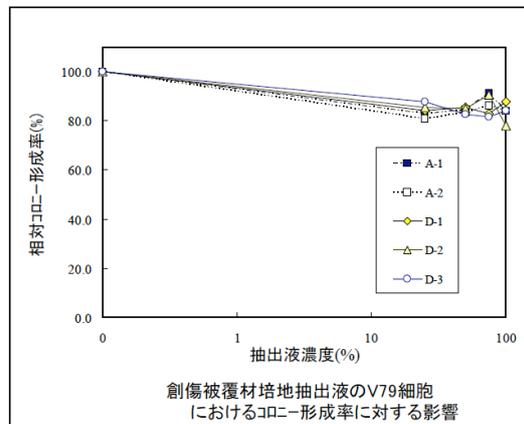


図3-5 NCゲルの細胞毒性試験



図3-6 皮膚刺激性試験

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計3件）

① Y.M. Zhou, T. MIZUNO et al, Nanocomposite hydrogels : a novel Wound dressings, The 3rd International Conference on BioMedical Engineering and Informatics (BMEI'10), 18 October 2010, Yantai, China.

② 水野敏秀 他, 抗血栓性コーティングの性能及び特性の定量的評価法の検討, 人工心臓と補助循環懇話会学術集会, 2013年2月1-2日, 山之内町, 長野

③ 水野敏秀 他, 抗血栓コーティングの性能及び特性の定量的評価法の検討, バイオマテリアル学会シンポジウム, 2012年11月26-27日, 仙台市, 宮城県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 敏秀 (MIZUNO TOSHIHIDE)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：40426515

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

原口 和敏 (HARAGUCHI KAZUTOSHI)
(財)川村理化学研究所・所長
研究者番号：10373391

巽 英介 (TATSUMI EISUKE)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究社番号：00216996

築谷 朋典 (TSUKIYA TOMONORI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・人工臓器部・室長
研究者番号：00311449

本間 章彦 (HONMA AKIHIKO)
東京電機大学・工学部・教授
研究者番号：20287428

武輪 能明 (TAKEWA YOSHIAKI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・人工臓器部・室長
研究者番号：20332405