

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5424535号
(P5424535)

(45) 発行日 平成26年2月26日(2014.2.26)

(24) 登録日 平成25年12月6日(2013.12.6)

(51) Int. Cl.		F I		
A 6 1 L 27/00	(2006.01)	A 6 1 L 27/00		P
A 6 1 L 29/00	(2006.01)	A 6 1 L 29/00		J

請求項の数 1 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2007-65840 (P2007-65840)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(22) 出願日	平成19年3月14日(2007.3.14)	(74) 代理人	100105315 弁理士 伊藤 温
(65) 公開番号	特開2008-220786 (P2008-220786A)	(72) 発明者	陳 咏梅 北海道札幌市北区北16条西3丁目 マン ション三宅B203室
(43) 公開日	平成20年9月25日(2008.9.25)	(72) 発明者	▲グン▼ 剣萍 北海道札幌市南区澄川3-4-4-16- 1406
審査請求日	平成22年1月25日(2010.1.25)	(72) 発明者	長田 義仁 北海道札幌市南区北の沢1丁目11-17 -3
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管内皮細胞の摩擦抵抗低減材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

N, N' - ジメチルアクリルアミドと、メチレンビスアクリルアミドにより合成される、血液と接触する環境下で使用される医療用具用ゲル材料であって、

前記ゲル材料を合成する際の、N, N' - ジメチルアクリルアミドに対するメチレンビスアクリルアミドの比が、3 ~ 5モル%である、医療用具用ゲル材料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カテーテルや人工血管といった、血液と接触する環境下に配される医療用具で使用可能な、低摩擦性・抗血栓性ゲル材料に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、血液と接触する環境下に配される医療用具は多種に亘る。例えば、カテーテル(catheter)は、血管から挿入して心臓や脳に到達させて血管造影剤の注入や血栓の除去等を目的として使用される医療用具である。

【0003】

このような血液と接触する環境に配される医療用具に関しては、二点の重要な問題が存在する。一点目が、例えば前述のカテーテルのように血管中に導入する使用態様に係る医療用具に関しての、当該医療用具と血管壁の摩擦による血管の破損である。このように、当

10

20

該医療用具と血管内皮細胞との摩擦挙動は、当該分野において重要な問題となる。

【 0 0 0 4 】

二点目が、当該医療用具と血液の適合性である。血液適合性が低い医療用具に血液が接触した場合、血小板が活性化され、血液凝固が誘発され、更には血栓を形成するおそれがあることは周知である。このように、医療用具の血液適合性も、上記の摩擦挙動に加え重要な問題となる。

【 0 0 0 5 】

ここで、このような医療用具材料としては、古くは、例えばカテーテルに関しては、基材の高分子材料表面に所定ポリマーをグラフト結合させる手法が提案されている（特許文献1）。しかしながら、このようなグラフト結合させる場合、グラフト鎖が非常に短いため、実際に使用したときには、グラフト鎖が本来奏する作用（低摩擦性・抗血栓性）を十分に発揮できないことに加え、当該グラフト鎖が内皮細胞と前記基材との間に介在しているものの、当該グラフト鎖はその厚さゆえ緩衝材としての機能を殆ど奏さない結果、柔らかい内皮細胞を堅い基材が傷つけてしまうという問題も危惧されている。

【 0 0 0 6 】

そこで、最近では、このようなグラフト結合させる手法とは異なる手法として、ハイドロゲルを医療用具材料として使用することが提案されている（特許文献2～7）。例えば、低摩擦性に関しては、当該ハイドロゲル層が潤滑層となり摩擦を低減させることが記載されている。更に、血液適合性の問題に関しては、古くは、抗血栓性薬剤をハイドロゲル層中に保持させる等の手法が提案されていたが、最近では、ノニオン系の非生体由来材料それ自体が抗血栓性を有していることが報告されている。

【 0 0 0 7 】

また、発明者等は、高分子ハイドロゲルが、他の固体物質と比較して表面摩擦係数が極めて低いことを明らかにしている（非特許文献1～12）。

【特許文献1】特開昭60-227763号公報

【特許文献2】特開2005-334216

【特許文献3】特開2004-305768

【特許文献4】特開平7-328124号公報

【特許文献5】特開平8-19599号公報

【特許文献6】特開平8-24327号公報

【特許文献7】特開平8-24328号公報

【非特許文献1】J. P. Gong, M. Higa, Y. Iwasaki, Y. Katsuyama and Y. Osada, J. Phys. Chem. B, 1997, 101, 5487.

【非特許文献2】J. P. Gong and Y. Osada, J. Chem. Phys., 1998, 109, 8062.

【非特許文献3】J. P. Gong, Y. Iwasaki, Y. Osada, K. Kurihara and Y. Hamai, J. Phys. Chem. B, 1999, 103, 6001.

【非特許文献4】J. P. Gong, G. Kagata and Y. Osada, J. Phys. Chem. B, 1999, 103, 6007.

【非特許文献5】J. P. Gong, Y. Iwasaki and Y. Osada, J. Phys. Chem. B, 2000, 104, 3423.

【非特許文献6】J. P. Gong, T. Kurokawa, T. Narita, K. Kagata, Y. Osada, G. Nishimura and M. Kinjo, J. Am. Chem. Soc., 2001, 123, 5582.

【非特許文献7】G. Kagata, J. P. Gong and Y. Osada, J. Phys. Chem. B, 2002, 106, 4596.

【非特許文献8】G. Kagata, J. P. Gong and Y. Osada, J. Phys. Chem. B, 2003, 107, 10221.

【非特許文献9】T. Kurokawa, J. P. Gong and Y. Osada, Macromolecules, 2002, 35, 8161.

【非特許文献10】Y. Ohseido, R. Takashina, J. P. Gong and Y. Osada, Langmuir, 2004, 20, 6549.

10

20

30

40

50

【非特許文献 1 1】D. Kaneko, T. Tada, T. Kurokawa, J. P. Gong and Y. Osada, Adv, Mater., 2004, 17, 535.

【非特許文献 1 2】T. Kurokawa, T. Tominaga, Y. Katsuyama, R. Kuwabara, H. Furukawa, Y. Osada and J. P. Gong, Langmuir, 2005, 21, 8643.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

このように、血液と接触する環境下に配される医療用具において、ハイドロゲルを使用すること、そして、当該ハイドロゲルの材料としてノニオン系非生体材料を使用すること、が既に提案されている。

10

【0009】

ここで、例えば、特許文献 2 ~ 7 では、いずれもジメチルアクリルアミドとグリシジルメタクリレートとの共重合体からなるハイドロゲルが提案されている。しかしながら、当該ハイドロゲルは、血管内皮細胞との、いわゆるズリ応力が高いという問題を抱えている。一般に、血液が血管を流れる際、血液と血管の間にはズリ応力が生じるが、当該ズリ応力は数 Pa 程度といわれている。ここで、血液と接触する環境下に配される医療用具が血管と接触する部位に適用される材料として、当該ズリ応力が前記血液と血管間のズリ応力と同等であることが、血管へのダメージを低減できるという観点から好ましいことである。

【0010】

そこで、本発明は、血管へのダメージを顕著に低減可能な低摩擦性を有する、抗血栓性の医療用具用材料を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は鋭意研究の結果、N, N' - ジメチルアクリルアミドを基材としつつ、所定の架橋剤を使用することにより、血管へのダメージを顕著に低減可能な低摩擦性ゲルとなることを見出し、以下の発明(1)を完成させたものである。

【0012】

本発明(1)は、N, N' - ジメチルアクリルアミドと、メチレンビスアクリルアミドにより合成される、血液と接触する環境下で使用される医療用具用ゲル材料であって、前記ゲル材料を合成する際の、N, N' - ジメチルアクリルアミドに対するメチレンビスアクリルアミドの比が、3 ~ 5モル%である、医療用具用ゲル材料である。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

<<ゲル材料の構成>>

本発明に係る医療用具用材料は、N, N' - ジメチルアクリルアミドと、少なくとも二つ以上のエチレン性不飽和結合を有する架橋剤により構成されるゲルである。ここで、当該ゲルは、N, N' - ジメチルアクリルアミド(以下、「DMAAm」という)が、主成分として含まれるゲルであれば特に限定されず、例えば、DMAAmと、架橋剤となる二以上のエチレン性不飽和結合を有する化合物の混合物を重合することにより合成される。ここで、主成分とは、ゲルを構成するモノマーの中で、好適には90mol%以上、より好適には91mol%以上、更に好適には95%含有されている成分モノマーを指す。また、DMAAmが主成分である限り、どのようなモノマー成分を用いてもよく、例えば、他のノニオン系モノマー、例えば、アルコキシアルキル(メタ)アクリレートを挙げることができる。ここで、「アルコキシ」や「アルキル」の炭素数は、例えば1~4である。

40

【0016】

少なくとも二以上のエチレン性不飽和結合を有する架橋剤とは、N, N' - ジメチルアクリルアミドと重合した場合に、得られる高分子が網目構造を構築するものであれば特に限定されないが、例えば、ビスアクリルアミド、多官能性アクリレート、少なくとも二つの末端CH₂基を含む多官能性ビニリデンモノマーである。具体的には、N, N' - メチ

50

レンビス(アクリルアミド)、トリメチロールプロパントリアクリレート、ブタジエン、イソプレン、ジビニルベンゼン、ジビニルナフタレン、アリルアクリレート等が挙げられる。中でも、ビスアクリルアミドのような、親水性架橋剤(特に好適には二個のビニル基を有する親水性架橋剤)が好適である。また、酸性環境下で使用する場合には、酸性下でも結合状態が安定である、ジビニルベンゼンのような疎水性架橋剤が好適である。ここで、本明細書にいう「親水性」とは、25 の水100mlへの溶解量が0.1g以上であるものを指し、「疎水性」とは、25 の水100mlへの溶解量が0.1g未満であるものを指す。

【0017】

本発明に係るPDMAAmゲルの架橋密度は、1~10mol%が好適であり、2~9mol%がより好適であり、3~5mol%が更に好適である。ここで、本明細書にいう「架橋密度」とは、モノマーの仕込みモル濃度に対する架橋剤のモル濃度の比をパーセントで表した値をいう。尚、実際には、重合に関与しなかったモノマーや架橋に関与しなかった架橋剤も僅かにある場合もあるが、この際も、本明細書におけるゲルの架橋密度は、前記の通りとする。

10

【0018】

尚、血液と接触する環境下に配される医療用具として、血液貯存バック等の用途で用いる際は、高強度等の観点から、PDMAAm単独ゲルの形態ではなく、PAMPSページ:5/PDMAAm DNゲル等の多重ネットワークゲル(例えばダブルネットゲル)の形態としてもよい。

20

【0019】

《ゲル材料の物性》

摩擦力

血管内皮細胞とゲルの摩擦力(ずり応力)は、滑り速度 10^{-4} m/sの条件において、15Pa以下が好適であり、10Pa以下がより好適であり、4Pa以下が更に好適であり、血管内を通過する血液と血管内壁の摩擦力に相当する2~3Paが最も好適である。ここで、摩擦力(ずり応力)とは、本明細書の「摩擦力測定」(段落番号0000)に示した方法で測定した摩擦力を指す。

【0020】

血液適応性

血清及び血漿に含まれる血小板の吸着が、 $50 \text{ cell} / 10^4 \mu\text{m}^2$ 以下であることが望ましい。

30

【0021】

《ゲル材料が適用される医療用具の基材》

カテーテルの基材は特に限定されない。有機材料、複合材料であっても、超弾性合金のパイプや金属よりなるコイル状物、メッシュ状物等を含んだものであってもよい。ただし、基材表面には、有機高分子化合物が存在していることが好ましい。該高分子単体で成形加工された基材であってもかまわないし、ポリマーアロイを成形加工した基材表面であってもよい。有機高分子材料としては、ポリオレフィン、変性ポリオレフィン、ポリエーテル、ポリウレタン、ポリアミド、ポリイミド、ポリエステルやそれらの共重合体等を例示できる。

40

【0022】

<<ゲル材料の製造方法>>

重合方法

ゲルの重合方法は、特に限定されず、例えば、ラジカル重合操作によって行うことができる。このようなフリーラジカル重合として、光開始、放射線開始、熱開始、又は酸化還元開始による重合開始が挙げられうる。典型的開始剤として、ベンゾインエーテルやベンゾイルペルオキシド、2-オキシグルタル酸が挙げられる。

【0023】

膨潤方法

50

前記重合方法により得られたゲルを一週間、大量の水で膨潤させた後に、更に緩衝生理食塩水にて、一週間、溶媒交換を行うことにより、試料を調製する。

【0024】

<<医療用具上へのゲル材料の適用方法>>

医療用具上へのゲル材料の適用方法は、特に限定されず、周知手法により適用可能である。例えば、バルーンやカテーテルチューブの該表面にゲル化層を設ける方法は、グラフト法、架橋不溶化法、コーティング法、表面重合法等、材料の種類によって適宜選択することができる。例えば、グラフト法では、材料表面に重合開始点を形成させた後モノマーをグラフト重合してゲル化層を形成する方法や予め高分子を合成した後材料表面に結合させる方法等がある。また、高分子間の架橋反応を伴って材料表面に結合させる方法も、材料表面で重合と架橋を同時に行う方法や合成した高分子を架橋する方法等がある。ゲルの架橋度や強度は、投与する医薬品の分子量や電荷により、目的に応じて設定される。

10

【0025】

《ゲル材料の用途》

本発明に係るゲル材料は、血液と接触する環境下に配される医療用具であれば特に限定されず、例えば、各種カテーテルやガイドワイヤー類、人工血管をはじめとする人工臓器を挙げることができる。

【実施例】

【0026】

以下、本発明を実施例を参照しながら具体的に説明することとする。尚、以下の実施例において、例えば「Xmol%PDMAAm」なる表示が存在するが、これはDMAAm 1Mに対するMBAAのモル濃度の比がX%であることを意味する。

20

【0027】

製造例

モノマー溶液を調製する。N, N'-ジメチルアクリルアミド(DMAAm) 1M、UV開始剤(2-オキソグルタル酸 0.1mol%)、架橋剤{N, N'-メチレンビス(アクリルアミド)(MBAA)} 0.04Mを蒸留水に溶解させ、窒素バブリングによって、ラジカル重合の妨げとなる溶存酸素の窒素置換を行った。続いて、得られたモノマー溶液を2枚のガラス基板の間に1.5mmのシリコンスペーサーを挟んだ鋳型に流し込み、室温でUVを6時間照射し、重合を行なった。これにより4mol%PDMAAmゲルを得た。

30

【0028】

製造例の製造方法に従い、以下に示すゲルを合成した。尚、これらゲルの化学構造を図1に示す。

・ポリ(p-スチレンスルホン酸ナトリウム)(PNaSS) :

架橋密度 4mol%、10mol%

・ポリ(NaSS-co-DMAAm)共重合ゲル :

$F_{NaSS} = 0.05, 0.1, 0.5$ (すべて、架橋密度 4mol%)

ここで、 F_{NaSS} とは、仕込みモノマーのうちNaSSが含まれるモル比率を表す値であり、すなわち、 $F_{NaSS} = NaSS / (NaSS + DMAAm)$ である。

40

【0029】

ゲルの平衡膨潤

前記製造例において重合して得られたゲルを大量の蒸留水で一週間膨潤した後、pH7.4の4-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-1-エタンスルホン酸(HEPES) buffer (NaHCO₃ 1.55 × 10⁻² M, HEPES 5 × 10⁻³ M, NaCl 0.14 M)中でさらに一週間溶媒交換した。

【0030】

<<ゲルと細胞の摩擦力測定試験>>

本実施例においては、擬似血管として、血管と同等の性質を有する、表面にグリコカリックス層を有する細胞シートを作成した。そして、当該細胞シートに対する円盤状のゲル

50

試料の摩擦力を測定した。ここで、当該試験において、この細胞シートが実際の血管と同一視できる理由は以下の通りである。

【0031】

毛細血管は数 μm という非常に細かいサイズにもかかわらず、血球は詰まることなくスムーズに流れる。これは、血管壁が、一層の内皮細胞で覆われており、内皮細胞表面にはグリコカリックスという、マイナス電荷を有し、血管壁から血管内側に向かってブラシのように伸びている糖鎖の層が存在しているからである。そして、当該グリコカリックスは、血管内皮細胞と血管内部を通過する物質との摩擦低減に寄与するものである。

【0032】

ゲルの試料調製

前記平行膨潤により得られたゲルを直径15mmの円盤形に調製した。

【0033】

細胞シート

平衡膨潤した10mol%PNaaS(直径15mm、厚さ約3mm)をシャーレに移し、121、20分でオートクレーブ後、直径15mmの円盤に切り出した。各基板上に $4 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ のHuman Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVECs)の懸濁液を1mlずつ加えた。細胞を乗せた基板を37、5%CO₂のインキュベータ内に入れて、細胞を培養した。細胞を位相差顕微鏡(OLYMPUS Japan)で観察した。

【0034】

<ゲル上で培養した細胞のproteoglycans(PGs)の発現の調製法>

PGsの合成を促進させる方法

Transforming growth factor-(TGF-)シグナルは、細胞増殖や分化、アポトーシス、遊走、細胞外マトリックスの産生と分解等を調節することが知られているサイトカイン(細胞の働きを調節する分泌性蛋白の一種)である。TGF-1が内皮細胞表皮proteoglycans(PGs)の合成を促進させることが報告されている(THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY:2000,275,1463-1470)。細胞培養液中にTGF-1を加えて細胞表面proteoglycans(PGs)の合成を促進させた(Kasinath BS. Glomerular EC proteoglycan regulation by TGF-₁. Archives Biochem Biophys 1993;305:370-7.)。

【0035】

PGsを分解させる方法

Heparinase I(ヘパリナーゼI)を用いてheparan sulfate proteoglycanを分解する。

【0036】

摩擦力測定

10mol%PNaaS上にコンフルエントまで培養した細胞シートと前記方法により調製した細胞シートと摩擦基板(ガラス、ゲル)は回転型レオメーターの平行平板にセットし、摩擦基板へ60gの加重により、圧縮した。

培養した細胞シート表面に対し、一方向で回転する摩擦基板とのトルクを測定し、単位面積あたりの摩擦応力(ずり応力)に換算して、これを、「摩擦力」とした(摩擦速度:7.5 $\times 10^{-6} \text{ m/s}$ ~7.5 $\times 10^{-3} \text{ m/s}$)。摩擦力測定は37の無血清培地中で行なわれた。測定時間に伴って、大量の細胞(80%以上)が残っており、且つ、摩擦力が一定値を示した時間における測定値を用いた。

【0037】

例1~9 細胞シートとガラス間の摩擦(グリコカリックスが摩擦に与える影響の評価)

図2は、未処理の細胞シート、heparinase Iで処理した細胞シート(グリコカリックスを分解させたもの)及びTGF-1で処理した細胞シート(グリコカリッ

10

20

30

40

50

クス含量を促進させたもの)とガラスに滑らせたときの細胞表面の摩擦力の速度依存性を示している。細胞表面のグリコカリックスを分解させたときでは、処理していない細胞表面のそれに比べて摩擦力の増大が見られる。細胞表面のグリコカリックスの含量を促進させたときでは、処理していない細胞表面に比べて摩擦力の減少が見られる。そして、処理していない細胞表面の摩擦力は滑り速度に依存しないのに対して、処理した細胞表面の摩擦力は滑り速度依存性が見られる。遅い滑り速度($7 \times 10^{-6} \text{ m/s}$ と $1.25 \times 10^{-5} \text{ m/s}$)ときの摩擦力の変化は速い滑り速度($7.5 \times 10^{-5} \text{ m/s}$)ときのそれに比べて顕著である。これらの結果から、内皮細胞表面のグリコカリックスが摩擦に関して重要な役割を果たしていることを明らかとなった。

【0038】

10

例10～18 細胞シートとゲル間の摩擦

図3は、未処理の細胞シート、heparinase Iで処理した細胞シート(グリコカリックスを分解させたもの)及びTGF- β 1で処理した細胞シート(グリコカリックス含量を促進させたもの)と4mol%PNaaSゲルに滑らせたときの細胞表面の摩擦力の速度依存性を示している。Heparinase Iで細胞表面のグリコカリックスを分解させたときでは、処理していない細胞表面のそれに比べて摩擦力の増大が見られた。TGF- β 1で細胞表面のグリコカリックスの含量を促進させたときでは、処理していない細胞表面のそれに比べて摩擦力の減少が見られた。細胞シートとガラス、4mol%PNaaSゲルと滑らせたとき、heparinase Iで細胞表面のHSPGsを分解したとき、滑り速度の増加に伴ってその摩擦力の減少が見られた。つまり、摩擦力が滑り速度に対して負の依存性を示している。この場合、細胞が基板(ガラス、PNaaSゲル)表面に吸着することが考えられる(吸着系)。TGF- β 1で細胞表面のHSPGsの合成を促進したときは、滑り速度の増加に伴ってその摩擦力の増大が見られた。この場合、細胞と基板間に反発力が働くことが考えられる(反発系)。これらの摩擦力の滑り速度依存性の変化は、基板に対して細胞が吸着的相互作用から反発的相互作用に変化していることを示している。これらのことからグリコカリックスの量の調整によって、細胞表面に電荷変化が起こったと示唆された。ところで、細胞-ゲル間の摩擦は細胞-ガラス間の摩擦より大きい。これについて二つの理由が考えられる。ひとつはPNaaSゲルの電荷密度はガラスの電荷密度より小さい。もうひとつはゲルが粘弾性であり、その表面に存在する高分子鎖と細胞表面のグリコカリックスがつりあって、摩擦力は大きくなったのではないかと考えられる。

20

30

【0039】

<ゲルの電荷密度による摩擦力への影響>

例19～30 負の電荷密度による影響

図4に細胞シートと電荷密度が違うゲルとの摩擦力の滑り速度依存性を示している。ゲルの電荷密度はPoly(NaaS-co-DMAAm)共重合ゲル中NaaSのモル量(F)で調整し、それぞれ0.05、0.1、0.5である。これらのゲルの弾性率はほぼおなじ値を示している。F=0.5の場合、滑り速度は $7.5 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 、 $1.25 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 、 $7.5 \times 10^{-6} \text{ m/s}$ のとき、摩擦力はそれぞれ292Pa、238Pa、617Paである。これら値と細胞-PNaaSゲル間の摩擦力に近い。ところで、摩擦基板はF=0.1の場合、滑り速度は $7.5 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 、 $1.25 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 、 $7.5 \times 10^{-6} \text{ m/s}$ のとき、摩擦力はそれぞれ21Pa、28Pa、42Paである。そして、F=0.05ときの摩擦力とF=0.1ときと近い値を示している。つまり、摩擦基板の電荷密度の減少に伴って、細胞摩擦力は約一桁下がることを示している。

40

【0040】

例31～48 電気的に中性のゲルを用いた場合

例19～30の結果から、中性ゲルと滑らせたとき、細胞シート-ゲル間の摩擦はもっと減少すると予想される。これを証明するため、細胞シートPDMAAm(4mol%、弾性率152.5kPa)ゲル間の摩擦測定を行った。図5に細胞シート-PDMAAmゲ

50

ル間の摩擦力の滑り速度依存性を示している。滑り速度は、 $7.5 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 、 $1.25 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 、 $7.5 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ 、 $2.73 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ のとき、摩擦力はいずれの細胞に対しても約2~4 Paである。このように摩擦力が低く、これらの滑り速度の範囲中に細胞シートの摩擦は200 s~1800 s間に80%以上の細胞は残ったため、長い時間にわたって細胞シートの摩擦測定ができた。そして、高い滑り速度での摩擦力の測定が実現した。滑り速度は $7.5 \times 10^{-3} \text{ m/s}$ 、 $7.5 \times 10^{-2} \text{ m/s}$ のとき、摩擦力は約9~14 Paである。これらの滑り速度範囲中に細胞シートの摩擦は50 s~100 s間80%以上の細胞は残った。以上の結果から細胞シートPDMAAm間の摩擦力は血管中のせん断応力に近いことが分かった。

【0041】

以上の結果から、ゲルの負の電荷密度の減少につれて細胞シートとゲルとの相互作用は吸着から斥力に推移することが分かった。つまり、負の電荷密度が低いほうが細胞と基板間の吸着が弱い。これは細胞表面に負と正の電荷を持つタンパク質を持つため、おそらくゲルと細胞表面のタンパク質との相互作用にかかわると考えられる。

【0042】

図6に未処理の細胞シートと4 mol% PNaSSゲル、poly(NaSS-co-DMAAm) F=0.5 (PNaSSの含有量は50%)ゲル、4 mol% PDMAAmゲル、ガラス間での摩擦挙動を示している。4 mol% PNaSSや、poly(NaSS-co-DMAAm) (F=0.5)ゲルは、ガラスよりも摩擦力が大きい。しかし、PDMAAmゲルの摩擦力は、他のゲルよりも顕著に低い摩擦力を示す。

【0043】

図7にTGF- β 1で処理した細胞シート(細胞表面のグリコカリックスの含量を促進させた)と4 mol% PNaSSゲル、4 mol% PDMAAmゲル、ガラス間での摩擦挙動を示す。この場合にも、PDMAAmゲルは顕著に低い摩擦力を示す。

【0044】

図8にHeparinase Iで処理した細胞シート(細胞表面のグリコカリックスの含量を減少させた)と4 mol% PNaSSゲル、4 mol% PDMAAmゲル、ガラス間での摩擦挙動を示している。この場合にも、PDMAAmゲルは顕著に低い摩擦力を示す。

【0045】

以上の結果から、細胞表面でのグリコカリックスの含量に関係なく、細胞シートと4 mol% PDMAAmゲル間での摩擦は、4 mol% PNaSSゲル、poly(NaSS-co-DMAAm) F=0.5 (PNaSSの含有量は50%)ゲル、ガラスに比べ、100倍小さいことが分かった。

【0046】

例49 正の電荷を持つゲルとの摩擦

細胞シート-中性ゲル間の摩擦は細胞シート-負の電荷を持つゲルより低いという結果を受けて、細胞シート-正の電荷を持つゲル間の摩擦確認試験を行った。正の電荷を持つゲルはPDMPAA-Q(10 mol%)を用いた。その結果、細胞シート-PDMPAA-Qゲル間の摩擦は1000 Paという高い値を示した。そして、摩擦測定後、PDMPAA-Qゲル表面に細胞シートと同じサイズの跡がみられた。これは細胞シートがPDMPAA-Qゲルに吸着して残った跡と考えられる。このことから細胞シートは主に負の電荷を帯びていることが分かった。

【0047】

<<血液適合性試験>>

先に記載した製造例の方法に従い、以下に示すゲルを合成し、更に平衡膨潤させた。各種ゲルの構造を図9に示した。

・ポリ(アクリル酸) :

(PAA) 架橋密度 1 mol%、2 mol%

・ポリ(p-スチレンスルホン酸ナトリウム) :

10

20

30

40

50

(P N a S S) 架橋密度 4 mol%、10 mol%

・ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸ナトリウム) :

(P N a A M P S) 架橋密度 2 mol%、4 mol%、10 mol%

【0048】

ゲルの試料調製

前記の平衡膨潤したゲルをシャーレに移し、121℃、20分でオートクレーブ後、直径15mmの円盤に切り出した。ポリエチレンテレフタレート(PET)とポリスチレン(PS)をコントロールとして用いた。直径15mmのPETとPS基板を75%のアルコールで滅菌した。滅菌した基板を24穴PSディッシュに入れた。種々ゲルを無血清培地、血清培地中で平衡膨潤した。一種類基板につき、3~4個を用いた。

10

【0049】

血小板血漿の調製

ヒト肘静脈より3.8%クエン酸ナトリウム1/9容を加えて採血した血液を1200rpmで5分間遠心し、この上澄みを分離した(上澄みに血小板が含まれている)。血小板を活性化させないように静かに別の容器に移した。これをPRP(多血小板血漿)とした。残りの血液を3500rpmで10分間遠心し、上澄みを分離した。これをPPP(乏血小板血漿)とした。そして、PRPとPPPを合わせて血小板血漿とした。

【0050】

血液適合性試験の方法

ゲル基板に上記の血小板血漿を150mlずつキャストし、37℃で2時間インキュベートした。2時間後基板上の血小板血漿を軽く除去し、PBS溶液で2回洗浄した。これを2.5%グルタルアルデヒド溶液に浸漬し、37℃で2時間静置した。架橋後基板についているグルタルアルデヒド溶液を軽く拭き取った後、PBS溶液1回、Milli-Q水で50%に希釈したPBS溶液1回、続いてMilli-Q水で1回洗浄した。

20

【0051】

SEMでの細胞観察

血小板がサイズの小さいため、光学顕微鏡で形を観察するのが難しい。そのため、SEMでの観察が必要になる。サンプルは凍結乾燥する前に2.5%グルタルアルデヒド溶液で細胞を固定した。サンプルを凍結乾燥機に入れて、凍結乾燥機の温度を-40℃まで冷やして、-40℃保ったまま5h凍結乾燥し、次に-25℃に保ったまま4h凍結乾燥し、更に25℃保ったまま4h凍結乾燥した。当該方法で準備したHUVECがコンフルエントまで増殖したサンプルをSEMで観察したところ、伸展した細胞が形を保ったまま観測された。

30

【0052】

評価方法

各ゲルについて、倍率1000倍で5視野撮影し、粘着している血小板を以下のように分類し、それぞれの個数をカウントする。

- I型 球状を保っている正常血小板。
- II型 球状を保っているが、偽足を出している活性化された血小板。
- III型 完全に伸展している一番活性化された血小板。

40

【0053】

コントロールサンプル

コントロールとしてPETとPSを用いた。PETは血小板粘着実験のnegativeコントロールとしてよく用いられる基板である。PSは細胞培養に広く使われている。

【0054】

比較例1~2 コントロールサンプルの血液適合性試験

図10にコントロール基板上で吸着した血小板のSEM写真を示している。基板上吸着した血小板の数は図17に示している。PET、PS上にそれぞれ27 cells / 10⁴ μm²、320 cells / 10⁴ μm²血小板の吸着がみられた。PS上で吸着した血小板が直径2~4 μmの正常の球状を示しているのに対して、PET上で吸着した血小

50

板の活性化が認められた。PET上で吸着した血小板のうち約53.9%が伸展、43.1%が偽足の形に示し、僅か3%が正常の球状を示している。これらの値から、PET、PS基板上に大量の血小板の吸着し、PET基板上では血小板が活性化しやすいことが分かった。

【0055】

例50～51 PDMAAmゲル

無血清培地と血清培地中で平衡膨潤した中性のPDMAAmゲル表面でははっきりとした網目が観察され、血清と血漿中含むタンパク質や血小板の吸着は認められなかった(図11)。

【0056】

例52～55 PAAゲル

無血清培地と血清培地中で平衡膨潤した2mol%PAAゲル表面にファイバと塊まり状のタンパク質の集合体と見られるものが吸着された(図12)。1mol%PAAゲルを用いた場合であっても、同じ結果を示した。無血清培地中にはタンパク質が含まれていないため、無血清培地中で平衡膨潤したPAAゲル表面の吸着したタンパク質は、血小板血漿中に含まれていたものと考えられる。無血清培地と血清培地中で平衡膨潤した1mol%のPAAゲル上に、それぞれ密度70、74 cells / 10⁴ μm²球状を保っている血小板(2～4 μm)の吸着が観察された。無血清培地と血清培地中で平衡膨潤した2mol%のPAAゲル上に、それぞれ密度329、247 cells / 10⁴ μm²血小板の吸着を観察された。その中でそれぞれ約15%、12%が偽足を出していた。2mol% PAAゲル上に吸着した血小板の数が1mol%のPAAゲル上に比べてやく4倍多い。これらの結果より、血清の存在に関係なく、血小板がPAAゲルに吸着しやすく、さらには、血小板の吸着がPAAゲルの架橋密度に敏感に依存していることが分かった。

【0057】

56～61 PNaAMPSゲル

無血清培地中で平衡膨潤したPNaAMPSゲル表面には、たくさんのタンパク質の集合体と見られるものが吸着している(図13)。無血清培地中にタンパク質は、含まれていないため、ゲル表面に吸着したタンパク質は、血小板血漿中に含まれていたものと考えられる。2mol%、4mol%、10mol%のPNaAMPSゲルに、球状を保っている血小板(2～4 μm)が、それぞれ36、2、8 cells / 10⁴ μm²の密度で吸着している様子が観察された。血清培地中で平衡膨潤した2mol%、4mol%、10mol%のPNaAMPSゲルに、球状を保っている血小板(2～4 μm)が、それぞれ123、44、6 cells / 10⁴ μm²の密度で吸着している様子が観察された。

血清培地中で平衡膨潤したPNaAMPSゲル表面にたくさんのタンパク質の集合体と見られるものが吸着している(図14)。さらにタンパク質の集合体に中心として球状の血小板(2～4 μm)の吸着がみられた。これらの結果から、血清培地中で平衡膨潤したPNaAMPSゲル上に血小板が吸着しやすいことが分かった。

【0058】

実施例62～65 PNaSSゲル

無血清培地中で平衡膨潤したPNaSSゲル上にタンパク質の集合体と見られるものの吸着が観察されなかった(図15)。血清培地中で平衡膨潤したPNaSSゲル上に密度高いファイバ状のタンパク質と見られるものの吸着が観察された。無血清培地中で平衡膨潤したPNaSSゲル上に僅かな血小板の吸着が観察されたのに対して、血清培地中で平衡膨潤した4mol%と10mol%のPNaSSゲル上に、血小板が、それぞれ68、172 cells / 10⁴ μm²の密度で吸着している様子が観察された。さらにその上に、ゲル表面は、タンパク質の線維が均一に覆われている(図16)。このため、吸着した血小板の形態がよく分からない。これらの結果から、血清培地中で平衡膨潤したPNaSSゲル上に血小板が吸着しやすいことが分かった。

【0059】

10

20

30

40

50

実施例の総括

図17に種々のゲル上で吸着した血小板の数を示している。これらの結果より、無血清培地中で平衡膨潤したゲルの場合では、血小板の粘着がPAA > PNaAMPSS > PNaSS > PDMAAmの順で減少し、血清培地中で平衡膨潤したゲルの場合では、血小板の粘着がPAA > PNaAMPSS ~ PNaSS > PDMAAmの順で減少することが分かった。何れの場合にも、PAAゲル上での血小板の粘着が強い。そして、血小板の吸着がPAAゲルの架橋密度に敏感に依存していることが分かった。血清培地中で平衡膨潤したPAA、PNaAMPSS、PNaSSゲル表面に血清タンパク質のファイバとみられるものが観察された。とくに、タンパク質の集合体の上とその周りに、血小板の粘着が顕著であった。これらの結果から、血清タンパク質が血小板の粘着を誘導するのではないかと示唆された。

10

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】図1は、種々のゲルの化学構造を示した図である。

【図2】図2は、各種細胞シートとガラス間の摩擦を示した図である。

【図3】図3は、各種細胞シートと4mol% PNaSS間の摩擦を示した図である。

【図4】図4は、細胞シートとPoly(NaSS-co-DMAAm)の摩擦を示した図である。

【図5】図5は、細胞シートと4mol% PDMAAmゲル間の摩擦を示した図である。

【図6】図6は、細胞シートと各種ゲルとの摩擦を示した図である。

20

【図7】図7は、TGF- β 1で処理した細胞シートと各種ゲルもしくはガラス間の摩擦を示した図である。

【図8】図8は、Heparinase Iで処理した細胞シートとゲルガラス間での摩擦を示した図である。

【図9】図9は、種々ゲルの化学構造を示した図である。

【図10】図10は、コントロール基板上で吸着した血小板のSEM写真である。

【図11】図11は、4mol% PDMAAmゲル上で吸着した血小板のSEM写真である。

【図12】図12は、2mol% PAAゲル上で吸着した血小板のSEM写真である。

【図13】図13は、2mol% PNaAMPSSゲル上で吸着した血小板のSEM写真である。

30

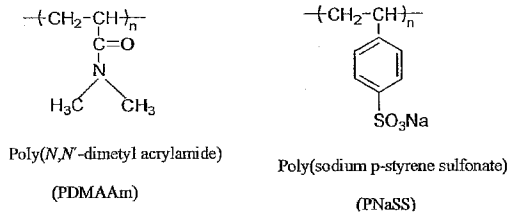
【図14】図14は、10mol% PNaAMPSSゲル上で吸着した血小板のSEM写真である。

【図15】図15は、4mol% PNaSSゲル上で吸着した血小板のSEM写真である。

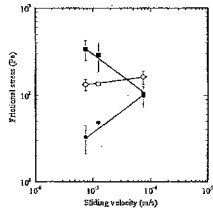
【図16】図16は、10mol% PNaSSゲル上で吸着した血小板のSEM写真である。

【図17】図17は、コントロール基板と種々のゲル上で吸着した血小板の数を示した図である。

【 図 1 】

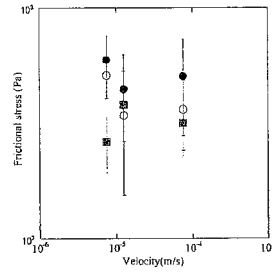


【 図 2 】



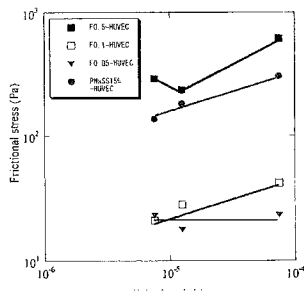
細胞シートとガラス間の摩擦。(○) 未処理の細胞、(●) TGF-β1 で処理した細胞、(■) Heparinase で処理した細胞。

【 図 3 】



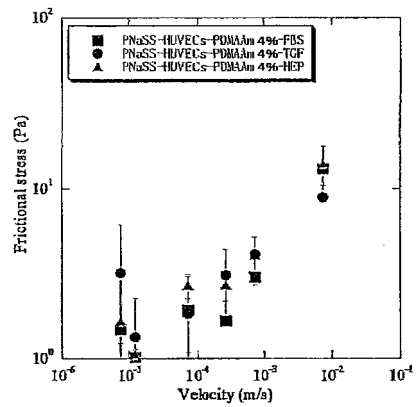
細胞シートと 4mol% PNaSS 間の摩擦。(○) 未処理の細胞、(●) TGF-β1 で処理した細胞、(■) Heparinase で処理した細胞。

【 図 4 】



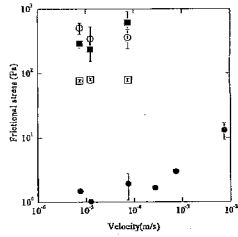
細胞シートと Poly(NaSS-co-DMAAm) 共重合ゲル間での摩擦。

【 図 5 】



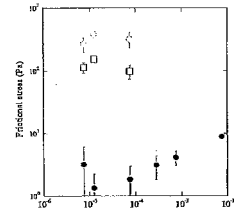
細胞シートと 4mol% PDMAAm ゲル間での摩擦。

【 図 6 】



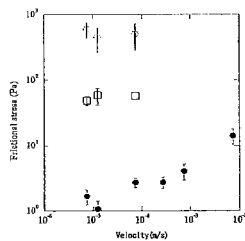
As-prepared 細胞シートとゲル、ガラス間での摩擦。(o) 細胞シートとゲル 4 mol% PNaSS ゲル間での摩擦、(■) 細胞シートと ploy(NaSS-co-DMAAm) F=0.5 (PNaSS の含有量は 50%) ゲル間での摩擦、(▲) 細胞シートと 4mol% PDMAAm ゲル間での摩擦、(□) 細胞シートとガラス間での摩擦。

【 図 7 】



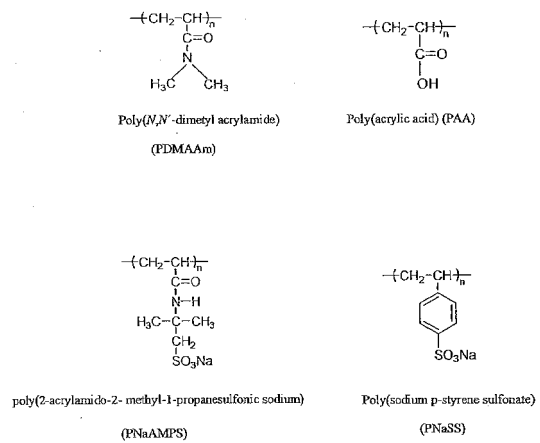
TGF-β₁ で処理した細胞シート(細胞表面の glycoCalyx の含量を促進させた)とゲル、ガラス間での摩擦。(o) 細胞シートとゲル 4 mol% PNaSS ゲル間での摩擦、(●) 細胞シートと 4mol% PDMAAm ゲル間での摩擦、(□) 細胞シートとガラス間での摩擦。

【 図 8 】

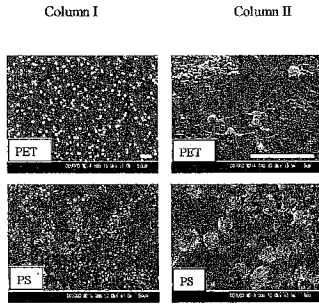


Heparinase I で処理した細胞シート(細胞表面の glycoCalyx の含量を減少させた)とゲル、ガラス間での摩擦。(o) 細胞シートとゲル 4 mol% PNaSS ゲル間での摩擦、(●) 細胞シートと 4mol% PDMAAm ゲル間での摩擦、(□) 細胞シートとガラス間での摩擦。

【 図 9 】

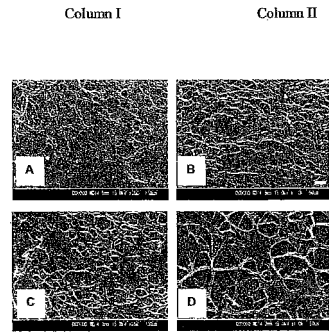


【 図 1 0 】



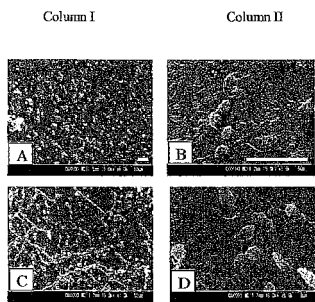
コントロール基板上で吸着した血小板のSEM写真。Column II はcolumn I の拡大です。 Scale bar: 5 μ m。

【 図 1 1 】



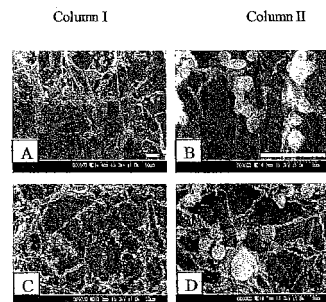
4 mol% PDMAAm ゲル上で吸着した血小板のSEM写真。Column II はcolumn I の拡大です。(A, B)無血清培地中で平衡膨潤したゲル。(C, D) 血清培地中で平衡膨潤したゲル。 Scale bar: 5 μ m。

【 図 1 2 】



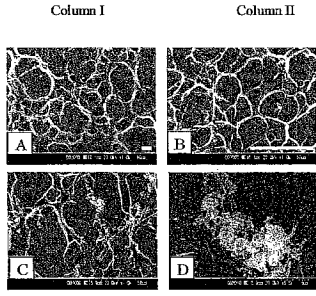
2 mol% PAA ゲル上で吸着した血小板のSEM写真。Column II はcolumn I の拡大です。(A, B)無血清培地中で平衡膨潤したゲル。(C, D) 血清培地中で平衡膨潤したゲル。 Scale bar: 5 μ m。

【 図 1 3 】



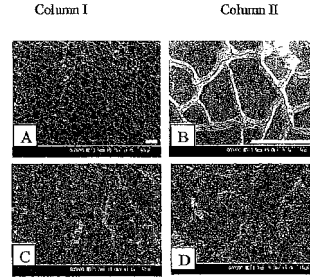
2 mol% PNaAMPS ゲル上で吸着した血小板のSEM写真。Column II はcolumn I の拡大です。(A, B)無血清培地中で平衡膨潤したゲル。(C, D) 血清培地中で平衡膨潤したゲル。 Scale bar: 5 μ m。

【 図 1 4 】



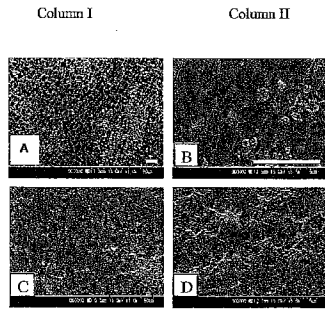
10 mol% PNAMPS ゲル上で吸着した血小板の SEM 写真。Column II は column I の拡大です。(A, B)無血清培地中で平衡膨潤したゲル。(C, D) 血清培地中で平衡膨潤したゲル。 Scale bar: 5 μ m。

【 図 1 5 】



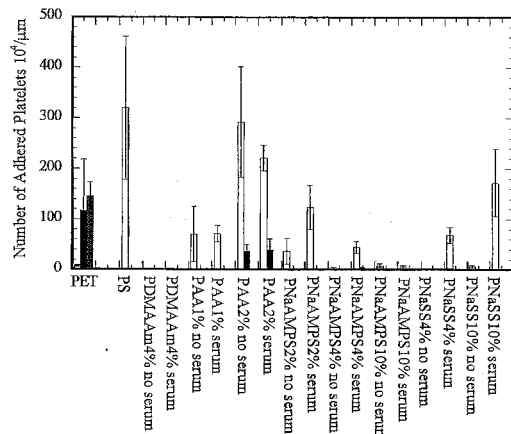
4 mol% PNASS ゲル上で吸着した血小板の SEM 写真。Column II は column I の拡大です。(A, B)無血清培地中で平衡膨潤したゲル。(C, D) 血清培地中で平衡膨潤したゲル。 Scale bar: 5 μ m。

【 図 1 6 】



10 mol% PNASS ゲル上で吸着した血小板の SEM 写真。Column II は column I の拡大です。(A, B)無血清培地中で平衡膨潤したゲル。(C, D) 血清培地中で平衡膨潤したゲル。 Scale bar: 5 μ m。

【 図 1 7 】



コントロール基板と種々のゲル上で吸着した血小板の数。White Bar : 球状を保っている正常血小板、Black Bar : 球状を保っているが偽足を突出している活性化された血小板、White Bar Oblique Lines : 完全に伸展している一番活性化された血小板。

フロントページの続き

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 特開昭60-250019(JP,A)
特開平01-280466(JP,A)
特開昭64-080368(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 15/00-33/00

CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)