(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105102007 B
(45)授权公告日 2017.09.08

(21)申请号 201480020874.1

(22)申请日 2014.04.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105102007 A

(43)申请公布日 2015.11.25

(30)优先权数据
2013-084121 2013.04.12 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.10.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/060376 2014.04.10

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/168197 JA 2014.10.16

(73)专利权人 东丽株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 棚桥一裕 阪口有佳 藤田雅规 门胁功治 土仓弘至 山田谕

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 庞立志 刘力

(51)Int.Cl.
A61L 27/00(2006.01)
A61F 2/06(2013.01)

审查员 张凌

权利要求书3页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

具有抗血栓性的人工血管

(57)摘要

本发明的目的在于,提供促进留置后的内膜形成、直至内膜形成为止期间可以维持抗血栓性的能够长期不闭合的人工血管。本发明提供人工血管,其为在含有超细纤维的纤维层的内侧具备包含纤维直径为10nm以上且3μm以下的超细纤维的超细纤维层的筒状织物,肝素以外的具有高分子链的抗凝血酶剂经由前述高分子链与前述超细纤维共价键合,37℃时的纤维表面的凝血酶活性抑制比率为60%以上。

CN 105102007 B

1.人工血管，其为在含有超细纤维的纤维层的内侧具备包含纤维直径为10nm以上且3μm以下的超细纤维的超细纤维层的筒状织物，

肝素以外的具有高分子链的抗凝血酶剂经由所述高分子链与所述超细纤维通过缩合反应或加成反应共价键合，

37℃时的纤维表面的凝血酶活性抑制比率为60%以上。

2.根据权利要求1所述的人工血管，其中，所述抗凝血酶剂的分子量为3000以下。

3.根据权利要求1或2所述的人工血管，其中，120mmHg时的透水性能为100mL/cm^2/min以上且不足4000mL/cm^2/min。

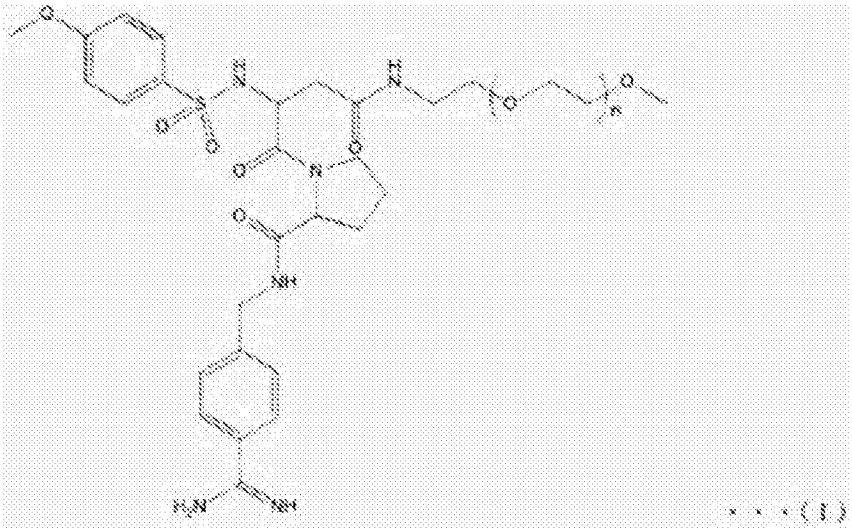
4.根据权利要求1～3中任一项所述的人工血管，其中，37℃的条件下、每1g该人工血管在10mL的生理盐水中抽提24小时后的抽提液中的凝血酶活性抑制比率为不足5%。

5.根据权利要求1～4中任一项所述的人工血管，其中，所述抗凝血酶剂具有胍基或脒基。

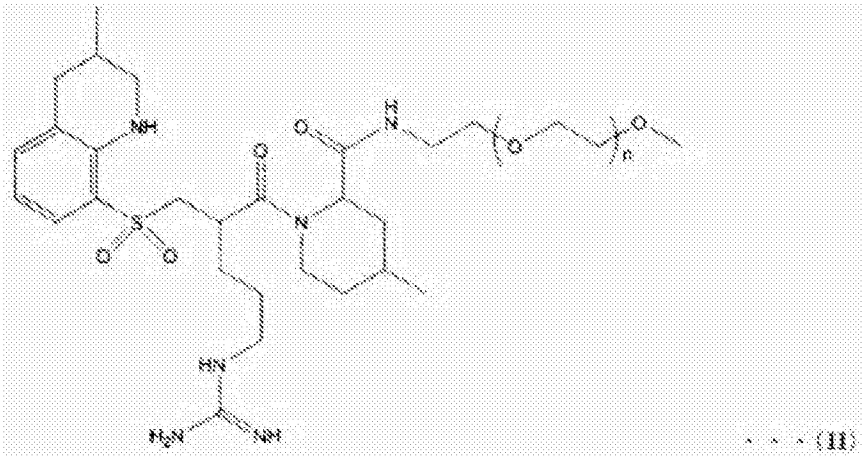
6.根据权利要求1～5中任一项所述的人工血管，其中，所述高分子链选自包含聚亚烷基二醇、聚乙烯醇或聚乙烯基吡咯烷酮的高分子结构。

7.根据权利要求1～6中任一项所述的人工血管，其中，所述抗凝血酶剂选自下述化学式(I)～(IV)，

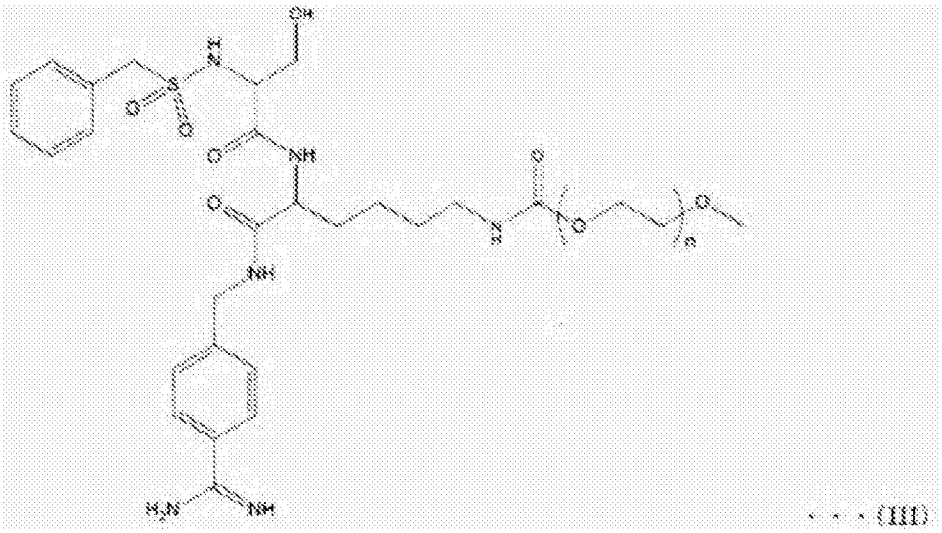
[化1]



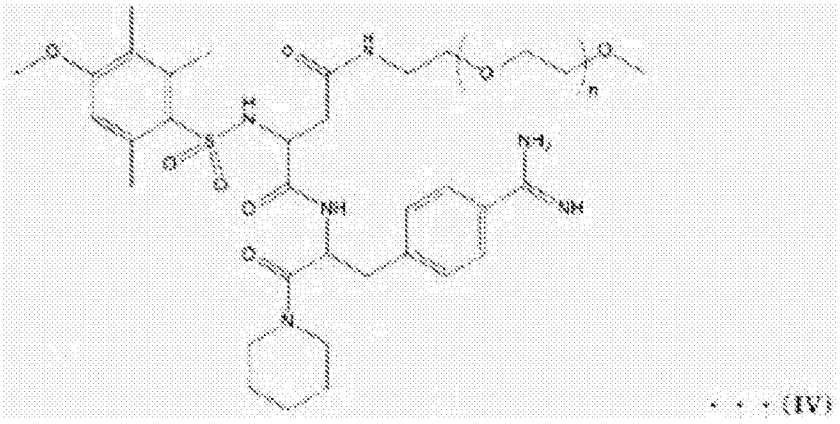
[化2]



[化3]



[化4]



其中，n为1～500的整数。

8.根据权利要求1～7中任一项所述的人工血管，其中，所述纤维层包含所述超细纤维、和总纤度为1～60分特的复丝。

9.根据权利要求8所述的人工血管，其中，构成所述复丝的单丝的纤度为0.5～10.0分特。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的人工血管，其中，血小板附着率不足20%。

11.根据权利要求1～10中任一项所述的人工血管，其中，所述筒状织物包含聚酯纤维。

12.根据权利要求1～11中任一项所述的人工血管，其中，所述筒状织物的内径为1mm以上且不足10mm。

具有抗血栓性的人工血管

技术领域

[0001] 本发明涉及受到了损伤等的血管的再建、修复或替代中使用的人工血管。

背景技术

[0002] 由于高龄化、代谢综合征的人口增加，受到动脉硬化困扰的患者数不断增加。动脉硬化为动脉壁的异常，血液的高血糖状态、高脂质状态使得血管壁变性，血管壁变得脆弱或肥厚、或者钙化而变硬、变脆。这种血管的变性在身体中的血管的任意部位产生，特别是在末梢的血管这种影响显著。

[0003] 对于这种变性了的血管的治疗而言，迄今除了进行使用导管的球囊扩张术、支架留置术等低侵袭的血管内治疗之外，还进行用自身的血管或人工血管置换损伤了的血管的外科手术。

[0004] 但是，留置人工血管时生物体将其作为异物识别，在人工血管的血液接触面会进行血液凝固反应，形成血栓。

[0005] 另外，生物体的血管在与血液接触的面存在具有血管内皮细胞的内膜，发挥抑制血栓形成的作用，即使是留置的人工血管，血管内皮细胞也会覆盖人工血管的血液接触面而形成内膜。但是，该内膜在直至被内皮细胞覆盖为止期间，人工血管会被作为异物识别，因此直至形成内膜为止需要防止血栓形成的手段。特别是使用小直径的人工血管的部位由于血流量少而血栓容易沉积，即使是少量的血栓，也容易堵塞血管。小直径的人工血管的现状是，长期的成绩不好、没有可以实现临床使用的产品。

[0006] 为了解决这些问题，迄今人工血管的开发中重点在于早期的内膜形成和抗血栓性的赋予。

[0007] 作为促进内膜形成的方法，除了将细胞的增殖因子、诱导因子担载于人工血管之外，作为人工血管其本身的结构原材料，使用聚酯等的纤维的织物、编物或无纺布。特别是已知含有不足10微米的超细纤维的情况下，超细纤维的尺寸或纤维间隙的尺寸适于细胞的增殖、浸润(专利文献1、2、3)。进而已知超细纤维也促进血小板的附着，还具有留置时防止血液由血管壁泄漏的效果(专利文献4)。

[0008] 另外，作为对人工血管赋予抗血栓性的方法，迄今进行担载肝素的方法。纤维自身没有担载肝素的能力，因此为了担载充分的肝素，已知填充含有肝素的包含生物降解性聚合物、明胶等的凝胶的方法(专利文献5)，通过共价键将肝素固定于纤维表面的人工血管(专利文献6)。

[0009] 另一方面，作为使用肝素以外的物质来赋予抗血栓性的方法，已知使用γ射线等高能量射线将抗凝血酶剂、或含有抗凝血酶剂的聚合物结合于表面的方法(专利文献7、8)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1：日本专利第1875991号公报

[0013] 专利文献2：日本专利第1870688号公报

[0014] 专利文献3:日本专利第1338011号公报

[0015] 专利文献4:日本专利第4627978号公报

[0016] 专利文献5:日本专利第3799626号公报

[0017] 专利文献6:日本特表第2009-545333号公报

[0018] 专利文献7:WO08/032758号公报

[0019] 专利文献8:WO2011-078208号公报。

发明内容

[0020] 发明要解决的问题

[0021] 但是,如专利文献5中记载的人工血管那样,填充纤维间隙的情况下,存在下述问题:不仅阻碍细胞浸润而使内膜延迟,而且在明胶等附着血小板、反而助长血栓形成。另外,如专利文献6中记载的人工血管那样,通过共价键将肝素固定于纤维表面的情况下,肝素的分子量大,因此存在下述问题:可以键合于表面的量有限、没有长期的效果。进而存在下述问题:由于将亲水性极高的肝素键合于纤维表面而使细胞粘附性降低。

[0022] 进而,如专利文献7、8中记载那样,有抗凝血酶剂通过γ射线等高能量射线结合于表面的方法,但是存在下述问题:抗凝血酶剂变性而活性降低,不能发挥充分的抗血栓性能。进而,对基材表面的固定化反应通过在水溶液中在使抗凝血酶剂吸附于表面的状态下照射γ射线来达成,但是表面张力高的水溶液不会浸渗到疏水性高的聚酯超细纤维的间隙,不能均匀地进行表面处理直至内部的纤维表面为止,因此存在没有进行表面处理的部分诱导血栓形成反应的问题。另外,亲水性聚合物不吸附于聚酯,因此只要抗凝血酶剂自身与聚酯不具有亲和性则不会产生吸附,成为表面固定化量降低的原因。进而,抗凝血酶剂不经由作为间隔物的亲水性聚合物地结合于表面,因此没有空间上的自由度,还存在与凝血酶结合受限的问题。

[0023] 如此,以往的人工血管没有达成兼具细胞亲和性和抗血栓性,特别是现在仍然没有临床中能够耐长期使用的小直径的人工血管。

[0024] 因此,本发明的目的在于,提供促进留置后的内膜形成、直至内膜形成为止期间可以维持抗血栓性的能够长期不闭合的人工血管。

[0025] 用于解决问题的方案

[0026] 本发明人等为了解决上述问题而进行深入研究,结果发现通过肝素以外的具有高分子链的抗凝血酶剂经由高分子链部分与超细纤维共价键合,可以在保持由超细纤维形成的微细结构的状态下赋予抗抗血栓性,即可以实现兼具细胞亲和性和抗血栓性。

[0027] 即,本发明提供以下的(1)～(12)的人工血管。

[0028] (1) 人工血管,其为在含有超细纤维的纤维层的内侧具备包含纤维直径为10nm以上且3μm以下的超细纤维的超细纤维层的筒状织物,肝素以外的具有高分子链的抗凝血酶剂经由前述高分子链与前述超细纤维共价键合,37℃时的纤维表面的凝血酶活性抑制比率为60%以上。

[0029] (2) 根据(1)所述的人工血管,其中,上述抗凝血酶剂的分子量为3000以下。

[0030] (3) 根据(1)或(2)所述的人工血管,其中,120mmHg时的透水性能为100mL/cm^2/min以上且不足4000mL/cm^2/min。

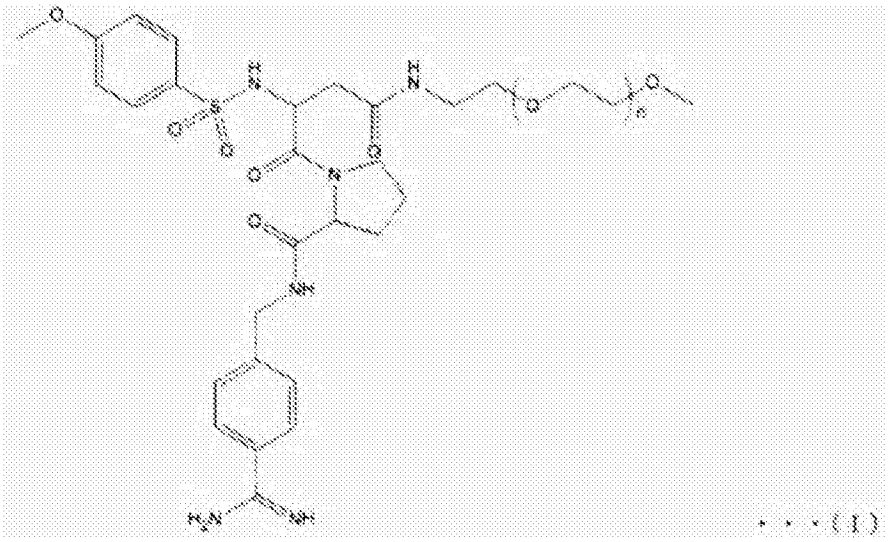
[0031] (4) 根据(1)～(3)中任一项所述的人工血管，其中，37℃的条件下、每1g该人工血管在10mL的生理盐水抽提24小时后的抽提液中的凝血酶活性抑制比率为不足5%。

[0032] (5) 根据(1)～(4)中任一项所述的人工血管，其中，上述抗凝血酶剂具有胍基(guanidino)、胍基(guanido)或脒基。

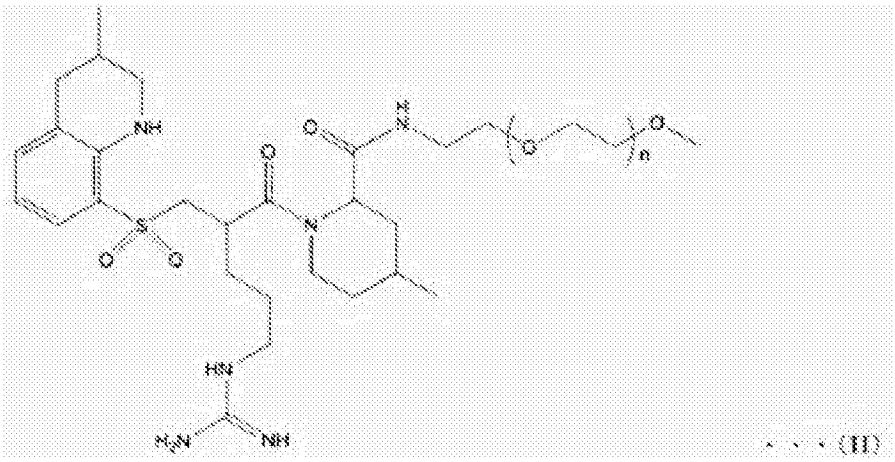
[0033] (6) 根据(1)～(5)中任一项所述的人工血管，其中，上述高分子链选自包含聚亚烷基二醇、聚乙烯醇或聚乙烯基吡咯烷酮的高分子结构。

[0034] (7) 根据(1)～(6)中任一项所述的人工血管，其中，上述抗凝血酶剂选自下述化学式(I)～(IV)，

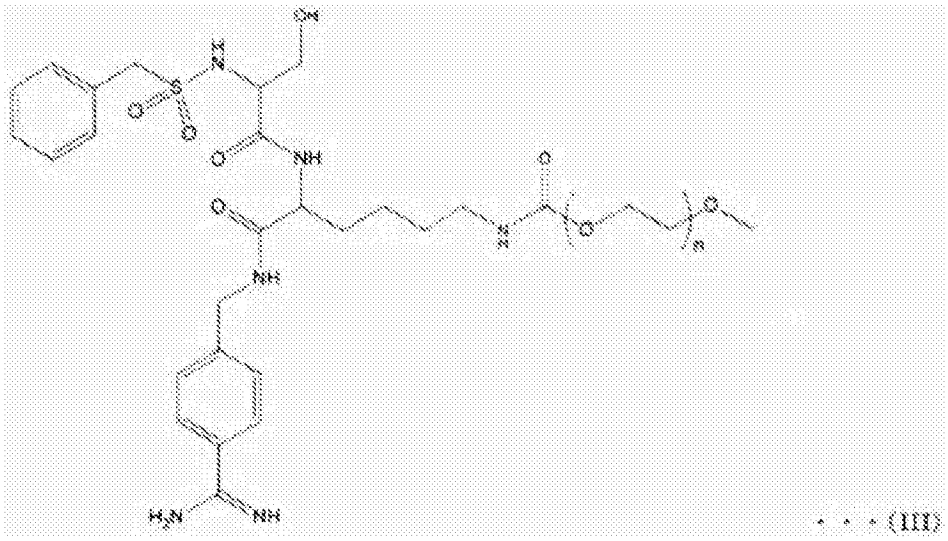
[0035] [化1]

[0036] 

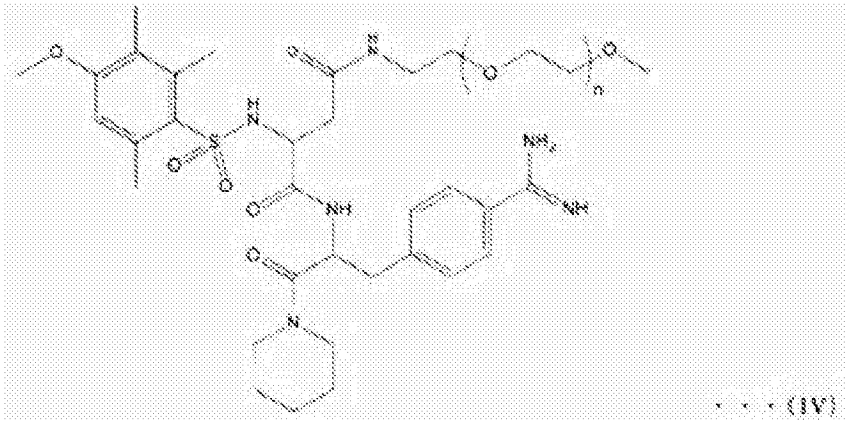
[0037] [化2]

[0038] 

[0039] [化3]

[0040] 

[0041] [化4]

[0042] 

[0043] n为1～500的整数。

[0044] (8) 根据(1)～(7)中任一项所述的人工血管，其中，上述纤维层包含上述超细纤维、和总纤度为1～60分特的复丝。

[0045] (9) 根据(8)所述的人工血管，其中，构成上述复丝的单丝的纤度为0.5～10.0分特。

[0046] (10) 根据(1)～(9)中任一项所述的人工血管，其中，血小板附着率不足20%。

[0047] (11) 根据(1)～(10)中任一项所述的人工血管，其中，上述筒状织物包含聚酯纤维。

[0048] (12) 根据(1)～(11)中任一项所述的人工血管，其中，上述筒状织物的内径为1mm以上且不足10mm。

[0049] 发明的效果

[0050] 根据本发明，可以提供促进留置后的内膜形成、直至内膜形成为止期间可以维持抗血栓性的能够长期不闭合的人工血管。

附图说明

[0051] 图1为表示本发明的人工血管的纤维结构的示意图。

具体实施方式

[0052] 本发明中所称的超细纤维指的是纤维直径为10nm以上且3μm以下的纤维。使用了超细纤维的人工血管，由于纤维超细而具有下述特征：适于生物体细胞附着的立足点数显著增大，细胞浸润也优异，不仅内膜形成极其早期且良好地进行，而且血液的漏出也显著低等。

[0053] 仅超细纤维的情况下，无法发挥能够追随于血压、组织的活动的强度，因此本发明的人工血管的纤维结构，如图1所示，形成具备在通过由粗的纤维构成的粗的织圈、编圈等形成的基本组织的空隙分散有超细纤维1的纤维层2、和纤维层2的内侧的包含超细纤维1的超细纤维层3的纤维结构。本发明的人工血管通过使该纤维结构为筒状来形成。

[0054] 作为形成在利用粗的织圈、编圈等形成的基本组织的空隙分散有超细纤维的纤维结构的制法，可以采用通常的超细纤维的制法，优选使用适于基本组织的强度的尺寸的纤维的同时，使用具有海岛结构等的多成分系纤维，加工为织物、编物、线带、无纺布等后，使用碱等将多成分系纤维内的一部分纤维的海结构溶解，由此进行超细化处理，制作基布中的超细纤维和超细纤维层。

[0055] 进而，进行超细化处理后，通过喷水、喷空气等，在基本组织交织超细纤维，由此达成对于细胞而言优选的间隙结构。另外，作为更有效地发挥细胞亲和性的手段，例如通过用锉棒摩擦血液接触面而使其起毛的方法，可以在血液接触面进一步形成超细纤维层。

[0056] 作为纤维原材料，若为具有生物适应性的聚合物则没有特别限定。例如可以使用聚酯、聚乙烯、聚四氟乙烯、聚氨酯、聚酰胺、尼龙等。这些纤维原材料中，从迄今作为人工血管的原材料在临床使用、强度优异的观点考虑，优选为聚酯，特别优选为聚对苯二甲酸乙二醇酯。

[0057] 作为纤维的形态，可以为纺织纱、复丝纱、单丝纱、撕裂薄膜纱等任何形态，但是从强度、物性的均匀性和柔软性方面考虑，复丝纱是优异的。另外，可以为无捻纱，但是也可以为加捻纱。还可以实施某程度的卷曲加工。

[0058] 纤维的总纤度优选为1～60分特(Dtex)，更优选为1～40分特。总纤度的下限更优选为5分特以上，最优选为10分特以上。总纤度的上限更优选为35分特以下，最优选为25分特以下。若为1分特以上则可以维持基布所需要的强度，若为40分特以下则可以降低基布的厚度。

[0059] 纤维的单丝纤度优选为0.5～10分特(Dtex)，更优选为0.5～3.0分特。单丝纤度的下限更优选为1分特以上，单丝纤度的上限更优选为2分特以下。若为3分特以上则柔软性受损，若为0.5分特以下则水解速度快，产生强度劣化的问题。

[0060] 另外，对于形成人工血管的筒状织物而言，布帛的形态从尺寸稳定性和强度优异的观点考虑，使用织物。

[0061] 另外，为了扩大固定化于纤维表面的抗凝血酶剂的量，在上述布帛的一部分配置超细单丝纤度复丝纱是有效的，该超细单丝纤度复丝纱的单丝纤维直径优选为10nm～20μm，更优选为10nm～3μm，最优选为0.8～1.2μm。

[0062] 人工血管的纤维层和超细纤维层中的纤维间隙的尺寸和量，可以将120mmHg的压力下的透水性作为指标来表示，优选为100mL/cm^2/min以上且4000mL/cm^2/min以下。为了在

人工血管的血液接触面形成含有稳定的血管内皮细胞层的内膜，用于支承其的以血管平滑肌、成纤维细胞作为主体的细胞层是重要的，该细胞层中的细胞，与在血管表面上移动的血管内皮细胞一起，通过纤维间隙由吻合部侵入到内部。另外，血管内皮细胞不仅由吻合部浸润，而且也由从人工血管外壁通过纤维间隙侵入的毛细血管在人工血管内壁开通的部位浸润。

[0063] 由此，若纤维间隙为100mL/cm^2/min以上则容易产生通过细胞、毛细血管浸润到纤维层的内部而实现的内膜形成，所以优选。另外，若纤维间隙为4000mL/cm^2/min以下则细胞伪足容易到达纤维层的内部，从而堵塞间隙而防止漏血，所以优选。

[0064] 对本发明的人工血管的尺寸没有特别限定，但是对于内径为1mm以上且不足10mm的小直径的人工血管而言是最有效的。

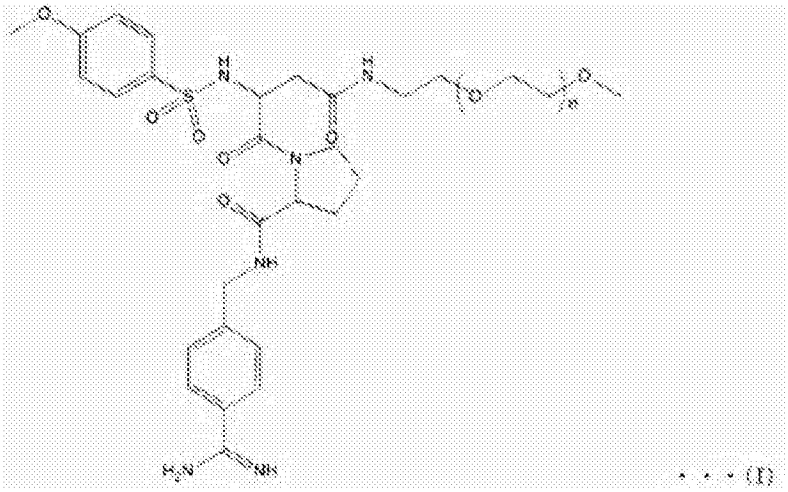
[0065] 本发明通过肝素以外的具有高分子链的抗凝血酶剂经由高分子链与构成基本组织的纤维和超细纤维的表面共价键合，来实现兼具细胞亲和性和抗血栓性。

[0066] 肝素以外的具有高分子链的抗凝血酶剂中，特别优选使用低分子量的抗凝血酶剂。具体而言，优选为分子量3000以下的抗凝血酶剂。

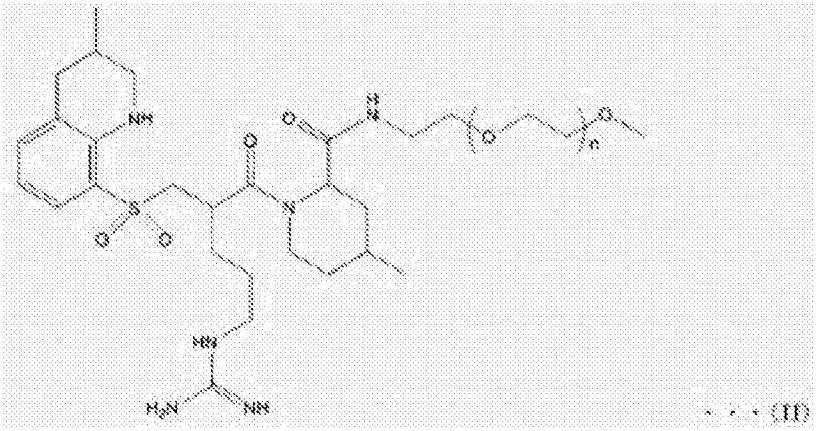
[0067] 作为抗凝血酶剂，通常已知的肝素为分子量大到30000～35000道尔顿的分子，因此可以固定化于表面的量受限。与肝素相比分子量小的低分子量肝素也在临床上使用，但是就连低分子肝素也为4000～6000的分子量，为合成抗凝血酶物质的分子量的约10倍。肝素与抗凝血酶III和凝血酶结合后才可以抑制凝血酶的活性，与抗凝血酶III和凝血酶的结合部位分别存在于分子内，因此这些结合位置以最合适的配置固定化于表面是极其难以控制的，也成为表面固定化的反应效率差的原因。另外，肝素的抗凝血酶活性其本身为合成抗凝血酶物质的十分之一左右，本来活性就低。进而已知对于肝素表现出过度的变态反应的肝素起因性血小板减少症的患者有很多，由于社会上、伦理上的理由，肝素并非可以完全自由使用。

[0068] 作为本发明中使用的具有高分子链的抗凝血酶活性物质，优选为具有胍基(guanidino)、胍基(guanido)或脒基的物质，更优选为选自下述通式的(I)～(IV)中的物质。

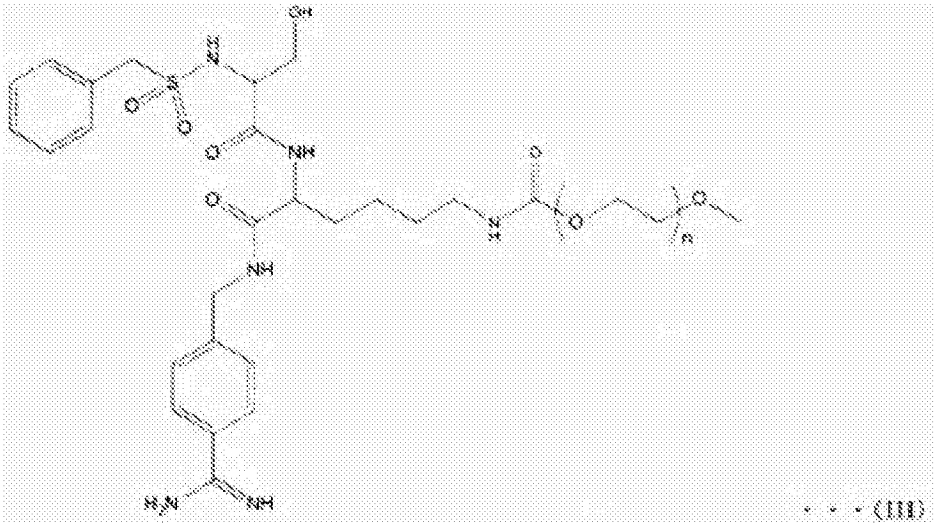
[0069] [化5]

[0070] 

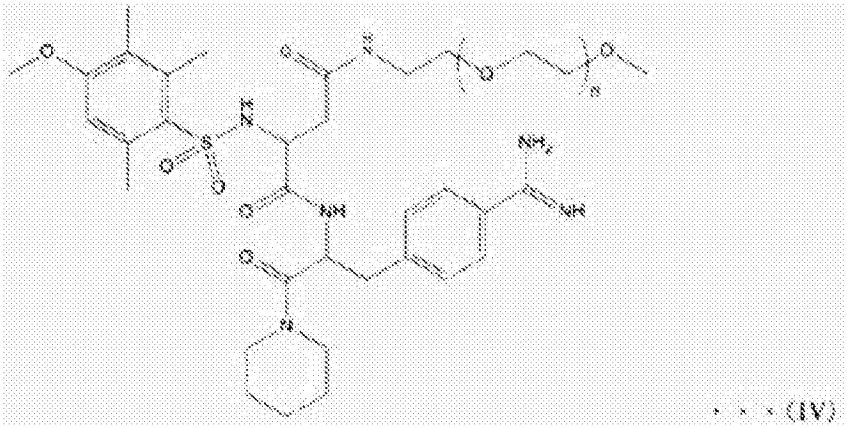
[0071] [化6]

[0072] 

[0073] [化7]

[0074] 

[0075] [化8]

[0076] 。

[0077] 这些具有高分子链的抗凝血酶剂由于经由高分子链末端的官能团通过共价键而固定化于纤维表面，因此不会溶出，可以在表面持续长期的效果。作为维持抗凝血酶活性的同时将抗凝血酶剂通过共价键而固定化于纤维表面的方法，最优选在与抗凝血酶剂的活性部位远离、例如夹着高分子链的部位导入用于固定化反应的反应性官能团形成衍生物，通过缩合反应、加成反应、接枝聚合反应等化学反应进行固定化。在使得抗凝血酶剂和纤维共存的状态下照射γ射线、电子束等高能量射线的方法，对纤维进行等离子体处理后与抗凝血酶剂接触的方法等，由于反应性高的自由基种使得活性部位失活、或者不能控制取向性

以使抗凝血酶剂可以发挥最大活性，因此不能使用。

[0078] 另外，固定抗凝血酶剂时，固定部位尽可能与活性部位远离，进而为了确保固定化后的自由度，优选为经由高分子链导入反应性官能团进行固定化的方法。另外，高分子链优选具有亲水性。对亲水性的高分子链的结构没有限定，但是为了特别是在亲水性的血液中发挥效力，优选选自包含聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、聚乙二醇/聚丙二醇共聚物(PEG-PPG)等聚亚烷基二醇、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)的高分子结构中。对亲水性的高分子链的聚合度n没有特别限定，但是若过高则亲水性变强、细胞粘附性降低，因此优选为1以上且500以下。

[0079] 对于本发明的人工血管所具有的抗血栓性和细胞亲和性，利用透水性、抽提液中的凝血酶活性抑制比率、纤维表面的凝血酶活性抑制比率、血小板附着率、细胞粘附率和血栓附着的测定示出。各自的测定方法如以下所示。

[0080] ＜透水性＞

[0081] 由人工血管随机取样两个部位，对于各样品利用下述方法测定两次，求出其相加平均。沿着轴向切开人工血管，制成1cm见方的样品片断。利用进行了直径0.5cm的冲裁的直径4cm的圈状衬垫两块，除了冲裁部分之外，夹着1cm见方的织物试样从而不会通液。将其容纳于圆形过滤过滤器用外壳。向该圆形过滤过滤器通液温度25℃的逆渗透膜过滤水2分钟以上直至样品片断充分含水为止。在温度25℃、过滤差压120mmHg的条件下，进行逆渗透膜过滤水的外压全过滤30秒，测定透过直径1cm的部分的水的透过量(mL)。透过量将小数第一位四舍五入来求出。将该透过量(mL)换算为单位时间(min)以及样品片断的单位有效面积(cm^2)的值，测定压力120mmHg下的透水性能。

[0082] 作为对于抗凝血酶剂固定化后的人工血管调查会产生多少抗凝血酶剂的溶出的方法，可以通过以下的方法测定抽提液中的凝血酶活性抑制比率。对于该抽提液中的凝血酶活性抑制比率而言，抽提液的37℃下的凝血酶活性抑制比率越低越好，优选不足5%，更优选不足1%。

[0083] ＜抽提液中的凝血酶活性抑制比率测定方法＞

[0084] 将人工血管在横截面方向切成圆片得到环状的样品，将该样品1g沿原来的血管的长轴方向每0.1g进行分割，分割为10个小片，相对于样品1g用10mL的生理盐水在37℃、24小时的条件下抽提。对于不含有样品的生理盐水和样品抽提液10μL，添加0.1U/mL凝血酶(Haematologic Technologies公司)水溶液0.5mL和200μM的S2238(积水メディカル社)水溶液0.5mL。37℃下静置45分钟后，用酶标仪(コロナ电气株式会社、MTP-300)测定405nm的吸光度，使用对硝基苯胺的波长316nm时的摩尔吸光系数($1.27\times10^4 mol^{-1}\cdot L\cdot cm^{-1}$)算出单位时间的S2238分解量、即分解速度。如以下的式1所示，不含有样品的生理盐水的分解速度设为100时，求出抽提液的分解速度的比率，算出37℃下的凝血酶活性抑制比率。使用该式1得到抽提液中的凝血酶活性抑制比率。

[0085] 凝血酶活性抑制比率(%)=(1-抽提液的分解速度/生理盐水的分解速度)×100 (式1)。

[0086] 对于抗凝血酶剂固定化后的人工血管，纤维表面的抗凝血酶能力，可以通过以下的纤维表面的凝血酶活性抑制比率的测定方法测定。对于该纤维表面的抗凝血酶活性抑制比率而言，凝血酶活性抑制比率越高越好，优选为60%以上，更优选为80%以上。

[0087] ＜纤维表面的凝血酶活性抑制比率测定方法＞

[0088] 将人工血管在横截面方向切成圆片得到环状的样品，将该样品1g沿原来的血管的长轴方向每0.1g进行分割，分割为10个小片，相对于样品1g添加0.1U/mL凝血酶(Haematologic Technologies公司)水溶液5mL和200μM的S2238(积水メディカル社)水溶液0.5mL。37℃下静置45分钟后，用酶标仪(コロナ电气株式会社、MTP-300)测定405nm的吸光度，使用对硝基苯胺的波长316nm时的摩尔吸光系数($1.27\times10^{4}mol^{-1}\cdot L\cdot cm^{-1}$)算出单位时间的S2238分解量、即分解速度。由该分解速度，如以下的式2所示，不含有样品的生理盐水的分解速度设为100时，求出纤维表面的分解速度的比率，算出37℃下的凝血酶活性抑制比率。使用该式2得到纤维表面的凝血酶活性抑制比率。

[0089] 凝血酶活性抑制比率(%)=(1-纤维表面的分解速度/生理盐水的分解速度)×100 (式2)。

[0090] 对于抗凝血酶剂固定化后的人工血管，纤维表面的血小板附着率，可以通过以下的纤维表面的血小板附着率测定方法测定。该纤维表面的血小板附着率越低越好，优选不足20%。

[0091] ＜纤维表面的血小板附着率测定方法＞

[0092] 沿着轴向切开人工血管，用冲裁冲头冲裁直径12mm的圆板样品。使得血液接触面朝上来将一块加入到细胞培养用的24孔微板(住友ベークライト社)的孔，由上方载置壁厚3mm的金属管状重物。以血小板数为每1孔10^{8}个左右的方式添加另外制备的多血小板血浆。37℃下静置2小时后，取出样品，用PBS(-)(ニッスイ社)冲洗后，如LDH Cytotoxicity Detection kit(LDH细胞毒性检测试剂盒)(タカラバイオ社)中记载的试验方案那样，测定破坏血小板生成的LDH的活性。由另外制成的标准曲线求出所附着的血小板数。如以下的式3所示，求出相对于与样品片断接触前的多血小板血浆的血小板数的接触后的血小板数的比率，作为血小板附着率。

[0093] 血小板附着率(%)=(接触后的血小板附着数/多血小板血浆的血小板数)×100 (式3)。

[0094] ＜细胞粘附性＞

[0095] 沿着轴向切开人工血管，用冲裁冲头冲裁直径12mm的圆板样品。将一块加入到细胞培养用的24孔微板(住友ベークライト社)的孔，由上方载置壁厚3mm的金属管状重物。以每1孔10^{6}个的方式添加悬浮于含有10%FCS的DMEM培养基的正常人脐带静脉内皮细胞(タカラバイオ社)。37℃下静置12小时后，取出样品，用PBS(-)(ニッスイ社)冲洗后，通过酶处理剥离细胞后，使用MTT检测试剂盒(フナコシ社)测定所剥离的细胞数。如以下的式4所示，求出相对于接种于样品的细胞数的所粘附的细胞数的比率，作为细胞粘附率。

[0096] 细胞粘附率(%)=(所粘附的细胞数/所接种的细胞数)×100 (式4)。

[0097] ＜血液循环中的血栓附着＞

[0098] 将人工血管切出长度4cm，与内径与人工血管相同的聚氯乙烯制管32cm连接。将以终浓度0.5IU/mL的方式添加有肝素的人新鲜血4.5mL导入到管内，立即关闭两端形成环(loop)。将其在预先调节于37℃的恒温恒湿干燥机内固定到粘贴于转子的框，所述转子的旋转速度调节于14rpm，旋转120分钟。取出环，切断聚氯乙烯制管，去除血液，用PBS(-)(ニッスイ社)冲洗后，对人工血管内的血栓形成的有无进行定量。试验以N=3进行。作为阴性对照，使用PBS(-)来替代人新鲜血，进行同样的试验。分别测定试验前和去除血液并进行冲洗后的4cm的人工血管的干燥重量，其差作为血栓重量，算出平均值和标准偏差。若试样的平

均值为阴性对照的(平均值+3×标准偏差)以上则判定为“+”、若不足则判定为“-”。循环中血液通过人工血管而漏出的情况下,无论量如何,都作为“漏出”停止试验。

实施例

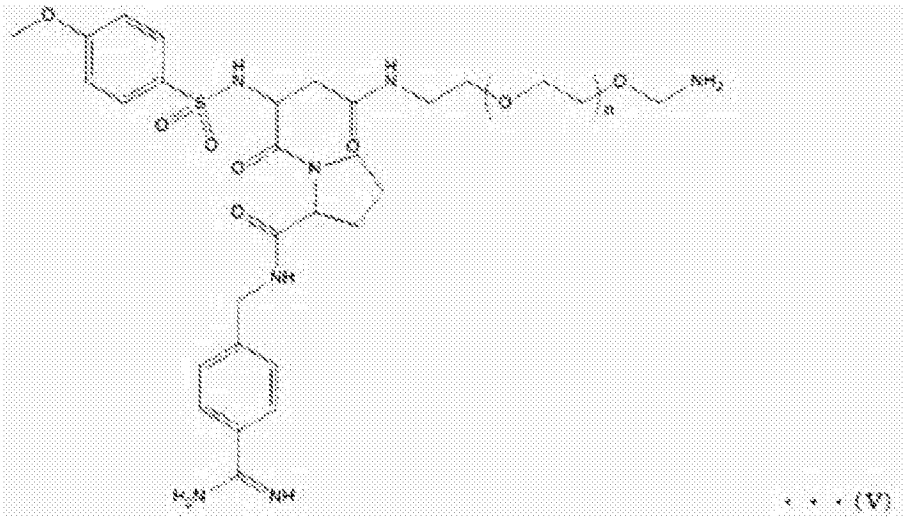
[0099] 以下对本发明的人工血管的具体实施例进行详细说明。

[0100] (实施例)

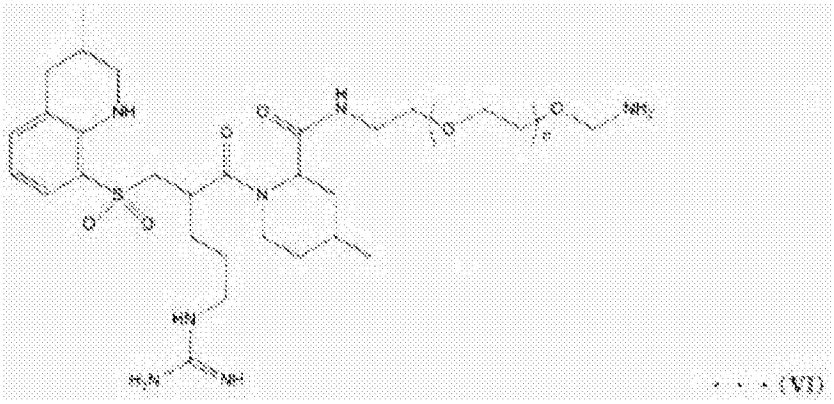
[0101] 经丝使用55Dtex-48f的聚对苯二甲酸乙二醇酯、纬丝使用245Dtex-40f的高分子排列体纤维,以平织组织制作筒状织物。此时使用的高分子排列体纤维,海成分为聚苯乙烯20份、岛成分为聚对苯二甲酸乙二醇酯80份、岛数为36/f。对于该筒状织物用80℃的氢氧化钠水溶液进行充分处理后,浸渍于甲苯中,接着用起毛机起毛,进一步进行喷水冲裁。

[0102] 对于上述处理后的筒状织物用0.5%氢氧化钠水溶液进行处理后,接着用5%高锰酸钾进行氧化处理。接着,在通式(I)～(IV)所具有的亲水性的高分子链部分的末端导入氨基而成的通式(V)～(VIII)化合物分别为1～50mg/mL溶液中浸渍筒状织物,在0.1%碳二亚胺的存在下进行缩合反应,利用生理盐水洗涤了的筒状织物作为用作人工血管的抗血栓筒状织物。

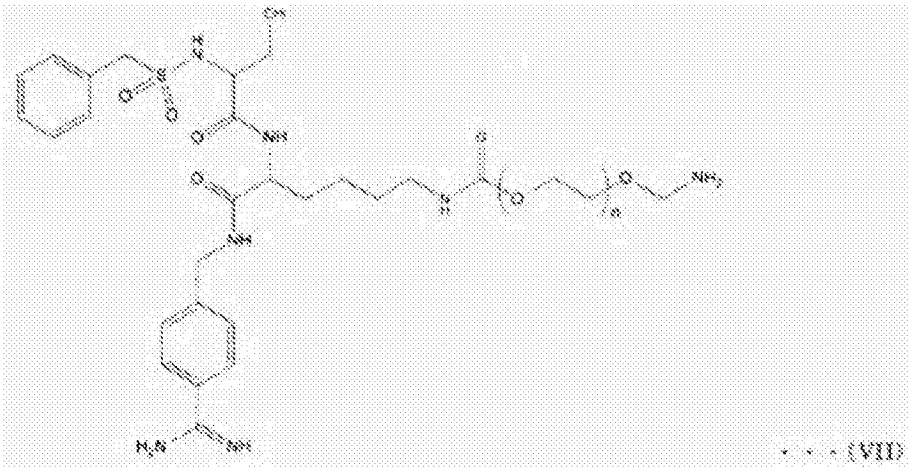
[0103] [化9]

[0104] 

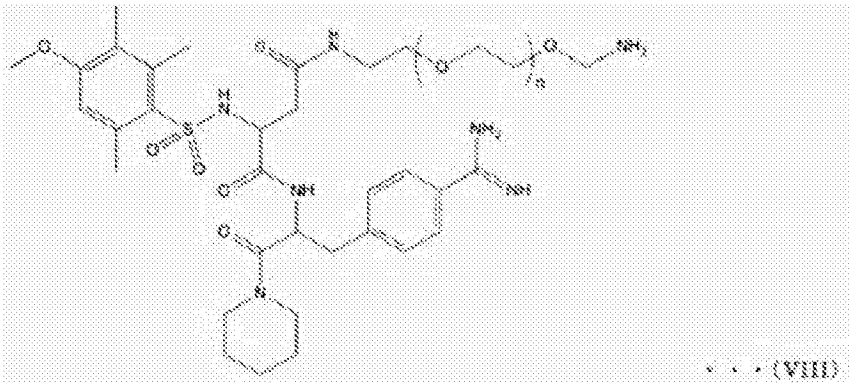
[0105] [化10]

[0106] 

[0107] [化11]

[0108] 

[0109] [化12]

[0110] 。

[0111] 各抗血栓筒状织物的透水性、抽提液中的凝血酶活性抑制比率、纤维表面的凝血酶活性抑制比率、血小板附着率、细胞粘附率和血栓附着的测定的性能评价结果如表1所示。

[0112] 在此，在通式(V)的抗凝血酶剂1mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例1、在通式(V)的抗凝血酶剂2mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例2、在通式(V)的抗凝血酶剂5mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例3、在通式(V)的抗凝血酶剂10mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例4、在通式(V)的抗凝血酶剂20mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例5、在通式(V)的抗凝血酶剂50mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例6、在通式(VI)的抗凝血酶剂50mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例7、在通式(VII)的抗凝血酶剂50mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例8、在通式(VIII)的抗凝血酶剂50mg/mL中处理了的抗血栓筒状织物作为实施例9。

[0113] (比较例)

[0114] 将与实施例1中得到的筒状织物相同的筒状织物分别浸渍于通式(I)～(IV)的抗凝血酶剂50mg/mL水溶液，在该状态下利用KOGA ISOTOPE进行5kGy γ射线照射。用Triton-X100和水洗涤，作为抗血栓筒状织物。

[0115] 在此，在通式(I)的抗凝血酶剂50mg/mL中进行了γ射线照射的抗血栓筒状织物作为比较例1、在通式(II)的抗凝血酶剂50mg/mL中进行了γ射线照射的抗血栓筒状织物作为比较例2、在通式(III)的抗凝血酶剂50mg/mL中进行了γ射线照射的抗血栓筒状织物作为比较例3、在通式(IV)的抗凝血酶剂50mg/mL中进行了γ射线照射的抗血栓筒状织物作为比较例4。各抗血栓筒状织物的透水性、抽提液中的凝血酶活性抑制比率、纤维表面的凝血酶

活性抑制比率、血小板附着率、细胞粘附率和血栓附着的测定的性能评价结果如表1所示。

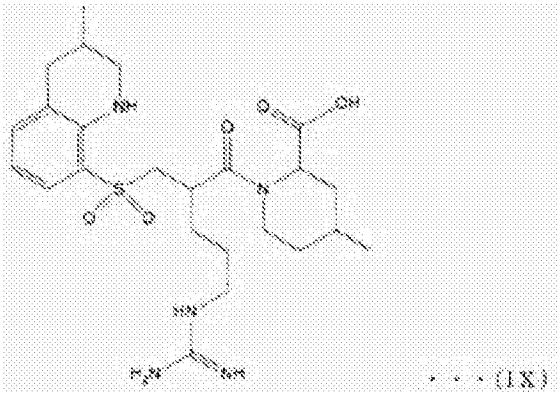
[0116] 经丝使用55Dtex-48f的聚对苯二甲酸乙二醇酯、纬丝使用245Dtex-40f的高分子排列体纤维，以高密度平织组织制作筒状织物。此时使用的高分子排列体纤维，海成分为聚苯乙烯20份、岛成分为聚对苯二甲酸乙二醇酯80份、岛数为36/f。对于该筒状织物用80℃的添加有NaOH的热水进行充分处理后，浸渍于甲苯中，接着用起毛机起毛，进一步进行喷水冲裁。浸渍于通式(I)的抗凝血酶剂50mg/mL的水溶液，在该状态下利用KOGA ISOTOPE进行5kGy γ射线照射。用Triton-X100和水洗涤，作为抗血栓筒状织物(比较例5)。抗血栓筒状织物的透水性、抽提液中的凝血酶活性抑制比率、纤维表面的凝血酶活性抑制比率、血小板附着率、细胞粘附率和血栓附着的测定的性能评价结果如表1所示。

[0117] 经丝使用55Dtex-48f的聚对苯二甲酸乙二醇酯、纬丝使用245Dtex-40f的高分子排列体纤维，以低密度平织组织制作筒状织物。此时使用的高分子排列体纤维，海成分为聚苯乙烯20份、岛成分为聚对苯二甲酸乙二醇酯80份、岛数为36/f。对于该筒状织物用80℃的添加有NaOH的热水进行充分处理后，浸渍于甲苯中，接着用起毛机起毛，进一步进行喷水冲裁。浸渍于通式(I)的抗凝血酶剂50mg/mL的水溶液，在该状态下利用KOGA ISOTOPE进行5kGy γ射线照射。用Triton-X100和水洗涤，作为抗血栓筒状织物(比较例6)。抗血栓筒状织物的透水性、抽提液中的凝血酶活性抑制比率、纤维表面的凝血酶活性抑制比率、血小板附着率、细胞粘附率和血栓附着的测定的性能评价结果如表1所示。

[0118] 经丝、纬丝都使用55Dtex-48f的聚对苯二甲酸乙二醇酯，以平织组织制作筒状织物。浸渍于通式(I)的抗凝血酶剂50mg/mL的水溶液，在该状态下利用KOGA ISOTOPE进行5kGy γ射线照射。用Triton-X100和水洗涤，作为抗血栓筒状织物(比较例7)。抗血栓筒状织物的透水性、抽提液中的凝血酶活性抑制比率、纤维表面的凝血酶活性抑制比率、血小板附着率、细胞粘附率和血栓附着的测定的性能评价结果如表1所示。

[0119] 向通式(IX)的化合物的二甲基甲酰胺溶液滴加4N盐酸/1,4-二噁烷(东洋化成社)进行反应，得到通式(IX)的盐酸盐。向该盐酸盐的二甲基甲酰胺溶液分别添加二环己基碳二亚胺和4-羟基苯并三唑，进而添加聚醚改性硅氧烷(X-22-3939A:信越シリコーン社)进行反应。将反应液加入到透析管(スペクトラポアRC ポア6 MWCO=1000)，在反应液的10倍体积的蒸馏水中进行透析。过滤透析后的反应液，去除滤液的溶剂，进行干燥得到亲水性高分子化合物。浸渍于所得到的亲水性高分子化合物50mg/mL的水溶液，在该状态下利用KOGA ISOTOPE进行5kGy γ射线照射。用Triton-X100和水洗涤，作为抗血栓筒状织物(比较例8)。抗血栓筒状织物的透水性、抽提液中的凝血酶活性抑制比率、纤维表面的凝血酶活性抑制比率、血小板附着率、细胞粘附率和血栓附着的测定的性能评价结果如表1所示。

[0120] [化13]

[0121] 

[0122] [表1]

[0123]

[表1]

样品				抗凝血酶剂	亲水性聚合物	透水性 ($mL/cm^2/min$)	抗凝血酶活性物质担持浓度 (mg/mL)	血浆中的凝血酶活性抑制比率 (%)	纤维表面的凝血酶活性抑制比率 (%)	血小板附着率 (%)	细胞附着率 (%)	血栓附着
实施例	1	PET纤维	超细纤维	V	PEG	130	1	0.3	68	4	94	—
	2	PET纤维	超细纤维	V	PEG	1430	2	0.3	73	6	88	—
	3	PET纤维	超细纤维	V	PEG	2330	5	0.2	77	3	87	—
	4	PET纤维	超细纤维	V	PEG	3420	10	0.5	84	8	92	—
	5	PET纤维	超细纤维	V	PEG	2190	20	0.1	89	2	93	—
	6	PET纤维	超细纤维	V	PEG	2080	50	0.2	90	5	91	—
	7	PET纤维	超细纤维	VI	PEG	2410	50	0.9	93	6	94	—
	8	PET纤维	超细纤维	VII	PEG	2250	50	1.2	90	1	89	—
	9	PET纤维	超细纤维	VIII	PEG	2150	50	0.5	87	4	90	—
比较例	1	PET纤维	超细纤维	I	—	3390	50	0.8	58	14	83	+
	2	PET纤维	超细纤维	II	—	2490	50	0.3	41	7	72	+
	3	PET纤维	超细纤维	III	—	2250	50	0.4	43	11	66	+
	4	PET纤维	超细纤维	IV	—	2730	50	0.3	38	10	61	+
	5	PET纤维	超细纤维	I	—	80	50	0.2	30	16	54	—
	6	PET纤维	超细纤维	I	—	4380	50	0.2	52	28	34	漏血
	7	PET纤维	—	I	—	4610	50	0.2	35	21	12	漏血
	8	PET纤维	超细纤维	I	—	2510	50	0.2	31	21	78	—

[0124] 如表1所示，抗凝血酶剂通过缩合反应进行固定的情况下，人工血管的纤维表面的抗凝血酶活性高，即使循环也没有形成血栓，与此相对，通过γ射线照射进行固定的情况下，表面抗凝血酶活性低、形成血栓。另外，若透水性过高则循环中漏血。进而没有间隔物进行固定化的情况下，也形成血栓。抗凝血酶剂通过缩合反应进行固定的情况下，抗凝血酶剂直至纤维的微细结构的深处为止地进行表面处理，血栓形成抑制效果高。

[0125] 产业上的可利用性

[0126] 本发明可以用作兼具抗血栓性和细胞亲和性、促进留置后的内膜形成、直至内膜形成为止期间维持抗血栓性、能够长期不闭合的人工血管。

[0127] 附图标记说明

[0128] 1 超细纤维、2 纤维层、3 超细纤维层。

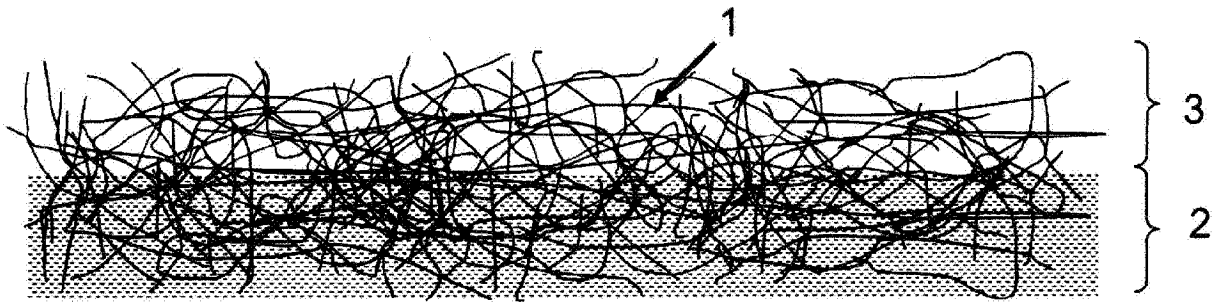


图 1