

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15416

研究課題名(和文)アテロコラーゲン素材の生体吸収性液状血管閉鎖栓の開発

研究課題名(英文)Development of bioabsorbable liquid blood vessel closure plug of atelocollagen material

研究代表者

稀代 雅彦(Kishiro, Masahiko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40317409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物実験施設改修工事のため大幅に研究計画を変更した。高研(株)から市販のアテロコラーゲンインプラントと造影剤を混和しアテロコラーゲン液状血管閉鎖栓を作製。37℃でゲル化、血管閉塞可能をin vitroで確認。動物実験ではウサギ計6匹に経カテーテル的に閉塞栓0.5mLを片側腎動脈内に注入し、ゲル化後の血管造影で塞栓を確認。外部飼育施設搬出後に再搬入し血管造影を施行。結果2匹は術後に死亡、死因は判明出来ず。28日後、49日後再搬入した計4匹は全て留置腎動脈の塞栓効果はみられなかった。閉塞栓と血管内皮の接着性不良および閉塞栓の血中溶解が要因と推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児循環器領域において体肺側副血管などの有害血管閉鎖術として、経皮的金属コイル塞栓術が行われている。しかし血管内金属コイル留置が生体へ及ぼす影響・長期的予後は不明である。また金属コイルは医療経済上の負担も大きい。この問題に対し医療用として実績のある天然素材atelocollagenを用いた血管閉塞用コイルの開発を試み、過去に動物実験において留置コラーゲンコイルが5年経過後には自己組織化、閉塞維持することを証明した。しかし更に理想的なatelocollagen液状血管閉鎖栓の開発を試みた。生体にも医療経済的にも優しいこのNew deviceの開発は、学術的にも社会的にもその意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The research plan was changed significantly due to the renovation work of the animal experiment facility. Atherocollagen implant commercially available from Koken Co., Ltd. was mixed with a contrast agent to prepare an atelocollagen liquid vessel closure plug. In vitro confirmed gelation at 37°C and possible vascular occlusion. In animal experiments, 0.5 mL of occlusion plug was injected into one renal artery via transcatheterization in 6 rabbits, and the embolism was confirmed by angiography after gelation. After carrying out to an external breeding facility, it is carried in again and angiography is performed. Results Two died after surgery, and the cause of death could not be determined. No embolization effect of the indwelling renal artery was observed in all of the four animals that were re-introduced after 28 days and 49 days. It was speculated that poor adhesion between the embolus and vascular endothelium and dissolution of the embolus in blood were the factors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体吸収性液状血管閉鎖栓 アテロコラーゲン 経皮的カテーテル治療 有害側副血管 New device 代替医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児循環器領域における体肺側副血管などの有害異常血管に対する血管閉鎖術には、従来の外科手術に代わり 1992 年頃より金属コイルによる非外科的な経皮的閉鎖術が行われるようになった。最近では Jackson detachable coil(Cook Cor,USA)や球状コイルなどが血管閉鎖栓として使用されている。しかしステンレスやプラチナを素材とする金属コイルが動脈内留置長期経過後に生体へ及ぼす影響や副反応に関しては明らかにされていない。対象が乳幼児であれば将来的な問題となり得る。またこれらの金属コイルは高額であり医療経済上の負担も大きい。

そこでこの問題に対して、これまで atelocollagen を素材とする血管閉塞用コイルの開発は可能であること (Ino T, Kishiro M, et al. Lancet,1996) 更にこのコラーゲンコイルによる動物実験を行い、コイル留置血管の組織学的変化を明らかにし(稀代,井埜,他,第 33 回日本小児循環器学会,1997) 留置 5 年経過後にはコラーゲンコイルの完全自己組織化を確認(稀代,金,他,第 39 回日本小児循環器学会,2003) 血管閉塞性の維持および腫瘍性病変発現なしの二点も明らかにしてきた(稀代雅彦,順天堂医学,2007)。理論上、どのような形状・太さの血管に対しても瞬時に形状変化し、かつ閉鎖栓として機能するのは、留置時に液状であり留置後に固形化する素材であることは明白である。そこでコラーゲンコイルより更に理想的な atelocollagen 素材の液状血管閉鎖栓の開発を立案した。

2. 研究の目的

循環器領域において体肺側副血管などの有害血管閉鎖術として、現在金属コイルを用いた経皮的コイル塞栓術が行われている。しかし血管外ではなく血管内への金属コイル留置が生体へ及ぼす影響・長期的予後については、明らかにされていない。この問題に対して、医療用として多分野で使用されている天然素材 atelocollagen を用いた血管閉塞用コイルの開発を試み、過去に動物実験において、血管内に留置したコラーゲンコイルは約 5 年の経過後には自己組織化し、閉塞性も維持できていることを証明した。しかしこのコラーゲンコイルよりも更に理想的な血管閉鎖栓の開発を目指し、atelocollagen 溶液を素材とする液状血管閉鎖栓の開発を立案した。本研究は、最終的に臨床応用できる生体にも医療経済的にも優しい New device の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アテロコラーゲン液状血管閉鎖栓の作製

現在市販されている 3%コラーゲン溶液に造影剤を混合し、注入時には液状で注入後に固形化し、かつ注入時に X 線に写る血管閉鎖栓を調整、作製する。

(2) 血管内注入・留置システムの考案・作製および改良

既存の先孔式バルーンカテーテルとマイクロカテーテルを用いたシステムを作製する。

(3) ウサギを用いた動物実験

生涯体重 3~5kg のウサギ 30 頭を対象とし、液状閉鎖栓を目標血管内へ留置。留置前後でコラーゲンナーゼ活性、Growth factor、炎症性サイトカインなどの血液学的解析を行う。また留置経過中に血管造影による評価を行い、予定期間経過後に順次解剖し、摘出血管の組織学的所見を実証する。

4. 研究成果

本研究は三段階の実施計画に基づく。第一段階はアテロコラーゲン液状血管閉鎖栓の作製、第二段階は血管内注入・留置システムの考案・作製および改良、第三段階はウサギを用いた動物実験である。H28 年度~H30 年度は当初第 3 段階に入り動物実験が終了している予定であったが、動物実験室ビル施設の改修工事が H29 年度末から着工され研究計画の変更を行った。3 年間の研究予定を 1 年間延長申請し、H31 年度までとなった。

in vitro の検討では、閉塞栓の開発・調整を行った。高研(株)より市販されているアテロコラーゲン素材製品であるアテロコラーゲンインプラントには 1%、2%、3%の製剤があり、各々粘張度も異なってくるため、エクステンションチューブで作成した疑似血管内で停滞性やゲル化までの時間などを検討した結果、基材として 3%の製品を用いることとした。

続いてアテロコラーゲンに造影効果を加えるため、混和物質の検討を繰り返し行った。非イオン性造影剤の添加により造影効果は得られるものの、粘性が低下し停滞性が不十分になることから、骨補填材として市販されているオスフェリオン(主成分：リン酸カルシウム)をさらに添加することとし、その用量比の検討を行った。造影効果を得ながら、停滞性及びゲル化が保たれる比率として 3%アテロコラーゲン：非イオン性造影剤：オスフェリオン=2ml:0.4ml:1.5g(粉末化)を同定し、X 線の非透過性とゲル化の有無を検討し、適した混合割合の液体状血管閉塞栓を作製した。続いて血管を想定したビニールチューブに液体状血管閉塞栓を注入し 37℃ の温度下でゲル化および血管閉塞ができることを確認した。

ヒトの新生児から乳児での適応が本実験の最終目的であるため、in vivo 検討においては 3-5kg

程度の JW ウサギを選択し動物実験を行った。しかし、実験開始後に自施設改修によりウサギの飼育が困難となったため、実験操作は自施設で行い、その後の飼育は外部飼育施設に委託する計画に変更した。それに伴い当初予算よりも飼育費が増大したためやむを得ず実験総数を計 6 匹に減数して検討を行うこととした。

動物実験はそれぞれ 1 匹ずつケタミン・キシラジンの筋肉注射で全身麻酔を行った上で、左右鼠径部いずれかの総腸骨動脈から 20G サーフローで穿刺を行い 5Fr のシースを挿入した。そこからガイドワイヤーを先行させ先孔タイプの 5Fr バルーンアンギオカテーテルを左右いずれかの腎動脈にすすめたのち、バルーンを拡張し血流を遮断した。次にカテーテルより閉塞栓を 0.5ml 程度注入し、ヘパリン化生理食塩水で後押しを行い、カテーテル先端より閉塞栓が腎動脈に充填されるのを透視下で確認した。その状態で 15 分程度静置しゲル化を待った後に慎重にカテーテルを腎動脈から腹大動脈まで引き抜き、再度中枢側にすすめ横隔膜レベルで腹大動脈血管造影を施行した。塞栓したサイドの腎臓は造影されず、健側腎は造影されることで塞栓完了と判断した。カテーテル、シースを抜去し、圧迫止血を 10 分間施したのち、麻酔から覚醒するのを確認し外部飼育施設に搬送した。この操作を 2 匹ずつ 3 回に分けて施行し、外部飼育施設での飼育の後、それぞれ 14 日後、28 日後、49 日後に自施設に再搬入を行い、再度同様の方法で麻酔、血管確保を行った後、腹大動脈の横隔膜レベルで血管造影を施行し、塞栓効果の持続や造影効果を確認した。

2020 年 1 月 30 日に塞栓処置を施行した 2 匹をそれぞれ rab-1、rab-2 と識別、同様に 2020 年 2 月 6 日の 2 匹は rab-3、rab-4、2020 年 2 月 20 日の 2 匹は rab-5、rab-6 と識別した。rab-1 は 3.58kg のメスで、右鼠径からの穿刺が困難であったため左鼠径から穿刺を行い右腎動脈を塞栓した。rab-2 は 3.69kg のメスで、右鼠径からの穿刺が困難であったため左鼠径から穿刺を行い右腎動脈を塞栓した。rab-3 は 3.54kg のメスで右鼠径から穿刺し右腎動脈を塞栓した。rab-4 は 3.54kg のメスで右鼠径から穿刺し右腎動脈を塞栓した。rab-5 は 3.42kg のメスで右鼠径からの穿刺が困難であったため左鼠径から穿刺を行い右腎動脈を塞栓した。rab-6 は 3.42kg のメスで右鼠径から穿刺し左腎動脈を塞栓した。rab-5 と rab-6 は外部飼育施設で 14 日間の飼育の後再造影の予定であったが、rab-5 は外部飼育施設にて術後 1 日目に、rab-6 は術後 4 日目に死亡が確認された。外部のため死因の検証はできなかった。rab-3 と rab-4 は 28 日後に再搬入し塞栓効果の確認を行った。rab-3 の再造影は右鼠径からアプローチを行ない横隔膜レベルの腹大動脈より血管造影を行ったが、両側腎臓が造影され右腎動脈の塞栓効果の維持は認められず、閉塞栓自体も造影されなかった。rab-4 は左鼠径からアプローチを行ない横隔膜レベルの腹大動脈より血管造影を行ったが、両側腎臓が造影され右腎動脈の塞栓効果の維持は認められず、閉塞栓自体も造影されなかった。ともに処置後ソムノベンチルの血管内投与で安楽死を行った。rab-1 と rab-2 は 49 日後に再搬入し塞栓効果の確認を行った。rab-1 の再造影は左鼠径からアプローチを行ない横隔膜レベルの腹大動脈より血管造影を行ったが、両側腎臓が造影され右腎動脈の塞栓効果の維持は認められず、閉塞栓自体も造影されなかった。rab-2 は左鼠径からアプローチを行ない横隔膜レベルの腹大動脈より血管造影を行ったが、両側腎臓が造影され右腎動脈の塞栓効果の維持は認められず、閉塞栓自体も造影されなかった。ともに処置後ソムノベンチルの血管内投与で安楽死を行った。

計 6 匹の *in vivo* 実験を行った。うち 2 匹は再造影を行えず考察を勘案することはできなかったが、残りの 4 匹については、いずれも閉塞栓注入直後は塞栓効果が認められたが、28 日後、49 日後の再造影時においては塞栓効果が維持されている個体は認めなかった。要因として閉塞栓と血管内皮の接着性の検討が不十分であったこと、および閉塞栓が時間経過とともに徐々に血中に溶解されてしまった可能性が推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----