

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19842

研究課題名(和文) 新薬剤溶出型バイオカバードステントの開発

研究課題名(英文) Development of drug eluting bio-covered stent

研究代表者

市橋 成夫 (SHIGEO, ICHIHASHI)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：60597102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤溶出ステント留置後に問題となりうるステント血栓症を抑制すべく、内皮細胞を貼り付けた薬剤溶出バイオカバードステントの開発を行った。2頭のビーグル犬の大腿静脈の一部を採取し、内皮細胞を分離培養した。ステントはZilver PTX(COOK Japan) 6mm径を使用した。フィブリンゲルをステント周囲に行き渡らせ、内皮細胞付着の素地とした。1ml 当たり 4×10^6 個の内皮細胞を含有した溶液をステント内に注入し、内皮細胞を接着させた。同ステントをビーグル犬の頸静脈留置した。1ヶ月後の血管造影では2頭のビーグル犬共に、頸静脈に留置された薬剤溶出型バイオカバードステントは閉塞していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会が到来し、低侵襲治療である血管内治療が広く普及している。ステント治療成績を改善するために薬剤溶出ステントが開発されたが、溶出する薬剤によって内皮細胞によるステントの被覆が妨げられ、ステント血栓症を惹起するリスクがある。内皮細胞を予め生着させた薬剤溶出ステントを開発することで、ステント血栓症の発生を抑制し、長期成績を改善させる目的で本研究が実施されたが、結果的には1ヶ月での血栓閉塞が認められた。内皮細胞生着の素地に用いたフィブリン膜の構造上の問題が大きいと考えているが、今後は違う素材の使用の検討を含め、改良の余地がある。

研究成果の概要(英文)：We have developed a drug-eluting bio-covered stent to prevent stent thrombosis, which can be a problem after drug-eluting stent placement. A part of femoral vein of two Beagle dogs was collected and endothelial cells were separately cultured. The stent used was Zilver PTX (COOK Japan, 6 mm diameter). Fibrin gel was injected around the stent to provide a substrate for endothelial cell attachment. A solution containing 4×10^6 endothelial cells per ml was injected into the stent to attach the endothelial cells. The stents were implanted in the jugular vein of the beagles. One month after angiography, both stents placed in the jugular vein were occluded due to thrombosis.

研究分野：放射線医学

キーワード：内皮細胞 ステント ステント血栓症

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化と高齢化社会の到来に伴い動脈硬化性疾患が急増し、下肢動脈の閉塞性動脈硬化症による間欠性跛行や重症下肢虚血に悩まされる患者は増加の一途である。画像下治療(Interventional Radiology; IVR)技術の進歩により、血管内治療が従来の外科的バイパス手術に置き換わって低侵襲治療として第一選択となっている。我々は、これまでに下肢動脈疾患に対して金属ステントを導入し、治療成績の向上を図ってきたが、ステント留置後慢性期においてはステント内の内膜過形成による再狭窄が問題となってきた。近年、冠動脈同様に下肢動脈においても薬剤溶出ステント (Drug Eluting Stent: DES) が本邦に導入され、内膜過形成の主たる原因となる平滑筋細胞の増殖を抑制する事で、長期開存率の向上が報告された。しかし、薬剤として使用されているパクリタキセルが内皮細胞の増殖も同時に抑制するため、ステント留置後の内皮化が遅延し、かつステント金属の血管内露出による慢性期血栓症のリスクが問題とされている。DES 留置後のステント血栓症を防止し、ステント開存改善を目的として我々は DES 表面に内皮細胞を生着させたステント、新期薬剤溶出型バイオカバードステントの開発を行った。

2. 研究の目的

以下の2つに集約される。

- 1 新期薬剤溶出型バイオカバードステント : 血管内皮細胞層含有の生体膜を用いたバイオステントを作成し、組織学的にステント表面の内皮細胞層の確認を行う。
- 2 新規薬剤溶出型バイオステント留置後の生体内における変化の観察 : ビーグル犬の頸静脈に留置した新規薬剤溶出型バイオカバードステントの血管内皮化および内膜過形成の程度を、従来の DES と比較評価する。

3. 研究の方法

ビーグル犬の大腿静脈の一部を採取し、内皮細胞を分離培養する(当初は大動脈内皮細胞を採取して、作成したステントを頸動脈に留置する方針としていたが、動脈径が細く、内皮細胞の取得と頸動脈への留置に難渋したため、伸縮性のある静脈を使用することとした)。内皮細胞には培養液として EBM2 (Lonza)を使用する。内皮細胞は passage 4 まで培養する。ステントは Zilver PTX DES (COOK Japan) 6mm 径を使用する。フィブリンゲルをステント周囲に行き渡らせ(ステントのフィブリンゲルによる molding)、内皮細胞付着の素地とする。Fibrin の重合に 15 分間 待ち、その後内筒を取り外し、1ml 当たり 4×10^6 個の内皮細胞を含有した EBM-2 をステント内に注入、内皮細胞がステント内全周に均一に接着するように回転させながら 6 時間かけて内皮化を促す。漏斗状の筒を用いて、crimp しながら作製されたステントを 9F シース内に充填する。ビーグル犬の頸静脈を露出し、穿刺、小切開を前壁側に入れ、ステントを充填したシースを頸静脈上流側より挿入。先端を鈍的に研磨したシースの内筒にてステントをシース外に押し出して頸静脈中枢側(下流側)に留置する。対側の頸静脈も同様に露出し、6F シースを挿入し、6mm 径 Zilver PTX を留置する。留置 1 か月目に血管造影でステント開存の有無を再評価した後にステントを摘出し、免疫染色、走査型電子顕微鏡での膜の構成成分、血管内皮層の評価を行う。計 2 頭のビーグル犬で同実験を繰り返す。

4. 研究成果

ビーグル犬の大腿静脈内皮細胞の培養の確立を行った。ビーグル犬から大腿静脈を露出し、5cm ほど分離採取、培養した (図 1)。次にフィブリンゲルを DES 周囲に注入し、その内腔に内皮細胞を注入し生着させた(図 2)。

図1: ビーグル犬内皮細胞

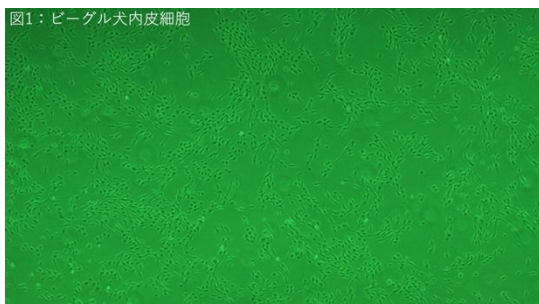


図2: フィブリンゲル膜付きのDES



上述の如く、ステントをシース内に充填し(図 3)、頸静脈にシースを挿入、ステントを頸静脈に留置した。留置後、血管造影では新期薬剤溶出型バイオカバードステントは良好に開存していた(図 4)。しかし1ヶ月後の血管造影では2頭のビーグル犬共に、左頸静脈に留置したコントロールの DES は開存していたが、右頸静脈の新期薬剤溶出型バイオカバードステントは閉塞していた(図 5)。病理組織学的所見ではバイオステントの内外に高度のリンパ球浸潤、炎症を認めた。特に外膜レベルで強い所見が認められた。平滑筋細胞に特異的な線維性内膜肥厚も認めた。

図3：ステント留置

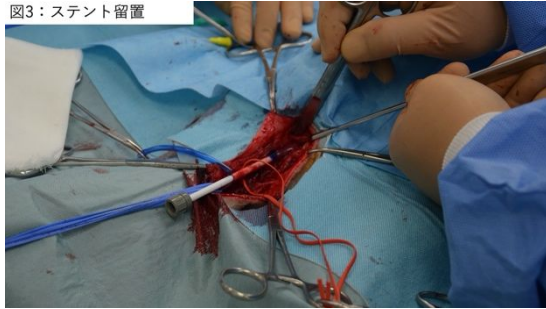
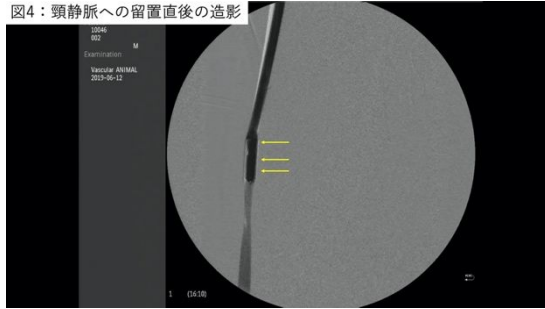
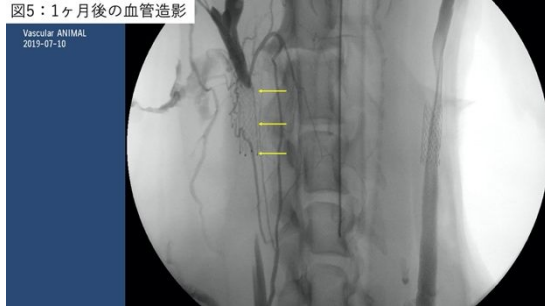


図4：頸静脈への留置直後の造影



薬剤溶出型バイオカバードステントの作成、埋め込みには成功したが、1ヶ月後には閉塞していた。病理組織上、強い炎症反応と内膜肥厚が認められ、コントロールの DES よりも炎症所見が強い結果だった。原因として、フィブリン膜が一定以上の厚みがあり、それにより乱流、炎症、血栓閉塞を惹起した可能性が考えられた。内皮細胞との親和性を持ちながら、薄く、かつ均質な膜の開発が必須と考えられた。また今回の動物実験では抗凝固、抗血小板療法を併用しなかったため、血栓症を惹起した可能性も否定はできない。

図5：1ヶ月後の血管造影



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichihashi S, Fernandez-Colino A, Wolf F, Rojas-Gonzalez DM, Kichikawa K, Jockenhoevel S, Schmitz-Rode T, Mela P.	4. 巻 25
2. 論文標題 Bio-Based Covered Stents: The Potential of Biologically Derived Membranes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Eng Part B Rev.	6. 最初と最後の頁 135-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEB.2018.0207.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----