

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560860

研究課題名(和文) プラズマ技術を用いた表面形状・薬剤徐放制御による大動脈ステントグラフト材料の開発

研究課題名(英文) Development of new aortic stent-graft materials by plasma technology that can control the surface morphology and the drug elution

研究代表者

長谷部 光泉 (HASEBE, Terumitsu)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20306799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：「ステントグラフト」は、致命的な結果を招く大動脈瘤に対し瘤内への血液を遮断する役割を果たす、血管内治療には重要な医療器具である。本研究では、この医療器具の課題であるエンドリーク(動脈瘤内への血液の再流入)を抑止する方法として、プラズマ技術により「表面形状制御」および「薬剤徐放制御」を融合させ、細胞の接着・増殖を制御できる新規材料の開発を目指した。本研究により、プラズマ処理によるポリマーの表面形状制御および薬剤徐放制御が血管内皮細胞の増殖に寄与すること示した。また、bFGFを含浸させたポリマー上にa-C:H膜をパターニングすることで血管内皮細胞が増殖することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Endovascular aneurysm repair (EVAR) using a stent-graft is designed to help prevent an aneurysm from bursting. Endoleaks are characterized by persistent blood flow within the aneurysm sac following EVAR. In this study, to inhibit the endoleak inflow, we controlled the surface morphology and the drug elution of graft material by plasma technology, and we developed new materials for a graft fabric that enhanced cell adhesion and proliferation. As the specific results, we revealed that (1) the control of the surface morphology and the drug emission contributed to the proliferation of endothelial cells and that (2) micro-patterned hydrogenated amorphous carbon (a-C:H) coating on the polymer impregnated with basic fibroblast growth factor (bFGF) improved the endothelial cells growth rate.

研究分野：工学

キーワード：新機能材料 非晶質炭素膜 リン脂質ポリマー マイクロパターニング 薬剤徐放 プラズマ技術 細胞接着制御

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症に起因する「腹部大動脈瘤」は、瘤の破裂による死亡率が 90%を超える致死性の高い病気であり、近年、血管系疾病の全国的な増加にともない、深刻な問題となっている。従来の治療法では、瘤の発生した血管を人工血管（グラフト）に置換するため、開胸を伴う大手術が必要であったが、近年、血管内治療（カテーテル手術）に基づく「ステントグラフト内挿術」による、経皮的なグラフト留置術が開発され、体に優しい治療法として広まってきている。

ステントグラフトとは、拡張力をもったメッシュ状の金属の筒（ステント）に人工血管（グラフト：ダクロンやPTFEなど）を縫い付けた血管内治療器具である。「ステントグラフト内挿術」では、折り畳んだステントグラフトを、細長く屈曲性のあるデリバリーシステムを用い、足の付け根の動脈から血管内に挿入し、患部に送り込む。患部でステントグラフトを拡張し、大動脈瘤を内側からカバーすることで、瘤と血流が遮断され、瘤の内部で血液が停滞・凝固し破裂を防ぐとともに、患部の血液の流れが正常化される。従来の外科的な方法に比べ、動脈へのわずかな切開のみで治療できるため、肉体的な負担が少ない画期的な方法であり、研究代表者も、臨床にて実施したステントグラフト内挿術により良好な成果を得ている。

しかし、有望な治療法であるステントグラフト内挿術であるが、ステントグラフトは未だ“機能的に”不完全であり、特に、留置後に発生する、血管壁とグラフトの隙間から瘤内への血液の漏れ（エンドリーク）が問題となっている。エンドリークは瘤の破裂を引き起こし死に至らしめる危険性があるため、早急な解決が不可欠である。エンドリークを抑制する方法としてグラフト材料表面への血管細胞の接着・増殖促進を目指す必要がある。

2. 研究の目的

本研究はエンドリークの解決を最終的な目標に据え、プラズマ技術によるグラフト表面形状制御および薬剤徐放システムの融合により、血管壁とグラフトの隙間の早期創傷治療が可能となる新規素材の開発を目的とする。

具体的には、薬剤を含浸したポリマー基材をプラズマ技術により生体適合性材料として注目されている非晶質炭素（a-C:H）薄膜を被覆し「ナノ・マイクロレベルでの表面形状」および「薬剤徐放特性」を制御することで血管内皮細胞の接着・増殖を制御するシステムを設計した（図 1）。薬剤含浸ポリマー上に血液適合性に優れ、細胞の静着も望まれる a-C:H 膜のマイクロパターンを行うことで、薬剤徐放による血管細胞の接着・増殖制御機能と細胞接着の足場となるマイクロパターン a-C:H 膜による血管内皮細胞適合性を併有したグラフトと血管壁の

隙間の封鎖および術後早期における患部創傷治療を目的とした新規素材の創製を目指す。徐放薬剤には創傷治療を促進させる細胞増殖因子を選定した。

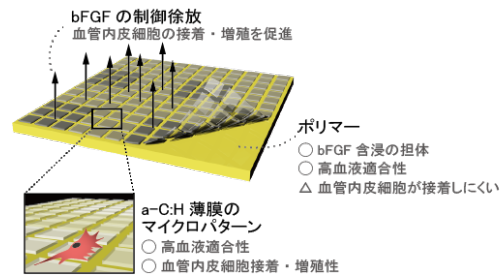


図 1 表面形状および徐放特性制御システム

3. 研究の方法

(1) プラズマ処理による表面形状制御および薬剤徐放制御が血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響評価

ポリマー表面へのプラズマ処理技術は、薬剤徐放制御および細胞接着・増殖促進に効果的な技術であり、材料の精緻かつ正確な制御が可能となっている。本研究では、生体適合性に優れたポリマーに薬剤を含浸させ、そのポリマー上に高周波プラズマ装置を用いてプラズマ処理を行ない、その後、リン酸緩衝生理食塩水中に浸漬し、薬剤徐放特性を評価した。具体的な方法は以下の通りである。

① 原料ガスに Ar, O₂, N₂を用いてプラズマ処理を行なった。また、プラズマ処理時間を 0, 5, 10, 15, 30, 45 s と変化させた。薬剤溶出挙動が原料ガスおよび処理時間に依ってどのように変化するかを評価した。

② プラズマ処理により a-C:H 膜を成膜した。このとき金属製メッシュを用いることで、ポリマー上に a-C:H 膜をマイクロパターンングし、成膜する面積を 0%, 35%, 100% と変化させた試料を作製した。成膜した a-C:H 膜の面積に応じて薬剤溶出挙動がどのように変化するかを評価した。

(2) ポリマーへ含浸させた塩基性繊維芽細胞増殖因子が血管内皮細胞の増殖性に及ぼす影響評価

細胞増殖因子は、特定の細胞に機能し、その増殖を促す蛋白質である。塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）は、新生血管増殖因子として注目されており、本研究では、材料表面の内皮化を促進する徐放薬剤として bFGF を選定し、内皮細胞増殖にあたる影響を評価した。具体的な方法は以下の通りである。

① 細胞増殖はマルチプレートに 20000 cell/ml で細胞を播種し、subconfluent になったところで bFGF を添加し、添加後 1, 3, 5 日目の増殖を CCK-8 Kit を用いて吸光度を測定した。

② 細胞遊走はメンブレン付きマルチプレートに 1000000 cell/ml で細胞を播種し、メン

ブレン下部に遊走した細胞を蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察し、画像解析ソフトで遊走した細胞の面積比として換算した。

③ bFGF 濃度 1, 10, 100 ng/ml で培養した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法で各濃度における eNOS の発現を評価した。

(3) bFGF 含浸ポリマー上マイクロパターンニング a-C:H 膜の内皮細胞増殖性評価

bFGF の含浸, a-C:H 膜のマイクロパターンニングが内皮細胞に与える影響を評価した。

生体適合性に優れているポリマーに bFGF を含浸させ、高周波プラズマ装置を用いて a-C:H 膜を成膜した。このとき金属製のメッシュを用いることで、ポリマー上に a-C:H 膜をマイクロパターンニングした。bFGF の含浸と a-C:H 膜マイクロパターンニングを行なった試料を bFGF 含浸ポリマー/a-C:H, bFGF の含浸のみを行なった試料を bFGF 含浸ポリマー, a-C:H 膜マイクロパターンニングのみを行なった試料をポリマー a-C:H と表記した。各試料に 2.0×10^4 cell/ml に調整した HUVECs を播種し、インキュベーター (37°C, 5%CO₂) 内で 24 時間培養した。培養 2, 6, 12, 24 時間目において試料に接着した細胞を 2.5%グルタルアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡で観察し、内皮細胞の接着面積比を測定した。

4. 研究成果

(1) プラズマ処理による表面形状制御および薬剤徐放制御が血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響評価

原料ガスおよびプラズマ処理時間を変えた試料ごとに薬剤溶出実験を行なった結果を図 2 に示す。各表面の薬剤徐放特性の時間依存性を示す本グラフより、プラズマ処理を行っていない試料からの薬剤溶出では初期に多くの薬剤が溶出してしまったことが示唆される。Ar, N₂ を原料ガスに用いた場合、プラズマ処理時間が長いほど溶出量が減少した。一方、O₂ を原料ガスに用いた場合、プラズマ処理時間 15 s 以下では未処理の試料と比較して薬剤溶出量が増加した。

次に、a-C:H 膜の成膜面積を変えた試料ごとに薬剤溶出実験を行なった結果を図 3 に示す。各表面の薬剤徐放特性の時間依存性を示す本グラフより、a-C:H 膜を 35%および 100%成膜した試料では、未処理のものに比べ薬剤溶出量が減少し、処理面積が増えるにしたがって溶出量が減少している。

以上の結果からプラズマ処理を行なうとともに処理時間や処理面積を変化させることで薬剤の溶出量を制御することに成功し、bFGF など内皮細胞を増殖させる薬剤を用いることで内皮細胞の接着・増殖の促進が期待できる。

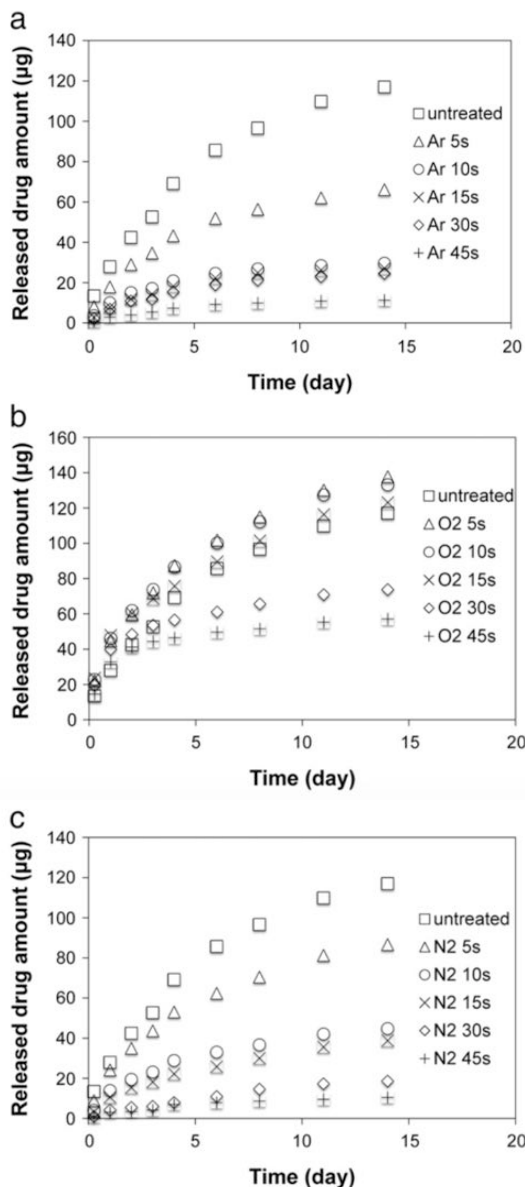


図 2 プラズマ処理による薬剤溶出量 (a) Ar プラズマ処理, (b) O₂ プラズマ処理, (c) N₂ プラズマ処理

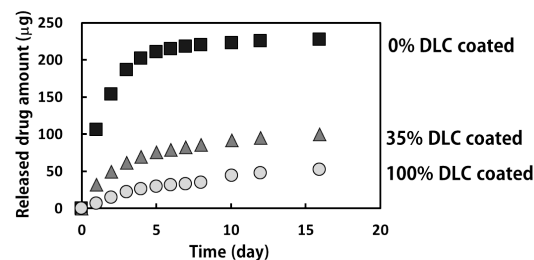


図 3 マイクロパターンニング a-C:H 膜による薬剤溶出量

(2) ポリマーへ含浸させた塩基性繊維芽細胞増殖因子が血管内皮細胞の増殖性に及ぼす影響評価

内皮細胞は bFGF 10 ng/ml をピークに濃度依存性に増殖および遊走を示した。平滑筋細胞は増殖および遊走を示すが、濃度による差はみられなかった (図 4)。また、血管拡張作用の指標として eNOS の発現をみた

ころ、bFGF 10 ng/ml で最も発現が高かった。これらより、bFGF は至適濃度 10 ng/ml で平滑筋細胞の過増殖なく、ステント内腔の内皮細胞の早期被覆に有用であると考えられる。

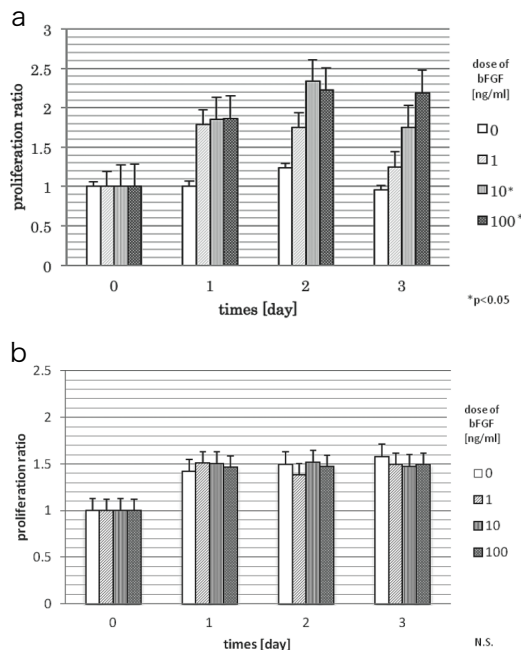


図4 bFGFの濃度による細胞増殖率
(a) HUVECs, (b) HASMCs

(3) bFGF 含浸ポリマー上マイクロパターニング a-C:H 膜の内皮細胞増殖性評価

24時間の培養実験において、bFGF 含浸ポリマー/a-C:H, ポリマー/a-C:H 各試料で内皮細胞は培養時間の経過に伴い増殖し、HUVEC に対する毒性は示されなかった。また、a-C:H 膜のマイクロパターニングに加え、生体適合性に優れたポリマーに bFGF を含浸させることで内皮細胞の増殖が促進することが明らかになった (図5)。一方、a-C:H 膜のマイクロパターニングを行わず bFGF の含浸のみを行なった試料では、24時間の培養時間において内皮細胞の接着が観察されなかった。

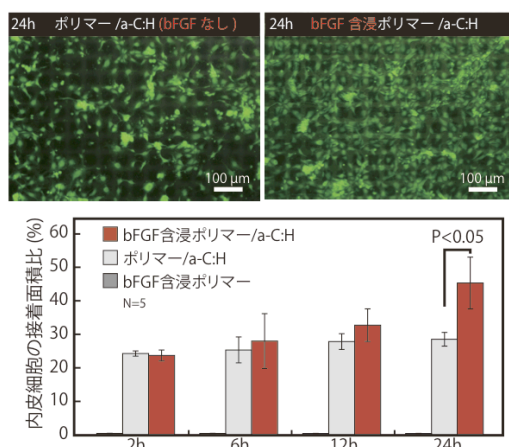


図5 内皮細胞適合性試験

以上の成果から bFGF を含浸させたポリマー上に a-C:H 膜をパターンニングすることで、血管内皮細胞の増殖が促進することを示しており、プラズマ技術によるグラフト表面形状制御および薬剤徐放システムの融合により、血管壁とグラフトの隙間の早期創傷治療が可能となると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Matsumoto T*, Endo J, Hashida K, Ichikawa H, Kojima S, Takashimizu S, Watanabe N, Yamagami T, Hasebe T* (* Matsumoto T and Hasebe T equally contributed to this work.): Balloon-occluded transarterial chemoembolization using a 1.8-French tip Coaxial microballoon catheter for hepatocellular carcinoma: Technical and safety considerations. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 24: 94-100, 2015. 査読有.
DOI: 10.3109/13645706.2014.951657
- ② Yamagami T, Yoshimatsu R, Kajiwara K, Ishikawa M, Matsumoto T, Kakizawa H, Toyoda N, Hasebe T, Awai K: Effectiveness of combined use of imprint cytological and histological examination in CT-guided tissue-core biopsy. *Eur Radiol* 24: 1127-1134, 2014. 査読有.
DOI: 10.1007/s-014-3104-2
- ③ Maeda T, Hagiwara K, Yoshida S, Hasebe T, Hotta A: Preparation and Characterization of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Polymer Nanofibers Prepared via Electrospinning for Biomedical Materials. *J Appl Polym Sci* 131: 40606, 2014. 査読有.
DOI: 10.1002/app.40606
- ④ Hasebe T*, Kitamura N*, Matsumoto T, Hotta A, Suzuki T, Yamagami T, Terada H (* Hasebe T and Kitamura N equally contributed to this work.): Basic fibroblast growth factor as a potential stent coating material inducing endothelial cell proliferation. *J Atheroscler Thromb* 21: 477-485, 2013. 査読有.
DOI: 10.5551/jat.20404
- ⑤ Hasebe T, Nagashima S, Kamijo A, Moon M, Kashiwagi Y, Hotta A, Lee K, Takahashi K, Yamagami T, Suzuki T: Hydrophobicity and non-thrombogenicity of nanoscale dual rough surface coated with

fluorine-incorporated diamond-like carbon films: Biomimetic surface for blood-contacting medical devices. *Diam Relat Mater* 38: 14-18, 2013. 査読有.

- DOI: 10.1016/j.diamond.2013.06.001
- ⑥ Yoshida S, Hagiwara K, Hasebe T, Hotta A: Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. *Surf Coat Technol* 233: 99-107, 2013. 査読有.
DOI: 10.1016/j.surfcoat.2013.02.042
- ⑦ Hagiwara K, Hasebe T, Hotta A: Effects of plasma treatments on the controlled drug release from poly(ethylene-co-vinyl acetate). *Surf Coat Technol* 216: 318-323, 2012. 査読有.
DOI: 10.1016/j.surfcoat.2012.11.064
- ⑧ Yoshimoto Y*, Hasebe T*, Takahashi K, Amari M, Nagashima S, Kamiyo A, Suzuki T (* Yoshimoto Y and Hasebe T equally contributed to this work.): Ultrastructural characterization of surface-induced platelet activation on artificial materials by transmission electron microscopy. *Microsc Res Tech* 76: 342-349, 2012. 査読有.
DOI: 10.1002/jemt.22172
- ⑨ Hasebe T*, Yoshimoto Y*, Nagashima S, Kamiyo A, Nakatani T, Yamagami T, Kitamura N, Kitagawa T, Hotta A, Takahashi K, Suzuki T (* Hasebe T and Yoshimoto Y equally contributed to this work.): Human umbilical vein endothelial cell interaction with fluorine-incorporated amorphous carbon films. *Jpn J Appl Phys* 51: 1-7, 2012. 査読有.
DOI: 10.1143/JJAP.51.090129

[学会発表] (計 18 件)

- ① 長谷部光泉, 松本知博, 中村挙子, 大花継頼, 堀田篤, 鈴木哲也: 炭素系材料が開く新世代医療器具の開発. ナノカーボンシンポジウム. 2015年2月20日. 東京大学伊藤国際学術研究センター, 東京.
- ② 長谷部光泉, 松本知博: 医工産学連携による血管内治療デバイスの開発の取り組み-From bench to bedside-. 第33回群馬IVR研究会. 2015年2月6日. 群馬大学医学部臨床中講堂, 群馬.
- ③ 長谷部光泉, 松本知博, 堀田篤, 鈴木哲也: 炭素系材料が開く新世代医療器具の開発. 第28回ダイヤモンドシンポジウム. 2014年11月19~21日. 東京電機大学東京千住キャンパス, 東京.

- ④ 長谷部光泉, 松本知博, 堀田篤, 鈴木哲也: 医工連携プロジェクトによる国内型血管内ステントの開発. 第17回日本栓子検出と治療学会. 2014年10月4~5日. 福岡大学病院福大メディカルホール, 福岡.
- ⑤ Kanazawa H, Hasebe T, Kitagawa T, Matsumoto T, Suzuki T: Hydrogen-free amorphous carbon film: Antibacterial and antithrombogenic biocompatible coating. International Conference on Diamond and Carbon Materials 2014. September 6-12, 2014. Madrid, Spain.
- ⑥ 長谷部光泉, 松本知博: 冠動脈ステントへのDLCコーティングについて-優れた生体適合性コーティング-. 第23回日本血管インターベンション治療学会学術集会. 2014年7月24~25日. 名古屋国際会議場, 愛知.
- ⑦ 尾藤健太, 長谷部光泉, 堀田篤: 早期内皮化促進性および抗血栓性を有するbFGF溶出性冠動脈ステントシステムの開発. 第37回日本バイオレオロジー学会年会. 2014年6月5~6日. 大宮ソニックシティビル, 埼玉.
- ⑧ Hasebe T, Kitagawa T, Nagashima S, Matsumoto T, Kitamura N, Hotta A, Suzuki T: Newly developed drug-eluting stent (DES) system for cardiovascular diseases. International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices (ALC) 2013. December 1-5, 2013. Hawaii, USA.
- ⑨ 前川駿人, 長谷部光泉, 北川智也, 鈴木哲也: 細胞接着性制御可能なマイクロパターンニングDLC-MPCポリマー複合材料: 薬剤徐放性血管内留置デバイスへの応用可能性. 第27回ダイヤモンドシンポジウム. 2013年11月20~22日. 日本工業大学学友館, 埼玉.
- ⑩ Kitagawa T, Hasebe T, Kitamura N, Nagashima S, Suzuki T: Newly developed drug-eluting stent system: Non-thrombogenic 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer combined with micro-patterned diamond-like carbon film as a scaffold for complete endothelial cells proliferation. International Conference on Diamond and Carbon Materials 2013. September 2-6, 2013. Riva Del Garda, Italy.
- ⑪ 長谷部光泉: 医工連携プロジェクトによるIVRリサーチ: 基礎研究から臨床研究へ. 栃木県放射線医会. 2013年7月6~7日. 那須赤十字病院, 栃木.
- ⑫ Yoshida S, Hasebe T, Suzuki T, Hotta A: Human umbilical vein endothelial cell interaction with phospholipid polymer nanofibers coated by micro-patterned

diamond-like carbon (DLC). APS March Meeting 2013. March 18-22, 2013. Baltimore, USA.

- ⑬ Yoshida S, Hasebe T, Suzuki T, Hotta A: Controlling the drug release rate from electrospun phospholipid polymer nanofibers with micro-patterned diamond-like carbon (DLC) coating. APS March Meeting 2013. March 18-22, 2013. Baltimore, USA.
- ⑭ Umemoto H, Hasebe T, Kasai R, Yoshimoto Y, Nagashima S, Hotta A, Suzuki T: Anti-bacterial property of hydrogen-free amorphous carbon coatings on Ar plasma-pretreated polytetrafluoroethylene (PTFE) with a-C:H:F interlayer. 2012 MRS Fall Meeting & Exhibit. November 25-30, 2012. Boston, USA.
- ⑮ 長谷部光泉: 医工連携プロジェクトによる次世代生体適合性血管内デバイスの開発. 第 53 回真空に関する連合講演会. 2012 年 11 月 14~16 日. 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 兵庫.
- ⑯ 長谷部光泉: 生体適合性に優れた国産 DLC コーティングステントとその臨床実績. 第 21 回日本心血管インターベンション治療学会・学術集会. 2012 年 7 月 13 日. 朱雀メッセ, 新潟.
- ⑰ Hagiwara K, Hasebe T, Asakawa R, Kamiyo A, Suzuki T, Hotta A: Controlling the drug release rate from biocompatible polymers by changing plasma-treated area. 39th ICMCTF (International Conference on Metallurgical Coatings and Thin Films). April 23-27, 2012. San Diego, USA.
- ⑱ Hagiwara K, Hasebe T, Suzuki T, Hotta A: Effects of argon plasma treatment on controlling the drug release rate from biocompatible polymers. 39th ICMCTF (International Conference on Metallurgical Coatings and Thin Films). April 23-27, 2012. San Diego, USA.

[図書] (計 1 件)

- ① Hotta A, Hasebe T (invited contrib): Diamond-Like Carbon Coated on Polymers for Biomedical Applications. Thin Films and Coatings in Biology, Biological medical physics, Biomedical Engineering Series. Nazarpour S (Ed.), Springer, USA, 2013, 58p.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷部 光泉 (HASEBE, Terumitsu)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 20306799

(2) 研究分担者

鈴木 哲也 (SUZUKI, Tetsuya)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 10286635

(3) 連携研究者

堀田 篤 (HOTTA, Atsushi)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 30407142