

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：32678

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26610193

研究課題名(和文) プラズマ照射細胞シートとステントの動脈硬化性疾患治療への応用

研究課題名(英文) The application of arteriosclerotic treatment by a plasma exposure cell seat and stento

研究代表者

森 晃 (MORI, AKIRA)

東京都市大学・工学部・教授

研究者番号：60219996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノチューブ(CNT)をコラーゲンスポンジに定着させ、ラット心筋細胞を増殖させると立体状細胞シートを作製することが可能であった。しかしながら、心筋梗塞ラットにおいて、この細胞シートを定着することには成功しなかった。その原因としては、モデルラットを再度開胸して細胞シートを定着する場合に2度目の開胸ではラットの負担が大きいことが示唆された。

ステントにCNTとコラーゲンスポンジにラット血管内皮細胞を増殖させた細胞シートを巻き付け増殖させた。この新型ステントを山羊左頸動脈から挿入して1か月後のステントの状態を観察すると血栓などの付着がなく生体適合性が認められた。

研究成果の概要(英文)：To make a cell seat like solid when I make a carbon nano tube (CNT) fixed in a collagen sponge, and makes them multiply rat myocardial cell. However, in a myocardial infarction rat, this cell seat, I didn't succeed to settle. Open chest did a model rat once again as its cause, and when settling, the thing which burdens a rat heavily suggested a cell seat by the 2nd time of open chest.

I wound the cell seat which made CNT and a collagen sponge multiply rat vascular endothelial cell in stent and made them multiply. There was no adhesion of a thrombus and biocompatibility was admitted to insert this new-style stent from a goat left neck artery and observe the state of stent one month later.

研究分野：プラズマ医学

キーワード：プラズマ 心筋梗塞 血流

1. 研究開始当初の背景

脳、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患は、梗塞組織再生や梗塞の原因となる狭窄血管部位を広げるステント留置法の再狭窄が本治療法の大きな問題となっている。これまでに考案された心筋梗塞組織再生の細胞シートの作製や生着の問題などで、心機能回復への確立された治療には至っていない。また、ステント留置法などはステント留置部位の再内皮化を永続的に阻害し遅発性の血栓形成リスクが高いことが明らかになっている。このように、梗塞組織再生や、傷害血管において再内皮化を促進させることがきわめて重要である。このことから、世界中で増加の一步をたどる脳、心血管病疾患に対する治療開発は急務である。

これを受け、プラズマ化学気相成長法(物質の薄膜を形成をする蒸着法)を用いたCNTの成長・配向及びプラズマ中のイオンを用いた表面改質による親水性化等の手法を組み合わせるにより、生体に適合した梗塞組織再生細胞シートや血管内皮再生型ステントが実現可能ではないかまた、立体状の細胞シート作成にコラーゲンスポンジも有効ではないかと考えた。

この研究の特色・独創的な点としては、心筋梗塞部位への細胞シートが連結し生着(移植)すること、また、血管狭窄部位において再内皮化促進が重要である。化学修飾化したCNTは、細胞を付着させるのではなくナノオーダーのCNT間に細胞が増殖し層を作ることに独創性があり、梗塞部再生や血管内膜増殖抑制が可能となれば脳、心機能回復が予想されるため大きな意義があると考えられた。

2. 研究の目的

脳、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患治療は、血栓溶解剤や血栓による狭窄血管部位を広げるステント留置法があるが、梗塞部の組織再生やステント再狭窄の問題などが重要な課題となっている。プラズマイオン照射により表面改質処理をしたカーボンナノチューブ(Carbon Nanotube、CNT)には通電性があり細胞間連結作用がある。そこで、脳、心筋梗塞部位再生にCNTを、立体状に細胞シートを作製するためにコラーゲンスポン

ジを足場にした細胞シートを開発して組織再生を行う。さらに、ステント留置後の再狭窄には、ステント表面にプラズマイオン照射により表面改質処理し血管内皮細胞を増殖させ、ステント内腔がより生理的な状態に近いステントを開発し、新しい治療としてのプラズマ医学を創出をすることが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

プラズマイオン照射による表面改質処理等の効果的複合により、新機能性を発現させたCNT上に心筋細胞を増殖させた細胞シートや血管内皮細胞を増殖させたステントの開発を行った。3年間の研究期間において始めに、細胞シートとステントの作製及び生体適合性の検証を行い、最終的に動物(ラット、山羊)に直接細胞シートとステントを挿入した場合の適合性と効果に対する総合的評価、分析を行った。

プラズマ化学気相成長法によるCNTの形成と共に、電極に直流バイアス電圧を印加しながらCNTの配向成長を促進させる。CNTの配向状態は、走査型電子顕微鏡(SEM)及び原子間力顕微鏡(AFM)で観察を行い、組成状態はラマン分光装置を用いて測定した。細胞定着度評価のために、FH精製タイプ、FHタイプ、APJタイプの三種類のCNTを使用した。FHとはFe触媒を使用し、不活性ガスにH₂を用いていることから双方の頭文字を取ったものである。APJタイプはArk Plasma Jet法の頭文字が由来で、この三種類のうちどのCNTが最も細胞培養に適しているのかの調査を行った。

CNT上に細胞との親和性を持たせるために、プラズマイオン照射による表面改質処理つまり“プラズマアクティベーション”を用いた官能基形成を行う。具体的には、酸素プラズマ中による酸素イオン照射を行い、CNT表面に生体適合に適している官能基(水酸基:OH、カルボキシル基:COOH)を形成させる。この場合、イオンエネルギー上昇によるCNTの変形及び破壊が考えられるので、照射エネルギーの最適値を明確にする。特に、O₂導入量、プラズマ発生用電源投入電力、イ

オン照射時間の変化に伴う COOH 基及び OH 基の形成量を X 線光電子分光 (XPS) を用いて計測した。

さらに、研究では抗原性の低いアテロコラーゲンをスポンジ状に加工したアテロコラーゲンスポンジを組織再生のための立体状細胞シート作製の足場材料として用いる。コラーゲンスポンジは力学強度が低く、生体内へと移植した際には組織圧により圧縮されることが予想され、再生組織の形状を維持するのが困難となること考えられた。そこで、上記の欠点を解決する手段の一つとして、作製した CNT とこのコラーゲンスポンジ及び心筋細胞や血管内皮細胞を培養して立体状の細胞シートを作成した。

CNT 定着コラーゲンスポンジ心筋細胞シート作成

温度応答性ポリマーを表面に固定した培養皿を使用するこの培養皿は器材表面が 32 度を境に可逆的に疎水性、親水性に変化する。温度を 20 度にして 30 分待ち、無傷な細胞がシート状に回収できる。この培用皿上に CNT とコラーゲンスポンジを添加して、細胞シートの定着状態を光学顕微鏡等により観察し評価を行った。

(チタン)-Ni (ニッケル)合金線(直径 0.15mm) をステント内径 2 ~ 3mm、長さ 20mm にダイヤモンドブレード編組し、ステントを作成

ステント上に CNT とコラーゲンスポンジを添加してステントと細胞シートの状態を光学顕微鏡等により観察し適合性評価を行った。

4. 研究成果

CNT の評価では、Fe 触媒を使用し、不活性ガスに H₂ を用いている FH 精製タイプが細胞増殖に適していた。(図 1 良好な細胞増殖)。そのために、FH 精製タイプ CNT を使用した。さらに、プラズマイオン照射により表面改質処理をした CNT には通電性による細胞間連結作用がある。また、円形の多孔質構造を持つコラーゲンスポンジは細胞培養において 3 次元(立体的)に細胞増殖する培養担体であり親水性が良いことが分かっ

た(図 2)。そのため、CNT をコラーゲンスポンジに定着させ、このスポンジにラット心筋細胞を増殖させ立体状に作製することが可能であった(図 3a、b)。実際の心筋梗塞モデルラットにおいてこの細胞シートの定着は成功しなかった。その原因としては、モデルラットを再度開胸して細胞シートを定着する場合に 2 度目の開胸ではラットの負担が大きすぎることが示唆された。

プラズマイオン照射により表面改質処理をしたステントを、CNT とコラーゲンスポンジさらに血管内皮細胞を増殖させ立体状にした細胞シートに巻き付けた。このようにして作製した新型ステントを山羊左頸動脈から挿入して 1 か月後のステントの状態を顕微鏡観察した。結果は、血栓などの付着がなかった。そこで、山羊左頸動脈を緩く結紮して狭窄部位を作成しステント挿入しても血栓付着は認められなかった。

プラズマイオン照射により表面改質処理をした CNT をコラーゲンスポンジに付着すると立体状の細胞シートを作製することが可能であったが、ラット心筋細胞を増殖させたシートでの治療効果を心筋梗塞モデルラットで検討すると、手術負荷が大きすぎ治療効果判定が不可能であった。新型ステント効果では、生体適合性は問題なく狭窄部位での有効な効果が期待できると考えられた。

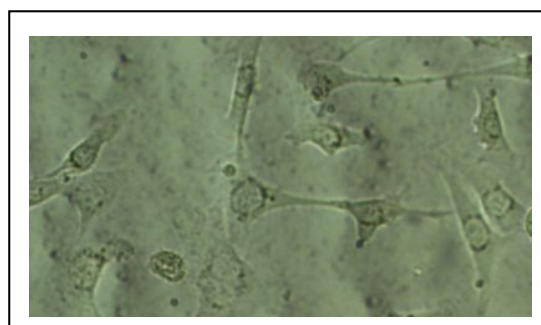


図 1 (FH 精製タイプ CNT に定着した細胞



図 2 コラーゲンスポンジ

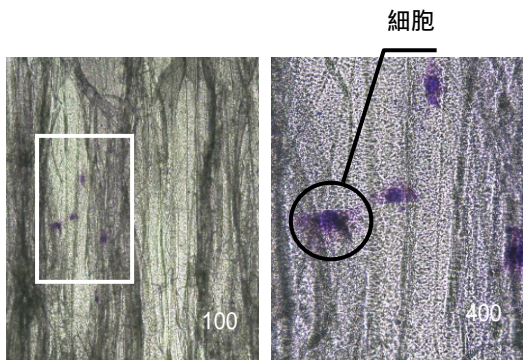


図3 : 左 コラーゲンスポンジの弱拡大斑点状が細胞とCNT、右: コラーゲンスポンジに定着した細胞とCNT強拡大

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

周産期医学におけるプラズマ医学の応用
(動物血流量と血管造影所見から) 森 晃
日本産科婦人科学会雑誌 2017 Vol.69
(accepted) 査読有

埋め込み型センサーの応用を目的としたカーボンナノチューブの生体適合性検討
小林千尋、横井由貴子、平田孝道
生体工学会雑誌 2014 Vol.52、113-119 査読有

Chihiro Tsutsui, Minjoo Lee, Genu Takahashi, Shigeru Murata, Takamichi Hirata, Takao Kanai and Akira Mori.

Treatment of cardiac disease by inhalation of atmospheric pressure plasma. Japanese J. of Applied Physics. Vol.53,060309 2014 査読有

〔学会発表〕(計3件)

森 晃 周産期医学におけるプラズマ医学の応用 日本産科婦人科学会総会 広島アリーナ(広島)4月12日2017

A. Yamanaka, S. Wakita, W. Hashimoto, C. Tsutsui, T. Hirata, A. Mori, M. Watada: "Influence on the Medium by the Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma Irradiation about the Cell Death", The 1st International Workshop on Nano-Carbon Materials and Plasma Life-Science, PJ10(9/10/2015) Kangon National University, Korea

Satoshi Wakita, Wataru Hashimoto, Atsuhiko Yamanaka, Hiroki Watanabe, Akira Mori, Masaya Watada, Takamichi Hirata, Chihiro Tsutsui: "Treatment of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy by Atmospheric Pressure Plasma Inhalation and Umbilical Cord Blood", The 1st International Workshop on Nano-Carbon Materials and Plasma Life-Science, PJ10 (9/10/2015) Kangon National University, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 晃(Mori Akia)
東京都市大学・工学部・教授
研究者番号: 60219996

(2) 研究分担者

平田 孝道(Hirata Takamichi)
東京都市大学・工学部・教授
研究者番号: 80260420

小林 千尋(Kobayashi Chihiro)
東京都市大学・工学部・講師
研究者番号: 00570699