

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06492

研究課題名(和文) 動脈瘤治療用細径カバードステントの開発：プラズマ技術による表面及び薬剤徐放制御

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) 3,800,000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し、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、ポリマーナノファイバー表面におけるプラズマ処理により、ナノファイバー表面の形状制御および薬剤徐放制御を実現した。またbFGFを含浸させたポリマーナノファイバー不織布上に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 can control 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 elution 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：構造・機能材料

キーワード：DLC ポリマー 薬剤徐放

1. 研究開始当初の背景

胸腹部末梢血管に発生する動脈瘤および動脈瘤破裂に伴う出血に対する治療は、救急現場においても非侵襲的で身体に優しい「カテーテル治療」による塞栓術が第一選択となってきた。塞栓術方法としては、動脈瘤内部を「金属コイル」にて詰める方法や動脈瘤の遠位部と近位部をコイルで塞栓し、動脈瘤を孤立させ血流を消失させる方法が一般的である。この場合、大きな動脈瘤塞栓術や複雑形状の動脈瘤では治療が数時間に及び、コイルのコストも多大であることや、コイルの末梢血管への逸脱、血管内腔の血栓性閉塞などの危険性が報告されている。

近年報告されている方法として、金属編み目状の筒(ステント)にカバーを巻いたカバードステントにより、血管内腔を保ちながらカバーにより動脈瘤部分への血流を消失させ、動脈瘤や出血を治療する方法が注目されているが、現状のデバイスはカバーが厚く、構造的な柔軟性の低さから蛇行血管や細径血管では病変部へのデバイスの導入が難しいことが課題であり、临床上で最良のデバイスは存在していない。更に導入が可能な場合でも、血管とデバイスの間隙からの血液漏れ(エンドリーク)が生じ動脈瘤が再び拡大してしまう問題や、カバー材質の血液適合性が不十分のため炎症や血栓が惹起され血管閉塞を生ずるなどの致命的な問題がある。

本研究では、以上の問題に対し、血液適合性(抗血栓性)をもつポリマー材料に、薬剤徐放性、細胞足場の付与により血管内皮細胞および線維芽細胞の早期接着・増殖を促し、抗血栓性を保持しながら血管壁との間で一体化しエンドリークを抑制する新規カバー素材開発を行った。

2. 研究の目的

1 点目は、エレクトロスピニング法において、リン脂質ポリマー(MPC polymer)溶液濃度が加工後に得られるMPC polymer ナノファイバー形状に与える影響の評価である。また、MPC polymer にポリウレタン(PU)を混合させたポリマー溶液を用いたエレクトロスピニング法も実施した。PU/MPC 溶液の濃度を広範囲で設定し、エレクトロスピニング法を用いてMPCを加工し、作製したMPCファイバーを用いたステントグラフトの作製も試みた。

2 点目は、ダイヤモンドライクカーボン(DLC)を用いたMPCファイバーからの薬剤徐放量の制御である。本研究では、エレクトロスピニング法でファイバー化したMPC上に被覆面積を変化させてDLCを成膜し、MPC polymer フィルムからの薬剤徐放量を制御できるかを試みた。マイクロパターンング

を施したDLCを成膜したMPC polymer上に線維芽細胞増殖因子(bFGF)を含有させ、MPC polymerからのbFGF徐放量を定量化、さらにはそのMPC上での細胞増殖量の定量化を行う。本研究では、MPC polymer内に含ませるbFGFの量を変化させてMPCファイバーからのbFGF徐放挙動を評価することを目的とした。細胞試験には血管内皮細胞を使用した。

3. 研究の方法

ファイバー化するポリマーには、細胞膜を擬似した構造を有し生体適合性に優れ医療用ポリマーとして用いられている2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)((株)日本油脂)を使用した。エレクトロスピニング法は個々のポリマーにおいてのファイバー化できる条件が異なり、さらにそのパラメータは印加電圧の大きさ、流れる電流の大きさ、ポリマー溶液の濃度、粘度、導電率、溶媒の蒸発速度、ポリマー分子量、針-基板間距離、針口径、溶液押し出し速度ときわめて多い。今回は、これらのパラメータの中でも影響力が大きいとされるポリマー溶液濃度を变化させたMPCをエタノールに溶かした溶液(1 wt% , 2 wt% , 3 wt% , 4 wt% , 5 wt% , 7.5 wt% , 10 wt%)を調整し、エレクトロスピニングに使用するMPC溶液を作製した。また、比較対象として平滑膜を作製する際には、スピンコーターを用いた。装置条件は、回転数 3000 rpm、使用時間 15 秒で、MPC 滴下量は 100 μ L である。エレクトロスピニングに用いる MPC 溶液濃度が、得られる MPC の形状に与える影響を観察するため、SEM を使用した。観察したサンプルは、1 wt% , 2 wt% , 3 wt% , 4 wt% , 5 wt% , 7.5 wt% , 10 wt% の MPC 溶液で作製したものである。

(1) MPC polymer の表面粗さ測定

ファイバー径を制御することで、ファイバー膜のナノ・マイクロオーダーの凹凸構造も制御できることを確認するため、AFM を用いて MPC ファイバー膜の算術平均粗さを測定した。また、ファイバー化したものと同様の材料である MPC を、スピンコーターで成膜した平滑膜も同様に測定し、物理的形狀の違いによる粗さの違いを比較した。

(2) MPC polymer の接触角測定

測定した試料は、MPC 溶液濃度を 5 wt% , 7.5 wt% , 10 wt% に調整してファイバー化したものである。各々の試料表面に脱イオン化した精製水を 5 μ L ずつ、接触角計を用いて静かに滴下した。また、ファイバー化したものと同様の材料である MPC を、溶媒キャスト法で成膜した

平滑膜も同様に測定し、物理的形狀の違いによる接触角の違いを比較した。精製水を滴下した後、接触角計内蔵のマイクロスコプを用いて試料表面上の液滴を側面から撮影することにより接触角を測定した。

(3) 薬剤含有 MPC ファイバー作製と薬剤徐放試験

MPC をエタノールに溶かした溶液 (5 wt% , 7.5 wt% , 10 wt%) を調整し、エレクトロスピンングに使用する MPC 溶液を作製した。また、薬剤を含ませる際は、薬剤を MPC 溶液に混合させて、エレクトロスピンングでファイバー化した。薬剤として、bFGF を使用した。bFGF は MPC 溶液 150 ml に対して 20 μ g となるよう混合した。作製したファイバー3種の基板をプラスチックシャーレに入れ、そこに溶媒 (リン酸緩衝溶液 (PBS), 以下分散媒とする) を 3 ml 入れ浸漬させ、37 °C の恒温槽中に静置した。浸漬後、24 時間ごとに分散媒を採取し、サンプル瓶に保管し、基板が入っているシャーレには新しい分散媒を同様に 3 ml 入れた。この作業を1週間繰り返し、吸光度を測定するサンプルを得た。

(4) 吸光度測定による薬剤徐放量の定量化
分散媒中の薬剤徐放量を、EILSA 法を用いて測定した。吸光度を測定し、420 nm に現れる波長のピークの大きさから薬剤徐放量を算出した。薬剤溶出の傾向を比較するためにグラフ化した。横軸には基板の浸漬日数、縦軸には累計薬剤徐放量を設定した。

(5) bFGF 含有 MPC ファイバー上での血管内皮細胞増殖試験

対数増殖期にある細胞を 5000 cells/well となるよう計算した。ウェル内に基板を設置し、滅菌処理を施した後、基板上で細胞を増殖させた。細胞懸濁液を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μ l ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で一定時間培養した。その後、CCK-8 溶液を各ウェルに 10 μ l ずつ添加した。CO₂ インキュベーター内で 1~4 時間呈色反応をおこなった。呈色反応が終了したら、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し、細胞増殖数を定量化した。また、この方法では基板に付着していない細胞数も影響するため、補足データとして、蛍光顕微鏡による細胞数や細胞状態を観察した。

4. 研究成果

(1) MPC polymer の表面粗さ測定
エレクトロスピンング法でポリマーを

紡糸する際、ポリマー溶液の濃度を変化させると、得られるポリマーの形状が変化する。一般的に、濃度が上がるにつれて、ビーズ状態、数珠状態、繊維状態へと変化していく。より低濃度の MPC 溶液で作製した場合、MPC もこのように形状が変化すると考えられる。そこで、MPC 溶液濃度を 1 wt% , 2 wt% , 3 wt% , 4 wt% と変化させてエレクトロスピンングを行い、SEM を用いて形状を観察した。その結果より、1 wt% では径が 500 nm 程度のビーズ状、2~4 wt% ではビーズとビーズが繊維で繋がった数珠状であることが確認できた。5 wt% , 7.5 wt% , 10 wt% の MPC 溶液で作製した場合、全てファイバー形状になることが再確認できた。また、5 wt% , 7.5 wt% , 10 wt% の MPC 溶液で作製したファイバーの径は、順に約 200 nm , 1 μ m , 2.5 μ m となった。MPC 溶液濃度が増加するにしたがい、MPC ファイバー径が増加することが確認された。エレクトロスピンングの条件パラメータとして、電圧と押し出し速度が知られているため、この2つのパラメータについて、得られる MPC ファイバーの形状への影響を評価した。5 wt% の MPC 溶液を用いて実験をおこなった。まず、押し出し速度について、0.1 ml/h で押し出したファイバーと、2.5 ml/h で押し出したファイバーを比較したが、特に大きな変化は見られなかった。エレクトロスピンング法でポリマーをファイバー化した場合、ポリマーの平滑膜に比べ、ファイバー膜は表面粗さの値が大きくなることが知られている。本研究では、MPC をファイバー化したのが、そのファイバー膜の表面粗さの値を知ることが、細胞増殖を促すステントグラフトを作製することにおいて、きわめて重要な意味をもってくる。生体材料の表面粗さが細胞に与える影響は、多くの研究報告で明らかになってきている。表面粗さは、創傷の治癒過程において、細胞接着、伸展、配列そして分化に影響を与える。骨芽細胞を例にとると、細胞接着においては粗面の方が平滑面に比べ接着率が高いことが報告されている。また、粗面のなかでもある値の表面粗さを持つものが、有意に接着細胞数が多かったことも報告されている。細胞伸展においては、粗面の溝に沿って細胞が走行したと報告されている。このように、材料の表面形状は、表面性状とともに、材料と生体との界面で起こる生体反応に大きな影響を与える。

ファイバー径が表面粗さに与える影響

を確認するため、AFM を用いて観察した。表面粗さの指標として、今回は算術平均粗さ Ra を選択した。算術平均粗さとは、粗さ曲線からその平均線の方向に基準長さ L だけを抜き取り、この抜き取り部分の粗さ曲線からその平均線の方向に基準長さ (L) だけ抜き取り、この抜き取り部分の平均線から測定曲線までの偏差の絶対値を合計し、平均した値をマイクロメートル (μm) で表したものをいう。5 wt%、7.5 wt%、10 wt% の MPC 溶液で作製したファイバー表面の算術平均粗さ Ra は、順に約 350 nm、500 nm、1 μm となった。濃度が増加するにしたがいファイバー膜の表面粗さが増加することが確認された。

- (2) MPC polymer の接触角測定
生体材料と血液との界面における生体適合性および抗血栓性に関する要素を検討する材料の 1 つに接触角が挙げられる。材料表面にフッ素を添加し、材料表面の撥水性を上げて、生体適合性を向上させた例がある。MPC は構造上蛋白質が付着しにくい、繊維形状にすることで、物理的効果で MPC 表面が撥水性を示し、血液をよりはじきやすい表面になれば、血栓形成の原因となる蛋白質もより付着しにくくなることが予想される。同一の MPC 材料を用いているにも関わらず、平滑膜では約 88°の接触角を示す一方で、ファイバー膜は 5 wt%、7.5 wt%、10 wt%の順に約 140°、141°、136°と接触角が 50°程度増加した。

- (3) 薬剤含有 MPC ファイバー作製と薬剤徐放試験

bFGF 含有 MPC ファイバーを、エレクトロスピニングで用いる MPC 溶液内に bFGF 水溶液を混ぜて作製した。5 wt% の MPC 溶液を用いて作製したが、混ぜた bFGF の水溶液は実験方法で述べた通りごく少量であるため、MPC 溶液単体で作製した場合と比べ、形状・径ともに大きな違いは見られなかった。さらに、今回は MPC ファイバー上に DLC を成膜し、薬剤徐放制御を試みた。小孔を有するメッシュを用いることでポリマー基板上に成膜面積率を調節して DLC 成膜することができた。

- (4) 薬剤含有 MPC ファイバーの薬剤徐放試験および吸光度測定による薬剤徐放量の定量化

上記基板を用いて薬剤徐放量の制御を試みた。その結果、DLC をパターニング成膜することで約 5 割、完全に被膜することで約 8 割 5 分の徐放量の抑制ができていたことが確認できた。薬剤溶出ス

テントにおいて、ステント留置後初期の薬剤大量溶出が問題の 1 つであり、DLC パターニングすることで 24 時間経過の薬剤溶出量が約 5 割に抑制されたことは、剤溶出システムに良い影響を与えることがわかる。また、5 日を過ぎると被覆面積によらず、徐放量が一定になった。ここからパターニングによって、薬剤含有ポリマーの被覆面積を変えても、初期における薬剤徐放量の抑制にとどまり、長期にわたっては一定の薬剤徐放量を確保できることが分かった。

- (5) bFGF 含有 MPC ファイバー上での血管内皮細胞増殖試

MPC 上の DLC が血管内皮細胞の増殖性に与える影響を評価するため、各サンプル上 (bFGF の含有はなし) で血管内皮細胞の増殖実験をおこなった。MPC film 上では細胞が増殖しないことが確認された。MPC は細胞の接着性が低く、そのため細胞の増殖も促されなかったと考えられる。それに比べ、MPC フィルムに DLC をコーティングしたサンプル上では、細胞が増殖することが確認できた。DLC が細胞接着の足場となり、そこから細胞の増殖が促されたと考えられる。DLC が薬剤徐放のコントロールとしての役割だけでなく、細胞接着の足場となることも示された。

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 6 件)

Shoji S, Hiraiwa S, Ogawa T, Kawakami M, Nakano M, Hashida K, Sato Y, Hasebe T, Uchida T, Tajiri T. Accuracy of real-time magnetic resonance imaging-transrectal ultrasound fusion image-guided transperineal target biopsy with needle tracking with a mechanical position-encoded stepper in detecting significant prostate cancer in biopsy-naïve men. *International Journal of Urology*. 24(4), p288-294, 2017. 査読有り. DOI: 10.1111/iju.13306.

Yamato Y, Maegawa S, Hasebe T, Bito K, Matsumoto T, Mine T, Hayashi T, Hotta A, Suzuki T. Biocompatibility Tests and Adhesion Improvements for Hydrogen-Free Amorphous Carbon for Blood-Contacting Medical Devices. *Sensors and Materials*. S&M1373, p843-854, 2017. 査読有り. DOI: 10.18494/SAM.2017.1573.

Matsumoto T, Ichikawa H, Imai J, Hayashi T, Tomita K, Mine T, Kojima

S, Watanabe N, Hasebe T, Feasibility and Safety of Repeated Transarterial Chemoembolization Using Miriplatin-Lipiodol Suspension for Hepatocellular Carcinoma. Anticancer Research. 37, 2017. 査読有り . DOI: 10.21873/anticancers.11678.

Bito K, Hasebe T, Maegawa S, Maeda T, Matsumoto T, Suzuki T, Hotta A. In vitro basic fibroblast growth factor (bFGF) delivery using an antithrombogenic 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer coated with a micropatterned diamond-like carbon (DLC) film. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 105, p3384-3391, 2017. 査読有り. DOI: 10.1002/jbm.a.36201.

Kamono M, Kabeya Y, Sohara E, Taoda A, Matsumoto T, Mine T, Hasebe T, Ueda A, Takagi A, Higaki M. The Etiology of Pyogenic Vertebral Osteomyelitis and Evaluation of Biopsy Specimen Cultures in Hospitalized Patients. Journal of Medical Microbiology & Diagnosis. 6, 2017. 査読有り. DOI: 10.4172/2161-0703.1000261.

Horikawa A, Maegawa S, Hasebe T, Matsumoto T, Tanaka T, Takaashi K, Susuki T. Fluorine-Incorporated Amorphous Carbon Coating Inhibits Adhesion of Blood Cells to Biomaterials. Sensors and Materials.29, 2017. 査読有り . DOI: 10.18494/SAM.2017.1558.

〔学会発表〕(計 4 件)

平岩真一郎, 中村智哉, 橋本亜樹生, 小川貴博, 川上正能, 中野まゆら, 内田豊昭, 長谷部光泉, 田尻琢磨. 核磁気共鳴画像-経直腸的超音波画像融合画像ガイド下前立腺標的生検の前立腺 significant cancer 検出における有用性. 第 105 回日本泌尿器科学会総会. 2017 年 4 月. 城山観光ホテル, 鹿児島

Hasebe T. Fluorine Incorporated Amorphous Carbon nano-coatings for Artificial Heart (Ventricular Assist Device). ALC'17. December, 2017. Aqua Kauai Beach Resort, Hawaii, USA

堀川あゆみ, 長谷部光泉, 前川駿人, 田中実, 鈴木哲也, 高橋孝喜. 血管内治療デバイスへの応用に向けたフッ素添加ダイヤモンドライクカーボン膜の評価. 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会. 2017 年 11 月. タワーホール船堀, 東京
Hasebe T. 1st European DES in Japan Orsiro with Ultra Thin Strut shows Excellent Data in Clinical Studies and Nano-Coating Test. CVIT2017 :

CVIT2017 : The 26th Annual Meeting of the Japanese Association of Cardiovascular Intervention and Therapeutics, July, 2017. Kyoto International Conference Center, Japan

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.hachioji-hosp.tokai.ac.jp/department/xp/research.php>

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 : 2 0 3 0 6 7 9 9

(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 : 1 0 2 8 6 6 3 5

(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 : 3 0 4 0 7 1 4 2