

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10814

研究課題名(和文) ソフトマター工学を利用した“見える”粒子塞栓物質の開発

研究課題名(英文) Development of visible particle embolic material used by new concept hydrogel

研究代表者

長内 俊也 (Osanai, Toshiya)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：90622788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、X線の可視性を備えたDNゲルの開発に成功した。DNゲルを基本材料として使用し、タンタル(Ta)粉末を使用して、2段階の懸濁ラジカル重合によりDN粒子を調製しました。さらに、ラットの頸動脈塞栓モデルを使用して、生体内研究で材料のX線CTの可視性を評価した。Ta粉末と混合することにより、CT可視性を持つDNゲル粒子を開発した。この塞栓物質は、X線CTスキャンで見ることができ、生体内で使用しても安全です。また、血管内に長期間留まるため、エンボスフィアよりも効果が期待されます。したがって、開発された材料は、X線CTの可視性を持つ有望なDN粒子塞栓材料です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して新たな塞栓物質を作成し、その特性を科学的に検証し、その特性をふまえた上で動物実験での素材の安全性および塞栓物質としての有用性が明らかになった。今後、現在の塞栓物質では治療行えなかったような疾患や状況においても、安全性を担保しつつ治療介入が可能になることが期待される。さらに本研究でソフトマターの医療への応用の可能性が示すことができれば、様々な臨床領域での応用のきっかけとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully developed a DN gel with X-ray visibility. We used a DN gel composed of poly (N,N'-dimethylacrylamide) and poly (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) as the basic material and prepared DN particles using tantalum (Ta) powder via two-step suspension radical polymerization. The characteristics of the DN particles were evaluated by comparing them with Embosphere, an existing embolization particle material. Furthermore, we used a rat carotid artery embolic model to evaluate the material's X-ray CT visibility in an in vivo study. We developed a DN gel particle with X-ray computed tomography (CT) visibility by mixing it with Ta powder. This embolization material was visible in X-ray CT scans and safe for use in the body. Moreover, as it remained in the vessels for a long time, it is expected to be more effective than Embosphere. Thus, the developed material is a promising DN particle embolization material with X-ray CT visibility.

研究分野：脳神経外科

キーワード：biomaterial embolization Intervention hydrogel hypervascular tumor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

粒子塞栓物質は血管に留置したカテーテルから注入することによって、異常血管などを閉塞する際に用いられる。臨床で頻繁に用いられているものとして、**Tris-acryl gelatin microsphere**(Embosphere®)がある(図1)。しかしながら粒子自身はX線透過性(見えない)であり、造影剤の浸透圧等の問題により、造影剤と生理食塩水を1:1に配合した溶液で流さなければならない。その結果、手技中の視認性が悪く、時に予期せぬ血管への迷入などの原因となりうる。粒子自身がX線不透透(見える)であれば実際にどの血管に粒子が集積しているかが明瞭となり、正常血管への塞栓物質の誤挿入のリスクを回避できる可能性が高くなる。しかし、この点を克服した粒子塞栓物質は未だにない。申請者らは血管内治療医として粒子塞栓物質を使用した数多くの治療に携わり、その経験から脳腫瘍の異常血管塞栓術の後方視的検討を報告しており、血管塞栓術に関して多くの知見を蓄えてきた(Osanai et al. No Shinkei Geka 2012)。複数の塞栓物質を組み合わせを行った血管閉塞のケースシリーズを報告し(Osanai et al. J Neurointerv Surg 2014)、また Embosphere®に関しても脳腫瘍塞栓での特性を報告してきた(Shimoda et al. No Shinkei Geka. 2016)。これらの経験を通じ筆者らは特に粒子塞栓物質に関して、治療効果、安全性を高めるために、操作性に優れ塞栓効果が高く、X線透視下で視認性を持つ塞栓物質の必要性を感じていた。

一方、高分子化合物に代表されるソフトマターは最近研究が進んでおり、ソフトマター工学の技術を駆使することによって、物性としての硬さ、形状、表面摩擦、接着度、などを用途に合わせて変更調節できるソフトマターの作成が可能となった。これから医療分野への応用が期待される物質である。また、粒子状のソフトマターについて共同研究者らは微粒子を基に強靱なダブルネットワーク(DN)ゲルを作成した経験がある(Hu et al. Macromolecules 2011)。さらにX線の透過性に関してゲル中でのミネラルゼーションにより、ジルコニアなどの金属のDNゲル内に微結晶化した実績がある(未発表)。

本研究ではこれらの医療側、工学側の経験を応用し、操作性、塞栓効果に優れたX線不透透性の粒子状のソフトマターを作成し、その化学的・物理学的な特性、また血液内での性状や血管内での挙動を現行品のEmbosphere®との比較を行うことによって、理想的な塞栓物質を開発したいと思うようになった。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は、ソフトマター工学を用いて作成したX線不透透性の塞栓物質の動態について検討し、現在本邦で入手可能な粒子状塞栓物質との比較を行い、その安全性および有用性を証明することを目的とした。

その目的のため以下の研究項目を行った。

- (1) 作成した粒子状の高分子の化学的安定性、X線下での視認性の評価を行う。
- (2) マイクロカテーテルへの通過試験を行い、カテーテル閉塞や粒子の破壊・変形がないかを確認する。
- (3) ラット頸動脈からそれぞれの塞栓物質を注入し血管閉塞させ、脳組織および血管組織の病理学的評価を行う。
- (4) X線CTにて観察を行い、Embosphereと比較する。

3. 研究の方法

倫理上の考慮事項

すべての実験プロトコルは、北海道大学大学院医学研究科の動物研究倫理委員会(18-0136)によって承認され、すべての手順は、動物実験に関する組織のガイドラインおよび動物の適切な行動に関するガイドラインに従って行った。

材料

DN粒子を作成するために以下の物質を使用した。

ケロセン、タンタル(Ta)粉末、ジメチルアクリルアミド(DMAAm)、N、N'-メチレンビスアクリルアミド(MBAA)、2-オキシグルタル酸(-ケト)およびイソプロパノール、50重量%の2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム塩(NaAMPS)溶液、SYグリスター、ポリグリセリル脂肪酸エステル(界面活性剤の一種)アルゴン(Ar)ガスを使用した。

また水溶液調製用の超純水は、Milli-Q Integral 10を使用した。

Ta粉末を使用したDN粒子の調製

2段階の懸濁ラジカル重合を使用して、Ta粉末を使用した二重ネットワーク粒子を調製した。2 wt %のSY Glyster 界面活性剤と1 M NaAMPS モノマー、4 mol %、N、N'-メチレン-ビス(アクリルアミド)MBAA クロスリンカーを含むプレゲル水溶液を含むケロセン、0.1 mol %、-ケト開始剤と0.2 g / mL Ta粉末をAr 雰囲気グローブボックスで平衡化して、酸素を脱気した。第1のプレゲル溶液をケロセン溶液に加え、攪拌して懸濁液を作った。プレゲルと灯油溶液の最終的な体積比は1:10であった。予備攪拌10分後、マグネチックスターラーを使用し1000rpmで攪拌しながら、365nmで4mW / cm²のUV光照射で懸濁液のラジカル重合を行った。グローブボックスで8時間重合後、デカンテーションした粒子を最初にイソプロパノールで2回洗浄し、次に超純水で2回洗浄した。一次粒子は、グローブボックス内の2 M DMAAm、0.1 mol %、MBAA および0.1 mol %、-ケトを含む十分な量の第2プレゲル溶液で平衡化された。2 wt %のSY Glyster と10倍量の粒子を含むケロセン溶液も、事前に脱気した。一次粒子をケロセン溶液に攪拌下で添加し、次に、第1ネットワークの存在下での第2ネットワーク重合を、1,000 rpmで8時間攪

拌しながら、365 nm で 4 mW / cm² の UV 照射を使用して行った。デカンテーションした DN 粒子を最後にイソプロパノールで 2 回、水で 2 回すすいで作成した。

カテーテル通過試験

300-500 μm Embosphere® (日本化薬、東京、日本) の 1cm³ を 1 cc シリンジに吸引し、3.5 cm ディッシュに移し、顕微鏡で観察した。無作為に選択した視野で損傷粒子数を 5 回カウントし、損傷粒子数を評価した。次に、Embosphere® を 1 cc のシリンジに再度吸引し、手動で一定速度で内径 0.58 mm の PE50®カテーテル (Becton, Dickinson and Company, USA) を通して 3.5 cm のディッシュに移し、カテーテル通過後に損傷を受けた粒子を、上記と同じ方法で顕微鏡下に観察した。次に、DN ゲル粒子を使用して同じテストを実行し、破損した DN 粒子の数と破損した Embosphere® 粒子の数を比較した。

実験動物

実験では、合計 250 グラムから 300 グラムの野生型 (WT) 8~10 週齢のオスの Sprague-Dawley (SD) ラット (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を 10 匹使用した。動物は管理された環境 (25 °C、湿度 50%、12 時間の明暗サイクル) で飼育され、餌と水を自由に摂取できるようにした。ラットをランダムに以下の 2 つのグループに分けた: DN ゲル粒子注入グループ (D グループ、n = 5)、および Embosphere® 注入グループ (E グループ、n = 5)。

ラット内頸動脈塞栓症モデル

イソフルランでラットを麻酔した。限局性脳虚血は、0.1 cc の塞栓物質 (Embosphere® または DN ゲル粒子) を PE50®カテーテル (I.D. 0.58 mm) から注入することにより作成した。右内頸動脈を外科的に露出し、外頸動脈を結紮し、切断し、近位方向に反転させた。次に、翼口蓋動脈を結紮した。血管を損傷しないように、カテーテルを外頸動脈に挿入し、ゆっくりと内頸動脈 (ICA) に挿入した。

PE50®カテーテルを右内頸動脈に挿入した後、DN ゲルまたは Embosphere® 微粒子を含む各サンプルを手動で非常にゆっくりと注入した。

神経学的評価 神経学的評価

覚醒条件下で 18 ポイントスケールのスコアリングシステムを使用して、塞栓術の 1、7、14 日後に神経学的評価を実施した。スコアは 0 から 18 までの段階で等級付けされた。スコアの低いラットには、重度の神経障害があった。すべての神経学的行動は、同じ研究者によって評価された。

梗塞体積の計算

急性期 (脳梗塞後 3 日目) の梗塞サイズを測定するために、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, スイス、ブッシュ) 染色を使用した。脳 (各グループで n = 3) を冠状に切片化し、2 mm 厚の連続切片を 6 つ取得し、2% TTC に 37 °C で 20 分間浸した。ImageJ ソフトウェア (Image J 1.37v; NIH、ベセスダ、メリーランド州、米国) を使用して、脳切片の写真を撮り、定量的に分析した。次の式を使用して梗塞サイズを計算した: 脳梗塞 (%) = (対側半球体積 - 同側非梗塞体積) / 対側半球体積。

さらに、慢性期の梗塞体積を評価するために、Kluver-Barrera 染色が行われた。

Luxol fast blue および Cresyl violet (Muto) を使用して、塞栓物質を注入してから 28 日後に脳容積を評価した。上記の方法 (各グループで n = 3) を使用してラットを屠殺した。その後生理食塩水で灌流し、次に 50 mL の 4% パラホルムアルデヒドで経心臓灌流した。脳を取り出し、同じ固定液で一晩後固定し、リン酸緩衝生理食塩水中の 20% スクロースに 4 °C で 2~3 日間浸した。次に、ブロックをその後の染色のために最適な切断温度のコンパウンド (Tissue-Tek; Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan) および厚さ 10 μm の横断面をポリ-L-リジンコートスライド (Matsunami, Tokyo, Japan) に埋め込み、体積を計算した。

免疫染色

炎症反応を、脳の冠状切片を使用して、脳梗塞の 28 日後に評価した (各 n = 5)。次のマーカーは、免疫組織化学を使用して神経炎症を調べるために選択された: イオン化カルシウム結合アダプター分子 1 (Iba1) およびクラス D スカベンジャー受容体 68 (CD68)。以下の抗体を使用した: 抗 Iba1 抗体 (室温で 1 時間 1: 1500、019-19741、和光、日本) および抗 CD68 抗体 (室温で 1 時間: 1、1000、MCA341GA、BIO-RAD)。最初の抗体インキュベーション後、切片を Histofine® Simple Stain™ ラット MAX PO (ニチレイバイオサイエンス株式会社、東京、日本) で 1 時間処理した。メーカーの指示に従って発色シグナルを得るために、DAB 代替キット (ニチレイ BIOSCIENCES INC、東京、日本) の DAB 色素原を 10~30 秒間適用した。損傷した病変から尾側および吻側に 5 mm の損傷周辺の病変から画像が取得された。5 つの重複しない病変をランダムに選択し、陽性細胞を自動細胞カウンターソフトウェア (BZ-X アナライザー、Keyence、大阪、日本) を使用して半定量的にカウントした。

毒性試験

合計 6 匹の雄 SD ラット、生後 8~10 週、体重 250~300 g を使用した。厚生労働省によって発行された生体材料の安全性の生物学的評価のためのガイドラインに従った。移植試験は、DN ゲル粒子と Embosphere® 粒子をラットの背部の皮下組織に移植することで評価した。上記のように、全身麻酔下で手術を行った。クリッパーで背中上の毛を取り除いた後、その領域を 70% アルコールで消毒し、1cm の長手方向の皮膚切開を行った。次に、Embosphere® または DN ゲル粒子 0.1 cc を皮下組織 (3 匹の動物それぞれ) に注入し、皮膚を 4-0 ナイロン糸で縫合した。手術後 4 週間で、各動物を屠殺した。さらに、0.1 cc の Embosphere® または DN ゲルを右頸動脈に注入したグ

ループを準備し（各グループ n = 3）、28 日後に屠殺し、前述のように梗塞病変周辺の炎症の程度を免疫組織化学によって評価した。

CT イメージング

Embosphere®および Ta-DN ゲル粒子をそれぞれ 1 cc のシリンジを使用して 3.5 cm ディッシュに入れ、CT イメージングを次の条件下で実行した：電圧 120 kv、スライス厚 0.312 mm、強度 101.3 mAs、ピッチ回転時間 0.63 0.65、視準 x 0.63、視野 (FOV) 56。CT によって描かれた範囲内で 5 つのポイントをランダムに選択し、各材料の平均 CT 値の間で比較が行われました。さらに、塞栓形成物質をラットの右頸動脈に注入した後、CT イメージングを行った。Embosphere® (E グループ) の 1cc と 1 cc の Ta-DN ゲル粒子 (D グループ) を上記のようにラット (n = 3) に注入し、注入直後に犠牲にして視認性を評価した。調査は、同じ 16 スライス CT マシン (Philips Brilliance、アイントホーフェン、オランダ) と以下のプロトコルを使用して行った。各ラットの体を仰臥位に配置し、軸方向の画像を頭部から撮影した。さらに、D グループの内頸動脈の頭蓋内側と周囲の骨組織/脳実質の両方の CT 値が計算した。

統計分析

データは平均+標準誤差 (SE) として提示した。すべての統計分析は、JMP Pro 14 (SAS Institute, Inc., Cary NC) を使用して実行した。2 つのグループの違いは、対応のない t 検定またはマンホイットニー-U 検定を使用して比較した。<0.05 の p 値は統計的に有意であると見なした。

4. 研究成果

カテーテル通過試験

カテーテル通過試験の結果によると、Embosphere®と DN ゲル粒子の間で通過前後の破損粒子数に有意差はなかった。(図 1)

神経学的評価

脳梗塞の翌日、および 7 日後と 14 日後の E グループと D グループの間の神経学的評価スコアについて両群で有意差は観察できなかった。

梗塞サイズの評価

2 つのグループ間の急性期 (POD1) の平均梗塞体積に有意差は観察されなかった (図 2)。同様に、28 日後の評価においても、脳梗塞の大きさに有意差は認められなかった。

組織病理学的評価

各グループにおいて、皮膚切開は感染なしで良好に治癒し、4 週間の期間中体重は減少しなかった。さらに、各グループのラットは、移植部位と犠牲の時点で、発赤、滲出液、膿瘍などの炎症や感染の兆候を示さず、2 つのグループ間に明らかな違いは認められなかった。免疫組織化学染色では、移植部位近くの皮下組織の周囲に浸潤した CD68 陽性細胞の数に統計的に有意な差は認められなかった (図 3)。炎症に関しては、梗塞周囲の組織でも同様の結果が得られた。梗塞組織周辺の活性化マクロファージ/ミクログリアの数は、2 つのグループ間で有意差がなかった。D1 グループでは、粒子は 4 週間、右前大脳動脈に残ったが、E グループでは、粒子は残っていなかった。

CT 評価

Ta-DN ゲルの CT 値は Embosphere®よりも統計的に高かった。塞栓形成後のラットの頭蓋骨の CT 画像は、D グループが周囲の軟組織と比較して頭蓋内内頸動脈の斑点密度が高いことを示した。E グループは、右頸動脈でより高い密度を示さなかった。したがって、周囲の軟組織および骨組織と比較して、CT 値に明らかな違いが検出され (P < 0.01)、DN ゲル粒子が CT スキャンで明確な可視性を示したことを示した (図 4)。

図 1

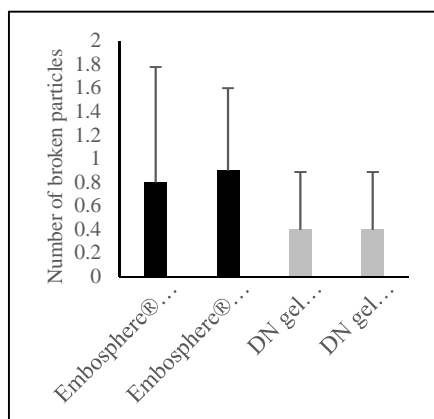
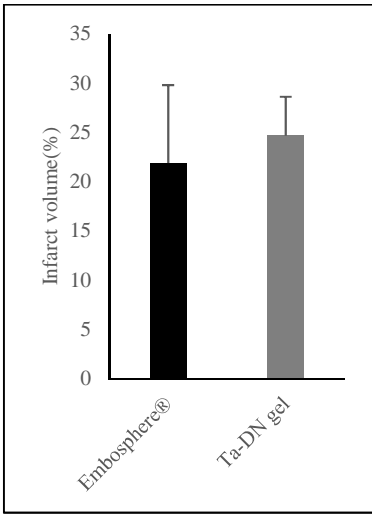
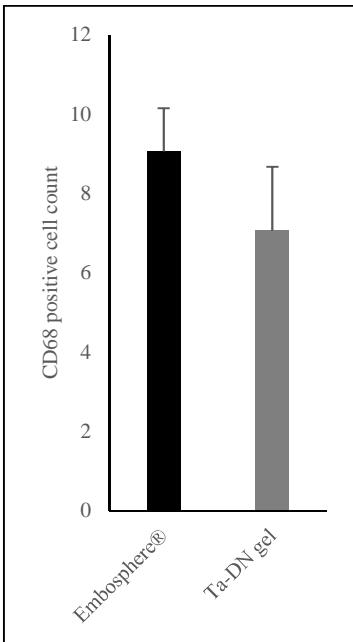


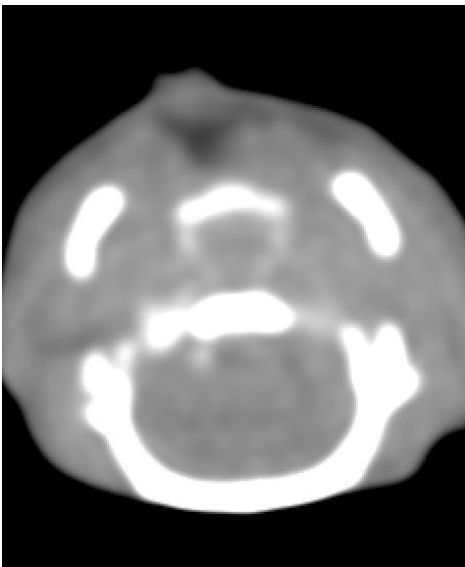
図 2



☒ 3



☒ 4



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〕

本研究の研究成果は現在英文雑誌への投稿準備中である。
 また、2020年10月に開催予定の日本脳神経外科学会で発表を検討している。（現在、演題募集期間中）

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
研究分担者	中山 若樹 (Nakayama Naoki) (40421961)	北海道大学・医学研究院・講師 (10101)	
研究分担者	黒川 孝幸 (Kurokawa Takayuki) (40451439)	北海道大学・先端生命科学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	数又 研 (Kazumata Ken) (60634144)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	鎧谷 武雄 (Abumiya Takeo) (80270726)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竇金 清博 (Houkin Kiyohiro) (90229146)	北海道大学・保健科学研究所・特任教授 (10101)	