

令和 3 年 10 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02086

研究課題名(和文)再閉塞抑制能と癌細胞増殖抑制能を有する消化器ステントの基盤技術創製

研究課題名(英文) Design of a stent with used for the digestive system to prevent the restenosis and cancer cell growth

研究代表者

田中 賢 (Tanaka, Masaru)

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号：00322850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再狭窄を抑制できる胆管ステントの設計指針を明らかにするために、生体親和性高分子で内面をコーティングしたカバードステントを作製し、胆汁からの吸着タンパク質の状態を調べた。特定の高分子で表面処理を行った胆管ステントは、タンパク質の吸着量と吸着したタンパク質の構造変化、細菌の付着が少ないことがわかった。胆汁の循環試験の結果、コンディショニングフィルム発生、細菌凝集、胆汁成分凝集、バイオフィーム形成が抑制されることが明らかになった。これらの結果は、従来の抗菌剤や抗生物質を用いた方法とは異なり、胆管カバードステントにおける合併症である早期胆管閉塞の抑制効果につながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国での死因第一位は悪性腫瘍であり、全体死因の約3割を占めている。本研究では、ステント治療可能な消化器系癌(約25%)に着目し、(1)消化器系ステントの再閉塞と炎症の抑制、(2)癌転移抑制による生存日数の大幅な延長を達成できる革新的な消化器系ステントの基盤技術開発のための指針を得ることを目的としている。本研究の結果得られた成果は、胆管の塞栓による再狭窄の原因となるタンパク質の吸着・変性、細菌付着、バイオフィーム形成抑制のプロセスを制御することの重要性を示している。従来の抗菌剤や抗生物質を用いた方法とは異なり、胆管カバードステントにおける合併症である早期胆管閉塞の抑制効果につながるものである。

研究成果の概要(英文)：We performed an in vitro evaluation on adhesion behavior of proteins at the inner surface of fully covered self-expandable metallic stents coated with biocompatible polymers. Model bile solution, fibrinogen, and albumin were used to reveal the inhibitory ability of the polymer coatings. The amount of adsorbed proteins and adhered bacteria (*E. coli*) on the polymer coatings were both strongly inhibited. Circulation test with bile was additionally performed under a clinical condition; adsorption/deformation of proteins and early-stage sludge formation were inhibited on the stent's surface coated with polyacrylate derivatives. The present study has revealed that the polymer coated stents suppressed the early-stage biliary sludge formation and the sludge formation inhibition must have been attained by the strong resistance of the polymers to protein adsorption/deformation. This material-based method differs from traditional bile sludge control that relies on the use of antibiotics.

研究分野：医療材料、医療機器

キーワード：胆管ステント 細菌付着 バイオフィーム形成 カバードステント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胆管ステント留置術は、悪性胆管狭窄による閉塞性黄疸の代表的治療法であり、カバー膜で覆われた胆管カバードステントが用いられるようになった。しかし、カバードステントの大きな問題点は、留置後の胆泥閉塞である。切除不能悪性胆道狭窄への緩和治療としてプラスチックステントや自己拡張型金属ステント (Self-expandable metallic stents; SEMS) を用いて狭窄部の拡張並びに胆汁の整流化が行われてきた。しかし、中下部悪性胆道狭窄ではプラスチックステントに比べて金属ステントの方が開存日数は長く<sup>1)</sup>、金属ステントの周りにカバー膜を付与したカバードステント (Covered SEMS) の方が開存日数は長いことが分かり<sup>2)</sup>、中下部悪性胆道狭窄ではカバードステントを用いることが主流になりつつある<sup>1)</sup>。

しかし、カバードステントは合併症が多く発生し、特に一番多い合併症として再閉塞が挙げられており<sup>3)4)</sup>、留置されたステントの約 25% で再閉塞が発生している。その内の約 80% が胆泥 (スラッジ) や食物残渣由来のバイオフィーム形成により再閉塞している。とりわけ、早期胆管閉塞として 3 ヶ月以内で閉塞するケースが多くあり、原因として主にスラッジが形成されステント内壁面へ付着することにより発生している<sup>5)</sup>。これらのステント再閉塞が発生した場合は、内管のクリーニングや抜去交換などで対処を行っているが、再度内視鏡処置が必要となり、処置時に出血を伴う場合があるためリスクが高く、著しく患者の Quality of life (QOL) が低下する<sup>6)</sup>。これらの早期胆管閉塞の主要因となっているスラッジについて抑制可能な方法を探索するために、スラッジ発生機序について調査した結果、まずはじめに、樹脂内管面へタンパク質が吸着し、その上に細菌が吸着し、さらにその上に胆汁成分が吸着することが分かった<sup>7)8)9)10)</sup>。

## 2. 研究の目的

我が国での死因第一位は悪性腫瘍 (癌) であり、全体死因の約 3 割を占めている。本研究では、ステント治療可能な消化器系癌 (約 25%) に着目し、(1) 消化器系ステントの再閉塞と炎症の抑制、(2) 癌転移抑制による生存日数の大幅な延長を達成できる革新的な消化器系ステントの基盤技術開発を目指す。申請者が独自に見出したタンパク質や細菌・細胞の吸着・接着に強く影響する医療材料表面に形成される水和構造 (中間水) に着目し、消化器ステントの内層・外層表面で起こる分子レベルでの生体反応の制御を行う。これにより、薬剤 (抗菌剤や抗癌剤) フリーで副作用や多剤耐性菌出現がないタイプもしくは従来の薬剤による治療効果を高めることができる世界初の消化器系ステント開発のための基盤技術を確立する。また、消化器系の表面と人工物の界面で起こる反応を分子レベルで理解するためのバイオ界面の学理の創成を目指す。

## 3. 研究の方法

タンパク質吸着量は Micro BCA Protein Assay Kit を用いて試験を行った。胆汁中タンパク質の吸着挙動を調べるために、胆汁末 (和光純薬工業(株)製 CAS NO. 8008-63-7) を使用し、純水 100 ml に胆汁末を 0.8 g 溶解させて、飽和水溶液 (8 mg/ml) を調整することで疑似胆汁溶液の作製を行った。この胆汁末はオックスバイルとも呼ばれ、ウシの胆汁を粉末にしたものであり、本品はヒト胆汁の主成分と同じコール酸を 40.0% 以上 (吸光度分析) 含有している。その後、PBS 溶液で 1/10 に希釈し、疑似胆汁溶液とした。細菌の接着に寄与する主要な接着性タンパク質である フィブロネクチンやフィブリノーゲン、生体内で多く存在するアルブミンを用いてタンパク吸着抑制能試験を実施した。疑似胆汁と播種した基板は 37℃ で 6 hr インキュベートを行い、その他のタンパク質を播種した基板は 37℃ で 1 hr インキュベートした。吸着タンパクの変性

度は、酵素結合免疫吸着法により定量化した。

また、Silicone (MED4755)、ポリウレタン (PU: Tecothane TT-1095A)、poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) および Poly(3-methoxypropyl acrylate) (PMC3A) の各平膜へ大腸菌生育用培地で 1 時間のプレコンディショニングを行った基板の上に大腸菌を  $7.5 \times 10^7$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、20 分間培養した後、PBS 洗浄と固定化を行った。その後、走査型電子顕微鏡 (SEM) により、基板上に接着した菌数を測定した。

胆汁を用いた試験に使用したカバードステントは、カバードパイルラッシュ (パイオラックス メディカルデバイス) で使用しているニッケルチタン合金 (NiTi) 製の両端ダンベル型ステント (φ10 mm × 80 mm) を用いており、Silicone カバードステントについては、ステントを芯棒に取り付け、シリコン溶液ステントをディップし、その後メーカー使用方法に従って加熱乾燥を行い作製した。PU 製カバードステントは、ステントを芯棒に取り付け、湿度 7% 以下の環境下で PU 溶液 8wt%-THF 溶液にステントをディップさせ乾燥を行って作製した。

PMEA カバードステントは、PU 製カバードステントをシリコン溶液 (MED4755) にステントをディップして乾燥した。得られたカバードステントの両端内側にプラズマ照射を行った後、各高分子溶液をコーティングした。循環装置は、無菌箱 (無菌箱 AC: テックジャム製、紫外線殺菌灯付き。サイズ (600x500x500mm)) をドラフト内に設置し、この無菌箱内にて図 1 に示すような循環回路を作製し、1000 mL/hr で胆汁を循環させた。

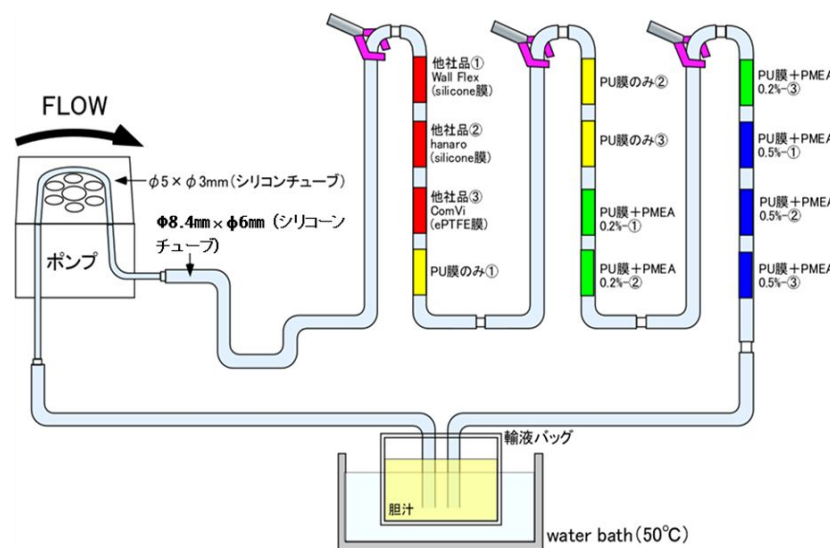


図 1 . 各種カバードステントを用いた胆汁循環試験系の確立

#### 4 . 研究成果

疑似胆汁中での各膜タンパク吸着量は、Silicone > PU > PMEA > PMC3A となり、PMEA や PMC3A が Silicone 膜や PU 膜よりもタンパク吸着量が少ないことが分かった。また、単一タンパク質吸着実験の結果、PMEA 膜は今回使用した全てのタンパク質において、Silicone 膜や PU 膜への吸着量より少なく、PU 膜に対しては有意に少ないことが分かった。さらに、PMEA 膜ではフィブリノーゲン、アルブミンともに Silicone 膜での変性度に比べてそれぞれ約 1/2、1/5 程度まで抑制されることが分かった。

疑似胆汁中での各膜タンパク吸着量を比較すると、PMEA や PMC3A を内管にコーティングしたカバードステントを胆管内に留置した場合、胆汁と接触してもタンパク吸着量が従来品の

カバー膜材質である Silicone や PU の表面よりも抑制されることが予想され、それによりコンディショニングフィルム形成が抑制される可能性が示唆された。

胆管カバードス TENT で用いられるカバー膜は Silicone 膜が主流であり、今回の結果から、従来の Silicone 製カバードス TENT に比べて PMEA コーティングしたカバードス TENT では良好なタンパク質吸着抑制能およびタンパク質変性抑制能を有することが示唆された。

次に、細菌付着試験の結果、各種コーティング材の中でも PMEA と PMC3A が Silicone 膜や PU 膜と比べて大腸菌の接着数が少ない傾向が見られた。スラッジ成分中で最も多く検出される細菌はグラム陰性桿菌であり<sup>11)</sup>、胆道感染症患者の半数以上の約 66% がグラム陰性桿菌を保有しており、その中でも最も多く検出された細菌は大腸菌であるとの結果が得られている<sup>12)</sup> ので、従来品で良く用いられる Silicone 膜や PU 膜と比較して、PMEA や PMC3A は比較的良好的な大腸菌吸着抑制能を有する傾向が示唆された。

胆汁循環14日目のSEM観察結果より、Silicone と PU 表面ではタンパク吸着によるコンディショニングフィルムが形成され、局所的に細菌が吸着・凝集していた。また、21日目では、Silicone と PU 表面では全面に肥厚なバイオフィルムが形成されていた。一方、PMEA表面では、細菌の吸着が局所的であり、その上にもみ僅かに胆汁成分の凝集が見られたが、バイオフィルムは観察されなかった。また、スラッジ度として 1)コンディショニングフィルム発生、2)細菌凝集(局所的)、3)胆汁成分凝集(局所的)、4)胆汁成分凝集(全体的)、5)肉厚化(バイオフィルム形成)としてスコアリングを行い経時的な耐スラッジ度との関係を整理したところ、PMEA表面は優位にスラッジ形成を抑制することがわかった。

ス TENT が使用される環境を考慮し、滅菌直後の乾燥状態から含水状態に変化した場合の最初のイベントであるス TENT 材料への水分子の吸着現象に着目し、材料へ吸着した水和構造・運動性と糖タンパク質との吸着・脱離の関係を調べた。とりわけ、不凍水と自由水の間隔的な性質を示し、生理環境で安定に存在する中間水の量に着目した。その結果、中間水の量を制御することにより、バイオフィルム形成のもとになるタンパク質の吸着・変性が抑制される中間水量が存在することがわかった。また、消化器ス TENT の課題である長期開存性を維持するための表面設計のために、再狭窄の原因となるタンパク質や細菌の付着などのスラッジ形成を防止するために新規合成したコーティング材の物理化学物性とコーティング条件、開存期間との関係を明らかにするための実験系を確立した。独自のス TENT デザインと内視鏡ルートによるデリバリーシステムを用いてミニプタを用いた動作確認を進めている。模擬狭窄からの抜去抵抗試験や豚胆管内留置試験により留置安定性と抜去性について検証し、最適化を行っている。

本研究の結果、PMEA および PMEA 誘導体コーティングはコンディショニングフィルムや細菌接着に關するタンパク質の接着や変性を抑えることがわかった。これにより、早期の細菌吸着を抑えることでバイオフィルム形成速度を抑制し、早期スラッジ形成を抑制させることが期待できる。これは、これまで検討されてきた抗菌剤や抗生物質を用いたスラッジ抑制検討方法とは異なるので、耐性菌の発生有無に関わらず胆管カバードス TENT における合併症である早期胆管閉塞の抑制効果につながると考えられる。

近年、胆管カバードス TENT にて早期胆管閉塞が発生した場合の従来品での解決策として、閉塞時に抜去交換がし易いような編み込み型カバードス TENT<sup>13)</sup>が開発されたが、逸脱(マイグレーション)しやすくなるなどの問題が明らかになった。この問題を解決するために留置中のマイグレーションを予防するために突起が付与されたカバードス TENT<sup>14)</sup>が開発されたが、スラッジ閉塞した場合に抜去交換が難しくなる問題があり、スラッジ閉塞時の抜去交換性と留置時の耐マイグレーション性について相反する要求特性があり、同時に達成させることが困難

な課題の一つとなっている。この問題解決に対する1つのアプローチとして、本研究で得られたPMEA及びPMEA誘導体コーティングステントの使用により、留置時の開存日数を向上させて抜去交換回数を抑制させることが有効である可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) K. Takahashi, H. Maguchi. Bile duct stenting for unresectable malignant stricture of biliary tract. *Journal of Japan Biliary Association* 2006: 20(2): 172-179.
- 2) H. Isayama, Y. Komatsu, T. Tsujino, et al. A prospective randomized study of covered versus uncovered diamond stents for the management of distal malignant biliary obstruction. *Gut* 2004: 53: 729-734.
- 3) H. Isayama, Metallic stenting. *Journal of Japan Biliary Association* 2005: 19(4): 462-468.
- 4) H. Isayama, Y. Nakai, O. Togawa, et al. Biliary stenting. *Journal of Japan Biliary Association* 2009: 23(1): 45-56.
- 5) Y. Nakai, H. Isayama, et al. New Method of Covered Wallstents for Distal Malignant Biliary Obstruction to Reduce Early Stent - related Complications Based on Characteristics. *Gastroenterol Endosc* 2012: 54(12): 3837-3845.
- 6) T. Hara, et al., 2013. Chemotherapy and Biliary Stenting in Patients with Advanced Pancreatic Cancer Treated by Chemotherapy. *Journal of Biliary Tract & Pancreas*, 34, 825-832.
- 7) A. Groen, T. Out, K. Huibregtse, et al. Characterization of the content of occluded biliary endoprostheses. *Endoscopy* 1987: 19(2): 57-59.
- 8) G. Donelli, et al. Plastic Biliary Stent Occlusion: Factors Involved and Possible Preventive Approaches. *Clinical Medicine & Research* 2007: 5(1): 53-69.
- 9) T. Shigeno. Bacterial characteristics of bile in patients treated with endoscopic retrograde biliary drainage (ERBD). *Gastrointestinal Endoscopy* 1990: 32(2): 334-344.
- 10) T. Shigeno. The role of bacteria for occlusion of endoscopic retrograde biliary drainage (ERBD) tube. *Gastrointestinal Endoscopy* 1990: 32(2): 345-352.
- 11) YH An, RJ Friedman. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998: 43: 338-348.
- 12) J. Wang, Q. Yu, H. Liu, et al. Distribution and drug resistance of pathogens cultured from bile of patients with biliary tract infections. *Zhonghua Yiyuan Ganranxue Zazhi* 2014: 24(14): 3431-3432,3435.
- 13) D. Walter, W. Laleman, et al. A fully covered self-expandable metal stent with antimigration features for benign biliary strictures: a prospective, multicenter cohort study. *Gastrointestinal Endoscopy* 2015: 81(5): 1197-1203.
- 14) H. Isayama, K. Kawakubo, et al. A Novel, Fully Covered Laser-Cut Nitinol Stent with Antimigration Properties for Nonresectable Distal Malignant Biliary Obstruction: A Multicenter Feasibility Study. *Gut and Liver* 2013: 7(6): 725-730.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 W. Lee, S. Kobayashi, M. Nagase, Y. Jimbo, I. Saito, Y. Inoue, T. Yambe, M. Sekino, G. G Malliaras, T. Yokota, M. Tanaka, T. Someya	4. 巻 4
2. 論文標題 A Nonthrombogenic, Stretchable, Active Multielectrode Array using Organic Electrochemical Transistors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaau2426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 F. Khan, M. Tanaka,	4. 巻 19
2. 論文標題 Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 F. Khan, F. Aratsu, S. Kobayashi, M. Tanaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Simple Strategy for Robust Hydrogel Preparation and Characterisation Derived from Chitosan and Amino Functional Monomers for Biomedical Application	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5115-5129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 生体親和性に優れた診断・治療用ソフトバイオマテリアルの設計
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 ソフトバイオマテリアルの設計と応用-中間水コンセプトの健康・医療、他産業分野への展開
3. 学会等名 先端化学・材料技術部会 新素材分科会/ライフサイエンス技術部会 材料分科会 共催 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 Design of soft-biomaterials based on the interfacial water structure for advanced medical devices
3. 学会等名 10th International Symposium on Organic Molecular Electronic (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 中間水コンセプトによる生体親和性材料のデザイン - 産官学連携による基礎から社会実装 -
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会第30回サマースクール (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 生体親和性に優れた医療デバイス用ソフトマテリアルの設計
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 界面の水で生体と仲良し～バイオ界面水の役割の理解と制御～
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 Roles of intermediate water in cell-material interactions
3. 学会等名 エンジニアリングネットワーク・ワークショップ - 生物のもつ耐性機能と工学の融合 - (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 界面水制御による生体親和性材料の設計
3. 学会等名 ナノデバイス工学分野連携ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 界面水制御による生体親和性高分子の設計
3. 学会等名 第14回関西支部若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 田中 賢
2. 発表標題 Design of soft-biomaterials based on the interfacial water structure for advanced medical devices
3. 学会等名 The 3rd Aquaphotomics International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 M. Tanaka	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 10
3. 書名 Design of Multifunctional Soft Biomaterials: Based on the Intermediate Water Concept. In: Chujo Y. (eds) New Polymeric Materials Based on Element-Blocks. Springer, Singapore	

1. 著者名 田中 賢	4. 発行年 2018年
2. 出版社 テクノシステム	5. 総ページ数 6
3. 書名 バイオマテリアルの表面処理・複合化プロセスと機能評価, 第1項 高分子系バイオマテリアル,	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="http://www.soft-material.jp/">http://www.soft-material.jp/</a>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			