

平成22年6月2日現在

研究種目： 若手研究（B）
研究期間： 2008～2009
課題番号： 20700395
研究課題名（和文） 細胞親和性と抗血栓性を兼備した薬剤放出ステントの創製
研究課題名（英文） Preparation of novel drug-eluting stents with cell-compatibility and antithrombogenicity
研究代表者
吉岡 朋彦（YOSHIOKA TOMOHIKO）
東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号： 50452016

研究成果の概要（和文）：

金属基材からなる細胞親和性の高い薬剤溶出ステントの開発を目的とした。Ni を含まないステンレス合金を用い、表面酸化物組成を熱処理によって制御することで、金属と薬物担持層のアンカー分子である γ -aminopropyltriethoxysilane（APS）を多量かつ安定に固定化できることを明らかにした。APS 固定化表面は、未処理表面より正常ヒト臍帯静脈内皮細胞の伸展性に優れていた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we focused on surface modification of Ni-free stainless-steel for novel drug-eluting stents with cell-compatibility. Ni-free stainless-steel was heated in order to control the composition of surface oxides. The surface composition was responsible for the immobilization of silane coupling agent, i.e., γ -aminopropyltriethoxysilane (APS). The APS immobilized surface adhered more human umbilical vein endothelial cells than a pristine surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：ステント、金属酸化物、表面修飾、シランカップリング剤

1. 研究開始当初の背景

心臓血管疾患の治療には、冠状動脈拡張用ステントが頻繁に用いられる。ステントは、閉塞した血管を拡張させるための網目状金属デバイスである。現在、ステント素材として、ステンレス鋼や Co-Cr 合金などが使用さ

れている。

しかし、それらの人工素材は、血液中の凝固因子を刺激して血栓の形成を惹起し、ひいては血管閉塞などの重篤な症状を引き起こす。そのため、抗血液凝固剤を併用することが不可避になるが、その副作用として出血を

まねくことが知られている。現在、ステントの細胞親和性を高めて抗血栓性を付与する技術開発が重要な課題になっている。

これまで、金属に抗血栓性を付与するため、抗血液凝固剤・抗血小板薬や親水性ポリマーを表面コーティングする研究が行われている。しかし、血流下でコーティングが剥離する問題が指摘されている。さらに、ステント拡張時にコーティングが剥離する問題もある。以上の問題は、金属とコーティング層（マトリックス層）の結合が弱いことに起因している。

一方、冠状動脈ステントでは、血栓形成のほかに、血管内膜細胞の過増殖による血管閉塞が大きい問題になっている。そのため、近年、血管内膜の過増殖を抑制する薬剤（免疫抑制剤等）をステント表面に担持させた「薬剤溶出ステント」が開発、実用化されている。この薬剤溶出ステントは、一般に薬剤を高分子マトリックスに溶解させ、ステント金属表面に塗布する方法で作製されている。現状の薬剤溶出ステントは、血管内膜の過増殖抑制に一定の効果をあげているものの、マトリックス層と金属表面の界面結合の高度化に関する問題は未解決のまま残されている。

そこで本研究では、細胞親和性と抗血栓性および薬剤溶出性を兼備した表面の、積層・界面制御法の確立に焦点を当てた。

申請者はこれまでの研究において、天然高分子であるアルギン酸は、ステンレス表面に製膜することで血栓の形成を抑制すること、および pH の制御によってタンパク質や薬剤を固定化できることを示した。この知見は、抗血栓性と薬剤担持・溶出性を兼備した表面層の構築の可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では、金属基材からなる細胞親和性の高い薬剤溶出ステントを目指し、金属基材と薬剤担持層の界面結合を安定化する技術開発を目的とした。薬剤担持層の溶出後の基材表面は、血管内皮細胞の適合性を有することが望ましい。金属基材表面に、薬物担持層のアンカーとなりかつ細胞親和性を有する

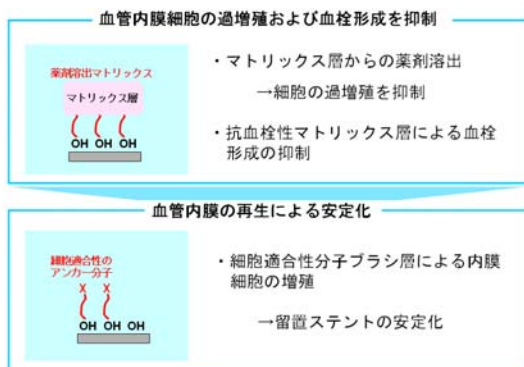


図1 ステント表面デザイン

表面修飾を行った（図1）。

金属としては、Ni を含まないステンレス合金（Fe-23.4Cr-1.03Mo-1.06N (wt%)）を選択し、表面酸化物の厚さ・組成・化学状態を制御することで、細胞親和性アンカー分子としてシランカップリング剤の固定化の最適化を目指した。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

金属基材としては、Ni レスのステンレス合金（Fe-24Cr-1.1Mo-5.1N (at%)）を用い、0.1 N の水酸化ナトリウムとアセトンを用いて脱脂したのち、大気雰囲気下、600 K~1200 K の温度で2時間加熱処理した。

種々の温度で加熱処理した試片は、アミノ基末端のシランカップリング剤である γ -aminopropyltriethoxysilane (APS) のトルエン溶液に浸漬させた。APS 濃度は 0.5wt% とし、浸漬時間は 24 時間とした。浸漬時間経過後は、試片を洗浄し 393 K で 10 分間加熱処理した。

(2) 試料のキャラクタリゼーション

種々の温度で加熱処理した試片の結晶層および化学組成・化学結合状態を X 線回折測定 (XRD)、X 線光電子分光法 (XPS) を用いて調べた。さらに表面から深さ方向への化学状態分析は、Ar スパッタを用いた XPS デプスプロファイルによって調べた。表面形状および表面粗さは原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて調べた。

種々の試片への APS 固定化量は、XPS を用いて調べた。APS 固定化後の試片断面は、透過型電子顕微鏡法 (TEM) を用いて観察した。固定化した APS の安定性は、Dulbecco の PBS(-) に 37°C で 30 日間静置浸漬し、XPS を用いて残存量を調べた。

(3) 細胞培養試験

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて細胞接着性試験を行なった。細胞の培地として、低血清血管内皮細胞増殖用培地 (HuMedia-EG2) を用いた。試料は、エタノールに 24 時間浸漬させることで滅菌した。細胞を播種した試料は CO₂ インキュベーター内で 37°C、5% CO₂ の条件で 1 時間培養した。培養後の細胞はグルタルアルデヒドで固定化した後、脱水・凍結乾燥し、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 表面酸化層のキャラクタリゼーション

600 K~1200 K で酸化物層形成させたところ、XRD 測定よりいずれの表面からでも γ -Fe が検出された。試料の AFM 像より、酸化処理による試料表面での粒成長が確認さ

れた。粒のサイズは酸化の温度の上昇とともに大きくなった。さらに、粒成長にともない試料の表面粗さも増加した。

表面における Fe2p と Cr2p の XPS スペクトルによれば、酸化処理温度に関わらず、Fe2p と Cr2p の化学結合状態は 3 個であった。これにより、Ni フリーステンレス鋼表面には Fe₂O₃ と Cr₂O₃ が生成していることが明らかとなった。しかし、600K においては Fe₂O₃ のみ、1200K においては Cr₂O₃ のみが表面に形成していた。酸化処理温度に対する [Fe]/([Fe]+[Cr]) 比のプロットより、酸化処理温度の上昇とともに、Cr₂O₃ の割合が増加することが明らかとなった。図 2 に、酸化膜の XPS から求めたデプスプロファイルを示す。600K においては、XPS スペクトルより、Fe の価数は試料表面から内部方向に行くにつれて Fe³⁺、Fe³⁺ と Fe²⁺、Fe²⁺、Fe⁰ (metal) となり、Cr の価数は Cr³⁺→Cr⁰ (metal) であった。デプスプロファイルから、表面から内部につれて主な元素は Fe であった。Cr の元素濃度が深さ約 10~20nm の辺り (SiO₂ 換算) で増加していた。800K においては、表面近傍は 600K 同様 Fe が主な元素であり、その価数は XPS スペクトルより、Fe³⁺→Fe³⁺ と Fe²⁺→Fe²⁺→Fe⁰ (metal)、Cr の価数は Cr³⁺→Cr⁰ (metal) と変化していた。これは 600K と同じ価数の変化であった。デプスプロファイルより、Cr の元素濃度が深さ約 20~30nm の辺り (SiO₂ 換算) で増加していた。1000K においては、表面の主な元素は Cr であった。これより、表面の主な組成は Cr₂O₃ と考えられる。酸化膜の厚さは 600K、800K と比較して厚くなった。XPS スペクトルより、Fe³⁺ の結合状態が 800K に比べ表面付近にしか現れず、酸化物層の厚みと比べて表面近傍で価数が 0 価になることが分かった。一方、Cr³⁺ の結合状態はより内部方向でも検出された。これより 1000K では Fe は酸化されにくいと考えられる。1200K において、表面の金属元素は Cr のみであった。Fe は深さ 600nm (SiO₂ 換算) で検出されており、表面には Cr が拡散していることがわかった。また、酸化膜は最も厚かった。Fe は表面近傍で検出されず、内部においても 0 価であった。これより、1200K では Fe 酸化物は形成しないことが明らかとなった。これに対し Cr の結合状態はほとんどが 3 価であり、Cr の組成は Cr₂O₃ であることが分かった。

これらの酸化物形成機構は、金属の拡散係数の差で説明された。316L ステンレス鋼中の Fe と Cr の拡散係数は、低温側においては Fe が Cr よりも大きい。しかし、高温側では Cr のほうが Fe よりも大きい。Ni フリーステンレス鋼の結晶構造は、316L ステンレス鋼と同様であることから、酸化後の試料表面には Fe₂O₃ と Cr₂O₃ が表面に存在し、600K

側では主に Fe₂O₃ が、1200K 側では主に Cr₂O₃ が存在していたと考えられる。

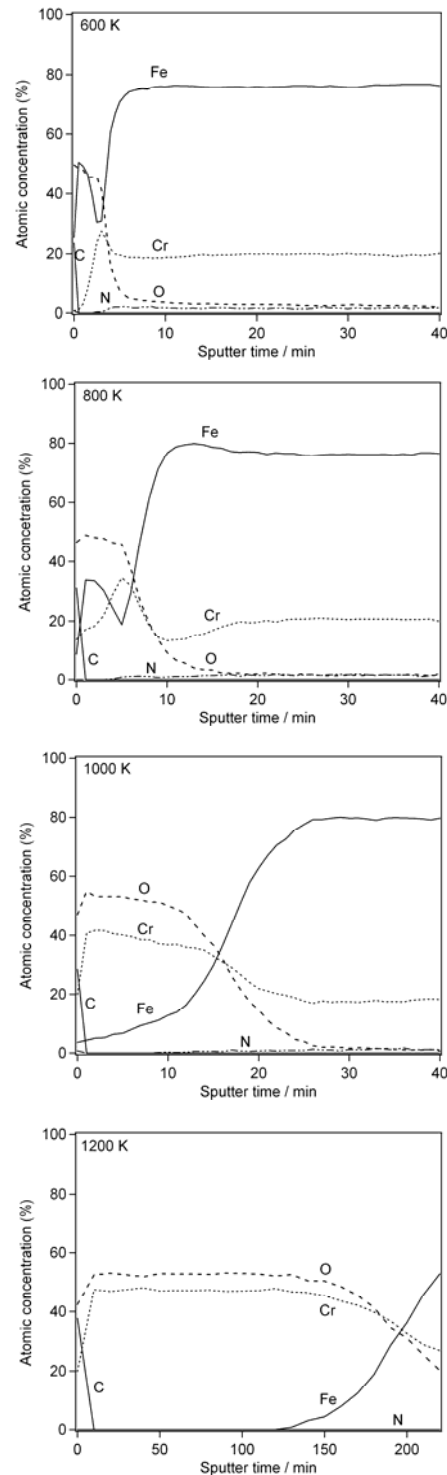


図 2 金属酸化層のデプスプロファイル

(2) APS の固定化

図 3 に、各試料への APS の修飾量を示す。APS の修飾量は 600K で熱酸化処理した試料が最も大きかった。熱酸化処理が上昇するにつれて APS の固定化量が減少した。表面の酸化物組成は、600K で Fe₂O₃、1200K で

Cr₂O₃のみ、800Kと1000Kではその混合層であることがわかっている。そのため、APSはFe₂O₃へ固定化されやすいことが明らかとなった。

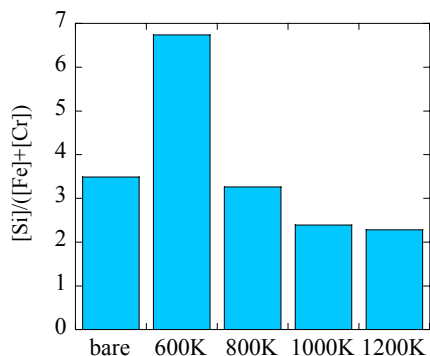


図3 種々の試片へのAPS固定化量

図4に、APS固定化表面での、断面TEM像を示す。FIB加工の保護膜として、Ptを蒸着させた後、カーボンを堆積させた。600Kと800Kでは、均質に酸化膜が形成し、その表面に1~2nmのAPS層が確認された。一方、1000Kと1200Kでは、表面でCr酸化物が粒成長しており、表面が粗くなっている様子が観察された。また、APSはCr酸化物の表面にところどころ1~2nmの厚さで層をなしていることが明らかとなった。

固定化したAPSの安定性を、Dulbecco PBS(-) (大日本住友製薬社製) 中で評価した。各試料で、APSの固定化量は減少していた。30日間経過後のAPS残存割合は34%~42%であり、表面のFeの割合が大きいほど、APSの残存割合が大きいことがわかった。したがって、APSと金属酸化物の間の結合はFe₂O₃がCr₂O₃よりも安定であることが明らかとな

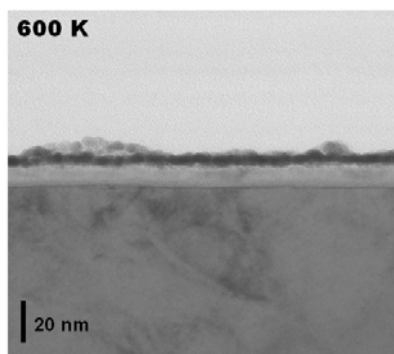


図4 600 Kで酸化層を形成させAPSを固定化した試片の断面TEM像

った。

(3) 細胞培養試験

600 Kで形成させた酸化物表面に固定化したAPS表面で、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて細胞接着試験を行った。APSを固定化した表面では、コントロール表

面(Niレスステンレス合金、600 Kで酸化処理したNiレスステンレス合金、ステンレス316L合金)と比較して、細胞の伸展性に優れていた。以上のことより、金属表面の酸化物層を制御することで、細胞親和性アンカー分子を多量かつ安定に導入できることを明らかにした。

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 1 件)

① M. Soya, T. Yoshioka, K. Shinozaki and J. Tanaka, Effect of Oxide Layers of Ni-Free Stainless-steel on Silane Coupling Agent Immobilization, Materials Transactions, 50, 1318-1321, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 征矢大、吉岡朋彦、大森健一、片田康行、田中順三、シランカップリング剤固定化に対するNiフリーステンレス鋼表面酸化物の影響、第48回セラミックス基礎科学討論会、2010年1月13日、沖縄

② M. Soya, T. Yoshioka and J. Tanaka, Oxidation Process of Ni-Free Fe-Cr-Mo-N System, STAC-3, 2009.6.17, Yokohama, Japan

③ M. Soya, T. Yoshioka, K. Shinozaki and J. Tanaka, Effect of Ni-free Stainless-steel oxide for silane coupling agent immobilization, IUMRS-ICA2008, 2008.12.10, Nagoya, Japan

④ 征矢大、吉岡朋彦、篠崎和夫、田中順三、シランカップリング剤を用いたNiフリーステンレス鋼表面の修飾、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008、2008年11月17日、東京

⑤ 征矢大、吉岡朋彦、篠崎和夫、田中順三、シランカップリング剤固定化に及ぼすNiフリーステンレス鋼表面酸化物の影響、第24回日本セラミックス協会関東支部研究発表会、2008年7月24日、神奈川

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 朋彦 (YOSHIOKA TOMOHIKO)
東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：50452016

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし