

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390410

研究課題名（和文）生理活性を有する脳血管内治療用デバイスの開発研究

研究課題名（英文）Development of new bioactive devices for neuroendovascular therapy

研究代表者

滝 和郎（TAKI WARO）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70144368

研究成果の概要（和文）：生理活性を有する脳血管内治療用デバイスの開発研究を行った。1）硫酸化ジェランをプラチナコイルの中空糸に加工し、Tenascin-C を結合させることにより、生理活性を高めた脳動脈瘤塞栓用コイルを製作した。2）高分子素材によるナノファイバーを作成し、エレクトロデポジット法によりステント表面に薄い被膜を形成し、柔軟性を持ったカバードステントを作成した。3）頸動脈ステント留置術に用いられるポリウレタン製の遠位塞栓防止用フィルターデバイスを、ウロキナーゼコーティングすることにより抗血栓性を付加することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：We developed new bioactive devices for neuroendovascular therapy. 1) Implantation of gellan sulfate core platinum coils with tenascin-C promoted organization of cavities and reduced lumen size in a rat aneurysm model. 2) We developed a novel stent graft consists of a single stent and nanofiber with the use of electrodeposition. 3) Filter type embolic protection device for carotid artery stenting immersed into urokinase solution inhibited fibrin net formation and suppressed aggregation of platelets covering the filter membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 5,500,000  | 1,650,000 | 7,150,000  |
| 2010 年度 | 4,000,000  | 1,200,000 | 5,200,000  |
| 2011 年度 | 4,000,000  | 1,200,000 | 5,200,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 13,500,000 | 4,050,000 | 17,550,000 |

研究分野：脳血管内科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管内科学・医用工学・デバイス・コイル・ステント

## 1. 研究開始当初の背景

近年、脳血管病変に対する血管内治療は、安全性と操作性が格段に改善され、患者の低侵襲治療に対する要望の高まりとともに、多数の症例に適応されるようになってきた。良好な治療成績から適応が拡大する一方で、長

期成績を含めた脳血管内治療の限界点や問題点も明らかになってきた。例えば、脳動脈瘤コイル塞栓術においては、動脈瘤の形態に制限され、初期治療で完全閉塞が得られない症例があること、特に動脈瘤の入口部の閉塞が不完全のため、再発の頻度が少なくない等

の問題がある。また、頸動脈ステント術では、遠位塞栓をいかに防ぐかが問題となっている。さらに、コイルやステントは金属製の異物であるため、血管内に留置した際の血栓形成や炎症反応に留意しなければならない。そこで、これらの諸問題を解決し、安全かつ確実な脳血管内治療を行うために、従来にはない全く新しい発想のデバイスや治療法を開発する必要に迫られている。

そこで、当教室では、これまで血管生物学および再生医学さらに医用材料学より得られた最新の知見を基礎としたデバイス開発を行ってきた。近年は、細胞増殖因子を結合させたコイルの開発 (Neurol Med Chir (Tokyo) 44: 279-85, 2004, J Neurosurg 102: 109-15, 2005)、液体塞栓物質の改良 (Biomaterials 25: 3845-52, 2004)、金ステントの作成 (AJNR Am J Neuroradiol 25: 53-9, 2004) 等を報告している。さらに、細胞外マトリックス蛋白のひとつである Tenascin-C (TNC) をコーティングしたコイルを開発し、ラット総頸動脈を結紮した動脈瘤モデルに留置し、血栓の器質化促進能があることを報告した (J Neurosurg 103: 681-6, 2005)。また、ナノファイバーを用いたカバードステントを開発した。

本研究では、これまでの研究成果を進展させる形で、薬理学・再生医学より得られた最新の知見を基礎に、脳血管内治療に対してより安全かつより治療成績の向上を得られるデバイスの開発を行う。我々の過去の経験と最新の知見を基にした生理活性あるいは薬理作用を応用したデバイスの開発は、今後の脳血管内治療の新たな方向性を示すこととなり、本治療法の発展に大きく貢献できるものと思われる。また、その結果、従来治療不可能とされてきた疾患に新しい治療手段を提供することが期待できる。

## 2. 研究の目的

### (1) 細胞外マトリックス蛋白を結合した脳動脈瘤塞栓術用コイルの開発

脳動脈瘤の塞栓術は瘤内に留置した体積比にして 30%以下のプラチナコイルによって瘤内の血流を停滞させることにより、瘤内を血栓化させ、器質化することを目的としている。しかし、塞栓術後の再開通により、再治療を要することも少なくなく、さらに稀ではあるが、破裂することも認められている。そこで我々は、細胞外マトリックスである Tenascin-C (TNC) を動脈瘤内に誘導することが可能になれば、速やかな器質化が得られることを報告をした (J Neurosurg 103: 681-6, 2005)。しかし、我々が報告した方法は、TNC とプラチナコイルの結合が煩雑であり、動脈瘤に用いるためには、さらに改良が必要であ

った。一方、多糖類で食品にも用いられているジェランを硫酸化した硫酸化ジェランは、TNC との結合性を有しており、動脈瘤内に TNC をデリバリーする素材として有効であることを確認している (投稿準備中)。そこで、この素材を加工して TNC を結合させ、動脈瘤塞栓用コイルに組み合わせることで、TNC 活性を有しかつ操作性にも干渉しない最適なコイルの開発を目指す。

### (2) 抗血小板剤溶出カバードステントの開発

我々は、エレクトロスピンング法を用いたポリウレタン製のナノファイバーをカバーとしたバルーン拡張型カバードステントを開発し、ウサギ動脈瘤モデルに留置し、瘤の消失と母血管の patency が保たれていることを明らかにした。ナノファイバーを用いたこのカバードステントは極めて薄く柔軟性に富み、種々の動脈に導入することができ、コイル単独では治療が難しいとされていた wide neck の動脈瘤に対して、瘤内の血流を完全に遮断できるという点で非常に有用である。しかし、通常のカバードステントでは血栓性塞栓症が弱点とされており、実用化に向けてこの点を改良する必要があると思われる。具体的には、抗血小板剤をステントあるいはカバーに結合させ、薬剤の長期溶出を可能にし、カバードステントに抗血栓性を持たせることを検討する。また、頭蓋内への留置のためには形状記憶を持った自己拡張型カバードステントの方が望ましく、その開発にも着手する。

### (3) 抗血栓性を有する頸動脈ステント用フィルターデバイスの開発

本邦においても 2008 年 4 月より頸動脈ステント留置術 (Carotid Artery Stenting, CAS) が保険収載され、遠位塞栓防止用デバイスとしては、フィルターデバイスが認可された。しかし、本来、術中に正常血流を保ったまま手技を行えるように設計されたフィルターが、手技中に部分閉塞または完全閉塞してしまい、血流が遅くなる状態 (slow flow 現象) あるいは完全に血流が遮断される状態 (no flow 現象) を生じる症例が 10~20% 程度報告されている。治療成績と slow / no flow 現象の間には相関性も指摘されている。そこで、これらの問題を解決することが CAS の治療成績をあげる上で急務である。これまでに、我々は、CAS に使用したフィルターデバイスを電子顕微鏡で観察した結果、フィルター表面にフィブリンが大量に付着し、ポリウレタン膜に開いている孔を閉塞していることを確認し、これらが slow / no flow 現象の原因のひとつではないかと推測している。そこで、フィブリンの付着を防止するのが slow / no flow 現象を防ぐために重要と考え、ポリウレタン表面に抗血栓性加工を施したフィルタ

ーデバイスの開発を行う。さらに、新たな抗血栓性素材を用いたフィルターのデザイン開発を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞外マトリックス蛋白を結合した脳動脈瘤塞栓術用コイルの開発

#### ①コイルの物性および伸展予防効果

脳動脈瘤の組織修復効果をもたらす最適なマトリックス蛋白である Tenascin-C を高率に保持・作用させるためには硫酸化ジェランと結合を増加させる必要がある。一方、硫酸化ジェランは含水するとゲル化し、膨張することが分かっていたために、TNC の効果を最大限に発揮するとともに、短時間で結合を得られる条件を直線状コイルを用いて、比較検討した。また、コイルの特性である柔軟性を阻害させず、かつ伸展効果を保つことができる適正な硫酸化ジェラン糸の太さを、市販の ED coil (KANEKA) の中空に入れて *in vitro* で操作性を脳血管内治療医が検討した。

②Gellan Sulfate core ED coil (GS-core ED coil) のラビットモデルへの留置  
硫酸化ジェランを ED coil の中空にいれた GS-core ED coil を作製し、TNC 溶液に浸漬させた後、ラビットの右総頸動脈結紮モデルに大腿動脈から挿入したマイクロカテーテルを用いてコイルを脳血管内治療専門医が実際の臨床の手技のごとく留置し、加工していない ED coil 留置群と比較し、コイルの柔軟性・伸展効果について比較検討した。また、コイルを留置した血管は2週間後に血管撮影を行った後、摘出し研磨標本とし、HE・EVG 染色を行い血管内腔の評価を行った。

(2) 抗血小板剤溶出カバードステントの開発

#### ①エレクトロデポジットカバードステントの開発

従来、我々が行っているエレクトロスピニング法ではバルーンの過拡張時に耐久性が弱いことが確認されたために、伸展性のある強いカバードステントを作製する必要が生じた。このことから、更なる伸展性を得るためにエレクトロデポジット法を用いてポリウレタンカバードステントを作製した。作製されたカバードステントは漏水試験を行い、血流遮断能の評価を行った。

#### ②ポリウレタンカバーへの抗血小板剤の吸着能の検討

抗血小板剤としてシロスタゾール・アルガトロバンを選択した。*In vitro* 試験として、薬剤をポリウレタンの溶媒であるテトラヒドロフルランに溶解し、薬剤を混合させた状態で、エレクトロデポジット法を用いてカバードステントを作製し、溶媒中に残った薬

剤の量を測定し、ポリウレタンに吸着した薬剤量を推量した。作製した薬剤吸着カバードステントはリン酸緩衝生理食塩水に浸透させ、溶出した薬剤の量を計測した。

#### ③薬剤溶出性ポリウレタンカバードステントの留置実験

薬剤溶出カバードステント2種類および薬剤を吸着していないカバードステントの抗血栓性を比較するために投薬を行っていないラビットの鎖骨下動脈へ経大腿動脈的にカバードステントを留置し、早期抗血栓性を評価するために翌日に血管撮影を行った後、カバードステントを摘出した。

摘出したカバードステントは実体顕微鏡で内腔を観察するとともに、電子顕微鏡で観察し、血栓形成の有無を確認した。

(3) 抗血栓性を有する頸動脈ステント用フィルターデバイスの開発

#### ①抗血栓・抗凝固薬剤の選択

抗血栓性・抗凝固性が得られると思われる候補薬剤ヘパリン・オザグレルナトリウム・ウロキナーゼを用いてフィルターデバイスの膜を形成するポリウレタンへの吸着能を surface plasmon resonance (PSR) を使用して評価する。

#### ②フィブリンプレートを用いたフィブリン溶解能の検討

上記で確認できた薬剤を各種条件下にポリウレタン膜に吸着させ、実際に抗血栓性・抗凝固作用を有するか溶液に浸漬させたポリウレタンをフィブリンプレートの上におき、溶解面積を評価した。

### 4. 研究成果

(1) 細胞外マトリックス蛋白を結合した脳動脈瘤塞栓術用コイルの開発

①硫酸化ジェランを  $10 \mu\text{g/ml}$  TNC 溶液に30分浸漬することで、血管壁の破壊などの副作用なく効果が最大限に引き出した。また、EDC の操作性に関しては、 $100 \mu\text{m}$  の径の硫酸化ジェランが ED coil の柔軟性を阻害することなく、伸展予防効果が得られる最適な太さであるとの結果を得た。

②上記結果で得た条件をもとに作製した GS-core ED coil は無加工の ED coil と遜色ない柔軟性・伸展性が得られた。しかしカテーテル挿入後の時間が経過すればするほど、操作性が悪くなっていくことも確認された。摘出血管内腔には血栓の残存がなく、また正常血管とコイルの近位部との間には  $2\text{mm}$  ほどの厚さの器質化組織が確認できた。

#### ③新たな学術的知見と今後の展望

本研究では、TNC と硫酸化ジェランの結合能および TNC の動脈瘤モデルの血栓器質化能を再確認できた。臨床応用にむけて市販化され

ているコイルに加工を加えて硫酸化ジェランを中空に挿入したコイルを作製したが、硫酸化ジェランのゲル化により操作性が悪くなることが確認できた。今後は、硫酸化ジェランのゲル化を弱めるあるいは、細くても強固な線維加工できる技術の開発が必要と思われた。

## (2) 抗血小板剤溶出カバードステントの開発

①エレクトロスピンニング法と同量の0.2mgのポリウレタンでエレクトロデポジット法でも極めて薄い膜が形成できた。nominal 3mmのstentであるが、4mmまで拡張しても十分な拡張性が得られた。漏水試験でも60mmHgで同様に耐水性が確認できた。

②シロスタゾール・アルガトロバンともにポリウレタンに薬剤を吸着させることが可能であった。残量より濃度依存性に薬剤吸着量が増加することも確認できた。また、両者ともにポリウレタンから遊離し、リン酸緩衝溶液中に放出されることが確認できた。

③血管撮影上は、明らかな血栓は認められなかったが、無処理のカバードステント内面を実体顕微鏡で確認すると、内腔は明らかに赤く血栓が付着していることが確認できた。シロスタゾール・アルガトロバンカバードステントでは同様に凝血塊が認められたが、無処理のものと比較すると明らかに範囲は狭かった。シロスタゾールとアルガトロバンでは明らかな差はなかった。電子顕微鏡像では、シロスタゾール群でステントの段端に血管内皮と思われる像が確認できた。

## ④新たな学術的知見と今後の展望

本研究において、あらたにエレクトロデポジット法による伸展性に富むポリウレタンカバードステントの開発に成功した。薬剤溶出能に関しては、今回選択したシロスタゾールおよびアルガトロバンともに確認でき、留置実験でもcontrolと比較して血栓形成がおさえられとことが確認できた。しかし、血中への薬物の溶出量・溶出スピードなどに関しては、未確認であるため、今後の生体内の血中薬物動態の観察および溶出スピードをコントロールする技術の開発などが必要と思われた。

## (3) 抗血栓性を有する頸動脈ステント用フィルターデバイスの開発

①PSRの結果では、ヘパリン・オザグレルナトリウムにはポリウレタンへの吸着能は全く認められなかった。ウロキナーゼはいったんポリウレタンに吸着するとそのまま表面上に残留し、効果を発することが期待できた。

②上記の結果を踏まえて、ウロキナーゼ溶液にポリウレタンを浸漬させたのち、吸着させて、線溶能を評価すると、溶液濃度依存性・

浸漬時間依存性に溶解面積がおおきくなることが確認できた。

## ③新たな学術的知見と今後の展望

本研究では、フィルターデバイスの主流になっているポリウレタン膜を使用したデバイスではウロキナーゼ溶液に浸漬することで、フィルター表面のフィブリン溶解能が得られた。

CASの際にフィブリンによってフィルターデバイスが閉塞し、血流障害を生じる可能性を低減させることができるようになると思われた。今後は、使用直前にウロキナーゼ溶液につける方法を省略できるようにあらかじめポリウレタン膜にウロキナーゼをコーティングしたデバイスの開発も可能と思われる。

## 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8件)

① Taki W, Sakai N, Suzuki H, PRESAT group. Determinants of poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage when both clipping and coiling are available: Prospective Registry of Subarachnoid Aneurysms Treatment (PRESAT) in Japan. World Neurosurg 76: 437-445, 2011. 査読有

② Taki W, PRESAT group. Factors predicting retreatment and residual aneurysms at 1 year after endovascular coiling for ruptured cerebral aneurysms: Prospective Registry of Subarachnoid Aneurysms Treatment (PRESAT) in Japan. Neuroradiology. 2011 Aug 23. [Epub ahead of print]. 査読有

③ 滝 和郎. 血管内治療の技量の継承. 脳神経外科ジャーナル 20: 513-516, 2011. 査読有

④ Hamada K, Matsushima S, Toma N, Tota ni T, Toda M, Ogawa S, Asakura F, Sakai da H, Iwata H, Taki W. Simple immersion of filter devices into an urokinase solution prevents fibrin net formation during carotid artery stenting. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 95: 171-176, 2010. 査読有

⑤ Taki W. Memorial review celebrating the 50th year of publication of NMC - neuroendovascular therapy. Neurol Med Ch

ir (Tokyo) 50: 809-823, 2010. 査読有

⑥ Kuraishi K, Iwata H, Nakano S, Kubota S, Tonami H, Toda M, Toma N, Matsushima S, Hamada K, Ogawa S, Taki W. Development of nanofiber-covered stents using electrospinning: in vitro and acute phase in vivo experiments. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 88: 230-239, 2009. 査読有

⑦ 滝 和郎. 脳血管内治療の過去・現在・未来. 脳神経外科速報 19: 364-373, 2009. 査読無

⑧ 滝 和郎. 技量の継承 -血管内治療の場合-. 脳卒中の外科 37: 426-428, 2009. 査読無

[学会発表] (計 8 件)

① 濱田和秀, 松島 聡, 外波弘之, 倉石慶太, 当麻直樹, 小川 覚, 戸田満秋, 岩田博夫, 滝 和郎. Electodeposition Polyurethane Covered Stent の開発. 第 26 回日本脳神経血管内治療学会学術総会, 2011 年 11 月 24-26 日, 千葉市.

② 松島 聡, 濱田和秀, 種村 浩, 三浦洋一, 当麻直樹, 宮本啓一, 今中-吉田恭子, 吉田利通, 滝 和郎. 硫酸化ジェラン線維性素材を用いた Bioactive Coil の開発研究. 第 70 回日本脳神経外科学会学術総会, 2011 年 10 月 12-14 日, 横浜市.

③ Taki W. The present and future of carotid stenting. 29th Annual Spring Meeting of the Korean Neurosurgical Society, April 21-23, 2011, Inchon.

④ 濱田和秀, 当麻直樹, 宮本啓一, 今中-吉田恭子, 吉田利通, 松島 聡, 滝 和郎. Gellan sulfate core platinum coils binding tenascin-C の開発と血管内腔の器質化促進能の検討. 第 25 回日本脳神経血管内治療学会総会, 2009 年 11 月 19-21 日, 富山市.

⑤ 外波弘之, 濱田和秀, 中野恵之, 窪田真一郎, 戸田満秋, 当麻直樹, 松島 聡, 滝 和郎, 岩田博夫. 脳血管内治療用カバードステントの作製と評価. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009 年 11 月 16-17 日, 京都市.

⑥ 濱田和秀, 当麻直樹, 松島 聡, 朝倉文夫, 阪井田博司, 小川 覚, 戸谷貴彦, 戸田満秋, 岩田博夫, 滝 和郎. Urokinase Coating

Angioguard XP 使用症例における slow flow の検討. 第 10 回近畿脳神経血管内治療学会, 2009 年 9 月 12 日, 大阪市.

⑦ Tonami H, Hamada K, Iwata H, Nakano S, Kubota S, Toda M, Toma N, Matsushima S, Ogawa S, Taki W. Fabrication and Evaluation of Electrospun Polyurethane-Covered Stent for Treatment of Cerebral Aneurysm. 6th International Intracranial Stent Meeting. August 5-7, 2009, Sendai.

⑧ 濱田和秀, 当麻直樹, 松島 聡, 朝倉文夫, 阪井田博司, 畑崎聖二, 佐藤 裕, 市川直巳, 山道 茜, 小川 覚, 戸谷貴彦, 戸田満秋, 岩田博夫, 滝 和郎. Urokinase Coating Angioguard XP の有用性についての検討. 第 8 回日本頸部脳血管治療学会, 2009 年 5 月 29-30 日, 北九州市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

滝 和郎 (TAKI WARO)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70144368

### (2) 研究分担者

松島 聡 (MATSUSHIMA SATOSHI)  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 50252367

阪井田 博司 (SAKAI DA HIROSHI)  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40273362

朝倉 文夫 (ASAKURA FUMIO)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90322362

当麻 直樹 (TOMA NAOKI)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 80362341

### (3) 連携研究者

岩田 博夫 (IWATA HIROO)  
京都大学・再生医科学研究科・教授  
研究者番号: 30160120

### (4) 研究協力者

濱田 和秀 (HAMADA KAZUHIDE)  
三重大学・大学院医学系研究科