

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500565

研究課題名(和文)末梢動脈疾患に対するステント内再狭窄予防のための低侵襲温度制御温熱治療の開発

研究課題名(英文)Development of minimally invasive strategy for in-stent restenosis for peripheral arterial disease

研究代表者

尾原 秀明(OBARA, HIDEAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20276265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroの磁界発生装置による磁場照射では25℃の温度上昇を認めたが、本装置ではサンプル全体を磁場コイルの中に入れることが必要なため使用には至らなかった。そこでステントと共に使用できる他の外部エネルギーによる低侵襲治療法として超音波照射を検討した。ステントに対する超音波照射では500kHzにおいてフリーラジカル発生が認められた。ゼノグラフトモデル(皮下腫瘍モデル)の側面にナイチノールステントを埋没させるモデルを作製した。超音波を照射した群でステント内狭窄が抑制された。この結果により、ナイチノールを超音波照射により励起したフリーラジカルは動物モデル体内においても有効であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to develop minimally invasive strategy for preventing in-stent restenosis of peripheral arterial disease.

The generation of heat was obtained by magnetic field irradiation to a nickel-titanium alloy (nitinol) stent at 200kHz or 900kHz/4mT in in vitro, but we could not reach to the stage of animal experiments due to construction of magnetic field generator. The generation of the free radicals was observed by ultrasound irradiation to a nitinol stent at 500kHz or 1MHz. Free radicals were effective to suppress the in-stent stenosis on xenograft model (subcutaneous tumor model). WHHLM1 rabbit exhibits hereditary hyperlipidemia and arteriosclerosis. In the rabbit intimal thickening model, the main artery of the WHHLM1 rabbit rubbed with Fogarty catheter, and then, nitinol stent was inserted after two weeks from the treatment. There was no restenosis after one month from insertion, thereby the model was extended up to six months and are currently being analyzed.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：動脈硬化 内膜肥厚 ステント

1. 研究開始当初の背景

我々は長年、閉塞性動脈硬化症に対する治療に取り組み、通常のバイパス術のみならず、特に最近では低侵襲治療である血管内治療に積極的に取り組んできた。しかしながら、この血管内治療の長期成績は、鼠径靭帯以下の下肢動脈ではバイパス術よりも劣っているのが現状で、生活環境の変化と共に閉塞性動脈硬化症が急増している現在では、血管内治療の長期成績の向上が血管外科領域では急務となっている。本来血管内留置用ステントは、バルーン拡張単独で生じ得る血管壁の解離や急性再狭窄などによる早期再狭窄を予防するために開発され、血管内治療の成績を飛躍的に向上させたが、冠動脈病変と比較して動脈硬化がより高度で、ねじれや進展などの外的侵襲も加わる鼠径靭帯以下の下肢動脈では、ステント破損やステント内再狭窄が問題となり、いまだ長期成績が不良である。ステントの改良と共に、破損の頻度が減少傾向となりつつある現在では、ステント内再狭窄が最大の課題となっている。ステント内再狭窄は、ステント留置後の血管平滑筋細胞の異常増殖による内膜肥厚が原因とされている。この血管平滑筋細胞の増殖を抑制するために、さまざまな取り組みが行われている。冠動脈領域ですでに臨床利用されているパクリタキセルやシロリムスによる薬剤溶出性ステントの臨床試験が末梢動脈領域でも行われているが、長期成績はいまだ明らかになっていない。それ以外にもステントによる影響を軽減するために、ステントそのものを生体に吸収させる biodegradable stent など研究されている。また発想を転換し、ステントを使用しない低温療法とバルーン形成術を組み合わせた Cryoplasty、カテーテルを用い粥腫を摘除する atherectomy など様々な臨床研究がおこなわれているが、いずれもいまだ研究段階である。

2. 研究の目的

血管平滑筋細胞の異常増殖を抑制するための手段として、温熱による細胞増殖抑制作用に着目した。実際に、悪性腫瘍に関しては、化学放射線療法に加えて温熱療法による腫瘍の極所制御の有用性が示唆されている。それを血管平滑筋細胞に応用して、ステントからの発熱がステント留置部局所での血管平滑筋細胞の異常増殖を抑制することが確認できれば、ステント内再狭窄の予防につながると考え本研究を企画した。現在、金属ステントに交流磁場をかけることにより渦電流が生じ、発熱が得られることは既に知られている。しかし、磁場のため温度をモニターするのが困難で臨床応用に至らず、それに加えて交流磁場を発生させる装置が高価で大型であった。そこで今回われわれは、東京工業大学の阿部名誉教授や上田特任教授らが発明した、安価で小型化された超高性能高周波

磁界発生装置および非接触型温度センサーを組み合わせて、ステント挿入患者に対する温熱療法を開発する着想に至った。

3. 研究の方法

(1) 血管内治療用ステントの励磁の確認：体外で各種血管内留置用ステントに磁界発生装置による磁場を照射し、発熱反応が得られるか確認した。

(2) 血管内治療用ステントの超音波によるフリーラジカル発生の確認：DHBA 法及び Aminophenyl Fluorescein (APF) 法によりフリーラジカル発生の確認を行った。

(3) ステント狭窄モデルの作製：A431 (類上皮癌細胞株) を免疫不全マウスの皮下に移植し、皮下腫瘍モデルを作製し、腫瘍径がおよそ 5mm になった際に腫瘍の側面にナイチノールステントを埋没させ、ステント内に腫瘍が侵食するモデルを作製した。

(4) ステント狭窄モデルの超音波による影響の検討：1MHz の超音波を 10 分照射し、2 週間後にステントを摘出、樹脂包埋切片を作製して狭窄を確認した。

(5) ウサギを用いた内膜肥厚モデルの作製：遺伝性高脂血症により大動脈に動脈硬化を自然発症する WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギを用いた。WHHLMI ウサギはケタミン (50mg/kg)、キシラジン (3mg/kg) の筋肉注射、およびイソフルランの吸入で麻酔した。右大腿部を切開し、鈍的剥離の後、右大腿動脈を露出した。右大腿動脈をカットダウンし、X 線透視下に大動脈に血栓除去用の 2Fr のフォガティールカテーテルを挿入し、位置を確認した後、バルーンを膨らませて 2cm 引き抜き、再度 2cm 挿入した。この操作を 3 回繰り返し、大動脈内膜に障害を加えた。術後、カテーテルを引き抜き、右大腿動脈は結紮し、切開部を縫合閉鎖した。右大腿動脈カットダウンに際して血栓閉塞を予防する目的でヘパリンを 100 単位静脈内投与した。また、血管内膜障害部位は、術後 X 線透視下に位置を容易に特定できるようにマーキングとしてクリップを皮下に埋め込んだ。

(6) 動脈内膜肥厚モデルウサギに対するステント留置：前述の通りにフォガティールカテーテルを用いて大動脈内膜に擦過障害を加え、内膜肥厚モデルを作製した。擦過障害の 14 日後に、同様の麻酔下に頸部正中切開し、鈍的剥離の後、頸動脈を露出した。頸動脈をカットダウンし、X 線透視下に障害部位に血管内治療ステントを留置した。留置後、ステントのシステムから血管撮影検査を施行し、ステントが適切に留置されていることを確認した。血管撮影後、システムを抜去し、頸動脈を結紮し、切開部を縫合閉鎖した。頸動脈カットダウンに際してはヘパリンを 100 単位静脈内投与した。

4. 研究成果

In vitro の 200kHz・4mT の磁界発生装置による磁場照射では、2400 秒でリファレンスとの差がおよそ 6 観察され (図 1)、900kHz・4mT では 420 秒でおおよそ 25 の温度上昇を認めた (図 2)。しかし、これらの装置ではサンプル全体を磁場コイルの中に入れることが必要なため、外部に向かって磁場を発生させる東工大の超高性能高周波磁界発生装置を検討したが、使用には至らなかった。そこで、ステントと共に使用できる他の外部エネルギーによる低侵襲治療法として超音波照射を検討した。ナイチノールステントの構成要素である二酸化チタンは超音波を照射することにより、フリーラジカルが発生することが知られている。原子が超音波などを受けて励起され、ペアの一方の電子が失われると、他者と反応を起こしやすい分子や原子になる。このようになった分子や原子をフリーラジカル (遊離基) と呼び、強い酸化作用で細胞障害性を有する。ステントに対する超音波照射では、500kHz においてフリーラジカル発生が認められた (表 1)。また 1MHz においても APF 法によってフリーラジカル発生が確認された。

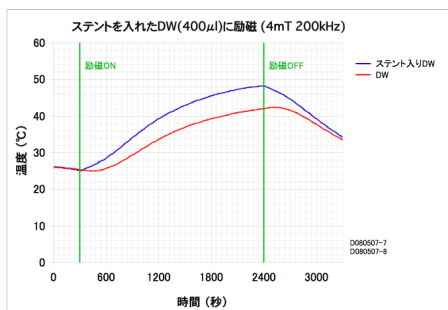


図 1

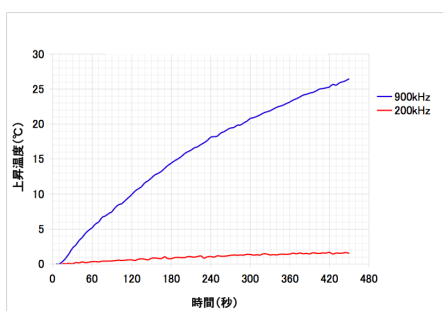


図 2

表 1. ステントに超音波照射した際のラジカル発生

周波数	超音波	ステント	DHBA
100 kHz	+	-	10.8
	+	+	33.6
300 kHz	+	-	6666.7
	+	+	6652.9
500 kHz	+	-	5291.8
	+	+	11638.2

DHBAの生成量を指標としたフリーラジカルの定量

発生したフリーラジカルの生体組織への影響を確認する為、ゼノグラフトモデル (皮下腫瘍モデル) の側面にナイチノールステントを埋没させるモデルを作製した。1MHz・10分の超音波照射を行った。超音波を照射した群でステント内狭窄が抑制された (図 3)。この結果により、ナイチノールを超音波照射により励起したフリーラジカルは動物モデル体内においても有効であることが確認された。



図 3

ウサギ内膜肥厚モデルは、遺伝性高脂血症を呈し動脈硬化が誘導される WHHLMI ウサギの大動脈をフォガティカテーテルで擦過し、2週間後にパラフィン標本を作製し、大動脈を観察したところ強度の狭窄が確認された (図 4)。ウサギ内膜肥厚モデルへのステント留置は、大動脈のバルーン擦過の 14日後、内膜肥厚モデルウサギの頸動脈を露出してステントを挿入し、X線透視下に腹部大動脈のバルーン擦過部位にステントを留置した。1カ月後の大動脈を採取、樹脂包埋切片を作製しての検討では、未だ再狭窄は見られなかった。6か月まで延長したモデルを作製し、現在解析中である。

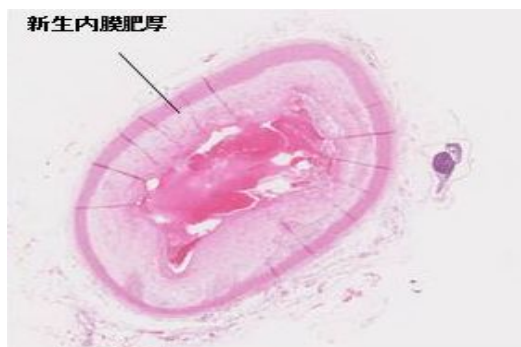


図 4

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾原 秀明 (Hideaki Obara)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20276265

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

松田 祐子 (Matsuda Yuko)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90534537