

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2014
 課題番号：25861224
 研究課題名(和文) 静脈グラフト劣化と狭窄予防のための生体吸収性薬物徐放血管外ステントの開発

 研究課題名(英文) Development of drug eluting biodegradable extravascular stent to prevent vein graft failure

 研究代表者
 河津 聡 (KAWATSU, SATOSHI)

 東北大学・大学病院・助教

 研究者番号：80633685

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：冠動脈バイパス術静脈グラフト劣化予防のため、薬物徐放生体吸収性血管外ステントを開発、研究した。ラパマイシン徐放性生体吸収性ステントを開発し、ビーグル犬の大腿動静脈血管吻合モデルを用い実験を行った。生体吸収性ステントによりコンプライアンスミスマッチを改善し血行力学的ストレスの影響を軽減、グラフト部の型膠原線維、 α -SMAの増殖を有意に抑制した。さらにラパマイシンにより α -SMA増殖を有意に抑制し、新生内膜増殖抑制効果が示唆された。ラパマイシン溶出性血管外ステントの使用は、静脈グラフトの遠隔期狭窄予防効果に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Vein graft stenosis and occlusion at long term have been a significant clinical issue. We tested the hypothesis that drug eluting biodegradable extravascular stent can prevent vein graft stenosis by suppressing an increase in the hemodynamic stress and also by inhibiting excessive cellular proliferation. We developed rapamycin (RM) eluting biodegradable poly L-lactic acid and epsilon-caprolactone copolymer (PLA-CL) extravascular stent. Femoral vein graft interposition was performed in beagles. Beagles were divided into four groups: without a stent (control); with a PLA-CL stent only; and with a PLA-CL stent containing RM 80 μ g, and with 800 μ g. Pathohistologic analyses were performed at 12-month interval. Rapamycin eluting biodegradable extravascular stent can modify the long-term deterioration of vein graft compliance. In addition, the drug eluting extravascular stent can inhibit neointimal hyperplasia of vein grafts and prevent graft stenosis at long term.

研究分野：心臓血管外科 虚血性心疾患 成人心臓血管外科

キーワード：冠動脈バイパス術 生体吸収性薬物徐放血管外ステント ラパマイシン 静脈グラフト 新生内膜 コ
 ンプライアンスミスマッチ

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化から我が国における糖尿病、虚血性心疾患などの血管性病変は増加しており、その治療成績の向上は国民の健康管理の観点からも重要度を増している。虚血性心疾患に対する現在の代表的治療法は、主としてカテーテルインターベンションによるステント治療と冠動脈バイパス術の外科的治療に大別される。近年、冠動脈バイパス術は手術手技、デバイスの改良により成績は向上している。左冠動脈主幹部病変を含む病変、多枝冠動脈狭窄病変、透析患者などの高度石灰化冠動脈病変に対してはカテーテルインターベンションよりも冠動脈バイパス術の長期遠隔成績は良好であることが実証されており、今後も虚血性心疾患において重要な治療法である。

冠動脈バイパス術で用いられるグラフトには、主として内胸動脈、橈骨動脈などの動脈グラフトと大伏在静脈に代表される静脈グラフトがある。内胸動脈グラフトの長期開存性が良好である報告は多数認めるが、大伏在静脈に関しては手術後10年で半数程度が閉塞するとの報告があり、満足できる開存性は認められない。しかし臨床では多数の狭窄病変に対してバイパス術を施行する必要がある場面が多いため、静脈グラフトは現在も尚、重要なグラフトである。

2. 研究の目的

冠動脈バイパス術で使用される静脈グラフトでは長期開存性に難点がある。当教室で研究開発してきた技術を駆使し、血管吻合部における新生内膜抑制効果が示されているラパマイシン徐放フィルム、静脈グラフトの血行力学的ストレス軽減効果が示されている生体吸収性血管外ステントを組み合わせることにより、薬物徐放が可能で生体吸収性血管外ステントを新規に開発し、静脈グラフトの劣化と狭窄を予防することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 薬物徐放生体吸収性血管外ステントの作製

ステントの素材にはポリ乳酸カプロラクトン共重合体(P(LA/CL))を使用する。P(LA/CL)の繊維から形成した網目状ステントを作製する。ラパマイシンゲルを作製し、ステントにコーティングすることによりラパマイシン徐放生体吸収性血管外ステントを作製する。

(2) 動物実験

実験動物はビーグル犬(体重約10kg)を用いる。全身麻酔下に両側大腿動脈、大腿静脈を露出後、大腿静脈を静脈グラフトとして約50mmの長さで両側から採取する。グラフト採取後の大腿静脈断端は結紮し処理する。ステントでラッピングした静脈グラフトを大腿動脈に間置するように端々吻合し血管吻合モデルを作成する。

尚、実験群は下記4群に分類する。薬物含有

量は当教室で行った先行研究を参考としラパマイシン80 μ g、800 μ gとする。また、ラパマイシンを含有しない吸収性ステントの作製も行う。

- ① ステント非使用(control)群
- ② 生体吸収性ステント(PLA/CL)群
- ③ ラパマイシン80 μ g徐放吸収性ステント(RM80)群
- ④ ラパマイシン800 μ g徐放吸収性ステント(RM800)群

(3) 評価

術後12ヶ月に標本を摘出し以下の評価を行う。

①開存率

各群の摘出標本の開存の有無を肉眼的に確認する。グラフト内に血流を認めるものを開存と判断し、病理組織学的評価を行う。

②病理組織学的評価

4%paraformaldehyde液で灌流固定を行い標本を摘出する。HE染色、EM染色を行い光学顕微鏡を用い内膜、中膜面積を測定する。また、内膜肥厚度=内膜面積/(内膜+中膜面積)とし測定し比較検討を行う。

③免疫組織学的検討

抗I型膠原線維抗体、抗 α -smooth muscle actin(α -SMA)抗体、抗von Willebrand抗体について免疫組織学的検討を行う。

④生理学的評価

術直後から術後12ヶ月までのランダムな測定時期に、体表超音波装置とドップラー超音波装置による吻合部の血流評価、グラフトの形態評価、エコートラッキング法による静脈グラフト剛性としてstiffness β 、粘弾性を定量化したI*(アイスター)について計測する。

4. 研究成果

(1) 薬物徐放生体吸収性血管外ステントの作製

3-0 PLA/CLモノフィラメント糸1本(約2m)を網目状に編み込み、ステントを作成した。3-0 PLA/CLモノフィラメント糸の性状は、径0.315mm、抗張力3098g(約30.4N)、結節抗張力2174g(約21.3N)、強力半減期約8週、生体吸収期間約12ヶ月であった。サイズは薬剤の徐放効果も考慮し、静脈グラフトの最大径6mmにtight fittingするように口径6mmに設定した。またラパマイシンゲルコーティングの際、長さが短くなることからあらかじめ静脈グラフト長より5mm長く55mmに設定した(図1)。

濃度変化による効果を比較するため、80 μ g、800 μ gの含有群とラパマイシンを含有しないPLA/CL単独群のステントを作成することとした。ラパマイシンゲルをステントにコーティングし、ラパマイシン溶出型生体吸収性ステントを作成した。作成手順は以下の通りである。

試験管内にPLA/CL(50:50、生体吸収期間約6ヶ月)50mgにラパマイシン、80 μ g、

800 μg を加え、ジオキサンを溶媒とし計 1.2 mL となるように加え、完全に溶解させ、ラパマイシンゲルを作成した。

血管外ステントにラパマイシンゲルを均一にコーティングし、ただちにジオキサンを乾燥させ、ラパマイシン溶出型血管外ステントを作製した。この際、試験管内のラパマイシンゲルが完全にコーティングできたかどうかは、コーティング前後での試験管残量測定を行った。残量測定の結果平均 24.1 \pm 14.5 mg、全ゲル量 1200 mg の約 2 % であり、ほぼ全量がコーティングされたこととした。尚、この過程で血管外ステントの網目にゲルが入り込み、サイズは長さ 50 mm、口径 6 mm となった。

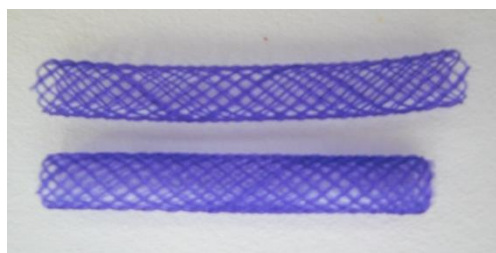


図1：ラパマイシン徐放性血管外ステント
上がゲルコーティング前、下がコーティング後

(2) 肉眼的所見、開存率

12ヶ月の観察期間中ビーグル犬は全頭生存した。摘出時ステントは全例で吸収されており、肉眼的には認められなかった。静脈グラフトの開存率は術後 12ヶ月で、control 群 67%、PLA/CL 群 67%、RM 80 群 70%、RM 800 群 80% であった。

(3) 病理組織学的検討

① グラフト吻合部

術後 12ヶ月における各群の吻合部における横断面 (EM 染色) を示す (図2)。

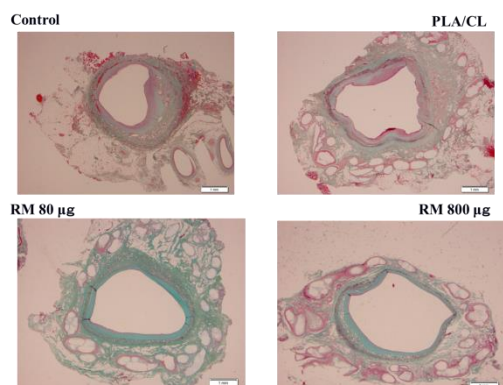


図2：グラフト吻合部横断面

control 群では新生内膜の形成と内腔の狭小化を認め、ステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) では、グラフト周囲にステントのポリマーと生体吸収反応に伴い形成された肉芽腫を認めた。また PLA/CL 群では新生内膜の形成を認めた。内膜肥厚度は control 群 0.32 \pm 0.06、PLA/CL 群 0.32 \pm 0.08、

RM 80 群 0.26 \pm 0.05、RM 800 群 0.25 \pm 0.03 であり、RM ステント群 (RM 80 群、RM 800 群) で control 群と比較して低い傾向であったが統計学的有意差を認めなかった。

② グラフト体部

術後 12ヶ月における各群のグラフト体部における横断面 (EM 染色) を示す (図3)。

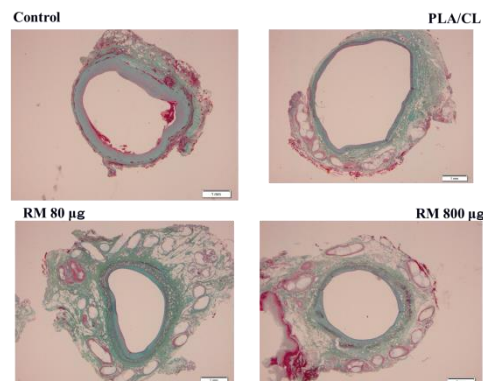


図3：グラフト体部横断面

control 群では新生内膜の形成を認めた。ステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) では、グラフト周囲にステントのポリマーと生体吸収反応に伴い形成された肉芽腫を認めた。内膜肥厚度は control 群 0.15 \pm 0.02、PLA/CL 群 0.09 \pm 0.03、RM 80 群 0.10 \pm 0.03、RM 800 群 0.07 \pm 0.02 であり、ステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) で control 群と比較して低い傾向であったが統計学的有意差を認めなかった。(RM 800 vs control: P=0.06)。

(4) 免疫組織学的検討

・抗 I 型膠原線維抗体染色、Elastica van Gieson 染色

術後 12ヶ月における各群のグラフト体部における抗 I 型膠原抗体免疫染色と Elastica van Gieson 染色を示す (図4)。

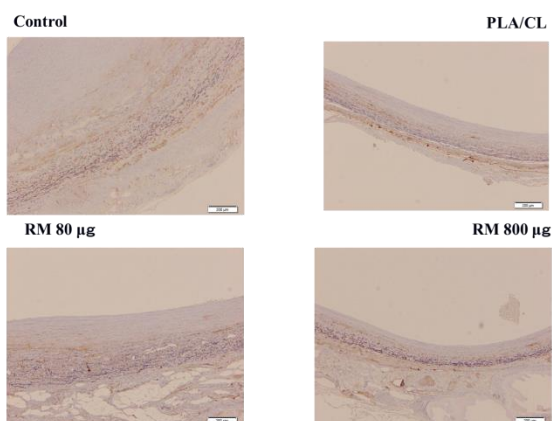


図4 抗 I 型膠原抗体免疫染色と Elastica van Gieson 染色

control 群ではステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) に比べ弾性線維が少なく、I 型膠原線維を多数認めた。

各群において弾性線維密度を計測した。control 群 0.247 \pm 0.004、PLA/CL 群

0.0378 ± 0.005、RM 80 群 0.0334 ± 0.009、RM 800 群 0.0385 ± 0.005 であり、control 群はステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) と比較して低い傾向であったが統計学的有意差を認めなかった。次に I 型膠原線維密度を計測した (図5)。control 群 0.0618 ± 0.0016、PLA/CL 群 0.0347 ± 0.003、RM 80 群 0.0324 ± 0.003、RM 800 群 0.0327 ± 0.003 であり、各ステント群は control 群と比較して有意に低かった (PLA/CL、RM 80、RM 800 vs control: P<0.05)。

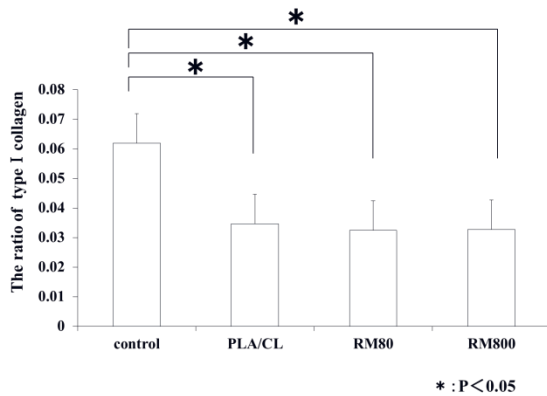


図5: I型膠原線維密度

・抗 α -SMA 抗体染色

術後 12ヶ月における各群のグラフト体部における抗 α -SMA 抗体免疫染色を示す (図6)。

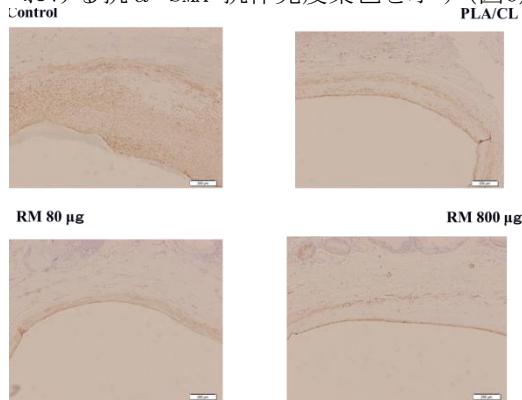


図6: 抗 α -SMA 抗体染色

Control 群の内膜では α -SMA 陽性細胞を多数認めた。各群において α -SMA 陽性細胞密度を計測した (図7)。control 群 0.32 ± 0.07、PLA/CL 群 0.15 ± 0.06、RM 80 群 0.08 ± 0.06、RM 800 群 0.07 ± 0.03 であり、各ステント群は control 群と比較して有意に低かった (PLA/CL、RM 80、RM 800 vs control: P<0.01)。さらに RM ステント群 (RM 80 群、RM 800 群) において PLA/CL 群と比較して有意に低かった (RM 80、RM 800 vs control: P<0.05)。

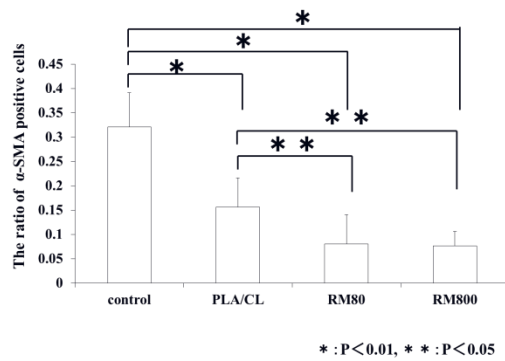


図7: α -SMA 陽性細胞密度

・抗 von Willebrand 抗体染色

術後 12ヶ月における各群の吻合部とグラフト体部では、全ての群において血管内皮細胞の配列を認めた。各群間で染色に差を認めなかった。

(5) 生理学的測定

・超音波による吻合部とグラフトの状態

control 群では術後 6ヶ月において吻合部で血流の加速とグラフトの拡張を認めた。術後 12ヶ月も同様であった。ステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) では術後 6ヶ月において吻合部からグラフトにかけて一様の径であり、血流も一定であった。術後 12ヶ月も同様であった。

・stiffness β の計測

control 群では術後早期は 23.8 と低値であったが、経時的に増加し術後 12ヶ月で 55.8 と高値となった。一方、各ステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) では術後早期は高値であったが、経時的に減少し術後 12ヶ月で動脈に近い値となった。(図8)

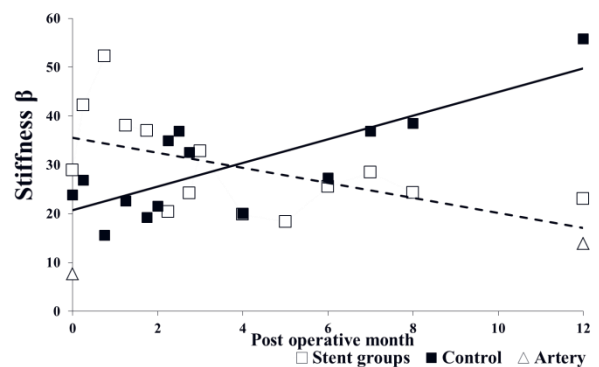


図8: stiffness β

・I* の計測

control 群では術後早期は -0.155 と低値であったが、経時的に増加し術後 12ヶ月で 0.44 となった。一方、各ステント群 (PLA/CL 群、RM 80 群、RM 800 群) では術後早期は高値であったが、経時的に減少し動脈に近い値となった。(図9)

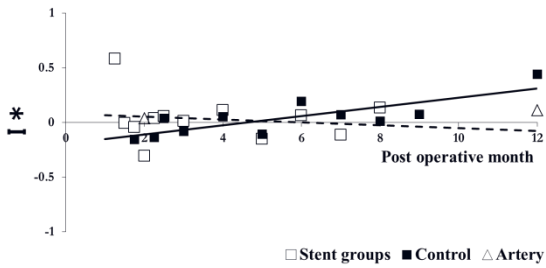


図 9 : I*

考察

ビーグル犬を用いた静脈グラフトバイパスモデルにおいて生体吸収性ステントの使用は、静脈グラフトの拡張を予防し、剛性と粘弾性を動脈とほぼ同程度とすることで、動脈と静脈グラフトのコンプライアンスミスマッチを改善し血行力学的ストレスの影響を軽減した。また、グラフト体部では、ステントの使用により新生内膜の増殖に関する I 型膠原線維の増殖と α -SMA の増殖を有意に抑制した。さらにラパマイシンの効果により α -SMA の増殖を有意に抑制した。したがってラパマイシン溶出型血管外ステントの使用は、静脈グラフトの遠隔期狭窄予防効果に有用であると考えられた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河津 聡 (KAWATSU, SATOSHI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号 : 80633685