

200/0663

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

循環器系疾患の治療に用いる医用材料
と
それを用いた治療デバイスの開発

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩田 博夫

平成14（2002）年 3月

目次

I.総括研究報告書

循環器系疾患の治療に用いる医用材料とそれを用いた治療デバイスの開発 岩田博夫	1
---	---

II.分担研究報告書

1. デバイスの試作と in vitro 評価 岩田博夫	5
2. 材料設計と合成に関する研究 中山泰秀	9
3. ステンツの設計試作 in vitro 評価 池内 健	18
4. 治療コンセプトの提示、動物実験による評価 滝 和郎	20

III.研究成果の刊行に関する一覧表	22
--------------------	----

循環器系疾患の治療に用いる医用材料とそれを用いた治療デバイスの開発

主任研究者 岩田博夫 京都大学再生医科学研究所

研究要旨 本研究では、要素技術の開発を行い、ついでそれらを血管内治療デバイスとして組み立て、さらに血管内治療システムとして完成させることを目指している。本年度は2年度でもあり、個々の要素技術、金属表面への生分解性高分子のグラフト法、温度応答性薬物コントロールリリース薄膜作製法、金属表面への遺伝子担持法、薬物固定化担体として有用な材料、カバースtent作製材料等の開発研究をほぼ完成させるとともに、一部、例えば器質化促進コイルとカバースtentについてはデバイス化して動物実験で機能評価を行った。Stentの力学的特性の解析に関しては、重要な力学特性であるStentの曲げに対する柔軟性に注目して、それを正確に測定できる試験機を開発し、試作Stentの評価を行った。

岩田博夫 京都大学再生医科学研究所・教授
中山泰秀 国立循環器病センター研究所生体工学部・室長
池内 健 京都大学再生医科学研究所・教授
滝 和郎 三重大学医学部脳神経外科・教授

A. 研究目的

カテーテル等を用いた血管内治療は、血管狭窄部位を拡張する血管再形成術と、動脈瘤や動静脈奇形等の正常でない血管部分を閉塞する血管塞栓術との二つに大別される。血管拡張術では、拡張後に高確率に再狭窄が発症し、その対策が急務である。血管の再狭窄を防止するために、種々の薬物のコントロールリリースや遺伝子治療等が試みられているが、コントロールリリース法や遺伝子の局所投与法が未熟であるため、その効果が十分上がらない、また、副作用が出るなどの問題が指摘されている。一方、血管塞栓術では、近年臨床で使用され始めたデバイスが多く、その長期成績が明らかでない。例えば、脳動脈瘤は白金コイルを留置することで治療が行われているが、瘤内に形成された血栓が器質化せず、後に再発してきたという報告も少なくない。本研究では、これらの問題を解決するために血管内治療に用いるデバイス、そのデバイスを作製するための要素技術の開発を進めている。

本年度は2年度でもあり、個々の要素技術の開発研究をほぼ完成させるとともに、作製されたデバイスの評価を行うための *in vivo* 評価系の確立を主眼に研究を進めた。

B. 研究方法

研究チームは、材料合成、デバイス作製と機械工学の専門家と臨床医とから構成されている。本研究では個々のユニットを順次開発し、それぞれの動物実験による評価、さらにユニットデバイスの改良を行う。行う研究はニーズプル型とシーズプッシュ型とに

大きく2つに分ける事が出来る。ニーズプル型研究では、医療現場での要求がかなり明確なデバイス、例えば液体塞栓材料、塞栓治療用マイクロビーズ、コイル、Stent、マイクロカテーテル等のハイパフォーマンス化へ向けた研究を進める。一方、シーズプッシュ型研究では、現有のシーズを医療に役立てる研究、さらに、シーズの開発研究を行う。その例としては、光反応、光反応性高分子の合成、微細加工技術、極表面加工技術、遺伝子治療用デバイスの開発等の基礎研究を進める。前者は速攻有効型、後者は意欲的・将来的研究である。個々の方法については分担報告書に記載した。

倫理面への配慮: 現在のところ臨床研究を行っていない。近い将来に臨床研究を進めるときは、研究所ならびに臨床研究施設での倫理委員会にはかり承認を得るとともに、患者に新しい治療であり、その危険性と有効性等を十分説明し、書面でインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

血管内治療に用いるデバイス、そのデバイスを作製するための要素技術の開発を進めている。本年度開発を進めた要素技術は、炎症惹起物質固定化コイル作製のためのラクトンの表面開始開環重合法、温度応答性薬物コントロールリリースシステム、遺伝子担持Stent等である。炎症惹起物質固定化コイルは合成物のみからなる器質化促進コイルを作製できると考える。温度応答性薬物コントロールリリースシステムはバルーンカテーテルやStentに適用することで、薬物の局所投与等が可能になり、遺伝子担持Stentとともに血管拡張術後の再狭窄予防システムの開発に応用できる。次年度では開発してきた要素技術をデバイス化し、一つでも多く臨床で使えるデバイスを作製していく予定である。また、液体塞栓物質と白金コイルの併用による動脈瘤の治療効果の検討を進めた。一部の動物モデルで動脈瘤のドーム部分の組織が消えてなくなっていた例もあった。欧米では臨床応用

が行われているが、われわれの結果からは極めて慎重に臨床使用すべきであると考え。

器質化促進コイルとして試作されている塩基性線維芽細胞成長因子(FGF-2)を表面に固定化した白金コイルの in vivo 機能評価を行った。ラットの総頸動脈に留置し一定期間後にコイル周囲の血栓の器質化を組織学的に比較検討すると、2週間後では FGF-2 コイルにおいて有意に血栓が器質化していた。一方、より臨床に近いモデルとして検討したイヌの総頸動脈に静脈片を吻合した動脈瘤モデルでは、4週間後に摘出し組織学的に比較検討したところ、両群とも内膜が再生されており、その厚さには有意差を認めなかった。原因として動脈瘤モデルの吻合部の自然治癒過程も影響したと推測され、動脈瘤モデルと留置方法等評価モデルの改良が必要と考える。よりよいモデルとして、ウサギで bifurcation type の静脈片を用いない動脈瘤モデルを作ったところ、まだ、1例であるが一応コイルの評価に使えるとの感触を得た。

光重合性たんぱく質(スチレン化ゼラチン、アルブミン)の光硬化特性を向上させる目的で、以下に示す2つの方法で溶質の高濃度化設計を行った。1) 共架橋剤として用いる PEG ジアクリレートとの相溶性を向上させ、スチレン化ゼラチンを高濃度化させることを目的として、PEG スペーサー鎖を介してスチレン基をゼラチンに導入したハイブリッド型スチレン化ゼラチンの合成、2) ゼラチン分子量を大幅に低下させたスチレン化ゼラチンの合成。PEG 鎖を導入することにより、PEG ジアクリレートと 50wt%まで白濁、層分離することなく溶液状態を保たせることが可能となり、光硬化性の向上が期待された。一方、低分子量化スチレン化ゼラチンは 60%まで流動性のある水溶液状態であった。1分程光照射すると弾力のある透明なヒドロゲルを生成した。ゲル生成能は高濃度化、照射の長時間化により増した。ステント表面への薬物固定化担体として有用な材料が開発できたといえる。

血管組織侵入に関するカバーフィルム材の多孔化設計の指針に基づいて、実際に多孔質カバーステントを作製し、慢性期に起こる再狭窄を抑制できるか兎を用いた動物実験で検証を行った。カバー材としてセグメント化ポリウレタンフィルムを用い、エキシマレーザーにより多孔化を高精度で施した。また、分子設計した先の光重合性ゼラチンをヘパリンと混合してフィルム表面に塗布した後、光照射するとヘパリンを包埋したゼラチンゲルが形成され、カバーステント内腔面に固定化できた。多孔化により経孔的な組織侵入が起り、新生内膜組織の再構築が促進され、並びにヘパリン包埋(局所投与)により血液凝固が大幅に抑制された。

重要な力学特性であるステントの曲げに対する柔軟性に注目して、それを正確に測定できる試験機を開発した。その試験機を使ってステントの曲げに対する柔軟性を測定したところ、リンクステ

ント構造が優れていることが判明した。またリンクの形状と配置がステントの柔軟性に及ぼす影響を明らかにすることができた。

以上の詳しいことは分担研究報告で述べる。

D. 考察

医師側からの要求や治療用デバイスのコンセプトの提言が行われ、工学側では要求されたデバイスの試作と、医師側でそれら进行评估するための評価モデルの作製を行ってきた。医療現場での要求がかなり明確なデバイス、例えば液体塞栓材料、コイル、ステント、マイクロカテーテルについては順調に開発・評価を進めることが出来た。将来の新しい医療の方法のシーズとなる技術の開発については、光反応性高分子の合成、微細加工技術や極表面加工技術の開発を進めている。これらを医師側にその詳細を提示し、新たな治療用デバイスの開発に役立つよう努力する必要があると考える。

E. 結論

以上のように閉塞性脳血管障害の治療に用いるカテーテルシステムの重要な要素技術の開発を進め、その一部についてはデバイス化して共同研究者の滝らにより機能評価が進められている。次年度は本研究の最終年度に当たるため、開発してきた要素技術をデバイス化し一つでも多くの臨床で使えるデバイスを作製していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

論文発表

1. Oleg N. Tretinnikov, Koichi Kato, and Hiroo Iwata, Adsorption of Enantiomeric Poly lactides on a Chemically Similar Brush: Suppressing the Expulsion of Free Polymer from the Grafted Layer by Streocomplexation, *Macromolecule*, submitted
2. Y. Nakayama, J. Y. Kim, S. Nishi, H. Ueno, T. Matsuda, Development of high-performance stent: gelatinous photogel-coated stent that permits drug delivery and gene transfer, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 57, 559-566.
3. S. Kidoaki, Y. Nakayama, T. Matsuda, Measurement of the interaction forces between proteins and iniferter-based graft-polymerized surfaces with an atomic force microscope in aqueous media, *Langmuir*, 2001, 17, 1080-1087.
4. S. Kidoaki, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive structural change of poly(N-isopropylacrylamide) graft layer measured with an atomic force microscope, *Langmuir*, 2001, 17, 2402-2407.
5. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with

- poly(*N*-isopropylacrylamide) grafts, *Biomacromolecules*, 2001, 2, 856-863.
6. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Material design for artificial extracellular matrix: cell entrapment in poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel, *J. Artif. Organs*, 2001, 4, 308-314.
 7. T. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Small-diameter compliant arterial graft prosthesis: design concept of coaxial double tubular graft and its fabrication, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 55, 266-276.
 8. H. Okino, Y. Nakayama, M. Tanaka, T. Matsuda, In situ hydrogelation of photocurable gelatin and drug release, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 59, 233-245.
 9. M. Kikuchi, H. Takita, Y. Nakayama, T. Matsuda, Y. Kuboki, Laser perforated collagen membrane: pore size-dependent bone induction as a new BMP carrier, *J. Hard Tissue Biology*, 2001, 9, 79-89.
 10. W. G. Brodbeck, M. S. Shive, E. Colton, Y. Nakayama, T. Matsuda, J. M. Anderson, Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 55, 661-668.
 11. 中山泰秀, 松田武久, ステント開発における材料工学的設計, *神経進歩*, 2001, 45, 1026-1033.
 12. Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, T. Matsuda, Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, *Langmuir*, in press.
 13. Y. Nakayama, T. Kawada, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, *Biomaterials*, in press.
 14. T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive heparin coating: Heparin conjugated poly(*N*-isopropylacrylamide) at one terminus, *Langmuir*, in press.
 15. H. Sonoda, S. Urayama, C. Uyama, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Measurement of the compliance of vessels with digital X-ray imaging system, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 60, 191-195.
 16. S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsutsui, Y. Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi, Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model, *Cardiovascular Res.*, in press.
 17. 池内 健, 清水慶彦, 中村達雄, 富田直秀, 葭仲潔(2001)より豊かな生活に貢献する医療技術に関する研究-磁界による生体内デバイスの方向制御-. *医科学応用研究財団研究報告*, 18, 39-42
 18. Zhou. YS., Quan. YX., Yoshinaka. K., Ikeuchi. K (2001) A new medical microrobot for minimal invasive surgery. *J. Mech. E, Part H Journal of engineering in medicine*, 215, 215-220
 19. 葭仲 潔, 世本敏高, 池内 健 (2001) 磁場によるカテーテル先端の方向制御に関する研究. *日本 AEM 学会誌*, 9(1), 15-20
 20. 森 浩二, 岩田博夫, 光藤和明, 池内 健 (2001) ステントの長軸方向の曲げ剛性に関する研究. *日本機械学会誌(C 編)*, 67(662), 3078-3082
 21. 森 浩二, 池内 健, 光藤和明 (2001) 冠動脈ステントの開発. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 22, 381-387
 22. 森 浩二, 池内 健, 光藤和明 (2001) 感度解析を用いたステントの設計. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 22, 389-398
 23. 森 浩二 (2001) ステントの力学特性. *日本機械学会誌*, 12, 820-822
- 1.
 2. 学会発表
 1. 池内 健: 冠動脈ステントの設計について, 医工学フォーラム-2000 年度特別学術講演会-(2001.2.14, 京都市)
 2. 奥田かんな, 中山泰秀, 松田武久, 機能性ゼラチンの分子設計: リビングラジカル重合を利用したマルチスチレン化ゼラチンの合成と光ゲル化, 第50回高分子学会年次大会(大阪), 2001年5月
 3. 鈴木貞信, 平野義明, 中山泰秀, 松田武久, 可視光表面ゲル固定化法の開発: プロトドナーを側鎖に有する親水性高分子の光ゲル化と表面固定, 第50回古文視学会年次大会(大阪), 2001年5月
 4. 園田拓道, 安井久喬, 松田武久, 高見沢計一, 中山泰秀, 二筒型コンプライアント人工血管の開発: 移植による組織形態学および力学的変化の検討, 高分子学会第30回医用高分子シンポジウム(東京), 2001年7月
 5. 大屋章二, 中山泰秀, 松田武久, 機能性人工細胞外マトリックス設計: 感温性ゼラチンゲル内での細胞の長期生存の可能性, 高分子学会第30回医用高分子シンポジウム(東京), 2001年7月
 6. 西正吾, 中山泰秀, 植田初江, 松田武久, ヘパリン固定化多孔質カバーステントの移植実験—その長期観察—, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
 7. 中山泰秀, 高見沢計一, 植田初江, 澤芳樹, 渋川貴規, 山中ゆか, 松田暉, 生体内で成長する人工血管, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
 8. 園田拓道, 高見沢計一, 中山泰秀, 城田利彦, 安井久喬, 松田武久, 二筒型コンプライアント人工血管の開発: 移植後の組織形態およびコンプライアンス変化の検討, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
 9. 大屋章二, 中山泰秀, 松田武久, 機能性人工細胞外マトリックス設計: 細胞の長期生存性を与える感温性ゼラチンゲルの分子設計, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
 10. 星川淳人, 満洲邦彦, 中山泰秀, 松田武久, 小田弘美, 中村耕三, 可視光により自己硬化する光反

応性ゼラチンは軟骨移植における担体として利用できる可能性がある、第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会(広島)、2001 年 10 月

11. 星川淳人、織田弘美、中村耕三、満洲邦彦、中山泰秀、松田武久、軟骨細胞移植における担体としてのスチレン化ゼラチンの可能性、第 23 回日本バイオマテリアル学会、2001 年 10 月

12. 安田聡、野々木宏、中山泰秀、心血管インターベンションの現状と求められるバイオマテリアル、第 23 回日本バイオマテリアル学会、2001 年 10 月

13. Kuboki Y, Kikuchi M, Takita H, Nakayama Y, Matsuda T, Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone-induction when used as a new BMP-carrier, 7th ICCBMT (FI), 2001, 11

14. Ohya S, Nakayama Y, Sonoda H, Matsuda T, Management of tissue adhesion prevention and hemostasis by thermoresponsive biopolymers, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11

15. Nishi S, Nakayama Y, Ueda H, Ishikawa M, Matsuda T, Development of a novel high-performance stent graft with micropores and heparin immobilization; Application for extracranial aneurysm in *in vivo* experimental model, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

炎症惹起物質固定化コイルと温度応答性薬物コントロールドリリースシステムについて特許出願予定。

2. 実用新案登録

(ナシ)

3. その他

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業：治療機器等開発分野）
分担研究報告書

循環器系疾患の治療に用いる医用材料とそれを用いた治療デバイスの開発
分担課題：デバイスの試作と in vitro 評価

分担研究者 岩田博夫 京都大学再生医科学研究所

研究要旨 血管内治療に用いるデバイス、そのデバイスを作製するための要素技術の開発を進めている。本年度開発を進めた要素技術は、炎症惹起物質固定化コイル作製のためのラク톤の表面開始開環重合法、温度応答性薬物コントロールドリリリースシステム、遺伝子担持ステント等である。炎症惹起物質固定化コイルは合成物のみからなる器質化促進コイルを作製できると考える。温度応答性薬物コントロールドリリリースシステムはバルーンカテーテルやステントに適用することで、薬物の局所投与等が可能になり、遺伝子担持ステントとともに血管拡張術後の再狭窄予防システムの開発に応用できる。次年度では開発してきた要素技術をデバイス化し、一つでも多く臨床で使えるデバイスを作製していく予定である。また、液体塞栓物質と白金コイルの併用による動脈瘤の治療効果の検討を進めた。一部の動物モデルで動脈瘤のドーム部分の組織が消えてなくなっていた例もあった。欧米では臨床応用が行われているが、われわれの結果からは極めて慎重に臨床使用すべきであると考えられる。

A. 研究目的

カテーテル等を用いた血管内治療は、血管狭窄部位を拡張することで治療する血管再形成術と、動脈瘤や動静脈奇形等の正常でない血管部分を閉塞することで治療する血管塞栓術との二つに大別される。血管拡張術では、拡張後に高確率に再狭窄が発症し、その対策が急務である。血管の再狭窄を防止するために、種々の薬物のコントロールドリリリースや遺伝子治療等が試みられているが、コントロールドリリリース法や遺伝子の局所投与方法が未熟であるため、その効果が十分上がらない、また、副作用が出るなどの問題が指摘されている。一方、血管塞栓術では、近年臨床で使用され始めたデバイスが多く、その長期成績が明らかでない。例えば、脳動脈瘤は白金コイルを留置することで治療が行われているが、瘤内に形成された血栓が器質化せず、後に再発してきたという報告も少なくない。本研究では、これらの問題を解決するために血管内治療に用いるデバイス、そのデバイスを作製するための要素技術の開発を進めている。

B. 研究方法

器質化促進コイル：プラチナ製コイルに金蒸着を行い、末端にカルボキシル基を有するアルカンチオール 11-Mercaptoundecanoic acid の自己組織化膜(SAM)を形成させる。続いて、イオン間相互作用を用いてポリエチレンイミン、さらにヘパリンを順次結合させる。動脈瘤内を器質化させ、ネックを内皮化させるための生理活性物

質としては塩基性線維芽細胞成長因子(FGF-2)を用いた。FGF-2 をヘパリンへのアフィニティ-相互作用によりコイル表面に固定化した。

炎症惹起物質固定化コイル:モデル実験として金蒸着ガラスを用いて乳酸の開環重合を行った。金薄膜上に、末端に水酸基を有する 11-mercaptopundecanol と末端メチル基の dodecanethiol との種々の割合の混合 SAM を形成させた。これらの表面からオクチルスズを触媒に用いて L-ラク톤の開環重合を行った。反射フーリエ変換赤外吸収分光法(RAS-FTIR)を用いて混合 SAM また乳酸グラフト重合後の表面の解析を行った。またグラフト層の厚さは、原子間力顕微鏡を用いたスクラッチテストで評価した。

液体塞栓物質と白金コイルの併用による動脈瘤の治療:ハウンド犬の頸動脈に静脈片を付けて動脈瘤モデルを作製した。経カテーテルで動脈瘤内に体積分率で約 10%になるように白金コイルをパッキングした後、液体塞栓物質としてよく用いられているエチレンビニルアルコール共重合体のジメチルスルホキシド溶液を注入することで、動脈瘤内の人工物体積分率の増加を図った。術後3ヶ月後に動脈瘤モデル部分を回収し、動脈瘤の入り口部分を肉眼にて観察し、さらに、薄切片を作製しその組織像の観察を行った。

温度応答性薬物コントロールドリリリースシステム:ポリイソプロピルアクリルアミドとメタクリロイルオキシエチルイソシアネートとを仕込みモル比 99:1 でランダム共重合体を作製した。得られた共重合体をアセトンに

所定濃度になるように溶解し、この溶液をスピコーターを用いることでガラス基盤上にコーティングした。この薄膜をリン酸緩衝生理食塩水に浸漬し膨潤させた。この薄膜の含水率の温度変化に対する応答性を表面プラズモン共鳴法にて観察した。また、薄膜の厚さの温度応答性を原子間力顕微鏡のフォースカーブより算出した。この共重合体ゲルからの薬物のコントロールドリリース実験は、薬物モデルとして蛍光染料 Calcein 用いて行った。共重合体薄膜を Calcein 溶液一晩浸漬することで、薄膜に Calcein を含浸した。60℃の水で薄膜を3回洗浄後、20mlの純水に浸漬し、37℃ついで4℃の条件下で振盪台上で放置し、薄膜膜に取り込まれた Calcein の放出実験を行った。

遺伝子担持ステント：ステント表面に金をスパッタリング蒸着し、この表面を 11-Mercapto-1-undecanol と 11-Mercaptoundecanoic acid の混合溶液に24時間以上浸漬することで、最表面にカルボキシル基と水酸基を有する混合 SAM を形成させた。Lipid-プラスミド DNA complex (LD 複合体) の調製は LipofectAMINE2000™の使用説明書に従って行った。プラスミド DNA 担持表面を作製は、LD 複合体溶液中に5分間静置することで LD 複合体の吸着を図った。表面を洗浄後、ステントを今度はプラスミド DNA 溶液 (8 µg/ml)中に5分間静置することでプラスミド DNA の表面への吸着を図った。再び洗浄し、同様の操作を繰り返すことでプラスミド DNA を担持した表面を作製した。遺伝子導入ステントのモデルとして、金蒸着ガラス基盤上にプラスミド DNA を担持した表面を作製した。これらのプラスミド DNA 担持表面は最表面が常に LD 複合体となるようにした。プラスミド DNA としては、CMV promoter の下流にレポーター遺伝子として Green Florescent Protein (GFP)をコードしているプラスミド DNA pQBI25 と GFP 遺伝子の代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) や血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の遺伝子を挿入したプラスミドも作製し実験に用いた。

細胞内へのプラスミドの取り込みの in vitro 評価は、プラスミド担持表面上に、HEK293 細胞懸濁液 (6×10^5 cells/ml) を播種した後、37℃、5% CO₂ インキュベーターの中で一日培養し、翌日培地交換を行い、3日後に蛍光顕微鏡で観察することで行った。

bFGF 遺伝子や VEGF 遺伝子のプラスミドを用いた場合は免疫染色にて、細胞への遺伝子導入を見た。

C. 研究結果とD. 考察

動脈瘤を白金コイルを用いて治療する試みが多数行われるようになったものの、その長期成績が明らかでなく、特に巨大動脈瘤では瘤内に形成された血栓が器質化せず、後に再発してきたという報告も少なくない。この問題を解決するために、本分担研究では、器質化を促進する細胞増殖因子 FGF-2 を固定化したコイルの開発、炎症惹起物質固定化コイルの開発、と白金コイルと液体塞栓物質の併用による治療を検討している。

動脈瘤の封入に用いるコイル：FGF-2 固定化コイルを試作し、三重大脳外科滝のグループにより動物実験により機能評価を行った。結果については、滝の分担研究報告書を参照のこと。

液体塞栓物質と白金コイルの併用による動脈瘤の治療：欧米の2, 3の神経放射線医が、白金コイルと液体塞栓物質との併用により脳動脈瘤の治療を行っていると報告している。用いられている液体塞栓物質はわれわれが以前開発した EVAL が基本になっており、しかし、開発当時は動脈瘤内で用いることを想定していなかったため、種々不具合が予想される。この治療法の有効性と問題点を明らかにするために、本実験を行った。

現在本研究は進行中であるがその結果の概略は、動脈瘤の入り口は比較的よく修復が進み、多くの例で動脈瘤の入り口から白金コイルは直視できなかった。また、組織像の観察でも、入り口近傍の組織は比較的しっかりしていた。しかし、動脈瘤のドーム部分の組織が消失しているものがあつた。前者の観察は、本治療法の可能性を示唆する。しかし、後者の観察結果は、瘤内にジメチルスルホキシドを溶媒とした高分子溶液を注入するため、有機溶媒の細胞毒により組織が壊死したと考えられる。巨大動脈瘤では1-2 ml 量の液体塞栓物質を動脈瘤に注入することもあり、有機溶媒が拡散していく周囲の組織への影響を十分に考慮に入れて本治療法を行っていく必要がある。今後、この治療法を行うためには、有機溶媒を用いない液体塞栓物質を開発する必要があると考える。現在経過観察中の動物の結果を加えて、次年度により詳しく報告する。

炎症惹起物質固定化コイル：ポリグリコール酸や乳酸との共重合体は、生体内で分解吸収され長期間体内に残らないため、縫合糸や骨固定ピン等の外科用補助材の原料として用いられるよう

になってきた。血管内治療の分野でも、生体内吸収性に着目し、これらの高分子材料を用いたステントの開発が行われてきた。しかし、分解時に乳酸やグリコール酸が生成することによる局所 pH の低下が原因となり、炎症反応を惹起し、このため再狭窄の発症率が高くなるとの報告もある。この特性に着目し、ポリグリコール酸や乳酸との共重合体を固定化した白金コイルの開発を進めている。本年度は、モデル実験として金蒸着ガラスを用いて L-乳酸の開環重合を行った。RAS-FTIR にてポリ乳酸グラフト表面の解析を行ったところ、1050-1250 cm^{-1} の C-O-C の伸縮バンドに顕著な吸収がみられ、SAM 表面にポリ乳酸が存在することを示している。また、原子間力顕微鏡を用いたスクラッチテストよりポリ乳酸層の厚さは、OH-SAM 表面では 9 nm、また、20/80% OH/CH₃-SAM 上では 30 nm であった。以上のことより、SAM 表面から開環重合により乳酸の重合が行えることが明らかになり、次年度に行う炎症惹起物質固定化コイル作製のための化学的基盤を確立できたと考える。

血管内手術で、カテーテルやステント等の表面に薬物や遺伝子が担持され、患部へと運ばれ、局所血管へ薬物の投与が試みられてきた。しかし、カテーテル操作の間に担持された薬物が洗い流されてしまったり、または、局所で思い通りに薬物が放出されない等の問題があり、未だコントロールドリリースシステムの開発が望まれている。本研究では、望むときに薬物を放出できるカテーテルやステントを作製するために、温度に応答して物質透過性を劇的に変化させるハイドロゲル薄膜の試作とその薬物放出挙動に検討を加えた。

温度応答性薬物コントロールドリリースシステム：重合した共重合体をアセトンに所定濃度になるように溶解し、この溶液をスピナーを用いることでガラス基盤上にコーティングした。濃度と回転数を調節することで望む膜厚の共重合体薄膜を形成させることが可能であった。この薄膜をリン酸緩衝生理食塩水に浸漬し膨潤させた。表面プラズモン共鳴法を用いて算出したこの薄膜の含水率の温度応答性、また、原子間力顕微鏡のフォースカーブより算出した薄膜の厚さの温度応答性から、共重合体薄膜は 25℃から 30℃の温度範囲でその体積が約 5 分の 1 に小さくなることが明らかになった。共重合体の薄膜からの薬物のコントロールドリリースは蛍光染料 Calcein を用いて調べた。37℃のときはほとんど放出されないが、4℃になるとわずか 10

分でほとんどの Calcein が放出されてしまった。共重合体薄膜をコーティングしたバルーンカテーテルを用いると、バルーンを患部へ誘導している間は薬物が放出されないが、患部にて冷水でバルーンを拡張するとただちに薬物が放出されるシステムを作製できる。

遺伝子導入ステントの試作：表面に担持されたプラスミド DNA の細胞へ取り込みとその発現を調べた。交互積層回数の異なる表面を比較したところ、いずれの表面においても GFP を発現している細胞が観察された。また、GFP を発現している細胞の全細胞に対する割合は吸着回数の増加とともに増加していく傾向があった。これは、交互吸着を繰り返すことで表面への LD 複合体の担持量が増大し、その結果、細胞に取り込まれるプラスミド DNA の量が増大したためであると考えられる。次に、SAM 表面のカルボキシル基密度の違いによる GFP の発現効率の違いを比較したところ、いずれの表面においても GFP の発現に基づく蛍光が観察されていたが、カルボキシル基密度の違いによる遺伝子導入効率の差はほとんど認められなかった。bFGF 遺伝子はほぼ GFP と同様の結果であったが、VEGF の場合バックグラウンドが高く未だ明確なことは言えなかった。

E. 結論

以上のように閉塞性脳血管障害の治療に用いるカテーテルシステムの重要な要素技術の開発を進め、その一部についてはデバイス化して共同研究者の滝らにより機能評価が進められている。次年度は本研究の最終年度に当たるため、開発してきた要素技術をデバイス化し一つでも多くの臨床で使えるデバイスを作製していく予定である。

F. 健康危険情報

ナシ

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oleg N. Tretinnikov, Koichi Kato, and Hiroo Iwata, Adsorption of Enantiomeric Polylactides on a Chemically Similar Brush: Suppressing the Expulsion of Free Polymer from the Grafted Layer by Streocomplexation, *Macromolecule*, submitted

2. 学会発表

1. 小屋松 祐一, 佐藤 秀樹, 平田 伊佐雄, 岩田 博夫, 細胞への遺伝子導入可能な表面の作製と解析, 第 59 回日本化学繊維研究所講演会 (2000. 11. 20 京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

炎症惹起物質固定化コイルと温度応答性薬

物コントロールドリリースシステムとについて特許出願予定。

2. 実用新案登録

ナシ

3. その他

ナシ

分担研究報告書

材料設計と合成に関する研究

分担研究者 中山泰秀 国立循環器病センター研究所生体工学部 室長

(I) 重合性たんぱく質の機能化設計

前年度分子設計した光重合性たんぱく質（スチレン化ゼラチン、アルブミン）の光硬化特性を向上させる目的で、以下に示す2つの方法で溶質の高濃度化設計を行った。1) 共架橋剤として用いる PEG ジアクリレートとの相溶性を向上させ、スチレン化ゼラチンを高濃度化させることを目的として、PEG スペーサー鎖を介してスチレン基をゼラチンに導入したハイブリッド型スチレン化ゼラチンの合成、2) ゼラチン分子量を大幅に低下させたスチレン化ゼラチンの合成。PEG 鎖を導入することにより、PEG ジアクリレートと 50wt%まで白濁、層分離することなく溶液状態を保たせることが可能となり、光硬化性の向上が期待された。一方、低分子量化スチレン化ゼラチンは 60%まで流動性のある水溶液状態であった。1分程光照射すると弾力のある透明なヒドロゲルを生成した。ゲル生成能は高濃度化、照射の長時間化により増した。ステント表面への薬物固定化担体として有用な材料が開発できたといえる。

(II) カバーステントの開発

前年度の犬を用いた予備的な動物実験により得られた、血管組織侵入に関するカバーフィルム材の多孔化設計の指針に基づいて、実際に多孔質カバーステントを作製し、慢性期に起こる再狭窄を抑制できるか兎を用いた動物実験で検証を行った。カバー材としてセグメント化ポリウレタンフィルムを用い、エキシマレーザーにより多孔化を高精度で施した。また、分子設計した先の光重合性ゼラチンをヘパリンと混合してフィルム表面に塗布した後に、光照射するとヘパリンを包埋したゼラチンゲルが形成され、カバーステント内腔面に固定化できた。多孔化により経孔的な組織侵入が起こり、新生内膜組織の再構築が促進され、並びにヘパリン包埋（局所投与）により血液凝固が大幅に抑制された。

研究協力者 松田武久
九州大学大学院医学系研究科
医用工学分野 教授

西 正吾
高槻日赤病院
脳神経外科 部長

奥田かな
国立循環器病センター研究所
生体工学部

ンは、紫外光照射により水膨潤ゲルを生成することから、我々は人工臓器やバイオセンサを含む医療デバイスの表面修飾剤への応用を検討した。また、ラジカル発生種として可視光照射により反応するカンファキノンを用いると、可視光照射によりゼラチンがゲル化できることから生体内や細胞、薬物存在下で作用させることが可能となり、止血剤を含む組織接着剤、あるいは細胞組込型のハイブリッド人工臓器や tissue engineering 分野における人工細胞外マトリックス材料、さらにステントを含む血管内治療デバイスの機能化材料への応用を検討している。この可視光硬化系における要素材料は、ゼラチン側鎖にスチレン基を導入したゼラチンマクロマーと水溶性光重合開始剤として新たに分子設計したカルボキシル化カンファキノンである。これらの混合水溶液に数分間光照射すると、マクロマー間で

(I) 重合性たんぱく質の機能化設計

A. 研究目的

これまで、紫外光照射によりラジカルを発生する、ベンゾフェノン基を側鎖に有する光反応性ゼラチ

の重合により、cross linking が起こり、ハイドロゲルを生成する。また、PEG ジアクリレートを混合して照射すると、共架橋反応が起こり、生成ゲルの強度を高めることができた。ここで、各マクロマー（ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレート）の濃度を高めると、水溶液の硬化速度を高めることができると考えられる。しかし、ゼラチンマクロマーは水溶液濃度を 50wt%以上に高めると、高粘稠となり、ほとんど流動性は無くなった。また、ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレートとの水への co-solubility は低く、全溶質濃度が 30wt%を越えると、水溶液は白濁あるいは層分離を起こし、ゲル化能の大幅な低下を招いた。

本研究では、ゼラチンマクロマーをより高濃度で溶解させるためにゼラチンマクロマーの低分子量体化を、またはゼラチンと PEG との co-solubility を高めるためにゼラチンマクロマーと PEG とのハイブリッド化について検討した。低分子量ゼラチンマクロマーについては、水への溶解性と光硬化性について、ならびに組織接着剤への要求性能の一つである生成ゲルの組織への粘着性について調べた。また、ゼラチン PEG ハイブリッドマクロマーについては PEG ジアクリレートとの水への co-solubility について調べた。

B. 研究方法

ゼラチンマクロマーは、4-ビニル安息香酸とゼラチンとを水溶性カルボジイミドを用いた縮合反応により合成した。

水溶性重合開始剤としてケトピン酸のセレン酸化によりカルボキシル基を有するカンファキノンを合成した。

ゼラチン PEG ハイブリッドマクロマーは、PEG とプロモ酢酸エチルとの反応により方末端をエステル化し、これを加水分解により酸に変換し、次いで、方末端の水酸基を酸クロライド化 4-ビニル安息香酸によりエステル化させることによりスチレン基を導入し、水溶性カルボジイミドを用いた縮合反応により、ゼラチンのアミノ基側鎖に導入した。

光ゲル化はゼラチンマクロマーの水溶液にハロゲンランプからの青色光を照射することにより行った。溶質重量の不溶化率をゲル化率、生成ゲルの単位乾燥重量あたりの吸水重量を膨潤度と定義した。

C. 研究結果

低分子量ゼラチンマクロマーの合成：

ゼラチンマクロマーとして、既報に従って、ゼラチン側鎖にスチレン基を導入したスチレン化ゼラチンを合成した。原料として、これまで用いた分子量約 10 万のゼラチンに比べて分子量の低い、約 3.1

千、5 千、1 万の分子量を有する 3 種類のゼラチンを用いた。ゼラチン側鎖へのスチレン基の導入は水溶性カルボジイミドを用いたゼラチン側鎖のアミノ基と 4-ビニル安息香酸との縮合反応により行った。スチレン基導入量はゼラチン 1 分子あたり 1.5 個（分子量約 3.1 千のゼラチン）、1.7 個（約 5 千）、3.6 個（約 1 万）であり、いずれも全アミノ基の約 80 %にスチレン基が導入された。得られたスチレン化ゼラチンは全て水溶性であった。

水溶液の粘性：

これまで用いてきた分子量約 10 万のゼラチンマクロマーは 37℃において 20wt%濃度での水溶液の粘度は約 20Pa の溶液状態であるが、濃度の上昇に伴って、急速に粘度が増大し、50wt%で粘度は約 1 万 Pa となり、流動性はほとんど無くなった。

一方、分子量約 1 万のゼラチンマクロマーでは、濃度 50wt%においても粘度は約 200Pa の少し粘稠な溶液状態で、流動パラフィンと同程度であった。濃度を 60wt%に増加させると粘度は約 10 倍に増加したが、充分溶液として取り扱いが可能であった。より低分子量のゼラチンを用いると、水溶液の粘度はさらに減少した。いずれの低分子量ゼラチンマクロマーとも濃度 80wt%程度まで高粘稠であるが液体として取り扱いが可能であった。

光照射によるゲル化：

合成した低分子量ゼラチンマクロマーの水溶液の可視光硬化性をゲル化率の比較から調べた。既に報告しているように、分子量約 10 万のゼラチンマクロマーでは濃度 30wt%において、1 分間の照射でゲル化率は約 40 %、濃度 40 %では約 60 %であった。一方、分子量約 1 万の低分子量ゼラチンマクロマーでは濃度 60 %で 1 分照射によりゲル化率は約 80 %に増加し、また、80 %に濃度を増加させると、30 秒の照射においても約 60 %の収率でゲルを生成した。低分子量ゼラチンマクロマーでは水溶液濃度を高めることが可能となり、その結果、短時間でゲル生成量を増大させることができた。

硬化ゲルの粘着性：

ゼラチンマクロマー水溶液をコラーゲンフィルム表面にのせて、所定時間の光照射によりゲル化させた。ゲル表面を別のコラーゲンフィルムで覆い、その上に 100g の分銅をのせてコラーゲンフィルムとゲルを密着させた。1 分後、分銅を取り除き、ゲルを覆ったコラーゲンフィルムを一定速度で上方に引っ張り、ゲルから引き離れた。未修飾のゼラチンでは 2mm 程度離れた時点でフィルムに約 50g の引っ張り加重がかかり、ゼラチンがフィルムから分離した。ここで、この破断時にかかる最大荷重量

を粘着力と定義した。一方、ゼラチンマクロマーの場合、ゲルは約 5mm まで引き延ばされ、約 400g の加重がかかった時点でゲルがフィルムから分離した。ゲルの粘着力は照射時間とともに増大し、50 %濃度の水溶液の場合、40 秒照射時において最大となり、その後の照射により急速に減少した。また、濃度 60 %の場合、より短時間の照射で最大粘着力を示した。一方、現在医用接着剤として臨床にもちいられているフィブリン糊の硬化物では粘着力は約 20g であり、GRF 糊では約 700g であった。

ゲルの伸張量は最大荷重時に最大となり、ゼラチンマクロマーでは約 30 倍に伸張した。この値はフィブリン糊の約 30 倍で、GRF 糊と同程度であった。

ゼラチン PEG ハイブリッドマクロマーの合成：

ゼラチン PEG ハイブリッドマクロマーの合成法の概略を以下に示す。まず、PEG とプロモ酢酸エチルとの反応により方末端をエステル化し、これを加水分解により酸に変換した。次いで、方末端の水酸基を酸クロライド化 4-ビニル安息香酸によりエステル化させることによりスチレン基を導入し、方末端にカルボキシル基を他端にスチレン基を有する PEG 誘導体を合成した。これを上記と同様に、水溶性カルボジイミドを用いた縮合反応により、ゼラチンのアミノ基側鎖に導入した。スチレン基導入量は、いずれも全アミノ基の約 80 %であった。

PEG マクロマーとの相溶性：

PEG 鎖を有しないゼラチンマクロマー（分子量約 10 万）の場合、20 %の PEG1000 ジアクリレート水溶液に 10 %のゼラチンマクロマーを混合しても無色透明であるが、ゼラチンマクロマーの濃度を 20 %に増加させると溶液の白濁が起こり、30 %では PEG 層とゼラチン層の 2 層に分離した。また、分子量約 1000 の PEG 鎖を有するゼラチンマクロマーの場合も同様に、10 %の混合では無色透明であったが、20 %以上では白濁化した。一方、分子量約 5000 の PEG 鎖を有するマクロマーでは 30 %まで混合しても無色透明溶液であった。

一方、ゼラチンマクロマーの濃度を 20 %に固定した水溶液に、PEG ジアクリレートを混合していくと、ゼラチンマクロマー内の PEG 鎖の有無に関わらず PEG ジアクリレート濃度は 10 %では無色透明であった。PEG ジアクリレートの含量を増加させると、PEG 鎖の無いゼラチンマクロマーと分子量約 1000 の PEG 鎖を有するゼラチンマクロマーの場合、20 %濃度で共に白濁し、30 %濃度以上で層分離を起こした。一方、分子量約 5000 の分子量を有するゼラチンマクロマーの場合、40 %においても無色透明を保持した。分子量約 5000 の PEG 鎖を有するゼラチンマクロマーの場合、全溶質濃度

が 50 %の範囲内で無色透明溶液を与え、この範囲内でマクロマーの混合比を変化させることが可能となった。

これまで我々は光照射によってゾルからゲルを形成する、ゼラチンをベースとした光反応性材料の分子設計を行い、止血剤を含む組織接着剤などの創傷被覆剤や人工臓器や組織工学材料への応用を検討している。これまでゼラチン側鎖に重合性基であるアクリレート基やスチレン基を導入したゼラチンマクロマーを水溶性重合開始剤（カルボキシル化カンファキノン）を用いて可視光照射により重合させることにより、水溶液をゲル化できる新しい可視光硬化系を開発した。本研究では硬化速度の向上をめざし、上記の硬化系における要素材料である、ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレートの高濃度化について検討した。これまで用いてきた分子量約 10 万のゼラチンマクロマーは 37℃下で水溶液濃度を 50 %に高めると、高粘稠でほとんど流動性はなくなり、これ以上濃度を高めることは出来なかった。また、共架橋により硬化速度と硬化強度を高めることを目的に使用してきた PEG ジアクリレートマクロマーはゼラチンマクロマーとの相溶性が悪く、ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレートとの総溶質重量が約 30 %を越えると白濁あるいは層分離を起こした。

D. 考察

本研究ではマクロマーの水溶液濃度を増大させる目的で、1)ゼラチンの低分子量化、ならびに2)ゼラチンと PEG のハイブリッド化の2種類について検討した。ゼラチンはコラーゲンの熱変成蛋白質であり、ゼラチン水溶液はゼラチン鎖の一部でコラーゲン様の3重らせん構造を分子内で形成し、分子間で3次的に架橋が起こるため熱可逆的にゲル状態を形成する。そのため通常ゼラチンのみでは 37℃下で約 20 %以上の高濃度水溶液は調整することが出来ない。本研究において示したように、ゼラチン側鎖にスチレン基を導入するだけでも、架橋構造形成能が阻害されて約 50 %濃度まで溶解させることができた。ここで、さらに、ゼラチン分子を低分子量化すれば、分子間で形成される1分子あたりのらせん構造形成による架橋点数が減少し、分子間での架橋構造形成が起こりにくくなると考えられる。その結果、ゼラチンをより高濃度で溶解することが可能になると期待される。一方、ゼラチンに PEG 鎖を導入したゼラチン PEG ハイブリッドマクロマーを合成すれば PEG との相溶性が向上し、両者をより高濃度に混合可能になると期待される。

低分子量化ゼラチンマクロマーは、これまで使用していた原料のゼラチンを低分子量体に変えるだけで、ゼラチンの場合と同様に、水溶性カルボジイ

ミドを用いた 4-ビニル安息香酸との縮合反応により合成できた。ゼラチンのアミノ基へのスチレン基の導入率はゼラチンの分子量にかかわらず約 80 % であった。分子量約 3.1 千と 5 千のゼラチンには約 2 分子、分子量約 1 万のゼラチンには約 3 分子のスチレン基が導入できた。これらの水溶液はいずれも 60 % 濃度においても 37℃での粘度は約数千で、流動性のある液体状態であった。ゼラチンマクロマーを低分子量化すると水溶液の溶質量を大幅に増加させることが可能となり、予想通り短時間での高い収率でゲルを生成することが可能となった（30 秒の照射でゲル化率は約 60 %）。

また、高分子量ゼラチンマクロマーから生成したゲルは比較的強度が強く、粘りや伸びに乏しく、粘着性がほとんど無かった。しかし、低分子量体では、粘着性は照射時間とともに増加し、ある一定時間で極大を示した。粘着性の増加はゼラチン分子内に導入されたスチレン基の重合により超高分子量化が起こったことによるものと考えられる。照射により徐々に高分子量体の濃度が増加し、高粘着性を示した。その後、分子間での架橋反応の割合が増加するのに伴ってゲル化反応が起こり、急速に粘着性が減少したと考えられる。高分子量のゼラチンでは 1 分子内に多数のスチレン基が導入されているため、反応初期から架橋反応が起こり、粘着性がほとんど増加しなかったと考えられる。一方、強力な組織接着力を有する GRF 糊は高濃度のゼラチン溶液を架橋剤（ホルムアルデヒドとグルタルアルデヒド）により化学架橋するもので、架橋剤との混合により速やかに溶液からゲルへと変化する。従って、一定時間内において非常に高い粘着性を示す。今回合成した低分子ゼラチンマクロマーは GRF 糊と同程度の高い粘着性と伸張性を示した。

ゼラチン側鎖に PEG スペーサー鎖を介してスチレン基を導入したゼラチン-PEG ハイブリッドマクロマーと PEG ジアクリレートとの水への相溶性は PEG スペーサー鎖の鎖長に依存した。PEG 鎖の分子量が約 1000 の場合、PEG ジアクリレートとの相溶性は PEG 鎖を導入していないゼラチンマクロマーとほとんど変化無く、全溶質濃度を約 30 % 以上に増加させることは出来なかった。一方、PEG 鎖長の分子量を約 5000 に延ばした場合、相溶性は大幅に向上し、全溶質濃度が 50 % の範囲で無色透明な均一溶液を与えた。PEG ジアクリレートは共架橋剤として、硬化速度と硬化密度を高める目的で使用してきた。ゼラチンと PEG とのハイブリッド化により、より高濃度で溶解させることが可能になり、これらの性能をより高めることができると期待される。

E. 結論

ゼラチンマクロマーの低分子量化と PEG とのハイブリッド化により硬化性能を向上させることが可能となった。これらのマクロマー水溶液は光照射時に薬物や細胞などを混合しておくこと、生成ゲル内にそれらを包埋することが可能である。現在、合成したゼラチンマクロマーの可視光硬化系を利用して、ステントの機能化設計を中心に進めており、その他、組織接着剤、あるいは抗癌治療を目的とした *in situ* でのドラッグリリース担体、血管形成術後の再狭窄予防を目的とした薬物や遺伝子の導入デバイス、並びに軟骨細胞の包埋によるハイブリッド人工軟骨などを開発中である。

(II) カバーステントの開発

A. 研究目的

近年、動脈硬化による全身血管の狭窄・閉塞病変がますます増加する傾向にある。心臓、末梢動脈系においてバルーンカテーテルによる経皮的血管拡張術（PTCA または PTA）が行われ、ある程度良好な成績を収めてきたが、急性期や亜急性期において 3~8 % の割合で起こる血栓性閉塞や、術後 3 から 6 ヶ月の慢性期において 30~50 % の割合で起こる再狭窄の発生などから治療法はバルーンからステントへと大きく変遷しつつある。しかし、冠動脈ステントの使用においても再狭窄は完全には抑制できず、依然として 25~30 % の高率で生じている。そのためステントと薬物との組み合わせによる高機能化など様々な提案がなされている。

本研究では、薬物担持機能と多孔質フィルムカバーを併せ持つ高機能性ステントの開発を行った。薬物としてヘパリンを選択した。これにより急性期の血栓形成が抑制できると期待される。また、多孔質フィルムでステントをカバーすることにより、ステント周囲から経壁的に腔内に侵入する組織量が規制され、慢性期の再狭窄を抑制できると期待される。一方、ヘパリンは血管平滑筋細胞の増殖抑制効果が有ることが知られており、先に示した血栓形成抑制と同時に再狭窄につながる平滑筋細胞の増殖による内膜肥厚の抑制が期待される。ステントカバーフィルムの材質は人工心臓などに利用されているセグメント化ポリウレタンを選択し、多孔化設計は小口径人工血管の作製のために開発したエキシマレーザーを用いた微細加工技術により行った。これまでの *in vitro* ならびに *in vivo* での細胞侵入に関する予備的な検討から微細孔の孔径は 30um に、孔と孔との間隔は 250um に厳密に設定した。一方、ヘパリンの固定化には既に開発した光硬化性材料を用いた。これはゼラチン側鎖にベンゾフェノン基を導入したのもので、ヘパリンなどの水溶性薬物との混合水溶液として、高分子フィルム表面に塗布した後、紫外光照射すると、ベンゾフェノン化ゼラチ

ンはゲル状に硬化すると同時に基材の高分子フィルムに共有結合により固定化され、生成ゲル内には薬物を包埋することが可能である。

本論文では、まず、カバーステントの作製方法について説明する。次いで、試験モデルとしてヘパリン固定した多孔質カバーでステントの末梢側半分を被覆化した半分カバー化ステントを作製し、これを兔総頸動脈に留置する。半分カバーステントを用いると、カバーの有無が内膜肥厚に与える影響を同一の動物を用いて同一のデバイス内での比較することが可能である。

B. 研究方法

カバーステントの作製方法：

カバーフィルムの基材としてセグメント化ポリウレタンフィルムを用いた。フィルムへの微細加工形成はエキシマレーザーマイクロ加工装置を用いて行った。レーザー光はマイクロ加工機内のビーム成形光学系にて均質化し、可動式試料ステージに固定したフィルムに照射した。ステージの移動、位置決め、およびレーザー発振は全てコンピューターで制御した。加工状態はフィルムを顕微鏡にて拡大してテレビモニターで *in situ* で観察した。多孔化したポリウレタンフィルムの方側面に光反応性ゼラチン（50mg/mL）をヘパリン（25 mg/mL、164.5units/mg）と混合して塗布（20 μ L/cm²）し、紫外光照射により固定化した。この塗布・照射操作を2回繰り返した後、フィルムの処理面が内腔に向くようにバルーン拡張型ステント（Palma-Schatz, length: 15 mm, diameter: 1.2 mm）の外側に置き、顕微鏡下にて10.0 ナイロン糸にて支持縫合した後、フィルムの断端を重ね合わせジメチルホルムアミドにて熔融接着させることによりカバーステントを作製した。

移植実験：

実験はニュージーランド白色家兎（体重3~4kg）で行った（n=7）。作製したカバーステントをバルーンカテーテルにマウントした後に、ニュージーランド白色家兎の大腿動脈より透視下で総頸動脈に誘導し、バルーンを拡張させてカバーステントを血管内に留置した。3月後、開存性を血管撮影にて評価した。

顕微鏡評価：

ステントを周囲の頸動脈組織を含めて摘出し、10%ホルムアルデヒド緩衝溶液にて固定した。固定組織をアルコール系列で脱水後、グリコールメタクリレートにて樹脂包埋し、円周方向の薄片を作製し、HE染色あるいはElastica VanGiessen染色を行い、組織学的に血流面への組織侵入の程度を評価し

た。別に、摘出組織を1%オスミウム酸で後固定した後に、アルコール脱水、白金パラジウム蒸着し、走査型電子顕微鏡にて内腔面および断面形状を観察した。

（倫理面への配慮）

研究上で倫理面へ配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に於いて国立循環器病センター内の倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究では、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を行い、説明と理解（インフォームドコンセント）を必ず書面にて確認した上で協力をお願いする。また、遺伝子解析などの研究内容を行う必要がある場合には、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号）を遵守する。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research)と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23)に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は国立循環器病センター付属の動物管理施設にて適切に一括管理される。

C. 研究結果

カバーステントの作製方法の概略を以下に示す。まず、カバーフィルムの基材となるセグメント化ポリウレタンフィルムにエキシマレーザー加工装置を用いて多孔構造化を行った。これに光反応性ゼラチンを用いて表面にゲルを固定し、ゲル内部にヘパリンを包埋させた。この表面処理した多孔質ポリウレタンフィルムを市販のバルーン拡張型ステントの外側に表面修飾面が内側になるようにラッピングした。フィルムの片面断端をステントの支持金属に縫合固定した。反対側の断端を先の固定断端面に重ね合わせ、ジメチルホルムアミドにより熔融接着させた。以下に、操作段階ごとに詳細に説明する。

カバーフィルムの多孔化：

ポリウレタンフィルムにエキシマレーザーの紫外パルス光を円形の貫通孔を有するフォトマスクを通して照射すると、フォトマスクの形状に一致した円形の貫通孔が形成された。コンピューター制御による自動移動ステージを用いて照射部位を段階的に移動させると孔の配置を任意に設計することができた。作製した多孔質フィルムの力学的性質を引っ張り強度試験により調べた。フィルムを一定速度で延伸させると、フィルムの歪みが増加し、孔形状は円形から楕円形に変形した。100%までの歪み

の変化の範囲内では応力はほぼ直線的に増加し、また4倍程度まで延伸させても破断することはなかった。延伸初期に得られた歪み-応力曲線の直線部の傾きからフィルムの弾性率を求めると、無孔フィルムの場合には $1.6 \times 10^7 \text{Pa}$ であり、直径 100 μm の孔を 500 μm の間隔で多孔化したフィルムでは $1.3 \times 10^7 \text{Pa}$ 、250 μm 間隔では $7.5 \times 10^6 \text{Pa}$ であった。

カバーフィルムへのヘパリンの固定化：

光反応性ゼラチンをヘパリンとの混合水溶液とし、ポリウレタンフィルムの片側表面に塗布・乾燥させた後に、紫外光を照射した。処理したフィルムを水に浸漬させると、照射した表面が僅かに膨潤し、ゼラチンゲルの形成を認めた。これを水で激しく洗浄してもゼラチン層は剥げ落ちることなく強固にフィルム表面に固定されていた。SEMにてフィルム断面を観察すると、フィルムに作製した貫通孔を塞ぐようにフィルム片面のみに厚さ約 5 μm の極薄いゼラチンゲルの薄膜の形成を認めた。また、フォトマスクを用いて照射領域を規制することにより、ゼラチンゲルをフィルム表面の一部分に固定化した。これをカチオン性色素、トルイジンブルーの水溶液に浸漬すると、ゼラチン固定領域のみが青紫色に染色された。一方、ヘパリンを混合せずに光反応性ゼラチンでゲル固定した場合にはほとんど色変化はなかった。以上より、ヘパリンを含む光反応性ゼラチンに光照射するとヘパリンを包埋したゲルが生成し、同時にポリウレタンフィルム表面に固定された。また、このゼラチン固定化フィルムを延伸すると、ゼラチン層は剥がれることなくフィルムの延伸に追従した。

カバーステントの作製：

ヘパリンを包埋したゼラチン固定面が内腔面に向くようにバルーン拡張型ステントの外側にポリウレタンフィルムを置いた。次に、顕微鏡下にて 10.0 ナイロンにてフィルム断端の3箇所をステントの支持金属ストラット部に縫合固定した。縫合部を起点に約半周分のフィルムをステントに巻き、そこで更に2箇所縫合固定した。その後、残りのフィルムを完全に巻き残り部約 1mm 幅の自由端を重ね合わせてジメチルホルムアミドにより溶解接着した。溶解接着したポリウレタンフィルムを先と同様に引っ張り強度試験機を用いて延伸させると、歪み増加に伴う応力の増加を示した。得られた歪み-応力曲線において、初期歪みにおける直線部の傾きをもとに見かけの弾性率を算出すると、溶解接着フィルムは未処理に比べ約 2/3 に減少していたが、約 4 倍に延伸しても接着面が破断することは無かった。作製したカバーステントをバルーンカテーテルにマウントした。バルーンを拡張させるとフィルム共々

ステントが拡張した。バルーンを収縮させステントから引き抜いても、ステントの拡張形状は変化することなく維持された。

移植と組織学的評価：

孔径 30 μm の微細孔を 250 μm の間隔で配置したヘパリン固定化多孔質ポリウレタンフィルムをステントストラットの外表面の半分にラッピングすることにより半分カバー化ステントを作製した。カバーフィルムには内腔面にヘパリンを固定した。カバーステントは末梢側がカバー領域となるようにバルーンカテーテルにマウントした後に、5F シースを通して兎の大腿動脈より挿入した。挿入時にはステントがバルーンから外れないように細心の注意を要した。血管内の操作に関してはフィルムの有無でほとんど差は無く、ともにスムーズであった。透視下にて総頸動脈に誘導し、バルーンの拡張によりステントを留置した。カバーの有無で拡張性にほとんど差はなかった。摘出後のカバーステントの肉眼的観察では全て顕著な内膜肥厚は認めなかった。走査型電子顕微鏡で観察すると、カバーの有無にかかわらず、全てコンフルエントの内皮細胞層での被覆化を認めた。短軸方向でステントの断面形態を観察すると、カバー化されていないステントストラットのみ領域ではストラットを取り囲むように薄い新生内膜層の形成を認めた。一方、カバー領域においては、主としてカバーフィルム内腔面に新生内膜層の形成を示し、新生内膜層と旧内膜層とはフィルムに作製した微細孔を通して一体化していた。未カバー領域に形成された新生内膜層の厚さは平均 230.6 μm 、カバー領域での厚さは平均 244.3 μm となり、両者の差にほとんど有意差はなかった。

D. 考察

動脈硬化性の動脈狭窄病変に対して、従来のバルーンに加えてステントなど外科的手術に比べ less invasive な血管形成が盛んに行われ、その治療効果は多大である。しかし、慢性基の再狭窄が問題となっている。この再狭窄の抑制を目的として従来型のステントに対して、ステント金属部を合成高分子で皮膜化する、さらに高分子内へ薬物を混合する、またはヘパリンなど抗血液凝固物質で金属部を被覆化するなどの試みが行われている。

我々は今回従来のステントを改良し、抗血液凝固性と組織侵入量の調節の2つの機能を付与したカバーステントを作製した。組織侵入量の調節機能の付与はカバー材として用いたポリウレタンフィルムに精密に微細孔設計することにより行った。また、抗血液凝固機能に関しては、既に表面修飾剤として開発している光反応性ゼラチンを用いてヘパリンを包埋固定することにより付与した。

ポリウレタンフィルムへの微細孔設計はエキシマレーザーを用いて行った。エキシマレーザーは紫外域に高強度のエネルギーを有するパルスレーザーであり、分子間の結合を化学的に開裂させることができ、ほとんど熱を伴わないため高分子の精密加工法として利用されている。我々は既にポリウレタンフィルムにエキシマレーザーを照射するとマイクロレベルでの精度で加工できることを示し、小口径人工血管の作製手段として利用している。今回、カバー材として用いたシーダム社製のポリウレタンフィルムにおいても精密に微細孔形成することができた。多孔化することによりフィルムの弾性率は減少し、孔密度の増加によりさらに減少した。多孔化フィルムの弾性率は孔形成部を除くフィルム面の総面積に依存することを既に報告しており、今回得られた傾向と一致した。また、カバーフィルム表面へ抗血液凝固性を付与する目的でヘパリン固定化を行った。これは、我々の研究グループに於いて既に合成され、組織接着剤や人工血管の表面修飾剤として応用している光反応性ゼラチンを用いて行った。これはコラーゲンの熱変性タンパク質であるゼラチンの側鎖に紫外光を照射することによりラジカルを発生するベンゾフェノン基を導入したものであり、ゼラチン1分子あたり約30個のベンゾフェノン基が導入されている。光反応性ゼラチンを用いると、基材表面にコーティングして照射するだけでゲルを形成すると同時に基材表面に強固に固定することができ、また、光反応性ゼラチンのコーティング時にヘパリンを混合しておくことで生成したゼラチンゲル内に容易にヘパリンを包埋しておくことができた。

作製したカバーステントを兔に移植すると、ステント内腔面はカバーフィルムの有無にかかわらず全て新生内膜層の構築を認め、血流接触面は全て完全に内皮化された。カバーフィルム両端からの組織侵入に加えて、微細孔からの経壁的な組織侵入が起こったことによると考えられる。形成された新生内膜の厚さはカバーフィルムの有無でほとんど差は無く極薄かった。これまで内膜肥厚を抑制する目的で平滑筋細胞のステント内腔内への浸潤を抑制するため、ステントを高分子チューブで皮膜化する試みが行われている。高分子の材質にはポリグリコール酸やポリプロラクトンなどの分解性高分子やポリウレタンやシリコン、ポリエステルなどの非分解性高分子が用いられている。しかし、いずれの場合も材質にかかわらず豚冠動脈に移植されると、顕著な炎症反応を起こし、平滑筋細胞の必要以上の増殖を促し、強度の血管狭窄を生じている。本研究では、表面にヘパリンを固定していることで初期の血栓形成が抑制されたこと、またフィルムの多孔化により早期での内皮化が起こったことの相乗効果が

働き、血栓形成に由来する平滑筋細胞の増殖が抑制されたと考えられる。

ステント表面へのヘパリンのコーティングはステントストラット表面へのカチオン性高分子(ポリエチレンジイミン)などを下地として予めコーティングしておいた上にヘパリン還元末端との end attachment や長鎖アルキル鎖を有するアルキル化ヘパリンの吸着コーティングなどにより行われている。ヘパリンコーティングすると動物実験において急性期の血栓形成は大幅に抑制されることが示されている。しかし、慢性期での内膜肥厚の程度はヘパリンコーティングの有無で大差は認められていない。ヘパリンは1970年後半に血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果が見いだされ、最近では、抑制効果の生化学的作用機序に関する基礎研究が精力的に行われており、また臨床的にもヘパリンの動脈硬化部位での局所投与による抗内膜肥厚化が検討されつつある。したがって、ステント内面のゼラチン層から徐放されるヘパリンは抗凝固効果、外面の組織接触面からは平滑筋細胞の増殖抑制効果が期待できる。

また、光反応性ゼラチンのコーティング時に他の薬物を混合しておけば、生成ゼラチン内に容易に包埋することが可能である。ゼラチン層は薬物の担持・放出機能を有するマトリックスとして機能することが期待される。また、ゼラチン層の光形成・固定化技術は、本研究でのヘパリンによる抗凝固作用に加えて、より積極的な薬物治療が原理的に可能である。すなわち、内面と外面のゼラチン層に異なる薬物を担持させる drug delivery system をステントに搭載することによって積極的な血管再構築を行うものである。例えば、強力に平滑筋細胞の増殖を特異的に抑制する薬剤や遺伝子を組織接触面に包埋・固定化して内膜肥厚を抑制し、一方、血液接触面には、ヘパリンに加えて、内皮細胞のみに作用する増殖因子(例えば VEGF)を固定化して血液接触面の早期内皮化が期待できると考えている。また、フィルムに作製した多数の微細孔を經由してフィルム外側の生体血管組織から内腔面への組織侵入が起こり、新生内膜層が早期に構築されれば早期から血栓形成が抑制されるものと考えられる。さらに慢性期において内腔面への組織侵入量が微細孔の密度の調節で制御できれば内膜肥厚が抑制され、再狭窄の防止につながるものと期待される。今回行った正常な動物を用いた実験では、内膜肥厚の程度はヘパリン化カバーの有無でほとんど差を認めなかった。現在、高脂血症兔の使用や擦過法による内膜肥厚モデルの使用により、より臨床に即した実験系を用いてカバーステントの有効性を評価している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Y. Nakayama, J. Y. Kim, S. Nishi, H. Ueno, T. Matsuda, Development of high-performance stent: gelatinous photogel-coated stent that permits drug delivery and gene transfer, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 57, 559-566.
2. S. Kidoaki, Y. Nakayama, T. Matsuda, Measurement of the interaction forces between proteins and iniferter-based graft-polymerized surfaces with an atomic force microscope in aqueous media, *Langmuir*, 2001, 17, 1080-1087.
3. S. Kidoaki, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive structural change of poly(*N*-isopropylacrylamide) graft layer measured with an atomic force microscope, *Langmuir*, 2001, 17, 2402-2407.
4. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(*N*-isopropylacrylamide) grafts, *Biomacromolecules*, 2001, 2, 856-863.
5. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Material design for artificial extracellular matrix: cell entrapment in poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel, *J. Artif. Organs*, 2001, 4, 308-314.
6. T. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Small-diameter compliant arterial graft prosthesis: design concept of coaxial double tubular graft and its fabrication, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 55, 266-276.
7. H. Okino, Y. Nakayama, M. Tanaka, T. Matsuda, In situ hydrogelation of photocurable gelatin and drug release, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 59, 233-245.
8. M. Kikuchi, H. Takita, Y. Nakayama, T. Matsuda, Y. Kuboki, Laser perforated collagen membrane: pore size-dependent bone induction as a new BMP carrier, *J. Hard Tissue Biology*, 2001, 9, 79-89.
9. W. G. Brodbeck, M. S. Shive, E. Colton, Y. Nakayama, T. Matsuda, J. M. Anderson, Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 55, 661-668.
10. 中山泰秀、松田武久、ステント開発における材料工学的設計、*神経進歩*、2001, 45, 1026-1033.
11. Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, T. Matsuda, Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, *Langmuir*, in press.
12. Y. Nakayama, T. Kawada, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, *Biomaterials*, in press.
13. T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive heparin coating: Heparin conjugated poly(*N*-isopropylacrylamide) at one terminus, *Langmuir*, in press.
14. H. Sonoda, S. Urayama, C. Uyama, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Measurement of the compliance of vessels with digital X-ray imaging system, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 60, 191-195.
15. S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsutsui, Y. Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi, Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model, *Cardiovascular Res.*, in press.

学会発表

1. 奥田かな、中山泰秀、松田武久、機能性ゼラチンの分子設計：リビングラジカル重合を利用したマルチスチレン化ゼラチンの合成と光ゲル化、第50回高分子学会年次大会(大阪)、2001年5月
2. 鈴木貞信、平野義明、中山泰秀、松田武久、可視光表面ゲル固定化法の開発：プロトンドナーを側鎖に有する親水性高分子の光ゲル化と表面固定、第50回古文視学会年次大会(大阪)、2001年5月
3. 園田拓道、安井久喬、松田武久、高見沢計一、中山泰秀、二筒型コンプライアント人工血管の開発：移植による組織形態学および力学的変化の検討、高分子学会第30回医用高分子シンポジウム(東京)、2001年7月
4. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、機能性人工細

- 胞外マトリックス設計：感温性ゼラチンゲル内での細胞の長期生存の可能性、高分子学会第30回医用高分子シンポジウム（東京）、2001年7月
5. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、ヘパリン固定化多孔質カバーステントの移植実験—その長期観察—、第39回日本人工臓器学会大会（大阪）、2001年11月
 6. 中山泰秀、高見沢計一、植田初江、澤芳樹、渋谷貴規、山中ゆか、松田暉、生体内で成長する人工血管、第39回日本人工臓器学会大会（大阪）、2001年11月
 7. 園田拓道、高見沢計一、中山泰秀、城田利彦、安井久喬、松田武久、二筒型コンプライアント人工血管の開発：移植後の組織形態およびコンプライアンス変化の検討、第39回日本人工臓器学会大会（大阪）、2001年11月
 8. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、機能性人工細胞外マトリックス設計：細胞の長期生存性を与える感温性ゼラチンゲルの分子設計、第39回日本人工臓器学会大会（大阪）、2001年11月
 9. 星川淳人、満洲邦彦、中山泰秀、松田武久、小田弘美、中村耕三、可視光により自己硬化する光反応性ゼラチンは軟骨移植における担体として利用できる可能性がある、第16回日本整形外科学会基礎学術集会（広島）、2001年10月
 10. 星川淳人、織田弘美、中村耕三、満洲邦彦、中山泰秀、松田武久、軟骨細胞移植における担体としてのスチレン化ゼラチンの可能性、第23回日本バイオマテリアル学会、2001年10月
 11. 安田聡、野々木宏、中山泰秀、心血管インターベンションの現状と求められるバイオマテリアル、第23回日本バイオマテリアル学会、2001年10月
 12. Kuboki Y, Kikuchi M, Takita H, Nakayama Y, Matsuda T, Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone-induction when used as a new BMP-carrier, 7th ICCBMT (FI), 2001, 11
 13. Ohya S, Nakayama Y, Sonoda H, Matsuda T, Management of tissue adhesion prevention and hemostasis by thermoresponsive biopolymers, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11
 14. Nishi S, Nakayama Y, Ueda H, Ishikawa M, Matsuda T, Development of a novel high-performance stent graft with micropores and heparin immobilization; Application for extracranial aneurysm in *in vivo* experimental model, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

循環器系疾患の治療に用いる医用材料とそれを用いた治療デバイスの開発
分担課題：ステントの設計試作 in vitro 評価

分担研究者 池内 健

研究要旨

ステント構造と力学特性は臨床成績に影響する重要な要素である。前年度はステント構造と血管壁支持能力の関係について調べたが、本年度はもう1つの重要な力学特性であるステントの曲げに対する柔軟性に注目して、それを正確に測定できる試験機を開発した。その試験機を使ってステントの曲げに対する柔軟性を測定したところ、リンクステント構造が優れていることが判明した。またリンクの形状と配置がステントの柔軟性に及ぼす影響を明らかにすることができた。

A. 研究目的

ステントにおいて重要な力学特性は、強い半径方向の剛性と曲げに対する柔軟性である。強い半径方向の剛性は、狭窄した部位を押し広げることによって生じる半径方向の圧縮力に対して血管径が減少しないため(すなわち血流を確保するため)に必要な力学特性であり、また曲げに対する柔軟性は、ステント留置に伴う血管形状の変化を小さくするために必要な力学特性である。これまでこのようなステントの力学特性に関して、詳細な研究は行われておらず、また試験法も確立されていない。そこで我々はステントの力学特性に注目し、試験方法の確立およびステント構造と力学特性の関係を調べることを目的として研究を行った。本報告ではステントの曲げに対する柔軟性の測定法の確立と、ステント構造が柔軟性におよぼす影響について調べた。

B. 研究方法

曲げに対する柔軟性を定量的に評価するパラメータとして曲げ剛性が挙げられる。この値が小さいほど曲げに対して柔軟な材料であるといえる。しかしながらステントは独特の構造をしているために、通常の機械試験法を利用して曲げ剛性を測定するのは困難である。具体的には、ステントは中空の構造をしている。そのためステントを直接押して曲げると、断面(円形)が崩れてしまい正確な曲げ剛性の測定ができない。また近年のステントは必ずしも同じ形状が連続的に繰り返しておらず、血管壁を支持する部分(以下「セル」と呼ぶ)と曲がりやすくするために構造を変化させた部分(以下「リンク」と呼ぶ)が交互に並ぶ構造をとっていることが多い。そのため局所的に曲げ剛性が異なることが予想される。

そこで我々は、これらの制約下で正確にステントの曲げ剛性を測定するために4点曲げ試験法を採用した。ステント両端に1辺が4mm、長さ75mmの亚克力製角材のジグをとりつけた試験片を作製し、圧子や支点はこの亚克力製のジグに接触させて曲げてやる。このジグはステントに比べてはるかに曲がりにくいのでこれの変形は無視できる。このジグを介して4点でステントを曲げてやることによりス

テントに直接触れることなく、均一なモーメントでステントを曲げることができる。

試料として、NIR, TERUMO, MULTI-LINK ステントを使用した。これらはいずれも直径3.0mmに拡張して測定を行った。

C. 研究結果

測定結果から、同じ構造が連続しているNIRステントに対し、「リンク」構造を採用しているMULTI-LINKステント、TERUMOステントの方が曲げ剛性が低いことがわかった。また3本のリンクで結合しているMULTI-LINKステントよりも、1本のリンクで結合しているTERUMOステントの方が、使用している部材の厚みが、厚い(TERUMOステント:0.75mm, MULTI-LINKステント:0.05mm)にもかかわらず、曲げ剛性が低いことがわかった。

D. 考察

ステントの重要な力学特性の一つである曲げに対する柔軟性を評価するためにステントの曲げ剛性を測定した。同じ構造が連続しているNIRステントよりも、リンク構造を採用したステントの方が曲げ剛性が低かった。またリンク構造を採用しているMULTI-LINKステントとTERUMOステントの比較から、リンクのデザインを工夫することによって、厚い部材を使用したステントでも、それ以下の薄い部材を使用したステントよりも曲げ剛性を低くできることがわかった。NIRステントとTERUMOステントの比較では、曲げ剛性は約1/30になっていることから、チューブステントは従来、曲げに対して柔軟性がないと考えられてきたが、その構造を工夫し、リンク構造を採用することによって、曲げに対する柔軟性を確保することができる。

E. 結論

ステントの力学特性に注目して、ステント構造と力学特性の関係について調べた。ステント独自の構造的特長により、通常の方法では困難であったステントの曲げ剛性を正確に測定できる試験機を開発した。前報および本報での測定結果から、リンクステ