

図 12. ステント留置後の X 線透過像写真  
(a) 未処理ステント ; (b) ナノアパタイト複合化ステント

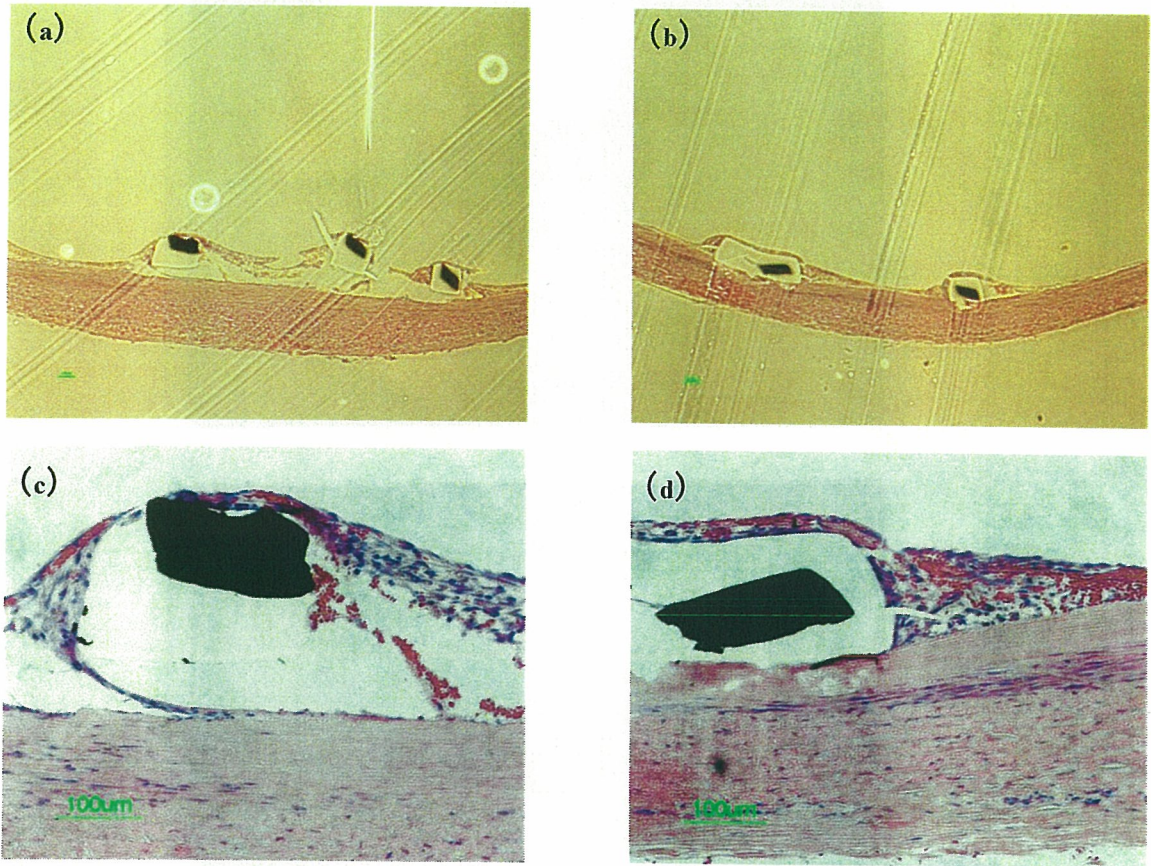


図 13. 留置 1 週後のステント内腔の組織切片像 (Hematoxylin-Eosin 染色)

(a, c) 未処理ステント ; (b, d) ナノアパタイト複合化ステント



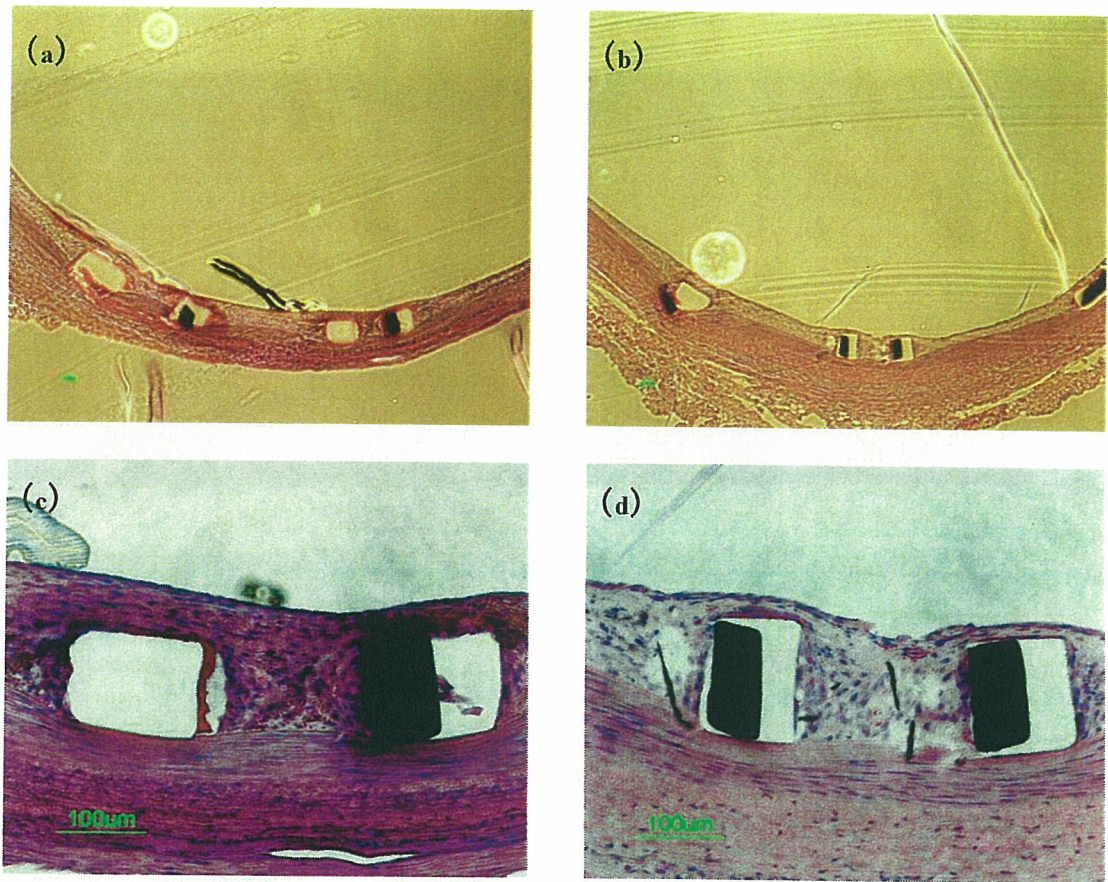


図 14. 留置 2 週後のステント内腔の組織切片像 (Hematoxylin-Eosin 染色)

(a, c) 未処理ステント ; (b, d) ナノアパタイト複合化ステント

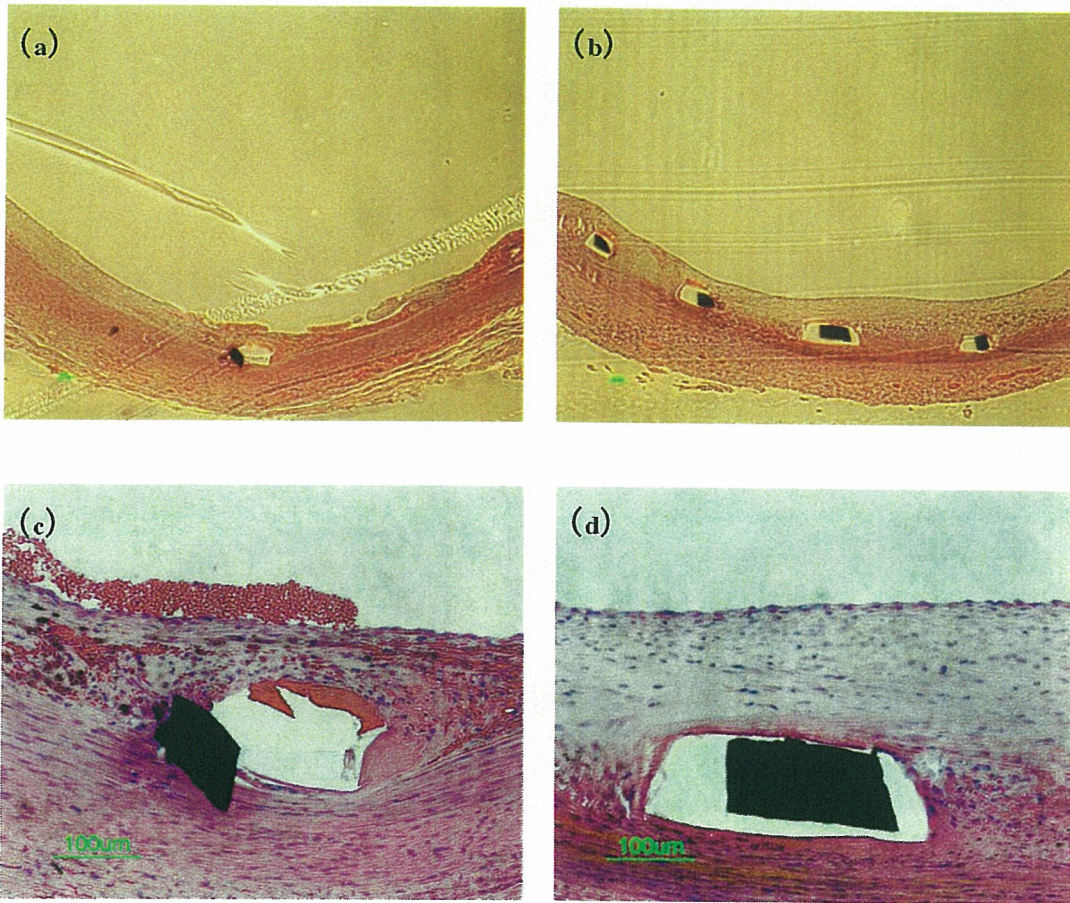


図 15. 留置 4 週後のステント内腔の組織切片像 (Hematoxylin-Eosin 染色)

(a, c) 未処理ステント ; (b, d) ナノアパタイト複合化ステント



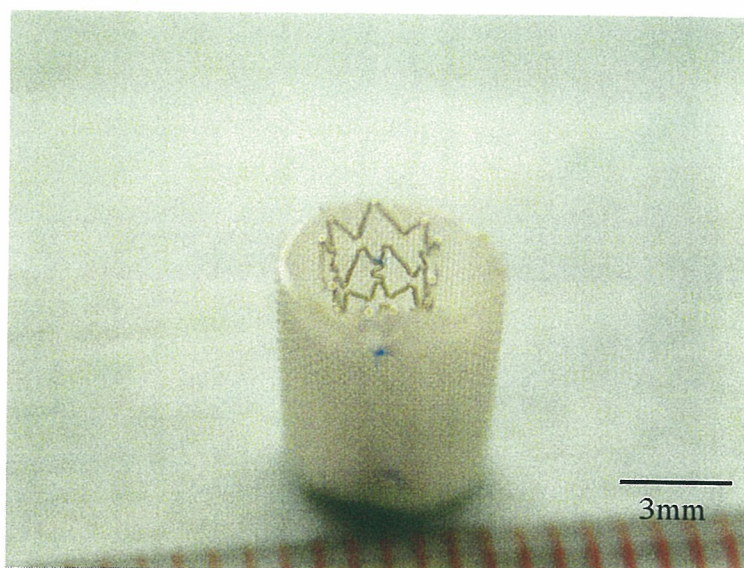


図 16. ナノアパタイト複合化ステントグラフトの外観

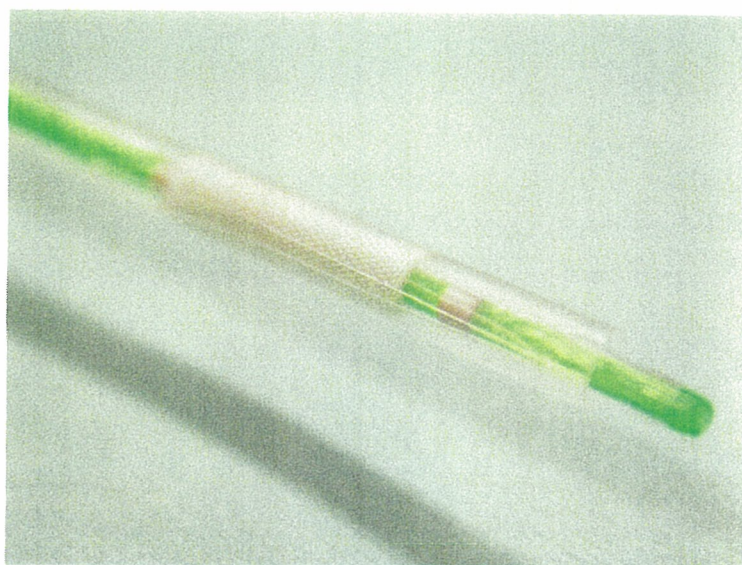


図 17. ステントグラフトをシース内に装着した状態の外観写真

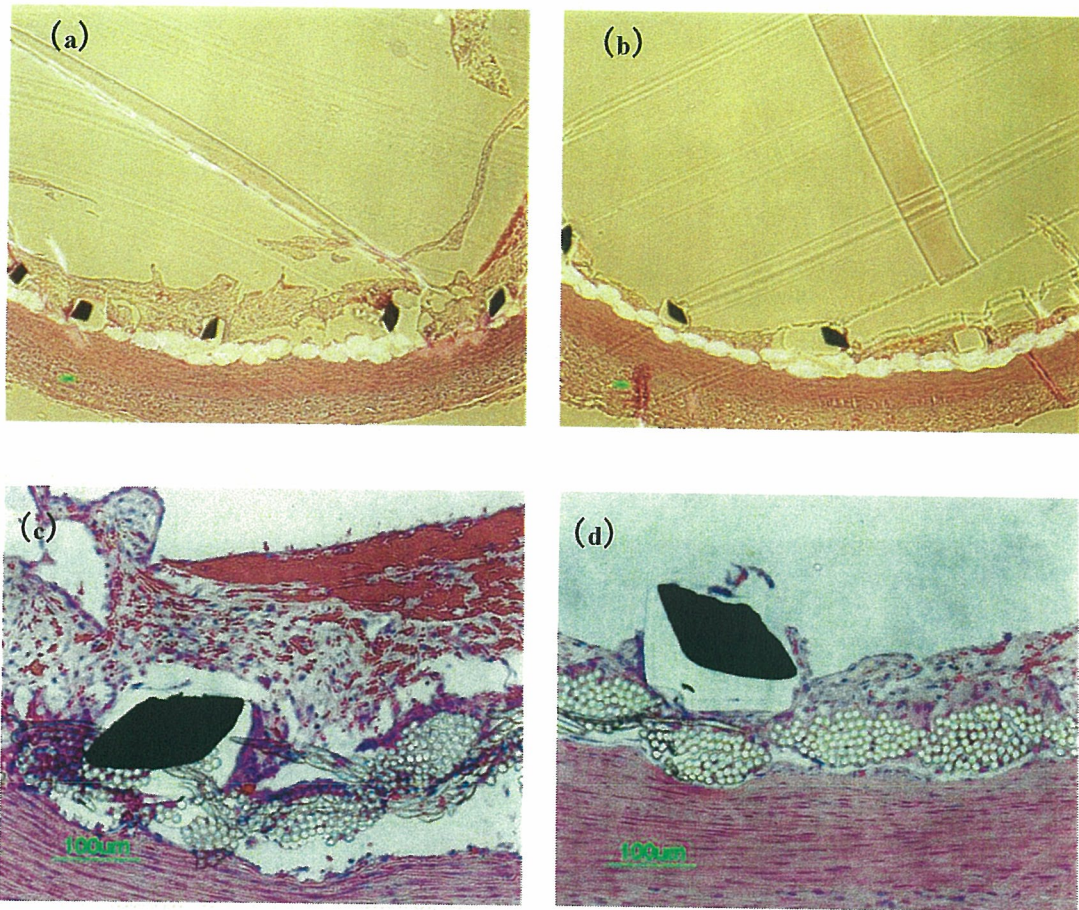


図 18. 留置 1 週後のグラフト内腔の組織切片像 (Hematoxylin-Eosin 写真)  
(a, c) 未処理ステントグラフト ; (b, d) ナノアパタイト複合化ステントグラフト



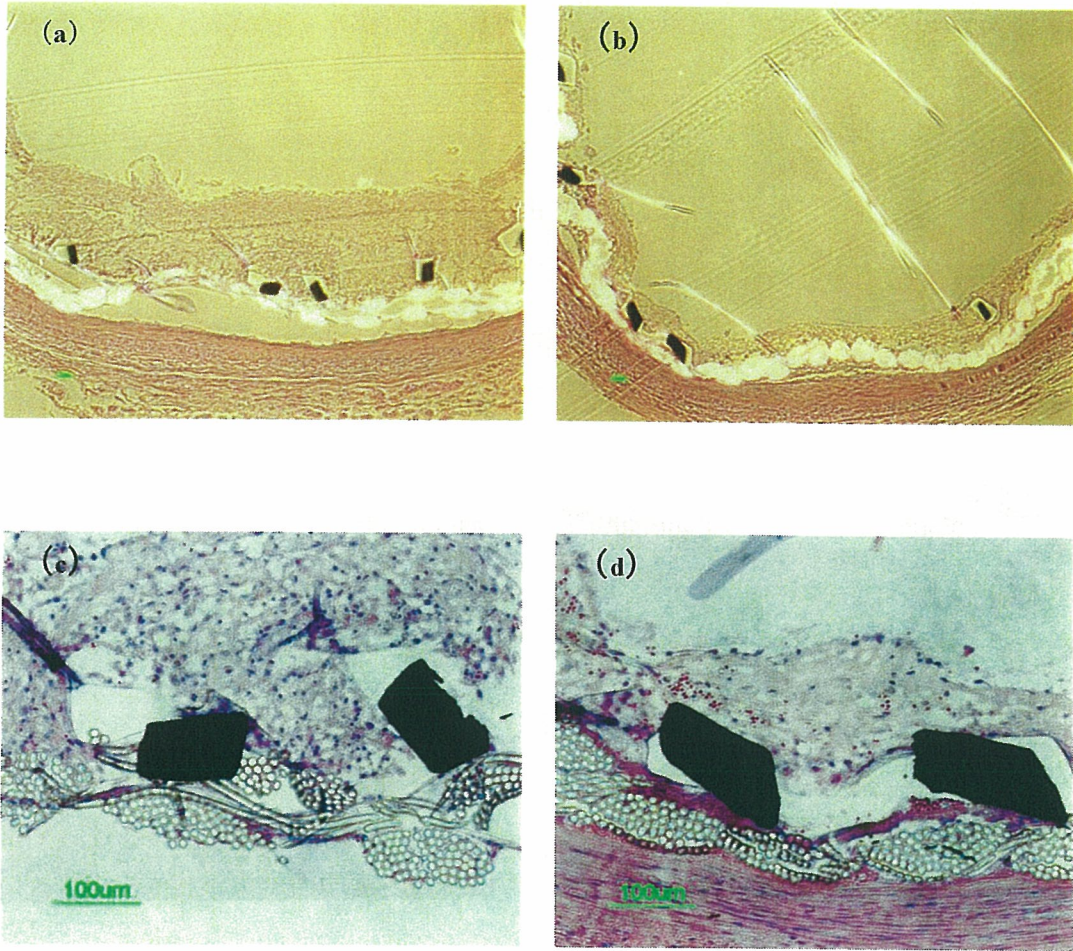


図 19. 留置 2 週後のグラフト内腔の組織切片像 (Hematoxylin-Eosin 染色)  
 (a, c) 未処理ステントグラフト ; (b, d) ナノアパタイト複合化ステントグラフト



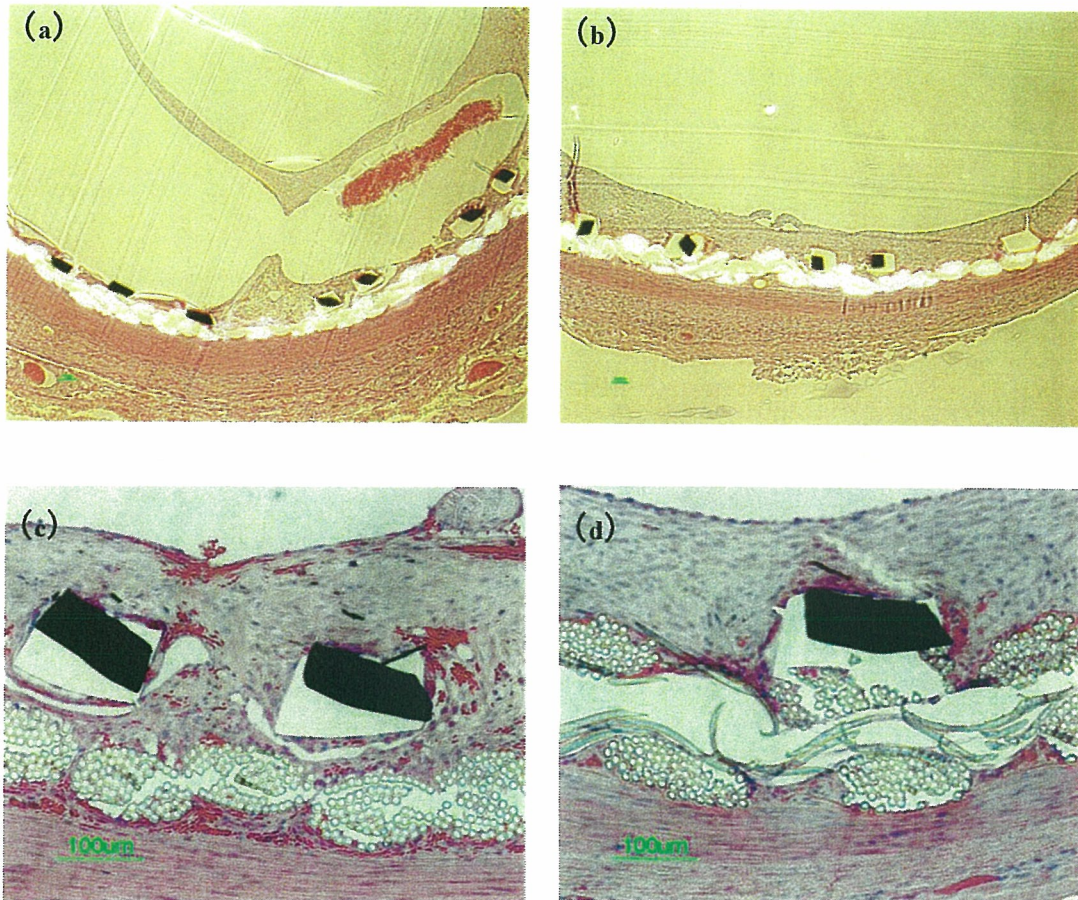


図 20. 留置 4 週後のグラフト内腔の組織切片像 (Hematoxylin-Eosin 染色)  
(a, c) 未処理ステントグラフト ; (b, d) ナノアパタイト複合化ステントグラフト

## 分担研究報告書

## 薬剤担持複合材料の機能

分担研究者 稲永 隆（日本海員救済会門司病院内科腎センター・内科部長）

## 研究要旨

薬物放出機能を付与した新規ステントを創出するために、まず、血管平滑筋細胞に対して増殖抑制能をもつシロリムスのナノアパタイト粒子表面への吸着挙動および放出挙動について検討を行った。次に、ナノアパタイト複合化を透明なポリエステル基材に対して行うことで、光学顕微鏡による血管平滑筋細胞増殖挙動の直接観察を可能とした。*in vivo* での検討結果から、ナノアパタイト複合化基材にシロリムスを担持させることによって、血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を確認することができた。

## A. 研究目的

ステント留置後の再狭窄の原因として、新生内膜の過形成が現在もっとも大きな問題となっている。この問題を克服するため、平滑筋細胞の過増殖を抑える薬剤をステントに担持し、除放させる薬物溶出ステント（Drug-Eluting Stent）が開発された。欧米では既にシロリムス溶出ステントとパクリタキセル溶出ステントの 2 種が臨床応用されており、日本でも 2004 年 8 月よりシロリムス溶出ステントが保険適用となった。

シロリムスはマクロライド系の抗生物質（分子量 914；図 1）であり、主に腎移植患者における拒絶反応を抑制するための免疫抑制剤として開発されてきたが、免疫抑制作用に加えて抗炎症作用と細胞増殖抑制作用があるとされ、ステント治療後の再狭窄予防の薬物として検討されるようになった。シクロスポリン A（CsA）、タクロリムス（FK506）などの大環状を有する免疫抑制剤と同様に、シロリムスはイムノフィリンと呼ばれ

る特異的なサイトゾルタンパク質に結合して複合体を形成する。CsA および FK506 は、それぞれのイムノフィリンであるシクロフィリン及び FK506 結合タンパク質（FKBP）12 と複合体を形成し、サイトカイン産生や T 細胞の初期活性化（G0 期から G1 期）で必要とされるカルシニューリンを阻害する。一方、シロリムスは FKBP12 と結合するが、シロリムス-FKBP 複合体はカルシニューリン活性に影響を与えず、mammalian Target of Rapamycin（mTOR）と呼ばれるシグナル伝達タンパク質と結合することでその活性を阻害する。mTOR はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ活性を持ち、細胞周期調節に重要な役割を果たすタンパク質であり、mTOR 作用の抑制によって、p27 レベルが上昇し、サイクリン・CDK 活性が抑制されることで、細胞増殖周期が G1 後期で休止期に切り替わる。つまり、細胞毒性（cytotoxic）の薬物とは異なり、シロリムスは細胞を破壊することなく細胞分裂を阻止して休止



期に留める (cytostatic) 薬物である。また、シロリムスは平滑筋細胞の増殖を抑制する一方、正常な内皮再生を促す (内皮細胞のステント被覆を阻害しない) ことが前臨床試験ですでに証明されている。

このような薬物を当該研究課題で開発してきたナノアパタイト複合化ステント表面に直接を担持させることで、短期 (治癒期間) での薬物放出、および、薬物放出後に露出するアパタイト表面の細胞接着性によって内皮細胞を被覆させることで、新生内膜過形成および血栓閉塞防止を可能とする新しいステントが創出できると期待される。

本研究では新しい薬物溶出ステントを創出することを目的として、まず、シロリムスのナノアパタイト表面への吸着およびその放出特性について検討を行った。次に、透明なポリエステル基材表面のナノアパタイト複合化を試み、血管平滑筋細胞の増殖挙動を光学顕微鏡によって観察することが可能なナノアパタイト複合材料の開発を行った。さらに、同透明基材表面上で血管平滑筋細胞の増殖挙動を観察し、シロリムス担持による増殖抑制作用の確認を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

ナノアパタイトは既報に従って作製した。薬剤として用いたシロリムス (図 1) は和光純薬工業 (株) 製のものを使用した。透明ポリエステルフィルムは厚さ約 0.5 mm のものを用い、エタノール洗浄を行った後に使用した。モノマーとして用いたアクリル酸は減圧蒸留後に使用した。その他の化学試薬はナカライテスク (株) 製の特級試薬をそのまま用いた。

### 2. ナノアパタイト複合化透明ポリエステルフィルムの調製

まず、透明ポリエステルフィルムにコロナ放電処理 (電圧 80 V ; 10 秒間) を行うことで、表面に過酸化物を導入した。そのフィルムを 10% アクリル酸水溶液中に浸漬し、封管中において高分子重合反応を窒素雰囲気下、60°C、30 分間行った。重合反応後、フィルムを多量の水およびエタノールを用いて順に洗浄を行い、室温にて乾燥させた。

次に、エタノール中にナノアパタイトを 1 wt% となるように分散させた液中に、アクリル酸を導入したポリエステルフィルムを浸漬し、5 分間超音波を照射することで基材表面にナノアパタイトを吸着させた。その後、エタノールで洗浄を行い、室温にて乾燥させた。

### 3. シロリムスの吸着挙動

50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度に調製したシロリムスのエタノール溶液に、10  $\text{mg/ml}$  の濃度となるようにナノアパタイトを添加し、超音波 (20 kHz; 35W) を照射することでアパタイトを分散させ、室温で 24 時間攪拌した。その後、遠心分離によって上澄を回収し、アパタイト添加前後の可視光吸収強度から、アパタイトへのシロリムスの吸着量を測定した。可視光吸収強度は、紫外可視分光光度計 (日本分光(株)製 ; V560-DS) を用いた。

### 4. シロリムスの放出挙動

ナノアパタイト複合化ポリエステルフィルムにシロリムスのエタノール溶液を添加することで、シロリムスをフィルム表面に担持させた (シロリムス担持量, 30  $\mu\text{g/cm}^2$ )。10 mL のリン酸緩衝液 (PBS) を加えた褐色瓶中に同フィルムを浸漬し、PBS の上部に 5 mL のオクタノールをゆっく

りと添加した。37℃のインキュベータ内に褐色瓶を静置後、所定の時間ごとにオクタノールをサンプリングし、紫外可視分光光度計（波長 278 nm）を用いてオクタノール中のシロリムス濃度を測定することでシロリムスの放出挙動を評価した。ここで、放出量はフィルム表面のシロリムス担持量を 100%として求めた。なお、実験は 3 回繰り返し行った。

## 5. シロリムス担持材料上での平滑筋細胞の増殖抑制

まず、ナノアパタイト複合化ポリエステルフィルムの透明性および細胞直接観察の可否を確認するために、マウス線維芽細胞（L929 細胞）を用いて評価を行った。作製したサンプルを 24 ウェルマルチプレートに静置し、 $\alpha$ MEM 培地で培養した L929 細胞を 4000 個/サンプルの濃度で播種した。5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養を行い、所定の時間ごとに光学顕微鏡で観察し、細胞数を測定した。

次に、以下の手順に従って、シロリムスの平滑筋細胞増殖抑制能を評価した。まず、ナノアパタイト複合化透明ポリエステルフィルムに所定の濃度に調製したシロリムスのエタノール溶液を添加し、フィルム表面にシロリムスを担持させた（シロリムス担持量、30  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>）。作製したサンプルを 96 ウェルマルチプレートに静置し、SMBM 培地で培養した正常ヒト臍帯動脈血管平滑筋細胞を 800 個/サンプルの濃度で播種した。5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養を行い、所定の時間ごとにサンプルを取り出してリン酸緩衝液で洗浄した後、Cell Counting Kit8（DOJINDO）を用いて接着細胞数をカウントした。また、その際の細胞を光学顕微鏡で観察した。

## C. 研究結果および考察

### 1. シロリムスの吸着挙動

図 2 には、シロリムスのエタノール溶液にナノアパタイトを添加する前後の UV スペクトルを示した。ナノアパタイト添加前と比較してナノアパタイトを添加した場合ではシロリムスによる UV 吸収強度が低下していることが確認できる。ここで、最大吸収波長 278 nm における吸光度は約 55%低下した。この結果から、エタノール溶液中においてシロリムスがナノアパタイト表面に吸着することが明らかとなった。ここで、シロリムス-ナノアパタイト間の相互作用についての詳細は明らかではないが、シロリムス骨格中のエステル基とアパタイト表面のカルシウムとの静電的相互作用あるいはやや疎水性を示すリン酸基との疎水性相互作用によるものと推測される。

### 2. シロリムスの放出挙動

図 3 には、ナノアパタイト複合化層表面に担持したシロリムス放出挙動を示した。今回用いた方法は、PBS を通して油相（オクタノール）中に抽出されるシロリムスの量を *in vitro* で経時的に測定したものである。初期におけるシロリムスの放出速度は速く、2 週間で約 70%のシロリムスが放出され、その後も約 1 ヶ月に渡ってシロリムスの放出が持続していることが確認できる。また、前年度の検討において、ナノアパタイトの表面性状・表面電位によって放出挙動を制御できることを明らかとしており、薬物放出挙動をさらに最適化することが可能であると考えられる。

### 3. ナノアパタイト複合化透明ポリエステルフィルムの作製

次に行うシロリムス担持材料表面上での平滑



筋細胞の増殖抑制機能を評価する前実験として、まず、光学顕微鏡で直接観察が可能となる透明材料の開発を行った。通常のハイドロキシアパタイト・セラミックスは白色であるが(図4c参照)、ハイドロキシアパタイト自体は可視光を吸収せず、つまりセラミックスの白色化はマイクロサブミクロンサイズの間隙あるいは結晶粒による可視光の散乱が原因である。このことから、当該研究課題で開発を行っているナノアパタイト複合化(光散乱性の低いナノ粒子のコーティング)を透明材料に適用することで、透明性に優れた材料の創出が期待できる。

図4には、ナノアパタイト複合化前後のポリエステルフィルムの外観写真を示した。複合化後においても基材であるポリエステルフィルムと同等の透明性を維持していることが確認できる。この透明性は、図5に示したように、均一なナノ厚みの複合化によって、透明性低下の原因となる光散乱が抑制できたことに起因する。

次に、同フィルム上に播種した線維芽細胞の無染色での直接観察を通常の光学顕微鏡を用いて行った(図6)。従来のセラミックス上で細胞を培養した用いた場合や、マイクロサイズのアパタイトを複合化した材料を用いた場合では、光散乱(白化)によって無染色での直接観察は困難であるが、ナノサイズのアパタイトを複合化することでプラスチックシャーレと同様に細胞の直接観察が可能であった。さらに、非破壊的であるため同一サンプルの連続観察が可能となり、図7に示したように、細胞の増殖挙動を連続的に測定することが可能となった。

#### 4. シロリムス担持材料上での平滑筋細胞の増殖抑制

次に、正常ヒト臍帯動脈血管平滑筋細胞を用いて、シロリムスの増殖抑制効果について検討を行った。図8および図9には、各材料上における平滑筋細胞の光学顕微鏡写真(5日間培養後)および増殖挙動を示した。シロリムスを担持させない場合、ナノアパタイト複合化材料は培養シャーレと同等の高い細胞増殖性を示した。一方、ナノアパタイト複合化材料にシロリムスを担持させた場合では、培養10日後においても増殖抑制効果が確認された。

#### D. 結論

新しい薬物溶出ステントを創出することを目的として、ナノアパタイト複合化表面への薬物の担持・放出について検討を行った。まず、新生内膜過形成を抑制可能な薬物であるシロリムスがナノアパタイト表面に吸着し、徐放されることが確認できた。次に、透明なポリエステル基材表面のナノアパタイト複合化に成功し、血管平滑筋細胞の増殖性を光学顕微鏡によって直接観察することを可能とした。さらに、同透明基材表面上で血管平滑筋細胞の増殖挙動を観察し、シロリムス担持による増殖抑制作用を確認することができた。この増殖抑制作用は、ナノアパタイトの表面性状および表面電位によって薬物放出挙動を制御することでさらに最適化が可能であると考えられる。

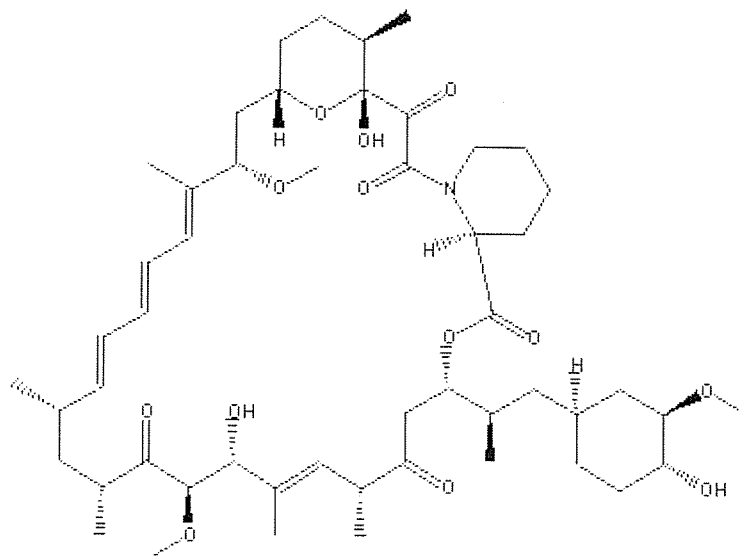


図 1. シロリムスの構造式



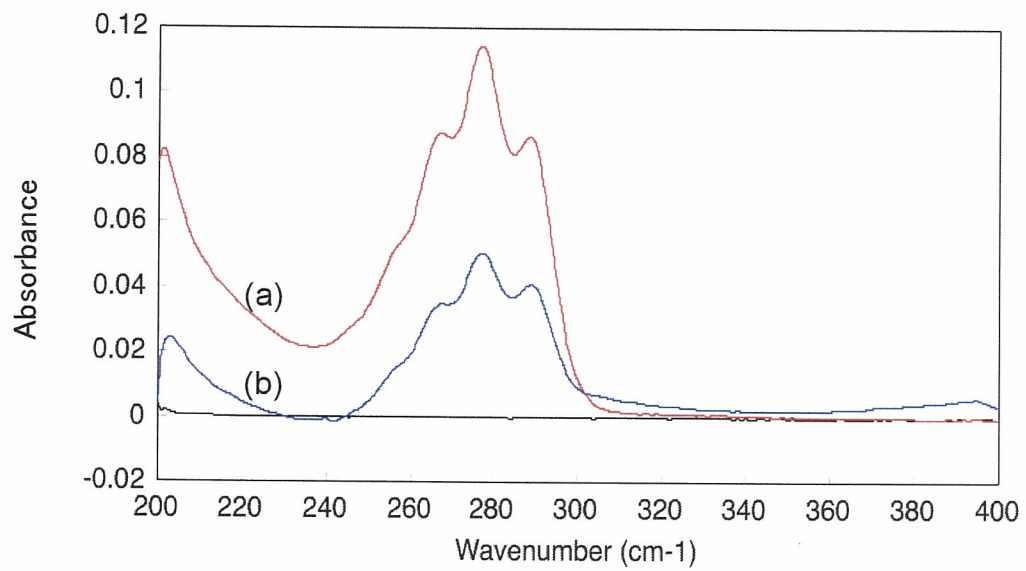


図2. シロリムス溶液のUVスペクトル。(a)ナノアパタイト添加前；(b)ナノアパタイト添加後。両者の吸光度の変化から、ナノアパタイト表面にシロリムスが55%吸着したことが分かる。

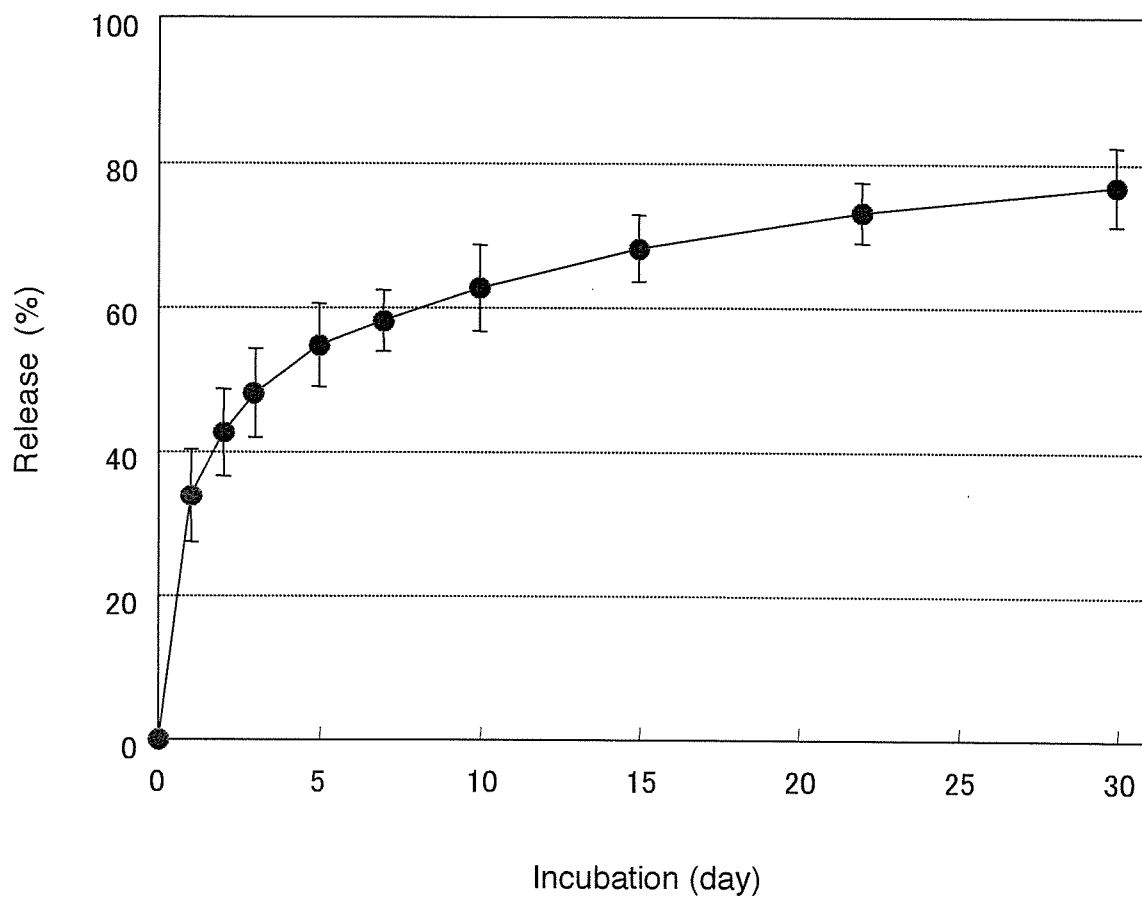


図3. アパタイト複合体に担持したシロリムスの *in vitro* 放出挙動 (リン酸緩衝液中 ; 37°C)

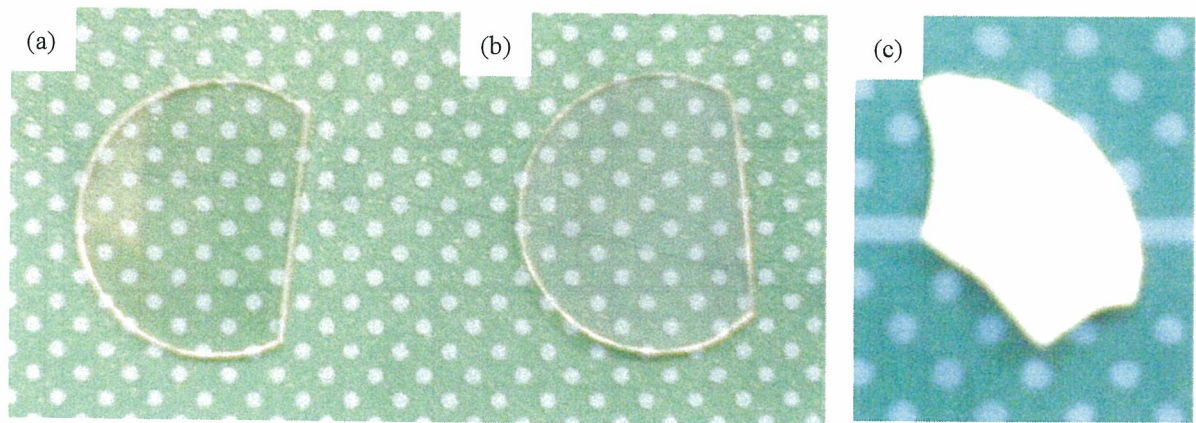


図4. (a) 基材として用いたポリエステルフィルム、(b) ナノアパタイト複合化後のポリエステルフィルム、および (c) 従来のハイドロキシアパタイト・セラミックスの外観



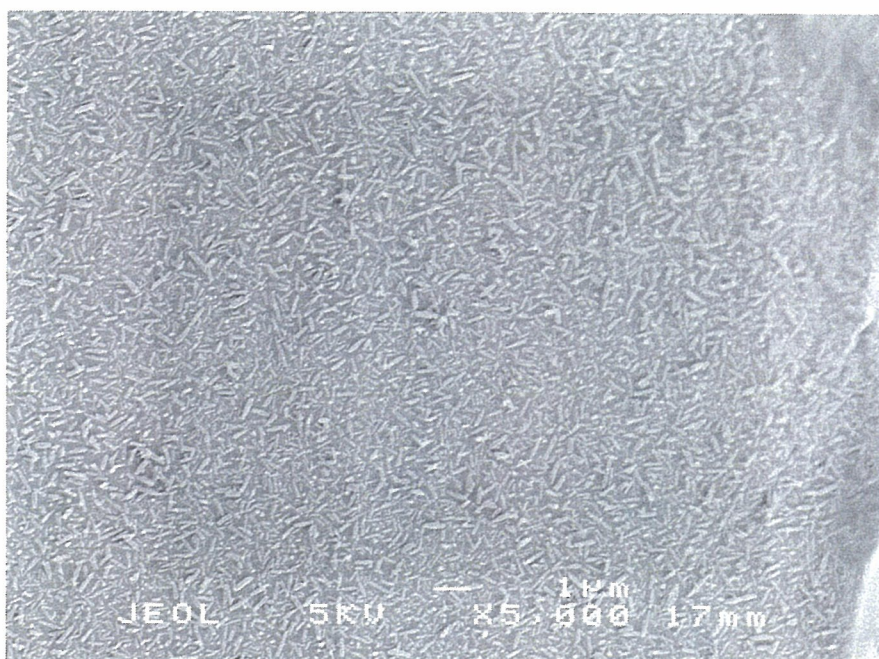


図5. ナノアパタイト複合化透明ポリエステルフィルムの走査型電子顕微鏡写真

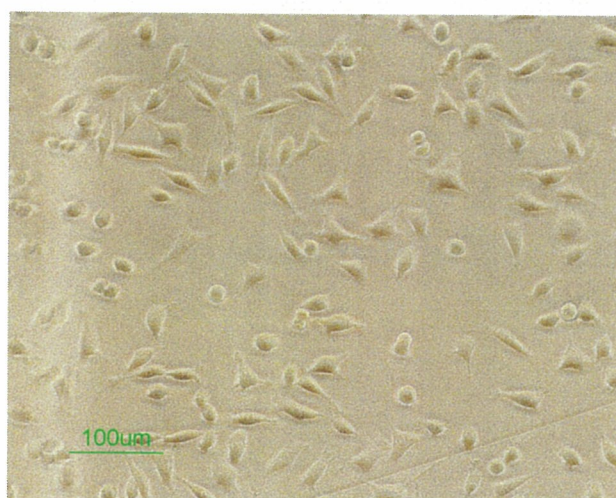


図 6. ナノアパタイト複合化透明ポリエステルに接着した L929 線維芽細胞の光学顕微鏡像

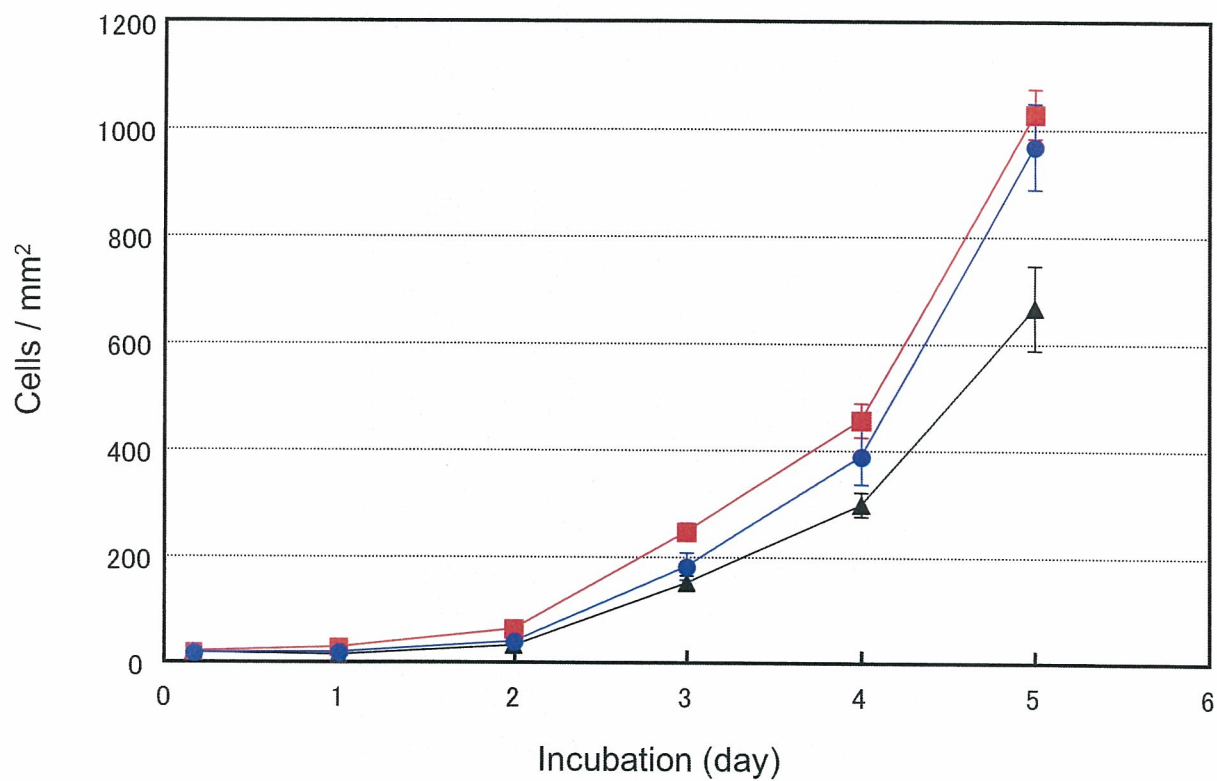


図 7. L929 線維芽細胞の増殖挙動：■ ナノアパタイト複合化透明ポリエステルフィルム、● 培養シャーレ、▲ 未処理透明ポリエステルフィルム