

での有効性、安全性の評価、薬物の体内動態などのより詳細なデータを集積する必要がある。

生体吸収性難燃性マグネシウムステンツプラットフォームの開発

現在、DESのプラットフォームとして用いられているステンツは、ステンレス製あるいはコバルトクロム合金といった「永久植込み型」であるため、ステンツが永久に異物として体内に残存する。そのため金属アレルギー、MRI撮影時のアーティファクトなど多くの問題を永久に抱えなくてはならない。生体吸収性ステンツプラットフォームの開発はBiotronik社が先行している。同社は市販の工業用マグネシウム合金(WE43)を用いてステンツを製造し、臨床試験を実施し、その結果がLancetに報告され、再狭窄率47.5%(4ヵ月後)、再治療率45%という結果⁶⁾であり、医療機器として普及するかどうか疑問である。更に本マグネシウム製ステンツはイットリウムなど希土類金属が微量ではあるが含まれ、非完全吸収性であり安全性が担保されていない成分を含有し、かつ量産が難しい。我々は製造特許を有する難燃性マグネシウムを用いたステンツプラットフォームの開発に取り組んでおり、今後、ナノ DDS ステンツのプラットフォームへの応用の検討を行っている。

おわりに

第一世代DESの有害事象が明らかになり、新規DESには有効性だけでなく、その安全性が十分担保されていなければ臨床への応用は不可能である。FDAから『Guidance for Industry: Coronary Drug-Eluting stents-Nonclinical and Clinical Studies』というDESの開発における詳細かつ厳格な前臨床試験および臨床試験に関するガイドライン(<http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/6255.html>)が提案され、またSchwartz RS, Virmani RからはCirculation: Cardiovasc Intervent誌上に『Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group』が報告された。これらのガイドライン、文献は第一世代のDESの反省点を二度と繰り返さないため高いハードルを設けており、我々が開発しているナノ DDS ステンツを臨床へ橋渡しするためには、クリアしていかなくてはならない課題が多い。国内での開発を進めて行くには産学官連携体制が必須であり、承認機関(独立行政法人医薬品医療機器総合機構)との連携が望まれる。

参考文献

参考文献

- 1) Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, et al: Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm* 45: 41-48, 1998
- 2) Nakano K, Egashira K, Masud S, et al: JACC: Cardiovascular Intervention, 2009 (in press)
- 3) Kitamoto S, Nakano K, Hirouchi Y, et al: Cholesterol-lowering independent regression and stabilization of atherosclerotic lesions by pravastatin and by antimonocyte chemoattractant protein-1 therapy in nonhuman primates. *Arterioscler thromb vasc biol* 24: 1522-1528, 2004
- 4) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al: Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105: 3017-3024, 2002
- 5) Walter DH, Schachinger V, Elsner M, et al: Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am j cardiol* 85: 962-968, 2000
- 6) Erbel R, Di Mario C, Bartunek J, et al: Temporary scaffolding of coronary arteries with bioabsorbable magnesium stents: a prospective, non-randomised multicentre trial. *Lancet* 369: 1869-1875, 2007

Overview

衝撃：DESは誰の心を痛くするのだろうか？

患者，医師，それとも企業

九州大学大学院医学研究院循環器内科学

江頭健輔
Kensuke Egashira

連載企画として「薬剤溶出ステントと遅発性血栓症 ～DESの陰から光を探る～」を企画致しました。DESは、いわゆる breakthrough テクノロジーとして登場し、初期臨床試験において格段の有効性が報告されたことから、予想以上に膨大な数が使用され、少なくとも数年間に600万人以上がDESの治療を受けたとされています。一般に、承認後に市場で爆発的に使用された場合、予想外の成果や副作用がまれながら認められることがあります。今回のDESにおける遅発性ステント内血栓症の発生がそれに当たると考えられます。

2006年9月、バルセロナで開催された欧州心臓学会議(ESC)において衝撃が走りました。DESが遅発性ステント内血栓を増加させ、その結果、急性心筋梗塞や心臓死が増加するという衝撃的報告が複数の施設から報告されました。私は現場で、該当するいくつかの発表を聞きましたが、「本当なら患者の死をもたらす重篤な副作用であり、現場の医療を変える重大な発表だ」、「現行のDESはもはや最終ゴールではなくなった」、「DESは反省期を迎える」と感じたことを鮮明に覚えています。DESを製造販売している医療機器会社の市販後調査の結果ではなく(医療機器会社はこの状況を把握していなかったと発表)、実際に患者を診療し、遅発性血栓症を実感した医師グループからの臨床研究であったことも不思議に思いました。医薬品業界では、このようなことはきわめて稀です。

これらの発表を受けて“Trading restenosis for thrombosis?”というeditorialがN Engl J Med誌(図1)に掲載され¹⁾、The Wall Street Journal誌に“Coated stents deliver heart burn”という記事(Johnson A: The Wall Street Journal. November 11, 2006)が掲載されるに至り、DES使用後の遅発性血栓症は世界的問題となりました。DESは誰に心の痛みをもたらすのでしょうか？DESを植え込まれた患者でしょうか？むしろ、DESを患者に植え込んだ医師やDES製造会社の心を痛くするのでしょうか？同年12月、FDAが急速、諮問委員会を開催したことは、その重要性を如実に表しています²⁾。さらに、N Engl J Med誌の2007年3月8日号に7つの論文が一挙に掲載されました。その詳細を連載の初めに取り上げます。

ご存知のように、DESに用いられている薬剤はバクリタキセル(抗血栓剤)やシロリムス(免疫抑制薬)です。より優れた血管保護作用を有する多数の薬剤・遺伝子が知られていた



図1. 薬剤溶出ステント(DES)の重篤な副作用(遅発性血栓→急性心筋梗塞・心臓死)は世界的問題
 薬剤がコーティングされていない通常のベアメタルステント(BMS)では、再狭窄(新生内膜形成)によって狭窄・閉塞が生じる。一方、DESでは、再狭窄は著明に減少するが、内皮細胞の再生が遅延しステントが血管内に露出することが多く、薬による組織因子の発現亢進と組み合わせると遅発性血栓が生じる。(文献1より改変して引用)

にもかかわらず、何故この2剤が選ばれたのでしょうか？ 私から見ると不思議です。その理由のひとつは、脂溶性がきわめて強く、ステントコーティングに用いるポリマーとの相性が良いという点であったようです⁹⁾。再狭窄の主因が「血管平滑筋の増殖」であるという立場から、その抑制作用が強力であることも理由でしょう⁹⁾。しかし、血管壁は平滑筋細胞だけで構成されているわけではないこと、他の構成細胞である内皮細胞が傷害後の再生修復反応に重要であること、は忘れられていたのでしょうか。動脈硬化性プラークにおいては、平滑筋の機能抑制はプラークの不安定化を促進することがあることも知られています。繰り返しになりますが、血管生物学の立場からは、バクリタキセルやシロリムスより優れた血管保護(再狭窄抑制、動脈硬化抑制)作用を有する化合物や遺伝子はたくさんあります。再狭窄(平滑筋増殖抑制)だけを注視して、臓器としての血管壁全体を見なかったのではないかと考えてしまいます。たとえば、血管平滑筋の増殖抑制なら、PDGFシグナル抑制が良かったかもしれません(PDGF抑制は内皮の再生にはほとんど影響しませんし、線維芽細胞の増殖も抑えます)。また、血管内皮の再生促進や抗炎症も強力な血管保護をもたらすことから、これらをターゲットにしても良かったかもしれません。

また、生体残存性ポリマーが使われている点も科学的ではありません。生体残存性ポリマーが冠動脈血栓症につながる血管傷害を惹起する可能性は、すでに1996年にCirculation誌に掲載されていました¹⁰⁾。DESによる冠動脈の遅延性炎症、内皮再生遅延などの副作用の懸念は、2000年以降、病理学者からも剖検所見に基づいて発表されていました(図2)¹¹⁻¹³⁾。私見ですが、DESは「血管生物医学の基礎研究成果を基盤にして開発された医療機器」なのかどうかは疑問です。

DESのステント内血栓は、今回初めて取り上げられたわけではありません。2004年、FDAは、稀ではあるが、ステント内血栓症が生じるリスクがあることを発表し、適切な

適応のもとにDESを使用することを提唱していました¹⁰⁾。しかし、このような基礎研究者やFDAから発信された心配は杞憂であるとして、インターベンションに関わる臨床医や企業からは顧みられませんでした。DESは、その劇的再狭窄防止効果を有することから、米国では冠動脈インターベンションの90%近くに使用され、承認後600万人以上の患者に過剰使用されてきました。安定狭心症の予後と医療費の調査から、冠動脈インターベンションの効果は内科的治療と同程度であることがN Engl J Med誌などに発表され、注目されています¹¹⁾。

現在、DESの遅発性ステント内血栓症を議論する場合、少なくとも3つの点を考える必要があると思います。

第一に、すでにDESを植え込まれた患者については最善の策を配慮しなくてはなりません。患者にどこまで通知するかは難しい点ですが、少なくとも安易に抗血小板薬を中止しないよう指導することが重要でしょう。

第二に、今後、冠動脈インターベンションを受ける患者において、DESはどのように位置づけられるのでしょうか？冠動脈インターベンションを受ける患者が治療後、菌科治療や外傷、手術などによって、抗血小板薬を中止せざるを得ない状況になる確率は少なくとも50%以上はあると思います。抗血小板薬の中止は、ステント内血栓症誘発のリスクであることは明白です。急性心筋梗塞症や心臓死のリスクがあるのであれば、「DESは慎重に使用すべきである」というのは自明です。議論の余地は少ないと思います。少な

急性心筋梗塞か突然心臓死で死亡した23症例

Group	Inflammation score	Eosinophils /strut	Fibrin score	% Struts with fibrin	% Struts endothelialized
DES (n=32)	1.7±1.5	5.6±11.1	2.3±1.1	49.3±30.8	55.8±26.5
BMS (n=36)	1.3±0.8	0.6±2.3	0.9±0.8	22.3±17.8	89.8±20.9
p value	ns	0.01	0.0001>	0.0005	0.0001

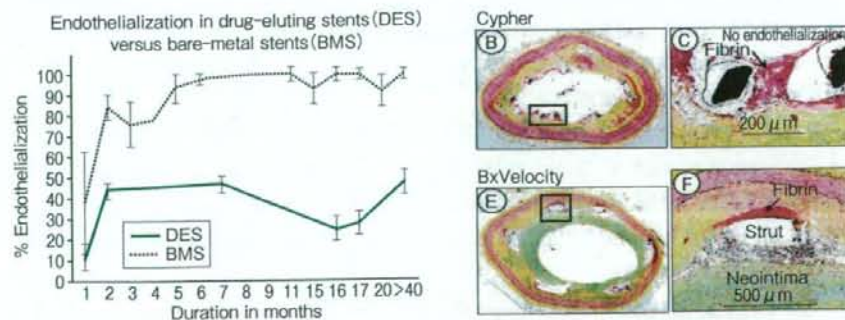


図2. ヒト病理組織は語る：DES使用症例では血管内皮細胞再生不全による遅発性血栓のリスクが増加する (文献9より改変して引用)

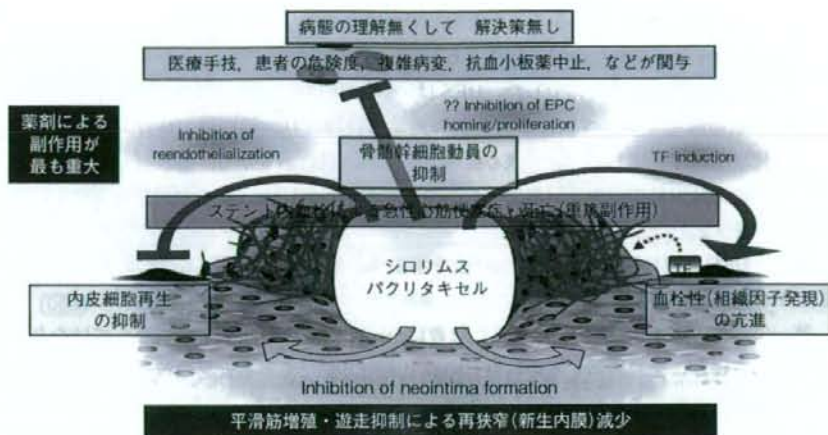


図3. 薬剤溶出ステント (DES) による遅発性ステント内血栓症の病態

くとも企業と冠動脈インターベンションを行う医師は、この点を患者に知らせるべきでしょう。

第三に、早急に遅発性ステント内血栓症の分子機序を理解し、それを基盤に次世代デバイスの開発を進めなければなりません。図3に示すように、DESにコーティングされた薬とポリマーによる内皮再生の遅延、骨髄内皮前駆細胞の増殖抑制、組織因子の発現亢進が、遅発性ステント内血栓症の最も重要な病態と考えられています。したがって、次世代ステントは細胞選択的に増殖や炎症を抑制、内皮細胞の再生を促進、抗血栓性の促進、などをもたらす新しいコンセプトに基づいた対策が必要と考えます。細胞特異的ドラッグデリバリーシステム(DDS)、あるいは細胞内シグナル応答性DDSなどの日本が得意とする新技術の導入はイノベーションをもたらすかもしれません。今まさに、血管生物医学の知識を基盤にした、より効果的で、かつ安全な血管内医療システムの開発が期待されています。現在、臨床治験が進められているDESはすべてシロリムスのアナログであり、根本的な解決になるかどうか疑問です。

最後に、今回取り上げる「薬剤溶出ステントと遅発性血栓症 ～DESの陰から光を探る～」は平成19年11月29、30日に開催される第15回日本血管生物医学学会学術大会(於九州大学医学部内九州大学医学部100年講堂)のプレナリーセッションとして取り上げます。学会に国内外の多くの研究者に参加していただき、活発な交流や討論を通じて光を探るきっかけになれば幸いです。

どうぞよろしくお願ひ申し上げます。

◎文献

- 1) Shuchman M : Trading restenosis for thrombosis? New questions about drug-eluting stents. *N Engl J Med* **355** : 1949-1952, 2006
- 2) Farb A, Boam AB : Stent thrombosis redux—the FDA perspective. *N Engl J Med* **356** : 984-987, 2007
- 3) Laskey WK, Yancy CW, Maisel WH : Thrombosis in coronary drug-eluting stents : report from the meeting of the Circulatory System Medical Devices Advisory Panel of the Food and Drug Administration Center for Devices and Radiologic Health, December 7-8, 2006. *Circulation* **115** : 2352-2357, 2007
- 4) Serruys PW, Kutryk MJ, Ong AT : Coronary-artery stents. *N Engl J Med* **354** : 483-495, 2006
- 5) van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, et al : Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* **94** : 1690-1697, 1996
- 6) Luscher TF, Steffel J, Eberli FR, et al : Drug-eluting stent and coronary thrombosis : biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* **115** : 1051-1058, 2007
- 7) Finn AV, Nakazawa G, Joner M, et al : Vascular responses to drug eluting stents : importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27** : 1500-1510, 2007
- 8) Finn AV, Joner M, Nakazawa G, et al : Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis : strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation* **115** : 2435-2441, 2007
- 9) Joner M, Finn AV, Farb A, et al : Pathology of drug-eluting stents in humans : delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* **48** : 193-202, 2006
- 10) Muni NI, Gross TP : Problems with drug-eluting coronary stents—the FDA perspective. *N Engl J Med* **351** : 1593-1595, 2004
- 11) Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, et al : Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *N Engl J Med* **356** : 1503-1516, 2007

ナノ医工学によるナノ DDS 技術開発に基づく 生体吸収性ナノ粒子コーティングステントの創製

九州大学大学院医学研究院循環器内科学 なかの 中野 かく 覚, えびらけんすけ 江頭健輔

はじめに

経皮的冠動脈血行再建術は、日本国内でおおむね年間20万例、世界的に年間200万例以上実施されている。その大部分(8~9割)はステント留置術である。通常のベアメタルステント(BMS)では、いったん拡張した血管内腔が再び狭くなり、狭心症の再発をきたす再狭窄が20~30%に生じる。この再狭窄の問題は、免疫抑制薬 sirolimus をコーティングした薬剤溶出ステント Cypher (日本では2004年3月承認, Cordis, Johnson and Johnson) や、抗癌薬 paclitaxel をコーティングした Taxus (日本では2007年3月承認, Boston Scientific) の開発成功により、ほぼ解決されたかに思われた。実際、Cypher および Taxus が米国食品医薬品局から BMS より有意に有効であると承認を受けた臨床試験のデータでは、再狭窄、標的病変部血行再建術(target-lesion revascularization: TLR) および標的血管血行再建術(target-vessel revascularization: TVR) が10%以下に抑えられることが示され¹⁾、2003年の発売開始以降、爆発的に普及し、冠インターベンションの世界を一変させた。

しかし、2004年に McFadden らは、Cypher あるいは Taxus 留置から335日以上経過したのち、外科手術等により抗血小板療法を中止した数日

後にステント内血栓症が生じた4症例について『Lancet』に報告し²⁾、また病理学者である Virmani らによる血栓症に関する有害事象の報告があったが³⁾、一部で話題にはなったもののあまり省みられることはなく、現在までに600万人以上に DES が留置されてきた。だが、昨年来、DES の安全性に関する懸念がクローズアップされている。とくに晩期に生ずるステント内血栓症は、いったん生じた場合、死亡や Q 波心筋梗塞が50%以上生ずるため、たとえステント内血栓症の発生率が低くてもみずごすわけにはいかない臨床的に重要な問題である。

第一世代 DES に用いられている薬剤

Cypher に使用されている sirolimus はマクロライド系の抗菌薬として開発され、現在は主に米国、欧州で腎移植後の免疫抑制薬として使用されている。sirolimus は血管平滑筋細胞の細胞内受容体である FK506-binding protein 12 (FKBP12) に結合し、mammalian target of rapamycin (mTOR) 活性を阻害する。その結果、サイクリン依存性リン酸化酵素阻害を有する p27^{kip1} の分解を促進し、細胞周期を停止する働きをもつ。

さらに、sirolimus は p70 S6 リン酸化経路を不活化することが知られている。これらの作用によ

[Key words] ドラッグデリバリーシステム, 生体吸収性ナノ粒子, ナノテクノロジー, 次世代型薬剤溶出ステント, 電着コーティングテクノロジー

生体吸収性ナノ粒子がもたらす優れた細胞導入率、細胞内安定性と安全性

- ◆生体吸収性高分子ポリマー (PLGA) 製ナノ粒子：安全
- ◆独自の封入技術：水中エマルジョン溶媒法によって多くの水溶性・脂溶性の薬物/遺伝子を封入可能
- ◆細胞選択性：ナノ粒子のサイズによる選択的導入，表面機能修飾による選択性
- ◆細胞内 DDS：PLGA の分子量を変えることによって細胞内放出時間を制御可能



図1 多機能・生体吸収性 PLGA ナノ粒子の有する特徴

り、Cypher は新生内膜形成やステント内再狭窄を引き起こす平滑筋の増殖・遊走を抑制する。しかし、これらの有益な作用だけでなく、ステント留置後の内皮再生に必要な内皮細胞の増殖をも阻害する。PI3 キナーゼとその下流にある mTOR は組織因子の発現を抑制しているが、sirolimus は mTOR を阻害することによって抑制されていた組織因子の発現および膜上組織因子の活性が生ずる⁴⁾。

Taxus に使用されている paclitaxel は、イチイ類 (*Taxus brevifolia* など) から抽出した天然ジテルペノイドを精製したものであり、乳癌、肺癌などに対する抗癌薬として使用されている。再狭窄抑制の作用機序はチューブリンのベータサブユニットに結合し、微小管の重合を促進することにより、細胞の増殖を抑制する。paclitaxel の微小管の重合促進により細胞増殖抑制だけでなく、細胞の遊走、細胞内蛋白輸送なども阻害すると考えられている。さらに、c-Jun NH₂ キナーゼ (JNK) のリン酸化を促進し、組織因子の発現と膜上組織因子の活性化を促進する⁵⁾。このように、現在の DES に用いられている薬剤は、再狭窄を抑制する血管平滑筋細胞への作用と同時に再内皮化の遅延、血栓症を誘発する組織因子の発現亢進という重大な副作用をもつ、両刃の剣であるといえる。

第一世代 DES に用いられているポリマーに起因する障害

第一世代 DES の薬剤は上記の二種類であり、いずれも脂溶性が高い薬剤である。この高い脂溶性のため、ステントへのコーティングは従来のポリマーを用いたコーティングが可能であった。Cypher には sirolimus をステント表面に保持するためにメタクリル酸共重合体 (アクリル系樹脂) が、Taxus にはトリブロック共重合体のポリスチレン-イソブチレン-スチレンが、キャリアマトリックスとして使用されている。これらは生体非吸収性であるため、血管壁に永久に残存する。ポリマーの残存はフィブリンの沈着、アレルギー反応、炎症の惹起、慢性化さらには晩期ステント内血栓症の発症に寄与すると考えられている⁶⁾。

生体吸収性ナノ粒子の開発

以上のことから第一世代 DES に代わる、より効果的で安全性の高い次世代型 DES の開発が望まれている。すなわち、ステント内新生内膜形成を抑制し、内皮細胞の修復を遅延させない薬剤あるいは遺伝子を、生体吸収性ポリマーを用いてス

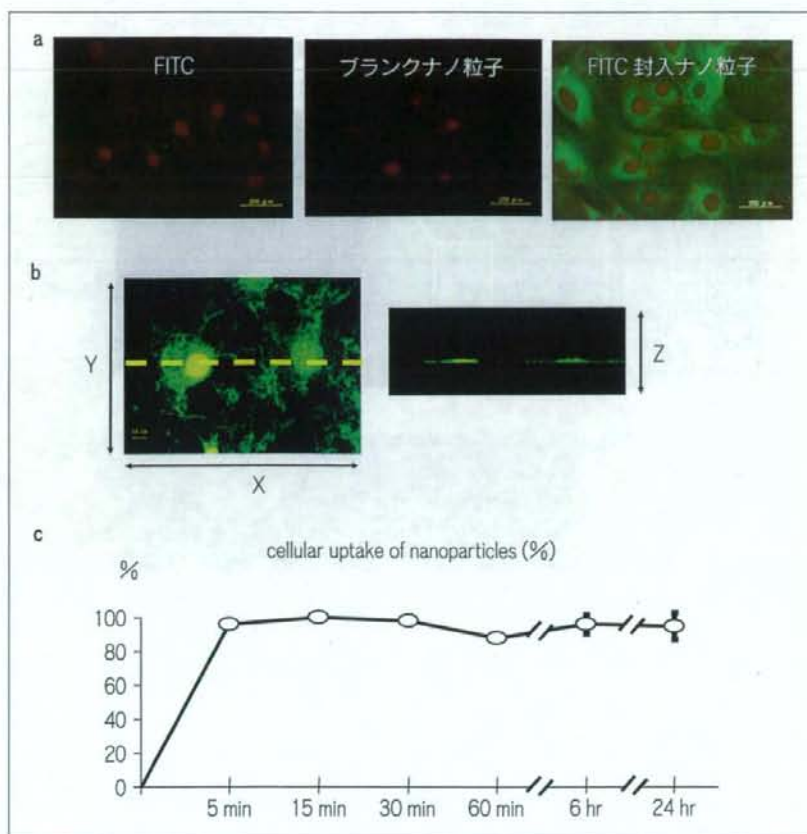


図2 培養ヒト冠動脈平滑筋細胞へのナノ粒子の取り込み

- a: ヒト冠動脈平滑筋細胞へ FITC のみ, ブランクナノ粒子, FITC 封入ナノ粒子を 1 時間インキュベートした. FITC 封入ナノ粒子をインキュベートした細胞のみ強い蛍光が認められた. FITC: 緑, 核: 赤.
- b: 共焦点レーザー顕微鏡で XY 方向および Y 軸方向から観察すると, ナノ粒子は核内および細胞質内に取り込まれたのが明らかになった. scale bar = 10 μm.
- c: FITC 封入ナノ粒子の取り込みを経時的に追跡すると, 短時間 (5 分) で多くの細胞に取り込まれ, 24 時間以上安定して停留した (各時間: n = 6~8).

テント表面へコーティングする技術を開発していく必要がある。

近年, われわれは生体吸収性, 生体適合性に優れた高分子である乳酸・グリコール酸共重合体 (co-poly-lactic acid/glycolic acid: PLGA) を, 「高分子球形析法⁷⁾」によりナノ粒子化するとともに, ペプチドや遺伝子プラスミドなどを封入するナノカプセル化技術を開発した. この方法の優れている点として脂溶性薬剤のみならず, 水溶性薬剤, ペプチドあるいは遺伝子 (核酸) の封入

も可能であることがあげられる. また, PLGA は生体吸収性縫合糸の材料として 30 年以上臨床で使用されており, さらに, PLGA マイクロ粒子によるリュープリン (酢酸リュープロレリン長期徐放型注射剤) の実績などからも, 生体内での安全性は保障されている.

さらに, PLGA ナノ粒子は, ドラッグデリバリーシステム (DDS) として, 薬物の酵素分解からの保護や薬物の放出制御などの通常の機能に加えて, 生体膜付着性による組織滞留性の向上,

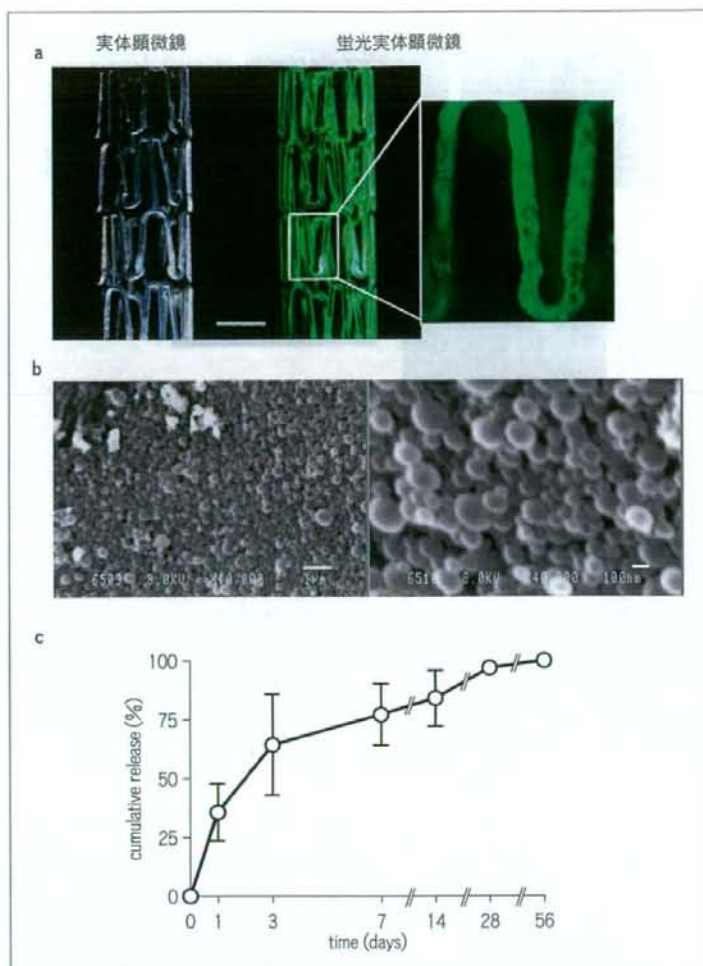


図3 電着コーティングテクノロジーによるナノ粒子溶出ステントの創製
 a: 実体顕微鏡および蛍光実体顕微鏡による, FITC封入ナノ粒子コーティングステント写真. 均一にナノ粒子がコーティングされているのが認められる.
 b: 走査型電子顕微鏡写真 (左: 弱拡大, scale bar=1 μ m, 右: 強拡大, scale bar=100 nm).
 c: ナノ粒子溶出ステントからの溶出速度の検討 (n=8).

それに起因する薬物の局所濃度の増大による薬物吸収の促進などの諸機能がすでに示されている(図1)⁷⁾.

実際, 蛍光色素 (FITC) を封入したナノ粒子の培養ヒト冠動脈血管平滑筋細胞への取り込みを視

察したところ, ナノ粒子はきわめて効率よく安定して培養細胞に取り込まれることが明らかになった(図2a). ナノ粒子に封入していない FITC では, 蛍光は検出されなかった. また, 共焦点レーザー顕微鏡で三次元的に観察したところ, 核およ

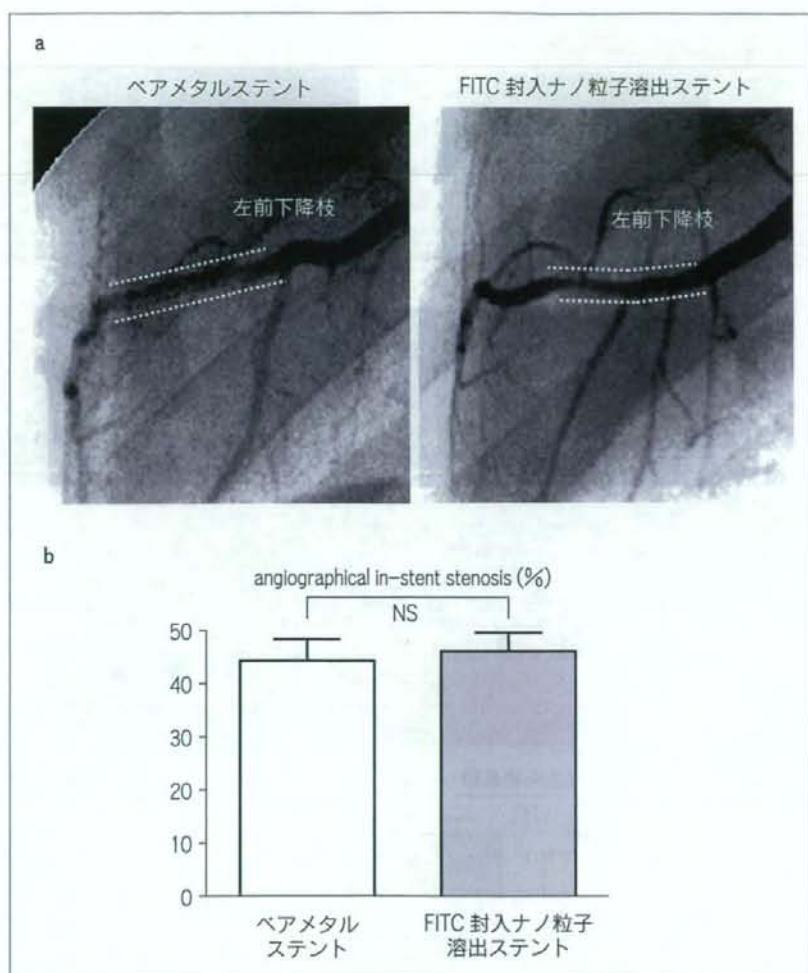


図4 血管造影と狭窄度

a: ベアメタルステントおよびFITC封入ナノ粒子溶出ステントをブタ冠動脈に留置し、28日後の血管造影写真。ステントストラットを白線で強調した。

b: ベアメタルおよびFITC封入ナノ粒子溶出ステントの再狭窄率。両群間で差は認められなかった(各群n=8)。

び細胞質内にナノ粒子が取り込まれていることが認められた(図2b)。経時的に観察すると、PLGAナノ粒子は60分以内に90%以上の細胞に取り込まれ、24時間以上にわたり細胞内に停留することが明らかになった(図2c)。

ステントへの電着コーティング

次に、このナノ粒子をステント表面にコーティングする技術開発を行った。ナノ粒子表面をキトサンで修飾することにより、ナノ粒子表面電化をプラスにチャージすることに成功したことから、電気的にステント表面にコーティングするというアイデアに行き着いた。

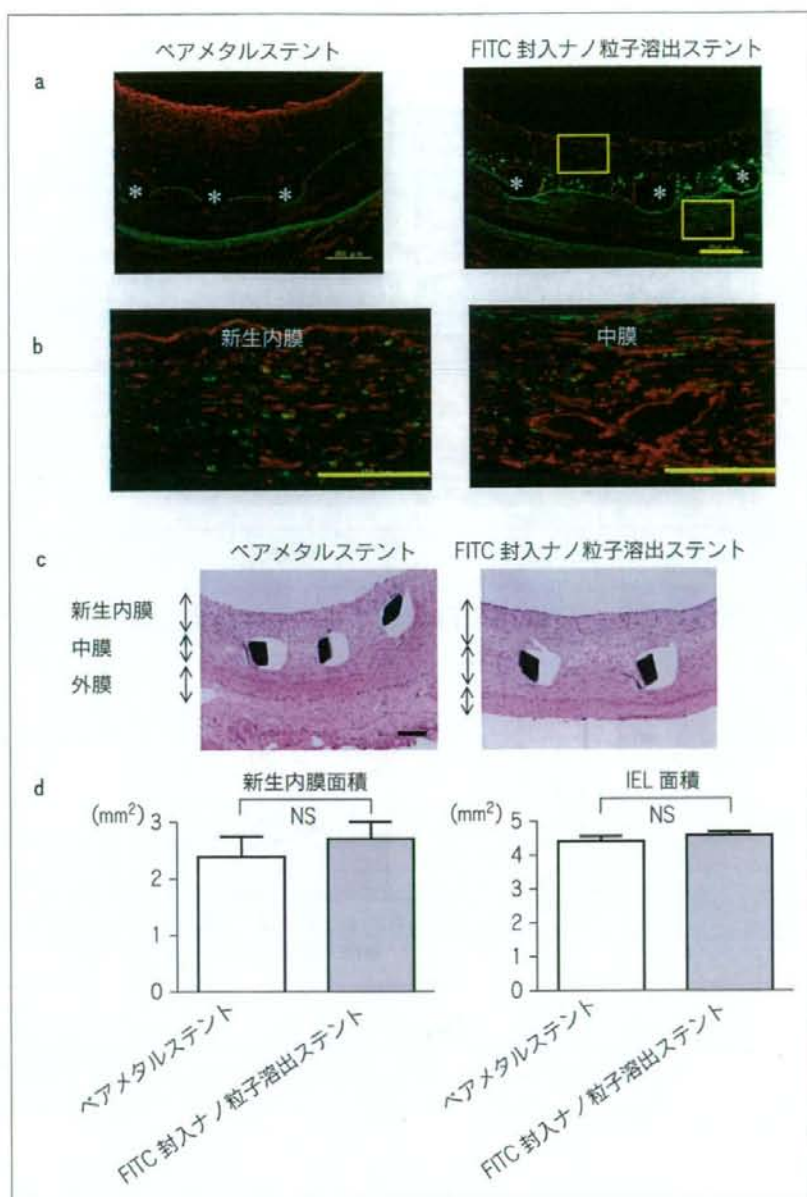


図5 FITC封入ナノ粒子溶出ステント留置28日後におけるFITCの組織分布と病理解析結果

- a: ベアメタルステントおよびFITC封入ナノ粒子溶出ステント留置28日後のステント留置血管の横断像の蛍光顕微鏡写真。*: ステントストラット。scale bar=100 μ m。
 b: aの写真で黄色く囲んだ部分の拡大像。新生内膜および中膜にFITCが認められた。
 c: ベアメタルステント, およびFITC封入ナノ粒子溶出ステント留置28日後のステント留置血管のHE染色病理標本。scale bar=500 μ m。
 d: ベアメタルステント, およびFITC封入ナノ粒子溶出ステント留置28日後の新生内膜面積および内弾性板 (IEL) 面積は, 両群間で差は認められなかった。
 NS=not significant.

FITC 封入キトサン修飾 PLGA ナノ粒子 (0.25 wt%) 懸濁液を作製し、長さ 15 mm ステンレス (SUS316L) 製マルチリンク様ステントをステント加工前の内径 1.1 mm、外径 1.3 mm のパイプに通し、陰極とした。そして、炭素棒が陽極、ステンレス製パイプが陰極となるように外部電源発生装置および電流計を直列に接続し、電流 5 mA 定電圧を維持するよう電圧を調整して 10 分間通電し、いわゆる電着コーティングテクノロジーにより、ステント表面にナノ粒子をコーティングした。コーティング後、ステントの表面を実体蛍光顕微鏡で観察すると、FITC 封入キトサン修飾ナノ粒子はステント表面に均一にコーティングされているのが認められた (図 3a)。さらに走査型電子顕微鏡によりナノ粒子コーティング後のステント表面を観察したところ、ステント表面にナノ粒子が均一にコーティングされており、粒子の形態的異常は認められなかった (図 3b)。また、通電時間を変えることにより、ステントへの搭載量を任意に調整することも可能であった。

ナノ粒子の溶出速度を測定するために、試験管内溶出試験を行った。FITC 封入キトサン修飾 PLGA ナノ粒子コーティングステントを、37°C の Tris-EDTA 緩衝液の擬似体液中に浸漬し、放出された FITC 封入キトサン修飾 PLGA ナノ粒子の蛍光強度を、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて経時的に測定した。その結果、約 45% のナノ粒子が早期 (24 時間以内) に放出されたが、その後、一定量が長期 (28 日間) にわたり溶出されることが明らかとなった (図 3c)。

フタ冠動脈への FITC 封入 PLGA ナノ粒子の留置

実際にフタ冠動脈に FITC 封入 PLGA ナノ粒子コーティングステントを留置し、28 日後に血管造影を行ったのち、剖検し組織内ナノ粒子の停留および病理学的な解析を行った。血管造影をしたところ、ベアメタルステントおよび FITC 封入 PLGA ナノ粒子コーティングステントでは狭窄

率は同程度であった (図 4)。また、血管を摘出しステント留置した血管の新生内膜を内腔側から実体蛍光顕微鏡で観察したところ、ステント周囲に強い蛍光が認められた。一方、ステント留置部位末梢には蛍光は認められなかった。

ステントストラットを慎重に外し、凍結切片を作製し蛍光顕微鏡で観察すると、ステントストラット周囲に強い蛍光が認められたほか (図 5a)、内膜直下、中膜にもナノ粒子に起因する蛍光が認められた (図 5b)。28 日後の炎症指数は、ベアメタルステント、ナノ粒子コーティングステントでそれぞれ 1.53 ± 0.09 、 1.58 ± 0.16 であり、傷害指数は 1.84 ± 0.06 、 1.81 ± 0.03 であり、いずれも 2 群間に差は認められなかった。また、新生内膜の面積は両群間で同程度であり (図 5d)、ナノ粒子ステントに起因する傷害、炎症の亢進などはないことが明らかになった。

今後の展望

われわれは FITC 封入 PLGA ナノ粒子を作製し、このナノ粒子を均一にステント表面にカチオン電着コーティングする技術を開発した。ステントコーティングのプロセスにおいて、ナノ粒子の形態と機能は温存されていた。培養ヒト冠動脈平滑筋細胞およびブタ冠動脈モデルを用いて、ステント表面から放出されたナノ粒子がきわめて高率に血管壁細胞に導入され、しかも長時間 (28 日間以上) 停留することを明らかにした。

また、われわれはすでに抗炎症作用、抗遊走作用をもつ遺伝子や血管平滑筋細胞に特異的に作用する分子標的薬、低分子薬剤のナノ粒子への封入に成功している。今後、このようなステント内再狭窄の病態を理解し、それに則した DDS 機能を有する次世代型 DES の開発を目指している。さらに、再狭窄治療のみならず、急性心筋梗塞や脳卒中を引き起こす不安定化プラークに対する有効性を評価していく予定である。

文 献

- 1) Babapulle MN, Eisenberg MJ: Coated stents for the prevention of restenosis: part I. *Circulation* 2002; **106** (21): 2734-2740
- 2) McFadden EP, Stabile E, Regar E et al: Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* 2004; **364**(9444): 1519-1521
- 3) Virmani R, Farb A, Guagliumi G et al: Drug-eluting stents: caution and concerns for long-term outcome. *Coron Artery Dis* 2004; **15** (6): 313-318
- 4) Steffel J, Latini RA, Akhmedov A et al: Rapamycin, but not FK-506, increases endothelial tissue factor expression: implications for drug-eluting stent design. *Circulation* 2005; **112**(13): 2002-2011
- 5) Luscher TF, Steffel J, Eberli FR et al: Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2007; **115**(8): 1051-1058
- 6) Virmani R, Guagliumi G, Farb A et al: Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation* 2004; **109**(6): 701-705
- 7) Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H et al: Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; **45** (1): 41-48

力研
ソ技
ホ一
大粉
九ワ

次世代DES、前臨床へ

ナノ粒子に薬剤封入

実用化でメーカーと交渉

九州大学大学院薬学研究所の江頭健輔准教授(循環器内科学)らの研究グループとホソカワ粉体技術研究所が共同開発しているスタチン封入ナノ粒子溶出DES(ドラッグデリバリーシステム)スタントが、09年度にも前臨床試験に入る。シロリムス溶出型の薬剤「サイファ」との豊富な細胞・組織を使った比較試験では、狭心抑制効果は同等でありながら、炎症や血栓の抑制効果では優れた成績を示しており、従来のDESの副作用を克服できる可能性を持つ。現在、テルモなどの国内スタントメーカーと実用化に向け交渉中。14年の国内承認申請を目標としている。開発できれば純国産DESとして、初となる見通しだ。

スタチン封入ナノ粒子溶出DESスタントは生体吸収性の高分子ポリマーであるPLGA(乳酸・グリコール酸共重合体)を使って、直径約0.2μmの粒子にスタチンを封入。ナノ粒子を均一にスタント表面にコーティングするため電着塗布技術が使われている。

血管内に留置後、スタント表面からナノ粒子が離れ、薬剤が血管壁に到達するというDES機能をもち、粒子が長期間、滞留しながら薬を徐々に放出するため、高い治療効果が期待できる。

ジョンソン・エンド・ジョンソン(J&J)のサイファとのアタリ運動脈を使った比較試験では、狭心抑制効果は同等でありながら、炎症、血栓、血管再生阻害抑制効果では優位な成績を示した。カニクイザルの腸骨動脈を使った慢性期での比較試験でも、4週間一

後の結果で同等の狭心抑制効果と、炎症、血栓の副作用抑制効果でサイファをしのぐ成績を示している。

江頭准教授らは09年度中にも、動物を使った前臨床試験を開始する方向。実用化に向け国内スタントメーカーと現在交渉中だ。また薬剤は興和の手だが、武田薬品工業のヒオクリタンも候補に挙げられている。

スタチン封入ナノ粒子溶出DESスタントの開発は、国が進めている先端医療開発特区(スーパー



特区)のプロジェクトの上つにも選ばれている。今後、オールジャパン体制で次世代のDESの開発を進めていく。