イオンビームによって改質したコラーゲンの 内皮化促進ステントへの応用と動物実験による考察

鈴木 嘉昭¹, 氏家 弘², 堀 智勝², 杉田 洋一³

In Vivo Animal Study of He⁺ Ion Irradiated Collagen for the Development of Small Diameter Stent

Yoshiaki SUZUKI, Ph.D.,¹ Hiroshi UJIE, M.D.,² Tomokatsu HORI, M.D.,² and Youichi SUGITA, M.D.³

¹Advanced Development and Supporting Center, RIKEN, ²Department of Neurosurgery, Neurological Institute, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan, and ³Center for Artificial Organ Development, Baylor College of Medicine, Texas, U.S.A.

Summary: In recent years, the stent technology available for endovascular treatment of aortic dissections has advanced tremendously. It is now possible to apply this minimally invasive technique to a wider range of pathology. The aim of this study was to develop anti-thrombogenic coronary stent using ion-beam technology. Our previous study indicted that He⁺-irradiated collagen surface with a fluence of 1×10^{14} ions/cm² has excellent antithrombogenicity and cell attachment property. The ion beam irradiated collagen-coated Ni-Ti and available SUS stents demonstrated a high anti-thrombogenicity and endothelialization in animal studies. The implantation of ions into a collagen-coated surface is a promising approach for developing a new stent. It is therefore very likely that ion-implanted collagen-coated stents will be clinically applicable.

Key words:

- ion beam
- collagen
- platelet adhesion
- cell attachment
- helium ion
- animal study

Surg Cereb Stroke
(Jpn) 36: 380-385, 2008

緒 言

冠動脈の治療あるいは小児用の人工血管など小口径の人工血管はいまだに研究段階である⁽³⁾⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾。この理由は血管内径の減少に伴い、抗血栓性を維持でき、かつ自己細胞によって修復できる人工材料がいまだ開発されていないことが主な原因である。近年は冠動脈の治療にはステント治療が普及し始めているが、抗血栓性の確保は抗凝固剤、抗

血小板剤の導入によって行われている。また遠隔期の問題としては初期には再狭窄の問題が生じてはいたが、現在はシロリムスなどの免疫抑制剤、細胞増殖抑制剤の固定化によって再狭窄の問題はほぼ解決された。しかしこの薬物徐放性ステント (drug eluting stent: DES) の使用でも患者は遅発性血栓性閉塞や日常的に塩酸チクロピジンなど強力な抗血小板剤の投与を余儀なくされ、これらの問題を解決できる次世代のステントが期待されているのが現状である。

¹理化学研究所 先端技術開発支援センター, ²東京女子医科大学 脳神経外科, ³ベイラー医科大学 (受稿日 2008.1.7) (脱稿日 2008.5.8) [連絡先: 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1 理化学研究所 先端技術開発支援センター ビームアプリケーションセンター 鈴木嘉昭] [Address correspondence: Yoshiaki SUZUKI, M.D., Advanced Development and Supporting Center, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan]

Material : Ti-Ni Alloy

Material diameter : 0.15 mm

Part A is round

Fig. 1 A schematic diagram of Ti-Ni stent.

また脳神経外科領域では1998年にGuglielmi detachable coil (GDC)¹⁾²⁾が本邦に導入され、そして2008年より頸動脈狭窄性病変に対するステント使用の認可がおりた。しかし欧米を中心に脳血管病変を血管内外科で治療するという趨勢はさらに加速し、日本ではまだ臨床使用どころか紹介すらされていない脳血管用stentまたはcovered stentによる治療も諸外国では始まっている⁷⁾。しかし頭蓋内脳血管は3-4mmと細く、血管壁が薄く直線状の部分が少ないため血栓化が生じやすいためステントの開発は、非常に難しい。

強力な抗血小板剤の投与の解決には血液凝固を抑制する表面(抗血栓性表面)の導入が考えられ、また遠隔期の過度の細胞増殖による再狭窄は、早期に内皮化を誘導し、線維芽細胞などの過度の細胞増殖を抑制する表面をステントに導入することでこれらの問題が軽減されると思われる。

われわれは細胞外マトリックスと呼ばれるタンパク質にイオンビームを照射すると、照射条件によって血小板粘着性、細胞接着性の制御が可能であることを報告している⁵⁾。特にコラーゲンへの He^+ イオンビーム照射によって血小板粘着が抑制され、かつ内皮細胞の接着を同時に生じることを明らかにして、小口径人工血管、損傷血管修復材に応用し、高い開存率、自己修復性を得た⁴⁾⁹⁾。本実験は、血小板粘着抑制と同時に内皮化を誘導するこの表面をステント表面に導入して動物実験によって抗血栓性、内皮化の誘導について検討した。

イオンビーム照射技術とは、添加を目的とする粒子を高真空(10^{-4} Pa)中でイオン化し、数十kVから数MVに加速して固体基板に添加する方法である。イオン源で作られ

加速されたイオンビームは、質量分離されるため、イオンの純度がきわめてよい。また加速エネルギー、照射量など制御性が高く、再現性、均一性のよい加工が可能である。また照射材料の構造変化に対するイオンビーム照射効果が解析しやすい利点を有する。この方法は添加効果を目的にした例ではすでにシリコンへの不純物添加法として確立された技術である。また表面改質法の中で最も高いエネルギーのイオンを用いることを特徴とする。

目 的

ニチノール製ステントおよび市販の冠動脈用ステント内面にタイプIコラーゲンをコーティングして He^+ イオンビーム照射することで、抗血栓性と同時に内皮化を誘導する表面を作成し、動物実験によってこれらのステントの有用性を実証することを目的とした。

実験方法

1. ステント

Ti-Ni合金線(直径0.15mm)をステント内径4mm、長さ25mmにダイヤモンドブレード編組し、Fig. 1に示すニチノール製ステントを作成した。また市販されているジョンソンエンドジョンソン社ベアステント(BXステント)、薬物徐放性Cypherステントを加えて用いた。

2. コラーゲンコートおよびイオンビーム照射

Fig. 2に示すようにステントをディップコート法によりタイプIコラーゲン(CELLGEN, Bovine dermis collagen, KOKEN Co. Japan)をコートした。乾燥後、 He^+ を加速電

Fig. 2 A schematic diagram of ion-implanted collagen-coated small diameter stent. Ion implantation was performed inner surface of the stent.

圧 150 keV で 1×10^{14} ions/cm² 傾斜回転照射法によりステント内面へのイオンビーム照射を行った。

3. 急性動物実験

ニチノール製ステント、コラーゲン複合化ニチノール製ステントをビーグル犬の大腿動脈末梢に2時間留置し、目視および走査電子顕微鏡 (SEM) によりステント表面への血栓形成状態を観察した。抗凝固療法、抗血小板療法は施さなかった。

4. 慢性動物実験

ニチノール製ステント、ジョンソンエンドジョンソン社 BX ステントをディップコート法によりタイプ I コラーゲンをコートした。乾燥後、He⁺イオンビーム照射を行った。ステントをビーグル犬の大腿動脈末梢に2カ月留置し、血管造影による慢性期の開存性評価および病理組織学的検査を行った。留置時以外は抗凝固療法、抗血小板療法は施さなかった。

5. 薬物徐放性ステントとの比較

比較としてジョンソンエンドジョンソン製薬物徐放性ステント (Cypher) を用いた。大腿動脈の両足に評価ステント、薬物徐放性ステントを2カ月留置して、さらに抗血小板療法 (チクロピジン 5 mg/kg, アスピリン 81 mg/錠) を行った。

結果と考察

1. 急性動物実験

Fig. 3 にニチノールステントおよびコラーゲン複合化イオンビーム照射ニチノールステントをビーグル犬大腿動脈両足に2時間留置したのちのステントおよびステント表面の SEM 写真を示す。目視ではニチノールステントにはわずかな赤色血栓の形成がみられたが、コラーゲン複合化イオンビーム照射ステントでは血栓形成はみられなかった。SEM による所見ではニチノールステント表面には血小板の粘着とともにフィブリンネットワークの形成が観察されたのに対して、コラーゲン複合化イオンビーム照射ステントは血小板粘着および血栓形成はみられず、良好な抗血栓性を示した。

コラーゲンに He⁺イオンビームを加速エネルギー 150 keV で 1×10^{14} ions/cm² 照射した表面をステント表面に導入し動物実験にて検証した結果、急性期でも良好な抗血栓性を示した。

2. 慢性動物実験

Fig. 4 にコラーゲン複合化イオンビーム照射ニチノールステントをビーグル犬大腿動脈に540日留置したのちのステント表面および組織写真 (アザン染色) を示す。抗凝固療法、抗血小板療法は一切行っていない。イオンビームを照射したステントを留置した血管内面は、肉眼的に血栓の生成はみられず、血管内皮細胞と考えられる白色の膜でステント材料が取り込まれていることが観察された。また組織学検査では切片作成の際、ニチノール製ステントを引き抜

Fig. 3 Non-ion implanted Ti-Ni stent (A) and He⁺ ion implanted collagen-coated Ti-Ni stent (B) with a fluence of 1×10^{14} ions/cm² after 2 hours and scanning electron micrographs.

A|B

Fig. 4 Inner surface of He⁺ ion implanted collagen-coated Ti-Ni stent (A) after 540 days and histology (B).

いたのちに行ったため一部の血管内宮側のステント表面の組織がその作業で脱落してしまったが、ステント部をまたがる内皮化が観察された。

Fig. 5に留置1カ月以上のニチノールステントおよびコラーゲン複合化イオンビーム照射ステントの開存率を示す。未処理のニチノールステントは10例中1例の開存のみであったが、コラーゲン複合化イオンビーム照射ステントは20例中16例の開存性を得た。

Fig. 6にコラーゲン複合化イオンビーム照射BXステント(拡張時 内径3.5 mm, 長さ 15 mm)をビーグル犬大腿動脈に2カ月留置したのちのステント表面およびSEM写真

Fig. 5 Patency of non-treated Ti-Ni stent and He⁺ ion implanted collagen-coated Ti-Ni stent over 30 days.

Fig. 6 Inner surface of He⁺ ion implanted collagen-coated BX stent (A) after 2 months without antiplatelet or anticoagulant and scanning electron micrograph (B).

A
B

Fig. 7 Inner surface of Cypher stent (A) and He⁺ ion implanted collagen-coated BX stent (B) after 2 months with antiplatelet.

A
B

Fig. 8 Scanning electron micrographs of inner surface of Cypher stent (A) and He⁺ ion implanted collagen-coated BX stent (B) after 2 months with antiplatelet.

A
B

を示す。抗凝固療法、抗血小板療法は一切行っていない。血栓形成はみられずまたステントをまたがる良好な内皮化も観察された。

市販のステント表面にコラーゲンをコーティングし、He⁺イオンビーム照射することで良好な抗血栓性と自己修復性を発揮することが判明した。

3. 薬物徐放性ステントとの比較

現在最も使用されているステントはジョンソンエンドジョンソン製薬物徐放性ステント (Cypher) である。このステントとコラーゲン複合化イオンビーム照射ステントの生体反応性を比較するため抗血小板療法を施した系でビーグル犬大腿動脈両足に留置した。未処理の 3.0 mm、長さ 18 mm の市販の薬物徐放性ステントとコラーゲンをコーティングして He⁺イオンビーム照射した BX ステントを、抗血小板療法 (チクロピジン、アスピリン) を施した同一の

ビーグル犬の大腿動脈に 2 カ月留置した。評価は 2 匹のビーグル犬を用いて行った (n=2)。Fig. 7 にステントの内面写真, Fig. 8 に SEM 写真を示す。薬物徐放性ステントは内面に非常に剥離しやすい厚い組織層がみられたが、コラーゲンコートイオンビーム照射ステントは薄く良好な安定した内皮化を促進することがわかった。この現象は他の 1 匹の留置実験でも同様の実験結果が得られた。

結 論

タイプ I コラーゲンをコーティングしてイオンビームを照射し、血小板粘着抑制、細胞接着性を付与したニチノール製ステントおよび市販の冠動脈ステントをビーグル犬の大腿動脈に抗凝固剤、抗血小板剤を施さない系で 2 カ月留置した結果、良好な抗血栓性と安定した内皮化が観察された。

また抗血小板療法を施した系で市販の薬物徐放性ステン

トとコラーゲン複合化イオンビーム照射ステントを比較した結果、コラーゲン複合化イオンビーム照射ステント表面はきわめて安定した内皮化が観察された。

以上の結果からコラーゲンに He^+ イオンビーム照射した表面をステント表面に導入することによって、抗凝固療法、抗血小板療法を軽減でき、かつ安定した内皮化層を形成することによって再狭窄を防止できる可能性を示唆した。

文 献

- 1) Guglielmi G, Vinuela F, Dion J, *et al*: Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience. *J Neurosurg* 75: 8-14, 1991
- 2) Guglielmi G, Vinuela F, Sepetka I, *et al*: Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 1: Electrochemical basis, technique, and experimental results. *J Neurosurg* 75: 1-7, 1991
- 3) Ishihara K, Shibata N, Tanaka S, *et al*: Improved blood compatibility of segmented polyurethane by polymeric additives having phospholipid polar groups. *J Biomed Mater Res* 32: 391-399, 1996
- 4) Kurotobi K, Suzuki Y, Kaibara M, *et al*: In vitro and in vivo study of ion-implanted collagen for the substrate of

- small diameter artificial grafts. *Artif Organs* 27: 582-586, 2003
- 5) Kurotobi K, Kaibara M, Suzuki Y, *et al*: Plasma protein adsorption onto cell attachment controlled ion implanted collagen. *Nuclear Inst and Methods in Physics Research B*: 175-177, 791-796, 2001
- 6) Kurotobi K, Kaibara M, Suzuki Y, *et al*: Ion implantation into collagen-coated surfaces for the development of small diameter artificial grafts. *Colloids Surf B Biointerfaces* 19: 227-235, 2000
- 7) Lanzino G, Kanaan Y, Perrini P, *et al*: Emerging concepts in the treatment of intracranial aneurysms: stents, coated coils, and liquid embolic agents. *Neurosurgery* 57: 449-459, 2005
- 8) Nojiri C, Okano T, Jacobs HA, *et al*: Blood compatibility of PEO grafted polyurethane and HEMA/styrene block copolymer surfaces, *J Biomed Mater Res* 24: 1151-1171, 1990
- 9) Suzuki Y, Iwaki M, Takahashi N, *et al*: In vitro and in vivo study of He^+ ion irradiated collagen for development of small diameter stent graft material. *Nuclear Inst and Methods in Physics Research B* 232: 353-357, 2005
- 10) Williams SK, Rose DG, Jarrell BE: Microvascular endothelial cell sodding of ePTFE vascular grafts. *J Biomed Mater Res* 28: 203-212, 1994