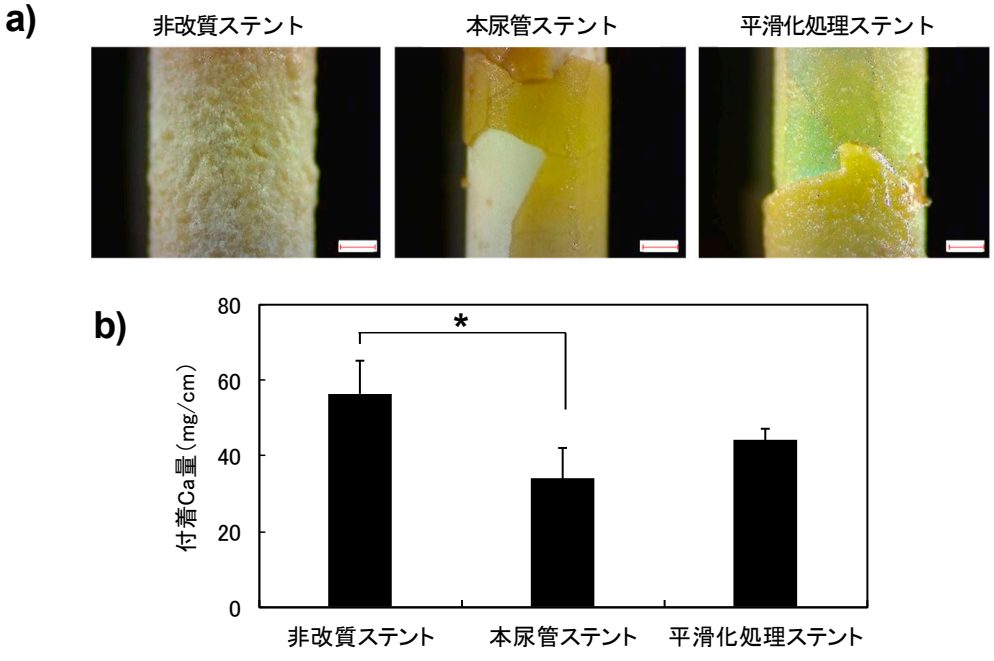
91　異物低付着性革新的尿管ステントの開発研究	松山　秀人

【目的】泌尿器科患者で特に尿管狭窄や尿管結石などの場合、尿管が閉塞もしくは尿の流れが停滞するため、尿路を確保する目的で尿管ステントを留置する。しかしこの尿管ステントは長期の留置により、主に結石などの異物が付着、堆積するため尿管ステント自体が閉塞し、逆に尿管閉塞を助長する。尿管ステントへの結石付着には、細菌が介在する機序と、細菌を介さず結石成分が直接ステント表面で析出する機序の大きく分けて 2 つの機序がある。このような機序の全体もしくは一部を抑止することで、結石の付着を予防し得る。これまで尿管ステントの閉塞予防や耐久性の確立のために様々な工夫がなされてきたが、現在市販されている尿管ステントでは結石付着の原因である尿中溶解カルシウム塩の付着に対する抑制効果は十分ではなく、今もまだニーズを十分に解決する製品があるとは言い難い。本研究では、結石付着阻止効果が高くかつ生体親和性が高い生体類似材料を用いて尿管ステント表面をコーティングし、その結石付着阻止効果および生体内での安全性を評価することで、新しい尿管ステントの医療機器開発を目的とした。

【方法】生体類似材料を用いて表面をコーティングした本尿管ステント、既存製品の非改質尿管ステントおよび平滑化処理尿管ステントを使用して、結石付着阻止効果および生体内留置における安全性の比較評価を行った。具体的には、1. 人工尿中への 5 週間浸漬実験、2. エチレングリコールおよび塩化アンモニウムを経口投与し尿中結石の生成を促したラットの膀胱内への 8 週間留置実験、を行い、実体顕微鏡での尿管ステント表面観察像および ICP 元素分析による結石成分付着量から、各尿管ステントの結石付着阻止効果を評価した。さらに、ラット膀胱組織に対してヘマトキシリン・エオシン（HE）染色および免疫組織化学染色（IHC）を行い、炎症や細胞浸潤有無などを指標とした本尿管ステントの生体内留置における安全性を評価した。

【結果】人工尿中への 5 週間浸漬では、本尿管ステント表面への結石付着および Ca 定量値が他の尿管ステントよりも少なく、本尿管ステントの結石付着阻止効果が認められた。また、ラット膀胱への 8 週間留置においても本尿管ステントは他の尿管ステントと比較して表面への結石付着および Ca の付着を抑制しており（$p<0.05$、one-way ANOVA）、ラット膀胱内における本尿管ステントの結石付着量阻止効果が認められた。さらに、ラット膀胱組織への HE 染色および IHC では各尿管ステント群で炎症、細胞浸潤などに有意な差は見られず、本尿管ステントの生体内における安全性が示唆された。

結石モデルラットにおける本尿管ステントの結石付着阻止効果



91. 異物低付着性革新的尿管ステントの開発研究

松山　秀人

神戸大学 先端膜工学研究センター

Key words：尿管ステント，コーティング，生体類似材料，異物（結石）付着抑制

緒　言

泌尿器科患者で特に尿管癌などによる尿管狭窄や尿管結石などの場合、尿管が閉塞もしくは尿の流れが停滞するため、予防目的に尿管ステントを留置する。しかしこの尿管ステントは長期の留置により、主に結石などの異物が付着するため尿管ステント自体が閉塞し、尿管閉塞を助長する［1，2］。これまで尿管ステントの閉塞予防や耐久性の確立のために様々な工夫がなされてきた。例として、主に尿管ステントの表面改質・改良を目的としたハイドロゲルコーティングがまず挙げられる。これは尿管ステント表面に親水性のコーティングを行い、結石成分や蛋白質成分を含んだ水分（尿）の尿管ステントへの付着を防ぐものである［3］。他には耐熱性・耐久性・平滑性を持ち合わせたテフロンコーティング、尿管ステントの表面積を減じ交換作業を円滑にする目的の平滑コーティングなどがある［4］。尿管ステントへの結石付着のメカニズムを図１に示す。細菌が介在する機序と、細菌を介さず結石成分が直接ステント表面で析出する機序の大きく分けて２つの機序がある。このような機序の全体もしくは一部を抑止することで、結石の付着を予防し得る。

前述のように、現在市販されているステントでは、表面の親水化処理や平滑化処理により蛋白質や細菌の付着に対しては一定の抑制効果が認められているものの、結石付着の原因である尿中溶解カルシウム塩のステント表面での析出・付着に対しては、抑制効果は十分ではなく、今もまだニーズを十分に満足する製品があるとは言い難い。そのため、本研究では生体親和性が高く、かつ異物低付着性の生体類似材料を用いて尿管ステントをコーティングし、結石に対する付着抑制効果や生体適合性を *in vitro* および *in vivo* で評価することで将来的な医療機器開発を目指した。

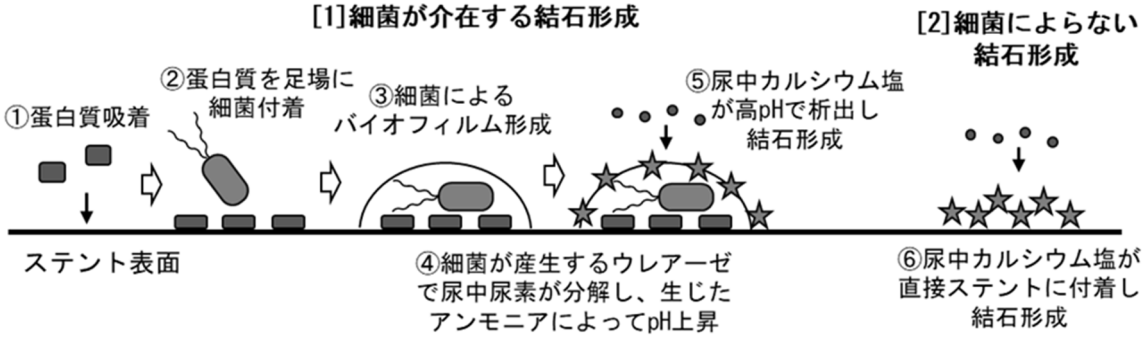


図１．尿管ステント表面における結石形成のメカニズムの模式図

方　法

1．生体適合性低吸着材料の開発とそれを用いた尿管ステントの表面改質

内在性生体物質を用いてこれをアルカリ条件下に重合化することで表面改質用ポリマーを調製し（濃度、pH、反応時間等を変えることで重合度を調節）、尿管ステント（Percuflex（Boston Scientific）を使用）へのコーティングを行うとともに、親水化度、異物付着抑止効果等を評価することで、材料構造の最適化を行った。

2. 表面コーティングした尿管ステントの異物付着抑制作用

尿管ステントへの異物付着抑制作用は、蛋白質、大腸菌、シュウ酸カルシウム結晶それぞれに対する付着抑制作用で評価した。蛋白質付着抑制作用は、フルオレセインイソチオシアネートで蛍光標識したウシ血清アルブミンを 0.1%含有するリン酸緩衝生理食塩水に尿管ステントを浸漬し、30℃で一晩インキュベートした後、純水で洗浄、乾燥後、ステント表面に付着した蛋白質量を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で測定することで定量化した。大腸菌付着抑制作用は、一晩液体培養し、660 nm 吸光度が 0.1 となるように生理食塩水で希釈した大腸菌 K12 株の懸濁液に尿管ステントを浸漬し、30℃で一晩インキュベートした後、 生理食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit（Invitrogen）を用いて染色した後、ステント表面の付着細菌量を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で測定することで定量化した。シュウ酸カルシウム結晶付着抑制作用は、50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 10.0）で調製した 1 mM シュウ酸カルシウム溶液に尿管ステントを浸漬し、37℃で 2 週間インキュベートした後、純水で十分に水洗し、1 N 硝酸を用いて尿管ステントに付着したシュウ酸カルシウムを溶解した後、誘導結合プラズマ（ICP）発光分析法による元素分析でカルシウムを定量した。

3. 人工尿を用いた *in vitro* における結石付着阻止効果の評価

尿管ステントの *in vitro* における結石付着性試験には人工尿（塩化ナトリウム 105.5 mM、リン酸二水素ナトリウム 32.3 mM、クエン酸ナトリウム 3.21 mM、硫酸マグネシウム 3.85 mM、塩化カリウム 63.7 mM、尿素 166.5 mM、塩化カルシウム 5.75 mM、シュウ酸ナトリウム 0.318 mM、塩化アンモニウム 27.6 mM、pH 6.0）を用いた［5］。具体的には、各成分を 9 倍濃度で溶解し 0.22 μm のフィルターでろ過滅菌した後、塩化カルシウム、シュウ酸ナトリウム、塩化アンモニウム以外の成分を順に混合し、塩酸で pH 5.0 に調整した。次いで塩化カルシウム、シュウ酸ナトリウム、塩化アンモニウムを混合し、最後に水酸化ナトリウムで pH 6.0 に調整した。この人工尿中に、コーティングした本尿管ステント、および比較のために既存製品の非改質ステント（Percuflex）と平滑化処理ステント（Tria Firm、Boston Scientific）を各 3 本（それぞれ長さ 1 cm）浸漬し、37℃で 5 週間インキュベートした。5 週間後にこれらの尿管ステントを取り出し、純水で洗浄、乾燥後、実体顕微鏡での尿管ステント表面観察、および ICP 元素分析による尿管ステント表面に付着した Ca の定量を行い、結石付着阻止効果を評価した。結石付着量は尿管ステント 1 cm 当たりの Ca 定量値で表示した。また、尿管ステント浸漬後の人工尿は、一部を DHL 寒天培地に塗布して 37℃で 24 時間培養し、本実験が無菌的に行われたかを確認した。

4. 結石モデルラットを用いた *in vivo* における結石付着阻止効果および生体適合性の評価

ラット（Jcl:SD 6 週令オス）に飲料水として 0.4%エチレングリコール、1%塩化アンモニウムを含む水道水を経口投与し、結石モデルラットとして各尿管ステント群で 3 体ずつ作製した。これらの結石モデルラットの膀胱内に上記の本尿管ステント、非改質ステント、平滑化処理ステントのいずれか（0.7 cm 長）を 8 週間留置した。8 週間後に各尿管ステントを膀胱内から取り出し、純水による洗浄、乾燥後に表面の観察および結石成分の定量解析を行い、結石付着阻止効果を評価した。実験期間中は一般状態観察・体重測定、採尿を行い、本実験の安全性を評価した。さらに、留置後の膀胱組織のヘマトキシリン・エオシン（HE）染色および免疫組織化学染色（IHC）を行い、炎症や細胞浸潤などを評価し、本尿管ステントの生体内留置における安全性を比較検討した。

5. ブタを用いた *in vivo* における結石付着阻止効果の評価

ブタ（LWD-SPF 家畜ブタ）にヒドロキシプロリン添加飼料を経口投与し、結石モデルブタを作製した。このブタの左右の腎－尿管－膀胱内に非改質ステント（右）および本尿管ステント（左）（いずれも 26 cm 長）を 3 か月間留置した。3 か月後に各尿管ステントを尿管内から取り出し、ステント表面の顕微鏡観察および Ca 定量解析を行い、結石付着阻止効果を評価した。

結果および考察

1. 生体適合性低吸着材料の開発とそれを用いた尿管ステントの表面改質

生体由来材料を用いて様々な条件で重合化反応を行い、尿管ステントへのコーティングを行った。異物付着抑制作用の比較から、生体由来材料濃度 2 mg/ml、pH 9.0、室温 3 日間の重合化反応を最適条件とした。

2. 表面コーティングした尿管ステントの異物付着抑制作用

コーティング処理した本尿管ステントとコーティング前の尿管ステントについて、アルブミン、大腸菌、シュウ酸カルシウム結晶に対する付着抑制作用を調べた結果を図2に示す。本コーティングを行うことにより、アルブミン、大腸菌の付着量を1／5以下に減らせることが分かった。また、シュウ酸カルシウム結晶に対しては、付着量は1／10以下となり、蛋白質や細菌に対する付着抑制効果よりもさらに抑制効果は大きいことが分かった。

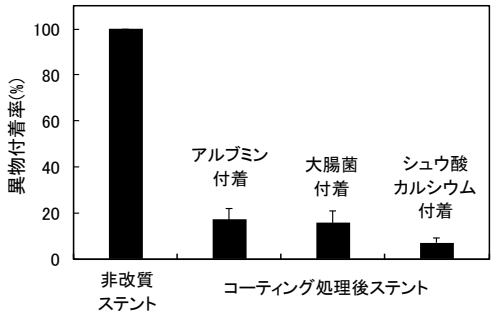


図2. 生体由来材料を重合化しコーティングした尿管ステントの異物付着抑制作用
FITC 標識アルブミン、大腸菌、シュウ酸カルシウムそれぞれの溶液に尿管ステントを浸漬して所定時間インキュベート後、付着した各異物量を定量した。

3. 人工尿を用いた *in vitro* における結石付着阻止効果の評価

人工尿中で各尿管ステントを37℃で5週間インキュベートし、ステント表面への結石付着に対する阻止効果を評価した。その結果、本尿管ステント表面への結石付着の減少が顕微鏡観察で認められるとともに（図3a）、Ca 量の定量値はそれぞれ、本尿管ステントが 11.1±3.5 μg/cm、非改質ステントが 46.5±11.9 μg/cm、平滑化処理ステントが 18.6±1.0 μg/cm となり、本尿管ステントは非改質ステントと比較して Ca 付着量が有意に少なかった（図3b）。これらの結果より、*in vitro* 人工尿中における本尿管ステントの結石付着阻止効果が確認された。なお、実験後の人工尿からは細菌は検出されず、本実験が無菌的に行われたことが確認された。

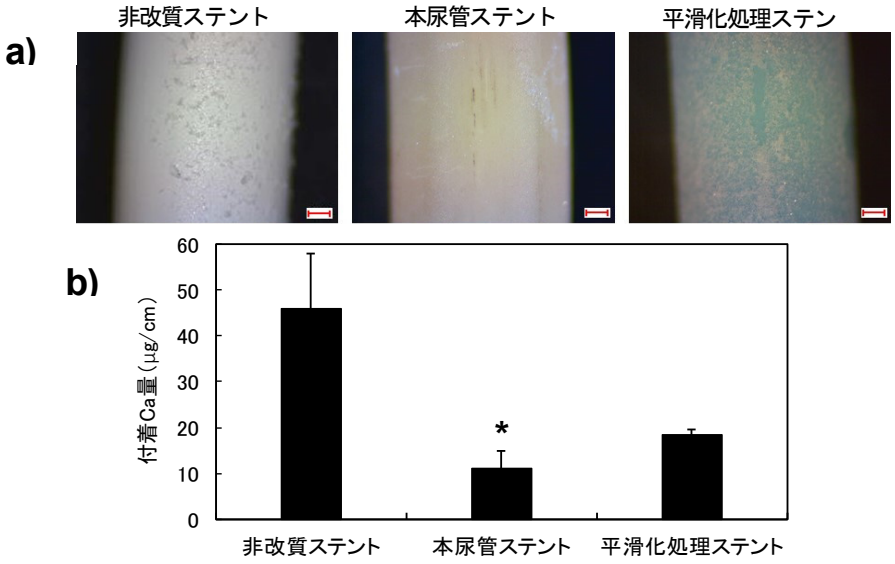


図3. 人工尿中における本尿管ステントの結石付着阻止効果
人工尿中で各尿管ステントを37℃で5週間インキュベートし、付着した結石を顕微鏡観察するとともに、Ca 量を ICP 元素分析で定量した。
a）インキュベート後の尿管ステント表面の顕微鏡観察像（スケールバー：0.2 mm）。
b）尿管ステント表面への Ca 付着量（one-way ANOVA、$*p<0.05$）。

4. 結石モデルラットを用いた *in vivo* における結石付着阻止効果および生体適合性の評価

結石モデルラット膀胱内への 8 週間の留置実験により、本尿管ステントの *in vivo* における結石付着阻止効果を評価した。本尿管ステントは他の尿管ステントと比較して結石付着が少ないことが観察され（図 4a）、Ca 付着量は本尿管ステントが 34.0±8.6 mg/cm、非改質ステントが 56.4±8.8 mg/cm、平滑化処理ステントが 44.4±2.7 mg/cm であり、本尿管ステントは非改質ステントに対して有意に抑制が認められた（図 4b）。一方、一般状態観察、体重測定、採尿結果には各ステントで有意な差は認められなかった。さらに、膀胱組織の HE 染色および IHC でも各尿管ステント群で炎症、細胞浸潤などに有意な差は見られず、本尿管ステントの生体内における安全性が示唆された。

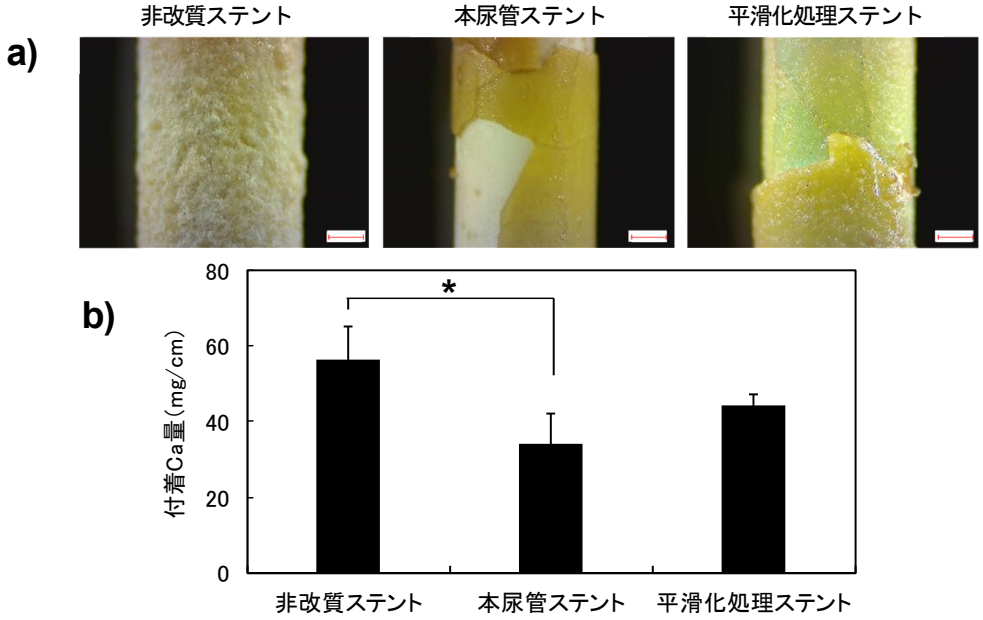


図 4. 結石モデルラットにおける本尿管ステントの結石付着阻止効果

ラット膀胱内に各尿管ステント（1 cm 長）を 8 週間留置後、付着した結石を顕微鏡観察するとともに、Ca 量を ICP 元素分析で定量した。

a）留置後の尿管ステント表面の顕微鏡観察像（スケールバー：0.5 mm）。

b）尿管ステント表面への Ca 付着量（one-way ANOVA、*p<0.05）。

5. ブタを用いた *in vivo* における結石付着阻止効果の評価

ブタ腎ー尿管ー膀胱内に 3 か月間留置した本尿管ステントおよび非改質ステントの顕微鏡による表面観察では、結石付着には大きな差は見られなかったが（図 5a）、Ca 定量解析の結果、本尿管ステントの Ca 付着量（31.1 μg/cm）は非改質ステント（50.7 μg/cm）より少なく、本尿管ステントは非改質ステントと比較して結石の付着を抑制できることがブタでの *in vivo* 試験で示された（図 5b）。

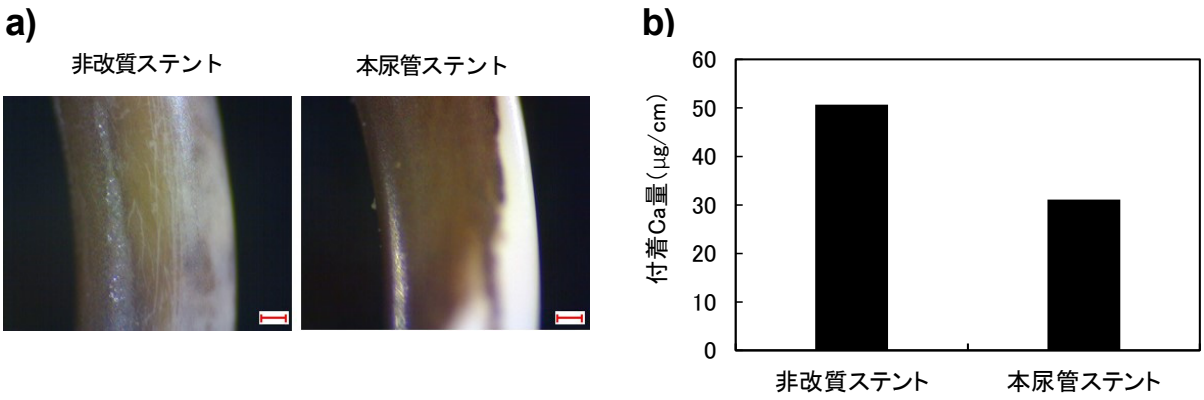


図 5. ブタにおける本尿管ステントの結石付着阻止効果

ブタ腎ー尿管ー膀胱内に各尿管ステント（26 cm 長）を 3 か月間留置後、付着した結石を顕微鏡観察するとともに、Ca 量を ICP 元素分析で定量した。

a）留置後の尿管ステント表面の顕微鏡観察像（スケールバー：0.2 mm）。

b）尿管ステント表面への Ca 付着量。

共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院保健学研究科・泌尿器科の重村克巳准教授、神戸大学医学部附属病院泌尿器科の梁英敏医師である。

文　献

1) Tunney MM, Keane PF, Jones DS, Gorman SP. Comparative assessment of ureteral stent biomaterial encrustation. Biomaterials. 1996 Aug;17(15):1541-6. doi: 10.1016/0142-9612(96)89780-8. PMID: 8853126.

2) Gorman SP, Tunney MM. Assessment of encrustation behaviour on urinary tract biomaterials. J Biomater Appl. 1997 Oct;12(2):136-66. doi: 10.1177/088532829701200204. PMID: 9399139.

3) Cottone CM, Lu S, Wu YX, Guan K, Yoon R, Limfueco L, Hoang T, Ciridon W, Ratner BD, Johnson KR, Patel RM, Landman J, Clayman RV. Surface-Treated Pellethanes: Comparative Quantification of Encrustation in Artificial Urine Solution. J Endourol. 2020 Aug;34(8):868-873. doi: 10.1089/end.2020.0097. Epub 2020 Jun 16. PMID: 32316757; PMCID: PMC7462028.

4) Yoshida T, Takemoto K, Sakata Y, Matsuzaki T, Koito Y, Yamashita S, Hara I, Kinoshita H, Matsuda T. A randomized clinical trial evaluating the short-term results of ureteral stent encrustation in urolithiasis patients undergoing ureteroscopy: micro-computed tomography evaluation. Sci Rep. 2021 May 14;11(1):10337. doi: 10.1038/s41598-021-89808-x. PMID: 33990648; PMCID: PMC8121799.

5) Brown P, Ackermann D, Finlayson B. Calcium oxalate dihydrate (weddellite) precipitation. J. Cry. Gro. 1989 Nov 2;98(3):285-292. doi: 10.1016/0022-0248(89)90143-7.