体外磁場による血管内皮細胞化の促進

【０３４５４３２８】

平成３年度科学研究費補助金【一般研究（Ｂ）】研究報告書

平 成 ５ 年 ３ 月

研究代表者　久 保 良 彦

（旭川医科大学医学部教授）

はじめに

生体の動、静脈から自家代用血管に至るまで血管の内面は、内皮細胞で覆われている。何らかの原因によりこの内皮細胞が欠損するとその部分に血栓が形成されるが、長期的な動脈の狭窄、閉塞の発生にも、内皮細胞障害の有無が大いに関係している。血管疾患の治療には、代用血管の移植やバルーンカテーテルを用いた血管拡張術（PTA,PTCA）が行われるが、移植された代用血管や血管拡張術後には高率に狭窄が発生し、それが閉塞の主因となっていることから、治療成績向上のためには、再狭窄に対する有効な対策を開発することこそ血管疾患治療の極めて重要な課題となっている。代用血管の狭窄部は、形態学的に平滑筋細胞の旺盛な増殖に起因する内膜肥厚であるが、同部内面の共通した所見として内皮細胞の欠損が確認されてきた（図 1, 2）[1) 2)]。代用血管移植後の内皮細胞再生は移植後 2 ～3 週で完了するが[3)]、もし内皮細胞化の完了しない部分があった場合には、そこに限局性、進行性内膜肥厚を発生しグラフト狭窄を来すことになる。従って代用血管移植後や血管拡張術後では、早期に内皮細胞化（図 3）が完了されることが望ましく、内皮細胞化を促進することが再狭窄防止につながるものと考えられる。

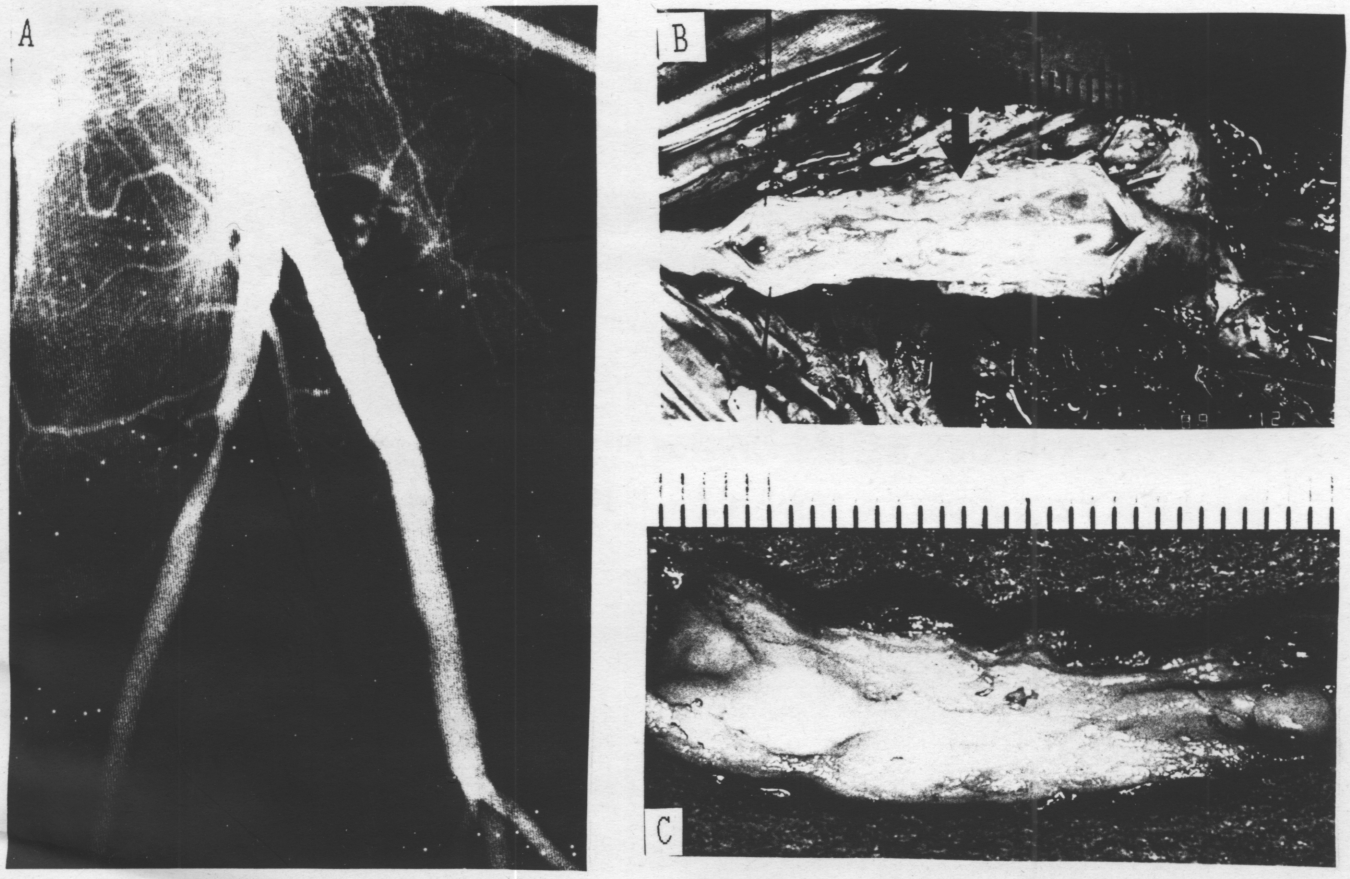

図　1.自家静脈グラフトに発生した内膜肥厚に寄る狭窄．A:血管造影，➡狭窄部．B:狭窄部の手術時展開所見，➡狭窄部．C:狭窄部摘出標本

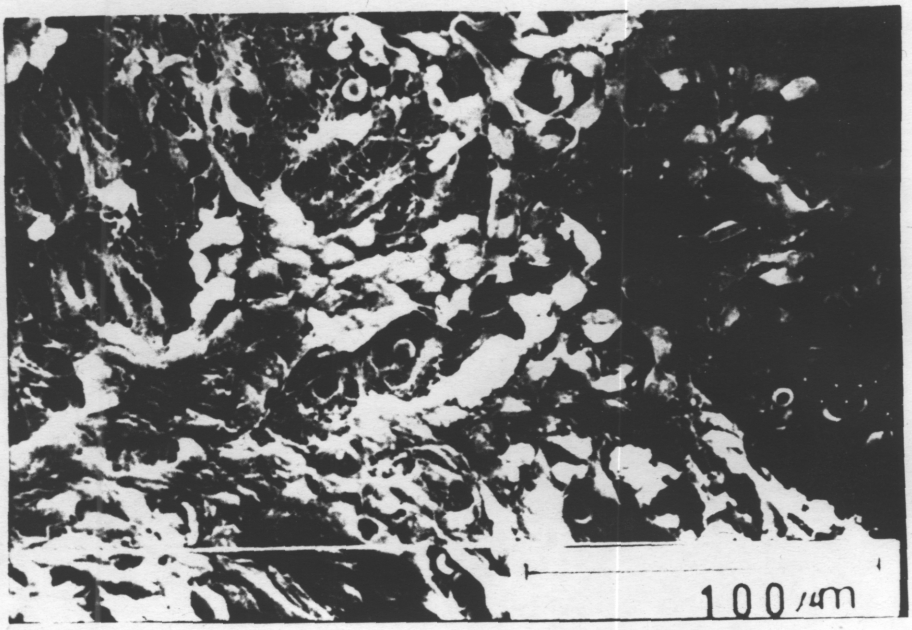

図　2.内膜肥厚によるグラフト狭窄部位の走査電顕所見．内皮細胞がほとんど脱落

内皮細胞の成長は、ある磁界内で促進されることが推察されてきたが、その現象を明確に捕らえ、磁場条件を明らかにした報告は見当たらない。本研究は、体外磁場の内皮細胞増殖促進効果を明らかにすると共にその至適曝露条件をもとに、in-vitroでの応用、すなわち代用血管移植後の内皮細胞化を促進する方法の開発を目的とするものである。

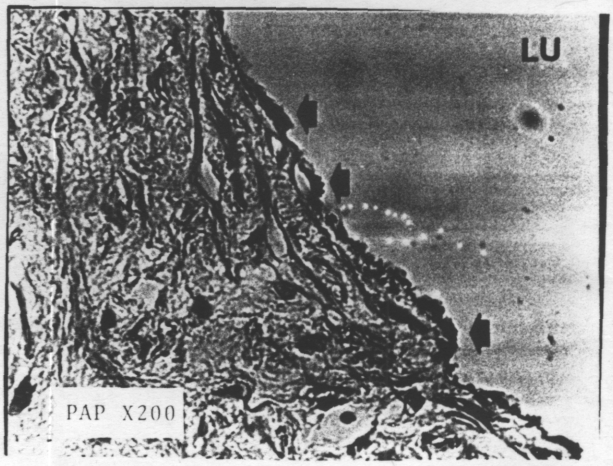

図　3.第VIII因子染色による自家静脈の内皮細胞(➡)

研究組織

研究者代表：久保良彦　　(旭川医科大学医学部教授)
研究分担者：笹嶋唯博　　(旭川医科大学医学部助教授)
研究分担者：田中邦雄　　(旭川医科大学医学部助教授)
研究分担者；吉田博希　　(旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成３年度　　３，２００千円
平成４年度　　　５００千円

計　　３，７００千円

研究発表

学会誌等

1). 中山一雄、笹嶋唯博、久保良彦. 下肢閉塞性動脈硬化症に対する自家静脈bypassの閉塞原因の検討. 第3 回血液血管研究会記録 121-127, 1991
2). Sasajima T, Kubo Y, Kokubo M et al. Comparison of reversed and in-situ saphenous vein grafts for infragenicuar bypass:experience of two surgeons. Cardiovasc Surg. 1-1, 38-43, 1993
3). 堀尾昌司. 自家静脈グラフトのde-endothelialization とre-endothelialization. 日本外科学会雑誌 92-7, 867-873, 1991

I. 研究方法

1. In-vitro 磁場発生装置の試作

固定磁場による培養内皮細胞への影響に関する予備実験において、その効果が予測されたことから任意の方向から曝露可能な磁場発生装置を設計試作した。細胞培養器内で曝露する関係で、今回は厚さ1.5cm の鉄材により外寸12.5 x 11 x 6cm のヨークを作り、これに25mmΦ x 9mm、表面磁力2,800 ガウスの希土類コバルト磁石4 個の組み合わせによる磁

極をヨーク内で対抗させるH 型磁石を構成した（図 4 ）。これにより磁極間隙 7.6cmで、この中心部に直径 35mm のコラーゲンディッシュを固定することにより、約420 ガウスの磁場環境に曝露することが可能である。ガウスメーターにより磁極空隙内磁場強度分布を計測した結果、磁極空隙内中心部で3cm Φ x 4cmの領域内では、中心磁場強度に対して20 % 程度以下の偏差であった。

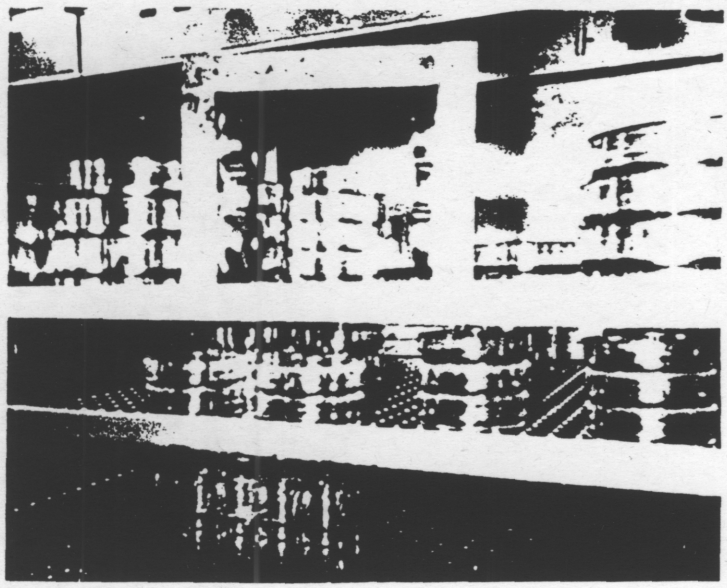

図　4.固定磁場とその中に設置された細胞培養シャーレ

2. in-vitro 磁場曝露による内皮細胞増殖促進効果の検討

ウシ頸動脈内皮細胞株（細胞名 HH, JCRB より供与）を用いて実験を行った。あらかじめ培養されている対数増殖期の細胞をトリプシン／EDTA処理をして回収する。それを直径 35mm のコラーゲンディッシュに 5.0 x 10^4 個ずつ撒いて磁場曝露群と非曝露群とに分けた。各々の細胞数およびDNA 量について経時的に 1, 3, 5, 7, 9 日で測定し両者を比較した。

3. In-vivo磁場発生装置の試作

培養内皮細胞に対するある程度の磁場の効果がとらえられたことから生体に移植された代用血管へ応用すべく、任意の方向から曝露可能な磁場発生装置を設計、試作した。しかし今回は、生体内に移植された代用血管への磁場の効果とその条件がまったく不明であることから固定型とはせず、基礎検討同様表面磁力2800ガウスの希土類コバルト磁石4 個の組み合わせによる磁極をヨーク内で対抗させるH型磁石を作成した。これにより同様に約420 ガウスの磁場を曝露可能とした。

4.イヌ頸動脈移植自家静脈グラフトへの応用

今回試作された磁場発生装置の規模の点で、イヌ腹部大動脈では、磁場曝露の正確さに疑問が持たれたため照射の容易なイヌ内頸動脈への自家静脈移植とした。雑件4 頭を用いて移植、磁場曝露実験を行った。静脈グラフトは口径の等しい前肢皮静脈を採取し、ヘパリン化自家血で拡張処理を行い、頸動脈にreverse 移植した。移植後4 日目からバルビタール麻酔下に隔日または連日で合計5 回照射し、10日目でグラフトを摘出した。自家静脈は両側頸動脈に移植し一側のみに照射する方法で、他側は対照とした。

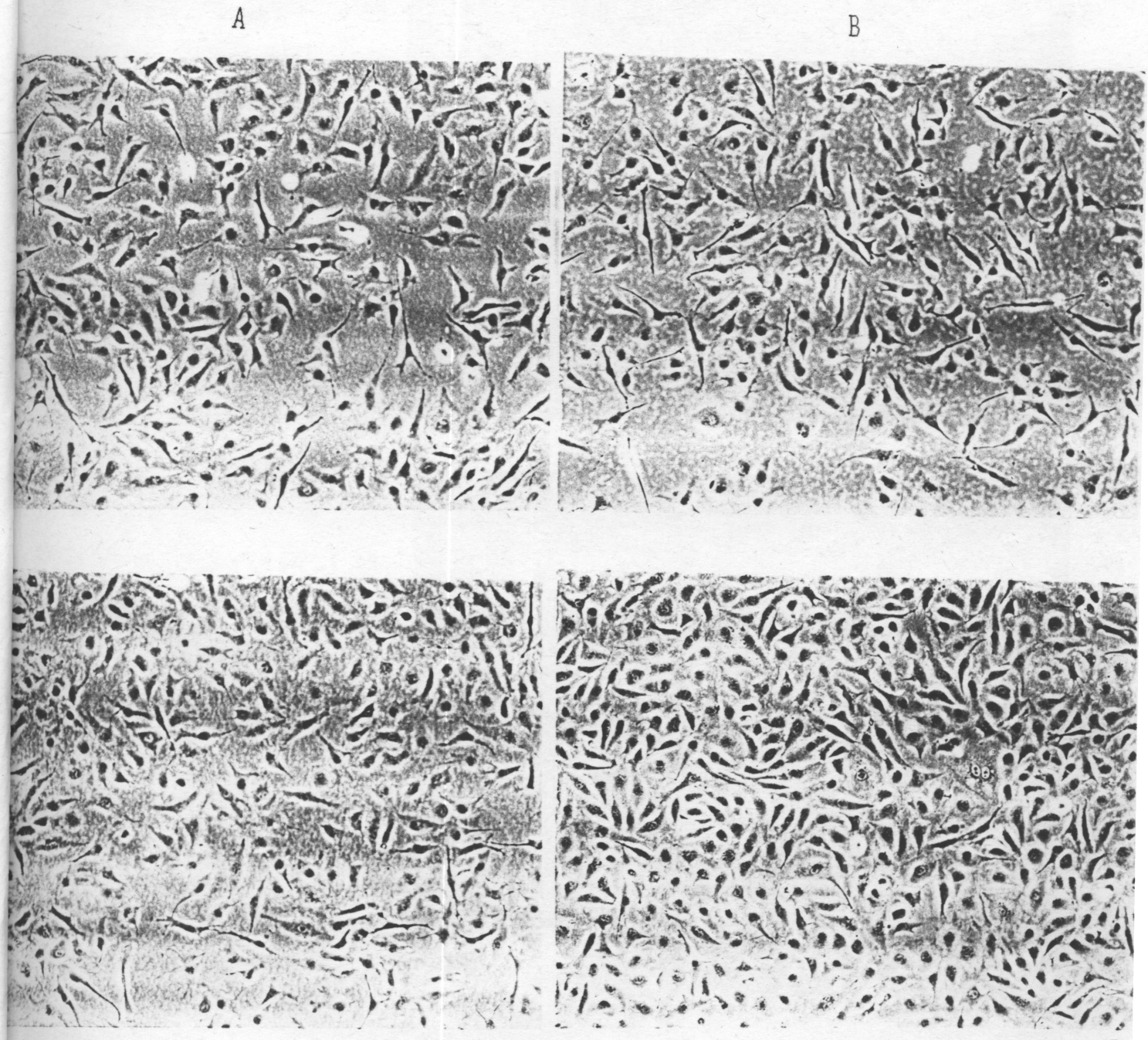

図 5. 磁場のin-vitro内皮細胞培養促進効果 A：対照群 3,5日目, B:磁場曝露群、同A

II. 結　果

in-vitro における磁場曝露群と非曝露群との細胞増殖に関する比較では、有意差を得られるまでには至らなかったものの、5 - 7 日後では曝露群で増殖促進傾向が観察された（図 5）。DNA 量についてもほぼ同様の結果であった。以上よりin vitroにおいて、磁場への曝露が血管内皮細胞の増殖に対し促進的に作用することが示唆された。

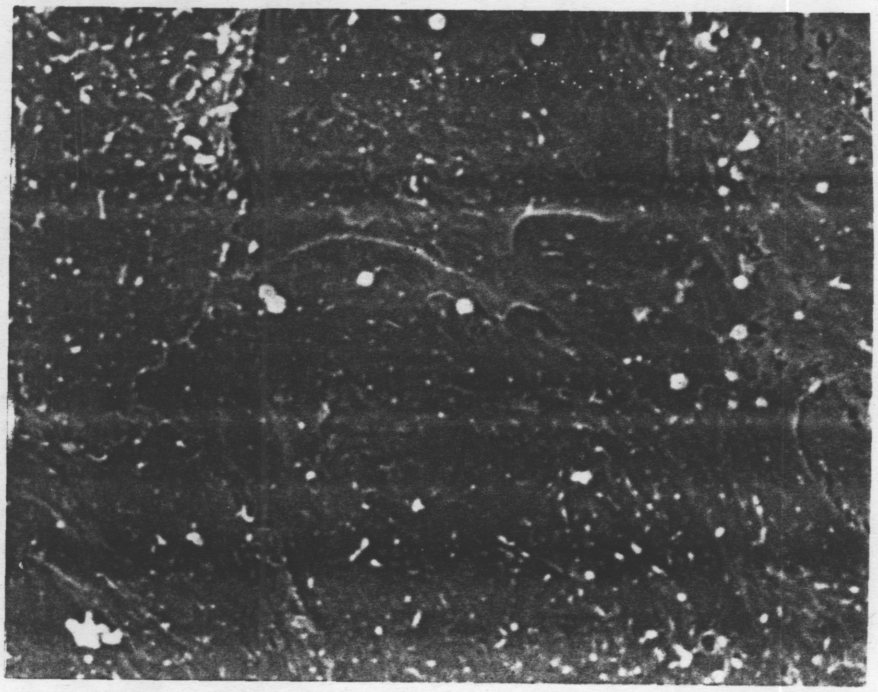

図 6. イヌ頸静脈の腹部大動脈移植 2日目の走査電顕. 内皮細胞は完全に脱落し内弾性板が露出している

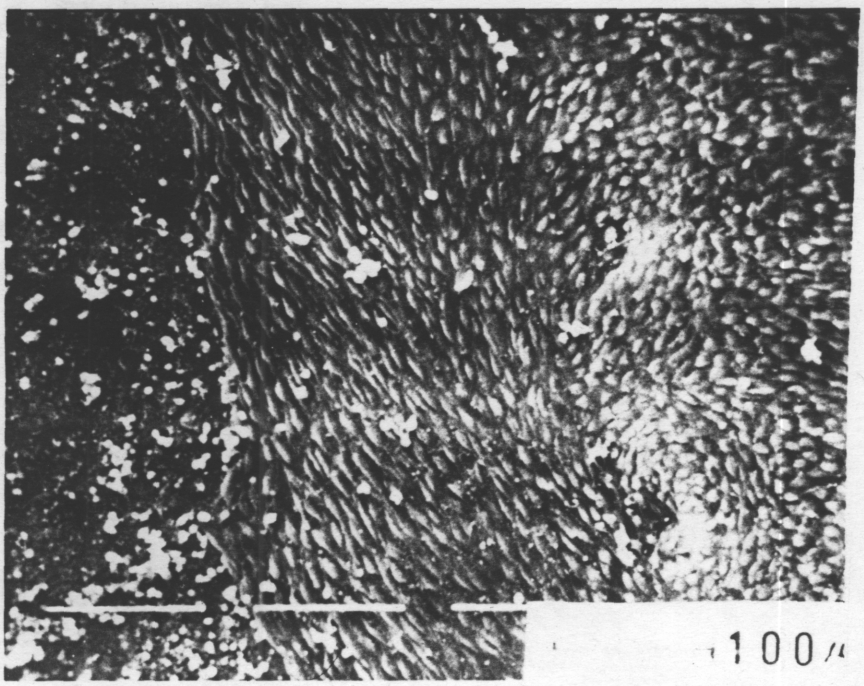

図 7. 同上の実験における移植 5 日目の所見. 内皮細胞が弁部より増殖する所見がとらえらている

in-vivo では、イヌ 4頭の移植静脈グラフトにおける平均の再内皮細胞化率は、対照群では、調整後移植直前で20% 程度残存しているが、移植後 2, 3 日目では、血流のずり応力でさらに剥されて、グラフト中央部ではほぼ完全に内皮細胞の脱落をみる（図 6)[3]。しかし静脈弁部のみは、内皮細胞が温存され、5 日目頃より弁部からの内皮細胞増殖が観察された（図 7）。この内皮細胞再生は、さらに続き7 日目で 52%, 10日目で 70%、14日目では、95% に達した。これに対し磁場曝露グラフト群は、7 日目まで差が見られなかったが、10日目では、84.5% の再内皮細胞化率で対照をやや上回る結果を得、その有効性が示唆された。

III. まとめ

本研究では、磁場の内皮細胞増殖促進効果傾向を捕らえることができたが、その効果の判定法、磁場の至適曝露条件、in－vivoでの応用として種々の再建部位における照射条件などには、なお検討の余地が残されており、今後の課題である。しかし本研究における有効性の観察は、種々の血行再建術後の画期的な再狭窄予防法としての体外的磁場照射装置の開発と臨床応用の可能性を大いに期待させるものと考える。