

4909501

エラスチン内面被覆小口径人工血管の開発

【06454357】

平成7年度科学研究費補助金【一般研究（B）】研究成果報告書

平成9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

小口径人工血管開発のためにこれまで進められてきた研究にはいくつかの重大な問題点が指摘される。まず有孔性を高めて器質化と内皮化を求める人工血管の問題点は、1) 内皮細胞が再生して内面を被覆するまでの間の抗血栓性をいかに保持するか、2) Neointima (内皮細胞を伴う新生内膜) が動物実験では形成されるが、ヒト移植においては部分的にも極めて稀であることが挙げられる。次に seeding 法に始まる人工血管の in-vitro 内皮細胞化は、ハイブリッド型人工血管を含めていまだ見るべき進展はない。その問題点は、完全防止と細胞の接着性である。例え内皮細胞被覆が達成されたとしても内皮細胞の接着性を生体血管以上に高めることは容易ではなく移植後悉く脱落する問題がある。自家静脈や内胸動脈においてさえ移植早期においてグラフト全内面の70% 以上の内皮細胞脱落が発生することからもその困難性が伺われる。一方、抗血栓性をひたすら高めただけの人工血管は、例え移植早期の開存が得られたとしても中間期以降に高度の吻合部内膜肥厚を例外なく発生し、腸詰め様の形をとって閉塞する。

このような内皮細胞被覆とそれによらない抗血栓性人工血管という2つの開発方向の中で、我々は後者の立場から研究を進めてきた。ヒト内胸動脈と臍帯静脈は、内弾性板が顕著に発達し無欠かつ均等にこれを保持する代表的な血管であるが、この内弾性板が極めて優れた抗血栓性を示すばかりでなく優れた組織適合性を有して吻合部内膜肥厚を発生しないことは、これまでの多くの基礎的、臨床的研究において観察してきた(図1)^{1) 2)}。我々は、この点を確かな事実として確認すべく、内弾性板が完璧に温存された化学修飾ヒト臍帯静脈を調整試作し、5頭のイヌ腹部大動脈に移植して3年間にわたり観察した。摘出標本の内面は、全例見事な無血栓内面を示すと共に、吻合部に限局した内皮細胞は、グラフトの内弾性板に固着して安定化し、まったく吻合部内膜肥厚を伴わず、まさに期待通りの結果が示された(図2)。

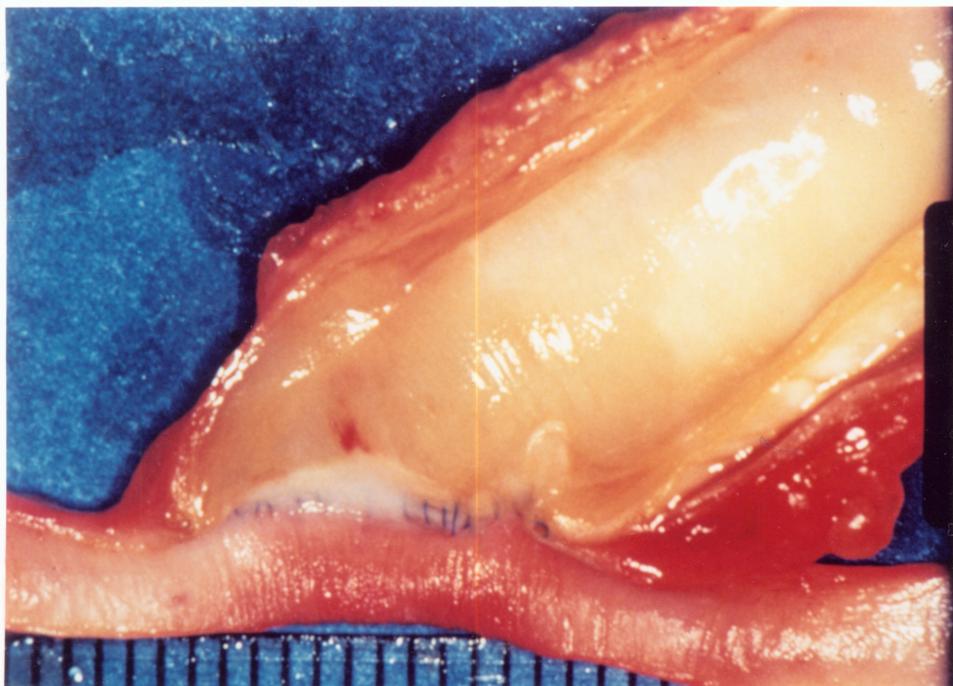


図 1. 保存ヒト臍帯静脈のイヌ腹部大動脈腸骨動脈バイパス埋め込み術後3年摘出標本. 吻合部内膜肥厚を認めず

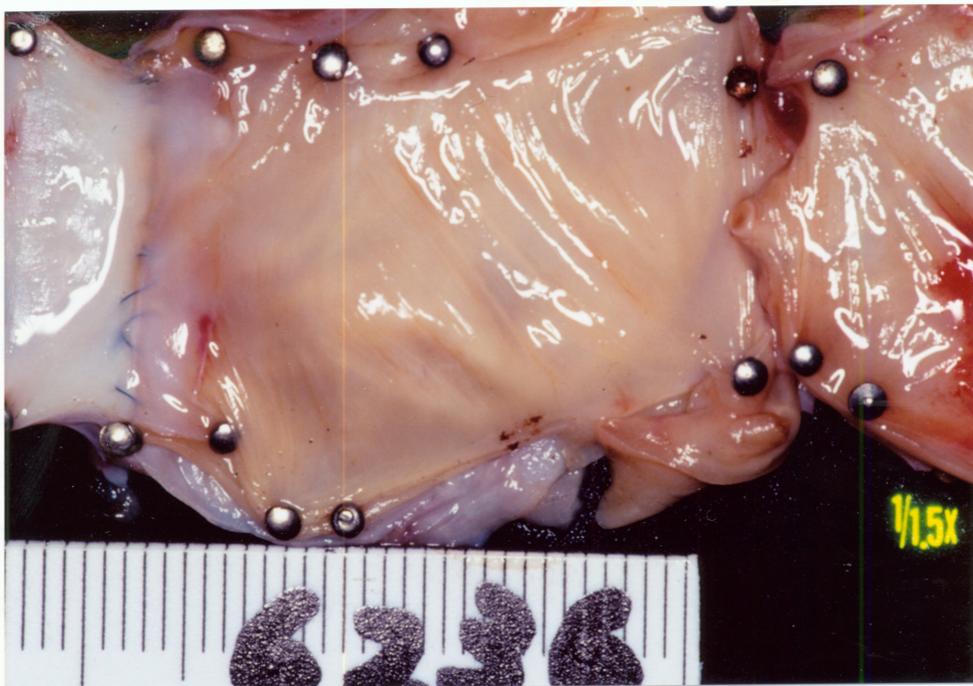


図 2. 内弾性板温存保存ヒト臍帯静脈のイヌ腹部大動脈埋め込み術後31カ月摘出標本の末梢吻合部所見. 図 1と同様に吻合部内膜肥厚を認めない

これらの結果は、小口径人工血管が抗血栓性と共に組織適合性を兼備するならば内皮細胞化は不要であることを示すと共に、内弾性板の主成分であるエラスチンが小口径人工血管の内面性状として極めて適していることを強く示唆するものである。

以上のような基礎的、臨床的研究結果から、本研究は、エラスチンについて人工血管の内面性状に応用するための条件の究明（単離する組織の選択、作成、精製、可溶化と不溶化調整など）と得られたエラスチンを主要内面性状とする複合型小口径人工血管の開発を目的とするものである。

研究組織

研究代表者 : 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）

研究経費

平成7年度 700 千円

計 700 千円

学会誌等

1). Sasajima T, Kubo Y, Kokubo M, Morimoto N, Yoshida H.

The biological compatibility and the fate of chemically modified collagen vascular grafts. *Artificial Organs Today*, Vol. 2, 9-19, 1992.

2). Sasajima T, Inaba M, Azuma N, Goh K, Koshiko S, Kubo Y, Miyamoto K,

Tokita M, Komai T. Myristoyl gelatin as a sealant for dacron vascular prosthesis. *Artificial Organs*, Vol. 21, 1-7, 1997.

1. 材料と方法

1). 素材となる人工血管の試作

エラスチンの優れた生物学的特性が発揮されるためには、人工血管の被覆内面は平滑であることが不可欠の条件である。そのためポリウレタン内面にゼラチンを平滑に被覆し、さらにアルブミン下地層を形成し、その内面に試作した被覆固定装置（図 3）を用いて、コアセルベーションを応用して水溶性 α エラスチンを被覆固定した（図 4）。エラスチン層はエポキシ（デナコール）またはグルタルアルデヒド架橋を加え、さらにヘパリンを固定したものとそうでないものの2タイプを試作した。内面のエラスチン被覆状況はElastic Van Gieson (EVG) 染色により黒染することで確認すると共に顕微鏡および走査電顕(SEM) により評価した。

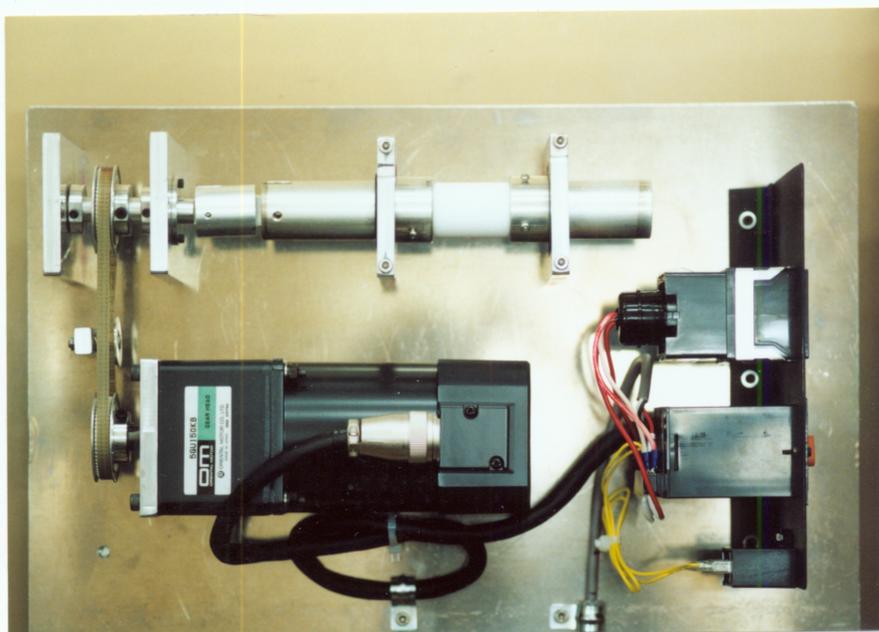


図 3. 試作したエラスチン塗布固定化装置

2). エラスチン被覆人工血管の動物埋め込み実験

試作された人工血管(内径6mm,長さ6 cm) 10本を雑犬10頭(体重12-18kg,平均13.6kg)の腹部大動脈に埋め込み、埋め込み後24時間、7日、1,3,6カ月で摘出した。人工血管の吻合は6-0ポリプロピレンの一点支持連続縫合とし、ヘパリンは大動脈遮断直前(1mg/kg)およびグラフト摘出前に静脈内投与したが、それ以外の抗凝固、抗血小板薬は観察期間中投与しなかった。

3). 人工血管摘出と標本作製

人工血管は、飽和KCL溶液を静脈内投与して動物を安楽死させ開腹して吻合部を含めて摘出した。摘出人工血管は、ヘパリン化生食で内面を洗浄し、血液を除去した後、肉眼的、光顕的、SEM的に観察した。光顕標本は、グラフト両吻合部(縦切)および中央部(輪切)から採取し、HE, EVG およびMasson Trichrome (MT) 染色にて評価した。

2. 結果

人工血管内面のエラスチンは100 μm の厚さで均一に被覆され、EVG染色では均一に濃く黒染した(図4-A)。SEMによりこれらの内面が均一、平滑であることが確認された(図4-B)。



図 4-A.

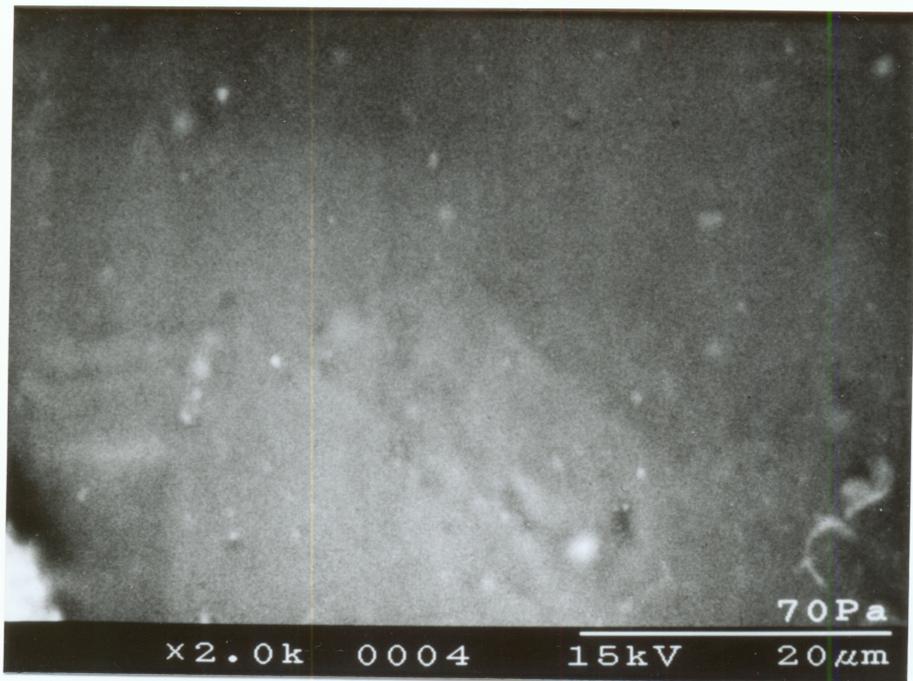


図 4-B. 図 4. エラスチン被覆人工血管の内面性状. A, EVG染色肉眼所見. エラスチン染色により内外面が黒染される; B, 平滑で膨潤、平滑な内面が示される
(Natural SEM, x2000)

イヌ埋め込み実験では、早期の抗血栓性がヘパリン非結合型で不十分であったのに対し、結合型は優れた抗血栓性を示した。埋め込み3 および6 カ月後の摘出標本はいずれも器質化がほぼ完了し(図5-A, B)、新生内膜で覆われた。内面のエラスチン層は光顕上確認できず、加水分解後、吸収された可能性が高いが、両吻合部とも内膜肥厚は認められなかった(図 5-A, 6)。



図 5-A.

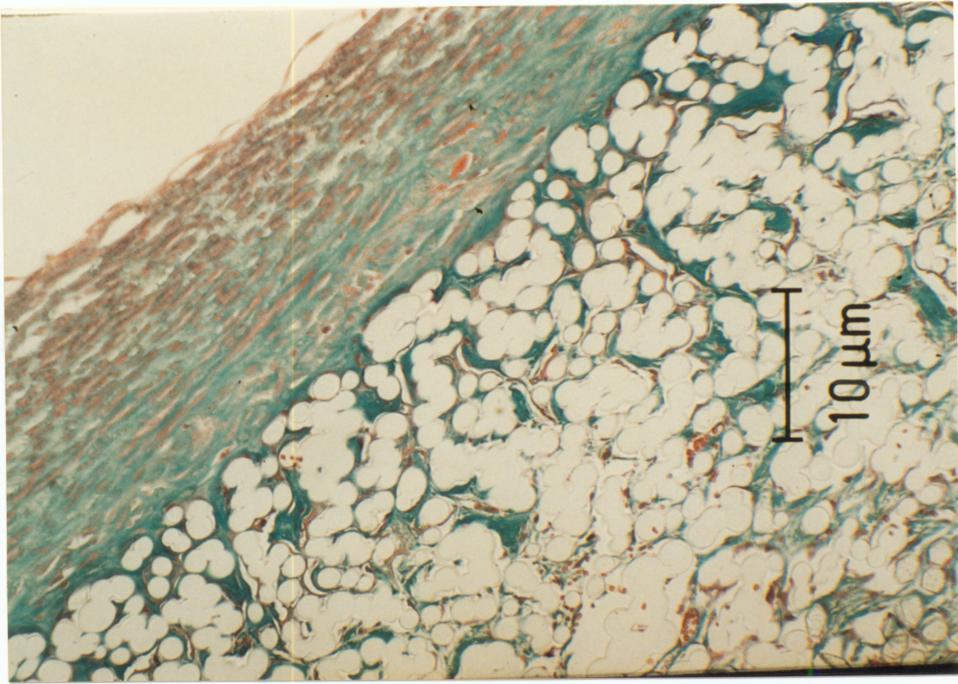


図 5-B. 図 5. エラスチン被覆人工血管イヌ腹部大動脈埋め込み術後 6カ月摘出標本. A, 良好な器質化を示す; B, 内包層が形成されエラスチン被覆層は消失している (MT 染色x 250)

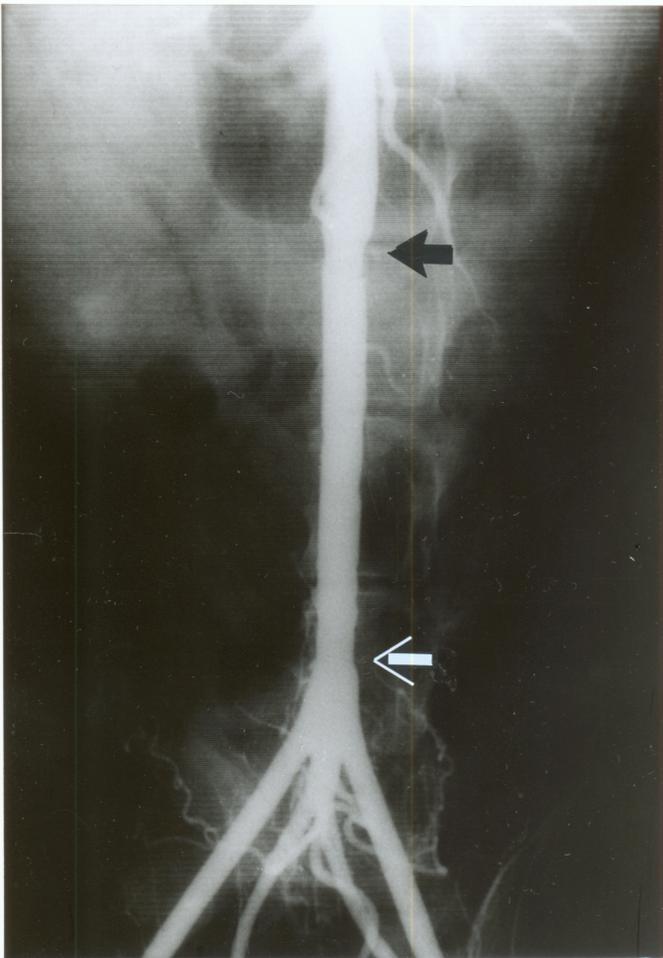


図 6. エラスチン被覆人工血管イヌ腹部大動脈埋め込み術後 6カ月摘出前大動脈造影. 吻合部内膜肥厚を認めない
←, 吻合部

3. まとめ

エラスチンの水溶化および人工血管内面への均一な被覆法を確立し、それらの方法を応用したエラスチン被覆人工血管の試作に成功した。同人工血管は、エラスチンの生物学的特性を評価するに十分なものであった。しかしイヌ埋め込み実験において抗血栓性がなお不十分で、臍帯静脈に見られた優れた抗血栓性を再現するに至らなかったことは使用された市販の α -エラスチンが含有するコラーゲンなどの不純物が影響したものと推察され内弾性板を形成するエラスチンの抽出と応用が必要と考えられた。