

学位論文題名

人工血管に新生した内皮細胞の抗血栓性

—門脈移植実験による検討—

学位論文内容の要旨

【目的】

近年、膵臓・胆道領域の門脈侵潤癌に対して門脈合併切除が積極的に行われるようになり、また、門脈圧亢進症に対するシャント手術の際にも門脈系静脈の再建が必要となることがある。現在は一般に、自家静脈が第一選択であるが、臨床的に満足できる開存性をもった人工血管の確立が望まれる。門脈を含む静脈再建によく用いられる人工血管としてexpanded polytetrafluoro-ethylene(EPTFE)が臨床的、実験的にも検討されている。そこでわれわれは、人工血管の繊維長を通常の2倍にすることによってマクロファージなどの細胞侵入を容易にし、移植血管の全周を血流を温存した大網で被覆することによって、大網の持つ治癒促進作用、免疫能、血管新生能、を利用して、移植血管の修復治癒が促進されることを証明してきた。しかし、人工血管内面に新生した内皮細胞様細胞の抗血栓性に関してはいまだ不明な点が少ない。人工血管の長期開存性を得るには、この内面に新生した内皮細胞様細胞の抗血栓性の検討が必要と思われ、今回門脈に移植した人工血管より内皮細胞様細胞を採取、培養してこれが内皮細胞であることを確認した後、細胞から産生される抗血栓性因子であるプロスタサイクリン(PGI₂)とNOの定量的評価をおこなった。

【材料と方法】

1. 人工血管移植

動物は雑種成犬(体重8~15kg)を使用した。気管内挿管調節呼吸下に、上腹部山型切開で開腹し、門脈を約2cm切除して長さ4cm、内径8mmで繊維長が60 μ mのEPTFE人工血管にて置換した。その後有茎大網にて人工血管の全周を被覆した。術後の抗凝固療法は行わず、抗生剤投与は術直後と翌日のみとした。

2. 内皮細胞様細胞の採取培養

3ヵ月後に人工血管の両端を結紮して摘出する。内腔をヘパリン加生理食塩水にて洗浄した後トリプシン液を注入して20分間静置する。その後脱落した細胞を含んだトリプシン液を回収する。採取した細胞を20%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地にて培養した。継代が1代ないし2代までの細胞を使用した。対象として、成犬の門脈と下大静脈より上記と同様の方法にて採取培養した内皮細胞を使用した。

3. 評価方法

a) 光顕的観察

培養した細胞を静脈の内皮細胞と光顕的に比較検討を行い、アセチル化LDLにて培養した細胞が内皮細胞であることを確認する。

b) PGI₂定量

monolayerになるまで培養した細胞を洗浄した後無血清のRPMI1640, 3mlにて5分, 10分,

30分培養する。培養液を回収し、PGI₂の最終安定産物である6keto-PGF₁αの濃度をRIA法にて測定する。これを基礎産生量とする。

次に別のwellの細胞をPBSにて洗浄した後トロンピン（2単位/ml）入りの無血清培養液にて同様に5分、10分、30分培養する。培養液を回収して6keto-PGF₁αの濃度を測定する。これをトロンピン刺激産生量とする。

最後に各々の細胞数を数えて細胞あたりの産生量を算出する。

c)NO定量

1×10⁵個の培養細胞を無血清培養液中で48時間培養し、NOの代謝産物であるNO₂の液中濃度をGRIESS法にて測定する。

[結果]

3ヵ月後に摘出した人工血管の内面は、ほぼ全面にわたり白色光沢のある仮性内膜で被覆されていた。HE染色像では最表層に内皮細胞様細胞が1列に配列されており、血栓は認められなかった。AZAN染色像では仮性内膜が良好に線維化されているのが観察された。

a) 光顕的観察

人工血管から採取した細胞は門脈の内皮細胞と同様に、いずれもN/C比が大きく、多角形の胞体を持ちそれが敷石状に配列されていた。採取した細胞は、アセチル化LDLにて胞体を赤色に発色させてこれが内皮細胞であることを確認した。また、ここで内皮細胞のpurityが70%以下のものは測定には使用しなかった。

b)PGI₂定量

門脈内皮細胞のPGI₂基礎産生量は、5、10、30分値で各々3.5±1.1、7.6±1.8、7.9±1.1pg/1×10⁴個であった。また、下大静脈内皮細胞の基礎産生量は、3.3±0.8、6.8±1.1、6.9±1.3pg/1×10⁴個であった。それに対して人工血管の内皮細胞の基礎産生量は6.4±2.3、10.2±2.3、10.0±1.9pg/1×10⁴個であった。

人工血管と門脈、下大静脈のPGI₂産生量には有意差を認めなかったが、全体的に人工血管のほうが産生量が多い傾向にあった。

内皮細胞をトロンピンで刺激した場合の産生量は、門脈内皮細胞で5、10、30分値は各々28.7±6.1、43.6±3.3、41.4±6.9pg/1×10⁴個であった。また、下大静脈内皮細胞で、36.4±9.8、50.6±7.1、75.8±12.9pg/1×10⁴個といずれの値も基礎産生量と比較すると当然のことながら有意に上昇していた。また、人工血管の内皮細胞のトロンピン刺激量も33.4±4.8、60.1±13.8、68.0±11.0pg/1×10⁴個と静脈の内皮細胞の場合と同様に有意に産生量の増加を認めた。静脈と人工血管の刺激産生量を比較しても有意差は認められなかった。

c)NO定量

48時間後のNO₂量は、門脈で22.9±7.4μM、下大静脈で14.48±3.5μM、人工血管で32.1±8.5μMであり、人工血管と門脈の間では有意差を認めなかったが、人工血管と下大静脈の間には有意差を認めた。

[考案]

今までは、人工血管内面の最表層に一層に新生した細胞を内皮細胞様細胞と呼んでいたが、トリプシン液により採取された内皮細胞がそれに当たるものと思われた。

人工血管に新生した内皮細胞のPGI₂基礎産生は、門脈や下大静脈と比較しても有意差は認められず、むしろ人工血管の方が高い傾向にあった。内皮細胞は動脈と静脈のように存在する部位によりその環境に合わせた機能を発揮することが知られている。したがってこれは、新生した細胞の機能が全体的に活性化されているか、または手術の影響による炎症等の局所的な環境の変化に対応したためと考えられた。

トロンピンで刺激した場合は、静脈の内皮細胞と同様に有意に産生の増加を示した。これは、術後は内皮細胞傷害や炎症により人工血管は血栓を形成しやすい状況下にあると思われ

るが、それが刺激になって傷害を受けていない内皮細胞は、PGI₂産生能が増加し抗血栓の方向に働くものと考えられた。

また、NO産生に関しても人工血管の内皮細胞は門脈の内皮細胞と同様の働きを行いうるものと考えられた。

【結語】

血管の内皮細胞は血栓形成の制御に重要な役割をはたしているが、人工血管に新生した内皮細胞は、他の静脈の内皮細胞と同等の抗血栓性を持ちうるものと考えられた。さらに今後血流モデルで検討することにより臨床応用が可能であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

人工血管に新生した内皮細胞の抗血栓性

—門脈移植実験による検討—

近年、脾臓・胆道領域の門脈浸潤癌に対して門脈合併切除の際に人工血管を用いた再建が試みられ、また門脈圧亢進症に対するシャント手術の際にも人工血管による再建が必要になってきた。この目的に合致する人工血管として当科で創案・工夫したhigh porosity EPTFE人工血管(繊維長60 μ m)を有茎大網で被覆する方法が優れた長期的開存成績を示している。この人工血管が長期的に開存するのは、人工血管内面に新生した内皮細胞が良好な抗血栓性を有することによるものと推察されるが、これに関する報告はない。内皮細胞から産生される抗血栓性因子としてPGI₂、NO等が知られており、人工血管の長期開存に大きな役割を果たしていると考えられている。本研究では、人工血管内面に新生した内皮細胞の摂取、培養を試みさらに門脈、下大静脈の内皮細胞と抗血栓性に関してPGI₂、NO産生量から比較検討を行った。

人工血管内面に新生した内皮細胞の採取方法であるが、動物は雑種成犬を使用した。上腹部山型切開で開腹し、門脈を約2cm切除して長さ4cm、内径8mmで繊維長が60 μ mのEPTFE人工血管にて置換した。その後有茎大網にて人工血管の全周を被覆した。3ヵ月後に犬を犠牲死させ、人工血管の両端を結紮して摘出した。内腔をヘパリン加生理食塩水にて洗浄した後トリブシン液を注入して20分間静置した。その後脱落した細胞を含んだトリブシン液を回収し、採取した細胞を20%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地にて培養した。継代が1代ないし2代までの細胞を使用した。対象として、成犬の門脈と下大静脈より上記と同様の方法にて採取培養した内皮細胞を使用した。培養した細胞は、アセチル化LDLにてそれが内皮細胞であることを確認した。

PGI₂の測定方法は、内皮細胞をmonolayerになるまで培養し、無血清のRPMI 1640、3mlにて5分、10分、30分培養する。その後培養液を回収し、PGI₂の最終安定産物である6 keto-PGF₁ α の濃度をRIA法にて測定した。これを基礎産生量とした。次に別のwellの細胞を洗浄した後内皮細胞の刺激因子であるトロンビン(2単位/ml)入りの無血清培養液にて同様に5分、10分、30分培養した。培養液を回収して6 keto-PGF₁ α の濃度を測定した。これをトロンビン刺激産生量とした。各々8例になるまで測定した。

次にNOの測定方法は、1 \times 10⁵個の培養細胞を無血清培養液中で48時間培養し、NOの代謝産物であるNO₂⁻の液中濃度をGRIESS'法にて5例測定した。

PGI₂に関しては、人工血管の内皮細胞の基礎産生量は、5、10、30分値とも門脈や下大静脈内皮細胞の基礎産生量と有意差はなかった。内皮細胞をトロンビンで刺激した場合、5、10、30分値とも産生量は有意に増加し、また門脈や下大静脈の内皮細胞の刺激産生量との間

には有意差を認めなかった。

NOに関しては48時間後のNO₂-量は、人工血管と門脈の間では有意差を認めなかったが、人工血管と下大静脈の間には有意差を認めた。

人工血管に新生した内皮細胞のPGI₂基礎産生は、門脈や下大静脈と比較しても有意差は認められず、むしろ人工血管の方が高い傾向にあった。内皮細胞は動脈と静脈のように存在する部位によりその環境に合わせた機能を発揮することが知られている。したがってこれは、新生した細胞の機能が全体的に活性化されているか、または手術の影響による炎症等の局所的な環境の変化に対応したためと考えられた。

トロンピンで刺激した場合は、静脈の内皮細胞と同様に有意に産生の増加を示した。これは、術後は内皮細胞傷害や炎症により人工血管は血栓を形成しやすい状況下にあると思われるが、それが刺激になって傷害を受けていない内皮細胞は、PGI₂産性能が増加し抗血栓の方向に働くものと考えられた。

また、NO産生に関しても人工血管の内皮細胞は門脈の内皮細胞と同様の働きを行いうるものと考えられた。

血管の内皮細胞は血栓形成の制御に重要な役割を果たしているが、この実験によると、人工血管に新生した内皮細胞は、他の静脈の内皮細胞と同等の抗血栓性を持ちうるものと考えられた。

口頭発表において内野純一教授より門脈に人工血管を移植した理由、内皮細胞が摂取できた時とできなかった時では細胞の性質、量に差はなかったのか、人工血管内面に内皮細胞を増殖させることの可能性、他の抗血栓性因子、人工血管の治癒過程の終了時期、安田慶秀教授からNO産生量で有意差が出たのは本質的なものなのか、内皮細胞の寿命、継代培養の時間、アセチル化LDLについて、内皮細胞の純度、仮性内膜を薄くする工夫、今後の展開、加藤紘之教授より臨床応用の可能性について質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をしていた。

人工血管から新生した内皮細胞を採取し、その抗血栓性を検討する報告は初めてであり、high porosity EPTFE人工血管の臨床応用に向けて本研究の意義は大きく、審査員一同は本論文が博士(医学)の学位授与に値するものと判定する。