

博士(医学) モル ウィリアム

学位論文題名

Evaluation of the Sclerotherapeutic Efficacy of Ethanol, Polidocanol and OK-432 Using an In Vitro Model

(血管内皮細胞における硬化剤の作用に関する研究)

学位論文内容の要旨

BACKGROUND & OBJECTIVE. Many cases of hemangiomas and vascular malformations are referred to the Hokkaido University Hospital, Department of Plastic & Reconstructive Surgery every week. In the past, the main treatment option was surgery. However, surgery poses the problems of excessive, intra-operative blood loss, prolonged admission period, scaring and other cosmetic problems. Nowadays, sclerotherapy is used. Sclerotherapy is a form of minimally invasive therapy, whereby sclerosants are injected into the vascular lumen of the lesions to cause vascular sclerosis over time. The main sclerosants used are absolute ethanol and 1 % polidocanol. OK-432 is used in other hospitals around Japan, to treat mainly cystic lesions and macrocystic lymphatic malformation. However, due to variations in the flow, the injected concentrations and the duration of exposure of these sclerosants to the endothelium is altered when injected. Therefore, the clinical effectiveness of sclerotherapy is variable for the different types of lesions, as well as the sclerosants. Furthermore, we do not fully understand the mechanism of action in vivo. The objective of our study was to fairly evaluate the differences in clinical response, usually observed among ethanol, polidocanol and OK-432 using an in vitro model of sclerotherapy. Five criteria were investigated:

1. The lowest effective concentration
2. The lowest effective exposure time
3. Morphological changes in the dead endothelial cells
4. Precipitant formation in whole, human blood
5. Influence on the degree of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by the endothelial cells as a marker of inflammation in vitro

MATERIALS & METHODS. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were cultured and exposed to different concentrations of the sclerosants for 5 seconds and the remaining, viable cells were counted

using a MTT assay kit. Dyes were used to visualize the morphological changes in HUVEC after exposure to lethal concentrations of the sclerosants. Precipitant formation, in serum and whole human blood were weighed. Finally, the degree of ICAM-1 expression, after exposure to lower concentrations of the sclerosants, was studied using immunocytochemistry.

RESULTS. Only ethanol causes precipitant formation and kills almost all cells from 30% concentration onwards. There is maximal cell death with 2 minutes of exposure, for both ethanol and polidocanol. However, as for OK-432, even at the highest concentration, it needs at least 12 minutes of exposure time to achieve almost a 100% cell death. Ethanol kills the endothelial cells by fixation. Polidocanol begins to disrupt cell membrane from 0.0125% onwards. However it did not cause any precipitant formation. Only OK-432 induced ICAM-1 expression but only in the presence of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC).

DISCUSSION. Clinically, ethanol seems to have a stronger sclerotherapeutic effect than polidocanol and OK-432. We attribute this to its strong precipitant forming effect, as we have demonstrated using our model. Ethanol's strong precipitant forming effect may induce thromboembolism, thus enhancing sclerosis *in vivo*. According to our *in vitro* model Polidocanol seems to be the strongest. However, some researchers suggested that polidocanol is weakened in the presence of proteinaceous fluids as in the *in vivo* condition. In addition to its non-precipitant forming effect, it may seem weaker than ethanol, clinically. The cell-lysing effect of Polidocanol was clearly elucidated. OK-432 has a weak, direct cell cytotoxicity. However, it may mediate its effect by inducing inflammatory response of the endothelium via ICAM-1 expression unlike ethanol and polidocanol.

CONCLUSIONS. We have determined precisely, the lowest effective exposure time and concentration for 3 commonly used sclerosants. Furthermore, the proposed mechanism of cell death by ethanol and polidocanol was confirmed and elucidated. The ability of OK-432 to induce an inflammatory response in the presence of PBMC was clearly demonstrated. This *in vitro* model may be useful in evaluating other sclerosants as well.

学位論文審査の要旨

主査教授 笠原正典
副査教授 神谷温之
副査教授 山本有平

学位論文題名

Evaluation of the Sclerotherapeutic Efficacy of Ethanol, Polidocanol and OK-432 Using an In Vitro Model

(血管内皮細胞における硬化剤の作用に関する研究)

硬化療法において用いられている硬化剤が、血管奇形に対しどのように作用するかについての研究は少ない。硬化剤の作用は、主に、1) 細胞毒性 2) 血液凝固 3) 炎症による癒着と考えられるが、これらの作用機序は、硬化剤の種類により異なる。臨床では硬化剤は血管内で血液により希釈されているため、内皮細胞の曝露時間も短いと推測され、内皮細胞にどれだけの濃度が接触すれば細胞死が起きるかが明らかでなかった。本研究では、硬化剤として用いられているエタノールとポリドカノール、OK-432について、in vitro で、血管内皮細胞に対する細胞毒性、血液の凝固作用、炎症作用について比較検討した。

最初に、MTT アッセイにて、異なる濃度のエタノールとポリドカノールに、in vitro で HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: ヒト臍帯静脈内皮細胞) を 5 秒間曝露させる実験を行った。高濃度・短時間曝露 (5 秒) で殆どの血管内皮細胞を細胞死させる濃度はエタノール 30%, ポリドカノール: 0.025% であった。OK-432 は細胞毒性を示さなかった。次に、5 秒間の曝露で大部分の細胞が生存する濃度の硬化剤 (エタノール: 12.5%, ポリドカノール: 0.0125%, OK-432: 10KE/ml) で曝露時間を 30 分まで延長させて MTT アッセイを行い、曝露時間ごとの細胞毒性を比較した。高濃度の OK-432 (10KE/ml) では、5 秒の曝露時間では細胞死を認めなかつたが、12 分以上曝露時間を延長すると殆どの細胞が死んでいた。細胞死の確認をトリパンブルー染色、死んだ細胞の形態変化を、Hoechst 染色と DAPI 染色を行い、ポリドカノールでは細胞膜と細胞質の溶解が認められた。これらの実験によりポリドカノールの強力な細胞毒性作用が確認された。硬化剤の血液凝固作用については、異なる濃度のエタノール・ポリドカノール・OK-432 をヒト全血に加え、沈澱物の重量を測定した。エタノールでは、30%で肉眼で認められる沈澱がおこり、エタノール濃度に従って沈澱量も増加した。ポリドカノールでは、90%でも沈澱は生じなかつた。これによりエタノールの強力な血液凝固作用が確認された。最後に、本実験では、血管内皮細胞が硬化剤の曝露により生じる、炎症性接着因子の発現を免疫染色で調べた。低濃度長時間曝露 (12 時間) で

HUVEC に各硬化剤を曝露したところ、ICAM-1 の発現は認めなかった。しかし、24 時間、PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) と HUVEC を共培養した後に、それぞれの硬化剤を低濃度で 12 時間曝露すると OK-432 (0.1KE/ml) の場合だけ ICAM-1 の強い発現を認めた。以上の実験から、代表的な 3 種類の硬化剤(エタノール・ポリドカノール・OK-432)が、異なる作用機序により硬化剤として作用することが判明した。エタノールは中等度の細胞毒性と、強い凝固沈殿作用を認めた。ポリドカノールは、強い細胞毒性を、OK-432 は強い炎症反応を認め、各々の硬化剤の作用機序の違い・特性が、実際の臨床での適応を根拠付ける結果となった。本研究の結果により、血管奇形の硬化療法において、硬化剤をより適切に選択することが期待できる。

公開発表において、副査 神谷温之 教授より 1) ICAM-1 の発現による HUVEC の形態変化の有無、2) 硬化剤による癒着作用と ICAM-1 発現の因果関係、3) ICAM-1 は同一分子間で親和性を有するのかについて質問があった。次いで、主査 笠原正典 教授より 1) 硬化剤の作用と予後、2) *in vivo* での研究計画の有無について質問があった。最後に、副査 山本有平 教授より 1) リンパ内皮細胞などその他の細胞での毒性について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、硬化剤の作用の強弱を、複数の作用機序別に比較できる *in vitro* のモデルを作成した点で高く評価された。抗がん剤やその他の薬剤を使用する諸外国の硬化剤との比較が可能なため、このモデルは国際的に応用されるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。