学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	川合　重久

学位論文題目

Biological degeneration of vein grafts after thrombotic occlusion; Thrombectomy within 3 days results in better indices of viability.
（血栓閉塞静脈グラフトの生物学的変性；血栓摘除の適応は閉塞後 3 日以内）

共著者：笹嶋唯博、佐藤恵介、稲葉雅史、郷一知、東信良、山崎弘資、及川賢輔

Journal of Vascular Surgery

研究目的

自家静脈グラフトが血栓閉塞した場合、血栓摘除と局所的修復手術でグラフトとして再利用可能なことがあるが、その開存成績は２年で１９－３１％ときわめて不良である。その原因はグラフト血栓症に伴う炎症反応とそれに引き続く血管壁の生物学的変性にあると考えられる。そこで、血栓閉塞静脈グラフトの実験モデルを作成し開存成績不良の原因及び血栓閉塞静脈グラフトの救済手術の時間的限界を解明したので報告する。

材料・方法

雑犬 25 頭を用い、大腿動脈を同側大腿静脈で 5cm 置換、3 ヵ月後、5 本を Control として摘出、残り 20 本はグラフト末梢を結紮し血栓閉塞させた。この内各５本は結紮後 3 日目(GroupI-3)、5 日目(GroupI-5)に摘出、さらに各 5 本は結紮後 3 日目、5 日目に 3F バルーンカテーテルを用い血栓摘除し対側大腿動脈に再移植後 28 日目に摘出した(GroupII-3、GroupII-5)。摘出標本に対し、生物学的活性（抗血栓性）の指標として Prostaglandin I_2（PGI_2）産生量を測定すると共に組織学・免疫組織学的検討を行った。【組織学・免疫組織学的検討】血管壁構造の同定に Hematoxylin& Eosin, Elastica van Gieson, Masson trichrome 染色、平滑筋細胞・増殖細胞・アポトーシス細胞・マクロファージの同定に 1A4(α-SM actin)・PCNA(PC-10)・single-stranded DNA(ssDNA)(DAKO ENVISION+)・CD68(KP1)を用いた。染色後の標本を光学顕微鏡にて観察、内・中膜(I/M)と外膜(A)に分けて各々細胞数をカウントし、視野面積５０×２００μm^2あたりの細胞数(/field)を計算した。またコンピューターソフト(NIH" IMAGE")を用いα-SM actin 陽性細胞の面積比率(%-α-actin positive area)を測定した。さらに内皮細胞の再生を走査電顕にて観察した。【PGI_2産生量測定】摘出標本を切開し血栓除去後へパリン加生理食塩水にて洗浄し Tris/NaCl/buffer(pH7.4)1.0ml 中に３７°C で５分間 incubation、標本を取り出した後 indomethacin(200μg/ml)を添加し RIA 法を用いその安定した代謝産物である 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$（6-keto-$PGF_{1\alpha}$）を測定(pg/mg of dried vein tissue/min)した。取り出した標本は heat chamber 100°C で 24 時間乾燥し、乾燥重量を測定した。【統計処理】すべてのデータはコンピューターソフト"Stat View"を用い、Kruskal-Wallis test(non-parametric ANOVA)及び Mann-Whitney U-test にて行い、$p<0.05$ を有意とした。

結果

【グラフト開存成績】Control、結紮前の GroupI、再移植 28 日後の GroupII-3 はすべて開存していたが、GroupII-5 の 5 本中 3 本は再移植後 28 日の間に再閉塞した。【組織学・免疫組織学検査】】GroupI：中・内膜のα-actin 陽性細胞面積比率、総細胞数、PCNA 陽性細胞数、ssDNA 陽性細胞数、KP1 陽性細胞数はそれぞれ、I/M: Control; 54.2±20.0%, 32.8±9.3/field, 17.9±10.0/field, 9.0±5.3/field, 0/field、GroupI-3; 40.6±21.9, 39.9±3.1, 29.2±11.5, 9.6±3.2, 2.7±2.4、GroupI-5;6.6±2.9, 11.4±7.9, 5.8±3.9, 8.3±6.2, 0.4±0.3 であった。外膜の総細胞数、PCNA 陽性細胞数、ssDNA 陽性細胞数、KP1 陽性細胞数はそれぞれ、A: Control; 20.3±3.6, 11.9±4.8, 8.1±2.8, 0、GroupI-3; 23.8±9.7, 12.6±5.6, 7.6±2.0, 2.7±1.8、GroupI-5; 10.7±7.4, 4.0±2.5, 8.4±6.2, 0.4±0.2 であった。統計処理の結果、α-actin 陽性細胞面積比率、総細胞数及び PCNA 陽性細胞数において GroupI-5 は GroupI-3 及び Control と比較し有意な低下が認められた。GroupII：走査電顕にてグラフト内面は血栓摘除直後内皮細胞の脱落と内膜損傷を認めたが、再移植 28 日後では再内皮細胞化が認められた。しかし、GroupII-5 では GroupII-3 と比較し高度の内膜

肥厚が認められた。【PGI_2 産生量】6-keto$PGF_{1\alpha}$の平均値は、Control: 40.0±14.1, GroupI-3: 84.1±18.9, GroupI-5: 15.4±7.7pg/mg/min であり、Control と比較し、GroupI-3 で有意な上昇が、GroupI-5 で有意な低下が認められた。

考察

中膜平滑筋細胞は PGI_2 等の産生により再内皮細胞化するまでのグラフト開存に大きな役割を果たしている。そのため本来であれば血栓閉塞後の静脈グラフトの評価は血管壁 3 層各々に対し行うべきところであるが、ヒトの大伏在静脈と比較しイヌの大腿静脈はきわめて薄く、移植 3 ヵ月後では内膜肥厚と中膜の萎縮のため 3 層各々の評価は困難であるためこの研究では内・中膜複合体(I/M complex)と外膜に分けて評価検討した。細胞死には apoptosis と necrosis があるが、ssDNA 染色で閉塞後 5 日目まで陽性細胞数に変化は認めず、一方総細胞数、PCNA 陽性細胞数、α-actin 陽性細胞面積比率に閉塞後 5 日目で有意な低下が認められた。したがって血栓閉塞後の静脈グラフトの細胞死は necrosis が主であり細胞死に至る主な細胞は α-actin 陽性細胞つまり中膜平滑筋であると考えられた。PGI_2 産生量測定で閉塞後 3 日目に有意な上昇を認め、同じく 3 日目にマクロファージの浸潤が認められた。マクロファージは interleukin-1(IL-1)を産生し、IL-1 は血管平滑筋に対し PGI_2 産生を刺激するといわれている。閉塞後 3 日目のグラフトは細胞が生き残っておりそこに IL-1 の刺激が加わり PGI_2 産生量が上昇したものと考えられ、一方 5 日目ではマクロファージの浸潤は認められたが、IL-1 に反応する細胞が減少したため PGI_2 産生量が減少したと考えられた。走査電顕にて血栓摘除再移植 28 日後に再内皮細胞化が認められたが、開存していた 2 本の GroupII-5 では高度の内膜肥厚を認めた。これは閉塞後 3 日目のグラフトでは完全な再内皮細胞化であったのに対し 5 日目では不完全であったためと考えられた。以上から血栓閉塞後 3 日目までであればグラフトの抗血栓活性は保持され血栓摘除後の長期開存が期待できると考えられた。

結論

自家静脈グラフトにおいて血栓閉塞後 3 日目まで PGI_2 産生量は保持されるが、その後細胞が変性し細胞死のため PGI_2 産生量は低下する。したがって、修復手術は閉塞後 3 日以内に施行されなければならない。

引用文献

1. Whittemore AD, Clowes AW, Couch NP, Mannick JA. Secondary femoro-popliteal reconstruction. Ann Surg 1981;193:34-42.
2. Yatsuyanagi E, Sasajima T, Goh K, Inaba M, Kubo Y. Role of medeial smooth muscle cell function in antithrombogenicity of vein grafts. Euro J Vasc Endovasc Surg 1998;15:350-6.
3. Beasly D. COX-2 and cytosolic PLA_2 mediate IL-1-β-induced cAMP production in human vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 1999;276:369-78.

参考論文

1. 下肢血行再建症例に対する Duplex Scan の有用性
   笹嶋唯博ほか 13 名と共著
   第 18 回血管無侵襲診断法研究会誌、1998,P29-30.

2. 閉塞性動脈硬化症に対する鼠径部以下への自家静脈バイパス成績
   笹嶋唯博ほか 6 名と共著
   日本脈管学会雑誌、39 巻、2 号, 1999, p73-76.

3. 下肢バイパスグラフト血流評価における術後 Duplex Scan の意義
   内田恒ほか 8 名と共著
   日本脈管学会雑誌、39 巻、6 号、1999,p297-300.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第　　　　号		
学位の種類	博士（医学）	氏　　名	川合　重久

審査委員長　石　川　睦　男　㊞

審査委員　塩　野　寛　㊞

審査委員　笹　嶋　唯　博　㊞

学位論文題目

Biological degeneration of vein grafts after thrombotic occlusion : Thrombectomy within 3 days results in better indices of viability.

(血栓閉塞静脈グラフトの生物学的変性血栓摘除の適応は閉塞後3カ月以内)

自家性静脈グラフトが血栓閉塞した際、血栓除去と局所修復手術により静脈グラフトの再利用が可能なケースもあるが、その開存成績は一般に不良である。しかし、血栓閉塞の際の適切な対応と処置によっては、良好な結果が得られた臨床成績を基に、本研究は動物実験モデルにより、血栓静脈グラフトの再利用の生物学的検討を行ったものである。

犬の大腿動物に静脈グラフトを移植し、1カ月後に結紮して血栓閉塞させ、3日後または5日後に血栓摘除術を行って再開通させた時の静脈グラフトの変性を形態学的に検討した。その結果、血栓閉塞後3日間のグラフトでは若干のマクロファージの浸潤を認めるものの血管壁細胞成分の変性、消失は見られずグラフトの生物活性が保持されているのに対し、5日後では、アポトーシス細胞には変化はみられなかったが、増殖細胞、平滑筋細胞は減少していた。すなわち、壁内細胞成分は壊死によりほとんど消失し生物学的活性は失われていることが示された。これらのグラフトについてprostaglandin I_2の測定を行ったところ、3日目までは産生が充分保持されているのに対し、5日目では、著明に低下しグラフトの抗血栓性が失われていることが明らかになった。さらに、閉塞3日目ならびに5日目に血栓摘除後、対側動脈に再移植1カ月後のグラフトを検討した。血栓摘除再開通1カ月後の組織標本では、閉塞3日目血栓グラフトでは良好な開存と内皮性細胞の再生が確認されたのに対し、血栓閉塞5日目のグラフトでは内皮細胞再生は散在性でアポトーシス細胞に変化はないが、総細胞数、平滑筋細胞、増殖細胞は減少した。

また、5日目のグラフト内面は走査電顕で3日目と比較して高度の内膜肥厚が認められ、半数以上のグラフトが閉塞した。

以上の結果は自家静脈グラフトにおいて血栓閉塞後3日以内に修復手術を行うことが適切であることの科学的根拠を与えるものである。

以上の結果は、自家静脈バイパスグラフトが血栓閉塞した場合に、そのグラフトを救済し再利用するかあるいは新たなグラフトでバイパスをやりなおすかの判断をする上で極めて有用な情報であり、臨床的意義は極めて大きいものと考えられます。

論文審査後、引き続き関連領域に関する試問審査を行い、本論文の内容および関連領域に関して十分な回答を得た。

以上より、本審査委員会は本論文が博士（医学）の学位に値するものと判定した。