

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08768

研究課題名(和文)自家心膜のグルタルアルデヒド処理と抗石灰化処理に関する研究

研究課題名(英文) Study on glutaraldehyde treatment and anti-calcification treatment of autologous pericardium

研究代表者

益田 宗孝 (MASUDA, Munetaka)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10190365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心臓血管外科領域において、臓器の壁欠損部や弁尖などへの補填材料として、患者自身の心膜は最も使用頻度の高いものの一つである。強度が必要な部位では、術野において短時間グルタルアルデヒド処理した自己心膜を使用されることが多いが、それにより長期的には組織の石灰化を引き起こす。現在広く使用されている生体弁は、構造的劣化の対策としてグルタルアルデヒド処理を行った後に、各生体弁メーカーが独自の抗石灰化処理法を用いているが、自己心膜のグルタルアルデヒド処理においては現在のところ手術室で可能な確立した短時間抗石灰化処理法はない。本研究の目的は、術中に施行可能な抗石灰化処理法を確立しその最適化を図るものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタルアルデヒド処理は経験的に0.2-0.6%程度の濃度での1-10分程度の処理時間が用いられ、すでに多くの患者の体内で長期的な観察が行われている。一方で、術中に施行できる抗石灰化処理とその有効性に関しては検討された形跡は少ない。本研究では、生体弁製造における長時間抗石灰化処理の方法のうち術中に施行可能な抗石灰化処理として、高濃度エタノール処理に着目し短時間抗石灰化処理の確立を図る。

短時間抗石灰化処理の評価法を、動物を用いた基礎実験を行うことで確立し短時間抗石灰化処理法の最適化を図る。

弁形成術の成績が向上することでその適応が広がれば、患者のquality of lifeの向上に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In the field of cardiovascular surgery, the patient's own pericardium is one of the most frequently used materials as a supplementary material for organ wall defects and valve leaflets. When used in areas exposed to pressure in the left heart system, a short-term glutaraldehyde-treated autologous pericardium is often used in the surgical field to increase its strength, which in the long term results in causes tissue calcification. Currently widely used bioprosthetic valves are treated with glutaraldehyde as a countermeasure against structural deterioration, and then each bioprosthesis manufacturer uses its own anti-calcification treatment method. Currently, there is no established short-term anti-calcification treatment method possible in the operating room. The objective of this study was to establish the method of short time anti-calcification treatment.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：自家心膜 弁形成 心臓手術

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科領域において、臓器の壁欠損部や弁尖などへの補填材料として、患者自身の心膜は最も使用頻度の高いものの一つであり、近年では大動脈弁形成などの弁膜症手術においてもその適応が拡大されてきている。手術中にいつでも使用可能、滅菌状態、抗原性がない、無料であるなどの多くの利点を持つが、その欠点としては強度の低さとそれに伴う操作性の悪さ、術後に短縮していくことなどが挙げられる。心臓血管外科手術中に使用される自己心膜については、新鮮な状態での使用の他、1989年の Chauvaud らの報告以来、適度な質感と癒痕収縮の少なさ、強度を保つためなどを理由にグルタルアルデヒドによる心膜固定が使用されている。右心系では新鮮な状態で用いることが多いのに対し、左心系の圧にさらされる部位に用いる際には、術野において短時間グルタルアルデヒド処理した自己心膜を使用されることが多い。

グルタルアルデヒドは、コラーゲン架橋による組織安定化、滅菌、抗原性の消失などの作用をもち、異種動物の組織使用を可能にした点で生体弁の開発に大きく寄与している。一方で、長期的には組織の石灰化を引き起こし、生体弁における構造的弁機能不全の原因の一つと考えられている。化学的な立体構造の変化はまだ解明しきれていないのが現状であるが、グルタルアルデヒドの持つ活性基が残存しており、この活性基に白血球などが架橋結合されることによって白血球内に含まれるカルシウムや血中のカルシウムが沈着していくことが石灰化の原因の機序の一つとして考えられており、生体弁の耐久性を向上させるため、遊離アルデヒド類の減少を目的に各生体弁が独自の抗石灰化処理法を用いている。

グルタルアルデヒド処理自己心膜の使用症例における再手術率は、自己心膜を使用せずに手術した症例の約2倍ともいわれており、グルタルアルデヒド処理自己心膜の耐久性に生体弁同様、何らかの問題があることは明らかである。

グルタルアルデヒド処理方法に関しては、生体弁などにおける長時間処理に加えて、手術中の短時間処理方法に関しても先行研究があり、実臨床では0.2-0.6%程度の濃度での1-10分程度の処理時間が一般的に施行されている。一方で、抗石灰化処理方法に関しては手術中の短時間処理に関する検討は検索しうる範囲内で報告がない。生体弁に用いる異種動物組織の抗石灰化処理の進歩を手術中の短時間処理に応用し、抗石灰化処理が術中に可能となればその遠隔成績を改善できるのではないかと考え、本研究の着想に至った。グルタルアルデヒド処理された自己心膜は、体内での構造的劣化により再手術、生命の危険にさらされる弁膜の弁尖に使用されていることもあり、本研究は心臓血管外科領域において急務と考えられる。

2. 研究の目的

手術中の短時間グルタルアルデヒド処理の自己心膜使用はすでに実際の臨床では広く行われつつある手技で、近年では僧帽弁や大動脈弁形成などの弁尖においてもその適応が拡大されている。術中短時間で施行可能な抗石灰化処理法を確立することができれば、生体弁が抗石灰化処理法の開発により耐久性の向上という点で進歩したように、弁形成の歴史を大きく前進させることに寄与する。

今日の実臨床では、グルタルアルデヒド処理は、経験的に0.2-0.6%程度の濃度での1-10分程度の処理時間が用いられ、すでに多くの患者の体内で長期的な観察が行われている。一方で、術中に施行できる抗石灰化処理とその有効性に関しては検討された形跡は少ない。本研究では、

生体弁製造における長時間抗石灰化処理の方法のうち術中に施行可能な抗石灰化処理として、高濃度エタノール処理に着目し、短時間抗石灰化処理の確立を図る。

短時間抗石灰化処理の評価法を、動物を用いた基礎実験を行うことで確立し、短時間抗石灰化処理法の最適化を図る。

再手術率の低下という点で心臓血管外科の手術の質を改善するだけでなく、弁形成術の成績が向上することで、その適応が広がれば、患者の quality of life の向上に貢献できる。

3. 研究の方法

(ア) グルタルアルデヒド処理した摘出組織をエタノールの濃度、処理時間を段階設定して処理し、同種他家動物個体に移植し、石灰化を観察する(慢性動物実験)

(イ) (ア)と同様に処理した組織でアルデヒド残基量を測定し、(ア)の結果と併せて石灰化とアルデヒド残基量との相関関係を示す(急性動物実験)

(ウ) 温度、濃度、処理時間などをさらに細かく段階設定し、アルデヒド残基量を最小にするような条件を検証することで、抗石灰化処理方法の最適化を図る(急性動物実験)

(エ) 得られた至適な条件の石灰化についての確認実験

(ア) グルタルアルデヒド及び抗石灰化処理ラット胸部大動脈組織の石灰化に関する実験

i. ラット(Wistar)より胸部大動脈を摘出し、組織パンチャーで径1cm程度の組織切片

を作成する。0.6%グルタルアルデヒド液、pH7.4、常温の状態、組織厚がヒトより薄いことを考慮して実臨床で一般的に用いられている自己心膜固定に用いられる固定時間より短い3分間の固定時間で処理する。抗石灰化材料としては98%エタノールを使用し、その処理時間は10-30分間で設定する。処理後の組織切片を同種他家個体の皮下に移植し、28日後に移植した組織を摘出する。

ii. 摘出した組織について病理組織学的に石灰化を半定量的に評価する。

(イ) グルタルアルデヒド及び抗石灰化処理ラット胸部大動脈組織のアルデヒド残基量に関する実験

(ア)と同様の手順で移植、摘出した組織についてマイクロプレートリーダーを用いてアルデヒド残基量を定量する。高濃度アルコール処理によりアルデヒド残基量を減少させることができれば、(ア)の結果と併せて、石灰化とアルデヒド残基量との正の相関関係が示され、急性動物実験によるアルデヒドの定量のみで慢性期の石灰化が予想できることになる。

(ウ) 抗石灰化処理方法の最適化の検証

温度、グルタルアルデヒド濃度、抗石灰化材料濃度、処理時間などを変数として、それぞれのアルデヒドの残基量を最小にする急性動物実験を行い、長期的な石灰化沈着を最小限にする至適な条件を探る。

(エ) 確認実験

得られた至適な条件をもって再度慢性動物実験を行い、石灰化について確認実験を行なう。好ましい結果を得られれば、ウサギ(NZW)自己心膜を用いて同様の方法で実験を行い、自己心膜においても同様の結果が得られることを示す。

4. 研究成果

グルタルアルデヒド処理自己心膜のエタノール処理の石灰化抑制効果について、小動物組織を用いた基礎実験を行った。並行してエタノールの濃度、処理時間、処理温度の最適化を検討する基礎実験を通じて図った。

石灰化の評価法としては、組織学的に同定した石灰化面積を測定し、半定量化された数値に関して統計解析を進め、上記(ア)に関しては好ましい結果を得られ、論文執筆中である。投稿前の段階であり、詳細に関しては記載を控える。

(ア)に引き続き、順次(イ)以降の実験を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Isoda Susumu, Yamazaki Ichiya, Matsuki Yusuke, Tomita Hiroto, Yano Yoshimi, Gondo Toshikazu, Masuda Munetaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Efficacy of Glutaraldehyde-Treated Leaflets for Mitral Valve Repair to Treat Active Infective Endocarditis: A Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 340 ~ 343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5761/atcs.cr.17-00222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	富永 訓央 (TOMINAGA NORIHISA) (00818049)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	
研究分担者	藪 直人 (YABU NAOTO) (10760316)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教 (22701)	
研究分担者	郷田 素彦 (GODA MOTOHIKO) (30644570)	横浜市立大学・附属病院・准教授 (22701)	
研究分担者	澁谷 泰介 (SIBUYA TAISUKE) (30818050)	横浜市立大学・附属病院・指導診療医 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	磯田 晋 (ISODA SUSUMU) (40254172)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	
研究分担者	根本 寛子 (NEMOTO HIROKO) (00769333)	横浜市立大学・附属病院・指導診療医 (22701)	
研究分担者	金子 翔太郎 (KANEKO SHOTARO) (20845474)	横浜市立大学・附属病院・指導診療医 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関