

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592047

研究課題名(和文)薬物徐放フィルムによる肺静脈狭窄抑制効果に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study of preventive effect of drug-eluting film for pulmonary vein obstruction in the piglet model

研究代表者

安達 理 (ADACHI, Osamu)

東北大学・大学院・講師

研究者番号：30375092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はブタを使用し肺静脈狭窄(PVO)モデルを作成する事。ラパマイシン徐放製剤を作成、肺静脈狭窄の予防法の可能性を検討する事を目的とした。として肺静脈を切開再縫合し、術後2ヶ月後の観察で吻合部の狭窄、閉塞の所見が認められた。病理組織学的に吻合部を中心に内膜肥厚が確認され、臨床における肺静脈狭窄と同様に肺実質の方向へ内膜肥厚が進展することが示された。として乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を徐放媒体としラパマイシンを含むフィルムを作成した。フィルムの厚みは約40 μ mと非常に薄く良好なハンドリングの素材が作成可能であった。現在同フィルムを使用し肺静脈狭窄の予防効果を検討中である。

研究成果の概要(英文)：There are two aims of this study. First is to establish an experimental model of pulmonary vein obstruction (PVO) after repair of total anomalous pulmonary vein connection, and second is to examine possible preventive effect of rapamycin-eluting films for PVO. We could establish the PVO piglet model by cut and suture method..In this model, intimal hyperplasia occurred on the anastomotic site and it progressed toward lung parenchyma 8 weeks after the procedure. In addition, we established very thin drug-eluting film (the thickness was about 40 μ m) which include rapamycin and polylactic-co-glycolic acid. Investigation of preventive effect of this film for PVO is in progress using the piglet PVO model.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：総肺静脈還流異常症 肺静脈狭窄症 内膜肥厚 ラパマイシン 徐放製剤

1. 研究開始当初の背景

総肺静脈還流異常症(以下 TAPVC)は、新生児期に手術介入を要する重症先天性心疾患の一つである。TAPVC の病態生理に対する理解の深まり、外科技術の改良、人工心臓などのデバイスの進歩、周術期管理の改善により、その外科治療成績は向上しているが、現代でも残る重要な課題として、肺静脈 - 左心房吻合部に生じる肺静脈狭窄(pulmonary venous obstruction; 以下 PVO)が挙げられる。PVO は TAPVC 術後の約 10~30%の患者に合併すると報告され、術後遠隔成績に大きな影響を与える因子となっている。PVO に対しては、さまざまな外科縫合材料や手術手技を駆使した再開心手術や、カテーテルインターベンションによっても、その解除は困難なことが多く、しばしば肺静脈末梢に狭窄が伸展し、予後不良な致命的合併症と捉えられている。PVO が発生し進行するメカニズムは未だ不明であるが、吻合部やその肺静脈側末梢に特異な内膜肥厚が起こることは知られている。

内膜肥厚抑制の試みは成人循環器疾患の領域で様々な試みがなされている。その中には、スタチンによる薬物治療や drug eluting stent によるインターベンションが含まれる。しかし、病態の違いと成長への配慮から、PVO を合併した乳幼児に対してこれらの治療を適応することはできない。そこで新たな治療戦略の構築を計画した。

我々の教室では、これまで蓄積してきた基礎研究により、血管吻合部の外膜側から特定の薬剤を局所的に徐放する技術を確立し、内膜肥厚抑制効果においてその有効性を立証してきた (Kawatsu S, et al. Ann Thorac Surg 2007, Kagatani T, et al. Jpn J Cardiovasc Surg 2010)。さらに、基礎研究をもとにラパマイシン徐放フィルムの冠動脈バイパス手術への臨床応用を既に開始している。これまで作製したラパマイ

シンフィルムは、透明性が高く可塑性にも富んでいる。これをビーグル犬の大腿動脈血管吻合部外膜側に貼付することで、その後内膜側に起こる病的新生内膜肥厚を抑制できることを明らかにし、また、その効果は用量依存的に発現されることも示した。さらに、 α -SMA 陽性の血管平滑筋細胞の内膜側への遊走が著明に抑制されたにもかかわらず、von Willebrand factor 陽性の内皮細胞は保たれるという結果が得られた。

このような特性を発揮するラパマイシンフィルムは、吻合部狭窄抑制を目指した外科治療補助療法として極めて有効である可能性が示唆され、今回、難治性 PVO の新たな予防戦略としてこの技術を応用するという着想に至った。

2. 研究の目的

上記背景より、総肺静脈還流異常症の術後遠隔期成績に影響を及ぼす最大の因子である肺静脈吻合部狭窄に対し、本学で開発した薬物徐放フィルムを応用することにより、全く新しい視点から吻合部狭窄の発症を抑制することを目的とする。さらに、未だ不明とされている肺静脈狭窄の発症機序と抑制法についての知見を得ることで、他の小児開心術後における末梢側肺動脈狭窄や心臓移植後の上大静脈狭窄の予防法開発へ向けての礎を築くことを目指す。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

実験動物としては生後 7-8 週齢、体重約 15-20kg の家畜ブタを使用した。ブタを用いた理由として、心臓の形態が人間に類似しており、また犬などの他の実験動物と比較して成長が早いことから、本研究のような先天性心疾患に関する実験に適していると考えられたからである。麻酔前処置を施行した後、気管内挿管後、調節呼吸を行いイソフル

レンで麻酔を維持した。

モデル作成は以下の方法で行った(iv-a, bの2通り)。

- i) 右側臥位に固定し、左開胸を行う。
- ii) 左下肺静脈を同定し、テーピングを行う。
- iii) ヘパリン化の後、左下肺静脈を遮断する。
- iv-a) 左下肺静脈の前面を半周性に切開し、縦に再縫合する。
- iv-b) 左下肺静脈を離断し、7-0 prolene で連続吻合する。
- v) 閉胸し、手技を終了とする。

(2) ラパマシン徐放フィルムの作製

ラパマイシンは脂溶性の物質であるため、同様に脂溶性の生体吸収性素材としてポリL乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を用いてラパマシン徐放フィルムを作製する。当教室での先行研究すでに同様のフィルム状の徐放形態が用いられており、その作製技術を応用する。作製方法は以下の通りとする。PLGAは商業ベースで販売されているものを入手する。ポリ乳酸とグリコール酸との比率は50:50のものを用いる。1×3cmの長方形のPTFEシャーレを新規に準備し、PLGA45mgを、共溶媒を利用してラパマシンと混合する。ラパマイシンの量は先行実験で用いられた濃度を参考とし、500 μ gを中心として変化させ最適化する。上述のように心臓背面の吻合部周囲で安定して配置されるための特殊なシート構造になるよう工夫を加え作製する。

(3) 動脈吻合部の組織変化とは異なるPVO独特の発生機序を解明するため、免疫組織学的手法を用いて吻合部の術後継時的変化を明らかにする。

(4) ラパマイシンの局所徐放により遠隔

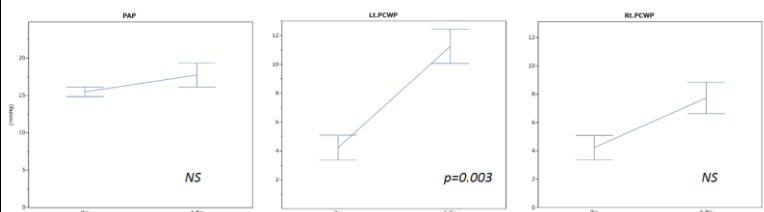
期におけるPVOを抑制しうるかどうかを評価し、さらに抑制しうることを示せた場合はその最適な濃度を検証する。

4. 研究成果

(1) 動物モデルに関して

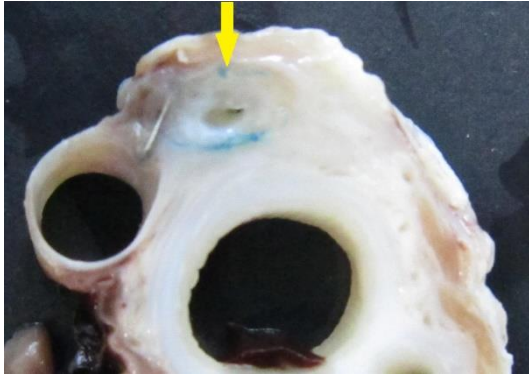
まず肺静脈を半周性に切開し、切開部を縦に吻合することで物理的狭窄により肺静脈狭窄症を模倣したモデルを作成した。術後2カ月の遠隔期には、病理組織学的に吻合部を中心に内膜肥厚が確認された。また、臨床における肺静脈狭窄と同様に肺実質の方向へ内膜肥厚が5~15mm程度進展することが示された。次いで肺静脈を全周性に切開・再吻合し、吻合部に乱流を生じさせることで内膜肥厚を生じさせる肺静脈狭窄モデルを作成した。術後4~8週における血圧のデータを測定したところ、術前に比べ、平均肺動脈圧(PAP)や右肺動脈楔入圧(Rt. PCWP)は上昇傾向は認めるが、有意差がないのに対し、左肺動脈楔入圧は有意な上昇を認めた(図①)。

図①

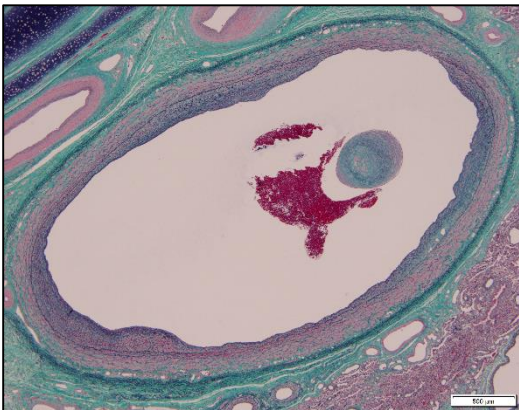


また、4~8週後の組織標本として吻合部が格子状に閉塞もしくはpin-hole状に高度に狭窄しており(図②)、末梢の肺静脈が狭小化している所見が得られた。病理組織学的には、吻合部に増生した内膜に加え、肺実質の方向には30mmを超え内膜肥厚が進展していることが示された(図③)。

図②

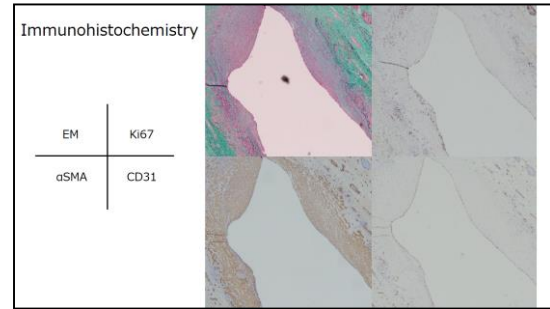


図③

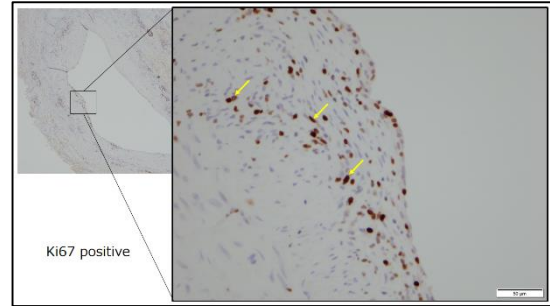


また、免疫組織化学的な検討を行った結果、今回作成した動物モデルにおける新生内膜病変に発現しているマーカーとして、これまでのヒトのPVSで観察されるものと同様に α SMA陽性の細胞(筋線維芽細胞)が多数観察された。また、新生内膜の最内層はCD31陽性細胞つまり内皮細胞で完全におおわれていることが分かった。また、新生内膜における細胞分裂の程度をしめすKi-67での染色では、通常の特処置を施していない肺静脈においては内皮以外の領域において陽性細胞が観察されないのに対し、PVSモデルにおける新生内膜においては、内膜細胞中に一部Ki-67陽性細胞が観察され、内膜を構成する細胞に未だ細胞分裂が生じ、PVSが進行していることが示唆された(図④、⑤)。

図④

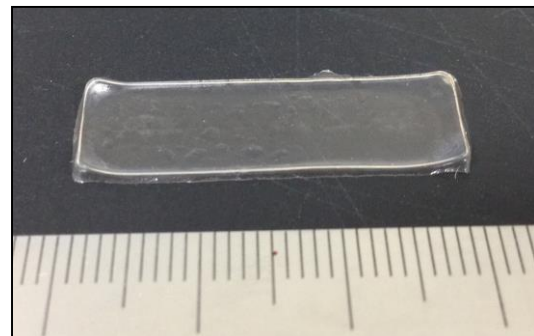


図⑤

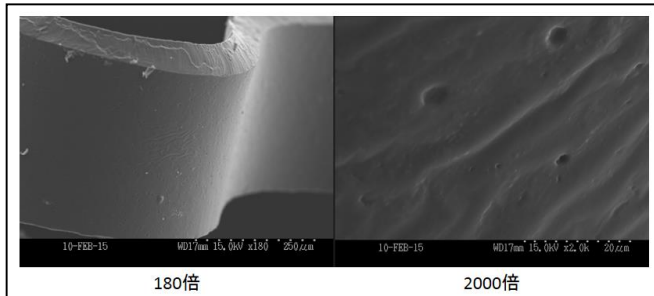


(2) ラパマイシン徐放剤の剤型としては薄いフィルム状の構造を選択した。ポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)をフィルムの基材として選択した。PLGA45mgとラパマイシン500 μ gを溶媒にとかし、型に入れ1 \times 3cmのフィルムを作成した(図⑥)。透明で可塑性に富む素材となった。フィルムの厚みは $40.8 \pm 12.7 \mu\text{m}$ でごく薄く、ハンドリングも良好であった。電子顕微鏡でフィルムの表面を観察すると下記のようなであった(図⑦)。また、このフィルムをブタの頸部静脈に巻き、1週間後、2週間後ともに、フィルム状構造物が肉眼的に確認され、ラパマイシンが徐放されていることが示唆された。

図⑥



図⑦



(3) ラパマイシンによる PVO 予防効果の検討に関しては現在研究を進行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 理 (ADACHI, Osamu)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：30375092

(2) 研究分担者

齋木 佳克 (SAIKI, Yoshikatsu)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50372298

秋山 正年 (AKIYAMA, Masatoshi)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：80526450

熊谷 紀一郎 (KUMAGAI, Kiichiro)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80396564

柿崎 周平 (KAKISAKI, Shuhei)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：10547417