

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861507

研究課題名(和文) 静脈奇形に対する加温生理食塩水注入療法の開発

研究課題名(英文) Development of heated saline infusion therapy for venous malformation

研究代表者

井原 玲 (Ihara, Aki)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：40532065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：静脈奇形病変に対する新規治療法の最適化および基礎的な検討を行った。この治療法は、全身毒性のない加温された生理食塩水を静脈奇形病変内に注入し、熱作用によって病変の血管内皮細胞を破壊する。In vitroにおいて、繊維芽細胞、血管内皮細胞の最高致死温度はともに50℃以上であったが、最低致死温度の決定には40℃から50℃の範囲で微細な温度調整が必要であった。In Vivoにおいて用いた家兎耳介の静脈奇形モデルは温度測定方法の最適化が必要であった。注入する生理食塩水の温度を微細に管理、調整することにより、周囲組織への損傷を最小限に抑えつつ、血管内皮細胞のみを破壊する新たな治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed basic experiments and optimization of a novel therapy for venous malformation. In this therapy, heated saline, which has no systemic toxicity, is injected into the lesions and destroys vascular endothelial cells. In vitro experiments, maximum lethal temperature was 50 °C for both fibroblasts and vascular endothelial cells. Between 40 and 50 °C, however, fine adjustment of temperature led to death of only vascular endothelial cells and survival of fibroblasts. In vivo experiments, we used a rabbit model of venous malformation with auricular vein. Our results indicate that injecting heated saline is a potential therapy for venous malformation.

研究分野：形成外科

キーワード：静脈奇形 血管内皮細胞 加温生理食塩水 細胞障害性 ケラチノサイト 繊維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

血管腫血管奇形の中でも静脈奇形(Venous malformation, VM)、特にびまん性広範囲の病変においては、外科的切除に伴い整容的、機能的障害をきたす恐れが強いこと、大量出血のリスクを伴うことから、病変部を穿刺し直接硬化剤を注入する、経皮的硬化療法が有用な治療選択肢となる。

硬化剤は病変部の血管内皮細胞を破壊し、異常血管の閉塞、器質化を介して病変を縮小させることができる。しかし硬化剤は、周囲の健常組織に対しても傷害性を有することから、適切に病変内に注入された場合であっても、皮膚壊死、神経麻痺、筋や関節の拘縮などをきたすことがある。

我々は、VM治療において、最も臨床的に問題となる局所合併症である皮膚傷害を回避しつつ、十分な治療効果を得るため「浅存性のVMに対してエタノールを硬化剤として注入した直後に直上の皮膚に生理食塩水を皮内・皮下注射する」方法を考案し、家兎耳介静脈の血流阻害モデルを用いた動物実験、および生食希釈による硬化剤の細胞傷害性減弱の解析によって、その有用性を実験的に示し、臨床的にも有効な手技として報告を行ってきたが、エタノールの使用にあたっては、中毒の危険性から投与総量が限られ、広範な病変においては、その効果に不足を感じることも多い。硬化剤自体が、中毒や肝障害など、全身性の影響を及ぼす可能性があることから、1回投与量には極量が存在し、広範な病変においては、十分な治療効果を得難いことが多い。

現状のVMに対する硬化療法の問題点を解決するためには「血管内皮傷害能はあるが、周囲組織に対する傷害性、全身的な影響の少ない」治療手技が望ましい。これらの条件を満たす方法として「血管内皮細胞の細胞死を惹起するのに必要十分な温度に加熱した生理食塩水を血管病変内に注入する」新しい治療手技の考案に至った。

腫瘍性病変に対する温熱を利用した治療方法としては、固形癌に対して放射線治療や化学療法に併行して行われるハイパーサーミア(がん温熱療法)や、ラジオ波焼灼治療が知られる。これらの治療も対象となる癌によっては効果的であるとされるが、VMに対する温生食注入療法は、以下の点において、より臨床的に有用である可能性が高い。

1) DSA透視下に、加熱された生理食塩水を病変内に注入することによって、病変(脈管)の分布に沿って、加熱生理食塩水の分布を得ることができる。

2) 脈管内への注入であるため、加熱生理食塩水は早期に継時的に希釈され、細胞傷害性を失う。

3) 本質的に、良性の疾患であるため、病変を根治する必要はない(あくまで大型の病変において、投与量の制限が少なく、広範囲に治療を行えば临床上の効果は十分である)。

2. 研究の目的

本研究は、血管腫血管奇形の中でも、特に治療の困難な、広範囲静脈奇形病変に対する新規治療法として考案した、「加熱された生理食塩水を病変内に注入し、熱作用によって静脈奇形病変の血管内皮細胞を破壊する新規治療」の最適化および基礎的な検討を目的としている。本治療法では、病変内の血管内皮細胞と周囲組織との選択性を、大量投与による全身的毒性のない加熱した生理食塩水を媒介とした熱作用に求める。研究期間内に、*vitro*、*vivo*での検討を行い「静脈に対しては傷害性を有するが、周囲組織に対する影響のない注入条件(温度、注入速度、注入回数など)」を最適化し、臨床応用への礎とする。

3. 研究の方法

*In vitro*における細胞の単離培養の方法と

としては、院内倫理委員会の許可したプロトコルに基づいて採取した検体より、初代培養を確立する。血管内皮細胞は、皮下組織の酵素処理分散法で得られた接着細胞分画よりフローサイトメトリを用いてCD31陽性細胞をソーティングし、確立する。DFs、KCsは申請者が過去の研究で用いた手法(Ihara A, et al. *Dermatol Surg.* 2011;37:1125-32.)に基づき確立する。培養細胞の私的生育温度は37度であり、100度であれば作用時間によらず細胞は死滅するものと考えられる。96 well plateに培養した各細胞に、40から100まで10毎の割り付けで加熱した生理食塩水を10秒作用させてから早急に常温の増殖培地と入れ替えた。細胞の回復を待つため1時間経過後に、各wellに10uLのMTT([3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド])標識試薬(Cell Proliferation Kit I (MTT); Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を加え、4時間のインキュベーションを行った。100uLの可溶化溶液を各wellに加え、さらに、オーバーナイトでインキュベーションすることでフォルマザン結晶が可溶化され紫色の着色を得た。可溶化されたフォルマザン産物の相対的な量を分光光度計としてマイクロプレート測定器を用いて計測した。吸光度の測定波長は590nmとして、リファレンス波長として977nmの波長を用いた。

各温度条件下で処理された細胞と37度(加熱生理食塩水を添加していない細胞)を用いて処理された細胞の生存率を比較した。80%致死温度(Lethal temperature 80, LT_{80})を含む温度域を決定後、温度幅を狭めて、各々の細胞の LT_{80} を決定したのち、3-5程度温度を上限させて、10秒の作用時間を3秒-5分程度の幅に割り付け、各々の細胞に LT_{80} を与える温度-作用時間曲線を得る。*In vitro*の結果を参考に、過去に報告した家兎耳介静脈の血流阻害モデルを用

いて in vivo での加温生理食塩水の静脈および周辺組織への影響を調べる。

In vivo においては血流阻害家兎耳介静脈モデルを用いた検討を行った。モデルは過去に報告した VM 類似の血行動態を有する静脈の動物実験モデルである (Ihara A, et al. Dermatol Surg. 2011;37:1125-32.)。アクリルプレートとシリコンリングからなる器械で家兎の耳介静脈の血行を遮断することによって、VM 病変に典型的にみられる「注入された造影剤が一定時間滞留する血行動態」を再現している。(図 1)

さらに、血管内および血管周囲組織に温度計を留置し、それぞれの組織内温度を計測する。加温生理食塩水を静脈注射する際の刺入部の皮膚熱傷をさけるべく刺入部は冷却する。

加温生理食塩水を注入後、一定時間(注入された生理食塩水も冷めると考えられるので、5分程度を想定している。)経過後に器具を取り外し、外観上観察を行った後、7,30日後に、局所の組織を採取し、血管の閉塞状態をはじめとした組織学的検討を行う。

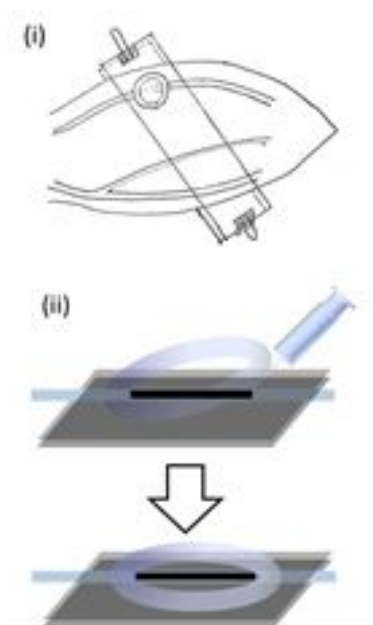


図 1

4. 研究成果

In vivo において 1 well あたり 100 μ L の培地に線維芽細胞を 4000 個/well の割合でそれぞれ 96 ウェルプレートに播種し、37、5%CO₂ で 48 時間培養を行った。その後 40 から 10 ずつ段階的に 100 まで加温した生理食塩水 100 μ L を添加し 10 秒間作用させ、加温生理食塩水を回収し、増殖培地を添加した。細胞障害性 MTT アッセイ後、オーバーナイトでインキュベーションすることでフォルマザン結晶が可溶化され紫色の着色を得た。フォルマザン産物の相対的な量を分光光度計としてマイクロプレート測定器を用いて計測した結果、繊維

芽細胞の最高致死温度は 50 であった。40 では線維芽細胞は 57.4% が死滅することが確認された。(図 2)

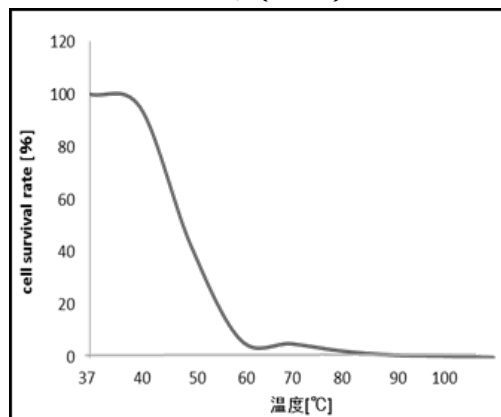


図 2

以上の結果から、LT₈₀ は 40 から 50 ° の範囲に存在すると考えられたため、次に前述同様に 1 well あたり 100 μ L の培地に線維芽細胞を 4000 個/well の割合でそれぞれ 96 ウェルプレートに播種し、1 ずつ 50 まで段階的に加温した生理食塩水を各ウェルに添加し細胞障害性 MTT アッセイを行い分光光度計による計測を行った。結果は、段階的な障害を認めず、再現性が得られなかった。80%致死温度 (Lethal temperature 80, LT₈₀) の統計的検討においては、障害される細胞数が温度に依存しない結果となった。これに関しては、40 から 45 まで連続で加温生理食塩水を添加し、10 秒後に回収したため、ウェル内の熱が隣接するウェルに影響を及ぼしたものと考えられた。また、正確に 1 ずつの微細な温度差で添加するには添加の方法に調整が必要と考えられた。

次に、1 well あたり 100 μ L の培地に血管内皮細胞を 4000 個/well の割合でそれぞれ 96 ウェルプレートに播種し、37、5%CO₂ で 48 時間培養を行った。その後 40 から 10 ずつ段階的に 100 まで加温した生理食塩水 100 μ L を添加し 10 秒間作用させ、加温生理食塩水を回収し、増殖培地を添加した。前述と同様に細胞障害性 MTT アッセイを行いフォルマザン産物の相対的な量を分光光度計としてマイクロプレート測定器を用いて計測した。結果、繊維芽細胞同様に最高致死温度は 50 であった。LT₈₀ 検討においては線維芽細胞同様に 40 から 50 の範囲で微細な温度調節が必要と考えられた。

In Vivo において、前述した血流阻害家兎耳介静脈モデルを用いた。温度測定方法に関しては、血管内に温度計を刺入することで、針入点から加温した生理食塩水が漏出してしまうこと、また、リングの内径は 16mm とモデルが小さく、血管内および病変内の正確な温度の計測を行うためには温度測定方法の最適化が必要であった。

注入する生理食塩水の温度を微細に管理、

調整することにより、周囲組織への損傷を最小限に抑えつつ、血管内皮細胞のみを破壊する新たな治療法の可能性が示唆された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特記事項なし

6．研究組織

(1)研究代表者

井原 玲 (IHARA AKI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：40532065