

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 8 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10172

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流障害抑制/抗血小板作用を持つ薬剤溶出生体吸収ステント開発と肝移植応用

研究課題名(英文) Development of drug eluting bioresorbable stents with antiplatelet effect and protection against hepatic ischemia and reperfusion injury: application to liver transplantation

研究代表者

尾原 秀明(OBARA, HIDEAKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：20276265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シロスタゾール(CZ)溶出生体吸収ステントの作成に難渋したため、ラット肝虚血再灌流モデルでのCZ投与効果を検討した。CZ投与にて肝機能値の改善および各種サイトカインの産生が低下した。また、CZ投与群で生存率も有意に改善し、CZによる肝虚血再灌流障害の抑制効果が示された。次に、大動物(ブタ)での門脈吻合モデルおよび門脈ステント留置モデルの作成を行った。全身麻酔下で開腹し、門脈を露出後に前壁2/3周切離し、同部を縫合閉鎖した。門脈縫合部末梢からガイドワイヤーとシースを留置し、透視下に金属ステントを留置した。血管造影にてステントが門脈縫合部に留置されていることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Since it was difficult to prepare cilostazol (CZ) eluting bioresorbable stent, the effects of CZ administration in rat hepatic ischemia reperfusion model were examined. Improvement of liver function value and decrease of production of various cytokines was observed by administration of CZ. In the CZ administration group, the survival rate was also significantly improved, which showing an inhibitory effect of CZ on hepatic ischemia reperfusion injury. Next, a portal anastomosis model and a portal vein stent placement model were created using large animals (pigs). Following laparotomy under general anesthesia, the portal vein was exposed and the anterior wall was cut by 2/3 rounds. After that, primary suturing closure of that part was performed. A guide wire and a vascular sheath were inserted from the distal part of the suture site of portal vein, and the metallic stent was placed under fluoroscopy. Angiography confirmed that the stent was precisely placed at the suture site.

研究分野：外科

キーワード：生体吸収 ステント 虚血再灌流障害 肝移植

## 1 研究開始当初の背景

当施設では、以前より生体部分肝移植において安定した成績を収めており、脳死肝移植数も増加してきている。われわれは以前から肝虚血再灌流障害に着目し、その克服のため現在まで数々の基礎研究を継続してきた。なかでも、肝移植後に経門脈的持続投与(門注療法)を行う画期的な治療法を開発し、本法を実臨床の ABO 血液型不適合肝移植に応用してすばらしい成績を収めている。肝虚血再灌流障害における key mediator としてグラフト肝の血管内皮細胞障害が挙げられる。今回、本研究では血管内皮細胞保護作用を有するシロスタゾールに着目した。元来シロスタゾールは、cAMP 濃度を増加させることにより血小板凝集抑制作用をもつ。また、臨床的には慢性動脈閉塞症に基づく虚血性諸症状の改善と非心原性脳梗塞の再発抑制の保険適用をもち、数々の臨床試験でその効果が証明されてきた。さらに、シロスタゾール投与における小腸の虚血再灌流障害予防効果も報告されていることから、シロスタゾールは肝移植時の虚血再灌流障害をも抑制する可能性が示唆される。このシロスタゾールの肝虚血再灌流障害抑制効果については、すでに申請者は予備的な研究結果を得ている。ラット肝虚血再灌流障害モデルにおいて、シロスタゾール投与群において、AST,ALT ともに有意な減少を認めた。こうした当施設でのこれまでの成果を受け、シロスタゾール投与による肝虚血再灌流障害抑制効果を大動物実験(ブタ)で確認するとともに肝移植モデルへの応用を検討している。

## 2. 研究の目的

肝移植において移植肝血流障害として術後の門脈吻合部屈曲とそれに伴う狭窄や血栓形成が挙げられる。そこで、抗血栓作用・血管拡張作用・新生内膜増殖抑制を有するシロスタゾールと生体吸収性ステントに着目した。治療に必要な期間を過ぎた後に消失する生体吸収性ステントは、従来の金属ステントでみられた術後再狭窄やステント破損、追加治療の阻害などの問題を解決することが期待されている。両者を融合させたシロスタゾール溶出生体吸収性ステントの開発により、血管吻合部合併症の予防のみならず、前記の如く虚血再灌流障害抑制にもつながる可能性が期待される。

## 3. 研究の方法

(1) ラット肝移植モデルにおけるシロスタゾール投与の効果の検討 ラット同所性肝移植モデルを用いる。肝移植は、従来通りカフ法にて行い、ラットに対する手術はすべてイソフルレンによる全身麻酔下で行う。4°C のラクテックリングル液で灌流した後、ドナー肝を全摘出する。移植肝の冷阻血時間は

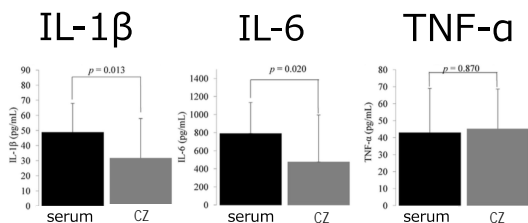
90 分以内である。レシピエントの全肝摘出後、肝臓を同所性に移植する。無肝期は 16 分以内とする。シロスタゾールによる虚血再灌流障害抑制効果の検討。シロスタゾールをレシピエントに投与する。投与時期は、移植前 3 日前から連日投与 30 分とする。再灌流後、6 時間、12 時間、24 時間、2 日、3 日で、シロスタゾール投与群とコントロール群において各種パラメータを比較検討する。(2) シロスタゾール溶出生体吸収性ステントの開発。シロスタゾールは、有機溶媒に溶ける性質を有している。ステントの安定性を確保するため、研究協力を得ている京都医療設計株式会社と、PLLA にシロスタゾールを混入させた際の PLLA の結晶化度を最適化し、さらに分解性試験を実施して分解性と強度について評価する。(3) ブタ肝移植モデルにおけるシロスタゾールの効果の検討。雄性ブタを使用。ドナーを心停止させ、40 分間温阻血した後肝全摘を行い、4 時間冷保存し、レシピエントに移植する。レシピエントには、術 3 日よりシロスタゾール内服を開始する。シロスタゾール投与群とコントロール群において AST, ALT, 各種サイトカインなどのパラメータを比較検討する。(4) ブタ門脈吻合部への薬剤非含有生体吸収性ステントとシロスタゾール溶出生体吸収性ステント留置の比較検討。全身麻酔下において、開腹し門脈を切離後、再吻合を行う。その後上腸間膜静脈にシースを留置し、直接門脈吻合部へ留置を行う。金属ステント、薬剤非含有生体吸収性ステント、シロスタゾール溶出生体吸収性ステントを留置した群を比較する。新生内膜が形成される術後 6 週間および 3 ヶ月後に、ブタを全身麻酔下に造影カテーテルを用いて血管撮影と血管内超音波検査を行い、開存率、ステント損傷などの有無を確認する。その後犠牲死させ、ステント留置部門脈の病理学的検査を行う。ステントを留置した門脈の組織切片を作成し形態学的なステント内再狭窄を評価する。(5) ブタ肝移植モデルにおける門脈吻合部への薬剤非含有生体吸収性ステントとシロスタゾール溶出生体吸収性ステント留置の比較検討。ブタ移植モデルにおける門脈吻合部に血管撮影下で門脈内にステントの留置を行う。薬剤非含有生体吸収性ステントをコントロール群として、シロスタゾール溶出性ステントを留置した群と比較する。また、血管内超音波検査装置を用い実際の内腔の評価を行う。

## 4. 研究成果

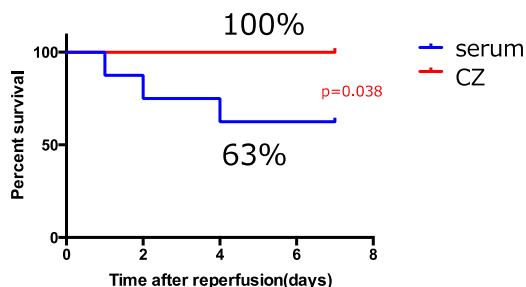
シロスタゾール溶出生体吸収性ステントの作成が困難であることから、ラットでの研究を並行してすすめることとした。シロスタゾールにて肝虚血再灌流障害を抑制する結果はすでに得ているので、次に生存率に着目した。雄性 Wistar ラットを用い、肝の中・左葉のグリソン鞘を一括遮断し、60 分間

約 70%の部分肝虚血を行った。その後、再灌流を行ない、肝虚血再灌流障害モデルを作成した。治療群とコントロール群の 2 群を作成し、前者は、シロスタゾールを肝虚血施行 3 日前から連日経口投与(20mg/kg)し、さらに肝虚血施行前 30 分にも投与した。また、後者に対しては等量の生食のみを同様に投与した。虚血 180 分後にラットを犠牲死させ、血液および肝臓を採取した。血中 AST、ALT の測定に加え、サイトカイン interleukin(IL)-18 および IL-6 濃度を ELISA 法により測定した。その結果、シロスタゾール投与は有意に肝虚血再灌流障害を抑制していた。本モデルで生存率の検討を試みたが、コントロール群で全例生存してしまったため、生存率のための虚血時間の optimization を行った。肝 70%虚血を 60 分から 90 分に延長することで、コントロール群の一週間生存率が約 50%となったことから、90 分虚血モデルでシロスタゾール投与を行い、生存率を検討した。その結果、シロスタゾール投与群で有意に生存率が改善された。

ラット肝移植モデルは、ドナーラットの手技は確立されてきており、レシピエントに移植肝をプットイン後、温阻血時間の短縮に努めている段階である。現在、温阻血時間は 30 分以上であり、さらなる修練を続けている。



### Survival analysis



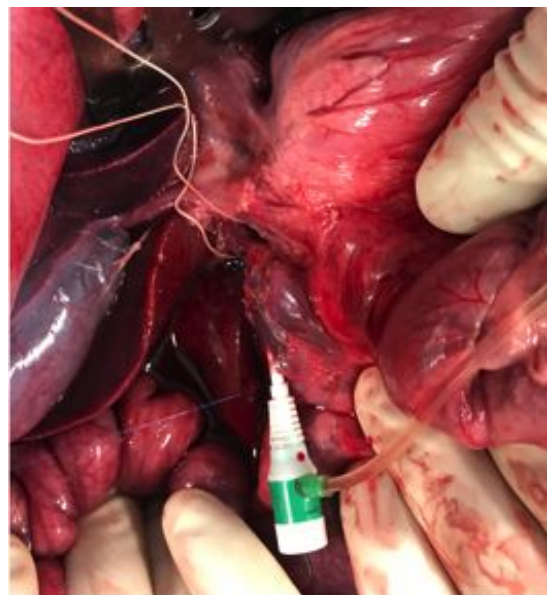
シロスタゾール溶出性生体吸収ステントの作成は技術的にさらなる時間を要することが判明したため、大動物(ブタ)でのモデル作成(研究計画 4)に着手した。全身麻酔下を開腹し、門脈を 5cm 長露出。ヘパリン 3000 単位を全身投与し、門脈の中樞と末梢をクラ

ンプして 2/3 周の横切開を加えた。次に横切開部を 6-0 血管縫合針で 5 針、結節縫合し、血流を再開。横切開部の末梢側門脈に 18G サーフロー針を刺入し、0.018GW を挿入した。C アーム透視装置で GW の先端が肝内にあることを確認し、6F シースを挿入した。シースよりベアメタルステント(8/40mm)を、横切開吻合部をまたぐように留置した。シースより造影し、ステント留置に問題がないことを確認した。

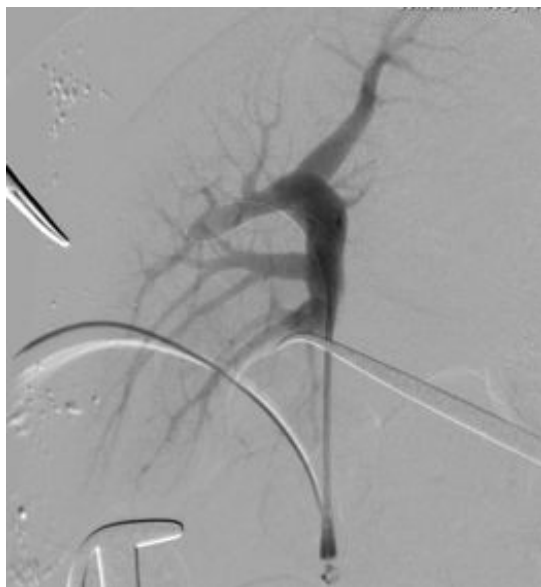
### ブタの門脈再吻合モデル



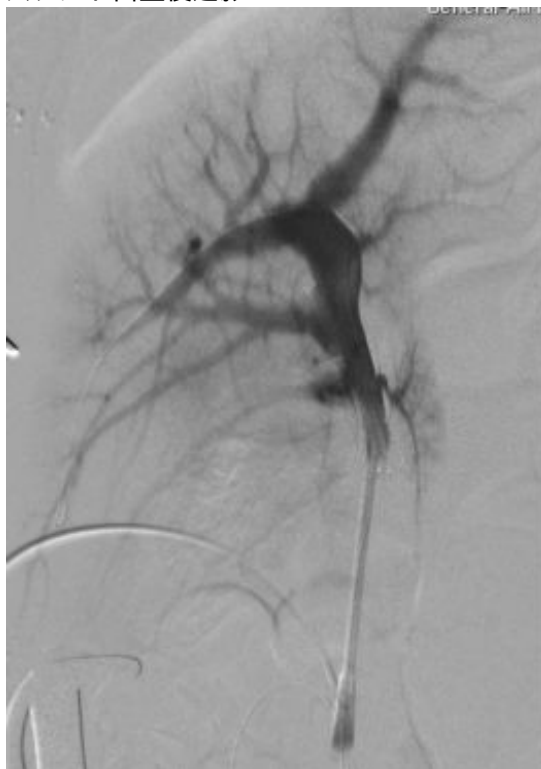
### 門脈にシース挿入



初回造影



ステント留置後造影



今後、本モデルを使用し、まずは生体吸収ステントを門脈吻合部に留置する予定である。

一方、生体吸収ステント留置後の構造変化を観察するため、ミニブタの腸骨動脈に生体吸収ステントと金属ステントを留置し、留置

後6ヶ月間、定期的に血管撮影検査と血管内超音波で評価した。4頭施行し、生体吸収ステントのリモデリングが優れていることが示された。金属ステントは6ヶ月間にわたり、ステント内狭窄が経時的に進行したが、生体吸収ステントでは、3ヶ月以降、ステント内狭窄は徐々に軽快していくことが画像上明らかとなった。この結果から、生体吸収ステント留置後、一定期間をシロスタゾール投与にて狭窄を抑制することができれば、一生涯にわたる長期開存が期待できる可能性が示唆された。今後、門脈切離再吻合モデルで生体吸収ステントを留置し、経時的に血管撮影検査により、門脈ステント内狭窄を観察する予定である。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

林 啓太, Comparison of vascular remodeling between the bioresorbable Poly-L-lactic acid scaffold and the metallic stent in porcine iliac artery, 18<sup>th</sup> congress of Asian Society of Vascular Surgery, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

尾原 秀明(Obara, Hideaki)

慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：20276265

(2)研究分担者

松原 健太郎 (Matsubara, Kentaro)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70348671

藤村 直樹 (Fujimura, Naoki)  
慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)  
研究者番号：80445212

(3)連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者

林 啓太 (Hayashi, Keita)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：80770859

林 心典 (Hayashi, Masanori)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20793475