

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16673

研究課題名(和文) 経動脈的微小血管塞栓術における短時間溶解型ゼラチンの応用

研究課題名(英文) Transcatheter Arterial Embolization of Abnormal Neovessels in Arthritis Models of The Knee of Swine

研究代表者

生駒 顕 (Akira, Ikoma)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60458065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：6匹の雌豚の12個の膝関節炎モデルを、パパインの関節内注射によって作成した。パパイン注入後、42日後に全例で膝蓋骨周囲に新生血管の増生を確認した。塞栓物質により、6頭(12膝)を3頭(6膝)ずつ、チエナム群と短時間溶解型ゼラチン群の2群に分け、新生血管を異なる塞栓物質で塞栓した。塞栓後3日目に、血管造影での塞栓効果と病理組織学的検査での組織損傷を比較した。異常血管の塞栓は成功し、両群とも12膝すべてで塞栓後3日で消失した。病理では、両群の12膝すべてに滑膜の肥厚や炎症細胞の浸潤などの滑膜炎の変化が認められた。皮膚や筋肉の壊死、炎症性細胞浸潤の程度は両群ともなく、両群間に有意な差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が作成した短時間溶解型ゼラチンは、イミペネム・シラスタチンと同程度の溶解時間であり、1-2mm程度の粒子や50μm程度のパウダー状粒子も作成可能である。関節炎モデルで生じた異常血管を、短時間溶解型ゼラチンで塞栓することで、イミペネム・シラスタチンで塞栓したものと比較して、異常血管の再発をおこさずに塞栓効果を持続させ、かつ、イミペネム・シラスタチンと同程度の組織障害であることが確認されたため、効果的な塞栓物質となりえるのではないかと考えた。

研究成果の概要(英文)：We created arthritis models of 12 knees in 6 female swine by intra-articular injection of the papain. According to the embolic material, 6 swine (12 knees) were divided into two groups of 3 swine (6 knees) each: imipenem/cilastatin (IPM) group and soluble gelatin sponge (SGS) group. Abnormal neovessels in the knees were embolized using IPM or SGS. Three days after embolization, we compared the embolic effects on angiography and the tissue damage on histopathologic examinations. Obvious abnormal neovessels appeared in all knees. The abnormal neovessels were embolized successfully, and disappeared 3 days after embolization in all 12 knees of both groups. In histopathological evaluation, synovitis changes such as synovial thickening and inflammatory cell infiltration were observed in all 12 knees of both groups. However, there was no skin or muscle necrosis in either group, and no significant difference between the two groups.

研究分野：Interventional radiology

キーワード：チエナム 経動脈的微小血管塞栓術 短時間溶解型ゼラチン

### 1. 研究開始当初の背景

五十肩や変形性膝関節症など、運動器の疼痛症状はさまざまな年代で出現し、その頻度が極めて高く、生活機能を低下させ、QOL (Quality of Life) の低下を来とし、さらに生命予後にも多大な影響を及ぼし、社会に与える負担が大きい。

近年、疼痛部位に生じた異常な微細血管とそれに伴走する神経とが痛みシグナルの原因であるとする仮説が提唱された。Alfredson らは慢性化した各種腱炎について超音波診断装置で観察される血流信号の増加と痛みとの関係を指摘しており、これらの症状に対して超音波診断装置で確認される血管内に硬化剤を投与することで血流を遮断し、疼痛の緩和が得られた[1]ことを報告している。

奥野らは、塞栓剤として短時間だけ塞栓効果を発揮するとされる imipenem/cilastatin (IPM/CS) を用いて、疼痛部に増殖した異常血管 とそれに伴走する神経とを標的として経動脈的の微細血管塞栓術 (TAME) を行ない、腱炎・付着部炎、肩関節周囲炎による慢性疼痛に対して施行し報告してきた[2]。2014年7月より2015年8月にかけて prospective な Phase I/II 試験 (UMIN 000014591, unpublished) を実施し、本法の安全性が示された。このような背景のもとに、保存療法に抵抗して夜間痛を伴う肩関節症状に対するイミペネム・シラスタチンを用いた TAME の臨床的有効性を評価するための臨床第 Ⅲ 相試験も実施中である。現在、本治療は、自由診療で行われているが、マスコミにも取り上げられる機会が増え、需要が高くなってきている。今後、保険診療が行えるようになれば、ますます普及する治療になると思われる。現時点では、IPM/CS を塞栓物質として使用しているが、IPM/CS は難溶性抗生物質の短時間塞栓物質であり、オーバードーズ疾患では再発例も少なからず報告されている。このため、虚血合併症を起こさず、かつ、異常血管の確実な塞栓を行えるようなより有効な塞栓物質はないのか、という疑問が生じ、これに対する答えが早急に求められている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、豚関節炎モデルを作成し、短時間溶解型ゼラチンを用いた経動脈的の微小血管塞栓療法を行い、その安全性と有効性を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

豚関節炎モデルを作成し、異常血管を従来の IPM/CS で塞栓する群と短時間溶解型ゼラチンで塞栓する群の 2 群に分け、塞栓効果 (再開通有無) や虚血性変化の比較 (塞栓後、豚をと殺し、病理組織で虚血の程度を比較) を行い、塞栓効果及び病理組織学的比較を行い、有効性及び安全性を検討する。以下の動物実験を計画した。

1) 実験場所・動物：株式会社アイビーテック 神戸ラボで行う。関節炎モデルの豚 6 頭を用いる。

2) 材料：パパインは和光純薬工業(株)より購入する。短時間溶解型ゼラチン (RMG) はゼライス社より提供された直径 200 ~ 500  $\mu\text{m}$  のパウダー状の粒子 (7%, 分子量 100kDa) を使用し、和歌山県立医科大学放射線医学教室で 120 度、24 時間の乾熱滅菌処理を行い、作成する。

3) 関節炎モデル作成・群構成：

新井らの報告[3]を参考に、豚両膝関節に関節炎を誘発する。豚 6 頭をエーテルで麻酔後、膝関節腔を肢の屈曲により確認し、粉末状のパパインを生理食塩水に 5% 濃度で溶かした溶液 3mL を左右膝関節の外側、膝蓋靭帯より約 2 指分外側の部分から垂直にアプローチし、23G 針を使用して大腿骨遠位端関節腔内に注入する (図 1a-b)。注入後は肢の伸展を行い、関節部分への薬液を浸透させる。パパイン溶液注入 1 回目を Day0 とし、翌日の Day1 にも同様の処置を施行する。右膝関節をイミペネム・シラスタチン投与群 (IPM/CS 群：n=6、豚 6 頭) 左膝関節を (RM 群：n=6、豚 6 頭) とする。



(図 1a. パパイン注入)



(図 1b. 透視下関節内穿刺)

4) 血管造影：

Day0, 3, 7, 14, 21, 42, 45 で血管造影を行い、新生血管や塞栓効果を評価する。

Day42 に IPM/CS と RM-G を用いて新生血管を塞栓する。

関節炎モデル作成 2 日後 (Day2)、両側大腿動脈より 4Fr シースを挿入し、両側膝関節周囲の異常血管をそれぞれイミペネム・シラスタチン (IPM/CS 群) あるいは RM ゼラチン (24 時間以内に溶解されるとされる[4]) (RM 群) で塞栓する。

5)と殺：

Day45 に血管造影後、安楽死させる。膝関節周囲組織をホルマリンで固定し、病理組織学的検討を行う。後日、病理標本作成を行い、炎症性変化や虚血性変化（浮腫、炎症性細胞浸潤有無、出血・壊死）を観察し、2 群間で比較検討する。

6)疼痛評価

連日(Day0 ~ 45)、疼痛スコア表を作成する。

触診反応；通常（0点） 少し嫌がる（1点） 逃避（2点） 熱感；平熱（0点） 有（1点） 起立状態；正常（0点） 不安定（1点） 自立不可（2点）の合計7点満点のスコアを毎日早朝に評価した。また、疼痛予防のため、キシラジン 0.5mg/kg 筋注(1回/日)した（動物実験の3Rの原則に配慮）。

#### 4．研究成果

##### 【結果】

Day42 にいずれの膝関節炎モデルにおいても、新生血管が出現した。いずれも異常濃染及び early venous return を確認している(図 2a-b)。なお、新生血管と思われる異常濃染は、関節腔周囲ではなく、いずれの豚においても、膝蓋骨周囲にのみ生じた。



( 図 2a.異常濃染 )



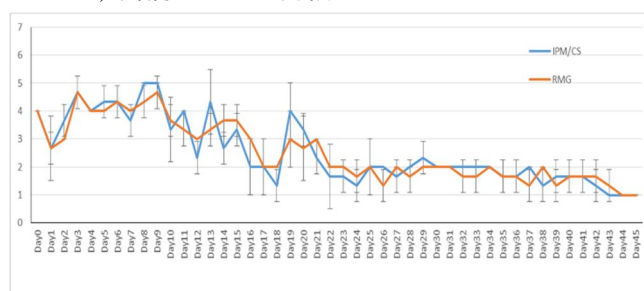
( 図 2b. early venous return )

異常血管の塞栓は、IPM/CS 群及び RM 群でもすべて症例で成功し、両群とも 12 膝すべてで塞栓後 3 日に消失した。詳細を Table1 にしめす。また、IPM/CS 群及び RM 群で新生血管の出現やその消失、親血管の再開通に関する血管造影所見に有意差は認められなかった。疼痛スコアは、2 群間で有意差は認められなかった ( Table 2 )。

Table1；動脈塞栓術

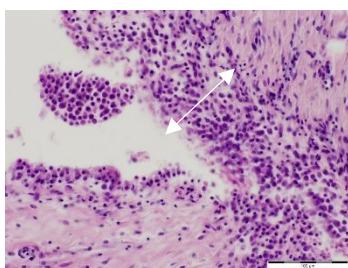
群	部位	前 (Day42)	直後 (Day42)	3日後 (Day45)	
		新生血管	新生血管の消失	親血管の再開通	新生血管の消失
IPM群①	右膝	+	+	+	+
IPM群①	左膝	+	+	+	+
IPM群②	右膝	+	+	+	+
IPM群②	左膝	+	+	+	+
IPM群③	右膝	+	+	+	+
IPM群③	左膝	+	+	+	+
RMG群①	右膝	+	+	+	+
RMG群①	左膝	+	+	+	+
RMG群②	右膝	+	+	+	+
RMG群②	左膝	+	+	+	+
RMG群③	右膝	+	+	+	+
RMG群③	左膝	+	+	+	+

Table 2; 疼痛スコアの比較

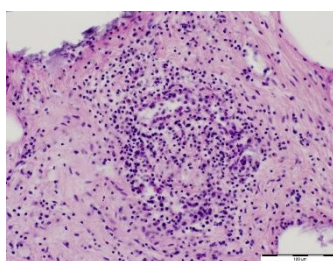


病理では、両群の 12 膝すべてに滑膜の肥厚 ( 図 3 ) や炎症細胞の浸潤 ( 図 4 ) などの滑膜炎の変化が認められた。両群とも、いずれの症例においても、滑膜内の脂肪壊死 ( 図 5 ) が所々に認められた。また、脂肪組織内には新生血管の増生 ( 図 6 ) が確認されたが、塞栓物質の同定はできなかった。

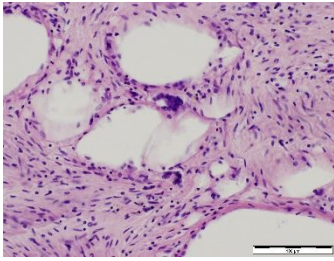
皮膚や筋肉の壊死、炎症性細胞浸潤の程度は両群ともになく、両群間に有意な差はなかった ( Table3 )。



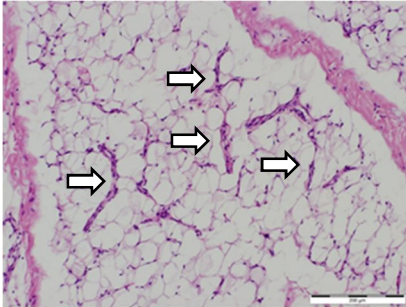
( 図 3.滑膜増殖 )



( 図 4.滑膜内の炎症細胞浸潤 ( 好中球とリンパ球 ) )



(図 5.滑膜内脂肪壊死)



(図 6.脂肪組織内の新生血管)

Table3;病理組織所見のまとめ

膝蓋骨周囲軟部組織	IPM群	RM-G群
異常血管の増生	+	+
炎症細胞浸潤	+	+
脂肪壊死	+	+
血管内塞栓物質	-	-

【考察】パパインは豚関節に注入したが、血管造影上は、膝蓋骨周囲のみに異常血管が生じた。今回の実験では、豚はケージ内での飼育のため、運動が困難であり、座位の時間がほとんどであったため、パパインが膝蓋骨周囲に偏在した可能性がある。

異常血管内に塞栓物質が同定できなかった理由は、塞栓 3 日後のと殺であり、IPM/CS、RMG それぞれ temporary[5-6]、24 時間程度[4]で溶解する塞栓物質であることが考えられる。

今回、異なる 2 種類の塞栓物質で慢性炎症に起因する異常血管の塞栓術を施行したが、血管造影、病理組織ともに、大きな差が認められなかった。このことより、RMG は、現在、臨床において、運動器カテーテル治療 (TAME) の塞栓物質として用いられているチエナムと同等の安全性、塞栓効果を有すると考えられる。

【Limitation】今回の実験では、2 種類の塞栓物質の粒子径が異なるため、塞栓レベルという点において、同様の塞栓効果があるのか不明である。また、動物愛護の観点や豚の成長を加味して長期的な慢性実験を計画できず、その評価がむずかしい。対象が豚であるため、今回使用した疼痛スコアが正しい疼痛評価であるのか不明である。

結語：パパインを用いたブタ膝関節炎モデルの作製に成功した。IPM/CS と RM-G の 2 群間で新生血管の塞栓効果と膝の組織障害に有意差はなかった。

【参考文献】

1. Ohberg L, Alfredson H. Ultrasound guided sclerosis of neovessels in painful chronic Achilles tendinosis: pilot study of a new treatment. *Br J Sports Med* 2002; 36:173-175.
2. Okuno Y, et al : Transcatheter arterial embolization using imipenem/cilastatin sodium for tendinopathy and enthesopathy refractory to nonsurgical management. *J Vasc Interv Radiol* 2013;24(6):787-92
3. 新井佐和子ら. パパイン関節内投与により誘発した豚脚弱症の臨床モデル. *日本養豚学会誌* 46; (4): 183-189, 2009.
4. Sanda H. et al. Synthesis of 24-h soluble gelatin sponge particles and their effect on liver necrosis following hepatic artery embolization: Results of in vitro and in vivo studies *Hepato Res* (2016) 46:337-344.
5. Aihara T. A Basic Study of Super-Selective Transcatheter Arterial Chemotherapy and Chemoembolization (1) -Establishment of an Animal Model for Superselective Transcatheter Arterial Chemotherapy and Preparation for Appropriate Suspension of Microembolization-. *Kawasaki Igakkaishi* (1999) 25(1):47-54
6. Okuno Y. *Okuno Y. CVIR* (2015) 38:336-343.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上裕敦文
2. 発表標題 豚膝関節炎モデルの作製および 新生血管に対する動脈塞栓術
3. 学会等名 第30回 和歌山Research and IVR conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上裕敦文
2. 発表標題 Transcatheter Arterial Embolization of Abnormal Neovessels in Arthritis Models of The Knee of Swine
3. 学会等名 第67回中部・第68回関西 Interventional Radiology研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上裕敦文
2. 発表標題 豚膝関節炎モデルの作製および 炎症血管に対する動脈塞栓術
3. 学会等名 第50回日本IVR学会総会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------