

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591644

研究課題名（和文）

組織工学による人工血管の生体内イメージングによる自己組織化機序の検討

研究課題名（英文）

The absorbable process of bioengineered graft assessed by in vivo imaging

研究代表者

小谷 順一（KOTANI JUNICHI）

独立行政法人 国立循環器病研究センター 心臓血管内科 医長

研究者番号：10448029

研究成果の概要（和文）：自己組織化人工血管における生体適合は、内腔面（血液成分）と周囲組織との接触により構築されることが示唆された。これらは内腔表面の色調及び平滑さ、そして外膜側からの血管新生によって評価される。現在臨床で使用されている血管内超音波法、光干渉断層像並びに血管内視鏡によりこれらの状態は観察可能であった。これは従来の剖検による組織診断に変わり、生体内での経時的な人工血管の状態を観察する新しい評価方法を示すものである。

研究成果の概要（英文）：The potent mechanism of bioabsorbable graft was considered two ways: contact between blood cells and luminal surface, and contact between adventitia and neighbor tissue. These were assessed by color, smoothing of the surface, and neovascularization outside the graft. The findings were observed by intravascular ultrasound, optical coherence tomography and angiography; those are used in clinical. Serial observation using imaging modality in vivo may become a new methodology instead of patho-histological assessment after scarified animal.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：血管内イメージング・循環器・自己組織化グラフト

1. 研究開始当初の背景
人工血管は現在あらゆる疾患に応用されており、今後もその素材はステントグラフトの

被覆素材などに応用される可能性から、長期の生体適合性などによる改良点が多い。一方、小児等成長の途上にある症例等においては、

(1) 長期の異物留置 (2) 成長に伴う血管径の変遷—等の観点から人工的な構造物の体内留置における自己組織化へ同化は古くから検討されている。ところがこのような体内に留置される構造物においては、その安全性や効果の評価に動物を用いた臨床及び剖検を経て評価が行われるが、臨床では経時的な組織学的評価を行うわけではない。臨床においてこのような血管治療の後は画像による診断が一般的であること、そして新しい改良に合わせ多くの動物実験が施行されている現状から、動物実験の段階から臨床応用が可能な生体観察が可能な機器による評価を行い、剖検と対比することによって、生体イメージングによる診断が今後の剖検の代用診断となるべく模索が研究の背景である。

2. 研究の目的

自己組織化人工血管留置後の病変部の形態を経時的に観察すること。これらの知見から OCT と内視鏡による結果の対比から臨床における画像診断と組織診断の関連を解明することで病理学的な標本サンプルを必要としない組織診断を模索する。本研究は将来的に臨床への応用を念頭に置き、現在日本で保険償還され使用可能な血管内視鏡・血管内超音波法(intravascular ultrasound: IVUS)・光干渉断層法(optical coherence tomography: OCT)を用いてその応用を模索する。

3. 研究の方法

自己組織化人工血管(PGA/PLLA sponge graft: J Thorac Cardiovasc Surg. 2004;128:472-479)をイヌ総頸動脈に外科的に吻合し、4-12 週のうちに血管内視鏡 (Vecmova NEO, Fiber Tech, Japan, Machida)・血管内超音波法(intravascular ultrasound: IVUS: AtrantisPro2, Boston

Scientific, USA, NJ)・光干渉断層法 (optical coherence tomography: OCT: (LightLab Imaging, Inc., Westford, Massachusetts)を用いて観察する。通常は、フォローアップ時における基本的な術後の観察は血管治療後の評価に則り X-線透視下でのシースイントロデューサー挿入とガイディングカテーテルを頸動脈近傍に留置してガイドワイヤーを先行させ、それぞれのイメージングを施行する手法であるが、これをより簡便にする目的で(1)カテーテル挿入部位と観察条件の検討を行いつつ(2)人工血管及びその周辺組織の観察を施行とそれに引き続くエバンスブルーに拠る生体染色とその評価—を行った。

(検討1) Blood access の確立と診断機器と至適血管径の模索:

大腿動脈からのアプローチと直接頸動脈近傍からのアプローチにつき、穿刺法と外科的な cut-down における観察の際について検討。さらに内視鏡や OCT といった血液遮断が必要な機器に対して、本来のバルーンバルーンに拠る閉塞と血管外からの血管遮断での比較検討を行う。具体的には、

- 観察に要する使用機器の改良
- 最小イントロデューサー径の模索
- blood access の成功率とその部位の検討
- 血液遮断の方法と画像への影響

につき検討した。

(検討2) 人工血管及びその周辺組織の観察:

OCT, 内視鏡, IVUS を用いて人工血管内部と遠位及び近位の対照血管部位を自動牽引器によって観察し、血管壁及び吻合部の性状(内腔面の色調と付着物・血管壁の構造)を評価した。エバンスブルー染色は濃度設定と薬剤滞留時間を検討した。具体的には、

- IVUS, OCT, 内視鏡による観察
- 吻合部とその周囲の色調の変化

- 人工血管の内腔の観察
 - 人工血管の周囲組織との連続性
 - エバンスブルー染色の応用の可能性
- を評価項目とした。

4. 研究成果

(検討1)

初例ではヒトにおけるカテーテル手技と同様の手法にて外科的に腸骨動脈を露出し、シースイントロデューサーを留置、X線透視下にガイドカテーテルを挿入してワイヤー操作を開始し、安定した観察を得た。本手法ではX線透視時間17分と造影剤100ccを必要とした。一方、新しいアプローチとして人工血管吻合の近位側で外科的に血管を露出させ、同部位からシースイントロデューサーを挿入して人工血管を観察する方法を試み、シースイントロデューサーを小径にすることが可能であった(6Frから5Frへのサイズ低下)。このことの応用は、病変近傍でのシースイントロデューサー挿入が得られる場合には直接的にカテーテルのみで観察を可能とした。しかし、血液遮断はブルドック鉗子・リボンのいずれを用いてもバルーン閉塞ほどの血流遮断効果は得られなかった。アプローチに関しては、病変部近傍の血管損傷と遠隔期開存が懸念されるが、遠い部位となるとX線透過システムや造影剤が必要となる。また、人工血管にX線不透過のマーカが存在しないために何処から人工血管であるのかが同定困難であった。

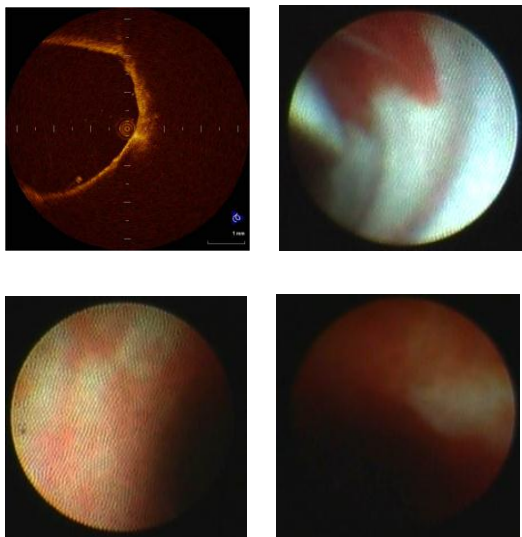
以上より、対照となる血管近傍の穿刺法を用いればX線照射及び造影剤は不要で、ガイドワイヤーをときに使用するという手法で対象部位の観察が可能である。その際には、5Fr(外径2mm)が担保されればカテーテル挿入は充分可能であった。本法の利点はX線照射と造影剤の使用が不要であるという点か

ら実験場所を選ばないということと、アプローチ部位から観察対象までの距離が短いということからガイドカテーテルが不要であるということであり、コスト・煩雑な操作の削減に加え、シースイントロデューサーを小径にすることが可能である(6Frから5Frへのサイズ低下; 外径2.3mm→2.0mm)。4Fr(外径1.67mm)の応用も現実的である。問題点としては、シースイントロデューサーは、複数回のカテーテルの出し入れの際に挿入部の拡大を防ぐことと出血を予防するという点で必須であると思われるが、刺入部から観察部位までにある程度の距離を取る必要がある。また、ヒトと異なりイヌ等四脚歩行動物における四肢からの安定した血管径の得られる穿刺と直接的な血管の走行の追及は穿刺部位が腹腔内に近くなり、止血も困難であることも考慮すると多くの症例では不向きであると思われる。

(検討2)

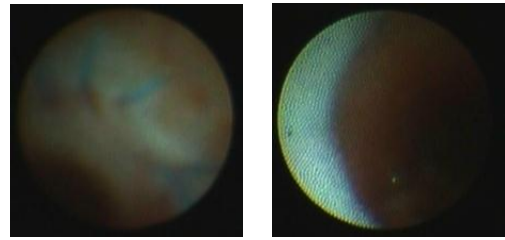
自己組織化人工血管のリモデリングは、開存の状況に大きく影響を受けた。再開塞や再狭窄をきたしていない人工血管は良好な張力を受け、良好な拍動を認め内腔は平滑で4.0mm以上の血管径を呈するが吻合部狭窄を有する例では内腔の血栓等の影響も含め内腔径は(<3.0mm)となる。今回はすべてのイメージング機器で、内腔の観察は可能であった。これは、直線的な頸動脈が対象であったからと思われる。しかし、画像の質に関しては開存の状態に拠る血管内径が評価機器の選択に大きく影響した。再開塞や再狭窄をきたしていない人工血管は良好な張力を有し血管外組織との関連はIVUSでしか評価ができなかった(40MhzのIVUSにおいても全周性の評価が可能であった)。今回用いた完全開存の人工血管は、血流再開

とともに張力を受け4.5mmほどの血管径を示し、IVUSにおける血管壁評価は生体内では石灰化に近い高輝度を示した。一方、以下に示すOCTや血管内視鏡にて観察を行った内腔の微細な変化はIVUSの解像度では評価不能であった。内腔径 (<3.0mm) となれば、より血管内視鏡とOCTが自己化の機序解明に有用であった。内腔の陽性所見はOCTでは内腔表面への付着物、血管内視鏡では網状の赤色血栓や内腔表面の白色斑状の島形成として認められた。これらは内皮細胞への分化能を持つ細胞集団である可能性が示唆されたが、画像診断上は血栓の域を超えない。



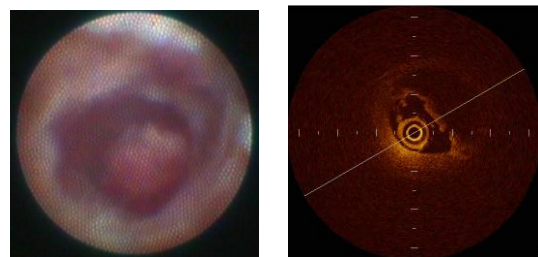
<図1：上段左(OCT)：2時及び6時に小さな付着物ありを認める。上段右(内視鏡)：内腔の平滑な人工血管内の壁在性血栓。下段左(内視鏡)：開存する人工血管の表面。下段右(内視鏡) 2-3時方向に斑状の白色隆起の部位を認める>

血管壁と内腔の評価には、OCTでの評価が期待されるが、大口径においては全周性の観察は困難である。内視鏡では内腔面の色調の変化は観察時期と開存の程度により、大きく異なることを示した。



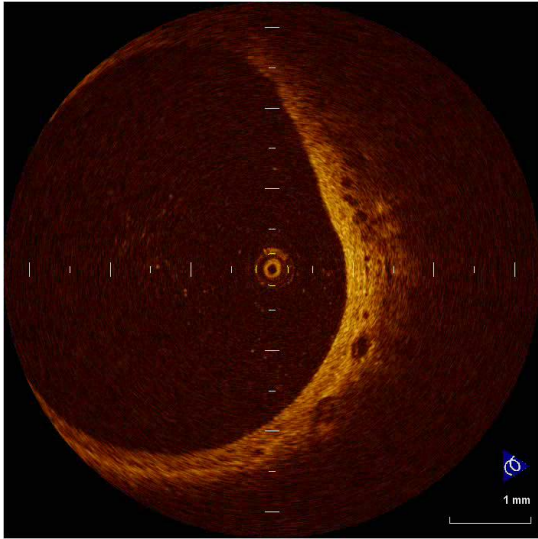
<図2：内視鏡所見；左は良好な開存を呈した症例。縫合糸が確認される。手前側方向は人工血管（術後3週）。右は、高度狭窄を呈した症例。手前側白色が固有動脈で、遠位が人工血管（術後4週）>

狭窄・閉塞例では混合血栓が多量に堆積し、開存部においても赤色の壁在血栓が確認されることがあった。



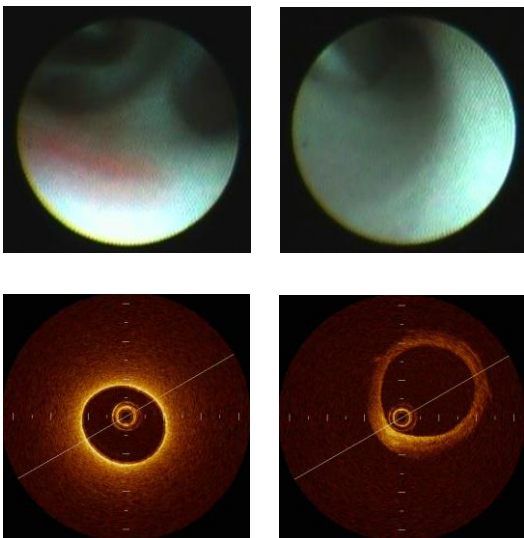
<図3：左：亜完全閉塞を呈した人工血管の内視鏡所見。右はOCTの所見（術後3週）>

OCTによる自己血管へ同化所見（弾性板の同定等）では、2つの大きな所見が得られた。一つは断層面における層状構造と血管周囲の微細腺管構造である。超遠隔期であれば3層構造などの評価も可能かもしれない。またIVUSにおいて単に高輝度の所見を呈した人工血管の断層面は、OCTによってより詳細に評価が可能であった。図4に示す如く、良好な内腔開大と平滑な内腔面を呈した生着例では血管周囲に新生血管が確認された。これはvasa vasorumに相当すると考えられ、開存 - 生着例のきわめて重要な所見と考えられる。



<図4：OCT像；良好な開存を示す人工血管。周囲組織との境界を中心に新生血管の増生が見られる。周囲組織に対する自己化は画像上得られている（術後12週）>

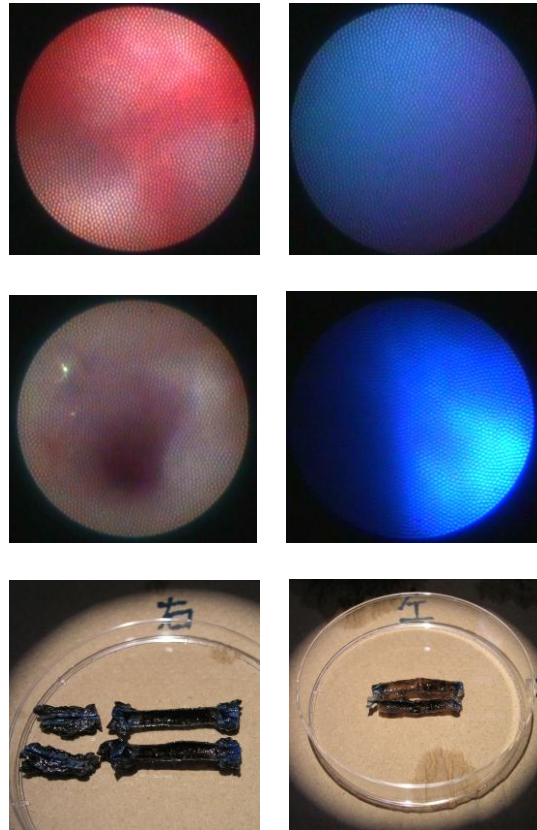
一方、血管内視鏡による内腔面の評価から自己化は血管壁全層に渡らずとも内腔面からも進行してゆく可能性が示唆された（図5）。



<図5：内視鏡像とOCT像：左は固有動脈（遠位側）で右は人工血管（近位側）の部位。人工血管周囲に多量の滲出液の存在（術後4週）>

エバンスブルー染色は、ヒトで用いられ

た2%-1ml溶液を用いたが、60秒・30秒の血流遮断法を用いた。ヒトでの検討にあった30秒でも染色力は強すぎる印象があった。可視光内視鏡の網状の赤血球の壁在血栓に一致して染色陽性所見があり、フィブリンの存在を示すものと思われるが、染色時間等に関してはさらなる検討が必要と思われる（図5）。



<図6：上段；大口径における開存例；2%-1mエバンスブルー60秒染色（術後3週）。中段；白色血栓による中等後狭窄病変；30秒染色（術後3週）。下段左60秒染色、右30秒染色>

以上よりOCTによる管腔の全周性評価は血管径に依存するため完全とは言えないが、局所における人工血管の自己化に関わるメカニズム解明が期待される。内視鏡及びエバンスブルー染色による内膜面の細胞構成の判定は、現実的な手法となりうることを示唆された。

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 1 件)

1. Jun-ichi Kotani, Assessment of intracoronary stents by coronary angioscopy, *Cardiology International*, 2010, 113-116.

[学会発表] (計 1 件)

1. Jun-ichi Kotani, Update on Coronary Angioscopy (血管内視鏡の最先端), The 3rd left main and coronary bifurcation summit, Nanjin, China (中国・南京), 2010/11/26.

[図書] (計 1 件)

1. 小谷順一、血管内視鏡最新診療ガイド、Medical View 社 (東京)、2011、189.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷順一 (Kotani Junishi)
国立循環器病研究センター・心臓血管内科・医長
研究者番号：10448029

(2) 研究分担者

斎藤充弘 (Saito Mitsuhiro)
大阪大学医学部附属病院 特任助教
研究者番号：20448038
(2010年：連携研究者)