術後内膜肥厚研究のための動物実験モデル

山村 光弘 八百 英樹 宮本 巍

要 旨: 今回われわれは, ラット腹壁静脈グラフトを大腿動脈にinterpositionした動物実験モデルにおけるグラフト内腔断面積および内腔断面積/血管断面積比を比較検討した。ラットinterposition vein graftモデルは, 顕微鏡下手術にて雄Lewisラット(484±7g)の右大腿動脈に腹壁静脈グラフトを端々吻合して作成した。手術前, 術直後, 術後2週目,4週目に腹壁静脈グラフトを採取した(An=5)。グラフト内腔断面積および内腔断面積/血管断面積比は,手術前の0.04±0.01mm²および 0.23±0.04から, 術直後は0.23±0.04 mm²および1.59±0.28に拡大した(p<0.01)。さらに術後2週目には0.41±0.10 mm²および1.83±0.48まで拡大する傾向にあった。しかし術後4週目には0.15±0.03 mm(p<0.05)および0.20±0.04と縮小した(p<0.001)。ラット腹壁静脈グラフトは術後2週目に動脈 化を, 術後4週目には術後内膜肥厚による狭窄を示した。今回の研究からも, このラットinterposition vein graftモデルは術後内膜肥厚の成因解明により有用であると思われる。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 755-759)

Key words: Vein Graft, Arterialization, Postoperative intimal hyperplasia, Vascular remodeling

序 言

これまで血管内膜肥厚の研究には,血管バルーン障 害によるウサギやイヌの動物モデルが多用されてき た。血管外科学においても,静脈グラフトの術後内膜 肥厚による閉塞は重要な問題である。そこで術後内膜 肥厚に対する詳細な分子生物学的研究を進めるには, ウサギやイヌよりもすでに遺伝子レベルの解析が進ん でいるラットに対し,実際に血管吻合した動物実験モ デルが必要である。われわれは,顕微鏡下でラットの 腹壁静脈グラフトを右大腿動脈にinterposition bypassし た動物実験モデルを第6回アジア心臓血管外科学会 (1998年,東京)で発表して以来,術後内膜肥厚の成因 解明および抑制のための研究に用いている¹⁾。今回, このラットinterposition vein graftモデルにおけるグラフ ト内腔断面積および内腔断面積/血管断面積比を測定 し,比較検討した。

方 法

1) ラットinterposition vein graftモデルの作成¹⁻⁴⁾ Lewisラット(雄,平均体重484±7g)に対し,手術顕

兵庫医科大学胸部外科

THE JOURNAL of JAPANESE COLLEGE of ANGIOLOGY Vol. 43 No. 12

微鏡 Olympus社,耳鼻科・脳外科手術用顕微鏡OME-J&N J73507[®])を使用し,約30倍視野下にまず同側の腹 壁静脈グラフトを採取した。次に右総大腿動脈に10-0 ナイロン糸(ELP社,黒ナイロン10-0,長さ20cm, WM4-10-0N2[®])を用い,7針前後の結節縫合にて静脈グ ラフトを端々吻合した。術後グラフトの開存確認に は,静脈グラフトの拍動およびその末梢の右総大腿動 脈への血流を視覚的に確認することで行った³)。

2 静脈グラフト内腔断面積および内腔断面積/血管断 面積比

静脈グラフト材料は,腹壁静脈グラフトを採取した のみのグラフトを「手術前」とし,前記1)の顕微鏡下手 術を施行し,その吻合終了後にグラフトの開存確認で きたグラフトを「術直後」とし,さらに術後2週目およ び術後4週目に開存を確認できた静脈グラフトをそれ ぞれ採取し,「術後2週目」および「術後4週目」とした (各n=5)。静脈グラフト採取時には5%へパリン加生 理食塩水にて凝血塊を除去してから,ホルマリン固定 し5μmの切片を作成,HE染色とElastica-van Gieson's 染色を行った。コンピューター画像処理(Adobe

2002年10月25日受付 2003年7月29日受理



Figure 1 Rat Vein Grafts stained with Elastica-van Gieson's (Original magnification X15, A: before bypass, B: 0 hour, C: 2 weeks, D: 4 weeks). Arrows show the internal elastic lamina

PhotoshopTM Ver. 3.0J Power Macintosh[®] 9500/120)で取 り込み, さらにコンピューター分析(NIH Image Ver. 1.61)により, 縫合糸の部分を除いた吻合中枢側の静脈 グラフト内腔断面積および内腔断面積/血管断面積比を 測定した。また数値は平均値±標準誤差で示し,統計 処理にはunpaired t-test(Stat View J-4.5 for Macintosh)を 用い, p<0.05を有意差ありと判定した。なお実験は Guide for the Care and Use of Laboratory Animal, Washington DQ(1996)に基き,愛護的に行った。

結 果

1 静脈グラフトのElastica-van Gieson's染色像

平均吻合時間は70±2分,初期開存率は88%であった。Fig.1に手術前A),術直後B),術後2週目(C)および術後4週目(D)のElastica-van Gieson's染色による静脈グラフトの断面像を示す(図中矢印は内弾性板)。術直後(Fig.1B)のグラフト内腔は手術前(Fig.1A)に比べ拡大し,術後2週目(Fig.1C)ではさらに拡大していたが,術後4週目のグラフト内腔(Fig.1D)は,矢印の内弾性板より内側の術後内膜肥厚の形成とともに縮小した。

2 静脈グラフト内腔断面積および内腔断面積/血管断 面積比

平均グラフト内腔断面積は,手術前(Fig. 2 before)の 0.04±0.01mm²から,術直後(Fig. 2 0h)の0.23±0.04mm² に拡大した(*p*<0.01)。さらに平均グラフト内腔断面積 は,術後2週目(Fig. 2 2W)の0.41±0.10mm²まで拡大す る傾向にあったが(*p*=0.15),術後4週目(Fig. 2 4W)に は0.15±0.03mm²と, 術直後に比べ縮小した(p<0.05)。

同様に内腔断面積/血管断面積比は,手術前(Fig.3 before)の0.23±0.04から,術直後(Fig.3 0h)には 1.59±0.28に拡大した(p<0.01)。さらに内腔断面積/血管 断面積比は,術後2週目(Fig.32W)は1.83±0.48で, 有意差はなかった(p=0.64)。しかし術後4週目(Fig.3 4W)には0.20±0.04と,術直後に比べ同じく縮小した (p<0.001)。

考案

1)歴史的背景と手技の工夫

1971年Grondinらは,術後内膜肥厚がACバイパス術 後遠隔期に静脈グラフトが閉塞する原因であることを 指摘した⁵)。このラットinterposition vein graftモデル は,1991年に米国のHirschとKarnovskyが考案したもの を⁶⁾,1994年に同じく米国のJohn R. Hochらが術後内膜 肥厚の研究に応用したものである⁷⁾。

しかしながら当初の手術手技は顕微鏡下手術を要す るため,修熟した血管外科医でさえ難しいものであっ た。そこでFig.4(数字は吻合の順番)に示したように, 手技の若干の工夫を加え,若手の血管外科医にもでき るよう簡素化させた¹⁾。その改良点は,支持糸はかけ やすいよう不均等にした事と,血管後壁を引っかけな いよう最後から2番目の結紮は最後の1針を通してか らする事である。

具体的には,まず支持糸は10時(Fig.4右上の1)と2 時(Fig.4右上の2)の方向にかける。次にその間は2針 (Fig.4右上の3*,4)かけて片面の吻合を終了し,引っ くり返してから逆面は間に3針(Fig.4右上の5,6*,



Figure 2 Luminal Area, before & after bypass (0 hour, 2 & 4 weeks).

7 かけ,合計7 針の結節縫合を行うようにする。さら に臨床の血管外科吻合時に行っているように,Fig.4の 3*と6*は次の4や7の針を血管壁に通してから結紮 することで,最後の血管吻合時に血管後壁を引っかけ 血管閉塞しないようにした。

これまで血管外科学においても、静脈グラフトの術 後内膜肥厚の研究には、実際に血管吻合を施行するの が困難なゆえに、ウサギやイヌの動物モデルが多用さ れてきた。さらに詳細な分子生物学的研究を進めるに は、ウサギやイヌよりもすでに遺伝子レベルの解析が 進んでいる、可能ならばマウス、少なくともラットに 対し、実際に血管吻合した動物実験モデルが必要であ ろう。またウサギやイヌに比べ、ラットは購入費や飼 育代も安価で入手しやすい利点もある。さらにこの ラットinterposition vein graftモデルは開腹を必要としな いのも利点である。試したい薬物を腹腔内投与でき、 血管に手術以外のいかなる侵襲を加えることなく実験 ができる。

以上より,われわれは術後内膜肥厚の研究に,文頭 で述べたように,このラットinterposition vein graftモデ ルをすでに1998年より用いている¹⁾。

2) 術後内膜肥厚の成因解明

動脈硬化では,1993年のRossの障害反応仮説response-to-injury hypothesisはあまりにも有名である⁸)。 さらに1999年にRossは,動脈硬化と他の慢性炎症疾患 の類似性を強調している⁹)。われわれは,このラット interposition vein graftモデルを用いて,Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)⁹およびMonocyte Chemoattractant Protein-1(MCP-1)の経時的変化を解明し⁴⁾,術後内膜肥厚 においても炎症疾患との類似性を強調した⁴⁾。さら





Figure 3 Luminal Area/Vessel Area, before & after bypass (0 hour, 2 & 4 weeks).





 Figure 4
 Sutures for Interposition Vein Graft
 A

 A: Above: Standard vs Yamamura's.
 B

 B: Below: Operative View.
 B

 * are tied after next needles are done, in order to avoid picking back vessel wall.
 B

に,TNF-α産生阻害剤投与が術後内膜肥厚抑制に有効 であるとの知見を得ている³⁾。

3 静脈グラフト動脈化から術後内膜肥厚へ 前述の術後内膜肥厚の比較検討では,内膜断面積ま

December 25, 2003

たは内膜断面積/血管断面積比を用いてきた²⁻³。しか し臨床では,術後内膜肥厚による静脈グラフトの狭窄 は,血管造影検査における血管内腔の狭窄度で表わさ れるので,今回このラットinterposition vein graftモデル が臨床的に合致するものか否かについて,グラフト内 腔断面積から再検討を行った。今回の検討によって, 術直後および術後2週目にラット腹壁静脈グラフトは 『動脈化』を示し,術後4週目に『術後内膜肥厚』による 内腔の縮小を示しているのであろうと考えられた。

次に方法論的にラット腹壁静脈グラフトの固定差を 解消し,このラット腹壁静脈グラフトの『動脈化』を明 確にするため,内腔断面積/血管断面積比を算出してみ た。これまでの多くの脈管学者のように,動脈硬化の 評価にはその分母に中膜面積をもってくるのが常道で ある。しかし組織学的に静脈は外弾性板の発達が悪い ため, Fig. 1のようにElastica-van Gieson's染色において も中膜がはっきりぜず,中膜面積の確定は困難であ る。よって,静脈グラフトにおける評価には血管断面 積を分母として代用し,内腔断面積/血管断面積比で評 価することにした。もしラット腹壁静脈グラフトの動 脈化』が維持されるなら,血管remodelingの立場から, 血液流量および血圧に従い内腔断面積は増加し,その 血圧維持のため血管断面積も増加するので,内腔断面 積/血管断面積比はほとんど変わらないであろうとの仮 説を立てた。また逆に術後内膜肥厚が起これば,その 内腔断面積は減少し、術後内膜肥厚を含む血管断面積 は増加するので,内腔断面積/血管断面積比は減少する のであろうとの仮説も想定した。

今回の検討において,内腔断面積/血管断面積比は, 手術前に比べ術直後には統計学的に有意に増加し (p<0.01),術後2週目は術直後とほとんど変わりなく (p=0.64),術後4週目は術直後と比べ統計学的に有意 に減少した(p<0.001)。術直後の内腔断面積/血管断面積 比の決定には,常識的に前記の血液流量および血圧の 増大にともなう内腔断面積の増加によるところが大き いと思われる。さらにわれわれは,このラットinterposition vein graftモデルを用いた血清MCP-1の経時的変化 において,すでにこの術直後から血清MCP-1の増加す ることを確認しており⁴⁾,術直後から血液流量および 血圧の増大による血管内皮細胞に対するshear stressの影 響が出ていると考えている。つまり,このラット腹壁 静脈グラフトは術直後から『動脈化』の兆しがあり,術 後2週目には『動脈化』を示し,術後4週目に『術後内 膜肥厚』による内腔の縮小を示していると思われた。

今後の課題は、ラットinterposition vein graftモデルを 用いた動脈化から術後内膜肥厚に向かう機序の解明 と、ラット腹壁静脈グラフトの術後2週目および術後 4週目が臨床的にはいつに相当するのかという問題で あろう。

結 語

今回の研究から,ラットinterposition vein graftモデル は術後内膜肥厚の成因解明に有用であると思われる。 今後,他施設においてもこの実験モデルが術後内膜肥 厚の研究に活用されることを期待する。

謝 辞

本論文を終えるにあたり御協力頂いた,本学動物実験施設 佐藤浩治氏,病院病理部 針山良二氏,共同研究施設久保博嗣氏,八木正人氏に深謝いたします。また動物実験 モデル作成などに御指導頂いた米国Wisconsin州立大学血管 外科 John R. Hoch準教授にも深謝いたします。

なお,本論文の要旨は,第102回日本外科学会定期学術集 会(2002年4月12日,京都)において発表した。

文 献

- Yamamura M, Hoch JR, Stark VK et al: The animal model of intimal hyperplasia after vein graft operation. The 6th Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular Surgery, Program and Abstract, 1998, 114.
- Yamamura M, Miyamoto T, Hoch JR: Tumor necrosis factor-α expression in rat models of intimal hyperplasia. Int J Angiol, 2001, 10: 77-79.
- 3)山村光弘,宮本 巍,八百英樹:ラットinterposition vein graftにおけるTNF-α産生阻害剤FR-167653の術後 内膜肥厚抑制効果について.日心外会誌,2002,31: 173-176.
- 4)Yamamura M, Miyamoto T, Yao H: Serum Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels in Rat Models of intimal hyperplasia. Int J Angiol, 2002, 11: 80-82.
- 5)Grondin CM, Campeau L, Lesperance J et al: Comparison of late change in internal mammary artery and saphenous vein grafts in two consecutive series of patients 10 years after operation. Circulation, 1984, **70** (Suppl. I): 208-212.
- 6 Hirsch GM, Karnovsky MJ: Inhibition of vein graft intimal

proliferative lesions in rat by heparin. Am J Pathol, 1991, **139**: 581-587.

- 7)Hoch JR, Stark VK Hullet DA et al: Vein graft intimal hyperplasia: Leukocytes and cytokine gene expression. Surgery, 1994, 116: 463-471.
- 8 Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature, 1993, 362 (29): 801-809.
- 9 Ross R:Atherosclerosis–an inflammatory disease. N Eng J Med, 1999, 340: 115-126.

Animal Model for Experimental Study of Postoperative Intimal Hyperplasia

Mitsuhiro Yamamura, Hideki Yao, and Takashi Miyamoto

Department of Cardiovascular Surgery, Hyogo College of Medicine

Key words: Vein Graft, Arterialization, Postoperative intimal hyperplasia, Vascular remodeling

In order to study the development of postoperative vein graft intimal hyperplasia, we re-estimate the rat epigastric vein interposition graft model from the perspective of vascular remodeling. In 20 male Lewis rats (484 ± 7 gm) we interposed epigastric vein grafts into the right common femoral arteries. Each luminal area and luminal area/vessel area(L/V) were measured before & after bypass (0 hour, 2 weeks & 4 weeks). The mean luminal area and L/V significantly increased at 0 hour (p<0.01) and 2 weeks (p<0.01), compared to those before bypass. However, at 4 weeks the mean luminal area decreased (p<0.05) and L/V also significantly decreased (p<0.001).

These results show that the process of vein graft arterialization with the development of postoperative intimal hyperplasia leads to significant loss of luminal areas. These results also indicate that the rat epigastric interposition vein graft model is an excellent experimental animal model to study vascular remodeling.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 755-759)