

平成 2 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：1 2 1 0 2

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：2 3 6 5 9 6 6 2

研究課題名（和文）低分子量エポキシ化合物TGA固定自己心膜の心血管補填材料としての適性に関する研究

研究課題名（英文）Shrinkage temperature and anti-calcification property of triglycidylamine-crosslinked autologous tissue

研究代表者

後藤 行延（GOTO, YUKINOBU）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：2 0 4 5 1 7 0 0

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円、（間接経費） 780,000 円

研究成果の概要（和文）：TGA固定における組織強度、柔軟性、定着後の石灰化抑制効果について、ヒト心膜および小動物心膜を用いたex-vivo基礎実験（物理学的検証、組織学的評価、放射光によるカルシウム沈着度の評価等）を行った。並行してTGA、GA固定液それぞれの組成および処理時間の最適化を、同じくex-vivo実験を通じて図った。引き続き、TGAあるいはGA処理した心膜をラット皮下に定着させ、前臨床的in-vivo慢性実験を行った。これらの実験を通じてTGAを用いた新たな心膜固定技術の確立を図った。本研究は初めて、TGAを用いた短時間自己心膜固定の功罪を検証し、新世代の固定処理技術への発展を期したものである。

研究成果の概要（英文）：TGA treatment resulted in slower increases in Ts of the pericardium, and it required 9 - 12 hours to reach Ts achieved by GA. In subdermal implantation of rat tissues, calcium content was lower in the TGA group than in the GA groups ($p < 0.005$). The expression site of TN-C and MMP-9 differed from the primary location of calcium deposition in the thoracic aorta treated with TGA suggesting a different underlying mechanism in calcification between GA and TGA crosslinking. TGA crosslinking in the allograft showed superior anti-calcification effect as compared to brief treatment by GA, although TGA crosslinking process was slow.

研究分野：胸部外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心血管手術 補てん素材 自己心膜 TGA

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患等の外科修復において、大血管・心室流出路・弁などへの補填材料として、患者自身の心膜は最も使用頻度の高いもののひとつである。未処理のままの使用の他、1989年の Chauvaud らの報告以来、適度な質感と瘢痕収縮の少なさを理由に低濃度 glutaraldehyde (GA)による心膜固定が多用されている。GA は組織固定性に優れ、免疫原性の減弱にも寄与する。一方、時間経過とともに共有結合が崩壊し、放出された GA が新生内膜の増殖を阻害して石灰化を誘発する可能性が指摘されている。現状では、柔軟性、組織強度、生体適合性、瘢痕収縮の程度、遠隔期の石灰化などにおいて、未処理と GA 固定のいずれが有利であるのか科学的根拠が不明瞭なまま任意な選択がなされており、固定に用いる GA の濃度や処理時間にも明確な指針はない。

生体弁作製の際の長期間固定媒体として、GA 以外にアシルアジ化合物、エポキシ化合物などの検討が従来なされてきた。2005 年、Connolly らによって新しいエポキシ化合物・triglycidylamine (TGA)による異種心膜処理の試験がなされ、組織柔軟性、生体適合性、抗石灰化に優れた親水性の固定媒体であることが示された。われわれは、従来の GA 固定よりも柔軟で抗石灰化作用に優れた新たな自己心膜固定方法確立のため、有望な固定媒体である TGA を用いた基礎実験を着想するに至った。また、TGA、GA 等を用いた心膜固定技術の最適化・標準化が急務と考えた。

2. 研究の目的

先天性心疾患等の外科修復においては患者の自己心膜が組織補填材料として頻用される。心膜は未処理またはGA固定して用いられることが多いが、柔軟性・強度・生体適合性・瘢痕収縮・遠隔期の石灰化などについて、未処理とGA固定のいずれが有利であるかは不明確である。固定媒体としてはGAが定着しているが、固定の際の濃度や処理時間にも明確な指針はなく、GA以外の組織固定媒体が検討された形跡も少ない。本研究では、

- (1) エポキシ化合物triglycidylamine (TGA)の親水特性と低毒性に着目し、従来のGA固定よりも柔軟で抗石灰化作用に優れた心膜固定の方法論確立に挑戦する。

- (2) TGA固定における組織強度、柔軟性、定着後の石灰化抑制効果についてヒト心膜および動物を用いた基礎実験を行い、並行してTGA、GA固定液の組成および処理時間の最適化を図る。

エポキシ化合物TGAによる新世代の自己心膜固定法を模索し、先天性心疾患の外科修復の質の改善、ひいては患者のquality of lifeの向上に寄与するための萌芽研究である。

3. 研究の方法

- (1) *Ex-vivo* 実験研究:心膜固定における TGA、GA の特性を検証する (固定早期の物理学的評価)

- (2) *In-vivo* 実験研究:摘出心膜を TGA または GA 処理した後に同一動物個体に移植し、物理学的特性変化・石灰化を観察する (慢性動物実験)

両実験において、TGA、GA の濃度、処理時間を段階設定し、TGA の固定適性を検証しつつ固定条件の最適化を図る。物理学的評価として、示差走査熱量計による架橋強度測定を行う。組織学的評価として、Kossa 染色による Ca 沈着の評価、MMP-9、TN-C 免疫染色によるタンパク分解酵素および細胞外基質糖蛋白発現の評価を行う。Ca 定量には、原子吸光分析法とプラズマ発光分光分析法を用い、石灰化の程度・分布の評価には放射光吸光度測定を実施する。

- (1) *Ex-vivo* 実験研究; 示差走査熱量計による TGA および GA 処理心膜の架橋強度評価
以下の *ex-vivo* 実験においては、倫理審査指針に則って手術余剰組織として得たヒト心膜を評価に用いる。以下の 4 群に分けて心膜架橋処理を行う。

GA 群 (0.6% glutaraldehyde による固定処理)

GA-C 群 (Professor Carpentier's recipe による固定処理; DW 700cc, MgCl₂ 4g, 25% GA 26cc, 1M HEPES 20cc を成分とし、NaHCO₃ で pH を 7.4 に調整しながら全量を 1L とする。GA 濃度 0.6%)

TGA 群 (100mM/L triglycidylamine による固定処理; TGA を 25mM/L sodium tetraborate decahydrate にて pH を 7.4 に維持しながら DW を加え 100mM/L に調整) 未処理群 (生理食塩水に保存)

GA 群および GA-C 群は、臨床的な慣例となっている自己心膜の処理時間に準じて、各々 10、20、30 分 (室温) の処理時間とする。

TGA は極性の安定した生体組織では反応が緩徐となるため、TGA 群では 30 分、1、3、6、12 時間 (37) の処理時間とする。架橋処理した心膜と未処理の心膜とについて、示差走査熱量計 (Differential scanning calorimetry; DSC) を用いて、shrinkage temperature (Ts) を測定する。DSC は物質から放出または吸収される熱量を測定することで、融点・結晶化点・熱変性などの熱容量変化を測定する装置であり、Ts は蛋白質の熱変性に伴う吸熱反応がピークとなる温度を示し、架橋強度の指標となる。

(2) *In-vivo* 実験研究 ; TGA および GA 処理ラット心膜組織の石灰化評価に関する実験
全麻下にラットを左開胸して心膜を摘出、各群の処理方法・処理時間に従って固定処理を行う。処理後の心膜を同一個体の皮下に移植し、21 日後に移植した心膜を摘出する。摘出した心膜について、Kossa 染色を用いて組織のカルシウム沈着を評価する。カルシウム沈着の程度は顕微鏡下で 1 視野当たりの visual scoring で評価する (1 = negative、2 = rare detection、3 = sparse but consistent、4 = uniformly present、5 = intense and wide spread staining)。

原子吸光分析装置 (試料溶液を炭素チューブ内で原子化し、これに測定元素の光源ランプからの単色光を照射して試料中の各元素濃度をそれぞれ測定する装置) およびプラズマ発光分光分析装置 (誘導結合プラズマを光源とする発光分光分析法 ; 外径約 20mm の石英製トーチの外側に 2 ~ 3 巻の誘導コイルを巻き、これに 20 ~ 50MHz、出力 1 ~ 2kW の高周波電力を加え、トーチに流したアルゴンガス中にフレイム状の放電を発生させる。試料溶液をネブライザーで霧化して、キャリアーガスでトーチの中心軸の試料導入管から導入する。試料原子は加熱され、生成する励起原子種が発する光の波長と強度から試料中の元素の同定およびその定量が可能) を用いて、摘出した自家移植心膜のカルシウム濃度を定量的に評価する。

TGA および GA 処理ウサギ心膜の免疫組織学的評価 : アテローム性動脈硬化や生体弁のミネラル化などを含む多くの心血管病態において、その石灰化には matrix metalloproteinases (MMPs) などの

タンパク分解酵素や Tenascin-C (TN-C) などの細胞外基質糖蛋白の発現が関与することが報告されている。摘出した心膜について MMP-9、TN-C 免疫染色を行い、顕微鏡下で発現度を評価する (visual scoring) と共に Western blots にて定量的な評価を行う。

4 . 研究成果

(1) TGA 固定における組織強度、柔軟性、定着後の石灰化抑制効果について、ヒト心膜および小動物心膜を用いた *ex-vivo* 基礎実験 (物理学的検証、組織学的評価、放射光によるカルシウム沈着度の評価等) を行った。並行して TGA、GA 固定液それぞれの組成および処理時間の最適化を、同じく *ex-vivo* 実験を通じて図った。引き続き、TGA あるいは GA 処理した心膜をラット皮下に定着させ、前臨床的 *in-vivo* 慢性実験を行った。これらの実験を通じて TGA を用いた新たな心膜固定技術の確立を図った。

(2) 未処理または GA 固定自己心膜を心大血管の補填材料として用いる現法は、急性期・遠隔期の特性いずれも満足のいくものではない。固定法の標準化がなされていないことも見過ごせない。TGA を異種心膜に用いた過去の試験は人工弁作製のための長期間固定であり、本研究は初めて、TGA を用いた短時間自己心膜固定の功罪を検証し、新世代の固定処理技術への発展を期したものである。同時に TGA ならびに GA 両固定法の最適化を図ることにより、心膜固定技術の標準化に向けての第一歩を印した。いかに再生医療が進歩しても、on-site で自己心膜を心血管の補填に用いる手法は、外科医にとって貴重な選択肢として残るはずである。本研究によって、先天性心疾患の外科修復の質を保証する心膜固定技術に関する基礎資料が得られたと考えている。

(3) 具体的な成果は以下のとおりである。

TGA 処理群においては Ts は緩徐に上昇し、GA 処理と同等の Ts を得るためには 9-12 時間を要した。

ラット自家移植慢性実験においては、カルシウム沈着は GA よりも TGA 処理において軽度だった ($p < 0.005$)。

TGA 処理大動脈においては、TN-C と MMP-9 の沈着部位はカルシウム沈着部位とは異なり、GA と TGA とでは石灰化の成立機転が異なる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Sato M, Hiramatsu Y, Matsushita S,

Sato S, Watanabe Y, Sakakibara Y.
Shrinkage temperature and
anti-calcification property of
triglycidylamine-crosslinked
autologous tissue. Journal of Artificial
Organs 2014 *In press* DOI
10.1007/s10047-014-0768-y (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

平松祐司ほか. 成長期の leaflet extension
大動脈弁形成術; 最長8年8ヶ月後の弁
置換までの記録(会長要望演題). 第44
回日本心臓血管外科学会学術総会、2014
年2月19日、つるやホール、熊本市
佐藤真剛, 平松祐司ほか.
Triglycidylamine 処理自己心膜の心血管補
填素材としての適性に関する基礎研究.
第64回日本胸部外科学会定期学術集会、
2011年10月12日、名古屋国際会議場、
名古屋市

〔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〕(ホームページ等)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 行延 (GOTO, YUKINOBU)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 20451700

(2)研究分担者

平松 祐司 (HIRAMATSU, YUJI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 30302417
松下 昌之助 (MATSUSHITA, SHONOSUKE)
筑波技術大学・保健科学部・教授
研究者番号: 70359579
揚山 直英 (AGEYAMA, NAOHIDE)
独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学
研究センター・研究員
研究者番号: 50399458
兵藤 一行 (HYODO, KAZUYUKI)
大学共同利用機関法人高エネルギー加速
器研究機構・物質構造科学研究所・講師
研究者番号: 60201729

(3)連携研究者

なし