

氏名（本籍）	佐藤 真剛（茨城県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7149 号		
学位授与年月	平成26年10月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Shrinkage temperature and anti-calcification property of triglycidylamine-crosslinked autologous tissue (自己組織のトリグリシジルアミンによる架橋処理後の組織強度と抗石灰化効果についての検討)		
主査	筑波大学教授	医学博士	長田 道夫
副査	筑波大学教授	博士（医学）	堀米 仁志
副査	筑波大学講師	博士（医学）	大川 敬子
副査	筑波大学講師	博士（医学）	後藤 行延

論文の内容の要旨

(目的)

自己心膜は流出路形成や弁形成術など心臓外科修復の際の形成補填材料として広く用いられている。そのうち、グルタルアルデヒド(GA)は、長期的には石灰化による狭窄症や閉鎖不全を起こす。トリグリシジルアミン(TGA)は生体材料の架橋処理媒体開発されたエポキシ化合物であり、工業用エポキシ化合物に比べ低分子量で、異種心膜の架橋処理に優れた抗石灰化効果を持つ。本研究は、TGAを用いた架橋処理効果について、組織強度と抗石灰化効果を検討した。またGA自体の石灰化への影響について、純粋なGA溶液とCarpentier医師が推奨するGA溶液の2つの処理方法での比較を行った。

(対象と方法)

実験 I：ヒト心膜架橋処理後の強度測定。架橋処理方法によって次の4群に分けた。

- ① GA群：0.6%GA(8%GAを蒸留水で希釈し0.6%とした)
- ② GA-C群：Carpentier's recipeに準じて生成；DW 700cc・MgCl₂ 4g・25%GA 26cc・1M HEPES 20ccを成分とし、NaHCO₃を使用してpHを7.4に維持。(GA濃度0.6%)
- ③ TGA群：100mM/LのTGAをホウ酸マンニトールbufferにてpHを7.4に維持しながら蒸留水を加えて生成
- ④ Control群：未処理のヒト心膜組織

各処理による心膜の強度を比較するため、示差走査熱量計を用いて、架橋処理組織の強度の指標として使用されている Shrinkage temperature(Ts)の測定を行った。GA群、GA-C群では実際使用されている方法に準じて10分、20分、30分で架橋処理を行い、TGA群では1時間、3時間、6時間、9時間、12時間で架橋処理を行い、Tsを測定した。

実験Ⅱ：ラットへの皮下移植実験での抗石灰化効果および組織化学的評価

未処理の Control 群を未処理のラット心膜、胸部大動脈とし、架橋処理は実験Ⅰの①～③と同じ溶液で架橋処理を行った後、組織カルシウム濃度測定とコッサ染色、matrix metalloproteinase-9(MMP-9)や Tenascin-C(TN-C)の免疫染色で評価した。

(結果)

実験Ⅰ：示差走査熱量計の結果では、GA 群、GA-C 群では 10～30 分間の処理で急激に Ts が上昇したのに対し、TGA 群では GA 群、GA-C 群での 10 分間処理と同等の Ts が得られるためには 9～12 時間の処理時間を要した。

実験Ⅱ：組織カルシウム濃度は、心膜：GA 群； $14.0 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{dry Wt}$ 、GA-C 群； $12.1 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{dry Wt}$ 、TGA 群； $1.1 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{dry Wt}$ 。胸部大動脈：GA 群； $16.7 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{dry Wt}$ 、GA-C 群； $14.0 \pm 2.6 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{dry Wt}$ 、TGA 群； $6.1 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{dry Wt}$ であった。TGA 群は心膜・胸部大動脈いずれにおいても GA 群、GA-C 群に対して有意に低値であった。心膜のコッサ染色では、GA 群、GA-C 群ではカルシウムの沈着を認めるのに対し、TGA 群ではカルシウム沈着をほとんど認めなかった。しかし免疫染色では、3 群とも MMP-9・TN-C の発現を認めた。胸部大動脈ではコッサ染色において GA 群、GA-C 群ではカルシウムの沈着は平滑筋細胞層に強く認め、免疫染色においてもほぼ一致した部位に MMP-9 や TN-C の発現を認めた。それに対し、TGA 群では平滑筋細胞層を隔する有窓性弾性板によりカルシウム沈着を認めたが、免疫染色においては平滑筋細胞層に MMP-9・TN-C の発現を認め、カルシウム沈着部位と MMP-9・TN-C の発現部位に相違を認めた。また TGA 群の心膜と胸部大動脈を比較すると心膜でより強くカルシウム沈着の抑制を認めた。

(考察)

TGA の形成補填材料としての有用性を検討した結果、TGA では GA 処理と同様の強度を得るには長時間を要することが判明した。反応時間の短縮には、TGA の反応速度の高い温度依存性が勘案できるが、生体材料では蛋白変性が危惧されるため、あまり高温での処理は困難と思われる。同種組織の皮下移植実験では、MMP-9 や TN-C が同種組織の石灰化の過程に関連がある可能性が示されたが、石灰化部位と異なる点などからさらなる検討を要する。TGA 処理効果を心膜と胸部大動脈で比較すると、両者とも MMP-9 や TN-C が発現したが、カルシウム沈着の程度に差を認めたことから、心膜と胸部大動脈の組成の違いが、カルシウムの沈着の相違に影響している可能性が考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究により、自己心膜形成の新しい補填材料としての TGA の可能性と、解決すべき問題点を示した意義のある論文である。

平成 26 年 8 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。