

学 位 論 文 題 名

Effect of Cilostazol on Endothelial Cell Denudation and Proliferation in Canine Vein Grafts

(イヌ静脈グラフトにおける内皮細胞剥離及び
増殖に対するシロスタゾールの効果)

学位論文内容の要旨

[背景]下肢閉塞性動脈硬化症において静脈グラフトによる再建はいまだ第一選択とされている。また、虚血性心疾患においては動脈グラフトの優位性は確立されているが、その本数や口径、長さなどに限界があり静脈グラフトの重要性が再認識されている。しかし、静脈を動脈系に使用することにより比較的早期に狭窄性病変を生じ、病理学的には線維組織の増生や血管平滑筋細胞の増殖などによる内膜肥厚がみられる。動脈グラフトは移植後から内皮細胞の剥離はほとんどみられず、nitric oxide や prostacyclin 産生など内皮細胞機能が維持されている。一方、静脈グラフトは血管内皮細胞の多くがいったん脱落して、再生内皮細胞で覆われるまで 3~4 週を要するため、それらの機能が低下し内膜肥厚を促進することが示唆されている。従って、静脈グラフトにおいては、移植後の血管内皮細胞脱落を阻止することにより、内膜肥厚の抑制が期待できる。

cilostazol は近年増加しつつある脳梗塞や心筋梗塞、慢性動脈閉塞症のような動脈血栓症における血栓形成阻止を目的として開発され、慢性動脈閉塞症の虚血症状の改善薬として臨床応用されている。cilostazol の作用機序は細胞内の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の分解酵素である cAMP phosphodiesterase (PDE) を阻害することにより cAMP 濃度を上昇させることであり、それにより抗血小板作用や抗血栓作用、血管拡張作用のような薬理作用を発揮する。さらに、cilostazol は内皮細胞の増殖や高血糖で惹起される内皮細胞のアポトーシスを抑制することが *in vitro* の実験で示されている。また、cilostazol はラット頸動脈のバルーン障害モデルやイヌ腸骨動脈のステント移植モデルで内膜肥厚を抑制することが報告されている。今回、われわれは cilostazol が有するこれらの内皮細胞の増殖作用やアポトーシス抑制作用に注目して、

cilostazol の内皮細胞の剥脱や増殖に対する作用をイヌ頸静脈移植モデルを使用して検討した。

[材料と方法] 体重 10~15kg の雑種成犬 20 頭を使用して、自家静脈移植を行った。動物の取り扱いは北京鉄道病院のガイドラインに従って行われた。実験動物の 10 頭は移植 10 日前より cilostazol の経口投与 (50mg/日) を摘出時まで続けた (cilostazol 群)。一方、対照として cilostazol を与えない群 10 頭を作成した (対照群)。自家静脈移植は以下のように行った。イソゾール静注し、挿管、調節呼吸とした。頸部正中切開にて一側頸静脈を剥離し、できるだけ損傷を与えないように約 4cm の自家静脈グラフトを採取した。腹部正中切開にて腹部大動脈と右側腸骨動脈を剥離して、ヘパリン静注後それらの動脈をクランプした。自家静脈グラフトの中枢側を腹部大動脈に 6-0 プローリン連続縫合で端々吻合を行った。自家静脈グラフトの末梢側を右側腸骨動脈に同様に吻合した。中枢側と末梢側の間自家動脈は競合しないように結紮した。術中、ペニシリン系抗生剤を点滴静注した。

それぞれの群において移植静脈グラフトの摘出を 5 頭ずつ移植 1 日目と移植 50 日目に行った。摘出は全身麻酔下でヘパリン化して行い、取り出した移植静脈グラフトはヘパリン生理食塩水で洗い、縦方向に切開した。内表面を 0.3% 硝酸銀で染色して、実体顕微鏡で観察した。多辺形の細胞を内皮細胞として同定して、全面積に対する内皮細胞で被覆された面積の割合を内皮細胞被覆率として算出した。また、標本の一部を 10%緩衝ホルマリン液で、固定しパラフィンで包埋した。5 μ m の厚さに切り出し Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い、光学顕微鏡で内膜の変化を観察した。統計は Mann-Whitney U-test で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。また、数値は平均 \pm 標準偏差で示した。

[結果] 術中術後に両群ともに出血による合併症はなかった。両群ともに摘出時に移植静脈グラフトは全例開存していた。

肉眼的観察では、cilostazol 群では移植 1 日目と移植 50 日目ともに内面は内皮細胞に広く被覆されていたが、対照群では内面の内皮細胞は大きく剥脱されていた。内皮細胞被覆率は、cilostazol 群では移植 1 日目 $80.2 \pm 7.9\%$ 、移植 50 日目 $81.8 \pm 8.3\%$ であり、対照群は移植 1 日目 $15.9 \pm 2.3\%$ 、移植 50 日目 $40.7 \pm 14.1\%$ であった。内皮細胞被覆率は移植 1 日目と移植 50 日目ともに cilostazol 群が対照群に比較して有意に高値であった。また、対照群では移植 1 日目と比較して移植 50 日目で有意に増加したが、cilostazol 群では有意な増加はなかった。

光顕的観察では、移植 1 日目では両群で正常静脈に比較して内膜肥厚して

いたが、cilostazol 群で対照群より薄かった。移植 50 日目では両群で内膜肥厚が続いていたが、やはり cilostazol 群で対照群より薄かった。

[考察] 自家静脈グラフト採取の際の低酸素や加圧、操作などのストレスは内膜障害を引き起こし、採取後 48 時間以内に 60~70%の内皮細胞が脱落する。その修復治癒はグラフト内面に残存した内皮細胞や吻合部の宿主動脈の内皮細胞の増殖によって行われ、移植条件に左右されるが再被覆の完成まで通常 1 週から数カ月かかる。この内皮細胞の脱落や増殖とともに、グラフト壁では細胞増殖、細胞死、細胞遊走、および細胞外マトリックスの産生・分解をきたすような血管構築の変化が起きている。内皮細胞の剥脱により血小板の付着や壁透過性の亢進などが起こり、血液よりしみ込むあるいは局所的に産生される増殖因子や血管作動性物質などにより血管平滑筋細胞の増殖や線維性成分の産生をきたし内膜肥厚を生ずることが示唆されている。

今回使用した cilostazol は PDE 阻害薬であり、cAMP の分解を阻害して増加させる。それにより phospholipase や cyclooxygenase が抑制され血小板の凝集が阻害されたり、Ca²⁺の放出が抑制され血管収縮が阻止されたり、血管平滑筋細胞の増殖が抑制されたりすることによって、バルーン拡張やステント留置後の閉塞に有効であることが報告されている。また、hepatocyte growth factor (HGF) 産生を活性化することにより、内皮細胞増殖の促進や高血糖による内皮細胞障害を予防することが示されている。今回の実験では cilostazol による内皮細胞増殖の促進作用はみられなかったが、静脈グラフト採取といった物理的な刺激に対して内皮細胞障害の予防効果があることを示唆された。また、今回の実験では cilostazol 投与による静脈グラフトの内膜肥厚の抑制も観察された。これは cilostazol による血小板凝集の阻止や血管平滑筋細胞増殖の抑制によるとともに、内皮細胞層がよく保持されたことが関与していることが推測された。

[結語] イヌ頸静脈移植モデルにおいて cilostazol は内皮細胞の剥脱を抑制し、内膜肥厚を抑制した。内皮細胞障害は血管リモデリングの初期変化にあたり、その予防はもっとも効果的な内膜肥厚の抑制法のひとつと考えられ、今後の発展が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

Effect of Cilostazol on Endothelial Cell Denudation and Proliferation in Canine Vein Grafts

(イヌ静脈グラフトにおける内皮細胞剥離及び
増殖に対するシロスタゾールの効果)

下肢閉塞性動脈硬化症において静脈グラフトによる再建はいまだ第一選択とされている。しかし、静脈を動脈系に使用することにより比較的早期に狭窄性病変を生じ、病理学的には線維組織の増生や血管平滑筋細胞の増殖などによる内膜肥厚がみられる。静脈グラフトは血管内皮細胞の多くがいったん脱落して、再生内皮細胞で覆われるまで 3~4 週を要するため、それらの機能が低下し内膜肥厚が促進されることが示唆されている。従って、静脈グラフトにおいては、移植後の血管内皮細胞脱落を阻止することにより、内膜肥厚の抑制が期待できる。cilostazol の作用機序は細胞内の cAMP の分解酵素である cAMP phosphodiesterase (PDE) を阻害することにより cAMP 濃度を上昇させることであり、それにより抗血小板作用や抗血栓作用、血管拡張作用のような薬理作用を発揮する。また、cilostazol は内皮細胞の増殖や高血糖で惹起される内皮細胞のアポトーシスを抑制することが *in vitro* の実験で示されている。今回、cilostazol が有するこれらの内皮細胞の増殖作用やアポトーシス抑制作用に注目して、cilostazol の内皮細胞の剥脱や増殖に対する作用をイヌ頸静脈移植モデルを使用して検討した。雑種成犬を使用して、自家静脈移植を行った。移植 10 日前より cilostazol の経口投与 (50mg/日) を摘出時まで続けた群 (cilostazol 群) と、対照として cilostazol を与えない群を作成した (対照群)。それぞれの群において移植静脈グラフトの摘出を 5 頭ずつ移植 1 日目と移植 50 日目に行った。内表面を 0.3%硝酸銀で染色して、実体顕微鏡で観察した。多辺形の細胞を内皮

細胞として同定して、全面積に対する内皮細胞で被覆された面積の割合を内皮細胞被覆率として算出した。また、標本の一部を 10%緩衝ホルマリン液で、固定しパラフィンで包埋した。5 μ m の厚さに切り出し Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い、光学顕微鏡で内膜の変化を観察した。両群ともに摘出時に移植静脈グラフトは全例開存していた。肉眼的観察では、cilostazol 群では移植 1 日目と移植 50 日目ともに内面は内皮細胞に広く被覆されていたが、対照群では内面の内皮細胞は大きく剥脱されていた。内皮細胞被覆率は、cilostazol 群では移植 1 日目 80.2 \pm 7.9%、移植 50 日目 81.8 \pm 8.3%であり、対照群は移植 1 日目 15.9 \pm 2.3%、移植 50 日目 40.7 \pm 14.1%であった。内皮細胞被覆率は移植 1 日目と移植 50 日目ともに cilostazol 群が対照群に比較して有意に高値であった。また、対照群では移植 1 日目と比較して移植 50 日目で有意に増加したが、cilostazol 群では有意な増加はなかった。光顕的観察では、移植 1 日目では両群で正常静脈に比較して内膜肥厚していたが、cilostazol 群で対照群より薄かった。移植 50 日目では両群で内膜肥厚が続いていたが、やはり cilostazol 群で対照群より薄かった。従って、cilostazol による内皮細胞増殖の促進作用はみられなかったが、静脈グラフト採取といった物理的な刺激に対して内皮細胞障害の予防効果があることを示唆された。また、今回の実験では cilostazol 投与による静脈グラフトの内膜肥厚の抑制も観察された。これは cilostazol による血小板凝集の阻止や血管平滑筋細胞増殖の抑制によるとともに、内皮細胞層がよく保持されたことが関与していることが推測された。口頭発表に際して、北島教授からシロスタゾールの血小板抑制作用の機序、初期の内皮細胞脱落の機序、投与期間などについて質問がなされた。次に加藤教授からシロスタゾールの前投与と後投与の意義、検索部位の妥当性について質問がなされた。安田教授からは実験の進め方についてコメントがあり、関連実験の現況について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去のデータや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

今後この論文で得られた結果は薬剤による移植血管内膜肥厚の予防法の開発に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。