シロスタゾール徐放フィルムによる 血管吻合部新生内膜増殖抑制に対する実験的研究

加賀谷 智明 小田 克彦 河津 聡 本吉 直孝
川本 俊輔 赤坂 純逸 新田 能郎 齋木 佳克
井口 篤志 田林 暁一

冠動脈バイパス術は技術の進歩、動脈グラフトの使用などで成績は向上しているが、問題点の一つとして新生内膜肥厚による吻合部狭窄があげられる。本研究の目的は、シロスタゾールと生体吸収性材料であるポリ L-乳酸・カプロラクトン共重合体 (copolymer of L-lactide and ϵ -caprolactone; P(LA/CL)) を混合したシロスタゾール徐放フィルムによるイヌ大腿動脈吻合モデルの吻合部被包が、吻合部新生内膜の増殖抑制効果を有するかについて組織化学および組織計測学的に検討することである。総数 20 頭のビーグル犬を用いて、大腿動脈を 2 カ所切断し端々吻合を行った動脈吻合モデルを作製した。フィルムに含有させるシロスタゾールの量は 10, 40, 80 mg とし用量効果について検討した。また、フィルムを使用せず吻合のみ試行した群をコントロールとした。手術終了 4 週間後に肉眼的所見を観察後、吻合部の病理組織学的検討を行った。シロスタゾール徐放フィルム群で有意に内膜中膜比の減少が認められた。また、proliferating cell nuclear antigen (PCNA), α -smooth muscle actin (α -SMA) および desmin に対する各抗体を用いた免疫染色による検討では、シロスタゾール徐放フィルム群でコントロール群と比較し PCNA index, α -SMA 陽性細胞率の有意な低下がみられた。Desmin 陽性細胞率は 80 mg 群で有意な低下を認めた。シロスタゾール徐放フィルムを吻合部外膜側から投与することで、新生内膜肥厚抑制効果が確認でき、血管吻合術の長期予後改善に有望な手法となる可能性が示唆された。日心外会誌 39 巻 4 号 : 162-171 (2010)

キーワード : 新生内膜肥厚, シロスタゾール, P(LA/CL), 動脈吻合モデル

Suppression of Neointimal Hyperplasia by External Application of Cilostazol-Eluting Film at Anastomotic Sites in a Canine Model

Tomoaki Kagatani, Katsuhiko Oda, Satoshi Kawatsu, Naotaka Motoyoshi, Syunsuke Kawamoto, Junetsu Akasaka, Yoshio Nitta, Yoshikatsu Saiki, Atsushi Iguchi and Koichi Tabayashi (Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan)

Neointimal hyperplasia is the principal mechanism of graft failure in coronary artery bypass surgery. Systemic administration of cilostazol has been reported to suppress neointimal hyperplasia in some vascular injury models. We sought to deliver cilostazol locally in an attempt to augment its beneficial effect to inhibit neointimal hyperplasia at an anastomotic site. We examined whether the external application of a novel cilostazol-eluting film can inhibit neointimal hyperplasia in a vascular anastomosis model. Canine femoral artery graft interposition was performed in 20 beagle dogs, assigned to 4 groups of 5 dogs each : a graft interposition without copolymer of L-lactide and ϵ -caprolactone (P(LA/CL)) film (control group) and groups with P(LA/CL) film containing cilostazol of either 10 mg, 40 mg, or 80 mg doses. All the cilostazol-eluting film with 10 mg, 40 mg, and 80 mg dose groups had a reduced intima/media ratio compared to the control group (0.15 ± 0.03 , 0.11 ± 0.03 , and 0.12 ± 0.03 , vs. 0.31 ± 0.03 , $p < 0.05$). Immunohistochemical analyses for proliferating cell nuclear antigens revealed reduced cellular proliferating activity associated with decreased α -actin positive cells in the cilostazol-eluting film groups compared to the control group. External application of cilostazol-eluting film can inhibit neointimal hyperplasia, at least in part, by inhibiting smooth muscle cell proliferation in the intima. Jpn. J. Cardiovasc. Surg. 39 : 162-171 (2010)

Keywords : neointimal hyperplasia, cilostazol, P(LA/CL), arterial graft model

はじめに

近年、心臓血管外科学領域における冠動脈バイパス術 (coronary artery bypass grafting : CABG) の普及は、冠動脈疾患患者の予後ならびに生活の質の向上に大きく貢献し

てきた^{1,2)}。CABG ではグラフトとして内胸動脈や大伏在静脈などが用いられるが、静脈グラフトは動脈グラフトと比較し、新生内膜肥厚による血管狭窄病変を惹起しやすいことが臨床上的の問題となっている^{3,4)}。グラフトの長期成績を妨げるものとしては、術後早期に発生する血栓症、新生内膜肥厚および長期的には動脈硬化性変化などが報告されてきた⁵⁾。

血管吻合部における新生内膜肥厚のメカニズムとしては、中膜平滑筋細胞の増殖と内膜への遊走が主要な原因と考えられてきた。また、この過程のなかで平滑筋細胞は収縮筋線維芽細胞を経て、膠原線維や結合組織基質産生性の合成型筋線維芽細胞へと形質転換し、この結果内膜に厚い結合組織の層が形成されると報告されている⁶⁻⁸⁾。この新生内膜肥厚を抑制することにより、血管吻合術の長期開存を得ることができると考えられる。

新生内膜肥厚の抑制のため、現在までさまざまな動物実験が行われてきた。薬物治療としては、1991 年ラット静脈グラフトモデルにおいて Hirsch ら⁹⁾は、ヘパリンの静脈内投与が有効であったと報告した。Yamanouchi ら¹⁰⁾は、pravastatin を経口投与し、ウサギ静脈グラフトの術後内膜肥厚が抑制されたと報告している。遺伝子導入治療も試行されてきたが、動物実験レベルでは一定の効果が認められたものもあったが、臨床レベルで 2005 年に発表された約 3,000 例の CABG 術後における Phase IV 多施設無作為二重盲検臨床試験では、有意差がみられなかった¹¹⁾。遺伝子導入治療では、遺伝子を目的細胞に運び込む vector そのものの安全性確保に関しても動物実験からヒトへの臨床応用のときに問題とされている。われわれは、臨床応用も視野におき市販薬物を徐放させる方法を選択し、今回の実験を計画した。

ホスホジエステラーゼ III (phosphodiesterase III; PDE III) 阻害剤は、cAMP の分解を特異的に阻害することによって細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、血管平滑筋弛緩作用、血小板凝集抑制作用および血管平滑筋細胞増殖抑制作用を導くことが知られている¹²⁾。経口 PDE III 阻害剤であるシロスタゾールの新生内膜肥厚抑制効果は、実験的および臨床的にその有用性が報告されている。実験的には、バルーン障害モデル、ステント留置モデル、血管吻合モデルで確認され報告されてきた¹³⁻¹⁶⁾。また臨床的には、経皮的冠動脈形成術後の新生内膜肥厚の抑制と狭窄予防に有用であったと報告されている¹⁷⁾。しかし、シロスタゾールを生体吸収性材料に含浸させ、吻合部の外側より徐放的に投与する報告はない。われわれは以前、生体吸収性材料であるポリ L 乳酸・カプロラクトン共重合体 (copolymer of L-lactide and ϵ -caprolactone; P(LA/CL)) とラパマイシンを用いて徐放フィルムを作製し、そのフィルムを吻合部の外

膜側から局所投与することにより、イヌ血管吻合モデルにおける術後内膜肥厚を抑制しうることを報告した¹⁸⁾。現在、ラパマイシンは薬剤溶出ステントとして臨床応用されているが、内皮機能障害や遅発性ステント血栓症が問題点として知られている。そこでわれわれは、シロスタゾールを使用し P(LA/CL) と混合することにより新たに徐放フィルムを作製することとした。

本研究の目的は、シロスタゾールと P(LA/CL) を混合したシロスタゾール徐放フィルムによるイヌ大腿動脈吻合モデルの吻合部被包が、吻合部新生内膜の増殖抑制効果を有するかについて組織化学および組織計測学的に検討することである。

対象と方法

1. シロスタゾール徐放フィルムの作製

シロスタゾール徐放フィルムは以下のような方法で作製した。まず、直径 28 mm のシャーレ上で P(LA/CL) (ポリ L 乳酸-カプロラクトン共重合体、重合比 1:1) (コアフロント(株)、東京) 50 mg をクロロホルム (和光純薬工業(株)、大阪) 1 ml に溶解し、クロロホルム 1 ml に溶解したシロスタゾール (大塚製薬(株)、東京) と混合、攪拌後、4℃にて 24 時間乾燥させクロロホルムを揮発させて除去することによりフィルム状とした (図 1)。シロスタゾールの投与量は人経口投与時の用量 200 mg/day をもとに体重による比例配分から 40 mg を基本とし、10 mg および 80 mg の 3 種類のフィルムを作製し、その用量効果についても検討を行った。

2. 実験動物

体重 9.0~12.5 kg (平均 10.5 kg) の 20 頭の雌性ビーグル犬 (北山ラベス(株)、長野) を用いた。すべての実験手順はヘルシンキ宣言および Guidelines for the Care and Use

図 1 シロスタゾール含有 P(LA/CL) 徐放フィルム
直径 28 mm で円形薄膜状となっている。

図2 (A) イヌ大腿動脈吻合モデル, (B) 吻合部へのフィルムの巻きつけ
矢印は吻合部を示し, ▲は徐放フィルムを示す。

of Laboratory Animals (NIH publication 85-23, revised 1996) に基づき行った。また、動物実験プロトコルは東北大学動物実験専門委員会の承認を受けた。

3. イヌ大腿動脈吻合モデルの作製法と実験群

ビーグル犬は 30 mg/kg のチオペンタール静脈注射により鎮静させ、経口気管内挿管、人工呼吸下にハロタンを用いて全身麻酔の維持を行った。術中は心電図をモニターした。吻合モデルは左大腿動脈をクランプ後 10 mm 離れた 2 カ所で切断し、それぞれの部位を 2 点支持法にて端々再吻合して作製した (図 2A)。すべての吻合は 8-0 サージプロ II (タイコヘルスケアジャパン (株), 東京) を用いて行った。抗凝固薬として、100 U/kg のヘパリンを静脈投与した。

実験群は 10, 40, 80 mg のシロスタゾール含有徐放フィルム群の 3 群とフィルムを使用せず吻合のみ試行した群 (コントロール) の計 4 群とした。各群あたり 5 頭のビーグル犬を割り付けた。作製したフィルムを図 2B のように吻合部全周を被覆するように置いた。フィルムは被覆部位がずれないように閉創直前に置くようにした。フィルムは水分を吸収すると粘着性を有し、固定しなくても被覆部位のずれが発生しにくかった。モデル動物は 4 週間後に全身麻酔下に塩化カリウム静脈注射にて犠牲死後、吻合部血管を摘出し、組織学的検索を行った。

4. 内膜肥厚度の定量化

摘出した吻合部血管は、4% パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液に 24 時間固定し、アルコール-キシロール脱水後パラフィン包埋した。薄切により吻合部の横断面を作製

し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および膠原線維、弾性線維同定のための Elastica-Goldner 変法 (EG) 染色を行った。

内膜肥厚度の定量化のために、デジタル画像解析 (Image-Pro Plus version 4.0 for windows, MediaCybernetics, Silver Spring, MD) により測定した内膜 (I) および中膜 (M) の面積からそれらの比 (I/M ratio) を算出した。

5. 内膜間葉系細胞の増殖と分化傾向の定量化

新生内膜における増殖細胞を可視化するためにマウス anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体 (NeoMarkers, CA) を用いて免疫染色を行った。新生内膜における間葉系細胞の形質を同定するために、マウス anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) 抗体 (DAKO, CA) およびマウス anti desmin 抗体 (Dako, CA) を用いて免疫染色を行った。

PCNA, α -SMA および desmin の各免疫染色標本から強拡大の無作為の 8 視野より撮影されたデジタル画像 (NIKON COOLSCOPE, (株) ニコン, 東京) 上に系統的無作為に unbiased counting frame¹⁹⁾を設定し、陽性および陰性細胞数を計測した。これらの値から陽性細胞/全細胞数の比を算出し PCNA index, α -SMA および desmin 陽性細胞率とした (図 3)。

6. シロスタゾール血中濃度測定

実験開始時、開始後 2 週間、および 4 週間の各時点でシロスタゾール血中濃度を測定した。ポジティブコントロールとして、シロスタゾール 100 mg を同系ビーグル犬に経口投与し、内服後 1 時間、3 時間、5 時間、および 8 時間

図 3

(A) 新生内膜細胞数測定に用いた unbiased counting frame
細胞数カウントのルールは、フレームの直交する細い線の 2 辺に交わったとき、および全体がフレーム内におさまっている細胞はカウントした。一方、太い線で表される 2 辺とその延長線に交わったとき、およびフレーム外にある細胞はカウントしなかった。(B) Unbiased counting frame 上での細胞数計測の例。写真のように設定されたフレームにより 2 個の desmin 陽性細胞 (矢印) がカウントされている。実際に計測した 1 つのフレームの面積は 0.008 mm^2 であり、1 視野に 7 個設定した。

後に採血し、血中濃度の比較を行った。血中濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー ((株)住化分析センター、大阪) により行った。

7. 統計分析

すべての実験データは平均±標準誤差で表示した。実験群間の比較には一元配置分散分析法および事後対比較として Tukey-Kramer 法を用いて検定した。すべての統計分析は、JMP 5.0.1 J (SAS Institute Inc, Cary, NC) を用いて行った。

結 果

1. 肉眼的所見

吻合術後 4 週間の観察期間中に実験動物の死亡はなく、グラフト閉塞も認めなかった。標本摘出時に P(LA/CL) フィルムはほぼ完全に吸収され、肉眼的に遺残は認めなかった。

2. I/M ratio

図 4 は各群の吻合部横断面画像である (EG 染色)。これらの画像を用いて測定した I/M ratio の値は表 1 のようであった。コントロール群、シロスタゾール 10、40 および 80 mg 投与群の I/M ratio はそれぞれ、 0.31 ± 0.03 , 0.15 ± 0.03 , 0.11 ± 0.03 , 0.12 ± 0.03 であり、コントロール

図 4 実験後 4 週間時の動脈グラフト吻合部横断面画像 (Elastica-Goldner 変法 (EG) 染色)

(A) コントロール群, (B) シロスタゾール 10 mg 群, (C) シロスタゾール 40 mg 群, (D) シロスタゾール 80 mg 群。シロスタゾール投与群で新生内膜肥厚の抑制がみられた。

表 1 術後 4 週間時点での動脈吻合部の I/M ratio, PCNA index, α -SMA 陽性細胞率, desmin 陽性細胞率

	Control (N=5)	10 mg (N=5)	40 mg (N=5)	80 mg (N=5)
I/M ratio	0.31 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.03 ^a	0.11 $\pm$ 0.03 ^a	0.12 $\pm$ 0.03 ^a
PCNA index	0.46 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.02 ^a	0.29 $\pm$ 0.02 ^a	0.30 $\pm$ 0.03 ^a
α -SMA 陽性細胞率	0.71 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.02 ^a	0.45 $\pm$ 0.02 ^a	0.50 $\pm$ 0.02 ^a
Desmin 陽性細胞率	0.15 $\pm$ 0.01 ^b	0.15 $\pm$ 0.02 ^b	0.20 $\pm$ 0.02 ^b	0.04 $\pm$ 0.02

^a p <0.05 vs. control, ^b p <0.05 vs. 80 mg.

図 5 I/M ratio

吻合部の新生内膜と中膜の面積比を示す。I/M ratio はシロスタゾール投与群で有意に低値であった (* p <0.05)。シロスタゾール投与群間では差はなかった。

群に比してシロスタゾール群で有意に低値であった (p <0.05, 図 5)。10 mg 投与群と 40 mg 投与群の I/M ratio の比較では 40 mg 投与群で陽性細胞率は低下傾向がみられたが, 80 mg 投与群では 40 mg 投与群に比して軽度増加した。投与群間で有意差はなかった。

3. PCNA 免疫染色

図 6 は各群の PCNA 免疫染色画像である。これらの画像を用いて得た PCNA index の値は表 1 のようであった。コントロール群, シロスタゾール 10, 40 および 80 mg 投与群の PCNA index はそれぞれ, 0.46 $\pm$ 0.02, 0.34 $\pm$ 0.02, 0.29 $\pm$ 0.02, 0.30 $\pm$ 0.03 であり, シロスタゾール投与群の値は, コントロール群に比して有意に低値であった (p <0.05, 図 7)。投与群間で有意差はなかった。

4. α -SMA 免疫染色

図 8 は各群の α -SMA 免疫染色画像である。これらの画像を用いて得た α -SMA 陽性細胞率の値は表 1 のようであった。コントロール群, シロスタゾール 10, 40 および 80 mg 投与群の α -SMA 陽性細胞率はそれぞれ, 0.71 $\pm$ 0.01, 0.59 $\pm$ 0.02, 0.45 $\pm$ 0.02, 0.50 $\pm$ 0.02 であり, シロスタゾール投与群の α -SMA 陽性細胞率は, コントロール群に比し

て有意に低下していた (p <0.05, 図 9)。投与群間で有意差はなかった。

5. Desmin 免疫染色

図 10 は各群の desmin 免疫染色画像である。これらの画像を用いて得た desmin 陽性細胞率の値は表 1 のようであった。コントロール群, シロスタゾール 10 mg 群, 40 mg, 80 mg 投与群の desmin 陽性細胞率はそれぞれ, 0.15 $\pm$ 0.01, 0.15 $\pm$ 0.02, 0.20 $\pm$ 0.02, 0.04 $\pm$ 0.02 であり, シロスタゾール 80 mg 投与群の desmin 陽性細胞率はコントロール群, シロスタゾール 10, 40 mg 投与群の desmin 陽性細胞率に比して有意に低値であった (p <0.05, 図 11)。

6. シロスタゾール血中濃度

実験開始時, 投与後 2 週間および 4 週間後のシロスタゾール血中濃度は, コントロール群およびシロスタゾール 10 mg 投与群では検出感度限界以下であった。40 mg 投与群では, 実験開始時は検出限界以下, 2 週間後は 0.006 $\pm$ 0.005 μ g/ml, 4 週間後は検出感度限界以下であった。80 mg 投与群では, 実験開始時は検出限界以下, 2 週間後は 0.019 $\pm$ 0.001 μ g/ml, 4 週間後は 0.020 $\pm$ 0.001 μ g/ml であった。

シロスタゾール 100 mg を経口投与した同系ビーグル犬の内服後 1 時間, 3 時間, 5 時間, 8 時間の血中濃度はそれぞれ, 検出感度以下, 0.570, 0.464, 0.144 μ g/ml であった。

考 察

今回の実験において, 生体吸収性のシロスタゾール徐放フィルムで血管吻合部を被包することにより新生内膜肥厚を抑制しうることが明らかとなった。生体吸収性のフィルム基剤として使用した P(LA/CL) には新生内膜肥厚に対する抑制効果はない¹⁸⁾とされ, この結果はシロスタゾールの効果によるものと考えられた。われわれの実験結果は, Yamamoto ら¹⁵⁾のラットの静脈吻合モデルへのシロスタゾール 20 mg 含有ゲルの単回局所投与の実験結果や, Kudo ら¹⁶⁾のビーグル犬の静脈吻合モデルに対しシロスタゾール (60 mg/kg/day) の経口投与を行った実験結果と概ね一致していた。今回の実験で, シロスタゾール局所徐放投与により, 吻合部の内膜肥厚が軽減されることが明ら

図6 実験後4週間時の動脈グラフト吻合部のPCNA免疫染色画像
(A) コントロール群, (B) シロスタゾール 10 mg 群, (C) シロスタゾール 40 mg 群, (D) シロスタゾール 80 mg 群. シロスタゾール投与群でPCNA陽性細胞数の減少がみられた.

図7 PCNA index

PCNA index を示す。PCNA index はシロスタゾール投与群で有意に低値であった (* $p < 0.05$)。シロスタゾール投与群間では差はなかった。

かとなったが、10, 40, 80 mgの間では用量依存的な結果は得られなかった。

新生内膜内の筋線維芽細胞に対する免疫染色を用いた検

討では、シロスタゾール投与群でPCNA index と α -SMA 陽性細胞率の有意な低下がみられた。また、desmin 陽性細胞率は 80 mg 投与群でコントロールに比して有意に低値であった。動脈硬化や内皮障害に伴う内膜の増殖、肥厚のメカニズムとして、刺激や組織ストレス下での中膜に存在する収縮型筋線維芽細胞の内膜への遊走、および収縮型筋線維芽細胞の結合組織基質や膠原線維産生能の高い合成型細胞への形質転換が重要であると報告されている^{20, 21)}。今回の実験では、80 mg 投与群において desmin 陽性細胞率の有意な低下と、I/M ratio の軽度の増加傾向がみられた。Johnson ら²⁰⁾および Vukovic ら²¹⁾は、desmin が内膜肥厚に寄与することが少ない収縮型筋線維芽細胞のマーカーであることを報告している。80 mg 投与群における desmin 陽性細胞率の有意な低下が合成型細胞への形質転換を示唆している可能性が考えられた。

以上より、シロスタゾールの動脈吻合部における新生内膜形成抑制作用の機序として、(1) 内膜筋線維芽細胞の増殖抑制および(2) 内膜筋線維芽細胞の収縮型から合成型への形質転換の抑制、の2つが考えられた。この形質転換の抑制は、Fujita ら²²⁾が脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットの脳内細血管においてシロスタゾール内服投与群で確認されたものと類似する結果である。分子薬理学的な研

図8 実験後4週間時の動脈グラフト吻合部の α -SMA免疫染色画像
(A) コントロール群, (B) シロスタゾール 10 mg 群, (C) シロスタゾール 40 mg 群, (D) シロスタゾール 80 mg 群. シロスタゾール投与群で α -SMA陽性細胞数の減少がみられた.

図9 α -SMA陽性細胞率
 α -SMA陽性細胞率を示す。 α -SMA陽性細胞率はシロスタゾール投与群で有意に低値であった (* $p < 0.05$)。シロスタゾール投与群間では差がなかった。

究によれば, シロスタゾールなどのPDE III阻害剤は, 細胞内のcAMP分解を特異的に阻害することによってcAMP濃度を上昇させることが知られており, cAMPの上

昇は動脈中膜平滑筋細胞の増殖と中膜から内膜への遊走を抑制すると報告されている²³⁻²⁵⁾。Newmanら²³⁾は, cAMPがIL-6産生を抑制することにより, 血管平滑筋細胞の遊走を抑制したと報告した。Indolfiら²⁴⁾は, cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化がラット総頸動脈バルーン障害モデルにおける新生内膜形成を抑制したと報告した。また, Hayashiら²⁵⁾は, cAMPにより癌抑制遺伝性であるp53およびp21の発現が亢進し, アポトーシスを誘導することにより, 血管平滑筋細胞の増殖を抑制したと報告した。われわれの今回の研究ではシロスタゾールの収縮型から合成型への形質転換の抑制作用の可能性も示唆されたが, このメカニズムについては明らかではなく, 今後検討する予定である。

さらに80 mg投与群で観察されたI/M ratioの軽度の増加傾向は10 mgおよび40 mg投与群との間には有意差はなく, またコントロール群との間の有意性は保持されており, 依然この投与量が新生内膜形成の抑制に有効であるとの印象もある。しかし, 免疫染色による検討ではこの投与群では有意なdesmin陽性細胞の減少とPCNA indexおよび α -SMA陽性細胞率の軽度の増加傾向をとまなっており, 内膜細胞増殖および合成型筋線維芽細胞の増加傾向という新生内膜形成の前駆の状態である可能性が考えられ

図10 実験後4週間時の動脈グラフト吻合部の desmin 免疫染色画像
(A) コントロール群, (B) シロスタゾール 10 mg 群, (C) シロスタゾール 40 mg 群, (D) シロスタゾール 80 mg 群. シロスタゾール 80 mg 投与群では他群に比して desmin 陽性細胞数の減少がみられた.

図11 Desmin 陽性細胞率

Desmin 陽性細胞率を示す。Desmin 陽性細胞率はシロスタゾール 80 mg 投与群でコントロール群, シロスタゾール 10 mg 群およびシロスタゾール 40 mg 群に比して有意に低値であった (* $p < 0.05$)。

た。すなわち, シロスタゾールの投与量は 10 mg および 40 mg で強い効果はあるが, 80 mg 投与により長期的には吻合部の狭窄に対してかえって促進的に作用する可能性も

あるため, 臨床応用においては至適投与量の決定が重要であり今後の検討課題と考えられた。

シロスタゾール徐放フィルムによる血管吻合部への局所投与と経口投与との血中濃度の推移の比較では, フィルム群におけるシロスタゾール血中濃度は高感度のアッセイを用いて $0.006 \sim 0.02 \mu\text{g/ml}$ であった。シロスタゾール 20 mg 含有ゲルを用いたわれわれ以外の実験でも投与後 14 日, 28 日の時点で $0.01 \mu\text{g/ml}$ 未満, $0.02 \mu\text{g/ml}$ 未満と採用されたアッセイ法の検出感度以下であり, われわれの今回の結果とほぼ一致していた。シロスタゾール徐放フィルム投与後の血中濃度は測定した時点での最も高い時期で $0.02 \mu\text{g/ml}$ であり, 100 mg 経口投与後の最高値 $0.57 \mu\text{g/ml}$ と比較すると約 1/30 であり, 出血傾向の発現や頻脈などの全身投与の場合の合併症や副作用を減少させることができるものと期待された。また, 今回作製したフィルムは徐放作用を有し, 80 mg 投与群では 4 週間でも $0.02 \mu\text{g/ml}$ の血中濃度を示すことから, 長期間の薬理学的作用が得られることが判明した。血中濃度の比較からは局所投与によるシロスタゾールの効果により新生内膜肥厚が抑制されたものと考えられたが, 血中に流出したシロスタゾールの関与も否定することはできず, 今後の検討課題である。

近年, 経皮的冠動脈形成術において再狭窄抑制を目的と

したシロスタゾール全身投与の臨床試験が行われており一定の効果があると報告されている^{26,27)}が、局所投与は全身投与と比較して安全で効果的な投与方法となりうる可能性が示された。さらに、今回われわれは新たなシロスタゾールの局所投与方法として生体吸収性の徐放フィルムを開発、使用した。同様に局所投与の基剤としてゲルを使用した報告^{13,15,28)}も散見されるが、これらと比較しても、われわれの方法は、投与部位を吻合部近傍のごく狭い範囲に局限させることが可能であること、生体吸収性素材であるため有害性が少なく使用が容易であること、滅菌が可能であることなど多くの利点があり、冠動脈バイパス術を含め多様な心臓血管外科手術への臨床応用が期待されるものと思われる。

結 語

生体吸収性シロスタゾール徐放フィルムの血管外膜側からの局所投与は、新生内膜肥厚抑制作用を有することが実験的に明らかとなった。シロスタゾールの新生内膜肥厚抑制の機序としては、中膜から内膜へ移行した後の筋線維芽細胞の増殖抑制および形質転換抑制によることが示唆された。

謝辞：本研究を行うにあたり、ご専門の立場から貴重な御意見、御助力をいただきました京都大学再生医科学研究所の田畑泰彦教授に深く感謝いたします。

病理標本の評価方法および統計学的処理にあたっては、仙台厚生病院病理診断臨床検査科の千葉良司部長からご指導をいただきました。また、病理標本作製に多大なるご協力をいただいた東北大学病理部スタッフの皆様にも深く感謝いたします。

本研究は、以上のように多くの方々の御支援によって成し遂げられたものであり、ここに心からの謝意を申し上げます。

文 献

- 1) Cameron, A., Davies, K.B., Green, G. et al. : Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts—Effects on survival over a 15-year period. *N. Engl. J. Med.* **334** : 216–219, 1996.
- 2) Verma, S., Szmítko, P.E., Weisel, R.D. et al. : Should radial arteries be used routinely for coronary artery bypass grafting? *Circulation* **110** : 40–46, 2004.
- 3) Goldman, S., Zadina, K., Moritz, T. et al. : Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44** : 2149–2156, 2004.
- 4) Sabik, J.F. 3rd., Lytle, B.W., Blackstone, E.H. et al. : Comparison of saphenous vein and internal thoracic artery graft patency by coronary system. *Ann. Thorac. Surg.* **79** : 544–551, 2005.

- 5) Motwani, J.G. and Topol, E.J. : Aortocoronary saphenous vein graft disease : Pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* **97** : 916–931, 1998.
- 6) Indolfi, C., Mongiardo, A., Curcio, A. et al. : Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents. *Tr. Cardiovasc. Med.* **13** : 142–148, 2003.
- 7) Martin, K.A., Rzućidlo, E.M., Merenick, B.L. et al. : The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **286** : C507–C517, 2004.
- 8) Roy-Chaudhury, P., Kelly, B.S., Miller, M.A. et al. : Venous neointimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene dialysis grafts. *Kidney Int.* **59** : 2325–2334, 2001.
- 9) Hirsch, G.M. and Karnovsky, M.J. : Inhibition of vein graft intimal proliferative lesions in the rat by heparin. *Am. J. Pathol.* **139** : 581–587, 1991.
- 10) Yamanouchi, D., Banno, H., Nakayama, M. et al. : Hydrophilic statin suppresses vein graft intimal hyperplasia via endothelial cell-tropic Rho-kinase inhibition. *J. Vasc. Surg.* **42** : 757–764, 2005.
- 11) Alexander, J.H., Hafley, G., Harrington, R.A. et al. : Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery : PREVENT IV : A randomized controlled trial. *JAMA* **294** : 2446–2454, 2005.
- 12) Pan, X., Arauz, E., Krzanowski, J.J. et al. : Synergistic interactions between selective pharmacological inhibitors of phosphodiesterase isozyme families PDE III and PDE IV to attenuate proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **48** : 827–835, 1994.
- 13) Ishizaka, N., Taguchi, J., Kimura, Y. et al. : Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis* **142** : 41–46, 1999.
- 14) Kubota, Y., Kichikawa, K., Uchida, H. et al. : Pharmacologic treatment of intimal hyperplasia after metallic stent placement in the peripheral arteries. An experimental study. *Invest. Radiol.* **30** : 532–537, 1995.
- 15) Yamamoto, K., Onoda, K., Sawada, Y. et al. : Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia and medial thickening in a vein graft model. *Ann. Thorac. Cardiac Surg.* **13** : 322–330, 2007.
- 16) Kudo, F.A., Kondo, Y., Muto, A. et al. : Cilostazol suppresses neointimal hyperplasia in canine vein grafts. *Surg. Today* **39** : 128–132, 2009.
- 17) Biondi-Zoccai, G.G., Lotrionte, M., Anselmino, M. et al. : Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after coronary percutaneous intervention. *Am. Heart J.* **155** : 1081–1089, 2008.
- 18) Kawatsu, S., Oda, K., Saiki, Y. et al. : External application of rapamycin-eluting film at anastomotic sites inhibits neointimal hyperplasia in a canine model. *Ann. Thorac. Surg.* **84** : 560–567, 2007.
- 19) Gundersen, H. J., Bendtsen, T. F., Korbo, L. et al. : Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96** : 379–394, 1988.
- 20) Johnson, J.L., van Eys, G.L., Angelini, G.D. et al. : Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** : 1146–1151, 2001.
- 21) Vukovic, I., Arsenijevic, N., Lackovic, V. et al. : The origin

- and differentiation potential of smooth muscle cells in coronary atherosclerosis. *Exp. Clin. Cardiol.* **11** : 123-128, 2006.
- 22) Fujita, Y., Lin, J.X., Takahashi, R. et al. : Cilostazol alleviates cerebral small-vessel pathology and white-matter lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* **1203** : 170-176, 2008.
- 23) Newman, W.H., Castresana, M.R., Webb, J.G. et al. : Cyclic AMP inhibits production of interleukin-6 and migration in human vascular smooth muscle cells. *J. Surg. Res.* **109** : 57-61, 2003.
- 24) Indolfi, C., Di Lorenzo, E., Rapacciuolo, A. et al. : 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation induced by balloon injury in vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36** : 288-293, 2000.
- 25) Hayashi, S., Morishita, R., Matsushita, H. et al. : Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of *p53* and *p21*. *Hypertension* **35** : 237-243, 2000.
- 26) Douglas, J.S. Jr., Holmes, D.R. Jr., Kereiakes, D.J. et al. : Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation* **112** : 2826-2832, 2005.
- 27) Lee, S.W., Park, S.W., Kim, Y.H. et al. : Comparison of triple versus dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation (from the DECLARE-long trial). *Am. J. Cardiol.* **90** : 1314-1319, 2002.
- 28) Schachner, T., Zou, Y., Oberhuber, A. et al. : Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann. Thorac. Surg.* **77** : 1580-1585, 2004.