原 著

ウロキナーゼ固定化ダクロン系に関する研究
—リンパ性浮腫に対するリンパ液誘導系としての利用—

大城 孟* 高橋 顯* 向井 清* 神前 五郎*

The study on dacron fiber immobilized urokinase
—The utility of this dacron fiber in Handley's
operation for lymphedema—Takeshi OHSHIRO*, Akira TAKAHASHI*,
Kiyoshi MUKAI* and Goro KOSAKI*

Key words : urokinase, disinfection, fibrinolysis, immobiliza-
tion, lymphangioplasty

Today, the development of antithrombogenic medical materials is the important points in advance of medical therapy. For this purpose, we prepared the dacron fiber immobilized urokinase which was the most useful fibrinolytic medicament.

This report investigated the influence of disinfection against the fibrinolytic activity of this fiber and presented the two clinical cases who were implanted this fiber in Handley's operation for lymphedema. Figure 1 shows the procedure of immobilization of urokinase to dacron. In this procedure, polyethyleneimine and gantrez (maleic anhydride/methylvinyl ether copolymer) play the role of grafted copolymer in order to couple the urokinase in peptide linking. Fibrinolytic activity of this fiber was measured by standard human fibrin plate.

The prepared dacron fiber kept the remarkable fibrinolytic activity in the repeated fibrinolysis test after the 6 months storage. In basic experiment, we checked how the immobilized urokinase was stable to the handling of disinfection. The fiber was soaked in 0.5 % chlorhexidine alcohol, boiled saline solution or ethyleneoxide gas. Figure 2 shows these results. The stability of immobilized urokinase was more superior in 0.5 % chlorhexidine alcohol.

These experimental data suggest the possibility of clinical use of immobilized urokinase technique.

Then, we applied this immobilized urokinase technique to the lymphangioplasty in lymphedema which was called Handley's operation. We had already two clinical cases implanted dacron fiber immobilized urokinase. The first case had primary lymphedema of left lower extremity and the second case had secondary lymphedema of left lower extremity. These patients were implanted three pieces of dacron fibers of approximately a half meter into subcutaneous tissue from below the knee to above the groin. After the operations, they were injected

* 大阪大学第二外科 (〒553 大阪市福島区福島1—1—50), Osaka University Medical School, 2nd Department of Surgery, Osaka, Japan.

intravenously the high concentration of urokinase solution once a month. In one patient, however, one of three pieces of dacron fiber was removed for the infection after 45 postoperative days. Figure 4 shows the histological finding of removed dacron fiber. The fiber was surrounded by the granulation tissue with giant cells. In peripheral portion, the spaces among the bundle were filled with granulation tissue, while in central portion, the some spaces were kept open. But the fibrinolytic activity of this removed material had been almost lost.

From these clinical cases, we fully realized the necessity to develop the new material immobilized urokinase which was able to maintain the strong fibrinolytic activity for a long period even in vivo.

はじめに

固定化ウロキナーゼの利用が血栓形成の防止に役立つかもしれないとする成績は、すでに1973年 Kusserow ら¹⁾により報告されているが、われわれもまたウロキナーゼ固定化ナイロンの研究²⁻⁷⁾から固定化ウロキナーゼは勝れた線溶活性を有することを確認めた。すなわちこの研究では、7-0 無傷針付ナイロン製血管縫合糸にウロキナーゼを共有結合法 (covalent binding) にて固定化させ、この縫合糸をラット下大静脈内に刺入、5分間留置したのち静脈片ごと取り出し、この縫合糸の表面に附着する血栓の性状を検討したが、その成績は対照群では血栓が附着していないもの8.3%に対し固定化群では33.3%で、ウロキナーゼ固定化ナイロン製血管縫合糸は無処理のそれに較べほぼ4倍の抗血栓効果を発揮するというものであった。この成績はウロキナーゼ固定化を施した医用材料が抗血栓性材料として臨床にも応用しうることを示唆した。

そこでわれわれは今回ウロキナーゼ固定化ダクロン糸を作製し、これをリンパ性浮腫に対する Handley's operation に利用した。Handley's operation とは皮下組織内に人工繊維を埋没させこの繊維を通してリンパ液を誘導させようとする手術である。

I. ウロキナーゼ固定化ダクロン糸の作製

この目的のために使用したダクロン糸はダクロン繊維1,000本以上からなる縫糸である。ウロキナーゼ固定化の方法は図1に示した。消毒法はアルコール消毒・煮沸消毒・ガス消毒のう

ちガス消毒を用いたが、ガス消毒の条件はエチレンオキサイドガス10%・CO₂90%・湿度50~60%・室温2時間で、以後数日間新鮮空気にて洗滌した。

作製したダクロン糸の線溶活性は標準ヒトフィブリン平板を用いその溶解能にて測定した。

II. 線溶活性に対する消毒法の影響

基礎実験としてウロキナーゼ固定化ダクロン糸の線溶活性に対する消毒法の影響を検討したが、その成績は次のごとくである。

① アルコール消毒の影響

ダクロン糸を0.5%ヒビテンアルコール (0.5% chlorhexidine alcohol) 溶液に1, 3, 5, 10, 30, 60分間浸水したのち生理食塩水にて十分洗滌し、その線溶活性の推移を検討したのが図2Aであるが、フィブリン溶解能は30分まではほぼ変わらず60分でやや低下した。すなわちダクロンを担体とした固定化ウロキナーゼの線溶活性はアルコール消毒にはよく抵抗し阻害されなかった。

② 煮沸消毒の影響

ダクロン糸を100℃煮沸生理食塩水に3, 5, 10, 15, 30, 60, 120分間浸水したのちその線溶活性の推移を検討したのが図2Bであるが、フィブリン溶解能は15分まで順次低下し30分では完全に消失した。すなわちこの線溶活性は煮沸にて強く阻害された。

③ ガス消毒の影響

エチレンオキサイドガス消毒の条件はすでに述べたが、その線溶活性の推移は図2Cに示すごとく消毒後ではやや低下した。ただしガス消毒の影響は一定せず、あるサンプルでは強い阻

Fig. 1 The procedure of immobilization of urokinase to dacron.

害を受けた。

以上の成績をまとめると、ウロキナーゼ固定化ダクロン糸の線溶活性は各種消毒法のうちアルコール消毒にはよく抵抗することがわかった。ただし今回の消毒にガス消毒を選んだのは使用したダクロン糸が縫糸であるために繊維間隙の毛細管腔を消毒するにはこれが最良と考えたからである。このダクロン糸は細菌培養にて一応消毒が完全なことを確認している。

III. Handley's operation を施行した臨床例

ウロキナーゼ固定化ダクロン糸を使い Handley's operation を施行した臨床例は2例である。Case 1 は24歳女性 primary lymphedema of left lower extremity の症例、Case 2 は45歳女性 secondary lymphedema of left lower extremity の症例で、それぞれの既往歴は図3 A・Bに示した。

各症例にはいずれも左膝下方 10cm から左ソケイ部上方 10cm にかけて3本のウロキナーゼ固定化ダクロン糸(長さ50cm)を埋没したが、その臨床経過は図3のごとくである。なお各症例は術前後にウロキナーゼを点滴静注した。術

Fig. 2 Influence of disinfections against the fibrinolytic activity of dacron fiber immobilized urokinase.

後大腿および下腿周径はやや減少し、とくに大腿皮下組織の緊満度は明らかに軽減した。臨床経過中 Case 1 では45日目に左大腿部蜂窩織炎を併発、埋没したダクロン糸3本のうち1本を中心に膿瘍を形成、膿汁排泄をみたのでこれを除去した。図4は除去したダクロン糸のHE染色であるが、ダクロン繊維は巨細胞を伴う肉芽組織でおおわれ、繊維間隙には一部結合組織が浸入し毛細管腔は閉塞していた。除去したダクロン糸の線溶活性はすでに消失していた。

IV. 考 按

ダクロンを担体としたウロキナーゼ固定化の方法は、原則的にはわれわれが行っているナイロンを担体とした固定化法³⁾と同じであるが、結合基の増大を計る腐食操作(etching)は後者が3N HClで行ったのに対し前者では1N

(A) Case 1. T. K. 24y.o. F Primary lymphedema of left lower extremity. 2 y.o. Bronchial asthma. 24 y.o. Hypoproteinemia, protein losing gastroenteropathy, anovulatory menstruation.

(B) Case 2. T. T. 45y.o. F Secondary lymphedema of left lower extremity. 35 y.o. Uterine cancer, radiation therapy. 45 y. o. Hernia of intervertebral disc. 45 y.o. Erysipelas in right thigh.

Fig. 3 Clinical course of case 1 (A) and case 2 (B) who were implanted dacron fiber immobilized urokinase.

NaOH にて行った。これは後者の重合様式がアミド結合 (CONH) であるのに対し前者のそれがエステル結合 (COOR) であるためである。

こうして作製したウロキナーゼ固定化ダクロン糸はナイロン糸の場合と同じく明らかにフィブリン溶解能を有し、その線溶活性は6か月保存後でもほぼ変わらず比較的安定であった。

この線溶活性に対する消毒法の影響については、基礎実験の成績が示すごとくアルコール消毒によく抵抗を示し、アルコール消毒が比較的良好のように思われた。ただし今回はすでに記した理由でガス消毒を用いた。消毒法にはその他ガンマー線消毒や電子線消毒があり、こうしたものの優劣については今後さらに検討してみたい。

ウロキナーゼ固定化を施した医用材料は、抗血栓性材料として臨床の各分野に応用可能であるが、今回はとくにリンパ性浮腫に対する Handley's operation に利用した。Handley's operation では従来から絹糸あるいはテフデック糸がよく用いられるが、われわれが今回作製したダクロン糸の特長は

- ①組織反応の少ない合成繊維であること
- ②太い繊維束として作られているために毛細管腔が多いこと
- ③各繊維表面にウロキナーゼが固定化されているために抗血栓性作用を有すること

である。この特長のゆえにこのダクロン糸は皮下組織内に埋没後も長期間リンパ液誘導の役割りを果すものと考ええる。すなわち繊維束の毛細管腔が凝固したリンパ液で閉塞するということとは抑制されるのではないかと考えている。

本手術を施行するに際しその前後にウロキナーゼを点滴静注したが、その理由はウロキナーゼ投与により線溶亢進準備状態を作り出すことおよび埋没ダクロン糸の線溶活性を維持することを考慮したからである。

2症例はその後順調な経過をたどり左下肢の腫脹もやや軽減したが、うち1例で蜂窩織炎を

Fig. 4 Histological finding of removed dacron fiber immobilized urokinase in case 1.

併発、膿瘍を形成したため汚染したダクロン糸を除去した。除去したダクロン糸の毛細管腔は一部閉塞していたが、繊維束の中心部には及んでいなかった。このダクロン糸の線溶活性はすでに消失していたが、この原因としては、

①固定化ウロキナーゼがダクロン繊維表面から離脱した

②抗ウロキナーゼ物質により失活した

③各種プロテアーゼにより変性ないし分解したなどの因子をあげることができる。動物実験では①の因子が大半を占めるが、今回の症例では細菌汚染がこれに拍車をかけたものとする。

おわりに

この論文ではウロキナーゼ固定化ダクロン糸に関する基礎実験を紹介するとともに、臨床応用としてリンパ性浮腫に対するリンパ液誘導糸としての利用法を紹介した。

われわれはこの臨床例から固定化ウロキナーゼの長期臨床応用に際しては、より強力でより安定な線溶活性を有する医用材料を作製することが必要であることを痛感した。そのためにはさらに勝れた固定化法の確立、担体の開発、消毒法の検討が重要である。

文 献

- 1) Kusserow, B.K. et al.: The surface bonded, covalently crosslinked urokinase synthetic surface. In vitro and chronic in vivo studies. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, **19**; 8~12, 1973.
- 2) 大城 孟, 門田守人, 神前五郎, 他: ウロキナーゼ固定化ナイロン製血管縫合糸による血管縫合. 脈管学, **17** (Suppl.); 31, 1977.
- 3) 大城 孟, 門田守人, 神前五郎, 他: ウロキナーゼ固定化ナイロン製血管縫合糸に関する研究(1). 人工臓器, **6**; 237~241, 1977.
- 4) 大城 孟, 神前五郎, 高木邦彦, 他: ウロキナーゼ固定化ナイロン—固定化法の検討. 人工臓器, **7**; 210~213, 1978.
- 5) 大城 孟, 向井 清, 神前五郎, 他: ウロキナーゼ固定化ナイロン——消毒法の検討および結合様式の検討. 人工臓器, 投稿中.
- 6) 大城 孟, 岡川和弘, 神前五郎, 他: ウロキナーゼ固定化医療材料の臨床応用 (その1). 人工臓器, 投稿中.
- 7) 大城 孟, 向井 清, 神前五郎, 他: ウロキナーゼ固定化医療材料の臨床応用 (その2). 血液と脈管, 投稿中.