細小動脈置換実験に於ける PGI₂ 誘導体 OP-41483 の効果

安田 慶秀* 鈴木 省悟* 田辺 達三*

Effect of OP-41483, a derivative of prostaglandin I₂ on small caliber arterial reconstructive surgery

Keishu YASUDA*, Seigo SUZUKI* and Tatsuzo TANABE*

Key words : arterial reconstruction, platelet aggregation inhibitor OP-41483, EPTFE

Canine femoral artery was substituted with expanded polytetrafluoroethylene graft (Gore-Tex) (inner diameter, 3 mm) and the effect of OP-41483 α -CD (OP-41483) on the graft patency was studied at six weeks after the surgery. OP-41483 was intravenously infused at the dose of 20 ng/kg/min for 3 hours two times a day. The period of administration was two weeks.

In the control group(five animals)without drug treatment, the graft patency was 40%, while all grafts were patent in the OP-41483 treated group(four animals).

The inhibitory effect of OP-41483 on platelet aggregation induced by ADP (5 μ M) was not observed *ex vivo* at the dose of 20ng/kg/min. But, the histological and electron scanning microscopic findings of the grafts showed that OP-41483 at the same dose obviously inhibited the platelet adhesion and aggregation, and this inhibitory effect might lead to elevation of the graft patency.

はじめに

プロスタサイクリン(PGI₂)¹⁾は強力な血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を有し、血管外科への応用が諮られてきた。しかし、本剤は化学的に不安定で、しかもその血管拡張作用が強力過ぎるため臨床応用には難点があった。PGI₂誘導

体である OP-41483・ α -CD (図 1, 以下 OP-41483 と略)は血管拡張作用は弱く, 特異的に血小板凝集抑制作用の強い, 安定性の高い物質であり²⁾血管外科における応用が注目されている.

著者らは EPTF グラフトを用いたイヌ細小動脈移植実験に OP-41483 投与を行い、移植グラフト開存成績に及ぼす効果および血行再建

* 北海道大学医学部第二外科 (〒060 札幌市北区北十五条西7丁目); Second Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan. 受付: 1988. 10. 7. 受理: 1989. 2. 27.

5(E)-6, 9-Deoxa-6, 9 α -methylene-15-cyclopentyl-16, 17, 18, 19, 20-pentanol-PGI₂· α -cyclodextrin clathrate

Fig. 1 Chemical structure of OP-41483 α -CD

Fig. 2 Substitution schema of EPTFE graft used in this experiment

手術における血中プロスタノイド，血小板機能，血液凝固系への変動について検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. EPTFE グラフト移植

体重 10~14kg, 雄の雑種成犬を用い，ネブタール麻酔下に左右両側大腿動脈を露出し，中枢側は鼠径靱帯の一部を切開してその少し上方まで血管を露出し，中枢および末梢側で動脈遮断鉗子をかけたのち，動脈の 1.5~2 cm を切除し，内径 3 mm, 長さ 4 cm の EPTFE グ

ラフト (Gore-Tex) を移植した (図 2)。吻合は 2.5 倍の拡大鏡下で 6-0 プロリン糸を用いて行い，支持糸を置かず，一本の糸を用いて全周連続 over and over 縫合とした。グラフト移植手術中，動脈遮断のためのヘパリン全身投与は行わず，また手術手技の拙劣にもとずく開存成績の差を無くすため，血管吻合は全て同一の熟練者が行った。術後は 3 日間抗生剤を投与した。グラフト開存性の確認は手術後 1, 2, 3, 4, 5 週目に体表から触診で行い，6 週目に麻酔下に移植グラフトを露出し拍動の確認を行った。次いで吻合部中枢側で動脈遮断を行っ

Fig. 3 Typical photograph of synthetic graft (C-5) in the control group in which the patency was not observed

て移植グラフトを取り出し、その開存性、吻合部及び内腔の肉眼的性状の観察を行った。写真撮影後摘出グラフトを二分し、それぞれを10%ホルマリン液、1.5%グルタルアルデヒド液で固定し光学顕微鏡的所見、グラフト内面の走査電子顕微鏡的所見について検索した。

2. 薬剤の投与方法

実験動物は第一群が対照群6頭、第二群がOP-41483 20ng/kg/min 投与群5頭で、これら群のうちそれぞれ1頭は移植後早期の変化を検索するために血流再開後30分および90分に左右いずれか一方のグラフトを摘出した。

薬剤の投与はグラフト移植手術に先立ち頸静脈に留置した内径1mmのビニールチューブより微量注入装置を用いて行い、術当日は動脈遮断前1時間より3時間、術翌日からは朝夕2回、1回の投与時間を3時間とし、投与期間は2週間とした。OP-41483は生理食塩液(生食)に溶解し5.7ml/hrの速度で、OP-41483を投与しない間はチューブの血栓防止の為に生食を1.5ml/hrで持続注入した。対照群は生食のみを1.5ml/hrの速度で2週間、間断なく持続注入した。各実験犬はharnessを用いて半固定し、静脈チューブの抜去や手術部位のトラブル防止を図った。術後2週間経過後は自由に動き

廻れる状態にした。

以上の第一群・第二群11頭のほかにOP-41483, 100ng/kg/min, 1日2回, 2週間投与を一頭の犬で行い(OP-41483, 100ng投与犬), さらに他の2頭ではOP-41483, 20ng/kg/minを術中から2時間静脈内投与し、術後は同経口剤20μg/kgを朝夕2回, 4週間経口投与した(OP-41483, 経口群)。

なお、OP-41483は小野薬品工業株式会社より入手したものを使用した。

3. 血小板凝集能の測定

手術当日、術後1週および2週目のOP-41483投与前後、および2週以降、3, 5, 6週目に頸静脈より採血しADPによる血小板凝集能を測定した。3.8%クエン酸ナトリウムと全血を1:9の割合で採血し、1,200Gで1分間遠心分離して多血小板血漿(PRP)を調製しAggregometer (NKK HEMA TRAC ER I model PAT-6M, 二光バイオサイエンス)を用いて行った。なお、PRP中の血小板数については調整はしなかったが、何れも $15 \sim 25 \times 10^4/\mu\text{l}$ の乗用内であった。

4. 凝固能の測定

クエン酸血漿を用い、PT, APTTおよびPTTの三項目についてそれぞれsimplastin,

Table 1 Effect of OP-41483 on the patency of grafts interposed in the canine feoral artery.

Experimental. Groups	Dog No.	Body weight	Patency		Patency Rate (%)	p<0.05 (x ² -test)
			left	right		
conntrol (n=5)	c-1	12kg	+	+	40 (4/10)	
	c-2	14	+	+		
	c-3	12	—	—		
	c-4	12	—	—		
	c-5	11	—	—		
OP-41483(n=4) 20 ng/kg/min	op-1	14	+	+	100 (8/8)	
	op-2	14	+	+		
	op-3	12	+	+		
	op-4	12	+	+		

*The patency of the grafts was confirmed at six weeks after the surgery.
But C-2 in the control group was observed at four weeks.

Fig. 4 Typical photograph of sythetic graft (OP-4) in the OP-41483 treated group in which the patency was observed

platerin plus activator, platelin (いずれも小野薬品) を用い Coagulation Profier Model CP-8 (BIO/DATA) にて常法通り測定した。

5. 血漿中 TxB_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の測定

終濃度 $28\mu\text{M}$ のインドメタシンおよび 4mM の EDTA-2Na の存在下に採血し, 冷却下に遠心分離して血漿を得, 測定試料とした。酒井らの方法で³⁾ TxB_2 および 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ を抽出, 精製しつつ radioimmunoassay (RIA)

法⁴⁾により測定した。RIA は小野薬品中央研究所にて作製した抗体および市販の [^3H] 標識体を用い, Dextran coated charcoal 法で行った。 [^3H] TxB_2 は NEN より, [^3H] 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ は Amersham より購入した。

6. 血小板数の測定

3.8% クエン酸ナトリウム採血血液を用い, TOA Platelet Counter PL-100 で測定した。

Fig. 5 Scanning electron microscopic finding of the internal surface of synthetic graft at 30 min after surgery (control group)

II. 実験結果

1. 移植グラフトの開存性

第1群(対照群)5頭, 第2群(OP-41483, 20ng/kg/min 投与群)4頭の術後6週目移植グラフト開存成績を表1に示した. 対照群の1頭(c-2)については術後4週で死亡したため, この時点での判定結果を採用した.

表1に示すごとく対照群5頭中2頭・4グラフトが開存しており他の3頭・6グラフトは閉塞していた. 一方, 第2群(OP-41483 投与群)では4頭・8グラフトが全て開存しており両群間には有意差がみられた. 閉塞例ではグラフトの中枢側吻合部, あるいは中枢と末梢の両吻合部に器質化した血栓を認め, グラフト内腔には凝血塊が充満していた(図3). 長期開存例ではグラフト内面は光沢のある内面で覆われていた(図4).

OP-41483 100 ng/kg/min 投与群の2グラフトは術後6週で2本とも開存していた. また, OP-41483, 経口投与群2頭・4グラフトのうち, 1頭2グラフトは4週間で薬剤を中止した後閉塞した.

2. 組織学的検査

血流再開後30分および90分で摘出したグラ

フトは対照群, OP-41483 投与群ともに開存していた.

1) 走査電子顕微鏡所見

対照群のグラフト内面の走査電子顕微鏡所見(SEM)は, 血流再開30分ですでに凝集した血小板の厚い層で覆われ, その上に多数の赤血球が付着していた(図5). 90分後のSEM像もほぼ同様の所見を示した. OP-41483 投与群のグラフト内面は血流再開30分, 90分ともほぼ同じ所見を呈し, グラフト内面は薄くて密なフィブリンネットで覆われ, その表面に赤血球, 血小板が散在しているが, 血小板の凝集は抑制されており対照群との差は明かであった(図6).

一方, 移植後6週目に取り出した長期開存グラフト内面のSEM所見は対照群, OP-41483 投与群間に大きな差異はみられなかった. 肉眼的に白色光沢のある仮性内膜は厚さ100 μm以下の繊維の層から成っており, その血流に接する部には内皮と推定される細胞の高まりの配列が見られ, 血小板, 赤血球のわずかな付着はあるが, ほぼ完成した仮性内膜の像を示していた.

2) 長期開存グラフトの光学顕微鏡所見

移植後6週で取り出した開存グラフトの光学による組織学的検索では対照群, OP-41483 投与群との間に差異は認められなかった. グラフ

Fig. 6 Scanning electron microscopic finding of the internal surface of the graft at 90 min after surgery (OP-41483 treated group)

Fig. 7 The time course of platelet aggregability in control (—○—) and OP-41483 (—●—) treated group

Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of four animals. * and ** indicates significant difference from control at $p < 0.05$ and 0.01, respectively (student *t*-test)

ト周囲からグラフト壁への組織の進入は僅かで、未熟な繊維のみであり、グラフト壁の隙間の大部分は血漿様の液で満たされており、中に小円形単核球の浸潤が認められた。グラフト内腔で吻合部から2～3mmのところまでは宿主血管から連続して伸びてきた厚さ200～300 μ mの繊維の層で覆われており、血流に接する面に

は一層の内皮細胞の配列が認められた。

3. 血小板凝集能

5 μ M ADPによる血小板凝集に対するOP-41483の効果および経日の血小板凝集率の変化を図7に示した。

OP-41483, 20 ng/kg/minの投与で手術当日、1週目、2週目いずれにおいても凝集抑制

Fig. 8 The time course of blood coagulation parameters in control (—○—) and OP-41483 (—●—) treated groups.

Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of four animals

Fig. 9 The time course of platelet counts in the control (—○—) and OP-41483 treated (—●—) groups

Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of four animals

効果は認められなかった。経日的な血小板凝集率の変化は OP-41483 投与群で、手術当日の前値に対し 2 週以降有意に凝集率が上昇することが認められた。対照群でも同様に 1 週、2 週で血小板凝集率の亢進傾向がみられたが有意差

はなかった。

4. 凝固能および血小板数

PT, APTT, PTT とともに OP-41483 の投与による影響は認められなかった (図 8)。また、血小板数についても大きな変動は認められ

Fig. 10 The changes of plasma prostaglandin levels before and after graft interposition surgery (—○—: control, —●—: OP-41483 treated group)

Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of four animals. * indicates significant difference from saline control at $p < 0.05$ (student's t-test)

なかった (図 9).

5. TxB_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の変動

グラフト移植前後の末梢静脈血中の TxB_2 および 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の値は対照群, OP-41483 投与群ともに有意な変動は認められなかった (図 10). $\text{TxB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 値でみても両群とも有意の変動はなかった (図 11).

III. 考 案

四肢末梢動脈の血行再建には自家静脈グラフトが用いられるが, 再手術例などで適当な自家静脈グラフトが使用できない場合は人工血管が用いられている. しかし, 人工血管による細小動

Fig. 11 The changes of plasma thromboxane B_2 / 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ratio before and after graft interposition surgery (—○—: control, —●—: OP-41483 treated group). Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of four animals

脈再建手術の開存成績は必ずしも良好とはいえず, 成績向上のためには手術手技の改善にくわえ抗血小板剤投与などの補助療法が大切である.

われわれは長年にわたり人工血管の開発, 改良に関する実験・研究を続けており, 最近においては EPTFE グラフトを用いてイヌ大腿動脈移植実験を行い, Ticlopidine および Aspirin の長期投与の効果を検討してきた⁵⁾. EPTFE グラフトは抗血栓性に優れており, 細小動脈は静脈の血行再建への臨床応用がはかられ一定の成績が得られている⁶⁾⁷⁾. 本グラフトを用いる場合, 血行再建手術早期には吻合部の血栓形成が大きな問題となり, 開存成績向上のためには抗凝固療法や抗血栓療法, 血栓溶解剤の投与など種々の補助療法が必要である. また慢性期においても, 過剰な pannus 形成による吻合部狭窄をきたすことがあり, とくに内径 6 mm 以下のグラフトを使用する場合には長期にわたる補助療法が必要である.

プロスタグランディン (PG) については最近, 研究の進歩が著しく, とくに PGI_2 , トロンボキサン A_2 の発見によって, 各種循環器疾患におけるこれらの相拮抗する物質の関与, 病態解明と治療への応用の両面で注目されてきてい

る。PGのうち primary PGの PGE_1 は閉塞性動脈硬化症 (ASO) やバージャー病 (ATO), レイノー病などの末梢循環障害において広く臨床応用が行われており, 血行再建手術に対する効果も確認されている⁸⁾。 PGI_2 は PGE_1 の約 30 倍の血小板凝集抑制作用, 約 10 倍の血管拡張作用を有し²⁾, 循環器疾患への応用が期待され ASO⁹⁾ や TAO¹⁰⁾, レイノー病¹¹⁾ などに対する臨床応用がはかられてきたが, 化学的な不安定性と強力すぎる血管拡張作用のためその臨床応用には一定の限界があった。この点, OP-41483 は血管拡張作用が PGE_1 と同定度であるのに対して血小板凝集抑制作用は約 10 倍 (selective index 10) と特異的に抗血小板作用の強い物質である²⁾。本剤の安定性は高く室温で 3 年以上安定といわれている。本剤についてわれわれはすでに体外循環の基礎的研究のなかで, PGI_2 との比較を行い, 応用しやすく強い血小板保護効果も認めてきた¹²⁾。また, ASO や TAO などの虚血性潰瘍に対する臨床応用も行い, 潰瘍に対する有効な改善効果を認めている¹³⁾。

代用血管を用いた細小動脈の血行再建に対する本剤の応用の報告はまだ他にみられないが, この領域に対する本剤の効果は術後早期にグラフト表面の走査電顕組織所見および遠隔期のグラフト開存率の向上から明かであった。しかし本実験で用いた程度の投与量では全身血において血小板や血液凝固の機能検査上に有意な変動はみられなかった。その血小板凝集能は OP-41483 投与群, 対照群とも術前値に比し術後に上昇する傾向がみられたが, 本剤投与群と対照群との間に有意の差は認められなかった。

その機序については不明な点もあるが, 皮膚や筋肉組織の血管拡張に伴う血流の増加, グラフトおよびその表面局所における血小板凝集の抑制などの相乗効果によってグラフト開存性の向上が得られたものと思われる。また下肢動脈閉塞症例においても下腿筋の分節組織血流の増加を示す成績が得られた¹⁴⁾。

血管外科においては血管拡張剤や抗血小板剤の投与など, 種々の補助療法が行われる。本研究で用いた PGI_2 誘導体である OP-41483 は

副作用も少ないため比較的使いやすく, とくに血栓形成が病変の進展に大きく関与しているといわれるバージャー病, 血栓形成とともに病態が進展する閉塞性動脈硬化症の急性増悪期, また各種血栓症, 血栓閉塞が問題となる細小動脈血行再建などにおいて, 従来用いられている薬剤とは異なる作用機序ではたらし, その応用に大きい期待がもたれる。

文 献

- 1) Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J.R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**; 663~665, 1976.
- 2) Kawasaki, A., Katsube, N. and Sakaguchi, K.: Anti-platelet activity of op-41483, a carbacyclin analog. *Perspectives in Prostaglandin Research, Proceeding of the Winter Seminar of the Japanese Inflammation Society*, Tokyo, 97~99, 1983.
- 3) Sakai, Y., Masuda, H., Taniguchi, K., Shintani, T., Miyamoto, S. and Matsumoto, K.: "Abstracts of Kyoto Conference on Prostaglandins", p. 161, 1984.
- 4) 稲川寿夫: 臨床検査, **26**; 135, 1982.
- 5) 橋本正人, 田辺達三, 本間浩樹, 森山 裕, 新里順勝, 坂本克輔, 武岡哲良, 青木秀俊, 杉江三郎: 細小動脈置換における血小板凝集剤, Ticlopidine および Aspirin の効果. 血液と脈管, **11**; 170~178, 1980.
- 6) Veith, F.J., Moss, C.M., Daly, V., Fell, S.C. and Haimovici, H.: New approaches to limb-salvage by extended extra-anatomic bypasses and prosthetic reconstructions to foot arteries. *Surgery*, **84**; 764~774, 1978.
- 7) Tellis, V. A., Kohlberg, W. I., Bhat, D. J., Driscoll, B. and Veith, F. J.: Expanded polytetrafluoroethylene graft fistula for chronic haemodialysis. *Ann. Surg.*, **189**; 101~105, 1979.
- 8) 田辺達三, 本間浩樹, 三島好雄, 塩野谷恵彦, 勝村達喜, 佐藤方紀, 草場 昭, 森山正明: 末梢血管再建術における Prostaglandin E_1 点滴静注の効果. 外科, **42**; 152~157, 1980.

- 9) Nizankowski, R., Krolikowski, W., Bielato-
wicz, J. and Szczeklik, A.: Prostacyclin for
ischemic ulcers in peripheral arterial disease.
A random assignment, placebo controlled
study. *Thromb. Res.*, **37**; 21~28, 1985.
 - 10) Fernandez, N. A., Rosenberg, V., Lee, M.
and Singer, A.: Prostaglandin E₁ in obstruc-
tive peripheral vascular disease. *Mt. Sinai J.
Med.*, **50**; 213~217, 1983.
 - 11) Belch, J. J., Newman, P., Drury, J. K., Mc-
kenzie, F. and Capell, H.: Intermittent
epoprostenol (prostacyclin) infusion in pa-
tients with Raynaud's syndrome. A double
blind controlled trial. *Lancet*, **1**; 313~315,
1983.
 - 12) 松倉裕美, 竹田治士, 鶴沢茂樹, 酒井圭輔, 川
上敏晃, 田辺達三: 体外循環における Prosta-
glandin I₂ 誘導体の実験的検討. *日胸外会誌*,
31; 871~875, 1983.
 - 13) 田辺達三, 安田慶秀, 佐久間まこと: 末梢動脈
閉塞例に対する新しい PGI₂ 誘導体の応用. *外
科治療*, **52**; 454~459, 1985.
 - 14) 未発表資料
-