特集／ティッシュウェルディング

組織コラーゲン動態から見たレーザー血管吻合部の創傷治癒

Wound healing of laser-assisted vascular anastomosis
from the viewpoint of tissue collagen dynamics

泉澤 康晴, 佐久間まこと¹⁾, 大場 淳一¹⁾,
安田 慶秀¹⁾, 山下 和人²⁾, 小谷 忠生²⁾

北大医学部第二外科

¹⁾ 同循環器外科, ²⁾ 酪農学園大学獣医外科

Yasuharu IZUMISAWA, Makoto SAKUMA*, Junichi OHBA*,
Keishu YASUDA*, Kazuto YAMASHITA** and Tadao KOTANI**

Second Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine

*Department of Cardiovascular Surgery, Hokkaido University School of Medicine

**Department of Veterinary Surgery 1, School of Veterinary Medicine,
Rakuno Gakuen University

要 旨

レーザー血管吻合部の創傷治癒を客観的に評価するために、健康雑種成犬の総頸動脈に作製した吻合部のコラーゲン量、非コラーゲン蛋白質量およびコラーゲン濃度を、色素結合法により測定し、手縫い吻合部を対照にその経時的(直後, 7日, 15日, 30日, 60日, 90日, 各=5)変化を観察した。

レーザー吻合部では、コラーゲン量およびコラーゲン濃度が吻合後急増し、15日をピークに30日以降吻合直後の値に回復した。手縫い吻合部においては、漸増し、60日まで高値を持続した。

その結果、レーザー血管吻合では、手縫い吻合よりも良好で早い創傷治癒が得られた。

キーワード：レーザー血管吻合, Nd:YAG レーザー, 小動脈, 創傷治癒, コラーゲン

Abstract

To evaluate the efficacy of laser-assisted vascular anastomosis (LAVA) for the wound healing, collagen content, non-collagenous protein content and collagen concentration were measured at 1 hour and 7, 15, 30, 60 and 90 days after anastomosis of canine common carotid artery. The dye-binding method was employed. Results were compared to conventional suture vascular anastomosis (CSVA) with 7-0 polypropylene.

In LAVAs, collagen content and concentration rapidly increased and hit a peak at 15 days, then, after 30 days, returned to the same value as at 1 hour. In CSVA, they were gradually increased and maintained high level even 60 days after surgery.

From these results, we concluded that LAVAs gained better and more rapid healing than CSVAs.

Key Words : Laser vascular anastomosis, Neodymium : YAG laser, Small caliber artery, Wound healing, Collagen

1. はじめに

レーザー血管吻合法は、レーザー光の持つ光熱エネルギーによる組織凝固作用を利用した方法である¹⁾。従来からの手縫い法に比べて吻合時間が短縮でき^{2) 3)}、また、縫合糸などの異物の影響が少なく組織の治癒がより自然に営まれることから高い開存成績をもたらすとされ^{3) 4) 5)}、とくに微小血管吻合への応用が期待されている。

近年外科手術における血管処理の係りが深まるなかで、血管吻合部の状態が、これらの手術成績に大きな影響を及ぼすものと考えられ、光顕や電顕などの形態学的検討、抗張力、耐圧力、弾性などの物性的検討など様々な観点からその部位の評価がなされてきた^{6) 7) 8) 9)}。

今回我々は、レーザー血管吻合部における創治癒を客観的に評価する観点から、組織コラーゲン動態に着目し、吻合部におけるその経時的变化を観察し、本吻合法の有効性を手縫い吻合法を対照に検討したので報告する。

2. 材料と方法

実験には、体重10kg前後の健康雑種成犬を用いた。Droperidol (0.1mg/kg iv), Ketamine hydrochloride (5 mg/kg iv) による麻酔導入後、Isoflurane 吸入による全身麻酔の維持により前頸部正中切開を行い、左右の総頸動脈(直径3-4 mm)を約7 cm剥離、露出した。ヘパリン(0.8mg/kg)を静脈内投与し、ブルドック鉗子にて総頸動脈の血行を遮断した後、鋭利な眼科剪刀を用いて切離した。一侧はレーザー吻合を、他側は対照として手縫い吻合を片側1-2箇所ずつ端々吻合にて行った。

レーザー装置は、Laser Sonics 社製 Nd : YAG レーザー Model 6000を使用した。切離した総頸動脈を、直径25 μ m 丸針付 7-0 Polypropylene 糸(Prolene8701, ETHICON)を用いて4ないし6箇所の支持糸を置き、切断面を正確に密着させた。支持糸を相反する方向に牽引して、その間の血管断端に先端径0.6mmの拡散型セラミックスチップ(LT10-08)を接触させ、既報の照射条件下⁹⁾に照射接合した。

手縫い吻合は、前記の7-0 Polypropylene 糸を用い、二点支持のもと合計14ないし16針の連続縫合にて行った。

手術後定期的(直後, 7, 15, 30, 60, 90日, 各n=5)に吻合部の血管を摘出した。血管を長軸方向に切開して四隅を木片に虫ピンにて展開し、中性緩衝ホルマリン液で固定した後、吻合線を中心に10mmの血管を常法によりパラフィン包埋した。

コラーゲンの定量は、血管を長軸方向に15 μ mの厚さに薄切し、脱パラフィンの後、Siriusred F 3 BA と Fast Green FCF の混合染色液(コラーゲンステインキット, コスモバイオ社)を用いた色素結合法¹⁰⁾により行った。小試験管に試料と染色液を入れ、遮光下で30分間放置した後染色液を除去し、DW で10回洗浄を繰り返した。NaOH メタノールで色素を抽出し、各色素の吸収スペクトルのピーク波長530nm および605nm で吸光度を測定し、コラーゲン量(μ g)、非コラーゲン蛋白質質量(μ g)およびコラーゲン濃度(μ g col./mg prot.)を算出した。

また同時に同染色液を用いて染色した厚さ3 μ mのブレパート標本により吻合部の組織学的観察を行った。

結果はSmirnov の棄却検定にて処理し、平均値±標準偏差で示した。数値間の有意差の検定にはStudent-t 検定を行い、危険率5%以下をもって有意差ありとした。

3. 結 果

吻合部の開存率は両群に差はなく、ともに摘出時において両群合計60箇所全て開存していた。また、いずれの場合も動脈瘤様変化や拡張は見られなかった。

1) コラーゲン量の経時的变化(図1)

レーザー血管吻合では、吻合直後 $1.13 \pm 0.48 \mu$ g あったが、その後直線的に増加して15日目の値 $3.58 \pm 1.98 \mu$ g をピークに30日目以降はほぼ手術直後の値を推移した。

これに対し手縫い吻合では、手術後7日目まで 1μ g 前後の値を示したが15日目には $3.07 \pm 1.42 \mu$ g と最大値を示し、その後は漸減したが、その間レーザー吻合部の値に対して有意に高く、90日目においても $1.60 \pm 0.42 \mu$ g と依然として高い値を示した。

2) 非コラーゲン蛋白質量の変化(図2)

レーザー吻合、手縫い吻合とも、手術直後の値はそれぞれ $204.37 \pm 160.52 \mu$ g, $218.52 \pm 115.47 \mu$ g とほぼ同じ

図1 コラーゲン量の経時的変化

図2 非コラーゲン蛋白質量の経時的変化

図3 コラーゲン濃度の経時的変化

値を示し、15日目 peaks に以後漸減したが、観察期間中手縫い吻合の値がレーザー吻合のそれよりも高値をとる傾向にあった。

3) コラーゲン濃度の経時的変化 (図3)

レーザー血管吻合では、手術直後 $5.62 \pm 1.01 \mu\text{g col./mg prot.}$ であったものが、その後急増し、15日目には $9.53 \pm 2.86 \mu\text{g col./mg prot.}$ と最大値を示し、30日以降はほぼ手術直後の値で推移した。

a

b

c

図4 レーザー吻合部の組織像

(Sirius red F 3 BA, Fast green FCF 染色, $\times 200$)

a. 吻合後15日目

b. 吻合後30日目

c. 吻合後90日目

一方、手縫い吻合では、手術直後 $5.16 \pm 0.80 \mu\text{g col./mg prot.}$ で、7日目には $4.69 \pm 1.47 \mu\text{g col./mg prot.}$ とわずかながら減少したが、以後漸増して30日目には最大値 $8.41 \pm 2.07 \mu\text{g col./mg prot.}$ を示した。その後漸減し、90日目にはほぼ手術直後の値に回復した。

4) 組織学的所見

図5 手縫い吻合部の組織像

(Sirius red F 3 BA, Fast green FCF 染色,
×200)

a. 吻合後30日目

b. 吻合後90日目

正常部では、全体に赤味を帯びていたが、特に外膜では一層赤く染まった。中膜では緑色に薄く染まった均質無効造の弾性線維に添って、一段と赤く染まった線維状物が認められた。

レーザー吻合部では、吻合7日目以降内皮化が認められた。15日目には内膜の肥厚がみられた(図4-a)が、30日以降はほぼ正常像にまで回復し(図4-b)、90日目には動脈の三層構造が良好に連続し、正常部と識別困難なほどに修復が進んだ(図4-c)。

手縫い吻合では、吻合部中央に縫合糸の紋扼による壊死や縫合糸周囲の異物巨細胞の浸潤などの異物反応域が濃緑色に染まって認められた(図5-a)。その外周は健常部に比べてより赤く Sirius red F 3 BA に染まった。これらの所見は時間経過とともに軽減した。90日目には染色性はほぼ正常像にまで回復したが、縫合糸から吻合部中心に向けてわずかながら依然として紋扼の影響が認められた(図5-b)。

4. 考 察

コラーゲンは、分子の種類により13種類以上が報告されている¹¹⁾。動脈壁にはI, III, IV, V, VIおよびVIII型の6種が知られているが、量的には30-70%がI型であり、残りの大部分をIII型コラーゲンが占めている¹²⁾。

1985年、López-De León らは、Sirius red F 3 BA と Fast green FCF という色素がそれぞれコラーゲンと非コラーゲン蛋白質に特異的に結合することに着目し、肝臓や肺の fibrosis を定量化する目的で、これらの色素の混合液を用いた色素結合法による組織コラーゲンの簡易微量測定法を開発した¹³⁾。Sirius red F 3 BAは、組織標本中のコラーゲンを選択的に染色する目的で広く用いられている染料で、4個のアゾ群化合物発色基をもち、高い吸光係数を有する分子量1372のナフトールで、I, II およびIII型コラーゲンに対する染色性が確認されている¹⁴⁾。一方、酵素、抗体、血液、構造蛋白などコラーゲン以外の蛋白質の染色に用いた Fast green FCF は、組織を緑色に均一に染、Sirius red F 3 BA によるコラーゲン染色で干渉されない特徴を有する。

著者らは、血管、特に動脈組織の創治癒や病的血管組織のコラーゲン動態の定量化を目的として、Lopez-De Leon らの方法を一般に行われている Inayama らの Hydroxyproline 定量法¹⁵⁾と比較し、その結果この色素結合法が動脈組織のコラーゲン定量法として極めて高い精度を有することを明らかにした¹⁶⁾。

今回の実験において、レーザー血管吻合部のコラーゲン量は、吻合後早期に直線的に増加して、15日目には最大となり吻合直後の値の約3倍量にまで達した。非コラーゲン蛋白質量も同様に増加したが、コラーゲンの増加率が上回り、結果としてコラーゲン濃度の増加につながった。一方同時期の手縫い吻合部では、コラーゲン量の増加率を非コラーゲン蛋白質のそれが上回って推移したため、コラーゲン濃度は7日目に減少し、以後増加するがそのピークは30日にまで遅延した。コラーゲンは、その骨組み形成により組織的な物理的保護、支持をもたらすといわれている¹¹⁾。レーザー吻合部はレーザーの組織凝固作用により接着しているために、吻合早期には手縫い吻合部のような高い抗張力が得られないので、このようなレーザー血管吻合部における吻合早期のコラーゲンの増加は極めて重要である。これらの変化は、Abergel ら¹⁶⁾のいうレーザーのコラーゲン産生促進能によるものかどうかは不明であるが、いずれにしろ、レーザー血管吻合法の最大の利点といわれる良好な創傷治癒^{17) 18)}に影響していることを強く示唆するものである。Guthrie ら¹⁹⁾は、アルゴンレーザーによる犬の静脈の

図6 血管吻合部のコラーゲン分布を示す模式図

接合を行った実験において、低分子量のいくつかの蛋白質とともに、I型およびV型のコラーゲンの増加を認めている。コラーゲンは、細胞外マトリックスとして、臓器の支持や結合という物理的機能に加え、細胞の足場となって細胞の生存環境を作り細胞の増殖や分化などの諸機能に大きな影響を与え、その結果として、組織構築や損傷を受けた組織の修復、すなわち創傷治癒に大きな役割を果たしている¹¹⁾。吻合部の内皮化が、手縫い吻合においては2-3週を要する²⁰⁾のに対して、レーザー吻合では、5日²¹⁾から7日^{21, 22)}で完了することや血管の三層構造の連続性が良好である²³⁾ことも、コラーゲン量で有意に勝るレーザー吻合部が、細胞の定着、代謝、増殖に有効な環境となっていることによるものと思われる。

吻合後30日目には吻合部のコラーゲン量は急減し、以降はほぼ吻合直後の値で推移した。しかし手縫い吻合では、30日以降漸減するがレーザー吻合に比較して有意な高値で推移し90日目においても依然として高い値を示した。非コラーゲン蛋白質量は手縫い吻合部の値が終始高値を示し、30日以降のコラーゲン濃度は逆転して手縫い吻合部の値が高値をとった。これらの変化は、模式図に示すように創傷治癒を必要とする組織量の違いに起因するものと考えられる(図6)。すなわち、レーザー吻合部では、組織修復が小規模で効率良く進められ、比較的早期に組織構造や物性の面で正常部に近い状態に回復する。コラーゲン量およびコラーゲン濃度の30日以降の減少は組織の治癒が完了に近い状態であることを示唆しているものと思われる。これに対し手縫い吻合部においては、縫合糸絞扼による広範囲な組織壊死や縫合系に対する炎症性反応が長い間存在するため、その修復に時間がかかる。いいかえれば、レーザー吻合部の創傷治癒が接合面に局限したいわゆる平面的な治癒であるのに対して、手縫い吻合部では縫合糸絞扼域を含んだ立体的な治癒であるといえる。

以上の結果から、レーザー血管吻合法は、吻合早期にコラーゲンの増加をもたらす、接合部の物理的支持を担

うとともに、細胞増殖のための良好な環境を提供し、その結果吻合部の創傷治癒が早期に達成されるものと考えられる。

5. 結 論

レーザー血管吻合部における創治癒の評価に、手縫い吻合法を対照として吻合部の組織コラーゲン動態を経時的に観察し、以下の結果を得た。

1. コラーゲン量は、レーザー吻合部では、吻合後早期に直線的に増加して15日をピークに、30日目以降はほぼ手術直後の値を推移した。手縫い吻合では、手術後7日目まで変化なく、15日目には最大値を示しその後は漸減したが、有意な高値で推移した。

2. 非コラーゲン蛋白質量は、両吻合部とも、15日目をピークに以後漸減したが、手縫い吻合の値が高値をとる傾向にあった。

3. コラーゲン濃度は、レーザー吻合部では、手術後急増して15日目に最大値を示し、30日以降はほぼ手術直後の値で推移した。手縫い吻合では、手術後7日目にわずかながら減少したが、以後漸減して30日目には最大値を示し、その後漸減して90日目にはほぼ手術直後の値に回復した。

4. 組織像は、レーザー吻合部では、吻合7日目以降内皮化が認められ、30日以降はほぼ正常像にまで回復した。手縫い吻合では縫合糸絞扼の影響が90日目においても認められた。

以上のごとく、レーザー血管吻合法は、吻合早期にコラーゲンの増加をもたらす、接合部の物理的支持を担うとともに、細胞増殖のための良好な環境を提供し、その結果吻合部の創傷治癒が早期に達成されるものと結論された。

文 献

- 1) Jain, K. K. and Gorisch, W.: Repair of small blood vessels with the Neodymium-YAG laser: A preliminary report. *Surgery* 85 : 684-688, 1979.
- 2) Jain, K. K.: Sutureless microvascular anastomosis using a Neodymium-YAG laser. *J Microsurg* 1 : 434-439, 1980.
- 3) Seure, A., Withers, E. H., Thomsen, S., et al: Comparison of carbon dioxide laser-assisted microvascular anastomosis and conventional microvascular sutured anastomosis. *Surg Forum*, 34 : 634-636, 1983.

- 4) McCarthy, W. J., Hartz, R. S., Yao, J. S. T., et al : Vascular anastomoses with laser energy. *J Vasc Surg*, 3 : 32-41, 1986.
- 5) Ashworth, E. M., Dalsing, M. C., Olson, J. F., et al. : Large-artery welding with a milliwatt carbon dioxide Laser. *Arch Surg*, 122 : 673-677, 1987.
- 6) 岡田昌義、清水一太、生田 博他 : CO₂ Laser を用いる新しい血管吻合法－基礎的並びに臨床的研究－, 日外会誌, 88 : 390-400, 1987.
- 7) 大場淳一、佐久間まこと、安田慶秀他 : 低エネルギー炭酸ガスレーザーを用いた血管吻合、気管吻合組織治癒過程について, 日外会誌, 88 : 1260-1263, 1987.
- 8) 椎谷紀彦 : 炭酸ガスレーザーを用いたラット大腿動脈吻合の研究－とくに吻合部の組織学的、物性的研究－, 北海道医学雑誌, 63 : 708-714, 1988.
- 9) 泉澤康晴 : Nd : YAG レーザーによる小動脈吻合に関する基礎的研究, 脈管学, 32 : 553-561, 1992.
- 10) 泉澤康晴、佐久間まこと、安田慶秀他 : 色素結合法を応用した血管組織コラーゲン簡易微量測定法の検討, 血管, 14 : 277-281, 1991.
- 11) 藤本大三郎 : 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー, アイピーシー, 東京, 1990.
- 12) Barnes, M. J. : *Atherosclerosis*, 46, 249-251, 1983.
- 13) López-De León, A. and Rojkind, M. : A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem*, 33 : 737-743, 1985.
- 14) Junqueira L. C. U., Bignolas, G. and Brentani, R. R. : A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem*, 94 : 96-99, 1979.
- 15) Inayama, S., Shibata, T., Ohtsuki, J., et al. : A new microanalytical method for determination of hydroxyproline in connective tissues. *Keio J Med*, 27, 43-46 (1978).
- 16) Abergel, R. P., Meeker, C. A., Lam, T. S. et al. : Control of connective tissue metabolism by lasers, Recent developments and future prospects. *J Am Acad Dermatol*, 11:1142-1150, 1984.
- 17) Mester, E., Szende, B., Spizy, T., et al. : Stimulation of wound healing by laser rays. *Acta Chir Sci Hung*, 13 : 315-324, 1972.
- 18) 田口喜雄, 黒川良望, 大原 到他 : 低出力光照射の創傷治癒促進効果, 日本臨床, 45 : 69-75, 1987.
- 19) Acland, R. D. and Trachtenberg, L. : The histopathology of small arteries following experiental microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg*, 63 : 924-929, 1977.
- 20) Guthrie, C. R., Murray, L. W., Kopchok, G. E. et al : Biochemical mechanisms of laser vascular tissue fusion. *J Invest Surg*, 4 : 3-12, 1991.