

特集

冠動脈疾患の外科治療 Technique & Technology

ITA の skeletonization

札幌医科大学医学部外科学第三講座 教授

樋上哲哉

Higami Tetsuya

CABG に対するコンセプト

私の冠動脈バイパスのスタイルは、一貫して、高品質・低侵襲の permanent grafting を目指すものである。Permanent grafting とは、生涯再発がなく high risk 患者においても合併症ゼロの理想的な妥協なき grafting を意味する (表1)。

1. 高品質の permanent grafting

高品質のための必要条件は、第一にグラフト選択にある。左前下行枝 (LAD)、回旋枝 (Cx) 領域の再建には、全例、必ず両側の内胸動脈 (ITA) を in-situ で用いることを大原則としている。左冠動脈領域 (LAD, Cx) に2本の ITA を用いることが、飛躍的な長期遠隔成績の向上をもたらしているからである。しかしながら、両側 ITA を高齢者や糖尿病患者を含めた全例で用いるには、それなりの採取技術を持つことが必須で、これなくして理想の妥協なき grafting はあ

り得ない。1998年に私の開発した Ultrasonic complete skeletonization (UCS) 法は、あらゆる条件での両側 ITA の使用を安全かつ容易なものとした画期的な打開策の1つである。

第二の高品質のための必要条件は、いかなる条件でも行える確実な吻合法である。これには2つの条件があり、常に同一の良好な視野展開と確実な運針能力である。Off-pump CABG (OPCAB) の場合、常に同一の安定した positioning が確実な吻合の絶対条件であり、OPCAB は positioning ができた段階で70%成功したといっても過言ではない。つまり、血圧・心拍出量に変動を来さない再現性ある positioning のコツをつかむことが OPCAB 成功の秘訣ともいえる。吻合に際しては、知らず知らずのうちにグラフト損傷を招いていることが自覚でき、その対策 (後述) が意識して講じられるようになれば万全であり、早期開

表1 permanent graftingの要件

高品質・低侵襲のための必要条件
1) グラフト選択…in-situ RITAとLITAのルーチン使用
2) 低侵襲のグラフト採取法…Ultrasonic complete skeletonization
3) 確実な吻合法…確実な視野展開と時間的余裕
4) 妥協のない安全なOPCAB…once positioningとaorta no-touch

存率90%→100%となるだけでなく、早期と相違ない長期開存率の獲得も夢ではない。

2. 低侵襲の permanent grafting

低侵襲性についての必要条件の第一は、グラフト採取における低侵襲性の確保である。このことは意外と意識されていないが極めて重要と考えている。特に、両側ITA採取時の胸骨血液温存は、縦隔炎の発生を抑える上で極めて重要である。さらに、十分な長さの採取によって両側ITAはLAD、Cxのほとんどの領域にin-situで用いることが可能になる。長期的に血流不均衡が生じる心配のある composite graftに頼らずして aorta no-touch が実現でき、大動脈操作に起因する脳梗塞の発生を阻止できる。

次なる低侵襲の必要条件は、人工心臓を用いないことである。すなわち OPCAB の導入である。私は最近の4年間、安定した positioning のおかげで100%の OPCAB 完遂を実現している。ただし、OPCAB がゆえに使用グラフトの制限や吻合部位の妥協、吻合の質の低下を来すようでは本末転倒である。OPCAB でも on-pump CABG よりむしろ高い grafting を維持できるものでなければ、全例での OPCAB は目指すべきではなく、high risk 回避のための一手段にとどめるべきである。

以上の必要条件に対して、それぞれの課題を確実に遂行できる技量を兼ね備えることがその十分条件である。

高品質・低侵襲の内胸動脈採取法— UCS 法

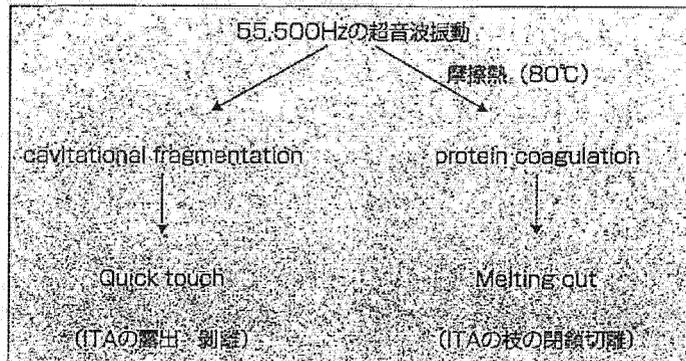
動脈グラフトとして、左内胸動脈 (LITA)、右内胸動脈 (RITA)、胃大網動脈 (GEA) を in-situ で用いることがほとんどであるが、すべて超音波メスによる skeletonization としている。ここでは、ITA の Ultrasonic complete skeletonization (UCS) 法の正しい考え方とコツを詳述する。

1. Quick touch と Melting cut

まず、超音波メスは2つの作用 (cavitation fragmentation と protein coagulation) を持つことを認識し、それぞれの作用を正しい部位に正しく応用することが重要である (表2)。

“Quick touch” とは、超音波メスの持つ cavitation 現象を利用して脂肪組織を排除し、ITA を剥離・露出させるテクニックを称したものであるが、この成否がグラフトの質、特に早期のグラフト流量と遠隔期のグラフト径に大きくかわる。ここで用いるのは Harmonic scalpel™ (Ethicon 社製) のフック型プローベ (DH105)

表2 Harmonic scalpelの特性



である (図1)。プローベ先端は、55,500Hzで振動しており、これに一瞬でも触れると脂肪細胞は崩壊し飛沫する。これを利用して、ITA周囲の脂肪織を除きITAのみを露出する。この際最も認識しておくべきことは、プローベ先端が摩擦熱により80°C近くに達していることであり、蛋白の融点(63°C)をはるかに超えていることである。すなわち、プローベ先端が脂肪織に触れると細胞は膨化破裂(飛沫)し、動脈に触れると外膜・中膜・内膜の構成細胞は蛋白融解凝固(やけど)するという現象が生じることである。ただし、脂肪と蛋白との間には決定的な差がある。それは、現象発現までの時間因子である。これはその機序の差に基づくものであり、脂肪の破壊は、超音波振動そのものによるもの(cavitation)であるため接触と同時に生じる。一方、蛋白の変性は超音波振動によりプローベ先端が組織と接触する際に生じる摩擦熱によるため、厳密には接触後に右肩上がりの曲線を描いて熱エネルギーが発生する。すなわち、脂肪は触れると一瞬のうちに飛沫してし

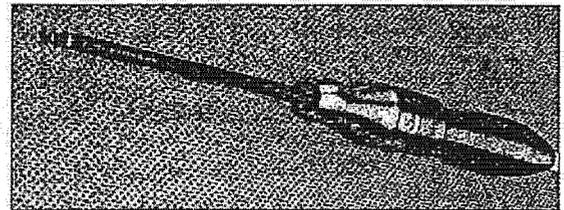


図1 UCS法; ITA採取に最適なプローベ Harmonic scalpelフック型プローベ (DH105)

まうが、蛋白はごく一瞬なら触れてもやけどしないということになる。これが“Quick touch”のコツそのものである。剥離する部位に応じてプローベの向き、動かす方向を正しく用いることが成功の秘訣である。具体的には、level 2の出力で、振幅10mm、5Hzのサインカーブを描くようにプローベ先端を動かすイメージである。Quick touchには、このサインカーブを描きながらブラシでさっさと埃を拭き去るように周囲の脂肪織を払い除く“Brush mode”と、動脈走行方向に平行に一方方向性にチェックマークを描くように進めていく“Nike mode”がある (図2)。Quick touchに際しては、これらのモードを適宜組み合

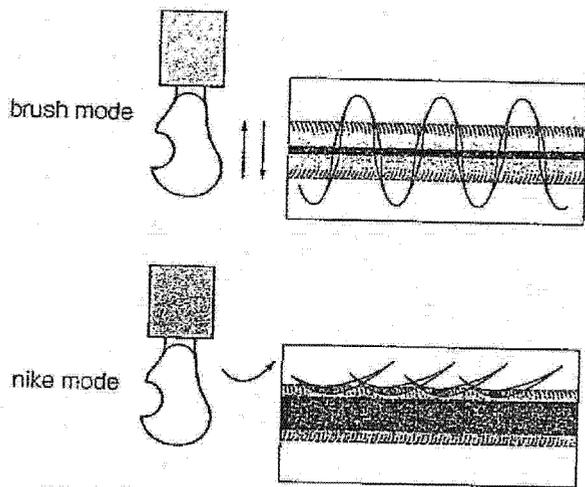


図2 Quick touchにおけるプローベ先端の軌跡
●は動脈と一瞬触れる接点を示す (文献1より改変)

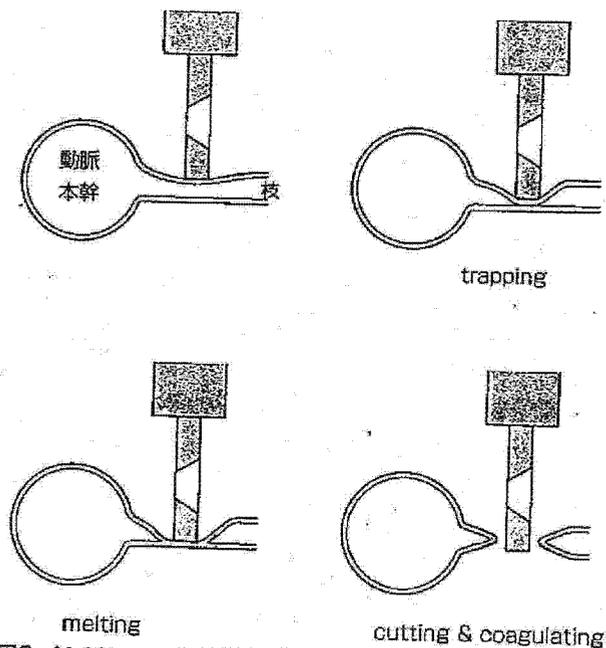


図3 Melting cutによる枝の凝固切離のイメージ (blunt mode)
(文献1より改変)

わせて手首を柔らかくして、同じ場所を続けてtouchしないこと、1回のtouchは0.2秒以内とすることが重要である。

一方、枝の処理は、超音波メスの蛋白の融解凝固変性 (protein coagulation) を正しく適切に応用することで、最も効率良く、最も確実に行うことが可能となる。ITAの枝に Harmonic scalpel フック型プローベの先端を押しあて背面の組織とサンドイッチすると、枝は切離されると同時に癒合した蛋白の凝固により確実に閉鎖される。この蛋白癒合による枝処理が“Melting cut”である (図3)。枝に対して垂直にプローベを当て、level 2の出力で2~3秒を目安に凝固切離を行う。枝の処理に際してのプローベ先端を本幹から1mm離すことと、3次元的直角を作ること、つまり、本幹・枝・プローベのいずれの角度も直角にすることが重要であり、正しく Melting cutを行えば本幹に熱損傷を与えることなく安全かつ確実に枝の止血切離を完了できる。

2. Harmonic scalpel による

ITA 採取の手順とコツ

まず、endothoracic fasciaを露出し第3もしくは第4肋間あたりでITA走行の約1cm正中寄りで切開する。疎性結合織・脂肪織を超音波メスで軽く Quick touch をすると伴走する内胸静脈が現れる。これを nike mode で視野上方へ払い上げ

表3 Ultrasonic complete skeletonization (UCS) によるITA採取の手順

- 1) 胸骨正中切開…胸骨の十分な止血を行う。
- 2) ITA採取視野の展開…Delacroix社製IMAレトラクターを使用する。
- 3) endothoracic fascia露出…胸腔開放(開胸)をしないようにする。
- 4) endothoracic fascia切開…第3~4肋間, ITVの1cm正中で行う。
- 5) ITA表面露出…Quick touch (nike mode) でITVを払い上げたのちbrush mode (5Hzを目安に) で表面を露出する。
- 6) ITA上半分剥離…Quick touch (nike mode & brush mode) で行う。
- 7) ITA枝処理…endothoracic fasciaを引き下げ、ITAを手前へ転回する。枝をMelting cut (3次元的直角, 3秒を目安にする)。
- 8) (6) と7) を繰返し、ITAの3方向の枝 (sternal perforating, intercostal branch) 処理する。
- 9) ITA末梢側のUCS完了…bifurcationまで行う。
- 10) ITA中枢側のUCS…鈍的にITA走行確認、縦隔側への枝に注意する。
- 11) ITA中枢側のUCS完了…phrenic nerveと交差するところまで剥離する。
- 12) ITA wrapping…10%papaverine湿ガーゼを使用する。

る。ITA露出のコツは、ITAの上半分の領域のみをQuick touchし、ITAの下方、すなわちendothoracic fascia側の結合織を残し、この筋膜を引き下げることによりITAを手前下方に転回することである(表3)。

枝の処理は、endothoracic fasciaを左手鉗子で把持して手前下方に牽引しつつ視野正面に認められる胸骨枝をMelting cutすることから始める。次いでendothoracic fasciaを下方奥へ牽引することによってITAを手前に90°転回させ貫通枝を、さらにITAを90°手前に転回させ前肋間枝を視野正面でMelting cutする。最後にITAをendothoracic fasciaから遊離するとその領域のcomplete skeletonizationが完了する(図4)。

Endothoracic fasciaのはっきりしなくなる第2肋間~第1肋間より中枢部では、胸膜側よりITAをツッペルなどで鈍的に剥離しITAの走行を視

認する。縦隔側へ向かう枝を処理したのち、ITAを視野手前から縦隔側へ転回しつつ胸壁側へ向う枝をMelting cutする。最終的に横隔神経の走行を確認しITAと交差する部分まで剥離をすすめる。

ITA剥離が終われば、温かい10%パパベリン液に浸したガーゼで被覆しておく。ITA使用前にfree flowを確認し、もし50ml/min以下ならITAの損傷を考慮しなければならぬ。ITA損傷は、注意力散漫で技術的に未熟ゆえ起こることであり、100%避け得る合併症であることと認識し、その技術の修得に真剣に取り組んでもらいたい。その近道は、一度は正しいUCS採取手技を間近に生で見ることである。

UCS法は1本の超音波メスのみで行える革命的な手技であり、これによって誰にでもITAを迅速かつ安全に採取することが可能となった。正し

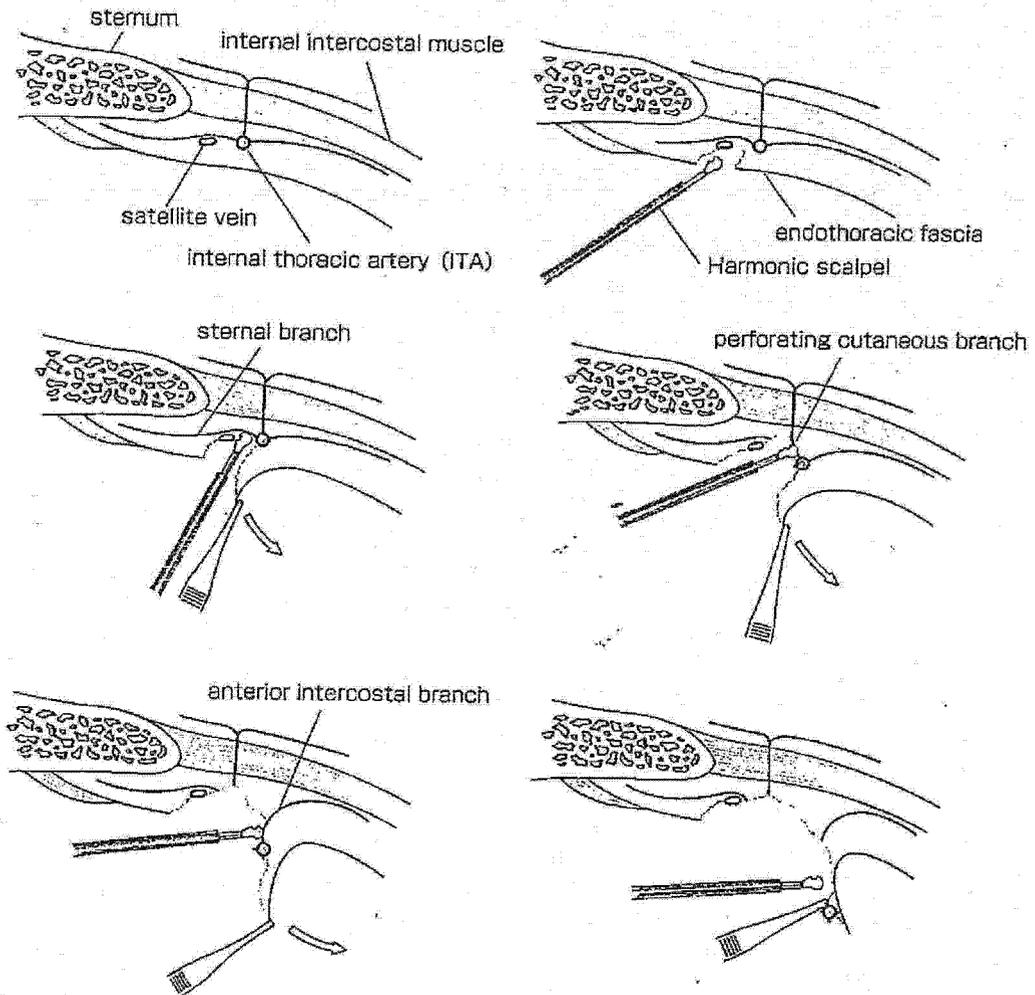


図4 UCS法：ITA枝処理のイメージ
(文献2より改変)

い Quick touch, 正しい Melting cut に習熟すれば, ITA は約 20 分で楽々採取できるようになる (図 5)。

高品質・低侵襲な吻合法

高品質な吻合を再現性をもって完璧に行うに

は 3 つの要素が重要と常々考えている。その第一は、安定した無血視野の展開であり、第二は時間因子の排除、第三は内膜の保護である。

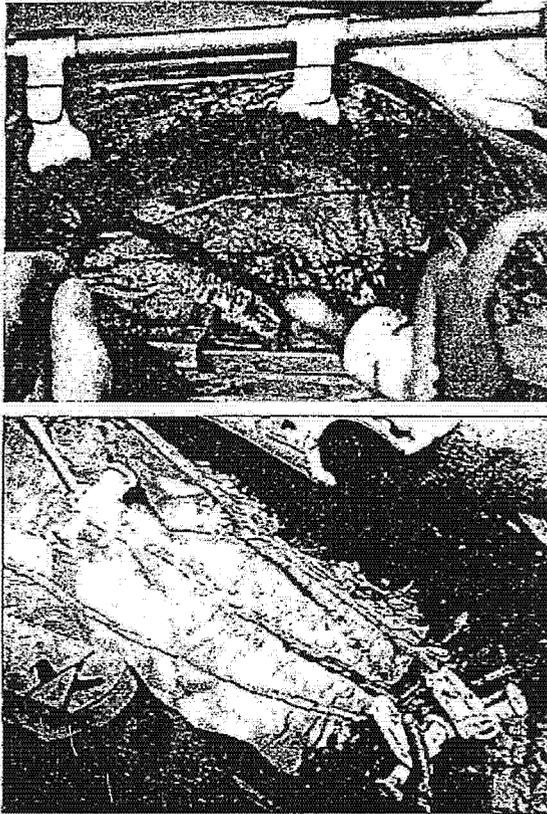


図5 UCS法でのskeletonized ITAとGEA

1. 確実かつ安全な視野の展開と 無血野の確保

特に OPCAB に際してはとても重要な因子である。ここでは OPCAB 時の positioning と視野展開のコツを述べる。私の OPCAB の最大の特徴は、LAD, Cx, RCA 吻合のすべてを同じ心臓の position で行うところにある。Deep pericardial suture (LIMA suture) を長めの 2-0 縫糸で 3~4 針かけ、それぞれに 10 号ネラトン (15cm 長) を通す。ベッドを頭低位 (20° くらい)、右傾位

(20° くらい) を目安に傾けたのち、LIMA suture を引き上げて心脱転を行う。他に positioner は不要であり、むしろ positioner を使用しないで安定した positioning を行えるようになることが大切である。この際、心尖部が天井を向いて垂直に立つ位置に微調整することが最も重要であり、最も良い位置はどんな症例でも必ず見つけることができる (図 6)。

この positioning では、血圧、肺動脈圧、心拍出量の変動は 10% 以内にとどまることがほとんどであり、循環血液量の調節のみで心臓は 2 時間でも 3 時間でもおとなしく機嫌よく活動してくれる。カテコラミンの使用はまったくといっていいほど不要である。というより、不整脈の出現、後負荷の変動などを考慮すればむしろ使用しないほうが安全と考えており、實際上その使用は皆無に等しい。

LIMA suture のみで positioning を行うコツは、右側心嚢を SVC, IVC 付近まで切開しておくこと (右胸腔は開ける必要はない)、心嚢の釣り上げ糸 (特に右側) を置かないこと、LIMA stitch は左下肺静脈の左心房流入部の右下方 15mm の点、IVC の RA 流入部の右側 15mm の点、両点の間で最も深い点を目安に心嚢のみを薄く幅広くかけること、positioning の前に CVP が麻酔導入時の 10~15% 上昇する程度に循環血液量を補っておくこと (軽い volume load) である。

この positioning (once positioning) の利点は、吻合ごとに血行動態の変化がないこと、視野が変わらないことから sequential bypass がやりやす

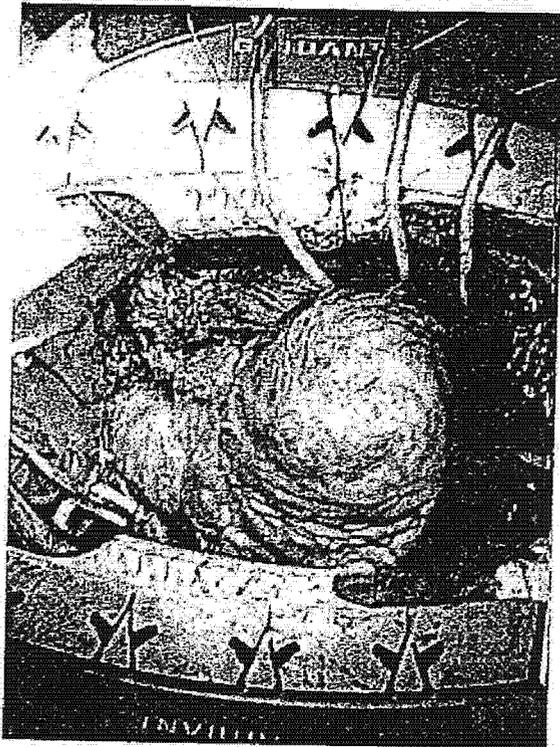


図6 OPCAB時のpositioning

いこと、in-situ グラフトの長さを確実にしかも容易に決められることなどである。

2. 時間因子の排除

吻合に際しての時間因子の排除とは、誰にでもゆっくりじっくり確実に吻合が行えるように十分な時間をかけられるだけの余裕を生み出す環境づくりを意味する。

具体的にその第一は、positioning で血行動態が安定していること、すなわち血行動態維持に麻酔医があくせくしている状況ではなく、平然と座っていられるほどの時間的制約のない状況を生み出すことである。

第二は、吻合中の心筋虚血を解除し、心筋虚血の点からも時間的制約のない状況を作ること、すなわち、どの場所の吻合も原則として shunt tube を挿入し、末梢領域の血流を確保した上で吻合することである。この時間因子の排除が、若い心臓外科医の養成にとっても重要なことであり、1針1針確実に確認しながら心筋に負荷をかけることなく吻合できる余裕こそが、誰もが行える高品質・低侵襲吻合法の秘訣である。

3. 冠動脈およびグラフトの内膜の保護

内膜の保護、特に動脈グラフトの内膜愛護は早期開存にかかわるばかりでなく、長期遠隔期のグラフト開存にも大きくかかわる因子である。具体的に内膜保護の方法は、吻合時に鑷子で内膜に触れない、すなわち、鑷子で動脈壁の全層を把まないこと、および、動脈切開時にメスではねない、すなわち、メスで切る感覚を持つことである。この意味から私は native, graft (sequential 時) ともに外膜側からのなで切りを行っている。特に、ITA の sequential 吻合の切開時に注意を要する。さらに、切れの良い 8-0 の針糸を使うことも内膜保護につながると考え、すべての動脈グラフトの吻合は 8-0 ポリプロピレン糸の連続吻合で行っている。特に、ITA 吻合時における ITA 内膜の断裂、引きつれ、締まり過ぎを防止するには、経験上 8-0 糸がより安全である。運針は sequential 吻合を含めてどの部位の吻合時も同じで、10 時から時計回りで、heel はグラフト内外、toe は冠動脈内外になるよう運針して、肝心の部分の内膜を確実に捕らえられるようにしている。

以上3つの基本要件を備えることが、高品質・低侵襲のグラフト吻合における必要条件であり、これに加えて、このいずれをも軽視することなく行おうとする意志とゆっくりでも確実な吻合が行える技量を備えることが十分条件となる。

In-situ graft による OPCAB — 成功のための隠し味

1. in-situ ITA graft のルート作り

LITA を LAD, Cx のどの領域に吻合する場合でも、LITA は左横隔神経に沿わせたルートで心臓内へ導くことが重要である。具体的には、LITA 中極で横隔神経を確認した部分から、肺動脈外側の心臓と胸膜の間に存在する脂肪織を切開する。肺動脈外側の心臓も左横隔神経の見える近くまで切り込んで、この部で ITA を心臓内へ誘導する。これによって LITA を最短コースで心臓内へ導けるばかりでなく、呼吸の影響を受けず LITA が引きつれることもなく、また、再手術時も胸骨から離れているため安全であるという利点を得ることができる。RITA を大動脈前面をクロスさせる場合も、胸腺を切り込み、閉胸前に胸腺を含めた周囲の脂肪織で覆っておくことで胸骨との癒着を防止できる。

2. より安全な OPCAB を — 完遂率 100% を支える小技

Positioning 前には、血清カリウム値を 4.5—5.0mEq/L にしておき、カテコラミンは使わない。循環血液量のごく軽度の負荷が不整脈防止、血行動態維持に重要である。さらに、OPCAB 時の吻

合は、key graft の吻合（最も虚血に関与する部位への grafting）を最後に行う。側副路血流供給源を含めて、周りの血行再建、血流充足を完了してから最後に最も虚血にかかわる領域の吻合操作を行うことがその意図であり、OPCAB を安全に行う上では極めて重要である。

3. Graft 開存率向上のために

実験的に UCS-ITA の flow reserve には優れたものがあり、sequential grafting を多用しても 1 領域全体の血流供給を 1 本の ITA で十分にまかなうことが可能である（図 7）。しかも冠動脈狭窄が甘い場合でも competition を起こしにくい graft と考えてよい。一方、GEA は competition に弱く、腹部分枝の枝ゆえ、ほかの分枝が buffer となり押しがきかないと考えられる。このため GEA は RCA 領域のみに限って使用し、その吻合はすべて 4PD, 4AV の末梢（ ϕ 1.5mm 以下の部位）に行うことを原則とすることで成功している。

グラフトの長さの決定は、吻合部に引きつれを起こさないためにも重要である。特に、OPCAB 時の in-situ ITA の長さの決定には少々のコツを要する。LITA もしくは RITA を Cx 領域に吻合する場合は、私の positioning 法において吻合する限りは、ぎりぎりの長さで吻合するべきである。脱転した心臓を元に戻した際には、必ずグラフトに余裕が生まれ適切な長さになる。一方、LITA もしくは RITA を LAD 領域に吻合する場合、同じく脱転した状態の心臓で、グラフトを肺動脈基部の左側端を経由するようにして長さを合わせると過不足のないぴったりとした長さが得られる。こ

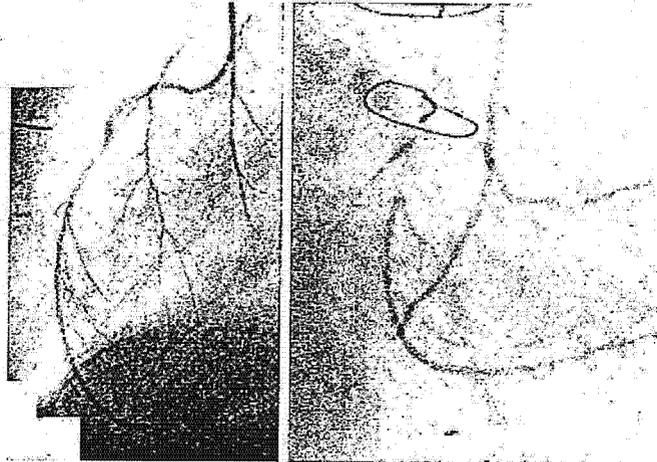


図7 OPCAB術後グラフト造影
in-situ LITA, in-situ RITAによるsequential bypass例

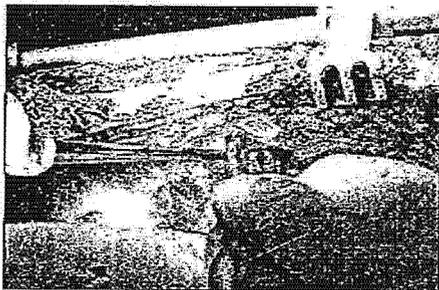


図8 I TAのskeletonization

れによって、心臓を脱転したままで、すべての in-situ グラフトの長さを容易に決定でき、視野を変更することなく安定した状態のままで OPCAB を完遂できる。

おわりに

最良のグラフトを最良の自然な形で使用する。そこに妥協なき吻合法が加味されれば permanent graft も夢ではない。この理想に近づくべく、頭

脳と技を磨いていただきたい。すべては、患者の財産となるものであることを忘れずに、本稿がその一助になれば幸いである。

参考文献

- 1) 榎上哲哉. 超音波メスによる新しい内胸動脈採取法 Ultrasonic Complete Skeletonization 法, 第1版. 金芳堂, 京都, 2004, 12-5.
- 2) Higami, T. et al. Skeletonization and harvest of the internal thoracic artery with an ultrasonic scalpel. Ann Thorac Surg. 70, 307-8, 2000.
- 3) Higami, T. et al. Histologic and physiologic evaluation of skeletonized internal thoracic artery harvesting with an ultrasonic scalpel. J Thorac Cardiovasc Surg. 120, 2000, 1142-7.
- 4) Higami, T. et al. Early results of coronary grafting using ultrasonically skeletonized internal thoracic arteries. Ann Thorac Surg. 71, 2000, 1224-8.
- 5) 榎上哲哉. 冠動脈外科の Knack & Pitfalls 2. グラフトの準備. 2) 内胸動脈 (ITA). 竹内靖夫, ed. 心臓外科 Knack&Pitfalls 冠動脈外科の要点と盲点. 東京. 文光堂, 2005, 96-9.

石灰化狭小大動脈弁に対する弁置換術

—超音波手術器を用いた石灰除去の有用性

菊地慶太 樋上哲哉 今井健介 山下暁立
 若林景子 寺田真也 山岡啓信 金築一摩
 清水弘治 花田智樹*

はじめに

大動脈弁狭窄 (AS) に対する大動脈弁置換術 (AVR) では、弁輪部の石灰化の除去に苦慮することがある。狭小大動脈弁輪例においても、高度石灰化を伴った症例や高齢者などでは組織が脆弱で手術侵襲も過大となることから、実際には弁輪拡大術を躊躇することがある。

これまでも石灰化を伴った AS に対し、超音波手術器などを用いて AVR を行う方法が報告されている¹⁻³⁾。当科では、超音波手術器 Sonopet (UST-2001: エム・アンド・エム社, 東京都) を用いて弁輪部石灰化の破碎と脱灰を行った後、AVR を施行している。

I. 対象および方法

2002年1月～2005年8月に AS に対し Sonopet を用いて AVR を行った 45 例を対象とした。平均年齢 73.3±9.7 歳, 男性 18 例, 女性 27 例であった。

キーワード: 狭小大動脈弁輪, 大動脈弁狭窄, 超音波手術器, 弁輪拡大, 超音波石灰除去

* K. Kikuchi (講師): 島根大学循環器・消化器総合外科; T. Higami (教授): 札幌医科大学第二外科; K. Imai, A. Yamashita, K. Wakabayashi, S. Tera-da, H. Yamaoka, K. Kanetsuki: 島根大学循環器・消化器総合外科; K. Shimizu, T. Hanada (部長): 松江市立病院心臓血管外科。



図 1. アングルハンドピース HS-01 S

手術方法は、胸骨正中切開後に上行大動脈送血, 右房 2 本脱血とし, 右上肺静脈から左室ベントチューブを挿入して人工心肺を確立した。完全体外循環・大動脈遮断後に逆行性に心筋保護液を注入し心停止とした。心筋保護液は 20°C の cold blood cardioplegia を直視下に冠状静脈洞から逆行性に持続注入する RC-CBCP (retrograde continuous cold blood cardioplegia) を行った。また、心筋保護終了直前に terminal warm blood cardioplegia を注入した。

大動脈遮断後に大動脈を横切開した。最初に小ガーゼを左室に挿入した後、メツェンバウムにて可及的に大動脈弁を切除した。その後、Sonopet の出力を 80%, 吸引を 100% に設定して弁輪の石灰化を除去した。ハンドピースには先端が 2～2.5 mm で角度のついたアングルハンドピース (HS-01 S: エム・アンド・エム社) [図 1] を使い、石灰化部位を削ぐような操作を行いながら少しずつ石灰化部位を破碎した。このとき、ハンドピースの先端が一点に集中しないよう細かく動かしながら操作した。操作中に脱灰・破

表 1. 術前因子

	全 例 (n=45)	S 群 (n=23)	L 群 (n=22)	p 値
平均年齢 (歳)	73.3±9.7	75.6± 7.6	70.9±11.1	NS
術前弁輪径 (mm)	19.7±2.3	18.2± 1.0	21.2± 2.3	<0.0001
BSA (m ²)	1.5±0.2	1.4± 0.2	1.59± 0.2	0.0009
術前 PG (mmHg)	84.7±29.0	93.4±31.1	75.5±24.0	0.0376
緊急例	6例 (13.3%)	5例 (21.7%)	1例 (4.5%)	0.0899
術前 AVA (cm ²)	0.7±0.3	0.6± 0.3	0.9± 0.2	0.0003
術前 NYHA 分類 (度)	2.2±1.0	2.3± 1.0	2.1± 0.9	NS
術前 LVDd (mm)	46.4±8.1	43.7± 6.4	49.3± 8.8	0.0182
術前 LVDs (mm)	28.9±9.1	27.8± 7.3	30.1±10.7	NS

PG=pressure gradient

表 2. 術中・術後因子

	全 例	S 群	L 群	p 値
人工弁サイズ (mm)	20.4±2.1	19.3±1.5	21.5±2.1	0.0003
supra-annular	8例 (17.8%)	6例 (26.1%)	2例 (9.1%) ^a	NS
intra-annular	37例 (82.2%)	17例 (73.9%)	20例 (90.9%)	NS
体外循環時間 (分)	170.8±48.1	174.7±52.3	166.8±44.0	NS
大動脈遮断時間 (分)	123.1±37.8	126.3±43.6	119.5±30.9	NS
術後 PG (mmHG)	30.0±12.3	31.1±13.2	29.0±11.5	NS
術後 LVDd (mm)	43.7±8.1	41.0±7.4	46.3±8.2	0.0317
術後 LVDs (mm)	28.1±8.9 ^a	26.0±7.6	30.1±9.7	NS
術後 AVA (cm ²)	1.6±0.6	1.5±0.6	1.6±0.7	NS
術後 NYHA 分類 (度)	1.1±0.3	1.1±0.3	1.1±0.3	NS
在院日数	26.4±10.0	24.3±9.6	28.7±10.1	NS
死 亡	1例 (2.2%)	0	1例 (4.5%)	NS

砕した石灰片は、ハンドピースの先端部位から吸引される。十分に弁輪部組織の脱灰を行い、左室内の小ガーゼを除去した後に生理食塩水 300 mlにて洗浄した。人工弁は原則として 70 歳未満であれば機械弁を、それ以上では生体弁を使用することとした。また、人工弁の縫着は原則として水平マットレス縫合による intra-annular position とした。

本法により AVR を行った症例に対し、術前因子として New York Heart Association (NYHA) 分類、体表面積 (BSA)、心エコーによる大動脈弁輪径と心機能、および弁口面積 (AVA) を検討した。また術中・術後因子として、挿入した人工弁の大きさと挿入位置、人工心肺時間、術後心エコーによる心機能評価、在院日数、転帰について検討した。

以上の項目に関して、術前心エコーにおける弁輪径が 19 mm 未満 (S 群) とそれ以上 (L 群) との 2 群に分け、統計学的検討を行った。また、狭小弁輪を有する S 群に関しては、NYHA 分類と心エコー結果の術前後における変化に関して検討を行った。

統計学的評価は、各測定項目を平均値±標準偏差で示し、両群間の有意差検定には χ^2 検定と Student *t* 検定を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

II. 結 果

1. 全例 (n=45) [表 1, 2]

術前の BSA は 1.5 ± 0.2 m²、NYHA 分類は 2.2 ± 1.0 度であった。心エコーにおける平均弁輪径 19.7 ± 2.3 mm、左室拡張末期径 (LVDd)

46.4±8.1 mm, 左室収縮末期径 (LVDs) 28.9±9.1 mm, AVA 0.7±0.3 cm² で, 大動脈弁圧較差 (PG) は 84.7±29.0 mmHg であった。手術で挿入した人工弁のサイズは 20.4±2.1 mm であり, 37 例 (82.2%) で intra-annular position に挿入した。術後に行った心エコー結果では弁周囲逆流はなく, 平均 AVA 1.6±0.6 cm², 平均 PG 30.0±12.3 mmHg であった。平均在院日数は 26.4±10.0 日で, 手術死亡は 1 例 (2.2%) であった。

2. S 群 (n=23) と L 群 (n=22)

1) 術前因子: S 群の弁輪径は 18.2±1.0 mm, BSA も 1.4±0.2 m² で, AVA も L 群と比べて有意に小さかった。また, 術前 PG は S 群のほうが有意に高く, LVDd は有意に小さかった。

2) 術中・術後因子: 人工弁サイズは, S 群は 19.3±1.5 mm と L 群の 21.5±2.1 に對して有意に小さかったが, 人工弁の挿入位に関しては両群間で有意差はなかった。また, 術後の LVDd は術前同様に S 群で有意に小さかった。その他の PG や AVA, NYHA 分類, 転帰に関しては, 両群間に有意差を認めなかった。

3. S 群の術前後における NYHA および心エコー結果 (表 3)

術前の弁輪径 18.2±1.0 mm に対し, 術後の人工弁サイズは 19.3±1.5 mm と有意に拡大した。また, PG や AVA, LVDd, NYHA 分類は有意に改善した。LVDs のみ有意差を認めなかった。

III. 考 察

弁の石灰化が著しい AS では, 弁輪部の石灰化が残存すると弁周囲逆流の原因となったり, 適切なサイズの人工弁を挿入することが困難となるため, 石灰除去がきわめて重要である。これまでも超音波手術器を用い石灰化を除去して AVR を行った方法は報告されている¹⁻³⁾が, 当科では 2002 年 1 月から同様な機器である Sonopet を用いて AVR を行ってきた。本機器は超音波による石灰の破碎・脱灰機能とハンドピース先端からの吸引機能, およびイリゲーション機能をもつ超音波手術機器である。ハンドピースの発振周波数は

表 3. S 群における術前後検査所見

	術 前	術 後	p 値
弁輪径 (mm)	18.2±1.0	19.3±1.5	0.0031
PG (mmHg)	93.4±31.1	31.1±13.2	<0.0001
AVA (cm ²)	0.6±0.3	1.5±0.6	<0.0001
NYHA 分類 (度)	2.3±1.0	1.1±0.3	<0.0001
LVDd (mm)	43.7±6.4	41.0±7.4	0.0159
LVDs (mm)	27.8±7.3	26.0±7.6	NS

25 kHz であり, 操作性がよいアングルハンドピースを用いた。先端部は 2~2.5 mm と弁輪部における手技にあった太さである。また, 先端部位から破碎された石灰片を吸引でき, 術中の塞栓予防に寄与する。

実際の脱灰の方法であるが, 可及的に弁を切除した後に, 石灰化部位にチップをあてながら, 一点に集中しないように石灰部を削いだり掃いたりするように動かすことが組織の破壊を予防し, 安全に石灰化除去を行ううえで重要である。

45 例全例で本法を施行することができ, 手技中に弁輪部が過剰に破壊されたり組織を損傷することはなく, 破碎・脱灰した石灰が飛散して除去に困ることもなかった。また, 弁輪部石灰化が著しい症例では十分な弁輪径が確保できず, supra-annular position での AVR をせざるをえない場合がある。しかし, 自験例では 37 例 (82.2%) で水平マットレス縫合が可能であった。これは, 本法により弁輪部が十分に拡大され, かつ組織に柔軟性が出たためと考えられた。術後に弁周囲逆流を認めた症例はなく良好な結果を得たこと, また手技が簡便で時間がかからないことから, 有用な方法であると考えられた。

術前に計測した弁輪径が 19 mm 未満の狭小弁輪を有する症例では, 手術を行うにあたりどのくらいの大きさの人工弁が挿入できるかが問題となる。狭小弁輪例に対しては Manouguian 法⁴⁾や Nicks 法⁵⁾, Konno 法⁶⁾などの弁輪拡大術が報告されている。しかし, 成人 AS 例で狭小弁輪を有する症例は高齢者や BSA が小さい症例であることが多く, 弁輪拡大術は脆弱な組織や硬化組織に対する術式となる。また, 最近では 19 mm の機械弁を用いた AVR の良好な成績⁷⁾や, 狭小弁に

対する Carpentier-Edwards pericardial valve (Edwards Lifesciences 社, アーバイン) を用いた AVR における良好な成績⁹⁾などが本邦で報告されていることから, 実際には弁輪拡大術の施行を躊躇することがある。

自験例では, 術前に 19 mm 未満の狭小弁輪を有すると診断された S 群において, 手術により挿入した人工弁サイズは 19.3 ± 1.5 mm と, 術前の弁輪径 18.2 ± 1.0 mm と比べて有意に大きなサイズの人工弁を挿入しえた。S 群における BSA は 1.4 ± 0.2 m² と, これまでの報告^{8,9)}と同様に小さく, 術後の心エコー結果や経過も良好であったことから, S 群における人工弁のサイズは妥当であったと考えられた。また S 群・L 群間の検討では, 弁の位置, 術後の安静時 PG や NYHA 分類, 予後に有意差はなく, 良好な結果を得られた。

以上より, 術前に狭小弁輪と診断されていても, 症例によっては Sonopet を用いて石灰除去を行うことで, 弁輪拡大術を行わずに弁輪部の拡大効果が期待できることから, 本法は容易かつ安全な石灰化弁輪拡大法であると考えられた。

おわりに

AVR における石灰化弁輪に対し, Sonopet を用いて石灰除去を行った。本法は安全かつ容易に適切な大きさの人工弁を挿入することが可能であり, 有用な石灰化弁輪拡大法であると考えられた。

文 献

- 1) McBride LR, Naunheim KS, Fiore AC et al.: Aortic valve decalcification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 100 : 36-43, 1990
- 2) Sheppard BB, Milliken JC, Nelson RJ et al.: Ultrasonic decalcification of the aortic annulus during aortic valve replacement. *Ann Thorac Surg* 52 : 59-65, 1991
- 3) Unal M, Sanisoglu I, Konuralp C et al.: Ultrasonic decalcification of calcified valve and annulus during heart valve replacement. *Tex Heart Inst J* 23 : 85-87, 1996
- 4) Manouguian S: A new method for patch enlargement of hypoplastic aortic annulus; an experimental study (author's transl). *Thoraxchir Vask Chir* 24 : 418-423, 1976
- 5) Manouguian S, Seybold-Epting W: Patch enlargement of the aortic valve ring by extending the aortic incision into the anterior mitral leaflet; new operative technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 78 : 402-412, 1979
- 6) Nicks R, Cartmill T, Berustein L: Hypoplasia of the aortic root; the problem of aortic valve replacement. *Thorax* 25 : 339-346, 1970
- 7) Konno S, Imai Y, Iida Y et al.: A new method for prosthetic valve replacement in congenital aortic stenosis associated with hypoplasia of the aortic valve ring. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70 : 909-917, 1975
- 8) 伊藤 智, 川人宏次, 田中正史ほか: 狭小大動脈弁に対する 19 mm 二葉弁の遠隔成績. *日心臓血管外会誌* 34 : 167-171, 2005
- 9) 古川貢之, 桑原正知, 中村栄作ほか: Carpentier Edwards pericardial valve 19 mm, 20 mm を用いた大動脈弁置換術の術後血行動態の検討. *日心臓血管外会誌* 32 : 240-242, 2003

SUMMARY

Aortic Valve Replacement for Calcified Aortic Valve and Annulus with Ultrasonic Decalcification

Keita Kikuchi et al., Department of Cardiovascular & General Surgery, Shimane University Faculty of Medicine, Izumo, Japan

We conducted ultrasonic decalcification on calcified annulus in patients with aortic stenosis (AS) using an ultrasonic operator, Sonopet (UST-2001) prior to aortic valve replacement (AVR). We studied the reliability of this method.

Subject and method: From January 2002 to August 2005, AVR was conducted for AS using the Sonopet in 45 patients, comprising of 18 male and 27 female subjects. The mean age was 73.3 ± 9.7 .

Result: Artificial valves were successfully inserted at the intra-annular level in 37 patients and at the supra-annular level in 8 patients without conducting annular enlargement. In the patients with narrow annuli of less than 19 mm (23 patients), the preoperative mean annular diameter was 18.2 ± 1.0 mm, but significantly larger artificial valves with an average diameter of 19.3 ± 1.5 mm

($p=0.003$) were successfully inserted.

Conclusion : AVR was proved to be safe and easy by previous ultrasonic decalcification of the annulus using the Sonopet. This method was very useful because it required no enlargement of aortic annulus.

KEY WORDS : small aortic annulus/aortic stenosis/ultrasonic surgical system/aortic root enlargement/ultrasonic decalcification

*

*

*

OA19-5 細胞分化への機械的微小振動刺激の影響に関する検討

○伊藤 由樹子¹、木村 剛¹、南 広祐¹、加藤 綾子²、増澤 徹²、岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学学生体材料工学研究所、²茨城大学工学部

<緒言>細胞機能の制御には、成長因子やサイトカインなどの液性因子、シヤアストレスや静水圧などの物理的因子が重要である。当研究室では、細胞に機械的な微小振動を与え、膜タンパク質や細胞骨格を刺激し、細胞機能を制御する方法を考案した。これまで、微小振動付加により、細胞の接着・増殖が促進されることを見出した。本研究では、細胞分化における微小振動の影響について詳細に検討した。<方法>ピエゾ電圧アクチュエータを振動子とする周波数可変的な振動を発生する微小振動装置を作製した。神経モデル細胞であるラット副腎褐色細胞腫由来細胞PC12を用いた。所定数のPC12を6ウェル培養プレートに播種し、神経分化誘導剤である神経成長因子 (NGF) を添加し、10kHzの微小振動を1時間、24時間毎に5日間加振した。神経突起が細胞体径以上の細胞を分化細胞と定義し、突起長および突起数をNIHイメージソフトにて計測し、分化細胞数を全細胞数で除した細胞分化率を算出した。<結果と考察>NGF無添加系では、微小振動の有無に依らず、細胞の分化は示されなかった。一方、NGF添加系では、細胞の分化が観察され、特に、加振した場合において、培養初期の細胞分化率の上昇が示された。培養後期においては、振動の有無に依らずほぼ同等の細胞分化率であった。以上の結果より、微小振動刺激は、細胞の分化を誘導する直接的な要因ではないが、分化のシグナル伝達経路のいずれかに影響すると考えられる。本研究は、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

機械的微小振動刺激の細胞分化に及ぼす影響に関する検討
 Study on influence of mechanical nano-vibration stimuli on cell differentiation

○伊藤由樹子, 木村剛, 南広祐, 加藤綾子*, 増澤徹*, 岸田晶夫
 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
 *茨城大学 工学部 機械工学科

Yukiko Ito, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Akio Kishida,
 Inst. of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
 *Ayako Kato, Tooru Masuzawa, Dept. Mechanical Engineering, Ibaraki University

<緒言>

細胞の増殖・分化などの細胞機能の制御法としては、増殖因子やサイトカインなどの液性因子を用いる化学的手法が主流である。最近、血管内皮細胞への張り応力や軟骨細胞への静水圧などの物理的的刺激が細胞機能に影響することが報告され、活発に研究がなされている。当研究室では、細胞への物理的的刺激として機械的な微小振動を与え、膜タンパク質や細胞骨格を刺激する微小振動法を考案し、細胞の機能制御について検討している。これまで、ある種の細胞において、微小振動刺激による細胞接着および増殖の促進を報告した。本研究では、細胞機能の一つである細胞分化における微小振動の影響について詳細に検討した。

<方法>

ピエゾ電圧アクチュエータを振動子とする周波数可変的に水平方向の振動を発生する微小振動装置を作製した。本装置は、各周波数において約200nmの振幅を有する。細胞としては、神経モデル細胞であるPC12を用いた。PC12細胞を6wellマルチプレートに播種し、細胞上清に神経分化誘導剤である神経成長因子(NGF)を添加した後、マルチプレートを振動装置にセットし、100、1k、10kHzの各周波数にて、37℃、5%CO₂条件にて1時間加振した。その後、24時間毎に1時間の微小振動刺激を5日間行った。また、振動直後の細胞の形態を観察し、Scion Image softwareを用いて細胞形態変化の解析を行った。PC12細胞の細胞分化については、細胞体径以上の突起を有する細胞を分化細胞と定義した。細胞の分化率は、全細胞数あたりの分化細胞数の割合とした。

$$\text{細胞分化率 (\%)} = \frac{\text{分化細胞}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

<結果と考察>

NGF無添加の場合、微小振動の有無によらず細胞の分化は観察されなかったが、NGFを添加することで分化細胞が観察された(図1)。NGF添加系における細胞分化に及ぼす微小振動の影響を検討するため、0、100、1k、10kHzの周波数の微小振動を1時間、24時間毎に2日間付加し、各周波数における細胞分化率を計測した。静置(0Hz)の場合に比して、いずれの周波数の微小振動付加の場合でも細胞分化率の上昇が示された。微小振動による細胞分化の促進と考えられる。この結果について詳細に検討するため、10kHz、1時間の微小振動を24時間毎に5日間付加し、各日の細胞分化率を計測した。NGF不添加系においては、分化細胞率は小さく、細胞の分化は示されなかった。一方の、NGF添加系の結果を図2に示す。NGF添加系においては、微小振動付加の初期(2、3日)での細胞分化率の有意な上昇が示された(P<0.05)。しかしながら、培養後期(3、4日)においては、細胞分化率に有意な差異は認められなかった。以上の結果から、微小振動刺激は、細胞の分化を誘導するのではなく、分化を促進さ

せると言える。1個の分化細胞からの突起長および突起数を計測した結果、微小振動の有無による差異は見られず、約200μmの突起を約3本有していた。この結果は、微小振動刺激が細胞への異常刺激として伝達されていないことを示唆している。また、分化細胞の総突起長の総和は、微小振動刺激の場合に長く、神経ネットワーク形成に有利と考えられる。微小振動による細胞分化促進のメカニズムは明らかではないが、分化のシグナル伝達経路のいずれかに影響していると考えられる。特に、これまで微小振動刺激による細胞の基材への接着促進が認められていることから、細胞膜タンパク質が刺激され易くなっているのではないかと考えている。

<謝辞>

本研究は、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

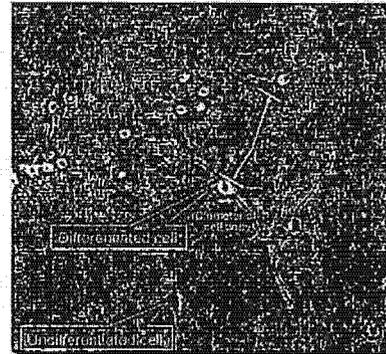


Fig1. PC12 Cells differentiated by NGF

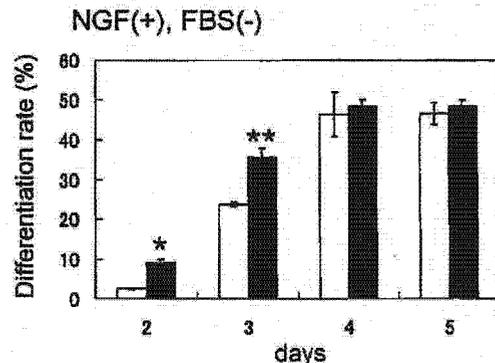


Fig2. Effect of Nano-vibration on cell differentiation (* P<0.02, **P<0.05)

ナノ振動が細胞に与える影響

Effect of nano-meter vibration on cells

○橋本健児、草間淳、加藤綾子*、岸田晶夫**、木村剛***、木村孝之、増澤徹****
 茨城大学大学院 理工学研究科 機械工学専攻、*医療機器センター、**東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、
 茨城大学 工学部 システム工学科、*茨城大学 工学部 機械工学科

Kenji Hashimoto, Jun Kusama, Graduate school of Sci. and Eng., Ibaraki University,

*Ayako Kato, Japan Association for the Advancement of Medical Equipment,

**Akio Kishida, Tuyoshi Kimura, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,

***Takayuki Kimura, Dept. of System Engineering, Ibaraki University

****Toru Masuzawa, Dept. of Mechanical Engineering, Ibaraki University

1. 緒言

本研究では、ナノ振動が細胞にどのような物理的影響を与えるのかを調べる事を目的としている。昨年度までの研究で、ナノ振動が細胞機能の活性化に影響を与える事が確認できている。一方、血管内皮細胞が血流の流れに伸展・配向するという報告やせん断応力に敏感なCa²⁺イオンチャネルが存在するという報告がある。そこで、より精確な振動負荷を実現するために、新たにフィードバック機能を有したナノ振動負荷装置を開発した。また、細胞に横振動を負荷した時の細胞周りの2次元定常流体解析を行い、細胞周りのせん断応力について検討した。

2. ナノ振動負荷装置の開発

Fig.1 にナノ振動負荷装置 (a 図) と駆動装置 (b 図) の概観図を示す。この装置では、シャーレを載せる土台の両側をピエゾ素子で挟み込む構造とした。1つのピエゾ素子を駆動用に、もう1つのピエゾ素子をセンサ用にした。

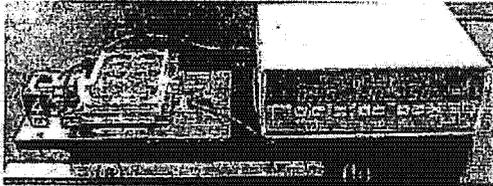


Fig.1 nano-meter vibration device(a) and drive unit(b)

Fig.2 にナノ振動負荷装置の振動特性を示す。この装置の振動周波数は100~9k [Hz]とした。設定振動振幅は10~990 [nm]である。500 [Hz]、600 [Hz]、2k [Hz]に共振点を確認した。

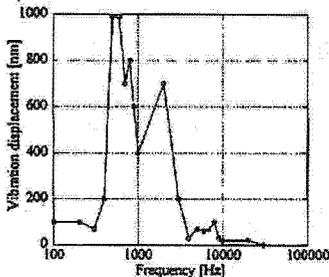


Fig.2 Frequency response

Fig.3 にフィードバックシステムのブロック線図を示す。フィードバック制御では、指令値 (任意の周波数・振動振幅で振動させる値) を駆動回路に入力し、駆動回路からのピエゾ駆動出力をナノ振動負荷装置へ入力し、ナノ振動負荷装置の振幅をピエゾセンサで読み取り、センサからの出力を駆動装置に入力して指令値と比較することで、任意の振動周波数で振動振幅を一定で振動させた。センサ用ピエゾ素子の周波数特性を駆動回路に組み込み、フィードバック制御を行い、任意の振動周波数において振動振幅を一定

で振動することを可能とした。

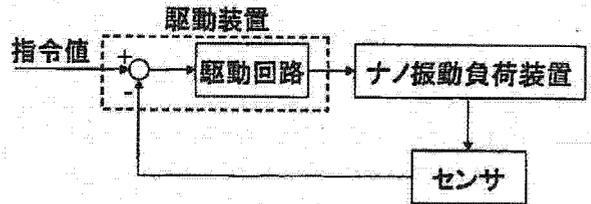


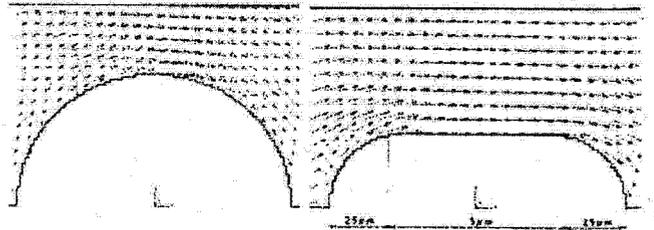
Fig.3 block diagram of feed-back system

3. せん断応力解析

Fig.4(a)に細胞が半円形状のモデルと Fig.4(b)に細胞の高さが半分の扁平形状のモデルを示す。有限体積法を用いた2次元定常せん断応力解析を行った。Fig.4(a)の細胞の大きさは半径5 [μm]とした。細胞を剛体、底面に接着、流体は水、流れは層流、温度は37 [°C]として解析を行った。流速は、振動周波数10 [Hz]、振動振幅400 [nm]とした時の振動の最大速度12.57 [μm]と設定した。

4. 結果と考察

Fig.4(a)に細胞が半円形状の解析結果を、Fig.4(b)に扁平形状の解析結果を示す。Fig.4(a)場合の境界層は14.5 [μm]であり、最大せん断応力は388 [mPa]であった。Fig.4(b)場合の境界層は9.5 [μm]であり、最大せん断応力は322 [mPa]であった。この結果を人体の各血管内に働くせん断応力と比較すると、直径2~6 [mm]の動脈と同程度のせん断応力が生じていることが確認できた。よって、細胞にナノ振動を負荷することで細胞に血管内と同程度のせん断応力がかかり、細胞に影響を与えている可能性が示唆された。



(a) Semicircular model (b) Flat model

Fig.4 Analysis results

5. 結言

より精確な振動負荷を実現するために、新たにフィードバック機能を有したナノ振動負荷装置を開発した。また、細胞に横振動を負荷した時の細胞周りのせん断応力解析を行った。振動周波数10 [Hz]でも、細胞周りの最大せん断応力は人体の動脈と同程度であるという結果が得られた。振動により生じるせん断応力が細胞機能の活性化に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

6. 謝辞

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金の支援のもと行われた。

振動エネルギー利用による生体接合技術の開発

Tissue adhesion technology by using vibration energy

○濱口 崇志, 加藤 綾子*, 岸田 晶夫**, 木村 剛**, 樋上 哲哉***, 増澤 徹****

茨城大学大学院 理工学研究科 機械工学専攻, *医療機器センター, **東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ***札幌医科大学 外科学第二講座, ****茨城大学 工学部 機械工学科

Takashi Hamaguchi, Graduate school of Sci. and Eng., Ibaraki University,

*Ayako Kato, Japan Association for the Advancement of Medical Equipment,

**Akio Kishida, Tsyoshi Kimura, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,

***Tetuya Higami, Dept. of Second Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine

****Toru Masuzawa, Dept. of Mechanical Engineering, Ibaraki University,

1. 緒言 ステントグラフト内挿術では、ステントグラフトと動脈の不完全な接合から生じる動脈瘤内への血液の滲れであるエンドリークが問題となっている。そこで、本研究ではステントグラフトを動脈へ確実に接合する方法の開発を目標としている。本研究では、新しい接合方法として、振動エネルギーと蛋白質熱変性を利用した接合方法を提案する。基礎実験として、今回、生体同士を接合させ、その接合強さを計測したので報告する。

2. 方法 [装置概要] 対象物に振動と熱と荷重を与えたときに接合可能かどうかを調べるため、接合装置を製作した。その概略図を図 1 に示す。電気こて先端形状は 8 [mm]×8 [mm]×8 [mm]の立方体とした。本装置では、対象物の下からピエゾ素子を用いて振動を与え、電気こて取り付け部にリニアスライダ機構を採用することで対象物に一定荷重を負荷できる構造とした。本装置に電気こてを取り付け、直動運動させ、対象物に振動と熱と圧力を与える。与圧荷重を計測するため、荷重変換器をこて先の直動運動方向に取り付けた。NI 社製の DAQ デバイスを用いて LabVIEW ソフトウェアで荷重を計測した。

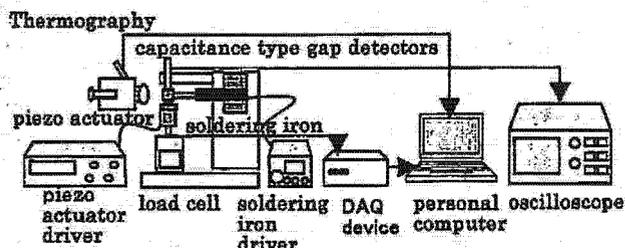


Fig.1 adhesion system for blood vessel

血管の接合効果を評価するため、血管用引張試験機を製作した。その概略図を図 2 に示す。送り速度 2 [μm/s] のパルスモータとボールねじが一体化した直動アクチュエータを採用し、高精度な試験機を開発した。NI 社製の DAQ デバイスを用いて LabVIEW ソフトウェアで制御すると共に、同時に荷重を計測した。

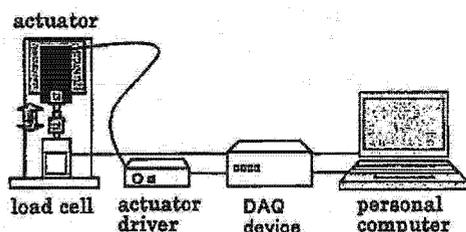


Fig.2 Tensile test system for blood vessel

[ピエゾ素子と電気こてによる血管同士の接合] 血管用接合装置を用いて生体同士の接合を行った。このときピエゾ素子の振動周波数を設定し、電気こての温度と押し付け荷重を計測した。対象物には豚の大動脈を用い、軸方向に 50 [mm] にカットし、円周方向に 5 [mm] にカットすることで短冊形とした。実験条件は、振動周波数 6.93 [kHz]、12.07 [kHz]、14.50 [kHz]、電気こての設定温度 110 [°C]、押し付け時間 2 [min]、4 [min]とした。

[接合させた血管の接合強度評価] 接合させた生体において、接合強さを調べるため、血管用引張試験機を用いて、引張試験を行った。引張方向は短冊形の長辺方向とした。実験条件は、引張速度 4 [mm/min]とした。

3. 結果および考察 豚の血管同士の接合条件であるピエゾ素子の振動周波数、電気こての押し付け時間、押し付け荷重、最高温度及び接合血管引張試験により求めた接合強さを表 1 に示す。

Table 1 adhesion strength under each conditions

frequency [kHz]	time [min]	load [N]	max temperature [°C]	adhesion strength [MPa]
6.93	2	6.39	113.5	0
	4	6.17	116.7	0.207
12.07	2	6.06	111.8	1.333
	4	5.93	115	1.745
14.50	2	4.22	111.6	0.162
	4	4.16	115	0.944

表 1 より、振動周波数 6.93 [kHz] の押し付け時間 2 [min] の場合を除きすべての条件において接合できた。また、接合できた条件のうち、振動周波数 12.07 [kHz] の押し付け時間 4 [min] のときに一番強く接合し、そのときの接合強さは 1.745 [MPa]であった。血管の接合強度は、アルデヒド系医用接着剤を用いた場合、約 0.01 [MPa]と言われており、数 10 倍～ 100 倍以上の強度を得ることができた。本結果より、振動エネルギーと蛋白質熱変性を利用した新接合方法は、十分な接着強度で生体接合を可能とすることが判明した。今後、生体と金属の接合を検証することにより、ステントグラフトを動脈へ確実に接合させ、エンドリークを防止する治療支援装置の実現が可能になると考える。

[謝辞] 本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金の支援のもと行われた。

O-02-2 機械的微小振動によるリバーストランスフェク
P-421 ション効率促進

岸田 晶夫¹, 田村 千都², 栗田 公夫³,
伊藤 由樹子¹, 加藤 綾子³, 増澤 徹³, 木村 剛³

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²日本大学理工学部物
質応用化学科, ³茨城大学工学部機械工学科

【緒言】再生医療分野においては、遺伝子・タンパク質導入による細胞の高次機能化技術の開発が進められている。我々は、ナノメートル領域の振幅を有する微小振動による細胞膜刺激に関する検討を行っており、振動による物質透過性の向上が期待できる。本研究では、細胞への遺伝子導入における微小振動の影響について検討した。

【実験】約 200nm の振幅振動を発生する微小振動装置を作製した。細胞は、COS7 細胞を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込むプラスミド DNA (pGL3) を用いた。数種の非ウイルス遺伝子導入剤とプラスミド DNA の複合体を形成させ、培養基に固定化し、細胞を播種した。直後に微小振動装置にて種々の周波数で 1 時間加振し、48 時間培養後に遺伝子導入効率等を評価した。また、接着細胞上清への複合体の添加による遺伝子導入における微小振動刺激も検討した。

【結果と考察】細胞上清に DNA を添加した場合、微小振動の有無による差異は認められなかった。培養基から遠方の細胞膜での運動性は緩和されたため、遺伝子発現効活性に差異は認められなかったと考えられる。一方、DNA を培養基に固定した場合には、加振による約 10 倍の遺伝子導入効率の促進が示された。DNA が基材近傍であるため振動刺激による細胞膜の運動性は緩和されず、遺伝子の取り込みが促進されたと考えられる。本研究は、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

O-02-4 炭酸アパタイト系ナノキャリアーによるタ
P-388 ンパク質の細胞内デリバリーシステムの設
計と細胞内構造の可視化

多田 誠一, Chowdhury Ezharul Hoque,
原田 伊知郎, 赤池 敏宏

東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻

生細胞内へのタンパク質導入技術は、基礎研究の分野において生細胞内での各種タンパク質の分布解析や細胞機能の制御に利用できるだけでなく、臨床における遺伝子治療の代替手法としての応用も期待できるため、組織工学/再生医療においても利用価値の高いツールといえる。

そこで本研究では、炭酸アパタイトとタンパク質との複合体を調製して細胞に投与し、タンパク質導入を行う手法を検討した。炭酸アパタイトは、リン酸とカルシウムを主成分とした無機物質である水酸アパタイトの炭酸イオン含有量を高め、結晶性を下げたものである。水酸アパタイトはもともと生体適合性が高く、またタンパク質を吸着する性質を持っているが、結晶性を抑えたことで、細胞にエンドサイトーシスによって取り込まれた後に複合体が溶解し、担持させたタンパク質が細胞質中に放出され易くなることが期待される。

炭酸アパタイト微粒子の利用により、モデルタンパク質として用いた蛍光標識したウシ血清アルブミンまたは β -ガラクトシダーゼの HeLa 細胞への導入に成功した。 β -ガラクトシダーゼについては、細胞内に導入後も活性が保持されていたことから、炭酸アパタイトを用いたタンパク質導入法の培養細胞に対する有効性が確認された。また、アクチンフィラメントの可視化を目的として、蛍光修飾したアクチンの細胞内への導入を行い、細胞内構造の解析における本手法の有用性を検討したので報告する。

O-02-3 Multifunctional nano-crystals for precise
P-427 and smart gene delivery in cell-based
therapy

Chowdhury E. H., Kutsuzawa K., Akaike T.

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo
Institute of Technology

Cells with the inherent capability of transforming into many cell types, have been shown tremendous potential for cell-based therapies for neurological disease or injury, diabetes and myocardial infarct. Transgene delivery could be a powerful strategy for specific differentiation of embryonic stem cells since several transcription factors have been demonstrated to regulate stem cell differentiation to specific cell types of heart, pancreas, liver and neurons. Recently, we have developed a safe, efficient nano-carrier of carbonate apatite which can assist both intracellular delivery and release of DNA leading to very high level of trans-gene expression in cancer and primary cells. However, its efficiency in embryonic stem cell is poor. Here, we reveal a new approach of organic-inorganic hybrid carrier devised by embedding fibronectin and E-cadherin-Fc chimera with the nano-crystals leading to synergistic acceleration of transgene delivery and expression into embryonic stem cells.

O-03-1 PIV 法による RWV/バイオリアクターがつくる
P-352 力学場計測と軟骨再生

植村 寿公¹, 山田 康孝², 大藪 淑美¹,
CUI JIEFENG³, 三島 初², 田中 順三³

¹産業技術総合研究所ナノテクノロジー研究部門, ²筑波大学人間
総合科学研究科, ³東京工業大学工学部

我々は以前、RWV(rotating wall vessel)バイオリアクターを用いて、ウサギ骨髄細胞より移植可能な大きさの 3 次元軟骨組織を得ることができ(Ohyabu et al. Biotech. Bioeng. 59, 1003(2006))、膝関節全層欠損モデルに移植することによる良好な軟骨再生を報告した。RWV バイオリアクターは円筒形のベッセルを横軸方向周りに回転させ、組織にかかる重力と、培養液の回転による流れがつりあうことにより、微小重力環境のように浮いている状況を実現するので、実際には外力が働いている。軟骨の組織構築に有効な力学刺激を研究する目的で、RWV ベッセル中の培養液が組織に与える力学場を測定できる力学場観察システムを構築した。本システムでは、培養液に 10 ミクロンのトレーサ粒子を混入させ、ベッセルの横方向から YAG レーザーをビーズに照射、ビーズからの光をベッセル正面から CCD カメラで時間的に捉え、培養液の各位置での速度ベクトルを求める(PIV:particle image velocity 法)。本手法により、RWV により骨髄由来軟骨組織が構築される過程での外力は、例えば 12 日目の培養で 0.42dyne/cm² と計算できる。Laser Microdissection を用いた組織の凍結切片の各位置での分化度 (col type-II, aggrecan の mRNA 発現) との相関などに関して詳細を報告する。本研究は (財) 日本宇宙フォーラムの推進している「宇宙環境利用に関する地上研究公募」プロジェクトの一環として行ったものである。