



Title	生体由来人工血管の開発のための動物実験
Author(s)	石坂, 高英; 鶏内, 雅司; 狩野, 猛
Citation	北海道大学電子科学研究所技術部技術研究報告集, 3, 25-40
Issue Date	1996-03-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/1459
Type	departmental bulletin paper
File Information	KJ00000697041.pdf



生体由来人工血管の開発のための動物実験

石坂高英, 鶏内雅司*, 狩野 猛**

* 大学院工学研究科 生体工学専攻 学生

**電子科学研究所 電子計測制御部門自律調節研究分野 教授

1. はじめに

近年、日本人の食生活の欧米化が進み、動物性蛋白質の摂取量が多くなるにつれて、動脈硬化が原因となって起こる心筋梗塞や動脈瘤形成など、心臓血管病が急増し、冠動脈のバイパスを始めとする血行再建の為の手術が多く行われるようになった。この血行再建に用いられる移植用血管（グラフト）としては、現在、冠動脈のバイパスの場合には内胸動脈や自家静脈が、また、大動脈や下肢の動脈には、合成繊維製の人工血管が主に用いられている。しかしながら、人工血管の場合には、手術直後における血栓形成や、術後数ヶ月から数年という遠隔期において発生する内膜肥厚による閉塞のため、グラフトの直径が小さくなるにつれて開存性が悪くなるという問題がある。その為、直径6mm以下の人工血管は、ほとんど使用されていないというのが現状である。そこで、長期的な抗血栓性と開存性を持った直径3mm以下の小口径人工血管の開発が強く望まれており、世界中の研究者によって現在研究が進められている。我々の研究室では、かねてより動脈硬化および吻合部内膜肥厚に及ぼす血行力学的因子、特にフローパターンおよび壁すり応力の影響について研究を行っており、独自の方法により透明化した天然血管を用いた一連の流れの実験の結果、上記のいずれの血管病も、血流が局所的に乱れてゆっくりした二次流や再循環流によって占められている低壁すり

応力領域に選択的に発生することを明らかにしている。また、これらの肥厚性血管病の発症機構に関しても、コレステロールの血中における担体としてのリポ蛋白の管壁への物質移動に及ぼす流れの影響についてコンピュータを用いたシミュレーションにより検討を行った。その結果、血管壁が血漿に対して透過性を有することに起因する一種の濾過作用により、血管内膜表面上で流速（従って壁すり応力）に依存したリポ蛋白の濃縮現象が起こり、これが原因となって渦などの形成により流れが極端に遅くなっている領域でリポ蛋白の濃度が高くなり、内膜肥厚や動脈硬化など、肥厚性の血管病が局所的に発生、進行する可能性のあることが判った。同様の解析を移植された人工血管について行った結果、血管壁の水透過率が天然の血管のそれに近いほど血管壁表面上におけるリポ蛋白の濃度がホスト動脈における濃度に近い値になる、即ち血管壁構成細胞の増殖に必要な栄養素としてのコレステロールの供給量がどこでも同じになることが判り、血管壁の過剰な肥厚（内膜肥厚）を抑制出来ることが示唆された。そこで我々の研究室では、生体血管に近い水透過率を持った人工血管として、生体由来の人工血管の開発をめざして研究を行っている。本報では、その生体由来人工血管を生体内に移植した場合に起こる管壁における水透過率および管壁の厚みの変化を調べるために行っているイヌを用いた動物実験に関して、特に我々の研究室で行っている方法について

詳しく紹介させていただくことにする。

2. 生体由来人工血管の生体内移植実験

2.1 動物実験の為の前準備

新たに開発された人工血管が、臨床用として実際にヒトに移植して用いられるようになるまでには、様々なテストが必要である。最も重要なのが実験用動物を用いた長期的移植実験である。これを行うことにより、人工血管の抗血栓性、内膜肥厚の程度、細菌などによる感染の程度、石灰化（カルシフィケーション）の程度、および生体内での血圧や張力などの力学的ストレスに対する耐久性などに関する知見を得ることが出来、それを評価することによってヒトへの臨床応用が可能か否かを判定するわけである。ここでは、動物実験を行う場合に、まず最初に行なければならないいくつかの事柄について述べることにする。

(1) 実験用動物の選定

作製した人工血管の生体内移植実験を行うにあたり、まず、どのような種類の動物を用いるかを決定しなければならない。これは、移植する人工血管のサイズ（直径および長さ）、動物の価格、および飼育しやすさを考慮して決定される。我々の研究室で現在行っている生体由来人工血管は、直径が約3mm程度のものなので、頸動脈に間置移植する事を考えると、犬、豚、羊などが候補として考えられるが、一匹当たりの価格は、羊が約8万円、豚は10万円と高価である。犬でも実験用動物として繁殖されているビーグル種のは10万円もするが、雑種犬は比較的安く購入することが出来る。我々の研究室では、飼育しやすい事と、最も安く購入出来るということにより、札幌市衛生局の動物管理センターより予防接種も何もしていない雑種犬を一匹千円以下の安価で購入している。

(2) 実験様式の決定

動物実験には、短期間で終了し、実験終了後動物を飼育管理する必要のない急性実験と、実験終了後、長期的な飼育管理を必要とする慢性実

験（生存実験）とがある。人工血管の開存性のテストは、たいてい慢性実験で行われる。慢性実験を行う場合には、手術中はもちろん、術前、術後の動物の健康管理、患部の消毒、手術用器具や覆い布などの滅菌などに細心の注意を払う必要がある。我々の研究室では、人工血管を移植した後1ヶ月から1年ほど経過した時点で取り出すような慢性実験を行っている。尚、移植した血管を取り出す場合には、実験用動物は血管を取り出した後処分するので、急性実験の様式で行っている。

(3) 動物実験を行うための事務手続き

我々の研究室のある電子科学研究所では、研究上で動物実験を行う必要のある場合には、所内の教授および助教数名で構成されている実験動物委員会に詳細な実験計画書を提出することになっている。また、実験用動物の取り扱いに関しては、医学部で動物実験指針講習会が毎年2回行われており、動物実験に携わる者は全て、3年に1回受講することが義務づけられている。

2.2 実験用動物の入手方法

人工血管の生体内移植実験に用いる雑種犬は、電子科学研究所から車で約30分の札幌市の北東のはずれにある札幌市衛生局環境管理部動物管理センター福移支所から購入し、運搬業者を頼んでそれを研究所まで運搬している。その詳細について以下に説明する。

動物管理センターでの犬の分譲は毎週2回、火曜日と金曜日に行われている。したがって犬が必要な場合は、その前日に電話をして体重10kg程度の雄犬が2匹以上いるかどうかを尋ね、もしもいる場合には、翌日、購入するための予約をする。次に運搬業者に連絡し、翌日の犬の運搬を依頼する。運搬業者は、その日のうちに研究所に来て、あらかじめ準備しておいた犬運搬用ケージ、鎖、首輪2～3匹分を車に積んで持って行ってくれる。分譲犬をもらいに行く当日は、朝早く、購入手続きに必要な書類と筋注麻酔薬、注射器セットを持って運搬業者の車で動物管理センターへ出かける。目的地に着いたら、まず、犬を見て、健康そうで

あること、体重が10kg程度であること、および雄である事を確認し、書類に必要事項を記入して購入の手続きをする。次に犬をケージに入れて研究所まで運搬するわけであるが、人に慣れていておとなしい犬は難なくケージに入れられるが、荒っぽくて暴れて手に負えないような犬の場合は、筋注用麻酔薬（ケタラール）を3～4ml注射して動作が緩慢になってからケージに入れるようにしている。雄犬と限定して購入する理由は、動物管理センターでは、1室に多数の犬を入れて管理しているため、雌犬の場合は妊娠していることがあり、それを知らずに手術をし、その数週間後に出産するという事が過去に一度あったので、動物愛護の精神からもそのような事が起こらないようにする為である。研究所に到着後、犬を運搬用ケージから飼育用ケージに移す。実験用の犬は、電子科学研究所の裏側にある2階建て事務棟の半地下にある大動物飼育室で飼育管理されている。

2.3 実験用動物の管理および飼育方法

実験に使用することを目的とした動物の管理および飼育の方法は、家庭でペットとして飼う場合と大きく異なる。ここでは、我々の研究室で行っている方法について説明する。

電子科学研究所には、犬など、比較的大きな動物を飼育できる大動物飼育室（床面積44㎡）およびラット、マウス、家兎を飼育できる小動物飼育室（床面積34㎡）がある。大動物飼育室には、長い2段になった自動水洗清掃装置があり、それぞれの段に犬を収容するケージが6個ずつ並べられるようになっている。犬の排泄物は、間欠的に作動するこの清掃システムによって洗い流され、常に清潔に保たれるようになっている。また、飼育室の床はコンクリートになっており、長いホースを用いて水道からの水、又はガス瞬間湯沸かし器からの温水で洗い流せるようになっている。その他、スチームによる暖房装置、換気装置が完備されている。飼育室は、半地下室になっていて、日中でも直射日光が入らず暗いので、白色光のライトを点灯して明るくし、タイマーで操作して

夕方になると消えるようにしている。犬のケージを清掃装置のある段の上に収容する際には、油圧式の手動のリフターを使用する。飼育室は常時、旋錠されており、関係者以外は出入り出来ないようになっている。

実験用動物を飼育室に搬入した後、動物に番号や名前などを付け、その動物の特徴を記録する。また、飼育用ケージにも同様の事項と、搬入した月日などを書き込んだカードを添付する。ケージは、普通サイズのもので12個自動水洗清掃装置の上にあり、さらにやや大きめのケージが1個床の上に設置されており、最大13匹の犬を飼育することができる。

犬の飼料としては、通常は固形飼料〔CD-5, 日本クレア〕と缶詰の肉〔ゲインツミール, AGF〕を与えるが、食欲のない犬には、補助食として牛乳、ソーセージ、牛すじ肉などを与えている。飲料水は、それぞれのケージに自動給水口が設置されているが、他にもプラスチック製のボウルに水を入れて置いてある。動物管理センターから購入したばかりの犬は、病原菌に感染していて、他の飼育中の犬に二次感染する恐れがあるので、その予防対策として、入舎後3日間、抗生物質〔シンクル, 旭化成工業〕の錠剤を粉にして缶詰の肉に混ぜて与えるようにしている。既に飼育中の犬でも、下痢をした場合には同様に抗生物質を与えている。尚、動物飼育室では、防疫を考慮に入れ、常に上下一体型の白い作業衣を身につけ、ゴム長靴、帽子、マスクを着用して作業するよう心がけている。

2.4 動物実験用設備、器具、薬品

(1) 実験用設備

我々の研究室には実験室が4つあり、そのうちの1つを半分に仕切ってその一方（床面積30㎡）を動物実験室として使用している。この部屋にある主な設備としては、水道および流し、ガス湯沸かし器、動物手術台、無影灯、電気メス（電源およびコード付き柄）、輸液用架台、洗濯機、電気掃除機、薬品用収納棚、手術器具用収納棚、

手術衣用ロッカー、手術器具用カート、薬品用カート、動物運搬用台車などがある。この動物実験室の隣の部屋には、純水（脱イオン水）製造装置およびオートクレーブがある。その他、器材室に、人工呼吸器、超音波エコーカーディオグラフ、ポリグラフ、電磁血流量計、呼気ガス分析器、血圧計などがあり、必要に応じて動物実験室に持ち込んで使用できるようになっている。

オートクレーブ〔HA-300P, 平山製作所〕は、患部に直接接触する手術器具や覆い布などを滅菌するのに用いられる。オートクレーブを使用するには、まず滅菌器の底部に約2.5リットルの脱イオン水をいれ、その上にステンレス製の円型網籠を置く。次に滅菌すべき手術器具および覆い布等をオートクレーブ用袋〔メディックロール, 三興化学工業〕に入れ、この袋の上下の開口部をオートクレーブ用テープ（これは、消毒が完全に行われると濃褐色の線が浮き出てくる滅菌表示テープ）で封をし、網籠の中に入れる。最後に蓋をしてスイッチを入れる。滅菌するのに冷却に要する時間を含めて約3時間ほどかかる。その間にオートクレーブ内の手術器具および覆い布などは約20分間、圧力1 Kg/cm²、温度121℃の条件下におかれ、滅菌されるのである。

動物手術台〔KN-304A, 夏目製作所〕は、高さ方向に30cmの範囲内で移動可能であり、動物の体位も前後、左右に傾斜させることが出来るようになっている。無影灯〔KY-950, 山田医療照明〕は、4個の電球の角度を調節して焦点を合わせることが出来、また、明るさも4段階に変えられるようになっている。この照明装置は、気道確保の為に気管チューブの挿入および手術時の患部を照明する際に使用される。電気メス〔E-22R, 泉工医科工業〕は、人工血管を移植する為の血管を露出させる際に、周囲の組織を切断したり、止血をする際に使用される。

(2) 実験用器具

人工血管の動脈への間置移植実験に用いる器具類は、実際に患部と接触する物と、しない物の2つのグループに大別され、前者には、外科用

メス、鉗、持針器、動脈鉗子、ピンセットなどがあり、これらは全てオートクレーブで滅菌して使用されるようになっている。後者には、電気バリカン、気管チューブ、挿管用鉗子などがあり、これらは滅菌せずに使用される。

(3) 実験用薬品

動物実験用薬品としては、前麻酔用として筋注用塩酸ケタミン製剤〔ケタラール50, 三共製薬〕、本麻酔用としてペントバルビタールナトリウム注射液〔ネンプタール注射液, 大日本製薬〕、抗生物質として静注用セファム系抗生物質〔セフォタックス, 中外製薬〕、血管拡張用として塩酸パパベリン注射液〔大日本製薬〕、血液凝固阻止剤としてヘパリンナトリウム注射液〔武田薬品〕、それに輸液として5%ブドウ糖液〔500mlボトル, 大塚製薬〕などが用いられる。

2.5 移植実験前の準備

動物実験を行う当日には、全てが揃っていつでも使用できるようにするために、出来るだけ前日のうちに準備しておく。実験台には、プラスチックの薄膜でコートされた白い大きな紙のシートを敷き、カートには、図1のように麻酔用器具、気管チューブ、バリカン、抗生物質など、滅菌する必要のない物を揃え、その他、消毒用薬品などを準備しておく。また、手術用器具の有無を確認し、滅菌用袋に入れ、オートクレーブを用いて滅菌しておく。尚、オートクレーブを使用できない電気メス用のコード付き柄は、消毒用エフゲン〔立山化学〕の入ったプラスチックケースの中に入れて滅菌する。

実験当日は、筋注用麻酔薬（ケタラール）を注射器に入れ、犬運搬用ケースを台車に乗せて大動物飼育室に行き、実験用の犬の首または臀部に麻酔薬を3～4ml注射し、麻酔薬が効き始め犬の動作が緩慢になった頃に犬をケースに入れ台車に乗せて実験室へ運ぶようにしている。

2.6 移植実験の前段階

動物実験、特に慢性実験を行う場合には、実際

に外科的作業に入る前にしなければならないことが沢山ある。ここでは、それらを含む移植実験直前の準備について説明することにする。

(1) 麻酔薬の投与量の決定

動物実験を行う際には、動物愛護の観点から、動物を無意識、無痛にし、さらに筋肉を弛緩させ、手術を安全かつ容易にする目的で麻酔処置を行う。一般的に用いられる方法は、麻酔薬を静脈より注射する全身麻酔である。我々の研究室では、ペントバルビタールナトリウム注射液〔ネンプタール注射液、大日本製薬〕の静脈注射により犬の全身麻酔を行っているが、麻酔処置を行うに当たって最適投与量を決定する必要がある。

ネンプタールによる全身麻酔の適量は、25~30 mg/kg体重とされているので、麻酔薬の投与量を決定する為には、まず、犬の体重を測定する必要がある。そこで、我々の研究室では、測定者が犬を両手で抱えてヘルスメーターに乗り、重さを測定し、その値から測定者の体重を差し引いて犬の体重を求め、それをもとにして麻酔薬の適量を算出している。適量が決定され次第、それに相当する量のネンプタール水溶液を滅菌された注射器に取り、準備しておく。

(2) 静脈注射による麻酔処置

犬の麻酔は、前肢肘下の静脈に麻酔薬を直接注射することによって行っている。その為に、まず、前肢の肘から下にかけて約10cmほどの区間を犬用の刃をつけた電気バリカンを用いて電気掃除機で刈り取った毛を吸い取りながら剪毛し、イソジン原液を用いて洗浄、消毒する。次に、前肢の肘関節の少し上部を止血用ゴム管で縛り、静脈の血流を一時止め、血管が膨張して見やすくなるようにし、そこに30cm程度のチューブの付いた翼状針を刺し込み、血液がチューブ内を満たしたところに麻酔薬の入った注射器に接続する。この時点で止血用ゴム管を取り外し、静脈の血流を再開させ、麻酔薬を先に犬の体重より算出した適量だけゆっくりと注入する。この時、犬はくしゃみをするので翼状針の翼の部分指で抑えるか、またはテープで固定して針先が血管から抜け出ないように注意する必要がある。麻酔薬の適量を注入した後は、図2に示したように、外科用テープを用いて翼状針およびチューブを犬の前肢にしっかりと固定する。最後に、麻酔用に使用した注射器を取り外し、翼状針のチューブを輸液セットを介して点滴用の5%ブドウ糖液のボトルに接続し、翼状針内で血栓形成が起こらない程度にゆっくりと（数秒間に1滴の割合で）ブドウ糖液が流れるよ

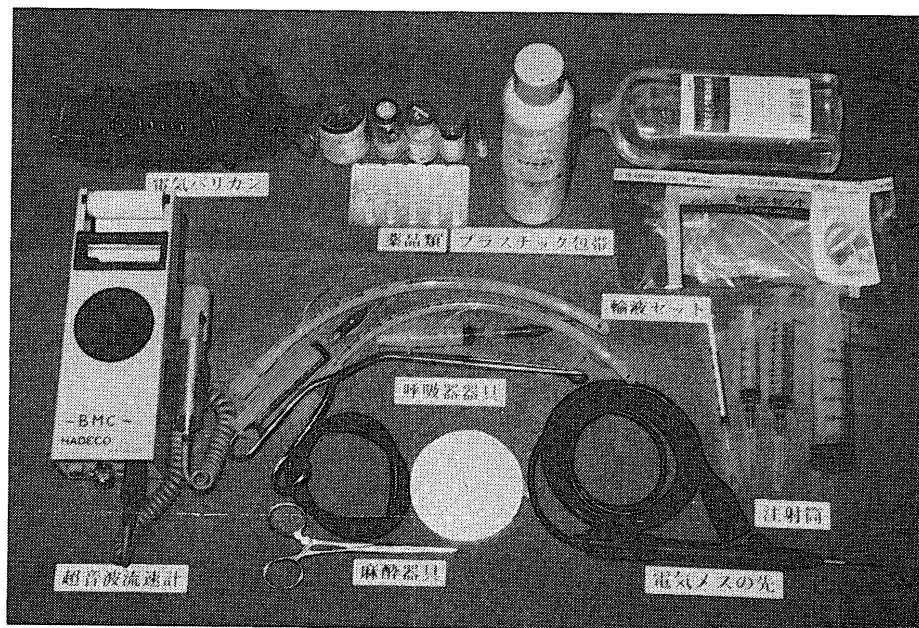


図1 実験用器具（滅菌する必要のない物）

うにしておく。

(3) 気道の確保

全身麻酔した犬を仰向けにして実験を続けていると、喉頭蓋の圧迫や、唾液、痰などによる気道の閉塞により、呼吸困難となり、最悪の場合は窒息死に至ることがある。そこで、気道に気管チューブを挿入し気道を確保する必要がある。この気管チューブの挿管は2人で行っている。まず、1人が両手を用いて舌と上顎をつかんで引っ張るようにして大きく口を開ける。この時、舌は唾液で滑りやすいのでガーゼを当てて行う。次に、もう1人の人がライトで照明しながら挿管用の長いマギル鉗子で喉頭蓋を大きくつかみ声帯が見えるようにし、吸気時に声門が開いた瞬間に気管チューブを気道に挿入する。挿入部分の長さは5cm程度でカフの部分が完全に隠れるようにする。最後に、カフに注射器で空気を送り込んで膨らませ、気管チューブが簡単に抜け出ない事を確認した上で、外科用布テープでチューブを下顎に縛りつけて固定する。この操作の終わった後で気管チューブの出口に掌を近づけて、気管チューブを通して呼吸の行われていることを確認するようにしている。

(4) 手術部の剪毛、消毒

皮膚の切開など、外科的操作を含む慢性動物実験を行う場合に最も注意すべきことは、皮膚切開部からの細菌の侵入による感染である。従って、この細菌による感染の予防の為に細心の注意を払う必要がある。我々の研究室では、以下のよ

うにして切開部からの細菌の侵入を防止するよう心がけている。まず、犬用の刃を取り付けた電気バリカンで電気メスのアース板の接触部に当たる犬の背部の毛を電気掃除機で吸い取りながら剪毛する。この部分は外科的操作とは直接関係なく、従って消毒する必要がないので剪毛するだけにし、アース板を下に置いて生理食塩水で湿らせたガーゼを介してこの部分が接触するように犬を仰向けにして寝せる。ここで、麻酔下の犬は、全身の筋肉が弛緩していること、および麻酔が醒めてくるとふんばることにより排便や排尿する恐れがあるので、それに備える目的で乳児用のおむつを装着するようにしている。また、犬は、麻酔が醒めてくると四肢を動かし、手術の妨げになるので、それを防止する目的で、布テープを用いて四肢のそれぞれを手術台の側端に固定する。次に手術野を確保するために電気バリカンを用いて、電気掃除機で毛を吸い取りながら切開予定部を含む前首約15~20cmの領域を剪毛する。これは、出来るだけ広い範囲にわたって、そして出来るだけ毛が短くなるよう、ていねいに行う。剪毛の後、図3に示したように、カートの上段に緑色の滅菌済みの布を敷き、その上にイソジン液、70%エタノールと0.02%ヒビテンの混合液、生理食塩液、滅菌ガーゼ、タオルなど、消毒に必要なものを並べて用意する。手術野の消毒は、まず石鹼とガーゼを用いて皮膚を擦り、汚れを落としてきれいにする。この作業の方が消毒殺菌剤の塗布よりも大切と思われる。石鹼水を良く拭き取った後、用意したイソ

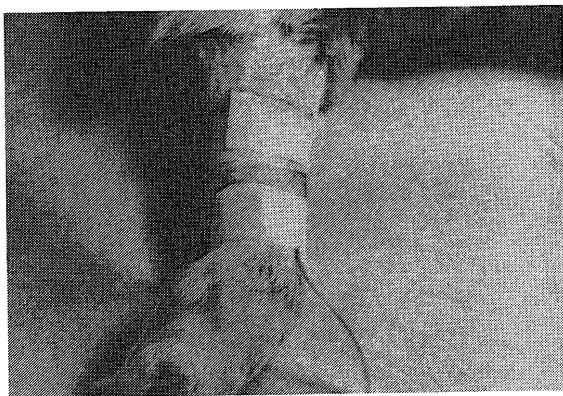


図2 輸液用チューブ付翼状針を挿管しテープで固定した後の犬の前肢

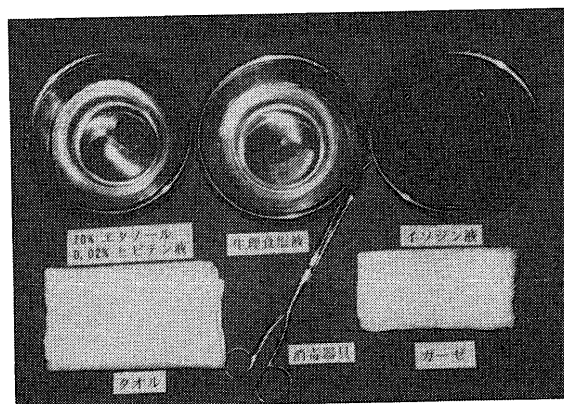


図3 消毒液および消毒用器具

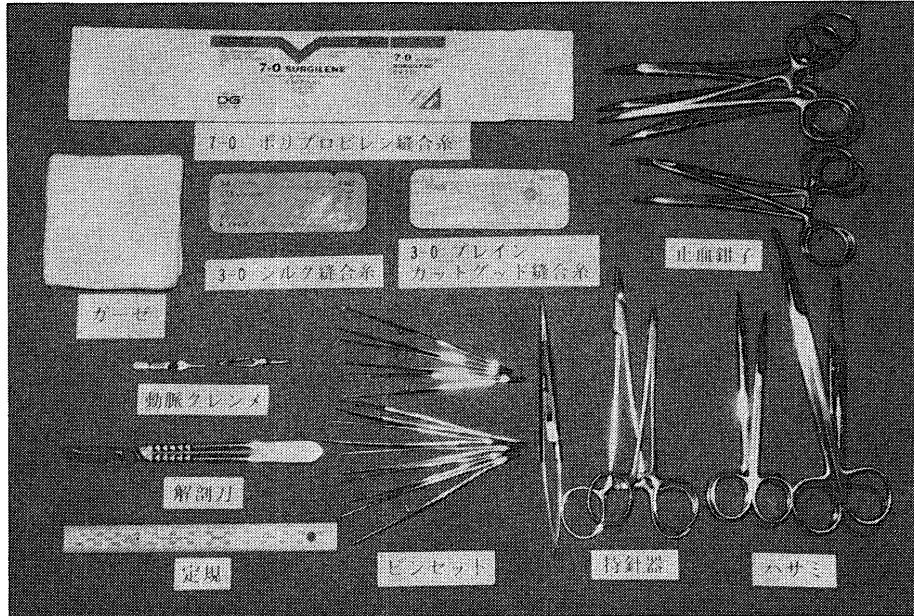


図4 滅菌済み手術用器具および縫合糸

ジン液を十分に塗布して消毒し、さらに0.02%のヒビテンを含む70%アルコール液をスプレーし、ガーゼで拭き取り、褐色をしたイソジンの色が消えるまでこの操作を2～3回繰り返し手術野の消毒を完了する。

(5) 手術用器具の準備および手術野の設営

手術野の消毒が終わり、手術野以外の犬の体の他の部分に手を触れる必要がなくなったところで実験器具用カートに滅菌済みの緑色の布を敷き、図4に示したように、各種縫合糸およびオートクレーブで滅菌した手術用器具類やガーゼなどを袋より取り出して並べ、外科的操作を開始できるよう準備する。続いて、皮膚の切開手術を行うので、消毒をしていない部分からの細菌による感染を防止するための工夫をしなければならない。我々の研究室では、図5に示したように、半分に折りたたんだ4枚の滅菌済みの緑色の布を、消毒した手術野の輪郭よりも1～2cm内側になるようにして4方に配置し、そのそれぞれの手術野に面した端（折り目の部分）に沿って3～4ヶ所を3-0針付黒色縫合糸で皮膚に直接縫いつけて固定した上で、さらに、犬全体を覆い隠すような大きなビニールコートされた緑色の紙製滅菌シートをか

け、図6に示したように、手術野の部分だけをハサミで切り抜いて露出させ、手術が始まったら、術者は、露出しているこの部分だけに神経を集中させて作業出来るようにしている。

(6) 術者および補助者の身支度

外科的手術を伴う慢性動物実験を行う場合、術者は常時、滅菌状態を保たなければならない。従って、麻酔のチェックや手術用器具、薬品などを補給してくれる補助者が少なくとも1人必要である。我々の研究室で行っている人工血管の移植実験は、3人で行っており、術者と補助者1人で



図5 4枚の滅菌済み布を皮膚に縫いつけて設営された手術野の写真

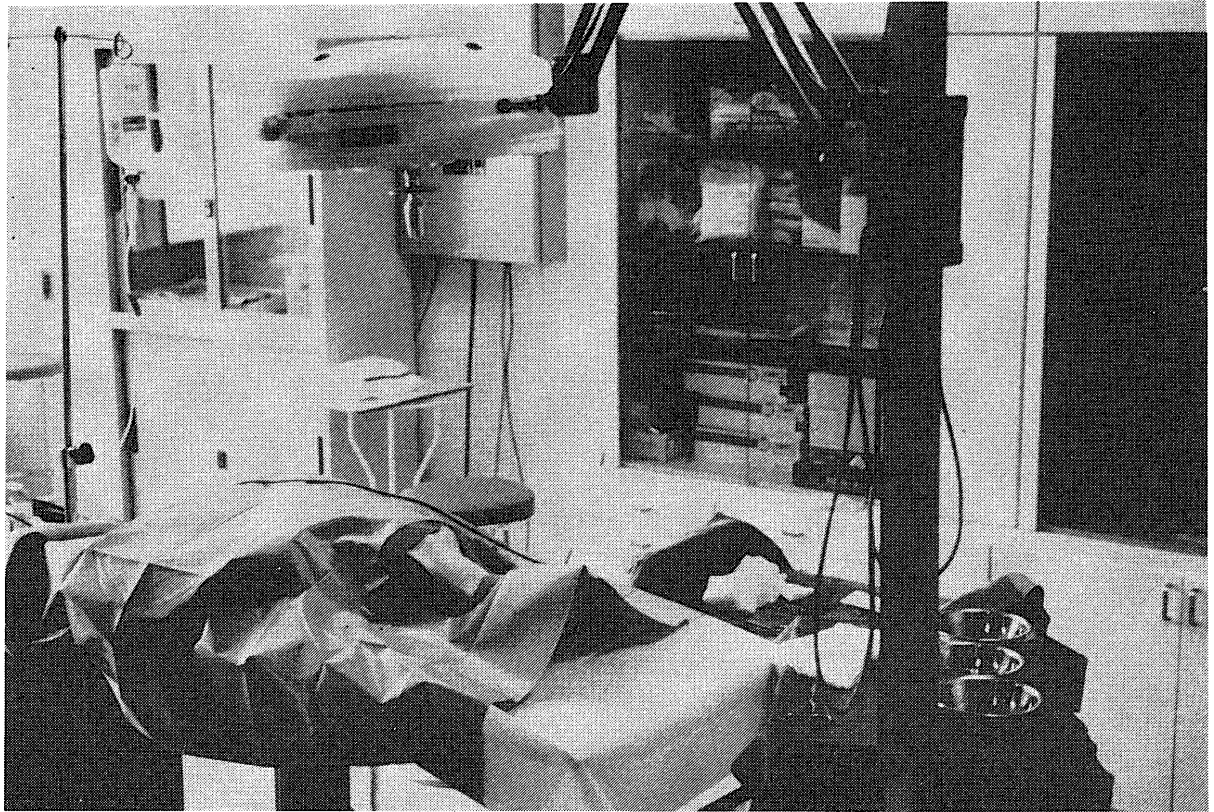


図6 犬の頸部に手術野を設営後の手術台周辺の様子

手術を行い、もう1人の補助者が犬の麻酔の状態のチェックや実験中に必要な器具や薬品、ガーゼなどの補給を担当している。実験に先立って術者および補助者は下着以外の衣服を実験用のものに替え、手術用マスク、帽子および靴カバーを着用する。続いて、手の消毒は、まず、ブラシで手を擦りながら水道水で洗う。次にイソジン液を手にかき手全体に擦り込んで濡らし、良く消毒する。最後に再び水道水でイソジン液を洗い流し、滅菌したタオルで水を拭き取る。手の消毒の後は、滅菌ガウンで身を包み、手術用滅菌ゴム手袋を装着し、準備を完了する。尚、術者は、血管縫合を行うに際して頭部に帽子の上から冠するようにして4倍の倍率の手術用拡大鏡 (Carl Zeiss, ドイツ) を着用する。

2.7 移植実験

人工血管の総頸動脈への移植実験は、皮膚の切開、総頸動脈の露出、人工血管の移植および切

開創の縫合などの操作により行われる。その詳細について、以下に順を追って説明する。

(1) 皮膚の切開

左右いずれか一方だけの総頸動脈を用いて実験を行う場合には、通常、その血管に沿って最も近い位置の皮膚を切開する。しかしながら、我々の実験では、左右両側の総頸動脈に人工血管を移植するので、1つの切開口より左右両側の総頸動脈に到達できるように首の正中線に沿って切開する方法を取っている。この皮膚の切開は、No. 20の丸形の替刃を付けたメスを用いて行っており、気道の峰に沿って喉頭直下より胸骨把柄近傍まで約2mmの深さで一刀のもとにまっすぐに15~20cm切開する。この時、皮膚の微小血管から出血するが、ガーゼで拭き取りながら電気メスの刃を出血部に軽く当てて凝固止血を行っている。尚、皮膚の切開に先立って抗生物質 (セフトラックス) 5mlを輸液セットを通じて静脈中に投与している。

(2) 総頸動脈の露出

慢性動物実験では、細菌による感染の機会が多いので、切開創を最小限にし、滅菌してない器具や不潔になった手指などを絶対に創傷に近づけないよう注意しなければならない。皮膚の切開の後には、筋層を剥離し、頸動脈を露出させる作業に入る。これは、主に電気メスと止血用鉗子を用いて行っている。まず、電気メスを切断と凝固の両方を同時にできるようにセットし、左手の親指と人差し指で広げながら皮膚の切開面に沿って電気メスの刃を走らせ、多重層になっている皮膚を深部まで切開し、その直下にある筋層を露出させる。続いて、気管の上を気管に沿って平行に走行している筋層を剥離する作業に取りかかる。これは、ゆるやかに上方に湾曲した止血用鉗子を筋層中にもぐり込ませ、外側へ開くようにして筋肉を左右に広げ、結合組織を電気メスで切断しながら正中線に沿って前進し、皮膚の切開部全長に渡って行う。筋肉は何層にもなっているので、この操作を繰り返しながら深層へと剥離を進めていく。その際に多少の出血があるが、この部分には直径約0.5 mm以下の微小血管しかないので、出血のある場合には、電気メスで凝固止血することが出来る。筋層を全て左右に剥離して切開口を広げると気管が見えてくる。左右の総頸動脈に到達し、これを露出させるには、気管の前面を覆っている透明な結合組織でできている薄膜をも切開しなければならない。これも上記と同様にして鉗子と電気メスで行うが、気管を横切って走行する静脈が数本あるので、これを切断するに当たっては、正中線（気管の峰に相当する）の両側で3-0の絹糸で2ヶ所結紮した後、その中間部で静脈を切断するようにしている。次に、気管の円周方向に筋層および結合組織の薄膜を剥離していくと左又は右の総頸動脈に到達することができる。総頸動脈は、直径約2 mmの迷走神経と一緒に鞘状の薄膜で包まれている。そこで、最後に、鉗子の先を動脈と神経の間に突き刺してこの鞘状の薄膜に穴をあけ、そこから鉗子と電気メスを用いて長さ方向に切開して行き、総頸動脈を露出させる。尚、こ

の部分の総頸動脈には、ほとんど側枝はないが、もしもある場合には、分岐部に近い所と、数 mm 隔てたもう1ヶ所を3-0の絹糸で結紮し、その真ん中で血管を切断することにより総頸動脈を遊離するようにしている。このようにして左右両側の総頸動脈を露出させ、人工血管の移植の為に準備が完了する。皮膚の切開から総頸動脈の露出まで、丁寧にやると1時間ほどを要するので、麻酔が醒めてくることがある。その場合には点滴用の輸液セットのチューブ内に必要に応じてネブタール1 mlを注射器で注入して追加麻酔を行う。麻酔の深度を調べる方法としては、顎の硬さを調べるのが最も簡単で確実である。両手で上下の顎をつかんで開こうとした時に簡単に開くことが出来れば麻酔が充分効いているし、逆に、大きな力を要する場合には醒めて来ていることを知ることが出来る。我々が実験する際には、補助者の1人が麻酔の効き具合を調べて麻酔薬を追加投与したり、図7に示した無影灯の焦点および電気メスの出力の

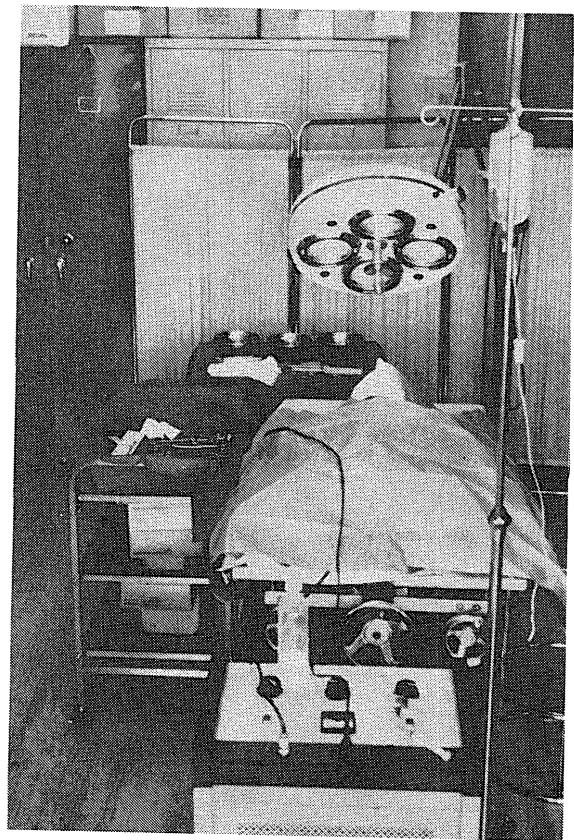


図7 動物実験用手術台、電気メス、照明装置の写真

調節をしたり、ガーゼや縫合糸の補給をし、実験が順調に進行できるようにしている。尚、点滴によるブドウ糖の注入量は、出血の状態によって増減するが、出血のない状態の場合で約10ml/kg/hr程度で行っている。

(3) 総頸動脈への人工血管の移植

我々が現在行っている犬による人工血管の移植実験では、犬の総頸動脈を薬品処理して作製した2種類の生体由来の人工血管を使用している。これらは、他の目的の為に行われた実験の終了後に麻酔薬の過剰投与により安楽死させられた犬より採取した総頸動脈を生理的圧力下でグルタルアルデヒドでコラーゲン線維を架橋結合することにより組織固定したもの（GAグラフトと呼ぶことにする）およびキモトリプシンで血管壁構成細胞および結合組織中の蛋白質を分解・除去した後にグルタルアルデヒドで組織固定したもの（CTグラフトと呼ぶことにする）である。

人工血管の総頸動脈への移植実験は、90度切断の端々縫合による間置移植により行っている。その方法について以下に詳細に説明する。

まず最初に、人工血管のホストとなる総頸動脈に筋弛緩剤として1%塩酸パパベリン注射液〔大日本製薬〕を生理食塩水で100倍に希釈した液を注射器でふりかけ、十分に浸潤させる。これは、血管を切断すると血管の中膜を構成している平滑筋細胞が収縮するため、血管壁の内面を一層になって覆っている内皮細胞が剥がれ落ち、血管縫合後に血流を再開した際に血栓形成が起こりやすいので、それを防止する目的で行っている。続いて、間置移植予定部の両側約1cmの所に血管用クランプをかけて血流を遮断し、心臓側の縫合予定部位を外科用のまっすぐな鋏を用いて切断面が血管の中心軸に対して直角になるように切断する。ここで、切断した血管は、血液がまだ中に残っていて凝固する可能性があるため、細いチューブを取り付けた注射器を用いて切り口よりヘパリンを含む生理食塩水を注入して洗い流すとともに、パパベリン希釈液をふりかけて血管の収縮を防止するようにしている。また、吻合面となる心臓側の切り

口近傍の外膜は、縫合の際に邪魔になるので剥離し、除去しておく。これでいよいよ人工血管の端々縫合による間置移植に取りかかるわけである。

移植実験用に作製した2種類の生体由来人工血管のうちの1つ（GAグラフト）を保存液（70%エタノール水溶液）より取り出し、長さ4cmの部分を定規で測定し、血管軸に対して直角になるように外科用鋏で切断する。そして、その一方の端を、先に切断し、外膜を除去して準備した総頸動脈の心臓側の切断面と縫合する。この端々縫合の仕方には、一針ごとに結紮して行う方法もあるが、我々の移植実験では、縫合糸として7-0の針付 Surgilene [モノフィラメント・ポリプロピレン縫合糸, Cyanamid Canada Inc.] を使い、カストロビージョ型持針器を使用して人工血管の外側からホスト動脈の内側への針送りによる連続縫合により、一針の幅が約2mm、ピッチが約1mmになるように行っている。図8は、この縫合操作を行っている様子を示したものである。この時、術者は、出来るだけ正確に縫合する目的で、4倍の倍率の拡大鏡を着用する。切断面に沿って一周り縫合したところで両手で糸を引っ張ってホスト動脈と人工血管の切断面が完全に密着するようにし、糸を引き締めて結紮する。この結紮は、使用しているポリプロピレン縫合糸は弾性が強くほぐれやすいので、それを防止するために7回行っている。心臓側の縫合が終わったところで血液の漏れのテストをする必要がある。そこで、人工血管の未縫合の方の端を指で押さえて密閉し、ホスト動脈にか

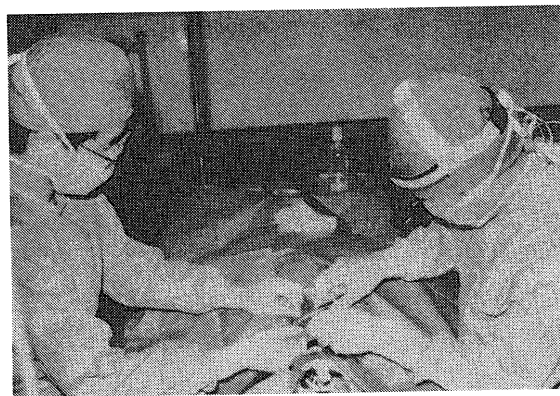


図8 人工血管の移植実験の様子

けてあるクランプを一時的にはずし、縫合した人工血管内にも血液が流れ込み、動脈圧がかかるようにする。この時、縫合部からの出血の程度を見て、もしも、どこか、激しく吹き出しているところがある場合には、その所へ針かけて結紮し、出血を止めるようにし、特にそのような所がない場合には、たいてい針穴からの漏れであり、血栓が形成されて止血されるので、そのまま放置する。漏れのテストの後には、再び宿主動脈にクランプをかけて止血し、血栓形成を防止するために人工血管内の血液をヘパリン入りの生理食塩水で完全に洗い流しておく。これで心臓側の縫合を完了したことになる。次に、既に血管クランプで止血してある抹消側の総頸動脈を約2cm切り落とし、縫合のために外膜を剥離除去する。末梢側の端々縫合を行う場合には、既に縫合してある人工血管と末梢側の宿主動脈を引き寄せて縫合する必要がある。そこで2つの血管を引き寄せて、血管の裏側に当たる部分に1ヶ所固定糸をかけておいて縫合を行うようにしている。末梢側の縫合も心臓側と同様にして行うが、最後の結紮の仕方だけ異なるところがある。切断面に沿って一周り縫合し、切断面が完全に密着するように糸を引き締めるが、糸を結紮せずに末梢側の血管クランプをはずし、動脈圧をかけ、針穴を通して人工血管内に捕らわれている空気を追い出し、それから心臓側の血管クランプをはずし、人工血管を間置移植した総頸動脈の血流を再開させた後に心臓側の場合と同様に7回結紮する。この際に、心臓側および末梢側の両方の縫合部を親指と人差し指で2～3分間軽く押さえ、血栓形成により針穴からの出血を止めるようにする。もしも激しく出血している所がある場合には、そこへ針かけて結紮し、出血を止めるようにするが、たいてい場合は、じわじわと滲み出てくる程度であるので、手指でその部分を押さえ続けて完全に止血するのを待つようになっている。これで片側（右側）の総頸動脈への人工血管の間置移植が完了することになる。

次に、もう一方の左側の総頸動脈への移植を行うが、これは先に行った右側の場合と全く同じ方

法で行うので省略することにする。我々の実験では、右側にGAグラフト、左側にCTグラフトを移植している。図9は、左右両側の総頸動脈に間置移植されたCTグラフト（上部）およびGAグラフト（下部）の写真を示したものである。CTグラフトの方が管壁が薄いので宿主動脈に近い色に見える。

縫合手術中、実験補助者は常に術者のそばにいて犬の麻酔の状況の観察、ブドウ糖液の点滴量のチェックを行うとともに縫合部の照明を良くするために照明部位を替えるなどの仕事を行っている。

（4）筋肉および皮膚の切開創の縫合

人工血管の移植が完了した後、約10分間程度、手術野に手を触れずに放置し、縫合部の様子を観察し、出血が完全に止まっていることを確認した上で筋肉および皮膚の切開創の縫合に取りかかる。この切開創の縫合は、次のように3回に分けて行っている。まず最初に、正中線に沿って剥離し、気管の左右両側に大きく広げられた筋肉のうちの最も深い（総頸動脈に近い）部分の層を両側から引き寄せて、その切開創の一方の端からもう一方の端に向かって針付の3-0のブレインカットグット縫合糸[Ethicon Ltd., U.K]を用いて約1cmのピッチで連続縫合する。そして、縫合の終点に到達したところで針を止め、縫合の出発点近傍の筋肉および組織を気管や血管に手で押しつけ、それを次第に縫合の終点の方向へ移動させて行って中に捕らわれている空気および組織液を追い出

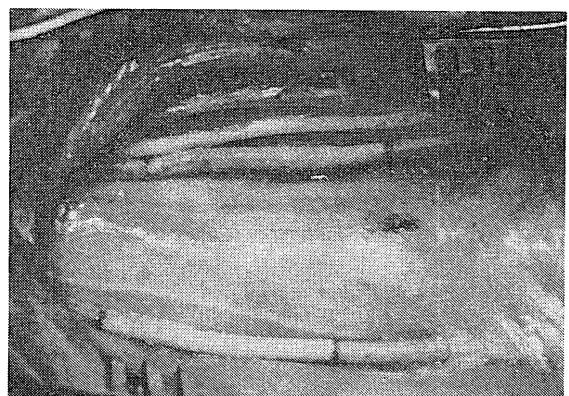


図9 端々縫合により犬総頸動脈に間置移植されたCTグラフト（上）およびGAグラフト（下）の写真

した後で縫合糸を結紮する。次に、同様に皮
膚に近い部分の筋層を引き寄せて縫合する。この
際に、太めの静脈がある場合には針を刺さないよ
う、針の位置をずらして縫合する。また、もしも
出血している所がある場合には、電気メスを用い
て凝固止血する。これを怠ると皮膚を縫合した後
で大きな血腫が形成されることがあるので、でき
るだけ完全に止血するようにしている。最後に皮
膚の縫合を行う。これを行う方法としては、一針
ごとに糸を結紮して行う結節縫合と、連続的に
行う連続縫合とがある。前者は、解ける危険性が
小さく、たとえ解けることがあっても局部的であ
るが、長期間動物を飼育するような慢性実験を行
う場合には、縫合する部位によっては、動物自身
の口や手足で簡単に解かれることがある。後者の
場合は、短期間で縫合を終了できるので実験時間
の短縮はできるが、糸が解けたり、切れたりした
時に破綻が縫合部全域に及び、したがって感染も
起こりやすい。それで我々の実験では、3-0の黒
色シルクブレイド縫合糸 [Ethicon Ltd., U.K.] を
用いて皮膚の切断面に直角に針を当て、皮膚の
真皮の部分に数mmのピッチで針を通し、左右の
切断面を引き寄せた時に縫合糸が皮膚中に埋没
して見えなくなるように連続的に縫合する埋没
褥被縫合法により皮膚の切開創を縫合している。

皮膚の縫合が終わった後は、手術部位および
剪毛部全体をイソジン液で消毒し、滅菌ガーゼ
で拭き取り、続いて0.02%ヒビテンを含む70%
エタノール水溶液をスプレーして褐色をしたイ
ソジンの色が消えるように拭き取り、プラスチ
ック包帯材であるノベクタンスプレー [吉富製
薬] をかけて手術部を保護する。これらの操作
が全て終わったところで、皮膚の切開に先立っ
て行ったと同様にして抗生物質 (セフトアック
ス) 5mlを輸液セットを通じて静脈中に投与
する。最後に気管チューブのカフの空気を抜き
取り、チューブを取り外し、また前肢の静脈に
挿入した翼状針 (点滴用の輸液セットに接続し
てある) を取り外し、手指で押さえて止血した
後でイソジン液で消毒し、ノベクタンスプレー
して傷口を保護し、移植実験を終了

する。

2.8 人工血管移植後の犬の管理

人工血管を移植した犬は、飼育室に戻し、ケ
ージの中で安全に覚醒できるようにする。以下
に、犬の動物飼育室への移動から移植一週後
までの管理の仕方について説明する。

人工血管の移植手術が終わった後、まだ麻
酔が効いている間に犬を運搬用ケージに入れ、
台車に乗せて飼育室へ運び、飼育用ケージに
戻す。この時、ケージの中に入れた犬の首の
部分ができるだけ真っ直ぐになっているよう
にし、麻酔で体温が低下しているのを不要に
なった実験着などをかけて保温するようにす
る。また、犬は、覚醒期に入ると無意識に
ケージの中を動きまわるので、餌入れや水
入れが入っていると邪魔になるし、窒息を
起こす原因ともなりかねないので外に出し
ておく。移植手術の翌朝は、犬はもう麻酔
から完全に醒めているので、手術をした首
の部分および両眼の状態を良く観察する。目
の瞳孔の大きさおよび形の変化から人工血
管を移植した総頸動脈が血栓形成によって
閉塞しているかどうかを予測することができる。
血管縫合部および筋層からの出血があると
首の部分が増えることがある。そのような場
合には、数日間様子を見て、小さくなるよ
うな時はそのまま放置するが、あまり大き
い時は、犬を再び手術室に連れて、麻酔下
で皮膚および必要があれば筋層の切開部を
開き、溜まっている血液や組織液を除去す
ることもある。水、および餌として固形飼
料と缶詰の肉を与える。この時、抗生物質
 [シンクル, 旭化成工業] の錠剤を砕いて粉
状にしたものを缶詰の肉に混ぜて与え、こ
れを3日間続ける。尚、具合が悪く、固形
飼料など食べられない犬には、牛乳、牛す
じ肉、ソーセージなどを与えている。

2.9 移植一週後における開存性のテスト

皮膚の切開創の治癒がほとんど完了する
ころと思われる移植一週後に、移植した時
と同じようにして犬を飼育室より動物実験
室へ運び込み、全身

麻酔をして手術台の上に仰向けに寝せ、四肢を布テープで手術台に固定し、以下の方法により総頸動脈に間置移植した人工血管内を血液が流れているか否かを調べることにしている。

まず、総頸動脈があると思われる部分を皮膚の上から指で軽く押しながら気管に沿って辿ってみて、拍動が感じられるかどうかを調べる。もしも左右いずれかの総頸動脈の人工血管移植部位で、はっきりした拍動が感じられる場合は、人工血管は確実に開存しているので、この時点でテストを終了する。しかし、たいていの場合、動脈は筋層の下に深く埋没されているのではっきりした拍動を手指で感知することは困難である。そこで、次の手段として超音波流速計 [ES-1000SP, Hayashi Denki Ltd.] を用いて流速波形を記録させ、その値から流れがあるか否かを判定する。この流速計は、図1の写真からわかるように、超音波ドップラーによる流速測定プローブの部分が円筒状になっており、その先端の部分を、超音波測定用ゼリーを塗布した頸部に皮膚の上から血管の軸に対して約60度の角度になるように押し当てて流速を測定するもので、血管内の流速が大きいほどシュツシュツというドップラー音も大きく出るようになっている。また、流速（測定部の断面における最大流速）を時間の関数として記録紙に記録させることも出来るようになっている。我々の実験では、記録した流速波形の最大値が 20cm/sec 以上の場合、ほぼ確実に開存していると判定し、人工血管を移植した左右2本の総頸動脈のうちのいずれか一方だけでも開存している場合は、当初の予定通りの期間飼育することになっている。測定された流速の最大値が 20cm/sec 以下の場合には、開存している可能性が低いので、移植時と同様の方法で頸部を開き総頸動脈を露出させ、指で触って拍動の有無を調べる。もしも、左右の総頸動脈のいずれか一方だけでも開存している場合には、再び切開創を縫合して閉じ、予定通り飼育するが、全く拍動が感じられない場合は、麻酔薬（ネンブタール）の過剰投与により犬を安楽死させた後に、血管を摘出して管軸方向に切開し、血栓がどの部分

にどのように形成されているかなどを調べ、失敗の原因を明らかにするようにしている。

2.10 移植人工血管の取り出し

我々が現在行っている実験では、移植した血管を数カ月から最長1年後に取り出し、その性状の変化を調べている。この際の血管の取り出し作業は、取り出した後で犬を安楽死させるので急性実験の様式で行っている。その方法は、まず、移植時と同様にして犬に全身麻酔をし、動物実験室の手術台の上に四肢を布テープで縛って固定して仰向けに寝せ、電気バリカンで前首を剪毛する。続いて丸形の替刃を付けたメスを用いて皮膚を移植時の切開線に沿って切開し、電気メスと止血用鉗子で筋層を気管の両側に剥離して広げることにより、人工血管を間置移植した左右の総頸動脈を露出させる。ここで、間置移植した人工血管を指で軽く摘んでみて拍動の有無を調べ、もしも開存していることが確認できた場合には、電磁血流量計 [MF-27, 日本光電工業] を用いて直径4mmのカフ型プローブを人工血管の上流又は下流側のホスト動脈に装着して1分間当たりの血流量を測定する。これは、後にレイノルズ数や人工血管の内壁に働いているずり応力の計算に用いるために行うものである。また、少量のヘパリンナトリウム注射液を静脈より注入した後、総頸動脈の末梢部にカニューレションし、圧力トランスデューサ [Model 52-9966, Harvard Apparatus] 水銀柱血圧計に接続して総頸動脈内における血圧の測定も行う。最後に、ホスト動脈を人工血管の上流および下流側約2cmの所で黒色絹糸で結紮し、そのすぐ内側で人工血管を含む総頸動脈を切断して取り出し、管壁における水の透過速度の測定までの間、細胞培養液 [RPMI1640, Sigma Chemicals] に入れて保存する。

2.11 血管採取後の犬の処理

移植した人工血管を含む総頸動脈を取り出した後、麻酔薬（ネンブタール）の過剰投与により犬を安楽死させ、頸部の切開口を2-0の黒色絹糸で

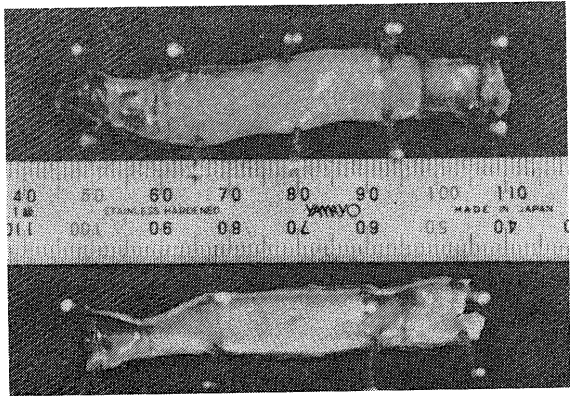


図10 移植1年後に回収されたGAグラフト（上）
およびCTグラフト（下）の内壁表面の写真

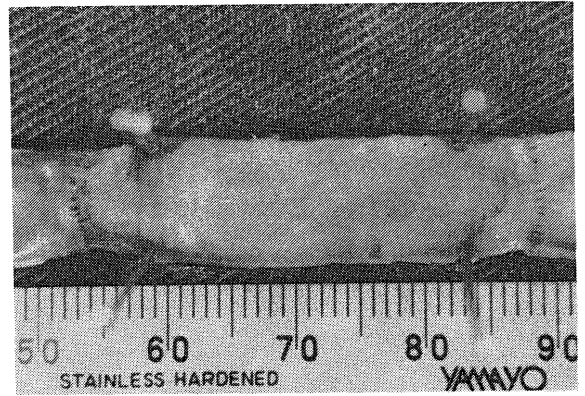


図11 移植1年後に回収されたもう1つのGAグ
ラフトの内壁表面の写真

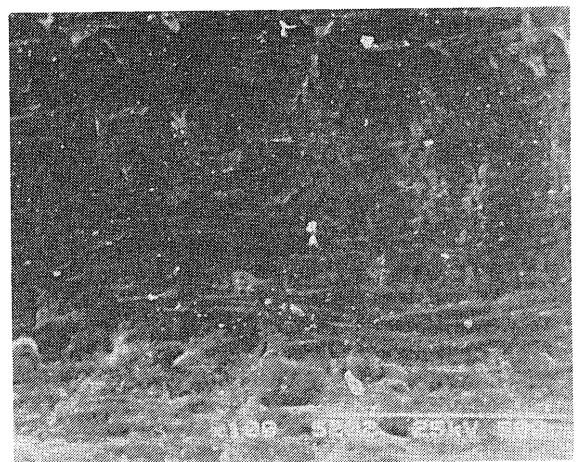
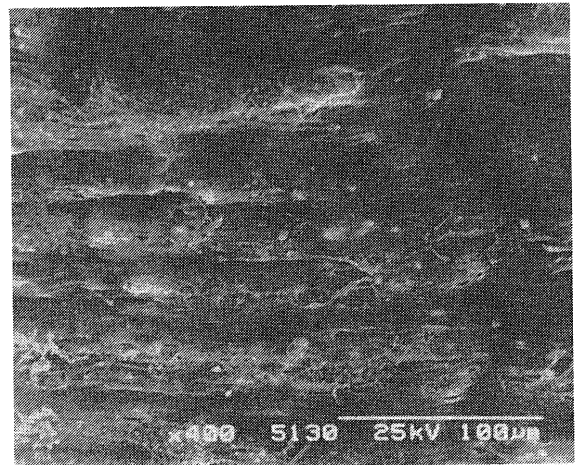
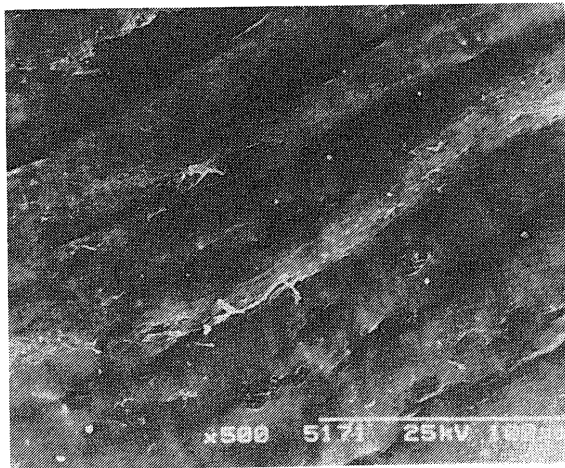


図12 CTグラフト（上段）およびGAグラフト（下段）の内壁表面の走査型電子顕微鏡による写真
（左側：移植前、右側：移植1年後）

縫合して閉じる。その犬を黒色のビニール袋に入れ、部門および実験者名などを記入したテープを貼り付けた後、一時的に研究所1階の小動物飼育室前にある大型の実験動物用冷凍庫に入れて保管し、最終的には医学部の動物実験施設に運び焼却していただいている。

3. 生体由来人工血管の生体内移植による性状変化

犬総頸動脈より作製した生体由来人工血管の生体内移植による性状の変化を調べるために、移植

前のグラフトおよび移植後に回収したグラフトの両方について管壁における水透過速度の測定、血管壁の厚みの測定、および血管内壁表面の微細構造の走査型電子顕微鏡による観察などを行っている。本技術報告は、動物実験の方法に関するものであるため、ここでは血管の性状の測定法についての説明は省略し、これまで得られた結果についてのみ、簡単に述べることにする。

移植実験に用いた2種類の生体由来人工血管は、いずれも生体血管に比べて色が褐色がかっており（特にGAグラフトの方）、柔軟性もかなり劣っていた。移植前のGAグラフトおよびCTグラフ

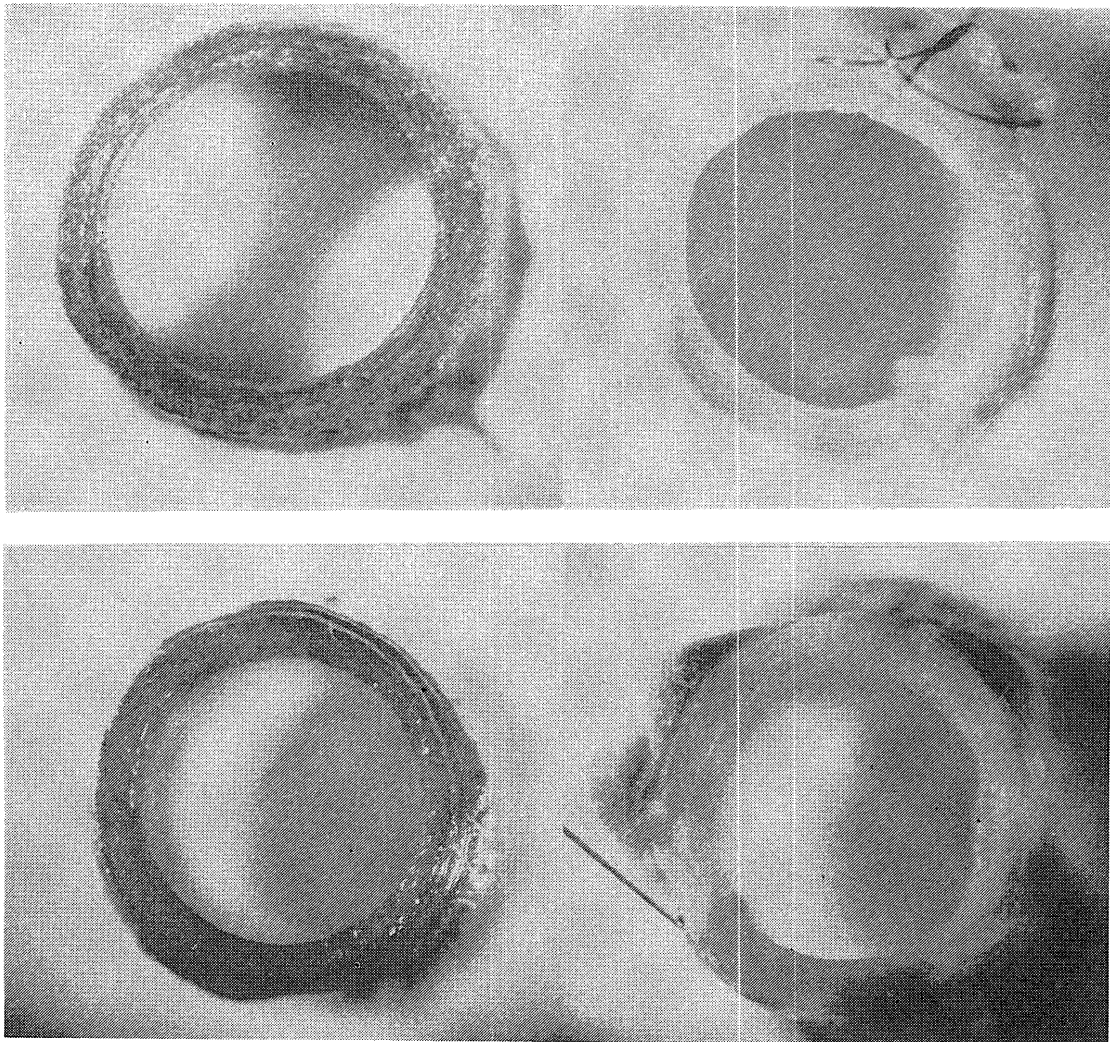


図13 CTグラフト（上段）およびGAグラフト（下段）の断面の写真
（左側：移植前、右側：移植1年後）

トの管壁における水透過速度は、灌流圧力100 mm Hgの条件下で、それぞれ 3.0×10^{-5} cm/secおよび 6.3×10^{-4} cm/secであり、同条件下で得られた犬の総頸動脈に対する値 1.3×10^{-5} cm/secに比べると約2倍および50倍大きい値であった。犬の総頸動脈に移植して1年後に回収したGAグラフトおよびCTグラフトの水透過速度は、移植前の値より低くなり、生体血管に対する値に近づく傾向が見られたが、まだ回収した血管数が少ないので、はっきりとした結論は得られていない。図10は、移植1年後に回収したGAグラフト（上段）およびCTグラフト（下段）、図11は、別のGAグラフトの内壁表面の写真である。いずれのグラフトも内壁面は滑らかで光沢があり、どこにも血栓などは見られなかった。図12は、移植前および移植1年後のこれらのグラフトの内壁表面を走査型電子顕微鏡を用いて観察した場合の写真である。CTグラフト（上段）およびGAグラフト（下段）共に移植前（左側）に比べると移植後（右側）は表面がフィブリンの薄膜で覆われているだけで、それほど大きな変化は見られなかった。また、血管壁の肥厚の程度に関しても、図13にCTグラフト（上段）およびGAグラフト（下段）のそれぞれの断面の写真で示したように、いずれのグラフトの場合にも移植前（左側）と移植1年後（右側）

でほとんど変化のないことがわかった。尚、この点に関しては、今後、更に組織標本を作成して定量的に評価する予定である。

4. おわりに

我々の研究室で現在行っている生体由来小口径人工血管の開発の為に犬を用いた人工血管の移植実験の方法について紹介させていただいた。動物実験は、日本中のほとんどの大学の医学部その他で行われているが、研究室および研究者によっては、ここに述べた方法とはかなり異なった方法あるいは簡略化された方法で行われているものと思われる。この技術報告を読まれる方の中には、我々が必要以上に細菌による感染や防疫に注意を払っていると感じられる方もおられるかも知れないが、動物実験に対する我々の基本的な考え方は、実験用動物にとっても、実験者にとっても常に万全の防疫体制を取って実験に臨むという事である。我々が行っていると同様の動物実験をこれから始めようとする方々、並びに現在遂行中の方々にとって、本稿で述べた事項の中に何か一つでも役に立つこと、あるいは参考になる事があれば幸いである。