

学位論文

「大動物を用いた Tissue engineering vascular graft の高
圧系への適応」

指導教授名

宮地 鑑

申請者氏名

松下 弘

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

目的

血管外科手術において人工血管を使用する機会は多いが直径 6 mm以下の小口径の人工血管は開存率が低い。Tissue-engineered vascular grafts (TEVGs)は生体吸収性で自己組織に置換され優れた開存性を有する。小児心臓血管外科領域の静脈系のグラフトとして臨床応用されているが高圧系においては前臨床段階にとどまっている。また、材料の特性として TEVGs はコンプライアンスが低く、屈曲閉塞するリスクを有する。今回我々はTEVGsを高圧系である動静脈シャントとして大動物に移植し評価した。

方法

poly- ϵ -caprolactone (PCL)と poly L-lactide-cocaprolactone (PLCL)の繊維をエレクトロスピニング法で TEVGsを作成し、モノフィラメント糸を用いて波形の形態を持つ TEVGsを作製した。この TEVGsをヒツジの両側の頸動脈と外頸静脈の間に U 字型に移植した(n=4、グラフト=8)。超音波を用いてグラフトの開存性を含めた形態を評価した。移植手術の1ヵ月後に摘出し組織学的検討を行った。

結果

グラフトの開存率は 87.5%であった。屈曲閉塞、破裂、石灰化、動脈瘤状の変化はなく、組織学的に血管内皮細胞、平滑筋細胞の浸潤を含む良好なリモデリングが観察された。

追加実験-目的

前実験は観察期間が短く、また TEVGsは拡大傾向を有していた。補強したグラフトを作成し、観察期間を延長した追加実験を行った。

追加実験-方法

TEVGs の作成は前回の実験と同様の材料、方法で作成し。グラフトの補強を① polydioxanone 糸 (PDO suture)、② 2-0 polypropylene 糸 (2-0 suture)、③ polyethylene terephthalate/polyurethane (PET/PU)層の3種類で行い3ヵ月後に摘出し評価した。

追加実験-結果

補強したグラフトは開存率の低下がみられた。しかしグラフトの拡大を防ぐことはで

きた。組織学的に評価したところ、外層で覆った PET/PU の層で補強したものは細胞浸潤が乏しく、TEVGs の特性を阻害されていることが示された。糸を外側に一定間隔で巻き付け補強したものは良好な細胞浸潤を認めた。

結語

本研究で使用した TEVGs を高圧系である動静脈シャントに使用すると拡大傾向を認めた。そのためグラフトの補強が必要となった。補強の方法としては細胞浸潤を阻害しないように間隔を設け、可及的に生体吸収性の素材を使用することが望ましいと考えられた。

目次

	頁
1. 序論	1
1-1 末期腎不全患者の治療の現状	1
1-2 動静脈シャントにおける人工血管の現状	1
1-3 Tissue-engineered vascular grafts (TEVGs)	1
1-4 本研究で使用した TEVGs	2
2. 方法	2
2-1. TEVGs の作成	2
2-2. TEVGs 移植手術	2
2-3. 評価方法	3
2-3-1. 超音波による評価	3
2-3-2. 組織学的評価	3
2-4. 統計処理	3
3. 結果	3
3-1. 屈曲に対する抵抗性	3
3-2. 肉眼的観察結果	4
3-3. 超音波解析結果	4
3-4. 組織学的解析結果	4
4. 追加実験	4
4-1. 追加実験-背景	4
4-2. 追加実験-方法	5
4-2-1. 補強グラフトの作成	5
4-2-2. 補強グラフト移植手術	5
4-3. 評価方法	5
4-4. 追加実験-結果	5
4-4-1. 屈曲に対する抵抗性	5
4-4-2. 肉眼的観察結果	6
4-4-3. 超音波解析結果	6
4-4-4. 組織学的解析結果	6

5. 考察	6
6. 総括	8
7. 今後の課題	8
8. 謝辞	8
9. 引用文献	9
10. 業績目録	11
11. 倫理基準の遵守	13
12 図表	13

1.序論

1-1.末期腎不全患者の治療の現状

世界全体の慢性腎臓病の推定有病率は13.4%と報告され増加傾向にある¹。2017年には、末期腎不全を発症した患者のうち、86.9%が血液透析、10.1%が腹膜透析、2.9%腎移植を受けている¹。最も頻度の高い治療法である血液透析を行う患者はアクセスルートとして動静脈シャントの造設を必要とする。

1-2.動静脈シャントにおける人工血管の現状

上記末期腎不全患者の治療の現状より血管外科医にとって動静脈シャントを作成することは最も重要な手術の一つである。前腕で自家動静脈シャントを作成することが好まれるが、静脈の発達が乏しかったり、動脈が狭窄していたりする症例も数多く遭遇する。また良好な自家動静脈シャントも何度も血液透析で穿刺を繰り返すと狭窄、閉塞など多くのトラブルが生じる。そのため市販の6 mm以下の小口径人工血管を使用し動静脈シャントを作成することも多い。1998年に日本で行われた全国調査では、腎不全患者のうち人工血管シャントを有する患者の割合は4.8%であったが、2008年には7.1%にまで増加している²。使用する人工血管としてはポリテトラフルオロエチレン(PTFE)やダクロンのような合成材料が使用されるが、これらの人工血管を用いたシャントもトラブルが多く、内膜の過形成や異物反応による血栓症が数多く報告されている^{3,4}。一般に、人工血管シャントの開存率は低く、術後1年でのPTFEを用いたシャントの一次および二次開存率は64%と43%であると報告されている⁵。これら諸問題により動静脈シャントに使用するより良い人工血管の開発が求められている。

1-3. Tissue-engineered vascular grafts (TEVGs)

Tissue-engineered vascular grafts(TEVGs)は生分解性ポリマー、コラーゲン、エラスチン、ゼラチン、アルブミンなど様々な素材で作成され、最終的には生体内で吸収され血管へのリモデリングが起こり、自己組織に置換される⁶。組織学的に評価をすると血管の内膜、中膜の組織を確認することができ、小児心臓血管外科領域の低圧系のグラフトとして米国では臨床の場で使用されている⁶。この方法により作成されたグラフトは高い抗血栓性を有し⁶、前述の市販の人工血管を使用した動静脈シャントの問題を解決する可能性を持つ。しかしながら報告されている小児循環器領域とは異なり、高圧系である動静脈シャントへの使用はグラフトの耐圧性に懸念が生じる。

Wystrychowskiらを含めTEVGsを動静脈シャントで使用した報告例は散見する⁷⁻⁹。しかし、これらの報告例は全てグラフトに細胞を播種する形で作成されており、コスト面や感染管理の面で不安が残る作成方法である¹⁰。今回我々は細胞播種を必

要とせず、将来的に商業ベースでも手に入りやすい TEVGs の作成を目的とした。

人工血管を使用した動静脈シャント手術では前腕、上腕、または大腿部の限られた領域で穿刺可能部位を増やすため U 字状に移植されることが多い。TEVGs は一般的にコンプライアンスが低く U 字状にグラフトを移植した際には屈曲による狭窄、閉塞が問題となりうる¹¹。この問題も TEVGs を動静脈シャントに使用する際には解決しなければならない。

1-4. 本研究で使⽤した TEVGs

本研究では poly- ϵ -caprolactone (PCL) と poly L-lactide-cocaprolactone (PLCL) の繊維を混合させ作成した。PLCL に PCL を混合させることで TEVGs の分解速度が遅くなり、⾼圧系においても耐圧できることが期待される¹²。また今回作成した TEVGs はモノフィラメント糸を⽤したエレクトロスピンギ法を⽤いて波型の形態とし、屈曲に強い形とした(図1 C)。本研究では TEVGs を⼤動物であるヒツジの総頸動脈(CCA)と外頸静脈間(EJV)に移植し⽣体適合性を超音波による⾎流評価ならびに摘出したグラフトの組織学的評価で行った。

2. 方法

2-1. TEVGs の作成

本研究の TEVGs は PCL/PLCL を⽤いて以下の方法でエレクトロスピンギ法¹³をもちいて、長さ 10cm、内径 5mm のグラフトとして作成された。6wt% の PCL と 5wt% の PCL を hexafluoroisopropanol に溶解し 室温で 24 時間攪拌した。別々のシリンジで、PCL:PLCL の重量比が 1:1 となるよう PLCL 溶液を 5.0 mL/h の流速、PCL 溶液は 4.2 mL/h の流速で注入できるように調節した。両溶液を同時に、針先から 20cm の位置より毎分 100 回転で +25kV の電荷をかけながら鋳型上でエレクトロスピンギを行った。その後直径 260 μ m のモノフィラメント糸を所定の間隔、糸張力で TEVGs に巻きつけることにより波形にした。TEVGs を 30% から 45% の長さとなるよう縦方向に圧縮し、24 時間放置し、その後もとの長さの 50% から 65% まで伸ばし、モノフィラメント糸を取り除いた。TEVGs は 10cm の長さに切り分け、ガンマ線照射により滅菌した。

2-2. TEVGs 移植手術

本研究において Q-Test Laboratories (Columbus, Ohio) の動物実験委員会が動物の使用、手術及び術後管理を行うことを承認した。

移植手術は 4 匹のヒツジに、CCA から同側の EJV への動静脈シャントとして、TEVGs を両側頸部に計 8 本移植した(図2 D、E)¹⁰。手術ではヒツジを 1% ~ 2% のイソフルランで麻酔し背臥位で固定した。CCA および EJV の露出後にヘパリン(10

0単位/Kg) 静脈内投与した。血管吻合は 7-0 Prolene 縫合糸 (Ethicon Inc, Somerville, NJ) を用いて連続吻合で行った。術中および術後 7 日間、抗生物質を投与し、試験終了までアスピリン (325mg/日) を毎日内服させた。TEVGs の評価のため内腔径、壁厚、血流量、血流速度を超音波を用いてカラードプラ法で測定した。移植 1 ヶ月後にペントバルビタールナトリウムで人道的に安楽死させ TEVGs を摘出した。

2-3. 評価方法

2-3-1. 超音波による評価

移植手術後 4 日目と 1 週間ごとにカラードップラーで超音波検査を行い、内腔径、壁厚、血流速度、血流量を測定した。測定は吻合部位とグラフトの中央部で行った。すべての部位で血流が観察された場合、開存と判定した。超音波装置は、Philips HD11 XE 超音波診断装置とプローブ (Philips L15-7io: Philips 社、Amsterdam, the Netherlands) を使用した。

2-3-2. 組織学的評価

摘出した TEVGs サンプルの中央部を 10%ホルマリンで 4°C、24 時間固定し、パラフィンに包埋し、Hematoxylin and eosin (HE) 染色、Masson's trichrome (MT) 染色、Verhoeff-Van Gieson (VVG) 染色、von Kossa (VK) 染色による標準的な組織学的分析を行った。VK 染色では、ヒト胎盤組織を陽性対照として使用した。免疫蛍光染色については、組織切片を脱パラフィンし、再水和し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。一次抗体として von Willebrand Factor (vWF) (1:2000; Dako, Glostrup, Denmark)、 α -smooth muscle actin (SMA) (1:500; Dako Glostrup, Denmark) を用いた。

2-4. 統計処理

すべての実験について、データは平均値±標準偏差で表した。超音波データ (内腔径と壁厚)、肉眼的に測定した内径は、Tukey の多重比較検定を用いた一元配置分散分析で解析した。t 検定を行い、P 値が 0.01 未満を統計的に有意とみなした。

3. 結果

3-1. 屈曲に対する抵抗性 (図 1)

市販の人工血管 (図1 A) と比較すると、TEVGs (図1 B、C) はその波形の構造により、屈曲により閉塞することなく 180 度曲げることができた (図1 B)。TEVGs と市販の人工血管を徐々に湾曲させていき、屈曲が生じた際の半径を比較することで屈

曲に対する抵抗性を評価した。波型の TEVGs の屈曲に対する抵抗性は市販の人工血管の16倍であった(図1 D)。

3-2.肉眼的観察結果(図 2)

摘出した TEVGs の肉眼的検査では、血栓、動脈瘤形成、破裂を示唆する所見はみられなかった(図2 A)。さらに TEVGsの動脈側(図2 B)および静脈側(図2 C)の吻合部において明らかな狭窄は認められなかった。吻合部および TEVGs 中央部の内径を肉眼で測定したところ、全体として約5~6.5mmであった(図2 F)。一次開存率は約4日間で100%、28日間で87.5%であった。

3-3.超音波解析結果(図 3)

超音波での解析の結果は図3の通りであった。やや拡大傾向がみられたが(図3 A)統計学的には有意でなかった。グラフトの壁肥厚が見られたが(図3 B)狭窄を示す血流速度の変化(図3 C)や血流量の低下は見られなかった(図3 D)。開存率は87.5%で1本のグラフトが移植手術後4日目に閉塞が確認されたが、残りの7本は開存していた。

3-4.組織学的解析結果(図 4)

最上段(図4 A、B、C、D、E)、最下段(図4 H、K、N、Q、T)は TEVGs、2 段目(図4 F、I、L、O、R)は CCA、3 段目(図4 G、J、M、P、S)は EJV である。最下段(図4 H、K、N、Q、T)は TEVGs を4倍の拡大率、その他は10倍の拡大率で撮影したものである。縦の列の H&E は Hematoxylin and eosin 染色、VVG は Verhoeff Van Gieson 染色、VK は von Kossa 染色、SMA は抗 α -smooth muscle actin 抗体を、vWF は抗 von Willebrand Factor 抗体を一次抗体として免疫蛍光染色を行ったものである。

Hematoxylin and eosin 染色により、TEVGs への広範な細胞浸潤を確認することができ、TEVGs の繊維が宿主細胞の浸潤を妨げないことが分かった。Verhoeff Van Gieson 染色はエラスチンを特異的に染色する。総頸動脈と同等にエラスチンが存在することが示された。von Kossa 染色は異所性石灰化があると黒く染まるが、TEVGs には見られなかった。TEVGs では再内層が von Willebrand Factor で陽性染色され、内皮細胞で覆われていることが証明できた。これは CCA、EJV でも同様であった。 α -smooth muscle (α SMC) actin は中膜の構成成分の一つであるが、TEVGs では染色陽性であり中膜の構成要素が形成されていることも証明できた。

4.追加実験

4-1.追加実験-背景

上記研究により我々が作成した TEVGs は動静脈シャントのような高圧系に応用でき

る可能性を示したが、観察期間が短期間であったこと、TEVGs の径が徐々に拡大傾向であったことなどの懸念点がみつかった。そのため追加実験として種々の方法で TEVGs を外側より補強したグラフトを作成し同様の実験を行い、補強なしのグラフトと比較し評価した。

4-2. 追加実験-方法

4-2-1. 補強グラフトの作成

TEVGs の作成は前回の実験と同様の材料、方法で作成した。TEVGsの補強は以下の3種の方法を用いた。

1 Polydioxanone 糸(PDO suture)による補強(図5 A)

TEVG の外側に吸収糸である polydioxanone 糸(PDO suture)を 400 μ m 間隔で巻き付け、グラフトの厚さが 800 μ m \pm 10%となるように調節した。

2 2-0 Polypropylene 糸(2-0 suture)による補強(図5 A)

非吸収糸である 2-0 polypropylene 糸(2-0 suture)を同様の方法で外側に巻き付け補強した。

3 Polyethylene terephthalate/polyurethane (PET/PU)層による補強

PET/PU 溶液を用いてグラフトの厚さが 800 μ m \pm 10%になるまでエレクトロスピニング法で TEVGs の外側に新たな層を作成した。グラフトの厚さが 800 μ m \pm 10%となるように調節した。

4-2-2. 補強グラフト移植手術

本研究においては Q-Test Laboratories (Columbus, Ohio)の動物実験委員会が動物の使用、手術及び術後管理を行うことを承認した。

手術は7匹のヒツジに、CCA から同側の EJV への AV シヤントとして、グラフトを両側に計14本移植した¹⁰。本追加実験では観察期間を12週とした。移植手術の方法、手術後の管理は前回の実験と同様の方法で行った。

4-3. 評価方法

超音波による評価、組織学的評価、統計解析の方法は前回の研究と同様の方法で行った。

4-4. 追加実験-結果

4-4-1. 屈曲に対する抵抗性(図 5)

図5 B、C に示したように移植前の補強されたグラフトを180度湾曲させてもグラフトの屈曲による閉塞は見られなかった。また屈曲に対する抵抗性も補強による低下はみられなかった(図5 D)。

4-4-2.肉眼的観察結果(図 6 A:補強なし、C、D:PDO suture、E、F:2-0 suture、G、H:PET/PU 層)

補強なしのグラフトにおいて閉塞はみられなかった。2-0 suture で補強されたグラフトとPET/PU 層で補強されたグラフトの平均グラフト開存率は50%、PDO suture で補強されたグラフトの開存率は33.3%であった。摘出したグラフトの内径を測定したところ(図 6 I)、PET/PU 層で補強されたグラフトが最も小さく($6.025 \pm 0.568\text{mm}$)、次いで2-0 suture で補強されたグラフト($6.700 \pm 3.203\text{mm}$)、PDO suture で補強されたグラフト($12.767 \pm 2.120\text{mm}$)の順であった。補強なしのグラフト内径は最大であった($14.867 \pm 2.829\text{mm}$)。

4-4-3.超音波解析結果(図 7)

移植手術後6週で、補強なしのグラフトとPDO suture で補強したグラフトは、内径が拡大する傾向を示した。その径は頸静脈の拡大の程度とほぼ一致していた。しかし、2-0 suture で補強したグラフトとPET/PU 層で補強したグラフトは、明らかな拡大傾向を示さなかった。

4-4-4.組織学的評価(図 8)

組織学的分析の結果を、図8に示した。すべてのグラフトにおいて、von Kossa 染色で明らかな石灰化組織は認めず、(図8 D、I、N、S、X、c)。Verhoeff-van Gieson 染色でエラスチンの増強が観察された(図8 C、H、M、R、W、b)。また von Willebrand Factor 染色で von Willebrand 因子陽性の単一細胞層が観察された(図8 E、J、O、T、Y、d)。Hematoxylin and eosin 染色の20倍の拡大画像で認められた細胞数は、PET/PU 層で補強されたグラフト(560.0 ± 180.6)の方が、補強なしのグラフトより(1258.3 ± 63.3 ;図9、10A)よりも優位に少なかった。しかし、 α -SMA 陽性細胞数には有意差は見られなかった(図9、10 B)。

5. 考察

末期腎不全患者数の著しい増加に伴い動静脈シャント手術の件数は増加している²。その中で人工血管を要する症例は数多くあるが、現在市販されている人工血管でその開存性において満足する成績を収めるものはない。故に高い抗血栓性を有するTEVGsをこの領域に応用することは重要なことと考える。

TEVGsは一般的にコンプライアンスが低く、U字状にグラフトを移植した際には屈曲が問題となりうる¹¹。今回我々は波型のTEVGsを、モノフィラメント糸を用いたエレクトロスピニング法で作成することに成功し、屈曲に強いTEVGsを移植手術に用いることができた。この方法は狭い領域に長いグラフトを挿入しなければならない動静

脈シャントのような手術において非常に有用であった。また追加実験でグラフトの補強を要する状況でも波型のグラフトを作成でき、屈曲に対する抵抗性も維持することができた。

開存率においては補強なしのグラフトの一次開存率は87.5%であり、小腸粘膜下層に組織より作成した TEVGs を豚に移植した Valencia Rivero らの実験の開存率を上回る結果であった¹⁵。

組織学的には、TEVGs の内腔表面は von Willebrand Factor で陽性に染色された内皮細胞の層を有していた。この因子は内皮細胞に特異的なものではないが、ヒツジには内皮細胞に特異的なマーカーがないため、von Willebrand Factor は多くの研究で代替として使用されている¹⁶⁻²¹。本実験において細胞外マトリックスの評価は Masson's trichrome 染色で評価し、エラスチン組成は Verhoeff Van Gieson 染色で評価した。TEVGs の組織学的分析は CCA のものと類似しており、融解された TEVGs が良好な血管リモデリングを受けたことを示唆している。また α -smooth muscle actin 抗体陽性細胞も数多く確認でき、血管平滑筋細胞の浸潤が同定された。このこともリモデリングが生じていることを裏付けるものである²²。しかし、血管平滑筋の過剰な増殖は内膜過形成を引き起こし、血管狭窄や閉塞の原因となる可能性がある²³。内膜肥厚により狭窄を呈したグラフトが手に入った際には、血管平滑筋細胞数を測定して閉塞のないグラフトと比較することにより適切な細胞浸潤の程度を検討できる可能性がある。

初回の実験においては高圧系においても TEVGs がその特性である生体分解性、を有し自己血管組織へのリモデリングが生じることを証明することができた。しかし前述の通り観察期間が短期間であったこと、グラフトの径が徐々に拡大傾向であったことなどの懸念点があり、それらを払しょくするために追加実験を行った。

追加実験においてグラフトの開存率は低下した。補強による屈曲への抵抗性の低下は認めなかったため、グラフトの加水分解、血管内皮細胞等の細胞浸潤が阻害され、抗血栓性が低下してしまった可能性を示唆するものであった。

これまでの TEVGs の研究では、グラフトの生体分解性が重要であると論じられている^{24,25}。その中でも分解の速度が重要な要素となりうる。すなわち分解速度が速いと瘤化を招き、遅いと狭窄や石灰化の因子となりうる⁶。本追加実験ではグラフトの瘤化を予防するため補強を行ったが、補強素材が細胞浸潤を阻害していないかが重要な論点となる。ラットを用いた研究で生体吸収性材料と非吸収性材料が右室流出路のパッチの細胞浸潤の比較が報告されており、非吸収性の PTFE パッチでは、内皮細胞とコラーゲンの沈着は表面のみで、パッチ内部への細胞浸潤はみられなかった。一方 polyglycolic acid と ϵ -caprolactone の重合体に L-lactic acid と poly-L-lactide で補強し作成した生体吸収性のパッチは良好な細胞浸潤、抗血栓性を示した²⁵。非吸収性の素材において T リンパ球の蓄積は確認されており、同細胞から

のインターフェロン- γ の放出が平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖を抑制することが報告されており抗血栓性に寄与していると考えられている^{26,27}。本実験ではPTU/PUの層状の補強では細胞浸潤が著しく抑制されていた。層状に配置された非吸収性の素材により細胞浸潤が機械的に阻害された可能性が示唆された。一方 Polydioxanone 系や 2-0 Polypropylene 系を外側に間隔をもつて巻きつける補強は細胞浸潤が著しく阻害されることがないことを証明できた。しかし、非吸収性の素材との間に惹起される炎症反応が細胞の浸潤を抑制する懸念は払拭できない。

今回の追加実験において補強したグラフトの拡大の抵抗性と細胞浸潤に対する耐性のグレードを図 11 に示した。グラフト拡大の抵抗性において+++は 5 mm 以上 10mm未満の拡大、++は 10 mm 以上 20 mm 未満の拡大、+, 20 mm 以上の拡大を示す。細胞浸潤に関しては+++は 10 倍の hematoxylin and eosin 染色の標本で細胞数が 1000 個以上のもの、++, 750 個以上 1000 未満のもの、+は 0 以上 750 未満のものを示している。上記解析によると PTU/FU 層や 2-0 Polypropylene 系のような非吸収性の素材はグラフトの拡大を防ぐ力学特性を有するが細胞浸潤を阻害してしまうことが示唆された。TEVGs のリモデリングの特性を鑑みると、補強材料として吸収系である Polydioxanone 系のような生体吸収性の素材がより適切であると考えられた。本実験で使用した Polydioxanone 系は残念ながら 6 週からで拡大傾向を呈してしまった。より分解吸収の遅い素材を用いて補強する必要性が認識された。瘤化を予防する力学的抵抗性とリモデリングを阻害しない生体吸収性、ならびに移植先の循環系の圧力系を考慮しグラフトを作成することが肝要であると考ええる。

6.総括

TEVGs は高圧系である動静脈シャントに於いて良好な開存率と自己組織への良好なリモデリングが達成できることが証明された。グラフトが拡大傾向を呈することがあるが、補強糸を外側に一定間隔開けて巻きつけ補強することによりグラフトの瘤化を防ぎ、血管のリモデリングは阻害されないことが示された。

7.今後の課題

今回の実験では前臨床研究として大動物を使用したのがコスト面では有利とはいえず、サンプルの数が制限されてしまった。臨床応用に向けて安全性を担保するためにサンプル数を増やし検証する必要があると考える。

8.謝辞

今回の研究のため多大なご支援を頂いた北里大学心臓血管外科宮地鑑教授、丁寧な指導を頂いたシカゴ大学心臓外科日比野成俊教授、同研究室の皆様にご場をお借りして感謝申し上げます。

9. 参考文献

1. Lv J.-C., Zhang L.-X. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1165:3-15.
2. Hatakeyama T., Okamoto H., Nakazawa T., Nonaka T., Sasaki S., Hoshino M. Introduction of arteriovenous grafts with graft insertion anastomosis for hemodialysis access. *J Vasc Surg.* 2017;66:952-957
3. Samand Pashneh-Tala, Sheila MacNeil, Frederik Claeyssens, The Tissue-engineered vascular graft-past, present, and future. *Tissue Eng Part B Rev* 2015;22:68-100.
4. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 2007;28:5009-27.
5. Cinat ME, Hopkins J, Wilson SE. A prospective evaluation of PTFE graft patency and surveillance techniques in hemodialysis access. *Ann Vasc Surg* 1999;13:191-8.
6. Narutoshi Hibino, Edward McGillicuddy, Goki Matsumura, Yuji Naito, Christopher Breuer, Toshiharu Shinoka, et al. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139:431-6
7. Wystrychowski W, Cierpka L, Zagalski K, Garrido S, Dusserre N, Radochonski S, et al. Case study: first implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. *J Vasc Access* 2011;12:67-70.
8. Lawson JH, Glickman MH, Ilzecki M, Jakimowicz T, Jaroszynski A, Peden EK, et al. Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: two phase 2 single-arm trials. *Lancet* 2016;387:2026-34.
9. Wystrychowski W, McAllister TN, Zagalski K, Dusserre N, Cierpka L, L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc Surg* 2014;60:1353-7.
10. 15. Zhou M, Qiao W, Liu Z, Shang T, Qiao T, Mao C, et al. Development and in vivo evaluation of small-diameter vascular grafts engineered by outgrowth endothelial cells and electrospun chitosan/poly(ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds. *Tissue Eng A* 2014;20:79-91.
11. Siang OC, Takuma F, Han LR, Kevin N, Huaitao Z, Elizabeth W, et al. Bilateral Arteriovenous shunts as a method for evaluating tissue-engineered vascular grafts in large animal. models. *Tissue Eng Part C Methods* 2017;23:728-35.
12. Pan Y, Zhou X, Wei Y, Zhang Q, Wang T, Zhu M, et al. Small diameter hybrid vascular grafts composed of polycaprolactone and polydioxanone fibers. *Sci Rep* 2017;7:3615.

13. Johnson J, Ohst D, Groehl T, Hettterscheidt S, Jones M. Development of novel, bioresorbable, small-diameter electrospun vascular grafts. *J Tissue Sci Eng* 2015;6.
14. Farber A, Tan T.-W, Hu B, Dember L.M, Beck G.J, Dixon B.S, et al. The effect of location and configuration on forearm and upper arm hemodialysis arteriovenous grafts. *J Vasc Surg.* 2015;62:1258-1265.
15. Valencia Rivero KT, Jaramillo Escobar J, Galvis Forero SD, Miranda Saldaña MC, López Panqueva, Sandoval Reyes, et al. New regenerative vascular grafts for hemodialysis access: evaluation of a preclinical animal model. *J Invest Surg* 2018;31:192-200
16. Hoerstrup SP, Cummings Mrcs I, Lachat M, Schoen FJ, Jenni R, Leschka S, et al. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation* 2006;114(1 Suppl): I159-66.
17. Brennan MP, Dardik A, Hibino N, Roh JD, Nelson GN, Papademitris X, et al. Tissue-engineered vascular grafts demonstrate evidence of growth and development when implanted in a juvenile animal model. *Ann Surg* 2008;248: 370-7.
18. Syedain ZH, Meier LA, Lahti MT, Johnson SL, Tranquillo RT. Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery. *Tissue Eng Part A* 2014;20:1726-34.
19. Fukunishi T, BestCA, Sugiura T, OpfermannJ, OngCS, ShinokaT, et al. Preclinical study of patient-specific cell-free nanofiber tissue-engineered vascular grafts using 3-dimensional printing in a sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2017;153:924-32.
20. Pepper VK, Clark ES, Best CA, Onwuka EA, Sugiura T, Heuer ED, et al. Intravascular ultrasound characterization of a tissue-engineered vascular graft in an ovine model. *J Cardiovasc Transl Res* 2017;10:128-38.
21. Dahan N, Sarig U, Bronshtein T, Baruch L, Karram T, Hoffman A, et al. Dynamic autologous reendothelialization of small-caliber arterial extracellular matrix: a preclinical large animal study. *Tissue Eng Part A* 2017;23:69-79
22. Ponticos M, Smith BD. Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J Biomed Res* 2014;28:25-39
23. Rodriguez VM, Grove J, Yelich S, Pearson D, Stein M, Pevcec WC. Effects of brachytherapy on intimal hyperplasia in arteriovenous fistulas in a porcine model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:1239-46
24. Sugiura T, Tara S, Nakayama H, Yi T, Lee Y.U, Shoji T, et al. Fast-degrading bioresorbable arterial vascular graft with high cellular infiltration inhibits calcification of the graft. *J Vasc Surg.* 2017;66:243-250.

25. Ozawa T, Mickle D.A.G, Weisel R.D, Koyama N, Wong H, Ozawa S, et al. Histologic changes of nonbiodegradable and biodegradable biomaterials used to repair right ventricular heart defects in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124:1157-1164.
26. Hansson G.K, Holm J, Holm S, Fotev Z, Hedrich H.J, Fingerle J. T lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:10530-10534.
27. Robertson A.-K.L, Hansson G.K. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2421-2432

10. 業績目録

(I) 原 著

1. ○H Matsushita, H Hayashi, K Nurminsky, T Dunn, Y He, I Pitaktong, Y Koda, S Xu, V Nguyen, T Inoue, D Rodgers, K Nelson, J Johnson, and N Hibino. Novel reinforcement of corrugated nanofiber tissue-engineered vascular graft to prevent aneurysm formation for arteriovenous shunts in an ovine model. *JVS Vascular Science*,3:182-191.2022
2. ◎H Matsushita, T Inoue, S Abdollahi, E Yeung, CS Ong, C Lui, I Pitaktong, K Nelson, J Johnson, and N Hibino. Corrugated nanofiber tissue-engineered vascular graft to prevent kinking for arteriovenous shunts in an ovine model. *JVS Vascular Science*,1:100-108.2020
3. ○松下 弘, 吉鷹 秀範, 坂口 太一: 急性心筋梗塞症例における CABG の検討. *日本冠疾患学会雑誌*,19: 201-204,2013

(II) 著 書

1. Hiroshi Matsushita, Vivian Neuyen, Katherine Nurminsky and Narutoshi Hibino. Cardiac Tissue creation with the Kenzan Method. *Kenzan Method for Scaffold-Free Biofabrication* 2021;109-115.

(III) 総説・講座

なし

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. ○松下 弘, 華山直二: 大動脈縮窄症術後乳び胸に octreotide acetate が著効した 1 例. *The Japanese journal of thoracic surgery*,67(2):149-152, 2014

2. ○Hiroshi Matsushita, Naoji Hanayama, Kyoko Hobo, Kiyomi Kuba, Arifumi Takazawa: Infectious endocarditis caused by Rhodococcus Equi. The Annals of thoracic surgery ,89:957-9,2010
3. ○松下 弘,朝蔭直樹,山本哲朗,鈴木貴久,小林 滋,山崎滋孝: 胆嚢異所性胃粘膜の1例.日本臨床外科学会雑誌,69(2):422-6,2008

11. 倫理基準の遵守

利益相反

本論文に際して、開示すべき利益相反関連事項はない。

12. 図表

図1 屈曲に対する抵抗性(A:市販の人工血管、B、C:TEVGs、D:屈曲への抵抗性)

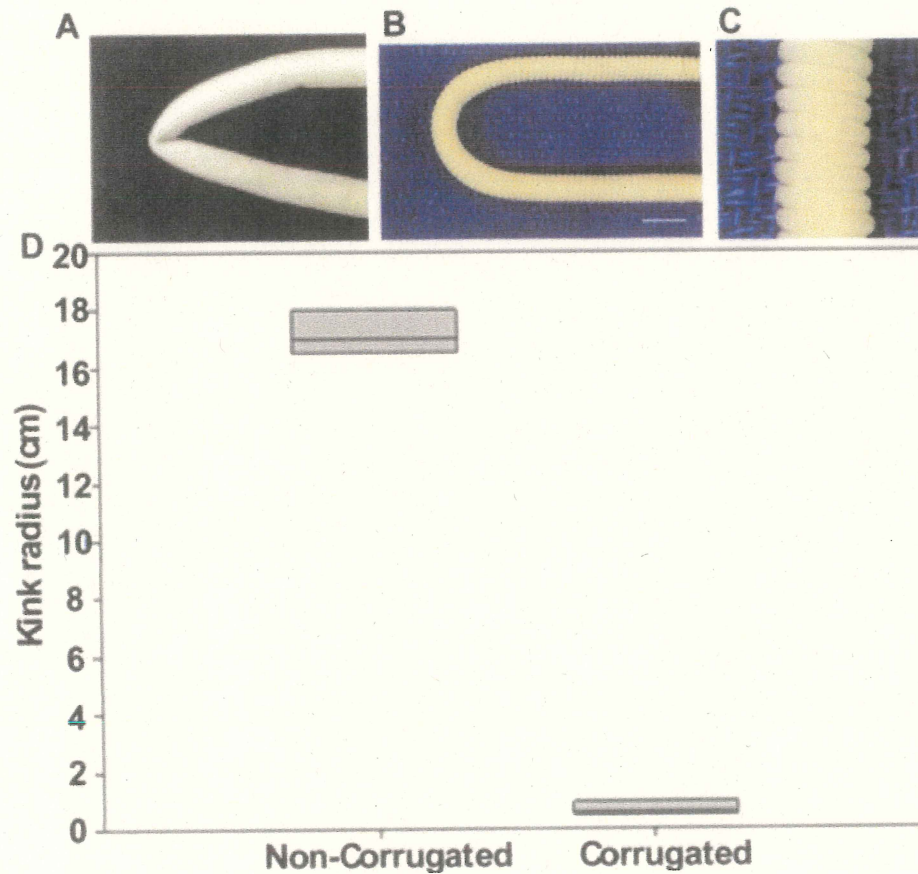


図2 肉眼的観察結果(B:動脈側吻合部、C:静脈側吻合部、D:手術時グラフト-a:動脈側吻合部、b:静脈側吻合部、E:グラフトアレンジのシェーマ、F:肉眼測定によるグラフト内径)

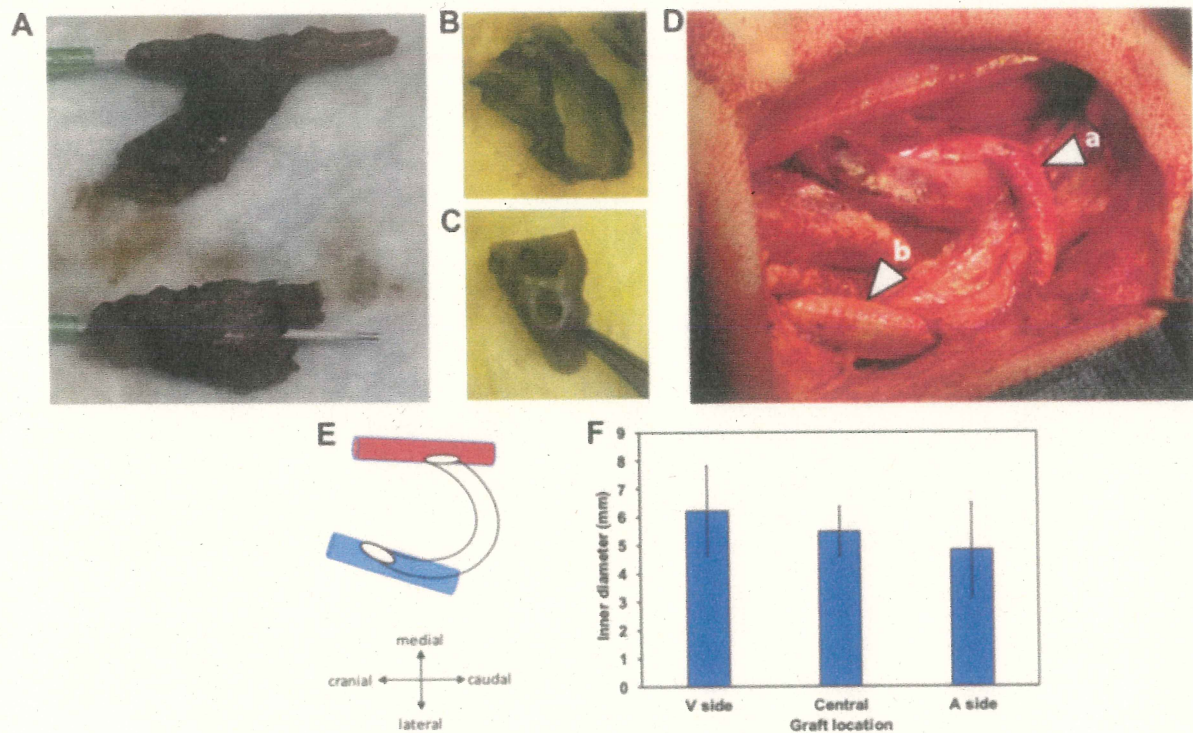


图3 超音波解析結果(A:内径、B:壁厚、C:流速、D:血流量)

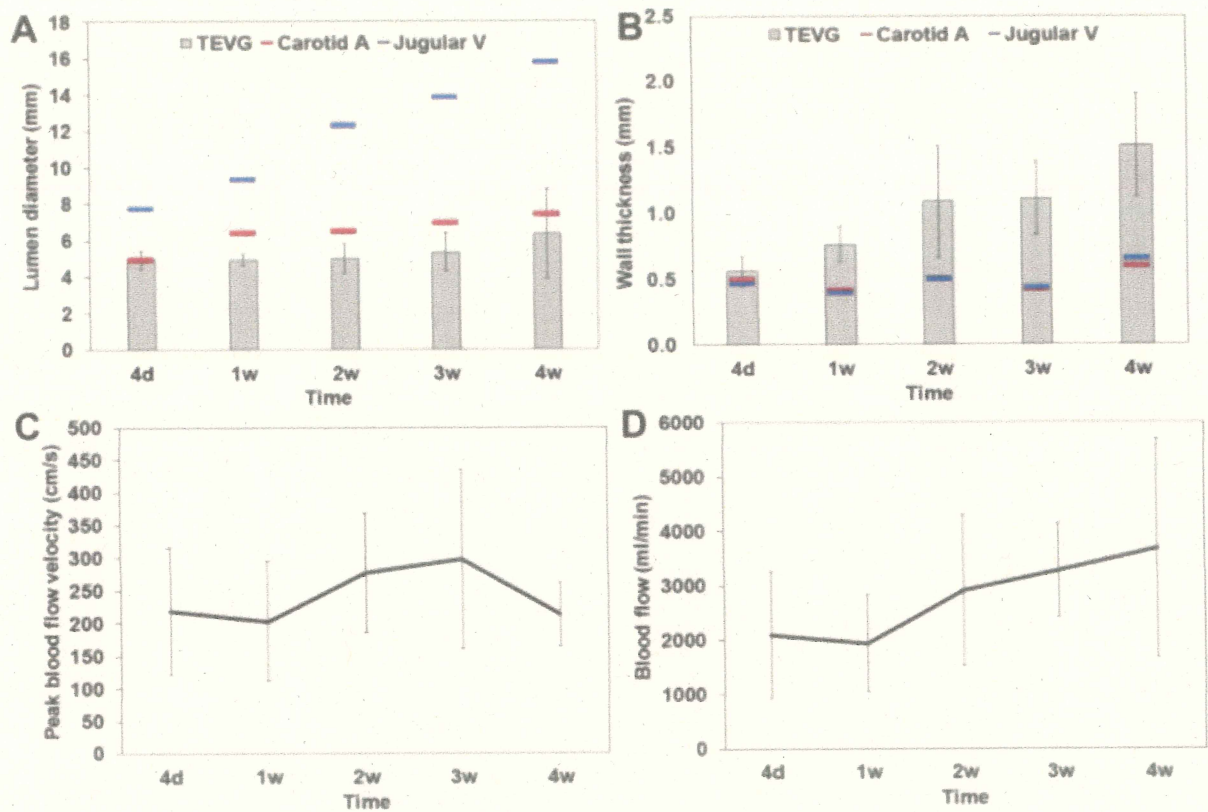


図4 組織学的解析結果

H&E 染色 (A、F、G、H), VVG 染色 (B、I、J、K), VK 染色 (C、L、M、N), SMA 免疫蛍光染色(D、O、P、Q)、vWF 免疫蛍光染色 (E、R、S、T). 4 倍拡大 (A-E). 10 倍拡大(F-Q). 20 倍拡大(R-T). スケールバー:750 μ m(4 倍)、350 μ m (10 倍)、150 μ m(20 倍)。

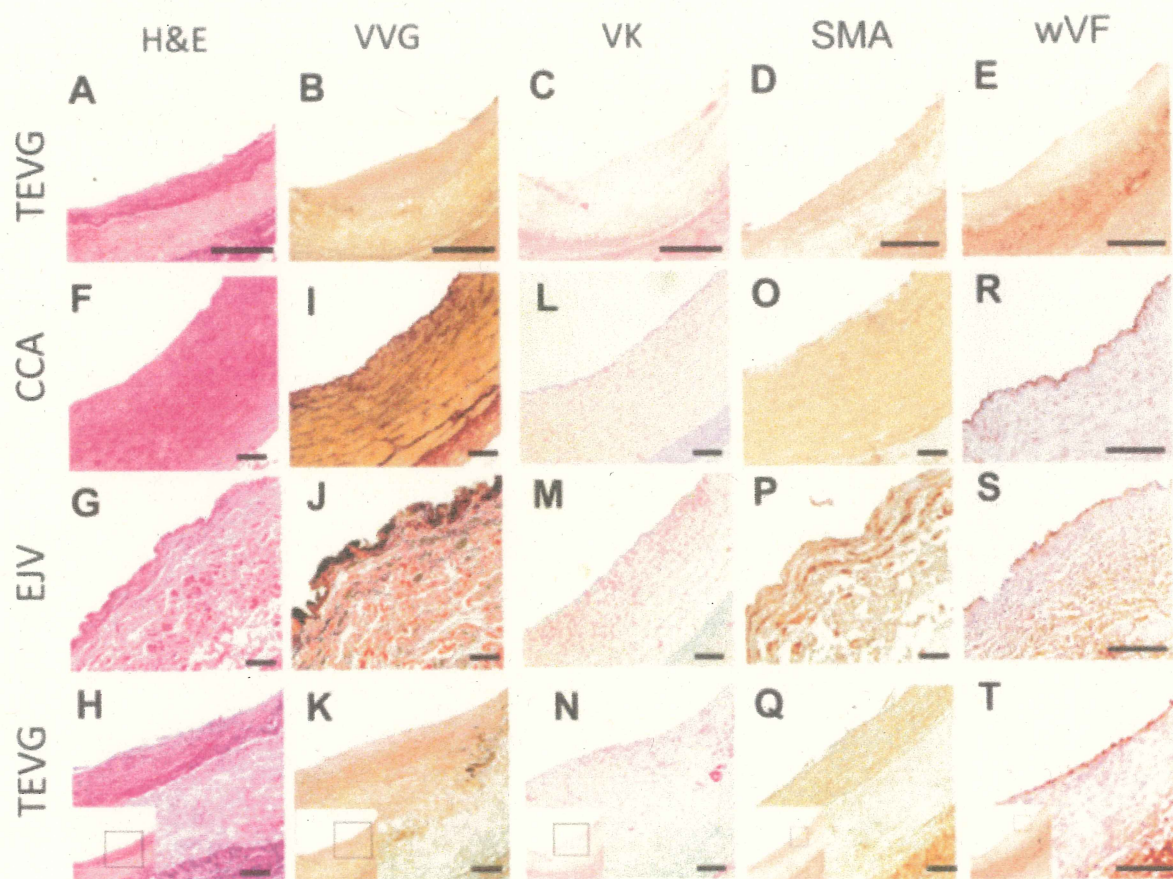


図5 補強グラフトの作成および屈曲に対する抵抗性
(A:糸による補強、B、C:屈曲時の写真、D:屈曲への抵抗性)

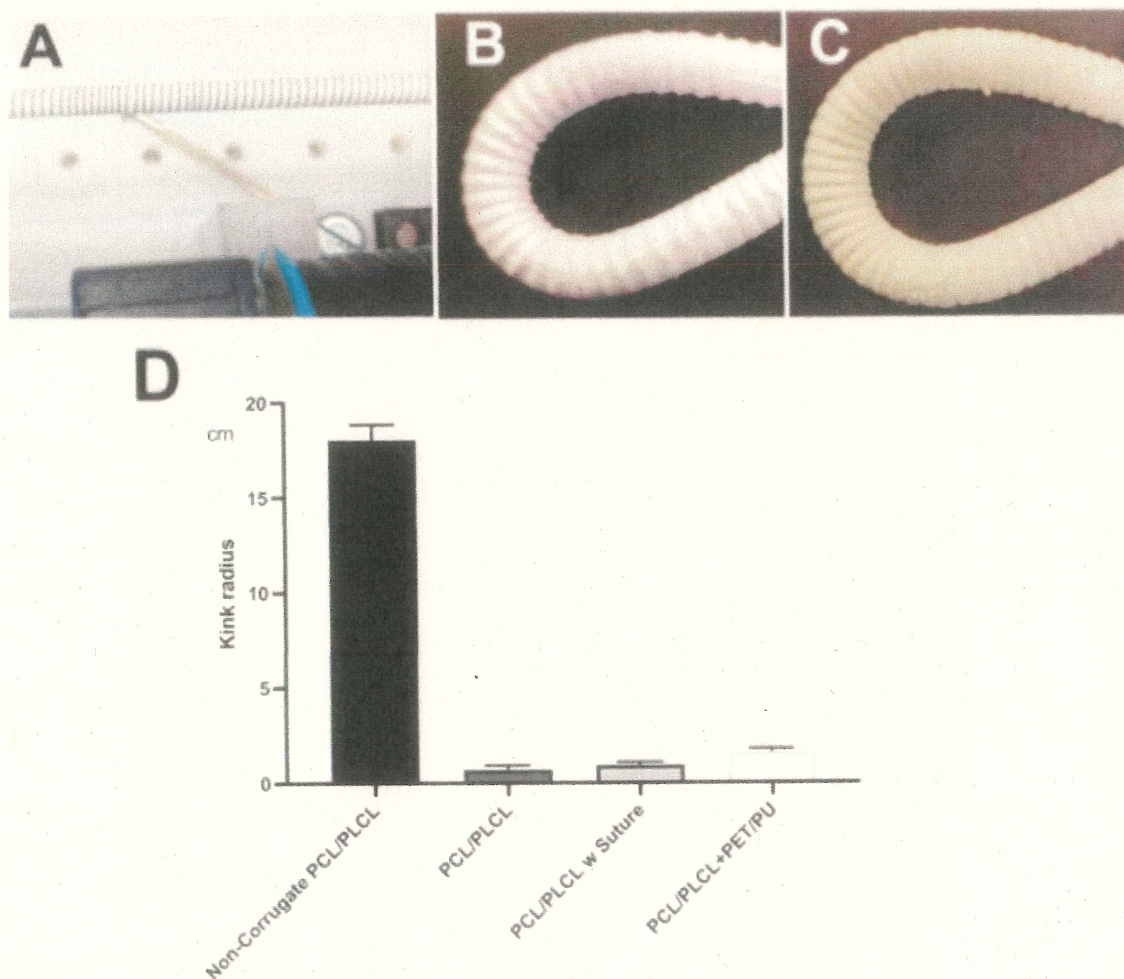


図 6 肉眼的観察結果(A、B:補強なし、C、D : PDO suture、E、F:2-0 suture、G、H:PET/PU 層、I:肉眼での内径測定結果)

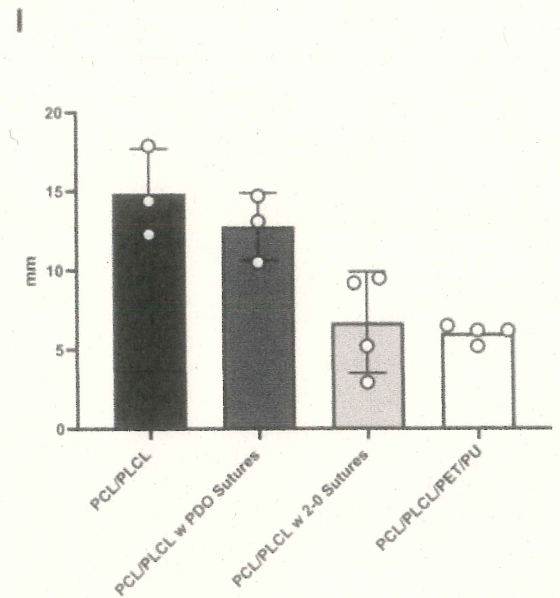
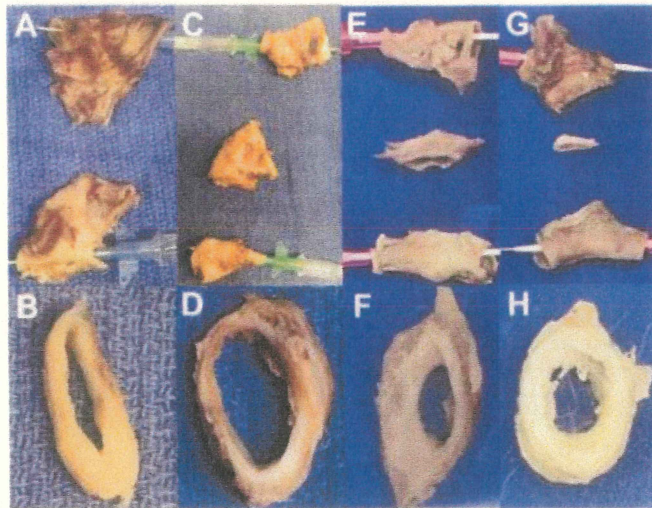


図 7 超音波解析結果(グラフト内径)

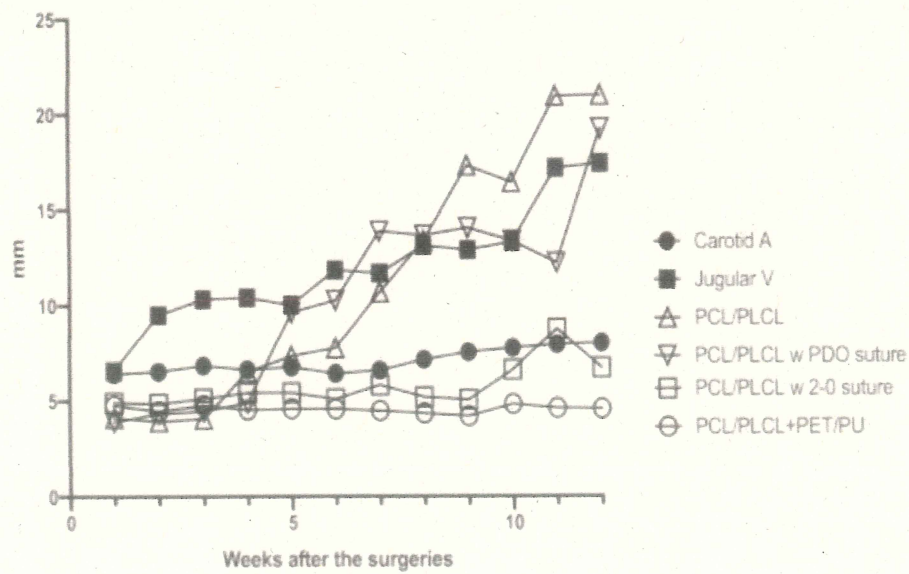


図8 組織学的評価

H&E 染色 (A、F、K、P、U、Z), MT 染色(B、G、L、Q、V、a)、VVG 染色 (C、H、M、R、W、b), VK 染色 (D、I、N、S、X、c), vWF 免疫蛍光染色 (E、J、O、T、Y、d). 10 倍拡大(H&E、MT、VVG、VK染色). 20 倍拡大(vWF). スケールバー: 350 μ m(10 倍), 150 μ m(20 倍)。

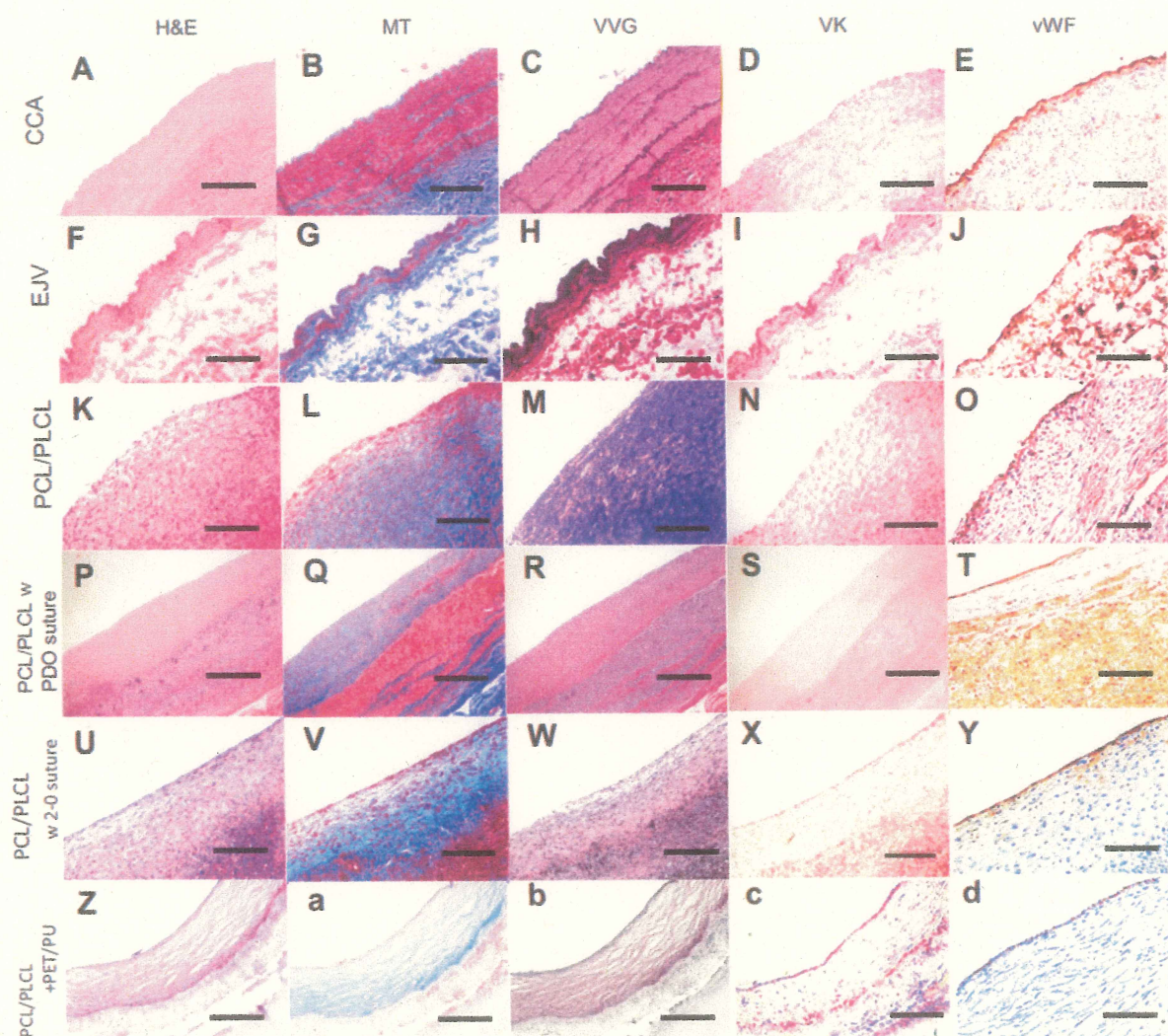


図9 組織学的評価(細胞数の評価:左H&E染色、右SMA免疫蛍光染色、スケールバー:150 μ m(20倍))

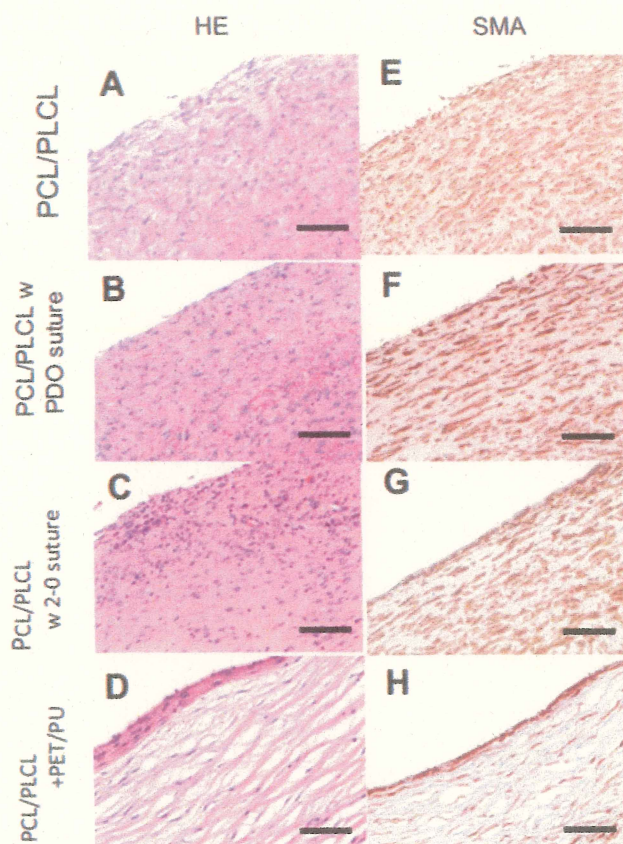


図10 組織学的評価(細胞数の評価:グラフ)

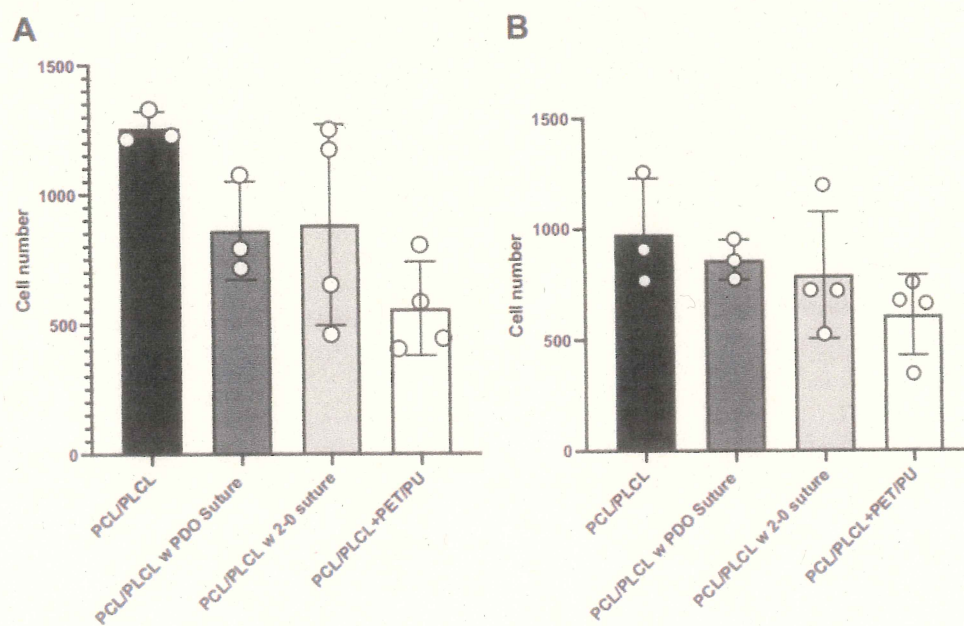


図 11 グraftの拡大の抵抗性と細胞浸潤の関係

TEVG	Resistance to expansion ^a	Cell infiltration ^b
PCL/PLCL	+	+++
PCL/PLCL with PDO	++	++
PCL/PLCL with 2-0 suture	+++	++
PCL/PLCL with PET/PU layer	+++	+

グラフトの拡大の抵抗性

+++は 5 mm 以上 10mm未満の拡大、

++は 10 mm 以上 20 mm 未満の拡大、

+, 20 mm 以上の拡大。

細胞浸潤

+++は細胞数が 1000 個以上

++, 750 個以上 1000 未満

+は 0 以上 750 未満