

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名          松下 弘



論 文 題 目

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

指 導 教 授 承 認 印

宮 地 鑽



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

松下 弘

## 1. 背景

Tissue engineering vascular grafts(TEVGs)は自己組織への置換可能な生体吸収性の人工血管である。静脈系に於いては臨床応用されており小児心臓外科領域に於ける低圧系のグラフトとして広く使用されている。

しかし動脈系を含む高圧系への臨床使用は未だ達成されていない。

小口径の人工血管は血液透析を要する末期腎不全患者のアクセスルート作成に使用されることある。現在使用されている PTFE (polytetrafluoroethylene) で作成された人工血管の一次開存率は 43% と十分ではない。そのため TEVGs を大動物の動静脈シャントのグラフトとして使用し評価を行った。

## 2 方法

### 2.1 グラフトの作成

TEVGs は 6Wt % の poly-ε-caprolactone と 5Wt% の poly(L-lactide-co-caprolactone)を 1 対 1 で混合しエレクトロスピンング法で内径 5mm、長さ 10 cmの人工血管を作成した。アクセスルート作成に使用される人工血管は U 字型に挿入されるため本実験でもそれに準じ

て挿入した。湾曲でグラフトが屈曲し閉塞する可能性があるためグラフトには襷をつけた。

## 2.2 手術

グラフトの挿入は4匹の羊の左右の総頸動脈と外頸静脈間にTEVGs計8本をU字型に挿入した。手術は全身麻酔下に羊の左右頸部を切開し総頸動脈、外頸静脈を露出した。100IU/kgのヘパリンを静脈注射した後、動静脈を遮断し7-0 Prolene (Ethicon Inc, Somerville, NJ)を用いて端側吻合し挿入した。

## 2.3 評価方法

グラフトの開存、血流の流速、内径、壁厚は挿入後4日後、1週間毎に評価された。4週間の時点でグラフトを摘出した。hematoxylin and eosin 染色、Masson's trichrome 染色、Verhoeff Van Gieson 染色、von Kossa 染色で評価した。免疫組織化学としては上記スライドを脱パラフィン、脱水、外因性のperoxidase活性をブロックした。一次抗体として抗 von Willebrand Factor 抗体(1:2000; Dako, Glostrup, Denmark)、抗  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体(1:500; Dako, Glostrup, Denmark)を用いた。

## 3. 統計処理

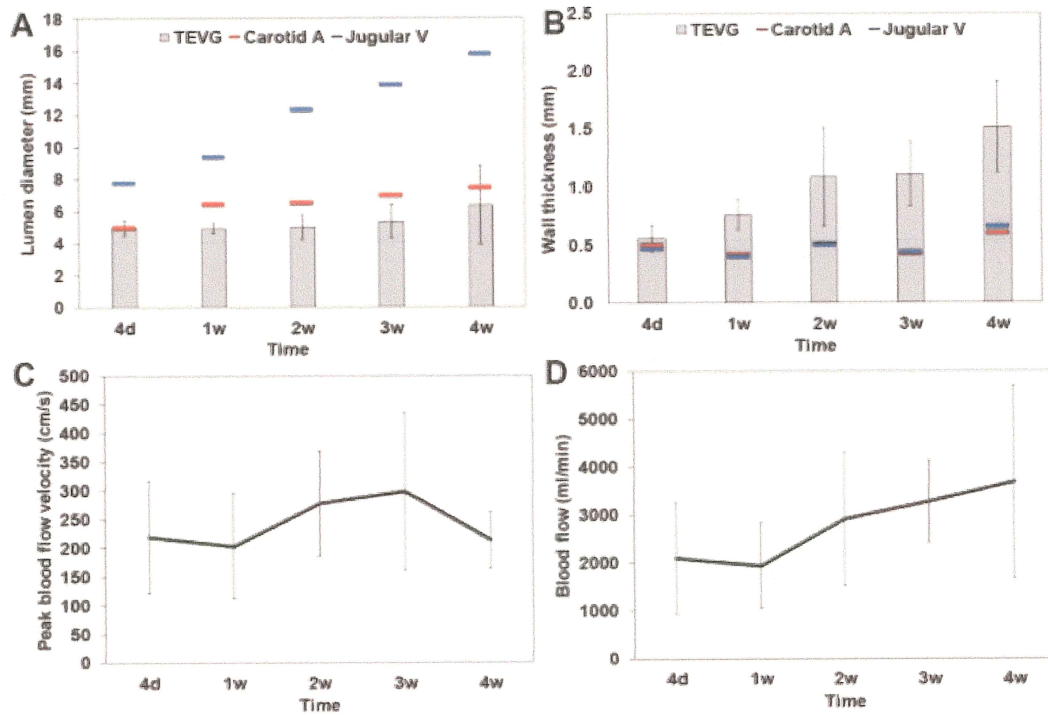
統計解析として各測定値は平均値±標準偏差で表した。Tukey の多重比較検定による一元配置分散分析で解析し、t 検定を行い、p 値が 0.01 未

満を統計学的に有意とみなした。

## 4. 結果

### 4.1 超音波解析結果

超音波での解析の結果は以下の図の通りであった。

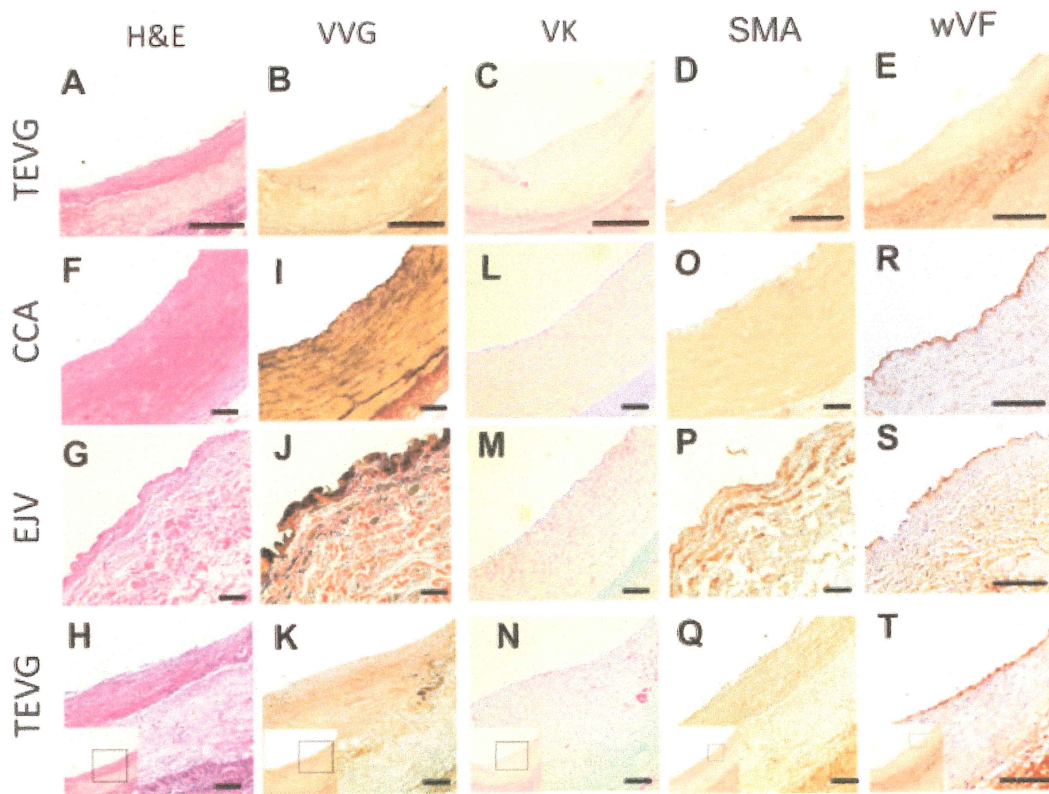


グラフはやや拡大傾向がみられたが (A) 統計学的には有意でなかった。

また壁肥厚も見られたが (B) 狭窄を示す血流速度の低下 (C) や血流の低下は見られなかった (D)。開存率は 87.5% で 1 本のグラフが挿入後 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。

### 4.2 組織学的評価

組織学的評価としては以下の画像を得ることができた。



最上段（ABCDE）、最下段（HKNQT）は TEVGs、2 段目（FILOR）は総頸動脈(CCA)、3 段目（GJMPS）は外頸静脈(EJV)である。最下段は 4 倍の拡大、その他は 10 倍の拡大率で撮影した。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  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体を、vWF は抗 von Willebrand Factor 抗体 を一次抗体として免疫組織化学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 因子で陽性染色され、内皮細胞で覆われていることが証明できた。これは native の血管でも同様であった。

$\alpha$ -smooth muscle 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が証明できた。

## 5 追加実験

### 5.1 追加実験－背景

以上の実験より上記 TEVGs は高圧系にも応用できる可能性が証明できた。懸念点としては拡大傾向がみられたこと、また観察期間が短期間であったことであった。

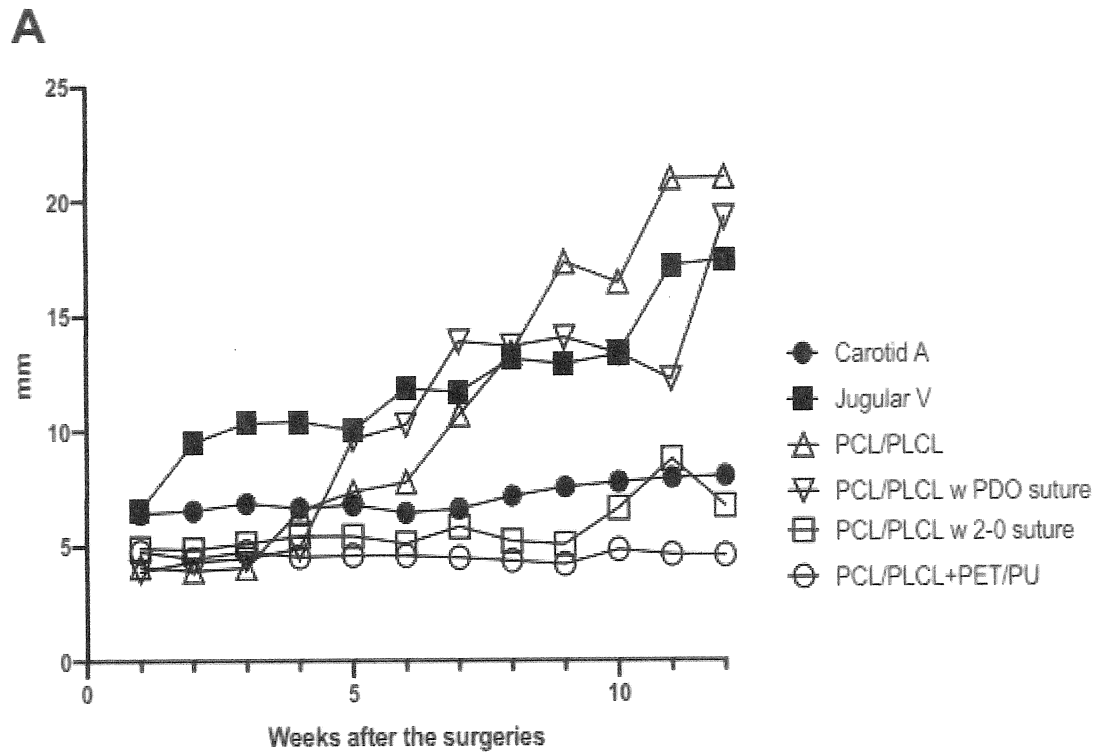
### 5.2 追加実験－方法

TEVGs の外側に吸収糸である polydioxanone 糸(PDO suture)を 400  $\mu$  m 間隔で巻き付け補強したもの、非吸収糸である 2-0 polypropylene 糸(2-0 suture)を同様に巻き付け補強したもの、400  $\mu$  m の厚さの polyethylene terephthalate/polyurethane (PET/PU) で作成した人工血管を外側に覆い補強したもので同様の実験を行い、血管の内径を評価した。観察期間は 10 週間とした。

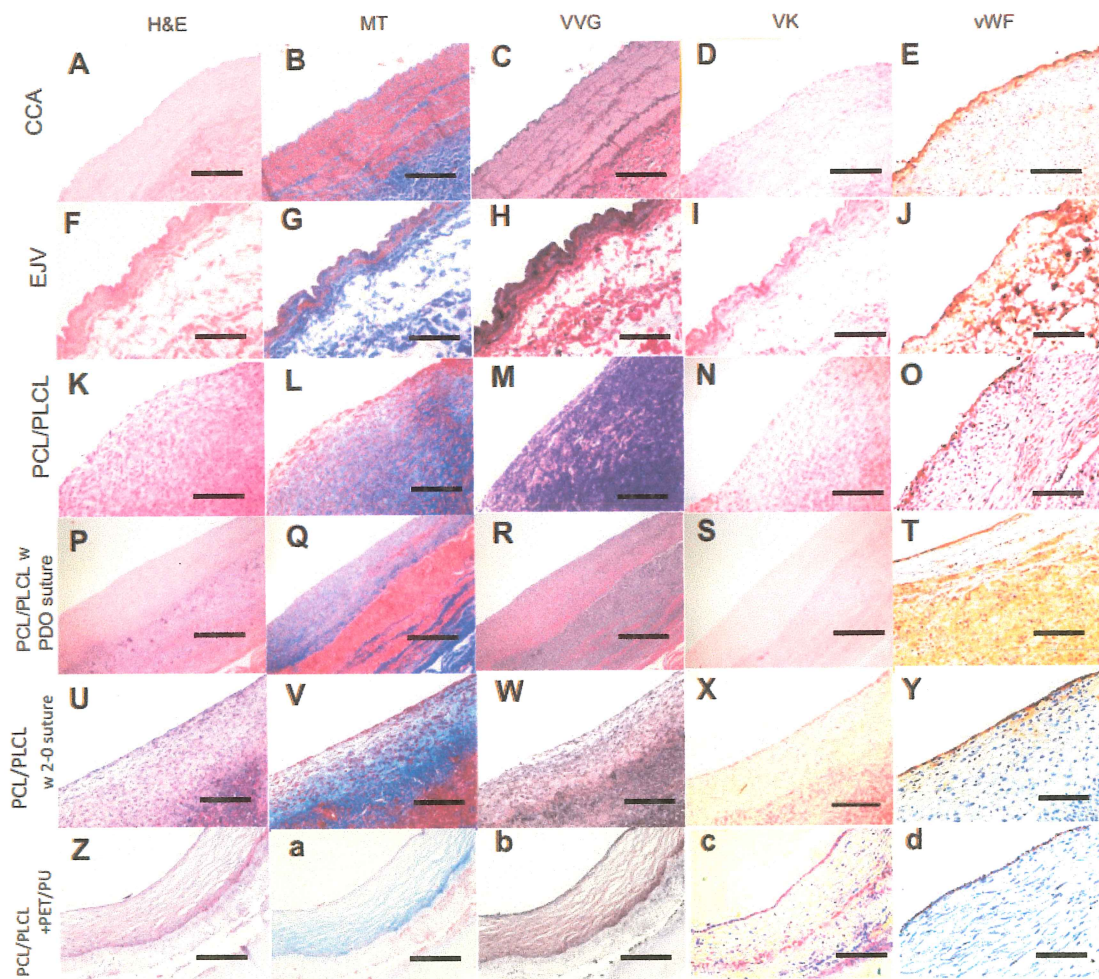
### 5.3 追加実験－結果

予想通り約 5 週後に補強なしの TEVGs (PCL/PLCL) は拡大傾向がみられた。しかし補強した TEVGs(PCL/PLCL w PDO suture、PCL/PLCL w

2-0 suture、PCL/PLCL + PET/PU)は拡大せず経過した（下図参照）。



組織学的にも同様に解析したところ（下写真）、外層で覆った PCL/PLCL +PET/PU は細胞浸潤が乏しく、TEVGs の特性を阻害していることが示された。一方で、PCL/PLCL w PDO suture では良好な細胞浸潤を認めた。



## 6. 考察

TEVGs は足場となる繊維の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。本実験では瘤化傾向を認めたため追加実験として補強した TEVGs の検討を行った。補強素材は細胞浸潤を阻害することなく瘤化を防ぐものが望ましい。材料として吸収糸である PDO suture が最も望ましいと考えられた。これらの考察をより深めるため様々な期間に摘出されたグラフトを時系列に、その力学特性、組織学的検討が必要であると考え。

## 7.結語

TEVGs は動静脈シャントに於いて良好な開存率と、これを補強することによりグラフトの瘤化を防ぐことができることを証明することができた。