

学 位 論 文 題 名

有茎大網被覆 High porous EPTFE
人工血管の修復治癒過程

—門脈移植実験による検討—

学位論文内容の要旨

(目的) 近年、肝癌の切除に際して門脈合併切除が積極的に行われるようになり、その再建に移植血管が必要とされる場合が生じてきた。一般に、門脈を含む静脈再建には自家静脈が第一選択であり人工血管として EPTFE (expanded polytetrafluoroethylene) も用いられるが、諸家の報告では開存率の点と良好な内膜治癒が得られない点で必ずしも満足のものではなかった。そこで人工血管の porosity を増加させて人工血管壁内へ細胞浸潤を誘導することと、移植血管の全周を血流を温存した大網で被覆することで、移植血管の修復治癒が促進されることを期待した。今回、fibril length 60 μ m の EPTFE 人工血管とこれと同じ素材で外面フッ化ゴム加工し人工血管壁内への細胞浸潤を抑制した 2 種類の人工血管を用いて、主として人工血管壁内への細胞浸潤の点からその内膜治癒について検討を加えた。

(材料と方法) 動物は雑種成犬を用いて静脈麻酔下に開腹した。門脈を剥離露出し目的のところで述べた EPTFE 人工血管と外面をフッ化ゴム加工した人工血管 (以下 F-EPTFE) の 2 種類を端々吻合した。実験動物は総計 30 頭であり、それぞれの人工血管につき観察期間を 1 週、2 週、4 週、とし各々 5 頭ずつ計 6 群作成した。EPTFE 人工血管を使用した 3 群 (E 群) を順に E-1、E-2、E-4 群とした。また、F-EPTFE 人工血管を使用した 3 群 (F 群) を順に F-1、F-2、F-4 群とした。犠牲死させ摘出した人工血管は一部をホルマリン固定後パラフィン包埋し、残りはマイナス 70℃ に凍結保存した。組織学的検討を HE 染色、Masson trichrome 染色、PTAH 染色にて行った。さらに、免疫組織化学的検討を抗 TGF- β 抗体、抗 Factor VIII 抗体、抗 muscle specific actin 抗体を 1 次抗体として labelled streptavidin biotin 法を用いて染色を行い検討した。評価方法は、定性的観察とともに以下の 4 項目について定量的に検討した。1. 仮性内膜の厚さ：人工血管中央部と吻合部に分け検討を加えた。2. 人工血管壁内細胞数：1 辺が 250 μ m の格子内に含まれる全有核細胞数を計測した。3. 吻合部より内膜に膠原線維の沈着した長さ：内膜のフィブリン血栓膜は吻合部より器質化が進行しているが、その器質化血栓の吻合部よりの長さを計測した。以下この計測値を器質化距離とする。4. 浸潤細胞の壁深達度スコア 人工血管の壁の厚さを内腔側、中央部、外膜側に 3 等分し、細胞浸潤を認めないものを 0 点、外膜側に止まるものを 1 点、中央部に達するが内膜側に達しないものを 2 点、内膜側に達するものを 3 点としてスコア化した。次に、人工血管採取時にマイナス 70℃ に凍結保存した検体より guanidine thiocyanate 法によって RNA を分離抽出し、Northern blot 法にて TGF- β mRNA の発現について検討した。プローブは、ATCC (American Type Culture Collection) より取得した。

(結果) 1. 肉眼所見 E-1 および F-1 群では人工血管内面は赤色のフィブリン血栓に覆われた。E-2 および F-2 群では内面に白色の部分の部分を認めたがその範囲は E-2 群に広

い傾向を認めた。E-4群では内面の大部分は白色で光沢を有した。しかし、F-4群では人工血管中央部は赤色血栓が残存していた。

2. 光顕所見 PTAH染色上、内膜の赤色部がフィブリン血栓であることが確認された。HE染色上、E-1 およびF-1群では内膜の器質化は吻合部の近傍に局限していた。E-2群では壁側より内膜への細胞浸潤像も見られた。E-4群では人工血管の全長にわたり器質化が進んでおり、F-2およびF-4群では依然として人工血管中央部は血栓が残存していた。免疫組織化学的検討では、TGF- β 染色では、すべての群にて人工血管外膜の血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、および紡錘型～卵円形の大型細胞に陽性であった。FactorVIII染色ではE-4およびF-4群の仮性内膜の内層に陽性細胞が見られた。muscle specific actin染色ではE-1およびF-1群では吻合部近傍の仮性内膜に陽性細胞を認めた。E-2およびE-4群ではそれぞれF-2およびF-4群より人工血管中央部を含む切片では仮性内膜に浸潤する細胞数が多かった。

3. 定量的評価 1) 仮性内膜厚 切片中央部と吻合部に分けて検討した。結果を平均値 (μm) で示すと、E-1群中央部718.6、吻合部998.3、E-2群中央部608.5、吻合部629.8、E-4群中央部546.0、吻合部806.0、F-1群中央部440.5、吻合部721.5、F-2群中央部1191.5、吻合部923.3、F-4群中央部706.0、吻合部722.6であった。E群中央部では経時的に厚さが減少したが、吻合部では1～2週にかけて厚さを減じたが、2～4週にかけ厚さが増加した。F群はいずれも1～2週にかけ厚さが増加し、2～4週にかけ厚さを減じた。2) 人工血管壁内細胞数 平均値 (count/0.0625mm²) で示すと、結果は、E-1群中央部119.8、吻合部188.4、E-2群中央部328.4、吻合部490.3、E-4群中央部682.6、吻合部612.6、F-1群中央部33.6、吻合部36.7、F-2群中央部70.8、吻合部99.5、F-4群中央部188.8、吻合部289.2であった。いずれの群も経時的に増加した。また、E群が有意に細胞数が多かった。3) 器質化距離 E-1、E-2、F-1、F-2群の4群で検討した。計測値を平均値 (μm) で示すとE-1群958、E-2群2625、F-1群1010、F-2群1886であった。E-2群はF-2より器質化距離が延長していた。4) 浸潤細胞の壁深達度スコア 平均値にて示すと、E-1群中央部2.0、吻合部2.22、E-2群中央部2.95、吻合部2.93、E-4中央部3、吻合部3、F-1群中央部1.0、吻合部0.66、F-2群中央部1.17、吻合部1.42、F-4中央部1.78、吻合部2.12であった。E群がF群に対して高いスコアを示し、F-4群にのみ吻合部と中央部のスコアに差を認めた。5) 3) と4) の相関関係の検討 E群では相関係数 $r=0.895$ 、F群では相関係数 $r=0.756$ と高い正の相関を示した。

4. Northern解析 陽性対照およびE群、F群のいずれの群にも1.3、2.3、4.5、6.2Kbに計4本のbandを認めた。次に、 β -actinをinternal controlとしてTGF- β の発現量を放射線量の比で検討した。各々の値は、E-1群10.5、E-2群5.28、E-4群7.93、F-1群7.99、F-2群4.14、F-4群8.65であった。E群、F群とも1週群で高く、2週群で低下し再び4週群で増加した。

(結語) 1. E群はF群に比較し仮性内膜の形成促進を認めた。人工血管壁側からの細胞浸潤は、E群において術後2週以降に認められた。また、吻合部よりの器質化の程度と人工血管壁の細胞の深達度が高い相関を有し、人工血管壁への細胞浸潤が初期血栓膜の器質化に重要であると思われた。器質化に関与するmyofibroblastは主として吻合部より浸潤し、内皮細胞による被覆は仮性内膜の器質化に遅れて進行していた。2. TGF- β は、免疫組織化学的検討にて、人工血管外膜に発現を認め、Northern解析によってそのmRNAは術後1、2、4週いずれにも発現を認め、人工血管の器質化に重要な役割を果たしているものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

有茎大網被覆 High porous EPTFE 人工血管の修復治癒過程

—門脈移植実験による検討—

近年、肝癌の切除に際して門脈合併切除が積極的に行われるようになり、その再建に移植血管が必要とされる場合が生じてきた。再建静脈としてEPTFE人工血管も用いられてきたが、開存率の点と良好な仮性内膜の形成が得られない点で必ずしも満足のいくものではなかった。そこで、EPTFE人工血管のfibril lengthを延長して人工血管壁内への細胞浸潤を誘導することと、移植血管の全周を血流を温存した大網で被覆することによって移植血管の内膜治癒が促進され、開存率の向上がもたらされることを期待した。fibril length $60\mu\text{m}$ のEPTFE人工血管とこの人工血管の外面をフッ化ゴム加工し人工血管壁内への細胞浸潤を抑制した人工血管(F-EPTFE人工血管)の2種類の人工血管を用いて、主としてその壁内細胞浸潤の点から、その修復治癒過程について検討した。

雑種成犬を用い、静脈麻酔下に開腹し先に述べた2種類の人工血管を門脈に端々吻合した。各々の人工血管について観察期間を1、2、4週とし各々5頭ずつ計6群作成した。EPTFE人工血管を使用した3群をE群とし、観察期間順にE-1、E-2、E-4群とした。また、F-EPTFE人工血管を用いた3群をF群とし、同様にF-1、F-2、F-4群とした。評価項目として、肉眼的観察とともに、組織学的検討をHE染色、Masson trichrome染色、PTAH染色にて行った。仮性内膜の厚さ、人工血管壁内細胞数、吻合部よりの器質化距離、浸潤細胞の壁深達度について定量的に検討した。さらに、免疫組織化学的検討をTGF- β 、Factor VIII、muscle specific actinについて検討した。次にRNAを分離抽出し、Northern blot法にてTGF- β mRNAの発現について検討した。肉眼所見は、E-1では人工血管内面は赤色のフィブリン血栓に覆われていたが、E-4群では内面の大部分は白色で光沢を有した。F群はE群に比べ白色部分の広がりが少なく、F-4群では人工血管中央部は

・赤色血栓が残存していた。HE染色、Masson trichrome染色によって人工血管壁側よりの器質化像、および吻合部よりの器質化像という2方向の器質化が認められた。人工血管壁に細胞浸潤を誘導することによって、人工血管壁側よりの器質化の関与が増大し、内膜の器質化が促進されると考えられた。E-4群では、HE染色上、内膜の器質化はほぼ完成しており、強拡大では人工血管の線維間隙に多数の細胞浸潤が見られた。masson-trichrome染色でも膠原線維の沈着を人工血管中央部まで認めた。免疫組織化学的にTGF- β は、主として外膜に血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、紡錘型～卵円形の細胞に陽性所見を認めた。Factor VIII染色ではE-4およびF-4群の仮性内膜の内層に陽性細胞が見られた。muscle specific actin染色ではE-2およびE-4群ではそれぞれF-2およびF-4群より人工血管中央部を含む切片では仮性内膜に浸潤する細胞数が多かった。仮性内膜の厚さは、E群中央部では経時的に厚さが減少した。吻合部では1-2週にかけて厚さが増加し、2-4週にかけ厚さを減じた。人工血管壁内細胞数は、E群が有意に細胞数が多く、いずれの群も経時的に増加した。吻合部よりの器質化距離はE-2群はF-2群より器質化距離が延長していた。浸潤細胞の壁深達度をスコア化し評価したが、E群がF群に対して高いスコアを示した。また器質化距離とこのスコアとがE群では相関係数 $r=0.895$ 、F群では相関係数 $r=0.756$ と高い正の相関を示した。次に、ヒトおよびイヌ培養線維芽細胞を陽性対照として実験6群について人工血管標本のTGF- β mRNAの発現について検討した。TGF- β は4本のバンドとして検出された。 β -actinを対照としてその放射線量比を検討したところ、E群、F群ともに術後1週で高く、2週で減少し、再び4週で増加した。これらから、EPTFE人工血管は、F-EPTFE人工血管に比べ仮性内膜の器質化が促進しており、これには人工血管壁内への細胞浸潤が重要であると考えられた。この促進現象には2方向の器質化が関与していると考えられた。またTGF- β は観察期間のすべてにおいて発現が確認され、その発現は人工血管の器質化過程に重要な役割を果たしているものと考えられた。

口頭発表において、内野純一教授より人工血管の口径と長さの関与、大網被覆の効果、TGF- β の発現の意義について、安田慶秀教授より人工血管の素材の問題、吻合部肥厚の問題についての質問があったが、申請者は概ね妥当な回答をした。また内野純一、安田慶秀両教授にはさらに個別に審査をいただき、合格と判定された。

門脈再建に対しての有茎大網被覆High porous EPTFE人工血管の有用性に関して、その治療過程に詳細に検討を加えた本研究の成果は、一般の大静脈再建用人工血管への応用も期待され、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと考えられる。