

学 位 論 文 題 名

Effects of Omental Wrap on Performance
of Small-Caliber High -Porosity
Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts

(有茎大網被覆 high-porosity ePTFE 小口径人工血管の
開存性および修復治癒過程に関する実験的検討)

学位論文内容の要旨

I. 背景

現在のところ自家静脈グラフトに匹敵する抗血栓性と組織治癒性を有する小口径人工血管は存在しないが、良好な開存性の得られる小口径人工血管が開発されれば临床上、極めて有益と考えられる。近年、繊維長の長い、high-porosity ePTFE人工血管が開発され、小口径人工血管への応用が期待されている中で、今回、創傷治癒作用をもつ有茎大網にも着目し小口径動脈における有茎大網被覆人工血管の開存性および修復治癒力を検討した。

II. 目的

小口径動脈領域における有茎大網被覆high-porosity ePTFE人工血管の開存性および修復治癒力の検討、特に大網被覆による毛細血管新生の差異を検討することを目的とした。

III. 材料と方法

実験は北海道大学医学部 動物実験に関する指針に従って行った。

実験動物; 体重8-12kgのビーグル成犬

人工血管; expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)を用いたがTechnograft(住友電工)と同様の外壁凹凸構造を有し、繊維長 60 μ m 内径4mm, 長さは40mmとした。

実験方法; 全身麻酔下に頸部正中切開を加え、全身ヘパリン化の後に両側頸動脈置換を行なった。縫合糸は6-0monofilament糸を用い、2点支持連続縫合により吻合操作を行なった。大網被覆は上腹部斜切開を加え、右胃大網動脈を茎とした有茎大網を作製し、経皮下経路で右側人工血管を被覆した。同一犬で右側を大網被覆群、左側を大網非被覆群として比較検討した。術後に抗凝固剤、抗血小板剤等の投与は行わなかった。

IV. 評価方法

移植4週、および12週で人工血管を摘出し、開存の有無を確認した。開存の得られたものについて、仮性内膜の光沢のある部分を非血栓部として、これが人工血管内面全面積に占める割合をthrombus-free surface score(TFS)として測定した。標本は長軸方向に半切し一片を光学顕微鏡用に10%ホルマリン固定し、一片を走査電子顕微鏡用に1%グルタルアルデヒド固定した。光学顕微鏡的観察ではHE, Azan染色を行った。さらに免疫組織化学的検討として、 α -actin, Factor-VIIIおよびvascular endothelial growth factor (VEGF)免疫染色を施行した。

定量的評価として画像解析装置を用いて人工血管壁内の0.2 $\times$ 0.3mm視野における侵入毛細血管の面積を定量組織学的に測定し、毛細血管面積比(capillary transsectional area score CTS)

とした。また同視野においての毛細血管個数を単位面積あたりの個数として表わし、毛細血管密度とした。

走査電子顕微鏡用標本はエタノール系列で脱水し、臨界点乾燥法で乾燥後、金-パラジウム蒸着を行って、その内腔面を観察した。

開存率の検定はフィッシャーの直接確率計算によった。TFS, CTS, 毛細血管密度は $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ で表し、検定はマン・ホイットニーU検定で行った。

V. 結果

開存率；4週観察犬では大網被覆群87%(5/6)，大網非被覆群100%(6/6)と有意差を認めなかった。12週観察犬では大網被覆群60%(3/5)，大網非被覆群20%(1/5)であった。

光学顕微鏡的観察；内腔面には吻合部より連続してFactor-VIII免疫染色陽性の一層の細胞層を認めた。その下層には数層の α -actin陽性の細胞層を認めた。人工血管壁内には線維芽細胞を中心とした多数の侵入細胞を認め、毛細血管新生を認めた。細胞侵入の程度、毛細血管新生は大網被覆群でより著明であった。12週観察犬では細胞侵入、毛細血管新生は4週観察犬と比較して少なかった。

TFS；4週観察犬では大網被覆群 $44.8 \pm 6.6\%$ ，大網非被覆群 $30.2 \pm 7.3\%$ と大網被覆群で有意に内皮化が促進されていた。12週観察犬では大網被覆群 $84.6 \pm 15.6\%$ ，大網非被覆群 62.4% であった。

CTS, 毛細血管密度；4週観察犬では大網被覆群でそれぞれ $3.3 \pm 1.7\%$ ， 196 ± 79.8 個/ mm^2 。大網非被覆群 $1.1 \pm 0.6\%$ ， 83.3 ± 16.1 個/ mm^2 と大網被覆群で有意に毛細血管新生が促進されていた。12週観察犬では大網被覆群でそれぞれ $1.1 \pm 1.0\%$ ， 69.4 ± 61.0 個/ mm^2 ，大網非被覆群 0% であった。

VEGF免疫染色；4週観察の大網被覆群では仮性内膜，人工血管壁内の細胞質および細胞外基質に陽性像が観察された。大網非被覆群では人工血管壁内の細胞質および細胞外基質には染色陽性像は観察されなかった。12週観察犬では大網被覆群，大網非被覆群ともVEGF免疫染色陽性像は観察されなかった。

走査電子顕微鏡的観察；人工血管内腔面には、吻合部より連続して類円形ないしは長円型の内皮細胞が観察された。この細胞間の結合は吻合部付近では強固であったが中心部に向かっては疎に観察された。細胞の性状，進展形式は大網被覆群と大網非被覆群で差異を認めなかった。

VI. 考察

現在、唯一小口径動脈グラフトとして臨床応用されている平均繊維長約 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ のePTFEグラフトは優れた抗血栓性をもつ反面、組織親和性に劣り、開存性、修復治癒とも満足すべきのとはいいがたい。新生内膜細胞被覆が良好に行われるためには、繊維間隙を通じて線維組織や毛細血管が侵入しやすいhigh-porosityのePTFEグラフト(HPグラフト)が有利とされ、近年小口径領域においてもHPグラフトの実験的検討が行われ、修復治癒の促進、開存率の上昇が報告されている。HPグラフトで今回観察された人工血管壁内の線維芽細胞を中心とした侵入細胞、毛細血管新生は天然の抗血栓材料である内皮細胞の早期の誘導をもたらし、人工血管の開存性に大きな影響を与えるものと考えられる。

有茎大網はその血管新生作用から虚血組織に応用され、人工血管修復治癒に対する有用性は大動脈、門脈および下大静脈ですでに論じられている。小口径領域で有茎大網を応用した今回の実験でも大網被覆群では有意に内皮化が促進されており、このことが長期の開存性に影響を与えたものと考えられる。

大網被覆群ではCTS, 毛細血管密度とも有意に毛細血管新生が促進されていた。新生毛細血管によって血流が増加し、細胞活性の高まった細胞からは内皮化を促進する作用を有するgrowth factorの産生または放出が亢進することが推察された。大網から放出される主要な血管新生因子として近年VEGFが同定されており、今回の実験では免疫組織学的手法によって人工血管壁内でのVEGFの局在を明らかにした。大網被覆群では仮性内膜，人工血管壁内に陽性像が観察されたが大網非被覆群では観察されなかった。このVEGFの局在は大網に由来し毛細血管新生と関連す

るものと推察された。

VII. 結語

有茎大網被覆は毛細血管新生を促進し、内皮化を促進したがその要因としてVEGFが強く関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 阿 部 和 厚
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Effects of Omental Wrap on Performance of Small-Caliber High -Porosity Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts

(有茎大網被覆 high-porosity ePTFE 小口径人工血管の
開存性および修復治癒過程に関する実験的検討)

現在自家静脈グラフトに匹敵する抗血栓性と組織治癒性を有した小口径人工血管は存在しない。自家静脈グラフトは採取が不可能な症例の存在や採取手技の煩雑さなどの問題を有しており、良好な開存性の得られる小口径人工血管が開発されれば临床上、極めて有益である。近年小口径人工血管においても繊維長の長い、high-porosity ePTFE人工血管が開発されているが、さらに各種創傷治癒作用をもつ有茎大網に着目し小口径動脈における有茎大網被覆人工血管の開存性および修復治癒を検討することとした。特に大網被覆による毛細血管新生の差異を検討するため各種検討を行った。

ビーグル成犬を使用し、全身麻酔下に頸部正中切開を加え、両側頸動脈露出、全身ヘパリン化の後に繊維長 $60\mu\text{m}$ の ePTFE人工血管(径4mm, 長さ40mm)を使用して両側頸動脈置換を行なった。縫合糸は6-0monofilament糸を用い、2点支持連続縫合により吻合操作を行なった。大網被覆は上腹部斜切開を加え、右胃大網動脈を茎とした有茎大網を作製し、経皮下経路で右側人工血管を被覆した。同一犬で右側を大網被覆群、左側を大網非被覆群として比較検討した。移植4週、および12週で人工血管を摘出。開存の有無を確認した。開存の得られたものについて、撮影写真において仮性内膜の光沢のある部分を非血栓部としてこれが人工血管内面全面積に占める割合をthrombus-free surface score(TFS)として測定した。標本は長軸方向に半切し一片を光学顕微鏡用に10%ホルマリン固定。一片を走査電子顕微鏡用に1%グルタルアルデヒド固定した。光学顕微鏡的観察ではHE, Azan, anti α actin染色を行った。さらに免疫組織化学的検討としてvascular endothelial growth factor (VEGF)免疫染色, Factor-8免疫染色を施行した。定量的評価として画像解析装置を用いて人工血管壁内約 $0.2\times 0.3\text{mm}^2$ 視野におけ

る侵入毛細血管の面積を定量組織学的に測定し、毛細血管面積比 (capillary transsectional area score, CTS)とした。また同視野においての毛細血管個数を単位面積あたりあたりの個数として表わし、毛細血管密度とした。

走査電子顕微鏡用切片はエタノール系列で脱水し、臨界点乾燥法で乾燥後、金－パラジウム蒸着を行った。

結果として開存率では4週観察犬では大網被覆群87% (5/6)、大網非被覆群100% (6/6)と有意差を認めなかった。12週観察犬では大網被覆群60% (3/5)、大網非被覆群20% (1/5)と大網被覆群で良好な傾向を示した。TFSの測定では4週観察犬では大網被覆群 $44.8 \pm 6.6\%$ 、大網非被覆群 $30.2 \pm 7.3\%$ と大網被覆群で有意に内皮化が促進されていた。12週観察犬では大網被覆群 84.6 ± 15.6 、大網非被覆群 62.4% と大網被覆群で良好な傾向を示した。光学顕微鏡的観察では人工血管壁内に繊維芽細胞を中心とした多数の侵入細胞を認め、毛細血管新生を認めた。毛細血管新生は大網被覆群でより著明であった。12週観察犬では器質化が進行し細胞侵入、毛細血管新生は4週観察犬と比較して少なかった。

定量組織学的検討ではCTS、毛細血管密度の測定において4週観察犬では大網被覆群でそれぞれ $3.3 \pm 1.7\%$ 、 196 ± 79.8 個/ mm^2 。大網非被覆群 $1.1 \pm 0.6\%$ 、 83.3 ± 16.1 個/ mm^2 と大網被覆群で有意に毛細血管新生が促進され、内皮化の促進との関連が示唆された。12週観察犬では大網被覆群でそれぞれ $1.1 \pm 1.0\%$ 、 69.4 ± 61.0 個/ mm^2 。大網非被覆群0%であった。VEGF免疫染色では4週観察の大網被覆群で仮性内膜、人工血管壁内の細胞質および細胞外器質に陽性像が観察され、大網非被覆群では観察されなかった。12週観察犬では両群ともVEGF免疫染色陽性像は観察されなかった。走査電顕的観察では吻合部より連続した内皮細胞が観察されたが細胞の性状、進展形式は両群間で差異を認めなかった。

以上：有茎大網被覆は移植初期の開存性に影響しないが、毛細血管新生および内皮化を有意に促進した。また移植初期の内皮化の促進が長期の開存性に影響することが推察された。VEGFは大網被覆によって促進された毛細血管新生に促進的に働くものと考えられた。

口頭発表において阿部和厚教授よりVEGFの局在について、新生毛細血管の進展形式、侵入細胞数の程度および実際の臨床応用部位についての質問があった。ついで安田慶秀教授より人工血管仮性内膜の由来、内膜肥厚の原因、内膜進展とVEGFとの関連および今回の実験結果より将来の人工血管開発への展望に関しての質問があった。また加藤紘之教授より閉塞例の閉塞原因について、内膜肥厚の制御についての質問があったが申請者はおおむね妥当な回答をした。

小口径動脈領域における有茎大網被覆high-porosity ePTFE人工血管の開存性および修復治癒を検討し、VEGFの局在を明かにした本研究の意義は大きく、審査員協議の結果、本論文は博士(医学)の学位授与に値するものと判定した。