

学位論文題名

The Influence of Node-Fibril Morphology on Healing of High-Porosity Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts

(小口径人工血管の幾何学構造の相違が Expanded polytetrafluoroethylene 人工血管の生物学的な修復治癒に与える影響)

学位論文内容の要旨

目的

口径 4 mm 以下の小口径人工血管は、透析用シャント、膝窩以下の動脈の置換、バイパス用として製品化されているが、血栓、仮性内膜肥厚により容易に閉塞し、長期にわたる開存性に乏しい。このようなことから、現在、小口径を適応とする血管置換には大、小伏在静脈などの自家静脈が第一選択として使用されているが、長さ、内径の点で使用に制約を受けることも多い。したがって、自家静脈に匹敵する優れた開存性を示す小口径人工血管が開発されたならば、適用の選択の幅が広がり、临床上、極めて有用である。

人工血管の中でポリテトラフルエチレン (PTFE) を延伸加工して製造される expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) 人工血管は、抗血栓性に優れ、速やかで良好な治癒傾向を示すとされている。この優れた特性は繊維と結節からなる幾何学的構造に大きく左右される。従来、ePTFE 人工血管の構造は平均繊維長のみで表現され、至適平均繊維長は $60\ \mu\text{m}$ とされていた。今日、製造過程を調節する事により同じ平均繊維長でありながら構造が全く異なる人工血管を作ることが可能になってきたがどのような幾何学的構造が人工血管の生物学的修復治癒に最も有利であるかは解明されていない。

そこで、平均繊維長は同じ $60\ \mu\text{m}$ とし、繊維と結節からなる幾何学的構造の異なる 2 種類の小口径 ePTFE 人工血管を製造し実験動物の頸動脈に移植して、生物学的修復治癒の違いを実験的に検討し、より優れた人工血管の開発を試みた。

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。

人工血管：人工血管はテクノグラフト (住友電工) と同様の凹凸壁構造を有し、屈曲閉塞を防ぐためテフロンで外壁補強している平均繊維長 $60\ \mu\text{m}$ 、内径 4 mm、長さ 5 cm、厚さ $650\ \mu\text{m}$ の幾何学的構造の異なる 2 種類の ePTFE 人工血管を用いた。電頭的に結節と繊維が規則性をもって構築されている人工血管を Group 1、結節と繊維が不規則に構築されている人工血管を Group 2 とした。

幾何学的微細構造の特徴：この 2 種類の人工血管において、人工血管の表面及び横断面を電子顕微鏡で観察し撮影した。100 視野を無作為に抽出し、(1) inter nodal distance (結節間距離) と (2) node-to-axis angle (結節と軸のなす角度) を各々測定した。Group 1 の人工血管の結節間距離は、表面及び横断面において各々 $59.7 \pm 13.0\ \mu\text{m}$ 、 $60.2 \pm 12.7\ \mu\text{m}$ である。結節と軸のなす角度は各々 $90.2 \pm 12.2^\circ$ 、 $91.0 \pm 14.2^\circ$ であった。また、Group 2 の人工血管の結節間距離は、表面及び横断面において各々 $59.9 \pm 18.4\ \mu\text{m}$ 、 $58.8 \pm 19.1\ \mu\text{m}$ 、結節と軸のなす角度は各々 $92.5 \pm 24.0^\circ$ 、 $92.5 \pm 23.6^\circ$ であった。この 2 種類の人工血管において、結節間距離の平均値および結節と軸のなす角度の平均値に差はなかったが、分布の偏りにおいて有意差が認められた ($p < 0.01$)。構造の違いはこの分布の違いに起因する。

実験動物：ビーグル成犬(体重 10~12kg)10 頭を使用した。

人工血管移植方法：塩酸ケタミン 5 mg/kg 筋注、チアミラールナトリウム 10~15 mg/kg 静注後、気管内挿管、人工呼吸器による調節呼吸とした。頸部正中切開を加え、両側頸動脈を 7 cm 以上露出、全身ヘパリン化 (100 単位/kg) を施行した後、上記 2 本の人工血管を対称的に端々吻合にて置換した。Group 1 の人工血管は、右頸動脈に 5 本、左頸動脈に 5 本で計 10 本置換、Group 2 の人工血管は Group 1 の人工血管と対称的に、右頸動脈に 5 本、左頸動脈に 5 本で計 10 本置換した。縫合法は 2 点支持連続縫合とし、縫合糸は 6-0 モノフィラメントポリプロピレン糸 (6-0 サージリン) を使用した。人工血管置換後、止血を確認し、皮下、皮膚を閉鎖、手術を終了した。術後に抗凝固剤、抗線溶剤は使用しなかった。

人工血管摘出：移植 12 週後において人工血管を摘出した。移植と同様に全身麻酔を施行し、前頸部を切開、全身ヘパリン化の後に対称的に置換されている左右の人工血管を摘出した。

開存性：人工血管を長軸方向に半切し、開存の有無を確認した。

非血栓部 (thrombus free area)：鍍銀染色、写真撮影を施行した。撮影写真において鍍銀非染色部を非血栓部とし、人工血管全体に占める同部位の割合を thrombus free area として測定した。

光学顕微鏡的観察：標本は 10%ホルマリンで固定後、定法に従いパラフィンで包埋、4 μ m 厚の切片を作成し、Hematoxyline eosin 染色、AZAN 染色を施行した。さらに免疫組織化学的観察として、抗 α actin 染色、抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色、抗 Factor VIII-related antigen 染色、抗 basic fibroblast growth factor (bFGF) 染色、抗 Vascular endothelial growth factor (VEGF) 染色を施行した。免疫組織化学的染色は ABC 法を施行し、DAB で発色させた。

定量組織学的検討：生物学的修復治癒の違いを定量的に測定するために以下の項目を検討した。

(1) 人工血管吻合部より約 2mm の部分において、顕微鏡マイクロメーターを使用し、仮性内膜の厚さを 5 点において計測し、仮性内膜厚とした (μ m)。(2) 吻合部より約 2mm の部分および中央部において、人工血管壁内 0.25 \times 0.25mm² の細胞数を 400 倍視野下で 5 視野計測し、その平均値を人工血管壁内侵入細胞数とした (cells/0.0625mm²)。(3) 同部位において、人工血管壁内 0.5 \times 0.5mm² の侵入細血管の数を測定した (cells/0.0625mm²)。(4) 抗 PCNA 染色により人工血管壁内細胞数 1000 個中の陽性細胞数より陽性細胞率を測定した(%)。

結果

人工血管移植

開存率は共に 30%で有意差は認めなかった。肉眼的観察において、吻合部から中央に向かって白色光沢ある仮性内膜が伸びていた。非血栓部 (thrombus free area) はそれぞれ 50.2 \pm 2.5%、52.0 \pm 3.2%で有意差を認めなかった。光学顕微鏡的観察において、①HE 染色：仮性内膜表面には扁平な核を持つ一層の内皮細胞様細胞を認めた。その下層には、扁平な核を持ちエオシン好性で紡錘型の細胞を認めた。仮性内膜最下層及び人工血管中央部の仮性内膜は線維芽細胞で占められていた。人工血管壁内を見ると、線維芽細胞、マクロファージ、異物巨細胞が分布しており、細動静脈の侵入も認めた。②AZAN 染色：青染する線維組織は仮性内膜最下層及び人工血管中央部に分布し、仮性内膜のうち人工血管に近い部位では密な層状の配列を示した。③抗 α actin 染色：仮性内膜に分布する細胞は多くが抗 α actin 染色に陽性の胞体を示し、この細胞は仮性内膜の表層ほど密な分布を示した。人工血管壁内に侵入した細動静脈の血管壁も陽性を示した。④抗 PCNA 染色：人工血管壁内には抗 PCNA 染色陽性細胞を多数認めたが、仮性内膜にはまれであった。⑤抗 Factor VIII-related antigen 染色：仮性内膜表面の内皮様細胞や人工血管壁内の細動静脈の内皮細胞が陽性を示した。また、仮性内膜に分布する細胞も陽性を示し、その分布は抗 α actin 染色と同様であった。⑥抗 bFGF 染色：人工血管周囲の組織中に、胞体が陽性を示す細胞集団を認めた。仮性内膜および人工血管壁には陽性細胞を認めなかった。⑦抗 VEGF 染色：陽性細胞の分布は抗 bFGF 染色と同様であった。

定量組織学的検討である仮性内膜厚 (μ m)、人工血管壁内侵入細胞数 (cells/0.0625mm²)、侵入細血管数 (cells/0.0625mm²)、人工血管壁内 PCNA 陽性細胞率(%)において Group 1, 2 の 2 群間に明らかな差を認めなかった。

結語

Porosity の高い ePTFE 人工血管においては、結節と繊維からなる幾何学的微細構造の違いは人工血管の生物学的な修復治癒に影響を与えなかった。この結果は新しい high porosity ePTFE 人工血管の更なる開発に寄与するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学位論文題名

The Influence of Node-Fibril Morphology on Healing of High-Porosity Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts

(小口径人工血管の幾何学構造の相違が Expanded polytetrafluoroethylene 人工血管の生物学的な修復治癒に与える影響)

口径4mm以下の小口径人工血管は、透析用シャント、膝窩以下の動脈の置換、バイパス用として製品化されているが、血栓、仮性内膜肥厚により容易に閉塞し、長期にわたる開存性に乏しい。このようなことから、現在、小口径を適応とする血管置換には大、小伏在静脈などの自家静脈が第一選択として使用されているが、長さ、内径の点で使用に制約を受けることも多い。したがって、自家静脈に匹敵する優れた開存性を示す小口径人工血管が開発されたならば、適用の選択の幅が拡がり、臨床上、極めて有用である。

人工血管の中でpolytetrafluoroethylene (PTFE)を延伸加工して製造されるexpanded polytetrafluoroethylene(ePTFE)人工血管は、抗血栓性に優れ、速やかで良好な治癒傾向を示すとされている。この優れた特性は繊維と結節からなる幾何学的構造に大きく左右される。従来、ePTFE人工血管の構造は平均繊維長のみで表現され、至適平均繊維長は60 μ mとされていた。今日、製造過程を調節する事により同じ平均繊維長でありながら構造が全く異なる人工血管を作ることが可能になってきたがどのような幾何学的構造が人工血管の生物学的修復治癒に最も有利であるかは解明されていない。

そこで、平均繊維長は同じ60 μ mとし、繊維と結節からなる幾何学的構造の異なる2種類の小口径ePTFE人工血管を製造し実験動物の頸動脈に移植して、生物学的修復治癒の違いを実験的に検討し、より優れた人工血管の開発を試みた。

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。

人工血管：人工血管はテクノグラフト(住友電工)と同様の凹凸壁構造を有し、屈曲閉塞を防ぐためテフロンで外壁補強している平均繊維長60 μ m、内径4mm、長さ5cm、厚さ650 μ mの幾何学的構造の異なる2種類のePTFE人工血管を用いた。電顕的に結節と繊維が規則性をもって構築されている人工血管をGroup 1、結節と繊維が不規則に構築されている人工血管をGroup 2とした。

幾何学的微細構造の特徴：この2種類の人工血管において、人工血管の表面及び横断面を電子顕微鏡で観察し撮影した。100視野を無作為に抽出し、(1) inter nodal distance (結節間距離)と(2) node-to-axis angle (結節と軸のなす角度)を各々測定した。Group 1の人工血管の結節間距離は、表面及び横断面において各々59.7 \pm 13.0 μ m、60.2 \pm 12.7 μ mである。結節と軸のなす角度は各々90.2 \pm 12.2 $^{\circ}$ 、91.0 \pm 14.2 $^{\circ}$ であった。また、Group 2の人工血管の結節間距離は、表面及び横断面において各々59.9 \pm 18.4 μ m、58.8 \pm 19.1 μ m、結節と軸のなす角度は各々92.5 \pm 24.0 $^{\circ}$ 、92.5 \pm 23.6 $^{\circ}$ であった。この2種類の人工血管において、結節間距離の平均値および結節と軸のなす角度の平均値に差はなかったが、分布の偏りにおいて有意差が認められた(p<0.01)。構造の違いはこの分布の違いに起因する。

実験動物：ビーグル成犬(体重10~12kg)10頭を使用した。

人工血管移植方法：塩酸ケタミン5 mg/kg 筋注、チアミラールナトリウム10~15 mg/kg静注後、気管内挿管、人工呼吸器による調節呼吸とした。頸部正中切開を加え、両側頸動脈を7cm以上露出、全身ヘパリン化(100単位/kg)を施行した後、上記2本の人工血管を対称的に端々吻合にて置換した。Group 1の人工血管は、右頸動脈に5本、左頸動脈に5本で計10本置換、Group 2の人工血管はGroup 1の人工血管と対称的に、右頸動脈に5本、左頸動脈に5本で計10本置換した。縫合法は2点支持連続縫合とし、縫合糸は6-0モノフィラメントポリプロピレン糸(6-0サージリン)を使用した。人工血管置換後、止血を確認し、皮下、皮膚を閉鎖、手術を終了した。術後に抗凝固剤、抗線溶剤は使用しなかった。

人工血管摘出：移植12週後において人工血管を摘出した。移植と同様に全身麻酔を施行し、前頸部を切開、全身ヘパリン化の後に対称的に置換されている左右の人工血管を摘出した。

開存性：人工血管を長軸方向に半切し、開存の有無を確認した。

非血栓部(thrombus free area)：鍍銀染色、写真撮影を施行した。撮影写真において鍍銀非染色部を非血栓部とし、人工血管全体に占める同部位の割合をthrombus free areaとして測定した。

光学顕微鏡的観察：標本は10%ホルマリンで固定後、定法に従いパラフィンで包埋、4 μ m厚の切片を作成し、(1)Hematoxyline and eosin (HE)染色 (2)Factor eight related antigen (Factor VIII)染色(3) α -actin 染色 (4)PCNA染色を施行、顕微鏡で比較観察した。免疫組織化学的染色はABC法を施行し、DABで発色させた。

定量組織学的検討：生物学的修復治癒の違いを定量的に測定するために以下の項目を検討した。

(1) 人工血管吻合部より約2mmの部分において、顕微鏡マイクロメーターを使用し、仮性内膜の厚さを5点において計測し、仮性内膜厚とした(μ m)。(2) 吻合部より約2mmの部分および中央部において、人工血管壁内0.25 \times 0.25mm²の細胞数を400倍視野下で5視野計測し、その平均値を人工血管壁内侵入細胞数とした(cells/0.0625mm²)。(3) 同部位において、人工血管壁内0.5 \times 0.5mm²の侵入細血管の数を測定した(cells/0.0625mm²)。(4) 抗PCNA染色により人工血管壁内細胞数1000個中の陽性細胞数より陽性細胞率を測定した(%)。

開存率は共に30%で有意差は認めなかった。肉眼的観察において、吻合部から中央に向かって白色光沢ある仮性内膜が伸びていた。非血栓部(thrombus free area)はそれぞれ50.2 \pm 2.5%、52.0 \pm 3.2%で有意差を認めなかった。組織学的観察において、HE染色では吻合部から中央に向かって仮性内膜が伸びていたが、中央部は血栓線維素膜で被われている。この状態は、両群で同様であった。2群共に、 α -actin染色では仮性内膜内に α -actin染色に陽性の平滑筋様細胞を認めた。仮性内膜の上層には抗Factor VIII-染色に陽性の血管内皮様細胞を認めた。また、人工血管壁内の細動静脈の内皮細胞も抗Factor VIII-染色に陽性を示した。人工血管壁内には抗PCNA染色陽性細胞を多数認めた。しかし、顕微鏡的観察において両群に差は認めなかった。定量組織学的検討である仮性内膜厚(μ m)、人工血管壁内侵入細胞数(cells/0.0625mm²)、侵入細血管(cells/0.0625mm²)、人工血管壁内PCNA陽性細胞率(%)においてGroup 1, 2の2群間に明らかな差を認めなかった。

有孔性(porosity)の低い小口径人工血管においては、構造の違いが細胞侵入ならびに修復治癒に影響を与えるという報告例が多く、細胞侵入に有利な幾何学的構造を持った人工血管が好まれる。しかし、有孔性(porosity)が高ければ容易に細胞が侵入し、幾何学的構造の違いは細胞侵入に好影響も悪影響も与えなかったと推察された。

Porosityの高いePTFE人工血管においては、結節と繊維からなる幾何学的微細構造の違いは人工血管の生物学的な修復治癒に影響を与えなかった。この結果は新しいhigh porosity ePTFE人工血管の更なる開発に寄与するものと思われる。

口頭発表において、加藤紘之教授より移植部位として頸動脈が適切な場所か否か、小口径人工血管開発の今後の方向性について質問があった。続いて安田慶秀教授より左右頸動脈での開存の差異について、閉塞例の閉塞機転について、人工血管の短縮の程度について、今後の実験の方向性について質問があった。また杉原平樹教授より本実験の材料は商品化されているものが否か、実験コントロールの設定方法、血管内腔はすべて内皮細胞で覆われるべきかについて質問があったが、申請者は実験で得られた知識、血管外科における臨床知識をふまえておおむね妥当な回答をした。

審査員一同は、この研究成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を授与されるのに充分値するものと判定した。