

臨床応用に向けた小口径人工血管のシルク
フィブリンコーティング方法に関する研究

2019年

岐阜大学大学院
連合獣医学研究科
(東京農工大学)

田中 隆志

目次

緒論	1
第1章 グリセリン混合シルクフィブロインを用いた小口径人工血管の評価	
緒言	9
材料および方法	11
結果	19
考察	23
小括	27
Figure	28
第2章 絹小口径人工血管における3種類の多孔質コーティングの検討	
緒言	38
材料および方法	41
結果	46
考察	51
小括	56
Figure	57

第3章 ポリエステル基盤を用いたシルクフィブロインコーティングの検討

緒言	73
材料および方法	75
結果	81
考察	87
小括	92
Figure	93

第4章 絹小口径人工血管における犬を用いた生体内評価

緒言	104
材料および方法	106
結果	110
考察	113
小括	117
Figure	118

総括	125
----	-----

謝辞	128
----	-----

引用文献	130
------	-----

略号一覧

Dacron： ポリエステル繊維

EDV： 拡張末期血流速度

ePTFE： 延伸ポリテトラフルオロエチレン

EtOH： エタノール

EVG： エラスチカ・ワンギーソン

GEL： ゼラチン

Glyc： グリセリン

HE： ヘマトキシリン・エオジン

MTC： マッソン・トリクローム

PEG： ポリエチレングリコール

PET： ポリエステル

PGDE： ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル

PSV： 収縮期最大血流速度

SF： シルクフィブロイン

VEGF： 血管内皮細胞増殖因子

緒論

心血管疾患は冠状動脈性心臓病，脳血管疾患，末梢動脈疾患および深部静脈血栓などがあり，これらは不適切な栄養摂取による血流の減少や組織の損傷によって，血管の閉塞や狭窄を引き起こすとされている(52)。これらの疾患に関連した死亡者の年間発生率は2030年までに全世界で2330万人に達すると予測されている(41)。心血管疾患の治療法はその疾患の重症度によって，食事療法および生活習慣の改善から薬物治療および外科的介入まで多岐に渡る(1)。外科的な治療としてはステントやカテーテルなどを用いた血管内手術とバイパス手術に分けられる。血管内手術はその技術の進歩や患者に対しての低侵襲性から，近年，多くの手術が行われてきているが，費用が高いことや罹患部位の位置や太さに制約があるといった問題点もあり，バイパス手術の需要は依然高いままである(2, 12)。バイパス手術には自己血管や人工血管が用いられている。1952年に世界で初めてVoorheesらによって合成材料で作製された人工血管の移植実験が行われ，ポリビニル繊維で作製した大口径人工血管(内径10 mm以上)を成犬の腹部大動脈に15例移植し，最長で5ヶ月の開存性を報告した(8)。その後，研究が進み現在では胸部大動脈用の大口径人工血管においてはポリエステル製(Dacron)が主に使用され，頸部や腋窩領域の動脈再建用の中口径人工血管(内径6~8 mm)には延伸ポリテトラフルオロエチレン製(ePTFE)の人工血管が使用され

ている。しかしながら、冠状動脈や膝窩動脈など小口径(内径 5 mm 以下)の部位において、現在臨床応用されている人工血管は存在しない。そのため、それらの部位にバイパス手術を行う際には主に自己血管が使用されている。それらは主に患者から摘出された内胸骨動脈、橈骨動脈および伏在静脈などが用いられている。しかしながら自己グラフトによる血管置換手術を行ったとしても 10 年後の開存率は 50%程度であり(23, 34)、加えてドナー患者の血管の質が悪いことや摘出手術による侵襲および術後の運動制限など未だ制約も多いのが現状である。ePTFE はその高い疎水性のためにタンパク質吸着性及び細胞接着性が低く、抗血栓作用を持つため主に中口径の部位で使用され、小口径(約 3 mm)の人工血管も市販されてはいるが、長さが数 cm でその適応は限定されている。また、冠状動脈のバイパス手術を ePTFE 製の人工血管で実施した場合、1 年間の開存率は自家グラフトの 90%と比較して 60%を下回る低い開存率であった(25)。以上のことから、閉塞しない小口径人工血管の開発が望まれている。

小口径人工血管の閉塞の原因としては、血栓形成、内膜肥厚、粥状硬化症、感染などが挙げられるが、その中でも移植後早期に起こる血栓の形成を防ぐことが長期の開存性を高めていく上でも重要である。しかしながら、疎水性である ePTFE などの素材で血栓の付着を予防する試みは中口径ではうまくいくが、小口径の部位のよう

な細い血管では良好な結果が得られていない。

小口径のためのグラフトには長期の機能性を維持するために様々な要件を満たす必要がある。そのためには血栓症を誘発しないように周囲組織や隣接する自己血管との生体適合性を有し、同時に収縮期血圧に耐えうる適切な機械的強度および弾性を有する必要がある。しかしながら、大口径および中口径で使用されている **Dacron** や **PTFE** 製の小口径人工血管では血管内皮細胞の欠如および自己血管との不一致から血栓形成や内膜肥厚を引き起こし閉塞する結果に終わっていた(7, 24, 35, 53)。そのため、この数十年間、自己組織へのリモデリングを促進する足場材料を用いた小口径人工血管に関する研究が活発に行われてきた(31, 44, 67)。その中で、血管内皮細胞(36)や骨髄細胞(55)をあらかじめグラフトに播種して調整された人工血管やバイオチューブ(39)と呼ばれる人工血管の有用性が報告されているが、作製に時間を要することあるいは長期間保存できないという問題点があることから実用化には至っていない。また、ポリグリコール酸、ポリ-L-乳酸およびポリカプロラクトン(45)などの分解性合成材料で作製された小口径人工血管は実験的には良好な結果が得られていたが、血栓形成および生体適合性の不一致から臨床応用はされていない。これらの合成ポリマーと比較して、コラーゲン、エラスチンおよびシルクなどの天然のバイオポリマーはより優れた細胞適合性および生体適合性を有し(60, 73, 74)、その中でもシルクは

他の生物学的材料よりも優れた機械的特性を持つと言われている(66)。

シルクは天然の繊維であり縫合材料として長い間使用されてきた歴史があり、近年、組織工学から移植デバイスへの薬物輸送まで幅広く使用されてきている。その理由の一つにシルクが持つ調整可能な機械的特性と生分解性を有することがあげられる。また、天然のシルクポリマーには合成ポリマーでは獲得できない優れた強度と弾力性を併せて持つとも言われている(51)。シルクはアリ、ノミ、コオロギなどの昆虫やクモによって産生される(61)。生物医学的用途のために、絹は主に繊維産業の蚕(*Bombyx mori*)から供給され、ほとんどの絹縫合糸材料はこの *B. mori* の絹糸から作られている。この *B. mori* シルクはフィブロインタンパクと接着様タンパクで繊維をコートし、それぞれを付着させるセリシンの2つの主要成分から構成されている。縫合糸材料として使用されてきたシルクはそのままの状態で使用されていたため、多くの患者でアレルギー反応や炎症反応を引き起こす結果となっていた。最近の研究によってこのアレルギー反応は天然のシルクフィブロイン(SF)とセリシンの複合構造によって誘発されるもので、SF あるいはセリシン単独の場合、アレルギー反応は誘発されないことがわかっている(4, 68)。そして、シルクは高いイオン強度あるいは酸性の溶液に溶けて多種多様な材料に加工することが可能で、フィルム、ゲル、多孔質足場などの形状に変わることができ、様々な医療材料として応用されている。

この様な性質を有することから SF は小口径人工血管に適する素材であると考えられた。そのため, Enomoto らは SF を用いて直径 1.5 mm, 長さ 1 cm の小口径人工血管を作製し, ラットの腹部大動脈へ移植し, 生体適合性および開存率について調査した(14)。SF で作製された小口径人工血管はラットの腹部大動脈で長期的な開存性を示した。移植の 1 年後の開存率は PTFE グラフトと比較して有意に高い結果となった(85.1 vs. 30 %, $P < 0.01$)。血管内皮細胞および平滑筋細胞は移植後 SF グラフト内に侵入し, それぞれ血管内皮と平滑筋層へのリモデリングが確認された。さらに移植後に SF 基盤が徐々に分解され, そこに膠原線維が入り込んでいることも認められた。この結果から, SF が小口径人工血管の素材として適している可能性が示された。しかしながら, SF グラフトが長軸および斜めの方向に剪断されると端から解れるという問題点があった。さらには強度においても PTFE や Dacron と比較して弱いという欠点が残っていた。そこで, Yagi らはダブルラッセル編みで作製された SF グラフトを作製し, 物性と移植実験を行った(71)。ダブルラッセル編みは, 従来, ポリエステル繊維の人工血管に使用されており, 編み方を変えることで人工血管の太さや弾力を変えることができると言われている。この研究で用いた絹小口径人工血管は PTFE と比較しても十分な強度を有し, 移植時の過程において解れるなどの問題は起きなかった。また, ラットの腹部大動脈へ移植後も血栓を形成することはなかった。しか

しながら、ダブルラッセル編みは弾性を得ようとする程、編み込みの間隙が大きくなってしまふ。そのため、移植時にその穴から血液が漏出する危険性がある。従来、人工血管の移植時の血液漏出にはプレクロッティングという手法が用いられてきた。これは人工血管を移植された患者自身の血液を用いてシーリングを行い、血液の漏出を防ぐ方法である。しかしながら、手術時間の延長や感染のリスクといった問題点から次第にコラーゲンやゼラチンなどのタンパク質を用いて、あらかじめコーティングを施した人工血管が使用されるようになってきた。しかし、これらのコーティング材は主に大および中口径人工血管に使用されているものであり、小口径人工血管に適しているかどうかは不明である。そのため、Fukayama らは SF をコーティング材として使用した場合、絹小口径人工血管において有用であるかについて調査を行なったが、SF は SF グラフトにコーティング剤として使用した時も血液の漏出を防ぎ、かつリモデリングにも貢献することが判明した(18)。このことから小口径人工血管において SF は基盤としてもコーティング材としても適していることが考えられた。

しかしながら、これまで作製してきた絹小口径人工血管は、ラットなどの小動物モデルにおいては十分な開存性およびリモデリング能力を示してきたが、大動物モデル、特に犬へ移植を行なった際、移植後、長期にわたる開存性および移植後早期における自己組織へのリモデリングの完了といった小口径人工血管に求められる結果は

得られていない(22)。その原因の一つに、コーティングに使用されている SF が硬くなり、生体内で分解されにくいことが考えられた。そこで、本研究では絹小口径人工血管におけるコーティング材料と方法に着目し、絹小口径人工血管に適した SF コーティングを検討し、大動物モデルにおいても長期にわたる開存性を示す絹小口径人工血管の開発を試みることを目的とした。

第 1 章

グリセリン混合シルクフィブロイン を用いた小口径人工血管の評価

緒言

SF は機械的強度が強く、また生分解性を持つことから人工血管用足場材料として研究がおおく行なわれてきており、ラットの移植実験において良好な結果を示してきた。我々が作成してきた人工血管は、従来、ダブルラッセル編みで組まれた基盤に SF 水溶液を用いてコーティングを施したものである。人工血管の基盤のみでは、基盤の網目の隙間から血液が多量に漏出するために使用できない。しかしながら、人工血管の隙間を完全に埋め込んでしまうと、移植後、細胞の接着、侵入が起こらないためリモデリングが不十分になってしまう。

そこで、コーティングを多孔質なスポンジ状にして基盤を覆うことで、適度に細胞のグラフト内への侵入を可能にしている。このコーティング材に使用する SF はコーティング濃度が高すぎる場合には、強度は増えるが、生体内での分解が遅れリモデリングに不都合が生じる。しかしながらコーティング濃度が薄いと強度が弱いため移植時に断端のほつれが生じたり、移植後の出血のリスクが高まる。そこで、様々な濃度の SF コーティングを施した SF グラフトをラットの腹部大動脈へ移植し、開存率およびリモデリング能力について調査した結果、約 2.5%の濃度の SF が絹小口径人工血管のコーティングに適していることが判明した(16)。しかし、未だ改善すべき問題点が残っている。それはコーティング部分の SF が硬く分解されにくくなるという性

質をもっていることである。そのためSFに柔軟性を付与する必要があった。そこで、我々はグリセリン(Glyc)に着目した。

Glyc は水溶性の可塑剤で吸収性が高く、古くから利用されてきた保湿剤である。

グリセリンは人間の体内にも中性脂肪として存在し、現在では化粧品や甘味料など幅広く利用されている。Glyc 自体には毒性はなく、自然蒸発も起こらないため、医療分野でも多数の利用例が報告されている(48, 65)。利尿薬、脳圧降下薬、浣腸液に配合されることに加え、その高い保湿力から市販の医療材料の柔軟性維持のために使用される(10)。しかし、多量の Glyc を含有することで移植後に体液の水分を Glyc が過剰に吸着してしまい、浸出液貯留の状態を招く(48)。これは組織治癒の際に重要な役割を果たす線維芽細胞の活動が停止し、組織治癒の遅延の原因となる。胸腔内手術後の癒着防止剤などには応用が広がるが、人工血管に用いた場合には、組織治癒の遅延により、自己組織へのリモデリングが遅れる恐れがある。

そこで本章では、コーティング材としてSFにGlycを混合させ、小口径人工血管を作製し、物性試験を実施し、柔軟性が得られるかどうか検討した。また、ラットの腹部大動脈に移植し、Glyc 混合 SF でコーティングされた小口径人工血管が従来のコーティングを施した小口径人工血管と比較して、生体内で分解されやすいか検討した。

材料および方法

1. 絹小口径人工血管の作製

1-1 基盤

福井経編興業製の編機(HDR16-EL)を用いてダブルラッセルで編まれた直径

1.5mm 径の絹小口径人工血管の基盤が作製された。この状態では、セリシンが取り除かれていないため精錬する必要がある。編みこまれている内側の部位のセリシンも取り除くため、通常の糸のみの精錬とは条件が異なり、炭酸ナトリウム等の重量を増やし、基盤が劣化しない程度の条件を検討し、精錬を行った。人工血管の重量に対し、400 mg のマルセル石鹼と 200 mg の炭酸ナトリウムを 200 ml の蒸留水に溶かした。95°Cで 2 時間煮ることでセリシンを除去し、基盤の重量に対し 2 %の炭酸ナトリウムを 95°Cの 200 ml の蒸留水に溶かした水溶液を作製した。そして、この溶液ですすぎと水切り機を用いて水切りを行った。このすすぎと水切りの工程をこの後もう 2 回行い、さらに 80°Cの蒸留水で同様の工程を 3 回行い、風乾させた。

セリシンの除去は走査型電子顕微鏡(SEM)(VE-7800, KEYENCE 社, 大阪)を用いて確認した。基盤を 5×5 mm の大きさに切り取り、カーボン両面テープを用いて撮影する面が上になるように資料台に載せた。資料台を資料ホルダに装着後、これをステージにネジで固定した。さらに真空ポンプを起動し、ステージ周囲を真空状態にし

た。その後、付属の操作盤を用いて位置、倍率、コントラスト、明るさおよびフォーカスを調整し、撮影を行った。

1-2 コーティング

まず、コーティングを行うための SF 水溶液を作製した。精練された糸 1g につき、塩化カルシウム 4.6g を精製水 6g に超音波を用いて完全に溶解させた。次にエタノール 4.75 ml を塩化カルシウム水溶液に加え、糸を湯浴 70°C で 1 時間攪拌させながら溶解した。得られた SF-CaCl₂-H₂O-EtOH 溶液は濾過し、残存する固形成分を除去したのち、セルロース透析膜(36/32, MWCO 14,000, Viskase Companies, Inc 製)を用いて、蒸留水に対し 4°C にて 3 日間透析した。蒸留水は 1 日 2 回交換した。透析後の水溶液は濾過することによりゴミや不純物を除去し、SF 水溶液を得た。この水溶液が 3% w/v となるように蒸留水を加えて調整した。一方で、SF 水溶液に対しグリセリンの割合が 3% w/w となるように調整し、SF 水溶液とグリセリンが均一となるよう穏やかに混合して、Glyc 混合 SF 水溶液を作製した。それぞれの作製された水溶液にダブルラッセル編みの人工血管を完全に浸漬し、100hPa の減圧下で 30 分間静置した。浸漬後、各水溶液から基盤を取り出しファルコンチューブに入れ、液体窒素の中に 1 分間浸し、凍らせた。さらに -80°C の冷凍庫に 1 時間静置して減圧し凍結乾燥

させた。

次に、このコーティングを不溶化させるため、70%エタノール水溶液に10分間浸した。エタノールを除去するため蒸留水に浸し洗浄した後、さらに、この一連のコーティング作業を2回繰り返した。コーティングされたSFコーティングおよびGlyc混合SFコーティング人工血管は、乾燥を防ぐために蒸留水を入れたパウチの中に入れ、密封保管した。滅菌はオートクレーブで120℃、20分間行い、滅菌後は冷蔵庫(4℃)にて保管した。以後、2種類の作製された人工血管はそれぞれ、SF水溶液でコーティングされた人工血管をSFグラフト、Glyc混合SFグラフトでコーティングされた人工血管をSF+Glycグラフトと表記した。

2. 絹小口径人工血管の評価

2-1 形態観察

作製したSFグラフトおよびSF+Glycグラフトにコーティング材がどのように付着しているかを観察するため、SEMを用いて1-1.と同様の方法で外表面を観察した。

2-2. 物性試験

2-2-1. 吻合保持強度試験

吻合保持強度試験は小型卓上試験機(EZ-graph, 島津製作所, 京都)を用いて行った。人工血管を 20mm の長さに切り, 端から 1 mm の場所に 7-0 の糸をかけて, 糸の長さが 2 cm になるように反対の断端を挟んで固定し, 100 N の力で毎分 3 mm ずつ引き離して人工血管が破綻した時点で計測を終了し, 破損時点で要した力(N)を計測した。計測には人工血管を各々6本使用した。

2-2-2. 圧縮弾性率試験

圧縮弾性率試験は小型卓上試験機(EZ-graph, 島津製作所, 京都)を用いて行った。人工血管を 10 mm の長さにきり, その外径を測定した。これを圧縮台の上に設置し, 上部圧縮装置が人工血管上部に触れるまで下降させた。この時, 試験機具の距離は人工血管の外径となる。その後, ロードセル 5 N, 測定速度 2 mm/min として, 内径の 25%まで圧縮した際の試験力(N/mm²)を圧縮弾性率とした。計測には人工血管をそれぞれ 6 本使用した。

2-2-3. 周軸引張試験

周軸引張試験は小型卓上試験機(EZ-graph, 島津製作所, 京都)を用いて行った。人工血管を 5 mm の長さにきり, 六角レンチをそれぞれ左右から人工血管の内腔に通した。サンプルのたわみを補正するためにリミット 0.3%の力(0.2N)が検知された点

を原点とし，そこから試験力を測定した。その後，ロードセル 100 N，測定速度 2 mm/min として，人工血管が破綻した時点で計測を終了し，破損時点で要した力 (N) を計測した。計測には人工血管を各々 6 本使用した。

2-2-4. 透水量試験

人工血管を 70 mm の長さにきり，両端をそれぞれ幅 1 cm で機器に固定した。ペリスタルティックポンプ(MINIPULS Evolution14595400, エムエス機器)で 1 分間に 60 回の脈動が起こるように設定し，一定の速度で水を循環させ，圧センサー(耐環境デジタル圧力センサー AP-V80, KEYENCE)にて一定の圧力(18 kPa)になるように設定した。人工血管から漏れ出した水を回収し，1 分間における透水量を測定した (ml/min/5cm)。計測には人工血管を各々 5 本使用した。

3. 移植実験

3-1. 供試動物

24 頭の Sprague-Dawley(SD)ラット，雌，体重 300-400g の腹部大動脈に SF グラフトおよび SF+Glyc グラフトの計 2 種類の人工血管を移植した。使用したラットは東京農工大学「実験動物指針及び動物実験の手引き」に基づいて飼育，実験操作を実施した(承認番号：27-100)。

3-2. 移植手技

2種類の異なるコーティングで作製された小口径人工血管(直径1.5 mm 長さ1 cm)を立体顕微鏡下(LEICA M60, Leica Microsystems)で24頭のラットの腹部大動脈に移植した。移植2週間後に各6頭から、移植3ヶ月後に残りの6頭から2種類の小口径人工血管を摘出した。移植のために、ペントバルビタール(ソムノペンチル, 共立製薬)50 mg/kgを腹腔内に投与した後、手術台に固定し、切開部である腹部の毛を脱毛クリーム(ヴィート除毛クリーム HS, Veet)にて除毛した。その後腹部正中切開にて開腹し、腹部大動脈を露出した。ヘパリン(ヘパリンナトリウム注射液, 富士製薬工業)100 IU/kgを尾静脈から投与後、腎動脈より尾側領域の腹部大動脈に2箇所、血管様クリップを装着し血流を遮断した。その後、遮断部位を切断し、10 mmの移植可能な長さを確保した後、9-0 モノフィラメントナイロン糸(ナイロン糸付縫合糸, ベアーメディック)を用いて片側8-10針の単純結節縫合による端々吻合を実施した。尾側のクリップを外して人工血管の空気を追い出した後、頭側のクリップを解除した。血液の流れを確認した後、腹壁を単純結節縫合にて閉腹した。

4. 組織学的評価

4-1. 小口径人工血管の取り出し

目的とする移植期間が経過した後、移植時と同様に麻酔処置をラットに施し、腹部正中切開にて開腹した。横隔膜を切開し、胸腔内の視野を確保した後、後大静脈を外科剪刀にて切断した。その後直ちに 0.9%生理食塩水(日本薬局方生理食塩液, 扶桑薬品工業)50 ml を 18 G, 長さ 16 mm の針(注射針 18G×5/8, NIPRO)を用いて左心室から注入して灌流した。その後、人工血管を周囲の組織から剥離して摘出した。摘出された人工血管は 99.5%メタノール(試薬メタノール, 関東化学)で 1 晩固定後、中央部 4 mm を横断面で切り出した。この組織片を再度 99.5%メタノールに 30 分間浸漬させて脱水した後、キシレン(試薬キシレン, 関東化学)に 90 分間浸漬し、パラフィン包埋を実施した。包埋したサンプルは 5 μ m に薄切し、組織標本を作製した。

4-2. 病理組織学的検査

作製したパラフィン切片に定法に従いヘマトキシリン・エオジン(HE)染色, マッソン・トリクローム(MTC)染色およびエラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色を実施した。免疫組織化学染色として, α -SMA マウス抗ラットモノクローナル抗体(ニチレイバイオサイエンス社製)及び CD31 マウス抗ラットモノクローナル抗体(Lifespan BioSciences, Inc.製)を一次抗体として使用し, 次に抗マウス IgG ビオチン付き二次

抗体(ニチレイバイオサイエンス社製)で反応させた後、発色として 3-アミノ-9-エチルカルバゾール(ニチレイバイオサイエンス社製)を用いた。

4-3. 膠原線維の組織侵入率

光学顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE) で MTC 組織標本を観察し、グラフト内の膠原線維面積を測定し、人工血管の面積との比率から画像解析ソフト(BZ-II Dynamic Cell Count Ver. 1.01, KEYENCE)を用いて、組織侵入率を計測した。人工血管の面積と膠原線維面積の測定では、人工血管面積はグラフト層と内膜層の部分を測定した。また膠原線維面積は、上記人工血管面積内に認められる膠原線維部分とした。そして、それらの比率を算出し膠原線維の組織侵入率とした。以後、組織侵入率については膠原線維のものと定義した。

4-4. 統計

各種物性試験の結果および組織侵入率に関する統計学的な比較は、one-way ANOVA と Bonferroni 法に基づいて実施した。これらのデータ解析には GraphPad Prism(Version 5.0a, エムデーエフ)を用いた。統計学的有意誤差水準は 5%とした。計測数値は平均値±標準偏差で算出した。

結果

1. 人工血管の形態観察

SEMによってコーティング後のSFグラフトとSF+Glycグラフトの外側面の画像を得た(Figure 1)。SFグラフトの外表面は一部基盤が露出してはいるが、大部分は絹糸の間隙を埋めるようにコーティングがされていた。SF+GlycグラフトはSFグラフトに比較して表面に多数の孔が観察された。また一部では比較的大きな孔も観察された。

2. 物性試験

2-1. 吻合保持強度試験

SFグラフトの吻合保持強度は 7.5 ± 0.88 N, SF+Glycグラフトの吻合保持強度は 7.51 ± 0.88 Nであった。2種類の人工血管の間に有意差は認められなかった(Figure 2)。

2-2. 圧縮弾性率試験

SFグラフトの圧縮弾性率は 0.161 ± 0.0751 N/min², SF+Glycグラフトの圧縮弾性率は 0.13465 ± 0.06802 N/min²であった。2種類の人工血管の間に有意差は認められなかったが、わずかにSF+Glycグラフトが低い傾向を示した(Figure 3)。

2-3. 周軸引張試験

SF グラフトの周軸引張強度は 29.98 ± 4.338 N, SF+Glyc グラフトの周軸引張強度は 27.8 ± 3.922 N であった。2 種類の人工血管の間に有意差は認められなかった (Figure 4)。

2-4. 透水量試験

SF グラフトの透水量は 35.25 ± 2.021 ml, SF+Glyc グラフトの透水量は 41.1 ± 2.074 ml であった。2 種類の人工血管の間に有意差が認められた ($p < 0.05$) (Figure 5)。

3. 移植結果

2 種類の異なるコーティングを施した人工血管において、縫合部位に糸のほつれは認められず、また、コントロールできない出血などの合併症も認められなかった。移植を行った 24 頭のすべてのラットで、後肢の麻痺や壊死などの副反応は認められず、取り出し予定の期日まで生存していた。移植後 2 週間および 3 ヶ月で閉塞は認められず、すべての症例において開存が確認された。摘出時、人工血管に動脈瘤や肉芽腫形成などの異常所見は確認されなかった。

4. 組織学的検査

移植後 2 週間では SF グラフトおよび SF+Glyc グラフトにおいて、人工血管の周囲に多くのリンパ球、形質細胞およびマクロファージが浸潤していた。さらにマクロファージは人工血管内部の基盤の線維の周囲にも存在していた。また、好中球の浸潤も認められたが、ほかの炎症細胞と比較して少なかった(Figure 6)。線維芽細胞および膠原線維は人工血管の周囲に集簇しているのが確認された。また、膠原線維は一部で人工血管の内部および基盤の間隙にも浸潤していた(Figure 7)。平滑筋細胞は主に人工血管の周囲に浸潤していたが、膠原線維と同様に人工血管の内部にも浸潤していた。弾性線維および血管内皮細胞は確認できなかった。

移植後 3 ヶ月では SF グラフトおよび SF+Glyc グラフトにおいて、人工血管の最内層に厚い層状の構造が確認された。人工血管の周囲のリンパ球、形質細胞、マクロファージおよび好中球は減少していた。人工血管の周囲の線維芽細胞および膠原線維は、移植後 2 週間と比較して変化が認められなかったが、人工血管内部および内膜層の線維芽細胞および膠原線維は、移植後 2 週間と比較して多く浸潤していた。血管内皮細胞は人工血管の内膜層を覆うように存在していた。また、その下層に弾性線維および平滑筋細胞層が形成されていた(Figure 8)。

5. 組織侵入率

移植後 2 週間の SF グラフトの組織侵入率は $30.73 \pm 5.49\%$, SF+Glyc グラフトの組織侵入率は $37.69 \pm 5.95\%$ であった。一方, 移植後 3 ヶ月の SF グラフトの組織侵入率は $30.77 \pm 11.87\%$, SF+Glyc グラフトの組織侵入率は $52.79 \pm 14.75\%$ であった。2 種類のグラフト間で有意差は認められなかった。しかしながら, SF+Glyc グラフトにおいて移植後 2 週間と 3 ヶ月で比較した場合に有意差は認められないものの, 移植後 3 ヶ月で組織侵入率が高い傾向を示した(Figure 9)。

考察

高齢化や生活習慣の変化に伴い、心血管疾患の増加が問題視されている。中でも臨床で良好な結果の得られていない小口径人工血管に関しては、その開発が急務となっている。そこで、我々は優れた生体適合性、生分解性をもつ SF を用いて、絹基盤の上に SF でコーティングを施した絹小口径人工血管の開発を行なっている(14, 19, 22, 71)。絹小口径人工血管に用いられている SF は様々な形状にすることが可能であり、エレクトロスピンニング(37)やチューブ(11)などが試されてきた。我々も過去の実験において、塩化ビニル棒に SF 繊維を編み込み、その後、3~4 回巻くことを組み合わせ、絹小口径人工血管を作製した(14)。しかしながら、SF グラフトが長軸および斜めの方向に剪断されると端から解れるという問題点があり、強度においても PTFE や Dacron と比較して弱いという欠点が残っていた。そこで、基盤の形状としてダブルラッセルで編み込まれた人工血管を作製した。ダブルラッセル編みは従来の人工血管よりも強度に優れ、かつ適度な伸縮性も兼ね備えている。また、編み込みの隙間から細胞が侵入しやすくりモデリングに貢献することが考えられた(71)。しかしながら、この隙間は移植時に血液の漏出が起きるため、SF 水溶液でコーティングを施し隙間を埋める必要がある。しかしながら、SF でコーティングをした際に硬くなって分解されにくくなる問題点があった(19)。そこで、本実験では保湿剤として使用されてい

る Glyc に着目し, SF に添加する事で SF に柔軟性が付与できるかを検討した。本章では SF と Glyc を混合した水溶液を準備し, それをダブルラッセル編みの基盤にコーティングを施して人工血管を作製し, 物性試験および生体内移植を行って評価した。

物性試験において, 吻合保持強度, 圧縮弾性率および周軸引張強度 は SF と SF+Glyc グラフトで有意な違いは認められなかった。吻合の強度は移植時の縫合手技に影響を与えるが, SF+Glyc グラフトは従来の SF グラフトと比較して同等の強度を有していた。本章の移植実験においても移植時の人工血管の断端のほつれなどは認められず, 移植に十分耐えうる強度を有していた。圧縮弾性率において有意差は認められなかったものの, SF+Glyc グラフトは SF グラフトと比較して低い圧縮弾性率を示した。一般に圧縮弾性率が低いほうが柔軟性に優れていると考えられているが, SF と混合した Glyc が SF に柔軟性を付与した可能性が示されたが, 有意差はなかったことから, 柔軟性の付与に関しては Glyc の含有濃度を増加させるなどのコーティング方法を再考する必要があると思われる。周軸引張強度は2種類のグラフト間で有意差は認められなかった。周軸引張強度は移植後に拍動する動脈に移植するためには十分な強度が必要とされるが, 本章において, SF+Glyc グラフトは SF グラフトと同等の強度を保ち, 移植後3ヶ月の時点において, 人工血管の破断や動脈瘤は認められなかった。以上のことから, SF+Glyc コーティングは柔軟性については改善の必

要性があるが、小口径人工血管としての強度は十分なものであった。

透水量試験においては SF+Glyc グラフトは グラフトと比較して有意に透水量が多かった。これはコーティング後 SF+Glyc グラフトにおいて、エタノールによる不溶化処理の際にコーティング部分の Glyc が一部抜け、その箇所が孔になったと考えられた。しかしながら、SF+Glyc グラフトの全てにおいて移植時にコントロールできないほど出血及び移植後の腹腔内出血などの副反応が認められなかったことから、血液漏出を防ぐためのコーティングとしての機能は十分に果たしていると考えられた。

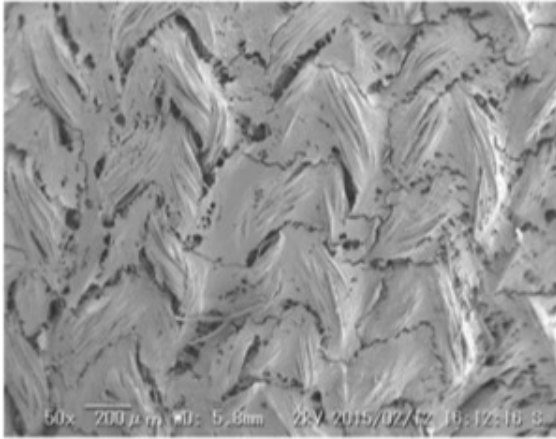
移植後 2 週間では SF+Glyc グラフトの周囲にリンパ球、マクロファージおよび好中球などの炎症細胞が多く認められたが、移植後 3 ヶ月の時点ではそれらは減少していた。そして、移植後 3 ヶ月の時点で血管内皮細胞が人工血管の内側を覆うように生着し、その下層に平滑筋細胞や弾性線維の存在を確認できた。Glyc はその保湿力の高さから生体内で滲出液貯留を引き起こすことが知られているが(48)、本章で使用された SF+Glyc グラフトにおいては異物反応などによる肉芽形成や滲出液貯留によるリモデリングの遅れは認められなかったことから、本章で使用した濃度の Glyc 混合 SF コーティングは絹小口径人工血管のコーティングとして使用できることが証明された。また、移植後 3 ヶ月の時点での組織侵入率が SF+Glyc グラフトで高かったことから、Glyc を SF に混合することでコーティングが多孔質になり、移植後よ

り多くの組織侵入が起きたことが考えられた。過去の報告により膠原線維の組織侵入が内皮化を促進することが明らかになっていることから(49)、小口径人工血管における SF+Glyc コーティングの有用性が示された。

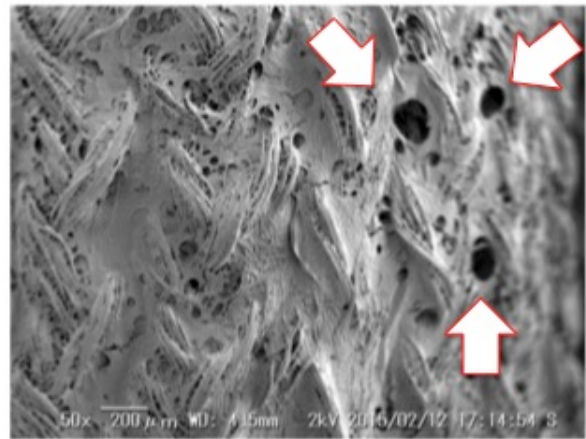
本章で使用された Glyc 混合 SF コーティングを用いて作製された人工血管はラットの腹部大動脈に移植した際、高い開存率および自己組織へのリモデリング能を発揮した。しかしながら、本来の目的でもあった柔軟性については十分な結果が得られなかった。SF は高い生分解性を保有することから、不溶化処理をせずに用いた場合に生体内で早期に分解されてしまい医療材料として用いる事は出来ないとされている。人工血管の場合、コーティングに不溶化処理を行わない状態で体内に埋め込まれると、移植後早期に分解されて大量出血を起こす危険性がある。そのため、我々は絹人工血管の不溶化処理にはエタノールを用いてきた(46)。しかしながら、この不溶化処理によって SF の急激な構造の変化が起き、硬くなっている可能性が考えられた(38)。そのため、今後はより柔軟なコーティング方法を考えた場合、エタノールを用いずに SF を不溶化できるかどうか検討していく必要がある。また、本章では 3%濃度の SF 水溶液に 3%Glyc 水溶液を混合してコーティング溶液を作製したが、SF に対して Glyc の割合を増加させることにより SF に柔軟性を付与できることから、SF と Glyc の混合比率も再検討する必要があると考えられた。

小括

絹小口径人工血管は基盤とコーティング部分からなり、基盤の改良は行われていたが、コーティング部分においては SF が硬く分解されにくい問題があった。そこで、本章ではコーティング部分の SF に Glyc を混合することで、柔軟性を付与し、生体内で分解されやすくなる人工血管の作製を目指した。従来の SF のみでコーティングを施した人工血管と SF と Glyc を混合させてコーティングを施した人工血管の 2 種類をそれぞれ、物性試験およびラットの腹部大動脈への移植試験を行った。SF+Glyc グラフトは従来の SF グラフトと比較して、人工血管のコーティング部分がより多孔質になることがわかった。また、生体内評価において、副反応が生じることなく移植は可能であり、移植 3 ヶ月後において自己組織によるリモデリングが確認された。以上の結果から、Glyc 混合 SF コーティングの有用性が明らかとなった。しかしながら、従来の SF コーティングと比較して、柔軟性およびリモデリング能力については違いが認められなかったことから、コーティング部分の SF の更なる改良の必要性がある。



SF グラフト



SF+Glyc グラフト

Figure 1 絹小口径人工血管の外表面の SEM 画像

SF グラフト(左)の外表面はSFで全体的に覆われている。SF+Glyc グラフト(右)においてはグラフトの外表面に多数の孔が観察された。また、比較的大きな孔(赤矢印)も複数観察された。

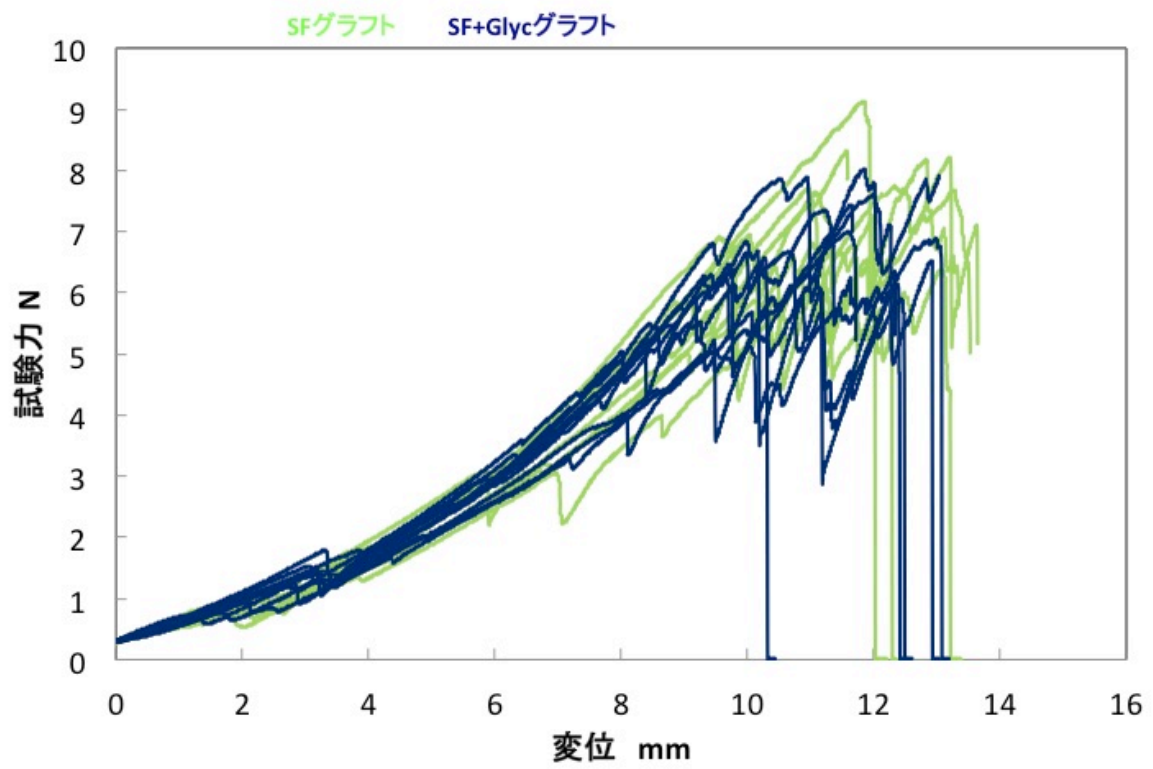


Figure 2 吻合保持強度試験 (n=6)

SF グラフト(緑線)と SF+Glyc グラフト(青線)の吻合保持強度に有意な差は認められなかった。

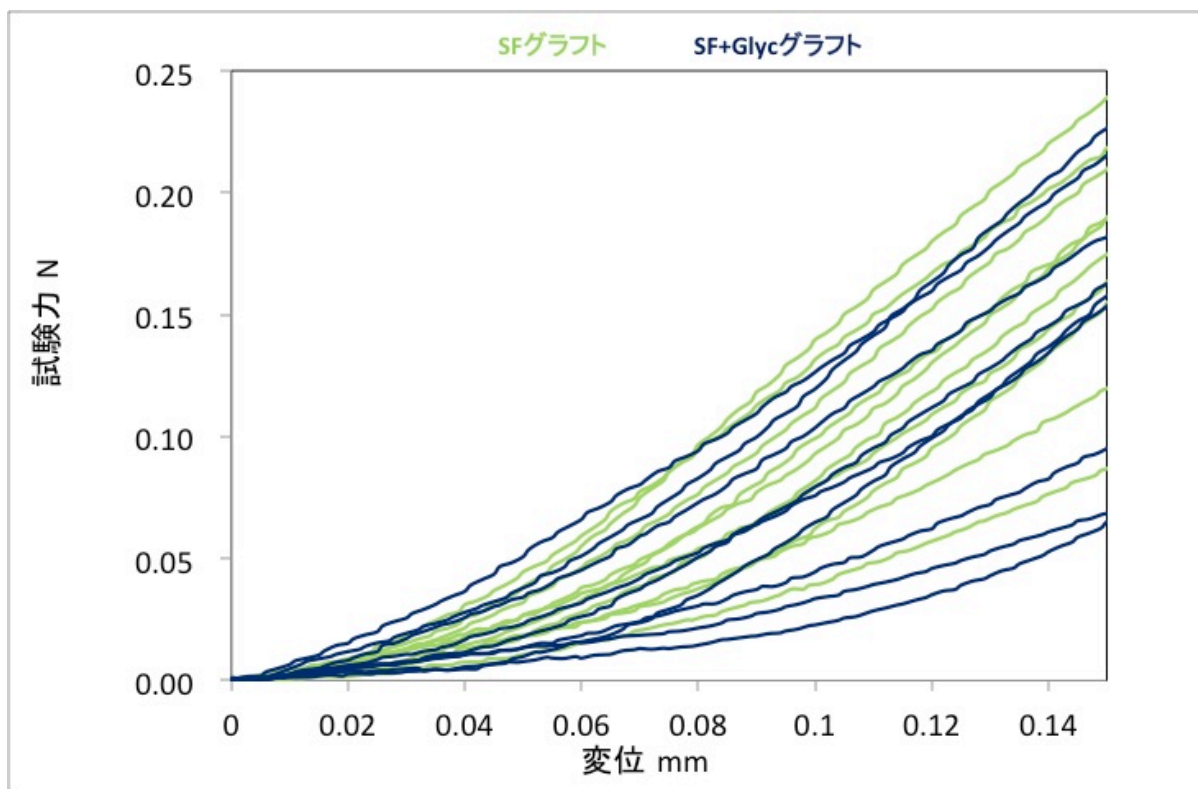


Figure 3 圧縮弾性率試験 (n=6)

SF グラフト(緑線)と SF+Glyc グラフト(青線)の圧縮弾性率に有意な差は認められなかったが、わずかに SF+Glyc グラフトが低い傾向を示した。

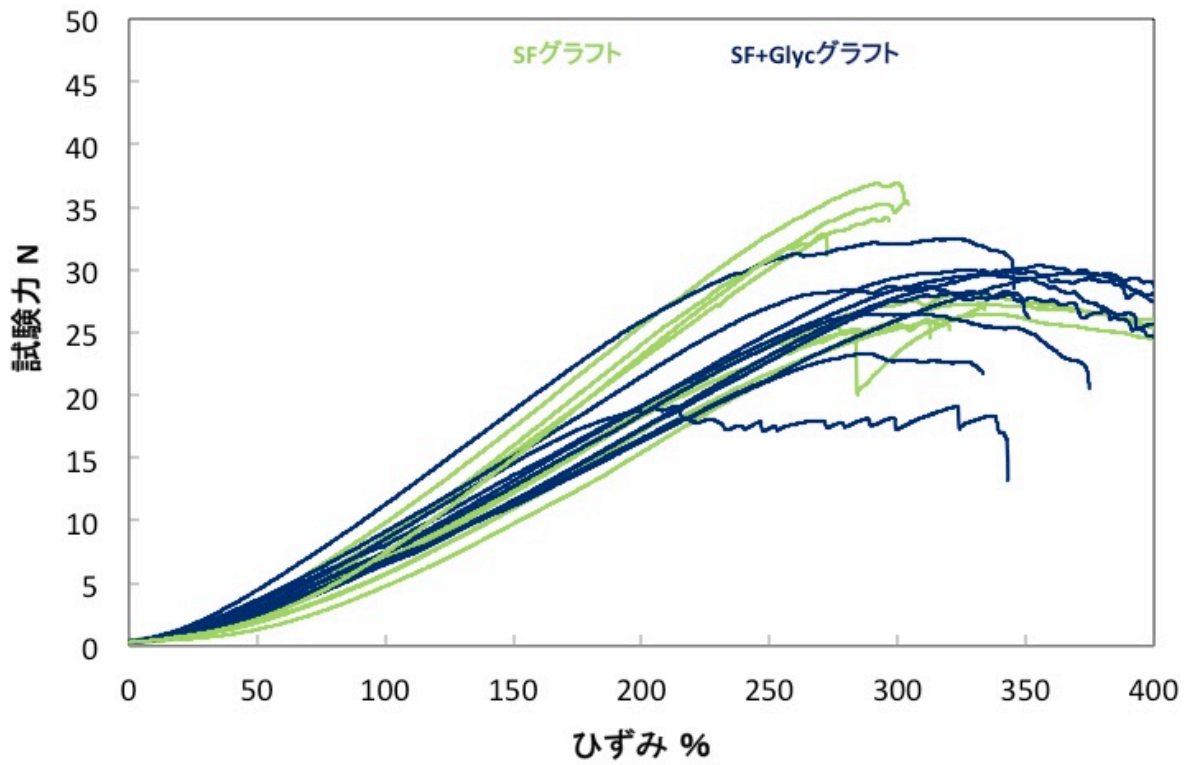


Figure 4 周軸引張試験 (n=6)

SF グラフト(緑線)と SF+Glyc グラフト(青線)の周軸引張力に有意な差は認められなかった。

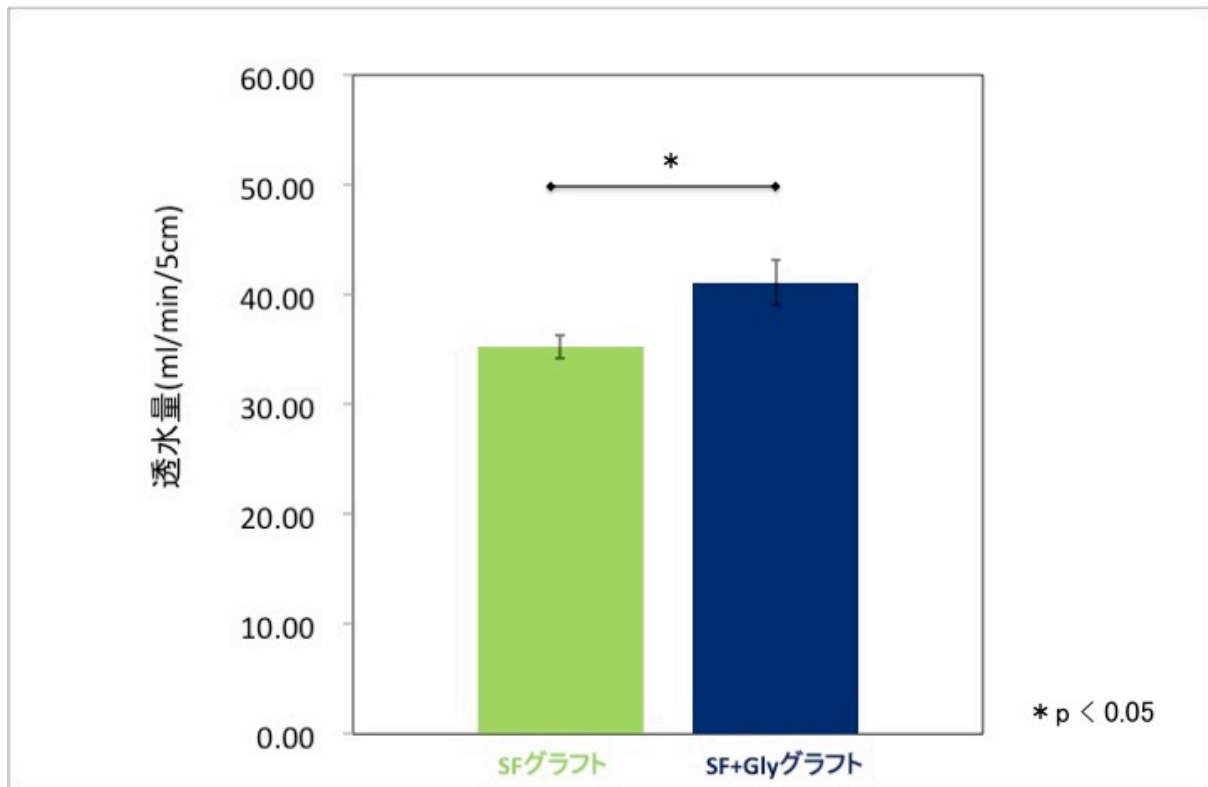


Figure 5 透水量試験 (n=5)

SF+Glyc グラフト(青棒)の透水量は SF グラフト(緑棒)と比較して有意に透水量が高かった(p < 0.05)。

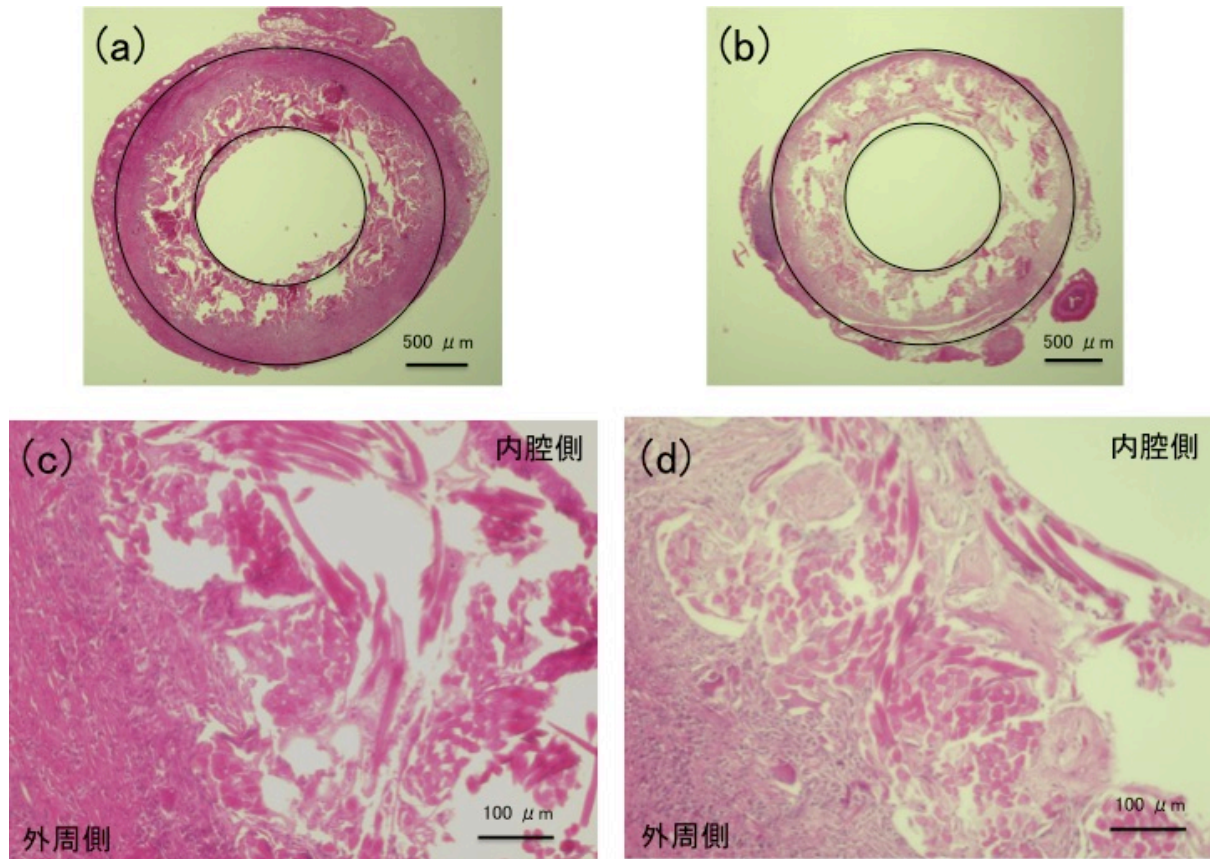


Figure 6 移植 2 週間後の SF グラフトおよび SF+Glyc グラフト

HE 染色を行なった SF グラフト(a), およびその高倍率像である(c)と SF+Glyc グラフト(b), およびその高倍率像である(d)の組織画像。人工血管の領域を 2 重の黒丸で示した。2 種類のグラフトにおいて炎症細胞の集簇がグラフトの外周側で主に認められた。

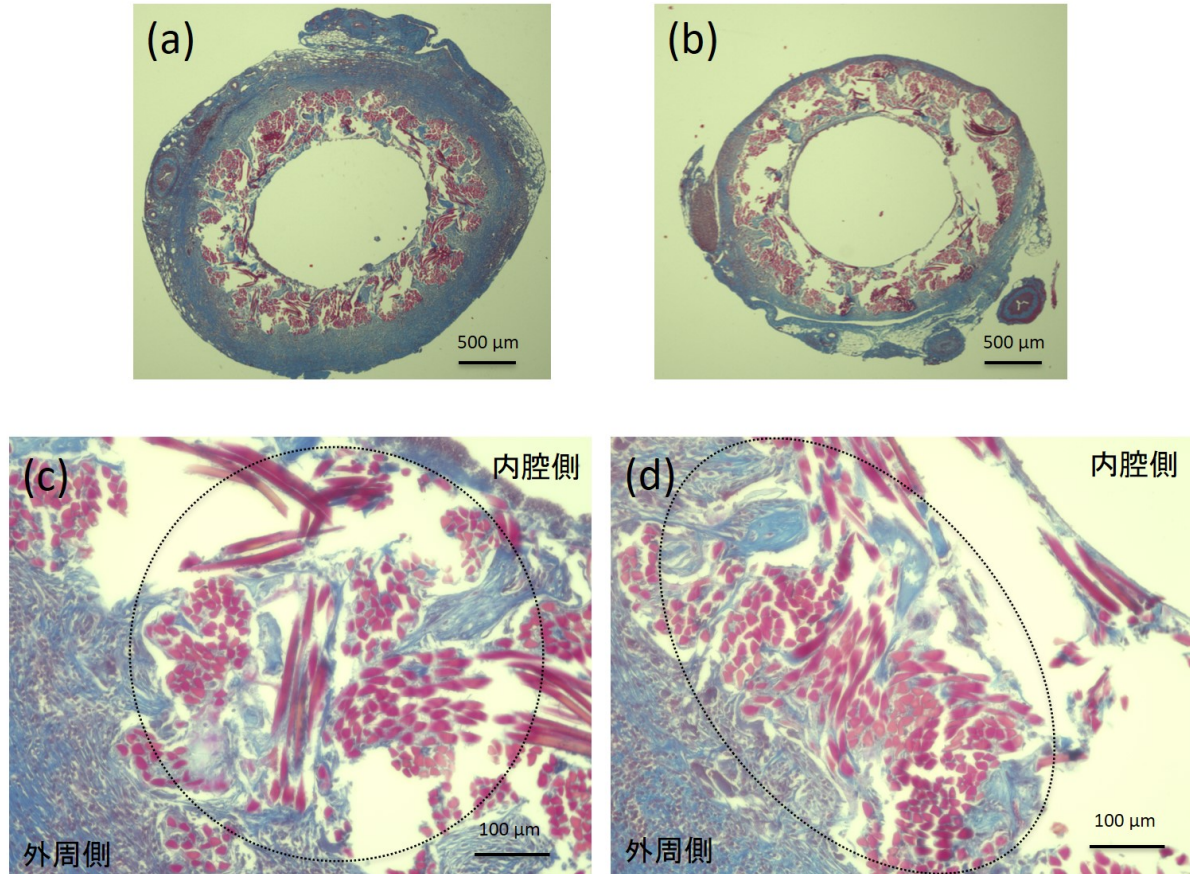


Figure 7 移植 2 週間後の SF グラフトおよび SF+Glyc グラフト

MTC 染色を行なった SF グラフト(a), およびその高倍率像である(c)と SF+Glyc グラフト(b), およびその高倍率像である(d)の組織画像。2 種類のグラフトにおいて、膠原線維および線維芽細胞は主にグラフトの外周に沿って集まっていたが、その一部はグラフト内へ侵入していた。また、SF 基盤の繊維の間にも膠原線維の侵入が認められた(丸印)。

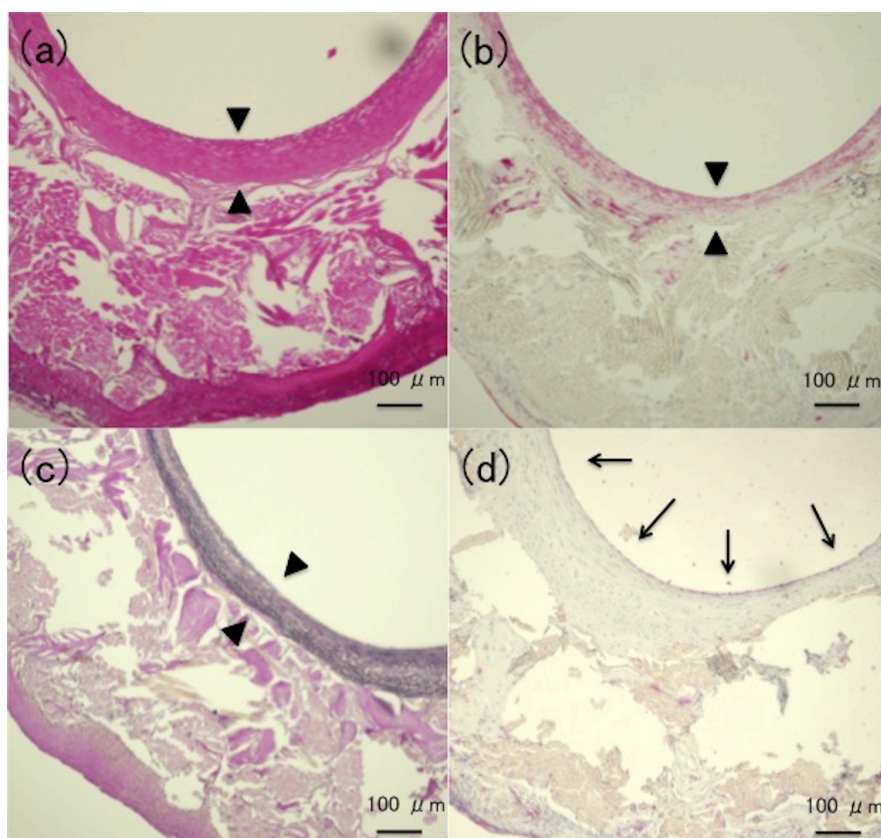


Figure 8 移植後 3 ヶ月の SF+Glyc グラフトの組織画像

SF+Glyc グラフトの HE 染色(a), α -SMA 染色(b), EVG 染色(c)および CD31 染色画像。移植後 3 ヶ月では内膜に厚い層状の構造物が確認された(矢頭)。それらは血管内細胞がもっとも内側を覆っており(矢印), その下層に弾性線維および平滑筋細胞が確認された(矢頭)。

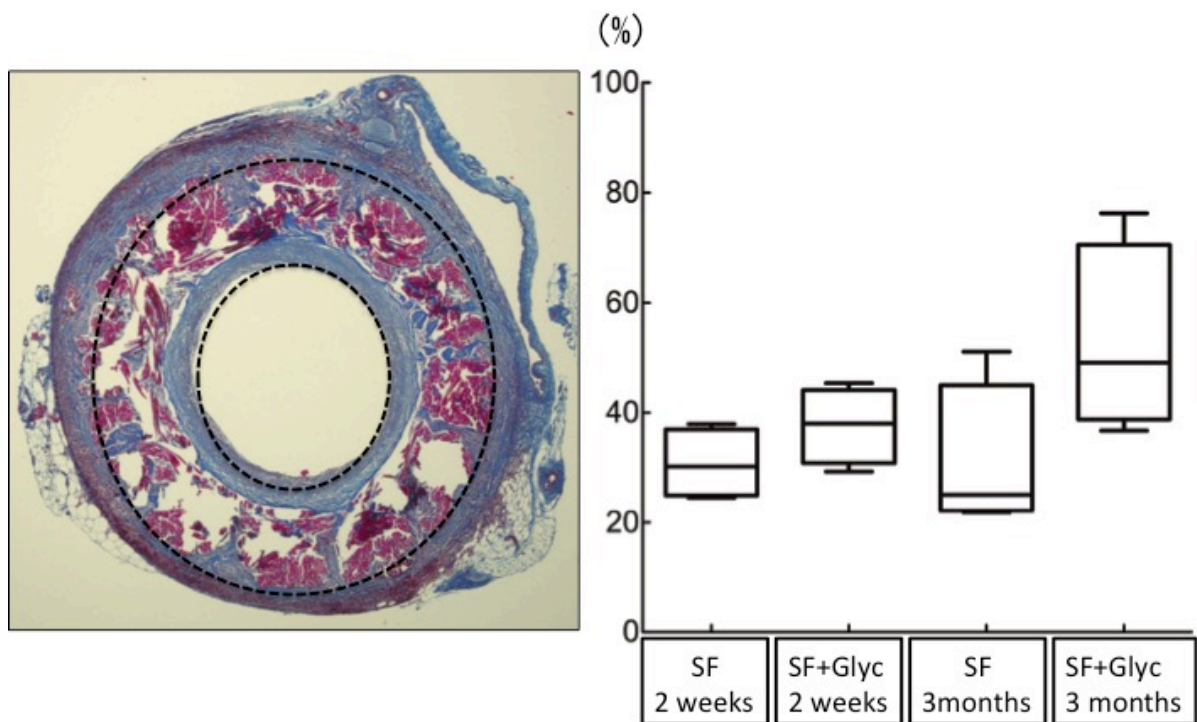


Figure 9 移植 3 ヶ月後の SF+Glyc グラフトの MTC 染色画像(左), 移植 2 週間後
および 3 か月後における膠原線維の組織侵入率(右)

組織侵入率において、人工血管の面積は点線内の範囲の全組織面積を測定し、膠原線維面積は人工血管内の膠原線維の面積を測定した。移植 2 週間後および 3 か月後では SF グラフトと SF+Glyc グラフト間で有意差は認められなかった。しかしながら、移植 3 ヶ月後では SF+Glyc グラフトが SF グラフトと比較して組織侵入率が高かった。

第 2 章

絹小口径人工血管における 3 種類の多孔質コーティングの検討

緒言

これまで、絹小口径人工血管の作製にあたりその基盤とコーティング部位にSFを用いてきた。SFを用いる利点としては、高い生体適合性および生分解性であり、高い開存率とリモデリング能力が求められる小口径部位において、これらの特徴は血栓形成や内膜肥厚を防ぐ上で非常に重要である。絹小口径人工血管のコーティングでは、コーティング処理の最後にSFをエタノールに浸すが、このエタノール処理を行うことでSFを不溶化させ、湿潤な環境下でもSFが溶けださないようにしていた。その処置を行うことで、移植時にも血液の漏出が生じないようにしていた。しかしながら、SFはエタノールを用いて不溶化処理を行うと、βシート構造を優先的に形成し、硬く分解されにくい構造へと変化する(5)。分解されにくいコーティングでは、その部位に細胞成分が侵入できず、SFの利点であるリモデリング能という特徴を損ねてしまう。また、コーティング部位が硬い場合、自己血管とのコンプライアンスの不一致により、血栓形成や内膜肥厚といった副反応を起こしてしまう可能性がある。したがって、硬く分解されにくいコーティングを改善する必要があった。

新しいコーティング方法として第1章ではSFにGlycを混合させて、柔軟性と分解性を向上させるコーティングを開発した。SFとGlycを混合させることで、SFコーティング部分のGlycが抜け落ち、多孔質になることで、移植後に自己細胞の組織侵入が容

易になり、リモデリング能が向上することが判明した。しかしながら、柔軟性を付与することができず、従来のSFのみのコーティングと比較して物性試験および生体内でのリモデリング能についても有意な違いを得ることができなかった。そのため、エタノールを使用せずに新たなSFコーティングを行う必要があった。

そこで本章では第1章で使用したGlycに加えて、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル (PGDE) およびポリエチレングリコール (PEG) をSFと混合させて、新たなコーティング法について検討した。PGDEは塩素系溶剤の安定剤や架橋剤として用いられている化合物である。PGDEとSFの研究は以前から行われており、混合させることでSFに柔軟性を付与する結果が得られている(42, 43)。PEGはエチレングリコールが重合した化合物であり、界面活性剤や潤滑剤として用いられることが多い。また、高い水溶性および生体適合性を有し、様々な生体材料として用いられ、その用途は多岐に及ぶ(70)。SFとPEGの研究も多く行われおり、SFと混合することで分解性が向上することが知られている(38)。Asakuraらはこれら3種類の化合物を孔源として、SFと混合することで、エタノールを用いずにSFを不溶化させ、SFスポンジを作製することに成功した。このSFスポンジと同様の作製方法を用いることで、人工血管のコーティングにも応用することが可能である。さらに、これらの作製された3

種類のスポンジは生体内で分解されやすい構造をしていることを核磁気共鳴装置を用いて解析した(5)。

以上のことから本章では, Glyc, PGDEおよびPEGの3種類の孔源を用いて不溶化されたSFコーティングを用いて絹小口径人工血管を作製した。そして, 第1章と同様に物性試験およびラットへの移植実験を行い, 有用性について評価を行った。

材料および方法

1. 絹小口径人工血管の作製

1-1. 基盤

第1章と同様の方法を用いてダブルラッセルで編まれた直径1.5 mmの小口径人工血管の基盤を作製した。その後、セリシンを除去するため精練を行い、SFのみの基盤を作製した。

1-2. コーティング

SFコーティングの製造方法をFigure 1に示した。まず、作製された直径1.5 mmの人工血管に1.5 mmのPTFE棒を挿入し、3種類の孔源、PEG,PGDEおよびGlycとSF(2.5 % w/v)の重量比を1:1に調整した水溶液が入っているパイプの中に浸漬させた。パイプをガラス製デシケーターに入れ、人工血管表面から気泡が出てこなくなるまで内部を100 hPaの減圧下に維持した。その後、人工血管を-20℃で一晩凍結させた。人工血管を3日間蒸留水のなかに浸漬させ、3種類の孔源を完全に除去した。その後、蒸留水を入れたパウチの中に入れ、密封保管した。滅菌はオートクレーブで120℃、20分間行い、滅菌後は冷蔵庫(4℃)にて保管した。以後、本章では、3種類の孔源を用いて作製した絹小口径人工血管をそれぞれ、PEG-SF、PGDE-SFおよびGlyc-SFとし

た。また、ラットへの移植実験でコントロールとして使用する人工血管はSFのみの水溶液に浸漬させ、その後、第1章と同様に70% エタノールに浸し不溶化処理を行った。以後、本章ではこの人工血管をEtOH-SFとした。

2. 絹小口径人工血管の評価

2-1. 形態観察

作製した4種類の人工血管はコーティング材がどのように付着しているかを観察するため、SEMを用いて1-1.と同様の方法で内・外表面を観察した。

2-2. 生分解性試験

4種類の人工血管(EtOH-SF, PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF)をプロテアーゼ14(1 U/ml)が含有しているリン酸緩衝食塩水中で37°C, 24時間インキュベートした。その後、SEMを用いて、1-1.と同様の方法で内・外表面を観察し、生分解前の画像と比較した。

2-3. 物性試験

3種類の孔源を用いて作製したPEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF の吻合保持強

度(N), 圧縮弾性率(N/min²)および周軸引張強度(N)を第1章と同様に行った。

3. 移植実験

3-1. 供試動物

雄 24 頭, 雌 24 頭の計 48 頭の Sprague-Dawley(SD)ラット(体重 300-400g)の腹部大動脈に EtOH-SF, PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF の計 4 種類の人工血管を移植した。使用したラットは東京農工大学「実験動物指針及び動物実験の手引き」に基づいて飼育, 実験操作を実施した(承認番号: 28-88)。

3-2. 移植手技

4種類の異なるコーティングで作製された小口径人工血管(直径1.5 mm 長さ3 cm)を立体顕微鏡下(LEICA M60, Leica Microsystems)で48頭のラットの腹部大動脈に移植した。移植2週間後に各 6 頭から, 移植3ヶ月後に残りの6頭から各4種類の小口径人工血管を摘出した。移植方法は第1章と同様に行った。

4. 組織学的評価

4-1. 小口径人工血管の取り出し

目的とする移植期間が経過した後、移植時と同様に麻酔処置をラットに施し、第1章と同様の方法で人工血管を摘出し、メタノールにて固定した。その後、3 cm の人工血管中央部(1 cm)を長軸方向に切断し、そこから頭尾側方向にそれぞれ 4 mm 幅で短軸方向に切断した(Figure 3)。その後、第1章と同様の方法で組織標本を作製した。

4-2. 病理組織学的検査

作製したパラフィン切片に定法に従いヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびマッソン・トリクローム(MTC)を実施した。免疫組織化学染色として、 α -SMA マウス抗ラットモノクローナル抗体(ニチレイバイオサイエンス社製)及びCD31 マウス抗ラットモノクローナル抗体 (Lifespan BioSciences 社製) を一次抗体として使用し、次に抗マウス IgG ビオチン付き二次抗体(ニチレイバイオサイエンス社製)に反応させた後、発色として α -SMA には Vectastain ABC-AP(Vector laboratories 社製)を CD31 には ImmPACT DAB ペルオキシダーゼ基質キット(Vector laboratories 社製)を用いた。

4-3. 組織侵入率

光学顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE)で MTC 組織標本を観察し、グラフト内の膠原

線維面積を測定し、人工血管の面積との比率から画像解析ソフト(BZ-II Dynamic Cell Count Ver. 1.01, KEYENCE)を用いて、組織侵入率を計測した。人工血管の面積と膠原線維面積の測定では、人工血管面積はグラフト層と内膜層の部分を測定した。また膠原線維面積は、上記人工血管面積内に認められる膠原線維部分とした。そして、それらの比率を算出し膠原線維の組織侵入率とした。

4-4. 統計

各種物性試験の結果および組織侵入率に関する統計学的な比較は、one-way ANOVA と Bonferroni 法に基づいて実施した。これらのデータ解析には GraphPad Prism (Version 5.0a, エムデーエフ)を用いた。統計学的有意誤差水準は 5%とした。計測数値は平均値±標準偏差で算出した。

結果

1. 人工血管の形態観察

コーティングを施す前の人工血管の基盤, EtOH-SF, PEG-SF, PGDE-SFおよびGlyc-SFの内面および外面の形態のSEM写真をFigure 2 に示した。コーティングなしの人工血管ではダブルラッセルで編み込まれている基盤が確認され, 線維間の間隙が明瞭に確認できた。EtOH-SF, PEG-SFおよびPGDE-SFの内表面および外表面のコーティングは基盤を覆っていることが確認された。しかしながら, Glyc-SFでは内表面のコーティングは十分だったが, 外面には少量のコーティングしか付着していなかった。同時にプロテアーゼ14を用いて37℃, 24時間インキュベートした後のEtOH-SF, PEG-SF, PGDE-SFおよびGlyc-SFの内面および外面を観察した。EtOH-SFの24時間後のコーティング量は少なくなっていたが, 特にグラフトの内側面でより多く残存していた。PEG-SFおよびPGDE-SFでは24時間後にわずかにコーティングは残っていたが, EtOH-SFと比べて少量であった。特にGlyc-SFでは, 24時間後のグラフトの内・外表面のコーティングは, ほぼ残存していなかった。

2. 物性試験

2-1. 吻合保持強度試験

PEG-SF の吻合保持強度は 6.073 ± 1.426 N, PGDE-SF の吻合保持強度は 6.33 ± 0.755 N, Glyc-SF の吻合保持強度は 6.14 ± 1.234 N であった。3 種類の人工血管の間に有意差は認められなかった (Figure 4)。

2-2. 圧縮弾性率試験

PEG-SF の圧縮弾性率は 0.0215 ± 0.0053 N/min², PGDE-SF の圧縮弾性率は 0.0145 ± 0.0033 N/min², Glyc-SF の圧縮弾性率は 0.013 ± 0.0027 N/min² であった。PGDE-SF および Glyc-SF が PEG-SF と比べて、有意に圧縮弾性率が低かった (Figure 5)。

2-3. 周軸引張試験

PEG-SF の周軸引張強度は 48.55 ± 2.275 N, PGDE-SF の周軸引張強度は 46.035 ± 7.165 N, Glyc-SF の周軸引張強度は 48.552 ± 2.275 N であった。3 種類の人工血管の間に有意差は認められなかった (Figure 6)。

3. 移植結果

4 種類の異なるコーティングを施した人工血管において、縫合部位に糸のほつれは

認められず、また、コントロールできない出血などの合併症も認められなかった

(Figure 7)。移植を行った 48 頭のすべてのラットで、後肢の麻痺や壊死などの副反応は認められず、取り出し予定の期日まで生存していた。第 1 章と同様に、移植 2 週間後および 3 ヶ月後で閉塞は認められず、すべての症例において開存が確認された。摘出時、人工血管に動脈瘤や肉芽腫形成などの異常所見は確認されなかった。

4. 組織学的検査

移植2週間後のHE染色では、EtOH-SFと比較して3種の孔源を使用して作製した人工血管では、グラフトの周囲および内部に好中球、リンパ球、マクロファージおよび線維芽細胞を含む炎症細胞が多く集簇していた。また、これらのグラフトの内腔は狭くなっていたが、閉塞は確認されなかった(Figure 8)。移植3ヶ月後では、4種類の人工血管で、グラフトの周囲および内部の炎症細胞が減少し、内腔表面に沿って厚い層状の構造物が存在していた(Figure 9)。これらの層状の構造物は、第1章と同様に血管内皮細胞、平滑筋細胞および弾性線維から構成されていた。また、4種類の人工血管において、この層状の構造物の厚さに違いは認められず、内膜肥厚や血栓形成も確認できなかった。移植2週間後のMTC染色では、膠原線維がグラフトの周囲に集まっていた。特に、PEG-SF, PGDE-SFおよびGlyc-SFのグラフトの周囲にはEtOH-SF

よりも多くの膠原線維が観察された。また、この現象はグラフトの内部についても同様であった(Figure 10)。移植3ヶ月後では、4種類のグラフトの全てにおいてグラフト周囲の膠原線維は減少していた。また、EtOH-SFにおいてはグラフト内部の膠原線維は移植2週間後と比べて増加していたが、PEG-SF、PGDE-SFおよびGlyc-SFにおいては変化していなかった(Figure 11)。移植2週間後の α -SMA染色において、EtOH-SFはグラフトの周囲に主に平滑筋細胞が集まっているのが観察されたが、PEG-SF、PGDE-SFおよびGlyc-SFにおいては、平滑筋細胞はグラフトの内側の内腔に沿って集まっていた(Figure 12)。移植3ヶ月後では、4種類のグラフトの全てにおいてグラフトの内腔に平滑筋細胞が集まっていた。これらの平滑筋細胞の厚さにおいて、4種類のグラフトの間に有意差は認められなかった(Figure 13)。

血管内皮細胞のリモデリングを評価するため、移植した人工血管の中央部(10 mm)を観察した。血管内皮細胞は移植2週間後では、いずれのグラフトにおいても観察する事は出来なかった。しかしながら移植3ヶ月後において、4種類のグラフトの全てにおいて血管内皮細胞が確認された。EtOH-SFおよびPEG-SFにおいては、血管内皮細胞はグラフトの中央部に断続的に認められたが、PGDE-SFおよびGlyc-SFにおいては、血管内皮細胞はグラフト中央部の全域に沿って、途切れる事なく繋がっている事が確認された(Figure 14)。

5. 組織侵入率

移植 2 週間後の EtOH-SF の組織侵入率は $12.63 \pm 4.297\%$, PEG-SF の組織侵入率は $17.44 \pm 6.687\%$, PGDE-SF の組織侵入率は $30.186 \pm 8.878\%$ および Glyc-SF の組織侵入率は $31.526 \pm 3.883\%$ であった。一方, 移植 3 ヶ月後の EtOH-SF の組織侵入率は $20.536 \pm 2.781\%$, PEG-SF の組織侵入率は $20.772 \pm 10.154\%$, PGDE-SF の組織侵入率は $39.648 \pm 8.151\%$ および Glyc-SF の組織侵入率は $30.095 \pm 9.089\%$ であった。移植 2 週間後では, EtOH-SF と PEG-SF ($p < 0.05$), EtOH-SF と PEG-SF ($p < 0.01$), EtOH-SF と Glyc-SF ($p < 0.001$) および PEG-SF と Glyc-SF ($p < 0.05$) との間に有意差が認められた。移植 3 ヶ月後では, EtOH-SF と PEG-SF ($p < 0.05$) および EtOH-SF と Glyc-SF ($p < 0.05$) との間に有意差が認められた (Figure 15)。

考察

SFはその優れた機械的特性および生体適合性、更には、線維、粉末、フィルム、ゲル、スポンジのような様々な形状に加工が可能な事から、有望な生体材料として使用されてきた(38, 63)。特に、SFスポンジは人工血管のコーティング材料として、優れた足場材料として使用されてきた(16)。一般に、SFスポンジで人工血管にコーティングをする際、SF水溶液を凍結乾燥させる事で固めていた。しかしながら、この状態では水に溶けやすく、生体内に移植する場合に不溶化処理が必要であった。この処置には主にエタノールが使用されていたが、それによってSFスポンジが硬く、分解されにくくなり、リモデリングの遅れや移植した人工血管と自己血管との間に剛性の不一致が生じ、内膜肥厚や血栓形成を生じさせる危険性があった(7)。そのため、エタノールを使用せずに不溶化処理を行い、人工血管にコーティングを行う必要があった。そこで、本章では孔源としてPEG, PGDEおよびGlycを使用し、SF水溶液を不溶化させコーティングを施した絹小口径人工血管を作製した。

ダブルラッセルで編まれた人工血管は基盤とコーティングから構成されるが、基盤全体をコーティングで覆うことにより、移植中の血液の漏出を防ぎ、縫合中の糸による人工血管の裂開を防ぐ(71)。このコーティング材はグラフトの強度、硬さ、操作性そして移植後の組織侵入に影響を及ぼすと考えられている(16)。本章においても第1

章と同様に、吻合保持強度、周軸引張強度、圧縮弾性率を測定し、PEG-SF、PGDE-SF および Glyc-SF の強度と硬さについて調べた。移植前に吻合保持強度および周軸引張強度を調べることは、移植時に縫合糸によってグラフトが縦方向に裂けないか、そして移植後の血流の拍動に耐えられるかを評価できるため、とても重要である。本章では PEG-SF、PGDE-SF および Glyc-SF は過去の研究で作製された人工血管と比較して移植に必要な強度を有していた(19, 71)。さらに、圧縮弾性率は PGDE-SF および Glyc-SF は PEG-SF よりも有意に低かった。低い弾性率は柔軟性があると考えられているため、PGDE および Glyc は PEG に比べて SF に柔軟性を付与できる可能性が示された。

手術時の操作性および生物学的応答を調べるため、4種類の異なるコーティングを施した人工血管をラットの腹部大動脈へそれぞれ移植した。コーティングの量および濃度が高ければ高いほど操作性は良好になるが、移植後の組織侵入やリモデリングが遅れる原因となる。本章ではコーティングに用いられた SF の濃度が4種類とも 2.5% に固定されていたため、操作性について明らかな違いは認められなかった。また、透量試験は本章では行われなかったが、人工血管の移植時にクランプを外した後、わずかな血液の漏出が吻合部およびグラフトから確認されたが、4種類のすべてのグラフトにおいて軽度の圧迫で止血のコントロールが可能であったため、移植には問題ない

と考えられた。

プロテアーゼ 14 を用いた生分解性試験において、PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF のグラフト表面の SF の量が少なかった為、移植後の血漏れや動脈瘤の形成などが懸念されたが、移植 2 週間後および 3 ヶ月後の摘出時に人工血管の破綻や変形は確認されず、また、失血による死亡例も確認できなかったことから本章で用いたコーティング方法は小口径人工血管に対して有用であると考えられた。また、プロテアーゼ 14 は SF の生分解性試験に主に用いられてきているが、哺乳類は生体内にこの酵素を保有しておらず、実験用に合成されたものであり(26)、本章の生分解性試験において過剰に分解された可能性が考えられた。Fukayama らの研究において、絹小口径血管に用いるコーティング濃度を検討した際、2.5%濃度が最もリモデリング能力が高く、操作性についても問題ないことが判明している(16)。その為、今現在、絹小口径人工血管にコーティングを施す際の SF 水溶液の濃度は 2.5%で統一されている。しかしながら、この研究ではエタノールを用いて不溶化している為、コーティングの SF は硬く分解されにくい状態であった。その為、本章で用いられたコーティングを施した時には SF 水溶液の濃度を上げて、基盤全体を覆うことで移植時の血液の漏出をさらに少なくすることが可能であると考えられた。

移植 2 週間後において、エタノールを用いないで不溶化処理した PEG-SF,

PGDE-SF および Glyc-SF では EtOH-SF と比較して炎症細胞の集簇および人工血管内部への組織侵入率が高かった。より多くの細胞がグラフト内に侵入したことにより、グラフト内腔がやや狭くなっていたが、PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF で内膜肥厚による狭小化や閉塞は認められなかった。また、平滑筋細胞のグラフト内腔への集簇が PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF で観察された。エタノールで不溶化处理した EtOH-SF や第 1 章で用いた人工血管ではこれらの反応は移植 3 ヶ月後で観察されたことから、PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF はコーティング部分の SF が移植後すぐに溶解して SF としての効果を発揮し、平滑筋細胞の生産および伸展を促したと考えられた。移植 3 ヶ月後において、EtOH-SF ではグラフトへの組織侵入率は移植 2 週間後と比較して増加していたが、この結果は以前の研究で報告されたものと同じ傾向を示している(16, 19)。一方、PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF では移植 2 週間後と比較して、組織侵入率は殆ど変化が見られなかった。この結果からも移植後 2 週間以内にコーティング部分の SF が分解し、膠原線維がグラフト内部へ侵入してリモデリングが促進されたことが考えられた。

移植 3 ヶ月後において、人工血管の中央部で血管内皮細胞のリモデリングについて評価を行った。血管内皮細胞が生着することで小口径部位でも血栓形成を抑制すると考えられているため(62)、移植後の内皮化は開存率を高くする上で非常に重要である。

本章では PGDE-SF および Glyc-SF で移植 3 ヶ月後に人工血管の中央部の内皮化が完了していた。長さが 30 mm の人工血管の中央部の内皮化は吻合部からの伸展，グラフトの外側からの毛細血管の侵入(50)および血流中の血管内皮前駆細胞の接着などによって行われるが(40)，血管内皮細胞の下層に平滑筋細胞や膠原線維の組織侵入が十分でなければ生着しないため(33)，移植後早期に分解され，リモデリング機能を促進するコーティングは内皮化にとって非常に重要であると考えられた。

本章の結果から，エタノールを用いないで不溶化処理を施した PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF は従来のコーティング法と比べて，生体内で分解されやすくリモデリング能力に優れていることが判明した。また，SF コーティングに不溶化処理するために用いる孔源としては，人工血管に柔軟性を付与でき，リモデリング能力にも優れていた PGDE および Glyc が PEG と比較してより優れていると考えられた。

小括

これまでの絹小口径人工血管のコーティングにおいては、コーティングされた SF にエタノールで不溶化処理を施すことで、移植後、生体内で早期に溶解することを防ぎ、出血が起きないようにしていた。しかしながら、エタノールによって SF の構造変化が誘発され、コーティング部分の SF が硬く分解されにくくなっていたことが考えられた。そこで本章では 3 種類の孔源として PEG, PGDE および Glyc を用いて SF を不溶化し、柔軟性のある分解されやすいコーティングを目指した。3 種類の孔源を用いたコーティングは移植後 2 週間の時点で平滑筋細胞が人工血管の内腔面に沿って集り、PGDE, Glyc においては、移植後 3 ヶ月の時点で人工血管の中央部が血管内皮細胞によって覆われていた。また、圧縮弾性率が従来の SF コーティングと比較して低く、特に PGDE, Glyc においては PEG と比較して有意に低かった。以上の結果から、エタノールを使用せず、PEG, PGDE および Glyc で不溶化した SF コーティングは人工血管に柔軟性を付与し、移植後生体内ですぐに分解され、リモデリングを促すことが明らかとなった。さらに、3 種類の孔源間では PGDE, Glyc が PEG よりも有用であることが判明した。

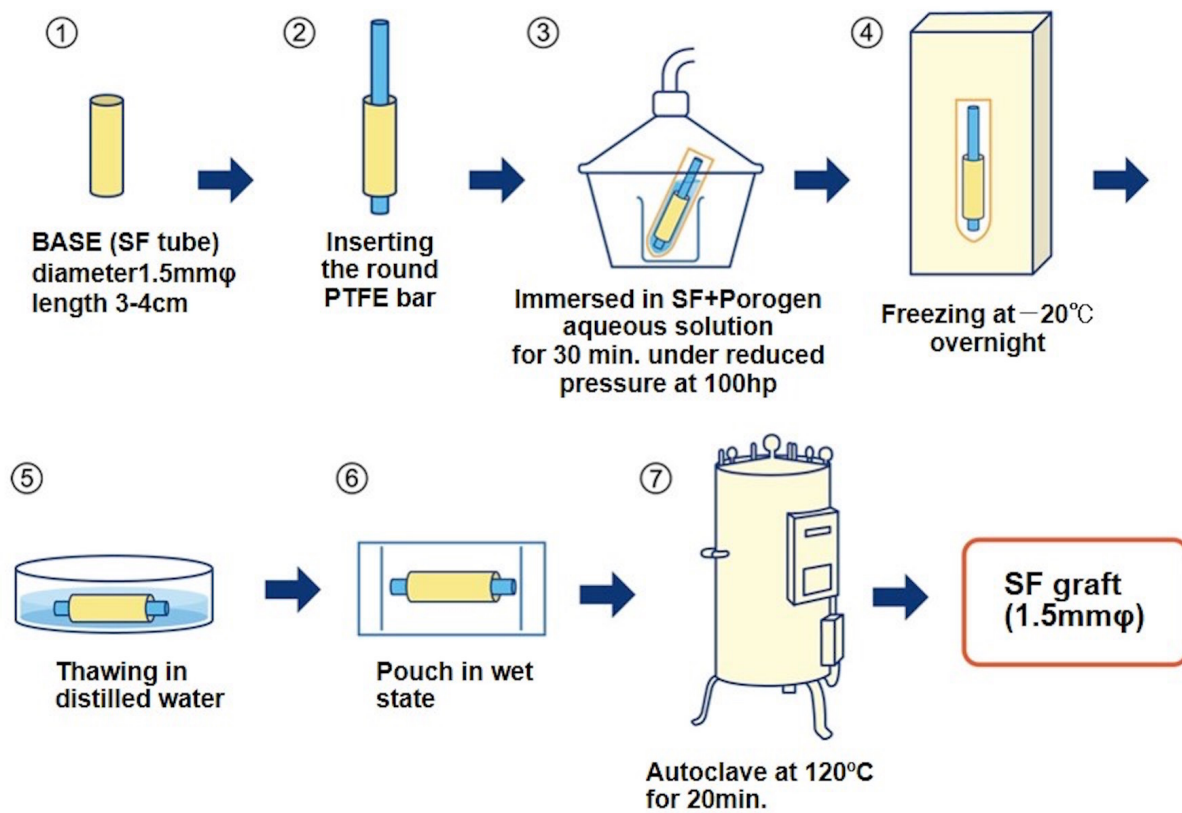


Figure 1 3種の孔源を用いてSF スポンジでコーティングした絹小口径人工血管

の作製過程

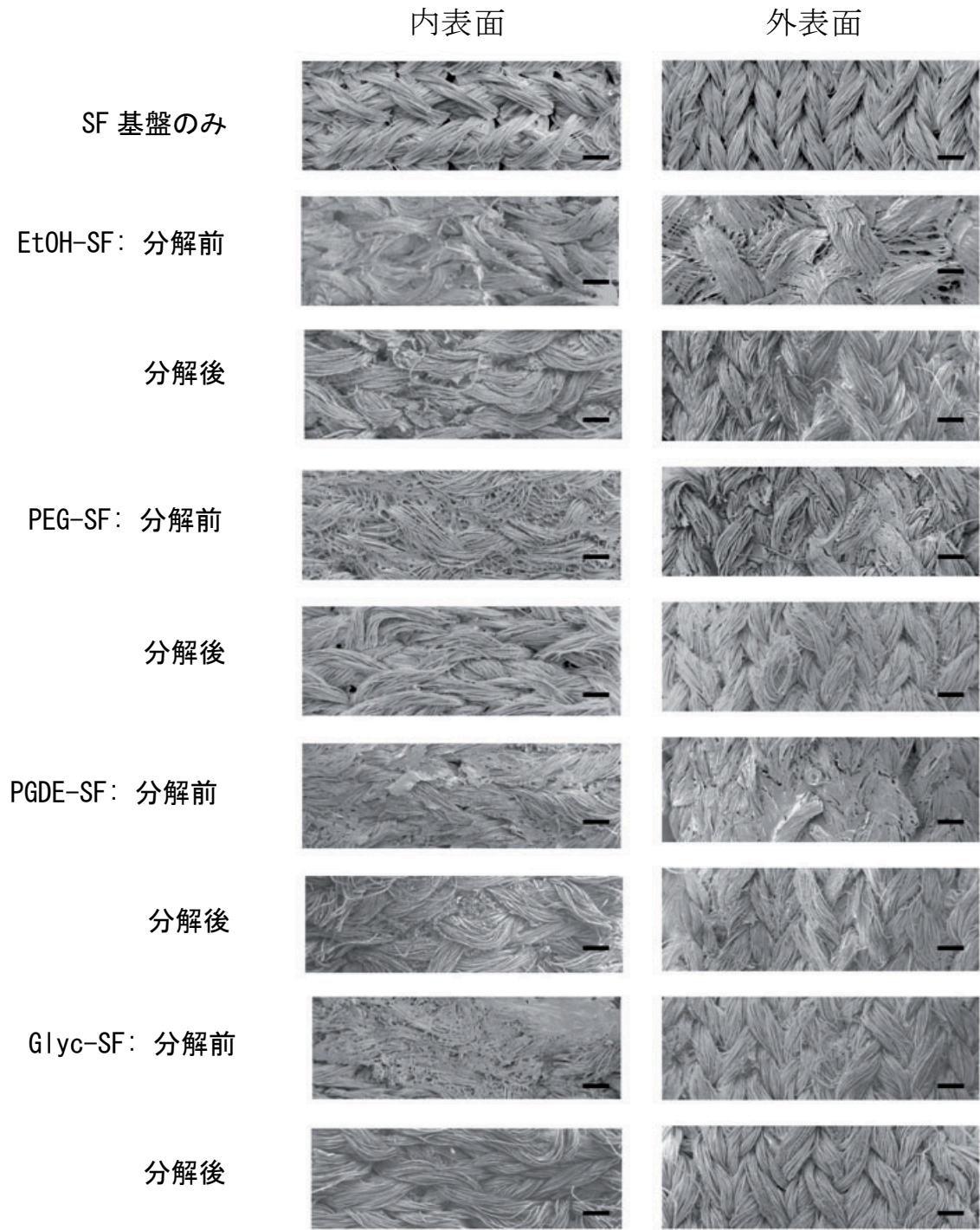


Figure 2 SF グラフトの内・外表面の SEM 画像

EtOH-SF は生分解性試験後もコーティング材が残存し、基盤の隙間を埋めていたが、PEG-SF および PGDE-SF ではコーティング材のほとんどが消失していた。また、Glyc-SF ではその傾向が顕著であった。Scale bar = 200 μ m

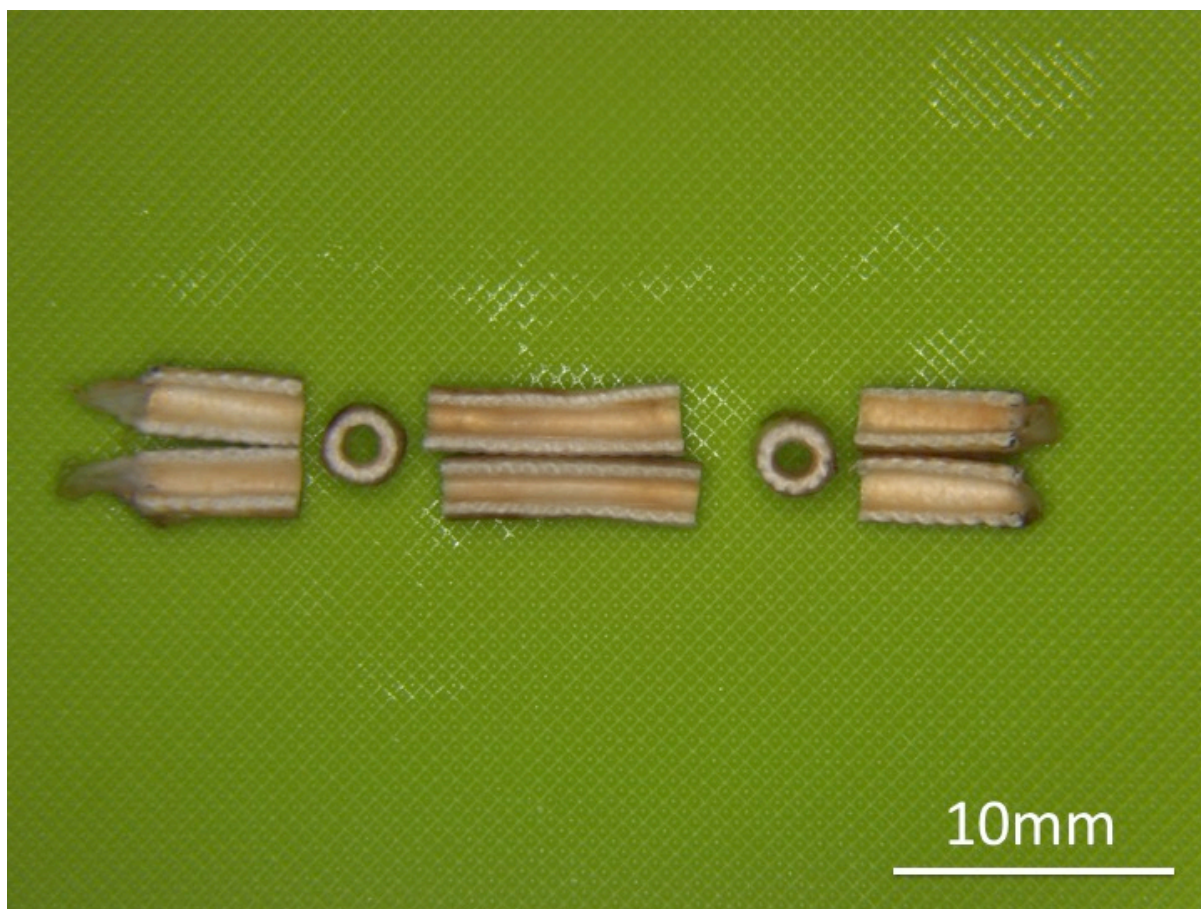


Figure 3 摘出した SF グラフトの切り出し写真

人工血管中央部(10 mm)は長軸方向に切り出しを行い、血管内皮細胞の評価に用いた。そこから頭尾側方向に 4 mm で短軸方向に切り出し、一般的な形態観察および膠原線維の組織侵入率の評価に用いた。

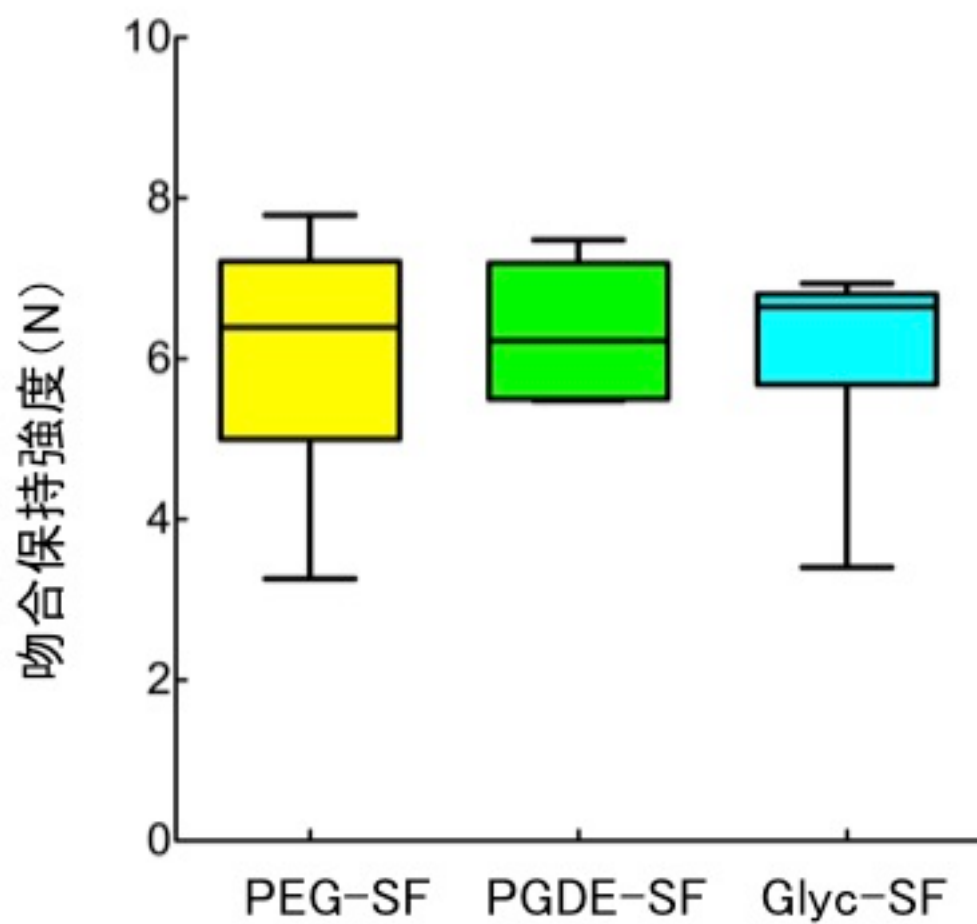


Figure 4 吻合保持強度試験 (n=6)

3種類の人工血管の吻合保持強度に有意差は認められなかった。

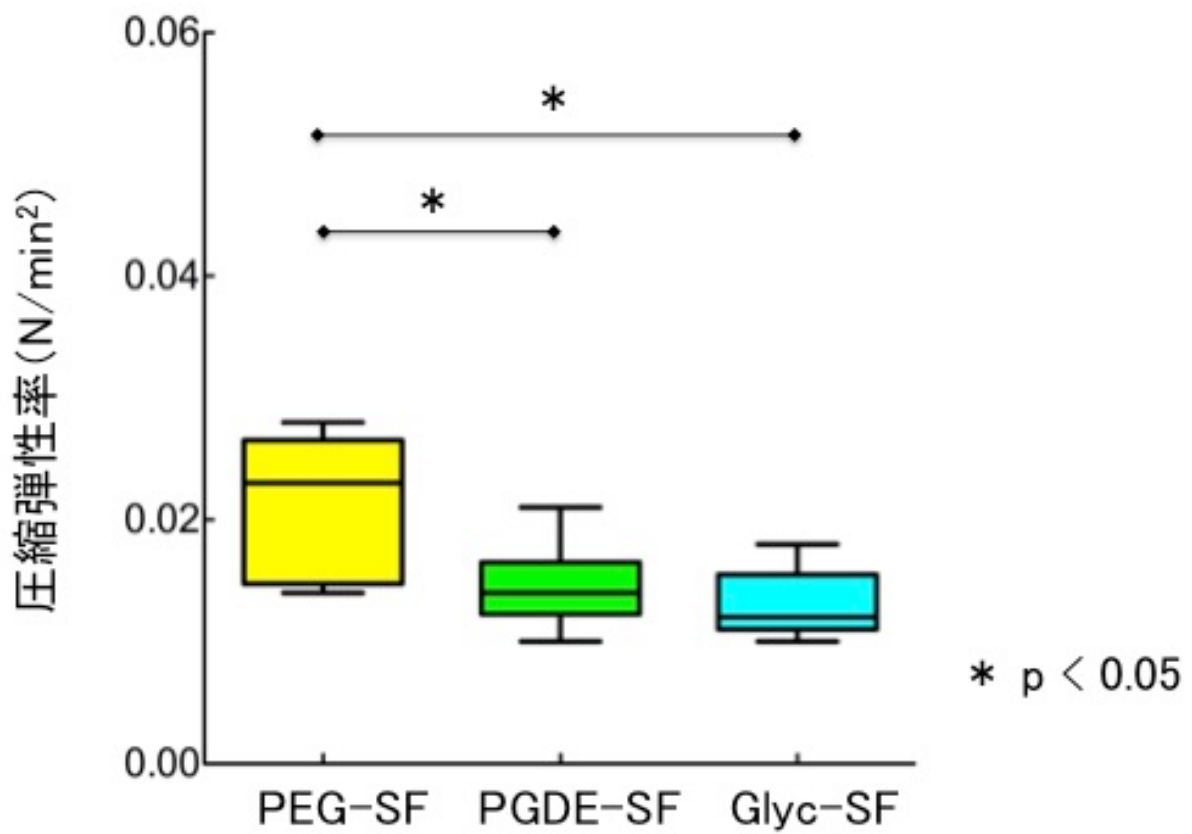


Figure 5 圧縮弾性率試験 (n=6)

PGDE-SF および Glyc-SF は PEG-SF と比較して有意に圧縮弾性率が低かった ($p < 0.05$)。

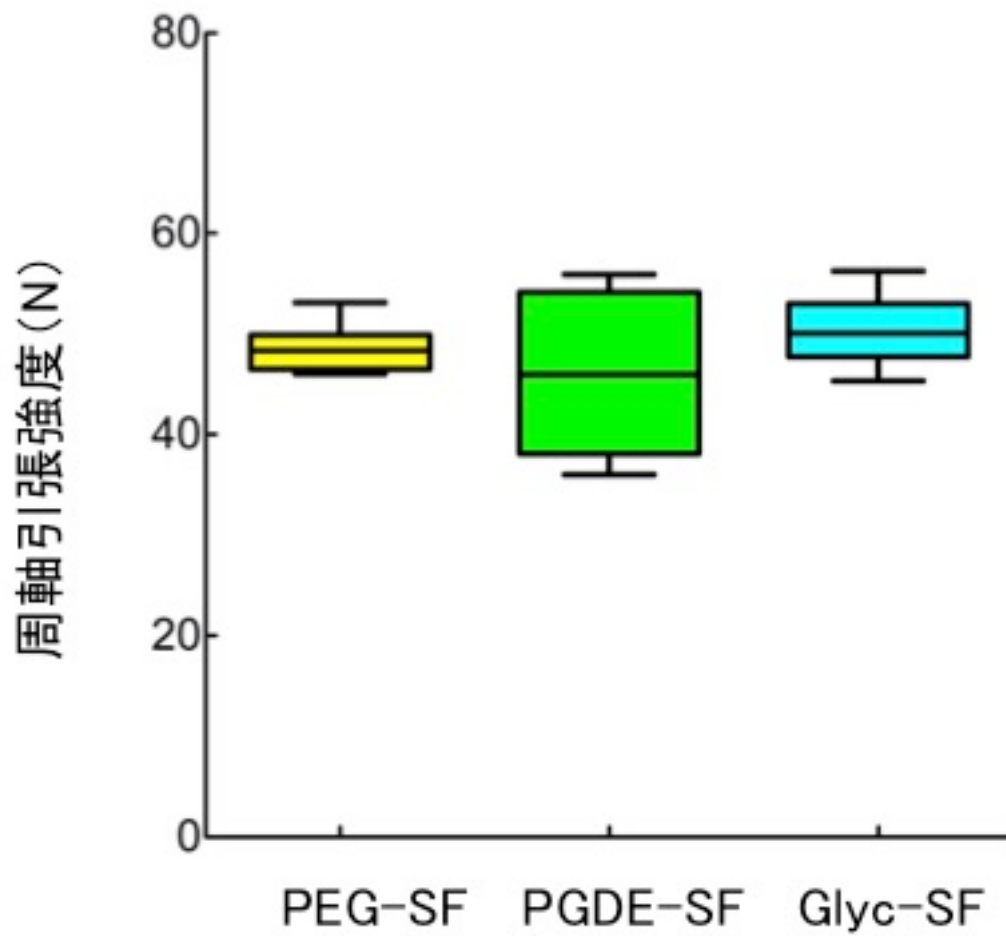


Figure 6 周軸引張強度試験 (n=6)

3種類的人工血管の周軸引張強度に有意差は認められなかった。

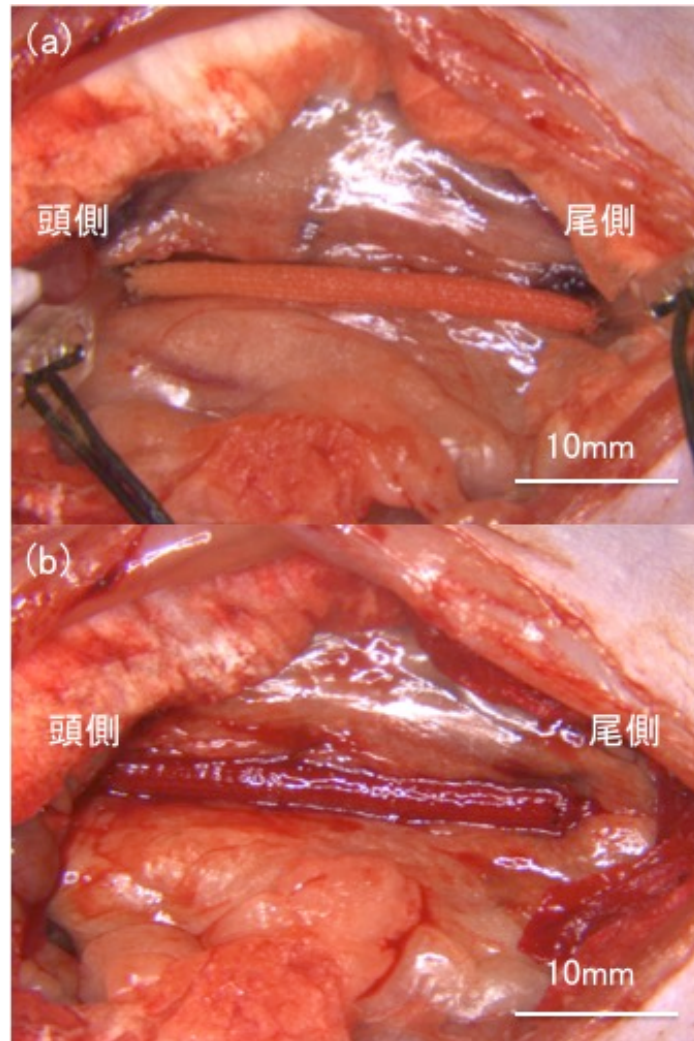


Figure 7 移植時の人工血管の写真

ラットの腹部大動脈へ移植した直後の人工血管(a), クランプを離した後の血流再開後の人工血管(b)。血液は吻合部および人工血管から漏れ出てきたが, 軽度の圧迫で止血可能であった。

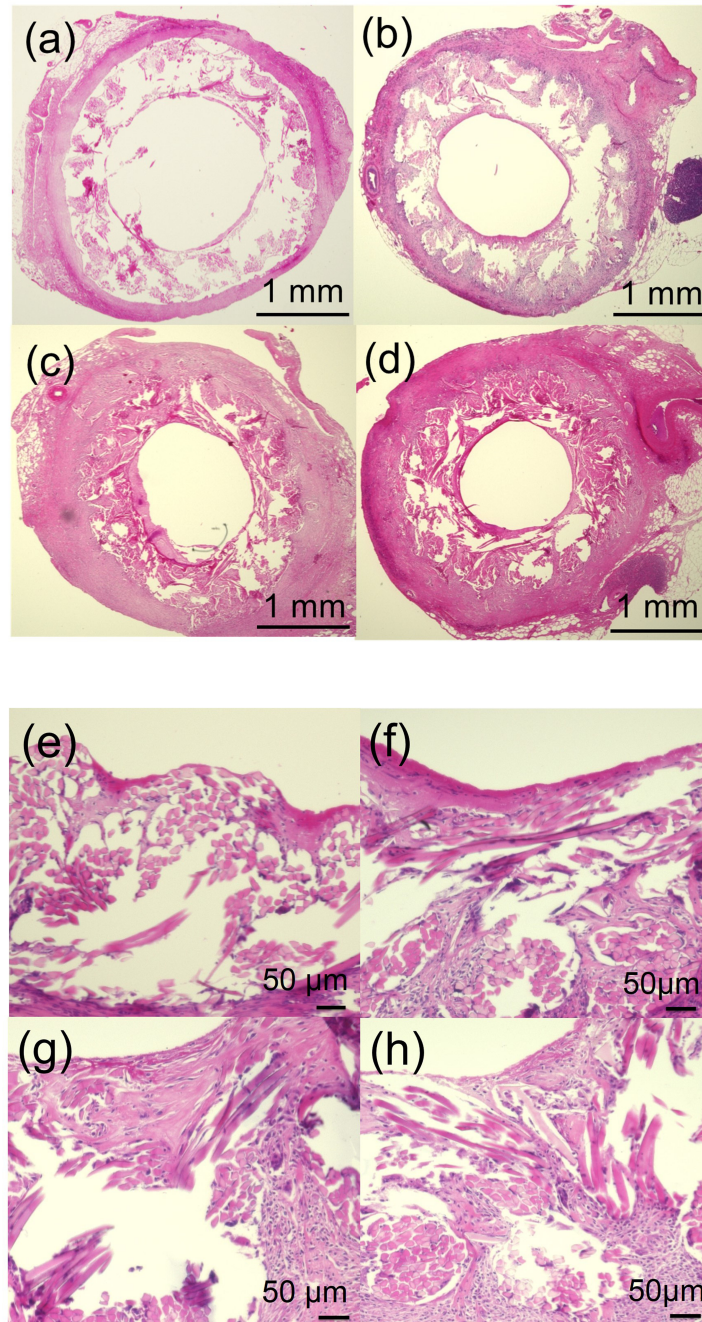


Figure 8 移植 2 週間後の HE 染色

(a) EtOH-SF, (b) PEG-SF, (c) PGDE-SF, (d) Glyc-SF およびこれらの高倍率像である(e) EtOH-SF, (f) PEG-SF, (g) PGDE-SF, (h) Glyc-SF を示した。EtOH-SF と比べて、PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF では、グラフト周囲と内部に多くの炎症細胞が集簇していた。

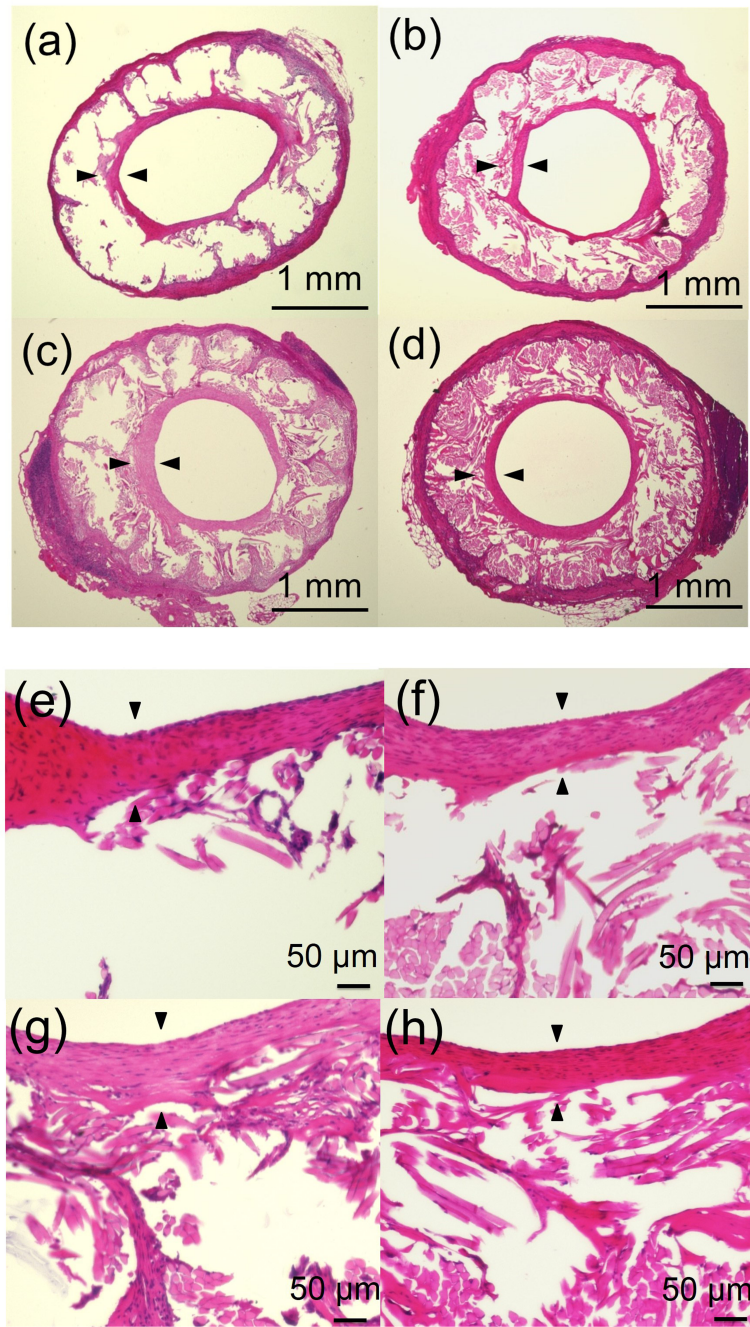


Figure 9 移植 3 ヶ月後の HE 染色

(a) EtOH-SF, (b) PEG-SF, (c) PGDE-SF, (d) Glyc-SF およびこれらの高倍率像である(e) EtOH-SF, (f) PEG-SF, (g) PGDE-SF, (h) Glyc-SF を示した。4 種類の人工血管で、グラフトの内側に層状構造物を認めた(2 つの矢頭)。

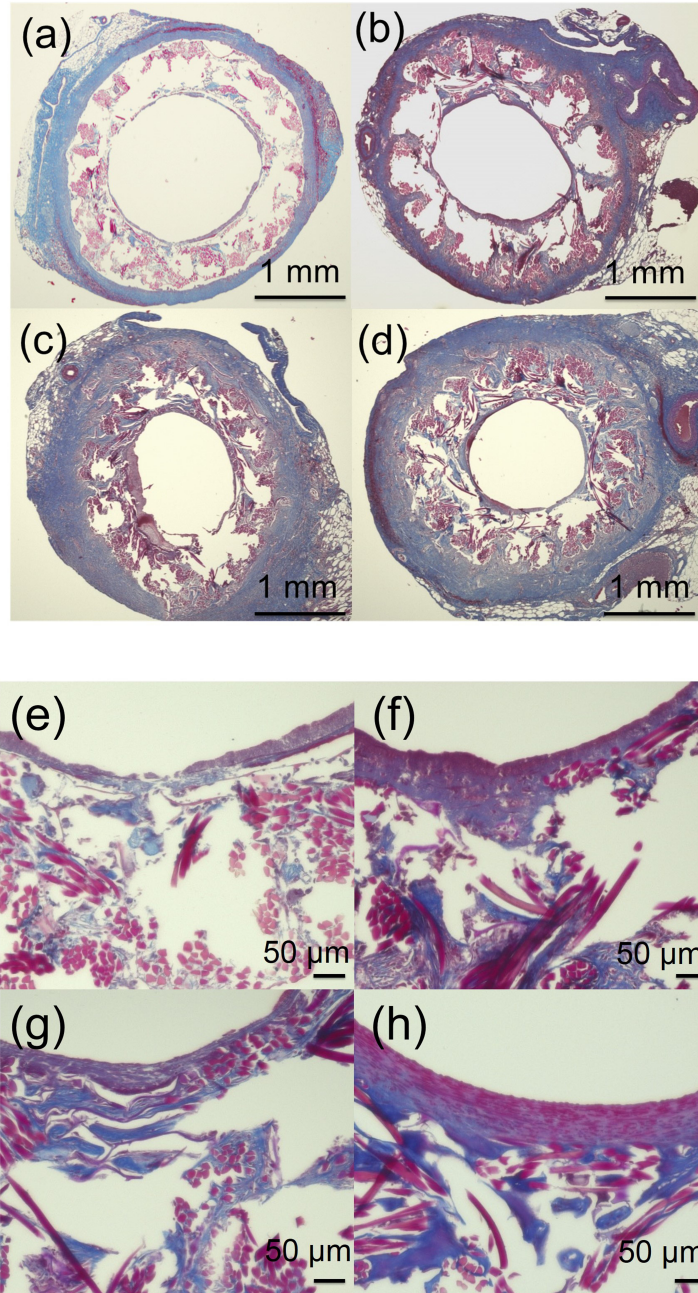


Figure 10 移植 2 週間後の MTC 染色

(a) EtOH-SF, (b) PEG-SF, (c) PGDE-SF, (d) Glyc-SF およびこれらの高倍率像である(e) EtOH-SF, (f) PEG-SF, (g) PGDE-SF, (h) Glyc-SF を示した。EtOH-SF と比べて, PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF では, グラフト周囲と内部に多くの膠原線維が集簇していた。

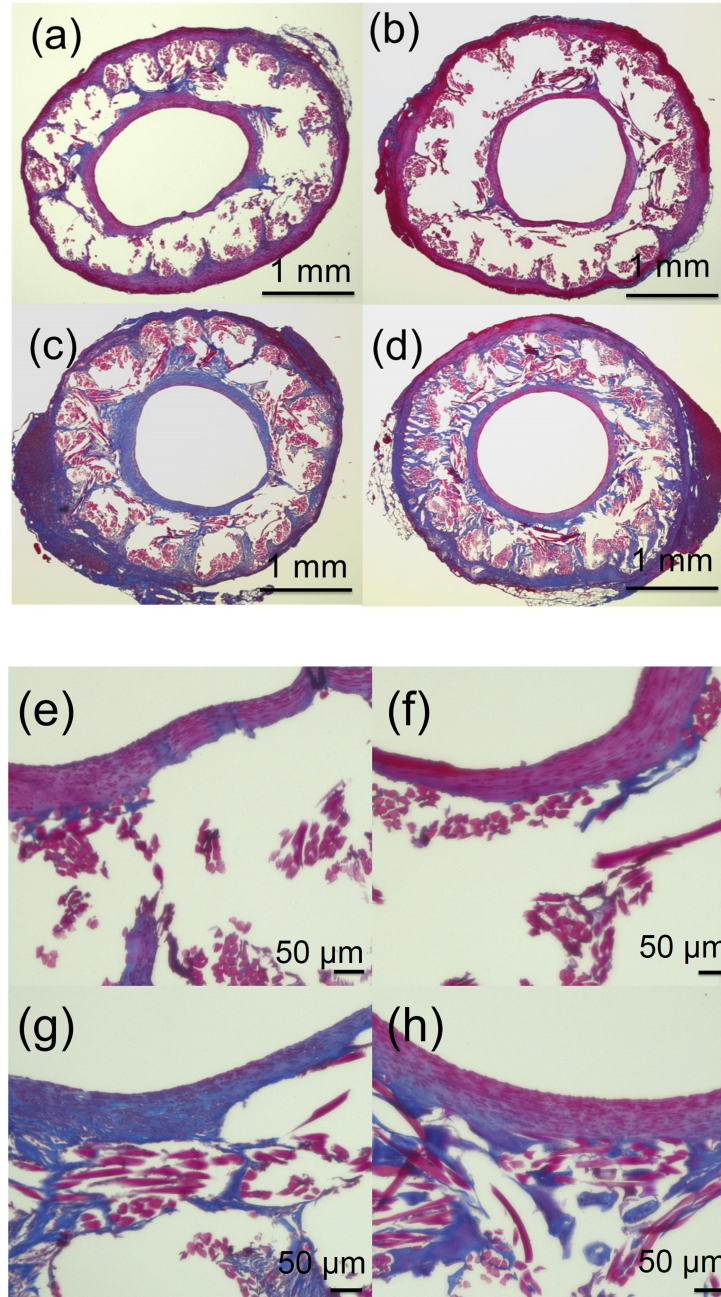


Figure 11 移植 3 ヶ月後の MTC 染色

(a) EtOH-SF, (b) PEG-SF, (c) PGDE-SF, (d) Glyc-SF およびこれらの高倍率像である(e) EtOH-SF, (f) PEG-SF, (g) PGDE-SF, (h) Glyc-SF を示した。EtOH-SF ではグラフト内部の膠原線維は移植 2 週間後と比べて増加していたが、PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF においては変化が認められなかった。

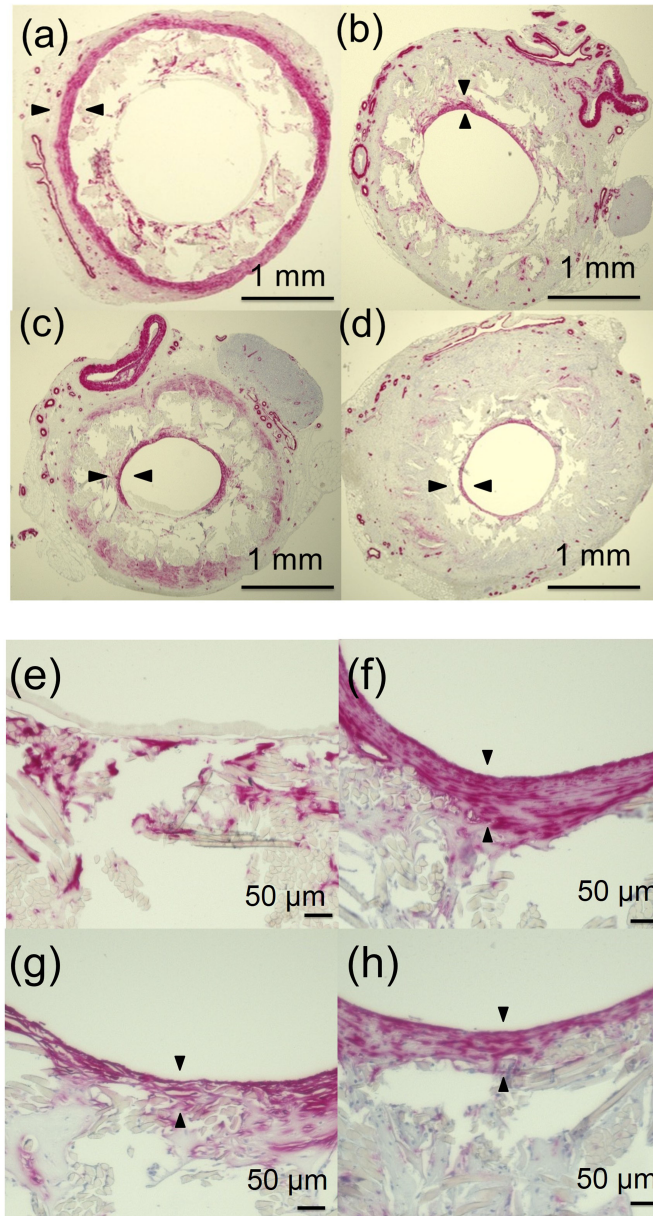


Figure 12 移植 2 週間後の α -SMA 染色

(a) EtOH-SF, (b) PEG-SF, (c) PGDE-SF, (d) Glyc-SF およびこれらの高倍率像である(e) EtOH-SF, (f) PEG-SF, (g) PGDE-SF, (h) Glyc-SF を示した。グラフトの内側の層状構造物を 2 つの矢頭で示した。EtOH-SF はグラフトの内腔に平滑筋細胞は確認できなかったが、PEG-SF, PGDE-SF および Glyc-SF ではグラフトの内腔に沿って集まっていた。

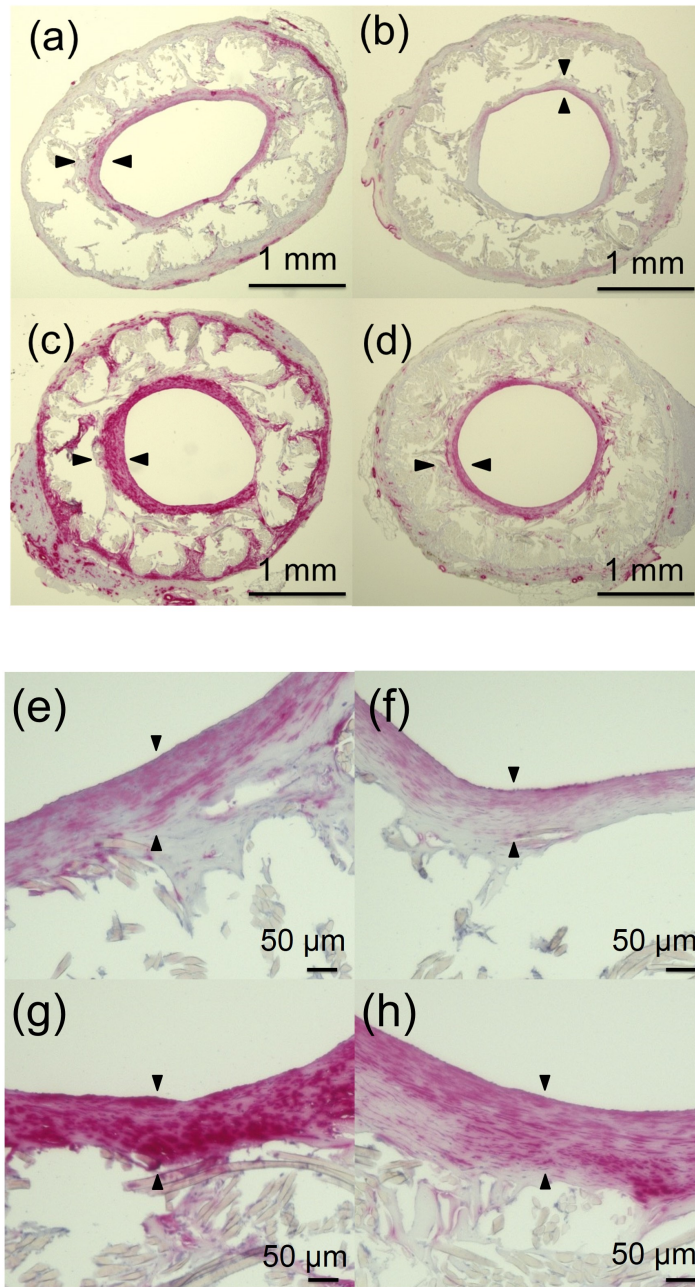


Figure 13 移植 3 ヶ月後の α -SMA 染色

(a) EtOH-SF, (b) PEG-SF, (c) PGDE-SF, (d) Glyc-SF およびこれらの高倍率像である(e) EtOH-SF, (f) PEG-SF, (g) PGDE-SF, (h) Glyc-SF を示した。グラフトの内側の層状構造物を 2 つの矢頭で示した。4 種類の全ての人工血管において、内腔に平滑筋細胞が集まっていた。

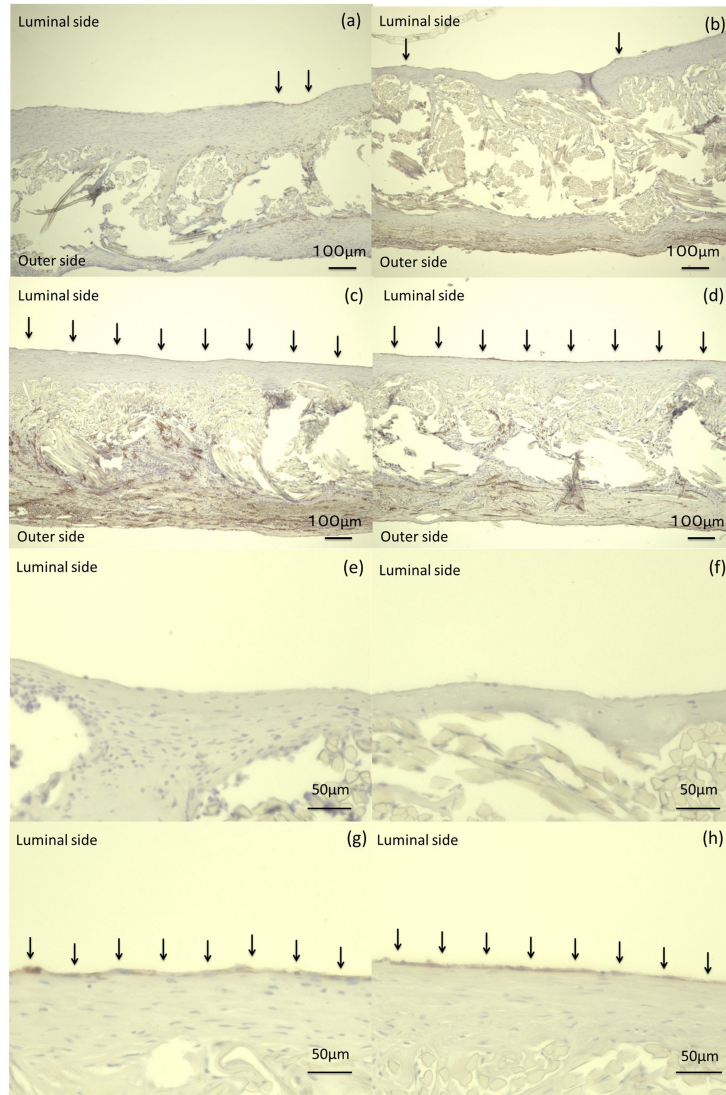


Figure 14 移植 3 ヶ月後の CD31 染色

(a) EtOH-SF, (b) PEG-SF, (c) PGDE-SF, (d) Glyc-SF およびこれらの高倍率像である(e) EtOH-SF, (f) PEG-SF, (g) PGDE-SF, (h) Glyc-SF を示した。EtOH-SF および PEG-SF においては、血管内皮細胞(矢印)はグラフト中央部に断続的に認められたが、PGDE-SF および Glyc-SF では、血管内皮細胞はグラフト中央部の全域に沿って、途切れることなく繋がっていた。

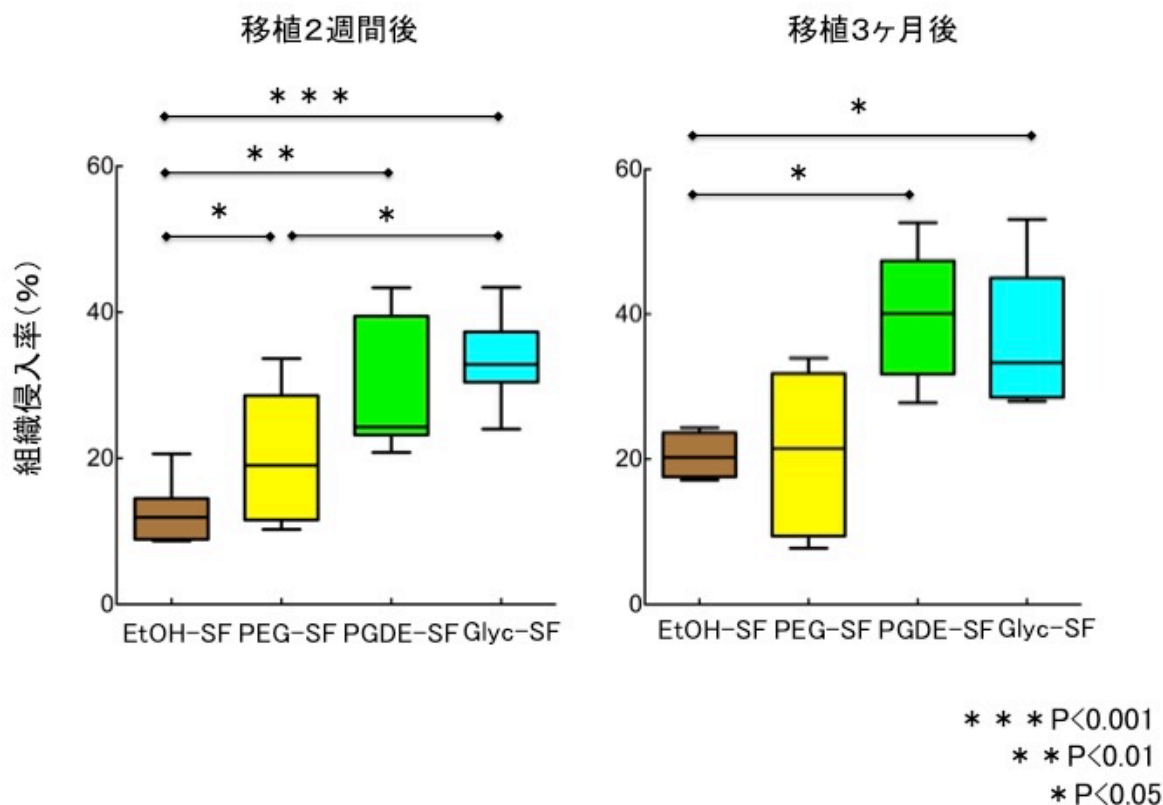


Figure 15 移植 2 週間後および移植 3 ヶ月後の膠原線維の組織侵入率 (n=6)

移植 2 週間後において、PEG-SF、PGDE-SF および Glyc-SF は EtOH-SF と比較して膠原線維の侵入率が有意に高かった(EtOH-SF vs PEG-SF, $p < 0.05$, EtOH-SF vs PGDE-SF, $p < 0.01$, EtOH-SF vs Glyc-SF, $p < 0.001$, PEG-SF vs Glyc-SF, $p < 0.05$)。

移植 3 ヶ月後において、PGDE-SF および Glyc-SF は EtOH-SF と比較して膠原線維の侵入率が有意に高かった(EtOH-SF vs PGDE-SF, $p < 0.05$, EtOH-SF vs Glyc-SF, $p < 0.05$)。

第 3 章

ポリエステル基盤を用いた シルクフィブロインコーティングの検討

緒言

繊維で編み込まれて作製された人工血管はコーティングをして表面を覆わなければ、移植時に血液の漏出が生じてしまう。この漏出を防ぐための方法として、患者自身の血液を人工血管に浸し、基盤の隙間を埋めるプレクロッティングが行われている(58)。しかしながら、操作が煩雑であることで手術時間が延長してしまうこと、ヘパリンを大量に投与されている手術の場合、および緊急事の対応が難しいなどといった問題点があった。そのため、現在市販されている人工血管にはゼラチン(GEL)やコラーゲンなどの素材を用いてあらかじめコーティングが施されているものがほとんどである(13, 32)。コラーゲンやゼラチンは牛などから採取されるために、生物材料に付随する感染の危険性があり、また、移植した際の炎症反応も問題となる。このことから非生物材料により繊維の隙間を充填する方法が望まれている。しかしながら、中・大口径の部位であれば、拍動する血流に耐えうる強度があれば、長期の開存は通常達成されるが、小口径の部位においては、どのような素材のコーティング材が適しているのかについては、未だ結論が出ていない(52)。

そこで、我々はSFに着目し、小口径人工血管の基盤とコーティングにSFを用いて研究を続けてきた。しかしながら、SFをコーティング材として用いた際に、SFが硬く分解されづらい構造に変化するという問題点があった。実際に、絹基盤にゼラチ

ンと SF でそれぞれコーティングを施した時の圧縮弾性率は、SF はゼラチンに比べて 3 倍もの硬さを有していた(19)。硬く分解されにくいコーティングでは、移植時に自己血管とのコンプライアンスの不一致による内膜肥厚やリモデリングが遅れる事で、人工血管の内膜に血管内皮細胞が生着できず、血栓形成を引き起こす可能性がある(7, 24, 35, 53)。

そこで第 1 章および第 2 章で SF コーティングの改良を行った。不溶化処理にエタノールを使用せず、孔源として PGDE および Glyc を用いることで SF が不溶化し、人工血管から血液の漏出を防ぐだけでなく、柔軟性や生分解性が向上することが判明した。しかしながら、第 1 章および第 2 章で用いられた基盤は SF が使用されており、コーティング部分の SF が分解された後も基盤の SF がリモデリングに寄与している可能性が考えられた。そのため、純粋なコーティングとしての SF を評価していたとは言い難い。そこで本章では、基盤の繊維に SF を使用せず、大・中口径で臨床応用されているポリエステル(PET)を用いた。そして、コーティング部分に第 2 章で使用された Glyc を孔源として用いて不溶化処理を行い、小口径人工血管を作製した。また、コントロール群としては PET 基盤にゼラチン(GEL)をコーティングしたものを作製した。そして、第 1 章及び第 2 章と同様に物性試験と生体内移植を行い改良された SF コーティング単独での評価を行うことを目的とした。

材料と方法

1. 絹小口径人工血管の作製

1-1. 基盤

第1章および第2章と同様の方法を用いてダブルラッセルで編まれたポリエステル繊維(PET)で、直径1.5 mmの小口径人工血管の基盤を作製した。

1-2. コーティング

SFコーティングは第2章と同様の方法を用いて作製した。まず、作製された直径1.5 mmの人工血管に1.5 mmのPTFE棒を挿入し、GlycとSF(2.5 % w/v)の重量比を1:1に調整した水溶液が入っているパイプの中に浸漬させた。パイプをガラス製デシケーターに入れ、人工血管表面から気泡が出てこなくなるまで内部を100 hPaの減圧下に維持した。その後、人工血管を-20°Cで一晩凍結させた。次に、蒸留水のなかに浸漬させGlycを完全に除去した。その後、蒸留水を入れたパウチの中に入れ、密封保管した。滅菌はオートクレーブで120°C、20分間行い、滅菌後は冷蔵庫(4°C)にて保管した。次に、ゼラチンでコーティングされた PETグラフトの作製を行った。ゼラチン(MediGelatin, Nippi)を60°Cで4時間の条件下で、蒸留水に溶解して3%(w/v)のゼラチン水溶液を調整した(21)。その後、基盤をゼラチン水溶液の中に60°Cで30分間浸漬し

た。更に、不溶化処理のため10%グルタルアルデヒドを用いて室温で30分間架橋し、その後グルタルアルデヒドを除去するために70%エタノール水溶液に10分間ずつ3回浸漬した。最後にパウチに入れて密封し、オートクレーブにて120°Cで20分間滅菌した(19)(72)。以後、本章では、Glycを用いてSFコーティングして作製したPET製小口径人工血管をGlyc-SFとし、ゼラチンでコーティングしたPET製小口径人工血管をGELとした。

2. 絹小口径人工血管の評価

2-1. 形態観察

作製した2種類の人工血管はコーティング材がどのように付着しているかを観察するため、SEMを用いて第2章と同様の方法で内・外表面を観察した。

2-2. 生分解性試験

2種類の人工血管(Glyc-SFおよびGEL)をプロテアーゼ14(1U/ml)が含まれたリン酸緩衝食塩水中で37°Cにてインキュベートした。その後、1, 3, 5および7日目に取り出して乾燥させた。その後、SEMを用いて、第2章と同様の方法で内・外表面を観察し、生分解前の画像と比較した。

2-3. 物性試験

Glyc-SF および GEL の 2 種類の人工血管の吻合保持強度(N), 圧縮弾性率(N/min²), 周軸引張強度(N)および透水量試験(ml/min/5cm)を第 1 章および第 2 章と同様に行った。

3. 移植実験

3-1. 供試動物

雄 12 頭, 雌 12 頭, 計 24 頭の Sprague-Dawley(SD)ラット(体重 300-400g)の腹部大動脈に Glyc-SF および GEL の計 2 種類の人工血管を移植した。使用したラットは東京農工大学「実験動物指針及び動物実験の手引き」に基づいて飼育, 実験操作を実施した(承認番号: 30-9)。

3-2. 移植手技

2種類の異なるコーティングで作製された小口径人工血管(直径1.5 mm, 長さ1cm および3 cm)を立体顕微鏡下(LEICA M60, Leica Microsystems)で24頭のラットの腹部大動脈に移植した。移植2週間後に長さ1 cmの人工血管を各6頭から, 移植3ヶ月後に長さ3 cmの人工血管を各残りの6頭から摘出した。移植方法は第1章および第2章と

同様に行った。

4. 組織学的評価

4-1. 小口径人工血管の取り出し

目的とする移植期間が経過した後、移植時と同様に麻酔処置をラットに施し、第 1 章および第 2 章と同様の方法で人工血管を摘出しメタノールにて固定した。その後、長さ 1 cm の人工血管は中央部 4 mm を短軸方向に切断し、長さ 3 cm の人工血管中央部(1 cm)を長軸方向に切断し、そこから頭尾側方向にそれぞれ 4 mm 幅で短軸方向に切断した。その後、第 1 章および第 2 章と同様の方法で組織標本を作製した。

4-2. 病理組織学的検査

作製したパラフィン切片に定法に従い HE 染色, MTC 染色および EVG 染色を実施した。免疫組織化学染色として、 α -SMA マウス抗ラットモノクローナル抗体(ニチレイバイオサイエンス社製), CD31 マウス抗ラットモノクローナル抗体(Lifespan BioSciences 社製)および CD68 抗ラット抗体(BIO-RAD 社製)を一次抗体として使用し、次に抗マウス IgG ビオチン付き二次抗体(ニチレイバイオサイエンス社製)に反応させた後、発色として ImmPACT DAB ペルオキシダーゼ基質キット(Vector laboratories 社

製)を用いた。

4-3. 組織侵入率

第1章および第2章と同様に光学顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE)でMTC染色票本を観察し、グラフト内の膠原線維面積を測定し、人工血管の面積との比率から画像解析ソフト(BZ-II Dynamic Cell Count Ver. 1.01, KEYENCE)を用いて、組織侵入率を計測した。

4-4. マクロファージ侵入率

光学顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE)でCD68染色標本を観察し、グラフト内のマクロファージ面積を測定し、人工血管の面積との比率から画像解析ソフト(BZ-II Dynamic Cell Count Ver. 1.01, KEYENCE)を用いて、マクロファージ侵入率を計測した。

4-5. 統計

得られた物性試験結果の統計学的な比較は、Student's t-test を使用した。また、組織侵入率およびマクロファージ侵入率に関する統計学的な比較は、one-way ANOVA と Bonferroni 法に基づいて実施した。これらのデータ解析には GraphPad

Prism(Version 5.0a, エムデーエフ)を用いた。統計学的有意誤差水準は5%とした。

計測数値は平均値±標準偏差で算出した。

結果

1. 人工血管の形態観察

プロテアーゼ14で分解した後のGlyc-SFおよびGELでコーティングしたPETグラフトの内面および外面の形態のSEM写真をFigure 1 に示した。コーティングなしの人工血管ではダブルラッセルで編み込まれている基盤が確認され、編み込みの間には大きな隙間が観察された。プロテアーゼ14で分解する前(0 day)のGlyc-SFおよびGELの内表面および外表面のコーティングは基盤全体を覆っているのが確認された。しかしながら、Glyc-SFでは外表面のコーティングは十分だったが、内面ではコーティング量が減少していた。続いて、プロテアーゼ14を用いて37°C、3日間および7日間インキュベートした後のGlyc-SFおよびGELの内面および外面を観察した。3日後のGlyc-SFではグラフトの内および外面の両方でコーティング量は大幅に減っており、基盤にわずかに付着している程度であった。GELでもコーティングの減少が認められたが、外面ではGlyc-SFに比べて多く残存していた。7日後のGlyc-SFでは、グラフトの内・外面のコーティングは、ほぼ残存していなかった。一方、GELの面ではほぼコーティングは消えていたが、外面では基盤の繊維の隙間にコーティング材が残存しているのが認められた。

2. 物性試験

2-1. 吻合保持強度試験

GELの吻合保持強度は 6.772 ± 1.566 N, Glyc-SFの吻合保持強度は 7.20 ± 2.416 Nであった。2種類の人工血管の間に有意差は認められなかった(Figure 2 (a))。

2-2. 圧縮弾性率試験

GELの圧縮弾性率は 0.0173 ± 0.0032 N/min², Glyc-SFの圧縮弾性率は 0.0218 ± 0.0044 N/min²であった。2種類の人工血管の間に有意差は認められなかった(Figure 2 (b))。

2-3. 周軸引張試験

GELの周軸引張強度は 57.023 ± 7.219 N, Glyc-SFの周軸引張強度は 57.513 ± 7.889 Nであった。2種類の人工血管の間に有意差は認められなかった(Figure 2 (c))。

2-4. 透水量試験

GELの透水量は 41.2 ± 5.115 ml, Glyc-SFの透水量は 52.88 ± 0.24 mlであった。Glyc-SFがGELに比べて有意に透水量が高かった($p < 0.05$)(Figure 2 (d))。

3. 移植結果

2種類の異なるコーティングを施した PET グラフトにおいて、縫合部位に糸のほつれは認められず、また、コントロールできない出血などの合併症も認められなかった(Figure 3)。移植が終了し、再び血流を再開した後、GEL において、出血はおもに吻合部からのみであったが、Glyc-SF では、吻合部と人工血管の基盤の隙間からも血液の漏出が生じたが、綿棒による軽度の圧迫で止血可能であった。移植を行った 24 頭のすべてのラットで、後肢の麻痺や壊死などの副反応は認められず、取り出し予定の期日まで生存していた。移植 2 週間後では、閉塞は 1 例も認められず、すべての症例において開存が確認されたが、移植 3 ヶ月後では、GEL において、6 例中 2 例で閉塞が確認された。また、移植 2 週間後および 3 ヶ月後の摘出時に人工血管に動脈瘤や肉芽腫形成などの異常所見は認められず、全ての人工血管は薄い脂肪の層と周囲組織によって覆われていた(Figure 4)。さらに、人工血管は周囲組織からの剥離は容易で、わずかに出血するのみであった。

4. 組織学的検査

移植 2 週間後の HE 染色では、GEL と比較して Glyc-SF では、グラフトの周囲お

よび内部に好中球，リンパ球，マクロファージおよび線維芽細胞を含む炎症細胞が多く集簇していた(Figure 5)。さらに，Glyc-SF はコーティングが殆ど残っていなかったが，GEL ではグラフトの内部にコーティング材であるゼラチンの残存が認められた。MTC 染色において，GEL では膠原線維はグラフトの外側にわずかにしか観察出来ず，グラフト内部への侵入もわずかであった。一方，Glyc-SF では膠原線維がグラフトの外周に集簇するだけでなく，内部へ侵入し，PET 繊維の間に膠原線維が入り込んでいる像も確認された(Figure 6)。 α -SMA 染色では，Glyc-SF において平滑筋細胞がグラフトの内部に観察されるだけでなく，第 2 章の絹基盤の時と同様に，グラフトの内腔に沿って集まっていた。しかしながら，GEL においてはグラフトの外周および内部で平滑筋細胞の存在は確認出来なかった(Figure 7)。CD31 および EVG 染色において，2 種類のグラフトで血管内皮細胞および弾性線維を確認することはできなかった。CD68 染色において，Glyc-SF は GLE と比較して，より多くのマクロファージがグラフトの内部に出現していることが確認できた。

移植3ヶ月後のHE染色では，Glyc-SFのグラフトにおいて，リンパ球，マクロファージおよび好中球などの炎症細胞がグラフトの周囲および内部で減少していた。また，第1章および第2章と同様に厚い層状の構造物がグラフトの内腔面に沿って確認された。一方，GELにおいて，移植2週間後と比較して好中球やリンパ球は減少して

いるものの、マクロファージは依然としてグラフトの内部に多く存在し、コーティング材であるゼラチンも減少していたが、ポリエステル繊維の間に残存していた。

Glyc-SFと同様に層状の構造物が内腔面に沿って確認されたが、Glyc-SFにくらべて薄かった。またフィブリン塊と血小板および血球成分で構成された血栓形成と膠原線維と平滑筋細胞が集簇した内膜肥厚が1例ずつ確認された(Figure 8)。平滑筋細胞および血管内皮細胞を観察するためにグラフトの中央部(10 mm)を評価した。平滑筋細胞はGELおよびGlyc-SFの両方でグラフトの内腔面に沿って集まっていた。一方、GELでは血管内皮細胞は内腔面に確認できなかったが、Glyc-SFでは血管内皮細胞が途切れずにグラフトの内腔面を覆っているのが確認された(Figure 9)。

5. 膠原線維の組織侵入率

移植2週間後のGELの組織侵入率は $5.908 \pm 2.682\%$ およびGlyc-SFの組織侵入率は $13.836 \pm 2.978\%$ であった。一方、移植後3ヶ月のGELの組織侵入率は $22.503 \pm 5.353\%$ およびGlyc-SFの組織侵入率は $38.109 \pm 8.501\%$ であった。移植2週間後では、GELとGlyc-SFの間に有意差は認められなかった。移植3ヶ月後では、GELとGlyc-SFとの間に有意差が認められた($p < 0.05$)(Figure 15 (a))。

6. マクロファージ侵入率

移植 2 週間後の GEL のマクロファージ侵入率は $6.774 \pm 1.43\%$ および Glyc-SF のマクロファージ侵入率は $13.536 \pm 6.009\%$ であった。一方, 移植 3 ヶ月後の GEL のマクロファージ侵入率は $4.481 \pm 2.657\%$ および Glyc-SF のマクロファージ侵入率は $3.007 \pm 1.603\%$ であった。移植 2 週間後および 3 ヶ月後では, GEL と Glyc-SF の間に有意差は認められなかった。一方, Glyc-SF において, 移植 2 週間後と移植 3 ヶ月後の間に有意差が認められた ($p < 0.05$) (Figure 15 (b))。

考察

現在、商業用として広く使用されている人工血管はポリエステル基盤にゼラチンでコーティングしたものであり、主に中・大口径の部位で使用されている(13, 32)。ゼラチンはコラーゲンの誘導体であり、生体適合性、親水性および生分解性を持っている(59)。また、ゼラチンには豊富なインテグリン結合部位が含まれているため、移植後に細胞の接着、遊走および分化を助ける働きをもっている(47, 69)。しかしながら、ゼラチンのみを人工血管の足場として用いても、引張強度が低いことや急速な変形をもたらすことから、人工血管グラフトとしての使用には適していないことが示されている(20, 54)。そのため、おもにコーティング材として商業用として広く使用されている。しかし、現在市販されている人工血管を小口径の部位に用いたとしても、すぐに閉塞してしまう。そこで、我々はSFを基盤とコーティングに使用することで、小口径人工血管の開発を行ってきたが、コーティングに使用するSFについては、未だ改良の余地があった。そこで、第1章および第2章でコーティングの改良を試みたが、基盤にもSFを使用していたため、本来のコーティングのみのSFの評価がされなかった。そのため、本章では中・大口径で広く使用されているポリエステルを基盤の繊維として使用し、第1章および第2章で改良されたSFコーティングと組み合わせることで、純粋なSFコーティングについての評価を行った。

プロテアーゼ14を用いたGlyc-SFおよびGELコーティングの分解試験において、それぞれ違いが認められた。分解前のGlyc-SFおよびGELではポリエステル基盤の繊維にもしっかりと付着し、基盤の編み目をしっかりと覆っていた。しかし、Glyc-SFのコーティング表面には一部、亀裂が生じていた。一方、GELについては滑らかな表面であった。分解前のコーティング状態はゼラチンの方が良好に思えたが、SEM写真の観察のために両方の人工血管を乾燥状態に保つたため、SFコーティングに亀裂が入った可能性が考えられた。Glyc-SFはラットに移植するまでは含水状態で保存して、水和状態を保つためこのような変化は移植時時には起きないと考えられた。分解3日および7日後にGlyc-SFはしっかりと内・外表面のコーティングは分解されていたが、GELでは外表面にコーティングの一部が残存していたことから、Glyc-SFのほうがGELよりも分解されやすいコーティングであることが示された。

人工血管におけるコーティングの量や材質は人工血管の強度や操作性に影響を与える(16)。そのため、移植前に物性試験を行い、人工血管の評価を行うことは非常に重要である。本章で作製されたGlyc-SFとGELの吻合保持強度および周軸引張強度は第1章および第2章で作製された人工血管と同等の強度を保ち、移植に必要な強度を有していた(19, 71)。また、圧縮弾性率試験においてGlyc-SFはGELと同等の値を示した。以前の報告では、アルコールでSFを不溶化処理した人工血管はゼラチンコ

ーティングと比較して約3倍の硬度を有していた。したがって、第2章で作製された Glyc-SFコーティング方法はポリエステル基盤においても柔軟性を付与できる可能性が示された。透水量試験においてGlyc-SFはGELと比較して有意に透水量が多かった。これはSEM写真でGlyc-SFの内側面のコーティング量が少ないことに起因すると考えられたが、移植時に漏出する血液は軽度の圧迫でコントロールできたことから、移植には問題ないと考えられた。

移植2週間後では、GELで血栓形成などによる閉塞は確認できなかったが、移植3ヶ月後では血栓形成と内膜肥厚による閉塞が認められた。これらは、血管内皮細胞の欠如および人工血管と自己血管とのコンプライアンスの違いによる血流の乱れが原因であると考えられた(3, 9, 30)。本章において、血管内皮細胞および平滑筋細胞は3 cm人工血管の中央部の全域に沿って確認された。過去の研究で、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を組み込んだ遺伝子組み換えSFを用いて作製された3 cmの人工血管をラットの腹部大動脈へ移植した際に、移植3ヶ月後でも血管内皮細胞は島状に点在するのみであった(17)。その実験では、コーティングの不溶化処理にエタノールが使用されていたため、移植後に生体内での分解が遅延し、リモデリングが遅れている可能性が考えられた。本章で使用したコーティング方法であれば、従来の大口径ポリエ

テル繊維であっても分解されやすいSFコーティングを施すことで、小口径の部位においても高い開存性を示す可能性が示された。

移植2週間後および3ヶ月後において、GELと比較してGlyc-SFの組織侵入率は高く、ポリエステル繊維の間隙にもしっかりと膠原繊維が侵入していたのが確認された。また、移植2週間後の時点で第2章と同様に平滑筋細胞がグラフトの内腔面に集簇していたことからSFが早期に分解され、ポリエステルの基盤であっても、早期のリモデリングに貢献できることがわかった。しかしながら、第2章で用いたSF基盤にGlycで不溶化処理した人工血管と比べた場合には、膠原繊維の組織侵入率は低かった。このことから、SF基盤が細胞の浸潤やリモデリングに寄与している可能性が示され、本章ではコーティング部分のみのSFのリモデリング能力について評価することが可能であった。

移植2週間後のマクロファージの侵入率はGELと比べてGlyc-SFで高かった。SFの分解および吸収にはマクロファージが大きな役割を担うことが報告されていることから(14)、移植後早期に分解されたSFが細胞の遊走を促し、自己組織へのリモデリングに寄与したことが考えられた。さらに、Glyc-SFにおいて移植2週間後と3ヶ月後と比較した場合、移植3ヶ月後でマクロファージの侵入率が有意に減少していたことから、移植3ヶ月の時点においてはポリエステル基盤においてもリモデリングが既に

完了していたことが考えられた。そのため、今後、ラットを用いた生体内評価については、従来の中期的な評価である3ヶ月から観察期間をより早めることで人工血管中央部におけるリモデリングについての評価が可能になるかもしれない。

小括

柔軟性があり分解されやすいコーティングに改良するため、人工血管をラットへ移植して、リモデリング能力について評価した。しかし、第1章および第2章において、基盤の部分にもSFを用いて作製していたため、移植後のリモデリングの評価については、純粋にコーティング部分のSFの評価ができていたとは言い難い。そこで、本章では中・大口径人工血管で主に臨床応用されているポリエステルを用いて基盤を作製し、第2章で良好な結果の得られたGlyc-SFコーティングを施し、リモデリング能力について評価を行った。本章のコントロール群には中・大口径人工血管で主に使用されているゼラチンをコーティング材として用いた。移植後に病理組織学的検査にて、Glyc-SFコーティングを施した人工血管は基盤がポリエステルであっても絹基盤の時と同様のリモデリング能力を発揮した。また、分解されやすいSFを用いることで、ポリエステル繊維の隙間にも組織が侵入し自己組織へのリモデリングができることが判明した。このことから、小口径人工血管において移植後のリモデリングにはコーティングの部分の分解能力が大きく影響を与えていると考えられ、新たなSFコーティングを用いることによって、既存の繊維を用いた基盤であっても小口径人工血管として有用であることが判明した。

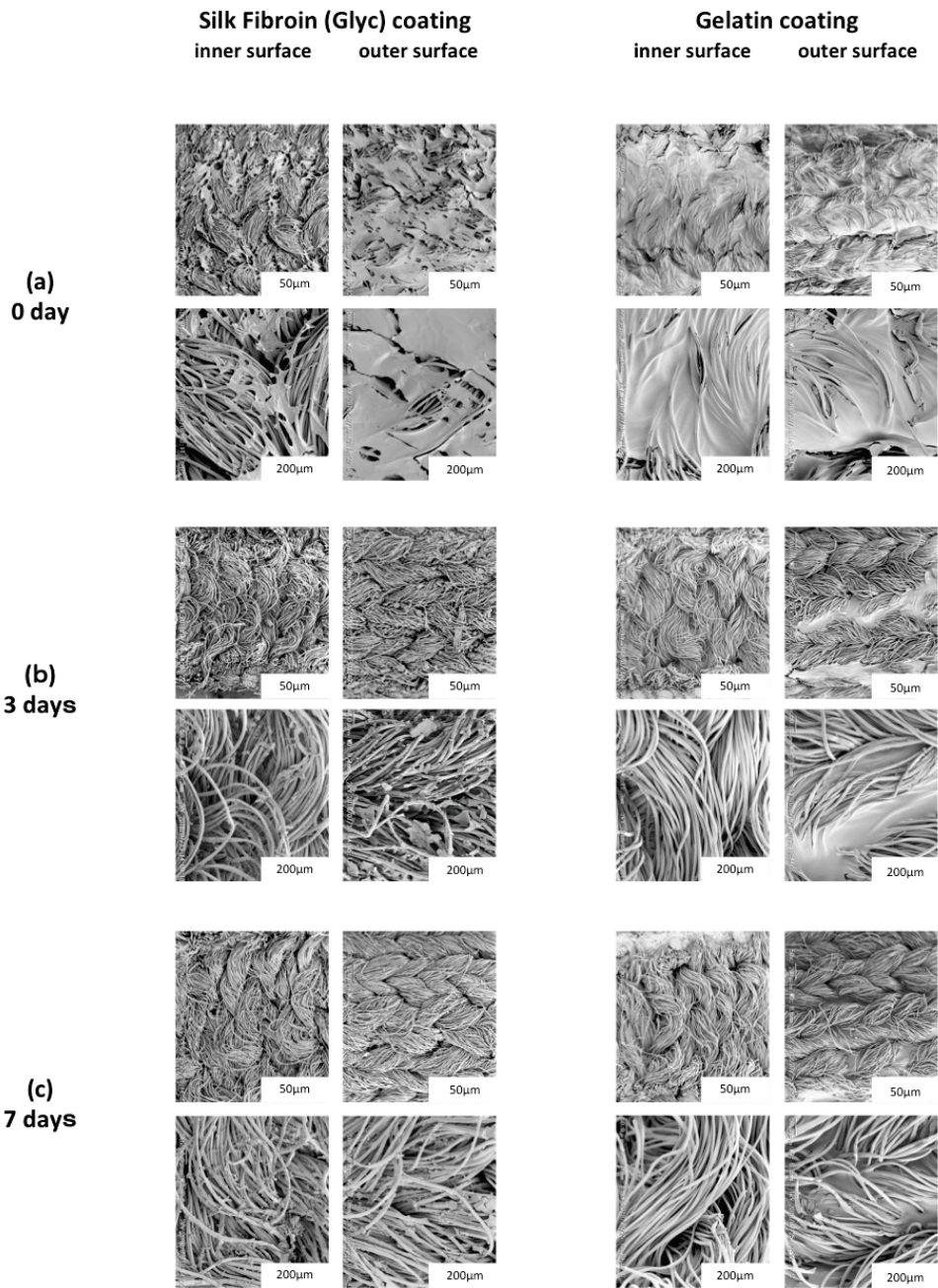


Figure 1 Glyc-SF および GEL でコーティングした PET グラフトの内面および外面の形態の SEM 写真

7日後の Glyc-SF では、グラフトの内・外面のコーティングは、ほぼ残存していなかった。一方、GEL では、外面では基盤の繊維の間隙にコーティング材が残存しているのが認められた。

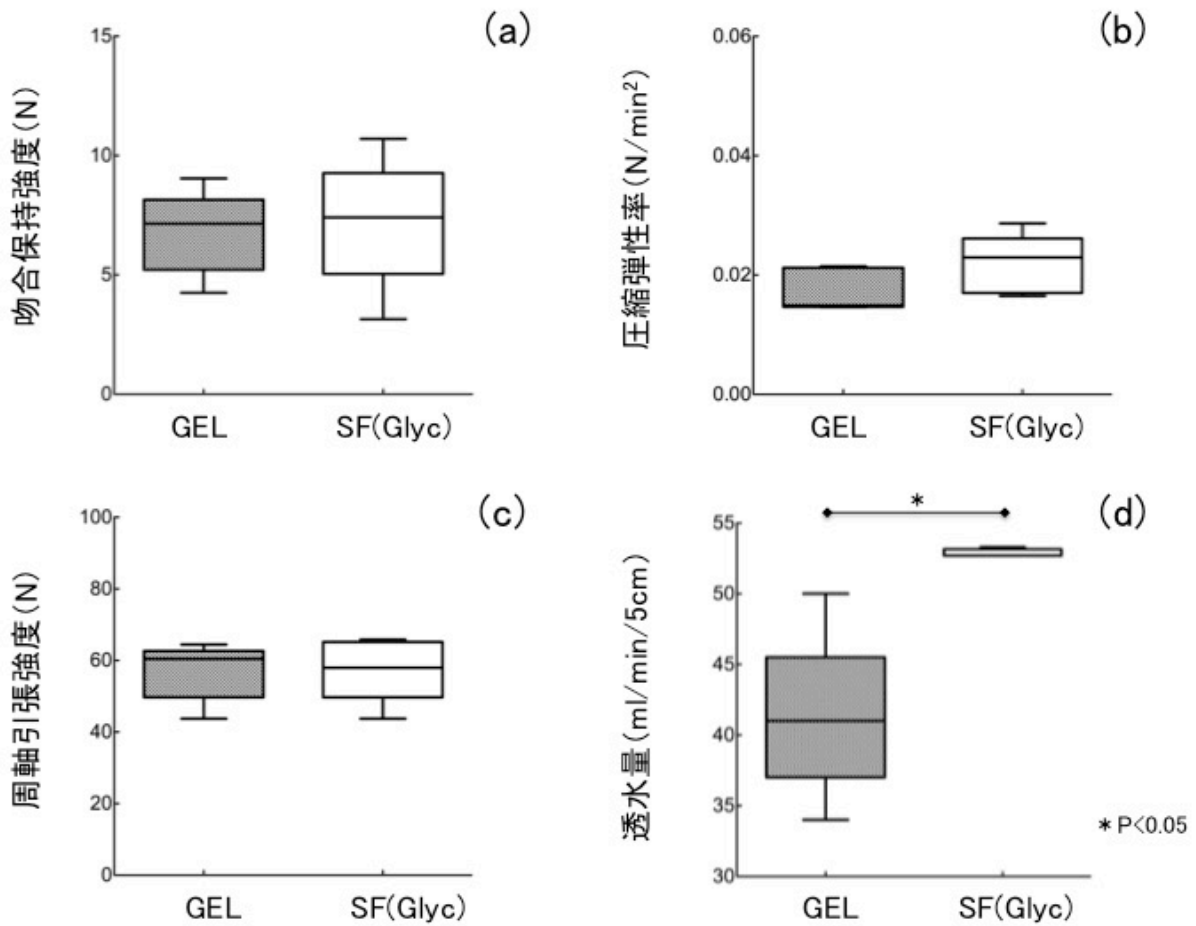


Figure 2 吻合保持強度試験(a), 圧縮弾性率試験(b), 周軸引張試験(c)および

透水量試験(d) (各々 n=5)

吻合保持強度, 圧縮弾性率および周軸引張強度においてGlyc-SFとGELの間に有意な差は認められなかったが, 透水量においてはGlyc-SFはGELと比べて, 有意に透水量が高かった。

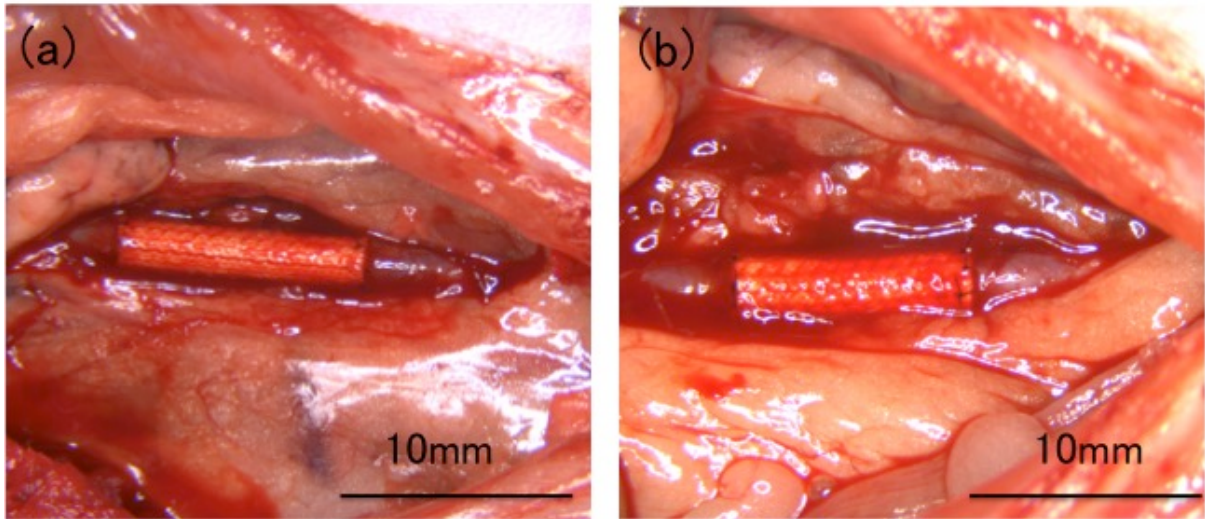


Figure 3 血管クランプを解除した直後のGlyc-SFおよびGEL

血管クランプを離した直後にGEL(a)は吻合部からのみの出血が認められたが、Glyc-SF(b)ではグラフト基盤からの血液の漏出が認められた。しかしながら、全ての人工血管において軽度の圧迫により止血は可能であった。

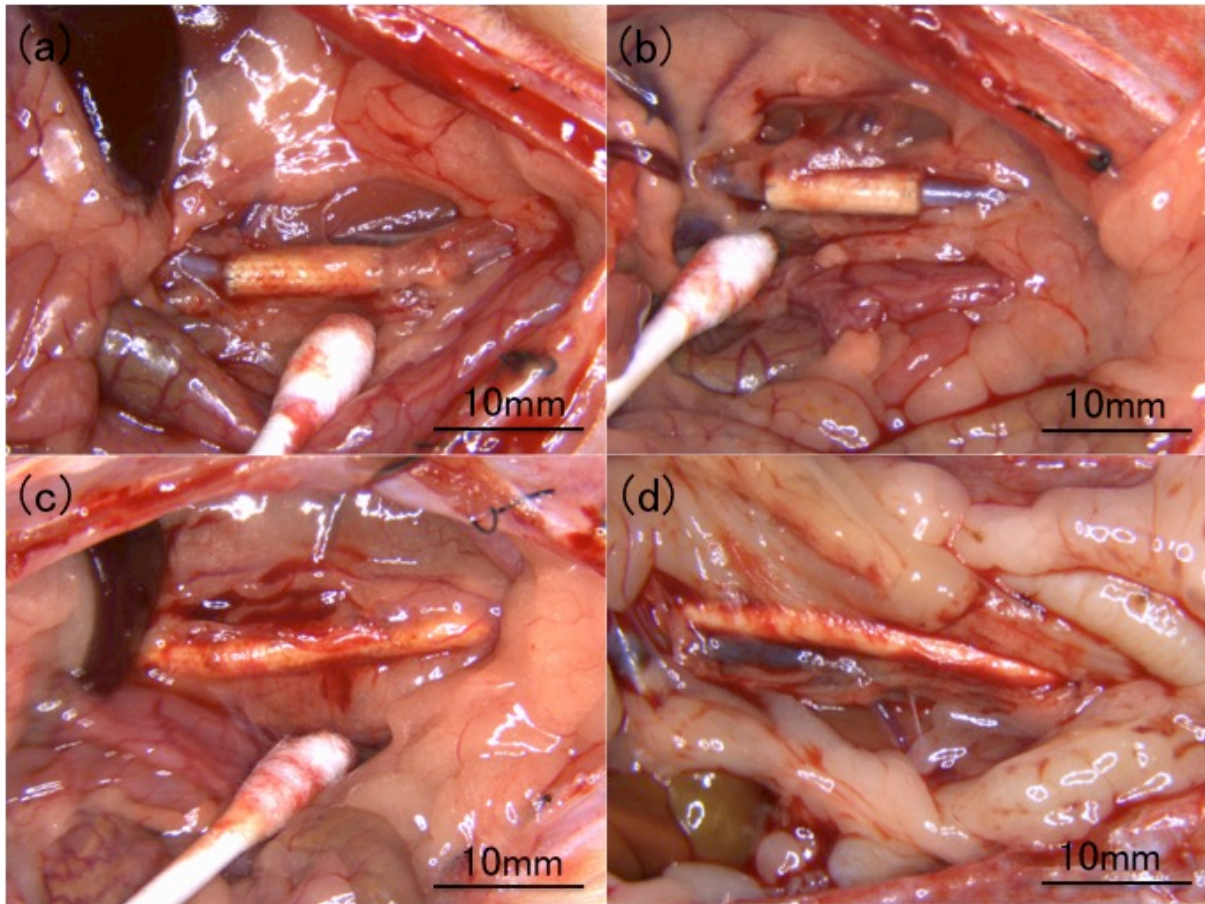


Figure 4 移植2週間後のGEL(a), Glyc-SF(b)および移植3ヶ月後のGEL(c),
Glyc-SF(d)

屈曲，裂開，肉芽腫，血腫および動脈瘤の形成などの副反応は認められなかった。

人工血管の摘出時の肉眼的な所見においてGELとGlyc-SFで違いは認められなかつ

た。周囲組織から人工血管の剥離は容易で，出血は軽度であった。

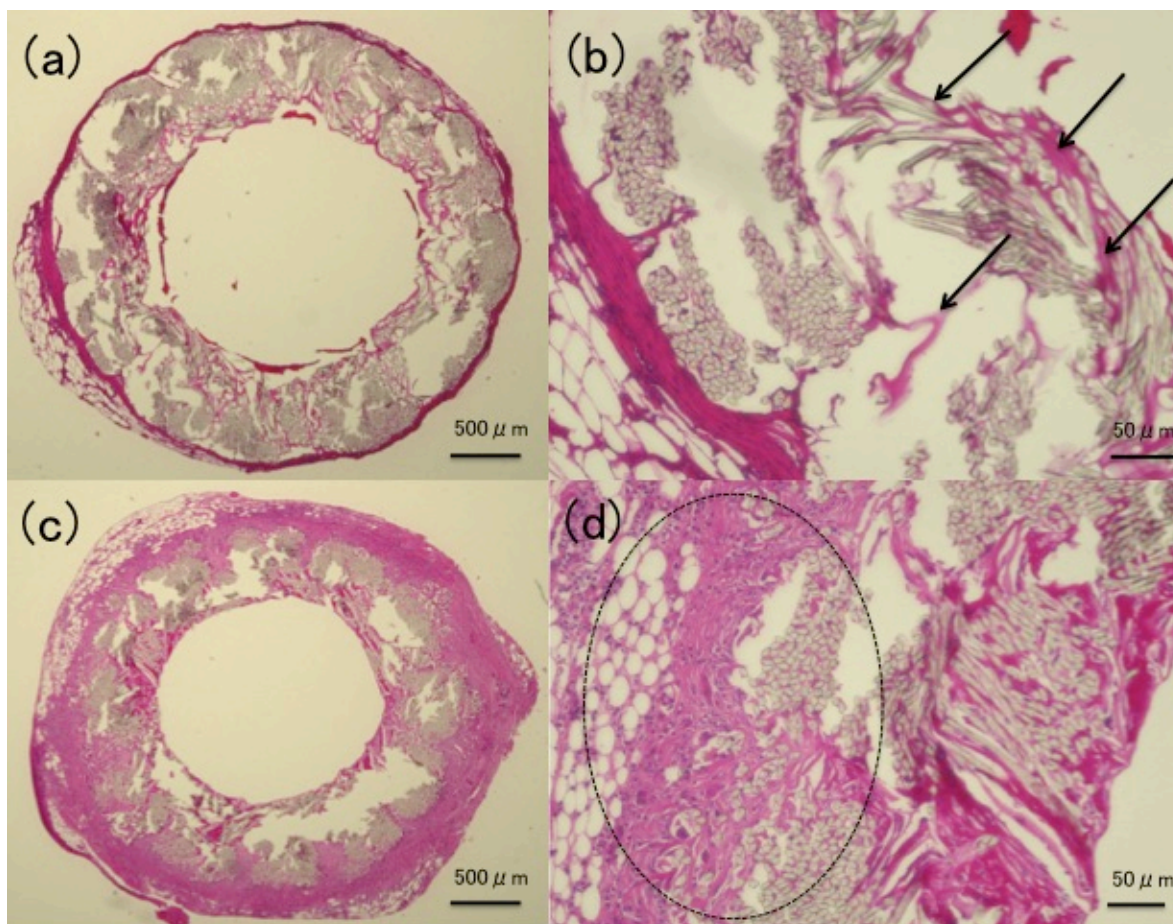


Figure 5 移植 2 週間後の HE 染色

GEL (a) およびその高倍率像である(b)と Glyc-SF(c) およびこの高倍率像である (d)を示した。Glyc-SF では、リンパ球、マクロファージおよび線維芽細胞などがグラフトの周囲および内部に GEL と比べて多く集簇していた(丸印)。また、GEL ではグラフトの内部にコーティング剤であるゼラチンが残存していた(矢印)。

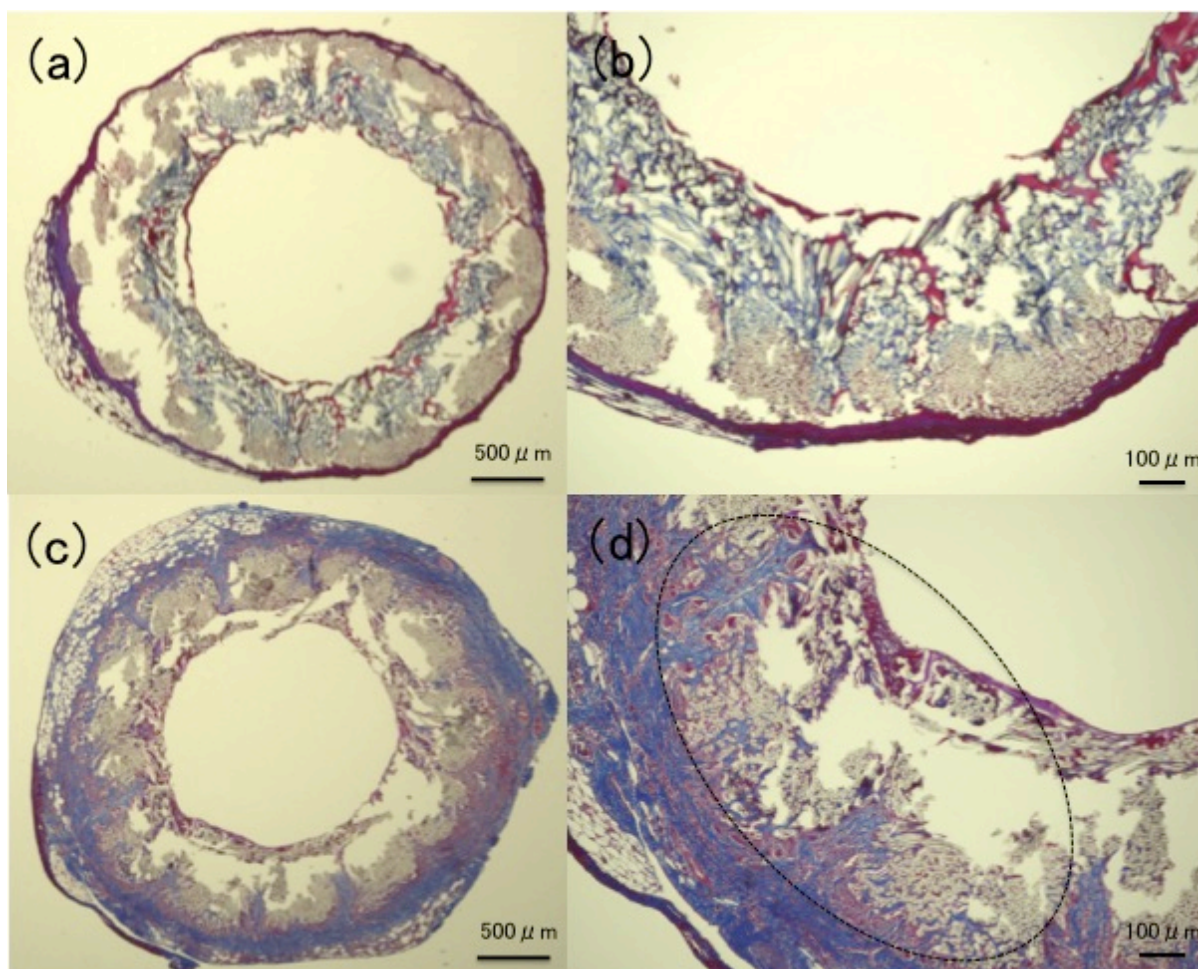


Figure 6 移植2週間後のMTC染色

GEL (a) およびその高倍率像である(b)とGlyc-SF(c) およびこの高倍率像である(d)を示した。GELでは膠原線維はグラフトの外側にわずかにしか観察されなかったが、Glyc-SFにおいては、膠原線維はグラフトの外周に集簇するだけでなく、グラフト内部へも侵入し、ポリエステル繊維の隙間にも入り込んでいた(丸印)。

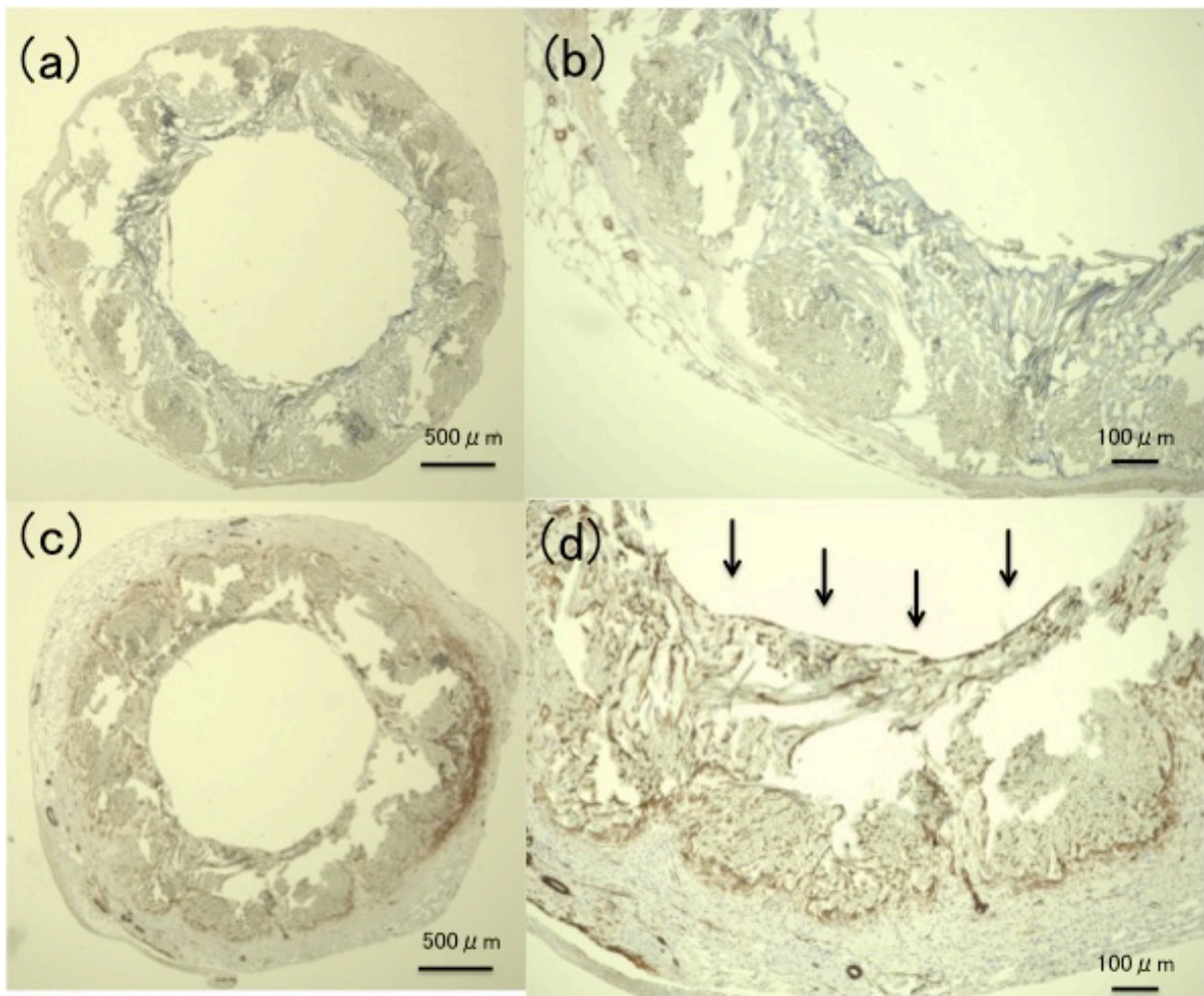


Figure 7 移植2週間後の α -SMA染色

GEL (a) およびその高倍率像である(b)とGlyc-SF(c) およびこの高倍率像である(d)を示した。矢印は人工血管の内腔面に沿って認められた平滑筋細胞を示している。Glyc-SFにおいて平滑筋細胞がグラフトの内部に観察されるだけでなく、グラフトの内腔に沿って集まっていた。しかしながら、GELにおいてはグラフトの外周および内部で平滑筋細胞の存在は確認出来なかった。

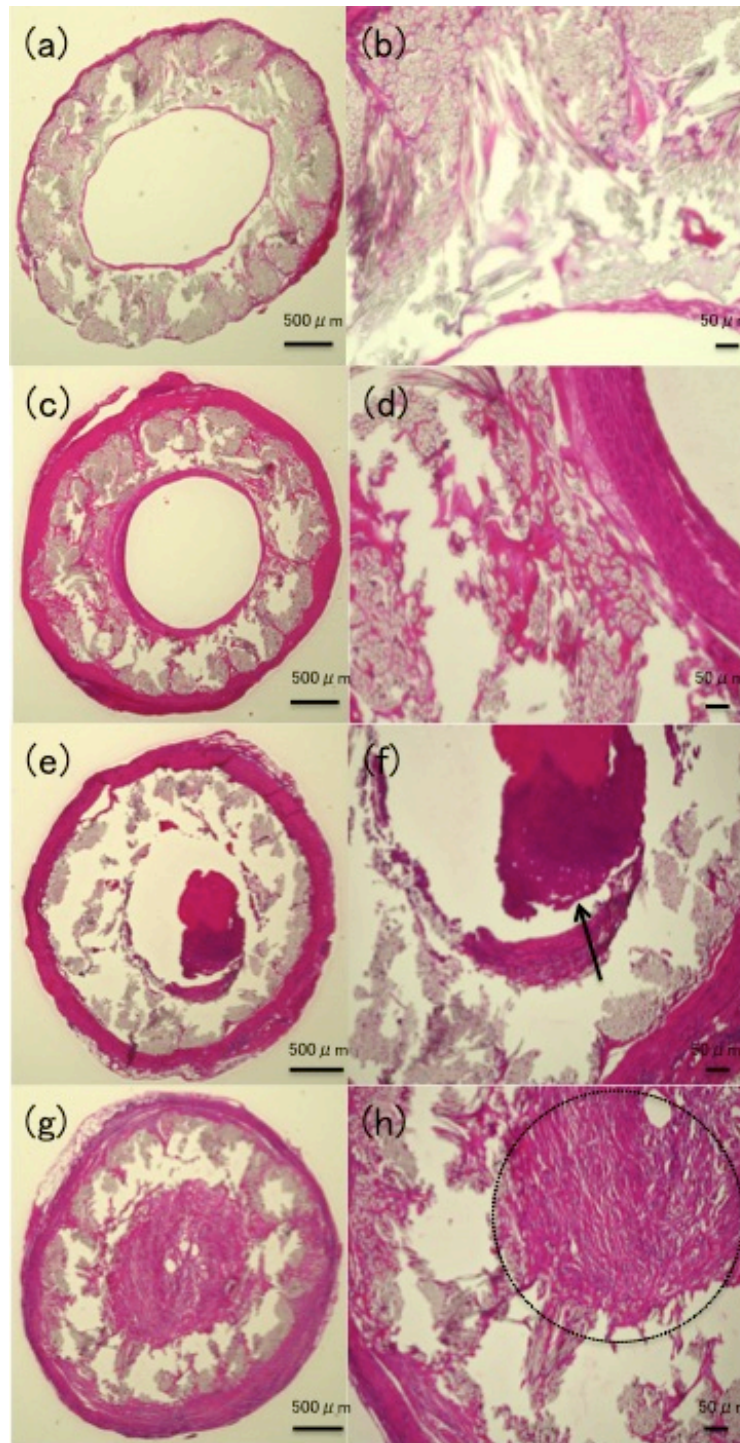


Figure 8 移植3ヶ月後のHE染色

GEL(a)およびその高倍率(b), Glyc-SF(c)およびその高倍率(d)。血栓が形成されたGEL(e)および血栓を矢印で示した(f)。内膜肥厚したGEL(g)およびそれを点線で囲った(h)。

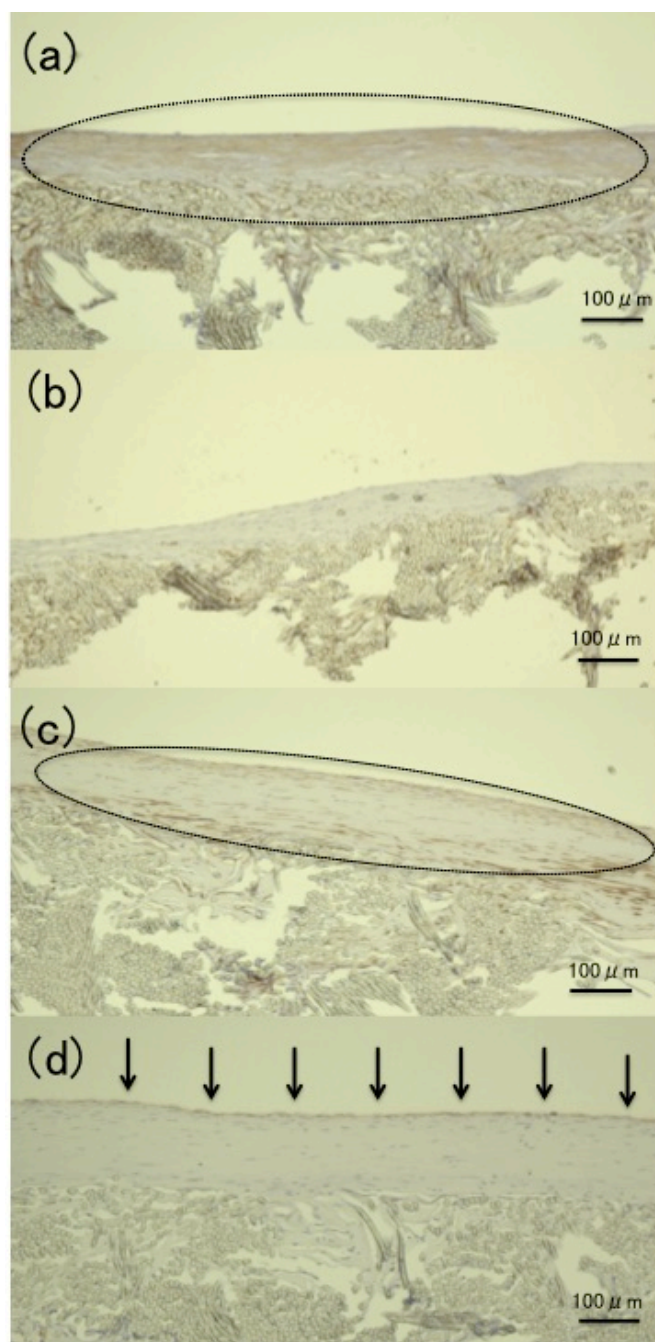


Figure 9 移植 3 ヶ月後の人工血管中央部の長軸像

GEL の α -SMA 染色(a)および CD31 染色(b)と Glyc-SF の α -SMA 染色(c)および CD31 染色(d)を示した。平滑筋細胞は点線で囲み，血管内皮細胞は矢印で示した。

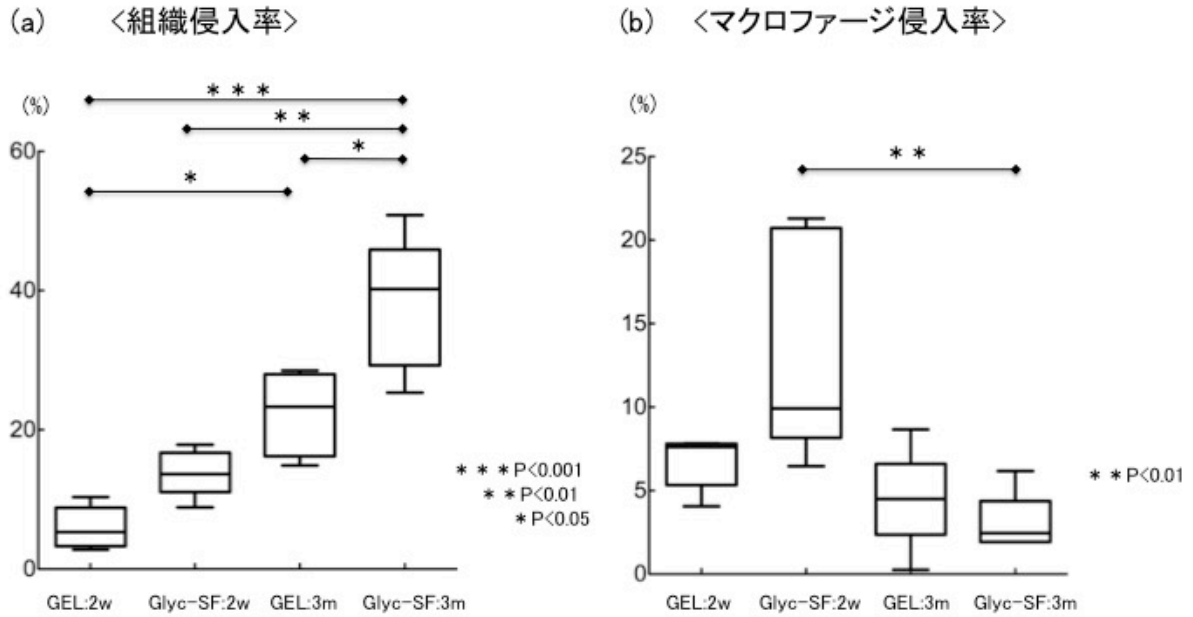


Figure 10 2種類の人工血管における移植2週間後および3ヶ月後の膠原線維の組

織侵入率(a)と移植2週間後および3ヶ月後のマクロファージ侵入率(b)

両方の人工血管において、移植3ヶ月後の組織侵入率は移植2週間後と比較して有意に高かった。また、移植3ヶ月後においてはGlyc-SFの組織侵入率はGELと比べて有意に高かった。GELのマクロファージ侵入率は移植2週間後と移植3ヶ月後で有意差は認められなかった。しかしながら、Glyc-SFにおいて移植3ヶ月後のマクロファージ発現率は移植2週間後と比較して有意に低かった。

第 4 章

絹小口径人工血管における 犬を用いた生体内評価

緒言

我々は作製した絹小口径人工血管を生体内へ移植し、評価を行うことで、その改良を続けてきた。しかしながら、これらの実験のほとんどがラットの腹部大動脈を用いて行われているものであった(14, 16, 17, 19, 71)。他の研究においても、SFを用いて作製された人工血管は生体内で、高い開存率およびリモデリング能力を示している(11, 15, 37)が、いずれもラットの腹部大動脈での評価であり、人医療での臨床応用を考えた場合、より大きな動物モデルでの生体内評価を行うことがSF製の人工血管での課題であった(26)。過去においてラット以外で生体内評価を行なった報告がなされている。Deryaらは直径3mmのダブルラッセルで編まれた人工血管をビーグルの頸動脈へ移植し、生体内評価を行なったが、5例中1例では1年以上の開存が認められたが、グラフト内腔の内皮化は不完全であった(6)。また、Hagaらも同様にダブルラッセルで編まれたSF製の人工血管をビーグルの頸動脈へ移植して開存率を調査するために、コントロールとしてPTFE製の人工血管も同時に移植し比較した(22)。しかしながら、SF製人工血管はPTFE製人工血管と比較して開存率に有意な違いは得られなかった。犬は他の動物種と比較して血液が凝固しやすいと言われているため(57)、移植後にSF製の人工血管であっても凝固を防ぐことができなかったことが考えられた。

本来 SF には自己組織の遊走や抗血栓作用を有し、様々な組織工学に応用されている。しかしながら、硬く分解されにくい状態の SF が人工血管の周囲を覆うことでその効果が十分に発揮できないことが考えられた。そこで第 1 章～第 3 章で分解されやすく、早期にリモデリングが可能な人工血管の作製を目指し、コーティングの改良を行ってきたが、これまでの生体内評価は全てラットの腹部大動脈で行ってきた。

そこで、本章では Glyc を用いて不溶化处理した SF コーティングで覆った小口径人工血管を犬に移植した。そして、移植後に開存率および病理組織検査を行うことで、本研究で作製したコーティング方法により、ラットよりも大きな動物モデルにおいても、高い開存率およびリモデリング能力の向上が可能かを検討した。

材料および方法

1. 絹小口径人工血管の作製

1-1. 基盤

第1章および第2章と同様の方法を用いてダブルラッセルで編まれた直径3.5 mmの小口径人工血管の基盤を作成した。その後、セリシンを除去するため精練を行い、SFのみの基盤を作製した。

1-2. コーティング

第2章と同様の方法でGlycを用いて不溶化処理を施し、直径3.5 mmの人工血管にSFコーティングを行った。その後、オートクレーブで120℃、20分間行い、滅菌後は冷蔵庫(4℃)にて保管した。以後、本章では、作製された絹小口径人工血管をGlyc-SFとした。

2. 移植実験

2-1. 供試動物

6頭のビーグル犬、雄、体重9-12 kgの大腿動脈にGlyc-SFの人工血管を移植した。使用したビーグルは東京農工大学「実験動物指針及び動物実験の手引き」に基づいて

飼育，実験操作を実施した(承認番号：29-38)。

2-2. 移植手技

立体顕微鏡下で6頭のビーグル犬の大腿動脈に Glyc-SF(直径3.5mm, 長さ4 cm)を移植した(Figure 1)。移植3ヶ月後, 移植5ヶ月後および移植1年後に,各2頭から小口径人工血管を摘出した。麻酔前投薬としての鎮痛および鎮静目的で酒石酸ブトルファノール(ベトルファール, 明治製菓ファルマ株式会社)0.2 mg/kg およびミダゾラム(ミダゾラム注 10mg 「サンド」, SANDOZ)0.1 mg/kg を静脈内に投与した。その後, プロポフォール(プロポフォール静注1% 50 mL 「FK」, フレゼニウスカービジヤパン株式会社)6 mg/kg を気管内挿管が可能になるまで投与した。麻酔の維持はイソフルランと酸素を混合させて, 気管内チューブを介して人工呼吸で管理した。大腿動脈を注意深く露出させた後, 分枝血管を 3-0 絹糸で結紮した。ヘパリン(ヘパリンナトリウム注, エイワイファーマ株式会社)100 IU/kg を静脈内に投与した後, 大腿動脈の近位および遠位の2箇所血管用クランプを装着して血流を遮断した。その後遮断部位を切断し, 7-0 モノフィラメントポリフッ化ビニリデン縫合糸(PREMIO 7-0, PETERS Surgical 社)を用いて端々吻合術で Glyc-SF を大腿動脈に移植した。遠位のクランプをゆっくり解放し, グラフト内の空気を追い出した後, 近位のクランプも解

除した。血液の漏出がないことを十分に確認した後に、定法に従い閉創した。アモキシシリン(パセトシン錠 250, アスペンジャパン株式会社)を感染予防のために、術後1日目から7日目まで、1日2回経口投与した。また、クロピドグレル(クロピドグレル錠「テバ」, 武田テバファーマ株式会社)を1日1回、目的とする摘出期間まで経口投与した。

2-3 人工血管のエコー検査

移植後の人工血管のエコー検査は、超音波画像診断装置(Prosound α-10, 日立アロカメディカル)を用いて、プロポフォル(プロポフォル静注1% 50 mL「FK」, フレゼニウスカービジャパン株式会社)を静脈内に投与し、鎮静下にて実施した。プローブは7.5-MHzのリニア型(電子リニア探触子, 日立アロカメディカル)を用いた。Bモードを用いて血管内部の構造, カラードプラを用いて血流の確認およびパルストプラを用いて血流速度を調べた。血管エコー検査は、移植後1日目, その後は毎週1回ずつ, 1ヶ月後以降は月に1回ずつ実施した。

3. 組織学的評価

3-1. 小口径人工血管の取り出し

目的とする移植期間が経過した後、移植時と同様に麻酔処置をビーグル犬に施し、第1章および第2章と同様の方法で人工血管を摘出しメタノールにて固定した。その後、長さ4 cmの人工血管は4mm幅で短軸方向に切断した。その後、第1章～第3章と同様の方法で組織標本を作製した。

3-2. 病理組織学的検査

作製したパラフィン切片に定法に従いHE, MTC, EVGおよびコッサ染色を実施した。免疫組織化学染色として、 α -SMA マウス抗モノクローナル抗体(SIGMA-ALDRICH社製)およびCD31抗ラビットポリクローナル抗体(Abcam社製)を一次抗体として使用し、次に抗マウスIgGビオチン付き二次抗体(ニチレイバイオサイエンス社製)に反応させた後、発色としてVectastain ABC-AP(Vector laboratories社製)を用いた。

結果

1. 移植結果

6例の全てにおいて、縫合部の裂開やコントロールできない出血などの副反応はなく、移植することが可能であった。移植後、血液の再還流時に吻合部およびグラフトからの出血が認められた。しかしながら、ガーゼなどによる軽度の圧迫で血液の漏出は防ぐことができた(Figure 2)。人工血管が移植された全ての犬において、観察期間中に後肢の麻痺および血腫などの異常所見は確認されなかった。摘出時において、移植3ヶ月後では、移植した人工血管は周囲の組織と癒着していた(Figure 3)。周囲組織との癒着の程度は移植3, 5および12ヶ月後と経過が長くなるにつれて強くなっていたが、周囲組織との剥離は可能であり、その際の出血は軽度であった。また、人工血管の変形、動脈瘤の形成、感染および肉芽腫などの副反応は観察されなかった。

2. 血管エコー検査

超音波画像診断装置を用いて、移植後全ての小口径人工血管について評価を行った。移植後早期に認められるような血栓の形成、血液の漏出による血腫および異物反応による肉芽形成などは観察されなかった。1例で移植4週間後に、人工血管の近位と遠位の2ヶ所で屈曲が確認された(Figure 4)。そのグラフトの内腔にはカラードップラ

一で検出されないエコー源性の高い構造物が認められた。残りの5例においては観察期間中(3ヶ月, 5ヶ月, 12ヶ月)に上記のような移植早期に起きうる副反応は認められず、内膜肥厚や動脈瘤などの長期で観察されるような副反応も起きなかった。

また、移植した人工血管領域で収縮期最大血流速度(PSV)および拡張末期血流速度(EDV)を測定したが、いずれの時期においても有意な上昇および下降は確認されなかった。

3. 組織学的検査

HE染色において移植3ヶ月後において人工血管の内腔に沿って層状の構造物を確認することができた。また、移植5ヶ月後、1年後と移植期間が長くなるに連れて、その厚みが増加していた(Figure 5)。人工血管の外周に沿ってリンパ球およびマクロファージが浸潤していた。さらにそれを覆うように好中球を含む多数の炎症細胞と膠原線維が人工血管を覆っていた。平滑筋細胞はそのほとんどが人工血管の内腔面に集簇し、人工血管の内部や外周には観察されなかった。膠原線維は人工血管の内部よりも内腔面と外周により多く集まっていた(Figure 6)。弾性線維および血管内皮細胞は移植3ヶ月時点で人工血管の中央部で確認することが可能であった(Figure 7)。移植5ヶ月後では、人工血管周囲の炎症細胞や膠原線維は減少していたが、人工血管の

内腔の構造は移植3ヶ月後と同様の所見であった。また、移植後1年経過しても石灰化は確認されなかった。

考察

これまでに、SFを用いた小口径人工血管の研究が報告されており、SFの特性を生かした人工血管開発の可能性が示されてきた(11, 14, 15, 17, 19, 37, 71)。しかしながら、これまでの報告では置換長が短い、移植数が少ない、移植期間が短い、小型動物モデルで評価を行っていたという制限があり、大型動物モデルでの報告は少数である(6, 22)。人への臨床応用へ向けては、大型動物モデルにおいて、実際に使用される人工血管の径や長さを考慮して、中長期的な評価を行う必要がある。そこで、本章においては上記の問題点の解決を目指して、第1章～第3章で改良されたSFコーティングを施した小口径人工血管を犬に移植し、生体内での人工血管の変化について中長期的な評価を行うことを目的とした。また、そのためには移植した人工血管の開存は必須であり、血管エコーを行って、中長期の開存性についても調査した。

本章においては作製された人工血管の物性試験は第2章と同じ作製方法で作られたため実施していないが、第1章～第3章と同様に縫合糸の裂開による人工血管の破断や移植後の動脈瘤の形成などは認められなかったことから直径が3.5 mmに大きくなったとしても、移植に必要な強度を有していると考えられた。しかしながら、移植が完了した後に血管クランプを外して血流を再開させた際に、血液の漏出が認められたが、その止血に要した時間はラットの移植に比べると比較的長かった。第2章お

よび第3章において、アルコールを用いないで Glyc で不溶化処理した SF でコーティングした人工血管は、従来のアルコールで不溶化処理した人工血管に比べて人工血管を覆う SF の量が少ないことが SEM で観察された。ラットの移植で用いた直径 1.5 mm 径の人工血管では問題なかったが、3.5 mm 径では基盤の網目が大きくなったために、より多くの血液が漏れ出たと考えられた。しかしながら、ヘパリンによって凝固処理された条件下であっても、ガーゼによる圧迫で全ての症例で移植可能であった。コーティング濃度が上がれば上がるほど人工血管は固く移植しやすくなるが、その代わりに SF の分解が遅れ、リモデリングには不利に働く(27)。本研究で改良された SF コーティングであれば、生体内に移植後、すぐ分解されるため、従来の最適な SF コーティング濃度である 2.5%(16)を上回る濃度でコーティングを施しても、移植後のリモデリング能力に影響しないと推察された。以上のことから、3.5 mm の SF 人工血管における最適な SF コーティング濃度を再検討する必要があると考えられた。

本章で移植した人工血管は中長期の期間において高い開存率を示した。また、移植3ヶ月の時点で、ラットへ移植した時と同様に自己組織へのリモデリングが認められ、人工血管の中央部での内皮化を確認することができた。移植後の経過が長くなるにつれて、内膜に厚みが出ていたが、それによる内腔の狭小化は認められなかった。移植後1年以上の経過は追っていないものの、血管内皮細胞は血液の凝固や平滑筋細胞の

過剰な増殖に起因する血管内腔の狭窄を防ぐと言われているため(62), 移植の経過が長くなったとしても一度, 血管内皮細胞が人工血管の内腔を覆ってしまえば, 移植後, 中長期で観察される内膜肥厚は防げると考えられた。また, 移植後 1 年経過しても人工血管の破綻, 動脈瘤, 石灰化は認められなかったことから, 移植後長期において, 今後も高い開存性が維持される。

6 例中 1 例において移植 4 週間後において, 人工血管の屈曲が生じた。移植 2 週間後から人工血管の屈曲が確認され, 経過がたつに連れて少しずつ曲がりの角度が急になっていった。そのため, その部位における血液の乱流が生じ, 血栓が形成され, 閉塞が生じたと考えられた。本章において移植 4 週間後の組織学的検査を実施していないため, 人工血管のリモデリングの状況は不明であるが, 過去の報告などからも移植 4 週間の時点において, 人工血管のリモデリングが不十分であるため, 血管内皮細胞が人工血管の内腔面を覆っていないことが考えられた。移植した人工血管における新生内膜形成については, ①吻合部からの伸展による内皮化, ②人工血管線維の間隙を経由して伸展してくる毛細血管からの内皮化, ③血液中を循環している血管内皮前駆細胞の接着による内皮化が考えられている(50)。本研究において生体内で分解されやすいコーティングを人工血管に施すことで, 移植後早期にコーティング部分の SF が溶け出し SF の特性を発揮したのと同時に, 間隙のできた基盤の隙間を通して毛細血管

や膠原線維などが多数侵入してくることで内皮化を早めることが可能になった。しかしながら、本章で使用された人工血管は移植 4 週間の時点ではリモデリングが不十分であった。人の臨床で応用される場合には人工血管に更なる長さが求められる(40)ことから、移植した人工血管中央部における内皮化を更に促進する必要がある。SF の特性の一つに遺伝子組み換えができる特性があり、蚕の中に遺伝子を導入して新たな機能を獲得することが可能である(28, 29, 64)。この技術によって、基盤の SF に血管内皮細胞の増殖を促す因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) を組み込み作製された人工血管によって、内皮化を早めることが可能であった(17, 56)。この技術を用いてコーティング部分の SF に VEGF などの因子を組み込むことで、大型動物モデルにおいて、更なる早期の内皮化が可能になるかを今後検討していきたい。

小括

今までの絹小口径人工血管のリモデリング能力および開存率については、主にラットに移植を行い、移植 2 週間後および 3 ヶ月後で生体内評価してきた。しかしながら、人での臨床応用を考えた場合に、より大型動物で、移植後長期にわたる評価が必要になってくる。そこで、本章では第 1 章～第 3 章で改良してきたコーティング方法を用いて人工血管を作製し、犬の大腿動脈へ移植を行い、移植後長期の開存性およびリモデリング能力について評価することを目的とした。移植 3 ヶ月後にラットと同様に人工血管の内腔に弾性線維、平滑筋細胞および血管内皮細胞が出現しリモデリングが完了していた。また、移植後 1 年でも人工血管の破綻、動脈瘤、内膜肥厚、石灰化などは観察されずに開存していた。本研究で改良したコーティングを施すことで、ラットよりも大型の動物においても長期の開存性と自己組織へのリモデリングが可能であることが明らかとなった。

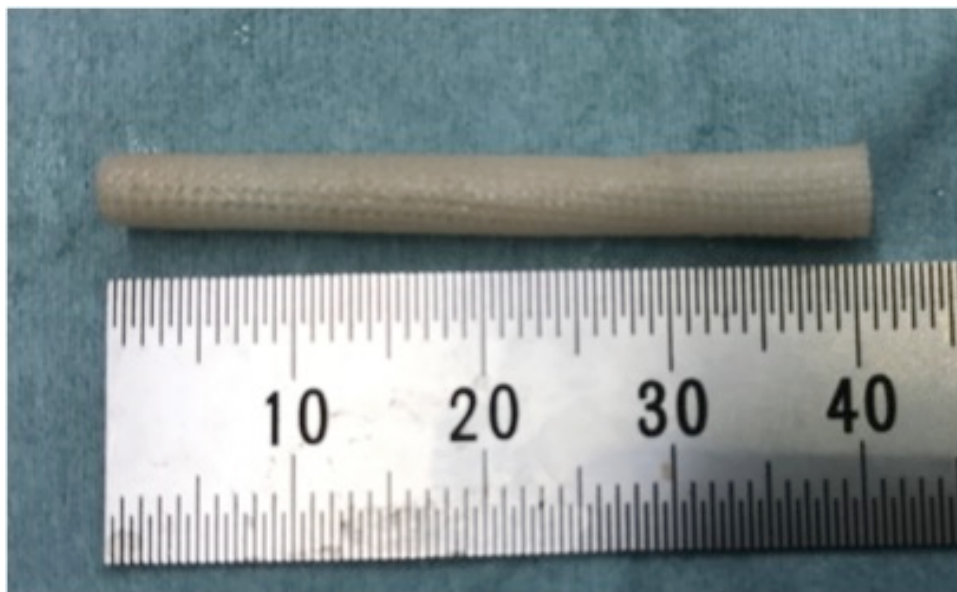


Figure 1 絹小口径人工血管の写真

直径 3.5 mm, 長さ 4 cm の絹小口径人工血管をビーグル犬の大腿動脈へ移植した。

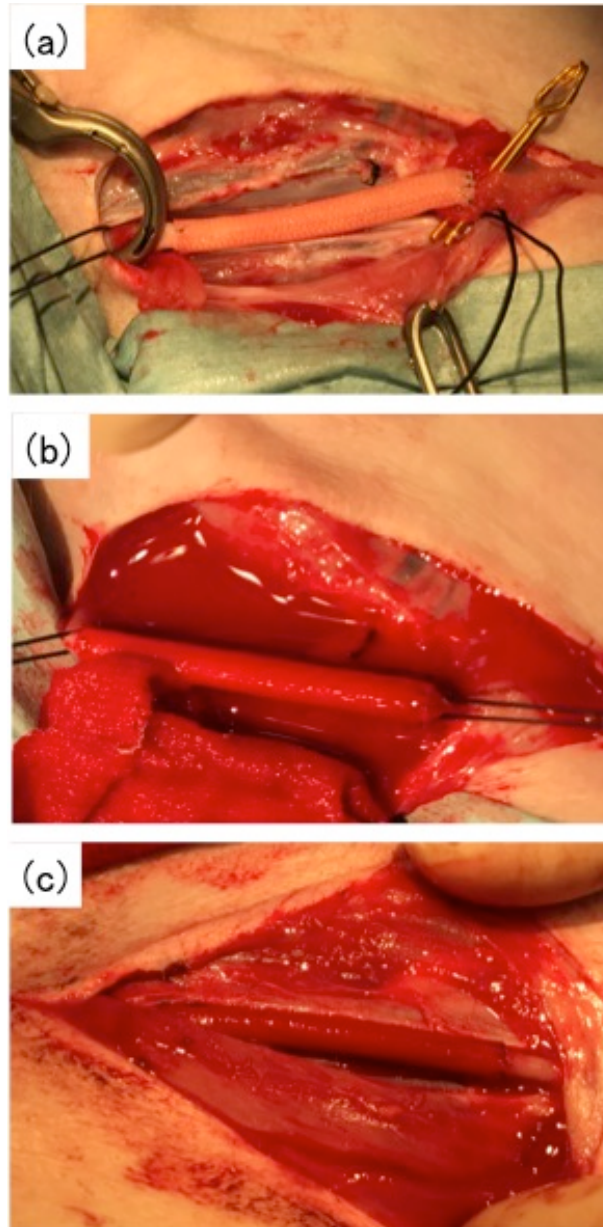


Figure 2 移植時の人工血管の写真

ビーグル犬の大腿動脈へ移植した直後の人工血管(a), クランプを離した後の血流再開後の人工血管(b)および止血された後の人工血管(c)。少量の出血は認められたが、数分の圧迫で止血可能であった。

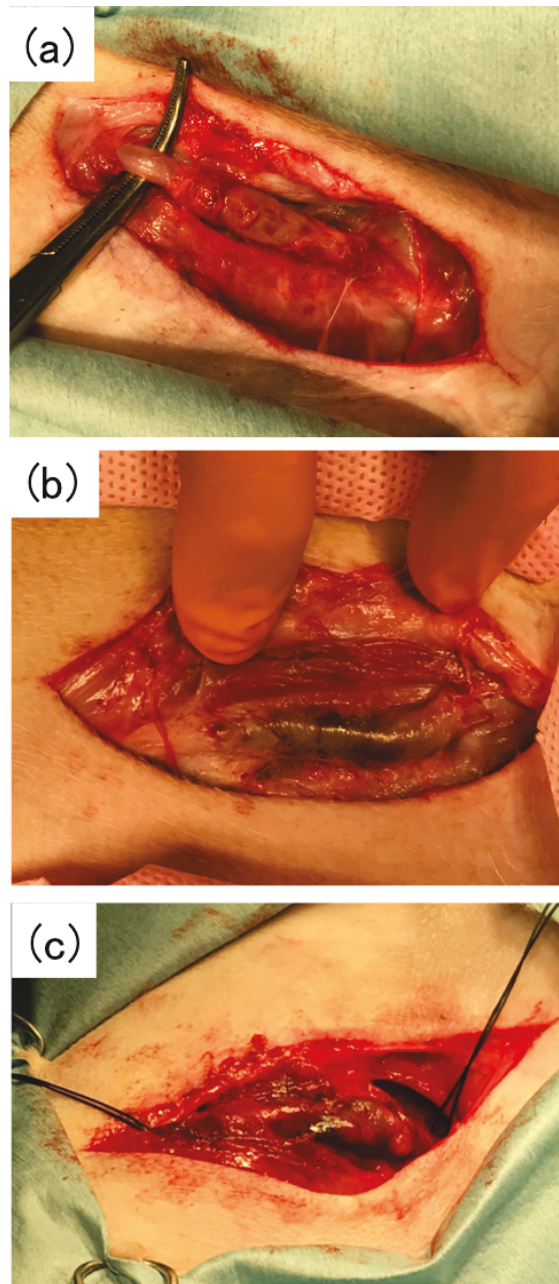


Figure 3 移植3ヶ月後(a), 5ヶ月後(b), 1年後(c)の人工血管の写真

移植された人工血管は周囲の組織と付着していたが、剥離可能であった。移植1年後の人工血管はより周囲との結合が強かった。

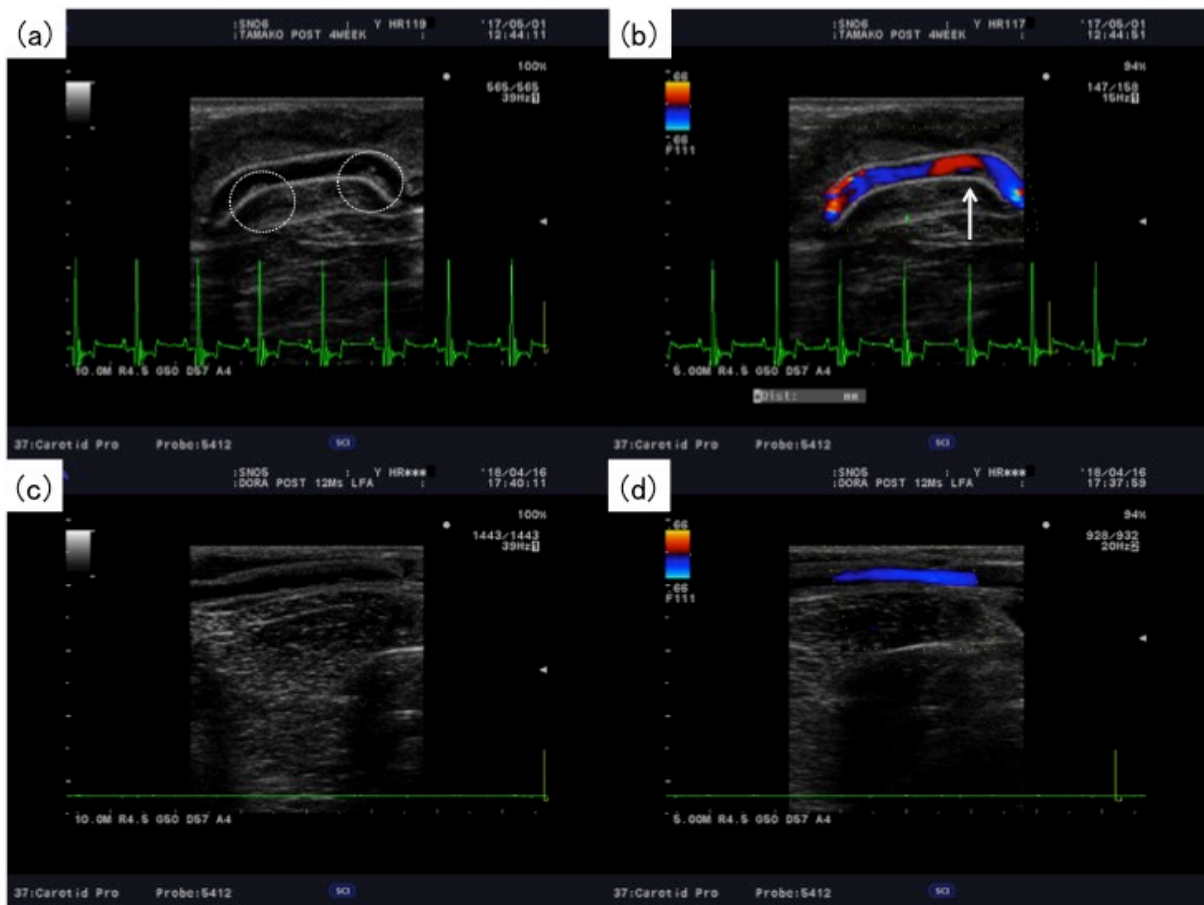


Figure 4 移植した人工血管のエコー検査

移植 4 週間後のエコー写真(a)。屈曲した人工血管の内腔面にエコー源性の高い構造物が確認された(丸印)。カラードプラにて血流は確認できたが、血栓の部位には、血流は認められなかった(b) (矢印)。移植 1 年後の人工血管のエコー写真(c)。人工血管の屈曲や瘤などは認められなかった。また、カラードプラにて血流が確認できた(d)。

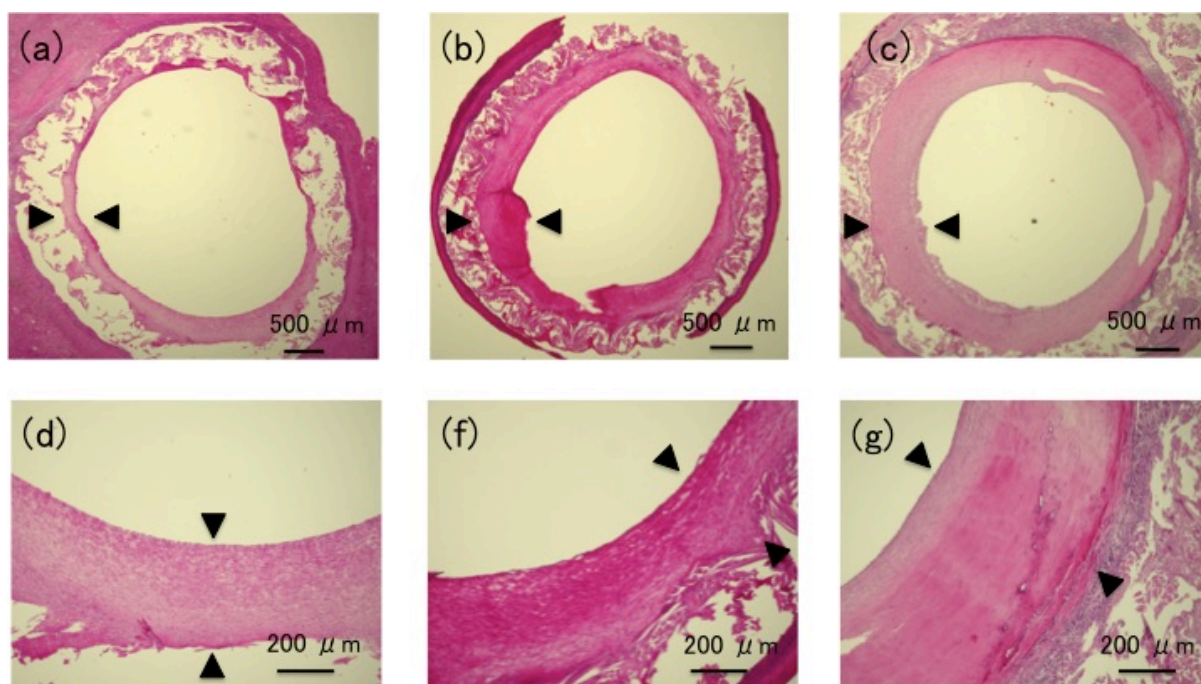


Figure 5 移植3ヶ月後, 5ヶ月後, 1年後のHE染色

移植3ヶ月後のHE染色(a)とその高倍率像(d), 移植5ヶ月後のHE染色(b)とその高倍率像(f), 移植1年後のHE染色(c)とその高倍率像(g)を示した。移植3ヶ月後において, 人工血管の内腔に形成された層状の構造を2つの矢頭で示した。移植5ヶ月後および1年後において, それらの厚みは増加していた。

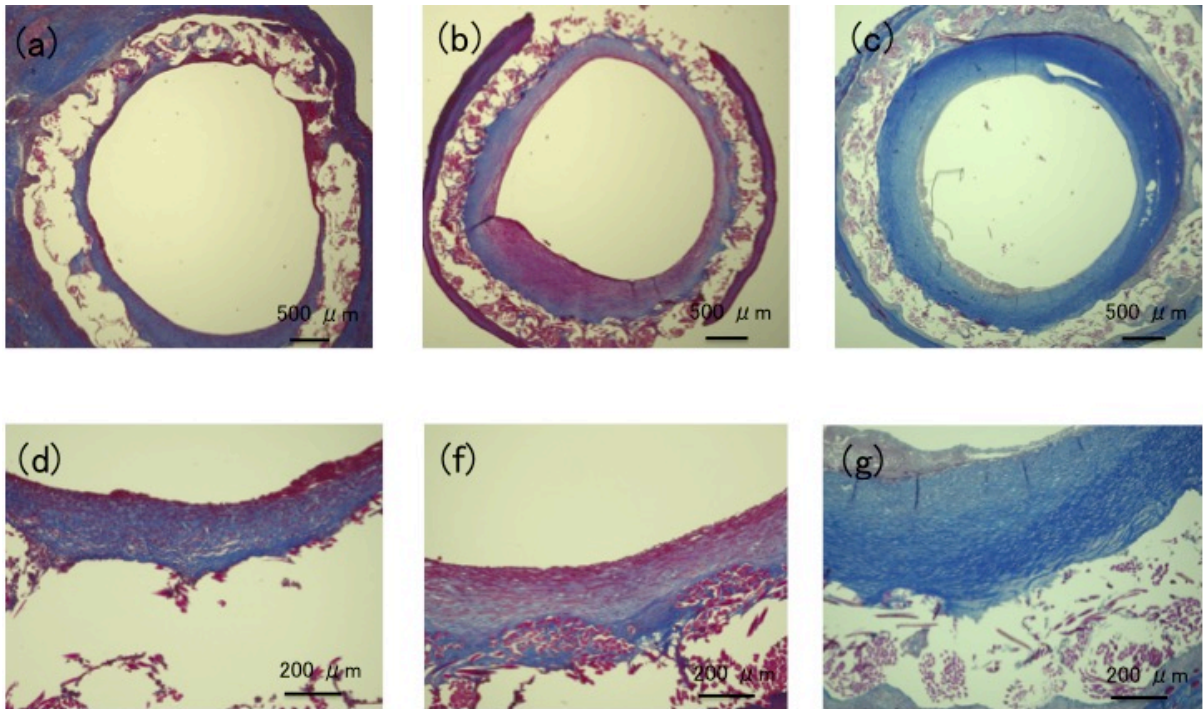


Figure 6 移植3ヶ月後、5ヶ月後、1年後のMTC染色

移植3ヶ月後のMTC染色(a)とその高倍率像(d)、移植5ヶ月後のMTC染色(b)とその高倍率像(f)、移植1年後のMTC染色(c)とその高倍率像(g)を示した。膠原線維は移植3ヶ月後においては、人工血管の外周に主に集まっていたが、人工血管の内腔に沿っても集まっていた。移植5ヶ月後および1年後では内腔面の膠原線維は増加し、外周の膠原線維は減少していた。

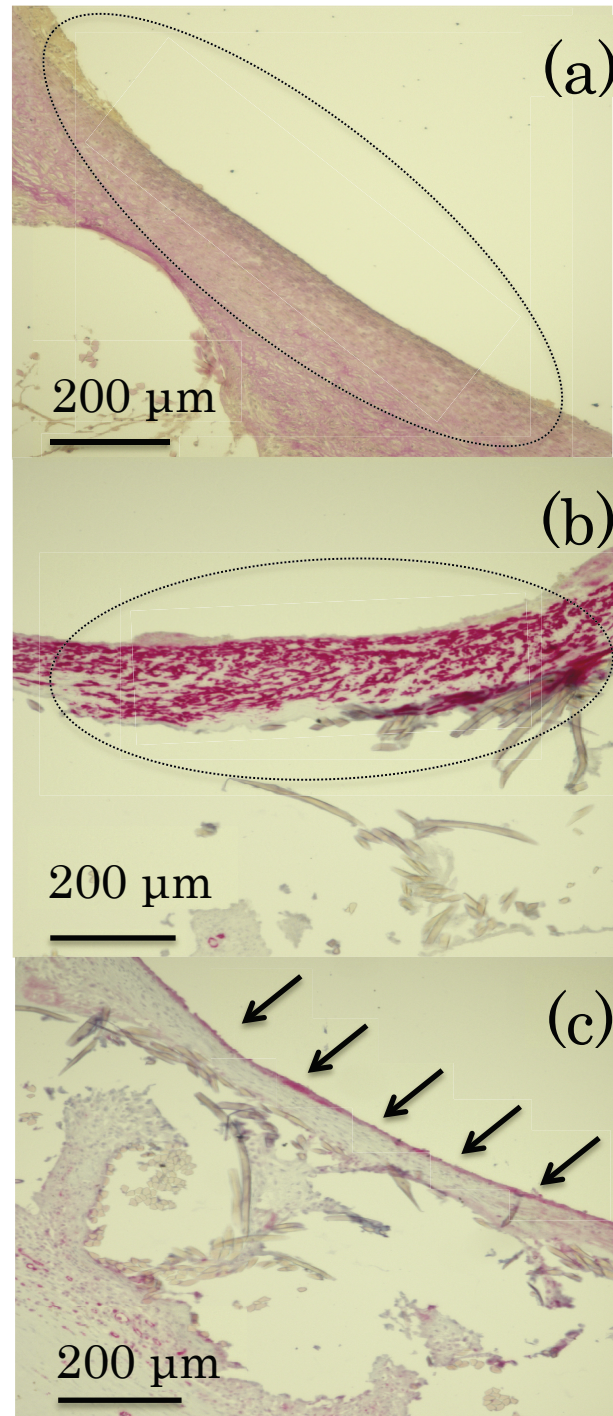


Figure 7 移植 3 ヶ月後の組織画像

EVG 染色(a), α -SMA 染色(b), CD31 染色(c)を示した。弾性線維, 平滑筋細胞(丸印)および血管内皮細胞(矢印)が人工血管の内膜層およびその表面で観察することができた。

総括

SF は様々な特性を有し、小口径人工血管における新たな素材として使用できる可能性がある。過去においてその有用性を示す研究がなされてきたが、人工血管のコーティング部分の SF が硬く分解されにくい性質を持っていた。そのため、本研究ではコーティング部分の SF が分解されやすくなるように改良し、生体内でのリモデリングを早める人工血管を作製することを目的とした。

そこで、第 1 章ではコーティング部分の SF に Glyc を混合することで SF に柔軟性を付与し、生体内で分解されやすいコーティング方法を試みた。そして、ラットの腹部大動脈へ移植し、従来の SF のみでコーティングした人工血管との比較を行った。Glyc を混合させた SF でコーティングした人工血管はコーティング部分の SF が多孔質になり、生体内でより分解されやすくなることが期待された。しかしながら、従来の SF コーティングと比べて、柔軟性およびリモデリング能力に違いは認められなかった。このことは、コーティングの最後に行われる、エタノールを用いた不溶化処理によって SF が硬く、分解されにくくなってしまふことが原因と考えられた。次いで、第 2 章では、不溶化処理にエタノールを使用せず、3 種類の孔源として PEG, PGDE, Glyc を用いて SF を不溶化処理して人工血管を作製し、比較検討した。3 種類の孔源を用いた人工血管は従来の人工血管と比較してより柔軟性があり、リモデリング能力

も向上した。特に、PGDE, Glyc は移植 3 ヶ月後に血管内皮細胞が人工血管の内腔を覆っていた。以上の結果から、コーティング部分の SF に柔軟性を付与し、分解されやすいコーティング方法が判明した。

しかしながら、第 1 章および第 2 章では人工血管の基盤にも SF を用いていたために、リモデリング能力についてコーティング部分のみの評価ができていなかった。そこで、第 3 章では基盤に中・大口径で使用されているポリエステル繊維を用いて、リモデリングに影響を与えない基盤の人工血管を作製し、コーティングには第 2 章で良好な結果が得られた Glyc で不溶化した SF を用いた。第 2 章で作製された人工血管よりも膠原繊維の人工血管内への組織侵入率は低かったものの、移植 3 ヶ月後でリモデリングは完了していた。また、このことは過去における VEGF を基盤に用いた人工血管よりも優れた結果であった。このことから、移植後のリモデリングにおいてはコーティング部分の SF の分解能力が向上することで、基盤がリモデリングに寄与しないポリエステル繊維であっても、移植後、自己血管に置き換わることが明らかとなった。

いままで SF コーティングされた人工血管においては、大型動物モデル、特に犬において開存率およびリモデリング能力が低く、ラットにおいて得られた結果と異なる移植結果しか得られていなかった。そこで第 4 章では第 1 章～第 3 章で改良されて

きた SF コーティングを用いて作製した人工血管をビーグル犬に移植し，犬における人工血管の開存率およびリモデリング能力について検討した。移植 3 ヶ月の時点で，血管内皮細胞が人工血管の内腔を覆い，リモデリングが完了していた。また移植 1 年以上経過しても，開存していたことから，本研究で用いたコーティング方法が小口径人工血管に適したコーティングであると考えられた。今後，さらなる改良を続け，絹小口径人工血管が臨床応用されることを期待したい。

謝辞

本学に入學するにあたって、何もわからなかった私に対して研究をご指導くださいました東京農工大学獣医外科学研究室の田中綾准教授に心より感謝し、御礼を申し上げます。また、本研究を中心にご指導していただいた東京農工大学画像診断学研究室の清水美希准教授、岐阜大学獣医臨床放射線学の神志那弘明准教授に深謝いたします。

本研究を行うにあたり、人工血管の開発ならびに研究のご指導をしていただいた東京農工大学工学部生命工学科の朝倉哲郎教授および研究室の方々に心から感謝申し上げます。

大変お忙しい中、主査を引き受けて下さり、根気強く指導していただいた東京農工大学獣医外科学研究室の打出毅教授、また、副査を快諾し、研究に対する指導をしていただいた帯広畜産大学臨床獣医学分野の山岸則夫教授、岩手大学画像診断学教室の片山泰章准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたって、研究に関する指導をしていただいた卒業生である深山俊治氏に心より御礼を申し上げます。また、研究をするにあたり、多くのご協力をしていただいた外科学研究室の卒業生ならびに学生の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、動物病院に勤務しながら、研究のために大学へ通うように助言していただいた手塚泰文院長，多くのご協力をしていただいた高島平手塚動物病院のスタッフの皆様に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Abdulhannan, P., Russell, D. A. and Homer-Vanniasinkam, S. (2012). Peripheral arterial disease: a literature review. *Br Med Bull.* 104, 21-39.
2. Antoniou, G. A., Chalmers, N., Georgiadis, G. S., Lazarides, M. K., Antoniou, S. A., Serracino-Inglott, F., Smyth, J. V. and Murray, D. (2013). A meta-analysis of endovascular versus surgical reconstruction of femoropopliteal arterial disease. *J Vasc Surg.* 57, 242~253.
3. Ao, P. Y., Hawthorne, W. J., Vicaretti, M. and Fletcher, J. P. (2000). Development of intimal hyperplasia in six different vascular prostheses. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 20, 241~249.
4. Aramwit, P., Kanokpanont, S., De-Eknamkul, W. and Srichana, T. (2009). Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *J Biosci Bioeng.* 107, 556~561.
5. Asakura, T., Endo, M., Fukuhara, R. and Tasei, Y. (2017). C-13 NMR characterization of hydrated C-13 labeled Bombyx mori silk fibroin sponges prepared using glycerin, poly(ethylene glycol diglycidyl ether) and poly(ethylene glycol) as porogens. *J Mater Chem B.* 5, 2152~2160.
6. Aytemiz, D., Sakiyama, W., Suzuki, Y., Nakaizumi, N., Tanaka, R., Ogawa, Y., Takagi, Y., Nakazawa, Y. and Asakura, T. (2013). Small-diameter silk vascular grafts (3 mm diameter) with a double-raschel knitted silk tube coated with silk fibroin sponge. *Adv Healthc Mater.* 2, 361~368.
7. Ballyk, P. D., Walsh, C., Butany, J. and Ojha, M. (1998). Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *J Biomech.* 31, 229~237.
8. Blakemore, A. H. and Voorhees, A. B., Jr. (1954). The use of tubes constructed from vinyon N cloth in bridging arterial defects; experimental and clinical. *Ann Surg.* 140, 324~334.
9. Bos, G. W., Poot, A. A., Beugeling, T., van Aken, W. G. and Feijen, J. (1998). Small-diameter vascular graft prostheses: current status. *Arch Physiol Biochem.* 106, 100~115.
10. Brown, J. E., Davidowski, S. K., Xu, D., Cebe, P., Onofrei, D., Holland, G. P. and Kaplan, D. L. (2016). Thermal and Structural Properties of Silk Biomaterials Plasticized by Glycerol. *Biomacromolecules.* 17, 3911~3921.
11. Cattaneo, I., Figliuzzi, M., Azzollini, N., Catto, V., Fare, S., Tanzi, M. C.,

- Alessandrino, A., Freddi, G. and Remuzzi, A. (2013). In vivo regeneration of elastic lamina on fibroin biodegradable vascular scaffold. *Int J Artif Organs*. 36, 166~174.
12. Conte, M. S. (2013). Critical appraisal of surgical revascularization for critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 57, 8S~13S.
 13. Drury, J. K., Ashton, T. R., Cunningham, J. D., Maini, R. and Pollock, J. G. (1987). Experimental and clinical experience with a gelatin impregnated Dacron prosthesis. *Ann Vasc Surg*. 1, 542~547.
 14. Enomoto, S., Sumi, M., Kajimoto, K., Nakazawa, Y., Takahashi, R., Takabayashi, C., Asakura, T. and Sata, M. (2010). Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg*. 51, 155~164.
 15. Filipe, E. C., Santos, M., Hung, J., Lee, B. S. L., Yang, N., Chan, A. H. P., Ng, M. K. C., Rnjak-Kovacina, J. and Wise, S. G. (2018). Rapid Endothelialization of Off-the-Shelf Small Diameter Silk Vascular Grafts. *JACC Basic Transl Sci*. 3, 38~53.
 16. Fukayama, T., Ozai, Y., Shimokawadoko, H., Aytemiz, D., Tanaka, R., Machida, N. and Asakura, T. (2015). Effect of fibroin sponge coating on in vivo performance of knitted silk small diameter vascular grafts. *Organogenesis*. 11, 137~151.
 17. Fukayama, T., Ozai, Y., Shimokawatoko, H., Kimura, Y., Aytemiz, D., Tanaka, R., Machida, N. and Asakura, T. (2017). Evaluation of endothelialization in the center part of graft using 3 cm vascular grafts implanted in the abdominal aortae of the rat. *J Artif Organs*. 20, 221~229.
 18. Fukayama, T., Takagi, K., Tanaka, R., Hatakeyama, Y., Aytemiz, D., Suzuki, Y. and Asakura, T. (2015). Biological reaction to small-diameter vascular grafts made of silk fibroin implanted in the abdominal aortae of rats. *Ann Vasc Surg*. 29, 341~352.
 19. Fukayama, T., Takagi, K., Tanaka, R., Hatakeyama, Y., Aytemiz, D., Suzuki, Y. and Asakura, T. (2015). Biological Reaction to Small-Diameter Vascular Grafts Made of Silk Fibroin Implanted in the Abdominal Aortae of Rats. *Ann Vasc Surg*. 29, 341~352.
 20. Gloria, A., De Santis, R. and Ambrosio, L. (2010). Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *J Appl Biomater Biomech*. 8, 57~67.
 21. Goeau-Brissonniere, O., Lepout, C., Bacourt, F., Lebrault, C., Comte, R. and

- Pechere, J. C. (1991). Prevention of vascular graft infection by rifampin bonding to a gelatin-sealed Dacron graft. *Ann Vasc Surg.* 5, 408~412.
22. Haga, M., Yamamoto, S., Okamoto, H., Hoshina, K., Asakura, T. and Watanabe, T. (2017). Histological Reactions and the In Vivo Patency Rates of Small Silk Vascular Grafts in a Canine Model. *Ann Vasc Dis.* 10, 132~138.
23. Harskamp, R. E., Lopes, R. D., Baisden, C. E., de Winter, R. J. and Alexander, J. H. (2013). Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. *Ann Surg.* 257, 824~833.
24. Haruguchi, H. and Teraoka, S. (2003). Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs.* 6, 227~235.
25. Hehrlein, F. W., Schlepper, M., Loskot, F., Scheld, H. H., Walter, P. and Mulch, J. (1984). The use of expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts for myocardial revascularization. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 25, 549~553.
26. Holland, C., Numata, K., Rnjak-Kovacina, J. and Seib, F. P. (2019). The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Adv Healthc Mater.* 8, e1800465.
27. Huang, F., Sun, L. and Zheng, J. (2008). In vitro and in vivo characterization of a silk fibroin-coated polyester vascular prosthesis. *Artif Organs.* 32, 932~941.
28. Imamura, M., Nakai, J., Inoue, S., Quan, G. X., Kanda, T. and Tamura, T. (2003). Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics.* 165, 1329~1340.
29. Inoue, S., Kanda, T., Imamura, M., Quan, G. X., Kojima, K., Tanaka, H., Tomita, M., Hino, R., Yoshizato, K., Mizuno, S. and Tamura, T. (2005). A fibroin secretion-deficient silkworm mutant, Nd-sD, provides an efficient system for producing recombinant proteins. *Insect Biochem Mol Biol.* 35, 51~59.
30. Isenberg, B. C., Williams, C. and Tranquillo, R. T. (2006). Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ Res.* 98, 25~35.
31. Jing, X., Mi, H. Y., Salick, M. R., Cordie, T. M., Peng, X. F. and Turng, L. S. (2015). Electrospinning thermoplastic polyurethane/graphene oxide scaffolds for small diameter vascular graft applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 49, 40~50.

32. Jonas, R. A., Ziemer, G., Schoen, F. J., Britton, L. and Castaneda, A. R. (1988). A new sealant for knitted Dacron prostheses: minimally cross-linked gelatin. *J Vasc Surg.* 7, 414~419.
33. Kashyap, V. S., Ahn, S. S., Quinones-Baldrich, W. J., Choi, B. U., Dorey, F., Reil, T. D., Freischlag, J. A. and Moore, W. S. (2002). Infrapopliteal-lower extremity revascularization with prosthetic conduit: a 20-year experience. *Vasc Endovascular Surg.* 36, 255~262.
34. Klinkert, P., Post, P. N., Breslau, P. J. and van Bockel, J. H. (2004). Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 27, 357~362.
35. Kuwabara, F., Narita, Y., Yamawaki-Ogata, A., Satake, M., Kaneko, H., Oshima, H., Usui, A. and Ueda, Y. (2012). Long-term results of tissue-engineered small-caliber vascular grafts in a rat carotid arterial replacement model. *J Artif Organs.* 15, 399~405.
36. Laube, H. R., Duwe, J., Rutsch, W. and Konertz, W. (2000). Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 120, 134~141.
37. Lovett, M., Eng, G., Kluge, J. A., Cannizzaro, C., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D. L. (2010). Tubular silk scaffolds for small diameter vascular grafts. *Organogenesis.* 6, 217~224.
38. Lu, Q., Wang, X., Lu, S., Li, M., Kaplan, D. L. and Zhu, H. (2011). Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process. *Biomaterials.* 32, 1059~1067.
39. Ma, N., Wang, Z., Chen, H., Sun, Y., Hong, H., Sun, Q., Yin, M. and Liu, J. (2011). Development of the novel biotube inserting technique for acceleration of thick-walled autologous tissue-engineered vascular grafts fabrication. *J Mater Sci Mater Med.* 22, 1037~1043.
40. Mahara, A., Somekawa, S., Kobayashi, N., Hirano, Y., Kimura, Y., Fujisato, T. and Yamaoka, T. (2015). Tissue-engineered acellular small diameter long-bypass grafts with neointima-inducing activity. *Biomaterials.* 58, 54~62.
41. Mathers, C. D. and Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3, e442.
42. Min, S., Gao, X., Han, C., Chen, Y., Yang, M., Zhu, L., Zhang, H., Liu, L. and Yao, J. (2012). Preparation of a silk fibroin spongy wound dressing and its therapeutic efficiency in skin defects. *J Biomater Sci Polym Ed.* 23, 97~110.

43. Min, S., Gao, X., Liu, L., Tian, L., Zhu, L., Zhang, H. and Yao, J. (2009). Fabrication and characterization of porous tubular silk fibroin scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 20, 1961~1974.
44. Nagaoka, Y., Yamada, H., Kimura, T., Kishida, A., Fujisato, T. and Takakuda, K. (2014). Reconstruction of small diameter arteries using decellularized vascular scaffolds. *J Med Dent Sci.* 61, 33~40.
45. Naito, Y., Shinoka, T., Duncan, D., Hibino, N., Solomon, D., Cleary, M., Rathore, A., Fein, C., Church, S. and Breuer, C. (2011). Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev.* 63, 312~323.
46. Nakazawa, Y., Sato, M., Takahashi, R., Aytemiz, D., Takabayashi, C., Tamura, T., Enomoto, S., Sata, M. and Asakura, T. (2011). Development of Small-Diameter Vascular Grafts Based on Silk Fibroin Fibers from *Bombyx mori* for Vascular Regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.* 22, 195~206.
47. Nichol, J. W., Koshy, S. T., Bae, H., Hwang, C. M., Yamanlar, S. and Khademhosseini, A. (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials.* 31, 5536~5544.
48. Noishiki, Y. and Shintani, N. (2010). Anti-adhesive membrane for pleural cavity. *Artif Organs.* 34, 224~229.
49. Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Yamane, Y. and Matsumoto, A. (1996). Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med.* 2, 90~93.
50. Noishiki, Y., Yamane, Y., Tomizawa, Y. and Matsumoto, A. (1995). Transplantation of autologous tissue fragments into an e-PTFE graft with long fibrils. *Artif Organs.* 19, 17~26.
51. Omenetto, F. G. and Kaplan, D. L. (2010). New opportunities for an ancient material. *Science.* 329, 528~531.
52. Pashneh-Tala, S., MacNeil, S. and Claeysens, F. (2016). The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev.* 22, 68~100.
53. Pektok, E., Nottelet, B., Tille, J. C., Gurny, R., Kalangos, A., Moeller, M. and Walpoth, B. H. (2008). Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. *Circulation.* 118, 2563~2570.
54. Pok, S., Myers, J. D., Madihally, S. V. and Jacot, J. G. (2013). A multilayered

- scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a PCL core for cardiac tissue engineering. *Acta Biomater.* 9, 5630~5642.
55. Roth, G. A., Forouzanfar, M. H., Moran, A. E., Barber, R., Nguyen, G., Feigin, V. L., Naghavi, M., Mensah, G. A. and Murray, C. J. (2015). Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med.* 372, 1333~1341.
 56. Saotome, T., Hayashi, H., Tanaka, R., Kinugasa, A., Uesugi, S., Tatematsu, K.-i., Sezutsu, H., Kuwabara, N. and Asakura, T. (2015). Introduction of VEGF or RGD sequences improves revascularization properties of Bombyx mori silk fibroin produced by transgenic silkworm. *J Mater Chem B.* 3, 7109~7116.
 57. Sato, M. and Harasaki, H. (2002). Evaluation of platelet and coagulation function in different animal species using the xylum clot signature analyzer. *ASAIO J.* 48, 360~364.
 58. Sauvage, L. R. and Wesolowski, S. A. (1955). The healing and fate of arterial grafts. *Surgery.* 38, 1090~1131.
 59. Sell, S. A., McClure, M. J., Garg, K., Wolfe, P. S. and Bowlin, G. L. (2009). Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 61, 1007~1019.
 60. Stamati, K., Priestley, J. V., Mudera, V. and Cheema, U. (2014). Laminin promotes vascular network formation in 3D in vitro collagen scaffolds by regulating VEGF uptake. *Exp Cell Res.* 327, 68~77.
 61. Sutherland, T. D., Young, J. H., Weisman, S., Hayashi, C. Y. and Merritt, D. J. (2010). Insect silk: one name, many materials. *Annu Rev Entomol.* 55, 171~188.
 62. Tai, N. R., Salacinski, H. J., Edwards, A., Hamilton, G. and Seifalian, A. M. (2000). Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg.* 87, 1516~1524.
 63. Thurber, A. E., Omenetto, F. G. and Kaplan, D. L. (2015). In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials.* 71, 145~157.
 64. Tomita, M., Munetsuna, H., Sato, T., Adachi, T., Hino, R., Hayashi, M., Shimizu, K., Nakamura, N., Tamura, T. and Yoshizato, K. (2003). Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol.* 21, 52~56.
 65. Uemura, A., Nakata, M., Goya, S., Fukayama, T. and Tanaka, R. (2017).

- Effective new membrane for preventing postthoracotomy pleural adhesion by surface water induction technology. *PLoS One*. 12, e0179815.
66. Wang, D., Liu, H. and Fan, Y. (2017). Silk fibroin for vascular regeneration. *Microsc Res Tech*. 80, 280~290.
67. Wang, W., Hu, J., He, C., Nie, W., Feng, W., Qiu, K., Zhou, X., Gao, Y. and Wang, G. (2015). Heparinized PLLA/PLCL nanofibrous scaffold for potential engineering of small-diameter blood vessel: tunable elasticity and anticoagulation property. *J Biomed Mater Res A*. 103, 1784~1797.
68. Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, J., Huang, L., Liu, J., Li, Y., Zhang, G., Kundu, S. C. and Wang, L. (2014). Exploring natural silk protein sericin for regenerative medicine: an injectable, photoluminescent, cell-adhesive 3D hydrogel. *Sci Rep*. 4, 7064.
69. Xiang, P., Wang, S. S., He, M., Han, Y. H., Zhou, Z. H., Chen, D. L., Li, M. and Ma, L. Q. (2018). The in vitro and in vivo biocompatibility evaluation of electrospun recombinant spider silk protein/PCL/gelatin for small caliber vascular tissue engineering scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 163, 19~28.
70. Xu, L., Yang, J., Xue, B., Zhang, C., Shi, L., Wu, C., Su, Y., Jin, X., Liu, Y. and Zhu, X. (2017). Molecular insights for the biological interactions between polyethylene glycol and cells. *Biomaterials*. 147, 1~13.
71. Yagi, T., Sato, M., Nakazawa, Y., Tanaka, K., Sata, M., Itoh, K., Takagi, Y. and Asakura, T. (2011). Preparation of double-raschel knitted silk vascular grafts and evaluation of short-term function in a rat abdominal aorta. *J Artif Organs*. 14, 89~99.
72. Yamamoto, S., Okamoto, H., Haga, M., Shigematsu, K., Miyata, T., Watanabe, T., Ogawa, Y., Takagi, Y. and Asakura, T. (2016). Rapid endothelialization and thin luminal layers in vascular grafts using silk fibroin. *Journal of Materials Chemistry B*. 4, 938~946.
73. Zhu, C., Fan, D. and Wang, Y. (2014). Human-like collagen/hyaluronic acid 3D scaffolds for vascular tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 34, 393~401.
74. Zhu, M., Wang, K., Mei, J., Li, C., Zhang, J., Zheng, W., An, D., Xiao, N., Zhao, Q., Kong, D. and Wang, L. (2014). Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts. *Acta Biomater*. 10, 2014~2023.