

学位論文題名

Improved Healing of Small-Caliber,  
Long-Fibril Expanded Polytetrafluoroethylene Vascular Grafts  
by Covalent Bonding of Fibronectin

(フィブロネクチン共有結合固定による  
小口径長繊維長 EPTFE 人工血管の治癒の改善)

学位論文内容の要旨

目的

小口径人工血管は、血液凝固によりしばしば閉塞を起こす。人工血管の開存性を向上させるためには優れた抗凝固性をもった仮性内膜が人工血管内腔面を覆うことが重要であるが、これまで血管内腔の全面を被覆し得た報告はない。

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。近年、生物学的素材を用いて ePTFE 人工血管壁への組織進展を促進する方法がいくつか報告されているが、われわれはフィブロネクチンに着目し、今回、フィブロネクチンを共有結合固定した小口径・長繊維長 ePTFE 人工血管の、中期間の成績を検討することを目的として、研究を行った。

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  $\mu$ m、内径 4 mm、長さ 10 cm の ePTFE 人工血管に、フィブロネクチンを共有結合固定したものをを用いた。対照として、フィブロネクチン共有結合固定をしていない同様の人工血管を用いた。

実験動物：ビーグル成犬(体重 10 - 12kg) 7 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。腹部正中切開により左右の腸骨動脈を、左右鼠径部の斜切開により左右の大腿動脈を露出し、全身ヘパリン化 (100 単位/kg) を施行した後、上記 2 種の人工血管を用い端側吻合にて左右の腸骨動脈 - 大腿動

脈バイパスを行った。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週間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、再開腹を行い、全身ヘパリン化の後に左右の人工血管を摘出した。

組織学的検討：人工血管を長軸方向に半切し、開存の有無を確認した後、写真撮影を施行した。内腔表面のうち、血栓で覆われていない平滑な部分(thrombus free area)の内腔表面全体に占める割合を測定した。

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 $\mu$ m厚の切片を作成し、Hematoxyline eosin染色、AZAN染色を施行した。AZAN染色は膠原線維の同定のために行った。さらに免疫組織化学的観察として、平滑筋細胞の同定のために抗 $\alpha$ actin染色を施行した。

人工血管修復治癒の違いを調査するために、仮性内膜の厚さ、仮性内膜内の膠原線維・平滑筋細胞の占める割合(%collagen area、%SMC area)を測定した。測定は、人工血管吻合部近傍・人工血管中央部でそれぞれ行った。

## 結果

開存率および肉眼的観察：開存率はともに43%で差を認めなかった。フィブロネクチン固定群では、内腔表面はほとんど白色で平滑であった。対照群では、白色で平滑な部分は吻合部近くに限局しており、中央部は赤色の血栓で覆われていた。内腔表面のうち、血栓で覆われていない部分(thrombus free area)の内腔表面全体に占める割合は、フィブロネクチン固定群で有意に高かった。

光学顕微鏡的観察：フィブロネクチン固定群では、人工血管内腔表面は、平滑で薄い仮性内膜で覆われていた。仮性内膜の内面は一層の内皮細胞が配列し、その下に紡錘形の平滑筋細胞が層状に並んでいた。細胞外基質は膠原線維でよく置換されていた。

対照群では、内腔表面は粗雑で不均一な仮性内膜で覆われ、平滑筋細胞はほとんど認めなかった。細胞外基質の線維化も不良であった。

仮性内膜の厚さは、吻合部付近では両群に差はなかったが、中央部では対照群がフィブロネクチン固定群と比べ有意に薄かった。

仮性内膜内の膠原線維・平滑筋細胞の占める割合(%collagen area、%SMC area)は、人工血管中央部において、フィブロネクチン固定群が対照群に比べ有意に高かった。

## 結語

フィブロネクチンを共有結合固定した小口径長繊維長ePTFE人工血管は、12週の観察期間において、開存率では対照群と差はなかったものの、内膜治癒は対照群と比

べ良好であることが示された。抗血栓性あるいは抗血小板性分子によるコーティングなど、さらなる改良を行うことによって、より有用な小口径人工血管が開発できる可能性が示唆された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 哲  
副 査 教 授 安 田 慶 秀  
副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

### Improved Healing of Small-Caliber, Long-Fibril Expanded Polytetrafluoroethylene Vascular Grafts by Covalent Bonding of Fibronectin

(フィブロネクチン共有結合固定による  
小口径長繊維長 EPTFE 人工血管の治癒の改善)

小口径人工血管は、血液凝固などによりしばしば閉塞を起こす。それゆえに、優れた抗凝固性をもった内皮細胞が人工血管内腔面を覆うことが、人工血管の開存性を向上させるために必要であるが、それは容易なことではない。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。近年、生物学的素材を用いて ePTFE 人工血管壁への組織進展を促進する方法がいくつか報告されている。申請者らは細胞接着分子のひとつであるフィブロネクチンの生理活性に着目し、フィブロネクチン共有結合固定法が、小口径長繊維長 ePTFE 人工血管の修復治癒過程に与える影響を明らかにすることを目的として、研究を行った。

人工血管は平均繊維長  $60\mu\text{m}$ 、内径  $4\text{mm}$  の ePTFE 人工血管に、フィブロネクチンを共有結合固定したものをを用いた。対照として、フィブロネクチン共有結合固定をしていない同様の人工血管を用いた。実験動物は、体重  $10 - 12\text{kg}$  のビーグル成犬 7 頭を使用した。全身麻酔下、上記 2 種の人工血管を用い端側吻合にて左右の腸骨動脈 - 大腿動脈バイパスを行った。術後に抗凝固剤、抗血小板剤は使用しなかった。移植 12 週後において人工血管を摘出した。摘出した人工血管を長軸方向に半切し、開存の有無を確認した後、肉眼的観察を行った。内腔表面のうち、血栓で覆われていない平滑な部分を仮性内膜として、これが人工血管内面全体に占める割合を測定した。さらに、 $4\mu\text{m}$  厚の切片を作成し、Hematoxyline eosin 染色、AZAN 染色を施行した。AZAN 染色は膠原繊維の同定のために行った。さらに免疫組織化学的観察とし

て、平滑筋様細胞の同定のために抗 $\alpha$ actin染色を施行した。人工血管修復治癒過程の違いを検討するために、仮性内膜の厚さ、仮性内膜内の膠原線維・平滑筋様細胞の占める割合を測定した。測定は、人工血管吻合部近傍・中央部でそれぞれ行った。

結果：開存率はともに43%で差を認めなかった。フィブロネクチン固定人工血管では、内腔表面はほとんど白色で平滑であった。対照人工血管では、白色で平滑な部分は吻合部近くに局限し、中央部は赤色の血栓で覆われていた。仮性内膜が人工血管内面全体に占める割合は、フィブロネクチン固定人工血管で有意に高かった。光顕的観察では、フィブロネクチン固定人工血管では、内腔表面は、平滑な仮性内膜で覆われ、仮性内膜の内面は一層の内皮細胞が配列し、その下に紡錘形の平滑筋様細胞が層状に並んでいた。細胞外基質は膠原線維でよく置換されていた。対照人工血管では、内腔表面は粗雑で不均一な仮性内膜で覆われ、平滑筋細胞はほとんど認めず、細胞外基質の線維化も不良であった。仮性内膜の厚さは、吻合部付近では両人工血管の間で差はなかったが、中央部では対照人工血管がフィブロネクチン固定人工血管と比べ有意に薄かった。仮性内膜内の膠原線維・平滑筋細胞の占める割合は、人工血管中央部において、フィブロネクチン固定人工血管が、対照人工血管に比べ有意に高かった。

以上より、フィブロネクチン共有結合固定法は、移植後人工血管の修復治癒過程に影響をおよぼし、線維組織・平滑筋様細胞をより多く含む良質な仮性内膜の形成を促すことが示唆された。このような良質な仮性内膜形成の促進は、フィブロネクチンの持つ細胞の接着・伸展・移動の促進などの生理活性によるものと考えられた。しかしながら、この結果は直接人工血管の開存率の改善には結びつかなかった。その想定される原因のひとつとして、フィブロネクチン共有固定法によって誘導された仮性内膜が十分な抗血栓性を示さなかった可能性がある。フィブロネクチン共有結合固定長繊維長 ePTFE 人工血管の開存性を高めるには、抗血小板因子・抗血栓因子によるコーティングなどさらなる修飾が必要であると考えられた。

口頭発表において、副査安田教授より母数が少なく、実験系として適切であるのか、新たにフィブロネクチンを用いた実験を行う意義は何か、閉塞例の閉塞時期をどのように考えるか、壁内への細胞侵入を期待して有孔性を増した ePTFE 人工血管にフィブロネクチンを結合させることはその有用性を失うことにはならないか、との質問があった。ついで副査丸藤教授より、内皮細胞の機能の評価を行うことはできないか、フィブロネクチンによるマクロファージ等の細胞や血小板の結合は組織修復や開存性に対し有用であるのか、との質問があった。また主査近藤教授より長期の経過観察を行う必要性について質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

フィブロネクチン共有結合固定 ePTFE 人工血管は、対照人工血管と比較して開存

率に差は認めなかったものの、良好な修復治癒過程を確認することができたことより、今後の臨床応用に向けた意義は大きいと考えられ、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。