

博士論文

若年ブタを用いた

大動脈ホモグラフト移植後のグラフト石灰化に対する、

炭酸ランタンによる治療効果の検討

李 洋伸

若年ブタを用いた

大動脈ホモグラフト移植後のグラフト石灰化に対する、

炭酸ランタンによる治療効果の検討

所属：心臓外科

指導教員名：小野 稔、山内 治雄

申請者名：李 洋伸

目次

略語表	4
要旨	6
序文	7
1 ホモグラフトの適応と問題点.....	7
2 ホモグラフトの凍結保存.....	8
3 若年者におけるホモグラフト移植後石灰化の機序.....	10
4 リン酸バインダーによるホモグラフト石灰化抑制効果.....	17
5 リン酸バインダーの有害事象と投与期間.....	21
目的	25
方法	26
1 ブタの取り扱い.....	26
2 研究デザインと除外基準.....	27
3 麻酔と周術期モニタリング.....	30
4 大動脈ホモグラフト採取と凍結処理.....	31

5	大動脈ホモグラフトの解凍と移植手術.....	34
6	大動脈ホモグラフトの摘出と大腿骨の採取.....	37
7	血液学的検査.....	38
8	病理組織学的検査.....	38
9	大動脈ホモグラフト含有カルシウム定量検査.....	39
10	大腿骨長の測定、骨塩量・骨密度試験と三点曲げ試験.....	39
11	動物愛護と倫理的配慮.....	41
12	統計学的分析.....	41
結果	42
1	ホモグラフトの凍結処理.....	42
2	大動脈ホモグラフト移植手術と術後経過.....	45
3	炭酸ランタンによるホモグラフト石灰化抑制効果.....	47
4	血液学的検査結果.....	53
5	成長障害と骨軟化の評価.....	55
考察	59

本研究の限界	67
今後の展望	69
結語	70
謝辞	71
引用文献	72

略語表

DMSO	dimethyl sulfoxide
HLA	human leukocyte antigen
NPC	sodium-dependent phosphate cotransporter
α SMA	α -smooth muscle actin
Runx2	runt-related transcription factor 2
PCR	polymerase chain reaction
TNF- α	tumor necrosis factor- α
Pit	sodium-dependent phosphate transporter
ATP	adenosine triphosphate
ZPP	Zen-Noh Premium Pig
SPF	specific pathogen free
Hct	hematocrit
LDH	lactate dehydrogenase
ALP	alkaline phosphatase

HE	hematoxylin eosin
EVG	Elastica van Gieson
DW	dry weight
DXA	dual energy X-ray absorptiometry
BW	body weight
OCN	osteocalcin
OPN	osteopontin
PPi	pyrophosphate
ENPP 1	ecto-nucleotide pyrophostase/phosphodiesterase 1
ANK	ankylosis
SMC	smooth muscle cell

要旨

成長期の若年者へ移植されたホモグラフトは石灰化を伴う変性が術後早期に現れ、耐久性に限界がある。我々の先行研究では、若年者の成長に関連した生理的な高リン血症が移植グラフトの石灰化を促進させる一因であることを明らかにした。また、リン吸着薬である炭酸ランタンの術後急性期投与により、グラフト移植後石灰化を有害事象なく抑制できる可能性が小動物レベルで確認された。そこで我々は、ブタ下行大動脈同所性移植モデルを作成し、ホモグラフトの凍結保存法や炭酸ランタン投与量を実際の臨床に即して設定して検証した結果、術後 4 週間の炭酸ランタン投与により、ホモグラフト移植後石灰化を有害事象なく抑制できる可能性が確認された。

序文

1. ホモグラフトの適応と問題点

ホモグラフトとは、脳死下臓器摘出後または心停止後ドナーから提供された同種心臓弁・血管組織のことを指し、代用弁・血管として組織移植に用いられるまで凍結保存される。ホモグラフトは人工弁や人工血管に比べ抗感染性、抗血栓性に優れ、また良好な血行動態が得られるため、心臓大血管領域における重症感染性疾患、妊娠適齢期の女性の弁置換手術、複雑な再建を要する先天性心疾患等で用いられている。ホモグラフトとして移植されるものとして、大動脈弁、肺動脈弁、胸部下行大動脈があり、大動脈弁ホモグラフトは主に感染性心内膜炎、大動脈弁輪膿瘍や乳幼児先天性重症大動脈弁狭窄症に、肺動脈弁ホモグラフトは右室流出路再建を要する先天性心疾患、特に Ross 手術や Norwood 手術時の大動脈再建に、胸部大動脈ホモグラフトは感染性大動脈瘤、人工血管感染や大動脈炎症症候群等に使用される[1-5]。

一方、ホモグラフトは長期耐用性に関して機械弁や人工血管に比べ劣ることが知られ、その主な原因は石灰化によるグラフト変性である。ホモグラフトのバルサルバ洞や弁尖の石灰化が遠隔期に弁狭窄・閉鎖不全、弁周囲逆流などの弁機能不全や仮性動脈瘤形成の原因となり、再手術を必要とする症例が多く認められている[5-10]。また、ホモグラフト移植後の石灰化によるグラフト変性は若年者で多いことが知られている[11]。既報では、成人感染性心内膜炎に対するホモグラフトによる大動脈基部置換

術後 10 年での再手術回避率は 60 歳以上で 88.7%、40～60 歳で 84.4%、40 歳未満で 79.8%と報告されている[12]。さらに、20 歳未満の若年患者における大動脈弁ホモグラフト移植後のグラフト変性による再手術回避率は、移植後 10 年で 47%まで低下する[6]。また、先天性心疾患に対する右室流出路再建術に関しては、グラフト機能不全回避率は術後 1 年で 84%、5 年で 47%、10 年で 22%と報告され、手術時年齢 1 歳以下の群は 1 歳より年長の群に比べて有意に弁機能不全を生じると報告されている[7]。

2. ホモグラフトの凍結保存

ホモグラフトの耐久性を向上させるために、これまで様々な保存方法が研究されてきた。本邦では 1960 年代後半に β -propiolactone による化学処理下にホモグラフト組織を nonviable な状態にして臨床応用していたが、石灰化による弁機能不全を高率に起こし再手術率が高かったため、ホモグラフト移植は一時期減少した[13]。一方、欧米では、 β -propiolactone や glutaraldehyde を用いた化学処理法、放射線照射、フリーズドライ法などの研究が 1960 年代から 1970 年代にかけて行われたが、いずれもグラフト組織構造の劣化を高率に招いた[14]。その後、多量の抗生剤で滅菌処理し新鮮グラフトとして保存する 4°C 冷蔵保存法[15,16]の開発によりグラフト耐久性がある程度改善したが、1987 年に O'Brien らは -196°C の液体窒素内で保存したホモグラフトが、移植後 10 年でのグラフト変性による再手術回避率において、新鮮グラフトに比べ著

しく成績が向上したことを報告した[17]。凍結保存によりホモグラフト組織の viability が保存期間中高率に保たれ、長期耐久性につながったと考えられている[17,18]。以降、凍結保存がホモグラフトの標準保存法として確立し、本邦においても 2016 年 4 月に凍結保存同種組織による外科治療が保険収載された。

東京大学医学部附属病院組織バンクでは、ドナーから摘出されたホモグラフトは、抗生剤を加えた RPMI1640 液体培地に浸漬して 24 時間～48 時間冷蔵保存した後、凍結処理を行っている。組織凍結用保存液は RPMI1640 と細胞凍結障害保護剤である dimethyl sulfoxide (以下 DMSO)を用い、心臓弁・下行大動脈などの大きい組織は、保存液とともに総量 100～150ml とし組織保存用バッグで二重パックされる。その際、DMSO は濃度 10%になるように調節する。なお静脈系などの小さい組織は、組織を含めず総量 30ml (RPMI 27ml、DMSO 3ml) に調節する。凍結はプログラムフリーザーを用い、組織凝固熱に対処するよう組織温度が $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度で -50°C まで、続いて $-5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -80°C まで、滑らかな温度下降曲線を描くようにプログラムする。組織はプログラムフリーザーで -80°C まで凍結処理された後、 SHIPPINGされるまで液体窒素保存槽に保存される。

また、凍結保存されたホモグラフトは、臨床使用に際し、細胞内が再結晶化されるのを防ぐため、可及的迅速な解凍が勧められている。まず $38\sim 42^{\circ}\text{C}$ の滅菌温生理食塩水 2L でパッケージのまま 10～15 分かけて解凍し、さらに温イソジン原液 500ml に 5

分間浸す。その後、ホモグラフトを取り出し、5%ソルビトール加乳酸リンゲル液 1L で洗浄し DMSO を除去し手術に使用する。

3. 若年者におけるホモグラフト移植後石灰化の機序

凍結保存法によりホモグラフトの耐久性が飛躍的に改善したものの、若年者、特に新生児や乳児に対する移植例では術後早期にホモグラフトの著しい石灰化を伴う変性が出現し、グラフト機能不全を来たして再手術を要する 경우가少なくない。

ホモグラフトは凍結保存させることにより、血管・弁組織の内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞といった間質細胞の *viability* が長期間にわたり保持される[19]。特に線維芽細胞は細胞外基質の維持に重要な役割を果たし、グラフトとしての構造的完全性も維持される[7,17]。一方、内皮細胞が主要組織適合遺伝子複合体 (*major histocompatibility complex; MHC*) クラス I および II 分子を発現してグラフト抗原性が高まることや[20,21]、ホモグラフト移植後レシピエント血中に抗ドナー特異的抗体が認められること[22,23]、さらに小児移植例ではホモグラフトに対する免疫応答がより強く誘導される[24-26]ことから、若年齢レシピエントの活発な免疫応答が移植グラフト変性・石灰化促進に関与すると推測されている[27]。近年欧米では、*tissue-engineering* の技術を用いて脱細胞化し免疫応答を不活化させたホモグラフトの臨床応用が試みられ、その有用性が報告されている[28-30]一方、小児移植例においては弁機能不全、組織破壊、変

モグラフト石灰化の一因であることを明らかにした[40]。研究の要旨を下記に示す。

まず若年ラットにおいて、同種同系または同種異系移植に関わらず、移植後グラフトの高度石灰化を認め、低リン濃度飼料を投与することにより石灰化が抑制された。一方、成年ラットにおいては、異系移植群のみに軽度石灰化を認めた (Figure 1)。これは免疫応答の有無に関わらず、若年であることがグラフト石灰化を促進させる要因であることを示している。また、血中リン濃度に関して、通常飼料投与群の若年ラットは、通常飼料投与群の成年ラットや低リン濃度飼料投与群の若年ラットに比べ有意に高値であった。

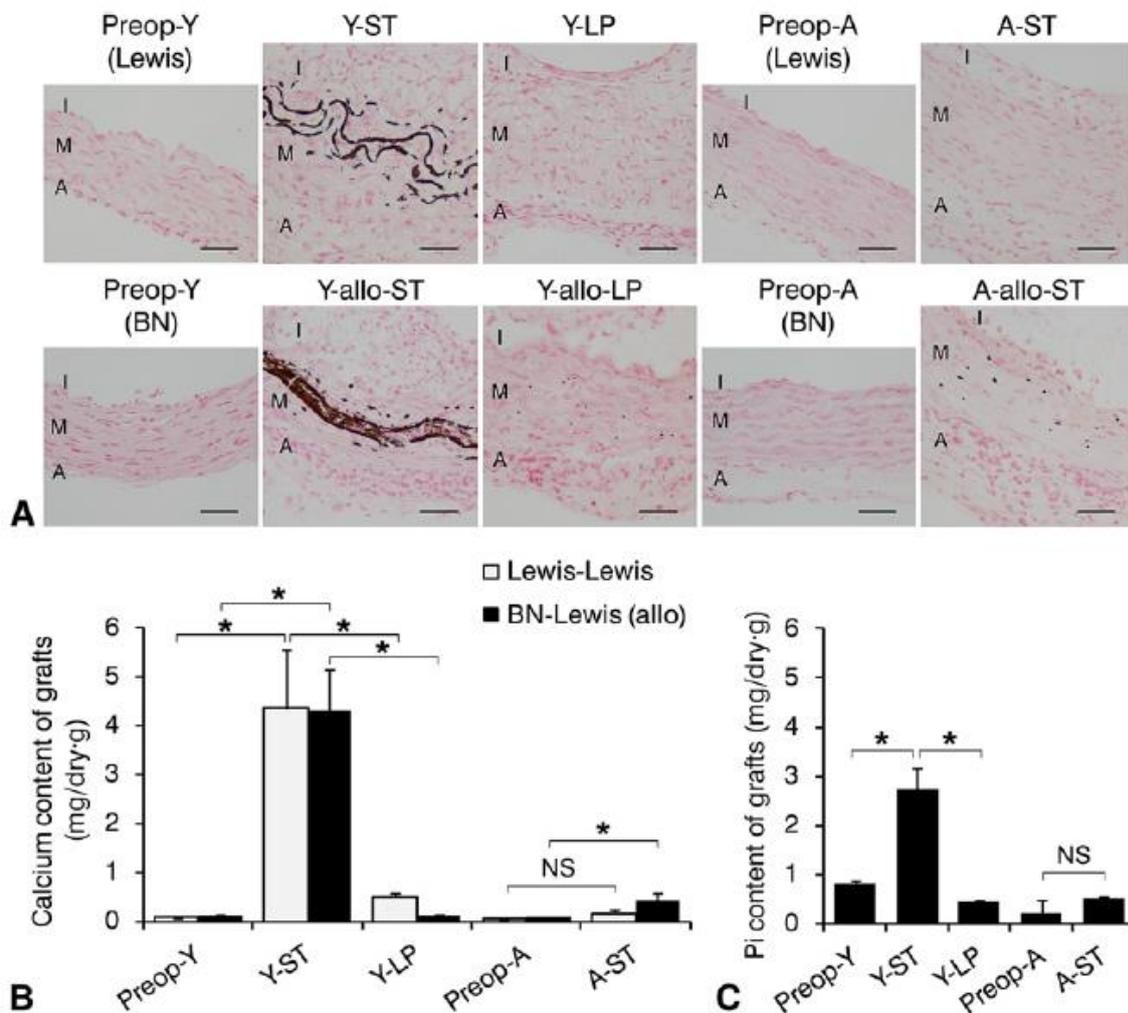
次に、同種同系移植ホモグラフトの免疫染色において、年齢・飼料の種類に関わらず、筋原性マーカーである α -smooth muscle actin (α SMA) の発現が減少し、炎症マーカーである CD68 陽性 macrophage、骨形成マーカーである runt-related transcription factor 2 (Runx2) 及び osteocalcin が中膜弾性線維に発現した。同様の結果は real-time PCR による定量評価でも得られ、 α SMA の mRNA 量が減少し、炎症系マーカーである tumor necrosis factor- α (TNF- α) のほか III 型 NPC である Pit-1、Runx2、osteocalcin の mRNA 量が増加していた (Figure 2)。これはホモグラフト中膜平滑筋細胞が Pit1 を介して骨芽細胞へ形質転換したためであると説明されている。

また、in vitro 実験においてラット大動脈平滑筋細胞は TNF- α 濃度依存的に α SMA の発現量が低下し、Runx2、osteocalcin、Pit-1 の発現量が増加し、さらに TNF- α 存在

下かつ無機リン濃度が高い環境下において平滑筋細胞の石灰化を強く認めた (Figure 3)。

以上のことから、若年レシピエントにおける大動脈ホモグラフト移植後石灰化は、生理的な高リン血症を条件下に、移植に伴う炎症反応によって促進されることが証明された。また、若年者において移植後グラフト石灰化は「高リン血症のみ」または「炎症状態のみ」では発生しにくいことも示された。

Figure 1. ラット大動脈皮下移植モデルにおける術後石灰化



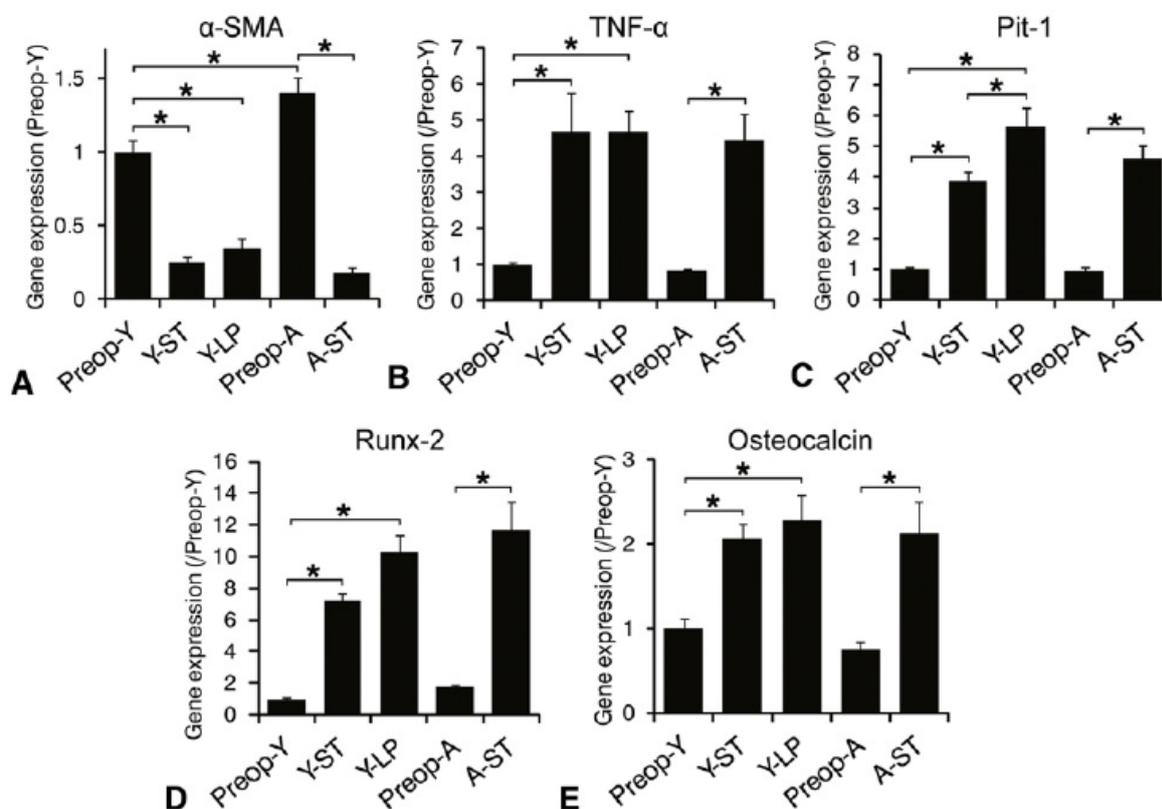
(Yamauchi H et al. *J Thorac Cardiovasc Surg.* [40]より引用)

Preope-Y and *Preope-A*, Preoperative young and adult groups; *Y-ST* and *Y-allo-ST*, young syngeneic- and allogeneic-transplant groups at postoperative day 14 on a standard (ST) diet; *Y-LP* and *Y-allo-LP*, young syngeneic- and allogeneic-transplant groups on a low phosphate (LP) diet; *A-ST* and *A-allo-ST*, syngeneic- and allogeneic-transplant adult group on an ST diet. *BN*, Brown-Norway; *I*, intima; *M*, media; *A*, adventitia.

A. Von Kossa 染色によるホモグラフトの石灰化評価。同種同系（上段）、同種異系（下段）に関わらず、通常飼料投与群の若年ラットはホモグラフトの高度石灰化を呈したが、低リン飼料投与群の若年ラットではグラフト石灰化が抑制された（各群 $n = 6$ 、Bar = 100 μ m）。

B, C. ホモグラフト中に含有されるカルシウムおよび無機リンの定量的評価。免疫応答の有無に関わらず、若年ラットにおいて、低リン飼料投与群は通常飼料投与群に比べて、有意にグラフト含有のカルシウム値が低下した。一方、成年ラットにおいては同種異系群でわずかにカルシウム含有量が増加した（各群 n = 6、*p < 0.05）。

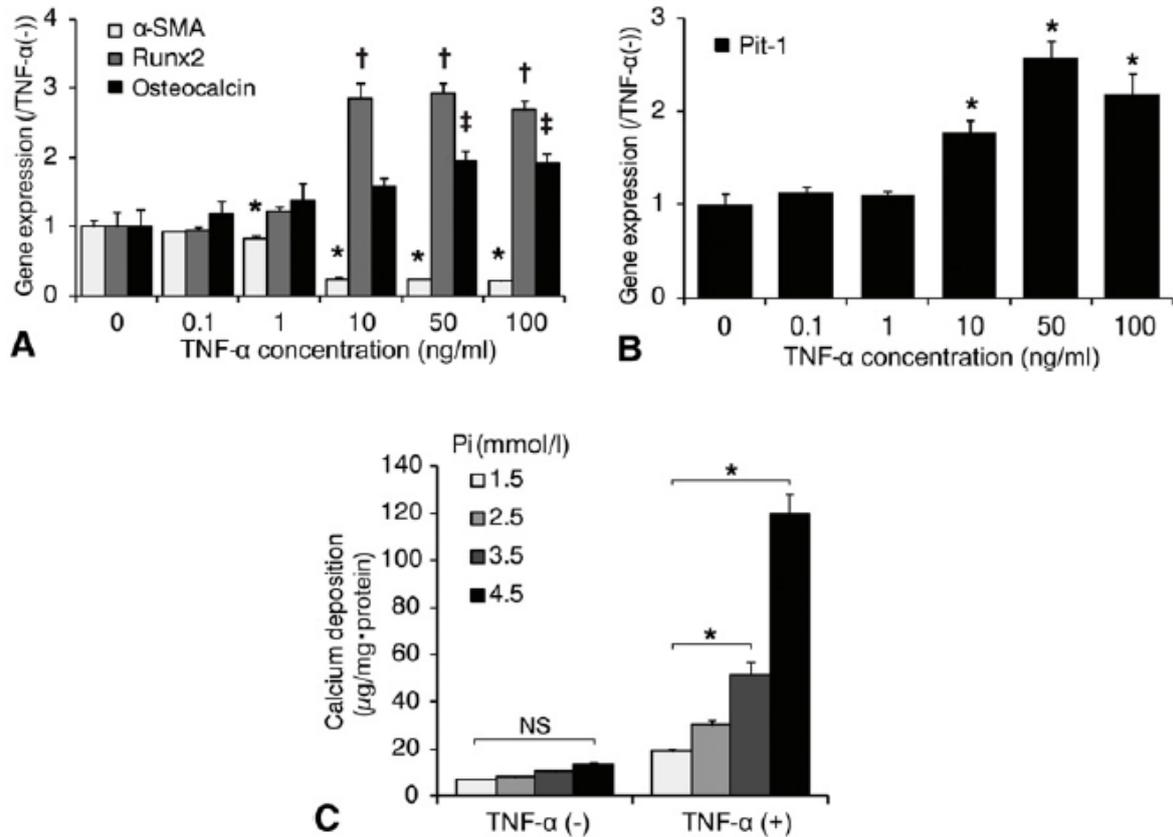
Figure 2. ラット大動脈皮下移植モデルにおける各種遺伝子発現量



(Yamauchi H et al. *J Thorac Cardiovasc Surg.* [40]より引用)

A-E. 移植ホモグラフト中の各種 mRNA 発現量 (Real-time PCR)。αSMA の mRNA 量が減少し、TNF-α、Pit-1、Runx2、osteocalcin の mRNA 量が増加していた（各群 n = 6、*p < 0.05）。

Figure 3. ラット大動脈平滑筋細胞における TNF- α と無機リン濃度の関係



(Yamauchi H et al. *J Thorac Cardiovasc Surg.* [40]より引用)

A-C. ラット大動脈平滑筋細胞は TNF- α 濃度依存的に α SMA の発現量が低下し、Runx2、osteocalcin、Pit-1 の発現量が増加した。また TNF- α 存在下かつ無機リン濃度が高い環境下において平滑筋細胞の石灰化を強く認めた (A,B; 各群 n = 4、培養期間 7 日、*,†,‡p<0.05, C; 各群 n = 4、培養期間 14 日、*p<0.0001)。

4. リン酸バインダーによるホモグラフト石灰化抑制効果

上記のような背景をもとに、Kinoshita らはリン酸バインダーを用いたリン抑制がホモグラフト移植後石灰化を抑制すると仮説を立て、ラット大動脈皮下移植モデルで実験を行った[41]。

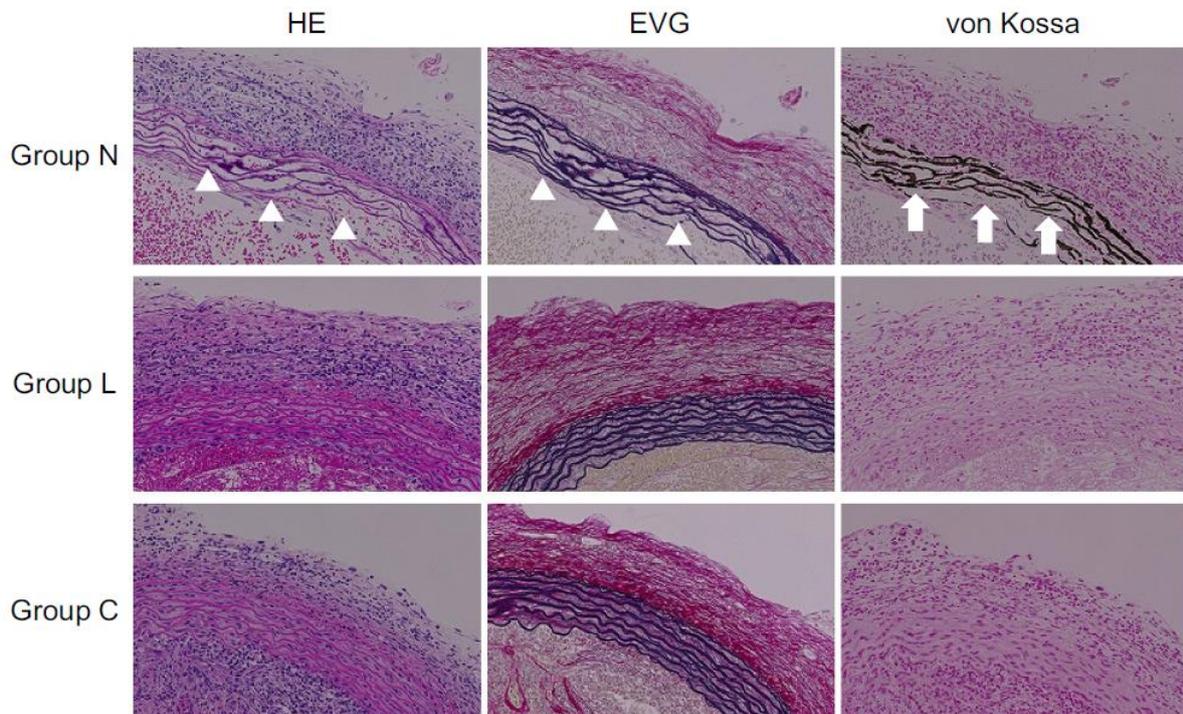
血清リン濃度は、腸管からの吸収、腎臓からの排泄、および細胞内や骨との間の移行により調節されている。慢性腎不全患者では尿中へのリン排泄が低下するため、高リン血症が発症する。この高リン血症は、冠動脈石灰化などの心血管疾患の原因となり死亡リスクが上昇すると報告され[42,43]、慢性腎不全患者に対し腸管からのリン吸収を抑制するリン酸バインダーの内服が生命予後改善目的に使用されている。

実際に臨床で用いられているリン酸バインダーにはカルシウム (Ca) 含有製剤と非 Ca 含有製剤の 2 種類ある。Ca 含有製剤である沈降炭酸カルシウム (カルタン®) は消化管内でリン酸イオンを結合し、不溶性のリン酸化合物として糞便中に排泄する。製剤として安価で、消化器症状などの副作用も軽度であるとされるが、Ca 含有率が高いため、投与量の増加による Ca 過剰負荷に注意が必要である [44]。一方、非 Ca 含有製剤の代表として炭酸ランタン水和物 (ホスレノール®) が挙げられる。炭酸ランタンのランタン (La) とは 3 価の希土類遷移元素で、腸管内でリン酸と結合して難溶性の化合物を形成して糞便中に排泄する。炭酸カルシウムと同等の血清リン低下作用があり、主な副作用は軽度の消化器症状である [44]。Kinoshita らは、これらの代

表的な2種類のリン吸着薬を用いて、その治療効果及び有害事象を検討した。研究の要旨を以下に示す。

ドナーラット(生後4週)の下行から腹部大動脈をレシピエントラット(生後4週)の皮下に移植する同種異系モデルを作成し、通常飼料投与群(Group N)、3%炭酸ランタン含有飼料投与群(Group L)、3%炭酸カルシウム含有飼料投与群(Group C)の3群に分け、2週間後に犠牲死として移植片と血漿を採取した。病理組織学的には、N群でグラフト中膜弾性板の破壊及び強い石灰化を認めたが、L群、C群では中膜構造の破壊は軽度であった(Figure 4)。またグラフト中のカルシウム含有量はN群に比べL群、C群において有意な低下を認め、またL群、C群間に有意差を認めなかった(Figure 5)。また、C群の血漿カルシウム濃度は他の2群に比べ有意に高値であった(Figure 5)。以上のことから、リン酸バインダーである炭酸ランタン、炭酸カルシウムはいずれもホモグラフト移植後石灰化を抑制するが、炭酸カルシウムは高カルシウム血症を呈するため、炭酸ランタンの方がより安全に投与可能であると考えられた。

Figure 4. 若年ラット大動脈皮下移植モデルにおける
ホモグラフト移植後の病理組織学的所見

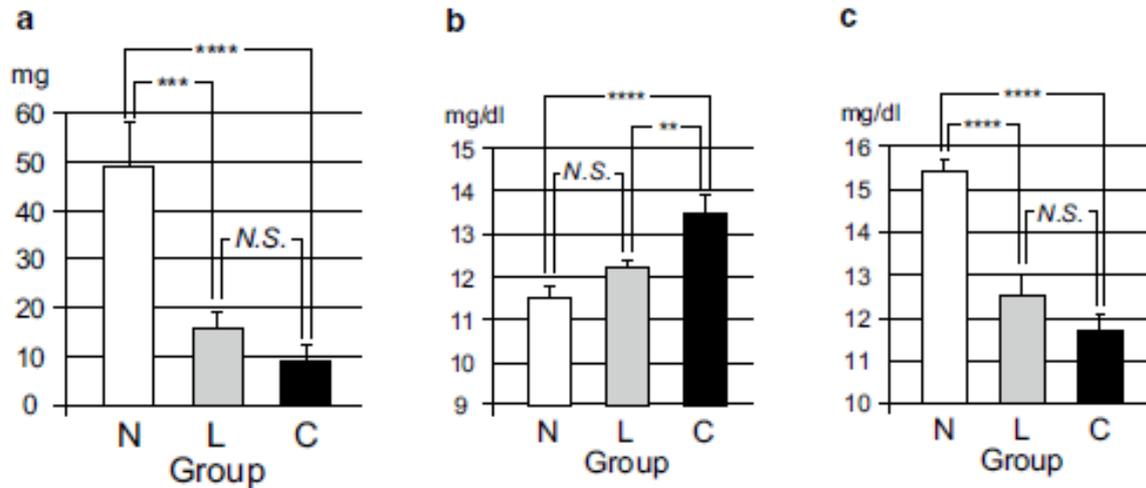


(Kinoshita O et al. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* [41]より引用)

病理組織学所見では、通常飼料投与群でグラフト中膜弾性板の破壊及び強い石灰化を認めたが、3%含有炭酸ランタン飼料投与群および3%炭酸カルシウム含有飼料投与群では中膜構造の破壊は軽度であった。

Figure 5. 若年ラット皮下移植モデルにおける

移植後ホモグラフト含有カルシウム量と血液学的所見



(Kinoshita O et al. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* [41]より引用)

- グラフト中カルシウム含有量は、通常飼料投与群に比べ、炭酸ランタンおよび炭酸カルシウム投与群で有意な低下を認めた。
- 血漿中カルシウム濃度は炭酸カルシウム投与群で有意に上昇した。
- 血漿中リン濃度は炭酸ランタンおよび炭酸カルシウム投与群で有意な低下を認めた。

(各群 n = 9, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)。

5. リン酸バインダーの有害事象と投与期間

軽度の低リン血症は、短期間であれば臨床的に問題となることはないが、長期間持続する低リン血症は、骨石灰化を障害し、くる病や骨軟化症の原因となる。さらに細胞内リン濃度の減少をきたすと、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 活性の低下から赤血球の解糖系を抑制し、adenosine triphosphate (ATP) や 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) の産生を障害するため、溶血性貧血、筋力低下、横紋筋融解、心機能低下、中枢神経障害などを引き起こすことがある[45]。その為、ホモグラフト移植後石灰化を抑制する目的で使用するリンバインダーの有害事象および至適投与期間について検証する必要性が生じた。

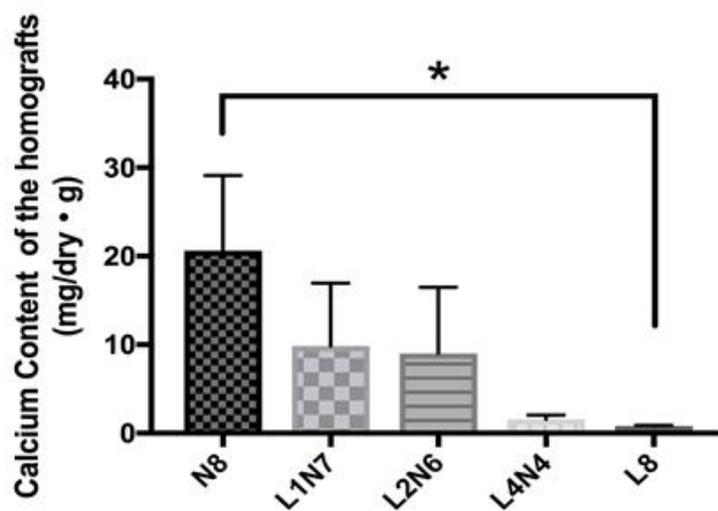
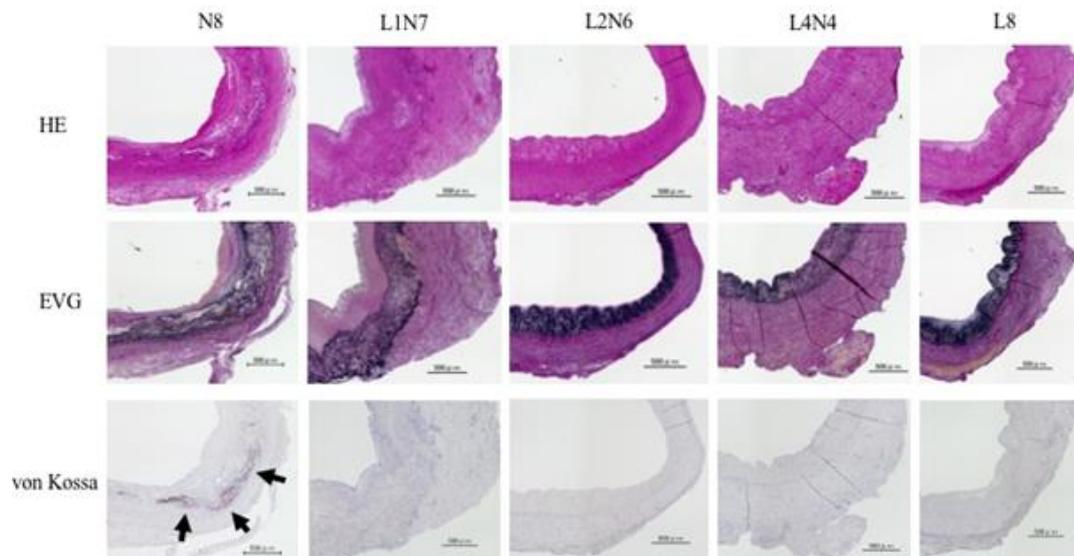
これまでのラットモデルは若年齢がグラフト石灰化に及ぼす影響を調べる目的から生後3週の若年齢ラットをレシピエントに用いる必要があり、血管吻合モデルの作成が技術的に困難であったため大動脈グラフトの皮下移植モデルを用いており、グラフトが血流の影響を受けない **limitation** があった。従って、次に若年ウサギを用いた血流影響下モデルを確立し、炭酸ランタンによる有害事象についても考慮した、同薬剤の適正な投与期間についての検討を行った。以下に要旨を示す。

ドナーウサギ（生後7週）下行大動脈をレシピエントウサギ（生後7週）頸動脈に新鮮グラフトとして移植する同種異系モデルを作成し、5%炭酸ランタン含有飼料の投与期間によって5グループに分け、8週間後に犠牲死として移植片、血液及び大腿

骨を採取した。Von Kossa 染色において、全期間に渡り通常飼料を投与した N8 群ではグラフト中膜弾性線維に高度石灰化を認めたが、炭酸ランタン含有飼料を投与した他の群では石灰化を認めなかった。またホモグラフト中のカルシウム含有量は炭酸ランタン投与期間が増えるほど減少した (Figure 6)。血液学的検査では、全期間に渡り炭酸ランタン含有飼料を投与した L8 群にのみ有意な低リン血症と貧血を認めた (Figure 7)。ウサギ体重増加量、大腿骨長、大腿骨密度・強度については、炭酸ランタン投与期間が増すに従い、有意に低下した (Figure 7)。また、多変量解析の結果、炭酸ランタン飼料摂取量と摘出時グラフト流量がグラフト移植後石灰化の独立した因子であり、炭酸ランタン投与量は L2N6 相当がカットオフ値として算出された[46]。

以上より、移植前後の短期間の炭酸ランタン投与は、成長障害や骨軟化症などの合併症を最小限に抑えつつ、移植ホモグラフトの石灰化を抑制することが証明された。一方で、炭酸ランタンの長期投与による慢性的な低リン血症は、成長障害、骨軟化、貧血などの有害事象を引き起こすことが判明した。

Figure 6. ウサギ血流影響下モデルにおける炭酸ランタン投与期間によるグラフト石灰化抑制効果



(Okamura K et al. *Circulation*. [46]より引用)

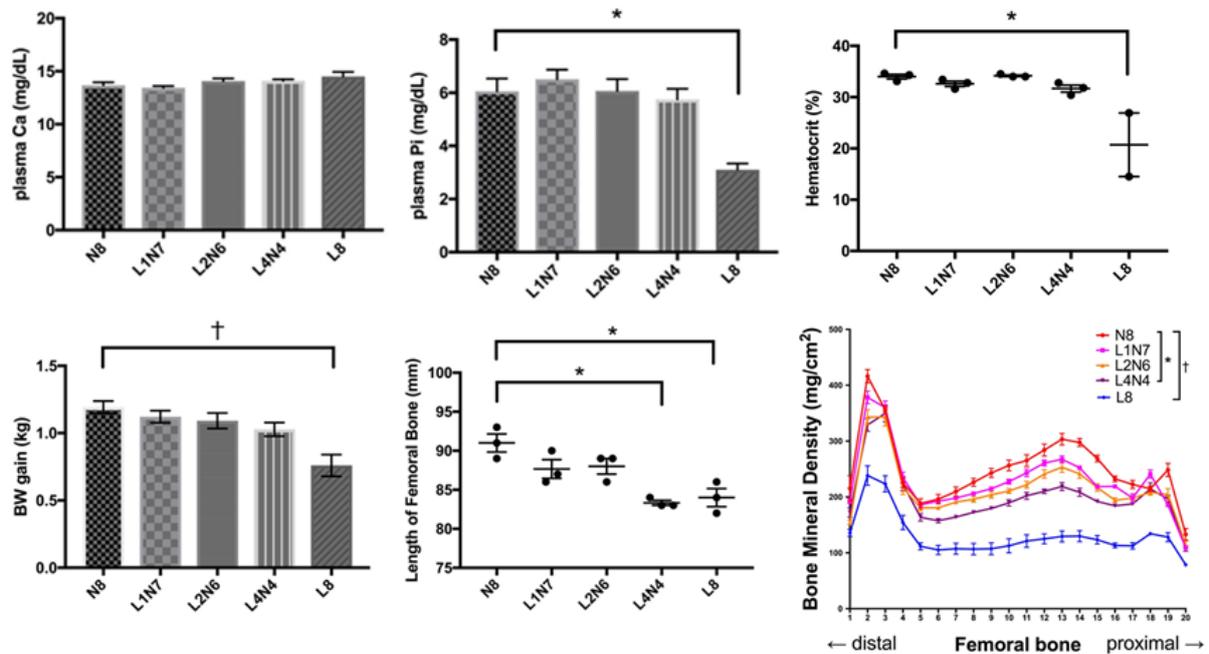
LXNY ; 5%炭酸ランタン含有飼料を術後 X 週投与した後に通常飼料を Y 週投与。

(上段) 病理学的組織像。Von Kossa 染色では、術後 8 週までの全期間にわたり通常飼料を投与した N8 群で強い石灰化を認めたが、その他の炭酸ランタン含有飼料投与群では石灰化を認めなかった。

(下段) N8 群に対し、炭酸ランタン含有飼料を投与したホモグラフトのカルシウム含有量は投与期間に応じて減少し、術後 8 週までの全期間炭酸ランタンを投与した L8 群では有意に低下した (N8, n = 12; L1N7, n = 13; L2N6, n = 10; L4N4, n = 8; L8, n = 7; *p<0.01)。

Figure 7. ウサギ血流影響下モデルにおける炭酸ランタン

投与期間別と血液学的所見および成長障害の評価



(Okamura K et al. *Circulation*. [46]より引用)

(上段) 血液検査。血中カルシウム濃度は各群間の差がなかったが、無機リン濃度と Hct 値において、L8 群が N8 群に対して有意に低下した。(N8, n = 12; L1N7, n = 13; L2N6, n = 10; L4N4, n = 8; L8, n = 7; *p<0.05)

(下段) 成長障害を体重増加量、大腿骨長および骨密度で評価した。炭酸ランタン投与期間が増すに従い、これらが有意に低下した。(各群 n = 3、*p<0.05, †p<0.001)

目的

本研究の目的は、大動脈ホモグラフト移植後のグラフト石灰化に対する炭酸ランタンによる治療効果を、よりヒト臨床に近い評価系モデルを用いて検討することである。当科でこれまで行ってきた大動脈ホモグラフト移植モデルはラット、ウサギといった小動物を用いた皮下、頸動脈への異所性移植モデルであった。今回我々は、循環器系、消化器系を始めヒトと類似している部分を多く有する大動物であるブタを使用することとし、また移植グラフトにかかる血圧や血流がより生理的である、下行大動脈への同所移植モデルの確立を行った。また、我々の先行研究ではホモグラフトを凍結処理せず新鮮グラフトとして移植を行ってきたが、本研究では東京大学医学部附属病院組織バンクのプロトコールに準じたホモグラフトの凍結保存処理を行い、臨床に即した実験モデルを作成した。さらに、炭酸ランタンの使用量も臨床の現場で慢性腎不全患者が実際に使う量に準じて定めた。

方法

1. ブタの取り扱い

本研究で使用したブタは、大ヨークシャー種とランドレース種を掛け合わせた二元交雑種であるゼンノー・プレミアム・ピッグ（ZPP）を用いた。ZPPは、研究用に開発された specific pathogen free（SPF）家畜ブタであり、日本 SPF 豚協会が規制対象にしている病原体を有さない。生後約 21 日で離乳するため、安定供給できる生後 4 週齢でドナー、レシピエントともに搬入し、いずれも雄ブタを使用した。レシピエントは約 1 週間の馴化期間を設けた後、生後 5 週で移植手術を行う方針とし、全てのブタは(株)東京実験動物から購入した。

動物飼育室は、室温 24～26℃、湿度 30～50%、照明は 12 時間毎の明暗サイクルで管理した。給餌は実験用小型ブタ用固形飼料である MP-A(株)オリエンタル酵母工業) 400g/日を朝 1 回摂取、飲水は水道水を自由摂取とした。

2. 研究デザインと除外基準

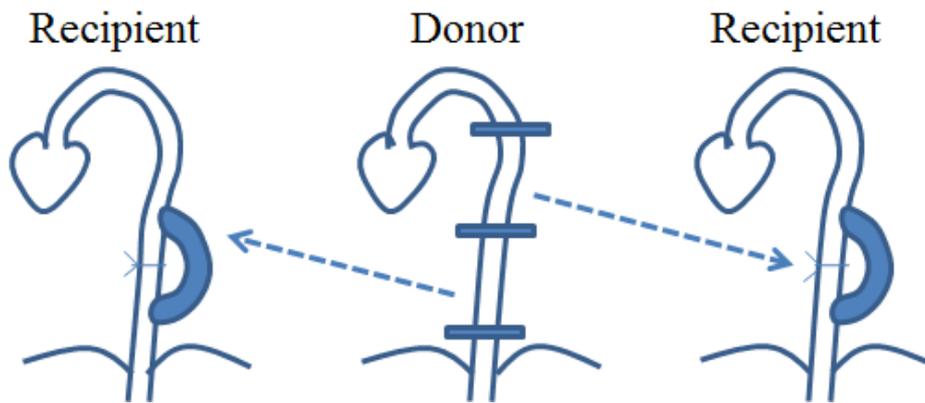
本研究では、実験に使用する動物数の削減のため、ドナー1頭からレシピエント2頭分の下行大動脈を摘出する方針とした (Figure 8)。ホモグラフト移植手術から摘出手術までの観察期間は8週間とし、通常飼料のみで飼育する対照群 (C群)、炭酸ランタンを術後4週間投与する炭酸ランタン群 (L群) の2群に分けた (Figure 9)。炭酸ランタンはホスレノール® (バイエル薬品) を使用し、臨床使用時の最大用量 (2250mg/日) を体重換算した量 (45mg/kg/日) を内服投与した。なお、ホスレノールは腸管からの無機リン吸収を抑制する薬剤であるため、手術直後から血中無機リン濃度を下げておく目的で、搬入時から内服を開始した (Figure 9)。術後観察期間と炭酸ランタン投与期間を上記のごとく設定した理由を下記に示す。

既報では Shimokawa らは生後3ヶ月のブタを用いて、ドナー大動脈弁付きグラフトをレシピエントの下行大動脈へバイパス状に移植する同様のモデルを作成し、移植後4週でグラフト石灰化が出現しはじめ、術後12週でグラフト中膜の著明な石灰化と壁構造の破壊を認めたと報告した[47]。本研究ではさらに若い生後1ヶ月のブタを使用することから、移植後8週で十分にグラフト石灰化が出現すると仮説を立て、術後観察期間を8週間に設定した。また、若年者における移植ホモグラフトの石灰化は、生理的な高リン血症をベースに移植手術に伴う炎症反応によって惹起され、同時に「高リン血症のみ」または「炎症状態のみ」の条件下では発生しにくいことがわかってい

る。我々のウサギを用いた先行研究では、炭酸ランタンの短期間投与により成長障害などの合併症を最小限に抑えつつグラフト石灰化抑制効果が得られた。これは、術後急性期の炎症反応が無くなる時期まで炭酸ランタンを投与することにより、若年者の移植ホモグラフトの石灰化が長期間にわたって抑制される可能性を示唆している。一方で、これまでのラット、ウサギモデルで用いたランタン使用量は臨床使用量に比べて多いため、臨床前研究として位置づけられるブタモデルにおいて、ウサギで得られた移植後 2 週間という至適投与期間が必ずしも当てはまらないことが予想された。したがって本研究では、ブタモデルにおけるランタン投与量は臨床使用量に準じており、ウサギモデルで用いた量よりも少量で有害事象が出にくいこと勘案し、炭酸ランタンの投与期間を術後 4 週間に設定し、その効果を検証することとした。

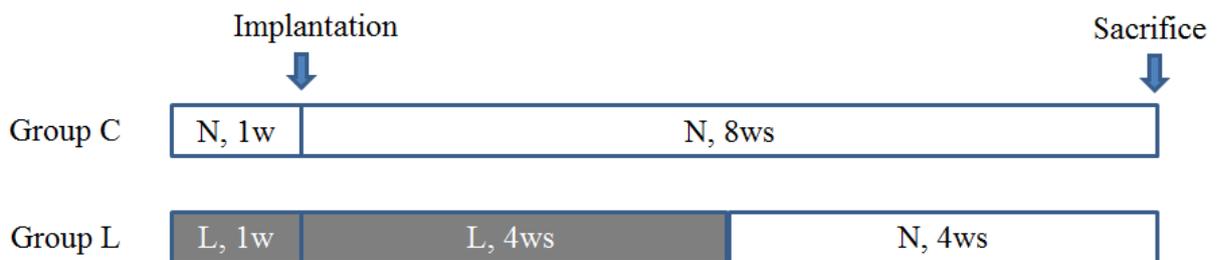
また、生後 1 ヶ月のブタに対する左開胸によるホモグラフト移植手術は非常に侵襲が高く、過去に報告された例がない。本研究では、まず手術手技を確立するために 6 頭のブタを要した。うち 3 頭は出血や心タンポナーデにより術中死、1 頭は術後 40 日目に腹膜炎により死亡した。残り 2 頭は術後 8 週間飼育を完了しホモグラフト摘出手術まで到達したが、グラフトの重度狭窄および解離を起こしていた。これらは、ホモグラフトの不適切な肋間動脈処理および手術手技に伴うグラフト kink が原因であると考えられた。したがって、これら 6 頭は解析の除外対象とし、全 10 頭（C 群、L 群ともに n=5）で解析を行った。

Figure 8. ホモグラフト移植手術シエーマ



ドナーブタ 1 頭から摘出した下行大動脈は中央で分割し、それぞれレシピエント 2 頭に移植した。

Figure 9. 炭酸ランタン投与群と対照群



N: Normal Diet

L: Normal Diet + Lanthanum Carbonate (45mg/kg/day)

通常飼料のみで術後 8 週間飼育する対照群 (Group C, n = 5) と、通常飼料に加え炭酸ランタンを術後 4 週間投与する炭酸ランタン群 (Group L, n = 5)。なお Group L は、術前 1 週間から炭酸ランタンを投与した。

3. 麻酔と周術期モニタリング

ブタは繊細な動物で興奮しやすい性質があるため、全身麻酔を行う際に麻酔前投薬を行うことにより麻酔の導入を容易にし、ブタのストレスを軽減させることができる。麻酔前投薬として、ミダゾラム（ドルミカム®、アステラス製薬）0.5mg/kg、塩酸キシラジン（セラクター®、バイエル薬品）2mg/kg、硫酸アトロピン（田辺三菱製薬）0.02mg/kg の3剤混合液を筋肉内注射することにより、鎮静・不動化、唾液および気管支粘液分泌の抑制を行った。イソフルラン（マイラン製薬）吸入（濃度4%）により麻酔を導入し、気管内挿管後（気管チューブは内径3～6mm）、同吸入薬（濃度1.5%～2.5%）で麻酔を維持した。維持麻酔中の人工呼吸器の一回換気量は10ml/kg、流量は空気：酸素＝2L/min：1L/min で開始し、右耳に装着したパルスオキシメーターで酸素飽和度のモニタリングを行い適宜調節した。

術中循環管理については、心電図モニタリングの他、全ての手術で左耳介静脈に24ゲージの静脈留置針（サーフロー®、テルモ）を挿入し、温生理食塩水約10～15ml/kg/hr の速度で投与した。また血圧モニタリングについては、後述するようにドナー手術・ホモグラフト移植手術では遠位弓部大動脈に、ホモグラフト摘出手術では右頸動脈に4Fr シース（ラジフォーカス®イントロデューサー、テルモ）を留置して動脈ラインを確保した。麻酔終了後は覚醒するまでヒートマット、赤外線ランプを用いて十分に復温を行った後、ゲージに返した。

4. 大動脈ホモグラフト採取と凍結処理

ドナー手術では、生後4週のZPPからホモグラフトとして下行大動脈を遠位弓部から横隔膜上にかけて全長にわたり摘出した。前項3の如く麻酔導入後、右側臥位として左胸部を剃毛、ポビドンヨード消毒を行い、オートクレーブ滅菌した覆布でドレーピングした。左第3肋間開胸で下行大動脈へアプローチし、遠位弓部大動脈に5-0プロノバ®（エチコン）でタバコ縫合をかけた後、同部位に4Frシースを挿入し、術中血圧モニターとした。ブタ下行大動脈前面を太い左奇静脈が横切っているため、これを結紮切離した後、下行大動脈を周囲組織からできるだけ剥離した。ヘパリンを300単位/kg投与し3分後に、塩化カリウム液10mEqを静注して心静止させ、遠位弓部及び横隔膜上で下行大動脈を遮断し、下行大動脈を全長にわたり摘出した（Figure 10）。

摘出した下行大動脈をトリミングした後に中央で2分割し、それぞれ組織保存用バッグ（Whirl-Pak®、75×185×0.064mm、Nasco）に入れ、組織凍結用保存液を加え空気を完全に除去した（Figure 10）。組織凍結用保存液はRPMI1640（ナカライテスク）27mlとDMSO（シグマアルドリッチ）3mlの混合液を用いた。密封した内バッグを外バッグ（Whirl-Pak®、115×230×0.076mm、Nasco）に入れ、外バッグをシールして2重パックとし、凍結させるまで4°C冷蔵庫内に保存した。

ホモグラフトの凍結処理は、すべて摘出から6時間以内に行った。プログラムフリーザー（Profreeze、日本フリーザー）を用いて、組織温度が-1°C/分の速度で-50°C

まで、続いて $-5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で -80°C まで冷却されるよう、下記の如くチャンバー内温度を設定した (Figure 11)。これは DMSO 濃度 10% の条件下において組織を緩徐凍結させるプログラムで、 -8°C 付近で発生する凝固熱を有効に抑えられるように設定されている[48]。2重パックされたホモグラフトは、金属製キャニスターに収納した後、チャンバー内に入れてプログラムフリージングを開始した。 -80°C まで凍結された組織は、キャニスターごとドライシッパー (CXR500、Taylor-Wharton) に入れ、液体窒素気相内 (-150°C 以下) に移植手術を行うまで最長約 1 ヶ月間 (平均 14.2 ± 8.7 日) 保存した。

Figure 10. ホモグラフトとパッケージング



ドナーから摘出したホモグラフトは組織保存用バッグに入れて2重パックとした。

Figure 11. プログラムフリーザーの設定

Channel	RATE (°C/min)	TEMP (°C)	HOLD (min)
1	-3.0	+4	10
2	-1.2	-8	
3	-74.0	-45	
4	+44.0	-23	
5	+0.4	-19	
6	-1.0	-50	
7	-5.0	-80	30

組織温度が-1°C/分の速度で-50°Cまで、続いて-5°C/分で-80°Cまで凍結されるようにフリーザーチャンバー内の温度をプログラミングした。

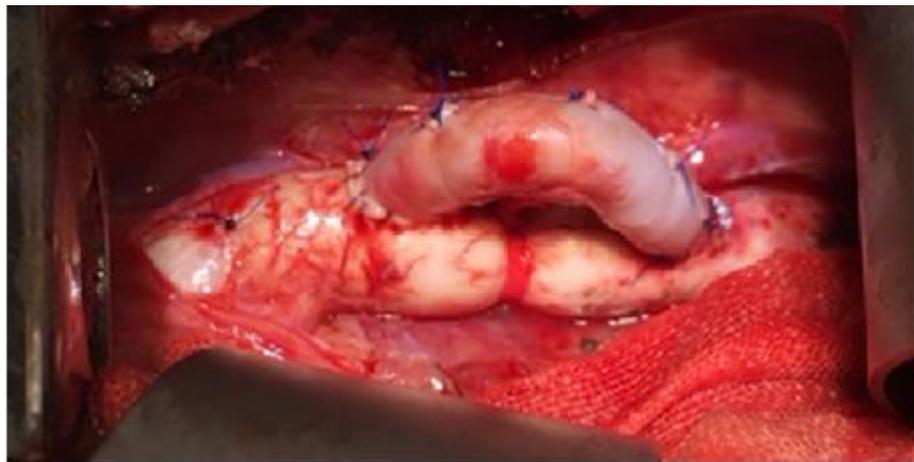
5. 大動脈ホモグラフトの解凍と移植手術

レシピエントの移植手術は生後 5 週の ZPP を使用した。前述の如く麻酔導入して右側臥位とし、左胸部の剃毛、消毒、ドレーピングを行った。移植手術に先立ち、まずホモグラフトの解凍処理を行った。外バッグから内バッグを清潔操作で取り出し、38～42℃に調整した滅菌温生食が入ったベイスンに静かに入れ、10 分間浸した。凍結保存液は完全に解けたことを確認後、内バッグからホモグラフトを取り出し、乳酸リンゲル液（ラクテック®、大塚製薬）で DMSO を洗い流した。解凍したホモグラフトは、肋間動脈の起始部を 5-0 プロノバ®で縫合閉鎖し、ヘパリン加生食に浸水して保存した。

続いて、ドナー手術と同様に第 3 肋間で開胸し、下行大動脈を露出した。下行大動脈を十分に剥離した後、下行大動脈中枢側（遠位弓部大動脈）及び末梢部に 5-0 プロノバ®によるタバコ縫合をかけ、それぞれに 4Fr シース、6Fr シースを留置した。これらのシースを耐圧チューブで接続して血液循環回路を作成し、下行大動脈遮断中の末梢灌流（Distal perfusion）として利用することにより術中脊髄虚血を予防した。またこの回路の側枝を用いて動脈圧ラインと接続し、術中血圧モニタリングを行った。ヘパリン 300 単位/kg を静注した後、クーリーデラ鉗子でまず末梢側下行大動脈をサイドクランプ後、同部位の下行大動脈を切開し、ホモグラフト末梢端と 5-0 プロノバ®による連続縫合で側端吻合を行った。ホモグラフトをプラスチック製ブルドッグで遮

断した後、下行大動脈の遮断を解除。続いて、中枢側下行大動脈を同様の手技でサイドクランプ、切開し、ホモグラフト中枢端と側端吻合を行った。下行大動脈、ホモグラフトの遮断を解除後、両吻合部の中間部でレシピエントの下行大動脈を結紮し、ホモグラフトに血液が流れるようにした (Figure 12)。次に、4Fr シースから動脈血を 50ml 採取し、採取した血液は速やかに遠心分離 (3000rpm、5 分間) を行い、得られた血漿は deep freezer (−80°C) で凍結保存した。皮下組織を 3-0 バイクリル® (エチコン)、皮膚を 1-0 ナイロン糸で縫合閉鎖し手術を終了した。覚醒が得られた後に、抜管、点滴投与を終了し、飼育室のゲージに戻した。また、全ての症例において術翌日からアセチルサリチル酸 (和光純薬) 100mg を経口投与してホモグラフトの血栓閉塞を予防した。

Figure 12. ホモグラフト移植手術



←proximal

distal→

ホモグラフト解凍後、肋間動脈を処理し、レシピエント下行大動脈にバイパス状に吻合した。吻合中は distal perfusion を行い、術中脊髄虚血を予防した。その後レシピエント下行大動脈を結紮し、グラフトに血液を流した。

6. 大動脈ホモグラフトの摘出と大腿骨の採取

大動脈ホモグラフト移植後 8 週経過時にホモグラフトを摘出した。前述の如く麻酔導入後、仰臥位として頸部～左胸部にかけて剃毛、消毒ののちにドレーピングして手術を開始した。まず右頸部を切開して右頸動脈を露出し、4Fr シースを留置して術中血圧モニタリングするとともに、動脈血 50ml を採取した。採取した血液は速やかに遠心分離を行い、血漿は deep freezer で凍結保存した。

再開胸は、左肺が胸壁やグラフトなどの周囲組織と強固に癒着していることが予想されたため、rib-cross 法に準じて行った[49]。ブタを右即臥位とし、左胸部に新たな皮切を置き、第 2～第 6 肋骨を切離して、足側から頭側にかけて癒着剥離を行い、下行大動脈およびホモグラフトを露出した。ヘパリン 300 単位/kg を静注 3 分後、塩化カリウム液 10mEq を静注して心静止させ、下行大動脈の中樞および末梢側を遮断し、ホモグラフトを摘出した。摘出したホモグラフトは、吻合部を含む両断端それぞれ 5mm 長を切離除去した後、中央彎曲部 20mm 長をカルシウム定量検査用に deep freezer で凍結保存した。また、残存ホモグラフトの中樞側 5mm 長は病理組織学的検査用にホルマリン固定した。

その後、左大腿部に切開をおき、股関節および膝関節で靭帯を切断して左大腿骨を摘出した。大腿骨は生理食塩水に浸したガーゼに包み、deep freezer で凍結保存した。

7. 血液学的検査

移植手術時および8週後のグラフト摘出時に採取した血液は、採取直後に血液ガス分析装置にかけ、ヘマトクリット（Hct）値を測定した。凍結保存した血漿から、カルシウム（Ca）濃度、無機リン（Pi）濃度、乳酸脱水素酵素（LDH）、アルカリフォスファターゼ（ALP）濃度をそれぞれ測定した。これらの測定は㈱SRLに委託した。

8. 病理組織学的検査

レシピエントから摘出したホモグラフト中枢側（5mm長）はホルマリン固定し、パラフィンブロック作製後に、ミクロトーム（LEICA SM2000R）で厚さ3 μ mに薄切りし、Hematoxylin-Eosin（HE）染色、Elastica-van Gieson（EVG）染色および von Kossa 染色を行い評価した。これらの検査は全て㈱クレハ分析センターに委託した。標本写真は、光学顕微鏡 Keyence BZ-X710（Keyence）および Nikon ECLIPSE 80i（Nikon）を用いて撮影した。

9. 大動脈ホモグラフト含有カルシウム定量検査

レシピエントから摘出したホモグラフト中央部（20mm 長）は外膜周囲の結合組織を除去した後に deep freezer（ -80°C ）で凍結保存した。ホモグラフトを解凍後、硝酸と過酸化水素水の混合液に入れ電磁波により組織を完全に溶解後、組織溶解液のカルシウム濃度を原子吸光度法により測定した。測定値は、検体の組織乾重量で除して補正し、mg/g dry weight（DW）で表記した。これらの測定は株SRLに委託した。

10. 大腿骨長の測定、骨塩量・骨密度試験と三点曲げ試験

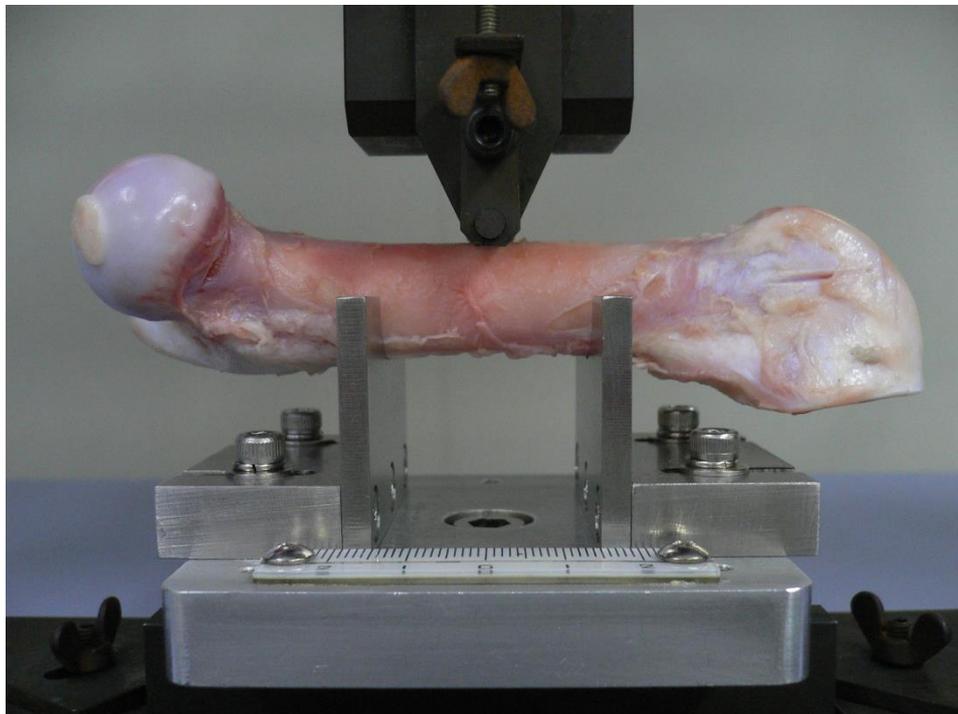
成長障害評価は、ウサギを用いた我々の先行研究に準じ、ブタ大腿骨長、骨塩量・骨密度、3点曲げ試験を以下の要領で実施した。

ブタの大腿骨長の測定は、大腿骨頭上縁～大腿骨内側上顆下縁の距離を測定した。骨塩量・骨密度試験は、Dual Energy X-ray Absorptiometry（DXA）法で行った。DXA法とは、二種類の異なるエネルギーのX線を用いることによって、筋肉や脂肪などに関係なく骨成分だけを測定する方法で、主に骨粗鬆症の診断に用いられている[50]。この測定法では骨塩量（mg）を単位面積（ cm^2 ）で割った値で算出し、 1cm^2 当たりの骨塩量（ mg/cm^2 ）、つまり骨密度として表現した。ブタ大腿骨を長軸方向に全長を20分割して骨塩量（mg）、骨密度（ mg/cm^2 ）を算出し解析を行った。

3点曲げ試験は、骨の生体力学的研究の分野で広く用いられている骨破断試験であ

り、主にラットなど実験動物の長管骨（大腿骨や脛骨）の皮質骨力学的強度を測定するために使用される[51-53]。大腿骨の両端を固定し中央部分にプレス機を用いて負荷をかけ、破断するまでの変位（mm）と荷重（N）を測定し、最大荷重（N）、剛性（stiffness）（N/mm）、最大荷重エネルギー（N・mm）を算出した（Figure 13）。これらの検査は、
（株）クレハ分析センターに委託した。

Figure 13. ブタ大腿骨 3点曲げ試験



摘出したブタ大腿骨の両端を固定し、中央の骨幹部に負荷をかけ、破断するまでの荷重（N）と変位（mm）を測定した。

11. 動物愛護と倫理的配慮

全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」、「動物実験の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する法律」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき倫理的な配慮をもって適正に行った。また、全てのドナーおよびレシピエント ZPP は下行大動脈遮断前に塩化カリウムを静注することによって安楽死させた。

本実験計画書は、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会における承認を得て実施された（承認番号：医-H18-017）。

12. 統計学的分析

統計解析は JMP version 14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) と GraphPad Prism version 8 (Graphpad Software, San Diego, CA) を使用した。連続変数は平均±標準偏差 (Standard Deviation, SD) で表し、2 群間の比較は対応がない場合は Student t-test または Man-Whitney test、対応がある場合は paired t-test を行った。すべての検定は両側検定で行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と解釈した。

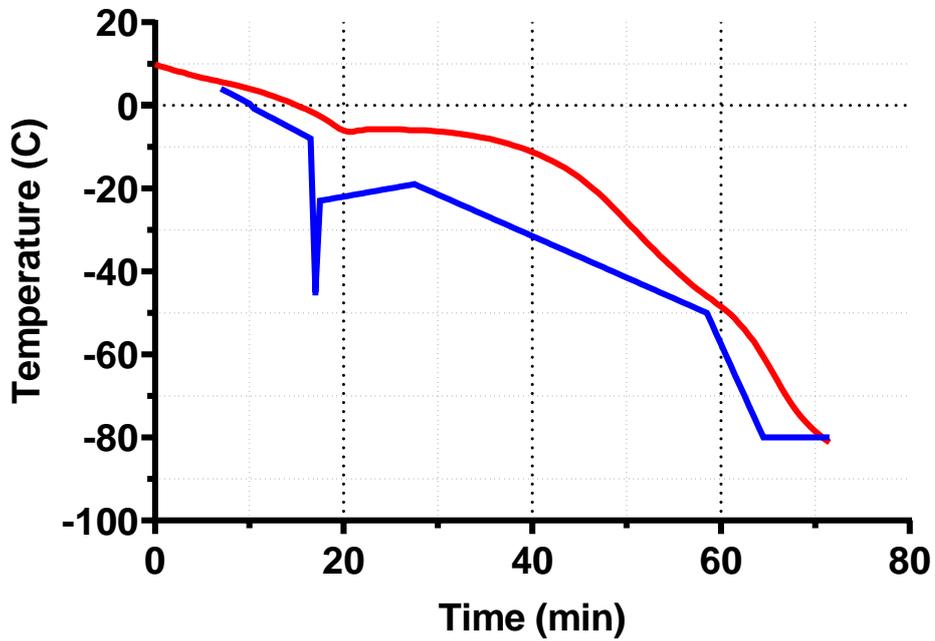
結果

1. ホモグラフトの凍結処理

ドナーから摘出したホモグラフトをプログラムフリーザーによる -80°C まで凍結させた実際の温度変化を示す (Figure 14)。プログラムフリージングにより凝固熱の発生を最小限に抑え、滑らかな温度曲線を描き目標温度まで到達している。

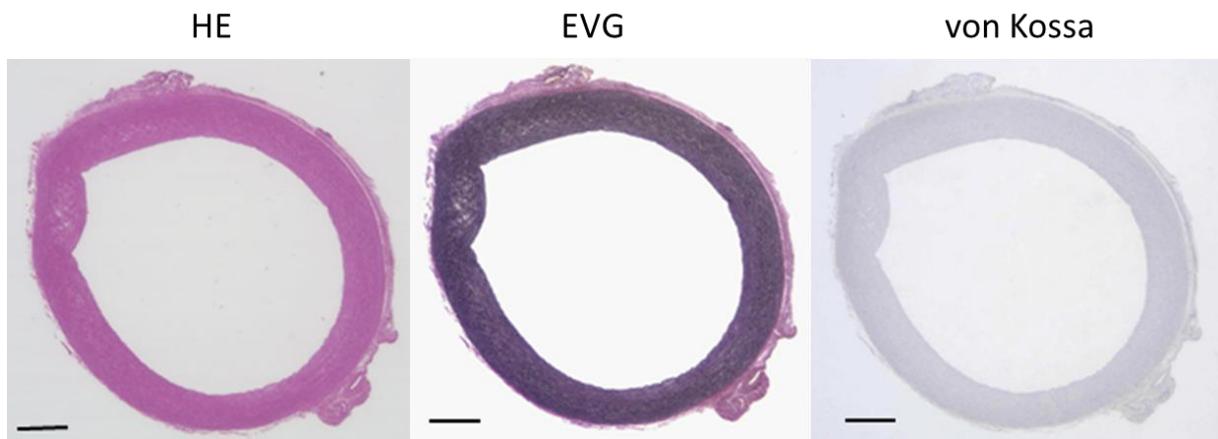
液体窒素保存庫から取り出し、解凍した後のホモグラフトの病理組織像を示す。グラフトの内膜肥厚は認めず、石灰化沈着も認めなかった (Figure 15-A)。またこれら移植前のホモグラフトのカルシウム定量値は $0.20 \pm 0.05 \text{ mg/g DW}$ であった。一方、凍結保存前の正常下行大動脈と比較すると、凍結保存解凍後グラフトの内皮細胞は剥離し、平滑筋細胞は核濃縮を示し断続的に空隙を形成していた (Figure 15-B)。

Figure 14. プログラムフリーザーによるホモグラフト組織温度
曲線



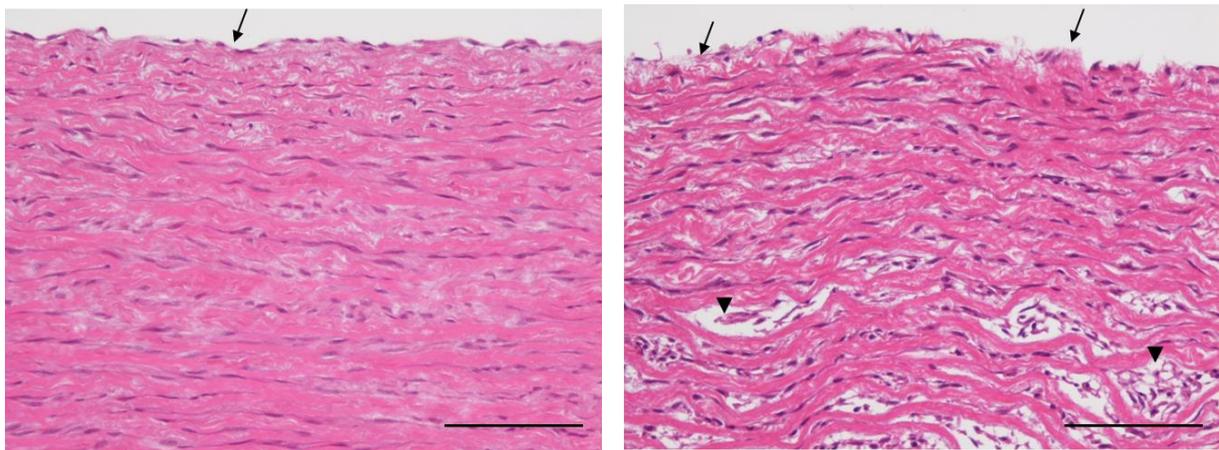
グラフの赤線が組織の温度、青線がフリーザーの温度変化。

Figure 15-A. 凍結保存、解凍後のホモグラフト病理画像



解凍後ホモグラフトは、内膜肥厚や石灰化沈着は認められなかった
(対物 4 倍率、Bar = 1000 μ m)

Figure 15-B. 正常下行大動脈と凍結保存ホモグラフト



(左) 正常下行大動脈。内皮細胞は扁平状にみられ (矢印)、中膜は弾性線維と平滑筋細胞が整然と並んでいる。

(右) 凍結保存、解凍後グラフト。内皮細胞は剥離し (矢印)、平滑筋細胞は一部核濃縮を示し、断続的に空隙を形成していた (矢頭)。

(対物 20 倍率、Bar = 100 μ m)

2. 大動脈ホモグラフト移植手術と術後経過

レシピエントにおける移植手術時点での各測定値を Table 1 に示す。手術時点でのレシピエント体重、手術時間、下行大動脈遮断時間、使用ホモグラフトのサイズに有意差を認めなかった。

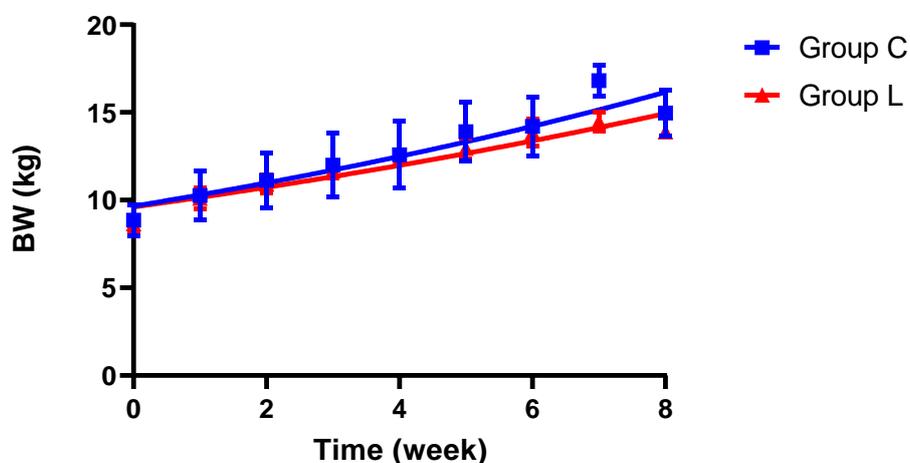
両群 (n = 10) とともに術翌日から飼料を全量摂取し、下肢麻痺症状や食欲不振、嘔吐、下痢などの消化器症状を認めなかった。

術後の体重推移を Figure 16 にしめす。術後 8 週時点でのホモグラフト摘出時の体重は、C 群で 14.9 ± 1.29 kg、L 群で 13.9 ± 0.33 kg で 2 群間に統計学的有意差は認めなかった (p = 0.11)。なお、全てのレシピエントは術翌日から飼料および内服薬を全量摂取した。

Table 1. 大動脈ホモグラフト移植手術時の各計測値

	Group C (n = 5)	Group L (n = 5)	p value
Age (day)	38.0	38.2 ± 0.45	0.347
BW (kg)	8.86 ± 0.89	8.64 ± 0.42	0.631
Operation time (min)	195 ± 12	199 ± 25	0.716
Clamp time (min)	48.2 ± 6.8	50.4 ± 3.4	0.535
Graft length (mm)	41.0 ± 2.2	42.4 ± 1.8	0.309
External width (mm)	7.5 ± 1.3	7.7 ± 1.4	0.819
Internal width (mm)	5.6 ± 1.1	5.8 ± 1.2	0.794

Age: 移植手術時ブタ日齢、BW: 体重、Operation time: 手術時間、Clamp time: 下行大動脈遮断時間、Graft length: ホモグラフト全長、External width: ホモグラフト外径、Internal width: ホモグラフト内径。移植手術時の各項目の計測値は2群間に有意差を認めなかった。

Figure 16. 2群間の術後体重推移

移植から摘出までの8週間の体重推移。2群間に有意差を認めなかった。(各群 n = 5、p = 0.11)

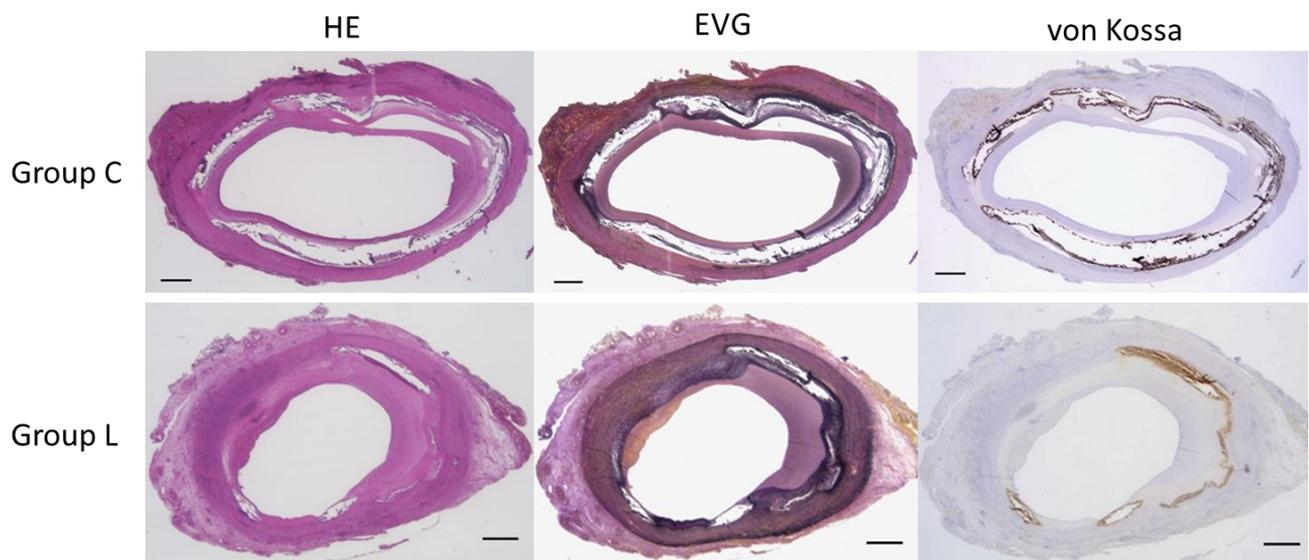
3. 炭酸ランタンによるホモグラフト石灰化抑制効果

両群の摘出ホモグラフトを病理組織学的に比較検討した。von Kossa 染色において、C 群では中膜弾性線維に沿ってほぼ全周性に強い黒色変化を呈し、高度石灰化の所見を認めた。一方、L 群においては、中膜石灰化の程度は C 群に比べ軽減していた (Figure 17-A)。両群とも中膜石灰化部位において平滑筋細胞および弾性線維の壊死を認め、これらは部分的に脱落・消失し、残存した弾性線維は断裂していた。L 群ではこれらの変化は C 群に比し軽減しており、壊死のない平滑筋細胞および弾性線維が残存していた (Figure 17-B)。また、L 群において回復を示す平滑筋細胞の再生が C 群よりも顕著に見られた (Figure 17-C)。

一方、移植後グラフトの内皮細胞は両群とも高率に保持されていた。また、両群の全例に内膜肥厚が認められ、肥厚した内膜には軽微から高度に増生した線維芽細胞、筋内膜細胞 (平滑筋類似細胞) および線維組織が見られ、特に線維組織の増生が C 群において高度に認められた (Figure 18)。

次に、原子吸光度法により測定したホモグラフト中カルシウム含有量は、C 群 123.2 ± 26.5 mg/g DW、L 群 74.9 ± 11.3 mg/g DW であり、L 群で有意に低下した ($p = 0.006$) (Figure 19-A)。また、内膜層および中膜層の断面積をそれぞれ測定し、内膜面積を中膜面積で割った値 (Intima/Media ratio) を算出すると、C 群 0.37 ± 0.37 、L 群 0.15 ± 0.10 と L 群で低下傾向であったが有意差は認められなかった ($p = 0.531$) (Figure 19-B)。

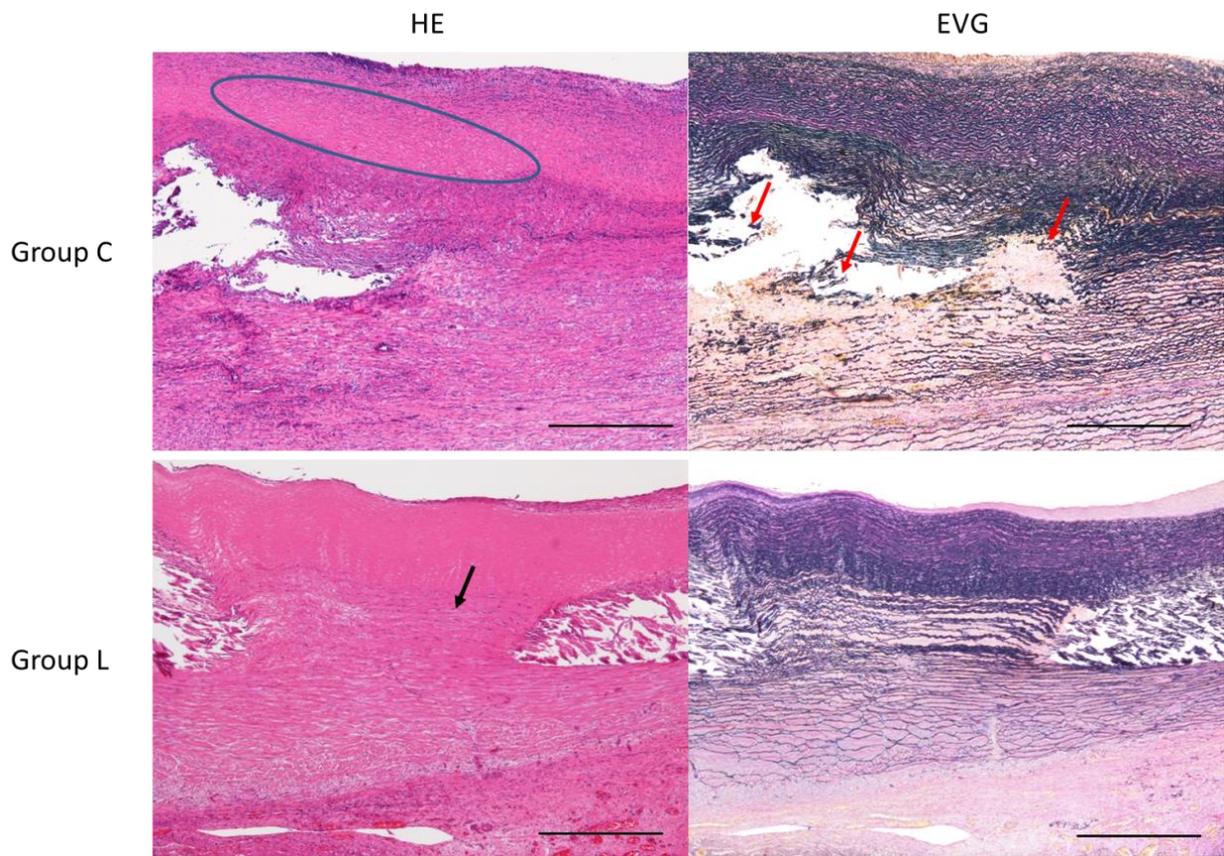
Figure 17-A. 摘出ホモグラフトの病理画像（全体像）



C群では、ほぼ全周性に中膜弾性線維の破壊、消失が見られ、また弾性線維に沿って全周性に強い黒色変化を呈し、高度石灰化の所見を認めた。L群では、弾性線維の消失や中膜石灰化が抑制され、中膜としての構造が保たれている部分も確認できる。

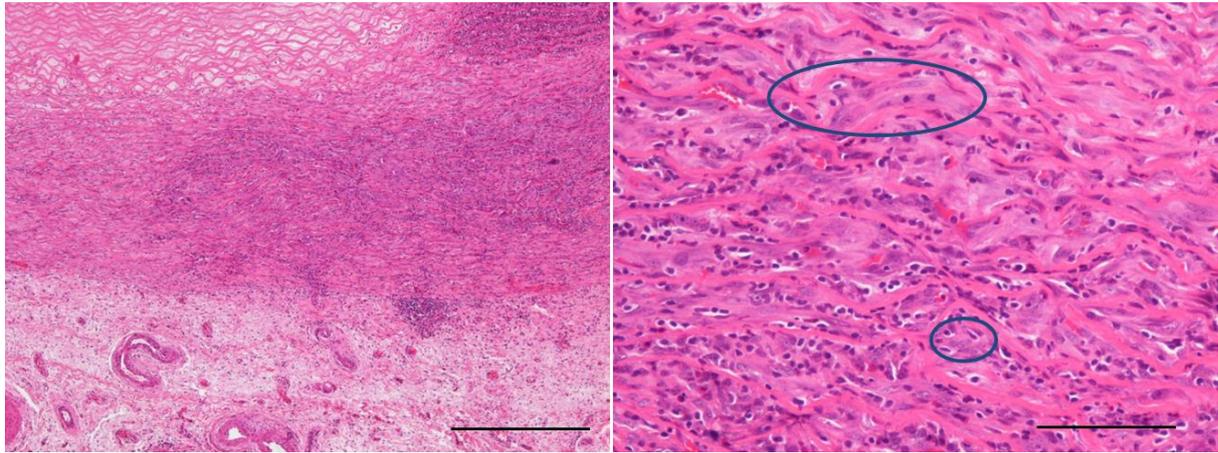
（対物4倍率、Bar = 1000 μ m）

Figure 17-B. 移植後グラフト中膜の変化



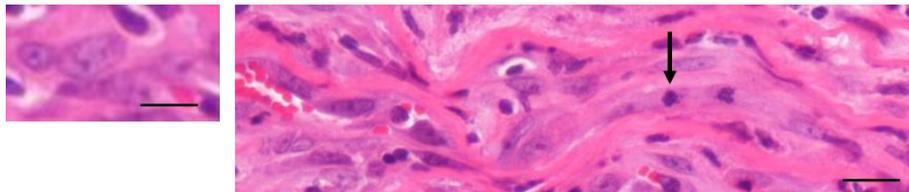
C 群の石灰化部位では弾性線維の断裂（赤矢印）あるいは脱落・消失を認めた。内膜付近の中膜はエオジン好性な中膜壊死（硝子様；○枠内）を示した。一方、L 群の非石灰化部では、弾性線維の配列の乱れを認めたが平滑筋細胞が残存していた（矢印）。
（対物 4 倍率、Bar = 500 μ m）

Figure 17-C. 中膜平滑筋細胞の再生



L 群非石灰化部位における中膜病理組織画像。炎症細胞浸潤を伴うが、顕著な肉芽組織の増生および平滑筋細胞の再生（○枠内）が認められた。

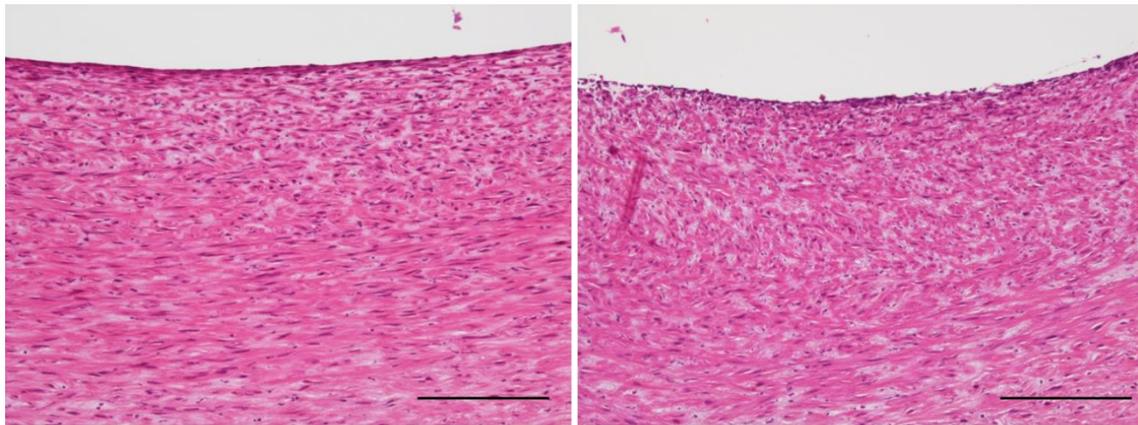
（左；対物 4 倍率、Bar = 500 μ m、右；対物 20 倍率、Bar = 100 μ m）。



（左）○枠（小）の拡大像。平滑筋細胞の再生にみられる特徴的な数珠つなぎ状の増生パターンが認められた。（Bar = 10 μ m）

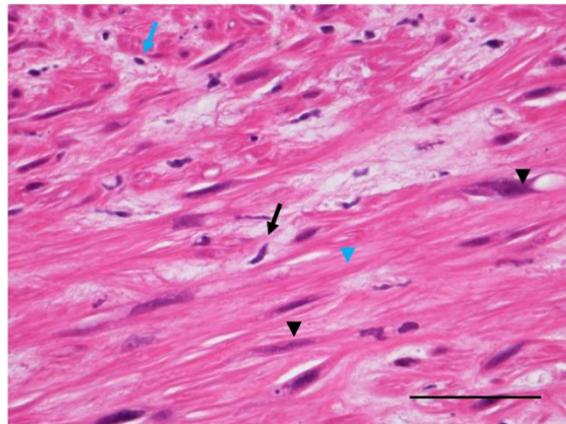
（右）○枠（大）の拡大像。平滑筋細胞の核クロマチン濃度が増加し、一部に有糸分裂像（矢印）が認められた。（Bar = 20 μ m）

Figure 18. 移植後グラフト内膜の変化



Group C

Group L

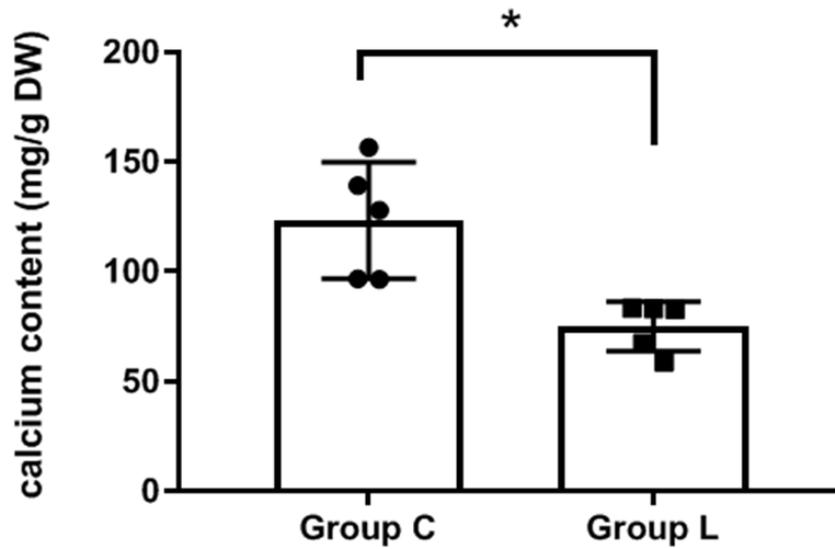


肥厚内膜の構成組織

両群とも内皮細胞が保持され、また内皮細胞下に線維芽細胞、筋内膜細胞（平滑筋類似細胞）および線維組織から構成された内膜肥厚が認められた。線維芽細胞（矢印）、筋内膜細胞（矢頭）、リンパ球（青矢印）。間質は線維組織（青矢頭）。

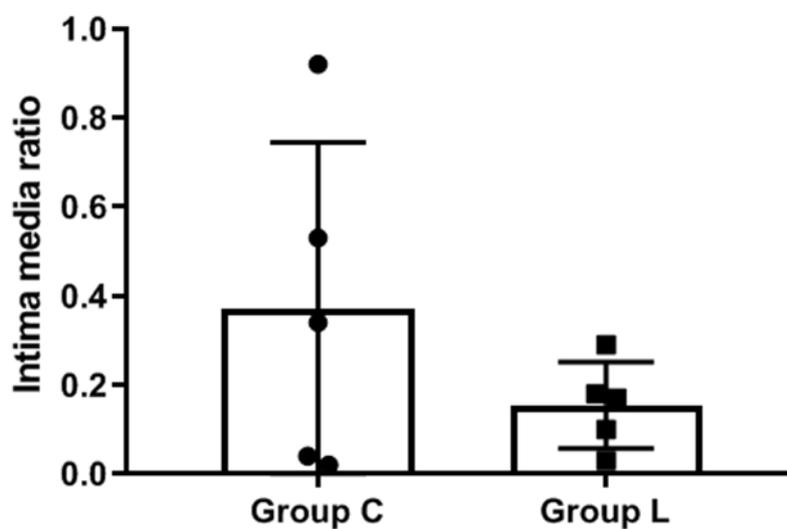
（上段；対物 20 倍率、Bar = 200 μ m、下段；対物 40 倍率、Bar = 50 μ m）

Figure 19-A. 移植後ホモグラフト中のカルシウム含有量



原子吸光度法により測定したホモグラフト中カルシウム含有量は、L群で有意に低下した（各群 n = 5、*p < 0.01）。

Figure 19-B. 移植後ホモグラフト内膜肥厚の評価

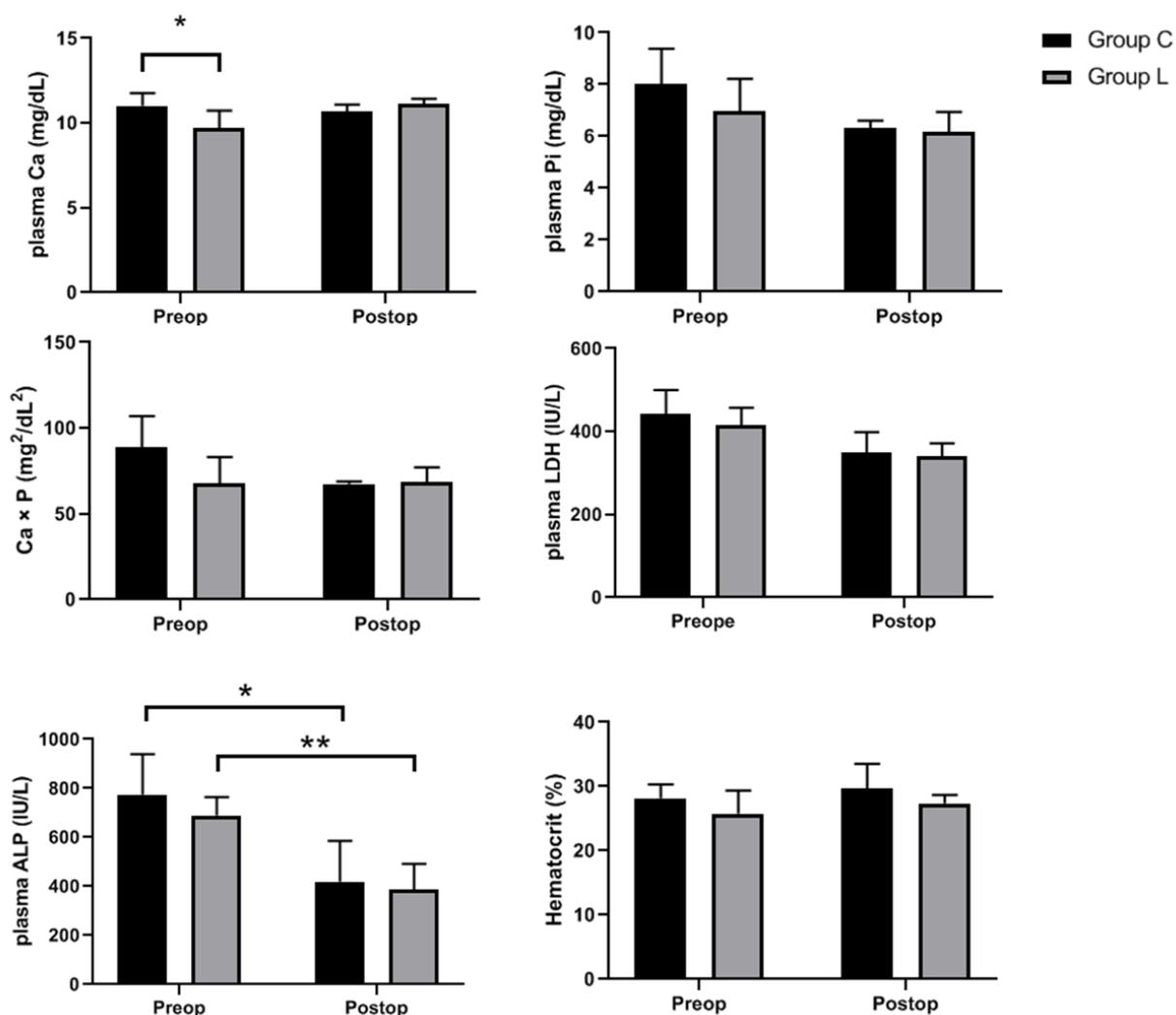


内膜/中膜比はL群で低下傾向であったが、有意差は認めなかった（各群 n = 5、p = 0.531）。

4. 血液学的検査結果

ホモグラフト移植時および8週飼育後のグラフト摘出時に採取したヘパリン化血から血漿中 Ca、Pi、LDH、ALP 濃度および Hct 値を測定した。血漿 Ca 濃度は移植時に C 群 11.0 ± 0.7 mg/dL、L 群 9.7 ± 1.0 mg/dL であり 2 群間に有意差を認めた ($p = 0.048$)。グラフト摘出時は C 群 10.7 ± 0.2 mg/dL、L 群 11.1 ± 0.2 mg/dL で 2 群間に有意差を認めなかったが、炭酸ランタン投与により Ca 濃度が上昇する傾向が見られた ($p = 0.052$)。血漿 Pi 濃度は、移植時に C 群 8.0 ± 1.4 mg/dL、L 群 7.0 ± 1.2 mg/dL ($p = 0.24$) であり L 群で低い傾向を認めた。また同濃度は摘出時に C 群 6.3 ± 0.3 mg/dL、L 群 6.2 ± 0.8 mg/dL ($p = 0.68$) であり、いずれも 8 週間の観察期間中に低下する傾向を認めた。これは若年であるほど血漿中 Pi 濃度が高値であることを示唆する。また Ca \times P 値は、移植時に C 群 88.8 ± 18.1 mg²/dL²、L 群 67.8 ± 15.2 mg²/dL² ($p = 0.08$) と L 群で低い傾向を示し、摘出時には C 群 67.4 ± 1.3 mg²/dL²、L 群 68.6 ± 8.6 mg²/dL² ($p = 0.77$) であり、L 群では Ca \cdot P にほぼ変化を認めなかった。血漿 ALP、LDH 濃度はいずれも成長に伴い低下する所見を認めたが、C、L 両群間に有意差を認めなかった。これらはヒトにおいても新生児期や小児期に高値を示すことが知られており、ブタにおいても成長に伴って減少したと考えられる。Hct 値に関しても 2 群間に統計学的有意差を認めなかった (Figure 20)。

Figure 20. ホモグラフト移植時、摘出時の血液学的所見



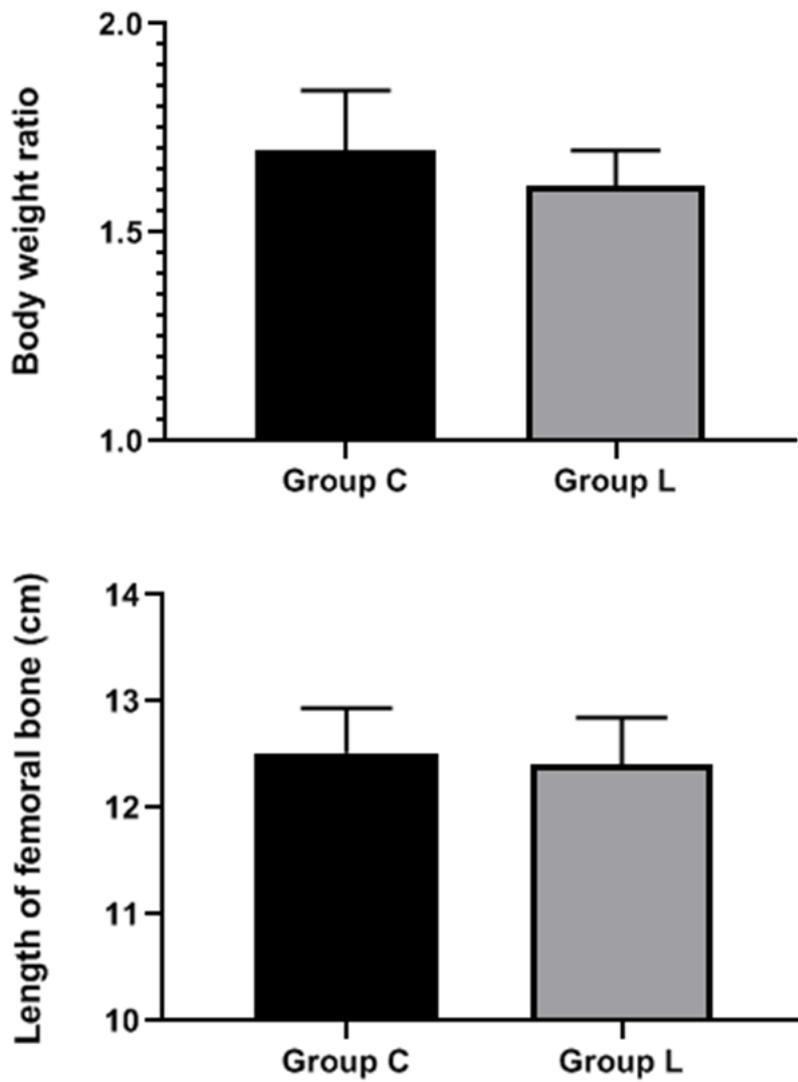
ホモグラフト移植時および8週飼育後の血漿中Ca、Pi、LDH、ALP濃度およびHct値の推移を示した。L群はC群に比べ移植時に血漿Pi濃度が低い傾向を示した ($p = 0.24$)。また両群とも血漿Pi、ALP、LDH濃度が成長に伴い低下傾向であった。血漿Ca濃度は移植時にC群がやや高値を示したが、8週後にはL群において上昇傾向を認めた。Hct値に2群間の差を認めなかった (各群 $n = 5$ 、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

5. 成長障害と骨軟化の評価

移植手術から術後 8 週までの体重変化は Figure 16 に示した通りで、体重増加率は C 群 1.69 ± 0.15 、L 群 1.61 ± 0.09 ($p = 0.29$) で 2 群間に有意差を認めなかった。また、グラフト摘出時の大腿骨長は C 群 12.5 ± 0.4 cm、L 群 12.4 ± 0.4 cm ($p = 0.67$) で 2 群間に有意差を認めなかった (Figure 21)。

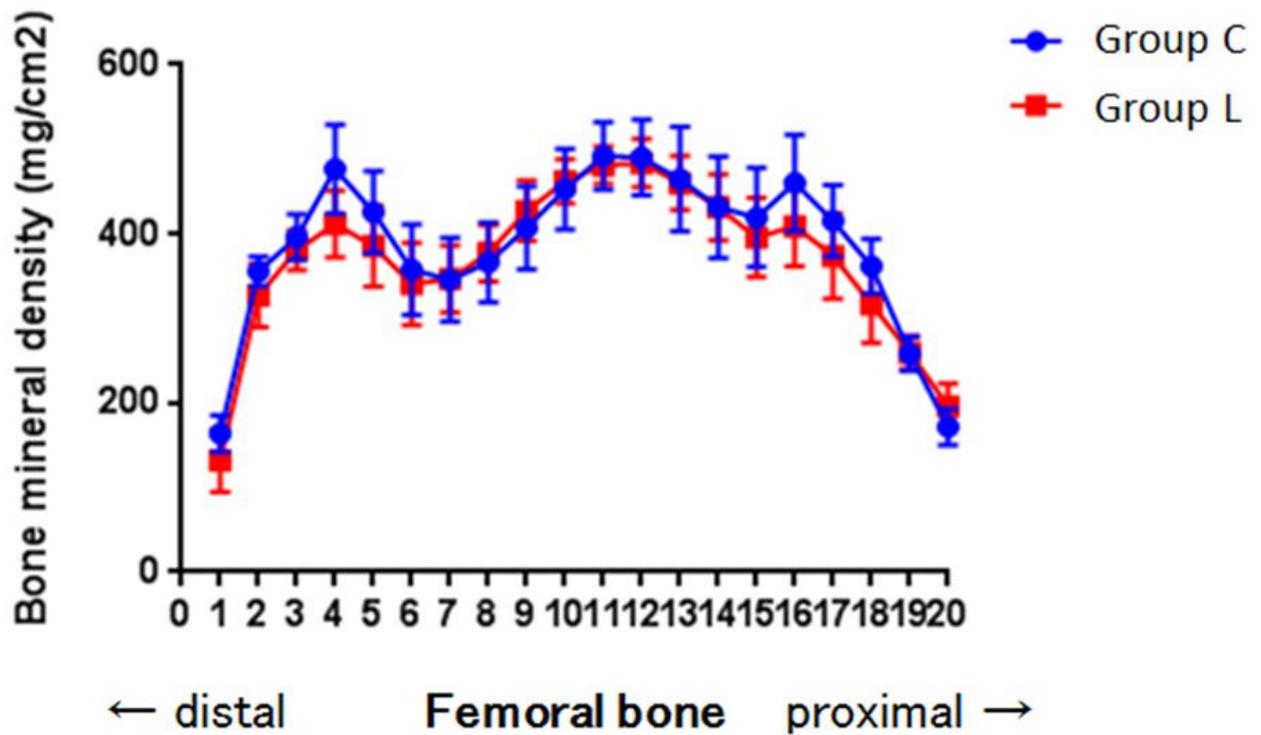
次に、各群ブタの大腿骨密度の比較を行った。大腿骨を長軸方向に 20 分割して、群毎に各部位の平均を 20 箇所算出し、すべての部位の平均値の合算から全体の平均値を算出すると、C 群 386 ± 35 mg/cm²、L 群 370 ± 29 mg/cm² ($p = 0.67$) であり有意差を認めなかった (Figure 22)。3 点曲げ試験では、最大荷重は C 群 1621 ± 258 N、L 群 1507 ± 156 N ($p = 0.42$)、剛性は C 群 999 ± 189 N/mm、L 群 853 ± 111 N/mm ($p = 0.18$)、最大荷重エネルギーは C 群 4910 ± 1459 N・mm、L 群 4015 ± 1136 N・mm ($p = 0.31$) といずれも有意差を認めず、炭酸ランタンによる骨軟化は認めなかった (Figure 23)。

Figure 21. グラフト摘出時の体重増加率およびブタ大腿骨長



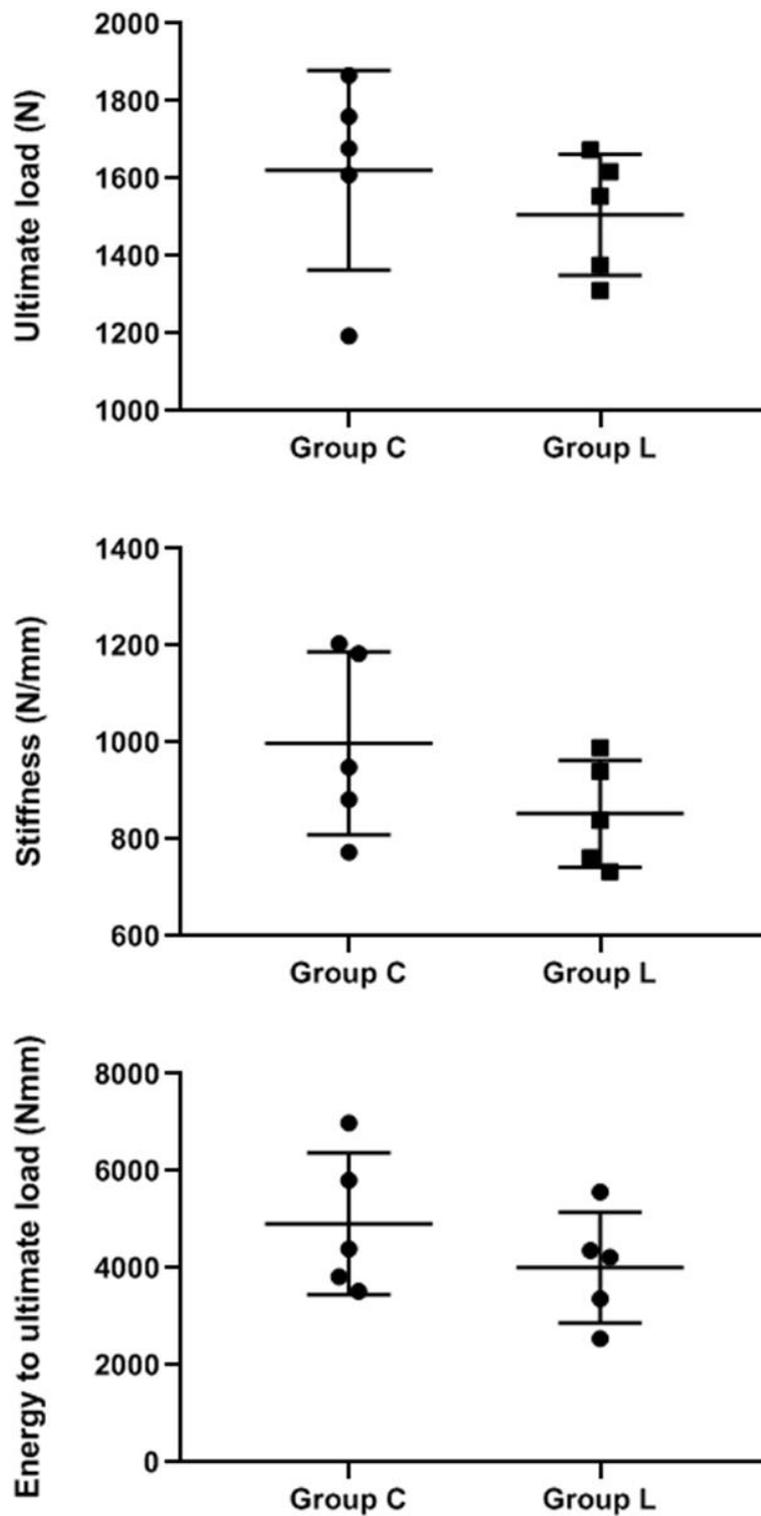
体重増加率およびホモグラフト摘出時の大腿骨長に2群間に有意差を認めなかった (各群 n = 5)。

Figure 22. グラフト摘出時のブタ大腿骨密度



大腿骨を長軸方向に 20 分割して骨密度を測定した。群毎に各部位の平均を 20 カ所算出し、すべての部位の平均値の合算から全体の平均値を算出した結果、2 群間に有意差を認めなかった (各群 n = 5)。

Figure 23. ブタ大腿骨 3 点曲げ試験結果



最大荷重、剛性、最大荷重エネルギーいずれも 2 群間に有意差を認めなかった (各群 n = 5)。

考察

本研究では、若年ブタに凍結保存後に解凍した大動脈ホモグラフトを移植し、術後急性期（4週間）に炭酸ランタンを投与することによって、成長障害、骨軟化症や貧血などの合併症を起こすことなく、グラフト石灰化を抑制できる可能性が示された。

血管中膜石灰化にはカルシウム・リン代謝が大きく関係しており、血中カルシウム・リン積の増加は慢性腎不全における心臓血管疾患の重要な予後規定因子と報告されている[54]。また、血中リンおよびカルシウム濃度の高値はそれぞれ単独で血管平滑筋細胞に作用し石灰化を引き起こす要因であると考えられている[55]。一方、若年齢の慢性腎不全では血中リン濃度とカルシウム・リン積が成人例に比べより高値となり、強い血管石灰化を引き起こすと報告され[56]、Yamauchiらはラットの下行大動脈皮下移植モデルにおいて、血中無機リン濃度の上昇が血管石灰化の決定因子であることを示した[40]。本実験では、グラフト中膜石灰化がより強く発現した対照群の移植前血中リン濃度（ 8.0 ± 1.4 mg/dL）はランタン群（ 7.0 ± 1.2 mg/dL）に比べ高値を示し（ブタの血中リン正常値は6.5～7 mg/dL程度）、同濃度は両群とも成長に伴い低下した。一方、血中カルシウム濃度はランタン群で移植後に上昇傾向を認めたが正常範囲内に抑えられ、対照群では移植前後で正常範囲内に保たれていた（ブタの血中カルシウム濃度は年齢による変動はわずかで、正常値は9.0～11.2 mg/dL）。以上のことから、大動物レベルにおいても、移植前の高い血中リン濃度が移植後グラフトの石灰化に関与

し、炭酸ランタンによってグラフト石灰化を抑制できることが確認された。

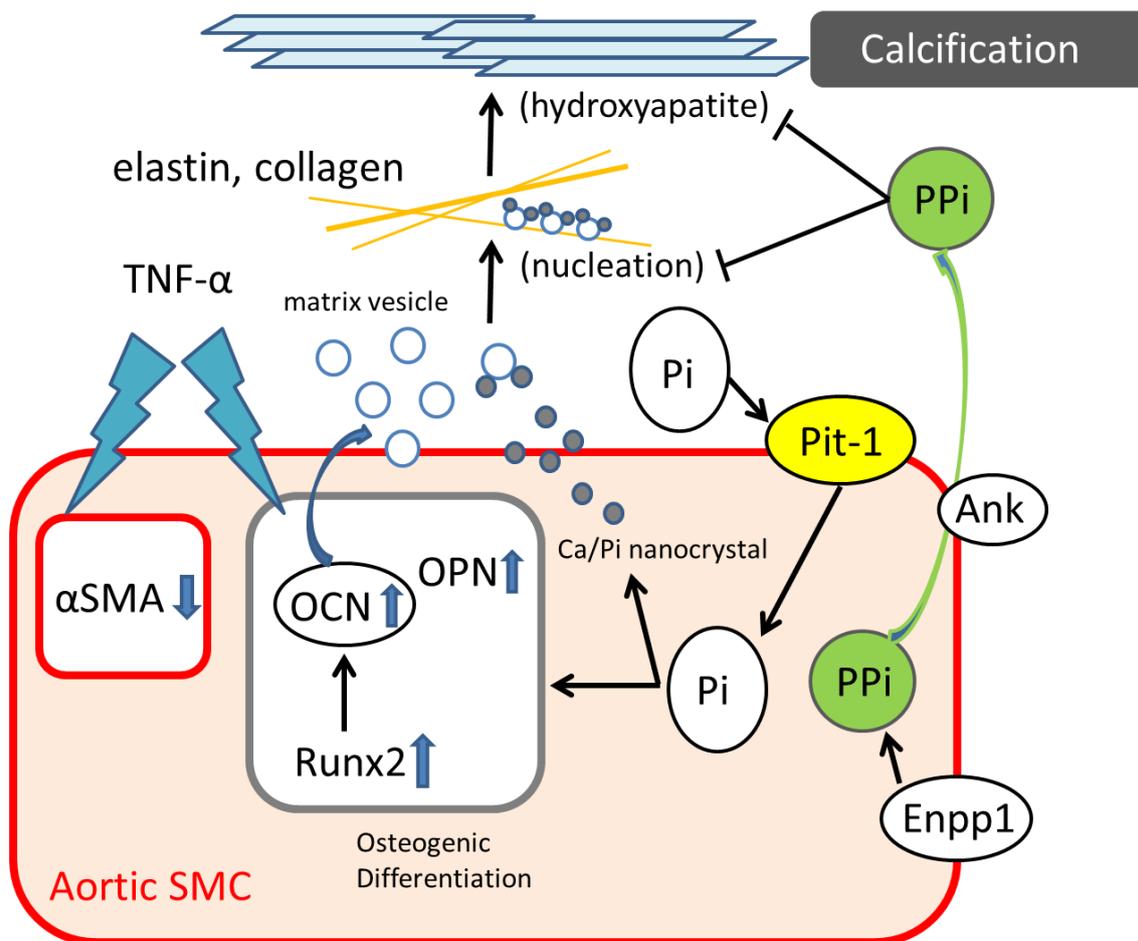
高リン血症が血管中膜石灰化を引き起こす分子機構には、細胞内外のリン酸代謝経路および調節因子、石灰化抑制因子が深く関わっている。糖尿病や慢性腎不全などに代表される Mönckeberg 型動脈硬化症では、細胞外リン濃度の上昇により、血管平滑筋細胞に発現している III 型 NPC である Pit-1 を介して細胞内へのリン輸送が促進され、微細なリン酸カルシウム結晶 (calcium phosphate nanocrystal) が形成されるとともに Runx2 や ALP などの骨形成遺伝子発現が誘導される[55,57-60]。そして Runx2 は骨芽細胞や軟骨細胞の分化に関与する転写因子である osteocalcin (OCN) や osteopontin (OPN) などの骨関連遺伝子の発現を誘導し、骨芽細胞様形質転換を惹起する[55,57-60]。この形質転換によって細胞外へ分泌された基質小胞 (matrix vesicle) にリン酸カルシウムが沈着し、hydroxyapatite を生成して細胞外基質の mineralization が促進すると考えられている[55,58-60]。また、ピロリン酸 (pyrophosphate; PPI) は mineralization の抑制因子であることが知られており、ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) により細胞内で ATP の加水分解によって生成され、ピロリン酸輸送体である ankylosis (ANK) によって細胞外に輸送され、ALP により分解される[55,58-60]。

一方、炎症性細胞が産生・分泌するサイトカインも血管石灰化の進展に関わると考えられている[55,58-60]。TNF- α は血管内皮細胞から bone morphogenetic protein-2 分泌

を促し[61,62]、Runx2 や Msx2 などの転写活性因子を介して血管平滑筋細胞に骨芽細胞様細胞への形質転換を引き起こすことが示されており[59,63,64]、粥状動脈硬化症におけるプラーク形成の中心的役割を持つと考えられている[58,65,66]。また、TNF- α は Mönckeberg 型硬化症においても中膜平滑筋細胞を介して中膜石灰化を引き起こすと考えられている[67]。我々のラット皮下移植モデルを用いた先行研究においても、ホモグラフト移植刺激に伴ってグラフト中の TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が増加し、中膜平滑筋細胞の骨芽形成様形質転換が惹起されることが示された。しかし若年ラットにのみ著明なグラフト石灰化が生じた原因は、生理的な体内高リン環境にあるとした[40]。

以上のことから、ホモグラフト移植後のグラフト中膜平滑筋細胞は、移植刺激による炎症性サイトカインがトリガーとなって骨芽細胞様細胞に形質転換し matrix vesicle を細胞外に分泌するが、PPi によってリン酸カルシウム沈着も抑制されている。しかし生理的な高リン血症状態にある若年者では、Pit-1 を介して細胞内に取り込まれるリンが増加するため、リン酸カルシウムが沈着した matrix vesicle も増加し、細胞外基質に hydroxyapatite を形成してグラフト石灰化が生じると推察された (Figure 24)。したがって、本研究における炭酸ランタンのホモグラフト石灰化抑制効果は、細胞外無機リン濃度を減少させることで Pit-1 を介して細胞内流入するリン量を減らし、matrix vesicle に沈着するリン酸カルシウム自体を減少させた、という機序による考えられた。

Figure 24. 若年者におけるホモグラフト移植後石灰化の機序



細胞外無機リン酸は Pit-1 によってホモグラフト平滑筋細胞内に取り込まれ、細胞質内カルシウムと結合してリン酸カルシウム結晶を形成する。また、移植刺激による炎症性サイトカインがトリガーとなり、平滑筋細胞は収縮型から分泌型へ形質転換を起こし、基質小胞を細胞外に分泌する。ピロリン酸は石灰化抑制因子として働くが、若年者の場合、基質小胞へのリン酸カルシウム沈着が促進され、細胞外基質成分にハイドロキシアパタイトとして沈着し、石灰化が形成される。

本研究において、若年齢による生理的な高リン血症以外にホモグラフト移植後石灰化に影響を与える因子として、①凍結保存、②機械的ストレス、が考えられた。

ホモグラフト凍結による間質組織への氷晶形成が、細胞外基質の破壊や構造変化を引き起こし、グラフト石灰化を誘発することがいくつかの *in vivo* 実験で示されている[68-70]。エラスチンの劣化は細胞外基質のカルシウム親和性を高め、エラスチン線維に沿った *hydroxyapatite* の形成を促進させることが知られている[71]。また、ヒト大動脈組織を用いた *in vitro* 実験では、凍結保存された大動脈片において細胞の *caspase-3/7* 活性や *LDH* 活性が亢進することが確認され、間質組織の氷晶形成が細胞の *apoptosis* や *necrosis* を誘導することを示した[72]。血管平滑筋細胞の *apoptosis* は高リン血症下において誘発されることも知られており、ビタミン K 依存性蛋白である *growth arrest-specific gene 6* の発現抑制を介して放出された *apoptosis* 小体がカルシウム沈着の核として働き、細胞外基質の石灰化を誘導すると報告されている[73]。一方、*TGF-β* などのサイトカインの作用により *apoptosis* を介して血管平滑筋細胞や大動脈弁の石灰化を生じるという機序も報告されている[72,74]。以上のことから、ホモグラフトは凍結によって細胞外基質の構造劣化や平滑筋細胞の *apoptosis* が誘発され、高リン血症や炎症を契機にグラフト石灰化が促進すると考えられる。本研究においても、凍結保存解凍後グラフト中膜には弾性線維を挟む平滑筋の空隙形成が断続的にみられ、強い間質障害を生じたと推察された。また、これらの平滑筋細胞の一部は核濃縮

を示し、不可逆性の細胞傷害を示唆した。移植後グラフト中膜の非石灰化部位において軽微な平滑筋細胞の再生所見が認められたが、これは凍結によるドナー残存平滑筋細胞への可逆性細胞傷害であった可能性が高いと考えられた。したがって、炭酸ランタンは細胞外リン濃度を減少させることにより移植グラフト中膜の残存平滑筋細胞や弾性線維に対し保護的に作用して石灰化進展を抑制し、その結果、可逆性傷害を受けた平滑筋細胞の再生・回復が促進される可能性が示唆された。

一方、凍結保存解凍後グラフト内皮細胞の一部に剥離を認めたが、移植後には両群とも再内皮化が生じた。この修復機転として、脱落部周囲に残存していた内皮細胞が遊走・増殖した可能性や、末梢血中に存在する骨髄由来の血管内皮前駆細胞が局所に動員された可能性などが推測されるが[75,76]、そのメカニズムは明らかではない。また肥厚した内膜には平滑筋類似細胞の増殖を認め、中膜平滑筋細胞が内膜へ遊走・増殖したことや[77]、骨髄幹細胞が局所に動員され平滑筋前駆細胞に分化したことなどが推察される[75,76]。増殖した平滑筋細胞は、骨芽細胞様細胞や泡沫細胞様細胞へ形質転換し、石灰化やプラーク形成の原因となると考えられており[77]、炭酸ランタン投与により石灰化の発生を抑制できる可能性はあると考えられた。

ホモグラフトにかかる機械的ストレスも術後のグラフト石灰化の危険因子として報告されている[78]。機械的ストレスには、主に血流方向と水平に加わる剪断応力 (shear stress) と、心拍により血管壁に垂直に作用する進展張力が存在する[78]。特に

血管分岐部や屈曲部では非定常の乱流性の shear stress が生じ、実際、動脈硬化や石灰化病変は血管分岐部外側や血管小弯側に生じやすいことが知られている[79]。動脈壁がこのような機械的ストレスの影響を受けると、結合組織成長因子 (connective tissue growth factor; CTGF) を介して活性酸素が生成される[80]。この酸化ストレスによって matrix metalloproteinases などのエラスチン分解酵素の発現が誘発され、血管平滑筋細胞の骨芽細胞への分化を促進し、血管内膜および中膜の石灰化が生じると考えられている [78,80]。本実験で作成した血流モデルは、ホモグラフトをレシピエント下行大動脈にバイパス状に吻合しているため、血管壁に shear stress が発生し、中膜平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換を介してグラフト石灰化を促進させた可能性も考えられた。

また、炭酸ランタン投与群において、移植グラフトの石灰化が完全に抑制されなかった原因を後向きに考察すると、炭酸ランタン投与量の影響が考えられた。炭酸ランタン投与群の血中リン濃度を本実験よりも低く抑えることができれば、血管平滑筋細胞内に流入するリンが減少し、移植後ホモグラフト石灰化をさらに抑制できた可能性が考えられた。また、本実験の炭酸ランタン1日投与量 (45mg/kg) はヒト臨床使用量の上限値を体重換算で算出した量に基づいているが、これまで我々が行った小動物への投与量 (1500~3000mg/kg) に比べるとかなり少なかった。今回、炭酸ランタン投与群で成長障害などの重大副作用だけでなく嘔吐や下痢などの軽微な副作用も発

生しなかったことを考慮に入れると、1日投与量の増加を検討する余地があると考えられた。

本研究の限界

本研究では「炭酸ランタンの短期間投与が移植後ホモグラフトの石灰化を抑制する」という仮説のもと、炭酸ランタンをホモグラフト移植手術 1 週間前から投与開始し、術後 4 週間投与のみで検討を行った。これは移植ホモグラフトが手術に伴う炎症の影響を受けている期間中、血中リン濃度を低下させることにより、基質小胞に沈着する微細リン酸カルシウム結晶の産生を抑制し、その結果グラフトの石灰化を抑制するという推定機序が根拠となっている。しかし、本実験において移植後の炎症が続く期間については不明である。これを検証するためには、炭酸ランタン 1 週間投与や 2 週間投与など異なる投与期間群を作成し、さらに炭酸ランタン投与終了後に犠牲死させ、移植グラフトの免疫染色を行い炎症系マーカーの発現を調べる必要があるが、予算の問題により本研究では記載の 2 群で実験を行った。

また、移植ホモグラフトの部位による石灰化程度の違いについて、グラフト摘出時の触診所見では吻合部およびグラフト中央部小弯側に石灰化がやや強く、吻合や shear stress による機械的刺激の関与が推察された。しかし、カルシウム含有量は全例グラフト中央部のみで評価し、また病理学的定性評価は吻合部を除くグラフト中枢側のみで行ったため、部位による石灰化の違いについては不明である。

ウサギを用いた先行研究では、移植時および摘出時のグラフト流量を transit-time flow meter (VeriQ®、MediStim) で測定し、摘出時のグラフト流量が石灰化の予測因

子として検出された。しかし本研究では、摘出時ブタ下行大動脈のサイズに合う flow meter が入手不可能であったため、グラフト流量と石灰化の関係は検討できなかった。

最後に、本研究で分析に用いたブタ数（各群 $n = 5$ ）が少なく、それによって2群間の移植後体重変化や骨強度などに統計学的有意差がでなかった可能性が考えられた。しかし、動物実験における使用動物数削減の理念および予算の関係から、本研究ではこれ以上のブタ使用は不可能であった。

今後の展望

今回実験に用いたホモグラフトは下行大動脈であるため、炭酸ランタン投与による心臓弁石灰化の抑制効果について検証できていない。心臓弁グラフトは血管グラフトと同様、若年齢レシピエントにおいて石灰化による変性が急速に進行し[20]、先天性心疾患に対する心臓弁グラフト置換術後の再手術のうち最も多い原因は弁尖石灰化による弁狭窄である[81,82]。また心臓弁は解剖学的構造上、機械的ストレスを受けやすい特徴を持つが、その石灰化の機序として筋線維芽細胞などの前駆細胞が炎症に伴って骨芽細胞様細胞へ分化することが提唱されており[83-85]、血管中膜平滑筋細胞の石灰化機序との類似点が多く認められる。したがって、今後は大動脈弁付きグラフトを用いた移植モデルを作成し、炭酸ランタンの投与量・期間について更なる検討を行う必要がある。

結語

本研究は、若年齢レシピエントにおけるホモグラフト移植後石灰化を炭酸ランタンにより抑制できることを大動物レベルで証明し、小児心臓外科領域でホモグラフトを必要とする患者の移植後グラフト石灰化による早期グラフト不全、再手術を回避できる可能性を示唆した。また、臨床応用の実現を見据えた今後の更なる動物実験へ向けての重要な足がかりとなる点で、本研究は大きな意義があると考えられる。

謝辞

本研究にあたり、多大なる御高配と御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科心臓外科学小野稔教授に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始直接の御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科心臓外科学山内治雄講師に心より感謝致します。

終わりに、本研究に数々の後助言、御協力を賜りました、東京大学大学院医学系研究科心臓外科学講座及び呼吸器外科学講座の諸氏に深く御礼申し上げます。

引用文献

1. Fontan F, Choussat A, Deville C, Doutremepuich C, Coupillaud J, Vosa C. Aortic valve homografts in the surgical treatment of complex cardiac malformations. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 87, pp. 649-57, 1984.
2. Ross D. Pulmonary valve autotransplantation (the Ross operation). *J Card Surg*, vol. 3, pp. 313-9, 1988.
3. Motomura N, Takamoto S, Murakawa T, Yoneda N, Shibusawa S, Maeda K, Suematsu Y, Murakami A, Nakajima J, and Kotsuka Y. Short-term result of aortic valve replacement with cryopreserved homograft valve in the University of Tokyo Tissue Bank. *Artif Organs*, vol. 26, pp. 449–52, 2002.
4. Burkhart HM, Ashburn DA, Konstantinov IE, and De Oliviera NC. Interdigitating arch reconstruction eliminates recurrent coarctation after the Norwood Procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 130, pp. 61-5, 2005.
5. Klieverik LM, Bekkers JA, Roos JW, Eijkemans MJ, Raap GB, Bogers AJ, and Takkenberg JJ. Autograft or allograft aortic valve replacement in young adult patients with congenital aortic valve disease. *European Heart Journal*, vol. 29, pp. 1446–53, 2008.
6. O'Brien MF, Harrocks S, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, Tesar PJ, Stephens F. The homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements. *J*

Heart Valve Dis. vol. 10, pp. 334-44, 2001.

7. Tweddell JS, Pelech AN, Frommelt PC, Mussatto KA, Wyman JD, Fedderly RT, Berger S, Frommelt MA, Lewis DA, Friedberg DZ, Thomas JP Jr, Sachdeva R, Litwin SB. Factors affecting longevity of homograft valves used in right ventricular outflow tract reconstruction for congenital heart disease. *Circulation*, vol. 102, pp. 130-5, 2000.
8. Doty JR, Salazar JD, Liddicoat JR, Flores JH, Doty DB. Aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft: ten-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 115, pp. 371-80, 1998.
9. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, Tesar PJ, Cochrane AD, Mau TK, Gall KL, Smith SE. Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up. *Ann Thorac Surg*, vol. 60, pp. 65-70, 1995.
10. Arabkhani B, Bekkers JA, Andrinopoulou ER, Roos-Hesselink JW, Takkenberg JJ, Bogers AJ. Allografts in aortic position: Insights from a 27-year, single-center prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 152, pp. 1572-1579, 2016.
11. Yankah AC, Alexi-Meskishvili V, Weng Y, Schorn K, Lange PE, Hetzer R. Accelerated degeneration of allografts in the first two years of life. *Ann Thorac Surg*, vol. 60, pp. 71-76, 1995.
12. Musci M, Weng Y, Hübler M, Amiri A, Pasic M, Kosky S, Stein J, Siniawski H, Hetzer R.

- Homograft aortic root replacement in native or prosthetic active infective endocarditis: twenty-year single-center experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 139, pp. 665-73, 2010.
13. Eguchi S, Asano K. Homograft of pulmonary artery or ascending aorta with valve as a right ventricular outflow. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 56, pp. 413-20, 1968.
14. Daly RC, Orszulak TA, Schaff HV, McGovern E, Wallace RB. Long-term results of aortic valve replacement with nonviable homografts. *Circulation*, vol. 84, pp. 81-8, 1991.
15. di Carlo D, de Leval MR, Stark J. "Fresh", antibiotic sterilized aortic homografts in extracardiac valved conduits. Long-term results. *Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 32, pp. 10-4, 1984.
16. Barratt-Boyes BG, Roche AH, Subramanyan R, Pemberton JR, Whitlock RM. Long-term follow-up of patients with the antibiotic-sterilized aortic homograft valve inserted freehand in the aortic position. *Circulation*, vol. 75, 768-77, 1987.
17. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, McGiffin DC. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 94, pp. 812-23, 1987.
18. O'Brien MF, Stafford G, Gardner M, Pohlner P, McGiffin D, Johnston N, Brosnan A, Duffy P. The viable cryopreserved allograft aortic valve. *J Card Surg*, vol. 2, pp. 153-67,

1987.

19. Mirabet V, Carda C, Solves P, Novella-Maestre E, Carbonell-Uberos F, Caffarena JM, Hornero F, Montero JA, Roig RJ. Long-term storage in liquid nitrogen does not affect cell viability in cardiac valve allografts. *Cryobiology*, vol. 57, pp. 113-21, 2008.
20. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg*, vol. 60, pp. 108-12, 1995.
21. Baskett RJ, Ross DB, Nanton MA, Murphy DA. Factors in the early failure of cryopreserved homograft pulmonary valves in children: preserved immunogenicity? *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 112, pp. 1170-8, 1996.
22. Smith JD, Ogino H, Hunt D, Laylor RM, Rose ML, Yacoub MH. Humoral immune response to human aortic valve homografts. *Ann Thorac Surg*, vol. 60, pp. 127-30, 1995.
23. den Hamer I, Hepkema B, Prop J, Elzenga N, Ebels T. HLA antibodies specific for cryopreserved heart valve "homografts" in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 113, pp. 417-9, 1997.
24. Rajani B, Mee RB, Ratliff NB. Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 115, pp. 111-7, 1998.
25. Vogt PR, Stallmach T, Niederhäuser U, Schneider J, Zünd G, Lachat M, Künzli A, Turina MI. Explanted cryopreserved allografts: a morphological and immunohistochemical

comparison between arterial allografts and allograft heart valves from infants and adults.

Eur J Cardiothorac Surg, vol. 15, pp. 639-44, 1999.

26. Shaddy RE, Hunter DD, Osborn KA, Lambert LM, Minich LL, Hawkins JA, McGough

EC, Fuller TC. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved

allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation*, vol. 94, pp. 1063-7, 1996.

27. Shaddy RE, Hawkins JA. Immunology and failure of valved allografts in children. *Ann*

Thorac Surg, vol. 74, pp. 1271-5, 2002.

28. Neidert MR, Tranquillo RT. Tissue-engineered valves with commissural alignment.

Tissue Eng, vol. 12, pp. 891-903, 2006.

29. Gerson CJ, Elkins RC, Goldstein S, Heacox AE. Structural integrity of collagen and

elastin in SynerGraft® decellularized-cryopreserved human heart valves. *Cryobiology*, vol.

64, pp. 33-42, 2012.

30. Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve

allografts. *Ann Thorac Surg*, vol. 71, pp. 428-32, 2001.

31. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E,

Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in

pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*, vol. 23, pp. 1002-6, 2003.

32. Perri G, Polito A, Esposito C, Albanese SB, Francalanci P, Pongiglione G, Carotti A.

- Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*, vol. 41, pp. 1320-5, 2012.
33. Brown JW, Ruzmetov M, Eltayeb O, Rodefeld MD, Turrentine MW. Performance of SynerGraft decellularized pulmonary homograft in patients undergoing a Ross procedure. *Ann Thorac Surg*, vol. 91, pp. 416-22, 2011.
34. Schmitz-Rixen T, Megerman J, Colvin RB, Williams AM, Abbott WM. Immunosuppressive treatment of aortic allografts. *J Vasc Surg*, vol. 7, pp. 82-92, 1988.
35. Räisänen-Sokolowski A, Vuoristo P, Myllärniemi M, Yilmaz S, Kallio E, Häyry P. Mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts. *Transpl Immunol*, vol. 3, pp. 342-51, 1995.
36. Chang Q, Jing H, Sun M, Xu P. Exploring the role of short-course cyclosporin a therapy in preventing homograft valve calcification after transplantation. *Cell Immunol*, vol. 287, pp. 36-45, 2014.
37. Shaddy RE, Lambert LM, Fuller TC, Profaizer T, Thompson DD, Baker SI, Osborne KA, Hawkins JA. Prospective randomized trial of azathioprine in cryopreserved valved allografts in children. *Ann Thorac Surg*, vol. 71, pp. 43-7, 2001.
38. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology of explanted cryopreserved allograft heart

valves: comparison with aortic valves from orthotopic heart transplants. *J Thorac*

Cardiovasc Surg, vol. 115, pp. 118-27, 1998.

39. Woda CB, Halaihel N, Wilson PV, Haramati A, Levi M, Mulroney SE. Regulation of renal NaPi-2 expression and tubular phosphate reabsorption by growth hormone in the

juvenile rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 287, pp. 117-23, 2004.

40. Yamauchi H, Motomura N, Chung UI, Sata M, Takai D, Saito A, Ono M, Takamoto S.

Growth-associated hyperphosphatemia in young recipients accelerates aortic allograft calcification in a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 145, pp. 522-30, 2013.

41. Kinoshita O, Yamauchi H, Motomura N, Ono M. Lanthanum carbonate, a phosphate

binder, inhibits calcification of implanted aortic allografts in a rat model. *Gen Thorac*

Cardiovasc Surg, 2018. [Epub ahead of print]

42. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J,

Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med*, vol. 342,

pp. 1478-83, 2000.

43. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus

and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a

national study. *Am J Kidney Dis*. vol. 31, pp. 607-17, 1998.

44. 北村正樹. 高リン血症治療薬 リン吸着薬. 耳鼻咽喉科展望, vol. 58, pp. 312-314, 2015.
45. M. Zalman S Agus. Signs and symptoms of hypophosphatemia. *UpToDate*, pp. 13–15, 2012.
46. Kenichi Okamura, Haruo Yamauchi, Osamu Kinoshita, and Minoru Ono. Short-term lanthanum carbonate safely inhibits aortic allograft calcification and intimal hyperplasia in a rabbit circulatory transplant model. *Circulation*, vol. 136, A13739, 2018.
https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/circ.136.suppl_1.13739
47. Shimokawa S, Matsumoto H, Ogata S, Komokata T, Nishida S, Ushijima T, Saigenji H, Moriyama Y, Taira A. A new experimental model for simultaneous evaluation of aortic and pulmonary allograft performance in a composite graft. *J Invest Surg*, vol. 9, pp. 487-93, 1996.
48. 日本フリーザー株式会社. プログラムフリーザーTNP-87S 型取り扱い説明書. pp. 12-15.
49. Minatoya K, Seike Y, Itonaga T, Oda T, Inoue Y, Kawamoto N, Miura S, Tanaka H, Sasaki H, Kobayashi J. Straight incision for extended descending and thoracoabdominal aortic replacement: novel and simple exposure with rib-cross thoracotomy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, vol. 23, pp. 367-70, 2016.

50. Morgan SL, Prater GL. Quality in dual-energy X-ray absorptiometry scans. *Bone*, vol. 104, pp. 13-28, 2017.
51. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, vol. 14, pp. 595-608, 1993.
52. Jämsä T, Jalovaara P, Peng Z, Väänänen HK, Tuukkanen J. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone*, vol. 23, pp. 155-61, 1998.
53. Leppänen O, Sievänen H, Jokihäärä J, Pajamäki I, Järvinen TL. Three-point bending of rat femur in the mediolateral direction: introduction and validation of a novel biomechanical testing protocol. *J Bone Miner Res*, vol. 21, pp. 1231-7, 2006.
54. Foley RN, Collins AJ, Ishani A, Kalra PA. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J*, vol. 156, pp. 556-63, 2008.
55. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res*, vol. 109, pp. 697-711, 2011.
56. Querfeld U. The clinical significance of vascular calcification in young patients with end-stage renal disease. *Pediatr Nephrol*, vol. 19, pp. 478-84, 2004.

57. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*, vol. 87, pp. 10-7, 2000.
58. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*, vol. 117, pp. 2938-48, 2008.
59. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, St Hilaire C, Shanahan C. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J*, vol. 35, pp. 1515-25, 2014.
60. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int*, vol. 75, pp. 890-7, 2009.
61. Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F, Mehta JL. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 320, pp. 424-7, 2004.
62. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation*, vol. 111, pp. 2364-72, 2005.
63. Tintut Y, Demer L. Role of osteoprotegerin and its ligands and competing receptors in

- atherosclerotic calcification. *J Investig Med*, vol. 54, pp. 395-401, 2006.
64. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A, Cheng SL, Towler DA. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 27, pp. 2589-96, 2007.
65. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol*, vol. 65, pp. 297-302, 1990.
66. Fukumoto Y, Shimokawa H, Ito A, Kadokami T, Yonemitsu Y, Aikawa M, Owada MK, Egashira K, Sueishi K, Nagai R, Yazaki Y, Takeshita A. Inflammatory cytokines cause coronary arteriosclerosis-like changes and alterations in the smooth-muscle phenotypes in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 29, pp. 222-31, 1997.
67. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*, vol. 100, pp. 2168-76, 1999.
68. Brockbank KG, Lightfoot FG, Song YC, Taylor MJ. Interstitial ice formation in cryopreserved homografts: a possible cause of tissue deterioration and calcification in vivo. *J Heart Valve Dis*, vol. 9, pp. 200-6, 2000.

69. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*, vol. 79, pp. 1072-80, 2005.
70. Schenke-Layland K, Madershahian N, Riemann I, Starcher B, Halbhuber KJ, König K, Stock UA. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann Thorac Surg*, vol. 81, pp. 918-26, 2006.
71. Rucker RB. Calcium binding to elastin. *Adv Exp Med Biol*, vol. 48, pp. 185-209, 1974.
72. Schneider M, Stamm C, Brockbank KGM, Stock UA, Seifert M. The choice of cryopreservation method affects immune compatibility of human cardiovascular matrices. *Sci Rep*, vol. 7, pp. 1702-7, 2017.
73. Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ota H, Senda Y, Maemura K, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y. Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circ Res*, vol. 98, pp. 1024-31, 2006.
74. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER 3rd, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg*, vol. 75, pp. 457-65, 2003.
75. Schober A, Hoffmann R, Oprée N, Knarren S, Iofina E, Hutschenreuter G, Hanrath P, Weber C. Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with

- coronary heart disease. *Am J Cardiol*, vol. 96, pp. 1116-22, 2005.
76. Inoue T, Sata M, Hikichi Y, Sohma R, Fukuda D, Uchida T, Shimizu M, Komoda H, Node K. Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation*, vol. 115, pp. 553-61, 2007.
77. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res*, vol. 114, pp. 590-600, 2018.
78. Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP. Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 86, pp. 115-25, 1983.
79. Cornhill JF, Barrett WA, Herderick EE, Mahley RW, Fry DL. Topographic study of sudanophilic lesions in cholesterol-fed minipigs by image analysis. *Arteriosclerosis*, vol. 5, pp. 415-26, 1985.
80. Branchetti E, Poggio P, Sainger R, Shang E, Grau JB, Jackson BM, Lai EK, Parmacek MS, Gorman RC, Gorman JH, Bavaria JE, Ferrari G. Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm. *Cardiovasc Res*, vol. 100, pp. 316-24, 2013.
81. Cleveland DC, Williams WG, Razzouk AJ, Trusler GA, Rebeyka IM, Duffy L, Kan Z, Coles JG, Freedom RM. Failure of cryopreserved homograft valved conduits in the

pulmonary circulation. *Circulation*, vol. 86, pp. 150-3, 1992.

82. Clarke DR, Bishop DA. Allograft degeneration in infant pulmonary valve allograft recipients. *Eur J Cardiothorac Surg*, vol. 7, pp. 365-70, 1993.

83. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*, vol. 107, pp. 2181-4, 2003.

84. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*, vol. 111, pp. 3316-26, 2005.

85. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv*, vol. 5, pp. 605-14, 2012.