

博士論文

静脈合併切除・再建へ応用可能な
Silk Fibroin を基盤とした新規人工血管の開発

桐 谷 翔

目次

略語一覧	4
要旨	5
第一章：序文	6
第二章：研究 1 「Silk Fibroin 人工血管の作製」	
第一節：Silk Fibroin 人工血管の作製	14
第二節：人工血管の物性評価	16
第三章：研究 2 「ラット後大静脈に対する小口径 Silk Fibroin 人工血管置換」	
第一節：研究 2 の方法	
第一項：対象動物	23
第二項：人工血管置換手技	23
第三項：対象としての既存人工血管の設定	25
第四項：評価項目および評価方法	26
第五項：統計学的事項	28
第二節：研究 2 の結果	
第一項：人工血管の SEM 画像	28

第二項：手術手技の結果	20
第三項：開存率の評価	32
第四項：病理学的評価	34
第四章：研究3「ビーグル後大静脈に対する中口径 Silk Fibroin 人工血管の予備実験」	
第一節：研究3の方法	
第一項：人工血管の準備	43
第二項：試供動物および人工血管置換手技	43
第三項：評価項目および評価方法	45
第二節：研究3の結果	
第一項：手術手技について	46
第二項：開存の評価	47
第三項：病理学的評価	48
第五章：考察	51
第六章：結語	64
引用文献	65
謝辞	

略語一覽

SF: silk fibroin

ePTFE: expanded polytetrafluoroethylene

ICG: indocyanine green

SEM: scanning electron microscope

HE: hematoxylin and eosin

EVG: Elastica van Gieson

SD: Sprague-Dawley

要旨

静脈浸潤を伴う肝胆膵悪性腫瘍に対する静脈合併切除・再建は標準術式だが、静脈再建に有用な人工血管は確立していない。古くより生体に使用され、高い安全性を持つ絹の主成分である Silk Fibroin を基盤とした人工血管を作製した。小動物への静脈移植では、既存人工血管と同等の開存率が示され、膠原繊維、内皮細胞などが定着したが、中型動物への静脈移植では、腹腔内圧により人工血管に歪みが生じ、血栓閉塞を来した。Silk Fibroin 人工血管は高い生体適合性を持ち、静脈再建に対する新たなバイオマテリアルとして期待されたが、低圧系静脈での開存性を向上させるため、より高い強度を付随させる必要があると考えられた。

第一章 序文

近年の肝胆膵領域外科的技術および周術期管理の発展に伴い、静脈浸潤を伴う肝胆膵悪性腫瘍に対し、積極的な静脈合併切除・再建が安全に併施できようになり、それに伴い良好な術後成績が得られるようになった。

肝細胞癌および肝内胆管癌は、肝原発悪性腫瘍の代表格であり、根治的切除により良好な予後が得られる。主に大腸癌に起因する転移性肝癌も疾患頻度が高く、肝切除により良好な予後が期待できる病態である。これら肝臓悪性腫瘍は、肝臓内を走行する肝静脈や肝臓の背面を伴走する下大静脈に容易に浸潤する[1-4]。浸潤した静脈も腫瘍と共に切除(静脈合併切除)することにより、腫瘍の完全切除(いわゆる R0 切除)が可能となり、非切除と比較して良好な予後が得られることが知られている[5-7]。しかしながら、静脈合併切除により静脈の還流が損なわれた場合、術後に還流領域の機能障害が生ずることがあり、積極的な静脈再建が術後の環流障害の予防に重要である[8, 9]。現在では、肝静脈あるいは下大静脈に浸潤する原発性および転移性肝癌に対する静脈合併切除・再建は、十分な切除マージンを得るために必須な標準術式として確立している[3, 9, 10]。肝腫瘍に対する下大静脈合併切除の模式図を図 1 に示した。

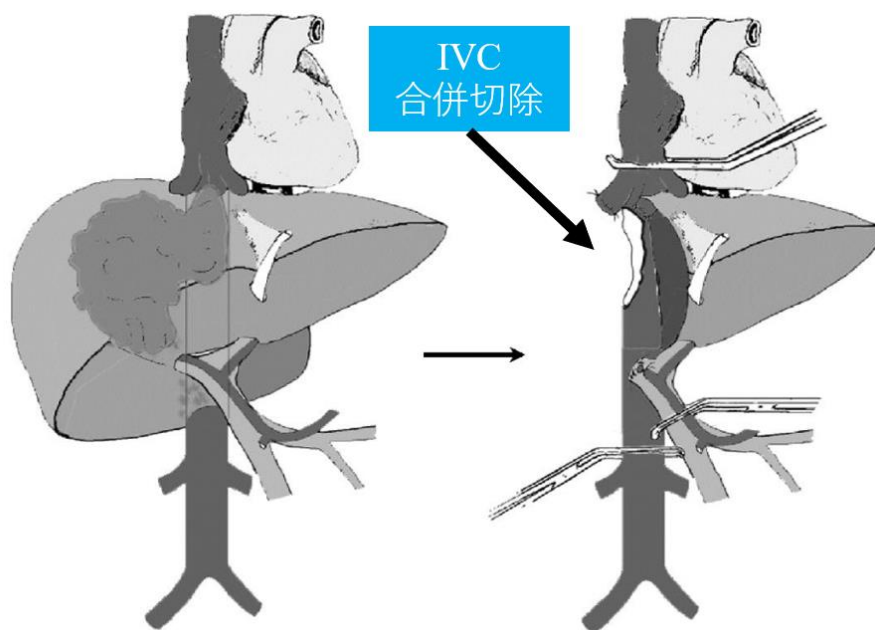


図 1. 肝腫瘍に対する下大静脈合併切除(文献 3 より引用)

肝腫瘍に対して右肝切除および下大静脈合併切除が行われている。

IVC: Inferior vena cava

膵癌および胆管癌は全癌腫の中でも特に悪性度が高く、完全切除が唯一の長期的治癒を見込める治療法である[11]。特に膵頭部、膵体部、および下部胆管は、肝臓へ流入する静脈系の1つである門脈を取り巻くように存在しており、癌の深達度および進展方向によっては、この門脈へ容易に浸潤を来す。施設により状況は異なるものの、膵頭部癌に限ると約 50%の症例に対して門脈合併切除を必要としたとの報告がある[12]。膵頭部領域の悪性腫瘍に対する標準術式は膵頭十二指腸切除であるが、門脈への浸潤が疑われる場合は積極的に門脈合併切除・再建が行われ、現在、この術式は安全な標準手技として定着し、良好な術後成績が報告されるようになってきた[13-15]。膵癌に対する門脈

合併切除の模式図を図2に示した。

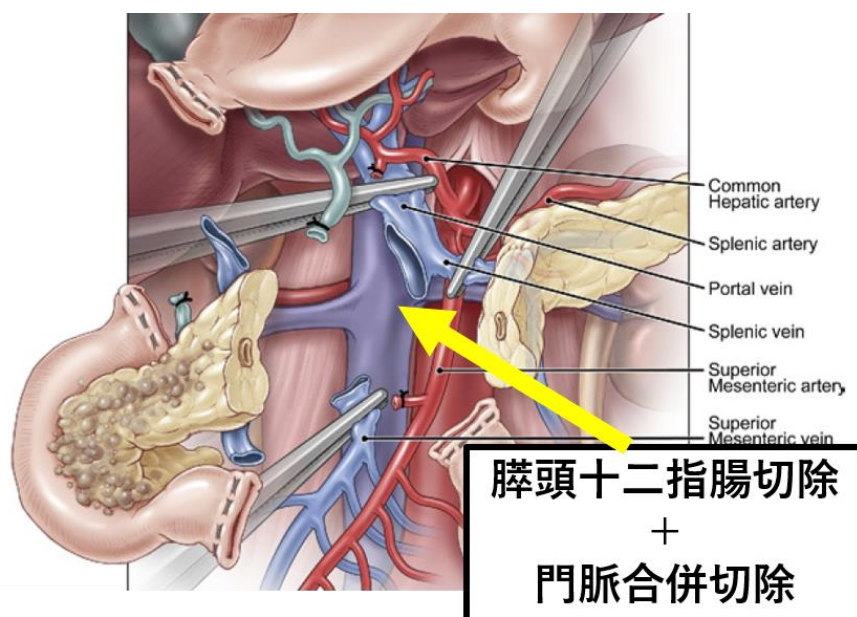


図2. 膵頭部癌に対する門脈合併切除の模式図(文献15より引用)

膵頭部癌に対して膵頭十二指腸切除および門脈合併切除が行われている。

静脈合併切除を伴う拡大手術を行う際、合併切除される静脈が長い
か、あるいは広範囲であれば、残された静脈同士を直接吻合することは困難で
あるため、代替血管を間置して再建をすることが必要となる。この静脈再建に
用いられる代替血管として、最も多く用いられるものは自己ヒト静脈(大伏在静
脈、腎静脈、精巣静脈など)である[16-18]。これらの静脈を使用するメリッ
トは、代替血管が viable な自己の静脈組織そのものであるため、血栓形成や感染
に対して高い抵抗力を持ち合わせている点である。しかし、自己ヒト静脈の使
用には摘出に際する手術時間の延長、手術侵襲の増大が問題となるため、患者

の全身状態等を考慮しなければならず、また使用した静脈還流領域にうっ血が生じることがある[8, 19]。もう1つの代替血管として、同種凍結保存静脈が使用されることがある。同種凍結保存静脈は、心停止を含む死体ドナーから提供される静脈である。使用機会が発生するまで凍結保存されており、必要に応じて解凍して使用する[19-21]。同種凍結保存静脈は、必要時に迅速に使用できるため余計な外科的侵襲を回避することができ、元来の静脈としての特性も期待できる。また、2016年より保険収載され、今後の更なる発展が期待できる医療デバイスであるが、使用するために施設認定が必要であり、現時点で使用可能な施設は限られている。これらの問題点を克服するため、

Polytetrafluoroethylene (PTFE)や Polyethylene Terephthalate (PET)などの人工合成素材を基盤とした人工血管が使われることがある。これらの代替血管のメリットは高い汎用性であり、必要に応じて術中すぐに使用することが可能である。しかし、静脈再建に対するこれら合成素材代替血管の使用報告はまだ少なく、人工血管移植後の開存性についてはまだ不明である[22-24]。また、異物として長期的に体内に遺残されるため、特に術後の消化液汚染に伴う合併症頻度の高い消化器外科手術においては難治性の感染症を惹起する可能性が高く、現段階ではまだ推奨されていない[25-30]。

以上より、汎用性が高く、人工血管としての開存性を保持し、高い抗

感染性を併せ持つ新規人工血管の開発により、消化器外科手術、特に肝胆膵外科手術の自由度が飛躍的に高まり、多大な利益がもたらされることが期待される。

カイコガより抽出される「絹」は、有用なバイオマテリアルとして古くから数多の報告がなされてきた。その特徴として、優れた生体適合性、適度な生分解性、優れた力学的強度、生体環境内での安定性が挙げられる[31-34]。さらに、絹はフィルム、ゲル、スポンジ、不織布など、様々な形態への加工が可能であり、これは様々な再生医療に応用される細胞培養・定着の足場材としての可能性を持つ[35, 36]。消化器外科領域では、外科用縫合糸として古くから医療現場で使用されてきた。絹は、長期にわたる生体内での使用実績を誇り、高い生体適合性および安全性の裏付けを持つ稀有な素材であると考えられる[37-41]。絹は、中心に絹フィブロイン(Silk Fibroin: SF)タンパク質からなる繊維を形成する核と、その周りを取り囲み繊維を強固に接着させるセリシンタンパク質からなる鞘で構成される[34, 38, 42]。模式図を図3に提示した。セリシンタンパク質は、強い生体反応の源となることが報告されており、現在使用されている絹由来の医療素材は、その殆どが精練操作によってセリシンタンパク質が除去されている[38]。近年はセリシン層に含まれるプロテアーゼインヒビター等のタンパク質やポリフェノール、ろう物質等の低分子化合物が組織反応原

困と考えられ、セリシン自体は抗腫瘍性、細胞保持硬化など、むしろ生体にとって有用な一面も報告されるようになってきているが[42, 43]、いずれにしても、それらを十分精練した後の SF の組織反応性は、バイオマテリアルとして実績の高いコラーゲンと同等あるいはそれ以下であることが示されており[44]、現時点では絹を十分に精練し、純度の高い SF をバイオマテリアルの基盤とすることが重要と考えられる。

Silk Fibroin

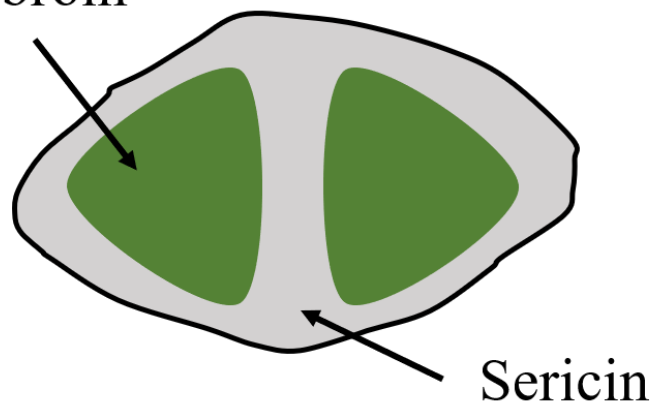


図 3. 絹の横断面図

カイコガが紡ぎ出す繭糸 1 本は 20 μ m 程度であり、Silk Fibroin という 2 本のタンパクフィラメントと、それらを接着する Sericin というタンパクから構成される。

朝倉らは、この SF を基盤とした小口径人工血管を作製し、ラット動脈への移植実験から SF 人工血管の利点を明確にした世界初の研究グループであり、詳細な移植結果は、同研究グループの江本らにより初めて報告された。

1.5mm 径、10mm 長で作製された SF 人工血管は、ラット大動脈へ移植され、既存の人工血管である expanded Polytetrafluoroethylene (ePTFE)人工血管と比較

して、より高い開存率が得られた[45]。また、後続研究の詳細な病理学的評価により、SF人工血管の最内層に内皮細胞の定着が確認され、またSF繊維自体の分解・吸収が確認された[45-48]。外科手術の縫合糸として使用経験の長い絹糸であるが、米国薬局方によれば吸収性縫合糸は「移植後60日以内にその緊張が低下するもの」と定義され、それに従えば絹は「非吸収性」に分類されるが、種々の研究からSFの分解自体は発生することが分かっている。素材の分解は移植後の生体反応スピードに依存するが、SFに対する反応は一般的に緩徐であると報告されている[37]。

SF繊維そのものの抗血栓性に関する研究は存在しないものの、人工血管に関しては、内皮細胞の定着によりその獲得が十分に期待できる[49, 50]。また、生体にとって異物は感染性微生物の温床となるが、SFは高い血管新生作用を持ち、微生物に対するスムーズな自己免疫反応を可能となることから抗菌作用を持つと考えられている[34]。SFの生分解性やnative tissueへのいわゆるremodelingは、それ自体が人工血管の抗菌性へとつながる。さらに、いわゆる縫合糸への感染は、絹に含まれるセリシンが原因となることが報告されており、これを精練に除去することも抗感染性を高めることになる[37]。以上より、SFを基盤とした人工血管は、汚染を伴う消化器外科領域の静脈合併切除・再建に対して、有用な新規医療素材としての可能性を提示するだろうと考えら

れた。また、静脈は動脈と比較して低圧系であり、動脈グラフトに必要な血管内圧に対する抵抗力を要さず、基質特異性という絹の持つ生物学的特徴を如何なく発揮できることが期待された。

SF 人工血管における、静脈合併切除・再建への応用はまだ試みられていない。そこで本研究の主目的として、小口径の SF 人工血管を作製し、ラット後大静脈への移植を研究 1 として設定した。実臨床としての使用経験がある ePTFE 人工血管を開発素材の対象群に設定し、同様にラット後大静脈へ移植した。2 群間の操作性、開存性、および病理学的所見の差異を評価することにより、SF 人工血管のヒトへの臨床応用の可能性を検証した。

SF 人工血管の臨床応用に際する次段階の検証内容として、ヒトの生態システムにより近い中型動物種での評価が必要であり、具体的にはヒトに類似した血圧変動によるメカニカルストレスへの対応能の評価が必要である。本研究の第 2 章はその予備実験の位置づけとした。すなわち、第 1 章と同様の作製過程による中口径人工血管を作製し、小頭数のビーグル後大静脈へ移植した。開存性および病理学的所見を観察し、中型動物種に対して活用が期待できる人工血管を作製するための知見を得ることを目的とした。

第二章 研究1 「Silk Fibroin 人工血管の作製」

第一節：Silk Fibroin 人工血管の作製

カイコ属のカイコガ種(*Bombyx mori*)由来の生糸を用い、筒状構造の繊維布を作成した。繊維布の作成方法は「編み(knitted)」と「織り(woven)」に分類される。編みは、1本あるいは数本の糸で網目を形成しながらループをつなぎ合わせて作る布地であり、織りと比較して伸縮性のある布地を得ることが可能となる。さらに編みは、経編みと緯編みに分類されるが、経編みはループを縦方向に連続させる方法であり、より伸縮性に優れ、縦・横方向に伸びる。また、編み方に多様性を持たせることが可能であり、様々な立体生地が作製できる。これらの特徴は、人工血管の基盤を作製する上で重要な要素である。福井経編工業製のダブルラッセル機(HDR16-EL、福井経編工業、福井)を用い、内腔3mm径のSF人工血管基盤をダブルバーコード法により作製した[45, 46, 51, 52]。ダブルバーコード法は経編みの中で比較的高い密度を形成でき、構造的強度を保つことができる。ダブルバーコード法による経編みの模式図を図4に示した。続いて、マルセル石鹼と炭酸ナトリウムをそれぞれ0.12% w/v、0.08% w/vになるように調整した水溶液中で、95°Cで2時間攪拌し、絹中に含有されるセリシンを除去した[52, 53]。

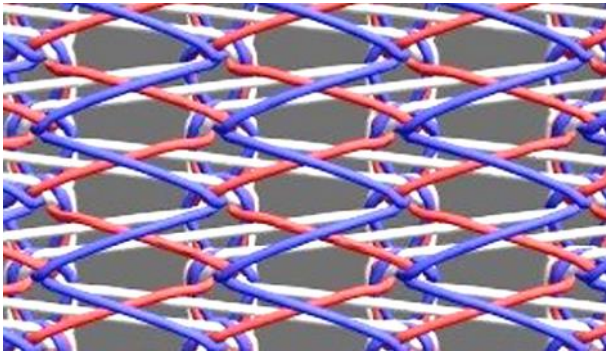


図 4. ダブルバーコード法による経編みの模式図

次に、作製された基盤に SF 水溶液によるコーティングを施行した(図 5)。SF 水溶液は、精練により得られた SF 10g に対して、塩化カルシウム (CaCl_2) 46g、蒸留水 60ml、エタノール (EtOH) 23.5ml を加え、攪拌しながら 70°C にて約 1 時間湯煎を行うことにより得た。SF 人工血管の基盤は、1:1 の SF 水溶液およびグリセリンの混合液に、100 hectopascal の気圧下で 30 分浸透させた。続いて基盤は -20°C で一晩凍結させた。これにより未反応グリセリンを除去した。次に SF 人工血管を蒸留水に 4 日間浸透させ、さらに乾燥させた。これらの処置により人工血管の表面はスポンジ状に変化した。SF 人工血管を 120°C のオートクレーブ滅菌に 20 分間かけた。オートクレーブ滅菌は材料に耐熱性が求められるためタンパク質には不適とされることが多いが、弾性率をはじめとした物性には変化が生じないと報告されている[54]。作製された人工血管は 0.9%生理食塩水内で保存した[45, 46]。コーティング前後の SF 人工血管を走査

電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope: SEM, VE-7800, Keyence Corp.)で観察した。

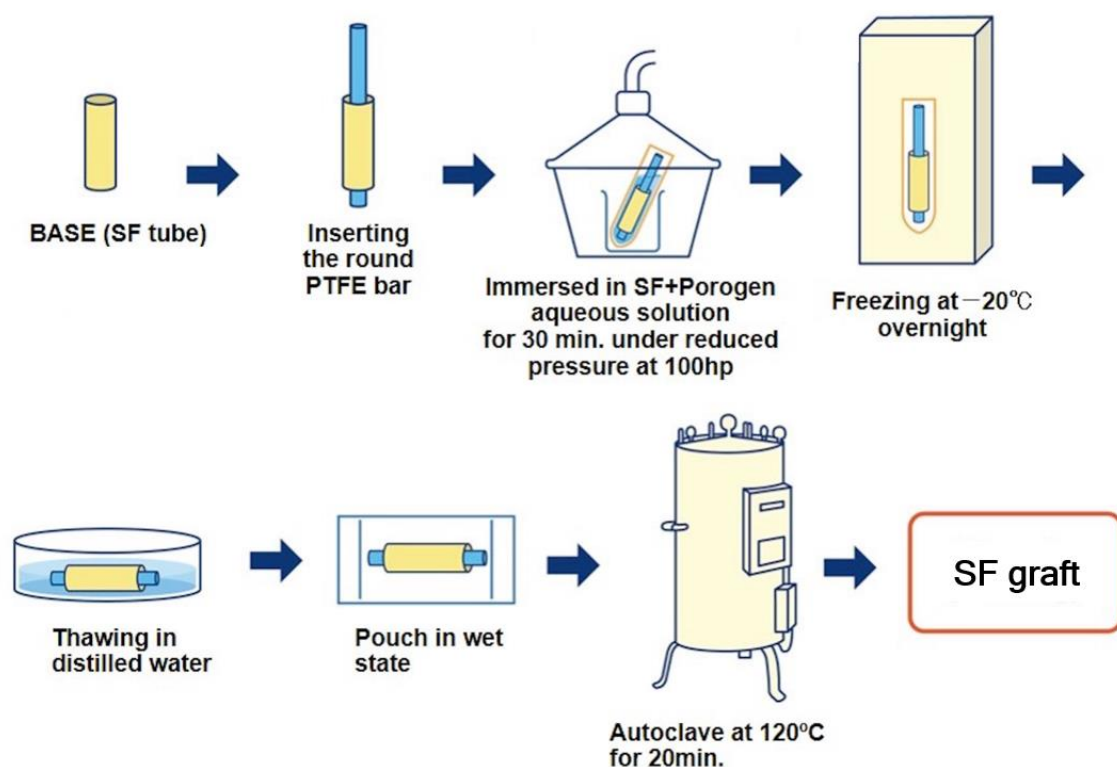


図 5. SF 水溶液による SF 人工血管基盤へのコーティング過程 (文献 17 より引用)

100hPa の気圧下に、SF 水溶液とグリセリンを 1:1 に混合させた水溶液に 30 分浸透させ、 -20°C で凍結させた。さらに蒸留水に浸透させ、滅菌させてコーティングを完了させた。

第二節：人工血管の物性評価

ダブルバーコード法で編成され、SF 水溶液によりコーティングされた内腔径 3mm の SF 人工血管に対し、人工血管壁の厚み測定、吻合保持強度試験、周軸強度試験、圧縮弾性率試験、透水量測定により物性を評価した。これ

らの物性評価においては人工血管の初期性能評価方法の国際ガイドライン(ISO 7198)を参考に設定した[55]。

人工血管の厚みはマイクロメーター(デジタルマイクロメーター、ミツトヨ株式会社)を用いて測定した(図 6)。



図 6. マイクロメーターを用いた SF 人工血管壁の厚み測定

吻合保持強度試験の模式図および試験写真を図 7 に提示した。人工血管吻合時に端部がほつれず、手術操作に支障がないかを調べるため、また遮断解除後の血流動態変化に対して人工血管吻合部が牽引力に耐えうるかを評価するために行った。引張試験機 (EZ-graph 引張試験機, Shimadzu Corporation) の下部チャックに人工血管下部 10mm を固定し、人工血管上端から 2mm のところに 7-0 ナイロン(ケイセイ株式会社)を通し、長さ 20mm の輪を作成した。輪を試験器上部に装着したフックに掛け、ロードセル 100N、引張速度 3mm/min の

条件で引張り、人工血管破断時の張力を吻合保持強度(N)とした。

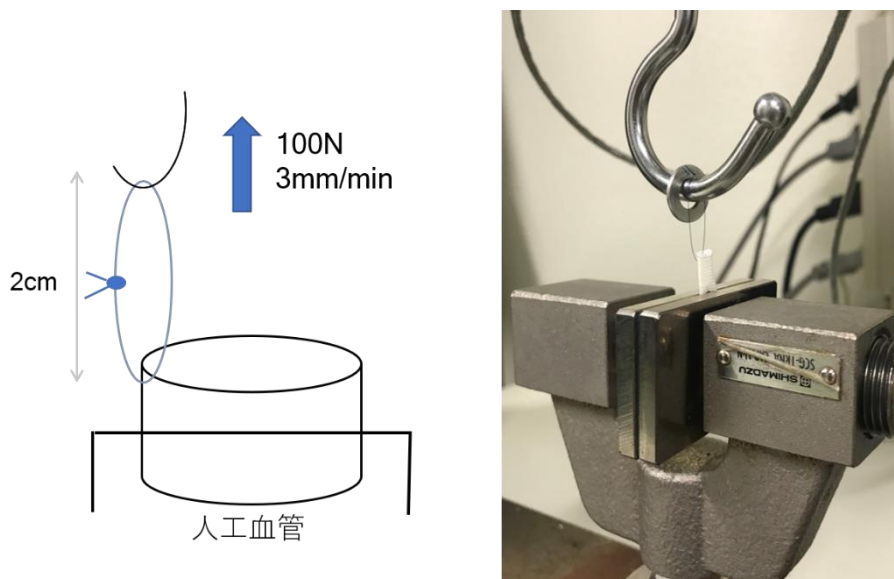


図 7. 吻合保持強度の測定方法

グラフトを 2cm にカットする。グラフトの端に 7-0 ナイロンを通し、2cm の輪を作成する。フックを輪へ引っ掛け、上方へ、100N の力かつ 3mm/min のスピードで牽引する。人工血管破断時の張力を吻合保持強度とする。

周軸強度試験の模式図および試験写真を図 8 に提示した。人工血管の直径方向への拡張に対する強度を評価するために施行した。引張試験機の上下に直径 0.7mm の六角棒スパナを挟み、そこに長さ 10mm に切った人工血管を通してロードセル 100N、引張速度 2mm/min の条件で周軸方向へ引張り、人工血管破断時の張力を周軸強度(N)とした。

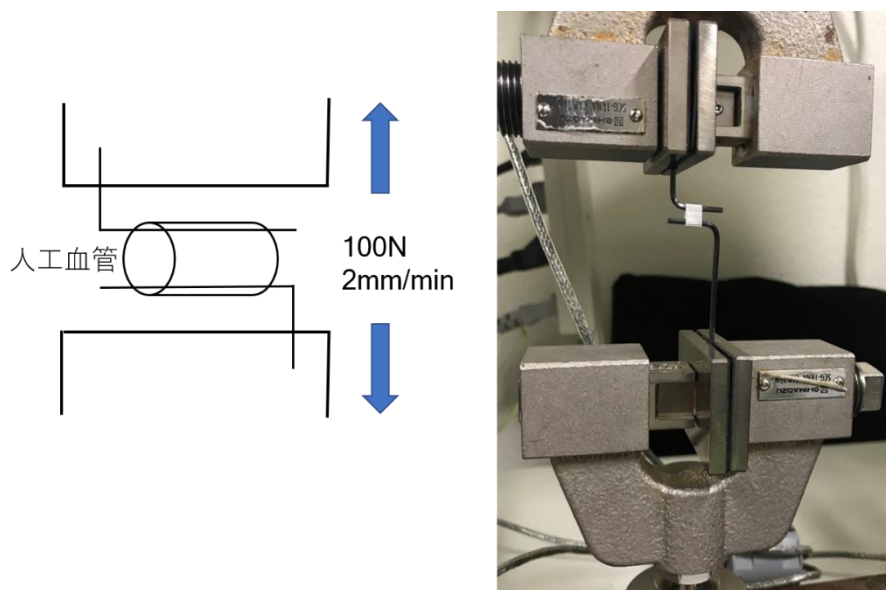


図 8. 周軸強度の測定方法

グラフトを 10mm にカットする。六角スパナを人工血管に通し、逆方向へ、100N の力かつ 2mm/min のスピードで牽引する。人工血管破断時の張力を周軸強度とする。

圧縮弾性率試験の模式図と試験写真を図 9 に提示した。人工血管の弾性率を評価するために施行した。圧縮台に、1cm 長に切断した人工血管を置いた。同様の引張試験器の、器具間の距離をグラフト外径となるように密着させ、ロードセル 5N、移動速度 2mm/min により、徐々に圧縮をかけることで測定を施行した。内径の 25%まで圧縮した時の値を圧縮弾性率(N/mm²)とした。

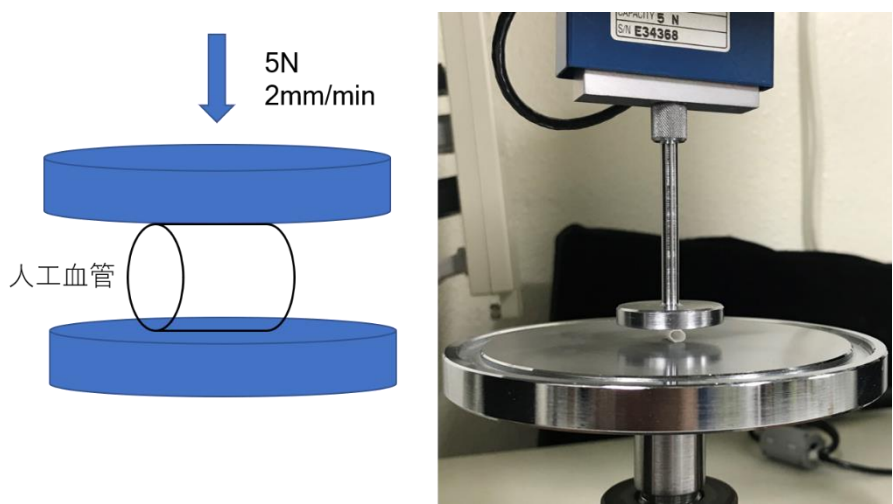


図 9. 圧縮弾性率の測定方法

人工血管を 1cm にカットする。圧縮器具を 5N の力がかつ 2mm/min のスピードで圧縮させる。内径の 25%まで圧縮した時の値を圧縮弾性率(N/mm^2)とした。

透水量測定の模式図を図 10 に提示した。透水量は、人工血管壁からの血液成分漏出の指標となる。また、人工血管壁内への細胞浸透の指標とすることも可能となる。人工血管は 1cm に切断し、透水試験器にセットした。

120mmHg の圧力となるように、約 170cm の高さより試験器内に水を流入させた。1 分間あたりに漏れ出した水量を計測し、透水量とした($ml/cm^2/min$)。

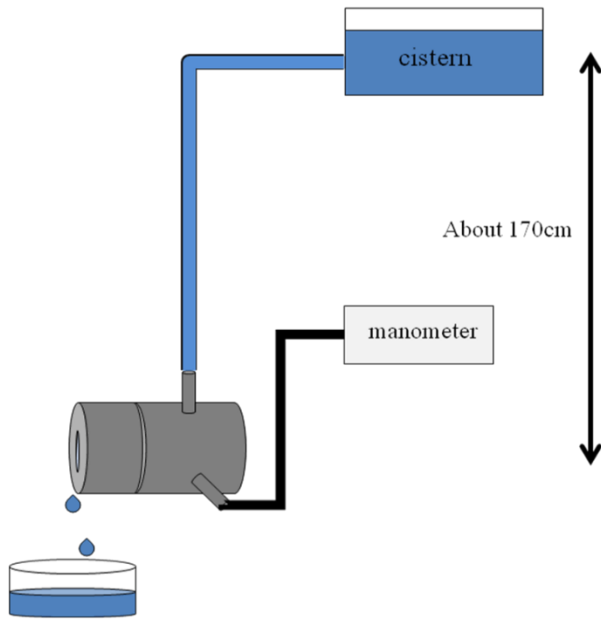


図 10. 透水量の測定方法

人工血管は 1cm にカットする。120mmHg の圧力となるように、約 170cm の高さより試験器内に水を流入させ、1 分間あたりの漏出量を漏れ出した水量を透水量とする。

人工血管の厚み、吻合保持強度試験、周軸方向強度試験、圧縮弾性率試験、透水量はそれぞれ、 0.33 ± 0.04 mm、 6.4 ± 0.6 N、 51.0 ± 3.0 N、 0.013 ± 0.002 N/mm²、 5.2 ± 3.9 ml/cm²/min であった。また、比較として PET 人工血管から得られた結果を付記した(表 1)。

表 1. 物性評価試験の結果

測定項目	単位	Silk Fibroin	PET
人工血管厚み	mm	0.33 ± 0.04	-
吻合保持強度	N	6.4 ± 0.6	6.1 ± 3.4
周軸方向強度	N	51.0 ± 3.0	112.9 ± 11.7

壓縮彈性率	N/mm ³	0.013 ± 0.002	0.67 ± 0.2
透水量	ml/cm ² /min	5.2 ± 3.9	0

第三章 研究 2「ラット後大静脈に対する小口径 Silk Fibroin 人工血管置換」

第一節：研究 2 の方法

第一項：試供動物の設定

移植を行う対象動物は、雄の Sprague-Dawley (SD)ラットとした(日本クレア株式会社)。週齢 12 週程度、体重 400-500g のラットの後大静脈に対して人工血管移植を施行した。ラットは東京大学構内にある生命科学実験棟で飼育した。12 時間ごとに昼夜を切り替え、Charles river formula-1 を飼料とした。飼料摂取のタイミングはラットに依存させた。約 10 週齢で実験室へ搬入し、そこから 2 週程度、上記の環境に適応させた。移植実験の 12 時間前から絶食管理とした。これらの飼育および実験操作は「東京大学動物実験実施マニュアル」に則って進めた。研究 2 は、東京大学動物実験委員会の倫理審査による承認の下に施行した（承認番号：I-P16-034）。

第二項：人工血管移植実験の手技

人工血管移植は桐谷および共同研究者の森戸により行われた。適応週齢に到達したラットに対し、塩酸メデトミジン(ドミツール、日本全薬工業株式

会社、ミダゾラム(ドルミカム、山之内製薬株式会社)、酒石酸ブトルファノール(ベトルファール、Meiji Seika ファルマ株式会社)をそれぞれ 0.15mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg の混合液とし、腹腔内投与にて麻酔導入とした。鎮痛としてブプレノルフィン(レペタン、大塚製薬株式会社)を 0.05mg/kg 皮下注した。腹部正中切開で開腹したのち、腸管を左側上方に脱転してラットの腹大動脈、後大静脈を露出した。左腎静脈から左右の腸骨静脈分岐部まで、約 20mm の後大静脈へ流入する分枝を、9-0 ナイロン(ケイセイ株式会社)で細かく結紮・切離した。後大静脈は大動脈と全面的に癒着しており、こちらを慎重に剥離した。人工血管を置換できるだけの十分な範囲を露出させた後に、バスキュラークリップで後大静脈の頭側、尾側を把持し、血流を遮断した。血管遮断の直前に陰茎静脈よりヘパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注、エイワイファーマ株式会社) 200 単位を静注した。10mm 長の後大静脈を摘出し、同じ長さにとりミングした SF 人工血管を端々吻合で移植した。吻合は 9-0 ナイロン(ケイセイ株式会社)を用いた、片側 12 針の単結節縫合とした。吻合に際し、まずは血管の左側縁、右側縁を結紮し、前壁、後壁それぞれ 5 針ずつ結紮した。頭側、尾側それぞれ結紮が終了した後に、頭側のバスキュラークリップを外し、続いて尾側のバスキュラークリップを外して遮断を完全に解除した。人工血管壁から血液漏出があった場合は、圧迫により止血を試みた。陰茎静脈から生理食塩水を約

0.5ml 静注し、人工血管内の血流が保たれていることを目視にて確認した。その後、腹壁を閉鎖して手術を終了とした。これまでラットの静脈に対する絹を基盤とした人工血管移植の報告は無く、術後の適切な投薬に対する情報が無いため、本研究では術後の抗血小板薬・抗凝固剤および抗生物質は投与しなかった。

第三項：対象としての既存の人工血管の設定

本邦で臨床応用されている人工血管は Polyethylene 製、または ePTFE 製が過半数を占める。現在、内径 8mm を超える大口径の動脈再建においては、Polyethylene 人工血管が主流であり、その開存性・耐久性に関しては満足できる状況にある[56]。内径 6-8mm の中口径人工血管は下肢・頸部・腋窩領域の動脈再建等が対象となるが、ePTFE 人工血管が主流である。小口径人工血管(内径 6mm 未満)は開存性・耐久性に満足できる人工血管に乏しい現況ではあるが、透析シャント症例や先天性心疾患を有する小児例の Blalock-Taussig 短絡術に内径 3mm の ePTFE 人工血管が用いられており[57]、開存性・耐久性においては Polyethylene 人工血管よりも ePTFE 人工血管が優れていると考えられたことから、本実験における control は内径 3mm の ePTFE 人工血管(日本ゴア合同会社)を選択した。

ラットの後大静脈への置換手技は、前述の SF 人工血管の手技と同様である。すなわち、ヘパリンナトリウム静注後に後大静脈の血行を遮断し、頭側、尾側それぞれを 9-0 ナイロンにより 12 針ずつ単結節縫合して端々吻合を施行し、血流遮断を解除した。移植直後の血流確認も同様に、陰茎静脈からの生理食塩水静注による目視とした。

第四項：評価項目および評価方法

人工血管移植の翌日、および以降は約 3 日ごとに開存評価を行った。イソフルラン(イソフルラン吸入麻酔薬、マイラン製薬株式会社)による全身麻酔下に、腹部超音波検査器(APLIO、TUS-A300、キャノンメディカルシステムズ株式会社)によって、人工血管の開存を評価した。超音波検査では、B モードを用いて血管内血栓形成について評価し、またカラードップラーおよびパルスドップラー検査により開存性の評価を施行した[58]。開存性の評価は全例 4 週間で打ち切りとした。静脈再建の頻度が高い生体肝移植の場合、術後 4 週間の再建静脈開存により十分な肝再生が得られることが確認されている[59]。

人工血管移植後 4 週間の時点で病理学的評価を施行した。4 週間以前に閉塞が認められた場合は、その時点で人工血管の摘出および病理学的評価を試みた。人工血管の摘出手技は以下のものである。移植手術の際と同様の手法で

麻酔処置を行った後に、腹部正中切開にて再開腹を施行した。人工血管置換部位は周囲との癒着が認められるため、周囲組織を損傷せぬように慎重に癒着を剥離した。人工血管が摘出可能となるまで癒着剥離を進めた後、心嚢および横隔膜を切開すると、数分でラットは sacrifice された。右心房へ流入する直前の後大静脈を切開し、左心室より 50ml の生理食塩水を急速注入して灌流し、人工血管を周囲組織とともに丁寧に摘出した。摘出した人工血管および周囲組織を肉眼で確認し、場合によって人工血管に切開を入れて内腔を確認した。摘出した人工血管は、吻合部からそれぞれ 5mm ずつの位置、すなわちちょうど中間点が切片となるように切り出し、OCT コンパウンド(ティシュー・テック、サクラファインテックジャパン株式会社)に包埋した後、液体窒素で凍結保存とした。

凍結保存検体は 4 μ m 厚に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (hematoxylin and eosin staining: HE)を施行し、人工血管における全体像を評価した。また、エラスティカ・ファン・ギーソン染色(Elastica van Gieson staining: EVG)を施行し、弾性繊維、膠原繊維を評価した。ePTFE 人工血管の内腔はフィブリン塊と思われる組織の蓄積が確認されたため、EVG 染色にシリウスレッド染色を追加して評価した。

続いて、以下の免疫染色により内皮細胞、平滑筋細胞、中皮細胞の発

現を確認した。内皮細胞の発現については、抗 CD 31 抗体 (clone TLD-3A12、Abcam 株式会社)により判定した。平滑筋細胞の発現については、抗 α SMA 抗体 (clone 1A4、Sigma-Aldrich 株式会社)により判定した。HE 染色では SF 人工血管外層に扁平細胞の定着があり、人工血管の漿膜化の可能性が考えられた。漿膜(中皮)の発現を確認するため、抗ポドプラニン抗体 (ab11936、Abcam 株式会社)染色を施行した。インキュベーションチャンバーは抗マウス Immunoglobulin G 2 次抗体 (ダコ・ジャパン株式会社)を使用した。

第五項：統計学的手法

29 匹の SD ラットに対し、19 匹に SF 人工血管を移植、10 匹に ePTFE 人工血管を移植した。2 群間の週齢、体重および移植時間を、中央値および範囲で示し、Mann-Whitney U test にて群間差を検定した。各々の開存率を Kaplan-Meier 曲線により示した。Log-rank 検定を行い、開存率の群間差を評価した。P 値 <0.05 を統計学的有意差あり、と定義した。統計ソフトは SPSS Statistics 25.0 (日本 IBM 株式会社)を使用した。

第二節：研究 2 の結果

第一項：人工血管の SEM 画像

SEM による SF 人工血管のコーティング前後の断面、内腔面、外面を 11 に提示した。コーティング前は SF 繊維間の間隙が空いており、血液漏出が多くなることが予想された。SF 水溶液によるコーティングにより、人工血管の基盤はスポンジ状に再形成され、過剰な血液漏出が抑制されることが期待された。

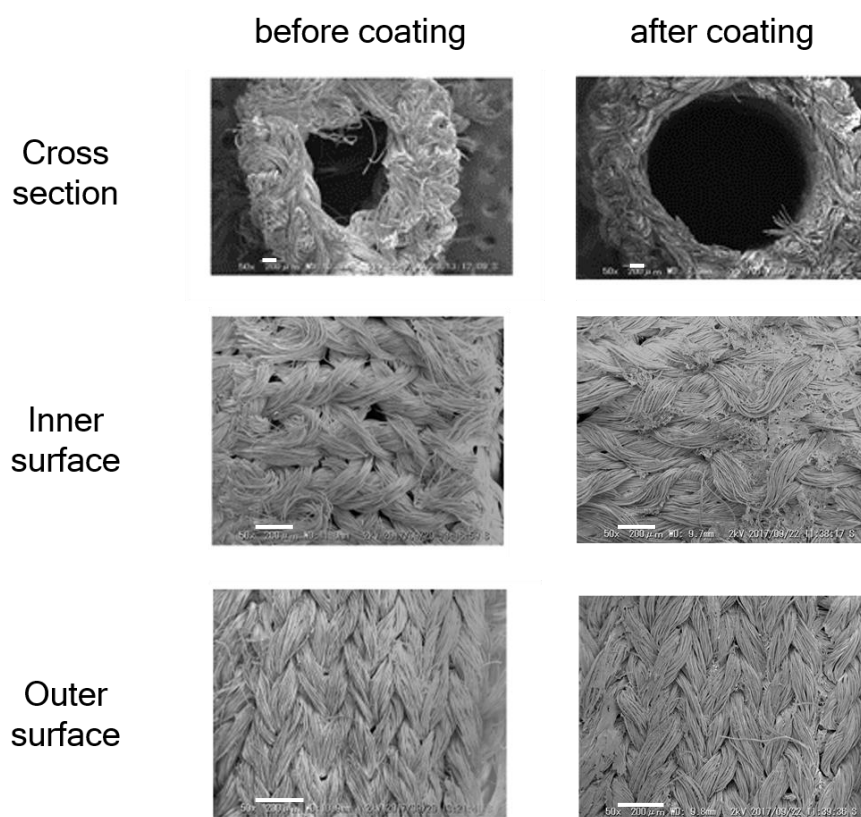


図 11. SF コーティング人工血管 (SEM 画像)

コーティング前とコーティング後を比較すると、基盤の網目に SF 水溶液が浸透しており、繊維間の間隙が小さくなり、スポンジ状化している。(scale bar: 200 μ m)

SEM: Scanning Electron Microscope

第二項：手術手技の結果

移植前の SF 人工血管と ePTFE 人工血管の外観を図 12 に示した。それぞれの人工血管の内腔は 3mm であり、また壁の厚みは約 1/10、0.3mm 程度であり、SF 人工血管および ePTFE 人工血管ともに同程度である。SF 人工血管は ePTFE 人工血管と比較して柔らかく操作性に富んだ。さらに、SF 人工血管は ePTFE 人工血管よりも弾性度が低いため、多様な形態に変形させることが可能である。静脈は伸縮能が高く、様々な形に変化する。すなわち、静脈再建に用いる素材は多様な形態を取れることが必要である。SF 人工血管を長さ調節や角度調節のため、剪刀による切断ないしトリミングを施行したが、人工血管の端にほつれは生じなかった。

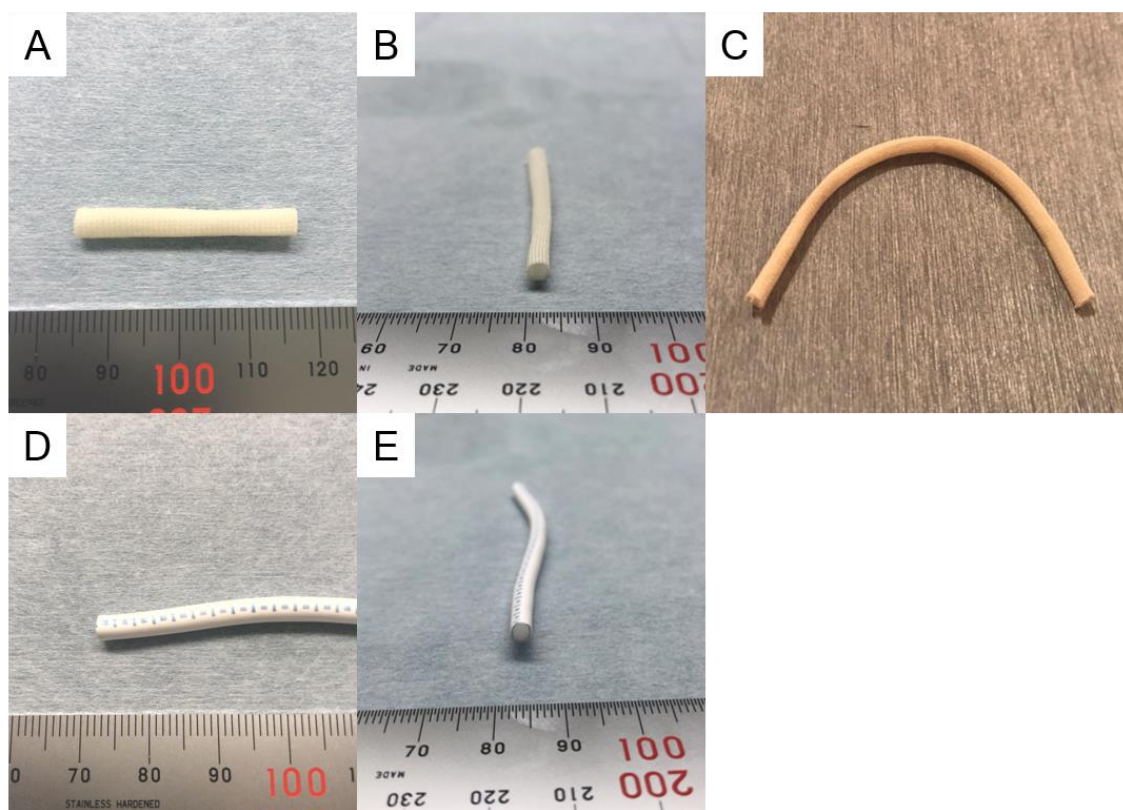


図 12. SF 人工血管と ePTFE 人工血管の概観

SF 人工血管の壁外側(A)と内腔面(B)、曲げた状態での写真(C)。下段は ePTFE 人工血管の壁外側(C)と内腔面(D)。SF 人工血管は弾性度が ePTFE 人工血管より低く、様々な形態に変えることが可能であった。

図 13 に、ラットの後大静脈に移植し、血流遮断解除直後の SF 人工血管と ePTFE 人工血管の概観を提示した。SF 人工血管、ePTFE 人工血管ともに頭側、尾側それぞれ 12 針の単結節縫合による吻合を施行した。吻合にはナイロン糸が使用されたが、人工血管への針の通過性は ePTFE 人工血管と比較して同程度であり、吻合に問題は無かった。その他の移植手技・操作においても ePTFE 人工血管と異なる点や問題点を認めなかった。SF 人工血管は繊維編みで作製されており、フッ素樹脂の延伸加工により作製された ePTFE 人工血管と比較すると吻合部のほつれが生じやすい。本研究では、吻合を全て単結節とし、SF 人工血管側のバイトを大きめに取ることでほつれの問題をコントロールした。SF 人工血管は血流遮断解除後に血液成分が人工血管壁に浸透し、軽度の出血を来した。人工血管が赤色化して見えるのはこのためである。しかし、止血のための追加縫合を必要とせず、1 分程度の圧迫のみで自然に止血が得られた。一方、ePTFE 人工血管は血管壁を通して血液浸透は認められず、概観も白色のままであった。どちらの人工血管も吻合部からの出血は認めなかった。

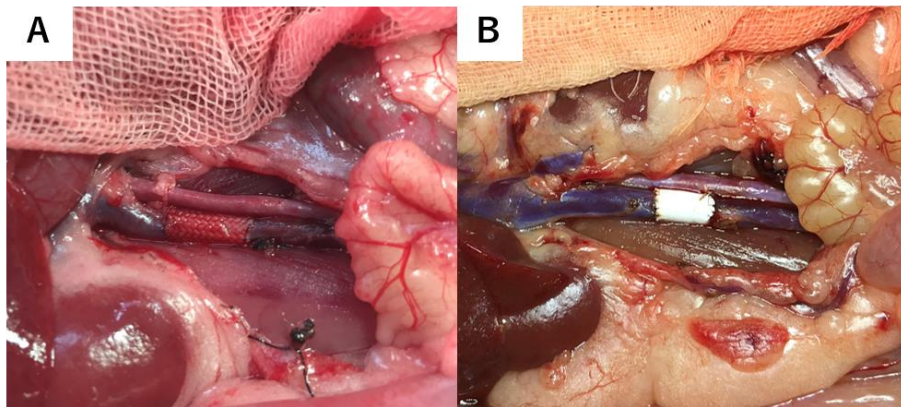


図 13. 静脈置換後の SF 人工血管と ePTFE 人工血管

SF 人工血管(A)は移植前と比較して赤色化していた。血液成分の浸透のためと考えられた。ePTFE 人工血管(B)は移植前と比較して白色化のままである。肉眼的に血液成分の浸透は確認できなかった。

表 2 に SF 人工血管置換群、および ePTFE 人工血管置換群の週齢、体重、および移植時間を示した。いずれの項目においても 2 群間に統計学的有意差を認めなかった。また、観察期間中に合併症等により死亡したラットはいなかった。

表 2. 移植ラット背景および手術時間

	SF (n=19)	ePTFE (n=10)	P [§]
週齢, 週	13 (10-20)	12 (10-20)	0.25
体重, g	450 (360-510)	405 (350-710)	0.16
手術時間, min	43 (37-61)	48 (42-53)	0.10

§: Mann-Whitney *U* test

第三項：開存率の評価

図 14 に人工血管移植後の超音波検査による開存率評価の施行例を示した。ラットの後大静脈は経腹超音波検査により描出は容易であった。カラードップラー法およびパルスドップラー法により、血流速度は約 5~10 cm/second、尾側から頭側方向へ血流があることが示された。次に、2 群間の移植後人工血管開存率の Kaplan-Meier 曲線を図 15 に提示した。SF 人工血管における移植 4 週後の開存率は 94.7% (18/19)、ePTFE 人工血管における開存率は 80.0% (8/10) であった。開存率は SF 人工血管の方が高い傾向であったが、Log-rank 検定では P 値 0.358 であり、統計学的有意差は認めなかった。

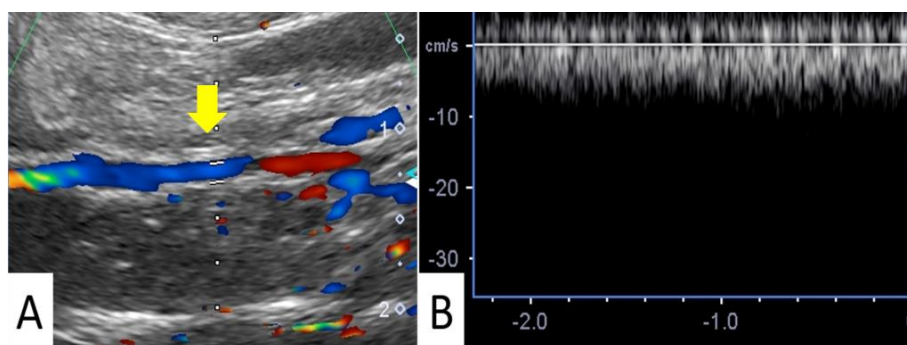


図 14. 移植後人工血管の超音波検査による評価

人工血管部位(A)は壁の均一なエコー輝度上昇があり、描出は容易であった。後大静脈は水平方向に走行しているため、ドップラーエコーイメージ(B)による血流測定は参考値であるが、5~10cm/second の定常血流が描画された。

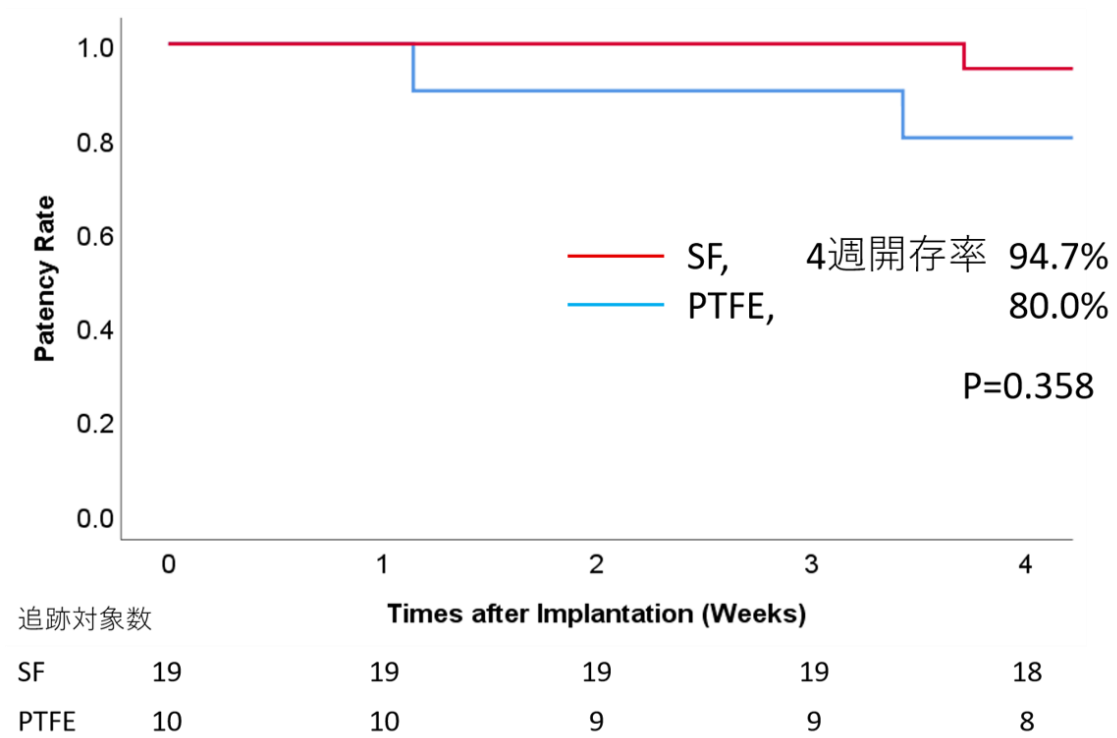


図 15. SF 人工血管と ePTFE 人工血管の開存率に関する Kaplan-Meier 曲線
SF 人工血管の 4 週開存率は 94.7%であり、ePTFE 人工血管は 80.0%であった。
Log-rank 検定では $p=0.358$ と有意差は認められなかった。

第四項：病理学的評価

摘出直後の肉眼写真を図 16 に示した。内腔が保たれていることが確認できた。

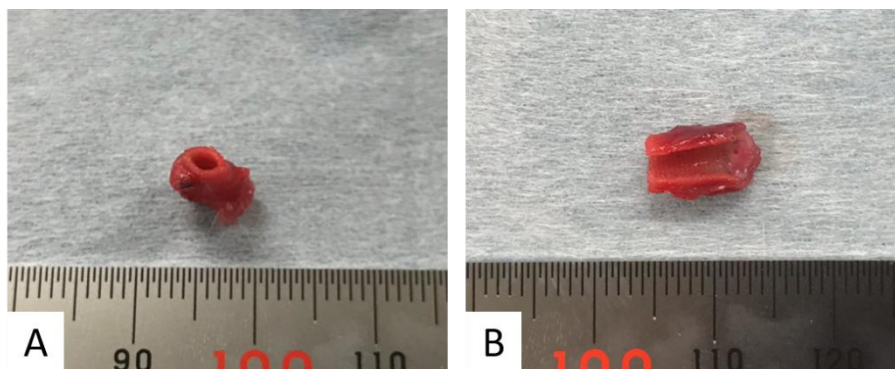


図 16. SF 人工血管摘出後の概観
A: 横断面像 B: 縦断面像

血栓や内膜肥厚なく、内腔が保たれていることが確認できた。

SF 人工血管、ePTFE 人工血管の HE 染色像を図 17 に示した。弱拡大では、双方の人工血管ともに内腔の開存が確認できた。ePTFE 人工血管は内腔に組織が著明に蓄積していた。SF 人工血管の強拡大像(図 17B)では、SF 繊維が明瞭に確認できた。また、繊維同士の間隙に種々の細胞成分が浸透していることが確認できた。さらに、人工血管壁の最内層、最外層には一層の扁平な細胞が並んでいることが確認できた。一方、ePTFE 人工血管の強拡大像(図 17D)では、人工血管壁の間隙に細胞成分の浸透は認められなかった。内腔に蓄積された組織は Eosin 染色によく染まっており、形態からフィブリンであることが予想された。また、SF 人工血管で認められたような扁平細胞の定着は認められなかった。人工血管の壁の厚みに関してはどちらも同程度であることが確認された。

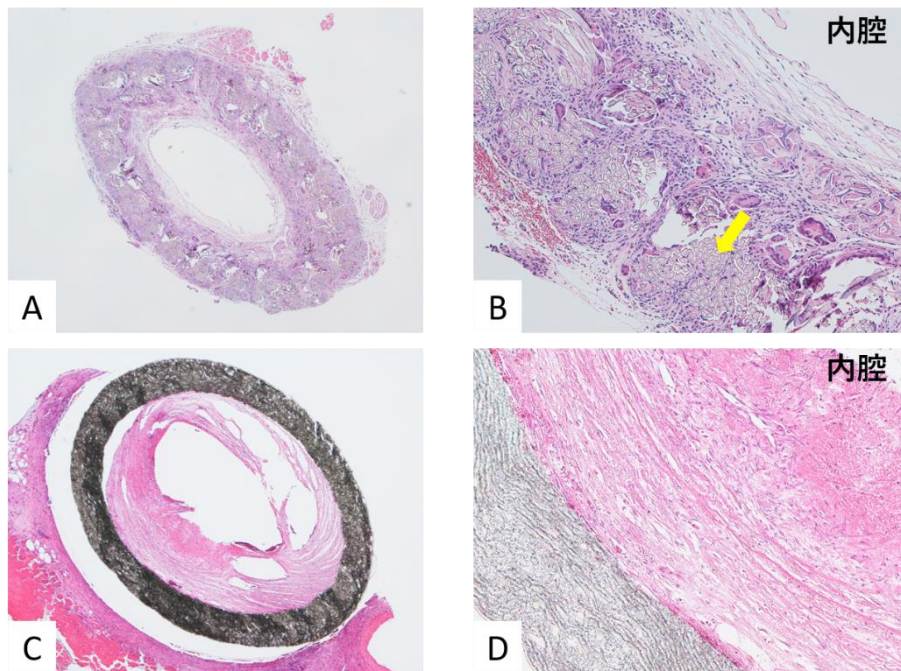


図 17. SF 人工血管と ePTFE 人工血管の HE 染色

SF 人工血管弱拡大像(A :x10)では内腔が良く保たれていることが確認された。SF 人工血管強拡大像(B :x100)では、SF 繊維が確認できた(矢印)。また、繊維間に細胞成分、間質成分が浸透していることが確認できた。さらに、最内層および最外層には 1 層の扁平細胞が定着していることが確認できた。ePTFE 人工血管弱拡大像(C :x10)においても内腔が保たれていることが確認された。一方、ePTFE 人工血管強拡大像(D :x100)では人工血管壁に細胞成分の浸透は認められなかった。さらに内腔には Eosin 好染色性のフィブリンが蓄積していた。

次に、SF 人工血管、ePTFE 人工血管の EVG 染色像を図 18 に示した。

SF 人工血管の染色像(図 18A, B)から、SF 繊維の間隙には赤色に染色される膠原繊維が認められ、SF 繊維間の大部分を占めていることが示された。弾性繊維はほとんど認められなかった。ePTFE 人工血管は HE 染色像からフィブリンの蓄積が強く疑われたため、シリウスレッド染色を追加した(図 18C, D)。濃赤色を呈しており、フィブリンの蓄積であることが示された。

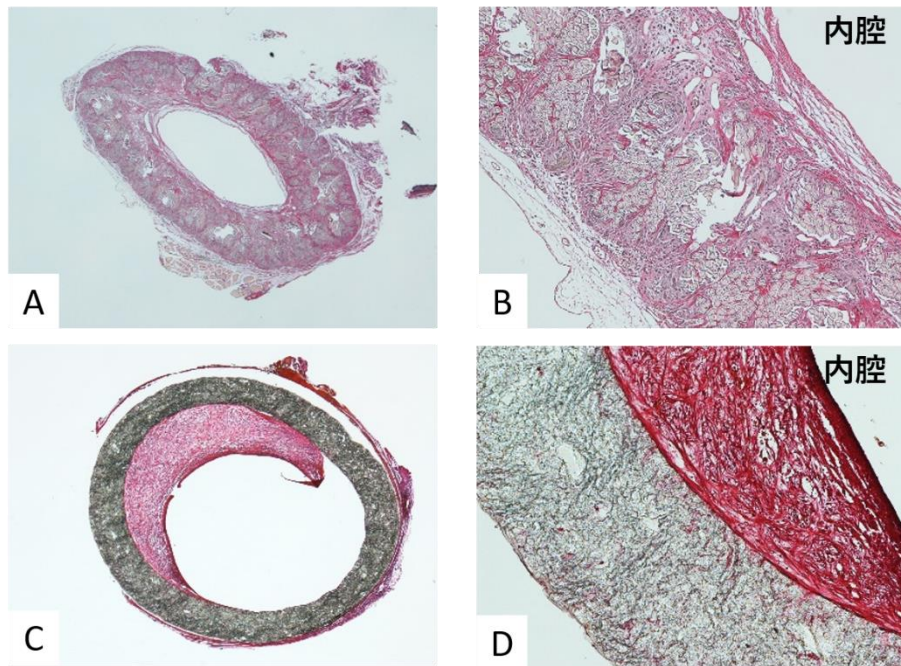


図 18. SF 人工血管の EVG 染色、ePTFE 人工血管の EVG/Sirius red 染色

SF 人工血管の弱拡大(A :x10)および強拡大(B :x100)から SF 繊維間を占めている組織は膠原繊維であることがわかった。弾性繊維はほとんど認められなかった。ePTFE 人工血管に対しては Sirius red 染色を追加した。弱拡大(C :x10)および強拡大(D :x100)から、内腔に蓄積した組織は濃赤色を呈しており、フィブリンであることが示された。

続いて、抗 α SMA 抗体染色の結果を図 19 に示した。SF 人工血管の染色像(図 19A, B)では、人工血管壁の内側に陽性細胞の集団が認められ、平滑筋細胞の定着が示唆された。ePTFE 人工血管の染色像(図 19C, D)では、非特異的染色のみ確認され、平滑筋細胞の定着は認められなかった。

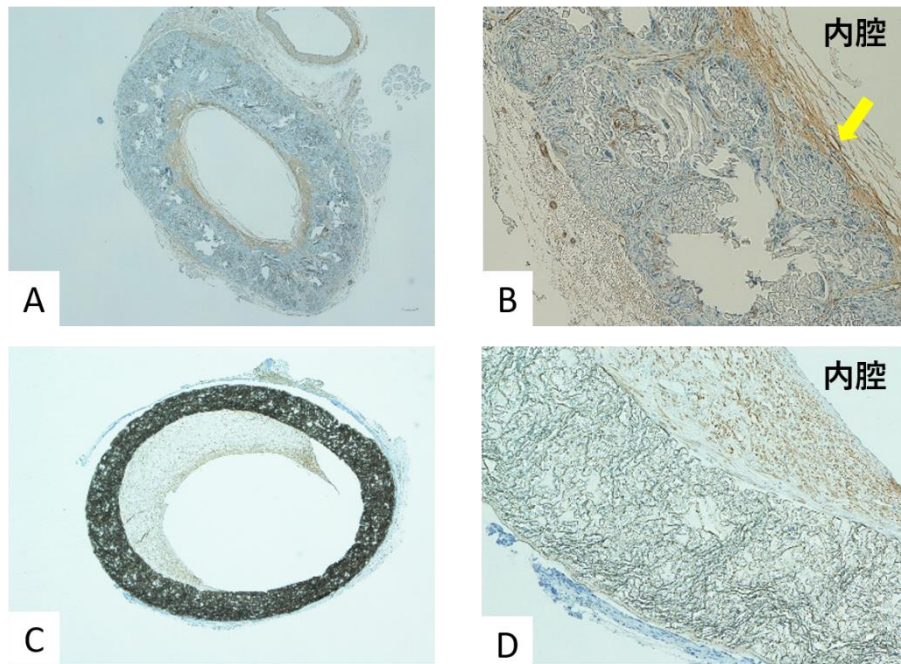


図 19. SF 人工血管と ePTFE 人工血管の抗 α SMA 抗体染色

SF 人工血管の弱拡大(A :x10)および強拡大(B :x100)から人工血管内腔よりに極わずかな陽性細胞が確認され、少量の平滑筋細胞が定着していることが示唆された。ePTFE 人工血管の弱拡大(C :x10)および強拡大(D :x100)からは陽性細胞は認められなかった。

続いて、抗 CD31 抗体染色の結果を図 20 に示した。SF 人工血管の染色像(図 20A, B)から、人工血管壁の最内層に CD31 抗原陽性の扁平細胞が定着していることが確認され、内皮細胞の定着が示された。弱拡大像からは、定着した内皮細胞は全周性であったことが分かった。ePTFE 人工血管の染色像(図 20C, D)からは染色陽性細胞は確認されず、内皮細胞の定着は否定的であった。

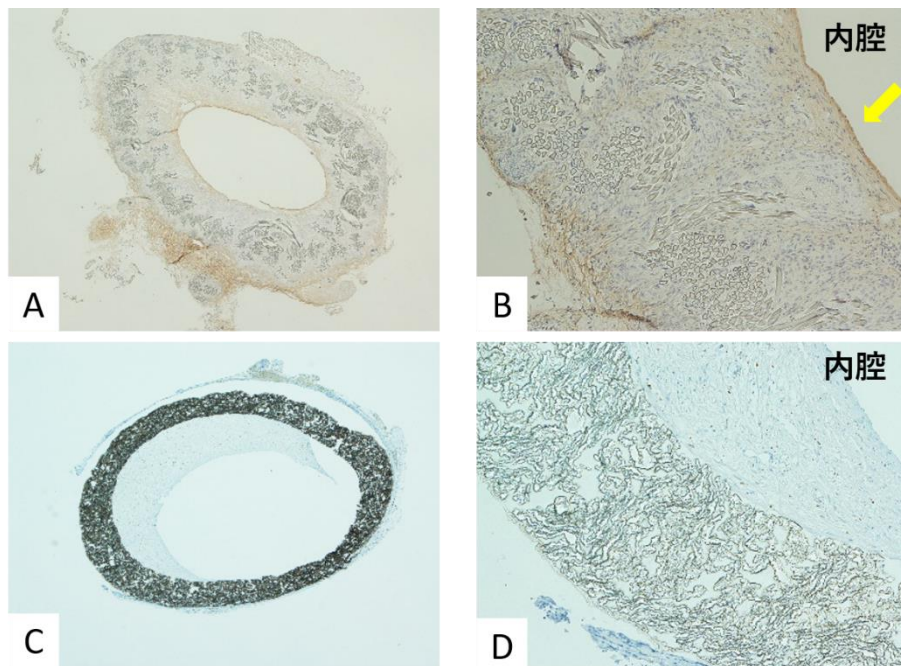


図 20. SF 人工血管と ePTFE 人工血管の抗 CD31 抗体染色

SF 人工血管の弱拡大(A :x10)および強拡大(B :x100)から人工血管最内層に、全周性に陽性細胞が確認され、内皮細胞の定着が確認された。ePTFE 人工血管の弱拡大(C :x10)および強拡大(D :x100)からは陽性細胞は認められなかった。

最後に、抗ポドプラニン抗体染色の結果を図 21 に示した。SF 人工血管の染色像(図 21A, B)から、最外層には弱陽性の扁平細胞が確認され、中皮細胞の定着の可能性が示唆された。ePTFE 人工血管の染色像(図 21C, D)は非特異的染色像が多く、明らかな陽性細胞の同定はできなかった。

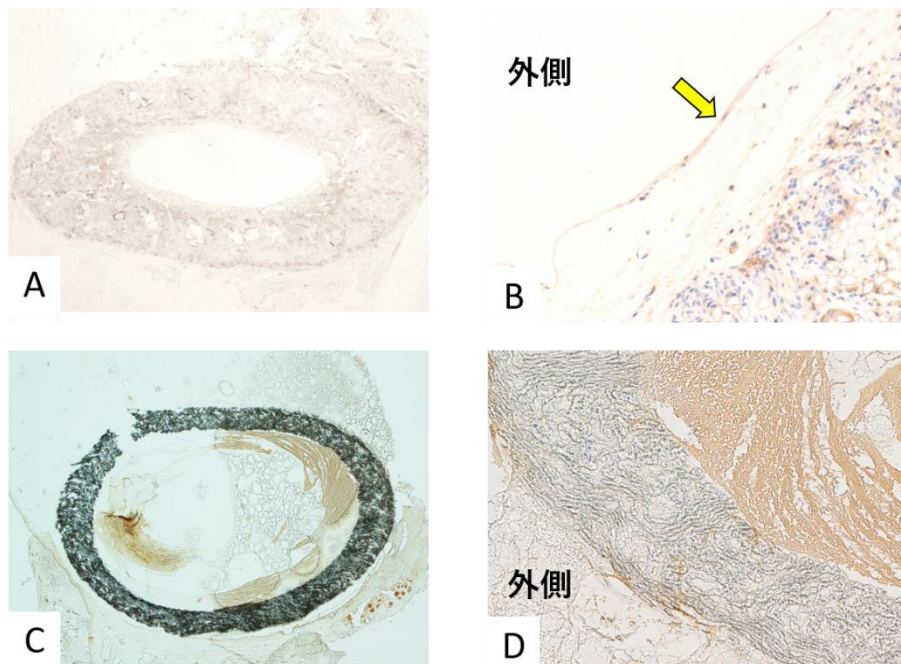


図 21. SF 人工血管と ePTFE 人工血管の抗ポドプラニン抗体染色

SF 人工血管の弱拡大(A :x10)および強拡大(B :x200)から人工血管最外層に、弱陽性の扁平細胞が確認され、中皮細胞の定着が示唆された。ePTFE 人工血管の弱拡大(C :x10)および強拡大(D :x100)からは陽性細胞は認められなかった。

本研究では、観察期間において、移植した SF 人工血管の 1 例が閉塞し、ePTFE 人工血管の 2 例が閉塞した。閉塞が認められた人工血管はその時点で速やかに摘出を行い、病理学的評価を試みた。図 22 に、閉塞した SF 人工血管および ePTFE 人工血管の HE 染色像を示した。SF 人工血管の内部には赤血球が著明に蓄積し、周囲にフィブリン形成が付随していた。ePTFE 人工血管の内部には少量の血栓、フィブリン塊が含まれるが、炎症反応浸潤が大半であり、また人工血管壁には好中球の浸潤が著明であった。

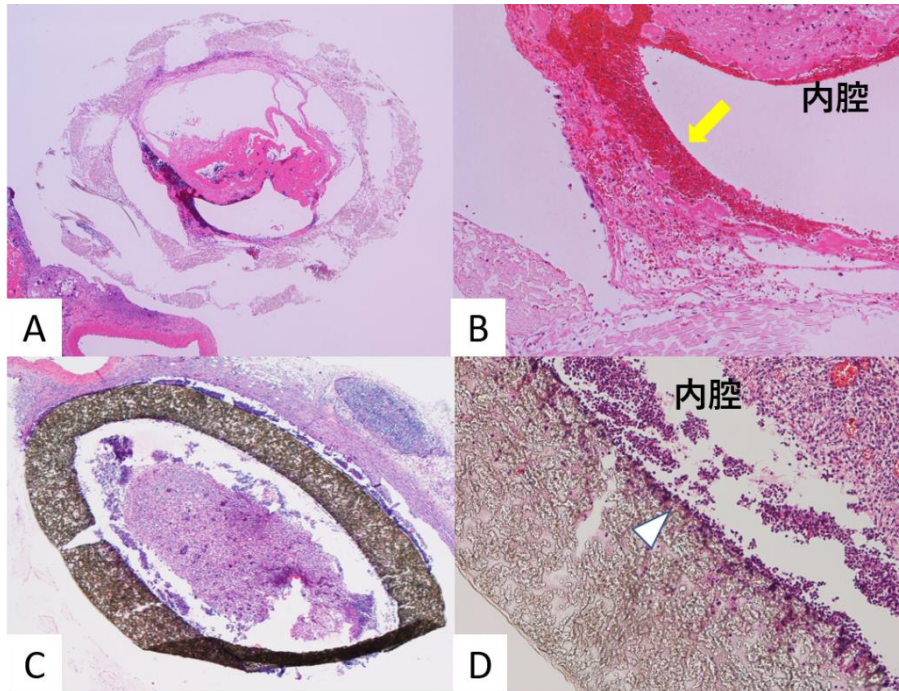


図 22. 閉塞した SF 人工血管と ePTFE 人工血管の HE 染色

観察期間中に閉塞した SF 人工血管の弱拡大(A: x10)と強拡大(B: x100)像。赤血球塊(矢印)を中心とし、周囲にフィブリンが形成され、血栓閉塞したことが示唆された。ePTFE 人工血管の弱拡大(C: x10)と強拡大(D: x100)像。内腔には細胞浸潤が著明であり、人工血管壁内側に好中球浸潤(矢頭)が著明であった。

ラット後大静脈そのものの病理所見を提示した文献は、検索しうる限り存在しない。そのため、本実験ではラット後大静脈の HE 染色、EVG 染色、抗 CD31 抗体染色、抗 α SMA 抗体染色を施行し、図 23 に提示した。ラット後大静脈壁は非常に薄く、EVG 染色では壁が弾性繊維および膠原繊維で構成されることが示された。抗 CD31 抗体染色では、一層の内皮細胞が示され、抗 α SMA 抗体染色では、静脈壁全周性に平滑筋細胞を示唆する細胞が認められた。

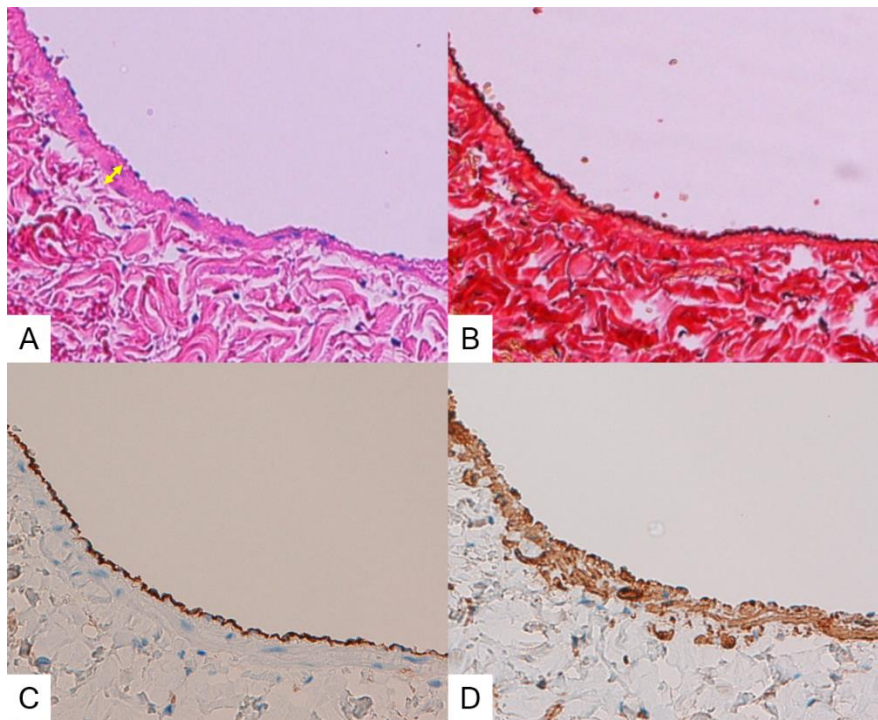


図 23. ラット後大静脈の HE 染色(A: x100)、EVG 染色(B: x100)、抗 31 抗体染色(C: x100)、抗 α SMA 染色(D: x100)

HE 染色ではラット後大静脈壁は非常に薄いことが確認される(黄色矢印)。EVG 染色では黒紫に染まる弾性繊維、および周囲の赤色の膠原繊維が確認された。抗 CD31 抗体では 1 層の内皮細胞が裏打ちしていることが示された。抗 α SMA 抗体染色では平滑筋細胞が存在することが示された。

第四章 研究3「ビーグル後大静脈に対する中口径 Silk Fibroin 人工血管の予備実験」

第一節：研究3の方法

第一項：人工血管の準備

研究3では、さらに内腔径を増大させ、中口径(内径 8mm)の SF 人工血管を作製した。作製方法は基本的に小口径人工血管と同様であるため詳述は割愛した。編み方は、同様にダブルバーコード法とした。コーティングも同様に、Glycerin を架橋剤とした SF 水溶液のコーティングとした。作製した SF 人工血管基盤からセリシンを除去した。研究3では、同じ 8mm 径の PET 人工血管をコントロールとして使用した。人工血管長はどちらも 10mm とした。周軸方向強度は 33.4 ± 2.8 [N]であり、3mm 径人工血管と比較してわずかに強度の低下が確認された。

第二項：試供動物および人工血管置換手技

週齢約 1 歳、およそ 9.0kg 体重の雌のビーグル(日本 SLC 株式会社)を用意した。ラットにおける移植実験と同様、後大静脈を選択した。雄の場合、生殖器が大きいため、後大静脈を広範囲に扱う場合は操作性が低下することから雌を選択した。エサは 1 日 1 回正午に与えた。実験 1 ヶ月程度前から環境適応させた。

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) 0.2mg/kg、ミダゾラム注射液(ミダゾラム、サンド株式会社) 0.2mg/kg、アトロピン硫酸塩注射液(アトロピン硫酸塩水和物、テルモ株式会社) 25 μ g/kg を静脈内に投与した。その後、抗菌薬はセファゾリンナトリウム注射用(セファゾリンナトリウム、日医工株式会社) 25mg/kg を投与し、プロポフォール(プロポフォール静注 1% 50ml 「FK」、フレゼニウスカービジャパン株式会社) 6ml/kg を気管内挿管が可能となるまで投与した。約 2.0%イソフルランと酸素の混合吸入による維持麻酔とした。手術中の補液は乳酸リンゲル液 (ラクテック注, 大塚製薬株式会社)を 60ml/h とした。

腹部正中切開で開腹した。腸管を脱転させると、大動脈および後大静脈の露出が容易に可能であった。後大静脈からの分枝血管は 4-0 絹糸(アルフレックスファーマ株式会社)で適宜結紮・切離した。後大静脈を大動脈からも剥離して十分に露出させた。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) 100IU/kg を静脈内投与した後、後大静脈の頭側、尾側をバスキュラークリップで遮断し、後大静脈を 1cm 切離した。切離された後大静脈に、同じく 1cm 長の SF 人工血管を端々吻合で置換した。吻合糸には 6-0 プロリン(ジョンソン・アンド・ジョンソン株式会社)を用い、2 点支持法による連続縫合を施行した。遮断を解除し、人工血管内の血流を肉眼的に確認し、さらに止血を確認

した後に閉腹して手術を終了とした。感染予防として、セファレキシン(セファレキシン, 日医工株式会社) 250mg を餌に混入させた。また、抗血小板療法としてクロピドグレル(クロピドグレル塩酸塩, 日東メディック株式会社) 75mg を餌に混入させた。さらに、ダルテパリン Na(ダルテパリンナトリウム, ニプロ株式会社) 3000 単位を皮下注した。人工血管摘出は、周術期と同様の麻酔をかけた後、腹部を再切開して人工血管を周囲組織と共に丁寧に摘出した。PET 人工血管の移植および摘出に関しても全く同様の方法である。研究 3 では、SF 人工血管、PET 人工血管ともに 3 頭のビーグルへ移植した。

研究 3 は、東京農工大学動物実験委員会の倫理委員会の承認の下、施行された(承認番号：30-95)。

第三項：評価項目および評価方法

研究 3 における評価項目は SF 人工血管および PET 人工血管移植後の開存評価および病理学的評価である。移植後の開存確認のため、腹部超音波診断装置(APLIO、TUS-A300、キャノンメディカルシステムズ株式会社)を使用した。プロポフォール(プロポフォール注射剤、日医工株式会社)を静脈内投与して適切な鎮静を得た後に評価を施行した。B モードを用いて血管内部の構造、カラードップラーを用いて血流の確認を行った。開存確認は 1-3 日後、1 週間

後、2週間後、3週間後、4週間後とした。腹部超音波診断装置での血流確認が難しい場合および閉塞が疑われた場合は、下大静脈造影検査を施行し、開存性について詳細評価を施行した。

病理学的評価は1ヶ月開存が得られた段階で施行する方針とした。摘出した人工血管は10%ホルマリンにより固定を行い、パラフィン包埋、薄切の工程を経た後にHE染色を施行した。1ヶ月以内に閉塞した場合は、その時点で人工血管を摘出し、HE染色を施行した。

第二節：研究3の結果

第一項：手術手技について

人工血管移植手技は桐谷および共同研究者の田中隆志により行われた。ラット人工血管置換に用いた内径3mm SF人工血管と同様、人工血管は柔軟かつ操作性に富んでいた。吻合にはポリプロピレン糸を使用した。人工血管への針の通過性に問題はなかった。血流遮断解除後、小口径SF人工血管置換実験と同様に、中口径SF人工血管壁からも血液漏出が認められ、人工血管壁は赤色化した。SF人工血管の血流遮断解除直後の外観を図24に提示した。血液漏出は小口径人工血管時よりも相対的に多い印象であったが、止血は圧迫

のみで容易に得ることができた。一方、PET 人工血管は血液漏出をほとんど認めなかった。

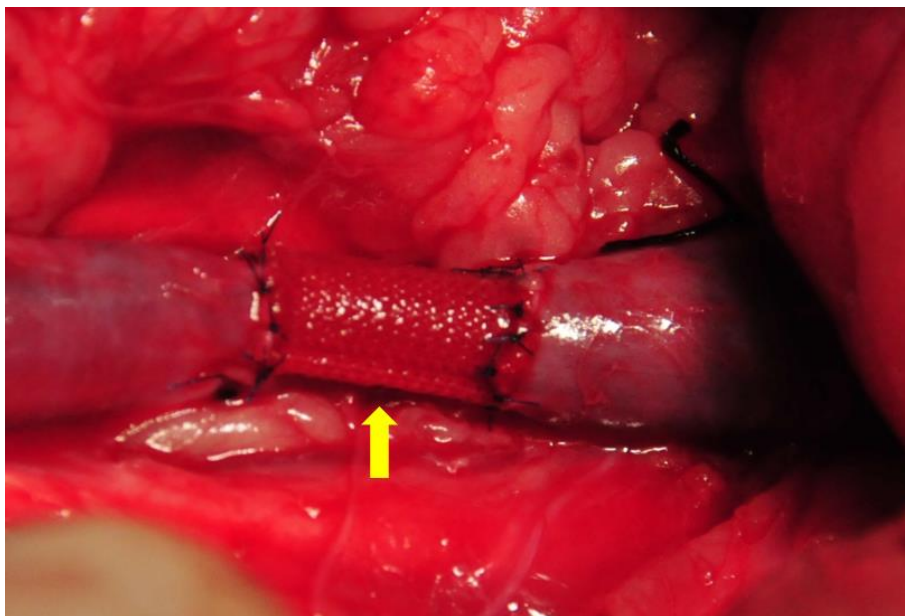


図 24. 移植直後の中口径 SF 人工血管

遮断解除直後の内径 8mm の SF 人工血管(矢印)を示した。小口径人工血管実験と同様、人工血管壁の赤色化が認められた。血液成分の漏出は多い印象であったが、止血は圧迫のみで容易に得られた。

第二項：開存の評価

開存評価の結果を表 3 に記載した。SF 人工血管を移植した 4 頭のビーグルのうち、移植後 1 ヶ月間の開存が得られた症例は認められなかった。試験中、超音波検査で閉塞が疑われた症例に施行した後大静脈血管造影検査を図 25 に示した。吻合部より尾側から腎静脈経由の側副血行路が描出された。

表 3. ビーグルへ移植した SF 人工血管と PET 人工血管の開存評価

人工血管	症例番号	開存期間(日)
SF	1	7

	2	1
	3	1
PET	1	1
	2	16
	3	21

SF: Silk fibroin

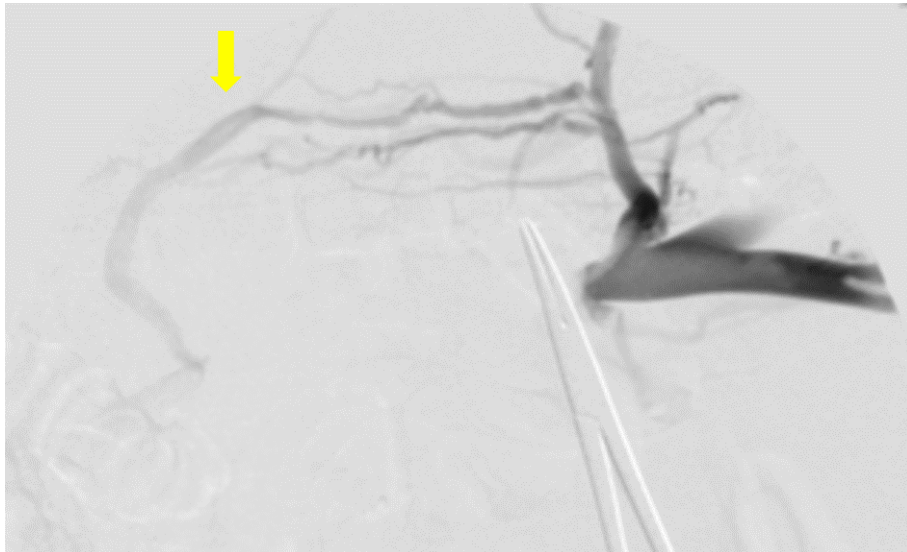


図 25. 閉塞した SF 人工血管に対する後大静脈血管造影検査

ビーグル大静脈から造影を施行した。ペアン鉗子の部位が尾側の吻合部でありそこで造影剤は途絶した。吻合部より尾側から左腎静脈を介した側副血行路(矢印)が認められた。

第三項：病理学的評価

閉塞が確認された SF 人工血管に対する HE 染色の代表像を **図 26** に示した。小口径 SF 人工血管置換の際と同様、残存する SF 繊維が確認された。人工血管壁は高度に歪み・変形を来しており、内腔はかなり狭小化していた。赤血球およびフィブリンの蓄積が著明に認められ、さらに炎症細胞を始めとする細胞成分の遊走が認められていた。人工血管周囲にも炎症細胞浸潤が認められ

た。人工血管の変形に伴って血栓が形成され人工血管は閉塞し、炎症反応が惹起されたものと推察された。

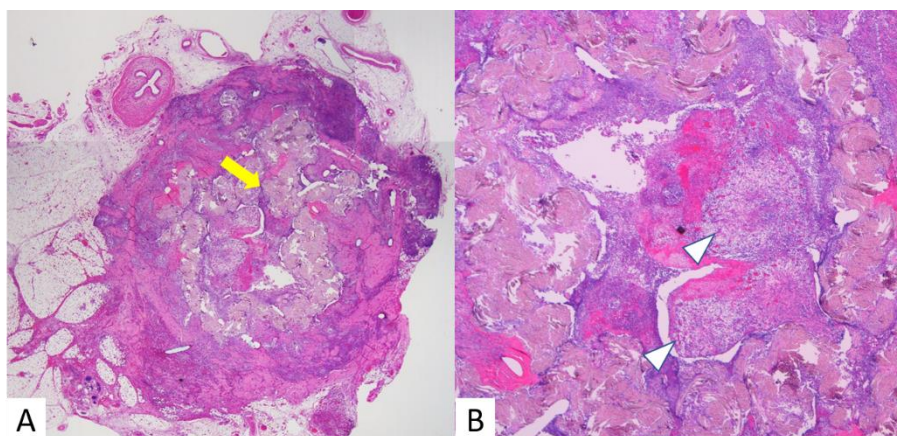


図 26. 閉塞した SF 人工血管の HE 染色像

SF 人工血管の弱拡大像(A: x10)。シルクフィブロイン繊維(矢印)は歪み、変形しており、その影響により内腔は狭小化していた。強拡大像(B: x100)では、赤血球塊およびフィブリン(矢頭)が内腔のメインを占めており、血栓閉塞が示唆された。炎症細胞浸潤も認められた。

閉塞が確認された PET 人工血管に対する HE 染色の代表像を図 27 に示した。PET 人工血管も、SF 人工血管ほどでは無いものの、人工血管壁の歪みが認められた。また、人工血管壁から内側・外側それぞれに膠原繊維の蓄積が確認された。それにより内腔は極めて狭小化し、内腔の内部には混合血栓が認められ、最終的に血栓によって閉塞したものと考えられた。

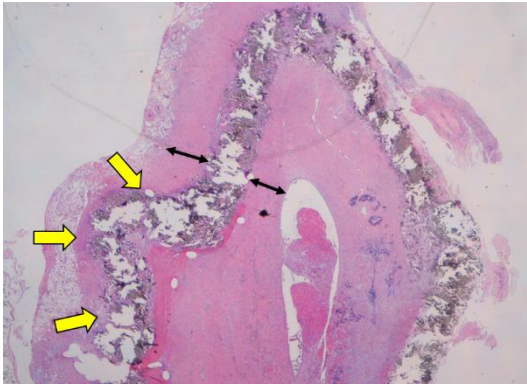


図 27. 閉塞した PET 人工血管の HE 染色像

PET 人工血管の弱拡大像(x10)。PET 繊維(矢印)は歪んでいる。PET 繊維の内側、外側それぞれに膠原繊維を疑わせる組織の蓄積が認められた(両矢印)。これにより内腔は極めて狭小化し、混合血栓による閉塞が認められた。

第五章 考察

本研究は、肝胆膵外科領域における静脈合併切除・再建に使用可能な新規人工血管の開発を主題として展開した。高い生体適合性が期待できる Silk Fibroin を基盤として小口径および中口径の人工血管を作製し、静脈移植実験から、開存性および病理学的変化を観察した世界初の研究である。小口径人工血管は、既存の ePTFE 人工血管と比較して開存性に統計学的有意差は認めなかったものの、高い傾向であった。病理学的には、SF 繊維の間隙に、主として膠原繊維を中心とした支持組織が定着し、最内側は内皮細胞でカバーされた。最外層には漿膜化を示唆する中皮細胞の定着が観察された。これは、高い開存性の維持、および細菌などに抵抗できる抗感染性を備える可能性を示したものであった。中口径人工血管の静脈移植では、人工血管径が 8mm となり、実際の静脈合併切除に近い感覚となったが、移植手技そのものには問題が無かった。しかしながら、移植後早期に血栓閉塞を来した。病理学的評価では、人工血管の歪みが目立ち、内腔の狭小化および血栓形成が確認された。実験系を **中型動物** へ変更したことにより、腹腔内圧が上昇し、低圧系の静脈はより強い外圧に晒されることになるが、構造的強度が既存の人工血管に劣る SF 人工血管では内腔が狭小化し、血栓を形成したものと考えられた。

本研究における、人工血管作製のポイントは以下の2点である。すなわち、繊維をどのように布地化し筒状に形成するか、また、形成された筒状構造に対するコーティングをどうするか、である。

基盤となる繊維をどのように筒状構造とするか、これが人工血管作製における最初のポイントである。繊維を布地化して筒状構造を作りあげる方法としては、大きく編み(knitted)と、織り(woven)があり、これを決定することは人工血管の物理的特性を決定するのに大きく関わる。人工血管開発の歴史において、人工繊維材料により作製された人工血管のヒトへの移植が初めて成功したのは1954年のことであり、Debakeyによる業績であったが[60]、ここで使用されたのは、合成繊維ポリエステルを編みで作製したものであった。Debakeyの報告では、最初の患者は13年間生存し、手術部位トラブルは無かった。現在、素材としてはこのポリエステルを編みか織りで作製することが主流となっている[61]。編みで作製された人工血管の特徴は人工血管壁に保持された高い有孔性であり、それにより得られる基質化特性である。すなわち、人工血管に細胞成分が浸透し、定着、一体化する。また、編みで得られた布地は柔軟性が高く、使用上の操作性が高まる。しかし、高い有孔度ゆえに繊維間隙からの血液漏出が実際の問題として挙げられる。一方、織りで作製された人工血管の有孔度は低い。構造上の強度は高まり、漏出性出血の危険性は少なくなるもの

の、基質化特性も低下する。また、柔軟性に劣るため操作性もやや低下する。以上を踏まえ、本研究では、人工血管基盤を SF の編みにより作製した。その理由として、静脈は動脈と比較して非常に低圧系であり、移植後の血液漏出が動脈ほど問題とならないことが予想されるため、静脈系は易血栓形成傾向であり抗血栓性を高く維持するための十分な内皮化を必要とするため、また、伸縮性に富む血管系であり高い操作性が要求されるためである。

人工血管に対するコーティングは、人工血管作製における 2 つ目のポイントである。上述の如く、有孔度の高い人工血管をそのまま使用すると重大な出血を惹起することがあり、临床上使用できない。そのため、以前はプレクロッティング操作を必要としていた[62]。すなわち、人工血管を移植する直前に血液成分に浸透させ、血栓により繊維間隙を目詰まりさせる方法である。20 世紀後半になると、ウシ由来のコラーゲン、ゼラチン、アルブミンによりコーティングされた人工血管が開発され、血液漏出に関してはプレクロッティング操作の必要なく臨床使用できるようになったが、一方異種成分による感染や炎症反応などの問題が残った[63]。Huang らは、Silk Fibroin の可塑性に着目し、Silk Fibroin 水溶液を作成し、Polyethylene 基盤の人工血管にコーティングした。臨床で使用されるゼラチンの吸収は 3 ヶ月程度かかるとされるが[64]、SF 水溶液はさらに早く、早期内皮化、抗血栓性が得られたことを報告した[65]。

また、Enomoto らの報告では、SF による基盤に対し、SF 水溶液のコーティング人工血管をラット大動脈に置換したところ、SF 水溶液は次第に分解されたことが確認された[45]。

以上より、本研究での SF 人工血管は編みにより基盤を作製し、SF 水溶液をコーティングしたものとした。作製された SF 人工血管の物性評価、および既報から引用した PET 人工血管の物性評価は表 1 として提示した。PET 人工血管は、繊維を編み、ゼラチンコーティングによって作製され、既に保険承認を受け臨床応用されている。周軸方向強度、圧縮弾性率、透水量はそれぞれ 112.9 ± 11.7 [N]、 0.67 ± 0.18 [N/mm³]、 1.0 ± 0.4 [ml/cm²/min] と報告されている[46, 66, 67]。SF 水溶液コーティングの SF 人工血管はそれぞれ 51.0 ± 3.0 [N]、 0.013 ± 0.002 [N/mm³]、 5.2 ± 3.9 [ml/cm²/min] であったことから、PET 人工血管と比較して周軸強度は約 1/2、弾性率は約 1/20 であり、透水量については約 5 倍である。つまり、構造強度としては PET 人工血管よりも低下するが、透水量は多く保たれており、より基質化特性が見込める人工血管と考えられた。

研究 2 では、3mm 径の SF 人工血管と ePTFE 人工血管を用い、静脈置換後の開存性および病理学的変化を評価した。ePTFE 人工血管は繊維を編み(あるいは織り)で作製した人工血管ではなく、非布製高分子材料であるポリテトラフルオロエチレンを急激に延伸して無数の亀裂を作ることによって多孔性、屈

曲性をもたせた人工血管である。現在では中口径血管移植に主として用いられており、臨床的には全人工血管のうち 20%に相当すると考えられている。この人工血管は極端に疎水であり、非粘着性のため血清蛋白や血小板の付着を阻止し、抗血栓性を併せ持つとされ、静脈用としても使用されることがある。しかしこのような特徴を持つ反面、織布で作製された人工血管と比較して強度の点で劣る[68, 69]。Polyethylene 繊維の編みによる人工血管は、小口径では臨床で満足のいく開存度が得られておらず、control として比較が困難であることから、研究 2 における SF 人工血管の control は ePTFE 人工血管とした。1 ヶ月後の開存率は SF 人工血管(94.7%: 18/19)、ePTFE 人工血管(80.0%: 8/10)であり、Log-rank 検定では $p = 0.358$ と有意差を認めなかったものの、開存率は SF 人工血管の方が高い傾向であった。3mm 径の ePTFE 人工血管は Blalock-Taussig shunt surgery で良好な開存結果が報告されており、実臨床においても確立した医療材料とされていることから[70, 71]、SF 人工血管の開存率も acceptable なものと考えられた。摘出後の SF 人工血管の肉眼所見(図 16)から、人工血管としての筒状構造が十分保たれていることが分かった。上述のように、SF 人工血管は既存の繊維編み人工血管と比較して構造的強度がやや劣ることが示されていたものの、小口径の静脈への置換実験においては問題とならないことが示唆された。移植した SF 人工血管のうち、1 例に閉塞が認められた。図 22 の所見か

ら、人工血管中間点では血栓による閉塞が示唆された。肉眼的には吻合部の狭窄がやや目立つ所見であり、吻合部の内膜肥厚または狭窄により、最終的に血栓閉塞を来したものと想定された。より詳細な閉塞メカニズムに迫るために、閉塞時の、吻合部での病理学的評価を加えることが今後の課題である。

開存が得られた人工血管に対し、基質化特性の評価として種々の病理染色を施行した。SF人工血管に対するHE染色の結果は非常に興味深く、残存するSFとともに周囲を取り巻く生体成分の浸透が認められた。さらに最内層および最外層に1層の扁平細胞の定着が示唆され、肉眼所見同様、十分な内腔が確保されていた。一方で、ePTFE人工血管の壁内には細胞成分およびその他の生体成分は全く定着していなかった。血管壁からの血液漏出の危険はほとんど無いことが期待された一方、人工血管壁の内側には血栓形成の結果であるフィブリンが著明に蓄積されており、内腔は狭小化していた。SF人工血管はSF繊維の内側へも多少の生体成分が定着しているため、内腔面積は移植直後より小さくなってはいたものの、最内層を扁平細胞が裏打ちしており、人工血管の形態が長期間に渡ってキープされることが期待された。

EVG染色では、SF繊維間および内側・外側に広く赤色変化が認められ、繊維間を大部分が膠原繊維で占めていたことが分かった。膠原繊維は適度な弾力性と高い力学的強度を有することが知られている[72]。基質化した後の

SF 人工血管に対する物性評価は施行できていないものの、Polyethylene 人工血管に劣る力学的強度は膠原繊維の定着によりカバーされることが期待された。一方、弾性繊維はほぼ認められなかった。ラット後大静脈に対する EVG 染色では弾性繊維が全周性に認められており、人工血管への組織定着機序は、必ずしも元生体組織に類似して起こるわけでは無いと考えられた。

抗 CD31 抗体染色では、SF 人工血管の内側に 1 層の陽性細胞が全周性に認められ、内皮細胞が定着したことが示された。人工血管の最も重要な役割は血流の保持であり、それに寄与する最大の要素は内皮細胞の定着と考えられる。血管内皮細胞が定着することにより、抗血栓性を呈し、血栓症のリスクを低下させる。さらに内皮化は抗感染性を併せ持つことも報告されている[24, 35, 49]。同じ繊維編みの Polyethylene 人工血管は、実臨床で応用され実績を得ているものの、内皮細胞が定着しないことも分かってきており、長期経過後の血栓形成も報告されている[73, 74]。本研究では、人工血管の切り出しは吻合部の中間点の 1 点のみであるため、全長に渡って内皮細胞が定着したかは不明である。しかし、既報から内皮細胞は吻合部から延伸するとされていることから全長に渡って内皮細胞が定着した可能性がある[75]。今後の研究では長軸方向の病理作成によりこの点を解明する必要がある。一方、ePTFE 人工血管に対する抗 CD31 抗体染色では、内皮細胞の定着は認められなかった。ePTFE 人工血管

の動脈置換における病理学的評価でも同様の報告があり、ePTFE 素材への内皮細胞の定着は動脈、静脈いずれに対しても生じないものと考えられた[45, 73]。既存の ePTFE 人工血管に内皮化が発症せず、SF 人工血管で内皮化が得られることは、素材として細胞増殖の足場としての機能に優れることに起因すると考えられる[35]。この性質を生かし、医療において絹は人工血管に内皮化が生じないことは、術後長期経過後も血栓閉塞や人工血管感染の発症リスクを抱えることを示唆する。門脈系の慢性長期的な血栓閉塞は、側副血行路の過剰発達による、異所性腸管静脈瘤の破裂出血や、高アンモニア血症など重篤な病態につながることもある[76]。本研究で、静脈移植した SF 人工血管のうち、閉塞した 1 例は赤血球およびフィブリンが蓄積しており、血栓形成によるものであった。この病理標本では内皮細胞が認められず、SF 人工血管への細胞浸透も極めて少なかった。細胞成分浸透が少なかった理由として、閉塞が移植後 1 週間であったことが考えられる。本研究では細胞定着までの期間、すなわち人工血管に対する細胞定着の経時的变化を観察していない。移植後 1 週間はまだ細胞定着に十分な時間では無かった可能性がある。この点は次の課題であるが、人工血管の安定した開存のためには、定着までの期間、いかに血栓を予防するかということを検討する必要があると考えられた。

SF 人工血管の最外層は、抗ポドプラニン抗体染色で弱陽性であった。

抗ポドプラニン抗体はリンパ管や中皮腫マーカーとして知られる[77]。最外層に定着した扁平細胞は中皮であり、人工血管自体が漿膜によりカバーされた可能性がある[77, 78]。漿膜には抗感染性の特性があることが知られており、消化器外科手術で医療材料を使用する際に特に重要である[79]。特に、消化器外科手術では術中の腸液汚染が術後腹腔内感染症の一因となる。すなわちデバイスの外側からの感染性微生物の侵入である。漿膜化はこの外的感染を予防できる可能性がある。血行再建術後の人工血管感染は 3%程度と報告され[28]、比較的稀ではあるものの、いったん発症すれば出血、敗血症、臓器虚血などを合併し、死亡率は 15%にも及ぶと報告される。しかし、これらは清潔手術とされる血管外科領域からの報告がほとんどであり、消化液汚染を伴う消化器外科領域からの纏まった報告は無く、感染の頻度はさらに高いことが想定される。本研究では、抗ポドプラニン抗体染色の結果から人工血管漿膜化の可能性が見いだされたものの、抗感染性の直接的な検証は行われておらず、汚染モデルによる検証が次なる課題の 1 つである。医療デバイスに対し、抗感染性を評価するための汚染モデルは整形外科領域で確立しており、*Escherichia coli* や methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* などの臨床上重要な病原性微生物を動物体内へ留

置したデバイスへ直接塗布し、一定期間の経過観察の後、コロニー数をカウント・比較する方法が用いられる[80]。

研究3では、内径8mmの中口径SF人工血管を作製し、ビーグルの後大静脈へ移植した。6-0ポリプロピレン糸による連続縫合での吻合が可能であったため、吻合時間は約25分であり、小口径人工血管より短時間で移植可能であった。また、図24から認められるように、移植直後の開存性は肉眼的に確実に確認できた。ラット静脈置換と同様、遮断解除後はSF人工血管の血管壁から血液成分漏出があり全体的に赤色化したが、止血は圧迫のみで容易に得られた。総じて、移植手技として十分に臨床応用可能と考えられた。

SF人工血管の開存評価結果は表3に記載した通りである。本実験では、移植1ヶ月後に開存が得られたSF人工血管は無かった。閉塞したSF人工血管のHE染色標本からまず指摘可能な点は、SF人工血管に強い歪みが生じていたことである。さらに内腔面積が著しく狭小化していたことから、人工血管の歪みは外からの圧力によることが示唆された。狭小化した内腔には赤血球が蓄積し、フィブリン形成も認められたことから、閉塞の直接原因は血栓形成によるものと考えられた。人工血管の静脈移植の既報は少なく、さらに置換した人工血管の血栓閉塞に関する詳細な機序を追究した論文は、検索しうる限り無い。Huangらによれば、大静脈に移植したePTFE人工血管を超音波検査で観察

したところ、吻合部に狭窄があり、狭窄した分だけ壁在血栓が形成され、内腔が狭小化していた。この部分は徐々に血栓化しさらに狭窄が進行した。つまり、人工血管および移植静脈の口径差と血栓形成傾向には関連性があることを示した[81]。本研究では、SF人工血管は外圧により高度に歪んだ可能性が高く、それにより早期に口径差を生じ、血栓を形成したものと考えられた。また、図24から示唆されるように、native後大静脈と人工血管に根本的な口径差があった可能性も否定できず、血栓形成を助長した可能性が考えられた。吻合方法を結節縫合から連続縫合に切り替えたことも吻合部の相対的狭窄を惹起する原因となった可能性がある。リング付きePTFE人工血管が低圧系の静脈に対して有効だとする報告が存在するが[3, 25, 82, 83]、これらによれば、呼吸により大きく変化する腹腔内圧に抵抗できる強度を併せ持つ人工血管でなければ、低圧系の静脈に移植した際に血管構造が崩れ、口径差が生じ、血栓閉塞するという論拠である。動脈置換の場合は、血圧が腹腔内圧よりも高いため、外からの圧力により変形・歪みを来す可能性は少ない[22]。SF人工血管は透水率が高く、組織定着、生体適合性に関しては既存の人工血管よりも優れているが、構造的強度が劣るため、中型動物への移植実験において、現段階では人工血管に歪みが発生し、血栓形成を来すものと考えられた。特に、ビーグルは咆哮時に腹腔内圧が15-20mmHg程度上昇することが知られており、小動物と比較して

腹腔内圧の変化が大きいことが想定され、静脈系への影響は大きいものと考えられた[84]。しかしながら、Silk Fibroin はその生化学的構造制限からいわゆる crimping (蛇腹加工)や、リング付加といった方法を採用できないため、別方法による構造強化を検討する必要がある。

また、ラットとビーグルの動物種差による影響も多分に関与している可能性も考えられた。一般にラットの循環血漿量は約 68ml/kg に対し、ビーグルは約 85ml/kg と言われ、ビーグルの方が容量血管である静脈系の血管床が広いことを意味し、より大きな側副血行路を形成している可能性を示している。これはすなわちビーグル静脈系の易血栓形成性を示唆している可能性がある[85]。また、種々の動物に対する prothrombin time および activated partial thromboplastin time の報告によれば、ビーグルの平均値は 5.7 秒、12.6 秒であり、ラットの平均値は 13.1 秒、23.8 秒であった。参考としてヒトでは約 10 秒、約 30 秒であることから、2 種の凝固系に関して言えばビーグルがより凝固系亢進傾向があり、ラットの方がヒトに近い凝固系と言える。もちろん生体の凝固カスケードは他の因子の影響も受けるためこれで全てを説明できるわけではないが、いわゆる外因子阻害による抗凝固療法はビーグル移植の結果を向上させる可能性があると考えられた[86]。

SF 人工血管の中型動物静脈への移植を成功させるために、根本的な SF 人工血管の構造的強度の増加が必要と考えられた。Fukayama らは、SF 水溶液の濃度を変えることで、透水率および細胞浸透の程度、構造的強度が変わることを報告した[47]。本実験は 2% SF 水溶液を用いているが、より濃度の高い SF 水溶液を用いることで構造的強度を高めることが可能となる。コーティング内容を変更することも今後の課題の 1 つである。Tanaka らの報告によれば、既存の Polyethylene 人工血管のコーティングに使用されているゼラチンは、透水率および組織浸透の面からは SF 水溶液に劣り、また異種抗原による感染の懸念がぬぐい切れないものの、より高い構造的強度を得ることが可能となる[67]。

本研究の限界を挙げる。1 点目、本研究の開存期間は 1 ヶ月でのみ評価している点である。現在、次段階として移植後長期間の開存性評価を施行中である。2 点目、抗感染性として漿膜化の可能性が見いだされたが、感染への抵抗性か存在するか直接的な検証を施行していない点である。移植された人工血管に対する細菌株投与など、新たな実験系にて抗感染性を評価することが必要と考えられる。3 点目、中口径人工血管の静脈移植に対しては、構造強度を高めた SF 人工血管の移植実験を行うとともに、既存の人工血管(ePTFE 人工血管および Polyethylene 人工血管)の移植後評価が必要である。

第六章 結語

本研究は、SF 人工血管における静脈移植後の経過を観察した世界初の報告である。小動物に対する小口径人工血管の開存率は既存の人工血管と比較して劣らぬ結果が確認された。また、膠原繊維、内皮細胞、中皮細胞といった本来の血管としての機能を提供する支持細胞の定着が確認され、細胞定着の足場としての優れたバイオマテリアルであることが改めて確認された。このことは、今後の更なる検証を重ねた後に、肝胆膵外科領域の静脈再建として用いられるだけでなく、心臓外科領域、形成外科領域などで行われる小口径動脈置換、リンパ管置換などにも応用可能であるかもしれない。しかしながら、中口径の SF 人工血管の静脈移植では満足な開存結果が得られず、人工血管は腹腔内圧により歪みを呈し、内腔は血栓で閉塞した。今後、静脈移植を成功させるため、特徴的な生体適合性を失うことなく、構造的強度を保つような、Silk Fibroin の編み方、織り方の改良、コーティング材料の再検討が必要と考えられた。

引用文献

1. Nakamura S, Sakaguchi S, Kitazawa T, Suzuki S, Koyano K, Muro H: **Hepatic vein reconstruction for preserving remnant liver function.** *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 1990, **125**(11):1455-1459.
2. Sano K, Makuuchi M, Miki K, Maema A, Sugawara Y, Imamura H, Matsunami H, Takayama T: **Evaluation of hepatic venous congestion: proposed indication criteria for hepatic vein reconstruction.** *Annals of surgery* 2002, **236**(2):241-247.
3. Azoulay D, Andreani P, Maggi U, Salloum C, Perdigao F, Sebah M, Lemoine A, Adam R, Castaing D: **Combined liver resection and reconstruction of the supra-renal vena cava: the Paul Brousse experience.** *Annals of surgery* 2006, **244**(1):80-88.
4. Hashimoto T, Minagawa M, Aoki T, Hasegawa K, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N: **Caval invasion by liver tumor is limited.** *Journal of the American College of Surgeons* 2008, **207**(3):383-392.
5. Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Miyazaki M: **Results of surgical treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma and clinicopathological factors influencing survival.** *The British journal of surgery*

- 2002, **89**(12):1525-1531.
6. Makowiec F, Bronsert P, Klock A, Hopt UT, Neeff HP: **Prognostic influence of hepatic margin after resection of colorectal liver metastasis: role of modern preoperative chemotherapy.** *International journal of colorectal disease* 2018, **33**(1):71-78.
 7. Ko S, Kirihataya Y, Matsusaka M, Mukogawa T, Ishikawa H, Watanabe A: **Parenchyma-Sparing Hepatectomy with Vascular Reconstruction Techniques for Resection of Colorectal Liver Metastases with Major Vascular Invasion.** *Annals of surgical oncology* 2016, **23**(Suppl 4):501-507.
 8. Yamamoto M, Akamatsu N, Hayashi A, Togashi J, Sakamoto Y, Tamura S, Hasegawa K, Fukayama M, Makuuchi M, Kokudo N: **Safety and efficacy of the venous reconstruction in liver resection using cryopreserved homologous veins.** *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences* 2017.
 9. Mise Y, Hasegawa K, Satou S, Aoki T, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N: **Venous reconstruction based on virtual liver resection to avoid congestion in the liver remnant.** *The British journal of surgery* 2011, **98**(12):1742-1751.
 10. Hemming AW, Reed AI, Langham MR, Fujita S, van der Werf WJ, Howard RJ:

- Hepatic vein reconstruction for resection of hepatic tumors.** *Annals of surgery* 2002, **235**(6):850-858.
11. Strobel O, Neoptolemos J, Jager D, Buchler MW: **Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery.** *Nature reviews Clinical oncology* 2018.
 12. Chua TC, Saxena A: **Extended pancreaticoduodenectomy with vascular resection for pancreatic cancer: a systematic review.** *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2010, **14**(9):1442-1452.
 13. Alemi F, Rocha FG, Helton WS, Biehl T, Alseidi A: **Classification and techniques of en bloc venous reconstruction for pancreaticoduodenectomy.** *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2016, **18**(10):827-834.
 14. Maeta T, Ebata T, Hayashi E, Kawahara T, Mizuno S, Matsumoto N, Ohta S, Nagino M: **Pancreatoduodenectomy with portal vein resection for distal cholangiocarcinoma.** *The British journal of surgery* 2017, **104**(11):1549-1557.
 15. Lee DY, Mitchell EL, Jones MA, Landry GJ, Liem TK, Sheppard BC, Billingsley KG, Moneta GL: **Techniques and results of portal vein/superior mesenteric vein reconstruction using femoral and saphenous vein during**

- pancreaticoduodenectomy.** *Journal of vascular surgery* 2010, **51**(3):662-666.
16. Fleming JB, Barnett CC, Clagett GP: **Superficial femoral vein as a conduit for portal vein reconstruction during pancreaticoduodenectomy.** *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 2005, **140**(7):698-701.
17. Hwang S, Lee SG, Park KM, Kim KH, Ahn CS, Moon DB, Ha TY: **Quilt venoplasty using recipient saphenous vein graft for reconstruction of multiple short hepatic veins in right liver grafts.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2005, **11**(1):104-107.
18. Uchiyama H, Shirabe K, Yoshizumi T, Ikegami T, Soejima Y, Taketomi A, Kayashima H, Morita K, Maehara Y: **Use of an internal jugular vein graft for middle hepatic vein tributary reconstruction in right-lobe living-donor liver transplantation.** *Transplantation* 2012, **94**(2):e17-18.
19. Akamatsu N, Sugawara Y, Nagata R, Kaneko J, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N: **Adult right living-donor liver transplantation with special reference to reconstruction of the middle hepatic vein.** *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2014, **14**(12):2777-2787.

20. Yamamoto M, Akamatsu N, Aoki T, Sakamoto Y, Tamura S, Hasegawa K, Kokudo N: **Safety and efficacy of cryopreserved homologous veins for venous reconstruction in pancreatoduodenectomy.** *Surgery* 2016.
21. Brown KE, Heyer K, Rodriguez H, Eskandari MK, Pearce WH, Morasch MD: **Arterial reconstruction with cryopreserved human allografts in the setting of infection: A single-center experience with midterm follow-up.** *Journal of vascular surgery* 2009, **49**(3):660-666.
22. Stansel HC, Jr.: **SYNTHETIC INFERIOR VENA CAVA GRAFTS. INFLUENCE OF INCREASED FLOW.** *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 1964, **89**:1096-1101.
23. Illuminati G, Calio FG, D'Urso A, Giacobbi D, Papaspyropoulos V, Ceccanei G: **Prosthetic replacement of the infrahepatic inferior vena cava for leiomyosarcoma.** *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 2006, **141**(9):919-924; discussion 924.
24. Seligsohn U, Lubetsky A: **Genetic susceptibility to venous thrombosis.** *The New England journal of medicine* 2001, **344**(16):1222-1231.
25. Hsu SC, Thorat A, Yang HR, Poon KS, Li PC, Yeh CC, Chen TH, Jeng LB: **Assessing the Safety of Expanded Polytetrafluoroethylene Synthetic Grafts**

- in Living Donor Liver Transplantation: Graft Migration Into Hollow Viscous Organs - Diagnosis and Treatment Options.** *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2017, **23**:3284-3292.
26. Chandrasegaram MD, Eslick GD, Lee W, Brooke-Smith ME, Padbury R, Worthley CS, Chen JW, Windsor JA: **Anticoagulation policy after venous resection with a pancreatectomy: a systematic review.** *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2014, **16**(8):691-698.
27. Smoot RL, Christein JD, Farnell MB: **Durability of portal venous reconstruction following resection during pancreaticoduodenectomy.** *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2006, **10**(10):1371-1375.
28. Casali RE, Tucker WE, Thompson BW, Read RC: **Infected prosthetic grafts.** *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 1980, **115**(5):577-580.
29. Yi NJ, Suh KS, Lee HW, Cho EH, Shin WY, Cho JY, Lee KU: **An artificial vascular graft is a useful interpositional material for drainage of the right anterior section in living donor liver transplantation.** *Liver transplantation :*

- official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2007, **13**(8):1159-1167.
30. Rawson TM, Lee MJ, Renton S, Buckley J: **The need for a validated pathway for the diagnosis and management of prosthetic vascular graft infection.** *Journal of vascular surgery* 2014, **60**(2):551.
31. Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL: **Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments.** *Biomaterials* 2002, **23**(20):4131-4141.
32. Asakura T, Tanaka C, Yang M, Yao J, Kurokawa M: **Production and characterization of a silk-like hybrid protein, based on the polyalanine region of Samia cynthia ricini silk fibroin and a cell adhesive region derived from fibronectin.** *Biomaterials* 2004, **25**(4):617-624.
33. Asakura T, Kaplan DL: **Silk Production and Processing.** *In Encyclopedia of Agricultural Science; Arutzen, C J, Ed; Academic Press: New York* 1994, **4**:1-11.
34. Thurber AE, Omenetto FG, Kaplan DL: **In vivo bioresponses to silk proteins.** *Biomaterials* 2015, **71**:145-157.
35. Minoura N, Aiba S, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y: **Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin.** *Biochemical and biophysical*

- research communications* 1995, **208**(2):511-516.
36. Correia C, Bhumiratana S, Yan LP, Oliveira AL, Gimble JM, Rockwood D, Kaplan DL, Sousa RA, Reis RL, Vunjak-Novakovic G: **Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells.** *Acta biomaterialia* 2012, **8**(7):2483-2492.
37. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL: **Silk-based biomaterials.** *Biomaterials* 2003, **24**(3):401-416.
38. Chen F, Porter D, Vollrath F: **Structure and physical properties of silkworm cocoons.** *Journal of the Royal Society, Interface* 2012, **9**(74):2299-2308.
39. Vepari C, Kaplan DL: **Silk as a Biomaterial.** *Progress in polymer science* 2007, **32**(8-9):991-1007.
40. Asakura T, Tanaka T, Tanaka R: **Advanced Silk Fibroin Biomaterials and Application to Small-Diameter Silk Vascular Grafts.** *ACS Biomater Sci Eng* 2019:5561-5577.
41. Melke J, Midha S, Ghosh S, Ito K, Hofmann S: **Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering.** *Acta biomaterialia* 2016, **31**:1-16.
42. Shitole M, Dugam S, Tade R, Nangare S: **Pharmaceutical applications of silk sericin.** *Annales pharmaceutiques francaises* 2020.

43. Kunz RI, Brancalhão RM, Ribeiro LF, Natali MR: **Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications.** *BioMed research international* 2016, **2016**:8175701.
44. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, Zichner L, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL: **The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo.** *Biomaterials* 2005, **26**(2):147-155.
45. Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Takahashi R, Takabayashi C, Asakura T, Sata M: **Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material.** *Journal of vascular surgery* 2010, **51**(1):155-164.
46. Yagi T, Sato M, Nakazawa Y, Tanaka K, Sata M, Itoh K, Takagi Y, Asakura T: **Preparation of double-raschel knitted silk vascular grafts and evaluation of short-term function in a rat abdominal aorta.** *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 2011, **14**(2):89-99.
47. Fukayama T, Ozai Y, Shimokawadoko H, Aytemiz D, Tanaka R, Machida N, Asakura T: **Effect of fibroin sponge coating on in vivo performance of knitted silk small diameter vascular grafts.** *Organogenesis* 2015, **11**(3):137-

- 151.
48. Haga M, Yamamoto S, Okamoto H, Hoshina K, Asakura T, Watanabe T:
Histological Reactions and the In Vivo Patency Rates of Small Silk Vascular Grafts in a Canine Model. *Annals of vascular diseases* 2017, **10(2)**:132-138.
49. Losi P, Lombardi S, Briganti E, Soldani G: **Luminal surface microgeometry affects platelet adhesion in small-diameter synthetic grafts.** *Biomaterials* 2004, **25(18)**:4447-4455.
50. Sarkar S, Sales KM, Hamilton G, Seifalian AM: **Addressing thrombogenicity in vascular graft construction.** *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2007, **82(1)**:100-108.
51. Makaya K, Terada S, Ohgo K, Asakura T: **Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage formation.** *Journal of bioscience and bioengineering* 2009, **108(1)**:68-75.
52. Aytemiz D, Sakiyama W, Suzuki Y, Nakaizumi N, Tanaka R, Ogawa Y, Takagi Y, Nakazawa Y, Asakura T: **Small-diameter silk vascular grafts (3 mm diameter) with a double-raschel knitted silk tube coated with silk fibroin sponge.** *Advanced healthcare materials* 2013, **2(2)**:361-368.

53. Tanaka T, Uemura A, Tanaka R, Tasei Y, Asakura T: **Comparison of the knitted silk vascular grafts coated with fibroin sponges prepared using glycerin, poly(ethylene glycol diglycidyl ether) and poly(ethylene glycol) as porogens.** *Journal of biomaterials applications* 2018, **32**(9):1239-1252.
54. 玉田 靖: バイオマテリアルとしてのシルク利用. *日本ゴム協会誌* 2014, **87**(10):428-433.
55. **ISO 7198: 2016 Cardiovascular implants and extracorporeal systems - Vascular prostheses - Tubular vascular grafts and vascular patches.** 2016.
56. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F: **The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future.** *Tissue engineering Part B, Reviews* 2016, **22**(1):68-100.
57. de Leval MR, McKay R, Jones M, Stark J, Macartney FJ: **Modified Blalock-Taussig shunt. Use of subclavian artery orifice as flow regulator in prosthetic systemic-pulmonary artery shunts.** *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1981, **81**(1):112-119.
58. Hwang SD, Lee JH, Lee SW, Kim JK, Kim MJ, Song JH: **Comparison of ultrasound scan blood flow measurement versus other forms of surveillance in the thrombosis rate of hemodialysis access: A systemic review and meta-**

- analysis.** *Medicine* 2018, **97**(30):e111194.
59. Sugawara Y, Makuuchi M, Sano K, Imamura H, Kaneko J, Ohkubo T, Matsui Y
Kokudo N: **Vein reconstruction in Modified Right Liver Graft for Living
Donor Liver Transplantation.** *Annals of Surgery* 2003, **237**(2):180-185.
60. De Bakey ME: **Successful resection of aneurysm of distal aortic arch and
replacement by graft.** *Journal of the American Medical Association* 1954,
155(16):1398-1403.
61. Schroeder TV, Eldrup N, Just S, Hansen M, Nyhuus B, Sillesen H: **Dilatation of
aortic grafts over time: what to expect and when to be concerned.** *Seminars
in vascular surgery* 2009, **22**(2):119-124.
62. Madhavan K, Elliott WH, Bonani W, Monnet E, Tan W: **Mechanical and
biocompatible characterizations of a readily available multilayer vascular
graft.** *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*
2013, **101**(4):506-519.
63. Ueberrueck T, Zippel R, Tautenhahn J, Gastinger I, Lippert H, Wahlers T:
**Vascular graft infections: in vitro and in vivo investigations of a new
vascular graft with long-term protection.** *Journal of biomedical materials
research Part B, Applied biomaterials* 2005, **74**(1):601-607.

64. Bordenave L, Caix J, Basse-Cathalinat B, Baquey C, Midy D, Baste JC, Constans H: **Experimental evaluation of a gelatin-coated polyester graft used as an arterial substitute.** *Biomaterials* 1989, **10**(4):235-242.
65. Huang F, Sun L, Zheng J: **In vitro and in vivo characterization of a silk fibroin-coated polyester vascular prosthesis.** *Artificial organs* 2008, **32**(12):932-941.
66. CDRH: **Guidance for industry and FDA staff guidance document for vascular prostheses.** 1999.
67. Tanaka T, Tanaka R, Ogawa Y, Takagi Y, Asakura T: **Development of Small-diameter Polyester Vascular Grafts Coated with Silk Fibroin Sponge.** *Organogenesis* 2020, **16**(1):1-13.
68. Soyer T, Lempinen M, Cooper P, Norton L, Eiseman B: **A new venous prosthesis.** *Surgery* 1972, **72**(6):864-872.
69. Stewart AH, Evers PS, Earnshaw JJ: **Prevention of infection in peripheral arterial reconstruction: a systematic review and meta-analysis.** *Journal of vascular surgery* 2007, **46**(1):148-155.
70. Lawless CE, Smith EE, Hallidie-Smith K, Sapsford RN: **The modified blalock-taussig shunt using microporous expanded polytetrafluoroethylene (PTFE).**

- The Journal of cardiovascular surgery* 1982, **23**(4):287-292.
71. Yuan SM, Shinfeld A, Raanani E: **The Blalock-Taussig shunt.** *Journal of cardiac surgery* 2009, **24**(2):101-108.
72. Ushiki T: **Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint.** *Archives of histology and cytology* 2002, **65**(2):109-126.
73. Chlupac J, Filova E, Bacakova L: **Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery.** *Physiological research* 2009, **58 Suppl 2**:S119-139.
74. Singh G, Cordero J, Wiles B, Tembelis MN, Liang KL, Rafailovich M, Simon M, Khan SU, Bui DT, Dagum AB: **Development of In Vitro Bioengineered Vascular Grafts for Microsurgery and Vascular Surgery Applications.** *Plastic and reconstructive surgery Global open* 2019, **7**(5):e2264.
75. Fukayama T, Ozai Y, Shimokawatoko H, Kimura Y, Aytemiz D, Tanaka R, Machida N, Asakura T: **Evaluation of endothelialization in the center part of graft using 3 cm vascular grafts implanted in the abdominal aortae of the rat.** *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 2017, **20**(3):221-229.

76. Piardi T, Lhuairé M, Bruno O, Memeo R, Pessaux P, Kianmanesh R, Sommacale D: **Vascular complications following liver transplantation: A literature review of advances in 2015.** *World J Hepatol* 2016, **8**(1):36-57.
77. Ordóñez NG: **Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker.** *Advances in anatomic pathology* 2006, **13**(2):83-88.
78. Wicki A, Christofori G: **The potential role of podoplanin in tumour invasion.** *British journal of cancer* 2007, **96**(1):1-5.
79. Mutsaers SE: **Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair.** *Respirology (Carlton, Vic)* 2002, **7**(3):171-191.
80. Akiyama T, Miyamoto H, Yonekura Y, Tsukamoto M, Ando Y, Noda I, Sonohata M, Mawatari M: **Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has in vivo antibacterial activity in the rat tibia.** *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2013, **31**(8):1195-1200.
81. Hwang S, Jung DH, Ha TY, Ahn CS, Moon DB, Kim KH, Song GW, Park GC, Jung SW, Yoon SY: **Usability of ringed polytetrafluoroethylene grafts for middle hepatic vein reconstruction during living donor liver transplantation.** *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver*

- Transplantation Society* 2012, **18**(8):955-965.
82. Quinones-Baldrich W, Alktaifi A, Eilber F, Eilber F: **Inferior vena cava resection and reconstruction for retroperitoneal tumor excision.** *Journal of vascular surgery* 2012, **55**(5):1386-1393; discussion 1393.
83. Park GC, Hwang S, Ha TY, Song GW, Jung DH, Ahn CS, Moon DB, Kim KH, Yoon YI, Cho HD: **Hemashield Vascular Graft Is a Preferable Prosthetic Graft for Middle Hepatic Vein Reconstruction in Living Donor Liver Transplantation.** *Annals of transplantation* 2019, **24**:639-646.
84. Swalec KM, Smeak DD, Brown J: **Effects of mechanical and pharmacologic manipulations on portal pressure, central venous pressure, and heart rate in dogs.** *American journal of veterinary research* 1991, **52**(8):1327-1335.
85. 野田 勉, 山田 明, 森田 茂, 大垣 寿, 清水 充: **ラットの血液, 血清成分および臓器重量の統計学的解析.** *生活衛生* 1986, **30**(3):133-141.
86. Sekita K: **Reliability of Automatic Blood Coagulometer (KC-10) on Some Species of Experimental Animals.** *Experimental Animals* 1985, **34**(3):319-322.

本研究の公表について

本研究の結果は以下の形で公表した

- 1) Kiritani S, Kaneko J, Asakura T, Tanaka T, Tanaka R, Hasegawa K. **Silk fibroin vascular graft: a new option for hepato-biliary-pancreatic surgery with venous replacement.** *Scientific Reports* 2020, 10(1): 21041

- 2) 第 22 回外科分子細胞治療研究会

「静脈用に特化した絹フィブロイン人工血管の開発」

共著者：金子順一, 伊藤大介, 田中隆志, 田中綾, 朝倉哲郎, 長谷川潔

謝辞

指導教官として直接、多岐にわたり御指導くださりました東京大学大学院医学系研究科肝胆膵・人工臓器移植外科 長谷川潔教授に深く感謝の意を表します。

研究を直接ご指導頂いた東京大学大学院医学系研究科肝胆膵・人工臓器移植外科 金子順一講師に深く感謝の意を表します。

本研究における技術面に関してご指導およびご協力頂きました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座 飯田拓也准教授、および東京農工大学グローバルイノベーション研究院 田中綾教授、田中隆志先生に深く感謝いたします。

本研究の病理学的評価につきご指導くださりました東京大学医学部附属病院病理部 田中麻里子助教に深く感謝致します。

最後に、本研究を行うに当たり、人工血管の開発・物理学的評価をはじめ本研究全体を通して多大なご協力・ご指導を賜りました東京農工大学工学部生命工学部 朝倉哲郎名誉教授に心より感謝申し上げます。