

論文の内容の要旨

論文題目 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
氏名 桐谷 翔

近年の肝胆膵外科学の発展により、静脈浸潤を伴う肝胆膵進行悪性腫瘍に対し、静脈合併切除を伴う拡大手術が安全に行われるようになり、良好な予後が報告されるようになった。静脈切除による術後の重篤な臓器障害を予防するため、積極的な静脈再建術が行われる。切除静脈が広範となった場合は代替血管を間置して再建を施行することになる。現在、最も多く用いられる代替血管は自己静脈（大伏在静脈、腎静脈など）である。これらは生きた静脈組織そのものであり、高い開存率が期待できるが、自己静脈を摘出するための手術時間延長、手術侵襲増大がデメリットである。心停止後に摘出される同種凍結保存静脈が使用されることもある。これは汎用性が高く、高い開存率も報告されているが、現在の日本では全施設で安定した使用状況には至っていない。ポリエチレンやポリテトラフルオロエチレンなどの合成素材を基盤とした人工血管が使用されることもある。これらは高い汎用性が最大のメリットだが、静脈移植に関しては使用経験が豊富とは言えず、開存率については不明である。代替血管に必要な要素として、高い開存性、汎用性が挙げられるが、特に肝胆膵領域を含む消化器外科手術では腸液汚染に晒されることが多く、高い抗感染性も要求される。これら全てを兼ね備えた人工血管の開発により、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。

「絹」は、外科用縫合糸として古くから医療現場で頻用されてきた。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バイオマテリアルである。共同研究者である朝倉らは、絹の主要な繊維であるシルクフィブロイン（Silk Fibroin: SF）を精練により抽出し、それを編むことによって新しい人工血管を作製した。この人工血管を小動物の動脈へ移植し、良好な開存性を報告した。また、内皮細胞や平滑筋などの生体組織が人工血管内部へ定着する様子を報告した。SF 自体に抗感染性を示唆する報告もあり、これらは静脈再建に対する使用可能性を支持する所見と考えられた。このような背景の下、まず研究 1 として SF を基盤とした人工血管を新規に作製し、研究 2 および研究 3 では実際に動物の静脈への移植を試みた。開存性および病理学的変化を観察し、ヒト静脈再建への使用可能性について追究した。

本研究で作製された SF 人工血管を電子顕微鏡で観察すると、繊維間の小孔が無数に確認でき、そのまま使用すると人工血管壁からの著明な出血を来す。そこで水溶性材によって人工血管をコーティングすることが肝要である。既存の人工血管ではウシコラーゲン由来のゼラチンなどが頻繁に使用されるが、異物反応や感染症の問題が指摘されることがある。本研究では、SF を溶解して作製した水溶性 SF をコーティング材料とした。既報によれば水溶性 SF によるコーティングは、より早い生体組織定着が得られるとされる。作製された SF 人工血管

に対し、人工血管の初期性能評価方法の国際ガイドライン(ISO 7198)に則って、吻合保持強度試験、周軸強度試験、圧縮弾性率試験、透水量測定を行った。結果はそれぞれ 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。既に保険承認を受けているポリエステル基盤の人工血管の参考値と比較すると、SF人工血管の周軸強度は約 1/2、弾性率は約 1/20、透水量は約 5 倍であった。つまり、構造強度としては、ポリエステル製人工血管よりも低下するが、透水量を高く保ち、これが既報における高い生体組織の定着を可能にしたものと考えられた。

研究 2 では、内腔 3mm 径の小口径 SF 人工血管をラットの後大静脈へ移植した。まず、SF 繊維を、ダブルラッセル機を用いて、ダブルバーコード法により編み進め人工血管の基盤となる筒状構造を作製した。繊維を編み込んで作製した筒状構造は、

作製された SF 人工血管を 1cm 長にトリミングし、ラットの後大静脈へ移植した。コントロールとして、実臨床で使用経験のある同径の expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) 製人工血管を準備し、同じく 1cm 長にトリミングしてラットに移植した。SF 人工血管は 19 例、ePTFE 人工血管は 10 例のラットに移植した。どちらもハンドリングには問題がなく、本実験を開始してから手技操作に伴う術中死や術後の主要な合併症発生を認めなかった。実際の移植では、後大静脈を血流遮断した後に、SF 人工血管、ePTFE 人工血管ともに 9-0 ナイロン糸による単結節縫合で吻合をした。吻合時間は 2 群間で有意差を認めなかった。吻合終了後、後大静脈の遮断を解除すると、SF 人工血管壁からはわずかに血液成分の漏出があり、人工血管は肉眼的に白色から赤色へと変化した。しかし、出血は圧迫によって容易にコントロールされた。術後、人工血管の開存率を腹部超音波検査によって評価し、移植 1 ヶ月後の 2 群間の開存率を比較した。SF 人工血管の 1 ヶ月開存率は 94.7% (18/19 例) であり、ePTFE 人工血管の同期間開存率は 80.0% (8/10 例) であった。開存率としては SF 人工血管の方が高い傾向があったが、Log-rank 検定では $p=0.358$ と有意差は認められなかった。1 ヶ月開存人工血管に対して、種々の病理染色を行い、人工血管性状の変化を観察した。SF 人工血管に対する Hematoxylin and Eosin 染色では、SF 繊維が確認され、繊維間スペースに生体組織の侵入が確認された。人工血管壁の最内層には扁平細胞が全周性に存在し、内腔の開存が確認された。また、人工血管の最外層にも扁平細胞の存在が認められた。一方、ePTFE 人工血管内部への生体成分の浸透は認められず、内腔は開存していたものの、フィブリンが蓄積しており、扁平細胞による内部からの裏打ちは確認されなかった。Elastica van Gieson 染色では、SF 繊維の間に浸透した組織は主に膠原繊維であり、構造的強度を支持していることが判明した。また、抗 α SMA 抗体染色では、SF 人工血管に少量の平滑筋が定着していることが判明した。さらに、抗 CD31 抗体染色では、SF 人工血管の最内層に認められた扁平細胞が陽性であり、全周性に内皮細胞が定着していることが判明した。最後に抗ポドプラニン抗体染色を施行したところ、最外層に認められた扁平細胞が弱陽性であり、これらは中皮細胞と考えられた。腹部臓器における最外層の中皮細胞は、すなわち漿膜を示唆する。漿膜は外部からの感染に対して抵抗性を示す組織であり、SF 人工血管の抗感染性の可能性が示唆された。

引き続き、研究3では同様の作製方法で内腔を8mm径に増大させ、中型動物の後大静脈への移植を施行した。よりヒトの生態系に近づけた環境で評価し、人工血管作製のヒントを得るための予備実験としての位置づけとした。動物種はビーグルとし、SF人工血管と、既存のPolyethylene terephthalate (PET)人工血管を3頭ずつに移植した。SF人工血管は1cm長にトリミングし、研究2と同様に端々吻合で移植した。研究3においても、ハンドリングには問題が無く、術中死亡や術後合併症は認めなかった。移植後、肉眼的には研究2と同様にSF人工血管壁からのわずかな血液漏出があり、人工血管は赤色化した。止血は容易であった。移植後の開存率に関しては、SF人工血管およびPET人工血管どちらも全例が1ヶ月未満で閉塞した。病理学的評価では、SF繊維に強い歪み・変形があり、内腔が狭窄し、内腔は血栓で充満していた。腹腔内圧等の外力により歪みが生じた人工血管内腔に血栓が形成され、閉塞に至ったものと考えられた。研究1の物性評価で示されたように、SF人工血管は生体組織の浸透が促進される一方、弾性率など強度で従来の人工血管に劣る結果であった。中型動物では、腹腔内圧の最大値がより高まるため、低圧系の静脈に移植されたSF人工血管は変形を来したと考えられた。

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。小口径人工血管の実験からは、従来の人工血管と比較して劣らぬ開存率が示された。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、実臨床に応用できるバイオマテリアルとしての可能性が示された。しかし、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、人工血管は変形を生じ、血栓閉塞した。今後、大きく変動する腹腔内圧下で開存を維持するため、本素材により得られる適度な生体組織の定着を損なうことなく、構造的強度を増加させるようなSFの編み方およびコーティングの改良を重ね、開発を進めていく必要があると考えられた。