

博士論文

ePTFE 人工血管の器質化を促進する
ハイドロゲル被覆素材の検討

松浦壮平

ePTFE 人工血管の器質化を促進する

ハイドロゲル被覆素材の検討

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 外科学専攻

指導教員 石原聡一郎教授

松浦壮平

目次

目次.....	1
略語一覧.....	2
要旨.....	3
序文.....	4
第1章 放射線架橋ゼラチン上での器質化促進の評価	
1-1 対象と方法.....	13
1-2 結果.....	25
1-3 考察.....	32
1-4 小括.....	34
第2章 放射線架橋ゼラチンコーティング ePTFE 人工血管周囲の器質化評価	
2-1 対象と方法.....	35
2-2 結果.....	45
2-3 考察.....	49
2-4 小括.....	53
結論.....	54
謝辞.....	55
引用文献.....	56

略語一覽

ePTFE: expanded polytetrafluoroethylene

PET: polyethylene terephthalate

ECM: extracellular matrix

RXgel: radiation-crosslinked gelatin hydrogel

PBS: phosphate buffer

α SMA: alpha smooth muscle actin

ROI: region of interest

HDI: hexamethylene diisocyanate

Col-III: type III collagen

NC: non-coated vascular graft group

要旨

本研究では、expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) 人工血管の外表面をコーティングすることで器質化を促進することを目的とした。第 1 章では新規加工技術を用いた放射線架橋ハイドロゲルに着目し、生体内で周囲器質化を促進することを明らかにした。第 2 章では実際に市販 ePTFE 周囲を放射線架橋ハイドロゲルでコーティングし、無コート ePTFE 人工血管と比較して周囲器質化が促進されることを明らかにした。

序文

鼠径靭帯以下の下肢動脈の血行再建では、自家静脈によるバイパス手術がガイドラインにおいても最も推奨される治療法である¹。しかし、心臓血管外科手術の既往があつて自家静脈が採取後であつたり、自家静脈が細い・閉塞しているなどの理由で使用できないことはしばしばある。また、人工透析用の内シャント造設においても、できるだけ遠位での自己血管による内シャント造設が推奨されている²が、前腕に使用可能な表在静脈がないなどの理由で困難なことも多い。

採取可能な自己血管がない大血管手術や、上記のように使用できる自家静脈がない末梢血管手術において、人工血管はしばしば使用される³。また、自家静脈採取は長大な切開創を必要とするため手術時間の延長につながり、創部トラブルも多い。人工血管はこのような問題も回避できる利点がある。近年では、金属製ステント骨格と人工血管を組み合わせたステントグラフトによる血管内治療も大血管から末梢血管まで広く使用されるようになっており、人工血管の重要性はますます高まっている。

人工血管は 1950 年頃から開発され、Voorhees らが世界で初めてパラシュートの素材を利用した人工血管の移植を報告した⁴。その後数々の改良がなされ⁵、現在では 1955 年に登場した Dacron (ポリエチレンテレフタレート; PET) と 1972 年に登場した ePTFE (延伸ポリテトラフルオロエチレン) が主な材質になっている。人工血管周囲の器質化、すなわち自己組織での被覆は、移植後に患者体内で定着する上で重要な生体反応である。かつては生体組織の侵入が容易で器質化が期待される高有孔性人工血管の開発が目指されたが、出血が重大な問題となり使用が困難であるため、現在では低有孔性の人工血管が使用されている。ePTFE は抗血栓性や開存性が高いが、人工血管周囲の器質化が乏しい。周囲組織の器質化が不十分であると、人工血管感染⁶⁻¹⁰や人工血管周囲漿液腫¹¹⁻¹⁷の形成を来す可能性があり、入院の長期化や再手術・菌血症・肢切断・死亡など重篤な事態を来すこともある。また、人工血管感染を治療するためには莫大な医療資源の投入が必要になることもしばしばある¹⁸。

人工血管周囲の器質化はこれらの予防に寄与すると考えられている。

これまでも人工血管には多くの改良がなされており、人工血管のコーティング技術はその中でも代表的である。例えば、かつては Dacron 製人工血管の血液漏出による出血が不可避であったため、事前に人工血管表面に患者血液を塗って目を詰まらせることで porosity を低下させるプレクロッティングが必要であった¹⁹⁻²¹が、人工血管壁の透過性を低下させて滲出を減少させるために Dacron 製人工血管の外表面をゼラチンやコラーゲン、アルブミンでコーティングしたもの²²⁻²⁴が現在では一般的に用いられている。また、内腔をヘパリンでコーティングすることで開存率を改善させた ePTFE 人工血管^{25,26}も市販されている。

人工血管周囲の器質化は、移植後に患者体内で定着する上で重要な生体反応である。人工血管周囲組織の器質化が不十分であると、人工血管感染⁶⁻¹⁰(図 1)や人工血管周囲漿液腫¹¹⁻¹⁷(図 2)の形成を来す可能性があり、入院の長期化や再手術・菌血症・肢切断・死亡など重篤な事態を来すこともある。また、人工血管感染を治療するためには莫大な医療資源の投入が必要になることもしばしばある¹⁸。人工血管周

囲の器質化はこれらの予防に寄与すると考えられている。しかしながら、現時点で人

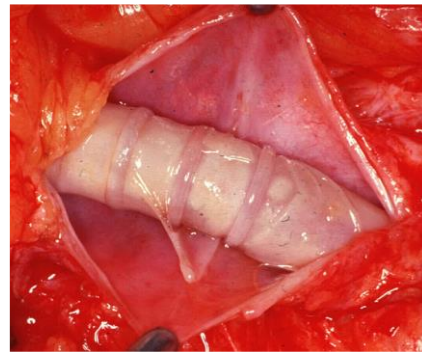
工血管周囲の器質化を促進することを目指した人工血管は市販されていない。

図 1. 人工血管感染²⁷



感染部に膿瘍を形成し、周囲皮膚の発赤を認める

図 2. 人工血管移植後漿液腫²⁸



(左) 上腕から前腕にかけて人工血管移植後。膨隆部(⇒)に漿液腫を形成している。

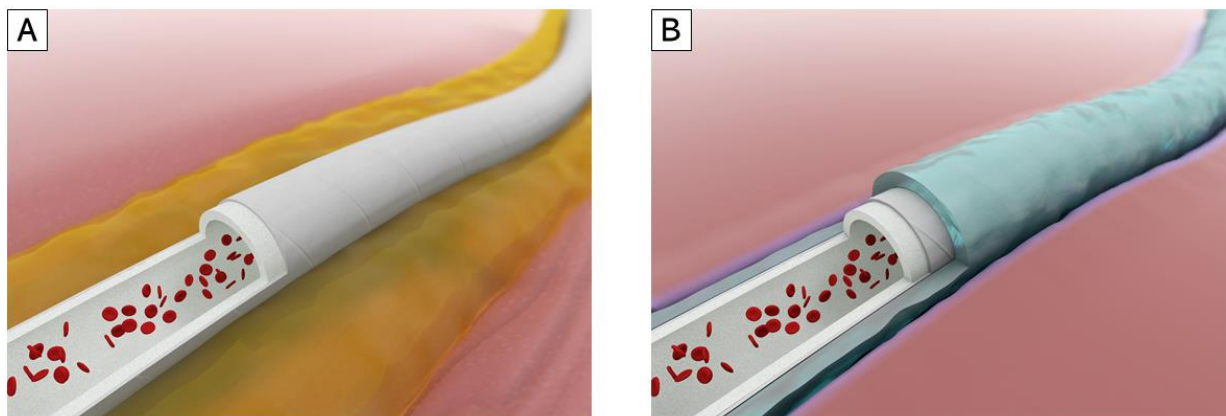
(右) 漿液腫を開放すると、人工血管と周囲組織との器質化は乏しい。

放射線架橋ハイドロゲルは生体内の細胞外マトリックス(ECM)を化学的および物理的に増殖させることができ、適切に付加することができれば人工血管周囲の器質化を促すことができる可能性のある素材である。ゼラチンはコラーゲンを精製・抽出して作られるが、ECMの主な成分でもある。ゼラチンはコラーゲンと比較すると抗原性が低く、組織の増殖と器質化を促すことで創傷治癒を促進することが知られている²⁹⁻³¹。生体内の温度ではゼラチンは融解してしまうが、放射線架橋ゼラチンは50°Cでも融解せず、細胞培養でも足場素材として使用できる。アルデヒドやカルボジイミドなど有害な薬剤を使用する他の化学架橋ハイドロゲルとは異なり、放射線架橋の際にはガンマ線や電子などの量子ビームの照射量を調整して硬さを調整することができる。これにより、生体適合性や生分解性、細胞接着能などのゼラチンの性質を失うことなく幅広い硬さに調整することができる³²⁻³⁴。これらの性質は人工血管周囲器質化を促すために有用な性質と思われた。放射線架橋ハイドロゲルは、国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学部門 高崎量子応用研究所 先端機能材料研

究部が開発した新規開発技術であり、細胞培養の足場素材としての有効性は既に報告されているが³⁴、生体内に移植したデータはなかった。

以上のような背景を踏まえ、本研究では、ePTFE 人工血管外表面を何らかの器質化促進素材によりコーティングすることで生体内での創傷治癒機転を促し、最終的には感染や漿液腫予防に資する新規人工血管の開発につながる技術を確立することを目的とした(図3)³⁵。第1章では新規加工技術である放射線架橋ハイドロゲルに着目し、細胞培養およびラット体内での挙動を観察し、放射線架橋ゼラチンが生体内で周囲器質化を促進することを明らかにした。第2章では実際に市販されている ePTFE 周囲を放射線架橋ハイドロゲルでコーティングし、無コートおよび市販のゼラチンコーティング ePTFE 人工血管とともにラット体内に移植・比較することで、放射線架橋ハイドロゲルによるコーティングが ePTFE 人工血管周囲の器質化を促進することを明らかにした。

図 3. 漿液腫およびコーティング人工血管のイメージ³⁵



(A) 人工血管周囲器質化が乏しいと、人工血管周囲に組織液が貯留する合併症である漿液腫が発生するリスクがある。図は、人工血管周囲に黄色の漿液が貯留している様子を表している。

(B) 創傷治癒を促進する足場素材である放射線架橋ゼラチンハイドロゲル(RXgel)によって人工血管をコーティングする。これにより人工血管周囲の器質化を促進できるのではないかと仮説した。図は、人工血管周囲を水色で表した RXgel でコーティングすることで漿液腫の貯留が起こらなくなるイメージを表現している。

第1章

放射線架橋ゼラチン上での器質化促進の評価

1-1 対象と方法

放射線架橋ゼラチンゲル上での線維芽細胞浸潤アッセイ

本研究では、第一に放射線架橋ゼラチンゲル(以下 RXgel)を足場素材として線維芽細胞の培養実験を行い、第二に RXgel をラット体内に移植して生分解性や器質化を評価した。動物実験のプロトコールは東京大学倫理委員会に承認(倫理審査番号 M-P 19-025)されており、東京大学の動物実験倫理のガイドラインに則って行われた。

RXgel の作成は、大山らの既報に則って行われた³³。ゼラチン(porcine skin, Type A, G1890; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)を 50℃の純水に 30 分間浸漬して溶解させ、細胞培養用の dish (φ35 mm, AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan)上に注いで 20℃で一晩ゲル化させた。このゲル入りの dish に 20℃以下の空气中で ⁶⁰Co γ-rays (⁶⁰Co No. 2; Irradiation Facility of Takasaki Advanced Radiation Research Institute,

QST)を照射し、未架橋のゼラチン成分を除去するために 50°Cのリン酸バッファー (PBS)に 2 時間浸漬させて RXgel を作成した。細胞培養に使用するため、37°C1 時間で PBS を培養液に置換した。

3 種類の硬度の RXgel を作成することとし、それぞれ照射量を 10, 15, 20 kGy として Rx[10], Rx[15], Rx[20]と呼称した。照射量が大きいほど硬い RXgel が出来上がる^{32,33} ため、数字が大きいものほど硬度が高くなっている。インデンテーションテスタ (RE2-3305B; Yamaden, Tokyo, Japan)による押込試験で評価した圧縮弾性率(ヤング率)および水含有率を表 1 に示した³⁵。

表 1. 放射線架橋ゼラチンゲル(RXgel)の物性³⁵

	Rx[10]	Rx[15]	Rx[20]
圧縮弾性率 (kPa)	23.4 ± 2.9	66.8 ± 4.8	108.3 ± 6.1
水含有率 (%)	90.4 ± 0.6	88.7 ± 0.7	88.5 ± 0.1

Rx[10]、Rx[15]、Rx[20]はそれぞれ照射量 10kGy、15Gy、20kGy で作成した RXgel である。表記はいずれも 平均値 ± 標準誤差 とした。各群 n=3 である。

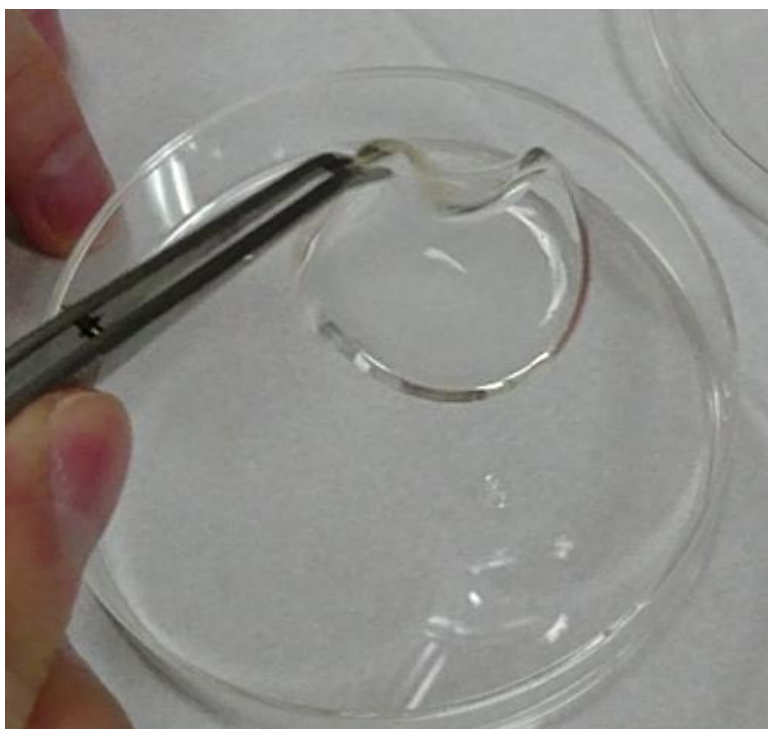
図 4. Rx[10]を鑷子で把持した様子



Rx[10]を鑷子で把持した様子。

非常に柔らかく、ディッシュから剥離して挙上するだけ操作で容易に千切れ、空中で形状が維持されない。

図 5. Rx[20]を鑷子で把持した様子



Rx[20]を鑷子で把持した様子。Rx[10]と比べると硬く、空中でも形状が保たれる。

このように用意した RXgel の上で、生体内で器質化を促進する細胞がどのような挙動を見せるか評価するために、RXgel 上での線維芽細胞の浸潤アッセイを行った。線維芽細胞は RIKEN BRC Cell Bank (Ibaraki, Japan)から入手した 3T3-Swiss albino mouse embryonic fibroblasts (RCB1642)を用い、Dulbecco's modified Eagle's medium (08488-55; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を 10% ウシ血清 (12483020; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で希釈し、100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (15140122; Thermo Fisher Scientific), and 2 mM の L-グルタミン (G7513; Sigma-Aldrich)を添加した。2mL の細胞懸濁液(1×10^4 cells/mL)を RXgel (35 mm dish, 厚さ 2 mm 以下)上に散布した。細胞は 37°C、5% CO₂ 中で培養した。

培養開始後 3 日目および 7 日目にサンプルを PBS で洗浄し、4% paraformaldehyde (163-20145; Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)で 15 分間固定した。再度 PBS で洗浄した後、細胞を 0.1% Triton X-100 (35501-02; Nacalai Tesque)添加 PBS で 5 分間 incubate し、PBS で洗浄した。続いて 0.1 µg/mL ファロイジン-テトラ

メチルローダミン B イソチオシアネート(P1951; Sigma-Aldrich)、1 µg/mL 4',6-ジアミジノ
-2-フェニルインドール (D523; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)および 1% ウ
シ血清アルブミン(P6154; Biowest, Nuaille, France)を添加した PBS で 20 分間 incubate
した。

放射線架橋ゼラチンゲルのラット体内移植後器質化評価

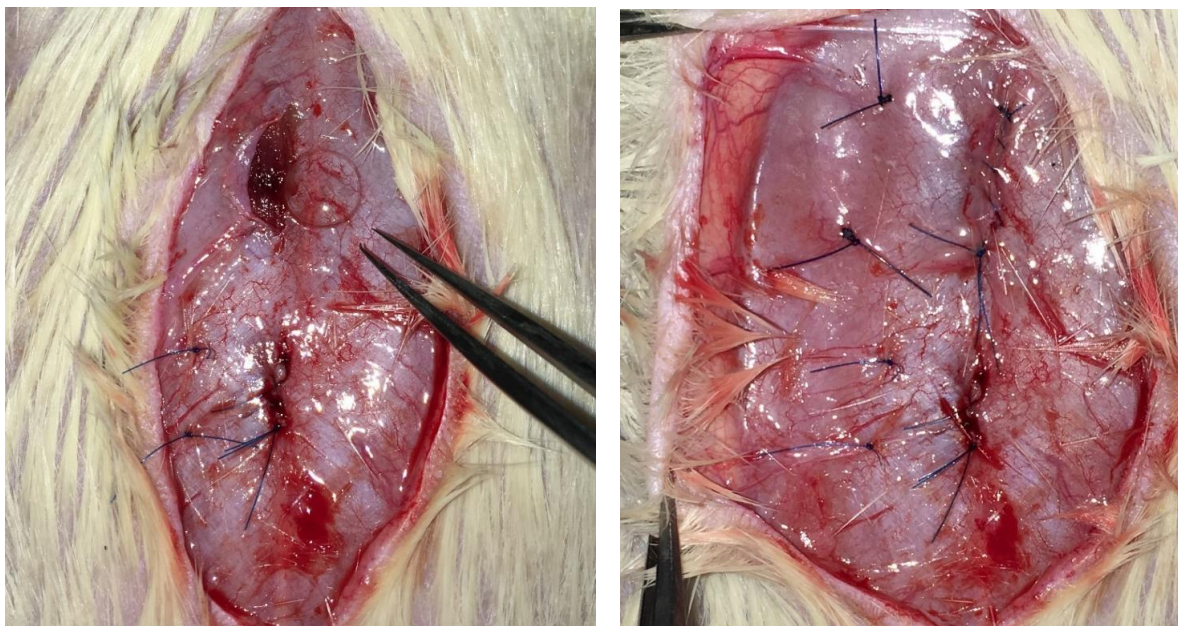
RXgel は生分解性であり、生体内で徐々に分解されて肉芽組織に置き換わって
いくことが期待されるが、*in vivo* での使用経験がなかった。RXgel の生分解性や器質化
を評価するため、Rx[10]、Rx[15]、Rx[20]をそれぞれ Sprague-Dawley ラット(週齢 12–
17 週; 400–600 g)の腹直筋筋膜下に移植して評価した。RXgel はそれぞれ厚さ 1mm
の均一なシート状に調整され、それらを 6mm 径の円盤状にくり抜いて移植した。腹直
筋筋膜下に高山らの方法 36 を参考にして 8mm 辺の正方形のポケットを作成し、そこ
に RXgel のディスクを移植した(図 6)。ラットは移植後 7 日後、10 日後、14 日後のい
ずれかに安楽死させ、20mL の 4%パラホルムアルデヒドを 120mmHg で心腔内投与

して灌流固定した。RXgel の標本は周囲組織を含めて en bloc に採取し、パラフィン固定した後に RXgel のディスクの中央に断面を入れて分割した。パラフィンブロックの断面の 5mm 厚のスライスで HE 染色すると、残存した RXgel は無構造な長方形の領域として観察された。実体顕微鏡で HE 染色標本を撮影し、残存する RXgel の断面積を ImageJ ver 1.4.3 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で測定した。移植したディスクの中央での断面積はもともと $6\mu\text{m}^2$ であることから、残存する RXgel の断面積を $6\mu\text{m}^2$ で割ることで残存率を計算した(図 7)。

また、新生血管の増殖や組織器質化の重要な因子である筋線維芽細胞の RXgel 辺縁での発現を評価するため、切片の alpha smooth muscle actin (αSMA)染色も行った。120°C、5 分間の加熱による抗原賦活化と、0.3% H_2O_2 を添加した 100% メタノールによる内因性ペルオキシダーゼ除去の後に、Histofine SAB-PO (M) kit (Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo, Japan) のブロッキング溶液に 30 分間浸漬した後に、PBS で 200 倍希釈した αSMA (M0851, Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) に

4°Cで8-24時間浸漬した。その後、Histofine キットの2次抗体と20分間、酵素試薬(ペルオキシダーゼストレプトアビシン)と10分間それぞれ反応させた後、Tris Bufferで希釈したDAB Tablet (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)溶液で7分間染色した。免疫染色標本の定量的評価として、既報の通り、染色スライドの写真を撮影し、RXgel断面の中心を中心とした500 × 1000- μm 長方形の領域(region of interest; ROI)の中で、ImageJを用いて画像を二値化(閾値180)して αSMA 陽性の領域の面積を計測し、ROIの面積で割ることで αSMA 陽性率を測定した(図8)³⁵。

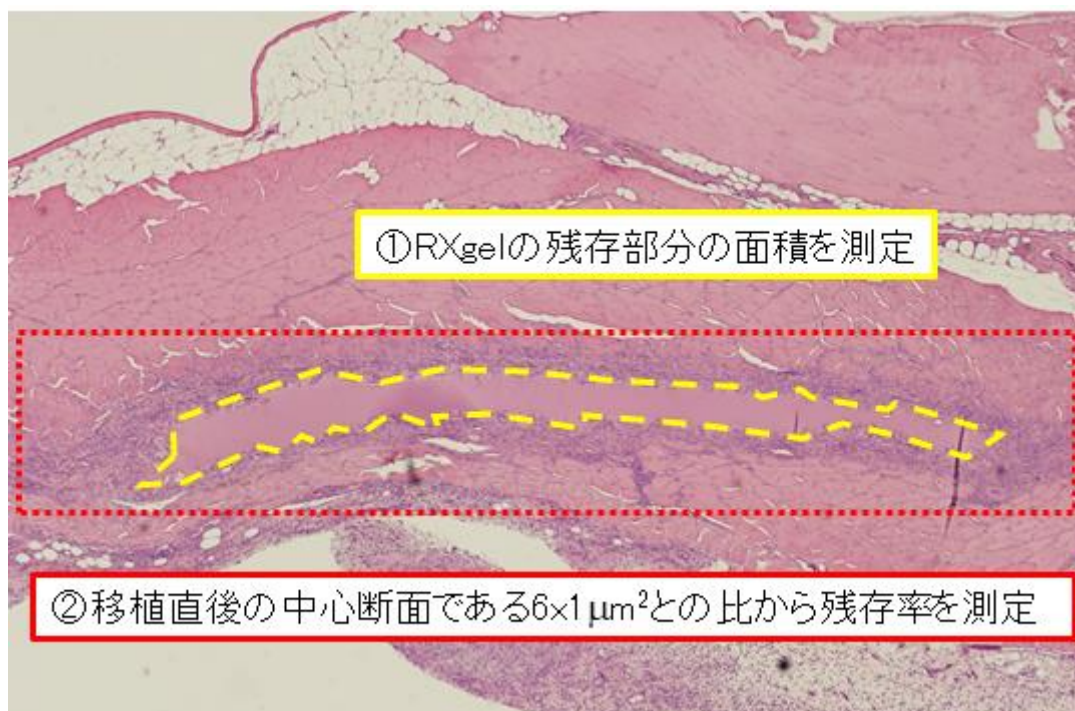
図 6. ラット腹直筋筋膜下への RXgel ディスクの移植



左:ラット腹直筋筋膜に 8mm の切開をおき、腹直筋筋膜下を剥離してポケットを作成。鑷子で示した 6mm の RXgel ディスクを作成したポケット内に移植。

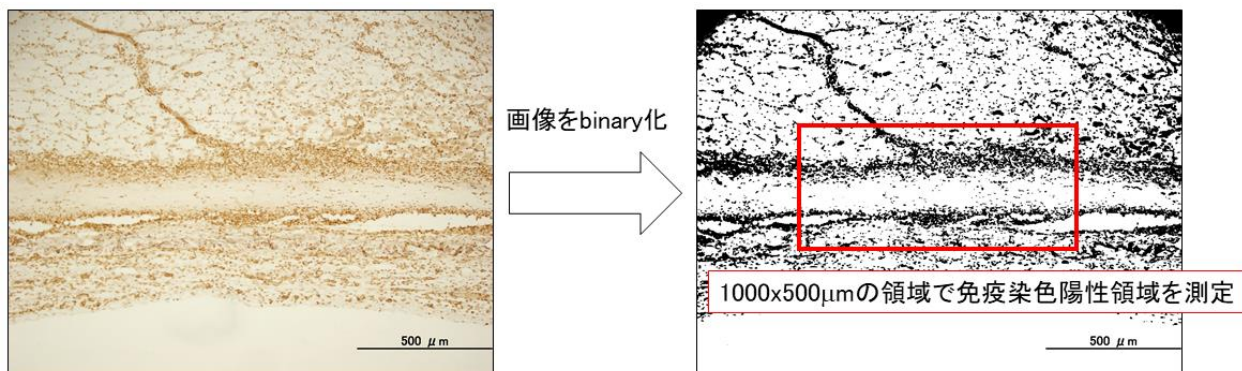
右:RXgel ディスクを移植後、切開部を縫合閉鎖。

図 7. RXgel 残存率測定



HE 染色で無構造の RXgel 残存部分(黄色破線)の面積を測定し、移植時の RXgel ディスク中央部の断面積である $6 \times 1 \mu\text{m}^2$ (赤色点線領域の面積)で割ることで RXgel の残存率を測定した。

図 8. 免疫染色陽性率測定



免疫染色画像を binary 化し、ゲル中央部を中心とした $1000 \times 500 \mu\text{m}^2$ の領域で免疫染色陽性率を測定した。

統計解析

本研究における統計学的解析は全て統計解析ソフト JMP Pro 14 statistical software

(SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。In vitro の浸潤深度の比較は Steel-

Dwass 検定、in vitro の各群の比較は対照群を設定した Dunnett検定で行った。いず

れの検定方法においても P 値 < 0.05 を統計学的有意差とした。

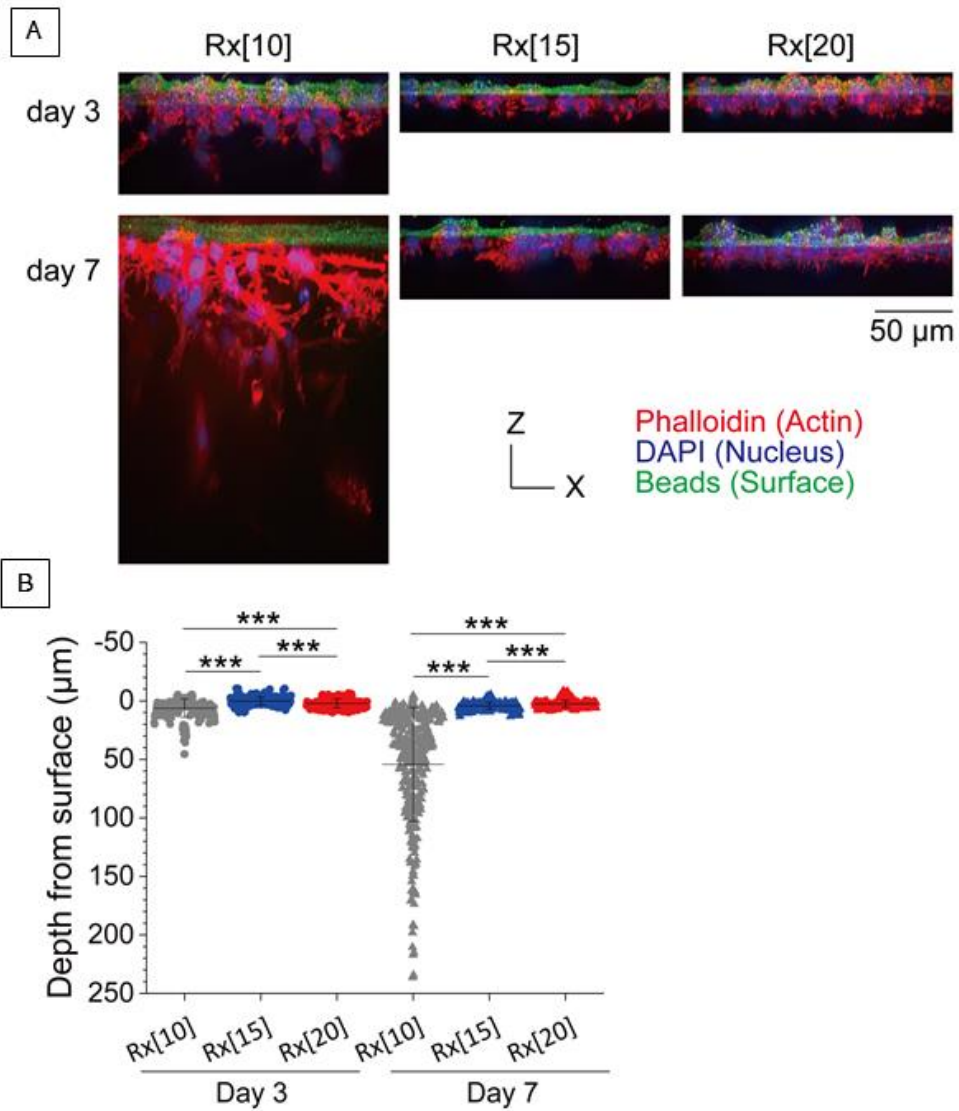
1-2 結果

RXgel 上での浸潤アッセイ

RXgel の生体内での硬度を比較するために、RX[10]、RX[15]、RX[20]それぞれの
上で線維芽細胞 (3T3-Swiss)の培養を 3 日間または 7 日間行った(浸潤アッセイ; 各
群 n=1)。3 日間 RXgel 上で培養された線維芽細胞の浸潤深度は Rx[10]、Rx[15]、
Rx[20]のそれぞれにおいて、 $6.23 \pm 7.84 \mu\text{m}$ (n = 252 cells), $0.09 \pm 3.43 \mu\text{m}$ (n = 251
cells), $2.19 \pm 3.84 \mu\text{m}$ (n = 216 cells)であった。また、7 日目においてはそれぞれ、 54.23
 $\pm 48.65 \mu\text{m}$ (n = 294 cells), $4.13 \pm 3.11 \mu\text{m}$ (n = 263 cells), $2.48 \pm 2.95 \mu\text{m}$ (n = 344 cells)
であった³⁵。

全ての群で垂直方向の浸潤が観察され、RX[10]の標本は他の群と比較して有意に浸
潤深度が深かった ($P < 0.0005$) (図 9)³⁵。

図 9. 浸潤アッセイ³⁵

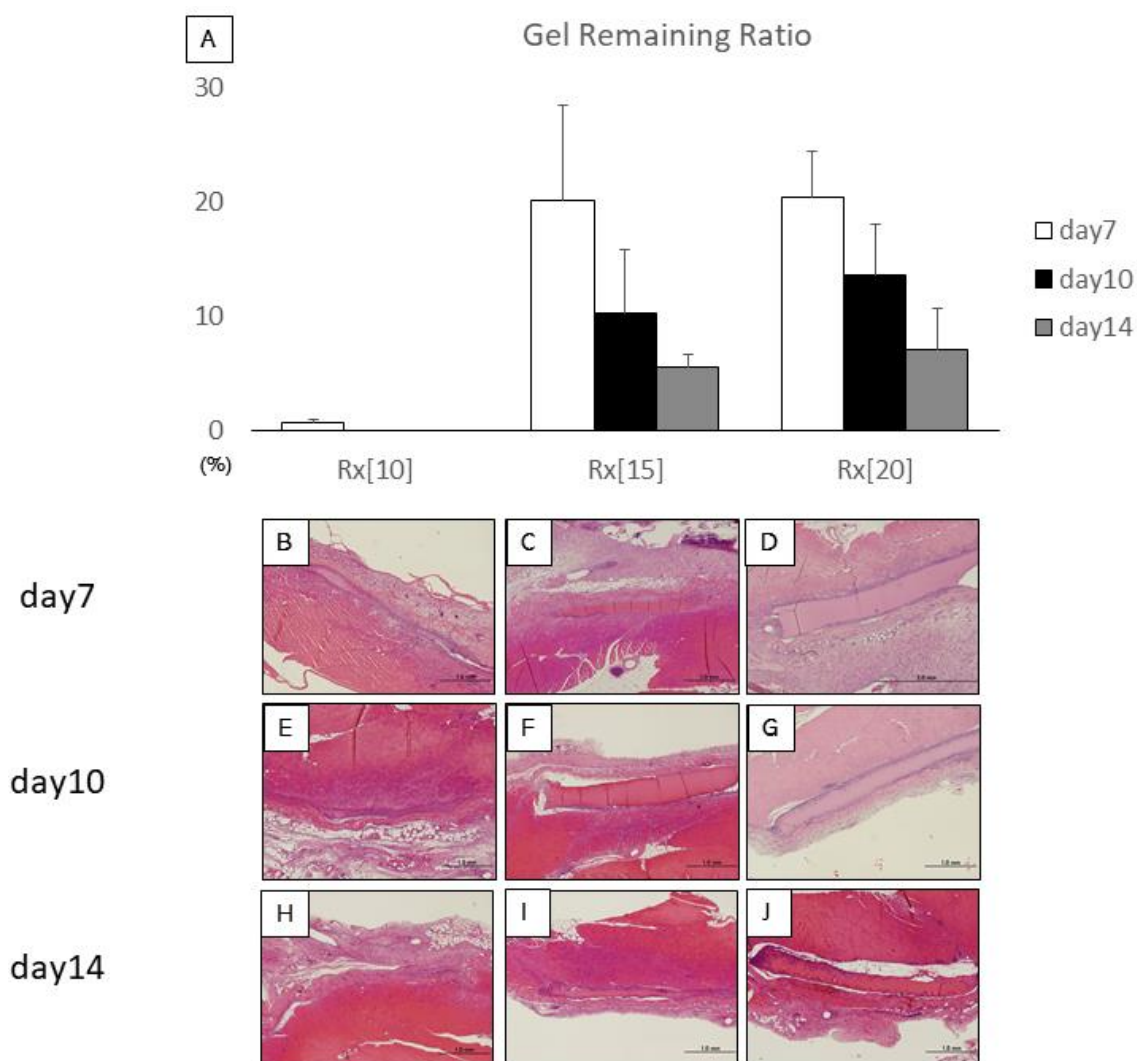


(A) 線維芽細胞(3T3-Swiss)を Rx[10]、Rx[15]、Rx[20]それぞれの上で 3 日(上段)または 7 日(下段)培養し、浸潤深度を計測した。蛍光染色は、actin filament を赤に、核を青に、ゲル表面を緑にした。(B) RXgel 内を移動した細胞の分布を示した。浸潤深度は全ての群間で統計学的有意差を認めた(*** P < 0.0005)。

RXgel 周囲器質化

ゲル残存率は生体内での RXgel の分解速度を反映しており、分解速度が緩やかであるほど残存率は高くなると考えられた。本研究では、それぞれの硬度の RXgel の分解がどのように進むかを評価するため、7 日目を対照群として 10 日目、14 日目の残存率を比較した。同一ゲルの異なる日付間での有意差はみられなかったものの、全ての硬度において 14 日目まで経時的に RXgel の分解が進むことが視覚的・定量的に確認された。Rx[10]は他の群と比較してかなり急速に分解が進み、7 日目の時点でほとんど分解されていた(図 10)³⁵。一方で、Rx[15]と Rx[20]は類似した分解パターンを示し、1mm 厚の RXgel は 14 日時点では完全には分解されず視認できる程度には遺残していた。

図 10. ラット生体内での RXgel 残存率の変化³⁵



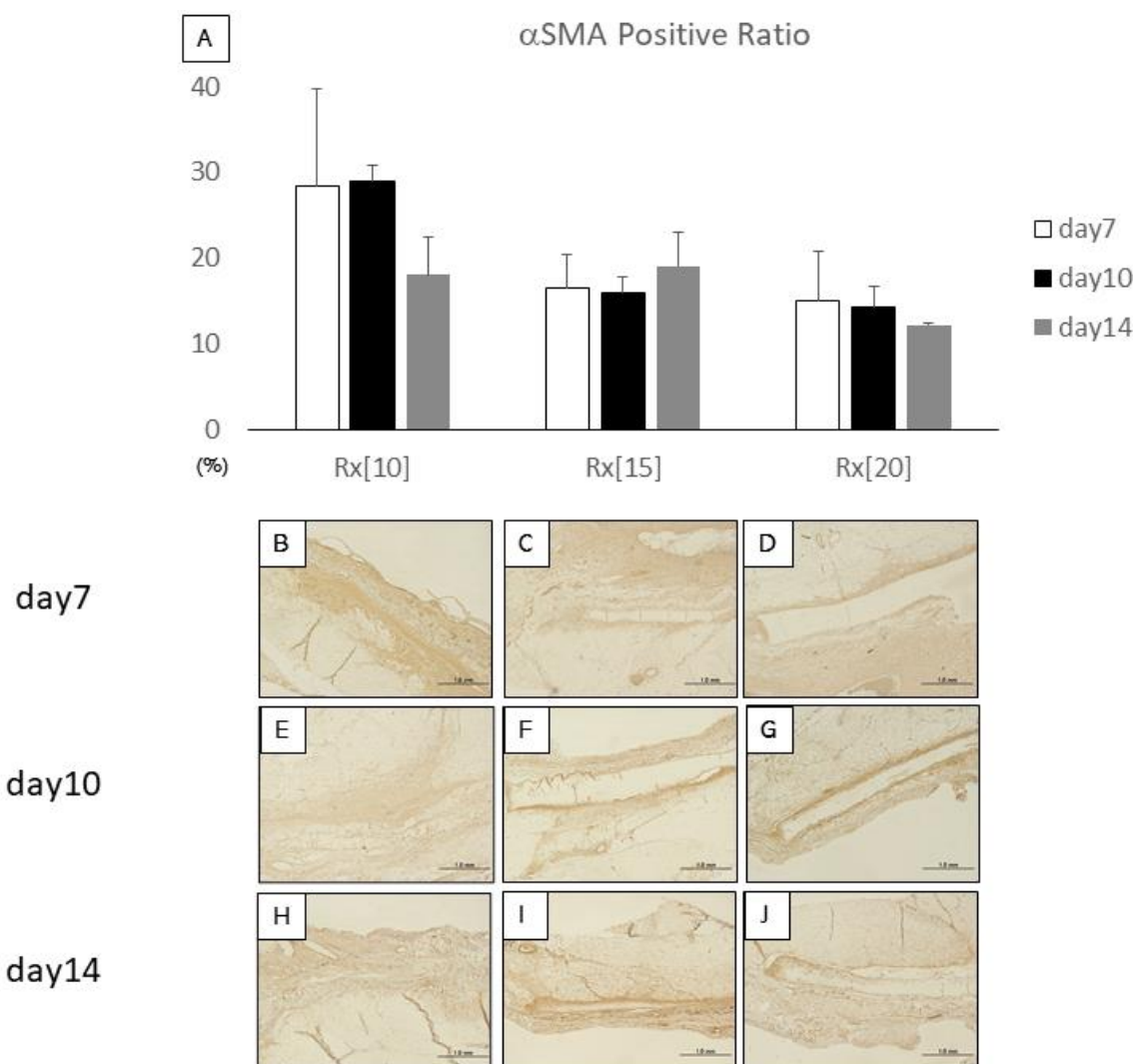
(A) HE 染色における RXgel 残存率の経時変化を示した。各群内において異なる日付間で統計学的有意差はなかった。

(B) - (J) 各 RXgel 移植後 7、10、14 日後の 5µm スライスの HE 染色写真を示した。

HE 染色により、RXgel は無構造な物質として認識できる。スケールバーはいずれも 1.0mm を表している。

一方、 α SMA は血管平滑筋や ECM を形成する主な因子である筋線維芽細胞のマーカーであり、 α SMA 陽性率は、RXgel 内の新生血管や周囲の器質化組織の増殖を反映する。ゲル残存率と同様、各 RXgel における 7 日目を対照群として 10 日目および 14 日目を比較したが、いずれの RXgel 群においても統計学的有意差はみられなかった(図 11)³⁵。

図 11. 移植後 RXgel の α SMA 染色³⁵



(A) 移植後 RXgel 標本の α SMA 免疫染色により、 α SMA 陽性領域の割合を測定した。同一の RXgel 群において、7 日目、10 日目、14 日目の間で統計学的有意差は認めなかった。

(B)–(J) RXgel 移植後 7 日目、10 日目、14 日目の 5 μ m 厚切片を α SMA 免疫染色した。免疫染色により、 α SMA 陽性領域は茶褐色を呈した。残存した RXgel はやはり無染色・無構造な領域として認識された。スケールバーはそれぞれ 1.0 mm を示している。

1-3 考察

本研究では新しい細胞増殖の足場材料として期待される RXgel の *in vitro* および *in vivo* の性質が照射量、すなわち、硬度によって変わることが示された。照射量が多くなるほど線維芽細胞が潜り込みにくく、生体内で分解にかかる時間が長くなることが定量的に示された。また、RXgel の分解とともに α SMA 発現組織が周囲に増加することも明らかとなった。

RXgel 移植実験における定量化の方法においては、ゲルの残存部分は α SMA 陰性となるため、ゲルの残存率が α SMA 陽性率に影響を与えている可能性がある。今回の実験は RXgel の生体移植における preliminary な実験であるという側面もあり、再現性を高くするためにこのような評価系としたが、評価系に関してはさらなる検討を要する。

創傷治癒の過程は炎症期、増殖期、リモデリング期という 3 つのステージに分けられる^{37,38}。炎症期は組織の傷害が起こると即座に始まり、48 から 72 時間程度続く。損傷した毛細血管からフィブリンやフィブロネクチンが漏れ出してネットワークを形成し、好中球やマクロファージなどの炎症細胞の遊走を可能にする³⁷⁻³⁹。これらの炎症細胞がサイトカインを放出し、線維芽細胞を増殖期に中心的な役割を果たす筋線維芽細胞に変換する⁴⁰。増殖期は 2 日目から 14 日目頃にかけて続き、筋線維芽細胞に特異的な働きとして、 α SMA を含むストレスファイバーを増殖することで創収縮による組織欠損の縮小と肉芽組織の増殖による組織欠損の充填を進め、筋線維芽細胞そのものは増殖期の終わりにアポトーシスにより死滅する。リモデリング期では、細胞外マトリックスから分泌されたコラーゲンが肉芽組織に蓄積し、繊維組織を形成して創傷治癒過程は完結する。RXgel 移植実験では、増殖期までの変化を観察するために 7, 10, 14

日目の標本を評価した。

α SMA は増殖期に中心的な役割を担う筋線維芽細胞の最も信頼できるマーカーであり⁴⁰、14 日時点での α SMA 発現量は増殖期の器質化を反映している。各 RXgel 群間で一定の経時的変化は見られなかったが、ゲルの分解とともに器質化が起こっていることが確認された。

1-4 小括

新しい足場素材として期待される RXgel が照射量に応じて調整可能な生分解性を持っていることが確認され、増殖期の器質化に寄与する筋線維芽細胞が RXgel の分解される過程で発現し、器質化が進むことが示唆された。

第2章

放射線架橋ゼラチンコーティング

ePTFE 人工血管周囲の器質化評価

2-1 対象と方法

RXgel コーティング ePTFE 人工血管の作成

第1章で使用した3種の硬度のうち、Rx[10]は数日で分解されて器質化にどの程度寄与するか不明であったこと、把持するだけで千切れてしまうなど、非常に柔らかく容易に人工血管から剥離するなど扱いが難しいと思われたため、Rx[15]とRx[20]を使用することとした。

RXgel コーティング ePTFE 人工血管の作成のために市販の4mm径 ePTFE 人工血管(AdvantaVTX, Atrium Maquet Getinge Group, Hudson, NH, USA)を使用した。

ePTFE 人工血管表面は撥水性であるため、表面を処理して化学的に結合させた(図 12A)³⁵。まず ePTFE 人工血管に 5 分間のエアプラズマ照射(YHS-R, SAKIGAKE-Semiconductor Co., Ltd., Kyoto, Japan)を行い、表面に-OH 基を付加した。次に、人工血管をヘキサメチレンジイソシアネート(HDI)とテトラヒドロフランの 1:1 溶液に 1 時間浸漬して-OH 基を-HDI 基に置換した。テトラヒドロフラン溶液に浸漬して未反応の HDI を除去した後、人工血管を 10%ゼラチン溶液に浸漬し、人工血管表面にゼラチン層を形成した。この段階でゼラチンのアミノ酸の一部が HDI と結合することでゼラチンを ePTFE 人工血管に化学的に結合させた。コーティングの厚さはゼラチン溶液に浸漬する回数で調整した。20°Cで一晩凝固させた後に、⁶⁰Co ガンマ線により人工血管を照射した。50°Cの PBS に 2 時間浸漬して未反応のゼラチンを除去し、RXgel コーティング人工血管を作成した(図 12B, 12C)。ePTFE に結合した RXgel 層の厚みを測定した結

果を示した(図 12D)³³。

前述の通り、Rx[10]は人工血管のコーティング素材としては硬度が不足していると思われたため、Rx[15]と Rx[20]それぞれでコーティングすることとした。それぞれ厚みを

2 種類用意し、

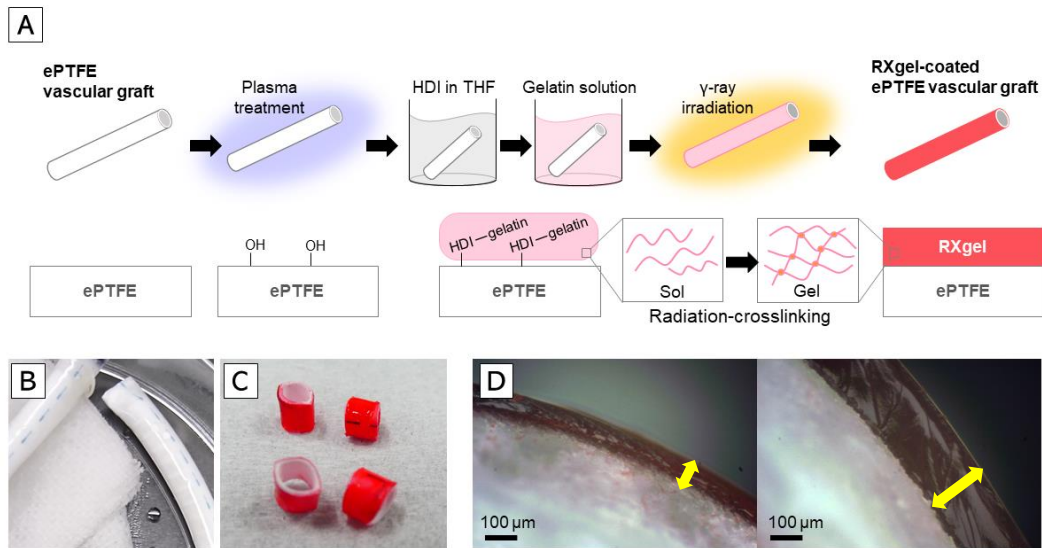
1. Rx[15]薄層コーティング人工血管:Rx[15]_t
2. Rx[15]厚層コーティング人工血管:Rx[15]_T
3. Rx[20]薄層コーティング人工血管:Rx[20]_t
4. Rx[20]厚層コーティング人工血管:Rx[20]_T

の計 4 種類作成した(t:thin, T:Thick)。50℃で調整したゼラチン水溶液に人工血管を約 30 秒浸漬し、室温(約 20℃)大気中に取り出して約 30 秒」を 1 回として、薄ゲルは

2 回、厚ゲルは 4 回繰り返した。各人工血管のコーティング厚を測定した結果を示す

(表 2)³⁵。

図 12. RXgel コーティング ePTFE 人工血管の作成³⁵



(A) コーティングの一連の流れを示す。プラズマ処理により OH 基を付加して HDI に置換した後、そこにゼラチンを結合させてガンマ線照射を行った。実際に光沢のある RXgel でコーティングされた ePTFE 人工血管 (B) およびゼラチンに食紅を混和して着色したもの (C)。 (D) RXgel コーティング ePTFE 人工血管断面の電子顕微鏡での拡大像。写真左下側の白い部分が ePTFE 人工血管で、黄色い矢印で示した部分が RXgel である。2 種類の厚みのコーティングを用意した。

表 2. RXgel コーティング層の厚さ³⁵

Sample	Rx[15] _t	Rx[15] _T	Rx[20] _t	Rx[20] _T
Thickness [μm]	66.5 ± 1.5	179.8 ± 9.5	67.6 ± 1.3	193.3 ± 5.9

データはいずれも平均値±標準誤差で示した。

RX-gel コーティング ePTFE 人工血管の生体内器質化評価

生体内での ePTFE 人工血管周囲の器質化を評価するため、ラット体内への移植実験を行った。前項のように直径 6mm の RXgel コーティング ePTFE 人工血管を作成し、幅 1mm ずつにスライスしてリング状にした。これを Sprague-Dawley ラット(週齢 13–14 週; 400–600 g, 各群 n = 5)の腹直筋筋膜下に RXgel のディスクを移植した。際と同様の方法で移植した(図 13)。対照群として無コート(NC 群)の ePTFE も移植した。移植後 14 日または 28 日でラットを安楽死させ、4%パラホルムアルデヒドの心腔内投与による灌流固定を行った後に人工血管リングの標本を周囲組織と一塊にして摘出した。取り出した標本は人工血管の中心線に沿って分割し、パラフィン固定した。パラフィンブロックから 5 μ m スライスを作成し、前述の方法により α SMA で免疫染色した。

また、今回は人工血管リング周囲に新たな増殖組織を視覚化するため、3 型コラーゲン

ン(Col-III)免疫染色も行った。スライスは 0.1% Proteinase K solution (Proteinase K ready-to-use, S3020, Dako)による酵素法抗原賦活化処理の後、抗 Col-III モノクローナル抗体 (1:200, ab6310, Abcam, Cambridge, UK)に浸漬した。その他の染色手順は α SMA と同様に行った。

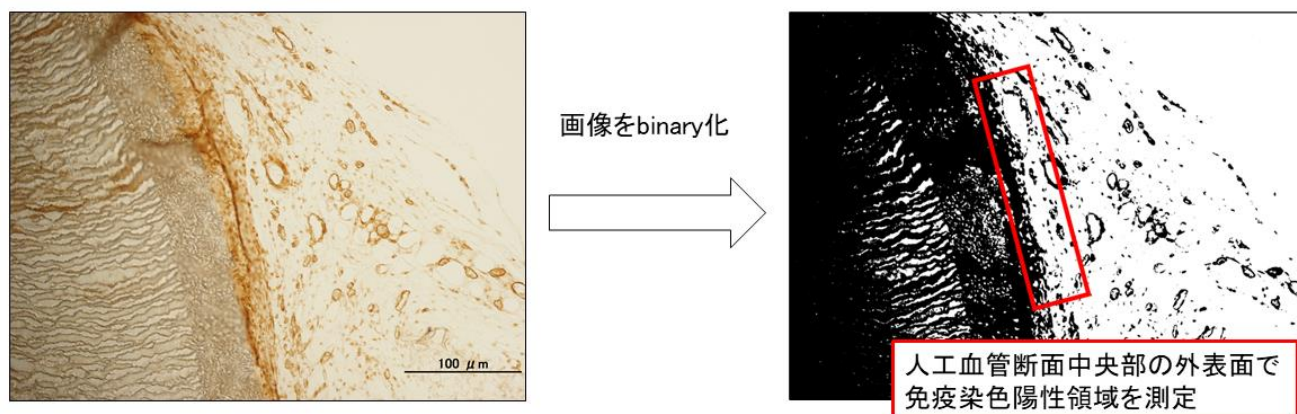
免疫染色標本の顕微鏡写真を撮影し、人工血管リングの中心断面の腹直筋膜側と腹直筋側の中間点で外表面に沿った $200 \times 50 \mu\text{m}^2$ の長方形を ROI として、 α SMA および Col-III それぞれの陽性領域の面積を ImageJ で binarize(閾値 180)して測定した。ROI に占める α SMA 陽性領域の割合を α SMA 陽性率とし、同様に Col-III の割合を Col-III 陽性率とした(図 14)。

図 13. ラット腹直筋筋膜下への人工血管リング移植



ラット腹直筋筋膜を切開し、筋膜と腹直筋の間を剥離してポケットを作成。厚さ 1mm の人工血管リングを移植後、筋膜を閉鎖。

図 14. 移植人工血管周囲の免疫染色陽性率測定方法



移植人工血管標本の中心断面のスライスの免疫染色画像を binary 化し、人工血管表面の $200 \times 50 \mu\text{m}^2$ の領域内の免疫染色陽性面積を測定。領域の面積で除して陽性率を測定した。

統計学的解析

結果は全て平均値±標準偏差で表した。統計学的解析は JMP Pro 14 statistical software (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。各群間の差は対照群に対する Dunnett 検定を行った。いずれも $P < 0.05$ をもって統計学的有意差とした。

2-2 結果

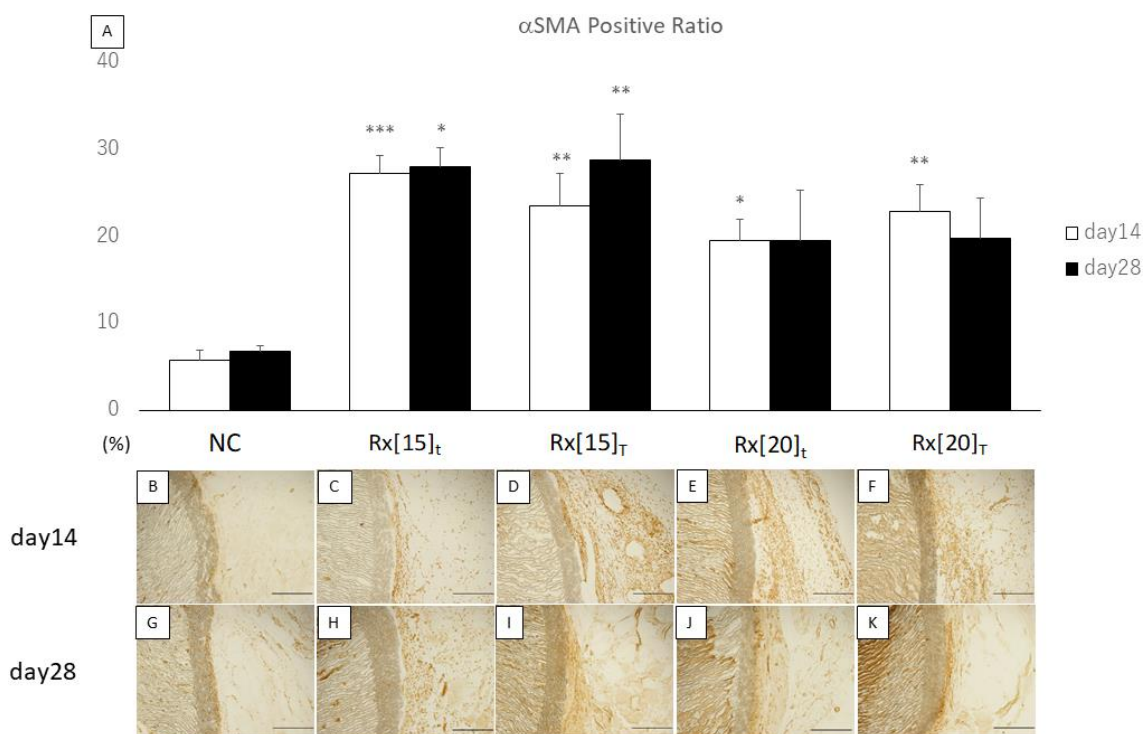
RXgel コーティング人工血管周囲の組織増殖の評価

本実験においては、移植後同一日数における無コートの ePTFE 人工血管と RXgel コーティング人工血管の α SMA 陽性率を比較した。移植後 14 日において、RXgel コーティング人工血管は無コート人工血管と比較して有意に高い α SMA 陽性率を示した。移植後 28 日においては、Rx[15]の両方の厚みにおいてのみ無コートと比較して有意に高い α SMA 陽性率を示した(図 15)³⁵。

また、本実験では移植後同一日数における無コート人工血管と RXgel コーティング人工血管周囲の Col-III の陽性率も比較した。移植後 14 日においては Rx[15]_t 群のみが無コート群と比較して有意に Col-III 発現率が高かった。移植後 28 日においては Rx[15]_t と Rx[15]_T のいずれにおいても無コートと比較して有意に Col-III 陽性率が高

かった(図 16)³⁵。

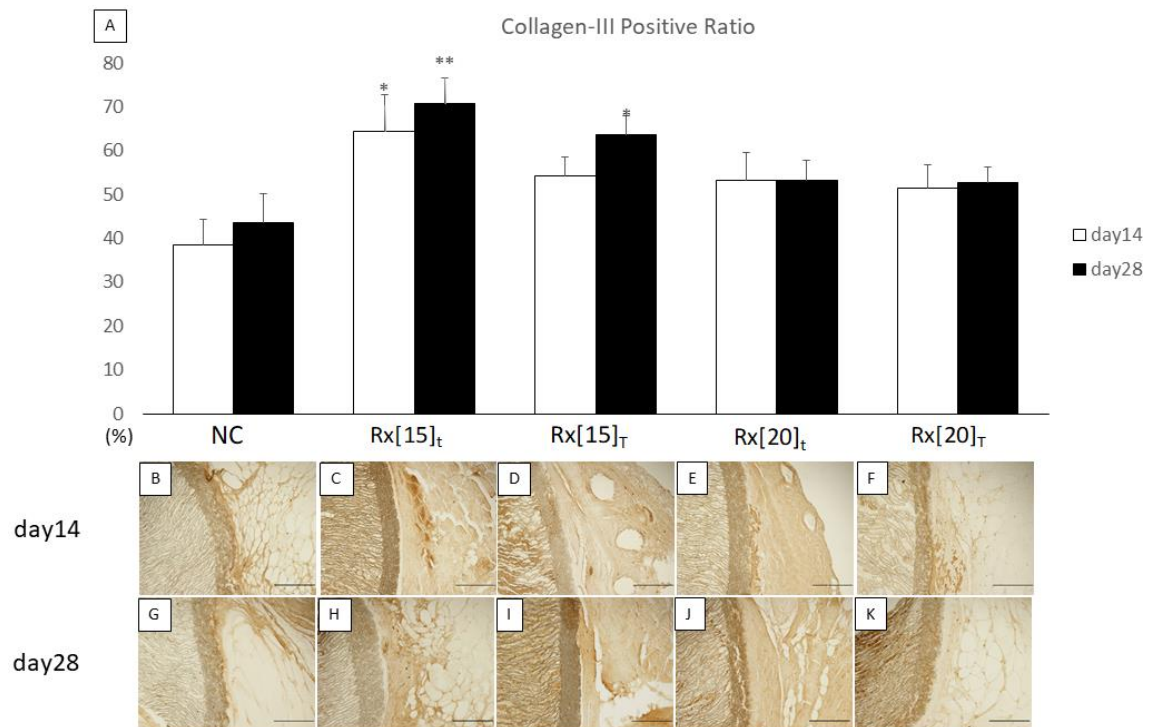
図 15. 人工血管移植後切片の α SMA 免疫染色³⁵



(A) α SMA 免疫染色を行い、 α SMA 発現率を測定した。それぞれの日数で各 RXgel コーティング人工血管群を無コート人工血管群と比較した(* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$)。

(B)-(K) 移植後 14 日または 28 日における各人工血管群の $5\mu\text{m}$ 厚スライスに α SMA 染色した。それぞれの写真において、ePTFE 人工血管の外表面が中央にあり、その内側の人工血管壁が左側に続いている。 α SMA 陽性領域は茶色で示されている。各スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表している。

図 16. 人工血管移植後切片の Col-III 免疫染色³⁵



(A) Col-III 免疫染色を行い、Col-III 発現率を測定した。それぞれの日数で各 RXgel コーティング人工血管群を無コート人工血管群と比較した(* P < 0.05, ** P < 0.005)。

(B)-(K) 移植後 14 日または 28 日における各人工血管群の 5µm 厚切片を Col-III 染色した。それぞれの写真において、ePTFE 人工血管の外表面が中央にあり、その内側の人工血管壁が左側に続いている。Col-III 陽性領域は茶色で示されている。各スケールバーは 100µm を表している。

2-3 考察

本研究では、第一章の結果を受けて Rx[15]および Rx[20]を用いて人工血管をコーティングし、周囲組織器質化を促進するかどうか検証した。PET と ePTFE という二つの主な人工血管材料のうち、本研究では末期腎不全患者の血液透析アクセスとして ePTFE を用いた動静脈内シャントが非常に広く使用されているという理由で ePTFE を選択した。人工血管内シャント術後の漿液腫形成は重大な問題であり⁴¹、ePTFE 人工血管周囲の器質化を促す新技術は透析患者の QOL を高めることが期待される。本実験では、それぞれの照射量で 2 種類の厚みのコーティングを施した 4 種類の RXgel コーティング ePTFE 人工血管を作成した。それらを厚さ 1mm のリング状にしてラットの腹直筋膜下に移植し、移植後 14 および 28 日後の器質化を無コート ePTFE 人工血管と比較した。人工血管周囲の器質化促進を評価するため、 α SMA と Col-III による染色

を行った。 α SMA は創傷治癒の早期に創収縮とコラーゲン増殖という最も重要な働きを担う筋線維芽細胞の最も信頼できるマーカー⁴²として、Col-III は線維増殖の初期におけるコラーゲンの主なサブタイプである³⁷ことからターゲットとした。Rx[15]でコーティングした ePTFE 人工血管は、無コートの ePTFE 人工血管と比較して α SMA と Col-III のいずれも有意に高い発現率を示していた。一方、Rx[20]でコーティングした ePTFE 人工血管も同様に無コート群より α SMA および Col-III の発現率が高い傾向を示したが、統計学的有意差は認めなかった。本研究で用意した硬度や厚み以外により至適な条件があるのかどうかなども含め、より詳細な設定や検討が必要である。また、コーティングそのものによる弾性の変化やハンドリングの問題は認めなかったが、今回作成した人工血管は添加物を加えていないためか数ヶ月単位の保存により表面が乾燥して固くなってしまいう問題が見られた。臨床応用のためには長期保存の可能な組成を見出す

必要があると考えられた。

第一章の考察で述べた通り、創傷治癒過程は炎症期、増殖期、成熟期に分けられ、侵襲が加わって 48 時間から 14-21 日頃にかけて起こる増殖期が器質化において最も重要な過程である。そのため、本研究では人工血管移植後 14 日および 28 日目の標本を評価することとした。 α SMA の発現により増殖期の早期に中心を担う筋線維芽細胞の増殖を確認し、線維増殖の初期に 1 型コラーゲンより優位である Col-III の増加を定量的に解析することで、RXgel が ePTFE 人工血管周囲の器質化を有意に促進することを確認できた。

それぞれの群において 14 日目と 28 日目の間でそれほど大きく α SMA や Col-III の陽性率が増加しなかった理由を考察する。 α SMA は筋線維芽細胞のマーカーであり、

筋線維芽細胞は治癒の進行とともにアポトーシスにより死滅する^{37,40} ために 14 日目以降ピークを迎えた可能性が高い。Col-III についても繊維増殖の初期の中心であるが最終的な線維化では分解されて 1 型コラーゲンに置き換わる³⁷ ために 28 日目より前にピークを超えていることが示唆される。

炎症期の浸潤細胞の評価としての免疫細胞の関与や繊維増殖に関わる他の因子の評価は本実験では行わなかったが、今後の臨床応用などを検討する際には、より詳細なメカニズムの解明のためにより多くの物質を対象として免疫染色や定量的な評価を行うことが望ましい。

人工血管周囲器質化を誘導する理想的な材質として、創傷治癒を促進するだけでなく、安全性(生体にとって有害でないこと)・実用性(高価ではなく容易に入手できること)・生分解性(ある程度の期間で分解されること)が重要であると考えられている。

RXgel の成分であるゼラチンは、生体適合性および生分解性を持ち、安全性や実用性も持ち合わせている²⁹。このことはゼラチンコーティング人工血管が心臓血管外科手術において長年広く使用されていることからわかる^{22,43}。大山らによると、RXgel 独自の利点として、ECM 類似性と形状や硬度の調整が可能で多用途に利用できることがある³⁴。RXgel は ECM 由来のゼラチンと水のみから作られており、生適合性・生分解性・細胞接着性などのゼラチンの生物学的機能³³を失うことなく広範な軟部組織をカバーできるあらゆる硬さに調整することができる。この材質は、普段から食物や医療材料の滅菌に使用されるγ線または電子線の照射による簡便かつ効率的な放射線架橋技術により作成され、照射量を調整することで硬度を変えることができる。RXgel コーティング人工血管を作成するために必要な照射線量は滅菌に使用される範囲内である 4-25 J/g である。すなわち、照射の過程で RXgel を作成すると同時に滅菌するこ

とができる。

今回のモデルではコーティングによる内腔への影響や内腔に血流が流れることでのような影響があるのかが評価できていない。今後、実用化を考える上では、大型動物でのバイパスモデルなどを検討する必要がある。また、安全面に関して、今回の研究期間ではラットの挙動や移植部位周囲の組織などに関して肉眼的な悪影響はなかったが、客観的評価はできていない。より長期間の生体への影響についても含め、さらなる評価が必要である。

人工血管と自己血管のコンプライアンスの差は人工血管移植後の人工血管閉塞の原因になると考えられている⁴⁴⁻⁴⁷。今後さらなる検討を要するが、RXgelは照射量によって硬度を調節することができるため、対応可能と考えている。また、人工血管移植後の周囲器質化は、人体内と比較して動物モデルでは良好な結果が得られることが知られ

ており、この点に関してもさらなる知見の集積が必要である。

2-4 小括

本研究では、無コート[®]の ePTFE 人工血管とは異なり、RXgel コーティング ePTFE 人工血管は移植後 28 日で α SMA および Col-III の豊富な肉芽組織に覆われていた。この事実は RXgel が ePTFE 人工血管周囲の器質化を促進する有望な材質であることを示している。

結論

本研究では、ガンマ線架橋ゼラチンハイドロゲルである RXgel が筋線維芽細胞の豊富な肉芽組織を増殖させ、RXgel で ePTFE の外表面をコーティングすることで人工血管周囲の器質化を促進することをラットモデルで示した。RXgel コーティング ePTFE 人工血管は器質化不良が関与する人工血管漿液腫や人工血管感染などの移植後合併症を減少させることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 石原聡一郎教授、同 保科克行准教授、同 高山利夫講師には、研究の概要をはじめ研究の進め方、具体的なデータの解釈、また論文の作成にあたって、多岐に渡る詳細な御指導を頂き、深く感謝いたします。また、国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学部門 高崎量子応用研究所 先端機能材料研究部 田口光正上席研究員、同 大山智子主任研究員、同 大山廣太郎主任研究員には、研究に必要な放射線照射やコーティングに関わる技術・材料の物性データの提供など、多岐にわたる協力を頂き、深く感謝いたします。

引用文献

1. 宮田哲郎, 赤澤宏平, 秋下雅弘, 東信良, 吉川公彦, 後藤信哉, et al. 末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン (2015 年改訂版).
2. 一般社団法人日本透析医学会 維持血液透析ガイドライン:血液透析導入.
日本透析医学会雑誌 **46**, 1107–1155 (2013).
3. 宮田哲郎. 人工血管の現状と将来—人工血管開発の歴史を中心に. 繊維と工業 **61**, 208–210 (2005).
4. VOORHEES AB, JARETZKI A, BLAKEMORE AH. The use of tubes constructed from vinyon ‘N’ cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg* **135**, 332–336 (1952).
5. 馬場健, 金岡祐司, 大木隆生. 人工血管の現状と最近の進歩. 人工臓器 **44**, 146–151 (2015).
6. Ratliff CR, Strider D, Flohr T, Moses D, Rovnyak V, Armatas J, et al. Vascular graft infection: Incidence and potential risk factors. *J Wound, Ostomy Cont Nurs* **44**, 524–527 (2017).
7. Legout L, Sarraz-Bournet B, D’Elia P V., Devos P, Pasquet A, Caillaux M, et al. Characteristics and prognosis in patients with prosthetic vascular graft infection:

- A prospective observational cohort study. *Clin Microbiol Infect* **18**, 352–358 (2012).
8. Chiesa R, Astore D, Frigerio S, Garriboli L, Piccolo G, Castellano R, et al. Vascular prosthetic graft infection : Epidemiology, bacteriology, pathogenesis and treatment. *Acta Chir Belg* **102**, 238–247 (2002).
 9. Kieffer E, Sabatier J, Plissonnier D, Knosalla C. Prosthetic graft infection after descending thoracic/thoracoabdominal aortic aneurysmectomy: Management with in situ arterial allografts. *J Vasc Surg* **33**, 671–678 (2001).
 10. O'Connor S, Andrew P, Batt M, Becquemin JP. A systematic review and meta-analysis of treatments for aortic graft infection. *J Vasc Surg* **44**, (2006).
 11. Dodos I, Kirmizis I, Apostolou C, Sioulis A, Mavromatidis K, Skandalos I. Seroma: An underestimated complication of vascular access for haemodialysis. *Hell J Surg* **86**, 302–306 (2014).
 12. Ahn SS, Machleder HI, Gupta R, Moore WS. Perigraft seroma: clinical, histologic, and serologic correlates. *Am J Surg* **154**, 173–8 (1987).
 13. Eid A, Lyass S. Acute perigraft seroma simulating anastomotic bleeding of a PTFE graft applied as an arteriovenous shunt for hemodialysis. *Ann Vasc Surg*

- 10**, 290–291 (1996).
14. Blumenberg RM, Gelfand ML, Dale WA. Perigraft seromas complicating arterial grafts. *Surgery* **97**, 194–204 (1985).
 15. Gazi A, Staffa R, Novotný T, Kriz Z, Hermanová M. Perigraft seroma as a rare angiosurgical complication. *Rozhl Chir* **94**, 477–81 (2015).
 16. Kadakol AK, Nypaver TJ, Lin JC, Weaver MR, Karam JL, Reddy DJ, et al. Frequency, risk factors, and management of perigraft seroma after open abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* **54**, 637–643 (2011).
 17. Thevendran G, Lord R, Sarraf KM. Serous leak, a rare complication of polytetrafluoroethylene grafts: a case report. *Cases J* **2**, 195 (2009).
 18. Darouiche RO. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N Engl J Med* **350**, 1422–1429 (2004).
 19. Shelton D. Preclotting of Grafts. *AORN Journal* vol. 43 972 (1986).
 20. Kratz JM. Preclotting Vascular Grafts. *Annals of Thoracic Surgery* vol. 31 97 (1981).
 21. Yates SG, Barros D'Sa AB, Berger K, Fernandez LG, Wood SJ, Rittenhouse EA, et al. The preclotting of porous arterial prostheses. *Ann Surg* **188**, 611–622

- (1978).
22. Drury JK, Ashton TR, Cunningham JD, Maini R, Pollock JG. Experimental and Clinical Experience with a Gelatin Impregnated Dacron Prosthesis. *Ann Vasc Surg* **1**, 542–547 (1987).
 23. Freischlag JA, Moore WS. Clinical Experience with a Collagen-Impregnated Knitted Dacron Vascular Graft. *Ann Vasc Surg* **4**, 449–454 (1990).
 24. Jonas RA, Ziemer G, Schoen FJ, Britton L, Castaneda AR. A new sealant for knitted Dacron prostheses: Minimally cross-linked gelatin. *J Vasc Surg* **7**, 414–419 (1988).
 25. Shemesh D, Goldin I, Hijazi J, Zaghal I, Berelowitz D, Verstandig A, Olsha O. A prospective randomized study of heparin-bonded graft (Propaten) versus standard graft in prosthetic arteriovenous access. *J Vasc Surg* **62**, 115–22 (2015).
 26. Lindholt JS, Houliind K, Gottschalksen B, Pedersen CN, Ravn H, Viddal B, et al. Five-year outcomes following a randomized trial of femorofemoral and femoropopliteal bypass grafting with heparin-bonded or standard polytetrafluoroethylene grafts. *Br J Surg* **103**, 1300–1305 (2016).
 27. Ho MF, Chan YC, Cheng SWK. Management of mycotic femoral artery

- aneurysm with two resistant organisms. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* **22**, 742–744 (2014).
28. Zanow J, Kruger U, Settmacher U, Scholz H, Berlin J. Treatment of Perigraft Seroma in Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts by Sequential Fibrin Sealing of the Outer Graft Surface. *Ann Vasc Surg* **24**, 1005–1014 (2010).
29. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 59 207–233 (2007).
30. Ito A, Mase A, Takizawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K-I, et al. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* **95**, 196–199 (2003).
31. Lien SM, Ko LY, Huang TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* **5**, 670–679 (2009).
32. Oyama TG, Kimura A, Nagasawa N, Oyama K, Taguchi M. Development of Advanced Biodevices Using Quantum Beam Microfabrication Technology. *Quantum Beam Sci* **4**, 14 (2020).

33. Oyama TG, Oyama K, Kimura A, Yoshida F, Ishida R, Yamazaki M, et al.
Elasticity and Topography-Controlled Collagen Hydrogels Mimicking Native Cellular Milieus. *bioRxiv* 706952 (2019) doi:10.1101/706952.
34. Oyama TG, Oyama K, Kimura A, Yoshida F, Ishida R, Yamazaki M, et al.
Collagen hydrogels with controllable combined cues of elasticity and topography to regulate cellular processes. *Biomed Mater* **16**, 045037 (2021).
35. Matsuura S, Takayama T, Oyama TG, Oyama K, Taguchi M, Endo T, et al. A Radiation-Crosslinked Gelatin Hydrogel That Promotes Tissue Incorporation of an Expanded Polytetrafluoroethylene Vascular Graft in Rats. *Biomol 2021, Vol 11, Page 1105* **11**, 1105 (2021).
36. Takayama T, Taguchi T, Koyama H, Sakari M, Kamimura W, Takato T, et al.
The growth of a vascular network inside a collagen–citric acid derivative hydrogel in rats. *Biomaterials* **30**, 3580–3587 (2009).
37. Gonzalez AC de O, Costa TF, Andrade Z de A, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol* **91**, 614–620 (2016).
38. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **7**, 301–11 (2014).

39. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci* **122**, 3209–3213 (2009).
40. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 349–363 (2002).
41. Dauria DM, Dyk P, Garvin P. Incidence and Management of Seroma after Arteriovenous Graft Placement. *J Am Coll Surg* **203**, 506–11 (2006).
42. Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* **90**, 993–1002 (2003).
43. Prager M, Polterauer P, Böhmig H-J, Wagner O, Fügl A, Kretschmer G, et al. Collagen versus gelatin-coated Dacron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: Results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial. *Surgery* **130**, 408–414 (2001).
44. Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg* **5**, 376–382 (1987).
45. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, et al. The Mechanical Behavior of Vascular Grafts: A Review: <http://dx.doi.org/10.1106/NA5T-J57A-JTDD-FD04> **15**, 241–278 (2016).

46. Okuhn SP, Connelly DP, Calakos N, Ferrell L, Pan M-X, Goldstone J. Does compliance mismatch alone cause neointimal hyperplasia? *J Vasc Surg* **9**, 35–45 (1989).
47. Hasson JE, Megerman J, Abbott WM. Increased compliance near vascular anastomoses. *J Vasc Surg* **2**, 419–423 (1985).