

博士論文

若年ウサギを用いた

血流下大動脈ホモグラフト石灰化モデルの確立と

炭酸ランタンによる治療効果の検討

岡村 賢一

若年ウサギを用いた

血流下大動脈ホモグラフト石灰化モデルの確立と

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：岡村 賢一

目次

略語表	7
要旨	9
序文	10
1 組織移植とホモグラフト	10
2 ホモグラフト移植後石灰化抑制処理の変遷	13
3 若年者の大動脈ホモグラフト移植後石灰化のメカニズム ...	15
4 リン吸着薬と大動脈ホモグラフト移植後石灰化抑制効果 ...	20
5 若年者の低リン血症に伴う有害事象	26
目的	27
方法	28
1 実験動物の取り扱い	28
2 麻酔とモニタリング	30
3 大動脈ホモグラフト採取と移植手術	31

4	大動脈ホモグラフトの摘出と大腿骨の採取	35
5	大腿骨長の測定、骨塩量・骨密度試験と3点曲げ試験 ...	36
6	血液学的検査	38
7	大動脈ホモグラフト含有カルシウム定量検査	38
8	病理組織学的検査	39
9	動物愛護と倫理的配慮	39
10	統計学的分析	40
	結果	41
	実験1 大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルの確立と観察期間の検討	
1-1	術後観察期間による群分けと移植手術及び摘出手術 ...	41
1-2	大動脈ホモグラフト摘出後における病理学的評価	46
1-3	大動脈ホモグラフト石灰化の定量評価	49
1-4	術後週数と血漿カルシウム濃度・無機リン濃度	51
	実験1 要約	53

実験 2 大動脈ホモグラフト移植後石灰化に対する炭酸ランタンの有用性

及び有害事象の検討

2-1 炭酸ランタン含有飼料投与期間によるグループ分け	54
2-2 大動脈ホモグラフト移植手術と術後経過	56
2-3 炭酸ランタンによる石灰化・内膜肥厚の抑制効果	59
2-4 炭酸ランタン投与期間と血液学的検査	64
2-5 長期炭酸ランタン投与による有害事象	66
2-6 ホモグラフト流量と石灰化の関係	74
実験 2 要約	79
考察	80
本研究の限界	86
今後の展望	88
結語	89
謝辞	90

引用文献	90
------------	----

略語表

NZW	New Zealand white
JW	Japanese white
TTFM	transit time flow meter
PI	pulsatility index
HE	hematoxylin eosin
EVG	Elastica van Gieson
Hct	hematocrit
BW	body weight
α SMA	α -smooth muscle actin
CD	cell differentiation
Runx2	runt-related transcription factor 2
PCR	polymerase chain reaction
TNF α	tumor necrosis factor α

Pit-1	sodium-dependent phosphate transporter 1
2,3-DPG	2,3-diphosphoglycerate
ATP	adenosine triphosphate
DXA	dual energy X-ray absorptiometry
ANOVA	analysis of variance
Tx	transplantation
LC	lanthanum carbonate,

要旨

凍結保存心臓弁血管組織（ホモグラフト）は人工弁や人工血管と比べて抗血栓、抗感染を持つ利点を有するが、移植後変性により長期耐久性に問題がある。特に若年者ではホモグラフトの石灰化がより強く発現することが知られており、その一因は我々の先行研究によると若年者の成長に伴う生理的な高リン血症であることが分かっている。一方、高リン血症は臨床では腎不全患者に認められ、その治療にはリン吸着薬が用いられるが、その中で炭酸ランタンは有害事象が少ないことが知られている。そこで我々は、「若年者における大動脈ホモグラフト移植後石灰化は、炭酸ランタンの投与により有害事象なく抑制することができる」という仮説を立てた。若年ウサギを用いてドナーの下行大動脈をレシピエントの頸動脈に移植し、血流影響下で移植後グラフト石灰化の程度を定量評価し、炭酸ランタン投与の効果を調べた結果、炭酸ランタンの投与期間（量）に応じて石灰化は軽減した。同時に、内膜中膜比は炭酸ランタンの投与に応じて低下し、内膜肥厚が軽減されていた。一方、炭酸ランタン投与量の増加に伴い、成長障害・骨軟化・貧血などの有害事象が現れた。本研究により、術後急性期に限定した炭酸ランタン投与は若年者における大動脈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示唆された。

序文

1. 組織移植とホモグラフト

一般に「組織」とは、身体の一部で皮膚・骨・臍島・心臓弁・血管・角膜などのことで、「組織移植」とは、機能を果たせなくなった組織や臓器の機能回復を図るためにヒトの組織を移植することを言う。ホモグラフトとは、亡くなられた人体（ヒト）から提供された「組織」を、同種（ホモ）であるヒトに移植するグラフト（組織片）のことで同種心臓弁・血管組織とも言われる。心臓大血管領域においては、大動脈弁ホモグラフト（Figure 1）・下行大動脈ホモグラフト・腹部大動脈ホモグラフト・肺動脈弁ホモグラフトなどが用いられ、その特徴として人工弁や人工血管と比べて血栓ができにくく、感染に強いなどの特徴がある。これらの特徴から、大動脈弁ホモグラフトは主に感染性心内膜炎や人工弁感染性心内膜炎・大動脈弁輪膿瘍・大動脈炎症候群などの感染性疾患に用いられ、肺動脈弁ホモグラフトは主に先天性心疾患における右室流出路再建やロス手術等で用いられている[1]–[3]。

一方で、大動脈弁ホモグラフトは耐久性に限界があることが知られている。既報では成人の大動脈弁ホモグラフト移植において石灰化などのグラフト変性により移植後5年時点でグラフト関連合併症回避率80%・グラフト摘出回避率88%、10～15年

時点での再手術回避率は81～92%と言われている[4]–[6]。また、大動脈弁ホモグラフト移植後石灰化は、若年者で多いことが知られており、20歳以下における再手術回避率は移植後15年で47%と著明に低下する[6]。さらに、若年者の中でもより若い症例では大動脈ホモグラフト石灰化が強く発現することが知られている (Figure 2)[7], [8]。

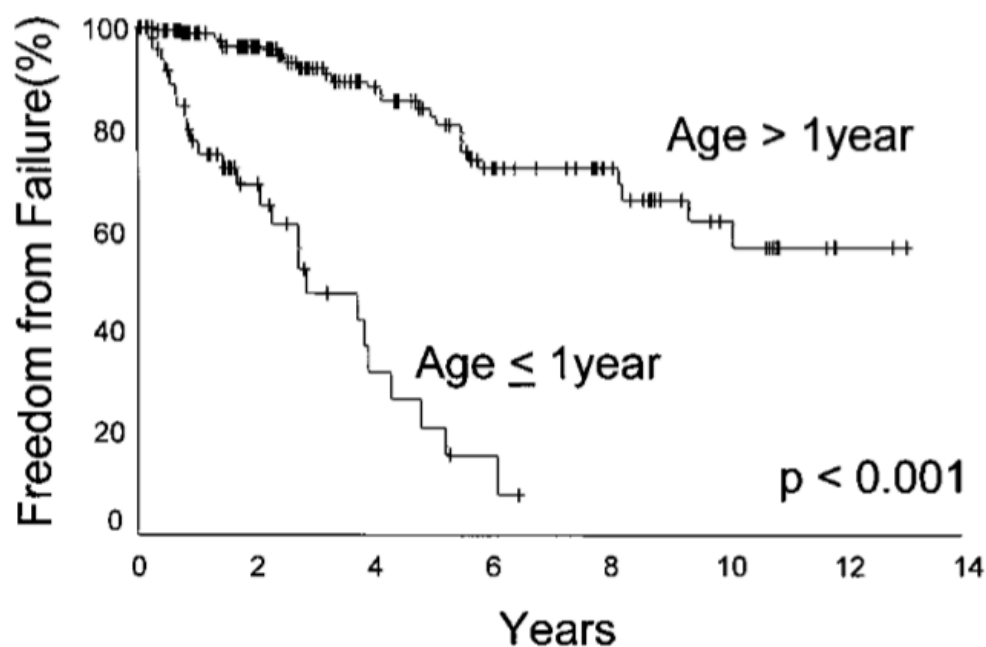
若年者における大動脈弁ホモグラフトの耐久性を改善するために、これまでに種々の研究が行われてきたが、有害事象の観点から根本的な解決には至っていない[9]–[12]。

Figure 1. 大動脈弁ホモグラフト



東京大学組織バンクより画像提供いただいた実際の大動脈弁ホモグラフト。

Figure 2. ホモグラフト移植後の弁不全回避率



Tweddell JS et al. Circulation. 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III130-5.より引用

ホモグラフト移植後の弁不全によって生じた再手術または遠隔期死亡の回避率に関する Kaplan・マイヤー曲線。手術時年齢が1歳以下の群は、1歳より年長の群に比べて有意に高率にホモグラフト移植後弁不全を生じる ($P<0.001$)。

2. ホモグラフト移植後石灰化抑制処理の変遷

ホモグラフトは抗血栓性・抗感染性に優れるが、石灰化を伴う変性による耐久性の悪さが課題とされ、長年に渡り多くの研究者が石灰化抑制の治療方法の開発に尽力してきた。これまでのホモグラフトの移植後石灰化に関する報告では、そのメカニズムは免疫応答が主体とされてきた[13]–[17]。その為、石灰化抑制目的に大動脈ホモグラフトをデオキシコール酸ナトリウムやドデシル硫酸ナトリウムで脱細胞化処理し免疫応答を不活化させるという方法や、シクロスポリンやミコフェノール酸モフェチルなどの免疫抑制剤を周術期に投与し免疫抑制状態とすることで石灰化を抑制させたという報告が多数存在する[9], [13], [15], [16], [18]–[25]。しかしながら、脱細胞化は移植前に 6～10 日の脱細胞処理期間を要し手間と時間がかかるため[9], [22]、臨床においては感染性大動脈疾患や先天性心疾患など準緊急で使用したい症例には不向きである。また、免疫抑制剤の投与は石灰化抑制効果がある一方で易感染状態となるため、臨床では感染性大動脈疾患においては使用困難である。

一方で、心臓外科領域で弁置換手術に使用されている生体弁も、これまでに種々の石灰化抑制処理法が開発されている。生体弁は、耐久性向上の為にグルタルアルデヒド処理を基本に、種々の石灰化抑制処理を施されてきた。グルタルアルデヒド処理により①滅菌、②強度・柔軟性の保持、③抗原性の消失、④コラーゲン架橋

による安定化が施されたが[26]、構造的弁機能不全が発生することがわかり耐久性の改善が課題となった。そこで石灰化抑制処理技術が改良され耐久性が向上してきた歴史がある。例えば、界面活性剤を用いて Ca^{2+} と付着するリン脂質を取り除く方法や、 α -アミノオレイン酸を用いて Ca^{2+} の組織侵入を抑え、アルカリホスファターゼ酵素を抑制し、グルタルアルデヒド基と Ca^{2+} の結合を抑えるという方法がある[27]。

大動脈ホモグラフトについては、グルタルアルデヒド処理に関する報告によると、15 歳以下の患者群は 15 歳より年長の患者群と比較して石灰化によるグラフトの変性が高率に発生した[28]。その後、Levy RJ らはラットの基礎実験によってグルタルアルデヒド処理に加えて FeCl_3 または AlCl_3 による前処置を施した大動脈ホモグラフトに石灰化抑制効果があることを示し、また若年ラット（生後 3 週）では成獣ラット（生後 3 ヶ月）に比べて有意に大動脈ホモグラフトの移植後石灰化が高値であることを示した[10], [11]。しかしながら、これまでの研究では、若年者が成人に比べて大動脈ホモグラフト移植後石灰化が強く発現するメカニズムについては言及されなかった。

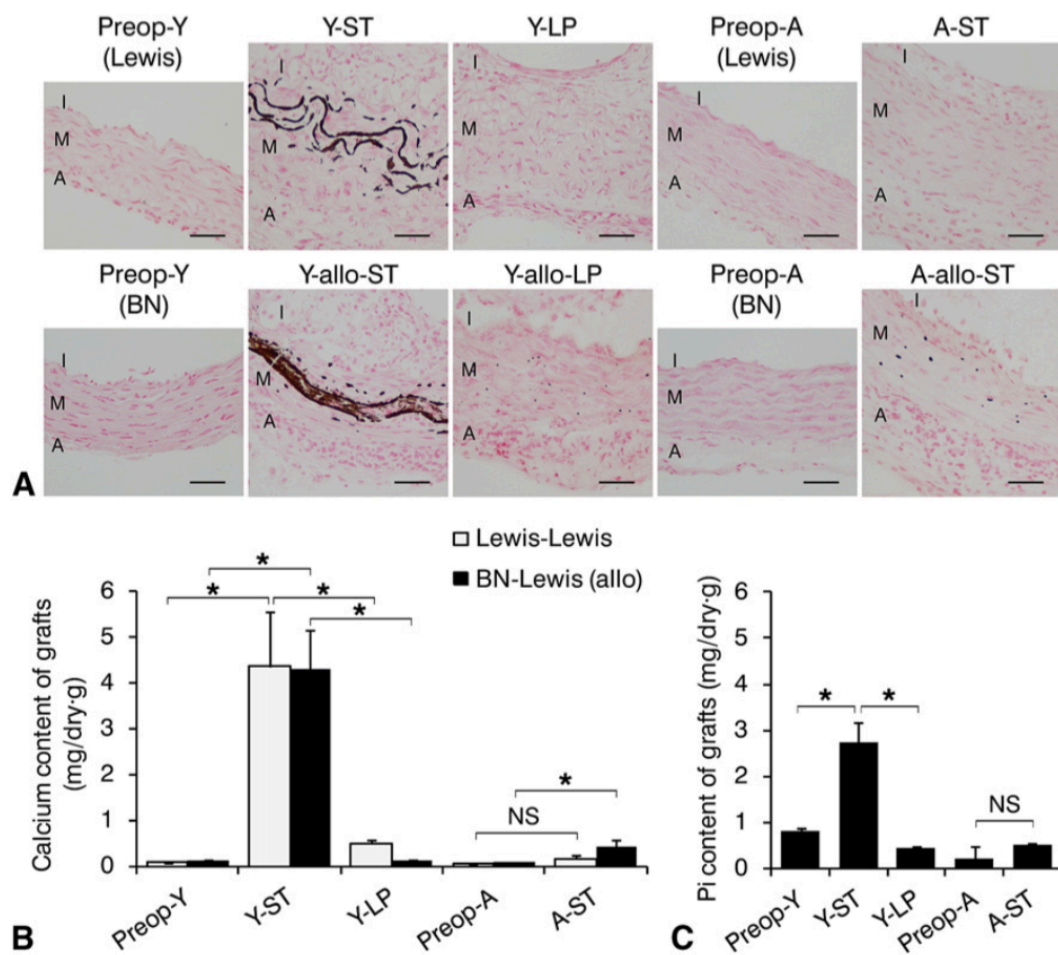
3. 若年者の大動脈ホモグラフト移植後石灰化メカニズム

大動脈ホモグラフト移植後石灰化が、成人に比べて若年者で強く発現するメカニズムについて、当科ではこれまでに血中無機リン濃度に注目して研究を行ってきた[29]。この研究の要旨を以下にまとめる。始めに、若年者における移植グラフトの石灰化は、Syngeneic か Allogeneic かという免疫応答に関わらず生じること、また低リン濃度飼料投与群の若年ラットでは通常飼料投与群の若年ラットに比べて移植グラフト石灰化が抑制されることを示した(Figure 3)。次いで、大動脈ホモグラフトの免疫染色では、 α -smooth muscle actin (α SMA) の発現が減少し、炎症マーカーである CD68 陽性のマクロファージ及び骨形成マーカーである Runx2 と osteocalcin が中膜弾性線維に発現していた。Real-time PCR による定量評価においても α SMA mRNA 量が減少し、TNF- α ・Pit-1・Runx2・osteocalcin の mRNA 量が上昇していた(Figure 4)。さらに In vitro の実験において、ラットの大動脈平滑筋細胞は TNF- α 濃度依存的に α SMA の発現が低下し、Runx2・osteocalcin・Pit-1 の発現量が上昇し骨形成性の変化を認め、石灰化については TNF- α 存在下において無機リン濃度依存的に増加した(Figure 5)。これらから、若年者における大動脈ホモグラフト移植後石灰化は、若年者の生理的な高リン血症をベースに、移植に伴う炎症反応によって惹起されること

が証明された。同時に、血管の石灰化は「炎症状態のみ」または「高リン血症のみ」では発生しにくいということも示された。

この結果を踏まえて我々は、「若年者の生理的な高リン血症を抑制することで、大動脈ホモグラフト移植後石灰化を抑制できる」という仮説を立て、次の研究に進んだ。また、成長障害など低リン血症に伴う合併症を検討する必要があると考えた。

Figure 3. ホモグラフト皮下移植モデルにおける石灰化の検討

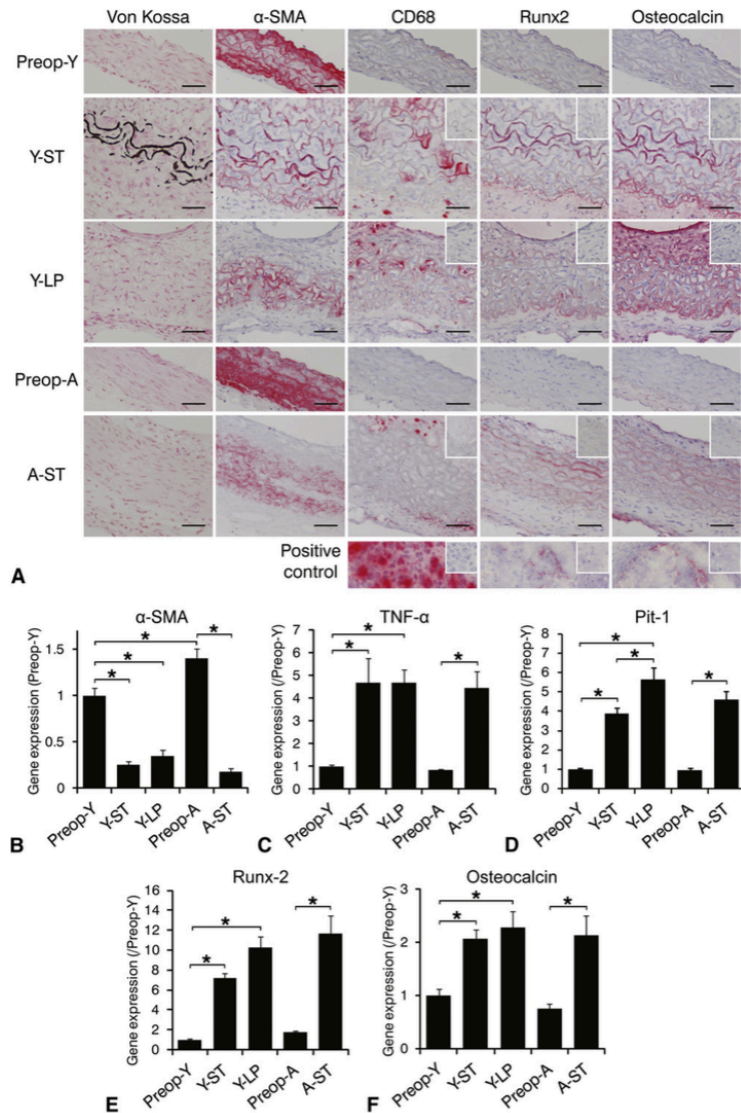


Yamauchi H et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Feb;145(2):522-30. より引用

- A. von Kossa 染色によるホモグラフト石灰化の定性的評価。上段が Syngeneic transplantation、下段が Allogeneic transplantation。通常飼料を投与した若年ラットはホモグラフト石灰化を呈するが、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。
- B. 原子吸光度法によるホモグラフト石灰化の定量的評価。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。

Figure 4. ホモグラフト皮下移植モデルにおける

各種免疫染色及び遺伝子発現量の検討

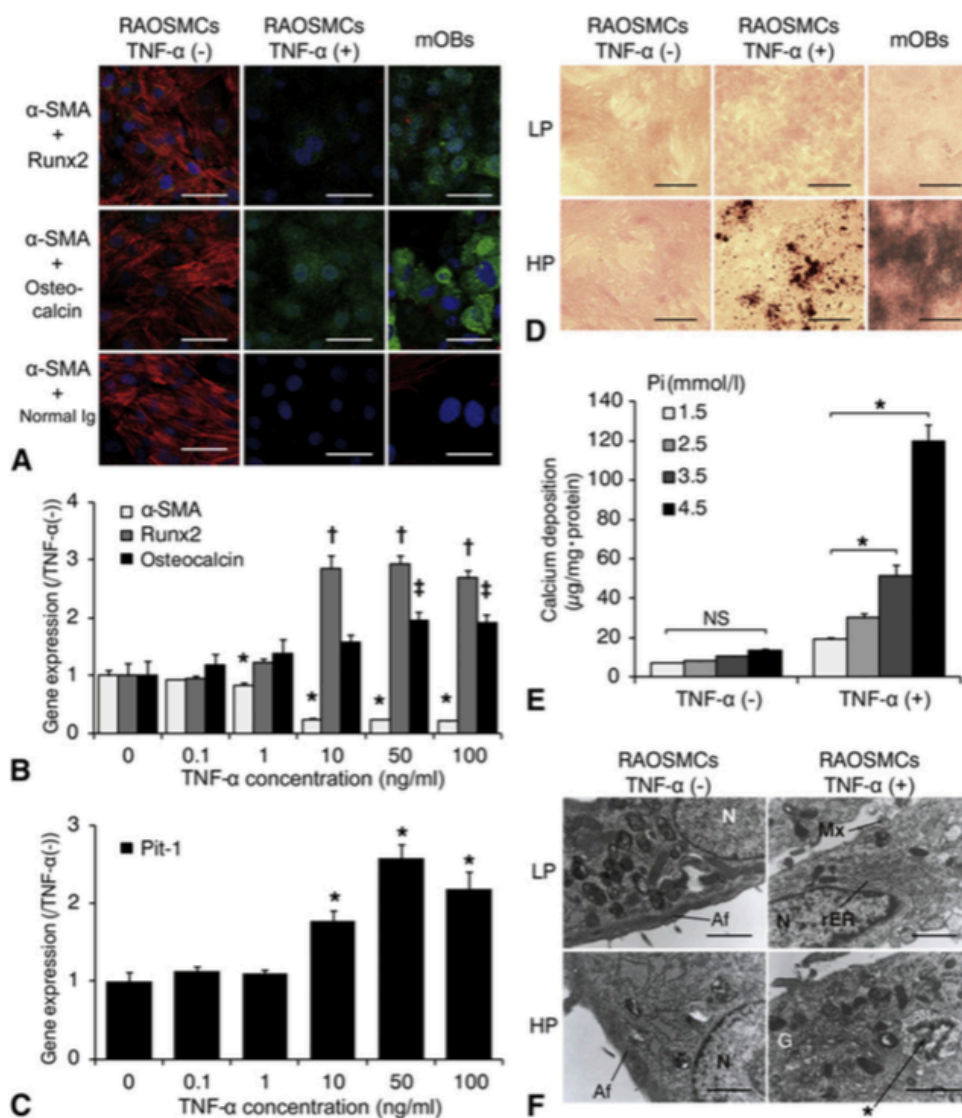


Yamauchi H et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Feb;145(2):522-30. より引用

大動脈ホモグラフトの免疫染色では、 α -smooth muscle actin (α SMA) の発現が減少し、CD68 陽性のマクロファージの出現及び Runx2 と osteocalcin が中膜弾性線維に発現していた。Real-time PCR においても α SMA mRNA 量が減少し、TNF- α ・Pit-1・Runx2・osteocalcin の mRNA 量が上昇していた。

Figure 5. 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と各種遺伝子発現



Yamauchi H et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Feb;145(2):522-30. より引用

In vitro の実験で、ラット大動脈平滑筋細胞は TNF- α の濃度依存的に α SMA の発現は低下し、一方で Runx2・osteocalcin・Pit-1 の発現量が上昇する。つまり骨形成性の変化を認めた。原子吸光度法によるカルシウム定量評価を行うと、TNF- α 存在下における高濃度無機リン存在下において強い石灰化を生じていた。

4. リン吸着薬と大動脈ホモグラフト移植後石灰化抑制効果

現在、入手可能な Phosphate binder（リン吸着薬）は大きく 2 種類に分けられる。

1 つは、炭酸カルシウム（カルタン®）や酢酸塩などの Ca 含有製剤で、もう 1 つが非 Ca 含有製剤である。非 Ca 含有製剤には、水酸化アルミニウム・炭酸ランタン（ホスレノール®）・炭酸マグネシウムに加えて、近年はスクロオキシ水酸化鉄（ピートル®）・クエン酸第二鉄（リオナ®）などの鉄ベースの吸着薬や、ビキサロマー（キックリン®）やセベラマー（フォスブロック®）などポリマーベースの吸着薬も用いられている[30]。Ca 含有製剤である炭酸カルシウム（カルタン®）は、消化管内でリン酸イオンを結合し、不溶性リン酸化合物として糞便中に排泄する作用がある。製剤として安価である一方で、沈降炭酸カルシウム製剤のカルシウム含有率は約 40%と高く、投与量の増加によるカルシウム過剰負荷での血管石灰化、過度の PTH 抑制による低回転骨、異所性石灰化などの副作用が問題となる[31]。非 Ca 含有製剤の 1 つである炭酸ランタン（ホスレノール®）のランタンとは 3 価の希土類遷移元素であり、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。国内での臨床試験から炭酸カルシウムと同等の血清リン低下作用が認められ、主な副作用は軽度の消化器症状のみであり、高カルシウム血症は生じない。炭酸ランタンの作用機序については、*in vitro* 試験でのリン結合作用や、*in vivo* 試験での慢

性腎不全モデルラットにおけるリン吸収抑制作用により、経口投与された炭酸ランタンは腸管内において、食事によって摂取されたリン酸と強固に結合して極めて難溶性の高いリン酸ランタンを形成し、解離することなく糞便中へ排泄され、腸管からのリン吸収は抑制されて血清リン濃度は低下すると考えられている[32]。また、血中濃度については、ヒト 30 名を対象とした実験において、炭酸ランタン 250mg、1000mg、2000mg を 8 名ずつ単回投与した群と、水のみを飲用させた無投薬対象群 6 名で比較した研究において検討されている[33]。いずれの投与群も、血漿中には低濃度のランタンが認められたのみで、250mg、1000mg、2000mg 投与時の血漿中の炭酸ランタン濃度は、それぞれ投与後 4 時間、5.25 時間及び 6.5 時間で C_{max} に達し、その後、7.78 時間、19.18 時間及び 28.49 時間の $t_{1/2}$ で血漿中から消失した。

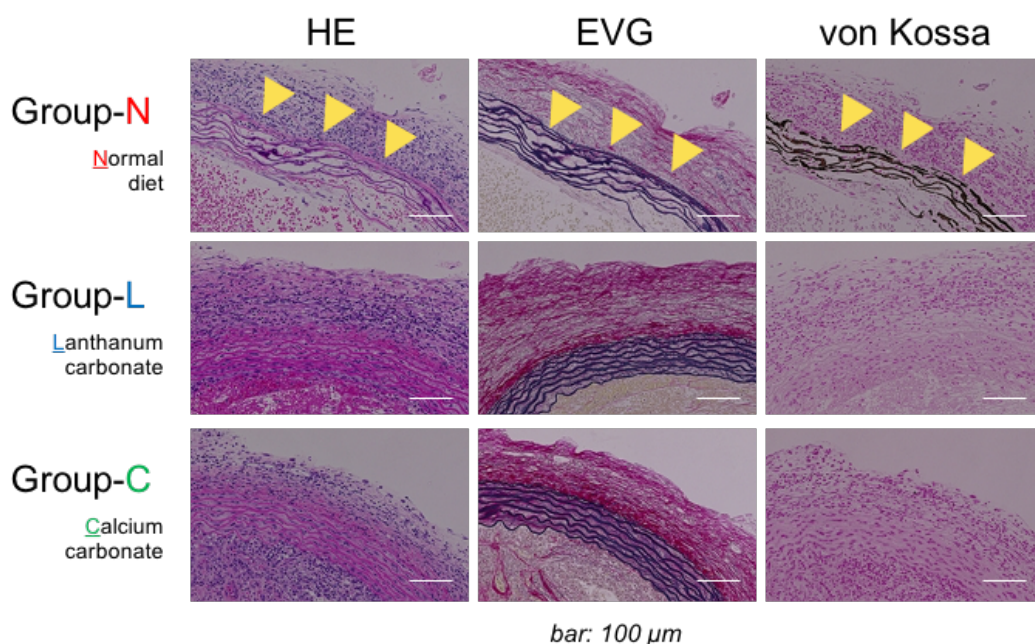
以上から、我々は先行研究において代表的なリン吸着薬である炭酸カルシウムと炭酸ランタンを若年ラットの大動脈ホモグラフト皮下移植モデルに投与し、その治療効果・有害事象を検討した (<http://webcast.aats.org/2010/presentations/16.21.pdf>)。

本実験の要旨を以下にまとめる。生後 4 週の Brown-Norway ラット (BN) をドナー、生後 4 週の Lewis ラット (LEW) をレシピエントとして用いた。BN の腹部大動脈を摘出して、LEW の皮下に移植を行い、通常飼料投与群・炭酸ランタン投与群・炭酸カルシウム投与群の 3 群にグループ分けを行った。2 週間の観察期間ののちにレ

シピエントである LEW を sacrifice し、病理組織学的検査・大動脈ホモグラフト中カルシウム含有量・血清学的検査を検討した。病理組織学的検査では、通常飼料投与群では von Kossa 染色で石灰化が確認されたが、炭酸ランタン投与群及び炭酸カルシウム投与群では石灰化を認めなかった (Figure 6)。

Figure 6. 若年ラットを用いた

大動脈ホモグラフト皮下移植モデルの病理組織所見



Kinoshita O et al. <http://webcast.aats.org/2010/presentations/16.21.pdf> より引用

Group-N: 通常飼料投与群、Group-L: 炭酸ランタン投与群、Group-C: 炭酸カルシウム投与群。

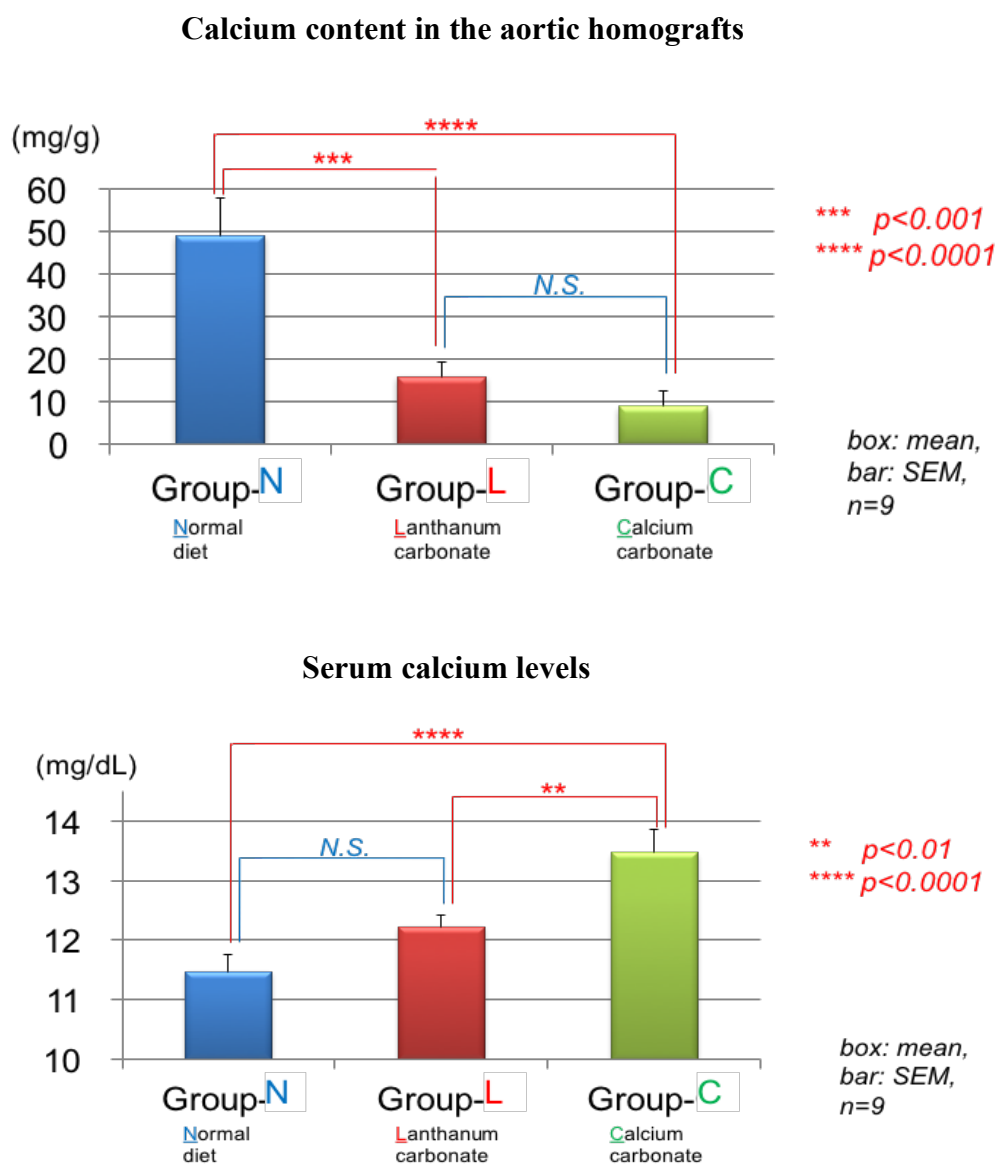
通常飼料投与群では、von Kossa 染色において中膜の黒色変化つまり石灰化を認めたが、炭酸カルシウム及び炭酸ランタン飼料投与群では石灰化を抑制した。

大動脈ホモグラフト中のカルシウム含有量では、通常飼料群に比べて炭酸ランタン投与群及び炭酸カルシウム投与群のいずれも有意な低下を認め、また炭酸ランタン投与群と炭酸カルシウム投与群の間では有意差を認めなかった。血清無機リン濃度については、通常飼料投与群に比べて炭酸ランタン投与群及び炭酸カルシウム投与群は有意な低下を認めたが、炭酸ランタン投与群と炭酸カルシウム投与群の間では有意差を認めなかった。また、血清カルシウム濃度については、通常飼料群と炭酸ランタン投与群で有意差を認めなかったが、一方で炭酸カルシウム投与群は通常飼料群及び炭酸ランタン投与群に比べて有意に高値であった（Figure 7）。

これらの結果から、炭酸ランタンと炭酸カルシウムはいずれも、若年ラットにおける大動脈ホモグラフト移植後石灰化を抑制するが、一方で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と推察された。また、本実験の **Limitation** として、皮下移植モデルであり血流影響下で同様の現象が確認されていないこと、リン吸着薬の投与による成長障害などの高カルシウム血症以外の有害事象が検討されていないことが挙げられた。

Figure 7. 若年ラット皮下移植モデルにおける

大動脈ホモグラフト含有カルシウムと血清カルシウム濃度



Kinoshita O et al. <http://webcast.aats.org/2010/presentations/16.21.pdf> より引用

Group-N: 通常飼料投与群、Group-L: 炭酸ランタン飼料投与群、Group-C: 炭酸カルシウム飼料投与群。

ホモグラフト含有カルシウム定量値は、炭酸ランタンと炭酸カルシウムで有意差を認めないが、血清カルシウム濃度は炭酸カルシウム群で有意に高値であった。

5. 若年者の低リン血症に伴う有害事象

長期の低リン血症による症状は、主に腎臓と骨に生じることが知られている。腎臓では、遠位尿細管におけるカルシウムとマグネシウムの再吸収が抑制され、高カルシウム尿症を呈する。また、リンは骨代謝にも極めて重要な役割を果たす。骨代謝は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより維持されているが、低リン血症では骨吸収が増加し、カルシウムが放出され高カルシウム血症となる。さらに長期の低リン血症はくる病や骨軟化症を引き起こすことが知られている。その他、低リン血症による細胞内リン濃度の減少によって、次の2つの結果を引き起こすことにより全臓器に大きな影響を及ぼす。その1つが、赤血球における2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) 濃度が低下することによりヘモグロビンの酸素親和性が増加して細胞レベルでの酸素放出が減少すること、もう1つは、細胞内adenosine triphosphate (ATP) が減少しエネルギー依存の細胞における細胞機能の低下を来すことである。この2点により、中枢神経障害・心肺機能の低下・骨格筋や平滑筋機能の低下・溶血性貧血・白血球減少・出血傾向などを引き起こすことがある[34]。

目的

以上から実験 1 では、これまで当科の先行研究の **limitation** であった「皮下移植モデル」を解決する目的で、若年ウサギを用いて「血流影響下モデル」を確立することとした。本来は遺伝子発現解析や分子生物学的解析が行いやすいマウスやラットでの実験が望ましいが、例えば離乳期の生後 3 週程度のラットは体重が 50～60g 程度の大きさであるため、血流を維持した血管吻合モデルの確立やデバイスを用いた流量の測定は技術的に困難と判断し、本実験では実験動物としてウサギを用いる方針とした。若年ウサギの大動脈を用いて、既報にはない移植手術時及び摘出時にグラフトの流量を定量評価し、大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルの確立を行う。また、これにより若年ウサギにおける大動脈ホモグラフトが移植後に最も石灰化する時期を評価し、石灰化モデルの適正な観察期間を決定する。次いで、実験 2 では、「若年者の大動脈ホモグラフト移植後石灰化は、炭酸ランタンの投与により有害事象なく抑制することができる」という仮説をもとに、リン吸着薬である炭酸ランタンをレシピエントに投与し、投与期間毎にグループ分けを行って、大動脈ホモグラフト移植後の石灰化を定性的・定量的に評価する。また、炭酸ランタンによる有害事象についても検討する。これにより適正な炭酸ランタン投与期間を検討する。

方法

1. 実験動物の取り扱い

本研究では、若年ウサギとして離乳直後(生後 4～5 週)で安定供給できる生後 6 週時点で搬入し、1 週間の環境慣らし期間の後に生後 7 週で移植手術を行う方針とし、全てのウサギは、(株)東京実験動物より購入した。ドナーは生後 7 週で雄の New Zealand White Rabbit (NZW)を使用し、レシピエントは生後 7 週で雄の Japanese White Rabbit (JW)を使用した。なお、レシピエントの JW は平均寿命が 6～8 年、成獣で体調が 40～50cm で体重が 3～6kg、生後 3～4 ヶ月頃から生殖可能となる。JW の年齢をヒトの年齢に換算すると、JW7 週＝ヒト 2～3 歳、JW9 週＝ヒト 8～9 歳、JW11 週＝ヒト 12～13 歳、JW15～16 種＝ヒト 15 歳、JW6 か月＝ヒト 20 歳、JW1 歳＝ヒト 25 歳、JW3 歳＝ヒト 43 歳、JW5 歳＝ヒト 58 歳、JW8 歳＝ヒト 78 歳と推察されている(https://www.cymb.net/a-odora/knowledge/data_knowledge4.html を参照)。

動物飼育室は、室温 24±2℃、湿度 45～65%で管理され、照明は 12 時間毎の明暗サイクルでの管理とした。通常飼料は、(株)オリエンタル酵母より搬入したウサギ用飼料である LRC4 を自由摂取とした。炭酸ランタン含有飼料は、(株)バイエル薬品より炭酸ランタン原末を入手し、オリエンタル酵母に依頼して上記の LRC4

と混合し 5%炭酸ランタン含有飼料となるよう調整した。飲料水は、ろ過水を自由摂取とした。なお、5%炭酸ランタン含有飼料は観察期間を通して 100g/日（炭酸ランタン 5000mg/日）とした。ウサギは後述の通り成長に伴い概ね体重 1.5kg～3.0kg で変動するため、炭酸ランタン投与量は概ね 1500～3000 mg/kg/day の範囲である。これはラットを用いた研究の既報[35][36]及び「ホスレノール製品情報概要（バイエル薬品）」（ウサギを含む）に記載されている動物実験の投与量（1500～2500mg/kg/day）を参考にして決定した。

2. 麻酔とモニタリング

麻酔方法は、ケタミン（ケタラール®、第一三共）とキシラジン（セラクタール®、バイエル薬品）の併用で行った。ドナー手術では、初回導入時はケタミン 30mg/kg 及びキシラジン 15mg/kg を右大臀筋に筋肉注射とし、レシピエント手術においては、初回導入時はケタミン 15mg/kg 及びキシラジン 7.5mg/kg を同様に右大臀筋に筋肉注射とした。術中の追加麻酔は、30 分毎に上記と同量の組成で適宜左大臀筋に筋肉注射を行い、麻酔を維持した。初回麻酔導入後に、体重測定を行った後に手術を開始した。全ての手術は、仰臥位で両上下肢を固定し、ドナー手術は前胸部～腹部正中にかけて剃毛、レシピエント手術は右頸部を剃毛した後に、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て実施した。レシピエント手術のみ、左耳の外耳静脈に 24 ゲージの静脈留置針（サーフロー®、テルモ）を挿入し、麻酔導入時～覚醒にかけて生理食塩水 50ml/kg/h で投与した。モニタリングについては、酸素マスク 3L/分の投与で開始し、右耳にパルスオキシメーターを装着して酸素飽和度 92%以上を維持するよう適宜流量を調節した。

3. 大動脈ホモグラフト採取と移植手術

ドナーである生後7週で雄のNZWから、大動脈ホモグラフトとして腹部大動脈と下行大動脈を摘出した。前項2の如く麻酔導入し、腹部正中切開で、開腹したのちに腸管を体外に誘導し視野を得た。丁寧に腹部大動脈と下大静脈の間を剥離し、2～3対の腰動脈を5-0絹糸で結紮切離した。下大静脈よりヘパリン500単位を投与し3分後に、腹部大動脈の中樞側は両側腎動脈上で結紮、末梢側は腹部大動脈分岐部で結紮切離した。摘出した腹部大動脈は、直後に行われるレシピエント移植手術まで4℃のヘパリン化した生理食塩水に浸水して保存した。次いで、胸骨正中切開を行い、左胸腔を解放して下行大動脈の周囲を丁寧に剥離した。下行大動脈の末梢側は横隔膜上で結紮、中樞側は遠位弓部で結紮切離して摘出した。肋間動脈は極めて細く結紮困難であるため、摘出時に下行大動脈から1cm程離れた部位を電気メスで焼灼しながら切離した。摘出した下行大動脈は同様に4℃のヘパリン化した生理食塩水に浸水して保存した。塩化カリウム液10mEqを心尖部より心腔内投与して、ドナーのNZWを安楽死させた。摘出した大動脈ホモグラフトの長さや幅を測定した。

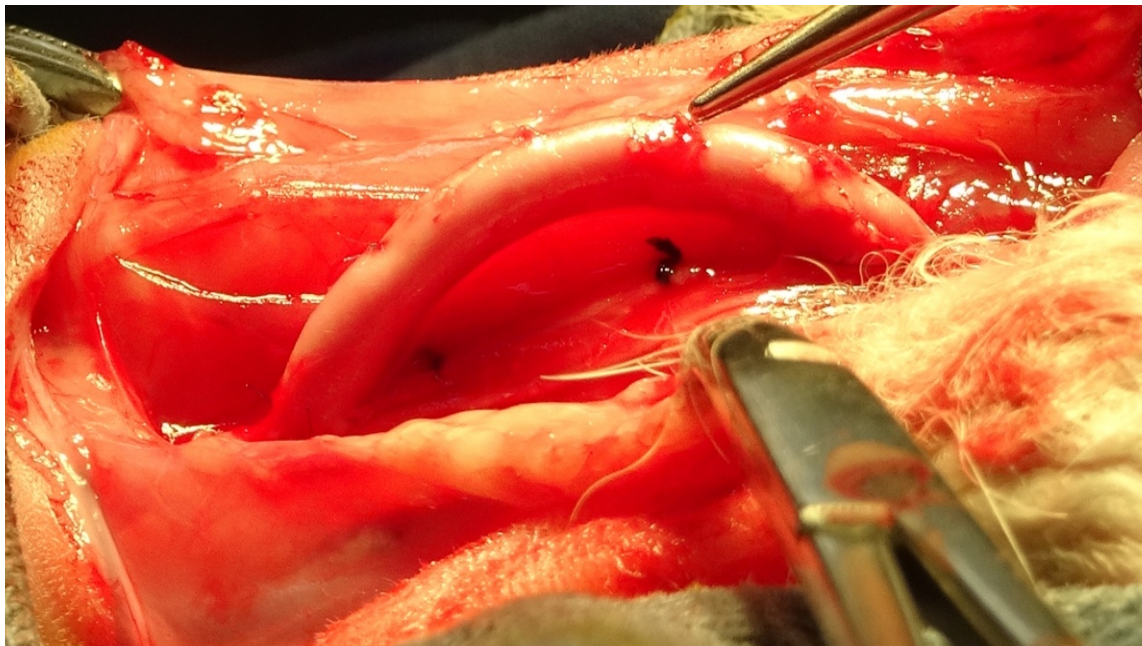
レシピエント（生後7週で雄のJW）の移植手術は、ドナーの大動脈ホモグラフト摘出直後に2羽連続で行った。JWの右頸部に1%リドカイン（キシロカイン®、アスペンジャパン）2mlで局所麻酔をした後に、4cmの縦切開をおいた。皮下組織を

剥離し右頸動静脈を露出して、右頸動脈周囲を十分に剥離したのちに、右頸静脈よりヘパリン 500 単位を静注した。3 分後に右頸動脈の中枢側と末梢側をそれぞれブルドック鉗子で遮断し、23 ゲージ針で中枢側吻合部に小切開をおいて、ポッツ剪刀で切開口を適切なサイズに広げた。大動脈ホモグラフト中枢側端とレシピエントの右頸動脈中枢側吻合部を 8-0 ポリプロピレン糸（プロリーン®、エチコン）による連続縫合で端側吻合した。吻合直後に中枢側のブルドック鉗子を一瞬解放して、グラフトに血流が流れることを確認した。次いで、レシピエントの右頸動脈末梢側に同様の手技で切開をおいて、大動脈ホモグラフト末梢端を同様に 8-0 ポリプロピレン糸による連続縫合で端側吻合した。中枢側と末梢側の吻合部の間を、吻合部の 1cm 内側をそれぞれ 1 カ所ずつ 3-0 絹糸で結紮し、大動脈ホモグラフトに血流が流れるようにした。ブルドック鉗子による右頸動脈の遮断を解除して、止血確認を行った。出来上がりを Figure 8 に示す。この時点で、通常ヒトにおける冠動脈バイパス術のグラフト流量測定で用いられている Transit Time Flow Meter (TTFM) (VeriQ®、MediStim) で流量の測定と吻合部の性状を評価する Pulsatility Index (PI) を測定した [37]–[39]。流量 < 5ml/min 未満かつ/または PI > 5 を、本研究における除外基準とした。皮下組織及び皮膚を 3-0 バイクリル®（エチコン）で縫合閉鎖し手術を終了し

た。覚醒が得られたのちに点滴及び酸素投与を終了し、飼育室のケージに戻した。

術翌日よりアスピリン 5mg を経口投与してグラフト血栓閉塞を予防した。

Figure 8. 大動脈ホモグラフト移植手術後



ドナー(NZW)から摘出した大動脈ホモグラフト（腹部大動脈または下行大動脈）を、レシピエント（JW）の右頸動脈に端側吻合でブリッジ状に吻合。中枢側及び末梢側吻合部の間は 3-0 絹糸で結紮した。

4. 大動脈ホモグラフトの摘出と大腿骨の採取

ケタミン 30mg/kg とキシラジン 15mg/kg を右大臀筋に筋肉注射して麻酔導入したのちに、体重測定を行った。仰臥位で両上下肢を固定し、頸部正中～胸部正中にかけて剃毛しイソジン消毒したのちにドレーピングして手術を開始した。摘出においては、追加麻酔を行っていない。頸部正中から胸骨下縁まで皮膚切開をおいて、まずは右頸動脈に移植した大動脈ホモグラフトを露出した。TTFM で大動脈ホモグラフトの流量及び PI を測定したのちに、ヘパリン 1000 単位を右頸静脈より投与して、3 分後に右頸動脈の中樞側と末梢側をブルドック鉗子で遮断した。大動脈ホモグラフトを損傷しないようにメツェンバウムで周囲を切離し摘出した。摘出した大動脈ホモグラフトは、生理食塩水に浸水して洗浄した。次いで、胸骨正中切開をおいて心臓を露出し心尖部より動脈血 30ml を採取した。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℃)で凍結保存した。塩化カリウム液 10mEq を心尖部より心室内に投与してレシピエントを安楽死させた。その後に、右大腿部に切開をおいて、右大腿骨を損傷しないよう股関節及び膝関節で靱帯を切断して摘出した。大腿骨は生理食塩水に浸したガーゼに包み、Falcon® コニカルチューブ 50mL に入れ、deep freezer(-80℃)で凍結保存した。

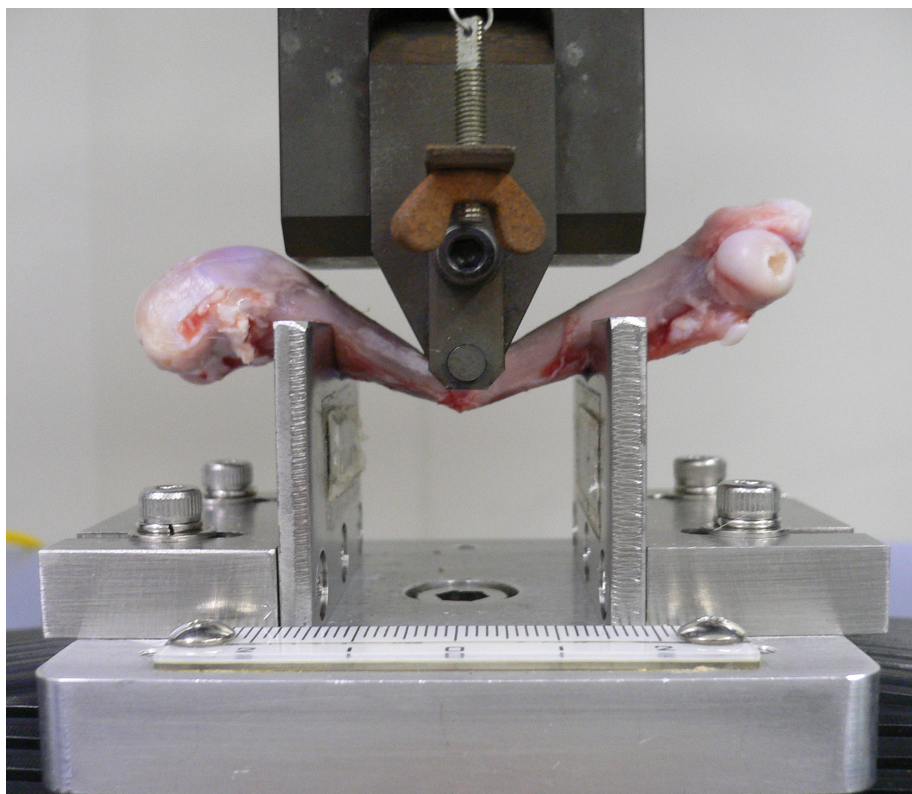
5. 大腿骨長の測定、骨塩量・骨密度試験と 3 点曲げ試験

成長障害の評価目的で、ウサギ大腿骨長、骨塩量・骨密度、3 点曲げ試験を以下の要領で実施した。ウサギ大腿骨長の測定は、大腿骨頭上縁～大腿骨内側上顆下縁の距離(mm)を測定し、各群の平均値を算出した。骨塩量・骨密度試験は、DXA

(Dual Energy X-ray Absorptiometry) 法にて行った。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ある。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。ウサギ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、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)を測定する (Figure 9)。得られる骨力学パラメータは、最大荷重(N)、破断荷重(N)、剛性(Stiffness)(N/mm)、最大荷重エネルギー($\text{N} \cdot \text{mm}$)で、破断エネルギー($\text{N} \cdot \text{mm}$)である。骨塩量・骨密度検査及び 3 点曲げ試験は、(株)クレハ分析センターに依頼した。

Figure 9. ウサギ大腿骨 3 点曲げ試験



摘出したウサギの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)を測定する試験。

6. 血液学的検査

レシピエントの心尖部直接穿刺により得られた血液を、採取直後に血液ガス分析装置にかけて、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)濃度・アルカリホスファターゼ(ALP)濃度を測定した。これらの測定は(株) SRL に依頼した。

7. 大動脈ホモグラフト含有カルシウム定量検査

レシピエントの JW から摘出した大動脈ホモグラフトは deep freezer (-80℃) で凍結保存した。原子吸光度法によるカルシウム定量値 (mg/dry・g) 測定を、(株) SRL に依頼して行った。端的に述べると、各検体を硝酸と過酸化水素水の混合液に入れ電磁波をあてて検体組織を完全に溶解後、各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、各検体の組織乾重量で除し補正し mg/dry・g で表記した。

8. 病理組織学的検査

摘出した大動脈ホモグラフト 5mm 長を短軸方向に切開してホルマリン固定し、パラフィン包埋したのちに、Hematoxylin-Eosin(HE)染色、Elastica van Gieson(EVG)染色、von Kossa 染色を行い評価した。これらの検査は、いずれも（株）クレハ分析センターに委託した。標本写真は、顕微鏡 Keyence BZ-9000 (Keyence)を用いて撮影した。Intima/media ratio の測定は、Keyence BZ-analyzer (Keyence)を用いて内膜の最大肥厚部分の幅（ μm ）で測定を行った。

9. 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」、「実験動物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われた。また、本実験計画は、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-P15-062）。

10. 統計学的分析

統計解析は全て GraphPad Prism7 (Graphpad Software. San Diego,CA)を使用した。得られたデータは、平均±標準誤差(Standard Error, SE)で表記し、3群間以上の検定は、全体の群間の差を Kruskal-Wallis 検定で行い、次いで Dunn の多重比較検定を用いた。相関は Pearson 相関係数を用い、名義変数の検定は Fisher の正確確率検定を用いた。P 値<0.05 を統計学的に有意と解釈した。

結果

実験 1. 大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルの確立と

観察期間の検討

1-1. 術後観察期間による群分けと移植手術及び摘出手術

大動脈ホモグラフト移植後石灰化の適切な観察期間を決定するために、移植手術から 2 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後にレシピエントを安楽死させ、大動脈ホモグラフトを摘出する方針とした。術後に死亡する症例を認めた為、それぞれの群が $n=8$ になるよう手術を実施した。なお、合計 44 羽のレシピエント手術を施行して、そのうち 12 羽が術直後または術後 7～14 日の間に死亡した。死亡症例は全例で食餌摂取不良及び下痢を発症しており、剖検では高度の腸管拡張をきたしていた。

レシピエントにおける移植手術時点での各種パラメータを Table 1 に示す。手術時点でのレシピエント体重、手術時間、頸動脈遮断時間、ケタミン投与量、キシラジン投与量、生理食塩水の点滴量、大動脈ホモグラフトの流量及び PI、腹部大動脈利用率(%)（下行大動脈と腹部大動脈のうちの腹部大動脈を用いた割合）に有意差を認めなかった。

大動脈ホモグラフト摘出時の各群におけるホモグラフト全体の開存率は、2 週群：87.5%、4 週群：62.5%、8 週群：62.5%、12 週群：62.5%と各群で有意差を認めなかった($P=0.68$)(Table 2)。しかし、各群における腹部大動脈ホモグラフトと下行大動脈ホモグラフトの開存率は、2 週群でそれぞれ 75%・100%、4 週群で 50%・75%、8 週群で 50%・66.7%、12 週群で 0%・100%であり、全ての術後観察期間において下行大動脈ホモグラフトが腹部大動脈ホモグラフトに比べ良好な開存率を示した (Figure 10)。

次に、開存例について大動脈ホモグラフト摘出時の各パラメータ値を Table 2 に示す。体重増加は、成長に伴い相関係数 $r=0.94$ で有意な正の相関を認めた($P<0.001$)。摘出時の大動脈ホモグラフト流量・PI・腹部大動脈利用率は、各群で有意差を認めなかった。

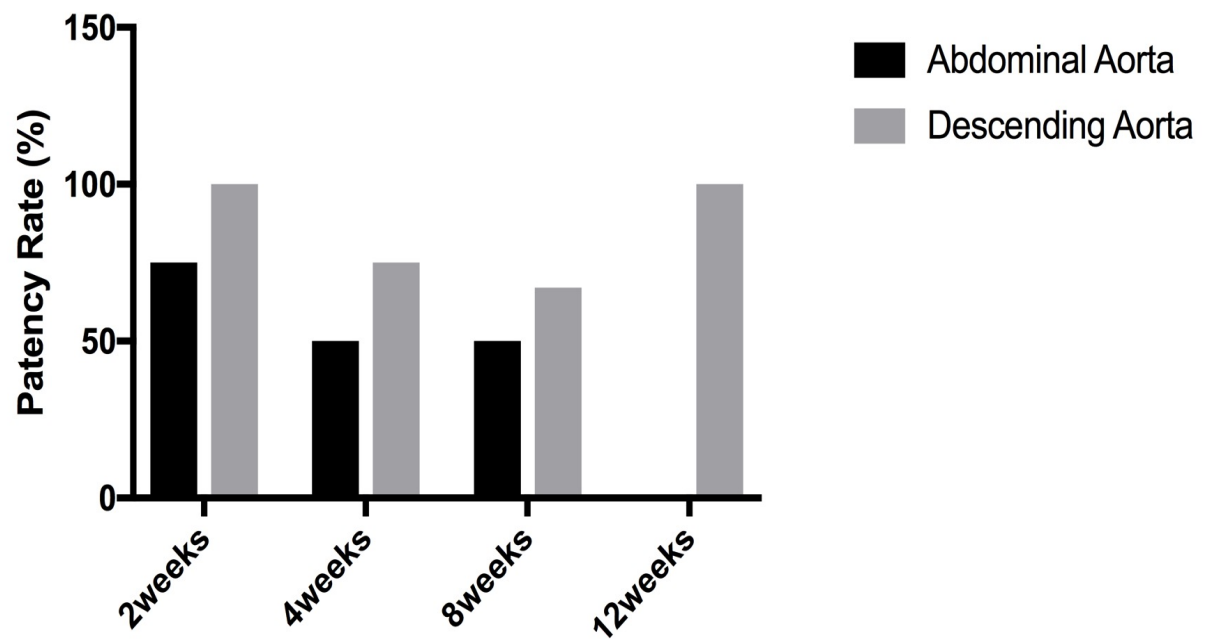
Table 1. 大動脈ホモグラフト移植手術時の各計測値

	2weeks (n=8)	4weeks (n=8)	8weeks (n=8)	12weeks (n=8)	P value
BW (kg)	1.51 ± 0.05	1.54 ± 0.03	1.46 ± 0.05	1.40 ± 0.03	0.11
Ope time (min)	59.5 ± 1.3	62.4 ± 2.1	61.8 ± 2.6	64.4 ± 5.0	0.77
Clamp time (min)	37.3 ± 0.7	38.8 ± 1.3	40.0 ± 1.1	40.1 ± 3.3	0.53
Ketamine (mg)	65.0 ± 12.4	53.1 ± 3.7	56.3 ± 5.7	51.9 ± 3.7	0.85
Xylazine (mg)	16.3 ± 1.8	15.0 ± 2.7	19.0 ± 3.4	16.3 ± 1.8	0.76
Div dose (ml)	200 ± 12	164 ± 15	163 ± 16	166 ± 13	0.27
Graft flow (ml/min)	15.4 ± 2.8	15.9 ± 1.5	11.0 ± 1.6	14.5 ± 1.0	0.11
PI	1.74 ± 0.15	1.45 ± 0.36	1.64 ± 0.42	1.79 ± 0.36	0.19
Abd. aorta (%)	4 (50)	4 (50)	2 (25)	3 (37.5)	0.858

BW:体重、Ope time：手術時間、Clamp time：頸動脈遮断時間、Div：頸静脈点滴、
PI：Pulsatility Index、Abd. Aorta：腹部大動脈

移植手術時の各項目の計測値は、各術後観察期間で有意差を認めなかった。

Figure 10. 腹部大動脈と下行大動脈の各群における開存率



全ての群で、腹部大動脈に比べて下行大動脈の方が良好な開存率を示した。

Table 2. 大動脈ホモグラフト摘出時の開存例における各測定値

	2weeks	4weeks	8weeks	12weeks	P value
BW gain (kg)	0.43 ± 0.34	0.68 ± 0.08	1.16 ± 0.10	1.40 ± 0.08	<0.001
Graft flow (ml/min)	15.7 ± 1.1	15.5 ± 3.7	19.6 ± 3.1	23.8 ± 4.6	0.46
PI	2.9 ± 0.50	2.33 ± 0.50	1.70 ± 0.12	1.96 ± 0.19	0.21
Patency rate (%)	87.5	62.5	62.5	62.5	0.68

BW:体重、PI : Pulsatility Index

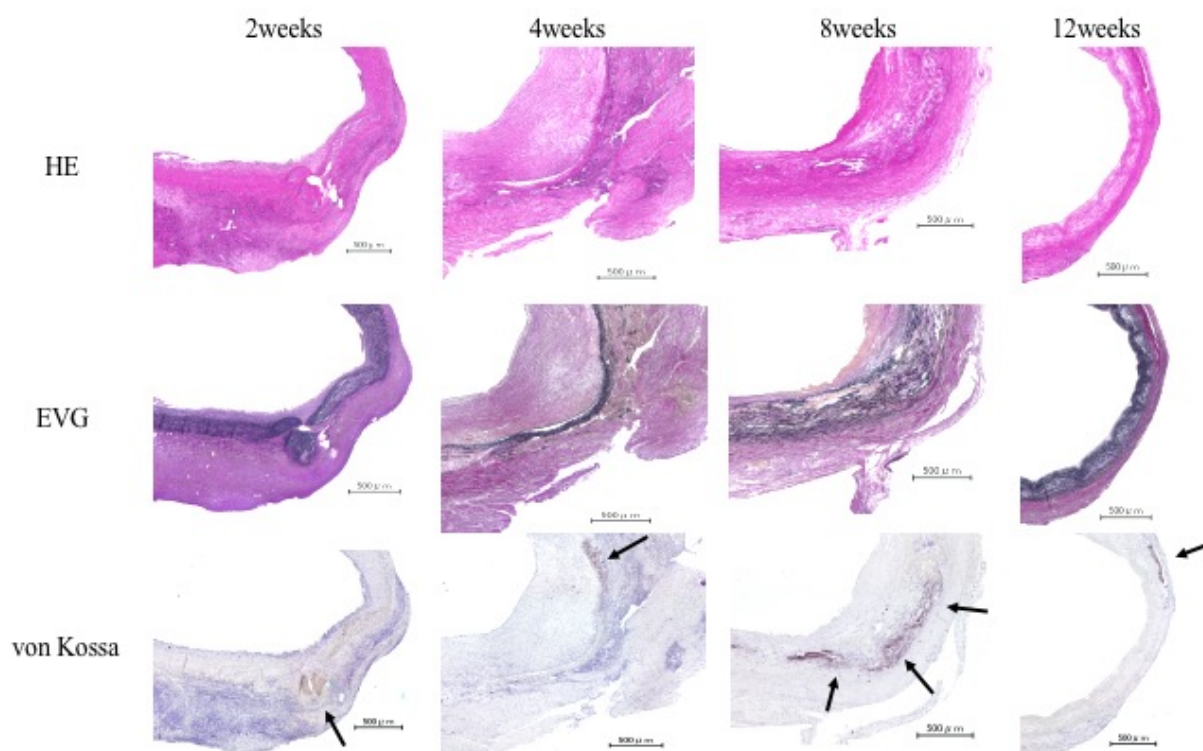
実験 1 における摘出時の体重増加は、成長に伴い有意差を認めたが、グラフト流量・PI・開存率に有意差を認めなかった。

1-2. 大動脈ホモグラフト摘出後における病理学的評価

石灰化部位を黒色に描出する von Kossa 染色において 2 から 8 週群では中膜弾性線維に強い石灰化を認めたが、12 週群ではごく軽度の石灰化を認める程度であった (Figure 11 下段矢印)。

EVG 染色では、2 週群と 8 週群で内膜の軽度肥厚を認め、4 週群では著明な内膜肥厚を認めた (Figure 11 中段)。さらに、内膜肥厚を定量的に解析するために、内膜/中膜の厚さの比 (Intima media ratio) を $n=4$ ずつ内膜の最大肥厚部位で測定すると、2 週群で 0.63 ± 0.12 、4 週群で 1.77 ± 0.34 、8 週群で 1.66 ± 0.35 、12 週群で 0.38 ± 0.18 であり、全体の平均値に有意差を認めた ($P=0.0034$) (Figure 12)。尚、Dunn の多重比較検定では各群間に有意差を認めなかった。

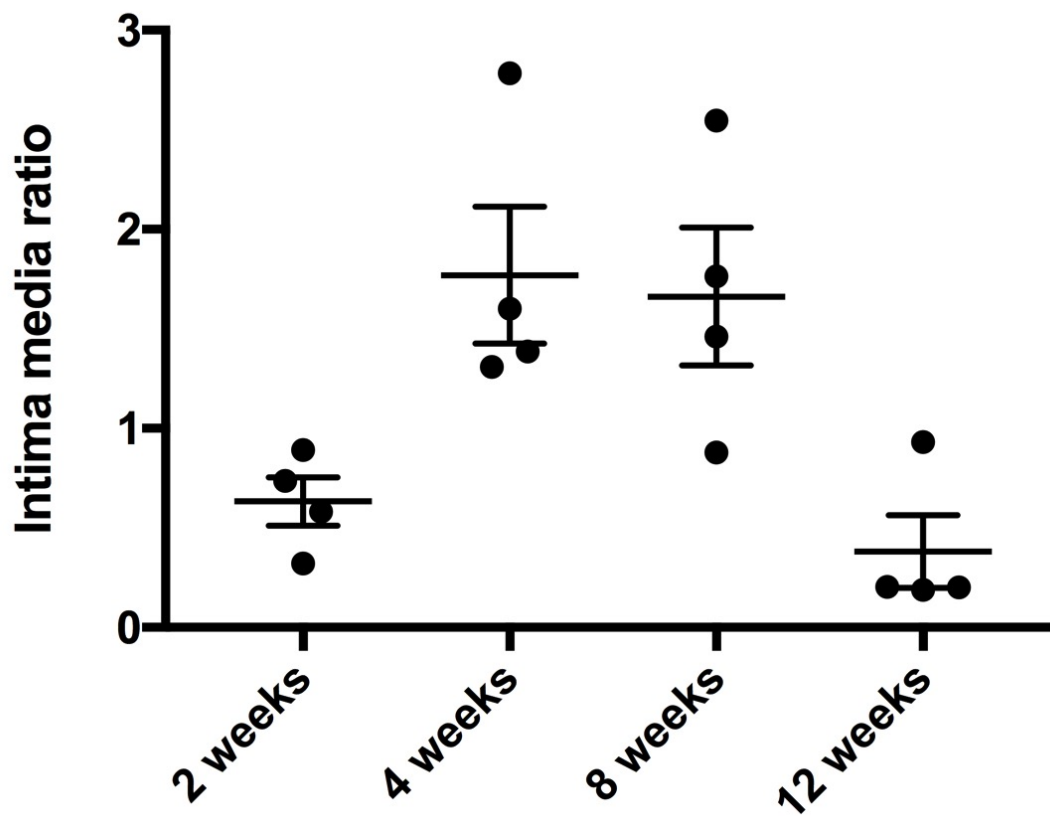
Figure 11. 大動脈ホモグラフト摘出後の病理画像



von Kossa 染色において、2 週群・4 週群・8 週群では中膜弾性線維に強い石灰化を認めたが、12 週群では軽度の石灰化を認めるのみであった。

EVG 染色では、2 週群と 8 週群で軽度内膜肥厚、4 週群で強い内膜肥厚を認めた。

Figure 12. 内膜/中膜の厚さの比 (Intima media ratio)

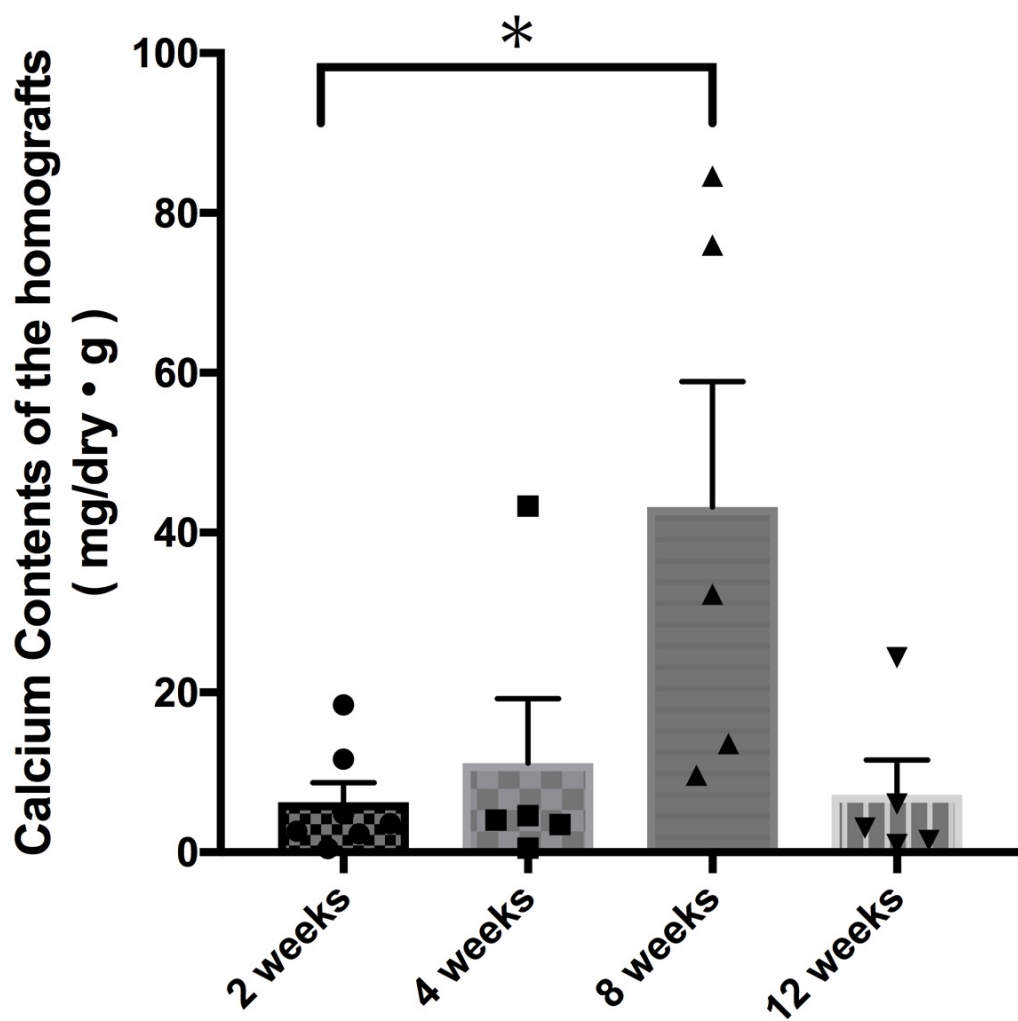


内膜肥厚の程度を評価するために、内膜と中膜の厚さの比 (Intima media ratio) を各群 n=4 ずつ最大肥厚部位で測定すると、全体の平均値に有意差を認めた (P=0.0034)。

1-3. 大動脈ホモグラフト石灰化の定量評価

大動脈ホモグラフトに含有されるカルシウム定量値(mg/dry・g)を原子吸光度法により測定すると、2週群：6.26±2.44 mg/dry・g、4週群：11.18±8.06 mg/dry・g、8週群：43.23±15.67 mg/dry・g、12週群：7.18±4.38 mg/dry・gであり、術後2から8週にかけては上昇傾向を認めたが、12週で減少に転じた。Dunnの多重比較検定を行うと、2週群に比べて8週群で有意に高値であった(P=0.0496)。その他の群では有意差を認めなかった (Figure 13)。

Figure 13. 大動脈ホモグラフト中のカルシウム含有量



* P < 0.05

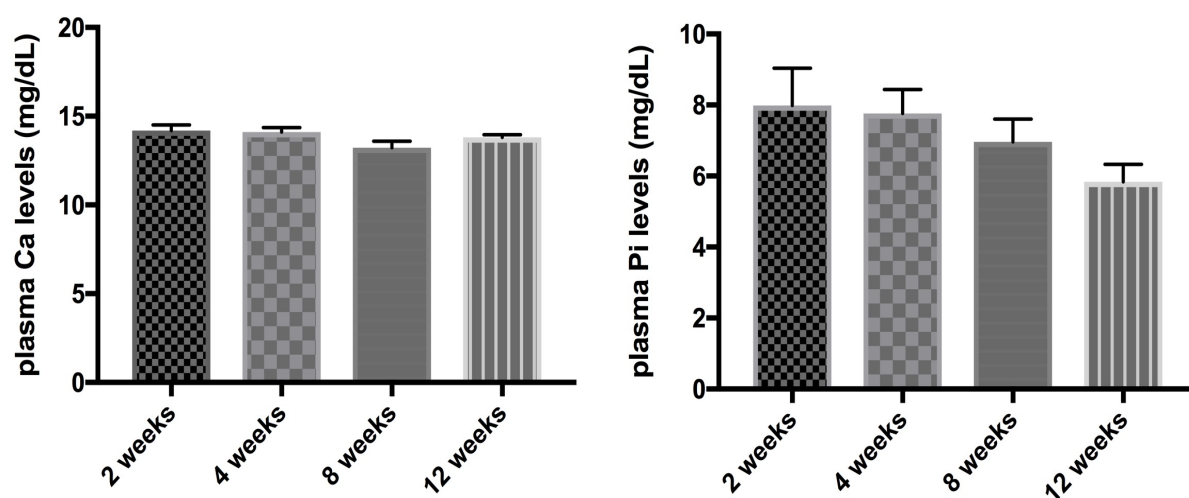
原子吸光度法により大動脈ホモグラフトに含まれるカルシウム含有量、つまり石灰化を定量評価において、2週・4週と次第に増加し8週群でピーク値をとり、12週群では減少に転じた。

1-4. 術後週数と血漿カルシウム濃度・無機リン濃度

血漿中のカルシウム濃度(mg/dL)は、2 週群：14.2±0.3 mg/dL、4 週群：14.1±0.2 mg/dL、8 週群：13.2±0.4 mg/dL、12 週群：13.8±0.2 mg/dL であり、各群間で有意差を認めなかったことから(P=0.23)、血漿カルシウム濃度は成長に伴い変動は認められなかった。

一方、血漿無機リン濃度(mg/dL)は、2 週群：7.99±1.0 mg/dL、4 週群：7.76±0.7 mg/dL、8 週群：6.96±0.6 mg/dL、12 週群：5.84±0.5 mg/dL であり、ピアソンの相関係数において $r=-0.407$ の有意な負の相関を認めた(P=0.019) (Figure 14)。すなわち、これにより若年者ほど血漿無機リン濃度が高値であることが本研究においても証明された。

Figure 14. 術後週数と血漿カルシウム濃度・無機リン濃度



血漿中のカルシウム濃度と無機リン濃度を測定すると、カルシウム濃度は術後週数にかかわらず一定であったが、無機リン濃度は成長に伴い低下した

(ピアソン相関係数 $r=-0.407$, $P=0.019$)。

実験 1 要約

上記の実験 1 の結果から、若年ウサギを用いた血流影響下大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルにおいて、石灰化を観察する最適な術後観察期間は、石灰化定量において最も強い石灰化を呈した術後 8 週間と考えられた。開存率の観点から、本実験モデルにおける大動脈ホモグラフトの種類は、腹部大動脈よりも下行大動脈が適していると考えられた。

また、若年ウサギほど血漿無機リン濃度が高値であることから、術後早期にリン吸着薬である炭酸ランタンを投与することで、より効率的に有害事象を少なく大動脈ホモグラフト移植後石灰化を抑制することに繋がると考えられた。

以上から、以下の実験 2 では術後観察期間を 8 週間、大動脈ホモグラフトの種類を下行大動脈で統一し、術後の炭酸ランタンの投与期間によってグループ分けする方針とした。

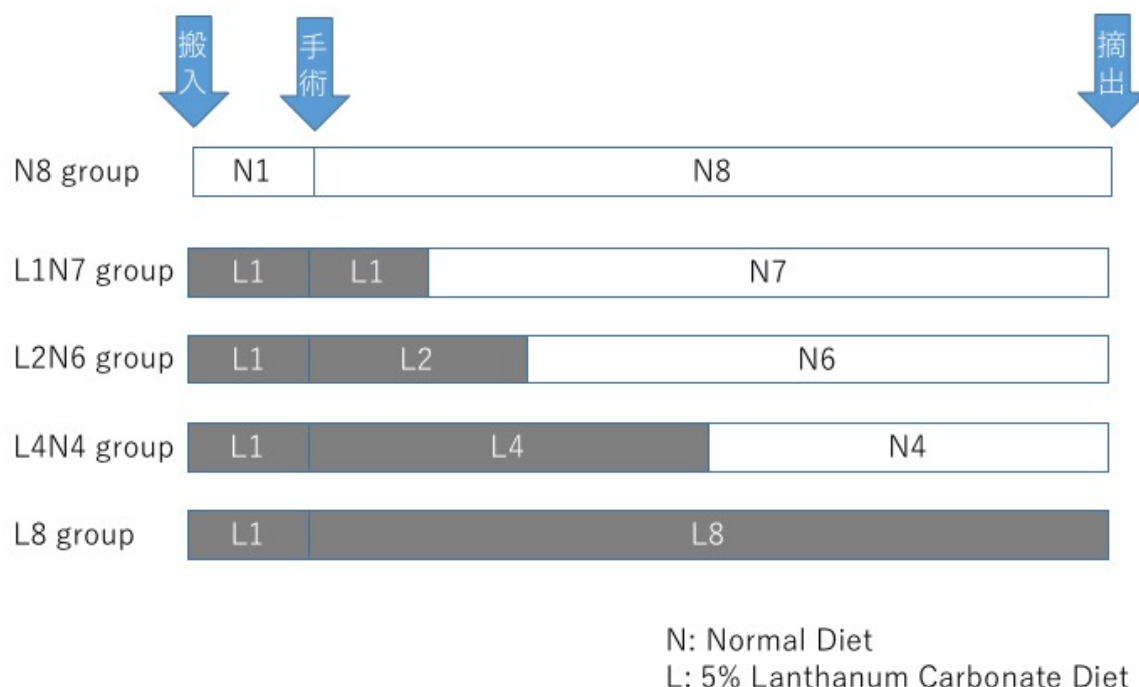
実験 2. 大動脈ホモグラフト移植後石灰化に対する

炭酸ランタンの有用性及び有害事象の検討

2-1. 炭酸ランタン含有飼料投与期間によるグループ分け

本実験では実験 1 で得られた結果から、術後観察期間を 8 週間で統一し、炭酸ランタン含有飼料の投与期間により以下のようにグループ分けを行った。搬入時～術後 8 週間の全期間において通常飼料 (Normal diet) を投与した群を N8 群、5%炭酸ランタン (Lanthanum carbonate) 含有飼料を搬入時～術後 1 週間投与した後に通常飼料を 7 週間投与した群を L1N7 群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時から術後 2 週間投与した後に通常飼料を 6 週間投与した群を L2N6 群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時から術後 4 週間投与した後に通常飼料を 4 週間投与した群を L4N4 群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時から術後 8 週間投与した群を L8 群とした (Figure 15)。なお、ウサギは変化に敏感で、搬入直後や手術後は食事摂取量が減る傾向にあり、また炭酸ランタン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 15. 炭酸ランタン飼料の投与期間によるグループ分け



5%炭酸ランタン含有飼料の投与期間によって、5 グループに分けて実験 2 を行った。N8 群は通常飼料を術後 8 週間まで投与した群、L1N7 群は術後 1 週間まで炭酸ランタン含有飼料を投与して、その後 7 週間は通常飼料を投与した群、以下 L2N6 群、L4N4 群、L8 群と炭酸ランタン含有飼料の投与期間により 5 群に分けた。

2-2. 大動脈ホモグラフト移植手術と術後経過

移植手術は、実験 1 と同様に全てのウサギを生後 6 週で搬入し、1 週間の慣らし期間の後に生後 7 週で行った。1 羽のドナー（NZW）から下行大動脈を全長に渡り摘出し 2 分割して、新鮮グラフトとして 2 羽のレシピエント（JW）の右頸動脈に移植した。また除外基準も実験 1 と同様に、TTFM において移植時の Graft flow < 5ml/min または PI > 5 とした。移植手術時の各測定値を Table 3 に示す。移植手術時の体重が、N8 群において有意に高値であり、それに伴いケタミン投与量・キシラジン投与量・点滴投与量・グラフト長に有意差を認めた。その他、手術時間・頸動脈遮断時間・大動脈ホモグラフト流量・PI・大動脈ホモグラフト幅に有意差を認めなかった。術後 8 週時点での大動脈ホモグラフト摘出時の各測定値を Table 4 に示す。体重増加については、炭酸ランタンの投与量によって減少を認めた（ $P=0.0003$ ）。また、L8 群を除いた群は明らかな合併症なく全例が観察期間 8 週を全うし、摘出時点で大動脈ホモグラフトは全例で開存し血流良好であった。L8 群（移植手術時 $n=14$ ）は術後に脊髄損傷から対麻痺になる症例または急変し突然死に至る症例が計 7 例認められた。これらは術後の各種評価から除外したため、L8 群で観察期間 8 週を全うしたのは 7 例のみであった。詳細は、2-5 に記す。

Table 3. 大動脈ホモグラフト移植手術時の各パラメータ値

	N8	L1N7	L2N6	L4N4	L8	P value
	(n=12)	(n=13)	(n=10)	(n=8)	(n=14)	
BW(kg)	1.54±0.02	1.39±0.02	1.40±0.03	1.37±0.04	1.41±0.04	0.0013
Ope time (min)	58.2±1.8	53.5±1.2	60.9±3.1	58.5±2.1	56.8±1.0	0.054
Clamp time (min)	38.1±1.1	35.6±0.8	37.4±2.8	38.6±1.9	36.2±0.8	0.29
Ketamine (mg)	67.5±2.7	54.2±2.9	53.5±3.6	61.9±5.3	58.2±2.3	0.018
Xylazine (mg)	27.0±1.1	21.7±1.2	21.4±1.4	16.3±1.8	21.6±0.9	0.0004
Div dose (ml)	211±7.7	226±8.1	210±10.0	201±12.8	228±6.6	0.0043
Graft flow (ml/min)	14.8±1.4	18.6±1.2	13.7±2.1	14.2±3.5	14.9±0.8	0.12
PI	1.46±0.1	1.48±0.2	1.56±0.2	2.05±0.5	1.4±0.1	0.96
Length (mm)	29.8±0.6	32.0±0.4	32.1±0.5	25.2±3.4	30.5±0.7	0.0075
Width (mm)	4.6±0.2	4.5±0.1	4.5±0.2	4.3±0.2	4.4±0.1	0.54

BW:体重、Ope time：手術時間、Clamp time：頸動脈遮断時間、Div：頸静脈点滴、PI：Pulsatility Index、Length：ホモグラフト長、Width：ホモグラフト幅

N8 群で移植時の体重が有意に重く、それに伴いケタミン投与量・キシラジン投与量・点滴量が有意に高値となった。グラフト流量や PI に有意差を認めなかった。

Table 4. 大動脈ホモグラフト摘出時の各パラメータ値

	N8	L1N7	L2N6	L4N4	L8	P value
	(n=12)	(n=13)	(n=10)	(n=8)	(n=7)	
BW gain (kg)	2.72±0.05	2.52±0.04	2.49±0.05	2.40±0.06	2.21±0.10	0.0003
Graft flow (ml/min)	20.1±2.0	21.8±2.0	17.1±2.6	14.4±1.8	20.1±1.8	0.11
PI	2.11±0.2	1.71±0.2	1.78±0.1	2.45±0.6	3.27±1.0	0.21

BW gain :体重増加、Graft flow : グラフト流量、PI : Pulsatility Index

摘出時点で体重増加は炭酸ランタンの投与量に応じて減少を認めたが、グラフト流量・Pulsatility Index については有意差を認めなかった。

2-3. 炭酸ランタンによる石灰化・内膜肥厚の抑制効果

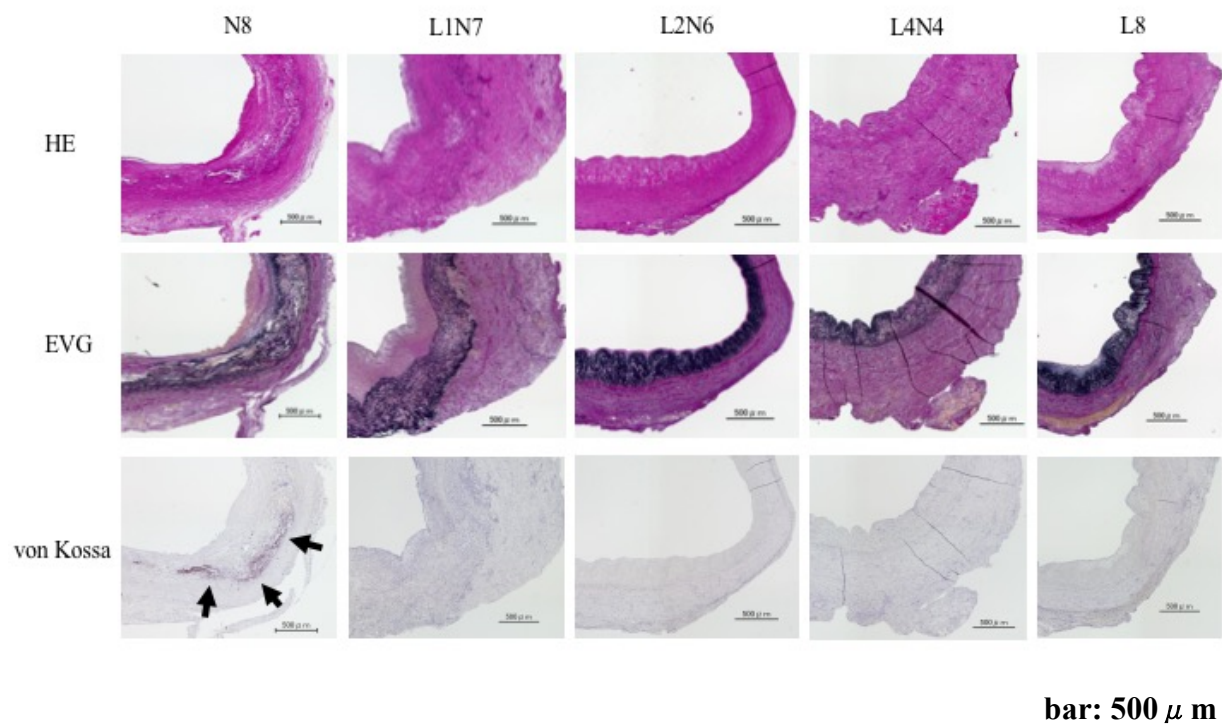
5%炭酸ランタン含有飼料の投与期間毎に大動脈ホモグラフトを病理組織学的に比較検討した。von Kossa 染色において N8 群では中膜弾性線維に強い黒色変化を呈しており高度石灰化の所見を認めたが、L1N7 群はごく一部に石灰化を認めたのみで、その他 L2N6 群・L4N4 群・L8 群では石灰化を全く認めなかった (Figure 16 下段)。EVG 染色では、N8 群と L1N7 群で中膜弾性線維が疎となり構造破壊の所見を認めたが、L2N6 群・L4N4 群・L8 群では中膜弾性線維の構造は保たれていた (Figure 16 中段)。

次いで、大動脈ホモグラフト中のカルシウム含有量を原子吸光度法により測定すると、N8 群 : 20.62 ± 8.50 mg/dry · g、L1N7 群 : 9.85 ± 7.10 mg/dry · g、L2N6 群 : 9.00 ± 7.41 mg/dry · g、L4N4 群 : 1.54 ± 0.48 mg/dry · g、L8 群 : 0.80 ± 0.10 mg/dry · g であり、N8 群をコントロールとした Dunn の多重比較検定において L8 群が $P=0.0034$ と有意に低下していた。その他、L1N7 群で $P=0.17$ 、L2N6 群で $P=0.15$ 、L4N4 群で $P=0.089$ といずれの群においても石灰化定量値が N8 群に比べ減少する傾向を認めた (Figure 17)。

炭酸ランタンの大動脈ホモグラフトにおける内膜肥厚の抑制効果を評価する目的で、内膜の厚さと中膜の厚さの比（Intima media ratio）を $n=3$ ずつ測定すると、N8 群： 1.65 ± 0.45 、L1N7 群： 0.42 ± 0.26 、L2N6 群： 0.26 ± 0.10 、L4N4 群： 0.36 ± 0.14 、L8 群： 0.38 ± 0.06 であり、 n が少なく有意差は得られなかったが、炭酸ランタンの短期投与においても著明な内膜肥厚の抑制効果があることが示唆された（Figure 18）。

Figure 16. 炭酸ランタン投与期間別の

大動脈ホモグラフト摘出後の病理画像

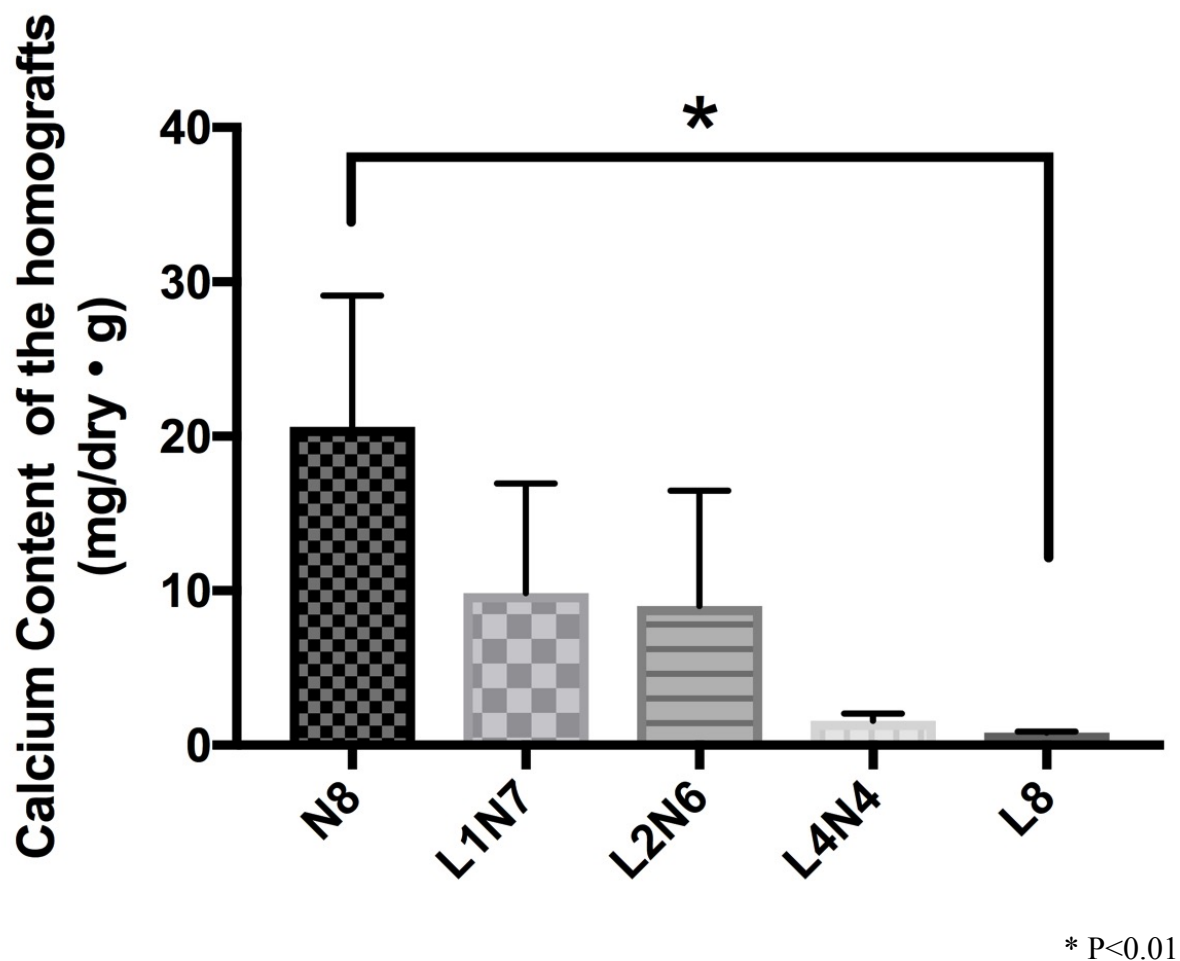


von Kossa 染色では、術後 8 週間までの全期間に渡り通常飼料を投与した N8 群において強い石灰化を認めたが、その他の炭酸ランタンを投与したレシピエントの大動脈ホモグラフトでは石灰化を認めなかった（下段）。

EVG 染色では、N8 群と L1N7 群では内膜肥厚を認めたが、L2N6 群・L4N4 群・L8 群では認めなかった（中段）。

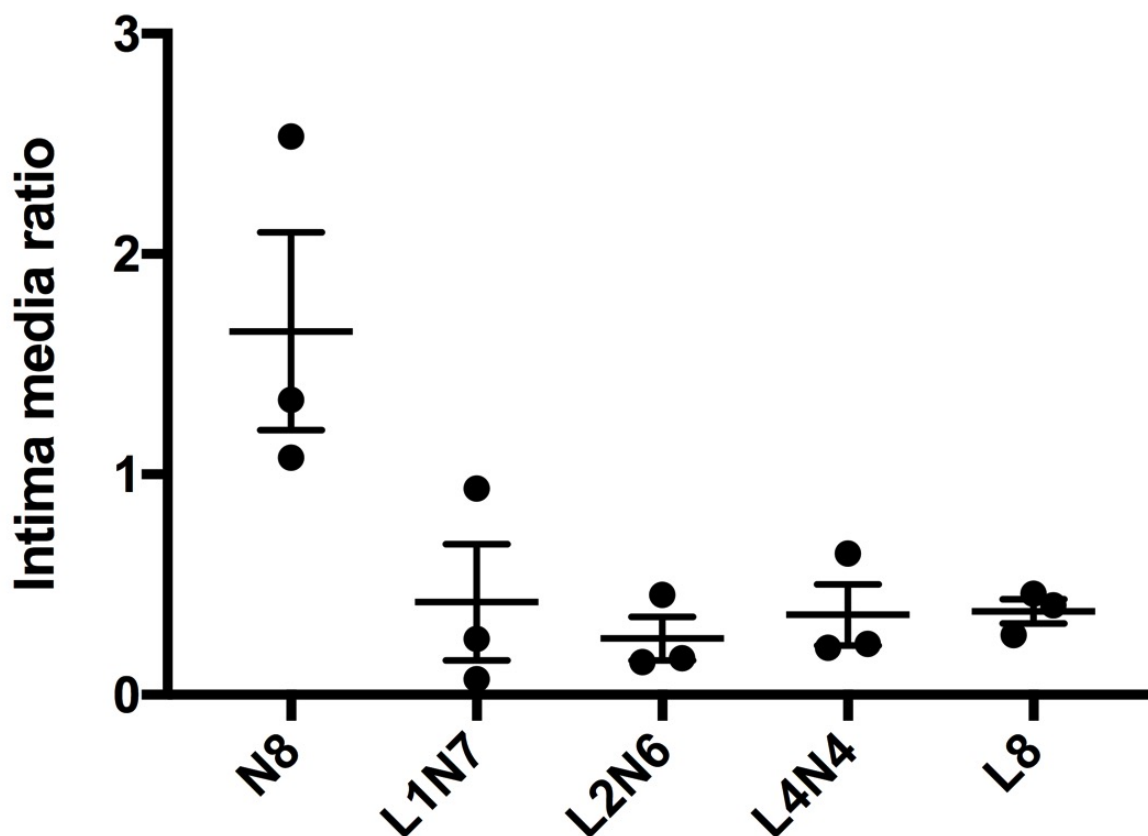
Figure 17. 炭酸ランタン投与期間による

大動脈ホモグラフト中のカルシウム含有量の変化



通常飼料を術後 8 週間まで与えた N8 群に対して、炭酸ランタン含有飼料を投与した大動脈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 週までの全観察期間で炭酸ランタンを投与した L8 群では有意に低下した (P=0.0034)。

Figure 18. 大動脈ホモグラフトの内膜肥厚抑制効果の検討



摘出した大動脈ホモグラフトの内膜肥厚を測定するために、EVG 染色における内膜の最大肥厚部分で、内膜の厚さと中膜の厚さの比（Intima media ratio）を n=3 ずつ測定した。N8 群では内膜肥厚を認めたが、統計学的に有意ではないが L1N7 群・L2N6 群・L4N4 群・L8 群において内膜肥厚抑制の傾向を認めた。

2-4. 炭酸ランタン投与期間と血液学的検査

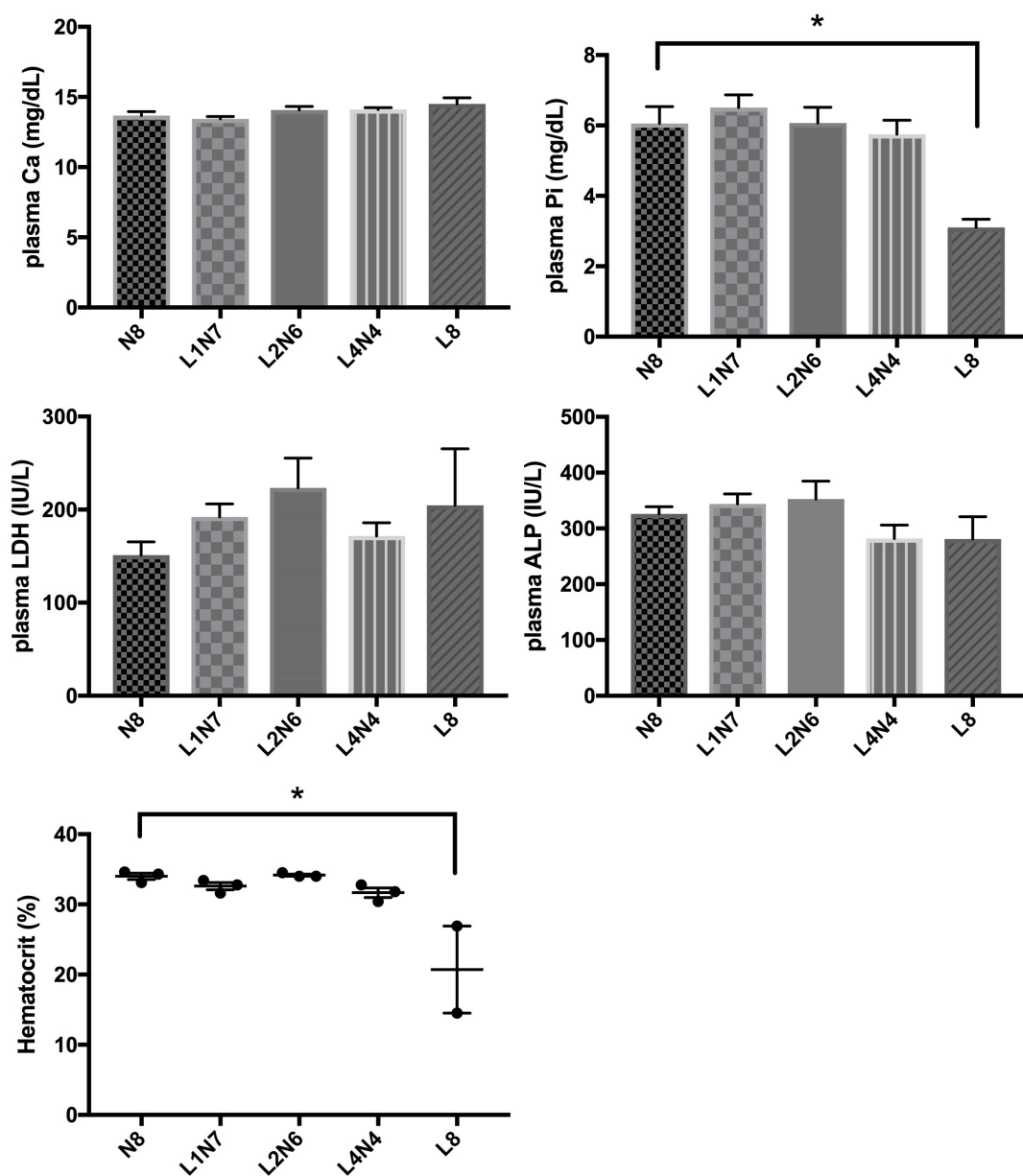
大動脈ホモグラフトの摘出時に、心尖部より採取したヘパリン化血からカルシウム濃度、無機リン濃度、乳酸脱水素酵素（LDH）濃度、アルカリホスファターゼ（ALP）濃度及び Hematocrit（Hct）値を測定した。血漿中のカルシウム濃度（mg/dL）は、各群間で有意差を認めなかった（ $P=0.067$ ）。無機リン濃度（mg/dL）は、N8 群に対して L8 群で有意に低値であったが（ $P=0.0030$ ）、その他の群では有意差を認めなかった。LDH 濃度（IU/L）及び ALP 濃度（IU/L）は、各群間で有意差を認めなかった（それぞれ $P=0.20$ 、 $P=0.13$ ）。Hct 値（%）は、L8 群が N8 群に対して有意に低値であった（ $P=0.039$ ）（Table 4, Figure 19）。

Table 4. 炭酸ランタン投与期間と血液学的検査の計測値

	N8	L1N7	L2N6	L4N4	L8	P value
Ca (mg/dL)	13.7±0.3	13.4±0.2	14.1±0.3	14.1±0.1	14.5±0.4	0.067
Pi (mg/dL)	6.1±0.5	6.5±0.4	6.1±0.4	5.8±0.4	3.1±0.2	0.0006
LDH (IU/L)	151±14	192±14	223±32	172±14	205±61	0.20
ALP (IU/L)	326±13	344±18	353±32	282±24	281±40	0.13
Hct (%)	34.0±0.5	32.6±0.5	34.2±0.2	31.7±0.7	20.7±6.2	0.0031

Ca: カルシウム、Pi: 無機リン、LDH: 乳酸脱水素酵素、ALP: アルカリホスファターゼ、Hct: ヘマトクリット

Figure 19. 炭酸ランタン投与期間と血液学的検査所見



* P<0.05

血液学的検査では、カルシウム濃度・無機リン濃度・乳酸脱水素酵素（LDH）濃度・アルカリホスファターゼ（ALP）濃度・Hematocrit（Hct）値を測定した。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ていた（それぞれ P=0.0030、P=0.039）。その他の値は各群間で平均値に有意差を認めなかった。

2-5. 長期炭酸ランタン投与による有害事象

実験 2 では、観察期間を術後 8 週間として実施したが、L8 群を除いた N8 群・L1N7 群・L2N6 群・L4N4 群は観察期間の間、特記すべき有害事象を認めなかった。

一方で、L8 群で術後 21 日目と 38 日目に脊髄損傷による対麻痺を発症する症例や術後 40 日目以降に急変して突然死に至る症例を 6 例認めた。死亡症例 6 例のうち 1 例は術後 21 日目に脊髄損傷を発症した症例で、その他の 5 例は急変直前まで明らかな有害事象なく経過したが、それぞれ術後 40 日目・42 日目・45 日目・48 日目・50 日目で死亡した。死亡症例は全例で解剖を行ったが明らかな死因の特定は出来なかった。なお、死亡症例は死亡後に血液は分離や凝固のため血液学的検査は実施できなかった。術後 8 週間時点で L8 群の生存率 57.1%、脊髄損傷発症率 14.7%であった (Figure 20)。

長期間の炭酸ランタン投与により慢性的な低リン血症となり、くる病と同様の病態になることが予想された。従って、くる病で認められる成長障害の指標として体重増加・大腿骨長を測定し、骨軟化の指標として骨密度・骨強度を測定した。

各群における移植手術から術後 8 週までの体重増加分は、N8 群： 1.19 ± 0.05 kg、L1N7 群： 1.12 ± 0.04 kg、L2N6 群： 1.09 ± 0.06 kg、L4N4 群： 1.03 ± 0.05 kg、L8 群：

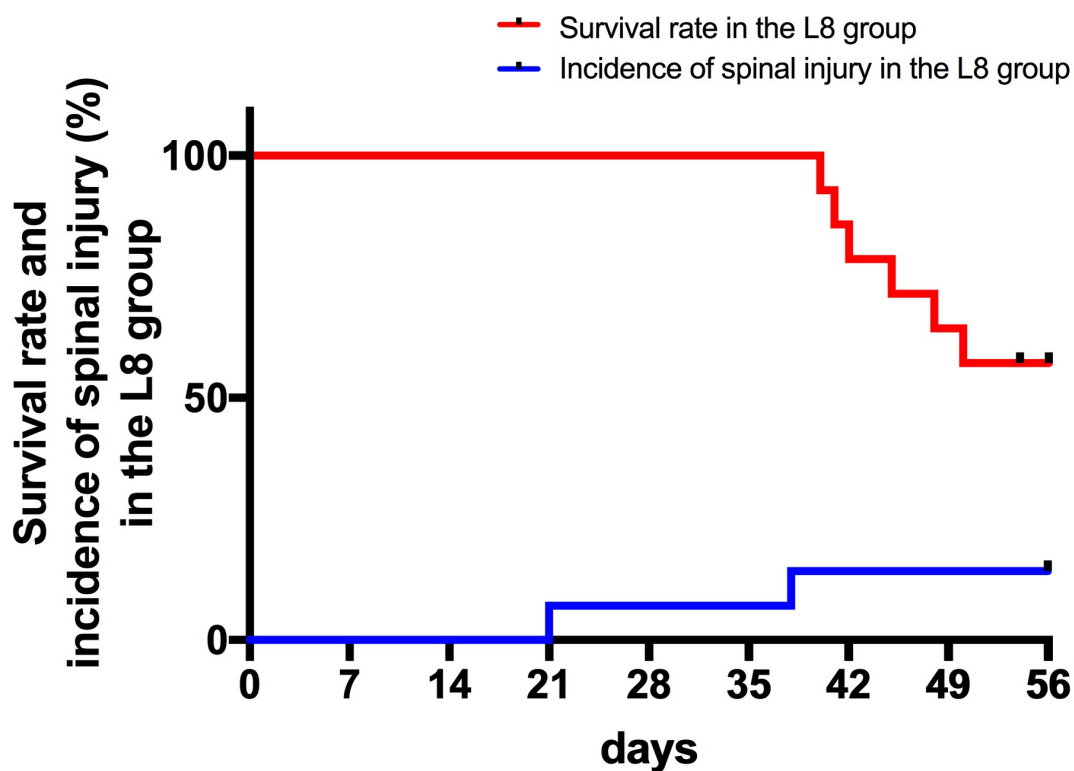
0.76±0.08 kg であり、L8 群は N8 群に比べて有意に低値であった ($P<0.0001$)。また、術後 8 週時点での大腿骨長 (mm) を $n=3$ ずつ測定すると、N8 群 : 91.0±1.2 mm、L1N7 群 : 87.7±1.2 mm、L2N6 群 : 88.0±1.0 mm、L4N4 群 : 83.3±0.3 mm、L8 群 : 84.0±1.2 mm であり、L4N4 群および L8 群が N8 群に比べて有意に低値であった (それぞれ $P=0.020$ 、 $P=0.045$) (Figure 21)。

次いで、大腿骨の骨塩量・骨密度試験を行った (各群 $n=3$)。大腿骨を長軸方向に 20 分割して、群毎に各部位の平均 ($n=3$) 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、一限配置分散分析で平均値を検定した。各群の平均値を、N8 群をコントロールとして Dunn の多重比較検定を行うと、炭酸ランタンの投与期間が増すにつれて骨密度は低下する傾向にあり、L4N4 群及び L8 群は N8 群に対して有意に低下していた (それぞれ $P=0.0093$ 、 $P<0.0001$) (Figure 22)。

3 点曲げ試験では、最大荷重 (N) が N8 群 : 309.9±9.1 N、L1N7 群 : 263.5±18.7 N、L2N6 群 : 254.2±14.8 N、L4N4 群 : 202.5±9.1 N、L8 群 : 53.3±16.0 N、剛性 (N/mm) が N8 群 : 579.9±24.8 N/mm、L1N7 群 : 456.7±14.7 N/mm、L2N6 群 : 440.3±21.3 N/mm、L4N4 群 : 322.5±17.5 N/mm、L8 群 : 87.8±52.6 N/mm であり、いずれも炭酸ランタン投与期間が増えるほど減少傾向で、L8 群は N8 群に比べて有意に

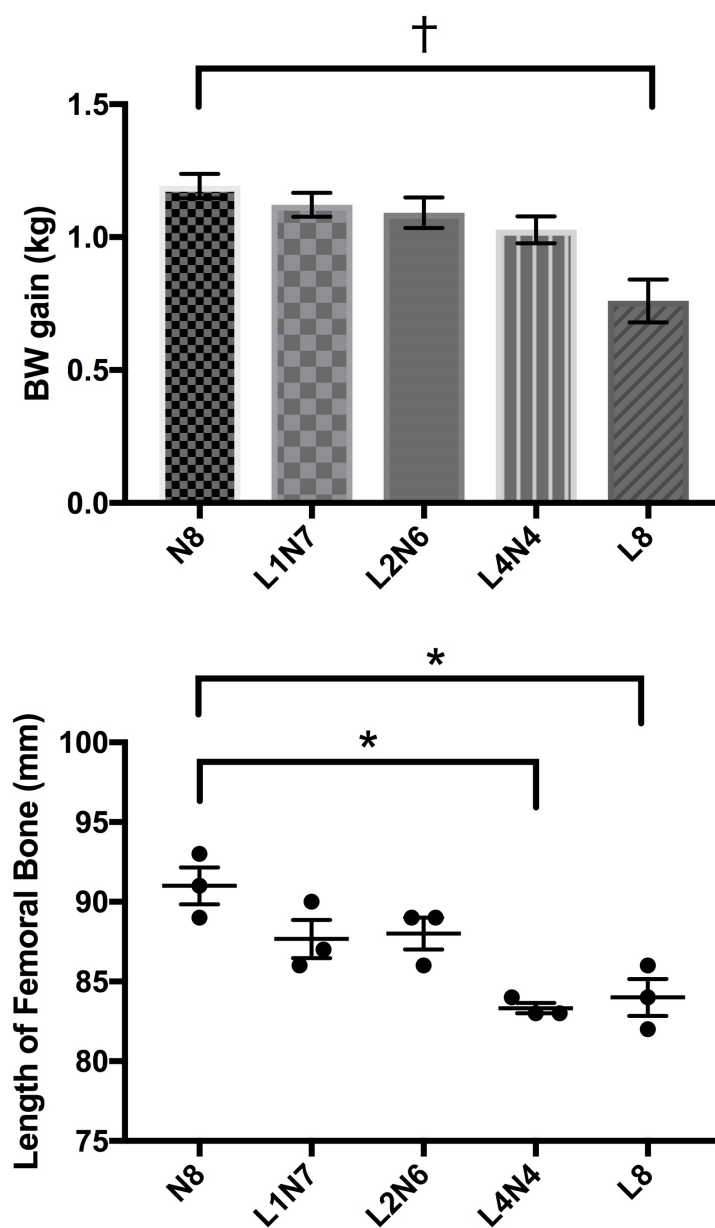
低値であった（それぞれ $P=0.0056$ 、 $P=0.0041$ ）（Figure 23）。これにより、炭酸ラ
ンタンの投与期間によって骨軟化が進行することが証明された。

Figure 20. L8 群における全生存率と脊髄損傷発症率



L8 群では、術後 40 日目以降に死亡する症例が散見され、術後 8 週時点での生存率は 57.1%であった（赤線）。また、術後 21 日目と術後 38 日目に脊髄損傷から対麻痺を発症した症例を認め、術後 8 週時点での脊髄損傷発症率 14.7%であった（青線）。

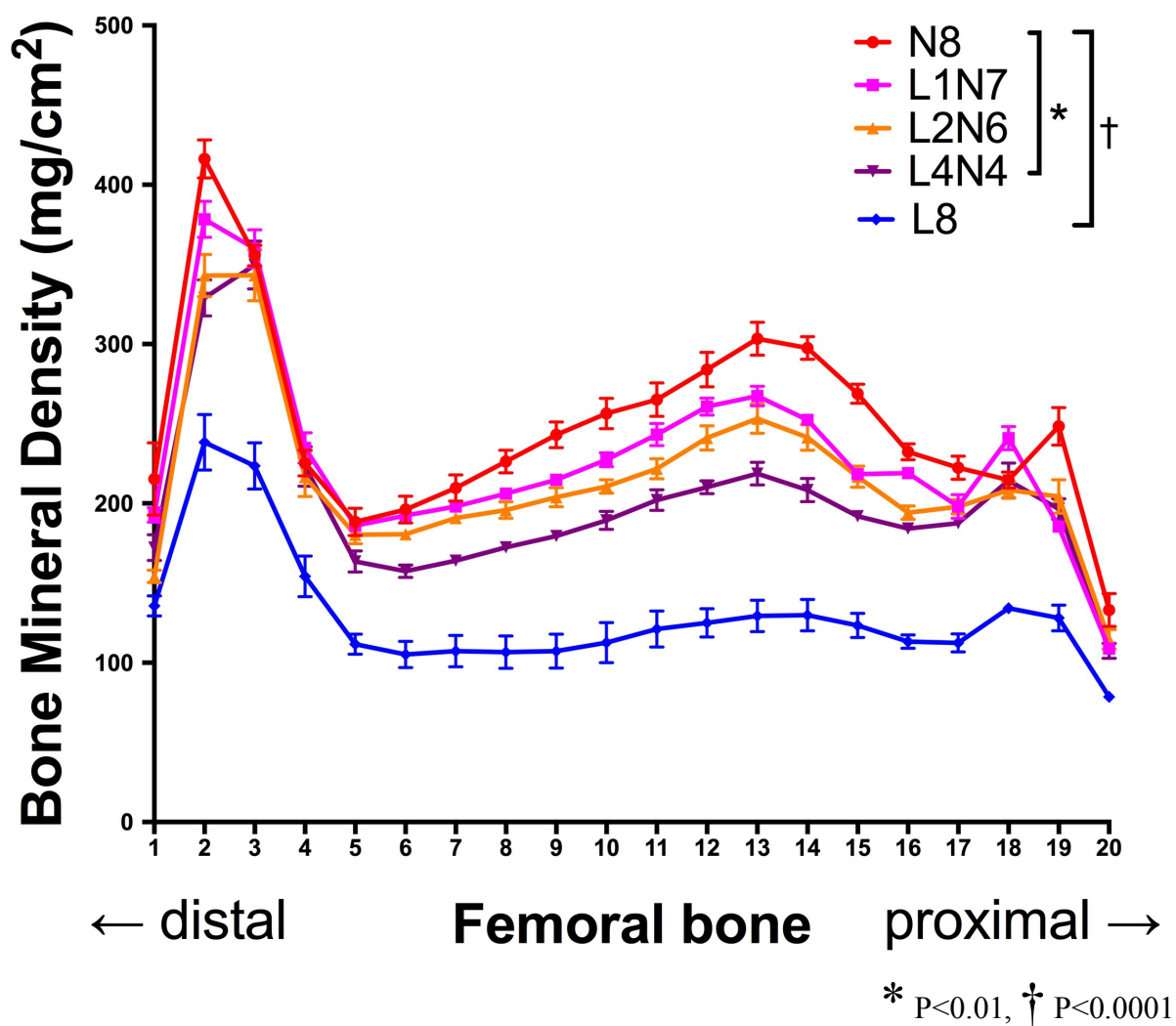
Figure 21. 炭酸ランタン投与期間と体重増加及び大腿骨長



* P<0.05, † P<0.0001

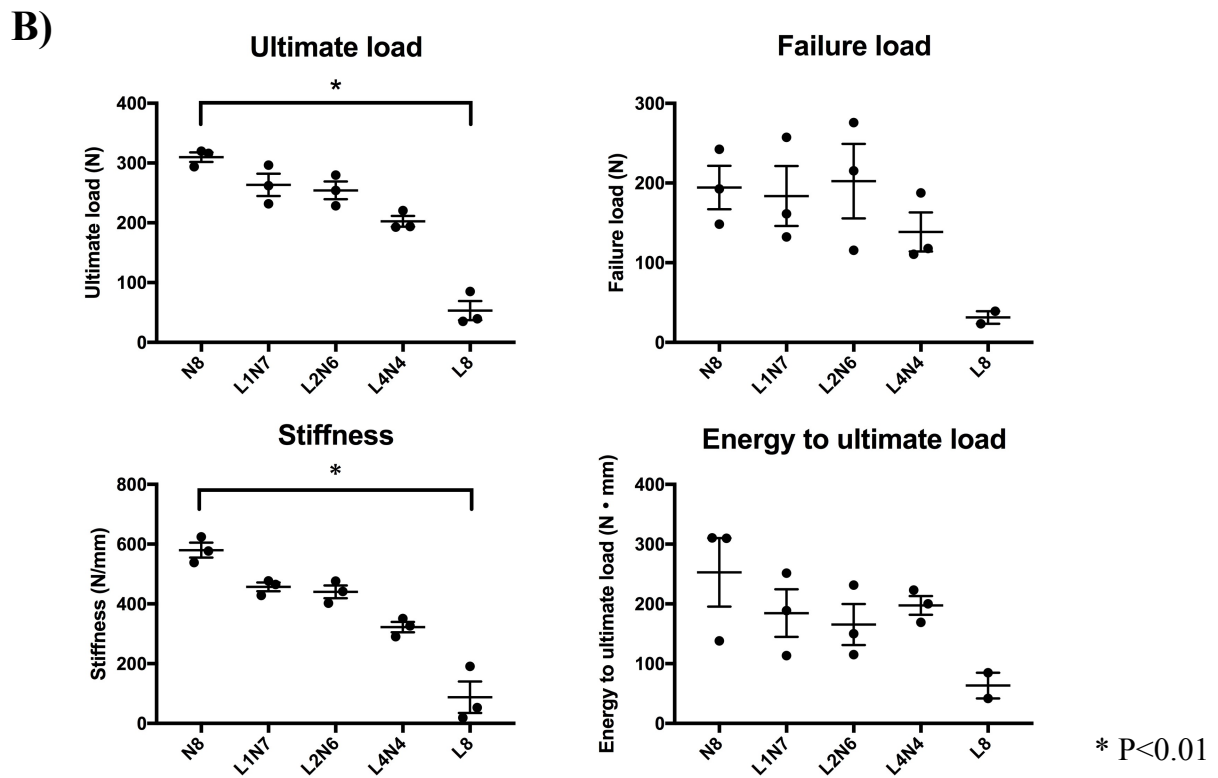
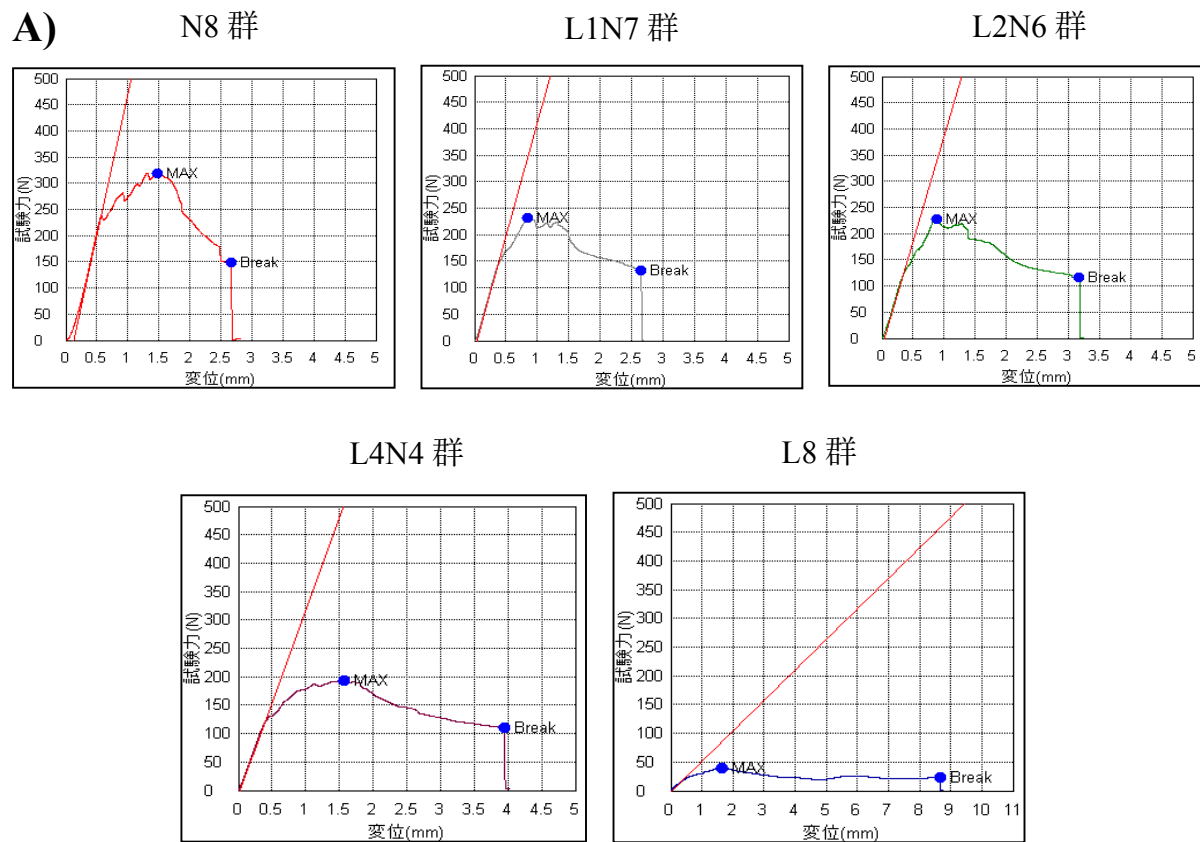
炭酸ランタンの長期投与により体重増加は、N8 群に比べ L8 群で有意に低下し、大腿骨長についても N8 群に比べ L4N4 群と L8 群で有意に低下した。

Figure 22. 炭酸ランタン投与期間と骨密度



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 (n=3) 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、一限配置分散分析で平均値を検定した。骨密度を炭酸ランタンの投与期間が増えると、骨密度は低下傾向を示し、L4N4 群と L8 群は N8 群に比べて有意に低下していた。

Figure 23. 炭酸ランタン投与期間と 3 点曲げ試験



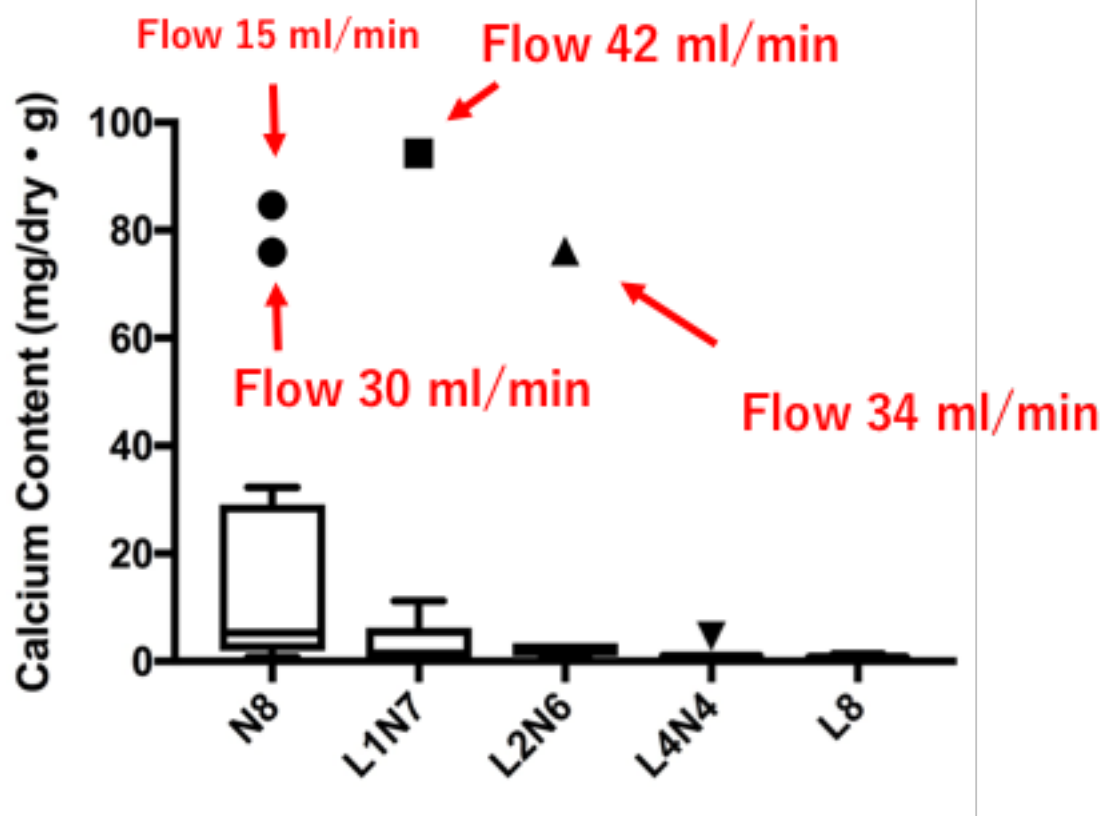
- A) 3点曲げ試験の結果を各群1例ずつ提示した。図中の[**MAX**]にあたる部分が最大荷重 (Ultimate load) (N)、[**Break**]にあたる部分が破断荷重 (Failure load) (N)、赤線による傾きが剛性 (Stiffness) (N/mm)、最大荷重までに要したエネルギー (曲線以下の面積) が最大荷重エネルギー (Energy to ultimate load) (N・mm) である。炭酸ランタン投与量が増えるほど、最大荷重点が下がり、剛性が低下していることが分かる。
- B) 最大荷重 (Ultimate load)・破断荷重 (Failure load)・剛性 (Stiffness)・最大荷重エネルギー (Energy to ultimate load)を各群で比較すると、最大荷重と剛性において、L8 群は N8 群に比べて有意に低下していた (それぞれ $P=0.0056$ 、 $P=0.0041$)。

2-6. ホモグラフト流量と石灰化の関係

本実験の Figure 17. 「炭酸ランタン投与期間による大動脈ホモグラフト中のカルシウム含有量の変化」を箱ひげ図で示し、プロットされる外れ値の 4 症例に注目した (Figure 24)。各群で外れ値を示す症例のホモグラフト摘出時の流量 (赤字) は 30.3 ± 5.7 ml/min だが、その他の症例の流量は 17.2 ± 0.8 ml/min であり、外れ値を示す症例の摘出時ホモグラフト流量が有意に高値であった ($P=0.021$)。ここから、大動脈ホモグラフト移植後石灰化に影響を及ぼす因子として、炭酸ランタンの投与の他にホモグラフト内を流れる血液の流量が関わっているのではないかと推察した。本実験では、計 50 羽のレシピエントが安楽死に至ったため、大動脈ホモグラフト移植後石灰化に関わる独立した因子を検討するため多変量解析を行った。「石灰化あり」を定量値で ≥ 2.0 mg/dry · g、「石灰化なし」を定量値で < 2.0 mg/dry · g とし、手術時間・頸動脈遮断時間・移植時グラフト流量・移植時グラフト PI・グラフト長・グラフト径・炭酸ランタン飼料摂取量・体重増加・摘出時グラフト流量・摘出時グラフト PI・血漿 Pi 値・血漿 Ca 値・血漿 LDH 値・血漿 ALP 値の 17 個の因子を単変量解析で検定した。単変量解析の結果、 $P < 0.05$ となるのは炭酸ランタン飼料摂取量・体重増加・摘出時グラフト流量・摘出時 PI・血漿 Pi 値であった。多変量解析に加えるべき因子の数は理論上 2 つまでなので[40]、上記の因子のうち有意差の小さい炭酸ラ

ンタン飼料摂取量と摘出時グラフト流量の2因子を多変量解析（ロジスティック回帰解析）に入れると、炭酸ランタン飼料摂取量と摘出時グラフト流量はそれぞれ独立した因子であることが判明した（Table 4）。これら2因子でROC曲線を描くと、AUC=0.875でカットオフ値が、炭酸ランタン飼料摂取量が1940g（L2N6群相当）・摘出時グラフト流量が23 ml/minであった（Figure 25）。

Figure 24. 大動脈ホモグラフト流量と石灰化



原子吸光度法による大動脈ホモグラフト移植後石灰化の定量値を示した Figure 17 を、箱ひげ図でみると外れ値を示す 4 症例は流量がその他と比べて早いことが判明した。

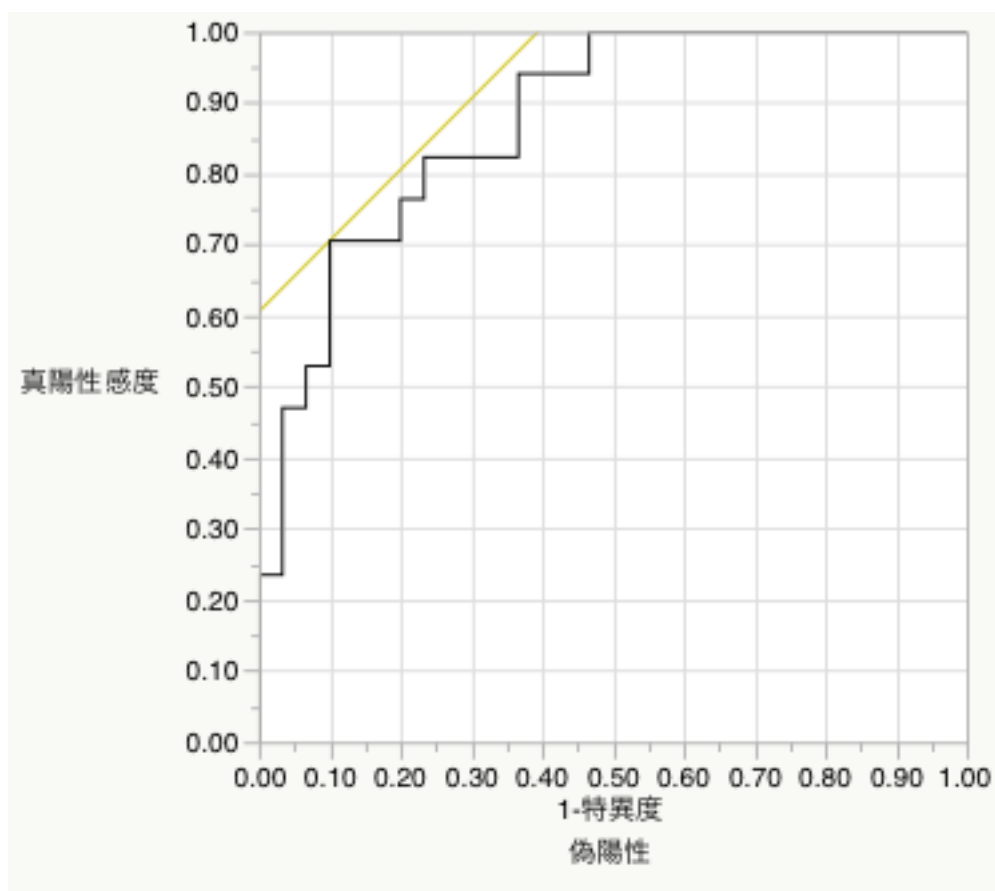
Table 4. 大動脈ホモグラフト移植後石灰化に関わる多変量解析

	Univariate analysis	Multivariable analysis	Odds ratio (95 % CI)
Operation time (min)	0.659		
Arterial clamp time (min)	0.615		
Graft flow at Tx	0.135		
Graft PI at Tx	0.504		
Length of graft (mm)	0.262		
Width of graft (mm)	0.859		
Total LC diet intake (g)	<0.01	0.009	0.999 (0.999 - 1.000)
BW gain (kg)	0.047		
Graft flow at sacrifice	<0.01	0.027	1.180 (1.02 – 1.37)
Graft PI at sacrifice	0.030		
Plasma Pi (mg/dL)	0.011		
Plasma Ca (mg/dL)	0.734		
Plasma LDH (IU/L)	0.576		
Plasma ALP (IU/L)	0.678		

Tx: transplantation, LC: lanthanum carbonate, BW: body weight, PI: pulsatility index, Pi: inorganic phosphate, Ca: calcium, LDH: lactate dehydrogenase, ALP: alkaline phosphatase

大動脈ホモグラフト移植後石灰化の独立した因子を調べるために多変量解析を行うと、炭酸ランタン飼料摂取量と摘出時グラフト流量の2つが独立した因子であった。

Figure 25. ROC 曲線



AUC=0.875

大動脈ホモグラフト移植後石灰化の「あり (≥ 2.0 mg/dry · g)」「なし (< 2.0 mg/dry · g)」をアウトカムとしたときの、炭酸ランタン飼料摂取量と摘出時グラフト流量の2因子による ROC 曲線 (AUC = 0.875)。この結果から、炭酸ランタン飼料摂取量 1940g (L2N6 相当) 及び摘出時グラフト流量 23 ml/min がカットオフ値として算出された。

実験 2 要約

本実験では、炭酸ランタンの投与期間毎にグループ分けを行うことで、大動脈ホモグラフト移植後石灰化の抑制効果が、術後短期間に限定した炭酸ランタン投与においても認められることが証明された。また、大動脈ホモグラフト移植後の内膜肥厚についても術後短期間の炭酸ランタンの投与により抑制効果が得られることが示された。血液学的検査では、L8 群でのみ有意な低リン血症と貧血を認めた。また、L8 群では、死亡症例及び脊髄損傷症例が遠隔期に認められることが判明し、成長障害・骨軟化の指標である体重増加・大腿骨長・骨密度・大腿骨 3 点曲げ試験を実施すると、いずれの検査でも炭酸ランタンの投与期間が増すに従い低下傾向を示し、特に L8 群では全ての検査で有意に低下しており、くる病・骨軟化症と類似の病態を呈していた。

大動脈ホモグラフト石灰化定量値の外れ値に注目すると、炭酸ランタン投与にもかかわらず強く石灰化する症例を認めた。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の 2 つが大動脈ホモグラフト移植後石灰化に関わる独立した因子であった。

考察

本研究では、若年レシピエント（JW7 週＝ヒト 2～3 歳）における大動脈ホモグラフト移植後石灰化に対して、短期間（本研究では 2 週間以内、ヒトに換算すると 3～4 年相当）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、大動脈ホモグラフトの石灰化を抑制するとともに、内膜肥厚も抑制し開存率の向上にも寄与することが証明された。一方で、炭酸ランタンの長期投与（本研究では 4 週以上、ヒトに換算すると 15 年以上）による慢性的な低リン血症は、体重増加不良・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。また、得られたデータを多変量解析することで、炭酸ランタンの投与量に加えて、大動脈ホモグラフト摘出時のグラフト内血液の流量も石灰化に影響する独立した因子であることが示唆された。

これまでに大動脈ホモグラフト移植後石灰化に関する研究のうち、多くはマウスまたはラットの皮下移植モデルまたは腹部大動脈への血流影響下モデルが用いられてきた[10], [11], [13]–[17], [29], [41]–[48]。その他、イヌ・ブタ・羊などの実験動物による実験も存在するが[12], [20], [21], [23], [24], [49]–[55]、ウサギを用いた報告は 1 件のみで、その 1 件も移植手術は行っておらず、New Zealand White rabbit から摘出した大動脈ホモグラフトをトレハロース入りの保存液で凍結保存したグラフトの病理

組織額的な検討を行ったものである[56]。また、血流影響下モデルの報告においても、上記いずれもグラフトの流量や Pulsatility Index による吻合の性状を評価したものはこれまでに存在しておらず、摘出時には閉塞していた症例が混在していた可能性は否定できない。それを回避するために実験 1 では、大動脈ホモグラフト移植後石灰化の血流が確実に存在する症例だけを評価・検討するために、移植手術時のみならず摘出時にも Transit Time Flow Meter で流量と Pulsatility Index を評価する方針とした。血流影響下モデルを確立するにあたり、本来は遺伝子発現解析や分子生物学的解析が行いやすいマウスやラットでの実験が望ましいが、例えば離乳期の生後 3 週程度のラットは体重が 50～60g 程度の大きさであるため、血流を維持した血管吻合モデルの確立は技術的に困難と判断し、本実験ではウサギを用いる方針とした。

また、ウサギは侵襲に極めて弱い動物種であり、侵襲の大きい手術を行うと術後に生存させることが困難となるが、今回の実験 1 で移植部位として頸動脈を選択することで、レシピエントの侵襲を最小限に抑えることが可能となり、血流影響下の大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルを離乳直後の若年ウサギにおいて確立することに成功した。これにより、若年ウサギを用いた血流影響下大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルにおける適正な観察期間を決定することが可能となった。観察期間の決定に際して、術後 8 週で石灰化定量値が最大となり、術後 12 週では石灰化定

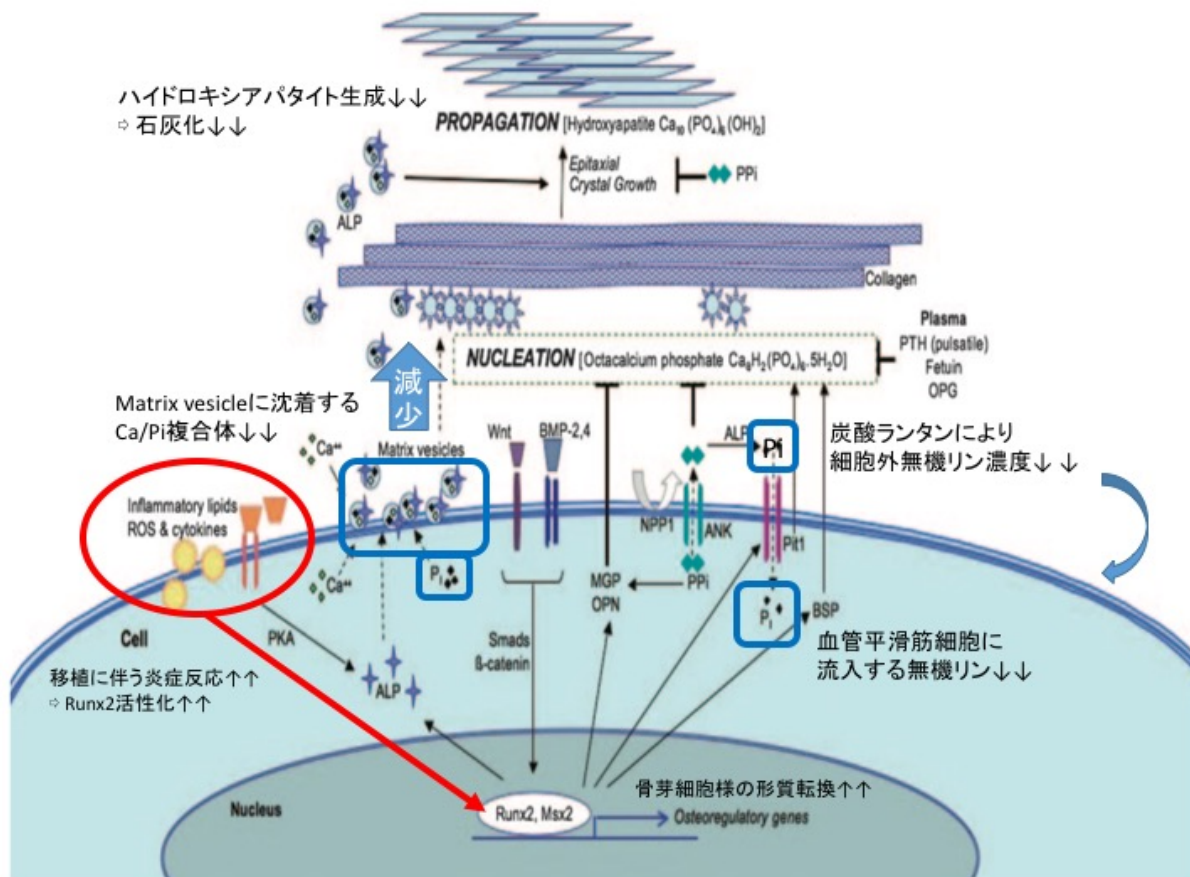
量値は減少に転じた。この結果から適切な観察期間を 8 週と決定したが、12 週で減少に転じたメカニズムは解明できていない。生後 12 週で生殖可能となるウサギにとって、12 週間の観察期間はヒトにおいては 15 年～20 年に相当する。通常、ヒトにおいて一度石灰化した血管が慢性期に消失することがないことを考慮すると、グラフト閉塞や死亡により除外した症例の中に石灰化や内膜肥厚の強い症例が含まれていた可能性が高いと考えられた。一方で、慢性経過の中では Runx2 の活性化に伴う石灰化亢進の機序から、osteopontin などの骨融解の作用が活性化すること知られており[57]、そういった骨融解の機序が働いている可能性も否定できないが、本研究では証明できていないため今後の課題としたい。

大動脈ホモグラフト移植後石灰化を抑制する目的で、これまでに多くの手法が試みられてきた。それらは大きく 2 種類に分けられ、1 つはホモグラフトそのものを脱細胞化などの目的で薬剤入りの保存液で処理したのちに移植手術を行うものと、もう 1 つはレシピエントに免疫抑制剤などの薬剤を全身投与するものである。本実験では、我々の先行研究をもとにリン吸着薬のうち高カルシウム血症を来たしにくい炭酸ランタンを選択し、飼料に含有させることで若年ウサギの経口投与に成功した。これまでの報告では、大動脈ホモグラフトの石灰化抑制処理として薬剤の全身投与を行ったものは、シクロスポリンやミコフェノール酸モフェチルなどの免疫抑

制剤を投与したものであり[13][15][16]、その他、臓器移植の拒絶予防で知られる CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand モノクローナル抗体を投与したものや[49]、Ca blocker を用いたという報告がある程度である[47]。本実験は、世界で初めて若年齢の動物における血流影響下での大動脈ホモグラフト移植後石灰化に対して炭酸ランタン投与の石灰化抑制効果を証明したものである。ここで、炭酸ランタンによる大動脈ホモグラフト石灰化抑制効果のメカニズムを、既報をもとに推察する。血管石灰化のメカニズムは種々の因子が関わっているとされ (Figure. 22)、最も重要な要素は、カルシウムとリンの代謝であると考えられている[58], [59]。細胞外に存在する無機リンイオンは、Pit-1 を介して濃度と時間依存性に血管平滑筋に流入し、Runx2 及びオステオカルシンが活性化され石灰化を引き起こすことが知られている[60]。また、無機リンのトランスポーターである Pit-1 の活性化は無機リンの細胞内流入を促進し血管平滑筋の石灰化を促進させることが知られている。これらの原理から、細胞外カルシウムや無機リンの濃度を調節することで血管石灰化を抑制したという報告[61]–[63]や Pit-1 を抑制することで血管石灰化を抑制した報告[64]がある。その他の血管石灰化のメカニズムとして、活性酸素種や炎症性サイトカインによる Runx2 の活性化によるもの[65]、尿毒症における Runx2 の活性化によるものが知られている[66], [67]。若年者の大動脈ホモグラフト移植後石灰化のメカニズムは、若年者の生理的な

高リン血症をベースに、移植に伴う炎症反応によって惹起されることが証明されている[29]。本研究における炭酸ランタンの石灰化抑制効果は、移植に伴い惹起された炎症反応は変わらずに存在し血管平滑筋細胞の骨芽細胞様の形質転換のカスケードは働いているが、炭酸ランタンにより細胞外に存在する無機リン濃度を減少させることで、血管平滑筋へ Pit-1 を介して流入する無機リンが減少し、それによりカルシウム・リン複合体そのものが減少し、カルシウム・リン複合体の沈着していない matrix vesicle（基質小胞）が存在することになり、生成されるヒドロキシアパタイト（つまり石灰化）を抑制させた、という機序によると推察される（Figure. 22）。

Figure 22. 炭酸ランタンによるホモグラフト移植後石灰化の抑制効果のメカニズム



Pi: 無機リン

Demer LL et al. Circulation. 2008 Jun 3;117(22):2938-48.より引用・一部加筆

炭酸ランタン投与により細胞外に存在する無機リン濃度を減少させることで、血管平滑筋へ Pit-1 を介して流入する無機リンを減少させることで、カルシウム・リン複合体が減少し、生成されるハイドロキシアパタイトつまり石灰化を抑制させたと推察される。一方、移植に伴い惹起された炎症反応は変わらずに存在し血管平滑筋細胞の骨芽細胞様の形質転換のカスケードは働いていると考えられた。

本研究の限界

本研究では、炭酸ランタン入手の観点から飼料への含有量を 5%で固定して投与を行った。すべての観察期間において 1 日あたり 100g の餌を与えたため、炭酸ランタン換算で 5000mg/日の投与を行ったことになり、概ね 1.5kg～3.0kg のウサギに換算すると 1500～3000 mg/kg/day の投与を行ったことになる。本来は、体重に応じて一定の投与量となるよう調整すべきであったが、飼料作成の都合や飼料を与える手間などを考慮して、全観察期間において同量の投与となった。また、含有量も 5%で固定であったため、1%や 3%など異なった投与量での比較検討も出来ていない。また、炭酸ランタンの有用性を議論するためには、本来「sham+炭酸ランタン投与群」及び「sham+プラセボ投与群」を作成する必要があるが、炭酸ランタン入手など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。

今回、レシピエントのホモグラフト移植部位を侵襲度・術後生存率の観点から頸動脈とした。移植後ホモグラフトに動脈血流、血圧がかかる生理的なモデルとして価値があるが、本来は移植部位が胸部や腹部の大動脈の方が同所性でより生理的に近い状態であった可能性はある。

大動脈ホモグラフト石灰化の予測因子として、摘出時のグラフト流量と炭酸ランタン含有飼料の投与量が独立した因子として残ったが、摘出時のグラフト流量については、流量が早いために石灰化したのか、それとも石灰化により大動脈壁の弾性が低下したことにより血流上昇したのか、どちらかは本実験からは証明できていないため、血流上昇による shear stress とグラフト石灰化の因果関係は説明できない。

本実験は、若年ウサギを用いていることから、プライマーの有無などの都合で PCR など分子生物学な評価が困難であったことから、炭酸ランタンが移植大動脈ホモグラフトの石灰化を抑制するメカニズムについては検討できていない。今後、ラットやマウスを用いた血流影響下大動脈ホモグラフト移植モデルが確立できれば Runx2 を始めとした種々のメディエーターを定量評価できる可能性がある。

今後の展望

本研究によって、若年齢レシピエントの血流影響下モデルにおいて大動脈ホモグラフト移植後の石灰化に対する炭酸ランタンの有用性が証明された。先行研究ではラットの皮下移植モデルで同様の実験が行われ、今回は若年ウサギの血流影響下モデルで実験に成功した。しかしながら、これまでの投与量は小動物を対象としており、ヒトに換算すると過剰投与であるため、今後は臨床応用を実現するために、動物種をブタ等の大動物に移行して適切な投与量を検討する必要がある。大動物での実験においても、同様の成果が得られた場合には、臨床応用が現実味を帯び、小児心臓外科領域でホモグラフトを必要とする患者の、術後の石灰化を伴うグラフト変性による早期グラフト不全、再手術を回避できることが可能となることが期待される。

また、血流影響下モデルで行った本研究によって、ホモグラフト流量は石灰化の独立した因子であることが示唆された。当科でのこれまでの研究は、主に血中の無機リン濃度に注目して行ってきたが、流体力学的な観点で石灰化を議論し、吻合方法やグラフト径をコントロールすることができれば、さらなる石灰化抑制効果を期待できる可能性を秘めていると考えられた。

結語

本研究における血流影響下での大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルの確立は、若年レシピエントに対してグラフト流量を実際に測定したという点が世界で初めての報告となる。また、リン吸着薬である炭酸ランタンの短期間投与で、移植後大動脈グラフトの石灰化を抑制することを証明し、また内膜肥厚を抑制する効果があることも示唆した。炭酸ランタンは、透析患者の高リン血症に対してすでに臨床使用されている薬剤であるため、今後は、グラフトの石灰化抑制の治療薬として臨床応用の実現を見据え、ブタ等の大動物に移行し適切な投与量・投与期間を検討する必要があると考えられた。

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。

本研究の遂行にあたり、その基礎となる知見をご教示頂いた、東京大学大学院医学系研究科心臓外科学木下修特任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] F. Nappi, N. Al-Attar, C. Spadaccio, M. Chello, M. Lusini, and C. Acar, “Aortic valve homograft: 10-year experience.,” *Surg. Technol. Int.*, vol. 24, pp. 265–72, Mar. 2014.
- [2] R. N. Mitchell, R. A. Jonas, and F. J. Schoen, “Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves.,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 60, no. 2 Suppl, p. S108–12; discussion S113, Aug. 1995.
- [3] S. Ben Ahmed, A. Louvancourt, G. Daniel, P. Combe, A. Duprey, J.-N. Albertini, J.-P. Favre, and E. Rosset, “Cryopreserved arterial allografts for in situ reconstruction of abdominal aortic native or secondary graft infection,” *J. Vasc. Surg.*, Aug. 2017.
- [4] J. R. Doty, J. D. Salazar, J. R. Liddicoat, J. H. Flores, and D. B. Doty, “Aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft: ten-year experience.,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 115, no. 2, pp. 371-9-80, Feb. 1998.
- [5] M. P. Harlander-Locke, L. K. Harmon, P. F. Lawrence, G. S. Oderich, R. A. McCready, M. D. Morasch, R. J. Feezor, Vascular Low-Frequency Disease Consortium, W. Zhou, J. Bismuth, W. C. Pevec, M. P. Correa, J. Jim, J. S. Ladowski, P. Kougias, P. G. Bove, C. M. Wittgen, and J. V White, “The use of cryopreserved

- aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 59, no. 3, p. 669–674.e1, Mar. 2014.
- [6] M. F. O’Brien, S. Harrocks, E. G. Stafford, M. A. Gardner, P. G. Pohlner, P. J. Tesar, and F. Stephens, “The homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements,” *J. Heart Valve Dis.*, vol. 10, no. 3, p. 334–44; discussion 335, May 2001.
- [7] K. Bando, G. K. Danielson, H. V. Schaff, D. D. Mair, P. R. Julsrud, and F. J. Puga, “Outcome of pulmonary and aortic homografts for right ventricular outflow tract reconstruction,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 109, no. 3, pp. 509–17–8, Mar. 1995.
- [8] J. S. Tweddell, A. N. Pelech, P. C. Frommelt, K. A. Mussatto, J. D. Wyman, R. T. Fedderly, S. Berger, M. A. Frommelt, D. A. Lewis, D. Z. Friedberg, J. P. Thomas, R. Sachdeva, and S. B. Litwin, “Factors Affecting Longevity of Homograft Valves Used in Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction for Congenital Heart Disease,” *Circulation*, vol. 102, no. Supplement 3, p. III-130-III-135, 2000.

- [9] H. Baraki, I. Tudorache, M. Braun, K. Höffler, A. Görler, A. Lichtenberg, C. Bara, A. Calistru, G. Brandes, M. Hewicker-Trautwein, A. Hilfiker, A. Haverich, and S. Cebotari, “Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 31, pp. 6240–6, Oct. 2009.
- [10] R. J. Levy, X. Qu, T. Underwood, J. Trachy, and F. J. Schoen, “Calcification of valved aortic allografts in rats: Effects of age, crosslinking, and inhibitors,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 217–226, Feb. 1995.
- [11] C. L. Webb, N. M. Nguyen, F. J. Schoen, and R. J. Levy, “Calcification of allograft aortic wall in a rat subdermal model. Pathophysiology and inhibition by Al³⁺ and aminodiphosphonate preincubations,” *Am. J. Pathol.*, vol. 141, no. 2, pp. 487–96, Aug. 1992.
- [12] W. Flameng, R. Jashari, G. De Visscher, L. Mesure, and B. Meuris, “Calcification of allograft and stentless xenograft valves for right ventricular outflow tract reconstruction: An experimental study in adolescent sheep,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 141, no. 6, pp. 1513–1521, Jun. 2011.

- [13] T. Schmitz-Rixen, J. Megerman, R. B. Colvin, A. M. Williams, and W. M. Abbott, "Immunosuppressive treatment of aortic allografts.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 7, no. 1, pp. 82–92, Jan. 1988.
- [14] K. B. Lemström, J. H. Bruning, C. A. Bruggeman, I. T. Lautenschlager, and P. J. Häyry, "Cytomegalovirus infection enhances smooth muscle cell proliferation and intimal thickening of rat aortic allografts.," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 2, pp. 549–558, Aug. 1993.
- [15] A. Räisänen-Sokolowski, P. Vuoristo, M. Myllärniemi, S. Yilmaz, E. Kallio, and P. Häyry, "Mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts.," *Transpl. Immunol.*, vol. 3, no. 4, pp. 342–51, Dec. 1995.
- [16] Q. Chang, H. Jing, M. Sun, and P. Xu, "Exploring the role of short-course cyclosporin a therapy in preventing homograft valve calcification after transplantation," *Cell. Immunol.*, vol. 287, pp. 36–45, 2014.

- [17] P. Religa, K. Bojakowski, Z. Gaciong, J. Thyberg, and U. Hedin, “Arteriosclerosis in rat aortic allografts: dynamics of cell growth, apoptosis and expression of extracellular matrix proteins,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 249, no. 1–2, pp. 75–83, Jul. 2003.
- [18] F. D. A. Da Costa, A. C. B. A. Costa, R. Prestes, A. C. Domanski, E. M. Balbi, A. D. A. Ferreira, and S. V. Lopes, “The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 90, no. 6, pp. 1854–1860, 2010.
- [19] R. Muratov, D. Britikov, A. Sachkov, V. Akatov, V. Soloviev, I. Fadeeva, and L. Bockeria, “New approach to reduce allograft tissue immunogenicity. Experimental data,” *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 10, no. 3, pp. 408–412, 2010.
- [20] M. Della Barbera, M. Valente, C. Basso, and G. Thiene, “Morphologic studies of cell endogenous repopulation in decellularized aortic and pulmonary homografts implanted in sheep,” *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 24, no. 2, pp. 102–109, Mar. 2015.
- [21] M. Gallo, A. Bonetti, H. Poser, F. Naso, T. Bottio, R. Bianco, A. Paolin, P. Franci, R. Busetto, A. C. Frigo, E. Buratto, M. Spina, M. Marchini, F. Ortolani, L. Iop, and G. Gerosa, “Decellularized aortic conduits: could their cryopreservation affect post-

- implantation outcomes? A morpho-functional study on porcine homografts,” *Heart Vessels*, vol. 31, no. 11, pp. 1862–1873, Nov. 2016.
- [22] F. D. A. da Costa, A. C. B. A. Costa, R. Prestes, A. C. Domanski, E. M. Balbi, A. D. A. Ferreira, and S. V. Lopes, “The Early and Midterm Function of Decellularized Aortic Valve Allografts,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 90, no. 6, pp. 1854–1860, Dec. 2010.
- [23] E. J. Lehr, G. R. Rayat, B. Chiu, T. Churchill, L. E. McGann, J. Y. Coe, and D. B. Ross, “Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 141, no. 4, pp. 1056–1062, Apr. 2011.
- [24] L. Iop, A. Bonetti, F. Naso, S. Rizzo, S. Cagnin, R. Bianco, C. D. Lin, P. Martini, H. Poser, P. Franci, G. Lanfranchi, R. Busetto, M. Spina, C. Basso, M. Marchini, A. Gandaglia, F. Ortolani, and G. Gerosa, “Decellularized Allogeneic Heart Valves Demonstrate Self-Regeneration Potential after a Long-Term Preclinical Evaluation,” *PLoS One*, vol. 9, no. 6, 2014.
- [25] S. Cebotari, I. Tudorache, A. Ciubotaru, D. Boethig, S. Sarikouch, A. Goerler, A. Lichtenberg, E. Cheptanaru, S. Barnaciuc, A. Cazacu, O. Maliga, O. Repin, L. Maniuc,

T. Breymann, and A. Haverich, “Use of Fresh Decellularized Allografts for Pulmonary Valve Replacement May Reduce the Reoperation Rate in Children and Young Adults Early Report.”

- [26] 碓氷章彦, “【人工弁(機械弁、生体弁)の動向】 生体弁の動向,” 心臓, vol. 48, no. 6, pp. 590–593, 2016.
- [27] 橋本和弘, “進化する人工弁—異種生体弁,” 人工臓器, vol. 39巻, no. 1号, pp. 28–30, 2010.
- [28] C. A. Salles, E. Buffolo, J. C. Andrade, J. T. Mendonça, J. Wanderley Neto, and I. S. Casagrande, “Cardiac valve replacement with glutaraldehyde preserved aortic allografts.,” *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 4, no. 3, pp. 147-53–5, 1990.
- [29] H. Yamauchi, N. Motomura, U. Chung, M. Sata, D. Takai, A. Saito, M. Ono, and S. Takamoto, “Growth-associated hyperphosphatemia in young recipients accelerates aortic allograft calcification in a rat model,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 145, no. 2, pp. 522–530, Feb. 2013.

- [30] F. Locatelli and L. Del Vecchio, “Cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients: potential mechanisms and possibilities of inhibition by resin-based phosphate binders,” *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, vol. 13, no. 5, pp. 489–499, 2015.
- [31] 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, no. 6, pp. 312–314, 2015.
- [32] T. Swainston Harrison and L. J. Scott, “Lanthanum carbonate,” *Drugs*, vol. 64, no. 9, pp. 985–96–8, 2004.
- [33] バイエル薬品株式会社, 医薬品インタビューフォーム、高リン血漿治療剤ホスレノール. 2011.
- [34] M. Zalman S Agus, “Signs and symptoms of hypophosphatemia,” *UpToDate*, pp. 13–15, 2012.
- [35] S. Damment, “Pharmacology of the Phosphate Binder, Lanthanum Carbonate,” *Ren. Fail.*, vol. 33, no. 2, pp. 217–224, 2011.
- [36] S. Robijn, B. A. Vervaet, B. Hoppe, P. C. D’Haese, and A. Verhulst, “Lanthanum carbonate inhibits intestinal oxalate absorption and prevents nephrocalcinosis after oxalate loading in rats,” *J. Urol.*, vol. 189, no. 5, pp. 1960–1966, 2013.

- [37] Y. Tokuda, M.-H. Song, H. Oshima, A. Usui, and Y. Ueda, “Predicting midterm coronary artery bypass graft failure by intraoperative transit time flow measurement,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 86, no. 2, pp. 532–6, 2008.
- [38] D. K. H. Leong, V. Ashok, A. Nishkantha, Y. H. Shan, and E. K. W. Sim, “Transit-Time Flow Measurement is Essential in Coronary Artery Bypass Grafting,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 79, no. 3, pp. 854–857, 2005.
- [39] K. Honda, Y. Okamura, Y. Nishimura, S. Uchita, M. Yuzaki, M. Kaneko, N. Yamamoto, T. Kubo, and T. Akasaka, “Graft flow assessment using a transit time flow meter in fractional flow reserve–guided coronary artery bypass surgery,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 149, no. 6, pp. 1622–1628, 2015.
- [40] 新谷歩, 今日から使える医療統計. 医学書院, 2015.
- [41] A. Mennander, S. Tiisala, J. Halttunen, S. Yilmaz, T. Paavonen, and P. Häyry, “Chronic rejection in rat aortic allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis,” *Arterioscler. Thromb. a J. Vasc. Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 671–80.

- [42] F. M. Lupinetti, S. Cobb, H. C. Kioschos, S. A. Thompson, K. S. Walters, and K. C. Moore, "Effect of immunological differences on rat aortic valve allograft calcification.," *J. Card. Surg.*, vol. 7, no. 1, pp. 65–70, Mar. 1992.
- [43] S. Bajaj, R. Parikh, A. Hamdan, and M. Bikkina, "Covered-stent treatment of coronary aneurysm after drug-eluting stent placement: case report and literature review.," *Tex. Heart Inst. J.*, vol. 37, no. 4, pp. 449–54, Jan. 2010.
- [44] K. Bojakowski, P. Religa, M. Bojakowska, U. Hedin, Z. Gaciong, and J. Thyberg, "Arteriosclerosis in rat aortic allografts: early changes in endothelial integrity and smooth muscle phenotype.," *Transplantation*, vol. 70, no. 1, pp. 65–72, Jul. 2000.
- [45] N. Vyavahare, M. Ogle, F. J. Schoen, and R. J. Levy, "Elastin Calcification and its Prevention with Aluminum Chloride Pretreatment," *Am. J. Pathol.*, vol. 155, no. 3, pp. 973–982, Sep. 1999.
- [46] P. Mathieu, J. C. Roussel, F. Dagenais, and I. Anegon, "Cartilaginous metaplasia and calcification in aortic allograft is associated with transforming growth factor beta 1 expression.," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 126, no. 5, pp. 1449–54, Nov. 2003.

- [47] S. a Thompson, G. B. Smith, S. M. Cobb, K. S. Walters, and D. M. Behrendt, “Effects of calcium channel blockers on calcium uptake in rat aortic valve allografts.,” *Circulation*, vol. 86, no. 6, pp. 1973–1976, 1992.
- [48] N. Motomura, M. Imakita, C. Yutani, Y. Kitoh, Y. Kawashima, and T. Oka, “Histological change in cryopreserved rat aortic allograft.,” *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, vol. 36, no. 1, pp. 53–60, Feb. 1995.
- [49] H. Sun, V. Subbotin, C. Chen, A. Aitouche, L. A. Valdivia, M. H. Sayegh, P. S. Linsley, J. J. Fung, T. E. Starzl, and A. S. Rao, “Prevention of chronic rejection in mouse aortic allografts by combined treatment with CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand monoclonal antibody.,” *Transplantation*, vol. 64, no. 12, pp. 1838–43, Dec. 1997.
- [50] K. A. Lomashvili, S. Narisawa, J. L. Millán, and W. C. O’Neill, “Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate,” *Kidney Int.*, vol. 85, no. 6, pp. 1351–1356, Jun. 2014.
- [51] H. Baraki, I. Tudorache, M. Braun, K. Höffler, A. Görler, A. Lichtenberg, C. Bara, A. Calistru, G. Brandes, M. Hewicker-Trautwein, A. Hilfiker, A. Haverich, and S.

- Cebotari, “Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 31, pp. 6240–6246, 2009.
- [52] R. Muratov, D. Britikov, A. Sachkov, V. Akatov, V. Soloviev, I. Fadeeva, and L. Bockeria, “New approach to reduce allograft tissue immunogenicity. Experimental data☆☆☆,” *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 10, no. 3, pp. 408–412, Mar. 2010.
- [53] W. Flameng, G. De Visscher, L. Mesure, H. Hermans, R. Jashari, and B. Meuris, “Coating with fibronectin and stromal cell–derived factor-1 α of decellularized homografts used for right ventricular outflow tract reconstruction eliminates immune response–related degeneration,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 147, no. 4, p. 1398–1404.e2, Apr. 2014.
- [54] S. Shimokawa, H. Matsumoto, S. Ogata, T. Komokata, S. Nishida, T. Ushijima, H. Saigenji, Y. Moriyama, and A. Taira, “A new experimental model for simultaneous evaluation of aortic and pulmonary allograft performance in a composite graft,” *J. Invest. Surg.*, vol. 9, no. 6, pp. 487–93.

- [55] Y. Sun, P. Ye, J. Wu, Z. Liu, A. Zhang, L. Ren, C. Cheng, X. Huang, K. Wang, P. Deng, C. Wu, Z. Yue, and J. Xia, “Inhibition of intimal hyperplasia in murine aortic allografts by the oral administration of the transforming growth factor-beta receptor I kinase inhibitor SD-208,” *J. Hear. Lung Transplant.*, vol. 33, no. 6, pp. 654–661, Jun. 2014.
- [56] Q. Chang, C. C. Cheng, H. Jing, C. J. Sheng, and T. Y. Wang, “Cryoprotective Effect and Optimal Concentration of Trehalose on Aortic Valve Homografts.,” *J. Heart Valve Dis.*, vol. 24, no. 1, pp. 74–82, Jan. 2015.
- [57] M. Y. Speer, M. D. McKee, R. E. Guldberg, L. Liaw, H.-Y. Yang, E. Tung, G. Karsenty, and C. M. Giachelli, “Inactivation of the Osteopontin Gene Enhances Vascular Calcification of Matrix Gla Protein–deficient Mice,” *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 8, pp. 1047–1055, 2002.
- [58] L. L. Demer and Y. Tintut, “Vascular calcification: Pathobiology of a multifaceted disease,” *Circulation*, vol. 117, no. 22, pp. 2938–2948, 2008.

- [59] M. Mizobuchi, D. Towler, and E. Slatopolsky, "Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 7, pp. 1453–1464, 2009.
- [60] S. Jono, M. D. McKee, C. E. Murry, A. Shioi, Y. Nishizawa, K. Mori, H. Morii, and C. M. Giachelli, "Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification.," *Circ. Res.*, vol. 87, no. 7, pp. E10-7, Sep. 2000.
- [61] X. Li, H.-Y. Yang, and C. M. Giachelli, "Role of the Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter, Pit-1, in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification," *Circ. Res.*, vol. 98, no. 7, pp. 905–912, Apr. 2006.
- [62] K. Lomashvili, P. Garg, and W. C. O'Neill, "Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro.," *Kidney Int.*, vol. 69, no. 8, pp. 1464–70, Apr. 2006.
- [63] H. Yang, G. Curinga, and C. M. Giachelli, "Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro¹ See Editorial by Towler, p. 2467.," *Kidney Int.*, vol. 66, no. 6, pp. 2293–2299, Dec. 2004.
- [64] M. Mizobuchi, H. Ogata, I. Hatamura, F. Koiwa, F. Saji, K. Shiizaki, S. Negi, E. Kinugasa, A. Ooshima, S. Koshikawa, and T. Akizawa, "Up-regulation of Cbfa1 and

Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 21, no. 4, pp. 911–916, Apr. 2006.

- [65] F. Parhami, A. D. Morrow, J. Balucan, N. Leitinger, A. D. Watson, Y. Tintut, J. A. Berliner, and L. L. Demer, “Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients.,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 680–7, Apr. 1997.

- [66] S. M. Moe, D. Duan, B. P. Doehle, K. D. O’Neill, and N. X. Chen, “Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels,” *Kidney Int.*, vol. 63, no. 3, pp. 1003–1011, Mar. 2003.

- [67] N. X. Chen, D. Duan, K. D. O’Neill, G. O. Wolisi, J. J. Koczman, R. LaClair, and S. M. Moe, “The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells,” *Kidney Int.*, vol. 70, no. 6, pp. 1046–1053, Sep. 2006.