

博士論文

絹フィブロインを利用した人工血管の開発

山本 諭

目次

要旨	P.2
I. 序論	P.3-6
II. 実験① イヌモデルにおける絹フィブロイン利用人工血管の移植後の変化	P. 7-34
III. 実験② 絹フィブロイン利用人工血管の移植後の変化過程の特徴	P.35-58
IV. 実験③ 絹フィブロインを利用した小口径人工血管の現状評価	P.59-76
V. 考察① 絹フィブロイン利用人工血管の特徴および課題	P.77-85
VI. 考察② 絹フィブロイン利用人工血管の開発および臨床応用への展望	P.86-89
VII. 総括 本研究の意義	P.90
VIII. 謝辞	P.91
IV. 引用文献	P.92-97

絹フィブロインを利用した人工血管の開発

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科

指導教員 渡邊聡明教授

山本諭

要旨

これまで絹フィブロイン利用した人工血管の研究が行われてきたが、まだ大型動物モデルでの系統的な組織学的評価はされていなかった。本研究において、イヌを用いた動物モデルで絹フィブロイン利用人工血管を移植し、特徴的な生体内での変化を観察できた。そして、絹フィブロインの利用により、内皮細胞は早期に生着して、一定の条件下では内腔層が薄く器質化が進む可能性がみられた。絹フィブロイン利用は人工血管の安全性、開存率、長期的な安定性の向上につながる可能性がある。本研究により絹フィブロインを利用した人工血管開発の基となる系統的な所見が得られ、今後の優れた人工血管開発につながると考えられる。

序論

血管外科手術において、自己血管がすでに採取後である場合、短い、細い等で代用血管に適さない場合、炎症や瘤化等の病変でグラフトに適さない場合などで、人工血管が必要となる。また、自己血管に劣らない人工血管があれば、自己血管採取が不要で手術時間は短縮でき、患者侵襲軽減につながる。人工血管の歴史としては、1940年代に生体由来人工血管が臨床で使われた一方で、1952年に Voorhees らが有孔性の Vinyon "N" を用いた布製人工血管を作成して以降、約 60 年間にわたり人工血管は大きく開発が進み改良がされてきた。多くの素材が試される中、1955 年にはポリエステル(polyester, Dacron®) 製人工血管、1972 年には expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) 製人工血管が登場し、改良が重ねられて臨床で使用されてきた。ポリエステル製人工血管や ePTFE 製人工血管は 6mm 以上の大・中口径においては開存性や耐久性に関して概ね満足できる状況であり[1]、現在、血管外科領域において、臨床では漏血を防ぐために予め異種タンパク（牛ゼラチン等）で被覆したポリエステル製人工血管が最も広く使われている。しかし、異種タンパクに由来する狂牛病などの感染症や反応性炎症（術後発熱、漿液貯留等）など、安全面で必ずしも十分では無い。大・中口径ではポリエステル製人工血管と ePTFE 製人工血管は開存性に関して差はないとされるが[2, 3]、ePTFE 製人工血管ではそれ自体に抗血栓性を持つとされる一方で、生体組織の進展・侵入（器質化）は乏しい。

実際の臨床において、小口径人工血管の必要性は高く、膝下下肢動脈へのバイパス、冠動脈バイパスなどや小児外科領域で渴望されるが、未だ自己血管に並ぶ小口径人工

血管はない。これまでの人工血管開発研究の歴史の中で、小口径においては器質化を阻害する方向では長期間の安定した成績は得られていない。[4] 一定の開存率が得られたという報告でも、移植長が短い、観察期間が短い、長期にわたる抗血小板薬投与下などの制限があった。器質化を阻害する人工血管では、抗血栓性を有する内皮の進展（内皮化）を妨げ、抗血小板療法や抗凝固療法の継続下になければ遅発性血栓閉塞のリスクをいつまでも有することになる。長期的には、特に小口径において、器質化を排除するより器質化を進める人工血管の方が安定した成績が得られる可能性が高いと考えられる。[5] 一方で、生体由来材料製の小口径グラフトでも、免疫抗原性やアルデヒド固定による毒性、グラフトの瘤化などの問題があり、臨床での使用に定着できていない。[6, 7] 組織工学を用いた人工血管 (TEVG: tissue-engineered vascular graft) においては、細胞播種人工血管や再生培養血管で良好な開存性を得られたという報告もある。[8-12] しかし、現状では特別な技術や設備および準備期間や費用が必要で、準備に侵襲を伴うことがあり、さらに臨床では予想されたほどの成績が得られず、実用化には至っていない。[1]

現在の人工血管の状況を踏まえると、（１）安全性：臨床で使用する人工血管では異種タンパクより安全性が高い素材利用の方が望ましい、（２）開存性：臨床実用化可能な開存性を持つ小口径人工血管が必要である、（３）安定性：長期的な生体内での安定性には人工血管の器質化を阻害しない方が好ましい等の課題が挙げられる。

生体内での安全性という点において、絹は長年にわたり縫合糸として手術に使われヒトの体内に留置されてきた実績があり、歴史的にも安全性が高い天然素材である[13]。カイコ (*Bombyx mori*) が吐き出す繭糸はフィブロイン (Silk Fibroin, 以下 SF

と表記) とセリシンというタンパクから構成されている。[14] (図 1) セリシンは SF を接着させる粘着性の水溶性タンパクであり抗原性を有するが、線維状の SF は非水溶性で抗原性は低い。[14-16] 縫合糸膿瘍等の絹の生体適合性や異物反応の問題も報告されてきたが、多くはセリシンの残存が原因と推測され[13]、SF は牛など異種タンパクより安全性が高いと考えられる。[15, 17] SF は酸や中性塩には溶けるため、ナノ (マイクロ) フィラメントを含めた線維形態以外にも、液状・ゲル状やフィルム状、スポンジ状、球状、カプセル状など、様々な形態に加工可能である。[14] SF は大量生産が可能であり、さらに遺伝子組み換えカイコの利用で様々なタンパクを発現させた SF も作成できる。[18-20] SF は生分解性で高い細胞親和性があり、in vitro においてヒト細胞は SF に対して細胞の種類を問わず生着良好であった。[14, 21, 22] 以上から、足場材料としての利用など再生医療材料の分野で注目され、臨床応用へ向けて多くの研究が行われている。[23] フィルム状にして角膜、鼓膜、人工皮膚、スポンジ状にして軟骨、骨、靱帯、歯など、生体代用材料として幅広い利用が研究されている中[24-27]、繊維やコーティング剤として人工血管への利用の可能性が考えられている。

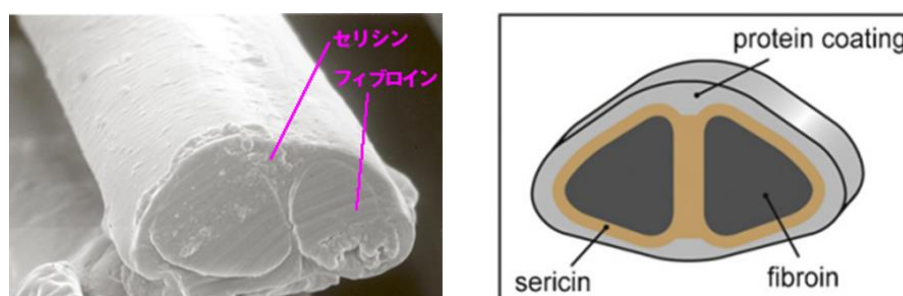


図 1. 絹フィブロイン (Silk Fibroin; SF) について：繭糸の断面図

(左：電子顕微鏡写真、右：シェーマ) (Hardy JG. et al. 2010 [14]より一部引用)
家蚕(*Bombyx mori*)が吐き出す繭糸の 1 本 (径 20 μ m 程度) は、フィブロイン (fibroin) という 2 本のフィラメントとそれらを接着するセリシン (sericin) というタンパクから構成される。

これまでに、SF を用いた人工血管の研究が報告されてきており、SF の特性を生かした人工血管開発の可能性が示されてきた。[28-31] Huang らにより、SF を液状にして被覆（コーティング）したポリエステル製人工血管では、内皮化が早く血栓性が低い可能性が報告された。[29] また、Enomoto らの報告では、SF 繊維製人工血管（朝倉研究室作成）をラットの腹部大動脈に移植したところ（内径 1.5mm、1cm 長）、PTFE より開存率は高く、SF は生分解され生体組織に置換されて 1 年後には生体の血管に類似した 3 層構造にリモデリングされた。[30]

人工血管への SF 利用の有用性は示唆されてきたが、これまでの報告では置換長が短い、移植期間が短い、移植数が少ない、小型動物モデルである等の制限があり、まだ大型動物モデルでの系統的な組織学的評価はされていない。ヒトへの臨床応用へ向けては、大型動物モデルにおいて、実際に使用される人工血管の径や長さを考慮して、中長期的な評価を行う必要がある。

本研究では、これまで解明されていない上記の問題の解決を目指して、SF を利用した人工血管を作成してイヌに移植し、生体内での人工血管の変化について中長期的な評価を行うことを目的とした。まず小型動物モデルで見られた SF 利用人工血管の移植後の生体内での変化（器質化）が大型動物モデルで見られるか観察し（実験①）、次に SF 利用人工血管の器質化過程の特徴を明らかにし（実験②）、現段階での小口径における SF 利用人工血管の評価を行って課題点を明らかにする（実験③）ことを目的とした。そして、それらの結果から、臨床応用に向けて SF 人工血管の改良・開発へつなげることを検討した。

実験① イヌモデルにおける絹フィブロイン利用人工血管の移植後の変化

【目的①】

絹フィブロイン（SF）利用人工血管を作成し、イヌモデルにおける SF 製人工血管の移植後の変化（器質化）過程の概要をみる。

【材料と方法①】

中口径絹フィブロイン人工血管作成

人工血管基盤作成について、編み（knit）による作成は福井経編興業株式会社で行い、組み（平織り woven に準ずる）による作成はニッケグループ 日本毛織株式会社で行った。人工血管基盤に対するコーティングは東京農工大学工学部朝倉研究室にて行った。東京大学血管外科にて移植実験における人工血管の問題点を指摘および検討して、基盤作成会社および東京農工大学工学部朝倉研究室に還元し、人工血管作成の改良を行った。具体的には、knit 構造に伴う異常拡張に対する編み方の改良および基盤の厚さ増加指示、組み基盤の繊維ほつれに対する指摘および改善、SF コーティングにおけるポリウレタン混合の中止、コーティング剤の剥がれに対する指摘および改良などを行った。

人工血管基盤作成 (図 1)

中口径人工血管として、内径 6mm になるように SF 繊維を編み（knit）（福井経編興業株式会社）または組み（平織り woven に準ずる）（ニッケグループ 日本毛織株式会社）、SF 繊維人工血管基盤（チューブ）を作成した。作成した SF 繊維人工血管基盤からはセリシンを完全に除去した。

初期の編み（以下 knit ①）では移植後に異常拡張（移植前の径の 1.5 倍以上の拡張）が生じることが判明した後は、異常拡張しないように改良した編み方（以下 knit ②）にして人工血管基盤を作成した。具体的には、knit 構造による伸びにつながる”たわみ”の程度を少なくした上で厚くするようにした。なお、組み（以下、準 woven）人工血管基盤では、繊維間隙（porosity）は編み基盤より少なく、拡張しにくい、管状にした端は繊維がほつれやすかった。

人工血管基盤（コーティング前）

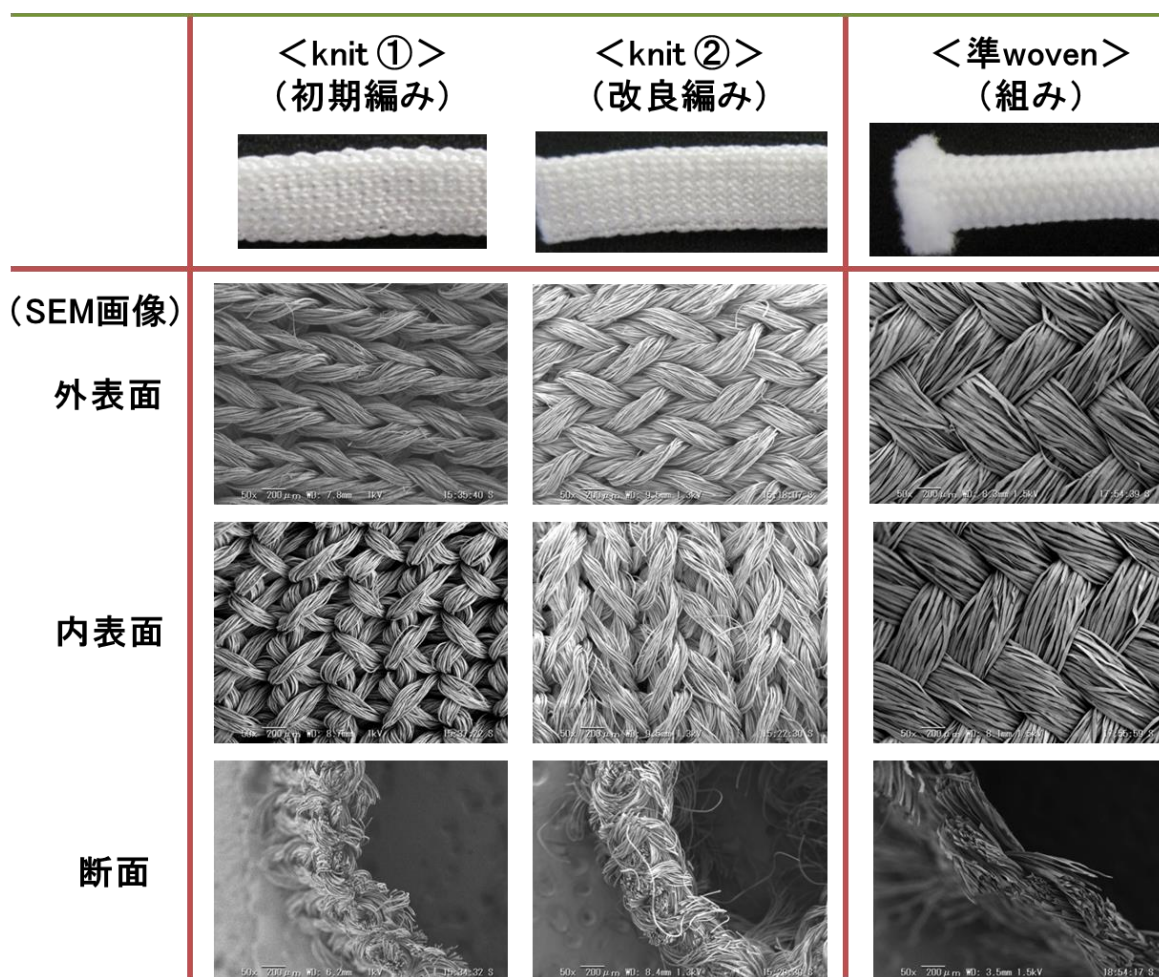


図 1. 人工血管基盤（写真）

SEM; Scanning Electron Microscope (走査電子顕微鏡)

編みは knit 構造を取り、組みでは平織り(woven)に準ずる構造であった。編みで改良したものは伸びにつながるたわみが少なくなり、厚みが増した。

SF コーティングによる人工血管作成 (図 2, 3)

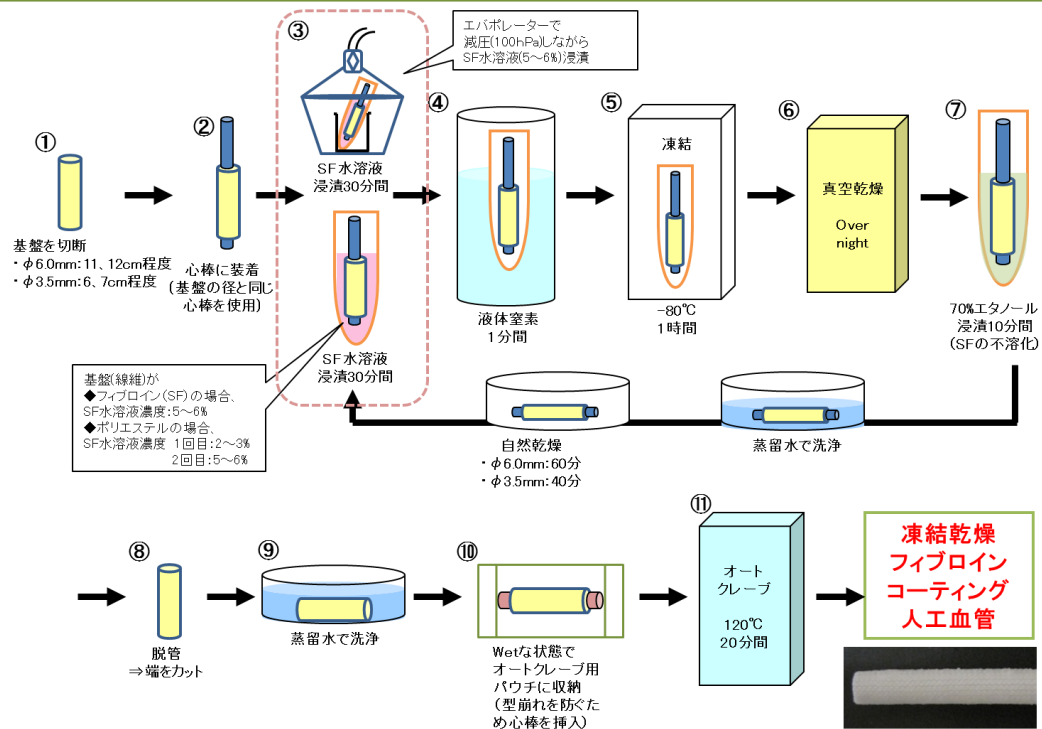
各人工血管基盤に、凍結乾燥法またはスポンジ法によるコーティングで SF コーティングを行った（東京農工大学工学部朝倉研究室）。[28, 32]

凍結乾燥法によるコーティングでは、人工血管基盤を SF 溶液に浸漬させ凍結乾燥を行った。SF は乾燥すると弾力性を失うため、当初は乾燥しても弾性を持たせるようにポリウレタン(polyurethane, neo-sticker®, Nicca Chemical Co., Ltd., Fukui, Japan) (PU と表記) を混ぜた SF 溶液を用いて行った。しかし、移植後に SF ではなく非生分解の PU の器質化を阻害する特性が出ることで判明し、その後はコーティング後も湿潤状態に保つことにしてポリウレタンを混合しない SF 溶液を用いた。

スポンジ法によるコーティングでは、界面活性剤・発泡剤としてのポリエチレングリコールジグリシジルエーテル(polyethylene glycol diglycidyl ether; PEGDE)を混ぜた SF 溶液に人工血管基盤を浸漬させ、後に PEGDE を取り除くことで多孔質状の SF コーティングを行った。本研究では内径 6mm に対し外径 9mm になるようにスポンジ状コーティングを行った。なお、スポンジ法による SF コーティングは、凍結乾燥法によるものと多孔質か非多孔質かの形状の違いがあるが、SF の材質としての違いは無いとされる。

作成した各々の SF コーティング人工血管は、乾燥しないように 5%SF 溶液に浸した状態で保存した。

＜凍結乾燥法によるSFコーティング(非多孔質)＞



＜スポンジ法によるSFコーティング(多孔質)＞

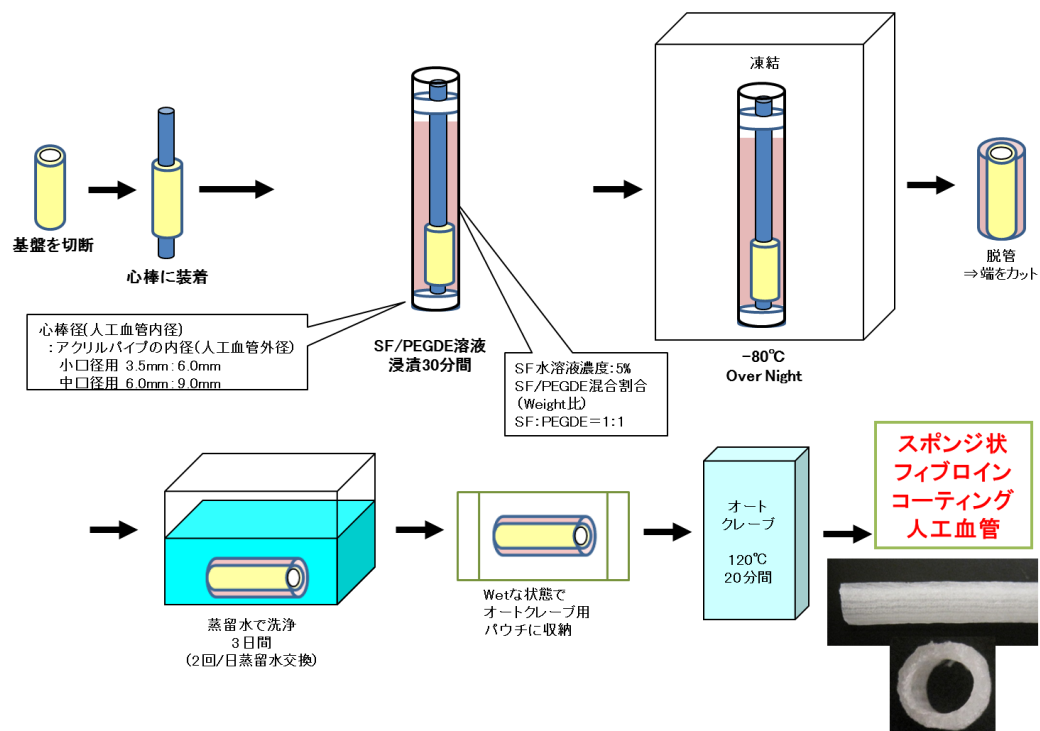


図2. 凍結乾燥法およびスポンジ法によるSFコーティング工程(シエーマ)

SF; 絹フィブロイン, PEGDE; polyethylene glycol diglycidyl ether (ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル)

凍結乾燥法では非多孔質、スポンジ法では多孔質状にコーティングされた。

絹フィブリンコーティング人工血管

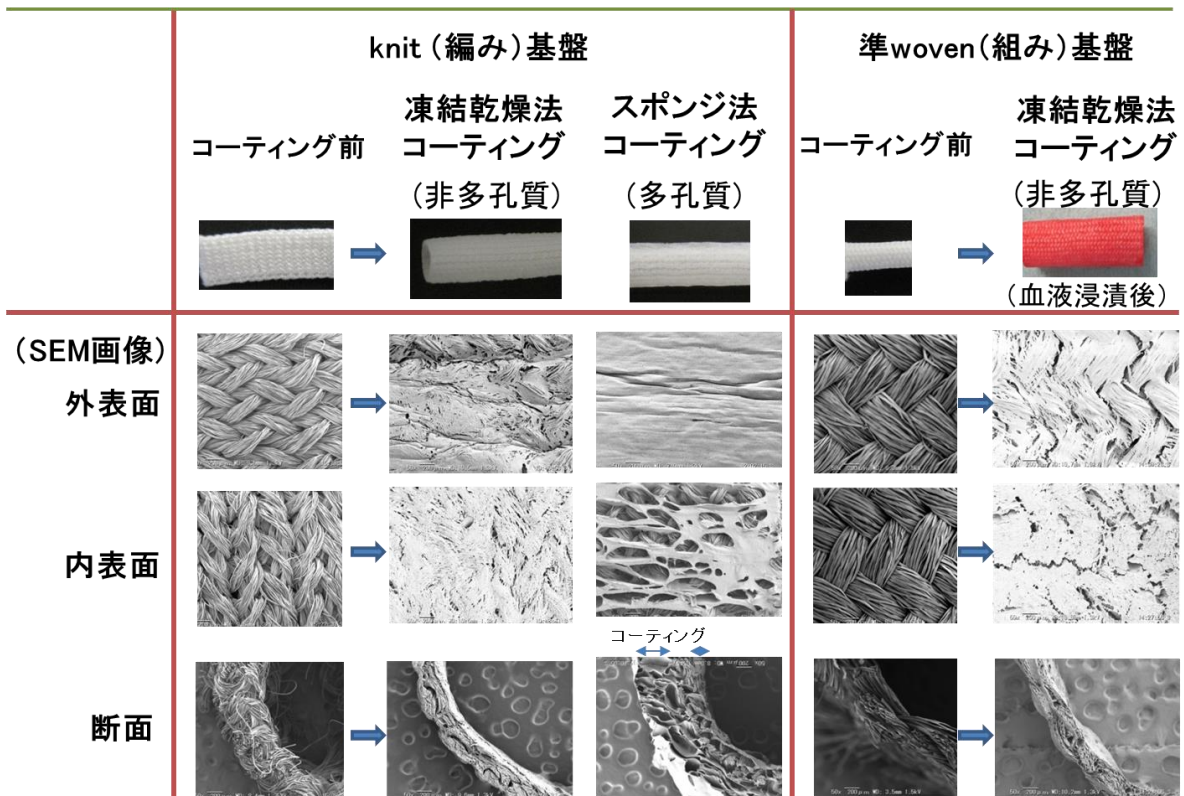


図 3. SF コーティング人工血管 (写真および画像)

SEM; Scanning Electron Microscope (走査電子顕微鏡)

写真及び画像は SF 繊維基盤に SF コーティングをしたもの。ポリエステル繊維基盤に SF コーティングしたものでも SEM 画像上同様であった。

以上により、各種人工血管について、表 1 のように M0～M3 まで作成した。

表 1 各種中口径人工血管

	繊維 (作成法)	コーティング (方法)
M0	SF (knit ①)	PU 含有 SF (凍結乾燥法)
M1	SF (knit ①)	SF (凍結乾燥法)
M2	SF (knit ②)	SF (凍結乾燥法)
M3	SF (knit ②)	SF (スポンジ法)
M4	SF (準 woven)	SF (凍結乾燥法)

人工血管の物理的性質測定

作製した人工血管について、移植前の人工血管の物理的性質を計測した。(表 2) 周軸強度、吻合保持強度については別図に示す方法で行った。(図 4) [28, 32]。knit ①の人工血管では、凍結乾燥コーティング後も周軸強度が 20(N)未満であったが、knit ②の人工血管はいずれも 20(N)以上であった。

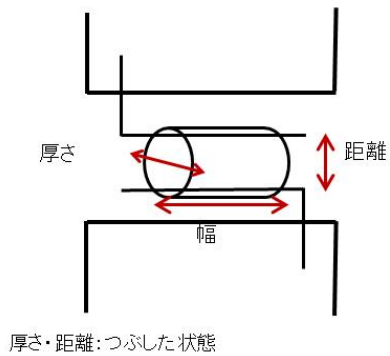
表 2 各人工血管の物理的性質

	人工血管 (各 n=5)		周軸強度	吻合保持	透水率
	繊維 (作成法)	コーティング	(N)	強度(N)	(ml/min/cm2)
M1	SF (knit ①)	SF (凍結乾燥法)	13.6 ± 0.9	3.6 ± 0.6	154.4 ± 32.0
M2	SF (knit ②)	SF (凍結乾燥法)	54.3 ± 6.1	7.9 ± 1.1	48.5 ± 2.4
M3	SF (knit ②)	SF (スポンジ法)	36.7 ± 7.8	7.1 ± 0.8	93.7 ± 26.7
M4	SF (準 woven)	SF (凍結乾燥法)	61.8 ± 12.2	11.8 ± 1.4	168.7 ± 61.6
参	Gelsoft Plus® (径 6.0mm)		112.9 ± 11.7	—	0

SF; silk fibroin (絹フィブロイン), PE; polyester (ポリエステル)

Gelsoft Plus®; ポリエステル繊維基盤 (編み knit) ・牛ゼラチンコーティングによる市販人工血管

周軸強度試験



吻合保持強度試験

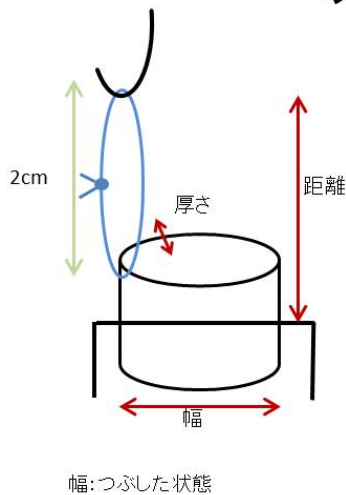


図 4. 周軸強度試験および吻合保持強度試験の測定方法 (シェーマ及び測定機器写真)
周軸強度試験

- ① グラフトを長さ 5mm にカットする。
- ② 六角レンチにグラフトを通す。
- ③ グラフトが引っ張られない状態でセットする(0.2N 前後)。
- ④ レンチを牽引していき (稼働セル: 100N or 1kN、測定速度: 2mm/min)、人工血管破断時の張力を周軸強度(N)とする。

吻合保持強度試験

- ① グラフトを長さ 2cm にカットする。
- ② 上から 2mm のところに手術用糸を通し、結紮を二重にする。この時、糸部分の長さが約 2cm となるようにする。
- ③ 下部を試験機のクリップに挟む (挟み長 1cm)。
- ④ 糸上部は試験機のフックに引っ掛け、糸の緩みがないようにフック位置を調節する(0.2N 前後)。結び目は糸部分の中央にセット。
- ⑤ 機器を移動していき (稼働セル: 100N、測定速度: 3mm/min)、破断時点での強度を保持強度 (N) とする。

人工血管移植 (図 5)

本研究において、全ての動物実験は東京大学医学部大学院医学系研究科長の承認の下、「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守して行った。

ビーグル成犬オス (1~2 歳, 体重 8-12kg) (Japan Laboratory Animals, Inc., Tokyo, Japan) に Propofol (10 mg/kg, 1% Propofol, Maruishi, Osaka, Japan) を静脈注射して全身麻酔導入を行い、挿管して、酸素とハロタン(Fluothane®, Takeda Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) によるガス麻酔にて維持した。左傍腹直筋切開にて開腹し、腹部大動脈を剥離露出させ、腎動脈分岐下～腸骨動脈分岐まで腰動脈を結紮切離した。腹部大動脈から血液約 3cc を採取し、人工血管を血液に浸漬して繊維間を目詰まりさせ、プレクロッシングを行っておいた。ヘパリン (100 IU /kg, Heparin sodium, Ajinomoto Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を静脈注射後、大動脈を遮断し切断して、6-0 ポリプロピレン糸 (6-0 Prolene; Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) による連続縫合にて端端吻合を行い、中口径人工血管 (7-10cm 長) で腹部大動脈を置換した。

手術終了後、感染予防目的に Orbifloxacin (DS Pharma Animal Health Co., Ltd., Osaka, Japan) 50mg を 1 回皮下注射した。術後に抗凝固剤や抗血小板剤は投与しなかった。

<腹部大動脈置換術>

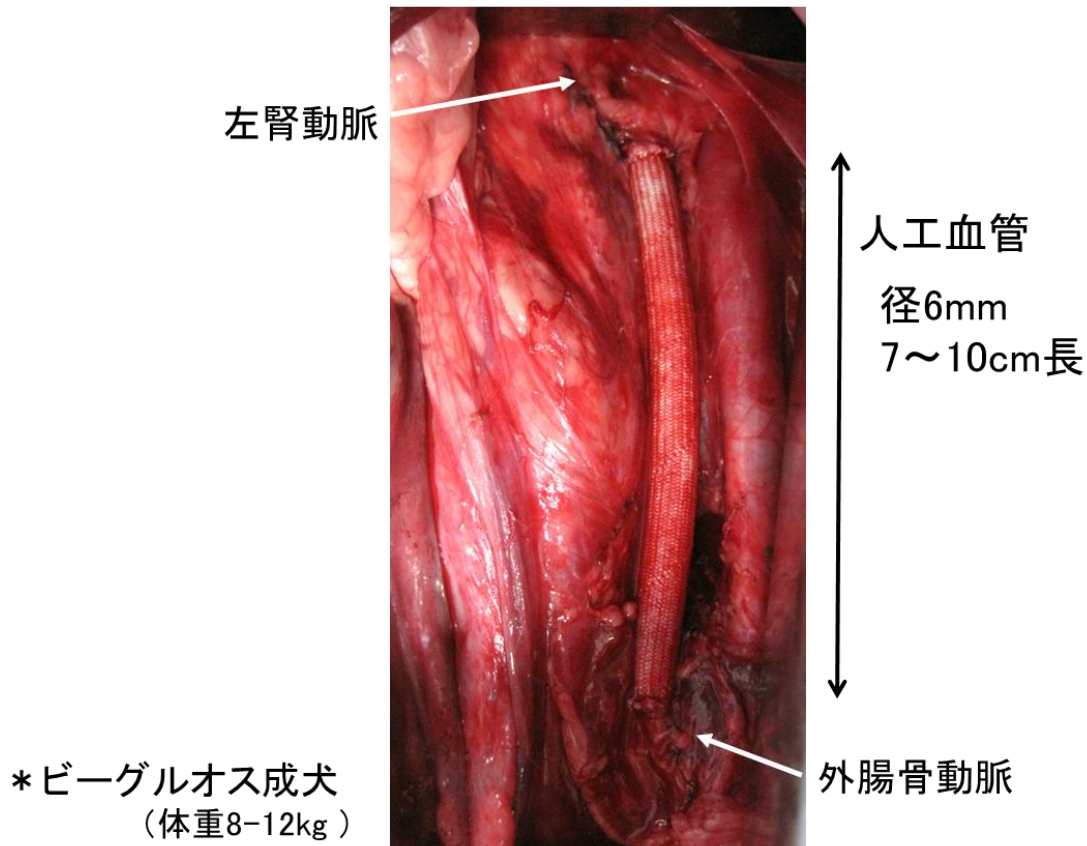


図 5. 中口径人工血管移植：腹部大動脈置換手術（術中写真）

右半側臥位にて、開腹して腹部大動脈を露出し、人工血管を移植した。

移植人工血管種類

M0 を 8 本、M1 を 1 本、M2 を 1 本、M3 を 1 本、M4 を 2 本、移植した。また、参考として市販ポリエステル繊維ウシゼラチンコーティング人工血管（径 6mm）(Gelsoft™ Plus, Vascutek, a Terumo Compan, Scotland, UK)を 2 本移植した。

移植人工血管検体採取

移植後、大腿動脈拍動触知を確認し、エコー(SonoSite, Inc., MicroMaxx®, United States)にて人工血管の開存状況および形状・径の変化を定期的に観察した(1~3 日後, 1 週間後, 2 週間後, 3 週間後, 4 週間後, 以降 1 ヶ月毎)。人工血管が閉塞した場合は閉塞

が判明した時点で検体を採取し、開存し続けた場合は 6 ヶ月ないし 2 年で検体を採取した。

移植時と同様にして、全身麻酔下に移植時と同じ皮膚切開にて開腹した。感染や血腫形成の有無などを確認後、人工血管を包んでいる周囲組織を極力損傷しないように、人工血管全体および連続する生体動脈の一部を一塊として採取した。

病理組織学検査

肉眼的に人工血管及び周囲組織を評価し、切開を入れて人工血管内腔を観察した。なお、検体によっては周囲組織が人工血管に固着しておらず容易に剥がれるため、ホルマリン固定後に各部分に切開を入れるようにした。両側の吻合部は長軸方向に切開し、人工血管中央部は横断方向（長軸に垂直方向）に切開した。各切片検体をパラフィン包埋後、薄切して Hematoxylin-eosine (HE) 染色、elastica van Gieson (EVG) 染色、Masson's trichrome (MT) 染色を行った。また、免疫染色として、平滑筋細胞の観察目的に抗 α Smooth Muscle Actin (α -SMA)モノクローナル抗体(DAKO, Glostrup, Denmark)を用いて抗 α -SMA 抗体染色、内皮細胞の観察目的に抗 von Willebrand Factor (vWF) ポリクローナル抗体(DAKO, Glostrup, Denmark)を用いて抗 vWF 抗体染色を行った。各染色後、プレパラートを光学顕微鏡にて観察した。

人工血管器質化評価

各染色画像から、吻合部における内膜肥厚の有無、人工血管中央部における内皮細胞数、内腔層の膠原繊維化、内腔層の厚さ、外側層の厚さについて、以下のようにカテゴリー分類を用いて評価した。

- ・ 内膜肥厚の有無（吻合部）

-; 無し, +; あり（70%未満の狭窄）、++; あり（70%以上の高度狭窄または閉塞）

- ・ 内皮細胞数（人工血管中央部）

抗 vWF 抗体染色または HE 染色で確認される内皮細胞数（個/全周）を以下に分類

-: 0, +: $1 \leq < 50$, ++: $50 \leq < 100$, +++: $100 \leq$ (単位: 個/全周)

- ・ 内腔層の膠原線維化（人工血管中央部）

EVG 染色にて確認される内腔層における膠原線維の面積の割合(%)を以下に分類

-: 0, +: $0 < < 50$, ++: $50 \leq < 100$, +++: 100 (単位: %)

- ・ 内腔層の厚さ（人工血管中央部）

画像解析ソフト(Image J)を用いて、内腔層面積/人工血管内腔周径 (μm) を算出し、以下に分類

-: $0 \leq < 100$, +: $100 \leq < 200$, ++: $200 \leq < 400$, +++: $400 \leq$ (単位: μm)

- ・ 外側層の厚さ（人工血管中央部）

画像解析ソフト(Image J)を用いて、外側層面積/人工血管外側周径 (μm) を算出し、以下に分類。なお、外側層は EVG 染色にて膠原繊維を含んだ領域とした(血腫や周囲の脂肪組織は外側層に含めない)。

-: 0, +: $0 < < 1$, ++: $1 \leq < 2$, +++: $2 \leq$ (単位: mm)

【結果①】

人工血管開存状況 (表 3)

M0 (PU 含有 SF コーティング人工血管) は 5 本が 1 週間以内に、残りも 3,4,7 か月後に血栓・塞栓による急性閉塞を来し、全例閉塞した。M2 (凍結乾燥コーティング knit ②人工血管) が 1 週間で血栓閉塞した。M4 (準 woven 人工血管) の 1 本は、3 か月後に吻合部内膜肥厚により閉塞した。その他には閉塞は無かった。臨床使用されている市販人工血管の Gelsoft Plus® は 2 本とも 6 か月以上開存し、移植手技的には問題なかった。

表 3 移植人工血管および移植結果

人工血管	繊維 (作成法)	コーティング (方法)	採取時期および開閉			移植 総数
			< 1m	1-6m	6m <	
M0	SF (knit ①)	PU 含有 SF (凍結乾燥法)	< 1w x5	3m x1, 4m x1	7m x1	8
M1	SF (knit ①)	SF (凍結乾燥法)			24m x1	1
M2	SF (knit ②)	SF (凍結乾燥法)	2w x1			1
M3	SF (knit ②)	SF (スポンジ法)			6m x1	1
M4	SF (準 woven)	SF (凍結乾燥法)		3m x1	24m x1	2
参	Gelsoft Plus® (径 6.0mm)				8m x1, 10m x1	2

SF; フィブロイン, PU; ポリウレタン, w; week(s), m; month(s),

赤字; 開存, 青字; 血栓・塞栓による閉塞, 緑字; 内膜肥厚による閉塞

*1; 移植前の 1.5 倍(9mm)以上の拡張あり

合併症

中口径人工血管計 15 本を移植し、イヌの術中死は無かった。1 例は M0 (PU 含有 SF コーティング人工血管) を移植後 4 日目に急性閉塞から多臓器不全に至り死亡した。全例で、人工血管感染や創感染の所見は認めなかった。

M1 (knit ①人工血管) では、移植数日後から編み方に由来する人工血管の異常拡張 (移植前の径の 1.5 倍以上の拡張) がみられ、拡張した繊維間の漏血から人工血管周囲に血腫形成したが、2 年後まで局所的な破綻は無かった。(図 6A) M3 (knit ②) と M4 (準 woven) では 1.5 倍以上の異常拡張は無く、観察期間内で局所破綻や瘤化は無かった。(図 6B, C) また、Gelsoft Plus®では移植後 2 週以降まで遷延する人工血管周囲液体貯留を認めたが (図 6D)、SF コーティング人工血管では目立たなかった。

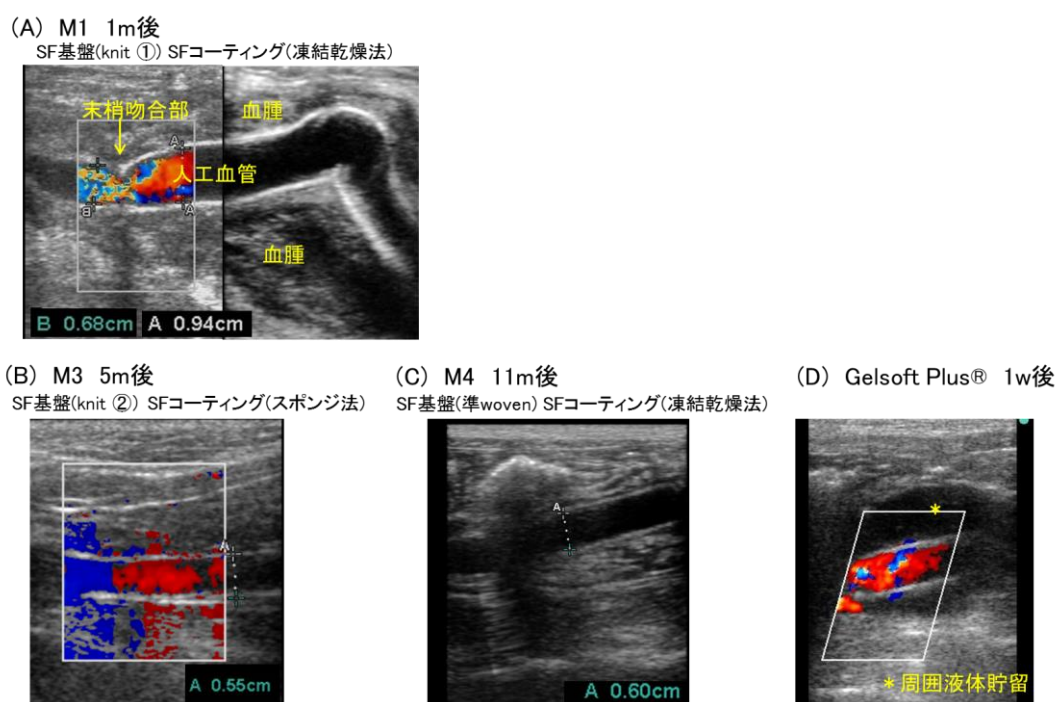


図 6. 移植後人工血管の状況 (エコー画像)

(A) 人工血管径は 1.5 倍(9mm)以上に拡張し、中央部近くで屈曲していた。人工血管周囲には血腫形成を認めた。

(B), (C) 人工血管の異常拡張は無かった。

(D) 周囲に 1~3 週間にわたり遷延する液体貯留が見られた。

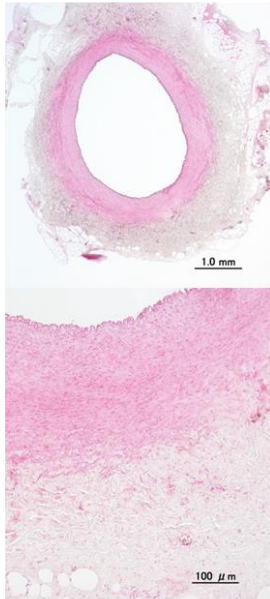
病理組織学検査

本研究における各染色について(図 7, 8)

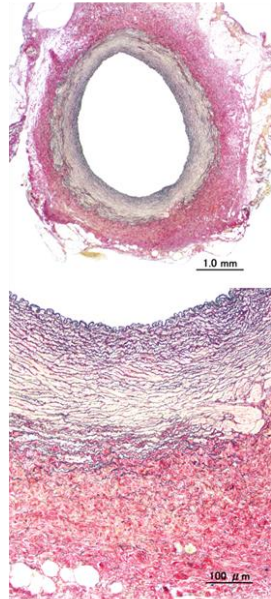
イヌモデルにおける各染色状況および SF 利用人工血管の染色状況を図 7, 8 に示した。主に HE 染色により基本的な構造や細胞（核）、血球等の観察を行い、EVG 染色・MT 染色により膠原線維等の組織構造・構成の観察、抗 α -SMA 抗体染色により平滑筋細胞、抗 von Willebrand Factor (vWF) 抗体染色により内皮細胞の観察を行った。SF についても各染色で観察可能であったが、MT 染色では SF コーティング剤も弾性線維も青色に染まり色調での判別が困難だったのに対し、EVG 染色では SF コーティング剤は灰色(ないし黄褐色)に対し膠原線維は赤色に染まり明瞭に区別可能であった。このため以降では、組織構造の観察目的の場合は EVG 染色画像を用いて検討を行った。

イヌ 腹部大動脈 (横断断)

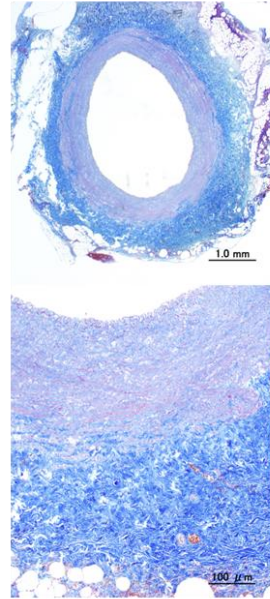
Hematoxylin eosin染色
(HE染色)



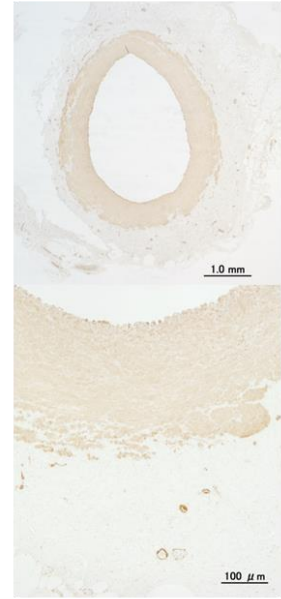
Elastica van Gieson染色
(EVG染色)



Masson's trichrome染色
(MT染色)



抗 α -SMA抗体染色



抗vWF (von Willebrand Factor) 抗体染色

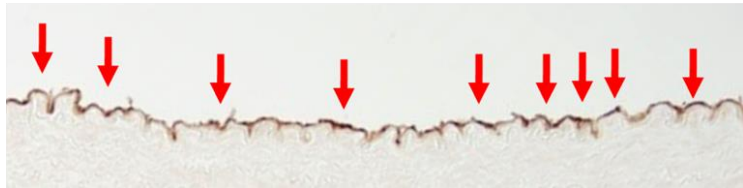


図7. 参考：イヌ腹部大動脈の各染色 (positive control 染色)

各染色により血管構造、組織が観察可能であった。

HE 染色：血管構造、細胞(核)、血球等の観察。

EVG 染色：弾性線維は黒、膠原線維は赤、平滑筋は淡黄褐色に染色。

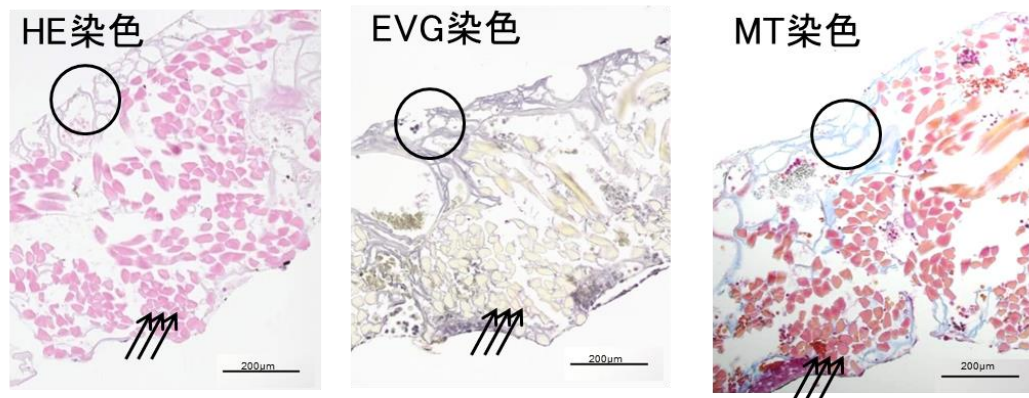
MT 染色：膠原線維は青、平滑筋は赤色調に染色。

抗 α -SMA 抗体染色：平滑筋が茶褐色に染色。

抗 vWF 抗体染色：内皮細胞が濃い茶褐色に染色。

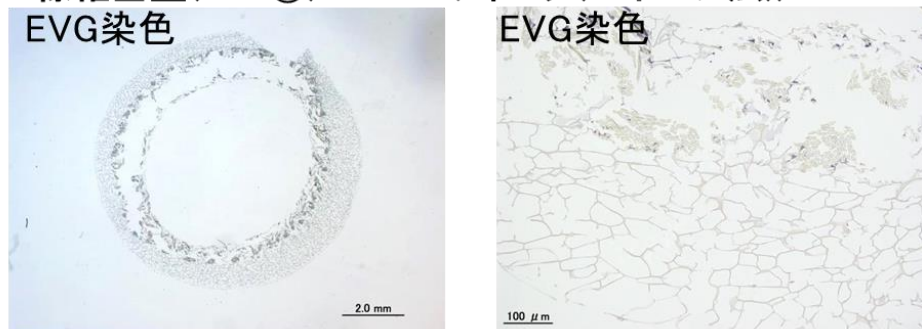
未移植SF人工血管

(SF線維基盤(準woven) SFコーティング(凍結乾燥法))



未移植SF人工血管

(SF線維基盤(knit ①) SFコーティング(スポンジ法))



移植後SF人工血管

(SF線維基盤(knit ②) SFコーティング(スポンジ法))

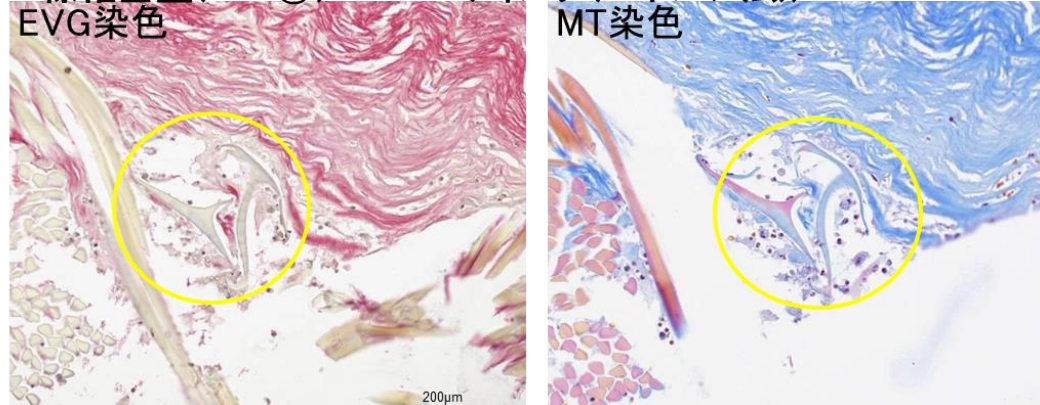


図 8. SF 利用人工血管の染色について (染色画像)

SF 線維(矢印) : HE でピンク色、EVG で淡い黄褐色、MT で赤色に染色(矢印)。

SF コーティング剤(円領域) : HE で淡いピンク色、EVG で灰褐色、MT で青色に染色 (多孔質、非多孔質とも同じ)。

黄線で囲んである三角状の領域は、スポンジ状コーティング剤の一部。MT 染色では SF コーティング剤も弾性線維も青色に染まり、色調での判別が困難であるのに対し、EVG 染色では SF コーティング剤は灰色(吸収過程で黄褐色調に見えることもある)、膠原線維は赤色で明瞭に区別できた。

PU 含有 SF コーティング人工血管 (M0)

肉眼的所見について、開存期間 1 か月未満の早期閉塞人工血管では、外側面は吻合部以外には生体組織で覆われていなかった。移植後 3 か月以上開存した人工血管では、周囲組織が人工血管を覆うが固着せず、容易に剥離される状態だった。内腔面は、血栓の他に、一部で黄褐色調のフィブリン堆積がみられたが、人工血管中央部では新生内膜の進展は認められなかった。また顕微鏡的所見では、PU コーティング剤が吸収されず残っており、繊維間の細胞浸潤はわずかで膠原線維の侵入は認めなかった。(図 9) 検体によっては内腔にフィブリン層堆積が散見されたが、全ての人工血管で内皮細胞による被覆は見られなかった。人工血管内外面および繊維間に膠原線維や平滑筋細胞層の形成は認めなかった。

PU含有SFコーティング人工血管 (M0)

中央部
7m後 血栓閉塞

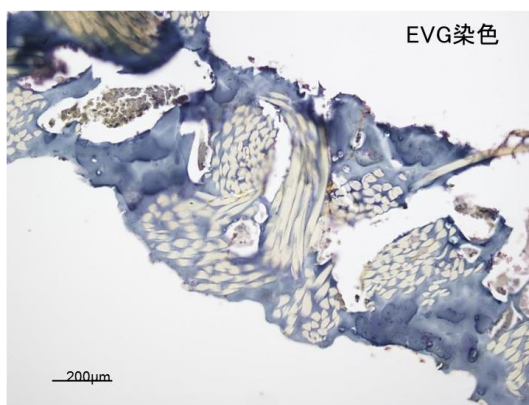
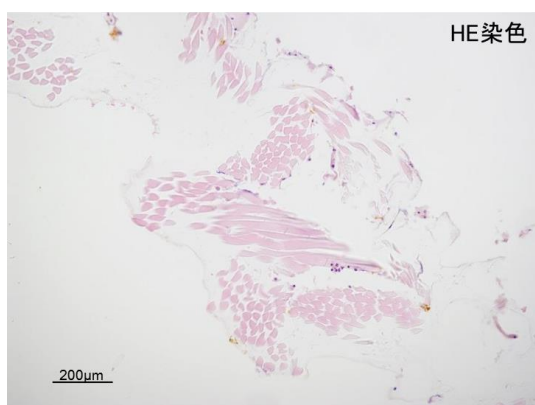
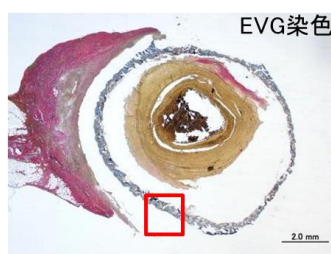


図 9. PU 含有 SF コーティング人工血管 (染色画像)

7 か月後に血栓により急性閉塞した人工血管でも、ポリウレタンコーティングが残存し、繊維間に細胞侵入はわずかであった(ポリウレタン：EVG 染色で青く染色)。

SF 繊維 SF コーティング人工血管（非 PU 含有）(M1, M2, M3, M4)

肉眼的所見 (図 10)

移植 2 週間で閉塞した人工血管(M2)では、外側面では吻合部以外には生体組織で覆われていなかった。内腔面については、吻合部では白色血栓及びそれにつながる赤色血栓がみられ、中央部では赤色フィブリン血栓を認めた。(図 10 A)

移植後 3 か月以上開存した人工血管では、外側面では生体組織が人工血管全体を覆っていた。(図 10 B, C, D) SF 基盤(準 woven) SF コーティング(凍結乾燥法)人工血管(M4)で比べると、3 か月後より 2 年後の方が全周性に厚みのある組織で覆われていた。(図 10 C, D) スポンジコーティング人工血管(M3)では、スポンジコーティング層の厚みがある分、人工血管の外側層は厚く形成されていた。(図 10 B) 内腔面では、3 か月後に閉塞した SF 基盤(準 woven) SF コーティング(凍結乾燥法)人工血管(M4)では、両側吻合部に内腔を占拠する内膜肥厚組織およびそれにつながる血栓が見られ、中央部では血栓以外に凹凸のある薄いフィブリン堆積層が人工血管内側の一部を覆っていた。(図 10 C) 6 か月以上開存した人工血管(M3, M4)では、部位による違いはあるが、中央部まで光沢がある滑らかな白色調の新生内膜の進展が見られた。(図 10 B, D)

SF繊維基盤SFコーティング (* 右: 中枢, 左: 末梢)

(A) M2 1w後 閉塞
(knit ②, 凍結乾燥法)



(C) M4 3m後閉塞
(準woven, 凍結乾燥法)

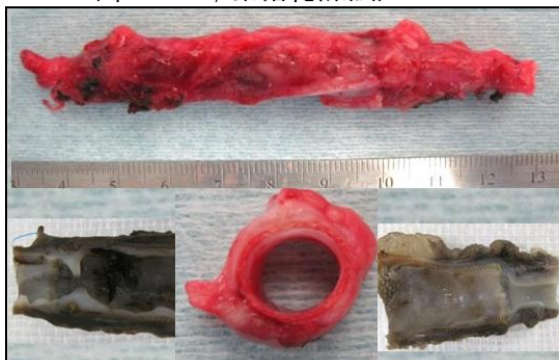


(* 下段: 内腔面写真(両側吻合部、中央部))

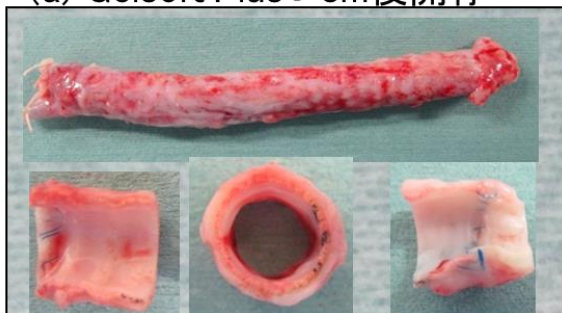
(B) M3 6m後開存
(knit ②, スポンジ法)



(D) M4 24m後開存
(準woven, 凍結乾燥法)



(a) Gelsoft Plus® 8m後開存



(b) Gelsoft Plus® 10m後開存



図 10. SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 肉眼的所見 (検体写真)

- (A) 吻合部付近以外に人工血管外側面に生体組織の被覆は見られなかった。
- (B) 全体が厚い生体組織で被覆。内腔面は中央部まで白色調の新生内膜が進展。
- (C) 全体が薄く生体組織に被覆。内腔面では、両側吻合部の内膜肥厚組織および血栓形成が見られ、中央部では薄いフィブリン堆積層がみられた。
- (D) 人工血管全体が厚い生体組織で被覆。内腔面では、凹凸はあるが中央部まで全面に白色調の新生内膜進展。
- (参) (左) 外側の生体組織の被覆や内腔面の新生内膜進展は全面的で良好、(右) 外側の被覆は薄く部分的、内腔面では新生内膜は吻合部近くに留まっていた。

顕微鏡的所見（図 11-16）

移植後 2 週間で閉塞した SF 人工血管(M2)では、PU 含有 SF コーティング人工血管と同様で、血栓およびグラフト表面及び繊維間にフィブリン堆積、赤血球・血小板沈着および白血球浸潤が見られた。（図 11A, 12A）

人工血管外側面では、内腔側の層形成および膠原線維進展より早期に膠原線維層豊富な外側層が形成された。人工血管内腔側においても、移植後開存期間の経過に伴い、中枢吻合部および末梢吻合部から人工血管内腔層へ膠原線維の侵入進展が進んでいく様子が見られ（図 11）、人工血管中央部でもフィブリン堆積層が形成されてフィブリン堆積層内に膠原線維の侵入・置換（以下、膠原線維化と表現）が進んでいく過程が見られた。（図 12）なお、肉眼的所見で光沢がある滑らかな白色調に見えた領域は、膠原線維の進展領域・状況に一致していた。さらにそれに伴い、内腔層の最内層には内皮細胞が生着していき、6 ヶ月以上開存した人工血管では人工血管中央部でも全周性に内皮細胞が確認された。（図 13）

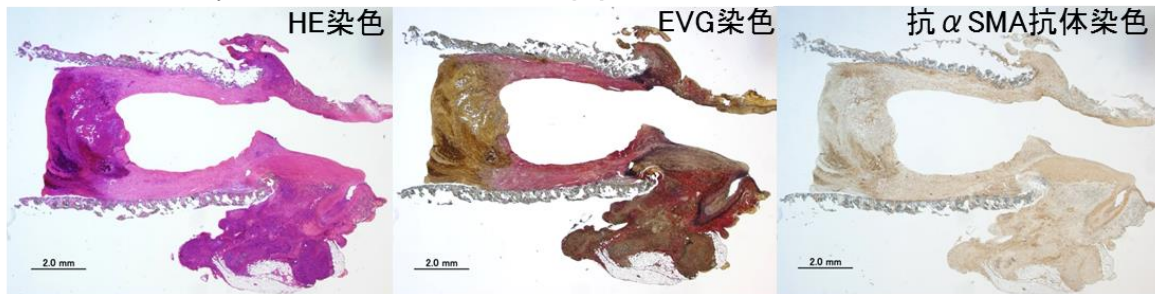
移植後早期より SF 繊維に接する領域や SF 繊維間に浸潤細胞が見られ、移植 2 年後でも多数の細胞が見られた。移植後早期では分葉核球（好中球）が目立ったのに対し、3 ヶ月以上経過後では単核球（形質細胞）が著増して大部分を占めており、その他に分葉核球(好中球、稀に好酸球)、組織球(マクロファージ)が見られ、人工血管繊維に直接接する領域で多核巨細胞も少数見られた。移植後長期経った検体でも、特に人工血管繊維外側に接する領域で、多数の単核の浸潤細胞が集簇している領域が散見された。SF スポンジ状コーティング人工血管(M3)では、人工血管外側でコーティング剤が細分化され、浸潤細胞に囲まれ（SF 繊維に接するところでは好中球が多く、少し離れ

たところでは形質細胞・単核球が集簇)、膠原線維が出現し置換していく所見が見られた。(図 14 A) さらに、6 ヶ月、2 年経過した人工血管(M1, M3,M4)では、破綻・瘤化は無かったが SF 繊維が分解され吸収されている所見が散見された。(図 14 B, C)

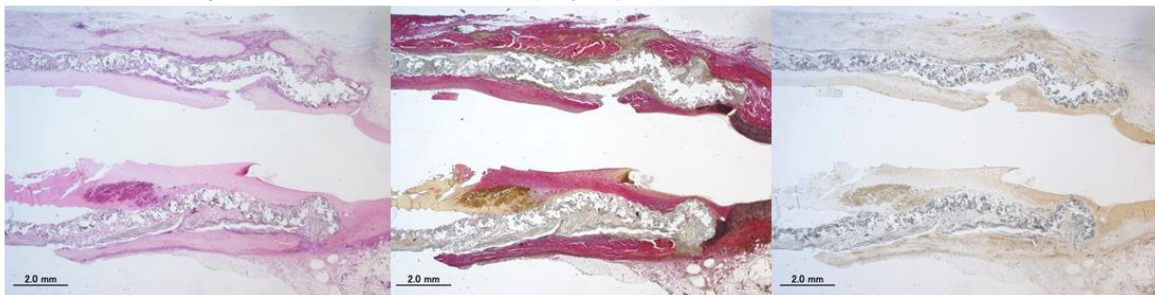
SF繊維基盤SFコーティング人工血管 吻合部

(* 右: 中枢, 左: 末梢)

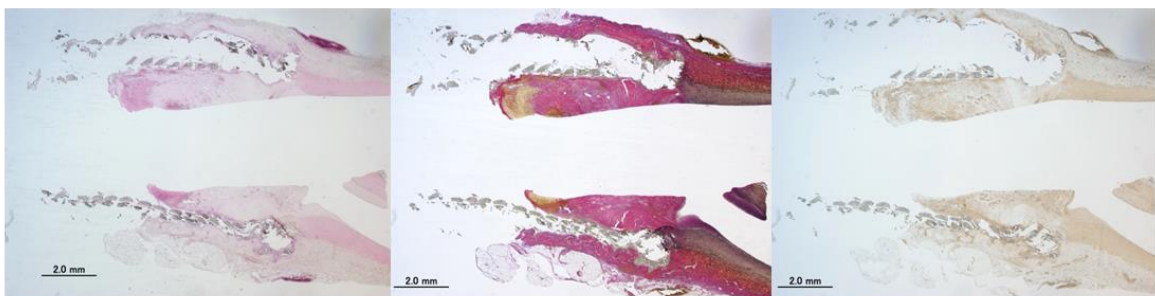
(A) M2 (knit ②, 凍結乾燥法) 2w後 閉塞



(B) M3 (knit ②, スポンジ法) 6m後開存



(C) M4 (準woven, 凍結乾燥法) 3m後閉塞



(D) M4 (準woven, 凍結乾燥法) 24m後開存

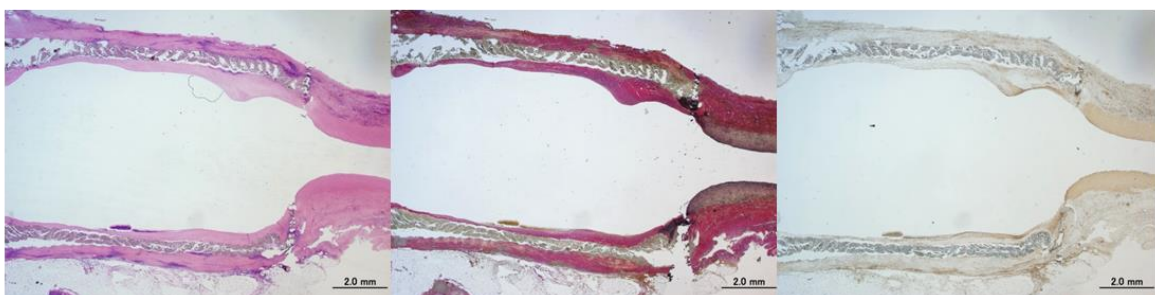


図 11. SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 顕微鏡的所見① (染色画像)

開存期間が長い検体では、人工血管内腔側・外側で生体動脈側から膠原線維(EVG染色で赤色)が進展。内腔層では、平滑筋層も内腔寄りに薄く形成され進展。(B)内腔層で、吻合部から離れたところではフィブリン堆積形成層 (EVG 染色で黄褐色) の状態で留まっていた。

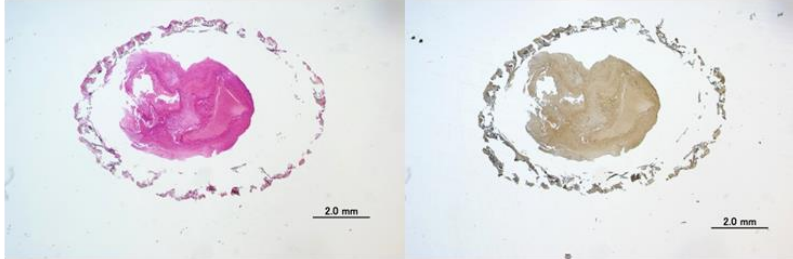
SF繊維基盤SFコーティング人工血管 中央部

(A) M2 (knit ②, 凍結乾燥法) 2w後 閉塞

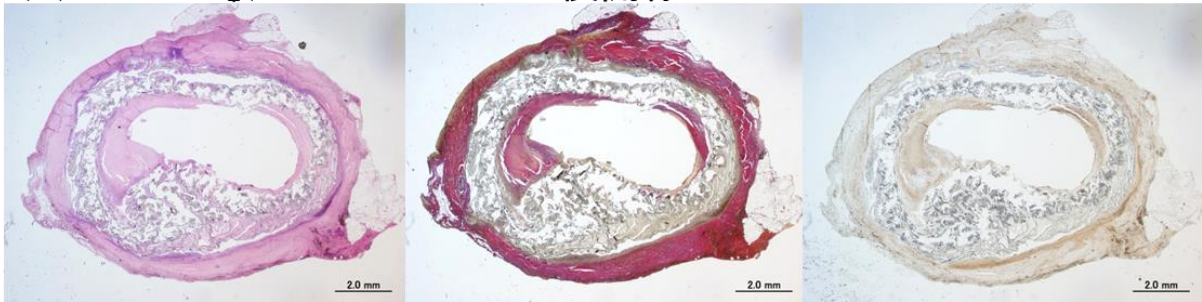
HE染色

EVG染色

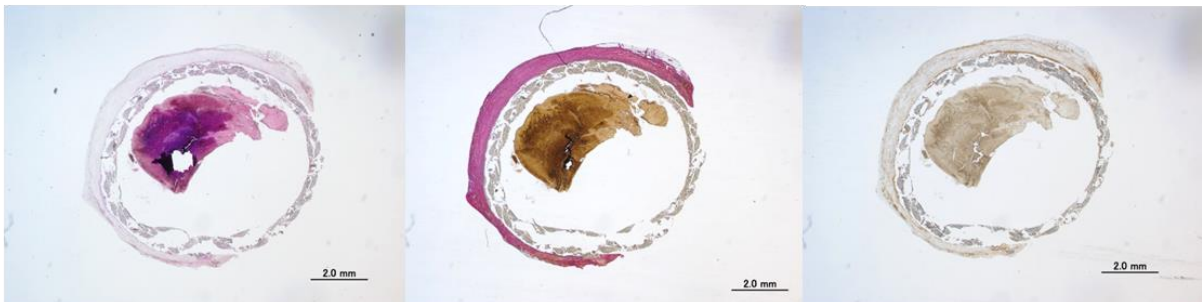
抗 α SMA抗体染色



(B) M3 (knit ②, スポンジ法) 6m後開存



(C) M4 (準woven, 凍結乾燥法) 3m後閉塞



(D) M4 (準woven, 凍結乾燥法) 24m後開存

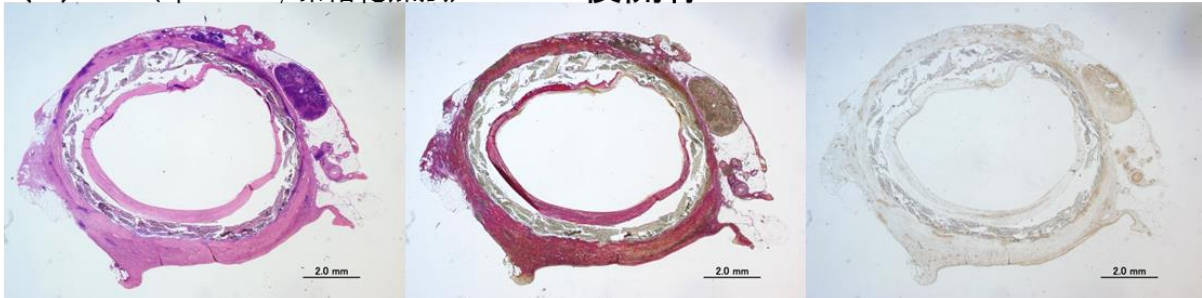


図 12. SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 顕微鏡的所見② (染色画像)

移植後経過に伴い、人工血管内腔層・外側層が形成。なお、(B) では壁変形（内部に凸）により一部で内腔層層は厚くなっていた(7-9 時方向)。

SF繊維基盤SFコーティング人工血管 内皮細胞

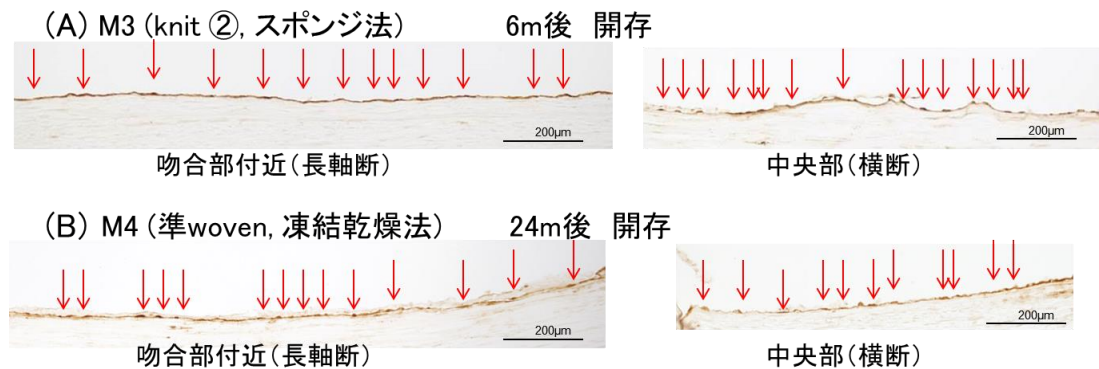
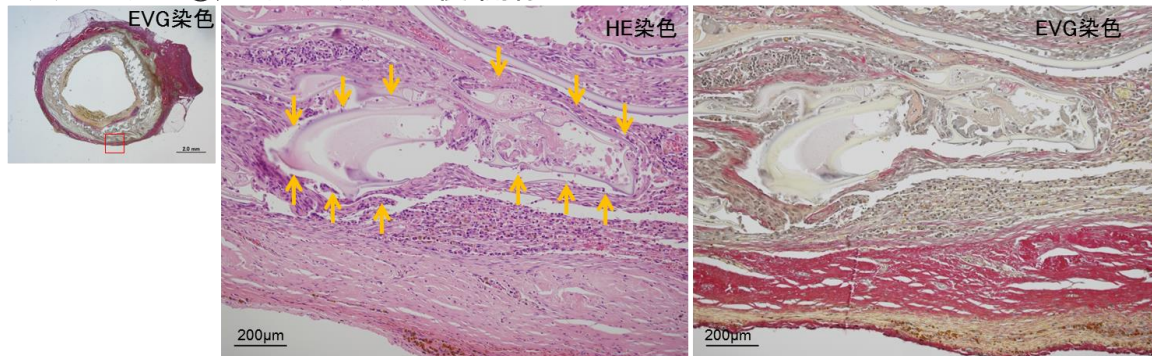


図 13. SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管：内皮細胞所見 (抗 vWF 抗体染色画像)
いずれも、扁平な一層の内皮細胞 (赤矢印) が吻合部から連続して見られ、中央部でも全周性に存在していた。

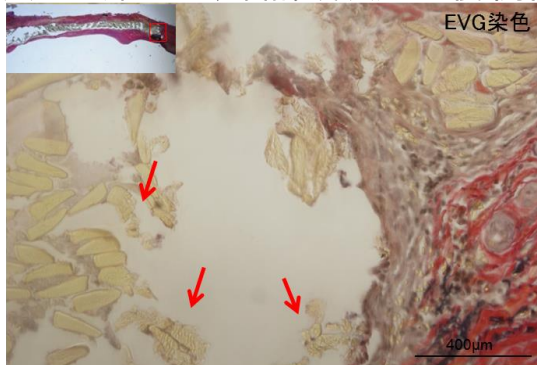
<SFコーティング剤(スポンジ状)の分解吸収>

(A) M3 (knit ②, スポンジ法) 6m後 開存



<SF線維の分解吸収>

(B) M4 (準woven, 凍結乾燥法) 24m後 開存



(C) M1 (knit ①, 凍結乾燥法) 24m後 開存

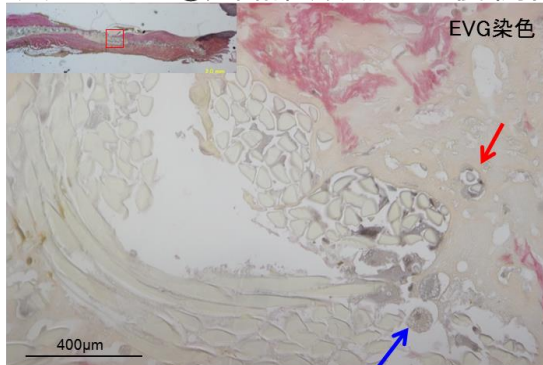


図 14. SF (コーティング剤、線維) の分解吸収所見 (染色画像)

(A) : SF スポンジ状コーティング剤が細分化され、浸潤細胞に囲まれていた (SF 線維に直接接するところでは好中球が目立ち、少し離れたところでは形質細胞・単核球の集簇)。また、膠原線維の出現も見られた。

(B) SF 人工血管線維に割が入っており、細分化されている所見が見られた(矢印)。

(C) SF 線維の断面積が他より小さくなっており (赤矢印)、また球形の泡沫状に分解されている所見が見られた (青矢印)。

市販ポリエステル繊維ゼラチンコーティング人工血管と比較して

Gelsoft Plus ®では個体差が大きく、(a)外側の生体組織の被覆が全面的で良好なものと(b)薄く部分的で不良なものがあり、内腔面は(a)では移植 8 か月後に全長 (10cm) にわたり白色調の新生内膜で覆われていたが、(b)では移植 10 か月後でも新生内膜は吻合部近くに留まっていた。(図 10)

SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管は市販ポリエステル繊維ゼラチンコーティング人工血管と比較して、次の傾向を示唆する所見が見られた；(1) 部位・個体によるばらつきは大きい、全体的には内腔層が薄い印象があった (Gelsoft Plus ® (a)との比較)、(2) 移植 2 年後も内腔層は完全には膠原線維化されておらず、フィブリン堆積層の状態に残る領域があった (Gelsoft Plus ® (a)では移植後 8 か月で完全に膠原線維化)、(3) knit でも準 woven でも繊維間への膠原線維の侵入は殆どなかった (Gelsoft Plus ® (a),(b)とも散見された)、(4) 内腔層の平滑筋層の形成面積は少なかった、(5) 移植長期経過後も人工血管外側に浸潤細胞が多数見られた、(6) 6 ヶ月以上経過した検体では、4 本とも例外なく人工血管外側面の生体組織の進展被覆は全体におよび、全周性で厚みがあった (Gelsoft Plus ® (b)では薄く、部分的だった)。(図 15, 16)

SF繊維SFコーティング

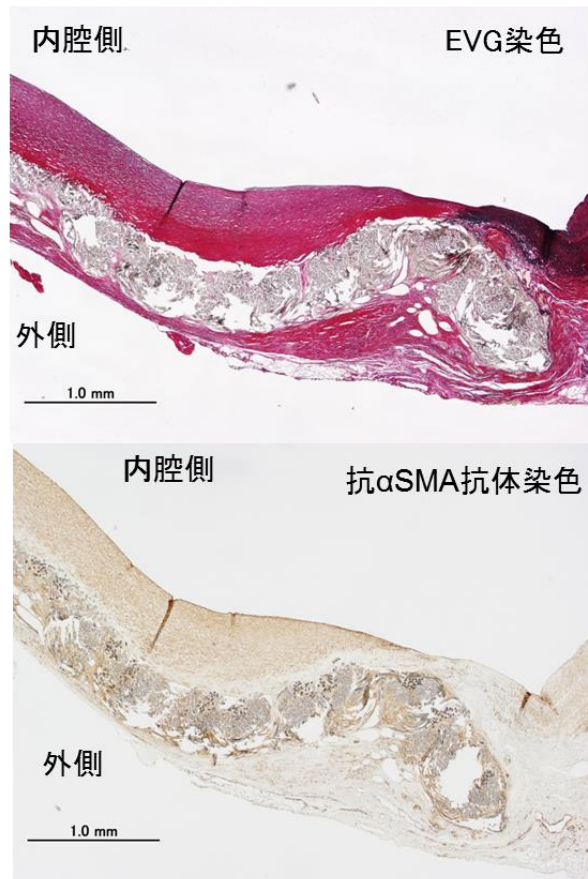
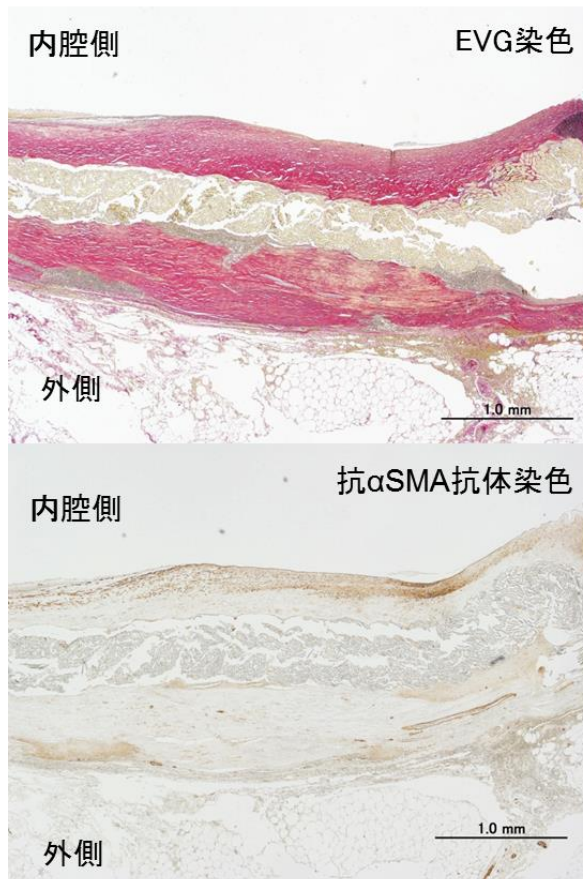
M4 24m後開存

(準woven, 凍結乾燥法)

Gelsot plus®

8m後開存

吻合部付近



中央部

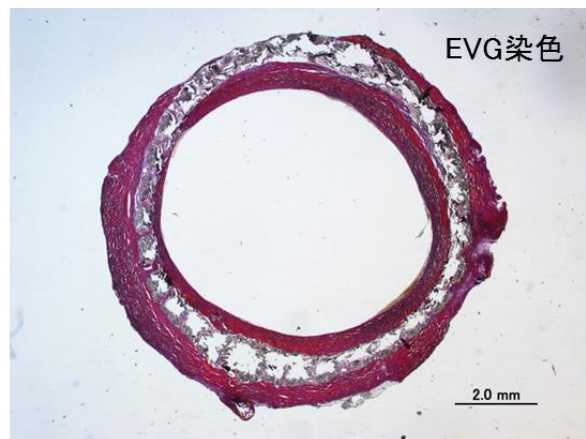


図 15. SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管と PE 繊維製ゼラチンコーティング人工血管の比較① (染色画像)

SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では、2 年後も内腔層の膠原線維化は不完全で、繊維間の膠原線維の侵入は無く、平滑筋細胞の進展も遅れる。一方で、内腔層は全体的には薄い傾向があった。

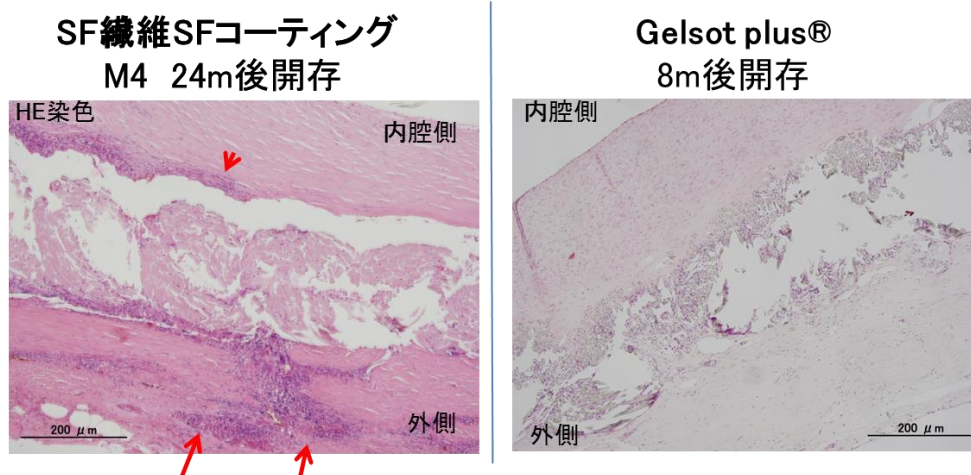


図 16. SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管と PE 繊維製ゼラチンコーティング人工血管の比較②（染色画像）

SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では、2 年後も浸潤細胞を多数認めた。

人工血管器質化評価

表 4 に人工血管の器質化状況について、カテゴリー分類を用いて記した。

表 4 人工血管の器質化評価

人工血管	採取時期	開存	吻合部	人工血管中央部			外側層厚さ
			内膜肥厚	内腔層 内皮細胞数	膠原線維化	厚さ	
SF 繊維基盤 PU 含有 SF コーティング人工血管							
M0	<1w	×	-	-	-	-	-
M0	3m	×	-	-	-	-	+
M0	4m	×	-	-	-	-	(脱落)
M0	7m	×	-	-	-	-	+
SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管							
M2	2w	×	-	-	-	-	-
M4	3m	×	++	-	-	-	+
M3	6m	○	-	++	++	++	++
M1	24m	○	-	-	-	++	(血腫形成)
M4	24m	○	-	+++	++	++	+
Gelsoft Plus® (径 6.0mm)							
(a)	8m	○	-	+++	+++	+++	+
(b)	10m	○	-	+	+	++	+

SF;フィブロイン, PU;ポリウレタン

【小括①】

異常拡張しない編み方などの改良を加えることで、イヌモデルでの腹部大動脈移植実験に許容できる SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管を作成でき、移植後の変化過程の概要が観察ならびに検討できた。SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では、移植後の内腔層の組織層形成や生体組織の進展（器質化）がみられ、それらが観察されなかったポリウレタン含有コーティング人工血管と比較すると、早期閉塞や遅発性血栓塞栓閉塞は少なかった。一方で、小型動物モデルで報告されたほどの生体組織置換はなく、移植後 2 年まで局所的な破綻・瘤化はなかったが、SF コーティング剤や SF 繊維が分解吸収されていく所見がみられた。さらには、ポリエステル繊維基盤ゼラチンコーティング人工血管に比べ、内腔層が薄く形成されるなどの違いがあることが示唆された。

実験② 絹フィブロイン利用人工血管の移植後の変化過程の特徴

【目的②】

個体差の影響を除くために同一個体に2種類の人工血管を移植して比較検討し、コーティング剤や繊維として利用したときのSFの効果を明らかにする。

【材料と方法②】

中口径人工血管作成

実験①と同様にして基盤作成およびコーティングを行い、各種人工血管を作成した。異常拡張しないように改良した編み方(knit ②)で、中口径(内径6mm)のPE繊維人工血管基盤またはSF繊維人工血管基盤を作成した。なお、準woven基盤では人工血管断端の繊維がほつれやすく繊維間隙(porosity)は少ないのに対し、knit基盤では操作性が良く、porosityが高く組織進展が生じやすいため、knit②基盤により作成した。各人工血管基盤に、SFまたはゼラチン(low endotoxin gelatin from porcine skin, MediGelatin®, Nippi Inc., Tokyo, Japan)でコーティングを行った。SFコーティングは、凍結乾燥法(非多孔質)またはスポンジ法(多孔質)で行った。ゼラチンコーティングについては、ゼラチン水溶液を浸漬させ、4℃に冷却してゲル化させ、その後10%グルタルアルデヒドに浸漬させて架橋し、その後70%エタノール溶液で架橋剤を除去して、乾燥させて行った(非多孔質)。(図1)

作製したPE繊維基盤SFコーティング人工血管について、実験①と同じ方法にて、移植前の人工血管の物理的性質を計測した。(表1) 周軸強度はスポンジ状コーティングではPE繊維基盤人工血管の方がSF繊維基盤のものより高い傾向があった。透水

率では PE 繊維基盤人工血管の方が SF 繊維基盤人工血管より低かった。その他は SF 繊維基盤と PE 繊維基盤で大きな差は無かった。

ゼラチンコーティング

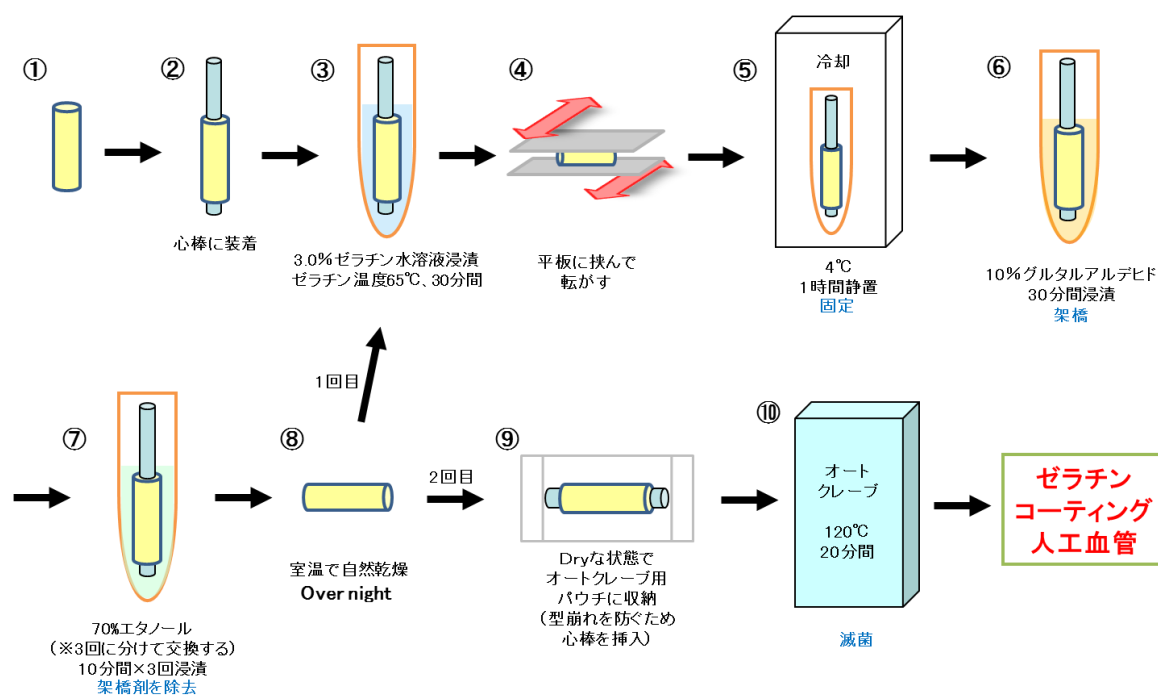


図 1. ゼラチンコーティング工程 (シェーマ)

ゼラチン水溶液に浸漬させ、ゲル化させ架橋し、乾燥させて行った。

表 1 各人工血管の物理的性質

	人工血管 (各 n=5)		周軸強度 (N)	吻合保持 強度(N)	透水性 (ml/min/cm2)
	繊維 (作成法)	コーティング			
1	SF (knit ②)	SF (凍結乾燥法)	54.3 ± 6.1	7.9 ± 1.1	48.5 ± 2.4
2	PE (knit ②)	SF (凍結乾燥法)	52.0 ± 3.6	7.0 ± 0.5	11.0 ± 2.6
3	SF (knit ②)	SF (スポンジ法)	36.7 ± 7.8	7.1 ± 0.8	93.7 ± 26.7
4	PE (knit ②)	SF (スポンジ法)	61.0 ± 7.0	7.5 ± 1.0	31.0 ± 10.7
参	Gelsoft Plus® (径 6.0mm)		112.9 ± 11.7	—	0

SF; silk fibroin (絹フィブロイン), PE; polyester (ポリエステル)

人工血管移植 (図 2)

個体差の影響を除くために、移植人工血管内に対照人工血管を含めるモデルを用いた。[33] 同じ長さの対照人工血管と接合した複合人工血管を移植した。なお、乱流等の力学的影響を回避するため、2 種類の人工血管は端端吻合により直線的に接合した。

2 種類の人工血管（各々、置換全長の半分の長さ(各 3.5~4cm)）を 6-0 ポリプロピレン糸(Prolene)で端端吻合して 1 本の複合人工血管とし、腹部大動脈（腎動脈分岐下～腸骨動脈分岐直上まで）に移植した(全長 7~8cm)。麻酔および移植手術手順は実験①と同様にして行った。術後に抗凝固剤や抗血小板剤は投与しなかった。

<腹部大動脈置換術>

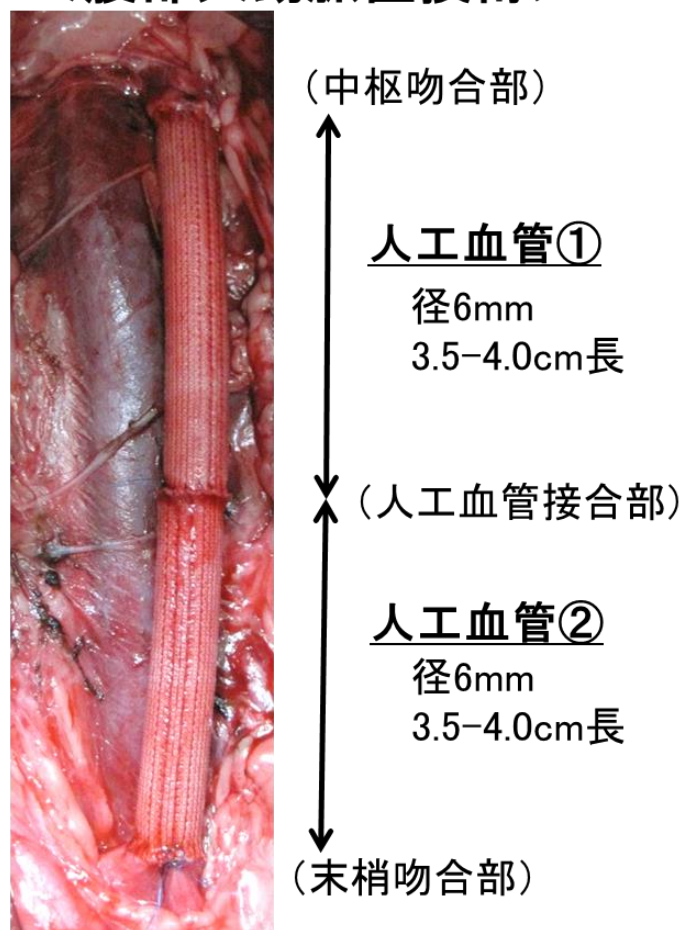


図 2. 中口径人工血管移植：腹部大動脈置換手術（術中写真）

2 種類の人工血管を吻合して 1 本の複合人工血管とし、腹部大動脈に移植した。

移植人工血管種類

SF のコーティング剤利用の評価目的で、PE 繊維基盤 SF コーティング(凍結乾燥法)+PE 繊維基盤ゼラチンコーティングの複合人工血管（複 I と表記）を 5 本移植した。3 本は中枢側が SF コーティング人工血管とし、2 本は中枢側がゼラチンコーティング人工血管とした。また SF の繊維利用の評価目的で、SF 繊維基盤ゼラチンコーティング+PE 繊維基盤ゼラチンコーティングの複合人工血管（複 II と表記）を 4 本移植した。さらに SF 繊維基盤人工血管 SF コーティング（スポンジ法）+PE 繊維基盤 SF コーティング(スポンジ法)の複合人工血管（複 III と表記）を 2 本移植した。

人工血管採取

実験①と同様に、移植後エコーにて人工血管の開存状況および形状や径を定期的に観察した（1~3 日後, 1 週間後, 2 週間後, 3 週間後, 4 週間後, 以降 1 ヶ月毎）。そして 1 か月、6 ヶ月後に検体を採取した。ただし、人工血管が閉塞した場合は、閉塞が判明した時点で検体を採取した。検体採取は実験①と同様に行った。

病理組織学検査

肉眼的に人工血管と周囲組織の器質化を評価し、内腔を観察した。2 種の各人工血管中央部は横断方向に切開し、各吻合部（中枢, 末梢, 人工血管-人工血管）はホルマリン固定後に長軸方向に切開した。パラフィンで包埋後薄切して、各染色（HE 染色、EVG 染色、抗 SMA 抗体染色、vWF 抗体染色）を行い、光学顕微鏡にて観察した。

人工血管器質化評価

各染色画像から、吻合部における内膜肥厚の有無、人工血管中央部における内皮細胞数、内腔層の膠原繊維化、内腔層の厚さ、外側層の厚さについて、実験①において使用したカテゴリー分類を用いて評価した。

- ・ 内膜肥厚の有無（吻合部）

-; 無し, +; あり（70%未満の狭窄）、++; あり（70%以上の高度狭窄または閉塞）

- ・ 内皮細胞数（人工血管中央部）

抗 vWF 抗体染色または HE 染色で確認される内皮細胞数（個/全周）を以下に分類

-: 0, +: $1 \leq < 50$, ++: $50 \leq < 100$, +++: $100 \leq$ （単位: 個/全周）

- ・ 内腔層の膠原線維化（人工血管中央部）

EVG 染色にて確認される内腔層における膠原線維の面積の割合(%)を以下に分類

-: 0, +: $0 < < 50$, ++: $50 \leq < 100$, +++: 100 （単位: %）

- ・ 内腔層の厚さ（人工血管中央部）

画像解析ソフト(Image J)を用いて、内腔層面積/人工血管内腔周径 (μm) を算出し、以下に分類

-: $0 \leq < 100$, +: $100 \leq < 200$, ++: $200 \leq < 400$, +++: $400 \leq$ （単位: μm ）

- ・ 外側層の厚さ（人工血管中央部）

画像解析ソフト(Image J)を用いて、外側層面積/人工血管外側周径 (μm) を算出し、以下に分類。なお、外側層は EVG 染色にて膠原繊維を含んだ領域とした(血腫や周囲の脂肪組織は外側層に含めない)。

-: 0, +: $0 < < 1$, ++: $1 \leq < 2$, +++: $2 \leq$ （単位: mm）

【結果②】

人工血管開存状況および移植成績（表 2）

いずれも移植後の人工血管の異常拡張はなかった。PE 繊維基盤 SF コーティング(凍結乾燥)+PE 繊維基盤ゼラチンコーティングの複合人工血管（複 I）では、2 本で異常拡張は無いものの漏血により人工血管周囲に血腫を形成し、1 週間後、3 週間後に血栓閉塞した。SF 繊維基盤ゼラチンコーティング+PE 繊維基盤ゼラチンコーティングの複合人工血管（複 II）4 本は 1 週間後(2 本)、2 週間後、2 か月後に血栓閉塞した。1 週間後に閉塞した 1 本および 2 週間後に閉塞した 1 本では、異常拡張は無いものの血腫形成があった。SF 繊維基盤人工血管 SF コーティング（スポンジ）+PE 繊維基盤 SF コーティング(スポンジ)の複合人工血管（複 III）2 本は観察期間内には閉塞しなかった。全例で合併症によるイヌの術中死・術後死は無く、人工血管感染や創感染の所見は認めなかった。

表 2 移植複合人工血管および移植結果

人工血管	繊維 (knit ②)	コーティング (方法)	採取時期および開閉			移植 総数
			< 1m	1-6m	6m	
複 I	{ PE PE }	{ SF (凍結乾燥法) ゼラチン }	1w x1 ^{*1} , 3w x1 ^{*1,*3}	1m x2 ^{*4}	6m x1	5
複 II	{ SF PE }	{ ゼラチン ゼラチン }	1w x2 ^{*2} , 2w x1 ^{*1}	2m x1	—	4
複 III	{ SF PE }	{ SF (スポンジ法) SF (スポンジ法) }	—	1m x1	6m x1	2

SF; silk fibroin (フィブロイン), PE; polyester (ポリエステル), w; week(s), m; month(s), 赤字; 開存, 青字; 閉塞

*1; 異常拡張は無かったが、漏血により人工血管周囲に血腫を形成し閉塞した。

*2; 1 本は、異常拡張は無かったが、漏血により人工血管周囲に血腫を形成し閉塞した。

*3; SF コーティンググラフトが末梢側

*4; 2 本のうち 1 本は SF コーティンググラフトが末梢側

病理組織学検査

複合人工血管 I (PE 繊維基盤 SF コーティング(凍結乾燥法) / ゼラチンコーティング)

肉眼的所見 (図 3 A, B, C, 図 4)

移植 1 か月の検体では、SF コーティング人工血管の方が、ゼラチンコーティング人工血管より人工血管外側の組織が肥厚しており、周囲組織との癒着は高度であった。

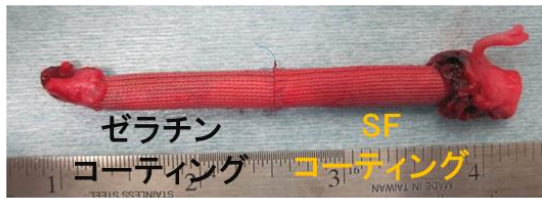
(図 3 B) 一部の検体では、人工血管近傍に腫大リンパ節を認めた。1 か月の検体の方が 6 か月検体より、周囲組織との炎症・癒着が高度であった。6 か月の検体でも SF コーティング人工血管では、内腔組織・外側組織は人工血管繊維に固着しておらず、人工血管繊維層から容易に剥がれる状態であった。

内腔面については、個体による差異や部位による差異はあったが、全体的な傾向として以下の所見が見られ、中枢側・末梢側の順序に関係なかった。(図 4)

1 週間検体、3 週間検体では、SF コーティング人工血管の方が、ゼラチンコーティング人工血管よりフィブリン堆積層が平均的に薄い傾向がみられた。1 か月検体では、SF コーティング人工血管では柔らかい内腔形成層であったが、ゼラチンコーティング人工血管では固い厚みのある内腔層がみられた。1 つの検体ではゼラチンコーティング部で形成された固さのある内腔層が、人工血管接合部を超えて氷柱状に浮き上がって SF コーティング側へせり出していた(SF コーティング人工血管の内腔面には接着していなかった)。(図 4 B) 6 か月検体では、SF コーティング人工血管の方がゼラチンコーティング人工血管より全体的には薄い傾向があり、人工血管繊維がより透見される状態であった。また、2 種類の人工血管接合部を境界にして、内腔層の厚さが変わる所見が見られた。(図 4 C)

<複I:PE線維基盤>

(A) 複I 1w後 閉塞



(B) 複I 1m後 開存



(C) 複I 6m後 開存



<複II:ゼラチンコーティング>

(D) 複II 2m後 閉塞



<複III:SFスポンジ状コーティング>

(E) 複III 1m後 開存



(F) 複III 6m後 開存



(* 右: 中枢, 左: 末梢、* SF; フィブロイン, PE; ポリエステル)

図 3. 複合人工血管外観 (検体写真)

複 I において、1 か月後の検体では SF コーティング部の方が人工血管外側層は厚かった。6 か月後は外側層の厚さの差は目立たなかった。

複 II において、SF 繊維部の方が人工血管外側層は厚かった。

複 III においては、SF 繊維部と PE 繊維部で大きな差は認めなかった。

複I 人工血管 (PE繊維基盤)

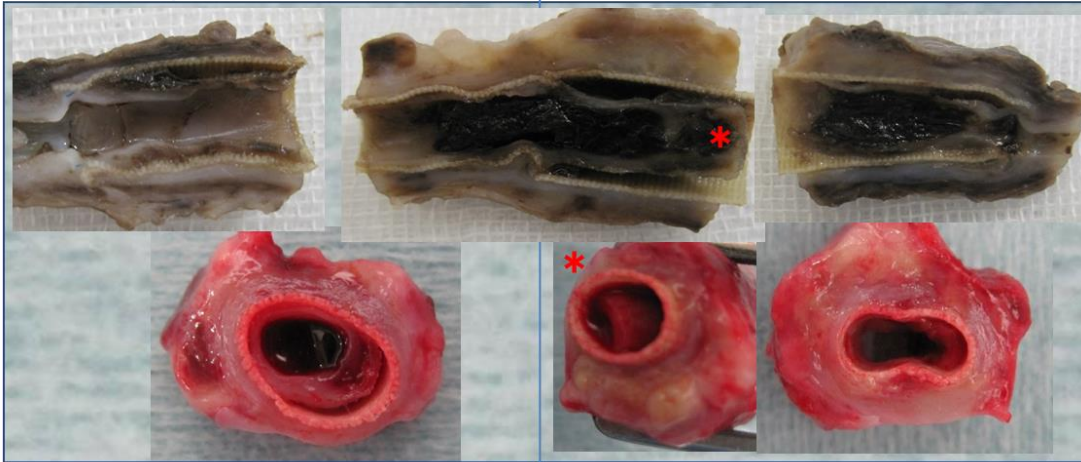
<ゼラチンコーティング>

<SFコーティング>

(A) 1w後 閉塞



(B) 1m後 開存



(C) 6m後 開存

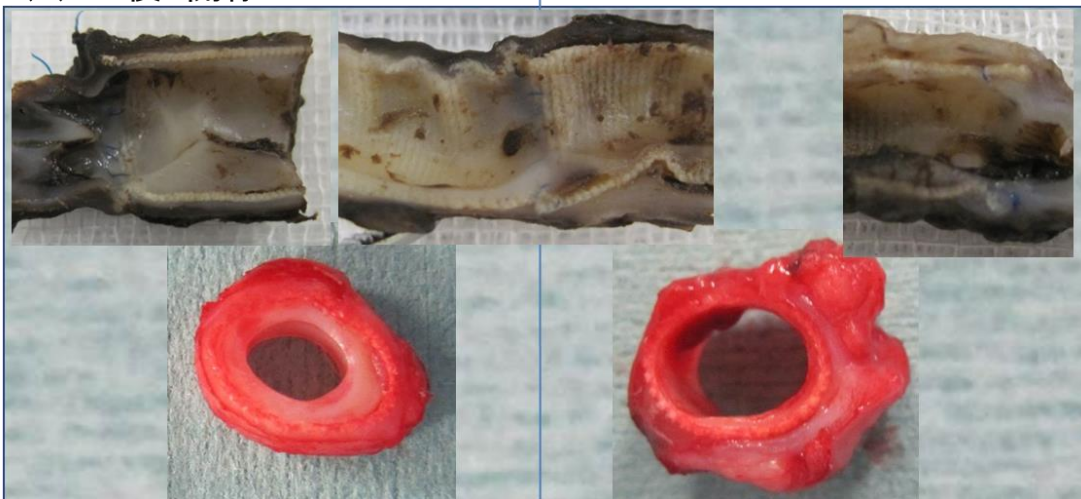


図 4. PE 繊維基盤 SF コーティング/ゼラチンコーティング人工血管 内腔 (検体写真)

(A) : 血栓(右)を愛護的に除いた内腔写真。ゼラチンコーティング部の方がフィブリン堆積層は全体的に厚かった。

(B) : ゼラチンコーティング部で形成された固い内腔層が、接合部を超えて氷柱状にSF コーティング側へせり出していた(SF コーティング部内腔面には接着せず)(*)。なお、内腔層の血栓は検体採取時に形成されたもの (採取前にはエコー上無かった)。

(C) : 2 種類の人工血管接合部を境界にして、内腔層の厚さが変わっていた。

顕微鏡的所見 (図 5-9)

各吻合部において内腔層を観察すると、SF コーティング人工血管の方がゼラチンコーティング人工血管より吻合部を超えての膠原線維の進展距離は短かった。(図 5 B, C)

各人工血管中央部において、SF コーティング人工血管はゼラチンコーティング人工血管と比較したところ、個体差や部位差はあるが全体的な傾向として以下の所見が見られた：(1) 人工血管内腔層は薄かった (図 6, 7)、(2) 内腔層の膠原線維化は少なく、人工血管繊維間の膠原線維侵入は殆どなかった (図 6, 7)、(3) 平滑筋層形成も内腔層には目立たず、外側で目立った (図 8)、(4) しかし、最内層にはフィブリン層の状態でも内皮細胞が見られた (図 9)、(5) 外側層は膠原線維の進展は豊富で 1 か月後検体ではより厚くなっていたが、6 ヶ月検体では薄くなっていた (図 6)、(6) 人工血管外側に多数の浸潤細胞の集簇が散見された (図 7)。

具体的には、1 週間、3 週間、1 か月、6 ヶ月のどの時点においても、人工血管内腔層は SF コーティング人工血管でゼラチンコーティング人工血管より薄く形成されていた。(図 6) 吻合部近くより吻合部から 2cm ほど離れた人工血管中央部の方が、内腔層が薄い特徴が明確に出ていた。(図 5, 図 6) 人工血管内腔層は主にフィブリン堆積層から成り、多数の好中球やリンパ球などの細胞浸潤がみられた。1 ヶ月と 6 ヶ月で比較すると、経過とともに吻合部からの膠原線維の侵入進行が見られ内腔層の膠原線維化が進むが、6 ヶ月時点でゼラチンコーティング人工血管ではほぼ完全に膠原線維で置換されているのに対し、まだ一部がフィブリン層の状態で留まっており膠原線維による置換は不完全であった。(図 6, 7) 6 ヶ月時点では、ゼラチンコーティング人

工血管では弾性線維の出現もみられたが、SF コーティング人工血管では見られなかった。(図 7) ゼラチンコーティング人工血管では人工血管繊維間に膠原線維が侵入しているのに対し、SF コーティングでは乏しかった。(図 7) なお、SF コーティング人工血管においては、人工血管内腔側からの人工血管繊維間への侵入は少ないながら散見されたのに対し、人工血管外側からの人工血管繊維間への侵入は殆どなかった。(図 7) 人工血管の外側で接するようにコーティングの吸収に関わる無数の細胞浸潤層・領域の形成が見られたが、ゼラチンコーティング人工血管では見られなかった。(図 7) 平滑筋細胞層形成は、ゼラチンコーティング人工血管では内腔層に見られるのに対し、内腔層には目立たず外側で目立っていた。(図 8) しかしながら、内皮細胞は、SF コーティング人工血管では内腔がフィブリン堆積形成層の状態でも多数観察され、移植 1 か月の時点で人工血管中央部でも散見され 6 か月の時点では全周性に人工血管最内層を覆っていた。(図 9) 一方で、人工血管外側層は 1 か月時点ではゼラチンコーティング人工血管に対し著明に厚くなった膠原線維層が見られたが、6 ヶ月時点では層は薄くなりゼラチンコーティング人工血管と変わらない程度の薄さになった。(図 6)

複I 人工血管 (PE繊維基盤)

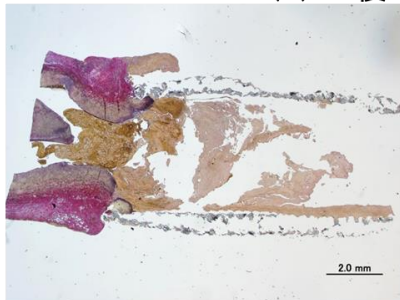
吻合部 (* 右: 中枢, 左: 末梢, EVG染色)

<ゼラチンコーティング>

<SFコーティング>

(A) 1w後

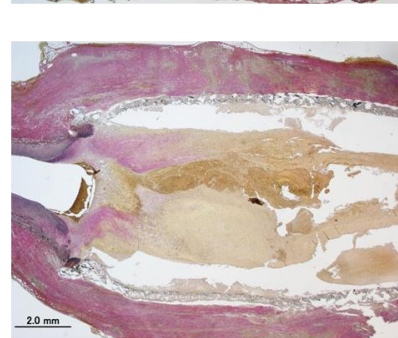
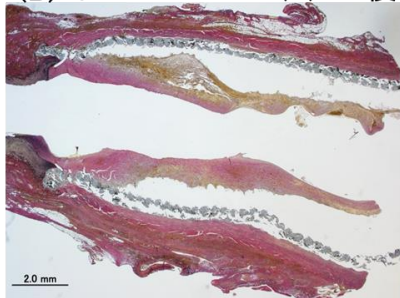
閉塞



(B)-1

(B) 1m後

開存



(B)-2

(C) 6m後

開存

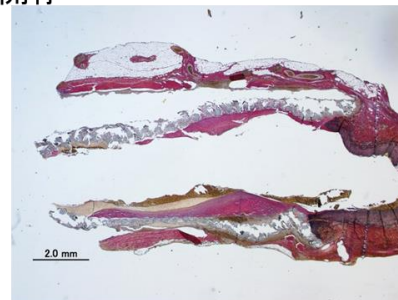


図 5. PE 繊維基盤 SF コーティング/ゼラチンコーティング人工血管 (染色画像)

(B) , (C) : 内腔層は、SF コーティングの方が吻合部を超えての膠原線維の進展距離は短かった。なお、固定後に内腔形成層は短縮するのに対し人工血管繊維は短縮せず、膠原線維の人工血管繊維間への侵入が無く固着していないため、内腔形成層は人工血管から剥離された状態になっていた (以下の図も同じ)。また、内腔にある血栓は、検体採取時に形成されたもので、採取前には無かった。

複I 人工血管 (PE繊維基盤)
中央部 (EVG染色)
<ゼラチンコーティング> **<SFコーティング>**

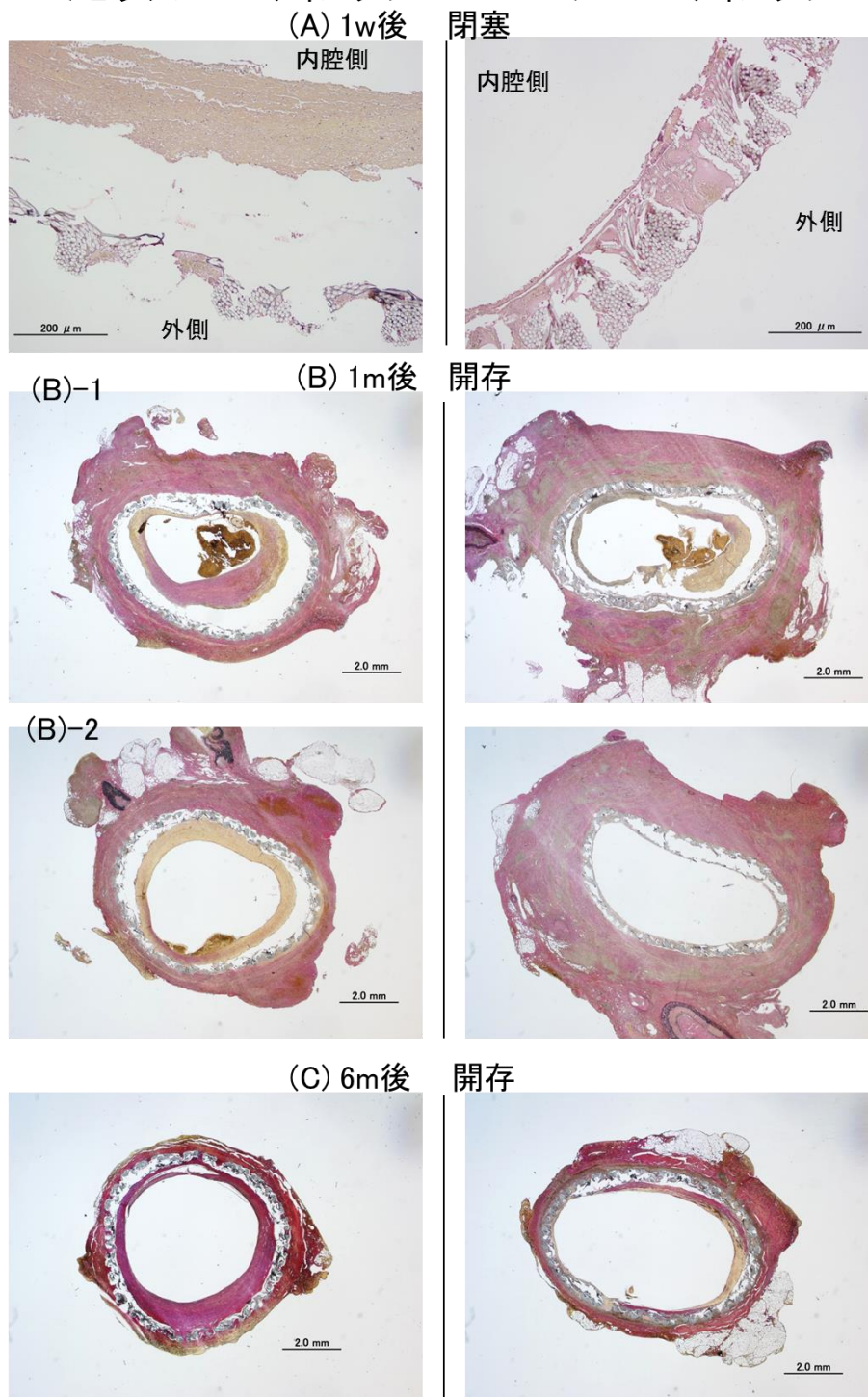
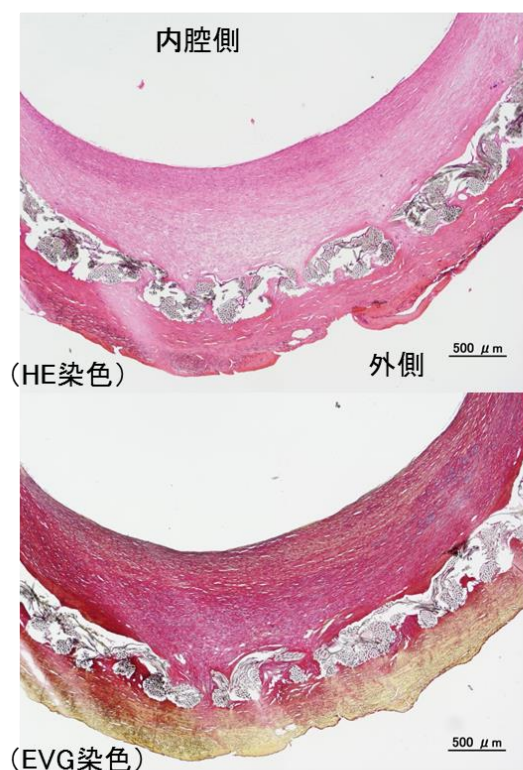


図 6. PE 繊維基盤 SF コーティング/ゼラチンコーティング人工血管 (染色画像)

どの時期も SF コーティングの方が内腔層は薄い傾向が見られた。(B)では急激な外側の組織進展に伴う圧排の影響があると考えられ、人工血管が扁平に変形していた。(変形に伴う血流力学上の影響で部分的なフィブリン堆積増加の可能性があったが、それでも SF コーティングでは内腔層は薄い傾向があった。)

複I 人工血管 (PE繊維基盤)
6m後 開存 中央部

<ゼラチンコーティング>
<SFコーティング>



(強拡大)

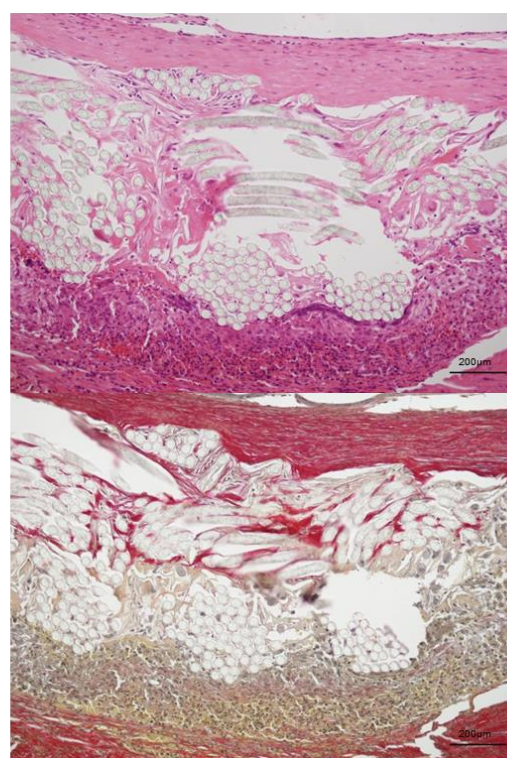
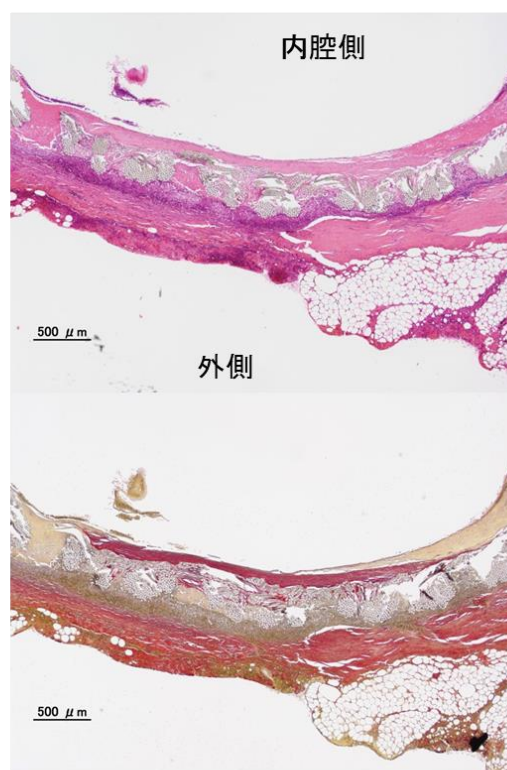
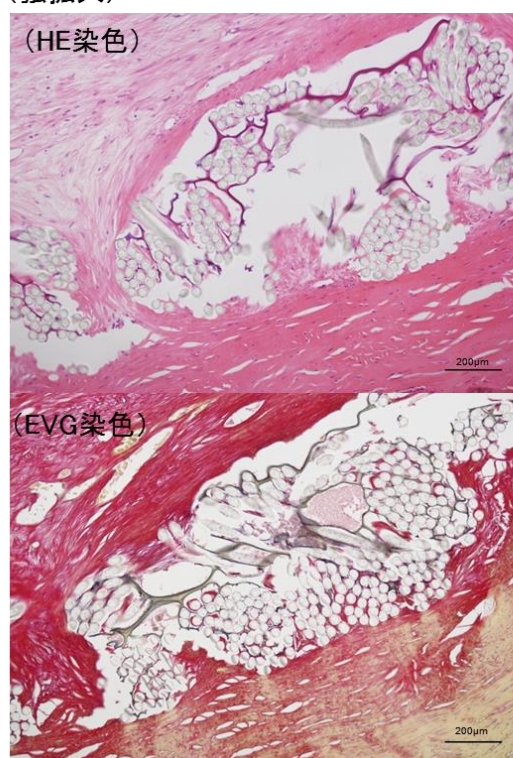


図 7-1. PE 繊維基盤 SF コーティング/ゼラチンコーティング人工血管 (染色画像)

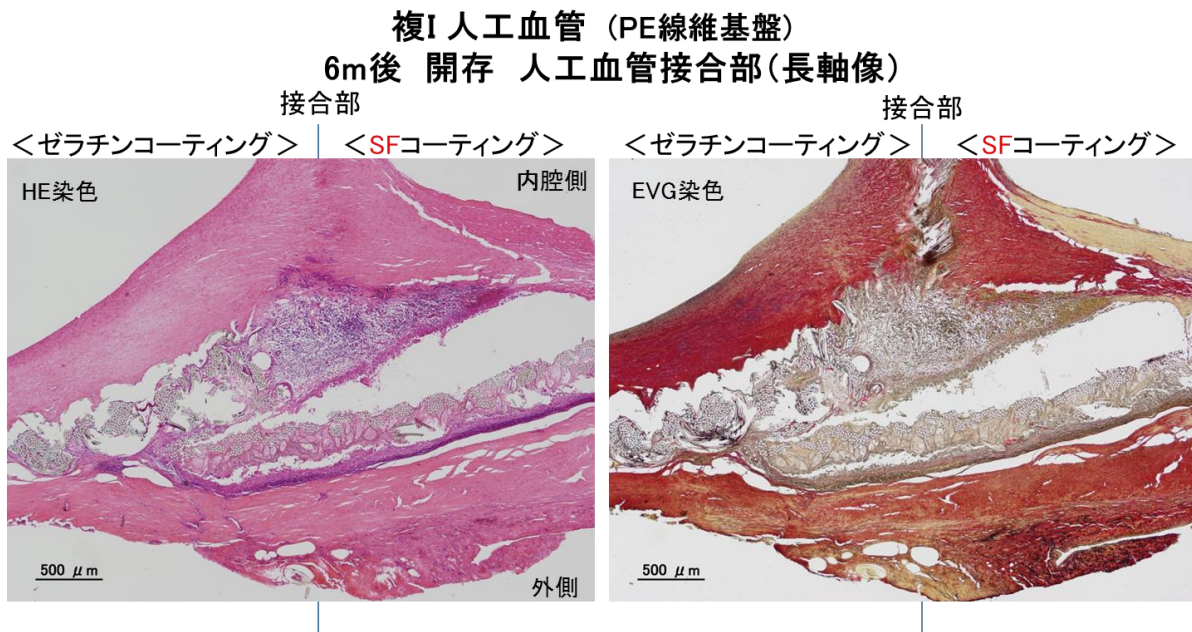


図 7-2. PE 繊維基盤 SF コーティング/ゼラチンコーティング人工血管 (染色画像)

(図 7-1,7-2) SF コーティング部では、内腔層の膠原線維化は完成されておらず、フィブリン堆積形成層の状態に留まる領域がみられた。また、人工血管繊維間の膠原線維の侵入は乏しく、特に人工血管外側面からの侵入は多数の浸潤細胞に阻まれ殆ど無かった。ゼラチンコーティング部では最内層寄りに弾性線維 (EVG 染色で黒色) も一部で見られたが、SF コーティング部では無かった。接合部を境界にして、所見の違いが明らかであった。SF コーティングでは、人工血管外側面に浸潤細胞が集簇しており、外側層は厚かった。

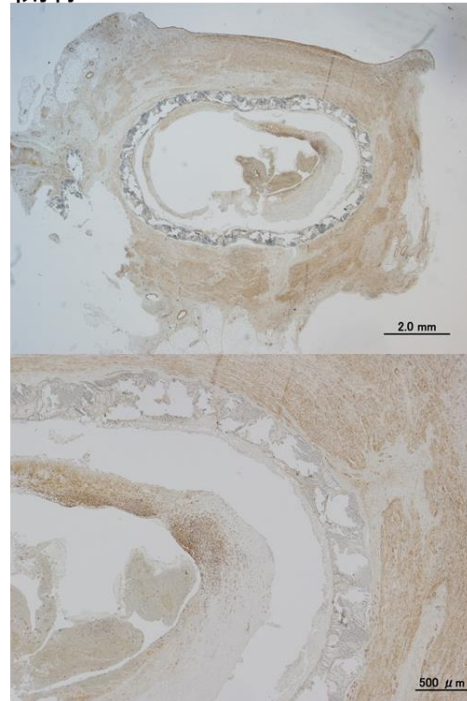
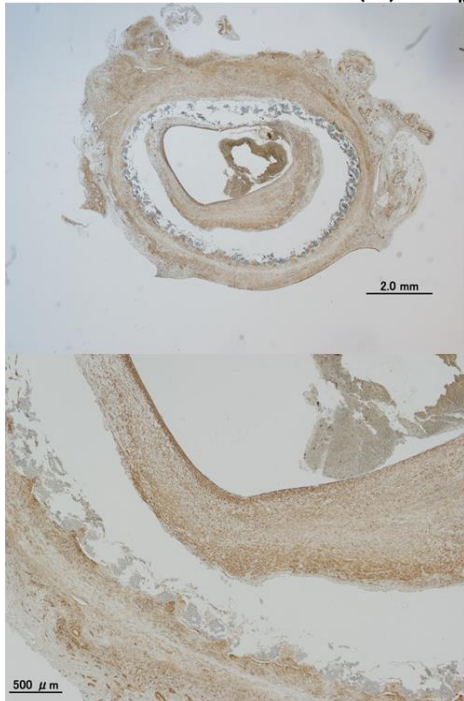
複I 人工血管 (PE繊維基盤)

中央部

<ゼラチンコーティング>

<SFコーティング>

(A) 1m後 開存



(B) 6m後 開存

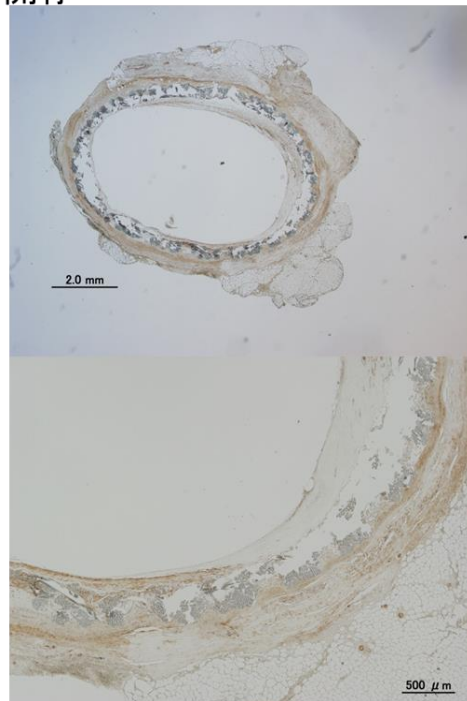
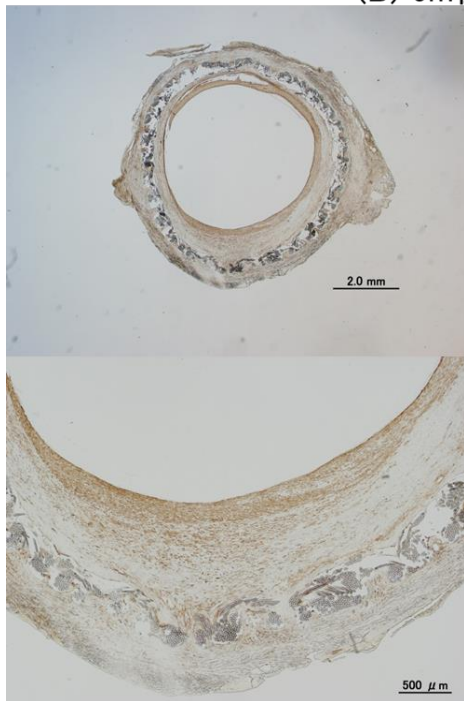


図 8. PE 繊維基盤 SF コーティング/ゼラチンコーティング人工血管：平滑筋層
(抗 α SMA 抗体染色画像)

1、6 か月後とも、SF コーティング部では内腔層の平滑筋層形成は目立たなかった。

複I 人工血管 (PE繊維基盤) 中央部

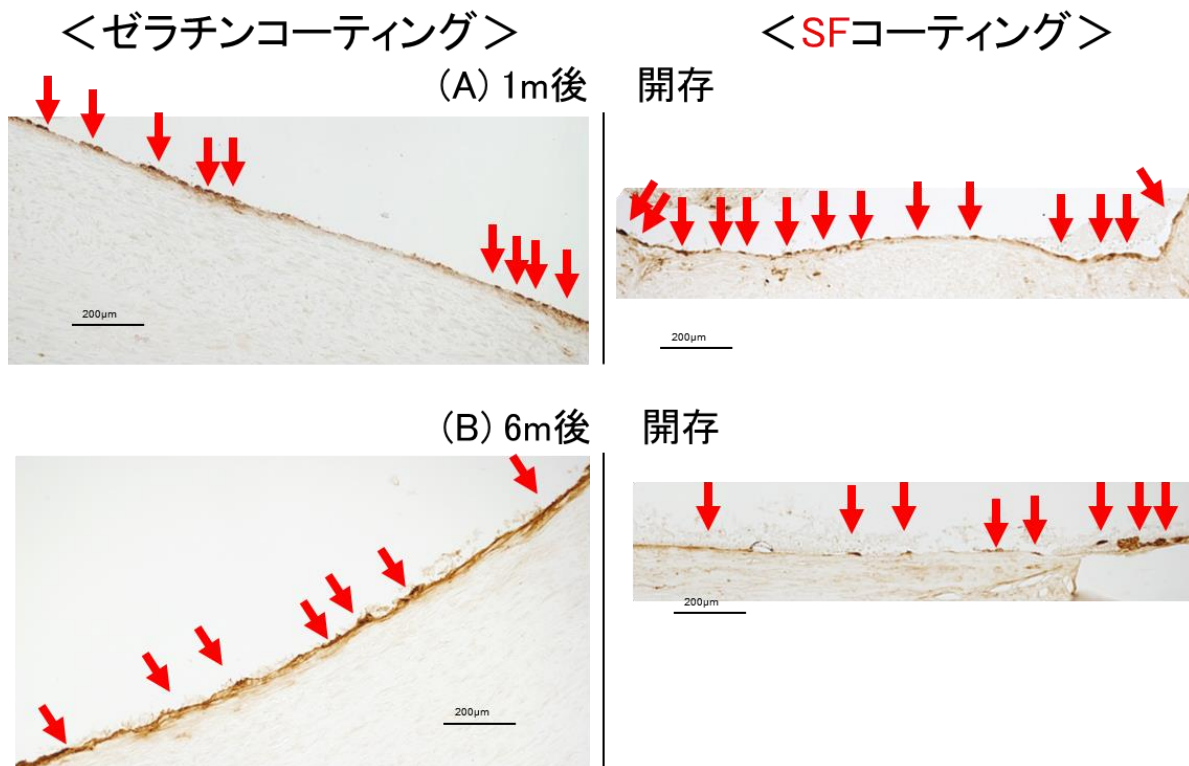


図 9-1. PE 繊維基盤 SF コーティング/ゼラチンコーティング人工血管：内皮細胞
(抗 vWF 抗体染色画像)

SF コーティングの方が 1 か月後では内皮細胞数は多い傾向があった (6 ヶ月後では有意な差は無かった)。6 か月後には全周性に見られた。

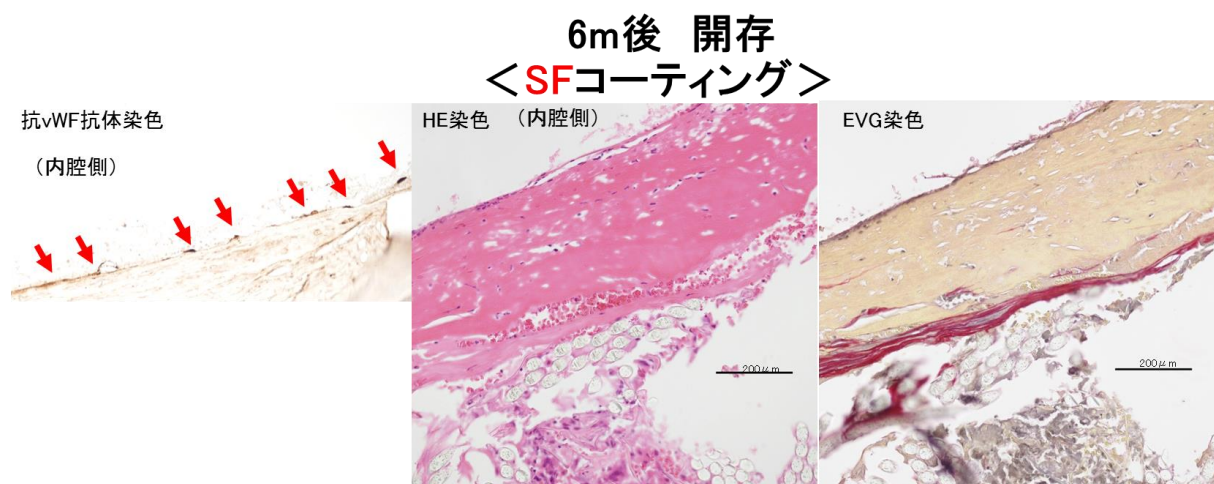


図 9-2. PE 繊維基盤 SF コーティング人工血管：内皮細胞 (染色画像)

SF コーティングでは、内腔層がフィブリン堆積形成層の状態でも、多数の内皮細胞の存在が確認された。

人工血管器質化評価（複合人工血管Ⅰ）

表 3 に人工血管の器質化状況について、カテゴリー分類を用いて記した。

表 3 人工血管の器質化評価

複Ⅰ PE 繊維基盤 SF コーティング(凍結乾燥法)/ゼラチンコーティング人工血管							
採取 時期	開 存	コーティ ング	吻合部 内膜肥厚	人工血管中央部			外側層 厚さ
				内腔層 内皮細胞	膠原線維化	厚さ	
1w	×	{ SF ゼラチン	-	-	-	-	-
			-	-	-	+	-
3w	×	{ ゼラチン SF	-	-	-	++	-
			-	-	-	+	-
1m	○	{ SF ゼラチン	-	++	+	++	+++
			-	+	++	+++	+
1m	○	{ ゼラチン SF	-	-	+	++	+
			-	+	-	-	++
6m	○	{ SF ゼラチン	-	+++	+	+	+
			-	+++	+++	+++	+

PE, ポリエステル; SF, フィブロイン

各複合人工血管について、上段が中枢側、下段が末梢側。

複合人工血管複Ⅱ <SF 繊維基盤 /PE 繊維基盤 ゼラチンコーティング>

長期間開存した検体は得られなかったが、SF 繊維基盤人工血管は PE 繊維基盤人工血管と比較して、以下の所見が見られた。(1) 人工血管内腔層は薄かった、(2) 内腔層の膠原線維化は少なく、人工血管繊維間の膠原線維侵入は殆どなかった、(3) 外側層は膠原線維の進展は豊富で 2 か月後検体ではより厚くなっていた、(4) 人工血管外側に多数の浸潤細胞の集簇が散見された。(図 10) これらの所見は、SF をコーティング剤として利用した場合(複Ⅰ)と共通しており、今回の検体群からは繊維利用とコーティング利用で明らかな違いは無かった。

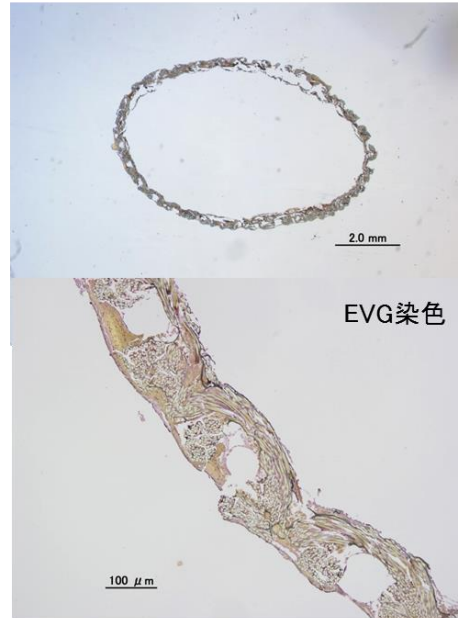
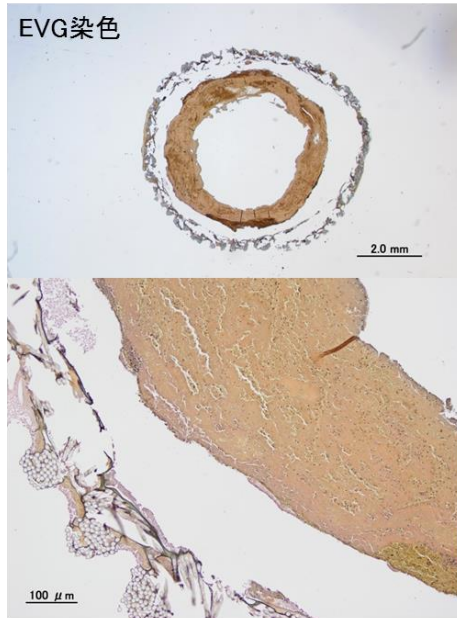
複Ⅱ 人工血管 ゼラチンコーティング
中央部

<ポリエステル繊維基盤>

<SF繊維基盤>

(A) 1w後

閉塞



(B) 2m後

閉塞

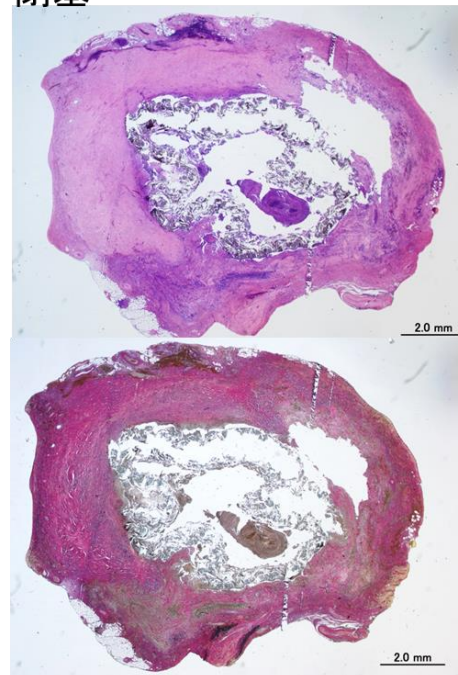
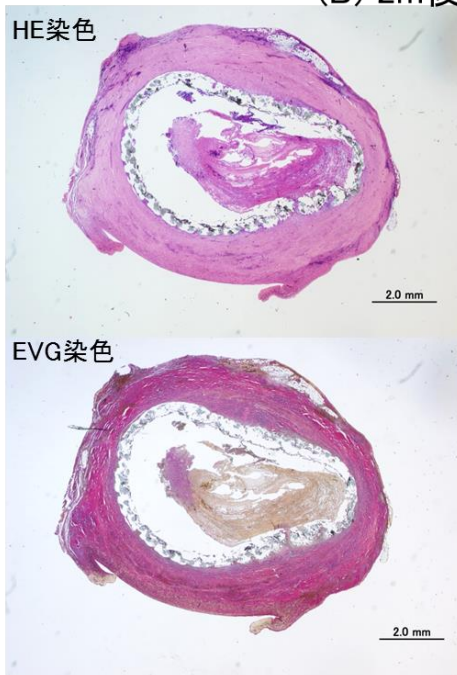


図 10. SF 繊維基盤 /PE 繊維基盤 ゼラチンコーティング人工血管 (染色画像)

SF 繊維基盤の方が内腔の堆積層・形成層は薄い傾向があった。

(A), (B)では、内腔層が人工血管から剥離していた。(B)では、人工血管壁が変形していた (閉塞原因の可能性あり)。

人工血管器質化評価（複合人工血管Ⅱ）

表4に人工血管の器質化状況について、カテゴリー分類を用いて記した。

表4 人工血管の器質化評価

複Ⅱ SF 繊維基盤/PE 繊維基盤 ゼラチンコーティング人工血管							
採取 時期	開 存	繊維	吻合部	人工血管中央部			外側層 厚さ
			内膜肥厚	内皮細胞	内腔層 膠原線維化	厚さ	
1w	×	{ SF PE	-	-	-	-	-
			-	-	-	+++	-
1w	×	{ SF PE	-	-	-	-	-
			-	-	-	++	-
2w	×	{ SF PE	-	-	-	+	-
			-	-	-	+++	-
2m	×	{ SF PE	-	-	-	-	+++
			-	-	+	+++	++

SF, フィブロイン; PE, ポリエステル

複合人工血管複Ⅲ<SF 繊維基盤/ PE 繊維基盤 SF コーティング(スポンジ法)>

SF 繊維基盤人工血管 SF コーティング (スポンジ法)でも PE 繊維基盤 SF コーティング(スポンジ法)でも、複Ⅰで観察された(1)～(6) の所見がみられた。(図 11) SF 繊維基盤人工血管、PE 繊維基盤人工血管ともに、内腔層は全長にわたり薄かった。吻合部近くでは移植 1 ヶ月後でも 6 ヶ月後でも PE 繊維基盤人工血管の方が SF 繊維基盤人工血管より内腔層はさらに薄い傾向があった。(図 11) 一方で、移植 6 ヶ月後で吻合部から離れた人工血管接合部付近を見ると、PE 繊維基盤部から SF 繊維基盤部に進んでいくにつれて内腔層はより薄くなるような変化が見られた。(図 12) 内皮細胞については、1 ヶ月後では SF 繊維基盤人工血管の方が PE 繊維基盤人工血管より多かったが、6 ヶ月後では大きな差はなかった。しかし、人工血管接合部付近で観察すると、

内皮細胞は SF 繊維基盤人工血管の方が PE 繊維基盤人工血管より密に見られた。

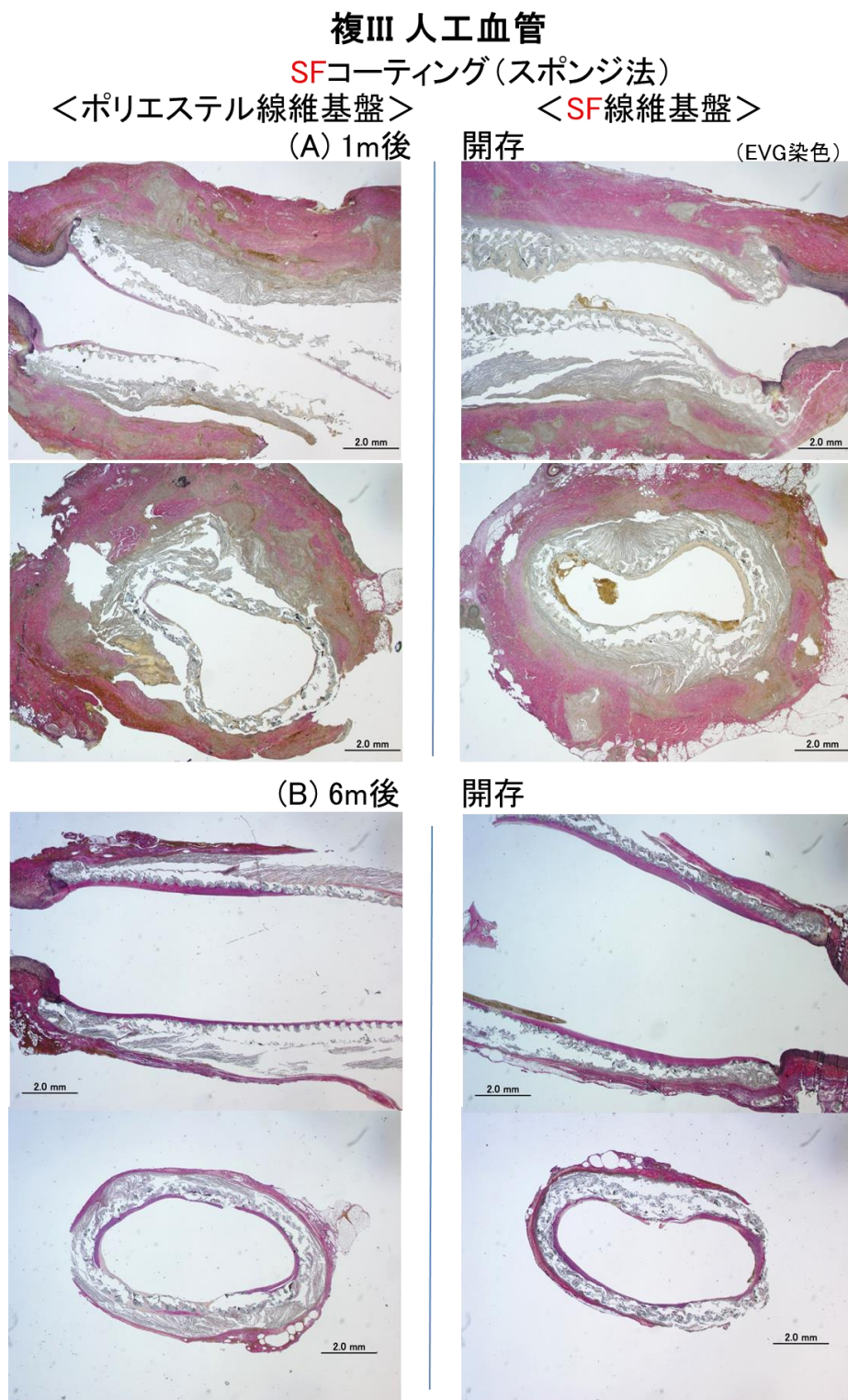


図 11. SF 繊維基盤/ PE 繊維基盤 SF コーティング(スポンジ法) 人工血管 (染色画像)
(各図の右側が中枢側、左側が末梢側)

SF 繊維基盤人工血管と PE 繊維基盤人工血管で大きな違いは見られず、ともに内腔層は全長にわたり薄かった。(なお、SF 繊維基盤の方により高度な壁変形があった。)

複Ⅲ 人工血管

SFコーティング(スポンジ法)

6m後 開存

人工血管接合部(長軸断)

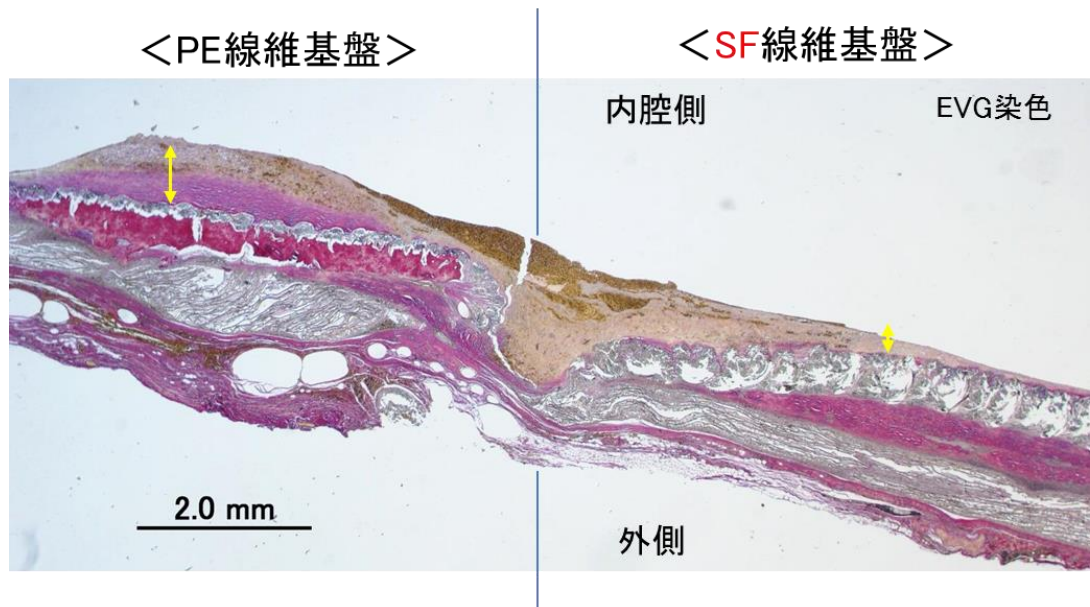


図 12. SF 繊維基盤/ PE 繊維基盤 SF コーティング(スポンジ法) 人工血管 (染色画像)

移植 6 ヶ月時点で 2 本の人工血管の接合部付近では、PE 繊維基盤部から SF 繊維基盤部に進んでいくにつれて内腔層はより薄くなるような変化が見られた。

なお、PE 繊維基盤 SF コーティング人工血管において、凍結乾燥法による SF コーティング(複 I)とスポンジ法による SF コーティング(複 III)では、全体的な器質化の進み方には明らかな差はなかった。しかし、外側層の形状による厚さの差があり、移植 1 ヶ月後ではスポンジ法の方が凍結乾燥法より人工血管外側形成層は厚かったが、6 ヶ月後ではスポンジ法でも薄くなっていた。また、全体的に 1 ヶ月時点でも 6 ヶ月時点でもスポンジ法の方が凍結乾燥法より内腔層は全長にわたって薄い可能性が示唆された (図 13)

＜PE繊維基盤＞

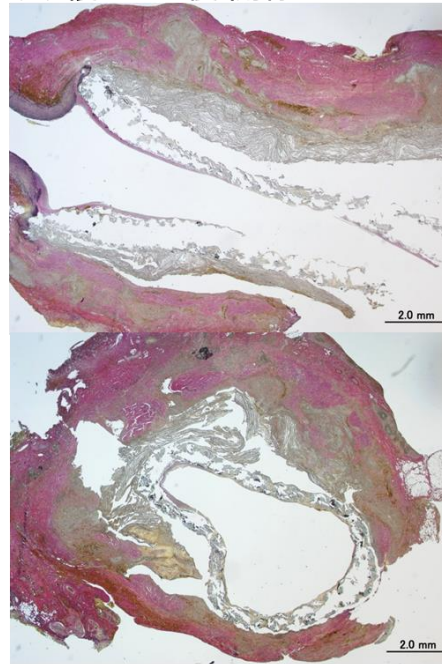
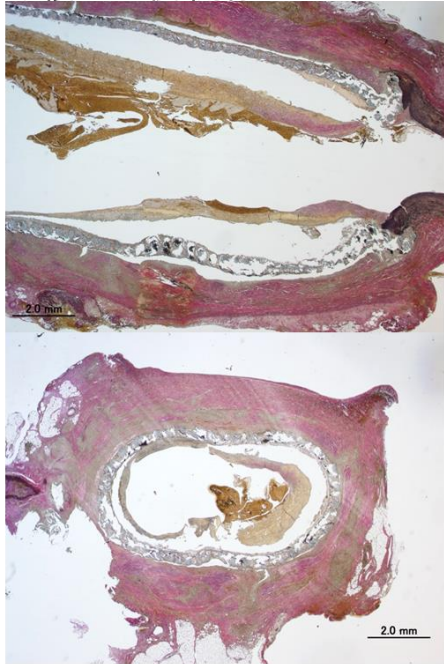
吻合部、中央部

SFコーティング(凍結乾燥法)

SFコーティング(スポンジ法)

(A) 複Ⅰ 1m後 開存

(B) 複Ⅲ 1m後 開存



(C) 複Ⅰ 6m後 開存

(D) 複Ⅲ 6m後 開存

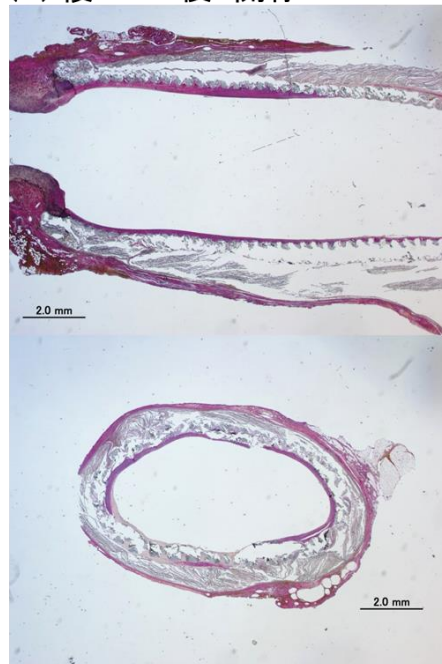
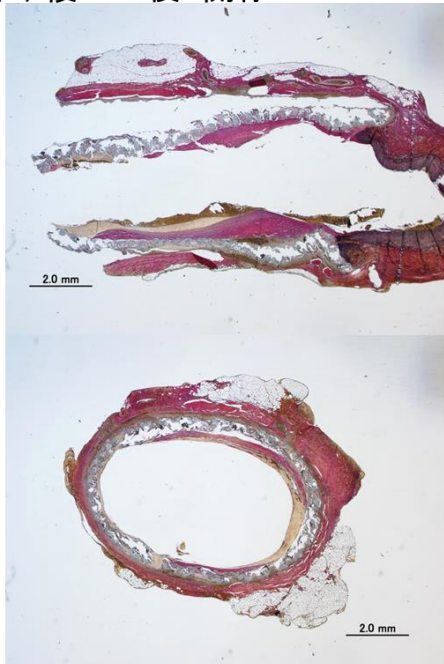


図 13. 複合血管における PE 繊維基盤 SF コーティングの凍結乾燥法とスポンジ法の比較（染色画像）

内腔層は 1 か月、6 ヶ月後でスポンジ法の方が凍結乾燥法より薄い傾向があった。
（複Ⅰの 1 か月後検体の中央部は内腔層形成良好のものと比較）外側層は移植 1 ヶ月後ではスポンジ法の方が凍結乾燥法より厚かったが、6 か月後ではスポンジ法でも薄かった。

人工血管器質化評価（複合人工血管 III）

表 5 に人工血管の器質化状況について、カテゴリー分類を用いて記した。

表 5 人工血管の器質化評価

複 III SF 繊維基盤/PE 繊維基盤 SF コーティング(スポンジ法)人工血管							
採取 時期	開 存	繊維	吻合部	人工血管中央部			外側層 厚さ
			内膜肥厚	内皮細胞	内腔層 膠原線維化	厚さ	
1m	○	{SF PE}	-	++	-	+	+++
			-	+	+	+	+++
6m	○	{SF PE}	-	+++	+++	+	+
			-	+++	++	+	+

SF, フィブロイン; PE, ポリエステル

* 人工血管接合部付近ではSF繊維基盤人工血管の方がPE繊維基盤人工血管より薄い

【小括②】

実験②の条件下において、SF をコーティング剤として利用した人工血管は、ポリエステル繊維ゼラチンコーティング人工血管と比較して、内腔層は薄く形成されて器質化が進む傾向がみられた。内腔層の膠原線維化は遅れ、人工血管繊維間の膠原線維侵入は少ないが、内皮細胞は移植 1 ヶ月後の早期から広く生着し始めていた。平滑筋層形成は内腔層には目立たず、外側で目立っていた。外側層は移植早期には炎症性に厚くなるが、経過に伴い薄くなっていった。以上の SF 利用人工血管の器質化の特徴は、SF を繊維として利用した人工血管でも同様にみられた。さらに、吻合部から離れた部位では、SF を繊維かつコーティング剤として利用したときは、SF をコーティング剤としてのみ利用した場合より器質化の特性が増強される可能性も示唆された。一方で、同じ PE 繊維基盤 SF コーティングにおいても、多孔質か非多孔質かなど、SF コーティングの形状や量などの条件によって差異が生じる可能性がみられた。

実験③ 絹フィブロインを利用した小口径人工血管の現状評価

【目的③】

中口径において SF 利用人工血管では特有の器質化の進み方をすることが分かった。これを踏まえて、小口径の SF 利用人工血管の移植後の変化を観察して現段階での評価を行い、課題を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法③】

小口径人工血管作成

実験①②で用いた方法に基づき基盤作成およびコーティングを行い、各種小口径人工血管を作成した。SF 繊維又は PE 繊維を用いて内径 3.5mm になるように knit ②又は準 woven にて人工血管基盤を作成した。作成した SF 繊維人工血管基盤からはセリンを完全に除去した。小口径でも knit ①では移植後の異常拡張（移植前の 1.5 倍以上の拡張）が生じたため、knit ②で人工血管基盤を作成した。

作成した人工血管基盤に SF またはゼラチンのいずれかでコーティングを行った。SF コーティングは凍結乾燥法またはスポンジ法を用いた。スポンジ状コーティングについては内径 3.5mm に対し外径 6mm になるように設定した。

各種人工血管について、表 1 のように S1～S9 まで作成した。

表 1 各種小口径人工血管

	繊維(作成法)	コーティング		繊維(作成法)	コーティング
S1	SF (knit ①)	SF (凍結乾燥法)	S6	PE (knit ①)	SF (凍結乾燥法)
S2	SF (knit ①)	SF (スポンジ法)	S7	PE (knit ②)	SF (凍結乾燥法)
S3	SF (knit ②)	SF (凍結乾燥法)	S8	PE (knit ②)	SF (スポンジ法)
S4	SF (knit ②)	SF (スポンジ法)	S9	PE (knit ②)	ゼラチン
S5	SF (準 woven)	SF (凍結乾燥法)			

人工血管移植 (図 1)

内径 3.5mm の小口径人工血管をビーグル成犬オスの総頸動脈に移植した(5cm 長)。

中口径人工血管移植時と同様、麻酔の導入および維持を行った。頸部正中切開にて両側総頸動脈を剥離露出させた。ヘパリン 150 IU/kg を静注後に動脈を遮断し、7-0 ポリプロピレン糸(7-0 Prolene; Ethicon, Somerville, NJ)による連続縫合にて端端吻合を行い、5cm 長にわたり人工血管で総頸動脈を置換した。ビーグル犬 1 頭につき左右 1 本ずつ合計 2 本移植した。手術終了後、Orbifloxacin (DS Pharma Animal Health Co., Ltd., Osaka, Japan) 50mg を 1 回皮下注射した。術後に抗凝固剤や抗血小板剤は投与しなかった。

<総頸動脈置換術>

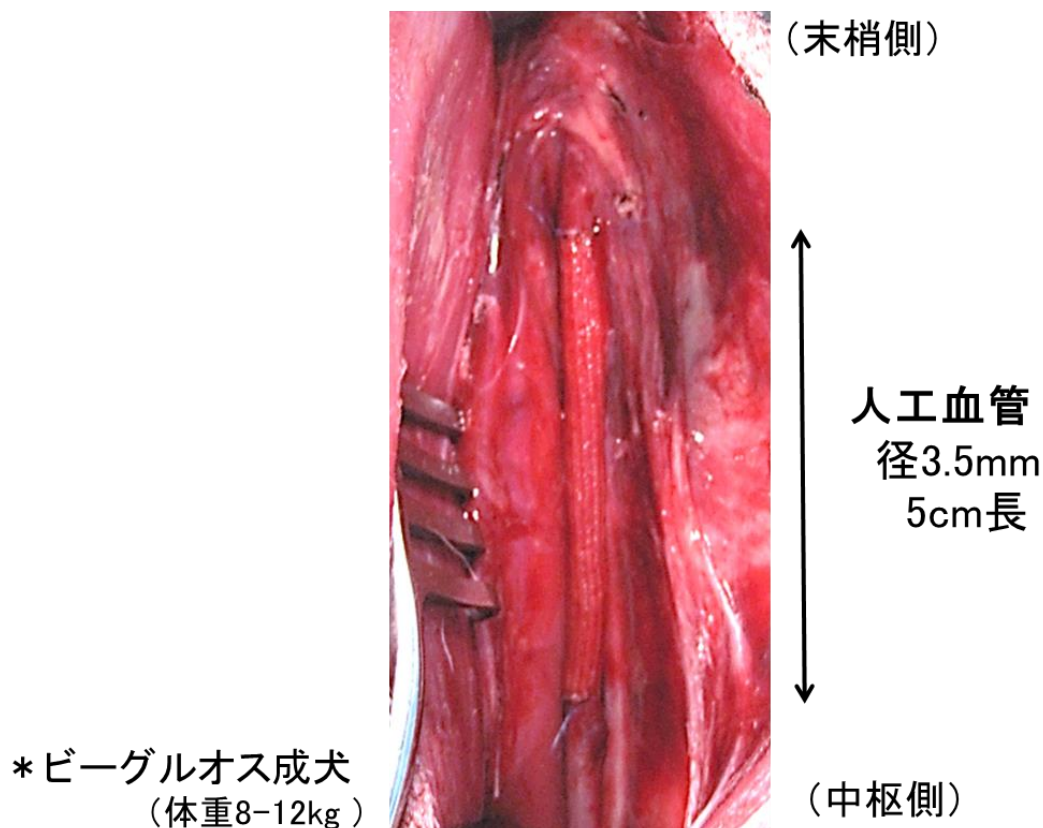


図 1. 小口径人工血管移植：総頸動脈置換手術（術中写真）
筋肉を避けて展開し、左総頸動脈に人工血管を移植した。

移植人工血管種類

SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管として計 18 本、PE 繊維基盤 SF コーティング人工血管として計 7 本、PE 繊維基盤ゼラチンコーティング人工血管 2 本を移植した。(表 2 参照) 参考として市販 ePTFE 人工血管(径 4mm)(GORE-TEX® Vascular Grafts, W. L. Gore & Associates, Inc. and Japan Gore-Tex Inc., Tokyo, Japan) 1 本移植した。

人工血管採取

実験①と同様に、エコーにて定期的に観察した(1~3 日後, 1 週間後, 2 週間後, 3 週間後, 4 週間後, 以降 2 週間毎)。人工血管が閉塞した場合は、閉塞が判明した時点で検体を採取した。人工血管が開存している場合は、6 ヶ月で検体を採取した。ただし、移植後異常拡張により漏血を生じた検体は、3 週、3 ヶ月、7 か月後に開存した状態で各々採取した。

病理組織学検査

採取検体について、実験①と同様にして病理組織学的検査および観察を行った。

人工血管器質化評価

各染色画像から、吻合部における内膜肥厚の有無、人工血管中央部における内皮細胞数、内腔層の膠原繊維化、内腔層の厚さ、外側層の厚さについて、以下のようにカテゴリー分類を用いて評価した。

- ・ 内膜肥厚の有無 (吻合部)

-; 無し, +; あり (70%未満の狭窄)、++; あり (70%以上の高度狭窄または閉塞)

- ・ 内皮細胞数 (人工血管中央部)

抗 vWF 抗体染色または HE 染色で確認される内皮細胞数 (個/全周) を以下に分類

-: 0, +: $1 \leq < 25$, ++: $25 \leq < 50$, +++: $50 \leq$ (単位: 個/全周)

- ・ 内腔層の膠原線維化 (人工血管中央部)

EVG 染色にて確認される内腔層における膠原線維の面積の割合(%)を以下に分類

-: 0, +: $0 < < 50$, ++: $50 \leq < 100$, +++: 100 (単位: %)

- ・ 内腔層の厚さ (人工血管中央部)

画像解析ソフト(Image J)を用いて、内腔層面積/人工血管内腔周径 (μm) を算出し、以下に分類

-: $0 \leq < 100$, +: $100 \leq < 200$, ++: $200 \leq < 400$, +++: $400 \leq$ (単位: μm)

- ・ 外側層の厚さ (人工血管中央部)

画像解析ソフト(Image J)を用いて、外側層面積/人工血管外側周径 (μm) を算出し、以下に分類。なお、外側層は EVG 染色にて膠原繊維を含んだ領域とした(血腫や周囲の脂肪組織は外側層に含めない)。

-: 0, +: $0 < < 1$, ++: $1 \leq < 2$, +++: $2 \leq$ (単位: mm)

【結果③】

人工血管開存状況 (表 2)

移植後に異常拡張(移植前の径の 1.5 倍(約 5.5mm)以上の拡張)を生じた人工血管(S1, S2)では、観察期間で閉塞しなかった。PE 繊維基盤人工血管(S6-S9)ではコーティングに関わらず 6 本全例が 1 週間未満に閉塞したが(異常拡張人工血管を除く)、SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では早期閉塞(1 か月未満の閉塞)しないものもあった(S4; 3/5 本, S5; 5/6 本)。(なお、SF 繊維基盤(knit ②)人工血管において、スポンジ法

による SF コーティング(S4)では早期閉塞しないものがあった(S4; 3/5 本)のに対し、凍結乾燥法による SF コーティング(S3)では 4 本全例が早期閉塞した。) しかし、早期閉塞を免れても、SF 繊維基盤(knit ②)SF コーティング人工血管(S4)では 1.5, 5.5, 6.5 か月後に、SF 繊維基盤(準 woven)SF コーティング人工血管(S5)では 2~4 か月後に吻合部内膜肥厚の影響で閉塞した。ePTFE 人工血管は 3 か月後に塞栓閉塞した。

表 2 移植人工血管および移植結果

人工血管	繊維 (作成法)	コーティング (方法)	採取時期および開閉			移植 総数
			< 1m	1-6m	6m <	
S1	SF (knit ①)	SF (凍結乾燥法)	3w x1 ^{*1}	3m x1		2 ^{*2}
S2	SF (knit ①)	SF (スポンジ法)			7m x1	1 ^{*2}
S3	SF (knit ②)	SF (凍結乾燥法)	< 1w x2, 3w x2			4
S4	SF (knit ②)	SF (スポンジ法)	< 1w x1, 2w x1	1.5m x1, 5.5m x1	6.5m x1	5
S5	SF (準 woven)	SF (凍結乾燥法)	< 1w x1	2~4m x5		6
S6	PE (knit ①)	SF (凍結乾燥法)	< 1w x1, 3w x1 ^{*1}			2
S7	PE (knit ②)	SF (凍結乾燥法)	< 1w x4			4
S8	PE (knit ②)	SF (スポンジ法)	< 1w x1			1
S9	PE (knit ②)	Gelatin	< 1w x2			2
参	ePTFE	(径 4mm, 5cm 長)		3m x1		1

SF; フィブロイン, PE; ポリエステル, w; week(s), m; month(s),

赤字; 開存, 青字; 血栓・塞栓による閉塞, 緑字; 内膜肥厚が主要因となった閉塞

*1; 人工血管拡張から活動性出血が続いたため開存状態で採取。

*2; 移植前の 1.5 倍(約 5.5mm)以上の拡張あり。

合併症（表 2）

小口径人工血管計 28 本を移植し、全例で合併症によるイヌの術中死・術後死はなかった。knit ①基盤人工血管(S1, S2, S6)では、編み方に由来する人工血管の異常拡張がみられた。1 例では左右に knit ①の SF 繊維基盤人工血管(S1)および PE 繊維基盤人工血管(S6)を移植後に、2 本とも異常拡張から活動性出血が続いたため、移植 3 週間後に検体を採取した。その他の人工血管では異常拡張は無く、観察期間内で局所破綻や瘤化はなかった。

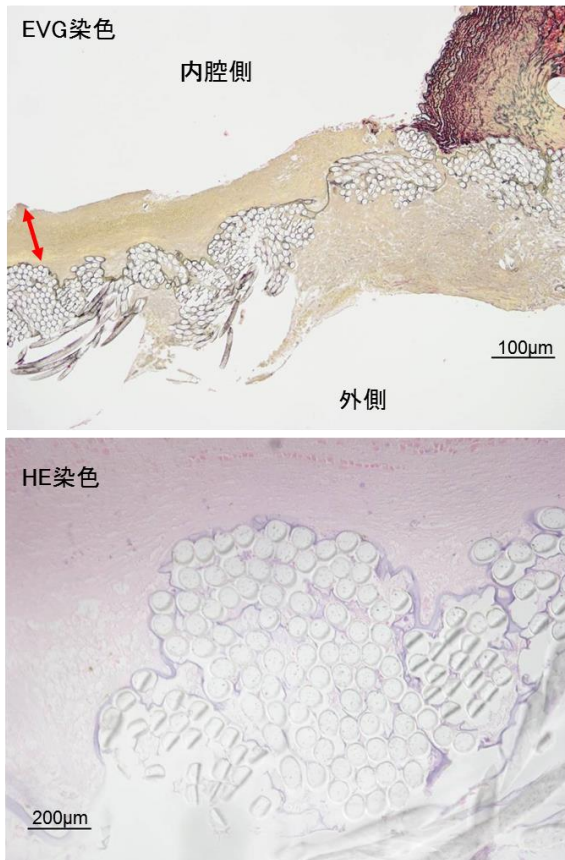
病理組織学検査

早期閉塞人工血管（開存期間 1 ヶ月未満）(S1~S9)

種類によらず、1 か月未満の早期閉塞人工血管では、外側面は吻合部以外に組織被覆はなかった。内腔面についても、血栓を認める他は、人工血管表面及び繊維間にフィブリン堆積、赤血球・血小板沈着および白血球細胞浸潤が見られるのみだった。ただし、中口径で観察されたように、PE 繊維基盤人工血管において SF コーティング(S7)ではゼラチンコーティング(S9)に比べ、内腔面のフィブリン堆積層は薄く、外側の膠原線維層は進展しており、また人工血管繊維間の浸潤白血球は有意に多かった。(図 2)

PE繊維基盤(knit ②)

<ゼラチンコーティング> S9 3d 閉塞



<SFコーティング> S7 3d 閉塞

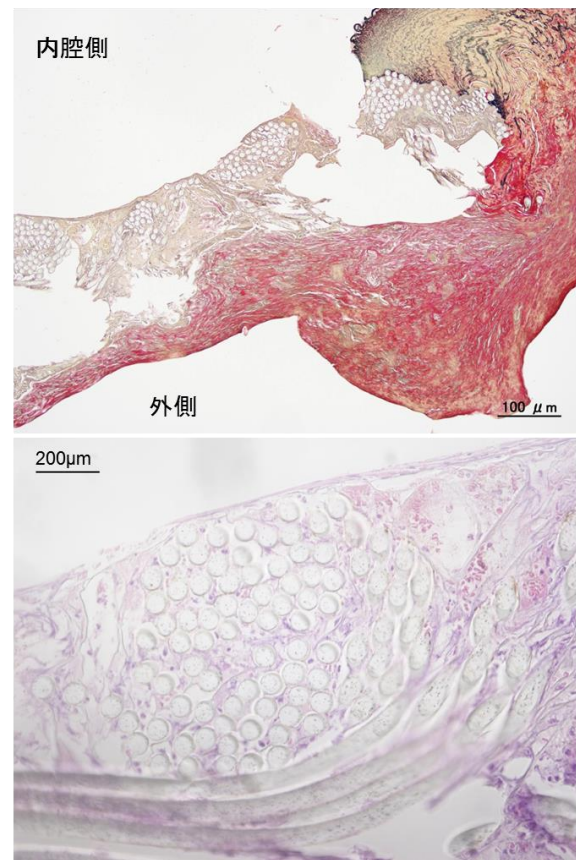


図 2. PE 繊維基盤人工血管における SF コーティングとゼラチンコーティングの比較 (染色画像) (吻合部長軸断像。同一個体の左・右検体)

SF コーティングではゼラチンコーティングに比べ、内腔面のフィブリン堆積層が薄く、外側の膠原線維層は進展していた。繊維間の白血球浸潤は有意に多かった。

早期閉塞を免れた SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管(S1, S2, S4, S5) (図 3 -11)

PE 繊維基盤人工血管で 1 か月以上開存した検体は得られず、移植後中長期的における PE 繊維基盤人工血管との比較はできなかった。

中口径 SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管と共通する所見

人工血管外側では約 1 ヶ月後には膠原線維豊富な生体組織により人工血管全体を被覆する外側層が形成されていた。(図 3, 4, 8) しかし、被覆周囲組織と人工血管は 6

ヶ月後以上経過しても固着はしていなかった。また、人工血管内腔面では、開存期間に伴って、フィブリン堆積層が形成されて両側の吻合部から膠原線維層形成が進展していた。(図 5) 人工血管中央部でみると開存期間に伴い約 3 か月後には肉眼的に観察されるフィブリン層が形成され、6 ヶ月後では膠原線維が出現していたが膠原線維化は不完全であった。平滑筋層の形成も内腔層では目立たなかった。(図 3, 6, 9) 一方で、内膜の形成および進展に伴い内皮細胞も見られるようになり、内膜肥厚が高度でない検体では人工血管中央部で 3 か月後には多くの内皮細胞が確認され、さらに 6 ヶ月後では全周性に確認されるようになっていた。なお、ePTFE 人工血管については、3 か月後には人工血管中央部では内腔層の形成は見られなかった。(図 9) また、移植後より多数の浸潤細胞が見られ、SF コーティング剤や SF 繊維が吸収される所見が見られた。

中口径 SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管と異なる所見

肉眼的に白色調に見える新生内膜領域の進展について、肉眼的所見で 6 ヶ月以上経過した検体では中口径人工血管(7-10cm 長)では中央部まで新性内膜領域が進展していたのに対し、小口径人工血管(5cm 長)では吻合部から 0.5~2cm 程度に留まり中央部までの進展は見られなかった。(図 3, 4, 8) 顕微鏡的所見でも肉眼的所見に一致した膠原線維の進展状況で、中口径人工血管よりさらに膠原線維化が遅れ、フィブリン堆積層の領域が広がった。(図 3, 5, 6, 9)

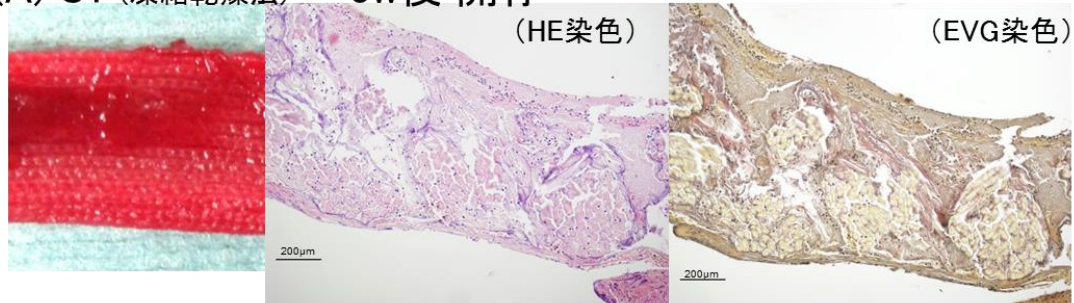
内膜肥厚について、吻合部および吻合部近くで内膜肥厚所見が見られるものがあった。(図 4, 5, 8) 開存期間が短いものほど、肥厚は高度で肥厚部は吻合部に近い傾向があった。また、内膜肥厚が高度の検体では、内膜肥厚が軽度の検体に比べ、吻合部

からの内皮細胞の進展は少なく、中央部で確認される内皮細胞も少なかった。(図 7)

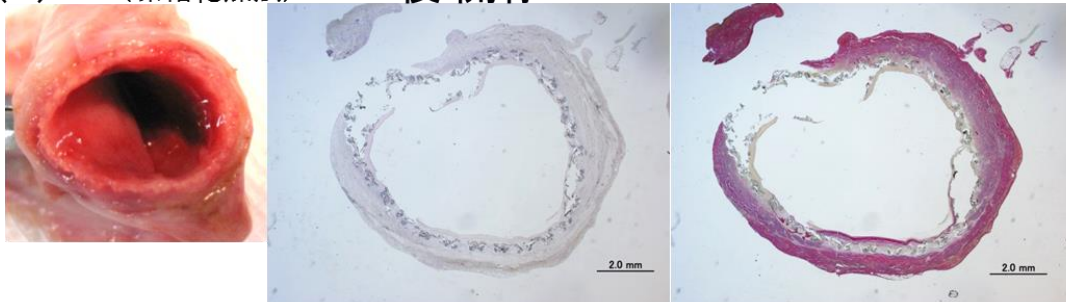
内腔層の薄さについては、人工血管基盤やコーティングの条件によって異なっていた。SF 繊維基盤(knit ①)SF コーティング人工血管(S1, S2)では、中口径と同様に内腔層は薄い傾向があった。(図 3) SF 繊維基盤(knit ②)SF コーティング(スポンジ法)人工血管(S4)では、フィブリン堆積層が厚く、中口径(M3, 複 III)と比較しても相対的に内腔層は厚い傾向があった。(図 10) SF 繊維基盤(準 woven)SF コーティング(凍結乾燥法)人工血管では、吻合部から離れたところでは、小口径でも中口径と同様に内腔層は薄い傾向がみられ、口径による相対的な差は少なかった。(図 11)

SF繊維基盤(knit ①) SFコーティング 中央部

(A) S1 (凍結乾燥法) 3w後 開存



(B) S1 (凍結乾燥法) 3m後 開存



(C) S2 (スポンジ法) 6m後 開存



参考: 中口径 M3 (knit ②, スポンジ法) 6m後開存

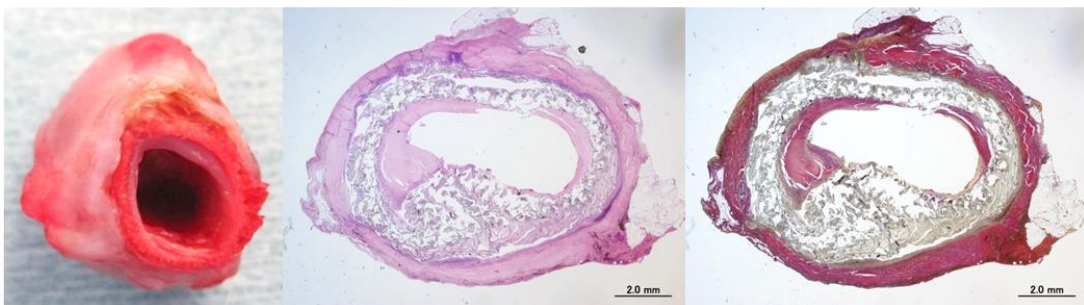
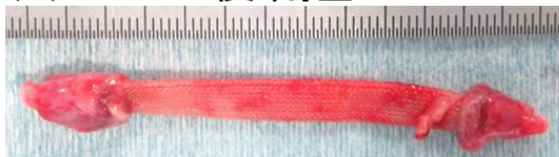


図 3. SF 繊維基盤(knit ①) SF コーティング人工血管 (検体写真および染色画像)

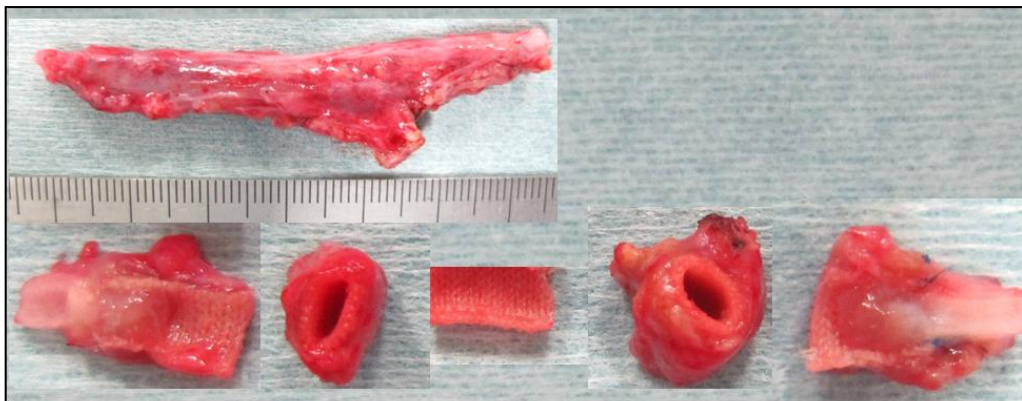
人工血管中央部では、フィブリンの局所堆積を除いて全体的に内腔層は薄かった。6 ヶ月以上経過した検体において、中口径の SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 (7-10cm 長, 径 6mm) では中央部まで白色調の新性内膜領域が進展していたのに対し、小口径人工血管 (5cm 長, 径 3.5mm(拡張して径約 6mm)) では見られず、大部分がフィブリン堆積状態に留まっていた。

SF繊維基盤(knit ②) SFコーティング(スポンジ法) 検体写真

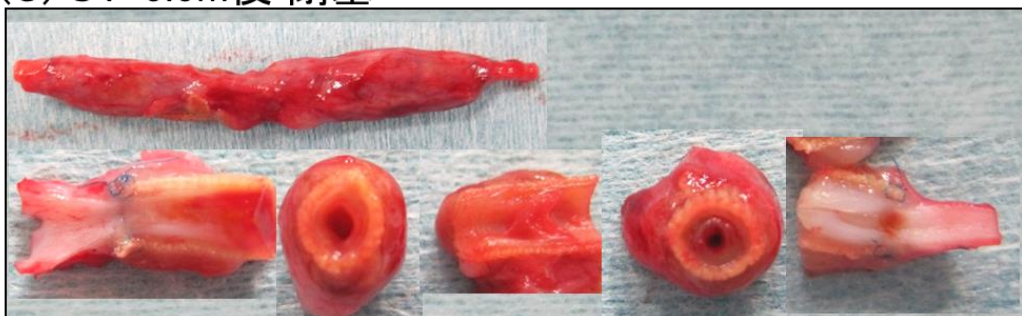
(A) S4 2w後 閉塞



(B) S4 1.5m後 閉塞



(C) S4 5.5m後 閉塞



(D) S4 6.5m後 閉塞

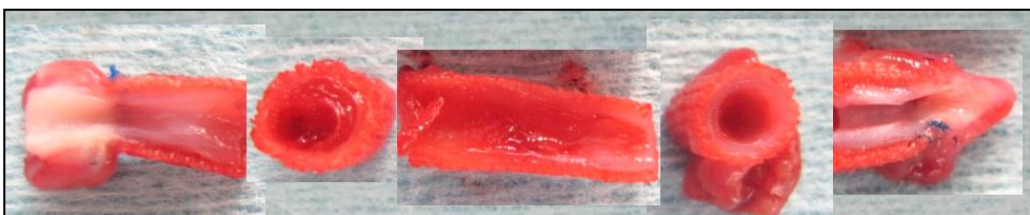


図 4. SF 繊維基盤(knit ②) SF コーティング(スポンジ法)人工血管 (検体写真)

(A) : 血栓閉塞。吻合部以外に外側面の組織被覆は見られなかった。

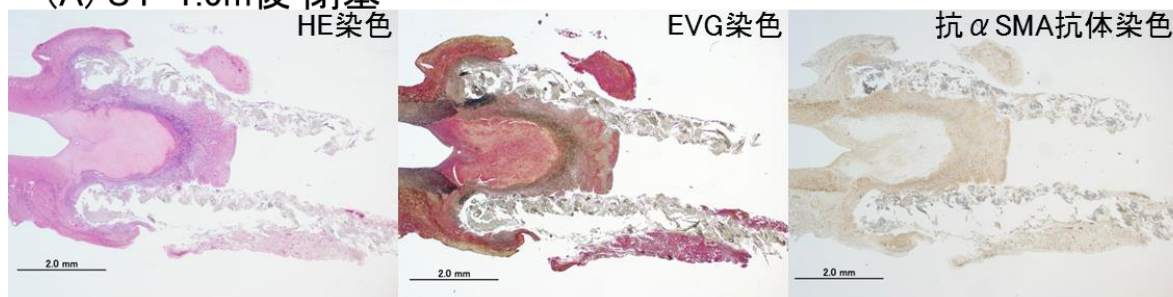
(B) : 両側吻合部内膜肥厚閉塞

(C) : 中枢吻合部高度狭窄による血栓閉塞。吻合部から少し離れたところが最も狭窄が高度であった。

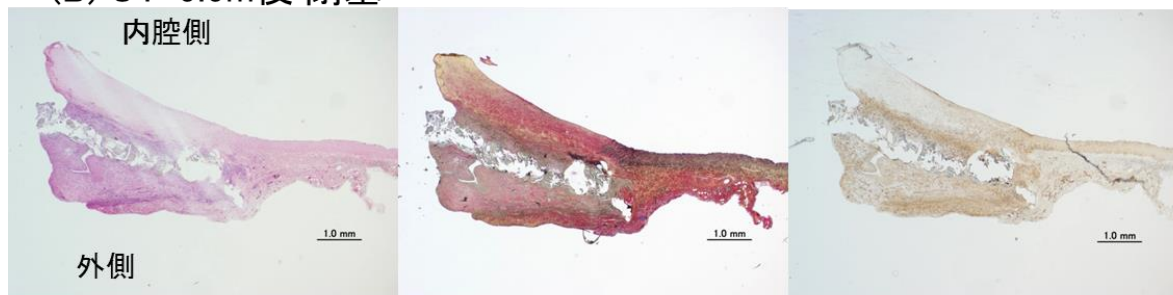
(D) : 高度狭窄はなかったが、血栓閉塞。白色調の新性内膜の進展は両側吻合部から 0.8~1.5cm 程度までで、それ以遠は赤褐色調のフィブリン堆積形成層の状態だった。

SF繊維基盤(knit ②) SFコーティング(スポンジ法) 吻合部

(A) S4 1.5m後 閉塞



(B) S4 5.5m後 閉塞



(C) S4 6.5m後 閉塞 (外側形成層は脱落)

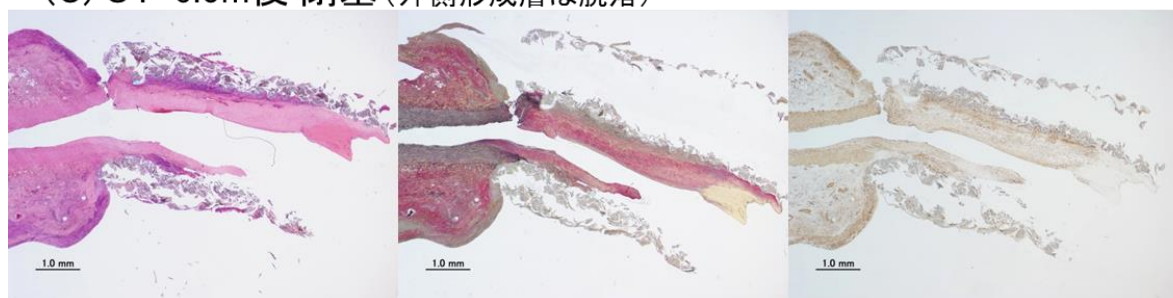


図 5. SF 繊維基盤(knit ②) SF コーティング(スポンジ法)人工血管 (染色画像)

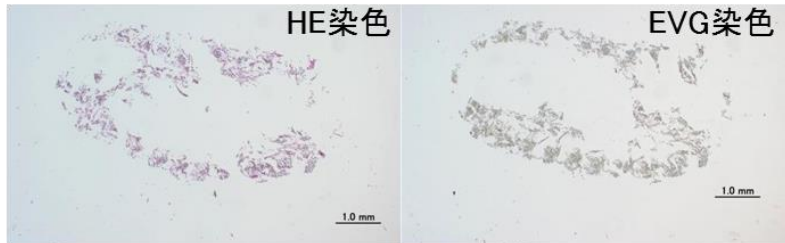
(A) : 吻合部内膜肥厚所見が見られ、肥厚部では膠原線維、平滑筋が増殖し、浸潤細胞が集簇した領域が見られた。

(B) : 内膜が肥厚しており、吻合部から少し離れたところが最も高度だった。

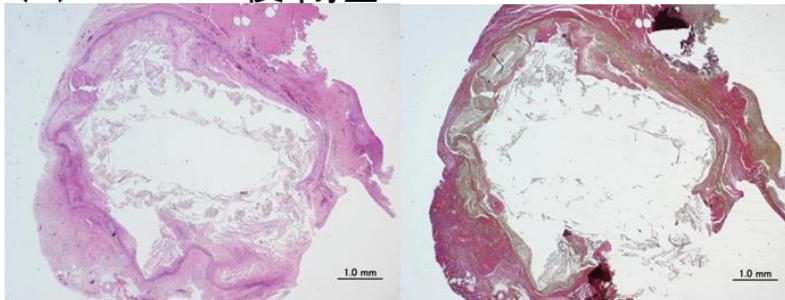
(C) : 吻合部から膠原線維の進展があるが、約 1cm 以遠はフィブリン堆積層の状態が残存していた。(当検体では、人工血管外側形成層は人工血管繊維から脱落。)

SF繊維基盤(knit ②) SFコーティング(スポンジ法) 中央部

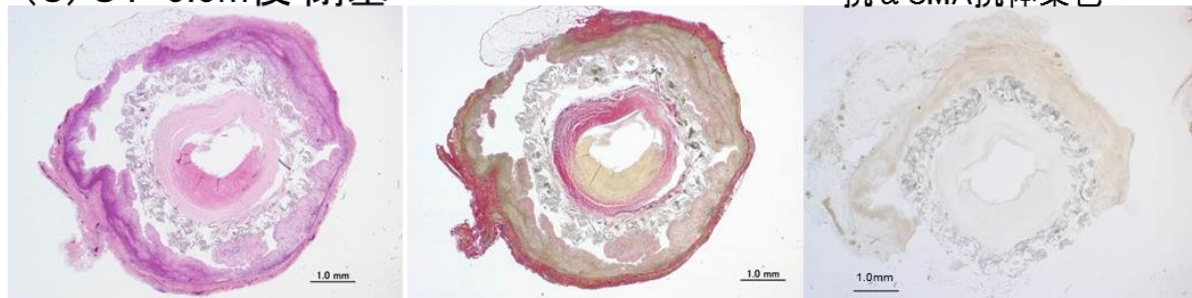
(A) S4 2w後 閉塞



(B) S4 1.5m後 閉塞



(C) S4 5.5m後 閉塞



(D) S4 6.5m後 閉塞 (外側形成層は脱落)

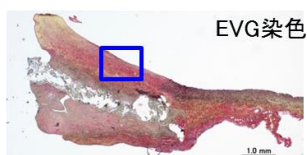


図 6. SF 繊維基盤(knit ②) SF コーティング(スポンジ法)人工血管 (染色画像)

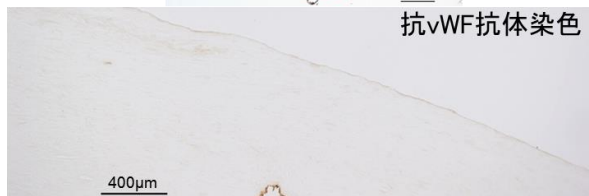
(A) 内腔側も外側も目立った層形成は見られなかった。(B) 1.5 ヶ月では内腔に目立った変化はないが、(C) , (D) 6 ヶ月前後では内腔層形成が進んでいた。膠原線維化は進んでいたが、フィブリン堆積層の領域も広がった。内腔層の平滑筋細胞層形成は乏しかった。

SF繊維基盤(knit ②) SFコーティング(スポンジ法)

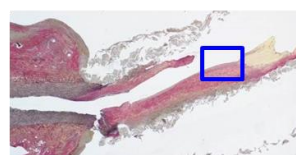
<内膜肥厚高度> S4 5.5m後 閉塞



抗vWF抗体染色



<内膜肥厚軽度> S4 6.5m後 閉塞



抗vWF抗体染色

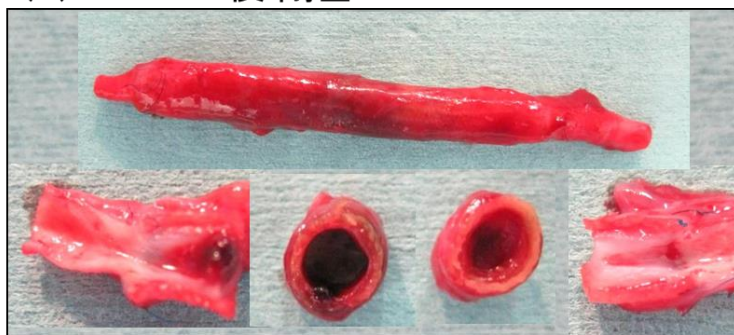


図 7. SF 繊維基盤(knit ②) SF コーティング(スポンジ法)人工血管：内皮細胞 (染色画像)

同一個体の左右検体。内膜肥厚が高度の検体では内皮細胞の進展は見られず、内膜肥厚軽度の検体では進展良好であった。

SF繊維基盤(準woven) SFコーティング(凍結乾燥法)

(A) S5 2.5m後 閉塞



(B) S5 3.5m後 閉塞

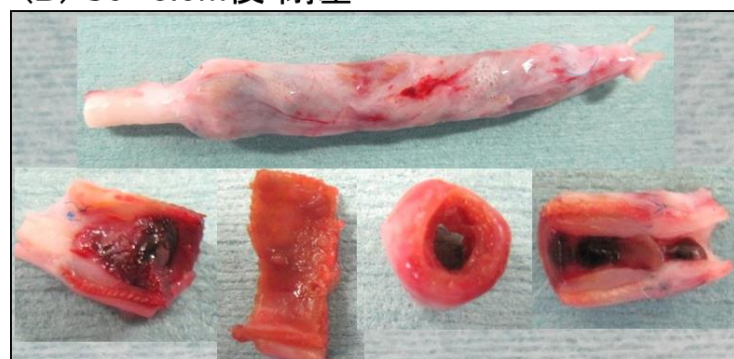


図 8. SF 繊維基盤(準 woven) SF コーティング(凍結乾燥法)人工血管 (検体写真)

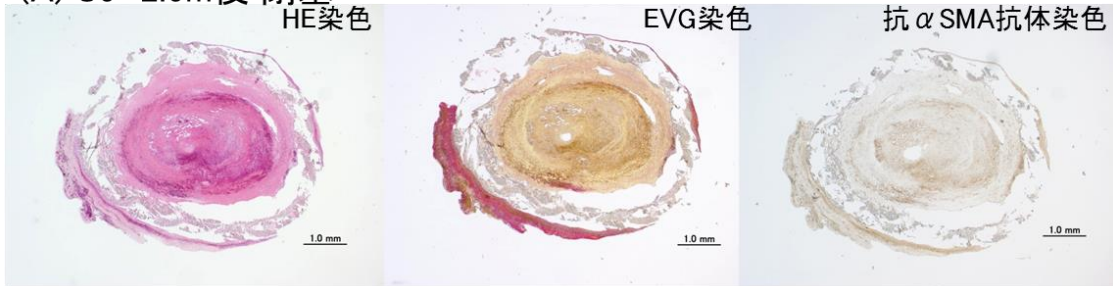
(右側が中枢側、左側が末梢側。下段は内腔面写真。同一個体の左・右検体)

(A) 中枢吻合部の約 5mm 末梢で内膜肥厚により閉塞していた。

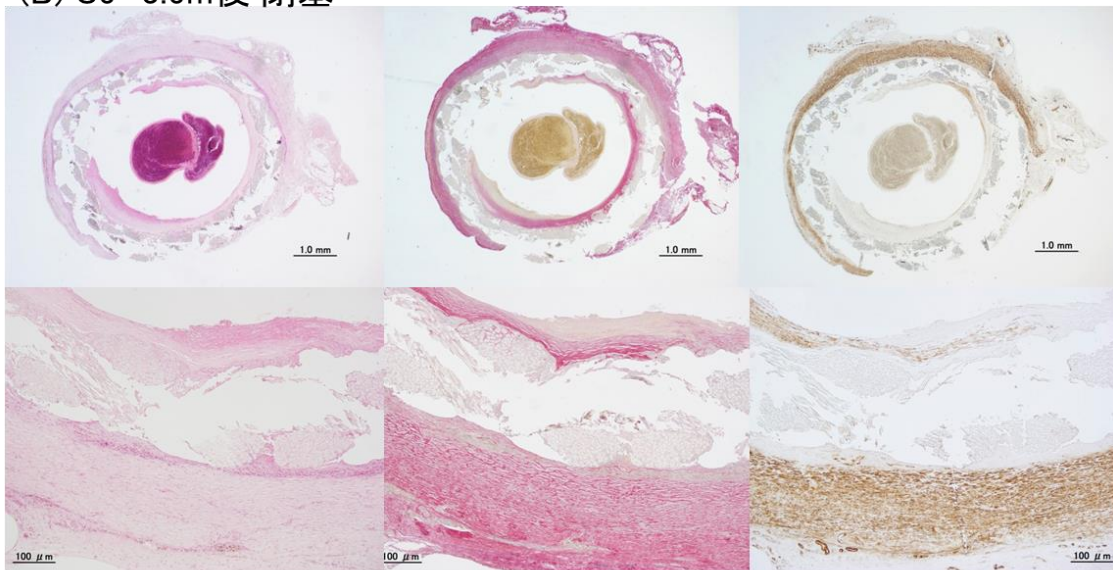
(B) 高度狭窄は見られなかったが、対側検体採取後 1 m 後に血栓閉塞した。外側面では栄養血管の進展も確認できた。

SF繊維基盤(準woven) SFコーティング(凍結乾燥法)
中央部

(A) S5 2.5m後 閉塞



(B) S5 3.5m後 閉塞



(参) ePTFE人工血管 3m後 閉塞

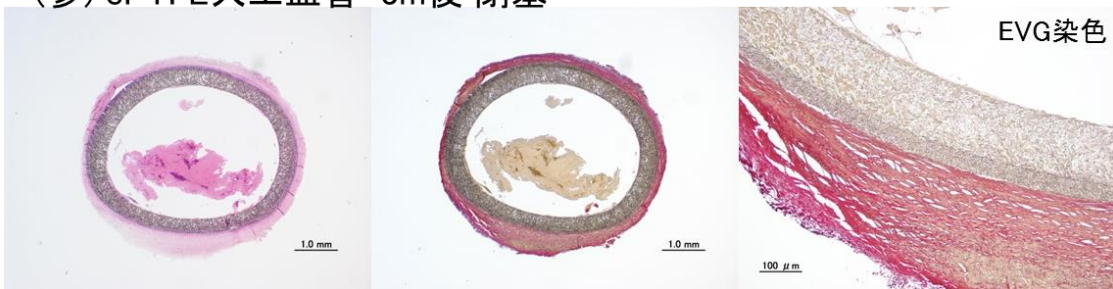


図 9. SF 繊維基盤(準 woven) SF コーティング(凍結乾燥法)人工血管 (染色画像)

経過に伴い内腔層、外側層の形成が進行していた。(A) 外側層は薄く不完全で、内腔側は血栓以外にフィブリン堆積層が見られたが膠原線維はわずかであった。(B) 外側層は全周性に厚くなり、内腔層は膠原線維が大部分を占めていた。

(参) ePTFE 人工血管では、3 か月後も中央部で血小板やごくわずかなフィブリン堆積が局所的に散見されるのみで内腔層の形成は無かった。

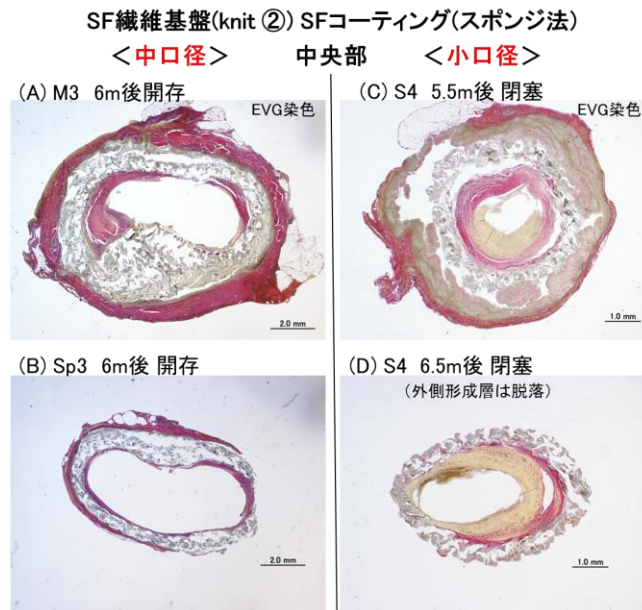


図 10. SF 繊維基盤(knit ②) SF コーティング(スポンジ法)人工血管：小口径と中口径の比較（染色画像）

移植 6 カ月前後の検体と比較すると、(A)，(B) 中口径人工血管では、中央部の内腔層は膠原線維がほぼ全体を占めていた。(C)，(D) 小口径人工血管では、人工血管繊維に接する領域で膠原線維が見られたが、内腔寄りにはフィブリン堆積層の状態であった。フィブリン堆積層の領域は広く、中口径人工血管 ((A)，(B)) と比べ、相対的に内腔層は厚い傾向があった。

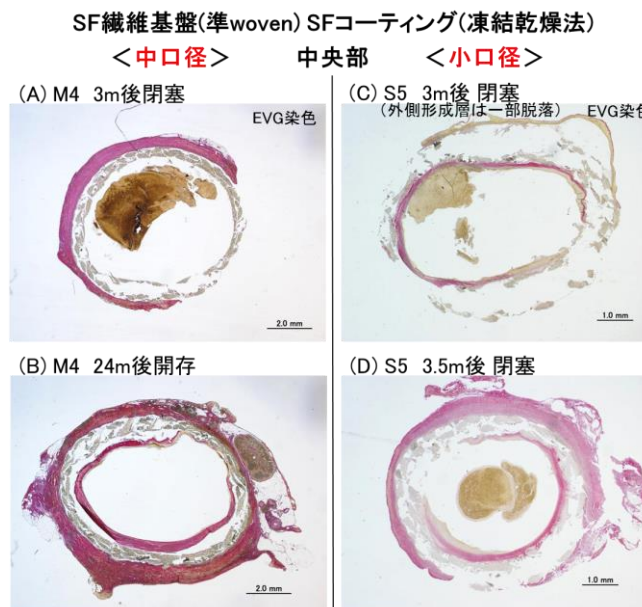


図 11. SF 繊維基盤(準 woven) SF コーティング(凍結乾燥法)人工血管：小口径と中口径の比較（染色画像）

(A) → (B) 中口径人工血管では、中央部の内腔層は薄く形成され、膠原線維の進展が進んでいた。(C)，(D) 小口径人工血管でも、内腔層は薄く、膠原線維が見られた。中口径人工血管 ((A)，(B)) と比べても、相対的に内腔層は薄かった。

人工血管器質化評価

表 3 に人工血管の器質化状況について、カテゴリー分類を用いて記した。

表 3 人工血管の器質化評価

人工血管	採取時期	開存	吻合部	人工血管中央部			外側層厚さ
			内膜肥厚	内腔層 内皮細胞	膠原線維化 厚さ		
早期閉塞 SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 (S3, S4, S5)							
S3-5	<1m	×	-	-	-	-	-
早期閉塞 PE 繊維基盤 SF コーティング人工血管 (S6, S7, S8)							
S6-8	<1m	×	-	-	-	-	-
早期閉塞 PE 繊維基盤ゼラチンコーティング人工血管 (S9)							
S9	<1m	×	-	-	-	-	-
早期閉塞を免れた SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 (knit①, 拡張あり)							
S1	3w	○	-	-	-	-	-
S1	3m	○	-	++	+	+	+
S2	7m	○	-	+++	-	++	++
早期閉塞を免れた SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 (knit②, スポンジ法)							
S4	1.5m	×	++	-	-	-	+
S4	5.5m	×	++	+	+	+++	++
S4	6.5m	×	+	++	+	+++	(脱落)
早期閉塞を免れた SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管 (準 woven, 凍結乾燥法)							
S5	2m	×	++	-	-	-	+
S5	2m	×	++	-	-	-	+
S5	3m	×	++	-	+	++	+
S5	3.5m	×	+	+	++	+	+
S5	4m	×	++	+	++	+	+
ePTFE 人工血管 (径 4.0mm)							
	3m	×	-	-	-	-	+

SF, フィブロイン; PE, ポリエステル

【小括③】

異常拡張人工血管を除いて、ポリエステル繊維基盤人工血管は SF をコーティング剤で利用しても全例早期閉塞した(5 例)のに対し、SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では 1 か月以上開存したものもあった(15 例中 8 例)。しかし、早期閉塞を免れた SF 利用人工血管でも、内膜肥厚が誘因となって数ヶ月後に閉塞した。

ポリエステル繊維基盤人工血管との比較検討はできなかったが、小口径でも SF 利用人工血管は実験①、②でみられた全体的な器質化の傾向がみられた。しかし、内腔層の膠原繊維の進展は中口径よりさらに少ない傾向があり、内膜肥厚が高度な検体では内皮細胞の進展が少なかった。また、人工血管の条件（knit や準 woven 等）や SF コーティング条件（多孔質か非多孔質か等）により、内腔層の薄さや膠原繊維の入り方などに違いが見られたが、その差は中口径の場合より大きかった。

考察①

SF 利用人工血管の作成

人工血管には多くの因子（繊維、編み方/織り方、厚さ、porosity 等）があり、コーティングについても多くの因子(材料、量、形状、局在等)があり、その組み合わせは無数にある。市販人工血管開発には多くの時間と費用がかかっており機密性が高い。ポリエステル繊維製人工血管を用いて SF のコーティング利用効果を評価する際にも、現在コーティングをしていないポリエステル繊維製人工血管は市販されていない。また、SF 利用人工血管はまだ研究段階であり作製方法は確立されていないが、SF 繊維製人工血管とポリエステル繊維製人工血管との比較においては極力人工血管の作成条件を合わせることが望まれる。以上から、本研究では自作の人工血管を用いることにした。

本研究で使用した自作人工血管は、SF 利用人工血管の器質化を見ることを目的とした開発研究段階であった。今回人工血管基盤を作成した会社はこれまでに人工血管作成を行ったことがなく、作成された人工血管が最適なものでない可能性が高いと考えられた。また、コーティングに関しても、大学の研究室で実施されているために最適なものではない可能性がある。このため、いくつかの人工血管作成やコーティングの条件に伴う問題があった。初期の“編み方”(knit ①)では移植後の異常拡張が生じたが、編み方を改良したり(knit ②) “組み”(準 woven)にしたりすることで改良することができた。SF コーティング後も透水率 (porosity) は市販のコーティング人工血管と比べて高かったが、プレクロッティングも併用することで移植終了時には凝血塊による

目詰まりで止血を得られていた。しかし、実験②において 11 例中 4 例の複合人工血管で、異常拡張が無くても移植後しばらくして人工血管繊維間からの漏血を生じ血腫を形成して閉塞した。血栓塞栓閉塞した人工血管の中には、誘因としてコーティング剤の剥がれや人工血管外側層の圧排性の組織進展による人工血管壁変形が疑われるものもあった。ただし、これらの問題は、今後、人工血管やコーティングの条件を調節することで修正できると考えられる。

本研究においては、大型動物モデルかつ中長期間の観察という点で制限があり、人工血管作成法などでは頻回の細かい修正はできなかった。しかしながら、その中でも、SF 利用人工血管は他の人工血管と異なった、特徴的な生体内での移植後変化（器質化）の過程を経ることが示された。

人工血管の移植後の変化（器質化）過程

生体に移植された PE 繊維製人工血管は、生体側の全身的・局所的諸因子や移植手技による修飾を受けるが、基本的には以下の経過をとると考えられている；①直後反応（数秒～数分以内）：人工血管内腔面に血漿蛋白層形成、②初期反応(数分～数日以内)：血小板、フィブリン、白血球等の血球成分沈着、③早期反応(数日～数週間)：フィブリン網形成、線維芽細胞出現、④晩期反応(数ヶ月以上にわたって)：線維組織形成を主とする反応、新生内膜形成。[34] また、移植人工血管における新生内膜形成については、吻合部経由の進展による内皮化と人工血管繊維間経由の毛細血管からの内皮化が考えられている。[34] さらに、循環する前駆細胞が接着して内皮化を生じることとも示唆されている。[30] 膠原線維についても同様に吻合部経由の進展と人工血管繊維間経由の進展が考えられる。さらに、臨床で使用されている PE 繊維製人工血管の

器質化の進み方について、Sato らはヒトに移植された Dacron double velour 人工血管の病理組織像を観察し、移植後 Initial Phase, Organizing Phase, Stable Phase と分類できることを報告している（Initial Phase: 血漿蛋白・血球成分吸着, フィブリン網形成、線維芽細胞出現(膠原線維は未出現)、Organizing Phase : 膠原線維の人工血管外側における進展形成および人工血管繊維間への侵入、Stable Phase : 膠原線維の内腔層における進展・置換）。[35] なお、上記の①直後反応, ②初期反応, ③早期反応は Initial Phase に相当し、④晩期反応が Organizing Phase 及び Stable Phase に対応すると考えられる。

イヌモデルにおけるポリエステル繊維製人工血管の移植後の変化過程について、胸部大動脈に移植した中口径人工血管の内腔面の変化過程は Noishiki らにより報告されており、典型的には移植後数ヶ月で白色調の新生内膜は両側の吻合部から 1～2cm まで進展して留まるが、例外的に全面を覆うものもあった。[4] 本研究で参考として腹部大動脈に移植した市販ポリエステル繊維製人工血管でも、内腔面の新生内膜進展を含む器質化状況には個体差があったが、同様の所見が見られた。

これに対し、イヌモデルにおける繊維またはコーティング剤としての SF 利用人工血管の変化についても、ポリエステル繊維製人工血管と同様に、全体的には Initial Phase → Organizing Phase → Stable Phase と進んでいくと考えられた。具体的には、SF 利用人工血管の作成条件（口径や編み方等）による差や個体差によらず、次の共通する過程がみられた；①人工血管外側面で、内腔側より早期に膠原線維豊富な外側層が形成され、約 1 ヶ月後には人工血管全体を被覆する、②人工血管内腔面では、開存期間につれてフィブリン堆積層の形成後、両側の人工血管吻合部から中央部へ向けて膠原線維層形成が進展していき、中央部でみると開存期間に伴いフィブリン堆積層が形

成され、移植後 6 ヶ月では膠原線維層が出現し置き換わっていく。

SF 利用人工血管の器質化の特徴

各段階において SF 利用人工血管に固有の器質化の進み方がみられた。本研究の条件下においては、コーティング剤または繊維として SF 利用した中口径人工血管は、PE 繊維基盤ゼラチンコーティング人工血管と比較して、(1) 人工血管内腔層は薄く形成され器質化が進む、(2) 一方で、内腔層の膠原線維化は遅れ、人工血管繊維間の膠原線維侵入はさらに遅れる、(3) 平滑筋層形成も内腔層で遅れる、(4) しかし、フィブリン堆積層の状態でも最内層に内皮細胞が生着する、(5) 外側層では膠原線維の進展が急激に進むが、経過に伴い薄くなる、(6) 多数の細胞が浸潤し、人工血管の外側へ向けて SF が生分解されていく、といった特徴が見られた。これらは、個体差や個体内での部位によるばらつきはあるが、SF 繊維でも SF コーティングでも全体的な器質化の傾向として観察された。一方で、人工血管作成条件（knit と準 woven 等）、SF の利用方法や条件（量や形状（多孔質と非多孔質）など）によって、SF 特性の発現状況・程度は変わってくることも示唆された。SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では、PE 繊維基盤 SF コーティング人工血管より、吻合部より離れた部位では内腔層が薄かったこと（実験②）や小口径において早期閉塞を免れたこと（実験③）からは、SF の繊維およびコーティング剤利用の上乗せ効果がある可能性も考えられた。

内腔面で薄く器質化が進むことは、人工血管にとって大きな利点である。SF 利用人工血管では薄い内腔層でありながら、ポリウレタンコーティング人工血管や ePTFE 人工血管とは違って細胞接着や器質化を排除するのではなく、細胞接着や器質化は逆に良好であった。また、器質化が進む中で薄くなっていくのではなく、移植早期 (initial

Phase) からフィブリン沈着堆積層の厚さが薄く、内腔層は薄いまま器質化が進んでいた。また、多くの修飾がかかる吻合部近くより吻合部から離れた部位の方が、内腔層が薄いという特性がより明確に見られた。一方で、同時期で見ると、膠原線維や平滑筋が進展してきていないため、内腔層が薄く見えるという可能性は否定できない。しかし、準 woven の SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管(M4)の 2 年後の検体においては、内腔層の大部分の膠原線維化が進んだ状態でも内腔層は薄かった。内腔層の厚さは人工血管や SF の条件、血流動態、個体差など多くの因子によって変わってくるため、SF を用いても必ずしも薄くなるわけではないが、人工血管や SF の条件を選べば確保され得ると考えられる。移植後から内腔層が薄く器質化が進めば内腔の面積が保たれることになり、特に口径が小さい人工血管において開存率向上に寄与する可能性が考えられる。

一方で、人工血管内腔層や人工血管繊維間の膠原線維化は遅れる。SF 利用人工血管でも生体動脈から吻合部を超えて膠原線維が進展していくが、この進展自体が遅れていた。さらに、人工血管外側の膠原線維の進展は速やかであるのにも関わらず、外側から人工血管繊維間を通して内腔側への膠原線維侵入が明らかに抑制されていた。これは SF の分解吸収が人工血管外側へ向けて行われるが、SF の分解吸収が進まないで膠原線維が入ってこないことが影響していると考えられる。一方で、SF の量を減らしたり多孔質など分解吸収されやすくしたりすることで、膠原線維化が早められる可能性があると考えられる。

通常、内腔層の膠原線維化がなくフィブリン堆積層の状態で留まっているのでは、内皮細胞が安定して存在できない可能性が考えられており[4]、移植人工血管が生体内

で完全に安定した状態にはならないと考えられる。しかし、実際には SF 利用人工血管では、膠原線維化が遅れフィブリン堆積層状態に見える領域でも、内皮細胞が早期に広い範囲で存在していた。内皮細胞は、ばらつきはあるが多くの切片で見られ、一時的に不安定な状態で接着しているだけでなく、生着していることが示唆された。SF は細胞親和性が高く、コーティング剤として用いた場合に早期に広い範囲で内皮化が見られたという報告もこれを支持する。[29] SF 利用人工血管におけるフィブリン形成層は、層内に多数の浸潤細胞があり、単にフィブリンが堆積した層とは異なった状態にあると推測される。SF によりフィブリン堆積形成層の状態でも内皮細胞は接着・生着できる可能性がある。高い抗血栓性を有する内皮細胞が生着した人工血管では、晩期の血栓閉塞リスクも減り長期的にも安定すると考えられる。

これらの SF に特有の器質化の進み方について、機序はまだ明らかでないが、生分解性であり細胞親和性が高いという SF 自体の特性が関連していると考えられる。SF 分解吸収にはマクロファージが大きな役割を担うことが報告されており[30]、分解吸収に関わる浸潤細胞から放出されるサイトカイン因子が膠原線維化を抑制していることが推測される。今後、細胞・分子レベルでのメカニズム解明の研究が必要である。

SF 利用人工血管の問題：耐久性

今回使用した自作 SF 利用人工血管は市販人工血管より周軸強度や吻合保持強度が低かったが、それでも SF の繊維としての強度は移植時や移植早期には問題なく、ヒトの血圧と同等である犬の血圧下で[36]、準 woven の人工血管で移植 2 年後まで局所的な破綻は無かった。しかし、生体吸収性人工血管ではグラフト劣化から耐久性に問題がある。SF は生分解性であるため[16]、SF 繊維基盤人工血管では長期的な破綻・

瘤化の危険性は残る。SF 繊維が十分な強度を持つ生体組織でリモデリングされていくなら耐久性を維持できる可能性もあるが、イヌモデルでは小動物モデルで見られた生体組織の完全置換によるリモデリングまでは見られなかった。[30] 本研究では2年以上の SF 利用人工血管の耐久性や組織置換性については評価できておらず、さらに長期にわたる観察が望まれる。

内膜肥厚について

小口径でも 3～4cm 程度の短い置換長であれば、両側吻合部からの膠原線維化が連続し全長にわたる内皮化が完了して、開存性は得られやすくなる。しかし、本研究では臨床応用を想定し、内皮化は通常では吻合部から 2cm 以下に留まるという報告を考えて[4]、5cm 長の移植を行った。この結果、異常拡張しない人工血管において、PE 繊維基盤人工血管は全 7 例が 1 か月未満に早期閉塞した（SF コーティング 5 例、ゼラチンコーティング 2 例）のに対し、SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では 15 例中 8 例で早期閉塞を免れた。その一方で、早期閉塞を免れた SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管でも、数か月後に吻合部内膜肥厚による閉塞ないし狭窄から血栓閉塞した。

SF 利用人工血管に関わらず小口径人工血管全般において吻合部内膜肥厚は大きな問題となるが、内膜肥厚の機序については多くの因子が関与しており不明な点が多い[37-40]。細胞親和性が高い SF が内膜肥厚リスクを高めるということは現段階では明らかでない。今回、人工血管専門企業が人工血管を作成しておらず、内膜肥厚は人工血管側の要因が大きく関与している可能性が考えられる。一方で、正常に機能する内皮細胞の存在が内膜肥厚を抑制することは示唆されている[38]。SF は内皮細胞の接

着・生着性を向上させるため、今後 SF を用いることで、内膜肥厚リスクを低減させる可能性がある。

本研究の問題点と展望

SF 利用人工血管は特徴的な器質化過程を経ることがわかったが、本研究における自作の人工血管作成やコーティングはまだ最適条件を満たしているとはいえなかった。人工血管作成には改良の余地が多く残されており、安定して最も効果を発揮できる条件決定を行う必要がある。

具体的な人工血管の改良については、以下の 5 点が主として考えられる；(1) 人工血管外側の組織進展に伴う圧排にも形状保持できる強度にする、(2) 線維は細いものが望ましい一方で人工血管の厚みを増して足場を増やす、(3) 器質化を促進するため Velour 構造を付ける、(4) 高 porosity にしつつ移植後コーティング剤が吸収されていっても血腫を形成しないように編む、(5) SF の利点がより有利に出るような編み方・組み方をする。

具体的な SF コーティングの最適化については、SF 利用の利点(内皮細胞生着が良く内腔層薄い点)を最大限に生かしつつ欠点(膠原線維化が遅れる点)を抑えるということから、現段階で以下の 6 点が考えられる；SF コーティングを(1) 剥がれにくくする、(2) porosity を 0 に近づくように行う、(3) SF の特性を維持する範囲で吸収されやすいように薄く量を減らす・濃度を下げる、(4) 内腔面と外側面で 2 層性に行う（内腔面のみを SF とし、外側面を他の素材にする）、(5) 吻合部近くと遠くで条件（量や濃度等）を調節できるようにする、(6) SF の生物学的特性を維持するため安定して湿潤状態を保つようにする。また本研究では、SF 繊維基盤人工血管(knit ②)において、ス

ポンジ法による多孔質 SF コーティングの方が凍結乾燥法による非多孔質 SF コーティングより早期閉塞しないものが多かった（中口径では凍結乾燥法の 1 例は 2 週間で閉塞したのに対しスポンジ法の 1 例は 6 か月開存し、小口径では凍結乾燥法の 4 例全例が 1 か月未満に閉塞したのに対しスポンジ法の 5 例中 3 例は 1.5, 5.5, 6.5 か月開存した）。多孔質にすることで表面積が著増し足場が増えて細胞接着生着の効率が向上したことや多孔質の方が SF は吸収されやすかったこと等が影響した可能性があると考えられる。内腔面は多孔質で外側面は非多孔質にするなど、コーティングの形状について SF の利点をより生かせるような条件の検討を進める必要がある。

本研究では、人工血管作成を専門的に行っている企業会社による人工血管作成ではなく、人工血管作成やコーティング条件が定まっておらず、定量的な評価や開存率の比較検討はできなかった。また、器質化には個体差やイヌとヒトでの種による差がある。今後、各最適条件を定め、SF 特性の定量的な評価を行い、改めて小口径人工血管にて開存率を含めた比較評価をしていきたいと考える。そして、本研究および更なる研究から、SF 利用人工血管の優位性を確立し、臨床試験を経て臨床応用へ向けていくことが望まれる。

考察②

SF 利用人工血管の臨床応用における利点

SF を人工血管に利用することで、条件によって内皮細胞が早期に生着しながら内腔層が薄く器質化が進むようにできる可能性がある。コーティング剤としても、漏血防止のみでなく細胞生着剤としての役割を付加できる可能性がある。ヒトでは長い距離の新生内膜の進展（膠原線維化）は起こらないと考えられるが、SF によりフィブリン堆積形成層の状態でも内皮細胞を接着・生着させられる可能性がある。さらに、器質化の進み方の特性以外にも様々な利点がある。セリシンを除いて精製した SF の抗原性は低いと報告されており[15-17]、精製した SF 利用はヒトにおいても生体適合性があり安全であると考えられる。セリシンを含まない精製した SF は感染に弱くない。その他にも、SF は生産性が高く経済的で、加工性が高く汎用化も可能である。また SF に Drug delivery system (DDS) 利用で様々な薬剤を付加することもできる。[41-43] さらに遺伝子組み換えカイコにより、SF の細胞親和性や生体適合性を向上させたり、血管成長因子等を発現させたりすることができる。[18-20, 44] 以上のように、SF の人工血管への応用性は極めて広い。

大中口径における臨床応用について

臨床では長期間の移植症例が増えてきており、慢性物理的刺激などの生体側の要因が加わることもあり、非生分解性の PE 繊維製人工血管や ePTFE 人工血管でも人工血管瘤を発症することがある。[45] 大中口径人工血管を使用する症例では人工血管破綻・瘤化が致死的になることがあるため、まだ長期的な耐久性が保証されていない生

分解性の SF 繊維基盤人工血管の臨床利用は、特殊な場合に限られる。現時点では、
現行の人工血管基盤にコーティング剤として SF を利用する方法が最も実用的で臨床
応用可能に近いと考えられる。

SF コーティング剤利用の人工血管が現行の人工血管より優れる点としては、(1) 異
種タンパクコーティングより安全性が高いと考えられること、(2) 細胞接着・生着剤
(特に内皮細胞)としての役割を付与でき得ること、(3) 人工血管外側層の生体組織被覆
を促進させられることが考えられる。(2) は特に吻合部から離れた部位で抗血栓性向
上につながる可能性があり、(3) は長期的にも人工血管の安定化を向上させる可能性
がある。これらの SF コーティングの効果は、移植直後の漏血防止だけでなく、その
後の生体内での器質化の過程に影響を及ぼし持続性を持つと考えられる。一方で、現
在コーティング剤に使用されている異種タンパクは移植後2週間程度での吸収消退が
想定されていることから、SF をコーティング剤として用いること自体が現行の人
工血管の成績を低下させることは無いと考えられる。

以上が確認され SF コーティングの優位性が確立されれば、現在行われている大中
口径人工血管手術全般に使用することができる。さらには低侵襲性から劇的に使用が
増えているステントグラフトにも利用できる。ステントグラフトでは、血管内治療用
として薄く改良されてきたが、およそ半数は ePTFE 製であり、また多くは外側からの
組織侵入がなく、器質化は不良で内皮細胞の生着は稀であり、長期的な耐久性には懸
念が残っている。[46] SF コーティングで長期的な安定性を向上することができれば、
有用な材料となり得る。

感染性動脈瘤症例の中には、リファンピシンを浸漬させた人工血管を用いて、感染

巢内で in situ で再建することがある。今後、DDS や遺伝子改変カイコによる SF を用いて、抗生剤を長時間保持して人工血管自体に持続的な抗感染性を付与することができれば、感染巣の手術や感染予防に極めて有用となる。現時点では目的タンパクの発現量は定まっていないが遺伝子改変カイコを用いた SF 研究も進行しており、将来的には抗生剤に限らず人工血管の様々な属性付与の材料として有望である。

小口径における臨床応用について

現時点では、ある程度の長さが必要な場合、SF 利用単独での臨床応用可能な小口径人工血管の開発は困難と予想される。しかし、その他の工夫と併せることで、総合的に SF 利用した小口径人工血管開発の可能性はあると考える。

本研究では、SF コーティング単独での成績向上は示せていないが、SF 繊維基盤 SF コーティング人工血管では早期閉塞リスクを低下させる可能性は認められた。吻合部近くでは内腔層が薄いという SF の特性が出にくく内膜肥厚抑制効果は見られていないが、吻合部から離れた部位では SF 利用で内腔層は薄く出来得ると考えられる。たとえば、両側吻合部から 1～2cm ずつを内膜肥厚抑制性の人工血管（あるいは内膜肥厚抑制性の属性を付与した SF 利用人工血管）とし、吻合部から離れた部分を SF 利用人工血管とした複合人工血管を用いることができれば、理想的な人工血管になる可能性があると考えられる。SF を内皮細胞接着生着剤として利用し、内皮細胞播種人工血管などのハイブリッド人工血管へ応用する方法も成績向上に役立つかもしれない。今回は使用しなかったが、抗血小板や抗凝固療法を含め、薬剤併用による開存性上昇の可能性もある。

一方で、3cm 程度の短い距離なら SF 利用人工血管で高开存が得られて SF の特性を

付加できる可能性がある。短距離病変の置換やグラフトの延長、動静脈シャント造設、小児外科領域手術（Blalock-Taussig シャント等）などで、置換距離が短くて済む特定の状況下なら、現時点で SF の特性を生かして臨床応用の可能性はあると考えられる。また、今後、小口径ステントグラフトの開発も検討されており、SF が有用性である可能性がある。さらに、人工血管ではないが、冠動脈ステントや腸骨動脈・下肢動脈のステントなど、現行のステントの一時的な cover として SF が有用性である可能性がある。小・中口径のステントに SF を塗布することで、その開存性、内皮化を向上させる可能性が示唆される。

総括 本研究の意義

これまで絹フィブロイン利用した人工血管の研究はされてきたが、まだ大型動物モデルでの系統的な組織学的評価はされていなかった。本研究において、イヌを用いた動物モデルで絹フィブロイン利用人工血管を移植し、その特徴的な生体内での変化を明らかにすることができた。そして、一定の条件下で、絹フィブロインを人工血管に利用することで、内皮細胞は早期に接着生着しながら内腔層が薄く器質化が進むようにできる可能性がみられた。本研究により、絹フィブロインを利用した人工血管開発の基となる系統的な所見が得られた。絹フィブロイン利用により人工血管の安全性、開存率、長期的な安定性などの向上につながる可能性がある。今後、更なる研究から、絹フィブロインの利点を生かした優れた人工血管開発につながると考えられる。

謝辞

本研究を遂行する機会及び御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科・血管外科 渡邊聡明教授、国際医療福祉大学血管外科 宮田哲郎教授（前東京大学医学部附属病院血管外科病院教授）に厚く御礼申し上げます。本研究の計画及び遂行にあたり御指導を賜りました東京大学医学部血管外科 重松邦広講師、岡本宏之特任講師に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行する上で全面的な御協力頂いた東京農工大学工学部生命工学科 朝倉哲郎教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり御指導及び御助言を頂いた、東京大学医学部血管外科教室の皆様にご心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. Zheng Q, Elliot LC. Prosthetic Grafts. Rutherford's Vascular Surgery, 7th Ed. 2: 1335-49, 2010.
2. Roll S, Muller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, Willich SN. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery-systematic review and meta-analysis. BMC Surg. 8: 22, 2008.
3. Takagi H, Goto SN, Matsui M, Manabe H, Umemoto T. A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting. J Vasc Surg. 52: 232-6, 2010.
4. Noishiki Y, Yamane Y, Okoshi T, Tomizawa Y, Satoh S. Choice, isolation, and preparation of cells for bioartificial vascular grafts. Artif Organs. 22: 50-62, 1998.
5. Randall RD, Jr., Walley BD, Meredith JH. Comparison of polytetrafluoroethylene (PTFE) and dacron as long, small-diameter arterial grafts in dogs. Am Surg. 48: 622-7, 1982.
6. Farber A. Biologic Grafts. Rutherford's Vascular Surgery, 7th Ed. 2: 1350-61, 2010.
7. Dardik H, Wengerter K, Qin F, Pangilinan A, Silvestri F, Wolodiger F, Kahn M, Sussman B, Ibrahim IM. Comparative decades of experience with glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for lower limb revascularization: an analysis of 1275 cases. J Vasc Surg. 35: 64-71, 2002.
8. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 74: 570-81, 2005.
9. Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. Eur J

Vasc Endovasc Surg. 23: 475-85, 2002.

10. Yokota T, Ichikawa H, Matsumiya G, Kuratani T, Sakaguchi T, Iwai S, Shirakawa Y, Torikai K, Saito A, Uchimura E, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 136: 900-7, 2008.
11. Hoerstrup SP, Cummings Mrcs I, Lachat M, Schoen FJ, Jenni R, Leschka S, Neuenschwander S, Schmidt D, Mol A, Gunter C, Gossi M, Genoni M, Zund, G. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation*. 114: I159-66, 2006.
12. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nature Medicine*. 7: 1035-40, 2001.
13. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 24: 401-16, 2003.
14. Hardy JG, Scheibel TR. Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science*. 35: 1093-115, 2010.
15. Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin HJ, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. *Biomaterials*. 24: 3079-85, 2003.
16. Minoura N, Aiba S, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *J Biomed Mater Res*. 29: 1215-21, 1995.

17. 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*. 26: 147-55, 2005.
18. Tatemastu K, Sezutsu, H., Tamura, T. Utilization of Transgenic Silkworms for Recombinant Protein Production. *J Biotechnol Biomaterial*. S9: 004, 2012.
19. Tomita M. Transgenic silkworms that weave recombinant proteins into silk cocoons. *Biotechnol Lett*. 33: 645-54, 2011.
20. Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature Biotechnology*. 21: 52-6, 2003.
21. Chiarini A, Petrini P, Bozzini S, Dal Pra I, Armato U. Silk fibroin/poly(carbonate)-urethane as a substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells. *Biomaterials*. 24: 789-99, 2003.
22. Unger RE, Wolf M, Peters K, Motta A, Migliaresi C, James Kirkpatrick C. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials*. 25: 1069-75, 2004.
23. Inouye K, Kurokawa M, Nishikawa S, Tsukada M. Use of Bombyx mori silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 37: 159-64, 1998.
24. Chirila T, Barnard Z, Zainuddin, Harkin DG, Schwab IR, Hirst L. Bombyx mori silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of

ocular surface disorders. *Tissue Eng Part A*. 14: 1203-11, 2008.

25. Guan GP, Bai L, Zuo BQ, Li MZ, Wu ZY, Li YL, Wang L. Promoted dermis healing from full-thickness skin defect by porous silk fibroin scaffolds (PSFSs). *Bio-Medical Materials and Engineering*. 20: 295-308, 2010.

26. Kuboyama N, Kiba H, Arai K, Uchida R, Tanimoto Y, Bhawal UK, Abiko Y, Miyamoto S, Knight D, Asakura T, Nishiyama N. Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 101: 295-302, 2013.

27. Levin B, Rajkhowa R, Redmond SL, Atlas MD. Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. *Expert Review of Medical Devices*. 6: 653-64, 2009.

28. 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. *Adv Healthc Mater*. 2: 361-8, 2013.

29. Huang F, Sun L, Zheng J. In vitro and in vivo characterization of a silk fibroin-coated polyester vascular prosthesis. *Artif Organs*. 32: 932-41, 2008.

30. 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. *J Vasc Surg*. 51: 155-64, 2010.

31. Zhang X, Wang X, Keshav V, Johanas JT, Leisk GG, Kaplan DL. Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. *Biomaterials*. 30: 3213-23, 2009.

32. 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*. 14: 89-99, 2011.
33. Shirakawa M, Egami J, Miyata T, Shindo S, Takagi A, Sato O, Tada Y, Idezuki Y.
Hybrid vascular prosthesis using ultrafine polyester fabrics. *Jpn J Artif Organs*. 20: 401-5, 1991.
34. Davies MG. Intimal Hyperplasia. *Rutherford's Vascular Surgery*, 7th Ed. 1: 69-88, 2010.
35. Sato O, Tada Y, Takagi A. The biologic fate of Dacron double velour vascular prostheses-A clinicopathological study-. *Jpn J Surg*. 19: 301-11, 1989.
36. Miyazaki H, Yoshida M, Samura K, Matsumoto H, Ikemoto F, Tagawa M. Ranges of diurnal variation and the pattern of body temperature, blood pressure and heart rate in laboratory beagle dogs. *Exp Anim*. 51: 95-8, 2002.
37. Wallitt EJ, Jevon M, Hornick PI. Therapeutics of vein graft intimal hyperplasia: 100 years on. *Ann Thorac Surg*. 84: 317-23, 2007.
38. Patel SD, Waltham M, Wadoodi A, Burnand KG, Smith A. The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 4: 129-41, 2010.
39. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340: 115-26, 1999.
40. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*. 28: 5009-27, 2007.
41. Dyakonov T, Yang CH, Bush D, Gosangari S, Majuru S, Fatmi A. Design and

characterization of a silk-fibroin-based drug delivery platform using naproxen as a model drug.

J Drug Deliv. 490514, 2012.

42. Pritchard EM, Kaplan DL. Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 8: 797-811, 2011.

43. Pritchard EM, Valentin T, Panilaitis B, Omenetto F, Kaplan DL. Antibiotic-Releasing Silk Biomaterials for Infection Prevention and Treatment. Adv Funct Mater. 23: 854-61, 2013.

44. Yanagisawa S, Zhu Z, Kobayashi I, Uchino K, Tamada Y, Tamura T, Asakura T. Improving cell-adhesive properties of recombinant Bombyx mori silk by incorporation of collagen or fibronectin derived peptides produced by transgenic silkworms. Biomacromolecules. 8: 3487-92, 2007.

45. Yamamoto S, Hoshina K, Kimura H, Okamoto H, Shigematsu K, Miyata T, Watanabe T. Clinical analysis of non-anastomotic aneurysms of implanted prosthetic grafts. Surg Today. (in press)

46. Yamamoto S, Hoshina K, Takazawa Y, Okamoto H, Shigematsu K, Miyata T, Watanabe T. Aortic dissection occurring 18 months after successful endovascular repair in an anatomically difficult case of abdominal aortic aneurysm. Case Rep Vasc Med. 4, 2013.