

腹腔内で使用可能な人工静脈の開発

宮澤光男

帝京大学医学部附属溝口病院 外科 緩和ケアセンター

【研究の背景】

近年外科技術の進歩により、肝胆膵領域の悪性腫瘍に対する手術は、門脈や肝静脈、下大静脈等に浸潤した腫瘍でも切除が可能となってきた。一方で静脈浸潤部の切除には再建が必要となるが、現在において感染巣や緊急時において使用可能な人工血管が存在しないのが現状である。

実際の臨床では自家静脈が多く使用されているが、採取に時間を要することから、緊急の静脈再建には不向きである。また人工物である expanded polytetrafluoroethylene (以下 ePTFE) も多く使用されているが、消化器手術では術野が汚染野であることから、非吸収性の人工血管は感染に弱く、ベストな材料とは言えない。このように使用できる再建材料が乏しいのが現状である。

我々は、これらの理由より、感染に強く、操作性がよく、緊急時に使用可能な大静脈の代替素材の開発が必要であると考えた。我々は近年発達してきた tissue engineering の技術を応用し、これまで生体吸収性ポリマーによる静脈再生療法の開発を検討してきた^{1,2)}。

【目 的】

本研究において、我々が開発してきた生体吸収性ポリマーシートが、門脈を狭窄なく再建可能か検討した。

【方 法】

我々の使用する生体吸収性ポリマーはポリ乳酸とポリカプロラクトン 50 : 50 共重合体で作成した繊維をポリグリコール酸繊維で補強し、約 6-8 週間で吸収されるように設計されている。その厚さは約 1 mm である。

本実験は雑種ブタ(15-30kg、1-2 歳)を用いて行った。全 8 頭を使用した。全てのブタは術前 12 時間の禁食を行った。ケタミン 20 mg/kg 筋注により麻酔導入を行い、プロポフォール持続静注 0.2 mg/kg/min で維持し、器械換気にて全身麻酔を行った。加刀直前にセファズリンナトリウム(セファメジン α®) 1 g を生理食塩水 100 ml に溶解し点滴静注施行した。ブタを仰臥位に固定、上腹部正中切開で開腹し、門脈を同定した。左右門脈の合流部から臍上縁までの門脈を剥離し、頭尾側をサイドクランプした。門脈前壁を 3×1.5 cm の楕円形に切除し門脈欠損を形成した。同部位に同じ大きさにデザインした生体吸収性ポリマーシートをパッチ状に 5-0 プロロンにて連続縫合し移植した。手術後は 6 時間の禁食とし、12 時間後より固形飼料を開始した。

術後 2 週間後に 3 頭、術後 3 か月に 5 頭をそれぞれ犠牲死させ門脈を摘出した。移植部位を肉眼的および組織学的に観察した。肉眼的には外観の再生の程度、狭窄の有無を含めて評価した。組織学的には摘出検体をホルマリンで固定し、hematoxylin and eosin(以下 HE)およびⅧ因子(Sigma, Japan)にて染色を行った。生体吸収性ポリマー移植部と血管壁を比較して平滑筋細胞や血管内皮の再生の有無を観察した。

すべての動物実験は以下に準拠して実施した。NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

【結 果】

術中所見

術中所見としては全例トラブルなく生体吸収性ポリマーシートにて門脈欠損部を閉鎖することができた。生体吸収性ポリマーシートは素材が柔らかく、運針も容易であった。

術後経過

ブタは2週間後および3か月後に犠牲死させるまで全頭生存した。術後の経過として経口摂取や排便状態、体重増加において異常をきたすことはなかった。2週間後および3か月後の術中所見は全てのブタにおいて同様であった。

肉眼的所見

移植後2週間の時点では肉眼的にポリマーシートは残存していた。癒着は軽度あるが容易に移植部を露出できた。移植部は特に変形を認めなかった。

移植後3週間では門脈パッチ移植部において、わずかに周囲組織との癒着があったが、移植部の露出は容易であった。移植部において明らかな感染は認めなかった。肉眼的にポリマーシートは完全に吸収され、周囲門脈と一体化していた。また狭窄所見は認めず、変形もなかった。切除標本にてパッチ部位の面積を評価したところ、 2.4×1.3 cm であった。元のパッチの面積が 3.53 cm² に対して切除検体のパッチの面積は 2.45 cm² でありは約70%の大きさになっていた。

病理組織学的所見

移植後2週間ではHE染色にてポリマーが残存していた。Ⅷ因子免疫染色にてパッチ部においてすでに positive となっており、移植後2週間で内皮が形成され始めていた。

移植後3週間ではHE染色にてポリマーが消失していた。パッチの内腔血管内皮細胞が並び、その下に支持組織が育っていた。内皮および中膜は形成されているが、外膜は形成されていなかった。平滑筋は支持組織内に確認できたが、パッチ部では平滑筋の割合が native Portal vein より少なかった。2週間時と同様にⅧ因子免疫染色にて、パッチ部において染色陽性となり、血管内皮細胞の存在が証明された。また3ヶ月後において狭窄および瘤形成は認めなかった。

【考 察】

近年外科技術の進歩により肝胆膵領域の悪性腫瘍手術において、門脈の合併切除症例が増加している。その再建方法としては欠損部が広範囲な場合、しばしば自家静脈や ePTFE が用いられているが、これらは理想的な再建材料とは言えない。自家静脈は一般的に大伏在静脈や腎静脈等を選択することが多いが、採取までに時間がかかるため緊急時に利用不可能である。ePTFE は非吸収性の人工血管であり、感染に弱く、材質が固いため縫合しにくい欠点がある³⁾。大血管の再建に用いて感染した場合に致死的な結果に至ってしまった報告もある⁴⁾。また ePTFE は人工物であるため、長期留置することで石灰化し血管閉塞をきたすリスクも高く、抗凝固薬の内服が必要となる欠点がある³⁾。現在において、世界的に臨床で使用されている理想的な人工静脈は存在していない。特に腹腔内での消化器手術では、術野がある程度の感染巣となるため、感染に強く、緊急に対応可能で、簡便性の高い人工静脈が必要となる。そこで我々は生体吸収性材料を用いて腹腔内で使用可能な人工静脈の開発を検討した。

近年技術の進歩に伴い、tissue engineering の研究が進んでいる。この技術によって生産された組織や臓器が臨床において利用されるようになってきている^{5,6)}。2001年 Shin'oka Tらは細胞播種した BAP による肺動脈の作製に成功したと報告している⁷⁾。そこから BAP に関する研究が進められてきているが、腹腔内に関しては非吸収性のグラフトの研究が多く^{7,8)}、生体吸収性材料に関する研究はほとんどなされていない状況であった⁹⁾。そこで我々は腹腔内での BAPS の移植研究を行った。我々は過去に細胞播種を施行しない BAPS を用いて 3×2 cm 大の下大静脈のパッチ状再建に成功した^{1,2)}。特に狭窄や変形がなく、静脈を再生させることが可能であった。また、これまでに本 BAP を用い、腹腔内臓器再生の検討も行っており、胆管、胃、食道を部分的に再生させることに成功した¹⁰⁻¹³⁾。これらの実験では特に感染を示唆する所見もなく再生可能であり、腹腔内での BAP 使用の安全性が示唆された。また BAP の安全性に関しては、この素材から作られた縫合糸の臨床経験によっても確立されている¹⁴⁾。これらを踏まえて、今回我々は人工門脈の開発を目指した。我々は細胞播種を施行していない BAPS を用いることにした。以前の研究で細胞播種を施行せずに血管の再生に成功しており、また腹腔内においては緊急時に使用する場合が多く、今後の臨床応用を考慮すると簡便さが必要であるため細胞播種は適当ではないと考えた。ま

た、下大静脈が4-5 mmHg 程度であるのに対して門脈圧は10 mmHg 程度と約2倍の圧がある。過去において我々は下大静脈のパッチ状再生に成功しているが、下大静脈と門脈の圧の違いにより、門脈では瘤形成などの変形や移植早期での血液の漏れなどが懸念されると考え、今回我々はBAPSを用いた人工門脈の研究を行った。

我々は移植後2週間の早期と移植後3ヶ月の中期のタイミングで評価を行った。緊急時にBAPSを使用した場合、術直後から2週間の時期で血液の漏れ、血栓形成、瘤形成や狭窄があつては臨床では使用できない。またBAPは6-8週間で加水分解され、消失するように設計されており、移植後2-3か月から徐々にdegradeしてくる。このタイミングで血管は最も弱くなると予想され、高い門脈圧の影響で瘤形成などをきたす可能性があると考えた。中長期的に瘤形成や狭窄をきたすようでも臨床では使用できない。我々はBAPSが緊急時に使用可能なのか、最も脆弱なタイミングで瘤形成などの変形が認められないかを検討するために、この2点での評価を行うことにした。

術直後から2週間すなわち早期において：

術中所見において肉眼的にあきらかな血液の漏れは認めなかった。病理組織学的にも2週間の時点ですでに血管内皮が作られていることがわかった。これにより術後早期から血液が漏れないことを病理組織学的に証明できた。また血栓形成や瘤形成なども認められず、BAPSは緊急時において使用が可能であると考えた。

3か月すなわち中期において：

移植後3か月のタイミングでも瘤形成は認められなかった。BAPSはすでに消失しており、肉眼的に移植部の内皮面はnative portal veinと見分けがつかない程度であり、門脈は変形なく再生されていた。病理組織学的に平滑筋の再生はnative Portal veinと比較して乏しかったが、最低限門脈圧に耐えうるだけの結合組織と平滑筋の再生がなされていることが証明された。また我々の以前の研究で結合組織と平滑筋の再生は移植後1-2年の経過で徐々に増大してくることがわかっている²⁾。結合組織はnative portal veinと比較して3か月では52%であるのに対して12か月で90.2%に変化した。平滑筋はnative portal veinと比較して3か月で3%であるのに対して12か月で50%、24か月で100%に増大した。移植後3か月において瘤形成がないことから、その後長期的にも瘤形成は認められないだろうと考える。

我々はBAPが実際に体内で吸収され、3ヶ月後には消失することが証明でき、さらにBAPS移植部において石灰化も認められないことがわかった。上記で述べた通りePTFEは永遠に体内に人工物として残存し、石灰化をもたらすことが懸念される。BAPは中期において生体内で吸収され、血管内の石灰化および閉塞が生じないことが証明された。これによりBAPSの移植後には抗凝固剤の内服は不要であることが示唆された。

次に我々はBAPS移植部に門脈が再生する際に、門脈狭窄をきたさないかを検討するため、再生した門脈の面積の縮小率の測定を行った。門脈の欠損部をシートによって修復し、その修復部に血管を再生させるということは、欠損部においては、創傷治癒が起こることである。創傷治癒の通常の経過は癒痕収縮であり、本研究においても、シート移植部に癒痕収縮が起こり、シート移植部が狭窄することが危惧されたため、シート移植後の面積を評価する必要があると考えた^{15,16)}。我々の過去の下大静脈および胃の検討^{2,10)}では、BAPS移植後3か月で狭窄はプラトーに達し、進行しないことがわかっている。そこで、移植後3か月における移植部面積を調べることで最終的な狭窄の程度がわかると考えた。結果としては、移植部は約72%の縮小のみであり、狭窄はほぼないことが証明された。ブタはいずれも経口摂取や体重増加において良好な術後経過をたどっており、門脈血流にも問題がなかったことがわかる。今回の実験では縮小率が小さく狭窄は問題にならなかったが、実際の臨床で応用する場合には、縮小率を考慮してBAPSを門脈欠損部の130-140%程度の大きさにデザインして移植する方がいいかもしれない。

吸収性材料による人工静脈は研究が少なく、今回の実験はとても画期的な研究結果であると考えられる。またBAPSは工学系で生産可能であり他の血管再建の方法と比較しても安価である点も理想的と思われる。今回の実験のLimitationとしては長期的な経過が不明である点が挙げられる。今回は移植後2週間の早期、3か月の中期を評価したが今後さらなる長期的な経過を評価する必要がある。瘤形成や移植部の縮小率に関しても以前の報告から長期的にも問題ないことが予想されているが、実際に実験で確認する必要があるだろう。さらに腹腔内での癌の浸潤による門脈再建においては、切除範囲が広範囲になってしまう場合もあるため、環状移植において本BAPSが使用可能なのか、今後さらなる研究が必要である。ただし、今回の実験で術直後から早期にかけて血液の漏れを認めないことが証明されているため、移植後に狭窄の有無を注意深く観察する必要はあるものの、緊急時ならば環状移植に関しても本BAPSは使用可能であると考えられる。

結語として本BAPSは腹腔内手術において、緊急時に門脈の代替物として門脈再建に利用可能であることが示された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、我々の研究している生体吸収性人工静脈が、門脈再建に使用可能であることが示された。このような人工静脈を使用することにより、肝胆膵疾患の外科的治療の拡大が図られ、手術成績の向上に寄与すると考えられた。

【参考・引用文献】

1. Toshimitsu Y, Miyazawa M, Torii T, Koyama I, Ikada Y. Tissue-engineered patch for the reconstruction of inferior vena cava during living-donor liver transplantation. *J Gastrointest Surg.* 2005 ;9:789-93.
2. Akimoto N, Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, Aikawa M, Okada K, Otani Y, Koyama I, Ikada Y. Regeneration of the inferior vena cava with a bioabsorbable polymer implant: a histological study. *J Surg Res.* 2008 ;144(1):22-8.
3. Kenny DA, Berger K, Walker MW. Experimental comparison of the thrombogenesis of fibrin and PTFE flow surface. *Ann Surg* 1980;191:355-361
4. Rabih O. Darouiche: Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.* 2004 Apr 1;350(14):1422-9.
5. Kaihara S, Kim S, Benvenuto M, et al. End-to-end anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel. *Tissue Eng* 1999;5:339-346.
6. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004;35:562-569.
7. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001; 344: 532-533.
8. Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:475-485.
9. Kumar TR, Krishnan LK. A stable matrix for generation of tissue-engineered nonthrombogenic vascular grafts. *Tissue Eng* 2002;8:763-770.
10. Miyazawa M, Aikawa M, Watanabe Y, Takase K, Okamoto K, Shrestha S, Okada K, Koyama I, Ikada Y. Extensive regeneration of the stomach using bioabsorbable polymer sheets. *Surgery.* 158(5):1283-1290, (2015).
11. Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, Okada K, Akimoto N, Sato H, Koyama I, Yamaguchi S, Ikada Y. A bioabsorbable polymer patch for the treatment of esophageal defect in a porcine model. *J Gastroenterol.* 48(7):822-9, (2013).
12. Miyazawa M, Aikawa M, Okada K, Toshimitsu Y, Okamoto K, Koyama I, Ikada Y. Regeneration of extrahepatic bile ducts by tissue engineering with a bioabsorbable polymer. *J Artif Organs.* 15:26-31, (2012).
13. Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, Okada K, Koyama I, Ikada Y. A tissue-engineered artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant.* 5(6):1541-7, (2005).
14. Hattori K, Tomita N, Tamai S, Ikada Y. Bioabsorbable thread for tight tying of bones. *J Orthop Sci* 2000;5:57-63
15. Elisabeth MZ, Oleg T, Michael Z, Adam LD, Julie RM, Erika G, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007; 13(8):952-961
16. Peng HW, Ben SH, Huann CH, Chang CY, Yi JC. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2018; 81(2): 94-101