

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

再生医療型心臓弁の臨床応用（大動物における前臨床試験）

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター臓器移植部長

研究要旨 脱細胞化心臓弁について、ミニブタを用いた同種移植実験にて有効性を検討した。大動脈弁では内膜の肥厚化や石灰化の所見が見られたが、肺動脈弁では全く見られず、良好な結果が得られた。肺動脈弁については、早期の臨床応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

組織バンクの整備により、我が国でも漸く組織移植が実施され始めた。国立循環器病センターでも平成11年には組織バンクを、平成16年には西日本組織移植ネットワークを設立し、主として心臓弁や血管等の循環器系組織の移植を実施している。しかしながら、年間の提供数は数十件程度に留まっており、年間1万件を超える心臓弁置換術における代用弁としてはとうてい足りない。米国では凍結保存した同種組織移植が商業化されており、例えば代表的企業であるクライオライフ社（ジョージア州）では、1年間に心臓弁を2,800個、血管を3,200本も出荷し、30億円以上を売り上げている（2003年、同社年次報告）。それでもなお提供数が足りないとして、同社は抗原性除去処理（SynerGraft®処理）したブタ組織を商品化している。しかしながら、感染事故を契機とした処理方法の安全性への疑念から、米国食品医薬品局の指導によって現在は製造中止状態にある。我々は、我が国での移植組織の不足を補うべく、脱細胞化処理した心臓弁の組織移植を目指している。提供された同種心臓弁は、その数割が感染等の理由で臨床使用できずに破棄されている。本研究では、それらの破棄される心臓弁を脱細胞化処理することによって、有効利用することができる。また、動物、特にブタ組織を脱細胞化することによって、提供不足を完全に解決することも夢ではない。ブタの心臓弁は、現在でも異種生体弁として、我が国でも年間3千個が使用されている。しかし、異種生体弁は、抗原性の問題からグ

ルタルアルデヒドによって固定化されており、移植後も機能は維持していても組織的には異物のまま留まっている。自己細胞が浸潤しないことと、固定剤の影響のため、徐々に石灰化反応が起こり、いずれ機能も廃疾してしまう。脱細胞化組織では固定化していないため、移植後に自己細胞が浸潤し、ブタ組織であっても、最終的には自己組織と置換されると考えられる。

本分担研究では、近い将来の臨床応用を目指し、超高静水圧及びマイクロ波照射下洗浄にて脱細胞化した肺動脈弁及び大動脈弁を、ミニブタを用いた同種移植実験によって評価した。

B. 研究方法

脱細胞化処理：クラウン系ミニブタ（株）ジャパンファーム）から清潔下にてブタ心臓を摘出し、大動脈弁を採取した。生理食塩水で洗浄後、冷間等方圧加圧装置（神戸製鋼所製Dr. CHEF）を用いた低温下超高压印加処理（4℃、10,000気圧）によってドナー細胞を破壊し、マイクロ波照射下（株）東屋医科機械製）にてPBS溶液にて洗浄除去した。

移植実験：クラウン系ミニブタ6頭を用い、3頭は、左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術にて、脱細胞化同種大動脈弁導管部による大動脈置換手術を行った。残り3頭は、右心バイパス下にて、脱細胞化同種肺動脈弁による肺動脈弁置換手術を行った。術後6ヶ月において、移植組織を摘出し、通常のHE染色の他、坑CD3（T細胞）免疫染色、及びvon Kossa染色（石灰化）によ

て組織学的所見を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、上記法律及び基準に則った国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。また、研究に利用されるヒト組織は厚生労働省の指針に沿って、臨床応用に適さない場合の研究目的使用に関して「屍体からの人組織採取・保存・利用に関する取扱い基準」に従い、組織提供の際の説明(インフォームドコンセント)により文書での同意を得ることで、施設内倫理委員会から承認を得た。

C. 研究結果

脱細胞化した同種肺動脈部及び大動脈弁導管部ともに、全例において移植後の破断や膨潤等の所見は見られなかった。

図1に示すように、細胞浸潤はともに良好であったが、両組織の導管部を比較すると、大動脈弁導管部中心部で細胞の見られない領域があった。細胞の浸潤部位はともに、吻合部並びに血管内腔面、及び外周組織からの全外周面からに渡ると思われが、大動脈では外周部からが顕著であった。また、大動脈では、内腔面に新たな内膜が肥厚化している所見も見られた(図1右下)が、肺動脈では見られなかった。

図2に示すように、大動脈弁導管部では石灰化も見られた。特に前述の組織中心部に顕著で、その形態はエラスチン線維の走行に並行しているように思われた。これに対して、肺動脈弁では、弁葉部及び導管部ともに石灰化は全く認められなかった。

図3に示すように、T細胞の浸潤は大動脈弁導管部の方がやや顕著であったが、いずれも軽微であった。

D. 考察

今回は、脱細胞化同種組織について、肺動脈弁同所性移植実験と大動脈弁導管部を用いた異所性実験について比較検討した。大動脈弁の同所性移植は、手術手技の難度や人工心肺等のコスト等から見送った。両組織とも、破断や膨潤は見られず、脱細胞化処理においても生体力学特性が十分維持されていると思われる。組織学的に検討したところ、両組織とも細胞浸潤は盛んであった。大動脈弁導管部の方が、細胞浸潤が遅いように思われるが、肺動脈に比べて大動脈の方が、導管部の組織が厚いためと思われる。また、大動脈では内膜肥厚の所見あるいは一部において狭窄傾向も見られたが、肺動脈では見られず、その理由は不明である。また、大動脈では石灰化の所見も全例で見られたが、肺動脈では全く見られず、その理由も詳細は不明である。エラスチンの変性や細胞膜成分の残存が考えられるが、今後の検討課題であり、より詳細な検討を行いたい。炎症反応は、両組織とも軽微であった。同種肺動脈弁に関しては、臨床的には問題が無く、より長期の動物実験による検証後、早期の臨床応用が可能であると考えられる。大動脈弁及び異種組織に関しては、更なる検討が必要であろう。

既に市販されている米国CryoLife社のブタ組織を脱細胞化したSynerGraft弁では、死亡事故も報告されており、同社は当該製品を製造中止にしている。これは脱細胞化が不十分であったのではないかと推測されている。一方、独国フンボルト大学のKonertz教授らのグループは、脱細胞化に薬液処理のみを行っているが、用いる界面活性剤等を工夫することで、臨床でも優れた成績を報告している。我々も早期の臨床応用を実施し、我が国発の再生型組織移植技術を確立する必要がある。

E. 結論

脱細胞化心臓弁について、ミニブタを用いた同種移植実験にて有効性を検討したところ、肺動脈弁では狭窄や石灰化等の病変は見られず、良好な結果が得られた。より長期の動物実験による有効性の確認後、臨床応用へと移行したい。

研究協力者

山崎祥子 国立循環器病センター心臓血管外科
殷 猛 国立循環器病センター臓器移植部
西岡 宏 ヒューマンサイエンス振興財団
吉田謙一 先端医療振興財団

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishida M, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Fukushima S, Kitamura S. Comparison of off-pump coronary artery bypass grafting in midterm results. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 52 (5): 240-6.
- 2) Matsuura K, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Yagihara T, Kitamura S. Rationale for off-pump coronary revascularization to small branches - angiographic study of 1,283 anastomoses in 408 patients. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1530-4.
- 3) Tagusari O, Ogino H, Kobayashi J, Bando K, Minatoya K, Sasaki H, Niwaya K, Okita Y, Ando M, Yagihara T, Kitamura S. Should the transverse aortic arch be replaced simultaneously with aortic root replacement for annuloarortic ectasia in marfan syndrome? *J Thoracic & Cardiovasc Surg* 2004; 127 (5): 1373-80.
- 4) Tagusari O, Kobayashi J, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Total arterial off-pump coronary artery bypass grafting for revascularization of the total coronary system: Clinical outcome and angiographic evaluation. *Ann Thorac Surg* 2004; 78 (4): 1304-11.
- 5) Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Yin M, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Preparation and recellularization of tissue engineered bioscaffold for heart valve replacement. In Mori H, Matsuda H. ed. *Cardiovascular regeneration therapies using tissue engineering approaches*. Springer-Verlag, Tokyo.

2004; 83-94.

- 6) Numata S, Fujisato T, Niwaya K, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Kitamura S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved allograft. *J Heart Valve Dis* 2004; 13 (5): 984-90.

学会発表

- 1) Fujisato T, Funamoto S, Nishioka H, Kamata W, Yamahigashi N, Yoshida K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular wall cell injection and endothelial cell seeding to tissue scaffold acellularized by cold isostatic pressing. 7th World Biomaterials Congress, 口頭, 2004年5月17~21日, シドニー.
- 2) 藤里俊哉, 西岡 宏, 吉田謙一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 菅 理晴, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体組織の脱細胞化処理による再生型移植組織の開発. 第11回日本臓器生物医学会総会, 口頭, 2004年5月21~22日, 広島.
- 3) 藤里俊哉, 吉田謙一, 西岡 宏, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超圧処理による安全な再生型移植組織. 第7回日本組織工学会, 口頭, 2004年7月1~2日, 東京.
- 4) Fujisato T, Yoshida K, Nishioka H, Yamazaki S, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Novel tissue processing for xenograft valve transplantation secure from xenogeneic rejection and unknown animal related infection: PowerGraft. *Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves*. ポスター. 2004年9月15~18日, フィレンツェ.
- 5) Minatoya K, Fujisato T, Yamazaki S, Yin M, Yoshida K, Nishioka H, Niwaya K, Ogino H, Ishibashi-Ueda H, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. A tissue engineered aorta and aortic root in a porcine model: novel tissue processing of acellularization by

- ultrahigh pressure treatment. *Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves*, ポスター. 2004年9月15～18日、フイレンツェ.
- 6) 吉田謙一、西岡 宏、澤田和也、藤里俊哉、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 細胞を除去した生物組織由来繊維素材による再生型組織移植. 2004年度繊維学会秋季研究発表会、ポスター. 2004年9月30～10月1日、熊本.
 - 7) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡宏、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高压による脱細胞化生体組織. 第42回日本人工臓器学会大会、口頭. 2004年10月5～7日、東京.
 - 8) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、沼田 智、湊谷謙司、庭屋和夫、菅 理晴、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 基材として脱細胞化組織を用いたハイブリッド血管・心臓弁. 第42回日本人工臓器学会大会、パネルディスカッション. 2004年10月5～7日、東京.
 - 9) 岸田晶夫、藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、沼田 智、湊谷謙司、庭屋和夫、菅理 晴、中谷武嗣、北村惣一郎. 血行再建における人工臓器と再生医療. 第42回日本人工臓器学会大会. シンポジウム. 2004年10月5～7日、東京.
 - 10) Fujisato T, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular tissue regeneration using bioscaffold acellularized by ultrahigh pressure treatment. Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society, ポスター. 2004年10月10～13日、ローザンヌ.
 - 11) 舘 義人、吉田謙一、殷 猛、山崎祥子、藤里俊哉、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 脱細胞化生体組織による再生型同種組織移植. 第18回日本エム・イー学会秋季大会、ポスター. 2004年11月4～6日、松山.
 - 12) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、殷 猛、山崎祥子、澤田和也、湊谷謙司、庭屋和夫、菅理晴、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高压処理による脱細胞化生体組織: パワーグ
ラフト. 日本バイオマテリアルシンポジウム2004、シンポジウム. 2004年11月15～16日、つくば.
 - 13) 藤里俊哉、沼田 智、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医学技術を用いた生体組織の再生. 第9回関西大学先端科学シンポジウム、招待講演. 2005年1月17～18日、吹田.
 - 14) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、山崎祥子、殷 猛、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 脱細胞化生体スキャフォールドを用いた組織再生. 第17回バイオエンジニアリング講演会. 2005年1月22～23日、名古屋.
 - 15) 湊谷謙司、藤里俊哉、山崎祥子、殷 猛、吉田謙一、西岡 宏、荻野 均、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 新しい脱細胞化処理を施したブタの大動脈弁同種移植実験の検討. 第4回日本再生医療学会総会、ポスター. 2005年3月1～2日、大阪.
 - 16) 殷 猛、庭屋和夫、山崎祥子、吉田謙一、西岡 宏、藤里俊哉、湊谷謙司、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 脱細胞化心臓弁による組織再生. 第3回再生心臓血管外科治療研究会、口頭. 005年2月23日、浜松.
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む.)
なし

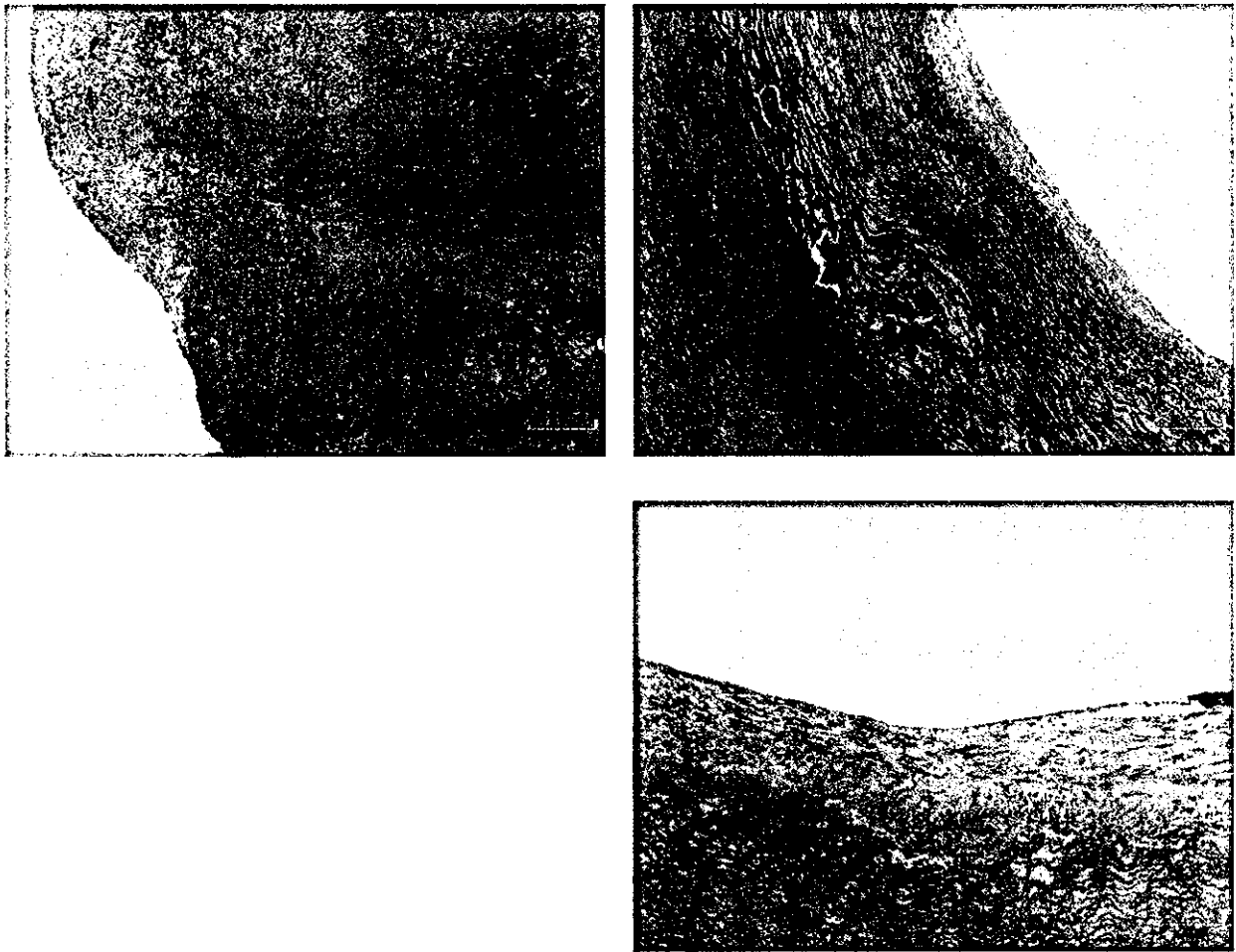


図1. 移植6ヶ月後の脱細胞化組織（左：肺動脈弁、右：大動脈弁導管部）

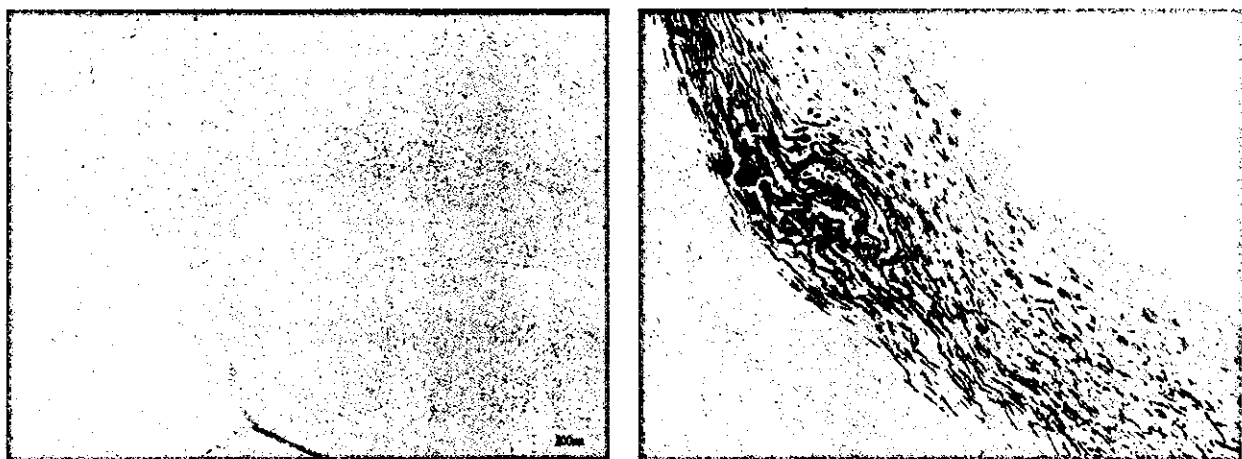


図2. 移植6ヶ月後の脱細胞化組織の石灰化（左：肺動脈弁、右：大動脈弁導管部）



図3. 移植6ヶ月後の脱細胞化組織の炎症反応（左：肺動脈弁、右：大動脈弁導管部）

異種心臓弁採取動物の安全性

分担研究者 吉田光敏 鹿児島大学農学部教授

研究要旨 ブタ生殖細胞系列におけるブタ内在性レトロウイルス（PERV）外被領域遺伝子DNAおよびRNAのモニタリングを実施した。その結果、卵子、卵丘細胞および精子には全てのタイプのPERV外被領域遺伝子DNAが存在し、卵子および卵丘細胞においては同RNAが検出された。一方、PERV制御においても必要不可欠な新規遺伝子改変技術の開発を胚性遺伝子であり拒絶反応に関与するブタ α -1,3ガラクトシルトランスフェラーゼ（pPGT-3）遺伝子を標的として検討した結果、pPGT-3遺伝子に対して設計した二本鎖RNAおよび短鎖RNA発現DNAベクターはpPGT-3遺伝子発現を抑制し、RNA干渉法を利用したブタ胚における遺伝子発現制御の有効性が示された。

A. 研究目的

ミニブタはヒトと類似した心臓血管系や臓器・組織を持ち、体型的にもヒトと近く実験動物やヒト疾患モデル、ヒトへの臓器および組織用の異種移植ドナーとして好適である。本研究は、鹿児島大学農学部で開発されたクラウン系ミニブタの育種・繁殖における外因性および内因性微生物のモニタリングおよびそれらの制御に必要な不可欠な発生工学的技術の高度化を検討し、安全に異種心臓弁採取ミニブタを供給するシステムの確立を目的として、本年度は以下に掲げた項目について実験を行った。1) ブタ生殖細胞系列におけるブタ内在性レトロウイルス（PERV）外被（env）領域遺伝子DNAおよびRNAのモニタリング、および2) 胚性遺伝子でありかつ超急性拒絶反応に関与する α -1,3ガラクトシルトランスフェラーゼ（pPGT-3）遺伝子を標的としたRNA干渉（RNAi）技術の開発。

B. 研究方法

実験1：ブタ生殖細胞系列におけるPERV-env領域遺伝子DNAおよびRNAのモニタリングを行った。

食肉センター由来の交雑種ブタ卵巣から卵丘細胞-卵子複合体を採取し、採取直後に卵核胞期

（GV）卵子およびその周囲の卵丘細胞を、体外成熟42時間後に第2減数分裂中期（MII）卵子およびその周囲の卵丘細胞を回収し、実験に用いた。精子はパークシャー種雄6頭およびクラウン系ミニブタ種雄2頭より採取した射出精子を実験に用いた。**実験1-1**：卵子、卵丘細胞および精子におけるPERV-env領域遺伝子の有無をPCR法で調べた。DNeasy Tissue Kit等を用いて卵子、卵丘細胞および精子よりDNAを抽出した。DNAは3種（A、B、C型）のPERV-env領域遺伝子特異的プライマー対を用いてPCRを行った。PCR増幅産物はアガロースゲルで電気泳動後、標的バンド（A型；320 bp、B型；223 bp、C型；280 bp）の検出状況を観察した。**実験1-2**：卵子および卵丘細胞におけるPERV-env領域遺伝子発現活性を逆転写（RT）-PCR法で調べた。RNeasy Mini Kit等を用いて卵子および卵丘細胞より総RNAを抽出した。RT反応により総RNAからcDNAを作製し、3種（A、B、C型）のPERV-env領域遺伝子特異的プライマー対を用いてPCR反応を行った。RT-PCR増幅産物はアガロースゲルで電気泳動し、標的バンドの検出状況を観察し、遺伝子発現状況を調べた。

実験2：pPGT-3遺伝子mRNAに対する二本鎖（ds）RNAの卵細胞質への顕微注入が注入卵の発生状況

およびpPGT-3遺伝子発現状況に及ぼす影響を調べた。pPGT-3遺伝子mRNA翻訳領域に対応するセンスRNAとアンチセンスRNAを設計、試験管内転写法によりdsRNAを合成した。そして、MII卵子細胞質にdsRNA溶液を顕微注入、顕微注入卵は電気的活性化 (DC100V/mm・50 μ sec・1回) 処理とサイトカラシンB処理を併用して単為発生を誘起後、発生培地にて7日間培養した。その後、胚盤胞へ発生した胚RNAを個別に抽出、pPGT-3遺伝子発現状況をRT-PCR法により調べ、対照区と比べた。

実験3：pPGT-3遺伝子mRNAに対する短鎖 (si) RNA発現DNAベクターの前核への顕微注入が注入卵の発生状況およびpPGT-3遺伝子発現状況に及ぼす影響を調べた。

pPGT-3遺伝子に対応するヒトU6プロモーターを組み込んだステムルーブタイプのsiRNA発現ベクターDNA (3814bp) を2種構築した (P591およびP961)。そして、体外成熟・体外受精由来雌雄前核形成卵の片側前核へsiRNA発現ベクターDNAを顕微注入し、発生培地にて8日間培養した。その後、脱出胚盤胞期へ発生した胚RNAを個別に抽出、pPGT-3遺伝子発現状況をRT-PCR法により調べ、対照区と比べた。

なお、実験2および3において標的バンドの蛍光強度は次の5段階に分類した。+++区；サイズマーカーの500bpバンドの蛍光より強いもの、++区；400bp~500bpバンド蛍光の間程度のもの、+区；400bpバンド蛍光よりやや弱いもの、±区；不明瞭なもの、-区；全くバンドが確認できないもの (図1)。

(倫理面への配慮)

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号) 及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号) に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。

C. 研究結果

実験1：ブタ生殖細胞系列におけるPERV-env領域遺伝子のモニタリング結果は表1~表3に

示した。実験1-1：卵子、卵丘細胞および精子におけるすべての検査材料において、A、B、C型3種のPERV-env領域遺伝子の内、1種以上が検出され、PERV-freeのものは見られなかった。特に、パークシャー種雄4個体、ミニブタ種雄2個体および卵丘細胞材料すべてでは、A、B、C型3種のPERV-env領域遺伝子が存在した。実験1-2：卵子および卵丘細胞において、PERV-env領域遺伝子発現が観察され、特に、卵丘細胞材料では、A、B、C型3種のPERV-env領域遺伝子発現がすべて高かった。

実験2：pPGT-3遺伝子発現率はdsRNA注入区で対照区と比べて有意に減少した ($P<0.05$)。しかし、卵割率や胚盤胞形成率にdsRNA注入の有無で差はなかった。

実験3：pPGT-3遺伝子発現率はP961ベクターDNA注入区で対照区と比べて有意に減少した ($P<0.05$) (表4)。さらに、明瞭な標的バンド (+~+++区) を示した胚の割合はP591ベクターDNA注入区で対照区と比べて有意に減少した ($P<0.05$) (表5)。しかし、卵割率や胚盤胞形成率はベクターDNA注入区で対照区と比べて有意に減少した ($P<0.05$)。

D. 考察

本研究の結果から、ブタ生殖細胞 (卵子、卵丘細胞および精子) はPERV外被領域遺伝子プロウイルス性DNAを持っており、また、ブタ雌性生殖細胞 (卵子および卵丘細胞) においてはPERV外被領域遺伝子が発現していることが初めて示された。さらに、ブタpPGT-3遺伝子に対して設計したdsRNAおよびsiRNA発現DNAベクターはpPGT-3遺伝子発現を抑制し、RNAi法を利用した胚におけるpPGT-3遺伝子発現制御の有効性が初めて実証された。

内在性レトロウイルスは病原性の外来性レトロウイルスの感染を阻止したり、転写エレメントとして機能していることが知られている。反対に内在性レトロウイルスが外来性レトロウイルスの感染を助長するとの指摘がある。

一方、現行の体外受精および体細胞クローン等の発生工学的実験では、病原体の伝播の可能性は汚染した取り扱い者・器具・機材、卵子および精液等の生殖細胞、培地や還流液などが考えられる。生殖細胞以外は滅菌済みのものを購入するか

自家滅菌をすることで病原体フリーの清浄化対策を実行できる。一方、卵子については食肉センターで安価でかつ大量に採取可能な産業雌ブタ由来のもの広く用いられてきた。しかし、産業雌ブタの生前の微生物感染状況は不明であり、感染症伝播のリスクが大きい。実験1の結果により、ブタ生殖細胞系列におけるPERV-env領域遺伝子潜伏とその発現状況が明らかとなり、生殖細胞を通じた遺伝子感染が広く現存していることが示された。今後、生殖細胞を通じた遺伝子感染において、PERVの重要な構造要素である逆転写酵素領域およびその内部構造タンパク質遺伝子についてもさらに調べる必要がある。

実験2および3の結果から、pPGT-3遺伝子発現が見られなかった胚盤胞の割合は、dsRNAやsiRNA発現ベクター注入区で著しく増加した。未受精卵の時から発現している遺伝子ではRNAiが機能してもタンパク質の分解を待たなければならず、RNAiの効果は観察できない。しかし、pPGT-3遺伝子遺伝子がブタでは胚盤胞期以降に発現することを我々は初めて明らかにしており、細胞内に導入されたdsRNAやsiRNA発現ベクターからの産物は、卵細胞内で保持され、pPGT-3遺伝子発現活性が劇的に増加する胚盤胞期でその抑制効果を顕著に示したと考えられる。

RNAi法は標的遺伝子に対応するdsRNAが導入されると、対応するmRNAが分解する結果、タンパク質合成が阻害されるという、ポストトランスクリプション機構である。同法は遺伝子ノックアウトよりもはるかに簡便に標的遺伝子の機能を阻害できることが示唆されてきたが、ブタ胚においてRNAiを介して標的遺伝子のノックダウンを誘起できること初めて明らかとなった。従って、今後、PERV遺伝子制御に同法の利用が期待でき、より安全に異種心臓弁採取ミニブタを供給するシステム確立への応用を目指したい。

E. 結論

ブタ生殖細胞系列におけるPERV-env領域遺伝子DNAおよびRNAのモニタリングを実施した。その結果、卵子、卵丘細胞および精子には全てのタイプのPERV外被領域遺伝子DNAが存在し、卵子および卵丘細胞においては同RNAが検出された。一方、PERV制御においても必要不可欠な新規遺伝子改変技術の開発を胚性遺伝子であり拒絶反応に関

与するブタ α -1,3ガラクトシルトランスフェラーゼ(pPGT-3)遺伝子を標的として検討した結果、pPGT-3遺伝子に対して設計した二本鎖RNAおよび短鎖RNA発現DNAベクターはpPGT-3遺伝子発現を抑制し、RNA干渉法を利用したブタ胚における遺伝子発現制御の有効性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida M, Miyazaki N, Matsuba J, Yamanouchi T: Why does developmental potential differ between oocytes from prepubertal and adult pig? Proc.2nd International Symposium "Present and Future of Transgenic Cloned Pig Research", pp. 39-44, (2004)
- 2) Miyoshi K, Yuki Y, Yoshida M: J Reprod Dev in press

2. 学会発表

- 1) 遊木靖人、三好和睦、吉田光敏. ミニブタ体細胞クローン胚の作製に用いる融合および活性化培地中のカルシウム濃度の最適化. 日本繁殖生物学会第97回大会. 2004年.
- 2) 佐藤啓介、三好和睦、吉田光敏. 超音波を用いたブタ卵子の活性化. 日本繁殖生物学会第97回大会. 2004年.
- 3) 渡邊弘樹、窪田 力、三好和睦、吉田光敏. Flow-FISH法を用いたウシ精子DNAのテロメア長検出技術の開発. 日本繁殖生物学会第97回大会. 2004年.
- 4) 日巻武裕、糸井史陽、三好和睦、吉田光敏. ウシ卵子の成熟・受精・発生過程におけるプリオンタンパク質遺伝子発現. 日本畜産学会第104回大会. 2005年.
- 5) 佐藤啓介、三好和睦、吉田光敏. 超音波により活性化したミニブタ体細胞クローン胚の体外発生. 日本畜産学会第104回大会. 2005年.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)なし

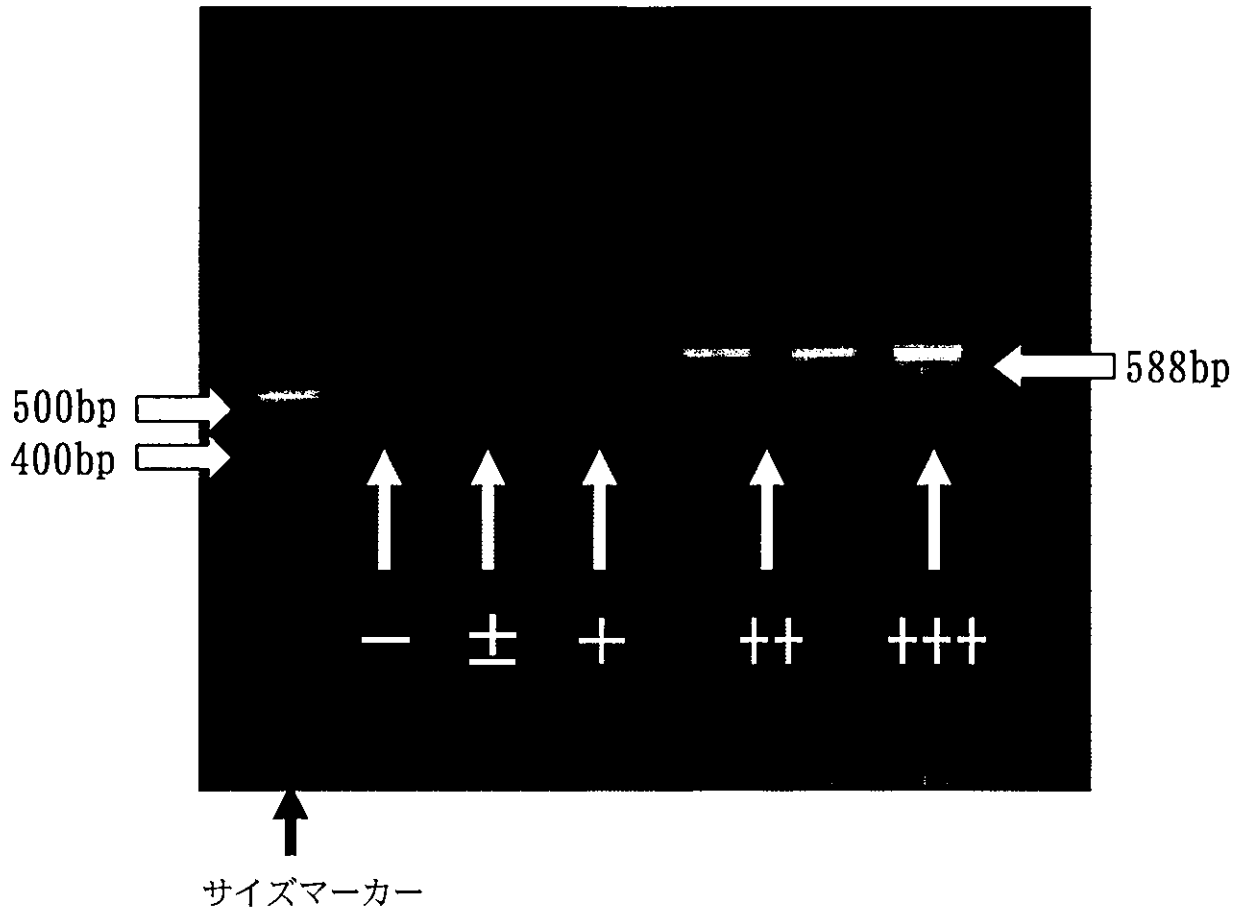


図 1. RT-PCR 法を用いた pPGT-3 遺伝子発現の泳動像および標的バンドの蛍光強度の分類
 +++ ; サイズマーカーの 500bp バンドの蛍光より強いもの
 ++ ; 400bp~500bp バンドの中間の蛍光程度のもの
 + ; 400bp バンド蛍光よりやや弱いもの
 ± ; 不明瞭なもの
 - ; 全くバンドが確認できないもの

表 1. PCR による雌性生殖細胞における PERV 外被領域遺伝子の検出結果

検査材料	検体数	PERV 外被領域 (env) 遺伝子の種類と DNA 検出状況 (%)		
		env-A	env-B	env-C
卵丘細胞	4	4 (100)	4 (100)	4 (100)
GV 卵子	3	2 (66.7)	2 (66.7)	3 (100)
MII 卵子	3	1 (33.3)	1 (33.3)	3 (100)

* GV; 卵核胞期, MII ; 第 2 減数分裂中期

表 2. PCR によるブタ精子における PERV 外被領域遺伝子の検出結果

個体 No.	品種	PERV 外被 (env) 領域遺伝子の種類と DNA 検出状況		
		env-A	env-B	env-C
1	パークシャー	+	+	+
2	パークシャー	-	+	+
3	パークシャー	+	+	+
4	パークシャー	+	+	+
5	パークシャー	+	-	+
6	パークシャー	+	+	+
7	クラウン系 ミニブタ	+	+	+
8	クラウン系 ミニブタ	+	+	+

* + : 検出可、- : 検出不可

表 3. RT-PCR によるブタ雌性生殖細胞系列における PERV 外被領域遺伝子の発現解析

検査材料	検体数	PERV 外被 (env) 領域遺伝子の種類と発現状況 (%)		
		env-A	env-B	env-C
卵丘細胞	9	7 (77.8)	8 (88.9)	8 (88.9)
GV 卵子	9	7 (77.8)	9 (100)	2 (22.2)
M II 卵子	10	4 (40.0)	1 (33.3)	1 (10.0)

* GV; 卵核胞期, M II ; 第 2 減数分裂中期

表 4. dsRNA 細胞質注入が pPGT-3 遺伝子発現に及ぼす影響

実験区	胚盤胞数	標的バンド検出状況* % (実数)		
		-	±	+~+++
対照	19	63.2 ^a (12)	10.5 (2)	26.3 ^c (5)
dsRNA 注入	26	92.3 ^b (24)	3.9 (1)	3.9 ^d (1)

* 図 1 に準ずる。

a vs. b: P<0.05, c vs. d: P<0.05

表 5. siRNAベクターDNAの顕微注入がpPGT-3遺伝子発現に及ぼす影響

実験区	胚盤胞数	標的バンド検出状況 % (実数)		
		-	±	+~+++
対照	31	35.5 ^a (11)	9.7 ^c (3)	54.8 ^e (17)
P597 注入	9	55.6 ^b (5)	44.4 ^d (4)	0.0 ^f (0)
P961 注入	10	70.0 ^b (7)	10.0 ^c (1)	20.0 ^f (2)

a vs. b: P<0.05, c vs. d: P<0.05, e vs. f: P<0.05

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
北村惣一郎	巻頭言	田中秀治、 篠崎尚史	移植コーディネーター 概論	へるす 出版	東京	2004	
中谷武嗣	人工心臓の現状と 将来	赤阪隆史、 吉川純一、 笠貫 宏、 土師一夫、 別府慎太郎、 松崎益徳	新・心臓病診療プラクテ イス 2. 心疾患の手術適応と 至適時期	文光堂	東京	2004	358-90
Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Yin M, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S	Preparation and recellularization of tissue engineered bioscaffold for heart valve replacement	Mori H, Matsuda H	Cardiovascular regeneration therapies using tissue engineering approaches	Springer- Verlag	Tokyo	2004	83-94

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishida M, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Fukushima S, Kitamura S	Comparison of off-pump coronary artery bypass grafting in midterm results	Jpn J Thorac Cardiovasc Surg	52 (5)	240-6	2004
Lee H, Tsukiya T, Homma A, Kanimura T, Takewa Y, Nishinaka T, Tatsumi E, Taenaka Y, Takeno H, Kitamura S	Observation of cavitation in a mechanical heart valve in a total artificial heart	ASAIO J	50	205-10	2004
Matsuura K, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Yagihara T, Kitamura S	Rationale for off-pump coronary revascularization to small branches - angiographic study of 1,283 anastomoses in 408 patients	Ann Thorac Surg	77	1530-4	2004
Tagusari O, Ogino H, Kobayashi J, Bando K, Minatoya K, Sasaki H, Niwaya K, Okita Y, Ando M, Yagihara T, Kitamura S	Should the transverse aortic arch be replaced simultaneously with aortic root replacement for annuloarortotic ectasia in marfan syndrome?	J Thoracic & Cardiovasc Surg	127 (5)	1373-80	2004
Tagusari O, Kobayashi J, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S	Total arterial off-pump coronary artery bypass grafting for revascularization of the total coronary system: Clinical outcome and angiographic evaluation	Ann Thorac Surg	78 (4)	1304-11	2004
中谷武嗣	補助循環と心臓移植	CURRENT THERAPY	22	175-80	2004
中谷武嗣	体外設置式補助人工心臓	Clinical Engineering	15	480-6	2004
中谷武嗣、工藤龍彦	人工肺・体外循環2	人工臓器	33	76-7	2004
中谷武嗣、富田伸司	骨髄幹細胞の心筋細胞への分化	生体の科学	55	334-7	2004

中谷武嗣	ここまで進んだ補助人工心臓	NHKきょうの健康	197	102-4	2004
中谷武嗣、花谷彰久	補助人工心臓、心臓移植時のBrain attack	Cardiovascular Med-Surg	6	499-502	2004
Ishida M, Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Hamamoto M, Nagaya N, Ohtsu Y, Suga M, Yutani C, Yagihara T, Yamada K, Kitamura S	Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy	J Heart Lung Transplant	23	436-45	2004
Hisashi Y, Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Yutani C, Kitamura S	Granulocyte-colony stimulating factor enhanced the recruitment of bone marrow cells into the heart: Time course evaluation of phenotypic differentiation in the doxorubici-induced cardiomyopathic model	Jpn J Thorac Cardiovasc Surg	52	451-5	2004
Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Yamashiro S, Sueda T, Yagihara T, Kitamura S	Granulocyte-colony stimulating factor directly enhances proliferation of human troponin I-positive cells derived from idiopathic dilated cardiomyopathy through specific receptors	J Heart Lung Transplant	23	1430-7	2004
Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A	Novel PVA-DNA nanoparticle prepared by ultra high pressure technology for gene delivery	Mater Sci Eng C	24	797-801	2004
Numata S, Fujisato T, Niwaya K, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Kitamura S	Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved allograft	J Heart Valve Dis	13 (5)	984-90	2004
Yoshida M, Miyazaki N, Matsuba J, Yamanouchi T	Why does developmental potential differ between oocytes from prepubertal and adult pig?	Proc 2nd Intl Symp "Present and Future of Transgenic Cloned Pig Research"		39-44	2004
Miyoshi K, Yuki Y, Yoshida M		J Reprod Dev		in press	

新聞報道等

論文タイトル名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
ブタ大動脈弁の脱細胞化に成功 ヒトへの異種移植に前進	日経バイオビジネス	日本経済新聞社	東京	2004年8月	21
心臓弁・血管再生 動物の組織活用	日本経済新聞	日本経済新聞社	東京	2004年11月22日	19
創造主義宣言 超テク国への道	日経産業新聞	日本経済新聞社	東京	2004年12月28日	1

Comparison of Off-pump and On-pump Coronary Artery Bypass Grafting in Midterm Results

Michiko Ishida, MD, Junjiro Kobayashi, MD, Osamu Tagusari, MD, Ko Bando, MD,
Kazuo Niwaya, MD, Hiroyuki Nakajima, MD, Satsuki Fukushima, MD,
and Soichiro Kitamura, MD.

From Department of Cardiovascular Surgery, National
Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan.

The Japanese Journal of THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY

*Official Publication of
The Japanese Association for Thoracic Surgery*

Vol. 52 No. 5, pp. 240–246, May, 2004

Comparison of Off-pump and On-pump Coronary Artery Bypass Grafting in Midterm Results

Objective: Off-pump coronary artery bypass grafting (OPCAB) has become a procedure of choice for surgical treatment of coronary artery disease. Although early advantages of OPCAB were confirmed in comparison with conventional on-pump coronary artery bypass grafting (CABG), late cardiac complications are still controversial. We examined midterm results of OPCAB compared with standard CABG. **Methods:** Between July 1997 and April 2002, 736 consecutive patients who underwent isolated CABG were retrospectively reviewed. The OPCAB group (Group I) comprised 357 patients (49%), and the on-pump CABG group (Group II) 379 patients (51%). Their preoperative, intraoperative, and follow-up data were analyzed. **Results:** The mean number of distal anastomoses and the early graft patency were not greatly different between the two groups. The actuarial survival rate at 3 years was not significantly different between Group I (98.3%) and Group II (98.2%) ($p=0.71$). The frequency of cardiac events was 4.2%/patient-year in Group I and 2.6%/patient-year in Group II ($p=0.12$). The actuarial event free rates were not different between the two groups ($p=0.61$). The cardiac event free rates at 3 years were significantly ($p=0.011$) higher in patients with complete revascularization (96.7%) than without complete revascularization in Group I (69.2%) and in Group II (92.7% versus 85.9%, $p=0.026$). **Conclusions:** Midterm clinical outcome in OPCAB is as good as conventional on-pump CABG. Incomplete revascularization caused cardiac events more frequently than complete revascularization both in OPCAB and on-pump CABG in the intermediate follow-up. (Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 2004; 52: 240–246)

Key words: coronary artery bypass grafting, minimally invasive cardiac surgery

Michiko Ishida, MD, Junjiro Kobayashi, MD, Osamu Tagusari, MD, Ko Bando, MD, Kazuo Niwaya, MD, Hiroyuki Nakajima, MD, Satsuki Fukushima, MD, and Soichiro Kitamura, MD.

Off-pump coronary artery bypass grafting (OPCAB) has become a procedure of choice in patients with operative risk factors for cardiopulmonary bypass (CPB). The frequency of OPCAB has increased gradually¹ because CPB induces a systemic inflammatory response and other adverse consequences. Improved stabilizers and other instruments have also accelerated the increase of OPCAB.

The advantages of OPCAB were reduction in operation time, bleeding, hospitalization, transfusion, and early morbidity. Although early graft patency of OP-

CAB is comparable with conventional coronary artery bypass grafting (CABG) with CPB, the difference in the cardiac event free rate between OPCAB and conventional on-pump CABG is still controversial. The lower number of grafts and quality of anastomosis may affect those long-term outcomes.

In the present study, we retrospectively examined the morbidity after discharge associated with CABG and assessed the efficacy of OPCAB, compared with conventional on-pump CABG.

Subjects and Methods

Between July 1997 and April 2002, 736 consecutive patients who underwent isolated CABG in our institution were retrospectively reviewed. The OPCAB group (Group I) comprised 357 patients (49%), and the on-pump CABG group (Group II) 379 (51%). Preoperative demographic data are summarized in Table I. The

From Department of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan.

Received for publication September 10, 2003.

Accepted for publication December 5, 2003.

Address for reprints: Junjiro Kobayashi, MD, Department of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan.

Table I. Baseline characteristics

Variables	Group I (n=357)	Group II (n=379)	p value
Clinical characteristics			
Age, mean (SD) (year)	66.6 (8.8)	64.6 (8.8)	0.013
Male, %	83.2	86.3	0.24
Angiographic profile			
Left main disease, %	25.2	24.2	0.77
One-vessel disease, %	4.5	1.6	0.02
Two-vessel disease, %	14.6	17.7	0.25
Three-vessel disease, %	55.7	56.5	0.84
Cardiac profile			
Unstable angina, %	22.7	28.5	0.07
Acute myocardial infarction, %	5.3	4.0	0.38
Previous myocardial infarction, %	28.9	24.0	0.14
Poor ejection fraction (<30%), %	3.4	3.7	0.81
Redo surgery, %	2.5	5.8	0.03
Emergency surgery, %	8.4	9.0	0.78
Preoperative IABP, %	2.2	4.5	0.09
Comorbidity			
Hypertension, %	65.0	68.1	0.37
Diabetes, %	46.2	47.0	0.84
Hyperlipidemia, %	54.9	49.3	0.13
Cerebral vascular disease, %	18.8	11.6	0.0067
Chronic renal failure, %	9.0	3.2	0.0009
Dialysis, %	3.4	1.6	0.12
Chronic pulmonary obstructive disease, %	2.0	2.9	0.41

IABP, Intra-aortic balloon pumping.

mean age at operation was significantly older in Group I (66.6±8.8 years) than in Group II (64.6±8.8 years) (p=0.013). OPCAB was performed more frequently in patients with cerebral vascular disease and chronic renal failure. Redo CABG was more frequently performed with cardiopulmonary bypass. About 2 weeks after the operation, 670 patients (91%) underwent coronary and graft angiography.

Follow-up data were compiled by April 30, 2002. The data of patients followed up in our out-patient clinic were obtained from their records. The data of other patients were obtained by primarily questionnaires and telephone interviews. The follow-up was completed in 100% of the patients. The interval from the operation was 1.0±0.8 years in Group I, and 3.2±1.0 years in Group II (p<0.0001). In the early series, patients with single vessel disease and who needed less distal anastomoses were assigned for OPCAB (Group I). During this period, OPCAB has gradually increased and replaced on-pump CABG (Fig. 1). The occurrence of new cardiac events after discharge, such as admission for congestive heart failure and tachyarrhythmia, refractory angina requiring angioplasty or redo CABG, acute myocardial infarction, or cardiac death was con-

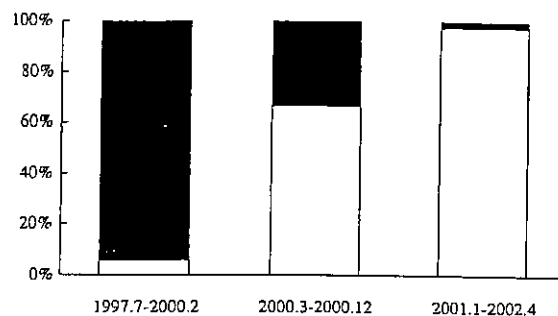


Fig. 1. Percentage for patients with OPCAB or on-pump CABG. OPCAB has gradually increased and replaced on-pump CABG.

□ Group I, ■ Group II.

ducted. Late coronary angiography was performed for patients with recurrent ischemic events on symptoms.²

Complete revascularization was defined as the revascularization of at least one bypass in each of the three major coronary artery systems diseased, and not being necessary to bypass every stenotic vessels, regardless of the number involved.³⁻¹⁰

Table II. Intraoperative characteristics

Variables	Group I (n=357)	Group II (n=379)	p value
Number of distal anastomoses,			
mean (SD)	3.1 (1.0)	3.2 (1.0)	0.074
Arterial graft bypass, %	93.2	58.3	<0.0001
Grafted vessel, %			
LAD	99.7	100	0.98
Dx	36.7	34.6	0.14
HL or OM	29.1	46.4	<0.0001
PL	57.1	54.1	0.45
4AV	23.5	17.2	0.04
PDA	49.3	49.9	0.94
RCA	8.1	17.4	0.0003
Early graft patency, %	96.9	97.1	0.80
Complete revascularization, %	73.4	77.8	0.17

LAD, Left anterior descending artery; Dx, diagonal branch; HL, high lateral branch; OM, obtuse marginal branch; PL, posterolateral branch; AV, atrioventricular artery; PDA, posterior descending artery; RCA, right coronary artery.

Operative technique. Conventional CABG was performed with CPB using an ascending aortic perfusion cannula and single venous cannula. Myocardial protection was achieved with antegrade and retrograde tepid blood cardioplegic arrest under aortic cross-clamping. OPCAB was performed through a median sternotomy. The details of the procedure were previously described.¹¹ Partial clamping of the ascending aorta was performed for the proximal anastomosis in 27 patients (7.6%). In 330 patients (92.4%), OPCAB was performed by the aorta "no-touch" technique with a combination of in situ and composite grafting.

Statistical analysis. Values are presented as means \pm standard deviations. Continuous variables were compared by the Wilcoxon rank sum test and discrete variables were analyzed using Fisher's exact test. Probability of survival or event free rate was calculated by the Kaplan-Meier life-table method and differences were analyzed by Mantel-Cox. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

The mean number of distal anastomoses was 3.1 ± 1.0 in Group I, and 3.2 ± 1.0 in Group II ($p = 0.074$). The arterial grafts were more frequently used in Group I (93.2% of all grafts) than in Group II (58.3%) ($p < 0.0001$). Anastomosis was more frequently performed for the atrioventricular artery (AV) in Group I ($p = 0.04$), and for the high lateral branch (HL) or the

obtuse marginal branch (OM) and the right coronary artery (RCA) in Group II ($p < 0.0001$, 0.0003 , respectively). The early graft patency was not significantly different between the two groups (96.9% in Group I and 97.1% in Group II, $p = 0.80$) (Table II).

The incidence and causes of early and late events are listed in Table III. The actuarial survival rate at 3 years in Group I ($98.3 \pm 0.8\%$) was not significantly different from that in Group II ($98.2 \pm 0.7\%$) ($p = 0.71$) (Fig. 2). The incidence of hospital deaths in Group I (1.4%) was not significantly different from that in Group II (1.3%) ($p = 0.92$). The late mortality was 5 patients (1.4%) in Group I and 3 (0.8%) in Group II. Cardiac events occurred in 15 patients (4.2%) in Group I and 32 (8.4%) in Group II (Table III). The frequency of cardiac events after discharge was $4.2 \pm 1.1\%$ /patient-year in Group I and $2.6 \pm 0.5\%$ /patient-year in Group II ($p = 0.12$). The actuarial event free rates were not significantly different between the two groups ($p = 0.61$) (Fig. 3).

Complete revascularization was performed in 73.4% in Group I. The actuarial survival rate at 3 years saw a minimal difference between patients with complete and incomplete revascularization ($99.1 \pm 0.7\%$ versus $96.3 \pm 2.1\%$, $p = 0.10$) (Fig. 4). The cardiac event free rate at 3 years was significantly ($p = 0.011$) higher in patients who received complete revascularization ($96.7 \pm 1.5\%$) than in patients who did not ($69.2 \pm 16.0\%$) in Group I (Fig. 5). Similarly in Group II, 77.8% patients received complete revascularization. The actuarial survival rate

Table III. Midterm clinical outcome

Outcome	Group I (n=357)	Group II (n=379)	p value
Death (total)	10 (2.8%)	8 (2.1%)	
hospital death	5 (1.4%)	5 (1.3%)	0.92
cerebral bleeding 1		low output syndrome 3	
pneumonia 1		VSP 1	
mediastinitis 1		respiratory insufficiency 1	
sepsis 1			
AMI 1			
late death	5 (1.4%)	3 (0.8%)	
cerebral infarction 1		ARDS 1	
gastric cancer 2		mediastinitis 1	
AMI 1		cholecystic cancer 1	
heart failure after AVR 1			
Cardiac event (total)	15 (4.2%)	32 (8.4%)	
linearized rate	4.2±1.1%/pt-yr	2.6±0.5%/pt-yr	0.12
congestive heart failure	7 (2.0%)	13 (3.4%)	
reintervention	4 (1.1%)	13 (3.4%)	
cardiac death	3 (0.8%)	4 (1.1%)	
arrhythmia (VT)	1 (0.3%)	2 (0.5%)	
Non-cardiac event			
stroke	4 (1.1%)	10 (2.6%)	
linearized rate	1.1±0.6%/pt-yr	0.8±0.3%/pt-yr	0.62

VSP, Ventricular septal perforation; AMI, acute myocardial infarction; ARDS, adult respiratory distress syndrome; AVR, aortic valve replacement; VT, ventricular tachycardia.

at 3 years was similar in patients with complete and incomplete revascularization (98.6±0.7% versus 96.4±2.0%, p=0.18) (Fig. 6). The cardiac event free rate at 3 years who received complete revascularization was superior (92.7±1.6%) to patients who did not (85.9±4.0%, p=0.026) (Fig. 7).

Discussion

OPCAB has become more common since the late 1990s after establishment of the deep pericardial suture technique and introduction of stabilizers.¹² The major advantages of OPCAB were reduction in operation time, blood loss, hospitalization, and transfusion.^{1,13} Arom et al.¹⁴ reported better early clinical results of OPCAB than standard CABG. After adjustment with the STS database model, they found that operative outcomes were better in the OPCAB group than in the conventional CABG group if the predicted risk was high. BHACAS studies, which were randomized controlled trials assessing the effects of cardiopulmonary bypass, showed significant reductions in early mortality and morbidity by OPCAB.¹⁵ In our experiences, OPCAB contributed reduction of ventilation time, ICU

stay, hospital stay, blood loss, requirement for transfusion, and in-hospital morbidity.¹⁶ However, only a few long-term studies comparing OPCAB to on-pump CABG are available though short-term results were encouraging. In this study we examined midterm results of OPCAB and conventional on-pump CABG.

It was suggested that the reduction of early morbidity with OPCAB surgery might be at the expense of long-term results. Cooley et al.¹⁷ reported that OPCAB with difficulty of access and exposure, especially when grafting vessels on the lateral or inferior wall, might compromise the quality of the anastomosis and result in the greater occurrence of late cardiac complications. Gundry et al.¹⁸ performed a 7-year follow-up study comparing CABG with and without CPB. These results showed a similar incidence of cardiac and non-cardiac deaths. The patients who had OPCAB needed repeat intervention with a percutaneous coronary intervention (PCI) or repeat CABG double those who had on-pump CABG. However, these results were performed before the introduction of stabilizers. Subramanian et al.¹⁹ and Poirier et al.²⁰ compared OPCAB with or without myocardial stabilization and showed coronary artery anastomosis had a lower degree of