



図1 ドナー心から摘出されたホモグラフト大動脈弁（左）とホモグラフト肺動脈弁（右）

述してきており詳細は割愛するが、原則は手術室の環境で、清潔手技で開心術に則った心臓への到達法を用いて、大動脈を弓部遠位まで剥離し、肺動脈も左右の肺動脈が分枝を出す部分で切断して心臓を摘出する。心臓摘出後、右室を展開して肺動脈弁を右室流出路から切離、その後、左室を僧帽弁輪から展開し大動脈弁を中隔心筋の一部をつけて切離する（図1）。摘出心臓からの弁組織の切離は、組織保存処理施設内のクリーンベンチ内で行う事もあるが、現実には心臓摘出に引き続き、手術室のサイドテーブルで行われることが主である。摘出したホモグラフト弁組織は低温の乳酸リンゲル液で洗浄した後、同じく乳酸リンゲル液に浸漬、密封してアイスボックスで保存処理施設に運搬する⁶⁾（図1）。

3. ホモグラフト弁の滅菌および凍結保存処理

移植用組織の凍結保存プロセスに当たっては、

表1 ホモグラフト弁の滅菌および凍結保存用培地組成

組織滅菌処理

TC199 培養液に		
HEPES buffer	5 %	
セフェム	250 μ g/ml	
クリンダマイシン	120 μ g/ml	
バンコマイシン	50 μ g/ml	
ポリミキシンB	100 μ g/ml	含有

組織凍結保存処理

TC199 培養液に		
HEPES buffer	5 %	
DMSO	10%	含有

細菌混入等の危険を極力回避するよう、フィルター空調の完備した独立した施設で行う事が望まれる。搬送されたホモグラフト弁組織を、液体栄養培地（TC199）で洗浄したあと、指定の抗生物質を加えた溶液に24時間浸漬することで滅菌する。滅菌処理を終えたホモグラフト弁はdymethylsu-

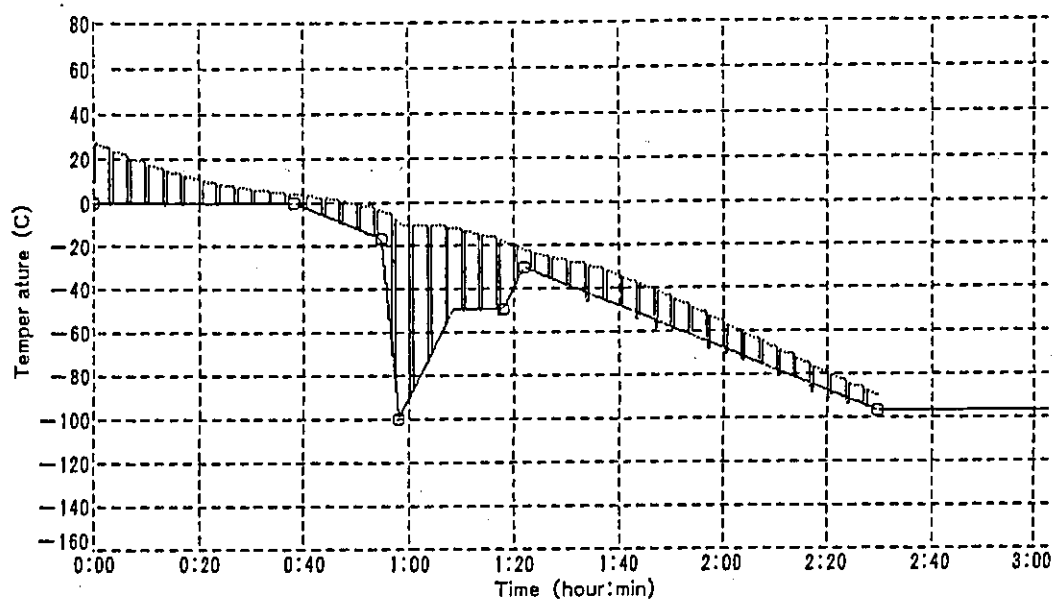


図2 プログラムフリーザーによるホモグラフト凍結の為のプログラム

グラフの上縁が組織の温度、下縁がフリーザー内の温度変化を示す。組織と保存液の総量が100 mlで、それを3重のパッケージに封入した際の凍結プログラムである。

lfoxicide (DMSO) を含む凍結保存用液体培地とともに、凍結保存用パッケージに密封し、プログラムフリーザーで -90°C まで緩徐凍結する(表1)(図2)。凍結されたホモグラフト弁は一定期間液体窒素気相での保存を経た後、液体窒素液相の保存庫に移し長期間保存する。

4. 凍結保存ホモグラフト弁の使用前処理手順とその要点

液体窒素液相から取り出されたパッケージは約5分間室温に放置したあと、 40°C 前後の温湯3リットルでパッケージのまま解凍される。解凍のための温湯は温度を調整してベイスンに入れ、凍結組織を浸漬した後は加温することなく静置する。理論上、凍結保存した細胞を解凍し回収する際には、低温からの急速解凍が原則ではあるが、凍結保存組織を急速解凍する際の組織の亀裂損傷、(cracking)は、組織保存の目的そのものに影響を与える。液体窒素保存槽での保存(-196°C)からの5分間の室温放置、それに引き続き解凍用の温湯を加温しないことで、凍結保存組織と外部

の界面での温度差が若干なりとも少なくなり、温度変化で生じる組織のひずみによる破損を回避できる。この配慮は、組織の形態保持が重要なホモグラフト弁保存において、きわめて重要な過程である。

解凍されたホモグラフト弁組織はパッケージから清潔に取り出され、組織内に浸透しているDMSOを除去するために5%マルトース入り乳酸リンゲル液で5分間洗浄される。その後、使用直前まで、低温の5%マルトース入り乳酸リンゲル液ないしはヘパリン化患者血液に浸漬しておく。

5. ホモグラフト弁凍結保存法の背景

前述のようにホモグラフト弁の臨床成績が安定し、かつ汎用されるようになった原因はその凍結保存法(cryopreservation)の導入に他ならない。ホモグラフト弁凍結保存法は、研究あるいは臨床領域で広く用いられている細胞の凍結保存法を応用したもので、その理念は組織内の細胞生存性を高度に保つことにあった。当初の概念では、高度に保存されたホモグラフト弁由来の細胞が、

移植された後も機能して組織構造の維持再生に寄与する事で、弁の長期的な臨床成績の向上に結びついているのではないかと考えられていた⁹⁾。O'Brienら⁸⁾が術後遠隔期まで機能を維持したホモグラフト弁が他病死により摘出された例で、ホモグラフト弁から患者とは性別の異なる染色体を示す細胞の存在を示したことは、ホモグラフト弁の質の評価はその細胞生存性によって語られることにも結びついた。

著者ら⁷⁾は、ドナーの心停止からホモグラフト弁保存までの時間が細胞生存性に影響を与えることから、ドナー心停止後のホモグラフト弁摘出の時間的限界を示したが、Gallら⁸⁾もホモグラフト弁の細胞生存性を高く保つためには、採取後の早期の凍結処理と抗生物質処理の際の抗真菌剤(Amphotericin B)の不使用が重要であることを示し、その後のホモグラフト弁凍結保存の基本となった。移植直後に組織内に存在するホモグラフト弁由来の細胞は、collagen合成に参与する遺伝子や組織再生に参与するfibroblast growth factor (FGF) 遺伝子を発現し、移植直後の局所組織治癒、修復に影響を与えていることが示唆された⁹⁾。ホモグラフト弁は、定型的な弁置換術における有用性はもちろんではあるが、局所組織が脆弱な感染性心内膜炎症例における重要性が認められている。ホモグラフト弁の細胞生存性によって保持される組織修復能や組織再生能が、かかる病態に有利に働くものと推察される。

一方で、ドナー由来細胞の存在は移植後免疫原性を呈することが数多く報告され、結果として、ホモグラフト弁由来の細胞は中期的にはapoptosisを迎えるか、組織そのものが比較的早期に硝子化変性を示すことなども示された。摘出ホモグラフト弁を構成する細胞成分の由来を検討したところ、レシピエント由来細胞のホモグラフト弁組織への進展が認められ⁹⁾、それらの細胞が新たにホモグラフト弁の構造を維持する働きに関与している期待がある。以上のように、ホモグラフト弁の移植後の組織や構成する細胞の変化は一定ではない¹⁰⁾。しかしながら、凍結保存方法によ

り心臓弁組織の強度あるいは柔軟性はほとんど影響を受けず、加えて細胞の生存性が高度に維持されることから、現時点では、凍結保存方法がホモグラフト弁に対するもっとも妥当な保存方法であることには異論がないであろう。

6. 凍結保存方法から無細胞化ホモグラフト弁への展開

今まで述べてきたように、ホモグラフト弁組織の臨床的有用性は広く知られてきたが、中長期に稀でなく発生する弁機能不全には、ホモグラフト弁に固有の細胞に対する免疫反応の関与が示唆されてきた^{11) 12)}。一方では、術後ホモグラフト弁組織への宿主細胞の進展が確認されていて⁹⁾、比較的安定したホモグラフト弁の術後成績には、宿主細胞による組織のremodelingの影響が推測されている。そこで現在、脚光を浴びている再生医工学を利用し、ホモグラフト弁の特性を利用する試みが取り組み始められている。

再生医工学を利用した組織再生療法では、生体内分解性ポリマー、同種組織、異種組織などが組織再生のscaffoldとして利用されている。とくに、生体組織由来scaffoldは、ドナー組織から細胞成分や抗原性部位を除去したもので、コラーゲン線維、弾性線維、基底膜などの構造マトリックスのみにより構成され、力学的特性が類似し、かつ複雑な構造をした組織が利用可能である。そこで、ホモグラフト弁組織を無細胞処理することで、自己修復能・成長性が期待し得るtissue engineering valve作成が取り組まれている^{13) 14)}。数種類の無細胞化処理による動物実験の報告がなされており、臨床使用も開始されたところである。我々もミニブタを用いた無細胞化ホモグラフト弁の同所性肺動脈弁置換実験を行っている。図3にはTriton-Xによる無細胞化処理を行った肺動脈弁の術後90日での組織像を示した。実験的には、無細胞化されたホモグラフト弁組織は、術後1ヶ月程度でレシピエント由来の血管内皮細胞により再内皮化し、その後、組織内への繊維芽細胞、平滑筋細胞の誘導が確認されている。現時点では、宿

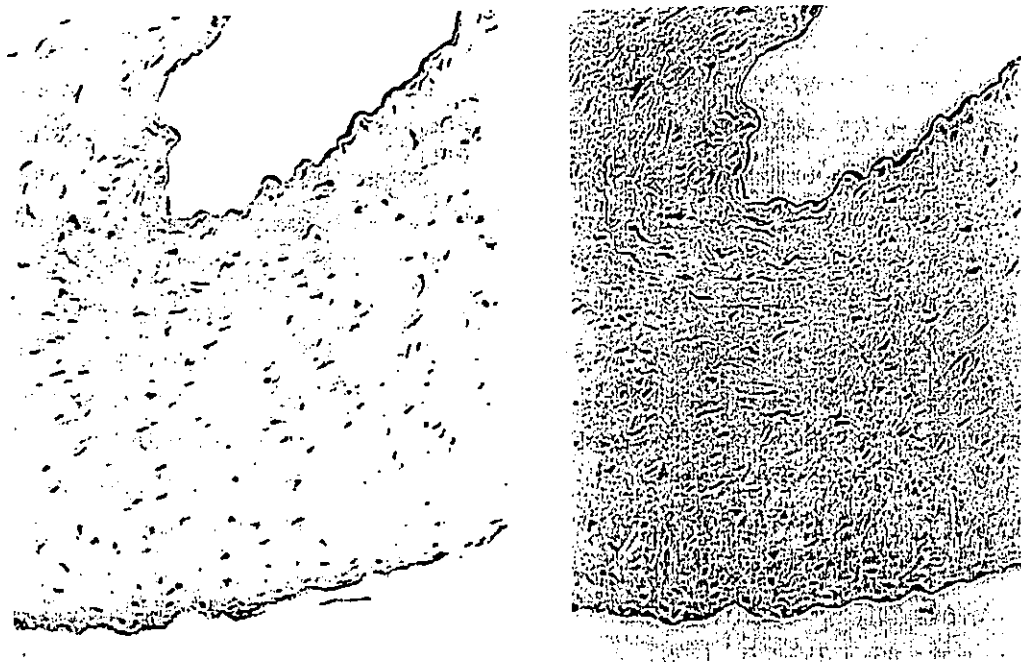


図3 Triton-Xによる無細胞化ホモグラフト弁実験モデル

移植後90日後の組織所見（左）抗vWF因子染色、（右）Vimentin染色により組織の内皮細胞化と間質への細胞進展が確認された。

主細胞による組織のremodelingまでは確認されてはいないが、これらの研究の臨床応用化は、細菌感染などの理由で廃棄されてきたホモグラフト弁組織の有効利用だけでなく、従来のホモグラフト弁組織ドナー条件の適応拡大を可能にする。現実の移植医療発展の遅さに起因する、再生医療が移植医療にとって代わる医療技術であるという概念に捉われず、組織移植医療のより良い発展にtissue engineering技術を応用する視点での研究が望まれる。

参考文献

- 1) Murray G : Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 7 : 466-471, 1956
- 2) Ross DN : Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 2 : 487, 1962
- 3) Barratt-Boyes BG : A method for preparing and inserting a homograft aortic valve. *Br J Surg* 52 : 847-856, 1965
- 4) Angell WW, Angell JD, Oury JH et al : Long-term follow-up of viable frozen aortic homografts. A viable homograft valve bank. *J Thorac Cardiovasc Surg* 93 : 815-822, 1987
- 5) O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH et al : A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 94 : 812-823, 1987
- 6) Song YC, Yao LY, Knebone JM et al : Effect of cryopreservation and histocompatibility on type I procollagen gene expression in aortic valve grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114 : 421-427, 1997

- 7) Niwaya K, Sakaguchi H, Kawachi K et al : Effect of warm ischemia and cryopreservation on cell viability of human allograft valves. *Ann Thorac Surg*. 60 : S114-7, 1995
- 8) Gall KL, Smith SE, Willmette CA et al : Allograft heart valve viability and valve processing variables. *Ann Thorac Surg* 65 : 1032-1038, 1998
- 9) Koolbergen DR, Hazekamp MG, Kurvers M et al : Tissue chimerism in human cryopreserved homograft valve explants demonstrated by in situ hybridization. *Ann Thorac Surg* 66 : S225-232, 1998
- 10) Arminger LC : Postimplantation leaflet cellularity of valve allograft. Are donor cells beneficial or detrimental. *Ann Thorac Surg* 66 : S233-235, 1998
- 11) Oei FB, Stegmann AP, van der Ham et al : The presence of immune stimulatory cells in fresh and cryopreserved donor aortic and pulmonary valve allografts. *J Heart Valve Dis*. 2002 May ; 11 (3) : 315-324 ; discussion 325, 2002
- 12) Hawkins JA, Breinholt JP, Lambert LM, Fuller TC, Profaizer T, McGough EC, Shaddy RE. Class I and class II anti-HLA antibodies after implantation of cryopreserved allograft material in pediatric patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Feb ; 119 (2) : 324-330. 2000
- 13) Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, Kleczka C, Ciubotaru A, Haverich A. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*. Sep 24 ; 106 (12 Suppl 1) : I63-I68. 2002
- 14) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. Oct;13 (4 Suppl 1) : 87-92. 2001

基礎研究

生物組織スキャフォールドを用いた テーラーメイド心臓弁

藤里俊哉*, 北村惣一郎*2

はじめに

わが国では年間約9,000件の心臓弁置換術が施行されており、代用弁としてパーフルオロカーボン製の機械弁が80%、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁が20%使用されている¹⁾。世界中では年間約30万件の置換術が施行されており、その市場規模は約1,000億円に達する。置換術による死亡率は、術前診断や術中の体外循環技術の向上等もあって、再置換術を含めても2%程度であり、比較的安定した成績となっている。このように、最も臨床的に使用される人工臓器の1つとして確立した感のある人工弁ではあるが、いまだ種々の問題点が存在する。これらを解決するため、現在、我々が開発している再生型テーラーメイド心

臓弁について紹介したい。

I. 研究の背景

機械弁は1960年代初頭の実用化以来、形状や材質の改良が重ねられ、現在使用されているものは一生の使用に耐えられる物理的強度を有している。従来、弁座部分の構造上、弁前後の圧較差が大きく、心機能や予後に影響を与えるとされてきたが、改良によって有効弁口面積を広くしたものが開発されている。しかし、機械弁では依然として抗血栓性の問題が解決されていない。抗凝固のため、生涯にわたり厳重なワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症を来す頻度も高くなる。また、ワーファリンが催奇形性を有することから、妊娠を希望する若年女性には使用できない。

異種生体弁も1960年代後半の登場以来、抗凝固剤の服用が不必要であるというQOL上の利点から、特に最近は使用例が増えている。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされていたが、近年、ステントを用いないステントレス異種生体弁が導入されている。しかし、異種生体弁は依然、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15~20年程度の耐久性を有するが、若年者では5~10年程度の耐久性しか有さず、米国心臓病学会及び心臓病協会のガイドラインでは65歳以上の高齢者に使用が奨励されている。

— Key word —

Artificial Heart Valve
Biological Tissue Scaffold
Decellularization
Cell Seeding
Tissue Engineering

Custom-made heart valve using biological tissue scaffold

*Toshiya Fujisato :

Department of Regenerative Medicine & Tissue Engineering,

National Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病センター研究所 再生医療部

*2Soichiro Kitamura :

President, National Cardiovascular Center
国立循環器病センター 総長

欧米では1980年代半ばから、わが国でも近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、死体から提供された凍結保存同種弁が臨床で使用されつつある。機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして両者に対して抗感染性で優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者に有効とされるRoss手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存同種弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存同種弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が多い。

以上のようなことから、自己弁と同等の抗凝固性、耐久性、成長性などを兼ね備えた次世代型の代用弁の開発が求められている。また、機械弁、異種生体弁ともほぼ全量が輸入品であり、BSE問題を契機とした厚生労働省のGMP基準の改定に伴い、生体弁の輸入が一時停止するといった事態も生じている。わが国の医療における安全保障の観点からも、わが国発の技術開発によるわが国製の安全な代用弁の登場が望まれる。

II. テーラーメイド心臓弁

再生医療の成功例として報告されることの多い血管再生療法では、患部に血管新生因子等の薬物あるいは細胞を直接注入する。しかし、代用心臓弁は組織置換であるため、自己組織再生の足場となるべき土台(スキャフォールド)が必要となる。現在、心臓弁に関しては、吸収性縫合糸等で利用されているポリグリコール酸やポリ乳酸等の生体内分解吸収性人工材料と、同種あるいは異種心臓弁組織か

らドナー由来細胞を除去した脱細胞化マトリックスとがある。

人工材料製スキャフォールドを用いた代表例として新岡らの報告がある。ヒツジを用いた実験で、ポリグリコール酸製のシート状メッシュスキャフォールドに末梢血管壁の細切によって得た血管内皮細胞、平滑筋細胞、及び線維芽細胞を、まず線維芽細胞と平滑筋細胞を、続けて1週間後に血管内皮細胞を播種することで、再生型心臓弁葉を作成した。ヒツジの肺動脈弁の一葉を再生医療心臓弁葉と置換したところ、6週後には正常組織と同様の組織が再生し、9週以降は力学特性も正常組織と同等であったと報告している³⁾。

脱細胞化マトリックスを用いた先駆例としては、米国CryoLife社によるSyner Graft心臓弁がある。1999年から脱細胞化ブタ大動脈弁の臨床使用を開始し、2001年には世界初の再生型心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数カ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告しているが⁴⁾、移植後に破断の生じた例も報告されている。ドイツ・ハノーバー医科大学のHaverichらは、1998年より異種生体弁から動物由来細胞を除去し、代わりにレシピエントの自己血管内皮細胞を播種する動物実験を行い、界面活性剤であるTriron X-100やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている⁵⁾。英国リーズ大学のInghamらは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDSが最も細胞除去に適していると報告している⁶⁾。また、ドイツ・フンボルト大学のKonertzらはヒツジを用いた6カ月間の実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を播種することで弁の変形や石灰化も見られなかったと報告しており、臨床使用も開始している⁷⁾。

我々は2000年から、脱細胞化した生体弁に患者自身の細胞を組み込むテーラーメイド心臓弁の開発を開始した。生物組織を選んだ

のは、以前から凍結保存同種弁の臨床使用に取り組んできたことと、心臓弁の複雑な形状を人工材料で造形することが容易でないこと、及び人工材料は生体よりも硬いために生体と同等の力学特性を持たせるのが難しいと考えたためである。免疫反応の主因を成すドナー由来細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスからなる脱細胞化スキャフォールドに患者の自己細胞を組み込むことで、生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する代用弁が創製できると期待できる（図1）。このためには、完全な脱細胞化処理法の開発、及び脱細胞化スキャフォールドへの患者細胞の組込法の開発が重要である。

Ⅲ. 脱細胞化と患者細胞の組込

1. 脱細胞化処理

前述のように、ほとんどのグループは界面活性剤やタンパク分解酵素等の薬液処理によって細胞を除去している。我々も当初、Triton X-100 溶液による界面活性剤浸漬処理

を検討した。その結果、厚さ数百 μm の弁葉内においては処理6時間後には細胞核は染色されなくなったが、弁葉基部の組織内細胞の核は処理24時間後でも表面から1mm以遠の組織深部では染色されており、界面活性剤溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた（図2中段）。また、細胞毒性を示すTriton X-100を洗浄除去するために数週間以上の時間を要し、その間における生体力学特性の変化や汚染の危険性についても注意が必要であった。そこで我々は、より完全な細胞除去法について検討し、液体を圧力媒体として等方圧力を加える冷間等方圧加圧法による超高圧印加処理法を開発した。多くのタンパク質や酵素は300MPa程度の高圧処理によって変性するとともに、酵母や芽胞をもたない細菌は500MPaの処理で細胞膜が破壊され、殺菌される。また、HIV等のエンベロープを持つウイルスは600MPaの処理でほぼ完全に不活化される⁷⁾。清潔下にて摘出したミニブタ心臓より肺動脈弁を採取し、低温下にて980MPa（10,000気圧）の超高圧印加処理

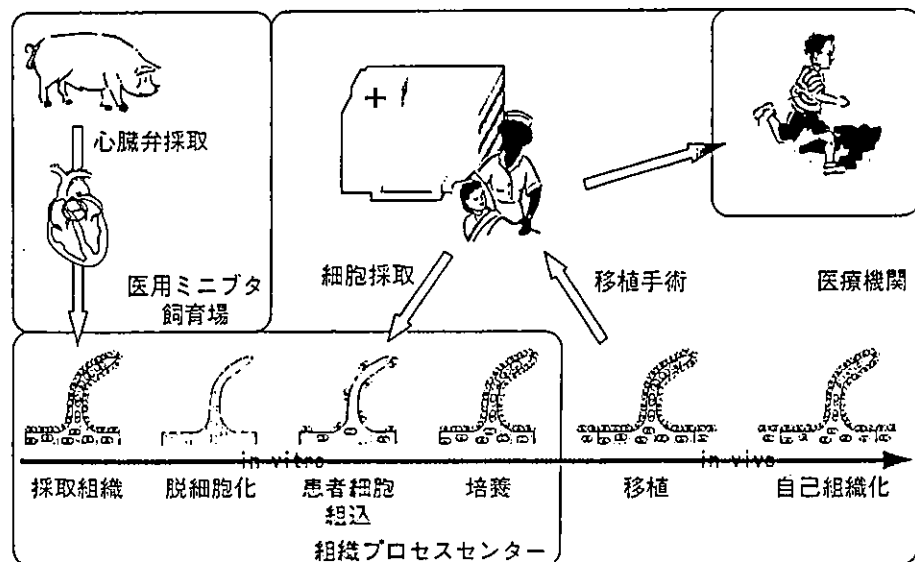


図1. 生物組織スキャフォールドを用いたテララーメード心臓弁

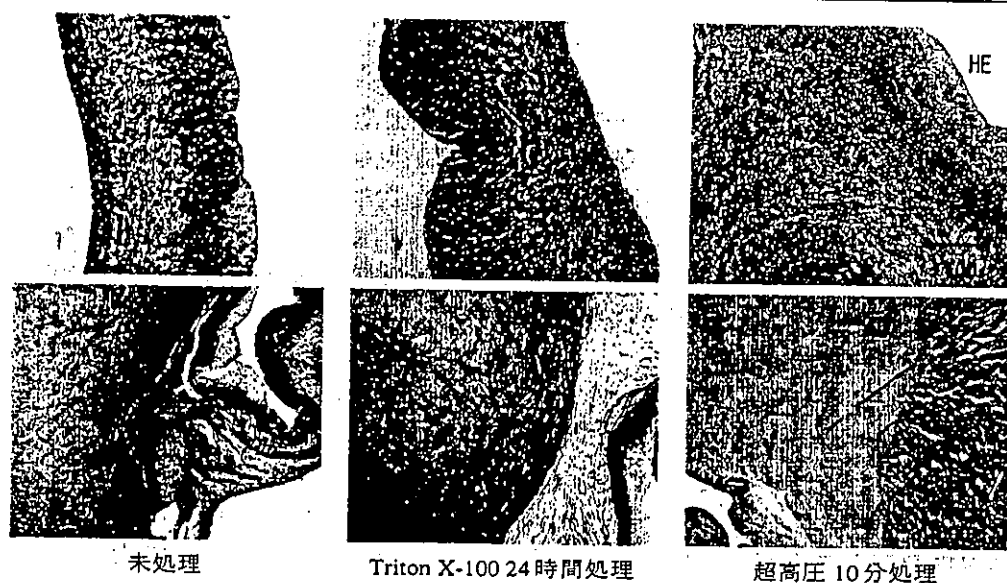


図2. 脱細胞化処理された心臓弁の組織断面（上：弁葉，下：弁基部）

（4℃，10分間）を行い，続いて洗浄処理したところ，組織深部まで完全に細胞を除去することができた（図2右段）。EVG染色したところ，超高圧処理後においても弁葉内のコラーゲン線維やエラスチン線維が保存されていることが認められた。また，常在菌にてあらかじめ感染させた試料を脱細胞化処理したところ，界面活性剤処理では感染が除去できなかったが，超高圧処理では脱細胞化に加えて滅菌効果も併せ持つことが確認された。力学特性を検討したところ，界面活性剤浸漬処理では，処理時間に伴って強度，弾性率とも増加する傾向を示したが，超高圧処理では力学特性への影響が見られなかった（図3）。

2. 細胞組込

心臓弁は表面が血管内皮細胞，組織内部は主に平滑筋細胞と線維芽細胞からなる。脱細胞化心臓弁スキャフォールド表面への血管内皮細胞の播種について検討した。通常，培養シャーレ等平面への細胞播種は細胞分散液を数時間，静置培養することで行われる。人工

血管等の管状物内面への細胞播種は，管状物を低速で連続回転あるいは断続的に回転することで，比較的容易に達成できる。しかし，心臓弁スキャフォールドは複雑な三次元構造表面を有するため，単純な回転運動では均一かつ全面に播種することが容易でない。いくつかのグループは，拍動型ポンプを用いた循環バイオリアクター²⁾や多軸回転バイオリアクター³⁾の使用を報告している。我々は，採血管用ローラー攪拌機を用いた二軸回転バイオリアクター，並びに遠心型血液ポンプを用いた循環バイオリアクターを開発し，脱細胞化心臓弁スキャフォールドへの内皮細胞播種を行った。将来のレシピエントとなるミニブタから大腿動脈を5cm程度摘出し，酵素処理によって血管内皮細胞を分離した。エクスパンド後，回転バイオリアクターにて4時間播種し，循環バイオリアクターにて2日間培養した。その結果，脱細胞化スキャフォールドの全面に渡り，コンフルエントな状態で細胞を播種することが可能であった（図4）。さらに，スキャフォールド内部への平滑筋細胞

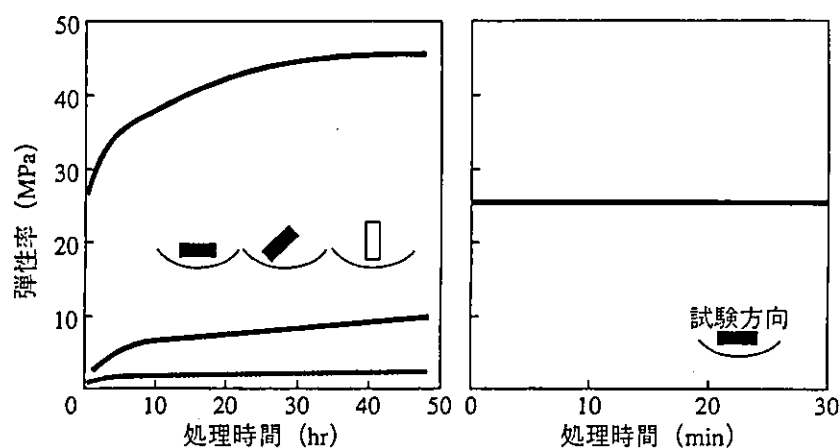


図3. 脱細胞化処理された心臓弁葉の生体力学特性 (左: Triton X-100, 右: 超高压)

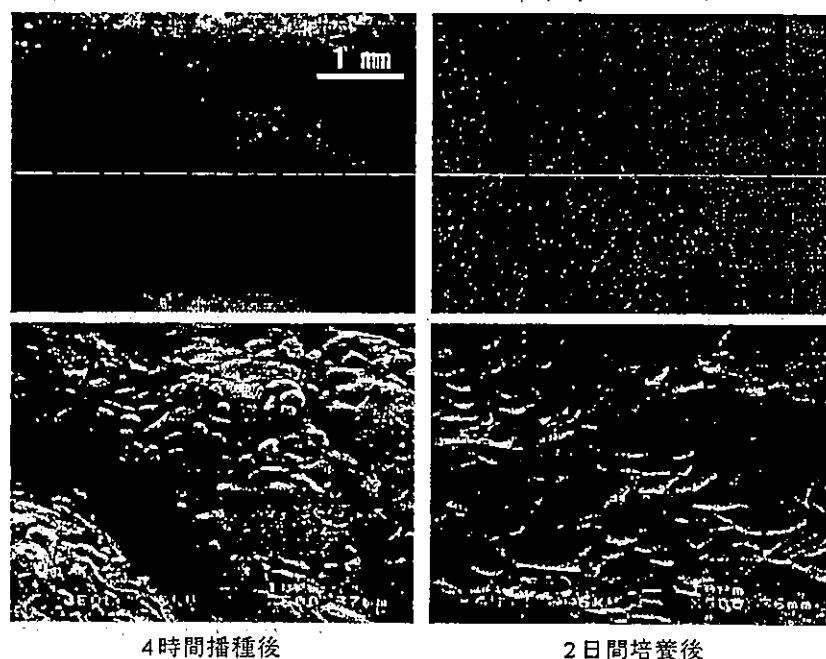


図4. 脱細胞化スキャホールドへの血管内皮細胞の播種

及び線維芽細胞の組込を行うために、汎用ディスペンサ装置を用いた細胞注入法の開発にも取り組んでいる。

3. 移植実験

*In vitro*にて作成したテラーメード心臓弁を臨床研究に供する前段階として、ミニブタを用いた大動物実験を行った。Triton X-100にて脱細胞化し、レシピエントのミニブ

タ自己内皮細胞を播種した脱細胞化同種肺動脈弁を用い、右心バイパス下にて肺動脈弁置換手術を行った。術後1カ月及び3カ月において、心エコーと圧測定による血行動態の測定後、移植弁組織を摘出して組織学的所見を検討した。さらに、これらの結果を細胞未播種の脱細胞化同種弁移植群及び凍結保存同種弁移植群と比較した。レシピエントの自己細胞を播種した脱細胞化同種弁では、血行動態並びに肉眼的所見から、術後1カ月においても良好な弁機能を示していた。術後1カ月において、移植された脱細胞化肺動脈弁組織の腔面が一層の細胞層によって覆われるとともに、一部組織内への細胞浸潤が認められた。さらに術後3カ月においては、弁葉内を含む移植組織の大部分への細胞の浸潤が認められた(図5)。浸潤した細胞を免疫染色によって検討したところ、表面層は血管内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋細胞と線維芽細胞とからなることが確認された。これに対して、未播種の脱細胞化同種肺動脈弁では、腔表面上に血管内皮細胞の進展は認められものの、組織内部への細胞浸潤はほとんど認められなかった。また、脱細胞化処理及び細胞播種を行わない凍結保存同種弁では、脱細胞化同種弁に比較して炎症細胞の浸潤が顕

著であった(図5)。現在、超高圧処理及び複数種の自己細胞を組み込んだテーラーメイド心臓弁の動物実験に取り組んでいるところである。

IV. 将来展望

いまだ長期間に渡って満足できる性能を発揮する人工臓器や組織は開発されておらず、また、患者の成長に伴って人工臓器に成長性を与えることはほとんど不可能である。一方、ブタやウシ等の生物由来の医療用素材も古くから使用されてきたが、最近のBSE及びCJD問題を契機として、使用が制限あるいは禁止されつつある。生物組織スキャフォールドではドナー由来の抗原性を減弱する必要がある、かつ動物由来の場合は未知の感染性やレトロウイルス等の除去が必須である。超高圧処理による脱細胞化ではウイルスも不活化できるところから、極めて高い安全性が確保できると考えている。細胞ソースをどこに求めるのかも検討すべき課題であるが、患者の負担を軽減するためには、骨髓細胞あるいは末梢血幹細胞等の利用が有効であろう。さらに臨床応用に際しては、GMP基準に適合した細胞プロセッシング設備の設置も必要である。生物組織の提供動物としての安全な医用ミニブ

<細胞播種群>

<凍結保存群>

(移植後1カ月)

(移植後3カ月)

(移植後1カ月)

図5. ミニブタによる動物実験結果

タ育種, 並びに採取から移植後までを追跡するトレーサビリティ確保を含め, テーラーメイド型移植システムを確立して早期の臨床応用を目指したいと考えている。既にいくつかの研究グループは臨床研究を始めつつある。いずれ再生型心臓弁が機械弁や異種生体弁に取って代わる日も近いであろう。

謝 辞

共同研究者の心臓血管外科沼田 智医師, 庭屋和夫医師, 生体工学部岸田晶夫部長及び臓器移植部中谷武嗣部長に感謝します。また, 研究の一部は, 厚生労働科学研究費ヒトゲノム・再生医療等研究事業 (H12-再生-005), 循環器病研究委託費事業 (13公-1), 及び日本学術振興会科学研究費補助金 (14380419) の補助を受けて行われました。

§ 文 献

- 1) 日本人工臓器学会レジストリー委員会: 人工臓器のレジストリー 2000. 人工臓器 2001; 30(suppl).
- 2) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, et al : Tissue-

- engineered heart valves : Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 1996 (Nov 1);94(9 Suppl):II164-II168.
- 3) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, et al : Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001(Oct);13(4 Suppl 1):87-92.
- 4) Teebken OE, Puschmann C, Aper T, et al : Tissue-engineered bioprosthetic venous valve : a long-term study in sheep. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003 (Apr);25(4):305-312.
- 5) Korossis SA, Fisher J, Ingham E : Cardiac valve replacement : a bioengineering approach. *Biomed Mater Eng* 2000;10(2):83-124.
- 6) Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, et al : Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg* 2002(Nov);74(5):1438-1442.
- 7) 鈴木敦士, 林力丸, 編: 高圧生物学と高圧技術. さんえい出版, 京都, 1997.
- 8) Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, et al : Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng* 2001(Feb); 7(1):9-22.
- 9) Laube HR, Matthaus M : A new semi-automatic endothelial cell seeding technique for biological prosthetic heart valves. *Int J Artif Organs* 2001 (Apr);24(4):243-246.

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-

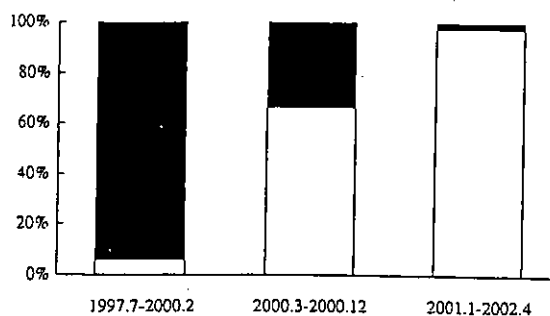


Fig. 1. Percentage for patients with OPCAB or on-pump CABG. OPCAB has gradually increased and replaced on-pump CABG.

□ 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	cholecyctic 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 ($98.6 \pm 0.7\%$ versus $96.4 \pm 2.0\%$, $p=0.18$) (Fig. 6). The cardiac event free rate at 3 years who received complete revascularization was superior ($92.7 \pm 1.6\%$) to patients who did not ($85.9 \pm 4.0\%$, $p=0.026$) (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

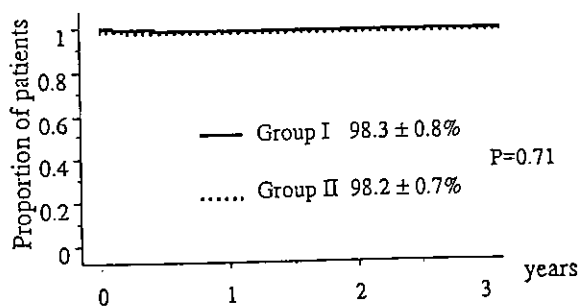


Fig. 2. Actuarial survival curve. Group I ($98.3 \pm 0.8\%$) was not significantly different from that in Group II ($98.2 \pm 0.7\%$) ($p=0.71$).

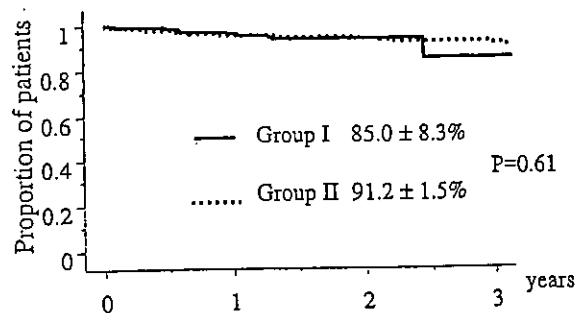


Fig. 3. Actuarial cardiac event free rate curve. The actuarial event free rates were not significantly different between the two groups ($p=0.61$).

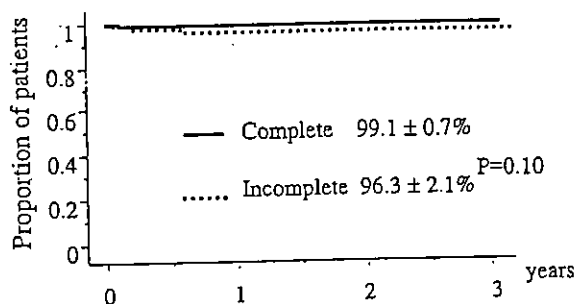


Fig. 4. Actuarial survival curve of patients with complete or incomplete revascularization in Group I. The actuarial survival rate at 3 years was not significantly different between patients who had complete and who had incomplete revascularization ($99.1 \pm 0.7\%$ versus $96.3 \pm 2.1\%$, $p=0.10$).

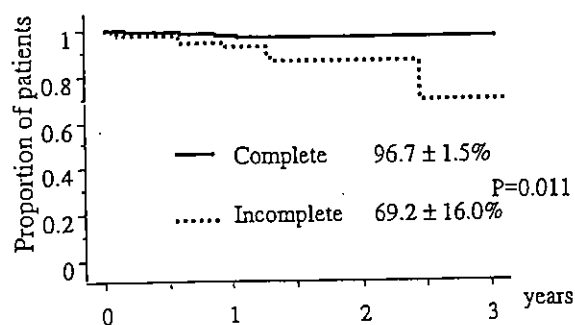


Fig. 5. Actuarial cardiac event free rate curve of patients with complete or incomplete revascularization in Group I. The cardiac event free rate at 3 years was significantly ($p=0.011$) higher in patients who received complete revascularization ($96.7 \pm 1.5\%$) than in patients who did not ($69.2 \pm 16.0\%$).

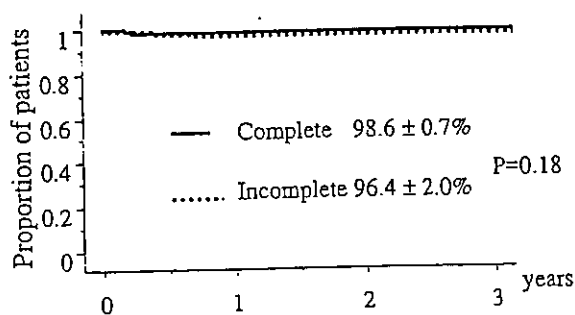


Fig. 6. Actuarial survival curve of patients with complete or incomplete revascularization in Group II. The actuarial survival rate at 3 years was similar in patients who had complete and incomplete revascularization ($98.6 \pm 0.7\%$ versus $96.4 \pm 2.0\%$, $p=0.18$).

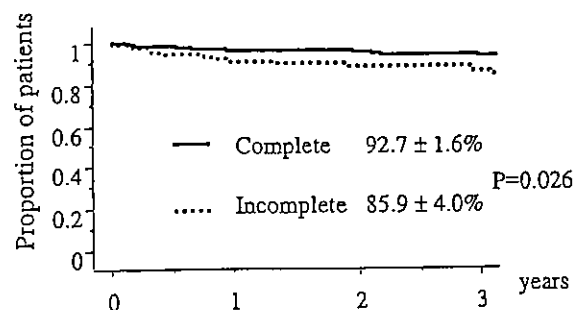


Fig. 7. Actuarial cardiac event free rate curve of patients with complete or incomplete revascularization in Group II. The cardiac event free rate at 3 years who received complete revascularization was superior ($92.7 \pm 1.6\%$) to patients who did not ($85.9 \pm 4.0\%$, $p=0.026$).

stenosis when mechanical stabilizers were used. In Gundry's results after OPCAB, PCI was performed in grafted vessels three times the one in ungrafted vessels.¹⁸ This might have been caused by not only immature skills and lower quality of graft anastomoses but also by difficulty of access to the lateral and posterior coronary branches. In BHACAS studies, OPCAB and on-pump CABG groups recorded a similar low rate of cardiac-related events.¹⁵ In the present study, we used both stabilizers and intracoronary shunts. Therefore, the cardiac event free and survival rate up to 3 years in the OPCAB group was as good as those in the on-pump CABG group.

Amano et al.²¹ reported the event free rate of OPCAB patients was less favorable than on-pump CABG patients. Their mean number of distal anastomoses in OPCAB was 1.9 and 3.6 in the on-pump CABG group. They concluded that the observed long-term cardiac events might be related to incomplete revascularization. Several studies have dealt with the importance of complete revascularization in on-pump CABG. Those studies showed improved long-term results with fewer cardiac events in complete revascularization compared with incomplete revascularization,³⁻⁵ though the definition of complete revascularization varied. Vander Salm et al.²² evaluated the importance of complete revascularization by their definition. By the traditional definition, complete revascularization means the state where at least one vessel is grafted in each of the three major coronary artery systems, and bypass grafting every stenotic vessels is not necessary, regardless of the number of stenosed coronary branches, on which our present study was based. The rate of complete revascularization was relatively low, but it was similar to other studies^{23,24} using the same definition, in which the rate of complete revascularization was about 70%. The main cause of incomplete revascularization was the surgeon's decision that the target vessel was too small. Our preoperative plan for grafting, in which we exclude the obviously ungraftable branches, was accomplished at 98%. In another study, the patients who underwent isolated left internal thoracic artery (LITA) to left anterior descending artery (LAD) grafting were followed up for 25 years.²⁴ In that study, in the late consequence of incomplete revascularization, survival rate and freedom from re-intervention were not improved. Isolated LITA to LAD grafting was not sufficient for patients with RCA, Cx, and left main trunk (LMT) lesions. The importance of complete revascularization should be recognized, and appropriate vessel requiring grafts should be ascertained. In the present study, complete revascularization for better prognoses was confirmed

not only in the on-pump CABG group but also in the OPCAB group.

The present study had several limitations. Patients were not randomly assigned to the OPCAB group and the conventional CABG group. This was a retrospective study of patients operated during the period of our initial experience with OPCAB. Although it was reported that a shift from routine use of cardiopulmonary bypass to OPCAB was possible without an apparent increase in morbidity or change in technique,²⁵ the pattern of graft material has also changed by using artery grafts. The mean follow-up time was shorter in OPCAB groups in the present study. For precise evaluation, more than 5 years of follow-up will be required, and to remove these biases, randomized prospective studies of OPCAB is necessary to confirm the present preliminary results.

In conclusion, midterm results of OPCAB were satisfactory. Although OPCAB is technically demanding, progression of the OPCAB technique contributed to the high quality of anastomosis and increased the number of anastomotic sites. Complete revascularization is key for better long-term results in OPCAB.

REFERENCES

1. Lee JH, Abdelhady K, Capdeville M. Clinical outcomes and resource usage in 100 consecutive patients after off-pump coronary bypass procedures. *Surgery* 2000; 128: 548-55.
2. Oliveira SA, Lisboa LA, Dallan LA, Rojas SO, Poli de Figueiredo LF. Minimally invasive single-vessel coronary artery bypass with the internal thoracic artery and early postoperative angiography: Midterm results of a prospective study in 120 consecutive patients. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 505-10.
3. Bell MR, Gersh BJ, Schaff HV, Holmes DR Jr, Fisher LD, Alderman EL, et al. Effect of completeness of revascularization on long-term outcome of patients with three-vessel disease undergoing coronary artery bypass surgery. A report from the Coronary Artery Surgery Study (CASS) Registry. *Circulation* 1992; 86: 446-57.
4. Bertelsen CA, Kjeller M, Høier-Madsen K, Folke K, Fritz-Hansen P. Influence of complete revascularization on long-term survival after coronary artery bypass surgery. *Scand Cardiovasc J* 1997; 31: 271-4.
5. Cukingnan RA, Carey JS, Witting JH, Brown BG. Influence of complete coronary revascularization on relief of angina. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 79: 188-93.
6. Tyras DH, Barner HB, Kaiser GC, Codd JE, Laks H,

- Pennington DG, et al. Long-term results of myocardial revascularization. *Am J Cardiol* 1979; 44: 1290-6.
7. Jones EL, Weintraub WS. The importance of completeness of revascularization during long-term follow-up after coronary artery operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112: 227-37.
8. Schaff HV, Gersh BJ, Pluth JR, Danielson GK, Orszulak TA, Puga FJ, et al. Survival and functional status after coronary artery bypass grafting: Results 10 to 12 years after surgery in 500 patients. *Circulation* 1983; 68: II200-4.
9. Cosgrove DM, Loop FD, Lytle BW, Gill CC, Golding LA, Gibson C, et al. Determinants of 10-year survival after primary myocardial revascularization. *Ann Surg* 1985; 202: 480-90.
10. Lawrie GM, Morris GC Jr, Earle N. Long-term results of coronary bypass surgery. Analysis of 1698 patients followed 15 to 20 years. *Ann Surg* 1991; 213: 377-87.
11. Kobayashi J, Sasako Y, Bando K, Niwaya K, Tagusari O, Nakajima H, et al. Multiple off-pump coronary revascularization with "aorta no-touch" technique using composite and sequential methods. *Heart Surg Forum* 2002; 5: 114-8.
12. D'Arrigo G, Scolaro A, Lomeo A. Off-pump myocardial revascularization. The single-suture technique: How to avoid any complication. *Heart Surg Forum* 2002; 6: E10-1.
13. Ferguson TB Jr, Hammill BG, Peterson ED, DeLong ER, Grover FL. A decade of change-risk profile and outcomes for isolated coronary artery bypass grafting procedures, 1990-1999: A report from the STS National Database Committee and the Duke Clinical Research Institute. Society of Thoracic Surgeons. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 480-90.
14. Arom KV, Flavin TF, Emery RW, Kshetry VR, Janey PA, Petersen RJ. Safety and efficacy of off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 704-10.
15. Angelini GD, Taylor FC, Reeves BC, Ascione R. Early and midterm outcome after off-pump and on-pump surgery in Beating Heart Against Cardioplegic Arrest Studies (BHACAS 1 and 2): A pooled analysis of two randomised controlled trials. *Lancet* 2002; 359: 1194-9.
16. Ishida M, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, et al. Perioperative advantages of off-pump coronary artery bypass grafting. *Circ J* 2002; 66: 795-9.
17. Cooley DA. Con: Beating-heart surgery for coronary revascularization: Is it the most important development since the introduction of the heart-lung machine? *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 1779-81.
18. Gundry SR, Romano MA, Shattuck OH, Razzouk AJ, Bailey LL. Seven-year follow-up of coronary artery bypasses performed with and without cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 1273-8.
19. Subramanian VA, McCabe JC, Geller CM. Minimally invasive direct coronary artery bypass grafting: Two-year clinical experience. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1648-53.
20. Poirier NC, Carrier M, Lesperance J, Cote G, Pellerin M, Perrault LP, et al. Quantitative angiographic assessment of coronary anastomoses performed without cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 292-7.
21. Amano A, Hirose H, Takahashi A, Nagano N. Coronary artery bypass grafting using the radial artery: Midterm results in a Japanese institute. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 120-5.
22. Vander Salm TJ, Kip KE, Jones RH, Schaff HV, Shemin RJ, Aldea GS, et al. What constitutes optimal surgical revascularization? Answers from the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI). *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 565-72.
23. Sabik JF, Gillinov AM, Blackstone EH, Vacha C, Houghtaling PL, Navia J, et al. Does off-pump coronary surgery reduce morbidity and mortality? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 698-707.
24. Scott R, Blackstone EH, McCarthy PM, Lytle BW, Loop FD, White JA, et al. Isolated bypass grafting of the left internal thoracic artery to the left anterior descending coronary artery: Late consequences of incomplete revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 173-84.
25. Anyanwu AC, Al-Ruzzeh S, George SJ, Patel R, Yacoub MH, Amrani M. Conversion to off-pump coronary bypass without increased morbidity or change in practice. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 798-802.