

Is Prompt Surgical Treatment of an Abdominal Aortic Aneurysm Justified for Someone in Their Eighties?

Masato Tochii, MD,^{1,2} Hitoshi Ogino, MD,¹ Hitoshi Matsuda, MD,¹ Kenji Minatoya, MD,¹
Hiroaki Sasaki, MD,¹ and Soichiro Kitamura, MD²

Objectives: The aim of this study is to review the early and long-term results and quality of life after abdominal aortic aneurysm (AAA) surgery in octogenarians to justify our prompt surgical intervention.

Patients and Methods: We reviewed the consecutive 444 patients who underwent graft replacement of AAA in our center from October 1997 to September 2002. The median age of the patients was 72.3. An elective operation was carried out in 401 cases (90.3%) and an emergency operation in 43 cases (9.7%). We evaluated the early and long-term results of AAA surgical treatment, including the quality of life after hospital discharge.

Results: There were 12 hospital deaths (2.7%) in the early outcomes, 11 of which (25.6%) were during emergency operations, and only one patient (0.2%) died among the elective cases ($p < .0001$). In the early results, the emergency operation ($p = 0.0001$) was the only risk factor in the early deaths investigated by the multivariate logistic regression; patients aged 80 years and over did not constitute a risk factor. There were 36 late deaths, but none related to AAA surgical treatment. The strongest predictors for late mortality included patients aged 80 years and over ($p = 0.027$), male gender ($p = 0.048$), chronic renal failure with preoperative serum creatinine level equal to or greater than 1.5 mg/dl ($p = 0.043$), a history of atherosclerotic obliterans ($p = 0.009$), and an emergency operation ($p < .001$) investigated by the Cox hazard multivariate logistic regression. Among the survivors, 86.1% of the patients aged 80 years and over were able to maintain their previous lifestyles with the independent activities of everyday life.

Conclusions: AAA surgical treatment in octogenarians had comparable results with younger patients, in either elective or emergency settings. The extension of indications for AAA elective surgery in octogenarians might lead to a lower rate of emergency settings and subsequently to better early and late surgical outcomes. (*Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 15: 23–30)

Key words: abdominal aortic aneurysm, octogenarian, surgical treatment

Introduction

Surgical indication for abdominal aortic aneurysm (AAA) in elderly patients depends on the risk of the operation compared with the risk of rupture of the

unoperated aneurysm in the natural course of events. However, the surgical risk tends to rise with age because of the increase in the prevalence of various diseases associated with declines in the homeostatic reserve. Our principle is not to deny AAA surgical

From ¹Department of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, Suita, and ²Department of Cardiovascular Surgery, Fujita Health University, Toyoake, Japan

Received January 29, 2008; accepted for publication February 12, 2008

Address reprint requests to Hitoshi Ogino, MD: Department of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan.

©2009 The Editorial Committee of *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. All rights reserved.

treatment even in patients aged 80 years and over if the surgical risk would not exceed the risk of rupture, and if the surgery would not impair the quality of life. The aim of this study is to review early and long-term results, including the quality of life after AAA surgical treatment in octogenarians, to justify our prompt surgical intervention.

Patients and Methods

We reviewed the consecutive 444 patients who underwent graft replacement of AAAs in our center during a 5-year period, from October 1997 to September 2002. All patients had infrarenal AAAs and underwent in-situ graft replacements of the aneurysm. Patients having suprarenal AAAs, redo cases, and patients undergoing concomitant coronary artery bypass grafting were excluded from this study. The patients' profiles are shown in Table 1. This study includes all 444 cases. Male patients comprised 83.3% of the cases, and the male-to-female ratio was 4:1. An elective operation was carried out in 401 cases (90.3%), and an emergency operation in 43 (9.7%). In the emergency settings, there were 30 cases of a ruptured AAA and 13 of an impending ruptured AAA. The median age of patients was 72.3, ranging from 49 to 89. Octogenarian patients numbered 69 (15.5%), and 375 of all the patients (84.5%) were less than 80 years old. The ratio of emergency operations was significantly higher ($p = 0.003$) in the octogenarians (20.3%; 14/69), but only 7.7% (29/375) in patients younger than 80. Two cases, aged 85 and 87, had a previous history of stent graft implantation for the AAA. They had undergone surgical treatment 2 years after the stent grafting. One patient underwent an elective operation for the severe coagulopathy resulting from a type I endoleak of the previous stent, and the other underwent an emergency operation for AAA rupture. The maximum diameter of the aneurysm was 54.9 ± 10.3 (35–110) mm. The past history is also shown in Table 1. Ischemic heart disease was detected in 182 cases (41.0%), 68 of which had undergone percutaneous coronary intervention, and 45 had a previous history of coronary artery bypass grafting. Thirty patients were suffering from chronic renal failure, and 8 had been maintained with hemodialysis. We evaluated the early and long-term results of AAA surgical treatment. Surgical treatment was indicated for aneurysms larger than 45 mm, even for smaller ones with expansion rates exceeding 10 mm per year, and for all cases of ruptured

Table 1. Patients' profiles

	Number of patients	%
Total	444	
Male gender	370	83.3
Age	72.3 ± 7.6 (49–89) years	
Maximum diameter	54.9 ± 10.3 (35–110) mm	
Elective	401	90.3
Emergency: rupture	30	6.8
Emergency: impending rupture	13	2.9
Hypertension	351	79.1
Hyperlipidemia	243	54.7
Diabetes mellitus	55	12.4
Cerebrovascular disease	50	11.3
Ischemic heart disease	182	41.0
COPD	36	8.1
Chronic renal failure (Cr ≥ 1.5 mg/dl)	30	6.8
maintained by HD	8	1.8
TAA/TAAA	27	6.1
Aortic dissection	29	6.5
Atherosclerotic obliterans	27	6.1

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; Cr, creatinine; HD, hemodialysis; TAA/TAAA, thoracic and/or thoracoabdominal aortic aneurysm.

or impending rupture of the aneurysm. The emergency settings included ruptured and impending ruptured AAAs. An impending AAA rupture was defined as a nonruptured, large symptomatic AAA that had undergone graft replacement within 24 hours after the diagnosis.

Our strategy involves performing dipyridamole myocardial scintigraphy for preoperative evaluation of coronary artery disease in all cases in elective settings. This is followed by coronary angiography only for patients having positive findings of myocardial ischemia detected by the scintigram, and having past histories of coronary artery disease or of surgical or catheter intervention. In a case of significant coronary artery stenoses, a catheter intervention or coronary artery bypass grafting was performed before AAA surgery. Coronary artery bypass grafting was carried out simultaneously with graft replacement of the AAA for patients having a large AAA (greater than 70 mm) and/or severe coronary artery disease. These patients having concomitant surgery were excluded from this study.

Clinical data collection, definition, and follow-up

The data were collected from the medical records. The preoperative complications and past histories were

defined as the following criteria: (1) ischemic heart disease included myocardial infarction with a history of enzymatic elevation and echocardiographic signs of necrosis and angina pectoris diagnosed by coronary angiography and scintigraphy; (2) chronic obstructive pulmonary disease with less than 70% of forced expiratory volume in one second; (3) chronic renal failure with serum creatinine (Cr) level equal to or more than 1.5 mg/dl; (4) thoracic and/or thoracoabdominal aortic aneurysm (TAA/TAAA); unoperated aneurysm over 40 mm in diameter; (5) past history of aortic dissection; (6) atherosclerotic obliterans for patients having intermittent claudication with significant arterial stenosis. Mortality in the early results included hospital deaths from all causes. The surviving patients were followed up in our outpatient clinic or other local clinic after hospital discharge. The most recent information was obtained by mailing and calling the patients or their families. For looking at the long-term outcome, we mailed a questionnaire to all patients who had survived the operation and returned home. Recent information about patients whose addresses were uncertain was obtained from their most recent clinical records. We asked the patients or their families about the clinical histories and daily activities after discharge and, if the patient had died, the cause of death and time. The end point of the late outcome was defined as death from any cause.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard deviation. A statistical analysis comparing the two groups was performed with an unpaired two-tailed Student's *t*-test for the means or χ^2 test for categorical variables, for which the relative risk with 95% confidence interval was calculated. The two-sided *p* values were calculated with Pearson's χ^2 test or, if expected frequencies fell below 5, with Fisher's χ^2 test. The actual survival curve was obtained by the Kaplan-Meier life table method, and statistical analysis was calculated with the log-rank test. The Cox hazard analysis model was used to evaluate the independent risk factors of the early and late results. Stepwise logistic regression was used to select the independent variables that could predict stronger factors for the early and late outcomes and included all the univariate variables with a *p* value less than or equal to 0.2. Independent variables were expressed as an odds ratio (OR), and the related *p* value was also reported. Significant factors from the univariate analysis were

Table 2. Early outcome

Hospital death	12/444	2.7%
Elective	1/401	0.2%
Rupture	10/30	33.3%
Impending rupture	1/13	7.7%
Major complication	52/444	11.7%
Blood transfusion	246/444	55.4%
Operation time	266.5 \pm 91.7 mins	
Hospital stay (survivors only)	20.5 \pm 14.0 days	

then entered into the multivariate analysis. In the Cox hazard model, the independent variables were expressed as an odds ratio, and the related *p* value and 95% confidence interval (95% CI) were also reported. The *p* values less than or equal to 0.05 were considered a statistically significant difference.

Results

Early outcome

There were 12 hospital deaths (2.7%) in the early results (Table 2). Among the elective cases, only one patient died (0.2%). This patient had previously undergone bifurcated stent implantation because at 85 years of age he was considered to be a very high-risk patient for surgery. Elective graft replacement was required because of severe coagulopathy resulting from a type I endoleak at the proximal portion of the previous stent, but he expired from multiple organ failure. Among 30 cases of ruptured aneurysm, 10 patients died (33.3%) during their hospital stay. The causes of death were bowel necrosis in 4 patients and renal failure in 2. The other 4 patients, who had suffered from cardiac arrest before the operation and emergency laparotomy under cardiopulmonary resuscitation, died because of multiple organ failure, though the graft replacement had been successful. The remaining patient had died of impending aneurysm rupture, pan peritonitis from the previously inserted peritoneal dialysis catheter. Major complications occurred in 52 patients (11.7%) (Table 3). The incidence of fatal complications after the surgical treatment—heart failure, respiratory insufficiency requiring a tracheotomy, acute renal failure requiring hemodialysis, and bowel necrosis—was significantly higher in the emergency cases (*p* < .0001, respectively). Bowel necrosis was observed in 4 patients with ruptured AAAs, and a laparotomy was carried out in the 4. They all died, though a colectomy had been successfully performed on 2. Colon resection could not be carried out for the

Table 3. Complications

	Elective (n = 401)	Emergent (n = 43)	P value
Cardiac	4 (1.0%)	6 (14.0%)	<.0001
Respiratory	6 (1.5%)	8 (18.6%)	<.0001
Acute renal failure	4 (1.0%)	10 (23.3%)	<.0001
Ileus	7 (1.7%)	1 (2.3%)	0.7858
Gastrointestinal bleeding	3 (0.7%)	1 (2.3%)	0.2982
Bowel necrosis	0	4 (9.3%)	<.0001
Distal emboli	12 (3.0%)	1 (2.3%)	0.8053
Postoperative bleeding	4 (1.0%)	1 (2.3%)	0.4328
Graft infection	1 (0.2%)	0	0.7430

Table 4. Univariate and multivariate analysis related early death

	Univariate p value	Multivariate OR (95% CI)	Multivariate p value
Male gender	0.4725		
Aged over 80	0.0030	3.314 (0.924–11.891)	0.0660
Emergency operation	<.0001	68.553 (8.042–584.364)	0.0001
Hypertension	0.6880		
Hyperlipidemia	0.5690		
Diabetes mellitus	0.7601		
Ischemic heart disease	0.7596		
Old cerebral infarction	0.7275		
COPD	0.6820		
Chronic renal failure	0.6936		
TAA/TAAA	0.8280		
Aortic dissection	0.7470		
Atherosclerotic obliterans	0.4380		

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; TAA/TAAA, thoracic and/or thoracoabdominal aortic aneurysm; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

other 2 patients because necrosis had spread throughout most of the colon and the small intestine.

In the early results, only the emergency operation (p = 0.0001; OR = 68.553; 95% CI, 8.042–584.364) was the risk factor for an early death by multivariate logistic regression (Table 4). In the previous clinical history, patients aged 80 years and over at the time of the operation and gender did not correlate with the early outcomes.

Long-term outcomes

A long-term follow-up was carried out for the 432 patients (97.3%) who survived and were discharged from the hospital. Recent clinical data were obtained by phone or from a questionnaire mailed to 335 patients (77.5%) or their families. The other cases were checked out through their most recent clinical records. Follow-up periods were 33.8 ± 24.8 months. There were 36 late deaths (Table 5), 14 of which (38.9%) were attributed to

Table 5. Causes of late death

	Number	%
Total late deaths	36	
Malignant tumor	14	38.9
Thoracic and/or thoracoabdominal aortic aneurysm	5	13.9
Ischemic heart disease	5	13.9
Respiratory failure	4	11.1
Gastrointestinal bleeding	3	8.3
Brain hemorrhage	2	5.6
Cerebral infarction	2	5.6
Renal failure	1	2.8

malignant tumors, 5 (13.9%) to rupture of the TAA/TAAA, and an unnamed number of hospital deaths after surgical treatment for the TAA/TAAA. The other causes of late death were ischemic heart disease in 5 patients, respiratory failure in 4, gastrointestinal bleeding in 3, cerebrovascular event in 4, and renal failure in

Table 6. Univariate and multivariate analyses related late death

	Univariate p value	Multivariate OR (95% CI)	Multivariate p value
Aged 80 years and over	<.001	2.091 (1.088–4.017)	0.027
Male gender	0.059	7.414 (1.017–54.050)	0.048
Hypertension	0.926		
Hyperlipidemia	0.143	0.917 (0.487–1.726)	0.788
Diabetes mellitus	0.440		
Old cerebral infarction	0.764		
Ischemic heart disease	0.842		
COPD	0.086	2.002 (0.821–4.881)	0.127
Chronic renal failure (Cr \geq 1.5 mg/dl)	0.131	2.359 (1.026–5.425)	0.043
TAA/TAAA	0.341		
Aortic dissection	0.913		
Atherosclerotic obliterans	0.036	3.279 (1.350–7.964)	0.009
Emergency operation	<.001	5.663 (2.711–11.833)	<.001

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; Cr, creatinine; TAA/TAAA, thoracic and/or thoracoabdominal aortic aneurysm; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

1. The late complications correlated with the previous surgical treatments of AAA in 14 patients. Eleven patients experienced mechanical ileus, 2 underwent additional surgical treatment for the aneurysm of common iliac arteries after straight grafting of the AAA, and 1 had undergone surgical intervention for the pseudoaneurysm at the previous anastomotic site. All 3 patients survived after the second operation.

The strongest predictors of late mortality included patients aged 80 years and over ($p = 0.027$; OR = 2.091; 95% CI, 1.088–4.017), male gender ($p = 0.048$; OR = 7.414; 95% CI, 1.017–54.050), chronic renal failure with serum creatinine (Cr) level equal to or greater than 1.5 mg/dl ($p = 0.043$; OR = 2.359; 95% CI, 1.026–5.425), history of atherosclerotic obliterans ($p = 0.009$; OR = 3.279; 95% CI, 1.350–7.964), and emergency operation ($p < .001$; OR = 5.663; 95% CI, 2.711–11.833) by the Cox hazard multivariate logistic regression (Table 6).

The quality of life was assessed by asking the patients or their families. Among the survivors, 86.1% of patients aged 80 and over and 91.6% of patients less than 80 were able to maintain their previous lifestyles with independent activities in everyday life. The median age of the octogenarians upon investigation was 84.5 years, ranging from 83 to 92. More than 80% of the octogenarians had returned to their preoperative environment and lifestyle, though some patients were transferred to extended care or nursing facilities after surgical treatment.

The Kaplan-Meier life table analysis demonstrates the long-term survival curve. The late results were significantly worse in the emergency operation group, as

well as in the early results (Fig. 1). By comparing the late survival after the elective operation between the octogenarians and patients less than 80 years old, we found no significant difference in the 3-year survival rate (Fig. 2). The 1- and 3-year rates were 97.6% and 90.9% in the octogenarians and 97.8% and 92.9% in patients less than 80 years old.

Discussion

Life expectancy has recently become longer, and the ratio of elderly patients subjected to AAA surgical treatment has increased. The surgical indication for AAA in elderly patients depends on the relative risk of the operation compared with the risk of rupture of the unoperated aneurysm in the natural course. However, the surgical risk tends to rise with age because of increases in the prevalence of various diseases associated with declines in the homeostatic reserve.^{1,2} Our principle is not to deny surgical treatment of AAA even in patients aged 80 and over if the surgical risk would not exceed the risk of rupture, and if the surgery would not impair the quality of life. We reviewed the early and late outcomes of AAA surgical treatment to evaluate the early and long-term results to justify our prompt surgical intervention even for elderly patients.

The early results of the elective surgical treatment for AAA had been well established because of the development of high-quality artificial graft and postoperative management. The surgical outcome of the emergency operation, however, is not satisfactory. The early mor-

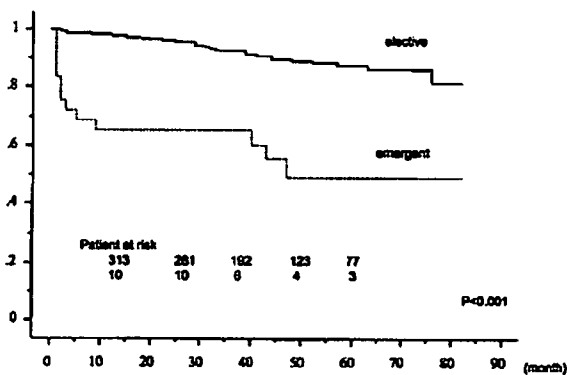


Fig. 1. Kaplan-Meier analysis of late survival compared with elective and emergency cases.

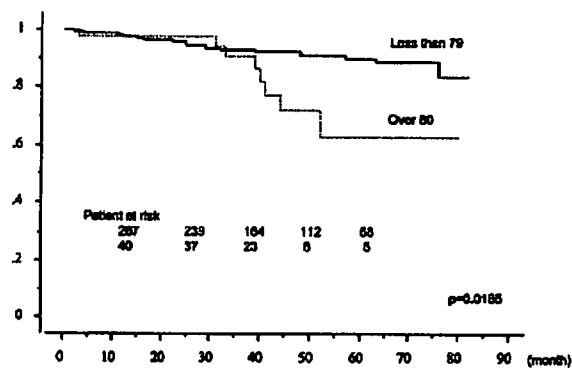


Fig. 2. Kaplan-Meier analysis of late survival among elective operations compared with octogenarians and patients less than 80 years old.

tality reported after the surgical treatment for non-ruptured AAA, including impending rupture, was 0 to 8.0%, and for the emergency operation for the ruptured AAA it was 34 to 68%.³⁻¹⁵⁾ These reports did not include patients who suffered from cardiac arrest after the aneurysm's rupture and died before reaching the hospital; however, the actual mortality rate for ruptured AAA would be even higher than that of previous reports.

In our study, the early mortality rate was extremely low and showed satisfactory surgical outcomes in comparison with previous reports.³⁻¹⁵⁾ In the early results, the mortality rates for elective and emergency operations were 0.2% and 25.6%, respectively. The predictive risk factor for early mortality was only the emergency settings. The previous clinical history, patients aged 80 years and over at the time of operation, and gender did not correlate with the early outcome.

The incidence of postoperative fatal complications after an emergency operation was higher than after an elective operation.^{1-3,16-19)} The higher rate of fatal complications, such as bowel necrosis or renal failure, especially with rupture cases, led to the unsatisfactory surgical outcome if the graft replacement itself had undergone completely. In our study, heart failure, respiratory insufficiency required a tracheotomy, acute renal failure required hemodialysis, and bowel necrosis was significantly higher in the emergency cases ($p < .0001$, respectively) than in the elective cases.

The ratio of the emergency operation in our study was significantly higher in the octogenarians than in younger patients (20.3% versus 7.7%; $p = 0.003$). The higher incidence of emergency operations among the

elderly patients may be attributed to the reluctance of primary care physicians to refer elder patients for surgery. The mean age of the patients was slightly higher ($p = 0.0046$) in the emergency cases (74.4 ± 9.0 years old) compared with that of the elective cases (72.0 ± 7.3 years old). In 50% (7/14) of the octogenarians who had undergone emergency operations, surgical treatment had been denied at referral because of patient refusal, unacceptable operative risk, or poor general condition judged by the local clinicians. Surgical treatment was finally indicated for those patients in the emergency settings because of rupture or large symptomatic aneurysm.

The elderly patients were considered a high risk for surgery, not only because of their poor general condition, but also because of the potentially high risk of postoperative complications. In the elective operations, there were no fatal complications except for one patient that died after the operation as a result of multiple organ failure following serious reoperative coagulopathy. We sometimes experience difficulties during the postoperative management of elderly patients. However, there were no fatal complications in the elective cases, and there was no significant difference ($p = 0.4278$) in the hospital stay after elective surgical treatment between the octogenarians (21.4 ± 12.6 days) and the younger patients (19.8 ± 13.5 days).

The previous report showed that bowel necrosis and renal failure after surgical treatment had strongly correlated with the worse early surgical outcomes.^{6,7,16-18)} The reported bowel necrosis after AAA surgical treatment was from 3.1 to 18.9% in ruptured AAAs, and 0 to 0.6% in nonruptured AAAs.¹⁶⁻²¹⁾ The reported mortality rate

for cases with bowel necrosis was 42 to 78%, remarkably higher than for those without bowel infarction. The incidence and mortality rate of our study, which was complicated by the bowel necrosis, was significantly high, as in previous reports. Four patients (9.3%) experienced bowel necrosis after the emergency operation, and all of them died, though no cases of necrosis were found among the elective operations ($p < .0001$). Two patients died after the second laparotomy as a result of serious and extensive necrosis of the bowel and small intestines impeding colectomy, and the other 2 died despite early diagnosis and treatment with colectomy. The prevention of bowel ischemia is important to achieve a better surgical outcome, since the infarction of the colon or small intestine leads to higher mortality.

Acute renal failure requiring temporary hemodialysis was observed in 14 patients, 4 in the elective patients and 10 in the emergency patients. The 4 patients of elective cases could finally be weaned from hemodialysis, and they survived after the operation. Acute renal failure occurred in the 10 patients having emergency operations. Only 3 survived this complication despite early and aggressive dialytic therapy.

In the late surgical outcome, no late deaths related directly to AAA surgical treatment. Malignant tumor was the most frequent cause of death in these cases as it also is reported to be in general statistical data in Japan. Heart failure after myocardial infarction and respiratory insufficiency were the next frequent causes of late death. Five patients died in the late period because of TAA/TAAAs. In 6.1% ($n = 27$), the size of either nontreated aneurysm was more than 30 mm at the initial AAA surgical treatment, and 5 patients died in the late period as a result of ruptured TAA/TAAA or of fatal complications after an elective graft replacement for either aneurysm. By Cox hazard multivariate regression, neither the history of nontreated TAA/TAAAs nor of aortic dissection was the predictive factor for late mortality. Careful observation and adequate treatment are important for better long-term survival, including surgical or nonsurgical treatment, because of generalized atherosclerosis, of which AAA is the one manifestation.

The predictive risk factor for early mortality was only the emergency operation. The strongest predictors for late mortality included an age of 80 years and over, male gender, chronic renal failure with serum Cr level equal to or exceeding 1.5 mg/dl, a history of atherosclerotic obliterans, and emergency operation resulting from the Cox hazard multivariate analysis. Surgical

treatment is therefore recommended in elective settings for octogenarians and also for younger patients, and close follow-up is necessary for patients having a high risk of late mortality.

The surgical treatment for AAA, even in elderly patients, did not exceed the risk of rupture and did not impair the quality of life. By the Kaplan-Meier life table analysis, the 5-year survival rate after the elective surgical treatment was 62.9% in the octogenarians and 90.4% in patients less than 80 years old. This rate is considered to be an excellent late outcome of surgical treatment for octogenarians, compared with the 5-year survival rate of Japan's general population aged 80, which was 50%.^{5,12} In this study, patients aged 80 years and over who had survived had kept their previous lifestyles with independent activities of everyday life. The 3-year survival rate was similar in the octogenarians and younger patients (90.9% and 92.9%, respectively), and 86.1% of octogenarians who survived had returned to their preoperative environments and lifestyles, except for those who were transferred to nursing or extended care facilities.

Conclusions

The surgical treatment for AAA in octogenarians had comparable results with the younger patients in either the elective or emergency settings. We believe that the optimal method to reduce the high mortality rate of emergency AAA operations is to repair AAA in the elective setting with early diagnosis. The extension of indications for AAA elective surgery in octogenarians might lead to a lower rate of emergency settings and subsequently to better early and late surgical results.

References

1. Menard MT, Chew DK, Chan RK, Conte MS, Donaldson MC, et al. Outcome in patients at high risk after open surgical repair of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003; 37: 285-92.
2. Schermerhorn ML, Finlayson SR, Fillinger MF, Buth J, Marrewijk C, et al. Life expectancy after endovascular versus open abdominal aortic aneurysm repair: results of a decision analysis model on the basis of data from EUROSTAR. *J Vasc Surg* 2002; 36: 1112-20.
3. Paty PS, Lloyd WE, Chang BB, Darling RC 3rd, Leather RP, et al. Aortic replacement for abdominal aortic aneurysm in elderly patients. *Am J Surg* 1993; 166: 191-3.
4. Hibino N, Tsuchiya K, Nakajima M, Sasaki H,

- Matsumoto H, et al. Surgical treatment of abdominal aortic aneurysm in octogenarians. *Jpn J Cardiovasc Surg* 2002; 31: 321–4.
5. Matsubara J, Sakamoto S, Shikata H, Hida K, Kobayashi M, et al. Is arterial surgery advisable for patients over 80 years of age? *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2001; 42: 375–9.
 6. Van Damme H, Sakalihan N, Vazquez, Desiron Q, Limet R. Abdominal aortic aneurysm in octogenarians. *Acta Chir Belg* 1998; 98: 76–84.
 7. Robson AK, Currie IC, Poskitt KR, Scott DJ, Baird RN, et al. Abdominal aortic aneurysm repair in the over eighties. *Br J Surg* 1989; 76: 1018–20.
 8. Soisalon-Soininen SS, Salo JA, Mattila SP. Abdominal aortic aneurysm surgery in octogenarians. *Vasa* 1998; 27: 29–33.
 9. Treiman RL, Levine KA, Cohen JL, Cossman DV, Foran RF, et al. Aneurysmectomy in the octogenarian. A study of morbidity and quality of survival. *Am J Surg* 1982; 144: 194–7.
 10. Ihaya A, Chiba Y, Kimura T, Morioka K, Uesaka T, et al. Abdominal aortic aneurysmectomy in the octogenarian. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 4: 247–50.
 11. Falk V, Vettelschoß M, Walther T, Schorn B, Autschbach R, et al. Surgical treatment of abdominal aortic aneurysms of octogenarians. *Cardiovasc Surg* 1996; 4: 727–31.
 12. Sugawara Y, Takagi A, Sato O, Miyata T, Takayama Y, et al. Surgical treatment of abdominal aortic aneurysms in octogenarians. *Jpn Circ J* 1996; 60: 328–33.
 13. Harris KA, Ameli FM, Lally M, Provan JL, Johnston KW, et al. Abdominal aortic aneurysm resection in patients more than 80 years old. *Surg Gynecol Obstet* 1986; 162: 536–8.
 14. Chalmers RT, Stonebridge PA, John TG, Murie JA. Abdominal aortic aneurysm in the elderly. *Br J Surg* 1993; 80: 1122–3.
 15. Dean RH, Woody JD, Enarson CE, Hansen KJ, Plonk GW Jr. Operative treatment of abdominal aortic aneurysms in octogenarians. When is it too much too late? *Ann Surg* 1993; 217: 721–8.
 16. Previti FW, Onopchenko A, Glick B. The ruptured abdominal aortic aneurysm in a community hospital. A 5-year study. *Am Surg* 1992; 58: 499–501.
 17. Björck M, Bergqvist D, Troëng T. Incidence and clinical presentation of bowel ischaemia after aortoiliac surgery—2930 operations from a population-based registry in Sweden. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996; 12: 139–44.
 18. Meissner MH, Johansen KH. Colon infarction after ruptured abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg* 1992; 127: 979–85.
 19. Bast TJ, van der Biezen JJ, Scherpenisse J, Eikelboom BC. Ischaemic disease of the colon and rectum after surgery for abdominal aortic aneurysm: a prospective study of the incidence and risk factors. *Eur J Vasc Surg* 1990; 4: 253–7.
 20. Järvinen O, Laurikka J, Salenius JP, Lepäntalo M. Mesenteric infarction after aortoiliac surgery on the basis of 1752 operations from the National Vascular Registry. *World J Surg* 1999; 23: 243–7.
 21. Welborn MB 3rd, Seeger JM. Prevention and management of sigmoid and pelvic ischemia associated with aortic surgery. *Semin Vasc Surg* 2001; 14: 255–65.

第2部 特集

臨床医が知っておきたい Tissue Engineering の知識

Tissue Engineering による心臓弁

大阪工業大学工学部生体医工学科 教授

志里俊哉

Shigami Toshiyuki

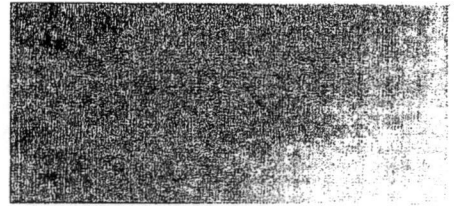
はじめに

わが国では年間約1万件の心臓弁置換術が施行されており、代用弁としてパイロライトカーボンを用いた機械弁あるいはブタ由来の生体弁が使用される。機械弁は抗凝固が必要であり、生体弁はグルタルアルデヒドで細胞および細胞間マトリックスを架橋処理することによって抗原性を減弱しているものの、残存している細胞片や異種抗原が石灰化を誘発すると考えられている¹⁾。機械弁はもとより、生体弁も前述の架橋処理によってレシピエントの生体反応による分解を阻止しているため、いずれも“非生体”であり、レシピエントの組織に置換されることはない。

一方、わが国では極めて数少ないものの、世界的には凍結保存同種弁（ホモグラフト）も数多く使用されている。ホモグラフトは他家組織であるが架橋等の化学処理は行われておらず、部分的に

はレシピエント組織の浸潤が期待される。しかし、抗原性や凍結保存時の組織損傷による劣化や石灰化が指摘されており²⁾、長期的な成績では生体弁より少し良い程度ではないと思われる。これらに対し、Tissue Engineering による心臓弁（TE弁）では、レシピエント細胞の浸潤によるリモデリングと再生を経て、いずれ組織全体が完全に自己化されることを目論んでいる（図1）。折しも本年2月には、米国CryoLife®社のCryoValve® SGがTE弁として初めて米国食品医薬品局（food and drug administration:FDA）の認可を受けた。

本稿では、最近のTE弁の状況ならびに国立循環器病センターと共同でわれわれが開発しているTE弁について述べる。なお、筆者は工学者であり、工学的視点からの記載となることに理解を得たい。



臨床医が知っておきたい Tissue Engineering の知識

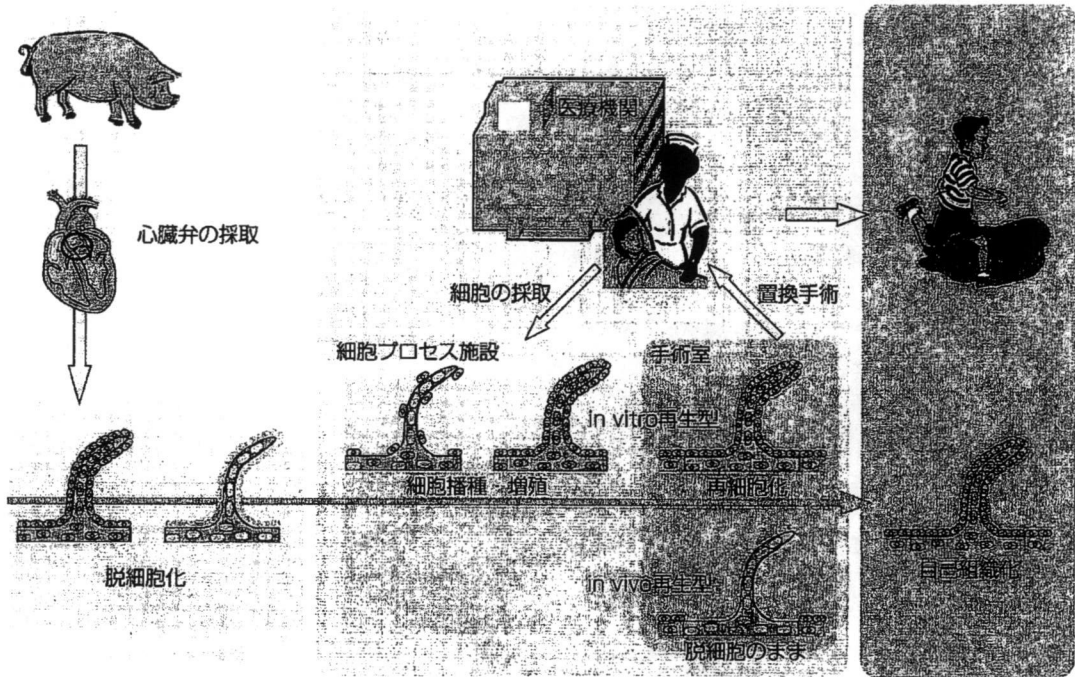


図1 Tissue Engineeringによる心臓弁

足場材料

Tissue Engineering による再生医療では、“細胞”，“増殖因子”，“足場”が三要素とされるが、心臓弁や大動脈などではコラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスが力学的特性を担っており、特に足場が重要である³⁾。TE 弁の足場としては、脱細胞化組織あるいは生体吸収性材料が使用される。生体吸収性材料の場合は、吸収性縫合糸と同様の材料を用いて弁形状を作成するものであり、形状安定性や量産性といった製造面では優位である⁴⁾。

一方、脱細胞化組織の場合は、同種あるいは異種心臓弁から細胞成分を除去するものであり、形

状を作成する必要がなく、力学特性も比較的保存されているという優位点がある。本稿では、臨床使用のより進んでいる脱細胞化組織を用いた TE 弁に限定して紹介する。

前述のように、ホモグラフトは架橋処理されていないものの、完全には自己化されない。脱細胞化 TE 弁では架橋処理を行わず、ドナー細胞成分を除去することによって抗原性を除去するとともにドナー組織の分解性を保持することで、レシピエントによる完全な自己化を達成する。多くの場合、細胞成分の除去は、界面活性剤や酵素、高・低張液を組み合わせて処理した後、界面活性剤や細胞残渣を洗浄除去することによって行われる。

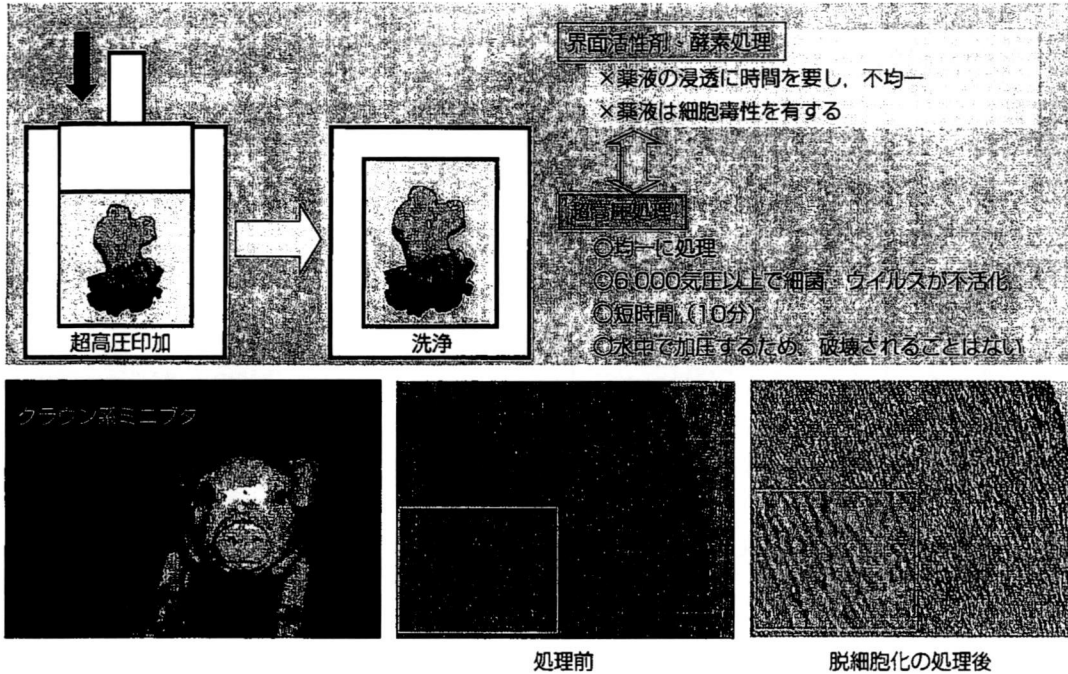


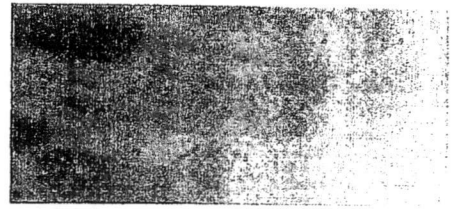
図2 超高压印加による脱細胞化

界面活性剤にはドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate : SDS) や Triton[®] X-100, デオキシコール酸ナトリウムなどが、酵素にはトリプシンや DNase, RNase などが用いられる。どの処理剤が最適かについてはさまざまな報告があるが、各グループが個々のレシピを使用しているのが現状である⁵⁻⁸⁾。界面活性剤は細胞毒性を有するので、その除去は重要である。

臨床応用された TE 弁

前述のように、本年、CryoLife[®] 社のヒト組織を脱細胞化した TE 肺動脈弁が FDA の認可を受け、市販が開始された。これに先立つのは 8 年前、2000 年 10 月に同社のブタ組織を脱細胞化した

TE 弁の SynerGraft[®] が欧州 CE マークの認証を受け、臨床使用が開始された。しかし、その成績は惨憺たるもので、オーストリアで 2001 年から行われた小児患者 4 例に対する右室流出路再建では、1 週間後の 1 例を含めて 1 年以内に 3 例が死亡し、これに伴って 1 例は術後 2 日で摘出を余儀なくされた。いずれも残存した異種抗原による炎症反応が原因であると考えられている⁹⁾。その後、同社はヒト組織を脱細胞化した TE 肺動脈弁 CryoValve[®] SG の開発を続け、FDA の認可を得ることに成功した。脱細胞化には低張液と酵素の組み合わせを使用している。成人ロス手術での肺動脈弁移植 23 例における 4 年間のフォローアップでは、徐々に圧較差が上昇したもののホモグラ



臨床医が知っておきたい Tissue Engineering の知識

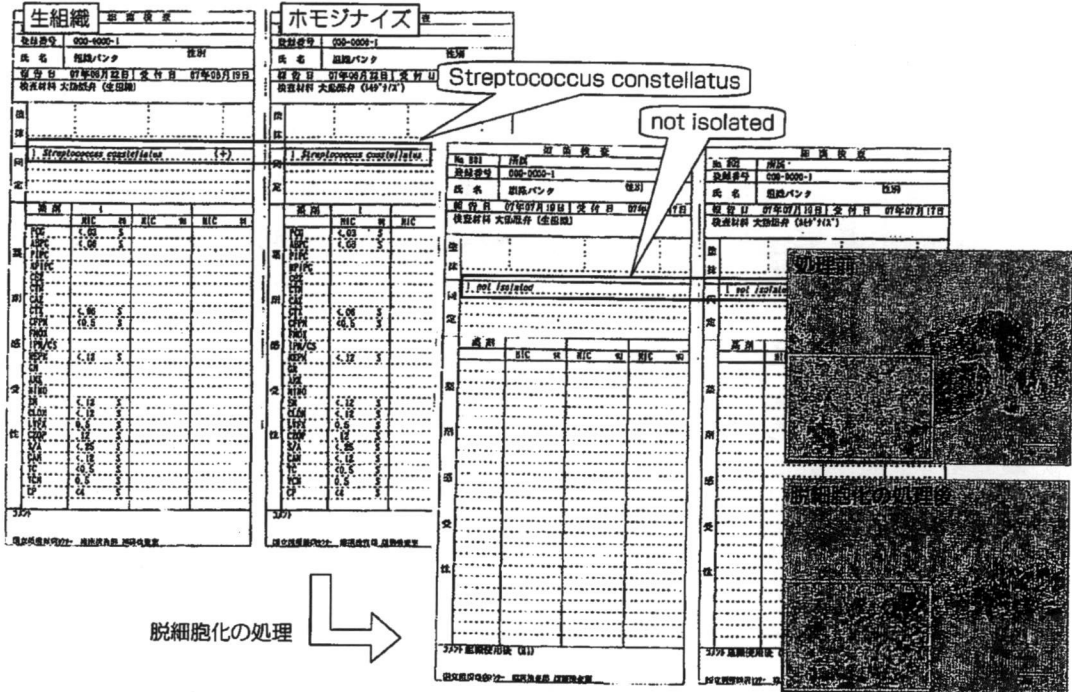


図3 ホモグラフトの細菌検査結果

フトと比較して有意差はなかったと報告されている¹⁰⁾。同社のウェブサイトによると、2000年からの臨床使用の実績は1,800例を超えており、399例の4年間のフォローアップでは弁に起因する死亡率は2%以下、小児患者での圧較差は平均24mmHgであった。

一方、独ベルリン医科大学のKonertzらは、脱細胞化したブタあるいはヒト肺動脈弁に、前もって伏在静脈から採取した自己内皮細胞を播種し、ロス手術での肺動脈弁移植に用いている。脱細胞化には界面活性剤を使用している。2000年から行われた23例の5年間の中期成績では、再手術1例、死亡1例を除く21例について、正常

な弁機能を報告している¹¹⁾。また、移植後6年の患者から血管壁の一部を採取し、内腔面が内皮細胞層に覆われていることと血管壁深部までの自己細胞化を報告している¹²⁾。ベンチャー企業のAutoTissue社を設立し、Matrix Pと命名されたTE肺動脈弁は、ウェブサイトによるとすでに臨床使用の実績が1,000例を超えている。

現状のTE弁の問題点

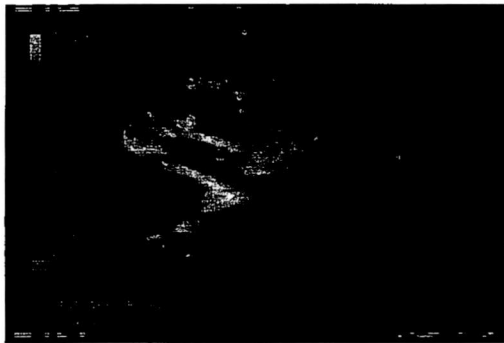
ロス手術は手技が複雑であるものの、代用大動脈弁として自己組織に勝るものはない。古いデータであるが、ロス手術後20年間のフォローアップによると、肺動脈弁位の高モグラフトに起因す



DVD 1 TE肺動脈弁を、同種ミニブタの肺動脈位に置換移植した



DVD 3 移植6カ月あるいは12カ月後に摘出



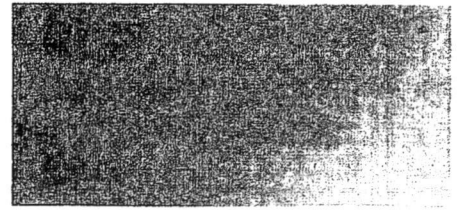
DVD 2 経時的なエコー観察によって弁機能を確認

る再手術例が2割程度ある¹³⁾。前述の臨床使用されているTE弁はいずれも肺動脈弁であり、主にロス手術における肺動脈弁位に使用することを目的としている。不思議なことに、最も必要であるTE大動脈弁はいまだに安定した成績が報告されておらず、大規模な臨床例はない。

ホモグラフトの供給を考えると、ドナーはブタが適当である。ヒトと旧世界サル以外のほ乳類が持つ α -Gal エピトープは超急性拒絶反応を引き起こすことが知られている。また、ブタ内在性レトロウイルスのヒトへの感染が以前から危惧され

てきたが、現在では大きな心配はないと思われる¹⁴⁾。これらは、脱細胞化過程における除去が必須であるが、将来的にはドナーブタの遺伝的改良も図られるであろう。脱細胞化の評価は一般に組織染色とDNA定量によって行われるが、臨床での安全性を確保するための統一的な評価項目、評価方法、評価基準の確立のため、ISOへの提案が検討されている。

移植前に患者細胞を播種する必要があるのか、ないのかは明確な結論が得られていない。報告を見る限りでは、細胞を播種しているグループの方が多ように思われる。広く扱われる製品にするためには細胞を播種しない、いわゆるin vivo再生型の方が適していると考えられるが、長期成績を左右するのであれば、in vitro再生型もやむを得ないであろう。この場合、患者から得たiPS細胞が細胞プロセス施設にて使用されることになると思われる。



われわれの TE 弁

界面活性剤は少なからず細胞毒性を有するため、移植後の自己組織化に影響を与える可能性がある。われわれは、界面活性剤を用いない脱細胞化法として超高静水圧印加法を用いている。ドナーはクラウン系ミニブタを選択した。液体中で対象組織に超高圧 (980MPa, 1 万気圧) を印加してドナー細胞を破壊し、洗浄液で細胞残渣を洗浄除去する (図 2)。超高圧によってレトロウイルスを不賦化でき、細菌類を死滅できる効果も合わせ持つ。ホモグラフトには細菌検査で感染が認められ、移植に供されずに破棄される組織が少なからず存在する。そのような感染ヒト組織に対して、本脱細胞化法は有効であり、貴重な提供組織を有効に利用できる可能性がある (図 3)。

ミニブタ肺動脈弁から本法によって脱細胞化し

た TE 肺動脈弁を、同種ミニブタの肺動脈位に置換移植した (DVD 1)。細胞は播種していない。経時的なエコー観察によって弁機能を確認するとともに (DVD 2)、移植 6 カ月あるいは 12 カ月後に摘出した (DVD 3)。肉眼所見で異常は認めず、正常組織と同様の平滑な内腔を呈していた (図 4)。また、TE 弁の組織内に浸潤したレシピエント細胞は主に平滑筋細胞と線維芽細胞であり、内腔面は内皮細胞にて完全に覆われていた (図 5)。また、その細胞浸潤は他の界面活性剤を用いているグループよりも早期に完了していた。

TE 肺動脈弁の同種置換移植で良好な成績を得たため、より必要とされる TE 大動脈弁の開発に着手した。ミニブタによる大動脈弁置換術は容易でないため、まず導管部の有効性を検討した。その結果、TE 肺動脈弁導管部と異なり無視できな

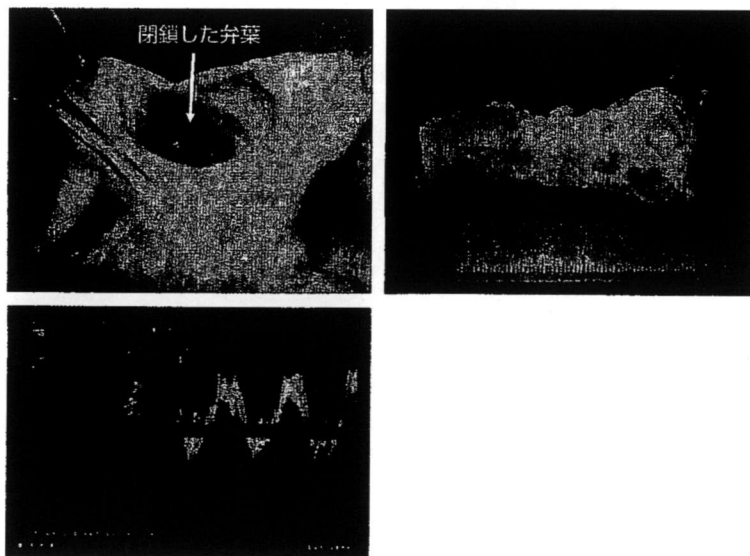


図 4 TE肺動脈弁の移植6カ月所見

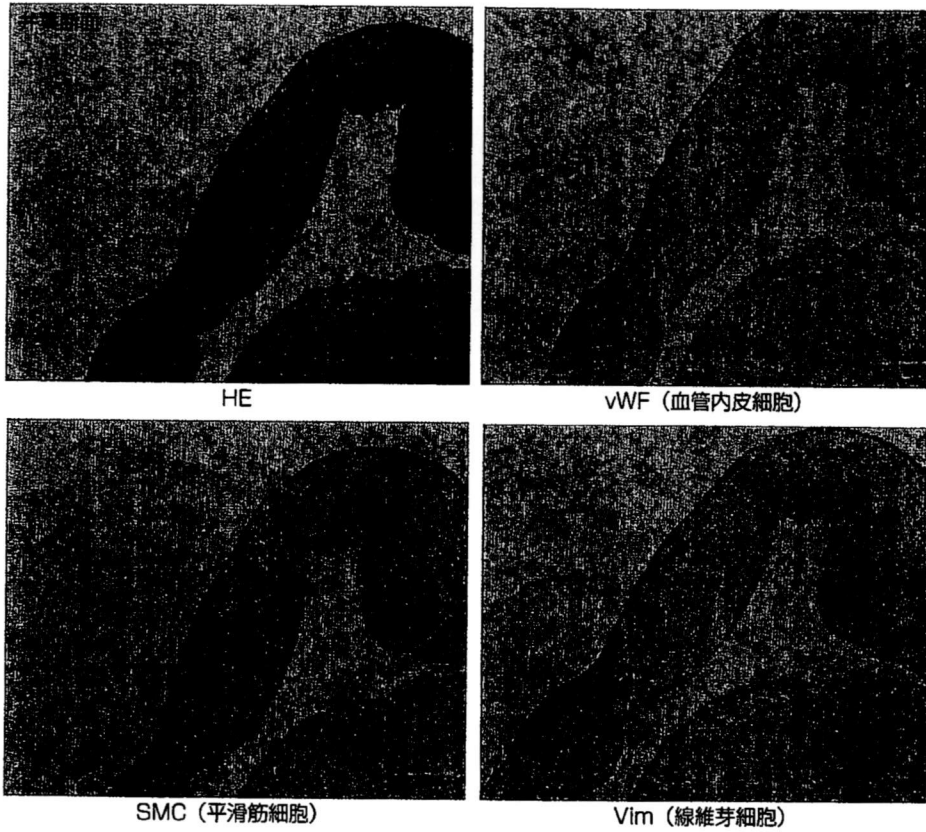


図5 TE肺動脈弁の移植6カ月組織像

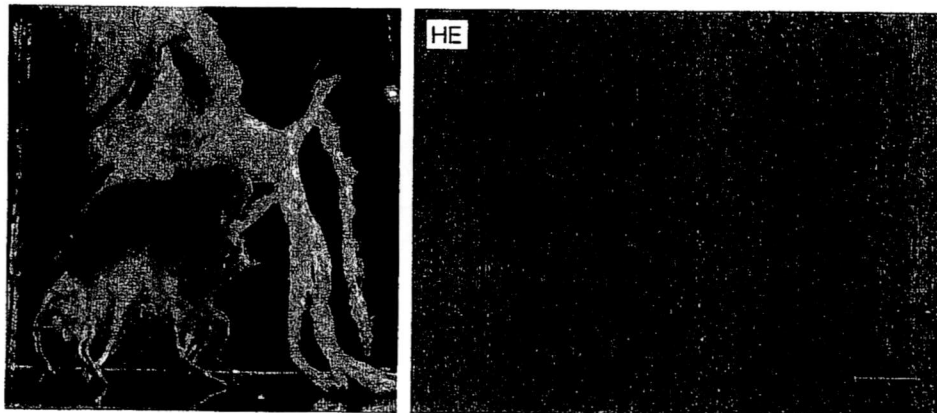
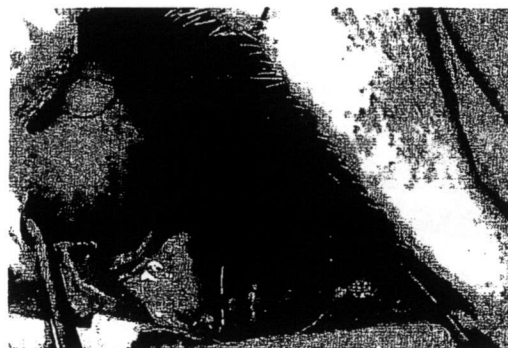


図6 TE大動脈弁



臨床医が知っておきたい Tissue Engineering の知識



DVD 4 TE肺動脈弁と同様に同種ミニブタ大動脈に置換移植

い石灰化を経験した。石灰化の可能性因子をできる限り除去するという発想で開発を行い、現在は多孔質コラーゲン構造体を主体とした TE 大動脈

導管を開発している (図6)。本 TE 弁はドナー細胞のみならず、酵素によって弾性線維も除去しており、熱架橋によってコラーゲンの力学強度を向上させることで動脈位に必要な強度と縫糸耐性を付与している。TE 肺動脈弁と同様に同種ミニブタ大動脈に置換移植したところ (**DVD 4**)、より早期の細胞浸潤を達成するとともに、石灰化も抑制できた (図7)。多孔質構造体が移植後早期の再細胞化を可能にしていると考えられる。しかしながら、少数ではあるが無視できない石灰化や狭窄を来す場合がある。現在のところ、これらの原因が明確に解明できておらず、in vitro 再生型を含めた検討を継続中である。

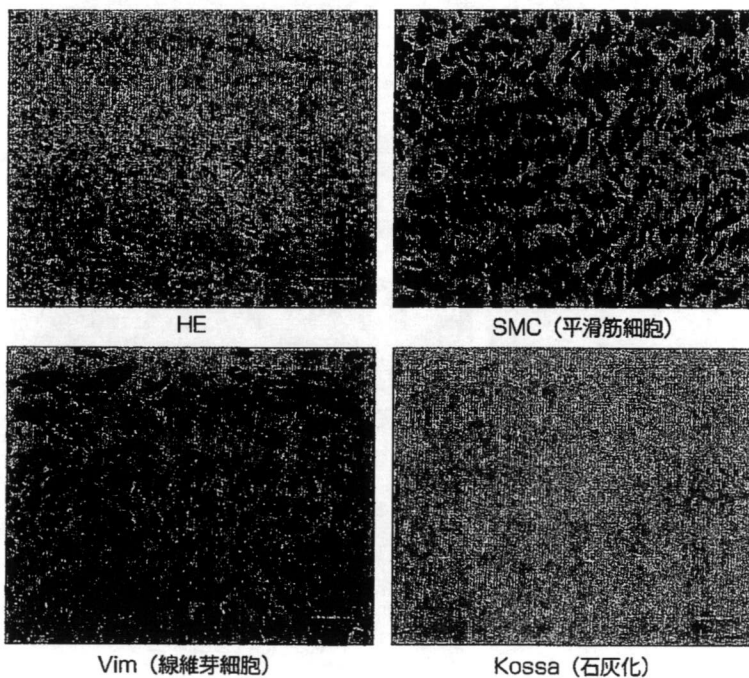


図7 TE大動脈弁導管部の移植3カ月組織像

おわりに

現在の生体弁は耐久性向上のための改良もあって、弁膜症例の9割を占める高齢患者において15～20年間は使用が可能である。これはホモグラフトと比べても遜色なく、代用弁としてあまり問題のない状況である。しかし、先天性小児患者からは再置換を必要としないTE弁が強く望まれている。現在のところ、TE肺動脈弁は臨床使用に耐え得るものが開発されたといえるが、TE大動脈弁はいまだ開発途上である。われわれのTE大動脈弁もあと一歩改良が必要だと感じている。いずれ開発されたTE大動脈弁はまず小児患者を中心に使用され、その耐久性が証明されることによって、いずれ全患者にとっての第一選択肢となるであろう。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費、科学技術振興調整費、文部科学研究費、循環器病研究委託費の補助を受けて行われた。また、国立循環器病センター北村惣一郎前総長や中谷武嗣臓器移植部長の指導のもと、庭屋和夫元医長、湊谷謙司医長、寺田堂彦研究員をはじめとした多くの医師、臨床工学技士、研究員、学生、研究補助員などの方々の共同研究の賜である。この場をお借りしてお礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Schoen. FJ. et al. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 79 (3), 2005, 1072-80.
- 2) Brockbank, KG. et al. Interstitial ice formation in cryopreserved homografts: a possible cause of tissue deterioration and calcification in vivo. *J Heart Valve Dis.* 9 (2), 2000, 200-6.
- 3) 田畑泰彦. 再生医療を支えるバイオマテリアルと基盤技術. 再生医療のためのバイオマテリアル. 東京, コロナ社, 2006, 1-19.
- 4) Shinoka. T. Tissue engineered heart valves: autologous cell seeding on biodegradable polymer scaffold. *Artif Organs.* 26(5), 2002, 402-6.
- 5) Tudorache. I. et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis.* 16 (5), 2007, 567-73.
- 6) Hopkins. RA. et al. Decellularization reduces calcification while improving both durability and 1-year functional results of pulmonary homograft valves in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 137 (4), 2009, 907-13.
- 7) Knight, RL. et al. Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells. *J Heart Valve Dis.* 14 (6), 2005, 806-13.
- 8) Seebacher. G. et al. Biomechanical properties of decellularized porcine pulmonary valve conduits. *Artif Organs.* 32 (1), 2008, 28-35.
- 9) Simon. P. et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 23 (6), 2003, 1002-6.
- 10) Bechtel. JF. et al. Fifty-two months' mean follow up of decellularized SynerGraft-treated pulmonary valve allografts. *J Heart Valve Dis.* 17 (1), 2008, 98-104.
- 11) Dohmen. PM. et al. Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg.* 84 (3), 2007, 729-36.
- 12) Dohmen. PM. et al. In-vivo repopularization of a tissue-engineered heart valve in a human subject. *J Heart Valve Dis.* 16 (4), 2007, 447-9.
- 13) Chambers. JC. et al. Pulmonary autograft procedure for aortic valve disease: long-term results of the pioneer series. *Circulation.* 96 (7), 1997, 2206-14.
- 14) Paradis. K. et al. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science.* 285 (5431), 1999, 1236-41.

バイオメカニクス

大阪工業大学工学部生体医工学科

藤里 俊哉

Toshia FUJISATO



1. はじめに

バイオメカニクスは生体の構造と機能を力学的に理解し、その結果を応用する学問であり¹⁾、医工学においても材料からリハビリやスポーツトレーニング、ロボットに至るまで幅広く応用されている。人工臓器関連においては、心筋や骨格筋の特性、運動時における骨や関節の応力変化、そして血管内や心臓弁での血液流動などについて古くから研究が行われてきた。また、運動や力学刺激が細胞や組織に与える影響についての研究も数多く行われている^{2),3)}。申し訳ないことに筆者はバイオメカニクスが専門ではないのだが、人工臓器や組織工学の研究に際してはその対象となる臓器や組織の力学特性を知ることは必須であり、作製した人工臓器や組織がその特性を発揮するかどうかを確認することもまた、必須である。そこで本稿では、これらに関し、筆者らの脱細胞化心臓弁の力学特性、培養細胞を用いた人工骨格筋の収縮特性、そして電気インピーダンス法による生体材料の評価について、最近の結果を紹介させていただく。

2. 脱細胞化心臓弁の力学特性

既存の人工弁とは異なり、脱細胞化処理された心臓弁ではレシピエント細胞の浸潤によるリモデリングと再生を経て、いずれ組織全体が完全に自己化されることを目論んでいる^{4),5)}。ほとんどの脱細胞化処理では界面活性剤を使用するが、少なからず細胞毒性を有するため、移植後の自己組織化に影響を与える可能性がある。我々は界面活性剤を

用いない脱細胞化法として超高静水圧印加法を用いている。これは液体中で対象組織に超高圧(980 MPa, 1万気圧)を印加してドナー細胞を破壊し、洗浄液で細胞残渣を洗浄除去する方法で⁶⁾、超高圧によってレトロウイルスを不活化でき、細菌類を死滅できる効果も併せもつ。屍体から提供された同種心臓弁(ホモグラフト)は、我が国でも新たな代用弁として使用されつつあるが、細菌検査で感染が認められたために、移植に供されずに破棄されるものが少なからず存在する。そのような感染ヒト組織に対しても本脱細胞化法は有効であり、貴重な提供組織を有効に利用できる可能性がある。ここでは、感染のため使用できない同種心臓弁を脱細胞化処理し、その力学特性を検討した結果を示す。

心臓弁組織は常に高い血流負荷に抗しており、組織の強度は変形方向に配向したコラーゲン線維が担っている。超高圧による脱細胞化法ではコラーゲン線維の配向を乱すことなく脱細胞化が達成されるため、心臓弁や大動脈などの力学的負荷が高い組織の脱細胞化法として有効であると考えられる。引張り試験を行ったところ、脱細胞化弁尖組織の半径方向における応力歪み曲線は低歪み領域から急激に立ち上がり、未処理組織の場合に見られる無荷重変形領域が消失していた。これは、脱細胞化処理の過程において弁尖組織内のグリコサミノグリカン含有量が減少したためと考えられる。グリコサミノグリカンは、その保水能によって弁尖組織の厚みの維持と変形性に大きく関与している。しかしながら、グリコサミノグリカンは分解を受けやすいため、脱細胞化処理によって含有量が減少し、応力歪み曲線の傾きが上昇したと考えられる。さらには、グリコサミノグリカンの損失は弁尖組織の断面積を減少させるため、見かけの破断応力の増加として現れたと考えられる。同様に、血管壁組織の円周方向における応力歪み曲線でも、脱

■ 著者連絡先

大阪工業大学工学部生体医工学科
(〒535-8585 大阪府大阪市旭区大宮5-16-1)
E-mail: fujisato@bme.oit.ac.jp

細胞化処理によって曲線の傾きが上昇した。これは弁尖の場合と同様に、細胞や多糖などが喪失したため血管壁の厚みは減少するが、血管壁の強度を担うコラーゲン線維は物性の低下などを生じないので、見かけの破断強度が増加したためと考えられる。いずれにせよ、脱細胞化処理したミニブタ心臓弁の動物移植実験結果より、この程度の変化であれば移植後に影響を与えないと考えている。

3. 培養細胞を用いた人工骨格筋の収縮特性

がん摘出や事故などにより筋組織が広範囲に失われた場合、患者自身の筋組織が欠損部に自家移植される。移植片を摘出した部分の組織は再生するものの、筋力の低下や損傷により患者の quality of life (QOL) が低下することは免れない。また、筋ジストロフィーや先天性ミオパチーなどの種々の筋原性疾患では、現在でも根治療法が存在しない。近年、これらのがん摘出・事故による筋組織の損失や重篤な筋疾患に対して、遺伝子治療や再生医療技術による治療が模索されている^{7)~9)}。ここでは、脱細胞化組織を人工腱として使用し、筋芽細胞を包埋したコラーゲングルと複合化させることで作製した人工骨格筋の収縮特性を示す^{10),11)}。

筋芽細胞には、マウス横紋筋由来の株化細胞であるC2C12を使用した。ピンで固定した2個の人工腱の間にC2C12細胞を包埋したコラーゲングル溶液を滴下し、ゲル化させた。当初の2日間は通常のウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) で培養し、続く12日間はウマ血清を含むDMEMで培養した。ウマ血清を含む培地で培養することによって筋芽細胞は融合し、筋管細胞へと分化する。その際、ゲル包埋培養では全体的にゲルの体積が収縮するが、両端をピンで固定しておくことによって、ピン間を収縮させずに異方向的に収縮させることができる。このため、得られた人工骨格筋は、長さ約15 mm、直径約0.5 mmの小さなダンベル状となり、内部の筋管細胞の走向は長軸方向と平行となる。透過型電子顕微鏡観察によって、内部にはサルコメア構造を有することも確認した。この人工骨格筋にパルス電圧を与えて等尺性収縮力を測定したところ、肉眼でその収縮を確認でき、収縮力は印加電圧が高くなるにつれて、そしてパルス幅が長くなるにつれて大きくなった。また、印加電圧を50 V、パルス幅を2 msとして周波数を0.5 Hzから20 Hzまで変化させたところ、周波数が高くなるにつれて収縮力が大きくなった。

生体骨格筋では、収縮力は収縮弛緩する筋繊維の数および神経からの刺激の頻度に依存する。人工骨格筋では、印

加電圧およびパルス幅の値を大きくすることで収縮弛緩する筋管細胞数が増加し、それによって等尺性収縮力が大きくなったと考えられる。また、生体骨格筋では刺激の頻度が高くなると、筋が弛緩する前に次の刺激が与えられるため、最初の収縮力よりも大きくなる「強縮」が見られる。人工骨格筋でも周波数が高くなるにつれて収縮力が大きくなったことから、強縮が生じたと考えられる。

これらのことから、人工骨格筋は生体筋に似た収縮特性を示すことがわかった。しかし、最大収縮力は生体筋の10分の1程度しかなく、組織断面を観察したところ、筋管細胞は表層近傍には多いが内部は少ないことがわかった。現在、より太く、生体の骨格筋に近い人工骨格筋を作製すべく、作製および培養方法を改良しているところである。

4. 電気インピーダンス法による生体材料の評価

ハイドロゲルは生体と類似する材料として、培養担体や薬物送達用基材などに用いられており、その基本的性質である保水能および力学特性を評価することは品質管理の観点からも重要である。保水能の評価では、質量測定によってゲル中の水分量を求める方法が一般的であり、完全な乾燥を必要とする。また、力学特性の評価では、クリープ試験や動的粘弾性試験によって粘弾性を測定する方法が用いられているが、力学的強度の低いハイドロゲルでは測定に際して破壊されることがある。ここでは、非破壊的定量評価法としての電気インピーダンス法の有効性を、生体由来の天然高分子であり、医療用材料として用いられているゼラチンハイドロゲルを対象に検討した結果を示す¹²⁾。

電気インピーダンス法は、測定対象物に微小な交流電流を流してインピーダンスを測定することによって、その構造を非破壊的に推定する技術である。既に体脂肪率の測定や患者の浮腫の診断、食品の品質評価などに応用されている。一般にハイドロゲルの電気的性質は、高分子鎖のネットワーク上に存在するイオンとゲル内部に保持されている水溶液中の電解質イオンによって特徴付けられる。ゲル構造を多く持つ生体組織の電気インピーダンスは組織内の水分量が増加するにつれて低下するとされており、ゼラチンゲルの電気インピーダンスもゼラチン濃度の低下、すなわち含水率の増加につれて上昇した。これは、ゼラチンゲル中に保持されている生理食塩水の量に変化し、電解質イオンであるナトリウムイオンと塩化物イオンの総量が増加したためと考えられる。塩化ナトリウム濃度の異なるゼラチンゲルを作製して電気インピーダンスを測定したところ、塩化ナトリウム濃度の増加に伴い電気インピーダンスは低下した。また、同じ含水率であっても、ホルムアルデヒド

溶液によって架橋したゲルでは電気インピーダンスは上昇した。これは、ゼラチン分子鎖が化学的に架橋されたことによってネットワークの網目がより細かくなり、電解質イオンの可動性を妨げているためであると考えられる。これらは、ゼラチンゲルの電気インピーダンスは高分子鎖ネットワークとその間隙に存在する溶媒中の電解質イオンとの相互作用に依存しており、含水率だけでなくゲル内部の網目構造の変化も捉えていることを示唆している。圧縮試験を行ったところ、ゼラチン濃度の増加に伴いゼラチンゲルの圧縮剛性も増加し、また、架橋により圧縮強度は増加するものの脆弱な特性に変化した。さらに、ゼラチンゲルの電気インピーダンスと圧縮剛性との間には相関関係が見られた。これらは、ゼラチン分子鎖のネットワークの増加が圧縮剛性に寄与しており、架橋によってネットワークやヘリックス自体の可動性が低下したことが原因であると考えられる。

以上のことから、電気インピーダンス法にて、ハイドロゲルの構造変化およびそれに伴う水分状態の変化を調べることで、構造の変化に起因するハイドロゲルの力学特性も推定できることがわかった。電気インピーダンス法は、水分を含むことの多い生体材料の非破壊的検査法として有効であり、前述の脱細胞化処理後の組織の検査や、人工骨格筋の培養に伴う成熟過程の追跡にも適用できることを確認している。

5. おわりに

本来ならば、バイオメカニクスを専門とする研究グループの最新の業績を幅広く紹介すべきと思ったが、筆者には荷が重く、やむなく筆者らの組織工学の研究におけるバイオメカニクス的な部分を紹介させていただいた。その点をお詫びさせていただく。

前述のように、人工臓器や組織工学による医療用具の開発では力学特性の解析や評価は欠かせない。また、特に脱細胞化組織のような生物由来素材を含む組織工学製品では、移植前の非破壊的な検査が臨床での安全性を確保するために重要である。現在、そのための統一的な評価項目や評価方法、評価基準がInternational Organization for

Standardization/technical committee194 (ISO/TC194)などで検討されている。

謝 辞

ここで示した研究は、寺田堂彦博士研究員や、山崎健一および近藤英雄大学院生などによって、厚生労働科学研究費、科学技術振興調整費、文部科学研究費、ヒューマンサイエンス振興財団などの補助を受けて行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 1) 林紘三郎：バイオメカニクス。コロナ社、東京、2000
- 2) Dado D, Levenberg S: Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 656-64, 2009
- 3) Fan X, Zou R, Zhao Z, et al: Tensile strain induces integrin beta1 and ILK expression higher and faster in 3D cultured rat skeletal myoblasts than in 2D cultures. *Tissue Cell* **41**: 266-70, 2009
- 4) 寺田堂彦, 木村 剛, 岸田晶夫, 他: バイオスキヤフォールド. *バイオマテリアル* **26**: 309-19, 2008
- 5) 藤里俊哉: *Tissue Engineering*による心臓弁. *Circulation Up-to-Date* **4**: 470-8, 2009
- 6) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, et al: Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. *High Press Biosci Biotech* **1**: 161-5, 2007
- 7) Dennis RG, Kosnik PE, Giobert ME, et al: Excitability and contractility of skeletal muscle engineered from primary cultures and cell lines. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: 288-95, 2001
- 8) Stern-Straeter J, Riedel F, Bran G, et al: Advances in skeletal muscle tissue engineering. *In Vivo* **21**: 435-44, 2007
- 9) Benchaoui R, Meregalli M, Farini A, et al: Restoration of human dystrophin following transplantation of exonskipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* **1**: 646-57, 2007
- 10) 山崎健一, 赤土和也, 林 宏行, 他: 無細胞生体由来組織とコラーゲンゲルとを足場とした培養骨格筋を用いたバイオアクチュエータの開発. *生体医工学* **46**: 690-7, 2008
- 11) Yamasaki K, Hayashi H, Nishiyama K, et al: Control of myotube contraction by electrical pulse stimulation for bio-actuator. *J Artif Organs* **12**: 131-7, 2009
- 12) 近藤英雄, 寺田堂彦, 山崎健一, 他: 電気インピーダンス法を用いたゼラチンハイドロゲルの力学特性の評価. *日本機械学会誌* **75**: 360-5, 2009