

Table 5. Multivariate Analyses of Early and Late Results

Variables	Hospital Mortality			Late Mortality			Reoperation		
	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
Age at operation	0.642	0.987	0.934-1.047	0.018	1.035	1.006-1.065			
Male gender									
Emergent operation	0.000	6.984	2.930-16.65	0.990	1.006	0.370-2.740			
Type A dissection	0.786	1.228	0.279-5.411	0.469	1.351	0.599-3.048	0.912	1.073	0.311-3.702
Marfan syndrome	0.506	0.594	0.128-2.759	0.015	2.912	1.229-6.897	0.525	0.687	0.216-2.184
Aortitis	0.651	0.716	0.169-3.037	0.009	3.086	1.325-7.187	0.850	1.153	0.263-5.065
Redo operation	0.752	1.199	0.331-4.350	0.023	2.556	1.138-5.740	0.144	2.881	0.097-11.90
Hypertension	0.364	1.829	0.497-6.733						
Diabetes mellitus	0.534	2.433	0.148-40.02	0.869	0.843	0.111-6.389			
Cerebrovascular disease	0.033	5.101	1.144-23.77	0.774	0.846	0.270-2.652			
Coronary artery disease	0.737	0.922	0.125-6.801	0.146	3.175	0.670-15.05			
Chronic renal failure	0.092	7.808	0.714-85.35	0.006	6.575	1.716-23.20			
Chronic obstructive pulmonary disease	0.553	1.634	0.323-8.264						
Pump time (minutes)	0.297	1.002	0.998-1.006	0.298	1.001	0.999-1.004			
Aorta clamp time (minutes)									
Use of bioprosthesis	0.353	0.325	0.030-3.474	0.597	0.749	0.257-2.186	0.002	5.346	1.838-15.55
Skirted proximal anastomosis technique	0.677	1.302	0.376-4.513	0.015	0.417	0.207-0.842	0.437	0.571	0.139-2.343
Direct button technique	0.027	0.270	0.085-0.860	0.602	0.826	0.403-1.693	0.239	0.431	0.106-1.750
Concomitant aortic surgery	0.178	0.311	0.057-1.697	0.936	1.035	0.452-2.367	0.237	0.291	0.038-2.250
Concomitant cardiac surgery	0.319	1.941	0.527-7.143	0.479	0.723	0.295-1.774			
Era of operation (after 1995)	0.341	0.524	0.138-1.982	0.969	1.014	0.490-2.100	0.442	0.501	0.086-2.916

95% CI = 95% confidential interval; OR = odds ratio.

Long-Term Survival

The mean follow-up duration was 106.1 ± 80.4 (2 to 306) months. The follow-up data were lost in 17 patients during the study period and the complete follow-up data were collected in 93.8%. A total of 45 late deaths (18.2%) were observed. Fourteen of those deaths were related to the composite valve prosthesis; graft infection in 7, cerebral hemorrhage under anticoagulation therapy in 4, gastrointestinal ischemia in 2, and acute myocardial infarction in one. Seven patients died from the rupture of

a residual aortic aneurysm or aortic dissection. The cause of the late death was unknown in 5 patients. The actuarial survival rate was 87.0%, 79.9%, and 72.9% at 5, 10, and 15 years respectively (Fig 1). A multivariate analysis showed that the age at operation, Marfan syndrome, aortitis, the presence of preoperative renal failure, the use of a standard proximal anastomosis and a redo operation were all significant independent predictors of late death (Tables 4; 5).

Reoperation

Twenty-four patients (9.5%) presented for reoperation of the ascending aorta and the aortic root. Some of the 24 patients had multiple indications for the reoperation. Of these patients, a prosthetic valve dysfunction was observed in 11 patients, graft detachment in 10 patients, and graft infection in 5 patients. Of the 11 patients with a

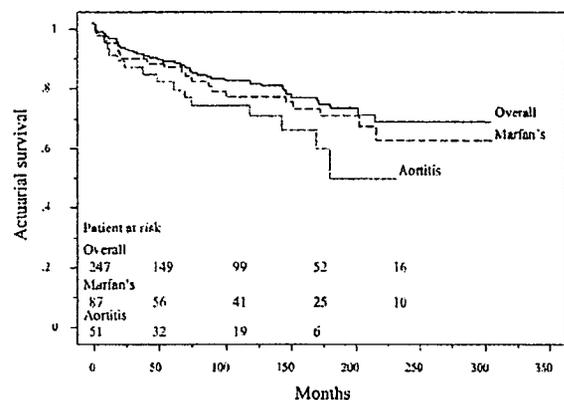


Fig 1. Overall survival curve and the influence of Marfan syndrome and aortitis on the actuarial survival.

Table 6. Procedures for Reoperation

Procedures Performed at Reoperation	No. of Patients
Aortic valve replacement	10
Recomposite graft replacement	8
Repair of graft detachment with/without coronary reconstruction	4
Homograft replacement	2
Total	24

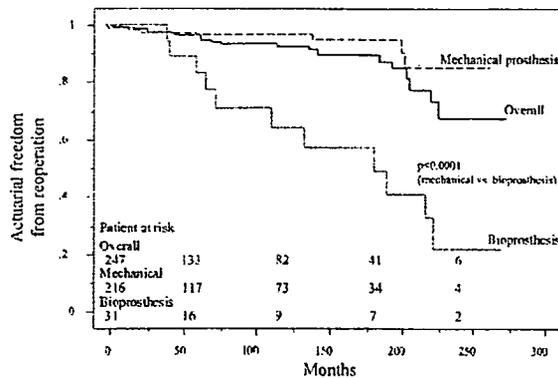


Fig 2. Actuarial freedom from reoperation of the ascending aorta and the aortic root in overall patients, patients with mechanical prosthesis, and patients with bioprosthesis.

prosthetic valve dysfunction, 9 of them underwent a secondary aortic valve replacement. The other 2 patients had a redo CGR for a coexisting graft detachment or a coronary ostial true aneurysm. Four patients with a graft detachment underwent a direct repair of the detachment with or without coronary reconstruction, and the other 6 patients with a graft detachment received a redo CGR. All the patients who were treated for a graft infection underwent a redo CGR. An aortic homograft was utilized in 2 patients. One patient underwent an aortic homograft root replacement due to methicillin-resistant staphylococcal prosthetic endocarditis 10 months after the initial CGR and concomitant total aortic arch replacement. He required a re-total arch replacement to treat the residual infection and a graft detachment 4 months later and died from an uncontrollable infection. Another patient who required an aortic homograft root replacement had giant-cell aortitis and repeated graft detachment. An aortic homograft was utilized for his third root replacement. He died 9 years after the aortic homograft root replacement. The procedures for reoperation are summarized in Table 6. Three patients (12.5%) died after the reoperation for graft infection. The reoperation free rates of the total patient population were 96.3%, 92.2%, and 89.7% at 5, 10, and 15 years, respectively (Fig 2). The multivariate analysis showed that the use of a bioprosthesis was the only significant independent predictor for reoperation (Tables 4; 5). In the patients who underwent a CGR with a mechanical valve, no prosthetic valve dysfunction was observed and the reoperation free rates were 96.5%, 96.5% and 95.0% at 5, 10, and 15 years, respectively (Fig 2). Univariate and multivariate analyses did not identify any variables as a significant predictor for reoperation in the patients who utilized mechanical valves.

Graft Infection

Ten patients (4.0%) developed a graft infection. Three of them experienced an accompanied graft detachment. Five patients underwent reoperation; a redo CGR in four patients and an aortic homograft root replacement in one. Three of them (60%) died after the reoperation. Five

patients were observed without reoperation, and four of them (80%) eventually died. The actuarial probability of remaining free of a graft infection was 95.5% at 15 years.

Detachment of the Graft Anastomosis

Fourteen graft detachments were observed in 12 patients (4.8%) including 6 patients with Marfan syndrome and 5 with aortitis. Seven detachments occurred at the proximal anastomosis. Of the 7 patients who developed a proximal graft detachment, the standard proximal anastomosis technique was utilized in 5 patients (5 of 105; 4.8%) and the skirted proximal anastomotic technique in 2 patients (2 of 147; 1.4%). The other 6 detachments developed at the coronary anastomosis. Of these 6 patients, Bentall and De Bono's original inclusion technique [1] was utilized in 2 patients, the graft interposition technique in 3, and the direct button technique in 1. One patient presented with multiple detachments at both the proximal and coronary anastomoses due to a graft infection. Ten of 12 patients with graft detachment underwent reoperation. One patient with a detachment of the proximal anastomosis accompanied by coronary true aneurysms has been followed up medically, and another patient with a detachment of the coronary anastomosis died from chronic renal failure before a reoperation was considered. The actuarial probability of remaining free of detachment of the graft anastomosis was 96.9% at 10 years and 95.5% at 15 years.

Thromboembolisms

Thromboembolic events occurred in 8 patients (3.2%); cerebral infarction in 7 and thromboembolism of the superior mesenteric artery in one. Seven patients had received anticoagulation therapy for the use of a mechanical valve. The actuarial probability of remaining free of thromboembolic events was 96.5% at 15 years.

Anticoagulant-Related Complications

Fourteen patients (5.6%) had complications related to anticoagulant therapy which required blood transfusion or in-hospital treatment; an intracranial hemorrhage in 7 patients, gastrointestinal bleeding in 5, and genital bleeding in 2. Four of the intracranial hemorrhages were fatal. In all, the actuarial probability of remaining free of these complications was 93.6% at 15 years.

Coronary Artery Complications

Coronary ostial aneurysms developed at 6 coronary anastomoses in 4 Marfan patients (1.6%). Of the 6 coronary ostial aneurysms, Bentall and De Bono's original inclusion technique was utilized in 3 of the anastomoses and the graft interposition technique was utilized in 3 anastomoses. A coronary obstruction was observed in 3 patients. Of the 3 patients, the Cabrol technique was utilized in 1 and the direct button technique in 2. Two of the 3 patients with a coronary obstruction had aortitis.

Event-Free Survival Rate

The actuarial probability of being alive and free from a prosthesis-related complication was 79.4%, 67.8%, and

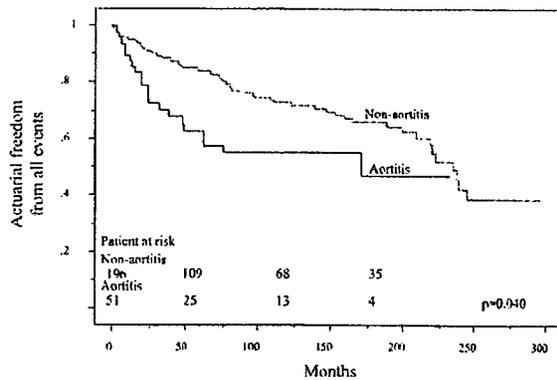


Fig 3. Actuarial freedom from all events including late deaths in aortitis and nonaortitis patients.

60.7% at 5, 10, and 15 years, respectively. The incidence of prosthesis-related complication was significantly high in aortitis patients (Fig 3).

Comment

Several large studies have demonstrated excellent outcomes associated with a CGR with low 30-day mortality rates ranging from 4.3 to 9.0% [2, 3, 7]. The current study documented a comparable result of 9.5% of the in-hospital mortality, even including that of the emergency surgeries. The mortality of elective surgery was 4.3%. Since 1995, no in-hospital death has occurred in 95 elective patients. The increased experience, as well as other factors, such as the development of a refined pump oxygenator system and the myocardial protection technique, the availability of "zero porosity" vascular grafts, and improved perioperative management, has contributed to the improvement of the outcome.

The actuarial survival rate was also comparable with the range of 62% to 93% at 10 years, which were previously published [7-9]. The present results suggest that one of the significant independent risk factors of late death is aortitis, which is predominant in Asian countries. The prevalence of aortitis leading to surgery is high in the current series. Takayasu arteritis was dominant among the 56 patients with the pathology of aortitis. The main pathologic findings associated with Takayasu arteritis are severe destruction of the medial elastic fibers and thickening of intima, media, and adventitia. The pathologic fragility causes frequent detachment of the prosthesis after an aortic valve replacement or CGR [10, 11]. Indeed, in the current study, late graft detachment was observed in 5 of 56 aortitis patients (8.9%). Although the appropriate approach to the aortic valve diseases associated with aortitis is unclear, we prefer a CGR, especially in the active stage, because the graft detachment was less frequent when treated with a CGR than with an isolated aortic valve replacement [10]. Ishikawa and colleagues [12] reported the long-term mortality of the patients having Takayasu arteritis with major complications who require surgical treatment was consider-

ably poor, with only 43% at 15 years [12]. In the present study, the 10-year and 15-year survival rates of aortitis patients were 69% and 58%, respectively. In addition, the incidence of prosthesis-related complications was significantly high in aortitis patients; 5 graft infections (8.9%), 4 cerebral infarctions (7.1%), and 2 coronary arterial obstructions (3.4%). Not only the poor natural history of this subset, but also the frequent need for a reoperation for graft detachment, the life-long steroid therapy, and the high incidence of graft infection can thus influence the poor long-term survival.

Although controversy remains in regard to whether Marfan syndrome decreases the late survival rate [2, 7, 13, 14], the current results suggested that Marfan syndrome was one of the significant predictors of late deaths. The high incidence of an aortic dissection and an aneurysm of the residual aorta, or subsequent operations can potentially increase the late mortality in Marfan patients. In fact, in the current series, the incidence of a reoperation on the residual aorta was significantly higher in Marfan patients (27 patients; 29%) than in non-Marfan patients (5%). In addition, 16 of 27 Marfan patients who required an operation on the residual aorta required a third or fourth operation. The incidence of graft detachment and coronary ostial true aneurysm were significantly high in Marfan patients. To reduce these complications, a direct button technique can be the most favorable technique, especially in Marfan patients. The size of the side hole made in the graft must be reduced to fit the diameter of the coronary artery, and a suture should be placed inside the origin of the coronary artery so that a residual aortic wall can be eliminated [15].

A composite valve graft root is one of the best treatment strategies for an acute type A aortic dissection and aortic regurgitation [16, 17]. In the current study only 25 patients had acute type A aortic dissection. The low prevalence of acute aortic dissection in this study can be explained by the fact that most of patients with acute type A aortic dissection and aortic regurgitation were effectively treated by an aortic valve resuspension and ascending aortic replacement, unless aortic root was pathologically dilated or destroyed by the dissection process. In addition, recently, an aortic valve-sparing operation has been used as an alternative strategy for this condition.

Although recent studies report an excellent early survival rate for a proximal reoperation after a CGR, ranging between 70% and 86% [15, 18, 19], a redo CGR remains a challenging procedure with a high morbidity and mortality, especially in the setting of graft infection. Graft detachment is one of the predominant indications for late reoperation [3, 8, 15, 20-23]. In the present study, graft detachment occurred in 11 patients with Marfan syndrome or aortitis. Extreme caution is necessary for the anastomosis in these patient subsets. The direct button technique is widely utilized and has reduced the rate of reoperation on the ascending aorta or aortic valve after a CGR (0% to 19% at 3 to 10 years) [2, 3, 8, 9, 14, 20]. Since 1985, we have utilized the direct button technique for coronary artery reconstruction and that technique has

contributed to reducing the incidence of graft detachment and coronary complications. At present, the direct button technique is our first-line technique. However, if there is anatomic difficulty or dense adhesion precluding the direct button anastomosis, especially in a redo root surgery, the alternative is a short-length graft interposition technique [4]. The current data support the efficacy of the graft interposition technique with nearly the same long-term reliability as the direct button technique. With regard to the proximal anastomosis, the skirted technique has been the current preference. The concept of translocating the prosthetic valve, initially described by Cabrol and colleagues in 1981 [5], was adopted in 1989 to secure the anastomosis without bleeding and to reduce the risk of late graft detachment. In the skirted technique, the prosthetic valve does not apply direct stress on the aortic annulus by separating the suture-line of the prosthetic valve from that of the aortic annulus [24]. Although the current study was not designed to compare the two proximal anastomosis techniques and it was not assumed that the skirted technique would completely surpass the standard technique, the current results demonstrate some advantages of the skirted technique by improving the frequency of late proximal graft detachment and the long-term survival. The results encourage the continued utilization of the skirted technique, especially in patients with a fragile aortic annulus, such as those with aortitis and Marfan syndrome. However, 2 patients experienced proximal graft detachment after a CGR using the skirted technique. One patient had giant cell aortitis and another had Behçet disease. The former underwent a second skirted CGR and repeated graft detachment of the right coronary ostium and was eventually treated with an aortic homograft root replacement. The latter underwent 3 CGR procedures for repeated graft detachment. In patients with a fragile inflammatory aortic pathology, further refinement of the anastomotic technique, such as buttress sutures from the lateral side of the aortic wall for reinforcement of the prosthesis at the aortic annulus, placement of thick belt-like Teflon felt on the lateral side of the aortic wall, is required to reduce late graft detachment [24].

The use of a bioprosthesis is an independent risk factor for a late reoperation. It is obvious that the prosthetic valve dysfunction is an inherent late complication of a bioprosthesis. However, all of the valve failures occurred in use of the Ionescu-Shiley (Shiley Laboratory) bioprosthesis implanted early in the study period. Since 1987, the Carpentier-Edwards bovine pericardial prosthesis has been used and there have been no valve failures. The durability of the manufactured bioprosthesis, especially the pericardial valve, is well-documented [25]. Galla and colleagues [26] also reported excellent long-term performance of bioprosthetic CGR with no instances of valve failure during a 5-year follow-up. A CGR using a bioprosthesis is a useful option for some subsets such as elderly patients, or those who are contraindicated for anticoagulation therapy. Currently, a "Valsalva graft" has been used with a bioprosthetic aortic valve for the long-term valve durability.

The current study has inherent biases. The series of patients examined were derived from a retrospective review covering a long time interval and the patients included in this study had various different surgical indications and were treated by different surgeons.

This report presented the 27-year experience in performing a CGR and concluded that a CGR is a safe and reliable procedure for various aortic root diseases, thus resulting in sufficient early and long-term results. Aortitis is the significant predictor of late death after CGR, with a high incidence of late graft detachment and other complications. The skirted proximal anastomotic technique can help surgeons to avoid late proximal graft detachment and the need to perform a reoperation.

We greatly thank Dr Akiko Kada for her valuable biostatistical expertise.

References

1. Bentall H, De Bono A. A technique for complete replacement of the ascending aorta. *Thorax* 1968;23:338-9.
2. Kouchoukos NT, Wareing TH, Murphy SF, Perrillo JB. Sixteen-year experience with aortic root replacement. *Ann Surg* 1991;214:308-20.
3. Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ. Composite valve graft replacement of the proximal aorta: comparison of techniques in 348 patients. *Ann Thorac Surg* 1992;54:427-39.
4. Pichler JM, Pluth JR. Replacement of the ascending aorta and aortic valve with a composite graft in patients with nondisplaced coronary ostia. *Ann Thorac Surg* 1982;33:406-9.
5. Cabrol C, Pavie A, Gandjbakhch I, et al. Complete replacement of the ascending aorta with reimplantation of the coronary arteries. New surgical approach. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;81:309-15.
6. Kouchoukos NT, Marshall WG Jr, Wedige-Stecher TA. Eleven-year experience with composite graft replacement of the ascending aorta and aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:691-705.
7. Gott VL, Gillinov AM, Pyeritz RE, et al. Aortic root replacement: risk factor analysis of a seventeen-year experience with 270 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:536-45.
8. Dossche KM, Schepens MA, Mörshuis WJ, de la Rivière AB, Knaepen PJ, Vermeulen FE. A 23-year experience with composite valve graft replacement of the aortic root. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1070-7.
9. Hagl C, Strauch JT, Spielvogel D, et al. Is the Bentall procedure for ascending aorta or aortic valve replacement the best approach for long-term event-free survival? *Ann Thorac Surg* 2003;76:698-703.
10. Matsuura K, Ogino H, Kobayashi J, et al. Surgical treatment of aortic regurgitation due to Takayasu arteritis: long-term morbidity and mortality. *Circulation* 2005;112:3707-12.
11. Miyata T, Sato O, Deguchi J, et al. Anastomotic aneurysm after surgical treatment of Takayasu's arteritis: a 40-year experience. *J Vasc Surg* 1998;27:438-45.
12. Ishikawa K. Natural history and classification of occlusive thromboangiopathy (Takayasu's disease). *Circulation* 1978;57:27-35.
13. Gott VL, Greene PS, Alejo DE, et al. Replacement of the aortic root in patients with Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 1999;340:1307-13.
14. Alexiou C, Langley SM, Charlesworth P, Haw MP, Livesey SA, Monro JL. Aortic root replacement in patients with Marfan's syndrome: the Southampton experience. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1502-8.
15. Kazui T, Yamashita K, Terada H, et al. Late reoperation for proximal aortic and arch complications after previous com-

- posite graft replacement in Marfan patients. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1203-8.
16. Lai DT, Miller DC, Mitchell RS, et al. Acute type A aortic dissection complicated by aortic regurgitation: Composite valve graft versus separate valve graft versus conservative valve repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1978-86.
 17. Halstead JC, Spielvogel D, Meier DM, et al. Composite aortic root replacement in acute type A dissection: time to rethink the indications? *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:626-32.
 18. Lemaire SA, DiBardino DJ, K oksoy C, Coselli JS. Proximal aortic reoperations in patients with composite valve grafts. *Ann Thorac Surg* 2002;74:S1777-80.
 19. Lepore V, Larsson S, Bugge M, Mantovani V, Karlsson T. Replacement of the ascending aorta with composite valve grafts: long term results. *J Heart Valve Dis* 1996;5:240-6.
 20. Panos A, Amahzoune B, Robin J, Champsaur G, Ninet J. Influence of technique of coronary artery implantation on long-term results in composite aortic root replacement. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1497-501.
 21. Dougenis D, Daily BB, Kouchoukos NT. Reoperation on the aortic root and ascending aorta. *Ann Thorac Surg* 1997;64:986-92.
 22. Hahn C, Tam SKC, Vlahakis GJ, Hilgenberg AD, Akins CW, Buckley MJ. Repeat aortic root replacement. *Ann Thorac Surg* 1998;66:88-91.
 23. Luciani GB, Casali G, Faggian G, Mazzucco A. Predicting outcome after reoperative procedures on the aortic root and ascending aorta. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:602-7.
 24. Ando M, Kosakai Y, Okita Y, Nakano K, Kitamura S. Surgical treatment of Behcet's disease involving aortic regurgitation. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2136-40.
 25. Plume SK, Sanders J. The Carpentier-Edwards stented supra-annular pericardial aortic prosthesis: clinical durability and hemodynamic performance. *Curr Opin Cardiol* 2002;12:183-7.
 26. Galla JD, Lansman SL, Spielvogel D, et al. Bioprosthetic valved conduit aortic root reconstruction: the Mount Sinai experience. *Ann Thorac Surg* 2002;74:S1769-72.

Notice From the American Board of Thoracic Surgery

The 2008 Part I (written) examination will be held on Monday, December 1, 2008. It is planned that the examination will be given at multiple sites throughout the United States using an electronic format. The closing date for registration was August 1, 2008. Those wishing to be considered for examination must apply online at www.abts.org.

To be admissible to the Part II (oral) examination, a candidate must have successfully completed the Part I (written) examination.

A candidate applying for admission to the certifying examination must fulfill all the requirements of the Board in force at the time the application is received.

Please address all communications to the American Board of Thoracic Surgery, 6333 N St. Clair St, Suite 2320, Chicago, IL 60611; telephone: (312) 202-5900; fax: (312) 202-5960; e-mail: info@abts.org.

Composite Valve Graft Replacement of the Aortic Root: Twenty-Seven Years of Experience at One Japanese Center

Tomohiro Tsunekawa, Hitoshi Ogino, Hitoshi Matsuda, Kenji Minatoya, Hiroaki Sasaki, Junjiro Kobayashi, Toshikatsu Yagihara and Soichiro Kitamura

Ann Thorac Surg 2008;86:1510-1517
DOI: 10.1016/j.athoracsur.2008.07.051

Updated Information & Services	including high-resolution figures, can be found at: http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/86/5/1510
References	This article cites 26 articles, 21 of which you can access for free at: http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/86/5/1510#BIBL
Subspecialty Collections	This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s): Great vessels http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/collection/great_vessels
Permissions & Licensing	Requests about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety should be submitted to: http://www.us.elsevierhealth.com/Licensing/permissions.jsp or email: healthpermissions@elsevier.com .
Reprints	For information about ordering reprints, please email: reprints@elsevier.com



**THE ANNALS OF
THORACIC SURGERY**



Dilatation of the Aneurysmal Sac After Total Arch Replacement

Hirota Watanuki, MD, Hitoshi Ogino, MD, Hitoshi Matsuda, MD, Kenji Minatoya, MD, Hiroaki Sasaki, MD, Tetsuya Fukuda, MD, and Soichiro Kitamura, MD

Departments of Cardiovascular Surgery and Radiology, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

In our institution, total arch replacement for distal arch aneurysms is performed through a median sternotomy with antegrade selective cerebral perfusion. The distal anastomosis to the completely transected descending aorta is made through the aneurysmal sac. We report on three interesting cases presenting late dilatation of the aneurysmal sac due to collateral flow after total arch replacement.

(Ann Thorac Surg 2008;85:639–41)

© 2008 by The Society of Thoracic Surgeons

In general, prosthetic graft replacement of aortic aneurysm is carried out without complete resection of the aneurysmal sac. In particular, total arch replacement for distal or proximal descending aortic aneurysm is performed through the aneurysm sac without resection of the aneurysmal wall to prevent injury to the phrenic and vagus nerves and to the lung. In this report, we present three interesting cases that developed late dilatation of the aneurysmal sac after total arch replacement for a distal arch aneurysm through a median sternotomy.

Case Reports

Patient 1

An 82-year-old man underwent total arch replacement for a huge saccular-type distal arch aneurysm of 94 mm in 2002. The postoperative course was uneventful. One year later, the follow-up enhanced computed tomographic scans revealed a small leakage of the contrast medium around the prosthetic graft (Fig 1). The leak was considered from the distal anastomosis site. Therefore, stent graft insertion was performed to cover the leak; however, even after this was performed the leak did not disappear. Angiography was then performed to identify some collateral vessels opening into the aneurysmal sac. A collateral vessel originating from the right internal thoracic artery (ITA) to the aneurysm sac was opacified. Coil embolization of the right ITA was then performed. Thereafter, the leak decreased, although it did not vanish completely. The aneurysm sac had not dilated 36 months after coil embolization.

Accepted for publication Aug 14, 2007.

Address correspondence to Dr Ogino, Department of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan; e-mail: hogino@hsp.nccvc.go.jp.

Patient 2

An 82-year-old woman underwent total arch replacement for a saccular-type distal arch aneurysm of 60 mm in 2002. The postoperative course was uneventful. One year later, the follow-up enhanced computed tomographic scans revealed some leak of contrast medium into the aneurysmal sac (Fig 1). Although angiography did not reveal any leakage from the distal anastomosis site, a collateral vessel originating from the left ITA to the aneurysmal sac was opacified. Coil embolization of the left ITA was performed. The leak of contrast medium to the aneurysmal sac did not completely vanish. However, the aneurysmal sac was not dilated 41 months after coil embolization.

Patient 3

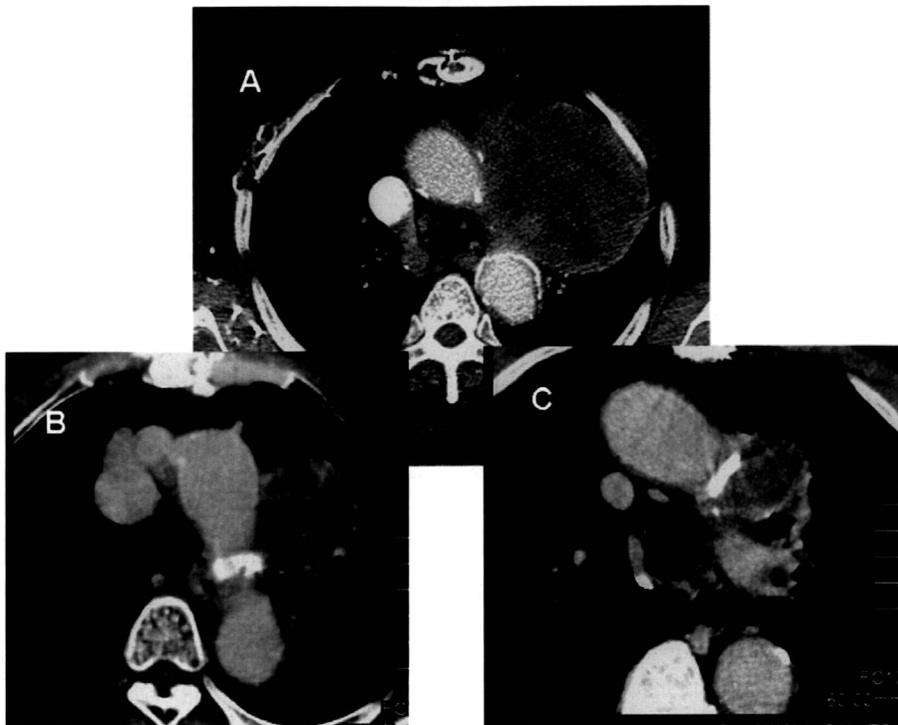
A 75-year-old man underwent total arch replacement for a huge fusiform type distal arch aneurysm of 100 mm in 2001. The postoperative course was uneventful. Five years later, hemoptysis developed in the patient. Computed tomographic scans revealed a small dilatation of the aneurysmal sac (Fig 1). Although angiography did not reveal leakage from the distal anastomosis site, a collateral vessel originating from the left ITA to the aneurysmal sac was revealed (Fig 2). After coil embolization of the left ITA was performed (Fig 2), hemoptysis disappeared. The patient continues to be carefully followed.

Comment

Pseudoaneurysm formation after thoracic aortic replacement develops in the late stage. Although it can be secondary to trauma or infection, previous cardiac surgery is the most frequent cause [1]. It occurs in less than 0.5% of all cardiac surgical cases [2]. Pseudoaneurysms are located at previous anastomotic sites, aortotomy sites, cannulation and venting sites, and proximal vein graft anastomotic sites. Anastomotic pseudoaneurysm after ascending or aortic arch replacement for aortic dissection has been reported at various rates ranging from 2% [3] to 38% [4]. It is usually caused by anastomotic leak or cutting of the aortic tissue. In the presented series, the residual aneurysmal sacs dilated after total arch replacement, although in most cases they shrink after surgery. Several causes were considered for these phenomena. Obviously they might be caused by anastomotic leak or cutting of the aortic tissue. However, angiography did not reveal any leak from the anastomotic sites. Even after stent grafting that covering the anastomotic sites, some leakage remained.

In our surgical techniques of total arch replacement for distal arch aneurysm, distal anastomosis is made by division of the descending aorta at the distal site of the aneurysm. The aneurysm is not resected. Some arteries opening into the aneurysm are closed by suturing. However, some of them might be disguised with mural thrombi or atheroma in the aneurysmal sac, because all mural thrombi or atheroma were not always removed in our routine techniques. Thus, the aneurysm sac might be

Fig 1. Enhanced computed tomographic scans for (A) patient 1, (B) patient 2, and (C) patient 3 showing leakage of contrast medium around the artificial graft and inflow of contrast medium to the aneurysm wall.



enhanced and dilated. It might have a similar mechanism to that of type II endoleak after endovascular aortic repair. Gould and colleagues [5] reported there were 20% type II endoleaks with preoperative coil embolization for aortic side branches and 23.3% type II endoleaks without preoperative coil embolization during the follow-up period. Therefore, coil embolization was performed to occlude the collateral vessels. There are two similar reports on coil embolization of an aortic arch false aneurysm [6, 7]. Miguel and colleagues [6] succeeded in coil embolization of a pseudoaneurysm over the distal suture line of an ascending aortic graft replacement. Chapot and colleagues [7] succeeded in coil embolization

of a pseudoaneurysm at the level of the aortic arch after surgical replacement of the aortic root and arch for aortic dissection. However, in our cases, coil embolization was successful in only 1 patient, presumably because there might be many collateral sources opening into the aneurysmal sac.

Otherwise, systemic pressure has recently been revealed within the aneurysm sacs of patients with collateral endoleak. This discovery suggests that these patients could remain unprotected and at risk for aneurysm rupture [8]. Consequently, close observation for a long period is mandatory even after successful total arch replacement.



Fig 2. Angiography of patient 3. (A) Inflow of contrast medium from the left internal thoracic artery (ITA) to the aneurysm wall (B) after coil embolization for the left ITA branch.

References

1. Sullivan KL, Steiner RM, Smullens SN, et al. Pseudoaneurysm of the ascending aorta following cardiac surgery. *Chest* 1988;93:138-43.
2. Katsumata T, Moorjani N, Vaccari G, et al. Mediastinal false aneurysm after thoracic aortic surgery. *Ann Thorac Surg* 2000;70:547-52.
3. Bachet J, Termignon JL, Goudot B, et al. Late reoperations in patients with aortic dissection. *J Cardiovasc Surg* 1994;9:740-7.
4. Sako H, Hadama T, Mori Y, et al. Factors affecting the occurrence of anastomotic leakage after graft replacement of type A aortic dissection [in Japanese]. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1995;43:1736-40.
5. Gould DA, McWilliams R, Edwards RD, et al. Aortic side branch embolization before endovascular aneurysm repair: incidence of type II endoleak. *J Vasc Interv Radiol* 2001;12:337-41.
6. Miguel B, Camilleri L, Gabrillargues J, et al. Coil embolization of a false aneurysm with aorto-cutaneous fistula after prosthetic graft replacement of the ascending aorta. *Eur J Radiol* 2000;34:57-9.

7. Chapot R, Aymard A, Saint-Maurice JP, et al. Coil embolization of an aortic arch false aneurysm. *J Endovasc Ther* 2002;9:922-5.
8. Baum RA, Carpenter JP, Golden MA, et al. Treatment of type II endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: comparison of transarterial and translumbar techniques. *J Vasc Surg* 2002;35:23-9.

Aneurysm of a Right-Sided Descending Aorta With a Normal Left-Sided Aortic Arch

Masahiro Daimon, MD, PhD, Hideki Ozawa, MD, Kazuo Kurihara, MD, and Takahiro Katsumata, MD, PhD

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Osaka Medical College, Takatsuki, Osaka, Department of Cardiovascular Surgery, Cardiovascular Center, Kyoto-Katsura Hospital, Nishikyō, Kyoto, Japan

We encountered an extremely rare case of a saccular aneurysm of the descending aorta developing to the right of the spinal column with a normal left-sided aortic arch. An 80-year-old man was admitted to our hospital because of a saccular aneurysm of the right-sided descending aorta that had increased in diameter. Resection of the aneurysm and prosthetic graft replacement of the right-sided descending thoracic aorta were successfully performed under deep hypothermia through a right thoracotomy.

(*Ann Thorac Surg* 2008;85:641-3)

© 2008 by The Society of Thoracic Surgeons

Because aneurysms of the right-sided descending aorta with the left-sided aortic arch are quite uncommon, few opinions on surgical treatment exist. We report our surgical strategy for this unusual entity and present a review of the literature.

An 80-year-old man was admitted to our hospital because of a saccular aneurysm of the descending aorta, which was detected on computed tomography several years previously, but it had increased in size from a diameter of 50 mm to 70 mm within 1 year. Hypertension had been present for more than 18 years. However, no symptoms had been noted. A chest x-ray film showed the dilatation of the mediastinum toward the right hemithorax (Fig 1). A computed tomographic scan (Fig 2) and angiographic examinations (Fig 3) revealed that the tortuous descending aorta was on the spinal column at the sixth thoracic vertebra just behind the esophagus, which ran along the right side of the spinal column to the first lumbar vertebra, and then returned to the usual position. The dilatation of the aorta was seen from the seventh thoracic to the first lumbar vertebra. The patient had a

past history of tuberculous pleuritis of the left hemithorax, partial gastrectomy for a gastric ulcer, and cholecystectomy for cholecystitis. Serological tests for syphilis were negative. No congenital anomalies were found on examination.

The right fifth intercostal space was opened, and a seventh intercostal pleurotomy was added to access the distal part of the descending aorta. Dense adhesions were seen in the pleural cavity. Cardiopulmonary bypass through ascending aortic perfusion and right atrial drainage was established, and perfusion cooling was initiated. A venting catheter was inserted into the left atrium through the right upper pulmonary vein. When the rectal temperature dropped below 18°C, the descending aorta just proximal to the diseased segment was clamped. Partial extracorporeal circulation was continued to maintain the cerebral and coronary circulation under ventricular fibrillation. The partial circulatory flow was 1,000 mL/min and the mean aortic pressure was maintained around 40 mm Hg. The proximal aorta was transected at the appropriate level. The aneurysm was then incised longitudinally just above the diaphragm. The aneurysm was extensively atherosclerotic with dense calcification, and all intercostal arteries were occluded. The anastomosis to the proximal aorta using a woven polyester, gelatin coated, 22 mm-prosthetic branched graft (Gelweave Anteflo; Sulzer Vascutek Ltd, Renfrewshire, Scotland) was completed using 3-0 polypropylene sutures, reinforced with polyester felt. Distal anastomosis was performed by an open aortic technique. Extracorporeal circulation lasted 160 minutes. The duration of the ventricular fibrillation was 106 minutes and the circulatory arrest of the lower body was 49 minutes. No neurocognitive dysfunction was found during the postoperative period. The postoperative chest computed tomographic scan showed no abnormal findings. Respirator management was required for 12 hours. However, he took time for rehabilitation for respiratory functional disorder. The patient was discharged on postoperative day 40.

Comment

Although there are some reports of right-sided descending aortas with a right-sided aortic arch [1, 2], atherosclerotic aneurysm of the descending aorta developing to the right of the spinal column with a normal left-sided aortic arch is extremely rare. Because Epstein and Friedman [3] reported the first case of the aneurysm of the descending aorta protruding to the right of the spine in 1949, several case reports have been subsequently made [4-6]. These reports usually focused on the difficulty of the diagnosis, because chest x-ray films were the major diagnostic method in those days.

The first successful surgical case was reported by Claxton and Dillon in 1969 [5]. The patient underwent closure of the neck of the saccular aneurysm and resection of the aneurysmal wall through a right thoracotomy. In 1970, Engelman and Clauss [6] reported another case of an aneurysm presenting in the right thorax. They performed resection of the aneurysm and an end-to-end

Accepted for publication July 26, 2007.

Address correspondence to Dr Daimon, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Osaka Medical College, 2-7, Daigakumachi, Takatsuki, Osaka, 569-8686, Japan; e-mail: m-daimon@jg7.so-net.ne.jp.

超高圧処理技術を応用した人工角膜の作製と評価

船本誠一^{*1, 2}、橋本良秀^{1, 2}、佐々木秀次^{2, 3}、服部晋也²、本田貴子²、
南 祐広¹、望月 学³、藤里俊哉⁴、木村 剛^{1, 2}、小林尚俊^{1, 2}、岸田晶夫¹

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
東京都千代田区神田駿河台 2-3-10

²物質・材料研究機構 生体材料センター
茨城県つくば市千現 1-2-1

³東京医科歯科大学 医学部附属病院 眼科
東京都文京区湯島 1-5-45

⁴大阪工業大学 医工学研究センター
大阪府大阪市旭区大宮 5-16-1

*E-mail: funamoto.fm@tmd.ac.jp

第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム抄録集

2008年1月24日受付/2008年1月31日受理

要旨

人工角膜として、これまでに多くの材料研究が行われているが、移植後の感染や脱落により、長期間有用である人工角膜開発には至っていない。一方、異種組織から細胞を除去し、残存する基材を移植組織として用いる方法として、組織の脱細胞化が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高圧印加により組織内の細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高圧脱細胞化法を考案した。本手法で、細胞の除去による免疫反応の抑制と生体の微小構造の保持による適合性の向上が期待できる。本研究では、超高圧脱細胞化法による人工角膜の作製とその物性解析を行ない、角膜移植片としての可能性を検討した。超高圧処理で得られた脱細胞角膜は、生体角膜に比べ白濁はしていたが組織内部から細胞は完全に除去されていた。また、移植結果により白濁していた角膜は透明となり移植後の拒絶も観察されなかった。このことから、超高圧印加法は、組織構造を維持しつつ、組織内からの細胞除去が行え、組織適合性が高い組織の作製ができるものと考えられ、かつ眼科領域における移植組織不足を解消できるものと考えられる。

キーワード：人工角膜、脱細胞化、超高圧処理技術

1. はじめに

現在、角膜移植術を要する患者は、全世界で100万人以上と見積もられている。しかしながら、角膜移植を受けている患者数は年間約6万人に不足しており、多くの国で提供眼球不足が大きな問題となっている。我が国においても、日本アイバンク協会に登録されている待機患者数が約5000人であるに対し、献眼者数が約1000人、利用眼球は約1500個に留まっており移植用角膜は不足している状況である。このような問題の抜本的な解決として、人工角膜の開発が待望されている。人工角膜としては、合成高分子であるポリメチル

メタクリレート (PMMA)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) やポリビニルアルコール (PVA) などが試みられている¹⁴⁾。我が国においても人工角膜の開発は、長い歴史を持っている⁵⁾。それにもかかわらず、高い信頼性・機能を有する人工角膜は開発されていない。最近では、AlphaCore (PMMA 製) が米国 FDA にて承認され、臨床治験の集積段階にある。しかしながら、これらの材料と角膜組織との適合性は十分とは言えず、その結果、レシピエント細胞の基材上への接着が十分になされず、人工角膜接合部での融解に伴う脱落や感染症などが重要課題となっている。この要因の一つとして、生体角膜と人工角膜との物性の相違が挙げられる。

一方、最近では、再生医療や組織工学の側面から角膜再生の研究が行われている。再生医療技術によって、角膜上皮および角膜内皮が臨床応用されており、再生医療技術の角膜再生への有効性から、角膜全層の再生が期待されている。しかし、角膜上皮および角膜内皮の再生は、細胞のみを用いた細胞シートや羊膜を用いた基本的には細胞層のみの再生であり、角膜のほぼ90%を占める実質部分の再生に関しては、未だ臨床応用にいたる再生技術は開発されていない。このため、角膜実質部の再生については、コラーゲングル・スポンジを用いた研究が大半を占めている。そこで我々は、生体組織の物性に類似する人工角膜として、脱細胞化角膜の調製について検討している。脱細胞化組織とは、異種組織から細胞を除去し、残存する生体支持組織を指す。脱細胞化組織の調製法としては、界面活性剤やタンパク質分解酵素などの薬液による化学的手法と、最近我々が開発した物理的手法である超高压処理法がある。後者は、超高压印加により細胞を破壊し、細胞残渣を洗浄により除去する手法である (Fig.1)。これまで、血管、心臓弁、靭帯、骨などの種々の組織における脱細胞化に成功している^{6,7)}。本研究では、界面活性剤法、超高压処理法による角膜の脱細胞化処理により得られた脱細胞化角膜の物性と *in vivo* での異種移植実験を行い、脱細胞化角膜の人工角膜としての有効性について検討した。

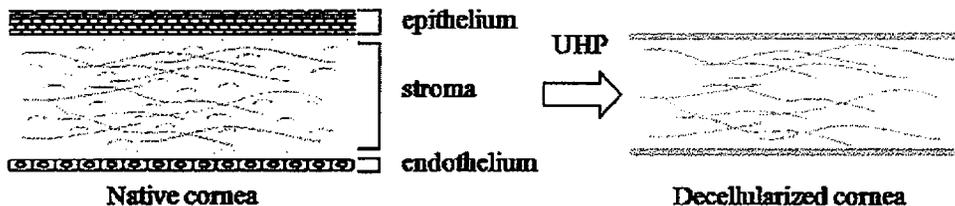


Fig.1. Structure of native cornea (left) and scheme of decellularized porcine corneas(right).

2. 材料と方法

2.1. 界面活性剤による角膜の脱細胞化

食用成体ブタ眼球から角膜を摘出し、各種処理溶液 (1 w/v% SDS, 1 w/v% TritonX-100) に浸漬し、37°Cで24時間の条件で連続振盪した。得られた脱細胞化組織は、HE染色により評価した。

2.2. 超高压処理技術を用いた角膜の脱細胞化

食用成体ブタ眼球から角膜を摘出し、PBS (Dextran70 35mg/ml, penicillin streptomycin 10u/ml)中において、超高压処理装置 (Dr.CHEF, 株式会社神戸製鋼所) を用い、処理圧力10000気圧で処理時間10分 (圧力印加速度666気圧/分、処理温度10°C) で超静水圧印加した。処理後に組織を洗浄液に浸漬し、37°Cのインキュベーター内で連続振盪し、細胞残渣を除去し

た。得られた脱細胞化組織は、HE染色や圧縮試験機により評価した。

2.3 脱細胞化組織の移植実験

ブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植実験を行った。日本白色家兎の角膜を一部切開し、角膜実質層に約4mm辺のポケットを作製し、直径約2mm×厚み0.16mmの脱細胞化角膜を挿入した。比較対象としては、未処理のブタ角膜を用いた。移植後に経過観察を行い、移植後2ヵ月で移植片を取り出し、組織学的に観察を行った。

3. 結果

3.1. 界面活性剤と超高压処理技術による脱細胞化角膜の組織評価

界面活性剤処理した脱細胞化角膜を Fig.2 に示す。SDS 処理では、角膜の円周部の溶解と中央部での膨張がみられ、白濁化した。Triton X-100 においても、周辺部の溶解はなかったものの、著しく膨張・白濁化がみられた。処理角膜片をヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色にて組織学的な検討を行った。Triton X-100 では、角膜実質層、上皮層のいずれの層においても青色に染色された細胞核が確認され、ほとんどの細胞が除去されていないことが明らかとなった。角膜実質層のコラーゲン繊維について、正常な角膜実質層では Fig.2 のような高密度に配向したコラーゲン繊維として観察されるが、膨張する Triton X-100 では、繊維間の空隙の拡大がみられた。一方、SDS の場合、上皮層部のほとんどの細胞は除去されていたが、実質層では細胞の残存が示された。また、コラーゲン繊維の配向は大きく乱れ、コラーゲン繊維の切断および空隙の拡大が観察された。

超高压処理による脱細胞角膜では、10000 気圧の超高压印加により、生体角膜より白濁した脱細胞角膜が得られた (Fig.2)。また、H-E 染色所見では、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった。DNA 残存量の定量においても検出限界程度の DNA が定量されただけで、破壊された細胞の残渣はほとんど除去されていた。

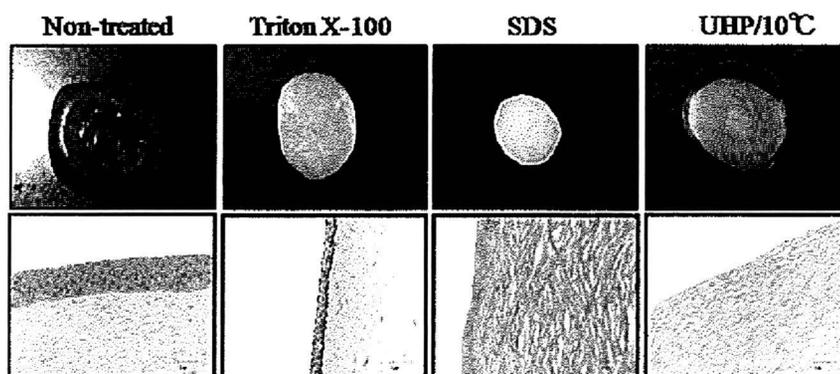


Fig.2. Photographs and H-E staining of the porcine corneas treated by UHP and detergent.

3.2. 超高压処理技術の脱細胞化角膜への影響

超高压処理で得られた脱細胞角膜は、生体角膜に比べ白濁していた。これは、生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により約70%の膨潤度に調節されていることが知られている。しかし脱細胞化することで、角膜内皮細胞のポンプ機能は傷害され、角膜は膨潤することで角膜の白濁は生じる。そこで、超高压脱細胞化により高度に膨潤した角膜が、脱水によ

る収縮により物性が回復するかどうかについて検討した。グリセロール溶液に浸漬することで浸透圧を調整し、その後の圧縮試験を行った。脱細胞化角膜の力学特性は、未処理角膜のそれとほぼ同等となり、移植後の角膜内皮細胞のポンプ機能により力学特性が回復される可能性が示された (Fig.3)。

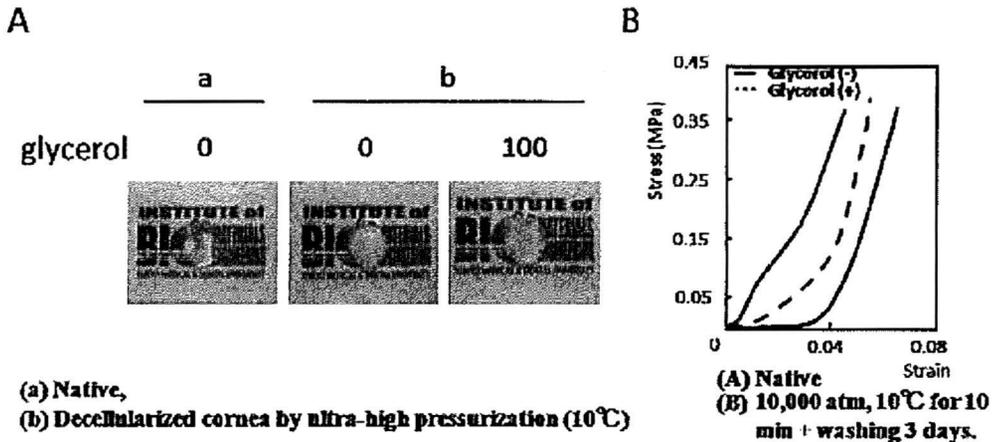


Fig. 3. A Photographs of decellularized corneas treated by glycerol immersion. B Stress-strain curve of the corneas treated under various conditions.

3.3. ウサギ角膜へのブタ脱細胞化角膜の移植実験

ウサギへの脱細胞化角膜移植実験の結果を Fig.4 に示す。移植直後および1週間後では、脱細胞化角膜は白濁しており、未処理角膜は透明であった。移植2週間後においては、脱細胞化角膜に変化は認められず白濁状態にあったが、一方の未処理角膜では炎症反応が示され若干の浮腫が認められた。移植4週間後には、脱細胞化角膜は透明になっていたが、移植部周辺にて若干の炎症が認められた。一方の未処理角膜では強い炎症による浮腫と血管の遊走が認められた。さらに、移植8週間後では、脱細胞化角膜の透明状態は維持されており、移植部周辺の炎症反応認められなかった。一方、未処理角膜では強い免疫応答が続いており、炎症に伴う血管の遊走が認められた。試料標本の H-E 染色では、未処理角膜においては多数の炎症細胞が観察され、埋入試料の確認ができなかった。一方の脱細胞化角膜においては、炎症細胞はほとんど観察されず脱細胞化角膜の残存が示された。

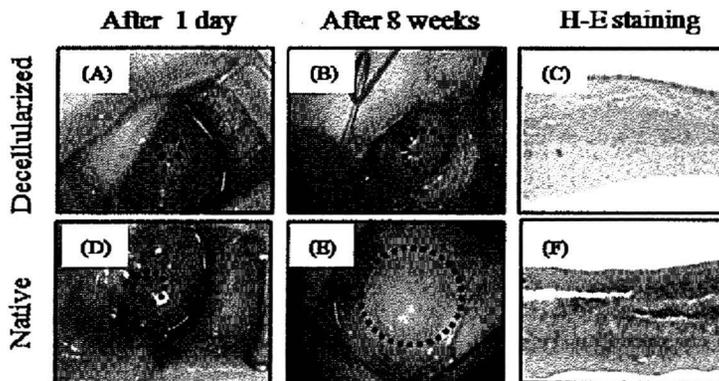


Fig. 4. Photographs and H-E staining of the porcine corneas implanted in rabbit after eight weeks (B, C, E, F).

4. 考察

国内外における脱細胞化組織研究の主流は、界面活性剤やタンパク質分解酵素等の薬液処理による脱細胞化法である。そこで、我々も種々の界面活性剤を用いて角膜の脱細胞化を試みた。イオン性界面活性剤である SDS は、細胞質、核膜の溶解が可能であり、強力な脱細胞化試薬として血管、弁、腱等の脱細胞化処理に用いられ、ほぼ完全な脱細胞化が報告されている³⁻¹⁰⁾。しかし、タンパク質-タンパク質相互作用の破壊によるタンパク質変性の誘起およびグリコサミノグリカン (GAG) の溶解傾向も報告されている¹¹⁾。SDS による角膜脱細胞化では、ある程度脱細胞化されるものの完全な脱細胞化は達成されず、また、コラーゲン繊維間の空隙の拡大が示された。浸漬時間が短いため脱細胞化が不十分であったと考えられるが、コラーゲン繊維配向の乱れが示されていることから、更なる浸漬時間の延長は困難であると考えられる。コラーゲン繊維配向の乱れは、SDS による GAG 溶解によって誘起されていると考えられ、血管、弁等の組織に比べ高い GAG 含有率の角膜組織の脱細胞化においては SDS の利用は不適であると考えられる。一方、タンパク質 (生体組織) 変性を誘起しない非イオン性界面活性剤である Triton X-100 では、コラーゲン繊維へのダメージは少ないものの、繊維間距離の拡大し、脱細胞化もほとんどなされなかった。Triton X-100 による脱細胞化処理では、用いる組織により脱細胞化効率が異なることが報告されており、何らかの角膜特性が脱細胞化に影響したと考えられる。これらの結果より、角膜の脱細胞化においては、界面活性剤のみでの利用は不適であると言える。

これに対して、我々が開発した超高压処理法は、超高压印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する方法であるが、10000 気圧の超高压印加により、白濁した角膜が得られた。また、H-E 染色所見では、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった。これらの結果は、超高压処理法による脱細胞化の有用性を示している。しかしながら、上記の界面活性剤法に比べて低いものの、処理による角膜の白濁と膨潤がみられた。この膨潤により角膜透過性が減少しているものと考えられ、角膜機能の一つである透過性を獲得するためには解決すべき問題である。そこで、デキストランを添加することで角膜の膨潤抑制を試みた。その結果、超高压処理、洗浄操作後の膜厚抑制がデキストラン添加により示された。また、生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により、角膜の透明性が維持されていることが知られている。従って、超高压脱細胞化により高度に膨潤した角膜が、脱水により収縮し、透明性が回復することができれば、移植人工角膜としての応用可能性が示唆される。そこで、脱水モデル実験として、超高压処理により得られた脱細胞化角膜を高張液であるグリセロールに浸漬し、透明性の回復について検討した。50%、100%グリセロール溶液に1時間浸漬すると、50%グリセロールにて半透明に透明性が回復し、100%グリセロールでほぼ透明になった。これらの結果は、得られた超高压脱細胞化角膜の移植時における透明性回復の可能性を示している。さらに、ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植試験では、炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。以上のこれらの結果から、超高压処理技術を用いた脱細胞角膜は生体由来人工角膜としての応用が期待できる。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金およびヒューマンサイエンス総合研究事業に行なわれた。

参考文献

- [1]Chirila TV. (2001) An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials*. 22(24): 3311- 3317.
- [2]Duan D, Klenkler BJ, Sheardown H. (2006) Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue-engineered corneas. *Exp Rev Med Devices*. 3(1): 59-72.
- [3]Kobayashi H, Kato M, Taguchi T, Ikomo T, Miyashita H, Shimmura S, Tsubota K Tanaka J. (2004) Collagen immobilized PVA hydrogel-hydroxyapatite composites prepared by kneading methods as a material for peripheral cuff of artificial cornea. *Mater Sci & Eng C*. 24(6-8): 729-735.
- [4]Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, Kato M, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. (2006) Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res Pt B*. 76B(1): 56-63.
- [5]Chirila TV, Charila M, Ikada Y et al. (2005) A historical review of artificial cornea research in Japan. *Jpn, J Ophthalmol* 49: S1-S13.
- [6]Fujisato, T, Minatoya, K, Yamazaki, S, Meng, Y, 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. pp83-94.
- [7]Fujisato T, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. (2006) Host cell infiltration to transplanted acellular allografts in porcine model. *Tissue Eng*. 12(4): 1077-1077
- [8]Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. (2006) Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 27(19): 3675-3683.
- [9]Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. (2005) Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Val Disease*. 14(2), 228-237.
- [10]Meyer SR, Nagendran J, Desai LS, Rayat GR, Churchill TA, Anderson CC, Rajotte RV, Lakey JRT, Ross DB. (2005) Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. *J Thoracic Cardio Surg*. 130(2): 469-476.
- [11]Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. (2005) Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardio-Thor Sug*. 27(4): 566-571.

Evaluation of Artificial Cornea Made by Ultra-High Hydrostatic Pressure Technology

Seiichi Funamoto^{*1,2}, Yoshihide Hashimoto^{1,2}, Syuji Sasaki^{2,3},
Shinya Hattori², Takako Honda², Kwangwoo Nam¹,
Mamabu Mochizuki³, Toshiya Fujisato⁴, Tsuyoshi Kimura^{1,2},
Hisatoshi Kobayashi^{1,2}, Akio Kishida¹

¹*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda-Surugadai2-3-10, Chiyodaku, Tokyo, 101-0062, Japan*

²*Biomaterials Center, National Institute for Material Science, Sengen 1-2-1, Tsukuba, Ibaraki, 305-0047, Japan*

³*Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519, Japan*

⁴*Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Oomiya 5-16-1, Asahiku, Osaka, 535-0002, Japan*

**E-mail: funamoto.fm@lmd.ac.jp*

Proceedings of the 15th Symposium for Japanese Research Group of High Pressure Bioscience and Biotechnology

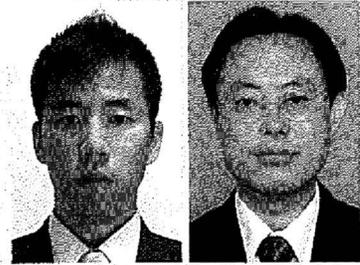
Received 24 January 2008/Accepted 31 January 2008

Abstract

We investigated the characteristics of a decellularized porcine cornea by ultra-high hydrostatic pressure (UHP) method. The UHP method consists of the disruption of cells by hydrostatic pressure and the removal of components of the disrupted cells by washing process. Porcine cornea were hydrostatically pressed at 10,000 atmospheres and 10 °C for 10 min and immersed in medium for 72 hours. The turbid cornea was obtained. For H-E staining of the cornea decellularized with the UHP method, the complete removal of corneal cells and maintenance of the superstructure of collagen fibrils were confirmed. When the corneas were immersed in glycerol for 1 hour, their optical and mechanical properties were restored to those of a natural cornea. As the preliminary animal study, when the implantation of the acellular porcine cornea to rabbit cornea was carried out, the immune reaction was not occurred and the turbid cornea became clear. These results indicate that the decellularized cornea by UHP method would be useful as corneal scaffold for regeneration. These results indicate the possibility of the acellular cornea prepared by the UHP method as artificial bio-cornea.

Keywords : Artificial cornea, Decellularization, Ultra-high hydrostatic pressure technology.

バイオスキャフォールド



寺田堂彦^{*1)}(写真左), 木村 剛・岸田晶夫^{*2)}, 藤里俊哉^{*1)}(右)

JJSB

Biological scaffold

A biological scaffold is an extracellular matrix body derived from biological tissues and is made through removal of unnecessary components from the tissues. An extracellular matrix is a polymer superstructure produced by cells and is an appropriate environment for cells in a biological tissue. Although there are some problems to utilize the scaffold as a biomaterial, there are certain advantages rather than disadvantages in biological scaffolds. In this article, advantages and disadvantages of a biological scaffold are described and an outline of researches related to biological scaffolds in the world is given. And then our researches are introduced.

生体組織から不要成分を除去して作製した細胞外マトリクス(ECM)構造体を、バイオスキャフォールドという。ECMは、細胞がみずからつくり出した高分子超構造であり、生体内で最適環境として機能していたスキャフォールドである。そのスキャフォールドを取り出して人工的に利用するためには解決すべき課題もあるが、それを上回る多くの利点もある。

本稿では、まずバイオスキャフォールドの紹介を兼ねて、バイオスキャフォールドの利点と問題点について解説し、世界の主な研究を鳥瞰したのち、最後に筆者らの研究について紹介する。

Dohiko Terada^{*1)}, Tsuyoshi Kimura・Akio Kishida^{*2)}, Toshiya Fujisato^{*1)}
 Key words: バイオスキャフォールド, 細胞外マトリクス, 脱細胞, 心臓弁, 角膜

ハーバード大学の Vacanti JP と MIT の Langer R らのグループによって再生医療の発端となる研究論文が発表されてから20年が経過した。昨今、誘導多能性幹細胞(iPS細胞)の開発²⁾や、細胞シート移植による治療など、再生医療に関する話題が一般のニュースとして伝えられる機会が増え、臨床応用への期待はこれまでに高く高まっている。

組織工学による再生医療の3要素としては、細胞、増殖因子、足場の三つがあげられる。なかでも再生医療の主役は細胞であり、足場はそのサポート

役でしかない。しかしながら、古くはその役割が間隙を満たすのみと考えられてきた細胞外マトリクス(ECM)の、“場”としての重要性が認識されるようになった。細胞生物学などの発展に伴って、細胞の増殖・分化、機能を制御するシグナル因子としてのマトリクスの役割が徐々に解明されてきている³⁾。

足場を構築する材料としては、合成高分子、セラミックス、金属などがあげられるが、本稿のテーマは“バイオスキャフォールド”である。ECMは、細胞がみずからつくり出した高分子超構造であり、生体内で最適環境として機能していたスキャフォールドである。そのスキャフォールドを取り出して人工的に利用するためには解決すべき課題もあるが、それを上回る多くの利点もある。

バイオスキャフォールドはバイオマテリアルとしてははまだマイナーな存在である。そのため本稿では、まずマテリアルとしての紹介を兼ねた一般論を概説し、世界の主な研究を鳥瞰した後、最後に筆者らの研究について紹介する。

^{*1)} Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology 大阪工業大学工学部生体医工学科

^{*2)} Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University 東京医科歯科大学生体材料工学研究所

[略歴] (寺田堂彦) 2005年 京都工芸繊維大学大学院工学科学研究科先端ファイブ科学専攻博士後期課程修了。博士(工学)取得。2005年 国立循環器病センター研究所再生医療部リサーチレジデント。2007年 大阪工業大学工学部生体医工学科流動研究員。専門: 高分子工学, 組織工学。趣味: 自由
 [略歴] (藤里俊哉) 1991年 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻博士後期課程認定退学。同年 京都大学生体医療工学研究センター(現再生医学研究所)研修員。1994年 国立循環器病センター研究所実験治療開発部研究員。1998年 マギル大学付属モントリオール総合病院研究所研究員。2000年 国立循環器病センター研究所実験治療開発部研究員。2003年 国立循環器病センター研究所再生医療部機能再生研究室長。2007年 大阪工業大学工学部生体医工学科教授。専門: バイオマテリアル, 再生医工学。趣味: DIY, 旅行計画

表1 スキャフォールドが満たすべき条件

- ① 生体安全性
- ② 生体(細胞)親和性
- ③ 組織再生のための空間の確保
- ④ 適度な分布で細胞を保持できること
- ⑤ 組織再生に伴って分解吸収されること
- ⑥ 対象組織の形状テンプレートとなること
- ⑦ 再生に至るまで、組織が担うべき物理的強度を担うこと

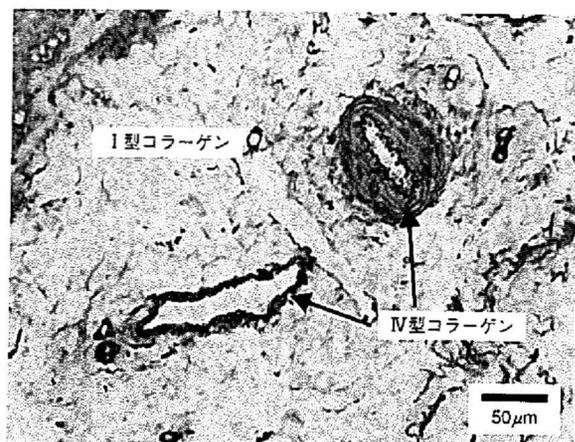


図1 ブタ組織のIV型コラーゲン免疫染色写真

バイオスキャフォールドとは

本稿の執筆を機に、国内外の再生医療、組織工学に関する書籍を改めて調査したが、バイオスキャフォールドに関する詳しい記述は皆無に等しかった。したがって、バイオスキャフォールドの定義をここで明示することは難しい。しかし、アメリカ国立医学図書館が無料公開しているインターネットサイト PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) での検索結果よりコンセンサスを推察すると、以下のようであろう。

バイオスキャフォールドとは、“生体組織から不要成分(ドナー細胞など)を除去するなどして作製したECM構造体”である。英語では一般に“biological scaffold”と表記され、化学架橋などを施されて生分解性を失った移植用組織は“bioprosthesis”などと記される場合が多いように見受けられる。

久保木らの定義によると、人工ECMとは、細胞の環境として機能する人工生産物である⁴⁾。ただし、広義なバイオマテリアルよりも以下の特徴などで限定的である。すなわち、天然のマトリクスの要件が



図2 大動脈弁周辺組織から作製したバイオスキャフォールド

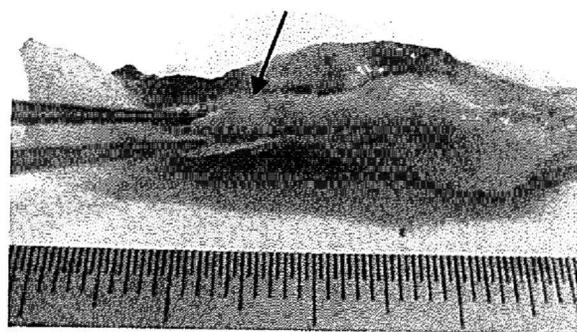


図3 石灰化によって硬化したミニマの血管中膜
矢印は板状に固まったリン酸カルシウム

考慮されており、ECM幾何学の要件を満たして“最適空間”を細胞に与え、さらには、“天然のマトリクスの知識”に基づいて調製された材料あるいはシステムであることである。これらの項目がバイオマテリアルのなかにおける人工ECMを特徴付けるとすると、バイオスキャフォールドは人工ECMの範疇にあるが、そのなかでもさらに特異な領域に分類されるであろう。

バイオスキャフォールドの利点

In vivo あるいは *in vitro* のいずれの場合においても、組織を再生するためには、細胞が付着して増

殖・分化するための足場が必要である。特に心臓弁組織や大動脈組織など、ECMがその力学的特性を大きく担う組織を、細胞のみで再構築することは難しい。

組織再生のための足場材料に必要とされる条件は、表1のように考えられる。わが国におけるスキャフォールド研究では吸収性高分子が優勢であり、各対象組織に対してすぐれた成果が報告されている。吸収性スキャフォールドは必要条件をある程度満たすうえ、製品安定性、設計性、量産性など工業製品としてのメリットも多い。バイオスキャフォールドは、動物由来という面で製品化のための課題は多いが、吸収性スキャフォールドにはないユニークなメリットを有しているのも確かである。

現在、移植用臓器開発のために、ドナー動物としてのブタの研究が多数行われている。日本では、鹿児島大学の中西らが改良開発したクラウン系ミニブタが医用ミニブタとして広く利用されはじめており、ジャパンファーム社のジャパンファームクラウン研究所ではドナーソースとしての基礎研究が進められている⁹⁾。ブタが選ばれる理由として解剖学的な類似性、生理学的特徴、倫理面、供給量などがあげられる。ヒト組織との解剖学的類似性は、バイオスキャフォールドをブタ組織から作製する際の大きなメリットの一つである。

生体組織を構成しているECMには、コラーゲン型の傾斜構造が存在する⁶⁾。内皮細胞や平滑筋細胞は、基材のコラーゲン型の違いによって形態や増殖挙動が異なることが知られている^{7,8)}。つまり、細胞に合目的な挙動を期待するためには、スキャフォールドにも μm オーダーの傾斜構造を持たせる必要があるといえる。コラーゲン型の傾斜、階層構造の例として、ブタ組織をIV型コラーゲン免疫染色した組織観察像を図1に示した。図のように、I型コラーゲンマトリクス中にIV型コラーゲンで囲まれた小口径血管を確認することが出来る。

さらに、基材の幾何学的要素や、物理的性質の異方性なども細胞挙動に対して影響を及ぼすため、スキャフォールドは非常に厳しい要求を満たさなければならない。しかしながら、再生対象組織を構築していたECM構造体を取り出して、それを組織再生

のスキャフォールドとして利用する場合には、スキャフォールドが満たすべき要件は少なからず満たされていると考えられる。

バイオスキャフォールドのこれらの特性を適切に有効利用できれば、組織再生を促進する適切な足場を提供することが出来る。図2は、筆者らが作製した大動脈弁周辺組織の再生用バイオスキャフォールドである。僧帽弁葉、大動脈弁、左右の冠状動脈、2本の上行動脈が一体で作製されており、心臓周辺の複雑な解剖学的特徴と、血管組織としての力学的特徴、血管組織に必要なECMの傾斜構造などを兼ね備えている。

バイオスキャフォールドの問題点

バイオスキャフォールドの潜在的な問題点として石灰化(calcificationあるいはmineralization)があげられる。石灰化とは、アパタイト様のリン酸カルシウムが過度に沈着することを意味し、慢性的な炎症の原因となるほか、硬化した組織は破断に至ることもある。顕著な石灰化によって血管中膜がアパタイトの板状になってしまった例を図3に示した。石灰化は、われわれの体内でも日常的に起こる正常な生理的現象であり、骨形成などがその例である。そのため、動物実験において、老年個体よりも、骨形成期にある若年個体に顕著な石灰化がみられることが知られている^{9,10)}。非常に軽微なものであれば代謝によって消滅するが、図3のような場合、自然に健常組織を回復することは期待できない。

石灰化はさまざまな原因と機序で生じる。不完全な脱細胞化処理による細胞残渣、コラーゲン線維、あるいはエラスチン変性物へのカルシウムの沈着が起点となるという説が一般的である^{11,12)}。脱細胞化ブタ組織をラット皮下に移植し、12週後に取り出してKossa染色により石灰化の様子を観察した(図4)。リン酸カルシウムがエラスチン線維に沿って沈着している様子と、顆粒状に分散している様子が見られる。いずれも同じ処理群の試料をラット皮下へ移植して生じた石灰化であるが、リン酸カルシウムの沈着には異なる機序が働いたと推察せざるをえない。*In vivo*での迅速な再細胞化は石灰化を抑制すると

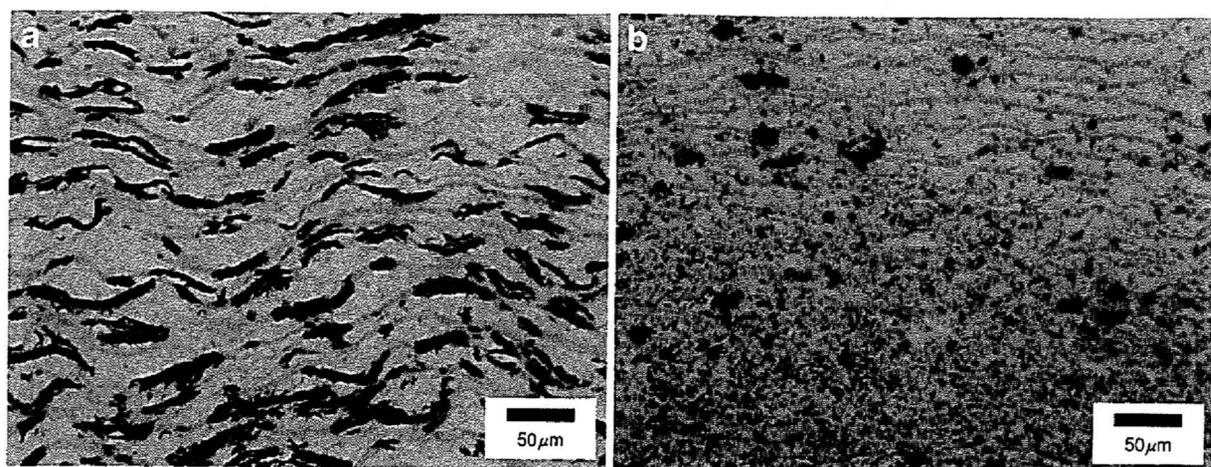


図4 ラット皮下へ移植した脱細胞化ブタ組織のKossa染色写真
 a: エラスチン線維に沿って生じた石灰化
 b: 顆粒状に分散して生じた石灰化

考えられるが、一方で、浸潤した線維芽細胞がエラスチン分解物によって骨芽細胞様の挙動を呈し、能動的に石灰化を促進するという研究もある¹³⁾。石灰化を抑制する方法に関しても種々検討されているが^{14)~16)}、いまだに根本的な解決策は見つかっていない。

ドナー動物由来のウイルスについても考慮が必要である。これは動物臓器をヒトへ移植する際に危惧される問題であり、世界各国で盛んに研究されている。ドナー動物では病気を引き起こさない内在性レトロウイルスが、ヒトの体内で変質・感染して新たな病気の原因となる可能性が懸念されている。ブタ内在性レトロウイルス (porcine endogenous retrovirus: PERV) のヒトへの感染は以前から危惧されてきたが、ブタ生体弁移植を受けた患者の追跡調査では、現在のところヒトへの感染は報告されていない¹⁷⁾。しかし、将来的に絶対的な安全性が保障されているわけではないため、現在でもさまざまな研究が行われている^{18)~20)}。これは動物臓器の移植に限った問題ではない。異種動物由来のバイオスキファールドにも、ウイルスの完全な除去が求められる。

異種動物組織のヒトへの移植では、まず拒絶反応の問題を解決しなければならない。ヒトに生まれつき備わる自然抗体 anti-Gal が、異種動物細胞の表面に発現している糖鎖抗体 α -Gal と反応して超急性拒絶反応を引き起こす。この超急性拒絶反応を回避す

るための研究は、数多く行われている^{21)~23)}。Galili, Tanemura らによると、 α -Gal は非常に強力な抗原であり、大量の高親和性 anti-Gal 産生を誘発するため、たとえトランスジェニックで α -Gal の発現を 95% 抑制しえたとしても、異種移植片の拒絶反応を抑制するには不十分である²⁴⁾。すなわち、バイオスキファールドにおいても、ドナー細胞の 5% の残存が致命的な超急性拒絶を招く可能性を考えなければならない。臨床で使用されている初期のブタ生体弁には α -Gal の残存が報告されており、それが石灰化を誘発する一因であるとする報告もある²⁵⁾。

バイオスキファールド研究の現状

バイオスキファールドに関する世界の代表的な研究を紹介する。

世界で最も臨床に近い研究を行っているのは、Konertz (ベルリン医科大学, ドイツ) らのグループである。脱細胞化したブタあるいはヒト肺動脈弁に、自己内皮細胞を播種培養し、ロス手術に伴う右室流出路再建に用いている。2000~2003 年の間に移植手術を受けた 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、経胸腔エコー、MRI、マルチスライス CT などにより、正常な弁機能を報告している²⁶⁾。また、同弁移植後 6 年の患者から血管壁の一部を採取し、内腔面が内皮細