

原 著

小口径人工血管表面への白血球，血小板粘着
——走査電子顕微鏡による形態学的評価——

京都大学医学部心臓血管外科学教室（指導：伴 敏彦教授）

松 本 雅 彦

〔原稿受付：昭和63年 5 月20日〕

Behavior of Platelets and Leukocytes on the Luminal
Surface of Small Caliber Prosthetic Grafts

MASAHIKO MATSUMOTO

Department of Cardiovascular Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

Abstract

Adhesion of leukocytes and platelets on small caliber grafts was examined by scanning electron microscopy. A total of 83 grafts (46 polyurethane, 20 expanded polytetrafluoroethylene, 6 heparinized graft, 11 autologous vein) were implanted into the carotid or femoral arteries of mongrel dogs. The animals were treated with aspirin and/or DN9693. The luminal surface was covered primarily with numerous platelets and some leukocytes, which formed thrombi in the control group. In the group treated with aspirin (40 mg/kg i.v.), the deposition of platelets on the luminal surface of the graft was suppressed and the surface was covered with leukocytes. Fibrin nets were formed on adherent leukocytes. In addition, the adhesion of leukocytes on the grafts was considerably suppressed in the group treated with DN9693 (50 μ g/kg/min i.v.). The formation of fibrin nets was remarkably reduced. These findings suggest that leukocytes adhere primarily to the prosthetic graft and play an important role in the initiation of fibrin formation.

緒 言

人工血管移植後，その表面が血流に触れると血漿蛋

白の吸着，血小板，白血球を主とした血球粘着が見られ，血栓形成が始まる(2)。Expanded polytetrafluoroethylene (PTFE)，ダクロン等を素材とした各種人工血

Key words: Leukocyte, Platelet, Thrombus formation, Polyurethane, Scanning electron microscopy.

索引用語：白血球，血小板，血栓形成，ポリウレタン，走査電子顕微鏡。

Present address: Department of Cardiovascular Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University 54, Kawaramachi, Shogo-in, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

管が臨床使用されているが、細小動脈への適用となると、これらの人工血管は開存率が不良で自家静脈グラフトが第一選択とされているのが現状である。新たに開発された2種類の小口径人工血管（ポリウレタン人工血管(8)、ヘパリン化人工血管(11)）の in vivo での評価のため、それらをイヌ動脈に端々吻合し一定期間後に摘出した。対照として PTFE 人工血管を選び移植成績を検討した。しかし、これら3種類の小口径人工血管のイヌ動脈への移植成績は不良で、なかでもポリウレタン人工血管は移植後3時間以上で、全例が血栓により閉塞した。ポリウレタン、ヘパリン化人工血管、PTFE の3種類の人工血管及び自家静脈グラフトの移植後早期の表面性状を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察し、血球粘着、血栓形成の評価を行った。血小板のみならず白血球粘着も多数見られたポリウレタン人工血管を中心として、特に白血球粘着に注目し、血栓形成における白血球粘着の役割について検討した。

I. 小口径人工血管のイヌ動脈への移植成績

1-1. 対象と方法

使用した3種類の人工血管は、非イオン性水溶性鎖の表面グラフト重合処理を施した平滑な表面を有するポリウレタン人工血管 (内径 4 mm, 長さ 25 mm)(8) (図1), イヌ頸動脈を Polyglycerol polyglycidyl ether でエポキシ架橋しヘパリン化を施したグラフト (ヘパリン化人工血管) (内径 3~4 mm, 長さ 40 mm)(11) (図2), 及び PTFE 人工血管 (ゴアテックス, W.L. Gore & Co.) (内径 4 mm, 長さ 40 mm) である(図3)。

雑種成犬 (体重 7.5~15 kg, 平均 11.5 kg) をネンブタール (30 mg/kg 静注) 麻酔し、頸動脈、大腿動脈又は腸骨動脈に6-0又は7-0ポリプロピレン糸の連続



図1 ポリウレタン人工血管内面の SEM 写真。表面は平滑である。(×4000)

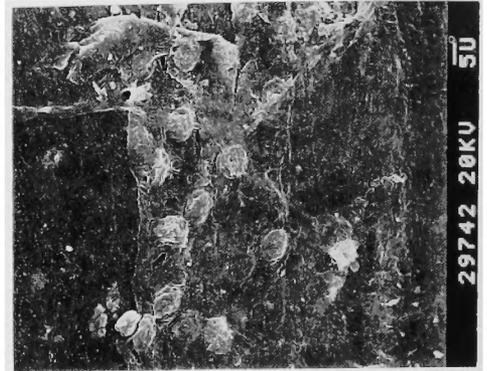


図2 ヘパリン化人工血管内面の SEM 写真。イヌ頸動脈をエポキシ架橋処理しヘパリン化を施してある。(×1000)

縫合でグラフト (ポリウレタン6例, ヘパリン化人工血管6例, PTFE 3例) を端々吻合した (表1)。一定期間後にグラフトを摘出し開存を判定した。

1-2. 結果

ポリウレタン人工血管:

グラフト摘出までの期間は5日から91日で、6例全例が血栓により閉塞し、開存率0%であった。

ヘパリン化人工血管

グラフト摘出までの期間は7日から94日で、6例中7日後に摘出した1例が開存し、5例は血栓により閉塞した (図4)。開存率17%であった。

表1

人工血管	摘出までの期間	結果
ポリウレタン (n=6)	91 d	閉塞
	68 d	閉塞
	68 d	閉塞
	14 d	閉塞
	8 d	閉塞
	5 d	閉塞
ヘパリン化人工血管 (n=6)	94 d	閉塞
	94 d	閉塞
	69 d	閉塞
	69 d	閉塞
	7 d	閉塞
	7 d	開存
PTFE (n=3)	30 d	開存
	30 d	閉塞
	14 d	閉塞

PTFE=expanded polytetrafluoroethylene

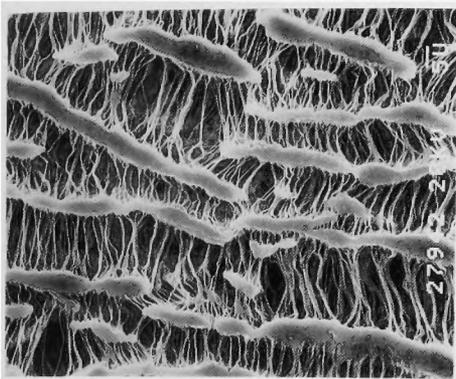


図3 PTFE人工血管内面のSEM写真。(×1000)

PTFE人工血管:

グラフト摘出までの期間は14日から30日で, 3例中30日後に摘出した1例が開存し, 2例は血栓により閉塞した。開存率33%であった。

1-3. 小括

新たに開発されたポリウレタン人工血管, ヘパリン化人工血管の両者ともに, 従来からある PTFE 人工血管よりも優れた成績は得られず, 検討の対象とした小口径人工血管のイヌ動脈への移植成績は不良であった。

II. 小口径人工血管表面への白血球, 血小板粘着

2-1. 対象と方法

使用した4種類のグラフトは, 非イオン性水溶性鎖の表面グラフト重合処理を施した平滑な表面を有するポリウレタン人工血管(内径4mm, 長さ40mm)(8)(図1), PTFE人工血管(ゴアテックス, W. L. Gore & Co.) (内径4mm, 長さ40mm)(図3), イヌ頸動脈をエポキシ架橋しヘパリン化したグラフト(ヘパリン化人工血管)(内径3~4mm, 長さ40mm)(11)(図2), 及び自家静脈(外径4~5mm, 長さ40mm)である。

雑種成犬(体重7~17kg, 平均11.7kg)をネブタール(30mg/kg 静注)麻酔し, 頸動脈又は大腿動脈に6-0又は7-0ポリプロピレン糸の連続縫合でグラフ

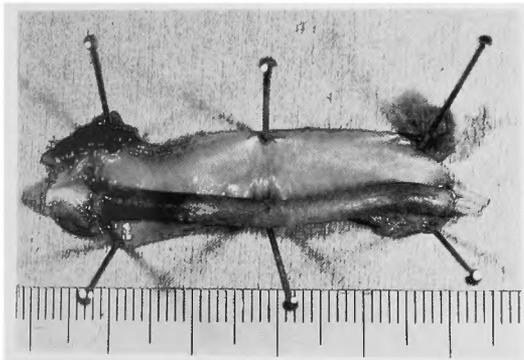


図4 ヘパリン化人工血管. 血栓による閉塞例. 移植後69日.

表2

	人工血管	No.	摘出までの時間
対照群	ポリウレタン	14	5min, 5min, 5min, 10min, 30min, 1h, 1h, 90min, 2h, 3h*, 5h*, 5h*, 6d*, 7d*
	PTFE	5	5min, 30min, 2h, 4h, 2d
	ヘパリン化人工血管	6	30min, 1h, 2h, 5h, 7d, 7d*
	自家静脈	11	5min, 5min, 30min, 30min, 1h, 1h, 1h, 2h, 2h, 2h, 2d
アスピリン投与群	ポリウレタン	13	30min, 30min, 30min, 1h, 1h, 1h, 1h, 2h, 2h, 4h, 22h, 5d*, 5d*
	PTFE	7	10min, 30min, 1h, 1h, 1h, 2h, 2d
DN 9693 10μg/kg/min 投与群	ポリウレタン	3	1h, 3h, 5h
	ポリウレタン	2	30min, 2h
	ポリウレタン	3	30min, 1h, 3h
	ポリウレタン	3	30min, 2h, 4h
アスピリン, DN 9693 併用群	ポリウレタン	8	30min, 30min, 30min, 1h, 1h, 1h, 2h, 4h
	PTFE	8	30min, 30min, 30min, 1h, 1h, 1h, 2h, 4h

PTFE=expanded polytetrafluoroethylene; * 血栓によるグラフト閉塞例

ト(ポリウレタン46例, PTFE 20例, ヘパリン化人工血管6例, 自家静脈11例)を端々吻合した。これらを以下の4群に分け比較検討した(表2)。1群(対照群)36例(ポリウレタン14例, PTFE 5例, ヘパリン化人工血管6例, 自家静脈11例)。2群(アスピリン投与群)アスピリン 40 mg/kg を吻合前に静注。20例(ポリウレタン13例, PTFE 7例)。3群(DN9693投与群)DN9693 を 10, 20, 30 又は 50 μ g/kg/min 吻合前に投与開始し持続静注。ポリウレタン11例。4群(アスピリン, DN9693 併用群)アスピリン 40 mg/kg を吻合前に静注, さらに DN9693 50 μ g/kg/min を吻合前から持続静注。16例(ポリウレタン8例 PTFE 8例)。以上83例のグラフトを移植5分から7日後に摘出し開存を判定した後, SEM で内面を観察した。

SEM 標本は近位側及び遠位側吻合部, グラフト中央部分の3カ所で作製し, 血栓による閉塞例では血栓を除去した後標本とした。グラフト摘出後, 直ちに生食水で洗浄し, 1.5%グルタルアルデヒド溶液で2時間固定した。次に0.15M カコジル酸緩衝液で洗浄した後, 1%オスmium溶液に2時間浸漬し, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 無水エタノール溶液により脱水した。そして臨界点乾燥(日立製 HCP-1)を行い, イオンスパッタリング装置(Eiko IB-3)を用い金パラジウム蒸着を施し SEM 標本とした。SEM は日立製 S-450 を使用した。

2-2. 結 果

1群(対照群)

ポリウレタン例は移植5分から7日後にグラフトを摘出した。14例中, 9例が開存し, 3時間以後の5例は血栓により閉塞した。移植5分後, 偽足を出した多

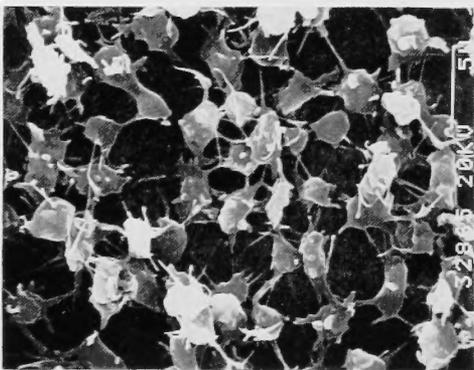


図5 ポリウレタン人工血管。対照群。移植5分後, 粘着した血小板が見られる。(×4000)

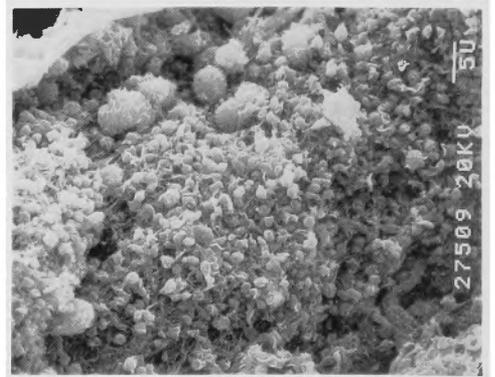


図6 ポリウレタン人工血管。対照群。移植30分後, 多数の血小板と少数の白血球からなる血栓形成が認められる。(×1900)

数の血小板の粘着が見られた(図5)。30分後には粘着した血小板数は著しく増加し, 多数の血小板と少数の白血球からなる血栓が形成された(図6)。また変形し偏平化した白血球の粘着している部分も見られた(図7)。1時間後, 吻合部には肉眼的血栓が認められ, 血栓は急速に増大し, 3時間後, グラフト閉塞に至った。

PTFE 例は移植5分から2日後にグラフトを摘出した。5例全例が開存した。移植5分後, 偽足を出した血小板の粘着が見られた(図8)。また一部で白血球粘着, フィブリン沈着が認められた(図9)。吻合部では密なフィブリン網が形成され, 多数の血球の取り込みが見られた。30分後に厚い血栓層が形成されたが(図10), 2日後には血栓は薄層化し, 血球粘着も減少した。

ヘパリン化人工血管は移植30分から7日後にグラフ

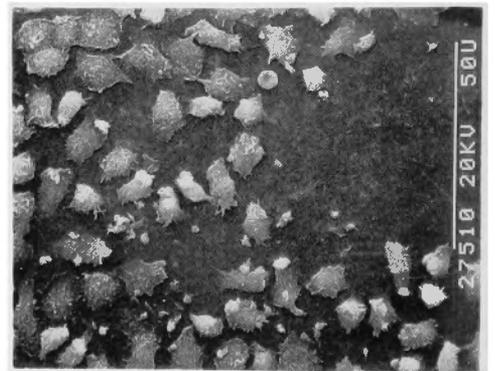


図7 ポリウレタン人工血管。対照群。移植30分後, 一部のグラフト表面には変形し偏平化した白血球が見られる。(×990)

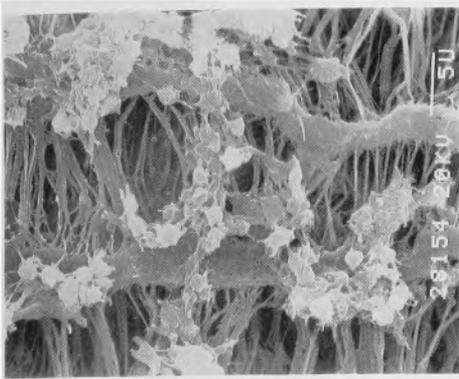


図8 PTFE人工血管. 対照群. 移植5分後, 粘着した血小板が見られる. (×2900)

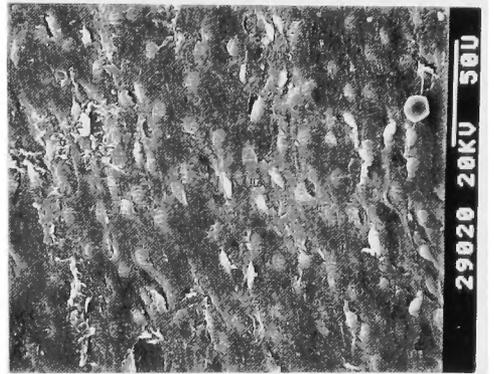


図11 ヘパリン化人工血管. 対照群. 移植5時間後, グラフト表面への血球粘着は少ない. (×500)

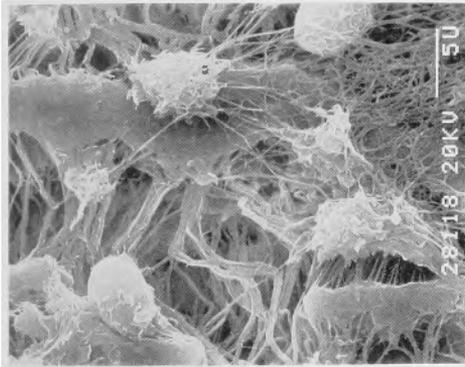


図9 PTFE人工血管. 対照群. 移植5分後, 白血球粘着, フィブリン形成が認められる. (×3200)

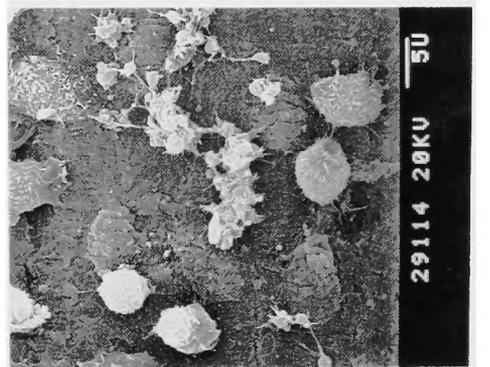


図12 ヘパリン化人工血管. 対照群. 移植5時間後, 一部に血小板, 白血球の粘着が認められる. (×2400)

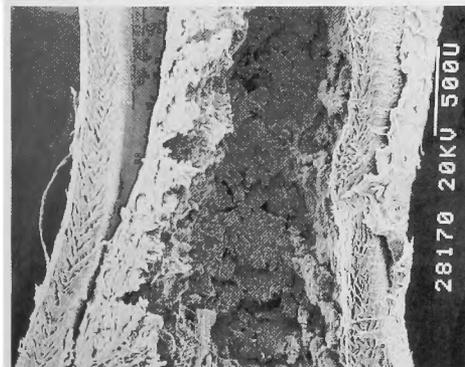


図10 PTFE人工血管. 対照群. 移植30分後, グラフト表面は厚い血栓層で被われている. (×42)



図13 自家静脈グラフト. 対照群. 移植2時間後, グラフト表面は内皮細胞に被われており, 粘着している血球は少ない. (×400)

トを摘出した。6例中5例が開存し、1例は血栓により閉塞した。移植後30分から5時間の経過では血球粘着は少なく(図11)、一部に血小板、白血球粘着が見られた(図12)。7日後に摘出した開存例では血球粘着、血栓形成は抑制されていた。

自家静脈例は移植5分から2日後にグラフトを摘出した。11例全例が開存した。移植2時間後、内皮細胞に被われたグラフト表面には血球粘着はほとんど見ら

れなかった (図13)。しかし内皮細胞の剝離した部分には血小板粘着、内皮下組織への白血球侵入が見られた (図14)。2日後にはグラフト表面への白血球、血小板の粘着は減少した。

2群 (アスピリン投与群) :

ポリウレタン例は移植30分から5日後にグラフトを摘出した。13例中、11例が開存し、5日後に摘出した2例は血栓により閉塞した。移植30分後、血小板粘着は抑制されたが、グラフト表面全体が変形し偏平化した白血球で被われた (図15)。また白血球の凝集塊も認められた (図16)。粘着した白血球にフィブリンが沈着し (図17)、多数の赤血球の取り込みが見られた。4時間後、フィブリン網は密となり血栓が形成された (図18)。5日後には血栓によりグラフトは閉塞した。

PTFE 例は移植10分から2日後にグラフトを摘出した。7例全例が開存した。移植10分後、粘着した血

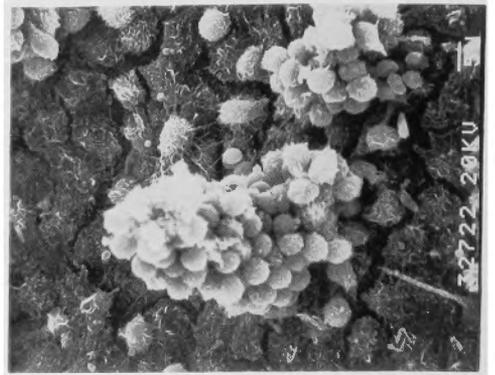


図16 ポリウレタン人工血管。アスピリン投与群。移植30分後、白血球の凝集塊が見られる。(×1400)

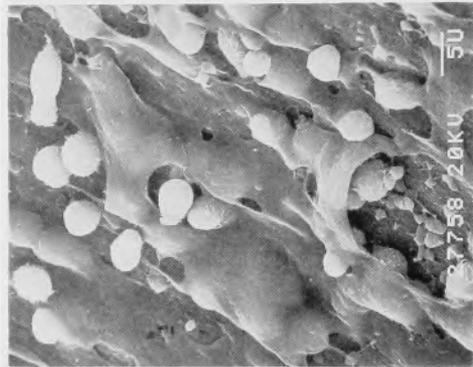


図14 自家静脈グラフト。対照群。移植5分後、内皮剝離部に粘着した血小板、白血球が見られる。(×2100)

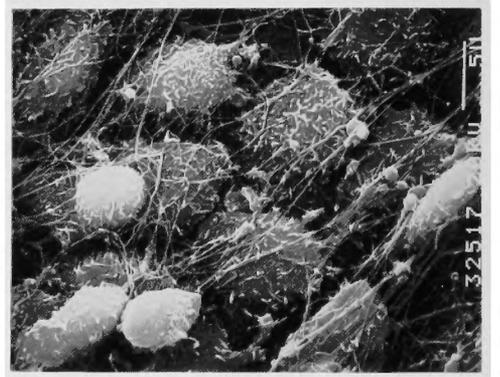


図17 ポリウレタン人工血管。アスピリン投与群。移植30分後、粘着した白血球にフィブリン沈着が認められる。(×3300)



図15 ポリウレタン人工血管。アスピリン投与群。移植30分後、グラフト表面全体に変形し偏平化した白血球が見られる。(×1000)

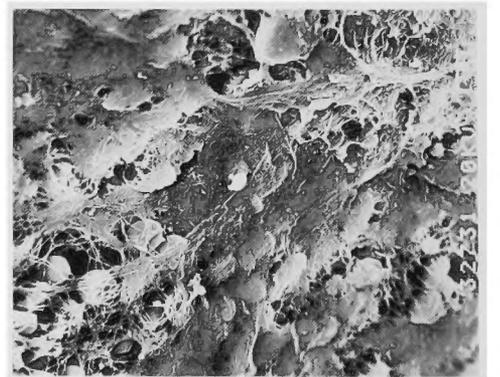


図18 ポリウレタン人工血管。アスピリン投与群。移植4時間後、白血球上のフィブリン網は密となり、多数の赤血球の取り込みが認められる。(×2000)

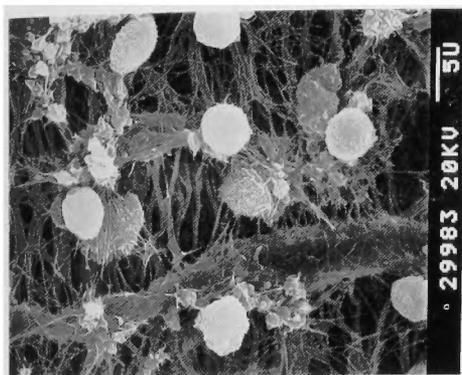


図19 PTFE人工血管。アスピリン投与群。移植10分後，粘着した血小板，白血球が見られる。(×2500)

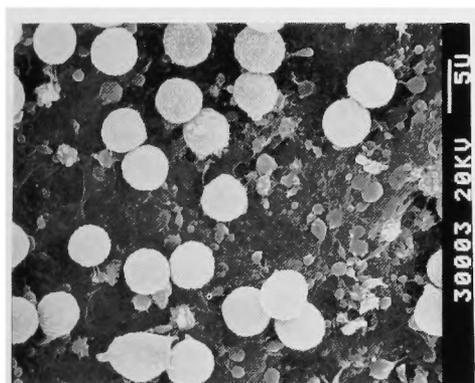


図20 PTFE人工血管。アスピリン投与群。移植2時間後，グラフト表面は粘着した血小板の薄層で被われている。白血球も多数見られる。(×2500)

血小板と白血球が散在して認められ(図19)，2時間後，グラフト表面は粘着した血小板の薄層で被われた(図20)。そして2日後には血栓の薄層が形成された。

3群(DN9693投与群)

ポリウレタン例11例で，移植30分から5時間後にグラフトを摘出，全例開存した。移植30分後，グラフト表面には偽足を出した血小板の粘着が見られた。4時間後，粘着した血小板数の増加が見られたが，白血球の粘着，凝集，フィブリン形成は抑制されていた(図21)。DN9693投与量は10~50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ であったが，投与量による差異は認められなかった。

4群(アスピリン，DN9693併用群)

ポリウレタン例は移植30分から4時間後にグラフトを摘出した。8例全例が開存した。移植30分後，偽足を出した血小板の粘着が見られたが，4時間後でも粘

着した血小板数の増加は軽度で，白血球の粘着，凝集，フィブリン形成の抑制が認められた(図22)。

PTFE例は移植30分から4時間後にグラフトを摘出した。8例全例が開存した。移植4時間後までの観察で，白血球粘着，血栓形成の抑制が認められた。またグラフト表面への血小板粘着が見られたが，粘着数の増加は軽度であった(図23)。

2-3. 小括

1. 移植後早期に人工血管表面への多数の血小板粘着，少数の白血球粘着が見られた。血球粘着はポリウレタン，PTFEで著しかった。
2. アスピリンにより血小板粘着が，DN9693により血小板，白血球粘着が抑制された。
3. PTFEと比較すると，ポリウレタンには多数の白血球が粘着し，また粘着した白血球の変形も著しかった。



図21 ポリウレタン人工血管。DN9693投与群。移植4時間後，粘着した血小板が見られる。(×2200)

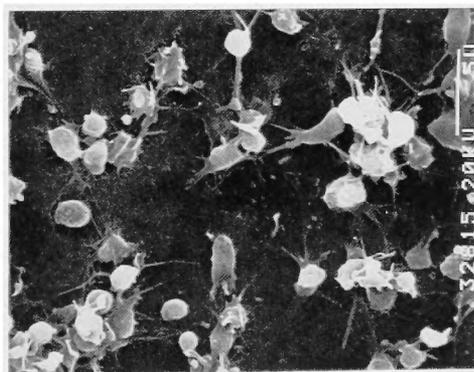


図22 ポリウレタン人工血管。アスピリン，DN9693併用群。移植4時間後，粘着した血小板が見られる。(×4100)

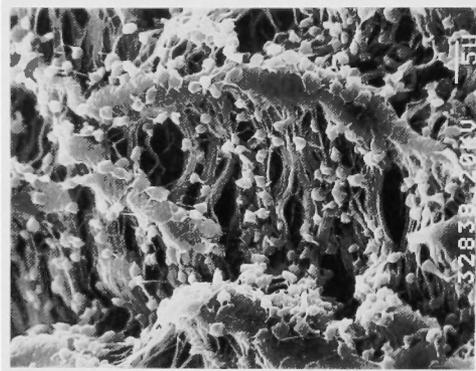


図23 PTFE人工血管. アスピリン, DN9693併用群. 移植4時間後, 粘着した血小板が見られる. (×2000)

4. 粘着した白血球にフィブリン沈着が起り, 赤血球が形成された.

III. 考 察

自家静脈は内皮細胞に被われており, その表面は優れた抗血栓性を有している. これに対し人工血管では表面が血流に触れると血漿蛋白の吸着が起り, 血球粘着, 血栓形成へと進行していく (2). 血流が速く口径の大きい動脈の再建に用いられた人工血管では, 血栓は進行性には増大せず治癒過程をとっていくが (14), 小動脈に移植された小口径人工血管の場合には, 人工血管表面に形成された血栓により内腔閉塞に至る危険性が高い. 今回検討の対象としたポリウレタン, PTFE, ヘパリン化人工血管の移植成績は満足できるものではなく, 臨床使用に供し得る小口径人工血管の開発の困難性を示していると言える. この中でヘパリン化人工血管は長期開存例は得られなかったが, 移植後早期のグラフト表面への血球粘着は少なく血栓形成の抑制が認められた. これに対し, ポリウレタン, PTFE は短時間で多数の血球が粘着し血栓形成が著しかった. このような人工血管表面の血球粘着, 血栓形成の形態学的評価には SEM が有力な手段の1つとされている.

移植後早期に人工血管表面に粘着する血球は血小板と白血球である. グraftの早期閉塞の原因である血栓形成に血小板が重要な役割を果していることはよく知られており, 抗血小板剤のグラフト開存への有効性は実験例 (13) 及び臨床例 (5) において認められている. しかし, 人工血管表面への白血球粘着に関しての報告は少なく, 特に *in vivo* での形態学的検討はあ

まりなされていない. 著者はアスピリン, DN9693 投与下での血小板, 白血球粘着を SEM により観察し, とりわけ血球粘着の著しかったポリウレタン, PTFE 人工血管表面での血小板, 白血球動態を分析した. アスピリンは血小板シクロオキシゲナーゼを不可逆的にアセチル化し, Thromboxane A₂ 産生, 血小板凝集を抑制する. 一方, DN9693 は化学名 1, 5-Dihydro-7-(1-piperidinyl) imidazo [2, 1-b] quinazolin-2(3H)-one Dihydrochloride Hydrate で, cyclic AMP phosphodiesterase を抑制し, 細胞内 cyclic AMP を増加させ, 血小板及び白血球の粘着, 凝集を抑制する (1, 9). 自験例でもアスピリンにより血小板粘着, 凝集が抑制され, グraftの早期開存が得られた. しかしアスピリン投与例では人工血管表面への血小板粘着は抑制されたが, 白血球の粘着, 凝集が著明となった. Bryant ら (4) は細胞内 cyclic AMP を増加させる薬剤により白血球粘着が抑制されることを報告している. DN9693 も同様の作用を有し, その投与により白血球粘着は抑制された. 白血球粘着はグラフトの材質の違いにより異なった結果が得られ, PTFE では白血球は散在して粘着し, 変形も軽度であったが, ポリウレタンでは表面全体が粘着した白血球で被われ, 変形も著しかった (図15). Craddock ら (6) は活性化された補体により白血球の変形, 凝集が4分以内に起こることを *in vitro* で示している. PTFE に比較しポリウレタンは補体活性化作用が強いと推測される.

粘着した白血球にフィブリンが沈着し多数の赤血球の取り込みが見られたことから (図18), 白血球が血栓形成過程の一役を担っていると考えられる. すでに Goldstein ら (7) はヒト白血球が Thromboxane A₂ を産生することを示し, Lotner ら (10) はヒト白血球由来の Platelet-activating factor の存在を報告している. また白血球が凝固系の活性化作用を発揮することが指摘されているが (12), Schaub ら (15) は深部静脈血栓症では白血球が血栓形成の主要な役割を果しており, 血小板は二次的役割をもつにすぎないと指摘している. アスピリン投与群のポリウレタン例で見られたように, 血小板機能が抑制されている場合は, 動脈に移植された人工血管表面においても, 白血球を主とした血栓形成が見られた (図18). そしてアスピリンに DN9693 を併用すると, 血小板, 白血球の粘着, 凝集の抑制のみならずフィブリン形成も抑制された (図22).

以上の結果から, 血小板同様に白血球も一次的に人工血管表面に粘着し, また粘着した白血球によりフィ

ブリン形成が促進されることが示唆された。

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました恩師京都大学医学部心臓血管外科学教室伴敏彦教授に深甚なる謝意を表すると共に, 実験に関する助言並びに御校閲を賜りました京都大学医学部心臓血管外科学教室岡本好史助教授に深謝致します。またポリウレタン人工血管を提供された京都大学医用高分子研究センター篠義人教授, DN9693を提供された第一製薬株式会社に深謝致します。

なお本論文の要旨の一部は, 第27回日本脈管学会総会, 第25回日本人工臓器学会大会において発表した。

References

- 1) Ashida S, Sakuma K, Kunitada S, et al: Prevention by DN9693 of leukocyte adhesion and of myocardial infarction in rabbits. *Thrombos Haemostas* **54**: 200, 1985.
- 2) Baier RE: The organization of blood components near interfaces. *Ann NY Acad Sci* **283**: 17-36, 1977.
- 3) Baier RE, Dutton RC: Initial events in interactions of blood with a foreign surface. *J Biomed Mater Res* **3**: 191-206, 1969.
- 4) Bryant RE, Sutcliffe MC: The effect of 3',5'-adenosine monophosphate on granulocyte adhesion. *J Clin Invest* **54**: 1241-1244, 1974.
- 5) Chesebro JH, Fuster V, Elveback LR, et al: Effect of dipyridamole and aspirin on late vein graft patency after coronary bypass operations. *N Engl J Med* **310**: 209-214, 1984.
- 6) Craddock PR, Hammerschmidt D, White JG, et al: Complement (C5a)-induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. *J Clin Invest* **60**: 260-264, 1977.
- 7) Goldstein IM, Malmsten CL, Kindahl H, et al: Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* **148**: 787-792, 1978.
- 8) Ikada Y: Blood-compatible polymers. In: Dusek K, ed. *Advances in polymer science* 57. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1984, p 103-140.
- 9) Ishikawa F, Saegusa J, Imamura K, et al: Cyclic guanidines. 17. Novel (N-substituted amino) imidazo [2,1-b] quinazolin-2-ones: Watersoluble platelet aggregation inhibitors. *J Med Chem* **28**: 1387-1393, 1985.
- 10) Lotner GZ, Lynch JM, Betz SJ, et al: Human neutrophil-derived platelet activating factor. *J Immunol* **124**: 676-684, 1980.
- 11) 宮田暉夫, 小平和彦, 古瀬正康, 他: 天燃組織特有の柔軟性を保持させた細口径抗血栓性人工血管. *人工臓器* **16**: 1474-1477, 1987.
- 12) Niemetz J: Coagulant activity of leukocytes. Tissue factor activity. *J Clin Invest* **51**: 307-313, 1972.
- 13) Oblath RW, Buckley FO Jr, Green RM, et al: Prevention of platelet aggregation and adherence to prosthetic vascular grafts by aspirin and dipyridamole. *Surgery* **84**: 37-44, 1978.
- 14) Reichle FA, Stewart GJ, Essa N: A transmission and scanning electron microscopic study of luminal surfaces in Dacron and autogenous vein bypasses in man and dog. *Surgery* **74**: 945-960, 1973.
- 15) Schaub RG, Simmons CA, Koets MH, et al: Early events in the formation of a venous thrombus following local trauma and stasis. *Lab Invest* **51**: 218-224, 1984.