

静脈グラフトの術中質的良否判定：病理組織学的所見による妥当性の検証

旭川医科大学大学院医学研究科博士課程 生態情報調節系専攻

一 色 学

共著者

笹嶋唯博、齋藤幸裕、菊地信介、小久保拓、内田大貴、古屋敦宏、内田 恒、
東 信良

はじめに

動脈硬化性重症虚血肢に対する下肢末梢動脈へのバイパス術は、その劇的な虚血改善効果、即効性、耐久性とそれらによる高い救肢率から第一選択の治療法としての評価は定着している。このバイパス手術では代用血管として静脈グラフト(vein graft: 以下 VG)の使用が必須であり、大伏在静脈が第一選択代用血管であることに異論はない。しかし手術手技や機器の発展により技術的な原因でバイパスが閉塞することは稀になったが、VG の質的不良による閉塞は依然として改善がなく、術後 5 年以内に約 30%の VG が閉塞し、その主因は進行性内膜肥厚(intimal hyperplasia: 以下 IH)による VG 狭窄で、80%以上が 2 年以内に発生する¹⁾²⁾。移植後の IH 発生は静脈硬化や炎症など、移植前 VG の病理変性と関係し、それは移植時の VG の性状から推察できる。その評価は移植後の開存性とおおよそ矛盾しないことが知られているが³⁾⁴⁾、より客観的な移植前病理組織学的所見との関係については詳細な報告がほとんど見当たらない⁵⁾。

このような背景において本研究では、バイパス移植の際に採取された余剰 VG 片の病理組織所見を解析し、その VG の 2 年後までの開存性から術中評価の妥当性を検証すると共に、病理変化に関係する術前諸因子を明らかにした。

1. 材料と方法

本研究は臨床研究に関する倫理指針に則り、本学倫理委員会の承認(課題番号 919)のもと患者のインフォームドコンセントを得て実施された。

研究対象

2002 年 1 月から 2011 年 12 月までに下肢閉塞性動脈硬化症患者 518 例に対し VG を用いた下肢末梢動脈バイパス術を施行した。その内、単一大伏在静脈をバイパスグラフトとして使用し、余剰片を採取し得た 68 例について病理組織学的に解析した。対象例の術前患者背景因子および検査値は表 1-A,B にまとめて示す。実施された術式は大腿-膝下膝窩動脈バイパス 12 例、大腿/膝窩-下腿/足部動脈バイパス 56 例、VG 移植法は Reversed vein graft 24, in-situ vein graft 44 であった。これら VG の質的良否は術中の内腔加圧時の拡張性の良否と内径、周囲組織との癒着、炎症所見などによる独自の評価基準に従って Good (以下 G-VG), Fair (以下 F-VG), Poor (以下 P-VG)の 3 段階に分類した(表 2)⁴⁾。

採取標本の処理

68VG は吻合部の中樞または末梢端余剰片が採取された。その内、40 標本は VG 片が管状のまま採取されホルマリンで内腔加圧固定された。すべての標本はパラフィン包埋し

て輪切切片を作成し、Hematoxylin-Eosin, Masson-trichrome (以下 MT), Elastica von Gieson 染色を行った。

顕微鏡画像はコンピュータ画像解析法(ImageJ1.47q,アメリカ国立衛生研究所)を用いて、輪切標本の 1/8 周における内膜厚比 (内膜厚/内膜厚+中膜厚; %)、内膜内筋線維成分密度 (内膜筋性成分の内膜面積に占める割合で IH により増加; %)、中膜平滑筋面積率 (静脈硬化による中膜輪状筋層の線維化度を定量評価; %)、および外膜線維密度 (外膜および周囲炎の有無; %)などを計測した。内膜厚比は加圧固定標本のみを対象としたが、加圧固定の有無が無視しうるその他の計測は全 68 標本を対象とした。

各層の計測基準として、内膜と中膜の境界は輪状筋層と内膜結合織層間として、輪状筋層のみを中膜とし、内膜は内皮細胞層血流面から内部に疎な縦走・斜走筋層を含む結合織外側縁までとした。一切片内に各層の厚さに不均一がある例は最大と最小の中間位を取り、IH が偏在する例はその最大値を採用した。

VG の開存性は質的良否と密接に関係することから、測定値を 2 年までの開存対閉塞群および術中の VG 質的良否評価基準などにより各々 2 群に分けて評価し、さらに質的良否や病理組織所見と関係する術前患者背景因子および検査結果について解析した。

統計解析

得られたすべての結果は、統計解析ソフト IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp. North Castle Drive, Armonk NY 10504-1785, USA) を用いて解析した。連続変数は平均値±標準偏差 (SD) または中央値±四分位範囲 (Median±Interquartile range: 以下 Me±IQR), および名義変数は%で表し、開存対閉塞および G-VG 群と F-VG+P-VG (以下 F/P-VG) 群の 2 群に分けて比較した。術前患者特性および検査値は臨床正常値あるいは receiver-operating characteristic (ROC) 曲線から cut-off 値を設定し、両群間で t 検定、Mann-Whitney U 検定、または χ^2 検定で比較した。次いで $p \leq 0.10$ を示した因子については、Logistic regression 解析により有意な関連因子を特定し、関連性の強さは Odds 比 (信頼区間 95%) で表した。VG 開存率は Kaplan-Meier 法で算出し、log-rank 検定で有意差を求めた。いずれの結果も危険率 $p < 0.05$ を有意とした。

2. 結果

68VG は開存群 n=59、閉塞群 n=9、また術中評価は G-VG=33、F-VG=27、および P-VG=8 で、これらの 2 年累積開存率は術後 24 時間以内の閉塞はなく、各々 93%、72%、73%、また G-VG 群対 F/P-VG 群では 93%、73% (P=0.035) で、VG の質的良否が移植後

の開存性と密接に関係することが示された（図 1）。

病理組織所見

開存群と閉塞群における病理組織所見計測値を表 3 に示す。内膜内筋線維成分密度 35% vs. 45% (P=0.032) および中膜平滑筋面積率 48% vs. 26% (P=0.002) で、移植前の IH の有無や中膜平滑筋層の線維化の進行、即ち VG の拡張性低下は VG の開存性に影響することが示された。内膜厚比、外膜線維密度には有意差を見いだせなかった。

術中評価による 3 群の代表的な病理組織所見をみると、G-VG では中膜平滑筋層が良好に温存されて線維化がなく、IH は認められない（図 2 A）。F-VG は中膜平滑筋層が中等度に線維化で失われ、IH は軽度に認められる（図 2 B）。P-VG は静脈硬化により中等度から高度の IH を来とし、内部には多数の筋線維を認める。中膜平滑筋層は線維化の進行により萎縮し、さらには高度に菲薄化する（図 2 C）。内膜内筋線維成分は G-VG から P-VG に向かって有意に増加する。一方、中膜平滑筋は萎縮、線維化が進行しついに菲薄化、線維化して筋層構造は失われる。

G-VG 群対 F/P-VG 群の病理組織所見計測結果を表 4 に示す。内膜内筋線維成分密度、中膜平滑筋面積率、外膜線維密度が両群間で有意差を示し、術中 VG 評価の妥当性が示された。

G-VG 群対 F/P-VG 群の関連する因子の単変量解析では、術前患者背景因子でワルファリンの内服、血液検査値では白血球、C-reactive protein、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血清アルブミン、ヘモグロビン A1（以下 HbA1）などが抽出された。これらのロジスティック解析では、F/P-VG 群と低血清アルブミンおよび HbA1 高値が有意に関連し、不良 VG の関連因子となることが示唆された（表 5）。

3. 考 察

VG 使用の可否は外科医の経験に基づく術中評価からなされるのが一般的である。その判断基準には定量性がなく、施設間で一定しないが、術者が不良と判断した VG の閉塞率は高く、使用されない場合が多い。本研究ではこの評価に客観性を付与するため手術時に採取された病理組織標本の画像解析を行い、その所見から評価の妥当性を病理組織学的に検証し、以下の結果を得た。即ち術中の 3 段階評価は病理組織所見で明瞭な相互間相違を示し、良好な VG の特徴として、IH がなく、中膜筋層が発達して、外膜の線維化が少ないことが示された。これに対し不良 VG では静脈硬化によりすでに IH を来とし、内部には筋線維成分を蓄積し、中膜は線維化して高度に萎縮し、外膜の線維化も高度であることが

確認された。また G-VG の特徴である内腔加圧時の良好な拡張性は中膜筋層の温存状態を反映している。

静脈壁病理組織解剖に関する詳細な報告は少ない。内弾性板および外弾性板は一定しないか存在せず、中・内膜間にある結合織とその内部にみられる疎な縦走または斜走筋束は内膜に含める見解^{6) 7)}と、それらを中膜に含めて内縦走筋層と外輪走筋層の 2 層からなるとする報告もあり⁸⁾、一定していないが、本研究では解剖書^{6) 7)}に従って前者を採用した。

VG の術中質的良否の評価基準として内腔加圧時の拡張性の良否、拡張後内径、周囲組織との炎症性変化などが重視される。内径の使用下限として、我々は 2.5mm 以上としているが、3mm や 2mm を下限とする報告もあり、その使用による開存率との関係は明確にはできていない。VG の拡張性評価は経験的、技術的な側面が大きい、良否判定上最も優先される特性である。拡張性に関する定量評価を行った報告はみられないが、我々は中膜筋層の多寡あるいは線維化の程度に注目し、その定量評価を試みた。中膜筋層の線維化度は G-VG から P-VG に向かって進行し、加圧時拡張性と良好に関連していることが示され、これは IH と共にグラフト開存/閉塞群とも合致する所見であった。一方、外膜線維密度は、G-VG 群対 F/P-VG 群では有意差を示したが、開存/閉塞群間比較では有意差がなく、VG の 2 年までの開存性に対しては影響が大きい可能性が示唆された。

P-VG 群には、静脈瘤様変化を伴う VG (varicose VG:以下 vVG)や連結 VG (spliced vein graft, 以下 sVG)が含まれ、今回の研究では 68VG 以外として 12VG が採取された。両者は閉塞率が高いため、臨床経験上、質的良否にかかわらず自動的に P-VG として扱われるのが一般的である。vVG は内径が 6mm 以内で、グラフト中央部の部分的瘤化が軽度な場合に使用される。病理組織標本は瘤化部以外の非変性部分が採取されるため、術中評価と今回の病理組織学的評価とは符号しない可能性が高い。同様に sVG では VG 連結部が閉塞の主因となるが、同部から採取された標本は性状が良好でも縫合操作が加わるため 2 次的に IH が発生しやすい条件になる。sVG も閉塞発生率が高いが、病理組織所見は必ずしも不良でない可能性がある。以上の理由から今回の病理組織学的計測値の比較ではこれらを除外した。

本研究は VG 移植後 2 年以内に発生する IH によるグラフト閉塞を減少させるための取り組みである。VG の移植後生物学的変化は静脈が動脈に移植される結果として、組織構造の remodeling が誘発され、それは動脈硬化症の進行過程と合致する。移植後、最初の

過程は内皮の脱落と再生であり、引き続いて動脈硬化症の初期像である IH が発生する。IH は内皮細胞再生の完了と共に停止し、remodeling 過程も休止期に入る一方、開存性は安定する。しかしこの過程は移植前の VG 質的良否に加えて宿主側の移植環境にも影響され、不良な VG では IH が進行性となって移植後数か月から数年で閉塞する。閉塞に至る VG は使用されるべきではないが、採取可能な VG の制限がある場合には使用せざるを得ない。その場合、移植前評価がより適切に行われるならば異常発生を回避でき、あるいは発生を予知して早期に対処し、VG を救済する余地が残される。以上より本研究は移植前評価基準をより精度の高いものに改良する一助になるものと考えられる。

患者背景因子や術前検査値は VG の質的良否に影響している可能性が推察された。臨床経験的に VG の質的不良に関与する因子として、1) 高齢者の VG は線維化する、2) 血清蛋白低下は低栄養を反映する、3) 糖尿病は神経障害が下肢静脈血行を増大させ、逆に VG の質を良好にする可能性が推察されている一方、HbA1 は血管膠原線維を変性させる。以上の諸点を推察して関連性を解析したが、患者背景因子に有意な関連は見いだせず、検査結果として低アルブミンと HbA1 が検出された。しかしこれらに関してはより詳細な解析が必要であると考えられた。

研究の制約

本研究では以下の研究制約が指摘される：1) VG 標本は末梢または中枢吻合部の余剰片を採取したが、必ずしも全例で採取可能ではなかったため連続症例解析とはならなかった；2) IH による VG 閉塞性病変は 90% が VG 体部に発生し、必ずしも吻合部に発生しないため、採取片の病理組織所見と病変発生部が必ずしも合致しているとは限らない；3) VG の閉塞原因は移植宿主条件にも強く影響されるため VG の移植前病理所見のみでは VG の予後規定因子を網羅できない。

結 論

術中の VG 評価基準と画像解析により定量化された病理組織所見を比較検討し、評価基準に対する病理組織学的意味付けがなされた。特に VG の開存性と密接に関係する拡張性の良否は中膜平滑筋層の発達や温存程度と強く相関することが明らかにされた。一方、外膜線維密度は F/P-VG 群で有意に高度であったが、VG の 2 年までの閉塞関連因子としての有意性は確認できなかった。

G-VG 群対 F/P-VG 群の術前患者背景因子および血液検査値との関連では F/P-VG 群で

血清アルブミン低値および HbA1 高値が VG の質的良否に有意に影響することが示唆された。

謝 辞

データの統計解析にご援助いただいた北海道教育大学、笹嶋由美名誉教授に深謝申し上げます。

引用文献

- 1). Szilagyi DE, Elliott JP, Hageman JH, Smith RF, Dall'olmo CA: Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: Clinical, angiographic and histopathologic observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis. *Ann Surg* 1973;178:232-46
- 2). Sladen JG, Gilmour JL: Vein graft stenosis. *Am J Surg* 1981;141:549-553
- 3). Szilagyi DE, Hageman JH, Smith RF, Elliott JP, Brown F, Dietz P: Autogenous vein grafting in femoropopliteal atherosclerosis: The limits of its effectiveness. *Surgery* 1979;86:836-51
- 4). Sasajima T, Kubo Y, Kokubo M, Izumi Y, Inaba M: Comparison of reversed and in-situ saphenous vein grafts for infragenicular bypass: experience of two surgeons. *Cardiovasc Surg* 1993;1:38-43
- 5). Marin ML, Cordon RE, Veith FJ, Panetta TF, Sales CM, Wengerter KR: Human greater saphenous vein: histologic and ultrastructural variation. *Cardiovasc Surg* 1994;2:56-62
- 6) 伊藤隆.組織学,南山堂,東京;1980,122-124
- 7).Rauber,Fr.Kopsch: Rauber-Kopsch Lehrbuch und Atlas der Anatomie des Menschen/von Fr.Kopsch,G.Thieme,Leipzig;1934
- 8). Fuchs JCA, Mitchener JS III, Hagen PO: Postoperative changes in autogenous vein grafts. *Ann Surg* 1978;188:1-15

図 1. G-VG群とF/P-VG群の術後2年累積開存率

G-VG群に比べてF/P-VG群の開存率が低く、VGの質的良否が移植後の開存性と密接に関係することを示す

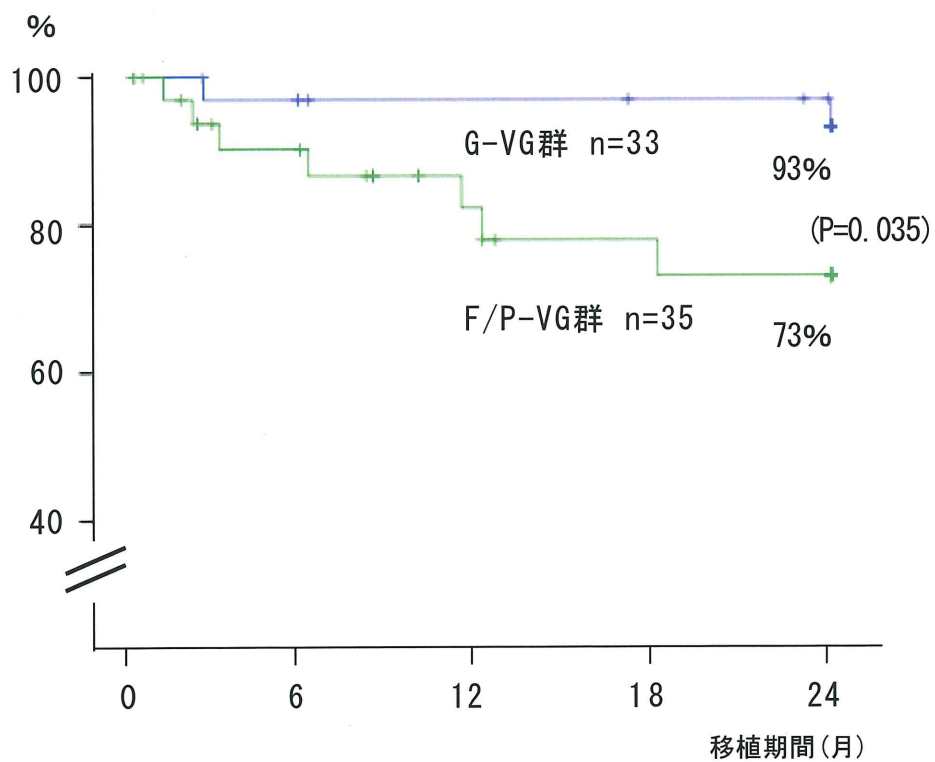
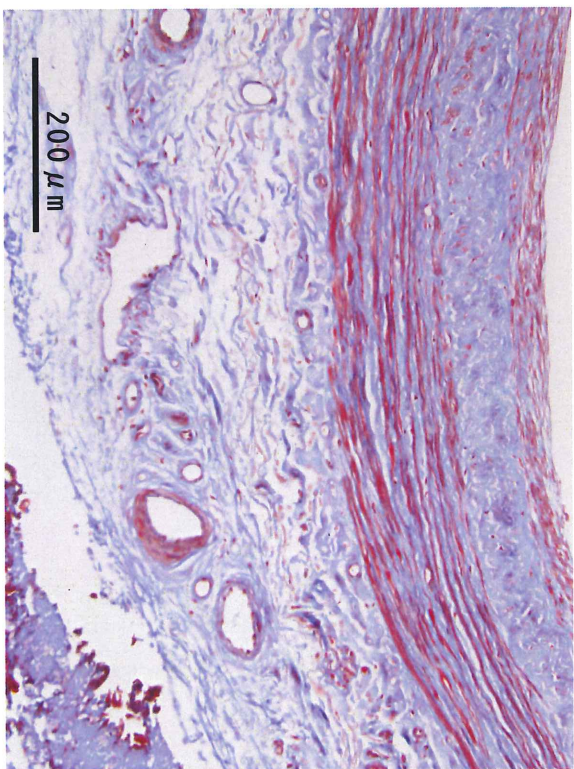
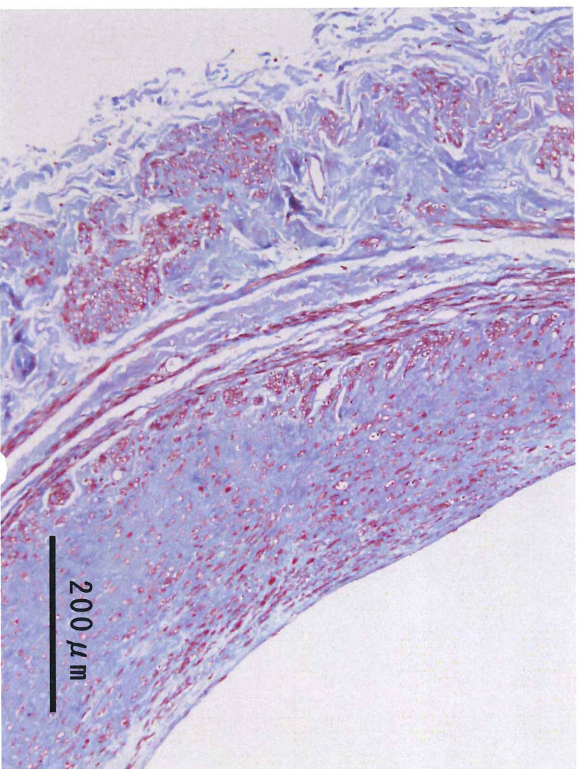


図2. 術中質的良好評価におけるG-VG, F-VG, P-VGの病理組織所見の特徴。

G-VGでは中膜平滑筋層が良好に温存されて線維化がなく, IHは認められない(A)。F-VGは中膜平滑筋層が中等度に線維化で失われ, IHはないか軽度である(B)。P-VGは静脈硬化により中等度から高度のIHを来し、中膜平滑筋層は線維化の進行により萎縮し、さらには高度に菲薄化する(C)



| | |
|---|---|
| A | B |
| C | |



Masson-Trichrome染色 × 200

表 1 - A. 術前患者特性のG-VG群とF/P-VG群の比較:単変量解析

| | | G-VG群 n=33 | F/P-VG群 n=35 | P |
|------|-----------------|---------------|-----------------|-----------|
| 年齢 | 平均±SD | 65±12 | 66±11 | 0.795 |
| | ≥65 | 19 (58%) | 22 (63%) | 0.368 |
| 性 | 男 | 28 (85%) | 33 (94%) | |
| | 女 | 5 (15%) | 2 (6%) | 0.234 |
| 危険因子 | 喫煙 | 22 (67%) | 26 (74%) | 0.188 |
| | 高血圧 | 28 (85%) | 25 (71%) | 0.673 |
| | 脂質異常 | 18 (55%) | 15 (43%) | 0.622 |
| | 糖尿病 | 29 (88%) | 30 (86%) | 1.000 |
| | 維持透析 (慢性腎不全) | 16 (48%) | 11 (31%) | 0.279 |
| | 冠動脈疾患 | 20 (61%) | 20 (57%) | 0.758 |
| | 脳血管疾患 | 5 (15%) | 4 (11%) | 0.461 |
| | 虚血重症度 | 間歇性跛行 | 7 (21%) | 6 (17%) |
| | 重症虚血肢 | 28 (85%) | 27 (77%) | 0.855 |
| 内服薬 | 抗糖尿病薬* | 17 (52%) | 13 (37%) | 0.446 |
| | 抗血小板薬 | 30 (91%) | 31 (89%) | 0.239 |
| | ワファリン | 11 (33%) | 3 (9%) | 0.022 |
| | 降圧薬 | 25 (76%) | 23 (66%) | 0.569 |
| | スタチン | 8 (24%) | 6 (17%) | 0.634 |

*:経口糖尿病薬およびインスリン注を含む
(%):各群内での出現率

表 1 - B. 術前患者特性のG-VG群とF/P-VG群の比較: 単変量解析

| | | G-VG群 n=33 | F/P-VG群 n=35 | P |
|-----------|--|---------------|-----------------|-------|
| 白血球 | $>7.9 \times 10^3/\text{mm}^3$ * | 4 (12%) | 9 (26%) | 0.097 |
| CRP** | $>2.1\text{mg/dl}$ * | 12 (36%) | 19 (54%) | 0.054 |
| 赤血球 | 男 $<4.0 \times 10^6/\text{mm}^3$ 女 $<3.4 \times 10^6/\text{mm}^3$ | 25 (76%) | 27 (77%) | 0.313 |
| ヘモグロビン | 男 $<13.5 \text{ g/dl}$ 女 $<11.5 \text{ g/dl}$ | 29 (88%) | 32 (91%) | 0.062 |
| ヘマトクリット | 男 $<40 \%$ 女 $<35 \%$ | 28 (85%) | 32 (91%) | 0.033 |
| 血小板 | $289 > \times 10^3/\text{mm}^3$ * | 8 (24%) | 4 (11%) | 0.674 |
| プロトロンビン時間 | $>13\text{sec.}$ | 10 (30%) | 7 (20%) | 0.484 |
| PTINR*** | >1.2 | 14 (42%) | 9 (26%) | 0.268 |
| 総タンパク | $<6.0 \text{ g/dl}$ | 6 (18%) | 3 (9%) | 0.242 |
| アルブミン | $<3.8 \text{ g/dl}$ | 22 (67%) | 28 (80%) | 0.040 |
| 総コレステロール | $>240\text{mg/dl}$ | 0 (0%) | 0 (0%) | - |
| トリグリセライド | $>150\text{mg/dl}$ | 7 (21%) | 9 (26%) | 0.838 |
| コリンエステラーゼ | $>459 <206 \text{ IU/l}$ | 9 (27%) | 15 (43%) | 0.102 |
| 尿素窒素 | $>30\text{mg/dl}$ | 20 (61%) | 24 (69%) | 0.179 |
| クレアチニン | $>1.3\text{mg/dl}$ | 20 (61%) | 23 (66%) | 0.283 |
| 血糖値 | $>109\text{mg/dl}$ | 13 (39%) | 15 (43%) | 0.486 |
| ヘモグロビンA1 | $>7.5\%$ | 15 (45%) | 24 (69%) | 0.013 |

*:ROC曲線によるcut-off値

** : CRP : C-reactive protein

*** : PTINR : prothrombin time-international normalized ratio

表 2. 静脈グラフトの質的良否評価基準

| 最小内径 (mm) | 拡張性 | |
|------------|--------|------|
| | 良好 | 不良 |
| ≥ 6 | Poor * | NAV |
| 5.9 ~ 4 | Good | Poor |
| 3.9 ~ 3 | Fair | NAV |
| 2.9 ~ 2.5 | Poor | NAV |
| ≤ 2.4 | NAV | NAV |

質的良否 : Good, Fair, Poorの3段階評価

*: 静脈瘤様変化

NAV : not available

表 3. 開存VG群と閉塞VG群における病理組織計測値の比較

| | 開存群 | 閉塞群 | P |
|------------|-------------|-------------|-------|
| 内膜厚比 | 27.7 ± 11.7 | 29.2 ± 27.8 | 0.922 |
| 内膜内筋線維成分密度 | 35.2 ± 13.1 | 44.5 ± 27.2 | 0.032 |
| 中膜平滑筋面積率 | 48.0 ± 17.9 | 26.2 ± 13.0 | 0.002 |
| 外膜線維密度 | 36.7 ± 36.7 | 36.0 ± 22.3 | 0.252 |

開存群 n=59, 閉塞群 n=9, Me±IQR

表 4. G-VG群とF/P-VG群における病理組織計測値の比較

| | G-VG群 | | F/P-VG群 | | P |
|--------------|-------|--------|---------|--------|-------|
| 内膜厚比* | 27.9 | ± 15.0 | 28.6 | ± 12.0 | 0.840 |
| 内膜内筋線維成分密度** | 29.2 | ± 9.8 | 41.6 | ± 22.1 | 0.008 |
| 中膜平滑筋面積率* | 63.5 | ± 13.4 | 29.4 | ± 13.5 | 0.000 |
| 外膜線維密度** | 27.0 | ± 11.8 | 39.6 | ± 22.0 | 0.024 |

G-VG群 n=33, F/P-VG群 n=35

*: Me ± IQR

** : 平均 ± SD

表 5. 術前患者特性のG-VG群とF/P-VG群の比較:二項ロジスティック回帰分析

| | オッズ比 | 95%信頼区間 | P |
|-------------------|-------|---------------|-------|
| 血清アルブミン値<3.8mg/dl | 0.213 | 0.059 - 0.765 | 0.018 |
| ヘモグロビンA1>7.5% | 0.213 | 0.071 - 0.644 | 0.006 |