

動脈石灰化における matrix metalloproteinase の役割

課題番号：16390351

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 笹 嶋 唯 博
(旭川医科大学医学部)

動脈石灰化における matrix metalloproteinase の役割

課題番号：16390351

(はしがき)

動脈硬化の終末像である動脈の石灰化は、病態を重症化するのみならず内科的、外科的治療を困難にしている（添付論文参照）。動脈壁の石灰化は病理学的に、主に内膜硬化（粥状硬化）として内膜に選択的に発生する病態と糖尿病・維持透析例にみられる中膜石灰化の2つがあるが、本研究は特異的な微小石畳状石灰化を形成する中膜石灰化のメカニズムを解明し、石灰化防止に関わる因子を明らかにすることを目的とした。研究対象は当該石灰化を確実に発生するモデルとして、ヒト糖尿病／維持透析例のバイパス術後静脈グラフトを主な研究対象として、石灰化病変形成初期における発生の局在、進展様式、それに関わる遺伝子発現などを検討した。その結果、移植早期グラフトにおいて、中膜細胞外に約 30 nm の最小微小石灰化早期病変を検出することができた。これは移植 1－3 か月の段階でみられ、自家静脈中膜内に、石灰物質はリンとカルシウムの混合物であり、分子数個分の大きさで、個々に独立して細胞外に存在した。中膜石灰化の終末像と対比して考察すると石灰化は中膜膠原線維の側鎖を起始部として成長が始まる可能性が推察された。

研究組織

研究代表者 笹嶋唯博 (旭川医科大学・医学部・教授)
研究分担者 山崎弘資 (旭川医科大学・医学部・講師)
角浜孝行 (旭川医科大学・医学部・助手)

交付決定額 (配分額)

| | | |
|----------|--------|----|
| 平成 16 年度 | 6,300 | 千円 |
| 平成 17 年度 | 3,600 | 千円 |
| 平成 18 年度 | 3,900 | 千円 |
| 計 | 13,800 | 千円 |

研究発表

誌上発表

1. Shimizu N, Azuma N, Nishikawa T, Hirata S, Morishita N, Kaneta Y, Sasajima T: Impact of nuclear factor- κ B decoy transfection on vein graft intimal hyperplasia. J Cardiovasc Surg in press
2. Kadohama T, Ohtani N, Sasajima T: Hepatic artery aneurysm involving the proper hepatic and gastroduodenal artery treated using a gastroepiploic artery in situ bypass. J Vasc Surg in press
3. Saitoh Y, Kaneda Y, Sasajima T et al. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary limphoedema via promotion of lymphangiogenesis. Circulation 2006;114:1177-84
4. Azuma N, Inaba M, Akasaka N, Haga M, Goh K, Sasajima Y, Erdem CC, Sasajima T: Limb salvage achieved by paramalleolar bypass with topical treatment. Jpn J Vasc Surg 2005;14:83-89
5. Akasaka K, Akasaka N, Sasajima T, Sumpio BE et al. Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells. J Vasc Surg 2005;41:517-22
6. Sasajima T, Inaba M, Azuma N et al. Novel anastomotic method enables aorto-femoral bypass for patients with porcelain aorta. Year Book of Vasc Surg 2004. Moneta GL. Ed. Mosby. Philadelphia. pp349-50;2004

口頭発表

笹嶋唯博 シンポジウム血行障害のある下肢創傷をどう治療するかー外科治療. 第5回日本フットケア学会 2007. 2. 17

Sasajima T. Vascular problems of diabetic foot. Dabetic foot workshop in Jeddah. (Saudi) 2006.11.3

Sasajima T. Limb salvage for diabetic patients with extensive tissue loss. 6th International Vascular Conference (Saudi) 2006.11.2

Sasajima T. Is an exclusive vein policy for arterial reconstructions below knee a realistic goal? The Congress of Taiwan Society for Vascular Surgery (Taipei) 2006.9.9

Sasajima T. Novel operation for foot-salvage in patients with Buerger's disease not having graftable distal arteries: Distal venous arterialization bypass combined with free flap. 4th German-Japanese Congress of Vascular Surgery (Neurnberg) 2006.8.24

Sasajima T. Limb salvage in extreme situations. 3rd Congress of Asian Vascular Society (Kuala Lumpur). 2006.8.16

笹嶋唯博 重症足趾壊疽：救足のための外科治療の実際 第3回日本フットケア学会金沢セミナー 2006. 10. 7

笹嶋唯博 A S O合併患者に対するマネージメント (外科的アプローチ) 第41回糖尿病額の進歩 2006. 9. 30

笹嶋唯博 糖尿病・維持透析の足壊疽- 救足のための外科治療 第 42 回日本糖尿病学会近畿地方会 2005. 11. 5

笹嶋唯博 「血管外科専門医の立場から」 第 39 回糖尿病学の進歩 2005. 2. 28

笹嶋唯博 「糖尿病と ASO」 第 47 回日本糖尿病学会 2004. 5. 14

出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

申請中

緒 言

粥状硬化(内膜硬化)では内膜肥厚、粥腫により狭窄を発生し、終末像として石灰化を発生する。これに対し中膜硬化(中膜石灰化)(図1)は内腔狭窄を発生しないが、終末像として中膜に広範かつ均一な微小石畳状石灰化を形成して動脈のコンプライアンスを消失させ循環障害をもたらす。大動脈炎症候群ではより高度の石灰化を特徴とし、弾性線維に対する自己免疫疾患とされ、石灰化は“elastin-oriented calcification”と推察されている。これら石灰化動脈では、いずれも外科治療、特に血行再建術において困難を極め、最近の糖尿病/維持透析患者の急増は外科治療の機会が増加し、その病態解明と防止法の開発が急務となっている。いずれの型の石灰化においてもその発生に matrix metalloproteinase (MMP) が密接に関与していることは想像に難くない。MMP は細胞外マトリックス分解酵素群で、作用基に Zn をもち、その活性は Ca^{++} に依存し、組織の再構築や細胞の遊走に重要な役割を果たすが、この作用は tissue inhibitors (TIMPs) 活性とのバランスにより生理的に制御される。しかし低酸素などの病態が発生すると MMP/TIMPs 活性不均衡を生じ細胞外マトリックスの過剰分解、変性がおこる。すなわち MMP 過剰発現が弾性線維を変性、分解し、産生されたエラスチン由来ペプチドに Ca^{++} が結合して石灰化が進行する。大動脈炎症候群の高度の石灰化は、エラスチンが免疫学的標的となっており、まさに MMP の関与を否定できない。すなわち炎症による動脈壁血行障害が中膜を虚血に陥らせ、MMP 過剰発現によりエラスチン分解による石灰化が進行する。大動脈弁石灰化は MMP-9 と tenascin-C の過剰発現が関与する“elastin-oriented calcification”であるとする研究が既に報告されている。粥状硬化症の内膜石灰化も同様の機序が推察される。MMP を産生して粥腫の線維性キャップを不安定化させるが、内膜石灰化に関与することは容易に推測される。一方、糖尿病/維持透析における中膜硬化症は弾性線維の少ない下腿～足部の筋性動脈に好発する。中膜虚血以外に、動脈硬化危険因子によるマクロファージや平滑筋細胞の刺激、これら細胞からの advanced glycation endproducts (AGEs) 蛋白受容体を介する MMP の産生など、様々な機序を介する MMP 過剰発現と合併する Ca 代謝異常が Ca^{++} 過剰取り込みに拍車をかけ石灰化が急速に進行するものと推察される。いずれの石灰化もその発生機序は大きく相違しないと考えられるので、

以上の推論に基づき、本研究では、確実に石灰化初期標本が得られる糖尿病/維持透析例の中膜硬化症を主な対象として、

- 1). 石灰化を発生する病態における血管壁での MMP、ostocalcin の発現
- 2). 石灰化発生初期における石灰化の局在
- 3). 石灰化発生初期における平滑筋細胞、膠原線維、弾性線維の関与
- 4). 石灰化の進展様式

などを明らかにするため、以下の解析を行い、動脈壁石灰化の発生機序、進展様式、その防止策などを検討した。



図1. 糖尿病維持透析例にみられる典型的な動脈中膜の石灰化像

材料と方法

動脈石灰化は進行性病変であり、高度に石灰化した血管からは必要な分析を行うことは困難、かつ無意味で、発生機序の解明には発生初期の石灰化巣を見つけ出すことが必須である。しかし通常の動脈が石灰化するかどうかは不明であり、実際、石灰化は個体によりかつ動脈の部位・局所により石灰化の発生には相違がある。それ故、石灰化発生局所には特異的な生物学的特徴があるはずであるが、研究対象を見いだすには、多くの可能性のある標本を採取する必要がある。そこで、石灰化動脈の初期所見を求めため、確実に中膜石灰化が発生し、かつ研究標本の獲得が可能な病態として、ヒト糖尿病／維持透析例の壊疽肢に対する救肢的自家静脈バイパスグラフトを主な研究対象とした。自家静脈バイパスグラフトは例外なく約15%において術後4週から2年以内に限局性グラフト狭窄を発生し、それらはグラフトの修復手術が必須で、移植早期のグラフト標本が入手できることから第一の研究対象とした。さらに種々の病態における石灰化を同様に解析するため期間中に行われた血行再建手術で、術後摘出する機会を得たすべての標本について石灰化の有無を含め解析を行った。一方、石灰化モデルが得難い動物では、イヌ、家兔、糖尿病ラット、糖尿病ハムスター、および糖尿病モデルラット(Otsuka Long Evans Tokushima Fatty : OLETF、大塚製薬研究所よ

り提供)を対象とし、腹部大動脈石灰化の有無を同様に解析した。

主な研究対象となった自家静脈グラフトは研究期間中に行われた下肢動脈閉塞症に対する自家静脈バイパス 146 例中、内膜肥厚により修復手術が必要となった糖尿病・維持透析例 15 例 18 グラフト片 (移植期間 2-8 か月)、非糖尿病例 18 例 20 グラフト片 (移植期間 3-12 か月)、冠動脈バイパスの内胸動脈、橈骨動脈、自家静脈グラフト (移植 4 年) であった。

動物は、石灰化の可能性から最終的に OLETF のみが対象となり、糖尿病は 20 週令前後で発症することから 17-24 週令、10 匹を使用し解析した。

以上の標本につき、以下の解析を行った。

1. 弾性線維への AGE 沈着の検出

1) 自家蛍光検出法

3 μ m パラフィン切片を作成、蛍光顕微鏡システムを用い、370nm の波長で励起し、AGE の発する 440nm の青色自家蛍光を観察した。

2) 免疫組織染色法

3 μ m パラフィン切片を作成、5 種類の抗 AGE 抗体 : 6D12, CMS-10 (抗 CML 抗体)、JNH-27 (抗 Imidazolone 抗体)、H-12 (抗 Pyrraline 抗体)、4D7 (抗 pentosidine 抗体)、KNH-30 (抗 carboxyethyllysine 抗体) を 1 次抗体として SAB 法で免疫組織染色を行った。また osteocalcin 染色を追加した。

2. MMP 発現解析

1) タンパク発現 : 免疫組織染色法

3 μ m パラフィン切片を作成、抗 MMP-1 (コラゲナーゼ)、抗 MMP-2 (ゼラチナーゼ)、抗 MMP-3 (ストロメライシン)、抗 MMP-9 (ゼラチナーゼ) 抗体を 1 次抗体として用い、SAB 法で免疫組織染色を行った。

2) mRNA 発現 : in-situ hybridization 法

新鮮血管横断標本を用い、MMP-1, 2, 3, 9 の in-situ hybridization を行った。

3. MMP 酵素活性の解析

新鮮血管横断標本を用い、MMP-1, 2, 3, 9 の in-situ zymography を行い、MMP 酵素活性の程度、活性分布を解析した。

4. 石灰化の検出、証明、局在の解析

まず得られたすべての標本について、3 μ m パラフィン切片を作成、H-E 染色、Elastica van Gieson 染色を行い、画像解析システムを用い、中膜石灰化および弾性線維破壊の程度などを評価した。

これにより過剰な石灰化の認められないことをスクリーニングし、同様の横断走査電顕 (SEM) 標本を作成して、石灰化の初期像を捉えるため Low vacuum scanning electron microscope (LVSEM) による反射電子像 (backscattered electron image) を行った。さらに電子線プローブマイクロアナリシスにより動脈断面の石灰化を評価した。すなわち横断血管断面の SEM 標本について、石灰化の

有無および石灰化 calcification (または mineralization) であることを証明するため、電子線プローブマイクロアナリシス (electric probe microanalysis: EPMA) により Ca, P の元素分析を行った。目的とする石灰化像が検出できた標本は、さらにどの部位から石灰化が始まるかをつきとめるため、超薄切片を作成し、透過電顕下に EPMA (分析電顕 AEM) を行い最小石灰化巣を追跡した。その微小石灰化部の微細構造を解析するため、エネルギー分散型 X 線分光法 (energy dispersive X-ray spectrometer: EDS) によって分析した。

結 果

血管壁の石灰化を明らかにするには、石灰化の初期像を捉えることが必須である。今回の研究対象のうち、糖尿病/維持透析例から採取された自家静脈グラフトは全例初期～中等度の石灰化が検出された。しかし、それ以外のヒト自家静脈グラフト、冠動脈バイパス動脈グラフト、および動物ではイヌ、家兎、糖尿病マウス、ハムスターは石灰化を検出できなかった。糖尿病モデルラット OLETF は 1 標本で石灰化初期像が捉えられているが、入手が遅れたため現在、追加検討中である。



図 2. AGE 抗体による免疫染色。手術後 4 年で他病死のため摘出された冠動脈バイパスグラフト。弾性線維層の乏しい SV で最も多く AGE 化が進んでいる。SV, 大伏在静脈グラフト; ITA, 内胸動脈グラフト; RA, 橈骨動脈グラフト。

MMP 免疫染色。A. MMP 2; B. MMP 9。100 μm。内膜と外膜に陽性所見があるが中膜は染色されない。

AGE 染色では、糖尿病／維持透析例静脈グラフトの多くは弾性線維層が欠如しており、明らかな関連所見を得ることができなかった。冠動脈バイパス後摘出グラフトでは明らかな AGE 染色陽性所見を得たが（図 2）、石灰化は検出できなかった。との関係を証明することはできなかった。ヒト静脈では、いずれの標本も中膜細胞成分の損失があり、明らかな陽性所見は得られなかった。即ち、AGE の発現は弾性線維層に限定され、中膜細胞成分の損失と関連を有していることが示唆された。これはその後の研究により、弾性線維層の発現は、弾性線維の合成と分解のバランスによって決定される良いモデルであり、弾性線維の合成と分解のバランスが崩れることで、弾性線維の減少や石灰化の問題であった。

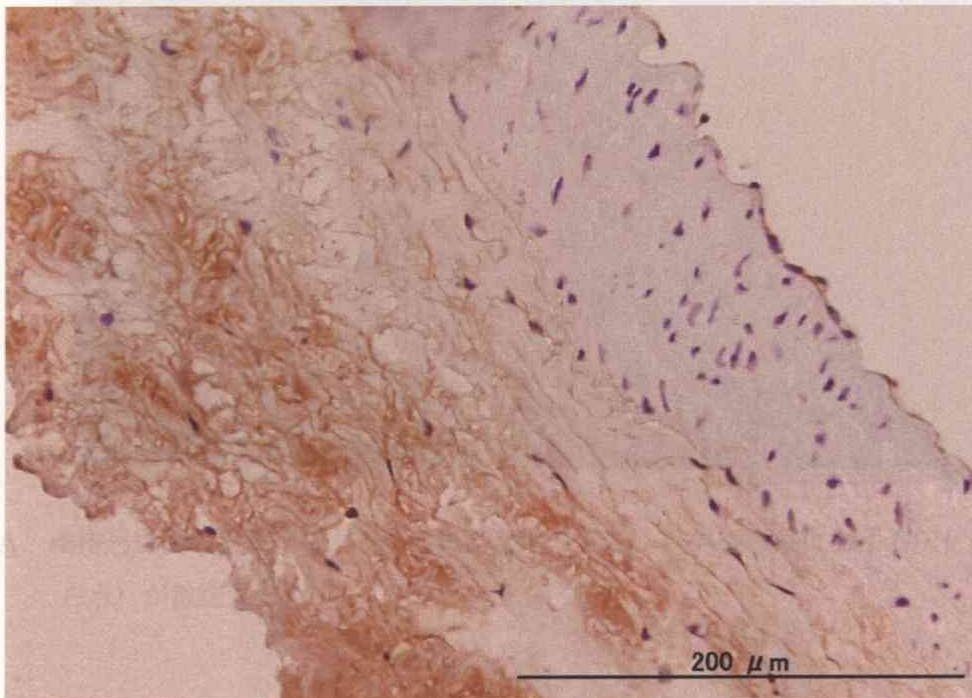
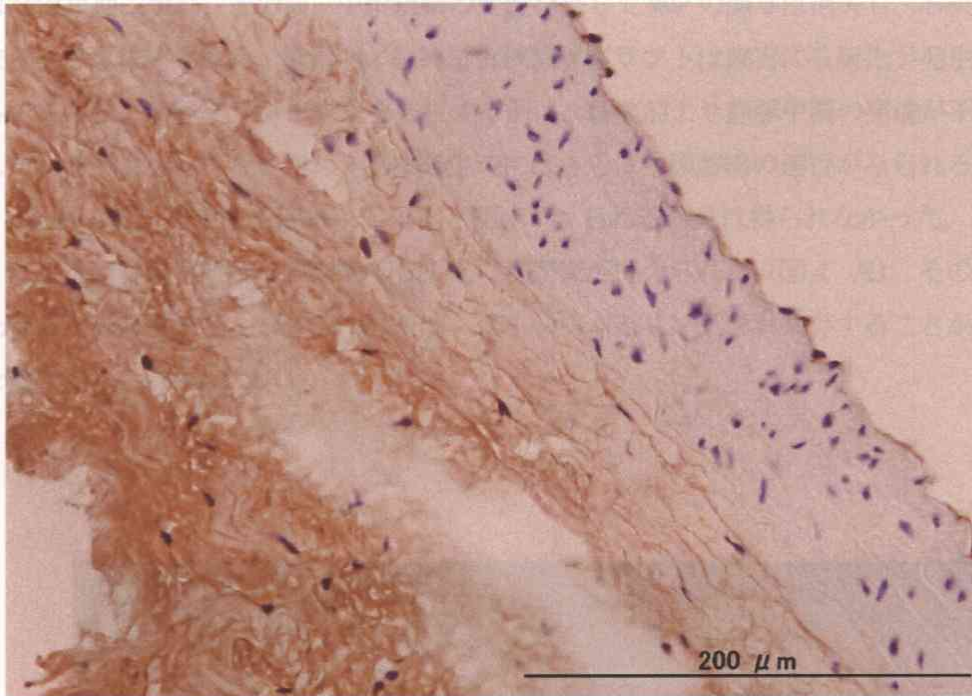


図 3. 2型糖尿病ラット 8 週齢大腿動脈 MMP 免疫染色。A、MMP 2 ; B MMP 9、(400 x)。内膜と外膜に陽性所見があるが中膜は染色されない

MMP 発現解析では、2型糖尿病ラットで内膜および外膜で明らかなMMP陽性所見を得たが、中膜には発現がなく、内、外膜側からMMPの関与が起るものと推察されたが(図3 A, B)、この段階では石灰化が認められず、発現したMMPとの関係を証明することはできなかった。ヒト静脈ではいずれの標本も中膜細胞成分の消失があり、明らかな陽性所見は得られなかった。即ちMMPの発現は移植早期に現れ、その後、中膜組織の変性を来してMMPの関与は消失し、石灰化はその後にはじまるものと推察された。糖尿病/維持透析例静脈グラフトは確実に石灰化が発生する良い研究モデルであるが、静脈グラフト狭窄を発生する例は、移植前より静脈中膜の発達が不良で、既に線維化している例も少なくないため、狭窄発生時にはさらに中膜萎縮の進行がみられる点で問題であった。Osteocalcin染色でも同様に石灰化と関連づけられる所見は得られなかった。

LVSEMによる反射電子像観察の結果、石灰化の初期像が捉えられた(図4 A)。その物質が、石灰化であることを証明するためのEPMAでは、カルシウムとリン元素が共存することが確認され、石灰化と証明された(図4 B, C)。

図 4 B. 電子線プローブマイクロアナリシス (EPMA) による血管断面の面分析でカルシウムとリン



図 4 A. 維持透析例の自家静脈グラフト横断面のSEM. 膠原線維内に微小石灰化巣(大小の白点)が散在する

図 4 C. EPMAによる血管断面の面分析画像でカルシウムとリン元素がほぼ同一のスポットに存在しており、石灰化巣であることが確認される。

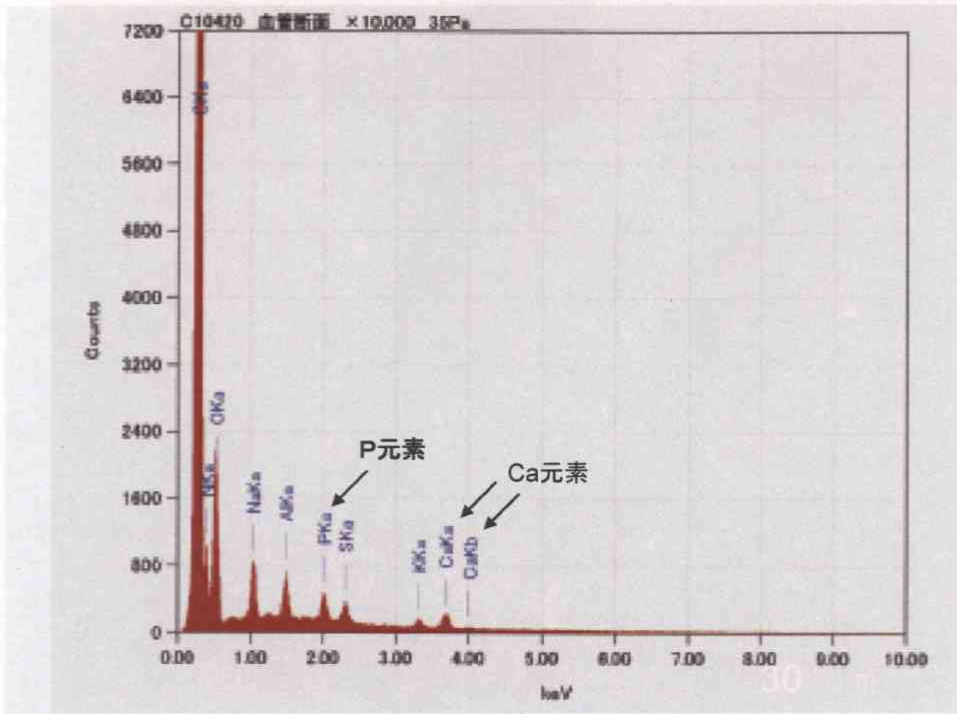


図 4 B. 電子線プローブマイクロアナリシス (EPMA) による血管断面の面分析でカルシウムとリン元素が共存することが確認された。

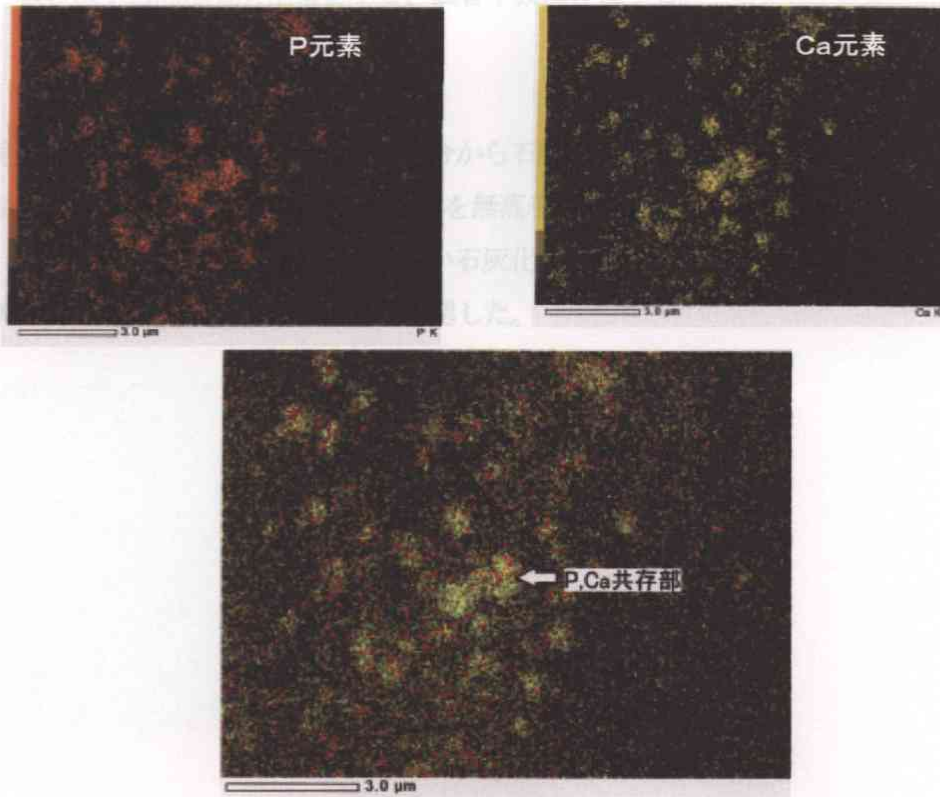


図 4 C. EPMA による血管断面の面分析画像でカルシウムとリン元素がほぼ同一の分布で共存しており、石灰化巣であることが確認される。

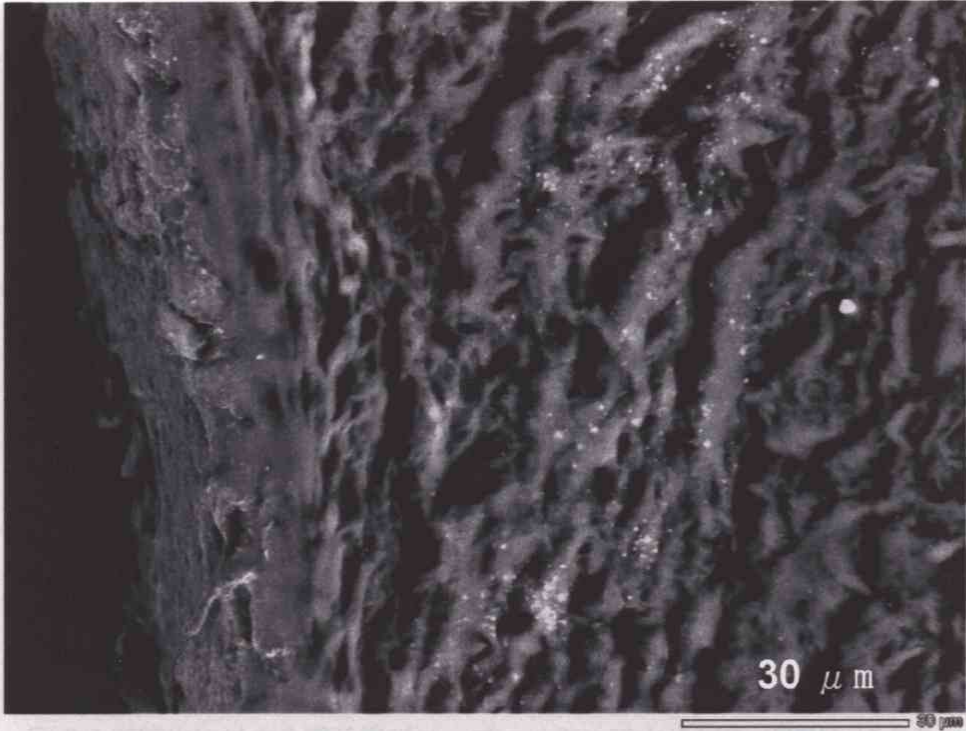


図5 B. 図5 A石灰化に対する電子線プローブマイクロアナライシスの血管断面の面分析でカルシウムとリン元素が共存することが確認された。

図 5 A. SEMにより微小石灰化巣を認める。維持透析例の自家静脈グラフト横断面SEM. 多数の微小白点は石灰化巣を示し、血管中膜に存在する。

この知見に基づいて、血管壁のいずれの部分から石灰化が発生するかを明らかにするため、肉眼的、光顕的に石灰化が認められない血管標本を無蒸着にてSEM観察し、超微小石灰化病変を検出した。その石灰化の領域の面元素分析を行い石灰化巣であること明らかにすると共に(図5 A-C)、石灰化が中膜内に形成されることを確認した。

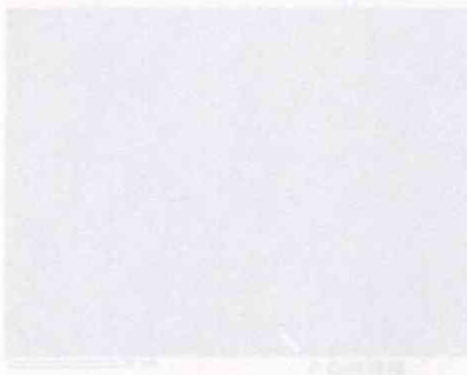


図5 C. 図5 A標本についてEDSによる血管断面の面分析画像でカルシウムとリン元素の共存があり、石灰化巣であることが確認される。

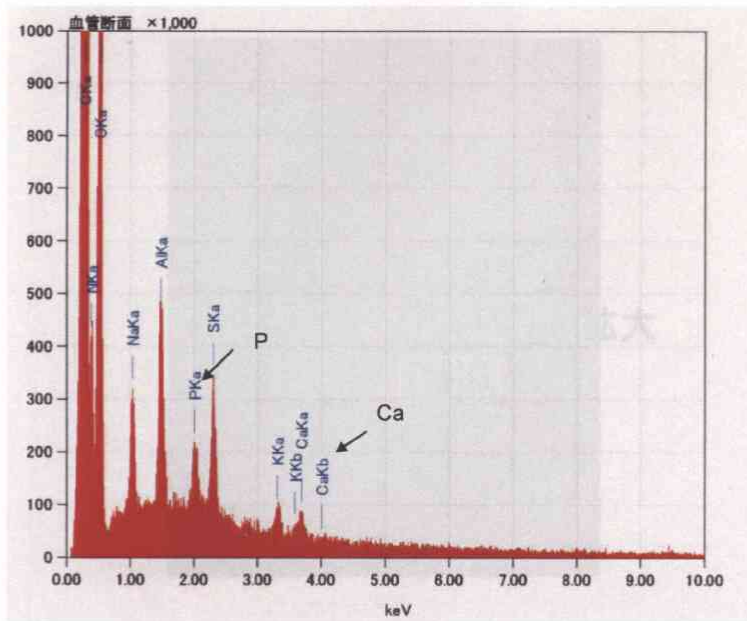


図 5 B. 図 5 A 石灰化に対する電子線プローブマイクロアナリシス (EPMA) による血管断面の面分析でカルシウムとリン元素が共存することが確認された。

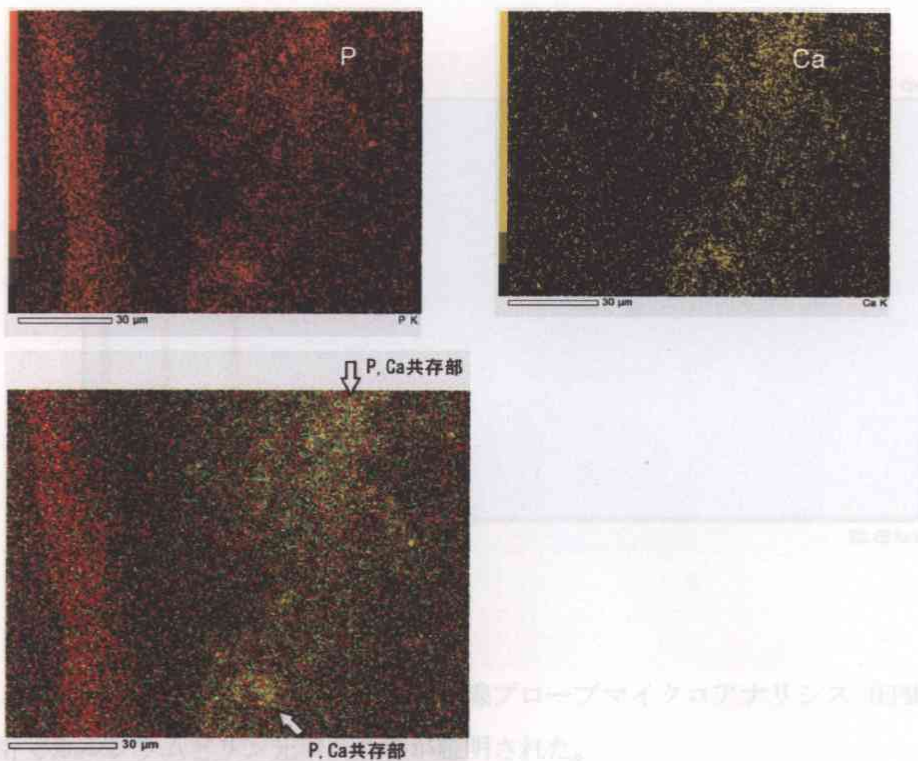


図 5 C. 図 5 A 標本について EPMA による血管断面の面分析画像でカルシウムとリン元素の共存があり、石灰化巣であることが確認される。

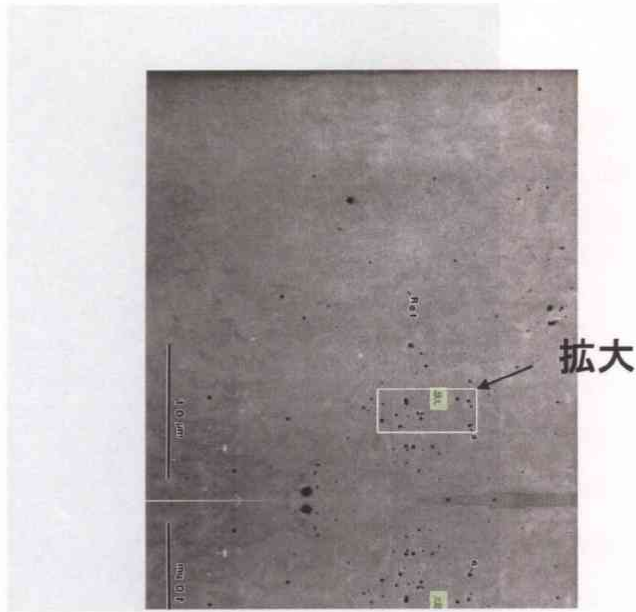


図7 A. 細胞内に存在する石灰質

図6 A. 血管の内面から約30ミクロン以遠の内部に多数の初期微小石灰化巣を認め、同部を拡大追跡。

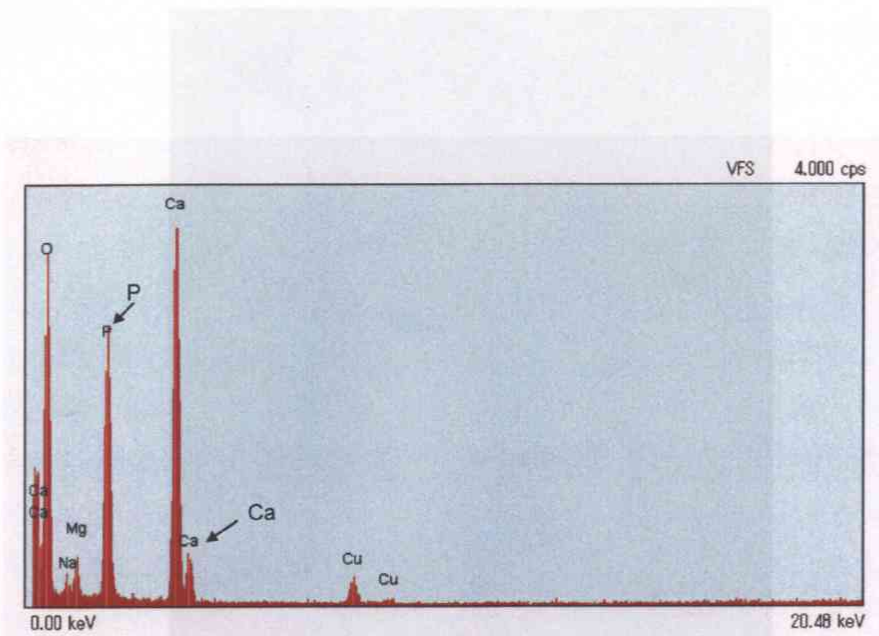


図6 B. 図6 Aの微小石灰化像に対する電子線プローブマイクロアナリシス (EPMA) による面分析でカルシウムとリン元素が共存が証明された。

図7 B. 微小石灰化の顕微鏡写真。直径10 nm以下のナノ微粒子の集合体が検出された (四酸化オスミウム染色済み)



図6 血管 <縦断>

図7 A. 細胞外に存在する石灰集

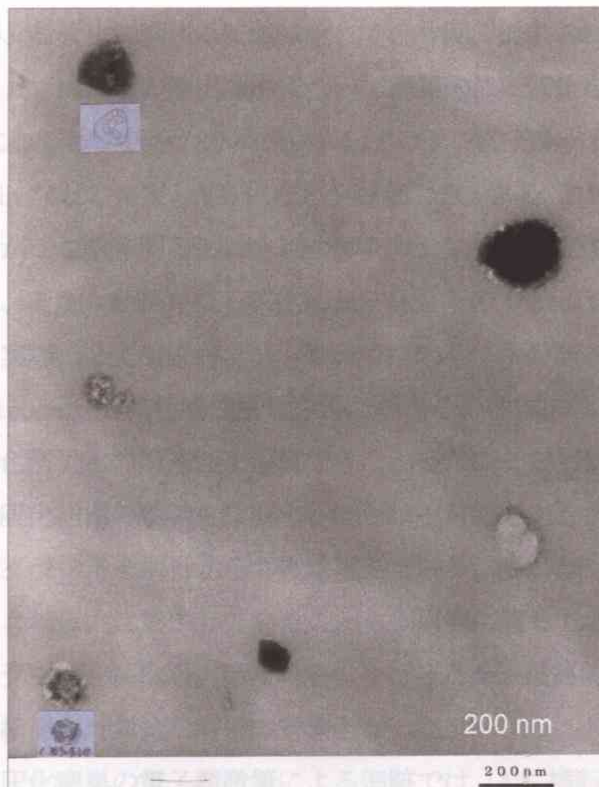


図7 B. 微小石灰化の強拡大 TEM. 直径 10 nm 以下のナノ微粒子の集合体が検出された

(四塩化オスミウム染色 TEM)

更に、TEM と EDS による微小石灰化部微細構造分析では、血管の内面から約 30 ミクロン外側に石灰化を示す直径約 70–300 nm のナノ微粒子が検出された(図 7 A)。

TEM の染色観察によって形成部位を詳細に観察した結果、細胞外に形成されていることを確認した(図 7 A)。これらの、粒子をさらに強拡大して観察した結果、直径 10 nm 以下のナノ微粒子の集合体であることが確認された(図 7 B)。

考 察

動脈の石灰化には内膜石灰化と中膜石灰化があり、前者は粥状硬化巣内壊死組織の終末産物としてみられるが、後者は中膜筋層に形成され、その発生機序の詳細は不明である。両者はその末期では外膜までに達する貫壁性で、密な石灰板を形成する。そのため両者の区別は大動脈からその一次分枝では困難な場合が少なくない。中膜石灰化は Monckeberg calcification, medical calcification, eggshell calcification などと言われ、微小石畳状を呈し、各々が 0.5mm 前後の微小石灰塊の集積であり、典型的には糖尿病や維持透析例の下腿～足部動脈の中膜にみることが出来る。本研究の主目的はこの中膜石灰化石灰化の発生機序を究明することにある。

本研究での重要な点は中膜に発生する石灰化のごく初期段階にある血管を採取することにある。種々の糖尿病動物があるが、石灰化に関する記載は乏しく、今回、提供された二型糖尿病モデルラットを対象とした。またヒトでは種々の摘出標本について網羅的に石灰化を追跡した。方法として EPMA にて走査電顕観察下に血管輪切断面のカルシウムおよびリンの元素分析を行った。また免疫染色により MMPs, osteocalcin などの発現、AGE 化などを評価した。AGEs や MMPs が動脈硬化に重要な役割を果たしていることがここ数年明らかにされつつあり、動脈瘤発症過程、動脈硬化プラークの破綻に MMP-2, 9 が関与し、また大動脈弁の石灰化に MMP-9 とその inhibitor が強く関与していることが明らかされている。実際、2 型糖尿病ラット動脈ではいくつかの標本においては内膜、外膜に MMPs の発現や中膜に osteocalcin 染色陽性所見を得たが、その標本には実際の石灰化を検出できず、遺伝子発現や AGE 染色所見との関連性を追跡できなかつた。一方、ヒト透析例では全例石灰化がみられることから、石灰化初期の動脈を採取することは不可能であるが、バイパス手術で移植早期に摘出される自家静脈グラフトを解析することは可能である。摘出の時期はグラフト狭窄という合併症が移植後 4 週から 2 年以内に集中していることも本研究に適している。そこでこのグラフトに着目し、期間中 18 グラフトを採取し、種々の解析を行ったが、最終的に、移植早期の 5 グラフトから石灰化初期病巣が検出され詳細な解析の対象となった。

得られた標本で、初期石灰化病巣の電子顕微鏡による追跡では、AVG 横断面走査電顕により多数の石灰化初期病巣が捉えられ、それらはさらに電子線プローブマイクロアナリシス面分析で Ca と P 元素の共存を確認し石灰化巣であることを証明した。これに基づいて血管の内面から約 30 ミクロン以上の外側にある同一標本の特定石灰化巣について分析電顕を行い病変を追跡した。エネルギー分散型 X 線分光法を用いた石灰化巣の微細構造分析では、最小で直径約 70–300 nm の石灰化巣が

検出され、四酸化オスミウム染色により形成部位は細胞外であり、石灰化粒子をさらに強拡大した結果、内部にはさらに直径 10 - 20 nm のナノ粒子があり、それらによる集合体であることが確認された。

以上より、石灰化は中膜細胞外にある何らかの“核”に結晶が形成され、その核は 10-20 nm の結晶の中にある。石灰化する部位とそうでない部位が混在することはその核が特異的であることを示唆している。その核をつきとめることが今後の課題である。

参考文献

1. Sasajima T, Azuma N, et al. Novel operation for foot-salvage in patients with Buerger's disease not having graftable distal arteries: Distal venous arterialization bypass combined with free flap. J Vasc Surg in submission
2. Shimizu N, Azuma N, Nishikawa T, Hirata S, Morishita N, Kaneta Y, Sasajima T: Impact of nuclear factor- κ B decoy transfection on vein graft intimal hyperplasia. J Cardiovasc Surg accepted
3. Kadohama T, Ohtani N, Sasajima T: Hepatic artery aneurysm involving the proper hepatic and gastroduodenal artery treated using a gastroepiploic artery in situ bypass. J Vasc Surg in press
4. Saitoh Y, Kaneda Y, Sasajima T et al. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary limphoedema via promotion of lymphangiogenesis. Circulation 2006;114:1177-84
5. Azuma N, Inaba M, Akasaka N, Haga M, Goh K, Sasajima Y, Erdem CC, Sasajima T: Limb salvage achieved by paramalleolar bypass with topical treatment. Jpn J Vasc Surg 2005;14:83-89
6. Akasaka K, Akasaka N, Sasajima T, Sumpio BE et al. Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells. J Vasc Surg 2005;41:517-22
7. Sasajima T, Inaba M, Azuma N et al. Novel anastomotic method enables aorto-femoral bypass for patients with porcelain aorta. Year Book of Vasc Surg 2004. Moneta GL. Ed. Mosby. Philadelphia. pp349-50;2004
8. Koshiko S, Sasajima T, Muraki S et al. Limitations in the use rifampicin-bonded gelatin-sealed grafts against virulent organisms. Year Book of Vasc Surg 2004. Moneta GL. Ed. Mosby. Philadelphia. pp289-90;2004.
9. 笹嶋 唯博. バイパス血管が血栓閉塞を起こさない理由. 日本血栓止血学会誌