細胞成長因子徐放システムを組み込んだ生体吸収性人工血管の開発

18591542

平成18～19年度科学研究費補助金
（基盤研究（C））研究成果報告書

新潟大学附属図書館
2080002861

平成20年5月

研究代表者　渡辺　弘
新潟大学医歯学系准教授

W20.5
Mo31
2006-07

W205
M071
2006-07

〈はしがき〉

本研究は、①生体吸収性scaffoldを用いる、②multi-potentialな細胞ソースである骨髄細胞を播種する、③細胞成長因子を徐放して細胞の分化・誘導を行う、という新しく開発された組織工学的手法を血管壁の再生で実現するという新しい試みである。

ラット右室流出路移植モデルを用いて、移植2週間及び4週間後の組織学的評価を行った。生体吸収性の人工血管に骨髄細胞を播種することにより、グラフト内の毛細血管の新生が促進された。骨髄細胞播種に加えてbFGFを徐放することによって、毛細血管の新生が更に促進された。また、骨髄細胞播種およびbFGFの添加は弾性線維量を増加させた。

以上の結果から、われわれが新たにデザインした生体吸収性人工血管は細胞成長因子であるbFGFを徐放することにより、血管壁の再生を促すことが示唆された。

研究組織

研究代表者：渡辺　弘（新潟大学・医歯学系・准教授）

研究分担者：筏　義人（奈良県立医大・医学部・教授）

（研究協力者：登坂有子）

交付決定額（配分額）　（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,000,000	0	2,000,000
平成 19 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究発表

学会発表

1）登坂有子、渡辺　弘、他：組織工学的手法を用いた血管再生における bFGF 投与による組織学的効果　第 59 回日本胸部外科学会定期学術集会　平成 18 年 10 月 4 日

2) 登坂有子、渡辺　弘、筏　義人、他：ゼラチン架橋人工血管を用いた血管再生における成長因子併用効果の組織学的検討　第 44 回日本人工臓器学会大会　平成 18 年 11 月 2 日
3) 渡辺　弘、筏　義人、他：組織工学的手法を用いた心血管壁再生における bFGF 投与の効果　第 7 回日本再生医療学会総会　平成 20 年 3 月 13 日

研究成果による産業財産権の出願・取得状況：なし

緒　言

小児心臓血管外科領域では、構造の欠損や低形成、機能不全に対する補填材料が必要不可欠である。特に右室流出路および肺動脈再建に対する補填材料が必要になる症例が多く、expanded polytetrafluoroethylene（ePTFE）や polyethylenterephthalate（ダクロン）等の人工素材、グルタールアルデヒド処理をした自己心膜などが用いられているが、その遠隔成績には問題を残している。異物反応による血栓形成、組織過増生、移植した補填物の退縮、石灰化等の変性のほか、患児の成長に伴う相対的な狭窄などにより、再手術を余儀なくされる場合も多い[1)]。これらの問題を克服する方法として、生体吸収性材料と自己細胞を用いたTissue Engineering技術を基盤とする再生医療が1980年代から研究されている[2-7)]。

Shin'okaらは、生体吸収性ポリマーに自家静脈細胞を組み合わせた組織工学的手法を用いた再生血管（tissue-engineered vascular graft (TEVG)）でヒトの肺動脈再建を行い、良好な結果を報告した[4)]。しかし、この方法は細胞の採取に全身麻酔や外科的血管摘出という侵襲があり、また十分量の細胞を得るために長期間の培養時間を要するなど手技が煩雑であるとともに、血清の使用や汚染細胞による感染も危惧される。このため2001年から自己骨髄単核球細胞を用いる手法に変更することにより、十分量の細胞を容易に得られ、培養過程を省略することが可能になった[5-7)]。さらに生体外での細胞播種を省略することが可能になれば、臨床での使用が簡便になるが[8-10)]、骨髄細胞等の細胞播種を行う方が組織再生が良好であったという実験結果の報告が多い[5,6,11)]。

骨髄単核球細胞 は、その環境に応じてさまざまな種類の細胞に分化する可能性をもつ未分化な細胞を多く含んでおり、血管内皮前駆細胞として機能するCD34陽性細胞やCD31陽性細胞なども存在することが知られている[11,12)]。生体吸収性材料に播種した骨髄細胞は、生体内に移植後、自身が内皮細胞や平滑筋細胞に分化するほか、血管内皮増殖因子（VEGF）やアンギオポエチンなどの血管新生因子を産生し、これらの前駆細胞を骨髄や流血中から誘導することが確認されている[5)]。

非吸収性人工血管であるePTFEでは、骨髄細胞を播種することによりグラフト内に毛細血管が新生され、より早期に内皮化することが動物実験で確認されている[13)]。生体吸収性ポリマーにおいても、骨髄細胞を播種することにより移植したポリマー内の毛細血管新生が促進されると予想され、播種細胞への血流

が増加すると伴に血管壁を構築する細胞の供給も促進されて速やかな組織再生が促されることが期待される。塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）は非吸収性の人工血管で表面の内皮化や毛細血管新生効果を示すことが知られているが[14-17]、bFGF を徐放するための新たな TEVG を新規開発して、bFGF が生体吸収性ポリマーを用いた血管壁の再生における毛細血管新生および組織再生に及ぼす効果をラット右室流出路再建モデルを用いて検討した。

材料と方法

1. 生体吸収性ポリマー

“通常グラフト”：メッシュ状のポリグリコール酸（PGA）芯材の内外両側にポリカプロラクトン（PCL）とポリ乳酸（PLA）（50 : 50）の共重合体（P(CL/LA)）を凍結乾燥法で多孔性のスポンジ層（図 1B）を形成したグラフトを使用した（図 1 左）。このポリマーは厚さが約 0.6～0.7mm、80%以上の空洞率（孔径 20～100 μm）で、細胞が接着しやすく、血液の漏出が少なく、生体内において PGA が約 2 ヶ月、P(CL/LA)が数ヶ月で非酵素的に加水分解されるという特性をもつ。

“新規グラフト”：豚皮膚由来のゼラチンを 135℃で 8 時間、真空中で熱架橋を行い、PCL と PLA の共重合体に 1 : 4 の重量比で混合して凍結乾燥を行った（図 1 右）。その他の構造は通常グラフトと同じである。

2. ラット右室流出路再建モデル

本実験では、オス Lewis ラット（Charles River Japan Inc, Yokohama, Japan）300～350g を用いた。すべての実験手順は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（NIH publication No. 85-23, revised 1996）に基づき無菌的に行った。

36 頭のラットを無作為に以下の 3 群に分けた。(1) Control 群（n=12）：細胞を播種せず通常グラフトのみを使用、(2) BMC 群（n=12）：骨髄細胞を播種した通常グラフトを使用。(3) FGF 群（n=12）：骨髄細胞を播種した新規グラフトを使用。

人工血管を径 7mm 大の円形のパッチ状にトリミングして使用した。FGF 群では、新規グラフトに 10 μg の bFGF（科研製薬, ToKyo, Japan）を含浸させて 1 時間静置してからから細胞播種を行った。骨髄単核球細胞は、ドナーラットの大腿骨と頸骨より採取した。ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール®、Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan）を腹腔内に過量投与して安楽死せしめ、大腿骨と脛骨を採取した。骨周囲の結合織を除去し、両端を切除して、10%牛胎

仔血清を含む培養液（RPMI 1640, Nipro, Osaka, Japan）で骨髄を洗い流した。Ficoll 液（リンフォプレップ®、Nycomed Pharma, Oslo, Norway）を用いた比重遠心分離法で骨髄単核球成分を採取した。BMC 群および FGF 群では、約 $1\times10^5/mm^2$ 個の骨髄単核球細胞をポリマーに播種し、細胞を播種した後は速やかに以下の方法で移植した。

ラットにキシラジン（0.5mg/kg）を前投与した後、塩酸ケタミン（24mg/kg）を筋肉内投与し、セボフルレンを併用して全身麻酔をかけた。経口挿管し、呼吸回数 60 回/分、一回換気量 10ml/kg、PEEP 3 cmH_2O、100%酸素で人工呼吸を行った。手術操作中はセボフルレン 1.0～2.5%で麻酔を維持した。胸骨正中切開し、右室流出路に 7-0 モノフィラメント糸で径 6mm 大のタバコ縫合をかけた。この糸をタニケットで締め、右室流出路の盛り上がった部分の心筋を切除した。タニケットを軽く緩めて出血させ、全層性に十分量の心筋が切除されていることを確認した。ポリマー単独もしくは骨髄細胞を播種したポリマーのいずれかを用いて欠損部を覆うように 7-0 モノフィラメント糸で連続縫合した。この際、心内膜に針糸がかかるよう最大限に注意を払った。タニケットを緩めてタバコ縫合の糸を除去し、止血を確認後、モノフィラメント糸で 3 層に閉創した。手術操作後は、麻酔が完全に覚めるまで保温しながら観察し、ケージに戻した[18]。

3. 組織学的評価

移植から 2、4 週後（各期間 Control、BMC、FGF 各群 n=6）、ヘパリン 300 単位(ノボ・ヘパリン®、 Mochida Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を筋注した後、致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し犠牲死させた。再胸骨正中切開で心臓を摘出し、20%ホルマリンで一昼夜固定した。移植したポリマーの中央を通る線で分割し、パラフィンに包埋後、厚さ 5μm の連続薄切切片を作製した。

新生血管数は、von Willbrand Factor（vWF、第 8 因子関連抗原；ウサギ、N1505, Dako, CA,USA）と平滑筋アクチン抗体（α-SMA, clone 1A4, Dako, CA,USA）で染色した切片を用いて測定した。顕微鏡は Nikon Eclipse E1000（Nikon, Tokyo, Japan）を用いて 200 倍で観察し、Nikon Digital CameraDXM1200 を用いてデジタル画像を作成した。それぞれの切片で移植したポリマー内の 20 視野を無作為に選び、Image-Pro Plus software（Media cybernetics, Silver Spring, USA）を用いて茶色のドットを自動抽出して vWF 陽性の血管内皮細胞およびα-SMA 陽性の血管平滑筋細胞の画像を得、血管数を測定した。$1mm^2$ あたりの血管数を算出して血管数の代表値とした。また、vWF 陽性の内皮細胞で囲まれた腔の面積を新生血

管の断面積として測定し、1mm^{2}あたりの血管面積を算出した。

移植部分の細胞外マトリックスの産生は、HE 染色と Elastica van Gieson (EvG) 染色で染色した標本を用いて計測した。弾性線維成分は EvG 染色で黒く染まった部分を Image-Pro Plus software を用いて自動抽出し、面積を測定した。PCLA 群の 4 週後の弾性線維量を 1 として、相対値で表示した。

4. 統計処理

各群の測定値は mean±SE で表記した。統計データの解析は SPSS (version 11.5J ; SPSS Japan, Tokyo, Japan) を用い、2 群間の比較は対応のない t 検定を行った。p 値は<0.05 を有意とした。

結　果

耐術したすべてのラットが予定期間まで生存した。

1. 内皮化

vWF 染色では、2 週後で、各群とも心腔面の完全な内皮化を認めた。内腔面に血栓の形成は認めなかった (図 2)。

2. グラフト内血管新生

2 週後から、移植ポリマー内に内部に血球成分を有する vWF およびα-SMA 陽性細胞からなる管腔構造を認めた (図 3)。ポリマー内の新生血管数は 2 週後 (Control: 8.6±1.8/mm^2, BMC: 15.0±1.6/mm^2, FGF: 20.0±3.2/mm^2) に比べて 4 週間後では各群で有意に増加していた (Control: 21.1±2.0/mm^2, BMC: 34.7±7.8/mm^2, FGF: 66.4±5.3/mm^2) (図 4)。2 週後では FGF 群は Control 群に比べて有意に多く、4 週後では FGF 群は Control 群および BMC 群に比べて有意に多かった。

単位面積あたりの新生血管の断面積は、各群とも経時的に有意に増大した (図 5) 。2 週後および 4 週後のいずれでも、FGF 群は Control 群および BMC 群より有意に血管面積が大きかった。

3. ポリマー内細胞外マトリックス形成

術後 4 週の時点で、ポリマーは部分的に分解吸収され、細胞と細胞外マトリックスで置換されていた。再生組織中には EvG 染色で弾性線維成分を認め (図 6 左段)、FGF 群は Control 群および BMC 群と比べて有意に多くの弾性線維量を認めた (図 7)。また、α-SMA 免疫染色では、弾性線維陽性部分に一致して、α-SMA 陽性細胞の集積を認めた (図 6 右段)。

考　察

再生医療は、低形成や欠損、機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、生きた細胞を用いる Tissue Engineering 技術[19]を応用し、本来生体が持っている自己再生能力を引き出すことにより、生体組織の再生、あるいは臓器機能の代替保障、修復、再生を行うものである[20]。細胞を分化誘導する適切な環境を設定することにより、生体の自己修復のトリガーが引かれ、組織再生が始まるといわれている[17]。心臓血管外科領域における再生医療では、抗血栓性や感染に対する抵抗性、長期耐久性などの優れた生体適合性を有し、成長の可能性を持った‘生きている’ 組織によって障害のある構造物を置換することが目標であり、理想的な補填材料の開発を目指して多くの施設で研究が重ねられている[2-7, 8-10]。開発方針は、1) 生体吸収性ポリマーに自己細胞を播種し、in vitro で一定期間培養して高度に成熟した TEVG を作成後に移植する方法[2-4]と、2) 細胞を播種した、もしくは播種しない生体吸収性ポリマーを、培養過程を経ずに移植して in situ で組織再生を起こさせる方法[5-7, 8-10]、に二分される。

Shin'oka らが行った自己血管平滑筋細胞を生体吸収性ポリマーに播種する方法は前者であり、自己細胞を採取後に十分な細胞数まで培養してから播種する必要があった[3,4]。この方法では手技が煩雑で時間がかかり、感染のリスクも増加することから、臨床での使用が容易とはいえなかった。骨髄単核球細胞は、周囲の環境に応じてさまざまな種類の細胞に分化する、多分化能を持つ細胞を含んでいることが知られている[11,12]ため、Shin'oka らは骨髄単核球細胞をグラフトに播種直後に移植する方法に変更して in vitro での培養過程を省略したが、臨床使用で良好な結果を収めている[7]。彼らは動物実験において、播種した骨髄細胞やそれらに動員された細胞がポリマー内に遊走・接着し、ポリマー内で増殖・分化して新しい血管壁構造の構成成分となることを明らかにした[5]。生体吸収性の足場と細胞播種を組み合わせる方法は Tissue Engineering の領域で多分野にわたり広く行われているが、播種した細胞への酸素や栄養供給のため、移植早期における足場内への毛細血管新生が重要であるといわれている[22]。酸素や栄養分を含んだ流血に晒される血管壁の再生でも、他臓器の再生と同様、移植組織内への毛細血管新生が重要であると考えられるが、今回の実験結果から、生体吸収性ポリマーへの骨髄細胞播種は移植早期からの毛細血管新生を促進することが示された。また、PCLA 群に比し BMC 群では新生血管数だけでなく血管面積も大きい傾向があり、骨髄細胞播種によって再生組織内により多くの血流が

呼び込まれると考えられる。

一方、Sawa は ex vivo での細胞播種を行わない肺動脈再生および大動脈再生を試みている[8,9]。Fujimoto らも、細胞を用いない生体吸収性ウレタンパッチの右室流出路への移植を行い、線維性組織に置換されることを示しており[10]、自己細胞を使用せずに大動脈や主肺動脈の血管壁を再生させる可能性を示唆した。しかし、グラフトに播種されて移植された細胞が増殖・分化するだけでなく、細胞が放出するさまざまなサイトカインにより、生体内の細胞が動員され、増殖・分化することによって組織の再生が起こると考えられており、移植細胞自身も環境を作り出す重要な因子のひとつであるといえる[12]。今回の実験結果から、生体吸収性ポリマーに骨髄細胞を播種することにより血管再生が促進されることが明らかになった。

血管再生における問題として、生体吸収性の足場が分解された後の再生血管壁の強度があげられる。血圧に対する強度が不十分であれば、再生血管は瘤化する恐れがある。上下大静脈や肺動脈などの低圧系では耐圧性は大きな問題とはならないが、高圧系である動脈壁の再生では極めて重大な問題である。生体においては弾性線維と平滑筋細胞からなる中膜が血管壁の耐圧性を保持しているが[23,24]、再生された血管でも弾性線維と平滑筋層の産生が重要である。今回の実験では、骨髄細胞播種により弾性線維の産生が促進されることが示された。

移植された生体吸収性足場内に自己組織が侵入して足場と置換することで再生が進行するが、毛細血管が再生の過程に関与している。このため、毛細血管の新生を促進することができれば、再生の過程を促進し、さらには弾性線維および平滑筋細胞の多い組織が再生する可能性があると考え、サイトカインを徐放する人工血管を開発した。bFGF は毛細血管新生作用を有することが知られており、非吸収性人工血管での実験結果が報告されている[14-17]。今回のわれわれの実験は、生体吸収性人工血管で bFGF の効果を検討した世界初の報告である。今回のデータでは、bFGF は生体吸収性足場内に侵入した自己組織で毛細血管新生を促進して、弾性線維の形成が多くなる傾向が認められた。

本実験の限界として、観察数が少なく、観察期間が短いこと、また移植したパッチのサイズが小さいことが上げられる。移植後 4 週では生体吸収性ポリマーは完全には分解されておらず、足場が完全に吸収された後の最終的な組織像は不明である。大動物を用いた十分大きい TEVG による移植実験で、長期の評価を行う必要がある。

結　論

生体吸収性ポリマーへの骨髄単核球細胞播種は、移植早期から再生血管壁内の毛細血管新生を促進し、bFGF は毛細血管の新生を助長した。観察期間が短いため最終的な組織像は明かではないが、bFGF により弾性線維量の増加が認められた。

参考文献

1) Kirklin J, Barratt-Boyes B: Ventricular Septal Defect and Pulmonary Stenosis or Atresia. New York, NY: Churchill livingstone; 1993.
2) Shin'oka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, et al: Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. J Thorac Cardiovasc Surg. 115: 536-46. 1998
3) Watanabe M, Shin'oka T, Yohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, et al: Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. Tissue Eng. 7: 429-39. 2001
4) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. New Engl J Med. 344: 532. 2001;
5) Matsumura G, Tomita SM, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. Circulation. 108: 1729-34. 2003
6) Hibino N, Shin'oka T, Matsumura G, Ikada Y, Kurosawa H. The tissue-engineered vascular graft using bone marrow without culture. J Thorac Cardiovasc Surg. 129: 1064-70. 2005
7) Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Naito Y, Watanabe M, Konuma T, et al: Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. J Thorac Cardiovasc Surg. 129: 1330-8. 2005
8) Iwai S, Sawa Y, Ichikawa H, Taketani S, Uchimura E, Chen G, et al. Biodegradable polymer with collagen microsponge serves as a new bioengineered cardiovascular prosthesis. J Thorac Cardiovasc Surg. 128: 472-9. 2004
9) Iwai S, Sawa Y, Taketani S, Torikai K, Hirakawa K, Matsuda H: Novel tissue-engineered biodegradable material for replacement of vascular wall. Ann Thorac Surg. 80: 1821-8. 2005
10) Fujimoto KL, Guan J, Oshima H, Sakai T, Wagner WR: In vivo evaluation of a

porous, elastic biodegradable patch for reconstructive cardiac procedure. Ann Thorac Surg. 83: 648-54. 2007

11) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med. 183: 1797-806. 1996

12) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, et al: Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived $CD34^+$ stem cells in a nonhuman primate model. Stem Cells. 23: 355-64. 2005

13) Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A: Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. Nat Med. 2: 90-3. 1996

14) Greisler HP. Growth factor release from vascular grafts. *J Control Release.* 1996; 39: 267-80.

15) Wissink MJ, Beernink R, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, van Aken WG, et al. Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices. *J Control Release.* 2000; 64: 103-14.

16) Doi K, Matsuda T. Enhanced vascularization in a microporous polyurethane graft impregnated with basic fibroblast growth factor and heparin. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34: 361-70.

17) van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, van Hinsbergh VW, van Bockel JH. Ingrowth of aorta vascular cells into basic fibroblast growth factor-impregnated vascular prosthesis material: a porcine and human in vitro study on blood vessel prosthesis healing. *J Vasc Surg.* 2002; 36: 1237-47.

18) Ozawa T, Mickle DAG, Weisel RD, Koyama N, Wong H, Ozawa S, et al: Histologic changes of nonbiodegradable and biodegradable biomaterials used to repair right ventricular heart defects in rats. J Thorac Cardiovasc Surg. 124: 1157-64. 2002

19) Langer R, Vacanti JP: Tissue Eng. Science. 260: 920-6. 1993

20) Tabata Y: Tissue regeneration based on tissue engineering technology. Cong Anomal. 44: 111-24. 2004

21) Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremoto K, Matsuno T, Tabata Y, et al: In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. Tissue Eng. 10: 537-44. 2004;

22) Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Inoue M, Shigeno K, Tabata Y, et al: Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering:

effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. Tissue Eng. 9: 153-62. 2003

23) Zatina MA, Zarins CK, Gewertz BL, Glagov S: Role of medial lamella architecture in the pathogenesis of aortic aneurysms. J Vasc Surg. 1: 442-8. 1984

24) Krings T, Moller-Hartmann W, Hans FJ, Thiex R, Brunn A, Scherer K, Meetz A, Dreeskamp H, Stein KP, Gilsbach JM, Thron A: A refined method for creating saccular aneurysms in the rabbit. Neuroradiolol. 45: 423-9. 2003

図 1　生体吸収性ポリマー

左：通常グラフト：ポリカプロラクトンとポリ乳酸のスポンジ状共重合体、右：新規グラフト：ゼラチンを熱架橋して混合したポリカプロラクトンとポリ乳酸のスポンジ状共重合体（×500）

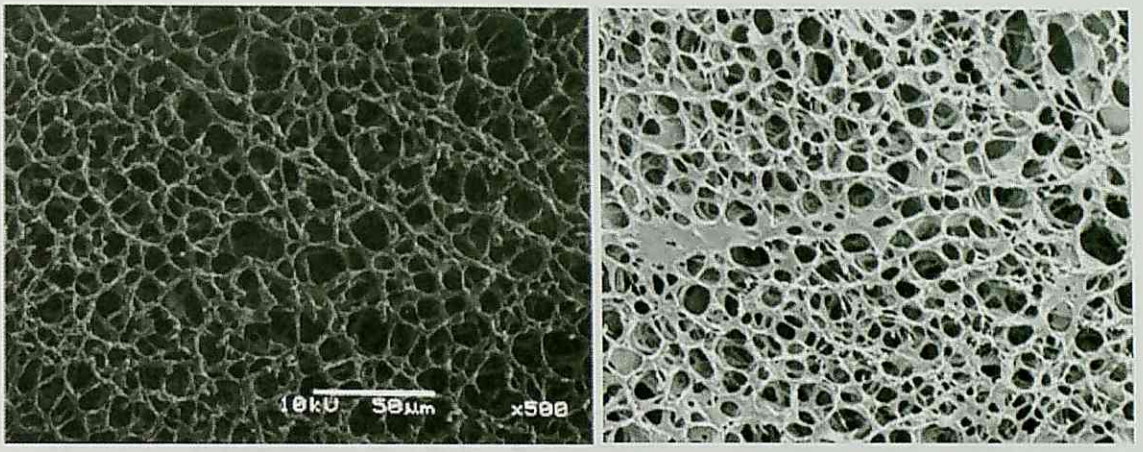


図 2　術後 2 週 心臓内腔面（von Willebrand factor 免疫染色，×100）

A：Control 群，B：BMC 群，C：FGF 群

図 3　血管新生効果（×200）

左段：von Willebrand factor 免疫染色、右段：α-smooth muscle actin 免疫染色

A, B：Control 群，C, D：BMC 群，E, F：FGF 群

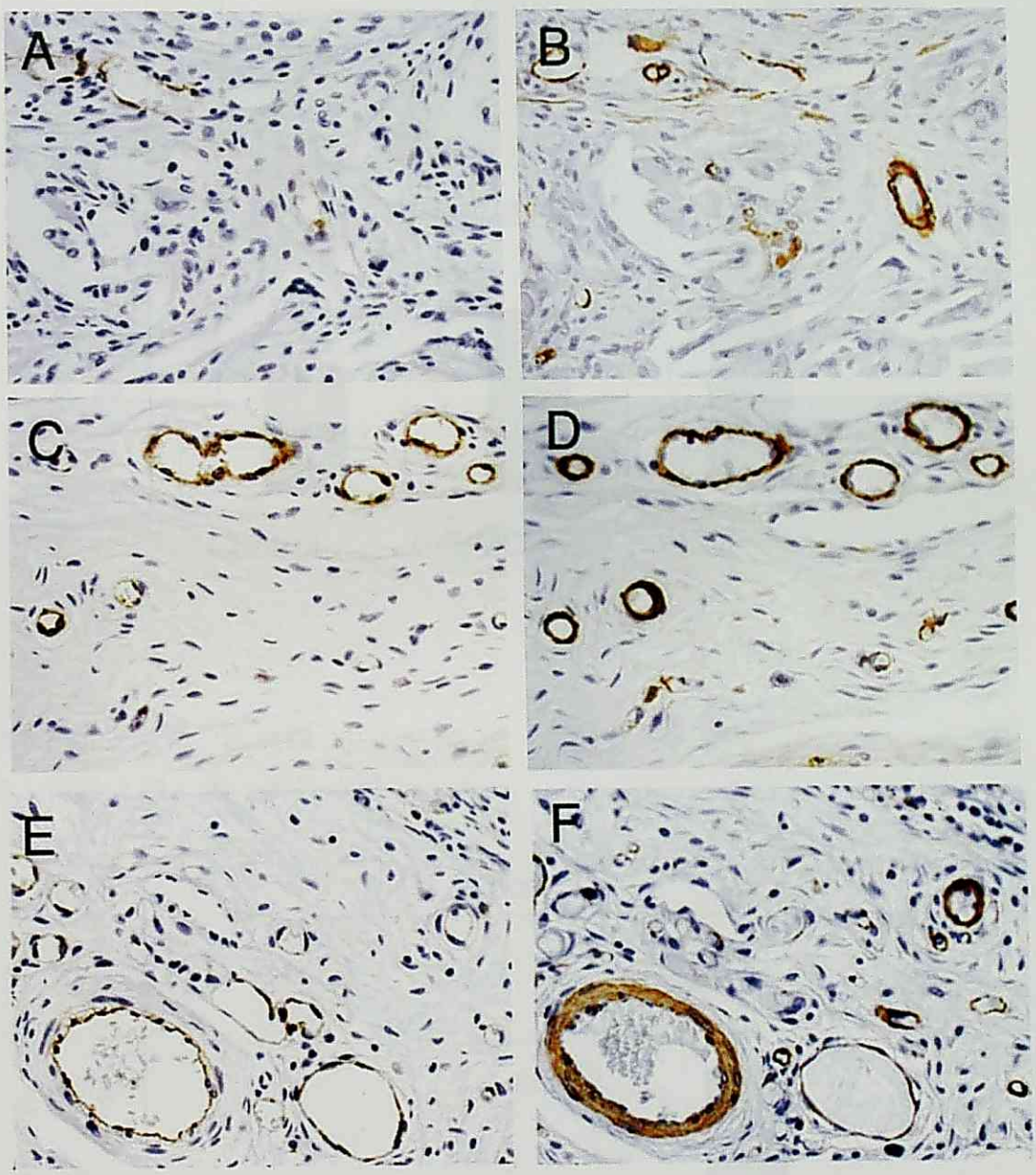


図 4　新生血管数

白：術後 2 週，黒：術後 4 週，

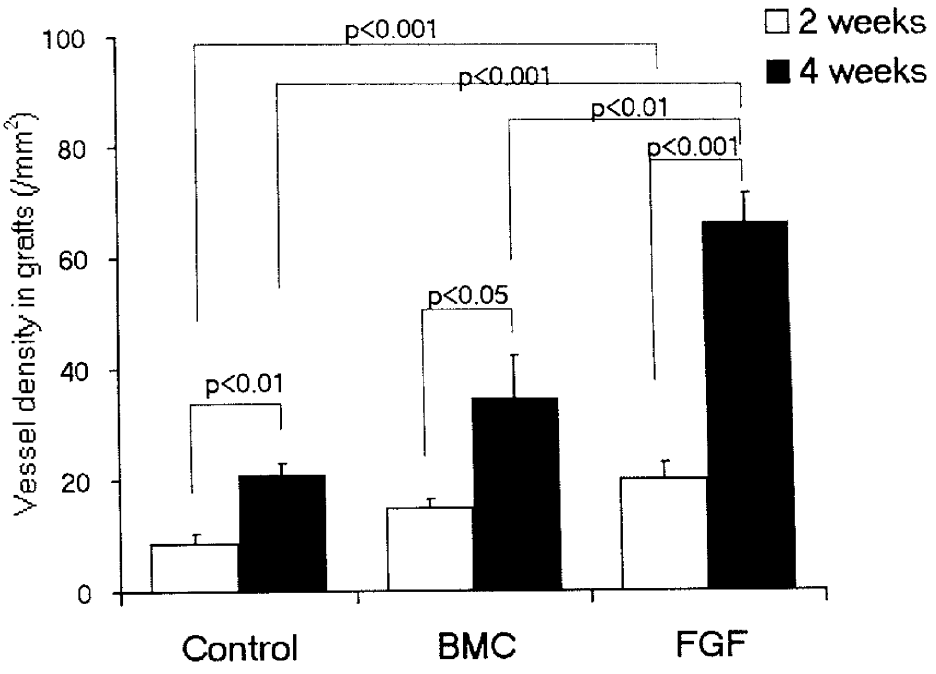


図 5　新生血管の断面積

白：術後 2 週，黒：術後 4 週

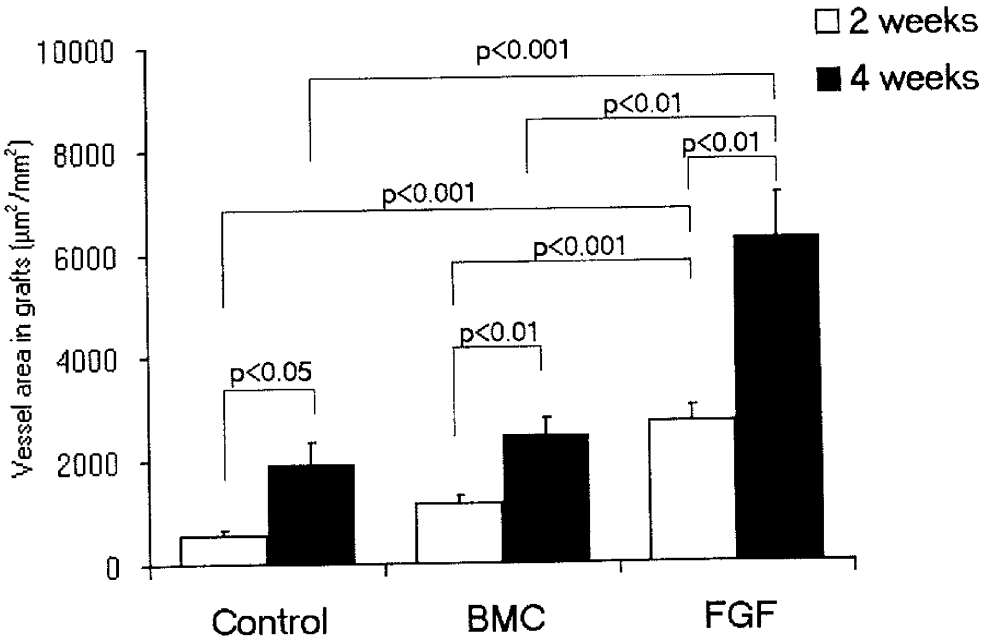


図 6　術後 4 週 弾性線維産生（×100）

左段：Elastica van Gieson（EvG）染色、右段：平滑筋アクチン（α-SMA）免疫染色、A, B：Control 群，C, D：BMC 群，E, F：FGF 群

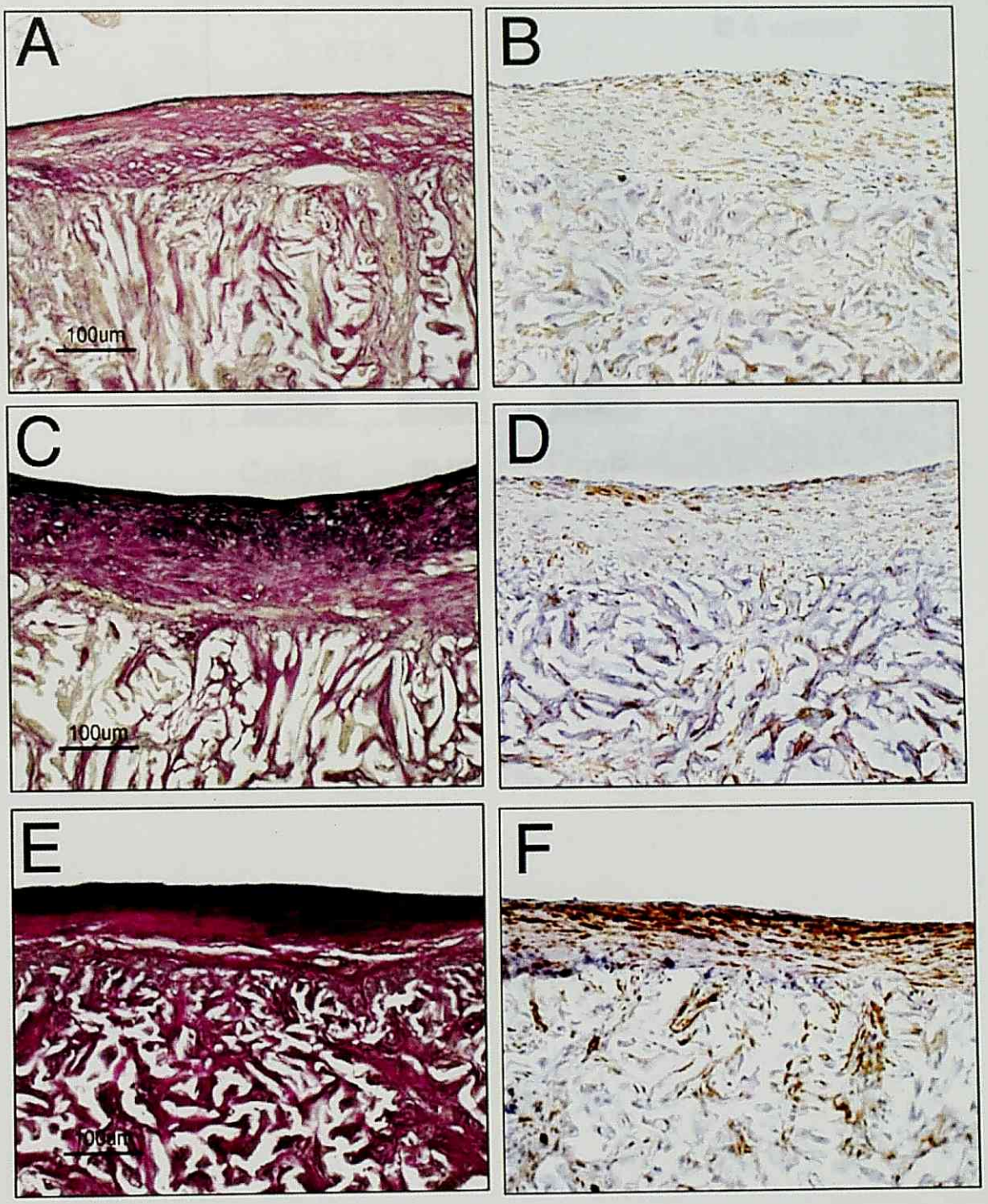
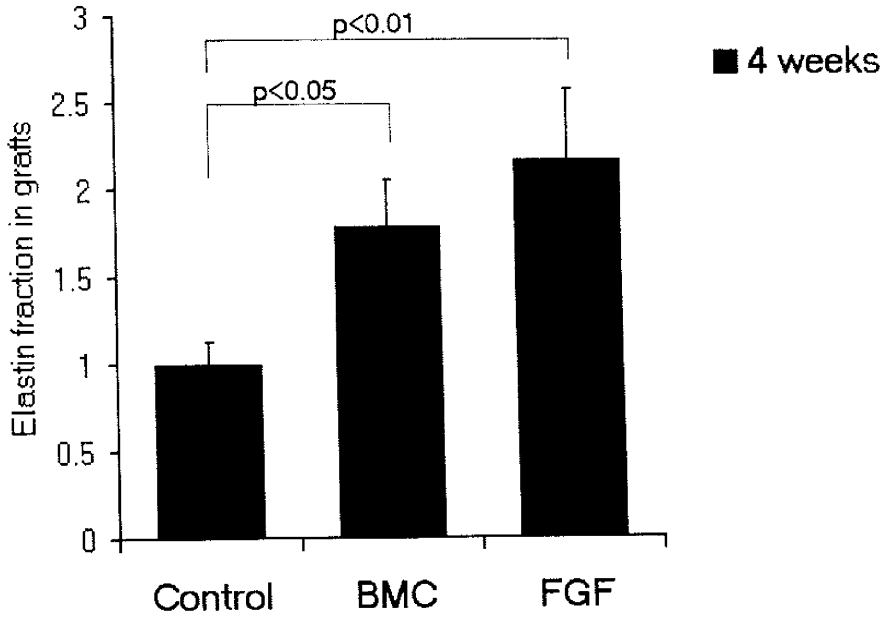


図７　弾性線維産生量


p<0.01
p<0.05
4 weeks
Elastin fraction in grafts
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
BMC
FGF