

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05426

研究課題名(和文) 光造形と生体内組織形成術による生体適合性に優れた弁再建用バイオリーフレットの開発

研究課題名(英文) Development of biocompatible bio leaflet for aortic valve reconstruction using in-body architecture technology

研究代表者

宮本 伸二 (Miyamoto, Shinji)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70253797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：基材を皮下に植えこみ純粋なコラーゲンで構成されたシートを作成する生体内組織形成法によりバイオシートを得ることができた。このバイオシートを用いて尾崎法による大動脈弁再建を行い、慢性モデルにてその自己組織化、弁機能を観察し、通常の自己心膜による尾崎法と比較検討した。自己心膜モデルは遠隔期においても裂傷等見られず十分な強度があったが、自己組織化は見られず石灰化の進行がみられた。それに対しバイオシートは遠隔期に自己組織化が進みそれは3～6カ月以内で停止終了した。ただ強度に問題があり、少なくとも一か所の裂傷が生じた。臨床応用に向けては強度の確保が最重要課題であり、更なる品質向上に努める必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己の皮下に基材を植え込み立体的な構造物を作成する生体内組織形成法にてコラーゲンシートを再生し、そのシートを大動脈弁の再建術に用いることで免疫反応のない弁を作成できた。バイオシートはおよそ6カ月で自己組織化が完成することが判明し、抗凝固療法も必要ないことが証明された。しかしシートの均一性に問題があり、脆弱な部分とその部分の縫合不全が起こることが判明した。自己組織化が証明されたことで弁の変性はおこらないので成長も期待でき、若年者への応用に期待が持たれるが、均一性の判断をする方法がまだ不十分であり、今後均一性を担保する方法技術の開発が必要ということが分かった。

研究成果の概要(英文)：The bio-sheet could be obtained by in-body tissue architecture in which the mold is implanted subcutaneously to make a sheet composed of pure collagen. The aortic valve was reconstructed by the Ozaki method using this bio-sheet, and its self-organization and valve function were observed in chronic models, and compared with the Ozaki method with a normal autologous pericardium. The autologous pericardium model showed no tears and so on even in the long stage and had sufficient strength, but self-organization was not seen and progression of calcification was observed. In contrast, the bio-sheets were self-organizing in the long phase, and were finished within 3 to 6 months. There was only a problem with strength and at least one tear occurred in each case. Securing strength is the most important issue for clinical application, and it is necessary to strive for further quality improvement.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 大動脈弁 心臓弁膜症 生体医用工学 慢性動物実験 大動脈弁置換 自己組織化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 開始当初の背景

心臓弁膜症手術で用いられている代用弁は耐久性に優れた機械弁は血栓性が高く、生涯抗凝固剤ワーファリンを投与する必要がある。また、異種生体弁は、耐久性の限界や石灰化があり、早期に弁破壊が起こる若年者への使用には問題が残る。更に近年増加している成長期にある小児弁膜症手術への適用にも限界がある。加えて感染症心内膜炎などの患者に良好な感染抵抗力のあるホモグラフトは圧倒的なドナー不足である。特に小児用に関しては商品が全く存在せず臨床現場から切望されている。東邦大学の尾崎教授が編み出した自己心膜を用いた大動脈弁再建術 (AVRec) はその問題を解決する日本発の方法として期待され、すでに7年を経過し再手術回避率98%とその耐用性、有効性が証明されつつある。近年評価が高まり国内外で広く行なわれるようになった。しかし、すでに自己心膜は過去多くの心臓手術に用いられており、心嚢膜として分化し固定された自己心膜は成長の可能性はなく、またいずれ石灰化を来すことは証明されている。我々は患者自身の組織のみで自己の移植用組織体を作製できる「生体内組織形成術」の開発を10年以上前から世界に先駆けて行っている。生体内組織形成術は、生体内に異物が侵入した際に異物周囲をコラーゲンのカプセルが覆う生体反応を利用している。マウスからヤギまでの背部皮下に鋳型の埋入を行ったが、いずれでも約4週後には組織体を形成した。結合組織体の細胞成分は主に線維芽細胞であり、炎症性細胞はほとんど認めない。

ヤギでヒトと同様のAVRecをバイオシートを用いて行うことでバイオシートの弁素材としての安全性を確認し、かつバイオチューブで見られた血管組織への移行のようなバイオシート弁の単純コラーゲン膜から本来の三層構造をした弁組織(右図)へ近づく組織学的変化を観察できれば固定自己心膜以上の長期耐用性、成長性があるバイオリーフレットでAVRecを行うというまったく新しい大動脈弁治療が可能となる。これは小児(弁自体の成長が可能のため)、若年者(特に妊娠を希望する女性)、抗凝固が行えない患者、再手術で心膜採取が困難な方の大きな福音となる。

2. 研究の目的

生体の皮下に光造形で作成した高分子製の鋳型を1ヵ月程度埋入させるだけで、完全に自己組織のみからなる自分用の移植用組織体が自動的に得られる画期的な再生医療技術「生体内組織形成術」(体内造形)を基盤として、それによって作成された自己生体材料(膜)が自己心膜より生体適合性、耐久性に優れることを確認し、若年者での弁再建に使用する材料として優れていることを証明する。研究期間内に、耐圧性と耐久性を獲得するための鋳型の最適設計を行い、移植実験によって生着する再生能力、耐久性を調べる。我々の先駆的な生体内組織形成術によって、血栓性や耐久性に問題を有し生着性の欠如する人工代用弁、自己心膜に置き換わる、待望の成長性の可能性を有する「再生型自己弁膜」を安全、確実、経済的に提供可能となり、一般医療として普及をめざす。

3. 研究の方法

大動物(ヤギ)でこれまで安定した組織形成が証明されている円筒形鋳型にてバイオシートを作成する。二ヶ月後その鋳型(基材)を取り出しバイオシートを得る。エタノール固定したのち、そのバイオシートの物性を測定後、同一個体にそのシートを材料として体外循環下に臨床とまったく同様の尾崎AVRec法を行い三ヵ月後、六ヵ月後、12ヵ月後に安楽死させ、心臓超音波による弁機能評価、光学顕微鏡による組織変化を観察する。対象として同様の尾崎AVRecを現在臨牀の方法と同様の方法でグルタルアルデヒド固定した自己心膜を用いて行い三ヵ月後、六ヵ月後、12ヵ月後に安楽死させ、心臓超音波による弁機能評価、光学顕微鏡による組織変化を観察する。

4. 研究成果

自己心膜モデルは周術期死亡9例、1ヵ月死亡2例、3ヵ月モデル4例、12ヵ月モデル3例であった。一方バイオシートモデルは周術期死亡13例、1ヵ月死亡2例、3ヵ月モデル4例、6ヵ月モデル3例、9ヵ月死亡1例、12ヵ月モデル3例であった。実験当初は手術手技由来(止血困難、VF等)、周術期管理の未熟さ故、周術期死亡を認めたが、その後各種改善により、生存率は向上できた。周術期死亡のうち、両者とも弁外れによる急性ARを認めたが、自己心膜は2/2例縫合糸由来であったのに対し、Biosheetは1/3例で移植弁自体の破損を認めた。弁機能に関しては、両群とも術直後Vmax 3.0前後の圧較差を認めるが、術後3ヶ月以降はVmax 2.0前後で落ち着いていた。ARに関しては、術直後は自己心膜でnone-trivial、Biosheetでnone-mildの逆流を認めた。術後3ヶ月時点で自己心膜はnone-trivialであったのに対し、Biosheetは弁破損に伴うmild-moderate程度の逆流を2/3例に認めた。一方、術後6ヶ月まで生存した3例は弁破損を認めず、逆流もtrivial-mild程度であった。術後1年になると、自己心膜は高度石灰化による弁尖の稼働性低下に伴うmoderate-severeの逆流を認めた。また、1弁尖に穴を認めたが長期経過しており、原因(弁由来、縫合糸由来)は判然としなかった。Biosheetに関しては、1/2例に交連部破損に伴うmoderate-severeの逆流を認めた。1/2例は麻酔導入直後に亡くなったため、データ採取できなかったが、交連部に破損を認めており、こちらもARの存在が示唆された。組織学的には、術後3ヶ月時点で、自己心膜は心膜組織が残存し、周囲にSMA陽性細胞の増生を認めるのに対し、BiosheetではBiosheetが完全に弁輪に癒合し、Biosheet内にSMA陽性細胞が侵入する像を認めた。術後6ヶ月経過すると、より細胞増生が弁尖に及び、左室流出路側に弾性線維、Biosheet表面に内皮細胞を認めた。術後1年では自己心膜は弁

輪部と弁腹に肥厚・石灰化を認め、石灰化は心膜由来と考えられた。一方、Biosheet では石灰化は認めなかった。細胞浸潤の度合いは6ヶ月と大きく変わらず、弁輪部の肥厚は改善し smooth になっており、native 弁と比較してみても、反応は終了しているものと考えられた。自己心膜に比べ、Biosheet は自己組織化の可能性があり、抗石灰化の観点からは有利と考えられる。一方、抗感染性に関しては、長期生存(周術期以降)のうち自己心膜で 1/8 例、Biosheet で 2/12 例に IE を認め、抗感染性に関しては Biosheet が有利とは言えない。Biosheet に関しては、強度が最大の問題であり、破損した箇所は概ね OCT で脆弱な可能性が考えられた箇所であった。臨床応用に向けては強度の確保が最重要課題であり、更なる品質向上に努める必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) 河島毅之, 梅野惟史, 岡本啓太郎, 和田朋之, 首藤敬史, 寺澤武, 中山泰秀, 穴井博文, 巽英介, 宮本伸二: 生体内組織形成術 (IBTA) による大動脈再建術の開発. 日本心臓血管外科学会雑誌 2018: 47(4); xxix-xxxiii (査読無)

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 河島毅之, Development of a New Aortic Valve Reconstruction Material Using In-body Tissue Architecture. American Heart Association, Chicago, USA, 2018年11月11日
- (2) 宮本伸二, Living aortic valve を目指して-生体内組織形成術 (IBTA) によるバイオリーフレット開発, 第17回日本再生医療学会総会, 2018年3月21日, 横浜市
- (3) 河島毅之, 生体内組織形成術 (IBTA) による大動脈弁再建組織の開発, 第48回日本心臓血管外科学会学術総会, 2018年2月20日, 津市
- (4) 河島毅之, 生体内組織形成術 (IBTA) を用いた大動脈弁再建組織の開発, 第123回日本循環器学会九州地方会, 2017年年12月2日, 福岡市
- (5) 河島毅之, 生体内組織形成術 (IBTA) によるバイオシートを用いた大動脈弁再建術の開発, 第55回日本人工臓器学会, 2017年9月2日, 東京
- (6) 河島毅之, 人工結合組織シート(バイオシート)の作成鑄型による内部構造変化, 第33回医学生物学電子顕微鏡技術学会学術講演会, 2017年5月13日, 神戸市
- (7) 宮本伸二, 大動脈弁再建術に生体内組織形成術 (IBTA) によるバイオシートは使用可能か, 第16回日本再生医療学会, 2017年3月9日, 仙台市
- (8) 宮本伸二, 生体内組織形成術 (IBTA) による BIOSHEET を用いた大動脈弁再建術の可能性, 第54回日本人工臓器学会, 2016年11月25日, 米子市
- (9) 岡本啓太郎, Aortic Valve Reconstruction Using In-body Tissue-Engineered Collagenous Connective Tissue Membranes, BIOSHEETS, In a 3-month Goat Model, American Heart Association, New Orleans, USA, 2016年11月16日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：穴井 博文

ローマ字氏名：Hirofumi Anai

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：2 0 2 9 1 5 4 4

研究分担者氏名：中山 泰秀

ローマ字氏名：Yasuhide Nakayama

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所

部局名：医学部医療材料工学

職名：室長

研究者番号(8桁)：5 0 2 5 0 2 6 2

研究分担者氏名：岡本 啓太郎

ローマ字氏名：Keitaro Okamoto

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：病院特任助教

研究者番号(8桁)：5 0 7 2 3 5 2 4

研究分担者氏名：和田 朋之

ローマ字氏名：Tomoyuki Wada

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：6 0 3 2 5 7 0 1

研究分担者氏名：首藤 敬史

ローマ字氏名：Takashi Shuto

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：6 0 6 4 9 7 6 3

研究分担者氏名：河島 毅之

ローマ字氏名：Kawashima Takayuki

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：2 0 7 9 1 0 4 9

(2)研究協力者

研究協力者氏名：尾崎 重之

ローマ字氏名：Shigeyuki Ozaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。