

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14592

研究課題名(和文)膀胱・尿管再生を目指すバイオシートを用いた自己再生型代用膀胱および代用尿管の開発

研究課題名(英文) Development of bladder and ureteral substitution using collagenous tissue membrane (biosheet) in dogs

研究代表者

船山 麻理菜 (Funayama, Marina)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員

研究者番号：30713599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：体内で任意の形状の移植用組織体を作製する「生体内組織形成術」にて犬のバイオシートおよびバイオチューブを作製し、膀胱および尿管への移植評価を行った。バイオシートおよびバイオチューブともに移植手術中に縫合による亀裂や損傷は認められず、移植操作性は良好であった。画像検査にて、バイオチューブは移植後3週目までに閉塞を認めた。一方、バイオシートは移植後12週目まで膀胱壁の破綻、石灰化および結石形成は認められず、組織学的検査にて、粘膜面が移行上皮により被覆され、SMA陽性細胞が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内組織形成術にて作製した移植用組織体は、サイズや形状の自由度が高く、比較的安価に提供できることから、伴侶動物の泌尿器治療に応用できる可能性がある。本研究では、自己の細胞やマトリックスから構成されたバイオシートおよびバイオチューブが、膀胱および尿管において良好な移植操作性を有することを示した。またバイオシートは伴侶動物の膀胱再建において、経済性に優れた移植用組織体となり得る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In-body tissue architecture technology was a novel and practical technique for regenerative medicine based on the tissue encapsulation phenomenon of foreign materials in patients. In this study, we prepared sheet-like collagenous tissues called "Biosheets" and tube-like collagenous tissues called "Biotubes" as reconstruction materials for urinary bladder and ureter. Each of Biosheets and Biotubes were implanted in the urinary bladder or ureter without damage at macroscopic levels to the tissues. Abdominal ultrasonography showed the occlusion of Biotubes until 3 weeks after implantation. Meanwhile, no disruption of Biosheets was observed until 12 weeks after implantation. Histological analyses revealed the luminal surface of Biosheets were covered with a multicellular layer of urothelium cells and SMA positive muscle cells were observed at the margin of Biosheets at 12 weeks after implantation.

研究分野：獣医外科学

キーワード：泌尿器疾患

1. 研究開始当初の背景

1. 膀胱腫瘍の外科的治療に対する課題

伴侶動物に発生する癌のうち、膀胱腫瘍は 90%以上が悪性腫瘍である。根治治療として腫瘍の切除が望まれるが、腫瘍の浸潤が強い場合や、腫瘍により尿路の閉塞が生じている場合は、腫瘍の切除および尿路閉塞の解除に伴い広範な泌尿器組織が欠損する。生体材料を用いて膀胱および尿管を再建することが理想的な治療法の一つではあるが、伴侶動物に有用な生体材料は少なく、膀胱の全切除を行った後に、残った尿管を膣や皮膚に開口させる尿路変更術が行われることが多い。尿路変更術は伴侶動物への侵襲が大きく、手術後の皮膚の尿やけや尿路感染等によって伴侶動物の生活の質が大きく低下することに加え、飼い主の負担が大きいため問題である。また、尿管の再建が必要となった場合は、金属や樹脂製の人工材料を用いて腎臓と膀胱をバイパスする尿路再建術が米国獣医内科学会で推奨されているが、人工材料による異物反応、バイパス内での結石形成および感染などの合併症が報告されている。

2. 生体内組織形成術による組織体の応用

生体内組織形成術は、体内を培養場として生体内に鋳型を埋入することで、任意の形状の移植用組織体を患者体内で作る手法である (Nakayama et al. Cell Transplant 2004)。従来の組織工学に基づく再生医療技術では、煩雑で感染の危険性を有し長期間を必要とする細胞培養操作が必須であるが、本技術では患者の皮下に鋳型を埋入するだけで、通常的生活を送りながら自然と組織体ができあがり、自己の細胞やマトリックスのみからなる組織体は自己の移植用組織体として理想的である。生体内組織形成術にて開発された自己組織由来組織膜、代用血管および代用心臓弁などは、心臓弁および血管などの循環器系組織、角膜、気管など広い治療分野に応用されつつあるが、これまでに犬の膀胱および尿管への移植評価は行われていない。

2. 研究の目的

膀胱腫瘍の切除および尿路閉塞の解除に伴い広範な泌尿器組織が欠損する場合、生体材料を用いた尿管の再建が理想的であるが、人医療で利用される生体材料は高価であり、サイズが大きく異なること等の理由から伴侶動物の臨床応用に至っていないのが現状である。そこで、本研究では、生体内組織形成術にて、自己の細胞から構成される膀胱用の移植用組織体(バイオシート)および尿管用の移植用組織体(バイオチューブ)を作製し、犬の膀胱および尿管への移植評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1. デザイン工学的な組織形成制御能の確立

円柱形状の鋳型を皮下に埋植することで得られるバイオシートおよびバイオチューブは、壁厚が 0.1 mm 未満と極めて薄くなることから、本研究では、作製する「型」の寸法を敢えて大きくするデザイン工学的な組織形成制御を行い、バイオシートおよびバイオチューブの作製を行った。シリコン製心棒とそれを覆うスリット形状の異なる 3 種類の外筒から形成された円筒状の鋳型を 3D プリンタ (ProJet 3510 HD Plus, 3DSystems, Rock Hill, SC) にて作製した。鋳型 A は、シリコン製円柱基材 (上端外径 20mm、下端外径 20 mm、中央外径 19 mm、高さ 80 mm) を、幅 1 mm のドット状のスリットが入ったステンレス製円筒基材 (外径 20 mm、高さ 80 mm) で覆う形状とした (図 1 A)。鋳型 B は、シリコン製円柱基材を、幅 2 × 15 mm のボックス状のスリットが入ったステンレス製円筒基材によって覆う形状とした (図 1 B)。鋳型 C は、シリコン製円柱基材の両端にアクリル製のキャップを装着し、その両端のキャップに円柱との間隙が 1 mm となるように太さ 1 mm のステンレス線を 18 本挿入し、幅 5 × 70 mm のライン状のスリットが入った鋳型を作製した (図 1 C)。作製した各鋳型を全身麻酔下にて、ビーグル犬の皮下に埋植した。次いで、形成された組織体を 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋した後、3-5 μm に薄切してヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) およびマッソントリクローム染色を行った。力学的評価は、寺澤ら (Terazawa et al. J Biomech 2020) の方法に準じて行った。強度試験機 (EZ-LX、島津、京都、日本) を用いて単軸引張試験を行い、強度を示す破断荷重ならびに単位破断荷重、物体の弾性を示す弾性率を算出した。組織厚は、光干渉断層計 (OCT; IVS-2000、サンテック、愛知、日本) を用いて測定した。組織体は長軸方向および単軸方向のそれぞれ 3 サンプルずつ測定した。

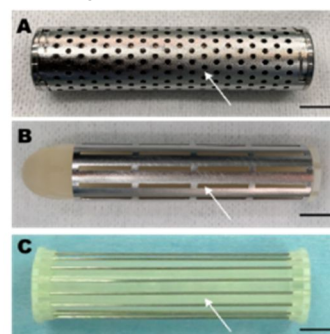


図 1 作製した3種類の鋳型写真
矢印: スリット部 (Bar = 1 cm)

2. 膀胱および尿管への移植評価

全身麻酔下で鋳型をビーグル犬4頭の背部皮下へ埋植し、8週間後に鋳型を摘出することでバイオシートを作製した。全身麻酔下にて、ビーグル犬の剣状突起から恥骨前縁にかけて剪毛、消毒した後に、臍から恥骨までの後腹部正中切開を行った。膀胱を腹腔外へ露出させ、膀胱尖部および膀胱体部の左右に4-0

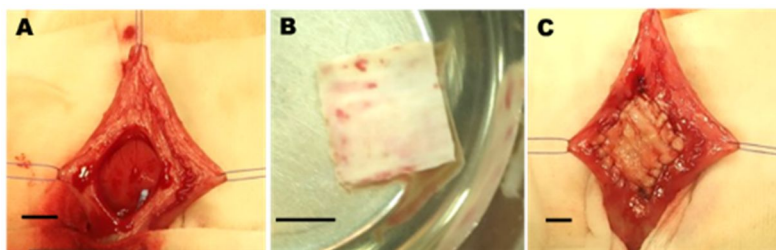


図2 バイオシートの移植 (Bar = 1 cm)

ポリジオキサノン (モノプラス、ビーブラウンエスクラブ、東京、日本)にて支持糸をかけた後、尖刃メスを用いて膀胱体部腹側に2 × 2 cmの膀胱壁全層の欠損を作製した (図2-A)、70%エタノールに浸漬したバイオシートを欠損領域に

合わせて成型し (図2-B)、4-0ポリジオキサノンを用いて膀胱壁と並置縫合して欠損を整復した (図2-C)。整復した膀胱欠損部に大網を被覆後、閉腹した。移植後は、ブプレノルフィン (10 μg/kg SC、日新製薬、山形、日本) による3日間の疼痛管理を実施した。

バイオシートの作製と同様に、全身麻酔下で鋳型をビーグル犬3頭の背部皮下へ埋植し、3種類のバイオチューブを作製した。バイオチューブAは内径3 mm、壁厚0.5 mm (図3-A)、尿管開口部への移植を考慮し片側が広径のバイオチューブBは内径3-15 mm、壁厚0.5 mm (図3-B)、ポリ乳酸ステントをバイオチューブ壁内に組み込んだバイオチューブCは内径4 mm、壁厚2 mm (図3-C)であった。各バイオチューブは、移植時に15 mmに成型した。バイオチューブA

およびCは、全身麻酔下にて腹部正中切開を行い、尿管を膀胱近位で離断した後にバイオチューブと尿管の端々吻合を行った。片側が広径のバイオチューブBは、尿管を膀胱近位で離断し狭径側を尿管と吻合した後に、膀胱尖部に切開を加え、バイオチューブの広径側と膀胱切開部の吻合を行った。

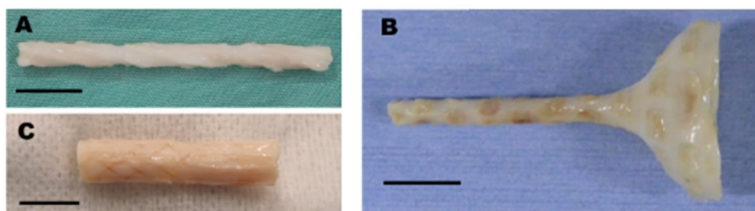


図3 作製した3種類のバイオチューブ (Bar = 1 cm)

移植後3日間は、一般身体検査として、体温、心拍数、呼吸数、体重の測定、心音、呼吸音、可視粘膜の色調、脱水の有無、体表リンパ節の評価、術創の状態の評価を行った。その後は、移植後1、2、3、4、8および12週目に一般身体検査、尿検査、腹部超音波検査ならびに排泄性尿路造影検査を実施した。尿検査では、尿道カテーテル (アトム栄養カテーテル8 Fr、アトムメディカル株式会社、埼玉、日本) を外尿道口から挿入して尿5 mlを採尿し、尿比重測定および尿試験紙検査、尿沈査の顕微鏡検査を実施した。尿比重測定はポケット犬猫尿比重屈折計 (アタゴ株式会社、東京、日本)、尿試験紙検査は自動分析機 (Clinitek STATUS、シーメンスヘルスケア株式会社、東京、日本) および尿試験紙 (N-マルチスティック SG-L、シーメンスヘルスケア株式会社、東京、日本) を用いて実施した。尿検査では、移植前後における尿中の炎症反応および感染の有無について評価した。超音波検査では、超音波診断装置 (Aplio XG scanner、東芝メディカルシステム株式会社、東京、日本) の腹部コンベックスプローブを用い、膀胱壁の破断や、膀胱内における結石形成、血腫、石灰化などの合併症の有無および尿管の開通性について評価した。排泄性尿路造影検査では、X線診断装置 (CARESTREAM DRX-1 system、ケアストリームヘルス株式会社、東京、日本) を用いて、管電圧75 kV、管電流320 mA、撮影時間12 msの撮像条件で、下腹部の腹背像および側面像を造影剤投与前 (pre) および造影剤投与1分後、5分後、10分後、15分後、および20分後に撮像した。造影剤はイオヘキソール (2 ml/kg、オムニパーク、第一三共、東京、日本) を用いて、撓側皮静脈から投与速度1 ml/秒で投与した。排泄性尿路造影検査では、造影剤の漏出の有無や、膀胱の形態および拡張能を評価した。

観察期間終了後、全身麻酔下でバイオシートおよびバイオチューブを採材した。採材した組織は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋し、3-5 μmの薄切標本を作製した。薄切標本にはHE染色および免疫組織化学染色を実施した。HE染色では、バイオシートへ遊走した細胞や、炎症反応および異物反応などについて評価した。免疫組織化学染色では、-smooth muscle actin (SMA) を用いて、バイオシートへ遊走した細胞のSMA発現について評価した。免疫組織化学染色では、作製した薄切標本を脱パラフィン後に、0.01 Mクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で20分間マイクロウェーブ処理することで賦活化を行った。1%牛血清アルブミン含有PBSを用いてブロッキングを行った。1次抗体には60分、室温条件下で、マウスモノクローナルSMA抗体 (1:200、Abcam, Cambridge, United Kingdom) を用い、2次抗体には120分、室温条件下で、ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体 (Alexa Fluor 594, 1:1000, Abcam, Cambridge, United Kingdom) を用いた。その後、40、6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI、Life Technologies, Carlsbad, America) による核染色を行なった。

4. 研究成果

1. デザイン工学的な組織形成制御能の確立

ビーグル犬3頭の背部皮下に、作製した鋳型を8週間埋植した。スリットの小さい鋳型AおよびBによって作製した組織は亀裂や欠損が生じており、均一なシート状の組織が形成されなかった。最もスリットの大きい鋳型Cでは、鋳型の間に亀裂や欠損などは認められず、組織形成のブスターとなる柵状構造で全周を囲ったことで、内部の基材と外周の柵との隙間を皮下結合組織が完全に埋め、導管を形成していた。その内部には導管とシームレスに一体化した組織体が形成されていた。形成された組織体の厚さ平均は 0.72 ± 0.17 mmであった。組織学的検査にて、組織体は主に線維芽細胞から構成されており(図4-A、B)、炎症細胞や血管は認められなかった(図4-C、D)。単軸引張試験では、破断荷重は 12.19 ± 4.96 N、単位破断荷重は 2.30 ± 1.09 N/mm、弾性率は 19.91 ± 6.00 MPaであり、強度および弾性に異方は認められなかった。

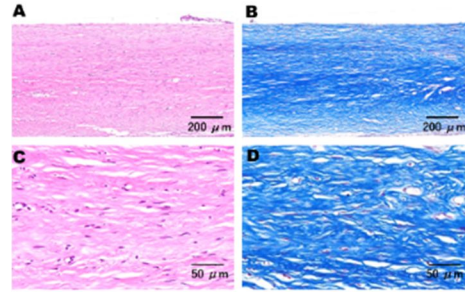


図4 作製した移植体の組織写真
HE染色(A、C)およびマッソントリクローム染色(B、D)

2. 膀胱および尿管への移植評価

バイオシートは、移植手術中に膀胱との縫合による亀裂や損傷は認められず、移植操作性は良好であった。観察期間を通して犬の一般状態は良好であり、血尿や排尿障害は認められず、尿検査において、感染や炎症を疑う所見は認められなかった。画像検査において、移植前と比較し、移植後12週目まで、膀胱壁の破綻、結石形成および石灰化は認められず、膀胱の拡張や収縮に異常は認められなかった(図5)。

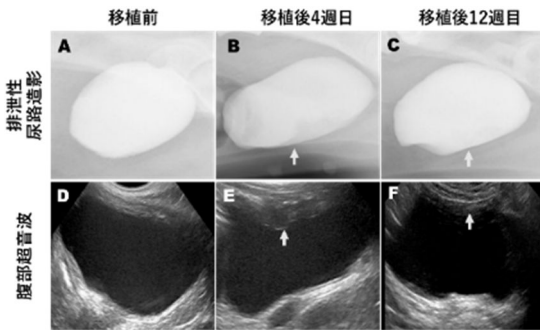


図5 排泄性尿路造影検査写真および超音波検査写真
矢印：バイオシート移植部位

が認められ、肉眼的観察にて管腔構造の圧排が認められた。

バイオシートは移植後4週目(図6-A、B)および12週目(図6-C、D)に採材された。肉眼的観察ではバイオシートの破断や結石形成、石灰化などは認められなかった。組織学的観察では、移植後4週目および12週目においてバイオシートの粘膜側は生体膀胱部と同様の尿路上皮により被覆されており、その直下では血管新生が認められた(図7)。また、バイオシート上に形成された粘膜下組織への炎症細胞の浸潤は認められなかった。移植後12週目までバイオシートは完全には分解されず、バイオシート

と膀胱の境界部では、生体筋組織からバイオシートに向けて遊走した好酸性の細胞質を有する間葉系細胞が認められ、それらは SMA に陽性を示した(図8-A、C)。また、バイオシートの中央部では、微小血管が多数認められ、SMA に陽性を示した(図8-B、D)。バイオシート内への炎症細胞や異物巨細胞の浸潤、壊死、石灰化は認められなかった。

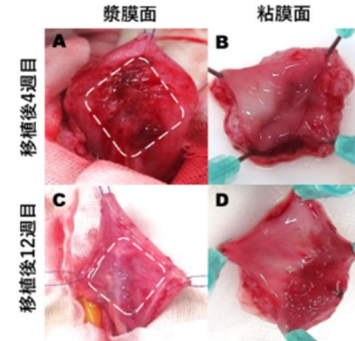


図6 膀胱の肉眼所見
白線：バイオシートの移植領域

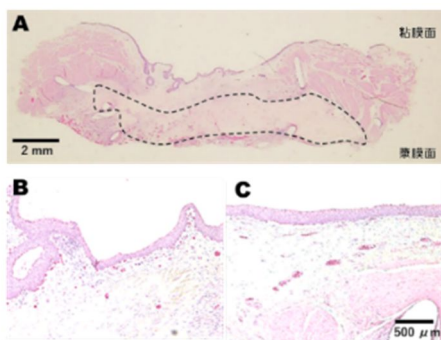


図7 移植後12週目の膀胱組織写真
A：バイオシート移植領域(黒線領域がバイオシート)
B：バイオシートの粘膜面、C：膀胱の粘膜面

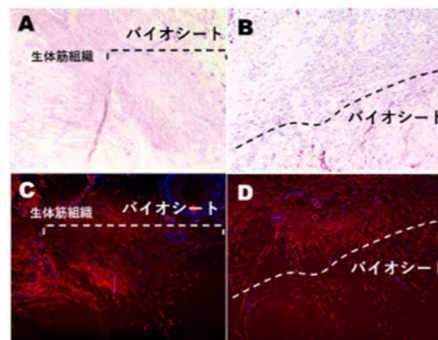


図8 移植後12週目のバイオシートの組織写真
A、C：バイオシートの辺縁部
B、D：バイオシートの中央部

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iimori Yasumasa, Iwai Ryosuke, Nagatani Kengo, Inoue Yuka, Funayama-Iwai Marina, Okamoto Mari, Nakata Mio, Mie Keiichiro, Nishida Hidetaka, Nakayama Yasuhide, Akiyoshi Hideo	4. 巻 15
2. 論文標題 Urinary bladder reconstruction using autologous collagenous connective tissue membrane “Biosheet” induced by in-body tissue architecture: A pilot study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 274 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Iimori Y, Nagatani K, Terazawa T, Inoue Y, Nakata M, Okamoto M, Funayama M, Mie K, Nishida H, Nakayama Y, Akiyoshi H
2. 発表標題 Long term outcomes of iBTA-induced allgenic Biosheets as a diaphragmatic hernia repair material in a beagle model.
3. 学会等名 The 6th Asian Meeting of Animal Medicine Specialties（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯盛安真、内藤一真、長谷健吾、船山麻理菜、岡本茉里、三重慧一郎、中山泰秀、秋吉秀保
2. 発表標題 犬における生体内組織形成術を用いた新規泌尿器修復材の検討
3. 学会等名 第96回日本獣医麻酔外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iimori Y, Nagatani K, Inoue Y, Iwai R, Okamoto M, Funayama M, Mie K, Nishida H, Nakayama Y, Akiyoshi H.
2. 発表標題 Efficacy and safety of iBTA-induced autologous “Biosheets” as a urological repair material in a dog model.
3. 学会等名 8th Annual AiSVS Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	秋吉 秀保 (Akiyoshi Hideo) (50420740)		
研究協力者	中山 泰秀 (Nakayama Yasuhide) (50250262)		
研究協力者	飯盛 安真 (Iimori Yasumasa)		
研究協力者	内藤 一真 (Naito Kazuma)		
研究協力者	長谷 健吾 (Nagatani Kengo)		
研究協力者	井上 侑花 (Inoue yuka)		
研究協力者	杉本 貴宣 (Sugimoto Takanori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------