

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 5 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21360123

研究課題名（和文）再生組織のミクロ分離構造解析による成熟度の評価

研究課題名（英文）Evaluation of the Degree of Maturation in the Regenerative Tissues by Analysis of Micro-Elastic Structure

研究代表者

高見沢 計一（KEIICHI TAKAMIZAWA）

独立行政法人国立循環器病研究センター・生体医工学部・研究員

研究者番号：10163312

研究成果の概要（和文）：

生体組織表面の弾性率分布を容易に観察できる、触覚顕微鏡(SHM)の開発を行ってきた。本研究によって、このSHMを改良することで、ブタ血管をサンプルとして、生理食塩水中で長時間かつ広面積の観察を可能とした。それによって、無負荷条件下ではあるが、イヌ血管の部位毎での細胞外マトリックスの構造的分布の違いを弾性率の違いから明らかとした。SHMは組織工学的な組織の移植後の力学的な成熟度を正確に評価する有力な手段である。

研究成果の概要（英文）：

We have been developed a scanning haptic microscope (SHM) for easy observation of the distribution of surface elasticity over a tissue slice sample. By improvement of SHM long time observation and wide area surface elasticity distribution imaging of the porcine arteries were enabled by soaking the sample in saline. Therefore, the differences in the elasticity under no load condition were revealed by visualization of local elastic structure at the extracellular matrix level in different segments of the canine aorta. SHM proved to be a powerful tool for precise evaluation of the degree of physical maturation after implantation of tissue-engineered tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：再生医療・触覚顕微鏡・弾性率・生体組織・計測装置

1. 研究開始当初の背景

これまで日本大学工学部の尾股教授のグループと共同で、組織のミクロ領域や細胞単体のバイオメカニクス特性として弾性率

を簡便に計測できる、日本発のタクタイルマッピングシステム装置(TMS)を開発している。現在、血管組織内の細胞外マトリックスレベルでの表面弾性率分布を容易

に非侵襲で観察可能とするまで本装置の完成度を高めることに成功している。

一方別に、京都府立医科大学医学部心臓血管外科の神田圭一講師のグループと共同で再生医療の新しいアプローチの一つとして、これも日本発の生体内組織形成術(*In Body Tissue Architecture : I B T A Technology*)の開発に取り組み、自己組織のみからなる代用血管(バイオチューブ)や心臓弁(バイオバルブ)など循環器系の自家移植用組織体の開発に成功している。

現在、これらの組織体の移植を進めているが、その成熟度を評価するには再生された組織と生体組織との細胞外マトリックスレベルでのマイクロバイオメカニクス特性を詳細に比較検討することが重要と考える。

2. 研究の目的

いずれも我々が開発中のTMSテクノロジーとIBTAテクノロジーとの融合によって、組織再構築過程を力学的な視点から精密かつ詳細に調べることが可能となる。

研究期間内にまずTMS測定装置の完成度を高める。具体的には、現在大気中で測定を行っているため生体試料の乾燥が起り、真の物性値を得るのに工夫が必要である。そこで水溶液中で測定できるようセンサの改良を行い、システムを確立させる。生体血管や心臓弁組織を再生することを最終目標とするため、各組織を構成する細胞外マトリックスの分布ならびにその物性測定を行い、ゴールを明確に設定する。また、既に移植を進めているIBTAテクノロジーによるバイオチューブやバイオバルブの生体内での成熟過程を、現在最長1年の移植モデルを含む移植期間更新中のサンプルを移植期間毎に摘出し評価を行う。

生体組織や組織工学的に作製された臓器や組織の物性機能評価に極めて有効な手段になると考えられ、細胞生物学や医学、特に再生医療に大きな福音がもたらされ、発展に貢献すると期待される。

3. 研究の方法

現在開発中のTMS測定装置を改良し、液中測定システムの開発と高速化に関する研究、並びに血管や心臓弁をモデルとして、TMS測定によって生体組織の部位別の弾性率分布を観察する研究、移植を行っているバイオチューブ人工血管の成熟度をTMS測定によって力学的に評価する研究に細分化して行った。以下具体的に示す。

TMS測定装置の改良：液中測定システムの開発と高速化

サンプルを完全に水中に浸漬した状態で測定するための液中測定システムの開発

を行う。水中で弾性率を測定できれば実際に存在する生体内の環境に非常に近い状態で、正確な値を得ることができる。既に、液中においても感度が安定するセンサの設計指針を得ており、これまでの予備的な検討によって、大気中では不可能であった大面積を安定して測定することに成功している。さらに問題点を明らかにして液中測定システムを完成させる。

続いて、高性能化に取り組む。現在の測定スペックは、1点あたり測定時間が約0.3秒で、10分程度で100 μ m四方内の血管断面の表面形状と弾性率の分布の精密微細3次元画像が同時に独立して観察できるが、測定時間を半分程度に高速化するよう設計を見直し、システムの完成度を高める。

生体組織の弾性率分布測定：血管や心臓弁の部位別観察

再生組織の最終目標は完全成熟による自己化の獲得であり、構造的にも機能的にも生体組織と同一となることが理想である。そこでお手本となる生体組織について、微細領域での力学的性質をTMS測定によって厳密に調べる。生体組織として血管並びに心臓弁をモデル組織として選択する。血管や心臓弁の細胞外マトリックスレベルでの物性評価に関する研究はほとんど報告例が無く、本研究によって体系的にまとめあげる。

これまでの準備段階において、別研究で行われた動物実験後のサンプルを集めた組織バンクを構築している。ウサギや犬、ヤギの血管並びに心臓弁を凍結保存して揃えているため、初年度の研究開始と同時に動物種、年齢、部位毎の力学的マッピングライブラリーの作製に取りかかる。次年度以降には国循の倫理委員会の承認を受け、ヒトの組織に関してもライブラリー化を進めていく。また、サンプルの凍結状態での保存期間による変化や凍結乾燥による影響なども検討する。

バイオチューブ人工血管の移植後の成熟度の評価

力学的な物性はコンプライアンス測定によるバルクレベルの評価に留まっており、細胞外マトリックスレベルでは行っていない。そこで、バイオチューブの作製時から移植期間ごとにTMS測定による弾性率マッピングを行い、マトリックスレベルでの成熟度を力学的に評価する。

4. 研究成果

TMS測定装置の改良：液中測定システムの開発と高速化

厚さ約 0.5 mm のブタ動脈の切片を生理食塩水で満たした試料台に固定し、数 100kHz で振動させた測定プローブを試料表面でタッピングさせながら 1 又は 2 μm 間隔で走査させ、各点での周波数の変化量から弾性率を求めて画像化した。

測定プローブの特性を利用すると、一定の水深の範囲内において液中での弾性率測定が可能であった。測定は大気中と同様に、試料表面から深さ 5 μm 内ではほぼ非侵襲的に行え、表面形状と弾性率の精密微細 3 次元像が同時に独立して観察できた。得られた像は弾性率の高いエラスチン線維部と低いコラーゲン線維部との積層構造であった。大気中測定では乾燥によって刻々と表面状態が変化するため、測定時間は数 10 分が限度であったが、液中では数時間後も安定した測定ができたことから、より大面積の測定に対応可能となり、さらに組織の存在環境に近い状態での真の弾性率を定量化することが可能となった（図 1）。

血管組織内の細胞外マトリックスレベルでの表面弾性率分布が大面積でそして明確に観察できた。TMS の完成度を高めることで、さらに組織の物性機能評価法としての有効性が高まった。

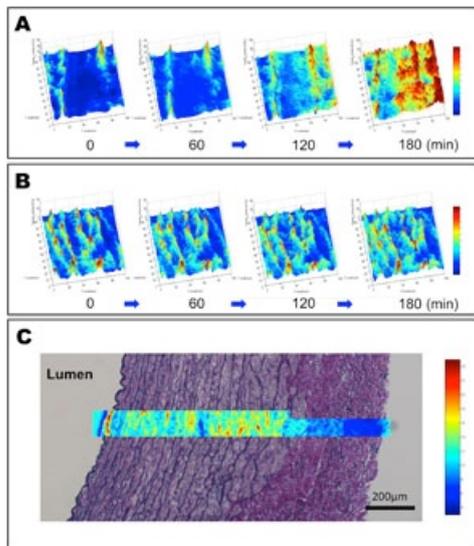


図 1 . 大気中観察による組織表面の乾燥に伴う高弾性化 (A) と液中観察による構造の長時間維持 (B)。血管の内腔側から外側までの広面積弾性率分布観察 (C)。

生体組織の弾性率分布測定：血管や心臓弁の部位別観察

ビーグル犬から弓部から大腿部までの動脈を摘出し、使用まで冷凍保存した。各部位毎に円筒状に切り分け、アガロース中に

包埋し、厚さ約 1mm の輪切り断面スライスサンプルを作製した。これを試料台に固定した後、一定水深量の生理食塩水に浸漬した。先端径約 5 μm の測定プローブを用いて 2 μm 間隔でサンプル表面をスキャンすることで断面形状と弾性率分布像を取得した。

水中測定によって表面乾燥が防げ、内腔側から外膜近傍に至る mm レベルの横断面測定が行えた。各部位の動脈に共通して、断面形状像は全て平滑であったが、弾性率分布像においては、線状のコラーゲン線維リッチ部とエラスチン線維リッチ部の円周方向での積層構造が観察され、エラスチン層の密度は内腔面から外膜へ傾斜する傾向を示した。エラスチン部はコラーゲン部に比べて弾性率が 10 倍以上高かった。エラスチン層自体の弾性率ならびに集積度は共に、胸部で最も高かったことから、胸部動脈が最も力学的強度が高いと判断され、引っぱり試験によるマクロメカニクス的な測定結果と一致した。

弓部から大腿部に至る大動脈内において、マイクロメカニクス的に断面弾性率を測定することにより、各部での細胞外マトリックス毎の弾性率ならびにそれらの構成分布の違いを明確に観察できた。得られた観察像は、組織工学的な血管組織体の作製において、マイクロメカニクス的な目標としての精密設計図となり得る。

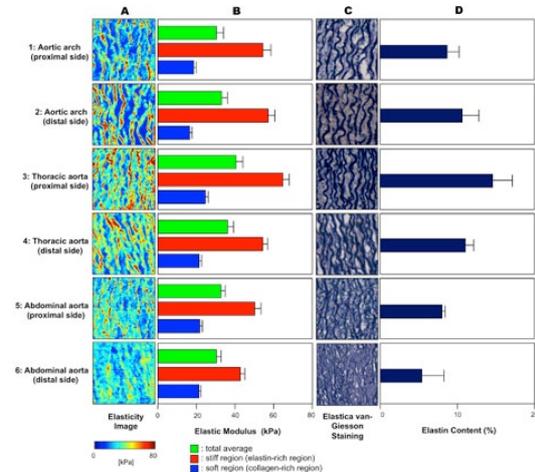


図 2 . イヌ動脈の部位毎の弾性率分布変化

バイオチューブ人工血管の移植後の成熟度の評価

IBTAテクノロジーの小口径人工血管への応用を進めた。6 週間移植すると生体血管と見分けがつかないくらい驚異的に生着し、12 週間移植するとコラーゲンやエラスチン層を含む血管壁を構成する細胞外マトリックス成分の再構築を組織染色評価によって認めた。また、血管内治療デバイスであるステントと併用してバイオチューブ

を生体血管内に密着させた場合には、1ヶ月後に血管とほぼ同様な3層構造を有する新生内膜の形成を組織学的に認めた。

移植8ヶ月後のバイオチューブ人工血管を円周断面でTMS計測を行うと、生体血管同様の筋状の層構造を認めた。エラスチンの層構造化は起こっていなかったが、力学的構造を模擬するようにバイオチューブ人工血管が成熟度を高めて再生過程にあることが認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

- 1) Nakayama Y, Yamaoka S, Yamanami M, Fujiwara M, Uechi M, Takamizawa K, Ishibashi-Ueda H, Nakamichi M, Uchida K, Watanabe T, Kanda K, Yaku H. Water-soluble argatroban for antithrombogenic surface coating of tissue-engineered cardiovascular tissues. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2011;99(2):420-30. DOI: 10.1002/jbm.b.31914.
- 2) Moriwaki T, Oie T, Takamizawa K, Murayama Y, Fukuda T, Omata S, Kanda K, Nakayama Y. Variations in local elastic modulus along the length of the aorta as observed by use of a scanning haptic microscope (SHM). J Artif Organs. 査読有 2011;14(4):276-83. DOI: 10.1007/s10047-011-0596-2
- 3) Nakayama Y, Yahata Y, Yamanami M, Tajikawa T, Ohba K, Kanda K, Yaku H. A completely autologous valved conduit prepared in the open form of trileaflets (type VI biovalve): mold design and valve function in vitro. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2011;99(1):135-41. DOI: 10.1002/jbm.b.31880.
- 4) Watanabe T, Kanda K, Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Yaku H, Nakayama Y. Long-term animal implantation study of biotube-autologous small-caliber vascular graft fabricated by in-body tissue architecture. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2011;98(1):120-6. DOI: 10.1002/jbm.b.31841.
- 5) Oie T, Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. In-body optical stimulation formed connective tissue vascular grafts, "biotubes," with many capillaries and elastic fibers. J Artif Organs. 査読有 2010;13(4):235-40. DOI: 10.1007/s10047-010-0517-9
- 6) Yamanami M, Yahata Y, Uechi M, Fujiwara M, Ishibashi-Ueda H, Kanda K, Watanabe T, Tajikawa T, Ohba K, Yaku H, Nakayama Y. Development of a completely autologous valved conduit with the sinus of Valsalva using in-body tissue architecture technology: a pilot study in pulmonary valve replacement in a beagle model. Circulation. 査読有 2010;122(11 Suppl):S100-6. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.922211
- 7) Oie T, Suzuki H, Murayama Y, Fukuda T, Omata S, Kanda K, Takamizawa K, Nakayama Y. Surface elasticity imaging of vascular tissues in a liquid environment by a scanning haptic microscope. J Artif Organs. 査読有 2010;13(2):121-5. DOI: 10.1007/s10047-010-0503-2
- 8) Yamanami M, Yahata Y, Tajikawa T, Ohba K, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Preparation of in-vivo tissue-engineered valved conduit with the sinus of Valsalva (type IV biovalve). J Artif Organs. 査読有 2010;13(2):106-12. DOI: 10.1007/s10047-010-0491-2
- 9) Watanabe T, Kanda K, Ishibashi-Ueda H, Yaku H, Nakayama Y. Autologous small-caliber "biotube" vascular grafts with argatroban loading: a histomorphological examination after implantation to rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2010;92(1):236-42. DOI: 10.1002/jbm.b.31510
- 10) Oie T, Suzuki H, Fukuda T, Murayama Y, Omata S, Kanda K, Nakayama Y. Tactile mapping system: a novel imaging technology for surface topography and elasticity of tissues or organs.

- Innovations (Phila). 査読有
2009;4(6):345-50.
DOI: 10.1097/IMI.0b013e3181c45bf9
- 11) Yamanami M, Yamamoto A, Iida H, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y.
3-Tesla magnetic resonance angiographic assessment of a tissue-engineered small-caliber vascular graft implanted in a rat. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2010;92(1):156-60.
DOI: 10.1002/jbm.b.31501
- 12) Nakayama Y, Yamanami M, Yahata Y, Tajikawa T, Ohba K, Watanabe T, Kanda K, Yaku H.
Preparation of a completely autologous trileaflet valve-shaped construct by in-body tissue architecture technology. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2009;91(2):813-8.
DOI: 10.1002/jbm.b.31460
- 13) Huang H, Zhou YM, Ishibashi-Ueda H, Takamizawa K, Ando J, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y.
In vitro maturation of "biotube" vascular grafts induced by a 2-day pulsatile flow loading. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2009;91(1):320-8.
DOI: 10.1002/jbm.b.31405
- 14) Oie T, Murayama Y, Fukuda T, Nagai C, Omata S, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y.
Local elasticity imaging of vascular tissues using a tactile mapping system. J Artif Organs. 査読有 2009;12(1):40-6.
DOI: 10.1007/s10047-008-0440-5
- 15) Sakai O, Kanda K, Takamizawa K, Sato T, Yaku H, Nakayama Y.
Faster and stronger vascular "Biotube" graft fabrication in vivo using a novel nicotine-containing mold. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 2009;90(1):412-20.
DOI: 10.1002/jbm.b.31300

〔学会発表〕(計9件)

- 1) 森脇健司、前川侑也、大家智恵、高見沢計一、福田達、村山嘉延、尾股定夫、上地正実、松井悠一、山南将志、神田圭二、中山泰秀
マイクロメカニクス的な再生度の評価手段としての走査型触覚顕微鏡の開発
第10回日本再生医療学会総会 2011年3月1-2日(東京、京王プラザホテル)
- 2) 森脇健司、前川侑也、大家智恵、高見沢計一、福田達、村山嘉延、尾股定夫、神田圭一、中山泰秀
走査型触覚顕微鏡を用いた内圧負荷に伴う動脈壁内部の弾性率分布変化の観察
第50回日本生体医工学会大会 2011年4月29-5月1日(東京、東京電気大学)
- 3) T. Moriwaki, T. Oie, K. Takamizawa, Y. Murayama, T. Fukuda, S. Omata, K. Kanda, Y. Nakayama.
Variation of local elasticity along the length of the aorta as observed by a scanning haptic microscope (SHM)
38th ESAO 2011(ヨーロッパ人工臓器学会) 2011年10月9-12日(ポルトガル、ポルト)
- 4) 高見沢計一、森脇健司、大家智恵、福田達、村山嘉延、尾股定夫、中山泰秀
生体作動類似環境下における動脈壁内弾性率の走査型触覚顕微鏡観察
第49回日本人工臓器学会大会 2011,11/25-27(東京、都市センターホテル)
- 5) Oie T, Moriwaki T, Murayama Y, Omata S, Uechi M, Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y
EVALUATION OF MECHANICAL PROPERTIES OF IN VIVO TISSUE-ENGINEERED PROSTHETIC HEART VALVES, "BIOVALVES"
37th Congress European Society for Artificial Organs 2009年9月8-11日(Macedonia, Skopje)
- 6) 森脇健司、大家智恵、高見沢計一、福田達、村山嘉延、尾股定夫、神田圭一、中山泰秀
走査型触覚顕微鏡(SHM)を用いた細胞外マトリックスレベルでの弾性率分布の比較
第48回日本人工臓器学会 2010年11月18-20日(仙台国際センター)
- 7) H. Suzuki, T. Oie, Y. Murayama, S. Omata, K. Kanda, Y. Nakayama
Development of tactile mapping system (TMS): Surface elasticity mapping of arteries in water.
36th Congress European Society for Artificial Organs 2009年9月2-5日(France, Comptegne)
- 8) 大家智恵、鈴木寿人、矢羽田侑希、山南将志、高見沢計一、渡辺太治、神田圭二、福田達、村山嘉延、尾股定夫、中山泰秀
循環器系再生医療におけるTMSの応用と可能性

第 24 回生体・生理工学シンポジウム(東北大学)

- 9) 鈴木寿人、大家智憲、福田 達、村山嘉延、尾股定夫、神田圭一、中山泰秀
水中での弾性率マッピングによる血管組織内のマトリックスの分布観察
第 47 回日本人工臓器学会大会 2009 年 11 月 12-14 日 (新潟コンベンションセンター)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高見沢計一 (TAKAMIZAWA KEIICHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・生体医工学部・研究員

研究者番号 : 1 0 1 6 3 3 1 2

(2) 研究分担者

神田圭一 (KANDA KEIICHI)

京都府立医科大学・心臓血管外科・講師

研究者番号 : 6 0 2 9 5 6 4 9