

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 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591632

研究課題名（和文）レーザー加工による極細繊維とメビオールジェルを用いた人工的生体血管の作成

研究課題名（英文）Development of artificial vessels by Mebiolgel and nanosheets prepared by laser supersonic multi-drawing

研究代表者 進藤 俊哉 (SHINDO SHUNYA)

山梨大学・医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：50206322

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、臨床で使用可能な小口径の人工血管を開発するための基礎的データを得ることにある。大伏在静脈の平滑筋細胞はメビオールジェル内で 3 次元培養可能であった。しかし、細胞培養後、メビオールジェル内から細胞層のみの立体構造（重層構造）を保ちながら、細胞層を得ることは困難であった。その理由としてジェル内での培養細胞の密度が低いためであると考え、細胞密度を上げることを目指した。培養条件の変更、増殖因子、細胞外基質を使用した、一定以上の密度が得られなかった。メビオールジェルを利用して細胞層のみの重層化構造を得るにはさらなる条件の検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to obtain a multilayered cell culture. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) grown in control media with Mebiolgel began attachment after 2 hours, continued to increase in number. After grown up, we tried getting only cells. However, it is difficult to obtain only multilayered cells without Mebiolgel under several conditions. We need more concentration of the cells in a plate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：人工血管、メビオールジェル

1. 研究開始当初の背景

高齢者人口の増加と糖尿病患者の増加に
より、本邦における最近の血管疾患患者の疾

患構造が変化しつつある。すなわち、閉塞性
動脈性硬化症に患者が増加するのみならず、
細動脈にまで広がる瀰漫性病変が頻繁に見

られるようになってきた。したがって閉塞性動脈硬化症による慢性動脈閉塞により発症した重症虚血肢患者では、細動脈への血行再建手術の可否がその患者の QOL を決める重要な要素となっている。膝上へのバイパスに対する人工血管のグラフト開存率は大伏在静脈と同程度の開存率が示されている。しかし、膝下へバイパスにおいては明らかに大伏在静脈グラフトの開存率が良好である。再バイパス時や冠動脈バイパス後の血行再建時では大伏在静脈がすでに使用されており、代替になるグラフトが必要とされる。特に、膝下バイパス手術では、満足できる開存率を有する人工血管がなく、自家静脈グラフトに匹敵する人工血管グラフトの開発が必要とされる。

2. 研究の目的

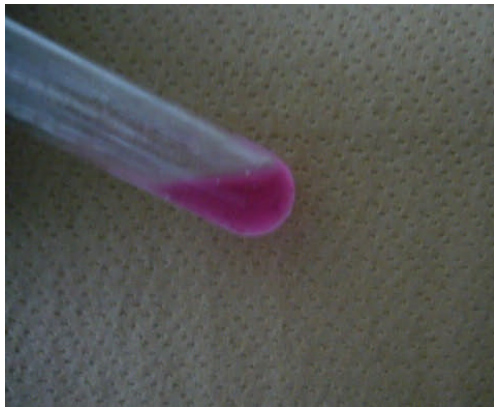
現在、臨床的に使用可能な小動脈用の人工血管で大伏在静脈に匹敵するグラフトは存在しない。そのため、開存率を改善させるため、人工血管の内側を様々な方法でコーティングを行い、抗血栓性化し開存率を向上させることが試みられてきた。しかし、現在までのところ定まった方法はない。また、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞でグラフトの内壁を覆い、人工血管の開存性を高めることが行

われてきた。しかし、正常の細胞を使用した場合、通常の方法では内壁を細胞一層の単層でしか覆うことができない。そのため、実際に生体内へ植えこんだ場合、すぐに人工血管からこの細胞層が剥がれてしまい人工血管の表面が露出してしまい血栓を形成し最終的に閉塞してしまう。この現象を避けるため、今回、われわれは、平滑筋細胞の3次元培養をおこない、重層化した細胞層で最終的に人工血管を被覆することを目標とした。本研究の目的は、臨床で使用可能な小口径の人工血管を開発するための基礎的データを得ることにある。

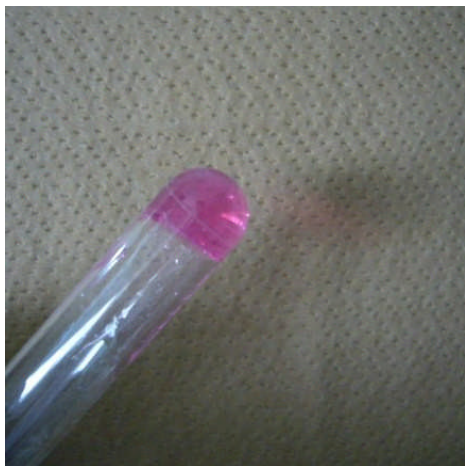
3. 研究の方法

大伏在静脈から平滑筋細胞を採取し初代培養を施行し cell line を確立したものを今回まず使用することとした。正常細胞の重層培養を行うため3次元培養の実績のあるメビオールジェルを使用することとした。

メビオールジェル（池田理化）は、0℃から15℃以下では流動性のあるゾル状態、25℃以上になると流動性のないゲル状態になる。ゾル状態では培養液、細胞など混合することができる。ゾル、ゲルの変化は温度変化に対応して可逆性である性質を持っている。



ゾル状態 (15°C以下で流動性がある状態)



ゲル状態 (37°Cの状態では流動性がない状態)



培養プレート上で培養中の血管平滑筋細胞

37°Cのゲル状態の時に、細胞、培地、メビオールジェルをインキュベートすることにより3次元の培養が可能と報告されている。

報告例では、軟骨細胞の3次元培養を行い、実際に立体構造（塊状構造）が構築されることが示されている

まず低温保存(4°C)しゾル化（液状化）にしたメビオールジェルに、平滑筋細胞と、ウシ胎児血清混合し、インキュベーター内に静置、ゲル化させメビオールジェル内で3次元培養を行った。

4. 研究成果

低温保存(4°C)でゾル化したメビオールジェルと大伏在静脈由来の平滑筋細胞と、ウシ胎児血清 20%と混合し、インキュベーター内に静置しゲル化させメビオールジェル内で培養を行った。細胞がコンフルエント後、重層化した細胞層を得るため再度低温化

(4°C)し、ジェルのみを取り除こうとしたが細胞を重層化したまま抽出することができなかった。その理由の一つとして細胞密度が低く、細胞同士の密着が少ないと判断した。対策として培養条件（FBS濃度、期間）を変更し、さらに、増殖因子（PDGF-BB）、細胞外基質（コラーゲン、フィブロネクチン）を使用したが高細胞密度はある一定以上にはできなかった。つぎに、細胞種を変更することとし、ヒト正常大動脈の平滑筋細胞の cell line を使用した(Lonza)。大伏在静

脈の平滑筋細胞同様ある一定密度まで培養可能であった。しかし、その細胞密度で重層した細胞層として得ることが不可能であった。以上より、メビオールジェルを利用して細胞層のみの重層化構造を得るにはさらなる条件の検討が必要であると考えられた。

(3)連携研究者
松原寛知 (MATSUBARA HIROCHIKA)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号:00374166

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)

[学会発表] (計3件)

- ① Sakakibara K, Matsumoto M, Kato K, Kaga S, Suzuki S: Three-dimensional culture of vascular smooth muscle cell (VSMC) using a thermo reversible polymer (Mebiol gel) (CTCOMCON 2010. 3. 1, New Delhi)
- ② 榊原賢士、進藤俊哉、蓮田憲夫、松原寛知、加賀重亜喜、井上秀範、緒方孝治、鈴木章司、松本雅彦、窪田健司: メビオールジェルを用いた血管平滑筋細胞の3次元培養の試み (山梨医学会 2009. 3. 9, 甲府)
- ③ 吉岡 祐樹、榊原賢士、松原寛知、進藤俊哉、松本雅彦、窪田健司、鈴木章泰: CO2レーザー超音速マルチ延伸法で作製したPLLA ナノファイバーシートでの細胞培養 II (第19回ポリマー材料フォーラム, 2010. 12. 3, 東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

進藤 俊哉 (SHINDO SHUNYA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員
研究者番号: 50206322

(2)研究分担者

榊原 賢士 (SAKAKIBARA KENJI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40419338