

## 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6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592289

研究課題名（和文） ティッシュエンジニアリングチャンバーを用いた血管柄付き皮弁作製の実験的研究

研究課題名（英文） Experimental study of vascularized flap preparation in a tissue engineering chamber

研究代表者

田中 嘉雄（TANAKA YOSHIO）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50171806

研究成果の概要（和文）：

Tissue engineering chamber（以下、TEC）を再生の場として、動脈血管束、人工真皮、FGF-2、多血小板血漿（PRP）を併用して、独自の栄養血管を有した軟組織を再生する方法を検討した。実験群は、コントロール群、非活性化PRP群、活性化PRP群、活性化PRP群+FGF-2群、非活性化PRP+FGF-2群の6群（n=5）に分け、再生組織の量、器質化の成熟度、血管新生について検討した。結果：血管付軟組織の再生組織量はcontrol群  $1.13 \pm 0.33 \text{cm}^3$ 、非活性化PRP群  $1.79 \pm 0.35 \text{cm}^3$ 、活性化PRP群  $1.48 \pm 0.22 \text{cm}^3$ で、非活性化PRP群がcontrol群に比し有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。人工真皮の器質化も非活性化PRP群で進んでいた。TECを用いた血管柄付き軟組織再生において、活性化PRPよりも非活性化PRPが有用であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated a method to regenerate soft tissue flap in a tissue engineering chamber (TEC) as a site of regeneration by concomitantly using an AV bundle, artificial dermis, FGF-2, and platelet-rich plasma (PRP). The samples were divided into control, FGF-2, non-activated PRP, activated PRP, non-activated PRP+FGF-2, and activated PRP+FGF-2 groups, and the amount of regenerated tissue, degree of maturation of organization were evaluated. Results: Non-activated PRP induced more satisfactory regeneration of vascularized soft tissue than Activated PRP. Regenerated tissue with the highest degree of maturation was obtained in the non-activated PRP+FGF-2 group. The results indicate that the simultaneous use of non-activated PRP and FGF-2 is advantageous for the regeneration of vascularized soft tissue in a TEC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：形成外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、形成外科学

キーワード：多血小板血漿、FGF-2、細胞増殖因子、細胞外マトリックス、再生組織

## 1. 研究開始当初の背景

外傷・手術などで生じた組織欠損部には、組織移植による再建が必要となる。この時、皮膚、脂肪、筋肉、骨、軟骨組織などの自家組織が用いられるが、その採取できる量には限度があり、犠牲も伴う。この問題を解決する方法として再生医療 (tissue engineering) が注目され、骨・軟骨・皮膚の再構築を目的とする研究が広く行われている。実際の臨床では栄養血管を有する組織移植 (自家遊離複合組織移植) が再建の主流であることを考えると、将来的には血管が組み込まれた組織 (器官) の再構築が望まれる。しかしながら、独自の栄養血管を有する再生組織 (器官: organoid) の報告は未だ見られない。これは、組織と血管の再構築を同時に行うという技術的に困難な問題点がまだ技術的に解決されていないからである。われわれは栄養血管を有する再生組織を作製する方法として、tissue engineering chamber 内に既存の vascular carrier (動静脈血管束) を導入し、これに細胞外マトリックス (人工真皮) と細胞 (in vivo) とを組み合わせる方法が有用であることを報告してきた。これまでの研究結果から、tissue engineering chamber 内の環境が動静脈血管束からの血管新生と移植細胞や組織の増殖・分化 (mechanotransduction) に促進的に働くことが示された。この chamber の特徴を利用してわれわれは血管付き皮膚 (prefabricated engineered skin flap) を実験的に作製し報告した。この血管を有する組織の再生は独創的で先進

的な研究である。近年、細胞増殖因子として多血小板血漿 (PRP) の有用性が報告されている。そこで、実験動物にウサギを用いて、軟部組織再生における PRP の投与方法と FGF-2 の併用の効果について検討した。

## 2. 研究の目的

本研究は、独自の栄養血管を有した軟部組織再生を目的とする。これまでの予備研究結果から多血小板血漿 (PRP) と人工真皮の組み合わせが tissue engineering chamber 内での組織再生に有用であることが判明した。今回、PRP の活性化と非活性化の違い、及び FGF-2 の併用効を検討し、臨床応用へ繋げる研究とする。

## 3. 研究の方法

実験モデル

- 1) 実験動物：雄ウサギ (体重 2.5kg~3.0kg)
- 2) 麻酔：マスク麻酔による全身麻酔
- 3) 再生の場：多孔性 Tissue engineering chamber (以下 TEC) 内 (サイズ: 4.2×3.2×0.5 cm、面積 9.4cm<sup>2</sup>、体積 4.7cm<sup>3</sup>、孔サイズ 1.5mm)。
- 4) Vascular carrier: 動静脈血管束 (伏在動脈、内側伏在静脈)。
- 5) 細胞外マトリックス：人工真皮 type I コラーゲンスポンジ (厚さ 3mm, 70-110- $\mu$ m pore size)。
- 6) 細胞増殖因子：FGF-2 100  $\mu$ g/chamber と多血小板血漿 (PRP) 3 ml/chamber  
多血小板血漿 (PRP) は、抗凝固剤クエン酸デキストロース (ACD) 4ml を入れた 40ml シリンジを準備して、大腿動脈から 26ml の自家採血し、これを遠心分離機にかけ (Magellan のシステムを使用) PRP を 3ml 作製 (回収)

した。PRP の活性化は、自家血清と 10%塩化カルシウムを 3:1 の割合で混じたものを自家トロンビンとして用い、PRP に対して自家トロンビン液を 10:1 の割合で添加して行った。実験グループ (n=7)

Control group : TEC+ 人工真皮+heparin saline

Group 1: TEC+人工真皮+ FGF-2:200  $\mu$ g + heparin saline

Group 2:TEC+人工真皮+ 非活性化 PRP3ml + heparin saline

Group 3:TEC+人工真皮+ 活性化 PRP3ml + heparin saline

Group 4:TEC+人工真皮+非活性化 PRP3ml + FGF-2 200  $\mu$ g + heparin saline

Group 5:TEC+人工真皮+活性化 PRP3ml + FGF-2 200  $\mu$ g + heparin saline

#### 7) 検討項目

大腿皮下に TEC 実験系を埋入し、4 週目に再生組織を取り出して以下の検討を行った。

- ① 再生組織の組織学的検討:再生組織を 10%ホルマリンで固定後、AV bundle の走行と直角方向に 3 mm 毎のブロックを作成。この各ブロックから厚さ 10  $\mu$ m の組織標本作製し、HE 染色と Masson's trichrome 染色を行って再生組織の器質化の成熟度、血管新生を検討した。
- ② 再生組織量の測定:上記実験群の Control 群、Group 1~3 で得た各標本の再生組織の面積を、画像解析ソフト WinROOF (Ver. 6.1) を用いて測定し、Planimetry 法で再生組織の体積を求めた。統計学的処理は一元配置 ANOVA を行った後、多重比較検定を行った。P<0.05 をもって有意差ありと判定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 再生組織の組織学的検討:

血管束の周囲にリンパ球、好酸球、多核巨細

胞、マクロファージが多数見られ、炎症反応層が形成されていた。炎症反応層の外側には同化されていない人工真皮由来の膠原線維と宿主由来の膠原線維とが種々の割合で混じり合う膠原線維形成層が見られた (図 1)。血管束由来の新生血管は、炎症反応層と膠原線維形成層を縦断するように末梢に進展していた (図 2)。再生組織の最外側には chamber の pore から侵入した新生血管と線維芽細胞によって薄い肉芽組織層が形成されていた。Control 群、非活性化 PRP 群、活性化 PRP 群ともに、血管束の外側に炎症反応が見られたが、特に PRP (活性化、非活性化) 群で高度で、FGF-2 を併用した場合には、血管束から最外側までこの炎症反応層が見られた。なお、この炎症反応は 7 週時点ではほぼ宿主由来の膠原線維に置換していた (図 3)。以上から、この再生組織再生は、①添加 PRP の脱顆粒によって放出された細胞増殖因子によって炎症反応が惹起され、血管束から炎症細胞の走りが促進される、②人血管束から遊走した炎症細胞は人工真皮に反応 (異物) し、炎症反応が長期化する (6-7 週)、③その間も徐々に血管束から新生血管が末梢に進展し、この新生血管から炎症細胞が遊走して同様の炎症反応が新生血管周囲の人工真皮に生じる、④血管新生が弱い部位 (外側層) では、炎症反応は弱く、fibroblast から産生された宿主由来の膠原線維に置換される、ことが明らかとなった。なお、これらの経過は、創傷治癒過程と一致する。

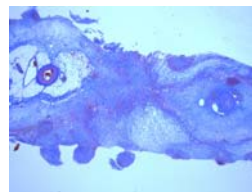


図 1 活性化 PRP 群 Masson's Trichrome 染色 (x1.25)

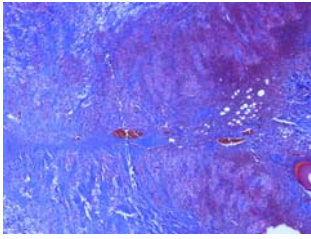


図2 活性化PRP群 Masson's Trichrome 染色 (x4) 新生血管の末梢への進展が見られる。

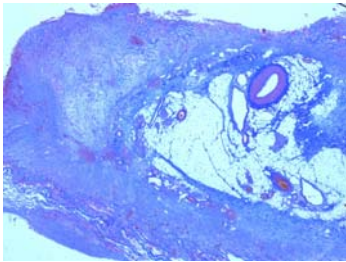


図3 活性化PRP群 Masson's Trichrome 染色 (x2) 7週で採取した組織。

## 2) 再生組織量：

Control群  $1.13 \pm 0.33 \text{cm}^3$ 、非活性化PRP群  $1.79 \pm 0.35 \text{cm}^3$ 、活性化PRP群  $1.48 \pm 0.22 \text{cm}^3$ で、非活性化PRP群がcontrol群に比し有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。(図4)。なお、非活性化PRP群と活性化PRP群とに有意差が見られなかった。このことは、PRPは人工真皮に添加する操作で脱顆粒が生じ細胞増殖因子を遊出することを示している。PRPを活性化して、ゲル化させることはPRP自体を用いる場合にはその操作性から有用であるが、人工真皮に添加する場合には活性化の必要性がないと考えられる。活性化群と非活性化群との再生組織量に有意差が見られた事は、非活性化群における細胞増殖因子の徐放効果を示唆している。

以上から、Tissue engineering chamber 内で既存の血管束と人工真皮を用いて血管柄付き軟組織 (soft tissue flap) を再生する方法として、細胞増殖因子にPRP(非活性化)を用い、同時にFGF-2を併用する方法が有用であることが判明した。このFGF-2は徐放化するか否かについては今後の検討を要する。

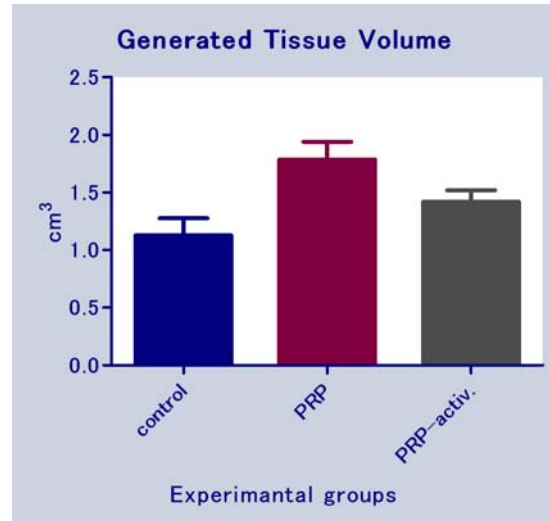


図4.

## 5. 主な発表論文等

現在、Dataを集積、実験を補遺し、学会発表の準備をしている。研究成果は日本形成外科学会基礎学術集会で発表予定である。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 嘉雄 (TANAKA YOSHIO)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：50171806

### (2) 連携研究者

上野正樹 (UENO MASAKI )  
香川大学・医学部・準教授  
研究者番号：

濱本有祐 (HAMAMOTO YHUSUKE)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：

木暮鉄邦 (KOGURE TETUKUNI)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：