

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03016

研究課題名（和文）生体組織由来脱細胞化小口径動脈グラフトの開発と大動物実験による検証

研究課題名（英文）Development of decellularized small-diameter arterial grafts and evaluation in large animal experiments

研究代表者

岩崎 清隆（Iwasaki, Kiyotaka）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20339691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：詰まった血管の先に血液を送るために用いる小口径の人工血管に対するニーズは高いが、合成繊維等を利用した内径3-4mmの小さい血管径の人工血管では、血が固まり閉塞する問題があり、臨床ニーズを満たす治療機器は開発されていない。本研究では、動物の血管組織を利用し、ヒトに応用する際に拒絶反応の原因となる細胞成分を除去する「脱細胞化技術」を応用し、生体本来の血管構造を保持した脱細胞化組織利用小口径人工血管の開発に取り組んだ。大動物実験で血管が血が固まり閉塞することなく3カ月間開存する脱細胞化組織利用人工血管を開発することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、動物の血管組織を利用し、拒絶反応の原因となる細胞成分を除去する脱細胞化技術と生体組織を滅菌する技術を応用し、生体本来の血管構造を保持した脱細胞化組織利用小口径人工血管を研究開発した。本研究において、大動物実験で血管が閉塞することなく3カ月間開存する脱細胞化組織利用人工血管を作製する技術を開発することに成功した。開発した生体組織利用脱細胞化小口径人工血管は、血管治療の新たな道を拓いていく方法論となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There is a great demand for small-diameter artificial blood vessels to provide blood to the ends of occluded blood vessels. However, artificial blood vessels with a small inner diameter of 3-4 mm made from synthetic fibers and other materials have issues with thrombus formation and occlusion, and no medical device has been developed to meet clinical needs. In this study, we applied decellularization technology, which removes cellular components that cause rejection when animal vascular tissue is used for human applications, to develop small-diameter artificial blood vessels using decellularized tissue that retains the original biological structure. In a large animal experiment, we succeeded in developing an artificial blood vessel using a decellularized small-diameter vascular graft that remained open for three months without occlusion.

研究分野：医用生体工学・生体材料学

キーワード：脱細胞化組織 小口径人工血管 医用機械工学

1. 研究開始当初の背景

全身性疾患である動脈硬化症の根治的治療法は動脈グラフトによる再建であるが、直径 3-4mm の合成繊維製の小口径人工血管では血栓による閉塞が課題であり、実用化に至っていない。超高齢社会を迎え、心血管疾患や下肢動脈疾患を併発する患者が増加傾向にあり、バイパスによる血行再建に用いる長期間開存する小口径動脈グラフトの開発は極めて重要な研究課題である。

申請者は、独自の脱細胞化処理と滅菌処理を施したウシ由来腱組織を用いた整形外科領域でのヒツジ膝前十字靭帯再建実験で、脱細胞化組織に細胞が入り 1 年の再建期間で自己組織化することを組織学的および力学的に明らかにしている。小口径動脈脱細胞化血管の開発においては、まず、冠動脈バイパスや下肢バイパスに用いる小口径の動物由来血管をどこから採取できるかが課題であるが、動物組織を調査した結果、ウシから小口径血管を採取できることが分かった。

人工材料を用いた小口径人工血管の開発における最大の課題は血栓閉塞である。申請者らは、独自技術である“脱細胞化処理”と“滅菌処理”で生体の動脈構造が保持できれば、植込一定期間後には血管内腔が内皮細胞で覆われることが期待できると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、3 年間の実施期間で、内径 3mm 程度のウシ血管の構造と力学的特性（血管コンプライアンス）を保持した脱細胞化動脈血管を開発すること、および、脱細胞化処理および滅菌処理した脱細胞化小口径動脈血管を用いたブタ大動物実験で、3 カ月の開存を得ることを達成することを目指した。具体的には、1 年目は、研究者代表者の基盤技術を応用してウシ小口径動脈血管を脱細胞化及び滅菌処理し、組織構造と力学的特性を保持する処理条件を決定することを目的とした。2 年目は、ブタを用いてバイパス術を行い、開存性を評価し、1 カ月開存した場合には、組織染色を行い内皮細胞の有無、微小血管の構築、平滑筋細胞、線維芽細胞の浸潤の程度を評価することとした。3 年目は、脱細胞化組織の処理を高度化し、3 カ月の開存を目指した。

3. 研究の方法

(1) 組織構造と力学的特性を保持した脱細胞化小口径血管の開発

1 年目は、内径 3mm のウシ由来血管を、マイクロ波照射および拍動循環の双方を同時に作用させて、低濃度のデオキシコール酸溶液を用いて脱細胞化処理する方法を確立させることとした。脱細胞化組織中の残存 DNA 量が、これまでの米国で市販されている脱細胞化ブタ小腸粘膜下組織の臨床経験で炎症が起こらない基準とされている乾燥重量当たり 50ng/mg (Carpo PM, Biomaterials 2011) となるように、処理条件を決定することとした。脱細胞化して凍結乾燥した組織を生理食塩水で水和させて元の組織に戻し、血管内腔を生理食塩水で満たして内圧を上昇させた時の直径の変化の関係を測定し、小口径血管の血管コンプライアンスが維持できる処理条件を明らかにすることを目指した。

(2) 大動物実験による血管開存性の評価

2 年目からブタを用いた大動物実験を本格的に実施することとした。ブタの腹部大動脈を脱細胞化血管で再建し、開存性を評価した。1 カ月開存できた時点でブタを犠牲死させて脱細胞化動脈血管を摘出して組織染色を行い、血管内腔の内皮細胞による被覆、動脈血管組織内の微小血管の構築、平滑筋細胞、線維芽細胞の浸潤について評価した。

3 年目は、小口径動脈血管の脱細胞化処置と滅菌処理を高度化・最適化しつつ、ブタ大動物実験で、3 カ月の開存を目指した。閉塞する場合には、いつまで開存が可能なのか、どこで閉塞するのかを分析し、脱細胞化処理および滅菌処理の改良を図ることとした。3 カ月の開存が得られた場合には、脱細胞化動脈血管を摘出し、von Willebrand factor, α -smooth muscle actin, Vimentin 等の染色を行い、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞の浸潤状況を分析した。また、Hematoxylin Eosin, Masson Trichrome, Elastica van Gieson 染色を行い、微小血管の構築や弾性繊維の構築等を分析した。

4. 研究成果

研究代表者独自の組織構造を保持して脱細胞化処理する技術と滅菌技術を基盤として脱細胞化処理条件と滅菌条件を詳細に検討し、血管コンプライアンスを保持できる処理条件を確立できた。本研究で目標に掲げたブタを用いた大動物実験で血管の血栓による閉塞が起こらず 3 カ月間開存する脱細胞化血管の Proof of Concept を実証するために精力的に動物試験を行った。2 年目に 1 週間開存できる脱細胞化小口径血管の開発に成功したことを踏まえ、組織の処理条件を洗練させ、また、動物試験の手技にも工夫を重ねた。動物試験の手技に工夫を加えた結果、1 月間開存 3 例、3 カ月開存 2 例を得ることができ、目標を達成することができた。Hematoxylin Eosin 染色を行ったところ、再建 1 か月後の組織において、脱細胞化血管内にレシピエントの細胞が浸潤していることがわかった。また、術後 3 か月後には血管内腔面に CD31 染色において陽

性となる細胞が存在していた。また、vimentin 染色において血管組織の内側寄りの組織に陽性細胞が多く存在していた。本研究で開発した脱細胞化技術と滅菌技術を用いた生体由来脱細胞化血管は、血管治療の新たな道を拓いていく方法論となる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1 . 発表者名 M. Quan, S. Imai, T. Nakamura, K. Uchiyama, H. Hatanaka, K. Iwasaki
2 . 発表標題 Microwave and pulsatile circulation decellularization treatment on bovine arteries
3 . 学会等名 43rd Annulus International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 (3) S. Imai, T. Nakamura, K. Syukuzawa, R. Nagami, S. Ota, S. Fukushima, T. Ohki K. Iwasaki
2 . 発表標題 Development of Bovine decellularized blood vessels
3 . 学会等名 45th Annulus International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (国際学会)
4 . 発表年 2023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
研究分担者	宿澤 孝太 (Shukuzawa Kota) (80647032)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	大木 隆生 (Ohki Takao) (50260948)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	國原 孝 (Kunihara Takashi) (80725268)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	
研究分担者	坪子 侑佑 (Tsuboko Yusuke) (40809399)	早稲田大学・理工学術院・次席研究員（研究院講師） (32689)	
研究分担者	弓場 充 (Yuba Mitsuru) (50875367)	早稲田大学・理工学術院・助手 (32689)	

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