

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 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659322

研究課題名（和文） PVA水素ゲルを基材とした新しい小口径人工血管の開発

研究課題名（英文） The development of small diameter artificial vessels consisted with PVA hydrogel

研究代表者

田原 真也 (TAHARA SHINYA)

神戸大学・医学部付属病院・教授

研究者番号：60207206

研究成果の概要（和文）：

PVAにより作成された口径3mmの人工血管を用いてラットの腹部大動脈に移植した。術直後、内腔は開存しており、血圧に同期した血管の拍動を認めたが数日の後、移植血管は全て閉塞した。本研究結果を踏まえ、また文献を併せた考察により、やはり血管内皮細胞の定着が必須であると考え、内皮細胞の定着の有無を検討するためにPVAチューブと血管内皮細胞とを回転培養させた結果、定着しない事が明らかとなった。そこでPVAによるマテリアルの作成過程においてコラーゲンのフラグメントを埋入したものと血管内皮細胞を回転培養したところ、内皮細胞の定着が認められた。加えて血管平滑筋細胞も同様に回転培養を行った結果、平滑筋細胞の定着も認められた。

研究成果の概要（英文）：

The small diameter (3mm) conduit consisted with PVA hydrogel was transplanted to rat abdominal artery. Immediately after the transplantation, beating was observed, however, all conduits were occluded in a few days. Next, endothelial cells were co-cultured with PVA sheet. No endothelial cells were adhered to PVA sheet. The collagen fragment was embedded into PVA hydrogel and endothelial cells were co-cultured with rotation. These cells were, then, adhered and migrated. In addition, smooth muscle cells were co-cultures, and these cells also adhered to the collagen-PVA sheet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

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：再生医学

1. 研究開始当初の背景

これまでにわれわれは小口径人工血管の開発に取り組み、特許の申請にまで至った。わ

れわれの研究モデルでは脱細胞化組織を用いており、動物実験レベルでは100%の開存率と血管内皮細胞層（内膜）だけでなく、

血管平滑筋層（中膜）の再生を認め、完全な小口径再生血管を得ることができた。本研究を行ってきた上で、再生血管を考える上でいくつかの知見が得られた。そのうち、特に重要なものとして、1. 適切な保存された足場（スキャフォールド）を提供すること、2. 血管内皮細胞が定着すること、3. 適切な弾性・強度を持ち、拍動や生理的環境に併せた拡張・収縮が行えること、などが挙げられる。共同研究者の堤は、様々な生体を模したモデルを作成してきた。最近ではポリビニルアルコール（以下 PVA）を主要な材料とした微小血管モデルを作成し、特許を申請した。当初は血管吻合の練習用や血管穿刺の練習用を想定され、より物性の近いものとして開発され現在では製品化されている。ところが、触感・弾性・強度などは native な血管に極めて近く、また、素材が生体内分解吸収性物質である PVA であるため、後述するようにいくつかの点をクリアすれば小口径人工血管として利用できる可能性が極めて高いと考えられたため、われわれがこれまでに得た知見と、PVA 人工血管モデルとをコラボレートさせることで、極めて優れた小口径人工血管が開発できるのでは、と考えた。

2. 研究の目的

近年、外科手術の発展・循環器系疾患の増加と共に人工血管の需要は高まる一方である。特にヨーロッパでは死因の4割を血管疾患が占め、また、世界中で年間に20万肢が血管障害に伴い切断されている。心筋梗塞や小児先天奇形などの冠動脈疾患や透析のシャント作成、下肢のバイパス術時に用いられる、さらにはわれわれ形成外科医が行う遊離組織移植に用いられる血管グラフトに求められる口径は3mmから4mmの物が多い一方、人工血管が利用できないために自己の静脈グラフトなどが用いられている。

小口径人工血管が実用化されるためには、①長期にわたり閉塞しないこと、②圧力に耐えられること（最低でも120mmHg）、③柔軟であり、手術操作に適していること、④弾力があり血圧の変動に生理的に対応できること、⑤生産工程が単純で安価であること、などが挙げられる。これまで ePTFE などの合成素材を利用した人工血管が実用化され、医療現場で多く用いられている。しかしながら開存率は決して高くなく、また、長期にわたり抗血栓療法が必要になること、口径6mm以下の人工血管の開発には至っていないことなど、様々な課題が山積している。

これまでにわれわれは新しい脱細胞化方法で作成した人工血管の開発に成功し、現在、特許申請を行っている。これらの研究により得られた知見を基に、PVA を用いた小口径人工血管の開発を目指している。PVA は前述の

とおり、生体にとって毒性が低く、また、自在に形状を操作でき、また、昭和の時代より洗濯糊の主材料であるように非常に安価な高分子化合物である。共同研究者の堤により物性が酷似した PVA を用いた血管のシュミレーションモデルが作成された。手術操作の行いやすさは native の血管と遜色ない。PVA の物性的特徴より、生体親和性も自在に操作でき、脱細胞化血管によって得られた知見を応用することで細胞組織工学的に生体内で血管を再構築できると考える。また弾性に富み、定着した血管内皮細胞および血管平滑筋に伸縮刺激を加えることができ、平滑筋の分化にも最適な足場を提供できる。さらには、PVA は生体内分解吸収性物質であり、いずれ再生血管として完全に自己組織に置き換わることを期待できる。これらの技術を組み合わせる事で、生体内に移植後の組織再生型の人工血管の開発を目指した。

3. 研究の方法

実験動物への移植

実験動物にはラット（Wistar 系メス成体）を用いた。

- ① ラットの腹腔内に麻酔剤を投与したのち、開腹・後腹膜に到達し腹部大動脈を約2cm 剥離・露出させた。
- ② 血管クリップで近位側/遠位側をクランプしたのちに血管を切離した。
- ③ 顕微鏡下に口径3mmのPVA製人工血管およびテフロンコートチューブを9-0 ナイロン糸で吻合した。
- ④ 数日の経過の後に移植された血管を露出させ、開存の有無について確認を行った。

接着培養

- ① 各細胞を専用の培地で80%コンフルエントになるまで培養し、トリプシンで剥離後、セルカウンターを用いて細胞数を測定した。
- ② SIGMA 社の PKH26 Red Fluorecent Cell Linker kit を用いて細胞を染色した。
- ③ コラーゲンをコートした PVA を3mm 角ほどのサイズに切った物を6cm ディッシュに PVA 置き、5分ほど風乾して貼りつけた。
- ④ それぞれの専用培地5ml とアンピシリンを加えた。
- ⑤ 2日間で回収用は 1.5×10^5 cells/dish、7日間で回収用は 7.35×10^4 cells/dish となるように細胞を播種した。

回転培養

- ① 各細胞を専用の培地で80%コンフルエントになるまで培養し、トリプシンで剥離後、セルカウンターを用いて細胞数を測定した。

- ② SIGMA 社の PKH26 Red Fluorecent Cell Linker kit を用いて細胞を染色した。
- ③ コラーゲンをコートした PVA を 3mm 角ほどのサイズに切った。
- ④ フィルター付きの 50ml 遠心管にそれぞれの専用培地 10ml とアンピシリンを加えた。
- ⑤ 5×10^5 cells/tube となるように細胞を播種した。
- ⑥ インキュベータ内のローテーターにセットし、回転させながら培養した。

共通

- ① 2, 3 日に一度、培地、アンピシリンを交換した。
- ② 培養 2 日、7 日目に PVA を回収し、10% 中性緩衝ホルマリンで 10 分間固定した。
- ③ PBS で洗浄後、DAPI で染色した。
- ④ メスで細かく切り、蛍光封入剤をかけ、蛍光顕微鏡で観察した。

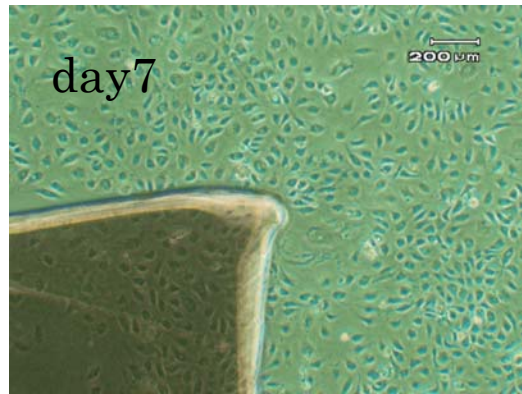
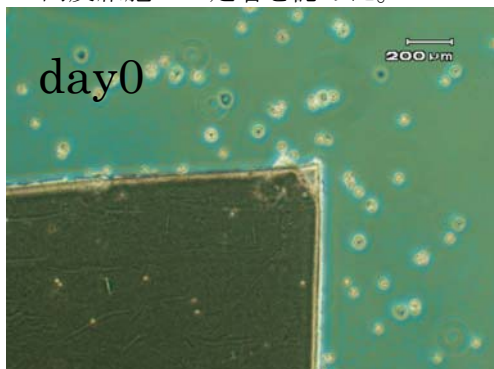
4. 研究成果

① 動物移植実験

PVA 人工血管を実験動物に移植した所、全例で血管内血栓を認めた。また、テフロンコーティングチューブにおいても同様に、移植直後は開存がみられたが、2 週間後に確認を行った所、全てにおいて閉塞が認められた。以上より、人工物では内皮細胞の定着が認められず、容易に血栓化することが示唆された。したがって、合成血管の利用においては血管内皮細胞の定着が必要であると考えられ、培養内皮細胞の定着化を検討する事とした。

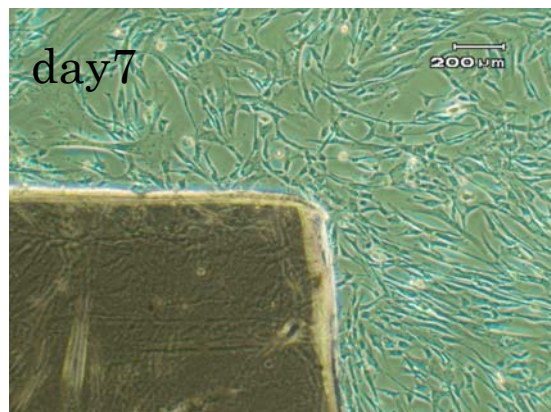
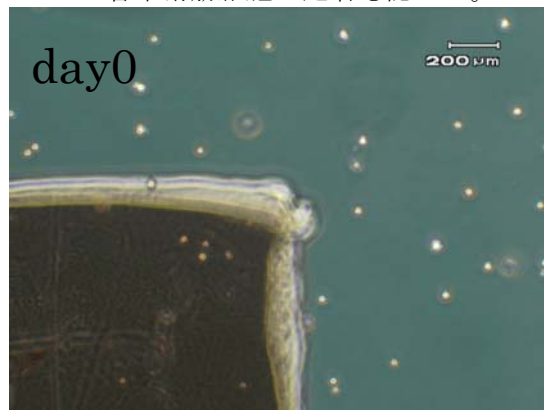
② 細胞培養実験

- i. PVA ハイドロジェル+血管内皮細胞
回転培養系を用いて、血管内皮細胞と PVA ハイドロジェルとを混じて培養を行ったところ、細胞の定着は認められなかった。
- ii. コラーゲンフラグメント含有 PVA ハイドロジェル+血管内皮細胞
i と同様に回転培養系を用いて、コラーゲンフラグメントを埋入した PVA ハイドロジェルを用いた場合、血管内皮細胞への定着を認めた。



図：上段は培養 0 日。細胞の定着は認めない。下段は培養 7 日目。血管内皮細胞がコラーゲン含有 PVA ハイドロジェル上に定着している。

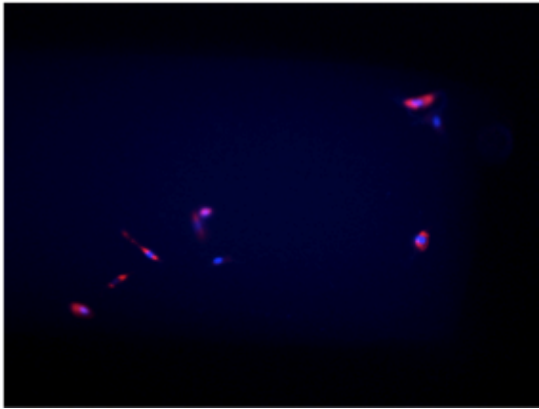
- iii. コラーゲンフラグメント含有 PVA ハイドロジェル+血管平滑筋細胞
i, ii と同様に回転培養系を用いてコラーゲンフラグメント含有の PVA ハイドロジェルと共培養を行った所、血管平滑筋細胞の定着も認めた。



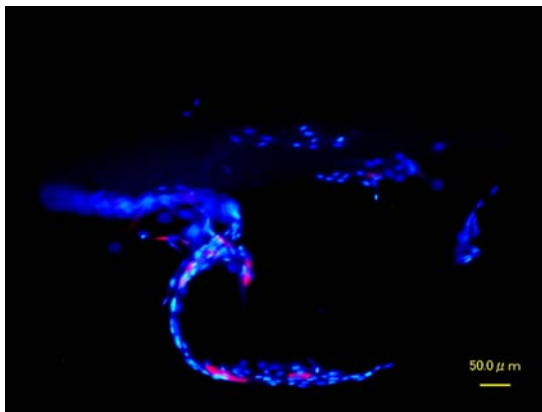
図：上段は培養 0 日。細胞の定着は認めない。下段は培養 7 日目。血管平滑筋細胞がコラーゲン含有 PVA ハイドロジェル上に定着している。

補足：

培養線維芽細胞も同様に定着を認めた。
また、接着培養および回転培養においての細胞の定着を検討した結果、回転培養を用いた場合の方がより定着を認めた。



培養線維芽細胞（接着培養）
少量の細胞の定着を認める。



培養線維芽細胞（回転培養）
接着培養に比して多くの細胞の定着を認める。

以上の結果より、

- ① 開存率を高める為には血管内皮細胞の定着が必要である。
- ② PVA ハイドロジェル単体では血管内皮細胞の定着は見込めない。
- ③ PVA ハイドロジェルにコラーゲンフラグメントを埋入した場合、血管内皮細胞のみならず平滑筋細胞の定着も認めた。
- ④ 回転培養系の方が接着培養系よりも細胞の定着率が高い事から、実際に移植を行った場合に血液中の内皮細胞前駆細胞の定着が見込まれる。
- ⑤ PVA ハイドロジェルはしなやかで移植した場合に拍動を認める事から、血管平滑筋細胞の定着後、収縮・弛緩などの運動による平滑筋細胞の分化に有利に働く可能性がある。

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 1 件)

- ① A simplest method of flap monitoring
Sakakibara S, Hashikawa K, Omori M, Terashi H, Tahara S.
J Reconstr Microsurg. 2010; 26(7):433-4

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 榊原 俊介
脱細胞化組織を用いた小口径人工血管の開発とその評価
第 38 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2011.11.10-12 新潟

- ② 榊原 俊介
脱細胞化組織を用いた小口径人工血管の開発とその評価
第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会 2011.10.6-7 東京

- ③ 榊原 俊介
高張塩溶液脱細胞化法による脱細胞化血管の開発とその評価
第 37 回日本マイクロサージャリー学会 2010.11.18 名古屋

- ④ 橋川 和信
0.5mm 径 PVA ハイドロジェル製血管モデルを用いるスーパーマイクロサージャリーのトレーニング
第 34 回日本頭頸部癌学会 2010.6.10 東京

- ⑤ 橋川 和信
ポリビニルアルコール(PVA)ハイドロジェル製微小血管を用いるマイクロサージャリーのトレーニング
第 53 回日本形成外科学会総会 2010.4.7 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 真也 (TAHARA SHINYA)
神戸大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：60207206

(2) 研究分担者

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)
神戸大学・医学部附属病院・特命講師
研究者番号：90403237

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)
神戸大学・医学研究科・特命助教
研究者番号：50444592

堤 堤美 (TSUTSUMI SADAMI)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：00028739