

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月16日現在

機関番号：24303
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2013
 課題番号：23659621
 研究課題名（和文）患者体内で簡便かつ安全に作成できる『心血管組織補填用自家結合組織シート』の開発
 研究課題名（英文）Development of autologous connective tissue sheet for cardiovascular organs
 研究代表者
 坂井 修 (OSAMU SAKAI)
 京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医
 研究者番号：10298432

研究成果の概要（和文）：アクリル製板状基材をビーグル皮下に8週間埋入して周囲組織ごと摘出し、そこから基材を取り除くことで、自家結合組織のみからなるシートを得た。次に人工心肺非使用下での移植モデルとして、ビーグル犬心耳を部分遮断して切開した部位にシートを縫合して、切開部を補填閉鎖することに成功した。このモデルによる移植実験の早期成績は、5頭でいずれも無事終了し、術後1週の心エコーで明らかな血栓形成や瘤化を認めず、摘出組織もわずかな血栓を認めるのみであった。

研究成果の概要（英文）：Acryl plates were embedded in subcutaneous space of beagles for 8 weeks. The connective tissue sheets were obtained from the implants after trimming of the connective tissues and pulling out of the plates. The obtained connective tissue sheets were implanted to the atrium of the beagles. All 5 cases were patent after 1 week implantation with little thrombosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：自家組織、シート状製生体組織、再生医療、組織工学、in vivo

1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科手術では、その補填材料・置換材料として様々な人工臓器が使用されている。

しかし、これまでの補填物である合成物（ePTFEシート、ポリエステル、繊維布）は易感染性や血栓性、生体材料（固定処理を行った異種動物心膜シート）は耐久性や石灰化などの問題を有する。

また現在開発が進んでいる培養細胞からなる細胞膜シートは、膨大な時間と費用を要する上に特殊施設を必要としており、より簡便かつ安全にこれまでの欠点を補う補填物

が求められている。

2. 研究の目的

自家組織とマトリックス成分を用いて、自己の体内において自らの移植臓器を自在に設計・誘導・再生する技術の開発・応用により、生体適合性の高い移植臓器を開発する研究を行ってきた。

本研究ではこの技術を応用して自家結合組織シートを開発し、これを心血管組織の補填材として使用する可能性を追求する。

3. 研究の方法

体内に非毒性・非溶解性の異物を埋入すると、生体防御反応によって主に線維芽細胞と膠原線維からなるカプセル状の組織体で皮膜化される。この生体反応を応用して、様々な形態・性状の鋳型を動物の背部皮下に埋入し、一定期間後に周囲組織とともに摘出し、そこから鋳型を取り除くことで自家結合組織のみから形成される代用臓器を得る。

我々はこれまでにこの技術を用いて、自家組織のみから形成される小口径代用血管や人工弁を作製してきた。同様の方法で自家結合組織シートを作製し、それを実際に移植実験に用いてその成果を検証する。

4. 研究成果

(1) 予備実験として作製した管状結合組織小口径代用血管は、安定した組織の形成に加えて、生体血管に類似したコンプライアンスと耐圧性を有していた。これを日本白色ウサギの総頸動脈への移植実験を行ったところ、動脈圧に曝されても瘤化などの変化を生じない耐久性と、良好な開存性、血液接触面での迅速な内皮化、代用血管壁の生体血管に類似した構造への再構築を確認することが出来た。

我々の作製している移植臓器は、自家組織のみから形成されるため、拒絶反応がなく・無毒性・感染に強い・成長の可能性があることに加えて、繰り返し大量生産が可能・様々な大きさ形状に作成可能・複雑な組織工学的な手技が不要・特殊施設が不要であることが確認できており、これまでの移植臓器の持つ様々な問題点を改善できる可能性を持つものであることが示唆された。

(2) これらのデータを基に、鋳型の形状をデザインしてシート状自家結合組織膜を作製した。

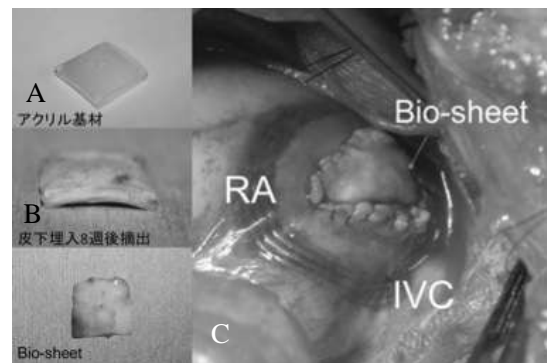
鋳型としては、シリコン製の管状鋳型を用いて作られるこれまでの結合組織管を一旦作製し、それを切開してシートとする方法と、アクリル製板状基材から直接結合組織シートを作製する2つの方法を試みた。作製法は従来通り、ビーグルの背部皮下組織内に鋳型を埋入して、1週後に鋳型を周囲に形成したカプセル状組織とともに摘出し、そこから鋳型を取り除いて自家結合組織膜を得た。こうして獲得した結合組織シートの物理特性及び組織学的評価を行った。

前者の鋳型は比較的安定してシートを作製することが出来て、植え込む鋳型の径を拡大することで出来上がったシートの厚みが増していくという結果が得られた。後者は部分的に厚みに異なる組織が形成されるなど、不完全なものが幾つか認められたが、ほとんどが外観上は遜色のないものであった。いずれの基材で作製したのものも、その耐圧性、壁

の厚みやコンプライアンスは、ほぼ同等であった。

今後様々な大きさ形状に鋳型を細工していく可能性を考え、板状基材で作製した結合組織シートを移植材料として用いていく方針とした。

(3) 移植モデルの最終目標は、ヒトへの応用を前提とした、人工心肺を用いた心大血管への移植モデルである。しかし、これはコストや時間を要するものであり、現段階でまずはより安定した方法で、移植後早期の評価を行い、人工心肺使用下モデルに移行可能かを判断すべきとの判断をした。そこで、人工心肺非使用下に心臓組織に移植可能なモデルを考案した。



全身麻酔下にビーグルを左（または右）開胸し、左（または右）心耳を部分遮断した。同部位に約2cmの切開を加えて欠損孔を作成した。シートは2×2cm、厚さ2cmのアクリル製板状基材（図A）をビーグルの背部皮下組織内に8週間埋入して、あらかじめ作製（図B）しておいたものを用いた。欠損孔にシートを血管縫合糸で逢着した上で遮断を解除して、出血等問題の無いことを確認して終了した（図C）。

自家結合組織シートは、自己心膜と遜色ない柔軟性と強度を有しており、吻合操作は容易であり、移植術中の出血に対して止血に難渋することなく終了できた。このように人工心肺や心停止を用いることなく、安全かつ容易に心臓組織へのアプローチが可能であり、このモデルを用いて、まずは心房という（より血栓形成を生じやすい）低圧系への移植の早期成績を評価した。

移植後は体表からの心エコーで、心房の状態を評価可能であった。移植1週後の体表心エコーでは、明らかな血栓形成や壁の瘤化を認めなかった。移植は計5頭に施行し、移植1週後にエコーを行った上で、シートを摘出した。その組織像ではわずかな血栓形成を認めるのみであり、概ね体表心エコーの評価と同等であることがわかった。

このように、自家結合組織シートは、低圧系の移植早期に問題が無いことが確認できた。

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 3 件)

- (1) Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y. Implantation study of small-caliber "biotube" vascular grafts in rat model. *J Artif Organs* 2013; 99(2): 59-65 査読有
- (2) Nakayama Y, Kanda K. A completely autologous valved conduit prepared in the open form of trileaflets (type VI biovalbe): mold design and valve function in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 99(1): 135-141 査読有
- (3) Watanabe T, Kanda K, 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* 2011; 98(1): 120-126 査読有

[学会発表] (計 38 件)

- (1) 神田圭一 生体内組織形成技術を用いたバイオチューブ代用血管の開発 日本再生医療学会 2013年3月 横浜
- (2) 山南将志、神田圭一 バイオチューブ小口径代用血管の開発 日本再生医療学会 2013年3月 横浜
- (3) 山南将志、坂井 修、神田圭一 バイオシートの心房修復材への応用：移植3ヶ月後の変化 日本再生医療学会 2013年3月 横浜
- (4) 渡辺太治、神田圭一 生体内組織形成技術を用いたバイオチューブ代用血管の開発 日本再生医療学会 2013年3月 横浜
- (5) Nakayama Y, Kanda K. In vitro and in vivo performance of a completely autologous aortic valved conduit (Biovalve type VII) prepared by in body tissue architecture technology using a novel separatable mold. American association scientific sessions. Nov. 2012, LA (USA)
- (6) 山南将志、神田圭一、中山泰秀 バイオチューブの血液透析用シャント用代用血管への応用の可能性 日本人工臓器学会 2012年11月 福岡
- (7) 渡辺太治、神田圭一、中山泰秀 バイオチューブを用いた冠動脈バイパス術-ブタでの予備的異種移植実験- 日本人工臓器学会 2012年11月 福岡

- (8) 山南将志、神田圭一、中山泰秀 バイオシートの心房修復材への応用 日本人工臓器学会 2012年11月 福岡
- (9) 中山泰秀、神田圭一 バイオバルブ大動脈弁 (Type VII) の開発 日本人工臓器学会 福岡
- (10) 渡辺太治、中山泰秀 神田圭一 バイオチューブ代用血管-冠動脈バイパスグラフトとしての応用- 日本胸部外科学会 2012年10月 福岡
- (11) Watanabe T, Kanda K, Nakayama Y. rapid preparation of Biotube vascular grafts by using eosin-eluting molds. XXXIX ESAO congress. Sep. 2012, Rostock (Germany)
- (12) Yamanami M, Kanda K Nakayama Y. Biotube application to the arteriovenous shunt. XXXIX ESAO congress. Sep. 2012, Rostock (Germany)
- (13) Watanabe T, Kanda K, Nakayama Y. First report of application of Biotube vascular graft to off-pump CABG in an acute porcine model. XXXIX ESAO congress. Sep. 2012, Rostock (Germany)
- (14) Yamanami M, Kanda K Nakayama Y. Development of autologous tissue small caliber vascular grafts (Biotubes). ESC congress. Aug. 2012, Munich (Germany)
- (15) 神田圭一、中山泰秀 患者の体内で自家移植臓器を作製し、移植後急速な再生組織構築を誘導する『生体内組織形成技術』の開発 日本再生医療学会 2012年6月 横浜
- (16) 中山泰秀 神田圭一 生体内組織形成術：自分の移植臓器を自分の体内で作れる新技術 日本再生医療学会 2012年6月 横浜
- (17) 中山泰秀 神田圭一 バイオバルブ心臓弁の生体内形成過程のカプセル内視鏡観察 日本再生医療学会 2012年6月 横浜
- (18) 山南将志、中山泰秀 神田圭一 生体内組織形成術による循環器系再生医療デバイスの開発 日本再生医療学会 2012年6月 横浜
- (19) 渡辺太治、中山泰秀 神田圭一 バイオチューブ短期作製のための工夫 日本再生医療学会 2012年6月 横浜
- (20) Yamanami M, Kanda K Nakayama Y. Successful replacement of beagle pulmonary valves by in vitro tissue-engineered valved-conduits with the sinus of valsalva. 61th ESCVS. May. 2012, Croatia

- (21) 神田圭一、坂井 修、中山泰秀 自家結合組織のみからなり宿主生体内で簡便に形成される、小口径代用血管バイオチューブの開発 日本外科学会 2012年4月 幕張
- (22) 中山泰秀、神田圭一 カプセル内視鏡内臓鑄型を用いた体内組織形成過程の in situ 観察 日本人工臓器学会 2011年11月 東京
- (23) 山南将志、神田圭一、中山泰秀 バイオチューブ小口径代用血管の固定処理：吻合操作性の向上と自己化の維持 日本人工臓器学会 2011年11月 東京
- (24) 渡辺太治、神田圭一、中山泰秀 インスタントバイオチューブ：エオシン徐放化鑄型による肉厚バイオチューブの短期形成 日本人工臓器学会 2011年11月 東京
- (25) Nakayama Y, Kanda K. Architecture design of a novel separable mold to obtain autologous tissue heart valves “Biovalves” non-invasively. ESAO-IFAO congress Oct. 2011, Porto (Portugal)
- (26) Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y. 6-month auto-implantation of autologous tissue small-caliber vascular grafts, “Biotube”, to carotid arteries of the beagle dogs. ESAO-IFAO congress Oct. 2011, Porto (Portugal)
- (27) Watanabe T, Kanda K, Nakayama Y. Development of a small-caliber autologous vascular graft Biotube; four-year animal implantation. ESAO-IFAO congress Oct. 2011, Porto (Portugal)
- (28) Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y. Preparation of a completely autologous valved conduit with the open form of trileaflets (Type VI Biovalve). ESAO-IFAO congress Oct. 2011, Porto (Portugal)
- (29) Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y. Feasibility study of in-body tissue-engineered, completely autologous valved conduits (Biovalves type IV) as an aortic valve in a goat model. ESC congress Aug. 2011, Paris (France)
- (30) Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y. Successful replacement of beagle pulmonary valves by in vivo tissue-engineered valved-conduits with the sinus of valsalva (Biovalves). ESC congress Aug. 2011, Paris (France)
- (31) 山南将志、神田圭一、中山泰秀 生体内組織形成技術を用いた自家移植用循環器系移植片の開発 日本小児心血管分子医学研究会 2011年7月 福岡
- (32) 中山泰秀、神田圭一 バイオバルブの開発：作製鑄型の変遷 日本炎症・再生医学会 2011年6月 京都
- (33) 中山泰秀、神田圭一 体内光照射によるエラスチン含有高肥厚バイオチューブ人工血管の作製 日本炎症・再生医学会 2011年6月 京都
- (34) 山南将志、神田圭一、中山泰秀 完全自己組織からなる心臓弁様組織体バイオバルブ (Type VI) の開発：開口形状での弁形成による弁機能の向上 日本炎症・再生医学会 2011年6月 京都
- (35) 渡辺太治、神田圭一、中山泰秀 宿主体内で形成する自家組織結合組織小口径代用血管バイオチューブの開発 日本炎症・再生医学会 2011年6月 京都
- (36) Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y. Development of autologous tissue small caliber vascular grafts (Biotubes) constructed by simple, safe and economical in vivo tissue engineering. ESCVS May. 2011, Moscow (Russia)
- (37) Yamanami M, Kanda K, Nakayama Y. Successful replacement of beagle pulmonary valves by in vivo tissue-engineered valved-conduits with the sinus of valsalva “Biovalves”. ESCVS May. 2011, Moscow (Russia)
- (38) 山南将志、坂井 修、神田圭一、中山泰秀 生体内組織形成技術を用いた小口径代用血管 “Biotube” の開発 日本血管外科学会 2011年4月 沖縄

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 修 (OSAMU SAKAI)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：10298432

(2) 研究分担者

神田 圭一 (KEIICHI KANDA)

京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師

研究者番号：60295649

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・室員
研究者番号：10163312

(3)連携研究者

中山 泰秀 (YASUHIDE NAKAYAMA)
独立行政法人国立循環器病研究センター・生
体医工学部・室長
研究者番号：50250262