

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560217

研究課題名(和文) 生体適合性材料の編織による強度と生体適合性を両立した人工胆管の開発

研究課題名(英文) Development of artificial bile duct which has transplatable strength and biocompatibility by knitting of biocompatible material

研究代表者

白木川 奈菜 (Shirakigawa, Nana)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：90724386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は世界的に研究の少ない組織置換性人工胆管開発を狙ったものである。生分解性ゲルストランドを編織することで、伸縮性を有する組織置換性人工胆管の開発を目指した。グルコマンナンを用いた生分解性ゲルストランドの作製及び、その編織に成功した。グルコマンナンゲルはラット体内においては10日間程度で分解されることが示唆され、濃度や化学的架橋により体内における分解を遅延するか、増殖因子の導入により組織置換性を促進する必要性が示唆された。一方で、本基材の性質を利用した新たな展開が期待された。

研究成果の概要(英文)：This research focused on the development of the tissue-engineered bile duct which is studied by few researchers. We tried to construct the tissue-engineered bile duct with stretchability by knitting of bio-degradable gel strand. The construction of glucomannan gel strand and knitting it were achieved. The glucomannan gel was suggested that it will be dissolved for 10 days in rat body. Therefore, the prolonging of the degradation time is needed by increasing the glucomannan concentration and performing additional chemical crosslinking. Otherwise, the accretion of replacement from the material to tissue is needed. In addition, the characteristics of this material is expected to be useful application for medical treatment.

研究分野：生物工学

キーワード：人工胆管 医工連携 生体適合性材料

1. 研究開始当初の背景

人工胆管に関する研究報告は非常に少なく、医療系論文検索エンジン PubMed によると年 10 本未満しか報告されていない。検討されている人工胆管の素材としては 3 つの方向性が報告されている。まず、静脈・尿管といった他の生体組織を利用するものが挙げられるが、生体適合性は高いが強度が低く管腔構造の維持が難しい。また、Gore-Tex といった合成素材を利用するものも研究されているが、強度は高いものの生体適合性が低く炎症性再狭窄を来す上に、感染が起ると異物として感染の難治化の原因となる。そして、非常に期待されているのが生体分解性材料を用いて作製したものであるが、強度と分解性の両立が難しく、また基材への細胞接着性が課題となっている。その中でも、Miyazawa らは 2005 年に生体吸収性素材としてポリ乳酸とポリカプロラク톤の共重合ポリマーで人工胆管を作製し、ブタへの移植により、6 カ月開存したことを報告している[1]が、それ以降の新たな成果の発表はない。また、その際の胆管の組織像をみると、腸上皮化生を起こしており、非常に強い生体反応を惹起している可能性が高い。つまり、胆管に適した生体材料に関する研究の必要性は非常に高いと考える。

[1] Miyazawa M. et al., *Am J Transplant.*, 2005, 1541-7.

2. 研究の目的

重篤な肝不全の場合、根本的な治療法は肝移植しかない。しかし、肝移植は心臓死ドナーからの移植が行えない。そのため、脳死(日本では年間 40 例)もしくは生体部分肝移植(日本では年間 500 例)が行われている。生体肝移植は肝静脈、門脈、動脈を再建した後に、胆管を再建する。しかし術後の胆管狭窄を伴う腸管からの逆行性胆管炎発症(発症率 5-10%)による入退院の繰り返しが、患者及び移植レシピエントの社会復帰を妨げている。

再建部位の選択の自由を広げ、かつ術後の狭窄を防ぐために強度を持ちつつも、生体適合性の高い人工胆管の開発が医療現場では希求されている。しかしながら、胆管に関する研究者は少なく、理想的な素材はまだ開発されていない。そこで、我々はその開発に取り組む。

3. 研究の方法

グルコマンナン(提供:清水化学株式会社)溶液と水酸化カルシウム溶液を混合し、加熱することでグルコマンナンゲルを作製した。このゲル作製時において、針付シリンジより押し出すことで紐状のゲル(ゲルストランド)を作製した。一方、平板に塗布して加熱することで、グルコマンナンフィルムを作製した。また、円盤状のゲルも作製した。

作製したゲルストランドを、筒状に編み上げ、編織による肝構造体の構築を試みた。一

方で、グルコマンナンフィルム上における細胞培養を試み、管腔構造体作製や癒着防止剤としての可能性を評価した。円盤状グルコマンナンゲルをラットに移植することで生分解性を評価した。

また、一方で胆汁採取および胆汁環境下におけるゲルの安定性評価を試みた。

動物実験においては、動物愛護・生命倫理の観点に配慮し、九州大学動物実験倫理委員会の審査を受けた上で、九州大学における学内規定「九州大学動物実験規則及び同実施細則」に従うとともに、実験動物を扱う者すべてが環境省の定める「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守して、適切に実験を行った。

4. 研究成果

(1)ゲルストランドの作製、及びその編織

1%グルコマンナン溶液に対して水酸化カルシウム溶液を混合し、沸騰水中に滴下することで直径 2 mm のグルコマンナンゲルストランドを作製することに成功した。

これを用いてかぎ針編みの要領で編織を試みたところ、編織することに成功した(Fig. 1)。作製した管状構造体の内径は 7 mm、管壁は 3 mm であった。大型動物としてブタや臨床で使用する際にはもう少し管壁を薄く必要があり、さらなる改良が期待される。



Fig.1 作製したゲルストランドを編織する様子

(2)作製したゲルの生分解性評価

作製した円盤状のグルコマンナンゲルをラット背部の皮下及び、腹腔内に移植した。移植 5 日後に摘出し、移植前後でサンプル重量を比較した。いずれのサンプルも 58%程重量が減少しており、移植時において体内で分解されることが示唆された。生体組織に置換可能な人工胆管の基材として使用するには数カ月程度体内で維持されるか、置換を促進する機能を付与することが必要であると考えられる。そのためにはグルコマンナンの濃度を上げることや、化学架橋を施すことで分解を遅らせることが期待される。また、増殖因子を基材に導入することにより、組織置換の促進が期待される。

(3)作製した基材に対する細胞接着性評価

水酸化カルシウム混合グルコマンナン溶

液をガラスシャーレに塗布し、煮沸水に浸漬することでグルコマンナンフィルムを作製した。作製したフィルムを直径 1 cm の円形に切り出し、48 well plate の底面に敷いた。胆管の内壁は胆管上皮細胞で構成されているが、その細胞は市販されていない。そこで比較的入手が容易な正常細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞を播種し、細胞接着性の評価を試みた。播種 1 日後に緩衝液で洗浄し、細胞を観察したところ、通常の培養プレートでは良好に細胞が接着しているのに対し、グルコマンナンフィルム上では細胞が観察されなかった。したがって、本基材は細胞接着性が低いことが示唆された。組織置換性基材として使用するためには、ゼラチン等の細胞接着性の高い基材を混合、もしくは表面にコートする必要があることが示唆された。一方で、細胞接着性が低いことが望ましい素材、例えば癒着防止剤といったものの基材としての展開が期待された。

(4) ブタ胆汁採取および胆汁内での安定性評価

ブタ肝臓を食肉センターより購入し、付属の胆のうから胆汁を採取することに成功した。10% ゼラチンゲルに対して、得られた胆汁を添加し、37℃で振とうし、経時的にゲル重量を測定した。一方で、リン酸緩衝液を用いて同様の検討を行った。リン酸緩衝液においても胆汁においてもゲル重量の変化は 10 日間ではほとんどなかった。ゼラチンゲルは生分解性が高い基材として知られており、ゲル基材は生分解性を有していても胆汁内においては安定であることが示唆された。本実験系は、上皮化した基材の安定性評価等への応用が期待される。

(5) フィルムによる管腔構造体作製

編織による管腔構造体の作製は、管壁の薄層化が課題であった。一方で、水酸化カルシウム混合グルコマンナン溶液をガラスシャーレに塗布し、煮沸水に浸漬することでグルコマンナンフィルムを作製することに成功した。そこで、得られたグルコマンナンフィルムをロッドに巻き付け、端部を縫合糸で縫い合わせ、管腔構造体の作製を試みた。厚さ 2 mm、内径 5 mm の管腔構造体を作製することに成功した。しかしながら、本構造体は側面からの圧力に対する応力が低く、腹圧下における内腔の維持が困難であることが予想された。人工胆管基材として使用するには側面方向からの圧力に対する応力の向上が期待される。

(6) フィルムの癒着防止剤としての展望

細胞接着性評価により、癒着防止剤としての展望が期待された。そこで、作製したグルコマンナンフィルムをラットの腹腔内に移植し、フィルムに対する生体組織の接着性を評価した。移植 5 日後に開腹し、観察したと

ころ、体内においてグルコマンナンフィルムに対する縫合部組織の接着等は観察されなかった。今後は、癒着誘発モデルにおける更なる評価が必要と考えるが、胆管基材以外への応用性が期待された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 10 件)

- ① 坂本裕希, 中村俊介, 趙宰庸, 白木川奈菜, 山尾宣暢, 宮田辰徳, 山下洋市, 馬場秀夫, 井嶋博之, 医工連携による臓器工学的ラット肝グラフトおよびその評価系の開発, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/03/07-09, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ② 白木川奈菜, 坂本裕希, 山下洋市, 吉住朋晴, 馬場秀夫, 前原喜彦, 井嶋博之, 臓器工学的ラット肝グラフトの性能評価, 第 52 回九大生体材料・力学研究会, 2016/11/24, 九州大学西新プラザ (福岡県・福岡市)
- ③ 平山貴啓, 徳山慶太郎, 白木川奈菜, 井嶋博之, 組織工学的人工胆管構築に向けた抗菌活性かつ増殖因子固定化能を有する基材の開発, 日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2016, 2016/11/21-22, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ④ 白木川奈菜, 坂本裕希, 趙宰庸, 山尾宣暢, 宮田辰徳, 山下洋市, 馬場秀夫, 井嶋博之, 医工連携による移植用肝臓構築を目指して, 第 4 回 TR 推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会, 2016/10/31, 九州大学医学部百年講堂 (福岡県・福岡市)
- ⑤ 森保紘樹, 我有絃彰, 徳山慶太郎, 白木川奈菜, 井嶋博之, ヘパリン固定化スポンジからなる吻合可能な組織工学的人工血管の開発, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 2016/07/02, 北九州国際会議場 (福岡県・北九州市)
- ⑥ 平山貴啓, 徳山慶太郎, 白木川奈菜, 今井大祐, 山下洋市, 調憲, 前原喜彦, 井嶋博之, 組織工学的人工胆管構築に向けた抗菌活性かつ再生促進能を有する基材の開発, 日本機械学会 第 26 回バイオフロンティア講演会, 2015/10/02-03, 九州大学伊都キャンパス (福岡県・福岡市)
- ⑦ N. Shirakigawa, H. Sakamoto, J. Cho, D. Imai, Y. Yamashita, K. Shirabe, Y. Maehara, H. Ijima, Fundamental technology for the creation of Whole Liver Engineering, and functional evaluation of recellularized liver, 2015 4th TERMIS World Congress, 2015/09/08-11, Boston (USA)
- ⑧ 白木川奈菜, 坂本裕希, 趙宰庸, 今井大祐, 山下洋市, 調憲, 前原喜彦, 井嶋博之, 医工連携による実用的肝グラフト構築を目指して, 第 51 回九大生体材料・力学研究会, 2015/07/28, 九州大学

- 西新プラザ(福岡県・福岡市)
- ⑨ 平山貴啓, 徳山慶太郎, 白木川奈菜, 今井大祐, 山下洋市, 調憲, 前原喜彦, 井嶋博之, 組織工学的な人工胆管構築に向けた抗菌性基材の開発, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015/06/27, 北九州国際会議場(福岡県・北九州市)
- ⑩ K. Tokuyama, N. Shirakigawa, D. Imai, Y. Yamashita, K. Shirabe, Y. Maehara, H. Ijima, Functional hydrogel tube for artificial bile duct, TERMIS-AP 2014, 2014/09/24-27, Daegu(Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白木川 奈菜 (SHIRAKIGAWA, Nana)
九州大学・工学研究院・助教
研究者番号: 90724386

(2) 研究分担者

前原 喜彦 (MAEHARA, Yoshihiko)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 80165662

井嶋 博之 (IJIMA, Hiroyuki)
九州大学・工学研究院・教授
研究者番号: 10274515

調 憲 (SHIRABE, Ken)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70264025

山下 洋市 (YAMASHITA, Yoichi)
熊本大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 00404070

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

井田 涼 (IDA, Ryo)
徳山 慶太郎 (TOKUYAMA, Keitaro)
平山 貴啓 (HIRAYAMA, Takaaki)
今井 大祐 (IMAI, Daisuke)
森保 紘樹 (MORIYASU, Hiroki)
我有 紘彰 (GAU, Hiroaki)
宮田 辰徳 (MIYATA, Tatsunori)
山尾 宣暢 (YAMA, Takanobu)