

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08754

研究課題名(和文)"自己体内再生型"結合組織代用血管バイオチューブの抗感染性に関する基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on anti-infective properties of biotube

研究代表者

岡田 健次 (Okada, Kenji)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：90284356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はバイオチューブに期待される抗感染性を感染実験により実証する事を目的とした。バイオチューブとは皮下組織に留置したシリコンチューブ周囲に形成される結合組織から得られる管状組織体であり、人工物を全く含まず、組織適合性が高いため抗感染性が期待された。抗感染性が実証されれば人工血管最大の弱点である感染への臨床応用につながる重要な研究である。ラットの腹部大動脈にバイオチューブを移植した群と人工血管を移植した群を作成して、ブドウ球菌を播種する感染実験を施行したが菌量の調整に難渋し、バイオチューブに期待された抗感染性を裏付ける結果が得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はバイオチューブに期待される抗感染性を感染実験により実証する事を目的とした。バイオチューブとは皮下組織に留置したシリコンチューブ周囲に形成される結合組織から得られる管状組織体であり、人工物を全く含まず、組織適合性が高いため抗感染性が期待された。抗感染性が実証されれば人工血管最大の弱点である感染への臨床応用につながる重要な研究である。ラットの腹部大動脈にバイオチューブを移植した群と人工血管を移植した群を作成して、ブドウ球菌を播種する感染実験を施行したが菌量の調整に難渋し、バイオチューブに期待された抗感染性を裏付ける結果が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to demonstrate the anti-infection property of biotubes by infection experiments. The biotubes are completely autologous in vivo tissue-engineered connective tissue tubes. Biotubes do not contain any artificial materials and are expected to be anti-infective. If the anti-infection property is demonstrated, it will be an important study for clinical application against infection. A model was created in which biotubes and artificial blood vessels were implanted into the abdominal aorta of rats. Staphylococcus aureus was implanted in those groups, but it was difficult to control the amount of Staphylococcus aureus. The results did not support the expected anti-infection properties of the biotubes.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：バイオチューブ 感染実験 抗感染性 人工血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在血管の治療に用いられる人工血管はすでに本邦で年間 70,000 本以上、市場規模は 80 億円以上と言われており広く使用されている。しかし、人工血管感染は心臓血管外科手術における重篤な合併症であり、死亡率や下肢切断率が高く、治療成績は極めて不良である。治療法としては感染人工血管摘出に加え、非解剖学的血行再建が困難な部位では in situ での血行再建となる。その際は感染部位に再度人工血管が留置されるため感染対策が必要になる。感染に抵抗性のある人工血管としてリファンピシン浸漬人工血管や、生体組織であるホモグラフトも有効とされるが供給が不十分であり一般的ではない。感染は人工血管の最大の弱点であり、その解決策が切望される。

今回研究に使用したバイオチューブとは非分解性のシリコン等の材料を動物の皮下に埋没することで生体反応により惹起される被包化(カプセル化)した結合組織からなる管状組織体である。これをバイオチューブグラフトとして血管の移植に用いるオーダーメイド医療である。自己組織であるバイオチューブは免疫拒絶反応もなく、鋳型の形状により血管の形状、長さ、直径に至るまで自由に作成可能である。更に自己組織と癒合し、栄養血管を自ら形成しつつ、個体の成長に伴ってともに成長するという特徴を有する(Nakayama Y, et al. Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery. 2016)。バイオチューブは極めて組織適合性が高い。当研究室でもラット腹部大動脈にバイオチューブ移植を行っており、数ヶ月後に摘出するとバイオチューブは閉塞・瘤化もなく、その表層は内皮細胞で覆われ、エラスチンも形成されており、血管の3層構造が再生される。バイオチューブは現在シャント血管等で臨床研究が進められており、今後の大血管への使用も期待されている。

人工物感染はわずかな菌量でも発症し、難治性となることは以前より指摘されている。原因として人工物周囲の死腔の存在や血流の低下、バイオフィルムの形成により、本来備わっている免疫機能を十分に発揮することができず、血管新生もなく抗生剤の到達も困難である。生体由来であるホモグラフトは人工血管感染治療に有効であるが、抗感染性を有する理由については未だに明確な結論は得られていないが、人工物を含まないことが感染組織に対して有効との指摘がある(Tuna, I.C, et al. Annals of Thoracic Surgery. 2009)。それに対してバイオチューブは人工物を全く含まず、さらに移植後は周囲には新生血管が形成され生体動脈と酷似した組織に変化していくという「組織適合性」が極めて高く、耐久性・操作性にも優れている(Furukoshi M, et al. Journal of Artificial Organs. 2016)。本研究ではこれらの特徴によりバイオチューブは感染に対しても自己血管と同等の抗感染性があるとの実験仮説を立てた。全て自己組織からなるバイオチューブは開発当初から抗感染性を有すると期待されていたが、抗感染性を証明する実験は未だ行われていない。バイオチューブの抗感染性を証明することを目標とした。

## 2. 研究の目的

全て自己組織からなるバイオチューブが抗感染性を有することを示すため、感染実験モデルを用いて有効性を確認する。また、感染に伴うバイオチューブの自己組織化のプロセスがどのように変化するかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) バイオチューブ作成

SD ラット（雄，15 週齢）を用い，3 種混合麻酔（メドミジン、ミダゾラム、プロポフォール）の腹腔内投与し全身麻酔下に背部皮下にシリコン、アクリル製の円筒形鋳型を背部皮下結合組織内の隙間に挿入して閉創する。2～3 ヶ月後に鋳型を摘出し得られたバイオチューブを採取する。得られたバイオチューブは移植まで 70%エタノールで保存した。



#### (2) モデル作成

イソフルレン吸入麻酔下にラットの腹部に正中切開をおき，腹部大動脈を確保・遮断しバイオチューブまたは ePTFE 人工血管を 10-0 ナイロン用いて移植し、グラフトが常に血流に接触するモデルを作成する。

#### (3) 感染実験

バイオチューブ移植群，ePTFE 人工血管移植群，未移植正常血管群にわけ，さらにそれぞれを A) 感染なし，B) 感染あり + 抗菌薬なし，C) 感染あり + 抗菌薬ありの計 9 群にわけ（n = 6）。感染の確立には黄色ブドウ球菌菌液（ $1.0 \times 10^8$  CFU）0.1ml を腹部大動脈・移植部に塗布する。また抗菌薬投与は感受性を持つセファゾリンナトリウム水和物を尾静脈より連日静注する。

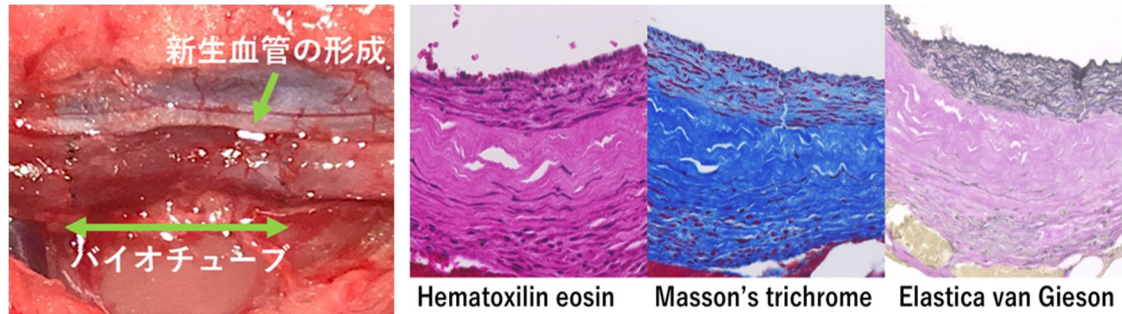
手術終了 1 週間後，4 週間後にそれぞれ犠牲死させ評価を行う。1 週間後にはグラフト評価として HE 染色・MT 染色・EVG 染色を行い，血管性状の評価をする。強度測定のため破断荷重測定を行なう。感染評価としてはグラフトをグラム染色し菌塊，貪食像を評価し，さらにグラフトおよび動脈血を採取し培養・菌数の評価を行う。4 週間後には前述評価に加えて，各群の生存率を比較検討する。

#### (4) 感染に伴うバイオチューブの組織学的特性変化の解析

前述実験と同様に移植を行い(1)正常バイオチューブ移植群，(2)感染を伴ったバイオチューブ移植群に分けて，バイオチューブの自己組織再生が十分に誘導される手術 3 ヶ月後に犠牲死させグラフトを摘出する。評価としては同様に破断荷重測定，感染評価を行う。さらに組織学的評価に HE 染色・MT 染色・EVG 染色にてグラフトの縮窄や瘤化・内腔の血栓付着・内膜面積・平滑筋層厚・新外膜厚の測定・内腔/壁厚比の測定・外膜における新生血管数を比較する。免疫染色として SMemb /SM2/ SMA 染色をおこない内皮化の有無，血管形成の有無，平滑筋細胞の分化および活性化の程度を検討する。

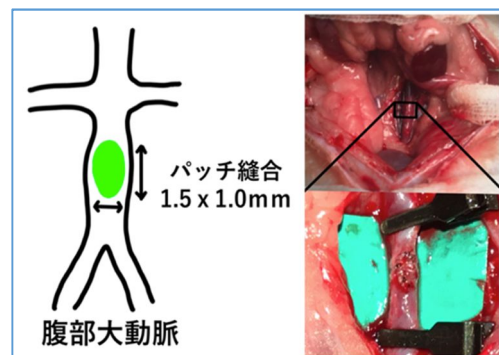
#### 4. 研究成果

ラット皮下にシリコンチューブを留置することでバイオチューブは期待どおり作成された。血管に移植することでバイオチューブは閉塞・瘤化もなく、その表層は内皮細胞で覆われ、エラスチンも形成されており、血管の3層構造が再生されていた。

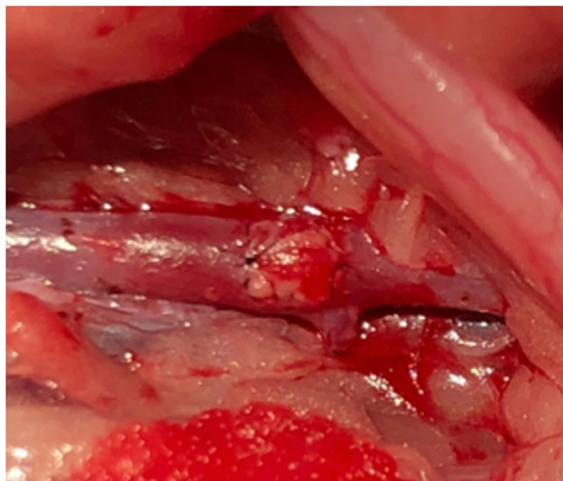


#### モデルの作成変更

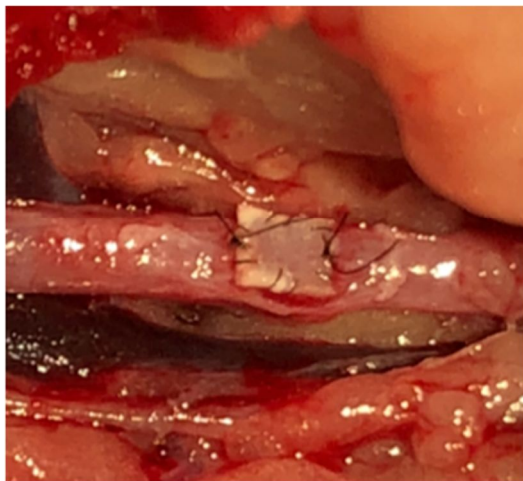
当初ラットの腹部大動脈をバイオチューブに置換した群と人工血管に置換した群での比較を検討していたが、ラットの大動脈に置換可能な人工血管は市販されていなかったために計画を変更してラットの腹部大動脈前面にバイオチューブとePTFE人工血管をパッチ(1.5x1.0 mm)として縫合し、人工血管が常に血流に接触するモデルを作成した。



#### バイオチューブ



#### 人工血管



感染実験において当初、先行研究から黄色ブドウ球菌菌液 ( $1.0 \times 10^8$ CFU) 0.1ml を用いて感染の確立を行う予定であったが、後腹膜に感染を成立させるのに難渋した。具体的には菌液濃度を濃くすると、バイオチューブ移植群、ePTFE人工血管移植群、未移植正常血管群で感染は成立するものの差が無くなってしまいが、濃度が低くなると全群で感染が成立しないという結果が続いた。

#### 菌液濃度検討

菌液濃度を  $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$ CFU、菌液量を 0.1~0.3ml に適宜調整したうえでコントロール群には感染が起こらず、ePTFE人工血管移植群には確実に感染が成立する菌液濃度の検討を続けた。しかし、結果にばらつきがあり一定の結果は得られなかった。

## 感染実験結果

上記条件にて濃度変更しつつ計 113 件(バイオチューブ移植群 38 例, ePTFE 人工血管移植群 52 例, 未移植正常血管群 23 例)の感染実験を施行した。結果としてパッチ菌量は、バイオチューブ移植群  $118.9 \pm 308$  CFU (0-1000), ePTFE 人工血管移植群  $101.9 \pm 296$  CFU (0-1000) で、両群間に有意差はなかった ( $p = 0.158$ )。また血液培養陽性率もバイオチューブ移植群 10/38 (26.3%), ePTFE 人工血管移植群 10/52 (19.2%) で、こちらも両群間に有意差はなかった ( $p = 0.427$ )。共に有意差は認めなかったもののややバイオチューブ群に不利な結果となった。

バイオチューブに期待された抗感染性を裏付ける結果が得られなかった原因としては当初の計画を変更し小さいパッチを用いたことにより人工血管の面積を十分に確保できなかったため、黄色ブドウ球菌の繁殖を促せなかったことが予想された。実験動物を変更し人工血管移植が可能なウサギ等での実験変更も検討したが各種調整がつかなかった。また他の要素としては自己組織化する前のバイオチューブはあくまでコラーゲンのチューブであり移植後およそ3ヶ月程度で十分に自己組織に変化するため移植直後に菌液を播種する今回の実験方法ではバイオチューブは抗感染性を発揮できなかった可能性がある。

以上のように当初計画した感染実験モデルで結果は得られなかった。そして組織学的・破断荷重の検討までは進むことができず、成果を論文発表することが叶わなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小松 正樹  (Komatsu Masaki)  (70816131)	信州大学・医学部附属病院・医員   (13601)	
研究分担者	中山 泰秀  (Nakayama Yasuhide)  (50250262)	大分大学・医学部・客員研究員   (17501)	
研究分担者	瀬戸 達一郎  (Seto Tatsuichiro)  (70362118)	信州大学・学術研究院医学系・教授   (13601)	
研究分担者	和田 有子  (Wada Yuko)  (30419410)	信州大学・学術研究院医学系・講師   (13601)	
研究分担者	五味淵 俊仁  (Gomibuti Toshihito)  (90597668)	信州大学・医学部附属病院・特任研究員   (13601)	

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
---------	---------