

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10633

研究課題名(和文)先天性心疾患の外科治療における自己結合組織による肺動脈形成素材の開発

研究課題名(英文) Material development of autologous in vivo tissue engineered vascular grafts for congenital heart surgery

研究代表者

前田 吉宣 (Maeda, Yoshinobu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20438203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間において5例に計8回19本のシリコン基材の埋め込みを行い、そのうち次段階手術に到達した3例から計4回5本の自己結合組織片(in vivo-TEVGs)採取を行った。埋入期間は196-1050日、平均535日であり、すべて鋳型のシリコン基材周囲に良好なin vivo-TEVGsが形成され血管壁代用素材として使用し得た。病理組織学的には主にコラーゲン繊維と少数の線維芽細胞で構成され、ほぼ均一の壁厚であった。縫合保持力、破壊圧力による機械的評価は臨床応用において十分な細断耐性と動脈圧に耐える強度を有していた。一方、追跡観察期間において良好に開存し遠隔期の狭窄や瘤状変化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

解剖学的な複雑性・多様性を特徴とする先天性心奇形であるが肺動脈の低形成を合併する疾患群においては治療の過程で肺動脈の拡大形成手術を要し、するが、その血管壁素材として自己心膜が一般的である。しかし遠隔期の肥厚・退縮・狭窄・壁肥厚などによる変性を来す可能性が排除できず、複数回の再手術時に採取困難となる。今回の研究において生体内組織形成技術を用いて作成した自己結合組織(in vivo-TEVGs)は自己心膜や人工血管に代わる新たな血管代用素材として非常に有用である可能性を示しており、先天性心疾患の外科治療領域において福音となり得る。

研究成果の概要(英文)：During the study period, 5 cases were implanted with a total of 19 silicon implants, and 3 cases that reached the next stage surgery had a total of 5 self-connecting tissue pieces (in vivo-TEVGs) collected. The implantation period was 196 to 1050 days, and the average was 535 days. Good in vivo-TEVGs were all formed around the silicon molds and could be used as a substitute material for blood vessel wall. Histopathologically, it consisted mainly of collagen fibers and a few fibroblasts, and had a nearly uniform wall thickness. Mechanical evaluation by suture retention strength and burst pressure showed sufficient shredding resistance and strength to withstand arterial pressure in clinical applications. On the other hand, during the follow-up observation period, patency was good and no stenosis or nodular change was observed in the midterm period.

研究分野：先天性心疾患の外科治療

キーワード：生体内組織形成 自己結合組織 自家移植 先天性心疾患 外科治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

解剖学的な複雑性・多様性を特徴とする先天性心奇形であるが、血行動態の観点からは、心内短絡路を通じた左右シャントの結果として肺血流が増加する疾患群と、右室流出路から肺動脈における狭窄性変化により肺血流が減少する疾患群に大別される。後者の多くは肺動脈の低形成を合併するため、治療の過程で肺動脈の拡大形成手術を要するが、その際に用いられる血管壁素材としては、自己の心膜が一般的である。

自己心膜は抗原性がなく、成長も期待できる優れた素材であるが、遠隔期に肥厚・退縮・狭窄・壁肥厚などを来す可能性が排除できない。また再手術時には癒着を起こしているため、良好な状態の自己心膜の採取は困難である。一方、人工素材である伸延ポリテトラフルオロエチレン（ゴアテックス®）人工血管は成長が期待できない他、自己血管壁に比べて硬いため自己血管の狭窄を惹起する可能性が懸念され、また、市販されているウシ由来の心膜も石灰化や固定液による自己肺動脈退縮などの問題を有する。小児に対する肺動脈形成手術に理想的な素材は未だ得られておらず、成長が期待でき、柔軟かつ開存性が良好で、抗原性を有さない血管壁素材の開発は急務である。

これまで生体内にシリコンやチタンなどの医療材料（異物）を留置させると、その周囲がカプセル化されて生体と共生する反応を利用して、患者自身の体内で任意の形状を有する自家組織を形成させ、それを移植片として自家移植する生体内組織形成技術を開発してきた。この技術は患者体内を反応場とするため、安全・簡便・低コストで移植片を作成できるという利点を有する。さらに自家組織であるため移植後の抗凝固療法や免疫療法が不要であり、成長の可能性も期待できる他、未知のウイルス等への感染の危険性も排除される。また、動物実験（ラット、ウサギ、ビーグル）では移植した管状組織体の内面は約 2 週間で完全な内皮化が起こり、移植後約 8 週では壁内細胞は平滑筋細胞に置き換わるなど、血管壁の再構築が行われていることが確認されている。これらの特徴を持つ自己結合組織片は、特に成長の可能性を要求される小児の肺動脈形成に非常に有用な素材であると考えられる。

2. 研究の目的

小児先天性心疾患の外科治療では、狭小化した肺動脈に対する拡大形成術のための血管壁素材として、自己の心膜が用いられる事が多い。しかし、将来的な退縮や石灰化の懸念に加え、複数回の手術を経て治療が完成する複雑心奇形の場合、前回手術の影響で心膜が癒着を起こし良好な状態での採取が困難となる、などの問題がある。本研究は、生体内組織形成技術に基づき、患者自身の体内で形成した膜状の自家組織（*in vivo* Tissue-Engineered Vascular Grafts; 以下 *in vivo*-TEVGs）を血管壁素材として、肺動脈の拡大形成手術を試みる臨床研究である。

生体内組織形成技術によって得られた *in vivo*-TEVG については、血管壁素材として自家移植を行った場合の安全性や成長可能性、耐圧性能が、動物実験においてすでに立証されている。本研究の最終的な目的は、同様の安全性や成長可能性がヒトにおいても成立することを確認することである。そのために研究期間内に以下のことを明らかにする。

- (1) シリコン製の基材を一定期間皮下に埋設することで、*in vivo*-TEVGs が採取可能であることを示す。また、それに至適な埋設期間を検討する。
- (2) 採取された *in vivo*-TEVGs を病理組織学的に検討し、その安全性を明らかにする。また感染症検査も同時に行い、皮膚常在菌などの混入の可能性について検討する。
- (3) 採取された *in vivo*-TEVGs を血管壁素材として肺動脈形成術を行う際の、手術手技上の注意点や問題点（素材の性質に適した縫合法や縫合糸の選択など）を明らかにする。
- (4) 肺動脈形成に用いた *in vivo*-TEVGs の経時的変化を観察し、その成長可能性を明らかにする。また退縮や石灰化、瘤状変化などの合併症の有無についても検討する。
- (5) 肺高血圧合併症例への使用を通じて、*in vivo*-TEVGs の耐圧性能と限界について検討する。
- (6) 肺動脈形成術後に再度の段階的手術を要する症例で、次回手術の際に組織片を採取し、血管壁として用いられた *in vivo*-TEVGs に、内膜化や平滑筋細胞の増生、エラスチンの発生といった、血管壁構造の再構築（動物実験ではすでに確認されている）が起こることを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、肺動脈狭窄または低形成を伴い、また段階的手術を要する先天性心疾患患者を対象として、初回手術時に皮下に埋設したシリコン基材を次回手術時に摘出、その周辺に形成された *in vivo*-TEVGs を採取して、肺動脈形成用の血管壁素材として応用することを主目的とする。

このための研究計画は、次の 4 点を骨子とする。

① 対象患者の選定、結合組織片の作製、肺動脈形成術への応用。

段階的治療を要し、かつ将来的に肺動脈の拡大形成術が必要となる患者を対象とし、その初回姑息手術時（多くは腕頭動脈-肺動脈人工血管シャント術）に、胸骨正中切開創より腹部皮

下、腹直筋直上に滅菌シリコン基材を埋入する。シリコン基材の形状は円柱状、大きさは径3~6 mm、長さ30~50 mmとし、症例に合わせて1~3本埋入する。第一期姑息手術が不要な症例では、単独で手術を行い、腹部皮下、腹直筋直上に滅菌シリコン基材を埋入する。埋入期間は4~12ヵ月とするが、各症例の循環動態を優先して次回手術時期を決定し、その期間は埋入する。第二期手術もしくは根治手術時：シリコン基材と結合組織片を採取。適切な *in vivo*-TEVGs が作成できているか肉眼的に確認を行う。*in vivo*-TEVGs を長軸方向に切り開き、適切な大きさにトリミングした後、切開した狭窄肺動脈部分に吸収糸もしくは非吸収糸にて縫着し、拡大形成を行う。手術は一連の心内修復術に合併して行う。第二期手術が不要な症例では、根治手術時に同様の手技を行う。

② 採取された *in vivo*-TEVGs を病理組織学的に検討する。

シリコン基材と結合組織片を採取する際に、一部を病理組織学的検査ならびに感染症検査に供する。

③ 移植された *in vivo*-TEVGs の経時変化を、画像検査を用いて追跡観察する。

in vivo-TEVGs 植え込み手術後は超音波検査、CT 検査などを用いて長期にわたって植え込み部位の開存性や異常の有無、血管成長などについて確認する。

④ 移植された *in vivo*-TEVGs を遠隔期に摘出し、病理組織学的検討を行う。

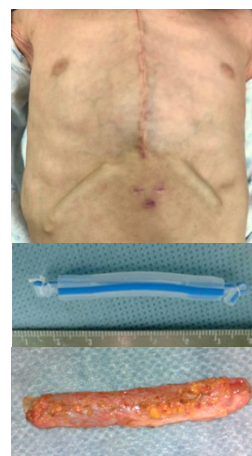
in vivo-TEVGs を用いた肺動脈形成手術後に、再度の段階的手術を要する症例については、安全に支障の無い範囲でグラフトの一部を採取、その病理学組織学的検討を行い、血管壁構造の再構築に関して検討を行う。

4. 研究成果

① *in vivo*-TEVGs の作成および肺動脈形成への応用

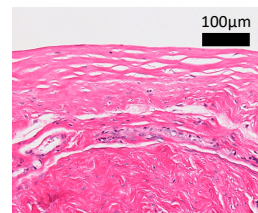
我々は先天性心疾患を有する患児に対して世界で初めてこの技術の臨床応用を行い、2016年にその報告 (Kato N, Yamagishi M, Kanda K, et al. First successful clinical application of the *in vivo* tissue-engineered autologous vascular graft. *Ann Thorac Surg.* 2016;102:1387-1390) を行った。その後、当該研究期間において5例の対象患者に計8回、19本のシリコン基材の埋め込み (2例は複数回の埋め込み。うち1例は3回、もう1例は2回) を行い、そのうち次段階手術に到達した3例から計4回、5本の *in vivo*-TEVGs 採取を行った。

シリコン基材の内訳は50mm長が15本、40mm長が4本でいずれも太さ19Fr (6.3mm) のシリコンドレーンを使用した。対象患者はいずれも肺動脈閉鎖、主要体肺動脈側副血行を原疾患とし、姑息手術時に正中切開創から埋め込み手術を行った。次段階手術時に *in vivo*-TEVGs の採取を行った5本の埋入期間は196日~1050日で平均535日であり、すべて鋳型のシリコン基材周囲に良好な *in vivo*-TEVGs が形成されており、血管壁代用素材として肺動脈形成に使用することができた。*in vivo*-TEVGs を使用する際は70%エタノールで10分間処理を行い、管状もしくは切り開いてシート状として使用したがいずれにおいても縫合時のハンドリングは良好で、縫合操作の機械的強度に問題を感じなかった。



② 病理組織学および機械的評価

採取された *in vivo*-TEVGs の一部を病理組織学的評価を行った。まず肉眼観察では非常に滑らかな内腔表面を持っていた。組織染色を行ったところ、それらの壁は主にコラーゲン繊維と少数の線維芽細胞で構成されており、弾性繊維形成や平滑筋細胞は観察されなかった。それぞれ10点の壁厚を計測したところ、ほぼ均一で平均 $200 \pm 36 \mu\text{m}$ であった。これはこれまでの研究で得られた動物実験における値 (ウサギ: $76 \pm 37 \mu\text{m}$ 、ラット: $56.2 \pm 27.5 \mu\text{m}$) と比べると2倍以上の厚さであった。感染症検査においてはすべて陰性であった。



in vivo-TEVG 組織断片 (H&E 染色)

また機械的強度評価を行ったところ、まず縫合保持力 (suture retention strength, SRS) は平均 $2.26 \pm 0.40\text{N}$ ($0.89\text{--}3.72\text{N}$) と計測された。他の報告においてヒト伏在静脈とヒト内胸動脈の SRS はそれぞれ 1.92N (196gf)、 1.35N (138gf) とされており、また *in vitro* でヒト細胞を用いて構築された他の臨床応用 TEVG に関するいくつかの研究では、その SRS は $1.49\text{--}1.75\text{N}$ (152~178gf) と報告されており、従来のヒト体内の血管や他の *in vitro* TEVGs と同等以上の SRS を有していた。一方、*in vivo*-TEVGs の破壊圧力 (burst pressure) は 3057mmHg と計測された。先の報告においてヒト伏在静脈の破壊圧力は 1599--

1680mmHg、ヒト内胸動脈の破壊圧力は 3196mmHg とされており、in vivo-TEVGs は同等の結果であった。これらから in vivo-TEVGs は外科的臨床応用において縫合の際の十分な細断耐性と動脈圧に耐える強度を有していると考えられた。

③ 移植後 in vivo-TEVGs の追跡観察

今回の研究期間中に in vivo TEVGs を採取し、自己の肺動脈形成に移植応用した 3 例は術後最長 7 ヶ月の時点において CT 検査上、形成部位の狭窄や瘤状変化を認めず良好に開存していた。また初めての臨床応用例に関しての追跡観察においては術後 4 年を経過しているが良好に開存し、狭窄や瘤状変化を認めていない。

④ 移植後 in vivo-TEVGs の病理組織学的評価

今回の研究期間において in vivo-TEVGs を自己肺動脈形成に移植応用し、その後再度の段階的手術にてグラフトの一部を採取できた症例がなかったため移植後の病理組織学的評価はできていない。

以上の結果より今回の in vivo-TEVGs の臨床応用研究はその作成で得られた in vivo-TEVGs の病理組織学および機械的評価において良好な結果であり、肺動脈形成における血管壁代用素材として安全に使用できることが示された。また短期の追跡期間ではあるものの、現段階において遠隔期の問題も認めておらず、多段階の手術を必要とする先天性心疾患の外科治療領域において自家心膜の有望な代替手段である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shuhei Fujita |
| 2. 発表標題 Clinical Application of an In Vivo Tissue-Engineered Vascular Graft in a Patient with MAPCA: Evaluation of the Mechanical Properties and Histology |
| 3. 学会等名 The Society of Thoracic Surgeons, 56th Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shuhei Fujita |
| 2. 発表標題 4-year follow-up of the first clinical application of the in vivo tissue engineered vascular graft to congenital heart disease: potential for adaptability to patient growth |
| 3. 学会等名 ISACB + ISVTE (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoya Inoue |
| 2. 発表標題 Modifications of mechanical properties of in vivo tissue engineered vascular tissues by short period of chemical treatments |
| 3. 学会等名 ESAO (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masashi Yamanami |
| 2. 発表標題 Application of in vivo tissue engineered decellularized connective tissue for cardiovascular grafts |
| 3. 学会等名 ESAO (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 山南 将志 |
| 2. 発表標題 脱細胞化生体由来結合組織膜の動脈パッチ移植への応用. |
| 3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masashi Yamanami |
| 2. 発表標題 Development of tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic arterial patch implantation. |
| 3. 学会等名 TERMIS World Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masashi Yamanami |
| 2. 発表標題 Application of tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic arterial patch implantation. |
| 3. 学会等名 European Society for Artificial Organ 2018 Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masashi Yamanami |
| 2. 発表標題 Development of in vivo tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic cardiovascular grafts. |
| 3. 学会等名 ISACB (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山岸 正明 |
| 2. 発表標題 VSD/PA/MAPCAに対する一期的unifocalizationと姑息的右室流出路再建術 |
| 3. 学会等名 第47回日本心臓血管外科学会学術総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山岸 正明 |
| 2. 発表標題 右室流出路再建を伴う先天性心疾患の外科治療（VSD+PA+MAPCA, PTA） |
| 3. 学会等名 第174回日本胸部外科学会関東甲信越地方会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山南 将志 |
| 2. 発表標題 異種由来自己再生型小口径代用血管「バイオチューブ・マトリックス」の開発 |
| 3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 M Yamanami |
| 2. 発表標題 Application of the xenogeneic decellularized tube matrix produced by in vivo tissue engineering to the 'off-the-shelf' small-caliber vascular graft |
| 3. 学会等名 European Society for Artificial Organ 2017 Congress（国際学会） |
| 4. 発表年 2017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 | 山岸 正明 (Yamagishi Masaaki) (40182422) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303) | |
| 研究分担者 | 宮崎 隆子 (Miyazaki Takako) (90405291) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師 (24303) | |
| 研究分担者 | 渡辺 太治 (Watanabe Taiji) (20448723) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303) | |
| 研究分担者 | 山南 将志 (Yamanami Masashi) (30438204) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303) | |