

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16388

研究課題名(和文)世界最小径再生型人工血管の開発とその成長性の可能性

研究課題名(英文)Development of microvascular grafts with an ultra small diameter of 0.6mm

研究代表者

石井 大造(Ishii, Daizo)

広島大学・病院(医)・医科診療医

研究者番号：30773775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内組織形成術を利用した、世界最小径(内径：0.6mm)の人工血管"microbiotube"作成して、ラットの大腿動脈へ移植し、その生着性及び開存性を評価した。移植後1ヶ月後の時点では、12例(75%)の開存が得られていた。その12例は全例で12ヶ月後までの開存が得られていた。移植後12ヶ月での病理組織学的所見では、母血管同様の層構造が完全に再構築されており、microbiotubeの移植後長期間における、高い生着性、安定性及び耐用性が確認された。近い将来microbiotubeは、微小血管手術領域において、有用なgraftになり得るものと確信している。

研究成果の概要(英文)：The long-term patency of small calibre "microbiotubes" with an inner diameter of 0.6 mm is described. No small calibre grafts of acceptable quality are currently available, and it has been difficult to maintain the patency of artificial vessels with an inner diameter of < 3 mm. In this study, 75% of microbiotubes used as allogenic grafts in rats remained patent at 12 months. It is believed that this study makes a significant contribution to the literature as it demonstrates that microbiotubes have high compatibility, stability, and durability as long-term replacement grafts and may be usefully applied to microsurgery.

研究分野：脳神経外科

キーワード：biotube vascular graft small calibre biomaterial

1. 研究開始当初の背景

我々は新しい再生医療技術として「生体内組織形成術」を開発している。本法では、皮下に目的の形状にあった鋳型を埋入し、皮下をバイオリクターとして利用することで、2ヶ月以内に自家組織のみからなる目的形状に合わせた移植体を得ることができる。これを現在様々な分野の治療に応用している^{1, 2)}。シート状のバイオシートは心臓血管系の修復材などとして、さらにバイバルブは三次元的な弁構造体として動物移植実験が行われ、それぞれ組織再生を認めている。その中の1つとして、円柱上の鋳型から得られる管状の結合組織体をマイクロチューブと名付け、人工血管への応用を目指している³⁾。内径5,6mmの中口径マイクロチューブ人工血管は既に臨床応用されており、透析患者の狭窄血管のバイパス治療に役立っている。一方、1mm未満の超小口径人工血管に関しては、一般的な再生医療技術で作製することは困難であり、ほとんど報告例もない未知の領域であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、生体内組織形成術を応用して、世界最小径(内径0.6mm)の超小口径人工血管、マイクロバイオチューブを作成した。それをラットの大腿動脈へ移植して、移植後急性期及び慢性期にそれぞれmagnetic resonance angiography (MRA)を用いてその開存性を評価した。またそれぞれの時期におけるマイクロバイオチューブの生着性を評価するために、一部の移植片を取り出して、病理組織学的評価も行った。

3. 研究の方法

マイクロバイオチューブの鋳型は、薄いシリコンチューブで被覆した7本のステンレス芯を、2個のプラスチックで並列に固定して組み立てた。鋳型をラットの皮下に2ヶ月間埋没させた後、周囲の結合組織ごと鋳型を摘出して、脆弱な余剰組織を削除し、鋳型の部材を全て取り除くことによって、内径0.6mmの管状結合組織体として、マイクロバイオチューブを得た(図1)。

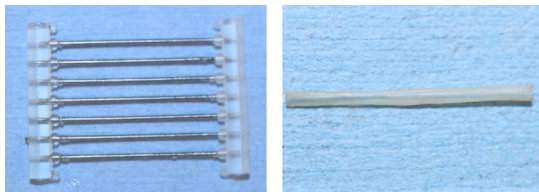


図1 鋳型及びマイクロバイオチューブ

これをラットの両側大腿動脈(内径:0.5mm)に移植した。顕微鏡下にラットの大腿動脈を露出し、マイクロクリップで中枢側、末梢側をそれぞれ遮断した後、その中間点で大腿動脈を切断した。切断された大腿動脈の間に interposition する形で、マイクロバイ

オチューブを移植した。吻合は10-0 nylon糸を使用して、stay sutureを2針、それぞれ両側に3針ずつ追加縫合を行い、合計8針で施行した。移植12ヶ月後まで経過観察し、MRI(小動物用7-Tesla MRI(BioSpec 70/30 USR; Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany))による開存性の評価は、移植後1ヶ月及び、その後は3ヶ月ごとに行った。12ヶ月後に一部の移植片を取り出し、病理組織学的所見の評価を行った。

4. 研究成果

マイクロバイオチューブは超小口径であるが、そのburst pressureは計測上4190 ± 1117 mmHgであり、動脈人工血管として十分な強度を有していた。また移植時の操作においても、吻合時に人工血管壁が避けるといった脆弱性は全く認めなかった。マイクロバイオチューブの吻合手技自体は、訓練を積んだ血管外科医であれば通常のマイクロサージャリー技術で十分に可能であり、特殊な器具や技能も不要であった。この点からマイクロバイオチューブは、移植可能な超小口径人工血管として、十分な汎用性を持ち得る可能性が示唆された。

研究期間中、全体で16例の移植を行った。移植後1ヶ月後の時点では、12例(75%)の開存が得られていた。その12例は全例で12ヶ月後までの開存が得られており、MRAでの血管描出所見にも変化はなかった。また母血管とマイクロバイオチューブの間の吻合部は、移植後の時間経過に伴って、MRA上徐々に不鮮明化していった。移植後1ヶ月の時点において、2例で吻合部に瘤形成が確認されたが、増大や破裂をきたすことなく、いずれも経過観察中に徐々に縮小していた。移植後12ヶ月で一部のマイクロバイオチューブを取り出して確認すると、肉眼的にはマイクロバイオチューブの内腔に明らかな血栓形成は認めず、その内腔はきわめて平滑であった。また母血管側から吻合部を介してマイクロバイオチューブ側への新生血管の良好な発達も確認された(図2)。

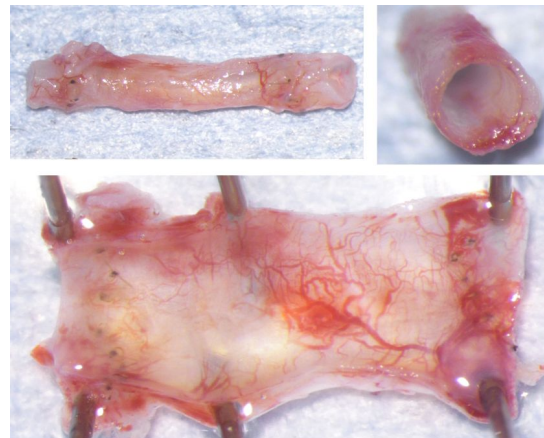


図2 マイクロバイオチューブ

移植1年後

病理組織学的には、母血管同様の層構造が完全に再構築されており、またその内腔は、von Willebrand factor 陽性の、再生された血管内皮細胞で完全に覆われていた。その他、マイクロバイオチューブ壁内に、顕著な炎症細胞の浸潤は認めず、また Vonkossa 染色においても明らかな石灰化は認めなかった。

小口径 (< 6 mm) の人工血管の移植においては、血栓の発生や内膜肥厚の高い合併率が問題となる。過去に 1mm 未満のマイクロ径人工血管の移植に関しては、数編が報告されているのみである。Kuwabara ら^{4, 5)}は polycaprolactone 製で口径 0.7mm の人工血管をラットに移植し、その開存率が 1 週間後 : 75%, 2 週間後 : 86%, 6 週間後 : 78% と比較的良好であったと報告しているが、12 週間後には 57% となり、中期的には大きく低下していた。また Tara ら⁶⁾は polyfiber で作成した超小口径の人工血管をラットに移植したところ、その 42% で動脈瘤の形成そして破裂をきたしたと報告している。一方、マイクロバイオチューブは内径 0.6mm とさらに細径にも関わらず、移植後 1 ヶ月の時点で高い開存率を示し、さらに 1 ヶ月以降の新たな閉塞例及び、瘤化、狭窄等の变形も皆無であった。これらの結果から、マイクロバイオチューブにみられた 1 ヶ月以内の閉塞、瘤化は、移植時の吻合操作に伴い、母血管に内膜損傷を生じていたり、マイクロバイオチューブの内腔自体に損傷を与えてことにより、吻合部の血流障害を誘発して血栓形成をきたしたり、または血管損傷部分に耐用以上の圧力が加わったことにより、血管閉塞や壁の膨隆、瘤化をきたしたものと考えられる。逆に、吻合操作自体に問題がなく、母血管の内膜とマイクロバイオチューブの内腔を損傷することなく確実に合わせることが出来れば、マイクロバイオチューブが本来持つ高い生着性によって、移植後急性期から慢性期にかけて、より高い安定した開存率を達成できる可能性が示唆された。

本研究結果から、マイクロバイオチューブは移植の実現性が証明された世界最小径の人工血管と言える。特殊な機器を要することなく生体組織のみで作製が可能で、また超小口径にも関わらず、高い開存率と再生能を併せ持つ点が、独創性に富む点と考える。将来的には切断指の再接着やリンパ管の再建など、形成外科での super-microsurgery 領域での臨床応用が大いに期待され、さらに新たな血管外科治療の開拓にもつながると考えられる。

< 引用文献 >

- 1) 中山泰秀: 生体内をバイオリアクターとする組織構築、三次元ティッシュエンジニアリング・細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで、大政健史ほか監、pp337-346, エヌ・ティー・エス、東京、2015
- 2) 中山泰秀、古越真耶: 小児先天性疾患に

対する外科治療での貢献をめざす生体内組織形成術 (IBTA): 成長性を有する再生型自己組織体の開発、日小児循環器会誌 32: 199-207, 2016

- 3) Nakayama Y, Ishibashi-Ueda H, Takamizawa K. In vivo tissue engineered small-caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (biotube). Cell Transplant. 2004;13:439-49.
- 4) Kuwabara F, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, Satake M, Kaneko H, Oshima H, Usui A, Ueda Y. Long-term results of tissue engineered small-caliber vascular grafts in a rat carotid arterial replacement model. J Artif Organs. 2012;15:399-405.
- 5) Kuwabara F, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, Kanie K, Kato R, Satake M, Kaneko H, Oshima H, Usui A, Ueda Y. Novel small-caliber vascular grafts with trimeric Peptide for acceleration of endothelialization. Ann Thorac Surg. 2012;93:156-63.
- 6) Tara S, Kurobe H, Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Yi T, et al. Well-organized neointima of large-pore poly(L-lactic acid) vascular graft coated with poly(L-lactic-co-epsilon-caprolactone) prevents calcific deposition compared to small-pore electrospun poly(L-lactic acid) graft in a mouse aortic implantation model. Atherosclerosis 2014;237:684-91.

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) Ishii D, Enmi JI, Iwai R, Kurisu K, Tatsumi E, Nakayama Y. One year Rat Study of iBTA-induced "Microbiotube" Microvascular Grafts With an Ultra-Small Diameter of 0.6 mm. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2018 Apr 13. pii: S1078-5884(18)30150-3. doi: 10.1016/j.ejvs.2018.03.011. [Epub ahead of print] (査読有)
- 2) 石井大造、圓見純一郎、飯田秀博、栗栖薫、中山泰秀、世界最小径人工血管(マイクロバイオチューブ)の開発 - ラットモデルでの完全 6 ヶ月開存 -: 形成外科 60(3): 341-345, 2017 (査読有)
- 3) Ishii D, Enmi J, Moriwaki T, Ishibashi-Ueda H, Kobayashi M, Iwana S, Iida H, Satow T, Takahashi JC, Kurisu K, Nakayama Y. Development of in vivo tissue-engineered

microvascular grafts with an ultra small diameter of 0.6 mm (MicroBiotubes): acute phase evaluation by optical coherence tomography and magnetic resonance angiography. J Artif Organs. 2016 Sep;19(3):262-9. doi:10.1007/s10047-016-0894-9. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 石井大造、圓見純一郎、岩井良輔、飯田秀博、栗栖 薫、中山泰秀、生体内組織形成術による世界最小径人工血管(マイクロバイオチューブ)の開発、第 54 回 日本人工臓器学会大会、2016/11/23-25、米子、シンポジウム
- 2) Ishii D, Enmi J, Iida H, Kurisu K, Nakayama Y. Absolute perfect patency of In Vivo Tissue-Engineered Vascular Grafts with an Ultra Small Diameter of 0.6 mm (MicroBiotubes) in a rat model for 1 year. American Heart Association Scientific Session 2016. November 12-16, New Orleans, USA. 2016
- 3) Ishii D, Enmi J, Iida H, Kurisu K, Nakayama Y. One result about growth adaptation of a Biotube vascular graft in a rat model. XLIII Annual Congress of the European Society for Artificial Organs. September 14-17, Warsaw, Poland. 2016
- 4) Ishii D, Enmi J, Iida H, Kurisu K, Nakayama Y. IBTA-fabricated MicroBiotube vascular grafts met 1 year's perfect patency in a rat model. XLIII Annual Congress of the European Society for Artificial Organs. September 14-17. Warsaw, Poland. 2016
- 5) Ishii D, Enmi JI, Iida H, Satow T, Takahashi JC, Kurisu K, Nakayama Y. Development of In Vivo Tissue-Engineered Vascular Grafts with an Ultra Small Diameter of 0.6 mm (MicroBiotubes). American Heart Association Scientific Session 2015. November 7 - 11, Orlando, FL, USA, 2015
- 6) Ishii D, Hayashi M, Enmi JI, Moriwaki T, Kobayashi M, Iida H, Satow T, Takahashi JC, Nakayama Y. High Patency of an In Vivo Tissue-engineered Microvascular Graft (MicroBiotube) in a Rat Model. XLII Annual Congress of the European Society for Artificial Organs. September 2 - 5, Leuven, Belgium, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 大造 (Ishii Daizo)
広島大学 病院(医) 医科診療医
研究者番号：30773775

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

中山 泰秀 (Nakayama Yasuhide)
国立循環器病研究センター 研究所医工学
材料研究室 室長
研究者番号：50250262