

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16293

研究課題名(和文) 下肢動脈バイパスに応用可能な小口径再生型ロング人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of small-diameter regenerative long vascular grafts applicable to lower limb arterial bypass

研究代表者

古越 真耶 (Furukoshi, Maya)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員

研究者番号：20739247

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)：本研究では、下肢血管をバイパスできるような細く長い人工血管の開発を目的とした。再生医療技術の一つである生体内組織形成術(iBTA)は鋳型を皮下に埋め込んで患者体内で自己組織からなる移植用組織体を作製する技術である。iBTAによって作製可能な管状組織体Biotubeを本研究の目的に合致するサイズとなるよう、鋳型の形状をれまでにないコンパクトな渦巻き状とすることで最長50cmのBiotubeが作製可能となった。また、25cm長のBiotubeを動脈間バイパスした生体内評価では、動脈圧に十分耐えて血管グラフトとして機能していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、重症下肢虚血(CLI)に代表される末梢血管障害の罹患率が増加傾向にあり、これは治療ができなければ、または治療が奏功しなければ下肢切断に至る非常に重篤な疾病である。しかし、下肢の血管をバイパスできるだけの内径が細く、長い人工血管は現在のところ存在しない。PTFEに代表される人工物製のグラフトでは耐久性、耐年性、グラフト自体の閉塞の発生率など様々な問題があるためである。一方で、医工学技術によって作製される、とくにBiotubeを始め自己組織で作製可能なグラフトは患者体内との適合性もよく、臨床応用可能となればこれまでにない外科治療の選択肢として臨床医学に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was development of small diameter and long length vascular graft which can bypass between lower limb. In vivo tissue-architecture technology (iBTA) is a technique in which a mold is implanted into a cutaneous poche to prepare a tissue body made of autologous tissue for implantation in a living body of a patient. In order to prepare the Biotube, which is a tubular tissue that can be fabricated using iBTA technology, into a size that meets the purpose of this study, we made the mold into a compact spiral shape, which is novel design, and made it possible to fabricate Biotubes with a maximum length of 50 cm. In addition, in vivo evaluation of the 25 cm length of Biotube bypassed between arteries showed that the Biotube was able to withstand arterial pressure and functioned as a vascular graft.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：重症下肢虚血 小口径人工血管 再生医療技術 生体内組織形成術(iBTA) バイオチューブ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年患者数が増加している重症下肢虚血 (CLI) において、外科的に閉塞部位を血管バイパスさせることが治療として不可欠である。バイパスの際には、現在のところ第一選択としては患者自身の末梢静脈を血管グラフトとして用いるが、基礎疾患の存在によってグラフトとして使用できるような自己血管がない場合、または再手術となった場合に治療に苦慮する。その場合には PTFE などに代表される人工素材製の人工血管を使用するが、人工素材では感染症や異物反応のリスク、経年劣化の可能性などが問題となる他、特に末梢血管に使用するような内径 6mm 以下の小口径人工血管は、血栓などによる閉塞が起こりやすく、未だ優れた製品は存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究は生体内組織形成術 (iBTA) と呼ばれる再生医療技術を用いて、患者の自己組織からなる管状組織体 Biotube を用いている。Biotube を作製するには、その形状の基となる「鑄型」が必要であり、この鑄型を生体の皮下スペースに 1~2 ヶ月埋め込むことでこの鑄型通りの形状の Biotube が形成されるというものである。これまでに、Biotube は内径では 0.6mm の極小径から数 cm までの径まで様々な径のサイズを作製することが可能であり、血管グラフトとして小口径のサイズという点では様々なニーズに合わせて作製できる。しかし、長さはこれまで開発してきた Biotube は 10cm 程度のものであった。本研究では、下肢血管のバイパスに適応可能な長い Biotube を開発することを目的とし、Biotube 作製の要である「鑄型」の設計を、いかに生体の侵襲を少なくできるかを念頭に工夫することとした。次いで、新たな形状の鑄型を基に開発した Biotube を実際に実験動物に移植して血管バイパスして生体内での開存性について評価し、小口径かつ長い Biotube の動脈間バイパス用グラフトとしての性能を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 鑄型の設計・作製

これまでの Biotube の鑄型とは、直線状で長さは 10cm 程度の形状を用いていたため、生体皮下に埋め込む際にも侵襲度は大きくはなく、特に問題とならなかった。本研究では長さを数十 cm の長さとなるような鑄型を、いかに生体に低侵襲な形状で作製ができるかが鍵となった。そこで、これまでとは異なる形状の鑄型設計に取り組むことが必要となった。

#### (2) 長い Biotube の作製

新たに設計した鑄型を作製し、次のステップとして実験動物 (ビーグル犬、ヤギ) の皮下に埋め込み、これまでの Biotube と同じ埋め込み期間で目的の長い Biotube が作製可能かを評価した。鑄型には皮下埋め込み期間中に生体組織が鑄型内に侵入しやすいよう、鑄型外壁にスリットが一定間隔で設けられているが、新たな鑄型に設けたスリットの位置、一つずつの間隔によって形成される Biotube の特に壁厚が不均一となったため、この鑄型のスリットの開け方を微調整し、所望通りの Biotube となるまで繰り返し鑄型設計を修正した。

#### (3) 生体内評価 (動物モデルを用いた Biotube バイパス移植評価)

新たな鑄型を用いて作製した長い Biotube を、ビーグル犬、ヤギといった比較的大型の実験動物を用いて、動脈間にバイパス移植し、生体内での開存性、血流の維持などを超音波ドップラー、血管造影などの画像診断装置を用いて評価した。観察終了後は移植した Biotube を採取し、組織学的評価も実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 鑄型の設計・作製

鑄型は生体の皮下に埋め込んでから 1~2 ヶ月留置でき可能な限り侵襲が少ない形状であるべきという点を念頭に鑄型形状を設計した。その結果、これまで使用していた直線の筒状鑄型を渦巻き状とすることで、直径にして 10~15cm 程度のコンパクトな鑄型となった (図 1A)。

#### (2) 長い Biotube の作製

設計した鑄型を生体皮下に 2 ヶ月埋め込み、その後鑄型ごと摘出した。鑄型内の組織の入り込みに不均衡がみられたため、何度か鑄型のスリットの位置や間隔を調整した結果、全長にわたって壁の厚みも均一な Biotube を作製することが可能となった。直径 15cm 程度の渦巻き状鑄型から、内部に形成された Biotube を取り出して伸ばしていくと内径は 5mm、長さは最長で 50cm の長い Biotube を得ることに成功した (図 1B)。取り出した直後の Biotube を引き伸ばしたりなどの力を加えても途中で干切れることもなく、1 本の長い組織体として形成されていた (図 1C)。

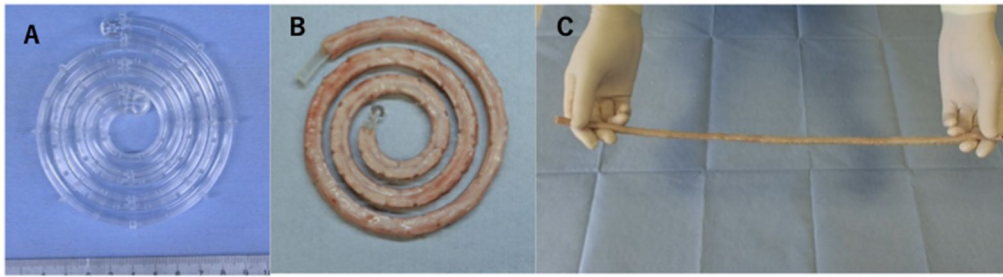


図1：(A)埋め込み前の渦巻き状鋳型。(B)生体皮下埋め込み2ヶ月後に鋳型を取り出し、鋳型のカバーを外すと中に鋳型の形状そのものの渦巻き状のBiotubeが形成されていた。(C)渦巻き状のBiotubeは直線状に伸ばすことが可能。

### (3) 生体内評価（動物モデルを用いた Biotube バイパス移植評価）

作製した Biotube をビーグル犬頸動脈間、ヤギ頸動脈間にそれぞれ 25cm 長の Biotube をバイパス移植した(図 2A)。生体動脈と Biotube を吻合し、その後血行遮断を解除すると吻合部出血、Biotube グraftの膨化、瘤化などの事象は一切なく全長にわたって拍動流が触知可能であった。移植後は経時的に血管造影検査および超音波ドップラー装置にて Biotube の開存の有無、膨化や瘤化、狭窄などの有無などを含めた Biotube 形状の評価、Biotube 内を流れる血流の評価を実施した(図 2B, C)。Biotube 移植を実施した全ての動物に移植後 1 ヶ月程度の期間抗血栓薬を投与し、その後は休薬して観察を続けたが、Biotube は開存を維持した。

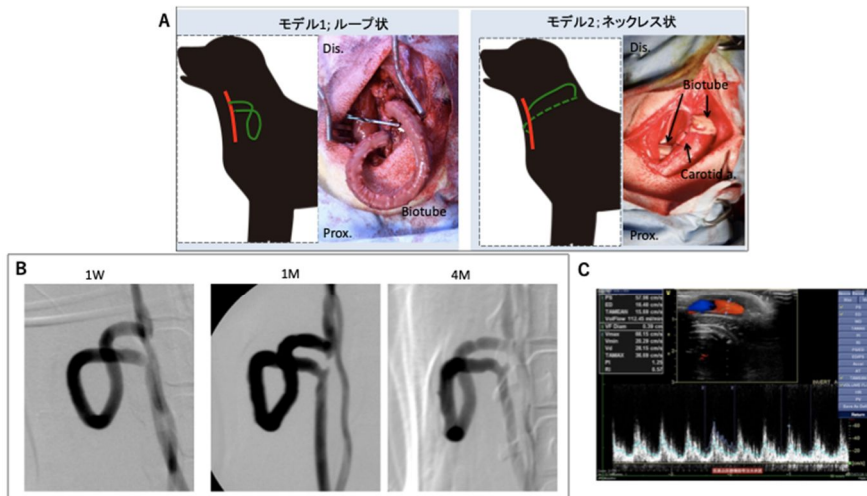


図2: (A) ビーグル犬頸動脈バイパスモデル。ループ状と頸部を1周するようなネックレス状の移植モデルを作製した。(B)移植後に開存性やBiotubeの形状を血管造影にて経時的に評価。(C)超音波ドップラーにて血流を評価。拍動流がBiotube内を流れていることが確認された。

移植後 4 ヶ月間の観察期間を終えた後に摘出した Biotube について組織学的評価を実施した。移植前の Biotube はコラーゲン線維主体の組織構造であるが[1]、内腔表層は vWF 陽性の 1 層の細胞層で覆われていることを確認した。同様に内腔側の Biotube 壁では SMA 陽性の平滑筋層が偏在していた。これは Biotube が生体内で血管様構造へと組織再構築されたことを示す。

血管グラフトにおいて、移植後に問題となるのは特に人工素材の場合は経年劣化、生体内での異物反応、感染のリスクがあげられる。このような合併症が移植後に発生した場合はいずれの場合においてもグラフトの摘出、再設置が必要であるばかりか、状況によっては緊急対応が必要となる。よっていかにこのような合併症の発生リスクを下げるか、または合併症が発生しにくい血管グラフトを使用できるかは患者の生命予後にも大きく関わるといっても過言ではない。加えて、内径 6mm 以下のいわゆる小口径サイズの人工血管では、わずかな血栓形成やグラフトまたは血管との吻合部領域での内膜肥厚が生じるだけでも閉塞のリスクが上がり、やはり血流を維持する必要性からこのような合併症に対して移植後も警戒しながら適宜定期的に検査、必要に応じて治療介入が必要となる。よって、様々な合併症のリスクの発生率を極限まで低下させることが可能な人工血管の開発が必要不可欠である。これに対して、日本ばかりか世界を見ても近年寿命の長期化が著しい分、このような血管外科治療が必要となる疾患の罹患率も増加している。そのため、人工素材製人工血管に代わって組織工学を用いて作製される人工血管の開発が注目されている。組織工学によって作られる人工血管の利点は、様々な種類があるが多くは自己組織または自己の細胞を培養することで組織体を形成することが基本的な土台であり、利点としては自己組織では異物反応が起きにくいこと、グラフトに感染が発生した場合も体内での自浄作用が期待ができること、また移植後に組織の再構築が期待できることがあげられる。多くの場合

は、患者体内から採取した細胞または組織を生体外過程で培養、成形することが必要であるため、それを取り扱う特殊な技術、精密かつ清潔な設備が必要となるため、時間と人手、そしてコストがかかる。一方で iBTA は鋳型があればこれを患者の皮下に埋め込むだけであとは患者の体そのものが製造場となるため、誰でも、どこでも、比較的安価で移植体が作製可能であることは他の人工血管と大きく異なる。特に医療費に対する個人の、そして社会の負担という問題点からも、Biotube が臨床応用される意義は大きいと考える。

本研究では、これまでになかった長さの Biotube が開発可能となり、動物移植モデルにおいても良好な成績を得た。この結果は近年治療に苦慮する末梢血管外科治療にとって有用性が期待できると考えられる。

<参考文献>

1. Furukoshi M, Moriwaki T, Nakayama Y. Development of an in vivo tissue-engineered vascular graft with designed wall thickness (biotube type C) based on a novel caged mold. J Artif Organs. 2016; 19(1):54-61.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maya Furukoshi, Eisuke Tatsumi, Yasuhide Nakayama	4. 巻 -
2. 論文標題 Application of in-body tissue architecture-induced Biotube vascular grafts for vascular access: Proof of concept in a beagle model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Vascular Access	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1129729819874318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhide Nakayama, Maya FURUKOSHI, Eisuke TATSUMI	4. 巻 61(2)
2. 論文標題 Shape memory of in-body tissue-engineered Biotube vascular grafts and the preliminary evaluation in animal implantation experiments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 208-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.23736/S0021-9509.19.10594-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Y, Furukoshi M, Terazawa T, Iwai R	4. 巻 185
2. 論文標題 Development of long in vivo tissue-engineered "Biotube" Vascular grafts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuhide Nakayama, Maya Furukoshi, Eisuke Tatsumi
2. 発表標題 Successful implantation of a long "Biotube" vascular graft for the bypass surgery in critical limb ischemia(CLI) in a goat model
3. 学会等名 European Society for Vascular Surgery（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maya Furukoshi, Eisuke Tatsumi, Yasuhide Nakayama
2. 発表標題 A long "Biotube" vascular graft for hemodialysis access: Evaluation in an animal model
3. 学会等名 European Society for Vascular Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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