

平成 22年 6月 16日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007 ～ 2009
 課題番号： 19390368
 研究課題名(和文) 患者が自身の細胞とマトリックスを用いて体内で作成する自家移植用心臓代用弁の開発
 研究課題名(英文) Development of autologous tissue heart valves constructed by in vivo tissue engineering.
 研究代表者
 神田 圭一 (KEIICHI KANDA)
 京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号： 60295649

研究成果の概要(和文)：自家結合組織のみからなる心臓代用弁を患者体内で形成する技術を開発した。シリコンやポリウレタンからなる鋳型を家兔の皮下に4週間留置すると鋳型に沿った組織形成が行われた。鋳型を取り除くことにより心臓弁形状の組織体が得られ、フローサーキットで良好な開閉動作が確認され、またその経時的流量カーブはウサギ大動脈弁に酷似していた。最新型は短期のパイロットスターディーとして、肺動脈弁位への移植に成功し、移植後の弁機能も良好であった。不足しているホモグラフト代用弁に取って代わる可能性のある生体弁として期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed the autologous tissue heart valves (Biovalves) constructed by the simple, safe and economical in vivo tissue engineering without any use of specially clean facilities nor complicated procedures. A tapered silicone mold was covered by a crown-shaped PU sponge scaffold, which was embedded in the subcutaneous space of the Japan white rabbit for 4 weeks. After removal of the silicone mold, tri-leaflet valvular shaped autologous tissues were formed. In the flow circuit, smooth valvular movements were observed. Their flow volume pattern was very close to that of native rabbit aortic valves. The latest model was successfully implanted to the pulmonary valves in the allogeneic beagle model as a pilot experiment. In vivo tissue engineered "Biovalves" could be idealistic autologous heart valve prostheses with potentiality replacing the short-coming Homografts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：医歯薬科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：自家組織、心臓生体弁、再生医療、組織工学、in vivo

1. 研究開始当初の背景

(1)心臓代用弁の発達と限界

心臓弁膜症に対する外科治療は古くから行われており、様々な人工機械弁・異種生体弁・同種凍結生体弁（ホモグラフト）などが臨床応用されている。現在用いられている代用弁はそれぞれ長所・短所を持ち、制限付きではあるが完成度の高いものである。

しかし耐久性に優れた機械弁は血栓性が高いため、生涯抗凝固剤であるワーファリンを投与する必要がある（出産に対する制限）。また異種生体弁は耐久性の限界や石灰化があり、若年者への使用には問題が残る。更に近年増加している成長期にある小児弁膜症手術への適応にも限界がある。加えて感染性心内膜炎などの疾患に良好な感染抵抗力のあるホモグラフトはドナー不足である。

(2)再生医療技術を用いた自家組織からなる代用臓器。その応用としての自家組織生体代用弁

もしも自家組織（細胞・細胞外マトリックス）からなる代用臓器を安全かつ簡便に作成することが出来れば臓器移植治療にならぶ治療法が実現することになる。心臓弁についても『生きている（高い Viability を持つ）』自家組織生体弁は、①内皮形成が良好であるため抗凝固剤が不要であり、自己再生能があるため②強い耐久性があり、石灰化も生じにくく③感染に強い。さらに④成長の可能性が期待でき、小児への適応が広がる・・・などの様々な長所を合わせ持つ理想的なものとなりうる。

現在の再生医療技術は自家培養細胞をもとに様々な代用臓器を *in vitro* で作成することを可能にしてきたが、心臓弁についても例外では無く、Tissue Engineered Valve としてこれまで様々な試みが行われた。しかし作成には膨大な時間と費用を要する上に安全性確保のための特殊な施設が必須であるため、一般の臨床現場への普及は非現実的である。そこで現在我々は全く簡便な方法を用いて自家結合組織体を形成する技術に注目している。

(3)皮下で形成される“バイオカプセル”と循環系人工臓器への応用

体内に異物を埋入すると、生体防衛機構の働きによってカプセル状の組織体で被膜化されることは古くから知られている。この古典的技術を最新の材料工学技術を用いることにより新たな見直しを行い、組織形成課程を制御した自家結合組織体“バイオカプセル”の循環系代用臓器への応用を開始した。管状結合組織小口径代用血管“Biotube”を開発し、実験動物での自家動脈への移植で良好な結果を得た。

2. 研究の目的

本研究では、自家細胞とマトリックス成分を用いて自己の体内において自らの移植臓器を自在に設計・誘導・再生するという、再生医療工学的に全く新しい着想に基づく移植医療技術の開発・応用を行う。これは人工臓器、移植臓器、*in vitro* 組織工学的臓器に続く次世代型臓器として位置づけることができる。体内に埋入された人工物の周囲に線維芽細胞とそれが産出するコラーゲン線維によって構成されるバイオカプセルを利用した上記の管状組織体“Biotube”に続き、患者の体内で作成し左心系にも応用可能な世界初の自家生体心臓代用弁“Biovalve”を開発する。不足している自家移植組織（オートグラフト）・同種移植組織（ホモグラフト）に取って代わり、成長期の小児にも適用できる可能性のある自家組織体を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)自家結合組織心臓弁（Biovalve）プロトタイプモデルの開発

これまでの予備的検討において、兔皮下にアクリル棒を埋入させると数ヶ月で主に自家線維芽細胞とコラーゲンからなる厚さ数百ミクロン程度のカプセル化組織体が形成され、生体動脈と類似の力学的性質を有することが示された。また用いる鑄型の材質や形状によって形成されるカプセルの力学的性質や形状が変化することを明らかとし、用途に応じた力学的性質や形状を設計することに成功した。まず多孔性ポリウレタンとシリコン棒を組み合わせた特殊な鑄型を作成し、ラット・日本白色ウサギの皮下に植え込むことにより三つの弁葉構造を持つ心臓弁様構造を持つ組織体“Biovalve”を形成させ、循環回路で機能の評価した。

(2)Conduitモデルの開発

移植を前提として人工血管内腔面に Biovalve をコンポジットグラフトとして作成する技術を開発中した。人工血管を想定した多孔性ポリウレタンスポンジチューブの内腔に特殊形状の凹凸の鑄型を挿入し、鑄型間でバイオカプセルを形成させることが出来ればチューブ内腔に Biovalve を形成することが可能となる。



(3)拍動型循環回路を用いた *in vitro* における Biovalve の機能評価

当初作成したの Biovalve はφ5mm の小口径である。初期動物実験をウサギに設定しているためこの大きさで作成したが、これまでこのような小口径バルブの機能評価を行うための拍動回路は開発されていなかった。ローラー・ポンプと2つのコンプライアンスチャンバーを用いて1回拍出量2 mL、拍動数240回/分を実現した。またフローサーキット内ではバイオバルブの形態変化を経時的に流量波形とシンクロして高速度ビデオカメラを用いて撮影することにより評価することが可能となった。

(4)動物移植実験モデルの開発

これまで開発が試みられたいわゆる Tissue Engineered Valve では動物植え込み前には良好な 弁尖形態の構造物が形成されていても移植後これらは徐々に退縮し、いずれは消失してしまうことが示されている。今回の Biovalve についてもこの現象の有無についての検証は不可欠である。そこで まず *in vitro* における力学的特性の評価、拍動培養回路における機能的・物理的変化の検証を行い動物実験に備え、十分な評価後自家移植実験モデルを開発した。研究開始当初はウサギを用いたモデルを考えていたが、この3年間で、日本大学獣医学部との連携が可能となり、人工心肺を用いたビーグル犬の肺動脈弁位への移植モデルの開発を開始した。

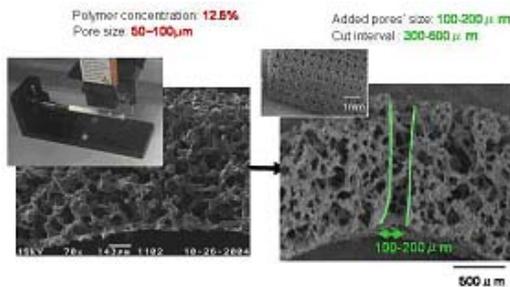
4. 研究成果

(1)自家結合組織心臓弁 (Biovalve) プロトタイプモデルの開発

上述の方法で三つの弁葉構造を持つ心臓弁様構造を持つ組織体“Biovalve”を形成させることに成功した。循環回路内での弁の開閉は良好であり、閉鎖時の逆流もほとんど無かった。弁尖部の機械的特性も極めて良好であり、弁機能として充分実用性があることが確認された。

(2)Conduitモデルの開発

ポリウレタンの有孔性や厚みが組織形成に大きく影響し、条件の最適化に時間を要した。最終的にはレーザー加工で新たに加工を加えることにより、組織侵入が良好となり、安定した組織形成が実現できた。Conduit モデルにおいても口径5mmが達成できている。



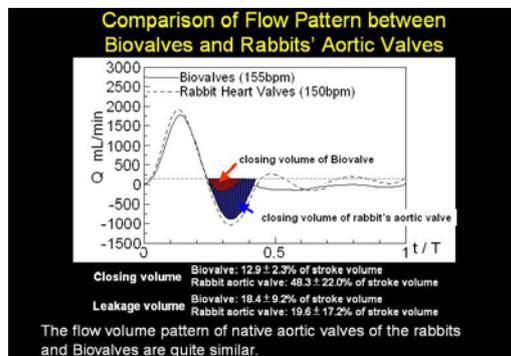
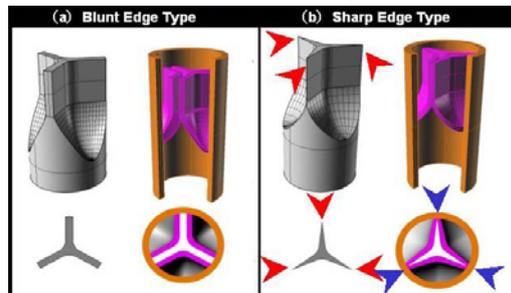
これまでこのような超小口径の代用弁は全く実現できなかった。動物実験は勿論、将来

的には非常に体重の小さな乳幼児への応用の可能性も期待できる。



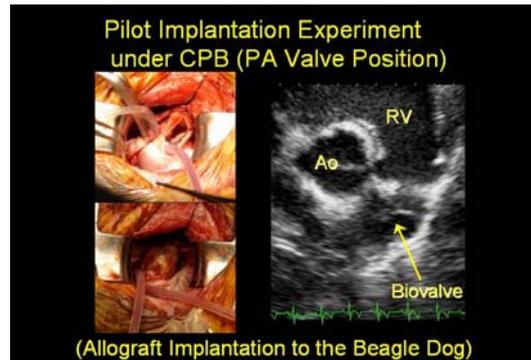
(3)拍動型循環回路を用いた *in vitro* における Biovalve の機能評価

バイオバルブの拍動流下における良好な開閉がビデオ画像で確認された。更に基材形状を改良することにより、ほぼ同径のウサギ大動脈弁と極めて類似した流量・圧カーブを得ることが出来るようになった。



(4)動物移植実験モデルの開発

上述のごとく、日本大学獣医学部の協力により、人工心肺を用いたビーグル犬の肺動脈弁位への移植モデルの開発を開始し、予備的植え込み実験に成功した。



以上、この3年間、研究開始当初の予想以上に研究は発展しつつある。現在では人工物を全く含まない完全自己組織化させた Biovalve や、バルサルバ洞構造を導入した Biovalve の改良を開始しており、より現実的な応用を実現するための体制を整えつつある。

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 13件)

- ① Yamanami M, Yahata Y, Uechi M, Fujiwara M, Ishibashi-Ueda H, Kanda K, Watanabe T, Tajikawa T, Ohba K, Yaku H, Nakayama Y. Development of a completely autologous valved-conduit with the sinus of valsalva (BIOVALVE) using in-body tissue architecture technology: a pilot study in pulmonary valve replacement in a beagle model. *Circulation* 2010 in press.
- ② Yamanami M, Yahata Y, Tajikawa T, Ohba K, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Preparation of in-vivo tissue-engineered valved conduit with the sinus of Valsalva (type IV biovalve). *J Artif Organs* 2010 in press.
- ③ Watanabe T, Kanda K, Ishibashi-Ueda H, Yaku H, Nakayama Y. Autologous small-caliber "biotube" vascular grafts with argatroban loading: a histomorphological examination after implantation to rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Jan;92(1) 2010, 236-42.
- ④ Yamanami M, Yamamoto A, Iida H, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. 3-Tesla magnetic resonance angiographic assessment of a tissue-engineered small-caliber vascular graft implanted in a rat. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Jan;92(1) 2010, 156-60.
- ⑤ Nakayama Y, Yamanami M, Yahata Y, Tajikawa T, Ohba K, Watanabe T, Kanda K, Yaku H. Preparation of a completely autologous trileaflet valve-shaped construct by in-body tissue architecture technology. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Nov;91(2) 2009, 813-8.
- ⑥ Huang H, Zhou YM, Ishibashi-Ueda H, Takamizawa K, Ando J, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. In vitro maturation of "biotube" vascular grafts induced by a 2-day pulsatile flow loading. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Oct;91(1) 2009, 320-8.
- ⑦ Oie T, Murayama Y, Fukuda T, Nagai C,

Omata S, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Local elasticity imaging of vascular tissues using a tactile mapping system. *J Artif Organs.* 12(1), 2009, 40-6.

- ⑧ Sakai O, Kanda K, Takamizawa K, Sato T, Yaku H, Nakayama Y. Faster and stronger vascular "Biotube" graft fabrication in vivo using a novel nicotine-containing mold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Jul;91(1) 2009, 412-20.
- ⑨ Hayashida K, Kanda K, Oie T, Okamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Onoyama M, Tajikawa T, Ohba K, Yaku H, Nakayama Y. Architecture of an in vivo-tissue engineered autologous conduit "Biovalve". *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008, Jul;86(1), 1-8.
- ⑩ K Hayashida, K Kanda, H Yaku, J Ando, Y Nakayama. Development of an in vivo tissue-engineered, autologous heart valve (the biovalve): preparation of a prototype model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Jul;134(1), 2007,152-9.
- ⑪ K Hayashida, K Kanda, T Oie, Y Okamoto, S Sakai, T Watanebe, H Ishibashi-Ueda, H Yaku, Y Nakayama. "In Vivo Tissue-Engineered" Valved Conduit with Designed Molds and Laser Processed Scaffold. *J. Cardiovascular Nursing.* 23(1), 61-6.
- ⑫ O Sakai, K Kanda, H Ishibashi-Ueda, K Takamizawa, A Ametani, H Yaku, Y Nakayama. Development of the wing-attached rod for acceleration of "Biotube" vascular grafts fabrication in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Oct;83(1), 2007, 240-7.
- ⑬ T Watanabe, K Kanda, H Ishibashi-Ueda, H Yaku, Y Nakayama. Development of biotube vascular grafts incorporating cuffs for easy implantation. *J Artif Organs.* 2007;10(1):10-5. Epub 2007 Mar 23.

[学会発表] (計 24件)

- ① K. Kanda, K Hayashida, M Onoyama, T Tajikawa, H Ishida, Y Yahata, K Ooba, T Ooie, Y Okamoto, Y Nemoto, H Ueda, T Watanabe, M Yamanami, H Yaku, Y Nakayama. RECENT ADVANCES IN AUTOLOGOUS TISSUE HEART VALVES "BIOVALVES": IMPROVED SCAFFOLDS FOR OPTIMAL TISSUE FORMATION AND VALVULAR FUNCTIONS. 14th World Congress on Heart Disease. 2008年7月26-9日トロント(カナダ)

- ② K. Kanda, K Hayashida, M Onoyama, T Tajikawa, H Ishida, Y Yahata, K Ooba, T Ooie, Y Okamoto, Y Nemoto, H Ueda, T Watanabe, M Yamanami, H Yaku, Y Nakayama. STRUCTURAL IMPROVEMENT IN AUTOLOGOUS TISSUE HEART VALVES (BIOVALVES) CONSTRUCTED BY SYMPLE IN VIVO TISSUE ENGINEERING. European Society for Artificial Organs: Annual Meeting 2008. 2008年9月3-6日 ジュネーブ (スイス)
- ③ K. Kanda, O. Sakai, K. Hayashida, T. Watanabe, M. Yamanami, M. Onoyama, T. Tajikawa, H. Ishida, Y. Yahata, K. Ohba, T. Ooie, Y. Okamoto, Y. Nemoto, H. Ueda, H. Yaku, Y. Nakayama. Highlights from the Japanese Society for Artificial Organs. New approach in tissue engineering -A Simple, Safe, Practical and Economical Autologous Tissue Regeneration Technique in vivo-. European Society for Artificial Organs: Annual Meeting 2008 2008年9月3-6日 ジュネーブ (スイス)
- ④ Hayashida K, Kanda K, Oie T, Okamoto Y, Tajikawa T, Oba K, Yaku H, Nakayama Y. In vitro performance of autologous prosthetic valved conduits fabricated by in vivo tissue engineering. The Society for Heart Valve Disease Fourth Biennial Meeting. 2007. June 15-18 ニューヨーク.
- ⑤ K Kanda, K Hayashida, M Onoyama, T Tajikawa, K Ooba, T Ooie, Y Okamoto, Y Nemoto, H Ueda, H Yaku. In vitro hydrodynamic functions of "Biovalves"- Mechanical compatibility before implantation. ESAO 2007 XXXIV. (European Society for Artificial Organs) Sep. 5-8 クレムス (オーストリア) .

〔図書〕(計 1 件)

林田恭子、神田圭一、大家智慧、岡本吉弘、根本 泰、植田初江、小埜山輝昌、田地川勉、大場謙吉、夜久均、中山泰秀. メディカ出版CIRCULATION Up-to-Date (1881-3585) 2 卷3号 2007, 285-289.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：人工血管及びその製造方法
 発明者：中山泰秀・神田圭一
 権利者：中山泰秀・新幹工業株式会社
 種類：
 番号：4483545
 取得年月日：平成22年4月2日
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神田 圭一 (KEIICHI KANDA)
 京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号：60295649

(2)研究分担者

高見沢 計一 (KEIICHI TAKAMIZAWA)
 国立循環器病センター研究所・生体工学部・室員
 研究者番号：10163312

大場 謙吉 (KEIKICHI OHBA)
 関西大学・工学部・教授
 研究者番号：30029186

田地川 勉 (TSUTOMU TAJIKAWA)
 関西大学・工学部・講師
 研究者番号：80351500

渡辺 太治 (TAIJI WATANABE)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：20448723