

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19H03741  
研究課題名(和文) 光造形と生体内組織形成術による自己成長可能な大血管再建用バイオチューブの開発

研究課題名(英文) Development of self-growth biotube for large blood vessel reconstruction by stereolithography and in-body tissue architecture

研究代表者  
宮本 伸二 (Miyamoto, Shinji)  
大分大学・医学部・教授

研究者番号：70253797  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内組織形成術によって作成された自己生体材料(膜)が生体適合性、耐久性に優れること、成長する可能性を証明しようとした。自己心膜での上行置換ではバイオチューブ径に変化なく、石灰化が起きていた。一方バイオチューブでは自己大動脈の成長には及ばないまでも20%ほどの外径の成長が見られ、組織学的には石灰化は全く起こっておらず平滑筋細胞は全長にわたりチューブ内に存在していた。血管内腔面には一層のCD31陽性内皮細胞で覆われており、バイオチューブの原型は消失していた。異種頸部置換では拒絶反応は起こっていないもののバイオチューブにみられた SMA陽性細胞浸潤も起こっておらず自己組織化はすすんでいなかった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓血管外科領域で用いられていた自己心膜は石灰化を起こし、また成長性はなく、成長によりサイズミスマッチが起きていた。生体内組織合成によって作成されたバイオチューブは石灰化を生じず、かつ軽度ではあるが成長も見られた。組織学的には弾性線維の出現、内皮による血管内面の被服など自己血管化がすすんでおり、また圧ストレスのかかる大血管にもちいても破綻することない強度も示され長期的に自己血管として体内で機能する可能性が高いことが示された。さらに長期のデータが蓄積される必要はあるが、この研究により、ことに小児心臓外科において大動脈系への移植・補填材料としてバイオチューブの臨床使用に一歩近づいたといえる。

研究成果の概要(英文)：We tried to prove that the autologous biomaterial membrane (biotube) created by in-body tissue architecture has excellent biocompatibility, durability, and growth potential. The autologous pericardium after ascending replacement did not change the diameter, and severe calcification occurred. On the other hand, in the biotube, growth of the outer diameter of about 20% was observed even if it did not reach the growth of the autologous aorta, and histologically, no calcification occurred and smooth muscle cells existed in the tube over the entire length. The luminal surface of the blood vessel was covered with a layer of CD31-positive endothelial cells, and the native structure of the biotube had totally disappeared. Although rejection did not occur in the heterologous replacement, the SMA-positive cell infiltration which was seen in the biotube did not occur, and self-organization did not proceed.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：再生医療 先天性心疾患 大血管 生体材料 心臓血管外科 異種移植

## 1. 研究開始当初の背景

我々は患者自身の組織のみで自己の移植用組織体を作製できる、全くこれまでの概念を覆す新しい再生医療技術として、「生体内組織形成術」の開発を 15 年以上前から世界に先駆けて行っている。従来の常識であった培養操作や滅菌施設を一切必要とせず、単に鋳型を皮下に入れておくだけで、ほぼ自動的に自家移植用組織体が得られる。ある種魔法の様な医療が実現可能となっている。生体内組織形成術は、生体内に異物が侵入した際に異物周囲をコラーゲンのカプセルが覆う生体反応を利用している。マウスからヤギまでの背部皮下に鋳型の埋入を行ったが、いずれでも約 4 週後には組織体を形成した。結合組織体の細胞成分は主に線維芽細胞であり、炎症性細胞はほとんど認めない。本技術を応用して、バイオチューブ人工血管、バイオバルブ心臓弁、バイオカバードステントグラフトなど主に循環器系組織体の開発を行ってきた。例えばバイオチューブを移植すると、移植約 2 週で血管内皮化され、約 12 週で壁内は血管平滑筋細胞に置き換わり、生体血管と肉眼的に見分けがつかない程に成熟した。バイオチューブは、作製時が完成ではなく、移植によって徐々に血管組織へと置き換わる。最長 6 年の経過観察では瘤化や狭窄、石灰化は認められておらず、移植期間が長くなる程自己化され、完成度が高まる。すでに犬において頸部血管に移植したバイオチューブの拡大成長も確認している。また 2010 年に鋳型形成に 3D プリンターを導入（光造形）、飛躍的に開発速度が増した。

しかし、大動脈への応用となると条件は異なってくる。末梢動脈の存在する皮下組織内と異なり胸腔、心嚢内に存在する大動脈は皮下の移植片のような周囲組織からの細胞浸潤は望めない。我々は動脈弁位のバイオシート弁は縫合された大動脈壁からの細胞浸潤と血液からと思われる内皮細胞による被包化を確認しているが更なる厚さと長さを有する大動脈バイオチューブがどのように、もしくは本当に自己組織化（成長へつながら）していくのかが興味深い。またこれまで肺動脈弁位、大動脈弁位へとバイオシートの耐久性を証明してきたがその圧は大動脈拡張期圧で最大でも 60mmHg であり、大動脈では 100mmHg を超える収縮期動脈圧に耐えうる強度が要求される。圧に関してはこれまで証明してきた末梢動脈での条件と同じであるが、実際の血管ストレスは圧×直径であり、大動物での大動脈位置での大動脈圧での耐久性を証明する必要がある。また犬で観察された末梢血管への移植片の拡大延長が成長であったのか瘤化変性であるのか明確な区別はできていない。より大きなストレスのかかる大血管で吻合部を含めその形態、組織変化を長期的に見ることで、成長であるのか瘤化につながる病的拡大であるのかが証明される。

小児心臓外科手術では小児期に人工物で組織を補填・再建した場合成長するにつけてサイズミスマッチが起こり多くの場合狭窄病変となり再手術が必要となる。それは自己心膜を用いた場合でも同様でむしろむしろ自己心膜は石灰化・硬化が進むという点でやっかいである。自己組織と同化し、成長に伴い成長する（大きくなる）移植片（補填物）が熱望されている。

また一方、人工血管が感染した場合や感染性大動脈瘤の場合に人工血管を用いた場合の再感染が問題であった。特に抵抗力の弱い高齢者に感染が生じやすい。ホモグラフトがこのような場合用いられることが多いが海外ではその遠隔期成績がよくないことから徐々に用いられなくなってきており、日本では法的に使用が可能になっているものの現実的には購入・使用法が煩雑で普及するに至っていない。人工物ではない自己もしくは異種であっても自己組織化する生体材料でできた人工血管を安定して供給できるようにすることは大変有用である。

## 2. 研究の目的

本研究はこれまでいくつかの進化（革新）を遂げ完成に近づきつつある生体内組織形成術を上記のような臨床ニーズに対して応用することを前提とした大動物による検証を行う translational study であり、長期生存モデルでバイオチューブの大動脈血管位での自己組織化、成長性を証明すると同時に瘤化の有無などの安全性を検証することを目的とする。生体内組織形成術を安定して形状規定できるまで精錬発達できているのは我々しかなく、バイオチューブが大動脈血管として自己組織化しかつ成長することが証明されれば世界初の知見であり、臨床応用への道が一気に短縮される。更に脱細胞技術を応用した異種間でのバイオチューブ移植が自己バイオシートと同じ組織変化、成長、安全性を証明する（世界初の知見）ことで、この革新的技術の臨床上の便宜性、汎用性がより高まる。

## 3. 研究の方法

小ヤギからの成長モデルを用いて短期、中期までの自己組織化、成長を検証する。自己心膜モデル、バイオチューブモデル、異種バイオチューブモデルを作成し移植後 1 年半にわたり半年毎に CT を撮影し（時に血管造影）自己組織の成長、移植グラフトの成長、吻合部の状態、瘤化の有無を観察する。その後安楽死させ移植片を摘出し組織学的に自己組織化の状態、異種においては拒絶反応の状態を確認した。上行大動脈グラフト移植は実臨床と同様に完全体外循環を用いて心停止下に行う（生後 4～6 ヶ月体重 20kg 前後のメス子やぎを使用。ケタミン 0.5ml/kg で導入、セボフルレン 4 % 程度で全身麻酔維持。第 3 開胸。頭へパリン全身投与後、下行大動脈

に 14Fr 送血管を穿刺法にて挿入。28Fr 脱血管を右心耳より挿入し体外循環開始。中枢音 30 度まで冷却。左心耳ベント挿入。腕頭ギリギリで遮断し、心筋保護液を注入し心停止を得る。注入針から心臓側の 2 mm の大動脈碧を採取、上行離断。まず一部連続、大部分は結節吻合で末梢吻合続いて中枢吻合。

#### ブタバイオチューブの脱細胞方法

4 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に 24 時間浸漬することで、エタノールを取り除いたバイオチューブ人工血管を脱細胞反応液 (DNaseI (1 mg/mL) RNaseA (100 µg/mL) TritonX-100 (2%) とペニシリンストレプトマイシン (2%) を含む PBS 液) に浸漬し 37 °C の恒温槽内にて 100 rpm で 48 時間振盪した。48 時間後、反応液を PBS に置換し 10 °C の冷蔵庫内にて 100 rpm で 24 時間振盪することで脱細胞反応液を除去した。

(脱細胞化バイオチューブ人工血管の評価)

バイオチューブ人工血管に含まれる細胞量の指標として DNA 定量を行うことで脱細胞化の程度を評価した。また、組織化学分析として薄切片のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色および Masson's trichrome 染色を行うことで、バイオチューブ人工血管の組織学的変化を評価した。一方、短軸方向に切り出した輪切り状のバイオチューブ人工血管の引張破断強度測定により脱細胞前後における機械的強度の変化を評価した。

#### 4. 研究成果

DNA 定量の結果、脱細胞化処理を行うことでバイオチューブ人工血管に含まれる DNA 量は脱細胞化組織の基準値として推奨されている 50 ng/mg dry weight 以下の値に近い  $68 \pm 38$  ng/mg dry weight (n=3) まで減少し、HE 染色においても細胞核が消失していることが確かめられた (図 2A-1, -2)。また、Masson's trichrome 染色により青色を呈するコラーゲン線維は脱細胞反応の後でほとんど変化はなく維持されていることが分かった (図 1B-1, -2)。

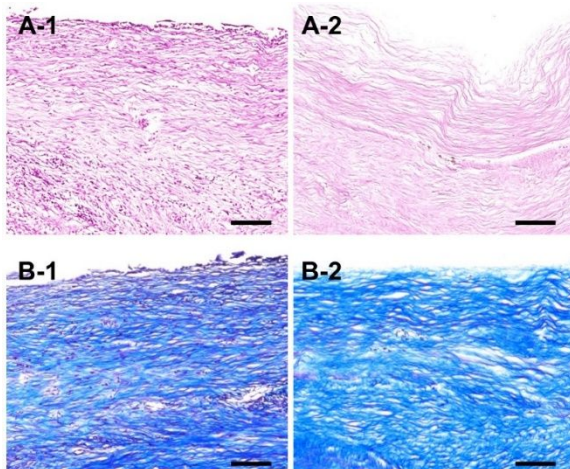
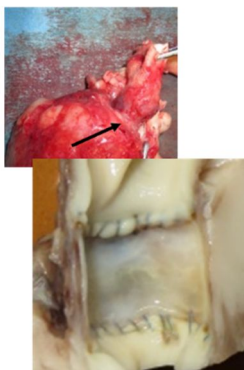


図 1 バイオチューブ人工血管の HE 染色 (A-1, -2) および Masson's trichrome 染色像 (B-1, -2)。未処理: A-1, B-1, 脱細胞化処理: A-2, B-2

一方で、引張破断強度測定を行った結果、脱細胞化処理の前後でバイオチューブ人工血管の破断強度に顕著な差はなく機械的強度が維持されていることが分かった。以上より、脱細胞反応液中に浸漬し 48 時間振盪することにより機械的強度とコラーゲン線維を維持したまま脱細胞化されたバイオチューブ人工血管を得ることができた。

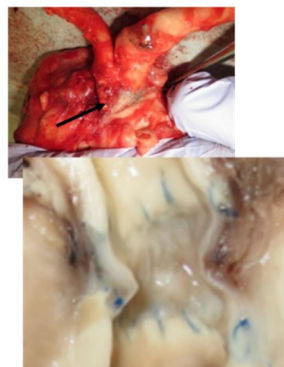
#### マクロ所見

グルタルアルデヒド自己心膜



円柱状の形状を維持。固い。レントゲンで石灰化。長軸方向への成長なし

Biotube



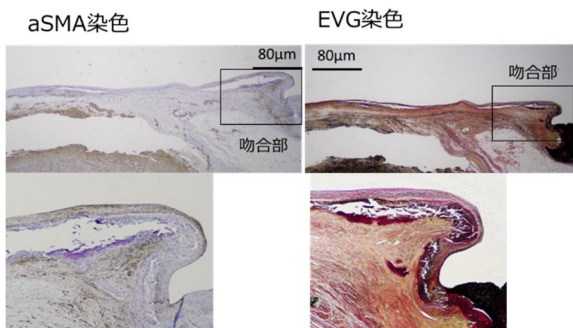
BTとnativeの境界がシグザク。肉眼的に境界と思われる長軸方向は短縮。

上行置換術後 6 か月でヤギは  $24 \pm 2$  kg から  $42 \pm 3$  kg へと成長した。内腔は自己心膜は  $4 \pm 0.8$  mm、バイオチューブは  $5 \pm 0.5$  mm 拡大し、長さは自己心膜モデルでは変化なく、バイオチューブは  $3 \pm 0.4$  mm 短縮した。いずれのモデルにおいても吻合部の破綻、瘤状変化はみられなかった。(図 2)

図 2 マクロ所見

6 か月後の組織学的変化は自己心膜は細胞成分に乏しく， SMA 陽性細胞成分はわずかしかなり、弾性線維も認められなかった。( 図 3 ) Kossa 染色で著明な石灰化を認めた。( 図 4 ) 内腔面には vWF 陽性細胞を認め、全体として移植前の自己心膜組織構造が残存していた。

グルタルアルデヒド処理自己心膜

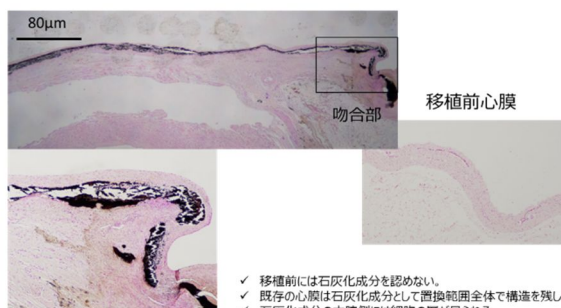


- ✓ 新生細胞層にはαSMA陽性細胞一部見られる
- ✓ 弾性線維は見られず

図 3

グルタルアルデヒド処理自己心膜

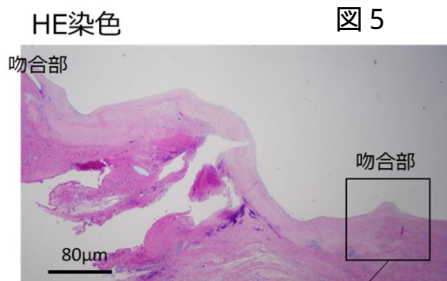
Kossa染色による石灰化の評価



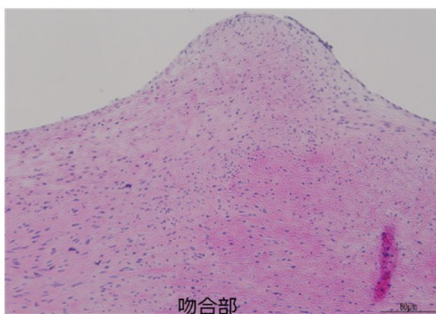
- ✓ 移植前には石灰化成分を認めない。
- ✓ 既存の心膜は石灰化成分として置換範囲全体で構造を残している。
- ✓ 石灰化成分の内腔側には細胞の層が見られる。

図 4

Biotube



もとのBiotube構造は消失し、層構造を示す新生壁に置換自己心膜よりも壁の厚さが保たれている印象



吻合部境界不明瞭、BTとnativeの境界が無くなっている。内腔面には血管内皮細胞と思われる1層の細胞層。

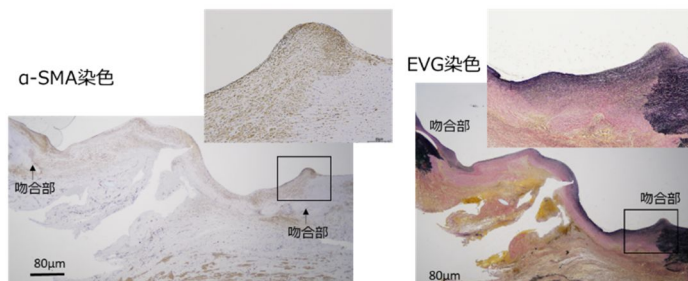
図 5

バイオチューブはもとの構造はほぼ消失し、層構造を有する新生壁に置換されていた。吻合部は自己血管との境界は消失し一体化していた。内腔面は内皮細胞と思われる1層の細胞層が見られた。( 図 5 )

SMA 陽性の幼弱な細胞層に置換されており、厚い弾性線維層が見られた。また内腔面には vWF 陽性内皮細胞を認めた。( 図 6、 7 )

Biotube

図 6



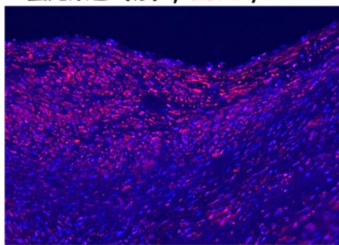
Biotubeはα-SMA陽性細胞をふくむ新生細胞層で置換

置換された構造内には弾性線維が含まれている

- ✓ 自己心膜エタノール群と類似し、幼弱な細胞層に置換された。石灰化成分はなし。
- ✓ Biotubeが置換された構造内にはエタノール心膜よりも厚い弾性線維あり。強度はBTの方が高いと思われる。

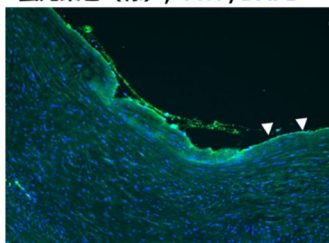
Biotube

蛍光染色 (赤) ; αSMA/DAPI



200 µm

蛍光染色 (緑) ; vWF/DAPI



- ✓ αSMA陽性平滑筋細胞は全長に渡り自己心膜表面を被覆し細胞密度が高い。
- ✓ 内腔面にはvWF陽性血管内皮細胞を認める。

バイオチューブは自己心膜とは異なり、自己血管化が起こることが判明した。また大血管のストレスにバイオチューブは耐えられることが証明されたが、成長は十分に確認できなかった。再生医療の特徴である移植後細胞成分の侵入による組織短縮が今回も見られたが、自己組織化(血管化)が進んでいることからいったん短縮したのちに成長していく可能性はあるものと思われる。数年に及ぶ長期モデルによってそのことを今後証明していきたい。

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	西邑 隆徳  (Nishimura Takanori)  (10237729)	北海道大学・農学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	穴井 博文  (Anai Hirofumi)  (20291544)	大分大学・医学部・教授    (17501)	
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	岩井 良輔  (Iwai Ryosuke)  (60611481)	岡山理科大学・フロンティア理工学研究所・講師    (35302)	
研究分担者	首藤 敬史  (Shuto Takashi)  (60649763)	大分大学・医学部・講師    (17501)	
研究分担者	岡本 啓太郎  (Okamoto Keitaro)  (50723524)	大分大学・医学部・病院特任助教    (17501)	削除：2021年1月14日

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