

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 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：19H04447

研究課題名(和文)世界最長組織工学人工血管が拓く近未来血管外科治療

研究課題名(英文) Tomorrow's Vascular Surgery Induced by World's Longest Tissue-engineered Vascular Grafts

研究代表者

中山 泰秀 (Nakayama, Yasuhide)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50250262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：膝下バイパス術に使用できる小口径の長い人工血管は世界に存在しない。我々は体内組織構造(iBTA)と呼ぶ完全自家アプローチを使用してバイオチューブと呼ぶ組織工学血管を開発した。バイオチューブ作製用鋳型を開発した。ヤギに所定期間(1~3か月間)皮下埋め込みした。得られたバイオチューブは、内径4mm、長さ50cm以上、壁厚約0.6mmであった。すべてのバイオチューブは完全に曲げても折れず、200mmHgの水圧で変形や漏れはなかった。破裂強度は約2500mmHgであった。バイオチューブは動脈に匹敵する特性を持っていることが確認され、下肢動脈バイパスや透析血管としての応用可能性を示せた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膝下でのバイパス術に使用可能な細く長い人工血管は存在しない。自家静脈を使うバイパス術では、採取しても脆くて使えない、あるいは既に他手術で使われている場合には実施できない。年間約1万人が足切断に至り、その後1年の死亡率は25%と生命に直結する。本研究において、皮下に1ヶ月間型を埋植するだけで長さ50cm以上の小口径人工血管を開発できた。経済性、汎用性に優れているため、医療費の大幅な低減をもたらせると考えられる。また、移植後速やかに自己再生が起こることが確認できたため、小児患者に対して再手術の必要の無い、成長する移植体を提供する社会貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：There are no small-diameter, long artificial vascular grafts that can be used for below-knee bypass surgery. We have developed tissue-engineered vascular grafts called Biotube using a completely autologous approach called in-body tissue architecture (iBTA). Molds were subcutaneously embedded into goats for predetermined periods (one, two, or three months). All Makers produced Biotubes as designed in all periods. All Biotubes obtained had an inner diameter of 4 mm and a length over 50 cm with wall thickness of 0.6 mm. All Biotubes did not kink when completely bent and did not leak without any deformation under a water pressure of 200 mmHg. Their burst strength was ca. 2500 mmHg. This study confirmed that Biotubes have properties comparable to arteries; hence, we will start an investigator-initiated clinical trial in near future after obtaining the results of another implantation study.

研究分野：再生医療、医療機器開発

キーワード：バイオチューブ 生体内組織形成術 再生医療 組織工学 血管 移植 動物実験

1. 研究開始当初の背景

高コレステロール血症、高血圧、糖尿病などの基礎疾患を患う特に長年血液透析を受けている患者の増加、加えて高齢化と平均寿命の長期化などを背景に、血管の脆弱化または血栓症のリスクの上昇から CLI を発症する患者数は年々増加している。CLI を発症すると、下肢での潰瘍発生から壊死までの進行が早い。血管内治療によるバルーン拡張術の効果が低く、最終的に下肢切断となると、生命予後が極めて悪い。そのため可能な限り早期に積極的な治療が必要となり、外科的な血行再建バイパス術が有効な場合が多い。バイパス術は自家静脈グラフトが第一選択肢であるが、1)脆弱化や再手術のために自家静脈が確保できない場合がある、2)グラフト確保のために下肢全長を大きく切開する必要がある。自家静脈が採取できない場合には人工血管を用いるが、1)開存性が低い、2)感染源となる可能性が高い、3)異物反応を起こす、4)膝下では使えないなど問題が多い。

一方、透析患者数は増加を続け 2014 年に約 32 万人を超えており、その半数近くが毎年何らかのシャントトラブルを経験している。透析自体に加えて、トラブルによって患者に与える精神的、肉体的、経済的負担は大きい。トラブルの約 8 割が狭窄や閉塞などの血管病変である。治療として、バルーン拡張術が一般的に広く行われているが、保険適用は 3 ヶ月に 1 度に制限される。血流が不足すれば新たに内シャントを作る必要があるが、数には限りがある。人工血管は感染のリスクが高くトラブルを拡大させることにもなる。従って、少なくとも自己血管と同等な性能を有する VA 血管の開発が臨床現場で強く望まれており、再生医療での解決に大きな期待が寄せられている。

自分自身の細胞を使って、失われた臓器や組織を修復・再生する再生医療が注目されている。従来の再生医療において、組織工学的手法によって血管組織が開発されている。人工物を足場として必要とし、煩雑な細胞培養操作が必須である。そのため、実施できるのは特別な大学病院など高度専門医療機関に限られ、膨大な手間と費用と期間を要して行われている。一方、再生医療を代表する iPS 細胞においては、形ある移植体を作製するにはさらなる研究が必要である。L'Heureux らは患者体内から採取した血管組織から血管壁を構成する細胞を分離、培養し、約 7 ヶ月の総作業期間を要して自己組織人工血管を先駆的に開発した。これは透析用のアクセス血管として臨床応用されているが、低圧系に限られる。また、Lawson らは献体から提供を受けた血管組織から作り置き可能な脱細胞血管を作製し、既にアクセス血管として全世界で 300 例の症例が実施されている。しかし、全ての組織工学人工血管の開発例は、長さ 20cm 程度が限界であり、ほとんどが数 cm 以内である。そのため、臨床に必要な長さを確保するために連結したコンジットグラフトが用いられている。また、動脈として高圧系への応用はほとんどなされていないため、短くても CLI の下肢バイパス症例に用いることは難しい。上記以外にも研究段階では組織工学的手法による 5mm 以下の小口径人工血管の開発例は多い。しかし、数十 cm を超える長さは実現できず、いずれも応用範囲は限られる。CLI、VA のいずれの分野も長さや機能の欠如を解決しなければならない。また、異種移植に関しては、ウシやブタの組織がグルタールアルデヒド処理されて、人工心臓弁の弁膜材料や補填修復材として広く臨床で用いられている。しかし、血管への応用例はほとんど無い。グルタール処理はコラーゲン線維を架橋するため、体内で分解されずに人工物として残り続け、長期的に劣化や石灰化などによる機能不全を引き起こす場合がある。一方、生体組織を生かしながら免疫拒絶反応を回避するために様々な処理方法が考案され、代表的には脱細胞が行われているが、作業が煩雑で評価にも時間がかかる。

以上の様に、従来技術は臨床ニーズに根ざしているとは言えず、以下の課題を有する。1) CLI や VA の臨床で必要とする 50cm を超える長い小口径組織工学人工血管は開発されていない。2) 長い組織工学人工血管の全長に欠損なく、動脈圧にも耐える強度と品質を保証できる非破壊評価手段がない。3) 家畜を含めた異種動物での iBTA 組織形成に及ぼす生体要因が不明であり、安全性を含めた迅速な評価方法が確立されていない。4) これまで長い小口径組織工学人工血管が存在しなかったため、その評価のための動物実験モデルがない。5) iBTA 組織は細胞を使用しないため、通常の再生医療製品ではない。再生医療法基準に該当せず、新たな枠組みによるプロトコル作りが必要である。

2. 研究の目的

50cm 以上の長い小口径組織工学人工血管 (ロングレンクスバイオチューブ) の作製法を確立させ、動物移植実験によって CLI 用の動脈バイパス血管、VA 用のシャント血管としての長期耐久性を評価し、異種移植の可能性も見出すことを目的とした。具体的に以下に示す。1) ロングレンクスバイオチューブ作製用鋳型の設計: 右写真の 50cm 長を作製できる鋳型の設計には成功している。さらなる 80cm へのロング化を検討すると共に、鋳型埋込時の低侵襲化のために、現在の直径約 10cm から鋳型寸法のコンパクト化に取り組む。2) ロングレンクスバイオチューブの作製と品質評価、力学的機能評価: 耐圧性や強度を有しているかバルク的な機能を基本として調べ、必要に応じて鋳型の改良に反映させる。血管として利用するには、出血、破裂の原因となるピンホールなどの僅かな欠損も許されない。抗血栓性には内腔面の平滑性も重要である。使用可能かを判断するために全長を非侵襲非破壊で検査する品質評価方法を考案する。作製完成

度 90%以上をめざす。3) 家畜ロングレンジスバイオチューブの生体適合化とその生物学的評価：異種移植を想定しているため、細胞レベルでの生着性の確認が必要である。さらに、移植対象とするヤギでの皮下埋込試験によって炎症性、分解性、生着性を調べた。必要な処理方法などの対策を考案する。また、将来的なヒトへの移植時に障害となると考えられる感染症や拒絶反応について異種移植研究者との連携を密に対策を検討する。4) 動物移植モデルの作製：CLI では動脈バイパスに対する評価系が必要となる。ヤギの解剖学的な血行路を理解して、臨床に即した実験モデルを考案する。5) 動物移植実験による長期機能性評価：移植モデルを用いて実際に移植を行い、長期経過観察によって有用性を調べる。移植結果に基づいて鑄型の設計にフィードバックさせ、半年以上の長期で 80%以上の高開存をめざす。また、異種移植については、組織分解、吸収、再構築過程のメカニズム解明によってヒト臨床時の安全性基盤を確立する。

3. 研究の方法

まず、50cm を超える長いバイオチューブの高品質で安定した作製方法を確立させた。次いで、CLI や VA としての要求項目を満たす適切な動物実験モデルを作製し、移植実験によって長期開存性、組織再生能を評価した。さらに保存や処理方法の工夫によって、異種移植の可能性に取り組んだ。最終年度には自家組織を用いた臨床研究の実施をめざした。研究内容、方法を以下に具体的に示した。

1) ロングレンジスバイオチューブ作製用鑄型設計：鑄型の設計を 3D CAD を用いて行い、3D プリンターによって研究室レベルで試作を繰り返し、形状や寸法設定後にシリコンやステンレスなど長期埋め込み型医療機器に使用実績のある生物学的に安全な材料を組み合わせる鑄型を委託製造した。鑄型の物理学的試験を行い、医療機器概要書への適合化仕様とした。

2) ロングレンジスバイオチューブの作製と品質評価、力学的機能評価：作製した鑄型を全身麻酔下のヤギの皮下に外科的に埋め込んだ。2ヶ月後に摘出し、鑄型内部に形成された内径 4~5mm、長さ最大 50cm 以上のロングレンジスバイオチューブを取り出した。組織学的にマトリックス及び細胞成分を調べた。引っ張り試験機を用いて、バイオチューブの強度を破断強度、弾性率によって評価する。バイオチューブ壁の内部の欠損の有無、厚さの均一性など品質評価を現有の光干渉断層像観察装置で非破壊的に行った。また、バイオチューブの保存方法を開発した。

3) 家畜ロングレンジスバイオチューブの生体適合化とその生物学的評価：鑄型を局所麻酔下のブタの皮下に外科的に埋め込んだ。先と同様に、ロングレンジスバイオチューブを得、強度試験、組織評価を行い、完成度を確かめた。免疫反応を抑制させるために、脱細胞処理などの有効性を皮下埋植試験によって確かめた。

4) 動物移植実験による長期機能性評価：大分大学にて、移植モデルを用いて実際に移植を行い、長期経過観察によって有用性を調べる。移植結果に基づいて鑄型の設計にフィードバックさせ、半年以上の 80%の高開存をめざす。また、異種移植については、岡山大学にて組織分解、吸収、再構築過程のメカニズム解明によってヒト臨床時の安全性基盤を確立する。

4. 研究成果

体内組織構造 (iBTA) と呼ぶ完全自家アプローチを使用してバイオチューブと呼ぶ組織工学血管が開発できた。ロングレンジスバイオチューブ作製用鑄型を開発した。ヤギやブタに所定期間(1~3 か月間)皮下埋め込みすることで得られたロングレンジスバイオチューブは、内径 4mm、長さ 50cm 以上、壁厚約 0.6mm であった。すべてのロングレンジスバイオチューブは完全に曲げても折れず、200mmHg の水圧で変形や漏れはなかった。破裂強度は約 2500mmHg であった。移植すると1ヶ月でバイオチューブは大きく分解され、3ヶ月で血管壁構造がほぼ完成し、半年以上構造を維持した。バイオチューブは動脈に匹敵する特性を持っていることが確認され、下肢動脈バイパスや透析血管としての応用可能性を示せた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawashima Takayuki, Umeno Tadashi, Terazawa Takeshi, Wada Tomoyuki, Shuto Takashi, Nishida Haruto, Anai Hirofumi, Nakayama Yasuhide, Miyamoto Shinji	4. 巻 32
2. 論文標題 Aortic valve neocuspidization with in-body tissue-engineered autologous membranes: preliminary results in a long-term goat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 969 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/icvts/ivab015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terazawa Takeshi, Kawashima Takayuki, Umeno Tadashi, Wada Tomoyuki, Ozaki Shigeyuki, Miyamoto Shinji, Nakayama Yasuhide	4. 巻 99
2. 論文標題 Mechanical characterization of an in-body tissue-engineered autologous collagenous sheet for application as an aortic valve reconstruction material	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 109528 ~ 109528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiomech.2019.109528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakayama Yasuhide, Kaneko Yoshiyuki, Okumura Noriko, Terazawa Takeshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Initial 3-year results of first human use of an in-body tissue-engineered autologous "Biotube" vascular graft for hemodialysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Vascular Access	6. 最初と最後の頁 110 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1129729819852550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terazawa Takeshi, Kawashima Takayuki, Umeno Tadashi, Wada Tomoyuki, Ozaki Shigeyuki, Miyamoto Shinji, Nakayama Yasuhide	4. 巻 99
2. 論文標題 Mechanical characterization of an in-body tissue-engineered autologous collagenous sheet for application as an aortic valve reconstruction material	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 109528 ~ 109528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiomech.2019.109528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Yasuhide, Kaneko Yoshiyuki, Okumura Noriko, Terazawa Takeshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Initial 3-year results of first human use of an in-body tissue-engineered autologous "Biotube" vascular graft for hemodialysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Vascular Access	6. 最初と最後の頁 110 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1129729819852550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Y, Iwai R, Terazawa T, Tajikawa T, Umeno T, Kawashima T, Nakashima Y, Shiraiishi Y, Yamada A, Higashita R, Miyazaki M, Oie T, Kadota S, Yabuuchi N, Abe F, Funayama-Iwai M, Yambe T, Miyamoto S	4. 巻 -
2. 論文標題 Pre-implantation evaluation of a small-diameter, long vascular graft (Biotube) for below-knee bypass surgery in goats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res B Appl Biomater	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) 10.1002/jbm.b.35084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashita R, Nakayama Y, Shiraiishi Y, Iwai R, Inoue Y, Yamada A, Terazawa T, Tajikawa T, Miyazaki M, Ohara M, Umeno T, Okamoto K, Oie T, Yambe T, Miyamoto S	4. 巻 54
2. 論文標題 Acute Phase Pilot Evaluation of Small Diameter Long iBTA Induced Vascular Graft "Biotube" in a Goat Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EJVES Vasc Forum	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejvsvf.2022.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中山泰秀
2. 発表標題 再生医療の常識を「破壊する」発想から生まれた技術とは？
3. 学会等名 第20回 Tonomachi Cafe (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山泰秀
2. 発表標題 厚生労働省の先駆け審査指定を受けたバイオチューブ作製用の鋳型とは？
3. 学会等名 第23回日本アクセス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山泰秀
2. 発表標題 先駆け審査指定を受けたバイオチューブ作製用鋳型とは？
3. 学会等名 第17回医療機器フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019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	宮本 伸二 (Shinji Miyamoto) (70253797)	大分大学・医学部・教授 (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	寺澤 武 (Terazawa Takeshi) (20815401)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	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	穴井 博文 (Hirofumi Anai) (20291544)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	西邑 隆徳 (Takanori Nishimura) (10237729)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	

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