

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580369
 研究課題名（和文）生体再生技術を応用した自己組織による生体弁の開発と弁置換後の機能評価
 研究課題名（英文）Evaluation of Implantation of Autologous In Vivo Tissue-Engineered Valved after Valve Transplantation
 研究代表者
 上地 正実（UECHI MASAMI）
 日本大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：90296426

研究成果の概要（和文）：生体内組織形成技術を応用して自己体内で弁付き導管（バイオバルブ）は、移植に耐えられる程の十分な物理的強度を持っていることを確認した。移植後の心臓超音波検査でバイオバルブの弁葉は良好な可動性が認められた。移植3ヵ月後における組織学的所見として、バイオバルブ血管部の両端から内皮化およびエラスチン形成を伴う内膜の新生が起り、良好な自己血管および弁化が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We developed completely autologous valved conduits in vivo tissue engineering, which had appropriate compliance and robustness. Postoperative echocardiography demonstrated smooth movement of the leaflets with little regurgitation for at least up to 3 months. Good functioning as the pulmonary valve was observed after implantation of firstly developed autologous valved conduits with completely autologous tissues, which will become a valid future option in adolescents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：生体再生、肺動脈弁、心臓外科手術、先天性心臓病、血液循環

1. 研究開始当初の背景

医用材料の移植適性は、生体機能代行性、生体安全性および生体適合性によって決定される。現在主流となっている生体弁を用いた弁付き導管の移植では、十分な生体機能代行性により術後の逆流を効果的に抑制できる [Carrel et al 2004] が、生体弁では移植後に炎症所見や慢性的な免疫反応が認められ、また長期では石灰化することが多く、生体安

全性および生体適合性を十分に満たしているとは言い難い [Homann M et al 2000]。

生体安全性および生体適合性を高めるために、自己組織および自己細胞を利用した弁付き導管の移植が試みられている。自己組織由来弁としては、ロス手術における自己肺動脈弁による大動脈弁置換や、自己心臓弁が報告されている。また、自己細胞由来弁として、培養自己細胞を播種した工学弁が利用され

ている。しかし、これらの方法は移植手技が困難である他、感染の可能性や培養行程の煩雑さが問題となる。

そこで我々はより容易に生体適合性の高い導管を得るために、生体再生技術の応用による自己組織由来弁付き導管（バイオバルブ）の作製を行った。バイオバルブは生体の防御反応によるカプセル化を原理としており [Shanklin et al. 1999]、三次元構造の基材を皮下に一定期間埋入することで作製する。バイオバルブの利点は、自己体内で作製の場とするため作製行程が容易で大量かつ多様な形態を作製でき、自己細胞由来のため異種感染が予防できる。さらに、自己組織由来であるため移植後の高い生体適合性および成長が期待できる。

Sparks らは、同様の原理で作製した代替血管を患者の大腿動脈に移植し十分な耐久性を示した [Sparks et al 1972, Sparks et al 1973]。さらに近年では、このような代替血管は移植後に自己組織化することが報告された [Watanabe et al 2010]。このように生体再生技術による自己組織由来医用材料は移植後に高い生体適合性をもつと考えられる。

バイオバルブは人工回路内で良好な開閉性および逆流抑止機能を示す [Hayashida et al 2008] 他、犬の肺動脈弁位に移植した場合にも生体内で良好な機能性を示し、さらに自己血管化の進行が認められた [Yamanami et al 2010]。このようにバイオバルブにおいても高い生体適合性が示唆される。Yamanami らの報告は 3 ヶ月間のバイオバルブ他家移植についての検討であったが、自己組織化の検討にはより長期移植後での観察および無固定での自家移植の検討が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

心臓病の治療として代用弁を用いた弁置換術が必要になることがある。代用弁には、機械弁や生体弁があるが、抗血栓療法や弁の取替えが必要になるため、動物では適応しづらく、人においても様々な問題が存在する。生体内組織形成技術は、生体内の組織異物反応を利用した組織形成法で、自己体内で様々な形状のコラーゲン組織を作ることが可能とする。この生体内組織形成技術を応用して弁付き導管（バイオバルブ）を作成し、そのバイオバルブを肺動脈弁位に弁置換したときの遠隔成績ならびに血管組織への適応性、さらに成長に応じた形態的变化が起こり、自己血管化の可能性について評価することを目的とする。

3. 研究の方法

本試験では、供試動物として日本大学生物資源科学部獣医学科内科学研究室にて飼育されている臨床的に健常なビーグル犬を用いた。すべての実験は日本大学生物資源科学部動物実験委員会の承認を得て実験指針に基づき行われた。

バイオバルブの作製

本試験では、供試動物として日本大学生物資源科学部獣医学科内科学研究室にて飼育されている臨床的に健常なビーグル犬を用いた。すべての実験は日本大学生物資源科学部動物実験委員会の承認を得て実験指針に基づき行われた。

特殊設計したシリコン製の凹型基材（直径 14mm, 全長 25mm, 図 1）および凸型基材（直径 14mm, 全長 30mm, 図 1）を弁葉部形成のための 1mm の間隙を設けて接合させた。基材は独立した三葉の弁葉部が得られるように設計された。バイオバルブのサイズは Yamanami らの報告と同様に設定した [Yamanami et al 2010]。凸型の基材にはバルサルバ洞部を模した 3 つの突起物を付した。基材は対象の犬に全身麻酔下にて皮下ポケットを作製し埋入した。基材を皮下ポケットに挿入し、基材が切開創から露出しないよう皮下織を縫合した後皮膚縫合した。2-4 週間後に全身麻酔下にて、カプセル化された基材を皮下織から摘出した。基材を被覆したカプセル合皮の両端を切開し、内部の基材のみを抜去しバイオバルブを得た。

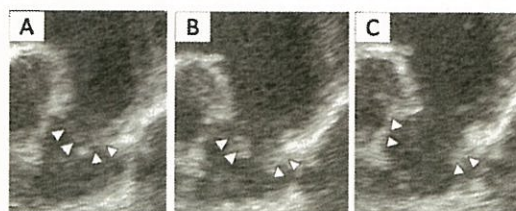


図 1. 特殊設計したシリコン製の凹型基材（直径 14mm, 全長 25mm, 中央）および凸型基材（直径 14mm, 全長 30mm, 左）を 1mm の間隙を設けて接合させる（右）。

肺動脈弁位への移植

バイオバルブの肺動脈弁位への移植は、体外循環下で心停止させ主肺動脈を切開した後、自己弁を切除して行った。バイオバルブの他家移植では、健常犬 11 頭（雌, 11 ± 0.8 ヶ月齢, 7.6 ± 0.5 kg）に対して無水エタノールで固定するか無固定のまま移植した。バイオバルブのトリミングは全長が 3.0 cm になるように血管部を切除した。抗血栓処理としてバイオバルブをアルガトロバン溶液に 10 分間浸漬させてから移植に供試した。

麻酔と外科手術

手術の麻酔前処置はアトロピン (0.025 mg/ml im) およびミダゾラム (0.2mg/kg iv) にて行った。麻酔の導入はプロポフォール (4 mg/kg iv) を用いて行い、術中は 100 %酸素 2.0 L/min および 1.5-2.5 %のイソフルランによる吸入麻酔で維持した。体外循環中の麻酔維持はプロポフォール (0.2 mg/kg/min iv) の持続点滴にて行った。

左側第四肋間で開胸し、ACT が 300 秒以上に延長したのを確認した後に送脱血カニューレは頸動静脈に設置し、接続を完了した。大動脈起始部を遮断し、大動脈起始部に挿入したルートカテーテルを介して心筋保護液 (10mL/kg; ミオテクター; 持田製薬) を注入して心停止させた。心停止は 20 分ごとにカルディオプレジアを注入することで維持した。その後、生体肺動脈弁を切除しバイオバルブを端々吻合にて移植した。バイオバルブの移植および肺動脈切開部の縫合は 6-0 polypropylene 縫合糸を用いて連続縫合した。肺動脈を縫合し大動脈遮断を解除して復温し体外循環を離脱した。全頭は体外循環離脱後、プロタミン (6mg/kg) を点滴された。抗凝固療法として低分子ヘパリン (50 U/kg/d) を術後一週間皮下投与し、その後は術後一ヵ月まで塩酸オザグレレル (100mg/kg BID) を経口投与した。

術後のバイオバルブ機能評価

移植後は経胸壁心臓超音波検査を一週毎に実施した。心臓超音波検査所見は心臓超音波診断装置 Toshiba Aplio SSA-770A (東芝, 栃木, 日本) を用いて記録した。心室-肺動脈間の収縮期最大圧較差は、肺動脈流速からベルヌーイの式を用いて算出した。心臓カテーテル検査は全身麻酔下にて、イオヘキソール注射液 (1 mL/kg iv) を右心室に注入して行った。

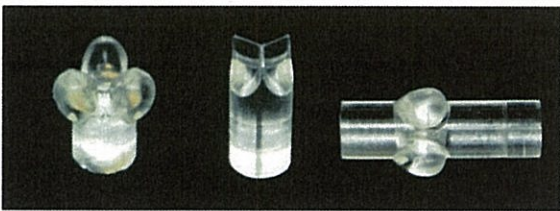


図 2. バイオバルブ移植一日後における良好な開閉. バイオバルブ弁葉部 (矢頭) における良好な開閉が認められる (A-C).

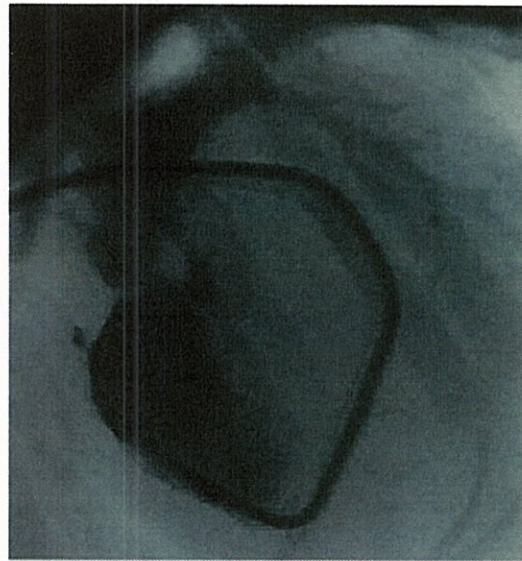


図 3. 心臓内造影検査所見. 移植したバイオバルブの捻れや収縮および屈曲といった所見は認められない。

移植後の評価

エタノール固定してから自家移植した場合は 5 ヶ月後に、無固定で移植した場合は移植 1 週間および 1 ヶ月後に全身麻酔下にて安楽死させ、移植したバイオバルブを摘出し、組織学的評価に供試した。バイオバルブ標本は摘出後に 10%ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン包埋後に縦断方向に薄切した後ヘマトキシリン・エオジン、マッソン・トリクローム、エラスチカ・ワンギーソン染色を行った。特殊染色としては α SMA 染色を行った (Dako Japan)。

4. 研究成果

手術の概要

対象の 5 頭中 2 頭に対してエタノール固定後に自家移植し 2 頭ともに生存した。残りの 3 頭に対しては無固定のバイオバルブを自家移植し 2 頭が生存した。生存した 5 頭における手術時間は ± 分間であり、体外循環時間および大動脈遮断時間はそれぞれ ± および ± であった。

固定後移植 5 ヶ月後の所見

バイオバルブ組織内における炎症細胞の浸潤は認められなかった。バイオバルブ壁内には細胞成分の分布はなく、主にコラーゲン様の線維成分で構成されていた。近位吻合部から洞部にかけて全体的に内皮および新生内皮が形成され、新生内皮内部には線維芽細胞が認められた。内皮形成は近位吻合部から遠

位吻合部まで到達したが、新生内膜の内部およびバイオバルブ壁内にエラスチン線維の形成は認められなかった(図4)。

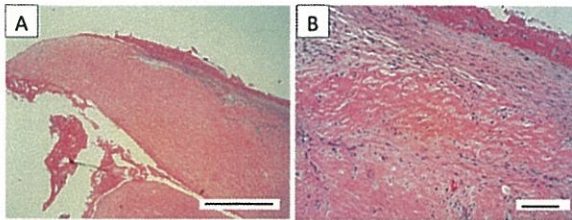


図4. 固定後移植5ヵ月後における内皮化および新生内膜形成(HE染色)
A: 近位吻合部付近, B: 洞部, C: 遠位吻合部付近

無固定での移植1週間後の組織学的所見

バイオバルブを無固定で移植した場合、移植1週間後にはバイオバルブ組織内において炎症所見や好中球を含む肉芽形成は認められず、コラーゲン様の線維成分が主体であった。弁葉表面ではコラーゲン様の線維成分の間隙に多数の線維芽細胞が認められた。弁葉部の心室側には線維成分が、肺動脈側には線維芽細胞が多数認められた(図5)。

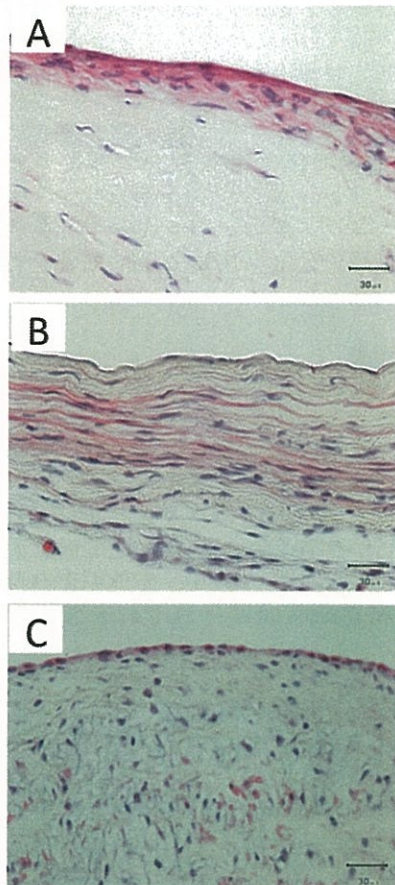


図5. 自家移植1週間後における組織学的

所見(HE染色) A: 弁葉部の弱拡大像(スケール: 1000 μm) B: 弁葉部の強拡大像(スケール: 100 μm)

移植1ヵ月後の組織学的所見

バイオバルブを無固定で移植した場合、移植1ヵ月後には近位吻合部から弁基部および洞部から遠位吻合部における血管部内腔に新生内膜の形成が認められた。近位吻合部付近の新生内膜内には高密度の αSMA 陽性細胞の分布および豊富なエラスチン線維の形成が認められた。弁基部においても少量のエラスチン形成が認められた。一方、移植1ヵ月後では弁葉部の短縮を認めた。

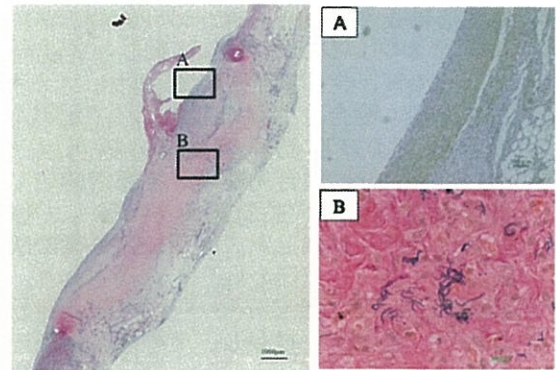


図6. 自家移植1ヵ月後における組織学的所見 左: HE染色 A: αSMA 染色 B: エラスチカワンギーソン染色

バイオバルブをエタノール固定後に移植した場合、移植5ヵ月後におけるバイオバルブの組織学的所見では炎症所見はなく、5ヵ月間にわたり生体安全性が示唆された。人では異種および同種弁の移植の際、脱細胞および固定を行ってもなお術後の弁機能不全につながる炎症反応が認められるのに対し[Lü et al 2010, Kasimir et al 2005, Pompilio et al 2004]、バイオバルブの自家移植では自己細胞で構成され、固定後であっても高い生体安全性をもつことが示唆された。また、移植後にバイオバルブ血管部および洞部の破裂などはなく、強度も十分であり生体適合性が示唆された。バイオバルブ内腔面は近位吻合部から洞部にかけて内皮化し、新生内膜の形成は近位吻合部から洞部まで到達した。内皮化は弁付き導管に抗血栓性を付与するのに重要な過程である[Schneider et al 1990]。犬に移植した異種生体弁付き導管では、移植6ヵ月においても内皮化が不十分であったとされているが[Lü et al 2010]、バイオバルブ移植の場合、内皮化は5ヵ月の観察期間で近位吻合部から遠位吻合部まで到達し、ほぼ内腔全体に及んだ。バイオバルブは固定後に移植しても、自己細胞由来であるため異種生体弁に比べて組織親和性が高い

可能性が考えられた。移植時のバイオバルブ内には固定により生細胞はなく、移植後の自己血管化はレシピエント細胞の侵入に依存すると考えられる。生体弁移植では、脱細胞後の弁において移植後に新生内膜が形成されない場合、導管内腔での血栓形成や内膜肥厚のリスクが高まる [Cebotari et al 2002, Kasimir et al 2005]。したがって、バイオバルブ内における線維芽細胞の浸潤および新生内膜の形成は、これらの有害事象を抑制すると考えられ、バイオバルブの高い生体適合性を示唆する所見である。

無固定で移植した一週間後においてバイオバルブに炎症所見は認められず、弁葉表面において多数の線維芽細胞が認められた。これらの細胞はバイオバルブを構成する皮下線維芽細胞が移植後に生着したか、あるいはレシピエント側からの細胞がバイオバルブ内に侵入した可能性が考えられた。線維芽細胞または筋線維芽細胞はコラーゲンやその他の細胞質基質を産生し、リモデリングに寄与する可能性がある [Stenmark 2006]。バイオバルブの構造骨格である線維成分の構造は移植後も保たれており、コラーゲンの分解像は認められず、線維間には線維芽細胞が豊富に認められた。生体の肺動脈弁は三層構造をとるが、そのうち ventricularis は主に線維芽細胞によって構成され、バイオバルブの線維成分はこれに類似していた。Ventricularis における線維芽細胞は弁間質の細胞質基質を産生するはたらきをもつ [Schoen et al 2008, Rabkin-Aikawa et al]。バイオバルブにおいてもこれらの細胞による細胞質基質産生の可能性があり、より長期的な観察によるリモデリングの評価が必要である。

無固定で移植した場合、移植1ヵ月後には新生内膜の形成が認められ、固定してから移植した場合よりも迅速な自己血管化の進行が認められた。吻合部付近の新生内膜内においては高密度の α SMA 陽性細胞が分布し、残存した線維芽細胞が一時的に活性化した状態であるか、もしくは平滑筋細胞の侵入が示唆された。筋線維芽細胞への転化は生体弁移植後の一過性の線維芽細胞活性化の所見として認められ、この場合は移植後一定期間の後に本来の線維芽細胞に戻ることが観察されている [Rabkin-Aikawa et al 2004]。また、移植一ヵ月後では吻合部付近において豊富なエラスチン線維の形成が、弁基部においても少量のエラスチン線維の形成が認められ、無固定で移植した場合は固定後に移植した場合と比較して移植後のリモデリングが促進する可能性が示唆された。一方で移植一ヵ月後では、弁葉の短縮を認め、今後バイオバルブ作製期間や条件について検討が必要であると考えられた。

本研究ではバイオバルブの自家移植を行い、固定後に移植した場合には5ヵ月間にわたり炎症所見はなく生体安全性が示唆された。さらに血栓形成や癌化はなく、バイオバルブは高い生体適合性をもつことが示された。さらに、無固定で移植した場合には自己血管化の進行が認められ、組織親和性が向上すると考えられる。今後、移植後のリモデリングについてより長期間の観察により詳細に評価する必要がある。

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1件)

- ① Fujiwara M, Harada K, Mizuno T, Nishida M, Mizukoshi T, Mizuno M, Uechi M. Surgical treatment of severe pulmonic stenosis under cardiopulmonary bypass in small dogs. J Small Anim Pract. 2012 Feb;53(2):89-94. (査読有り)

[学会発表] (計4件)

- ① 船山麻理菜、水野壮司、松井悠一、田地川勉、大場謙吉、山南将志、渡辺太治、神田圭一、夜久均、中山泰秀、上地正実。生体内組織形成術による自己組織ステントバルブの開発:ビーグル犬肺動脈への自家移植。第50回人工臓器学会(福岡・アクロス福岡)。2012年11月22日~2012年11月24日。
- ② 船山麻理菜、水野壮司、松井悠一、田地川勉、大場謙吉、山南将志、渡辺太治、神田圭一、夜久均、中山泰秀、上地正実。生体内組織形成術による自己組織ステントバルブの開発:ビーグル犬肺動脈へのアプリケーション移植。第154回日本獣医学会(盛岡・岩手大学)。2012年09月14日~2012年09月16日。
- ③ 船山麻理菜、水野壮司、松井悠一、田地川勉、大場謙吉、山南将志、渡辺太治、神田圭一、夜久均、中山泰秀、上地正実。生体内組織形成術による自己組織ステントバルブの開発:ビーグル犬肺動脈への移植。第11回日本再生医療学会(横浜・パシフィコ横浜)。2012年06月12日~2012年06月14日。
- ④ 船山麻理菜、上地正実、松井悠一、水野壮司、藤原めぐみ、田地川勉、大場謙吉、山南将志、渡辺太治、神田圭一、夜久均、中山泰秀。生体内組織形成術によるステント付バルブのビーグル犬への肺動脈移植。第96回日本獣医循環器学会(大宮・大宮ソニックシティ)。2012年06月09日~2012年06月10日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上地 正実 (UECHI MASAMI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90296426

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：