

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592026

研究課題名(和文) 生体適合性ナノファイバーによる自己組織完全再生を目指した人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of artificial blood vessel using biocompatible nanofiber sheet as a scaffold to accelerate native tissue regeneration

研究代表者

石坂 透 (ISHIZAKA, Toru)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10372616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：目的 ポリグルタミン酸ナノファイバーシートの組織親和性を活かし、早期の自己組織を促す人工血管器材としての可能性を検討した。方法 ナノファイバーシートを配した人工血管器材をラットの皮下ならびにウサギ腹部大動脈に移植した。結果 皮下では早期の人工血管内への細胞浸潤がみられたが、大動脈では早期の血栓閉塞を来たした。結論 ナノファイバーシートは組織親和性に優れるが、血栓形成を招くため人工血管器材には適さない。

研究成果の概要(英文)：<Objective> We sought to evaluate the usefulness of polyglutamic acid nanofiber sheet as a scaffold on the artificial arterial vessel. <Methods> Polyglutamic acid nanofiber sheet was attached to the woven polylactic acid vessel graft, which was transplanted under the skin in the thigh of the rat and was replaced of the abdominal aorta of the rabbit. <Results> Early infiltration of the native fibroblast cells was observed on the graft under the skin. Graft replacing the aorta invited the thrombo-occlusion of the abdominal aorta followed by paraplegia. <Conclusion> Polyglutamic acid nanofiber sheet showed high histocompatibility, but its thrombogenicity excluded the possibility of its use as an artificial blood vessel.

研究分野：医歯薬学

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：ナノファイバー 人工血管 心臓血管外科学 生体組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓血管外科手術においては各種血行再建に際して血管の代替物の使用が求められる。患者自身から採取した動脈、静脈、心膜などが第一選択となるが、採取部位での本来の機能が失われる上に、グラフトとしての機能にも、長さや太さなどの数量・形態の制限、血管攣縮、graft vein disease といった問題があり、その使用に制約が伴う。そのため、ホモグラフト、ePTFE、Dacron などが血管の代替素材として使用されている。しかしながら、血栓閉塞を来さない、内膜肥厚増殖による閉塞を来さない、感染に強い、成長に追従した適合性を有する、といった特性を十分に満たす理想的なものは未だ存在しない。

(2) これらの要件を満たす人工血管開発にむけて、我々は、細胞親和性の高い生体分解性ポリマー scaffold を、患者に移植し、scaffold を足がかりとして in-situ に scaffold 上での自己細胞の colonization、血管構造の再構築を促すという手法に注目してきた。我々はこれまでにコラーゲンマイクロスポンジ複合 knitted polyglycolic acid を内層に polycaprolactone を中層に woven poly L lactic acid を外層に配した三層の graft を豚下行大動脈に移植し、良好な自己細胞構築ならびに比較的早期からの内膜形成と機能的平滑筋細胞層の出現を明らかにした。また Polyglycolic acid (PGA) を内層に poly L lactic acid (PLLA) を外層に配した二層の小口径 graft を犬の頸動脈に移植し、良好な開存性と、内膜形成、横走平滑筋細胞による中膜形成を示した。さらに細胞外マトリックスにおいて、移植後 12 か月においてエラスチン、コラーゲンを有する繊維が多層性に生合成され、自己の動脈血管構造に近づいていくことを明らかにした。そこで今回、細胞親和性のより高い、ポリグルタミン酸ナノファイバーシートを人工血管器材として scaffold に配することで、より早期に自己血管構造に近い血管壁構造の再構築を促し、scaffold に依存しない血管壁強度と抗血栓性を含めた高い生体適合性を有する血管代替素材の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究は、PGA をエレクトロスピンニング法でナノファイバー化したバイオポリマー素材に着目し、その血管代替素材としての使用の可能性について、強度や生体適合性を in vitro で検討し、至適な構造・条件を決定した上で、さらに in vivo に応用し、形態的、組織学的、生理学的な分析を行い評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 概要

PGA にオキサゾリン化合物を架橋剤として加えた溶液を、エレクトロスピンニング法で繊維径 200-300 nm にナノファイバー化し、シート状に積層させ、ポリグルタミン酸ナノファイバーシートを作成した。これを人工血管外層器材である PGA/PLLA 合成系を用いた織布に熱融着あるいは接着剤(ポリ乳酸ポリマー)塗布により接着し血管パッチを作成した。架橋剤の配合濃度や、接着の条件の異なるいくつかの基剤を用意し、これらを生体温下に生食水に浸潤し、経時的に繊維形態、強度を検査し、至適作成条件を絞り込んだ。次に条件を絞り込んだ血管基剤をラットの皮下および腹腔内埋植し、これを経時的に摘出し、摘出標本での生体分解、細胞浸潤の程度を検討した。さらに至適条件で作成された基剤を人工血管パッチとして、ウサギの腹部大動脈に移植し、これを経時的に摘出し、人工血管素材としての応用の可能性を評価した。

### (2) 研究プロトコール

人工血管基材の至適な作成条件として、架橋剤 10%配合ナノファイバーシートを PLLA 織布に PGA 溶剤を接着剤として塗布したものに熱融着したもの、架橋剤 40%配合ナノファイバーシートを PGA 溶剤塗布 PLLA 織布に熱融着、PGA 溶剤塗布 PLLA 織布のみ、ポリグルタミン酸ゲル溶液を PLLA 織布に塗布したもの、架橋剤 10%配合ナノファイバーシートを PGA 溶剤塗布 PLLA 織布に熱融着した後リン酸緩衝液に浸漬させたもの、の 5 種類の基材を準備した。

### (3) ラット皮下ならびに腹腔内埋植実験

上記の基材を、生後 12 週のラットの腹腔内および大腿部皮下に埋植し、埋植後 1、4、8 週の 3 回にわけて基材を摘出し、肉眼所見比較ならびに、ホルマリン液に浸漬固定後 HE 染色スライド標本を作成して病理学的評価を行った。

### (4) ラビット腹部大動脈への血管移植実験

ラットの皮下ならびに腹腔内埋植実験の結果から、最も至適と思われる条件で作成したポリグルタミン酸ナノファイバーシート配合人工血管器材を全身麻酔下にラビットの腹部大動脈を部分遮断し、大動脈血管壁の一部を切除、同サイズの人工血管を補填し、7-0 Polypropylene 糸にて連続縫合した。移植人工血管は経時的にラビットを犠牲死させ、摘出し、形態的、組織学的な検討を加えた。

## 4. 研究成果

(1) 人工血管基材の作成条件として、架橋剤 10%配合ポリグルタミン酸ナノファイバーを 12 g/平方メートルの目付でシート状に

積層させたシートを、ポリ乳酸合成系による織布に、熱融着により接着させたものを得た。さらに比較対照となる作成条件として、架橋体 40%配合のもの、ナノファイバーのないもの、PGA をゲル状に塗布したもの、

の条件で作成後リン酸緩衝液に浸漬したもの、を用意した。これら 5 種類の条件で作成された基材を、ラットの腹腔内、大腿部皮下に埋植後 1、4、8 週後に経時的に摘出した。その結果、ポリグルタミン酸ナノファイバーシートの生体内への移植の安全性が確認できた。また摘出標本の肉眼所見ならびに HE 染色による顕微鏡的組織検査による検討を加えた結果、作成条件 の架橋体 10%配合ポリグルタミン酸ナノファイバーシートをポリ乳酸織布に PGA 溶剤を塗布し熱融着させた基材は、他の条件で作成した基材に比し、より早期に基剤のほぼ全面にわたる良好な自己細胞浸潤による織布の被覆が観察され、細胞親和性、生体適合性に優れていることが示唆された。

(2) 上記 の条件で作成された人工血管器材をウサギの腹部大動脈血管壁の一部と置換した。手技の習熟により大動脈遮断時間の短縮、出血量の減少、周期期の管理の向上、抗凝固薬の投与量の調節、血管遮断中の shunt tube の使用などにより、耐術生存が得られた。その結果、手術は耐術するものの、血管移植後ウサギ 6 尾全例において術後対麻痺の発症が観察され、術後生存期間は 0 日から最長 23 日、平均 5 日であった。摘出標本の肉眼所見では、全例において人工血管置換部分における血管内腔の血栓閉塞が確認された。

### (3) 考察

近年ナノファイバーの技術開発にともない、いろいろな高分子物質をロール法エレクトロスピニングと呼ばれる技術で一度に多量のナノファイバーを積層させシート状にすることが可能となった。ポリグルタミン酸ナノファイバーシートは生体適合性や細胞親和性に優れていることから注目され、細胞培養器材などとして応用され始めている。本研究はポリグルタミン酸ナノファイバーシートを人工血管器材として配することにより、生体分解性 scaffold として、より早期の自己細胞浸潤を促し、より早期の自己組織による血管壁構造の構築(自己組織による血管壁への置き換わり)を得ようと試みた最初の報告である。

今回の実験により、オキサゾリン架橋体 10%配合ポリグルタミン酸ナノファイバーを 12 g/平方メートルの目付でシート状に積層させたシートを、ポリ乳酸合成系による織布に、熱融着により接着させたものは組織壁構造体として、ラットの体内(皮下および腹腔)に埋植しても、ラットの成長発育に悪影響をおよぼさず、安全に移植可能であることが示

された。また、摘出した器材には、埋植後一週間の早期から、自己細胞組織による良好な浸潤が観察され、組織親和性に大変優れていることが示唆された。

しかしながら、上記の条件で作成したポリグルタミン酸ナノファイバーシートを配した人工血管器材をラビット腹部大動脈壁に血管壁を置き換えるパッチとして腹部大動脈の径の約半周を置換したところ、種々の手技的工夫や、手技の習熟後においても、早期の動脈の血栓閉塞を来した。そのため、ポリグルタミン酸ナノファイバーは血栓形成性の観点から、人工血管壁としての使用には適さないものと考えられた。

ポリグルタミン酸ナノファイバーシートは人工血管器材としては適さないが、優れた生体適合性、細胞親和性を有することから、今後は、創傷治癒促進や、組織被覆材などの器材として生体での応用に可能性を有するものと考えられた。

### (4) 結論

ポリグルタミン酸ナノファイバーシートを配した人工血管器材は、ラット皮下埋植実験において自己細胞の浸潤による被覆、肥厚が観察され、細胞親和性、生体適合性に優れていることが示唆されたが、ウサギ腹部大動脈壁の一部として置換する人工血管器材としての使用においては早期の血栓閉塞を来した。従って本器材は抗血栓性に乏しいことから、人工血管としての使用は困難であり、今後は創傷組織の治癒促進など別な用途での使用方法に期待できると考えられた。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石坂 透 (ISHIZAKA, Toru)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10372616

### (2) 研究分担者

松宮 護郎 (MATSUMIYA, Goro)  
千葉大学・医学研究院・教授  
研究者番号：20314312

黄野 皓木 (KOUNO, Hiroki)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40375803

石田 敬一 (ISHIDA, Keiichi)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究分担者：40375671