

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791389

研究課題名(和文)患者自身の皮下で簡便に作成できる自己の結合組織からなる小口径代用血管の開発

研究課題名(英文)Development of autologous tissue small-caliber vascular grafts (biotubes)

研究代表者

山南 将志 (Yamanami, Masashi)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：30438204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：患者体内で安全・簡便に移植片を作製する『生体内組織形成技術』を用い小口径人工血管の開発を行った。

ラット背部皮下に径1.5mm、長さ20mmのシリコン円柱基材を埋入し、4週後に基材周囲に形成されたカプセル化組織と共に摘出、基材を抜去することでバイオチューブを得、ラット腹部大動脈へ自家移植を行った。術後1年6カ月のグラフト開存性は89%と高く、グラフトの瘤化・狭窄を認めなかった。組織学的評価ではグラフト内腔は内皮細胞に覆われ、-SMA陽性細胞やエラスチンが層状に形成されており血管壁構造が再構築されていた。バイオチューブは移植後1年を超える長期でも高い開存性、耐久性を示した。

研究成果の概要(英文)：We have developed autologous small-caliber vascular grafts, named "biotubes", by simple, safe and economical "in-body tissue architecture technology". In this study, we evaluated the long-term results of small-caliber biotubes.

Silicone rod molds were placed into subcutaneous pouches of rats, and after 1 month the implants were removed. Biotubes were obtained as tubular connective tissues. They were auto-implanted to the abdominal aorta. At over 1 year, graft status was evaluated by ultrasound echocardiography (UCG), magnetic resonance angiography (MRA) and histology. High patency rate of 89% (8/9) was obtained. UCG and MRA showed little stenosis, no aneurismal dilation. Histological evaluation revealed hierarchical vessel wall reconstruction including complete endothelialization, circumferentially oriented smooth muscle cells, elastin fibers mimicking native arteries. The biotubes performed as excellent vascular grafts with high patency and regeneration activity.

研究分野：血管外科学

キーワード：小口径人工血管 組織工学 再生医療 生体内組織形成術 バイオチューブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 自家組織よりなる代用血管への取り組み

これまで冠状動脈や膝以下の末梢動脈への遠位バイパスなどに適応できる小口径(径5mm以下)の人工血管のほとんどがグラフト閉塞の壁を打ち破ることなく断念され、未だ実用化されたものは無い。人工材料開発や人工的な表面加工技術による抗血栓処理では人工血管内腔面での血栓形成は一定期間予防できても、長期に渡る抗血栓性の獲得が困難であるばかりでなく、吻合部内膜肥厚・パルス形成などを回避することができず、吻合部狭窄が晩期グラフト閉塞の主たる原因となっている。

このため最近では自家血管壁細胞による迅速かつ良好な組織化が長期の抗血栓性を獲得し吻合部狭窄を回避するための唯一の手段であると考えられている。

in vitro における複雑な細胞工学的手法を駆使した自家組織のみからなる血管組織体の開発が行なわれているが、膨大なコストと制作時間・培養のための特殊施設を要するため、臨床現場へ広く普及させることは困難である。そこで我々は以前より簡便な方法を用いて同様の管状組織体を患者体内で形成する技術に注目している。

(2) レシピエント皮下でレシピエント自身が作り出す代用血管の開発

体内に異物を埋入すると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。この生体の防御反応としての現象を最新の材料工学技術で制御することを『生体内組織形成技術』と名付けた。この技術を用いて体内で作製したカプセル状の組織体を代用血管『バイオチューブ』として用いる試みを開始した。これにより患者自身の体内で安全かつ安価に作成でき、特殊な作成施設を必要としない、自家組織代用血管の実用化の可能性が明らかとなってきた。自家組織からなる代用血管は内皮形成が良好であるため、抗血栓薬が不要であり、自己再生能により強い耐久性があり、石灰化も生じにくく、感染に強いなどの長所を併せ持つ理想的なものとなり得る。

2. 研究の目的

『生体内組織形成技術』による自家移植様小口径代用血管『バイオチューブ』を開発し、前臨床段階としての動物移植実験によりバイオチューブの有用性を証明することを目的とした。

体内で作成されるバイオチューブは厚さ数百 μm 程度と薄いものの、1500mmHgもの内圧に耐えうる高い耐圧性を持つことが明らかにされた。これまでの報告でラット腹部大動脈(径1.5mm)、ウサギ頸動脈(径2mm)、ビーグル犬頸動脈(径5mm)へのバイオチューブ自家移植を行い良好な開存を得ている。組織学的には移植前には粗でランダムであ

ったコラーゲン線維であったが、移植後6週-12週でコラーゲンが円周方向に高密度配向し、さらにエラスチンや血管平滑筋が層状に形成され、内腔は血管内皮細胞で完全に覆われていた。このように移植後早期に自己の動脈組織に再構築されることがわかった。本研究では今後の臨床応用に向け移植後1年を超える長期観察を行い、バイオチューブの成熟化と耐久性の評価を行う。

3. 研究の方法

直径1.5mm、長さ20mmのシリコン円柱基材をウイスターラット背部皮下に埋入し4週後に基材周囲に形成されたカプセル化組織と共に基材を摘出。基材を抜去することで直径1.5mmの円柱状の結合組織管であるバイオチューブを得た。得られたバイオチューブのうち一部を用いて耐圧性評価を行った。

抗血栓処理としてアルガトロパンをバイオチューブ内腔に塗布した後にラット腹部大動脈に端々吻合にてバイオチューブを移植した(n=9)。移植後は抗血小板薬、抗凝固薬共に投与しなかった。

移植後のグラフト開存性を超音波検査及び磁気共鳴血管撮影(MRA)にて評価した。移植後1年6ヵ月経過した時点でグラフトを摘出し組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) バイオチューブの作成、耐圧性評価

ラット皮下に埋入した基材はいずれも感染徴候を示すことなく、基材周囲にコラーゲンと線維芽細胞を主とするバイオチューブが形成された。厚さは約70 μm と薄いものの耐圧性試験で破裂圧を測定したところ1845 \pm 158mmHgとラットの自家静脈(1593 \pm 103mmHg)とほぼ同等の高い耐圧性を示した。

(2) バイオチューブ自家移植

ラット腹部大動脈へバイオチューブの自家移植を施行したが、通常のマイクロサージャリー手技にて、血管吻合系(10-0プロリオン)による結節縫合での端々吻合が可能であった。吻合時のハンドリングは自家血管と遜色なく、遮断解除後の吻合部からの滲みだし出血に対する止血も数分間の圧迫にて止血可能であった。

通常の外科学手技でバイオチューブは移植可能であることが示された。

(3) バイオチューブ開存性評価

バイオチューブ移植後のラットはすべて生存した。移植後1ヵ月の時点でMRAを撮影し開存性の評価を行ったが、1匹でグラフト閉塞を認めたものの、他はすべて開存しており開存率は89%(8/9)と高かった。開存しているグラフトは瘤化や狭窄を認めなかった。

移植後1年6ヵ月の時点で再び超音波検査、MRA撮影にてグラフトの形態学的評価を行ったが、8匹のグラフトは移植後1ヵ月での形

態と同様に瘤化や狭窄を認めることなく開存していた。

移植後1年を超える長期においてもバイオチューブは瘤化、狭窄することなく動脈圧に耐える、高い耐圧性、耐久性があったことがわかった。

(4) バイオチューブ摘出

移植後1年6カ月経過した時点でバイオチューブを摘出した。バイオチューブ周囲の癒着は軽度で剥離は容易であった。

グラフトの内腔は血栓形成を認めず、表面は平滑であった。また吻合部においても内膜肥厚を認めず、内腔面は非常に滑らかであった。

一般に小口径代用血管移植後、長期的に吻合部に内膜肥厚が起こることが知られているが、本研究ではバイオチューブ移植後の吻合部内膜肥厚は認めなかった。

(5) バイオチューブ移植後の組織学的評価

組織学的評価にてバイオチューブ内腔面はCD31陽性細胞を認め、血管内皮細胞にて内腔面が完全に覆われていることがわかった。またα-SMA陽性細胞が層状に形成されており、エラスチン染色でもエラスチンが層状に形成されているのを認めた。

移植前のバイオチューブはコラーゲンと線維芽細胞を主成分としており、血管内皮細胞や血管平滑筋、エラスチンは認めておらず、移植後に血管壁を構成する自己の細胞により、血管壁が再構築されたと考えられた。

一方、フォンコッサ染色にてグラフトの一部や吻合部の一部に石灰化を認めた(8本中6本)。石灰化は部分的であり、その部位においての壁肥厚は認めていないが、移植後数年といったより長期的に壁肥厚などの変化が起こる可能性もあり得る。また一方で2本のグラフトでは全く石灰化を認めなかった。

組織工学的に作成された小口径人工血管の移植後1年後に石灰化が起こったという報告もあるが、その原因については不明のままである。本研究でも石灰化がみられたが、その原因についてははっきりしない。今後も長期移植モデルを作成し石灰化の原因や予防法についての検討を行う必要があるが、ラットの寿命の関係上、同じモデルでは評価出来ないため、ビーグル犬など別の動物移植実験により評価を行う必要がある。

(6) まとめ

生体内組織形成技術を用いて作成したバイオチューブは移植後1年を超える長期でも高い開存性を維持し、動脈圧環境下でも充分耐えうる高い耐久性を持つことが示された。また移植後には血管内皮細胞で内腔面が完全に覆われ、血管平滑筋細胞やエラスチンが層状に形成され、自家動脈と同等の血管壁構造が再構築されていた。一方でグラフト壁内に部分的ではあるものの石灰化をみとめる

ものもあった。石灰化の原因については明らかではないが、今後も長期移植モデルを通じて石灰化の原因や予防法について検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Kawajiri H, Mizuno T, Moriwaki T, Iwai R, Ishibashi-Ueda H, Yamanami M, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Implantation study of tissue-engineered self-expanding aortic stent graft (bio stent graft) in a beagle model. J Artif Organs 2015;18(1):48-54. (査読有)

Kawajiri H, Mizuno T, Moriwaki T, Ishibashi-Ueda H, Yamanami M, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Development of tissue-engineered self-expandable aortic stent grafts (Bio stent grafts) using in-body tissue architecture technology in beagles. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2015;103(2):381-386. (査読有)

Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Matsui Y, Oie T, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohnuma K, Tajikawa T, Kanda K, Tatsumi E. In-body tissue-engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015;103(1):1-11. (査読有)

Mizuno T, Takewa Y, Sumikura H, Ohnuma K, Moriwaki T, Yamanami M, Oie T, Tatsumi E, Uechi M, Nakayama Y. Preparation of an autologous heart valve with a stent (stent-biovalve) using the stent eversion method. J Biomed Mater Res Appl Biomater 2014;102(5):1038-1045. (査読有)

Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Yamamoto A, Iida H, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Implantation study of small-caliber "biotube" vascular grafts in a rat model. J Artif Organs 2013;16(1):59-65. (査読有)

〔学会発表〕(計24件)

Yamanami M, Kawajiri H, Mizuno T, Iwai R, Enmi J, Iida H, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Long-term performance of autologous tissue ultra-small-caliber vascular grafts (biotubes) in a rat abdominal aorta replacement model. ESC Congress 2014 (European Society of Cardiology), 2014年4月24-27日、バルセロナ(スペイン)。 山南将志, 水野壮司, 神田圭一, 夜久均, 中山泰秀. バイオチューブ超小口径代用血管移植後の長期開存性評価. 第42回日本

血管外科学会学術集会、2014年5月21-23日、青森市。

山南将志、水野壮司、神田圭一、夜久均、中山泰秀。生体内組織形成技術を用いた小口径代用血管(バイオチューブ)移植後のコンプライアンス変化の検討。第51回日本人工臓器学会大会、2013年9月27-29日、横浜市。

山南将志、渡辺太治、神田圭一、夜久均、上地正実、武輪能明、中山泰秀。生体内組織形成技術による循環器系生成医療デバイスの開発。第11回日本再生医療学会総会、2012年6月12-14日、横浜市。

Yamanami M, Watanabe T, Kanda K, Ishibashi-Ueda H, Yaku H, Nakayama Y. By rapid arterialization, completely autologous vascular grafts without synthetic support materials "BIOTUBES" showed no degenerative changes under systemic blood pressure. The 61st ESCVS (the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery)、2012年4月25-28日、ドブロブニク(クロアチア)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山南 将志 (YAMANAMI, Masashi)

京都府立医科大学付属病院・心臓血管外科・専攻医

研究者番号：30438204