

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462794

研究課題名(和文) PRPと徐放化FGF-2を併用した体内埋入型チャンバーを用いた血管柄付き組織再生

研究課題名(英文) Effect of platelet rich plasma and bFGF in in-vivo tissue engineered vascularized soft tissue flap

研究代表者

田中 嘉雄(TANAKA, Yoshio)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50171806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生場：in vivo chamber、細胞外matrix：collagen sponge、血管source：既存の血管束、細胞増殖因子：PRPとbFGFの実験モデルで、有害事象無く独自の栄養血管を有した肉芽組織を再現性を持って再生出来た。細胞増殖因子は、活性化PRPと徐放性bFGFを併用するのが最も有用であった。血管柄付き組織(器官)再生の臨床応用へ歩み出す上での重要な研究成果と考える。

研究成果の概要(英文)：(Purpose) Evaluate the effectiveness of platelet rich plasma (PRP) in tissue-engineered vascularized soft tissue flaps in in-vivo chamber. (Materials and methods) Animals: Japanese white male rabbit, Chamber was used as protected space for tissue engineering, pedicle vascular bundle for vascular source, collagen sponge for scaffold of cell migration. PRP and bFGF were additionally used as growth factors and the most effective combination to get a larger and more matulated granulation tissue was evaluated. Results) Additional use of PRP prevented the white, bean-curd-like debris, which was thought to be degradation of collagen sponge as a result of foreign body reaction in the previous experiments. The combination of activated PRP and controlled release bFGF showed the most effectiveness for generation of vascularized soft tissue flaps. These results suggested the usefulness of PRP in the clinical application of in vivo tissue-engineering vascularized soft tissue flap.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 血管付加組織 in vivo chamber 多血小板血漿 bFGF collagen sponge 徐放性bFGF

## 1. 研究開始当初の背景

再建外科領域では血管柄付き自家組織を移植する再建が欠かせない。近年のマイクロサージャリー技術と器機の発展によって、自家組織移植は安全に行われるようになった。しかし、ドナーの制限と犠牲が残された課題である。この問題を克服するために再生組織の開発が試みられているが独自の栄養血管を持つ組織（器官）の再生は実現していない。2006年に我々は tissue-engineered vascularized soft tissue flaps in in-vivo chamber を報告し、独自の栄養血管を有する組織の再生が可能であることを示した<sup>1)</sup>。しかし、この研究において collagen sponge に対する異物反応が稀に見られた。これは臨床応用においては有害事象であり、克服しなければならない課題であった。

## 2. 研究目的

Platelet の - 顆粒に含まれる成長因子が細胞の増殖・分化に関与することが報告され、Platelet Rich Plasma (PRP) として再生医療に広く用いられている。この PRP を用いて実験を行ったところ異物反応が全く見られず、再現性をもって vascularized soft tissue が再生できた。そこで PRP とこれまで用いてきた bFGF とを併用して、Tissue-Engineered Soft Tissue Flap の臨床応用へ step up するための研究を行った。

## 3. 研究方法

実験動物は白色日本ウサギ（雄、3~3.5 kg）を用いた。全ての実験は倫理委員会の承認（no.136）のもと香川大学動物実験のガイドラインに基づいて行った。チャンパーは、ポリプロピレン製、最大内径は 4.2×3.2×0.5 cm、容量 4.7mL である。コラーゲンスポンジは、Type I の豚コラーゲン（3 mm 厚、70- to 110 μm 孔、グンゼ株式会社提供）を用いた。細胞増殖因子は、bFGF（100 μg）、徐放性 bFGF と多血小板血漿（PRP,  $(35.8 \pm 15.9) \times 10^4 / \mu\text{L}$ ）を用いた。

### 実験デザイン

組織再生のための空間(space)を維持するためにチャンパーを、再生組織の新生血管を提

供するために既存の血管束（伏在動脈と伴行静脈）を、細胞が遊走するための細胞外マトリックスとしてコラーゲンスポンジを、細胞増殖因子として PRP と bFGF を用いた。血管束をチャンパー内に入れてコラーゲンスポンジで挟み込み、皮下に 4 週間埋入した。実験群は以下の 4 グループに分けた(n=5)。

Control group: 血管束/生理食塩水含浸コラーゲンスポンジ

Group 1: 血管束/活性化 PRP 含浸コラーゲンスポンジ

Group 2: 血管束/活性化 PRP/bFGF 含浸コラーゲンスポンジ

Group 3: 血管束/活性化 PRP/徐放性 bFGF 含浸コラーゲンスポンジ

### 組織採取と組織学的検討

4 週後、再度全身麻酔下にチャンパー内の再生組織を取り出し、再生組織量と組織学的検討を行った。再生組織を 10%ホルマリンで固定後、血管束と直角方向に 3mm 毎の組織ブロックを作製した。そして各組織ブロックから 10 μm の組織切片を作製し HE 染色と Masson's trichrome 染色を行った。

### 全再生組織量と組織性分別再生組織量の測定

組織切片の面積をハイブリッドセルカウント機能(Bio-Revo BZ-X700)で測定。planimetry 法で全再生組織量を測定した<sup>1)</sup>。また、組織成分別再生組織量（血管束と脂肪組織、線維性組織、炎症性組織、低細胞密度組織）もハイブリッドセルカウント機能で測定した。

### 統計学検討

各実験群の全再生組織量の比較は、一元分散分析(Turkey post-test)で、組織成分別再生組織量の比較は、二元分散分析(Bonferroni post-test)で行った。P < 0.05 をもって有意差ありと判断した。

## 4. 研究成果

チャンパー内再生組織の肉眼的所見  
チャンパーの移植部位には明らかな感染や漿液の貯留は見られず、線維性組織で被覆されていた。PRP を併用した実験群ではコラーゲンスポンジの異物反応は全く見られなかった。

拍動が全ての再生組織の表面に見られた (図 1)。

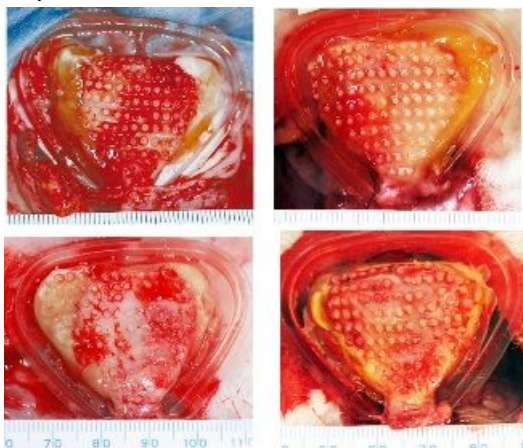


図 1 各実験群の代表的な肉眼所見 (上段左: control 群、上段右: aPRP 群、下段左: aPRP/bFGF、下段右: aPRP/徐放 bFGF)

Control 群では、チャンバーの約 2/3 が再生組織で占められ、器質化されずに残った collagen sponge が周縁に見られ、一部は白い豆腐様に変性していた。他の実験群のチャンバーは、ほぼ再生組織で充満し、周縁には残っていた collagen sponge も変性していなかった

#### 組織学的検討

全ての実験群において、血管束の周囲に肉芽組織が再生され、血管束と chamber の pore の近位では線維化が進行していた。また、新生血管が血管束から末梢に向かって進展していた。実験群の 1 と 3 では、血管束の外側にリンパ球や巨細胞などの炎症細胞が見られる炎症組織が見られたが、Control group と bFGF を単回投与した Group 2 では、炎症細胞の集積は少なかった。なお、この炎症性組織は、経時的に膠原線維に置き換わることが追加実験で判明した。

#### 全再生組織量

Control 群:  $2.63 \pm 0.50$  mL、Group 1:  $3.10 \pm 0.31$  mL、Group 2:  $4.00 \pm 0.39$  mL、Group 3:  $3.86 \pm 0.80$  mL。Group 2 と 3 が Control group に比べて再生組織量が多かった ( $p < 0.05$ , 図 2)。

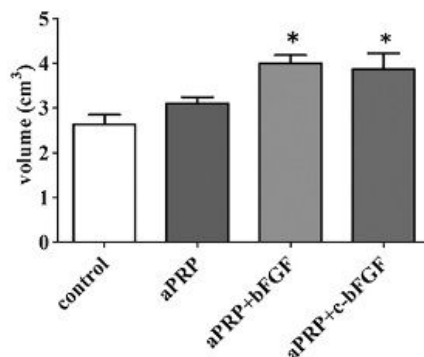


図 2 各実験群の再生組織量

#### 組織成分別再生組織量

組織成分別再生組織量の比較では、実験群 2 と 3 の血管束/脂肪組織と線維性組織、実験群 3 の炎症組織が多い傾向が見られたが有意差はなかった。実験群 2 の低密度細胞組織が他の実験群に比較して多かった ( $p < 0.05$ , 図 3)。

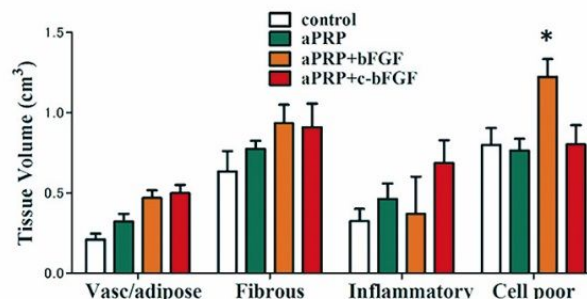


図 3 各実験群の組織成分別再生組織量

#### まとめ

多血小板血漿 (aPRP) を用いることで、collagen sponge の異物反応を惹起すること無く再現性を持って vascularized soft tissue flap を作製することが可能であった (安全性と再現性の確保)。aPRP を単独使用の Group 1 と bFGF を徐放した Group 3 で炎症細胞が多く見られたが、この炎症は経時的に自己由来の線維性組織に置き換わり、問題とならないことが分かった。逆に細胞の遊走を刺激し、細胞成分が多い組織の再生が行われることを示唆した所見が得られた。今後、

aPRP/徐放性 bFGF を併用した実験を進め、臨床応用へ展開する予定である。

#### **引用文献**

- 1) Tanaka Y. et al. Prefabricated Engineered Skin Flap Using an Arterio-venous Vascular Bundle as a Vascular Carrier in Rabbits. Plastic and Reconstructive Surgery 117:1860-1875, 2006.

#### **5. 主な発表論文等**

##### **学会発表（計2件）**

田中嘉雄 乳房再建を目指した in vivo tissue engineering vascularized fat flap の作製  
第45回日本創傷治癒学会 2015年11月30日-12月1日（東京）

田中嘉雄 臨床応用を目指した in vivo tissue engineering vascularized fat flap の作製  
第5回 DDS 再生医療研究会 2015年11月28日（大阪）

#### **6. 研究組織**

田中 嘉雄 (TANAKA yoshio)  
香川大学医学部形成外科 教授  
研究者番号：50171806  
濱本 有祐 (HAMAMOTO yhusuke)  
香川大学医学部形成外科 助教  
研究者番号：10380180  
上野 正樹 (UENO Masaki)  
香川大学医学部炎症病理 教授  
研究者番号：30322267