

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462087

研究課題名(和文) 抗凝固療法不要な、自己組織による内皮化人工血管の作成、臨床応用

研究課題名(英文) Study of the autologous endothelialized artificial graft which so not need anticoagulant therapy

研究代表者

小沼 武司 (KONUMA, TAKESHI)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40307559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「自己組織で内皮化された人工血管，再生小口径動脈の臨床応用」を最終目的に，吸収性ポリマーと人工血管(ePTFE)を組み合わせ，自己細胞とバイオリアクターを用いて完全内皮化された再生細小動脈グラフトおよび静脈グラフトの作成を目的としている．内皮化された人工血管は，感染性，抗凝固療法血管開存の点で人工血管に比して理想的であり，人工血管としての耐久性も期待できる．自己骨髄細胞および吸収性ポリマーを共培養した重合体を生体移植することで心臓大静脈の再生が臨床応用されているが，同方法を用いてバイオリアクター内で生体移植可能な再生血管グラフト作成を行い，機能組織学的な経時的評価を行う．

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study is to produce the artificial graft which is endothelialized with autologous tissue and is not necessary of anticoagulant therapy. To produce the endothelialized graft, we tried to use bioreactor and the artificial graft combined with bioabsorbable polymer. Endothelialized artificial graft is expected of antibiotic effect and can be good for infection, and patency would be good with or without anticoagulant therapy. To investigate the graft functional and histological evaluation.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 人工血管

1. 研究開始当初の背景

生分解性ポリマーを応用した組織工学による弁膜組織研究は、新岡らがハーバード大学にてポリマーと血管細胞の共培養複合体から、羊で肺動脈一葉弁の再生に成功しているが、国内外を通じて追試や同成功の報告例はない。一方近年、バイオリアクターを用いた再生弁の生体内での作成成功例の報告が複数施設からある。細胞播種した生分解性組織をバイオリアクターで生体内移植前に数週間 in Vitro で培養することによって、物理的強度とポリマーへの細胞の固着が増強される。

2. 研究の目的

本研究は「自己組織で内皮化された人工血管、再生小口径動脈の臨床応用」を最終目的に、吸収性ポリマーと人工血管(ePTFE)を組み合わせ、自己細胞とバイオリアクターを用いて完全内皮化された再生細小動脈グラフトおよび静脈グラフトの作成を目的としている。内皮化された人工血管は、感染性、抗凝固療法血管開存の点で人工血管に比して理想的であり、人工血管としての耐久性も期待できる。自己骨髄細胞および吸収性ポリマーを共培養した重合体を生体移植することで心臓大静脈の再生が臨床応用されているが、同方法を用いてバイオリアクター内で生体移植可能な再生血管グラフト作成を行い、生体移植後の機能組織学的な経時的評価を行う。

3. 研究の方法

実験動物として(ビーグル犬、約 10kg)を用い、腸骨より骨髄穿刺を行い骨髄液を 5-10ml 採取し、フィコー留法にて単核球成分のみ採取して培養を行い stroma cell を誘導、 10^8 個を目標に培養する。細胞培養液は RPMI (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 及び 1% GPS (29.2 mg/mL L-glutamine, 10,000 units/mL penicillin G sodium, and 10,000 g/mL streptomycin, GIBCO BRL-Life Technologies, grand island, NY)

VEGF(Vascular Endothelial Cell Growth Factor) FGF(fibroblast growth factor) HGF(hepatic growth factor) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO BRL-Life Technologies, grand island, NY) を使用する。播種細胞数は 10^6 個/cm² とし、骨髄培養細胞と混合し生分解性ポリマーに細胞播種後、バイオリアクター内で約 4 週間、37 の培養液による拍動流(圧、流量調整により)培養増殖に至適な数値を事前に基礎実験にて求める。ポリマー、培養細胞重合体の一部の検体から、組織学的構造と、一定重量での増殖細胞数をカウントし、細胞増殖に最適な環境を設定する。バイオリアクターはローラーポンプ、もしくは空気圧搾装置と膜構造体と、人工心肺用チューブにより作製したものであり、滅菌構造、二酸化炭素付加機能を備えたものである。

4. 研究成果

ポリマー重合体人工血管に培養細胞を播種し培養を行った。培養の手法は段階的にシャーレ内で細胞播種後の培養、細胞固着後のバイオリアクター内での流体、圧加後の培養細胞増殖を行うことが可能であった。バイオリアクターは市販品がなく、気密性、滅菌の問題のため contamination (細菌混入) を生じた。Contamination を生じた培養体は本来の細胞は培養継続することはできず、細胞の混入防止方法を試みながらの再培養となった。人工血管と生体吸収性ポリマー重合体では両者の密着性では、ポリマーと人工血管の解離が生じる傾向があり、人工血管の内皮化の寄与に至らなかった。またポリマーの菲薄化の点で至適な厚さの再現が小口径人工血管には必要であった。目的としていた 3.0 から 3.5mmPTFE グラフトでは内腔の保持が困難で、結果的に 5mm の人工血管で内腔を確保することが可能であり、現状の内皮化人工血管は 5mm 程度が限界であった。

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5件)

KONUMA TAKESHI, Novel aortic arch reconstruction using a modified Norwood procedure based on hypoplastic left heart syndrome-specific anatomical malformations. Interact Cardiovasc Thorac Surg, Mar 12, 2018, 印刷中, 査読あり

後藤健宏, 小沼武司, 新保秀人, 先天性心疾患における人工心肺中の血漿遊離ヘモグロビン管理と腎保護効果 Hemocue の測定値を指標としたハプトグロビン製剤の投与戦略, 体外循環技術, 44 巻 1 号, 2017, -13, DOI: 10.1093/icvts/ivy047, 査読あり

後藤健宏, 小沼武司, 新保秀人, 小児心臓手術での人工肺入口側圧力上昇と血小板減少に関する検討, 体外循環技術, 44 巻 1 号, 2017. 03, 7 - 13, 査読あり

小沼武司, 肺動脈幹温存法 Norwood 変法を行い改善した, 左心低形成症候群に合併する気管支軟化症の一例, 日本小児循環器学会雑誌, 32 巻 3 号, 2016. 05, 208 - 212, 査読あり

小沼武司, 先天性心疾患 大血管転位症, 胸部外科, 66 巻 8 号, 2015. 07, 624 - 628, 査読なし

[学会発表](計13件)

小沼武司, 左室流出路再建, Norwood 手術での工夫, 肺動脈幹温存法と

HLHS の解剖学的特徴の検討, 第 48 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2017

小沼武司, DUNK technique を応用した fenestrated Fontan の工夫と検討, 第 48 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2017

小沼武司, Fontan 手術周術期におけるトルバプタン奏功例の検討, 第 53 回日本小児循環器学会総会, 2017

小沼武司, Norwood, TAP 術後 6 か月後の sever TR に奏効した Edge to edge TV plication の一例, 第 68 回 近畿心臓外科研究会, 2017

小沼武司, Norwood 手術における大動脈再建方法の工夫(肺動脈幹温存法)と完全心拍動下手術, 第 59 回関西胸部外科学会, 2016.6

小沼武司, ファロー四徴症の右冠動脈起始走行異常に関する検討, 第 52 回日本小児循環器学会, 2016.7

小沼武司, 小児心臓手術の人工肺入口部圧異常高値と血小板減少に関する検討, 第 69 回日本胸部外科学会, 2016.9

小沼武司, HLHS の外科治療 合併症回避のための治療戦略 Norwood 手術における新しい大動脈再建(肺動脈幹温存法)と HLHS の解剖学的特徴の検討, 第 46 回日本心臓血管外科学会, 2016.2

小沼武司, 重症大動脈縮窄症、大動脈離断症に対する自己組織補填による大動脈修復術式の検討, 第 51 回日本小児

循環器学会，2015

小沼武司，Norwood 手術における両側肺動脈端々吻合、大動脈再建方法に関する検討。、第 45 回日本心臓血管外科学会，2015

小沼武司，肺動脈壁グラフト Interpose にて修復した IAA の 1 例，第 48 回関西胸部外科学会，2015

小沼武司，心嚢内における癒着防止フィルムの使用と再手術症例の検討，第 67 日本胸部外科学会，2014

小沼武司，手術室早期抜管とカテコラミン使用量による小児心臓麻酔、周術期管理に関する検討，第 50 回日本小児循環器学会，2014

6．研究組織

(1)研究代表者

小沼 武司 (KONUMA, Takeshi)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40307559

(2)研究分担者

新保 秀人 (SHIMPO, Hideto)

三重大学・医学研究科・教授

研究者番号：70179076