



Newly developed tissue-engineered material for reconstruction of vascular wall without cell seeding

高橋, 宏明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4722

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004722>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 高橋 宏明
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4722 号
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付 平成 21 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Newly developed tissue-engineered material for reconstruction of vascular wall without cell seeding（生体内で自己組織化する血管修復用パッチの肺動脈移植実験の検討）

審 査 委 員

主 査 教 授 黒坂 昌弘
教 授 平田 健一
教 授 田原 真也

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Newly developed tissue-engineered material for reconstruction of vascular wall without cell seeding

生体内で自己組織化する血管修復用パッチの肺動脈移植実験の検討

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻 外科学講座

心臓血管外科学

(指導教員：大北 裕 教授)

高橋 宏明

【背景】現在、心臓血管外科の臨床においては、血管修復材料として合成材料からなるパッチや人工血管を使用することが多い。これらの人工血管は耐久性に優れる半面、血栓形成や内膜肥厚による内腔の閉塞、成長に追従しない、また感染などの問題点が存在する。これらの問題点を解決するために、Tissue-Engineered Vascular graftの開発が進められているが、その多くは抗血栓性や生体適合性の向上を目指し、scaffoldに自己細胞の播種などの細胞操作や、bioreactorによる preconditioning が移植前に施される。しかしながら細胞播種などの操作は、感染のリスクや、緊急時の対応が難しい、手間がかかるなど、臨床への応用には未だ問題点が多い。

【目的】今回我々は、術前の細胞操作を必要としない、生体分解性ポリマーを用いた scaffold のみで自己組織化する血管修復用グラフトを開発し、その有用性を検討した。

【方法】いずれも生体吸収性ポリマーである、poly-L-lactic acid(PLLA)の芯に、外周が poly-glycolic acid(PGA)の2重構造の糸を平織りしてパッチを作成し、最後にコラーゲン付加を行った。この Tissue-Engineered Vascular patch のサイズは、縦 25mm、幅 5mm でイス（平均体重 20kg、肺動脈主幹部直径約 15mm）の肺動脈主幹部に移植し、移植後 1, 2, 6 ヶ月で摘出し(n=4)、形態的、組織学的、生化学的評価を行った。なお術後抗凝固、抗血小板療法は導入しなかった。コントロールとして、臨床で汎用されている ePTFE パッチを用いた。

【結果】術後合併症は認めず、全例生存した。血管造影では、瘤の形成や血管内腔の血栓形成は認めなかった。摘出したパッチの電子顕微鏡写真では、内腔面に内皮細胞が整然と血流方向に配

列し、6ヵ月においては native とほぼ同様の所見を呈していた。また肉眼的には特に6ヵ月の時点で native tissue と同様の外観を呈していた。一方、ePTFE patch は、一部血栓の形成が認められ、組織再生も吻合部に留まった。再生組織の壁厚に関して、中枢側、末梢側、パッチ中心部の測定を行なったが、経時的な変化は認めず、1ヵ月の時点から約1.3mmの壁厚で、各地点での変化も認めず、一律に組織再生が行なわれていることが伺われた。組織学的評価では、内腔面は von Willebrand factor 陽性の mono-layer を示し、血管内皮細胞の存在が認められた。またその下層では α -SMA 陽性細胞が平行に配列する像が観察された。これにより血管平滑筋細胞の存在が示唆された。Victoria blue 染色では、内皮下の elastic fiber の存在が示唆された。一方、ePTFE patch では、ほとんど組織再生は認められず、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の存在は認められなかった。摘出したパッチを5mm幅で短冊状にトリミングし、これを強度試験用の機械を用いて施行した Mechanical test の結果では、経時的に強度の低下が認められたが、移植後6ヵ月の時点でも、イヌ肺動脈と比較すると十分な強度を有していた。生化学的検討として collagen の定量を行なったが、1ヵ月： $338.1 \pm 176.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、2ヵ月： $361.0 \pm 123.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、6ヵ月： $375.8 \pm 165.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ と経時的に増加し、すでに1ヵ月の時点で、イヌ肺動脈の collagen 定量($238.8 \pm 77.2 \mu\text{g}/\text{mg}$)より上回っていた。さらに再生組織の RT-PCR を施行したが、血管増殖因子である VEGF は1ヵ月、2ヵ月と経時的に増加し、6ヵ月の時点では、イヌ肺動脈と同等のレベルに低下していた。また SM22 α は、経時的に増加し、6ヵ月の時点でイヌ肺動脈の2倍のレベルに達していた。今回の検討では、移植1ヵ月の時点で、十分な組織再生が行なわれてお

り、そのメカニズムを探るため、移植早期の評価を行なった。同じ動物モデルで、肺動脈主幹部に PGA/ PLLA patch を移植後3時間で、内腔面を電子顕微鏡で評価すると、scaffold に比較的均一に細胞が敷き詰められており、明らかなフィブリンの析出は認めなかったのに対し、ePTFE の方では、フィブリンが直接内腔面に不規則に析出する像が認められた。

【結語】我々の開発した Tissue-Engineered Vascular graft は術前の細胞操作を行わずとも、良好な in situ cellularization を可能とした。また早期の内皮化により、抗凝固療法を行わなくとも血栓形成による狭窄・閉塞は認めなかった。本素材は、自己化しうる血管修復用素材として、特に成長追従が必須な小児心臓手術への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 2043 号	氏名	高橋 宏明
論文題目 Title of Dissertation	Newly developed tissue-engineered material for reconstruction of vascular wall without cell seeding 生体内で自己組織化する血管修復用パッチの肺動脈移植実験の検討		
審査委員 Examiner	主査 黒坂 昌弘 Chief Examiner 副査 田原 真也 Vice-examiner 副査 平岡 健一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景】現在、心臓血管外科の臨床においては、血管修復材料として合成材料からなるパッチや人工血管を使用することが多いが、これらの人工血管は耐久性に優れる半面、血栓形成や内膜肥厚による内腔の閉塞、成長に追従しない、また感染などの問題点が存在する。これらの問題点を解決するために、Tissue-Engineered Vascular graft の開発が進められているが、その多くは抗血栓性や生体適合性の向上を目指し、scaffold に自己細胞の播種などの細胞操作や、bioreactor による preconditioning が移植前に施される。しかしながら細胞播種などの操作は、感染のリスクや、緊急時の対応が難しい、手間がかかるなど、臨床への応用には未だ問題点が多い。

【目的】術前の細胞操作を必要としない、生体分解性ポリマーを用いた scaffold のみで自己組織化する血管修復用グラフトを開発し、その有用性を検討した。

【方法】いずれも生体吸収性ポリマーである、poly-L-lactic acid(PLLA)の芯に、外周が poly-glycolic acid(PGA)の2重構造の糸を平織りしてパッチを作成し、最後にコラーゲン付加を行った。この Tissue-Engineered Vascular patch のサイズは、縦 25mm、幅 20mm でイヌ（平均体重 20kg、肺動脈主幹部直径約 15mm）の肺動脈主幹部に移植し、移植後 1, 2, 6 ヶ月で摘出し(n=4)、形態的、組織学的、生化学的評価を行った。なお術後抗凝固、抗血小板療法は導入しなかった。コントロールとして、静脈系として臨床で汎用されている ePTFE パッチを用いた。

【結果】術後合併症は認めず、全例生存した。血管造影では、瘤の形成や血管内腔の血栓形成は認めなかった。摘出したパッチの電子顕微鏡写真では、内腔面に内皮細胞が整然と血流方向に配列し、6 ヶ月においては native とほぼ同様の所見を呈していた。また肉眼的には特に6 ヶ月の時点で native tissue と同様の外観を呈していた。一方、ePTFE patch は、一部血栓の形成が認められ、組織再生も吻合部に留まった。再生組織の壁厚に関して、中枢側、末梢側、パッチ中心部の測定を行なったが、経時的な変化は認めず、1 ヶ月の時点から約 1.3mm の壁厚で、各地点での変化も認めず、一律に組織再生が行なわれていることが伺われた。組織学的評価では、内腔面は von Willebrand factor 陽性の mono-layer を示し、血管内皮細胞の存在が認められた。またその下層では α -SMA 陽性細胞が平行に配列する像が観察された。これにより血管平滑筋細胞の存在が示唆された。Victoria blue 染色では、内皮下の elastic fiber の存在が示唆された。一方、ePTFE patch では、ほとんど組織再生は認められず、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の存在は認められなかった。摘

出したパッチを 5mm 幅で短冊状にトリミングし、これを強度試験用の機械を用いて施行した Mechanical test の結果では、経時的に強度の低下が認められたが、移植後 6 カ月の時点でも、イヌ肺動脈と比較すると十分な強度を有していた。生化学的検討として collagen の定量を行なったが、1 カ月 : $338.1 \pm 176.4 \mu\text{g}/\text{mg}$, 2 カ月 : $361.0 \pm 123.8 \mu\text{g}/\text{mg}$, 6 カ月 : $375.8 \pm 165.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ と経時的に増加し、すでに 1 カ月の時点で、イヌ肺動脈の collagen 定量 ($238.8 \pm 77.2 \mu\text{g}/\text{mg}$) より上回っていた。さらに再生組織の RT-PCR を施行したが、血管増殖因子である VEGF は 1 カ月、2 カ月と経時的に増加し、6 カ月の時点では、イヌ肺動脈と同等のレベルに低下していた。また SM22 α は、経時的に増加し、6 カ月の時点でイヌ肺動脈の 2 倍のレベルに達していた。

【結語】新たに開発された Tissue-Engineered Vascular graft は術前の細胞操作を行わずとも、良好な in situ cellularization を可能とした。また早期の内皮化により、抗凝固療法を行わなくとも血栓形成による狭窄・閉塞は認めなかった。本素材は、自己化しうる血管修復用素材として、特に成長追従が必須な小児心臓手術への応用が期待される。

本研究は、Tissue-Engineering の手法を用いた、血管修復材料の開発とその有用性について研究したものであるが、Scaffold の工夫により、術前の細胞操作を行わずとも良好な in situ cellularization が可能であり、また抗凝固療法なしで良好な結果が得られたことから、自己化しうる血管修復用素材としての臨床応用が期待される。特に成長追従が必須な小児心臓手術への適応が期待され、今後の人工素材についての重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。