

## 血管誘導のための人工足場材料の作製と評価

## Evaluation and Fabrication of Artificial Scaffold for Angiogenesis

○ 野中一洋 (電機大・理工) 和田知明 (電機大院・理工) 幡多徳彦 (電機大・フロンティア共同セ)

野口展士 (電機大院・先科技) 矢口俊之 (ウルサン科技大) 大越隆文 (津田沼中央総合病院)

朝倉哲郎 (農工大・工) 福井康裕 (電機大・理工) 舟久保昭夫 (電機大・理工)

Kazuhiro NONAKA, Yasuhiro FUKUI, Akio FUNAKUBO, School of Science and Engineering, Tokyo Denki University

Tomoaki WADA, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Denki University

Nohiroko HATA, Frontier Research and Development Center, Tokyo Denki University

Hiroo NOGUCHI, Graduate School of Advanced Science and Technology, Tokyo Denki University

Toshiyuki YAGUCHI, Nano-Bioscience and Chemical Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology

Takafumi OKOSHI, Tsudanuma Central General Hospital

Tetsuo ASAKURA, Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

**Abstract:** Stereoscopic design of artificial scaffolds is required for the microscopical extracellular environments and complex three-dimensional structures. Electrospinning is an effective method used to fabricate nano-microscale fibers that are similar in structure and function to the extracellular matrix. The purpose of this study was to provide high cell adhesion and cell proliferation potential to electrospun nano-microscale scaffolds. The mixed electrospun-fibrous scaffolds composed of segmented polyurethane (SPU) and silk fibroin were prepared by simultaneous electrospinning on a teflon coated mandrel. Scaffold was observed by scanning electron microscopy and was analyzed infrared spectroscopy. Collar Doppler ultrasonography demonstrated patency in 1 month of SPU/Silk fibroin electrospun graft for dog implantation study.

**Key Words:** Electrospinning, Scaffold, Segmented polyurethane, Silk fibroin, Blayered fabric, Cell organization

## 1. 緒言

エレクトロスピンニング法(Electrospinning: E.S 法, Fig.1)は溶液性状や作製条件を制御することで細胞外マトリックスを模擬した微細繊維構造を構築することができ、薄膜シートやチューブ状に成型した人工血管等の組織デバイスを作製することが可能である<sup>1)</sup>。本研究では E.S 法により作製されるナノ・マイクロファイバーの特性を考慮し、新規の人工細胞足場材料(Scaffold)の作製を行った。細胞-材料複合体を生体内に埋入して早期生着、長期機能維持させるには血管網の構築が必須であり、血管誘導能を促進させる Scaffold の開発が求められる。我々は、抗血栓性、柔軟性および高耐久性を有し、様々な医療分野に応用されているセグメント化ポリウレタン(Segmented Polyurethane: SPU)を血管誘導材料とし、その機能化を検討してきた<sup>2)</sup>。しかし、SPU は生分解性高分子と比較すると細胞接着性および増殖性が低いという問題点が挙げられる。そこで細胞親和性に優れたタンパク質由来の絹フィブロインを用い、E.S 法による SPU-絹フィブロイン混紡型のナノ・マイクロファイバーから成る内径 3.5mm の円筒型の Scaffold を作製し、その生体親和性評価を行った。

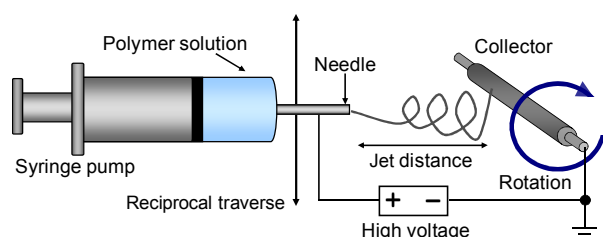


Fig.1 Schematic diagram of electrospinning apparatus: Nonwoven structure was fabricated by electrospinning process using a rotating collector.

## 2. 実験方法

### 2.1 Scaffold 作製

Scaffold 材料として、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP, 和光純薬工業株式会社)にて SPU と絹フィブロインを 2:1 の割合で溶解し、高分子溶液を調合した。そして E.S 法により、Table 1 に示した条件にて絹フィブロインおよび SPU 8.0w/v%の混合溶媒で繊維を紡糸した。Scaffold 作製は温度 30℃、湿度 30%の条件下で行った。

次に作製した Scaffold の構造を走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM, JSM-5310LV, JEOL Ltd.)により観察および画像を取得し、無作為に各繊維の径を 10 箇所測定し、平均繊維径を算出した。また二層型 Scaffold の成分分析として、赤外線分光分析(IR)を行った。

Table 1 Fabrication condition of scaffold with bilayered fabrics.

	Silk fibroin + SPU 8.0w/v% in	
	HFIP	
Applied voltage (kV)	22.2	
Jet distance (cm)	9.0	
Traverse speed (mm/min)	2.3	
Mandrel speed (rpm)	300	
Flow rate (ml/s)	0.06	

### 2.1 *in vivo* 評価試験

作製した円筒型 Scaffold(人工血管)を (内径 3.5mm, 直径 30mm) をビーグル犬 (8-12kg) の総頸動脈へ移植し、40 日間における開存性および生体親和性評価を行った。また、移植後の Scaffold の機能性を非侵襲的に評価するための評価法として超音波検査を行った。測定にはパルスドプラ、解析ソフトウェア(color-flow, e-flow), ソナゾイド造影を使用し、収縮期最大流速 (PSV), 拡張末期流速 (EDV),

拍動係数 (PI), 抵抗係数 (RI), 収縮期加速時間 (AT), 血管径 (CSD), プラークの有無, 乱流の有無, 狭窄の様子, 血管周囲組織の反応について測定および評価を行った. (Fig.2). またこれまでの実験において, ビーグル犬の頸動脈の正常値は PSV(約 70~200m/s), EDV(約 10~60m/s), PI(約 1.6~3.5), RI(約 0.7~0.9), AT(約 60~72ms)である.

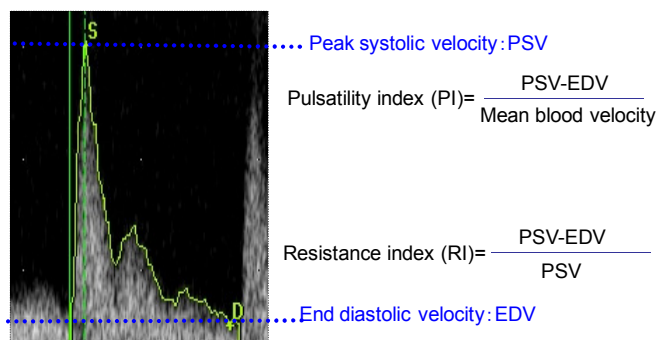


Fig.2 Doppler evaluation of dog implantation study

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 Scaffold 作製結果

Fig.3 に作製した Scaffold の断面画像を示す. 作製した人工血管を走査型電子顕微鏡により観察した結果, 膜厚は 590-640 $\mu$ m で構成され, IR 分析結果より, 血管壁がナノファイバーの絹フィブリン繊維とマイクロファイバーの SPU 繊維から構成されているのが確認された (Fig.4). また平均繊維径は絹フィブリンが 0.29 $\pm$ 0.05 $\mu$ m であり, SPU が 1.25 $\pm$ 0.29 $\mu$ m であり, E.S の駆動時間により, 膜厚を制御することが可能であった.

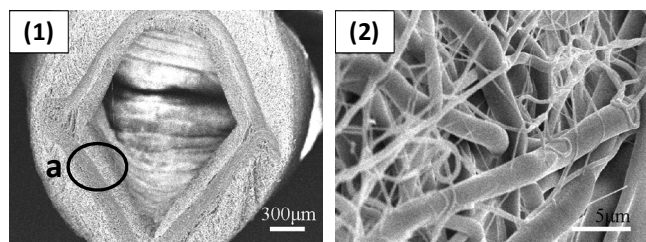


Fig.3 Fibrous scaffold with blended fabrics of SPU/silk fibroin. (1) Scanning electron micrograph of the blended fabrics, (2) Magnified image of region (a) in photo.

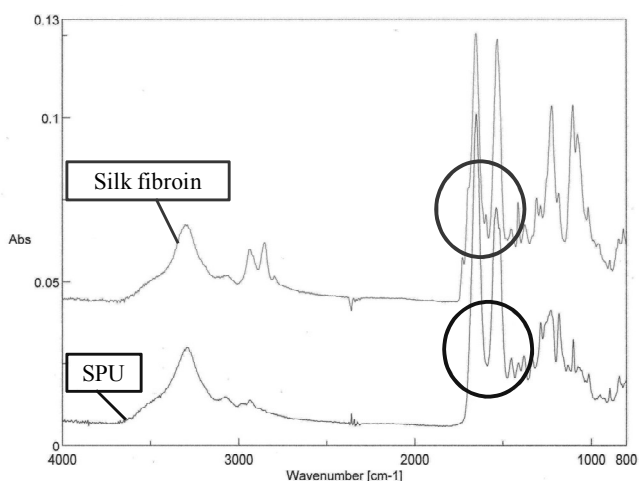


Fig.4 IR spectrum of fibrous scaffold with blended fabrics.

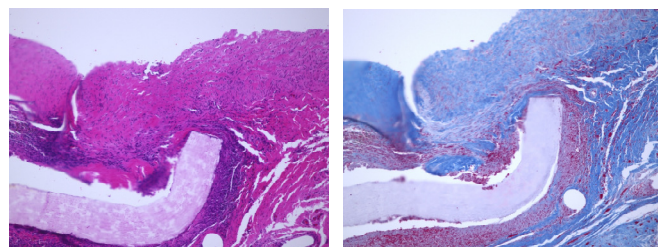
#### 3.1 in vivo 評価結果

Table 2 に円筒型 Scaffold をビーグル犬の頸動脈に移植後,

各パラメータにおける時間経過後の超音波検査結果を示す. 人工血管の移植後において, プラークや吻合部の不整などによる狭窄時には狭窄部位及びその直下において PSV, EDV の値が上昇し, また Scaffold 全体において PI, RI の値が低下することが確認された. さらに人工血管の外径が, 時間経過とともに小さくなっていることが確認された. これは血液流速の影響により, 人工血管が長軸方向伸長したことや SPU あるいは絹フィブリンの加水分解が要因と考えられる. Fig.5 にイヌ総頸動脈埋め込み 40 日後の人工血管の H&E 染色および MTC 染色画像を示す. 血液接触面となる内面に内皮細胞の良好な増殖能が示され, 良好な組織形成が確認された.

Table 2 Dog implantation study Doppler ultrasonography

	PERIOPERATIVE (Average)	POST 1ST WEEK (Average)	POST 1ST MONTH (Average)
PSV (m/s)	194.55	222.05	260.55
EDV (m/s)	16.65	48.95	81.05
PI	3.775	1.69	1.43
RI	0.915	0.78	0.695
DIAMETER (mm)	3.05	2.4	2.25



H&E staining

MTC staining

Fig.5 Postoperative 40 days: Intimal cell organization of proximal anastomosis side

### 4. 結論

本研究では, 抗血栓性, 柔軟性および耐久性に優れたセグメント化ポリウレタン(SPU)と細胞親和性に優れたタンパク質由来の絹フィブリンを用い, 血管化促進足場材料としての評価を行い以下の結論を得た.

E.S 法により, SPU と絹フィブリン混紡型の Scaffold を作製することが可能であった. 円筒型に成型した人工血管のイヌの総頸動脈への移植実験により, 良好な開存性および血液接触面への豊富な組織侵入が確認された.

今後は更なる開存性を目指すべく人工血管の構造の最適化および SPU と絹フィブリンの混合割合を変化し, 細胞が最も生着しやすい条件を追求していく.

### 謝辞

本研究の一部は, 科学研究費補助金 (研究活動スタート支援 課題番号 22800064), および平成 20~24 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(S0801023)の研究費を受けて行われた.

### 参考文献

- (1) Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S: Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*. 2004; 25(5), 877-886.
- (2) Yaguchi T, Funakubo A, Okoshi T, Noishiki Y, Fukui Y: Fabrication of small-diameter polyurethane vascular grafts with microporous structure. *J Artif Organs* 2002; 5: 117-122.