

ハイブリッド材料の抗血栓性と生体癒合に関する研究

Study on Antithrombogenicity and Intention of the Hybrid Material

○ 井上雄介(東北大) 川瀬由季乃(北里大) 田代彩夏(北里大) 斎藤逸郎(東大)
磯山隆(東大) 小野俊哉(東大) 原伸太郎(東大) 塚本晃海(東大) 李欣陽(東大)
前野映里奈(北里大) 石井耕平(香川高専) 白石泰之(東北大) 三浦英和(東北大)
山家智之(東北大) 阿部裕輔(東大)

Yusuke INOUE, Tohoku University
Yukino KAWASE, Kitasato University
Ayaka TASHIRO, Kitasato University
Itsuro SAITO, The University of Tokyo
Takashi ISOYAMA, The University of Tokyo
Toshiya ONO, The University of Tokyo
Shintaro HARA, The University of Tokyo
Terumi YURIMOTO, The University of Tokyo
XinYang LI, The University of Tokyo
Erina MAENO, Kitasato University
Kohei ISHII, National Institute of Technology, Kagawa College
Yasuyuki SHIRAIISHI, Tohoku University
Hidekazu MIURA, Tohoku University
Tomoyuki YAMBE, Tohoku University
Yusuke ABE, The University of Tokyo

Abstract: The purpose of our research is to develop new medical material that we can use at blood contact surface. The issue of ventricular assist device is thromboembolism at surface of inflow cannula due to low biocompatibility of the arterial. We try to solve the challenge to develop new material. The hybrid material use polymeric material and biomaterial. The hybrid material consists of scaffold and regenerated tissue. And we use polyester velour fabric as scaffold and titanium conduit as structure material. The scaffold was implanted under the skin and the tissue was regenerated. Finally the conduit was decellularized. The hybrid cannula was implanted with VAD for evaluation. In result, the goat survived 3 month without antithrombogenic agents and the hybrid cannula was connected to cardiac muscle smoothly and thrombus weren't formed. And the result of immunostaining, surface of cannula was coated with endothelial cells.

Key Words: Hybrid material, Antithrombogenicity, Biocompatibility, VAD, Biomaterial

1. はじめに

1-1 背景

人工心臓が臨床応用されはじめ、特に補助人工心臓(VAD)は年間多くのデバイスが植え込まれている。そのVAD治療において、脱血カニューレの心臓挿入部に血栓が形成されることがあり、解決すべき重要な課題である。血栓が形成される要因として考えられるのは、心臓内に挿入した脱血カニューレに使用されている材料の生体適合性が十分でないことが挙げられる。具体的には、左心室に挿入されているカニューレコンジットの材料が心筋と癒合しないことと、コンジットの材料表面で血栓が形成されることが大きな要因としてあげられている。心筋とコンジットが癒合できない場合、心筋とコンジットの間に隙間が生じ、心拍により空隙に血液が流入し、鬱滞することで凝血塊が生じると考えられている。

1-2 ハイブリッド材料

一般に医療材料は、その材料によって大別すると人工材料と生体由来材料に区分することができる。人工材料は金属や高分子材料を原料とし、高い加工性能と高い工場強度

を有しているが、前述のように生体適合性は十分でなく、血液接触面での使用には解決すべき課題として残されている。生体由来材料はブタなどの動物の生体組織を原料とし、化学固定や脱細胞処理を施し、免疫抑制反応を低減させる処理を施した上で利用される。生体由来材料は高い生体適合性、血液適合性を示すものが多いが、機械的強度に課題が残されており、人工血管として動脈圧下で適用した場合には、内圧に耐えられず径の拡張や、断裂等に由来する内膜肥厚などが生じる恐れがあるとされている。そこで我々は、生体由来材料の生体適合性と、人工材料の強度を併せ持つハイブリッド人工材料の開発を行っている⁽¹⁾。ハイブリッド人工材料は高分子材料を足場として、生体組織を誘導して新生させた後に脱細胞処理を施して得る材料で、高分子材料が構造強度を維持し、材料の最表面にある細胞外マトリクスが優れた生体適合性を示す事を期待した構成となっている。

1-3 脱血カニューレ用ハイブリッドコンジット

脱血カニューレの血栓形成を防止するために、脱血用カニューレに求められる要件は

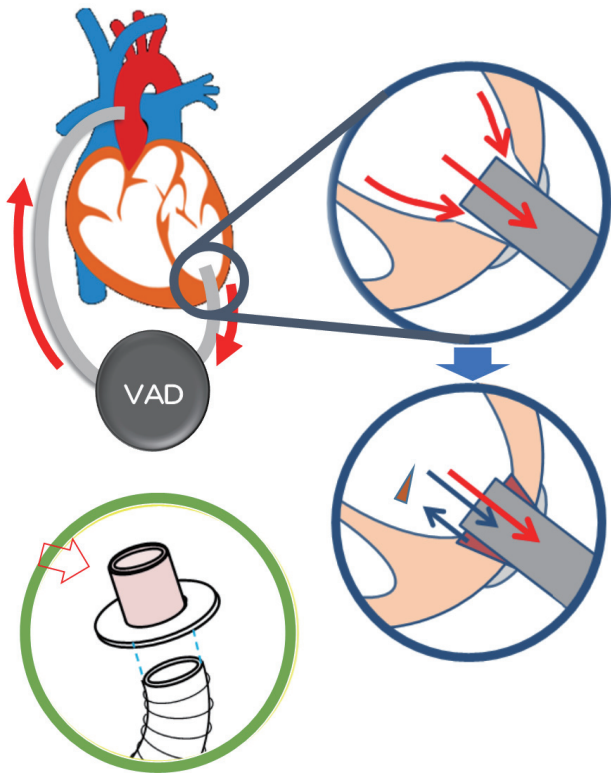


Fig.1 Issue of Inflow cannula for VAD

1. 材料の表面で血栓が生じないこと
2. 心室内に挿入したカニューレコンジットと心筋がなめらかに癒合し、コンジットと心壁の間隙で凝血塊が生じないこと

の2点であると考えている。そこで、我々は補助人工心臓用脱血カニューレの心室内部に挿入されるコンジットをハイブリッド材料で作製し、その生体適合性を動物実験によって評価することを目的とした。

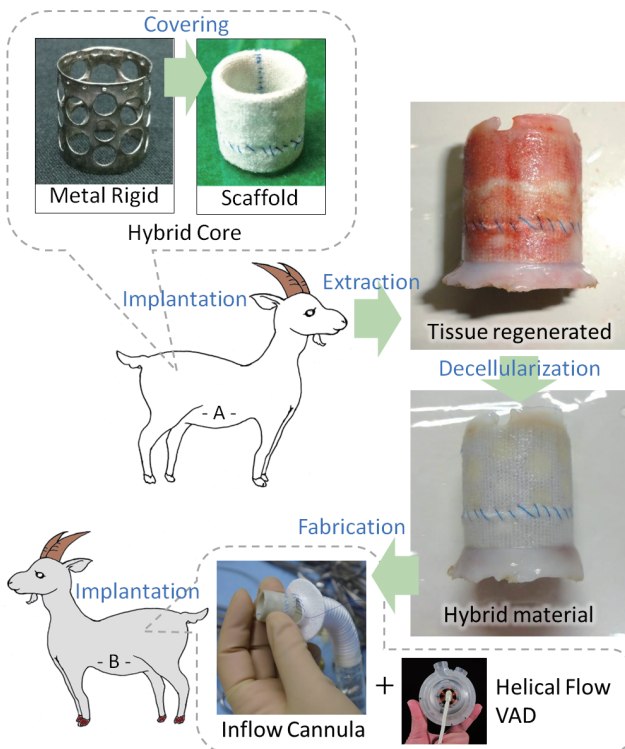


Fig.2 Concept of Hybrid Material

2. 方法

2-1 脱血カニューレ用ハイブリッドコンジットの作製

ハイブリッドコンジット作製する手順は次の3段階の手順を必要とする。

1. 核の準備
2. 生体組織の誘導
3. 脱細胞処理

核は円環構造を維持するため金属剛体と、生体組織を誘導する高分子足場の2つから構成した。剛体はチタンの鋼材から切削し、直径18mm、長さ17mm、薄さ0.5mmの形状で作製した。足場はポリエステル布を起毛処理した厚さ1mmのペロア布を使用した。足場は剛体の全周を覆うように縫製して、核として作製した。

生体組織を誘導するために、核を動物の皮下に植え込んだ。動物にはヤギ(日本ザーネン, 50kg, ♀)を用い、核を外型に挿入した上で、広背筋近傍に埋込を行った。約5ヶ月間の埋込の後、核の摘出を行った。

生体組織が全面に誘導された核を、無菌操作下で脱細胞処理を施した。脱細胞には1%ドデシル硫酸ナトリウム(和光純薬工業, 196-08675)水溶液を用いて6時間攪拌暴露し、その後、3日間生理食塩水でリンス処理し、ハイブリッドコンジットとして完成させた。

2-2 動物実験方法

東京大学で開発中の螺旋流型補助人工心臓と共に、ヤギにハイブリッド脱血カニューレを適用し、材料の抗血栓性と生体癒合性を評価した。作製したハイブリッドコンジットはVAD用の脱血カニューレとして構成するために、ゴアテックス製の人工血管(GORE, Vascular Graft)と吻合し、螺旋流型人工心臓と接続した。コンジットに生体組織を誘導した個体とは別のヤギにVADと共に適用した。実験期間は3ヶ月間で、期間中は抗凝固療法と免疫抑制療法は実施しなかった。3ヶ月後に実験を終了し、材料表面の血栓の有無と、材料と心筋との癒合を確かめた。

動物実験は、東京大学大学院医学系研究科医用生体工学講座生体機能制御学分野で行い、東京大学で制定されている動物実験マニュアルに基づいて、東京大学医学系研究科動物実験委員会への届け出と許可の下に行った(承認番号: 医-H13-046)。

2-3 組織染色

実験終了後のハイブリッドコンジットを10%ホルマリンバッファ液を用いて化学固定した後、基本染色と免疫染色を実施して組織学的に評価した。

3. 結果

3-1 ハイブリッドコンジット

皮下植え込み後5ヶ月経過後に摘出した核は、生体組織によって全面が覆われていることが確認された。摘出後直ちに脱細胞処理を実施した。完成したハイブリッドコンジットは細胞成分が除去されたため白色となり、ポリエステル足場と細胞外マトリクスのみが残存した。

3-2 動物実験結果

実験開始から3か月経過後、予定通り93日目まで動物実験を終了した。実験終了前に、十分な量のヘパリンを投与し、心停止後の血栓形成を防止した。実験終了はチオペンタールナトリウム(ラボナール)麻酔下に塩化カリウムを投与し心停止させた後、VADの駆動を停止した。心停止確認後、

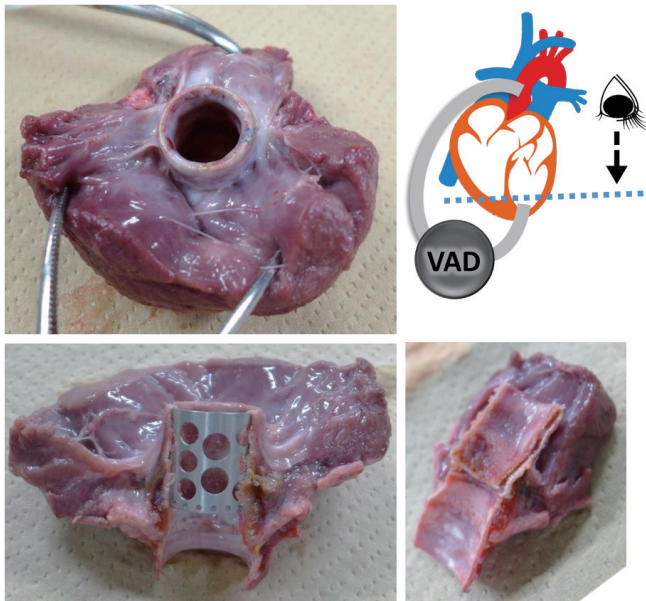


Fig.3 Result Pictures After Animal Experiment

直ちに解剖を行った。胸腔内には血餅や化膿は見られず、良好な結果を得た。生体中のカニューレや人工血管の折れ曲がりなどの異常状態の有無を確認した後、心臓と肺、ポンプ、カニューレが接続された状態で取り出し、ポンプとカニューレの観察を行った。ハイブリッド脱血カニューレの人工血管部に血栓などの所見がないことが確認された。次に、人工血管部でカニューレを切断し、脱血カニューレが挿入されている左室心尖を残して心臓組織を取り除き、左室内腔側よりハイブリッドカニューレの状態を確認した。ハイブリッドコンジットと周りの心臓組織は滑らかに癒合しており、心臓内およびコンジット表面に血栓や凝血塊は認められなかった。

3-3 組織染色結果

HE 染色によりハイブリッドコンジットと心筋は滑らかに結合しており、心筋とハイブリッドコンジットとの間に空隙は確認されなかった。ハイブリッドコンジットに核が確認されたことより、脱細胞化したハイブリッドコンジットは免疫拒絶反応もなく、適用したヤギ由来の細胞で再細胞化されていたことが分かった。また、ハイブリッドコンジットに組織の肥厚なども見られなかった。

ハイブリッドコンジットの表面の組織の様子を観察するために、フォンヴィレブランド因子 (vWF) を用いた免疫染色を行った。この因子は、血管内皮細胞の結合組織に結合するもので、ハイブリッド材料表面の血管内皮細胞の有無を確認した。心筋とカニューレの血栓ができやすい部分は血管内皮細胞で覆われていたことが分かった。血管内皮細胞は血栓を防止する働きをするため、作製したハイブリッドコンジットは組織学的にも血栓形成を防ぐことのできるカニューレであった。また、カニューレの内腔表面はハイブリッド材料部分がほぼすべて茶色く染まっていた。このことから、内皮が肥厚した可能性が示唆された。しかし、ハイブリッド材料部にパンヌスが認められなかったことより、内皮肥厚による異常形成は防ぐことができた。

4. 考察

一般に細胞外マトリクスの主要素であるコラーゲンは抗血栓性が悪いと言われている。しかしながら本研究の成果

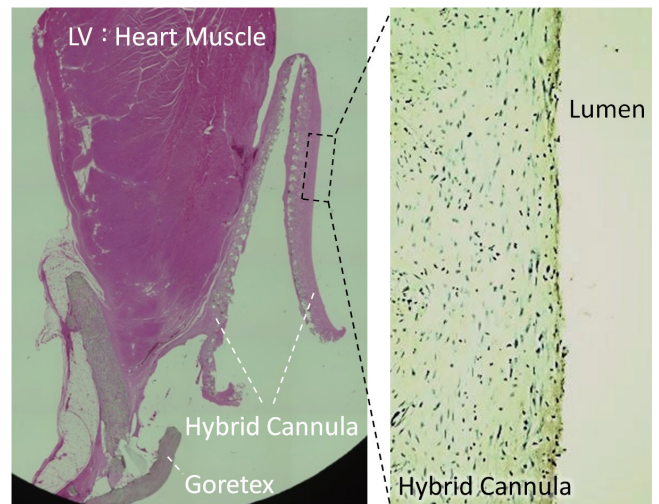


Fig.4 Result of Histological Staining

は、高い抗血栓性を示した。これは、解剖時の腎臓の状態が良好であったことや、脳梗塞や四肢の血栓塞栓症が生じていないことから同様の結果を示している。この理由として考えられることは、超短期的にはハイブリッド材料の表面に薄く凝血塊が生じているのではないかと考えられ、またその薄い凝血塊自体が疑似内膜として機能することで、ダクロン製の人工血管の様に機能したのではないかと考えられる。ダクロン製の人工血管と大きく異なる点は、ダクロン人工血管を中・長期間使用しても、内膜形成がほとんど生じず、生体との吻合部から一定の距離のみが内膜として構成されるのに対し、本材料で作製したコンジットは、心筋と接していないコンジット内腔を含む全面が、レシピエントの細胞で置き換わり、最表面には血管内皮細胞で完全に覆われたことである。このことによって、周術期から長期間にわたって、高い抗血栓性を示したと考えられる。

ハイブリッド材料と心筋組織は非常に良好な癒合が見られたが、ハイブリッド材料に再生した細胞は心筋由来ではなかった。本来心筋はほとんど再生しないとされているが、染色結果を見ると、ハイブリッド材料と心筋の接合部ではまだら状に筋細胞と結合組織が混ざり合っている部位も観察された。また心筋中に炎症反応や壊死した部分などは見られず良好な結果を得たこと、ハイブリッド材料が白血球等に食食されることはなく、また肥厚することもなかったことから、免疫拒絶反応は生じておらず、異物として認識されなかったものと考えられる。

5. まとめ

本研究で開発した補助人工心臓用ハイブリッド脱血カニューレは、高い抗血栓性と生体癒合性を示し、実験中3ヶ月にわたって抗凝固療法無しに、血栓や凝血塊は生じず、合併症は生じなかった。また、免疫拒絶反応や感染、ショック等は生じず、良好な結果を得た。これらのことから、開発したハイブリッド材料は高い生体適合性を有していることを示した。

参考文献

- (1) Kishi A, Isoyama T, Saito I, Miura H, Nakagawa H, Kouno A, Ono T, Inoue Y, Yamaguchi S, Wei S, Abe Y, Imachi K, and Noshiro M., Use of In Vivo Insert Molding to Form a Jellyfish Valve Leaflet. *Artificial Organs*34, vol.12, pp1125-1131, 2010