

組織工学材料における血管新生の生体内連続観察

東京大学大学院医学系研究科

生体物理医学専攻医用生体工学講座

生体機能制御学分野

指導教員 阿部裕輔 准教授

井上 雄介

## 要旨

組織工学材料としての Scaffold に新生する血管を長期間安定に観察するために、3 種類の血管新生観察装置を開発した。高解像度 CMOS 受像素子とオートフォーカス機能を備えることにより画質の問題を解決した。開発した血管新生観察装置を用いることで、麻酔や沈静薬剤を必要とせず、かつ厳しい拘束なしに長期間安定して、Scaffold における血管新生を連続観察できることを実証した。細胞播種が Scaffold における血管新生に与える影響について検討し、細胞を播種した方が細胞を播種しない場合よりも Scaffold における血管新生の速度が早いことを明らかにした。本研究で開発した血管新生観察装置は、様々な研究に応用可能であり、その有用性が期待できると考えられる。

# 目次

第 1 章	緒言	1
1.1	組織工学技術の課題	1
1.2	新生血管観察手法の問題点	2
第 2 章	研究目的	4
第 3 章	Scaffold の選択	5
3.1	血管新生観察に求められる Scaffold の条件	5
3.2	Scaffold の材料と形状の選択	5
3.3	Scaffold の最適な厚み決定実験	6
3.3.1	実験に使用した材料と機器	6
3.3.2	動物実験方法	8
3.3.3	動物実験結果	10
3.3.4	考察	14
第 4 章	体内埋込型超小型観察装置の開発	15
4.1	プローブ型血管新生観察装置 (Type I)	15
4.1.1	設計概念	15
4.1.2	デバイス	16
4.1.3	動物実験方法	21
4.1.4	動物実験結果	22
4.1.5	考察	25
4.2	チャンバー型血管新生観察装置 (Type II)	27
4.2.1	設計概念	27
4.2.2	デバイス	28
4.2.3	動物実験方法	35
4.2.4	動物実験結果	36
4.2.5	考察	41

4.3	長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III)	43
4.3.1	設計概念	43
4.3.2	デバイス	43
第5章	血管新生の生体内連続観察実験	52
5.1	実験目的	52
5.2	実験方法	52
5.2.1	動物実験方法	52
5.2.2	画像取得方法	53
5.2.3	組織評価方法	53
5.3	実験結果	53
5.4	組織学的検討結果	56
5.5	考察	60
5.5.1	動物実験管理	61
5.5.2	画像取得	61
5.5.3	画像の画質	62
第6章	血管新生における細胞播種の影響の検討	63
6.1	実験目的	63
6.2	実験方法	63
6.2.1	播種細胞の初代培養方法	63
6.2.2	細胞播種比較実験方法	68
6.2.3	動物実験方法	68
6.2.4	血管新生の観察方法	71
6.2.5	血管新生速度の算出方法	71
6.3	実験結果	73
6.4	考察	78
第7章	総合考察	79
第8章	結語	83
引用文献		84

# 第1章

## 緒言

### 1.1 組織工学技術の課題

現在再生医療<sup>[1-4]</sup>が非常に注目されており、それに伴って組織工学技術<sup>[5-9]</sup>の発展が非常に重要な課題となっている。現在行われている研究において、大きな問題点の1つに、現在の組織工学技術では、複雑な臓器を構築できないという点が挙げられる。培養細胞を用いて組織を形成させようとする場合、ディッシュを用いて平面に細胞を培養することは可能であるが、細胞シートを重ねて作製した厚みを持った組織は、深層へ栄養が行き渡らないため、現状では、細胞シートから臓器の形成は困難である。一方、Scaffold（足場）を用いた組織工学技術も発展しており、歯や骨を作り出すことに成功している<sup>[10-13]</sup>。Scaffoldとは、組織工学において組織を誘導する足場となる材料である。Scaffoldはバイオマテリアルとして、また細胞培養のための足場としても非常に有用な材料である。材料には無機物と有機物のどちらも使われており、また材料の他に構造や形成方法によって様々に分類されている。その中で特に生体内で加水分解される高分子のScaffoldが医療材料としてよく使われている<sup>[14-15]</sup>。しかし、Scaffoldを用いた組織工学技術で構築可能な臓器は比較的単純な組織からなる臓器であり、複雑な臓器の構築にはまだ成功していない<sup>[16-19]</sup>。その原因としては、組織工学において、血管を構築するための技術が未開発であり、またScaffoldにおいて血管新生を誘

導するメカニズムも未解明であることによると考えられる。組織工学技術においては、血管新生が非常に重要な要素であるにもかかわらず、組織工学材料において血管新生を直接観察する研究は今まで行われていない。

## 1.2 新生血管観察手法の問題点

血管の観察に関しては、今までにも多くの研究が行われている。ウサギの耳介窓を用いた観察法<sup>[20-26]</sup>は、血管や組織の新生を直接観察する方法として効果的な方法のひとつである。この方法はウサギの耳介にパンチを用いて10mm以下の孔を空け、この穴を表と裏から透明な樹脂またはガラスで挟み込むことで窓を作製し、その窓に増生する血管を観察する方法である。この方法を用いて数多くの研究が行われたが<sup>[20-26]</sup>、観察時には実験動物を拘束し、一般的な光学顕微鏡を用いて観察する必要があるため、短時間の観察は可能であるが、長期間の連続観察は非常に困難であるという問題があった。また拘束や薬剤による影響は無視し得ず、自然な状態での連続観察も困難であった。その他の方法としては、観血的に生体組織や臓器を直接観察する方法が行われている<sup>[27]</sup>。この方法は、急性動物実験において麻酔下の状態で行われるもので、腸間膜を用いられることが多く、薬剤や刺激に反応する血管の観察を行う方法である。さらに、生体において血管系が表在化している部位を利用する方法も行われている<sup>[29-29]</sup>。この方法はコウモリの翼、カエルの水掻き、サンショウウオのエラ、ハムスターの頬袋など動物での観察<sup>[30-37]</sup>が多いが、ヒトにおいても、眼瞼結膜や眼底網膜、爪、掌静脈<sup>[38-43]</sup>において観察

が行われている。しかし、これらのどの方法も、観察時には実験動物を拘束する必要があるため、長期間の連続観察は非常に困難であった。

当研究室では、顕微鏡を用いずに血管を観察する方法として小型の CCD 素子を用いた血管観察装置の開発を行っている<sup>[44-46]</sup>。この研究では、腸間膜等を観察することにより顕微鏡を使用することなく微小な血管を観察し、血流等の有無を観察することに成功したが、光源と光学素子の間に、対象を挟み込んで撮影するという、その構造上の問題から視野を長期間確保できないという問題と、デバイスの低い耐久性が課題として残された。

## 第2章

### 研究目的

組織工学技術においては、血管新生が非常に重要な要素である。しかしながら、組織工学材料における血管新生を直接観察する研究は今まで行われていない。麻酔や拘束による影響をうけずに、組織工学材料における血管新生の時間的変化の観察や血管新生メカニズムの解明を行うためには、体内に埋め込んで使用できる小型血管観察装置が必要である。また、組織工学材料における血管新生の連続観察を可能とするには、長期間視野を安定に確保する必要がある。その方法として、近年大きく発展している小型イメージ素子を用いてワンピースの血管観察装置を開発し、かつ観察装置に血管を誘導する Scaffold を組み込むことを考えた。すなわち、観察装置内部に Scaffold を固定し、Scaffold に血管や組織を誘導させることで、安定した視野が確保できると考えた。

本研究は、小型イメージ素子と Scaffold を使用して、体内に埋め込んで長期に使用できる血管観察装置を開発することを目的とした。

本論文では、開発した観察装置をヤギに埋め込み、Scaffold に血管や組織を誘導することで組織工学材料における血管新生の連続観察を行い、血管や組織の新生状況を検討するとともに、開発した観察装置の有効性を検証し、さらに観察装置を用いた応用として、Scaffold への細胞播種の有無が血管新生に与える影響を検討した。



## 第3章

### Scaffold の選択

#### 3.1 血管新生観察に求められる Scaffold の条件

血管および生体組織を誘導し、安定して観察するためには適切な Scaffold を選択する必要があった。本研究における Scaffold に求められる主な条件は、

- ①体内で生分解代謝され血管新生・組織新生が速やかに行われること
- ②新生血管が組織中に埋没せず、2次元的に観察可能であること
- ③生体に悪影響を及ぼすことのない素材であること

であるため、以上の3点を満たす Scaffold の選択を行った。

#### 3.2 Scaffold の材料と形状の選択

現在生体に用いられている Scaffold にはいくつかの種類が存在するが、生体適合性、生体親和性が良好で、現在医療材料や生物実験材料として用いられており(条件③)、特に高い多孔質性と表面積をもち、任意の構造強度をもち条件①に当てはまるポリマー Scaffold に限定して選択を行った。ポリマー Scaffold の代表的な3種類に、ポリ L-乳酸 (PLLA)、乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) およびポリグリコール酸 (PGA) があるが、この中で最も生分解性の速いポリグリコール酸 (PGA) を本研究の Scaffold として用いることとした。次に Scaffold はその構造によって特性が変化するため、Scaffold の構造を選択する必要がある。ポリマー

Scaffold の構造はその作製方法から、融解形成、押出成型、三次元印刷、発泡成形、凍結乾燥等いくつかの作製手法が存在するが、今回は条件②に適合する構造である繊維集合体を加熱圧着したフェルト状シート構造のポリグリコール酸 (PGA) を用いることとした。

### 3.3 Scaffold の最適な厚み決定実験

本研究で使用する Scaffold 材料と形状はポリグリコール酸 (PGA) の不織布シートタイプを用いることとしたが、条件①②および③を最も良い条件で満たす厚さが未解明で、Scaffold の最適な厚さを決定するために動物実験を行った。実験方法は厚みの異なる 3 種類の Scaffold を生体内に埋込み、一定期間後に摘出し、Scaffold に新生した血管の様子を評価した。

#### 3.3.1 実験に使用した材料と機器

Scaffold の厚みは 0.3mm / 0.4mm / 0.5mm の 3 種類 (ネオベール、グンゼ (株)、京都) を用いた。0.3mm より薄い 0.15mm の Scaffold も存在するが、事前の予備実験によって 0.15mm の Scaffold には血管新生がほとんど見られなかったため、本実験では対象から除外した。またゲル等でも予備実験を行ったが、血管・組織新生に安定した再現性が認められなかったため本試験からは除外した。Scaffold のサイズは 40mm × 18mm で統一して使用した。図 3-1 に作製した Scaffold 厚試験用観察装置の模式図を示す。石英のカバーガラス (30mm × 26mm × 1mm) に



図 3-1 Scaffold 厚選定用観察装置の模式図

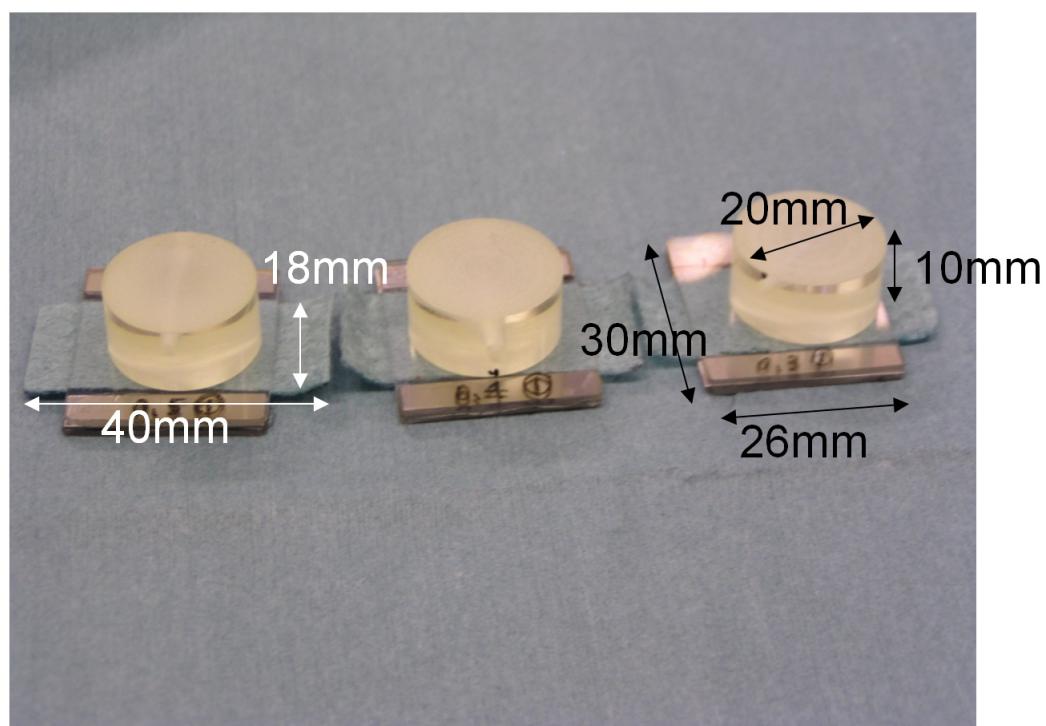


図 3-2 作製した Scaffold 厚選定用観察装置  
(Scaffold 厚さ 左 : 0.5mm 中 : 0.4mm 右 : 0.3mm)

Scaffold を挟み込み、Scaffold の厚さを一定に保つためにスペーサーを同時に挟み込んで接着した。また生体組織中に埋没することが予想されるため、医療用エポキシ樹脂で作製した識別用マーカ―を付加した。このマーカ―には埋込手術時に生体と固定するための糸通し穴を設けた。またカバーガラスとマーカ―は分離可能で、実験終了後にマーカ―を除去することで、カバーガラスが露出し観察窓として機能するよう設計した。マーカ―のサイズは直径 20mm、高さ 10mm とした。作製した Scaffold 圧試験用観察装置を図 3-2 に示す。これらを酸化エチレンオキサイドガスを用いて滅菌し、動物に埋め込みを行った。

### 3.3.2 動物実験方法

本研究における全ての動物実験は、東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会のガイドラインに則って届け出と許可のもとに行った。

成獣ヤギ（45kg、メス、ザーネン種）を用いた。事前に血液検査（血算・総蛋白・腎機能・肝機能・血漿遊離ヘモグロビン）、体重測定および一般状態を調べ、病気の無いことを確認した。手術前日は絶食とし、飲水のみ可とした。手術当日は、術前投薬として、硫酸アトロピン（5ml）を皮下注射した。麻酔の導入はセボフルレンを用いてスローインダクションで行い、気管内挿管後に吸入麻酔薬をイソフルランに変更して全身麻酔を維持した。右もしくは左側臥位とし、毛刈り後、術野をポビドンヨードで消毒し、さらにグルコン酸クロルヘキシジンで消毒した。頸静脈より輸液ラインを挿入した。手術は滅菌された手術器具を用いて、清潔野

で行った。埋め込みは皮下の肋骨上広背筋近傍に行い、Scaffold 厚選定用観察装置を筋肉に縫合糸を用いて固定した（図 3-3）。手術後はヤギ管理台に移し、自発呼吸の確認を行って、挿管チューブを抜去した。術後 3 日間抗生剤を投与した。餌と水は毎日適切な量を与え、尿尿処理と清掃を毎日行った。



図 3-3 Scaffold 厚選定用観察装置の埋込手術の様子

### 3.3.3 動物実験結果

埋め込み後 49 日目に Scaffold 厚試験用観察装置を摘出し、評価を行った。図 3-4 に埋め込み後 49 日目の埋込部位の様子を示す。壊死や感染等は見られず良好に回復した。図 3-5 に摘出時の様子を示す。皮下組織においても感染等は見られなかった。図 3-6 に Scaffold に新生した血管の様子を示す。どの厚みの Scaffold でも血管および組織が新生した。腫瘍や壊死なども見られず良好な結果を得た。0.3mm 厚の Scaffold は全て加水分解され、Scaffold を確認することはできなかつた。0.4mm 厚の Scaffold は 35%ほど血管が新生している様子が観察された。0.5mm 厚の Scaffold では最も血管新生している面積が小さかつた。図 3-7 に Scaffold に新生した血管の拡大画像を示す。0.3mm 厚の Scaffold に新生した血管が最も鮮明に観察された。0.4mm、0.5mm と Scaffold が厚くなるにつれて、血管の一部が組織中に埋没する様子が観察された。

同一の動物を用いて、2 度の実験を行い、同様の結果を得た。



図 3-4 手術後 49 日目の埋込部位の様子

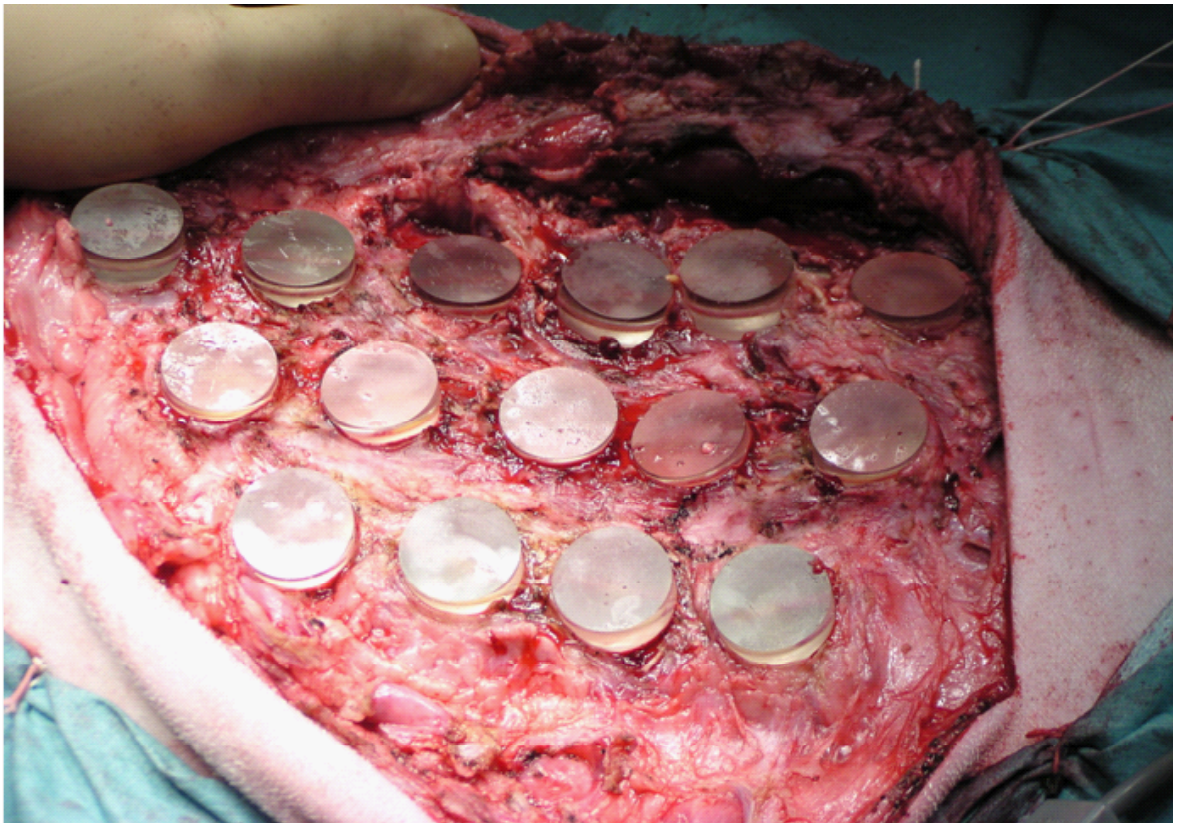


図 3-5 摘出手術時の様子

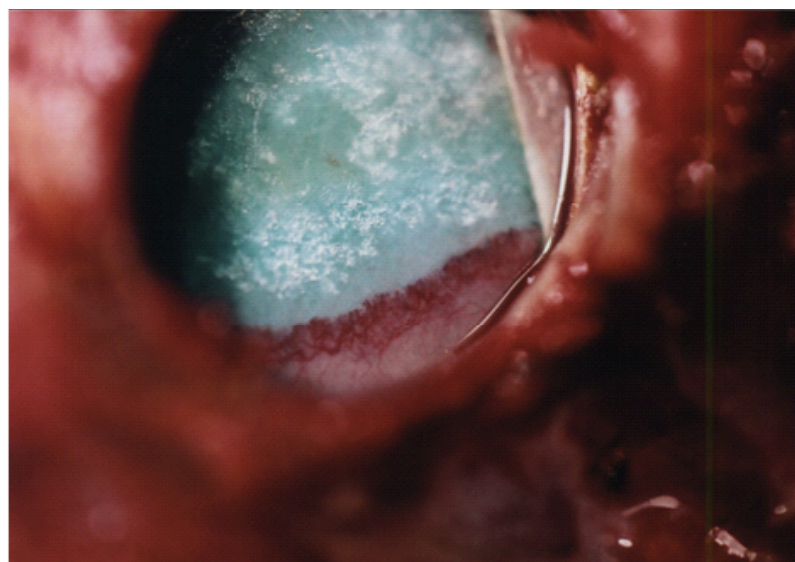
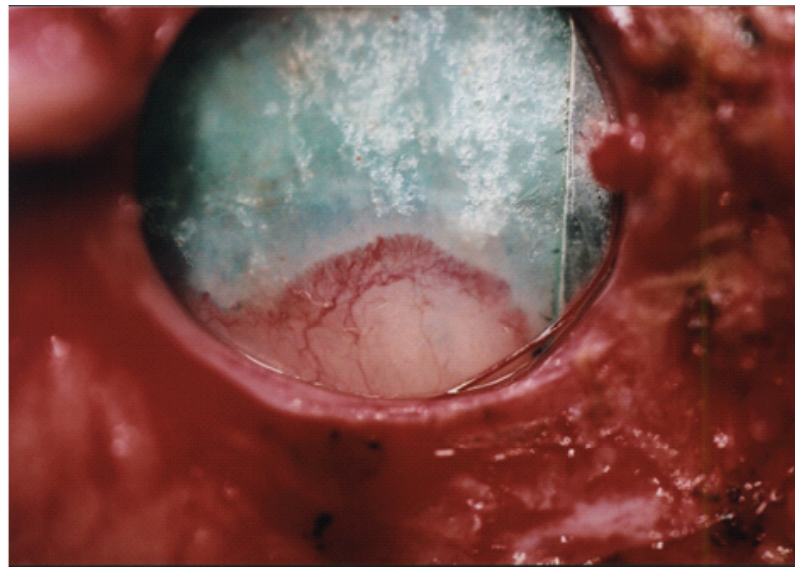
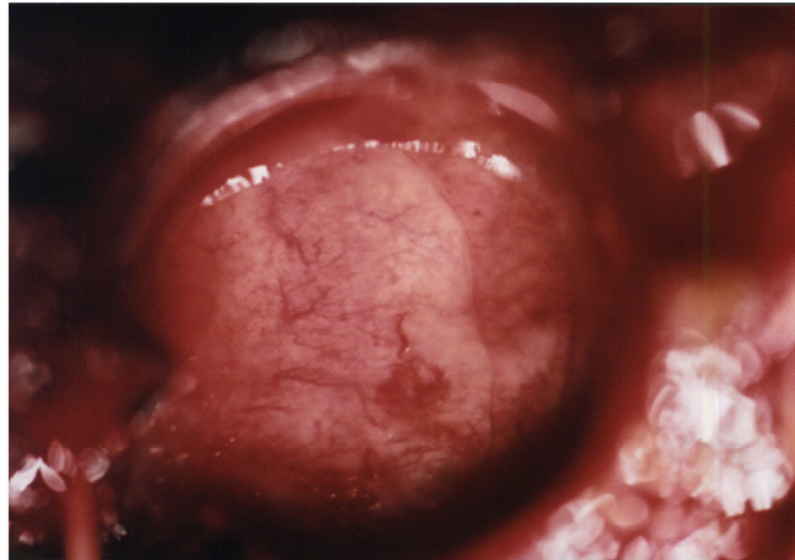
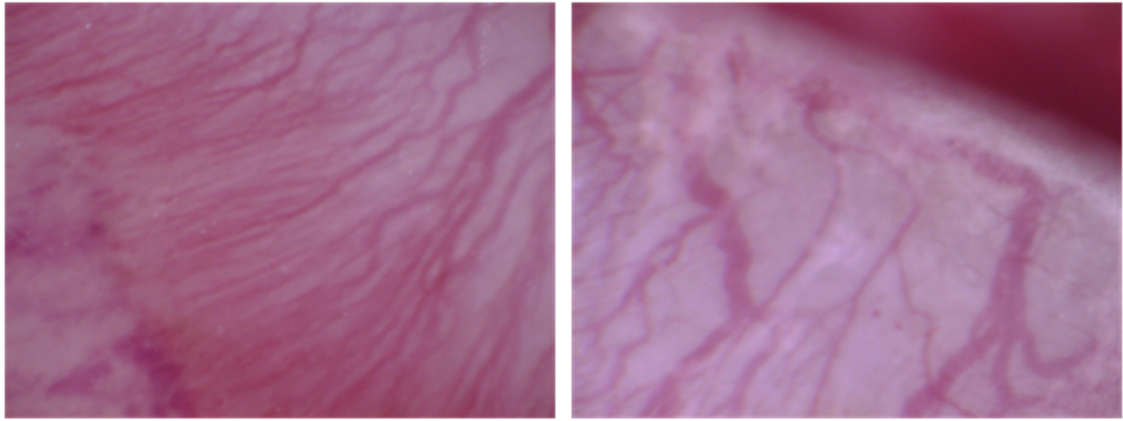
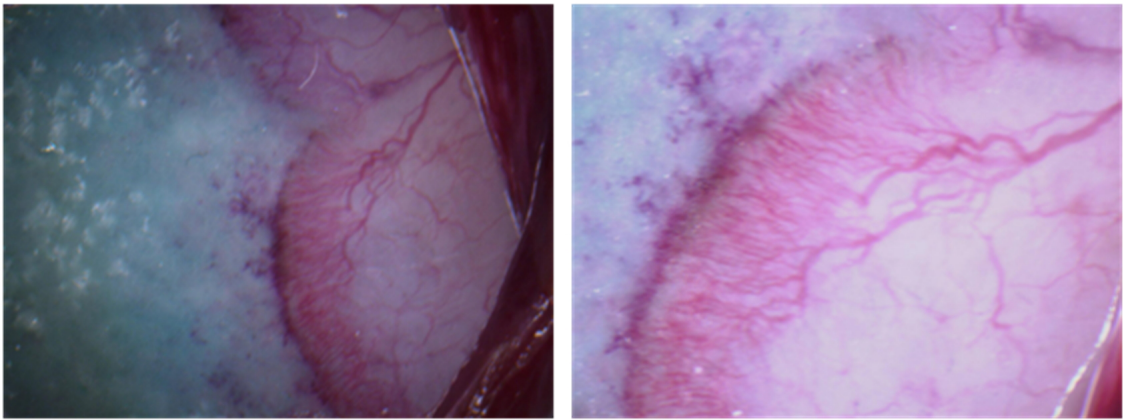


図 3-6 Scaffold に新生した血管の様子  
(上 : 0.3mm 中 : 0.4mm 下 : 0.5mm)

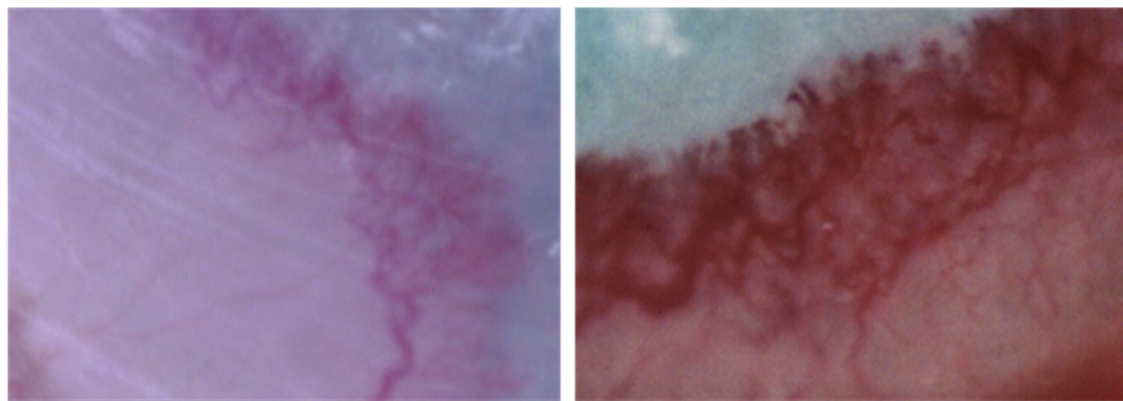




0.3 mm



0.4 mm



0.5 mm

図 3-7 新生した血管の拡大画像

#### 3.3.4 考察

作製した Scaffold 圧試験用観察装置を用いて、生体中で Scaffold に新生する血管を観察することができた。Scaffold に血管および組織が新生し、壊死なども見られず、正常な血管・組織が観察されたことから、本実験に使用した Scaffold は生体適合性が高いことが確かめられた。Scaffold の材料と構造を変えずに厚みのみ 0.3 から 0.5mm まで 0.1mm ごとに変えて生体への埋込み実験を行ったところ、0.3mm の厚みの時に最も血管が新生する速度が早かった。これは Scaffold を加水分解しながら血管が新生するために、厚みに比例して Scaffold の分解に時間を要するためであると考えられる。また Scaffold の厚みが薄いほど鮮明な血管を観察することができた。この理由はカバーガラスに挟んだ Scaffold の片面のみを観察しているために、Scaffold の厚みよりも細い血管は組織中に埋没してしまうためであると考えられる。

これらの結果より、本研究における Scaffold に求められる主な条件である血管新生が速やかに行われ、血管が組織中に埋没せず 2 次元的に観察可能であり、高い生体適合性を満たす Scaffold は 0.3mm の Scaffold であることがわかった。今後、本研究では全て 0.3mm の PGA Scaffold を用いた。