

## 論文審査の結果の要旨

氏名：船山 麻理菜

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：自己拡張性ステント付きバイオバルブ自家組織代用心臓弁の開発における基盤技術と移植評価に関する研究

審査委員：（主査） 教授 亘 敏 広

（副査） 教授 杉 谷 博 士                      教授 中 山 智 宏

日本どうぶつ先進医療研究所 所長 上 地 正 実

高齢化先進国である日本において、循環器系疾患が死因別疾患の第二位となっている。弁膜症に起因する心不全患者数も増加の一途をたどっており、年間約2万人が弁膜症の標準的治療である心臓弁置換術を受けている。代用心臓弁の開発は、1940年の人工物からなる機械弁の登場以降目覚ましく、現在では動物組織に由来する生体弁が主流となりつつある。しかし、機械弁は一般的に生体弁に比べて耐久性が高い利点を有するが、生涯にわたる抗凝固療法が煩雑である。また、血栓塞栓症、組織増殖による弁不全、弁周囲逆流、患者-機械弁不均衡等の理由で再手術を要する場合もある。一方、生体弁は抗凝固薬なしでも低い血栓塞栓症率、簡便で標準化された埋め込み手技等の利点があるが、不完全な血行動態や人工弁感染性心内膜炎のリスクが挙げられ、特に構造的弁破壊による低い耐久性は深刻である。従って、機械弁、生体弁共に臨床で用いられている代用心臓弁には依然解決出来ていない問題が残る。

近年、自己の心臓弁を自己組織によって再生させる「弁再生」をめざし、組織工学的な手法を用いた代用心臓弁の開発が進んでいる。一般的な組織工学手法による代用心臓弁の作製は、患者から細胞を採取して、培養によって増殖させ、人工物や動物由来の型に生着させ、必要に応じてバイオリクターでの追加培養によって行われている。これらの操作は高度滅菌施設が必要であり、治療は特殊な専門医療機関に限られる。海外では臨床応用が行われているが、強度が不足し低圧系への応用に留まっている。完全に自己組織からなる代用心臓弁が開発されれば現状の問題点がほぼ全て解決されると考え、臨床現場から切望されている。

このような背景の中で、申請者は従来の再生医療・組織工学的技術とは異なるアプローチで、任意の形状の移植用組織体を作る技術として「生体内組織形成術（in body tissue architecture; IBTA）」の開発に携わってきた。IBTAは組織構造を模した型を生体内に留置するだけで人工物を全く含まずに、完全に自己組織からなる移植用組織体を得る新しい概念の移植医療技術である。IBTAを用いて、自己細胞およびマトリックスのみから構成される完全自己組織由来代用心臓弁がバイオバルブと名付けられて開発されている。バイオバルブは免疫拒絶反応が生じないばかりでなく、自己再生能を併せ持ち、血栓症を克服する革新的な代用心臓弁となることが期待されている。

これまでの心臓弁置換術は、人工心肺装置を用いた開心術が一般的である一方、開心術の適応が困難と判断される高齢、低心機能、併存疾患などのハイリスクな患者に対して、経カテーテル的大動脈弁置換術（Transcatheter aortic valve implantation; TAVI）に代表される低侵襲の経カテーテル心臓代替弁置換術が近年欧米を中心として普及しつつある。縫合の必要量が少なく、手術時間の大幅な短縮を実現することは、移植操作性を格段にあげるのみならず、患者への負担を軽減する。また、代用心臓弁は適応される疾患や患者の体格によって細分化されており、サイズを自由に調整可能なバイオバルブは動物の種類によって体格差のある獣医療において有用である。そこで、本研究では、バイオバルブの次世代型として、経カテーテル心臓代替弁置換術に適用できるように、バイオバルブとステントを一体化させたステント付きバイオバルブの開発を行った。第一章では、ステント付きバイオバルブ作製のための型の設計と、IBTA手法を用いて得たステント付きバイオバルブの動物移植による生体内機能評価、生着性評価を行った。第二章では、IBTAでの弁組織形成過程の観察技術の開発と実証を行った。第三章では、作製思想を変更し、ステント付きバイオバルブの改良に取り組んだ。

### 1. ステント付きバイオバルブの開発：ビーグル犬の肺動脈移植による検討

本章は、IBTAを用いてバイオバルブとステントを一体化させる基盤技術として、弁葉形成部となる隙間を設計したアクリル製円柱基材（外径14 mm、長さ40 mm）に自己拡張型ステント（内径14 mm、長さ15 mm）を組み合わせ、その外側の一端を3つの半円を有するカバー材で密着させて覆う鋳型を設計した。鋳型をビーグルの背部皮下へ埋入し、4週目に自己組織に完全に覆われた基材を摘出した。形成された自己組織を温存しながら鋳型を除去するとバルサルバ洞位が開口し、内腔に自己結合組織からなる三葉弁が強固にステントと結合したステント付きバイオバルブを得た。体外循環下にてビーグル肺動脈弁位へ移植をすると、ステント付きバイオバルブは肺動脈壁に密着し、移植後3ヵ月まで弁葉の開閉運動とそれに伴う血行動態を確認できた。中期生存に成功するとともに、ステント付きバイオバルブ内部に毛細血管網の構築、生体血管に類似した3層構造の出現を確認した。弁葉表面は内皮様細胞で裏打ちされ、内部にはコラーゲンを中心とした細胞外マトリックスの産生および血管構成細胞であるエラスチンの産生を確認した。本章ではステントとバイオバルブを一体形成する技術開発に成功し移植操作性を向上するとともに、移植後の組織再生過程により弁葉とステントとの結合強度が増し、複雑な機能を有する心臓弁組織への生着化および置き換わり（成熟化）を可能とすることが明らかとなった。

### 2. 弁組織形成過程の可視化技術の開発

生体内で形成される弁組織は、生体の治癒過程として能動的な組織遊走によって形成される。しかし、鋳型内部の弁形成孔への組織遊走は、皮下組織に直接接合した導管部と比較して緩徐である。そこで、ワイヤレス・カプセル内視鏡を利用して、弁形成過程を直接、非侵襲的に観察できる鋳型を開発するとともに、弁組織の形成完了時期について評価した。ワイヤレス・カプセル内視鏡を凸型基部に包埋した鋳型をヤギの背部へ埋入した。弁形成孔への組織遊走は毛細血管の発達に付随し、弁尖端から形成されることを経時的に観察できた。埋入後 $63.1 \pm 17.1$ 日で弁形成孔は完全に自己結合組織に置換され、弁組織となった。弁形成孔内部に脂肪組織または自己血液を充填した場合、弁形成完了期間はそれぞれ $46.7 \pm 4.2$ 日、 $41.1 \pm 6.9$ 日であり弁組織の形成は加速した。また、自己血液の充填に加え組織が遊走する進入孔として、スリット溝を設計した鋳型では弁形成期間は $37.0 \pm 2.8$ 日となり更に弁形成が促進した。本技術により、これまで鋳型を生体外に取り出さずには把握できなかった弁形成の成否判断が非侵襲的に可能となり、完全なバイオバルブの弁形成のための埋入期間の最適化が可能であることが確認できた。

### 3. ステント付きバイオバルブの改良：組織膜を折り返す新たな弁形成法の検討

可動弁葉面積の確実な確保は、ステント付きバイオバルブの最大の課題である。そこで個体差に影響なく確実に弁葉面積の確保が可能な新しいステント付きバイオバルブの開発を目的として、新しい発想の折返し型ステント付きバイオバルブを作製し、拍動性血行回路を用いて大動脈圧条件（100 mmHg）および肺動脈圧条件下（15 mmHg）にて弁機能を評価した。弁組織が鋳型内部に形成される従来のステント付きバイオバルブの設計を抜本的に見直し、弁組織が鋳型の外側に形成されるステント骨格を新たに設計した。このステント骨格を円柱の基材にマウントすることで、外側に形成された弁組織をステント内腔へと折り返す新しいチューブ形状の折返し型ステント付きバイオバルブの鋳型を作製した。鋳型をヤギの背部皮下へ埋入し、4週目に自己組織に完全に覆われた基材を摘出した。形成された自己組織によってステントは完全に包埋され、形成された弁組織とともにステントを導管内部へ折り返すことで弁尖長の異なる折返し型ステント付きバイオバルブ（直径25 mm、弁尖長25 mmまたは直径25 mm、弁尖長15 mm）を得た。拍動性血行回路による逆流率評価にて、弁尖長15 mmでは、肺動脈圧条件下での逆流率は10%であった。一方、弁閉鎖形状を有する弁尖長25 mmでは、逆流率は約5%まで著しく低下し、収縮期の逆流は完全に防止され、本来の心臓弁と類似した血行動態を示した。本章では、弁尖長と弁形状の最適化が生体弁に極めて類似した弁開口率、逆流率等の流体力学的特性を有することを確認できた。生体内での長期の弁機能および耐久性評価のため、動物移植を現在進行中である。

## 総括

IBTAは患者体内の皮下に鋳型基材を埋入するだけで、生体適合性を有する移植用組織体が、通常の生活を送りながら自然とコストをかけずに作製できる。鋳型の構造を工夫することで複雑な構造の組織体も作製可能であるという点で、安全で確実な再生医療の早期の実現に加え、移植医療における臓器再生の実現にも貢献できると考えられる。本研究では、個体差に関わらず、生体の治癒プロセスにより安定したステント付きの代用心臓弁が形成できることを示し、TAVIに代表される低侵襲の経カテーテル移植に適応するステント付き自己組織代用心臓弁の技術開発の先駆けとなる。最終目標はステント付きバイオバルブの臨床応用の実現であり、これまで成し得なかった生体適合性と優れた耐久性を兼ね備える理想の代用心臓弁として、弁膜症の治療体系を大きく変え得ると期待できる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 27 年 1 月 21 日