

学 位 論 文 題 名

Studies on the Evaluation of Micro-Biomechanical
Properties Based on the Improvement of Tactile
Mapping System as the Basis of the Development of
In Vivo Tissue-Engineered Cardiovascular Tissues

(生体内組織工学による循環系組織体の開発において
基盤となる弾性率分布測定装置の改良に基づく
精密バイオメカニクス特性の評価に関する研究)

学位論文内容の要旨

1990年代以降、循環器系組織(心臓、血管)において、自己組織による再生医療が本格化し、すでに動物への移植実験や臨床応用が報告されている。しかし、その工程は、自己の骨髄細胞や前駆細胞を採取後、体外の装置において細胞培養し、人工基材に播種後さらに培養するといった複雑な操作が不可欠である。我々の研究グループでは数年前より体内での組織カプセル化を利用した生体内組織形成技術の開発に取り組んできた。この技術は、免疫反応がない、複雑な生体外工程がない、移植後の成長が期待される等の利点を有している。これら生体内組織工学に基づいて作製された組織体を利用した再生医療を実現するには、作製組織体の完成度ならびに移植後の成熟度を力学的な視点からも精密に調べる必要があると考えられる。一方、これまで組織のミクロ領域や細胞単体のバイオメカニクス特性として弾性率を簡便に計測できる、タクタイルマッピングシステム(TMS)が開発されている。そこで本研究では、TMSのポテンシャルを高める改良について検討を行い、生体内組織工学を用いて循環系組織体として血管(バイオチューブ)や心臓弁(バイオバルブ)を作製し、その移植前後でのミクロ領域でのバイオメカニクス特性を精密に評価することを目的とした。本論文は序論および総括を含む5章より構成されている。

第2章では、生体内組織形成技術により、自己組織からなる人工心臓弁の開発を目指した。目標とする心臓弁の形状に成形した樹脂製基材を体内に埋め込んで組織カプセル化し、組織部分のみを分離して人工弁としての機能を確認した。第一段階においては、直径5mmの樹脂基材を組み合わせた時に三葉弁形状に隙間(0.5mm~0.8mm)が形成されるように加工し、組織生着性に優れたスポンジ状のウレタンチューブに挿入後、ウサギの背中に埋入し1カ月後に摘出した。基材は完全にウサギの結合組織により覆われ、得られた組織体を切開し内部の基材を除去するとチューブ内に三葉からなる膜状組織(0.3mm~0.5mm)が弁状に均一に形成された。病理組織学的所見では、ウレタンチューブの空洞部分には生体組織が侵入しており、弁葉部も主としてコラーゲンと繊維芽細胞で形成され、血管新生も見られた。いずれにも炎症の痕跡や炎症細胞は見られなかった。得られた弁葉組織の弁としての機能を拍動回路下で確認した。Windkessel型の拍動回路を使用し、弁葉組織

を通る生理食塩水の流量および圧力をモニタするとともに高速のビデオカメラで弁の動作を記録確認した。その結果、作製された弁葉組織が弁として機能していることが確認された。第2段階では弁の形状をより生体弁の形状に近づけることと完全に自家組織だけで形成することを目標とした。豚大動脈弁を基本形状としバルサルバ洞を模した膨らみを有すると同時にウレタンチューブによる外装を必要としないシリコン製基材 (直径 14mm) を開発した。ビーグル犬に埋入し組織を作成した。組織は、弁置換手術時に縫合に適する自立性があり、拍動回路による動作確認においてもポンプ動作と同期した良好な弁機能を確認した。これにより、生体内組織形成術による3次元構造の作製が初めて実現した。

第3章では、循環器系組織の細胞外マトリックス領域での物性評価の実現を目的として、TMSを改良し、生体内条件に近い生理食塩水中で $2\ \mu\text{m}$ 以下の分解能での弾性率分布像の測定を可能にした。TMSは超音波振動を先端径数 μm から数十 μm のガラス製プローブに伝播させ、プローブ先端が試料に侵入した時の周波数変化で弾性率を測定している。従って、プローブが水に接すると振動インピーダンスが変化し、試料の弾性率を測定できない欠点があった。生理的食塩水中で試料の弾性率分布が測定できるようにTMSの駆動周波数を最適化した。これにより、生体内と同じ条件で組織試料に力学的な損傷を与えることなく $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ 以上の広範囲で測定が可能になった。また、光反応性ゼラチンを使用し、露光技術により弾性率の異なる厚さ $14\ \mu\text{m}$ の line and space テストパターンを作製し、TMSにより弾性率分布像を計測できることと、 $2\ \mu\text{m}$ 以下の分解能で測定可能であることを初めて示した。

第4章では、改良したTMSを使用し、循環器系組織の例として、豚および犬の動脈断面の弾性率分布を測定し、従来の force-deformation 法や tensile tester による測定法と比較することにより、細胞外マトリックスレベルでのマイクロ領域弾性率測定が組織の物性評価に有効であることを示した。循環器系組織の主な構成要素であるエラスチンとコラーゲンは、単体での弾性率はコラーゲンがエラスチンに対して1000倍以上大きな弾性係数を持っているが、動脈組織内では、組織染色像で同定したコラーゲン領域は逆に約1/3の弾性率しかないことをTMS弾性率像の解析から見出した。大動脈基部から大腿動脈にいたる動脈の縦方向部位のバルク弾性率の違いが、それぞれの組織染色像からは推定できなかったが、TMS測定により細胞外マトリックスレベルの弾性率変化により生じている可能性を見出した。コラーゲンと繊維芽細胞で構成され、エラスチンを持っていない生体内組織形成技術により作製した人工血管 (バイオチューブ) 組織体や人工心臓弁 (バイオバルブ) 組織体においても移植前後において組織染色像とは異なる力学的マイクロ分布があることが確認された。本研究では生体内組織形成技術を応用し、3次元構造である三葉弁とバルサルバ洞を持つ完全自家組織の心臓弁を初めて開発し、拍動回路を用いて弁としての良好な動作を確認した。組織の微小領域での弾性特性を把握するためにTMSを生理食塩水中で計測できるように改良し、 $2\ \mu\text{m}$ 以下の分解能で数百 μm 角領域の弾性率分布測定が可能になったことを弾性率テストパターンにより確認した。生体動脈や生体心臓弁のTMS測定値とバルク測定値の比較や再生組織の測定から、組織染色像で解析される組織構造からは弾性率分布構造が推定できないことを明らかにした。マイクロ領域でのバイオメカニクス特性を精密に評価することは、再生医療での組織体開発において基盤となる工学技術として重要であることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 客員教授 中 山 泰 秀

副 査 教 授 高 木 睦

副 査 教 授 棟 方 正 信

学 位 論 文 題 名

Studies on the Evaluation of Micro-Biomechanical Properties Based on the Improvement of Tactile Mapping System as the Basis of the Development of In Vivo Tissue-Engineered Cardiovascular Tissues

(生体内組織工学による循環系組織体の開発において
基盤となる弾性率分布測定装置の改良に基づく
精密バイオメカニクス特性の評価に関する研究)

1990年代以降、心臓や血管などの循環系組織において、自己組織による再生医療が本格化し、すでに動物への移植実験や臨床応用が報告されている。しかし、その工程には、自己の骨髄細胞や前駆細胞を採取後、体外の装置において細胞培養し、人工基材に播種後、さらに培養するといった煩雑な操作が不可欠である。著者の研究グループでは数年前より、体内でのカプセル化反応を利用した生体内組織形成技術の開発に取り組んでいる。この技術は、煩雑な生体外操作が必要ない、免疫拒絶反応がない、移植後の成長が期待される等の利点を有している。これら生体内組織工学に基づく再生医療を実現するには、作製組織体の完成度ならびに移植後の成熟度を力学的な視点からも精密に調べる必要があると考えられる。一方、これまで組織のミクロ領域や細胞単体のバイオメカニクス特性として弾性率を簡便に計測できる、タクタイルマッピングシステム (TMS) が開発されている。そこで本論文では、先ず、TMS のポテンシャルを高める改良について検討が行われ、生体内組織工学を用いて循環系組織体として血管 (バイオチューブ) や心臓弁 (バイオバルブ) が作製され、それらの移植前後でのミクロ領域でのバイオメカニクス特性を精密に評価することを目的としたもので、以下に示す優れた研究成果が得られている。

生体内組織形成技術により、自己組織からなる人工心臓弁の開発が行われた。組み合わせられた時の隙間 (0.5mm~0.8mm) が三葉弁形状になるように、直径 5mm の 2 種類の樹脂基材が加工され、組織生着性に優れたスポンジ状のウレタンチューブ内に挿入された後、ウサギの背中に埋入され、1 カ月後に摘出された。基材は完全に主としてコラーゲンと線維芽細胞からなるウサギの結合組織により覆われた。得られた組織体を切開して内部の基材を除去すると、チューブ内に三葉からなる膜状組織体 (0.3mm~0.5mm) が弁形状に均一に形成され、新生血管も見られた。ウレタンチューブ

の空洞部分にも同結合組織が侵入しており、いずれにも炎症の痕跡や炎症細胞は見られなかった。得られた弁様組織体の弁機能が拍動回路下で確認された。Windkessel 型の拍動回路を使用して、弁葉組織を通る生理食塩水の流量および圧力のモニター、ならびに高速のビデオカメラでの弁の動作の観察によって、良好な弁機能が確認された。続いて、弁の形状をより生体弁に近づけること、さらに完全に自家組織だけで形成することが目標とされた。豚大動脈弁が参考とされ、バルサルバ洞を模した膨らみを有するシリコン製基材 (直径 14mm) が開発された。ビーグル犬に埋入して得られた組織体は、弁置換手術時に縫合に適する自立性があり、拍動回路による動作確認においてポンプ動作と同期した良好な弁機能が確認された。これにより、生体内組織形成術による完全自家組織からなる心臓弁様組織体の作製が初めて実現された。

循環系組織の細胞外マトリックスレベルでの物性評価の実現を目的として、TMS を改良し、生体内条件に近い生理食塩水中で $2\ \mu\text{m}$ 以下の分解能での弾性率分布像の測定が行われた。TMS は超音波振動を先端径数 μm から数十 μm のガラス製プローブに伝播させ、プローブ先端が試料に侵入した時の周波数変化で弾性率を測定している。従って、プローブが水に接すると振動インピーダンスが変化し、試料の弾性率を測定できない欠点があった。そこで生理的食塩水中で試料の弾性率分布が測定できるように TMS の駆動周波数が最適化された。これにより、生体内とほぼ同じ条件で組織試料に力学的な損傷を与えることなく $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ 以上の広範囲での測定を可能とした。また、光反応性ゼラチンを使用し、露光技術により弾性率の異なる厚さ約 $5\ \mu\text{m}$ の line and space テストパターンを作製し、 $2\ \mu\text{m}$ 以下の高分解能で測定可能であることを明らかにした。

改良した TMS を使用し、循環系組織の例として、豚および犬の動脈断面の弾性率分布を測定し、従来の force-deformation 法や tensile tester による測定法と比較が行われ、細胞外マトリックスレベルでのミクロ領域弾性率測定が組織の物性評価に有効であることが示された。循環系組織の主な構成要素であるエラスチンとコラーゲンは、単体での弾性率はコラーゲンがエラスチンに対して 1000 倍以上大きい、動脈組織内では、組織染色像で同定したコラーゲン領域は逆に約 1/3 しかないことを TMS 弾性率像の解析から見出された。大動脈基部から大腿動脈にいたる動脈の縦方向部位のバルク弾性率の違いが、それぞれの組織染色像からは推定できなかったが、TMS 測定により細胞外マトリックスレベルの弾性率変化により生じている可能性が見出された。また、生体内組織形成技術により作製した人工血管 (バイオチューブ) 組織体や人工心臓弁 (バイオバルブ) 組織体は、移植前後において組織染色像とは異なる力学的ミクロ分布があることが明らかにされた。

これを要するに、著者は、生体内組織形成技術を応用し、3 次元構造である三葉弁とバルサルバ洞を持つ完全自家組織の心臓弁様組織体の開発に初めて成功し、拍動回路を用いて弁としての良好な動作を確認した。組織の微小領域での弾性特性を把握するために TMS を生理食塩水中で計測できるように改良し、 $2\ \mu\text{m}$ 以下の分解能で数百 μm 角領域の弾性率分布測定が可能になったことを、弾性率テストパターンにより確認した。生体動脈や生体心臓弁の TMS 測定値とバルク測定値の比較や再生組織の測定から、組織染色像で解析される組織構造からは弾性率分布構造が推定できないことを明らかにした。生体内組織形成術を応用した循環系移植用組織体の作製、ならびにミクロ領域でのバイオメカニクス特性の精密評価を通じて、再生医療での組織体開発における基盤技術として新知見を得たものであり、再生医療工学ならびに組織計測工学に対して貢献するところが大きなものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格があるものと認める。