

Title	脱細胞化技術を用いた新規小口径グラフトの開発と大動物CABGへの適応
Sub Title	Decellularized small-diameter long grafts for CABG : a feasibility study in a large animal model
Author	金山, 拓亮(Kaneyama, Hiroaki) 志水, 秀行(Shimizu, Hideyuki)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	CABG手術をより多く低侵襲で提供するために他家小口径ロンググラフト技術の開発を行った。グラフトへの再細胞化について我々独自のバイオリアクターシステムを使用して動的培養を行うプロトコルを確立した。病理学的評価を行うと、単層膜状に均一にグラフト表面に生着していた。ブタへのCABG手術下での移植は6頭行われた。3頭の豚が生存し、1頭は10日間、2頭は3日間生存した。残りの3頭は手術当日に死亡しました。移植後3日目の冠動脈造影、術後1週間後の冠動脈CTでは、グラフトは良好に描出された。術後10日目に採取したグラフトの内腔は血栓を認めず滑らかであった。 We developed a technique using allogeneic small-diameter long grafts to provide more minimally invasive CABG surgery. We established a protocol for dynamic culture using our proprietary bioreactor system for recellularization of the grafts. Pathological evaluation showed that the grafts were uniformly attached to the graft surface in a monolayer. Six pigs underwent CABG surgery with graft transplantation. Three pigs survived, with one surviving for 10 days and two for 3 days. The remaining three pigs died on the day of surgery. Coronary angiography on day 3 post-transplantation and coronary CT one week post-surgery showed the grafts were well visualized. The lumen of the grafts collected on day 10 post-surgery was smooth with no thrombus detected.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2022～2024 課題番号：22K12826 研究分野：心臓外科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K12826seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 7 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K12826

研究課題名（和文）脱細胞化技術を用いた新規小口径グラフトの開発と大動物CABGへの適応

研究課題名（英文）Decellularized Small-Diameter Long Grafts for CABG: A Feasibility Study in a Large Animal Model

研究代表者

金山 拓亮 (KANEYAMA, Hiroaki)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：60898005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：CABG手術をより多く低侵襲で提供するために他家小口径ロンググラフト技術の開発を行った。グラフトへの再細胞化について我々独自のバイオリアクターシステムを使用して動的培養を行うプロトコルを確立した。病理学的評価を行うと、単層膜状に均一にグラフト表面に生着していた。ブタへのCABG手術下での移植は6頭行われた。3頭の豚が生存し、1頭は10日間、2頭は3日間生存した。残りの3頭は手術当日に死亡しました。移植後3日目の冠動脈造影、術後1週間後の冠動脈CTでは、グラフトは良好に描出された。術後10日目に採取したグラフトの内腔は血栓を認めず滑らかであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冠動脈バイパス術(CABG)は優れた成績が報告されているが、異所性自家グラフトは採取する際の侵襲が大きく、グラフトの状態によっては使用困難な場合もある。また完全内視鏡下CABGでも優れた成績が散見され、我々の教室でも小切開下CABGを開始しており、今後低侵襲手術がCABG手術の主流となることに疑いの余地はない。CABG手術をより多く低侵襲で提供するために他家小口径ロンググラフト技術の開発が必要と考えられた。大型動物モデルにおいてCABG後の小径・長尺血管グラフトに関する報告は少なく、本研究は重要な前臨床的知見を提供している。当研究は、自己由来血管が移植に利用できない患者を救う鍵となる可能性がある

研究成果の概要（英文）：We developed a technique using allogeneic small-diameter long grafts to provide more minimally invasive CABG surgery. We established a protocol for dynamic culture using our proprietary bioreactor system for recellularization of the grafts. Pathological evaluation showed that the grafts were uniformly attached to the graft surface in a monolayer. Six pigs underwent CABG surgery with graft transplantation. Three pigs survived, with one surviving for 10 days and two for 3 days. The remaining three pigs died on the day of surgery. Coronary angiography on day 3 post-transplantation and coronary CT one week post-surgery showed the grafts were well visualized. The lumen of the grafts collected on day 10 post-surgery was smooth with no thrombus detected.

研究分野：心臓外科

キーワード：脱細胞 小口径グラフト 冠動脈バイパス 大型動物移植 再細胞化

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患 (CVD) は、高い罹患率と死亡率を認める。これらの問題に対して、さまざまな治療戦略が検討されてきた。冠動脈疾患に対する経皮的冠動脈インターベンション (PCI) は著しい進歩を遂げているが、左主幹動脈疾患や多血管疾患などの冠動脈疾患 (CAD) に対しては、その優れた治療成績から冠動脈バイパス手術 (CABG) が依然として第一選択の治療法である。しかし、さまざまな合併症、自家グラフトに疾患が存在すること、または複数回の手術により移植可能な血管が不足していることなどから、多くの患者が治療を享受できていないことがある。

2. 研究の目的

人口の高齢化に伴い、心血管疾患 (CVD) の発生率は毎年増加しており、自家グラフトの代替として小口径長尺グラフトの開発が急務となっている。特に、冠動脈バイパス手術 (CABG) で使用されるグラフトは長さが必要だが、手術に適したグラフトは未だに市販化されていない。本研究では、脱細胞化豚頸動脈から小口径で長尺のグラフトを作成し、その有用性を検討した。

3. 研究の方法

【豚頸動脈の脱細胞化】

高い汎用性を持つグラフト素材として、豚の頸動脈を選択した。冷凍された豚の頸動脈は、EBM 株式会社 (東京都) から購入した。中口径 4~6mm、末梢径 2~4mm を有し、長さが 13cm 以上のものを移植グラフトとして使用した。徐々に解凍した後、動脈周囲の組織をトリミングした。グラフトは、室温で 20 時間、流量 0.5 ml/分にて 0.1% ナトリウムドデシルスルホン酸 (SDS; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪府、日本) で灌流して細胞成分を除去した。その後、残存した界面活性剤を除去するため、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪府) で 48 時間洗浄した。滅菌のため、37°C で 70% エタノールに 20 分間浸漬した。脱細胞化グラフトは PBS で 2 回洗浄し、再細胞化まで PBS 中で保存した。

【脱細胞グラフトの再細胞化】

再細胞化には、ブタ内皮細胞 (ENC01C、コスモバイオ株式会社、東京、日本) を使用した。培養液は、EGM Single Quot サプリメントおよび Zell Shield (Minerva Biolabs、ベルリン、ドイツ) を添加した内皮細胞基礎培養液 (EBM-2、Lonza、スタイン、スイス) を使用した。再細胞化に先立ち、Hussein らによって以前に報告した方法と同法に、血管基底膜への内皮細胞の付着を促進するために、グラフトにヘパリン・ゼラチンコーティングを施した。グラフトを 1 回洗浄した後、播種前に培地に浸漬した。再細胞化は、静的培養と動的培養の 2 つの異なる方法で行った。静的培養では、約 2×10^7 個の内皮細胞がグラフトに播種された。グラフトの両端をクランプし、24 時間静的に培養した。その後、グラフトを 180°回転させ、同数の内皮細胞を同じ方法で播種した。24 時間の培養後、グラフトはクランプを解除し、10 日間培養した。培地は 2 日ごとに交換した。動的培養では、最初の 2 日間は静的培養と同様の方法で細胞播種を行った。その後、グラフトは我々が開発したオリジナルバイオリアクターシステムに装着し、培地を灌流させながら 10 日間培養した。灌流量は最初に 2 日間 0.5 ml/分、次に 24 時間 3 ml/分、24 時間 10 ml/分とし、その後 1 日あたり 10 ml/分ずつ増加させ、最大 60 ml/分まで増加させた。CABG に使用されるグラフト血管は、動的培養法を用いた。

【動物】

体重約 40kg の豚 6 頭 (全農、茨城県、日本) を、再細胞化グラフトを用いた冠動脈バイパス手術 (CABG) に用いた。

【CABG 手術によるグラフト移植】

豚は、全身麻酔下で頸静脈に中心静脈カテーテルを挿入し、大腿動脈に動脈ラインを挿入した。術前には、アンピシリンナトリウム (1g; 明治製菓、東京、日本) とゲンタマイシン (40mg; Nichiiko、富山、日本) を静脈内投与した。胸骨正中切開により開胸し、左総頸動脈をテーピングした。心膜切開により左前下行枝 (LAD) を同定した。その後、ヘパリン (AY PHARMACEUTICALS、東京、日本) を 200 単位/kg 静脈内投与し、活性化凝固時間 (ACT) が 300 秒を超えることを確認した。左総頸動脈をクランプし、7-0 ポリプロピレンを使用してグラフトと側端吻合した。次に、リドカイン (Takada Pharmaceutical、埼玉県、日本) 2 mg/kg、イソソルビド硝酸塩 (Eisai、東京都、日本) 2.5 mg、ロクロニウム臭化物 (MSD、東京都、日本) 0.6 mg/kg を静脈内投与した。グラフトと LAD は、2.0mm の冠動脈シャントチューブ (JMS、広島県、日本) を使用して、7-0 ポリプロピレンで側端吻合した。吻合中部部を結紮し、心筋梗

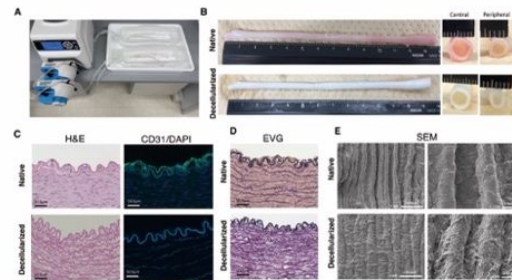
塞モデルを作成した。血流は超音波流量計（TS420；Transonic Systems, Inc., NY, 米国）で測定された。ネオスチグミン（2 mg；TERUMO、東京、日本）を静脈内投与して筋弛緩剤をリバースし、プロタミン（1 mg/kg；MOCHIDA、東京、日本）を静脈内投与してヘパリンを中和した。19-Fr シリコンドレナージュチューブを心膜腔に挿入した。胸腔は胸骨ワイヤーで閉鎖し、皮膚は吸収性縫合糸で閉鎖した。手術後、飲水するまで、60 ml/h の速度で生理食塩水を輸液した。抗凝固薬としてヘパリンを投与し、ACT を 170~230 に調整した。食事摂取が開始された時点でヘパリンを中止し、1 日 100 mg のアスピリンと 1 日 75 mg のクロピドグレルを毎日経口投与した。

4. 研究成果

【脱細胞化グラフトの評価】

グラフトはポンプによる灌流で脱細胞化された（図 1A、B）。脱細胞化前後の口径はほぼ変化しなかった（図 1B）。H&E 染色により、脱細胞化グラフトから細胞成分が除去されたことが確認され、血管内皮マーカーである CD31 免疫染色と核を標識する DAPI 染色でも確認された（図 1C）。EVG 染色により、脱細胞化後も弾性繊維とコラーゲン繊維が維持されていることが示された（図 1D）。SEM 画像から、脱細胞化により縞状構造の表面の細胞が除去され、コラーゲン繊維などの ECM 成分が露出していることが観察された（図 1E、補足図 2）。

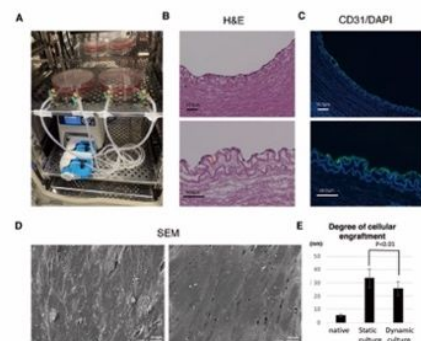
Fig. 1



【再細胞化グラフトの評価】

移植後の血栓形成を防止するため、グラフトはヘパリン・ゼラチンコーティングを施し、豚の血管内皮細胞で再細胞化された。再細胞化の最適な方法を決めるため、静的培養と動的培養の 2 つの培養条件が検討された。動的培養にはバイオリアクターシステムが使用された（図 2A）。結果、静的培養では細胞が部位によって蓄積していた（補足図 3）。一方、動的培養では、CD31 陽性内皮細胞がグラフト表面に単層で均一に定着した（図 2B、C）。SEM 画像も、動的培養において細胞がグラフト表面に定着したことが確認された（図 2D）。細胞の定着の程度は、静的培養では 33.5 ± 6.8 nm、動的培養では 25.7 ± 5.2 nm であり、元の 5.2 ± 1.1 nm と比較して、動的培養において移植片表面への細胞の定着がより良好であった（図 2E）。動的培養で再細胞化したグラフトが移植に用いられた。

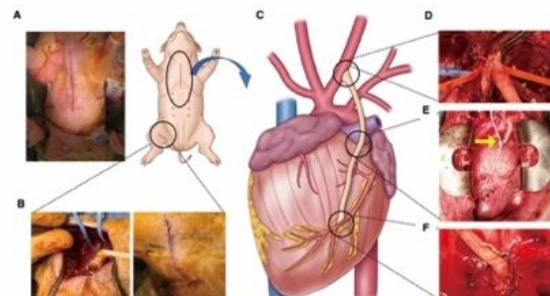
Fig. 2



【CABG 手術による豚へのグラフト移植】

動的培養で再細胞化した小口径長径グラフトは、6 頭の豚において CABG を介して移植された（図 3A-F）。すべてのグラフトは口径が 4.0 mm 未満、長さが 13.0 cm 以上であり、屈曲なくて移植された。超音波流量計による術中血流速度は平均 94 ± 5.4 ml/m で、血管内血流は良好で明らかな血管抵抗は認められなかった（図 3E）。3 頭の豚が生存した。1 頭は 10 日間、2 頭は 3 日間生存した。残りの 3 頭は手術当日に死亡した。1 頭はグラフトの血流再開後に致死性不整脈を認め、おそらく空気塞栓または吻合中の心筋虚血による再逆流障害によるものと考えられた。残りの 2 頭はゲージへの移送後に SpO2 の低下を示し、おそらく呼吸不全によるものと考えられた。

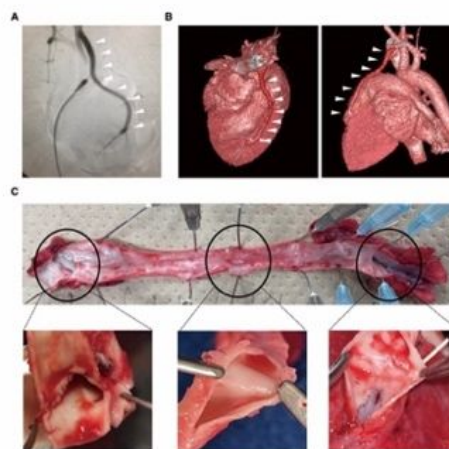
Fig. 3



【グラフトの通過性評価】

生存した豚の POD 3 における冠動脈造影(CAG)では狭窄は認められず、吻合部末梢側の左前下行枝 (LAD) は明確に描出され、グラフト内の良好な血流を示した (図 4A)。POD 7 における冠動脈 CT では、グラフト内に血栓は認められず、グラフトの良好な描出が確認された (図 4B)。POD 10 に摘出されたグラフト腔は滑らかで、中枢吻合部、末梢吻合部、または管腔内に血栓や狭窄は認められなかった (図 4C)。他の 5 頭の豚に移植されたグラフトも吻合部狭窄がなく、グラフトの腔内や吻合部に血栓は観察されなかった。

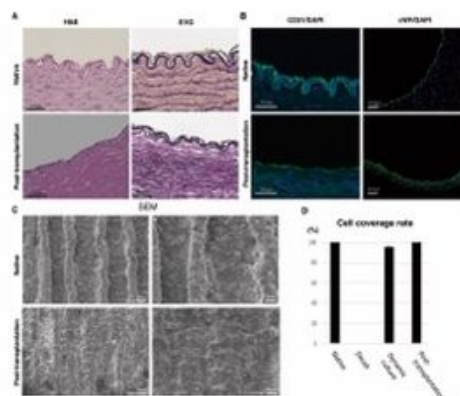
Fig. 4



【移植後グラフトの組織学的評価】

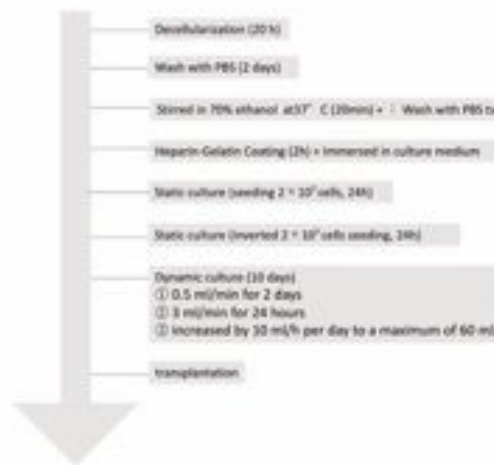
POD 10 におけるグラフトの組織学的評価は図 5 に示した。H&E 染色により、移植後グラフト表面に単層の細胞が定着していた (図 5A)。EVG 染色では、移植されたグラフトに弾性繊維とコラーゲン繊維が維持されていることが示された (図 5A)。免疫染色では、移植後グラフト表面に血管内皮細胞のマーカーである CD31 陽性および vWF 陽性細胞が観察された (図 5B)。SEM 画像では、内皮細胞がグラフト全体にほぼ均一に定着しており、天然の細胞と類似した形態を示していた (図 5C、D)。

Fig. 5

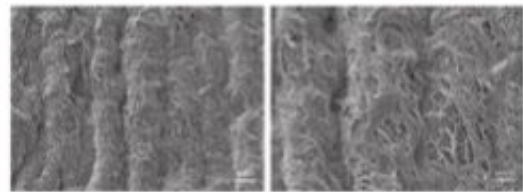


大動物モデルで CABG 手術下に小口径長尺の血管グラフトを移植し良好な開存を得られた報告は類がなく、本研究は基盤となる知見を提供する意義深いものとなった。自己の血管内皮細胞や MSC、あるいは近年、研究が進む人工多能性幹細胞由来の血管構成細胞などをもちいた再細胞化を行うことで、ヒトへ移植可能な血管グラフトの作成が可能となる。我々の作成した脱細胞化小口径長尺グラフトは自家血管移植ができない患者を救う鍵となる可能性がある。

Supplement 1

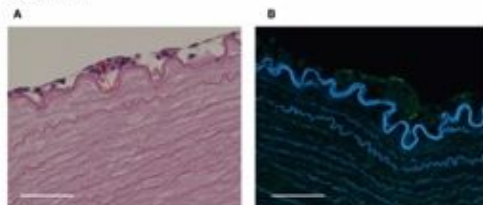


Supplement 2



Supplement 3

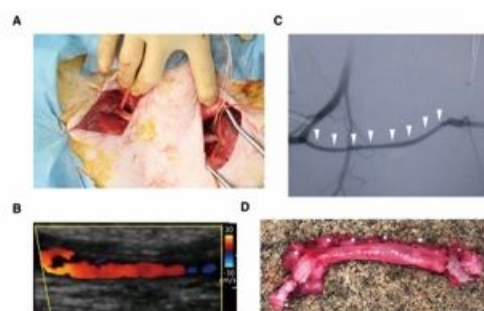
static culture



Supplement 4 (B)



Supplement 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	志水 秀行 (SHIMIZU Hideyuki) (50226247)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------