

称号及び氏名 博士(獣医学) 飯盛 安真

学位授与の日付 2021年3月31日

論文名 犬における生体内組織形成術によるシート状生体材料の
作製と応用

論文審査委員 主査 秋吉 秀保
副査 笹井 和美
副査 桑村 充
副査 西田 英高

緒言

人医療において、心臓弁、血管、硬膜、皮膚などの軟部組織および靭帯・腱などが損傷あるいは手術で切除した場合、化学合成された人工材料もしくは家畜などから採取して加工した生体材料を用いて再建することが一般的である。これらの移植材料が臨床応用された当初は人工材料も汎用されていたが、**1990**年代から、移植材料の長期観察結果が報告されるようになり、人工材料では移植後に石灰沈着や硬化による機能障害が生じることが明らかとなったことから、現在では、これらの合併症が生じにくい生体材料が移植・置換用の材料として主流となっている。生体材料は豚、牛などの異種動物由来の様々な組織が製品化され、人医療における再建のための移植材料として利用されている。**2011**年に生体材料の世界的な市場が約**1,000**億円と報告されて以降、現在まで急速に拡大している。また、近年では生体材料の細胞外マトリックス(**ECM**)がレシピエントの細胞の分化を促進することが広く知られるようになり、生体材料を用いた再生医療に向けた研究が精力的に進められている。一方、伴侶動物医療においては、人と概ね同様の疾患が存在することから、移植用生体組織の需要はあるものの、人用に開発された生体材料は非常に高価であることやサイズが大きく異なることなどから臨床応用に至っていないのが現状である。

生体内組織形成術(**iBTA**)は、生体内に分解されない異物が侵入すると線維芽細胞が異物周囲に集積し、コラーゲンを産生することで異物を隔離する反応、いわゆるカプセル化反応を応用して生体材料を作製する技術である。具体的には、シート状、チューブ状など治療に必要な組織の形状に合わせて作製した鋳型を動物の皮下に埋植し、鋳型周囲を覆ったコラーゲン組織を生体材料として利用する。既存の生体材料は家畜の屠殺時に採取するために、基本的に異種材料となるが、**iBTA**では患者自身に鋳型を埋め込むことによって、患者由来の生体材料の自家移植が可能となり、免疫拒絶反応や感染などが生じないといった利点がある。さらに、鋳型は**3D**プリンターを用いて作製できるため、生体材料の設計自由度が高いとともに、比較的安価に利用する事が可能である。また、牛や豚などの家畜に鋳型を埋植しておくことで、異種由来の生体材料の計画的、安定的な生産・供給が可能になるとともに、家畜資源の効率的な利用にもつながる可能性がある。**iBTA**によって作製した生体材料は自家移植および異種移植のどちらにも対応出来る、サイズや形状の自由度が高い、安価に提供できることなどから、伴侶動物医療に応用できる可能性があると考えられる。

そこで、本研究では、**iBTA**を用いて作製した生体材料を犬の臨床へ応用することを目的として、犬において**iBTA**によるシート状生体材料の作製を試みるとともに、作製したシート状生体材料を膀胱ならびに横隔膜に移植し、犬の体腔内での生体材料の性状変化について基礎的な検討を行った。

第1章 犬におけるシート状生体材料の作製

iBTAでは、鋳型の形状を工夫することで、チューブ状やシート状など様々な形状の生体材料を作製できることが特徴であるが、犬の臨床に応用する際に最も汎用性が高いと考えられるのはシート状である。現在、人をはじめとして牛などの動物で安定して生体材料が採取される条件などが検討されているものの、犬ではシート状生体材

料の作製方法が検討されていない。そのため、本章では、最初に犬においてシート状生体材料を作製するための最適な鑄型形状の検討を行った。シリコン製心棒とそれを覆うスリット形状の異なる 3 種類の外筒からなる円筒状の鑄型を作製し、ビーグル犬の背部皮下に 2 ヶ月間埋植した。結果として、最もスリット形状の大きい鑄型のみでシート状生体材料の作製が可能であった。続いて、最適と考えられた形状の鑄型を用いて、複数のシート状生体材料が安定して作製できるかどうか検討した。ビーグル犬 3 頭の背部皮下の肩甲骨尾側から最後肋骨の間ならびに最後肋骨から腸骨翼頭側の間に、それぞれ脊椎を挟んで左右に 1 箇所ずつ、合計 4 箇所に鑄型を 2 ヶ月間埋植した。皮膚の外傷による鑄型の露出は認められず、全ての鑄型から生体材料の採取が可能であった。作製した生体材料の厚さは平均 0.72 mm であり、亀裂や欠損は認められなかった。組織学的評価では、生体材料は主に線維芽細胞およびコラーゲン線維から構成されており、炎症細胞浸潤や、血管は認められなかった。単軸引張試験では、シート状生体材料の強度および弾性に異方性は認められず、軟部組織の再建に応用されている生体材料である豚小腸粘膜下組織と同等の強度を有していた。以上の結果から、犬における iBTA を用いたシート状生体材料の作製法において、スリット形状の大きい鑄型が適していることが明らかになった。さらに、その鑄型を背部皮下に 4 個埋植した場合においても安定して生体材料の作製が可能であることが示された。また、作製されたシート状生体材料は、移植材料として使用可能な強度が期待されるコラーゲン組織体であることが明らかになった。

第 2 章 膀胱欠損モデル犬へのシート状生体材料の応用

伴侶動物において、膀胱腫瘍の摘出や尿路閉塞の解除に伴って広範な泌尿器組織が欠損する場合、生体材料を用いて生理的な尿路を再建することが理想的な治療ではあるが、現状では、利用できる生体材料がないために、合併症の多い人工材料を用いた尿路のバイパス手術が治療の主流となっている。泌尿器の再建に用いる生体材料は、移植初期には尿が漏出することを防ぐためのバリアとして機能すること、さらに、尿によって移植した生体材料が変性しないために、尿路上皮によって生体材料が被覆されることが重要となる。

本章では、iBTA によるシート状生体材料が泌尿器の再建に用いることが可能かどうかを検証するために、ビーグル犬 4 頭を用いて全身麻酔下において 2×2 cm の膀胱欠損モデルを作製し、欠損部に生体材料を自家移植し、臨床的評価ならびに組織学的評価を行った。

血液検査では、移植後に白血球数および C 反応性タンパクの一過性の上昇が認められたが、移植後 7 日目以降は炎症反応が認められず、免疫拒絶反応は認められなかった。尿検査において、感染や炎症、結晶を疑う所見は認められなかった。画像検査において、膀胱壁の破綻、石灰化および結石形成は認められず、膀胱の拡張や収縮に異常は認められなかった。移植後 28 日目において生体材料の内腔側は尿路上皮により被覆されており、その直下では血管新生が認められた。また、生体材料内に炎症細胞や異物巨細胞の浸潤は認められなかった。移植後 84 日目では、生体筋組織から生体材料に向けて遊走する α -smooth muscle actin 陽性細胞が認められた。以上のこと

から、シート状生体材料は、膀胱への自家移植において尿の漏出を防ぐためのバリアとして機能し、尿路上皮によって被覆されたために、泌尿器の再建に応用可能であることが示された。また、生体材料は膀胱組織の再生の足場となることが示唆された。

第3章 横隔膜欠損モデル犬へのシート状生体材料の応用

伴侶動物において、先天あるいは外傷によって形成された横隔膜や腹壁の臍帯部や鼠径部の巨大なヘルニア孔や胸壁腫瘍の拡大切除などでそれら体腔を隔てる組織が広範に欠損する場合、生体材料を用いて生理的な体腔の隔壁を再建することが最適な治療ではあるものの、現状では、利用できる生体材料がないために、合併症の多い人工材料を用いた孔や欠損のパッチ閉鎖が治療として行われている。胸壁や腹壁や横隔膜など体腔を隔てる組織の中でも、横隔膜は収縮・拡張を繰り返し呼吸運動に関与することで高い圧力負荷がかかるために、横隔膜の再建に用いる生体材料は、特に高い強度および耐久性が必要となる。

本章では、iBTA によるシート状生体材料が体腔を隔てる組織の再建に用いることが可能かどうかを検証するために、ビーグル犬 3 頭を用いて全身麻酔下において 4×6 cm の横隔膜欠損モデルを作製し、欠損部に生体材料を自家移植と同等であると報告されている同種移植し、臨床的評価、組織学的評価ならびに力学的評価を行った。

血液検査では、移植後に白血球数および C 反応性タンパクの一過性の上昇が認められたが、移植後 7 日目以降は炎症反応が認められず、免疫拒絶反応は認められなかった。画像検査では、観察期間を通して横隔膜の破断や胸水の貯留は認められず、横隔膜の拡張や収縮に異常は認められなかった。単軸引張試験では、生体材料の強度は横隔膜筋性部より有意に高く、横隔膜膜性部と同等であった。また、弾性においても、生体材料は横隔膜筋性部および膜性部と同等であった。組織学的評価では、生体材料内に炎症細胞浸潤は認められず、Vimentin 陽性細胞が遊走していた。以上のことから、シート状生体材料は、横隔膜への同種移植において移植材料として適切な強度ならびに耐久性を示したために、横隔膜や胸壁や腹壁など体腔を隔てる様々な組織に応用できることが示唆された。

総括

1. 犬においてシート状生体材料を作製するためには、スリット形状の大きい鋳型が適しており、背部皮下に 4 個の鋳型を埋植した場合でも安定して生体材料の作製が可能であることが明らかとなった。また、作製された生体材料は、移植材料として使用可能な強度が期待されるコラーゲン組織体であることが明らかになった。
2. シート状生体材料は、膀胱への自家移植において尿の漏出を防ぐためのバリアとして機能し、尿路上皮によって被覆されたために、泌尿器の再建に応用可能であることが示された。また、生体材料は膀胱組織の再生の足場となることが示唆された。
3. シート状生体材料は、横隔膜への同種移植において移植材料として適切な強度および耐久性を示したために、横隔膜や胸壁や腹壁など体腔を隔てる様々な組織に応用できることが示唆された。

審査結果の要旨

人医療において、組織や臓器が損傷あるいは手術で切除した場合、化学合成された人工材料もしくは家畜などから採取して加工した生体材料を用いて再建することが一般的である。人工材料では移植後に石灰沈着や硬化による機能障害が生じることが明らかとなっており、現在では、これらの合併症が生じにくい生体材料が移植・置換用の材料として主流となっている。一方、伴侶動物医療においては、人と概ね同様の疾患が存在することから、移植用生体組織の需要はあるものの、人用に開発された生体材料は非常に高価であることやサイズが大きく異なることなどから臨床応用に至っていないのが現状である。

生体内組織形成術 (iBTA) は、生体内に分解されない異物が侵入すると線維芽細胞が異物周囲に集積し、コラーゲンを産生することで異物を隔離する反応、いわゆるカプセル化反応を応用して生体材料を作製する技術である。具体的には、治療に必要な組織の形状に合わせて作製した鋳型を動物の皮下に埋植し、鋳型周囲を覆ったコラーゲン組織を生体材料として利用する。iBTA では患者自身に鋳型を埋め込むことによって、患者由来の生体材料の自家移植が可能となり、免疫拒絶反応や感染などが生じないといった利点がある。さらに、鋳型は 3D プリンターを用いて作製できるため、生体材料の設計自由度が高いとともに、比較的安価に利用する事が可能である。また、家畜に鋳型を埋植しておくことで、異種由来の生体材料の計画的、安定的な生産・供給が実現できる可能性がある。iBTA によって作製した生体材料は自家移植および異種移植のどちらにも対応できる、サイズや形状の自由度が高い、安価に提供できることなどから、伴侶動物医療に応用できる可能性があると考えられる。

そこで、本研究では、iBTA を用いて作製した生体材料を犬の臨床へ応用することを目的として、犬に応用する際に最も汎用性が高いと考えられるシート状生体材料の作製を試みるとともに、作製したシート状生体材料を膀胱ならびに横隔膜に移植し、犬の体腔内での生体材料の性状変化について基礎的な検討を行った。

第 1 章では、これまでに犬において iBTA によるシート状生体材料の作製についての検討は行われていないことから、最初に犬で iBTA を用いてシート状生体材料を作製するために適した鋳型形状の検討を行った。結果として、最もスリットの大きい鋳型のみでシート状生体材料の作製が可能であった。続いて、最適と考えられた形状の鋳型を用いて、複数のシート状生体材料が安定して作製できるかどうか検証するために、ビーグル犬 3 頭の背部皮下の 4 箇所を 2 ヶ月間埋植した。その結果、全ての鋳型から生体材料の採取が可能であった。作製した生体材料の厚さは平均 0.72 mm であり、亀裂や欠損は認められなかった。組織学的評価では、生体材料は主に線維芽細胞およびコラーゲン線維から構成されていた。力学的評価では、シート状生体材料の強度および弾性に異方性は認められず、軟部組織の再建に応用されている豚小腸粘膜下組織と同等の強度を有していた。以上の結果から、犬における iBTA を用いたシート状生体材料の作製において、スリット形状の大きい鋳型が適していることが明らかになった。さらに、その鋳型を背部皮下に 4 個埋植した場合においても安定して生体材料の作製が可能であることが示された。また、作製されたシート状生体材料は、移植材料として使用可能な強度を有したコラーゲン組織体であることが明らかになった。

第 2 章では、iBTA による犬シート状生体材料が泌尿器の再建に用いることが可能かどうかを検証するために、常に尿に暴露される環境にある膀胱壁に欠損を作製し、欠損部へシート状生体材料を自家移植し、臨床的評価ならびに組織学的評価を行った。臨床的評価では、観察期間を通して膀胱壁の破綻や結石の形成などの合併症は認

められず、膀胱の拡張や収縮に異常は認められなかった。組織学的評価では、生体材料の内腔側は尿路上皮により被覆されており、その下層では血管新生および生体筋組織から生体材料に向けて遊走する SMA 陽性細胞が認められた。また、生体材料内に炎症細胞や異物巨細胞の浸潤は認められなかった。以上のことから、シート状生体材料は、膀胱への自家移植において尿を貯蔵する膀胱壁の一部として機能し、尿路上皮によって被覆されたために、泌尿器の再建に応用可能であることが示された。また、生体材料は膀胱組織の再生の足場となることが示唆された。

第3章では、iBTA による犬シート状生体材料が腹壁や胸壁や横隔膜など体腔を隔てる組織の再建に用いることが可能かどうかを検証するために、体腔の隔壁組織の再建において、特に高い強度と耐久性が必要となる横隔膜に欠損を作製し、欠損部に自家と同等であると報告されている同種によって作製した生体材料を移植し、臨床的評価、力学的評価ならびに組織学的評価を行った。臨床的評価では、観察期間を通して横隔膜の破断や胸水の貯留などの合併症は認められず、横隔膜の拡張や収縮に異常は認められなかった。力学的評価では、移植後の生体材料の強度および弾性は横隔膜膜性部と有意な差は認められなかった。組織学的評価では、生体材料内に炎症細胞浸潤は認められず、Vimentin 陽性細胞が遊走していた。以上のことから、シート状生体材料は、横隔膜移植に対して、過剰な炎症反応による早期分解を惹起せず横隔膜組織の一部として機能し、移植材料として適切な強度ならびに耐久性を示したことから、体腔の隔壁組織へ適用できることが示唆された。

以上、本研究は、犬における iBTA によるシート状生体材料の安定した作製に成功し、作製した生体材料は、移植後早期には代替組織として機能し、過剰な炎症反応を惹起せず、生体内でレシピエントの細胞の遊走の足場となり、強度を維持できる移植材料であることが示された。今後、iBTA によるシート状生体材料は、新たな移植材料として犬へ臨床応用できることが期待される。さらに、犬を用いて得られた本研究の知見は、人への外挿も可能であると考えられる。よって、これらの研究成果は、臨床獣医学ならびに臨床医学の発展に貢献するとともに、新たな展開に資するものであることから、本論文の審査および最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。