

氏名（本（国）籍）	Pinkarn Chantawong（タイ王国）
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 田 中 綾
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第549号
学位授与年月日	令和元年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	Experimental Application of Silk-based Cardiovascular Patches using Tissue-engineered Process in the Rat Abdominal Aorta (シルク基盤人工血管パッチのラット腹部大動脈への実験的適用)
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 福 島 隆 治 副査 帯広畜産大学 教授 宮 原 和 郎 副査 岩 手 大 学 教授 山 崎 真 大 副査 東京農工大学 教授 田 中 綾 副査 岐 阜 大 学 准教授 神志那 弘 明

学位論文の内容の要旨

心臓血管疾患は世界において致死率の最も高い疾患である。房室中隔欠損症や肺動脈狭窄症のような生命を脅かす心臓奇形ではパッチグラフトを用いて構造を修復するための手術が必要となる。さまざまな種類のパッチ材料が現在では使用されており、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）同種他家または異種由来の心膜などがある。しかし、これらのパッチは患者の臓器の成長とともに成長しない、組織リモデリングが生じない、狭窄や石灰化を生じやすいといった、長期使用においていくつかの欠点がある。そのため、組織工学技術を用いた心臓修復用の生体材料パッチの開発が急務である。

シルクフィブロイン（SF）は *Bombyx mori* のカイコに由来する天然の高分子の繊維タンパクである。SF は他の天然生体高分子に比べて優れた特性を有することから、生体材料の代替候補として使用されるようになったという背景がある。SF を使用することの利点としては、優れた組織親和性、低い免疫原性、機能改変のために容易に化学基にアクセス出来る点が挙げられる。しかし、SF 素材の制限としては、柔軟性がないことと強度に欠ける面がある。これらの欠点に打ち勝つために、本研究では SF を用いて柔軟性のある生体適合性の高い素材を開発し、新しい心臓血管パッチを作ることに焦点を当てた。本研究ではポリウレタン（PU）を SF と組み合わせて柔軟性のある SF/PU パッチを作成した。PU を選択した理由として、その高い柔軟性、良好な血液適合性、および微生物に対しての抵抗性が挙げられる。本研究の目的は、①ラットの血管モデルに対して SF/PU パッチの可能性を調査すること、②新規パッチにおいて生体適合性に寄与する因子を精査することである。これらの因子には SF/PU パッチにおける異なる SF 濃度やパッチ制作過程、パッチの組成が含まれ

る。

最初の実験では、SF7PU*3 パッチが新規パッチを作成する上においての条件を満たしていると考えられたが、中程度の組織侵入や上皮化の遅延において限界があった。それ故、第2の実験では組織侵入の改善させるために新規パッチを加工することに焦点を絞り、ソリューションブロースピニング (SBS) 法とエレクトロスピニング法を組み合わせることで組織侵入を改善させた。本実験で使用したパッチは2層構造で構成されている。最初に SBS 法によりアルミ箔の上に SF3PU*7 を作成した。その後、エレクトロスピニング法にて SF7PU*3 を SF3PU*7 の上に積層させることによって2層パッチとした。この2層パッチ (n=18) をラットの腹部大動脈に埋植し、SF7PU*3 のエレクトロスピニング法のパッチ (n=18) をコントロールとして使用した。本実験結果は、この2層構造のパッチは多孔質構造の分布により組織侵入や早期内皮化を実現し、SF7PU*3 のエレクトロスピニング法のパッチの弱点を克服するものであった。さらに、このパッチはネイティブの血管に見られるような組織構造をあらたな血管においてリモデリングさせることが可能であった。

2層構造のパッチは血管再生において魅力的であるにも関わらず、生分解性の特徴は埋植後6ヶ月後の組織学的評価では認められなかった。そのため、第3の実験ではパッチの組成を変えることによって分解過程を促進させるという新たな戦略に関して研究を行った。軟質セグメントとしての PCL diol より生分解性 PU を合成し、SF と配合することで新しい生分解性パッチを作成した。生分解性 PU (BD-PU)、生分解性 SF7PU3 (BD-SF7PU3)、SF の3つのタイプのパッチを作成し、それぞれのパッチ (n=18 ずつ) をラットの腹部大動脈に埋植した。実験結果では BD-PU の 50%、BD-SF7PU3 の 30% が埋植後6ヶ月において部分的に分解されていた。さらに、BD-SF7PU3 は SF や BD-PU パッチと比べて最も組織侵入、弾性繊維形成が多く、内皮化が早いという魅力的な特徴を有していた。平滑筋細胞の増生は均一であり、平滑筋層の厚みはネイティブの血管のものと類似していた。このため、BD-SF7PU3 パッチは心血管補填剤として有望であると考えられた。

結論として、本研究において得られた結果は、作成された新しい生分解性 SF/PU パッチが、心血管組織の修復に利用可能であるという目的を満たすものであった。さらに SF/PU パッチにおける SF 濃度の違い、パッチ作成過程、およびパッチの組成はパッチの品質や生体適合性に大きな影響を与えることも明らかとなった。これらの所見は心臓血管パッチの開発に大きく貢献することであろう。

審 査 結 果 の 要 旨

心臓血管系疾患には、致死率の高い疾患が多く含まれている。生命を脅かすような心臓奇形に対しては、心臓血管パッチを用いた、外科的な構造の修復がしばしば必要となる。現在市販されているパッチには、長期的な使用において組織リモデリングが生じない、狭窄や石灰化を生じやすいなどのいくつかの欠点が存在する。このため、心臓血管再生のための組織工学バイオマテリアルを代用することが危急の課題として挙げられている。本研究の目的は、①ラットの血管モデルを用いて、シルクフィブロイン (SF) /ポリウレタン (PU) パッチの可能性を調査すること、②新規パッチにおいて生体適合性に寄与する因子 (SF/PU パッチにおける異なる SF 濃度やパッチ制作過程、パッチの組成) を精査することである。

本研究は3つの章から構成されており、第1章ではポリウレタン (PU) とシルクフィブロイン (SF) の最適な混合比の検討がなされた。その結果、PU : SF = 7 : 3 が最適な混合比であり、十分な強度と柔軟性を有し、炎症反応は少なく、適度な平滑筋再生があり、内皮化も完全で、組織侵入も多く、そして弾性繊維形成も認められるなどの多くの利点が示された。第2章では SF/PU パッチをブロースピニング法とエレクトロスピニング法の技術を組

み合わせて二層性パッチを作成し、エレクトロスピンニング法単独によるパッチとの比較が行われた。その結果、二層性パッチはエレクトロスピンニング法単独パッチよりも、多孔質構造の分布により組織侵入や早期内皮化を実現させ、ネイティブの血管に見られるような組織構造を、あらたな血管においてリモデリングさせることが示された。第3章では生分解性 (BD) PU を SF とブレンドすることで、BD-SF/PU パッチを作成し、BD-PU パッチならびに SF パッチとの比較が実施された。その結果、BD-SF/PU パッチが生分解性を有しながら、組織侵入、弾性繊維形成が多く、内皮化が最も早いという魅力的な特徴が示された。

本研究から得られた知見は、新しい実用的なパッチを生み出すだけでなく、動物をプロトタイプとして実験を行うことによって、人医療における心臓血管疾患に対し、有効な外科的治療法の発展にも貢献しえるものとなっている。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Silk fibroin-Pellethane® cardiovascular patches: Effect of silk fibroin concentration on vascular remodeling in rat model
著 者 名 : Chantawong, P., Tanaka, T., Uemura, A., Shimada, K., Higuchi, A., Tajiri, H., Sakura, K., Murakami, T., Nakazawa, Y. and Tanaka, R.
学術雑誌名 : Journal of Materials Science: Materials in Medical
巻・号・頁・発行年 : 28(12):191-204, 2017

既発表学術論文

- 1) 題 目 : バルーン拡張術を実施した重度大動脈弁性狭窄の犬の1例
著 者 名 : 上村暁子, 田中綾, 合屋征二郎, 島田香寿美, 田中隆志, Chantawong, P., 松浦功泰, Kitpipatkun, P.
学術雑誌名 : 動物臨床医学雑誌
巻・号・頁・発行年 : 26(4):186-191, 2017
- 2) 題 目 : Hybrid technique for closing an atrial septal defect using an Amplatzer® canine duct occlude in a small breed dog
著 者 名 : Uemura, A., Tanaka, R., Nakata, T.M., Matsuura, K., Goya, S., Shimada, K., Chantawong, P., Pitipipatkun, P. and Hamabe, L.
学術雑誌名 : Australian Veterinary Practitioner
巻・号・頁・発行年 : 48(1):19-21, 2018
- 3) 題 目 : Development of an insoluble hyaluronic acid membrane as an effective material for the prevention of post-thoracotomy pleural adhesions in dogs
著 者 名 : Uemura, A., Tanaka, T., Chantawong, P., Kitpipatkun, P. and Tanaka, R.
学術雑誌名 : Thai Journal of Veterinary Medicine
巻・号・頁・発行年 : 48(3):493-498, 2018