

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12501

研究課題名(和文)複合低エネルギー生体組織接合のコラーゲン構造変化可視化と冠動脈血管吻合への適用

研究課題名(英文)Visualization of structure change of the living tissues with the Integrated Low-level Energies (ILE) adhesion method and development of a coronary artery bypass assist device by using the method

研究代表者

増澤 徹 (MASUZAWA, TORU)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：40199691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低レベル量の100℃程度の熱、数10 kPa～1 MPa程度の圧力を生体組織基材であるコラーゲンに与えることにより生体組織の接合を行う新しい生体組織接合方法について研究を行った。コラーゲン変性、再凝固のメカニズムが解明できれば、従来では手縫いの縫合しか手段のなかった血管吻合や止血手技において、人工物に依らない簡便かつ低侵襲、無毒な全く新しい血管吻合技術を確立できる。本研究では、熱によるコラーゲンの形態学的変化の観察とFIB(収束イオンビーム)やSEM(走査型電子顕微鏡)を用いて接合部位構造の可視化を行い、本接合方法の現象を明らかにし、本技術を応用した冠動脈吻合装置を開発し有効性を評価した。

研究成果の概要(英文)：The Integrated Low-level Energies (ILE) adhesion method, which is a novel tissue adhesion technique, has been studied. We investigated the effect of thermal energy on the collagen structure in living tissues using ILE adhesion method. The structural changes of the living tissues with the ILE adhesion method were observed by using SEM and FIB microscopes. The dense layer was observed at the adhesion boundary and heat and pressure are significant to create the dense boundary. A coronary artery bypass assist device by using the ILE adhesion method has been developed and evaluated. Bypass grafts were anastomosed on the porcine coronary artery successfully with an adhesion temperature of 120 degrees Centigrade and an adhesion time of 60 seconds. The average anastomosed strength is 18.7 kPa and sufficient adhesion performance is confirmed.

研究分野：医用工学，医用機械工学，医用生体工学

キーワード：生体組織接合 複合低エネルギー生体組織接合 コラーゲン FIB-SEM 冠動脈バイパス手術 血管吻合

1. 研究開始当初の背景

生体組織接合に関して、科学的な生体接着剤やレーザー光、超音波メスや電気メス等を用いた方式[1,2]が研究されている。科学接着剤は生体由来物質使用のため安全性に課題がある。レーザー光融着方式ではレーザーエネルギーを効率よく吸収させるための組織染色の必要性が実用化の壁となっている。また、超音波、電気メスでは局所への高エネルギー集中による組織の熱破壊が生じるため、小血管の切断、断端止血のみに用いられているのが現状である。血管吻合においては、米国で冠動脈バイパス用吻合器としてホチキス針を用いた C-Port が製品化されているものの、手間がかかる血管装着、低確実性から普及に至っておらず、針と糸を使った従来の手技に頼らざるを得ない。これに対し申請者は、図1に示す基礎実験装置により 100℃程度の熱、数 10 kPa ~ 1 MPa 程度の圧力、振幅数 μm 程度の振動を複合して生体組織基材であるコラーゲンに与えることによりそのゲル化、接着を生起する全く新しい方法で生体組織同士の接合を実現している[3]。本複合低エネルギー接合は、化学的材料を介することなく、図2のように低損傷かつ組織再構成可能な状態で確実な生体組織接合が行える。しかし、本接合原理は生体組織のコラーゲンの変性によるものと推定されるだけで十分に解明されていない。本研究では、熱によるコラーゲンの形態学的変化の観察、再凝固した接合部分のコラーゲン線維構造三次元可視化を活用して複合低エネルギー接合の機序を検証し、生体組織内のコラーゲン変性を利用した血管吻合の可能性を追求する。

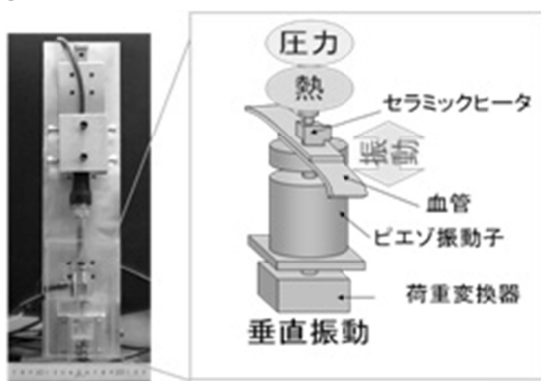


図1 複合低エネルギー接合実験装置

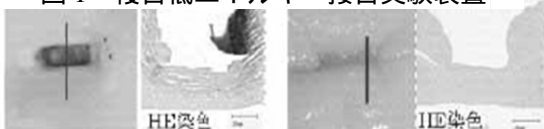


図2 超音波メスによる損傷組織外観と染色および提案方法による低損傷接合外観と染色

2. 研究の目的

低レベル量の 100℃程度の熱、数 10 kPa ~ 1 MPa 程度の圧力、振幅数 μm 程度の振動を

複合して生体組織基材であるコラーゲンに与えることによりそのゲル化、再凝固を生起して生体組織の接合を行う新しい生体組織接合方法について研究する。既に本接合方式を用いて豚動脈血管同士を強固に接合できることを確認している。コラーゲン変性、再凝固のメカニズムが解明できれば、従来では手縫いの縫合しか手段のなかった血管吻合や止血手技において、人工物に依らない簡便かつ低侵襲、無毒な全く新しい血管吻合技術確立できる。本研究では、コラーゲン含有量と水分含有量が異なる生体組織における熱によるコラーゲンの形態学的変化と SEM (走査型電子顕微鏡) と FIB (収束イオンビーム) を用いた接合部位構造の可視化を行い、本接合方法の現象と血管接合条件を明らかにし、本技術を応用した冠動脈吻合装置を開発し動物実験によりその有効性を実証する。

3. 研究の方法

(1) 熱によるコラーゲンの形態学的変化の解明

コラーゲン含有量、水分含有量、組織に与える熱量を変更パラメータとして、熱によるコラーゲンの形態学的変化を明らかにする。牛より抽出したネイティブコラーゲンをリン酸緩衝生理食塩水に加え攪拌し、セルデスク上に滴下、維持することでコラーゲンを再線維化させる。再線維化させたコラーゲンを飽和食塩水中に浸して水分含有量を調節してコラーゲン含有量と水分含有量がそれぞれ異なる組織試料片を作成する。先行研究で強固な組織接合が可能であった接合温度 80 ~ 120 程度の範囲で作成した試料片を水中で加熱し、加熱後のコラーゲンの形状を原子間力顕微鏡を用いて観察し、コラーゲンフィブリルの形状の変化や凝集具合、繊維構造の有無等を評価することで、コラーゲン熱変性現象を明らかにする。

(2) 組織接合部位観察による変性組織構造の評価

コラーゲン熱変性と再凝固による接合の機序を明らかにするためには、生体組織のコラーゲン含有量、水分含有量、熱量に対して、接合後のコラーゲンがどのような構造となるのかを詳細に解析することが重要である。そこで、本接合方法を用いて、80 ~ 120 の範囲で組織加熱を行い豚動脈血管同士を接合し、その接合面の構造を SEM と FIB を用いて可視化する。これにより複合低エネルギー接合の現象解明を行う。

(3) 冠動脈吻合装置の設計・開発

血管吻合技術を有効に活用できる応用手術として心臓表面の冠動脈にバイパス用血管を吻合する冠動脈バイパス手術を対象とした吻合装置の開発を行う。加熱部周辺組織損傷回避のために加熱範囲が最小、バイパス用血管の取り付けが簡便、小型な冠動脈接合

装置を実現する。本デバイスは、陰圧吸引により柔軟生体組織である冠動脈とバイパス用血管を固定、内筒管にニクロム線を用いて熱誘導し加熱、加圧機構で血管同士を挟み込み圧力付加する。血管固定・加圧機構を別構造とすることで、バイパス用血管の取り付け、接合後の血管の取り外しを簡便に行える構造とする。内筒管加熱部により十分な熱量が得られない場合は、加圧機構先端にニクロム線を配置し、冠動脈とバイパス用血管の両側から加熱する機構を検討する。

(4) 冠動脈吻合装置評価

屠殺試料の豚心臓、血管を用いて冠動脈吻合装置の評価を行う。開発装置を用いて心臓の冠動脈に細血管を吻合し、その接合強度を引っ張り試験により評価する。また動物実験により冠動脈吻合装置評価を行う。成山羊実験モデルを作成し、本接合方式により冠動脈バイパス手技を行い、本装置の操作性等の有効性を検証する。

4. 研究成果

(1) 熱によるコラーゲンの形態学的変化の解明

体外で線維化したコラーゲンフィブリルを水中・空气中で加熱し、加熱環境・加熱温度・加熱時間がどのようにコラーゲン線維の幾何学的形状に影響するか検証した。水中加熱の場合、コラーゲンフィブリルは、加熱温度・加熱時間の増加と共に、変性量も増加した。空气中加熱の場合、加熱温度 100 °C で 90 分間加熱を行っても、コラーゲンフィブリルは加熱前の線維構造を維持していた。これより生体組織に含まれる水分量が少ない場合（加圧して脱水した状態）、線維構造を維持しつつ接合が行えるが判明した。

(2) 組織接合部位観察による変性組織構造の評価

複合低エネルギー生体組織接合実験装置を用いてブタ大動脈試料片の内膜同士を接合条件：温度 100 °C、圧力 1.25 MPa、接合時間 60 秒で接合し接合試料を作製した。また、100 °C のコンベクションオープンで 60 秒間加熱した加熱試料、1.25 MPa で 60 秒間加圧した加圧試料、および未処理試料を作製した。これら 4 種の試料を SEM 観察用化学処理し、SEM(JSM, 日本電子)および FIB-SEM(NB5000, 日立ハイテクノロジーズ)で観察した。その結果、接合試料では、接合部において他試料に比較して更に緻密な組織構造を確認した。(図3)三次元再構築した断面画像からも接合界面で組織が三次元的に緻密に重なり結合している様子が確認され(図4)、本接合方法はコラーゲンを主とした生体組織構造を変化させ緻密化することが判明した。また、その緻密化には加熱、加圧の双方が必要であることが可視化より確かめられた。

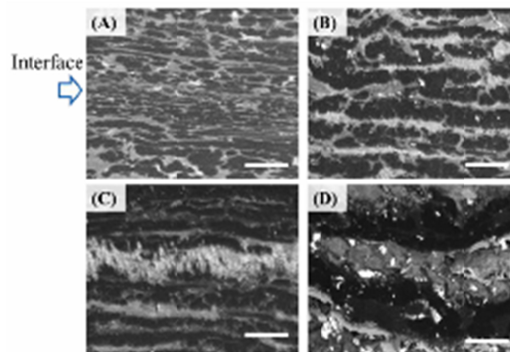


図3 SEM 画像 (A)接合試料 (B)加熱試料 (C)加圧試料 (D)未処理試料(スケールバー: 10 μm)

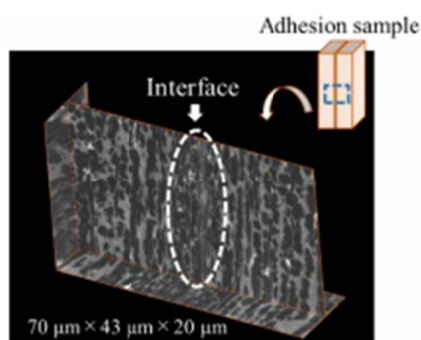


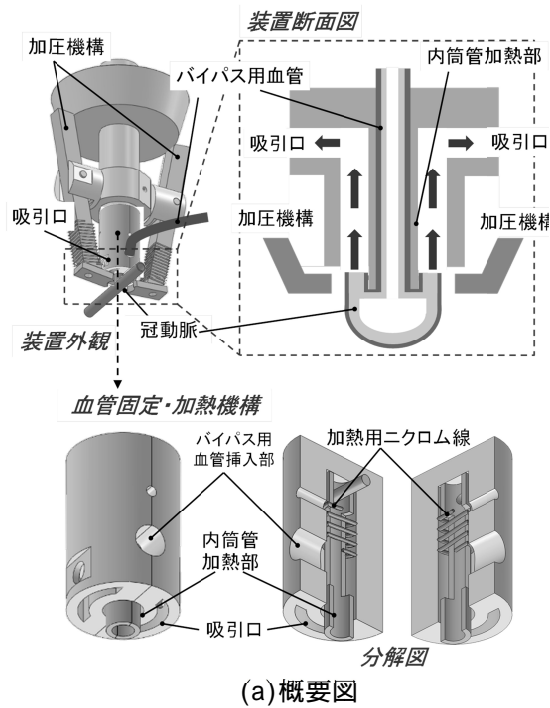
図4 FIB による接合試料の内部組織構造

(3) 冠動脈吻合装置の設計・開発

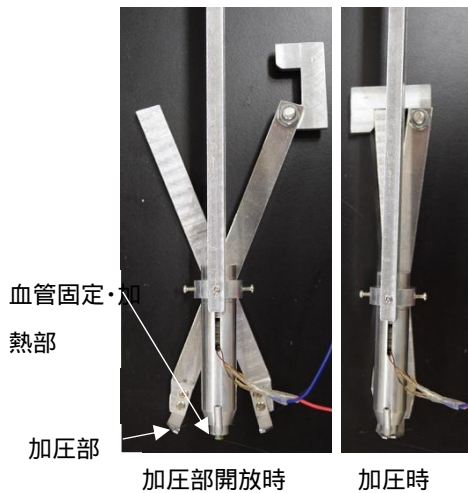
血管吻合技術を有効に活用できる応用手術として冠動脈バイパス手術を対象とし、心臓表面の冠動脈にバイパス用血管を吻合する装置の開発を行った。加熱部周辺組織損傷回避のために加熱範囲が最小、バイパス用血管の取り付けが簡便、小型な冠動脈接合装置の実現を目指してプロトタイプ機を設計・製作した。本デバイスは、陰圧吸引により柔軟生体組織である冠動脈とバイパス用血管を固定、内筒管にニクロム線を用いて熱誘導し加熱、加圧機構で血管同士を挟み込み圧力付加する。鉗子状加圧機構により、操作性を向上、吻合部への的確な加圧を実現した。外筒の先端部分を段状、テーパ加工して吻合部の目視を容易にした。内筒と生体試料の接着を抑制するために内筒の先端部にテフロンコーティングを行い、血管のデバイスへの接着を防止した。図5に設計した冠動脈吻合装置の概要図とその外観を示す。

(4) 冠動脈吻合装置評価

屠殺試料の豚心臓、血管を用いて冠動脈吻合装置の評価を行った。プロトタイプ機を用いて豚血管同士の吻合、心臓上の冠動脈への血管吻合を実施し、その接合強度を引っ張り試験により評価した。血管はブタの大動脈から分岐する内径約 3 mm のものを用いた。吻合温度は 120 °C とし、吻合時間は 60 秒とした。



(a) 概要図



(b) デバイス外観

図5 冠動脈吻合装置（プロトタイプ機）の概要と外観

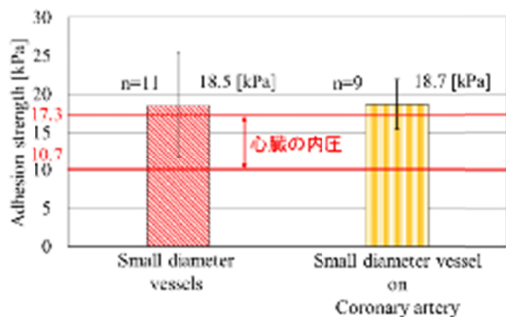
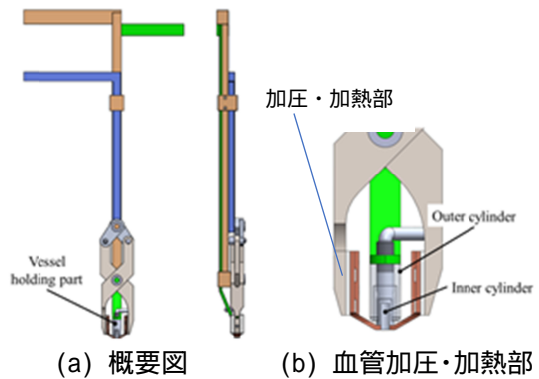


図6 血管吻合強度 (左)血管同士の吻合 (右)冠動脈への血管吻合

引張強度は吻合した血管を引っ張り、引張力をカトランスジューサで計測する専用計測装置を製作して行った。図6に血管吻合強度

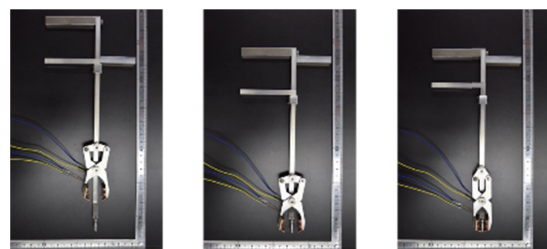
計測の結果を示す。血管同士の吻合成功率は11回中11回と100%で、引張強度は平均18.5kPaであった。血管の冠動脈への吻合成功率は10回中9回と90%であり、引張強度は18.7kPaと血圧と同等程度の十分な強度を確認した。

成山羊を用いて本デバイスの評価動物実験を行った。その結果、胸腔内の冠動脈にアクセスするためには内筒ヒータ直径が大きく、鉗子把持部分も周囲と干渉すること、加熱内筒内部に通したバイパスグラフトが加熱損傷すること、陰圧による位置決め精度が低いこと、融着面の視認が困難であること、等が問題として挙げられた。本問題を解決するためにプロトタイプ2号機(図7)を設計した。熱源とバイパスグラフトとの接触を減らすために、加熱機構を内筒内部から加圧アーム部に移動した。これにより内筒部の直径の減少、バイパスグラフトの低損傷を実現した。トンギ機構を用いて加圧アーム部の幅を減少すると共に加圧アーム部をスライダ機構により上下位置変更可能とすることで、血管接着時の接着部の位置決め精度の向上と視認性の向上を図った。プロトタイプ2号機の血管接合強度は23kPaと1号機と同等以上の接合性能を得、120 までの加熱に要する時間は1号機の40秒に対して2号機が20秒と縮小に成功した。今後、動物実験にて評価・改良を進めていく。



(a) 概要図

(b) 血管加圧・加熱部



(c) 血管挿入時,アームスライド時,加圧時のデバイス写真

図7 冠動脈吻合装置（プロトタイプ2号機）の概要と外観

<参考文献>

[1] Ameral JF, Experimental comparison of the ultrasonically-activated scalpel to electrosurgery and laser surgery for laparoscopic use, Min Invas

Ther & Applied Technol., 6, 324-331, 1997

- [2] 大森初夏, 他, 胸部大動脈に対するレーザー溶着の基礎検討, 生体医工学, 41-1, 1-8, 2003
- [3] Katoh A, Masuzawa T, Development of tissue adhesion method using integrated low-level energies, Medical Engineering & Physics, 32, 304-311, 2010

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yosuke Suwa, Kwangwoo Nam, Kazuhide Ozeki, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Toru Masuzawa, Thermal denaturation behavior of collagen fibrils in wet and dry environment, 査読有, JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH B: APPLIED BIOMATERIALS, VOL 104B, ISSUE 3, 2016, 538-545, DOI: 10.1002/jbm.b.33418

〔学会発表〕(計6件)

羽根田洋輔, 増澤徹, 長真啓, 尾関和秀, 岸田晶夫, 複合低エネルギーを用いた冠動脈バイパス手術支援デバイスの開発 - 吻合時温度変化の検討 -, LIFE2017 講演要旨集, 47(2017.9.15-17)

羽根田洋輔, 増澤徹, 長真啓, 尾関和秀, 岸田晶夫, 複合低エネルギーを用いた冠動脈バイパス手術支援デバイスの開発 - 血管装着部の変更・加圧機構の改良 -, 第25回茨城講演会 CD, 514(2017.8.29)

羽根田洋輔, 増澤徹, 尾関和秀, 岸田晶夫, 樋上哲哉, 複合低エネルギーを用いた冠動脈バイパス手術支援デバイスの研究開発, 第26回ライフサポート学会フロンティア講演会予稿集, 87(2017.3.10-11)

小泉綾香, 増澤徹, 長真啓, 尾関和秀, 岸田晶夫, 複合低エネルギー生体組織接合技術における生体組織構造変化の可視化, 第24回茨城講演会講演論文集, 171-172 (2016.8.26)

小泉綾香, 増澤徹, 長真啓, 尾関和秀, 岸田晶夫, 複合低エネルギー生体組織接合技術の研究開発 - FIB-SEM による生体組織接合部の観察 -, ライフサポート学会第25回フロンティア講演会, 39 (2016.3.8-9)

荒昌幸, 増澤徹, 長真啓, 尾関和秀, 岸田晶夫, 樋上哲哉, 熱損傷最小化を目指した冠動脈バイパス手術支援デバイスの改良, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会, CD (2015.9.7-9)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mech.ibaraki.ac.jp/masuzawa-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増澤徹 (MASUZAWA, Toru)

茨城大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 40199691

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

長真啓 (OSA, Masahiro)

茨城大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号: 30735105

巽英介 (Tatsumi, Eisuke)

国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号: 00216996

岸田晶夫 (KISHIDA, Akio)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号: 60224929

(4) 研究協力者

なし