

内径2.6mmのシャントチューブを接続している(図4)。このシャントチューブは、低流量域における遠心ポンプの回転数を上昇させ流量の安定化を図り、また血流量を増加することでシステムの血液停滞部位を減らし血栓形成を予防する目的として設置した。

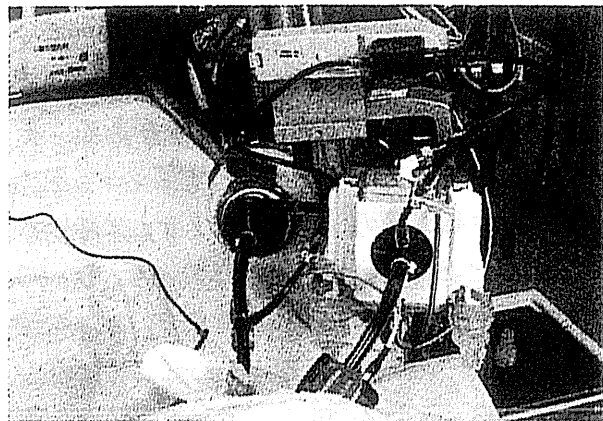


図4 ECMO管理の実際

人工肺出口部と遠心ポンプ入口部の側枝にシャントチューブを接続し、使用する。

2.2 ECMOシステムの充填方法

まず人工肺と遠心ポンプを装着し、清潔回路を架台のポールフックにかけてプライミングを開始する(図5)。プライミングは落差充填から開始する。落差充填はプライミングラインから充填液を投与し、図1のように清潔回路最上点および各側枝に保護フィルターを装着することで遠心ポンプ、人工肺、清潔回路まで自動的に充填できる。この保護フィルターはエアのみを通過するため、充填液が保護フィルターまで満たれば落差充填は完了する。次に落差充填完了後は遠心ポンプを3000RPMまで回転させ、残存した細かなエアを人工肺で抜く。落差充填終了時にはほぼエアは除去できているため、遠心ポンプ回転直後にはエア抜きが完了できる。

2.3 ECMOシステムの使用基準

新生児・乳児期のECMOシステムは2種類あり、ECPRを施行する場合は体重別でシステムを使い分けている。5kg以下の体重では本シス

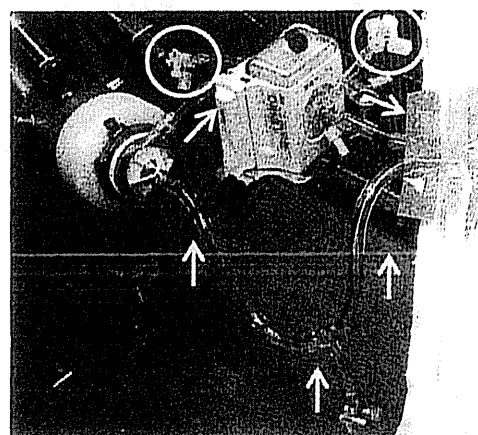
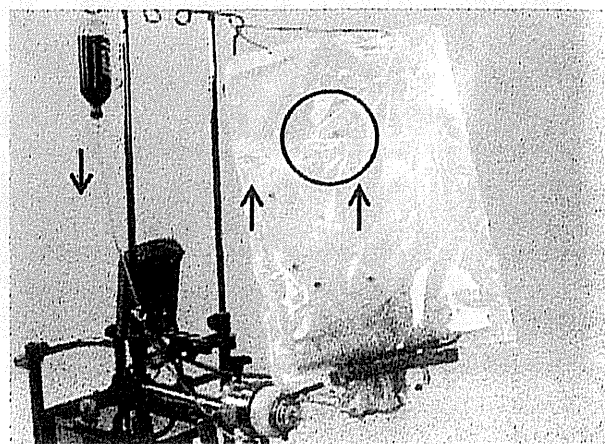


図5 落差充填の実際

矢印は落差充填時の充填液が満たる方向、○は保護フィルター装着部。

テムを用いたECPRを、5-14kgでは長期耐久性に優れている平和物産社製Endumo[®]-2000(充填量180mL)を用いている⁶⁾。5kg以下でも人工心肺離脱困難や呼吸不全症例など心肺停止に至っていない場合は濃厚赤血球とアルブミン製剤を用いて充填したEndumo[®]-2000を用いている。

3. 症例および経過

3.1 心肺停止までの経過

症例1: 日齢18、男児。身長50cm、体重3.0kg。主診断は右側相同に伴う肺動脈閉鎖、機能的単心室。左ブラロック・トーチヒ変法術、右肺動脈形成術を施行、閉胸直後に肺高血圧発作と思われる急性心肺不全となり、心臓マッサージを開始、ヘパ

リンを急速静注後(300IU)に本システムを用いたV-A ECMOを導入した。送血管は上行大動脈に8Fr(メドトロニック社製小児ワンピース)、脱血管は右心房に12Fr(エドワーズ社製FEMII)を用いた。

症例2：日齢67、男児。身長53cm、体重3.1kg。主診断は左心低形成症候群。日齢2より両側肺動脈絞扼術を行い、日齢23より動脈管が狭小化してきたためにステントを留置した。日齢67にノルウッド変法(RV-PA conduit)、心房中隔欠損孔拡大術を施行、手術終了後に人工心肺の離脱を試みたが、離脱困難であったためV-A ECMO(Endumo®-2000)へ移行した。装着から11日目にECMOを離脱したが、離脱から16時間後に突如VTとなり心臓マッサージを開始、ヘパリンを急速静注後(300IU)に本システムを用いたV-A ECMOを導入した。送血管は上行大動脈に8Fr(メドトロニック社製小児ワンピース)、脱血管は右心房に12Fr(泉工医科工業社製フレックスメイト)を用いた。

症例3：日齢4、男児。身長45cm、体重2.6kg。主診断はエブスタイン奇形。スターンズ術、右ブラロック・トーシヒ変法術、動脈管閉鎖術を施行。手術終了から僧房弁閉鎖不全が進行し、9時間後に突如血圧が20mmHg台まで低下、心臓マッサージを開始、ヘパリンを急速静注後

(200IU)に本システムを用いたV-A ECMOを導入した。送血管は上行大動脈に8Fr(メドトロニック社製小児ワンピース)、脱血管は右心房に12Fr(泉工医科工業社製フレックスメイト)を用いた。

3.2 心肺停止からECPR施行までの経過

症例1：システムの充填・エア抜きを含めた時間は1分32秒で、心肺停止から15分後にECPRを施行した。導入前後の血液ガス検査を表1に、ECMO管理を図6に示した。本システムは開始から68時間後に人工肺ガス流出部から血漿漏出、70時間後に溶血尿を確認し、人工肺および遠心ポンプの劣化と判断して73時間後にEndumo®-2000へ交換した。ECPR開始から115時間後にECMOを離脱し、神経学的合併症なく退院した。

症例2：システムの充填・エア抜きを含めた時間は深夜で正確な時間は不明であったが3分以内で完了し、心肺停止から31分後にECPRを施行した。導入前後の血液ガス検査は表1に、ECMO管理を図7に示した。本システムはECMOの長期補助が予想されたため11時間後にEndumo®-2000へ移行した。ECPR開始から148時間後に明らかな神経学的合併症なくECMOを離脱したが、離脱から673時間後に敗血症、多臓器不全にて死亡した。

表1 導入後の血液ガス検査
導入後は人工肺出口部から採取

	症例1		症例2		症例3	
	導入前	導入後	導入前	導入後	導入前	導入後
Hct (%)	37.6	32.2	42.8	31	35.1	29.2
pH	7.328	7.375	7.214	7.467	7.271	7.487
PaO ₂ (mmHg)	40.3	429	29.4	359	34.9	385
PaCO ₂ (mmHg)	35.2	34.7	57.1	33.3	56.6	33.1
BE	-6.7	-4.2	-4.5	0.8	-4	0.8
Lactate (meq /L)	1.6	9	16	19	12.6	27

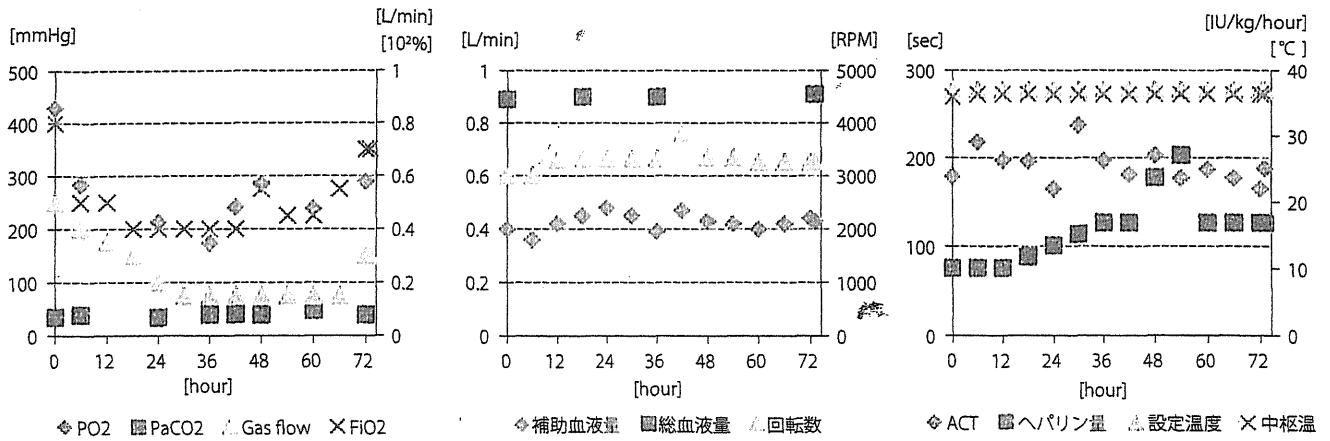


図6 症例1におけるECMO管理の実際

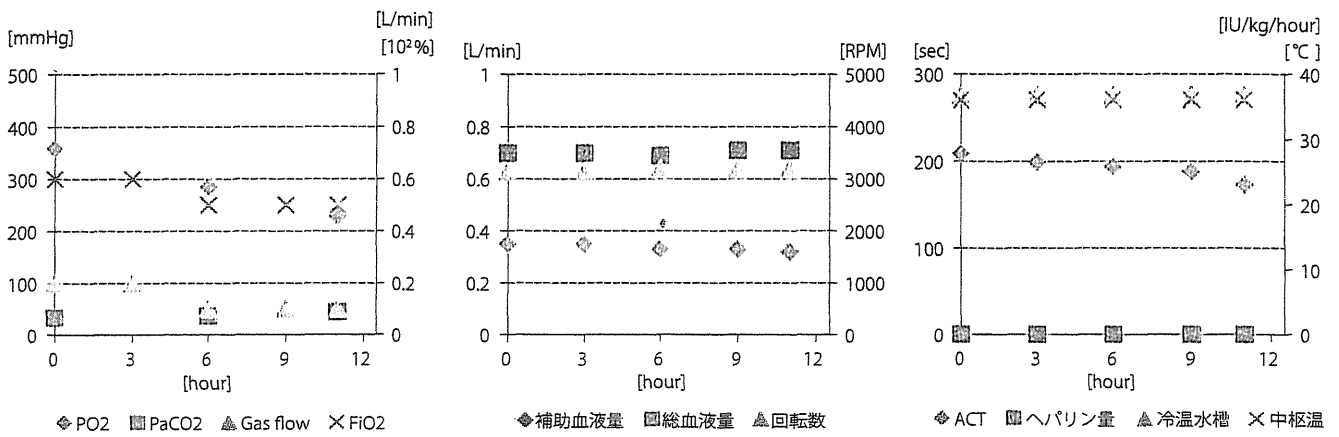


図7 症例2におけるECMO管理の実際

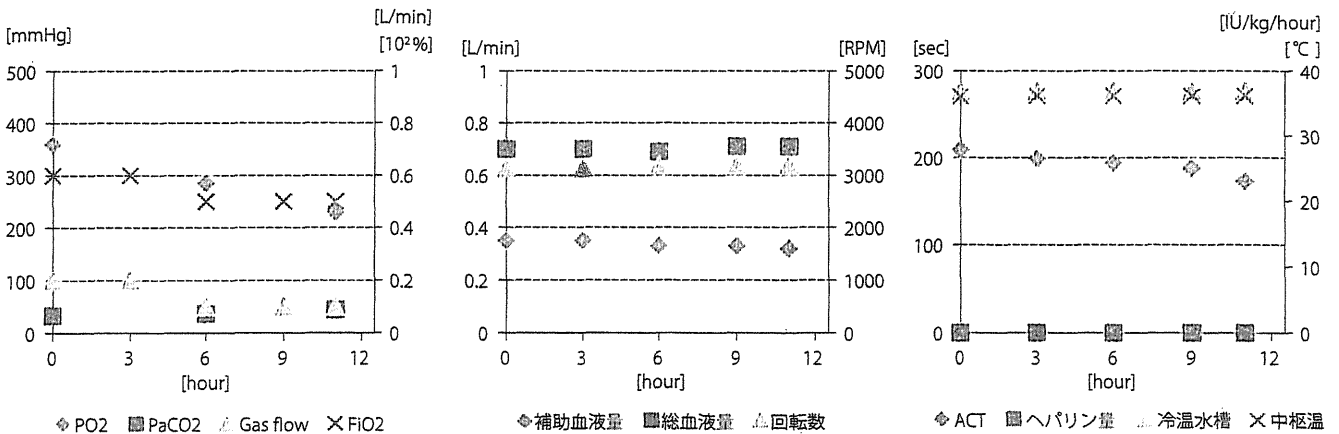


図8 症例3におけるECMO管理の実際

症例3：システムの充填・エア抜きを含めた時間は1分57秒で、心肺停止から22分後にECPRを施行した。導入前後の血液ガス検査は表1に、ECMO管理は図8に示した。本システムもECMOの長期補助が予想さ

れたため9時間後にEndumo®-2000へ移行した。ECPR開始から735時間後に多臓器不全にて死亡した。神経学的合併症の有無は不明であった。

3.3 ECMOシステム使用後の血栓評価

本システム使用後に生理食塩水で回路を洗浄し、血栓評価を行った。人工肺は症例1の血液流出部上方に赤色血栓が少量、症例2は血液流出部の塩化ビニルチューブ接続部の段差に赤色血栓が見られ、症例3は観察されなかった(図9)。血液流入部に関しては症例1に黒色血栓塊が散在していたが、症例2、3は観察されなかった(図10)。

遠心ポンプは症例1の軸受けシール全周に黒色血栓の付着が見られたが、症例2、3では観察されなかった(図11)。

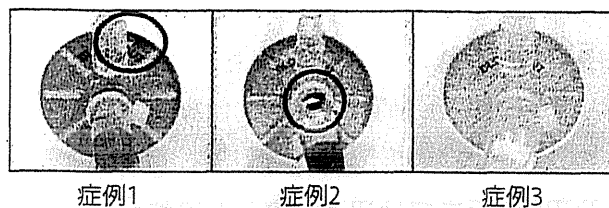


図9 人工肺出口部の血栓評価
○は血栓付着部位



図10 人工肺入口部の血栓評価
○は血栓付着部位

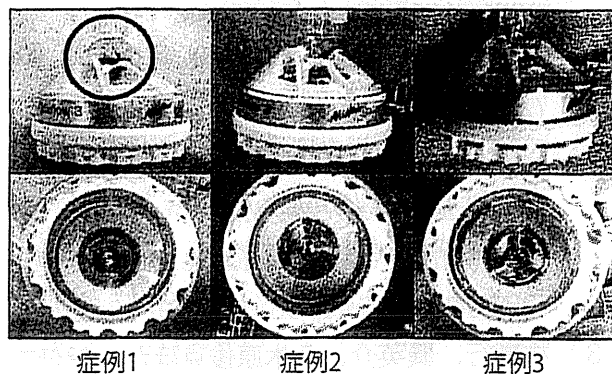


図11 遠心ポンプの血栓評価
○は血栓付着部位

4. 考察

ELSO registry report⁷⁾によれば新生児および乳児期に対するECPRの生存率は38、39%である。その中でもICUや高度に監視された環境下でECPRを導入すれば、院内発症した心疾患患者は良好な転帰が得られている^{8)~12)}。しかしながら、呼吸不全によるV-V ECMOは一定の導入基準¹³⁾が定められているが、循環不全によるECMOは明確な導入基準がない。ECMOは患者への侵襲はもちろん、人的なマンパワーを要することや経済的な負担を考慮すると適応には慎重になることもあり、心肺停止に陥ってからECMOを施行する場合も少なくない。これらの背景からどのようなタイミングでも迅速なECPRができる体制を確立することは非常に重要である。当院では従来使用していたシステムの問題点を改善するために2010年本システムを開発、臨床応用した。本システムは早期に充填・気泡除去ができるよう、保護フィルターを用いた落差充填と、遠心ポンプの採用を特徴としている。本症例の結果からも、充填・気泡除去に要した時間が2、3分程度で完了しており、迅速なセットアップを可能とした。準備に掛かる時間を短縮できれば、適切な状況判断と他の処置に努めることが可能であり、マンパワーを要するECPRに優れたシステムである。

回復の望めない急性心肺停止からECPR開始までの時間が短時間である程生存率が高い事は文献的にも示されている¹²⁾。我々もECMO導入により速やかに全身臓器、特に脳へ十分な酸素を供給する事が予後の改善につながると考え、迅速なECPRを心掛けてきた。本研究では3例全例でシステムの充填・エア抜きが3分以内に行えており、その結果心肺停止からECMO導入までは15、31、22分と短時間であった。その一方で、CPR時間とECPR後の転帰に明らかに関連を認めていないという報告もあり^{8)~11)}、転帰に及ぼす影響は現在のところ評価が定まっていない。ECPR開始までの時間が神経

学的合併症にどの程度影響しているかは現在のところ検討されていないため、理論的に質の高いCPRとECMO適応決定後の速やかなECPRは各施設試みられている。ECPR導入後の血液ガス検査は、CPR施行中に適正な循環血液量の調整や送脱血管挿入時などの出血を考慮して濃厚赤血球を患児へ投与しているため正確な希釈の影響は不明であったが無輸血充填での導入にもかかわらずヘマトクリットの低値は認められなかった。

遠心ポンプを用いた本システムの流量は3例ともに全使用期間を通じて安定していた。新生児・乳児期のECMOは低流量域の補助であるため、安定した流量制御を可能とするローラーポンプが好まれている。これらの血液ポンプはそれぞれ特有の理論的利点と欠点を持ち、どちらが適しているのか証明されていないのが現状である¹⁴⁾。しかし、ローラーポンプはオクルージョンの調節や回路内圧上昇によるデバイスの破損、回路内圧をモニタリングする装置が必須などセットアップ時の操作や注意点が増え、準備時間を要する。遠心ポンプはドライブモーターと流量計を装着するのみで、回路内圧上昇によるデバイスの破損もなく安全性・迅速性に優れており、ECPRに用いる血液ポンプには適している。特に本システムに採用しているMIXFLOW3は現在臨床使用できる遠心ポンプの中で最も小型であり、他の遠心ポンプと比べても高い回転数が必要であること、また人工肺出口部と遠心ポンプ入口部の側枝にシャントチューブを作成することにより血流量と回転数を増加できることも循環血液量の少ない新生児・乳児期のECPRには適していると考えられる。

症例1では68時間後に人工肺ガス流出部から血漿漏出、70時間後に溶血尿を確認した。症例2、3に関してはシステムの劣化は認めずに長期補助を予想して11、9時間後に交換を行ったが、症例1同様2日程度の維持は可能で

あると予想している。従来使用していた旧システムでは熱交換器を装着していないために体温調節が不可能であり、システム劣化の有無に関わらず可及的速やかに濃厚赤血球を用いて充填したEndumo[®]-2000(充填量180mL)への交換が必要であった事と比較すると有意に長期の使用が可能であり、比較的速やかな改善が見込まれる不整脈や肺高血圧発作が原因のECPRなどではシステムの交換なく使用出来ることが期待される。もちろんシステムの耐久性は、生体側因子にも影響されるため、今後症例を蓄積して検討する必要があると考えている。

5. まとめ

新生児、乳児期に対する心肺蘇生用ECMOシステムを3例に臨床応用した。心肺停止からECPR施行までは迅速な導入が可能であり、ヘマトクリット値も低値を示すことはなかった。従来使用していた旧システムと比較すると、熱交換器内蔵型人工肺を採用しているため体温維持が可能で、ECPR開始後に長期用のシステムへ交換する必要がなくなった。

参考文献

- 1) Joffe AR, Lequier L, Robertson CM. Pediatric outcomes after extracorporeal membrane oxygenation for cardiac disease and for cardiac arrest: a review. *ASAIO J*, 58 (4); 297-310, 2012
- 2) Tajik M, Cardarelli MG. Extracorporeal membrane oxygenation after cardiac arrest in children: what do we know? *Eur J Cardiothorac Surg*, 33(3); 409-17, 2008
- 3) 林輝行、巽英介、八木原俊克ほか：超低充填小児ECMOシステムの開発と基礎研究。循環器病研究の進歩1：62-69、2009
- 4) Yamasaki Y, Hayashi T, Yagihara T, et al : Early experience with low-prime (99 ml) extracorporeal membrane oxygenation

- support in children. *ASAIO J*, 52(1); 110-4, 2006.
- 5) 西田博、遠藤真弘、小柳仁：人工心肺回路の生体適合性向上を目指して 各種ヘパリンコーティングと新しいアプローチ。循環制御4：394-403、1999
- 6) 吉田幸太郎、林輝行、巽英介ほか：小児用ECMOシステム「Endumo-2000」の臨床使用経験。体外循環技術38(2)：160-167、2011
- 7) Extracorporeal life support Organization (ELSO): Extracorporeal Membrane Oxygenation Registry of the Extracorporeal Life Support Organization. Ann Arbor, MI, ELSO, 2011
- 8) Morris MC, Wernovsky G, Nadkarni VM. Survival outcomes after extracorporeal cardiopulmonary resuscitation instituted during active chest compressions following refractory in-hospital pediatric cardiac arrest. *Pediatr Crit Care Med* 5: 440-6, 2004
- 9) Alsoufi B, Al-Radi OO, Nazer RI, et al: Survival outcomes after rescue extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in pediatric patients with refractory cardiac arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 134(4); 952-959. e2, 2007
- 10) Lequier L, Joffe AR, Robertson CM, et al: Two-year survival, mental, and motor outcomes after cardiac extracorporeal life support at less than five years of age. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 136(4); 976-983. e 3, 2008
- 11) Thiagarajan RR, Laussen PC, Rycus PT, et al: Extracorporeal membrane oxygenation to aid cardiopulmonary resuscitation in infants and children. *Circulation*, 116(15); 1693-700, 2007
- 12) Huang SC, Wu ET, Ko WJ, et al: Extracorporeal membrane oxygenation rescue for cardiopulmonary resuscitation in pediatric patients. *Crit Care Med*, 36(5); 1607-13, 2008
- 13) Extracorporeal life support Organization (ELSO): Patient Specific Supplements to the ELSO General Guidelines. Ann Arbor, MI. November 2009
- 14) Yamagishi T, Kunimoto F, Morishita Y, et al: Clinical results of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support for acute respiratory failure: a comparison of a centrifugal pump ECMO with a roller pump ECMO. *Surg Today*, 34(3); 209-13, 2004

第1章 埋め込み医療機器・材料に起こっているトラブルとその解決

第7節 人工弁

[6] 安全性の高い人工弁材料の開発

中山 泰秀

国立循環器病研究センター 医工学材料研究室 室長 工学博士

武輪 能明

国立循環器病研究センター 人工臓器部 室長 医学博士

(株)技術情報協会

書籍「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」

(2013.10.31 発刊) 抜刷

[6] 安全性の高い人工弁材料の開発

はじめに

大動脈と肺動脈への出口にそれぞれ大動脈弁と肺動脈弁、心房と心室の間に僧帽弁と三尖弁の4種類の心臓弁が、ポンプ活動する心臓内の血液の逆流を防いでいる。これらの弁が何らかの原因によって働きが損なわれて弁膜症となると、血液の逆流（弁膜の破損）や流れの障害（弁膜の硬化）を生じ、悪化すると心肥大、不整脈、心不全などの症状が現れる。最近の弁膜症治療の動向として、自己弁温存術式もしくは自己修復能や成長性を期待した弁形成術の適応拡大がみられる。しかし、著しい弁の変性を帰した場合においては、人工弁を用いた弁置換術が行われている。

代表的な弁置換用の人工弁として生体弁と機械弁があり、ほぼ半数の割合で使用されている。我が国の心臓弁膜症の推定患者数は約200万人で高齢化に伴って近年増加傾向にあり、毎年2万人近くの患者が手術を受けている。しかし、他の循環器系の埋め込み型の人工臓器と同様に、人工弁にも国産品はほとんど無く、そのほぼ全てを海外製品に頼っている。

生体弁は、ウシやブタの心膜を成形する、あるいはブタの心臓弁を人間の心臓に移植できるように加工するなど、動物（生体）の組織を利用して作られている。最近欧米を中心に普及が広がっている、従来の外科的な開胸手術を必要としない、経カテーテル的心臓弁植え込み術（Transcatheter Aortic Valve Implantation: TAVI）においても動物由来の組織が用いられている。一方、機械弁は炭素繊維やチタンなどの人工材料からできている。また、他の代用弁として、ホモグラフトという亡くなられた方の心臓弁を用いる特殊なものもある。

機械弁は優れた耐久性を有しているものの血栓性があるため、生涯にわたって抗凝薬を飲み続ける必要がある。一方、生体弁は血栓ができにくいいため手術後数ヶ月を除いて抗凝薬療法は必要なく、また比較的感染に強いという特徴がある。しかし、機械弁に比べて耐久性に乏しく、10～15年程度で狭窄や逆流を生じて再び弁置換が必要となる。またホモグラフトは提供数が極めて限られている。従って現行の医療においては、弁膜症に対して必ずしも満足できる治療が提供されているとは言えない。

1. 「生体内組織形成術」による再生医療^{1,2)}

人工弁の問題点を克服すべく、“自身の心臓弁を自己組織によって再生させる”という再生医療をめざす、組織工学的な手法を用いた心臓弁代用弁の研究開発が活発化している。その有力候補の一つとして、患者の体内において、自己の移植用の組織体を自分の体内成分のみから作製する、「生体内組織形成術」と名付けられた新しい再生医療技術の開発が国立循環器病研究センター研究所を中心に進められている。その技術では、従来の生体外での組織工学技術に必須である無菌管理室での煩雑で時間を要する細胞操作を一切必要としない。心臓弁の反転形状をしたプラスチック製の鋳型を患者の皮下に1,2ヵ月間埋め込むだけで、鋳型の周囲に心臓弁形状をした組織体が自動的にできあがる（図1）。移植時には、内部の鋳型を取り除き、自己組織だけを用いる。自分の移植用の組織を自分で作ることができる、まさに自己完結型のオーダーメイド医療である。この移植用の心臓弁様組織体はバイオバルブと名付けられている。自己組織であるため、免疫拒絶反応や毒性がなく生体適合性に優れており、感染症において有利である。さらに、移植後に体内で成長できる可能性が期待されるなど多くの利点を有している。「生体内組織形成術」を用いた再生医療は、未だ研究段階であるが、血管や心臓弁などの循環器系分野に始まり、皮膚や角膜、さらに気管など他分野へと広く展開されつつある。

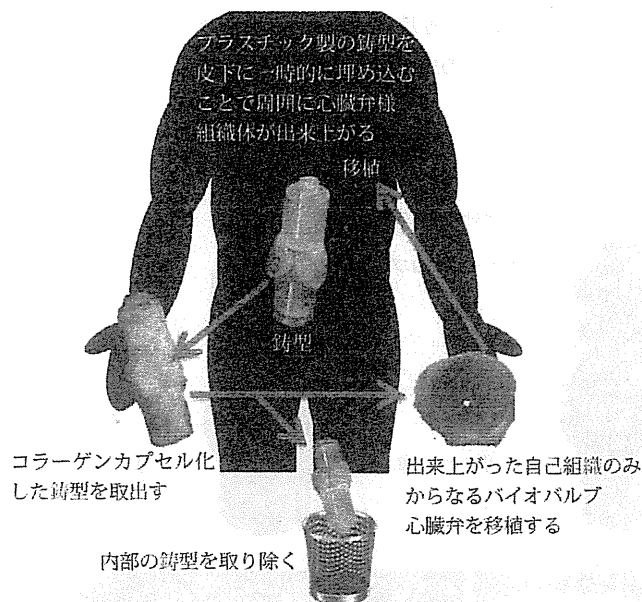


図1 生体内組織形成術による新発想の再生医療技術に基づく自家移植用心臓弁様組織体（バイオバルブ）の作製方法

2. 心臓弁様組織体（バイオバルブ）の開発

大動脈弁と肺動脈弁はほぼ同じ形状をした3葉弁である。弁葉が固定されている導管部に大動脈球や肺動脈球と呼ばれる3つの半球状の膨出部を有しており、それらに対応して導管部の内腔はそれぞれバルサルバ洞（大動脈洞）や肺動脈洞と呼ばれる空洞が3枚の弁葉毎に存在する。その空洞部分は、弁の開口時には血液の逃げ場となって弁葉が導管方向に開きやすくするのを助け、また閉口時には逆行する血流の溜まり場となって、それが弁葉を閉じる力に変換される巧みな構造となっている。この洞の存在によって、狭窄や逆流のない弁の機能が良好に保たれている。

生体内組織形成術によれば、複雑な3次元形状をした大動脈弁や肺動脈弁に対して、埋入する鋳型の形状を工夫することによって、シームレスな一体成形物としてバイオバルブ心臓弁様組織体を得ることが容易である³⁾。第7世代となる分解組立て型の鋳型では、バルサルバ洞形状を模した3つの半球状の膨出基材を、弁葉形成部となる僅かな隙間を介して円柱基材の側面に噛み合わせる設計となっており、3Dプリンターを用いて移植対象に合わせた寸法で光造形を行っている（図2）⁴⁾。円柱基材の内部にはカプセル内視鏡が内蔵されており、隙間での弁葉の形成過程が非侵襲で経時的に画像観察できる。皮下に埋入した鋳型周囲の空気は体液に置き換わり、やがて皮下組織内の繊維芽細胞がコラーゲンを産生し、鋳型の外形に添ってカプセル皮膜として覆い尽くす。同時に隙間にも豊富な毛細血管を伴って繊維芽細胞が侵入し、鋳型の大きさに依存するが2ヵ月程で隙間をコラーゲンが完全に埋め尽くし、バイオバルブ組織体が体内において形成される。バイオバルブを形成するコラーゲン組織は、異物に対する生体防衛反応を作業原理として埋入鋳型の皮下組織からの隔離が目的であるため、組織に欠損は全く生じず、配向はランダムであるものの均質で強固である。一方、バイオバルブの組織は周囲の皮下組織とは弱い粘膜で繋がられているだけで容易に引き離すことができ、また内部の鋳型表面とは全く結合せずに分離されており、バイオバルブに損傷を与えることなく鋳型を分解しながら容易に取り出すことができる。得られたバイオバルブは、大動脈弁環境を模擬した拍動流回路（Laboheart）内において、既存の人工物の機械弁と遜色のない非常に良好な弁機能を発揮し、さらにバイオバルブは生ものであるにもかかわらず、生理食塩水中において40日以上にも渡って機能が維持され、高い耐久性を有していた^{3,5)}。

ヤギの皮下で作製したバイオバルブの生体内での機能評価を目的として、左室心尖脱血から下行大動脈送血への左心人工血管バイパス内に移植すると、血栓形成無く、動脈圧100-150mmHg、バイパス流量2.5-4.0L/minの条件下で弁機能を維持し、2ヶ月後にはバイオバルブ内腔面は白く滑らかで、内部には平滑筋細胞が浸潤した⁶⁾。また、イヌで作製し

たバイオバルブで肺動脈弁置換を行うと、3 ヶ月で弁葉は内皮化されていた⁷⁾。バイオバルブは元々は皮膚を構成する組織であったが、移植することによってその環境に応じた変化が起こり、弁組織に置き換わって *in situ* での組織再生が起こることが分かった。

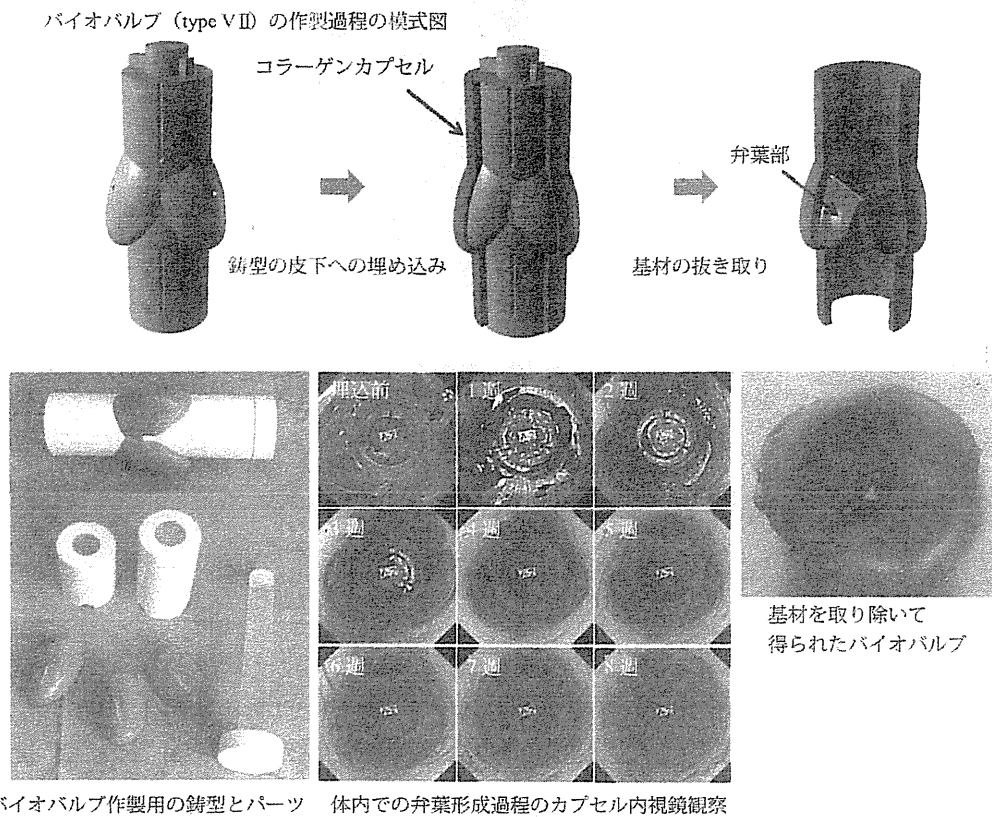
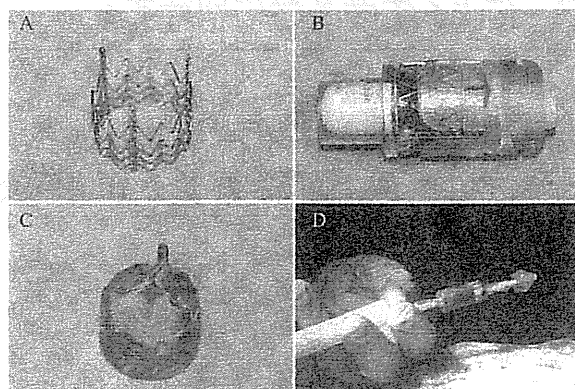


図2 バイオバルブ (type VII) の作製

3. 経カテーテル的心臓弁移植への応用⁴⁾

大動脈弁狭窄症は 70 代から増え、80 代に急増することが知られている。しかし高齢者であるがゆえに、さまざまな他病を抱えた患者さんも多く、体力も低下している。そこで、外科的に手術することなく低侵襲でカテーテル的に弁置換ができる TAVI が開発された。現在この治療に使用される人工弁は、動脈の狭窄を拡張治療するのに用いられている金属製ステントの内腔面に動物由来の膜状組織が縫い付けられている。ステントと共に弁を折りたたんでカテーテルに乗せて、病変した患者の弁の中で押し広げて、弁位置に取り付ける。これによって弁置換が簡単に行える。

一方、TAVI で使用できるバイオバルブとして、ステントと一体化させたステント付バイオバルブが開発されている(図 3)。先のバイオバルブ作製用の鑄型を基本として、バルサルバ洞に相当する膨出部を除いた円柱状の基材の外面にステントを組み合わせて鑄型とし、皮下に一定期間埋入する。同様のカプセル化原理によってバイオバルブの弁葉が形成されるのと同時にステントを取り囲む様に形成された組織と強固に結合される。体内に鑄型を留置するだけでステント内部に弁葉を有するステント付バイオバルブの見事な一体成形が起こる。ステンレス製ステントを用いればバルーン拡張型、形状記憶合金であるニッケルチタン製ステントを用いれば自己拡張型ができあがる。カテーテルを用いることでヤギでの大動脈弁置換やイヌでの肺動脈弁置換が短時間で可能となっている。



- (A) ステント付バイオバルブ用のステント（株式会社グッドマン製）、
 (B) ステントを組み合わせた作製用鋳型、
 (C) 出来上がったステント付バイオバルブ、
 (D) ヤギ動物実験にて大動脈弁置換に備えてバルーンカテーテルにマウントしたステント付バイオバルブ

図 3

おわりに

生体内組織形成術を利用すると、皮下に鋳型を埋入しておくだけで、移植に耐えうる強固な組織体をいとも簡単に作製することができる。それは現在の最新の技術と設備を駆使しても人工的には不可能である。得られるバイオバルブは大動脈弁としても機能し、現在より複雑な形状をした僧帽弁や三尖弁への応用も可能になりつつある。移植後には早期に目的部位に応じた組織の再構築が速やかに起こり、心臓弁の再生へと促される。今日の完全ではない人工弁に置き換わる新たな治療の可能性を有しており、近い将来には、弁膜症の治療以外に、自分の損なわれた組織を取り替えるために、自分の体内で移植物を作製する再生医療がありふれた一般的な治療として普及しているかもしれない。

文 献

- 1) 中山泰秀, 再生医療叢書 3 (循環器), 日本再生医療学会 監修, 澤芳樹・清水達也 編, 朝倉書店
- 2) 中山泰秀, 化学工業 特集 進化するバイオマテリアルの新機能 (2012), p523-p528
- 3) Y.Takewa, M.Yamanami, Y.Kishimoto, et al., J Artif Organs, 16, 176(2013)
- 4) Y. Nakayama, Y. Takewa, H. Sumikura, et al., Circulation, 126, A8910 (2012)
- 5) H.Sumikawa, Y.Nakayama, K.Ohnuma, et al., Artif Organs, in press(2013)
- 6) Y. Takewa, Y. Nakayama, M. Yamanami, et al., Circulation, 126, A11009 (2012)
- 7) M.Yamanami, Y.Yahata, M.Uechi, et al., Circulation, 122, s100 (2010)

医療への応用事例： 再生する自己組織心臓弁 「バイオバルブ」の開発

国立循環器病研究センター研究所
中山 泰秀

1. はじめに

水やゼラチンを型の中に流し込んで冷やすと、型の形に合った氷やゼリーができる。同じ様に、皮膚の下にプラスチック製の型（鋳型）を約1ヵ月埋め込むだけで、型の形に合った、自分の体内成分だけからなる移植用の組織体が自然とできあがる。自分自身の組織であるため当然拒絶反応はなく、安全で安心である。そんなある種魔法の様な革新的な治療技術（生体内組織形成術）が、実際の再生医療として現実のものとなりつつある。その研究開発は、3Dプリンターの登場によって目覚ましい発展を遂げ、今では欠く事ができない大きな存在となっている。本稿ではバイオバルブと名付けた心臓弁の開発を中心に、3Dプリンターの応用事例を紹介する。

2. 心臓弁とその治療

「心臓病」は日本人の死因として「がん」に次ぐ第2位であるため、身近に耳にすることも多く命に直結する恐ろしい病気とは分かっている。しかしなぜ発病するかについては良く知られていないと思われる。原因の8割

近くは、心臓に酸素や栄養を与えている血管が詰まることによって心臓自体の動きが悪くなる「虚血性心疾患」と、心臓弁が詰まるあるいは破損することによって血液を送りにくくなる「弁膜性心疾患」で占められており、心臓自体の構造的な変性による。いずれも心臓がポンプとしての役割が果たせなくなるため重篤な症状を起こすことが多い。

心臓には4種類の弁が付いており、逆流を防いで全身に血液が送り出されている。心臓弁は能動的に動く組織ではなく、単なる膜状組織がそれぞれ理にかなった独特の形状をして逆止弁としての機能を発揮している。心臓弁膜症の推定患者数は約200万人と多く、変性した弁を内科的に修復することはできないため年間1万人以上の患者さんが外科手術を受けている。全身に影響を及ぼしやすいのが大動脈弁と僧帽弁で、この2つの弁の手術が心臓弁膜症手術の9割以上を占めている。

最近の弁膜症治療の動向として、自分の組織をできるだけ残す自己弁温存術もしくは自己修復能や成長性を期待した弁形成術の適応拡大がみられる。しかし、著しく弁の変性を来した場合においては、従来の心臓弁代用弁を用いた弁置換術が行われている。代表的な弁置換用の人工弁として「生体弁」と「機械弁」がある（図1）。「生体弁」はウシやブタの心膜を成形する、あるいはブタの心臓弁を人間に移植できるように加工するなど、動物の組織を用いて作られている。一方、「機械弁」はパイロライトカーボンという炭素繊維やチタンなど人工材料からできている。また、他の代用弁として、「ホモグラフト」という亡くなられた方の心臓弁を用いる特殊な

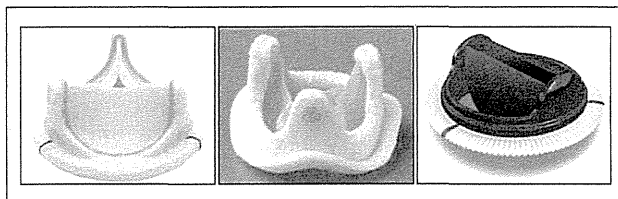


図1 臨床で使用されている代表的な人工弁。ウシ心膜を利用した生体弁（左）、ブタ心臓弁を利用した生体弁（中）と機械弁（右）

なかやま やすひで

ものもある。「機械弁」は優れた耐久性を有しているものの血栓性であるため、生涯にわたって抗凝固薬を飲み続ける煩わしさがある。一方、「生体弁」では血栓ができにくいいため手術後数ヶ月を除いて抗凝固療法は必要なく、また比較的感染に強いという特徴がある。しかし、「機械弁」に比べて耐久性が低く、10～15年程度で狭窄や逆流を生じて再び弁置換が必要となる。

これらの人工弁の問題点を克服するために、近年では、自身の心臓弁を自己組織によって再生させるという「弁再生」をめざす、組織工学的な手法を用いた心臓弁代用弁の開発が活発化している。例えば、ポリ乳酸などの生分解性高分子で心臓弁形状に形作った鋳型、あるいは脱細胞化させた動物の心臓弁に対して、自己の血管壁細胞を生着させたハイブリッド型の代用弁が開発されている。これは特に小児において、右心系などの低圧系で臨床応用が進められ良好な成績が取られている。しかし、その作製工程では、特殊な専門医療機関などにおいて、自己の骨髄細胞や血管前駆細胞などを含む組織を採取したあとに、高度な滅菌環境下での細胞分離、増殖、鋳型への播種、生着培養などを経てデバイス化させる生体外での長期間の煩雑な細胞操作が不可欠である(図2)。また、これらの弁においても左心系などの高圧系への応用は破裂や瘤化のため耐久性の点で問題があり、臨床応用には至っていない。

3. 生体内組織形成術を用いた新しい再生医療

生体は自分の体を守るために巧くできており、もともと体がない「異物」が体内に侵入すると、それを排出しようとする。例えば、傷んだ食べ物を口にすると、吐き出すあるいはお腹を下すなど様々な防衛手段を講ずる。

また、刺(とげ)が皮膚に刺さると、体外へ押し出そうとする。しかし「異物」が皮下深くにまで入り込んでしまい分解もできないとなると、排出をあきらめざるを得ない。そこで別手段として、生体は異物との共存を選ぶ。しかし、仲良く共存する訳ではない。自分にとって不快な侵入者と仕方なく同居しなければならないため、不快であるのは確かであり、できれば姿を消して欲しい。そこで生体は侵入者を隠すことを行う。では何で隠すのか? コラーゲンで隙間なく覆い囲むのである。生体のタンパク質の約30%はコラーゲンが占めており、コラーゲンは生体の組織や臓器の基本骨格を構成している。覆い尽くした結果、「異物」は外見上自分自身のコラーゲンの固まりとなり、直接接することはなくなる。「異物」を隔離することで共存が成立する。この生体反応は「カプセル化」として古くから知られており、ペースメーカーの電池交換などの際に、埋め込まれた人工物の周囲には必ず起こっている。形成外科などではインプラント周囲に形成する厄介モノとして扱われることもある。いずれにしても生体にとって大きな負担のない、ごくありふれた現象である。

生体内組織形成術とは、このカプセル化を利用して、自分の移植用の組織体を自分自身のコラーゲンで形を作ろうとする新発想の革命的な再生医療技術である(図2)^{1)~3)}。再生医療と言うと、先述した様に患者から採取した細胞を高度な滅菌施設内で増殖させて増やして組織や臓器を作ろうとする組織工学に基づいているのが一般的である。しかしiPS細胞など万能細胞を用いても移植可能な形ある自己組織体の作製はいまだ遠い将来の話である。一方、生体内組織形成術では患者の体内を培養器(バイオリクター)として使うために、細胞培養の煩わしい

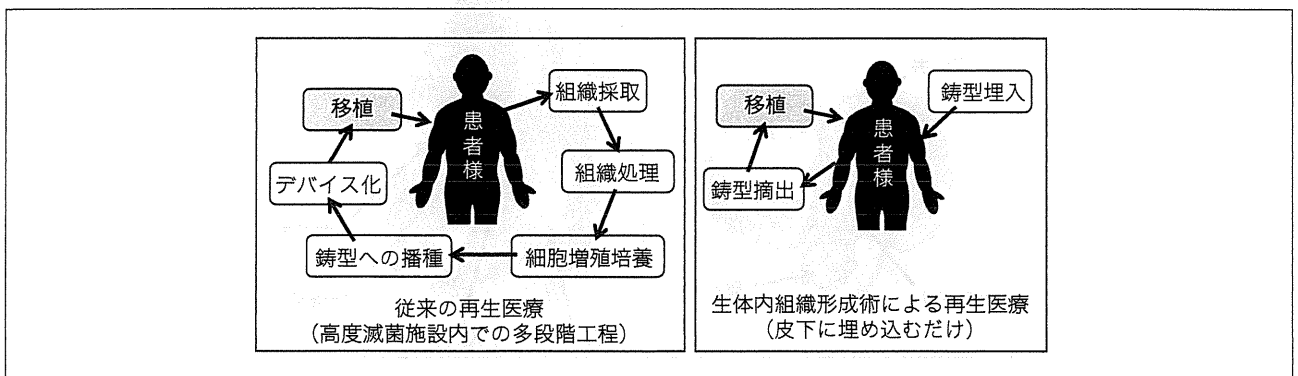


図2 従来型の再生医療と生体内組織形成術を用いる再生医療との作業工程の違い

手間暇さらにコストが一切かからない。単に皮下に移植対象の組織体の形を型取った人工物（鋳型）を一時的に埋入することで形ある移植用自己組織体が自然と得られる。鋳型の材料は、これまで形成外科のインプラントや人工臓器に用いられてきた安全性の高いプラスチックを用いることができる。そのため多くの利点を有する。例えば、1) 鋳型の数によって多量に作製できる、2) 鋳型の形によって形状を自由に設計できる。また、得られる組織体は自己組織のみからなるため、3) 免疫拒絶反応がない、4) 毒性がなく生体適合性に優れている、5) 感染症において有利である、6) 移植後に体内で成長できる可能性がある。生体内組織形成術は、安全かつ簡便で経済的である。この再生医療は、種々の組織作製への汎用性が高く、また鋳型さえあれば一般の医療施設において現在の治療方法の範囲内で行えるため、一般医療として広く普及できる高い実現可能性を有している。

4. 「バイオバルブ」心臓弁再生医療における3Dプリンターの導入による技術革新

生体内組織形成術では皮下に埋入する鋳型の表面の形状を設計図として、生体は寸分違わない呼応形状を有する組織体の作製をわずか1ヵ月程で完了する。従って、希望の形状の組織体を得るためには、その反転形状の鋳型を設計すればいい。鋳型ができれば、あとは体内に埋め込んで待つだけである。単純には円柱状の鋳型を用いれば筒状の組織体を得られ、板状の鋳型からはシート状の組織体を得られる。心臓弁など複雑な3次元形状の場合でも、設計の工夫によって作製が可能である。我々は

生体内組織形成術を用いて作製した心臓弁様組織体を「バイオバルブ」と名付けている。生体に4つある心臓弁のうち大動脈弁と肺動脈弁は共に、血管の内腔面に3枚の弁葉が半月状に張り付いたほぼ同様な構造をしている（図3）。そのため、基本的に共通した鋳型が大動脈弁と肺動脈弁の双方の作製に利用することができる。一方、僧帽弁は大動脈弁や肺動脈弁の3葉弁構造とは大きくことなり、前尖と後尖と呼ばれる2つの弁尖からなる二尖弁であり、その形状がカトリックの司教冠に似ているとして命名された。弁の先端からヒモ状の腱索が出て心室壁の乳頭筋とつながっている。残りの三尖弁は3枚の弁尖から構成されている以外は大きくは僧帽弁と似た構造をしている。現在これら4種類の心臓弁について形状と大きさ毎に鋳型を作製している。

バイオバルブの開発は2005年にわずか直径5mmの3葉弁形状の第1世代から開始した⁴⁾。当初は市販のシリコーン部材や切削加工した多数の亚克力部材を組み合わせ、非常に苦勞しながら鋳型を作製していた（図4）。その後、完全自己組織型⁵⁾やバルサルバ洞付随型⁶⁾など生体組織形状へ類似させる様に世代を進化させきたものの、設計加工の自由度の低さから形状に大きな制限を受け、年間1世代のバージョンアップがせいぜいであり、ビーグル犬での低圧系の肺動脈弁の移植の成功⁷⁾まで5年を要した。

そこで我々は医療研究機関における先駆けとして、2010年に3Dプリンターを導入した。現在加工精度に優れたProjet HD3000（3D Systems）と材料選択肢の広いObjet Eden260（Stratasys）を用途に応じて使い分

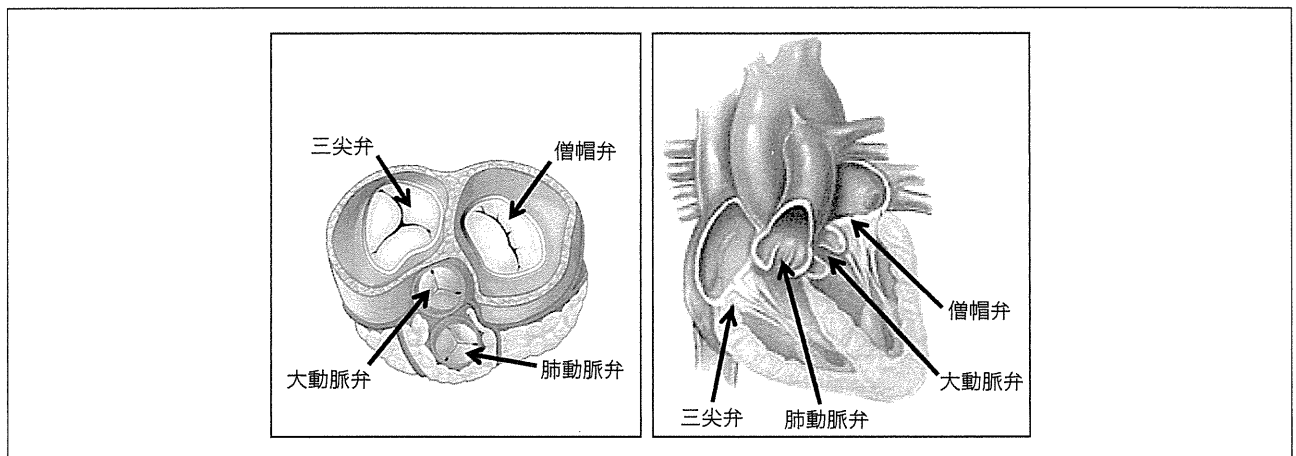


図3 心臓の縦方向（左）と横方向（右）の断面から見た4種類の心臓弁

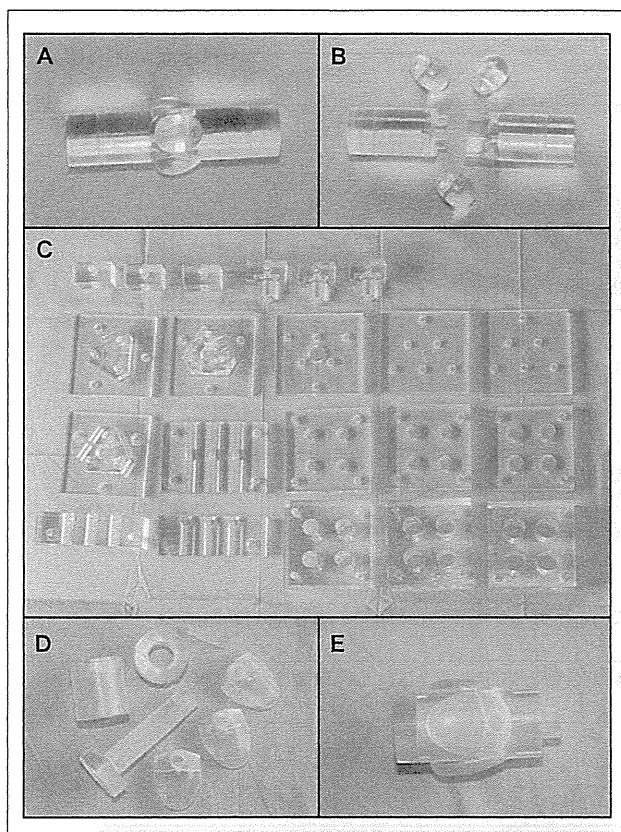


図4 初期型バイオバルブ心臓弁のシリコン製作用鋳型 (A) とそれに必要なパーツ (B)。全パーツを作製するために必要な全アクリル部材 (C)。各パーツ用の型は1点ずつアクリル板を切削研磨して作製した。3Dプリンターで作製したアクリル製パーツ (D) とそれを組み立てた最新型バイオバルブ心臓弁の作製用鋳型 (E)。

けながら鋳型作製に用いている。数ヶ月を要していた鋳型の作製が数時間に短縮されたことで、飛躍的に開発速度が増し、2011年には高血圧系でリスクの高い大動脈弁移植が大動物のヤギで可能なまでに技術レベルが向上している⁸⁾ (図4)。さらに2012年には「ステント」と呼ばれる血管拡張用の医療機器と鋳型を組み合わせ、皮下に埋め込むことで、自己組織とステントを強固に体内で一体化させたステント付バイオバルブの作製にも成功した (図5)⁹⁾。通常の外科手術を必要とせずに、足の血管に開けた穴から「カテーテル」と呼ばれるチューブを血管内に挿入して、血管の中から心臓弁手術が可能な「経カテーテル的心臓弁移植術(TAVI:transcatheter aortic valve implantation)」を可能にし、ヤギでの移植に成功している。さらに最近では、弁葉に腱索が一体化した完全自己組織からなる僧帽弁や三尖弁用のバイオバルブも開発している (図6)¹⁰⁾。

未だ動物実験による非臨床研究段階であるが、生体は皮下に鋳型を埋入しておくだけで、わずか1ヵ月間で移植に耐える組織体を自動的に作製する。それは現在の最新の技術と設備を駆使しても人工的には不可能である。鋳型を抜き取ることで得られる自己組織体は心臓弁の基本骨格構造を有しており、大動脈系への応用も可能である。移植後には早期に目的部位に応じた組織の再構築が速やかに起こり、再生へと促される。移植片が完全

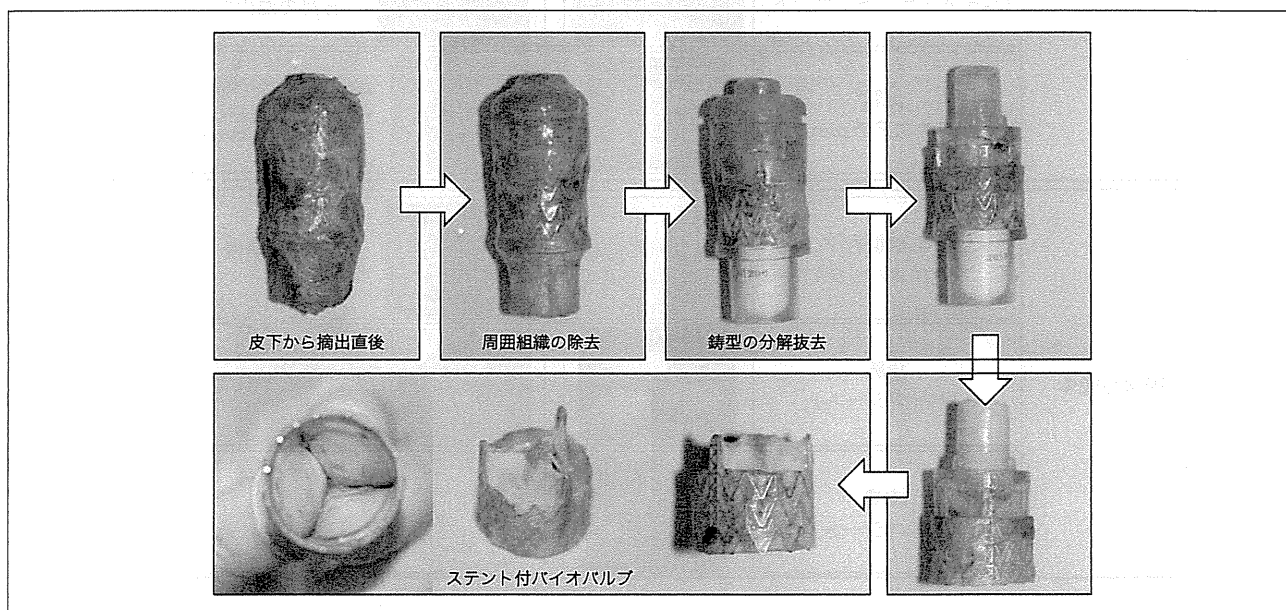


図5 3Dプリンターを用いて作製した鋳型を皮下組織から抽出し、周囲組織を除去した後、鋳型を段階的に分解抜去することによって、ステントと自己組織が体内で一体化して形成されたステント付バイオバルブが得られた (ステントは(株)グッドマンから提供)。

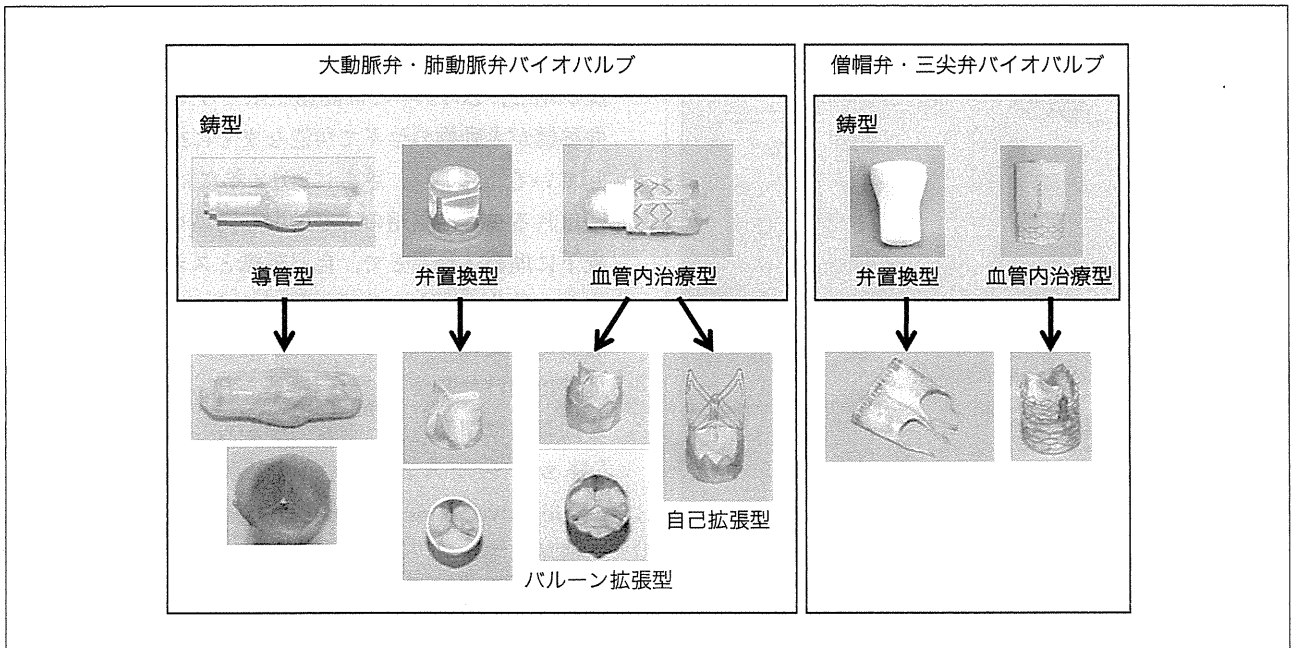


図6 3Dプリンターを用いて作製した各種心臓弁用の鋳型と動物体内で形成された多種類のバイオバルブ

		鋳型	組織作製・実施例
管状組織体	血管 (バイオチューブ)		 6年間の長期開存継続
	拡張型人工血管 (バイオステントグラフト)		 腹部大動脈内へのカテーテル留置と1カ月の血管再生
	気管 (バイオエアチューブ)		 移植後6週間で気管軟骨リングを連結したコラーゲン組織体が形成
膜状組織体	心修復材 (バイオパッチ)		 心筋欠損の修復 心膜の代用
	角膜 (バイオシート)		 移植後約1カ月で透明に
	皮膚 (バイオシート)		

図7 3Dプリンターを用いて開発中の生体内組織形成術による心臓弁以外の組織体作製例

に自己組織であるが故に、生体が本来有する治癒能力を利用するだけで拒絶や炎症などがなく簡単に組織を再生させることができる。血管（バイオチューブ）^{11),12)} から開始した研究は、心臓弁（バイオバルブ）、角膜（バイオシート）¹³⁾、気管（バイオエアーチューブ）¹⁴⁾ へと展開している。今後生体内組織形成術を用いた新たな再生医療が一般治療として普及することを期待している（図7）。

5. 今後の医療にもたらす展望

3Dプリンターは医療の世界に深く浸透しつつある。コンピューター断層撮影装置（CT）や磁気共鳴画像装置（MRI）の発展に伴って画像データの収集が容易になっている。これらをもとに、骨の大きさや形状を割り出し、チタンやリン酸カルシウムの粉末を固めて患者個人の人工骨を作るオーダーメイド医療が既に行われている。また、先天性の心疾患の術前シミュレーターとしての取り組みが行われている。疾患内容はバリエーションに富み、同じ疾患でも個体差が大きく、また心臓内部及び大血管の立体構造が複雑である上に、心疾患患者の血管走行は複雑なため、診断が難しい。また、手術も極めて難易度が高くなることから、術中死や後遺症が残るケースも少なくない。患者の心臓及び大血管の複雑な立体構造を術前に正確に把握することで、手術治療の成功率が高まることが期待されている。将来的には多種の細胞を任意に配置させることで移植可能な組織や臓器自体を3Dプリンターで構築させることも現実味を帯びてくるであろう。

3Dプリンター（光造形）の導入によって、生体内組織形成技術（体内造形）との2つの造形技術を融合化させることで、再生医療技術の開発が促進化された事例として「バイオバルブ」心臓弁について紹介した。3Dプリンターによって研究室が半工場的な製造機能を得ることができたことから、4種類あるすべての心臓弁の形状や大きさを自在に作り分けることが可能となり、用途別に十数種類のラインアップを揃えるまでに発展を遂げている。朝思いついた案が夕方までに具体化して製図できれば、3Dプリンターにセットして、印刷スタートボタンを押して帰るだけで翌朝には実物として姿を表す。これが現実の世界となっている。今後、試作段階での試行錯誤の回転促進によって開発がさらに加速することは間

違いない。また、我々が行っている組織体を作るための鋳型を作ることに加えて、人工臓器を作る、病変臓器の形状を再現する、さらに組織臓器までも作るなど、3Dプリンターの医療での活躍の場、方法は多種多様に広がりを見せて、益々身近で便利な存在となるであろう。

参考文献

- 1) 中山泰秀：“弁の再生”，再生医療叢書，第3巻循環器，第1版，日本再生医療学会，pp.127-148（2012）
- 2) 中山泰秀：“体内で作るバイオマテリアル”，化学工業，Vol.163,No.7,pp.35-41（2012）
- 3) 山南将志，中山泰秀：“もう一つの再生医療 - 生体内組織形成術による自家移植用循環器系組織体の開発”，循環器病研究の進歩，Vol.30,No.1,pp.53-61（2009）
- 4) K.Hayashida, K.Kanda, H.Yaku, J.Ando, Y.Nakayama, “Development of an in vivo tissue-engineered, autologous heart valve (the biovalve): preparation of a prototype model,” J Thorac Cardiovasc Surg, 134, pp.152-159（2007）
- 5) Y.Nakayama, M.Yamanami, Y.Yahata, T.Tajikawa, K.Ohba, T.Watanabe, K.Kanda, H.Yaku: “Preparation of a completely autologous trileaflet valve-shaped construct by in-body tissue architecture technology,” J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 91, pp.813-818（2009）
- 6) M.Yamanami, Y.Yahata, T.Tajikawa, K.Ohba, T.Watanabe, K.Kanda, H.Yaku, Y.Nakayama: “Preparation of in-vivo tissue-engineered valved conduit with the sinus of Valsalva (type IV biovalve),” J Artif Organs, 13, pp.106-112（2010）
- 7) M.Yamanami, Y.Yahata, M.Uechi, M.Fujiwara, H.Ishibashi-Ueda, K.Kanda, T.Watanabe, T.Tajikawa, K.Ohba, H.Yaku, Y.Nakayama, “Development of a completely autologous valved conduit with the sinus of Valsalva using in-body tissue architecture technology: a pilot study in pulmonary valve replacement in a beagle model,” Circulation, 122, S100-S106（2010）
- 8) Y.Takewa, M.Yamanami, Y.Kishimoto, M.Arakawa, K.Kanda, Y.Matsui, T.Oie, H.Ishibashi-Ueda, T.Tajikawa, K.Ohba, H.Yaku, Y.Taenaka, E.Tatsumi, Y.Nakayama, “In vivo evaluation of an in-body, tissue-engineered, completely autologous valved conduit (biovalve type VI) as an aortic valve in a goat model,” J Artif Organs, 16, pp.176-184（2013）
- 9) Y.Takewa, Y.Nakayama, M.Yamanami, Y.Kishimoto, M.Arakawa, K.Ohnuma, H.Sumikura, K.Kanda, Y.Matsui, Y.Taenaka, E.Tatsumi: “Successful implantation of a completely autologous aortic valve with a stent (biovalve stent) by transcatheter aortic valve implantation (TAVI),” Circulation, 126, A11009（2012）
- 10) Y.Nakayama, Y.Takewa, M.Uechi, K.Kanda, T.Tajikawa, T.Oie, M.Ono: “M. In body tissue-engineered heart valve (biovalve) architecture based on 3D printer molding,” Circulation, 128, A13742（2013）

- 11) Y.Nakayama, H.Ishibashi-Ueda, K.Takamizawa : "In vivo tissue-engineered small-caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (biotube)," Cell Transplant, 13, pp.439-449 (2004)
- 12) T.Watanabe, K.Kanda, M.Yamanami, H.Ishibashi-Ueda, H.Yaku, Y.Nakayama : "Long-term animal implantation study of biotube-autologous small-caliber vascular graft fabricated by in-body tissue architecture," J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 98, pp.120-126 (2011)
- 13) N.Takiyama, T.Mizuno, R.Iwai, M.Uechi, Y.Nakayama : "In-body tissue-engineered collagenous connective tissue membranes (biosheets) for potential corneal stromal substitution," J Tissue Eng Regen Med, in press (2014)
- 14) 古村 真, 佐竹亮介, 寺脇 幹, 小高哲郎, 小西健一郎, 鈴木啓介, 中山泰秀, 岩井良輔 : "生体内組織形成術を利用した自己組織代替組織気管 (バイオエアチューブ) : 開発コンセプトと試作," 人工臓器, 42, S-220 (2013)

In vivo evaluation of an in-body, tissue-engineered, completely autologous valved conduit (biovalve type VI) as an aortic valve in a goat model

Yoshiaki Takewa · Masashi Yamanami · Yuichiro Kishimoto · Mamoru Arakawa · Keiichi Kanda · Yuichi Matsui · Tomonori Oie · Hatsue Ishibashi-Ueda · Tsutomu Tajikawa · Kenkichi Ohba · Hitoshi Yaku · Yoshiyuki Taenaka · Eisuke Tatsumi · Yasuhide Nakayama

Received: 14 February 2012 / Accepted: 25 November 2012 / Published online: 20 December 2012
© The Japanese Society for Artificial Organs 2012

Abstract Using simple, safe, and economical in-body tissue engineering, autologous valved conduits (biovalves) with the sinus of Valsalva and without any artificial support materials were developed in animal recipients' bodies. In this study, the feasibility of the biovalve as an aortic valve was evaluated in a goat model. Biovalves were prepared by 2-month embedding of the molds, assembled using two types of specially designed plastic rods, in the dorsal subcutaneous spaces of goats. One rod had three projections, resembling the protrusions of the sinus of Valsalva.

Completely autologous connective tissue biovalves (type VI) with three leaflets in the inner side of the conduit with the sinus of Valsalva were obtained after removing the molds from both terminals of the harvested implants with complete encapsulation. The biovalve leaflets had appropriate strength and elastic characteristics similar to those of native aortic valves; thus, a robust conduit was formed. Tight valvular coaptation and a sufficient open orifice area were observed in vitro. Biovalves ($n = 3$) were implanted in the specially designed apico-aortic bypass for 2 months as a pilot study. Postoperative echocardiography showed smooth movement of the leaflets with little regurgitation under systemic circulation (2.6 ± 1.1 l/min). α -SMA-positive cells appeared significantly with rich angiogenesis in the conduit and expanded toward the leaflet tip. At the sinus portions, marked elastic fibers were formed. The luminal surface was covered with thin pseudointima without thrombus formation. Completely autologous biovalves with robust and elastic characteristics satisfied the higher requirements of the systemic circulation in goats for 2 months with the potential for valvular tissue regeneration.

Y. Takewa (✉) · Y. Kishimoto · M. Arakawa · Y. Taenaka · E. Tatsumi

Department of Artificial Organs, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan
e-mail: takewa@ri.ncvc.go.jp

E. Tatsumi
e-mail: tatsumi@ri.ncvc.go.jp

M. Yamanami · Y. Matsui · T. Oie · Y. Nakayama (✉)
Division of Medical Engineering and Materials, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan
e-mail: nakayama@ri.ncvc.go.jp

M. Yamanami · K. Kanda · H. Yaku
Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

Y. Matsui · T. Tajikawa · K. Ohba
Department of Mechanical and Systems Engineering, Kansai University, Osaka, Japan

T. Oie
Shinkan Kogyo Co., Osaka, Japan

H. Ishibashi-Ueda
Department of Pathology, National Cerebral and Cardiovascular Center Hospital, Osaka, Japan

Keywords In vivo tissue engineering · Heart valve · Autologous tissue · Aortic valve · Systemic circulation

Introduction

Prosthetic valve replacement is a common treatment for severe valvular heart disease. There is a tendency to select bioprosthetic valves over mechanical valves. A major advantage of using bioprosthetic devices is that administration of anticoagulants such as warfarin is not required; however, disadvantages include time-related structural deterioration and pathogenicity (e.g., mad cow disease) [1].

Bioprosthetic devices are usually heterologous (made of bovine pericardia or porcine valves) and require chemical treatment to reduce immunogenicity, which could accelerate their degeneration, including calcification and/or time-related functional failure. Advances in biotechnology and tissue engineering may provide promising solutions to overcome the limitations of current heart valve substitutes [2–4]. Recently, autologous bioprostheses with enhanced maturation characteristics such as anticoagulation, self-repair, tissue regeneration, and growth adaptability have been developed using *in vitro* tissue engineering technology. Some investigators have successfully implanted *in vitro* tissue-engineered heart valves (TEHV) in animals and humans by using either decellularized natural tissues [3] or biodegradable synthetic polymers as scaffolds [2]. More recently, allogeneic TEHVs were successfully used for aortic root replacement in lambs [5].

To develop autologous prosthetic tissues that can endure high pressures, we have been focusing on the use of in-body tissue architecture technology [6–9], which is a novel concept in regenerative medicine based on the phenomenon of tissue encapsulation of foreign materials in living bodies. This technology involves the use of living bodies as a reactor and is simple, safe, and cost-effective. Since 2007, we have used in-body tissue architecture technology to develop a series of autologous trileaflet heart valves, called biovalves [10–12]. Last year, a type V biovalve, made of tissues completely autologous with the sinus of Valsalva, was shown to successfully function as an allogeneic conduit valve in the pulmonary valve position for up to 3 months in beagle models [13]. Recently, we have developed a type VI biovalve that did not need pretreatment before implantation by altering the design concept of the mold used to prepare the biovalves so that the trileaflet was obtained in the open form (unpublished data). In this study, the possibility of the type VI biovalve as an aortic valve was evaluated by implantation at the apico-aortic bypass in a goat model as a pilot study.

Methods

Preparation of biovalves

All animals received care according to the Principles of Laboratory Animal Care (formulated by the National Institutes of Health, publication no. 56-23, received 1985), and the research protocol (no. 22-2-4) was approved by the ethics committee of the National Cerebral and Cardiovascular Center.

Three goats (aged 1–2 years; body weight 40–50 kg) were used in this study. A specially designed concave acrylic rod (diameter 16 mm; length 35 mm; Fig. 1a) and convex silicone rod (diameter 16 mm; length 37 mm;

Fig. 1a) were assembled with a small 0.5-mm aperture to prepare a cylindrical mold for the biovalve organization (Fig. 1b). The mold was designed to separate the leaflets from each other in the open form. The concave-shaped rod had three removable projections that resembled the three protrusions of the sinus of Valsalva. We placed eight molds into the dorsal subcutaneous pouches of each of the three goats (a total of 24 biovalves) under anesthesia that was induced with 10 mg/kg of ketamine and maintained with 1–3 % isoflurane. After 2 months had elapsed (Fig. 1c), we harvested the implants, which were completely encapsulated with robust connective tissue (Fig. 1d). After treatment with 0.6 % glutaraldehyde for 10 min, the rods were removed from both ends of the developed tubular tissue; furthermore, the type VI biovalves with three protrusions resembling the sinus of Valsalva were well formed. Three membranous leaflets from the inside of the conduit were obtained separately (Fig. 1d). Three out of 24 biovalves were used for transplantation, and the rest were used for evaluation of valve motion characteristics ($n = 6$), mechanical properties ($n = 9$), and histological examination ($n = 6$).

In vitro valve motion

The motion of the biovalve leaflets was recorded using a video camera at a frequency of 20 frames per second and was analyzed in conjunction with the circuit flow pattern by using a modified Windkessel pulsatile flow circuit model used in our previous study [14] (working fluid 0.9 % saline; pulsatile rate 62 bpm; flow rate 627 ml/min). The Reynolds and Womersley numbers were 956–1195 and 10.3–11.7, respectively, and were calculated under heart rates ranging from 70 to 90. We used the cardiac output averaged bypass flow, which is generally 80 ml/min per body weight (kg). The upper pressure was set at 120–150 mmHg and lower pressure at 50–80 mmHg as the systolic and diastolic aortic pressure.

Mechanical properties

Biovalves and native aortic valves ($n = 3$) were used as samples. The native aortic valve was simultaneously obtained from each goat when the 2-month implanted biovalve was harvested. The mechanical properties of the leaflets and conduits were measured using a tensile tester. The samples were cut in a circumferential direction and opened. Tissue specimens, 7 × 7 mm, were tested in humid conditions under a tissue extension rate of 3 mm/min. The ultimate tensile strength and elongation at breaking, indicative of tissue strength and tissue extensibility, respectively, were obtained from the stress-strain curves. The modulus, indicative of tissue stiffness, was calculated as the slope of the linear part of the stress-strain curves.