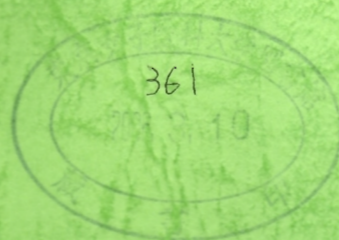


組織工学による人工腱索開発のための基礎的研究

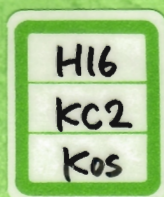
(課題番号 15591500)

平成 15、16 年度科学研究費補助金(基盤研究C 2)
研究成果報告書



平成 17 年 12 月

研究代表者 小坂由道
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)



組織工学による人工腱索開発のための基礎的研究

(課題番号 15591500)

平成 15、16 年度科学研究費補助金(基盤研究C 2)
研究成果報告書

平成 17 年 12 月

研究代表者 小坂由道
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)

目次

はしがき	2
1. 研究課題名・研究組織・研究経費	3
2. 研究発表	4
3. 研究成果	
1. 研究計画と成果の概要	11
2. 肺動脈弁のティッシュエンジニアリング (羊)	16
3. 自己細胞を使用した 肺動脈弁のティッシュエンジニアリング (羊)	20
4. 細胞の起源の違いによる ティッシュエンジニアリング肺動脈弁の組織学的検討 (羊)	25
5. 主肺動脈のティッシュエンジニアリング (羊)	31
6. 大動脈のティッシュエンジニアリング (羊)	42
7. 下大静脈のティッシュエンジニアリング (犬)	50
8. 細胞の凍結保存法の検討	61
9. 臨床応用例の呈示	68
10. ティッシュエンジニアリングによる肺動脈パッチの作成	69
11. 臨床応用例の呈示	75
4. 参考文献	
1. 血管再生—現状と展望	78
2. 血管再生と細胞工学	84
3. 高分子ポリマーを用いた再生血管の開発	91
4. 患者本人の細胞から作る再生血管	95
5. Current Status of Tissue Engineering for Cardiovascular Structure	98
Tissue Engineered Heart Valves: Autologous Cell Seeding On Biodegradable Polymer Scaffold	103
6. ティッシュエンジニアリングによる心臓弁、血管再生	108
7. 心臓血管外科の再生医工学	113
8. 再生医学の基礎的、臨床的研究の最新の進歩	121
9. 心臓血管外科における再生医療	126

再生医工学(Tissue Engineering)は1980年代後半に、臓器移植医療における donor 不足が深刻化している米国で提唱された新しい概念で、donor を必要としない人工臓器の開発途上で提唱された。工学(Engineering Science)と生物学(Biological Science)を伴って応用し、生体吸収性ポリマーを足場として培養細胞から小組織を in vitro で生成しようという新しい学際的研究分野である。再生医工学という言葉には二つの側面がある。臨床医学での応用をめざした再生医療、すなわち臓器移植、人工臓器置換に替わるいわゆる‘Tissue Engineering’と、もうひとつは生体再生のメカニズムを研究する発生工学、分子生物学を包含する再生生物学である。後者は主に基礎的研究の色彩が強く、MD よりむしろ PhD による「いもりの手足は再生するのに何故ヒトの手足は再生しないのか？」の研究である。二つの側面が有機的に発展することが最終的に全体の医療を向上させることは言うまでもない。

すでに Tissue Engineering という言葉は米国では広く認知されるに至っており、現在全世界に爆発的に普及し、さまざまな研究がなされている。Medline を使用して“tissue engineering”という keyword で論文を検索すると、84-90 年で計 9 編だった論文数が、91-95 年間には計 79 編と増加し、さらに 96-97 年で計 93 編、98 年には一年で 115 編、99 年には 216 編、2003 年には 807 編と急増している。本邦では当初、「組織工学」と直訳されていたが、その言葉のイメージがなじまず、最近では「再生医療」、「再生医工学」の言葉のほうが普及しているようである。皮膚、軟骨などはすでに米国において臨床応用もなされ、本邦においても一部の施設では施行可能となっている。また、工学系では様々な吸収速度を有する生分解性-高分子ポリマーの開発も同時に進行しており、さらに細かい生分解速度の調節、強度の調節は多種類のポリマーの組み合わせによって制御可能となっている。

心臓外科領域における理想的な補填材料は未だ発展途上にあり、多くの外科医は移植直後から生体適合性を有し、かつ移植後に再手術が不要で成長の可能性を有する生きた補填物を模索している。組織工学された組織の最大の利点は細胞が細胞外間質を完成させた時点で足場としてのポリマーが完全に生分解され、移植後長期的に異物が全く残存しない点にある。つまり、組織工学で作成された人工腱索は、先天性心疾患の外科治療において補填物を使用する際、患児の成長という因子を考慮すると、理想的な生体材料といえる。

2000 年 5 月に本邦初の臨床一例目の応用がなされ良好な結果が得られているが、過去 2 年間の基礎研究をふまえて、この分野のさらなる発展を願い、努力を続けていきたい。

1. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

組織工学による人工腱索開発のための基礎的研究

(課題番号 15591500)

【研究組織】

研究代表者	:小坂由道(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座	助手)
研究分担者	:黒澤博身(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座	教授)
	青木 満(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座	講師)
	新岡俊治(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座	助教授)

【研究経費】

平成 15 年度 1,800 千円

平成 16 年度 1,700 千円

計 3,500 千円

1. 研究発表

【学会誌など】

1. Shin'oka T [Clinical results of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells] Nippon Geka Gakkai Zasshi. 2004 Aug;105(8):459-63. Japanese.
2. Isomatsu Y, Shin'oka T, Aoki M, Terada M, Takeuchi T, Hoshino S, Takanashi Y, Imai Y, Kurosawa H Establishing Right Ventricle - Pulmonary Artery Continuity by Autologous Tissue: An Alternative Approach for Prosthetic Conduit Repair Ann Thorac Surg 2004; 78: 178-180
3. Shin'oka T Clinical results of tissue engineered vascular autografts Yonsei Medical Journal 2004; 45: 73-74
4. Sakamoto T, Kurosawa H, Shin'oka T, Aoki M, Isomatsu Y The influence of pH strategy on cerebral and collateral circulation during hypothermic cardiopulmonary bypass in cyanotic patients with heart disease: Results of a randomized trial and real-time monitoring J Thorac Cardiovasc Surgery 2004; 127:12-19
5. 新岡俊治、黒澤博身 「ラット肺に対する経肺動脈 HGF 遺伝子導入による新生血管の検討」小野論文に対する comment 心臓 2004
6. 松村剛毅、新岡俊治 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例 炎症と免疫 12:154-158, 2004
7. Hibino N, Shin'oka T, Kurosawa H Long-Term Histologic Findings in Pulmonary Arteries Reconstructed with Autologous Pericardium The New England Journal of Medicine 348:865-867, 2003
8. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience Biomaterials24: 2303-2308, 2003
9. Matsumura G, Sachiko Miyagawa-Tomita, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H First

- Evidence That Bone Marrow Cells Contribute to the Construction of Tissue-Engineered Vascular Autografts In Vivo *Circulation* 108: 1729-1734, 2003
10. Isomatsu, Y, Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Konuma T, Nagatsu M, Kurosawa H, Extracardiac total cavopulmonary connection using a tissue-engineered graft *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:1958-1962, 2003
 11. Matsumura G, Sachiko Miyagawa-Tomita, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H First Evidence That Bone Marrow Cells Contribute to the Construction of Tissue-Engineered Vascular Autografts In Vivo *Circulation* 2003; 108:1729-1734
 12. Matsumura G, Shin'oka Successful Application of Tissue Engineered Vascular Autografts; Clinical Experience. *Biomaterials* 2003 ; 24:2303-2308
 13. Shin'oka T Tissue Engineered Heart Valves: Autologous Cell Seeding on Biodegradable Polymer Scaffold *Artificial Organ* 2002; 26:522-6
 14. Naito Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Kashiwagi, Konuma T, Murata A, Miyake T, Kurosawa H. A Successful Clinical Application of Tissue Engineered Graft for Extracardiac Fontan Operation *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2002; 125, 419-420
 15. T. Hiramatsu, Y. Imai, H. Kurosawa, Y. Takanashi, M. Aoki, T. Shin'oka, M. Nakazawa Effects of dilutional and modified ultrafiltration in plasma endothelin-1 and pulmonary vascular resistance after the fontan procedure *Ann Thorac Surg* 2002; 73:862-5
 16. T. Hiramatsu, Y. Imai, H. Kurosawa, Y. Takanashi, M. Aoki, T. Shin'oka, T. Sakamoto Midterm results of surgical treatment of systemic ventricular outflow obstruction in Fontan patients *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 855-861
 17. Hiramatsu T, Okamura T, Imai Y, Kurosawa H, Aoki M, Shin'oka T, Takanashi Y Effects of Autologous Platelet Concentrate Reinfusion After Open Heart Surgery in Patients With Congenital Heart Disease *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1282-5
 18. Kashiwagi J, Imai Y, Aoki M, Shin'oka T, Hagino I, Nakazawa M An arterial switch operation for a concordant crisscross heart with the complete transposition of

- the great arteries *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2002; 124:176-8
19. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New England Journal of Medicine*. 2001;344:532-533.
 20. Ishida T, Imai Y, Hoshino S, Hiramatsu T, Seo K, Aoki M, Shin'oka S. [Case report of CABG for progressive coronary artery stenosis after 22-year history of Kawasaki disease]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 2001;54:859-862.
 21. Nemoto S, Aoki M, Dehua C, Imai Y. Effects of carnitine on cardiac function after cardioplegic ischemia in neonatal rabbit hearts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;71:254-259.
 22. Sakamoto T, Aoki M, Imai Y, Nemoto S. Carnitine affects fatty acid metabolism after cardioplegic arrest in neonatal rabbit hearts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;71:648-653.
 23. Isomatsu Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Sato K. Coarctation of the aorta and ventricular septal defect: should we perform a single-stage repair? [see comments.]. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2001;122:524-528.
 24. Watanabe M, Shin'oka T, Tohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, Kosaka Y, Ishida T, Imai Y, Yamakawa M, Ikada Y, Morita S. Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Engineering*. 2001;7:429-439.
 25. Isomatsu Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Iwata Y. Surgical intervention for anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery: the Tokyo experience. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2001;121:792-797.
 26. Momma K, Takao A, Matsuoka R, Imai Y, Muto A, Osawa M, Takayama M. Tetralogy of Fallot associated with chromosome 22q11.2 deletion in adolescents and young adults. *Genetics in Medicine*. 2001;3:56-60.
 27. Fujimaki W, Iwashima M, Yagi J, Zhang H, Yagi H, Seo K, Imai Y, Imanishi K, Uchiyama T. Functional uncoupling of T-cell receptor engagement and Lck

- activation in anergic human thymic CD4+ T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:17455-17460.
28. Hibino N, Shin'oka T, Matsumura G, Watanabe M, Toyama S, Imai Y. [Cryopreservation of vascular mixed cell for tissue engineering in cardiovascular surgery]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 2001;54:479-484.
29. Shinoka T, Imai Y, Matsumura G. [Current status of tissue engineering for therapeutic use]. *Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine*. 2001;59:1389-1399.
30. Hibino N, Imai Y, Aoki M, Shin'oka T, Hiramatsu T. Double switch operation for superior-inferior ventricles. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;72:2119-2121.
31. Imai Y, Seo K, Aoki M, Shin'oka T, Hiramatsu K, Ohta A. Double-Switch operation for congenitally corrected transposition. *Seminars in Thoracic & Cardiovascular Surgery. Pediatric Cardiac Surgery Annual*. 2001;4:16-33.

【学会発表等】

- 1.日比野成俊、今井康晴、新岡俊治、瀬尾和宏、青木 満、渡辺 学、小坂由道、松村剛毅、山川光徳、森田真一郎 ティッシュエンジニアリング技術を用いた末梢肺動脈再建術 第31回日本心臓血管外科学会(平成13年2月)
- 2.新岡俊治 培養自己細胞を使用したティッシュエンジニアリングによる再生血管移植 第6回関東甲信越セロトニン研究会 学術集会(招請講演)(平成13年2月)
- 3.Naito Y, Shin'oka, Imai Y The Expansion of Human Bone Marrow Derived Cells with Combinations of Growth Factor ISACB 8th(International Society for Applied Cardiovascular Biology) Biennial meeting, St. Gallen, Switzerland 2002
- 4.Watanabe M, Shin'oka, Imai Y Tissue Engineered Vascular Autograft - Inferior Vena Cava Replacement Study in a Dog Model ISACB 8th (International Society for Applied Cardiovascular Biology) St. Gallen, Switzerland 2002
- 5.日比野成俊、黒澤博身、青木 満、新岡俊治、磯松幸尚、森島重弘、坂本貴彦、石山雅邦、岩田祐輔、山本 昇、松村剛毅 大血管転位症に対するJatene術後遠隔期に生じたARに対してfree style valveによる弁置換を行った2例 日本循環器学会関東甲信越地方会 第184回学術集会, 2002
- 6.Hibino N, Shin'oka T, Watanabe M, Matsumura G, Konuma T, Kurosawa H Tissue Engineered vascular graft: Effects of the Cell Source on the Creation of the Tissue Engineered vessel 5th Annual Meeting of the Tissue Engineering Society international , 2002

【著書】

1. 新岡俊治 先天性心臓病 最新版 家庭医学大全科 1008-1012, 2004
2. 新岡俊治 1. Tissue Engineering 第11章 医療材料、治療機器の進歩 先端医療シリーズ12：心臓病「心臓病-その最新医療と21世紀への展望」 357-363 先端医療技術研究所 2001
3. 新岡俊治 心臓弁、血管の再生「化学フロンティア③」再生医療工学 筏 義人編、化学同人、2001
4. 新岡俊治 第II部再生組織 第5章 胸・腹部 5. 血管「再生医療工学の最先端」 153-158 シーエムシー出版、2002
5. 新岡俊治 心臓血管外科における再生医療 「Annual Review 循環器」271-277 2002 中外医学社 2002
6. 新岡俊治 バイオ医人工血管 現代化学増刊「再生医学・再生医療」201-206 東京化学同人 2002
7. 新岡俊治 ティッシュエンジニアリング 目で見える循環器病フロンティア ベーシック&クリニカルサイエンス 128-137 メジカルビュー社 2002
8. 新岡俊治 再生弁 「生活習慣と遺伝子疾患」 267-273 メディカルレビュー刊 2002

【総説】

1. 小坂由道、松村剛毅、新岡俊治 血管再生医学の臨床応用 Medical View Point 25:4, 2004
2. 小坂由道、新岡俊治 自己骨髄細胞を用いた再生血管移植 医学のあゆみ 210: 215-216
3. 松村剛毅、新岡俊治 弁の再生医療 現代医療 36:23-27,2004
4. 日比野成俊、新岡俊治 バイオ人工血管 バイオマテリアル 2004
5. 市原有起、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身 生体弁の tissue engineering Cardiovascular Med-Surg 7: 317-320, 2004
6. 新岡俊治 骨髄細胞を使用する再生血管移植の臨床 外科学会雑誌 105: 459-463, 2004
7. 内藤祐次、新岡俊治、松村剛毅 生体吸収性ポリマーを使用する再生血管の臨床応用 高分子 53:153-155, 2004
8. 松村剛毅、新岡俊治 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例 炎症と免疫

12:154-158,2004

9. 新岡俊治、今井康晴、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、日比野成俊 再生血管移植の基礎 整形・災害外科 44:161-167, 2001
10. 新岡俊治、今井康晴、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、日比野成俊、村田明 再生血管の臨床応用 外科 63: 304-310, 2001
11. 新岡俊治、今井康晴 心臓血管外科の再生医工学 分子心血管病 2:17-24, 2001

【研究成果】

1. 研究計画と成果の概要

はじめに

ここでは本研究の全貌の大まかな理解のために、研究計画および成果の概要を解説する。同時にこの研究を始めるにあたっての背景、社会的意義や位置づけについても明らかにしておきたい。これらにより以下の研究成果のより深い理解が得られると考える。

研究の背景

心臓外科領域における理想的な補填材料は未だ発展途上にあり、多くの外科医は移植直後から生体適合性を有し、かつ移植後に再手術が不要で成長の可能性を有する生きた補填物を模索している。組織工学(Tissue Engineering)は1980年代後半に、臓器移植医療における donor 不足が深刻化している米国で提唱された新しい概念で、donor を必要としない人工臓器の開発途上で提唱された。工学(Engineering Science)と生物学(Biological Science)を伴に応用し、生体吸収性ポリマーを足場として培養細胞から小組織を in vitro で生成しようという新しい学際的研究分野である。すでに、皮下細胞(Dermal Fibroblasts)を用いた Tissue Engineered skin は実用段階であり、臨床において数百例の移植手術が行われている。その他、肝組織、骨組織、軟骨組織、尿管組織、心臓弁膜組織、血管組織、等の各分野において活発な研究が現在進行している。また、様々な吸収速度を有する生分解性-高分子ポリマーの開発も同時に進行しており、さらに細かい生分解速度の調節、強度の調節は多種類のポリマーの組み合わせによって制御可能となっている。組織工学された組織の最大の利点は細胞が細胞外間質を完成させた時点で足場としてのポリマーが完全に生分解され、移植後長期的に異物が全く残存しない点にある。

研究の目的

心臓外科領域における理想的な補填材料は未だ発展途上にあり、多くの外科医は移植直後から生体適合性を有し、かつ移植後に再手術が不要で成長の可能性を有する生きた補填物を模索している。組織工学(Tissue Engineering)は1980年代後半に、臓器移植医療における donor 不足が深刻化している米国で提唱された新しい概念で、donor を必要としない人工臓器の開発途上で提唱された。工学(Engineering Science)と生物学(Biological Science)を伴に応用し、

生体吸収性ポリマーを足場として培養細胞から小組織を *in vitro* で生成しようという新しい学際的研究分野である。すでに、皮下細胞(Dermal Fibroblasts)を用いた Tissue Engineered skin は実用段階であり、臨床において数百例の移植手術が行われている。その他、骨組織、軟骨組織、尿管組織、心臓弁膜組織、血管組織、等の各分野において活発な研究が現在進行している。また、様々な吸収速度を有する生分解性-高分子ポリマーの開発も同時に進行しており、さらに細かい生分解速度の調節、強度の調節は多種類のポリマーの組み合わせによって制御可能となっている。組織工学された組織の最大の利点は細胞が細胞外間質を完成させた時点で足場としてのポリマーが完全に生分解され、移植後長期的に異物が全く残存しない点にある。

先天性心疾患に対する外科領域において、心臓弁の構築、再建が必要な症例は多い(エプシュタイン奇形、房室弁逆流症、等)。現在使用されているのは、ゴアテックスあるいは自己心膜等であるが、それぞれ問題点を有している。ゴアテックスは表面に内皮化がおこらず、さらに間質の石灰化、高価格、等に問題が残っている。さらに生きた細胞が存在しないため成長の可能性は皆無である。自己心膜に関しては供給に限界があり、十分な量が確保できないことが多い。

本研究の目的は、組織工学の手法によりヒト血管壁細胞または骨髄細胞を用いて臨床応用可能な腱索を作成し、上記の補填材料の問題点を解決することである。ヒト細胞を用いたこの分野での研究は過去になく、ヒト細胞の生分解性ポリマーへの接着、ポリマー上での分裂増殖能の研究は不可欠と思われる。

組織工学では体内で徐々に分解吸収される素材を細胞の足場として用い、細胞が細胞間質蛋白質を産生した段階で吸収消失するため、組織が完成した段階においては組織内に異物は残存しない。現在、手術野における細胞播種方法も同時に研究し、細胞培養期間の短縮を計っている。この方法は従来の組織工学の手法から *in vitro* での細胞培養の課程を省略可能で、より簡便、より安価に施行可能である。また、血管壁細胞から弁膜組織という類似の組織を作成するのにほぼ同一の起源の細胞を用いる点も組織構築にとって有利である。本法では移植細胞の脱分化、再分化は必要ないため、より迅速な組織の再構築が期待でき、ひいては弁膜組織の成長を達成できる可能性が大きい。また、従来の補填物使用による手術に比しても安価に実施でき、自己組織のため拒絶反応も存在しない。

この研究の独創的な点

心臓外科領域において、生体にとって異物となる補填物を使用した修復法を要する症例は比較的多数存在し、移植後遠隔期には生体の治癒機転として擬内

膜形成や内皮細胞被覆によって、大多数の症例においては生体に適合し問題を残さない。しかし、これら異物は移植直後から血流に曝され異物表面が直接血液に面するため、前記の治癒機転が働くまでは、異物表面の血栓形成、易感染性等、重大な合併症を発症する可能性を秘めている。このため患者は術後急性期に抗凝固療法、抗生物質の投与が必要となる。特に人工弁置換術をうけた患者は生涯にわたる抗凝固療法を継続しなければならず、morbidityを高めている。さらに、異物は生体内に永続的にとどまり、吸収、成長の可能性は皆無である。これら生体にとっての欠点を克服するため、組織工学では体内で徐々に分解吸収される素材を細胞の足場として用い、細胞が細胞間質蛋白質を産生した段階で吸収消失するため、組織が完成した段階においては組織内に異物は残存しない。この点で本法は移植細胞の脱分化、再分化、組織の再構築が期待でき、ひいては組織の成長を達成できる。また、従来の補填物使用による手術に比しても安価に実施でき、自己組織のため拒絶反応も存在しない。

国内外の関連する研究の中での当研究の位置づけ

生分解性ポリマーを応用した組織工学による弁膜組織研究は国内外を通じて皆無である。米国において同様の手法を用いた人工皮膚研究は散見される。心臓血管領域での組織工学は今後本邦においても急速に普及していくものと考えられる。脳外科領域において同様の方法による人工硬膜の作成、臨床治験が京都大学において開始されている。

(着想の経緯)

小児心臓外科領域に用いられる補填材料に求められる一つの理想として成長性が挙げられる。近年、再建術式を考慮する上で将来の再狭窄を回避すべく様々な工夫がなされてきたが、低体重時ではそれも限界がある。生きた組織として自己心膜等も補填材料として用いられているが、成長性に関しては未だ検証されておらず、neo-intima 中に遠隔期の内皮細胞も認められていない。小児における理想的なパッチあるいは弁組織等が存在すれば患児の成長とそのときどきの血行動態にあわせて、適応可能で心機能形成に有利であるとともに手術の適応、可能性がさらに拡大すると考えられる。また、成人の弁膜症例においては、現在の人工弁置換術では患者は生涯、抗凝固剤の投与を必要とし、たえず出血、血栓症の合併症の危険に曝されている。弁組織の作成が自己細胞から成されれば心臓外科領域においては画期的な治療法となりうる。

研究計画

平成 15 年度は基礎的研究を主に施行し、平成 16 年度に臨床応用をめざした。

1. 基礎的研究

〈in vivo 実験〉動物実験による至適ポリマー、至適細胞数、至適培養期間の探究及び選定を行う。

実験動物として子犬を用い、大腿静脈を清潔化に採取し自己細胞の起源とする。通常の細胞培養手法を用いて単離された細胞の大量生産を行う。十分な細胞数を得た後、生分解性ポリマー（3 x 3 cm）に in vitro で播種しポリマー上での培養を約一週間継続する。その後、細胞を採取した同一の動物に対して移植手術を行う。移植前日にポリマー上の細胞に対して蛍光色素を用いた細胞の追跡用マーキングを行い播種された細胞と自己細胞との鑑別を試みる。移植 3-12 ヶ月後に作成された組織に対して生化学的、生力学的、免疫組織学的検討を行う。生化学検査として、組織中コラーゲン、エラスチン、カルシウム濃度の測定を行い、インストロン張力検査機を用いて作成された組織の最大張力を測定し自己の同じ部位の組織と比較検討する。組織学的には免疫染色の手法を用いて内皮細胞の指標である第八因子を染色すると共に細胞間隙の間質蛋白質を染色し自己組織と比較検討する。実験モデルとして右心系モデル（右心室肺動脈導管）と左心系モデル（腹部動脈置換）を用い低圧系、高圧系における組織工学された組織中の細胞の挙動（細胞間質蛋白合成能）を研究する。同種細胞 (allogenic) は拒絶反応の因子を排除できないため、細胞は全て自己 (autologous) 細胞を用いる。

〈ヒト細胞の in vitro 実験〉

ヒト静脈片より採取した平滑筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞を用いてポリマー上での増殖能、ポリマーへの接着性、成長因子の影響等の分子生物学的研究を in vitro で行う。

2. 臨床応用

〈自己細胞を用いた組織工学の方法〉

心臓カテーテル検査時、または初回手術時、皮膚小切開より約 5 mm 長の末梢静脈片を完全清潔下に採取し、直ちに組織培養液中に浸漬し、細胞培養室にて simple explant 法を用いて細胞単離を行う。新生児例では臍帯静脈片も細胞源となる。細胞培養液は 10% 胎仔牛血清 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 及び 1% GPS (29.2 mg/mL L-glutamine, 10,000 units/mL penicillin G sodium, and 10,000 g/mL streptomycin, GIBCO BRL-Life Technologies, grand island, NY) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO

BRL-Life Technologies, grand island, NY) を使用し、2-3日毎に培養液の交換を清潔下に行う。培養フラスコ内での線維芽細胞は分裂、増殖を繰り返し、細胞数は指数関数的に増加する。予備実験より線維芽細胞の doubling time は 24-48 時間で、 10×10^6 個の細胞を獲得するためには約 6 週間を要する。この間も上記の培養液を使用し 2-3日毎に培養液の交換を清潔下に行う。生分解性ポリマーは、メッシュ状 (porosity=95% air) の PGA(poly-glycolic acid) をシート状の polyglactin で補強したものを使用する。厚さは約 1mm で生体内での分解は約 8-10 週で完結するようデザインされている。播種する細胞数は 1 cm^2 あたり約 100 万個とする。ポリマー上に播種された細胞のうち約 50% の細胞がポリマー繊維に接着し、さらに培養を続けるとポリマー上でも分解、増殖、細胞間質蛋白の合成を始める。約 1 週間で confluent の状態となる。ポリマー上での細胞培養 7-10 日後に細胞/ポリマー構成物を開心術時にパッチあるいは導管として使用する。術後約 1 ヶ月後に、心臓カテーテル、造影検査、心臓超音波検査を行いフォローアップは 6 ヶ月毎に心臓超音波検査を用いて形態学的検索及び内膜過形成の有無等を経過観察する。術後遠隔期にも心臓カテーテル造影検査を施行する。

3

研究成果と参考論文

参考論文としては臨床家として研究者としての考えを示せるものを引用するようにつとめ、臨床で現在何が問題であるか、方向性を示した。さらに、我々循環器科臨床医が、日常的に遭遇する症例、あるいは高度医療を必要とする症例の治療法について考察する際に参考となるような論文を列記した。

まとめ

平成 15 年度はおもに、ヒト細胞培養の技術的な手法を確立し、平成 16 年度は動物実験では細胞-ポリマーの人工腱索移植を犬モデルにて施行した。本研究費により十分な研究成果が得られ、結果は前述の学会で発表した。さらに当科では、研究成果を基に 1999 年 4 月には東京女子医大倫理委員会での是認も得られ、2000 年 5 月に臨床応用第一例目が施行され、良好な血管が得られている。今後もさらに臨床例を積み重ねて検討を加えて報告する。臨床例は現時点で 47 例となり、現在経過観察中であるが、経過は良好である。しかしながら、腱索に関しては、未だ張力に問題点があり、基礎実験を継続する必要があると考える。