

バイオリアクター技術を応用した機能的微小口径人工血管の
開発

(課題番号 16591414)

平成 16、17 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)
研究成果報告書



平成 18 年度 12 月

研究代表者 森嶋克昌

(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)



**バイオリアクター技術を応用した機能的微小口径人工血管の
開発**

(課題番号 16591414)

平成 16、17 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)
研究成果報告書

平成 18 年度 12 月

研究代表者 森嶋克昌
(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	4
2. 研究発表	5
3. 研究成果	
1. 研究計画と成果の概要	16
2. 肺動脈弁の Tissue Engineering (羊)	21
3. 肺動脈の Tissue Engineering (羊)	25
4. 心臓血管領域における Tissue Engineering の現状	36
5. 下大静脈の Tissue Engineering Vascular Autografts (TEVAs) (犬)	41
6. 血管の Tissue Engineering	52
7. TEVAs に対する骨髄細胞播種の有効性	58
8. 播種される骨髄細胞の培養の必要性	64
9. TEVAs の臨床応用	71
10. TEVAs のフォンタン手術への応用	73
11. TEVAs の臨床応用(中間報告)	75
12. TEVAs の中期遠隔成績(臨床)	81
13. TEVAs の組織学的小および生化学的評価	94
4. 参考文献	
1. 心臓血管外科の再生治療の基礎	103
2. 心血管系のティッシュエンジニアリング	109
3. 培養人工血管	113
4. 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例	120
5. バイオ人工血管	125
6. バイオ人工血管の臨床応用	132
7. 再生人工血管の臨床応用	139
8. 骨髄細胞を用いた再生血管と臨床応用	146
9. 先天性心疾患領域における再生医療	150

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。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。临床上、小口径人工血管、心臓代用弁などは、既存の治療法ではさまざまな問題点を有し、発展の余地を十分に残している。そこでわれわれは、こうした問題点を克服すべく、Tissue Engineering 技術を用いた再生組織の開発、臨床応用をめざし、基礎実験を継続してきた。その中で、小口径人工血管に関しては、組織形成不全によると思われる体内移植後の早期血栓形成、破裂、間隙率の上昇などの問題点が提起され、未だ十分な開存性が出せずにいる。そこで、組織工学的手法を用いて、これまでの成果をさらに発展させ、バイオリアクター技術を応用することによって、既存の人工血管を上回る開存性を持つ小口径グラフトを開発したいと考えている。

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6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】

バイオリアクター技術を応用した機能的な小口径人工血管の開発

(課題番号 16591414)

【研究組織】

研究代表者 :

森嶋克昌 (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 :

内藤祐次 (東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)

Oei Kwan Liong (東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)

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)

松村剛毅 (東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)

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 16 年度 3,500 千円

平成 17 年度 1,500 千円

計 5,00 千円

研究発表

【学会誌など】

1. Goki Matsumura, Yoko Ishihara, Sachiko-Miyagawa Tomita, Yoshito Ikada, Shojiro Matsuda, Hiromi Kurosawa, Toshiharu Shin'oka. Evaluation of Tissue-Engineered Vascular Autografts: Tissue Engineering. 12, 11, 2006
2. Shin'oka, T., Matsumura, G., Hibino, N., Naito, Y., Watanabe, M., Konuma, T., Sakamoto, T., Nagatsu, M., Kurosawa, H. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells : J Thorac Cardiovasc Surg、129, 6, 1330, 2005
3. Hibino, N., Shin'oka, T., Matsumura, G., Ikada, Y., Kurosawa, H. The tissue-engineered vascular graft using bone marrow without culture : J Thorac Cardiovasc Surg、129, 5, 1064, 2005
4. 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.
5. 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
6. Shin'oka T Clinical results of tissue engineered vascular autografts Yonsei Medical Journal 2004; 45: 73-74
7. 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
8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience Biomaterials24: 2303-2308, 2003
 12. 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 Circulation108: 1729-1734, 2003
 13. 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
 14. Matsumura G, Shin'oka Successful Application of Tissue Engineered Vascular Autografts; Clinical Experience. Biomaterials 2003 ; 24:2303-2308
 15. Shin'oka T Tissue Engineered Heart Valves: Autologous Cell Seeding on Biodegradable Polymer Scaffold Artificial Organ2002; 26:522-6
 16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New England Journal of Medicine*. 2001;344:532-533.
22. 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.

23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.

30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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・研究会発表等】

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
7. 新岡俊治、黒澤博身、斎藤聡、松村剛毅、小坂由道、筏 義人、保々恭

- 子、市原有起、宮本真嘉、自己細胞を用いた中～大口径再生血管の再生治療。
第43回日本人工臓器学会、2005年、東京
8. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤聡、坂本貴彦、小坂由道、市原有起、宮本真嘉、保々恭子、黒澤博身、筏 義人。骨髄細胞と生分解性ポリマーを用いた再生血管の経時的変化・遠隔評価。第36回日本心臓血管外科学会総会、2006年4月、盛岡
 9. Goki Matsumura, Toshiharu Shin' oka, Narutoshi Hibino, Yoshimichi Kosaka, Hiromi Kurosawa. Tissue Engineering Vascular Autograft Utilizing Bone Marrow Cells in a Dog Model. 4th World Congress of Pediatric Cardiology and Pediatric Cardiovascular Surgery. 2005.9. Argentina
 10. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤 聡、小坂由道、小沼武司、保々恭子、市原有紀、宮本真嘉、黒澤博身、筏 義人。自己細胞を用いた中～大口径再生血管の作成：心筋・血管新生療法研究会、2005年7月、東京
 11. 松村剛毅、新岡俊治、小坂由道、日比野成俊、黒澤博身。再生血管の内皮細胞の評価：日本胸部外科学会総会、2004年10月、札幌
 12. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤聡、小坂由道、小沼武司、保々恭子、市原有起、宮本真嘉、黒澤博身、筏義人。自己細胞を用いた再生血管治療と臨床経過：第4回再生心臓血管外科治療研究会、2005年、浜松
 13. 松村剛毅。 ” 再生医療技術を用いた循環器疾患に対する組織移植および血管新生に関する研究 ” ハイブリッド心臓弁、血管サブグループ。再生血管の臨床応用：循環器病研究委託費 13公-1、2004年2月、大阪
 14. 松村剛毅。生分解性ポリマーによる血管の再生：循環器病研究委託費「工学的再生治療技術に関する分野横断的研究」、第1回 班会議、2006年12月、大阪

15. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 *虚血肢に対する細胞移植と細胞シート移植による血管再生療法の比較検討* 第5回再生医療学会（平成17年3月）
16. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 *虚血肢に対する細胞シート移植による血管再生療法の検討* 第5回再生心臓血管外科治療研究会（平成18年4月）
17. Kyoko Hobo, Tatsuya Shimizu, Hidekazu Sekine, Hiromi Kurosawa, Satoshi Saito, Yoshimichi Kosaka, Goki Matsumura, Shinka Miyamoto, Yuki Ichihara, Teruo Okano, Toshiharu Shin'oka *Smooth muscle cell sheet transplantation enhances angiogenesis and improves of hindlimb ischemia* The1st World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2006.4.)
18. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 *ラット虚血肢モデルにおける細胞シート移植による血管再生* 第9回日本組織工学会（平成18年9月）
19. Kyoko Hobo, Tatsuya Shimizu, Hidekazu Sekine, Hiromi Kurosawa, Satoshi Saito, Yoshimichi Kosaka, Goki Matsumura, Shinka Miyamoto, Yuki Ichihara, Teruo Okano, Toshiharu Shin'oka *Smooth muscle cell sheet transplantation induced revascularization and preserve blood perfusion in ischemic hind limb* The5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine-EU meeting (2006.11.)

【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
9. Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka . Clinical Application of
Tissue-Engineered Blood Vessels : Cardiovascular Regeneration Therapies
Using Tissue Engineering Approaches、105, 2005, Springer-Verlag Tokyo, H.
Mori, H. Matsuda edition
10. 松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. 心臓血管外科の再生治療の基礎 :
Cardiovascular Med-Surg、6, 3, p64, 2004
11. 松村剛毅、新岡俊治. 弁の再生医療 : 現代医療、36, 1, p23, 2004

12. 松村剛毅、新岡俊治、日比野成俊、黒澤博身、松田晶二郎、高橋文丈、筏義人．骨髄細胞を用いた再生血管治療と臨床応用：第3回再生心臓血管外科治療研究会、2004年2月、福岡
13. 松村剛毅、新岡俊治、日比野成俊、内藤祐次、村田明、東隆、黒澤博身．骨髄細胞による Tissue Engineered Vascular Autograft：第2回再生心臓血管外科治療研究会、2003年5月、札幌

【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
12. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. バイオ人工血管の臨床応用 : *Vascular Biology & Medicine*, 5, 6, p 59, 2004
13. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治. バイオ人工血管 : 医療用マテリアルと機能膜、119、2005
14. 松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. 心臓血管外科の再生治療の基礎 : *Cardiovascular Med-Surg*, 6, 3, p64, 2004
15. 新岡俊治、黒澤博身、長津正芳、松村剛毅、小坂由道、小沼武司、日比野成俊. 心臓血管外科の再生治療の臨床 : *Cardiovascular Med-Surg*, 6, 3, p70, 2004
16. 保々恭子、新岡俊治 培養人工血管 (*Tissue Engineering Graft*) 分子新血管病学 2006; 7:5:761-68

【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

再生医学は、全身のあらゆる組織・臓器を対象に、自己の細胞が増殖・分化できる足場となる適切な環境を体内に与えることで、自己の臓器が本来の構造と機能を取り戻すことを目的とした、新しい医療として現在大きな注目を集めている。組織工学(Tissue Engineering)は、吸収速度の制御が可能な生体吸収性ポリマーを足場として生体細胞から目的組織を作成しようという新しい学際的研究分野である。歴史的には1980年代後半に臓器移植医療における臓器提供者不足が深刻化している米国で提唱された。その最大の利点としては播種、生着した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、移植後長期的な異物の残存を認めないという点にある。临床上、小口径人工血管、心臓代用弁などは、既存の治療法ではさまざまな問題点を有し、発展の余地を十分に残している。そこでわれわれは、こうした問題点を克服すべく、Tissue Engineering 技術を用いた再生組織の開発、臨床応用をめざし、基礎実験を継続してきた。その中で、小口径人工血管に関しては、組織形成不全によると思われる体内移植後の早期血栓形成、破裂、間隙率の上昇などの問題点が提起され、未だ十分な開存性が出せずにいる。

研究の目的

これまでに心臓血管外科領域においては、冠動脈バイパス術を初めとする小口径の血管に対する血行再建には、自己の他の部位の血管を移植して使用してきた。しかし、こうした血管の開存性は十分でなく、また、再手術時にはグラフトとして使用できる適当な自己の血管が採取できない場合もあり、人工血管を用いる場合もある。この人工血管の開存性はさらに悪いため、現在、組織工学的手法を用いた小口径グラフトの開発が現在国内外で急ピッチで進められて

いる。我々は既に組織工学的手法を用いて自己細胞として末梢静脈壁細胞を用いた Tissue Engineered Vascular Autograft による肺血行再建の臨床例を経験した。具体的には、自己細胞（末梢静脈壁細胞，骨髓細胞）を播種した生体吸収性ポリマーを用いて自己血管を *in vitro* で作成し，体内への移植後は，生体吸収性ポリマーが完全に分解・吸収された時点で自己細胞，間質のみから構成される Tissue Engineered Vascular Autograft が肺血行を担うことになる。しかし、現在のポリマーを使用したグラフトは口径が 5 mm 以下では開存を得ることはほぼ不可能である。

本研究の目的はこれまでの成果をさらに発展させ，バイオリアクター技術を応用することによって、既存の人工血管を上回る開存率を持つ小口径グラフトを開発することである。

この研究の独創的な点

Tissue Engineering 技術を用いた再生組織の作成において、我々は従来の方法を採用してきた。つまり、*in vitro* にて自己細胞（自家静脈細胞，自家骨髓間質細胞，自家骨髓幹細胞）を生分解性ポリマーに播種し，ポリマー上での細胞培養の後，それらを体内へ移植する。しかし，これらの方法にはいくつかの問題点を有する。つまり，1) ポリマーへの細胞播種における細胞分布の不均衡，2) ポリマー上での細胞培養の際の，相対的な栄養分及び酸素の欠乏，3) 発達段階にある組織への生理的，物理的刺激的欠除，4) 細胞外マトリックス形成不全などがある。これらの問題点を克服すべく，現在さまざまなバイオリアクターが考案されている。バイオリアクターのもたらす可能性としては，1) ポリマーへの細胞接着率の上昇，2) 温度，pH などの生理的環境の維持，3) growth factor, vitamin などの生理活性物質の持続的な供給，4) *in vivo* 環境に類似した物理的刺激的供給，5) 十分な酸素，栄養分の供給，などが予想され，結果として組織的，機能的にも成熟した段階でのポリマー移植が可能となる。本研究の目的は，従来の方法と比較し，バイオリアクターを用いた組織形成が十分な段階でのポリマー移植がもたらす影響について考察することである。

国内外の関連する研究の中での当研究の位置づけ

本研究の当面の目的は小口径における生体適合性，成長能を有する自己血管組織の開発である。生体吸収性ポリマーを応用した組織工学による人工血管作成の試みは国内外で行われているが，大動物での小口径の分野で良好な結果を出している研究は国内では皆無である。我々はバイオリアクター技術と、種々の細胞に分化可能な骨髓幹細胞を用いて，Tissue Engineered Vascular

Autograft の作成が可能であると考えている。さらに、この技術の応用によって、将来的には虚血性心疾患に対するバイパス手術用、透析用シャント用の小口径人工血管の開発も期待される。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。

研究計画

平成 16 年度は基礎的研究を主に施行し、平成 17 年度に臨床応用をめざした。

<基礎研究>

1. 細胞採取培養

実験動物としてビーグル犬を用い、腸骨より骨髓を 2-3/kg 採取後、密度勾配法を用いて単核球成分のみを分離、採取する。体重 1kg 当たりの単核球細胞数が 1×10^6 を超えていれば十分量の骨髓細胞が採取できたと考えられる。続いて採取した細胞を 75cm² フラスコへ移し、培養液を加えて 5%CO₂ incubator 内にて 2-4 週間培養する。単核球成分はフラスコ内において付着細胞へと変化し、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などのさまざまな血管構成細胞へと分化する。十分な骨髓間質細胞が増殖されたのを確認し、トリプシンを用いてフラスコより付着細胞を採取し、同時に幹細胞を含む浮遊細胞も採取する。

2. 生体吸収性ポリマー

細胞接着、増殖を介助する足場材料として我々は合成高分子化合物を用いている。吸収性合成材料の中で最もよく使用されているのはポリグリコール酸 (PGA)、ポリ乳酸 (PLA) およびそれらの共重合体である。これらの高分子が多く利用される理由は、分解生成物であるグリコール酸、乳酸が生体内代謝産物であり安全性が認められていることと、強度や分解性は分子量や組成を変えることによってコントロール可能であることがあげられる。ポリ-ε-カプロラク톤は単独では弾性率が低く使用が難しいが、化合が比較的容易なため PGA、PLA との共重合体として用いられている。我々は PGA、PCL の共重合体である P(CL/LA) をスポンジとして用い補強材料を追加したポリマーを用いる。作成する人工血管の内径は 3.5mm、全長 5cm とする。

3. 細胞播種

生体吸収性ポリマーに培養した骨髓間質細胞および浮遊細胞を細胞密度は $10^6/\text{cm}^2$ を目安に播種する。播種はリアクターチャンバー内にポリマーを装着し

た状態で行い細菌，ウイルス等の contamination を可及的に少なくする．また，播種する前にグラフトをさまざまな物質にて処理を行い細胞接着性の向上を図る．

4. バイオリアクター装着，稼動

バイオリアクターはガス交換器，リアクターチャンバー，リザーバー，拍動流ポンプから構成される．装置全体を CO₂ インキュベーター内へ配置し，圧，拍動流，流量，温度等の生理学的条件を調節しながら生体類似環境を作り出し生体吸収性ポリマーに播種した細胞を培養する．拍動流は空気圧圧縮ポンプを応用して作成し，圧リザーバーをおくことにより，生理的な圧波型を作り出す．リアクターチャンバーはマウントした人工血管が回転できるように設計し，細胞が重力の影響を受けて分布に偏りができるのを予防する．また，バイオリアクター稼動中は培養細胞を適宜追加して血管内皮の生育を促進する．培養液は RPMI 1640 に Growth Factor, 10% FBS, 抗生物質, heparin を添加したものをを用いる．

5. 組織の評価

作成された組織に対し，組織学的検討（光顕，電顕，免疫組織学的，DNA 量），機械的強度測定（張力試験，破裂試験，コンプライアンス測定），細胞外骨格合成量（collagen, elastin 量），機能的検査（薬物負荷試験，血小板凝集能，活性能）を行い自己組織と比較検討する．

6. 大動物移植実験

定められた時間にて合成された血管組織を，ビーグル犬頸動脈への移植実験を行う．2 週間，4 週間，8 週間，12 週間にて開存性をカテーテル造影にて確認する．上記 5. と同様の内容で組織の評価を行う．

以上の計画で良好な組織形成，動物実験での開存性が得られた次の段階として，口径の縮小，全長の延長，作成期間の短縮，培養技術の改良等の課題を検討して行く．産業化へ向けての基礎研究も図ってゆく予定である．

<臨床応用>

十分な基礎実験結果をふまえ，良好な成績が確認された段階でヒトへの臨床応用を考慮する．細胞準備手術として，全身麻酔もしくは局所麻酔にて腸骨より骨髓細胞を採取し，基礎実験と同様の方法にて血管構成細胞の培養を行う．十分な組織の形成，成熟を認めた段階において移植手術を行う．移植手術を行

う疾患候補については、まず、MAPCA（主要大動脈肺動脈側副血管）に対するuniformalization時の末梢細動脈など、万が一閉塞しても患者に及ぼす影響が非常に少ないような部位の血管形成に使用する。さらに良好な開存成績が得られた段階で、透析用動静脈シャント、チアノーゼ性心疾患に対するブレロック氏シャント、冠動脈バイパス用グラフトとしての使用を進めてゆく。開存性の評価は、カラードップラーエコーによる流速測定、心臓血管カテーテル造影検査にて定期的に評価を行う。

臨床応用については、学内の倫理委員会の承認は得られているが、家族、本人からのインフォームドコンセントを十分に得られた症例のみに施行する。

2 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。

3 まとめ

平成 16 年度はおもに、ヒト細胞培養の技術的な手法を確立し、バイオリアクターによる小口径再生血管の作成を試み、イヌを用いた動物実験で移植実験を行った。本研究費により十分な研究成果が得られ、結果は後述の学会で発表した。

当科では、研究成果を基に静脈系の中一大口径の血管に対して、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、小口径に関しては未だ開存率が十分ではなく、基礎実験を継続する必要があると考える。