

**大口径長径の再生血管の開発、
解析と臨床応用**
(課題番号 17591490)

平成 17、18 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)
研究成果報告書



平成 19 年 4 月

研究代表者 山本 昇
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)



**大口徑長徑の再生血管の開発、
解析と臨床応用**
(課題番号 17591490)

平成 17、18 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)
研究成果報告書

平成 19 年 4 月

研究代表者 山本 昇
(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	17
2. 肺動脈弁の Tissue Engineering (羊)	27
3. 肺動脈の Tissue Engineering (羊)	31
4. 心臓血管領域における Tissue Engineering の現状	42
5. 下大静脈の Tissue Engineering Vascular Autografts (TEVAs)(犬)	47
6. 血管の Tissue Engineering	58
7. TEVAs に対する骨髄細胞播種の有効性	64
8. 播種される骨髄細胞の培養の必要性	70
9. TEVAs の臨床応用	77
10. TEVAs のフォンタン手術への応用(症例報告)	79
11. TEVAs を用いたフォンタン手術手技	81
12. TEVAs の臨床応用(中間報告)	86
13. TEVAs の中期遠隔成績(臨床)	92
14. TEVAs の組織学および生化学的評価	105
4. 参考文献	
1. 心臓血管外科の再生治療の基礎	114
2. 心血管系のティッシュエンジニアリング	120
3. 培養人工血管	124
4. 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例	131
5. バイオ人工血管	136
6. バイオ人工血管の臨床応用	143
7. 再生人工血管の臨床応用	150
8. 先天性心疾患領域における再生医療	157
9. 組織工学による心臓弁、再生血管	163

はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科 山本 昇

再生医工学 -Tissue engineering- とは生体材料と自己の細胞の特徴を利用して、培養細胞から小組織を再生させたり、組織修復を助ける技術である。本来生体が有している組織修復のメカニズムでは補いきれない欠損や先天的に欠落している場合、Tissue Engineering の技術によって自己組織を再生したり、代替となる組織を形成したりする研究が進められてきており、1980 年代後半にはじめて Tissue Engineering の概念が米国で発表されてから約 20 年経った今、すでに臨床においては、皮膚、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、臨床応用が展開している。我々の心臓血管外科領域特に先天性心疾患では、先天的な心血管構造の欠損や低形成に対する再建に成功し、臨床応用が可能となった。作製される組織には生きた自己細胞が含まれており、生物学的な成長、修復機転が見込まれるため、より長い耐久性が期待できる。さらに、完全な生体適合性を有するため感染に抵抗性があり、最終的に異物が残存せず内腔も完全に内皮化されるため、移植後、長期間の抗凝固療法を必要としない利点がある。

我々は、初めてこの完全な生体吸収性のポリマーを用いて羊の肺動脈弁の作成に成功し、以後肺動脈グラフト等の作成について研究、臨床応用を進めてきた。これらの基礎実験、動物実験をふまえ、東京女子医大倫理委員会に臨床応用を申請し、2000 年 5 月より心血管系では世界で初めて Tissue Engineering の臨床応用が行われた。異

種動物の血清を必要とせず、体外にて培養という工程を必要としないためより安全で簡便に行え、また再生組織は自己細胞のみで構成されるため拒絶反応がないという利点がある。また、当日全身麻酔下に骨髄を採取するために、患者の負担は少ない。そして何より、術後長期の抗凝固療法を必要とせず、内服薬なしに生活できることが、患者の、特に小児患者の負担を大きく軽減できる。これは、移植された再生血管の内腔が内皮化され生体適合性を有するため、血栓や感染に対して抵抗性が高いことに由来する。生体の自己細胞による血管損傷の治癒機転を利用した本法では、内腔面の完全な内皮化、中膜層での平滑筋細胞の存在等、血管組織に極めて近い組織の構築が観察され、これまでの人工材料に代わるものとして世界的に普及すると考えられる。しかしこの技術の歴史はまだ浅く、さらなる発展が求められる所である。改善の余地はあるものの、生体適合性のある、また成長の期待できる代用補填物は他になく、各々の患者にとっての利点と起こり得る合併症を考慮したうえで、当施設では今後も使用していく方向である。

1. 研究課題名・研究組織・研究経費

【研究課題名】

大口径長径の再生血管の開発、解析と臨床応用

(課題番号 17591490)

【研究組織】

研究代表者：

山本 昇（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）

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）

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）

立石 実（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手）

【研究経費】

平成 17 年度 1,900 千円

平成 18 年度 1,800 千円

計 3,700 千円

2. 研究発表

【学会誌など】

1. Miura T, Sakamoto T, Kobayashi M, Shino'ka T, Kurosawa H. *Hemodilutional anemia impairs neurologic outcome after cardiopulmonary bypass in a piglet model.* J Thorac Cardiovasc Surg 2007;133(1):29-36
2. Goki Matsumura, Yoko Ishihara, Sachiko-Miyagawa Tomita, Yoshito Ikada, Shojiro Matsuda, Hiromi Kurosawa, Toshiharu Shin'oka. *Evaluation of Tissue-Engineered Vascular Autografts.* Tissue Engineering 2006;12(11):3075-
3. 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 2005;129(6):1330-
4. 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 2005;129(5):1064-
5. Shin'oka T. *Clinical results of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells.* Nippon Geka Gakkai Zasshi. 2004;105(8):459-63 Japanese.
6. 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
7. Shin'oka T. *Clinical results of tissue engineered vascular autografts.* Yonsei Medical Journal 2004;45:73-74
 8. 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 Surg 2004; 127:12-19
 9. Hibino N, Shin'oka T, Kurosawa H. *Long-Term Histologic Findings in Pulmonary Arteries Reconstructed with Autologous Pericardium.* The New England Journal of Medicine 2003;348:865-867
 10. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. *Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience.* Biomaterials 2003;24:2303-08
 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. 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 2003;126:1958-62
 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. J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;125:419-420
15. Hiramatsu T, Imai Y, Kurosawa H, Takanashi Y, Aoki M, Shin'oka T, Nakazawa M. *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. Hiramatsu T, Imai Y, Kurosawa H, Takanashi Y, Aoki M, Shin'oka T, Sakamoto T. *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. J Thorac Cardiovasc Surg* 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. 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
 21. 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 2001;54:479-484 Japanese.
 22. Shin'oka T, Imai Y, Matsumura G. *Current status of tissue engineering for therapeutic use*. Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine 2001;59:1389-1399

【学会・研究会発表等】

1. Naito Y, Shin'oka, Imai Y. *The Expansion of Human Bone Marrow Derived Cells with Combinations of Growth Factor*. The 8th International Society for Applied Cardiovascular Biology. (2002 St. Gallen, Switzerland)
2. Watanabe M, Shin'oka T, Imai Y. *Tissue Engineered Vascular Autograft : Inferior Vena Cava Replacement Study in a Dog Model*. The 8th International Society for Applied Cardiovascular Biology (2002 St. Gallen, Switzerland)
3. 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*. The 5th Annual Meeting of the Tissue Engineering Society international (2002)
4. 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、(2004.2 大阪)
5. 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. 第57回日本胸部外科学会総会 (2004.10 札幌)
6. 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. 自己細胞を用いた中～大口径再生血管の作成. 心筋・血管新生療法研究会 (2005.7 東京)

7. G Matsumura, T Shin'oka, N Hibino, Y Kosaka, H Kurosawa. *Tissue Engineering Vascular Autograft Utilizing Bone Marrow Cells in a Dog Model*. The 4th World Congress of Pediatric Cardiology and Pediatric Cardiovascular Surgery (2005.9 Argentina)
8. 新岡俊治、黒澤博身、齋藤聡、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～大口徑再生血管の再生治療. 第 43 回日本人工臓器学会 (2005.11 東京)
9. 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 (2006.3 岡山)
10. 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. 骨髓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 (2006.4 盛岡)
11. 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 (2006.4 盛岡)
12. Hobo K, Shimizu T, Sekine H, Kurosawa H, Saito S, Kosaka Y, Matsumura G, Miyamoto S, Ichihara Y, Okano T, Shin'oka T. *Smooth muscle cell sheet transplantation enhances angiogenesis and improves of hindlimb ischemia*.

The 1st World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2006.4.)

13. 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 (2006.9 京都)
14. 齋藤 聡、青見茂之、新岡俊治、川合明彦、山寄健二、坂本貴彦、石山雅邦、富岡秀行、宮城島正行、松村剛毅、黒澤博身. 大動脈基部病変に対する外科治療 (小児から成人まで) : Konno手術から Ross 手術へ、Bentall 手術から David 手術への変遷. 第59回日本胸部外科学会総会 (2006.10 東京)
15. 山本 昇、黒澤博身、新岡俊治、石山雅邦、坂本貴彦、森嶋克昌、松村剛毅、石橋信之、村田 明、三浦 崇、杉本晃一. Arterial switch 手術における冠動脈形態による手術成績の検討. 第59回日本胸部外科学会総会 (2006.10 東京)
16. Hobo K, Shimizu T, Sekine H, Kurosawa H, Saito S, Kosaka Y, Matsumura G, Miyamoto S, Ichihara Y, Okano T, Shin'oka T. *Smooth muscle cell sheet transplantation induced revascularization and preserve blood perfusion in ischemic hind limb*. The 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine-EU meeting (2006.11 Rotterdam, Netherlands)
17. 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「医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 (2006.12 大阪)

18. Saito S, Aomi S, Tomioka H, Ishii H, Kurosawa H. *Selective reconstruction of preoperatively identified Adamkiewicz artery during repair of thoracoabdominal aortic aneurysm.* The 43rd Annual Meeting of The Society of Thoracic Surgeons (2007.1 SanDiego, USA)
19. Hobo K, Shimizu T, Sekine H, Kurosawa H, Saito S, Kosaka Y, Matsumura G, Miyamoto S, Ichihara Y, Okano T, Shin'oka T. *Transplantation of Smooth Muscle Cell Sheets for Ischemia Therapy.* The 43rd Annual Meeting of The Society of Thoracic Surgeons (2007.1 SanDiego, USA)
20. 齋藤 聡、黒澤博身. Barlow 病変を伴う Marfan 症候群に対する僧帽弁形成術、David 手術の同時手術. 第 37 回日本心臓血管外科学会 (2007.2 東京)
21. 山本 昇、黒澤博身、新岡俊治、石山雅邦、坂本貴彦、森嶋克昌、松村剛毅、日比野成俊、石橋信之、矢野清崇. Arterial switch operation(ASO)術後遠隔成績と社会的自立度の検討. 第 37 回日本心臓血管外科学会 (2007.2 東京)
22. 石山雅邦、黒澤博身、石原和明、新岡俊治、坂本貴彦、森嶋克昌、山本 昇、松村剛毅、日比野成俊、矢野清崇、住 瑞木. Bjork 手術の長期遠隔とその後の TCPC conversion 手術成績. 第 37 回日本心臓血管外科学会 (2007.2 東京)
23. 石山雅邦、黒澤博身、石原和明、新岡俊治、坂本貴彦、森嶋克昌、山本 昇、松村剛毅、日比野成俊、矢野清崇、小嶋 愛、鈴木憲治. 房室錯位に対する Senning+Rastelli 手術の適応に関する検討. 第 37 回日本心臓血管外科学会 (2007.2 東京)

24. 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. 平滑筋細胞シート移植による虚血治療の可能性. 第37回日本心臓血管外科学会 (2007.2 東京)
25. 松村剛毅、新岡俊治、坂本貴彦、石山雅邦、森嶋克昌、山本昇、日比野成俊、石橋信之、矢野清崇、市原有起、保々恭子、宮本真嘉、齋藤聡、黒澤博身. 自己骨髄細胞と生体吸収性ポリマーにて作成した再生血管による臨床研究44症例の経過. 第37回日本心臓血管外科学会 (2007.2 東京)
26. 日比野成俊、新岡俊治、石山雅邦、坂本貴彦、森嶋克昌、山本昇、松村剛毅、石橋信之、黒澤博身. 外科治療としての再生医療—肺動脈形成術のため Tissue Engineering Patch. 第37回日本心臓血管外科学会 (2007.2 東京)
27. 市原有起、新岡俊治、松村剛毅、日比野成俊、宮本真嘉、保々恭子、吉岡朋子、坂本貴彦、齋藤聡、筏義人、黒澤博身. 生体吸収性ポリマーを用いた高圧系再生血管素材の開発. 第6回日本再生医療学会 (2007.3 横浜)

【著書】

1. 新岡俊治 先端医療シリーズ 12：心臓病「心臓病の最新医療」
第 11 章 医療材料・治療機器の進歩：Tissue Engineering
357-363 先端医療技術研究所 2001
2. 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 中外医学社 2002
3. 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
4. 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
5. 新岡俊治 再生弁「生活習慣と遺伝子疾患」 267-273 メディ
カルレビュー社 2002
6. 新岡俊治 先天性心臓病 最新版 家庭医学大全科 1008-1012
2004
7. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治. 「医療用マテリアルと機能膜」
第 6 章 バイオ人工血管 119-125 シーエムシー出版 2005
8. 新岡俊治 先端医療シリーズ 37：人工臓器・再生医療の最先
端 第 8 章 人工血管と再生医療 2：人工血管と再生医療 先
端医療技術研究所 2006

【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* 2004;25(4)
2. 松村剛毅、新岡俊治. 弁の再生医療. *現代医療* 2004;36:23-27
3. 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* 2004;7:317-320
4. 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* 2004;105:459-463
5. 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* 2004;53:153-155
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* 2004;12:154-158
7. 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* 2004;5(6):59-
8. 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* 2004;6(3):64-
9. 市原有起、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. 再生人工血管の臨床応用. *小児外科* 2004;36(11):1394-1400
10. 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* 2004;6(3):70-
11. 保々恭子、新岡俊治. 培養人工血管-Tissue Engineering Graft-. *分子心血管病学* 2006;7(5):761-68
12. 宮本真嘉、新岡俊治. 組織工学による心臓弁、血管再生. *医*

学のあゆみ 2006;217(5):424-

13. 齋藤 聡、山寄健二、遠藤真弘、黒澤博身. 透析患者の冠動脈・虚血性疾患へのインターベンション治療 (2)外科的治療. 臨床透析 2006;22(4):429-435
14. 齋藤 聡. 人工心臓 (臨床) 人工臓器—最新の進歩— 2006;35(3):313-315

3. 研究成果

1. 研究計画と成果の概要

研究の背景

1980年代後半に臓器移植医療における深刻な臓器提供者不足から、移植に必要な目的組織を作成しようという概念が提唱された。その後も世界中で研究・開発が進められ、現在では組織工学 (Tissue-Engineering) という概念が定着しつつある。

一方で心臓血管外科，特に小児心臓血管外科領域における理想的な補填材料・人工血管は未だ発展途上にあり，移植後長期にわたる生体適合性，成長能を有し，移植後の再手術が不要である生きた補填物の開発が模索されている。我々は既に 1) 雑種犬において，組織工学的手法を用いて自己の静脈壁細胞、骨髄細胞からなる Tissue Engineered Vascular Autograft の *in vivo* での作成に成功しており，2) 2000年5月以降，東京女子医科大学倫理委員会の承認下に患者家族の十分なインフォームドコンセントを得た後，40名を超える患者にこの方法による静脈系の血行再建を行っている。

研究の目的

これまでに心臓血管外科領域においては、生体適合性および成長する可能性を有する素材として、自己心膜や凍結保存同種組織が多くの施設で臨床使用されてきた。しかしながら前者は採取量に限界があること、後者は臓器提供者不足による慢性的な供給不足が問題となっている。さらには、これらの素材が遠隔期において成長した

ことを示す明確なエビデンスはない。そのため、組織工学的手法を用いた生体補填材料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）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** が血行を担うことになる。初期の段階では自己の末梢静脈壁細胞は全身麻酔下に採取せねばならず、また細胞培養にも非常な手間がかかり、場合によっては細胞増殖が不十分なため、細胞採取のための再手術を余儀なくされることがあった。その後基礎研究の進歩によって、細胞源を骨髓細胞に変え、細胞培養手技を省略した新手法を確立し、臨床応用している。これまで、基礎実験では動物モデルの制約から、直径 10mm、長さ 20mm の再生血管を用いて、血管形成の機序を研究してきた。しかし、臨床応用では解剖学的な条件から直径 18mm、長さ 40–50mm といった大口径、長径のポリマーグラフトを使用する必要がある。

本研究の目的は、臨床応用を広く、本格的に展開するに当たって、これまで我々が比較的小口径のグラフトを用いて行ってきた基礎研究の成果をさらに発展させ、新しい動物モデルを確立させ、大口径、長径のグラフトでの再生血管形成の機序を解析し、さらに質の高い再生血管を臨床の場に提供することができるようにすることである。

この研究の学術的特色，独創的な点及び予想される結果と意義

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。生分解性ポリマーのシートに末梢血幹細胞を播種する事により同細胞の生分解性ポリマーへの浸潤を誘導する。骨髄幹細胞は種々の細胞への分化能を有するために、血流を担う部位に移植された同細胞は血管組織の再生を起こすと予想される。これまで、動物モデルの制約から実際に臨床で使用されるような大口徑、長徑の再生血管に関する研究は、過去に見られなかったが、今回予備実験において、新しいモデルの作成に成功したため、より臨床の場で必要とされるデータが正確に蓄積され、さらなる再生血管の改良につながるものと考えられる。

本研究の位置づけ

本研究の当面の目的は、静脈系における生体適合性，成長能を有する自己血管組織の再生の臨床応用に必要な基礎データを収集し、再生血管の質の向上を図ることである。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、臨床応用を前提とした、大口徑、長徑の再生血管の開発研究は世界的にも皆無である。さらに、この技術の応用によって、臓器提供者不足が問題となっている凍結保存同種組織の不足、欠点を克服すると期待される。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。

過去の関連研究費

種別 科学研究費 基盤研究 (B) (2)
研究代表者 今井康晴
題名 自己細胞と吸収性ポリマーを用いた組織工学による
心血管用補填材料の開発、応用
期間 平成 10 年～11 年
研究経費 平成 10 年度分として 7,700 千円
平成 11 年度分として 1,900 千円
研究成果 新岡俊治、今井康晴、高梨吉則：組織工学による自
己肺動脈作成：第 51 回日本胸部外科学会 優秀演題
受賞、東京、平成 10 年 10 月 3 日

種別 科学研究費 基盤研究 (C)
研究代表者 渡辺 学
題名 組織工学的手法を応用した、自己組織の再生と凍結
保存同種組織の開発
期間 平成 12 年～13 年
研究経費 平成 12 年度分として 1,100 千円
平成 13 年度分として 1,200 千円
研究成果 渡辺 学、新岡俊治、遠山悟史、日比野成俊
今井康晴、山川光徳、筏 義人、森田真一郎：Tissue
engineered vascular autograft の経時的遠隔期価：
第 53 回 日本胸部外科学会 優秀演題受賞、大分、
平成 12 年 10 月 27 日

その他の研究成果

2000年5月以降、東京女子医科大学倫理委員会の承認下に患者家族の十分なインフォームドコンセントを得た後、47名の患者に自己静脈細胞を使用したティッシュエンジニアリングによる肺および静脈血行再建を行っている。本方法による血管移植の第一例目は世界でも初の臨床応用例であった。2001年の *New England Journal of Medicine* の論文が掲載された。

また、骨髄細胞が再生血管の形成に関与することの証明にて *Circulation* に、そしてこれらの臨床応用に関して *Biomaterials* に論文が掲載された。*Circulation* に掲載された論文については、平成16年度東京女子医大医師会賞および日本小児循環器病学会 Y I A 賞を受賞した。

準備状況

これまで、再生血管の研究については、東京女子医大においてビーグル犬を用いて行われてきた。現在最長2年までの慢性実験を継続しており、また同時に、分子学的手法を用いた血管の詳細な評価、研究を行っている。

本年の予備実験にて、臨床で使用されるのと同サイズの大口径、長径のグラフトを、臨床の手術時と同体重のビーグル犬に植え込んで、評価するモデルを確立することができた。同時に病理組織学的、生化学的、分子生物学的な評価手法についても大きな進歩をしており、より一層質の高い研究が可能となる条件がそろっている。

I. 骨髄幹細胞と生分解性ポリマーによる血管組織の形成が可能であることが証明されたことを受け、再生血管を作成するにあたり、より簡便な方法、より良い材質の開発を追求し、同一の結果が得られることを証明する。具体的には、培養液、異種動物の血清を使わないこと、成長因子を使用しない、等である。作製方法を簡便にすることは、感染の危険性、誤操作、コスト面を考慮した場合、臨床的にも重要であり、また将来本法による再生血管作成が普及した場合にも重要となる。さらに、理想的な生分解性ポリマーの作成、および安全性を検討することである。現在、ポリグリコール酸による生分解性ポリマーを移植し、2年以上の生存犬も得られ、また組織形成も問題なく行われた。今後はさらに大口径、長径のグラフトの解析、移植後の他臓器への影響等を実験的に検討する予定である。

II. 吸引した細胞を処理するためのクリーンベンチ、骨髄幹細胞を播種した生分解性ポリマーを一時的に保管するためのインキュベータ、外科的に再生血管を移植するための動物実験室、生存犬を管理する実験動物舎があり、またそれに携わる技師が常在している。(東京女子医科大学日本心臓血圧研究所研究部)。また、免疫組織学的検討を行う病理部門、も併設しており、再生血管の生力学的検査(張力)を行うための張力試験器、さらに薬物負荷に対する力学的検査を行うためのセンサー、トランスデューサーを完備している。分子生物学的検索を行うための機器も完備している。

研究計画・方法

基礎研究

1：骨髄細胞の採取と、ポリマーへの播種

体重10 k g 前後のビーグル犬より骨髄液20-30mlを採取し、密度勾配法によって、単核球成分を分離する。細胞数をカウントし、これまでの研究で再生血管の作成に必要であるとされた 1.0×10^6 個/mlの骨髄短核球細胞からなる細胞懸濁液を5ml作成した。臨床で使用するサイズに近い、直径16mm、長さ40mmの生体分解性の高分子ポリマーからなるグラフトに、作成した細胞懸濁液を播種した。

2：至適グラフトの選定

細胞の足場となるグラフトは、播種された細胞が接着しやすいようにlow porosityであるため、本研究で使用するグラフトのようにサイズが大きくなると血液との接触面積が大きくなり、in vivoに植え込んだ際に、グラフトからのoozingによる出血が大きな問題となる。こうした出血の防止のため、現在臨床応用ではフィブリン糊をあらかじめgraft表面に塗っている。本研究では、植え込み時の出血を予防できるようにするために、グラフト表面をフィブリン糊に代わってcoatingするのに最適な物質を検討した。グラフトはPGAとPCLを50:50の割合で配合されたポリマーをPGA sheetで補強したものを使用する。Coatingに使用する物質は以下の3種類について検討した。

1. フィブリン糊でのcoating
2. ゼラチンでのcoating
3. PLLA sheetでのcoating

それぞれのグラフトについて同数の細胞数を播種して、細胞の接着数をカウントした。

各群について、植え込み後一ヶ月でグラフトを摘出しそれぞれの組織と、自己の下大静脈組織を比較して、検討した。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や、異なった種類のポリマーの組織と比較検討した。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8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した。

3：血管組織構築のメカニズムの検討

In vivo において、骨髄中の幹細胞から分化した内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞がポリマー上でどのように血管組織を構築していくのかを調べるために、植え込み後、2、4、6週でグラフトを摘出し、これをトリプシン処理して、ポリマーに接着していた細胞を分離し、フローサイトメーターを用いて細胞の評価を行った。また同時に摘出されたグラフト組織を VEGF, bFGF 等によって免疫染色し、幹細胞の分泌する growth factor の分布、密度を画像解析し、それらの分布と血管組織構築の関連を検討し、血管組織構築のメカニズムの解明に必要な所見を得た。

4：遠隔期の組織検討

以上の実験から得られた結果を基にして、至適なグラフトの coat

ing剤を選定した。これらをもちいて、生体内で形成される再生血管の遠隔期の組織について検討した。

これまでの実験と同様に子犬を用いて、全身麻酔下に左開胸し、下大静脈を、細胞を播種していない生体分解性ポリマーよりなる導管で置換した。グラフトを植え込み後、半年、1年、2年、5年でグラフトを摘出し、グラフト組織に対して生化学的、生力学的、免疫組織学的検討を行った。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、遠隔期における組織のfibrosisの程度を、自己の血管組織と比較検討した。また、インストロン張力検査機を用いて、組織の最大張力を測定し自己の同じ部位の組織と比較した。遠隔期における組織の強度は重要な評価項目でした。また、組織学的検討によって、生体内で加水分解されずに残存しているポリマーの割合を評価した。また、免疫染色の手法を用いて内皮細胞の指標である第8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した。

5：成長性の評価

生体内で再生血管が形成された後、遠隔期に血管が拡張するのか、成長するのかについての検討を行った。

生後数ヶ月（5 kg）の子犬を用いて、下大静脈を生体分解性ポリマーで置換し、3年後、5年後にグラフトを摘出して、そのグラフト径を自己の下大静脈径と比較することで、その変化を検討した。

6：臨床応用

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、術前に手術についてのインフォームドコンセント時に、本治療法について詳しい説明をし、家族、本人からの同意を十分に得られた症例のみに施行する。また本治療に伴う必要経費は、研究費から支出するものとし、患者本人、および家族に対して、経済負担はかからないようにする。遺伝子操作、人クローンを扱うことはなく、自己の流血中の幹細胞に期待して組織作りを行うため、in vitroでの細胞培養が全く不要となる。異種動物である牛胎児血清などの使用も避けることが可能となり、より安全な治療を行い得る。平成18年度に関しては、大口径長径グラフトは臨床応用されていない。臨床応用された症例に関しては、CT, MRI、またカテーテル検査などで定期的にfollowしていく予定である。