

生体吸収性素材を使用する
再生血管・弁の作成
(課題番号 17500317)

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 石山雅邦
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)



**生体吸収性素材を使用する
再生血管・弁の作成**
(課題番号 17500317)

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 石山雅邦
(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)	26
3. 肺動脈の Tissue Engineering (羊)	30
4. 心臓血管領域における Tissue Engineering の現状	41
5. 下大静脈の Tissue Engineering Vascular Autografts (TEVAs) (犬)	46
6. 血管の Tissue Engineering	57
7. TEVAs に対する骨髄細胞播種の有効性	63
8. 播種される骨髄細胞の培養の必要性	69
9. TEVAs の臨床応用	76
10. TEVAs のフォンタン手術への応用(症例報告)	78
11. TEVAs を用いたフォンタン手術手技	80
12. TEVAs の臨床応用(中間報告)	85
13. TEVAs の中期遠隔成績(臨床)	91
14. TEVAs の組織学および生化学的評価	104
4. 参考文献	
1. 心臓血管外科の再生治療の基礎	113
2. 心血管系のティッシュエンジニアリング	119
3. 培養人工血管	123
4. 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例	130
5. バイオ人工血管	135
6. バイオ人工血管の臨床応用	142
7. 再生人工血管の臨床応用	149
8. 先天性心疾患領域における再生医療	156
9. 組織工学による心臓弁、再生血管	162

はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科 石山雅邦

近年、50歳未満でも心筋梗塞を発症する患者が多く、生活習慣病を根底とする血管疾患罹患率の上昇は顕著である。大血管および末梢血管に対する手術は90年代後半と比べても増加傾向にあり、多くの患者で血行再建術が必要となっている。心臓血管外科だけにかかわらず、外科系の多くの科が手術の際に血管の処置・修復に携わっており、その対象は例えば動脈硬化により瘤化・狭窄した血管の置換、癌細胞浸潤を受けた血管の修復、移植における血管吻合、小児患者の先天性な異常血管の再建手術など多岐にわたる。外科医はできる限り自己血管組織を温存する治療戦略を立てるが、結果として異物である人工血管による置換を選択せざるを得ないケースが多い。現在使用されている人工血管の材料は polytetrafluoroethylene (PTFE：テフロン) と polyethyleneterephthalate (ポリエステル繊維：ダクロン) の二つが主流であるが、これらは耐久性、開存率ともに十分満足できる成績ですでに確立されたものとなっている。

では、人工血管の問題点とは何か。最も注目されてきたのはその生体適合性 (biocompatibility) であろう。自己血管と比較し人工血管の内皮化は非常に遅い。人工血管という異物に対する生体の拒絶反応を最小限にとどめ、素早く、かつ完全に自己組織化できるのが理想であるが、現在の人工血管には、血管内腔の血栓形成、血栓吸収過程に関連する内膜肥厚、不完全な内皮化、さらには人工繊維の劣化、石灰化等の人工物そのものの耐久性など、未解決な問題が多く見受けられる。

このような背景のもと、1993年に Langer、Vacanti らが Tissue Engineering という新しい枠組みを提唱した。吸収速度の制御が可能な生分解性ポリマーを足場とし、そこに生着した細胞から目的組織を作製するという研究分野である。Tissue Engineering の最大の利点は、播種した細胞の成長に伴い、その組織構造を担っていたポリマーは完全に分解吸収され、移植後長期的には異物が残存しない自己組織に置き換わるところにある。つまり、生体適合性という重要な因子を兼ね備えた理想的な生体材料が得られる可能性が秘められている。現在は、Tissue Engineering の技術を用いて得られた再生組織の質を高める研究が進められている。形態的だけでなく、機能的にも自己組織に類似した血管が、より早く、より低侵襲で作成できることが求められる。

我々は動物実験において肺動脈弁および下大静脈の再生に成功し、2000年からは中口径再生血管の臨床応用を行い良好な結果を得た。基礎実験や臨床応用から得られた知見に統合的な解析を加え、多くの研究者にフィードバックする必要がある。より理想的な代用血管・再生弁のさらなる発展の一役を担えるよう今後も努力していきたい。

1. 研究課題名・研究組織・研究経費

【研究課題名】

生体吸収性素材を使用する再生血管・弁の作成

(課題番号 17500317)

【研究組織】

研究代表者：

石山雅邦（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手）

*申請時の代表者：長津正芳より変更

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）

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）

【研究経費】

平成 17 年度 1,600 千円

平成 18 年度 1,400 千円

計 3,000 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～大口径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. 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、山崎健二、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

はじめに

ここでは本研究全体の理解を深めるため、まず研究計画および成果の概要を解説する。Tissue Engineering による再生血管・再生弁の研究背景および社会的な意義や位置付けについて説明する。

研究の背景

組織工学 (Tissue Engineering) は、工学 (Engineering Science) と生物学 (Biological Science) を伴に応用した学際的な新しい概念で、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培養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。すでに皮下細胞を用いた Tissue Engineered Skin Graft は実用段階にあり、臨床において数百例の移植が施行されている。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。我々はすでに 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、6 名の患者にこの方法による肺血行再建を行っている。

研究目的

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く、そのため再生医療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。我々は既にこの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。さらには、現在までに骨髄幹細胞を主として使用する方法での再生血管移植は 47 例に行われた。具体的には、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 が肺または静脈系血行を担うことになる。

本研究の目的はこの成果をさらに発展させ、骨髄細胞を自己細胞として用いて補填材料・人工血管を作成し、既存の素材との比較検討よりこのグラフトを評価し、さらにヒトにおける至適ポリマー、

至適培養法、至適細胞数を明らかにすることである。骨髄細胞を用いたこの分野での研究は過去になく、また骨髄間質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。

本研究の学術的特色、独創的な点

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使い、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骨髄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。

我々が細胞の起源として骨髄細胞を使用した理由は、1) 従来の組織工学の手法における約10日間の *in vitro* での細胞培養の課程を省略し、より簡便より安価に施行可能であること、2) 組織幹細胞であるので血管のみならず、心筋・心臓弁あるいは骨・軟骨・腱・靭帯などの組織への再生が可能で応用範囲が広いこと、3) 臨床において骨髄細胞の採取を手術当日の麻酔下で行うことにより、患者への侵襲を軽減できることがあげられる。

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および成長能を有する自己血管組織の再生と、臓器提供に頼らない凍結保存同種組

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、自己細胞として骨髄細胞からなる人工血管の開発研究は国内では皆無である。我々は種々の細胞に分化可能な骨髄細胞を用いて、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、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代用素材（代用弁）の開発、虚血性心疾患に対するバイパス手術用の小口径人工血管の開発も期待される。

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を証明する論文が *Circulation* 誌に、これらの臨床応用に関しては *Biomaterials* 誌に、そして再生血管の生化学的評価についての論文が *Tissue Engineering* 誌に掲載された。さらには第84回米国胸部外科学会にて、当院での *Tissue Engineered Vascular Autografts* 45症例の臨床結果を報告した。

準備状況

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ため、次に再生血管を作成するにあたり、より簡便な方法を追求し、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しすることである。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、組織形成も問題なく行われた。今後はさらに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。

施設設備面では、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配置されている（東京女子医科大学内、旧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いる。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。

研究計画

始めに研究代表者および研究分担者の相互関係を提示する。研究代表者石山雅邦は研究の総括、分子生物学的評価、臨床使用を担当した。分担者黒澤博身は臨床使用を担当した。分担者長津正芳は細胞培養、動物実験を担当した。分担者小坂由道、山本 昇、松村剛毅はそれぞれ臨床使用の際の細胞単離、培養、播種を担当した。

1. 基礎的研究

動物実験による至適骨髄細胞数、至適脱細胞化の探究及び選定を行う。使用する細胞として、静脈血管細胞、骨髄細胞（単核球成分）、骨髄液実質、末梢血幹細胞を使用し、至適な細胞起源、細胞数を探索する。実験動物として犬を用い、骨髄細胞の採取は通常骨髄穿

刺針を用いて行う。末梢血幹細胞のマーカ―として CD34⁺細胞を用いる。採取血液中の白血球数と採取血液の重量の積を、血液比重の 1.05 で除して総採取細胞数を求める。この総採取細胞数に CD34⁺細胞陽性率を乗したものが採取できた CD34⁺細胞数である。体重 1kg 当たりの CD34⁺細胞数が 2×10^6 を超えていれば十分量の末梢血幹細胞が採取できたと考えられる。十分な細胞数が得られれば、弁付き生体吸収性素材に播種する。2-3 時間後に細胞を採取した同一動物を全身麻酔下に左開胸し、人工心肺を装着したうえで心拍動下にパッチ移植手術を行う。右心室から肺動脈までの間に、このティッシュエンジニアリングで作成したパッチを補填する。コントロール実験として細胞を播種しない生体吸収性素材の足場のみの移植も行う。移植 3-12 ヶ月後に作成された組織に対して、心エコー検査、生化学的および生力学的評価、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 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する。同種動物の細胞を使用した場合拒絶反応の因子を排除できないため、細胞は全て自己細胞を用いる。また再生血管の薬理的検討を行うために、再生血管をアセチルコリンにて刺激し、NO の産生能の有無を検討する。アイソトニック変位計に固定した正常血管壁（内皮細胞 (-)）を用い、その血管をノルアドレナリンにて収縮させ、その後、別のチャンバ―にて再生血管をアセチルコリンにて刺激し、正常血管が弛緩する

かを検討する。さらに再生血管自身が同様の方法にて薬物刺激により収縮、さらに弛緩するかを検討する。さらに、eNOS の産生を mRNA レベルにて検討するために Agilent 2100 bioanalyzer を用いて RT-PCR を行う。

2. 臨床応用

根治手術時、全身麻酔下に骨髄穿刺を行い、体重あたり 2cc の骨髄液を採取する。上記の血液成分分離装置により完全清潔下に操作を施行する。直ちに生分解性ポリマーの足場に播種した後、組織培養液中に浸漬し、手術室内の細胞培養室にて細胞の viability を維持しつつ保存する。細胞培養液は使用せず、自己血清を細胞浮遊液とする。自己血清に浸漬する目的は、骨髄細胞ができるだけ多くポリマー繊維に接着するように誘導することである。播種前にポリマーをファイブロネクチンで処理することにより細胞とポリマーの接着性は向上する。播種細胞数は 10^6 個/cm² とし、細胞播種後約 2-3 時間のインキュベート後、移植手術を行う。このティッシュエンジニアリングで作成した導管を移植する際には、助手は導管を培養液に浸漬させながら移植を行う。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組織過形成の有無等を経過観察する。術後遠隔期にも心臓超音波検査を施行する。再手術時に肺動脈移植部の組織片を客観的に評価した後、小組織を採取し、人工肺動脈組織と自己心肺動脈織を生化学的、生力学的、免疫組織学的に比較検討する。