

**自己骨髄細胞と脱細胞化ホモグラフトを
用いた心臓弁の開発と臨床応用**
(課題番号 17591489)

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 齋藤 聡
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 講師)



**自己骨髄細胞と脱細胞化ホモグラフトを
用いた心臓弁の開発と臨床応用**
(課題番号 17591489)

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 齋藤 聡
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 講師)

はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科 齋藤 聡

成人心臓血管外科において、重症弁膜症に対する外科的治療は人工弁置換術がすでに確立されたものとなっている。開発初期の多くの人工弁は耐久性に問題を抱えており、弁自体の構造的破壊が生じたり、血栓弁 (thrombed valve) となってしまうものもあったが、長年の改良の結果、現在機械弁では約 20 年以上の耐久性を誇るまでになった。90 年代前半からは生体弁 (ウシ心膜弁) という選択肢も増え、これらは本邦でも高齢者を中心に積極的に使用され始めている。抗血栓性に優れワーファリンの内服を必要としないという利点は、挙児希望のある若年女性に対する弁置換術の選択肢ともなった。

人工弁の問題点は何であろうか。最大の問題は人工弁感染 (Prosthesis Valve Endocarditis : PVE) であると思われる。生体にとって異物である人工弁は感染に弱く、一度 PVE と診断されるとその多くが再手術を免れない。その際、代用弁として有効性が示されているのが凍結同種弁、ホモグラフトである。これらは機械弁と比較してより生理的な血行動態を確保でき、また高い生体適合性を併せ持っているが、我が国ではその入手の困難さから、同種弁が最適と考えられる症例においても他の代用弁が使用されてきたのが実情である。

当教室では既に世界に先駆けて組織工学の方法を肺循環系血管への臨床応用に成功している。本研究ではこの技術を脱細胞化したホモグラフトに応用する。ホモグラフトは前述したようにそれ自体優

れた生体弁であるが、遠隔期の強い石灰化のため再手術が必要になり、またその際には強固な癒着のため技術的に困難であるという問題点がある。脱細胞化しその抗原性を減少することで、石灰化の原因と考えられる慢性拒絶反応を抑制することが可能である。この脱細胞化された組織を足場（scaffold）として利用し、これに自己骨髄細胞を播種することによって優れた左心系の心臓弁を作成し臨床応用することが可能であると考えられている。

心臓外科領域において完全に理想的な代用弁というものは存在しない。しかし、ホモグラフトはドナーの善意を必要とするものの、脱細胞化処理および自己細胞を用いた組織工学の手法を応用することで理想的な代用組織になり得る可能性を秘めている。我々は従来、再生血管の研究に力を入れてきたが、そこで得られた新たな知見を同種弁組織へ応用し、有用な代用弁の開発を目指していく。

1. 研究課題名・研究組織・研究経費

【研究課題名】

自己骨髄細胞と脱細胞化ホモグラフトを用いた心臓弁の開発と臨床応用

(課題番号 17591489)

【研究組織】

研究代表者：

齋藤 聡（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 講師）

研究分担者：

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）

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）

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）

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 1,800 千円

平成 18 年度 1,700 千円

計 3,500 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、山嵯健二、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。研究背景および社会的な意義や位置づけについて説明し、この分野の現状と研究目的を明確にする。

研究の目的

心臓外科領域において完全に理想的な代用弁は存在しない。ホモグラフトは、ドナーの善意の提供を必要とするが、血行動態的特性、抗凝固性に優れ、耐久性も良く、感染症例を始め、その適応症例は確実に存在する。我が国では同種弁はその入手の困難さから、同種弁が最適と考えられる症例に於いても同種弁が用いられずに他の代用弁が使用されてきたのが実情である。当教室では、東京大学組織バンクに参加し、貴重なドナーから提供される同種弁を使用する事が可能となった。ホモグラフトはこのようにそれ自体優れた生体弁であるが、遠隔期の強い石灰化のため再手術が必要になり、また石灰化のため再手術も技術的に困難であるという問題点がある。

当教室では既に世界に先駆けて組織工学の方法を肺循環系血管への臨床応用に成功している。本研究ではこの技術を脱細胞化したホモグラフトに応用する。脱細胞化することによって、石灰化の原因と考えられる慢性拒絶をその抗原性を減少することで抑制することが可能である。この脱細胞化された組織を **scaffold** として使用し、

これに自己骨髄細胞を播種することによって内皮化し、優れた左心系の心臓弁を作成し臨床応用が可能であると考えられる。

本研究の目的は脱細胞化したホモグラフトに自己骨髄細胞を播種することにより、石灰化のない再手術の可能性の低いより理想的な心臓弁を開発、臨床応用することである。

本研究の学術的特色、独創的な点及び予想される結果と意義

従来組織工学では細胞の分化の足場として生体吸収性ポリマーが用いられてきた。そのため分化した組織が完成する段階では生体内に異物が残存しない補填物の作成が可能とされている。一方生体吸収性ポリマーは人工的に作成するため強度、形状に問題点があり、大動脈弁や僧帽弁に代わるものの作成は技術的に困難な状況である。そこで脱細胞化したホモグラフトを足場として自己骨髄細胞を播種することで拒絶反応の無い、石灰化ない心臓弁の開発が可能であると予想される。

国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

現在臨床使用可能な、組織工学を用いた大動脈弁はなく、自己骨髄細胞の分化の足場としてのホモグラフトの使用は生体吸収性ポリマーによる弁の開発よりも実現性の高いものと考えられる。本研究において国内外で他に例の無い石灰化の起こらない心臓弁の臨床応用を目指す。

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組織工学的手法を用いた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。

準備状況

研究代表者は1996年から1998年まで米国 *Georgetown University*, Marie Foegh 博士、Peter Ramwell 教授のもとに留学し、血管生物学、特に移植後組織の動脈硬化の分子生物学的病因解明および成長因子の関与の解析に携わった。血管生物学研究の基礎と応用を習得し、移植後動脈硬化の予防にエストロゲンを用いて、その有用性とそのメカニズムについて基礎的研究を行い *Insulin like growth factor* (IGF-1) と一酸化窒素の影響を証明した。

さらに1999年から2003年まで、英国 *Oxford* 大学心臓血管外科 *Stephen Westaby* 教授のもとに留学し、ホモグラフトの臨床応用における有用性と問題点を血管組織、大動脈弁を行いて報告してきた。帰国後直ちに東京大学心臓血管外科学教室との共同研究を開始し、東京大学組織バンクと協力し、本邦では入手困難なホモグラフトの

臨床使用を目指して啓蒙活動、harvesting 等に参加、活動してきた。2004年、東京女子医科大学倫理委員会の認可を得て、ホモグラフトの心臓血管外科手術における臨床使用を開始した。2004年10月までに3例（先天性大動脈弁狭窄症の1例、大動脈弁機能不全の1例、および感染性腹部大動脈瘤の1例）のホモグラフト移植を行ってきた。術後経過はいずれも良好で現在外来経過観察中である。

さらに本研究では、脱細胞化したヒトホモグラフトに自己骨髄細胞を播種するという組織工学の手法を用いて、石灰化がより少なく、高圧系にも耐えうる生体弁を開発、臨床応用することを目的としている。

研究計画

< 基礎実験 >

1) in vitro 実験－組織工学的心臓弁の作成－

以下の手順に従ってあらかじめ犬から採取しておいた心臓弁の脱細胞化を行う。4℃、0.9%の生理食塩水を用いて心臓弁を洗浄する。PBS(Phosphate buffered saline)液を用いて3度洗浄を行い、0.1%トリプシンPBS溶液にて37℃、2時間攪拌する。PBS液にて3度洗浄する。4℃、0.01M Tris-HCl バッファー液にて24時間の攪拌を行う。洗浄後4℃、0.05M Tris-HCl バッファー液にて24時間の攪拌を行う。Hank's 液を用いて3度洗浄する。37℃0.05M Tris-HCl バッファー液に、5分間浸し、DNase, RNase 液で2時間攪拌する。4℃、0.05M Tris-HCl バッファー液にて24時間の攪拌を行う。この段階において、脱細胞化が完全にできているか組織学的にHE染色および

免疫組織染色を用いて検討する。

骨髓細胞の採取および播種を以下の手順で行う。前腸骨または大腿骨骨頭より骨髓穿刺を行い、骨髓液を 5-10ml 採取する。フィルターにより血球細胞のみに濾過した後遠心し、単核球細胞成分をペレットとして分離する。この細胞をあらかじめ脱細胞化した心臓弁に接着播種する。骨髓細胞播種後、約 1 時間 37°C でインキュベートを行う。

2) in vivo 実験

石灰化の評価

石灰化モデルとして既に確立されているラット皮下移植モデルを用いて、脱細胞化していないホモグラフトをコントロール群として比較検討する。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。

弁機能の評価

実験動物としてビーグル犬 (n=18) を用い、細胞を採取した同一動物を全身麻酔下に開胸し、体外循環をもちいて大動脈弁を移植する。動物は以下の 3 群に分類する。

DB: 脱細胞化骨髓細胞播種ホモグラフト群 (N=6)

H: 脱細胞化しないホモグラフト群 (N=6)

DC: 脱細胞化した骨髄細胞を播種しないホモグラフト群 (N=6)

植え込み時に心エコーを用いて、base line として血行動態および弁機能を評価する。移植 3-12 ヶ月後に実験動物を犠牲死させ、移植弁を摘出し、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い 3 群間で比較検討する。

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う。生力学的には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Ⅷ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。

<臨床応用>

1) ヒトホモグラフトの脱細胞化

ホモグラフトは東京大学組織バンクより提供を受けたものを使用する。 SHIPPINGされた冷凍保存されたホモグラフトをプロトコールにしたがって解凍する。脱細胞化のプロトコールは基礎実験と同様のプロトコールを用いる。

2) 自己細胞を用いた組織工学の方法

ヒト同種弁は東京大学組織バンク（本部、東京大学）に保存されている、主に心臓死後のドナーの善意による提供された同種組織を使用する。このホモグラフトの臨床使用については本学倫理委員会にて認可されている。10ml の骨髓細胞を完全清潔下に採取し、脱細

胞化したホモグラフトに接着播種させ、組織培養液中に浸漬し、手術室内の細胞培養室にて約 1 時間 37°C でインキュベートを行う。単純裁断法を用いて組織の断片化を行う。細胞培養液は RPMI (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) と各種成長因子 VEGF (Vascular Endothelial Cell Growth Factor)、FGF (fibroblast growth factor)、HGF (hepatic growth factor) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO BRL-Life Technologies, grand island, NY) を使用する。

3) 対象症例

対象は、同種弁の使用が最適と考えられる先天性及び後天性心疾患症例とする。特に、大動脈弁狭窄症に対する Ross 手術の右室流路再建への適応は最適であると考えられる。また活動性感染性心内膜炎に対する大動脈基部置換も重要な選択肢である。身体に重篤な感染症があると見受けられる患者、術野が明らかに汚染されている症例、compromised host と考えられる患者、長期間の副腎皮質ホルモン製剤による治療を受けている患者、創傷治癒が著しく障害されると予想される患者 (糖尿病含む)、妊娠またはその可能性のある患者、その他担当医師が不相当と判断した症例は除外する。

4) 手術

手術は十分な informed consent の得られた症例に施行する。通常

の開心術と同様に全身麻酔、人工心肺下に弁置換術を施行する。移植術後は詳細な術後観察を施行する。約1ヶ月後に心臓カテーテル造影検査、心臓超音波検査、MRI 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MRI 検査を施行する。