

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

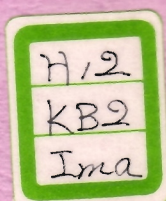
(課題番号 10470279)

平成 10、11、12 年度科学研究費補助金(基盤研究 B 2)  
研究成果報告書



平成 13 年 3 月

研究代表者 今井康晴  
(東京女子医科大学医学部循環器小児外科学講座教授)



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

(課題番号 10470279)

平成 10、11、12 年度科学研究費補助金(基盤研究 B 2)  
研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 今井康晴  
(東京女子医科大学医学部循環器小児外科学講座教授)

# 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	14
2. 肺動脈弁のティッシュエンジニアリング (羊)	19
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)	23
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)	28
5. 主肺動脈のティッシュエンジニアリング (羊)	34
6. 大動脈のティッシュエンジニアリング (羊)	45
7. 下大静脈のティッシュエンジニアリング (犬)	53
8. ティッシュエンジニアリング下大静脈の免疫組織学的検討	72
9. ヒト細胞の生体吸収性ポリマー表面への接着性の研究	82
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	84
11. 臨床応用例の呈示	90
12. 臨床例のサマリー	97
4. 参考文献	
1. 血管と心臓弁の再生	98
2. 患者本人の細胞から作る再生血管	102
3. 再生医療の現場-「再生血管の移植」	105
4. バイオ人工血管	109
5. Current Status of Tissue Engineering for Cardiovascular Structure	115
6. New Frontiers in Tissue Engineering: Applications of Tissue Engineering in Cardiovascular Surgery	120
7. 再生血管移植の基礎	127
8. 心臓血管外科の再生医工学	134
9. 再生医学の基礎的、臨床的研究の最新の進歩	142

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。組織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血管あるいは弁膜組織は、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。

過去 3 年間の基礎研究を土台として、2000 年 5 月に臨床一例目の応用がなされ良好な結果が得られた。本報告書でのその報告ができることは感慨深いものがあるが、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】

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

(課題番号 10470279)

### 【研究組織】

研究代表者 : 今井康晴 (東京女子医科大学循環器小児外科 教授)

研究分担者 : 新岡俊治 (東京女子医科大学循環器小児外科 講師)

青木 満 (東京女子医科大学循環器小児外科 講師)

高梨吉則 (東京女子医科大学循環器小児外科 教授)

安藤 誠 (東京女子医科大学循環器小児外科 助手)

松岡瑠美子 (東京女子医科大学循環器小児科 助手)

### 【研究経費】

平成10年度 7,700千円

平成11年度 1,900千円

平成12年度 2,100千円

計 11,700千円

## 1. 研究発表

### 【学会誌など】

1. Nakanishi T, Tsuji T, Kondoh C, Park I, Kawana M, Magosaki N, Takahashi S, Nakazawa M, Koyanagi H, Imai Y, Kasanuki H, Momma K. [Catheter intervention for adult congenital heart diseases]. *Journal of Cardiology*. 1998;31:361-372.
2. Nagashima M, Shin'oka T, Nollert G, Shum-Tim D, Hickey PR, Roth SJ, Kirchhoff A, Springer TA, Burke PR, Mayer JE, Jr. Effects of a monoclonal antibody to P-selectin on recovery of neonatal lamb hearts after cold cardioplegic ischemia. *Circulation*. 1998;98:II391-397; discussion II397-398.
3. Tomizawa Y, Takanashi Y, Noishiki Y, Nishida H, Endo M, Koyanagi H. Evaluation of small caliber vascular prostheses implanted in small children: activated angiogenesis and accelerated calcification. *ASAIO Journal*. 1998;44:M496-500.
4. Park IS, Nakanishi T, Nakazawa M, Takanashi Y, Imai Y, Momma K. Radiofrequency pulmonary valvotomy using a new 2-French catheter [see comments]. *Catheterization & Cardiovascular Diagnosis*. 1998;45:37-42.
5. Shin'oka T, Shum-Tim D, Laussen PC, Zinkovskiy SM, Lidov HG, du Plessis A, Jonas RA. Effects of oncotic pressure and hematocrit on outcome after hypothermic circulatory arrest. *Annals of Thoracic Surgery*. 1998;65:155-164.
6. Shin'oka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1998;115:536-545; discussion 545-536.
7. Shum-Tim D, Nagashima M, Shin'oka T, Bucerius J, Nollert G, Lidov HG, du Plessis A, Laussen PC, Jonas RA. Postischemic hyperthermia exacerbates neurologic injury after deep hypothermic circulatory arrest. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1998;116:780-792.
8. Hiramatsu T, Imai Y, Takanashi Y, Seo K, Terada M, Nakazawa M. Hemodynamic effects of human atrial natriuretic peptide after modified Fontan procedure. *Annals of Thoracic Surgery*. 1998;65:761-764.
9. Nollert G, Shin'oka T, Jonas RA. Near-infrared spectrophotometry of the brain in cardiovascular surgery. *Thoracic & Cardiovascular Surgeon*. 1998;46:167-175.

10. Hiramatsu T, Takanashi Y, Imai Y, Hoshino S, Seo K, Terada M, Iwata Y, Tomimatsu H. Atrial septal displacement for repair of anomalous pulmonary venous return into the right atrium. *Annals of Thoracic Surgery*. 1998;65:1110-1114.
11. Kawasaki M, Yoshihara K, Koyama N, Watanabe Y, Yamazaki S, Takanashi Y. [A successful case report of one and one half ventricle repair for pure pulmonary stenosis in a 4-year-old girl]. *Japanese Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1998;46:933-938.
12. Nomura F, Aoki M, Forbess JM, Mayer JE, Jr. Effects of adenosine infusion with or without leukocyte depletion on recovery after hypothermic ischemia in neonatal lamb hearts. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 1998;14:76-81.
13. Yoshihara K, Ozawa T, Sakuragawa H, Fujii T, Shiono N, Watanabe Y, Koyama N, Matsuura H, Saji T, Takanashi Y. [Surgical treatment of total anomalous pulmonary venous connection--clinical aspects of pulmonary venous obstruction]. *Japanese Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1998;46:1126-1132.
14. Nagashima M, Shin'oka T, Nollert G, Shum-Tim D, Rader CM, Mayer JE, Jr. High-volume continuous hemofiltration during cardiopulmonary bypass attenuates pulmonary dysfunction in neonatal lambs after deep hypothermic circulatory arrest. *Circulation*. 1998;98:II378-384.
15. Fujii T, Koyama N, Watanabe Y, Shiono N, Yoshihara K, Takanashi Y. [A case report of incomplete endocardial cushion defect with mitral stenosis in an elderly patient]. *Japanese Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1998;46:1032-1036.
16. Uchita S, Imai Y, Takanashi Y, Hoshino S, Seo K, Terada M, Aoki M, Nagashima M. [Surgical management of patent ductus arteriosus in low body weight infants]. *Japanese Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1998;46:1088-1092.
17. Yasharu Imai, Kazuhiro Seo, Masatsugu Terada, Mitsuru Aoki, Toshiharu Shin'oka, Jun Ohta, Yuhsuke Iwata Valvulara repair for atrioventricular regurgitation in complex anomalies in modified Fontan procedure with reference to a single ventricle associated with a common atrioventricular valve *Pediatric Cardiac Surgery Annual of the Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1998 : 2 ; 5-19
18. Nollert G, Nagashima M, Bucarius J, Shin'oka T, Jonas RA. Oxygenation strategy and neurologic damage after deep hypothermic circulatory arrest. I.

- Gaseous microemboli. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1999;117:1166-1171
19. Kashiwagi J, Imai Y, Takanashi Y, Terada M, Suetsugu F. [A case of intracardiac repair for anatomically corrected malposition of the great arteries (S, D, L)]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 1999;52:587-591.
  20. Nollert G, Nagashima M, Bucerius J, Shin'oka T, Lidov HG, du Plessis A, Jonas RA. Oxygenation strategy and neurologic damage after deep hypothermic circulatory arrest. II. hypoxic versus free radical injury. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1999;117:1172-1179.
  21. Shin'oka T, Nagashima M, Nollert G, Shum-Tim D, Laussen PC, Lidov HG, du Plessis A, Jonas RA. A novel sialyl Lewis X analog attenuates cerebral injury after deep hypothermic circulatory arrest. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1999;117:1204-1211.
  22. Sasaki H, Imai Y, Takanashi Y, Hoshino S, Seo K, Terada M, Aoki M, Hiramatsu K, Ota J, Koide M, Hagino I. [A case of supra-avalvular mitral ring]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 1999;52:583-585.
  23. Ozawa T, Yoshihara K, Koyama N, Watanabe Y, Shiono N, Fujii T, Sakuragawa H, Hamada S, Masuhara H, Takanashi Y. [Reoperation of tetralogy of Fallot for the transannular patch neo-intimal stenosis: a case report]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 1999;52:856-859.
  24. Yoshihara K, Ozawa T, Sakuragawa H, Fujii T, Kawasaki M, Shiono N, Watanabe Y, Koyama N, Mastuura Y, Saji T, Takanashi Y. [Noonan syndrome associated with atrial septal defect, pulmonary stenosis, and completely unroofed coronary sinus without LSVC: a case report]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 1999;52:134-137.
  25. Ozawa T, Yoshihara K, Koyama N, Yamazaki S, Takanashi Y. Superior biocompatibility of heparin-bonded circuits in pediatric cardiopulmonary bypass. *Japanese Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1999;47:592-599.
  26. Hiramatsu T, Imai Y, Takanashi Y, Seo K, Terada M, Aoki M, Nakazawa M. Time course of endothelin-1 and adrenomedullin after the Fontan procedure. *Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68:169-172.
  27. Ohno H, Imai Y, Terada M, Hiramatsu T. The long-term results of commissure plication annuloplasty for congenital mitral insufficiency. *Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68:537-541.
  28. Ohkado A, Imai Y, Takanashi Y, Seo K, Terada M, Aoki M, Hiramatsu T, Ohta J, Hagino I. [A case of Bentall's operation for an 11-year-old patient with Marfan syndrome]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*.



- 1999;52:201-203.
29. Nomura F, Aoki M, Forbess JM, Mayer JE, Jr. Myocardial self-preservative effect of heat shock protein 70 on an immature lamb heart. *Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68:1736-1741.
  30. Tobe M, Kondo J, Suzuki S, Isoda S, Takanashi Y, Uchida K, Sugiyama M. [Clinical outcome of emergency coronary artery bypass grafting for acute myocardial infarction with cardiogenic shock]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 1999;52:611-614.
  31. Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses MA, Stamp A, Taylor G, Moran AM, Landis W, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68:2298-2304; discussion 2305.
  32. Serdar Gunaydin, Toshiharu Shinoka New Frontiers in Tissue Engineering: Applications of Tissue Engineering in Cardiovascular Surgery Turkish J Medical Sciences30 : 1-7, 2000
  33. 新岡俊治、今井康晴、高梨吉則、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、平松健司、太田 淳、柏木潤一、森島重弘、小沼武司 右心系再建に自己組織のみを用いるRoss手術変法 胸部外科 53:175-184,2000
  34. Shin'oka T, Nollert G, Shum-Tim D, du Plessis A, Jonas RA. Utility of near-infrared spectroscopic measurements during deep hypothermic circulatory arrest. *Annals of Thoracic Surgery*. 2000;69:578-583.
  35. Nemeto S, Aoki M, Dehua C, Imai Y. Free hemoglobin impairs cardiac function in neonatal rabbit hearts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2000;69:1484-1489.
  36. Isomatsu Y, Imai Y, Seo K, Terada M, Aoki M, Shin'oka T. [Cerebral oxygenation during non-blood prime cardiopulmonary bypass in congenital heart surgery]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 2000;53:847-851.
  37. Ozawa T, Yoshihara K, Koyama N, Watanabe Y, Shiono N, Takanashi Y. Clinical efficacy of heparin-bonded bypass circuits related to cytokine responses in children. *Annals of Thoracic Surgery*. 2000;69:584-590.
  38. Okamura T, Imai Y, Kon Y, Goto M, Yamamoto M, Watanabe T. Molecular cloning and characterization of mouse testis poly(A) binding protein II encoded by the Pabp3 gene, which transcomplements meiotic mutant sme2 of *S. pombe*. *Biochemical Genetics*. 2000;38:1-11.
  39. Tsukui H, Imai Y, Takanashi Y, Terada M, Hiramatsu T. Anatomic biventricular correction by taking down bicaval Glenn shunt. *Annals of Thoracic Surgery*. 2000;69:1268-1270.

40. Ando M, Tomizawa Y, Noishiki Y, Terada M, Imai Y. Autologous tissue-fragmented extracardiac conduit with rapid, stable endothelialization due to angiogenesis. *Japanese Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2000;48:153-160.
41. Watanabe M, Shinoka T, Imai Y Tissue engineered vascular autograft- inferior vena cava replacement in a dog model- *Tissue Engineering* ( in press),2001
42. Shinoka T, Imai Y, Ikada Y Transplantation of a Tissue Engineered Pulmonary Artery *The New England Journal of Medicine* 344:532-533, 2001

【学会発表等】

1. 寺田正次、今井康晴、高梨吉則、瀬尾和宏、青木 満、新岡俊治、平松健司、太田 淳、小出昌秋、森島重弘、柏木潤一、打田俊司、坂本貴彦、門間和夫、中沢 誠、中西敏雄 自己組織による手術-右室肺動脈直接吻合による右室流出路再建術の検討 第 34 回日本小児循環器学会総会(平成 10 年 7 月 21 日)
2. 新岡俊治 血管の Tissue Engineering 第 8 回大阪マイクロサージェリー研究会 (特別講演) (平成 10 年 10 月 3 日)
3. 新岡俊治、今井康晴、高梨吉則、John E. Mayer Jr., Joseph P. Vacanti 組織工学(Tissue Engineering)による自己肺動脈作成 第 51 回日本胸部外科学会総会 (平成 10 年 10 月 4 日)
4. 新岡俊治、今井康晴、高梨吉則、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、平松健司、太田 淳、小出昌秋、篠崎雅人、柏木潤一、萩野生男、森島重弘、打田俊司 右心系再建に自己組織のみを用いる ROSS 手術変法 第 34 回日本小児循環器学会総会 (平成 10 年 7 月 22 日)
5. 新岡俊治、今井康晴、高梨吉則、長島光樹、John E Mayer Jr., Joseph P Vacanti 組織工学(Tissue Engineering)による心血管補填材料作製の試み 第一回日本組織工学会 (平成 10 年 6 月 26 日)
6. 新岡俊治 人工血管、循環器外科におけるバイオマテリアル バイオマテリアル学会講座  
バイオマテリアル入門 (平成 10 年 6 月 5 日)
7. 新岡俊治、今井康晴、高梨吉則、JP Vacanti, JE Mayer, Jr. 組織工学による自己肺動脈弁作成の試み 日本外科学会 (平成 10 年 4 月 10 日)
8. 新岡俊治 Tissue Engineering の現況-心臓弁膜、血管組織作成をめざして- 第 4 回臓器工学研究会 (名古屋) (平成 10 年 4 月 20 日)
9. Manabu Watanabe, Toshiharu Shin'oka, Satoshi Tohyama, Takeshi Konuma, Toru Ishida, Yasuharu Imai, Mitunori Yamakawa, Yoshito Ikada, Shin'ichiro Morita TISSUE ENGINEERED VASCULAR AUTOGRAFT (TEVA) INFERIOR VENA CAVA (IVC) REPLACEMENT STUDY IN A DOG MODEL 4th International Conference of Cellular Engineering(平成 11 年 11 月 3 日)
10. 平松健司、今井康晴、高梨吉則、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、新岡俊治、太田 淳、長嶋光樹、石山雅邦、岩田祐輔、滝口 信、押富 隆、島袋高志、斎藤博之、渡辺 学、佐々木英樹、遠山悟史、中島光貴、依田真隆 右室肺動脈導管としての自己心膜 2 弁付き心外導管の中期遠隔成績 第 35 回日本小児循環器学会総会 (平成 11 年 3 月)

11. Toshiharu Shin`oka, Yasuharu Imai, Yoshinori Takanashi, Kazuhiro Seo, Masatsugu Terada, Mitsuru Aoki, Takeshi Hiramatsu, Jun Ohta. Pulmonary Outflow Tract Reconstruction with Autologous Tissue during the Ross Procedure: Right Ventricular Characteristics in Mid-term Follow-up American College of Cardiology 48th Annual Scientific session (平成 11 年 3 月 9 日)
12. Toshiharu Shin`oka Vascular Tissue Engineering Expert Symposium Tissue Engineering Status quo 2nd International Interdisciplinary Meeting on Abdominal Cancer in Children (平成 11 年 2 月 22 日)
13. 新岡俊治、今井康晴、柏木潤一、渡辺 学、小沼武司、石田徹、遠山悟史、筏 義人、JP Vacanti, JE Mayer Jr. 心血管領域におけるティッシュエンジニアリングの新展開 第 37 回人工臓器学会(シンポジウム) (平成 11 年 10 月 16 日)
14. 新岡俊治、今井康晴、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、平松健司、太田 淳、長嶋光樹、石山雅邦、佐藤一樹、森島克昌、岩田祐輔、渡辺 学、佐々木英樹、小沼武司、遠山悟史、依田真隆 先天性大動脈弁病変に対する Ross 手術と今野手術の比較検討(術中、術後急性期因子) 第 52 回日本胸部外科学会総会 (平成 11 年 10 月)
15. 新岡俊治、今井康晴、柏木潤一、渡辺 学、小沼武司、石田 徹、遠山悟史 Step to the next decade: Tissue Engineering 心血管領域におけるティッシュエンジニアリングの現況 第 26 回マイクロサージェリー学会(特別講演) (平成 11 年 11 月)
16. 寺田正次、今井康晴、高梨吉則、瀬尾和宏、青木 満、新岡俊治、平松健司、太田 淳、森島重弘、柏木潤一、打田俊司 自家心膜の二弁付き導管による肺動脈再建術を併用した Ross 手術 第 29 回日本心臓血管外科学会学術総会 (平成 11 年 2 月)
17. Dominique Shum-tim, Urlick Stock, Jeff Hrkach, Toshiharu Shin'oka, Jamie Lien, Marsha Moses, Andrea Stamp, George Taylor, Adrian Moran, William Landes, Robert Langer, Joseph Vacanti, John E Mayer Jr. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer 35th Annual Meeting The Society of Thoracic Surgeons (San Antonio) (平成 11 年 2 月)
18. 小沼武司、新岡俊治、石田 徹、渡辺 学、遠山悟史、今井康晴 組織工学による心血管組織構築のためのヒト動脈壁細胞-生分解性ポリマーの接着性の研究 第二回組織工学会 (平成 11 年 5 月)
19. 新岡俊治、今井康晴、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、平松健司、太田 淳、

- 長嶋光樹、石山雅邦、岩田祐輔、押富 隆、滝口 信、渡辺 学、佐々木英樹、遠山悟史 低出生体重児心疾患の開心根治術の検討 第 35 回日本小児循環器学会総会（平成 11 年 7 月）
20. 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 Autograft の経時的遠隔期評価 第 53 回日本胸部外科学会総会（平成 12 年 10 月）
21. 渡辺 学、新岡俊治、遠山悟史、日比野成俊、山川光徳、筏 義人、森田真一郎、今井康晴 Tissue Engineering (TE) により作成した静脈グラフトの慢性期の免疫組織学的検討 第 3 回日本組織工学会（平成 12 年 5 月）
22. 平松健司、今井康晴、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、新岡俊治、太田 淳、長嶋光樹、石山雅邦、佐藤一樹 心外導管手術後の導管不全に対する再手術例の検討 第 36 回日本小児循環器学会総会（平成 12 年 7 月）
23. 渡辺 学、新岡俊治、遠山悟史、小沼武司、石田徹、日比野成俊、山川光徳、筏義人、森田真一郎、今井康晴 Tissue Engineering (TE) により作成した静脈グラフトの慢性期の免疫組織学的検討 第 30 回日本心臓血管外科学会（平成 12 年 2 月）
24. 平松健司、今井康晴、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、新岡俊治、太田 淳、長嶋光樹、石山雅邦、佐藤一樹、岩田祐輔、丁 毅文、渡辺 学、遠山悟史、岡山尚久 右室流出路再建術としての心外導管手術の工夫と中期遠隔成績 第 30 回日本心臓血管外科学会（平成 12 年 2 月）
25. 新岡俊治 Tissue Engineering Cardiovascular Structure 第 1184 回慶應医学会（平成 12 年 11 月 9 日）
26. 新岡俊治 心血管外科領域におけるティッシュエンジニアリングの応用 第 30 回横浜循環器セミナー（平成 12 年 12 月 1 日）
27. 新岡俊治、今井康晴、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、平松健司、太田 淳、石山雅邦、佐藤一樹、丁 毅文、岡村 達 狭小左心室を有する大血管転位症 I 型に対する外科治療の選択とその成績 第 53 回日本胸部外科学会総会（平成 12 年 10 月）
28. 新岡俊治 心臓弁と血管の Tissue Engineering（特別講演）第 2 回徳島臨床脈管研究会（平成 12 年 9 月 29 日）
29. 新岡俊治 心血管系のティッシュエンジニアリング 第 10 回脳血管シンポジウム（平成 12 年 9 月 9 日）
30. 新岡俊治 自己細胞を用いるティッシュエンジニアリングによる自己再生血管の開発 第 3 回再生医工学フォーラム（平成 12 年 8 月 22 日）
31. 新岡俊治 Tissue Engineering による心血管材料の開発 第 10 回循環器内科、外科フォーラム（平成 12 年 9 月 16 日）
32. 新岡俊治 心臓血管外科領域における Tissue Engineering 日本血

- 管外科学会中国四国地方会第31回総会（平成12年7月22日）
33. 新岡俊治、今井康晴、日比野成俊、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、小沼武司、遠山悟史、山川光徳、筏 義人、森田真一郎 バイオ人工血管の開発 第48回日本心臓病学会学術集会 大阪（平成12年9月12日）
  34. 新岡俊治 ティッシュエンジニアリングを応用した心臓弁膜組織、血管組織の作成 榊原記念病院特別講演会（平成12年5月26日）
  35. 新岡俊治 心臓血管外科の再生医工学 再生医工学推進シンポジウム（平成12年7月7日）
  36. 新岡俊治 心臓血管外科系の Tissue Engineering（特別講演）第11回医工学フォーラム（平成12年5月12日）
  37. 新岡俊治、今井康晴、渡辺 学、遠山悟史、小沼武司、日比野成俊、山川光徳、筏義人、森田真一郎 心臓血管外科領域におけるティッシュエンジニアリング 日本医工学治療学会第14回学術大会（平成12年2月）
  38. 新岡俊治、今井康晴、瀬尾和宏、寺田正次、青木 満、渡辺 学、小沼武司、遠山悟史、柏木潤一、石田徹、筏義人、森田真一郎、山川光徳 ティッシュエンジニアリングによる心血管材料の開発、応用 第30回日本心臓血管外科学会（平成12年2月）
  39. Toshiharu Shin'oka Tissue Engineered Vascular Autograft International Workshop on Bio-integrated Materials & Tissue Engineering(Panelist)（平成12年1月）
  40. 新岡俊治、今井康晴、日比野成俊、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、小沼武司、遠山悟史、山川光徳、筏 義人、森田真一郎 自己組織を用いるティッシュエンジニアリングによる自己再生血管の開発 第38回日本人工臓器学会（ワークショップ）（平成12年9月29日）
  41. 新岡俊治 心臓弁と血管のティッシュエンジニアリング 第5回九州心臓血管外科若手の会（平成12年10月14日）
  42. 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)
  43. 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）

## 【著書】

1. 新岡俊治 ティッシュエンジニアリングによる心臓弁組織作成  
--大動物（羊）モデルによる検討--ティッシュエンジニアリング  
組織工学の基礎と応用上田実編 p177-185 名古屋大学出版会、1999
2. 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、2000

## 【総説】

1. 新岡俊治 血管と心臓弁の再生 BIO Clinica 15:1123-27, 2000
2. 新岡俊治、今井康晴 患者本人の細胞から作る再生血管 治療 82:125-  
27,2000
3. 新岡俊治 再生医療の現場-「再生血管の移植」 実験医学 18:2276-  
2279,2000
4. 新岡俊治、今井康晴 バイオ人工血管 医学のあゆみ 195:170-174,2000
5. Toshiharu Shin'oka, Yasuharu Imai, Manabu Watanabe, Goki  
Matsumura, Yoshimichi Kosaka, Takeshi Konuma, Narutoshi Hibino,  
Satoshi Toyama, Mitunori Yamakawa, Yoshito Ikada, Shinichiro Morita  
Current Status of Tissue Engineering for Cardiovascular Structure  
Journal of Artificial Organ 3:102-106,2000
6. 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
7. 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 (in press), 2001
8. 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

心臓血管外科領域における心内及び血管修復術において、欠損病変（心房中隔欠損症、心室中隔欠損症、肺動脈閉鎖症、肺動脈狭窄症、弁膜症）に対しては自己組織あるいは異物による補填あるいは置換が必須となる。現在、一般的に頻用されている補填材料としては 1)自己心膜、2)冷凍保存同種大動脈壁、3)保存異種心膜、4)人工布（ダクロン、テフロン、ゴアテックス等）が挙げら



れる。これらは、遠隔期石灰化及び劣化、拒絶反応、donor 不足、高価格、内皮化遅延に問題が残っている。また後 2 者は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。本研究の目的は、組織工学の手法によりヒト細胞を用いて臨床応用可能な心血管組織を作成し、上記の補填材料の問題点を解決することである。現在の心臓血管外科領域の組織工学においては、右心系すなわち低圧系システムにおける可能性は大動物による研究でほぼ検証されてきたが、高圧系においては研究がなされていない。また、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。

### 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受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、mobidity 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は米国での研究は散見されるが国内での研究は、ほとんど皆無で、上記のような利点を有す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	奨励研究 (A)
研究代表者	安藤誠	
題名	吸収性素材を支持体とした成長し得る新生血管壁の形成	
期間	平成8年	
研究経費	1000 千円	
研究成果	Ando M, Noishiki Y, Terada M, Imai Y. Regeneration of viable neointima in the valved extracardiac conduit using in vivo cultivation technique. 2nd World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery, Honolulu, Hawaii, May 11-15, 1997	

#### (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 10 年度は基礎的研究を主に施行し、平成 11、12 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。培養プラスチック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、 $10 \times 10^6$  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  $1 \text{ cm}^2$  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。

## 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 10、11 年度はおもに、ヒト細胞培養の技術的な手法を確立し、動物実験では細胞-ポリマーの人工血管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、これらの研究成果を基に平成 11 年 4 月には東京女子医大倫理委員会での是認も得られ、平成 12 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た。今後さらにも臨床例を積み重ねて検討を加えて報告する。