

内因性サイトカインの活性化により治癒を  
促進するハイブリッド人工血管の開発

(課題番号 09680865)

平成9、10年度科学研究費補助金（基盤研究C）  
研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 富澤 康子

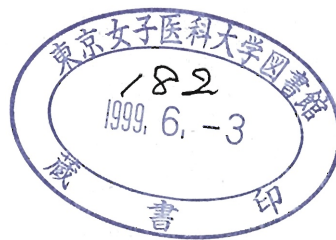
(東京女子医科大学循環器外科学講座助手)



内因性サイトカインの活性化により治癒を  
促進するハイブリッド人工血管の開発

(課題番号 09680865)

平成9、10年度科学研究費補助金（基盤研究C）  
研究成果報告書



平成11年3月

研究代表者 富澤康子

(東京女子医科大学循環器外科学講座助手)

## 目次

|  |       |
|--|-------|
| はしがき .....   | 1     |
| 1. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表 .....  | 3     |
| 2. 研究成果  |       |
| 1. この度の研究計画及び成果の概要 .....   | 7     |
| 2. Evaluation of Small Caliber Vascular Prostheses Implanted in<br>Small Children; Activated Angiogenesis and Accelerated<br>Calcification ..... | 1 1   |
| 3. 人工血管内皮化促進のためのin vivo組織培養における内因性サイト<br>カインの活性化 .....   | 2 9   |
| 4. 皮下に植え込まれた人工血管の治癒過程におけるbFGFの動向 .....   | 3 5   |
| 5. 細胞と組織移植によるバイオ人工血管 .....   | 4 5   |
| 3. 参考論文  |       |
| 1. 各種動脈グラフトの組織学的特性 .....   | 5 3   |
| 2. <i>In situ</i> 3本動脈グラフトによるCABG<br>-何も引かない、何も足さない .....  | 5 7   |
| 3. CABGグラフトの早期および遠隔成績 .....  | 6 5   |
| 4. MIDCABにおける工夫 .....  | 7 1   |
| 5. 冠動脈内血栓が疑われ術中造影及びPTCRを施行したMIDCABの<br>1 治験例 .....   | 7 5   |
| 6. 術前左室造影施行不能例に対する冠状動脈バイパス手術の検討 .....  | 8 1   |
| 7. 呼吸機能障害を伴った症例に対する冠動脈バイパス術の検討 .....   | 8 7   |
| 8. 左中大脳動脈に高度狭窄を伴う狭心症例に対する 1 手術治験例;<br>術中脳血流モニタリングの有用性 .....  | 9 3   |
| 9. ミズオオトカゲとグリーンイグアナの心臓の観察からの<br>Transmyocardial perfusionに関する一考案 .....   | 9 7   |
| 10. Rabbit Ear Chamberの撮影方法 .....  | 1 0 1 |
| 11. 日本における長期植え込み型人工臓器のインプラント・データ・<br>システム設立の可能性 .....  | 1 0 7 |

人工血管の研究についてAlexis Carrel博士抜きには語れないが、博士は1873年にフランス・リオンで生まれた。1894年6月にフランスの大統領が刀で襲撃され、腹部大動脈損傷を受けた。このとき担当医師は大血管が切断しているので救命できないといったが、病院でインターンをしていたカレルは『皮膚・腸・筋肉・腱は縫える。血管も縫えないはずがない。』と思い、1901年から実験血管外科を始めた。大変器用な人でリヨンの刺繍師ラルディエ夫人に就いて学び、また凹凸のない針とワセリンを塗ってなめらかにした糸を用いることをレース細工の女工たちから学んだのが大いに役に立った。

カレル博士は組織培養、組織移植、血管縫合、代用血管の開発などに力を注ぎ、学術的に優れた論文を多数残した。特に、『血管吻合の手術テクニック』という題で血管吻合の際に三点支持を行ったという論文は1902年にLyon Medicaに掲載されているのが有名である。

優れた研究者はしばしば“evidence”、すなわち自分の目を見たことを自分なりに解釈したことを真実だと主張する傾向にあるが、カレルもevidenceを重んじたばかりに、母国フランスにいられなくなる原因を作ってしまった。霊泉のある聖地ルルドへの巡礼の団体に付き添った時に見た現象（奇跡？、信仰の力？）をリオンの医学会に報告した。その結果、教会の牧師からは神の力を疑うとはけしからんと意見され、医者からはだまされていると軽蔑された。その結果1904年には新大陸にわたっている。

カレル博士は血管外科、移植外科、心臓外科の基礎をほとんど作り、それが認められ1912年にノーベル賞を受賞している。現在、87年前の博士のノーベル賞受賞講演を読んでも、間違いがほとんどないことに驚く。博士は移植した臓器と宿主との拒絶反応とかの相互作用について気付いてはいたが、サイトカインという生理的活性化物質の存在をみつけるまでには至らなかった。

この度、内因性サイトカインの活性化により治癒を促進するハイブリッド人工血管の開発を目指した。人工血管研究者の努力が実を結び、優れた人工血管が開発され、臨床に応用される日の来ることを祈る。

## 1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

### 【研究課題名】

内因性サイトカインの活性化により治癒を促進する  
ハイブリッド人工血管の開発

研究課題番号 09680865

### 【研究組織】

研究代表者 富澤康子（東京女子医科大学循環器外科助手）

### 【研究経費】

平成9年度 2,500千円

平成10年度 1,100千円

計 3,600千円

### 【研究発表】

学会誌

1. 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 J, 44:M496-M500, 1998
2. 富澤康子：細胞と組織移植によるバイオ人工血管、人工臓器、27:708-714, 1998
3. 富澤康子、北村昌也、小柳仁：日本における長期植え込み型人工臓器のインプラント・データ・システム設立の可能性、人工臓器、27:92-96, 1998
3. 富澤康子ほか：ミズオオトカゲとグリーンイグアナの心臓の観察からの Transmyocardial perfusionに関する一考案、冠疾患学会雑誌、4:71-74, 1998
4. 富澤康子、遠藤真弘、西田博、古川博、華山直二、安原清光、小柳仁、中村光司、羽生富士夫、高崎健：急性胆嚢炎により胆嚢摘出術または経皮経肝的穿刺ドレナージを必要とした虚血性心疾患に対する冠動脈バイパス術、Coronary, 15:165-170, 1998
5. 坂本貴彦、遠藤真弘、西田博、富澤康子、木原信一郎、小柳仁：術前左室造影施行不能例に対する冠状動脈バイパス手術の検討、日胸外会誌、46:966-970、1998
6. 古川博史、遠藤真弘、西田博、富澤康子、平田欽也、川合明彦、小柳仁：冠動脈内血栓が疑われ術中造影及びPTCRを施行したMIDCABの1治験例、Coronary, 15:113-117, 1998
7. 上部一彦、遠藤真弘、西田博、富澤康子、小柳仁、大西哲、笠貫宏：III群治療薬MS-551が著効した致死性不整脈(VT,Vf)による人工心肺離脱困難例の経

- 験、胸部外科、51:108-111、1998
8. 佐藤志樹、西田博、遠藤真弘、富澤康子、椎川彰、赤沢俊政、佐々木英樹、小柳仁:呼吸機能障害を伴った症例に対する冠動脈バイパス術の検討、日胸外会誌、46:145-149、1998
  9. 鮎沢慶一、遠藤真弘、西田博、富澤康子、上部一彦、前田朋大、丁毅文、滝口信、石田徹、小柳仁:左中大脳動脈に高度狭窄を伴う狭心症例に対する1手術治験例;術中脳血流モニタリングの有用性、胸部外科、51:731-734、1998
  10. 小林健介、遠藤真弘、西田博、富澤康子、佐藤宏明、小柳仁:Extramammary Paget's Diseaseで植皮施行後に労作性狭心症に対する冠状動脈バイパス術を施行した1例、日胸外会誌、46:878-881、1998
  11. 岡徳彦、遠藤真弘、西田博、川合明彦、富澤康子、小柳仁:TMLR術1時間後の左室造影で心筋へのチャンネルを認めなかった1例、Coronary, 15:171-175、1998
  12. Noishiki Y, Yamane Y, Okoshi T, Tomizawa Y, Satoh S:Choice, isolation, and preparation of cells for bioartificial vascular grafts, Artif Organs, 22:50-62, 1998
  13. Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H:Multiple CABG with only In Situ Arterial Conduits, Cardiovascular Engineering, 3:22-25, 1998
  14. 富澤康子、高梨吉則、野一色泰晴、今井康晴、小柳仁:先天性心疾患の姑息的シャント術に使用された人工血管の変化、人工臓器、26:524-528、1997
  15. 富澤康子、野一色泰晴、西田博、遠藤真弘、小柳仁:人工血管内皮化促進のためのin vivo組織培養における内因性サイトカインの活性化、人工臓器、26:699-703、1997
  16. 富澤康子、西田博、遠藤真弘、小柳仁:各種動脈グラフトの組織学的特性、coronary,14:5-8、1997
  17. 富澤康子、西田博、遠藤真弘、小柳仁:MIDCABにおける工夫、日本冠疾患学会雑誌、3:71-74、1997
  18. 遠藤真弘、西田博、富澤康子、八田光弘、北村昌也、青見茂之、小柳仁:In situ, 3本動脈グラフトによるCABG-何も引かない、何も足さない、coronary,14:59-66、1997
  19. 高梨吉則、富澤康子、野一色泰晴、吉原克則:Blalock-Taussig短絡に用いたEPTFE人工血管壁に石灰化が認められた1症例、胸部外科、50:71-73、1997
  20. 北村昌也、青見茂之、木原信一郎、大塚吾郎、平田欽也、富澤康子、八田光弘、西田博、遠藤真弘、小柳仁:遠隔成績から見た弁膜症手術の術式の選択:弁置換術と弁形成術の比較検討、日胸外会誌、45:406-407、1997
  21. 西田博、前田朋大、上部一彦、八巻文貴、平田欽也、中野秀昭、北村昌也、富澤康子、青見茂之、八田光弘、遠藤真弘、小柳仁:人工心肺離脱困難時の補助循環-導入基準とClinical Impression-、Cardiovascular Anesthesia, 1:95-98、1997

22. Noishiki Y, Yamane Y, Tomizawa Y, Satoh S: Attempt to use natural cytokine synthesis from transplanted bone marrow, Cell Eng, 1997, 2(1):19-28
23. Ohtsuka G, Aomi S, Koyanagi H, Tsukui H, Tomizawa Y, Hashimoto A, Sakomura Y: Heart valve operation in acromegaly, Ann Thorac Surg, 1997;64:390-3

## この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学循環器外科 冨澤康子

### はじめに

この度の研究計画及び成果のエッセンスについて簡単に解説しておきたい。それを理解しておくことで、本研究の全貌が大まかに理解できるであろうし、以下に続く研究成果論文、参考論文を読むに当たっても、一層深い理解が得られるであろう。また同時に、この研究を始めるに当たっての背景についても解説しておくので、それを知ること、この度の研究成果の意味を浮き彫りにすることができると思う。

### 研究の背景

現在、布製およびePTFE製の多種類の人工血管が市販されている。しかし、人工血管置換術を含めた外科治療にて使用される人工血管は治癒不全のため遠隔期においても内皮細胞によって内面が完全に被覆されることはほとんどない。これは人工血管における治癒不全によるものであり、これを改善することに興味をもたれている。

ハイブリッドとは、その構成において材料もしくは構造の違うものを組み合わせることにより各々の利点を引き出すことを目的にしている。人工素材と生体素材を用いて作った人工血管をハイブリッド人工血管とよんでいる。

生体由来材料とは生体細胞や生体組織由来物質を意味し、遺伝子治療の場を提供することが可能である。そのため細胞工学的手法を使って成長因子を産生させることが可能な細胞を作ることが可能になってきている。従来の血液導管としての受動的な機能に加えて機能を新しく賦与した能動的なハイブリッド人工臓器として新しい展開が大いに期待されている。またサイトカイン、中でも basic

fibroblast growth factor (bFGF)と血管新生の研究が人工血管において盛んであるが血管新生をうまく誘導できれば内皮細胞による内面被覆が可能で、抗血栓性に優れた小口径も夢ではない。

### 研究の目的

本研究の目的は自己の組織内に含まれるサイトカインを植え込み後にその場所で活性化することにより、個々の持つ治癒力を最大に発揮できる人工臓器を人工血管という形で開発することである。また、ハイブリッド人工血管の利点を生かして、播種した組織片内の細胞に細胞工学的手法を使うことによって、VEGF、bFGF等の因子、またヘパリン様物質、インスリン等の物質を産出し、能動的な機能を発揮するように設計したい。この研究は動脈硬化症の外科的治療の進歩に大いに貢献するばかりでなく、将来の多機能型人工臓器への発展をも目指している。

### この研究の独創的な点

従来からの人工血管開発に比べて以下のような特徴および利点を有する。

- ①自己のサイトカインを活性化するので自然であり、外からの調節を必要としない。
- ②recombinantのサイトカインを購入しなくて良いので安く研究できる。
- ③ハイブリッド人工血管の基礎構築は市販されている布製人工血管であるので臨床応用に支障はない。
- ④bFGFと血管新生と内皮細胞被覆の研究は人工血管において容易である。
- ⑤組織片は細胞および細胞外基質を含み、このような人工血管は他にない。
- ⑥組織片播種型人工血管の植え込み直後



は細胞分裂が盛んで、リポソームを使用しても効果が大きいことが期待される。

- ⑦内因性サイトカインはautocrineおよびparacrineの効果が期待でき、サイトカインネットワークで治癒が完了すると消退するので調節が確実である。
- ⑧内皮細胞は血流面に向かうように遊走する性質があるのでマーカーを付ければ肉眼的にも観察可能である。

#### この研究から予想される結果と意義

古くから自己組織は多用されてきたが、傷つけることによって内因性サイトカインを活性化するといったように、材料は同じでも処理方法を変えることにより新しい性質を生み出すことがわかった。発想を転換することにより独創的な研究になっているといえる。本研究はかならずや実用化されると考えている。

#### 国内外の関連する研究の中での当研究の位置づけ

布製人工血管の治癒は壁の器質化の他に内面の内皮細胞による被覆が必要である。臨床においては植え込み後の治癒が遅延していることは良く知られている(Sauvage, 1974)。これは血栓がvicious cycleを形成しており(Noishiki, 1995)、内皮細胞は吻合部から進展することになり、人工血管の吻合部から離れた中央部に島状の内皮細胞のコロニーを臨床で観察することはまれである(Sauvage, 1995?)。

人工臓器の機能を向上させるためにサイトカインの導入が内外で試みられており、recombinantのものが多数使用されている(Wilson, 1989)が、先端技術を駆使して、高価で、不安定なものを手間をかけて研究しているのが現実である。

しかし元来、生体は傷を負うと自分で傷を治そうとする働きを持っており、多種のサイトカインが体内に存在している(Gospodarowicz, 1974)。我々々は傷を治そうとする物質がサイトカインであると知らずに現象をとらえて研究を始めた

(Noishiki, 1992)。しかも、その技術を布製人工血管ばかりでなく、多の材料においても導入可能だと知り(Noishiki, 1996)、その物質がbFGFを含むサイトカインであることを観察した。

#### 研究計画

平成9年度には①～⑨を、平成10年度には⑩の研究を予定した。

- ①グラフトの設計：材料の選択(静脈片、皮下結合組織、大網、骨髄)、基礎構築の選択(市販の布製人工血管およびePTFE人工血管、ポリエステル布から作成した管)、および細切条件(はさみ、メス、ホモジナイザー)の設定。
- ②グラフトの作成：内面を平滑にするための播種条件の設定
- ③in vitro実験：作成した組織片播種人工血管の植え込み前bFGFの評価
- ④作成した人工血管の評価：グラフト全体を培養し、細胞の増殖・遊走状態を組織学的に観察する。また培養液中に放出されたbFGFの定量をELISAで試す。
- ⑤慢性動物実験：作成した人工血管を雑種成犬の腹部大動脈に植え込み一定期間後に摘出し肉眼的、組織学的、免疫組織学的に検討する。また内皮細胞の機能を評価する。なお対照として処置していない人工血管をプレクロテイングして用いる。
- ⑥大動脈造影：動物実験にて植え込まれたグラフトを一定期間後に造影し、狭窄度、内面の平滑性を観察する。
- ⑦摘出したグラフトの観察：肉眼的に血栓の付着状況、色調を観察する。また内腔より注型用樹脂メルコックスを注入すること新生血管の分布状態を鋳型を作って観察する。
- ⑧病理組織学的検討：ヘマトキシリン・エオシン、バンギーソン、テキサクロム等の染色を行う。また単位面積あたりの細小血管の数を経時的に評価する。
- ⑨免疫組織学的検討：ファクターVIIIで内皮細胞を、CD68でマクロファージを、抗bFGF抗体で陽性になる細胞を、人工

血管壁で検討する。

- ⑩リポソームあるいはエレクトロポレーションを使った組織片内細胞への遺伝子導入：人工血管壁に組織片を播種し動脈を置換すると3日目にはbFGFが陽性に、5日目には活発な内皮細胞、平滑筋細胞および線維芽細胞の増殖が観察される。このように活発な細胞増殖および遊走を期待できればリポソームを使った遺伝子導入では細胞を傷つけることなく行うことが可能だと考える。

## 研究成果と参考論文

この報告書の研究成果論文としてまとめた第一は『Evaluation of Small Caliber Vascular Prostheses Implanted in Small Children; Activated Angiogenesis and Accelerated Calcification』で先天性心疾患のシャントグラフトという臨床標本における治癒を観察し、人においても布製人工血管の間隙に内皮細胞での被覆に貢献する毛細血管が侵入することがあり、ePTFEと布製では平滑筋細胞の存在部位が異なること、ePTFE血管壁の石灰化にCD68陽性マクロファージの関与が示唆された。第二の論文では『人工血管内皮化促進のためのin vivo組織培養における内因性サイトカインの活性化』において、内因性サイトカインのひとつであるbFGFを人工血管治癒過程において免疫組織学的に証明した。第三は『人工血管内皮化促進のためのin vivo組織培養における内因性サイトカインの活性化』で、皮下結合組織を細切する刺激により内因性サイトカインを活性化し、創傷治癒を促進することにより、その内部には血管新生が観察された。第四の論文は『細胞と組織移植によるバイオ人工血管』であり、人工血管開発における方向性を組織工学および分子生物学の分野から方向性を示した。

今回のプロジェクトで目指した、bFGFを含む内因性サイトカインの活性化による、血管新生による内皮細胞被覆を含む治癒を促進させたハイブリッド人工血管

の開発は実現可能であることが明らかになった。

参考論文としては臨床家として、また研究者として、現在冠動脈バイパス術に多用している動脈グラフトの特徴および利点、グラフト別開存率、MIDCABの工夫および問題点、さらに、我々、心臓外科医が臨床において日常的に遭遇する問題症例、中でも心不全が強くて左室造影が不可能、呼吸不全、脳の動脈に動脈硬化性の狭窄を伴った症例、またその対策、および高齢化社会での心不全、呼吸不全などの症例の外科治療についてまとめた。未来の治療として心筋梗塞後の心筋内への血管新生療法が日本でも行われた。このたび原点に戻って爬虫類の心臓の解剖に目を向けた。また、人工臓器の開発を試みる上で考えなければならない現実を示した。また将来、日本においても長期植え込み型人工臓器のインプラント・データ・システムの設立が必要となると考え可能性を示した。

## まとめ

人工血管が登場してから40年であるが、高度な機能を持った人工臓器へと急速な進歩を遂げている。我々が用いた『内因性サイトカインの活性化』はもともとの自然現象を活性化して利用したため、器質化が進み生体内で因子が不必要になると効果が消退する利点がある。この度の研究成果をもとに人工臓器に適応しやすくさらに改良できたら幸いである。