

ティッシュエンジニアリングによる再生血管の開発, 応用

新岡 俊治*, 今井 康晴*, 松村 剛毅*, 渡辺 学*
小沼 武司*, 日比野 成俊*, 筏 義人**

著者らは, 自己血管壁細胞と生体吸収性ポリマーを用いて, 血管組織をティッシュエンジニアリング (TE) の技術で作成しようという試みを1994年に開始した. 生後20日目のヒツジを使用し, 単純 explant 法にて内皮細胞, 平滑筋細胞, 線維芽細胞を単離培養した. 細胞数を増加させ, 6-8週で生吸収されるようにデザインされた生体吸収性ポリマーのメッシュ状チューブに混合培養細胞を播種し, 一週間後に細胞を採取した同一の動物に移植手術を行った (自家移植). これらの結果は予想以上に良好であり, 追加追試実験でも同様の結果を得たため, 倫理委員会の承認下に臨床応用を開始した.

培養細胞を利用して使用可能な組織を作成するティッシュエンジニアリングという概念が最初に発表されたのは1980年代の後半, ハーバード大学 Vacanti とマサチューセッツ工科大学 (MIT) Langer によってである. 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, 細胞培養技術の発達により細胞を用いた医療も徐々に普及してきている. 皮膚, 軟骨などのティッシュエンジニアリングはすでに臨床応用もなされ企業化の方向へ向かっている. 本邦においてもこの数年で, 「再生医療」と言う言葉で認知されるようになり, さまざまな学会, 研究会が立ち上がった.

心臓外科領域では, 先天的に肺動脈が欠損または低形成の場合, 従来, 肺動脈再建に異種心膜または人工血管を用いた再建術が行われてきた. しかし, 成長期にある小児においては遠隔期の石灰

化, 導管の劣化, 再狭窄のため再置換手術が必須となっている. 近年では術後の再手術を回避する目的で可及的に自己組織 (自己心膜など) を利用する修復法を採用しているが, 使用可能な自己組織にも限界がある. より良い生体適合性をもった血管代用物の開発は切望されている. 本稿では, 過去のバイオ人工血管の歴史的流れを概説し, 現在, 著者らが行っているティッシュエンジニアリング技術を用いた再生血管の作成法, またその臨床応用の現況について記述する.

key words : Autologous cell transplantation, Tissue engineering, Biodegradable polymer scaffold

バイオ人工血管の歴史的流れ

ダクロンや PTFE のような人工素材と生体素材を組み合わせたいわゆるハイブリッド (hybrid) 型の人工血管を一般的にバイオ人工血管と呼んでいる¹⁾.

初期の布性人工血管は移植直後に出血の少ない, 壁の有孔性の低いものが使用されてきた. しかしながら, 人工血管壁の有孔性 (porosity) の高いほうが柔らかく, 縫合針も通りやすく操作性も優れている. また, 遠隔期の組織の新入や内膜化にも有利であることが判明して以来, 高有孔性の人工素材に生体素材を組み合わせるようになった. 生体素材には血漿成分, 生体組織由来物質, 生体細胞等が試みられている. 直後の出血回避の目的で, ①自己血で人工血管の布目を目詰まりさせるプレクロッティング法, ②フィブリン糊でシールする方法, ③アルブミンを熱処理する方法, 等が使用されてきた. しかし, 近年緊急手術にも対応できるようにあらかじめアルブミン, ゼラチ

*東京女子医科大学附属日本心臓血管研究所心臓血管外科
**鈴鹿医療科学大学医用工学部医用電子工学科

ン、コラーゲン等で目詰まりさせた人工血管が多用されている。

一方、内皮細胞を人工血管内面に被覆することにより抗血栓生を賦与しようという試みも1970年代より実験的に行われてきたが、臨床においても100人の患者の自己の内皮細胞をePTFEグラフトに播種した後に移植し、播種した方が良好な結果が得られたとの報告もある²⁾。野一色らは人工血管壁内に細胞、サイトカイン、細胞外マトリックスの3要素を導入すると体内における治療が促進され、より早期の内皮化が起こることを報告している³⁾。自家の脂肪、静脈、皮下結合組織、大網などの組織を細切し、有孔性人工血管に播種、圧入する方法、自家の骨髄細胞などを使用する方法を用いて良好な結果を得ている。

松田らは人工の細胞外マトリックスあるいは自己平滑筋細胞を含んだマトリックスであらかじめ人工血管を処理し、その上に自己内皮細胞を播種した層状のハイブリッド人工血管を作成した。直径4 mm、長さ6 cmのグラフトを34匹のイヌ頸動脈に移植し、26週後まで追跡し極めて良好な結果を報告している⁴⁾。

自己血管壁細胞を用いたティッシュエンジニアリングによる血管組織作成

拒絶反応の可能性を排除するため“自己細胞”を用いての組織作りを目指してきた。作成された組織には生きた自己細胞が存在するため、より長い耐久性が期待できる。また、最終的に異物が残存せず、内腔が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。さらに、最も期待されているポイントであるが、自己組織のため成長の可能性が高いと考えられることである。繰り返しになるが、自己細胞の含まれた自己組織は生物学的な成長、修復機転が働き、より長い耐久性が期待できる。さらに異物が残存せず、完全な生体適合性を有するため感染や血栓形成に対しても抵抗性が高いと考えられる。

基礎的研究とその結果

大動物モデル（肺動脈：ヒツジ、下大静脈：イヌ）を使用し、末梢の血管細胞から大口徑の血管を構築し、それが急性期に外科的移植に耐え、遠隔期にも良好に機能するか否かを検証する基礎的

実験を行った⁵⁾。

- 1) 血管組織構築（①細胞採取、②細胞大量生産、③ポリマー上への播種）

動物の大腿静脈を約2 cm採取し、単純 explant 法で細胞を単離培養した。混合細胞を約6-8週間かけて大量生産し、移植約一週間前に細胞濃厚浮遊液を作成し、生分解性ポリマーに播種した。細胞の足場となる生分解ポリマーは、細胞を播種する前の air porosity が95%以上であり、生吸収期間は6-8週間となるように設計された。播種された細胞はさらにポリマー上で分裂増殖し、移植前には三次元的にポリマー上で confluent の状態となった。

- 2) 血管移植手術

播種後7-10日目に動物への移植を行った。血管壁細胞から作成された導管を、細胞を採取した同一動物に移植を行った（自己移植）。全身麻酔下に体外循環を確立し、常温心拍動下に主肺動脈を切除、置換した。下大静脈置換は単純遮断下に施行した。

心血管系におけるティッシュエンジニアリングでは、移植された細胞・構築物が血管内の血液に直接接触可能で、移植直後から酸素、栄養物、液性因子の供給が得られるという播種された細胞にとって有利な条件を有する。従って、移植された構造物上の細胞は生理的条件下でさらに分化、組織の再構築が可能となると考えられる。

- 3) 遠隔期評価

実験動物は移植後10-36週間後にそれぞれ血管径を評価した後に犠牲死せしめた。移植されたポリマーは完全に吸収され、作成された組織は組織学的に血管組織に類似していた。（図1）これらを組織学的、生化学的、生力学的に検討した。

組織コラーゲン含有量は経時的に増加傾向を示し、組織の in vivo におけるリモデリングが示唆された。生力学的検査でも同様に経時的な最大張力（Tensile Strength）の増大を認めた。Factor VIII とエラスチンによる免疫組織学的検討では、作成された血管組織は内皮細胞で被われ、間質にはエラスチンが存在することが確認された。下大静脈の免疫染色では中膜に平滑筋細胞が整然と配列していた。また、血管径は動物の成長とともに増大した。

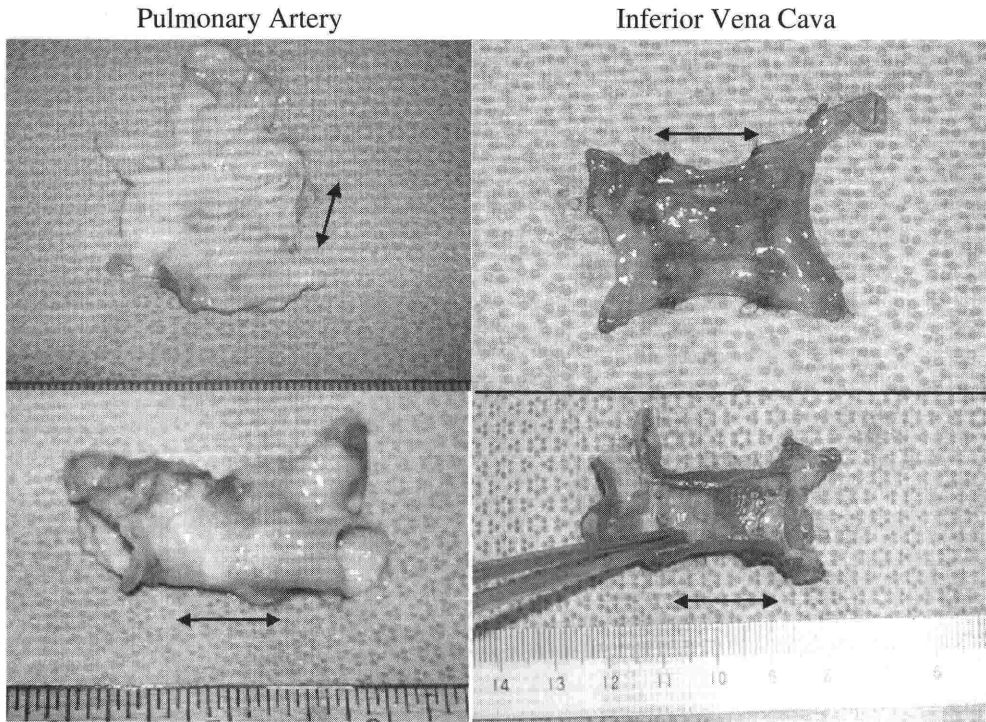


図1 左段はヒツジ肺動脈置換後6ヶ月目の組織の肉眼的所見。右段はイヌ下大静脈置換後6ヶ月目(上段)と9ヶ月目(下段)。

臨床応用例

1999年4月に東京女子医科大学倫理委員会の承認を得て、患者からの細胞採取が開始された。患者家族の十分なインフォームドコンセントをいただいたうえで臨床応用が開始され、移植第一例目は2000年5月に肺動脈再建において再生血管移植を4歳の小児例で応用し、良好な結果を得た⁶⁾。現段階で小児心臓外科領域における生体材料は満足できるものが存在しないため、従来の方法では結果が明らかに不良と思われる症例に対してのみ本方法を用いているが、将来的にはすべての補填材料を本方法で作成できるように期待が高まっている。今後、さらに症例を積み重ねて臨床での適応を拡大していく予定である。以下に臨床応用法の詳細を記述する。

ティッシュエンジニアリング技術を用いたグラフトの作成：

1) 静脈採取、細胞培養

はじめに患者の下肢より長さ約3cmの大伏在静脈を採取した。次にクリーンベンチ内で、これを

リン酸緩衝液で洗浄した後、培養用のシャーレ上へ移し、メスで1-2mmの小片にきざみ、これに培養液を加え、37℃、5% CO₂の条件下で、インキュベーター内で培養した。培養液には0.1 μg/ml 線維芽細胞増殖因子 basic fibroblast growth factor (SIGMA)を加えたものを使用し、培養液は2-3日ごとに交換した。細胞は約10日間で増殖し始め、培養が順調に進むと、細胞はその後約2週間でシャーレ上に密集した状態になるので、トリプシン処理によって細胞培養フラスコ上へ移した。さらに培養を続けると、約4週間でconfluentの状態が得られるが、この際の細胞カウントでは75 cm²フラスコで約200万個の細胞数であった。この時期の細胞を免疫染色で同定すると、内皮細胞が約10%、平滑筋細胞が約20-30%、線維芽細胞が60-70%の割合の混合細胞であった。

2) ポリマーへの播種

細胞培養フラスコ上でconfluentとなった細胞をトリプシン処理によって細胞浮遊液とし、これを遠心器にかけて、上清を捨て、1-2ccの濃縮細胞浮遊液を作成した。これを生体吸収性ポリ

マー上に播種させてグラフトが完成した。これをその後約1週間培養した後、手術に使用した。グラフトの表面を走査電子顕微鏡で観察するとポリマーの表面や間に細胞が入り込み、接着した状態になっていた。ポリマーはスポンジ状のポリカプロラクトンとポリ乳酸の高分子重合体をポリグリコール酸の線維で補強したものを使用した。

症例1：4歳，女児

複雑心奇形に対してフォンタン手術（右心房-肺動脈吻合術）が施行されていたが、術後に、右下肺動脈の閉塞を認めた。患児のQOLを考慮し、本方法での肺動脈再建の適応と判断した。細胞採取から移植まで約3カ月であった。

手術所見：胸骨正中切開にてアプローチし、上行大動脈送血，上下大静脈脱血にて人工心肺を確立し、心拍動下に右肺動脈を主肺動脈から末梢側へ切開し、内腔を観察すると、右肺動脈は中下葉分枝の入口部の部位で完全閉塞し、約1cm長で索条になっていた。まず肺動脈の索条部を切断し、肺動脈の前面に切開を入れ内腔を確保し、次に後

壁を直接吻合した。前面に用意しておいたチューブ状グラフトを切開してパッチ状にしたものを補填し、肺動脈の再建を完成した。（図2）

術後造影検査：手術によって右中下肺野への血流が改善された。再建を行った部分からの肺動脈の選択的造影においても、ティッシュエンジニアリングによって作成されたグラフト部の壁はスムーズで特に有意な狭窄所見もなく良好に開存していた。（図2）

症例2：12歳，男児

多脾症，単心室の症例で，人工血管（ヘマシールド）を使用したTotal cavo-pulmonary connection術（TCPC術：大静脈-肺動脈吻合術）が施行されていたが，術後7カ月目の造影検査で，肝静脈と肺動脈を連絡する人工血管の完全閉塞を認めた。本法による再生血管移植の適応とした。

手術所見：胸骨正中切開にてアプローチし，高度な癒着のなかで閉塞している人工血管を完全に切除した。上行大動脈送血，上下大静脈脱血にて人工心肺を確立し，心拍動下に再生血管の導管に

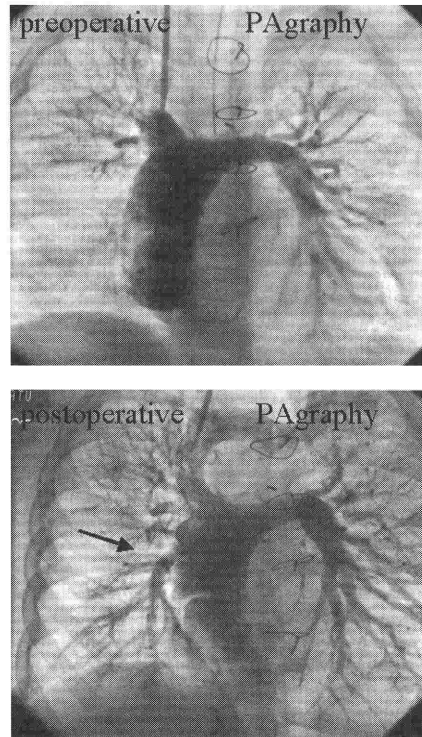
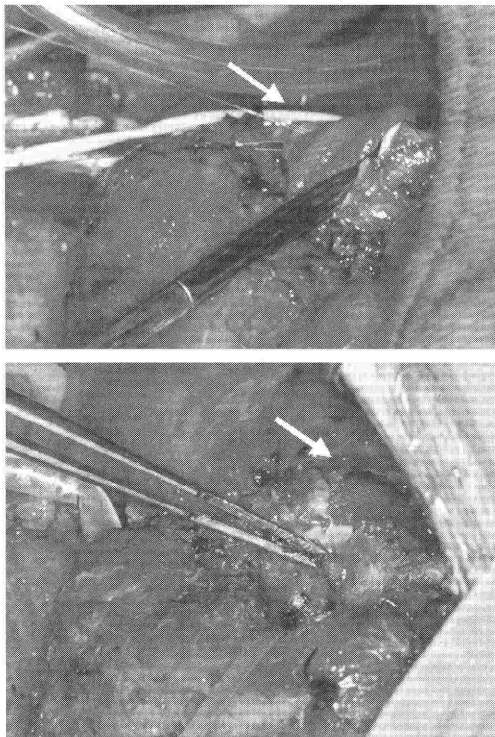


図2 臨床例

再生血管移植時の手術所見（左段）と手術前後の肺動脈造影検査所見（右段）。

よる置換を行った。

術後検査：術後4カ月目の胸部CT検査でグラフトの開存が確認された。(図3)

症例3：1歳，男児

無脾症，右室性単心室，両大血管右室起始症，肺動脈狭窄症，共通心房，共通房室弁，総肺静脈還流異常症の診断にて，当科に手術目的で入院した。再生血管によるTCPC手術と総肺静脈還流異常の根治手術を同時に施行した。

手術所見：下大静脈と肺動脈間直径18mmのグラフトを吻合した。細胞は手術当日に採取した骨髓細胞を用いた。(図4)

術後胸部CT検査所見

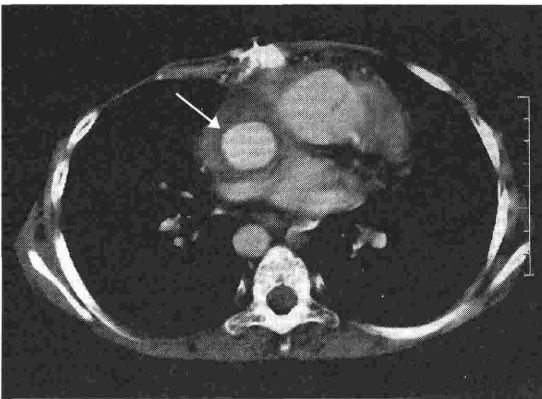


図3 臨床例

術後4カ月目の胸部CT造影所見。矢印は開存している再生血管。

術後検査：術後エコー検査では，グラフトの良好な開存を認めた。(図4)

現在の問題点と将来の発展性

著者らが構築，使用したティッシュエンジニアリングの手法による血管組織は，あくまでも現段階で使用可能なのは肺動脈圧程度の中等度以下の血圧の範囲内であり，より大きな体血圧内での使用は制限される。ポリマー消失後の強度が体血圧によるストレスに耐えられないと判断しているため，今後，ポリマーの吸収性の改善，あるいはin vitro seeding後に早期の間質蛋白導入による強度の増強がなされれば，大動脈圧内での使用に移行可能と考える。後者のin vitroにおける細胞/ポリマー構造物の“conditioning”をより生理的条件下で行うため，培養液を拍動性に繰り返し循環させるバイオリクターの実用化が始まっている。さらに，細胞の起源を自己血管以外(骨髓細胞，皮下の細胞，他者の細胞)に求めた場合あるいは播種する方法(混合細胞の一括播種，あるいは線維芽細胞と内皮細胞の段階的播種)による相違点等を確認すべく実験を継続している。

これら心臓血管系のティッシュエンジニアリングの発展のためには，工学系における伸縮性のある柔軟でより長期間の吸収期間を有する生分解性のポリマー，あるいはポリマーからサイトカインを徐放させる技術等の開発が不可欠と思われる。これらが解決されれば，ティッシュエンジニアリングの手法で作成される僧帽弁や大動脈弁組織，

術中所見



術後心エコー検査

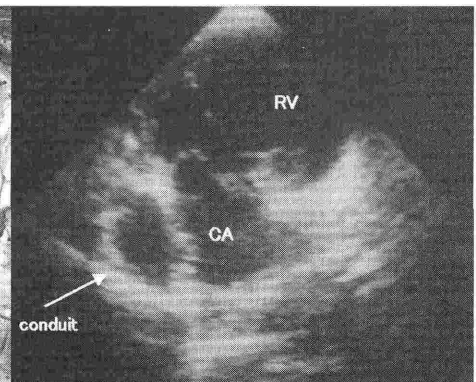


図4 臨床例

初回TCPC手術に再生血管の導管を使用した。術後経過は良好で，退院時の心エコーでもグラフトの良好な開存が認められた。

ACバイパス用動脈系グラフト，腱索組織等の作成も近い将来可能となると考えている。

文 献

- 1) 富沢康子：細胞と組織移植によるバイオ人工血管．人工臓器 27：708-714, 1999
- 2) Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, et al : Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal e PTFE grafts in 100 patients : a 9-year experience. Surgery 126 : 847-855, 1999
- 3) Noishiki Y, Yamane Y, Okoshi T, et al : Choice, isolation, and preparation of cells for bioartificial vascular grafts. Artif Org 22 : 50-62, 1998
- 4) Matsuda T, Miwa H : A hybrid vascular model biomimicking the hierarchic structure of arterial wall : neointimal stability and neoarterial regeneration process under arterial circulation. J Thorac Cardiovasc Surg 110 : 988-997, 1995
- 5) Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, et al : Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. J Thorac Cardiovasc Surg 115 : 536-545 ; discussion 545-546, 1998
- 6) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y : Transplantation of a Tissue Engineered Pulmonary Artery. New Eng J Med 344 : 532-533, 2001