

骨髄細胞を用いた再生血管と臨床応用

宮本 真嘉 松村 剛毅 新岡 俊治 黒澤 博身

要 旨：近年，再生医学の分野において，いくつかの領域で臨床応用が始まっている。われわれは自己骨髄細胞と生体吸収性ポリマーを用い，ティッシュエンジニアリング(tissue-engineering: TE)による理想的な“生きた”血管組織作成を試み，組織学的，生化学的，生力学的に良好な結果を得た。なお，われわれはこの技術を臨床応用し，現在44例施行した。本稿では，現在行われている基礎研究とわれわれが現在行っているTEグラフトの作製法，臨床応用の現況について述べる。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 175-178)

Key words: tissue-engineering, biodegradable scaffold, autologous bone marrow cells, cardiovascular surgery

はじめに

心臓血管外科領域では，先天的に血管が欠損，低形成の場合や，後天的に動脈硬化により血管が狭窄，閉塞している場合，人工血管を用いた再建術が行われてきた。特に先天性心疾患の修復術においては，異種動物の心膜や既製の人工血管を使用せざるを得ないのが現状であり，ことに年齢とともに成長する小児においてこれら代用補填物は遠隔期での石灰化，導管の劣化や再狭窄を来すことが多く，また人工物は成長しないことやサイズの適正化が起こらないために，しばしば再手術を余儀なくされることがある。本邦では，約80種類もの人工血管が臨床使用されているが，理想的な人工血管はいまだ開発されておらず，より高い抗血栓性，耐久性，生体適合性，安全性等の生体適合性をもった血管代用物の開発が切望されている。われわれは現在問題となっている欠点を克服し，理想的な人工血管の作成を最終目標として，再生血管の開発，臨床応用を目指し，基礎実験を継続してきた。拒絶反応の可能性を排除するために“自己細胞”のみを用い，異物を生体内に残存させないため，“生分解性ポリマー”を用いることで再生血管の作成が可能であることがわかった。この方法により，成長，組織の適正化が期待

できる生体適合性のある再生血管を開発した。作成された組織層は，生きた自己細胞にて形成され理論的には長い耐久性が期待できる。内腔も完全に内皮化され，最終的に異物が残存しないため，移植後，長期間の抗凝固療法を必要とせず，自己組織のため成長の可能性も高いと考えられる。

本稿では，現在，われわれが行っているティッシュエンジニアリング[再生医学(tissue-engineering: TE)]技術を用いた再生血管の作製法，またその臨床応用の現況について記述する。

基礎的研究とその結果

われわれは，ビーグル犬を用い，自己の骨髄細胞を用いて，生分解性scaffold(Fig. 1)より中口径(8mm)再生血管を構築し，組織学的検討，生化学的検討，生力学的検討および長期の移植実験を行った。再生血管用ポリマーは移植後1カ月前後で強度を失い，約6カ月には生体内で完全に分解されるように設計されている。Fig. 2はTEにより作製された犬のIVC(inferior vena cava: 下大静脈)の肉眼的所見と免疫学的組織染色像(Factora VIII, α -actin陽性細胞)を示す。移植後4週間では内皮側は内皮細胞に被覆され，中膜に α -actin陽性細胞の平滑筋細胞が整然と配列していた。作製された

東京女子医科大学心臓病センター心臓血管外科

2005年3月3日受理

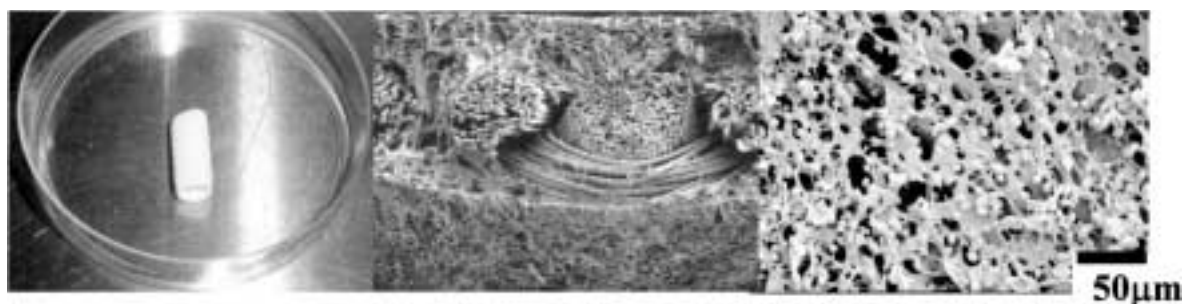


Figure 1 Overview of the biodegradable scaffold (right). SEM findings of the biodegradable scaffold. A polymeric woven scaffold composed of polycaprolactum and PLA reinforced with PGA mesh (middle). Seeded bone marrow cells adhered onto the tissue-engineered graft (TEG) (right).



Figure 2 Macroscopic and histological findings of TEG. Surface of the graft is completely covered with endothelial cells (left). Factor VIII positive cells lined in the surface of the TEG (middle). And α -actin positive cells expressed in tunica media of the TEG.

血管組織は内皮細胞で被われ、抗血栓性の面から内皮化することの意義が大きい。作成された組織は血管組織としては未熟であるが、肉眼的にも組織学的にも自己の血管組織に類似していた。

臨床例

患者家族から十分なインフォームドコンセントを得たうえで、2000年5月に臨床応用が開始された。移植第1例目は4歳の小児例で、肺動脈閉塞例において再生血管パッチ移植を施行し良好な結果を得た^{1,2)}。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、従来の方法では遠隔結果が明らかに不良と考えられる症例に対してのみ本法を用いている。初期の3例は培養細胞を播種していたが、現在は細胞の起源は自己骨髓細胞とし、手術当日に骨髓細胞を採取し、生分解性scaffoldに播種している。現在までに骨髓細胞由来のグラフト移植を44例に施行した。手術時平均年齢 7.5 ± 6.5 歳(1~24歳)に行った。術

式は、フォンタン型手術27例(うちextra cardiac法24例, lateral tunnel法3例), 肺動脈へのパッチとしての使用例が12例, 右室流出路での使用例が4例, 上大静脈での使用例が1例である。このうち、前回の手術で自己心膜, ウシ心嚢膜, 人工血管にて再建されたものが狭窄等を来し、再生血管を用いての再手術となったものが12例であった。グラフト評価は遠隔期エコー, 造影CT, MRIで行った。急性期手術死亡はないが、遠隔期死亡1例(左心低形成症候群の症例でTCP(total cavopulmonary connection)手術後に心不全による死亡)を認めたが、グラフトに関連する死亡ではなかった。再手術は1例で施行した(心房内での使用。右左シャントを認めた)。急性期より、グラフトの開存を遠隔期に確認するまで抗凝固療法を施行した。最長の経過観察期間は4.5年を超えている。術後遠隔期にSVC (superior vena cava: 上大静脈)閉塞に対するパッチ再建例では閉塞を1例, TCPCグラフトの狭窄を2例認めた³⁻⁵⁾。再狭窄例に対しては、自己組織であるが故に力

テーテル治療を行い、その後の狭窄は認めない。
現在の臨床応用法の詳細を後述する。

TE技術を用いたグラフトの作製： 骨髓採取、ポリマーへの播種

患者の手術日当日に全身麻酔により鎮静・鎮痛が得られた後、手術時の清潔野と同等の清潔操作により患者の上前腸骨棘より骨髓穿刺針を用い、10mlあたり1,000単位のヘパリンを含むシリンジにて骨髓を吸引する。可能な限り末梢血の混入を防ぐために左右数カ所を穿刺し、骨髓を吸引する。直ちに同一手術室内のクリーンベンチ内にて同骨髓より骨片成分、脂肪成分、凝血成分を取り除くために骨髓をまずフィルターにかける。そして、この骨髓を比重1.077のFicoll液の上部に静かに注入し、400g、30分、37度にて遠心を行う。その後、遠心により得られた患者血清を別途保存し、後の細胞を播種したポリマーの保管のために使用する。単核球層を分離する。単核球層の細胞塊のみを得るためにさらに10分間遠心し、単核球の細胞塊を得る。細胞塊を播種する生分解性ポリマーの大きさに合わせ、適宜分別してある自己の血清にて希釈、攪拌し、用手的に生分解性ポリマーに播種する。生分解性ポリマーの外表面はあらかじめ漏出性の出血を予防するためにフィブリン糊を塗布しておくようにしている(Fig. 1)。生分解性ポリマーに播種された骨髓単核球細胞を温存させるために、分別してある自己血清中に同ポリマーを浸し、当日、同患者のみに使用するインキュベータに37度、5%二酸化炭素、100%湿度下に保存する。手術が進行し、単核球播種後の生分解性ポリマーを使用する間にインキュベータより取り出し、別の滅菌シャーレに血清とともに清潔に手術野に移し、外科医により移植する。これらの操作は、すべて同一手術室内にて行っており、患者の骨髓を手術室内より持ち出すことはない。

症例：11歳、男児

無脾症候群、右室性短心室に対して9歳時にbidirectional Glenn術を施行し、10歳時に径18mmのTEグラフトによるTCPC手術への変更手術の適応となった。再手術の癒着剥離に数時間を要したため、この間に培養器の中で培養を行った。手術後、下大静脈-右肺動脈間のグラフトは良好であった。合併症もなく、退院時心



Figure 3 Postoperative cine angiogram of the patient who underwent TCPC utilizing TEG. We confirmed that the graft was patented without stenosis.

エコーではグラフト内血栓は認められず、良好な開存が認められた。また、1年2カ月後のCT、心臓カテーテル検査にて径は12mmであったが、体格にあった径の太さと良好なグラフト開存が認められた(Fig. 3)。

おわりに

心臓血管領域において、移植後の拒絶反応の可能性を排除するため“自己細胞”を用いての組織作製を試みている。われわれが作製、使用した再生血管の組織は、生きた自己細胞が存在するため、より長い耐久性も期待できる。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点は、自己組織であるため成長あるいはグラフトサイズの適正化が行われる可能性があることである。われわれが構築、使用したTE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大静脈、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(高圧系)での使用は考えていない。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、体血圧に耐え得る臨床応用可能な再生血管は今のところ開発されていない。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アクターの実用化が始まっている。

今後,高圧系への応用,小口径の人工血管の長期開存性維持のために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,細胞足場としての脱細胞化異種組織等の開発が期待される。また長期におけるヒトでの組織形成(完成度),成長,石灰化の有無などはいまだ不明で,長期にわたる経過観察が不可欠である。

文 献

- 1) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New Engl J Med*, 2001, **344**: 532–533.
- 2) 日比野成俊, 今井康晴, 新岡俊治: ティッシュエンジニアリングによって作製されたグラフトを用いた肺動脈再建. *胸部外科*, 2002, **55**: 368–373.
- 3) Matsumura G, Hibino Y, Ikada Y et al: Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials*, 2003, **24**: 2303–2308.
- 4) Isomatsu Y, Shin'oka T, Matsumura G et al: Extracardiac total cavopulmonary connection using a tissue-engineered graft. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, **126**: 1958–1962.
- 5) Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N et al: Mid-term clinical results of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *JTCVS*. in press 2004.

Clinical Application of Tissue-Engineered Vascular Grafts Seeded with Autologous Bone Marrow Cells

Shinka Miyamoto, Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka, Hiromi Kurosawa

Department of Cardiovascular Surgery, The Heart Institute of Japan,
Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Key words: tissue-engineering, biodegradable scaffold, autologous bone marrow cells, cardiovascular surgery

Tissue engineering (TE) is a new discipline that offers the potential to create replacement structures from autologous cells and biodegradable scaffolds. To overcome the disadvantages of prosthetic and bioprosthetic materials often used in pediatric cardiovascular surgeries, we devised a novel method by combining biodegradable scaffold and autologous bone marrow cells (BMCs) to construct an autologous vessel. To date, TE grafts seeded with autologous BMCs were implanted in 44 patients as a tubular graft or a patch for reconstruction. While we obtained satisfactory results, long-term follow-up is needed to verify the feasibility of this technique. (*J Jpn Coll Angiol*, 2005, **45**: 175–178)