

人工血管から再生血管

新岡 俊治

要 旨: 人工血管の形状は極めて単純であるが、その作成にあたっては取り扱い性、抗血栓性、耐久性、生体適合性、安全性等のさまざまな重要な因子を考慮しなければならない。本邦でも臨床では約80種類もの人工血管が使用されているが、理想的な人工血管はいまだ開発されていない。本稿では人工血管移植の現状と現在行われている開発上の工夫について考察し、さらに臨床応用が開始されたティッシュエンジニアリング手法による再生血管作成法とその結果について概説する。
(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 165-170)

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

人工血管の現況

Voorheesらが1952年にVinyon[®] N[®]を用いて臨床で初めて人工血管移植を行って以来、さまざまな人工素材が置換用血管として使用されている。臨床の現場においては、現在、大、中口径人工血管の開存性、耐久性に関してはほぼ満足できる状況にある。しかし、小口径人工血管ではいまだに自己の血管より優れるものは開発されていない¹⁾。

胸腹部大動脈用の大口徑(内径10mm以上)においては布製人工血管が主流である。中口径(内径6~8mm)の下肢、頸部、腋窩領域における動脈再建、特に大腿膝窩動脈には布製あるいはePTFE(polytetrafluoroethylene)製人工血管が多く使用されている。小口径(内径6mm未満)人工血管は、主に先天性心疾患を有する小児例のBlalock-Taussig短絡術(鎖骨下動脈-肺動脈シャント術)に使用されている。開存性を保つために術後抗血小板療法が必要となる。

さらに、成長期にある小児においては右室、肺動脈再建にしばしば異種心膜やPTFE導管を利用した人工血管挿入術が行われてきた。しかし遠隔期に、石灰化、劣化、再狭窄を来すため、近年では再手術を回避するため、可及的に自己組織(自己心膜など)を利用する修

復法が採用されているが、使用可能な自己組織にも限界がある。よりよい生体適合性をもった人工血管の開発は切望されている。

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²⁾。

初期の布製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、人工血管壁は有孔性(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、遠隔期の組織の侵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、自己血で人工血管の布目を目詰まりさせるプレクロッキング法、フィブリン糊でシールする方法、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

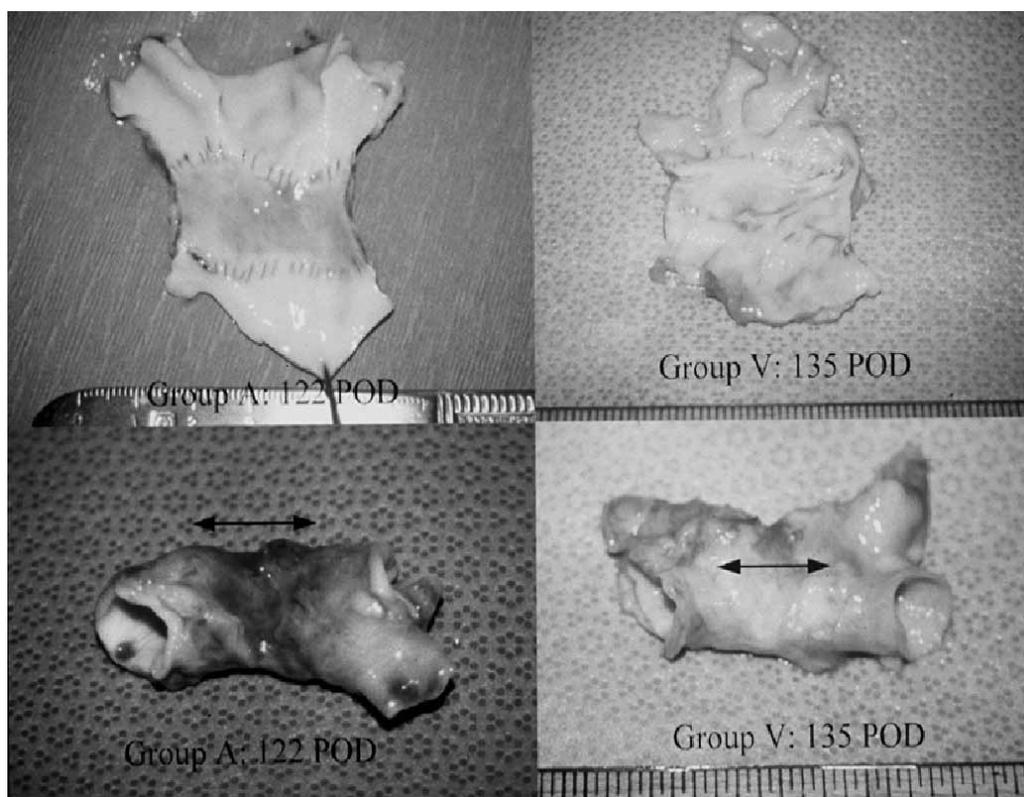


Figure 1 Macroscopic finding of tissue engineered vessels 6 months after implantation.

り抗血栓性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たほう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癒が促進され、より早期の内皮化が起こることを報告している³⁾。自己の脂肪、静脈、皮下結合組織、大網などの組織を細切し、有孔性の高い人工血管に播種、圧入する方法、自己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4mm、長さ6cm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⁾。

自己細胞を用いたティッシュエンジニアリングによる再生血管作成

大動物モデルを用いた移植実験で心臓弁葉組織構築の可能性が証明された後⁵⁾、血管組織の構築実験に移植した⁶⁾(Fig. 1)。

“自己細胞を用いたティッシュエンジニアリング”に固執したのは以下の理由による。拒絶反応の可能性を排除できる。ドナーを考慮する必要がない。

生きた組織のため、より長い耐久性が期待できる。異物が残存しない。移植後、抗凝固療法を必要としない。自己組織のため成長が期待できる。つまり、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はリスクが最小であると考えられる。

Biodegradable scaffold

Scaffold's Design

P(CL/LA) sponge
+
PGA fibers
Φ8mm×20mm

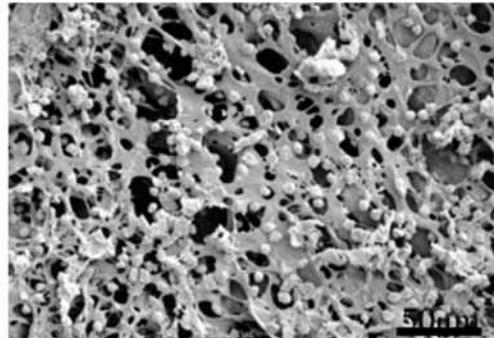
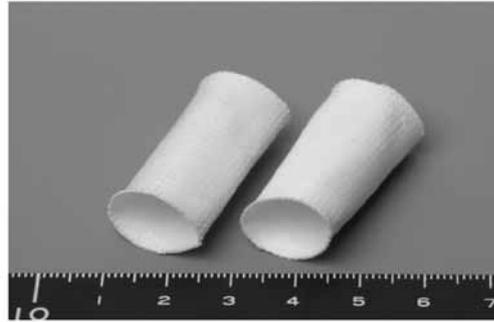
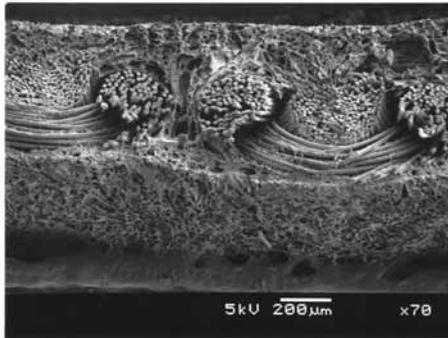


Figure 2 Biodegradable polymer scaffold.
SEM (scannig electron microscope) shows the finding after bone marrow cell seeding.

基礎的研究とその結果

ビーグル犬モデルを用い、自己の骨髄細胞と生分解性scaffold(Fig. 2)より中口径(8 mm)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カ月後には生体内で完全に分解されるように設計されている。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。作成された血管組織は内皮細胞で覆われ、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native血管組織に類似していた。

臨床例

患者家族の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。移植第一例目は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^{7,8)}。現段階で小児心臓外科領域における生体素材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方法を用いている。初期の3例は培養細胞を播種していたが、現在、細胞の起源は自己骨髄細胞とし、手術当日に骨髄細胞を採取し、生分解性scaffoldに播種している。現在までに骨髄細胞由来のグラフト移植を47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26例[うちextra-cardiac TCPC(total cavopulmonary connection)23例, lateral tunnel法3例], 肺動脈へのパッチとしての使用例が13例, 右室流出路での使用例が4例, 上大静脈(superior vena cava: SVC)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14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かった。遠隔死亡1例(左心低形成症候群の症例で

TCPC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5.5年を超えている。術後遠隔期にSVC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⁹⁻¹¹⁾。再狭窄例に対して、自己組織であるがゆえにballoonによるカ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。

骨髄採取、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髄穿刺針を用い、10mlあたり1,000単位のヘパリンを含むシリンジにて骨髄を吸引する。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、骨髄を吸引する。直ちに同一手術室内のクリーンベンチ内にて同骨髄より骨片成分、脂肪成分、凝血成分を取り除くために骨髄をまずフィルターにかける。そして、この骨髄を比重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なっている(Fig. 1)。生分解性ポリマーに播種された骨髄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、患者の骨髄を手術室内より持ち出すことはない。



Figure 3 MRI finding of tissue engineered conduit one year after implantation in 18-year-old male.

症例：17歳、男性

無脾症候群、左室性短心室、房室弁逆流に対して3カ月前にbidirectional Glenn術を施行し二次的フォンタン型手術の適応となった。2002年、径24mmのティッシュエンジニアリンググラフトによるextra-cardiac TCPC型フォンタン型手術を施行した。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、術後のMRI、心臓カテーテル検査にて良好なグラフト開存が認められた(Fig. 3)。

現在の問題点と将来の発展性

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”を用いての組織作りを試みている。われわれが作成、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点

は、自己組織の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、使用したティッシュエンジニアリングの手法による血管組織において、現段階で使用可能なのはあくまでも大静脈、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、体血圧に耐えう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、小口径の人工血管は長期開存性の維持のために伸縮性があり柔軟で、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さらなる経過観察が不可欠である。

おわりに

われわれが行った初期段階の実験結果、臨床成績は、予想以上に有望であり、置換組織の必要性の大きい心臓血管外科領域において、移植・人工臓器とともに、ティッシュエンジニアリング的アプローチが重要な役割を果たす時代が目前に到来している。

本稿の一部は脈管学の45巻3号175～178頁にすでに記載したものである。

文 献

- 1) 江里健輔, 山下晃正: 人工血管の現状. 医学のあゆみ, 1999, **188**: 671-676.
- 2) Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T et al: Clinical autologous *in vitro* endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery*, 1999, **126**: 847-855.
- 3) Noishiki Y, Yamane Y, Okoshi T et al: Choice, isolation, and preparation of cells for bioartificial vascular grafts. *Artif Organs*, 1998, **22**: 50-62.
- 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*, 1995, **110**: 988-997.
- 5) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D et al: Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation*, 1996, **94**: 11164-168.
- 6) Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX et al: Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, **115**: 536-545; discussion 545-546.
- 7) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med*, 2001, **344**: 532-533.
- 8) 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成されたグラフトを用いた肺動脈再建. 胸部外科, 2002, **55**: 368-373.
- 9) Matsumura G, Hibino N, Ikada Y et al: Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials*, 2003, **24**: 2303-2308.
- 10) 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.
- 11) Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N et al: Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, **129**: 1330-1338.

Tissue Engineered Vascular Grafts Seeded with Autologous Bone Marrow Cells

Toshiharu Shin'oka

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 with the potential for creating 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 with a combination of biodegradable scaffold and autologous bone marrow cells (BMCs) to construct an autologous vessel. To date, TE grafts seeded with autologous BMCs are implanted in 47 patients as a tubular graft or a patch for reconstruction. Satisfactory results were obtained after surgeries, and long term follow-up is necessary to determine the clinical feasibility and effectiveness of this technique.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 165–170)