自己骨髄細胞と生体吸収性ポリマーにより作製した 再生血管による臨床研究 44 症例とその経過

松村 剛毅^{*,**} 新岡 俊治^{*,**} 日比野 成俊^{*}
 斎藤 聡^{*} 坂本 貴彦^{*} 市原 有起^{*}
 保々 恭子^{*} 宮本 真嘉^{*,**} 黒澤 博身^{*,**}

2001年9月より2004年12月の間に再生血管を用いて外科手術を行った44症例につき、その中期遠隔期の成績を検討した。ポリL乳酸(24例)またはポリグリコール酸(20例)を補強材とし、内外側にスポンジ状のポリカプロラクトンとポリ乳酸の共重合体を塗布したハイブリッドポリマーをパッチまたは導管として使用した。術当日にFicoll法により骨髄単核球細胞を分離し、ポリマー上に播種、移植した。再生血管を用いて、肺動脈形成または右室流出路形成術を16例に、フォンタン型手術を28例に行った。対象は、男性(児)19例、女性(児)25例で、手術時平均年齢は 7.4 ± 6.4 歳、術後在院平均日数は 42 ± 23 日であった。再手術時に再生血管を使用した例は18例で、うち14例が先行手術時に自己心膜やウシ心嚢膜パッチにより肺動脈形成術が行われており、4例がAPCフォンタン術、Björk, Septationからの転換例であった。病院死亡は認められなかった。全症例の最終経過観察日ないしイベントまでの平均観察期間は 3.0 ± 1.3 年であった。再生血管に関連しない心不全死を遠隔期に3例、脳出血死を1例認めた。再生血管に関連する再手術例は2例であった。再生血管に関連しない再手術1例、グラフトの閉塞1例、グラフトの狭窄などに対するPTA介入例5例を認めた。生分解性ポリマーと自己細胞による再生血管は、再手術時などに使用できる有用な代用生物(生体適合性)補填物である。内皮化など組織学的にも既存の人工物よりも有利であり、ワーファリンの回避や血栓の防止などに寄与すると考えられる。日心外会誌36巻6号:309-314(2007)

Keywords: 再生医療, 先天性心疾患, 自己骨髄単核球細胞, 生分解性ポリマー

Mid-Term Clinical Results of Tissue-Engineered Vascular Autografts

Goki Matsumura^{*,**}, Toshiharu Shin'oka^{*,**}, Narutoshi Hibino^{*}, Satoshi Saito^{*}, Takahiko Sakamoto^{*}, Yuki Ichihara^{*}, Kyoko Hobo^{*}, Shin'ka Miyamoto^{*,**} and Hiromi Kurosawa^{*,**}
 (Department of Cardiovascular Surgery^{*} and International Research and Educational Institute for Integrated Medical Sciences^{**}, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan)

Prosthetic and bioprosthetic materials currently in use lack growth potential and therefore must be repeatedly replaced in pediatric patients as they grow. Tissue engineering is a new discipline that offers the potential for creating replacement structures from autologous cells and biodegradable polymer scaffolds. In May 2000, we initiated clinical application of tissue-engineered vascular grafts seeded with cultured cells. However, cell culturing is time-consuming, and xenoserum must be used. To overcome these disadvantages, we began to use bone marrow cells, readily available on the day of surgery, as a cell source. Since September 2001, tissue-engineered grafts seeded with autologous bone marrow cells have been implanted in 44 patients. The patients or their parents were fully informed and had given consent to the procedure. A 3 to 10 ml/kg specimen of bone marrow was aspirated with the patient under general anesthesia before the skin incision. The polymer tube serving as a scaffold for the cells was composed of a copolymer of lactide and ϵ -caprolactone (50:50) which degrades by hydrolysis. Polyglycolic or poly-L-lactic acid woven fabric was used for reinforcement. Twenty-six tissue-engineered conduits and 19 tissue-engineered patches were used for the repair of congenital heart defects. The patients' ages ranged from 1 to 24 years (median 7.4 years). All patients underwent a catheterization study, CT scan, or both, for evaluation after the operation. There were 4 late deaths due to heart failure with or without multiple organ failure or brain bleeding in this series; these were unrelated to the tissue-engineered graft function. One patient required percutaneous balloon angioplasty for tubular graft-stenosis and 4 patients for the stenosis of the patch-shaped

2007年4月3日受付, 2007年7月2日採用

* 東京女子医科大学心臓血管外科

〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1

** 東京女子医科大学国際統合医科学インスティテュート

本論文の要旨は、第37回日本心臓血管外科学会学術総会(2007年2月, 東京)において最優秀演題として発表した。

tissue engineered material. Two patients required re-do operation; one for recurrent pulmonary stenosis and another for a resulting R-L shunt after the lateral tunnel method. Kaplan-Meier analysis in relation to patients' survival was 95% within 3 years. There was only 1 patient (who underwent a total cavo-pulmonary connection procedure) requiring re-intervention in the tubular graft group and the material-related event-free rate was 96% within 3 years. This tissue-engineering approach may provide an important alternative to the use of prosthetic materials in the field of pediatric cardiovascular surgery. As it is living tissue, these vascular structures may have the potential for growth, repair, and remodeling. However, this approach is still in its infancy, further studies to resolve the problems presented, and longer follow-up in patients are necessary to confirm the durability of this approach. Jpn. J. Cardiovasc. Surg. 36: 309-314 (2007)

工学と生物学との応用である tissue-engineering という概念が Science 誌に発表されたのは 1993 年、約 15 年前のことである¹⁾。深刻な臓器移植のドナー不足に端を発したこの発想は、自己の細胞と生分解性素材の組合せにより小組織を *in vitro* で作製し、それを体内に移植するという当時では全く新しい学際的研究分野であった。これにより各臓器の再建を目標に各分野において研究が進められ、心血管の分野においてもその技術が応用された。90 年代前半にマサチューセッツ工科大学、ボストン小児病院の共同研究により心血管用補填材料の研究が開始された。羊の血管壁細胞を体外で培養、増殖させ生分解性ポリマーに播種し、それを再び同一個体に再移植する方法により、世界で初めて肺動脈弁尖の再生に成功し²⁻⁴⁾、さらに導管での主肺動脈の作製に成功した⁵⁾。その後、実験犬において、低圧系の下大静脈においても自己細胞と生分解性素材の組合せにより内腔が内皮化された再生血管の作製に成功した⁶⁾。これらの実験結果をもとに、東京女子医科大学倫理委員会に臨床応用の申請を行い、1999 年 4 月に条件付きで承認された。

2000 年 5 月心血管系では世界で初めて tissue-engineering の技術を臨床応用した⁷⁾。小静脈採取、細胞培養および生分解性素材の組合せによって作製した再生血管を用いた症例は合計 3 例である。肺動脈形成術⁷⁾、unifocalization, total cavo-pulmonary connection (TCPC) の症例⁸⁾に再生血管を用いた。第 2 例目は 3 mm の血管に使用し、術後閉塞したが、ほかの 2 例の再生血管の経過は順調である。当方法は、移植時にポリマーの中に自己の細胞がコンフルエントとなっていることが大きなメリットであった。しかし、*in vitro* での大量の細胞増殖には、異種動物の血清（胎児ウシ血清など）が不可欠であり、感染の問題などが潜在していた。狂牛病の問題がもちあがり、これらのものを使用しなくても再生血管が作製できる方法の模索が迫られた。また、自己の細胞を採取するためには、入院し、全身麻酔のもと、静脈血管を採取しなくてはならず、また、その採取した静脈より十二分の細胞が増殖するかは個々により不定であった。よって、待機手

術の場合、細胞の増殖次第でその後の予定が変更となり、時として再度血管採取のために再入院、あるいは小児の場合は感冒などにより手術が延期されると細胞を播種したポリマーが無駄になってしまうなどの可能性もあった。

そこで、これらのデメリットを補うための細胞の起源を模索していたところ、骨髄細胞に内皮などを形成する能力があることより^{9,10)}、骨髄細胞を用いての再生血管づくりが可能であろうと考えた。そこで、犬の下大静脈モデルを用いて動物実験を行ったところ血管の形成が同様に認められ、その有用性が証明された。また、同治療法が自己修復能に依存していながらも、血管組織（犬下大静脈）の組織形成に播種した骨髄細胞が関与していることを実験的に証明した¹¹⁾。これらの実験により骨髄に存在する細胞を起源とすることに意義があると判断、また、下大静脈といった大血管の再生においても血管前駆細胞の組織形成への関与が強く示唆されたため¹¹⁾、効率よくしかも大量にこれらの細胞をポリマーに播種するために「密度勾配法による骨髄単核球の分離と播種」という方法にいたり、再度東京女子医科大学倫理委員会承認を受けた。以下にわれわれが経験した骨髄単核球と生分解性素材の組合せにより作製した再生血管療法を行った 44 症例につき概説する。

対象および方法 (図 1)

対象は、2001 年 9 月より 2004 年 12 月の間に再生血管を使用して手術を行った 44 症例である。術前には、同治療に関するメリット・デメリットを家族および（たとえ未成年者でも理解可能と判断できれば）本人にも十二分な説明を行い、同意を得たうえで手術を行った。手術時平均年齢 7.4 ± 6.4 歳 (1~24 歳)、男性 (児) 19 症例、女性 (児) 25 症例であった。再建方法別に大きく肺動脈系と TCPC 系で分けたときの症例の背景を表 1 に示す。診断は、TGA/DORV や TF など肺動脈の再建を要する疾患群の症例が多く、TCPC 系は単心室疾患が多い。術式は、TCPC 型手術が 28 例 (内心外導管型 25 例、新側方型 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 例であった

図1 再生血管治療におけるプロトコルの概略

表1 44症例の fundamental diagnosis
(再生血管移植時の主診断ではない)

	肺動脈系	TCPC系
手術時年齢(歳)	8.4±5.6 (1~24)	6.8±6.8 (1~24)
先行手術(回)	18±0.9	2.1±1.1
主診断	肺動脈系	TCPC系
TF	4	0
TA/SV	1	19
TGA/DORV	6	3
TAC	2	0
AVSD	0	3
Others	3*	3**

TCPC: total cavopulmonary connection, TF: tetralogy of Fallot, TA: tricuspid atresia, SV: single ventricle, TGA: transposition of great arteries, DORV: double outlet right ventricle, TAC: truncus arteriosus communis, AVSD: atrio-ventricular septal defects. *: aortic insufficiency, interruption of aorta, Bland-White-Garland syndrome, **: primary pulmonary atresia (2 pts), hypoplastic left heart syndrome.

(重複あり)。このうち、41症例(93%)に姑息、根治術を含めなんらかの先行手術があった。18例(41%)が再手術例であり、うち4例がTCPC conversion症例(2例がAPCフォンタンから、1例がBjörk法から、1例が心室中隔造成術からの転換症例)であり、14例が肺動脈(右室流出路)形成後の再手術症例であり、先行手術で自己心膜、ウシ心嚢膜ないし人工血管により再建されたが再狭窄などをきたし、再生血管により手術を行った症例で

あった。

1. 生分解性ポリマー

生分解性ポリマーはスポンジ状のポリカプロラクトン(PCL)とポリ乳酸(PLA)の高分子重合体(50:50)をポリグリコール酸(PGA)またはポリL乳酸(PLLA)の線維で補強したものを使用してきた。これら合成高分子は、体内で非酵素的に加水分解され、それらの分解産物は生体内で徐々に代謝される。これらの生体吸収性素材は、その配合により吸収期間を調節できる。PLLAは、1~2年で強度を失い、PGAは約8週で強度を失う。分解にはさらに時間を要し環境によっても異なるが、PLLAは約3~5年、PGAは約16週以内に分解される。内外表面にスポンジ状のポリカプロラクトンとポリ乳酸の共重合体(P(LA/CL))を50:50で配合したものをを用い、これは80%以上の空洞率をもち細胞が接着しやすくかつ血液の漏出が少なくなるように設計してある。P(LA/CL)が体内で分解されるまでに約6カ月を要す。これらの材質で作製した生分解性ポリマーは厚さ約0.7mmで、径は12~24mm、長径13cmを用意した。PLLA補強を24例に、そしてPGA補強を20例に使用した。移植部位別では、肺動脈部位(肺動脈形成または右室流出路形成)にPLLA補強を11例、PGA補強5例、心房内(心側方型)にPLLA補強2例、PGA補強1例、導管(TCPCまたはTCPS)としてPLLA補強11例、PGA補強14例、そして上大静脈にPLLA補強を1例に使用した。

2. 骨髄の採取・播種・保存

すべての行程は、術当日に患者が手術室に入室したのちに清潔操作下に行った。全身麻酔下に、血行動態をモニタリングしながら清潔野で骨髄穿刺針を用いて、前骨髄を3~10 ml/kgほど患者の前腸骨稜より10 mlあたり1,000単位のヘパリンを含むシリンジで骨髄を吸引した。末梢血の混入を可能なかぎり防止するために左右数カ所を穿刺した。その後、同一手術室内のクリーンベンチ内でナイロンフィルター(100 μ m)を用いて骨髄中に含まれる骨片や脂肪、凝血塊を除去した。その後、骨髄を静かに密度勾配液上に重層し、400 $\times$ g、30分間、常温で遠心分離を行い、骨髄単核球を得た。また、ここで上清として得られた患者血清は、単核球を播種した生分解性基材を保管するための保存用(培養)液として使用した。得られた骨髄単核球細胞は生理食塩水を用いて1,000 $\times$ gで10分間、2回遠心分離し洗浄した。その後、上清を吸引破棄し、得られた細胞塊を別途仕分けした2~4 mlの自己の血清と混和し、単核球細胞混濁液として生分解性ポリマーに用手的に播種した。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た。ポリマー全体を血清に浸漬したのち、培養環境下(5%CO₂, 37°C)のインキュベーター内で保管した。この間、手術は同時進行で行われており、手術の進行状況にもよるが、このポリマーは数時間以内に体内に移植されることとなる。これらの操作は、すべて同一手術室内で行っており、患者の骨髄を手術室内より持ち出すことはないこととなっている。

3. 抗凝固療法

術後管理は、通常の開心術に準ずる。術後出血のコントロールがつきしだい、ヘパリンの持続点滴を行い、ACTを約180~200でコントロールした。経口摂取が可能となった段階で、抗血小板薬、ワルファリンの投与を全例に行った。とくにワルファリン療法は最低3カ月行うこととし、CTなどの検査で血栓のないことを確認したうえで順次減量、中止した。

4. 術後の諸検査

術後評価はおもにCTにより、グラフトの開存、狭窄の有無、血栓の有無を確認している。術後の状態により適宜造影CTを行っている。時期は、術後1カ月(状態によっては退院前)に行い、退院後は、6~12カ月おきにCTを行う方針としている。CTやMRI、超音波検査で狭窄などが疑われる場合や肺動脈への使用例は、適宜心臓カテーテル検査を行った。

結 果

平均在院日数は、41.8 $\pm$ 23.0日であった。病院死亡は

認めず、遠隔死亡例は4例であった。遠隔期での心不全死が3例、心不全や他の合併症、最終段階において多臓器不全、脳出血を合併し死亡した症例が1例であった。いずれもTCPC(extracardiac)を行った症例であり、うち2例はTCPC conversion症例であった。再手術例は2例であり、1例はlateral tunnel後の右左シャントのための再手術、もう1例はバルーン形成術を行っても解除しえなかった再々肺動脈狭窄例である。バルーンカテーテルによる追加治療を必要とした症例が5例あり、肺動脈狭窄に対して3例(うち1例が再手術)、導管・心房内狭窄に対して2例行った。低肺血流に対する肺動脈分枝再建後(6 mm)の遠隔期での閉塞を1例に認めた。

累積生存率などをKaplan-Meier法により検証した結果、本治療を行った全症例では95.0%(3年)、85.3%(4.8年)であった(図2a)。肺動脈系の症例では死亡例はなく、TCPC(extracardiac法, lateral tunnel法)を行った症例では、92.4%(3年)、77.0%(4.6年)であった(図2b)。Reintervention回避率(再手術ないしカテーテルインターベンションの回避率)は、肺動脈系で77.0%(3.0年)、TCPC系で92.7%(3.0年)、77.3%(4.6年)であった(図2c)。肺動脈系では肺動脈に介入した先行手術例が多く、よって材質に対する事象を検証するためにextracardiac TCPCを行った症例のみでのmaterial related eventsを検証した結果、material related events free rateは95.8%(3年)であった(図2d)。

まとめ・考察

先天性心疾患修復術においては、その構造的欠陥を補うためになんらかの代用物を必要とすることが多い。その多くが異種動物の心膜や既製の人工血管であるが、これら代用物は生態適合性に欠けるために移植後何年かすると石灰化を起こすなど、患者にとって不利な現象を起こすことは周知の事実である。しかし、先天性心疾患の修復術において異種動物の心膜や導管、既製の人工血管、ホモグラフトなどを使用せざるを得ないのが現状であり、ことに体が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¹²⁾、導管の劣化や再狭窄をきたすことがあり^{13,14)}、また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。これらの欠点を補うために自己組織で入手が比較的容易である自己心膜を用いてのさまざまな形成術を行い、異物を使用した場合と比較して良好な成績を得たものの、いまだ満足いく結果は得られていないのが現状である。また、根治手術後の再手術を余儀なくされる症例が増加している現在^{15~17)}、再手術を受けるさいには癒着や前回の手術時に心膜を使用していることなどにより十二分な組織(自己

図2 Kaplan-Meier 法による検証結果

生存率 (a: 全症例, b: 肺動脈部位使用例, TCPC 施行例別), c: 肺動脈部位使用例, TCPC 施行例別 reintervention 回避率および d: 心外導管型フォンタン術症例における material-related events 回避率 (いずれも Kaplan-Meier 法)

心膜)を得ることができないことも少なくない。そこで、われわれは生態適合性のある、また成長、適正化の期待できる代用補填物を模索してきた。そして、われわれは自己細胞と生分解性ポリマーを組み合わせることで再生血管の作製が可能であること、そしてまたそれが有用であることを見出し、それを臨床応用した^{7,8,18~20)}。

自己細胞により作製される「自己組織」を用いることにより、拒絶反応のない、成長や自己修復機転の働く可能性のある素材を応用することができるようになった。作製された自己組織「自己再生血管」は内腔が自己の細胞により完全に内皮化されるために生体適合性が高いと考えられ、とくに血栓や感染に対しては有利と考えられる。よって、移植後長期間のワルファリンを初めとした抗凝固療法が不必要となる。とくに成長期の患児にとってワルファリンを回避することは活動範囲の拡大も期待でき、また、拳児希望の女性にとっても大きな利点となりうる。

骨髄細胞を用いた再生血管の作製によるメリットとしては、細胞培養の回避、安全性と確実性、治療に伴うコストの軽減、そして患者の負担を軽減できることである。つまり、1) 培養が不必要であることより異種動物の血清の使用と培養に伴う感染(コンタミネーション)を防ぐことが

でき、また、骨髄細胞であれば術当日に必要な十二分な細胞数を得ることができる。2) 術当日に細胞採取を行うために、患者にとっては余計な入院を必要としない。また、小児の場合、発熱などにより手術が延期されることも少なくないが、その場合でも影響がない。3) 医療サイドにとっては、培養に伴う機材、消耗品、試薬を少なくすることができる。培養に伴う労働力と経費が軽減され、安全面においては細胞(検体)の取り扱いなどを起こしにくいことである。

この生体吸収性素材を用いる大きな利点は、血管組織が形成されるにしたがい足場(scaffold)であるポリマーが消え、自己の修復能を頼りに自己細胞で血管壁が構築されていくことである。異物である生体吸収性素材が消失し自己組織に置換されることの大きな利点は、生体適合性のある組織に置換されるのみならず、遠隔期での石灰化の可能性を減弱させ²¹⁾、拒絶反応がないために導管の機能が保持されること、内腔面の内皮化^{11,22)}により血栓や感染の確率を減少できることである。また、長期にわたる抗凝固薬の内服、とくにワルファリンフリーとなることは患児の負担を大きく減少できるものである。そして、フォンタン型手術において、“auto-tissue repair”を目指した一つの治療

体系を確立することが可能となることである¹⁸⁻²⁰⁾。これから自己骨髄細胞と生分解性ポリマーを用いた再生血管を作製する当方法は、先天性心疾患を治療する心臓血管外科手術において、異種あるいは人工補填物を用いた手術の欠点を補う大変有用な再生血管（医療材料）と考えられる。

先天性心疾患においても今後、動脈系の再生血管が望まれると思われる。しかしながら、本研究で使用したポリマーでは組織形成にかかる時間と素材の吸収期間、強度の消失期間の関係によりそのままで高圧系に応用することはできない。研究段階ではあるが、ポリマーの組成の改変により動脈組織の再生も可能となりつつある。これらを新たな医材として世に早く提供すべく、研究を継続しているところである。

当治療方法はいまだ研究開発・臨床研究段階であり、当方法が最善であるかはなおも基礎的動物実験、臨床経過などにより検討中である。本稿においては、これまでわれわれが最善であろうと考え、施行してきた方法およびその臨床経過につき概説した。本法を発展させるためのさらなる基礎研究を継続しているところである。行く末は、臨床治療を国内外で行い、本法が一診療行為として認知、普及することを期待している。

最後に、「再生医療」という新たな分野が今後も発展していくためには、産・官・学がそれぞれの役割・立場を認識し、共同してこの領域の発展に尽力すべきであり、社会に貢献するための最善の努力を継続すべきである。

文 献

- 1) Langer, R. and Vacanti, J. P.: Tissue engineering. *Science* **260**: 920-926, 1993.
- 2) Shinoka, T., Breuer, C. K., Tanel, R. E. et al.: Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann. Thorac. Surg.* **60**: S 513-516, 1995.
- 3) Shinoka, T., Ma, P. X., Shum-Tim, D. et al.: Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* **94**: II 164-168, 1996.
- 4) Shinoka, T., Shum-Tim, D., Ma, P. X. et al.: Tissue-engineered heart valve leaflets: does cell origin affect outcome? *Circulation* **96**: II-102-107, 1997.
- 5) Shinoka, T., Shum-Tim, D., Ma, P. X. et al.: Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **115**: 536-545; discussion 545-546, 1998.
- 6) Watanabe, M., Shin'oka, T., Tohyama, S. et al.: Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Eng.* **7**: 429-439, 2001.
- 7) Shin'oka, T., Imai, Y. and Ikada, Y.: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N. Engl. J. Med.* **344**: 532-533, 2001.
- 8) Naito, Y., Imai, Y., Shin'oka, T. et al.: Successful clinical application of tissue-engineered graft for extracardiac Fontan operation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **125**: 419-420, 2003.
- 9) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A. et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**: 964-967, 1997.
- 10) Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Yamane, Y. et al.: Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat. Med.* **2**: 90-93, 1996.
- 11) Matsumura, G., Miyagawa-Tomita, S., Shin'oka, T. et al.: First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation* **108**: 1729-1734, 2003.
- 12) Christenson, J. T., Vala, D., Sierra, J. et al.: Blood group incompatibility and accelerated homograft fibrocalcifications. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **127**: 242-250, 2004.
- 13) Ishizaka, T., Ohye, R. G., Goldberg, C. S. et al.: Premature failure of small-sized Shelhigh No-React porcine pulmonic valve conduit model NR-4000. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **23**: 715-718, 2003.
- 14) Schreiber, C., Sassen, S., Kostolny, M. et al.: Early graft failure of small-sized porcine valved conduits in reconstruction of the right ventricular outflow tract. *Ann. Thorac. Surg.* **82**: 179-185, 2006.
- 15) Oechslin, E. N., Harrison, D. A., Harris, L. et al.: Reoperation in adults with repair of tetralogy of Fallot: indications and outcomes. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **118**: 245-251, 1999.
- 16) Lange, R., Schreiber, C., Gunther, T. et al.: Results of biventricular repair of congenital cardiac malformations: definitive corrective surgery? *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **20**: 1207-1213, 2001.
- 17) Berdat, P. A., Immer, F., Pfammatter, J. P. et al.: Reoperations in adults with congenital heart disease: analysis of early outcome. *Int. J. Cardiol.* **93**: 239-245, 2004.
- 18) Isomatsu, Y., Shin'oka, T., Matsumura, G. et al.: Extracardiac total cavopulmonary connection using a tissue-engineered graft. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **126**: 1958-1962, 2003.
- 19) Matsumura, G., Hibino, N., Ikada, Y. et al.: Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials* **24**: 2303-2308, 2003.
- 20) 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.* **129**: 1330-1338, 2005.
- 21) Matsumura, G., Ishihara, Y., Miyagawa-Tomita, S. et al.: Evaluation of tissue-engineered vascular autografts. *Tissue Eng.* **12**: 3075-3083, 2006.
- 22) Hibino, N., Shin'oka, T., Matsumura, G. et al.: The tissue-engineered vascular graft using bone marrow without culture. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **129**: 1064-1070, 2005.