循環器の再生医工学

1) 成長する可能性のある培養人工血管の再生技術

新岡俊治

東京女子医科大学付属日本心臓血圧研究所，心臓血管外科

心臓外科領域では，先天的に心血管構造が欠損または低形成の場合，血管再建のために人工血管や異種心膜を用いた再建手術が行なわれている．しかし，成長期にある小児の場合は，人工血管の遠隔期での石灰化，導管の劣化，再狭窄などのため，10年以内に再置換手術が必須となっている．近年では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り，より良い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．筆者らは，ティッシュエンジニアリング技術を用いた再生血管の開発，臨床応用を目指し，基礎実験を継続してきた．本方法で血管を作製する際には，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が理想的である．作製された組織内に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，最終的に異物が残存せず内腔も完全に内皮化され，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として，自己組織のため成長の可能性が高いことが挙げられる．

血管組織構築法と基礎実験結果

基本的なティッシュエンジニアリングは，①細胞採取，②細胞大量生産，③ポリマー上への播種，④血管移植手術，⑤遠隔期評価の5つのステップを経て進む⁽¹⁾（図1）．

動物の大腿静脈を約2 cm 採取し，単純イクスプラン

図 1 ■ 基本的ティッシュエンジニアリング法のシェーマ

ト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1週間前に細胞濃厚浮遊液を作製し、生体吸収性ポリマーに播種した。細胞の足場となるこのポリマーは、細胞を播種する前の air porosity (含空気率)が95%以上であり、生吸収期間が6～8週間となるように設計した。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コンフルエント(集密状態)となった。播種後7～10日目に、細胞を採取した動物へ移植を行なった(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。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。したがって、移植された構築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になると考えられる。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させた。移植されたポリマーは完全に吸収され、作製された組織

は血管組織に類似していた(図2)。

これらを組織学的、生化学的、生力学的に検討したところ、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、作製された血管組織は内皮細胞で被われ、間質に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^(2～5)。

臨床例

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。患者家族から十分なインフォームドコンセントをいただいた上での臨床応用が開始され、移植第1例目は2000年5月、肺動脈再建において再生血管移植を4歳の小児で応用し、良好

図 2 ■移植後の血管径評価

左：静脈細胞を使用したグラフトでの羊肺動脈置換後 122 日目の組織の肉眼的所見。右：動脈壁細胞を使用したグラフトでの羊肺動脈置換後 135 日目。

な結果を得た。現段階では、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本方法を適応しているが、将来的にはすべての補填材料を本方法で作製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述べる。

1. 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製

基本的な方法は、前述した基礎大動物実験に準じている。

1) 静脈採取，細胞培養

はじめに患者の下肢より長さ約 3 cm の大伏在静脈を採取した。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 1~2 mm の小片にきざみ、これに培養液を加え、37°C、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 fibro-

last growth factor ; SIGMA)を加えたものを使用し、培養液は 4~5 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 週間でコンフルエント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コンフルエント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、1~2 cc の濃縮細胞浮遊液を作製した。これを生体吸収性ポリマー上に播種させて、細胞がポリマー上に接着した後に培養液を加え、インキュベーター内に留置した。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型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(図1)。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。

2. 4歳女児の症例

右室性単心室、肺動脈閉鎖症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 (quality of life) 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。

1) 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た。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1 cm 長で内腔を認めず索状になっていた。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。

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。再建を行な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製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(血流が良好に保たれている状態)していた⁽⁶⁾(図3)。

3. 12歳男児の症例

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ため、本方法による再生血管移植の適応とした。

図3 ■ 肺動脈の再建例

肺動脈造影検査所見。左：手術前、右：手術後。矢印部分が移植された部位。

グラフト内に血流が認められる

開存したグラフト

図4 ■ 12歳男児の臨床例

左：術中の経食道エコー所見。右：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。

図 5 ■ グraftの吻合（術中所見）

培養液を滴下しながらグラフトを吻合している。

1) 手術所見

胸骨正中切開にてアプローチし、高度な癒着の中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よる置換を行なった。

2) 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4)。

4. 6歳女児の症例

ファロー四徴症（生まれつき心内に4つの奇形が合併する代表的なチアノーゼ性心疾患）、肺動脈狭窄に対して3歳時に根治手術を施行されていたが、肺動脈の再狭窄をきたし手術適応となった。前回の手術で、パッチとして自己心膜を大きく採取していたため、今回は本方法を考慮した。手術同日に骨髓細胞を採取し、ポリマーシートに播種した。再手術の癒着剝離に数時間を要したため、この間に培養器の中で成長因子を加えた培養を行なった。グラフト吻合中には図5に示すように、助手が注射器に入れた培養液をグラフトに噴霧し、細胞が死滅しないよう注意をした。手術後、右室流出路が再建され、術前血圧と等圧であった右室圧は40%まで低下した(図

図 6 ■ グraft移植完了後（術中所見）

6). 合併症もなく、術後経過も良好であった。

*

以上のように、臨床においても *in vivo* での大血管再生が可能となった。将来的には、動脈系での血管再生も応用されると考えられる。今後、臨床の場で質の高い再生医療が普遍化するよう、さらなる進歩が期待されている。筆者らも現在、使用する細胞の起源として骨髓幹細胞、末梢血幹細胞に着目し、より簡便に再生血管を作製でき、患児の負担が少なくなるような方法を模索して研究を継続している。

文献

- 1) R. Langer & J.P. Vacanti : *Science*, **260**, 920 (1993).
- 2) T. Shinoka, P.X. Ma, D. Shum-Tim, C.K. Breuer, R.A. Cusick, G. Zund, R. Langer, J.P. Vacanti & J.E. Mayer Jr. : *Circulation*, **94**, II 164 (1996).
- 3) T. Shinoka, D. Shum-Tim, P.X. Ma, R.E. Tanel, R. Langer, J.P. Vacanti & J.E. Mayer Jr. : *Circulation*, **96**, II 102 (1997).
- 4) T. Shin'oka, C.K. Breuer, R.E. Tanel *et al.* : *Ann. Thorac. Surg.*, **60**, S513 (1995).
- 5) T. Shin'oka, D. Shum-Tim, P.X. Ma, *et al.* : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **115**, 536 (1998).
- 6) T. Shin'oka, Y. Imai & Y. Ikada : *N. Engl. J. Med.*, **344**, 532 (2001).