血管：エラスチックな精密マシン*

 松 田 武 久*¹

Vascular Vessel: Elastic Precision Machine

Takehisa MATSUDA

Key Words: Vascular Graft, Artificial Graft, Hybrid Graft, Biomechanics

1. 緒 言

古くから“人は血管とともに老いる”という有名な言葉がある。血液循環は生命現象の根幹に関わり、心臓のポンプ作用によって拍動的に送り出された血液が大動脈から細動脈を経て全身の組織に送り込まれ、組織の毛細血管において酸素と栄養を細胞に補給し、代謝産物を回収して静脈血となって心臓（右心房→右心室）に戻り、この静脈血が肺を循環することによって酸素化されて動脈血となって心臓（左心房→左心室）にかえり、再び全身をめぐる。心臓から送り出される血液の量は運動量に応じて増減し、また血圧調節が行われる。この血圧は送血のための駆動エネルギーであるが、高い状態、すなわち高血圧が続くと、動脈硬化等の血管障害を引き起こす。マシンとしての血管はマシンコントローラとしての血圧調節が破綻したり、あるいはマシンに起こる老化として動脈硬化によってその機能が低下する。重要な血管、例えば心臓の筋肉を動かすのに必要な冠動脈が狭くなったり、あるいは閉塞すると、生命にとって重篤な状況を創出する。

血流量を大きくし、かつ血圧を過度に上昇させないために血管は弛緩し、逆に低い血圧の場合には収縮する。血管は血圧・血流量に応じて伸縮してその容積を変えるしなやかな導管である。1分間に60回の心臓の拍動は1日に換算すると10万回、1年では約数千万回の拍動を動脈に与え、また送血量は成人で1分間に約5lであり、1日に換算すると約7tと見積もられる。この血管がつまるとその下流組織には当然血液が流れ

ず、早晚壊死になる。したがって、血管はまさしく生命維持のライフラインである。病変血管を正常にするためには、まず通常の投薬による内科的治療、あるいは外科的修復が行われる。このような方法で不可能な場合には人工血管あるいは生体血管による臓器置換が行われる。本稿では、まず人工血管の現状について概説し、ついで人工血管の設計思想と生体移植による許容（自己化とも呼べる）過程について著者らの研究をもとに説明する。

2. 血管壁組織の構造と機能

図1に示したように、血管壁は内膜/中膜/外膜の階層構造を有し、各層はそれぞれ内皮細胞(EC)、平滑筋細胞(SMC)および線維芽細胞(FC)、およびコラーゲン、エラスチン、多糖よりなる細胞外マトリックス(ECM)より構成されている⁽¹⁾。内膜は基底膜上に形成

Fig. 1 Schematics of hierarchical structure of artery (note that endothelial cells in the aligned parallel to the direction of flow and smooth muscle cells in the media aligned parallel to the wall distension generated from the pulsatile stress)

* 原稿受付 1997年2月18日。

*¹ 国立循環器病センター研究所生体工学部 (〒565 吹田市藤白台5-7-1)。

するEC単層充填の二次元組織である。機能的にはプロスタサイクリン、組織プラスミノゲン等を分泌して抗血小板性および線溶活性を発現し、また細胞膜表面のトロンボモジュリンやヘパラン硫酸によってその抗凝固性を発現し、これらの三つの協奏的作用によって血液の導管としての機能維持を発現している。中膜はSMCが重層し、コラーゲンおよびエラスチンが繊維状あるいは層状に配向した三次元組織である。SMCの収弛緩によって血管径の調節を行い、血圧・血流量等の血行力学的機能を分担している。健康な血管中膜のSMCの細胞は、後述するように細胞周期では休止期にあり、細胞外マトリックスの分泌活性および増殖活性を示さず、ホルモンによりただちに応答して収弛緩する(収縮型)。動脈硬化の病巣やin vitro培養では、SMCは収弛緩性は失われ分泌・増殖性の合成型である。外膜はFCと主としてコラーゲンからなる三次元組織体である。ECとSMCは液性因子(サイトカインやホルモン)を媒介して細胞間コミュニケーションを行っているといわれている。

動脈では、常時加わる拍動流および拍動圧の力学的ストレスを負荷された力学場において恒常性の維持と機能発現が営まれる。動脈は1心拍ごとに最高血圧(約130 mmHg)、最低血圧(70 mmHg)の伸縮による力学的ストレスを受け、また拍動流の水力学的ストレスを受ける。図1に示したように、ECは流体力学的せん断応力によって血流方向に変形・配向し、最も流体力学的応力を受け難いように偏平な流線型を呈している。一方、中膜層のSMCはホルモンに感応して収弛緩の力学的応答を発現し易いように血管壁の円周方向に配向している。ECMの構成成分のうち、コラーゲンとエラスチンは構造蛋白質であり、コラーゲンは剛性を、エラスチン(弾性繊維ともよばれる)は弾性的特性を担っているといわれる。これらの分子は自己組織化して集合し、前者は繊維を形成し、後者は無定形の層を形成する。受動的な外力を受けて、また能動的な内力を最も効率よく変形しやすいように配向していることが多い。

3. 人工血管

口径が6 mm以上の大血管用の人工血管は古くからポリエステル繊維を編んで加工したダクロン人工血管およびゴアテックス人工血管[四弗化ポリエチレン(PTFE)を延伸して成型加工した人工血管: expanded PTFE 又は e PTFE と呼ばれている]が1960~1970年代に開発され、現在でも改良されて臨床応用されている。構造的な特徴はいずれも壁面に無数の細孔があ

り、また蛇腹構造のため屈曲しても狭窄しないように成型されている。細孔(Porosity)は人工血管が生体内で自己化を獲得するために必要な要素であり、1960年代半ばには、Porosity: A Primary Determinant of Vascular Wall Regeneration という論文が提出されており、その重要性が指摘されている。このPorosityを変化させると、大きいPorosity程人工血管の開存率(移植期間中の非塞栓率)が高くなることが報告されており、孔を経て外側から内腔への細胞の侵入による組織形成(細胞交通性)が開存性に重要であることを示唆している。この開存性は移植早期には血液の凝固(血栓)による閉塞、慢性期には再生した血管壁の過増殖による狭窄によって誘起される血栓形成によるといわれている。この血管壁の再生は前述の外側から内腔への組織侵入(Transmural Tissue Ingrowth)に加えて、吻合部から人工血管への組織侵入(Anastomotic Tissue Ingrowth)による。したがって、人工血管が生体内で許容され、生体組織と共存するためには、血栓形成を抑え、一方、血管壁の再生を促進し、かつ一定期間後は過度な増殖を抑えることが必要となる。

一方、人工血管が拍動圧や力学的伸縮に宿主血管と同様に感応すれば吻合部の応力集中がなく、また細胞は十分に生体血管と同様な力学場に存在できるようになり、力学的に適応できることになる。しかし、人工材料で作製した人工血管は硬く、そのため吻合部周辺においてストレス集中や拍動しないために流体力学的乱れによって周辺部で組織損傷が生じることが示唆されている。このように生体と同等なコンプライアンスを有する人工血管の構造化(Compliance Matching)は力学的設計から重要である。したがって、理想的な人工血管とは、しなやかで、かつ耐久性があり、移植早期から非血栓ないしは軽度の血栓層の厚さで、生体組織の再構築が速やかに起こり、終局的には生体血管と“同化”して自己化を獲得するもののことである。この初期の血栓層の厚さは小口径になる程開存性に大きく影響する。例えば、血栓層の厚さが1 mmの場合、口径6 mmの人工血管の場合には、実効血流域は4 mmであるが、口径が3 mmの場合には僅か1 mmになるので、口径が小さくなるほど開存性に与える影響は極めて大きい。従来の人工血管は人工材料のみからなる管状構造体であるが生体組織の構成成分である生体高分子である蛋白質(コラーゲン、ゼラチン、アルブミン等)や多糖(非凝固性物質であるヘパリン)を人工材料に組み込んだ人工血管(ハイブリッド化人工血管といえる)も最近市販されている。一方、生体高分子に加えて生細胞を組み込んだ人工血管はハイブリッド型人

Fig. 2 Vessel replacement technologies with a wide spectrum from artificial graft, hybrid tissue to living or cryopreserved grafts

工血管といわれ、その場合の生体高分子は細胞の接着・増殖等の細胞外環境を形成させる。図2に人工血管からハイブリッド人工血管、移植血管のスペクトルを示した。ハイブリッド人工血管は細胞移植人工血管であり、人工臓器と移植臓器の中間に位置する“第3”の臓器といえる。細胞を組み込んだハイブリッド臓器は組織工学 (Tissue Engineering) とよばれ、欧米において急速に発達している。人工材料、細胞生物学、バイオメカニクス等の複合した学際領域の学問である。

4. 新しい概念による人工血管の開発

著者らが上記の理想的な人工血管の開発を目指して行っている三つのアプローチについて紹介する。一つは、人工材料と生体高分子よりなるハイブリッド化人工血管であり、人工材料 (人工血管) 上に血管壁組織を生体外であらかじめ再構築したハイブリッド型人工血管、最後に人工基材を用いずに作成したハイブリッド血管壁組織を紹介する。

4.1 エキシマレーザ加工した人工血管 柔軟性を付与するためには、ヤング率が低く、薄いこと、また生体内劣化を最小限にするために、単位体積当たりの比面積をできるだけ小さくすることが必要である。このために、材料として人工心臓のダイアフラムに用いられ、耐久性およびエラストマとしての性能が保証されているセグメント化ポリウレタンを用い、これを薄膜チューブ上にガラス棒の上に製膜した後に、KrFエキシマレーザ (波長: 248 nm) を照射して孔 (口径 100 μ m) を開けた。パーソナルコンピュータで制御することにより、規則性の多孔質管状体を形成させた (図3)。多孔質の程度が増すと、コンプライアンス (ここではその逆数と相関する stiffness parameter: 林紘三郎博士提唱) は冠状動脈に近づいた。この内腔と外側

A

Fig. 3 Microporous artificial grafts with excimer-laser ablation technique, by which pore size and its density are well-controlled to provide compliance matching and tissue ingrowth

に光反応性ゼラチン (ゼラチンは生体高分子コラーゲンの熱変性体) をコーティングし、ついで紫外光を照射すると、ゼラチンは人工基材に化学固定され、またゼラチン分子間は架橋されてゲル化した。レーザ照射前の人工血管 (A)、レーザ照射によって溝を開けるが開通していない人工血管 (孔・溝の深さは照射回数にて調節可能: B)、および開通孔の人工血管 (C) とすると、1箇月の開存性は $C > B \gg A$ であり、一方内膜肥厚化は $A \gg B > C$ であった。A と B の差はいずれも無開孔の内腔であるが A は non-compliant, B は compli-

antであり、内膜肥厚、開存性の差は compliance の差に起因し、一方、BとCの差はいずれも compliant であるが開孔の有無である。したがって、BとCの移植実験の差は細胞交通性の差に起因できる。Aの場合には両側の吻合部からのみ組織は形成し内膜肥厚が著しい。Bの場合には内膜肥厚は極めて小さかった。このことは、compliance matching が tissue regeneration の制御に大きな効果を与えていることが実証できたといえる。Cの場合には外側から内腔へかけて組織の侵入と内腔では円周方向に平滑筋細胞が配向しており、力学的伸縮に感応して細胞が応答した。したがって、コンプライアンスが細胞の過増殖を制御し、連通孔が細胞交通性をもたらし、最も高い開存性と内膜安定化をもたらしたと推察できる。

EC: Endothelial Cell, SMC: Smooth Muscle Cell, FC: Fibroblast

Fig. 4 Fabrication procedures of hybrid grafts with different degrees of hierarchy (Model I: intimal model, Model II: intimal/medial model, Model III: intimal/medial/adventitial model)

4・2 ハイブリッド型人工血管 市販の人工血管内腔にコラーゲン溶液を回転しながらコーティングし、ついで 37°C に加温するとコラーゲンは繊維化しゲルを形成する。この上に血管壁を内張りしている内皮細胞を播種 (Seeding) して培養すると、内腔は細胞の敷石状の最密充填組織になった (図 4)。このハイブリッド型人工血管を細胞を採取した犬の動脈に移植すると、極めて高い開存性が得られた。ハイブリッド型人工血管の研究は 1978 年にアメリカの Herring らによって開始されたが、内皮細胞が流血下で数時間以内にはく離することが報告された⁽²⁾。Shindo らはコラーゲン・コーティングにより著明な接着強度の上昇を認めた⁽³⁾。したがって、コラーゲンを細胞のマトリックスに使用すれば極めて脱離し難い効果が発現したといえる。一方、このコラーゲンのゲルを作製する際に血管壁の中膜層の平滑筋細胞を混ぜてゲルを作成すると平滑筋細胞がゲルの中に包埋され (ハイブリッド中膜)、この上に内皮細胞を播種すると内膜/中膜階層型ができることになる。一方、上述のゲル層の半分に線維芽細胞を包埋したゲル (ハイブリッド外膜) を作成し、ついでこの上層に上述のハイブリッド中膜を形成させて内皮細胞を播種すると動脈と同様な内膜/中膜/外膜モデルができる。これらを移植すると、開存性はいずれも高く統計的に有意性はないものの、血管壁細胞再構築 (Morphogenesis) は細胞の階層的な棲み分け、平滑筋細胞の円周方向への配向化およびマトリックス成分の増生と自己組織化がもたらされた。コラーゲンは繊維束を形成して円周方向へ超分子構造体を形成し、一方、エラスチンはハネカム構造を形成し、これらの超分子構造の多糖類によって構成されていた。構築された血管壁厚は移植とともに増大し、ついで縮退して稠密な組織を形成した。

4・3 ハイブリッド血管組織 人工基材による骨格 (Scaffold) なしに生体高分子と生細胞のみから管状

Fig. 5 Preparation of hybrid tubular tissue composed of only collagen and cells

Fig. 6 Devices for preparation of hybrid graft (a: glass-made inner-rod and outer-vessel, b: hybrid tissue produced just after removal of outer-vessel, c: 10 days-incubation, d: endothelial cell-seeding after removal of inner rod)

構造体がつくられれば生体組織の代替えとなりうる。古くは皮膚組織の繊維芽細胞をコラーゲンゲルの中に包埋すると細胞はコラーゲン繊維に接着し、ついで繊維を手繰り寄せてゲル自体が収縮し脱水化して体積は数百分の1まで縮小し白色の組織体を形成することが知られていた。この現象を利用すると管状のハイブリッド血管壁が形成できる(図5)。ガラス製の内筒と外筒を有する容器の筒の間にハイブリッド中膜を作るときに用いたコラーゲン溶液を注ぎ込み、加温することにより管状ゲル体を形成させる。ついで、外筒を抜去して培養を続けると、ゲル化時は透明であった組織体は収縮して長さおよび厚さとも小さくなる。ついで内筒を抜去し、内腔に内皮細胞を播種して単層構造を形成させる(図6)。内腔に生理食塩水を注入して破裂強度を調べると、200~250 mmHgで破断した。動脈に移殖すると、約70%位は一昼夜以内に破裂して移植された犬は死亡した。一方、血圧がかからない静動脈系では破裂せず高い開存率が得られた。移植期間とともに細胞外マトリックスの産生と自己組織化、および血管壁の縮小と稠密化が進行した。以上のように、新しい設計概念と生体組織の力学的および構造的適応(リモデリング)を誘導する三つのアプローチに基づくプロトタイプを開発した。生体外の細胞操作と細胞外環境の設計により移植早期より高い開存性を与える小口径人工血管ができつつある。

5. 力学的ストレスと細胞バイオメカニクス

このように、血管壁組織は、(1)多成分不均一系、(2)多細胞社会、(3)階層構造と棲み分け、(4)自己組織化、(5)配向性に特徴があるといえる。これらの構造的異方性は組織としての力学的性質の異方性を大きく反映しているが、発生期における定序的な組立に加えて、生体内の力学的ストレスに適応して、高度な配向および自己組織化が生じたものと考えられる(Mechanical Adaptation)。すなわち、生体組織は長大なる時間の中で最も効率よく環境に応じるような構造を形成するように組織形成が起こってきたと推定されるが、この先天的な運命付け(あるいは資質の獲得)に加えて、後天的に絶えず加わるストレスに対する機能的適合制御ともいえることが最近のバイオメカニクスの研究で明らかにされつつある。血流に直接さらされるECが流体力学的せん断応力に感应して流れのベクトル方向に配向することを明らかにした研究は多い⁽⁸⁾⁽⁹⁾。一方、中膜層のSMCは図1に示したように壁の伸縮応力を受ける。SMCの力学的ストレス反応性をin vitroで明らかにした著者らの研究を紹介する。

血管壁細胞をポリウレタン薄膜フィルムに接着させ、図7に示した方法により両端に一次元方向の伸縮を繰り返し加えて、経時的にベクトル負荷方向に対し

Fig. 7 Apparatus to load unidirectional cyclic distention to adhered cells

での細胞配向角を測定した。振幅 (5~20%) および伸縮頻度 (15~120 rpm) の実験条件下では、振幅および頻度の増大とともに、ストレス負荷方向に対する平均配向角は経時的にベクトル負荷方向に対して 90° に近づき、いずれの細胞も負荷ベクトルに直交して配向する傾向が観察された (図 8)。これは細胞の力学的ストレスからの忌避反応であると考えられる。配向応答性の細胞依存性、すなわち力学的ストレスからの忌避反応性の大きさは $FC > SMC > EC$ であった^{(10)~(13)}。

二次元組織では、細胞配向の力学的応答性はベクトルに直交することになったが、図 1 で示したように、生体血管壁中膜層の伸縮は円周方向であり、SMC はベクトルと平行して配向している事実と矛盾することになる。この点を明らかにするためコラーゲンと SMC からハイブリッド“中膜”をつくり、繰り返し力学的負荷を与えた。すなわち、冷コラーゲン溶液に SMC を混和し、加温によりゲル化させた高度に水和した粗なハイドロゲル状円筒体 (ハイブリッド中膜) に動脈と同様な拍動を加えると、経時的にゲルは収縮し、高密度のハイブリッド組織を形成した。組織染色および走査および透過電顕で観察すると、SMC は円周方向に配向し、またコラーゲン繊維も円周方向に配向し、生体血管壁と同様なベクトルの配向性を示した⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。これはコラーゲン繊維に接着している SMC が伸縮しようとしてコラーゲンをたぐり寄せることによってゲルが収縮し、高密度化したコラーゲン繊維が拍動ストレスを受けて円周方向に配向し、この配向した繊維束に SMC が接触誘導 (contact guidance) されることにより円周方向に配向したものと考えられる。したがって、二次元組織で見られたような力学的忌避反応よりも接触誘導反応が優先したといえる。したがって、生体内においても同様な機構で細胞配向が誘導

Fig. 8 Cellular orientation of three vascular cell types (endothelial cell; EC, smooth muscle cell; SMC and fibroblast; FC) adhered on polyurethane film upon cyclic distention at 5% amplitude and 60 rpm (the vectoral direction; 0 and 180 degrees, upper; 6 hrs, lower; 24 hrs)

されていると推察される。

このようにして形成した高配向性および高密度ハイブリッド中膜組織の SMC の細胞内超微細構造を透過電顕で調べると、ストレス負荷前は合成型特有の器官構造 (粗面小胞体・ミトコンドリア・ゴルジ体・リボゾーム等) であったが、ストレス負荷とともに収縮型器官 (筋原繊維・緻密体等) の発現とその分率が増加した。三次元培養と周期的伸縮性ストレス負荷という生理的環境を模倣した条件下では、生体組織に極めて類似の構造・機能化の発現に加えて形質変換が誘導されたといえる⁽¹³⁾。したがって、生体内における SMC の輪状配向化と内膜肥厚の抑制は SMC が力学的ストレスを感じるメカノケミカル・センシングとこれを細胞内器官へ情報伝達するトランスダクション機構を有していることを示唆している。

6. おわりに

以上のように、生体血管と類似の階層化および細胞外環境の付与により、細胞の棲み分けと配向および SMC の形質変換が見られた。また、組織の力学的機能適合によるリモデリングおよび細胞外マトリックスの立体再構築が実現できた。繰り返し受ける拍動の力学場および三次元マトリックス場において、細胞は血管壁組織が再構築し、早期 (抗血栓性) から慢性期 (内膜肥厚抑制) にかけて、移植血管の自己化獲得のシナリオが書けつつあるとみなせる。ハイブリッド人工血管の人工材料は力学的骨格として作用するが、細胞とコラーゲンからのみで管状物をつくれば、より生体組織に近いものができると考えられる。また、細胞外環

境の設計に加えて、生体組織の置かれている力学的環境場をできるだけ感応できるように、組織の力学的支持体である人工血管の力学および構造設計が必要であると考えられる。また、生体組織の置かれている力学的環境場を感応する細胞のメカノセンサの分子装置とこの装置から細胞内へ伝達され、遺伝子レベルでの形質変換および機能発現に関する研究は現在分子細胞生物学の分野で急速に明らかにされつつある。力学的刺激と遺伝子発現の関係は、生体組織構築と維持の解明に大きく貢献するものとみなされる。

文 献

- (1) Rhodin, J. G., Architecture of the vessel wall (Bohr, D. F., Somlyo, A. P. and Sparks, H. V. eds.), Handbook of physiology, section 2: The cardiovascular system, vol. II: Vascular smooth muscle Bethesda, *Am. Phys. Soc.*, (1980), 1-31.
- (2) Herring, M., Gardner, A. and Glover, J., A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium, *Surgery*, **84**(1978), 498-504.
- (3) Shinndo, S., Takagi, A. and Whittemore, A. D., Improved patency of collagen-impregnated grafts after in vitro autogeneous endothelial cell seeding, *J. Vasc. Surg.*, **6**(1987), 325-332.
- (4) Matsuda, T., Iwata, H. and Akutsu, T., *Vascular Organ Reconstruction Technology for Hybrid Graft. Artificial Heart*, **2**(1989), 65-81, Springer-Verlag.
- (5) Miwa, H. and Matsuda, T., An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prostheses., *J. Vasc. Surg.*, **19**(1994), 658-667.
- (6) Matsuda, T. and Miwa, H., Hybrid vascular model biomimicking the hierarchical structure of arterial wall: Neointimal stability and neoarterial regeneration process under arterial circulation, *J. Thor. Cardiovasc. Surg.*, **110** (1995), 988-997.
- (7) Ishibashi, K. and Matsuda, T., Reconstruction of a hybrid vascular graft hierarchically layered with three cell types, *J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **40-3** (1994), M284-M290.
- (8) Shirinsky, V. P., Antonov, A. S., Birukov, K. G., Sobolevsky, A. V., Romanov, Y. A., Kabaeva, N. V., Antonova, G. N. and Smirnov, V. N., Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size, *J. Cell Biol.*, **109**(1991), 331-339.
- (9) 増田道隆・藤原敬巳, 内皮細胞の細胞生物学と血流, *BME*, **6-2**(1992), 35-50.
- (10) Kanda, K. and Matsuda, T., Behavior of Arterial Wall Cells Cultured on Periodically Stretched Substrates, *Cell Transplant.*, **2**(1993), 475-484.
- (11) Kanda, K. and Matsuda, T., Mechanical stress-induced orientation and ultrastructural change of smooth muscle cells cultured in three-dimensional collagen lattices, *Cell Transplant.*, **3**(1994), 481-492.
- (12) Kanda, K. and Matsuda, T., In vitro reconstruction of hybrid arterial media with molecular and cellular orientations, *Cell Transplant.*, **3**(1994), 537-545.
- (13) Kanda, K., Miwa, H., Matsuda, T. and Oka, T., Phenotypic modulation of smooth muscle cells in intima/media-incorporated hybrid vascular prostheses, *J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **39-3**(1993), M278-282.
- (14) L'Heureux, N., Germain, L., Labb, R. and Auger, F. A., In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: A morphologic study, *J. Vasc. Surg.*, **17**(1993), 499-509.
- (15) Hirai, J., Kanda, K., Oka, T. and Matsuda, T., Highly-oriented, Tubular-shaped Hybrid Vascular Tissue for Low-pressure Circulatory System, *ASAIO J.*, **40** (1994), 383-388.