

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ハイブリッド型人工血管の作成に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 野一色 泰晴

(横浜市立大学医学部外科学第一講座 講師)

平成13(2001)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

- ハイブリッド型人工血管の作成に関する研究 _____ 1
野一色 泰晴

II. 研究成果資料

1. 生体内の組織工学 _____ 10
2. 治癒力を引き出す Tissue Engineering _____ 13
3. Blastogenesis について _____ 21
4. Tissue Engineering..... _____ 23
5. Bone Marrow vascular Graft _____ 37
6. 走性を利用しよう _____ 51

III. 参考資料

1. 極細繊維を用いた人工血管 _____ 57
2. 超極細人工血管開発の経緯 _____ 71
3. Adipose Tissue Fragments _____ 79
4. Toray _____ 85
5. 人工血管、歴史 _____ 100
6. 細胞ホイホイ _____ 108
7. ハイブリッド型人工血管の開発 _____ 111
8. 小中学生の理化離れと人工臓器の授業 _____ 116
9. 超極細繊維交絡型人工血管の開発 _____ 123
10. 超極細繊維交絡型人工血管の滑脱テスト及び物性テスト _____ 129

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 133

V. 研究成果の刊行物・別冊

1. Formation of Neointima in Vascular Prosthesis Sealed with Autologous
Adipose Tissue Fragments for Femoropopliteal Bypass _____ 134
2. In vivo tissue engineering:dreams for the future. _____ 141
3. Age Dependency of Neointima Formation on Vascular Prostheses in Dogs _____ 148
4. Autologous Tissue-Fragmented Extracardiac Conduit With Rapid,
Stable Endothelialization due to Angigenesis. _____ 159

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

ハイブリッド型人工血管の作成に関する研究

主任研究者 野一色 泰晴 横浜市立大学医学部外科学第一講座・講師

研究要旨 患者自身の治癒力を最大限に引き出すことによって、血管壁組織の自己形成を誘導する技術を開発し、この手法を活用して治癒力の低下した高齢者にも有利な治癒をもたらす小口径人工血管を開発することを、3年計画の本プロジェクトの目標としてとらえ、本年度はそのうちの、基材となるマトリックス、すなわち血管壁組織が形作られる骨組みとなるべき人工血管の基本構造の作成を行った。さらに、使用する細胞をどのような状態で取り扱うことが、最も効率よく組織再生を促すかについての検討を行った。具体的には、細胞の好む足場として、我々は極めて細いポリエステル繊維を使用して人工血管の作成を行った。これは細胞が極めて細い繊維に寄り添うように付着する本能的性質である「接触走性」を活用した手法である。この方法によって、細胞成長因子を使用することなく高齢者でも若者と同じような治癒を得て、血管壁を体内で作る可能性が高まった。

A. 研究目的

患者自身の治癒力を最大限に引き出すことによって、血管壁組織の自己形成を誘導する技術を開発し、この手法を活用して治癒力の低下した高齢者にも有利な治癒をもたらす小口径人工血管を開発することを、3年計画の本プロジェクトの目標としてとらえ、本年度はそのうちの、基材となるマトリックス、すなわち血管壁組織が形作られる骨組みとなるべき人工血管の基本構造の作成を行う。さらに、使用する細胞をどのような状態で取り扱うことが、最も効率よく組織再生を促すかについての検討を行ない、これらの結果を基に、合成高分子材料を枠組みとして、患者自身の治癒力で新

たな血管壁を創成し、その結果として人工血管の長期間の開存性を得ることを研究の目的とする。

B. 研究方法

我々は最初に、人工血管の基本構築構造物を何にするかについての検討に入った。今日、人工血管の枠組みとしては、ポリエステル布製と、テフロン製の管を急激に圧力をかけて延伸して無数の亀裂を生じさせた e-PTFE graft が臨床で使用されている。我々はこの両者に対しての改良を行うことで、本プロジェクトで使用する人工血管の枠組み作りを行った。

ポリエステル繊維は 1957 年の Creech ら

のアメリカ血管外科学会報告でみられるように、生体内での異物反応、発癌性などがなく、しかも生体内での劣化が極めて少ないことがあげられており、それ以降の生体内植え込み用の人工臓器用素材として多用され、人工血管もそれを使用して今日に至っている。ポリエステル繊維はアメリカのDuPont 社が Dacron の名前で売り出し、世界中の人工臓器市場を占めていた。しかしながら、ダウコーニング社を始めいくつかの会社がシリコーンの医用材料としての医療訴訟問題で多額の和解金を払わざるを得なくなった経緯があるため、DuPont 社は1994年1月31日以降、Dacron を医療用の素材としては出荷しないとアナウンスしたことから、今日では DuPont 社の Dacron は使用されていないが、世界中のその他の会社のポリエステル繊維が使用されている。このたび我々が注目したのは日本の繊維技術で最高級のハイテクを駆使して創成した極細繊維であり、我々が極細繊維に注目したのは、細胞の本能的性質を利用して繊維周囲に細胞を集めることが可能であることを我々が基礎研究の結果、見いだしたからである。

前述したとおり、今日使用されているポリエステル繊維を用いた人工血管は1957年以来、臨床で広く使用され、その安全性が確認されているが、その後においてポリエステル繊維を改良した研究は行われていない。そこで我々はポリエステル繊維をより活力のある材料に変換させるため、その改良を行った。我々の用いた改良のための指標は、細胞との親和性である。本プロジェクトでは、人工血管の上にかんしてハイブリッド型の血管壁を創成するかにかか

っていることから、細胞といかにすれば親しくなれるか、細胞活動をいかにすると助けることができるか、といったことにその努力目標をおいた。

具体的な研究方法としては、超極細繊維を用いた人工血管を作ることであったが、実際には、人工血管として要求される基本的な要件、例えば内圧による変形が生じないこと（動脈瘤防止）、異物反応などの副作用のないこと、吻合部が解れないこと、血液の漏れを生じないこと、その他の要件を満たす布製人工血管を通常の太さの繊維を用いて作成し、さらに底に超極細繊維を組み込んで、細胞の誘導を無理なく行うための設計上の工夫を行った。

次に我々は e-PTFE graft の改良を行った。E-PTFE Graft は1972年に医療の場に紹介された。元々は電線の被覆用のカバー材であったものを、それがテフロン製であることから、テフロンが植え込み用の医療材料の素材として、やはり Creech の委員会でお墨付きをもらっていることから、人工血管の素材としても使用する考え方があったが、テフロン繊維を使用して布製人工血管を作成した場合には、繊維が互いに解れやすくなって、人工血管の切断端が解れてしまうという欠点があることから、敬遠されていたが、編む、織る、といった方法以外の方式で作成された e-PTFE graft は、取り扱いが容易であって、しかもテフロンの持つ非粘着性という特性が血栓を付着させにくいという利点として強調されたことから、人工血管として導入されたという経緯がある。

我々の主眼は、異物反応の少ないテフロンを用い、さらにこの構造物に細胞成分をいかにして絡めてゆくかの工夫であった。

そのためには、細胞を動かすためのサイトカインを e-PTFE graft の壁に固定可能な条件の設定を行った。

この研究は、本研究をスタートする前から考えていたことではあったが、細胞を組み込みやすいハイブリッド型人工血管を考える上に置いては、是非とも e-PTFE graft も活用したいと考えていたことから、この考え方がでてきた。

e-PTFE graft の利点は血栓が付着しにくいことである。これは鍋の底にテフロンコーティングをしていることから明らかなように、テフロンの非粘着性によるものである。しかしながら、テフロンの特徴は逆に欠点ともなりうる。すなわち、細胞との親和性の悪さである。テフロン自体は生体内において何の毒性もないことから、組織内においてのステルス性が発揮され、存在をそれほどまでには認識されずに生体内に居続けることが可能である。ところが細胞がそれに付着しようとしても、細胞はテフロンに接着することはできない。とくに細胞成長因子やサイトカインがいかに多量にあったにしても、それらを安全な形で吸着してとどめておくことはできない。このようなことから、我々はテフロン製の人工血管についても、改良の必要性を感じていた。

この具体的改良方法としては、我々は生体内で吸収分解される物質を一時的に e-PTFE graft の壁に絡めておいて、それにサイトカインなどを吸着させ、組織構築が完了する頃には、それが分解吸収されるような設計を行うことを計画した。そしてこのための生体内吸収物質として、コラーゲンおよびゼラチンは選んだ。これらはすでに人工血管のシール材として使用されてい

る実績があり、種々の化学修飾が可能であったから、取り扱いの面での有利性を我々はとった。

次に細胞をどのような方法で取り扱おうと、組織創成をいち早くやってくれるかについての検討も行った。細胞は鳥足す会場県の差異によって、細胞の持つ本来の働きを果たしたり、あるいはそのような働きをすることができなかつたり、また、ある条件下では、予期した以上の働きをしてくれるものでもあるから、その条件を追求する理論的研究を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、我々は ES 細胞は使用しない。すべての細胞は患者自身の細胞を活用する予定である。このことから、倫理面での配慮は、特別視しなくてもよいと考えている。ただし、来年度から動物を用いた実験を行うことから、我々は横浜市立大学医学部動物実験センター倫理委員会に対して、我々の研究内容についての説明を行い、動物実験の行う上での倫理についての審査を受けた。我々はできうる限りの研究を、たとえその実験の一部分であっても、動物を使用せずにすむ研究は、代替えの研究で済ませるように配慮を行ってきた。そして、どうしても動物を使用せざるを得ない場合には、動物への苦痛を最小限にとどめる古風を行っている。この様な我々の申請に対して、先日、動物実験倫理委員会から、動物実験の許可を得ることができた。

C. 研究結果

超極細繊維を使用した人工血管の作成に関しては、試作品レベルではあるが、人工

血管を作成することができた。通常の繊維を縦糸に用い、横糸には通常繊維と超極細繊維を重ねて使用する方法である。使用した通常繊維の太さは糸の断面直径が約 16 ミクロンであるのに対して、超極細繊維ではそれが約 3.5 ミクロンであった。

この様な通常繊維と超極細繊維の組み合わせによる人工血管を作成したあと、我々は人工血管を無数の小さなフックで鈴鹿敵に引っ掻き、極細繊維を集中的に起毛した。この様な起毛処理をしやすいように、我々はあらかじめ横糸の超極細繊維をゆとりを持ってふくらませる「縞子織り」の技術を組み込んだ。その結果、SEM で観察すると、超極細繊維の選択的な起毛が可能となった。次に我々は 70 気圧程度の高水圧の water jet を用いて起毛した人工血管を高圧水に曝し、超極細繊維を通常繊維に複雑に絡ませる操作を行った。この処置によって、超極細繊維の繊維間隔が広がり、細胞が入り込みやすくなり、組織の創成、極細繊維と宿主組織との一体化が進みやすくなることが期待できる。

次に我々の行った e-PTFE Graft のコラーゲン処理であるが、我々は抗原性の極めて少ないアテロコラーゲンを使用した。これはコラーゲン分子の中でも特に抗原性の高いテロペプチドの部分ペプシンで溶かし取り除いたコラーゲンの基本分子である。テロペプチドはコラーゲン分子の両端にあって、種々の化学反応に関わりやすい部位であるが、コーネル大学にいた宮田博士の研究で、この部分を取り除くことで、コラーゲンの抗原性を極めて低くすることが可能となったことから、我々はそれを使用した。

次に我々が行った工夫は、コラーゲンが極めて高い親水性の物質であることから、そのまま水溶液にしても、超疎水性の性質を e-PTFE の亀裂の隙間に押し込むことができないと言う困難点であった。これに対して我々はコラーゲン分子の一部に長いアルキル基をつけることで、コラーゲン分子の一部を疎水性にしておき、これを 50% エタノール液に溶解する方法を開発した。そしてこの方法を用いて、アテロコラーゲンの 50% アルコール溶液を用いた e-PTFE graft へのコラーゲンの封入を行った。その結果、予期したとおりに、コラーゲンを封入することができた。

次に、我々は細胞の取り扱いについての検討を行った。我々は ES 細胞を用いることなく幼弱な細胞を集める方法として、組織に刺激を与えることで、組織内の細胞を幼弱化させる方法を採用することとした。一般の成熟した組織の細胞は、よほどのことがない限り細胞分裂は行わない。単に新陳代謝における細胞の入れ替えがあるのみであるが、これを我々は積極的に細胞の幼弱化を行うこととした。これは Brastogenesis という言葉で表現されている細胞の特性である。細胞が刺激に応じて遊走や細胞分裂などを行う。一般の創傷治癒にはこの細胞の働きが大きな役割を演じている。そこで積極的に刺激による細胞の幼弱化を行った。具体的には組織片を採取して、それを切り刻むといった機械的な刺激である。これによって細胞の活性度が非常に高まることが細胞培養の結果、明らかとなった。

次に我々は、手術創においても、多くの細胞が刺激を受けて、活性化していると考え、これらの細胞の遊走能、分裂能を活用

するのみならず、サイトカインや細胞増殖因子の産生力を活用することとした。

人工血管などの人工臓器を植え込むときには、手術創の部分では、多くの細胞が傷害を受け、あるものは死滅し、あるものは傷害を受けたものの生きながらえることができるが、これらの細胞は傷害に応じて細胞成長因子やサイトカインなど、傷害からの修復のために多量の因子を産生する。しかしながら、テフロン製の人工血管のような合成高分子材料では、それらをとどめておくことが難しい。そこで我々はテフロン製の e-PTFE Graft にコラーゲンを被覆することを行った。この処理によって、サイトカインや細胞成長因子を長期間とどめておくことができるようになったが、我々はもう一つの効果も得ることを計画していた。それは e-PTFE Graft では血清がひとたび壁内部に染み込むと、持続的に血清が漏れ始めることが分かっている。そこで、壁内にコラーゲン線維を特殊処理して捕捉させ、そこに血清がくると、それが膨潤してそれ以上結成を通過させなくする働きを発揮させることであった。これによって e-PTFE Graft の欠点であった血清の漏れを防止することに成功した。

D. 考察

超極細繊維の使用に関しては、予期した成果が出ている。作成した人工血管は非常に柔軟であり、細胞をとらえるに十分な繊維間隙を持つ。さらに我々が期待していることは、極細繊維を使用することで、繊維表面の表面積が飛躍的に広がることであった。このため、繊維表面に何かの薬剤、例えば、抗生物質や細胞増殖因子を付着さ

せておくと、効率よくそれをとどめておくことが可能となった。

超極細繊維に使用に関しては、我々は接触走性を利用することにしていて、特に我々はパイロットスタディの段階で、骨髄の自家移植を人工血管に置いて行う方法に成功していた。この方法は基本的には単純ではあるが、臨床使用に関しては、いくつかの工夫が必要である。我々は超極細繊維を用いて、骨髄細胞を細くさせやすい構造物を作り上げたことから、大きな問題点を解決することができた。

走性については、以下に説明する。

それは我々が細胞の基本的な性質に注目したことから始まる。これをくすぐって、細胞を快適な状態に置き、その環境を準備することで細胞を人為的に集め、そこで環境によって細胞が血管壁を作り上げる、という筋道を立てた。この様な観点から血管壁の基本構築を検討した結果、我々は極めて細いポリエステル繊維を用いて、布製人工血管を作成することとなった。それは細胞の本能的な性質の一つである「走性」の活用であった。一般に、自由運動の能力を持つ生物が外部からの刺激に反応して運動を起こし、この運動に方向性が認められたとき、これを「走性」という。走性は刺激の種類によって、化学走性、重力走性、電気走性、流れ走性、光走性、音波走性などに分けられる。走性は下等動物の行動において極めて重要な意義を持つ。

細胞の動きを考えるとときにおいて、細胞も単細胞生物のような下等動物のようなものであり、それ自身には自走の能力があることから、細胞も走性に従うと思われる。そこでその細胞の持つ走性を活用するに当

たって、もしも人工血管壁に細胞成長因子やサイトカインがあると、これらが化学物質であることから、「化学走性」を活用して細胞を導くことができよう。確かにサイトカインや細胞成長因子を人工血管の内面に固定化して人工血管にいち早く内膜を覆わせようとする研究が行われ、それに関する特許もいくつか申請されている。ところがその効果は予期したほどではなくて、良好な成果が得られていない。その原因を考えるのに、それらの因子の有効濃度維持期間の短さ、それを固定した人工血管の滅菌の困難さ、長期保存の難しさ、その他の要因から、追試験の段階でよい結果が得られていない。これはアイデア的に特許を押さえているにすぎないことがわかる。そこで我々は化学走性を極力使用しないこととした。そこでどの走性が使用可能化について検討した結果、「接触走性」を使用することに決定した。「接触走性」とは、あまり耳慣れない言葉であるが、我々は細胞を取り扱っていてよく出くわす現象である。例えばシャーレを用いて細胞培養を行っている時など、シャーレの底に傷がある場合、細胞はまずその傷に沿って付着を始める。これが接触走性である。このような現象は細胞のみならず、我々人間でもみられる。入院患者がベッドを選ぶときに、8人はいる部屋では、患者は必ず壁のそばのベッドや窓のそばのベッドを選び、部屋の真ん中のベッドを選ぶ患者はいない。患者にとっては、何かに寄り添っていた方が安心感があると思われる。ラットを広い部屋に放つと、必ず部屋の隅に沿って、活動を開始する。はじめから部屋の真ん中でてくることはあり得ない。えさがあれば別であるが、

それはそれで臭い走性が働いているのかもしれない。ともかく、動物も細胞もこのような走性に支配されている。そこで我々は、何か細い線や角などに寄り添うように細胞が付着してくる性質である「接触走性」を活用することとした。

この研究においては、我々はポリエステル繊維を極めて細く、線維断面直径を3ミクロン以下にすることで、細胞の接触走性を引き出すことに成功していたので、このたびはその成果を活用することとした。この様な細い繊維を使用することで、細胞を積極的に誘導するのみならず、その繊維上で組織形成を行わせることを計画した。この様な考え方から、我々は極めて細いポリエステル繊維を我が国のみならず、海外からも入手することに苦心し、結局、このたびのプロジェクトでは3ミクロン以下の細いポリエステル繊維を使用して人工血管の枠組み作りに成功した。このとき、我々は福井県にある繊維会社の多大な協力を得た。この協力なくしては、この研究は不可能であったと思われる。

このようにして作成した布製人工血管は、通常の太さの繊維が太さ20ミクロン程度であることから、3ミクロン繊維が非常に柔軟であって、絡まりやすく、更に繊維の総表面積が極めて広くなる。このことから細胞に広い接着面を与え、結果的には、皮下組織に挿入した実験では、細胞増殖因子を使用することなく細胞を多量に誘導することが可能となった。

我々は、細胞の取り扱いに関しての新たな考え方を提唱し、その有効的な使い方を現在工夫している。その新たな考え方とは、以下の通りである。現在、世界中の多くの

研究者たちは、ES細胞(Embryonic stem cell、出生前の胎児から採取した細胞であって、あらゆる種類の高機能の細胞に分化する可能性を持っている)を使用して、人為的に意図した臓器を細胞に作らせる研究を行っている。これに対して、我々は成熟した患者自身の体細胞を幼弱化させて、あるいは分化の逆方向、つまり脱分化を生じさせて、細胞を活性化させる方法を活用することになっている。その方法として、細胞の遊走しやすい環境を作り、意図的に組織に刺激を与え、細胞の遊走を促し、活性度の高い、好奇心の旺盛な細胞を集める方法を開発した。さらに組織を切り刻むなどの刺激を与えて、細胞の幼弱化(Blastogenesis)を促進させ、更にそれらの細胞から細胞増殖因子を産生させ、創傷治癒を促進させるのである。この方法を活用すると、我々は、ES細胞を使用しなくとも、骨髄書式を使用しなくとも、活性度の高い細胞を用いて血管壁を構築させることが可能となって、しかもその細胞活動を加速させる事ができると考えている。

超極細繊維を使用することで、我々はもう一つの利点を見いだした。それは予期せぬことによる余波から生じたことであつた。つまり、思わぬことが昨年暮れに生じたことである。それは厚生省からコラーゲンなどの動物から採取する生態由来材料の取り扱い上の注意があつたことである。この通達以来、我々はその趣旨を十分に理解した上で、本研究のうちでコラーゲンを使用する部分中止し、現在はその代替物の検討に入っている。

そこで、一つの取り組みとしては、我々の新たな方式として、人工血管をコラーゲ

ンで目詰まりさせる代わりに、超極細ポリエステル繊維で目詰まりすることを行った。すなわち、ポリエステル繊維製人工血管に超極細繊維を高水圧を用いて絡ませる方法である。前述したこの方法であると、非常に緻密に目詰まりさせた後であっても、超極細繊維同士の擦れ合いによって、人工血管壁の柔軟性が維持可能となった。この実験の結果、目標である人工血管の枠組みとなるべき布製の人工血管の作成に成功し、さらに極細繊維を用いて、人工血管の目詰まりに成功した。この方法であると、その人工血管はプレクロッティングが不要となることから、安全な手術が可能となると思われる。

我々の基本的考え方は、「生体内環境」を活かし、幼弱で好奇心の旺盛な活動的細胞を用いて「生体内細胞培養」を行い、患者自身の体内で血管壁を創成させることである。例えば骨髄組織を人工血管壁に自家移植し、そのまま人工血管として植え込むと、移植先の「血管」という環境に応じて骨髄細胞は血管壁を構成する諸細胞に分化するとともに多量の細胞増殖因子を持続的に産生させ、血管壁形成を促進させ得る。一方、成熟体細胞でも刺激に応じて若返りを起こし、治癒促進に貢献する。本プロジェクトではこの様な患者自身の潜在的治癒力を賦活化することによって、ハイブリッド型人工血管という形態において、人工物の上に新たな血管壁構造を患者自身の組織に作らせ、結果的に人工血管を半永久的に開存させることを目指している。

本年度の具体的な目的としては、この様な方法で血管壁をつくらせるにあたって、細胞を最もとらえやすく、さらに捕捉され

た細胞が血管壁構造を創成するにあたって活動しやすいマトリックスとして、人工血管の基本的枠組みの作成を行うことを、具体的目標に掲げ、さらに、細胞をどのような状態で血管壁に持ち込むかについての理論的考察を行った。

初年度に得られた第一の成果は、人工血管の基本的枠組みとして、極めて細いポリエステル繊維を用いた布製人工血管づくりであった。第二の成果は、人工血管へのコラーゲンによる被覆であって、特にそのうちでも、テフロン製の人工血管である e-PTFE Graft へのコラーゲンによる被覆を行った。さらに第三の成果としては、細胞の取り扱いによる組織再生の加速化であった。

これらの成果でもって、本プロジェクトの基礎となる部分が達成できたと、我々は考えている。そこでこの様な成果をもとに、総合的に判断してみると、この方式であると 2 年間プロジェクトを遂行することで、最終目標に近づき、それを達成できるのではないかと、我々は期待している。来年度はこのような事を実証するために動物を使用した研究を行う予定である。そしてこの現象を確実に行わせることができたときに、はじめに説明した超極細繊維を用いた人工血管、およびコラーゲン被覆、もしくはコラーゲンに代わる物質による被覆を行った人工血管を使用して、この細胞の幼弱化現象をも組み込んで、ハイブリッド型人工血管を設計し、その動物実験をもとに、ヒトへの臨床に向けた諸条件を明らかにする予定である。

E. 結論

今年度の研究で、3 年計画のうちの初年度として、人工血管の基を敵枠組みが完成した。次に細胞やサイトカインの使い方の基本的方針が決定した。本プロジェクトが始まる前に我々は、独自に開発した基本的なアイデアの有用性をパイロットスタディによって確認しているが、それを臨床へ持ち込むには数多くの問題点を解決せねばならなかった。本プロジェクトはこのような問題点を掘り起こして、臨床応用への道筋をつけることを最重要視しており、本プロジェクトのターゲットとしては、開発が遅れている冠動脈バイパス用や、下肢などの末梢領域、人工透析患者の内シャント等の、内径 6mm 以下の細い領域で使用可能な小口径人工血管の作成に置いている。このための基礎的な資料を初年度で集めることに、我々は成功したことから、我々はこの成果を基に来年度への発展への夢をふくらませている。

F. 健康危機情報

本研究を遂行するに当たっては、基本的には大きな問題点は存在しなかった。しかしながら、2 点において、問題が生じた。

1 つは、超極細ポリエステルの入手である。我が国の主な繊維メーカーは前述したとおり、DuPont 社のアナウンス以来、植え込み用の人工臓器の素材となりうる材料を、日本のメーカーも出荷しないという姿勢を崩しておらず、我が国の繊維を使用することが不可能であった。そこで我々は海外にその入手先を求めて、各方面に働きかけを行った結果、何とか入手することが可能となった。

次の問題点は、コラーゲンの入手である。
昨年12月の厚生省の通達で、コラーゲンなどの動物由来材料の取り扱いにおける注意点が知らされたが、これを拡大解釈してみると、現在我々はアメリカ産のうちの皮からコラーゲンを採取しているが、いつの日か、それも無さかしくなるかもしれないという危惧が生じている。そこでわれわれはその対策を行っている。その詳細については、次年度にも報告できると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yukio Ichikawa, Yasuharu Noishiki, Tamitaro Soma, Ichiya Yamazaki, Takayuki Kosuge, Jiro Kondo, Norihisa Karube : Biomaterials Engineering and Devices:Human Applicatios, Volume 1., Formation of Neointima in Vascular Prosthesis Sealed with Autologous Adipose Tissue Fragments for Femoropopliteal Bypass., Donald. Wise, Joseph D. Gresser, Debra J. Trantola, Mario V. Cattaneo, Kai-Uwe Lewandrowski, Michael J. Yaszemski., 181-187, Human Press, Inc., Totowa, NJ., 2000
- 2) Yasuharu Noishiki : In vivo tissue engineering:dreams for the future, Journal of Artificial Organs, 3(1):5-11, 2000
- 3) Yasuharu Noishiki, Yoshihisa Yamane, Yukio Ichikawa, Ichiya Yamazaki, Kenji Yamamoto, Takayuki Kosuge, and Makoto Mo : Age Dependency of Neointima Formation on Vascular Prostheses in Dogs., Artificial Organs, 24(9)718-728, 2000
- 4) Makoto Ando, Yasuko Tomizawa, Yasuharu Noishiki, Masatsugu Terada, Yasuharu Imai :

Autologous Tissue-Fragmented Extracardiac Conduit With Rapid, Stable Endothelialization due to Angigenesis., J. Thoracic Cardiovascular Surgery, 48(3)153-160, 2000

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

現在検討中であるが、まだ具体的に予定までは立っていない。

2. 実用新案登録

無し

3. その他

特に記すことは、現在のところ発生していない。

生体内の環境を活用した組織工学、名付けて、in vivo tissue engineering

横浜市立大学 医学部 野一色泰晴

研究のバックグラウンド

今年には本研究が開始されて3年目となる。この間に世界中でTissue Engineeringに対する期待が高まってきた。本研究にとっても、昨年と同様なものの見方だけでは世界の研究にリーダー的なコンセプトを出し続けることはおろか、状況に追従できない状態にもなりかねなくなってきた。

世界の状況のこの1年間での変化は、in vivo tissue engineeringの考え方が広がってきたことであろう。マウスの背中に人間の耳の形態をした構造物を作らせることが人目を引く報告として現れた。このような技術は学術的には何ら新鮮味はないが、臨床的にこれでいけるのではないかと言った期待感を一般の方々に持たせることに貢献したと思われる。そこで次にはこの技術をどのように臨床で活用するかが問われ、さらにもっと新しい進んだアイデアはないものかと、多くの人たちが期待するようになった。このことを考えると、本研究に課せられた期待は大きくなってきたことを私は感じている。

これまでの研究の総括

我々は骨髄を人工血管に播種して、骨髄組織の産生する細胞成長因子を活用して人工血管内に血管壁を形成させる技術を開発した。この技術はこれまでにない方法であって、人工血管領域のみならず、外科手術一般に細胞性因子産生システムの移植方法として活用されるようになった。

この研究で我々が行わなかったことは、骨髄組織内に含まれる幼弱な未分化細胞、幹細胞の血管壁細胞への分化の過程を追求できなかったことである。しかしながら、骨髄には幹細胞があつて、このような細胞は環境の変化に応じて分化するはずである。このようなことから、我々は積極的に未分化細胞を人工血管に用いることを考え、次の研究に移行した。

次に行った研究は腹腔内における幼弱な細胞の活用であつた。我々は骨髄以外の組織から幼弱な幹細胞を採取することを考慮してきた、その結果、腹腔内には胎生期の細胞が幼弱なまま残存していることが判明したことから、腹腔内で管腔組織を作成し、そこに幼弱な腹腔内の細胞を集め、ついでその管腔を人工血管として血管の場に植え込むことによってこの幼弱な細胞が、血管という環境の変化に応じてそれぞれ血管内皮細胞や平滑筋細胞、繊維が細胞などに分化し、血管内皮細胞は人工血管内表面を覆い尽くすとともに、その表面からヘパリンなどのムコ多糖類を産生し、その表面での血栓形成を阻止する作用を行う。一方平滑筋細胞は内皮細胞層下に位置し、その長軸を張力、歪みのかかる方向に配列し、周囲に弾性繊維網を形成して、血圧によって生じる血管壁の張力に順応する柔軟で

弾力性のある組織形態を作り上げる。線維芽細胞は人工血管の枠組みとして用いたポリエステル繊維を異物として見なし、異物処理のためポリエステル繊維周囲に集まり、コラーゲン線維を産生して線維性の結合組織を形成する。

このように、ここの細胞がそれぞれの場に応じて環境によって分化の方向付けが定められ、その結果、組織全体として血管壁組織へと分化してゆくことを確認した。

この研究によって、幼弱な細胞を用いて幼弱な組織を形成させ、その組織を環境を変化させることによって高機能組織へと組織分化させることが可能となることが明らかとなった。

本年度の研究の主眼

次に行った研究は、骨髄組織や腹腔内組織に頼らずに、一般の体組織から幼弱な細胞を集める方法の開発である。このために我々は Blastogenesis という現象を活用した。一般に細胞は成長過程にある組織内では活発に細胞分裂を繰り返し、組織形成を行う。しかしながらひとたび組織が形成されると、その維持管理のために、あるいは代謝作用によって細胞死があった場合のみ細胞分裂が行われ、新たな細胞が生まれる。小腸の内面粘膜組織のように、非常に活発に細胞死と細胞分裂の行われる組織もあれば、脳組織のように、ひとたび組織が形成されると、もはや新たな細胞分裂がほとんど行われない組織もある。また皮膚組織のように、徐々にではあるが、常に新たな細胞分裂が行われ、表皮を押し上げつつ、最上層階の細胞が細胞死を迎えている組織もある。

このような組織の中にあつて、一般的な多くの組織では、細胞は組織が傷害を受けた場合のみ細胞分裂を活発に行い組織修復を行うが、平時は細胞分裂をあまり行わないのが常である。そこでこのような組織内で活発な幼弱な細胞を集める方法として、細胞集積装置を開発した。

この装置は多孔性のシリコン袋の中に細胞の進入に適した足場としてのコラーゲンスポンジを入れた、単純な構造物である。この装置を皮下組織や肝臓、脾臓、腹腔漿膜などの近くに置くことによって、それらの組織内から遊走能や分裂能の高い、好奇心の旺盛な細胞を集めることが出来る。遊走能の高い細胞が必ずしも幼弱な細胞とは限らないが、活性度が高いという意味からは、細胞分裂能力も高く、幼弱な細胞、もしくは幼弱化した細胞が多く含まれているということが考えられる。すなわち、このような装置を組織の近くに置くことによって、その刺激で平時にはじっとしている細胞がとたんに細胞の遊走活動を開始し、そして細胞分裂を繰り返して、装置内の新たな環境の場へと進んできている。これがいわゆる Blastogenesis, 若返り現象、である。この若返り現象を積極的に惹起させることによって幼弱な細胞を積極的にかつ選択的に集積させることが可能となった。

このような装置で集めた細胞には、細胞分裂の活発な細胞に特有な PCNA 染色で陽性に染め出される細胞が多く含まれていることが判明しており、この装置で幼弱な細胞を選択的に集めることが可能であることが判明した。

ではこのようにして集めた細胞をどのようにすれば活用可能であろうか。我々は Blastogenesis はあらゆる組織で起きうるのではないかと考えている。たとえ神経細胞でも刺激によって細胞分裂がみ

られることは近年明らかとなってきた。そこでこのような刺激で必要な組織から幼弱な細胞を集めて、それを用いて組織構築を行わせると、ハイブリッド型人工臓器が *in vivo* で創製させることが可能となる。例えば、肝臓内部にその装置を置くことによって、幼弱な肝細胞を集めることも可能となるであろう。そうすると人工肝臓が効率よく作成できる可能性が出てくる。従って、工夫次第でこの Blastogenesis を活用した装置の応用範囲は広がると期待される。

次の研究の方向性

これまでの研究の流れから、幼弱な細胞の活用、骨髄細胞の利用、腹腔内の幼弱な幹細胞の利用、成熟した組織から幼弱な細胞を集積する方法の開発、ときたので、今後は選択的に幼弱な細胞を選別して新たな組織を作成するつもりである。

我々は本研究の根底に血管壁の形成を掲げていることから、これまでの手法を改良して、選択的に血管壁を構成する細胞を集積させ、それらの細胞で幼弱な、しかも血管組織に近似した構造物を作り上げ、それを血管という場に移すことによって、ここの細胞がその場に応じた細胞分化を起こし、組織も全体として組織分化を起こすことによって、効率のよい血管壁の形成が行われる様な手法を確立してゆく予定である。

組織の治癒力を引き出す事による in vivo tissue engineering

生体のもつ潜在的能力を活用して血管壁を作る試み

横浜市立大学 医学部 野一色泰晴

はじめに

私共の研究の目的は、可能な限り、生体の持つ力を引き出して、細胞自身に、つまり患者さん自身の力で新たな組織を創成するために手助けをする方法を見いだすことにあり、このためのコンセプトとしては、個々の細胞の特性、細胞や組織の持つ本能的な性質や、生体内の環境と刺激に対する諸変化、細胞の刺激応答、組織修復能などを活用することにある。

このような目的で、このようなコンセプトに従って我々が最近行った研究として特に興味深いと我々が感じている研究は、幼弱な細胞の活用、細胞の刺激に対する反応の活用、生体内細胞培養技術の活用、それらを有効利用するための技術の開発、等である。これらについて、羅列的になるが、概要を紹介し、それらを取りまとめて将来的な展望を話したい。

I. 刺激に対する細胞応答の活用

私共が考えている研究のメインテーマは「生体の治癒力を賦活化する事によって人為的に組織や血管を作り出す組織工学」であるが、生体外で細胞を操作するにしても、生体外での操作によって細胞が種々の刺激を受ける。その刺激に応じて細胞は種々の反応をするが、ある反応は組織修復にとって必ずしもプラスに働くとは限らず、あるものはプラスに働く。これらの反応において、学術的な説明は付けられないが、生体にとって合目的な反応が強く表れるのが一般的で、その結果が組織修復現象として表に出る。この力を組織創成に結びつけ、人為的な方向に導くのが、我々の知恵の出どころであると思われる。

1. 細胞の幼弱化現象、Blastogenesis

多くの成熟した細胞は細胞活動が限られている。例えば、心筋細胞は筋肉の伸縮機能を発揮し、内分泌細胞はホルモンの産生を持続している。これらの細胞は生体の創生期においては細胞分裂や遊走などを当然行っていたのであるが、成熟した後は仕事の的が絞られている。そこでこのような成熟細胞に刺激を与えることで、本来の仕事をしつつも、幼弱な時期に行っていた仕事も思い出させ、行わせるのが幼弱化現象の活用である。たとえば、皮膚の表皮細胞や線維芽細胞はひとたび表皮が完成すると、ルーチンワークとしての皮膚の代謝のみにエネルギーを使う。ところがひとたび皮膚が障害を受けると、これらの細胞はとたんに細胞分裂、遊走、コラーゲンなどの器質の産生、サイトカインの放出、等を行い始め、組織形成、組織修復を成し遂げる。これらの動きの中の一つは脱分化とい

う表現で表されている細胞の幼弱化現象である。このような細胞の能力を人為的に活用する工夫を、組織工学では要求されると、我々は考えている。

我々が本プロジェクトの初期の段階で紹介した骨髄の人工血管への自家移植も、細胞の幼弱化現象の活用の一つにあげられる。骨像組織はそれ自身が幼弱で原始的な細胞集団であるが、現実には骨の中であって、造血活動を主な仕事として行っているのが骨髄のルーチンワークとしての実状である。骨髄組織は多くのサイトカインの放出などの、その他の情報活動も行っているであろうが、少なくとも我々の目には造血活動が主要な活動と見られる。

しかしながら、この骨髄を体外に採取し、その細胞浮遊液を作り、合成高分子材料で作られた人工血管に播種し、改めて生体内の血管壁として戻すことで、骨髄細胞への強い刺激が加わることになる。この刺激の結果、細胞が多量の血管成長因子を産生し始め、その結果として周囲から無数の毛細血管が人工血管へ機内に侵入して、人工血管壁は多量の内皮細胞を抱え込むこととなる。その後、それらのいくつかが人工血管の内面に顔を出して、人工血管の内面被覆に貢献する。

この時、骨髄細胞から血管内皮細胞が分化したとも考えられるが、元々骨髄組織は毛細血管の多い組織であることから、骨髄の採取にあたって、内皮細胞も採取されている可能性も高い。そしてこの内皮細胞も幼弱化現象を起こすと、細胞分裂、遊走などを生じさせることとなり、結果的には短期間に人工血管壁が完成された。この時、細胞の分化が進行したであろうが、脱分化も行われたと思われる。結果的には骨髄組織に含まれる細胞の幼弱化が、生体外の操作、異なる環境への移植、などによって引き起こされ、人為的に新たな血管壁の創成に利用したこととなった。

2. 幼弱化に伴うサイトカイン産生

細胞に対する刺激によって、ある細胞は死滅する事もあるが、ある細胞は刺激に応答して種々のサイトカインを産生する。このサイトカインの活用が有用であると我々は考えている。前述した骨髄組織もその一例ではあるが、体外に取り出す事による細胞への刺激もさることながら、ここでは体内に残存している細胞に対する刺激と、それらの細胞が産生するサイトカインに関する我々の実験例を一例として説明する。

手術野における細胞のサイトカイン産生と、その活用

手術野における細胞のサイトカイン産生を活用した我々の取り組みを紹介する。手術野では、多くの細胞が手術時の機械的科学的物理的な刺激によってサイトカインを出す。これらは周囲のコラーゲンなどの細胞外マトリックス、器質等に、ある程度トラップされて、その後組織修復細胞への情報を与え、その後比較的短時間のうちに分解されたり不活性化されたりして、効力を失う。しかしこの間にこれらのサイトカインの働きの結果、組織修復の引き金が引かれて新たな組織が作り上げられる。

ところが、人工臓器、例えば布製の人工血管などでは、これらのサイトカインを吸着して一時的にしても止めておき、後の組織修復に活用する機能が内。従って、現実の状況はこのときに、人工血管のような合成高分子材料でできた構造物の中には、細胞の侵入は限られてくる。布製人工血管を植え込み、1週間から10日後には外膜側で非常に活発な組織修復が行われ、線維芽細胞の増殖、毛細血管の侵入などが行われるが、それらはほとんど人工血管の壁内部には侵入せずに、人工血管における内膜形成には貢献しない。

手術中には、非常の多くの細胞が障害を受けるであろうから、大量のサイトカイン、細胞増殖因子が産生されているはずである。ところが現実には、それらを活用する装置がないため、あたかも禿げ山に雨が降ったかの状態で、水が必要になったときには水は蓄えられていないのが人工臓器における現実である。

この現実を考えてみると、合成高分子材料によって作られた人工血管には、多くの細胞が産生したサイトカインを止めておく能力をもたせるべきである。この能力がないので、これらが如何に多くても活用できない状態であると思われる。生体の大切な働きを活用していないのではないかと、この現象は示唆しているように思われる。そこでこれらを止めておく工夫を行った。

材料と方法

布製人工血管に株式会社高研から入手したアテロコラーゲンを塗布し、凍結乾燥した。その後、真空下で摂氏135度、24時間の条件で、コラーゲンを熱架橋し、不溶化させた。このようにして作成したコラーゲン被覆人工血管(Collagen Coated Graft)を成犬の腹部大動脈に植え込み、植え込み後の治癒過程を観察した。

これとは別に、ラジオアイソトープでラベルしたbFGFを布製人工血管と作成したCollagen Coated Graftとに触れさせて、その吸着量を測定すると共に、生理的食塩水の中での、つまりin vitroでの徐放出の状況を観察した。

結果と考察

植え込み実験の結果では、植え込み3日目の人工血管にあるコラーゲン線維にはbFGFの免疫染色で濃く染まる部分が多く見られ、人工血管に絡ませたコラーゲンが多量のbFGFを吸着していることが判明した。我々はその他いくつかの抗体を用いて、どのようなサイトカインが吸着されているかどうかの検討をおこなった。まず始めに、VEGF(Vascular Endothelium Growth Factor)等の検出を試みたが、使用した動物が犬であったため、検出の可能性が少なくなり、bFGFのみの検出しかできなかった。染色のための抗体は、人やラット、マウス、家兎などの抗体があるものの、イヌに対する抗体が発売されておらず、検出がbFGGにのみに限られたが、これで明らかのように、生体内で、手術野で産生される因子を吸着することが可能であり、対照のコラーゲンを被覆していない人工血管に比べて、明らかな違いを見せた。

細胞活動では、植え込み後1週間で人工血管周囲から活発な線維芽細胞の侵入が見られ、その後に毛細血管の侵入が多く見られた。このコラーゲンは植え込み後30日で90%以上が吸収されたが、この間に内膜形成が確実に進行した。

In vitroでのbFGFの吸着と徐放出のテストでは、コラーゲンを被覆しておく、多量のbFGFを吸着させている事が判明した。しかもそれから放出されるbFGFは1週間以上、持続した。

この結果から、細胞外マトリックスを工夫することで、我々は明らかに細胞の産生するサイトカインを始め、各種の細胞成長因子を活用することが可能であることを示した。従来的人工臓器、個々で例に挙げられている人工血管などは、このような生体の細胞の働きを考えて設計されていなかったが、組織工学的に考え直すと、少しの配慮で内膜形成においては劇的に改善することが可能であることが明らかとなった。勿論、細胞の侵入し易いように、編み目の粗い人工血管を使用したことや、臨床で使用されているような、コラーゲンの種類、取り扱い状の配慮、架橋方法の選択などでは、現時点で可能な限りの細胞に取っての有利な状況を再現させた。

コラーゲンを被覆した人工血管が既に市販され、臨床で多用されているが、我々はこれまでのこのようなよい内膜治癒像を見たことがなかった。それは細胞の立場に立った設計がなされていなかったためと思われる。本プロジェクトでは細胞の立場に立った設計を考え直す機会を与えてくれた様に思われる。

3. 幼弱な細胞の蒐集

我々は幼弱な細胞をどのような方法で効率よく集めるかについての検討を行ってきた。その結果、昨年の報告で、細胞の刺激による幼弱化を活用して遊走能の活発な、細胞分裂能の活発な細胞を集める事を行った。これは我々が実験室内であだ名で読んで「細胞ホイホイ」をいう単純な装置である。最近の研究では、成熟した臓器や組織の中にあっても、組織特有の幹細胞が静かに存在していることが指摘されている。そうであるとすれば、何らかの刺激によって、それらを誘導して集めることが可能と考えられる。我々はそのための単純な装置を考えしたが、しかしこの単純な装置であっても、実際には幼弱な細胞を効率よく集めることに成功した。この装置の中にはコラーゲンスポンジを封入しており、そこに細胞が侵入した。そしてこれらの細胞の中にはPCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)に染色される細胞分裂の旺盛な細胞が多く含まれていた。(前回の報告を参照していただきたい。)

そこで次の段階として、我々は集める細胞に選択性を持たせるため、装置の中に細胞の足場として使用したコラーゲンに特殊な工夫を凝らす方法を考えた。なぜならば、このような幼弱な細胞は、幼弱であるが故に、細胞の持つ原始的な性質を持つのではないかと考えられたからである。

我々の注目したのは、細胞の持つ走性である。一般的に言うと、細胞や単細胞生物など、勿論多細胞の生物にも見られる現象であるが、それらの個体とか細胞にある本能的な動きの特徴の一つとして

「走性」という性質があきらかにされている。この性質を活用すると、無理なく多くの細胞を集めることが可能となる。「走性、Taxis」の項目を理化学事典で引くと、以下の様な説明が書かれている。

走性、Taxis. 自由運動の能力を持つ生物が外部からの刺激に反応して運動を起こし、この運動に方向性が認められたときに、これを走性という。走性は刺激の種類によって化学走性、重力走性、電気走性、温度走性、流れ走性、音波走性、などに分けられ、いずれの場合にも刺激源に向かって進むときには正、刺激源と反対方向に進むときには負、とよばれる。走性は下等動物の行動において、きわめて重要な意義を持っている。(Chemotaxis, Aerotaxis, Phototaxis, Thigmotaxis, Osmotaxis, hygrotaxis, Geotaxis, Electrotaxis, Thermotaxis, Rheotaxis, Phototaxis etc)

具体的に説明すれば、メダカが川の流りに沿って泳ぐのもその一つ、流れ走性であり、誘蛾灯に虫が集まるのもその一つの光走性である。ひまわりが太陽の方向を向くのも、根の部分が光と反対方向に進むのも、この性質に由来する。この現象は細胞のようなレベルから、ヒトのような高級な個体でも見られる現象であり、それぞれには科学的な説明が付けられていないが、現実存在し、これを活用することで細胞からヒトのレベルまで、誘導効果を上げることが判明している。

このような、細胞の持つ本能的な性質をいかに活用するかが、Tissue Engineering の重要なキーポイントとなるであろう。しかもそれを *in vivo* で用いると、さらに顕著に現象が現れ、素直に、無理なく細胞組込型の人工臓器を作成することができるであろうと思われる。

我々は以前、人工血管の基材として、超極細ポリエステル繊維を使用して細胞を積極的に集め、良好な内膜治癒を得た経験がある。ここで見られたのは主として線維芽細胞であったが、線維芽細胞を多く集めることは、その後にそれらが栄養を要求して多量の血管新生因子を出すことから、細胞の侵入に続いて毛細血管の侵入が見られ、結果的には人工血管壁が無数の毛細血管を持つこととなって、それにある内皮細胞が人工血管の内目炎被覆に貢献する。

細胞は何か極めて細い繊維の様な物に積極的に寄り添い、細長くなって、それに付着しようとする性質がある。この現象は「走性」の立場から説明すると、接触走性(Thigmotaxis)と呼ばれる性質である。細胞のこの性質は他の表現では「形態追従効果」(Contact Guidance) と呼ばれ、細胞培養の研究では既に知られている現象である。我々は人工血管を設計する上で、この細胞の特性を活用するため、極めて細いポリエステル繊維を使用した。我々の基礎実験では、繊維の太さが3ミクロン以下になると、その現象が発揮される。この現象をもちいた白血球を選択的に集めるフィルターも発売されている。

このような細胞特性をどのように活用するかが、今後の課題となると思われる。そこで我々は前述した細胞ホイホイにこの考え方を導入することを考慮した。まず、細胞に取っての最も顕著で一般的な現象として、細胞成長因子に反応する事である。そこで、我々は使用したコラーゲンのマトリック

スに、各種の細胞成長因子を固定化する事を行った。この際、それらの因子の生理活性度を維持したまま吸着する方法を工夫することとなった。また、それらの滅菌にも配慮した実験を行った。この研究は、まだ結論が出ていないが、途中経過として、現在までに明らかになっている結果を紹介する。

即ち、この研究は、これらの細胞増殖因子をコラーゲンに吸着させておくことで、細胞にとっての強力な「化学走性」(Chemotaxis)を発揮させ、意図する細胞を選択的に集める方法である。我々は一連の研究から、内皮細胞の誘導を考え、bFGF や VEGF のコラーゲンへの吸着を効率よく行う方法を開発することを試みた。その結果、ラジオアイソトープでラベルした bFGF や VEGF を用いた実験では、各種の材料への吸着が確認されたが、それらの吸着の難易度から、我々は一つの法則性を見いだした。それはこれらの細胞増殖因子が疎水性物質に多量に吸着されることである。そこで我々は次の研究として、使用するコラーゲンに疎水性部分を持たせる工夫をおこなった。具体的には、我々はアテロコラーゲンのアミノ基の末端のうち、総数の 10%程度にミリスチレンを結合させることとした。これによって長いアルキル基をコラーゲンがあちこちに持つこととなって、bFGF や VEGF を効率よく吸着できるのではないかと期待から行った実験である。

その結果、予期したとおり、効率よくこれらの因子を吸着する事が可能となった。そこで次の研究として、どの程度の量の bFGF や VEGF が毛細血管の誘導、Chemotaxis に有効であるかを検討している。

ここで残念なことに、現時点では、その報告ができない。それは我々が、できる限り多くの因子を固定し、細胞誘導を行うことを始めに取り組んだために、過剰の因子が固定化されたようであって、いつも無菌性の炎症の様な像が出ている。この結果を他の研究室に問い合わせたところ、やはりそれらの因子が過剰であるとそのような現象が出るらしいことが判明してきた。そこで、現在では、その適切な量の判定を行っているところであり、その結論が出ていない。いつか、報告ができると思い、現在は研究を継続中である。

しかしながら、このような細胞の特性を活用することで、選択的に幼弱な細胞、活性度の高い細胞などを人為的に集めることが可能となれば、私共の進めている人工血管の開発のみならず、他の多くの領域に置いて、本技術が活用されることと、期待している。

II. 刺激に対する生体（個体）の応答の活用

手術野では手術操作によって、多くの細部が強い刺激を受けている。この刺激によってかなり多くの細胞が死滅するが、強い刺激を受けたにもかかわらず死滅せずに残る細胞を含めて、現実的には周囲組織や臓器に多くの細胞が残され、それらの細胞が手術後に組織修復を開始する。この時に多くの細胞は種々のサイトカインを発する。このサイトカインを介しての情報は全身に広がり、これに呼応して全身から新たな情報と組織修復の援助が行われる。組織障害時における腎臓、肺、肝臓などの遠隔臓器からの Hepatocyte Growth Factor (HGF) の産生もその一つとしてあげられる。このような遠隔臓