

器からの援助が得られるのは、in vivo tissue engineering の特徴であって、これを如何に活用するかも、今後の大きな課題となると思われる。

従来の方法では、このような生体内部の環境変化によって起こされる状況を活用する方法を考え出すことは、行われていなかった。1980年代から1990年代にかけて、世界中の多くの研究者が生体外で種々の組織や臓器を創り上げる研究を行ってきたが、このような in vitro での tissue engineering ではここに取り上げた in vivo での利点を活用できる in vivo tissue engineering が語られていなかった。我々は生体の homeostasis 維持活動を活用することで、in vivo tissue engineering を捉えることには配慮を行ってきたが、積極的な遠隔臓器から産生される因子の活用のための方策は考えていなかった。しかしこれは大きな治癒促進の応援団としての働きがあると考えられるので、手術野における局所のサイトカインリザーバー準備とともに、今後の課題として明示しておきたいと思う。

III. 生体内環境の活用。

生体内では前述したように、遠隔地からの応援のほかに、個体の homeostasis 維持のための活動がある。生体内が巨大なバッファ的機能を備えているのもその一つである。ある意味では効率の悪い働きをしつつも、このバッファ的機能は確実に守られている。そこで in vivo tissue engineering を行うと、細胞培養の維持管理は臍帯が行い、感染対策も行ってくれるため非常に効率の良い生体内細胞培養が可能となる。

更に個々で我々が注目していることは、in vivo における細胞の棲み分け現象である。細胞は in vitro においては生存し続けるために必死に勢力拡大を計るため、一つの強い細胞のみがコンフルエントなり、弱い細胞は押さえつけられる。しかしながら in vivo では、それらは互いに干渉せず、それぞれが活発に分裂増殖して、しかもそれぞれが棲み分けを行い、異種細胞の共存した細胞社会を創り上げる。この現象は、in vitro では得にくい、独特な現象であって、我々の初期の人工血管の研究においても、内皮細胞と線維芽細胞、平滑筋細胞の3種類の細胞がごく自然に棲み分け現象を行った結果、新生血管壁が効率よく形成された研究成果を得ている。

この現象を、今後の組織工学的研究、それを用いた組織形成には活用すべきであると我々は考えている。現在は、まだ研究の途中であるので、具体的な方法は個々には示すことができないが、将来はその効率の良い方法を示すため、研究を継続している。

まとめ

この度は我々の日頃考えていた組織工学の考え方に沿った研究の一例、実施例、及びその考え方の基礎、そして将来展望の一つについて、まとめ的な意味合いから、全体を包括した見方で方向性を示した。現時点では具体的な臨床使用可能な人工血管の作成にまでは至っていないが、理論的に、そして基礎実験的に細胞自体の特性、in vivo での細胞培養特性、等が明らかになってきたことから、近

い将来、それが実際に活用されることを期待している。

Blastogenesis について考え、それを活用する

横浜市立大学医学部外科学第 1 講座

野一色泰晴

これまで血管壁形成を効率よく行う方法を試行錯誤してきたが、これまでの成果から基本的な方針を一つ申し上げたい。それは成熟した細胞を若返らせて使用する、いわゆる blastogenesis 現象の活用である。この事について考えてみたい。

1、これまでの試行錯誤

過去 25 年ほどハイブリッド型人工血管の研究を行ってきた中で、最も効率の良い新生血管壁構築手段は自家組織の活用であった。まず私共は皮下組織内に布製のポリエステル繊維性のマトリックスを挿入し、それに絡まる細胞、組織をそのまま人工血管に使用する試みを行った。ちょうどその頃アメリカでは Dr. Sparkes が Sparkes mandril Graft という名前をつけて、似たような試みを行っていた。皮下組織でこの様な自家組織を作らせる試みは 1948 年頃にすでに行われていたが、Dr. Sparkes はこれを取り扱い易い形態にして発表し、映画を作り盛んに宣伝したので急速に世界中の人の知れるところとなった。しかし彼は設計上においてミスを犯し、予期した成果も得られず、弟子達の反乱にもあって、心臓病発作で急死した。彼の着眼点はすばらしかったが、皮下に挿入した後に 3 カ月以上待たねばならず、Blastogenesis の活用にはなり得なかった。

これに対して私は皮下挿入後 1-2 週間で取り出し、人工血管として使用し、急速な内膜治癒を得た。そこで我々はさらに緊急手術にも使用可能な方法として、自家静脈組織を細切して人工血管壁に播種する方法を開発して良好な結果を得た。この方法では手術室内で 10 分で操作が完了する。そこでその臨床応用を行ったが、実際に臨床では静脈片を集めることは難しかったので、皮下脂肪組織の細切を行い、約 50 例の臨床経験をえた。これらはいずれも満足できる結果であったが、皮下脂肪が年齢、性別、食事習慣、運動習慣、糖尿病等の基礎疾患の有無、等によって全く異なる不便さがあった。

2、幼弱な細胞の活用

そこで我々はその様な影響を受けることのない骨髄組織を選んで更に良好な結果を得た。次に我々は幼弱な細胞を用いるために腹腔内の細胞を利用した。腹腔内には発生学的に骨髄と同程度の幼弱な細胞がある。ここで管腔状の大まかな構築を得て、それを血管として植え込み、管状構造のまま血管壁へと分化させる方法である。この方法でもほぼ予期した成果を得た。しかしいつも開腹術を行うわけには行かないので普通の成熟細胞をなんとか使えないかと考えたのが昨年報告した「細胞ほいほい」と名付けた皮下組織内での活性化の高い細胞を集める方法であった。

3、Blastogenesis の活用

これまでの全ての実験を振り返り、共通することは、機械的な刺激でもって細胞や組織の blastogenesis を活用する事であった。たとえ骨髄組織でも、腹腔内の細胞にしても、皮下組織内にしても、手術的な刺激が Blastogenesis を惹起している。そこでいかにすれば Blastogenesis を引き出して血管壁を作らせるか、といった直接的な考え方が浮かんでくる。そうなるに機械的な刺激以外でも Blastogenesis の惹起は可能となる。この度はそのための小実験も行ったので参考にさせていただきたい。

Tissue Engineering から見た小口径人工血管開発の問題点

横浜市立大学医学部外科学第一講座

野一色 泰晴、孟真、岩井芳弘、市川由紀夫、山崎一也、
小菅宇之、高橋和裕

要旨

小口径人工血管の設計を Tissue Engineering 的に考え、合わせて今日臨床で使用されている人工血管の問題点も考察した。Tissue Engineering に必要な条件として、私どもは細胞、細胞外マトリックス、サイトカイン、及び周囲環境、の4要素を考えている。細胞は内皮細胞のみならず、原始的な幹細胞のような未分化細胞をも組み込み、複数種類の細胞を共存させると Tissue Engineering 的な可能性が広がる、細胞外マトリックスは細胞の侵入や増殖に欠かせないのみならずサイトカインのリザーバーとしての役目を果たす。サイトカインは組織治癒を促進させ、周囲環境はこれらの働きを円滑に進める。従来の人工血管にはこの様な要素が欠けていたため、新生内膜形成が期待通りに進まなかった。しかし Tissue Engineering 的に考えた設計をすれば、短期間のうちに新生内膜が形成された。この考え方は将来人工血管の設計のみならず、広く一般的に応用されることが期待されている。

はじめに

Tissue Engineering という言葉を最近よく耳にするようになった。一昔前には Protein Engineering という言葉が頻繁に使われており、その分野において優れた基礎研究が数多く行われ、すべての生命現象を蛋白分子の研究領域で説明できるのではないかとするほどの勢いであった。しかし世の中が細分化から集合と協調へ目が向けられるようになり、基礎研究面でも蛋白分子の高機能の発揮場所として蛋白レベルから細胞レベルへの研究が進められる様になった頃、これと時を同じくして細胞への遺伝子の組み込みが容易に行えるようになり、研究面では Cellular Engineering, そして Gene Engineering の時代に突入した。しかしさらに研究が進むにつれて、細胞を十分に働かせるには単一細胞の平面培養よりも細胞群を塊として取り扱う方が、そしてさらに複数種類の細胞を同時に取り扱う方が種々な面で機能的であることが判明してきたと同時に、細胞間の言葉ともいえるサイトカインの研究及び細胞間接着因子の研究が進んだこともあって、Cellular Engineering から Cytokine Engineering, Adhesive Molecule Engineering および Tissue Engineering へと研究のフィールドが移行してきた。

例えば肝細胞を培養し、人工的に肝機能を in vitro で得るための研究としては従来は肝細胞のみを平面的に培養したり、人工腎臓に用いられるフォローファイバーに単層培養して肝細胞の機能を発揮させようとしていたが、最近では肝細胞をグループで取り扱うことによって肝細胞群のスフェロイド形成を促しており、これによって肝細胞間隙に細胆管様の構造を形成させ、アルブミン産生の効率

も向上させることが可能となった(1)。またさらに内皮細胞をはじめ、異種類の細胞を共存させ、適当な細胞成長因子を働かせることによって立体的な肝臓組織を人工的に作る研究も始まった(2, 3)。また人工皮膚の研究においては Cellular Engineering の時代には表皮細胞のみをコラーゲン膜上に培養していたが、優れた結果は得られなかった。しかし1975年、Rheinwald と Green が腫瘍の研究を進めているときに放射線照射を行った線維芽細胞をコラーゲン層内に培養しておき、その feeder cell としての働きを表皮細胞の培養に用いる方法を偶然に開発して以来(4)、複数種類の細胞を混在させることでバイオ人工皮膚の研究が一気に進み臨床応用にまで至った(5, 6)。

このような例に見られるように、異種類の細胞が混在した立体的細胞社会を任意に形成させ、これによって高機能特殊細胞にその機能を存分に発揮させるための工夫がこまめに行われるようになった。これが Tissue Engineering の時代の幕開けである。従って今日の Tissue Engineering の技術とは Protein Engineering, Cellular Engineering, Gene Engineering, Adhesive Molecule Engineering, Cytokine Engineering 等の諸技術が包含された総合的な技術と見ることができる。本稿ではこのような状況下にあって、小口径人工血管開発研究における Tissue Engineering 的考えの進め方について、実例を交えて述べてみたい。

1、小口径人工血管と内皮細胞被覆

小口径人工血管が長期間安定した開存生を維持するためにはその内面は宿主の内皮細胞で覆われる必要があると私は考えている。この仮説には異論のある方もあろうかと思われる。現実に臨床で使用されている人工血管には内皮細胞による被覆は見られないことから、これでも良いのではないかと主張する方もおられるでしょう。また、抗血栓性合成高分子材料で人工血管を作れば内皮細胞による内面被覆など期待しなくて良いと考える方もおられるでしょう。確かに内皮細胞被覆が無くとも人工血管が開存している例はいくらでも見られる。それは患者の条件がよくて、生体の持つ順応性の幅が広い、もしくは抗凝固薬を使用して順応性の幅が広げられているためであり、人工血管の口径もある程度以上の場合に限られている。しかし小口径で、しかもひとたび生体側の順応性の幅が狭くなると人工血管は閉塞へと向かう。従って正常な血管壁には血栓の付着は見られなくても人工血管の内面には常に血栓が付着している状況を病理解剖時に見ることが多い。死亡直前の DIC 状態からこの様な結果となったかも知れないが、たとえ DIC 状態になっても血栓を付着させないようにしなければ冠動脈バイパス手術用の人工血管としては使えない。この意味から、今後開発される小口径人工血管は内皮細胞による被覆が得られるような設計にすべきであろう。

2、内皮細胞播種の研究の流れ

一般に布製人工血管にしる、E-PTFE graft にしる、植え込み後長期間経過してもヒトの場合、吻合部付近以外の人工血管内面は内皮細胞による被覆が見られない(7)。若い患者、幼児においては内皮細胞による被覆が広い範囲に見られることがあるが(8)、一般に血管外科手術を受ける患者は高齢者

が多く、細胞活動も活発でないので、内皮細胞による被覆は望めないのが実状である。それは人工血管の構造にも原因が有るが内皮細胞の特性にも起因する。内皮細胞はその特性として老化しやすく、70回以上細胞分裂を繰り返すともはや新しい細胞を作ることができないほどに老化してしまう(9, 10)。したがって吻合部で宿主血管壁の内皮細胞が分裂を繰り返し人工血管内面を覆うべく這ってきても途中で力つきてしまう。

Wesolowskiは通水率4000ml/min以上のPorosityをもつ高有孔性人工血管を使用すれば人工血管壁を貫通して外膜側から内膜側へ至る毛細血管の侵入(Capillary ingrowth)が得られるので、内面に内皮細胞がもたらされて新生内膜形成が良好となり、石灰化等の退行変性も生じないと報告しているが(11)、実際の臨床では出血の危険性があるため1500ml/min以下のPorosityを持つ人工血管が使用されており、Capillary ingrowthは見られず、吻合部以外での人工血管内面への内皮細胞の供給の道は閉ざされている。従って内皮細胞は宿主血管と接する吻合部に限られ、一般的には縫合線から2cm以内で内皮細胞の被覆は停止する。

1979年(当時はCellular Engineeringの時代であったが)、Herringらは内皮細胞を静脈から採取し、プレクロッキング時に内皮細胞を人工血管壁に混ぜ込んで自家移植する方法を発表した(12)。彼らの実験では内皮細胞はプレクロッキングの壁在血栓層から内面に出て生着し、コロニーを形成して内面被覆に貢献した。この報告を受けて世界中の研究者が一斉に内皮細胞を人工血管に播種する研究を開始した。当時細胞の大量培養技術が確立されたこと及び内皮細胞の持つ特殊性が基礎研究者の研究対象になっていたこともあって、研究は各地で活発に行われた(13, 14)。しかしながら多大の研究費と時間をつぎ込んだにもかかわらず予期した成果が上がらず、内皮細胞の生着率がきわめて悪かったこともあって約10年で研究は下火となった。

3、新生内膜形成における異種細胞の混在

内皮細胞を用いた研究の中にあって3カ所のグループが新生内膜形成に著明な成果を残したのでそれらを紹介する。第一のグループは国立循環器病センターの松田らである(15, 16)。彼らはin vitroで人工血管壁の最内層に内皮細胞を、その下層に平滑筋細胞層を、そしてその下に線維芽細胞層をそれぞれ層状に配置することによって天然の血管壁に類似した構造を作成し、それをin vivoに戻すことによって急速に安定した新生血管壁形成を得ることに成功した。

第二のグループはアリゾナ大学のWilliamsらである(17, 18)。彼らは内皮細胞を皮下脂肪組織から採取しE-PTFE graftに播種し動物実験的に植え込んだ結果、良好な新生内膜形成を人工血管内面のすべての部分において得た。私はDr. Williamsの講演を聴く機会に恵まれ、彼の示すスライドをつぶさに見せたもらった。彼の説明では皮下脂肪組織は脂肪細胞と毛細血管からなり、それを細切し酵素処理して遠沈すると軽い脂肪細胞は上層に、重たい内皮細胞は沈殿するため、その沈殿物から内皮細胞を純粋に集めることができるので、純粋に内皮細胞のみを人工血管壁に播種する事ができるという。私からの彼への質問にたいして、彼は内皮細胞以外の細胞はそこには含まれていないとのことで

あったが、そのスライドに示された細胞のうち半分は内皮細胞以外の細胞であった。当時は Cellular Engineering の時代であり、内皮細胞の単独培養を皆が心がけていたためにこのような説明となったことと思われるが、期せずして異種類の細胞が混在することで良好な結果を得たと私は理解している。

第三のグループは著者らである。我々は人工血管内面が長期間経過しても治癒しない状態を血管壁の難治性潰瘍とみなした。そして難治性皮膚潰瘍に皮膚の細切片を播種するように、遷延性骨折に骨の細切片を播種するように、人工血管壁における難知性潰瘍にも静脈の細切片を播種した。これによって静脈細切片から内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞がそれぞれ活発に遊走して新しい血管壁が完成した(19, 20)。このとき個々の細胞は抑制し合うことなくそれぞれに適した位置に分布し、膠原繊維や弾性繊維を産生し、新しい構造物を作り上げた。著者らは静脈組織片のみならず、皮下脂肪組織細説片や大網組織細説片等も人工血管壁への播種に用いて同様に良好な結果を得た(21)。完成した新生内膜では弾性繊維の形成も良好で、内皮細胞は血流方向にその長軸を平行に並べ、平滑筋細胞は人工血管壁にかかる張力による歪みの方向に平行に配列し、機能的にも無理のない新生血管壁が形成された(22)。この成果は臨床にも応用され(23)、現在長期結果の観察中である。

これら3グループの研究とそれ以外の内皮細胞を用いた研究グループとの違いは、3グループがいずれも内皮細胞以外の異なった種類の細胞を混在させた状況を作っていたことである。前述したように、人工皮膚においても線維芽細胞が混在することで、それが表皮細胞にとっての Feeder cell となり、表皮細胞の遊走、成長、分裂増殖を助けたと同時に、表皮細胞は線維芽細胞を外界からの刺激から守る働きをした。すなわち、共存共栄の細胞社会を形成した。人工血管壁においても、平滑筋細胞は内皮細胞下にあつて内皮細胞に対して Feeder cell として働き、内皮細胞は平滑筋細胞や線維芽細胞を高濃度の血清の刺激から守り、線維芽細胞は人工血管基材を異物として取り囲む役目をする。この様な分業で助け合い、共存共栄の細胞社会が築かれている事が理解できる。異なる種類の細胞を同時に培養することは *in vitro* では何らかの工夫が必要であるが、*in vivo* では細胞固有の住み分け性によって、協調することはあつても競合はしない。*in vivo* ではこの利点を生かすことができる。

4、人工血管における Tissue Engineering 的考え方の必要性

このような現実をみると、人工血管の新生血管壁形成を意図的に効率よく誘導するには Cellular Engineering 的な考え方をしなければならないことが理解できる。ではどのような取り組みをすれば人工血管において Cellular Engineering 的な考え方を取り入れることができるのであろうか。このことについてまず一般的に Tissue Engineering の必要条件を考えてみたい。私はその一般的な必要条件としては細胞、細胞外マトリックス、サイトカイン、周囲環境の4つの要素を満たす必要があると考えている。

Tissue Engineering は一般には *in vitro* で細胞操作を行って組織を形成させることと考えられているので、それにそつて考えてみよう。まず必要な要素は細胞である。人工血管において内皮細胞が思い浮かぶように、そして人工臓器においては島細胞が思い浮かぶように、Tissue Engineering では

高度に分化した特殊細胞が必要と思われている。私は後述するように必ずしもこれにはこだわらず、幼弱な細胞を使用することも考えているが、とにかく第一の要素は細胞である。そして前述したように単独種類の細胞のみでは細胞社会は形成できないため、複数細胞を共存させることを工夫する。例えばガン細胞と線維芽細胞とを共存させるために予め線維芽細胞に放射線を照射しておき、細胞分裂能力を落としておいて、ガン細胞の増殖能力を十分に発揮させる状況を準備して共存させるのも一つの方法である。また細胞培地を三次元的に設計し、表皮細胞、内皮細胞、中皮細胞などの表面に出たがる本能的な性質を持つ細胞を表層に、平滑筋細胞のようにマトリックスに埋もれて増殖したがる細胞を内部に潜らせて住み分けをさせるといった、細胞の特性を活用するのも一方法である。このようにして、特殊細胞とそれを支える一般細胞との共存社会の細胞の組み合わせを用意することが Tissue Engineering において求められる。

次に必要なのは細胞外マトリックスである。細胞は足場がしっかりしていないと遊走、分裂、増殖のみならず、本来の機能が発揮できない。個々の細胞には細胞固有の特性があり、細胞特性に適した場を用意する必要がある。例えば線維芽細胞などはお互いが全表面で接していてもかまわない。また接してなくても良い。しかし内皮細胞は細胞端のみが接する事ができ、また接している必要がある。これらを満足させるための機構が細胞外マトリックスである。複数種類の細胞を同時に扱うにはこの細胞外マトリックスをいかに活用するかが工夫のしどころである。また一方、細胞の接着や遊走には細胞固有のものしくは共有の細胞接着因子があって、その影響を直に受ける(24, 25)。したがって接着因子を選択したり、あるいは接着因子の主要な要素部分をマトリックスに固定化することで細胞のマトリックスへの接着、誘導が可能となってくる(26)。ここに Tissue Engineering の面白味が出てくる。

次に必要なのはサイトカインである。サイトカインは細胞間の言葉であると理解されている(27, 28)。細胞社会を作り、効率よく運営するには言葉を駆使する事が求められる。つまりどのようなサイトカインをどのような組み合わせでどの時期に使用するかによって細胞誘導が行えることとなる。今日、種々のサイトカインの様々な細胞への作用が明らかになり、サイトカインネットワークの研究から複数のサイトカインが同時に細胞へ働きかけた場合の影響も明らかにされつつあるので、組織形成のための細胞誘導についてはさらに考えやすくなるであろう。このような工夫をする事が機能的細胞社会による組織形成では重要である。

次に必要なことは周囲環境である。細胞外マトリックスやサイトカインも周囲環境の一つの要素とも言えるが、さらに広い範囲での環境を考慮しておく必要がある。in vitro では細胞培養に必要な最低限の条件は変えることはできない。しかし物理的は刺激は単純に変えうる。例えば浮遊培養を行うとか、振動をかけたり、遠心力下、無重力下等の負荷をかけて培養をする、温度を変えるなど、いろいろなことが考えられる。化学的にも pH や CO₂ 濃度、血清濃度、電解質、微量元素濃度等は単純に変化させうる。これらはサイトカインのような特定の生物活性物質による環境操作とは独立して考えた方が良く私は考えている。そしてこれらの諸条件は細胞の社会形成時期に応じて組み合わせを変え

て環境設定できるため、細胞にとっては環境の一大変化となる。これらの諸条件を組み合わせる技術を駆使することによって細胞活動を任意に誘導することが可能である。前述した松田らのグループでは *in vitro* で三次元的に内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞の三層構造を形成させるのに、細胞外マトリックスと周囲環境を巧みに変化させている。

一方、Tissue Engineering を生体内で行わせる場合にはこの周囲環境を特殊な状況として理解しておく必要がある。*in vivo* においてはこのような条件は不変であると考えられがちである。確かに生体の恒常性の下では大きな変化はない。しかし、だからといって考慮しなくても良いものではなくて、*in vivo* には *in vivo* の特性があることを理解しておく必要があるだろう。特に手術侵襲が加われば、恒常性も変化を来す。

例えば人工血管を大腿部に植え込んだとしよう。手術野では多くの細胞が手術操作によって傷害を受け、あるいは死滅することもあり、死にゆく状態に置かれることもある。また、酸素濃度、温度、栄養状態も一時的にしろ手術操作によって変化を余儀なくされる。これらの条件下において手術野では多くの細胞が種々のサイトカインを産生する。これらは必ずしも組織修復に必要なサイトカインばかりではないが、多くのそれらは組織修復を促進するように働く。局所では個々の細胞が細胞の置かれた状態に応じてその様な言葉を発していると考えれば理解しやすい。したがってこれらのサイトカインの働き、特に持続的な働きには注意を払い、これを活用するような工夫が必要となってくる。このサイトカインを一時的に吸収し、後に徐放出する例は後述するので参考にしていただきたい。

in vivo では *in vivo* の特性として、局所のみならず全身で手術侵襲を受けとめることを理解して Tissue Engineering を計画する必要がある。例えば大腿部の手術でも全身の臓器はそれに応じた働きをする。そのため手術侵襲の情報が全身に及び、組織修復に貢献する HGF (Hepatocyte Growth Factor) などは肝、腎、肺などから多量に産生されて大腿部の局所に至り創傷治癒を促進させる (29, 30)。このような遠隔地からの応援があるのも *in vivo* の特性である。

このように *in vitro*, *in vivo* での違いは有るにしても周囲環境は Tissue Engineering の重要な要素の一つと考えた方が良い。そこで人工血管において新生血管壁を効率よく形成させるためにはこれらの諸要素を人工血管壁にあたえることが必要となってくる。このような観点から前述した 3 グループの研究を振り返ってみると、それぞれの研究は Tissue Engineering の諸要素を満足していることが分かる。

例えば我々の行った静脈組織細切片の人工血管壁への播種においては、静脈細切片には新生血管壁を構成する細胞、すなわち内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞はすでに存在し、組織をそのまま最切することで、酵素処理による細胞外マトリックスの破壊は免れていることから、細胞を結びつける細胞外マトリックスも十分に残在している。さらに組織を細切することによって大量の細胞が傷害を受けることとなり、これらの傷害を受けた細胞が多量のサイトカインを産生することからサイトカインという点でも満足できる。また組織修復が *in vivo* でおこなわれるから、*in vivo* の周囲環境を活用できる。このような結果、人工血管における Tissue Engineering、すなわち新生内膜形成が素直に行われ

たことが理解できる。

5、新生血管形成を Tissue Engineering 的に考える

retrospective に考えて 良好な結果を得た例は Tissue Engineering の諸要素を満足していたが、では積極的に Tissue Engineering 的な考え方で人工血管を設計するとすればどの様な考え方が可能であろうか。これについて我々は骨髄組織を人工血管壁に移植した実験例 (31, 32) を持っているのでそれを紹介したい。

Tissue Engineering に必要な要素の中で、細胞といえば常に内皮細胞や平滑筋細胞などが考慮の対象となる。血管内面に血栓を形成させないためには内皮細胞が必要であり、それを支え、人工血管壁にかかる張力にも対処するために平滑筋細胞が必要と思われて当然である。しかし生体内の環境下では細胞の分布や配列を制御できると共に、周囲環境やマトリックス等の適切な諸条件を与えることで細胞の分化をも支配することが可能とも思われる。そこで内皮細胞や平滑筋細胞にとらわれることなく、未分化細胞を用いることによって人工血管壁内で環境と分布位置に応じた細胞分化を誘導する事もできるのではないかと期待される。この様なことから幼弱な細胞を多く含む骨髄組織が人工血管への移植組織として考えられる。では細胞以外の要素はどうであろうか。

骨髄においては細胞外マトリックスは骨髄組織の細胞周囲に付着しているので、そのまま活用できる。しかも酵素処理は行わなくとも細胞外マトリックスを付着させたまま細胞を分散させるので取り扱い易い。さらに骨髄細胞が多くの種類の、しかも多量のサイトカインや成長因子を産生する事が既に知られていることから、骨髄を移植することはサイトカイン産生システムを移植することとなる。この様に Tissue Engineering の方向から考えると、人工血管壁に骨髄移植準備すれば in vivo の環境下で新生血管壁形成を誘導することができると期待される。

この設計にもとづく人工血管の植え込みは予期した通りの成果を得た。動物実験では植え込み後 18 日で内面はすべて内皮細胞に覆われ、新生血管壁内で bFGF 等の成長因子産生も確認され、毛細血管を多量に持つ新生血管壁が誕生した。詳細は文献 (31, 32,) を参考にさせていただきたいが、この様に Tissue Engineering を中心に考えると従来とは異なった小口径人工血管の設計が可能となることが理解できる。

6、市販のコラーゲン被覆人工血管と Tissue Engineering

最近コラーゲンやゼラチンなどで被覆した人工血管が臨床で多用されるようになった。一般にコラーゲンは細胞侵入に良好な足場を提供するもの (33) として細胞培養において頻繁に用いられているが、臨床で使用されるコラーゲン被覆人工血管において、コラーゲン被覆された人工血管壁内に細胞が良好に侵入したとは聴いていないばかりか、最近の研究では市販のコラーゲン被覆人工血管が小口径人工血管に適していないと報告されている (34)。これは明らかにコラーゲンの本来の働きに矛盾している。Tissue Engineering 的に考えるとコラーゲンは細胞外マトリックスとなり得るため新生内膜

形成では無被覆人工血管に比べて有利なはずである。

この矛盾点を解明するために我々は市販のコラーゲンやゼラチンを被覆した人工血管の解析を行った。その結果それらの被覆物質にエンドトキシンの混入を確認した(35)。そして細胞培養でこの様な汚染されたコラーゲンには細胞の侵入が起こらないことをみとめた。これと時期を同じくして、多くの施設から臨床上、被覆物質に起因すると思われる副作用の発生が報告された。また文献を調べると、使用した牛のコラーゲンがアレルギー反応を引き起こしている可能性も指摘されている(36)。またコラーゲンやゼラチンを人工血管壁に塗布し、不溶化するために使用したグルタルアルデヒドやフォルムアルデヒド等の化学薬品の細胞毒性(37)も考えられる。これらの化学薬品に対する細胞毒性は既に知られていることであり、*in vitro* の細胞培養ではグルタルアルデヒドやフォルムアルデヒド等で処理されたコラーゲン膜上には線維芽細胞も生えない事が確認されている。このようなことから、市販のコラーゲンやゼラチン被覆人工血管では Tissue Engineering が *in vivo* で期待通りには進行してくれないようである。

7、汚れのないコラーゲンを被覆した人工血管

それでは汚れを防いだコラーゲン被覆人工血管を作成すれば Tissue Engineering 的に考えたストリーが適応できるであろうか。当然このような疑問がわき上がってくる。我々はこの様な考え方から以下の実験を行った。

被覆用コラーゲンとして無菌的に採取したコラーゲンをを用い、コラーゲン分子構造の中で陽性部分であるアミノ基をカルボキシル基に変換させるサクシニール化を行った。この処置によってコラーゲン線維は水に触れると多量の水を抱え込み、人工血管は水で覆われるようになる。水は血液凝固に影響を与えないことから人工血管表面は無血栓性となる。人工血管基材としては今日臨床で使用できる布製人工血管の中でもっとも異物反応の少ない人工血管 (MICRON, InterVascular C. Ltd) を用いた。作成したコラーゲンは 1% の溶液にして人工血管内に圧注入し熱架橋(38)によって人工血管壁に固定し不溶化した。このようにして作成した人工血管を成犬の腹部もしくは胸部大動脈に植え込んだところ、3 週間で 95% 以上の内面から赤色血栓が消失し、急速な内膜治癒を得た。その治癒過程を観察すると、植え込み後 3 日で細胞成長因子として知られている bFGF (basic fibroblast growth factor) が多量にコラーゲンに吸着されていた(39)。そして植え込み後 7 日でコラーゲン内には無数の線維芽細胞が侵入し、その後毛細血管も多数侵入した。侵入した細胞はコラーゲン線維にそって人工血管の内膜側に侵入していた。コラーゲン線維に対しては異物性巨細胞等の付着などの異物反応は全く認められなかった。この結果人工血管壁は多量の内皮細胞と線維芽細胞を持つこととなり、急速な内膜治癒が進行した。

8、Tissue Engineering 的な解釈

この現象を Tissue Engineering 的に考察してみよう。人工血管植え込み時には前述したように手

術野付近で多量の細胞が傷害を受けており、それらの細胞は活発に組織修復に必要なサイトカインを産生している。一般の創傷治癒過程においてはこれらのサイトカインは周辺のコラーゲン等の細胞外マトリックスに一時的に吸着され、手術後に徐放出されて細胞侵入や分裂、遊走、毛細血管誘導、組織構築等に貢献する。しかし臨床で使用されている布製人工血管にはその様な細胞外マトリックスが無いので、折角産生されたサイトカインも流れ去り、失活する。これはちょうど布製人工血管が禿げ山の様な状態であり、雨水を蓄え、徐々に放出する事ができない状況にあると理解される。私どもの研究で用いたコラーゲン被覆人工血管ではコラーゲンに bFGF 等のサイトカインが自然に吸着され、その後サイトカインはコラーゲンから徐放出されてゆくと思われる。またコラーゲン自身も徐々に吸収されるので、吸収の過程でさらにサイトカインが放出されるであろう。そのためコラーゲンに沿って宿主の細胞が侵入し、それらの細胞がさらにサイトカインを産生して毛細血管を呼び込み、Tissue Engineering に必要な細胞とサイトカインを人工血管が持つこととなったと考えられる。これはちょうど樹木の生い茂った山が雨水を一時的に蓄え、生物の成長を助ける状態に例えられよう。

すなわち、人工血管植え込み時においては、局所にはサイトカインも細胞も人工血管周囲に存在しているが、それを利用できる状態に無いだけのことであると考えられる。そこで適切な細胞外マトリックスを人工血管に賦与することで良好な Tissue Engineering のサイクルに持ち込むことができる事を示している。ここで注目すべき事は従来コラーゲンは細胞に良好な足場を提供すると考えられていたが、実際にはコラーゲンは足場を提供したのみならず、サイトカインの吸着、徐放出のためのリザーバーとしても活躍していたことであった。この様なことから内膜形成において Tissue Engineering が無理なく行われたと推測される。

アイソトープでラベルした bFGF を用いた我々の基礎研究では市販のコラーゲン被覆人工血管のコラーゲンも bFGF を吸着できた。しかし細胞毒性がコラーゲンにあればそれが前面に出て細胞を誘導することができなかつた。したがって、市販の人工血管も少しの改良で Tissue Engineering の理論を活用できる状態にあると思われる。

9、小口径人工血管開発と Tissue Engineering

文頭に述べたように小口径人工血管には内皮細胞被覆が必要であり、そのためには新生内膜形成を Tissue Engineering 的な考えで進めるべきであって、Tissue Engineering における 4 要素を考慮すれば新しい考え方にもとづく小口径人工血管が誕生すると期待される。

in vivo 環境は Tissue Engineering を行う上でとても恵まれている。in vivo の特性については前述したが、局所のみならず遠隔地からもサイトカインによる応援が受けられる長所がある。そしてそれらを活用することも、意図的に排除する事も可能である。また、幼弱な細胞、たとえば骨髄細胞や各種幹細胞などを働かせることもできる。そしてそれらの分化をも誘導可能という利点も出てくる。

従来の人工血管の考え方は血栓を付着させないこと、血液をもらさないこと等であった。それはそれで必要であるが、一時的な抗血栓性は抗凝固療法を併用したり、適切なシール材で被覆すれば獲得

可能であろう。そして天然の、しかも永久的な抗血栓性をもつ内皮細胞は細胞活動を前述した種々の手段で誘導したり制御することが Tissue Engineering 的に考えると可能となった。細胞の活動する場は素材、細胞、サイトカイン等の特性を生かし、組み合わせて考えることで人工血管として与えた基材の上で新生内膜を形成させるための作戦が練られるようになってきた。この様な考え方で小口径人工血管の設計を行うと従来考えられなかった幾通りもの設計が可能となってくる。その様な工夫の中で最も素直に Tissue Engineering が進められる方法が小口径人工血管をいち早く実用化に導いてくれると思われる。

おわりに

Tissue Engineering の考え方は始まったばかりであるが医学領域のみならず産業界を含めて広い分野で活用される技術としてとらえられており、おそらく 21 世紀には多くの領域で当たり前のように用いられるようになっていくと考えられている。ここに述べた考え方は今日の時点での最も進んでいると思われる考え方であるが、サイトカインや接着蛋白等の新しい情報が入れればそれらを参考にさらなる改良可能と思われる。ここに示したことを参考にした新たな工夫が人工血管のみならず、広い範囲で生まれることを期待している。

文献

- 1, Wu, F. J., Peshwa, M. V., Friend, J. R., et al: Hepatocytes cultivated as spheroids for potential application in a bioartificial liver. A. S. A. I. O. 41st Annual Conf. Chicago, May 1995.
- 2, Matsuda, T., Kondo, A., Miura, K: Synthesis of RGD-Agarose and its application to 2-dimensional and 3-dimensional artificial extracellular matrices. A. S. A. I. O. 41st Annual Conf. Chicago, May 1995.
- 3, Tobe, S., Takei, Y., Kobayashi, K. et al: Receptor-mediated formation of multilayer aggregates of primary cultured adult rat hepatocytes on lactose-substituted polystyrene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184:225-230, 1992.
- 4, Rheinwald, J. G., Green, H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 6:331-344, 1975.
- 5, Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J., et al.: Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science 211:1052-1054, 1981.
- 6, Yamada, N., Shioya, N., Kuroyanagi, Y.: Evaluation of an allogenic cultured dermal substitute composed of fibroblasts within a spongy collagen matrix as a wound dressing. Scand. J. Plast Reconstr. hand Surg. 29:211-219, 1995.
- 7, Burger, K., Sauvage, L. R., Rao, A. M. et al: Healing of arterial prostheses in man: its

incompleteness. *Ann. Surg.* 175:118-127, 1972.

8, 竹内敬昌、今井康晴、澤渡和男、他：超極細纖維人工血管（東レグラフト）の先天性心疾患手術に対する使用経験。人工臓器、22:542-544, 1993.

9, Hoshi, H., McKeehan, W.: Isolation, growth requirements, cloning, prostacyclin production and life-span of human adult endothelial cells in low serum culture medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 22:51-56, 1986.

10, Golden, P.B., Sussman I., Hatcher, V.B.: Long-term culture of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 19:661-671, 1983.

11, Wesolowski, S.A., Fries, C.C., Karson, K.E., et al.: Porosity: primary determinant of ultimate fate of synthetic vascular grafts. *Surg.* 50:91-96, 1961.

12, Herring, M.B., Gardner, A.L., et al: A single stage technique for seeding vascular graft with autologous endothelium. *Surg.* 84:489-504, 1978.

13, Clowes, A.W., Clowes, M.M., Kirkman, T.R., et al: Capillary endothelium can substitute for aortic endothelium in healing arterial replacements. *Fed. Proc.* 45:473, 1986.

14, Hunter, T.J., Schmidt, S.P., Sharp, W.V. et al: Endothelial cell-seeded arterial prostheses for coronary bypass grafting. *Trans. A.S.A.I.O.*, 32:339-341, 1986.

15, Ishibashi, K., Matsuda, T.: Reconstruction of a hybrid vascular graft hierarchially layered with three cell type. *A.S.A.I.O. Journal*, 40:284-290, 1994.

16, Miwa, H., Matsuda, T., Iida, F.: Development of a hierarchically structured hybrid vascular graft biomimicking natural arteries. *A.S.A.I.O. Journal*, 39:273-277, 1993.

17, Jarrell, B.E., Williams, S.K., Rose, D. et al: Optimization of human endothelial cell attachment to vascular graft polymer. *Trans. A.S.M.E.* 113:120-122, 1991.

18, Rupnick, M.A., Hubbard, F.A., Jarrell, B.E., et al: Endothelialization of vascular prosthetic surfaces after seeding or sodding with human microvascular endothelial cells. *J. Vasc. Surg.* 9:788-795, 1985.

19, Noishiki, Y., Yamane, Y., Tomizawa, Y., et al: Rapid endothelialization of vascular prostheses by seeding autologous venous tissue fragments. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 104:770-778, 1992.

20, Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Yamane, Y. et al.: Acceleration of neointima formation in vascular prostheses by transplantation of autologous venous tissue fragments. Application to small-diameter grafts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 105:796-804, 1993.

21, Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Yamane, Y. et al: Effectiveness of fragmented autologous adipose tissue as a sealer of porous textile grafts: effect on endothelial development. *J. Vasc. Surg.* 20:279-287, 1994.

- 22, Noishiki, Y., Yamane, Y., Tomizawa, Y. et al: Rapid neointima formation with elastic laminae similar to the natural arterial wall on an adipose tissue fragmented vascular prosthesis. A.S.A.I.O. Journal, 40:267-272, 1994.
- 23, Matsumoto, A., Noishiki, Y., Ichikawa, Y. et al: Sealing of fabric vascular prosthesis with autologous adipose tissue: A preliminary report of its clinical application. Artif. Organs 19:51-56, 1995.
- 24, Berwick, L., Coman, D.R. : Some chemical factors in cellular adhesion and stickiness. Cancer Res. 22:982-986, 1962.
- 25, Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. : Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309:30-33, 1984.
- 26, Matsuda, T., Inoue, K., Sugawara, T. : Development of micropatterning technology for cultured cells. A.S.A.I.O. Trans. 36:559-562, 1990.
- 27, 宮園浩平 : 細胞増殖因子のバイオロジー、実験医学バイオサイエンス、羊土社、1993.
- 28, Arai, K., Lee, F., Miyajima, A. et al: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. Annu. Rev. Biochem. 59:783-836, 1990.
- 29, Higuchi, O. Nakamura, T. : Identification and change in the receptor for hepatocyte growth factor in rat liver after partial hepatectomy or induced hepatitis. Biophys. Res. Commun., 176:599-607, 1991.
- 30, 中村敏一 : HGF-形態形成、組織再生、癌化。実験医学、11:1109-1157, 1993.
- 31, Noishiki, Y. Tomizawa, Y., Yamane, Y. et al: Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. Nature Med. 2:90-93, 1996.
- 32, Noishiki, Y. Yamane, Y., Tomizawa, Y. et al: Attempt to use natural cytokine synthesis from transplanted bone marrow. Cell. Eng. 2:19-28, 1997.
- 33, Stenzel, K.H., Miyata, T., Rubin, A.L. : Collagen as a biomaterial. Ann. Review Biophys. Bioeng. 3:231-253, 1974.
- 34, Guidoin, R., Marois, Y., Deng, X., et al: Can collagen impregnated polyester arterial prostheses be recommended as small diameter blood conduit? A.S.A.I.O. Journal, 42:974-983, 1996.
- 35, Yamamoto, K., Noishiki, Y., Mo, M. et al: Unusual inflammatory responses around a collagen-impregnated vascular prosthesis. Artif. Organs, 17:1010-1016, 1993.
- 36, The Canadian Multicenter hemashield study group: Immunologic response to collagen-impregnated vascular grafts: A randomized prospective study. J. Vasc. Surg. 12:741-746, 1990.
- 37, Speer, D.P., Chvapil, M., Eskelson, C.D., et al: Biological effects of residual

glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 14:753-764, 1980.

38, Ma, X.H., Noishiki, Y., Yamane, Y. et al: Thermal cross-linking for biologically degradable materials. Preliminary report. *A.S.A. I.O. Journal*, 42:866-871, 1996.

39, Noishiki, Y., Ma, X.H., Yamane, Y. et al: Natural adsorption of endogenous bFGF on an artificial extracellular matrix. 43rd Ann. Meeting, A.S.A. I.O. Atlanta, May, 1997.

The Concept of Tissue Engineering in the Development of Small Diameter Vascular Prostheses

Yasuharu Noishiki, Makoto Mo, Yoshihiro Iwai, Yukio Ichikawa, Ichiya Yamazaki, Takayuki Kosuge, Kazuhiro Takahashi

First Department of Surgery, Yokohama City University, School of Medicine

Key words: Small diameter vascular prosthesis, Tissue engineering, Neointima, Cytokine, Extracellular matrix

In order to obtain rapid neointima formation, a way of thinking of tissue engineering concepts were introduced in the field of vascular prostheses. Our hypothesis is as follows. Neointima formation is a product of tissue engineering in vivo, and four major factors, i. e., cells, extracellular matrices, cytokines, and in vivo environment should be arranged for effective tissue engineering. Vascular prostheses reported previously lack one or other of these factors. Therefore, endothelial cell seeding alone is not sufficient even if the cells are treated carefully. Recently, we obtained rapid neointima formation with endothelial cell lining throughout the graft surface by using autologous bone marrow transplantation. The key to success is as follows. Firstly, young and primitive cells such as stem cells should be used. Previously, highly differentiated cells such as endothelial cells have been used. The combination of different cell types is also useful. For example, a new skin can not be produced by cultured epidermal cells alone. However, with cultured fibroblasts underneath the epidermal cell layer as feeder cells, a skin-equivalent graft can be produced. Bone marrow contains both young, multipotential cells and highly differentiated cells such as endothelial cells. The second point is separation of cells. We do not use enzymatic separation of cells in order to avoid destruction of biological extracellular matrix in the case of bone marrow. Thirdly, a system for continuous cytosine synthesis is important. We obtained continuous synthesis of cytokines from transplanted marrow cells. Finally an in vivo environment is helpful for cell activity. With this hypothesis, we produced a simple collagen

coated prosthesis, which can adsorb endogenous cytokine, resulting in acceleration of fibroblast migration and proliferation, and capillary ingrowth into the graft wall. From these examples, we can recognize the importance of the combined use of these factors in vascular grafts for effective tissue engineering. Vascular prostheses designed with tissue engineering will become available for clinical use in the near future.

Bone marrow transplantation in vascular prostheses

Yasuharu Noishiki

Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine

Abstract

We obtained natural cytokine synthesis by bone marrow transplanted autologously in a synthetic vascular prosthesis. Bone marrow contains young, primitive cells with a strong survival potential which can differentiate into many kind of mesenchymal cells and can produce many kind of cytokines. These cytokines are useful if we can employ them in the right way at the right time. As an example of the use of natural cytokines, bone marrow transplantation into a synthetic vascular prosthesis will be described. Transplanted marrow cells survived in the prosthesis and accelerated neointima formation on its luminal surface. Bone marrow contains numerous undifferentiated cells which can differentiate into various kinds of cells depending on their environment. We expected the marrow cells to differentiate into cells such as fibroblasts, endothelial cells, and smooth muscle cells. But we could not find any signs of differentiation of the transplanted marrow cells.

Introduction

We have recently achieved natural cytokine synthesis by bone marrow transplanted autologously in a synthetic vascular prosthesis¹⁾. Bone marrow contains young, primitive cells with a strong survival potential which can differentiate into many kind of mesenchymal cells and can produce many kind of cytokines²⁾. How to use cytokines and growth factors efficiently in clinical medicine is one of the most interesting fields of research^{3,4)}. Gene transfer technologies using viruses, liposomes, DNA-coated micro projectiles, and infected cells are major methods for this purpose^{5,6)}. Some basic experiments have shown promising results, but there are also undesirable side effects^{7,8)}. Instead of genetically modified cells, we used autologous bone marrow.

In an ordinal environment, marrow cells works as a physiological tissue synthesizing their usual cytokines^{9,10)}. In unusual conditions, however, they synthesize various other cytokines for survival. Therefore, if we transplant them ectopically, they will synthesize cytokines actively and continuously. These

cytokines are useful if we can employ them in the right way at the right time. In this communication, as an example of the use of natural cytokines, bone marrow transplantation into a synthetic vascular prosthesis will be described. Transplanted marrow cells survived in the prosthesis and accelerated neointima formation on its luminal surface.

Problems with synthetic vascular prostheses

Vascular prostheses used in clinical applications have a number of problems, such as lack of anti-thrombogenicity, lack of protection from infection, less compliance than natural arteries, and low affinity for host tissues^{11,12}). The most undesirable problem is the delay of neointima formation with a natural anti-thrombogenic endothelial cell lining. In fact, most of the prostheses implanted are not endothelialized, and the inner surfaces remain thrombogenic long after implantation^{13,14}). Dacron fibers do not cause foreign body reaction¹⁵), but have no anti-thrombogenicity^{16,17}). Therefore, when the prosthesis is exposed to the blood, the coagulation system works against the Dacron fibers and red thrombi adhere to its luminal surface. Usually, from the anastomotic sites, approximately 2 cm areas are healed with endothelial cell lining. There was no thrombus deposition in these areas. These areas are covered with endothelial cells which have crept in from the host arterial wall at the anastomotic sites. Endothelial cells prevent thrombus formation and adhesion on the luminal surface of natural blood vessels¹²). On the areas far from the anastomotic sites, however, thick thrombi adhere to the surface because there is no endothelial cell lining. In clinic, vascular prostheses are not endothelialized except at anastomotic sites.

Reasons for the delay and efforts to overcome the problem

There are several reasons for the delay in healing, i.e., foreign body reactions of the prosthesis, inflammation, hypercoagulation, cell aging, and unusual blood flow dynamics. The major reason is the aging of endothelial cells. After more than 70 cell divisions, endothelial cells form another generation due to aging^{18,19,20}). The maximum area covered by 70 endothelial cell divisions is less than 2 cm from the suture lines. In clinical practice, we used 30 to 60 cm long vascular prostheses in a patients with peripheral arterial occlusive disease. Therefore, most of the luminal surface except very limited areas of anastomotic sites are not covered with endothelial cells. As a result, the vascular prosthesis cannot acquire natural anti-thrombogenicity of endothelial cells even after a long period of time. This is the one of the most