

difficult problems to overcome in a small diameter arterial regions. Details of pathological observations have been described elsewhere<sup>21</sup>).

### **Background of our new trial**

As explained, vascular grafts in humans do not endothelialize<sup>13,21</sup>). This is a protracted ulcer in the blood vessel wall. Transplantation of autologous tissue fragments has been used effectively to accelerate the healing process of protracted skin ulcers and prolonged bone fractures<sup>22,23,24</sup>). Tissue fragments contain various kinds of cells. In the skin, fibroblasts act as feeder cells to epidermal cells<sup>25</sup>). In equivalent experiments, smooth muscle cells and fibroblasts were shown to enhance endothelial cell growth<sup>26,27</sup>). We have applied a similar technique to vascular prostheses, since endothelial cell proliferation is greatly improved with an underlying base of feeder cells. Satisfactory results in both animal experiments<sup>28,29</sup>) and in clinical practice<sup>30</sup>) were obtained with venous and adipose tissue fragments in prostheses. Capillaries for endothelialization originated from the transplanted fragments and complete endothelialization was observed in a canine study<sup>28</sup>). We also showed that tissue fragments transplanted into the fabric prosthesis wall synthesized high amounts of cytokines such as bFGF from the early stage of implantation, resulting in rapid capillary ingrowth into the prosthesis wall<sup>31</sup>).

### **A new trial**

From these evidences, the procurement of autologous tissue containing a satisfactory quantity and quality of proliferate feeder cells become desirable to accelerate endothelialization. In order to regulate the healing process, we designed a vascular prosthesis which would have growth factors during endothelialization. Autologous bone marrow tissue containing various proliferative and differentiative cells with feeder cells and cytokine secretion<sup>32</sup>) was chosen for the source of fragments and was transplanted into the vascular prosthesis wall<sup>21</sup>). With this background, we applied bone marrow transplantation technology to the field of vascular prosthesis as shown in the following animal experiment.

### **Preparation of the graft**

As a basic matrix, an expanded polytetrafluoroethylene prosthesis (e-PTFE prosthesis) with fibril length of 60 to 150  $\mu\text{m}$  (average 90  $\mu\text{m}$ ) was used. The prosthesis was donated by the Vascular Group, Baxter

CVS Division (Irvine, CA, U.S.A.). Approximately 0.5 ml of bone marrow was obtained and stirred into 20 ml of lactated Ringer solution to create a bone marrow suspension. This suspension was sieved through the prosthesis wall by repeated and pressurized injections into the closed prosthesis with a syringe. The residual suspension that passed through the prosthetic wall was then injected again. During the repetition of this sieving procedure, bone marrow tissues were trapped in the pores of the prosthesis wall. Then the prosthesis was washed several times with lactated Ringer solution to remove the free remnants of tissue from the luminal surface, and it was implanted as a vascular substitute in the same dog from which the bone marrow was taken. As a control, a similar E-PTFE prosthesis without any bone marrow transplantation was used.

### **Prosthesis implantation**

Twenty-four adult dogs of both sexes, weighing 7 to 12 kg, were used for implantation of the vascular prostheses (inside diameter 6 mm; length 6 to 8 cm) in the abdominal aorta. Twelve of them were used for the implantation of the treated prostheses, and 12 for the control prostheses. The abdominal cavity was entered via a midline incision in the abdomen. The abdominal aorta was exposed and mobilized by sacrificing several branches between the renal arteries to the trifurcation. A 5 cm segment of the aorta was resected and replaced by the prosthesis. During the operation, an antibiotics (1 gm Cefazolin sodium, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) was administered into the abdominal cavity, and no anticoagulants were used at any time.

All animal care was in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" formulated by the National Society for Medical Research and the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication No. 80-23, revised 1985).

### **Prosthesis removal**

The prostheses were removed from the animals at 3 days, 3 weeks and 3 months. Before harvesting, heparin sodium (100 IU/kg) was administered intravenously to prevent clotting. All the removed specimens were rinsed with saline solution to remove excess intraluminal blood and inspected macroscopically and microscopically.

All of the animals with prosthesis implantation looked healthy during the observation period. Chronic ileus symptom with a distended abdomen due to intestinal adhesion was noticed in one test animal, but

it survived the observation period. In the treated group, 2, 4, and 6 prostheses were retrieved at 3 days, 3 weeks, and 3 months, respectively. One prosthesis out of 4 at 3 weeks was occluded, but all the other prostheses were patent. In the control group, 2, 4, and 6 prostheses were retrieved at 3 days, 3 weeks, and 3 months, respectively. All of them were patent.

### **Macroscopic appearance of the removed grafts**

The treated prostheses removed at 3 days were covered with fresh, thin, red thrombus, and were colored red. There was no thick thrombus deposition on the surface. At 3 weeks, all the prostheses were dark red in color along the entire luminal surface, and there was no fresh thrombus at all. The prosthesis wall was soft and pliable. There was no unusual adhesion, hematoma, seroma formation, inflammatory reaction or scar tissue around the prosthesis. The one occluded prosthesis was hard along its entire length and dark brown in color. Its lumen was completely occupied by connective tissue. But there was no inflammatory reaction either inside or outside. At 3 months, the luminal surfaces were still red in color, but the degree of redness was less than at 3 weeks. There was also no thrombus in the luminal surface. On the adventitial side, there was no unusual response at all. The prostheses were soft and pliable. Some areas of the luminal surface were red like thrombus deposit, but they had no thrombus deposition at all. The redness had arisen from the inside of the wall. The adventitial side was white in color composed of very loose connective tissue without unusual reactions.

In the control group at 3 days, thin red thrombus covered the luminal surface. No thick thrombus was present. At 3 weeks, the luminal surface looked slightly red in color due to a thin layer of red thrombus. Near the anastomotic sites, however, the lumen was white and glistening. There were no unusual reactions around the prosthesis. There was no hematoma, scar formation, seroma formation, or inflammatory reaction. At 3 months, the prostheses were surrounded with very loose connective tissue without any unusual responses. The luminal surface was red in color with thin red thrombus adhesion except for the anastomotic sites, where the surface was glistening and white for about 10 mm from the suture line. At the adventitia side, the prosthesis was surrounded with loose white connective tissue without unusual reactions.

### **Light microscopic appearance**

Before implantation, the treated prosthesis had numerous bone marrow tissue including megakaryocytes and erythroblasts in the interstices of the Teflon fibrils of the E-PTFE prosthesis. Stem cells were not identified. The cells, including small pieces of bone marrow tissue, were enmeshed and accumulated in the interstices of the Teflon fibrils near the luminal surface. But numerous cells including peripheral red blood cells were present all over the prosthesis wall.

At 3 days after implantation, the prosthesis wall contained numerous cells including bone marrow cells. These marrow cells were immunohistochemically reactive. At 3 weeks, the luminal surface of the treated prosthesis was completely lined with a continuous layer of endothelial-like cells. These cells could be stained with the PAP method, indicating that they had factor VIII, and were identified as endothelial cells. There were many capillary blood vessels near the luminal surface. The thickness of the neointima was about 20  $\mu\text{m}$ . A small pannus about 30  $\mu\text{m}$  thick extended approximately 2 mm from the proximal anastomosis. There were no giant cells around the prosthesis, which was surrounded with connective tissue containing a large number of fibroblasts and collagen fibers. Inside the prosthesis wall, numerous macrophages could be seen. Many capillary blood vessels were also observed inside and outside the wall. Hemopoiesis areas with erythroblasts were present sporadically inside and outside the graft wall. Around these areas there was always some capillary blood vessel ingrowth. Because of the hemopoiesis and the numerous capillary blood vessels, the wall contained a great amount of endothelial cells and blood components.

At 3 months, the luminal surface of all the prostheses was covered with a layer of endothelial cells. The thickness of the neointima was between 10 to 100  $\mu\text{m}$ . There was no thrombus on the luminal surface. At the anastomotic sites, small panni from 1 to 3 mm in width along the suture line and 20 to 100  $\mu\text{m}$  in thickness were seen, but there was no intimal hyperplasia at all. These panni were formed to make the surface smooth between the host aorta and the prosthesis surface. There were some areas with hemopoiesis associated with capillary blood vessels. But the number of these areas was less than at 3 weeks. Inside the neointima, there were small pieces of bone fragments. They were embedded in the neointima without any inflammatory reactions or intimal hyperplasia. Hemopoietic activity was still present at 3 months. We observed some erythroblastic islands which are typical sites of hemopoiesis in the interstices of prosthesis fibers. Around the erythroblastic islands, numerous capillary blood vessels were present.

In the control group at 3 days, the prosthesis was covered with a fibrin layer with numerous erythrocytes. Inside the prostheses wall, a fibrin layer containing erythrocytes and leukocytes occupied all

areas. At 3 weeks, the surface near the proximal anastomotic site had a pannus. It was between 0.5 to 1.5 mm in width and 20 to 50  $\mu\text{m}$  in thickness. The areas about 5 mm from the anastomotic site were endothelialized. The other areas far from the anastomotic sites were not endothelialized, but were covered with a thin layer of fibrin. Inside the prosthesis wall there were numerous macrophages. On the adventitia side, fibrin layers of 50 to 200  $\mu\text{m}$  in thickness were attached sporadically to the outer surface. Connective tissue composed of fibroblasts and collagen fibers was also seen. There were some capillary blood vessels inside the connective tissues on the adventitia side. But there were no capillary blood vessels inside the prosthesis wall, i.e., in the interstices of the PTFE fibrils. In immunohistochemical examination, the control graft showed no bFGF reactive in any areas of the graft wall.

At 3 months, the panni at the anastomotic sites of the control prostheses were about 1 to 3 mm in width and 20 to 50  $\mu\text{m}$  in thickness. A continuous endothelial cell lining from the suture line was noticed beyond the pannus edge, but the other areas far from the anastomotic sites were covered with a thin layer of thrombus without endothelial cell lining. Inside the wall, numerous macrophages were seen. But there was only a very small number of capillary blood vessels inside and outside the graft wall. On the adventitial side, connective tissue layer composed of fibroblasts and capillary blood vessels could be seen. There was a fibrin layer on the adventitia side.

There was no intimal hyperplasia in the pannus layer of the anastomotic sites. These endothelial cells were located on the fibrin layer or on the connective tissue containing fibroblasts. Inside the wall, a small number of macrophages were seen. Some capillary blood vessels were also observed. On the adventitial side, a thin layer of fibrin 1 mm in thickness and 5 mm in width directly adhered to the outer surface. Outside the fibrin layer, connective tissue composed of fibroblasts and collagen fibers was seen. A small number of capillary blood vessels were observed here and there.

#### **Acceleration of the neointima formation observed in the results**

As shown in the results, neointima formation was obviously accelerated by the bone marrow transplantation. The treated prostheses showed more rapid endothelialization than the controls. Without exception, all of the retrieved prostheses showed extremely rapid healing. Endothelialization of the center area was quicker than at the anastomotic sites. In the control group, endothelialization always started from the anastomotic sites even at 3 months. There was no endothelial cell lining in the center areas of the control

prostheses. The patterns of endothelialization of the treated prostheses and the controls showed great differences.

In humans, endothelialization always starts from the anastomotic sites<sup>13)</sup> as in the control prostheses of the current experiment. If it could start from the entire luminal surface at a very early stage after implantation as in the treated prostheses of the current experiments, the prostheses could quickly obtain the natural anti-thrombogenicity of endothelial cells, which would be of great benefit in small diameter vascular prostheses.

In order to obtain complete endothelialization, endothelial cell seeding techniques have been tested during the past two decades. Some of them produced favorable results<sup>33,34,35,36)</sup>, but they remain unavailable for general use because they require special cell culture techniques and facilities. They are also not available for emergency use, because the cell culture requires an extended period of time. In endothelial cell seeding experiments previously reported, the survival rate of the seeded cells were extremely low. Almost no seeded cells are available for endothelialization<sup>37,38)</sup>. Some experiments showed that the cells in the newly formed neointima did not originate from the seeded cells but from the surrounding host tissue at the adventitia side. These experiments were not successful because the seeded cells were washed away by the circulation. Enzymatically separated cells have difficulty surviving *in vivo*.

#### **Survival of the transplanted cells**

It was obvious that the bone marrow cells survived and maintained their activities during the sieving procedure and after implantation. They created colonies and acted as bone marrow tissue inside the prosthesis wall. This result is greatly superior to the low survival rate of enzymatically derived single cells. We need clumps of endothelial cells to minimize washoff. In the metastasis of cancer cells, it is assumed that a single cell that has migrated from the original tumor does not survive to cause a metastasis. A certain number of cells is required to start a new colony. In the current experiments, the survival rate of the bone marrow cells *in vivo* was not calculated, but bone marrow tissues formed clumps of cells and it is evident that these bone marrow tissues certainly survived and continued their hemopoiesis.

Our hypothesis regarding the cell survival is as follows. The interaction of different kind of cells is probably of crucial importance. In artificial skin grafts, new skin can not be produced with cultured epidermal cells alone. However, with cultured fibroblasts underneath the epidermal cell layer, a skin-equivalent graft can be produced<sup>25)</sup>. Fibroblasts are considered to act as feeder cells for the epidermal cells. Fibroblasts

do not suppress the epidermal cell growth in vivo. The combined use of different cell types is important for organ reconstruction. Wildevuur et al. found that seeding of smooth muscle cells enhanced endothelialization of vascular prostheses<sup>26</sup>). Tissue fragments containing endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts also enhanced neointima formation of a fabric vascular prosthesis<sup>27,28</sup>). As shown in our in vitro cell culture results, bone marrow contains various cell types. Therefore, the bone marrow in the vascular prosthesis was in a desirable condition for their survival.

### **Ectopic hemopoiesis of the transplanted marrow cells**

It was surprising that the hemopoiesis took place in the treated prosthesis wall. Colonies of erythroblasts were always associated with capillary blood vessels. During the hemopoiesis, the marrow cells require nutrition for survival and raw materials for hemopoiesis. Therefore, capillary blood vessels are required quickly. There is natural angiogenesis. As a result of this activity, the prosthesis wall can obtain numerous capillary blood vessels. This is the reason why the luminal surface of the treated prostheses looked red without fresh thrombus deposition.

In general, bone marrow obtained by needle puncture contains some endothelial cells. The amount of endothelial cells is not high. But these cells could survive to make colonies to promote marrow cell survival, producing the entire luminal surface lining within a short period of time. This activity is quite aggressive in the young, primitive cells of the bone marrow. We can obtain an active bone marrow tissue even from elderly patients. Therefore, bone marrow transplantation into the vascular prosthesis wall can induce this activity in the healing process of neointima very efficiently.

### **Bone marrow transplantation technology**

Exogenic hemopoiesis on these vascular prostheses was characteristic. During hemopoiesis, some cytokines might aid capillary ingrowth into the prosthesis wall. Marrow cells need nutrition for their survival, raw materials for producing blood cells during hemopoiesis, and routes for shipping out their products, i.e. "blood cells". As a result, capillary ingrowth was required. These requirements of the marrow cells might be translated by cytokines and growth factors. Remarkable capillary ingrowth shortly after the prosthesis implantation indicated the existence of strong angiogenic properties. Detection of bFGF in the transplanted marrow cells suggests that its production continued throughout the prosthesis wall as long as those

cells existed. bFGF has gained attention due to its strong angiogenic property and ability to accelerate capillary ingrowth to form collateral circulation for the ischemic heart<sup>39,40</sup>). The dark-red color of the treated prostheses observed macroscopically might have come from the newly formed capillaries and numerous immature blood cells at hemopoiesis. The size of the capillaries decreased in parallel with the regression of the hemopoiesis and at that time the prosthesis turned light pink. These four factors, i.e., bFGF, capillary ingrowth, hemopoiesis, and graft color seem to be interrelated.

The dose of cytokine and growth factors sufficient for angiogenesis and neointima formation might be small, but continuous release would be essential for the cells to endothelialize the prosthesis lumen, since these factors' efficacy lasts a short time<sup>40,41,42</sup>). However, there appears to be an autoregulating system in the bone marrow treated prostheses, since endothelialization was complete within 3 weeks and was arrested without endothelial cell hyperplasia or hemangioma formation, whereas hemopoiesis continued for more than 3 months.

#### **Cytokines synthesized from bone marrow**

The activity might be stimulated by cytokines such as bFGF synthesized by the transplanted bone marrow. We have shown that in a vascular prosthesis made with fragmented autologous tissue, a high amount of bFGF was synthesized soon after implantation<sup>31</sup>). There was much capillary ingrowth in the prosthesis wall and the luminal surface was endothelialized within 1 month. In the current experiments, we did not identify any synthesized cytokines other than bFGF. During hemopoiesis, however, marrow cells could continuously produce various cytokines that accelerate the neointima formation. In effect, we transplant a system that slowly releases cytokines and supplies young cells. Such systems could be useful not only in vascular prostheses, but also in various hybrid artificial organs and in surgery in general. Thus we were able to produce neointima formation on vascular prostheses without recourse to the use of gene transfer technology.

#### **Differentiation of cells**

Bone marrow contains numerous undifferentiated cells which can differentiate into various kinds of cells depending on their environment. In the current experiments, 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. If such differentiation could be effected with the



aide of some kind of cytokines, bone marrow technology would be useful to design future hybrid artificial organs with the ability of cytokine synthesis .

### **Conclusion**

Active angiogenesis in the bone marrow tested prosthesis and accelerated endothelialization throughout the luminal surface seemed to be the result of co-operation of the transplanted cells and cytokines secreted from them. The prosthesis appears to be an autocrine artificial organ producing growth factors for itself under an autologously controlled system. Based on these observations, we could understand how useful the ectopic transplantation of bone marrow was. We expect that this technology will be applied in all medical fields.

### **References**

- 1, Noishiki, Y., Yamane, Y., Tomizawa, Y., and Matsumoto, A.: Transplantation of autologous tissue fragments into an e-PTFE graft with long fibrils. *Artif. Organs* 19, pp.17-26, 1995.
- 2, Noishiki, Y., Yamane, Y., Tomizawa, Y., and Matsumoto, A.: Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 2, pp.90-93, 1996.
- 3, Schall, T.J.: 'The chemokines. In the cytokine handbook, 2nd ed., Academic Press, pp.419-460,1994.
- 4, Gillis, S : Cytokine receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 3 pp. 315-319,1991.
- 5, Mortensen, R.: *Current protocols in molecular biology.* ed Ausubel F.M. et al. pp.9.15.1-9.16-6,1987.
- 6, Williams R.S., Johnston S.A., Riedy, M., DeVit, M.J., McElligott, S.G., and Sanford, J.C. : Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, pp. 2726-2730,1991.
- 7, Sekhon, H.S., and Larson, J.E.: In utero gene transfer into the pulmonary epithelium. *Nat. Med.* 1, pp. 1201-1203, 1995.
- 8, Baffour, R., Berman, J., Rhee, S.W., Kaufman, J., and Friedmann, P.: Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J. Vasc. Surg.* 16, pp. 181-191, 1992.
- 9, Gabilove, J.G., White, K., Rahman, Z., and Wilson, L.: Stem cell factor and basic fibroblast growth factor are synergistic in augmenting committed myeloid progenitor cell growth. *Blood* 83, pp. 907-910, 1994.

- 10, Jacobsen, S.E.W., Veiby, O.P., and Smeland, E.B. : Cytotoxic lymphocyte maturation factor (Interleukin 12) is a synergistic growth factor for hemotopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 178, pp.413-418,1993.
- 11, Szilagy, D.E. : Perspectives in vascular grafting. in *Vascular grafts* ed Sawyer P.N., and Kaplitt M.J.Appleton-Century-Crofts, New York, pp.5-22
- 12, Noishiki, Y. (1995): Progress and problems in the development of vascular protheses. *Artif. Organs* 19, pp. 3-6,1978.
- 13, Berger, K., Sauvage, L.R., Rao, A.M. and Wood, S.J. : Healing of arterial protheses in man: its incompleteness. *Ann. Surg.* 175, pp. 118-127,1972.
- 14, Szilagy, D.E., Smith, R.F., Elliott, J.P., Allen, H.M.: Long-term behavior of a Dacron arterial substitute. *Ann. Surg.* 162, pp. 453-477,1965.
- 15, Noishiki, Y.: Biochemical response to dacron vascular prothesis. *J. Biomed. Mater. Res.* 10, pp. 759-767, 1976.
- 16, Nossel, H.L., and D.Phil, C.B. : Interface-induced coagulation reactions. in *Vascular grafts* ed Sawyer P.N., and Kaplitt M.J.Appleton-Century-Crofts, New York, pp.108-112,1978.
- 17, Sawyer, P.N., Stanczewski, B., Lucas, T.R., Srinivasan, S., Ramasamy, N., and Kirshenbaum, D.: Physical chemistry of the vascular interface. in *Vascular grafts* ed Sawyer P.N., and Kaplitt M.J.Appleton-Century-Crofts, New York, pp.53-75, 1978.
- 18, Hoshi, H., and 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, pp. 51-56,1986.
- 19, Golden, P.B., Sussman, I., and Hatcher, V.B. :Long-term culture of human endothelial cells. *In vitro Cell Dev. Biol.* 19, pp. 661-671,1983.
- 20, Hasegawa N., Yamamoto, M., Imamura, T., Mitsui, Y., and Yamamoto, K.: Evaluation of long-term cultured endothelial cells as a model system for studying vascular aging. *Mech Ageing Dev.* 46,pp. 111-123, 1988.
- 21, Noishiki, Y., Yamane, Y., Tomizawa, Y. and Matsumoto, A. : The vicious cycle of nonhealing neointima in fabric vascular protheses. *Artif. Organs* 19, pp. 7-16,1995.
- 22, Barsky, A.J., Kahn, S., and Simon, B.E.: Principles and practice of plastic surgery. New York McGraw-hill, pp.419-445, 1964.

- 23, Heppenstall, R.B. : Bone grafting. in Fracture treatment and healing. Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 97-112,1980.
- 24, Rudolph, R., & Ballanthyne, D.L. Jr.: Skin grafts. in Plastic Surgery, Vol. 1, General Principles. McCarthy, J.G., May, J.W. Jr., Littler, J.W. ed., W.S. Saunders, Co., Philadelphial, pp. 221-274,1990.
- 25, Bell, E., Ehrlich, H.P., Buttle, D.J., and Nakatsuji, T. : Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science 211, pp. 1052-1054,1981.
- 26, Yue, X., Van der Lei, B., Schakenraad, J.M., Van Oene, G.H., Kuit, J.H., Feijen, J., and Wildevuur, C.R.: Smooth muscle cell seeding in biodegradable grafts in rats: A new method to enhance the process of arterial wall regeneration. Surgery 103, pp. 206-2126,1986.
- 27, Noishiki, Y., Tomizawa, Y., Yamane, Y., Okoshi, T., Satoh, S., and Matsumoto, A.: Acceleration of neointima formation in vascular prostheses by transplantation of autologous venous tissue fragments. Application to small-diameter grafts. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 105, pp. 796-804,1993.
- 28, Noishiki, Y., Yamane Y., Tomizawa, Y., Okoshi, T., Satoh, S., Wildevuur, C.H.R. : Rapid endothelialization of vasuolar prostheses by seeding autologous venous tissue fragments. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 104, pp. 770-778,1992.
- 29, Noishiki, Y., Tomizawa, Y., and Yamane,Y.: Effectiveness of fragmented autologous adipose tissue as a sealer of porous textile grafts: Effect on endothelial development. J Vasc Surg 20, pp. 279-287, 1994.
- 30, Matsumoto, A., Noishiki, Y., Ichikawa, Y., Soma, T., Kondo, J.,and KosugeT. : Sealing of Fabric Vascular Prosthesis with Autologous Adipose Tissue. - A Preliminary Report of its Clinical Application-. Artificial Organs 19, pp. 51-56,1995.
- 31, Tomizawa, Y., Noishiki, Y., Okoshi, T., Endo, M., and Koyanagi, H.: Basic fibroblast growth factor in non-functioning vascular grafts: Experimental study. Ann. Meeting Am. Soc. Artif. intern. Organs, Chicago, May 4-6, 1995.
- 32, Bruno, E., Miller, M.E., and Hoffman, R.: Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocytopoiesis. Blood, 73, pp. 671-677, 1989.
- 33, Herring, M.B., Gardner, A.L.,and Glover, J.: A single stage technique for seeding vascular graft with autologous endothelium. Surgery 84, Pp. 489-504,1978.

- 34, Dilles, A.R.S., and Herring, M.B.: Endothelial seeding of vascular prostheses. in Jaffe, E.A. ed. Biology of endothelial cells. Boston, Martinus Nijhoff, pp. 401-423, 1984.
- 35, Rosenman, J.E., Kempeziński, R.E., Pearch, W.H., and Silberstein, E.B. : Kinetics of endothelial cell seeding. *J. Vasc. Surg.* 2, pp. 778-784, 1985.
- 36, Rupnik, M.A., Hubbard, F.A., Pratt, K., Jarrell, B.E., and Williams S.K.: Endothelialization of vascular prosthetic surfaces after seeding or sodding with human microvascular endothelial cells. *J. Vasc. Surg.* 9, pp. 788-795, 1989.
- 37, Sharefkin, J.B., Van Watt, H.E., and Williams, S.K.: Adult human endothelial cell enzymatic harvesting: estimates of efficiency and comparison of crude and partially purified bacterial collagenase preparations by replicate microwell culture and ELISA-measured fibronectin degeneration. *J. Vasc. Surg.* 6, pp. 567-577, 1986.
- 38, Sharefkin, J.B., Van Wart, H.E., and Williams, S.K.: Enzymatic harvesting of adult human endothelial cells for use in autologous endothelial vascular prosthetic seeding. *Endothelial seeding in vascular surgery.* Orlando, Fla.: Grune & Stratton, pp. 79-101, 1987.
- 39, Yanagisawa-Miwa, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Tomaru, T., Kido, H., Kamijo, T., Sugimoto, T., Kaji, K., Utsuyama, M., Kurashima, C., and Ito, H.: Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action on basic fibroblast growth factor. *Science* 257, pp. 1401-1403, 1992.
- 40, Giordano, F.J., Piing, P., McKirman M.D., Nozaki, S., DeMaria A.N., Dillmann, W.H., Mathieu-Costell, O., and Hammond K.: Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat. med.* 2, pp. 536-539, 1996.
- 41, Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M.B., Dinarello, C.A. and Mier, J.W.: Interleukin-6 (IL6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor. *Blood* 83, pp. 113-118, 1994.
- 42, Meurice, T., Bauters, C., Auffray, J.L., Vallet, B., Hamon, M., Velero, F., Van Belle, E., Lablanche, JM, and Bertrand M.E.: Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent response after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation* 93, pp. 18-22, 1996.

## 走性を利用しよう

横浜市立大学医学部外科学第一講座

野一色 泰晴

### はじめに

先の研究から、幼弱な細胞、遊走能の活発な細胞、分裂能の高い細胞、等を意図的に集めることが可能であることが明らかとなった。これは一般の体組織内であっても、通常な何ら活発な動きのみられない組織内であっても、何らかの刺激でそのようなことが惹起されることが判明した。この手法を用いると、用意にBlastogenesisの現象を引き出すことができる。そうなると、細胞組込型人工臓器を作成するに置いて、この現象を積極的に取り入れると、成熟した組織においても幼弱な細胞を集めて、その細胞の活力を生かすことが可能となる。

さらにこのような時に置いて、積極的に細胞に働きかけると、意図的に細胞を選別しつつ集めることも可能となるはずである。具体的に言えば、前回行った「細胞ほいほい」の装置を用い、使用したコラーゲンスポンジにVEGF (vascular endothelium Growth Factor) の如き細胞成長誘導因子を用いていけば、その特異性によって特定の細胞を集めることが可能となるはずである。

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未羅列現象であるが、それらの個体の本能的な動きの特徴の一つに「走性」という性質がある。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、以下の様な説明がかかっている。

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, hygro taxis, Geotaxis, Electrotaxis, Thermotaxis, Rheotaxis, Phototaxis etc)

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人工血管を作成することができるであろう。このたびの研究はこのようなことを基本に考えて、人工血管作りを目指した試みである。

### 材料と方法

#### 1. 使用した人工血管の基材

ポリエステル繊維で編まれた布製人工血管 (Micron, knitted graft, water permeability,

1, 200ml/min/cm<sup>2</sup>) を枠組みとして用いた。次に、アテロコラーゲン (株式会社高研、東京) を重量比で 5% となるように蒸留水内に入れてコラーゲン分子を膨潤させた後に、徐々に加熱してコラーゲン分子を熱変性によってゼラチン化させ、結果的に 5% の親ゼラチン液を得た。さらにこれとは別に、0.5% になるように繊維性コラーゲンの粉末を蒸留水中に入れ、0.1N の塩酸溶液を滴下して酸性とし、pH 5 付近でコラーゲンの均質な分散液を作成した。

次に布製人工血管基材にコラーゲン溶液を圧注入して、コラーゲン線維をポリエステル繊維に絡ませ、その後に凍結乾燥にてコラーゲン線維の多孔質な状態での人工血管被覆状態を得た。次にこれにゼラチン液を振りかけて、多孔質部分にゼラチンをしみこませ、高濃度の被覆状態を作った。そして再び凍結乾燥を行った。

つぎにこの様な状態となった被覆人工血管を接し 135 度、24 時間、真空下で熱架橋を行い、コラーゲンとゼラチンの不溶化を行った。このようにして、コラーゲンとゼラチンで被覆された人工血管を得た。

つぎにこの人工血管内腔に、ちょうど内面に接する様なサイズの断面を持つ、断面が円形のシリコーンひもを入れ、5-0 ポリプロピレン糸にて、人工血管とシリコーン樋本を固定した。この組み合わせの基材はエチレンオキサイドガスにて滅菌した。

## 2、人工血管基材への細胞の付着

作成した人工血管基材を成犬の腹部の皮下組織内に挿入した。このとき挿入に際して、2.5 マイクログラム含有の VEGF 溶液およびセファロスポリン系の抗生物質とを被覆された基材に降りかけ、無菌的に植え込んだ。この植え込んだ資料は 1 週間から 10 日後に付着した周囲組織とともに採取し、シリコーンひもを抜去した。この作業によって、布製人工血管を枠組みとした、細胞のからまた結合組織管を得た。

この管の一部は組織学的な検査のためにホルマリンバッファー液によって固定した。

## 3、人工血管としての植え込み

作成した結合組織管を、それを取り出した同一のイヌの腹部大動脈に人工血管として植え込んだ。植え込みに当たっては、5-0 ポリエステル糸を用いて連続縫合で、端々吻合をおこなった。なお、術中に抗生物質の散布を手術創部分に散布したが、抗凝固薬はいっさい使用しなかった。

## 4、人工血管の取り出しと試料観察

術後 3 日目から 120 日目に至るまで、順次、時間の経過を追って動物から資料を採取した。得られた試料は血管の長軸方向に切り開き、内面を観察するとともに、ホルマリンバッファー液によって固定し、組織切片を作成して光学顕微鏡にて観察した。なお、組織切片の染色は HE 染色、ワンギンソン染色、フォンコッサ染色、アザン染色、およびファクターエイト染色のための PAP 法の各染色

を行った。

また、一部の試料はグルタルアルデヒドにて後固定したあと1%オスミウム液に浸け、さらにアルコール系列にて脱水し、液体炭酸ガスを用いて臨界点乾燥を行い、白金パラジウムを蒸着して、走査型電子顕微鏡にて観察を行った。

## 結果

### 1、人工血管基材の作成と細胞の付着

基材の作成と動物の腹腔内への挿入は容易であった。しかしながら、感染する例が12例中に3例あり、一般の手術では感染は極めて希である我々の実験室においては、この数字は実に不名誉な高率感染であったため、慎重な手術が求められた。これらの感染例は評価の対象から外した。

皮下組織から取り出す際には、試料周囲には大量の血管の進入が肉眼レベルでも明らかにわかり、周囲はきわめて赤く、その部は出血しやすかった。この部の切り出しには電気メスを使用せざるを得なかった。細胞の付着は7日間で人工血管の網目が完全に被覆されるだけのフィブリンと細胞が絡まり、十分に付着していた。また10日後ではしっかりした組織が付着していた。

光学顕微鏡による観察では、7日後の試料で、布製人工血管のポリエステル繊維はフィブリンと細胞に絡まられており、大この細胞はマクロファージ、赤血球、白血球、形質細胞などであった。さらにはこれらの細胞内に線維芽細胞が見られ、さらに毛細血管の形成と思われる血球を含む管腔が見られた。挿入後10日目には血管構造はハッキリとしており、多くの血管が人工血管のポリエステル繊維間隙に進入している状態がよく観察された。

### 2、人工血管としての植え込み

人工血管の編み目はコラーゲンおよびゼラチンで完全に被覆されていたが、人工血管としての植え込み時には、これらのコラーゲンやゼラチンはほぼ完全に分解され吸収されていたと思われる。しかしながら、人工血管壁は進入してきた組織によって完全にシールされており、植え込み時に人工血管壁からの出血は全く認められなかった。

吻合に関しては、通常の布製人工血管の吻合と言うよりも、自家組織を縫いつけているといったハンドリングであって、人工血管と本来の血管との吻合がきわめて良好であって、その部からの出血は全くみられなかった。

### 3、人工血管の採取

人工血管の周囲はしっかりした結合組織に取り囲まれていた。しかし、その結合組織には次の様な変化が見られた。すなわち、通常的人工血管を植え込んだ場合には、緩やかな結合組織が周囲を覆うが、作製した人工血管の場合には、血管組織の多い、肉芽組織に近い状態の実質的な組織が人工血管を取り囲んでおり、この状態は植え込み後1ヶ月以上の経過例では全てに認められた。

#### 4、採取した人工血管の外側の肉眼的所見

7日間人工血管として植え込まれていた試料では3例の全て、人工血管の周囲に柔らかいが赤色がかった厚い肉芽様の組織が形成されていた。その肉芽組織と人工血管とは緩やかに結合しており、その間に組織液の貯溜は見られなかった。21日間人工血管として植え込まれていた試料では3例の全て人工血管周囲にある肉芽様の組織が更に肥厚しており、厚みが3ないし5mmであった。7日間人工血管として植え込まれていた試料では2例の全てにおいて3日間と同様の組織が形成されていたが、その厚みが更に厚くなっていた。21日間人工血管として植え込まれていた試料では2例の全てにおいて3日間と同様の組織が形成されていたが、その厚みが更に厚くなり、5乃至7mmの厚いところもあって、それと人工血管との間隙が剥がれやすいところもあった。

これらよりも長期間植え込まれていた人工血管の10例すべてにおいては前述した肉芽様の組織は認められなかった。人工血管の周囲は一般の血管壁の外膜側と同様の薄い結合組織によって覆われ、周囲組織から人工血管を切離すのには剪刀で容易に剥がすことが可能であった。

#### 5、人工血管内側の肉眼的所見

採取した人工血管は事前に腹腔内に挿入されていた期間とは余り関係なく、人工血管として植え込まれていた期間に関係して、内側の所見が変化していた。

まず、植え込み直後、1日で採取した例では、人工血管内面に薄い血栓層が付着していた。これは部分的には赤い赤色血栓であったが、部分的には赤色が薄く、あたかもフィブリン層の様であった。

植え込み後7日目では血栓の付着は部分的であって、全面にわたることはなかった。血栓の厚みは2mm程度であった。しかし、血栓の中であって、所々に白色の組織が見られ、その様な部分では血栓の付着が見られなかった。植え込み後21日目では白色部分が広くなり、血栓の付着部分が少なくなっていた。植え込み後21日、120日などの長期例では人工血管が周囲組織によって圧排されたり、犯行組織による収縮によって変形している部分を除けば、内面は光沢のある白色組織によってお覆われており、その部には血栓は全く付着することはなかった。

#### 6、光学顕微鏡的評価

植え込み後に人工血管の周囲に見られた肉芽様の組織は7日目、21日目で見ると毛細血管を多く含む細胞線維性組織であった。それらの組織は毛細血管の数が多く、いわゆる肉芽組織に近い組織であった。

6週間腹腔内に挿入されていた例ではこのような癒痕組織は見られず、粗性結合組織が人工血管周囲に付着しており、その中には少数の毛細血管が見られた。

3日間腹腔内に挿入され、7日間人工血管として植え込まれていた例では、人工血管壁のポリエステル繊維間隙には細胞成分は少なく、フィブリンが多量組織であった。吻合部近くではこのフィブリン



ン層の上を内皮細胞がホストの血管壁から連続的に伸展してくる所見が観察されたが、吻合部から離れたところでは人工血管内面はフィブリン層のみで覆われていた。

7日間以上腹腔内に挿入されていた人工血管ではポリエステル繊維間隙には細胞成分が残存しており、フィブリン層のみといったところはなかった。これらの例においては人工血管内面には多くの場で、7日目にも21日目にもフィブリンで覆われたところと、細胞の覆い組織で覆われたところが見られた。特に6週間挿入されていた例では内面には白色の組織が多く見られ、その部では内皮細胞と、内皮細胞様ではあるが、漿膜細胞的でもある細胞が表面を覆っていた。そして、これらの細胞が覆っている表面にはフィブリンや血球の付着、血栓形成などは見られなかった。

311日目の長期例では内面は一部を除いて、全面的に扁平な内皮細胞によって覆われていた。しかし部分的には、扁平な内皮細胞出もなく、少し盛り上がった内皮細胞も見られた。これらの細胞のPAP法による染色では陽性に染まることから、これらの細胞は内皮細胞と思われる。

### 考察

皮下組織内に挿入している間に、VEGFの作用で、血管内皮細胞が引き寄せられて、人工血管の壁内部には内皮細胞がきわめて多い状態になった。これは一種の化学走性である。正の chemotaxis 現象であって、この作用によって、周囲組織内にあった内皮細胞が引き寄せられ、肉眼的な現象としては小血管が人工血管基材となる組織内に短時間内に進入していったと考えられる。

これは以前の実験で用いた細胞ほいほいの装置ではコラーゲンがシリコーンの袋の中に入っていたが、これを裸にして、コラーゲンを直接露出したために、効率よく細胞を集めることが可能となったと思われる。

人工血管壁内に毛細血管が多く進入するということは、人工血管壁が多量の内皮細胞を持つということとなる。かつて、1980年代の後半には、内皮細胞を大量に *in vitro* で培養し、これを人工血管壁に播種して人工血管に植え込みを行ってきた。しかしながら、この手法では内皮細胞がはがれやすく、その生着率は3%未満であった。これではせつかくの細胞培養の努力が認められなくなったと言わざるを得ない。 いっぽう、本研究では、積極的に *in vivo* で内皮細胞を集め、それを人工血管としてかつよう可能な状況としている。従って、*in vivo tissue engineering* の手法としては、我々の方法が、少ない努力量で確実な成果を得ることとなる。従って、より自然であって、どこの施設でも誰が行っても良好な一定レベル以上の成果を与えることが可能である。

### 3、人工血管としての評価

1970年代に Dr. Sparkes が布製人工血管を比か組織内に挿入しておき、3ないし6カ月後に皮下組織から取り出してそれに絡まりついた組織と共に人工血管として使用する報告をした。この時同時に多くの臨床も行われたが、ダクロン繊維と人工血管に取り込まれた組織などとの離開のため、今

日では使用されなくなった。

この度の実験では Sparkes Graft よりは短時間で細胞や組織を絡ませることに成功したけれど、ここでポリエステル繊維の様な網目状の構造では容易に細胞が流されるため、人工血管の構造を改良し、細胞のトラップに適した人工血管と組み合わせることで腹腔内細胞を活用する人工血管に価値が出るかも知れない。

終わりに

本研究は細胞の本能的な性質を利用して血管を作らせる方法が可能なのかどうか、その研究の基礎的な興味と、展開と実用的な面との兼ね合いで、更に進められることが期待される考え方であると期待している。

1、人工血管の歴史と、現在抱えている問題点

一般的な Back Ground

今日使用されているような合成高分子材料製布で作成した管が人工血管として使用可能である事を実証したのは若い外科医者 Voorhees であった。彼は 1952 年に動物実験結果を報告した。第二次世界大戦時においても、朝鮮戦争時においても血管外傷者はあとをたたず、アメリカでは人工血管の開発が急務となっていたにもかかわらず、当時は水も漏らさないようなポリエチレンや塩化ビニール等の管、もしくはヒトや動物の血管をが臨床でごくわずか代用血管として使用されており、それらは血栓が付着して閉塞し易く、満足できるものではなかった。この様な時に、しかも単なる合成高分子繊維で作った布を丸めた、水が漏れるような管であっても、人工血管としては使用できると Voorhees が動物実験結果とはいえ、報告したことによって大きな話題となつたが、それでもそれを臨床で使用する医者は全くいなかった。しかしその後 1955 年に Edwards と Tapp が、蛇腹構造をつけると Flexibility が賦与できるので布製人工血管も扱いやすくなると報告し、布製人工血管への興味が持たれるようになった。そこでアメリカの血管外科学会、American Society for Vascular Surgery では Creech が Chairman となって Committee を作り、当時 DuPont 社を始めとして多くの化学関連会社が活発に開発を進めていた合成高分子材料をいろいろと調査した。そして生体内の劣化も少なく、生体内で異物反応、毒性、発癌性が少ないという事を主眼においてし、人工血管の素材としては Dacron と Teflon がすぐれていることを 1957 年に示した。この結果、ダクロン製とテフロン製人工血管が作られたが、結局は編んだり織ったりするときの取り扱い性と手術時の操作性にすぐれているダクロンが主として使用されることとなった。

Dacron 製人工血管が始めて臨床に用いられたのは 1958 年であり、世界的に有名な DeBakey 博士が世界で始めて腹部動脈瘤の患者に使用した。しかし世間ではまだその使用に対して慎重であった。例えば 1955 年にアインシュタイン博士が腹部動脈瘤に罹患していることが分かり、博士に最高の医療を施すべく多くの人が英知をしぼったが、布製人工血管は採用されず、結局、博士は 1960 年に動脈瘤が破裂して死亡した。

しかし布製人工血管の基礎研究は進み、1962 年頃になると、同じ様な布製人工血管でも、血液が漏れないような緻密に織った人工血管（低有孔性人工血管）では植え込み後に人工血管の内面を覆ってくる新生内膜が形成され難く、血液が漏れるぐらい緩く織った人工血管（高有孔性人工血管）の方が新生内膜の形成が早く、内膜の治癒性が優れていると、Wesolowski が動物実験の結果をもって示し、高有孔性人工血管の使用を推奨した。また高有孔性人工血管の使用方法として、植え込み直前に新鮮な血液を人工血管に振りかけて、人工血管の布に血栓組織を形成させることにより布の網目、織り目を目詰まりさせる操作、いわゆる Preclotting が行われるようになったが、Sauvage らは高有孔性人工血管に対して、Preclotting のやり方における独特の方法を報告した。その結果このような

Preclotting を行って高有孔性人工血管を使用することが一般的となった。

このような努力の結果、布製人工血管が臨床で多く使用されるようになってきた。しかし、植え込み後に線維素溶解現象等で Preclotting によって目詰まりさせていた血栓が溶け出して、思わぬ大出血をきたす例が相次いだことや、胸部大動脈では出血の危険性が高いこと、さらにヘパリンを使用する手術例が多くなって Preclotting 操作を確実に行ったにしても、出血の危険性からは逃れられない事などが明確となったため、植え込み長期間経過後における内面の内皮細胞による治癒を望むよりも、手術時における患者の安全性の方が重要であるとして、次第に低有孔性の人工血管が使用されるようになってきた。

折しも Burger 達がヒトにおいては、人工血管を植え込んで何年経過しようとも、内面を内皮細胞が覆うような、内膜治癒は期待できないのだ、と臨床例をかかげて報告したことから、どうせ内膜治癒は期待できないのなら、出血の危険性が無く、安全であった方が良くして、低有孔性の布製人工血管が特に胸部大動脈手術では主流となった。

しかし、内膜治癒を望む声は依然として根強いものがあり、さら低有孔性の人工血管がテント布の様に硬く緻密に織られていたこともあって取り扱い難かったことから、もう少し柔軟な人工血管がほしいという要求が高まり、このような要求を満足させるために中程度の有孔性の人工血管をコラーゲンやゼラチン等の生体内吸収性物質で一時的に目詰まりさせておくことで、Preclotting をせずとも植え込み時の出血をなくした人工血管、しかも柔軟であるような被覆型の人工血管の開発が進められた。しかしながらこの様な考え方が始まった 1965 年頃においては、まだコラーゲンの取り扱い、すなわち如何にして被覆させたコラーゲンを不溶化させるか、滅菌はいかにするか、被覆の過程における清潔環境の維持、コラーゲンやゼラチンの持つ柔軟性や湿潤性の維持、作成後の保存方法等、多くの問題が未解決であったために、生体内吸収性物質による被覆の人工血管の開発は一時的に 1980 年頃まで中断していた。しかしながら Meadox 社が Arizona 大学にいた Dr. Chvapil らの協力を得て、コラーゲン被覆人工血管の開発を再開し、10 年あまりの試験期間の後に臨床使用が可能な製品を開発した。ちょうどこの時、野一色はアリゾナ大学で客員教授として招聘されていて、2 年間にわたってその開発に協力し、人工血管の設計と動物実験および FDA への申請のための資料作りを行った経緯がある。

一方のテフロン製の人工血管は、それを繊維状態にすると繊維同士が滑りやすくなって、結局織り構造が型くずれし易いため、使用が敬遠されていた。しかしテフロンが新しい形態をもって人工血管分野に再登場した。それが e-PTFE graft である。e-PTFE 人工血管は 1972 年に試験研究が始まり、静脈系と、内径 4 ないし 8 mm 程度の細い動脈領域において使用可能であるとの事で注目を集めた。e-PTFE 人工血管は植え込み時に Preclotting をしなくても人工血管壁から出血することもなく、テフロンの特性である非粘着性も発揮されて血栓が付着しにくいこと、延伸によって無数の亀裂が入っており、そのために蛇腹構造を持たせなくとも屈曲性に優れていること。手術時の取り扱いも良好であること等の理由から、その後も順調に静脈系と、内径 4 ないし 8 mm 程度の細い動脈領域および人工