

the materials manufacturers' attitudes are being gradually changed.

Polyester fiber is very stable inside the human body and not prone to deterioration, and side effects like carcinogenicity, etc. have not occur in clinical cases of many polyester fiber products including sutures and heart valve pedestals, as well as in vascular grafts in more than one million cases. In a previous study Noishiki demonstrated that Dacron is a hydrophobic substance, so that when Dacron fibers are implanted, they become covered with a thin membrane, similar to the outer half of cell membrane, which is created by the host. The membrane is formed by a single layer of lecithin molecule in in vitro experiments. Therefore, Dacron fibers that are already insulated by the covering of the special host membrane at the molecular level will not show foreign body reaction if the fibers are not contaminated during fabrication. Accordingly, there does not seem to be a problem of safety, and there is good possibility that the makers will supply ultrafine fibers if we negotiate with them.

9. Others : FDA, MHW Approval, etc.

Since Toray Graft has already obtained FDA and MHW approval in the U.S. and in Japan, approval for new grafts fabricated from ultrafine polyester fibers does not seem to be difficulty in the application with 510K.

## 人工血管

横浜市立大学医学部外科学第一講座

野一色泰晴

Keywords: 人工血管、ポリエステル繊維、内皮細胞、血管外科、Carrel A

### 1. 人工血管開発の歴史

血管からの出血を結紮によって止血することはAD303年、AD1080年、に記載が残っている。またAD1552年には近代外科学の父と言われるAmbroise Pareも結紮止血をおこなっている。しかし人工物を血管に入れたのは1897年Nitzeが血管吻合のために象牙の管を挿入したのが初めてであろう。1900年Payrは血管内で溶ける期待してマグネシウムの管を用い、3日後にその開存を確認している。しかし実際に人工血管を外科手術で治療を目的として使用したのは1906年Goyanesによる自家静脈の動脈への移植である。したがって今から100年前の19世紀には血管を縫合することも不可能であった。このころ人工血管開発に影響を与えた衝撃的な事件が発生した。

1884年フランス共和国大統領Marie Francois Sadi Caronotがイタリア人の無政府主義者Santo Caserioによって腹部を刺された。大統領は緊急開腹術を受けたが傷は門脈に達していた。1881年Billrothによって胃癌の手術法が開発され、乳ガンの手術法なども一般化しつつあった当時であったが、損傷した血管の再建ができなかったために大統領は出血のために死亡した。この事件は後に人工血管の開発のみならず血管外科の発展に尽くし、1912年にノーベル賞を受賞する事となったAlexis Carrelに少なからぬ影響を与えた。

Carrelは1900年にリヨン医科大学に入学し、この事件後、血管外科手術の必要性を痛感した。そして血管の取り扱い、吻合方法などを工夫し理論的説明付けをして1906年には血管外科手術における基本的手技を確立した(1)。彼は人工血管の製作にも着手し、1902年、カラメル管を用いている。これは血管内で消失することを期待していた。1912年にはガラス管やアルミニウム管をパラフィンコーティングして動物に植え込んだ。しかしこれらの人工血管は全て不成功に終わった(2)。その後象牙やゴムで人工血管を作成したが、これも全て失敗した。彼は人工物のほかに遊離した自己の動、静脈片を人工血管として使用し成功を収めたが、自家移植片には限りのあることを認識しており、1908年、摂氏4度に動脈を保存する事を推奨し、実験的な血管銀行の設立にも興味を持っていた。Carrelと同時代にErnst JegerやGoyanes、Lexerらによって遊離自家静脈片のバイパス手術が行われている(3-5)。その後最初のヒトからヒトへの動脈移植が1910年にPirovanoによって行われたが、成功せず、この動脈移植自体に疑問が投げかけられたこともあって動、静脈片を人工血管として使用することは40年間興味の対象から離れてしまった。

硬い管を用いる研究はCarrelの報告後も続いた。1917年Tuffierは銀製の管をパラフィンコーティングしたが、これも失敗した。この銀製チューブは第一次大戦時に臨床で使用されたが、あくまで

一時的シャントとしての使用であった。第二次大戦時にはBlakemoreはバイタリウムチューブを、1949年Donovannはポリエチレンチューブを、Moreも1950年ポリエチレンチューブを用いたがすべて失敗した。

保存動脈を用いる研究はGrossによって1949年摂氏4度に保存する方法で再開された(6)が4-6週間が限度であった。またMarrangoniらによって凍結乾燥技術がこの領域に導入された(7)が実用化にはいたらなかった。しかし1951年木本らはアルコール処理した山羊の動脈を腹部大動脈瘤患者に移植し(8)、結果的に8年以上の成功を得た。これはエポックメイキングな出来事であった。今日でも化学処理によって蛋白を変性させ、抗原性を低下させ、生体内での劣化を防ぐ方法としてグルタルアルデヒド処理等が使用されているが、アルコール処理法は強度賦与では不十分なものの、毒性は少なく優れた方法であった。

一方人工物を用いる研究においても時を同じくして画期的な工夫が行われた。1952年若いレジデントであったVoorheesが合成高分子繊維のヴィニオンNで作成した布製のチューブが人工血管として使用可能であると報告した(9)。これまでの考え方と全く異なる取り組みであったことと各種合成高分子繊維が相次いで作られ始めた時期と一致していたため、アイバロン、オーロン、テフロン、ナイロン、ダクロンと相次いで種々の合成高分子繊維が用いられた(10-13)。そして、Creechを委員長とするアメリカ外科学会の委員会がその当時合成されていたいくつかの材料を動物実験をもとに評価した結果、ダクロンとテフロンが異物反応もなければ生体内の劣化も少ないとして人工血管用素材として推奨し(14)、今日でもそれらが用いられている。人工血管創成期の記録は日本の状況も含めて和田らによってまとめられた記載があり(15)、VoorheesおよびCallowらも人工血管の始まりについてまとめている(16, 17)。

## 2. 人工血管の材料学的特性と構造

現在臨床で使用されている人工血管はダクロン(DuPont社製ポリエステル、日本での商品名はテトロン)繊維で織ったり編んだりした布製の管と、テフロンを急激に延伸して無数の微細な亀裂を生じさせることによって多孔質としたePTFE管である。前者は1955年Edwards及びTappによって開発された蛇腹加工(クリンピング)による屈曲性を賦与させる技術が導入されて(10, 13)一般的となった。その後編み方織り方が工夫され、Wesolovskiによって布の編み目の大きい方が人工血管の内面治癒に有利であるというPorosityの理論が提唱され(18)、基本的構造が決定された。

ダクロン繊維については「二重膜である細胞膜の半分の一重膜でダクロン繊維が覆われることによって分子レベルで生体に受け入れられる」という機序が1976年著者によって明らかにされた(19)。そのほか極めて細い繊維を用いると細胞が積極的に寄り添うように付着してくる現象(形態追従効果)によって、人工血管の生体細胞に対する親和性が飛躍的に向上することなどが著者によって明らかにされ、超極細ポリエステル繊維が人工血管素材として導入された(20)。ポリエステル繊維は生体内で異物反応とか細胞毒性を示さないことがこのように明らかになった後、カナダのKingらは生体

内でのダクロン繊維の劣化は19年間で10%以下であることを明らかにした。ポリエステル人工血管は強度的に安全であることから内径6mmから30mmまでの大動脈を含めた広い範囲の血行再建術で使用されている。

テフロン製人工血管については、当初はテフロン繊維で織られた布製人工血管が使用されたが、テフロンの滑りやすい性質から布の切断端がほつれやすく、血管吻合時に不便であることから使用されなくなった。しかしテフロン管を急激に延伸して無数の微細な亀裂を生じさせることによって多孔質とした電線の被覆用に用いられていたePTFE管が人工血管としても利用できることが1972年に報告されて以来(21, 22)、人工血管としての強度、管空維持するための工夫が加えられ、臨床で広く使用されるようになった。テフロンはその特異な疎水性と非粘着性によって血栓の初期付着が少ないため内径4ないし8mm程度の末梢領域での血行再建術に用いられている。しかしそれ以上に細い領域では人工血管は血栓性閉塞の危険性が高く、使用されていない。

布製人工血管はその繊維間隙からの漏血防止のため、使用直前に血液に浸して血餅を付着させて繊維間隙を目詰まりさせる操作、いわゆるプレクローティングを行うが、抗凝固療法を併用する場合にはそれでも出血の危険性があるため、コラーゲンやゼラチン等で前もって目詰まりさせておく方法が提唱され(23, 24)、最近その型の被覆人工血管が広く使用されつつある。現在コラーゲン等の汚れの問題やそれらを不溶化しておくためのグルタルアルデヒドやフォルムアルデヒド等の細胞毒性による副作用が報告されている(25-27)にも関わらず、出血の危険性を避けることを考えて、その使用範囲は広がりつつある。

最近の外科手術の傾向として、Minimum invasive surgeryに向かいつつあるが、人工血管植え込み術においてもカテーテルを用いて、血管内に人工血管を挿入し、植え込むべき部位まで搬入し、そこでカテーテルから人工血管を押し出してステントと称するステンレス製のバネで固定するという方法が広がりつつある(28, 29)。ステントは歯に種々の詰め物をして固定するのに工夫をこらした歯科医のDr. Stentの名をとったものである。現在ステントの構造、挿入方法等の工夫をこらすことによって広まりつつあり、手術症例によってはこの方法は極めて効果的である。

### 3. 人工血管の機能とその臨床応用

現在臨床で使用されている人工血管は胸部大動脈瘤、腹部大動脈瘤、大動脈解離、大動脈狭窄、大動脈閉塞、四肢の末梢動脈閉塞などの少なくとも内径6mm以上の比較的太い動脈領域と、大静脈のような太い静脈領域、門脈、肺動脈基始部等で安全に用いられている。その理由は合成高分子材料で作成した人工血管を植え込んでもその内面を患者自身の内皮細胞は覆わず、内面は血栓がいつまでも付着した治癒不全状態のままだが、太い領域では開存を維持できることによる。

しかしながら細い血管領域では血栓のために人工血管は閉塞する。ここでいかに血栓の付着を阻止するため、また付着した血栓の溶解のため血栓溶解療法をしようとも血栓の溶解と付着を繰り返す悪循環状態になり、決して内面治癒は進まない血管壁の難治性潰瘍状態を維持してしまう(30, 31)。従

って小口径人工血管は現時点では臨床には使用されていない。この解決のため抗血栓性材料を用いた人工血管の開発が進められているが、まだ確実な方法は開発されていない。

そのほか、人工腎臓使用時に血液を体外に引き出し、血液浄化の後に体内に返すための太い注射針の刺せる人工血管が使用されている。現在この目的のためには ePTFE 人工血管が使用されているが、ePTFE 人工血管の特性として、穿刺孔が開存したままとなって、注射針抜去後に出血が持続することが多い。そのため、伸縮性を人工血管に賦与する目的でポリウレタンを被覆した人工血管が臨床で利用されはじめた。

#### 4. 生体内環境における変化、溶出物の生体内動態

前述したとおり、ダクロン繊維の生体内劣化は極めて少なく、人工血管が生体内に永久的に植え込まれるとして、患者の術後の平均余命を考えるとそれは無視できる範囲内である。一方テフロンにおいては更に安定したポリマーであることから、生体内での人工血管基材の変化については考える必要はなく、これらからの溶出物が出る可能性もない。しかし理論的にそうであってもダクロン繊維を強い洗剤で洗浄すると、洗剤は繊維内に吸着されて、生体内への植え込み後年余にわたり異物反応を示すこともある。したがって、製造過程に於いて十分な配慮をすればこのことは防げる性質のものである。

コラーゲンやゼラチン等を被覆した人工血管においては、これらの被覆材が生体内で吸収されることが前提となっており、その生体内での動態は興味的であるが、可能な限り無理なく吸収され通常の代謝経路に沿って分解される。そして特殊反応を惹起させないように現在ではコラーゲン、ゼラチン、アルブミン等が使用されている。ただし、これらは製造過程に於いて一度汚染されるともはや汚染物質を取り除くことが不可能であるため、汚染による異物反応が問題視されたこともある。またこれらを人工血管基材に付着させ、不溶化させておくのにグルタルアルデヒドやフォルムアルデヒドなどの化学薬品が使用されていて、その細胞毒性(32)が今日問題となっている。これらについては、この問題を考慮した人工血管の新たな設計が求められている。

#### 5. 副作用および合併症

人工血管植え込みに伴う副作用、合併症などは異物であるはずの人工物が植え込まれているにも関わらず少ない。それは著者が明らかにしたように、ダクロン繊維が分子レベルで生体親和性を獲得しているからであろう。テフロンにおいてはこのような研究は行われていないが、やはり同様の状況が考えられる。

しかし前述したように、コラーゲンやゼラチン等を被覆した人工血管においては被覆材の汚染や化学薬品の細胞毒性などが副作用として出ており(24-26)、臨床的には植え込み後持続する発熱や人工血管周囲の滲出物貯留、炎症反応などが問題視されている。これらの多くは植え込み後3週間程度で被覆物の吸収とともに解消され少しの治癒遅延ですむが、高齢者や栄養状態の悪い患者、抗凝固療法

を併用している患者ではその副作用が重く響いて、時には生命の危険性をも脅かすこともある。

人工血管植え込み手術に伴う合併症としては手術操作によって血管と併走する神経線維を傷害したり、リンパ管を傷つけてリンパ漏を生じたり、副損傷の産物として各種神経障害、腸管癒着、皮膚癬痕形成などが挙げられる。ただしこれらは手術方法の改善で軽減しうるものである。

人工血管植え込みに伴う感染は大きな問題としていつも臨床家の頭の中にある。異物である人工血管に感染が生じると、これを核として細菌巣が形成されていつまでたっても治癒しないばかりか、人工物を排除しようとする生体反応も加わって非常に危険な状況に陥ることもある(33-36)。そのため植え込まれた人工血管を切除せざるを得ない感染症例が時にはみられる。人工血管の感染は手術直後に多発する。これらの症例では手術中の何らかの細菌感染が考えられる。しかし手術後何年も経過した後に感染を生じることもある。この項では詳細に述べなかったが人工血管内面は一般には新生内膜で覆われにくく、いつまでも新鮮な血栓組織が内面を覆っていれば、そこには流血中に細菌があれば付着しやすく、感染巣を形成させやすいという人工血管の構造上の欠点に起因する。

人工腎臓用の内シャント用人工血管は1週間に2ないし3回の体外からの穿刺を受けるため、感染の機会が多く、つねに感染が問題視されている。そのため感染に強い人工血管の開発も求められている。

人工血管植え込み上における禁忌としては炎症性疾患がある。細菌性、非細菌性の炎症にかかわらず人工血管の植え込み部分に炎症が存在することは人工血管にとってとても不利であるため、可能な限りさけることが望ましい。ただし慢性の血管炎においてはこのような配慮をしつつ人工血管の植え込みをせざるを得ないこともあり、今後の課題として残されている。

最近使用頻度の高まってきたステント人工血管についてはまだ多くの資料は集まっていないため論評し難いところであるが、人工血管挿入に伴う血管損傷、人工血管の血管外脱出、人工血管挿入後の人工血管の位置のずれ、人工血管壁を通しての血液の漏れ、人工血管と生体血管の間隙を通しての血液の漏れ等の報告がみられる(37-39)。これらは比較的挿入後早期の合併症であるが今後長期観察下における合併症も出てくることが考えられることから、この型の人工血管は気になる存在である。

## 6. 今後の動向

人工血管にはこれまで述べたように感染に弱いとか、血栓が付着しやすいとか、内面に新生内膜がはりにくい等と入った問題点があり、ステント人工血管では未知の要素が多くあって今後はこれらを解決して行かねばならない。被覆人工血管においては問題点が明らかであるのですぐにでも解決可能であろうと思われる。この項では詳述しなかったが、人工血管吻合部に於け内膜肥厚も問題視されている。特に人工腎臓用の内シャントに用いられた ePTFE 人工血管ではそれが大きな問題とされている。吻合部の問題は人工血管の材質の問題から血管壁との柔軟性の違い、血行流体力学的問題点、外科手術手技の問題、人工血管内での血液破壊の問題、生体細胞と人工血管壁との親和性、付着性、そして血栓阻止性などの兼ね合いもあって複雑な構図の中で解決方法を模索しているのが現状である。

乳幼児用の人工血管の開発も急務となっている。新生児は生直後約 3Kg の体重であるが、成長すると 20 倍の 60Kg となる。すなわち生直後に人工血管を植え込むと成長に伴って相対的に 20 分の 1 に縮小するため機能不全となる。人の成長は時間の関数に対しては直線的でないことから、これに合わせた成長可能な人工血管(40)の開発が必要である。

その他小口径用の人工血管の開発も未解決のままである。急増する冠動脈閉塞性疾患に対して使用可能な人工血管が存在しない。小口径人工血管では内面での血栓付着を阻止しただけでは問題が解決しないことはこれまでに明らかにされてきたために最近では積極的に内皮細胞の被覆を促す方向に研究が進んでいる。その手段として内皮細胞移植、組織片移植、ハイブリット化、ティッシュエンジニアリング的取り組み、遺伝子工学的手法、サイトカイン工学の利用等が考えられており、今後の展開が期待されている。

#### 文献

1. Carrel A: The surgery of blood vessels. Bull Johns hopk hosp 19:18-27, 1906.
2. Carrel A.: Results of permanent intubation of the thoracic aorta. Surg Gynec Obstet 15:245-248, 1912.
3. Goyanes J: Nuevos Trabajos de cirugía vascular substitucion plastica de las venase arterioplastica venosa, aplicada cunio nuevo metodo al tramiento de los aneurismos. Siglo Med 53:543-561, 1906.
4. Jeger E: Die Chirurgie der Blutgefasse und des Herzens. Hirschwald, Berlin. 1913.
5. Lexer E: Die ideale Operation des arteriellen und arteriovenosen Aneurysmas. Arch Klin Chir 83:459-463, 1907.
6. Gross RE, Bill AH, Peirce EC: Methods for preservation and transplantation of arterial grafts. Observatrion of arterial grafts in dogs, report of transplantation of preserved arterial grafts in human cases. Surg Gynec Obstet 88:689-701, 1948.
7. Marrangoni AG, Cecchini LP: Homotransplantation of arterial segments preserved by the freeze drying methods. Ann Surg 134:977-983, 1951.
8. 木本誠二、杉江三郎、角田正彦、鍵谷徳男、和田達雄、松井澄：アルコール固定動脈片による動脈移植術、臨床外科 7:111-114, 1952.
9. Voorhees AB Jr, Jaretzki A, Blakemore AH: The use of tubes constructed from vinyon 'N' cloth in bridging arterial defects. A preliminary report. Ann Surg 135:332-336, 1952.
10. Edwards WS, Tapp JS: Chemically treated nylon tubes as arterial grafts. Surg 38:61-70, 1955.
11. Hufnagel CA, Rabil P: Replacement of arterial segments, utilizing flexible orlon prosthesis. Arch Surg 70:105-109, 1955.

12. DeBakey ME, Cooley DA, Crawford E, Morris GC: The clinical application of a new flexible knitted dacron arterial substitute. Arch Surg 77:713-724, 1958.
13. Edwards WS: Progress in synthetic graft development. An Improved crimped graft of teflon. Surg 45:298-309, 1959.
14. Creech O Jr, Deterling RA Jr, Edwards WS, Julian OC, Linton RR, Shmacker H Jr: Vascular prostheses: Report of the committee for the study of vascular prostheses of the society for vascular surgery. 41:62-75, 1957.
15. 和田達雄、横田徳男、菱田泰治、石田幸三、鈴木昭彦、丸山雄：合成代用血管の研究. 呼吸と循環 7:1083-1093, 1959.
16. Voorhees AB: How it all began. Vascular graft. Sawyer PN and Kaplitt MJ (eds) pp3-4 (1978).
17. Callow AD: Historical development of vascular grafts. Vascular graft. Sawyer PN and Kaplitt MJ (eds) pp5-22 (1978).
18. Wesolowski SA, Fries CC, Karlson KE, DeBakey ME, Sawyer PN: Porosity: Primary determinant of ultimate fate of synthetic vascular grafts. Surg 50:91-96, 1961.
19. Noishiki Y: Biochemical response to Dacron vascular prosthesis. J Biomed Mater Res 10:759-768, 1976.
20. Noishiki Y: Evaluation of a new vascular prosthesis fabricated from ultrafine polyester fiber. Trans ASAIO 32:309-314, 1984.
21. 松本博司、布施勝生、山本光伸、長谷川嗣夫、三枝正裕、上井巖：Porous polytetrafluoroethylene の人工血管への応用、第1報：末梢動脈への応用. 人工臓器、1 : 44-47, 1972.
22. Soyer T, Lempinen M, Cooper P, Norton L, Eisenman B: A new venous prosthesis. Surg 72:864-872, 1972.
23. Bascon JU: Gelatin sealing to prevent blood loss from knitted arterial graft. Surg 50:504-512, 1961.
24. Humphries AW, Hawk WA, Cuthbertson AN: Arterial prosthesis of collagen-impregnated dacron tube. Surg 50:947-954, 1961.
25. Yamamo K, Noishiki Y, Matsumoto A: Unusual inflammatory responses around a collagen-impregnated vascular prosthesis. Artif Organs 17:1010-1016, 1973.
26. Norgen L, Holtas S, Persson G, Ribbe E, Saxne T, Thorne J: Immune response to collagen impregnated Dacron double velour grafts for aortic and aorto-femoral reconstructions. Eur J Vasc Surg 4:379-384, 1990.
27. Angelini GD, Witsenburg M, Ten Kate FJW, Hiddema PAE, Quaegebeur JM: Severe stenotic

scar constructure of the Microvel Hemashield reght-side extracardiac conduit. *Ann Thorac Surg* 48:714-716, 1989.

28. Parodi JC, Palmaz JC, Barome HD: Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysmas. *Ann VASC SURG* 5:491-499, 1991.

29. McGahan TJ, Berry GA, McGahan SL, White GH, Yu W, May J: Results of autopsy 7 months after successful endoluminal treatemnt of an infrarenal abdominal aortic aneurysm. *J Endovasc Surg* 2:348-355, 1995.

30. Berger K, Sauvage LR, Rao AM, Wood SJ: Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg* 175:118-127, 1972.

31. Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A: The vicious cycle of nonhealing neointima in fabric vascular prsotheses *Artif Organs* 19:7-16, 1995.

32. Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J: Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* 14:753-764, 1980.

33. Hoffert PW, Gensler S, Haimovici H: Infection complicating arterial grafts. Personal experience with 12 cases and review of the literature. *Arch Surg* 90:427-435, 1965.

34. Javid H, Julian OC, Dye WS, Hunter JA: Complication of abdominal aortic grafts. *Arch Surg* 85:650-662, 1962.

35. DeBakey ME, Crawford ES, Cooley DA, Morris GC Jr, Royster TS, Abbott WP: Aneurysm of abdominal aorta, analysis of results of graft replacement therapy one to eleven years after operation. *Ann Surg* 160:623-639, 1964.

36. 和田達雄: 代用血管移植手術の予後. *日本臨床* 5:698-702, 1959.

37. White GH, Yu W, May J, Chaufour X, Stephen MS: Endoleak as a complication of endoluminal grafting of abdominal aortic aneurysms: Classification, incidence, diagnosis, and management. *J Endovasc Surg* 4:152-168, 1997.

38. Mialhe C, Becquemin JP, Amicabile C: Stentor endoprosthesis for aortic diseases treatment: critical analysis of early complications. *European Society for Vascular Surgery XI Annual Meeting, Abstract pp 68, Sept 1997, Lisbon, Portugal.*

39. Gilling-Smith GL, Cuypers P, Buth J, Harris PL: EWndovascular repair of abdominsl aortic aneurysms: Results of european multicentre study. *European Society for Vascular Surgery XI Annual Meeting, Abstract pp 108, Sept 1997, Lisbon, Portugal.*

40. Noishiki Y, Yamane Y, Furuse M, Miyata T: Development of a growablr vascular graft. *Trans ASAI0* 34:308-313, 1988.

この度は幼弱で活性度の高い細胞を集める方法を考案した。この考え方に沿っておこなった実験では、確かに、遊走能、分裂能の高い細胞を集めることが可能となった。我々は不謹慎にも、この小さな装置を「細胞ホイホイ」というあだ名をつけて呼んでいるが、たしかに、その語源と同じような感じで、動きの早い細胞を集めることができた。この様な細胞を集めることは、組織工学的な手法で組織や器官を生体内で作るときには、この装置がそのまま使えるとは思わないが、この modification の装置とか、あるいはこの考え方が活かされて、結局大きな役割を発揮するようになるのではないかと我々は考えている。その意味合いから、おこがましくも個々に紹介する。

現在世界的な研究の流れとしては ES 細胞を用いて細胞組み込み型人工臓器を作成する方法が検討されている。ES 細胞は胎仔の身体を構成する幹細胞であり、あらゆる臓器へも分化する可能性を持っている細胞である。従って、その技術が確立されれば夢の様な臓器が人工的に作りうることとなる。しかしながらそれを実現させるにはあまりにも大きな未解決な問題が多く残されている。この様な現状を踏まえて、我々は成長した身体の中にもあるといわれる体組織内の幹細胞もしくは幹細胞に近い細胞分裂能、細胞遊走能を持つ活性度の高い細胞を用いて血管形成の基礎研究を行った。

### 材料と方法

#### 1、幼弱な細胞を収集するための小道具の作成

内径 10 ないし 12 mm のシリコン製の長さ約 5 cm のペンローズドレーンを用意した。次にそれに 1 mm の孔を開けるパンチャーにて無数の孔を開けた。これでもって細胞を集めるためのケージとした。

つぎに 2% の牛の真皮から採取したアテロコラーゲン溶液を凍結乾燥してアテロコラーゲンのスポンジを作成した。このコラーゲンの主成分は 1 型コラーゲンである。次にコラーゲンスポンジを熱架橋に世って不溶化した、架橋条件は真空化で 135 度 48 時間である。この様にして作成したスポンジを幅 1 cm 長さ 3 cm 厚み 5 mm に切り出し、前述の多孔質となったペンローズドレーンの中に挿入し、その両端を止めてスポンジが外に出ないようにした。これが細胞を集めるための小道具である。

#### 2、幼弱な細胞を収集する方法、動物実験

作成した小道具をエチレンオキシドガス滅菌し、清潔操作下に、家兔の、1. 皮下組織内、2. 壁側腹表面、3. 脾臓組織表面、4. 肝組織表面、5. 腹腔内に挿入した。これらの試料をそれぞれの部位に固定する必要がある場合には、その固定にポリエステルマルチフィラメント糸を用いた。

挿入期間は 4 週間であった。

#### 3、資料の解析

試験期間が経過すると、試料は周囲に付着した試料と共に切除し、肉眼的、光学顕微鏡的に観察し

た。なを、光顕的観察においては、HE 染色の他に PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 染色を行った。(その他、いくつかの増殖細胞を示す特殊染色も行ったが、使用した動物が家兎であり、その交叉免疫性から、PCNA 以外の増殖細胞を示す抗体を用いた特殊染色では染め出すことができなかったため、ここでは PCNA 染色結果のみを示す。

#### 4、肉眼的解析結果

各資料は生体内にあって、排除されることなく周囲組織内に付着していた。コラーゲンスポンジ内には組織が侵入し、毛細血管の侵入すら見られた。すなわち、活発な細胞活動がその場で行われ、エネルギーを必要としている状態にあることが分かった。(活版網細胞がたくさんあると思われます)。皮下組織内、脾臓組織表面、肝組織表面、腹腔内、など、部位の違いは少なく肉眼的には同様の結果であった。

#### 5、光学顕微鏡による観察

挿入場所によってそれぞれの組織には詳細な観察では異なった現象が見られたが、基本的には共通して次の現象が見られた。すなわち、コラーゲンスポンジの周囲に無数の細胞が侵入していた。これらの細胞はマクローファージ、線維芽細胞、異物性巨細胞、リンパ球等が多いが、その他一見して分類しにくい様な細胞も多くあった。しかしながら、脾臓や肝臓の表面に置いた試料においても、それらの中には一見して脾臓や肝臓に特異と思われる細胞(例えば肝実質細胞)は見られなかった。分裂期にあって、形態が比較的丸くなっているような細胞は多く見られた。

#### 考察

最近、骨髄内で間葉系の幹細胞が単離されたとの報告がある。また神経系の幹細胞も単離されている。このような手法を用いて、本研究で得られた試料を解析すれば、本研究で得られたコラーゲンスポンジ内に侵入してきた細胞の中に幹細胞類似の細胞が多くもられたが、それらが幹細胞であるとの同定はできなかった。

これらの細胞の種類解析であるが、これらの解析は現在進行中であり、まだ結論は言えないが、少なくとも、肝実質細胞などが直接遊走して出てくることなさそうである。しかし脾臓の表面からは、多くの細胞が連続的に遊走してくる様子が得られている。これらの細胞は脾臓の実質細胞であるのかどうか、まだ判別ができていないが、脾臓から多くの細胞が直接出ていることは明らかである。

これらの郵送しつつある細胞は、ほとんど全て PCNA 染色には陽性とならない。つまり、遊走期にある細胞は余り分裂をしないようである。あるいは活発な細胞分裂をする細胞は同時には活発な遊走を行わないのかも知れない。

しかしながら、コラーゲンスポンジの間隙に至ったときには PCNA 染色に陽性となっている。すなわち、適切なマトリックスに到達したときに初めて細胞分裂を行い始めるのかも知れない。PCNA 染色陽性細胞はほとんど全て、コラーゲンスポンジの繊維の間隙などに見られたことがそれを物語っている。

これらの PCNA 陽性細胞のなかに幹細胞が含まれているだろうか。この断定はできていない。しか

しながら、細胞の種類は分からないにしても、これらの中に何らかの幹細胞が含まれていると考えても不思議ではない。その可能性大である。

#### 結論

単純な方法で、とにかく好奇心の旺盛な細胞を集めることに成功した、それらの細胞の中には、細胞分裂の旺盛な細胞も多く混在していました。血液内の幹細胞を集める方法が確立した後に、それに関する研究が進んだように、本研究でも、もう少し改良すれば、多くの研究に貢献できるかも知れない。

## ハイブリッド型人工血管の開発

横浜市立大学医学部外科学第一講座 野一色泰晴

今日は人工血管開発の初期の頃のお話と、最近最も注目されておりますハイブリッド型人工血管のお話をいたします。

人工血管は動脈が膨らんで、破れそうになった動脈瘤の治療や、動脈が狭くなって、血液を送ることができなくなった、動脈閉塞の治療に広く用いられておりますが、昭和30年以前には、それは不可能なことでありました。

古い話をしますと、人工血管の開発には一つの事件がきっかけとなっております。今からちょうど100年余り前の、1894年、フランスの大統領Marie Francois Sadi Carnotが、イタリア人の無政府主義者Santo Caserio、によって刺される事件が起きました。大統領は直ちに開腹手術を受けましたが、お腹の中の門脈という血管が傷ついておりました。しかし当時だけひとり血管を縫うことも、勿論人工血管で繋ぐ事もできませんでしたので、みんなが手をこまねいているうちに、大統領は出血死、してしまいました。

この事件のあと、血管の手術方法の開発と、人工血管の開発が真剣に考えられるようになりましたが、試行錯誤の連続でありました。しかし当時フランスの大学を卒業したばかりの、Alexis Carrel という、若いお医者さんがこの研究を精力的に進め、血管外科の基本的な手技を確立させました。彼はその成果が認められて、1912年にノーベル医学賞を受賞いたしました。それと平行して行っていた人工血管の開発では、象牙の管やアルミニウム管、ガラス管など、ありとあらゆる物を人工血管として試し、全て失敗に終わっております。当時は血液が身体の外に出たり、人工物に触れると、なぜ固まってしまうのかといった理由も分かっておりませんでしたので、無理のないことだったかも知れません。その後、第二次世界大戦のあとまで、人工血管の必要性は日増しに高まるものの、ポリエチレンチューブで一時的に繋ぐか、または保存しておいた、動物やヒトの血管を使用していたにすぎませんでした。

したがって当時は、動脈瘤であると診断がついても、治療法がありませんでした。例えば、今世紀最大の科学者の一人とされております、アインシュタイン博士は1949年、腹部大動脈に動脈瘤があると診断されました。主治医は博士に、死亡した人の動脈をもらってきて、それを移植できるかも知れない、と説明しましたが、博士は「自分はこれまで十分に生きてきました。今更わざわざそのようなことをする必要はありません」といって断り、6年後の1955年、つまり昭和30年に動脈瘤が破裂して、亡くなられております。当時は人工衛星の打ち上げが計画され、宇宙時代の幕開けであり、

医学の世界では腎臓移植がすでに始まっていました。しかし人工血管開発の分野は大変遅れておりました。

この様な情けない状況でありましたが、動物実験では新しい光がさしこんでいました。と言いますのは Voorhees と言う、アメリカの若い外科医者が、布を丸めて管を作り、動物実験で、それが人工血管として使える事を証明したのであります。当時は、水を流しても漏れることのないチューブが、人工血管として考えられていましたので、布切れで人工血管ができたことに、みんなとても驚きました。そしてこの話が伝わると、ありとあらゆる合成繊維の布が人工血管として試みられ、その結果、1960年、つまり昭和35年頃から、ポリエステル繊維で作られた布製人工血管が、臨床で使えるようになりました。現在では、胸部や腹部の大動脈、及び大腿部の、太さ6mmから30mm程度の、動脈領域に、人工血管は使われております。

人工血管はこのように、生まれてまだ40年足らずであります。この歴史の新しさにも関わらず、世界中で多くのヒトの命を救ってきました。そして今日では心臓の冠動脈が閉塞した時などにも使用できる、冠動脈バイパス用の、3mmより細い人工血管の開発が、求められるようになりました。しかしこれがなかなかの難問で、世界中で研究が続けられていますが、突破口が見いだせず今日に至っております。

人工血管を植え込みますと、内皮細胞という、天然の血管の内面にあつて、血液を固まらせない仕事をしている特殊な細胞が、細胞分裂を繰り返して、次第に人工血管の内面を覆うことで、天然の血管壁と同じように血栓がつかなくなると、期待されておりました。しかし実際には、内皮細胞には分裂の限界があつて、期待通りには進みません。

内皮細胞は特殊で、高級な細胞ですので、70回ほど細胞分裂を繰り返しますと、老化現象によって細胞分裂ができなくなります。そのため人工血管のごく一部しか、内皮細胞は覆うことができず、それ以外の内面には血栓が付着して、それが厚くなったり、剥がれたり、さらに新しい血栓が付着するなど、落ちつかない状態が続くこととなります。細い人工血管では、この血栓によって閉塞してしまうこともありますので、血液が固まらないようにする薬を、一生の間、飲み続けたいといけません。しかし長い間そのような薬を使っていると、その副作用として、歯ぐきから出血しやすくなったり、怪我をすると出血が止まらなくなります。また、脳出血でも起こすと致命的な状態になったりいたします。

この問題を解決するには、人工血管内面に、積極的に内皮細胞を移植するとか、内皮細胞を初めから人工血管に組み込んでおく、という考え方が当然持ち上がって参ります。これが話題のハイブリッド型人工血管であります。

ハイブリッド、というのは、動植物では雑種とか混血を意味しますし、物では、異質の要素からなる合成物を、意味します。最近では環境問題から、電気モーターとガソリンエンジンとを組み合わせたハイブリッドカーが、話題になっておりますように、人工血管におきましても、合成高分子材料と、生きている細胞との組み合わせが、ハイブリッド型人工血管と呼ばれて、話題となっております。

ハイブリッド型人工血管の研究は、1979年にアメリカで始まり、細胞培養技術を用いて内皮細胞を身体の外で大量に培養して、それを人工血管の壁に張り付ける、という手段で、精力的に行われました。しかしせっかく大量の内皮細胞を付着させたのに、体の中に植え込みますと、ほとんどの細胞が激しい動脈の血流によって剥がされてしまいますので、この研究は次第に下火となってしまいました。

しかしこれらの研究の中であって、世界中で三つのグループが良い結果を示しました。ひとつは大阪にあります国立循環器病センターの松田武久先生のグループであります。松田先生は細胞増殖のための足場、これはマトリックスと呼ばれていますが、そのマトリックスに工夫をこらして、3種類の細胞が重なって存在するハイブリッド状態を作りました。つまり、マトリックスの内面に内皮細胞を、そしてその下に平滑筋細胞層を、そしてさらに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、天然の血管壁に良く似た構造を、体の外で、細胞培養の技術を用いて作りました。しかしながら、これには余りにも高度な技術と、長い時間が必要ですので、臨床には使われておりません。

第二のグループはアメリカの、アリゾナ大学のWilliams先生の研究グループであります。Williams先生は、皮下脂肪組織から内皮細胞だけを純粋に分離して人工血管に絡ませて、動物に植え込みました。すると人工血管のすべての内面が、内皮細胞によって覆われたと言うのです。この方法は手術中に内皮細胞を分離せねばなりませんので、技術的に難しく、時間もかかりますので、実用化には至りませんでした。内皮細胞だけを移植した他のグループはすべて失敗したのに、なぜWilliams先生だけが成功したのか、私にはとても興味がありました。

ある時私はWilliams先生の講演を聴く機会があつて、先生の示すスライドをじっくり見せてもらいました。すると彼のスライドで示すところの内皮細胞のなかには、無数の平滑筋細胞や線維芽細胞が混ざっていることを私はみつけました。異種類の細胞が混入していたことは、細胞におけるハイブリッド状態となつて、期せずして成功を呼び込むことになったと私は考えております。

さて、ハイブリッド型人工血管の開発に関して成功を収めた、第三のグループは、私どもであります。私どもは人工血管の内面が、長期間経過しても内皮細胞に覆われない状態を、血管壁の難治性潰瘍、とみなしました。その様に考えますと、皮膚に於ける難治性潰瘍では、皮膚を切り刻んで、潰瘍部分に播くことで、潰瘍をなおす事実が参考になります。また、いつまでたっても治らない骨折では、骨を細かく砕いて骨折部に詰めますと、骨折がなおる、といった現象があります。そこで血管壁における難治性潰瘍にも、この原理が応用できるのではないかと、考えられます。そのようなことから、私どもは血管を細かく切り刻んで、人工血管に播いてみました。するとそこから内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞が、それぞれ活発に出てきて、わずか2週間で新しいハイブリッド状態の血管壁が完成し、それ以降、ずっと安定した状態を保ったのであります。この方法は、単に組織を切り刻んで人工血管に絡める、約10分間の作業ですから、これまでに50人余りの患者さんがこの手術をうけ、現在はその長期成績を観察している段階に来ております。

以上説明しました3グループの研究の特徴は、いずれも内皮細胞以外の異なった種類の細胞を、ハ

イブリッド状態で共存させたことであります。これに似た現象は人工皮膚の開発においても見ることが出来ます。人工皮膚では、皮膚の表面にあります表皮細胞だけを培養するのではなくて、その下にあります線維芽細胞も同時に培養しますと、それが表皮細胞にとっての Feeder cell としての働き、つまり成長因子を出して、表皮細胞の成長、分裂、増殖を助ける働きをします。また一方の表皮細胞は、外界の刺激から線維芽細胞を守ることで、2種類の細胞は分業が成立し、共存共栄の細胞社会を形成します。

人工血管においても、内皮細胞や線維芽細胞、平滑筋細胞などを混在させますと、内皮細胞は表面に出たがる性質がありますし、線維芽細胞は下に潜って、他の細胞の支えになりたがる性質がありますし、平滑筋細胞は張力のかかる場所に行きたがる性質がありますので、身体の中では細胞固有の棲み分け性によって、ハイブリッド状態での共存共栄の細胞社会が築かれてゆくのであります。

この様に種々の細胞の本能的性質を利用することで、ハイブリッド型人工血管は現実の物となりました。

ではどのような条件で、これらの細胞を混在すれば良いのでしょうか。これが成功の鍵を握ることとなりそうです。

種々の細胞を組み合わせる新しい臓器を作る、これは最近話題となっています Tissue Engineering の領域であります。皆様は Tissue Engineering という言葉を、お聞きになった事があるでしょうか。脾臓の島細胞や肝臓の肝実質細胞を、立体的にグループで培養して、人工脾臓や人工肝臓を作るといった試みが、その例であります。この様な Tissue Engineering では、どのような種類の細胞を組み合わせるのか、それに細胞同士の言葉といわれています、サイトカインという蛋白質のうち、どのようなサイトカイン、つまりどのような言葉を使うか、そしてさらに、この様な細胞をいかなる足場で、つまりいかなるマトリックス上で活動させるか、といった、細胞、サイトカイン、マトリックス、の三つの要素の設定が工夫のしどころとなってきます。

この Tissue Engineering の考え方に立って、ハイブリッド型人工血管を発展させた例としまして、最近注目を集めております、私どもの開発しました手法を、紹介しましょう。

まず細胞に関してですが、最も効率よく血管壁を完成させるには、細胞をいち早く増殖させねばなりません。しかし、内皮細胞は高級な細胞で、細胞分裂に限りがありますので、内皮細胞にかわって未分化な細胞を用います。そうしますと、細胞分裂が早く、しかも環境に応じて機敏に棲み分けをし、その場に適した特殊な細胞に、自ら分化してくれるのではないかと、いう期待が沸いて参ります。つぎに細胞同士の言葉でありますサイトカインと、細胞の足場でありますマトリックスですが、それらを初めから含む組織を用いれば良い、という事となりますので、その条件を満足させるために、私どもは骨髄組織に注目しました。骨髄組織は多くの未分化細胞を持っていますし、さらに多くのサイトカインを出し、細胞にとって最適なマトリックスも含んでおりますので、先ほど説明しました、細胞、サイトカイン、マトリックス、の三要素はこれで万全となります。このようにして骨髄組織を絡ませた人工血管で動物実験をしましたところ、期待した通り、人工血管の内面には内皮細胞が、その下層

には平滑筋細胞層が、整然と配置されて、天然の血管壁と全く同じ構造の血管が、体の中で短期間のうちに作られました。

この新しい考え方、すなわち「未分化細胞とマトリックス、サイトカインなどの工夫によって新しい臓器をつくる」という考え方は、Tissue Engineering の研究領域で、あつと言う間に全世界に広まりました。発案者の私はアメリカのNIHやハーバード大学などから講演を依頼されることになって、いまでは、アメリカのいくつかの大学で、私の考え方を参考にして、研究が進められております。

Tissue Engineering は生まれたばかりの技術であります。医学領域のみならず、細胞を用いたセンサーの開発や、遺伝子工学技術で操作した細胞を組み込んで、新しい薬を開発する、といったように、産業界でも広く研究が進められており、21世紀には巨大産業にまで成長すると、期待されています。

この様なことからハイブリッド型人工血管も新しい局面を迎えることとなりました。すなわち、従来の様に内皮細胞や平滑筋細胞を使うのではなく、若い未分化細胞を最適な環境のもとで、のびのびと働かせて、思いのままの新しい血管壁を作らせる方向に、進みつつあります。現在ではその基礎研究の一部が実って、私どもは内径4mmの細い人工血管を開存させる所までたどり着きました。あと1mm、つまり内径3mmまで進めば、心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療に使えるような、ハイブリッド型小口径人工血管が生まれる事となります。私はごく近い将来、この夢が、実現するものと期待しております。

20000417

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので  
下記をご参照ください。

**小中学生の理科離れと人工臓器の授業**

野一色泰晴

人工臓器 28 巻 5 号 Page683-689(1999.12)

**超極細繊維交絡型人工血管の開発**

野一色泰晴, 山根義久, 大越隆文, 富澤康子, 殿倉英次

人工臓器 28 巻 1 号 Page278-283(1999.02)

**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**

野一色泰晴, 山根義久, 大越隆文, 富澤康子, 殿倉英次

人工臓器 28 巻 2 号 Page547-550(1999.04)

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	版出年	ページ
Yukio Ichikawa, et al	Formation of Neointima in Vascular Prosthesis Sealed with Autologous Adipose Tissue Fragments for Femoropopliteal Bypass	D.L.Wise, et al	Biomaterials Engineering and Devices: Human Applicatios, Vol1	Human Press, Inc	Totowa, NJ	2000	181-187

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yasuharu Noishiki	In vivo tissue engineering: dreams for the future	J Artificial Organs	3(1)	5-11	2000
Yasuharu Noishiki, et al	Age Dependency of Neointima Formation on Vascular Prostheses in Dogs	Artificial Organs	24(9)	718-728	2000
Makoto Ando, et al	Autologous Tissue-Fragmented Extracardiac Conduit With Rapid, Stable Endothelialization due to Angigenesis.	J. Thoracic Cardiovascular Surgery	48(3)	153-160	2000

# Formation of Neointima in Vascular Prosthesis Sealed with Autologous Adipose Tissue Fragments for Femoropopliteal Bypass

*Yukio Ichikawa, Yasuharu Noishiki, Tamitaro Soma, Ichiya Yamazaki, Takayuki Kosuge, and Norihisa Karube*

## 1. Introduction

If the vascular prosthesis had adequate anti-thrombogenicity and healing ability of the luminal surface, results of revascularization of peripheral artery would be better than they are today. Therefore, the authors gave antithrombogenicity artificially to the fabric vascular prosthesis, which was sealed with tissue fragments, and expected the graft to heal like native arterial wall, and have natural antithrombogenicity after surgery.

In animal studies, the authors have previously reported (1,2) the advantages of sealing porous fabric vascular prostheses with autologous adipose tissue fragments, as an alternative to preclotting. A preliminary study in humans has also been reported (3). With this method, implanted grafts showed rapid healing of the neointima throughout the graft. In the present study, the method was applied at the femoropopliteal (FP) position in 23 human patients (28 limbs). Three of the 28 grafts had to be removed because of infection or occlusion, and were analyzed morphologically. These grafts showed characteristic findings in their neointima, including elastic laminae, which have not been reported before.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Graft Preparation

Approximately 30 g subcutaneous adipose tissue was resected from the lower abdominal region of each patient, and chopped as small as possible with scissors and a food processor. It was then suspended in a lactated multiple electrolyte Ringer's solution containing 1 g cefazolin (Fujisawa Pharmacia, Osaka, Japan), to create a tissue suspension, according to our original method (1,2). Larger particles, >1.5 mm in size, were excluded, using a mesh filter. Highly porous fabric vascular prostheses of 5 and 6 mm in internal diameter (id) (Sauvage EXS, water permeability, 1500 mL/cm<sup>2</sup>/min at 120 mmHg; C. R. Bard, Billerica, MA; or Micron, water permeability, 1200, Intervascular, Clearwater, FL), were used for the framework of the graft. One end of the prosthesis was clamped, and the suspension was injected into its lumen from the other end under pressure, with a syringe, until the luminal surface was sealed with the adipose tissue fragments. Free remnant fragments were removed, and fresh blood was infused into the lumen. A Teflon rod, with diameter equal to the graft id was then inserted into the graft, to