

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

### 生体のもつ潜在的能力を活用して血管壁を作る試み

横浜市立大学 医学部 野一色泰晴

#### はじめに

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

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

#### I. 刺激に対する細胞応答の活用

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

##### 1. 細胞の幼弱化現象、Blastogenesis

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

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

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

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

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

## 2. 幼弱化に伴うサイトカイン産生

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

### 手術野における細胞のサイトカイン産生と、その活用

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

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

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

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

#### 材料と方法

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

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

#### 結果と考察

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

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

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

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

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

### 3. 幼弱な細胞の蒐集

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## II. 刺激に対する生体（個体）の応答の活用

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

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の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、このバッファの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、まとめた意味合いから、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 の活用

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 週間に取り出し、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。そうなると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。

## 小口径人工血管開発の問題点、Tissue engineering 的考察

横浜市立大学医学部外科学第一講座

野一色 泰晴、市川由紀夫、山崎一也、小菅宇之、

### 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。従来的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つて、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 状態からこのよう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あ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、協調することはあっても競合はしない。*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されている。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。また接していなくても良い。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。この様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 CO<sub>2</sub> 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よい。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存している。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髓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髓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。

骨髓においては細胞外マトリックスは骨髓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。さらに骨髓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、骨髓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、人工血管壁に骨髓移植準備すれば 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 的に考えたストー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囲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りと考えられる。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しさらに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 Reconst. 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.