

adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627,1996.

4.Vescovi AL, et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 156:71-83,1999.

5.Roy NS, et al. In vitro neurogenesis by progenitor cell isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 6:271-277,2000.

6.Thomson JA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147,1998.

7.Shamblott MJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13726-13731,1998.

8.Deacon T, et al. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol* 149:28-41,1998.

9.Reynolds BA, et al. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707,1992.

調査報告 (7)

血管

(担当：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 清水達也)

1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

狭窄あるいは閉塞血管に対する外科的治療法としては人工血管を用いた置換術が行われている。ポリエチレンテレフタレート (PET, ダクロン) やポリテトラフルオロエチレン (ePTFE, Gore-Tex) が合成素材として用いられている。口径の大きな血管では開存率も向上しており広く臨床の場に普及している、しかし冠動脈など小口径 (<5mm) の血管への臨床応用は血管閉塞が高率に生じるため困難なのが現状である。また小児の先天性血管疾患に対する治療に人工血管を用いる場合には時間とともに成長することがないという問題点がある。こういった状況のなかで組織工学的手法を用い自己の細胞を使った血管の再構築・移植は、抗血栓性、成長、感染などの諸問題を解決しうる治療法として期待されている。血管の組織再生では、生体分解性高分子を使い作製した支持体あるいは人工材料と生体分解性高分子を組み合わせた支持体が細胞の足場として用いられた研究が盛んに行われており、小児心臓外科領域において臨床応用されている¹⁾。

2 細胞ソース

血管組織は、内皮細胞からなる内膜、平滑筋細胞からなる中膜、線維芽細胞からなる外膜から形成されている。従って細胞のソースとして自己の血管から単離した内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞が用いられることが多い。また、近年骨髓や末梢血にもそれぞれの細胞の前駆細胞がいることが報告されていることから、自己の骨髓や末梢血由来単核球細胞

が血管再生のソースとして注目されている。

3 単離・培養・増殖法

頸動脈あるいは大腿静脈などを数cm採取後、血管組織の薄片を直接培養皿上で培養する explant culture やコラゲナーゼ還流による細胞単離法を用いて細胞を増殖させている。線維芽細胞に関しては皮膚から採取した細胞も用いられている。通常牛胎児血清を用い培養したのち、トリプシンを用いて細胞を脱着、細胞浮遊液としたのち支持体に播種される。

4 細胞の担体、作製プロセス

細胞を使った血管組織の作製に関しては、血栓形成による閉塞が最大の課題であるため、当初は既存の人工マテリアル表面を細胞接着因子で修飾するなどして血管内皮細胞を事前にあるいは早期に接着させ血栓を防ごうという研究が中心であったが、人工マテリアルと内皮細胞の強固な接着の限界が明らかになるにつれ、中膜組織も含めた層状の血管組織を細胞を使って再構築する研究にシフトしているのが現状である。

松田らは、ダクロンに平滑筋細胞を含んだコラーゲン溶液をゲル化しその内面に内皮細胞を播種することにより血管様組織を作製した²⁾。さらに、生体血管に近似したコンプライアンスを実現するため、微細加工技術を駆使した多孔質ポリウレタンチューブを用いた研究を展開している³⁾。

L'Heureuxらは平滑筋細胞および線維芽細胞をアスコルビン酸を含む培地で1ヶ月程度培養することで細胞自信が作り出す細胞外マトリクスを増大させ、ハンドリングできる程

度の厚さにしたり。さらにそれをチューブに巻き付けて管状にした後、内面に血管内皮細胞を播種、バイオリアクターを用い管内を拍動還流することで2000mmHgまで耐えうる血管組織を実現した。しかしこの血管組織に関しては、犬への移植実験による開存率は50%と報告されており、その作製に3ヶ月を要するという問題がある。

Niklasonらは生体吸収性高分子であるポリグリコール酸 (PGA) を管状にした支持体に平滑筋細胞を播種培養後、血管内皮細胞を内面に播種、バイオリアクターを用い拍動流下で培養することにより血管組織を再構築した⁹⁾。支持体に関しては強度、分解速度の観点からpolyglactinやpolyhydroxyalkanoateとPGAとの共重合体を用いた研究も行われている。新岡らはこの技術を小児先天性疾患の患者を対象に始めて臨床応用した¹⁰⁾。彼等は、患者の下肢大腿伏在静脈を約3cm採取したの細片化し explant culture を施行、3週間ほどたって増殖した細胞をトリプシン処理して再度培養フラスコに播種、4週間ほど増殖させたのち再度、トリプシン処理で細胞を脱着、生体吸収性ポリマーからなる支持体に播種、さらに1週間培養後、欠損部に移植を行っている。その結果、手術後の血管の開存が確認されている。また、最近骨髓由来の細胞を用いた血管組織の移植も行っている。

Mayerらは、無細胞化した4mm径の血管に血管内皮前駆細胞を播種して2週間培養、その後動物モデルに移植したところ4ヶ月にわたる開存が確認されたと報告している¹¹⁾。

別のアプローチとして、in vitro でなく腹腔内などに支持体を挿入し in vivo で血管組織を再生したのち患部に移植するという研究も行われている¹²⁾。

また、支持体に増殖因子などを修飾して、組織の再生を促進するという研究も多く行われている。

6 移植法

血管の移植法に関しては、通常、病変部との置換術が行われているが、小児先天性疾患の治療に関しては、欠損部位へのパッチ状血管組織の移植も行われている。

7 今後の課題

細胞ソースに関しては上記のように、自己からの採取が可能なものであり、今後いかに効率的に体外で増殖させるかが課題である。また、臨床に用いられているのは低圧系への移植であり、今後高圧に耐えうる血管組織の構築が必要である。また、小口径の血管について長期的な開存を可能としている報告は数少なく今後の課題であろう。近年、組織工学的に作製された血管と生体の血管との間に種々のホルモンや薬剤に対する反応性が異なるという指摘もあり、作製された血管の機能的な評価法の確立も必須であろう。

6 参考文献

1. Mann BK, West JL. Tissue engineering in the cardiovascular system: progress toward a tissue engineered heart. *Anat Rec.* 2001;263(4):367-71.
2. Ishibashi K, Matsuda T. Reconstruction of a hybrid vascular graft hierarchically layered with three cell types. *ASAIO J.* 1994;40:M284-90.
3. Doi K, Matsuda T. Significance of porosity and compliance of microvascular vessel on neoarterial wall regeneration. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:573-84.
4. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 1998;12:47-56.

5. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999;284:489-93.
6. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med*. 2001;344:532-3.
7. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*. 2001;7:1035-40.
8. Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR. Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res*. 1999;3-17;85:1173-8.

調査報告 (8)

心臓弁

(担当：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 清水達也)

1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

弁膜症に対する根本的治療としての代替弁としては従来、機械弁と異種動物由来の生体弁がある。前者においては血栓予防のため抗凝固療法を生涯にわたり必要とし、後者に関しては石灰化や耐久性の問題があり、術後遠隔期の再手術の可能性がある。また両者とも先天性奇形など若年の患者に対する治療としては、時間とともに成長することがないため不十分である。こういった状況のなかで組織工学的手法を用い自己の細胞を使った心臓弁の開発・移植は、耐久性、抗血栓性、成長、感染などの諸問題を解決しうる治療法として期待されている。細胞を使った弁組織の臨床応用はまだ報告されていないが、生体分解性高分子を使い作製した支持体あるいは異種弁を無細胞化したものに細胞を播種して弁を作製し移植しようという研究がさかんに行われている¹⁾。

2 細胞ソース

心臓弁組織は、線維芽細胞を含みコラーゲンやエラスチンなどの豊富な結合組織からなり、表面は内皮細胞におおわれている。従って細胞のソースとして線維芽細胞や内皮細胞が用いられている。動物実験では頸動脈や大腿静脈から線維芽細胞(平滑筋細胞を含む)や内皮細胞が採取されている²⁾。また臨床応用を念頭に皮膚から採取した線維芽細胞を用いた研究も報告されている³⁾。

3 単離・培養・増殖法

血管組織の小片を直接培養皿上で

培養する explant culture やコラーゲンゼによる細胞単離法が用いられている。通常牛胎児血清を用い増殖させたのち、トリプシンを用いて細胞を脱着、支持体に播種される。

4 細胞の担体、作製プロセス

心臓弁の作製には polyglycolic acid (PGA), polyglactin, polyhydroxyalkanoate (PHA) などの生体分解性の高分子を弁の形に形成したものに細胞を播種するというもの⁴⁾、異種動物の弁を脱細胞化したものに細胞を播種するという手法⁵⁾、生体内高分子溶液と細胞を混ぜて弁の形に形成する^{7,8)} という3つの手法が研究されている。コンピューターを用いた弁形状の設計がおこなわれつつあり、また生体内での開閉に耐えうるような組織作製のための培養装置(バイオリアクター)の開発も進んでいる^{9,10)}。

Mayerらのグループは生体分解性高分子を用いた心臓弁の作製の研究を精力的に行っている^{24,510)}。当初はPGA-polyglactinの共重合体を用い porous な弁支持体を作製しそれに細胞を播種していたが、血管瘤の形成が問題となったため、近年はより強度、柔軟性にすぐれたPGA-PHA共重合体を用いた弁作製を行っている。作製した支持体に血管から単離・増殖させた平滑筋細胞や線維芽細胞を含む細胞を播種、約2週間培養後、内皮細胞を播種、数日中に動物に対する弁置換術を行っている。彼等の報告では羊に移植後4ヶ月は支障なく機能していたとしており、組織的にも生体に近いものが作製されている。さらに彼等は、バイオリアクターを用い in vitro で移植前にある程度まで組織を再構築させる研究を行っている。

脱細胞化した異種動物弁に関しては、細胞を播種しない形で既に臨床

応用されている。従来グルタルアルデヒドを用いた固定が行われているが、移植後の石灰化などの問題がある。これに対し、CryoLife社は特殊な弁処理技術を開発、ブタ心臓弁を脱細胞化したSynerGraftを臨床応用している¹⁾。これらの脱細胞化した支持体に細胞を播種し弁組織を再構築する研究も始まっている。

生体由来の高分子としてはコラーゲンやフィブリンが用いられており、これらと細胞を混合したのちモールド内に流し込んでゲル化、適切な形状とし培養する手法が報告されている。フィブリンゲルの場合その重合および分解を調節することができ弁組織の構築に有効であることが報告されている。

6 心臓弁の移植法

弁状の組織を再構築し、弁置換術を行う手法と大血管のついた形の支持体を用い血管付き弁組織を再構築し置換する手法が用いられている。

7 今後の課題

細胞ソースに関しては上記のように、自己からの採取が可能なものであり、今後いかに効率的に体外で増殖させるかが課題である。支持体に関しては長期的な耐久性の評価が必要であり、動物を使ったより長期にわたる耐久試験が必要と予測される。また、実際の動物実験では低圧系の肺動脈弁への置換術が主で、大動脈弁置換への応用はまだ報告されおらず、高圧系にも耐えるような弁組織構築には新たな高分子やバイオリアクターの開発が重要であろう。

6 参考文献

1. Mann BK, West JL. Tissue engineering in the cardiovascular system: progress toward a tissue engineered heart. *Anat Rec.* 2001;263(4):367-71.

2. Stock UA, Mayer JE Jr. Valves in development for autogenous tissue valve replacement. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu.* 1999;2:51-64.

3. Zund G, Breuer CK, Shinoka T, Ma PX, Langer R, Mayer JE, Vacanti JP. The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valve. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997;11(3):493-7.

4. Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;115(3):536-45; discussion 545-6.

5. Sodian R, Sperling JS, Martin D P, Egozy A, Stock U, Mayer JE Jr, Vacanti JP. Fabrication of a tri-leaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2000;6(2):183-8.

6. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A.

Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III50-5.

7. Jockenhoewel S, Chalabi K, Sachweh JS, Groesdonk HV, Demircan L, Grossmann M, Zund G, Messmer BJ. Tissue engineering: complete autologous valve conduit--a new moulding technique. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;49(5):287-90.

8. Rothenburger M, Vischer P, Volker W, Glasmacher B, Berendes E, Scheld HH, Deiwick M. In vitro modelling of tissue using isolated vascular cells on a synthetic collagen matrix as a substitute for heart valves. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;49(4):204-9.

9. Sodian R, Loebe M, Hein A, Mar

tin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T, Hetzer R. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *ASAIO J.* 2002;48(1):12-6.

1 O. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer JE Jr. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III44-9.

11 O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, Black KS, Elkins R, Clarke D. The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;11(4 Suppl 1):194-200.

調査報告 (9)

心筋細胞移植

(担当：大阪大学医学部機能制御外科 澤 芳樹)

1. 対象臓器・疾患及び細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性が高齢化、虚血性心疾患の増加にともなう、今後心不全患者数が増加しつつあり、その治療法の研究が重要である。重症心不全に対する現在の最終的な治療法は、補助人工心臓や、心臓移植などの置換型治療であり、これまでその有用性が報告されてきたが、現段階では前者はその耐久性や合併症に、後者はドナーの確保や免疫抑制剤等に問題があり、普遍的治療とは言い難いのが現状である。

最近、このような重症心不全に対し、これまでの置換型治療から、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医学等を駆使した再生型治療が新しい治療法として注目されている。特に、「細胞移植法」の研究の発展は目覚しく、移植した心筋細胞、非心筋細胞の不全心への生着、及び機能向上が数多く報告され、今後様々な心不全を呈する疾患に対する効果的な治療法となることが期待されている。

重症心筋梗塞等においては、心筋細胞が機能不全に陥り、さらに線維芽細胞の増殖、間質の線維化が進行し、心不全を呈するようになる。消失した心筋細胞は再生不可能であるため、心不全は不可逆的である。このような心筋細胞が絶対的に減少した疾患に対して、体外にて再生した心筋細胞を移植し、不全心と電氣的、物理的に統合させ、機能的組織的に不全心を再生させようとする試みが心筋細胞移植であり、これまで、様々な種類の細胞移植により、心機能が向上することが報告されている。

2. 細胞ソース

1. 心筋細胞移植

SV40 largeTを発現させたトランス

ジェニックマウスの心臓から樹立したAT-1細胞という一種の心筋細胞株がある。Kohらは、このAT-1細胞をマウスの心筋に移植し、これらが、生着することを報告した(1)。一方、Soonpaaらは、胎児トランスジェニックマウスから単離した心筋細胞をマウスの正常心筋に移植したところ、胎児心筋細胞は宿主側の心筋細胞と介在板を形成し、Connexin43を発現したことを確認した(2)。Liらは、心筋梗塞モデルに、胎児心筋細胞を移植し、心機能の向上を証明した(3)。

2. 筋芽細胞移植

心臓には、心筋細胞になる前駆細胞が存在しないが、骨格筋には筋芽細胞からなる衛星細胞が存在し、骨格筋が障害を受けたときに、分裂、分化を開始し、障害された部分の筋肉を補填する。このような筋芽細胞の幹細胞様の性質に着目し、Marelliらは筋芽細胞を犬の心筋梗塞巣に移植し、その生着を確認した(4)。またMurryらは自己筋芽細胞を梗塞心に移植したところ、myotubeの形成を認めたが、レシピエント心筋との結合を認めなかったと報告した(5)。一方、Taylorらは、凍結障害を加えたウサギの心臓に自己筋芽細胞を移植したところ、心機能の改善が得られたことを報告している(6)。

3. 骨髄細胞移植

近年のstem cell biologyの発展により、成人の組織においても未分化幹細胞が存在していることが明らかとなり、様々な細胞に分化しうることが明らかとなった。特に、骨髄間質細胞中には間葉系の未分化幹細胞が含まれており、中胚葉系の様々な細胞に分化することが報告された。Makinoらは、このことに注目し、骨髄間質細胞から5-アザシチジンを用い

て胎児型心筋細胞を誘導することに成功した(7)。また、Orlicらは、骨髓Lin^c-kit^{POS}細胞を梗塞心に移植したところ、骨髓由来の新生心筋細胞により梗塞巣は修復され、梗塞心の機能改善が得られたことを報告した(8)。成体内に存在する骨髓から分化誘導された心筋細胞は、自己細胞よりの心筋再生という点で、極めて有用な細胞源となるものと思われる。

また近年、骨髓細胞中に血管内皮前駆細胞が存在することが報告され、骨髓単核球細胞移植による血管新生療法が行われている。Kawamotoらは、ヒト末梢血より採取した血管内皮前駆細胞をヌードラット心筋梗塞モデルに静注したところ、虚血領域にヒト血管内皮前駆細胞が多数認められ、血管新生が助長されていたことを報告した(9)。今後、心筋細胞移植だけではなく、血管構築をターゲットにした細胞療法が注目されるものと思われる。

4. ES細胞由来心筋細胞移植

マウスES細胞は、LIF(leukemia inhibitory factor)非存在下で、細胞塊を作らせると胚様体(embryoid body)と呼ばれる構造を形成する。胚様体では、外胚葉、中胚葉、内胚葉の細胞が分化し、1週間ほどで自律拍動する心筋細胞のクラスターが観察できるようになる。ES細胞より分化誘導された心筋細胞は、無論、自己細胞ではないため、拒絶の問題が考えられるが、様々な細胞を供給できるという点で有望な細胞源であるが、Teratomaの発生等も含め、臨床応用に向けてのハードルは高いものと思われる。

5. その他

これまで、いったん最終分化した成熟心筋細胞は分化増殖をしないとされてきた。しかし、近年、成熟心筋細胞が分化能を有することが報告されている。Leferovichらは(10)、MRL miceの心筋をcryoinjuryしたところ、心筋細胞が分化し、心臓が組織再生したことを報告している。ま

た、Beltramiらは(11)、心筋梗塞患者の梗塞巣周囲の心筋組織を検索したところ、成熟心筋細胞の分化像が認められ、成熟心筋細胞が分化増殖し、障害を受けた心臓を修復している可能性が示唆された。

臨床応用における細胞移植法の問題点

1. ドナー細胞の選択

ドナー細胞の選択は、細胞移植法の臨床応用において、極めて重要な要因である。最適なドナー細胞の条件は、① レシピエント心と物理的電氣的に結合すること ② 拒絶反応のない自己細胞であること ③ 移植後分化増殖をコントロールできず腫瘍化しないこと ④ 安価で効率的に多量の細胞数を確保できること ⑤ 可能ならば自動的収縮能を持つ心筋細胞であること、であるものと思われる。

2. 細胞のレシピエント心への生着効率、心機能改善は、胎児心筋細胞が最も適していると思われるが、拒絶、倫理的な問題を抱えており、最適なドナー細胞とは言えない。また筋芽細胞は、自己細胞であるが、レシピエント心と電氣的物理的に結合できず、限られた期間で、十分な細胞数を確保することが難しく、またES細胞より分化誘導された心筋細胞においては、拒絶、倫理的な問題があり、最適なドナー細胞とは言えない。骨髓間葉系細胞から分化誘導された心筋細胞に関しては、自己細胞で拒絶反応はないが、心筋細胞への分化誘導効率が低く、ヒトにおいて可能であるか不明である。現在のところ、上述した条件を全て満足するドナー細胞は存在せず、今後、細胞移植法にとって最適なドナー細胞を開発することは急務である。(表1)

3. 単離・培養・増殖法

胎児、新生仔心筋細胞：心筋組織より、トリプシン、またはコラゲナーゼ処理を行うことにより、心筋細胞を単離し、牛胎児血清を混入した培

養液を用いて培養している。分化増殖に関しては、現在のところそのコントロール法は開発されていない。**筋芽細胞**：臨床の場合には、下肢の外側広筋より採取した骨格筋をトリプシン、またはコラゲナーゼ処理を行うことにより、単離し、2週間培養した後、細胞移植に用いている。また、実験のレベルでは、骨格筋のsingle fiberを採取し、このsingle fiberを梗塞巣に移植し、機能組織回復が得られたことが報告されている。**骨髄単核球細胞**：腸骨より、穿刺採取し、パーコール法にて分離し、移植されている。また、Lin^c-kit^{pos}等の表面抗原で、前駆細胞を採取する際には、セルソーターで、目的の前駆細胞を選別後、細胞移植に用いる。**骨髄間葉系細胞**：牛血清で増殖させた後、分化誘導剤である5-azaの投与にて心筋細胞に分化させ、これをトリプシンを用いて回収し、移植している。

4. 細胞移植法

これまでの不全心への細胞供給システムとして、最も一般的な30G針を用い心外膜側より移植するneedle injection以外に、冠動脈より細胞を注入するintra-coronary injection(12)、心内腔より細胞を移植するNOGA systemを用いた方法がある。しかし、細胞移植の効率、細胞による冠動脈塞栓の危険、非薄化した左室自由壁におけるruptureの危険等様々な問題があり、golden standardになり得ないものと思われる。

近年、再生医学、組織工学の発展により、*vitro*で様々な細胞、及び細胞外マトリックスを用い、多様な組織を作成することが可能となった。近い将来、組織を構成する細胞単独の移植ではなく、細胞・細胞外マトリックスで構成される再生組織を移植する方法が臨床上有用であるものと思われる。

現在、フランスでは、Menascheらは(13)、筋芽細胞を単離し、これを心筋梗塞患者にneedle injectionし、

治療を行っている。

5. 今後の課題

細胞ソースに関しては、拒絶及び倫理的見地より、自己細胞を使った細胞治療が期待されている。筋芽細胞に関しては、現在臨床の場合で、虚血性心疾患に対する細胞移植療法が行われているが、心不全を治療できるだけの細胞数の得るのに時間がかかること、不整脈等の合併症が指摘されており、移植細胞の分化増殖のコントロール及びneedle injection以外の細胞供給システムの開発が急務である。また、骨髄細胞に関しては、骨髄単核球移植が行われているが、血管内皮、心筋細胞以外の細胞(脂肪細胞、骨細胞等)に分化する危険性、また冠動脈の狭窄の原因になる可能性があり、慎重に検討する必要があるものと思われる。

また、現在のところ、様々な細胞を培養する際に用いられるのは、牛胎児血清であり、狂牛病の不安を考えると、牛胎児血清を用いない細胞培養法の開発が急がれる。

6. 参考文献

1. Koh GY et al. Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *Am J Physiol* 1993;264:H1727-1733
2. Soonpaa MH et al. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994;264:98-101
3. Ren-Ke Li et al. Cardiac myocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996;62:654-661
4. Marelli et al. Cell transplantation for myocardial repair: An experiment approach. *Cell Transplant* 1992;1:383-390
5. Murry CE et al. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest* 199

6: 98;2209-2217

6. Taylor DA et al. Regeneration of functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. Nature Med 1998; 4:929-933

7. Makino S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vivo. J Clin Invest 1999;103:697-705

8. Orlic D et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001;410:701-705

9. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells of myocardial ischemia. Circulation 2001;103:634-637

10. Leferovich JM, et al. Heart regeneration in adult MRL mice. PNAS 2001;98:9830-9835.

11. Beltrami AP, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. N Engl J Med 2001;344:1750-1757.

12. Suzuki K, et al. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. Circulation. 2001 Sep 18;104(12 Suppl 1):I213-7.

1. Menasche P, et al. Myoblast transplantation for heart failure. Lancet. 2001 Jan 27;357(9252):279-80.

移植細胞	利 点	欠 点
胎児心筋細胞 新生仔心筋細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・レシピエント心に介在板を介して結合 ・収縮機能の改善が良い 	<ul style="list-style-type: none"> ・臨床応用の場合倫理的問題
筋芽細胞 平滑筋細胞 線維芽細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・左室リモデリングの改善 ・左室拡張能の改善、自己細胞移植 ・細胞数を得やすい 	<ul style="list-style-type: none"> ・収縮能の改善に乏しい
血管内皮前駆細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・血管新生作用 	<ul style="list-style-type: none"> ・心機能の改善は血流改善による間接的なもの
CMG細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・自己心筋細胞移植 	<ul style="list-style-type: none"> ・様々な細胞に分化するため、移植するには純度を向上させる必要あり
ES細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・様々な細胞に分化できる 	<ul style="list-style-type: none"> ・拒絶反応、倫理的問題

心筋組織

(担当: 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 清水達也)

1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

心筋梗塞や拡張型心筋症による重症心不全に対しては心移植が最終的な治療となっているが、ドナー不足や移植後の免疫拒絶反応が問題となっている。機械的人工心臓に関しては、一時的な補助、あるいは心移植までのブリッジとしての心室補助装置が普及している。さらに、完全植え込み型人工心臓が実際に臨床応用されるまでに至っているが、血栓形成の問題があり機械的な人工心臓では長期的な生命の維持は困難なのが現状である。一方、遺伝子工学を駆使した遺伝子治療やブタ心臓を用いた異種移植の研究も行われており臨床応用が期待されているがウイルス感染などの問題も生じておりさらなる研究が必要である。こういった状況の中で、幹細胞生物学の発展により胚性幹細胞 (ES細胞)¹⁾ や骨髄間質細胞²⁾ から心筋細胞の分化誘導が可能であることが報告されている。さらに、成人になると分裂増殖しないとされてきた心筋細胞が正常組織と虚血組織の境界部において分裂しうることも報告されている³⁾。これらの研究成果から、ヒトへ移植可能な心筋細胞を多能性幹細胞から分化誘導し、さらに増殖させ不全心筋部に注入する心筋細胞移植療法や組織工学的手法による心筋組織再生が虚血性心疾患や心筋症に対する新たな治療法として研究され細胞移植に関しては一部臨床応用されている。

2 細胞ソース

心筋細胞移植の基礎的な研究は1990年代前半からはじまっている⁴⁾。Sonpaaらはマウス移植心筋細胞がホスト心筋に生着し、さらにホスト心筋

細胞との間に電氣的結合部であるギャップジャンクションが形成されることを示した⁵⁾。さらに、心筋虚血モデルへのラット心筋細胞移植により心機能が回復することが確認されている⁶⁾。これらの研究では出生後の心臓より胎児期の心臓から採取した心筋細胞を用いたほうが良好な結果となることが報告されており、より未分化な心筋細胞を用いたほうがその組織再生能力が高いことが予測されている。従って、再生能力の観点からは移植する細胞源としてES細胞を用いるのが最も有効かもしれない。しかしながら、これらの細胞使用に関して、倫理的問題が世界的な論議をよんでおり、その臨床応用には困難が予測される。そこで、近年注目されているのが骨髄由来の多能性幹細胞である。MakinoらはDNAのメチル化を阻害する5-azacytidineを使いマウス骨髄間質細胞から心筋細胞の分化誘導が可能であることを示した⁷⁾。Tomitaらは同様の方法で分化誘導したラット心筋細胞を心筋虚血モデルへ移植、心機能の改善を報告した⁸⁾。さらに、骨髄中にある多能性の幹細胞のみを細胞表面マーカー (Link-its)⁹⁾ により選択し心筋梗塞部に注入しておくだけで、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞に分化、周囲の環境に応じて心筋組織が再生されることをOrlicらは示しており¹⁰⁾、これらの細胞が実際に臨床応用されたと報じられている。また、虚血部での血管新生を目的に骨髄単核球細胞を不全心筋へ移植する治療も行われている¹¹⁾。このように、自己の骨髄細胞を使った心筋組織再生治療は、倫理的にも、免疫拒絶の観点からも今後最も期待されている治療法である。一方、不全心筋に対する細胞移植療法の細胞ソースとして心筋細胞ではなく骨格筋組織に存在する筋芽細胞

を使う研究も行われてきた。筋芽細胞は骨格筋損傷時に分裂・増殖し組織を修復する能力を持ち、自己の筋肉から細胞の採取が可能であることから、心筋細胞の代替としての可能性が追求されてきた¹⁰⁾。その結果、近年フランスにおいて臨床応用され、不全心筋部への自己筋芽細胞の移植と冠動脈バイパス術との併用により心機能が回復したと報告されている¹¹⁾。また、平滑筋細胞を用いた研究でも心機能が回復することが示されており、これら心筋細胞以外の細胞移植による心機能の改善効果は不全心筋のひ薄化およびそれに続くリモデリングによる心拡大の阻止、増殖因子分泌による血管新生によるものと考えられている¹²⁾。さらに血管内皮細胞と心筋細胞の共培養により内皮細胞が一旦脱分化し心筋細胞に再分化する現象が報告された¹³⁾。従って、内皮細胞の移植により血管新生のみならず心筋再生を促す可能性があり、ひとつの細胞ソースと考えられる。心筋組織再生の細胞ソースについて表1

表1にまとめた。

3 単離・培養・増殖法

研究レベルにおいては、心筋組織からトリプシンあるいはコラゲナーゼを用い心筋細胞を単離、牛胎児血清を用いた培養が行われている。筋芽細胞を用いた臨床例では下肢の外側広筋から摘出した筋肉から筋芽細胞を単離・培養、数回継代したのち2週間後に心筋梗塞部に移植している。骨髄細胞に関しては通常、腸骨より穿刺採取、単核球に関してはパーコール法により分離、Lin-c-kit^{pos}細胞に関しては表面マーカーでラベル後セルソーターにて分離、培養・増殖過程なしに移植されている（臨床）。骨髄間質細胞に関しては培養皿に付着後、浮遊細胞を除去することで分離、動物(牛or馬)血清を用い増殖させたのち5-azaの投与にて心筋に分化後トリプシンを用い単離、その後移植されている（研究）。

胎児・新生児 心筋細胞	心機能改善、ホスト心筋とジャンクション形成 拒絶・倫理的問題あり
筋芽細胞	自己から採取可能、心機能改善、臨床応用
平滑筋細胞 線維芽細胞	自己から採取可能、細胞数豊富 左室拡張の抑制、収縮能なし
ES細胞	心筋細胞へ分化誘導の可能性、拒絶・倫理的問題あり
骨髄間質細胞	自己から採取可能、心機能改善、5-azaによる分化誘導
Lin-c-kit ^{pos} 細胞	自己から採取可能、心機能改善、臨床応用 環境に応じ心筋・平滑筋・内皮細胞に分化
骨髄単核球細胞	自己から採取可能、新生血管促進、臨床応用
血管内皮細胞	自己からの採取可能 血管新生の促進に加え心筋細胞への分化の可能性

4 細胞移植法

細胞の注入法に関しては開胸下に注射針(27?30G)を用いて心外膜側から注入する手法(needle injection)が多くの研究で用いられているが、米国Biosense Webster社のNOGAシステムを用いたカテーテルによる心腔内からの注入や、冠動脈からの注入といった新たな手法も開発されている。

5 組織工学的的手法による心筋組織の構築法

LangerおよびVacantiが提唱した3次元生体吸収性のバイオマテリアルを用い組織再生を行うというコンセプトに基づく心筋組織再構築の研究が報告されている¹⁴⁾。

Eschenhagenらは生体内細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンの溶液と鶏胚あるいはラット培養心筋細胞を混和しシリコン製のモールド内で培養することにより、3次元の心筋組織を作成その張力の測定を可能とし、反復伸展刺激により細胞が配向性を獲得し肥大することを報告している¹⁵⁾。Bursacらはポリグリコール酸(PGA)からなる生体吸収性の支持体に心筋細胞を播種、回転式の組織培養装置(バイオリアクター)を用いることにより心筋様組織を構築、その電気的特性を解析している¹⁶⁾。また、Liらのグループはスポンジ状のゼラチンを使った心筋グラフト作製の研究を展開している。ゼラチンスポンジに培養心筋細胞を数回に分けて一様に播種し培養、心筋梗塞モデルに移植したところ心機能の改善を認めたと報告している¹⁷⁾。さらに右心系心筋欠損部に移植したところ3ヵ月後ゼラチンが完全に分解された後も組織として残存し欠損部を補完した¹⁸⁾。さらに生体吸収性高分子としてアルギン酸を用いた研究では心筋梗塞モデルへの移植により収縮能の改善は認めなかったものの心拡大が回避されたと報告されている¹⁹⁾。

一方、シート状の心筋細胞を積層化することにより3次元の心筋組織を再構築するという新しいコンセプトに基づく研究も行われている²⁰⁾。シート状の細胞の作製には温度応答性高分子であるイソプロピルアクリルアミドを表面グラフトした培養器材が用いられ、低温処理のみで細胞および細胞外マトリクスからなる細胞シートの回収を可能としている。

現在行われている組織工学的的手法による心筋組織構築に関する研究を表2に示す。いずれの研究も現段階では動物心筋から蛋白分解酵素を使って心筋細胞を単離、牛胎児血清を用いた培養を行っている。

6 心筋グラフトの移植法

心筋グラフトの移植に関しては、当面パッチ状に作製されたものを開胸下に不全心筋部に心外膜側から移植するという手法が検討されている。

7 今後の課題

細胞ソースに関しては上記のように、倫理的な観点から骨髄由来の細胞を使った治療に期待が寄せられているが、今後、不全心筋の機能を十分回復しうるだけの細胞数にまで体外でいかに増殖させるかが課題である。細胞移植法に関しては、注入による、出血、血管への流出、不整脈などのリスクが指摘されておりより安全な細胞デリバリーシステムの開発が必要である。心筋組織の構築に関する研究ではすでに安全性が確認され他の組織で臨床に用いられている生体吸収性バイオマテリアルが多く用いられているが、分解時の炎症反応やその強度・柔軟性が問題となっており、心筋組織に適切な新たなバイオマテリアルの開発が望まれている。またより大きな心筋組織の構築には毛細血管網を再構築する新規の技術開発が必須となっている。

表2

3次元生体吸収性材料を使った組織構築	
バイオマテリアル	
コラーゲン	Eshenhagen' s group, Univ Eppendorf, Germany Eshenhagen et al, Faseb J 1997;11:683 Fink et al, Faseb J 2000;14:669 Zimmermann et al Biotech&Bioeng, 2000;68:106 構築組織の張力測定、伸展負荷による肥大化
PGA	Freed' s group, MIT, USA Bursac et al. Am J physiol 1999;277:H433 Papadaki et al. Am J physiol 2001;280:H168 バイオリアクターによる組織構築
ゼラチン	Li' s group, Univ. of Tronto, Canada Li et al. Circulation, 1999;100:II63 Sakai et al, J throac Cardiovasc Surg 2001;121:932 心筋梗塞モデル・右室欠損部への移植
アルギン酸	Kohen' s group, Ben-Gurion Univ., Israel Leor et al. Circulation, 2000. 102:III56-61 心筋梗塞モデルでの左室拡張抑制
細胞シートの積層化による3次元組織構築	
温度応答性培養皿	Okano' s group, Tokyo Women' s Medical Univ, Japan Shimizu et al, J Biomed Mater Res. in press. 心筋細胞シート重層化による3次元化

6 参考文献

1. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-El dor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 2001;108:407-414.
2. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.
3. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344:1750-7.
4. Reinlib L, Field L. Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease?: A worksh

- op of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*. 2000;101:E182-187.
5. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 1994 ;264:98-101.
 6. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, Rao V, Ivanov j Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:654-60
 7. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999 ;100:II247-56
 8. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410:701-705
 9. Kamihata H, Matsubara H, Nishie T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001;104:1046-52
 10. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996;98:2512-2523. Makino
 11. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-280.
 12. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Li G, Yau TM. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg*. 2000 Sep;70(3):859-65.
 13. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescevi A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10733-10738.
 14. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 2001 ;72:577-591.
 15. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Ellison EL. Three-dimensional reconstruction of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J*. 1997;11:683-694.
 16. Bursac N, Papadaki M, Cohen R J, Schoen FJ, Eisenberg SR, Carrier R, Vunjak-Novakovic G, Freed L E. Cardiac muscle tissue engineering: toward an *in vitro* model for electrophysiological studies. *Am J Physiol*. 1999;277:H433-444.
 17. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*. 1999;100:II63-69.
 18. Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim ET, Jia ZQ, Yau TM. The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventric

ular outflow tract of the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:932-942.

19. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation.* 2000;102:II156-61.

20. Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, Shibata T, Isoi Y, Kikuchi A, Umezu M, Okano T. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res.* in press.

調査報告 (11)

気管

(担当：聖マリアンナ医科大学形成外科 熊谷憲夫)

1. 対象臓器、疾患および細胞、組織を用いた医薬品、医療用具の必要性

近年、気管の切除再建を要する症例が増加している。これに対し、既に確立されている気管環状切除・気管端端吻合術には切除範囲に限界 [1] があり、その最終的な治療法として、気管移植が上げられる。しかし、日本人の特徴的な死生観がドナー不足を助長する結果となり、臓器移植法が施行された現在においても不透明な問題を含んでいる。従ってその打開策としては、代用気管の実用化以外なく待望されている。

これまで実験的に検討された代用気管の1つには生物材料による代用気管には、同種または異種の気管や、自家代用組織を用いたものがある [2, 3]。この同種・異種気管移植の免疫反応による拒絶は、免疫抑制剤の長期投与が必須であり、大網被覆による血液供給で同種気管移植が生着したとの報告 [4] もあり有望視されているが、本法では材料の供給に難点がある。同時に異種動物からの代用気管は、BSEに代表されるように未知の感染の危険性、また仮に臓器移植が日常化しても、乾燥硬膜移植に見られるようなnvCJD発病など大きなリスクを伴っている事も否定できない。従って生物材料以外に、代用気管を考案する一つの考え方に人工材料を用いる方法があげられる。人工材料を用いた代用気管としては、初期にガラス管、ステンレススチール管、そしてポリエチレン、ナイロン、ダクロンなどを経てシリコン製人工気管へと発展している [5, 6] が、気管と人工器官吻合部の狭窄による窒息など、完成にはなお改良を必要としている。現在ノンポラス型人工気管の研究では、導管本体部分にシリコ

ンが多用され、その固定や吻合の方法にさまざまな工夫が見られる [7]。さらに最近では、新たな人工材料としてセラミックスの人工気管への応用も試みられているが、材質の差にかかわらずやはり過剰肉芽による吻合部の狭窄が大きな問題である。この問題に関して、培養した線維芽細胞や気管上皮細胞を予め作成した人工気管 Scaffold に組み込み人工気管をハイブリッド化する事も試みられ、ハイブリット型再生気管として注目されている。既にこのハイブリット型再生気管は、犬に植埋され長期生存も可能な状況にある [8]。将来的には、胚性幹細胞 (ES細胞) の分化制御技術の発展によって完全再生型気管の出現が予想されるが、いわゆる末梢幹細胞を用いた気管上皮細胞の培養などは可能な状況になっており、これらの研究成果を用いれば、完全再生気管の作製も可能な状況にあり、近い将来に臨床応用が可能と思われる。また、再生気管の完成は、呼吸器外科における廓清範囲を飛躍的に拡大できる事が予想され、近年増加傾向にある肺癌の予後の改善にも役立つものと推定される。

2. 細胞ソース

前述のように、人工気管のアイデアと応用は、相当古く迄に遡れる [5] が、ハイブリット型の再生気管の考え方は、極最近である [8]。一方、このハイブリット型再生気管や、完全再生気管は、1995年頃より試みられており、そのために必要な細胞である気管上皮細胞や肺胞線維芽細胞の培養なども、既に確立された状況にあると言って良い [9]。

細胞ソースとしての気管上皮細胞は、気管支鏡を用いて気道粘膜上を

擦過したりバイオプシーした組織片程度で、大量培養が可能な状況にある。線維芽細胞については、肺胞採取には危険が伴うので、一部皮膚を採皮し皮膚由来の線維芽細胞を培養し、再生気管の構成線維芽細胞として用いる。

いずれの細胞も胚性幹細胞由来ではなく末梢幹細胞を用いた方法であり、同一個人の細胞を用いる事から、自家再生気管であるため倫理上の問題はない。

3. 単離、培養、増殖法

1) 気管上皮細胞の培養の実際。

採取した気管上皮組織片を、ポビドンヨードで除菌後、PBSで頻回に洗浄する。この除菌済み気管上皮組織片を、ある種のコーティングマトリクス上に（特許申請中）静置し接着させる。その後、一般に知られる気管上皮細胞培養用培地の一部組成変更をした培地に交換し、一定期間培養する。気管上皮細胞は組織周囲から遊走増殖を始め、その後は、常法に従って継代操作を行う。培養に関して用いる薬品類は、牛由来の製剤が潜在的な危険を伴うため、総てヒトにリコンビナントな薬品を用いる事で危険回避を計る。気管上皮細胞の培養に関しては、他施設の状況は不明であるが、本学（聖マリアンナ医科大学）においては、牛由来薬品から、ヒトリコンビナント薬品への移行はほぼ完了しており、潜在的危険性は低減できている。

2) 線維芽細胞の培養の実際

採皮組織片を、Tissue Chopperを用いて1mm各程度の組織片とした後に、ポビドンヨードで除菌後、PBSで頻回に洗浄する。除菌済み組織片を培養ディッシュに静置し、無血清線維芽細胞培養培地を用いて、一定期間培養する。気管上皮細胞と同様に線維芽細胞も組織周囲から遊走増殖を始め、その後は、常法に従って継代操作を行う。感染リスクに対する

対策は、気管上皮細胞の培養法の手技に準ずる。

4. 細胞移植法

気管Scaffoldへのこれら細胞の応用は、要約すると以下の通りである。気管Scaffoldをあらかじめある種のマトリクス（特許申請中）でコーティングしておき、このコーティング気管Scaffold上にあらかじめ分散しておいた上記細胞を播種する。その後一定期間、培養を行い十分に細胞を増殖させた後、このハイブリット型再生気管を植埋する。

5. 今後の課題

ハイブリット型再生気管の成功の可否は、吻合部に於ける創治癒に至る迄の生体組織との親和性が重要である。特にハイブリッド型再生気管においては、植埋気管の吻合部内側に生体気管側から粘膜組織が進展し、血行が再開される迄の間、ハイブリッドされた線維芽細胞や混合培養された細胞が低栄養条件下に於いても正常な機能を維持している必要があると考えられる。この問題に関しては、すでに高密度で線維芽細胞を培養する事で2週間程度の期間は、貧栄養条件下でも正常な細胞機能を維持できることは証明されている[9]。この過程でさらにフィブリンジェル内で線維芽細胞を立体培養するとさらに生体組織に近似された環境を作り出し、気管上皮細胞との混合立体培養が可能であることも判明している。しかしフィブリンの場合も、線溶系の酵素に対する抵抗性を持たせるために、牛由来の蛋白分解酵素阻害薬を使用しており、将来的にはこの問題を解決する必要がある。

しかしながら、本法に於いても最終的には一部人工組織が生体組織と端々面で接触するため、異物反応の結果として不良肉芽の増生の危険性を否定できない。この問題は、再生(再構築)させた生体(再生)気管を移植する以外に解決する方法はない。そこ

で、今後は完全再生型気管の開発が必要であろう。本技術開発は、慢性的なドナー不足にある臓器移植問題の解決法として注目され始め精力的に研究が進められるべきであるが、京都大学式の再生気管も、内腔面の不良肉芽の増生に伴う気管狭窄を解決できていない。そこで、ハイブリット型再生気管から完全再生気管への発展過程をブリッジする形として、組織再利用による再生気管の開発が一つの解決策と考える。すなわち吻合部狭窄、内腔狭窄を引き起こす事を前提に、気管切除後にtemporaryに人工気管を植埋し、その間に切除した気管を無細胞化してをScaffoldとして利用し、気管の再生を試み患者に再度戻すと言うアイデアである。現在この概念で研究は乏しいが、それなりの実験結果が得られつつあり、このような新規技術開発は、必須と思われる。

6. 参考文献

1. Grillo, H. C., Tracheal Surgery, Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg., 17:67-77, 1983
2. Kato, R., Onuki, A. S., Watanabe, M., Hajizume, T., et. al., Tracheal resconstruction by esophageal interposition, An Thorac. Surg., 49:951-954, 1990
3. 中山光男、自家遊離空腸を用いた代用気管に関する実験的研究、日胸外会誌 38(9):35-40, 1990
4. 森山重治、どう手記肝移植による広範囲気管切除後の気道再建に関する実験的研究、日胸外会誌、37(2):24-30, 1989
5. Neville, W. E., Bolanowski, PJP, Soltanzadeh, H., Prosthetic reconstruction of the trachea and carina J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 72:528-538, 1976
6. Teramachi, M., Nkamura, T., Yamamoto, Y., Kiyotani, T., et. al., Porous-type tracheal prosthesis sealed with collagen sponge, Ann. Thorac. Surg., 64:968-969, 1997
7. Osada H, Takeuchi S, Kojima K, Yamate N. The first step of experimental study on hybrid trachea: use of cultured fibroblasts with a rtificial matrix. J Cardiovasc Surg 35(suppl. 1):165-168, 1994
8. Kojima H. Effect of hepatocyte s growth factor (HGF) on induction of epithellial extension onto the inner surface of the anastomot ic ends of a hybrid artificial t rachea implanted in dogs. J Jpn Soc Bronchol 17:570-577, 1995
9. Inoue H, Osada H, Kojima K, Tomioka M & Ishida H. Surviving anproliferating faculty of fibroblasts cultured under no-serum and poor nutritional conditions -The basic study on hybridization of cultured cells with an artificial matrix- J. Cardiovas. Surg. 1999;40(3):435-438.