

には2ないし3本の毛細血管が個々の筋肉細胞の走行に平行して配列されている。したがって、それを平面的にみると、筋肉細胞と毛細血管は交互に存在すると言っても過言ではない様な構造を持っている。そして、この毛細血管は内皮細胞によってつくられているので、心筋組織はほとんど心筋細胞と内皮細胞とから構築されると考えても良いであろう。

この心筋組織に何らかの障害が生じると、組織修復は如何なる形で進むであろうか。一般に組織や細胞には自己修復能録がある。したがって、心筋組織にもそれがあるはずであるが、心筋に特徴的な事として、筋細胞が再生しない、という事が挙げられる。多くの高級な細胞は、一度分化すると、もう再生しないと言われている。最近の研究では、組織に特異的な幹細胞があって、それらが組織修復を行う、ということが判ってきているが、それも条件によりけりであって、一般的には心筋細胞は再生しない。神経細胞とおなじように、再生しにくい高度に分化した高級な細胞である。ちなみに線維芽細胞などはエンドレスに細胞分裂を繰り返すことが出来、血管の内皮細胞は約70回ほど分裂を繰り返すと、老化によって次世代を創ることが出来なくなる。したがって、内皮細胞も高級な細胞に分類される。

しかしながら、心筋細胞に比べると、組織修復可能な細胞であることから、内皮細胞は分裂、増殖、遊走、といった組織修復活動に必要な細胞活動を行うことが出来る。

この様に考えると、心筋組織自体は心筋細胞が再生不可能であることから、再生、自己修復、という観点から考えると、大きな欠点を持った臓器である。しかしながら、内皮細胞の立場にとって考えると、心筋組織が障害を受けた場合、心筋細胞に邪魔されることなく、内皮細胞は組織修復を行うことが可能となる。そうなる、この組織特異性を活用することで、選択的に内皮細胞を働かせて、血管壁を創らせることが可能ではなかろうか、という考え方環自然と湧いてくる。これが私の編み出したアイデアである。すなわち、心筋組織には大きな欠点がある。しかし、その欠点がある、ということと諦めるのではなくて、「欠点がある、という特徴がある」と考えると、その特徴は考え方によっては、「長所」として活かすことが出来るはずである。この、欠点を長所として捉え、その長所を特徴として活かす、という考え方で、心筋内に血管壁を構築する事が可能となった。

3. 私の考え方による心筋内に血管を創る方法の実際。

私の方法は単純である。心筋組織内に14なし16ゲージの静脈留置針を入れて、その管腔をかいして生体内で分解吸収されうるハイドロゲルを挿入する方法を採用する。この方法によって、ハイドロゲルが吸収されると同時に、この部分に、ハイドロゲルの太さ、長さ、形状などに合わせた血管腔が形成される、という手法である。この実際は単純であり、誰が行っても同じ結果が得られるのであるが、その理論を理解することによって、この手技が更に改良されて、高度な医療に用いられる可能性が出てくるので、是非とも、その理論を理解していただきたい。

まずは、単純に、針で心筋組織に孔を開けるとどうなるであろうか。当然の事ながら、下図に示すとおり、心筋内には無数の毛細血管があるので、その血管が傷つき、そこから出血して、その孔は直

ちに血液によって満たされるであろう。そうすると、心筋細胞が障害を受けていることから、出血した新鮮な血液は破壊された心筋細胞などに触れて、血小板は凝集をはじめ、フィブリノーゲンも刺激によってフィブリンモノマーを付着させ、それらに次々とフィブリンモノマーが上積みされてフィブリンポリマーとなり、血小板も顆粒を放出して凝集を加速度的に早めて、巨大な血栓が形成されるであろう。そうすると、折角孔を開けたにもかかわらず、孔は数分以内に血栓によって閉塞するであろう。

そうすると、血栓内に周囲組織から内皮細胞が遊走してくる。内皮細胞は血管腔をつくる事のできる環境にあると、自然に管腔形成を行って、毛細血管を作り始める。しかしながら、血栓の中に長く埋もれていると、次第に脱分化も始まって、その場で最も働きやすい形態に変わる可能性がある。すなわち、血栓組織を修復するには、恐らくマクロファージが出てきて血栓を貪食し、その結果、マクロファージが多量のサイトカインを産生することから、このサイトカインの刺激によって内皮細胞は線維芽細胞に脱分化する可能性がある。この場では線維芽細胞の方が組織修復を行いやすいと考えられるからである。また、周囲には平滑筋細胞もごく僅かではあるが存在するので、この平滑筋細胞が大量に血栓組織内に侵入して血栓の器質化を生じさせ、結果的には細胞の多い肉芽組織が形成され、その後に癒痕組織となって、管腔は完全に閉塞し、不可逆的変化となる。これが一般的な心筋の障害時における修復過程であろう。したがって、心筋組織内に、如何に丁寧に孔を開けようと努力してもこの経過を辿って、閉塞する。

この事を理解した上で、私は下図に示すような試みを行った。すなわち、心筋内にシャープな刃で孔を穿つ。その後、間髪入れず、ハイドロゲルを孔の中に挿入する。このハイドロゲルは生体内で分解され吸収される機能を持つ。更には細胞毒性もなく、周囲の細胞の活動を押さえる事をしない。ただし、周囲に血栓を創らせないように工夫しておく、その作用で、ゲルの周囲には新鮮な血液が流動的に存在するような状況が創られる。心筋組織は常に収縮と弛緩を繰り返している、この運動作用によって、その部分にある血液は常にいれかわり、新鮮な血液が孔のなかで、ゲルとの間隙を流れることとなる。そうすると、その部分を修復するために出てき得る細胞は内皮細胞である。内皮細胞は常に血液に接する面に出てゆこうとする性質がある。人工血管を植え込んだ後に組織修復が生じて、線維芽細胞や平滑筋細胞が活発に細胞分裂、増殖、遊走を繰り返す中で、内皮細胞のみが内腔面に至って、その内表面を覆う現象は、よく見られる。そこで、この場合も、その部位において、ゲルの周囲で、孔の壁には、内皮細胞が這い込んできて、その表面を自然治癒の一過程として修復し、これによって、孔の内面が内皮細胞によって覆われる事となる。

このような細胞の動きによって内面が内皮細胞によって覆われた後に、ハイドロゲルが消失すると、この部分に血管壁が現れることとなる。私のアイデアを図示すると、下図のようになる。

4. 心筋内に血管を創る試み、過去に行われた研究の紹介と、私の方法との対比

私の理論を実現させるために、私は5つの工夫を施した。一つは心筋組織内に何らかの孔を穿った

場合、その周辺にあって組織修復にかり出されるべき内皮細胞を破壊しないための工夫。次は、内皮細胞が修復に出てくるべき足場を確保しておくこと、次は、内皮細胞が修復を行うにおいて、その場で組織修復を促す細胞増殖因子の産生を行わせること、更に次の一つは、内皮細胞が血管壁構造を形成する間に、その管腔構造を維持するための工夫である。さらにもう一つの工夫は、内皮細胞を内皮細胞のまままで活動させるための工夫である。

これらの5つの条件を満足させる事は、組織工学の考え方に則って組織創成を行うときに要求される3要素、すなわち、細胞、細胞外マトリックス、細胞成長因子、を具備させるための工夫でもある。そこで、この考え方に則って、考察を進め、一つ一つ、詳細に考えてみたい。

最初の工夫に対しては、心筋組織に孔を穿つため、私は単純に静脈留置針を用いて、心臓壁に孔を穿った。アメリカのあるグループでは1990年代に心臓壁に血管を創ると題して、レーザー光線を用いてシャープな孔を開けた事がある。彼らのグループは6000例を越す臨床での実施まで行って、その有効性をアピールしたが、結局瘢痕組織を創るだけに終わり、成功しなかった。これに対して、私は14ないし16ゲージの太さの静脈留置針を用い、用手的に心筋に孔を穿った。この操作によって、周辺にある血管内皮細胞を破壊することなく孔を正確に開ける事ができるようになった。レーザー光線では、シャープな孔が開くけれど、何処まで開けて、何処でその孔を留めるか、と言うことは不可能であるが、この単純な方法ではそのような小細工も可能である。それよりも、主義的に特殊な装置は不要であり、単純で低コストであることも合わせて得られた有益な事であった。

次の工夫に対しては、内皮細胞の足場の確保である。レーザーを用いたアメリカのグループの実験結果を観察すると、レーザー光線によって、開けられた管腔の壁は黒く焼けた炭化組織となっている。これでは細胞が付着するのに適していない。この上に内皮細胞が付着するとすれば、まずはマクロファージが無数に出現してこの炭化組織を処理し、清掃を行う必要がある。その後その部位に内皮細胞が侵入する事が可能となるが、このステップを踏むことによって、出現したマクロファージが多量のサイトカインを産生することから、この部位に無数の線維芽細胞が侵入する可能性がある。すなわち、通常の、最もポピュラーな組織修復が進行する。そうすると、その部位は瘢痕組織となって管腔は閉塞する。アメリカのグループの研究を詳細に検討すると、全てこのような経過を辿っている。そこで、わたくしは孔を穿つのに静脈留置針を用いた。この処置によって、炭化組織は出現しなくなる。せいぜい機械的に破壊された細胞塊である。このような組織の修復は通常の臓器内で日常的に行われているので、無数のマクロファージを動員する引き金を引くことはない。そうすると、その破壊組織の表面に組織液が流れ出て、組織液内の蛋白、特にフィブリノーゲンなどが付着すると、その上に用意に内皮細胞が付着することが出来る。この事によって、2番目の工夫は実現する。

次の工夫としては、組織修復に必要な細胞成長因子を確保することである。レーザーを用いたアメリカのグループでは、このような細胞成長因子を用いることに配慮を行っていないことが判る。私はこの事が費寿に大切であると考えて、その工夫を行ったが、結局は自然に任せることが有利で効率が良いことが判明した。すなわち、この考え方で行った事は、静脈留置針を用いて孔を穿つ操作であ

る。これによって周囲の細胞には機械的な刺激が加わる。ある細胞は一部が破壊される。組織としては損傷を受ける。このような障害を受けた細胞や組織は自然の流れとして、自然治癒の機序が開始される。この過程にあって、障害を受けた細胞からは多量の細胞成長因子が産出される。これは絵はごく自然の動きである。しかしながら、アメリカのグループの行ったレーザーを用いた方法では、それらの細胞成長因子を出すための細胞が炭化してしまっており、因子を出すことが出来ない。私の方法では、単純ではあるが、直にそれが得られることから、この音に関する工夫は成就可能となった。

次の工夫は、内皮細胞が血管壁の内部を覆う間の管腔形態確保である。レーザーを用いたアメリカのやり方では、この点に全く配慮していない。しかしながら、私はこの点に最も注目し、これに大きな力を注いだ。そして、ある程度の可能性をえた。しかし、まだ完成の域に達していないことから、改良を要する領域でもある。そこで、現時点での私の行った工夫を紹介する。まずは、管腔を閉塞させる最も大きな原因として、レーザーの例を見ると、出血と、その後に来る血栓による閉塞であることが判った。これは当然の事である。組織に障害がおきれば、その部位に出血し、そこに血栓が出来る。そこで、私は血栓が出来ないように工夫を行った。そして、血栓によって管腔が閉塞されない工夫も同時に行った。具体的に言うと、静脈留置針によって創られた孔の中にハイドロゲルを挿入したのである。そして、そのハイドロゲルには血栓の形成を阻止するためのヘパリンを徐放出する機能を賦与させた。この工夫によって、ハイドロゲルの存在自体が血栓の形成されるはずの部位を占拠してしまうので、その部位には血栓が創られない。更にはそのゲルからヘパリンが徐放出されるため、周囲にも血栓が形成されなくなる。そうして、管腔は血栓に占拠されることなく形態の維持が可能となる。しかしながら、内皮細胞が内面を覆った後には、このハイドロゲルの存在は邪魔となるので、私はハイドロゲルを1ないし2週間で分解吸収されるように設計した。この工夫によって、血栓が阻止され、管腔の形態が維持され、内皮細胞が内面を覆い、そして、その被覆後は管腔内からゲルが消失して、血管腔のみがのこる、という設計が完了し、4番目の工夫が成就する事となる。

最後の工夫は、内皮細胞が線維芽細胞などの脱分化しないための工夫である。私のこれまでの人工血管の開発改良における研究過程で、私は血栓の覆い組織内の出現した、もしくは血栓組織内に埋もれてしまった内皮細胞は線維芽細胞に分化しやすいのではないかという、仮説を持っている。血栓が長時間存在すると、当然の事ながら、この部位にはマクロファージが出てくる。この時に、多量のサイトカインが出されるため、これらの化学的刺激によって、細胞の分化が進行することは大いに考えられることである。そこで、血栓組織を創らせない4番目の工夫と合わせて考えると、この5番目の工夫も難なく得られそうであろうという考え方が出てくる。その状態となれば、内皮細胞は周辺の毛細血管壁から出てくるが、この時に管腔の中には侵入の足場がないので、すなわち、血栓が存在しないので、その管腔壁の上を這って出てくるしか、侵入の足場がないこととなる。そうなると、直に管腔壁の表面に内皮細胞が出てくることとなる。ここで、私はさらに一工夫を行った。それは、ゲルの中にヘパリンがあって、その表面には血栓が出来ないので、新鮮な血液が常に存在することとなる。しかも心臓壁は常に収縮弛緩を繰り返しているため、その部位の血液は常に置き換わっていることと

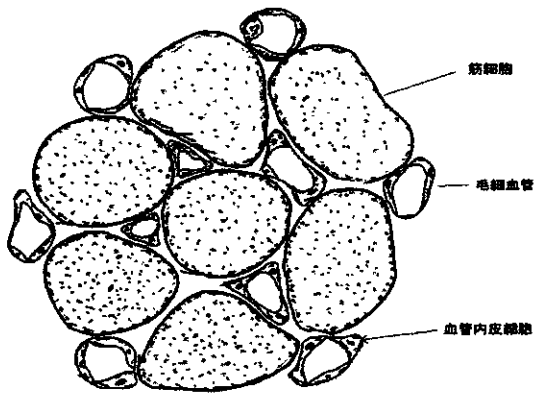
なる。すなわち新鮮な血液が流れていることとなる。そうすると、その部位に進出できる細胞は内皮細胞に限られてくる。なぜならば、平滑筋細胞や線維芽細胞は血清濃度の高い部位では活発な細胞活動が不可能であり、常に内皮細胞によって覆われた組織の中での活動となるからである。そうすると、その部位の表面に出てくる細胞は内皮細胞に限られる。我々は血管外科の臨床の現場において、血管外傷後の動静脈瘻を見ることがあるが、このように組織内に創られた血流路は、常に内皮細胞によって覆われているので、この自然現象も理解できることである。したがって、このような条件設定をおこなうことで、進出してきた内皮細胞が線維芽細胞や平滑筋細胞に脱分化する事を防ぐことが可能と予測されることから、5番目の工夫も成就出来ることとなる。

以上の5つの工夫を実際に行う事によって、私の理論を実際実現するための条件を揃えることが出来ると思われる。

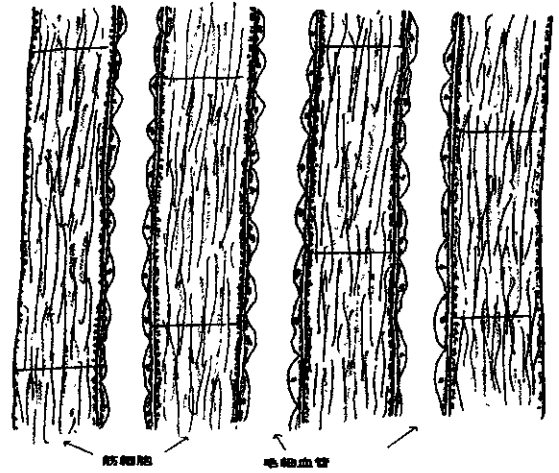
おわりに

組織工学の基本に則って、心筋組織内に血管を創成する方法を解説した。この考え方は、これまで世界中の多くの研究者と企業の方々が、多額の費用のかけて、しかもエネルギーと人手をかけ、時間をかけてもなし得なかった冠動脈の再生を、あっさりと乗り越えて実現してくれた。それには、基本的に発想の転換があったので、なし得たと、私は考えている。一つは、「人工血管を作る」から、「人工的に血管を創る」に考え方を変えたこと。もう一つは、心筋組織の特異性を理解した上で、心筋の持つ欠点を長所として活かしたことである。そうすることによって方向性が定まり、努力すべき事柄が明らかとなった。それは、単に、血液を心臓に導く方法を創ることと、管腔維持のためにハイドロゲルを用い、そのゲルに要求されるべき条件を列記して、その実現を図ったに過ぎない。しかし、この様に、大枠で方向性が決まれば、夢の様な事の実現も現実の物となることをこの考え方を編み出すことで学ぶことが出来た。そして、あくまでもそれをなし得たのは、自然の力であった。私はその自然治癒を、自分の意図する方向に誘導したに過ぎない。16世紀にフランスの Ambroas Pare が、「私が処置をし、紙がそれを癒し賜うた」と、名言を残し、自然治癒の偉大さを認識した。今日の医療も、この自然治癒を活用することで高度な医療が実現すると思われる。したがって、私は常に「成功裏に行われる医療行為は全て、自然治癒の人為的誘導である」と考えている。最後まで読んでくれて、私の考え方を理解してくれた読者には感謝致します。

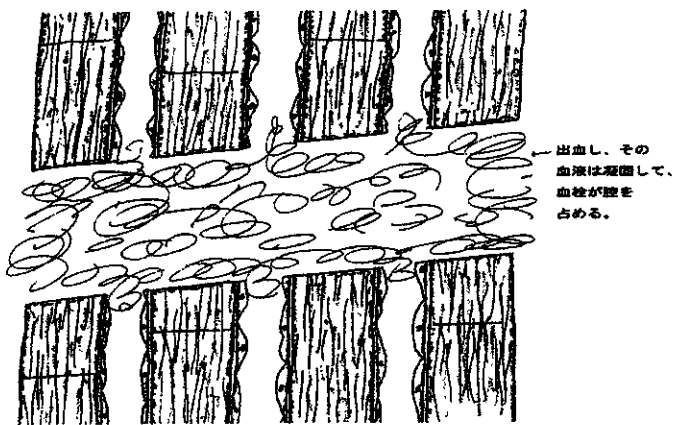
(2003. 03. 13.)



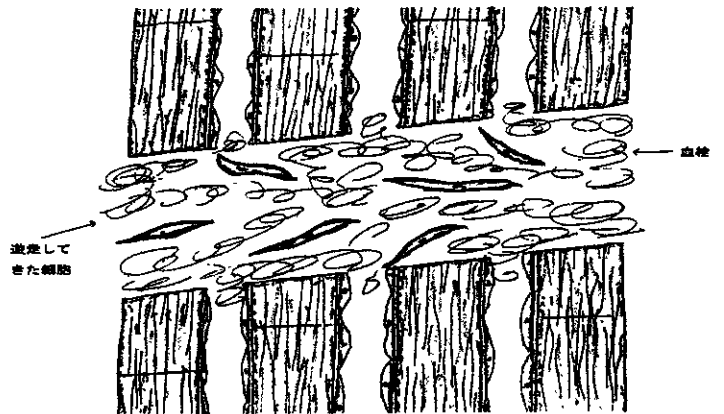
心筋組織の断面像。筋細胞の周囲を毛細血管が取り囲む。



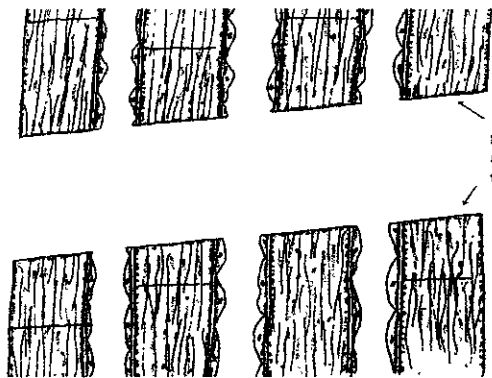
心筋組織の縦断面。心筋細胞と毛細血管は交互に存在する。



心筋に孔を開けると、その孔は直ちに血栓閉塞する。

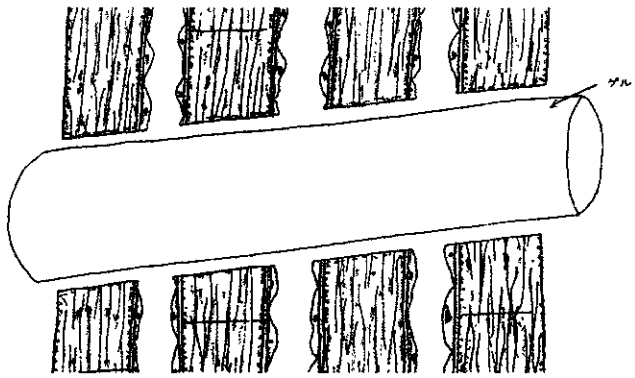


血栓内に細胞が遊走して、瘢痕組織となる。孔は開存しない。

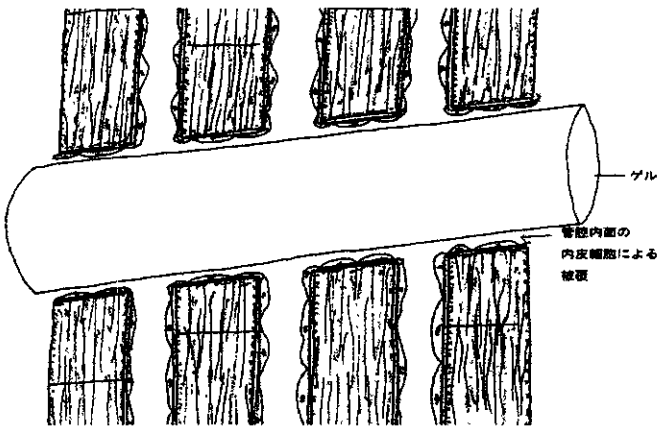


シャープな針で
穿孔させる。
血管内皮細胞を過剰
傷つけないように。

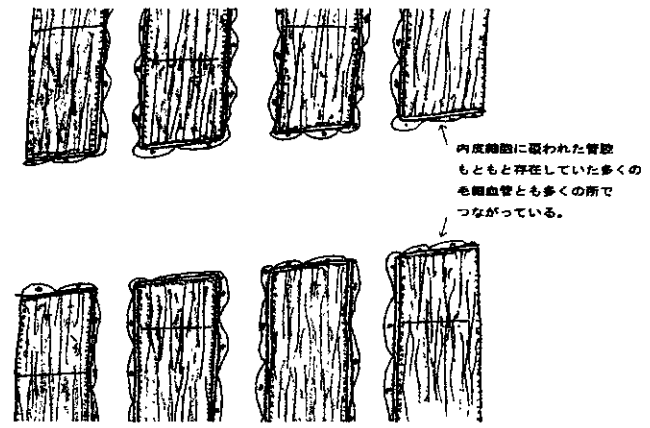
機械的に心筋内に孔を開ける。



ゲルを挿入して、血栓形成を阻止する。



ゲルに沿って、周囲から内皮細胞が遊走して、
管腔周囲の壁を修復する。(自然治癒の誘導)



ゲルが溶解すると、内皮細胞によって修復さ
れた管腔(血管)が残る。

In vivo tissue engineering

横浜市立大学 医学部 野一色泰晴

研究のバックグラウンド

今年には本研究が開始されて3年目となる。この間に世界中でTissue Engineeringに対する期待が高まってきた。本研究にとっても、昨年と同様なものの見方だけでは世界の研究にリーダー的なコンセプトを出し続けることはおろか、状況に追従できない状態にもなりかねなくなってきた。

世界の状況のこの1年間での変化は、in vivo tissue engineeringの考え方が広がってきたことであろう。マウスの背中に人間の耳の形態をした構造物を作らせることが人目を引く報告として現れた。このような技術は学術的には何ら新鮮味はないが、臨床的にこれでいけるのではないかと言った期待感を一般の方々に持たせることに貢献したと思われる。そこで次にはこの技術をどのように臨床で活用するかが問われ、さらにもっと新しい進んだアイデアはないものかと、多くの人たちが期待するようになった。このことを考えると、本研究に課せられた期待は大きくなってきたことを私は感じている。

これまでの研究の総括

我々は骨髄を人工血管に播種して、骨髄組織の産生する細胞成長因子を活用して人工血管内に血管壁を形成させる技術を開発した。この技術はこれまでにない方法であって、人工血管領域のみならず、外科手術一般に細胞性因子産生システムの移植方法として活用されるようになった。

この研究で我々が行わなかったことは、骨髄組織内に含まれる幼弱な未分化細胞、幹細胞の血管壁細胞への分化の過程を追求できなかったことである。しかしながら、骨髄には幹細胞があって、このような細胞は環境の変化に応じて分化するはずである。このようなことから、我々は積極的に未分化細胞を人工血管に用いることを考え、次の研究に移行した。

次に行った研究は腹腔内における幼弱な細胞の活用であった。我々は骨髄以外の組織から幼弱な幹細胞を採取することを考慮してきた、その結果、腹腔内には胎生期の細胞が幼弱なまま残存していることが判明したことから、腹腔内で管腔組織を作成し、そこに幼弱な腹腔内の細胞を集め、ついでその管腔を人工血管として血管の場に植え込むことによってこの幼弱な細胞が、血管という環境の変化に応じてそれぞれ血管内皮細胞や平滑筋細胞、繊維が細胞などに分化し、血管内皮細胞は人工血管内表面を覆い尽くすとともに、その表面からヘパリンなどのムコ多糖類を産生し、その表面での血栓形成を阻止する作用を行う。一方平滑筋細胞は内皮細胞層下に位置し、その長軸を張力、歪みのかかる方向に配列し、周囲に弾性繊維網を形成して、血圧によって生じる血管壁の張力に順応する柔軟で

弾力性のある組織形態を作り上げる。線維芽細胞は人工血管の枠組みとして用いたポリエステル繊維を異物として見なし、異物処理のためポリエステル繊維周囲に集まり、コラーゲン繊維を産生して線維性の結合組織を形成する。

このように、ここの細胞がそれぞれの場に応じて環境によって分化の方向付けが定められ、その結果、組織全体として血管壁組織へと分化してゆくことを確認した。

この研究によって、幼弱な細胞を用いて幼弱な組織を形成させ、その組織を環境を変化させることによって高機能組織へと組織分化させることが可能となることが明らかとなった。

本年度の研究の主眼

次に行った研究は、骨髄組織や腹腔内組織に頼らずに、一般の体組織から幼弱な細胞を集める方法の開発である。このために我々は Blastogenesis という現象を活用した。一般に細胞は成長過程にある組織内では活発に細胞分裂を繰り返し、組織形成を行う。しかしながらひとたび組織が形成されると、その維持管理のために、あるいは代謝作用によって細胞死があった場合のみ細胞分裂が行われ、新たな細胞が生まれる。小腸の内面粘膜組織のように、非常に活発に細胞死と細胞分裂の行われる組織もあれば、脳組織のように、ひとたび組織が形成されると、もはや新たな細胞分裂がほとんど行われない組織もある。また皮膚組織のように、徐々にではあるが、常に新たな細胞分裂が行われ、表皮を押し上げつつ、最上層階の細胞が細胞死を迎えている組織もある。

このような組織の中であって、一般的な多くの組織では、細胞は組織が傷害を受けた場合のみ細胞分裂を活発に行い組織修復を行うが、平時は細胞分裂をあまり行わないのが常である。そこでこのような組織内で活発な幼弱な細胞を集める方法として、細胞集積装置を開発した。

この装置は多孔性のシリコン袋の中に細胞の進入に適した足場としてのコラーゲンスポンジを入れた、単純な構造物である。この装置を皮下組織や肝臓、脾臓、腹腔漿膜などの近くに置くことによって、それらの組織内から遊走能や分裂能の高い、好奇心の旺盛な細胞を集めることが出来る。遊走能の高い細胞が必ずしも幼弱な細胞とは限らないが、活性度が高いという意味からは、細胞分裂能力も高く、幼弱な細胞、もしくは幼弱化した細胞が多く含まれているということが考えられる。すなわち、このような装置を組織の近くに置くことによって、その刺激で平時にはじっとしている細胞がとたんに細胞の遊走活動を開始し、そして細胞分裂を繰り返して、装置内の新たな環境の場へと進んできている。これがいわゆる Blastogenesis, 若返り現象、である。この若返り現象を積極的に惹起させることによって幼弱な細胞を積極的にかつ選択的に集積させることが可能となった。

このような装置で集めた細胞には、細胞分裂の活発な細胞に特有な PCNA 染色で陽性に染め出される細胞が多く含まれていることが判明しており、この装置で幼弱な細胞を選択的に集めることが可能であることが判明した。

ではこのようにして集めた細胞をどのようにすれば活用可能であろうか。我々は Blastogenesis はあらゆる組織で起きうるのではないかと考えている。たとえ神経細胞でも刺激によって細胞分裂がみ

られることは近年明らかとなってきた。そこでこのような刺激で必要な組織から幼弱な細胞を集めて、それを用いて組織構築を行わせると、ハイブリッド型人工臓器が *in vivo* で創製させることが可能となる。例えば、肝臓内部にその装置を置くことによって、幼弱な肝細胞を集めることも可能となるであろう。そうすると人工肝臓が効率よく作成できる可能性が出てくる。従って、工夫次第でこの Blastogenesis を活用した装置の応用範囲は広がると期待される。

次の研究の方向性

これまでの研究の流れから、幼弱な細胞の活用、骨髄細胞の利用、腹腔内の幼弱な幹細胞の利用、成熟した組織から幼弱な細胞を集積する方法の開発、ときたので、今後は選択的に幼弱な細胞を選別して新たな組織を作成するつもりである。

我々は本研究の根底に血管壁の形成を掲げていることから、これまでの手法を改良して、選択的に血管壁を構成する細胞を集積させ、それらの細胞で幼弱な、しかも血管組織に近似した構造物を作り上げ、それを血管という場に移すことによって、ここの細胞がその場に応じた細胞分化を起こし、組織も全体として組織分化を起こすことによって、効率のよい血管壁の形成が行われる様な手法を確立してゆく予定である。

細胞活動の賦活化法

横浜市立大学医学部外科学第1講座

野一色泰晴

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

1、これまでの試行錯誤

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

これに対して私は皮下挿入後 1-2 週間で取り出し、人工血管として使用し、急速な内膜治癒を得た。そこで我々はさらに緊急手術にも使用可能な方法として、自家静脈組織を細切して人工血管壁に播種する方法を開発して良好な結果を得た。この方法では手術室内で 10 分で操作が完了する。そこでその臨床応用を行ったが、実際に臨床では静脈片を集めることは難しかったので、皮下脂肪組織の細切を行い、約 50 例の臨床経験を得た。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髓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髓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。

人工血管開発を組織工学的に考える

横浜市立大学医学部外科学第一講座

野一色 泰晴、孟真、岩井芳弘、市川由紀夫、山崎一也、
小菅宇之、高橋和裕

要旨

小口径人工血管の設計を Tissue Engineering 的に考え、合わせて今日臨床で使用されている人工血管の問題点も考察した。Tissue Engineering に必要な条件として、私どもは細胞、細胞外マトリックス、サイトカイン、及び周囲環境、の 4 要素を考えている。細胞は内皮細胞のみならず、原始的な幹細胞のような未分化細胞をも組み込み、複数種類の細胞を共存させると Tissue Engineering 的な可能性が広がる、細胞外マトリックスは細胞の侵入や増殖に欠かせないのみならずサイトカインのリザーバーとしての役目を果たす。サイトカインは組織治癒を促進させ、周囲環境はこれらの働きを円滑に進める。従来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言うほどの勢いであった。しかし世の中が細分化から集合と協調へ目が向けられるようになり、基礎研究面でも蛋白分子の高機能の発揮場所として蛋白レベルから細胞レベルへの研究が進められる様になった頃、これと時を同じくして細胞への遺伝子の組み込みが容易に行えるようになり、研究面では Cellular Engineering, そして Gene Engineering の時代に突入した。しかしさらに研究が進むにつれて、細胞を十分に働かせるには単一細胞の平面培養よりも細胞群を塊として取り扱う方が、そしてさらに複数種類の細胞を同時に取り扱う方が種々な面で機能的であることが判明してきたと同時に、細胞間の言葉ともいえるサイトカインの研究及び細胞間接着因子の研究が進んだこともあって、Cellular Engineering から Cytokine Engineering, Adhesive Molecule Engineering および Tissue Engineering へと研究のフィールドが移行してきた。

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

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

このような例に見られるように、異種類の細胞が混在した立体的細胞社会を任意に形成させ、これによって高機能特殊細胞にその機能を存分に発揮させるための工夫がこまめに行われるようになった。これが Tissue Engineering の時代の幕開けである。従って今日の Tissue Engineering の技術とは Protein Engineering, Cellular Engineering, Gene Engineering, Adhesive Molecule Engineering, Cytokine Engineering 等の諸技術が包含された総合的な技術と見ることができる。本稿ではこのような状況下にあって、小口径人工血管開発研究における Tissue Engineering 的考えの進め方について、事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が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であって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)。完成した新生内臓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っ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、それにそって考えてみよう。まず必要な要素は細胞である。人工血管において内皮細胞が思い浮かぶように、そして人工臓器においては島細胞が思い浮かぶように、Tissue Engineering では

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

次に必要なのは細胞外マトリックスである。細胞は足場がしっかりしていないと遊走、分裂、増殖のみならず、本来の機能が発揮できない。個々の細胞には細胞固有の特性があり、細胞特性に適した場を用意する必要がある。例えば線維芽細胞などはお互いが全表面で接していてもかまわない。また接していなくても良い。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つて、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。つまりどの様なサイトカインをどの様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 CO₂ 濃度、血清濃度、電解質、微量元素濃度等は単純に変化させうる。これらはサイトカインのような特定の生物活性物質による環境操作とは独立して考えた方が良く私は考えている。そしてこれらの諸条件は細胞の社会形成時期に応じて組み合わせを変え

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

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

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

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

このように *in vitro*, *in vivo* での違いは有るにしても周囲環境は Tissue Engineering の重要な要素の一つと考えた方がよい。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、組織をそのまま最終することで、酵素処理による細胞外マトリックスの破壊は免れていることから、細胞を結びつける細胞外マトリックスも十分に残在している。さらに組織を細切することによって大量の細胞が傷害を受けることとなり、これらの傷害を受けた細胞が多量のサイトカインを産生することからサイトカインという点でも満足できる。また組織修復が *in vivo* でおこなわれるから、*in vivo* の周囲環境を活用できる。このような結果、人工血管における Tissue Engineering、すなわち新生内膜形成が素直に行われ

たことが理解できる。

5、新生血管形成を Tissue Engineering 的に考える

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

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

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

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

6、市販のコラーゲン被覆人工血管と Tissue Engineering

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

形成では無被覆人工血管に比べて有利なはずである。

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

7、汚れのないコラーゲンを被覆した人工血管

それでは汚れを防いだコラーゲン被覆人工血管を作成すればTissue Engineering的に考えたスト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