

## 走性を利用しよう

横浜市立大学医学部外科学第一講座

野一色 泰晴

### はじめに

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

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

一般的に言うと、細胞や単細胞生物など、勿論多細胞の生物にも未羅列現象であるが、それらの個体の本能的な動きの特徴の一つに「走性」という性質がある。この性質を活用すると、無理なく多くの細胞を集めることが可能となる。「走性、Taxis」の項目を理化学事典で引くと、以下の様な説明がかかっている。

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

このような、細胞の持つ本能的な性質をいかに活用するかが、Tissue Engineering の重要なキーポイントとなるであろう。しかもそれを *in vivo* で用いると、さらに顕著に現象が現れ、素直に、無理なく細胞組込型人工血管を作成することができるであろう。このたびの研究はこのようなことを基本に考えて、人工血管作りを目指した試みである。

### 材料と方法

#### 1. 使用した人工血管の基材

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

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

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

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

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

## 2. 人工血管基材への細胞の付着

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

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

## 3. 人工血管としての植え込み

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

## 4. 人工血管の取り出しと試料観察

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

を行った。

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

## 結果

### 1、人工血管基材の作成と細胞の付着

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

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

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

### 2、人工血管としての植え込み

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

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

### 3、人工血管の採取

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

#### 4、採取した人工血管の外面の肉眼的所見

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

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

#### 5、人工血管内面の肉眼的所見

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

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

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

#### 6、光学顕微鏡的評価

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

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

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

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

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

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

### 考察

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

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

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

### 3、人工血管としての評価

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

日では使用されなくなった。

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

終わりに

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

## 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、それらをと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血管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継続している。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目的が絞られている。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。この様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、その後に組織修復細胞への情報を与え、その後に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、非常の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。

この現実を考えてみると、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のみに限られたが、これで明らかなように、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

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、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。従来の人工臓器、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と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思われる。

### 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、メダカが川の流りに沿っ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、現実に存在し、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目炎被覆に貢献する。

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스에、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であって、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よう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的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、このバッファ的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、弱い細胞は押しえつけられる。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、まとめの意味合いから、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。

The long-term clinical results of vascular prostheses sealed with autologous adipose tissue fragments

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

## ABSTRACT

**Purpose:** Tissue engineering can improve the former limitations of artificial organs. This article reports the long-term clinical results of grafts constructed with fragmented adipose tissue (FAT grafts). **Method:** We did a retrospective analysis of a series of 53 patients with lower leg ischemia that received 69 fragmented adipose tissue grafts (FAT grafts) implantation in our institution. The mean follow-up period was 36.0 months. **Results:** After 1, 2, 3, and 5 years, the primary patency rates were 85.3%, 83.3%, 73.8%, and 67.7%, respectively. The lumen of occluded areas not only at anastomotic sites but also in areas far from the anastomotic sites was occupied by a thickened neointima, which had a great number of capillary blood vessels, elastic laminae, smooth muscle cells, fibroblasts, and collagen fibers. This type of intimal hyperplasia was a characteristic finding in FAT grafts. **Conclusion:** From the results of the present clinical trial, we conclude that the FAT grafts are acceptable as vascular prostheses for ischemic low extremities. The intimal hyperplasia at sites far from the anastomotic lines suggested the possibility of neointima formation throughout the luminal surface of the grafts.

## INTRODUCTION

Tissue engineering can improve former limitations of artificial organs. Two major problems of vascular prosthesis for reconstruction are the resultant delay in tissue healing with endothelialization over the graft luminal surface and development of anastomotic intimal hyperplasia. In an attempt to overcome these problems, we devised an original method of tissue engineering to accelerate the neointima formation of fabric prostheses made with autologous tissue embedded in the pores of the grafts, and we succeeded in producing a graft that may accelerate tissue healing and prevent late thrombosis occlusion. The aim of this study is to demonstrate the short-term and long-term results of our newly conceived graft.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient data

Between July, 1992, and July, 1995, a total of 69 autologous tissue fragmented graft (FAT grafts)

prostheses were implanted in 53 patients with lower leg ischemia in our institution. There were 44 males and 9 females. The mean age was 68.9 years. All the patients had arteriosclerosis obliterans in a lower peripheral artery, and according to the Fontaine classification 39 were grade 2, 7 were grade 3, 6 were grade 4 (mean grade  $2.4 \pm 0.7$ ).

#### Sealing of fabric vascular prosthesis

Approximately 30 g of subcutaneous adipose connective tissue was resected from the lower abdominal subcutaneous layer of the patient and chopped up with scissors in small pieces and suspended into saline solution according to our original method (1). Micron (Intervascular, Clearwater, FL, USA), Bard Sauvage EXS (C.R.Bard, Inc., Billerica, MA, USA), Micronit (Golaski Laboratories Inc., Philadelphia, Pa, USA), and Intervascular Low Porosity (Intervascular, Inc., Clearwater, FL, USA) were used for the framework of the graft. To obtain a smooth-tissue fragmented luminal surface, the fabric Dacron vascular prosthesis was turned inside out, except for the Sauvage EXS, and the adipose tissue fragments suspension was injected several times with pressure to force the fragments into the interstices of the fabric. Injections were repeated until it was no longer possible to pass any liquid through the graft wall by manual injection through a 20ml syringe. The sealed graft was then turned right side out to yield a fragmented adipose connective tissue graft with smooth luminal and rough outer surfaces.

Because Sauvage EXS, which was externally supported, cannot be turned inside out, the graft preparation was performed without this maneuver. A Teflon rod (Sanplatec corp., Osaka, Japan) was inserted in the prosthesis to preserve the smooth surface during further manipulation. A heparin slow release system was added, in order to mask the positively charged collagen fibers of the tissue fragments, to increase the antithrombogenicity of the graft (2). The size of straight grafts ranged from 5 to 10 mm, and the size of Y-grafts was 16-8 mm.

#### Operative techniques

The procedure was performed under general inhalation anesthesia combined with epidural anesthesia. A piece of adipose connective tissue was obtained from the subcutaneous layer of the lower abdomen, and the vascular prosthesis was prepared intraoperatively as described above. All patients had reconstruction with the FAT grafts. All the anastomoses were performed using the continuous polypropylene suturing technique. During the operation, systemic heparinization was performed (100IU Heparin/Kg) intravenously. The reconstructive procedures employed for the graft were 34 above-knee femoropopliteal bypasses, 10 aorto-unilateral femoral bypass, 9 aorto-bilateral femoral bypasses (Y grafts), 4 below-knee femoropopliteal bypasses, 4 aorto-iliac and femoral bypasses (Y grafts), 3 aorto-iliac bypasses, and 5 others. The patients were routinely treated after the graft implantation with antiplatelet

medication.

#### Follow-up

The patency of the reconstructed vessels was assessed every 2 months during the first year and every 6 or 12 months thereafter. Follow-up information was obtained from recent clinic visits. Graft patency was determined by clinical pulse examination, ankle/brachial pressure index measurements, and angiographies whenever symptoms recurred or there was a suspicion of threatening graft failure. In cases where recent follow-up was not possible, graft patency was determined at the time of the most recent examination. The mean follow-up period was 36.0 months (range, 0 to 97).

#### Statistics

All results were analyzed by actuarial methods and presented in the form of life tables, according to procedures established by the Society for Vascular Surgery/International Society for Cardiovascular Surgery committee on guidelines for reporting lower extremity ischemia (3).

## RESULTS

### Perioperative complications

In the 30-day postoperative period three patients died, one of acute myocardial infarction, one of acute mesenteric artery occlusion, and one of pneumonia. In two patients early graft thrombosis occurred (within 2 weeks) as a result of a technically flawed anastomosis.

Immediate thrombectomy and reconstruction of the anastomosis was performed leading to long-term patency in both cases. Eight patients (15.4%) had delayed wound healing because of resection of subcutaneous adipose connective tissue for sealing the fabric vascular prosthesis.

### Long-term results

During follow up, a total of 8 patients died, one each of acute myocardial infarction, cerebrovascular accident, pulmonary thromboembolism, lung cancer, ruptured esophageal varix, peritonitis, pneumonia, and hemolytic anemia. No patients underwent amputation during the period of follow-up. In one patient a fulminating infection around an FAT grafts developed, necessitating removal of the graft after 2 months.

The life table analysis for cumulative patency is summarized in Tables 1 and 2, and life tables for primary and secondary graft patency are displayed in Figs.1 and 2. At 1-year, 2-year, 3-year, and 5-year follow-up, the primary patency rates were 85.3%, 83.3%, 73.8%, and 67.7%, respectively (Table 1). Secondary patency (achieved by additional intervention) rates were 90.0%, 86.1%, 76.8%, and 70.8% at the same intervals.



Occluded or infected FAT grafts at the late follow-up times were removed and evaluated histologically. Graft occlusion did not occur at the distal and proximal sites, but in areas far from the proximal anastomotic sites. The lumen of the occluded areas was occupied with a granulositously thickened neointima, and other areas throughout the graft had a thick neointima and thrombus in the remaining narrow cavity. Under the microscope, the neointima had a great number of capillary blood vessels, elastic laminae, smooth muscle cells, fibroblasts, and collagen fibers (4).

## DISCUSSION

### Long term patency

From the results of the present clinical trial, it is concluded that the FAT grafts is capable of long-term patency: at 1-year, 3-year, and 5-year follow-ups, the primary patency rates were 87.1%, 83.2%, and 70.7%, respectively. These results must be compared with the use of other grafts for low extremity ischemia. Budd *et al* reported that the 5 year patency rates were 41% for in situ veins, 62% for reversed saphenous veins, 31% for polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts, and 29% for human umbilical vein grafts (HUV) at above and below the knee femoropopliteal bypasses(5). In randomized clinical trials between PTFE and HUV by Aalders *et al*, at 5 years the patency rate was 38.7% for PTFE and 75.1% in HUV(6). Veith *et al* compared autologous saphenous vein (ASV) and PTFE grafts, and primary patency rates at 4 years for above knee grafts were 61% for ASV and 38% for PTFE(7). El-Massry *et al* reported good results with externally supported knitted Dacron grafts for femoropopliteal bypasses, and 5-year primary patency rates for the entire series, for above knee grafts, and for below knee grafts were 70%, 71%, 57%, respectively(8). Since in this report, we counted all patients who received an FAT graft, we could not compare our results with other grafts directly. But we confirmed that our FAT grafts is equal to other kinds of grafts in long-term patency. From the long-term results, we conclude that the FAT graft is acceptable as a vascular prosthesis for ischemic low extremities.

### Tissue engineering procedures and hybrid vascular prostheses

Recently, organ construction and creating tissues by tissue engineering techniques have been attempted in various fields of medical sciences. Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biologic substitutes that restore, maintain, or improve tissue function (9).

In the field of vascular prostheses, up to this time, an endothelial cell lining on a fabric graft has never been observed except at the anastomotic sites(10). For a vascular prosthesis to

maintain long-term, stable patency it is necessary for the luminal surface of a vascular prosthesis to become covered with antithrombogenic endothelial cells rapidly and completely, not only near the anastomotic sites but also over the total length of the graft. The problem has been how to accelerate the endothelialization so that the entire luminal surface of vascular grafts becomes covered with endothelial cells.

Therefore, the combination of various types of hybrid vascular prostheses with autologous, heterologous, and homologous tissue has been studied as a tissue engineering approach to this problem. Herring et al showed that if the graft was pre-clotted with fresh blood, endothelial cells could be increased. Vascular prostheses with his method were the first hybrid vascular prostheses. They expected that antithrombogenic and antistenotic features could be gained by reconstruction of blood vessels with cell components and matrix level (11). However, the surface of the graft could not become covered with endothelial cells simply by directly seeding a prosthesis with endothelial cells.

In an experimental study, what we did to accelerate endothelialization was to transplant autologous venous tissue fragments onto the fabric vascular wall, so that neointima formation was clearly accelerated and become complete (12). The tissue fragments contain endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts (13). Tissues and organs are always composed of various kinds of cells. They create a cell community that works together synergistically, performing different roles and aiding survival. We have learned that a mixed cell community is important for the design of new hybrid artificial organs. We recognized the efficacy of venous tissue transplantation, but we could not obtain enough venous tissue for clinical use. Therefore, we tried adipose tissue instead of venous tissue for clinical applications after basic animal experiments (14,15).

#### Neointima formation

In an experimental study, we demonstrated the accelerated endothelialization and neointima formation of the FAT grafts. In clinical works, occluded and infected FAT grafts in the late follow-up period were also removed and inspected histologically. In general, vascular prostheses implanted in humans do not heal (16). Only the areas near anastomotic sites have been able to form a neointima (10,17-19). Other areas are usually covered with a fresh thrombus layer (20-22). In comparison, occlusion in FAT grafts did not occur at the distal and proximal sites, but in areas far from the proximal anastomotic sites. The lumen of the occluded areas was occupied with a granulositously thickened neointima, which contained a great number of capillary blood vessels, elastic laminae, smooth muscle cells, fibroblasts, and collagen fibers. These findings indicate that the FAT grafts has a possibility of healing its

own luminal surface.

A limitation of the FAT grafts is the existence of excessive neointima healing in some cases. It is possible that too rapid and excessive neointima healing lead to the graft occlusion. We could not control the neointima formation, so that if cells on the tissue fragments are too active, and growth factors are synthesized in too great amounts, the graft will be quickly occluded. We need to learn how to control the remodeling process using still more in vivo tissue engineering techniques. But we wish to emphasize that FAT grafts appear to have a dynamically metabolized neointima, which has not been observed in any other kind of vascular prosthesis implanted clinically.

FAT grafts are only a first step in the tissue engineering approach. The concept of FAT grafts and other tissue engineering techniques will give us better vascular prostheses with more biocompatibility and long-term patency

## CONCLUSION

From the long-term results of the present clinical trials, we concluded that FAT grafts are highly acceptable as vascular prostheses for ischemic low extremities. The FAT grafts appear to have a dynamically metabolized neointima, which has not been observed in any other kind of vascular prosthesis implanted clinically.

### 1、人工血管の歴史と、現在抱えている問題点

#### 一般的な Back Ground

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

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

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