

細胞移植療法へ向けての工学的アプローチ

山岡哲二, 馬原 淳, 橘 洋一

はじめに

人工的に組織を修復しようとする試みの歴史は古く、特に1980年頃から皮膚組織の再建が精力的に進められた¹⁾。Greenらは、フィーダーレイヤー (Feeder Layer) なる細胞層の上で表皮組織を重層化させて表皮シートを作製することに成功し²⁾、皮膚組織を再生する試みが相次いで報告された³⁾。そして1988年、米国では、これらの研究を統合した新たな分野としてTissue Engineering (組織工学) が生まれた。その後、我が国では“再生”医療と姿を変えて市民権を得ることとなり、現在では、海外でもRegenerative Medicineという英語が一般的に使われるようになってきている。表皮シートの報告から26年たった本年の7月、我が国では初めて、培養表皮の製造販売が認可されるに至った。よう

— Key word —

細胞移植療法
細胞トラッキング
MRI
幹細胞
細胞分離

Engineering approaches for the cell transplantation therapy

Tetsuji Yamaoka, Atsushi Mahara, Yoichi Tachibana :
Department of Biomedical Engineering,
Advanced Medical Engineering Center,
National Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病センター研究所
先進医工学センター 生体工学部

循環器病研究の進歩 Vol. XXVIII No.1 2007

やく再生医療を実現する時代が到来したわけであるが、それぞれの再生医療戦略の臨床化は、未だ多くの困難に直面している。

I. 再生医療

1993年、R Langerらは、ポリグリコール酸 (PGA) の不織布をスキャホールドとして用い、軟骨細胞を播種してヌードマウスの皮下に埋入することで、異所的な軟骨の再生が誘導できること、さらに、この手法が、肝臓、腸、尿管、骨などに展開できる可能性を示唆した⁴⁾。さらに1998年には、ヒトES細胞の単離が報告され⁵⁾、その後も続々と組織幹細胞が発見された。発生生物学的視点からその分化誘導技術の研究が進むとともに、組織工学の最大の問題であった有用細胞の入手問題の解決策としても期待された。

工学的要素と細胞成分からなる再生医療を、著者なりに整理すると、図1のようになる⁶⁾。工学的要素として、スキャホールドの開発、生理活性物質送達システム (DDS)、三次元培養バイオリアクター、さらには、様々な細胞分離培養基材などの技術が投入されている。また、細胞成分としては、その安全性、純度、倫理的問題など、臨床化のための課題も多く残されてはいるが、体細胞、ES細胞、組織幹細胞など、多くの優れた細胞ソースに期待がかかっている。特に患者本人から採取できる間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell : MSC) や、脂肪幹細胞の分化誘導に関して研究が進んでいる。

生体吸収性高分子の不織布やコラーゲン多

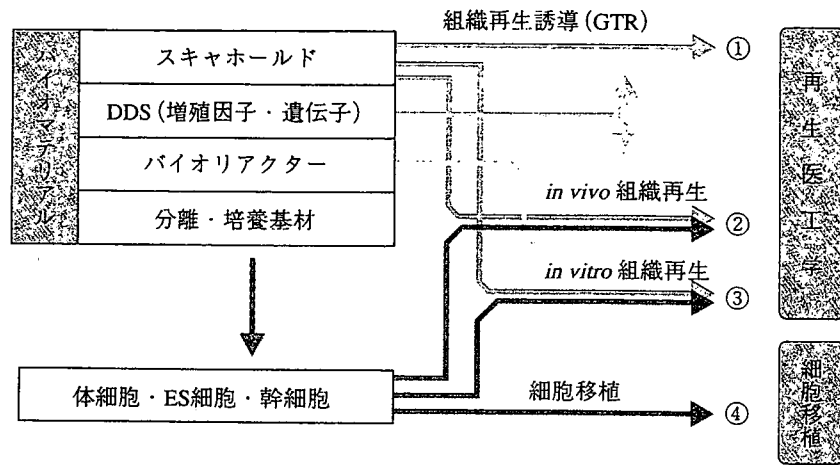
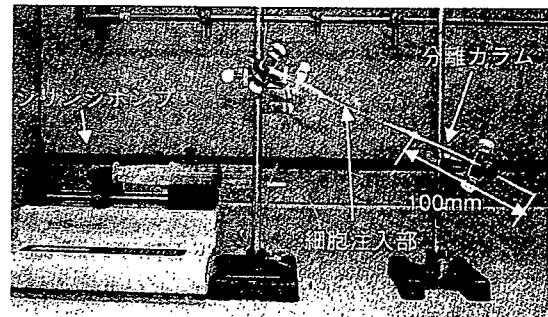


図1. 再生医療の戦略(文献6より引用改変)

孔質体をスキヤホールドとして使い、細胞を播種した後の組織再生を生体に委ねる *in vivo* 組織再生(図1②)では、内在性の増殖因子の存在や、毛細血管の新生による酸素や栄養素の供給のために、効率良い組織再生が期待できる。さらに、播種細胞が幹細胞の場合には、*in vivo*に埋入することで、幹細胞が周囲の微小環境に相応しい細胞へと分化誘導することも期待できる。一方、*in vitro*組織再生では、常に再生組織を準備できるために、工業的に大きな期待が寄せられている。しかし、内部(深部)の細胞が壊死することも多く、三次元での細胞播種・増殖・機能亢進を目指した様々なバイオリアクターが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。また、図1の①は、スキヤホールドのみを使って、*in vivo*で組織再生を試みる戦略である。例えば、断裂した末梢神経を生体吸収性チューブでつなぐ手法で、組織再生誘導法(Guided Tissue Regeneration: GTR)とも呼ばれ¹¹⁻¹³⁾、歯周組織¹⁴⁾や顎堤への検討が進んでいる。

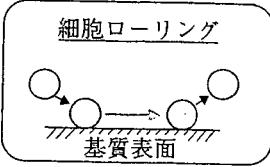
一方、図1の④の細胞移植は、マトリックスを利用することなく体外に取り出した細胞を欠損部位に注入することで治療効果を狙う



カラム長=10cm, カラム内径=0.5mm
 カラム傾斜角=20°
 細胞: 2×10^6 cells/mL, 50 μ L inject
 流速(フラクション1-5)=50 μ L/min
 流速(フラクション6-10)600 μ L/min
 フラクション体積=12.5 μ L/フラクション
 図2. 新たに設計した細胞分離カラム

方法である。臨床という意味で最も進んでいるのが、この細胞移植ではないだろうか。特に自己細胞移植では認可などの問題も少なく、さらに、幹細胞を移植することによる優れた効果が心疾患¹⁵⁾やパーキンソン病¹⁶⁾の治療において報告されている。しかしながら、これらの先進的手法が、一般的な治療法とな

細胞ローリング



$$\frac{dN_b}{dt} = \underbrace{k_f \cdot N_{l0} \cdot N_a}_{\text{forward}} - \underbrace{N_b \cdot [k_r^0 \cdot \exp(\gamma \cdot F_b / k_b \cdot T)]}_{\text{reverse}}$$

N_b : 結合体の密度
 k_f : 結合速度定数
 N_{l0} : リガンド密度
 N_a : 接触領域内にあるフリーのレセプター密度
 k_r^0 : 解離速度定数
 γ : Characteristic structural length

F_b (force per bond) $\propto \frac{\partial v_f(s)}{\partial s}$
 k_b : ボルツマン定数
 T : 絶対温度

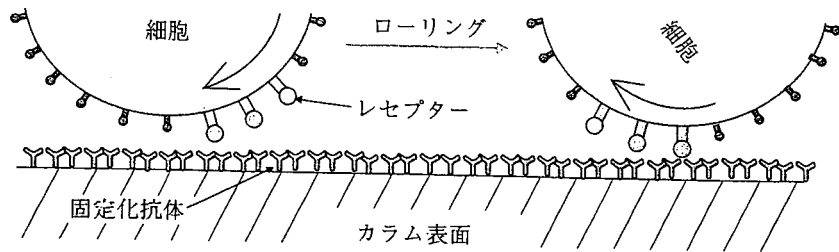


図3. 細胞ローリングの理論

[Daniel A. Hammer and Douglas A. Lauffenburger, Biophys. J., 52, 475-487 (1987)]

るには解決しなくてはならない課題もまだまだ多い。

本稿では、我々が進めている、細胞移植療法を実現するための新たな工学的システムの開発について紹介する。

II. 新しい原理に基づく細胞分離カラム

MSCは、細胞移植における有力な細胞ソースとして注目されている。しかし、均一なMSCを組織から単離することは難しい。一般的に骨髄などの組織からMSCを単離する簡便な手法としては、付着系細胞を分離する手法や密度勾配遠心法が用いられている。さらに細胞表面マーカーに基づく分離法としては、FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) 法、あるいはMACS (磁気ビーズ) 法が挙げられる。しかしながら、得られる細胞群には多くのサブポピュレーションが含まれており、均一なMSCを単離することは困難である。さらに、抗体や化学試薬が単離した細胞懸濁液に混入するために、さらなる細胞

の洗浄精製も必要である。このような問題を解決するために、我々は平面基板上に抗体を配列した細胞分離システムを開発した。細胞は基板上に高密度で固定化された抗体と相互作用するので、周囲の液体を強制的に流すと、細胞は基板上を転がる。このように基板上を細胞が転がる現象は、炎症部位などに白血球が集積する際に血管内壁で起こる白血球ローリング現象として知られており¹⁾、この現象を応用した細胞分離カラムである(図2)。抗体を高密度で導入するために、シリコンチューブ(内径0.5mm)内腔にポリアクリル酸のグラフト鎖を導入し、カルボジイミド法により抗CD34抗体を固定化した。Hammerらは、流体中における細胞表面レセプターと固定化リガンドとの連続的な脱着反応について、数学的な知見からそのメカニズムを解析している(図3)。この式の第1項に記述されているように、脱着反応におけるリガンド-レセプター間の複合体形成は、細胞表面レセプター密度に依存することが示唆されてい

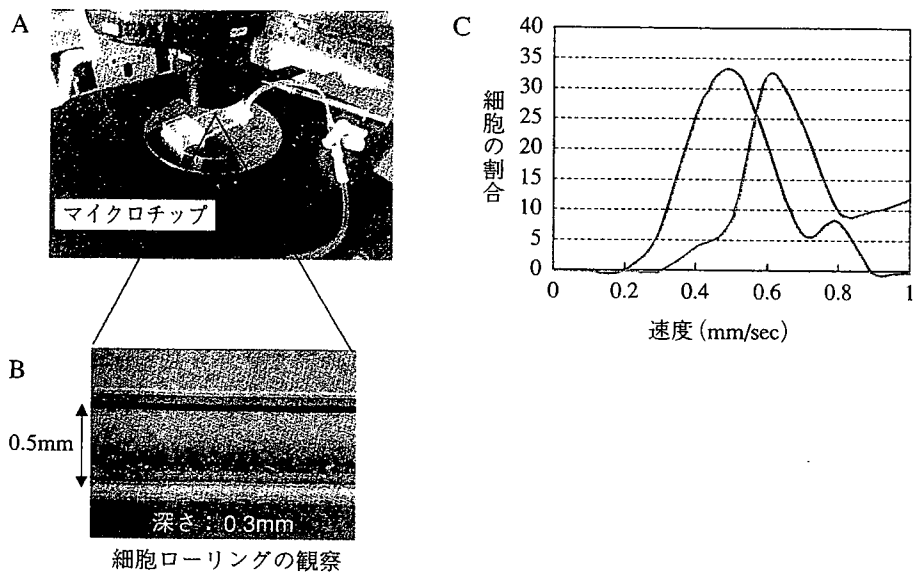


図4. マイクロ流路中 (B) を移動する KG-1a細胞 (Cの青) と HL60細胞 (Cの赤) の速度分布

る。つまり、レセプター密度が高い細胞が流体中においてリガンド固定化基板上をローリングする場合、多くの複合体形成が誘起されるため、ローリング速度に大きく影響を与える¹⁸⁾。すなわち、この新規カラムに、ヘテロなポピュレーションを有する細胞懸濁液をアプライすると、細胞表面マーカー密度が高い細胞ほど、遅れて溶出する。また、この手法では、抗体などで細胞を染色する必要がなく、密度勾配メディウムなども利用しないために、溶出してきた細胞懸濁液への異物混入はない。

図4は、CD34陽性株 KG-1a細胞と陰性株 HL-60細胞を、抗CD34抗体固定化表面でローリングさせたときのローリング速度を実測した結果である。この実験では、マイクロチップ底面に抗体を配列して細胞を流し、その移動速度を高速度撮影により評価した。その結果、KG-1a細胞の移動速度は、HL60に比較して30%程度抑制されていることが明らかとなった。このカラムを用いて、

C57BL/6マウスの大腿骨から採取した骨髓細胞中の接着性細胞(粗精製MSC細胞を含んでいると考えられている)の分離を行った。その結果、抗CD34抗体固定化カラムに通液した場合にのみ、溶出時間が遅延するフラクションが確認され、その溶出時間はCD34抗原密度に依存していることが証明された¹⁹⁾。さらに、得られた各フラクション中の細胞に対して骨芽細胞への分化を誘導したところ、あるCD34密度を有する細胞フラクションで最も高い分化マーカー遺伝子の発現が確認された。すなわち、ある密度で目的表面マーカーを有する細胞群のみを回収できる本細胞分離カラムを用いることで、分化能力の高い細胞フラクションを単離することが可能となった。

Ⅲ. 細胞トラッキング

細胞移植療法のメカニズムは、未だ不明な部分が多い。すなわち、組織再生や機能改善が、移植した細胞自身の増殖により機能が回

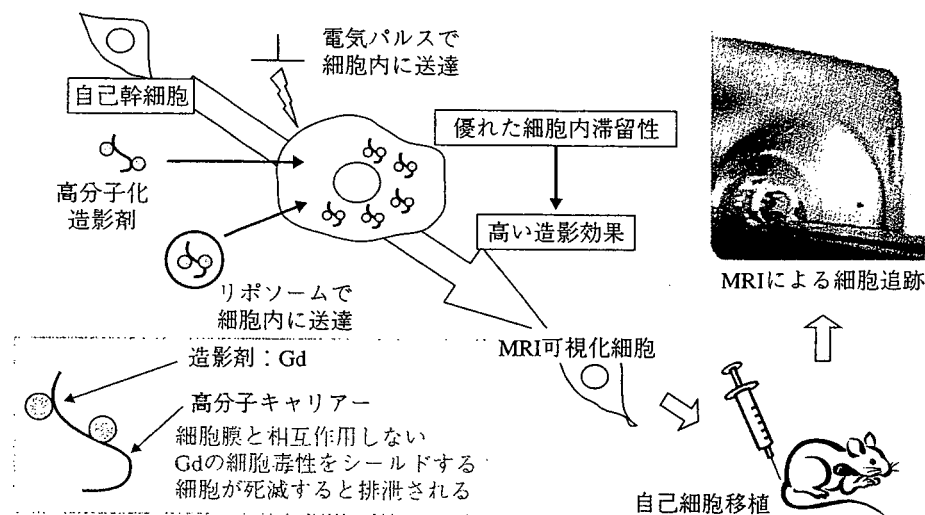


図5. 移植した自己幹細胞をMRIにより追跡するための高分子化MRI造影剤システム

復したためによるのか、あるいは、移植した細胞が産生する生理活性物質などに対してレシピエント（移植を受けた患者）が反応することで治癒したパラクライン効果によるものかは不明である。その最大の原因は、移植した細胞を見分けられないからである。特に、自家細胞移植では免疫染色でも区別が困難である。1つの手法として、GFP(+)の細胞をGFP(-)マウスに移植して*in vivo*蛍光イメージング装置で追跡すれば、非侵襲的かつ経時的に追跡することも可能だが、蛍光の特性により、ラット程度の小動物が限界である。このような現状では、細胞移植治療自体の具体的な効果を証明できず、臨床への大きな障害となっている。

そこで我々は、移植した細胞をMRIで経時的に追跡することが、細胞移植治療の評価に大きく貢献すると考え、新規な細胞標識用MRI造影剤の開発を開始した。この目的を達成するには、磁性を有する分子（ガドリニウム錯体など）を移植細胞の細胞質内に長期間安定に滞留させる技術が必須となる。さら

に、細胞の増殖や機能発現を妨げることなく、細胞が死滅したときには、この造影剤が速やかに体外へ排泄されることが必要である。

図5に、本システムの概要を示した。ガドリニウム錯体分子（青丸）の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、高分子キャリアーを用いた。この高分子化により、細胞滞留性は向上する反面、細胞内へ送達することも容易ではない。そこで、細胞に微弱な電氣的ショックを加える手法により、細胞内に高分子化造影剤を送達した。このような物理的・機械的手法を選択することで、細胞の種類を問わず同一条件で、本造影剤を送達することが可能となった²⁰⁾。NIH3T3細胞、およびラット間葉系幹細胞を本造影剤にて標識したところ、10日間にわたって、細胞からの造影剤の有意な漏出は認められなかった。このことより、1年程度は、移植細胞をMRIにより追跡できる性能を有していると考えられる。図6は、標識したNIH3T3細胞を皮下に埋入したマウスの、MRI断層写真である。移植細胞がはっきり

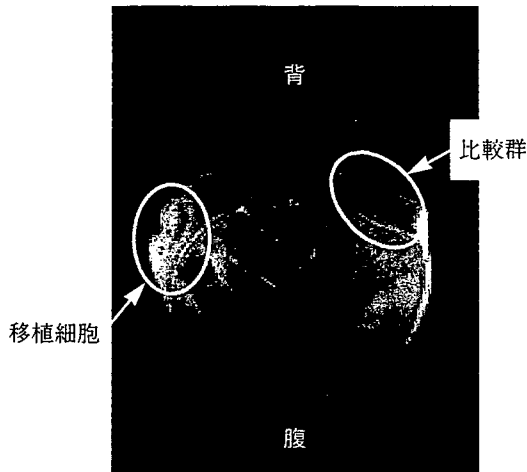


図6. 高分子化MRI造影剤を封入した細胞を皮下に移植したマウスのMRI断層写真

と確認できる。細胞内に存在する極微量の水を介して撮像可能なコントラストが得られていることは、キャリアーとして選択したPVA分子がGd周囲環境の水を確保しているためかもしれない。本造影剤により、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、移植細胞数を最低限に抑えることにより、最低限のリスクで、最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を得ることが可能になると期待される。

おわりに

ヒト細胞を利用した再生医療は魅力的であるが、その安全性確保、レギュレーション、倫理的問題の解決にはまだ時間がかかりそうである。実際のデバイス開発はもちろんのこと、その安全性と確実性を担保して、高い治療効果を現実のものとするためにも、新たな工学的戦略の創成が必須である。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助

金事業の医療機器開発推進研究事業(ナノメディシン研究)、および文部科学省京都地区知的クラスター創成事業京都ナノテク事業創成クラスターからのご援助を頂いた。ここに心から謝意を表するものである。

§ 文 献

- 1) 筏義人: 再生医工学. 東京, 化学同人, 2001.
- 2) H Green, O Kehinde, J Thomas : Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:5665.
- 3) E Bell, HP Ehrlich, DJ Buttle, et al : Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science 1981;211:1052.
- 4) R Langer, JP Vacanti : Tissue engineering. Science 1993;260:920.
- 5) JA Thomson, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145.
- 6) 石原一彦, 畑中研一, 山岡哲二, 他 : バイオマテリアルサイエンス. 東京, 化学同人, 2003.
- 7) RL Carrier, M Papadaki, M Rupnick, et al : Tissue Engineering: Cell Seeding, Cultivation Parameters, and Tissue Construct Characterization. Biotechnol Bioeng 1999;64:580.
- 8) G Vunjak-Novakovic, I Martin, B Obradovic, et al : Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage. Journal of Orthopaedic Research 1999;17:130.
- 9) T Kitagawa, T Yamaoka, R Iwase, et al : Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor for *in vitro* tissue reconstruction. Biotechnology and Bioengineering 2006;93: 947.
- 10) L Soletti, A Nieponice, J Guan, et al : A seeding device for tissue engineered tubular structures. Biomaterials 2006;27:4863.
- 11) S Nyman, J Lindhe, T Karring, et al : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol 1982;9:290.
- 12) M Chaouat, C Le Visage, A Autissier, et al : The evaluation of a small-diameter polysaccharidebased arterial graft in rats. Letourneur Biomaterials 2006;27:5546.

- 13) MJ Moore, JA Friedman, EB Lewellyn, et al : Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials* 2006;27:419.
- 14) IG Needleman, HV Worthington, E Giedrys-Leeper, et al : Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;19: CD001724.
- 15) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al : Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;12(4):459.
- 16) SW Kim, H Han, GT Chae, et al : Successful Stem Cell Therapy Using Umbilical Cord Blood-Derived Multipotent Stem Cells for Buerger's Disease and Ischemic Limb Disease Animal Model. *Stem Cell* 2006;24:1620.
- 17) UH von Andrian, JD Chambers, LM McEvoy, et al : Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7538.
- 18) Daniel A. Hammer and Douglas A : A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Lauffenburger Biophys J* 1987;52:475-87.
- 19) 山岡哲二, 他 : 細胞の分取方法, 及び当該方法に用いる基材. 特願 2005-324162.
- 20) Tachibana Y, Ennmi J, Iida H, et al : Abstract for SFB 2007 Annual meeting. 94, 2007.

心臓移植

中谷武嗣 国立循環器病センター臓器移植部

心筋障害が高度となり心臓ポンプ機能を維持できなくなると心臓機能の置換が必要となり、心臓移植あるいは人工心臓が考慮される。心臓移植は、世界では7.3万例以上に施行され¹⁾、わが国では1997年10月に「臓器の移植に関する法律」が施行されてから36例に行われている²⁾。また、2006年4月からは健康保険において移植関係学会合同委員会で心臓移植実施施設として選定された7施設での同種心臓移植術の実施が認められた。

心臓移植の適応

表1に心臓移植の適応基準を示す。主な適応疾患は、拡張型心筋症(DCM)および拡張相肥大型心筋症(dHCM)と虚血性心筋疾患で、DCMおよびdHCMでは心筋生検による確定診断が必須である。また、移植後においては一生免疫抑制療法が必要であり、移植後の治療に対するコンプライアンスなどを含めて検討する必要がある。

表1 ▶ 心臓移植におけるレシピエント適応基準

1. 適応となる疾患	3. 除外条件
<p>心臓移植の適応となる疾患は従来の治療法では救命ないし延命の期待がもてない以下の重症心疾患とする</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 拡張型心筋症、および拡張相の肥大型心筋症 2) 虚血性心筋疾患 3) その他(日本循環器学会および日本小児循環器学会の心臓移植適応検討会で承認する心臓疾患) 	<p>A) 絶対的除外条件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 肝臓、腎臓の不可逆的機能障害 2) 活動性感染症(サイトメガロウイルス感染症を含む) 3) 肺高血圧症(肺血管抵抗が血管拡張薬を使用しても6 wood単位以上) 4) 薬物依存症(アルコール性心筋疾患を含む) 5) 悪性腫瘍 6) HIV(human immunodeficiency virus)抗体陽性 <p>B) 相対的除外条件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 腎機能障害、肝機能障害 2) 活動性消化性潰瘍 3) インスリン依存性糖尿病 4) 精神神経症(自分の病気、病態に対する不安を取り除く努力をしても、何ら改善がみられない場合に除外条件となることがある) 5) 肺梗塞症の既往、肺血管閉塞病変 6) 膠原病などの全身性疾患
<p>2. 適応条件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 不治の末期的状態にあり、以下のいずれかの条件を満たす場合 <ol style="list-style-type: none"> a) 長期間または繰り返し入院治療を必要とする心不全 b) β遮断薬およびACE阻害薬を含む従来の治療法ではNYHA3度ないし4度から改善しない心不全 c) 現存するいかなる治療法でも無効な致死的重症不整脈を有する症例 2) 年齢は60歳未満が望ましい 3) 本人および家族の心臓移植に対する十分な理解と協力が得られること 	

適応決定と待機中の管理

心臓移植の適応決定には、各施設内適応検討会と日本循環器学会心臓移植適応検討小委員会の2段階審査を経なければならない^{3, 4)}。心臓移植適応と判定されれば、各移植施設でインフォームドコンセントが本人および家族へ行われ、諸手続きを行って日本臓器移植ネットワークの心臓移植待機リストへ登録し移植待機となる。

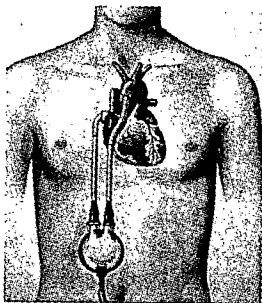
ドナー情報はいつくるか予測できないため、移植待機中は、いつでも移植できる状態に維持するように治療を続ける。また、心機能改善例や他臓器障害などのため適応外となることがあるため、6か月ごとに再検討を行う。心不全が進行し多臓器不全を引き起こすようであれば、心臓移植へのつなぎとして補助人工心臓 (ventricular assist system : VAS) の適応を考慮する。これまで種々のシステム(図1)が用いられてきたが、現時点では左室脱血体外設置型VASの東洋紡製国立循環器病センター型(国循型)が用いられ、また、遠心ポンプを用いた植込み型LVASのEvaHeartの治験が行われている⁵⁾。

図1 ▶ わが国で用いられる補助人工心臓

拍動流体外設置型LVAS

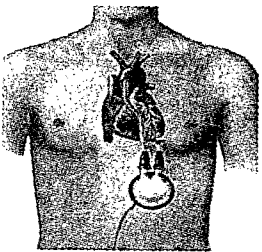
東洋紡製国循型

左房脱血方式(1982-)

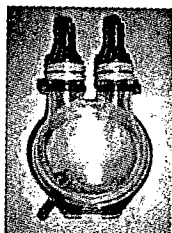


制御駆動装置
VCT-50

左室脱血方式(1999-)



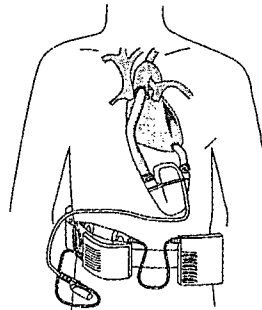
制御駆動装置
Mobart-NCVC(2006-)



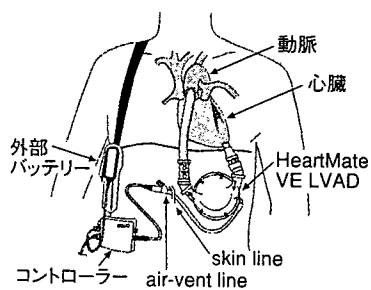
ヘパリン化ポンプ
(2006-)

拍動流体内設置携帯型LVAS

Novacor LVAS



HeartMate VE LVAS/IP

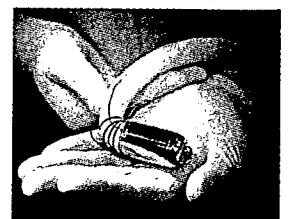
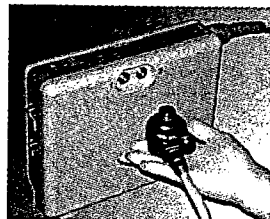


無拍動流体内設置携帯型

サンメディカル社
EVAHEART (遠心ポンプ)



Jarvik2000
(軸流ポンプ)



ドナー心の評価とレシピエント候補の決定

臓器移植のドナーとしての適否の検討とともに、ドナー心の評価が行われ、心疾患、心臓外傷、開心術の既往があれば適さない。心臓移植のドナーとして現状では60歳以下が対象で、心電図や心エコー図などで評価するが、男性45歳、女性50歳以上では冠状動脈硬化性病変に配慮する。また、大量のカテコラミン剤(ドバミン $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 相当以上)が用いられている場合は慎重に検討する。最終判定は、ドナー手術における開胸下の触診および視診により行う。

ドナーに対するレシピエント候補の選定においては、まず適合条件として、血液型の一致あるいは適合、サイズの適合(体重差 $-20\sim+30\%$ が望ましい)、前感作抗体がないこと(リンパ球・クロスマッチを実施)が検討される。複数の適合候補がいる場合は、虚血許容時間(4時間以内に血流再開ができること)、医学的緊急度(表2)、ABO式血液型および待機期間により優先され、同一条件の患者が複数いる場合は待機期間の長い者から優先される。

心臓移植手術および術後管理⁶⁻¹¹⁾

移植術式としては、心房位吻合を行うLower-Shumway法(図2)と、上・下大静脈で吻合するbicaval法(図3)があり、当センターではレシピエントの右房後壁の一部を温存して上・下大静脈で吻合するmodified bicaval法(図4)を用いている⁷⁾。

心臓移植後の予後に影響する重要な因子として、移植心不全、急性拒絶反応、感染症、移植心冠動脈病変、悪性腫瘍がある。移植心不全には、摘出時のドナー心の状況、心保存法などが関係する。強心薬が使用されている場合や経過中に心停止がある場合は、心電図や心エコーによりドナー心機能の評価を慎重に行う。心保存液としては、ドナー病院で使いやすいものであることも重要で、筆者らはCelsior液を用いている。また、小型ジェット機やヘリコプターを積極的に用い短時間での搬送が行えるようにする。

移植後の管理においては急性拒絶反応への対応が重要である。診断法として心内膜心筋生検法が確立し、新たな免疫抑制薬としてシクロスポリンが開発された1980年初頭から心臓移植の成績が向上し、治療手段として受け入れられるようになった。なお、急性拒絶反応があっても臨床的に無症状である場合が多く、定期的に心内膜心筋生検を行う¹⁰⁾。免疫抑制療法として、一般的にシクロスポリン(ネオ

Status 1: 次の(ア)から(エ)までの状態のいずれかに該当すること

(ア) 補助人工心臓を必要とする状態

(イ) 大動脈内バルーンポンピング(IABP)を必要とする状態

(ウ) 人工呼吸を必要とする状態

(エ) ICU, CCUなどの重症室に収容され、かつ、カテコラミンなどの強心薬の持続的な点滴投与が必要な状態

Status 2: 待機中の患者で、上記以外の状態

Status 3: Status 1, Status 2で待機中、除外条件(感染症など)を有する状態のため一時的に待機リストから削除された状態

表2 ▶ わが国における心臓移植希望者(レシピエント)選択基準—医学的緊急度

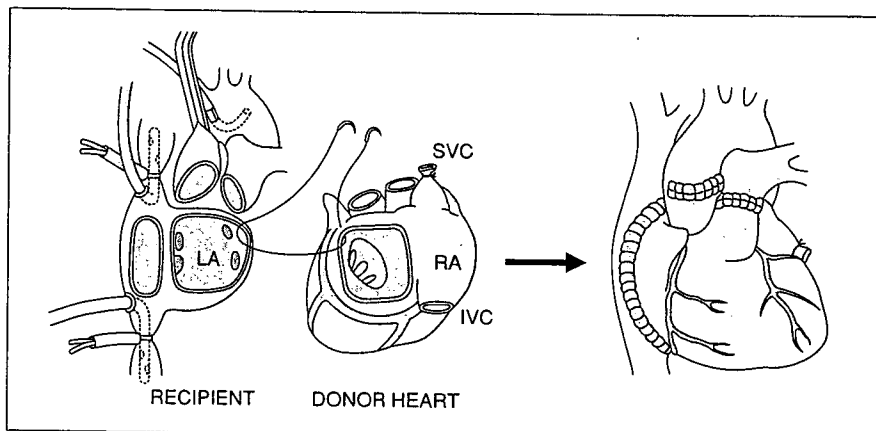
ール®)あるいはタクロリムス(プログラフ®), ミコフェノール酸モフェチル(セルセプト®)とステロイド(プレドニン®)の3者併用療法が用いられる¹¹⁾。国際心臓肺移植学会の基準2あるいは3A以上の所見がある場合には治療が必要で、まずステロイドパルス療法を行う。パルス療法に抵抗性の場合には抗胸腺抗体(ATGやOKT3)による治療が必要となる。

免疫抑制療法を行う場合には感染症への対応が重要となる。術後1ヵ月以内は細菌感染症が多いが、その後はサイトメガロウイルス(CMV)や単純ヘルペスウイルスなどの日和見感染が増加する。特にCMV感染は、移植後冠動脈病変の危険因子の1つとされており、早期発見および治療が予後に大きく影響する。

移植後冠動脈病変は、移植心冠動脈にびまん性の求心性内膜肥厚が進行するもので、心移植患者の長期予後に関与する。なお、移植心は除神経されているため、虚血病変に対し胸痛を自覚せず、心原性ショックを突然発症したり、不整脈による突然死を引き起こすことがある。定期的な冠動脈造影と血管内超音波検査(IVUS)による検討が必要である。また、移植後冠動脈病変はびまん性で血行再建術の適応とならない場合が多く、重症例では再移植が必要となる。最近移植後冠動脈病変発現を抑制する新しい免疫抑制薬として、シロリムス(ラパマイシン)やエベロリムス(RAD, サーティカン)が開発され、近々わが国へ導入される予定である。

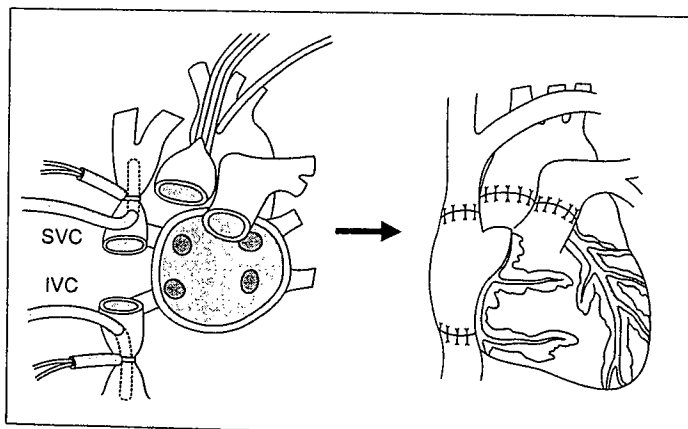
免疫抑制療法は心臓移植後一生継続する必要がある、移植後長期になるにつれて

図2 ▶ Lower-Shumway法



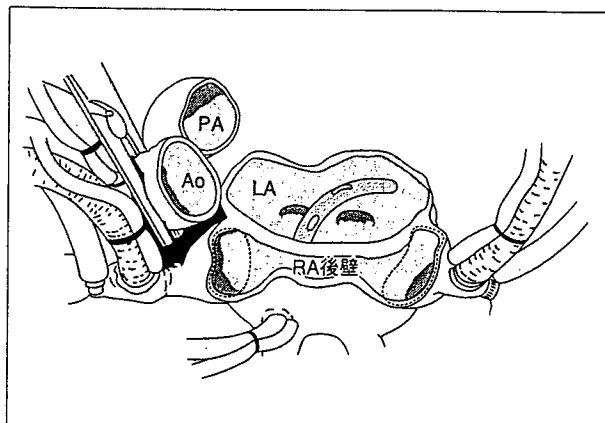
(文献8より改変引用)

図3 ▶ bicaval法



(文献8より改変引用)

図4 ▶ modified bicaval法



(文献6より改変引用)

悪性腫瘍発生の危険性も高まる。特に、悪性リンパ腫 (post transplant lymphoproliferative disorder : PTL) や皮膚癌に注意する。

QOLの維持と良好な予後を得るために、免疫抑制薬による腎機能障害や糖尿病などの予防、移植後冠動脈病変の進展予防のための高血圧や高脂血症の予防および治療、感染症予防(特にCMV感染、ヘルペス感染など)、悪性腫瘍の早期発見、ステロイド使用による骨粗鬆症の進展予防などへの配慮が重要である。

世界の成績¹⁾

国際心肺移植学会による2006年の統計では、1982年から2005年までに73,300例が行われ、1年生存率81.2%、10年生存率49.8%で、移植後1年生存した症例での50%生存期間は13年であった。また、1999年以降の症例では、1年生存率が84.9%と良好になってきている。主な免疫抑制療法は、シクロスポリン(あるいはタクロリムス)、ミコフェノール酸モフェチル、プレドニンの三者併用療法であるが、最近ラパマイシンが用いられるようになってきている。また、導入療法としてATGやOKT3に加え、IL2 receptor antagonistが用いられている。死亡原因は、急性期では移植心不全、急性拒絶反応が多く、1年以後の主なものは移植後冠動脈病変や悪性腫瘍である。また、移植後7年までの調査で、ほぼ90%の患者が活動制限なしの生活を送っている。

わが国における心臓移植の成績²⁾

日本臓器移植ネットワークへの登録は2006年8月現在250例で、36例(14%)の心臓移植が実施されたが85名(34%)が待機中に死亡した(表3)¹²⁾。

わが国での施行36例を表4に示すが、原疾患はDCM、dHCMなど非虚血性心筋症が大部分で、虚血性および非虚血性心筋症がほぼ同数の国際レジストリーと異なっている¹⁾。待機状態は全例Status 1で、28例(78%)はLVAS装着例であった。移植待機日数は長期化し、Status 1として平均688日であり28例が1年以上の待機であった。このため、LVAS装着期間も長期化し、平均739日、22例(61%)が1年以上であった。

移植後最長7年7ヵ月におよび、死亡は2例のみで、国際レジストリーに比べ良好な成績を示している(図5)。また、良好なQOLを示している。

今後の展望

末期心不全に対し、心臓移植は良好な成績を示しているが、ドナー心を必要とするため、施行数に限界があり、特にわが国での心臓移植施行例は少なく、待機期間も長期におよび、LVASによるブリッジ例が多数を占めている。今後、わが国での心臓移植プログラムの充実を図るとともに、QOLのよいLVASの臨床導入も必要である。

表3 ▶ 日本臓器移植ネットワークへの登録症例(2006年8月31日現在)

登録待機中	90例*
移植	36例
取消し	12例
死亡	85例
海外渡航移植	27例
登録者累計	250例

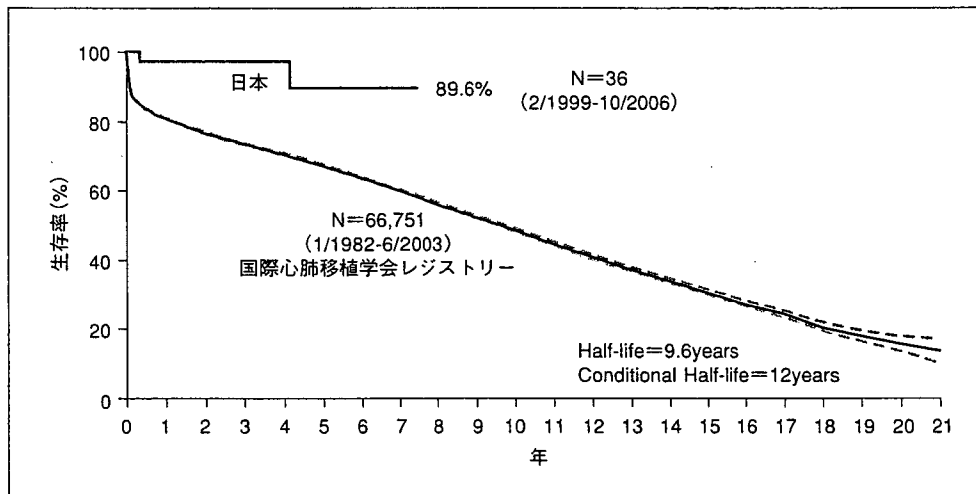
(* ; status 1 : 48例, 3年以上待機 : 29例)

(文献12より引用)

表4 ▶ わが国における心臓移植症例

症例数	36例
年齢	8~61 (平均37) 歳
性別	男性 : 26例, 女性 : 10例
原疾患	DCM : 26例, dHCM : 6例, 薬剤性CM : 1例, 心筋炎後CM : 1例, ICM : 1例, 先天性 : 1例
待機状況	Status1 : 全例 (LVAS装着 : 28例, 強心薬持続投与 : 8例)
待機期間 (status 1)	29~1,304日 (平均688日, 1年以上 : 28例)
LVAS補助期間	21~1,443日 (平均731日, 1年以上 : 22例)
東洋紡-左房型	2例 (39日, 964日)
東洋紡-左室型	20例 [99~1,443日 (1年以上 : 16例)]
Novacor	2例 (125日, 1,087日)
HeartMate-IP	2例 (518日, 590日)
HeartMate-VE	2例 (993日, 1,056日)
移植施設	
	国立循環器病センター : 18例, 大阪大学 : 9例, 東京女子医大 : 3例, 九州大 : 2例, 埼玉医大 : 2例, 東北大 : 1例, 東京大 : 1例

図5 ▶ 心臓移植後の累積生存率



【文献】

- 1) The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation : Twentieth-second official adult heart transplant report-2006. J Heart Lung Transplant 25 : 869-911, 2006.
- 2) 中谷武嗣 : 心臓移植. 総合臨床 55 : 2053-2062, 2006.
- 3) 藤原久義, 西垣和彦 : なぜ内科医は移植医療にかかわらないか? -心臓移植の立場から- わが国は信じがたい心臓移植後進国- . 移植 41 : 2-9, 2006.
- 4) 日本循環器学会ホームページ : <http://www.j-circ.or.jp>
- 5) 中谷武嗣 : 治療の進歩 : 補助人工心臓. 日本内科学会雑誌 94 : 111-118, 2005.
- 6) 北村惣一郎 : 心臓移植. 『心臓血管外科手術書』(小柳 仁, 北村惣一郎, 安井久喬, 編). 先端医療技術研究所, 2002, p221-226.
- 7) Kitamura S, Nakatani T, Bando K, et al : Modification of bicaval anastomosis technique for orthotopic heart transplantation. Ann Thorac Surg 72 : 1405-1406, 2001.
- 8) McCarthy PM, Smith JA, Siegel LC, et al : Cardiac transplant admission, anesthesia, and operative procedures. in The Stanford Manual of Cardiopulmonary transplantation, Futura, New York, 1996,
- 9) 中谷武嗣, 花谷彰久 : 心臓移植療法のパラダイムシフト. 治療 86 : 2147-2155, 2004.
- 10) 植田初江, 由谷親夫, 中谷武嗣 : 臓器移植の病理 : 心臓移植. 移植 38 : 8-13, 2003.
- 11) 中谷武嗣, 花谷彰久, 北村惣一郎 : 胸部移植プロトコール集 (北村惣一郎, 黒澤博身, 松田 暉ほか編). メジカルビュー社, 東京, 2003, p15-36.
- 12) 日本臓器移植ネットワークホームページ : <http://www.jotnw.or.jp/>

心筋症

編集

松森 昭

京都大学大学院医学研究科循環器内科学助教授
国際心筋症・心不全学会理事長

113

MEDICAL VIEW

新目でみる循環器病シリーズ 15
心筋症

2007年3月20日 第1版第1刷発行

■企画 木全心一 きまたしんいち

■編集 松森 昭 まつもりあきら

■発行者 浅原実郎

■発行所 株式会社メジカルビュー社

〒162-0845 東京都新宿区市谷本村町2-30

電話 03(5228)2050(代表)

ホームページ <http://www.medicalview.co.jp/>

営業部 FAX 03(5228)2059

E-mail eigyo@medicalview.co.jp

編集部 FAX 03(5228)2062

E-mail ed@medicalview.co.jp

■印刷所 株式会社シナノ

ISBN978-4-7583-0137-4 C3347

©MEDICAL VIEW, 2007. Printed in Japan

-
- ・本書に掲載された著作物の複写・複製・転載・翻訳・データベースへの取り込みおよび送信(送信可能化権を含む)・上映・譲渡に関する許諾権は、(株)メジカルビュー社が保有しています。
 - ・**JCLS** (株)日本著作出版権管理システム委託出版物)
本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど、事前に(株)日本著作出版権管理システム(電話 03-3817-5670 FAX 03-3815-8199)の許諾を得てください。

再生医療工学の技術

再生医療工学の技術

監修 ◆ 笹 義人

Technology
Regenerative
Medicine

再生医療工学の技術

再生医療工学の技術

監修 ◆ 笹 義人



9784882319375



1923047038005

ISBN978-4-88231-937-5
C3047 ¥3800E

定価(本体3,800円+税) (B0830)



通常は60歳以上の高齢者への適用とされる。また、BSE問題をきっかけに、ウシ心臓の使用は控えられる傾向にある。

欧米では1985年頃から、我が国でも、近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことにより、死体から提供された凍結保存心臓弁が臨床で使用されつつある。これは、機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして両者に対して抗感染性で優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者では比較的早期に機能不全をきたす症例も報告されており、免疫反応の関与が強く示唆されている。若年者に有効とされる Ross 手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存心臓弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存心臓弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が少なくない。以上のように、再生医療心臓弁に求められる特性として、抗凝固性、耐久性、成長性などが挙げられよう。

4.3 再生医療心臓弁の世界的動向

マサチューセッツ工科大学の Langer や Vacanti らによって提唱された組織工学の手法は、すでに米国で細胞を組み込んだ人工皮膚として製品化されている。同様の手法を用いた再生医療人工弁が、1995年以降、彼らのグループから報告されている¹⁾。新聞からはトジジを用いた実験で、末梢血管の細切によって血管内皮細胞、平滑筋細胞、および繊維芽細胞を分離した後、8-10週間培養し、ポリグリコリコール複製のシート状メッシュ上にまず繊維芽細胞と平滑筋細胞を、続けて1週間後に血管内皮細胞を播種することによって、再生医療心臓弁を作成した。ヒツジの肺動脈弁の一葉を再生医療心臓弁葉で置換したところ、6週後には正常組織と同様の組織が再生し、9週以降は力学特性も正常組織と同等であったと報告している²⁾。最近、彼らは弁葉だけでなく、三葉を有するバルサルバル弁の心臓弁組織 scaffold を開発し、細胞を播種することで *in vitro* で弁全体を組織工学的に作成し、臨床応用を開始する計画である。このような生体吸収性 scaffold を用いた再生医療心臓弁は、韓国ソウル大学などからも報告されている³⁾。

一方、米国の CryoLife 社は1992年から米国政府の補助を受けて動物組織から細胞を除去した異種組織移植法の研究開発に取り組み、詳細を明らかにしていないが、SynerGraft と称する細胞除去方法を発表している。同社は1999年から脱細胞化ブタ大動脈弁の臨床使用を開始し、2001年には世界初の再生医療心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数ヶ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告している⁴⁾。

ドイツ・ハノーバー大学医科大学の Haverich らのグループは、1998年から CryoLife 社と同様に異種生体弁から動物由来細胞を除去し、さらにレジンエポキシの自己血管内皮細胞を播種している。

4 心臓弁

4.1 はじめに

日本人工臓器学会の調査によると、我が国で心臓弁膜症によって置換術を受けた患者は人工動脈弁と僧帽弁あわせて1999年において年間8千人以上のぼり、80%が機械弁、残り20%が異種生体弁である。また、米国胸外科学会の調査によると、大動脈弁置換術は1997年において年間約9千人であり、判明しているものうち約50%が機械弁、45%が異種生体弁、3%が僧帽弁、残りが自己弁である。術前診断や術中の体外循環技術の向上などもあり、大動脈弁置換術における死亡率は1998年において約4%とされている。このように、最も臨床的に使用される人工臓器の一つとして確立した感のある心臓弁置換術ではあるが、現在、どのような問題があり、これを解決するために再生医療心臓弁にはどのような特性が要求されるのだろうか。まず、心臓弁置換術の現状について述べた後、現在、開発されている再生医療心臓弁の動向、そしてその将来展望について述べる。

4.2 心臓弁置換術の現状

現在用いられている機械弁は、主にバイフロイトカーボン製の2枚の半月状弁葉をもった二葉弁である。従来、弁葉部分の構造上の問題から弁前後の圧差が無視できない大きさで、心臓弁や弁後に影響を与えたとされてきたが、最近、弁葉部分の改良によって有効弁口面積を広くしたものが開発され、弁輪が狭小の症例においても通常の弁置換術で対応可能である。また、独特の弁葉作動音を減少させたものも開発されている。機械弁はすでに十分な耐久性と血行動態を得ているが、依然として抗血栓性の問題は解決されていない。抗凝固のため、術後は生涯にわたり重いワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症をきたす頻度も高くなる。また、ワーファリンが腫瘍形成を有することから、妊娠を希望する若年女性には使用できないという問題もある。

異種生体弁は、ブタ心臓弁あるいはウシ心臓を免疫原性の低下のためにグルタルアルデヒドで固定化したものである。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされていたが、近年、後述の心臓弁の成功をきっかけにステントを用いないステンレス異種生体弁が導入され、耐久性の向上が期待されている。異種生体弁は抗凝固性に優れているが、若年者では5-10年程度の耐久性しかなく、

* 1 Toshia Fujisato 国立循環器病センター研究所 再生医療部 研究員

* 2 Seichiro Kitamura 国立循環器病センター 総長

彼らは界面活性剤である Triton X-100 やタンパク分解酵素であるトリプシン常液を細胞除去に用いている³⁾。一方、英国リーズ大学の Ingham らのグループは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDS が最も細胞除去に適していると報告している⁴⁾。また、ドイツ・フンボルト大学の Konertz らのグループはヒツジを用いた6ヶ月間の動物実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を播種すると、弁の変形も石灰化も見られなかったと報告しており⁵⁾、臨床使用を開始している。

4.4 我々の最新成果の紹介

我々は2000年から、Haverich らの方法を対照として、脱細胞化した異種生体弁を用いた再生医療研究を開始した。我々が生体組織を凍んだのは、以前から脱細胞保存用弁の臨床使用に取り組んできたことと、心臓弁のような複雑な形状を吸収性人工材料で成形することが容易でないこと、およびポリ乳酸などの生体吸収性人工材料は生体よりも硬いために生体と同等の力学特性をもたせるのが難しいと考えたためである。ミニブタあるいは食用ブタ肺動脈弁を採取し、Triton X-100 溶液に浸漬して脱細胞化処理した。脱細胞化処理による生体力学特性への影響は力学試験機で測定した。ミニブタの大動脈から酵素処理によって採取した自己内皮細胞を2週間培養液に播種し、2日後に心バイパス下に肺動脈弁置換術を施行した。心エコーと圧測定による血行動態測定後に移植弁組織を摘出し、免疫染色などによって組織学的所見を検出した。

24時間の無細胞化処理によって表面から1mm以内の組織内細胞を除去できた(図1)。組織表面の血管内皮細胞は破壊されていたが、完全に脱落することはなく、他の物理的方法の併用が必要であった(図2)。また、Triton X-100 は細胞毒性を示すため、組織から除去して細胞を播種するためには2週間以上の洗浄を要した。脱細胞化処理によって強度、弾性率ともに増加した

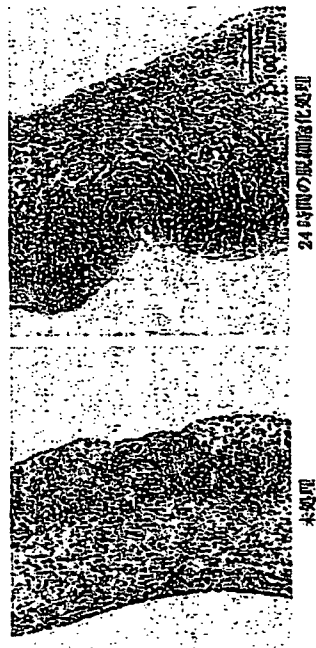


図1 Triton X-100 によって脱細胞化された心臓弁葉の組織断面

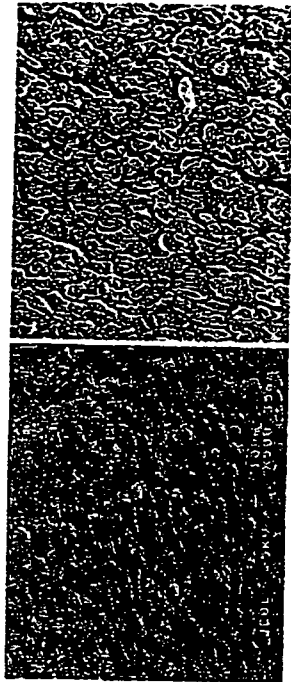


図2 Triton X-100 によって脱細胞化された心臓弁葉の表面

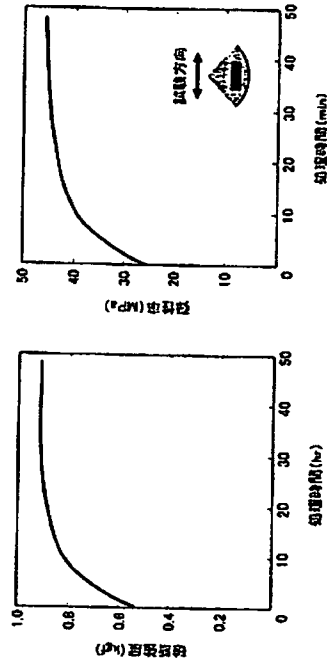


図3 Triton X-100 によって脱細胞化された心臓弁葉の生体力学特性



図4 ミニブタに1ヶ月間培養された再生区部心臓弁

も変化は見られなかったため、置換術への影響はないと考えている (図3)。ミニブタ血管内皮細胞は分腫も容易で、内皮細胞用培養地で容易に増殖させることができ、前置下での培養で弁葉表面に内皮細胞を播種できた。ミニブタへの移植実験では術後1ヶ月においても良好な弁機能を示しており、自己内皮細胞を播種した再生医療弁では表面が完全に血管内皮細胞で覆われるとともに、組織内部への細胞浸潤も見られたのに対し、細胞を播種しないものでは、血管内皮細胞ではば覆われたものの、組織内への細胞浸潤はわずかであった (図4)。

4.5 問題点と将来展望

以上のように、現在、再生医療心臓弁の scaffold には生体吸収性材料と脱細胞化生体組織とが研究されているが、現時点ではどちらが優れているかを見極めることは困難である。新網らの再生医療心臓弁および CryoLife 社の SynerGraft ともに、肺動脈弁では良好な結果が得られているが、大動脈弁では力学強度の問題などから満足な結果が得られていないと報告されている。大動脈弁での血圧に耐えうる scaffold を得るために、吸収性材料の材質および造形方法の改良、あるいは細胞除去方法の改良などが必要であろう。また、脱細胞化処理については組織深部の細胞除去、動物組織からのウイイルス除去などが課題であるが、我々はまったく新規な方法を開発しており、有望な結果を得つつある。一方、細胞の組み込み方法については、いくつかのグループは平滑筋細胞と線維芽細胞を先に播種し、後に血管内皮細胞を (播種) することで複数種の細胞を組み込んでいる。バイオリアクター装置を用いた細胞播種法の報告が参考となるが¹⁹⁾、弁葉部、弁葉基部、血管壁部のそれぞれに正常組織と同様に複数種の細胞を組み込むことは容易でないと恐われる。細胞ソースをどこに求めるのかも検討すべき課題であるが、患者の負担をできるだけ下げるためには、作細胞あるいは未梢血幹細胞などの利用が有効であろう。さらに臨床応用に際しては、GMP 基準に適合した細胞プロセッシング設備の設置も必要となる。

すでにいくつかの研究グループは臨床応用を始めつつある。いずれ、再生医療心臓弁が臨床弁や異種生体弁に取って代わる日も近いと信ずる。

謝 辞

我々の研究の一部は、厚生労働省再生医療研究費ヒトゲノム・再生医療等研究事業 (H12-再生-005) 並びに新薬臨床研究委員会 (13公-1) の補助を受けて行われた。

- 1) Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, Moran A, Lien J, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 Apr; 119 (4 Pt 1): 732-40.
- 2) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Brouer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered heart valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 1996 Nov 1; 94 (9 Suppl): II1164-8.
- 3) Kim WG, Cho SK, Kong MC, Lee TY, Park JK. Tissue-engineered heart valve leaflets: an animal study. *Int J Artif Organs* 2001 Sep; 24 (9): 642-8.
- 4) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 87-92.
- 5) Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Malias 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 Nov 7; 102 (19 Suppl 3): III50-5.
- 6) Korossis SA, Fisher J, Ingham E. Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. *Biomed Mater Eng* 2000; 10 (2): 83-124.
- 7) Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 93-8.
- 8) Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng* 2001 Feb; 7 (1): 9-22.

トランスレーショナルリサーチを支援する

遺伝子医学 MOOK 9

Gene & Medicine

ますます広がる 分子イメージング技術

生物医学研究から創薬,先端医療までを支える
分子イメージング技術・DDSとの技術融合

別 刷

株式会社 メディカルドゥ