

生体吸収性材料を用いた血管再生における 骨髄細胞播種効果の組織学的検討

登坂 有子

新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科分野

(主任：林 純一教授)

Enhanced Neovascularization and Tissue Regeneration in a Biodegradable Vascular Graft by Implantation of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells

Yuko TOSAKA

Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Jun-ichi HAYASHI)

要 旨

【背景と目的】生体吸収性材料と自己細胞を用いた Tissue Engineering 技術による再生医療が臨床応用され始めている。移植されたグラフト内への毛細血管の新生により、組織再生が促されと考えられる。さまざまな種類の細胞に分化する可能性をもつ未分化な細胞を多く含む骨髄単核球細胞 (BMC) を生体吸収性ポリマーに播種することにより毛細血管新生が促進されと考えられるため、ラット右室流出路再建モデルを用いて BMC 播種の効果を検討した。

【方法】播種する細胞には、ラット大腿骨および脛骨より採取した BMC を用いた。生体吸収性材料としてポリカプロラクトン (PCL) とポリ乳酸 (PLA) (50 : 50) の共重合体 (P (CL/LA)) ポリマーを使用した。細胞を播種しないポリマー (PCLA 群) と $1 \times 10^5/\text{mm}^2$ 個の BMC を播種したポリマー (BMC 群) を用いて、ラット右室流出路に作成した貫壁性の欠損を再建した。2 週、4 週および 8 週後 (各期間、各群 $n = 6$) の病理組織を血管新生および組織再生について検討した。

【結果】von Willebrand factor による免疫組織学的染色では、2 週後で両群ともに心腔面の内皮化を認めた。移植したポリマー内の新生血管数は 2 週後 (PCLA: $85.7 \pm 17.6/\text{mm}^2$, BMC: $149.8 \pm 16.1/\text{mm}^2$, $p < 0.05$) では BMC 群が有意に多く、4 週後 (PCLA: $210.5 \pm 20.1/\text{mm}^2$, BMC: $347.0 \pm 78.0/\text{mm}^2$, $p = 0.121$) では BMC 群が多い傾向があった。また、BMC 群では α -SMA 陽生の血管平滑筋細胞に取り囲まれた成熟した血管も多く認めた。Elastica van Gieson 染色では、BMC 群で内皮直下の弾性線維層と同部位に α -SMA 陽性細胞の集積を認め、4 週、8 週後とも BMC 群は PCLA 群と比べて有意に多くの弾性線維量を認めた。

Reprint requests to: Yuko TOSAKA
Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科
登坂 有子

【結論】生体吸収性ポリマーへの BMC 播種により、再生組織内における血管新生が促進され、弾性線維量の増加が認められた。

キーワード：再生医療、血管新生、骨髓細胞播種、生体吸収性ポリマー

緒 言

小児心臓血管外科領域では、構造の欠損や低形成、機能不全に対する補填材料が必要不可欠である。特に右室流出路および肺動脈再建に対する補填材料が必要になる症例が多く、expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) や polyethylene terephthalate (ダクロン) 等の人工素材、グルタールアルデヒド処理をした自己心膜などが用いられているが、その遠隔成績には問題を残している。異物反応による血栓形成、組織過増生、移植した補填物の退縮、石灰化等の変性のほか、患児の成長に伴う相対的な狭窄などにより、再手術を余儀なくされる場合も多い¹⁾。これらの問題を克服する方法として、生体吸収性材料と自己細胞を用いた Tissue Engineering 技術を基盤とする再生医療が 1980 年代から研究されている^{2)~7)}。

Shin'oka らは、生体吸収性ポリマーに自家静脈細胞を組み合わせた組織工学的手法を用いた再生血管 (tissue-engineered vascular graft (TEVG)) でヒトの肺動脈再建を行い、良好な結果を報告した⁴⁾。しかし、この方法は細胞の採取に全身麻酔や外科的血管摘出という侵襲があり、また十分量の細胞を得るために長期間の培養時間を要するなど手技が煩雑であるとともに、血清の使用や汚染細胞による感染も危惧される。このため 2001 年から自己骨髓単核球細胞を用いる手法に変更することにより、十分量の細胞を容易に得られ、培養過程を省略することが可能になった^{5)~7)}。さらに生体外での細胞播種を省略することが可能になれば、臨床での使用が簡便になるが^{8)~10)}、骨髓細胞等の細胞播種を行う方が組織再生が良好であったという実験結果の報告が多い⁵⁾⁶⁾¹¹⁾。

骨髓単核球細胞は、その環境に応じてさまざまな種類の細胞に分化する可能性をもつ未分化な細胞を多く含んでおり、血管内皮前駆細胞として機

能する CD34 陽性細胞や CD31 陽性細胞なども存在することが知られている¹¹⁾¹²⁾。生体吸収性材料に播種した骨髓細胞は、生体内に移植後、自身が内皮細胞や平滑筋細胞に分化するほか、血管内皮増殖因子 (VEGF) やアングリオポエチンなどの血管新生因子を産生し、これらの前駆細胞を骨髓や流血中から誘導することが確認されている⁵⁾。

非吸収性人工血管である ePTFE では、骨髓細胞を播種することによりグラフト内に毛細血管が新生され、より早期に内皮化することが動物実験で確認されている¹³⁾。生体吸収性ポリマーにおいても、骨髓細胞を播種することにより移植したポリマー内の毛細血管新生が促進されると予想され、播種細胞への血流が増加すると伴に血管壁を構築する細胞の供給も促進されて速やかな組織再生が促されることが期待される。今回われわれはラット右室流出路再建モデルを用いて、骨髓細胞播種が生体吸収性ポリマーを用いた血管壁の再生における毛細血管新生および組織再生に及ぼす効果を検討した。

材料と方法

1. 生体吸収性ポリマー

メッシュ状のポリグリコール酸 (PGA) 芯材の内外両側にポリカプロラクトン (PCL) とポリ乳酸 (PLA) (50 : 50) の共重合体 (P (CL/LA)) を凍結乾燥法で多孔性のスポンジ層 (図 1B) を形成したグラフトを使用した (図 1A)。このポリマーは厚さが約 0.6 ~ 0.7mm, 80 % 以上の空洞率 (孔径 20 ~ 100 μ m) で、細胞が接着しやすく、血液の漏出が少なく、生体内において PGA が約 2 ヶ月、P (CL/LA) が数ヶ月で非酵素的に加水分解されるという特性をもつ。このポリマーを径 7mm 大の円形のパッチ状にトリミングして使用した。

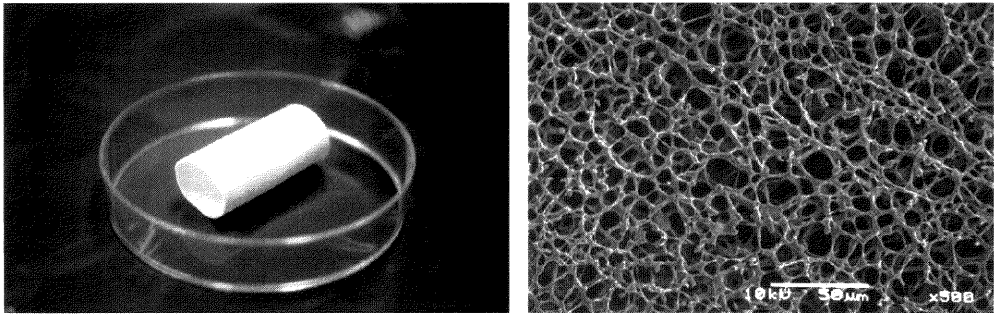


図1 P (CL/LA) 生体吸収性ポリマー

A : 全体像, B : ポリカプロラクトンとポリ乳酸のスポンジ状共重合体 (×500)

2. ラット右室流出路再建モデル

本実験では、オス Lewis ラット (Charles River Japan Inc, Yokohama, Japan) 300 ~ 350g を用いた。すべての実験手順は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 85-23, revised 1996) に基づき無菌的に行った。36頭のラットを無作為に以下の2群に分けた。(1) PCLA 群 (n = 18) : 細胞を播種せずポリマーのみを使用, (2) BMC 群 (n = 18) : 骨髄細胞を播種したポリマーを使用。

骨髄単核球細胞は、ドナーラットの大腿骨と頸骨より採取した。ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®], Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) を腹腔内に過量投与して安楽死せしめ、大腿骨と脛骨を採取した。骨周囲の結合組織を除去し、両端を切除して、10%牛胎仔血清を含む培養液 (RPMI 1640, Nipro, Osaka, Japan) で骨髄を洗い流した。Ficoll 液 (リンフォプレップ[®], Nycomed Pharma, Oslo, Norway) を用いた比重遠心分離法で骨髄単核球成分を採取した。BMC 群では、約 $1 \times 10^5/\text{mm}^2$ 個の骨髄単核球細胞をポリマーに播種し、細胞を播種した後は速やかに以下の方法で移植した。

ラットにキシラジン (0.5mg/kg) を前投与した後、塩酸ケタミン (24mg/kg) を筋肉内投与し、セボフルレンを併用して全身麻酔をかけた。経口挿管し、呼吸回数 60 回/分、一回換気量 10ml/kg、PEEP 3 cmH₂O、100%酸素で人工呼吸を行った。

手術操作中はセボフルレン 1.0 ~ 2.5% で麻酔を維持した。胸骨正中切開し、右室流出路に 7-0 モノフィラメント糸で径 6mm 大のタバコ縫合をかけた。この糸をタニケットで締め、右室流出路の盛り上がった部分の心筋を切除した。タニケットを軽く緩めて出血させ、全層性に十分量の心筋が切除されていることを確認した。ポリマー単独もしくは骨髄細胞を播種したポリマーのいずれかを用いて欠損部を覆うように 7-0 モノフィラメント糸で連続縫合した。この際、心内膜に針糸がかかるよう最大限に注意を払った。タニケットを緩めてタバコ縫合の糸を除去し、止血を確認後、モノフィラメント糸で3層に閉創した。手術操作後は、麻酔が完全に覚めるまで保温しながら観察し、ケージに戻した¹⁴⁾。

3. 組織学的評価

移植から 2, 4, 8 週後 (各期間 PCLA, BMC 各群 n = 6)、ヘパリン 300u (ノボ・ヘパリン[®], Mochida Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を筋注した後、致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し犠牲死させた。再胸骨正中切開で心臓を摘出し、20%ホルマリンで一昼夜固定した。移植したポリマーの中央を通る線で分割し、パラフィンに包埋後、厚さ 5μm の連続薄切切片を作製した。

新生血管数は、von Willbrand Factor (vWF, 第8因子関連抗原; ウサギ, N1505, Dako, CA, USA) と平滑筋アクチン抗体 (α-SMA, clone

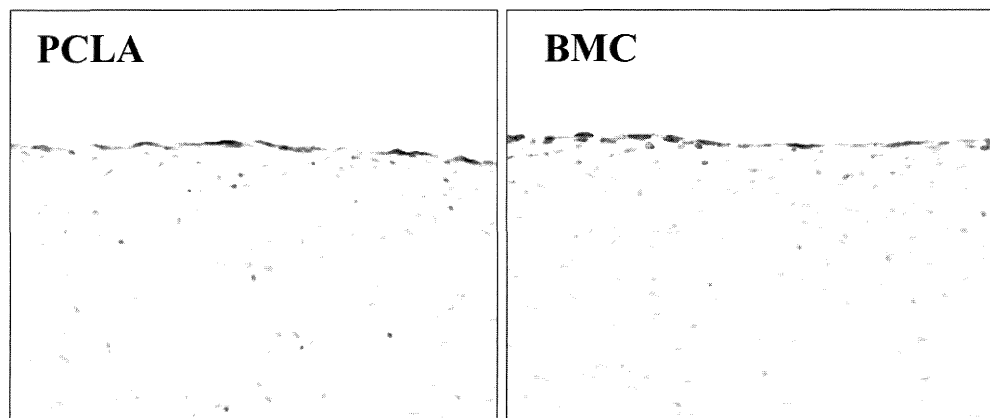


図2 術後2週 心臓内腔面 (von Willebrand factor 免疫染色, $\times 100$)
いずれも心臓内腔面に一層の内皮細胞層を認め, 血栓の付着は認めない.
左: PCLA, 右: BMC

1A4, Dako, CA, USA) で染色した切片を用いて測定した. 顕微鏡は Nikon Eclipse E1000 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて 200 倍で観察し, Nikon Digital CameraDXM1200 を用いてデジタル画像を作成した. それぞれの切片で移植したポリマー内の 20 視野を無作為に選び, Image-Pro Plus software (Media cybernetics, Silver Spring, USA) を用いて茶色のドットを自動抽出して vWF 陽性の血管内皮細胞および α -SMA 陽性の血管平滑筋細胞の画像を得, 血管数を測定した. 1 mm^2 あたりの血管数を算出して血管数の代表値とした. また, vWF 陽性の内皮細胞で囲まれた腔の面積を新生血管の断面積として測定し, 1 mm^2 あたりの血管面積を算出した.

移植部分の細胞外マトリックスの産生は, HE 染色と Elastica van Gieson (EvG) 染色で染色した標本を用いて計測した. 弾性線維成分は EvG 染色で黒く染まった部分を Image-Pro Plus software を用いて自動抽出し, 面積を測定した. PCLA 群の 4 週後の弾性線維量を 1 として, 相対値で表示した.

4. 統計処理

各群の測定値は mean \pm SE で表記した. 統計データの解析は SPSS (version 11.5J; SPSS Japan, Tokyo, Japan) を用い, 2 群間の比較は対応のない t 検定を行った. p 値は < 0.05 を有意とした.

結 果

耐術したすべてのラットが予定期間まで生存した.

1. 内皮化

vWF 染色では, 2 週後で, 両群とも心腔面の完全な内皮化を認めた. 内腔面に血栓の形成は認めなかった (図 2).

2. グラフト内血管新生

2 週後から, 移植ポリマー内に内部に血球成分を有する vWF および α -SMA 陽性細胞からなる管腔構造を認めた (図 3). ポリマー内の新生血管数は 2 週後 (PCL: $85.7 \pm 17.6/\text{mm}^2$, BMC: $149.8 \pm 16.1/\text{mm}^2$, $p < 0.05$) では BMC 群が有意に多く, 4 週後 (PCL: $210.5 \pm 20.1/\text{mm}^2$, BMC: 347.0

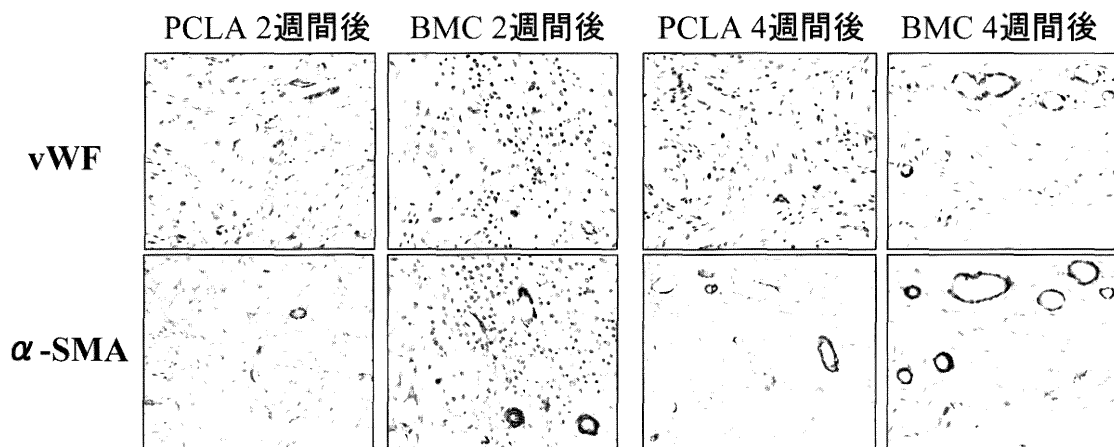


図3 血管新生効果 (×200)

上段：von Willebrand factor 免疫染色，下段： α -smooth muscle actin 免疫染色
術後2週から内皮細胞層と平滑筋細胞層からなる毛細血管を認めた。PCLA 群に比し BMC 群ではより管腔構造が明瞭であり，内腔に血球系細胞を認める。

PCLA, BMC 両群で2週後に比べて4週後は毛細血管数の増加を認める。BMC 群でより多くの毛細血管が存在する。

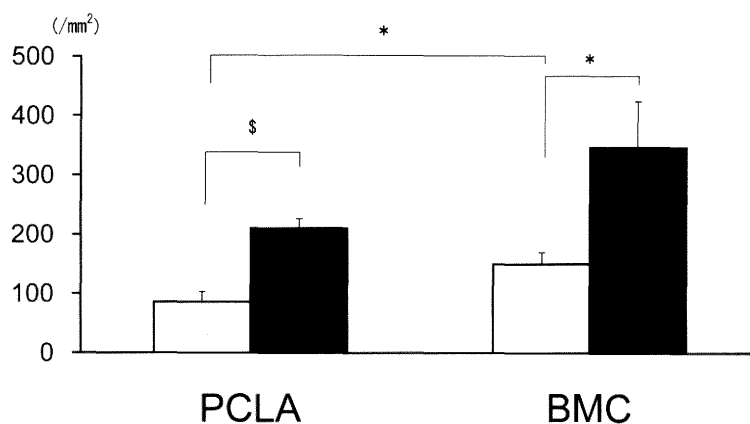


図4 新生血管数

ポリマー内に新生した単位面積あたりの毛細血管数を示す。PCLA 群, BMC 群のいずれの群でも経時的な血管数の増加を示した。術後2週ではPCLA 群に比べてBMC 群でより多くの毛細血管を認めたが，4週後ではBMC 群が多い傾向があったが，有意差は認めなかった。

白：術後2週，黒：術後4週，* $P < 0.05$ ，\$ $P < 0.001$

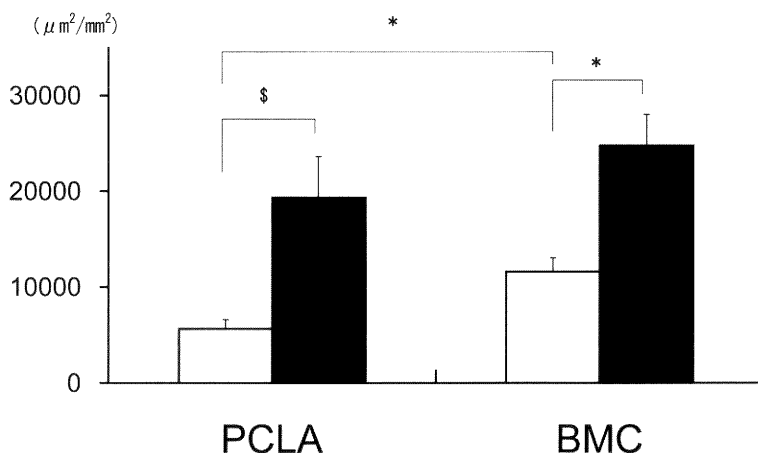


図5 新生血管の断面積

ポリマー内の新生血管の単位面積当たりの断面積を示す。新生血管の断面積は、両群とも経時的に有意に増大した。術後2週ではBMC群はPCLA群より有意に血管面積が大きかったが、4週後ではBMC群で大きい傾向があったが、有意差は認められなかった。

白：術後2週，黒：術後4週，* $P < 0.05$ ，\$ $P < 0.001$

± 78.0/mm², $p = 0.121$) ではBMC群が多い傾向があったが、有意差は認めなかった(図4)。4週後の血管数は2週後の血管数と比べ、PCLA, BMCの両群とも経時的に有意に増加した。

単位面積あたりの新生血管の断面積は、両群とも経時的に有意に増大した(PCLA: 2週後 5646.6 ± 949.7 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, 4週後 19331.0 ± 2451.9 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, $P < 0.05$, BMC: 2週後 11595.6 ± 1451.0 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, 4週後 24743.5 ± 3261.3 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, $P < 0.01$) (図5)。2週後ではBMC群はPCLA群より有意に血管面積が大きかったが、4週後ではBMC群で大きい傾向があったが、有意差は認められなかった。

3. ポリマー内細胞外マトリックス形成

術後4週、8週の時点で、ポリマーは部分的に分解吸収され、細胞と細胞外マトリックスで置換されていた。再生組織中にはEvG染色で弾性線維成分を認め(図6上段)、術後4週後(PCL:

1.00 ± 0.12, BMC: 1.79 ± 0.21, $p < 0.05$)、8週後(PCL: 1.14 ± 0.20, BMC: 2.45 ± 0.41, $p < 0.05$)ともBMC群はPCLA群と比べて有意に多くの弾性線維量を認めた(図7)。また、 α -SMA免疫染色では、弾性線維陽性部分に一致して、 α -SMA陽性細胞の集積を認めた(図6)。

考 察

再生医療は、低形成や欠損、機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、生きた細胞を用いるTissue Engineering技術¹⁵⁾を応用し、本来生体が持っている自己再生能力を引き出すことにより、生体組織の再生、あるいは臓器機能の代替保障、修復、再生を行うものである¹⁶⁾。細胞を分化誘導する適切な環境を設定することにより、生体の自己修復のトリガーが引かれ、組織再生が始まるといわれている¹⁷⁾。心臓血管外科領域における再生医療では、抗血栓性や感染に対す

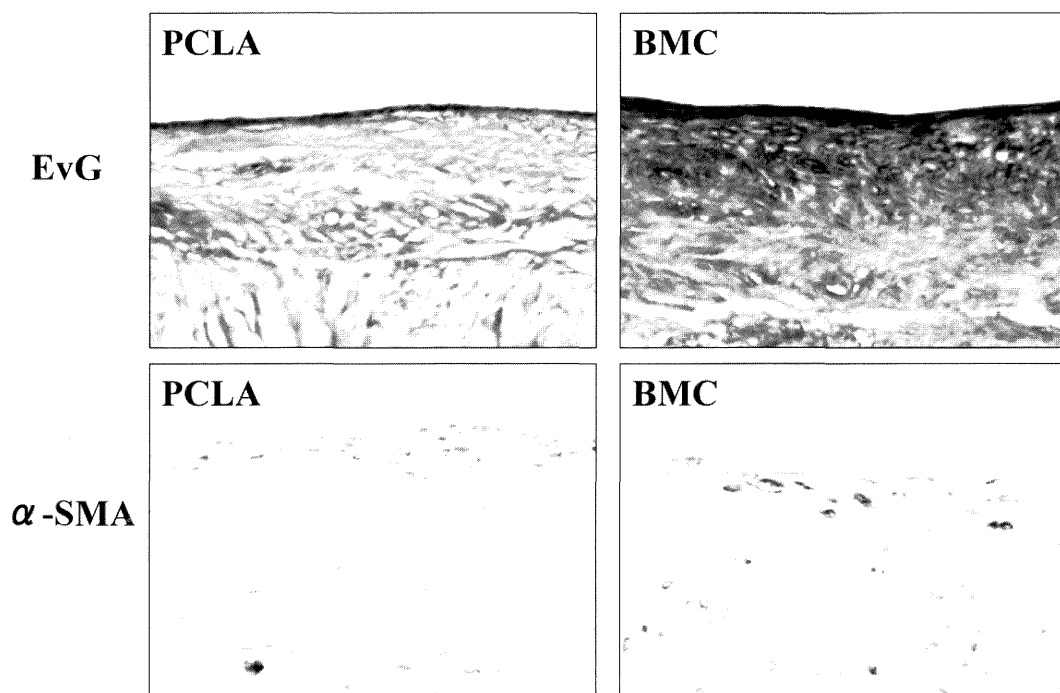


図6 術後4週 弾性線維産生 (×100)

ポリマーは部分的に分解吸収され、線維性組織を主体とする成分で置換されている。EvG染色で黒色に染まる弾性線維成分の出現を認めるが、PCLAでは内腔近くにごくわずかに存在するのみである。上段のEvG染色における弾性線維成分の出現部位に一致して α -SMA染色陽性の平滑筋細胞が出現している。

上段：Elastica van Gieson (EvG) 染色，下段：平滑筋アクチン (α -SMA) 免疫染色

る抵抗性，長期耐久性などの優れた生体適合性を有し，成長の可能性を持った‘生きている’組織によって障害のある構造物を置換することが目標であり，理想的な補填材料の開発を目指して多くの施設で研究が重ねられている²⁾⁻¹⁰⁾。開発方針は，1) 生体吸収性ポリマーに自己細胞を播種し，in vitro で一定期間培養して高度に成熟したTEVGを作成後に移植する方法²⁾⁻⁴⁾と，2) 細胞を播種した，もしくは播種しない生体吸収性ポリマーを，培養過程を経ずに移植してin situ で組織再生を起こさせる方法⁵⁾⁻¹⁰⁾，に二分される。

Shin'oka らが行った自己血管平滑筋細胞を生体吸収性ポリマーに播種する方法は前者であり，

自己細胞を採取後に十分な細胞数まで培養してから播種する必要があった³⁾⁴⁾。この方法では手技が煩雑で時間がかかり，感染のリスクも増加することから，臨床での使用が容易とはいえなかった。骨髄単核球細胞は，周囲の環境に応じてさまざまな種類の細胞に分化する，多分化能を持つ細胞を含んでいることが知られている¹¹⁾¹²⁾。

Shin'oka らは骨髄単核球細胞をグラフトに播種直後に移植する方法に変更してin vitro での培養過程を省略したが，臨床使用で良好な結果を収めている⁷⁾。彼らは動物実験において，播種した骨髄細胞やそれらに動員された細胞がポリマー内に遊走・接着し，ポリマー内で増殖・分化して新

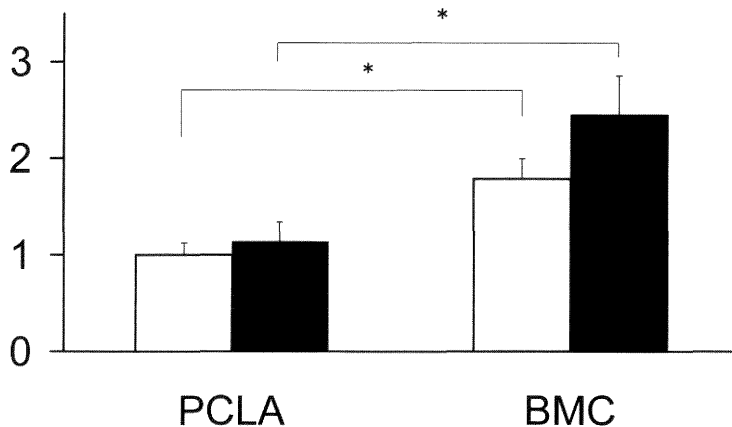


図7 弾性線維産生量

術後4週, 8週とも BMC 群は PCLA 群と比べて有意に多くの弾性線維量を認めた。

白：術後4週, 黒：術後8週, * $P < 0.05$

しい血管壁構造の構成成分となることを明らかにした⁵⁾。生体吸収性の足場と細胞播種を組み合わせる方法は Tissue Engineering の領域で多分野にわたり広く行われているが、播種した細胞への酸素や栄養供給のため、移植早期における足場内への毛細血管新生が重要であるといわれている¹⁸⁾。酸素や栄養分を含んだ流血に晒される血管壁の再生でも、他臓器の再生と同様、移植組織内への毛細血管新生が重要であると考えられるが、今回の実験結果から、生体吸収性ポリマーへの骨髓細胞播種は移植早期からの毛細血管新生を促進することが示された。また、PCLA 群に比し BMC 群では新生血管数だけでなく血管面積も大きい傾向があり、骨髓細胞播種によって再生組織内により多くの血流が呼び込まれると考えられる。

一方、Sawa は *ex vivo* での細胞播種を行わない肺動脈再生および大動脈再生を試みている⁸⁾⁹⁾。Fujimoto らも、細胞を用いない生体吸収性ウレタンパッチの右室流出路への移植を行い、線維性組織に置換されることを示しており¹⁰⁾、自己細胞を使用せずに大動脈や主肺動脈の血管壁を再生させる可能性を示唆した。しかし、グラフトに播種

されて移植された細胞が増殖・分化するだけでなく、細胞が放出するさまざまなサイトカインにより、生体内の細胞が動員され、増殖・分化することによって組織の再生が起こると考えられており、移植細胞自身も環境を作り出す重要な因子のひとつであるといえる¹²⁾。今回の実験結果から、生体吸収性ポリマーに骨髓細胞を播種することにより血管再生が促進されることが明らかになった。

血管再生における問題として、生体吸収性の足場が分解された後の再生血管壁の強度があげられる。血圧に対する強度が不十分であれば、再生血管は瘤化する恐れがある。上下大静脈や肺動脈などの低圧系では耐圧性は大きな問題とはならないが、高圧系である動脈壁の再生では極めて重大な問題である。生体においては弾性線維と平滑筋細胞からなる中膜が血管壁の耐圧性を保持しているが¹⁹⁾²⁰⁾、再生された血管でも弾性線維と平滑筋層の産生が重要である。今回の実験では、骨髓細胞播種により弾性線維の産生が促進されることが示された。

本実験の限界として、観察数が少なく、観察期

間が短いこと、また移植したパッチのサイズが小さいことが上げられる。移植後8週では生体吸収性ポリマーは完全には分解されておらず、足場が完全に吸収された後の最終的な組織像は不明である。大動物を用いた十分大きいTEVGによる移植実験で、長期の評価を行う必要がある。

結 論

生体吸収性ポリマーへの骨髓単核球細胞播種は、移植早期から再生血管壁内の毛細血管新生を促進した。観察期間が短いため最終的な組織像は明かではないが、骨髓単核球細胞播種により弾性線維量の増加が認められた。

謝 辞

研究を指導していただいた呼吸循環外科学分野、林純一教授、渡辺弘准教授、および組織学的評価において多大なるご協力をいただいた畑野高四技官に深謝いたします。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究補助金(基盤研究(C))によって行われた。

参 考 文 献

- 1) Kirklin J and Barratt - Boyes B: Ventricular Septal Defect and Pulmonary Stenosis or Atresia. New York, NY: Churchill livingstone; 1993.
- 2) Shin'oka T, Shum - Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP and Mayer JE Jr.: Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. J Thorac Cardiovasc Surg 115: 536 - 546, 1998.
- 3) Watanabe M, Shin'oka T, Yohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, Kosaka Y, Ishida T, Imai Y, Yamakawa M, Ikada Y and Morita S: Tissue - engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. Tissue Eng. 7: 429 - 439, 2001.
- 4) Shin'oka T, Imai Y and Ikada Y: Transplantation of a tissue - engineered pulmonary artery. New Engl J Med 344: 532, 2001.
- 5) Matsumura G, Tomita SM, Shin'oka T, Ikada Y and Kurosawa H: First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue - engineered vascular autografts in vivo. Circulation. 108: 1729 - 1734, 2003.
- 6) Hibino N, Shin'oka T, Matsumura G, Ikada Y and Kurosawa H: The tissue - engineered vascular graft using bone marrow without culture. J Thorac Cardiovasc Surg 129: 1064 - 1070, 2005.
- 7) Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Naito Y, Watanabe M, Konuma T, Sakamoto T, Nagatsu M and Kurosawa H: Midterm clinical result of tissue - engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. J Thorac Cardiovasc Surg 129: 1330 - 1338, 2005.
- 8) Iwai S, Sawa Y, Ichikawa H, Taketani S, Uchimura E, Chen G, Hara M, Miyake J and Matsuda H: Biodegradable polymer with collagen microsp sponge serves as a new bioengineered cardiovascular prosthesis. J Thorac Cardiovasc Surg 128: 472 - 479, 2004.
- 9) Iwai S, Sawa Y, Taketani S, Torikai K, Hirakawa K and Matsuda H: Novel tissue - engineered biodegradable material for replacement of vascular wall. Ann Thorac Surg 80: 1821 - 1828, 2005.
- 10) Fujimoto KL, Guan J, Oshima H, Sakai T and Wagner WR: In vivo evaluation of a porous, elastic biodegradable patch for reconstructive cardiac procedure. Ann Thorac Surg 83: 648 - 654, 2007.
- 11) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS and Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med 183: 1797 - 1806, 1996.
- 12) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K and Hanazono Y: Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow - derived CD34⁺ stem cells in a nonhuman primate model. Stem Cells 23: 355 - 364, 2005.
- 13) Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y and Matsumoto A: Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. Nat Med 2: 90 - 93, 1996.

- 14) Ozawa T, Mickle DAG, Weisel RD, Koyama N, Wong H, Ozawa S and Li SK: Histologic changes of nonbiodegradable and biodegradable biomaterials used to repair right ventricular heart defects in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124: 1157 - 1164, 2002.
- 15) Langer R and Vacanti JP: *Tissue Eng. Science* 260: 920 - 926, 1993.
- 16) Tabata Y: Tissue regeneration based on tissue engineering technology. *Cong Anomal* 44: 111 - 124, 2004.
- 17) Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremoto K, Matsuno T, Tabata Y, Eto K and Shimizu Y: In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament - derived cells. *Tissue Eng* 10: 537 - 544, 2004.
- 18) Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Inoue M, Shigeno K, Tabata Y, Eto K and Shimizu Y: Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. *Tissue Eng* 9: 153 - 162, 2003.
- 19) Zatina MA, Zarins CK, Gewertz BL and Glagov S: Role of medial lamella architecture in the pathogenesis of aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1: 442 - 448, 1984.
- 20) Krings T, Moller - Hartmann W, Hans FJ, Thiex R, Brunn A, Scherer K, Meetz A, Dreeskamp H, Stein KP, Gilsbach JM and Thron A: A refined method for creating saccular aneurysms in the rabbit. *Neuroradiol* 45: 423 - 429, 2003.

(平成 20 年 1 月 10 日受付)
