

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

組織工学、再生医療技術を応用した凍結保存同種弁移植の品質改良に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村惣一郎

平成13年（2001年）4月

目 次

I. 総括研究報告	
組織工学、再生医療技術を応用した凍結保存同種弁移植の 品質改良に関する研究	1
北村惣一郎	
II. 分担研究報告書	
1. 無細胞化処理弁の組織学的評価	4
北村惣一郎	
2. 無細胞化処理弁の生体力学的評価	6
中谷武嗣	
3. トリトンX溶液による無細胞化処理とSEM観察	8
庭屋和夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	11

総括研究報告書

組織工学、再生医療技術を応用した凍結保存同種弁移植の品質改良に関する研究

主任研究者 北村惣一郎 国立循環器病センター

研究要旨 心臓弁のドナー由来細胞を除去するため、トリトンX-100溶液にて浸漬処理し、時間や濃度による影響を組織学的観察及び力学試験によって評価した。本処理によって、弁葉内のコラーゲン線維を保存しながらドナー由来細胞を破壊できた。本処理は、ドナー由来細胞の除去に効果的であると示唆された。

分担研究者 中谷武嗣
国立循環器病センター研究所部長
庭屋和夫
国立循環器病センター病院医師

A. 研究目的

一般に、移植された同種弁組織では免疫学的拒絶反応を経て、線維芽細胞はアポトーシスの機序により消失すると考えられる。一方、一部の症例ではレシピエント由来の細胞が移植組織に進展してくることが確認されている。この場合、レシピエント由来の細胞が同種弁組織のマトリックス骨格を利用して増殖し、弁の機能を維持するような機構が働いているという期待がある。そこで、同種弁組織を無細胞化処理し、その組織マトリックスを利用してレシピエントの自己細胞を播種した弁組織を作成したり、あるいは無細胞処理後に細胞増殖因子を組み込むなどしてレシピエントの自己細胞が誘導されやすい弁組織を作成することを組織工学的手法によって目指す。ドナーの細胞を消失させてレシピエントの細胞を移植組織内に誘導することで、免疫反応を抑制し、生物学的な自己修復・成長の期待できる、長い耐久性を有する心臓弁が開発できると考える。また、現在、ドナーから抽出された同種弁は10～30%の割合で細菌感染により臨床使用が不可能になっている。この廃棄される同種弁組織を無菌化・無細胞化処理を行うとともに、欠如した部位を生体吸収性の人工材料で置換することにより、ヒト組織を用いた新しい心臓弁を作成する可能性を開くことも目標とする。

B. 研究方法

ブタ心臓弁を摘出して各弁葉を一葉ずつ含むように3分割した後、ハンクス液で3回洗浄した。各葉をRNase A、DNase I及びEDTA2Naをそれぞれ20 μ g/ml、0.2mg/ml及び0.02%含む各種濃度のトリトンX-100溶液に浸漬し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベータ内で攪拌した。所定期間経過後、PBS溶液にて3回洗浄した。

この無細胞化処理した心臓弁を2%グルタルアルデヒドにて固定し、脱水後、HE及びVan Gieson染色にて顕微鏡観察するとともに、走査電顕にて表面を観察した。また、人工材料にて弁組織を作製するための基礎的知見を得るため、正常心臓弁を幅3mm、長さ約15mmの短冊状に切り取り、引っ張り試験機にて力学的特性を測定した。さらに、無細胞化処理による力学的特性への影響についても検討した。

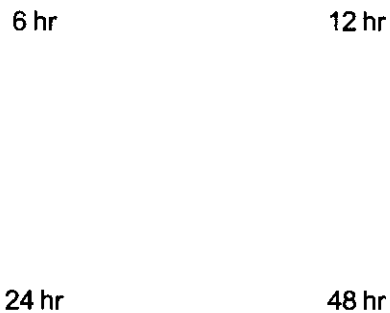


Fig.1 Pig aortic valves treated with 1% Triton X-100.

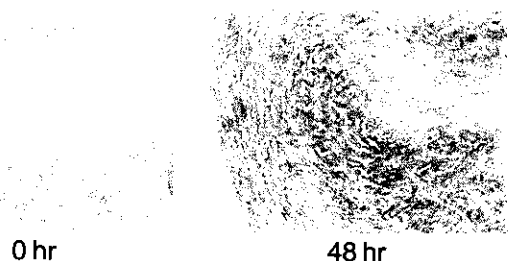


Fig.2 Pig aortic valves treated with 1% Triton X-100.

(倫理面への配慮)

本研究において、動物実験に対する動物愛護上の配慮は規定に則り十分に払われる。また、研究に利用されるヒト組織は、臨床応用に適さない場合の研究目的使用に関し、「屍体からの人組織採取・保存・利用に関する取扱い基準」に従い、組織提供の際の説明により文書での同意を得ている組織に限る。

C. 研究結果

1%トリトンX溶液で処理した大動脈弁断面のHE染色標本を図1に示した。表面内皮細胞の核は、無細胞化処理6時間後には染色されなくなった。しかし、組織内部の細胞核は48時間経過後も染色された。1%トリトンX溶液で処理した大動脈弁断面のVan Gieson染色標本を図2に示した。コラーゲン線維層は、無細胞化処理後もよく保存されていた。図3には、各種濃度のトリトンX溶液処理による、組織表面から核消失領域までの距離の時間依存性を示した。250 μ mの深さまで浸透する6時間後には、厚さ約500 μ mである弁葉内の細胞は全て消失した。48時間後には表面から1mmまでの細胞核が消失した。無細胞化処理後の組織表面を、走査電顕によって観察した結果を図4に示した。無細胞化処理によって時間依存的に内皮細胞間に隙間が生じ、各細胞がばらばらになっていくことが示された。しかしながら、48時間後でも細胞が剥がれ落ちていることはなかった。正常大動脈弁葉の応力-歪み特性を図5に示した。また、無細胞化処理後の応力-歪み特性を図6に示した。弁葉を血管周囲方向を0°、血流方向を90°として異方性について検討したところ、血流方向の方がしなやかな弾性を示し、異方性を持っていた。また、トリトンXによる無細胞化処理によっても、弾性率、破断強度ともに大きな影響はなかった。

D. 考察

心臓弁表面からドナー由来の細胞を除去し、レシピエントの自己内皮細胞を播種する場合、ドナー由来の細胞は完全に除去される必要があると思われる。本研究では、細胞除去法として文献的に報告のある、トリトンX-100溶液による浸漬処理について検討した。弁葉に関しては、処理6時間後にはドナー由来細胞の核は染色されなかったが、弁葉基部の心筋組織内細胞の核は処理24時間後でも、表面から1mm以下の領域では染色された。細胞核の除去は、トリトンXの組織表面からの拡散・浸透によるが、その速度は組織の密度や組成などによって影響を受けると考えられる。顕微鏡観察では細胞核が染色されなくなるにも関わらず、SEM観察では細胞の残骸が依然残っていた。トリトンXによって細胞膜や核膜などの脂質二重層は破壊されるものの、細胞骨格そのものは残存していると考えられる。そのため、表面の細胞残骸を完全に除去するためには、物理的方法が必要である

と考えられる。トリトンX-100は細胞障害性を示すため、無細胞化処理した組織表面に自己内皮細胞を播種する場合、十分な洗浄が必要である。現在、効率的な洗浄方法について検討中である。弁葉は血管側がひだ状の、心臓側がスムーズな表面を有している。引っ張ることによって、ひだ状の血管側表面はコラーゲン線維に長さの余裕があるが、心臓側表面には余裕がないため、心臓側表面から破断すると考えられる。血流方向の方

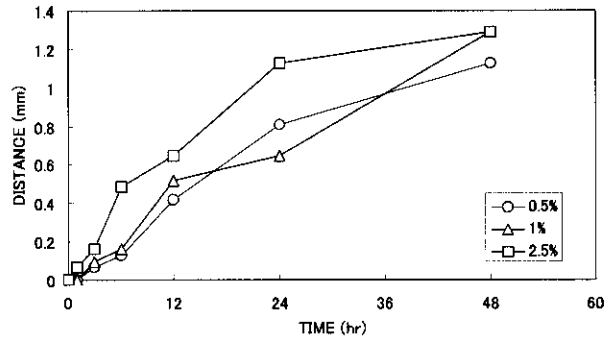


Fig.3 Distance from surface to non nuclear area in pig aortic valves treated with Triton X-100.

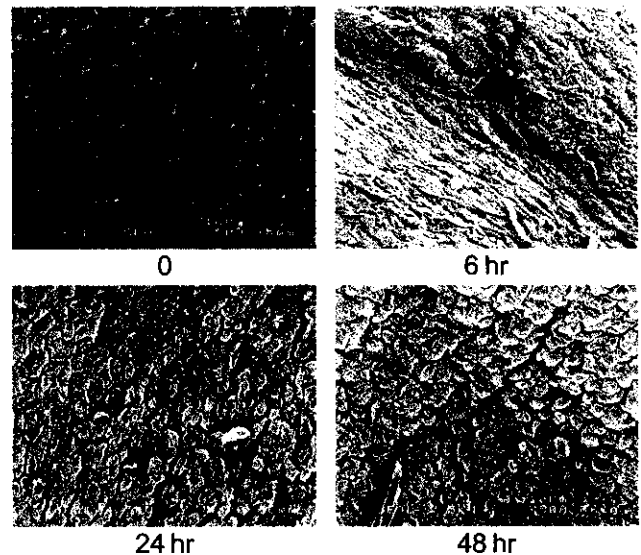


Fig.4 Pig aortic valves treated with 1% Triton X-100.

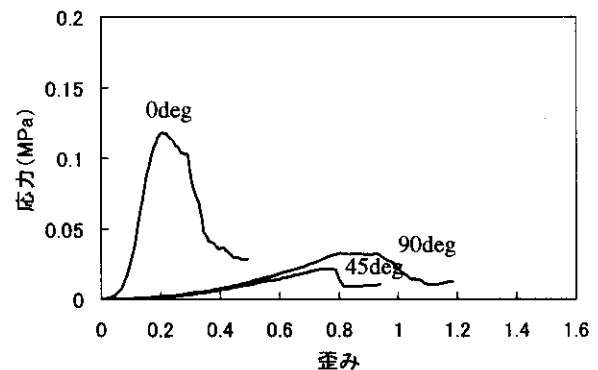


Fig.5 Elastic property of pig aortic valve.

がしなやかな弾性を示す異方性については、弁葉内のコラーゲン線維の配向性と関係すると思われる。欠如した弁葉を生体吸収性人工材料で補う場合、このような構造と異方性を持たせるためには、機械弁のような単純な板状構造ではなく、織布構造で、かつ編み方や織り方などについて工夫する必要があると思われる。なお、トリトンXによる無細胞化処理における力学特性への影響については、大きな影響はないと考えている。これは、弁葉内のコラーゲン線維の保存性をVan Gieson染色によって検討した結果からも支持される。

E. 結論

トリトンX-100溶液にて処理することにより、心臓弁葉内のドナー由来細胞を破壊できた。この処理によっても弁葉内のコラーゲン線維は保存されていた。しかし、細胞を完全に剥離するには物理的方法の併用が必要であった。また、十分な洗浄によるトリトンXの除去が必要であった。ブタ正常弁の力学特性は、血流方向はしなやかで弱く、血管周囲方向は硬くて強い特性を持った異方性を示した。これらの力学特性は、トリトンX-100溶液にて無細胞化処理しても大きな影響はなかった。本処理は、ドナー由来細胞の除去に効果的であると示唆された。

F. 研究発表

- 1) 北村惣一郎、笹子佳門、中谷武嗣. 心臓移植とその他の外科治療. CURRENT THERAPY 2000; 18: 158-65.
- 2) 坂東 興、中谷武嗣、八木原俊克、北村惣一郎. 小児の心臓・肺・心肺移植の今後の課題. HEART nursing 2000; 13: 970-4.
- 3) 公文啓二、今中秀光、宮野博史、中谷武嗣、北村惣一郎. 心臓移植に対する周術期 Critical Care. 集中治療 2000; 12: 845-52.
- 4) 松田 暉、福嶋教偉、大竹重彰、澤 芳樹、西村元延、松宮護郎、市川 肇、高島成二、堀正二、白倉良太、中谷武嗣、北村惣一郎. 臓器移植法後実施された心臓移植と今後の展望. 心臓 2000; 32: 845-53.
- 5) 今中秀光、宮野博史、公文啓二、中谷武嗣、北村惣一郎. 心臓移植術後2症例の急性期管理の経験. 日集中医誌 2000; 7: 365-72.
- 6) Kitamura S, Nakatani T, Yagihara T, Sasako Y, Kobayashi J, Bando K, Minatoya K, Hanatani A, Komamura K, Imakita M, Yutani C, Kuro M, Kimura K Nonogi H, Miyatake K. Cardiac transplantation under new legislation for organ transplantation in Japan - Report of two cases -. Jpn Circ J 2000; 64: 333-9.

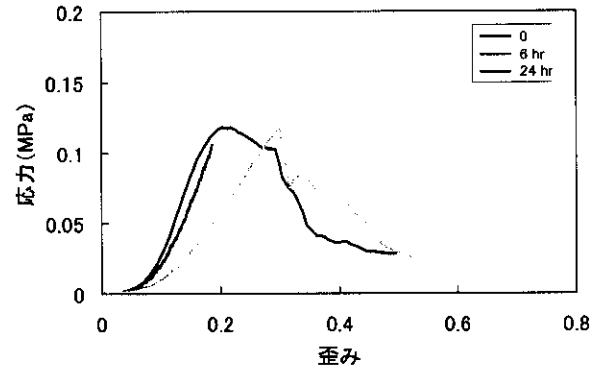


Fig.6 Elastic property of pig aortic valves treated with 1% Triton X-100 (0 degree).

- 7) 中谷武嗣、花谷彰久、宮武邦夫、北村惣一郎. 人工心臓と心臓移植. 循環器専門医 2001; 9: 51-6.
- 8) 中谷武嗣. 心臓移植へのbridgeとしての補助人工心臓. ビデオによる胸部外科手術のコツとトピックス 2000; 127-34.
- 9) 中谷武嗣. 心臓移植-医師の立場から-. 大阪薬科大学公開教育講座講演集 2000; 7-50.
- 10) 森井 恵、上野和行、高田充隆、中谷武嗣、柴川雅彦. 当センター第1例目の心臓移植後患者の薬剤管理指導報告: 腎機能変化に伴う薬物相互作用を含む. 月刊薬事 2000; 42: 303-9.
- 11) 宮武邦夫、花谷彰久、中谷武嗣. 心臓移植患者の管理 A. 心臓移植患者の術前管理. 循環器専門医 2000; 8: 271-4.
- 12) 川崎誠治、田中紘一、中谷武嗣、松田 暉、相川直樹. 脳死臓器移植の成果と展望. からだの科学 2000; 215: 2-21.
- 13) 中谷武嗣. 心臓移植2例の経験. JHIF WORKSHOP 移植とヘルペスウイルス感染症 2000; 55-8.
- 14) 森 勝志、米田高司、片山善章、佐田正晴、中谷武嗣. FLOW PRATM Screening Testによる抗HLA抗体の測定. VERITAS NEWS 2000; 9.
- 15) 森 勝志、佐田正晴、宮田茂樹、米田高司、片山善章、中谷武嗣. 新しいHLA抗体測定法と測定意義について. KAMON 2000; 10-5.
- 16) 北村惣一郎、庭屋和夫、中谷武嗣. 同種心臓弁(ホモグラフト弁)移植. CURRENT THERAPY 2000; 18: 62-9.
- 17) 北村惣一郎、八木原俊克、庭屋和夫、上村秀樹、坂東 興、小林順二郎、笹子佳門、湊谷謙司、川平洋一、吉川義郎、小泉信達、中谷武嗣. 国内で提供を受けた肺動脈ホモグラフト弁を用いたRoss手術. 胸部外科 2000; 53: 275-80.

G. 知的所有権の取得状況

新規な細胞除去方法について申請準備中

分担研究報告書

無細胞化処理弁の組織学的評価

分担研究者 北村惣一郎 国立循環器病センター

研究要旨 心臓弁のドナー由来細胞を除去するため、トリトンX-100溶液にて浸漬処理し、処理時間や濃度による影響を組織学的観察によって評価した。本処理によって、心臓弁葉内のコラーゲン線維を保存しながらドナー由来細胞を破壊できた。本処理は、ドナー由来細胞の除去に効果的であると示唆された。

A. 研究目的

一般に、移植された同種弁組織では免疫学的拒絶反応を経て、線維芽細胞はアポトーシスの機序により消失すると考えられる。一方、一部の症例ではレシピエント由来の細胞が移植組織に進展してくることが確認されている。この場合、レシピエント由来の細胞が同種弁組織のマトリックス骨格を利用して増殖し、弁の機能を維持するような機構が働いているという期待がある。そこで、同種弁組織を無細胞化処理し、その組織マトリックスを利用してレシピエントの自己細胞を播種した弁組織を作成したり、あるいは無細胞処理後に細胞増殖因子を組み込むなどしてレシピエントの自己細胞が誘導されやすい弁組織を作成することを組織工学的手法によって目指す。ドナーの細胞を消失させてレシピエントの細胞を移植組織内に誘導することで、免疫反応を抑制し、生物学的な自己修復・成長の期待できる、長い耐久性を有する心臓弁が開発できると考える。本分担研究では、トリトンX-100溶液による浸漬処理によって無細胞化した心臓弁の、処理時間や処理濃度による影響を組織学的観察によって評価した。

B. 研究方法

食用ブタ繁殖場からブタ心臓を購入し、4℃にて搬送した。心臓摘出時における温阻血時間は20分以下とした。大動脈弁および肺動脈弁を摘出した後、各弁葉を一葉ずつ含むように3分割し、ハンクス液で3回洗浄した。各葉をRNase A、DNase I及びEDTA2Naをそれぞれ20µg/ml、0.2mg/ml及び0.02%含む各種濃度のトリトンX-100溶液に浸漬し、37℃、5%CO₂インキュベータ内で攪拌した。所定期間経過後、PBS溶液にて3回洗浄した。この無細胞化処理した心臓弁を固定・脱水し、HE及びVan Gieson染色にて顕微鏡観察した。また、細胞核が染色されなくなった領域の組織表面からの距離を、HE組織標本の画像解析処理に

よって測定した。

C. 研究結果

1%トリトンX溶液で処理した大動脈弁断面のHE染色標本を図1に示した。表面内皮細胞の核は、無細胞化処理1時間後で染色されなくなり、内部のおそらく線維芽細胞だと思われる細胞の核も、6時間後には染色されなくなった。しかし、弁基底部組織内の細胞核は48時間経過後も染色された。1%トリトンX溶液で処理した大動脈弁断面のVan Gieson染色標本を図2に示した。コラーゲン線維層は、無細胞化処理48時間後においてもよく保存されていた。図3には、各種濃度のトリトンX溶液処理による、組織表面から核消失領域までの距離の時間依存性を示した。250µmの深さまで浸透する6時間後には、厚さ約500µmである弁葉内の細胞は全て消失した。48時間後には表面から1mmまでの細胞核が消失した。この傾向は、トリトンX濃度による大きな差は認められなかった。

D. 考察

心臓弁組織からドナー由来の細胞を除去してレシピエントに移植する場合、免疫反応の主因を成すであろうドナー由来細胞はできるだけ除去する必要がある。本研究では、細胞除去法として文献的に報告のある、トリトンX-100溶液による浸漬処理について検討した。弁葉に関しては、処理6時間後にはドナー由来細胞の核は染色されなかったが、弁葉基部の心筋組織内細胞の核は処理24時間後でも、表面から1mm以下の領域では染色された。細胞核の除去は、トリトンXの組織表面からの拡散・浸透によるが、その速度は組織の密度や組成などによって影響を受けると考えられる。ドナー由来の抗原性を完全に除去するためには、トリトンXによって細胞を破壊するだけでなく、その残物を除去する必要があると考えられる。本研究では、処理液にトリトンXとともに

RNaseとDNaseを用いているが、その効果について、免疫組織染色等によって検討する予定である。トリトンX処理によって細胞以外の組織構造体に影響がある場合、弁葉の力学特性に影響を与える可能性がある。本分担研究では、弁葉内のコラーゲン線維の保存性をVan Gieson染色によって検討した。処理48時間後においてもコラーゲン線維はよく保存されていたことから、トリトンX処理によっても弁葉の力学特性には大きな影響がないと考えられた。

E. 結論

トリトンX-100溶液にて処理することにより、心臓弁葉内のドナー由来細胞を破壊できた。この処理によっても弁葉内のコラーゲン線維は保存されていた。本処理は、ドナー由来細胞の除去に効果的であると示唆された。

F. 研究発表

- 1) 北村惣一郎、笹子佳門、中谷武嗣. 心臓移植とその他の外科治療. CURRENT THERAPY 2000; 18: 158-65.
- 2) 坂東 興、中谷武嗣、八木原俊克、北村惣一郎. 小児の心臓・肺・心肺移植の今後の課題. HEART nursing 2000; 13: 970-4.
- 3) 公文啓二、今中秀光、宮野博史、中谷武嗣、北村惣一郎. 心移植に対する周術期 Critical Care. 集中治療 2000; 12: 845-52.
- 4) 松田 暉、福嶋教偉、大竹重彰、澤 芳樹、西村元延、松宮護郎、市川 肇、高島成二、堀 正二、白倉良太、中谷武嗣、北村惣一郎. 臓器移植法後実施された心臓移植と今後の展望. 心臓 2000; 32: 845-53.
- 5) 今中秀光、宮野博史、公文啓二、中谷武嗣、北村惣一郎. 心臓移植術後2症例の急性期管理の経験. 日集中医誌 2000; 7: 365-72.
- 6) Kitamura S, Nakatani T, Yagihara T, Sasako Y, Kobayashi J, Bando K, Minatoya K, Hanatani A, Komamura K, Imakita M, Yutani C, Kuro M, Kimura K, Nonogi H, Miyatake K. Cardiac transplantation under new legislation for organ transplantation in Japan - Report of two cases -. Jpn Circ J 2000; 64: 333-9.
- 7) 中谷武嗣、花谷彰久、宮武邦夫、北村惣一郎. 人工心臓と心臓移植. 循環器専門医 2001; 9: 51-6.

G. 知的所有権の取得状況

新規な細胞除去方法について申請準備中

0 hr 1 hr

6 hr 12 hr

24 hr 48 hr

Fig.1 Pig aortic valves treated with 1% Triton X-100 (HE staining).

0 hr 48 hr

Fig.2 Pig aortic valves treated with 1% Triton X-100 (Van Gieson staining).

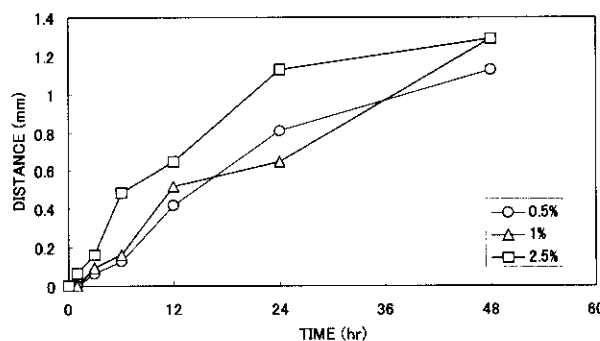


Fig.3 Distance from surface to non nuclear area in pig aortic valves treated with Triton X-100.

分担研究報告書

無細胞化処理弁の生体力学的評価

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター研究所

研究要旨 プタ心臓弁の力学特性を引っ張り試験によって調べた。弁葉は血流方向はしなやかで弱く、血管周囲方向は硬くて強い特性を持った異方性を示した。また、トリトンX-100溶液による心臓弁の無細胞化処理を行っても、力学特性に対しては大きな影響はないと考えられた。

A. 研究目的

同種弁組織を無細胞化処理し、その組織構造を利用してレシピエントの自己細胞を播種するための生体弁組織由来scaffoldを開発する。ドナーの細胞を消失させてレシピエントの細胞を移植組織内に誘導することで、免疫反応を抑制し、生物学的な自己修復・成長の期待できる、長い耐久性を有する心臓弁が開発できると考えられる。現在、ドナーから摘出された同種弁は10～30%の割合で細菌感染により臨床使用が不可能になっている。この廃棄される同種弁組織を無菌化・無細胞化処理を行うとともに、欠如した部位を生体吸収性の人工材料で置換することにより、ヒト組織を用いた新しい心臓弁を作成する可能性を開くことも目標とする。本分担研究では、トリトンX-100溶液による浸漬処理によって無細胞化した心臓弁の、処理時間による力学的特性への影響を力学試験機を用いて評価した。また、生体吸収性人工材料にて弁組織を作製するための基礎的知見を得るため、未処理弁の力学的特性についても検討した。

B. 研究方法

食用ブタ繁殖場からブタ心臓を購入し、4℃にて搬送した。心臓摘出時における温阻血時間は20分以下とした。大動脈弁および肺動脈弁を摘出した後、各弁葉を一葉ずつ含むように3分割し、ハンクス液で3回洗浄した。各葉をRNase A、DNase I及びEDTA2Naをそれぞれ20μg/ml、0.2mg/ml及び0.02%含む1%トリトンX-100溶液に浸漬し、37℃、5%CO₂インキュベータ内で攪拌した。6時間及び24時間経過後に試料

を取り出し、PBS溶液にて3回洗浄した。この無細胞化処理した心臓弁葉を幅3mm、長さ約15mmの短冊状に切り取り、力学試験機にて引っ張り試験を行って破断までの張力を測定した。測定後の切断片の重量と比重から弁葉の膜厚を求め、弾性率や破断強度を計算した。

C. 研究結果

正常ブタ大動脈弁葉の比重は約1.05であった。これから計算した正常ブタ弁葉の応力-歪み特性を図1に示した。試料片は心臓側表面から破断した。また、弁葉の血管周囲方向を0°、血流方向を90°として異方性について検討したところ、血流方向はしなやかで弱く、血管周囲方向は硬くて強い特性を持った異方性を示した。0°の試料における破断張力は、個体差があるものの10N前後であった。無細胞化処理後の応力-歪み特性を、弁葉における試料片の角度ごとに図2から4に示した。トリトンXによる無細胞化処理によっても、弾性率、破断強度ともに大きな影響はなかった。

D. 考察

弁葉は血管側がひだ状の、心臓側がスムーズな表面を有している。引っ張ることによって、ひだ状の血管側表面はコラーゲン線維に長さの余裕があるが、心臓側表面には余裕がないため、心臓側表面から破断すると考えられる。異方性は弁葉内のコラーゲン線維の配向性と関係すると思われるため、現在、組織学的に検討中である。欠如した弁葉を生体吸収性人工材料で補う場合、

このような構造と異方性を持たせるためには、機械弁のような単純な板状構造ではなく、織布構造で、かつ編み方や織り方などについて工夫する必要があると思われる。なお、血管周囲方向の弾性率及び破断強度は、大動脈壁について報告されている結果と同等であった。また、トリトンXによる無細胞化処理における力学特性への影響については、大きな影響はないと考えている。現在、標本数を蓄積中である。

E. 結論

ブタ正常弁の力学特性は、血流方向はしなやかで弱く、血管周囲方向は硬くて強い特性を持った異方性を示した。これらの力学特性は、トリトンX-100溶液にて無細胞化処理しても大きな影響はなかった。

F. 研究発表

- 1) 中谷武嗣. 心臓移植へのbridgeとしての補助人工心臓. ビデオによる胸部外科手術のコツとトピックス 2000; 127-34.
- 2) 中谷武嗣. 心臓移植—医師の立場から—. 大阪薬科大学公開教育講座講演集 2000; 7-50.
- 3) 森井 恵、上野和行、高田充隆、中谷武嗣、柴川雅彦. 当センター第1例目の心臓移植後患者の薬剤管理指導報告：腎機能変化に伴う薬物相互作用を含む. 月刊薬事 2000; 42: 303-9.
- 4) 宮武邦夫、花谷彰久、中谷武嗣. 心臓移植患者の管理 A. 心臓移植患者の術前管理. 循環器専門医 2000; 8: 271-4.
- 5) 川崎誠治、田中紘一、中谷武嗣、松田 暉、相川直樹. 脳死臓器移植の成果と展望. からだの科学 2000; 215: 2-21.
- 6) 中谷武嗣. 心臓移植2例の経験. JHIF WORKSHOP 移植とヘルペスウイルス感染症 2000; 55-8.
- 7) 森 勝志、米田高司、片山善章、佐田正晴、中谷武嗣. FLOW PRATM Screening Testによる抗HLA抗体の測定. VERITAS NEWS 2000; 9.
- 8) 森 勝志、佐田正晴、宮田茂樹、米田高司、片山善章、中谷武嗣. 新しいHLA抗体測定法と測定意義について. KAMON 2000; 10-5.

G. 知的所有権の取得状況

新規な細胞除去方法について申請準備中

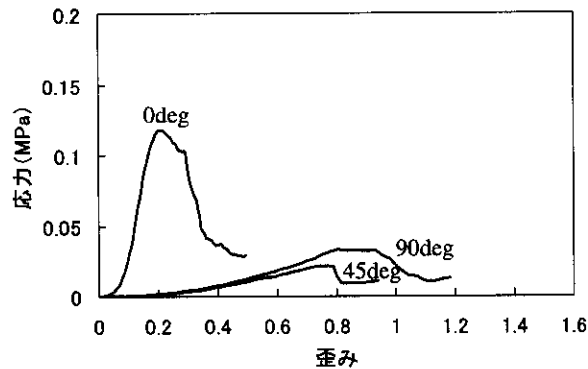


Fig.1 Elastic property of pig aortic valve.

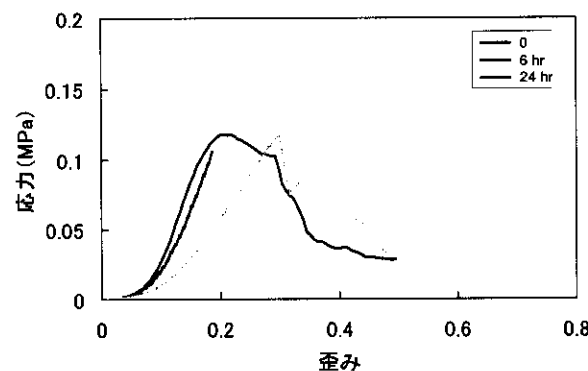


Fig.2 Elastic property of pig aortic valves treated with 1% Triton X-100 (0 degree).

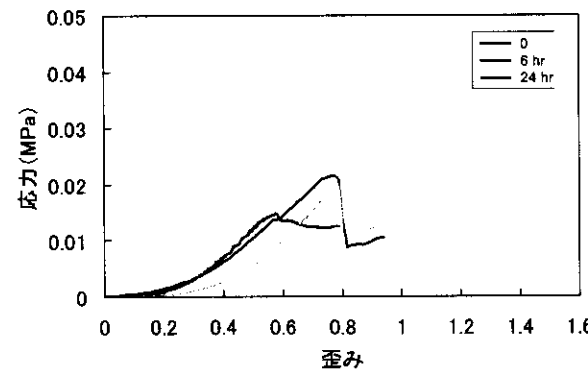


Fig.3 Elastic property of pig aortic valves treated with 1% Triton X-100 (45 degree).

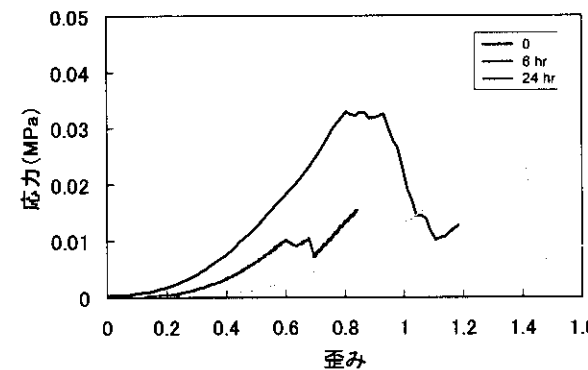


Fig.4 Elastic property of pig aortic valves treated with 1% Triton X-100 (90 degree).

分担研究報告書

トリトンX溶液による無細胞化処理とSEM観察

分担研究者 庭屋和夫 国立循環器病センター病院

研究要旨 心臓弁のドナー由来細胞を除去するため、トリトンX-100溶液にて浸漬処理し、SEM観察によって評価した。ドナー由来細胞を完全に剥離するには、物理的方法の併用が必要であった。また、細胞除去後に内皮細胞を播種するには、十分な洗浄によるトリトンXの除去が肝要であると示唆された。

A. 研究目的

現在、再生医療における細胞播種 scaffold として用いられているポリ乳酸などの生体吸収性材料には、複雑な形状に成形するのが難しいこと、また、生体に比べて硬いため、成形できても生体と同等の力学特性を再現するのが難しいことなどの欠点がある。そこで本研究では、同種弁組織を無細胞化処理し、その組織マトリックスを利用した生体組織由来心臓弁 scaffold を開発する。さらに、生体由来 scaffold にレシピエントの自己細胞を播種したり、あるいは細胞増殖因子を組み込むなどしてレシピエントの自己細胞が誘導されやすい弁組織を作成する。本分担研究では、ドナー弁のコラーゲン線維や弾性線維、基底膜などの構造マトリックスをそのまま残しつつ、細胞成分や抗原部位のみを除去し、生体由来 scaffold として利用するために、立体構造や力学特性を保持したまま細胞成分や抗原部位のみを効果的に除去する方法について検討する。本年度は、無細胞化方法として、界面活性剤であるトリトンX-100溶液による浸漬処理を選び、処理時間や処理濃度による影響を走査型電子顕微鏡（SEM）観察によって評価した。

B. 研究方法

食用ブタ繁殖場からブタ心臓を購入し、4℃にて搬送した。心臓摘出時における温阻血時間は20分以下とした。大動脈弁および肺動脈弁を摘出した後、各弁葉を一葉ずつ含むように3分割し、ハンクス液で3回洗浄した。各葉をRNase A、DNase I及びEDTA2Naをそれぞれ20 μ g/ml、0.2mg/ml及び0.02%含む各

種濃度のトリトンX-100溶液に浸漬し、37℃、5%CO₂インキュベータ内で攪拌した。所定期間経過後、PBS溶液にて3回洗浄した。この無細胞化処理した心臓弁を2%グルタルアルデヒドにて固定し、脱水乾燥後、SEMにて表面を観察した。また、無細胞化処理後の心臓弁をPBS溶液中で攪拌浸漬し、PBS溶液内へ溶出したトリトンX-100量を、波長280nmにおける吸光度から測定した。

C. 研究結果

1%トリトンX-100溶液にて無細胞化処理した後の組織表面を、走査電顕によって観察した結果を図1に示した。無細胞化処理によって時間依存的に内皮細胞間に隙間が生じ、各細胞がばらばらになっていくことが示された。しかしながら、48時間後でも細胞が剥がれ落ちていることはなかった。この傾向は、トリトンX濃度0.5%、1%、2.5%に依らず同様であった。大動脈弁、肺動脈弁、両弁基部の血管、それぞれの表面においても差異は認められなかった。表面の細胞残骸を完全に除去するために、大動脈弁基部の血管表面をブレードで剥離した結果を図2に示した。明らかに、表面の内皮細胞層が剥離していることが示された。無細胞化処理後のトリトンX-100溶出量を図3に示した。浸漬2週間後においてもトリトンXの溶出が認められた。

D. 考察

心臓弁表面からドナー由来の細胞を除去し、レシピエントの自己内皮細胞を播種する場合、ドナー由来の細胞

は完全に除去される必要があると思われる。本研究では、細胞除去法として文献的に報告のある、トリトンX-100溶液による浸漬処理について検討した。1%トリトンX溶液にて48時間処理した場合には、顕微鏡観察では細胞核が染色されなくなるに関わらず、SEM観察では細胞の残骸が依然残っていた。トリトンXによって細胞膜や核膜などの脂質二重層は破壊されるものの、細胞骨格そのものは残存していると考えられる。そのため、表面の細胞残骸を完全に除去するためには、物理的方法が必要であると考えられる。図2に示したように、ブレードで剥離することは有効であるが、弁のようなしなやかな組織には適用しにくい。たとえば超音波処理やボルトックス処理などの併用を現在、検討中である。

トリトンX-100は細胞障害性を示すため、無細胞化処理した組織表面に自己内皮細胞を播種する場合、十分な洗浄が必要である。無細胞化処理した組織からのトリトンX-100溶出量を測定したところ、2週間後でも溶出が認められた。効率的な洗浄方法について、現在、検討中である。

E. 結論

トリトンX-100溶液にて処理することにより、心臓弁表面の内皮細胞間に間隙が生じたが、剥離することはなかった。完全に剥離するには物理的方法の併用が必要であった。また、細胞除去後に内皮細胞を播種するため、十分な洗浄によるトリトンXの除去が必要であった。

F. 研究発表

- 1) 北村惣一郎、庭屋和夫、中谷武嗣．同種心臓弁（ホモグラフト弁）移植．CURRENT THERAPY 2000；18：62-9.
- 2) 北村惣一郎、八木原俊克、庭屋和夫、上村秀樹、坂東 興、小林順二郎、笹子佳門、湊谷謙司、川平洋一、吉川義郎、小泉信達、中谷武嗣．国内で提供を受けた肺動脈ホモグラフト弁を用いたRoss手術．胸部外科 2000；53：275-80.

G. 知的所有権の取得状況

新規な細胞除去方法について申請準備中

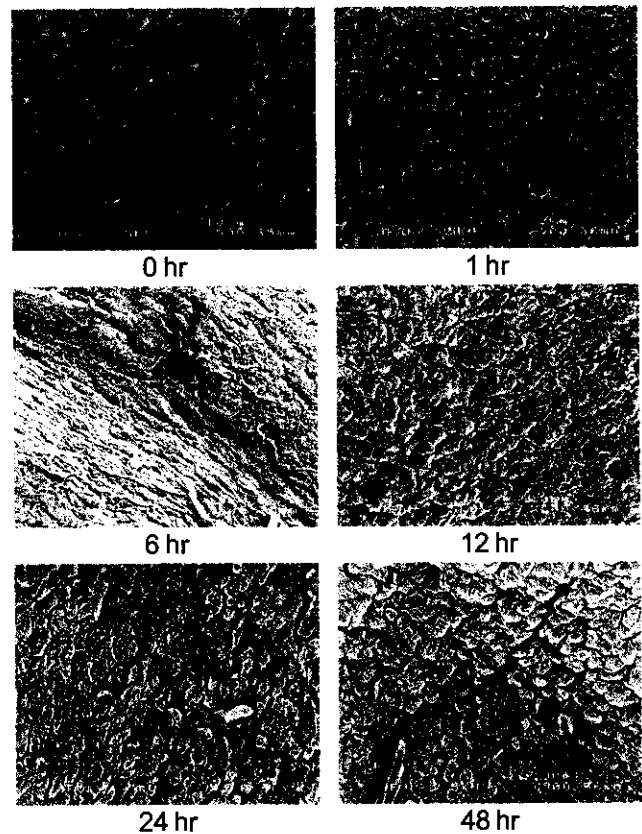


Fig.1 Pig aortic valves treated with 1% Triton X-100.

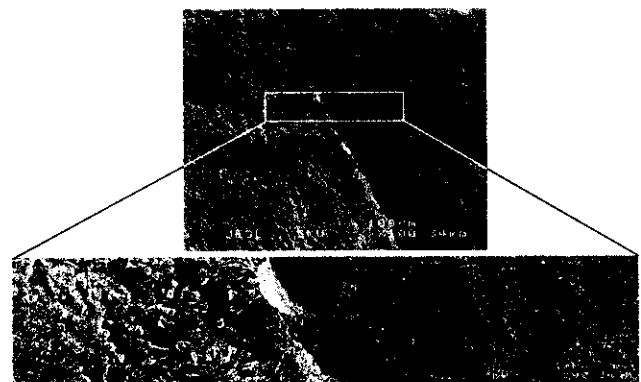


Fig.2 Pig aorta surface scratched with blade.

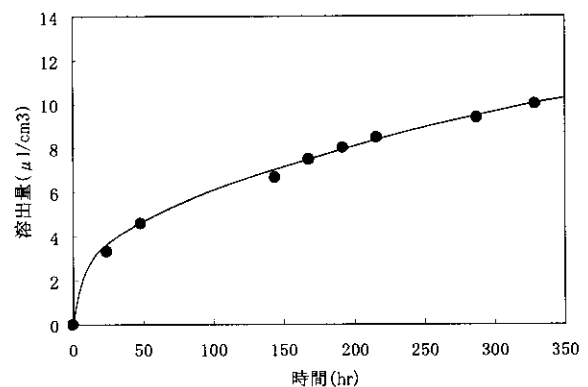


Fig.3 Elution volume of Triton X-100 from acellularized pig aorta treated with 1% Triton X-100.

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
北村惣一郎、笹子佳門、中谷武嗣	心臓移植とその他の外科治療	CURRENT THERAPY	18	158-65	2000
坂東 興、中谷武嗣、八木原俊克、他	小児の心臓・肺・心臓移植の今後の課題	HEART nursing	13	970-4	2000
公文啓二、今中秀光、宮野博史、他	心臓移植に対する周術期 Critical Care	集中治療	12	845-52	2000
松田 暉、福嶋教偉、大竹重彰、他	臓器移植法後実施された心臓移植と今後の展望	心臓	32	845-53	2000
今中秀光、宮野博史、公文啓二、他	心臓移植術後2症例の急性期管理の経験	日集中医誌	7	365-72	2000
Kitamura S, Nakatani T, Yagihara T, Sasako Y, et al	Cardiac transplantation under new legislation for organ transplantation in Japan - Report of two cases -	Jpn Circ J	64	333-9	2000
中谷武嗣、花谷彰久、宮武邦夫、他	人工心臓と心臓移植	循環器専門医	9	51-6	2001
中谷武嗣	心臓移植への bridge としての補助人工心臓	ビデオによる胸部外科手術のコツとピックス		127-34	2000
中谷武嗣	心臓移植 - 医師の立場から -	大阪薬科大学公開教育講座講演集		7-50	2000
森井 恵、上野和行、高田充隆、中谷武嗣、他	当センター第1例目の心臓移植後患者の薬剤管理指導報告: 腎機能変化に伴う薬物相互作用を含む	月刊薬事	42	303-9	2000
宮武邦夫、花谷彰久、中谷武嗣	心臓移植患者の管理 A. 心臓移植患者の術前管理	循環器専門医	8	271-4	2000
川崎誠治、田中紘一、中谷武嗣、他	脳死臓器移植の成果と展望	からだの科学	215	2-21	2000
中谷武嗣	心臓移植2例の経験	JHIF WORKSHOP 移植とヘルペスウイルス感染症		55-8	2000
森 勝志、米田高司、片山善章、他	FLOW PRATM Screening Test による抗 HLA 抗体の測定	VERITAS NEWS	9		2000
森 勝志、佐田正晴、宮田茂樹、他	新しい HLA 抗体測定法と測定意義について	KAMON		10-5	2000
北村惣一郎、庭屋和夫、中谷武嗣	同種心臓弁 (ホモグラフト) 移植	CURRENT THERAPY	18	62-9	2000
北村惣一郎、八木原俊克、庭屋和夫、他	国内で提供を受けた肺動脈ホモグラフト弁を用いた Ross 手術	胸部外科	53	275-80	2000

20000418

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。