

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村惣一郎

平成14年（2002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. 無細胞化処理弁の移植実験による評価 6

北村惣一郎

2. 無細胞化処理弁の生体力学特性評価 9

中谷武嗣

3. 無細胞化処理弁への細胞組込 12

庭屋和夫

4. 無細胞化のための新規処理法の開発 15

藤里俊哉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 18

IV. 研究成果の刊行物・別刷 20

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
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総長

研究要旨 心臓弁のドナー由来細胞を除去し、レシピエントの自己血管内皮細胞を播種することで、力学特性を損なうことなく優れた自己化を示す組織工学化心臓弁を開発した。さらに、トリトンX-100処理に代わる、よりよい細胞除去方法を開発した。

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

藤里俊哉

国立循環器病センター研究所研究員

A. 研究目的

同種弁は機械弁や異種生体弁などの人工弁の開発、導入と歩みを同じくして、代用心臓弁として臨床に導入されてきた。一般に、同種弁は機械弁に比べ抗血栓性で、異種生体弁に比べ耐久性で、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っていると考えられ、心臓弁自体も弁に連続する血管組織も近代的心臓血管外科の治療戦略として、欠くべからざる選択肢となっている。一方、一部の、特に若年者に用いた同種弁は、術後比較的早期に導管部分の狭窄や石灰化を特徴とする変化によって、比較的早く機能不全を起す事も報告されており、免疫反応の関与が強く示唆されている。そこで、本研究では同種弁が臨床的に優位である原因を検討し、組織工学的手法を用いてその利点をさらに補強する同種弁保存方法を開発し導入する。この技術により、同種弁を必要とする致命的でさえある症例の救命と、より質の高い術後生活に結びつくと考えられる。さらに、免疫反応の主因を成すであろう、同種組織細胞を消失させ、再生工学的手法により患者の自己細胞を組織内に誘導することで、より長い耐久性を有する代用弁の開発を目指す。自己細胞の含まれた組織は、生物学的な自己修復の機転や、成長までもが期待できる。現在、ドナーか

ら摘出された同種弁は10%から30%の割合で、摘出時の細菌感染で臨床使用が不可能になる。それら廃棄される同種弁組織の新たな臨床使用の可能性を開くことは、社会資本としての提供組織の有効利用にも結びつく。本年度は、昨年度に引き続いて界面活性剤であるトリトンX-100溶液による浸漬処理によって無細胞化した心臓弁に関し、生体力学特性への影響について詳細に検討するとともに、ミニブタを用いた動物実験によって、レシピエントの自己血管内皮細胞を組み込んだ脱細胞化心臓弁の移植実験を行った。さらに、長期間の洗浄が必要であること、及び組織内部の細胞除去が困難であること、というトリトンX-100による細胞除去処理法の問題点を解決するために、新規な界面活性剤洗浄除去方法並びに新規な細胞除去方法について検討した。なお、具体的な処理方法については、現在、特許出願手続き中のため、規定に従って詳細は省略し、結果のみを報告する。

B. 研究方法

脱細胞化処理: 食用ブタ（(株) ジャパンファーム）あるいはNIBS系ミニブタ（(財) 日本生物科学研究所、日本農産工業（株））の心臓を摘出して肺動脈弁を分離し、ハanks液で洗浄後、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1%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24時間攪拌した。PBS溶液にて3回洗浄後、残存トリトンX-100を除去するために、4 $^{\circ}$ CのPBS溶液にて3週間洗浄した。トリトンX-100の除去効果を調べるためには、PBS洗浄溶液中への溶出量を、サイズ排除クロマトグラフィー法（使用カラム：

TSKgel ALPHA-M、東ソー（株））を用いた。

力学特性評価:無細胞化処理した心臓弁葉から、辺縁方向を0°、法線方向を90°として角度0°、45°、90°における幅3mm、長さ約15mmの短冊状の切片を切り取り、力学試験機（テンシロン、（株）オリエンテック）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。

細胞播種:NIBS系ミニブタの大腿部動脈を長さ約5cm摘出し、両端に留置カテーテル針を挿入後、三方活栓を接続した。PBSにて洗浄後、0.1%細胞分離酵素液（Liberase Blendzyme 2、スイスRoche社）を注入し、37℃にて20min間静置した。分離した細胞を含む酵素液を回収後、洗浄し、血管内皮細胞用増殖培地（EBM2、三光純薬（株））にて培養した。2週間培養増殖後、トリプシン溶液にて細胞を剥離回収した。脱細胞化処理したミニブタ心臓弁scaffoldの弁葉内側を標的領域とし、2日間静置培養した。

移植実験:NIBS系ミニブタを用い、右心バイパス下にてレシipientのミニブタ自己細胞を播種した脱細胞化同種肺動脈弁による肺動脈弁置換手術を行った。術後1ヶ月及び3ヶ月において、心エコーと圧測定による血行動態の測定後、移植弁組織を摘出し、HE染色、抗vWF免疫染色及び走査型電子顕微鏡によって組織学的所見を検討した。さらに、これらの結果を細胞の未播種モデル群と比較した。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案などについて、実験動物に対する動物愛護上の規定に則って配慮した。

C. 研究結果

正常弁の伸展特性:張力-伸び曲線は各切片ともに伸展とともに張力は増加していき、破断に至るが、その曲線経過は角度により異なった。0°方向では伸展初期に張力が緩やかに増加した後、急激に増加し、破断強度が高かったのに対し、90°方向では伸展による張力の増加は緩やかで低かったが、伸びは逆に大きく、破断強度は低かった。

トリトンX-100処理による力学特性への影響:図1に示すように、0°方向では処理6時間後で未処理弁切片の強度に比べて約2倍に増加したが、それ以降24時間

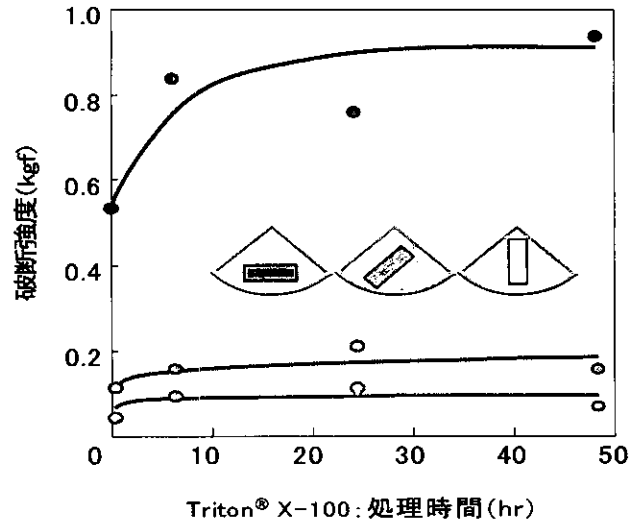


図1. 脱細胞化処理による破断強度への影響

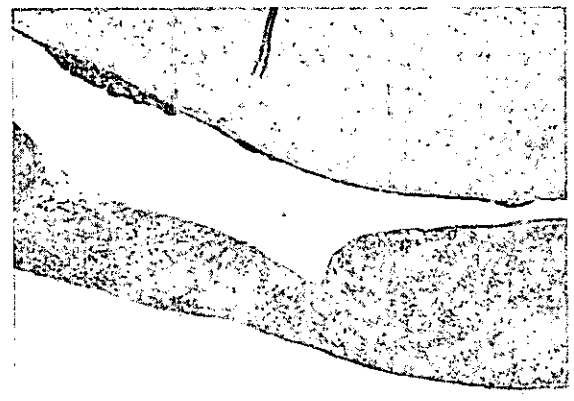


図2. 細胞を播種した脱細胞化心臓弁葉の断面

及び48時間における増加は僅かであった。45°方向並びに90°方向では処理による増加は僅かであった。トリトンX-100処理6時間後で、弁葉全層の細胞はほぼ完全に消失し、空胞化状態になった。コラーゲン線維及び弾性繊維の層内含有量と配列状態はほとんど変化なかった。弁葉の厚さにも変化は見られなかった。

細胞播種:ミニブタ大腿動脈から分離された血管内皮細胞は、2週間の培養によって約 10^7 個にエクスパンドすることができた。肺動脈弁を心臓側を下方向として垂直に静置し、上部から血管内皮細胞浮遊液を滴下し、2時間静置する事で、図2に示すように細胞を付着させることができた。

移植実験:自己細胞を未播種の脱細胞化同種肺動脈弁は、血行動態並びに肉眼的所見から、術後1ヶ月

においても良好な弁機能を示していた。HE染色したところ、移植された脱細胞化肺動脈弁組織の内腔表面上に吻合部から細胞の進展が認められ、抗vWF抗体免疫染色にて血管内皮細胞であることが確認された。これに対して、ミニブタレシピエントの自己細胞を播種した脱細胞化同種弁では、術後1ヶ月において、組織表面が血管内皮細胞層によって覆われているのみならず、組織内への細胞浸潤も認められた。さらに術後3ヶ月においては、図3に示すように、弁葉内への細胞の浸潤も認められた。

新規処理法:トリトンX-100による処理では24時間処理後でも、表面から1mm以上の深部組織内では細胞の核は染色された。これに対し、新規処理法では10分間の処理によって組織内の細胞はほぼ完全に染色されなくなった。同組織のElastica Van Gieson染色標本からは、いずれの処理法においても、コラーゲン線維層並びに弾性線維層はよく保存されていた。昨年度の洗浄法では、残存トリトンX-100を十分除去し、脱細胞化組織内へ細胞を組み込むために3週間の洗浄が必要であったが、新規方法では約1/10の洗浄時間で十分であった。また、図4に示すように、新規処理法による破断強度への影響について検討したところ、トリトンX-100による処理では破断強度及び弾性率とも増大する傾向があったが、新規処理においてはいずれもほとんど変化が見られなかった。

D. 考察

正常弁の伸展特性:張力-伸び曲線及び応力-ひずみ曲線ともどの切片角においても伸展に伴って張力並びに応力軸に凹になる非線形性を示した。また、辺縁方向は伸びにくかつ硬い上に強靱な性質であるが、法線方向は非常に伸びやすかつ柔らかい上に脆弱な性質を示した。弁葉を構成する成分の弾性率を直接測定することは困難であるが、弁葉の弾性率を規定する成分は主にコラーゲン線維であり、細胞成分及び弾性繊維はほとんど関与していないと考えられる。

正常弁の非線形性と異方性:心臓側の表面構造は全面平滑であるが、動脈側は辺縁方向に多くのヒダが弁葉の両端に向かって走行しており、表面が凸凹している。0°では動脈側のヒダに平行していることから、伸展初期では弛んでいるコラーゲン線維が伸ばされて直線状になるまでの経過として張力及び応力が緩やかに増加す

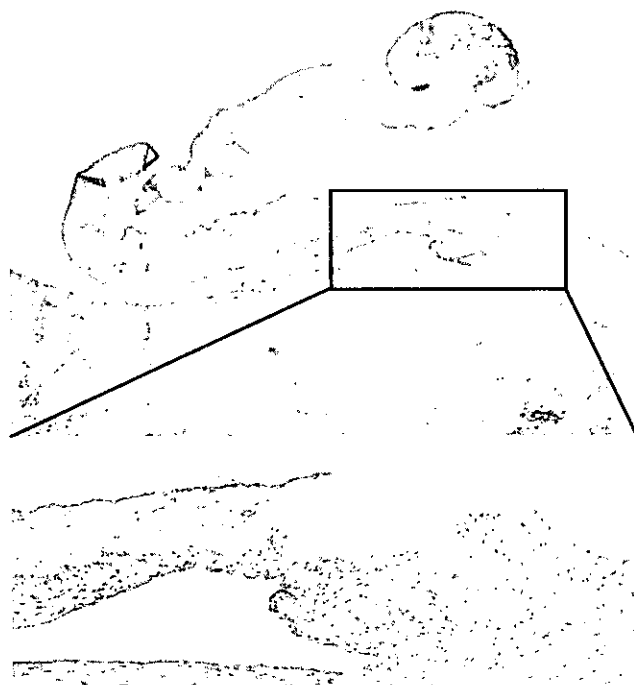


図3. 術後3ヶ月の自己細胞組込ミニブタ脱細胞化心臓弁組織

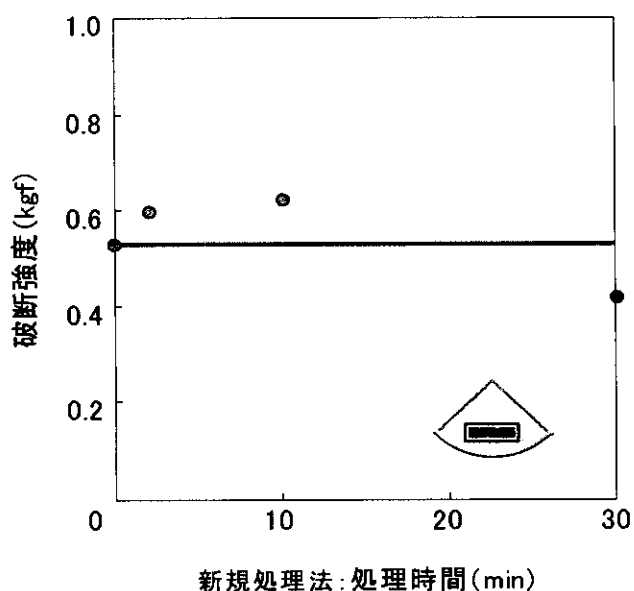


図4. 新規処理法による破断強度への影響

るが、コラーゲン線維のたるみが取れると、コラーゲン線維自体の応力発生に移るため、伸びにくかつ高い破断強度となる。

トリトンX-100処理の力学特性への影響:トリトンX-100溶液への浸漬処理によって弁葉の強靱さが増大し

たが、組織学的には細胞の消失による空胞化は見られるものの、コラーゲン線維及び弾性線維の密度並びに配列状態に変化は認められなかった。従って、弁葉の力学特性の変化は主にコラーゲン線維の材質的变化によるものであって、線維自体に化学的変化が生じている可能性もある。強靱さが増大することで、血管内圧の上昇に対する安全性はさらに確保されるが、柔軟性が低下するという問題もある。現在行っている動物移植実験からは、大きな影響はないと考えている。

血管内皮細胞の播種:ミニプタ血管内皮細胞は、大腿動脈から通常の酵素処理法によって容易に分離増殖することができた。臨床応用に際しては、患者への負担をなるべく下げるために、幹細胞の利用についても検討する必要がある。来年度においては、幹細胞の分離増殖について検討する予定である。また、血管内皮細胞の組み込みについては、本年度は弁葉内側のみを標的領域として播種しているが、来年度は、組織全面を対象とした血管内皮細胞播種方法及び組織内部への線維芽細胞の組み込み方法についても検討する必要がある。さらに、臨床応用に際しては、ヒト細胞を用いたGMP基準に則った施設で、基準に則った操作を必要とする。現在、GMP基準に適合した細胞プロセッシング設備を有する施設との共同研究についても検討中である。

動物実験:レシピエント自己細胞をあらかじめ播種した脱細胞化心臓弁の場合では、術後1ヶ月において、移植組織表面が血管内皮細胞に覆われているのみならず、組織内への細胞浸潤も認められた。しかし、弁葉内への浸潤は認められなかった。これに対し、術後3ヶ月では、さらに弁葉内にまで細胞浸潤が認められた。細胞未播種の場合では、細胞播種した場合に比べ、組織内への細胞浸潤は少なかった。自己細胞を組み込むことによって、移植後の自己化が促進される詳細な理由は不明であるが、組み込まれた血管内皮細胞が増殖因子を産生し、細胞浸潤を促している可能性も考えられる。来年度は、浸潤した細胞の性状、石灰化等について、長期の成績について検討する予定である。

新規処理法: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。昨年度の研究結果から、トリトンX-100溶液による脱細胞化処理では、浸透性の問題から組織内部の細胞除去が困難なこと、及び残存トリトンX-100を除去

するために長期間の洗浄が必要なことが大きな問題であった。新規処理法では、短時間の処理によって組織内の細胞をほぼ完全に破壊することができ、かつ短時間で十分な洗浄効果を得られる。また、生体力学特性もほとんど未処理のものと同等であった。さらに、現在検討中であるが、組織内の細菌等を完全に除去し、滅菌することも可能であると考えている。したがって本方法が確立された場合、同種弁のみならず異種心臓弁を脱細胞化処理することで、ドナー不足等の問題をも解決した、我が国発の高度な安全性を有した再生医療用生体由来組織を開発できる可能性もあろう。

E. 結論

弁葉は辺縁方向は伸展しにくく、弾性率が高く破断強度も大きいのに対し、法線方向は伸びやすく、弾性率も低く破断強度も小さいという異方性が認められた。トリトンX-100による脱細胞化処理によって、弁葉の破断強度及び弾性率は増大したが、移植に際しての大きな影響はないと考えられた。血管内皮細胞は大腿動脈から容易に分離することができ、In vitroでの増殖後、静置培養法によって、脱細胞化組織表面の弁葉内側に血管内皮細胞を播種することができた。ミニプタを用いた動物実験によって、自己細胞を組み込むことで、細胞未組み込み群と比較して、移植後の細胞浸潤が促進された。さらに、トリトンX-100処理に代わる新規な脱細胞化方法を開発することで、より大きな組織内部の細胞除去も可能であり、生体力学特性は未処理組織と同等に維持したまま、処理時間の大幅な短縮が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitamura S, Nakatani T, Bando K, Sasako Y, Kobayashi J, Yagihara T. Modification of bicaval anastomosis technique for orthotopic heart transplantation. *Ann Thorac Surg*, 72(4), 1405, 2001.
- 2) Minatoya K, Okita Y, Hanafusa Y, Tagusari O, Sasako Y, Kobayashi J, Ando M, Kitamura S. Valve-sparing operation versus bentall

operation: Comparison at medium-term follow-up. Kawada S, Ueda T, Shimizu H, Eds. Cardio-aortic and aortic surgery. Springer-Verlag, Tokyo, 33, 2001.

- 3) 北村惣一郎. 心臓弁・血管. 北村惣一郎編. 組織移植—採取・保存・使用技術マニュアル. 日本医学館, 東京, 47, 2001.
- 4) 庭屋和夫、北村惣一郎. 心臓弁膜症の外科治療. 篠山重威、矢崎義雄編. 循環器疾患最新の治療 2002—2003, 南江堂, 東京, 165, 2002.
- 5) 北村惣一郎. わが国の組織移植医療の在り方と国立循環器病センター組織保存バンクの設立. 循環器病研究の進歩, 22 (1), 21, 2001.
- 6) 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. 循環器専門医誌, 9 (1), 51, 2001.
- 7) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東 興、小野安生、庭屋和夫、田鎖 治、佐藤長人、駒村和雄、公文啓二、由谷親夫、八木原俊克、宮武邦夫、北村惣一郎. 特集: わが国の心臓移植の現状 国立循環器病センターでの経験. 今日の移植, 14 (4), 418, 2001.
- 8) 坂東 興、中谷武嗣、小林順二郎、庭屋和夫、笹子佳門、花谷彰久、田鎖 治、宮武邦夫、八木原俊克、北村惣一郎. 特集: わが国の心臓移植の現状 摘出チームの経験. 今日の移植, 14 (4), 433, 2001.
- 9) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東 興、小野安生、庭屋和夫、田鎖 治、駒村和雄、公文啓二、八木原俊克、宮武邦夫、北村惣一郎. HANPフォーラム2001 心不全治療の cardioprotection—慢性期から急性期へ— 末期の心不全に対する外科的治療法としての左心補助人工心臓と心臓移植. 心臓, 34 (1), 54, 2002.

2. 学会発表

- 1) 庭屋和夫、藤里俊哉、中谷武嗣、沼田 智、北村惣一郎. 再生医工学技術を応用した新しい同種心臓弁組織の開発—Tissue engineered heart valveの骨格としての無細胞化同種弁組織の工学的特性の検討—. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 49 (abst), 291, 2001.
- 2) 庭屋和夫、沼田 智、藤里俊哉、船本誠一、富

田伸司、中谷武嗣、八木原俊克、北村惣一郎. 同種心臓弁組織を利用したtissue engineering valveの作成. 第1回再生心臓血管外科治療研究会抄録集, 8, 2002.

- 3) Fujisato T, Nakatani T, Funamoto S, Hasegawa M, Tomita S, Sada M, Niwaya K, Kitamura S. Pathphysiological evaluation of acellularized heart valves. Abstracts of International Conference on Transplantation 2001, 185, 2001.
- 4) 藤里俊哉、中谷武嗣、船本誠一、森反俊幸、北村惣一郎. 細胞移植基材となる生体組織由来 scaffoldの開発. 第17回ライフサポート学会大会講演予稿集, 62, 2001.
- 5) 船本誠一、藤里俊哉、長谷川正光、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. トリトンX-100によって無細胞化処理したブタ心臓弁とその力学特性. 第17回ライフサポート学会大会講演予稿集, 126, 2001.
- 6) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、富田伸司、沼田 智、庭屋和夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体組織由来 scaffoldの開発とブタ心臓弁への応用. 第23回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 152, 2001.
- 7) 藤里俊哉、中谷武嗣、船本誠一、森反俊幸、長谷川正光、北村惣一郎. ブタ心臓弁の脱細胞化処理と生体力学特性. 第12回バイオエンジニアリング学術講演会・秋季セミナー講演論文集, 199, 2001.
- 8) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、森反俊幸、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体 scaffoldとしての脱細胞化ブタ心臓弁. 第14回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 41, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
新規な細胞除去方法について2件申請処理中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

無細胞化処理弁の移植実験による評価

分担研究者 北村惣一郎 国立循環器病センター総長

研究要旨 ミニブタを用いた動物実験によって、無細胞化した肺動脈弁にレシピエントの自己血管内皮細胞を組み込み、肺動脈弁置換術を行った。移植された肺動脈弁は良好な弁機能を示し、自己細胞を組み込むことによって、細胞未組み込み群と比較して、良好な細胞浸潤が認められた。

A. 研究目的

移植された同種弁組織では、組織内に存在するドナー由来の細胞は免疫学的拒絶反応を経た後、アポトーシスの機序によって消失すると考えられる。一部の症例においては、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おり、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考えられる。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の作成を組織工学的手法によって目指す。ドナー由来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及び成長の期待できる、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、ミニブタを用いた動物実験によって、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肺動脈弁にレシピエントの自己血管内皮細胞を組み込み、肺動脈弁置換手術をすることによって評価した。また、細胞を組み込んでいない無細胞化ミニブタ肺動脈弁の結果と比較検討した。

B. 研究方法

脱細胞化処理：NIBS系ミニブタ（（財）日本生物科学研究所、日本農産工業（株））の心臓を摘出して肺動脈弁を分離し、ハンクス液で洗浄後、RNase A、DNase I及びEDTA2Naをそれぞれ20 μ g/ml、0.2 mg/ml及び0.02%含む1%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24時間攪拌した。PBS溶液にて3回洗浄後、残存トリトンX-100を除去するために、4 $^{\circ}$ CのPBS溶液にて3週間洗浄した。

細胞播種：NIBS系ミニブタの大腿部動脈を長さ約5 cm摘出し、両端に留置カテーテル針を挿入後、三方活栓を接続した。PBSにて洗浄後、0.1%細胞分離酵素液（Liberase Blendzyme 2、スイスRoche社）を



図1. 術後1ヶ月のミニブタ脱細胞化心臓弁

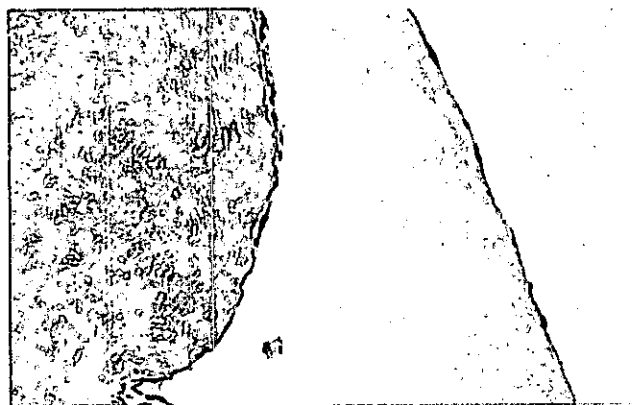


図2. 術後1ヶ月のミニブタ脱細胞化心臓弁組織（左はHE染色、右は抗vWF免疫染色）

注入し、37℃にて20min間静置した。分離した細胞を含む酵素液を回収後、洗浄し、血管内皮細胞用増殖培地（EBM2、三光純薬（株））にて培養した。2週間培養増殖後、トリプシン溶液にて細胞を剥離回収した。脱細胞化处理したミニブタ心臓弁scaffoldの弁葉内側を標的領域とし、2日間静置培養した。

移植実験：NIBS系ミニブタを用い、右心バイパス下にてレシピエントのミニブタ自己細胞を播種した脱細胞化同種肺動脈弁による肺動脈弁置換手術を行った。術後1ヶ月及び3ヶ月において、心エコーと圧測定による血行動態の測定後、移植弁組織を摘出し、HE染色、抗vWF免疫染色及び走査型電子顕微鏡によって組織学的所見を検討した。さらに、これらの結果を細胞の未播種モデル群と比較した。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案などについて、実験動物に対する動物愛護上の規定に則って配慮した。

C. 研究結果

図1に示すように、自己細胞を未播種の脱細胞化同種肺動脈弁は、血行動態並びに肉眼的所見から、術後1ヶ月においても良好な弁機能を示していた。HE染色したところ、図2に示すように、移植された脱細胞化肺動脈弁組織の内腔表面上に吻合部から細胞の進展が認められ、抗vWF抗体免疫染色にて血管内皮細胞であることが確認された。また、図3に示すように、弁葉上に島状に血管内皮細胞の生着が観察された。これに対して、ミニブタレシピエントの自己細胞を播種した脱細胞化同種弁では、術後1ヶ月において、図4に示すように、組織表面が血管内皮細胞層によって覆われているのみならず、組織内への細胞浸潤も認められた。さらに術後3ヶ月においては、図5に示すように、弁葉内への細胞の浸潤も認められた。

D. 考察

脱細胞化心臓弁をミニブタに1ヶ月間移植したところ、吻合部から血管内皮細胞が進入するとともに、弁葉上にも島状に内皮細胞が見られた。しかしながら、組織内への細胞浸潤はほとんど認められなかった。これに対し、レシピエント自己細胞をあらかじめ播種した脱細胞化心臓弁の場合では、移植組織表面が血管内皮細胞に覆



図3. 術後1ヶ月のミニブタ脱細胞化心臓弁の表面電子顕微鏡写真

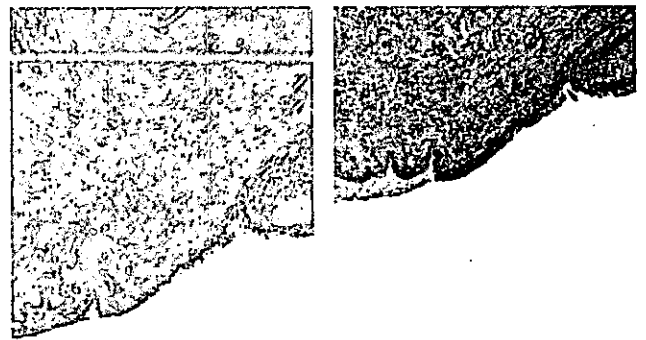


図4. 術後1ヶ月の自己細胞組込ミニブタ脱細胞化心臓弁組織（左はHE染色、右は抗vWF免疫染色）

われているのみならず、組織内への細胞浸潤も認められた。しかし、弁葉内への浸潤は認められなかった。3ヶ月移植した場合は、さらに弁葉内にまで細胞浸潤が認められた。自己細胞を組み込むことによって、移植後の自己化が促進される詳細な理由は不明であるが、組み込まれた血管内皮細胞が増殖因子を産生し、細胞浸潤を促している可能性も考えられる。このように、良好な再上皮化と弁機能により、脱細胞化处理した肺動脈弁のscaffoldとしての有用性が示唆された。本年度においては、自己血管内皮細胞を、弁葉内側のみを標的領域として播種しているが、来年度は、組織全面を対象とした細胞播種方法及び組織内部への線維芽細胞の組み込み方法、さらに浸潤した細胞の性状、石灰化等について検討する予定である。現在、心臓弁は心停止提供者から提供されているが、ドナー数が絶対的に不足している上、感染などの理由で破棄されるものも少なくない。本方法によって、破棄される心臓弁の有効利用が図れ

ると考えている。また、現在、動物組織のヒトへの使用は狂牛病など感染症への懸念から否定的な意見もある。本方法では、抗原性及び感染症の原因となる細胞を除去し、コラーゲンなどの構造素材のみを用いることから、感染症などの影響も解決できると考えている。

E. 結論

ミニブタを用いた動物実験によって、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肺動脈弁にレシピエントの自己血管内皮細胞を組み込み、肺動脈弁置換手術をすることによって評価した。自己細胞を組み込むことによって、細胞末組み込み群と比較して、移植後の細胞浸潤が促進された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitamura S, Nakatani T, Bando K, Sasako Y, Kobayashi J, Yagihara T. Modification of bicaval anastomosis technique for orthotopic heart transplantation. *Ann Thorac Surg*, 72(4), 1405, 2001.
- 2) Minatoya K, Okita Y, Hanafusa Y, Tagusari O, Sasako Y, Kobayashi J, Ando M, Kitamura S. Valve-sparing operation versus bentall operation: Comparison at medium-term follow-up. *Kawada S, Ueda T, Shimizu H, Eds. Cardio-aortic and aortic surgery. Springer-Verlag, Tokyo, 33, 2001.*
- 3) 北村惣一郎. 心臓弁・血管. 北村惣一郎編. 組織移植—採取・保存・使用技術マニュアル—. 日本医学館, 東京, 47, 2001.
- 4) 庭屋和夫, 北村惣一郎. 心臓弁膜症の外科治療. 篠山重威, 矢崎義雄編. 循環器疾患最新の治療 2002—2003, 南江堂, 東京, 165, 2002.
- 5) 北村惣一郎. わが国の組織移植医療の在り方と国立循環器病センター組織保存バンクの設立. 循環器病研究の進歩, 22 (1), 21, 2001.

2. 学会発表

- 1) Fujisato T, Nakatani T, Funamoto S, Hasegawa

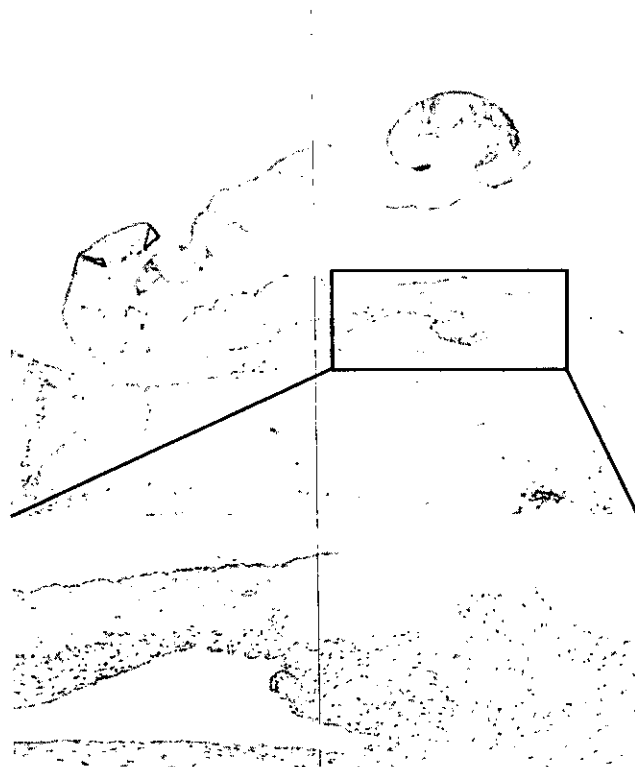


図5. 術後3ヶ月の自己細胞組込ミニブタ脱細胞化心臓弁組織

M, Tomita S, Sada M, Niwaya K, Kitamura S. Pathophysiological evaluation of acellularized heart valves. *Abstracts of International Conference on Transplantation* 2001, 185, 2001.

- 2) 藤里俊哉, 中谷武嗣, 船本誠一, 森反俊幸, 北村惣一郎. 細胞移植基材となる生体組織由来 scaffold の開発. 第17回ライフサポート学会大会講演予稿集, 62, 2001.
- 3) 藤里俊哉, 船本誠一, 長谷川正光, 富田伸司, 沼田 智, 庭屋和夫, 森反俊幸, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体組織由来 scaffold の開発とブタ心臓弁への応用. 第23回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 152, 2001.
- 4) 藤里俊哉, 船本誠一, 長谷川正光, 沼田 智, 庭屋和夫, 森反俊幸, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体 scaffold としての脱細胞化ブタ心臓弁. 第14回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 41, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

無細胞化処理弁の生体力学特性評価

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター研究所部長

研究要旨 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、力学的特性への影響を検討した。脱細胞化処理によって、弁葉の強靱さが増大したが、組織学的にはコラーゲン線維及び弾性線維の密度並びに配列状態に変化は認められなかった。移植に際しての大きな影響はないと考えられた。

A. 研究目的

凍結保存同種弁組織からドナー由来の細胞や抗原性部位を除去し、そのコラーゲン線維や弾性線維、基底膜など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や成長の期待できる、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及び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、昨年度に引き続き、界面活性剤であるトリトン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にて評価した。また、生体吸収性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（（株）ジャパンファーム）からブタ心臓を購入し、4℃にて搬送した。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、24時間及び48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から、辺縁方向を0°、法線方向を90°として角度0°、45°、90°（それぞれD₀、D₄₅、D₉₀と表記）における幅3mm、長さ約15mmの短冊状の切片を切り取り、力学試験機（テンシロン、（株）オリエンテック）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。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、実験動物に対する動物愛護上の規定に則って配慮した。

C. 研究結果

正常弁の伸展特性:図1に示すように、張力-伸び曲線は各切片ともに伸展とともに張力は増加していき、破断に至るが、その曲線経過は角度により異なった。D₀では伸展初期に張力が緩やかに増加した後、急激に増加し、破断強度は500gfと高かったのに対し、D₉₀では伸展による張力の増加は緩やかでかつD₀より低かったが、伸びは逆に大きく、破断強度は100gfと低かった。応力-ひずみ曲線については、D₀では伸展後すぐに応力は急激に増加し、ひずみ0.2の低い値で破断したのに対し、D₉₀では伸展による応力の増加は小さい一方、ひずみ1.7と高い値で破断した。破断応力はD₉₀ではD₀の約1/4であった。また、応力-ひずみ曲線から求めた弾性率はD₉₀ではD₀の約1/25であった。破断点に達した際、破断はいずれの切片でも心内膜側に生じ、その亀裂状態は切片角により異なっていた。一般的にD₀では亀裂線は縦方向（0°方向）に見られたが、D₉₀では切片軸とほぼ直角方向かつ全面に亀裂が生じた。

トリトンX-100処理の影響:図2に示すように、D₀では処理6時間後で未処理弁切片の強度に比べて約2倍に増加したが、それ以降24時間及び48時間における増加は僅かであった。D₄₅並びにD₉₀では処理による増加は僅かであった。図3に示すように、弾性率はD₀では処理6時間後で36MPaとなり、未処理弁よりも増加したが、増加度は破断強度ほど大きくなかった。24時間後でも引き続き増加したが、48時間後では増加は僅かであった。D₄₅並びにD₉₀では増加は少なかった。トリトンX-100処理6時間後で、弁葉全層の細胞はほぼ完全に消失し、空胞化状態になった。コラーゲン線維及び弾性繊維の層内含有量と配列状態はほとんど変化なかった。弁葉の厚さにも変化は見られなかった。

D. 考察

正常弁の伸展特性:張力-伸び曲線及び応力-ひずみ曲線ともどの切片角においても伸展に伴って張力並びに応力軸に凹になる非線形性を示した。この度合いはD₀で最も強く、角度が大きくなるにつれて弱くなった。血管壁でも同様の非線形性と角度依存性が報告されている(Hasegawa M. Biorheology, 20, 531, 1983)。弁葉の各切片方向における応力-ひずみ曲線を比較すると、弁葉の伸展性には異方性が認められる。すなわち、D₀では伸展性が極めて低いのにに対し、角度が大きくなるにつれて伸展性は高くなった。辺縁方向は伸びにくかつ硬い上に強靱な材質であるが、法線方向は非常に伸びやすくかつ柔らかい上に脆弱な材質であるといえる。弁葉を構成する成分の弾性率を直接測定することは困難であるが、平滑筋を主成分とする小腸外壁では0.15MPa、弾性繊維を主成分とする項韌帯では0.37MPa、コラーゲン線維を主成分とする腱では420MPaと報告されている(Azuma T, Hasegawa M. Jpn J Physiol, 21, 27, 1971)。弁葉の弾性率を規定する成分は主にコラーゲン線維であり、細胞成分及び弾性繊維はほとんど関与していないと考えられる。

正常弁の非線形性と異方性:伸展特性に見られる非線形性と異方性は、弁葉の表面構造及び構成成分の力学特性や密度、配列状態に依存すると考えられる。心臓側の表面構造は全面平滑であるが、動脈側はD₀に多くのヒダが弁葉の両端に向かって走行しており、表面が凸凹している。D₀では動脈側のヒダに平行していることから、伸展初期では弛んでいるコラーゲン線維が伸

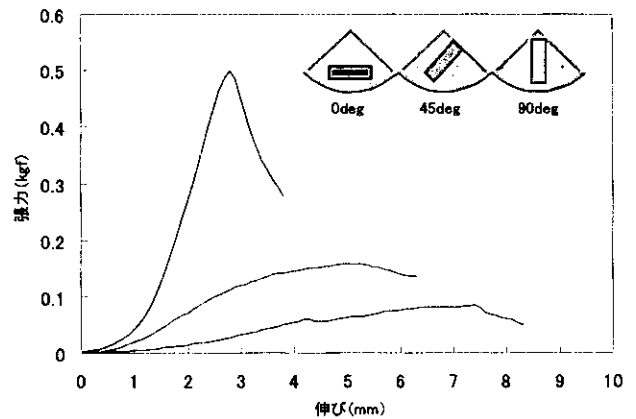


図1. プタ正常心臓弁葉の張力-伸び曲線

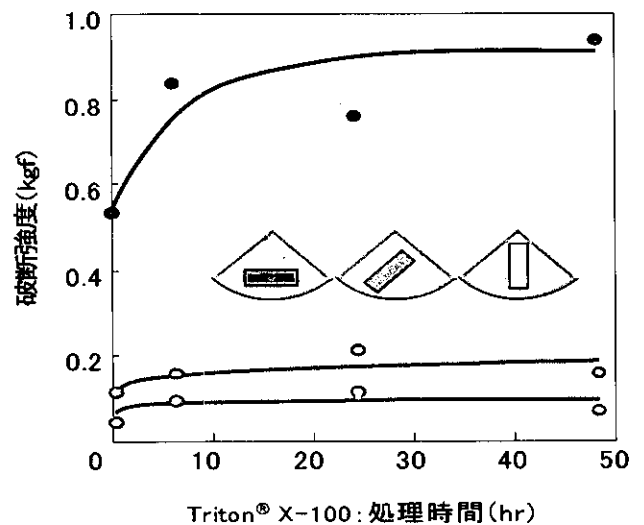


図2. 脱細胞化処理による破断強度への影響

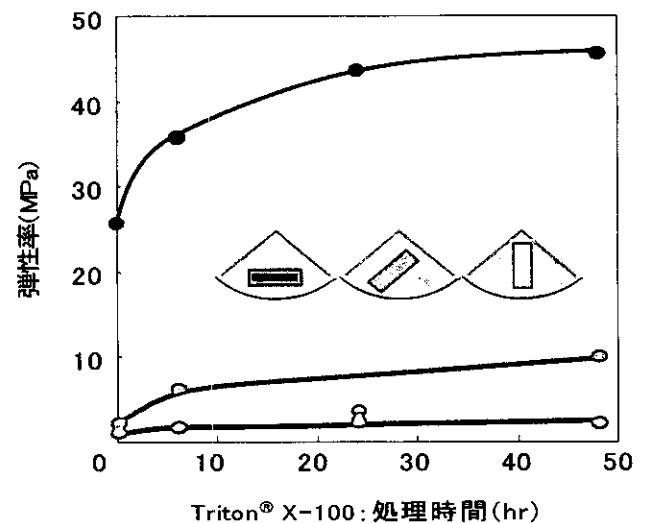


図3. 脱細胞化処理による弾性率への影響

ばされて直線状になるまでの経過として張力及び応力が緩やかに増加するが、コラーゲン線維のたるみが取れると、コラーゲン線維自体の応力発生に移るため、伸びにくくかつ高い破断強度となる。一方、D₉₀ではヒダが直交配列するために、伸展の際にヒダが消失するまで張力がほとんど発生せず、伸展性が大きくなり、破断強度も低くなると考えられる。

トリトンX-100処理の影響:トリトンX-100溶液への浸漬処理によって弁葉の強靱さが増大したが、組織学的には細胞の消失による空胞化は見られるものの、コラーゲン線維及び弾性繊維の密度並びに配列状態に変化は認められなかった。従って、弁葉の力学特性の変化は主にコラーゲン線維の材質的变化によるものであって、線維自体に化学的变化が生じている可能性もある。強靱さが増大することで、血管内圧の上昇に対する安全性はさらに確保されるが、柔軟性が低下するという問題もある。この点に関しては、処理方法を改良する必要があるかもしれないが、現在行っている動物移植実験からは、大きな影響はないと考えている。

E. 結論

弁葉は辺縁方向は伸展しにくく、弾性率が高い上に破断強度も大きいのに対し、法線方向は伸びやすく、弾性率も低くかつ破断強度も非常に小さいという異方性が認められた。トリトンX-100による脱細胞化処理によって、弁葉の破断強度及び弾性率は増大したが、移植に際しての大きな影響はないと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. 循環器専門医誌, 9(1), 51, 2001.
- 2) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東 興、小野安生、庭屋和夫、田鎖 治、佐藤長人、駒村和雄、公文啓二、由谷親夫、八木原俊克、宮武邦夫、北村惣一郎. 特集: わが国の心臓移植の現状 国立循環器病センターでの経験. 今日の移植, 14 (4), 418, 2001.

- 3) 坂東 興、中谷武嗣、小林順二郎、庭屋和夫、笹子佳門、花谷彰久、田鎖 治、宮武邦夫、八木原俊克、北村惣一郎. 特集: わが国の心臓移植の現状 摘出チームの経験. 今日の移植, 14 (4), 433, 2001.

- 4) Kitamura S, Nakatani T, Bando K, Sasako Y, Kobayashi J, Yagihara T. Modification of bicaval anastomosis technique for orthotopic heart transplantation. Ann Thorac Surg, 72(4), 1405, 2001.

- 5) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東 興、小野安生、庭屋和夫、田鎖 治、駒村和雄、公文啓二、八木原俊克、宮武邦夫、北村惣一郎. HANPフォーラム2001 心不全治療のcardioprotection—慢性期から急性期へ— 末期的心不全に対する外科的治療法としての左心補助人工心臓と心臓移植. 心臓, 34 (1), 54, 2002.

2. 学会発表

- 1) 庭屋和夫、藤里俊哉、中谷武嗣、沼田 智、北村惣一郎. 再生医工学技術を応用した新しい同種心臓弁組織の開発—Tissue engineered heart valveの骨格としての無細胞化同種弁組織の工学的特性の検討—. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 49 (abst), 291, 2001.
- 2) Fujisato T, Nakatani T, Funamoto S, Hasegawa M, Tomita S, Sada M, Niwaya K, Kitamura S. Pathophysiological evaluation of acellularized heart valves. Abstracts of International Conference on Transplantation 2001, 185, 2001.
- 3) 船本誠一、藤里俊哉、長谷川正光、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. トリトンX-100によって無細胞化処理したブタ心臓弁とその力学特性. 第17回ライフサポート学会大会講演予稿集, 126, 2001.
- 4) 藤里俊哉、中谷武嗣、船本誠一、森反俊幸、長谷川正光、北村惣一郎. ブタ心臓弁の脱細胞化処理と生体力学特性. 第12回バイオエンジニアリング学術講演会・秋季セミナー講演論文集, 199, 2001.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

無細胞化処理弁への細胞組込

分担研究者 庭屋和夫 国立循環器病センター病院医師

研究要旨 ミニブタ大動脈弁を凍結保存した後、脱細胞化処理し、ミニブタ血管内皮細胞を播種した。血管内皮細胞は大腿動脈から容易に分離増殖することができた。静置培養法によって、脱細胞化組織表面の弁葉内側に血管内皮細胞を播種することができた。

A. 研究目的

凍結保存同種弁組織からドナー由来の細胞や抗原性部位を除去し、そのコラーゲン線維や弾性線維、基底膜など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並びに成長の期待できる、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及び無細胞化処理することで、提供された同種弁の有効利用にもつながる。本分担研究では、凍結保存同種弁組織を無細胞化処理し、レシピエントの自己細胞を播種するためのモデル実験を行った。ミニブタ大動脈弁を凍結保存した後、昨年度と同様に界面活性剤にて脱細胞化処理した後、ミニブタ血管内皮細胞を播種した。

B. 研究方法

脱細胞化処理: NIBS系ミニブタ（（財）日本生物科学研究所、日本農産工業（株））の心臓を摘出して肺動脈弁を分離した。ハンクス液で洗浄後、凍結保護材としてジメチルスルフォキシドを10%含む199培地に浸漬し、フリージング容器にパックした。プログラムフリーザー（米国Thermo Forma社）にて -90°C まで $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度で徐冷凍結し、液体窒素中で保存した。1ヶ月後に解凍し、RNase A、DNase I及びEDTA 2Naをそれぞれ $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.2\text{mg}/\text{ml}$ 及び 0.02% 含む1%トリトンX-100溶液に浸漬し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ イ

ンキュベータ内で24時間撹拌した。PBS溶液にて3回洗浄後、トリトンX-100を除去するため、 4°C のPBS溶液にて3週間洗浄した。

細胞播種: 図1のように、NIBS系ミニブタの大腿部動脈を長さ約5cm摘出し、両端に留置カテーテル針を挿入後、三方活栓を接続した。PBSにて洗浄後、 0.1% 細胞分離酵素液（Liberase Blendzyme 2、スイスRoche社）を注入し、 37°C にて20min間静置した。酵素液を回収後、洗浄し、血管内皮細胞用増殖培地（EBM2、三光純薬（株））にて培養した。2週間培養増殖後、トリプシン溶液にて細胞を剥離回収した。脱細胞化処理したミニブタ心臓弁scaffoldの弁葉内側を標的領域として、静置播種した。2日間静置培養した後、HE染色にて評価した。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案などについて、実験動物に対する動物愛護上の規定に則って配慮した。

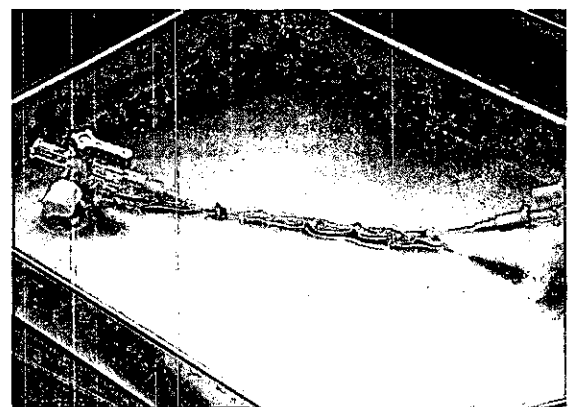


図1. ミニブタ血管内皮細胞の分離

C. 研究結果

凍結保存前後において、力学特性の変化は見られなかった。解凍後、トリトンX-100処理によって弁葉内の細胞核は染色されなくなったが、組織内深部の細胞は一部染色された。ミニブタ大腿動脈から分離された血管内皮細胞は、図2に示すように、2週間の培養によって約 10^7 個にエクスポンドすることができた。図3のように、肺動脈弁を心臓側を下方向として垂直に静置し、上部から血管内皮細胞浮遊液を滴下し、2時間静置する事で、図4に示すように細胞を付着させることができた。

D. 考察

ミニブタ血管内皮細胞は、大腿動脈から通常の酵素処理法によって容易に分離増殖することができた。しかしながら、臨床応用に際しては、患者への負担をなるべく下げるために、幹細胞の利用についても検討する必要がある。現在、血管内皮細胞へと分化すると報告されている幹細胞には、骨髄中の幹細胞や末梢血中のプロジェニター細胞などがある。来年度においては、これらの幹細胞の分離増殖について検討する予定である。また、血管内皮細胞の組み込みについては、本年度は弁葉内側のみを標的領域として播種しているが、来年度は、組織全面を対象とした血管内皮細胞播種方法及び組織内部への線維芽細胞の組み込み方法についても検討する必要がある。このため、血管内皮細胞の播種のためのバイオリクター装置及び線維芽細胞組み込みのための細胞注入組込装置について検討していく予定である。また、組み込まれた細胞が維持され、増殖するかどうかについても、拍動型ポンプを用いたバイオリクター装置を開発し、検討する予定である。さらに、臨床応用に際しては、ヒト細胞を用いたGMP基準に則った施設で、基準に則った操作を必要とする。現在、GMP基準に適合した細胞プロセッシング設備を有する施設との共同研究についても検討中である。

E. 結論

凍結保存同種弁組織を無細胞化処理し、レシピエントの自己細胞を播種するためのモデル実験を行った。ミニブタ大動脈弁を凍結保存した後、脱細胞化処理し、レシピエントのミニブタ血管内皮細胞を播種した。血管内皮細胞は大腿動脈から容易に分離することができた。

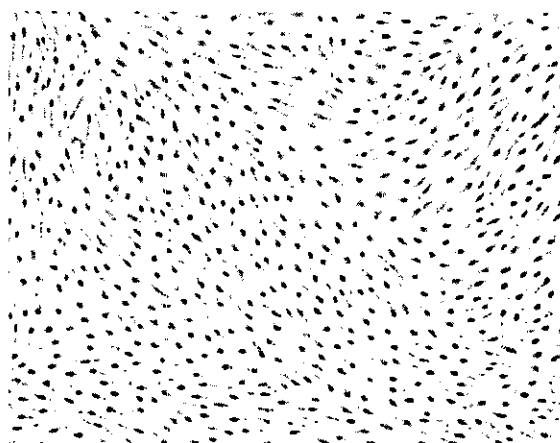


図2. ミニブタ血管内皮細胞



図3. 脱細胞化心臓弁への血管内皮細胞の播種

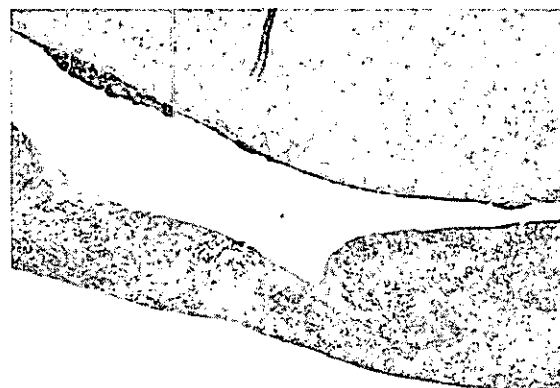


図4. 細胞を播種した脱細胞化心臓弁葉の断面

In vitroでの増殖後、静置培養法によって、脱細胞化組織表面の弁葉内側に血管内皮細胞を播種することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 庭屋和夫、北村惣一郎. 心臓弁膜症の外科治療. 篠山重威、矢崎義雄編. 循環器疾患最新の治療 2002-2003, 南江堂, 東京, 165, 2002.
- 2) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東 興、小野安生、庭屋和夫、田鎖 治、佐藤長人、駒村和雄、公文啓二、由谷親夫、八木原俊克、宮武邦夫、北村惣一郎. 特集:わが国の心臓移植の現状 国立循環器病センターでの経験. 今日の移植, 14 (4), 418, 2001.
- 3) 坂東 興、中谷武嗣、小林順二郎、庭屋和夫、笹子佳門、花谷彰久、田鎖 治、宮武邦夫、八木原俊克、北村惣一郎. 特集:わが国の心臓移植の現状 摘出チームの経験. 今日の移植, 14 (4), 433, 2001.
- 4) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東 興、小野安生、庭屋和夫、田鎖 治、駒村和雄、公文啓二、八木原俊克、宮武邦夫、北村惣一郎. HANPフォーラム2001 心不全治療の cardioprotection—慢性期から急性期へ— 末期の心不全に対する外科的治療法としての左心補助人工心臓と心臓移植. 心臓, 34 (1), 54, 2002.

2. 学会発表

- 1) 庭屋和夫、藤里俊哉、中谷武嗣、沼田 智、北村惣一郎. 再生医工学技術を応用した新しい同種心臓弁組織の開発—Tissue engineered heart valveの骨格としての無細胞化同種弁組織の工学的特性の検討—. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 49 (abst), 291, 2001.
- 2) 庭屋和夫、沼田 智、藤里俊哉、船本誠一、富田伸司、中谷武嗣、八木原俊克、北村惣一郎. 同種心臓弁組織を利用したtissue engineering valveの作成. 第1回再生心臓血管外科治療研究会抄録集, 8, 2002.
- 3) Fujisato T, Nakatani T, Funamoto S, Hasegawa M, Tomita S, Sada M, Niwaya K, Kitamura S. PATHOPHYSIOLOGICAL EVALUATION OF ACELLULARIZED HEART VALVES. Abstracts of

International Conference on Transplantation 2001, 185, 2001.

- 4) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、富田伸司、沼田 智、庭屋和夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体組織由来 scaffoldの開発とブタ心臓弁への応用. 第23回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 152, 2001.
- 5) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、森反俊幸、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体scaffoldとしての脱細胞化ブタ心臓弁. 第14回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 41, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

無細胞化のための新規処理法の開発

分担研究者 藤里俊哉 国立循環器病センター研究所研究室員

研究要旨 トリトンX-100処理に代わる新規な脱細胞化方法を開発した。本方法ではトリトンX-100浸漬処理に比較して、より大きな組織内部の細胞除去も可能であり、生体力学特性は未処理組織と同等に維持したまま、処理時間の大幅な短縮が可能であった。

A. 研究目的

広範な欠損部を有する場合の再生医療には、細胞を組み込むための scaffold が欠かせない。現在、scaffold材料としてはポリ乳酸などの生体吸収性人工材料が用いられており、生体よりも硬い人工材料であるために、複雑な形状を造形するのが難しい、生体と同等の力学特性を持たせるのが難しい、などの問題がある。本研究では、心臓弁組織から細胞成分や抗原性部位のみを除去し、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のみを用いて生体組織由来 scaffold として利用する技術を開発する。そのため、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などについて検討する。また、機械弁はもとより、異種生体弁や凍結保存同種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も少なくない。あらかじめ患者の自己細胞を scaffold 内に組み込むことで、自己修復性や成長性を有する臓器や組織が創製できると期待できる。また、scaffoldのテンプレート材料として動物組織を用いることができれば、絶対的ドナー不足も解消されよう。本分担研究では新規な細胞除去方法について検討した。昨年度の研究成果として、界面活性剤による細胞除去処理法では長期間の洗浄が必要であること、及び浸透性の問題から組織内部の細胞除去が困難であることがわかった。本年度は、これらの問題を解決するために、新規な界面活性剤洗浄除去方法並びに新規な細胞除去方法について検討し、昨年度の脱細胞化処理法と比較検討した。なお、具体的な処理方法については、現在、特許出願手続き中のため、規定に従って詳細は省略し、結果のみを報告する。

B. 研究方法

食用ブタ繁殖場（（株）ジャパンファーム）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。界面活性剤による細胞除去方法として、昨年度と同様に、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24時間攪拌した。PBS溶液にて3回洗浄後、HE及びElastica van Gieson 染色にて顕微鏡観察した。また、辺縁方向を0°、法線方向を90°として角度0°、45°、90°における幅3mmの短冊状の切片を作製して引っ張り試験を行い、弾性率及び破断強度を計算した。トリトンX-100の洗浄除去効果を調べるために、PBS溶液中への溶出量を、サイズ排除クロマトグラフィー法（使用カラム：TSK gel ALPHA-M、東ソー（株））にて測定した。これらを、新規に開発したトリトンX-100洗浄除去法、及び界面活性剤を用いない細胞除去法と比較した。同様に、NIBS系ミニブタ（（財）日本生物科学研究所、日本農産工業（株））の大動脈弁についても検討した。（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案などについて、実験動物に対する動物愛護上の規定に則って配慮した。

C. 研究結果

本年度に開発した新規な脱細胞化処理法と、昨年度に実施した1%トリトンX-100溶液による脱細胞化処理

法について、処理後の心臓弁組織断面のHE染色標本を図1に示した。トリトンX-100による処理では、24時間処理後でも表面から1mm以上の深部組織内では、おそらく線維芽細胞だと思われる細胞の核は染色された。これに対し、新規処理法では10分間の処理によって組織内の細胞はほぼ完全に染色されなくなった。同組織のElastica Van Gieson染色標本からは、いずれの処理法においても、コラーゲン線維層並びに弾性線維層はよく保存されていた。図2には、1%トリトンX-100溶液による24時間処理後の、洗浄過程におけるトリトンX-100溶出量を示した。昨年度の洗浄法では、残存トリトンX-100を十分除去し、脱細胞化組織内へ細胞を組み込むために3週間の洗浄が必要であったが、新規方法では約1/10の洗浄時間で十分であった。新規処理法による破断強度と弾性率への影響について、それぞれ図3及び図4に示した。トリトンX-100による処理ではいずれの特性も増大する傾向があったが、新規処理においてはいずれもほとんど変化が見られなかった。

D. 考察

心臓弁組織からドナー由来の細胞を除去してレンピエンに移植する場合、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。昨年度の研究結果から、トリトンX-100溶液による脱細胞化処理では、浸透性の問題から組織内部の細胞除去が困難なこと、及び残存トリトンX-100を除去するために長期間の洗浄が必要なことが大きな問題であった。本年度はこれらの問題を解決するために、種々の方法について細胞除去効果を検討した。その結果、有効的な方法を開発することができた。本方法では、短時間の処理によって組織内の細胞をほぼ完全に破壊することができ、かつ短時間で十分な洗浄効果を得られる。また、生体力学特性もほとんど未処理のものと同等である。さらに、現在検討中であるが、組織内の細菌等を完全に除去し、滅菌することも可能であると考えている。したがって本方法が確立された場合、同種弁のみならず異種心臓弁を脱細胞化処理することで、ドナー不足等の問題をも解決した、我が国発の高度な安全性を有した再生医療用生体由来組織を開発できる可能性もあろう。

E. 結論

トリトンX-100処理に代わる新規な脱細胞化方法を開

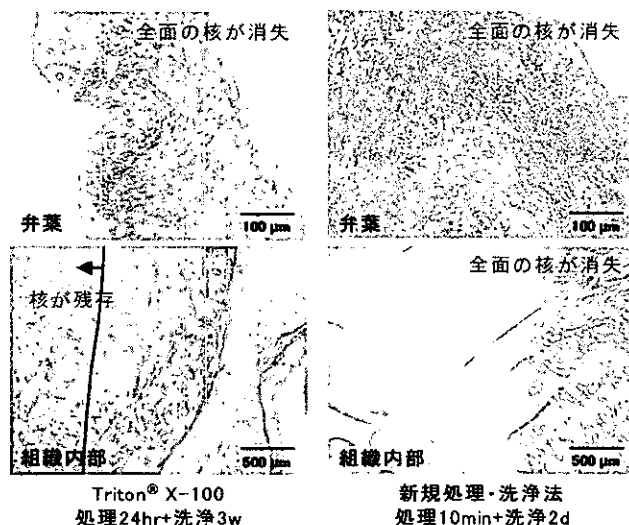


図1. 脱細胞化心臓組織の断面

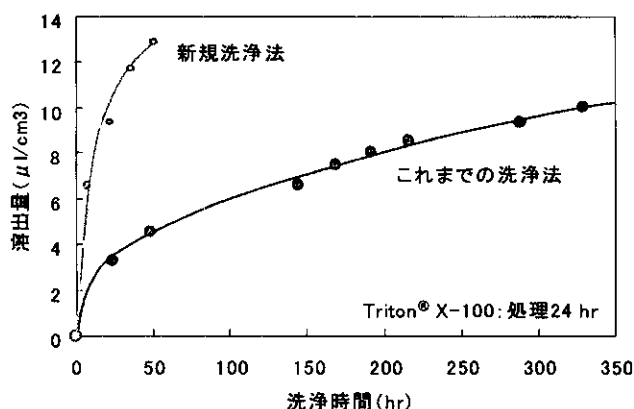


図2.トリトンX-100にて脱細胞化処理した心臓弁組織からの残存トリトンX-100溶出量

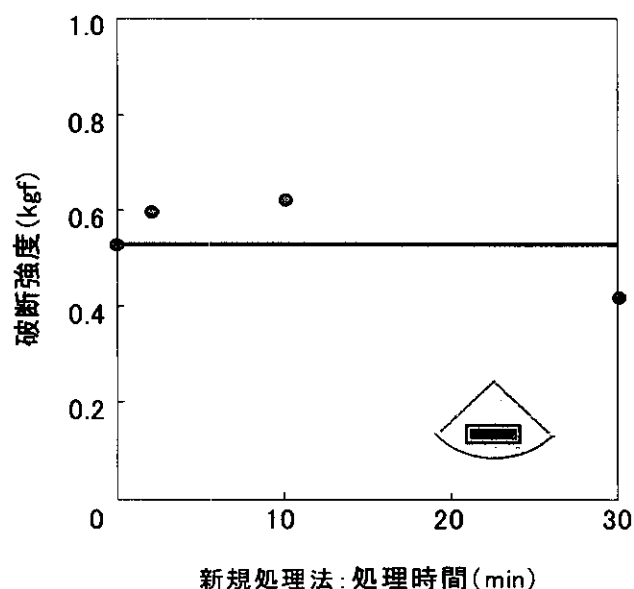


図3. 新規処理法による破断強度への影響

発した。本方法では、より大きな組織内部の細胞除去も可能であり、生体力学特性は未処理組織と同等に維持したまま、処理時間の大幅な短縮が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Fujisato T, Nakatani T, Funamoto S, Hasegawa M, Tomita S, Sada M, Niwaya K, Kitamura S. Pathophysiological evaluation of acellularized heart valves. Abstracts of International Conference on Transplantation 2001, 185, 2001.
- 2) 藤里俊哉、中谷武嗣、船本誠一、森反俊幸、北村惣一郎. 細胞移植基材となる生体組織由来 scaffold の開発. 第17回ライフサポート学会大会講演予稿集, 62, 2001.
- 3) 船本誠一、藤里俊哉、長谷川正光、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. トリトンX-100によって無細胞化処理したブタ心臓弁とその力学特性. 第17回ライフサポート学会大会講演予稿集, 126, 2001.
- 4) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、富田伸司、沼田 智、庭屋和夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体組織由来 scaffold の開発とブタ心臓弁への応用. 第23回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 152, 2001.
- 5) 藤里俊哉、中谷武嗣、船本誠一、森反俊幸、長谷川正光、北村惣一郎. ブタ心臓弁の脱細胞化処理と生体力学特性. 第12回バイオエンジニアリング学術講演会・秋季セミナー講演論文集, 199, 2001.
- 6) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、森反俊幸、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体 scaffold としての脱細胞化ブタ心臓弁. 第14回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 41, 2002.
- 7) 庭屋和夫、藤里俊哉、中谷武嗣、沼田 智、北

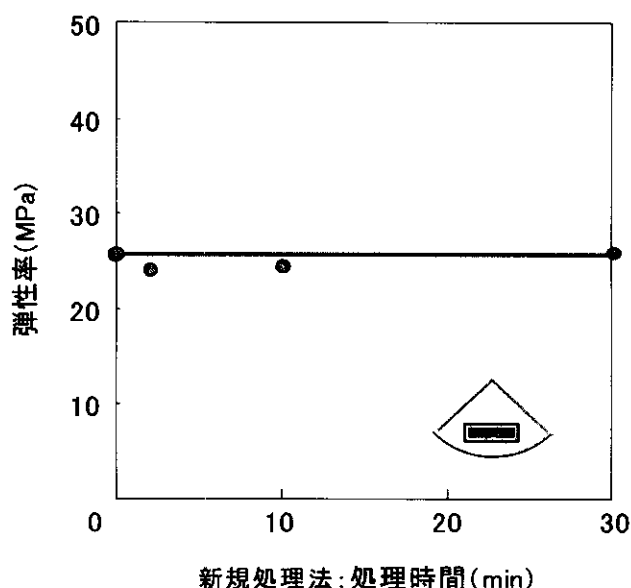


図3. 新規処理法による弾性率への影響

村惣一郎. 再生医工学技術を応用した新しい同種心臓弁組織の開発—Tissue engineered heart valveの骨格としての無細胞化同種弁組織の工学的特性の検討—. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 49 (abst), 291, 2001.

- 8) 庭屋和夫、沼田 智、藤里俊哉、船本誠一、富田伸司、中谷武嗣、八木原俊克、北村惣一郎. 同種心臓弁組織を利用したtissue engineering valveの作成. 第1回再生心臓血管外科治療研究会抄録集, 8, 2002.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

新規な細胞除去方法について2件申請処理中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
北村惣一郎	心臓弁・血管	北村惣一郎	組織移植－採取・保存・使用技術マニュアル－	日本医学館	東京	2001	47
Minatoya K, Okita Y, Hanafusa Y, et.al	Valve-sparing operation versus bental operation: Comparison at medium-term follow-up	Kawada S, Ueda T, Shimizu H	Cardio-aortic and aortic surgery	Springer-Verlag	Tokyo	2001	33
庭屋和夫、北村惣一郎	心臓弁膜症の外科治療	篠山重威、矢崎義雄	循環器疾患最新の治療 2002-2003	南江堂	東京	2002	165

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitamura S, Nakatani T, Bando K, Sasako Y, et.al	Modification of bicaval anastomosis technique for orthotopic heart transplantation	Ann Thorac Surg	72 (4)	1405	2001
北村惣一郎	わが国の組織移植医療の在り方と国立循環器病センター組織保存バンクの設立	循環器病研究の進歩	22 (1)	21	2001
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	循環器専門医誌	9 (1)	51	2001
中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東興、小野安生、他	特集：わが国の心臓移植の現状 国立循環器病センターでの経験	今日の移植	14 (4)	418	2001
坂東 興、中谷武嗣、小林順二郎、庭屋和夫、笹子佳門、花谷彰久、他	特集：わが国の心臓移植の現状 摘出チームの経験	今日の移植	14 (4)	433	2001
中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、坂東興、小野安生、他	心不全治療のcardioprotection－慢性期から急性期へ－ 末期的心不全に対する外科的治療法としての左心補助人工心臓と心臓移植	心臓	34 (1)	54	2002
庭屋和夫、藤里俊哉、中谷武嗣、沼田 智、北村惣一郎	再生医学技術に応用した新しい同種心臓弁組織の開発－Tissue engineered heart valveの骨格としての無細胞化同種弁組織の工学的特性の検討－	Jpn J Thorac Cardiovasc Surg	49 (abst)	291	2001
庭屋和夫、沼田智、藤里俊哉、船本誠一、富田伸司、中谷武嗣、他	同種心臓弁組織を利用した tissue engineering valveの作成	第1回再生心臓血管外科治療研究会抄録集		8	2002