

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括研究報告書

主任研究者 北村惣一郎

平成15年（2003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. 自己細胞を組み込んだ脱細胞化処理弁の移植実験による評価	11
中谷武嗣	
2. 脱細胞化処理弁への自己細胞の組み込み	17
庭屋和夫	
3. 脱細胞化のための新規処理法の開発	23
藤里俊哉	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	33
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（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 新規に開発した脱細胞化処理により、ミニブタ心臓弁組織から力学特性を有効に維持しつつドナー由来細胞を除去できた。さらに、回転培養装置により自己細胞を均一に播種することができた。この自己細胞播種代用心臓弁を移植したところ、移植早期に細胞が浸潤し、組織が自己化されていた。

分担研究者 中谷武嗣

国立循環器病センター病院部長

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

我が国では年間約9千件の心臓弁置換術が施行されており、代用弁としてパーフルオロカーボン製の機械弁が80%、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒド等で固定化した異種生体弁が20%使用されている。しかしながら、機械弁では催奇形性を有する抗凝固剤を毎日服用する必要があり、異種生体弁では10年程度の耐久性しかない。近年世界的に組織バンクが整備され、我が国においても死体から提供された凍結保存同種弁移植が施行され始めた。凍結保存同種弁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、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っているとされる。また、不全の大動脈弁位に自己肺動脈弁を、肺動脈弁位に凍結保存同種弁を移植するロスと呼ばれる術式も優れた成績を上げている。自己肺動脈弁は抗原性を有さず、かつ患者の成長に伴ってサイズが大きくなる成長性を有しているため、特に小児患者で有効とされている。しかし、ロス手術は術式が複雑であるとともに、我が国では凍結保存同種弁の提供数不足のため、限られた

施設でのみ施行されているのが現状である。また、一部の、特に若年者に用いられた凍結保存同種弁は、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疑われている。これらの諸問題を解決するために、組織工学及び再生医療技術を応用した代用弁の開発が試みられている。そのアプローチとしては、ポリ乳酸等の生体内分解吸収性人工材料のスキヤフォールド(足場材料)に患者細胞を播種するものと、同種あるいは異種心臓弁組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスをスキヤフォールドとして患者細胞を播種するものがある。前者には人工材料を複雑な形状に造形するのが難しいことや、生体と比較して硬い人工材料に生体と同等の力学特性を付与するのが難しいこと、生体内での分解速度を制御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、凍結保存同種弁からドナー由来細胞を除去し、患者細胞を組み込んだ後に移植するテーラーメイド型組織移植によって、自己弁に匹敵する代用弁を開発する(図1)。機械弁はもとより、グルタルアルデヒド等で固定された異種生体弁に成長性を付与することは困難であり、凍結保存同種弁においても成長性はないとされている。免疫反応の主因を成すであろうドナー由来細胞を消失させ、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスからなる脱細胞化組織スキヤフォールドに患者の自己細胞を組み込むことで、生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製

できると期待できる。現在、ドナーから摘出された同種弁は10%から30%の割合で、摘出時の細菌感染等によって臨床使用が不可能になる。本研究は、それら廃棄される凍結保存同種弁組織の新たな臨床使用の可能性を開き、社会資本としての提供組織の有効利用にも結びつく。

B. 研究方法

脱細胞化処理:食用ブタ(㈱ジャパンファーム)あるいはNIBS系ミニブタ(日本農産工業㈱)から清潔下にてブタ心臓を摘出し、肺動脈弁を採取した。プログラムフリーザーを用いた徐冷凍結後、液体窒素中に保存した。1ヶ月後に解凍し、ハンクス液で洗浄後、新規に開発した冷間等方圧加圧装置(神戸製鋼所製Dr. CHEF)を用いた低温下超高压印加処理(4℃、10,000気圧、10分間)によってドナー細胞を破壊し、PBS溶液に浸漬後、マイクロ波低温照射(東屋医科機械製MI-33)下で洗浄除去した(図2)。脱細胞化は組織学的に評価した。処理標本の組織断面をHE染色及びEVG染色により光学顕微鏡にて観察するとともに、表面を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察した。既に報告されているトリトンX-100溶液による界面活性剤浸漬処理を対照とした。

力学特性評価:脱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(㈱オリエンテック製テンシロン)にて引っ張り試験を行い、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、応力歪み特性から弾性率を計算した。

細胞播種:将来のレシピエントとなるNIBS系ミニブタから大腿動脈を5cm程度摘出し、酵素(ロシュ製リベラーゼ)処理によって血管内皮細胞を分離した。数週間の培養によるエクスパンド後、新規に開発した回転培養バイオリアクターにて2時間播種後、循環培養バイオリアクターにて2日間培養した。細胞付着は組織学的に観察した。

移植実験: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等の免疫染色、及びSEM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、細胞未播種の脱細胞化同種弁移植群及び凍

結保存同種弁移植群と比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、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、規定に則り十分に払っており、文部科学省及び実験動物学会等の指針に沿って処理した。また、研究に利用されるヒト組織は厚生労働省の指針に沿って、臨床応用に適さない場合の研究目的使用に関する「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(インフォームドコンセント)により文書での同意を得ることで、施設内倫理委員会から承認を得た。

C. 研究結果

脱細胞化処理:既に報告されているトリトンX-100溶液による界面活性剤浸漬処理では、厚さ数百 μm の弁葉内においては浸漬処理6時間後には細胞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以遠の組織深部では染色されており、界面活性剤溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた。これに対して、超高静水压印加及び低温下マイクロ波照射処理では、組織深部まで完全に細胞を除去することができた(図3上)。EVG染色したところ、超高压処理後においても弁葉内のコラーゲン線維やエラスチン線維が保存されていることが認められた。また、常在菌にてあらかじめ感染させた試料を脱細胞化処理したところ、界面活性剤処理では感染が除去できなかったが、超高压処理では脱細胞化に加えて滅菌効果も併せ持つことが確認された(図3中)。

力学特性評価:界面活性剤浸漬処理では、処理時間に伴って強度、弾性率とも増加する傾向を示し、動物実験ではハンドリングや縫合性、血行動態等への大きな影響は見られなかったものの、脱細胞化処理による力学特性への影響が明らかとなった。これに対して、超高静水压印加処理では力学特性への影響が見られなかった(図3下)。

細胞播種:ミニブタ血管内皮細胞はヒト血管内皮細胞と同様、容易に培養、エクスパンド可能であった。脱細胞化心臓弁スキュフォールドの血液流出側を上方に配置した静置培養では、細胞を均一に播種することが困難であり、また、培地中の酸素濃度による問題等のため、7日間の培養後で

も細胞の増殖は見られなかった。これに対して、回転培養バイオリアクター及び循環培養バイオリアクターを用いた細胞播種では、均一に播種することができた(図4)。

移植実験: レシピエントミニブタの自己細胞を播種した脱細胞化同種弁では、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、術後1ヶ月において、移植された脱細胞化肺動脈弁組織の内腔面が一層の細胞層によって覆われるとともに、一部組織内への細胞浸潤が認められた。さらに術後3ヶ月においては、弁葉内を含む移植組織の大部分への細胞の浸潤が認められた(図5)。浸潤した細胞を免疫染色によって検討したところ、表面層は血管内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋細胞と線維芽細胞とからなることが確認された。これに対して、自己細胞を未播種の脱細胞化同種肺動脈弁では、内腔表面上に血管内皮細胞の進展は認められたものの、組織内部への細胞浸潤はほとんど認められなかった。また、脱細胞化処理及び細胞播種を行わない凍結保存同種弁では、脱細胞化同種弁に比較して炎症細胞の浸潤が顕著であった。

D. 考察

我々は、再生医療の一つのアプローチとして、*in vitro*において患者の自己組織と同等の組織構築を行った後で移植するテーラーメイド型組織移植を目指している。生体組織由来スキャフォールドの作製については、新規に開発した超高静水圧印加処理により、ドナー細胞を完全に破壊し、かつ滅菌できることで、安全なスキャフォールドを得ることができた。血管や心臓弁は主に血管内皮細胞と平滑筋細胞、線維芽細胞からなる。本研究においては、スキャフォールド表面への血管内皮細胞の播種について検討したが、回転培養法によって血管内皮細胞を血管壁面、弁葉表面に均一に播種することができた。現在、平滑筋細胞と線維芽細胞を含めた複数種細胞の播種についても検討中であるとともに、より長期の動物実験によって臨床応用へ向けた有効性及び安全性の検討を続けている。

生体由来組織スキャフォールドではドナー由来の抗原性を減弱する必要がある、かつ動物由来の場合は未知の感染性やレトロウイルス等の除

去が必須である。米国CryoLife社はSynerGraftと称する細胞除去方法を発表し、2001年には世界初の再生医療型心臓弁と称して市販を開始した。レシピエント患者の細胞を播種したテーラーメイド型ではないものの、移植後数ヶ月間で自己組織化すると発表している。しかし、2002年秋の欧州胸部外科学会学術集会において、移植組織の断裂等によって術後成績が当初の期待ほどではないことが報告されており、また、米国では当該製品ではないが、同社製品の汚染によって患者への感染事故も報告されている。ドイツ・ハノーバー医科大学のHaverichや英国リーズ大学のInghamのグループは異種生体弁から動物由来細胞を除去し、患者の自己血管内皮細胞を播種するテーラーメイド型の研究を動物実験で実施している。彼らは界面活性剤やタンパク分解酵素を細胞除去に用いているが、これらの方法は洗浄液の組織に対する浸透性の低さから、大組織では内部まで完全に細胞を除去することが困難であると指摘されている。また、洗浄に数週間以上の時間を要し、生体力学特性の変化や汚染の危険性についても注意が必要である。さらに、複雑な形状を有するスキャフォールド表面に、患者の自己細胞を播種することは容易でない。我々の新規細胞除去法及び細胞播種法は、細胞除去効率や安全性の面で上記の研究者らの方法を凌駕しており、当初対象としていた凍結保存同種弁のみならず、異種生体弁への適用も可能であると考えている。

未だ長期間に渡って満足できる性能を発揮する人工臓器や組織は開発されておらず、また、患者の成長に伴って人工臓器に成長性を与えることはほとんど不可能である。一方、ブタやウシ等の生体由来の医療用素材も古くから使用されてきたが、最近のBSE及びCJD問題を契機として、我が国においては新GMP基準が策定され、使用が制限あるいは禁止されつつある。このままでは医者と患者の双方に負担を強いることとなり、国民医療に対して重大な欠損となる。また、再生医療分野では、米国にかなり先を越されているのが実状であり、既に多くの基本特許を押さえられている。しかし、組織再生技術は次世代産業の基本技術の一つであることは疑いようもなく、我が国での新規な研究開発は火急である。また、超高齢化社会を目前に控えている我が国にとって、高いQOLを伴った健康寿命の延長は社会の

維持発展及び医療保険制度にとって非常に重要な問題である。本研究において我々が開発した新規な細胞除去法を用い、同種並びに異種組織からドナー由来の細胞のみならず細菌やウイルスを完全に除去し、さらに心臓弁以外の血管、心膜や硬膜等をも対象として安全な移植用生体組織を開発し、数年以内の臨床応用を目指す考えである。そのため、1)組織の提供動物としての安全な医用ミニブタ育種、2)採取から移植後までを追跡するトレーサビリティ確保、3)動物細胞を除去した高度な生体組織スキャフォールド作成、そして4)スキャフォールドへの患者細胞の組込、のテーラーメイド型移植システムの研究開発を総合的に行う必要があると考える。

E. 結論

新規に開発した超高静水圧印加及びマイクロ波照射処理により、ミニブタ心臓弁組織から力学特性を有効に維持したままドナー由来細胞を除去することができた。さらに、新規に開発した回転培養バイオリクター装置により、細胞除去組織スキャフォールドに患者細胞を均一に播種することができた。この患者細胞を播種した代用心臓弁を移植したところ、患者細胞が組織内に浸潤し、移植早期に自己化された。本研究によって、我が国発の生体由来組織製品が開発され、テーラーメイド組織移植システムが創製されることによって国民医療へ貢献するとともに、患者のQOLを高めることができると考えられる。今後、本研究成果を生かし、我が国発の高度な安全性を有した移植用生体組織の開発を進め、数年以内の臨床応用を目指したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤里俊哉, 北村惣一郎. 心臓弁, 筏 義人編. 再生医療工学の最先端, シーエムシー出版, 東京, 2002.
- 2) Niwaya K, Numata S, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Experimental Evaluation of tissue engineering heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Heart Surg Forum. 2002; 6(1): 1.
- 3) Numata S, Niwaya K, Fujisato T, Funamoto S,

Yagihara T, Nakatani T, Kitamura S. Decellularized allograft valve for tissue engineering: experimental study. Heart Surg Forum. 2002; 6(1): 2.

4) Fujisato T, Funamoto S, Hasegawa M, Numata S, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. In Vitro and In Vivo Biomechanical Properties of Decellularized Heart Valves. Heart Surg Forum. 2002; 6(1): 2.

5) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Morisaki A, Kishida A, Yutani C, Kitamura S. Comparison of cell labeling methods for cell transplantation to heart failure. Transplantation Proc 2002; 34(7): 2720.

6) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、板東 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. 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 2002; 34(1): 54.

7) 中谷武嗣、花谷彰久、笹子佳門、小林順二郎、板東 興、庭屋和夫、田鎖 治、公文啓二、八木原俊克、北村惣一郎、小野安生、駒村和雄、宮武邦夫. 難治性心不全に対する補助人工心臓と心臓移植. 兵庫県循環器病研究会会報 2002; 69: 10.

8) 中谷武嗣. 難治性心不全に対する補助循環と心臓移植—新世紀の展望—. 進歩する心臓研究—Tokyo Heart Journal— 2002; 39: 32.

9) 中谷武嗣、富田伸司. 心筋再生療法. 呼吸と循環 2002; 50: 1015.

10) 北村惣一郎、中谷武嗣、小林順二郎、花谷彰久、庭屋和夫、板東 興、田鎖 治、八木原俊克、由谷親夫、宮武邦夫、妙中義之、高野久輝. わが国における心臓移植と問題点. 移植 2002; 37(4): 147.

11) 北村惣一郎、中谷武嗣、花谷彰久. 心臓移植の現状と将来の発展. Cardiovasc Med-Surg 2002; 4(4): 483.

12) 富田伸司、中谷武嗣. 細胞移植による心筋再生と臨床応用. 最新医学 2002; 57(1): 63.

2. 学会発表

- 1) 庭屋和夫、藤里俊哉、沼田 智、加賀重亜喜、富田伸司、香河清一、菅 理晴、八木原俊克、中谷武嗣、北村惣一郎. 同種心臓弁組織を利用した

- Tissue engineering心臓弁の開発. 第102回日本外科学会定期学術集会 (シンポジウム). 2002年4月11~13日、京都.
- 2) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体由来心臓弁scaffoldの開発. 第1回日本再生医療学会総会. 2002年4月18~19日、京都.
- 3) 沼田 智、庭屋和夫、藤里俊哉、船本誠一、富田伸司、八木原俊克、中谷武嗣、北村惣一郎. 無細胞化+自己内皮細胞播種肺動脈グラフトによる実験的検討. 第1回日本再生医療学会総会. 2002年4月18~19日、京都.
- 4) Fujisato T, Nakatani T, Funamoto S, Hasegawa M, Numata S, Niwaya K, Tomita S, Sada M, Kitamura S. Pathophysiological Evaluation of Acellularized Bioscaffold for Cell Transplantation. 28th Annual Meeting of Society for Biomaterials. 2002年4月24~27日, タンパ (米) .
- 5) Nakatani T, Niwaya K, Tomita S, Fujisato T, Fukuhara S, Yuyani C, Numata S, Ishida M, Yagihara T, Kitamura S, Nishigami K, Morisaki T. Application of tissue-engineering and regenerative medicine to heart and heart-valve diseases. 第66回日本循環器学会総会 (シンポジウム). 2002年4月24~27日, 札幌.
- 6) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療を目的とした凍結保存同種弁の脱細胞化. 第9回日本臓器保存生物医学会総会. 2002年5月24~25日、東京.
- 7) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療用ブタ心臓弁組織の生体力学特性. 第25回日本バイオレオロジー学会年会. 2002年6月6~7日、松本.
- 8) Fujisato T, Funamoto S, Hasegawa M, Numata S, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Biomechanical Properties of Acellularized Heart Valve as Bioscaffolds. Forth World Congress of Biomechanics. 2002年8月4~9日, カルガリー (カナダ) .
- 9) 藤里俊哉、小越拓郎、菅 裕亮、岸田晶夫、大場謙吉、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療を目的とした脱細胞化生体組織への細胞組み込み. 第18回日本ライフサポート学会大会. 2002年9月5~6日、富山.
- 10) 藤里俊哉、岩澤伸明、倉林千恵、西岡 宏、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療を目的とした生体組織の脱細胞化処理. 第18回日本ライフサポート学会大会. 2002年9月5~6日、富山.
- 11) Fujisato T, Hasegawa M, Numata S, Niwaya K, Nakatani T, Yamada K, Kitamura S. Decellularized Biological Tissue as A Scaffold for Cell Transplantation. 17th European Society for Biomaterials conference. 2002年9月11~14日, バルセロナ (スペイン) .
- 12) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療用生体由来素材の力学特性. 日本機械学会2002年度年次大会. 2002年9月25~27日、東京.
- 13) 藤里俊哉、沼田 智、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、山田和彦、北村惣一郎. 再生医療用 scaffoldとしての生体組織の脱細胞化と自己細胞化. 第40回日本人工臓器学会大会 (ワークショップ) . 2002年10月2~4日、札幌.
- 14) Fujisato T, Funamoto S, Hasegawa M, Numata S, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. In Vitro and In Vivo Biomechanical Properties of Decellularized Heart Valves. Cardiac Bio Intervention 2002. 2002年10月4~5日, サンフランシスコ (米) .
- 15) Numata S, Niwaya K, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Decellularized allograft valve for tissue engineering: experimental study of heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Cardiac Bio Intervention 2002. 2002年10月4~5日, サンフランシスコ (米) .
- 16) Niwaya K, Numata S, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Experimental evaluation of tissue engineering heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Cardiac Bio Intervention 2002. 2002年10月4~5日, サンフランシスコ (米) .
- 17) 藤里俊哉、船本誠一、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療を目的とした異種心臓弁の脱細胞化処理--脱細胞化処理による組織及び生体力学特性への影響--. 第

55回日本胸部外科学会総会. 2002年10月9～11日、福岡.

18) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Hasegawa M, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Decellularized Xenograft Valve by Newly Developed Physical Method and Its Autologous Cell Incorporation. 3rd Smith & Nephew International Symposium. 2002年10月13～16日, アトランタ (米) .

19) 藤里俊哉、長谷川正光、沼田 智、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療型組織移植を目的としたドナー細胞除去法の開発. 第38回日本移植学会総会. 2002年10月17～19日、東京.

20) 藤里俊哉、岩澤伸明、西岡 宏、中谷武嗣、森反俊幸、山田和彦、北村惣一郎. 新規細胞除去法による生体scaffoldの作成. 第24回日本バイオマテリアル学会大会. 2002年11月29～30日、東京.

21) 藤里俊哉、小越拓郎、菅 裕亮、岸田晶夫、中谷武嗣、大場謙吉、山田和彦、北村惣一郎. 生体心臓弁scaffoldへの細胞組込. 第24回日本バイオマテリアル学会大会. 2002年11月29～30日、東京.

22) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Hasegawa M, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Recellularization of Tissue Engineered Bioscaffold for Heart Valve Replacement. International Congress on Biological and Medical Engineering. 2002年12月4～7日, シンガポール.

23) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Yamada K, Kitamura S. Recellularization of Decellularized Bioscaffold for Heart Valve Transplantation. 5th International Meeting of the Tissue Engineering Society international. 2002年12月8～10日, 神戸.

24) 藤里俊哉、小越拓郎、菅 裕亮、岸田晶夫、中谷武嗣、大場謙吉、山田和彦、北村惣一郎. 生体組織由来心臓弁scaffoldへの細胞播種. 第15回バイオエンジニアリング講演会. 2003年1月21～22日、大阪.

25) 藤里俊哉、岩澤伸明、小越拓郎、菅 裕亮、西岡 宏、森反俊幸、大場謙吉、長谷川正光、岸田晶夫、中谷武嗣、山田和彦、北村惣一郎. 超高

圧及びマイクロ波処理による生体scaffoldの作製とその循環培養による細胞播種. 第2回日本再生医療学会大会. 2003年3月10～12日、神戸.

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

1) 藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高静水圧印加による生体組織の処理方法. 特願2002-264470、2002年9月10日.

2) 藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎. マイクロ波照射による生体組織の処理法. 特願2002-360094、2002年12月12日.

3) 藤里俊哉、岸田晶夫、小越拓郎、菅 裕亮、北村惣一郎. 生体材料への細胞播種法. 出願手続き中.

4) 藤里俊哉、岸田晶夫、北村惣一郎. 生体材料への細胞組込法. 出願手続き中.

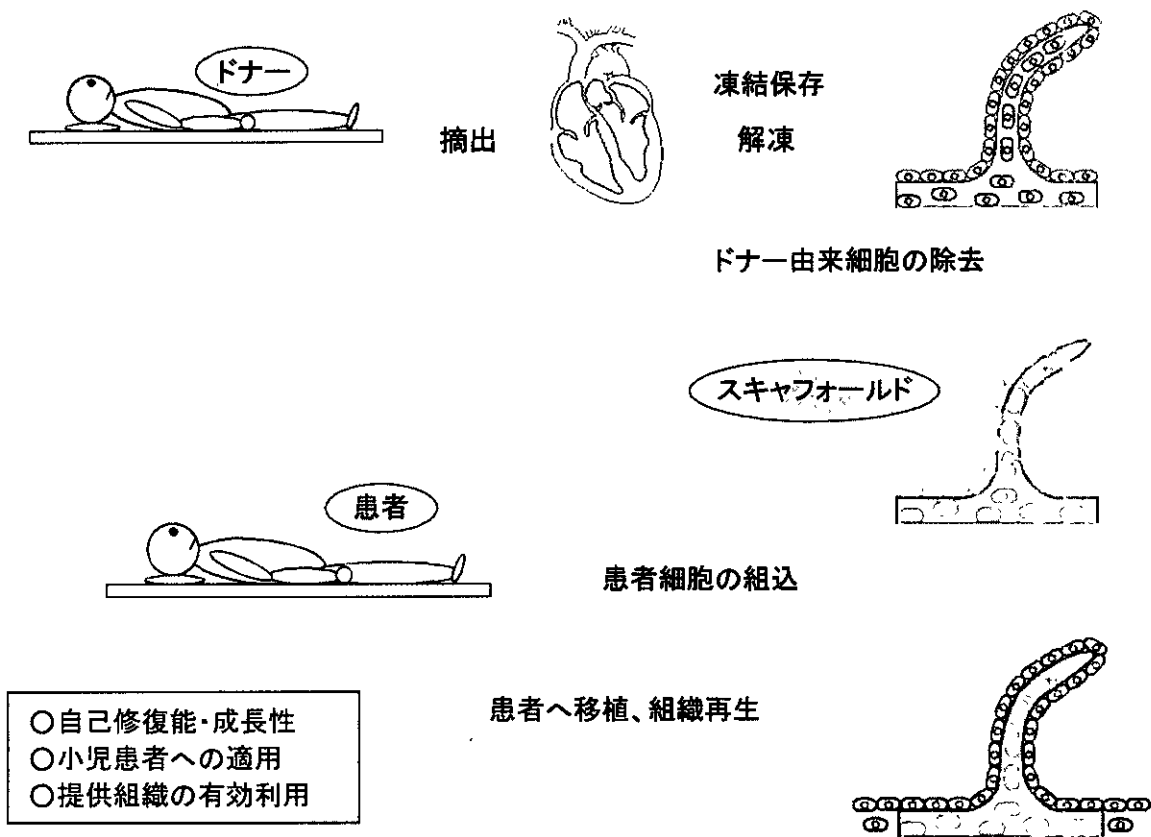


図1. 本研究のコンセプトである組織工学及び再生医療技術を応用した凍結保存同種弁移植の品質改良によるテーラーメイド型心臓弁移植

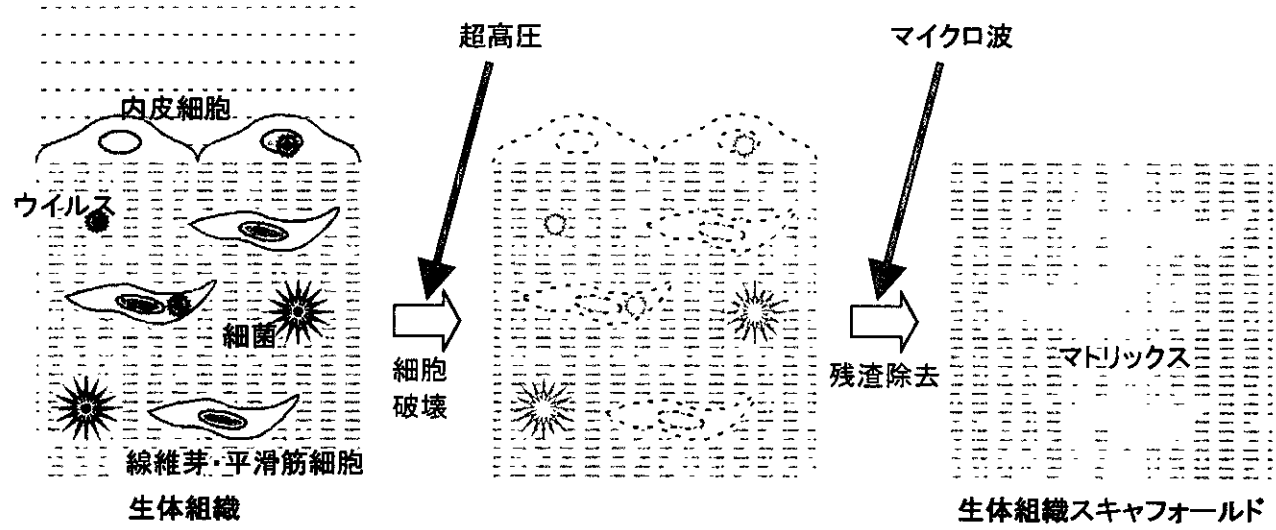


図2. 本研究において新規に開発されたドナー由来細胞除去法 (特許出願中)

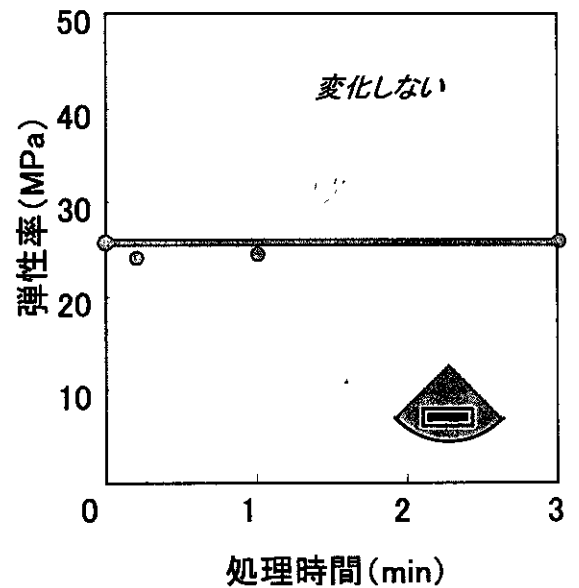
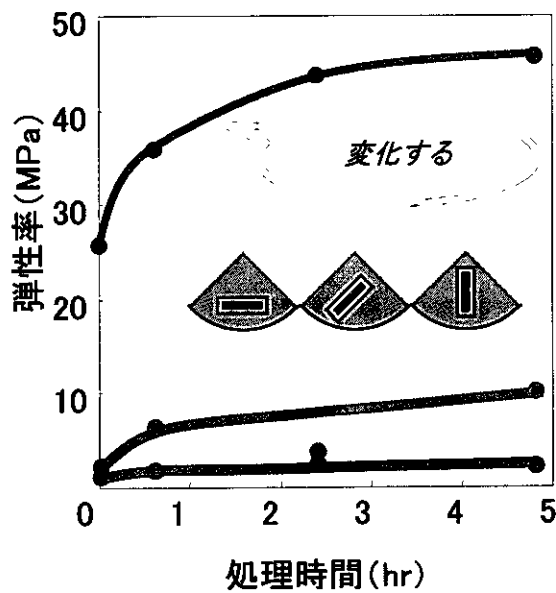
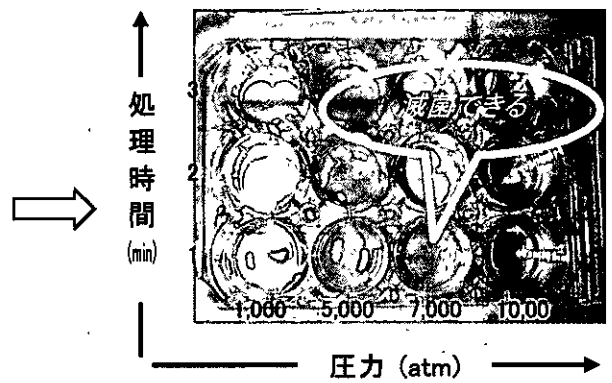
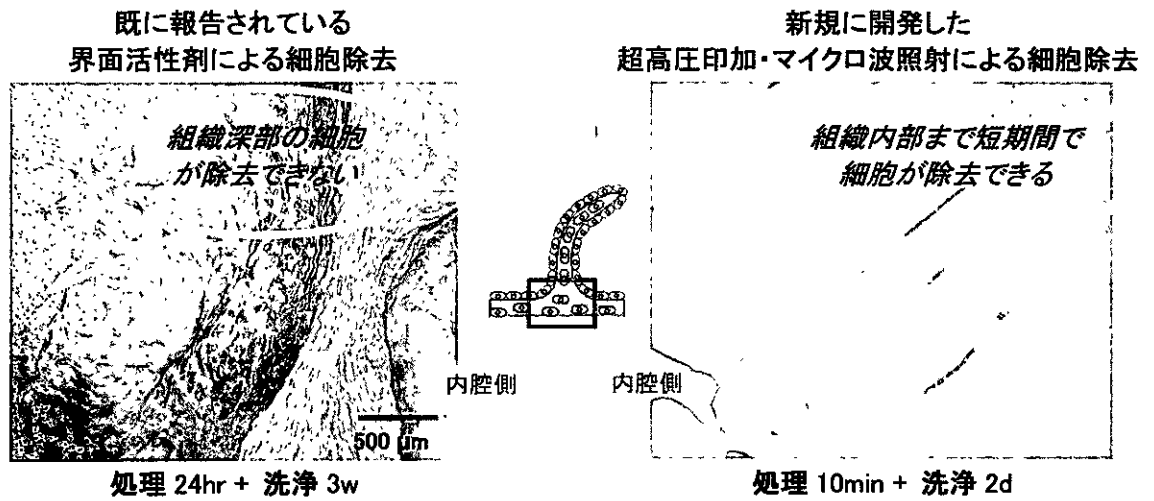


図 3. 本研究によって新規に開発されたドナー由来細胞除去法の優位性

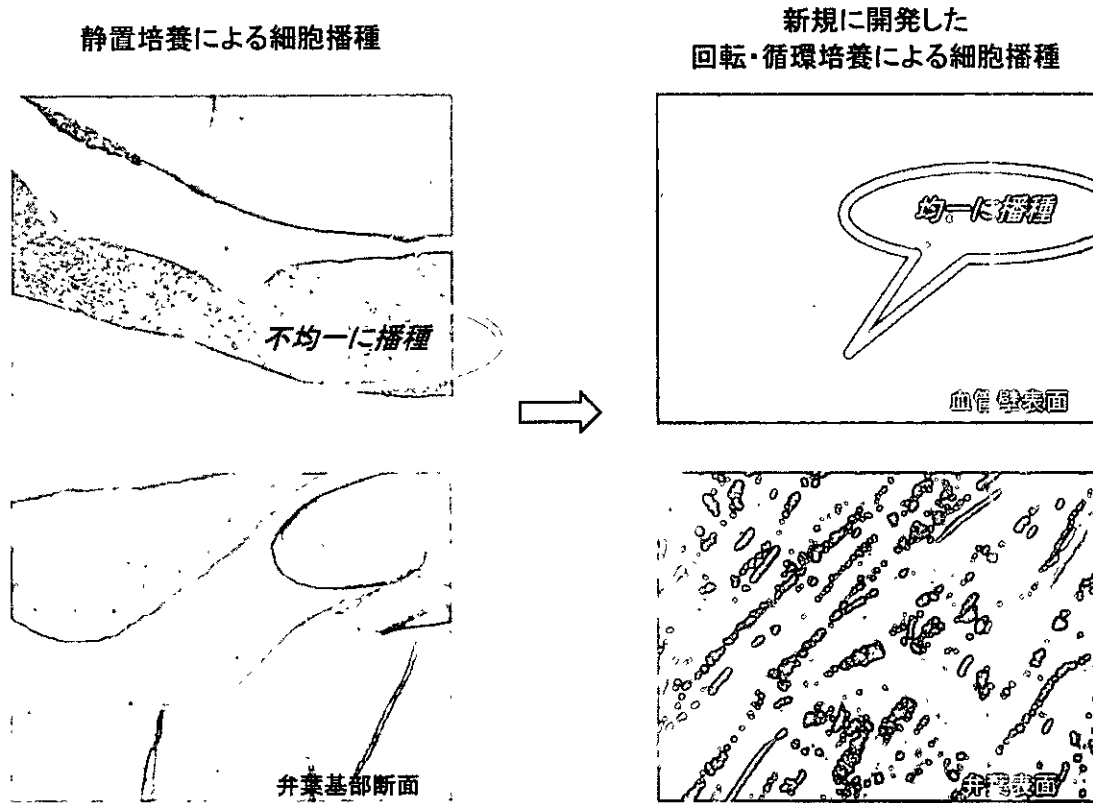


図4. 本研究によって新規に開発された患者細胞播種法の優位性 (特許出願手続中)

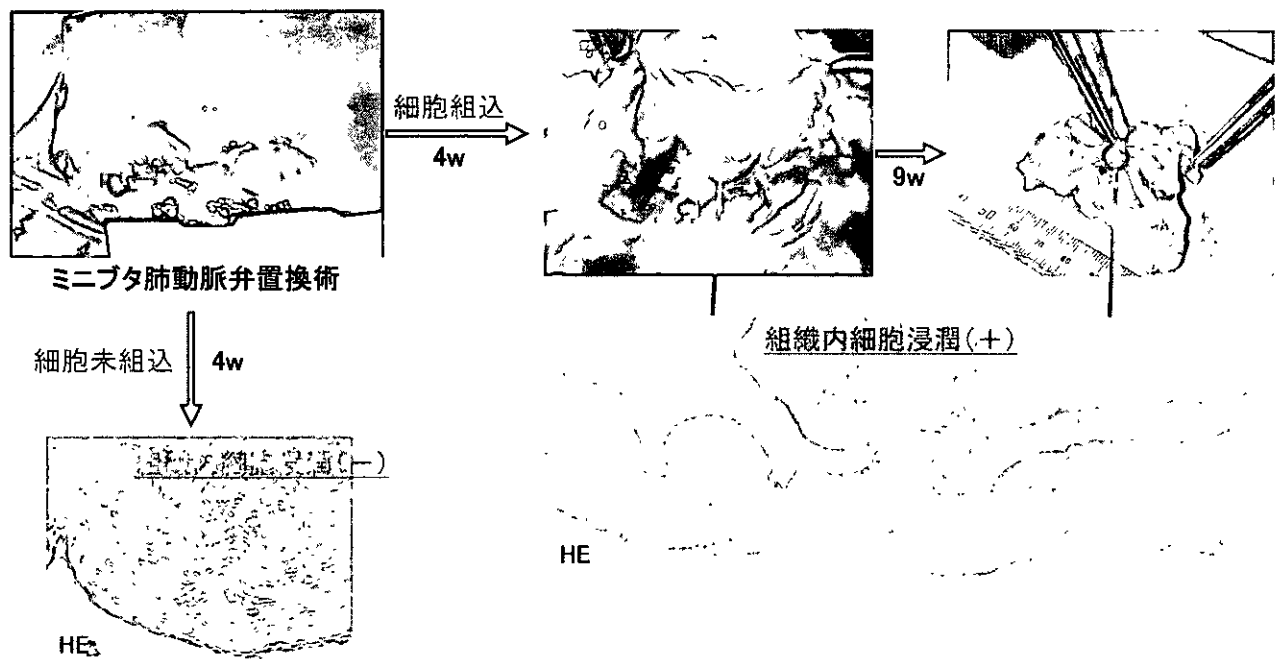


図5. ミニブタへの移植実験結果

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

自己細胞を組み込んだ脱細胞化処理弁の移植実験による評価

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター病院部長

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

移植された凍結保存同種弁組織では、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ことを目的とした。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られる。本分担研究では、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、肺動脈弁置換手術をすることによって移植後の自己組織化について評価した。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（日本農産工業株式会社）から清潔下にてブタ心臓を摘出し、肺動脈弁

を採取した。プログラムフリーザーを用いた徐冷凍結後、液体窒素中に保存した。1ヶ月後に解凍し、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、0.2mg/ml及び0.02%含む1%トリトンX-100溶液に浸漬し、37°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°CのPBS溶液にて3週間洗浄した。

細胞播種：将来のレシピエントとなる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（スイスロシュ社製リベラーゼブレンザイム2）を注入し、37°Cにて20分間静置した。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（三光純薬株式会社製EBM2）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、回転培養バイオリアクターにて2時間播種後、循環培養バイオリアクターにて2日間培養した。

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（図1）。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、抗 α -SMA、及び抗ビメンチン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

群及び凍結保存同種弁移植群と比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、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、規定に則り十分に払っており、文部科学省及び実験動物学会等の指針に沿って処理した。

C. 研究結果

レシピエントミニブタの自己細胞を播種した脱細胞化同種弁では、エコーによる血行動態並びに肉眼的所見から、一部の術後例にて弁葉に血栓の付着している場合も見られたが、術後1ヶ月及び3ヶ月においても良好な弁機能を示していた(図2)。移植組織前後の圧格差を測定したところ、術後3ヶ月においては若干の格差が認められた(図3)。犠牲死後に摘出した移植組織を組織学的に観察したところ、術後1ヶ月においては、移植された脱細胞化肺動脈弁組織の内腔面が一層の細胞層によって覆われるとともに、一部組織内への細胞浸潤が認められた。さらに術後3ヶ月においては、弁葉内を含む移植組織の大部分への細胞の浸潤が認められた(図4)。浸潤した細胞を免疫染色によって検討したところ、抗vWF染色より表面層は血管内皮細胞によって覆われ、抗 α -SMA及び抗ビメンチン染色より組織内は平滑筋細胞が乏しく、大部分が線維芽細胞であることが確認された(図5)。これに対して、自己細胞を未播種の脱細胞化同種肺動脈弁では、内腔表面上に血管内皮細胞の進展は認められたものの、組織内部への細胞浸潤はほとんど認められなかった。また、脱細胞化処理及び細胞播種を行わない凍結保存同種弁では、脱細胞化同種弁に比較して炎症細胞の浸潤が顕著であった。

D. 考察

脱細胞化心臓弁にレシピエント自己細胞を組み込まない場合では、ミニブタに1ヶ月間移植しても、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ものの、組織内への細胞浸潤はほとんど認められず、3ヶ月間移植しても同様であった。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場合は、1ヶ月移植後においても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。3ヶ月移植後においては、さらに弁葉内にまで細胞浸潤が認められた。なお、3ヶ月移植後において移植組織前後に圧格差が認められたが、これは移植組織近位端における吻合部の狭窄によるものと考えられ、吻合方法を改良することで改善することが可能であると考えられる。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、良好な自己化と弁機能により、レシピエント自己細胞を播種した脱細胞化肺動脈弁の有用性が確認された。本研究においては、自己血管内皮細胞を播種しているが、将来的には、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についても検討する必要がある。さらに、動物実験によって浸潤した細胞の性状、石灰化等、及び成長性について検討する必要がある。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。我々が開発した新規脱細胞化法も含めて数年以内の臨床応用を目指し、より長期の動物実験を進める予定である。

E. 結論

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、細胞未組み込み群と比較して、早期に自己化されることが認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Niwaya K, Numata S, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S.

Experimental Evaluation of tissue engineering heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Heart Surg Forum. 2002; 6(1): 1.

2) Numata S, Niwaya K, Fujisato T, Funamoto S, Yagihara T, Nakatani T, Kitamura S. Decellularized allograft valve for tissue engineering: experimental study. Heart Surg Forum. 2002; 6(1): 2.

3) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Morisaki A, Kishida A, Yutani C, Kitamura S. Comparison of cell labeling methods for cell transplantation to heart failure. Transplantation Proc 2002; 34(7): 2720.

4) 中谷武嗣、笹子佳門、花谷彰久、小林順二郎、板東 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. 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 2002; 34(1): 54.

5) 中谷武嗣、花谷彰久、笹子佳門、小林順二郎、板東 興、庭屋和夫、田鎖 治、公文啓二、八木原俊克、北村惣一郎、小野安生、駒村和雄、宮武邦夫. 難治性心不全に対する補助人工心臓と心臓移植. 兵庫県循環器病研究会会報 2002; 69: 10.

6) 中谷武嗣. 難治性心不全に対する補助循環と心臓移植—新世紀の展望—. 進歩する心臓研究—Tokyo Heart Journal— 2002; 39: 32.

7) 中谷武嗣、富田伸司. 心筋再生療法. 呼吸と循環 2002; 50: 1015.

8) 北村惣一郎、中谷武嗣、小林順二郎、花谷彰久、庭屋和夫、板東 興、田鎖 治、八木原俊克、由谷親夫、宮武邦夫、妙中義之、高野久輝. わが国における心臓移植と問題点. 移植 2002; 37(4): 147.

9) 北村惣一郎、中谷武嗣、花谷彰久. 心臓移植の現状と将来の発展. Cardiovasc Med-Surg 2002; 4(4): 483.

10) 富田伸司、中谷武嗣. 細胞移植による心筋再生と臨床応用. 最新医学 2002; 57(1): 63.

2. 学会発表

1) 庭屋和夫、藤里俊哉、沼田 智、加賀重亜喜、富田伸司、香河清一、菅 理晴、八木原俊克、中谷武嗣、北村惣一郎. 同種心臓弁組織を利用した

Tissue engineering心臓弁の開発. 第102回日本外科学会定期学術集会 (シンポジウム). 2002年4月11~13日、京都.

2) 沼田 智、庭屋和夫、藤里俊哉、船本誠一、富田伸司、八木原俊克、中谷武嗣、北村惣一郎. 無細胞化+自己内皮細胞播種肺動脈グラフトによる実験的検討. 第1回日本再生医療学会総会. 2002年4月18~19日、京都.

3) Nakatani T, Niwaya K, Tomita S, Fujisato T, Fukuhara S, Yuyani C, Numata S, Ishida M, Yagihara T, Kitamura S, Nishigami K, Morisaki T. Application of tissue-engineering and regenerative medicine to heart and heart-valve diseases. 第66回日本循環器学会総会 (シンポジウム). 2002年4月24~27日、札幌.

4) Numata S, Niwaya K, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Decellularized allograft valve for tissue engineering: experimental study of heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Cardiac Bio Intervention 2002. 2002年10月4~5日, サンフランシスコ (米).

5) Niwaya K, Numata S, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Experimental evaluation of tissue engineering heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Cardiac Bio Intervention 2002. 2002年10月4~5日, サンフランシスコ (米).

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

1) 藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高静水圧印加による生体組織の処理方法. 特願2002-264470、2002年9月10日.

2) 藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎. マイクロ波照射による生体組織の処理法. 特願2002-360094、2002年12月12日.

3) 藤里俊哉、岸田晶夫、小越拓郎、菅 裕亮、北村惣一郎. 生体材料への細胞播種法. 出願手続き中.

4) 藤里俊哉、岸田晶夫、北村惣一郎. 生体材料への細胞組込法. 出願手続き中.

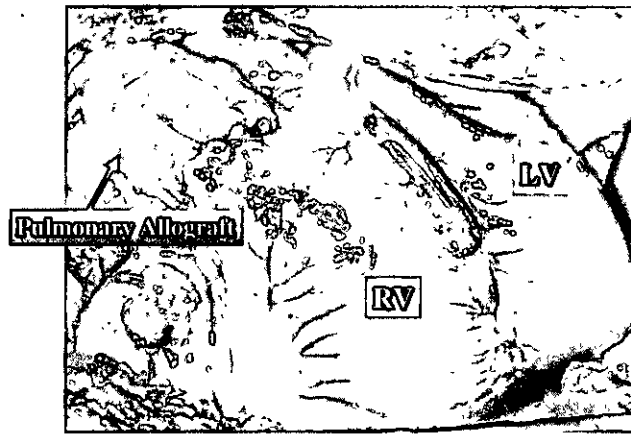


図 1. 肺動脈弁置換術



図 2. 移植 3 ヶ月後の事故細胞組込脱細胞化肺動脈弁置換術

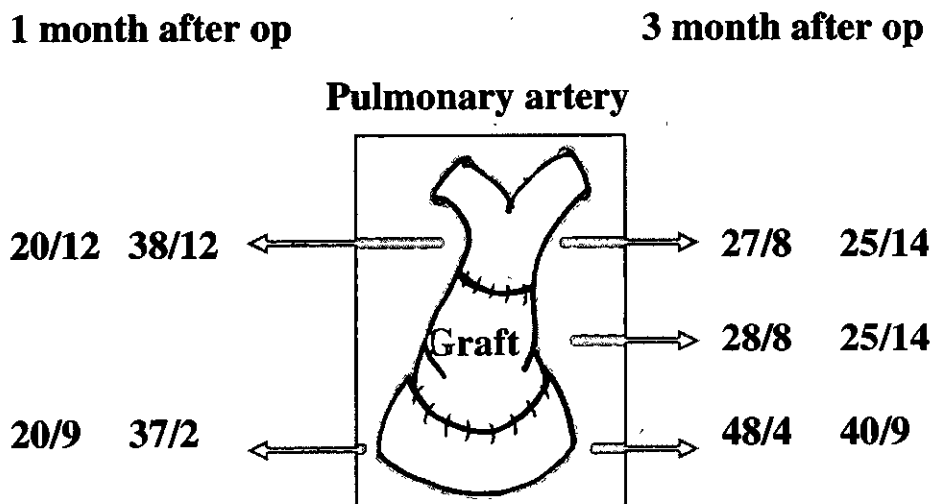


図 3. 移植後 2 例の移植組織前後の圧格差 (上/下)

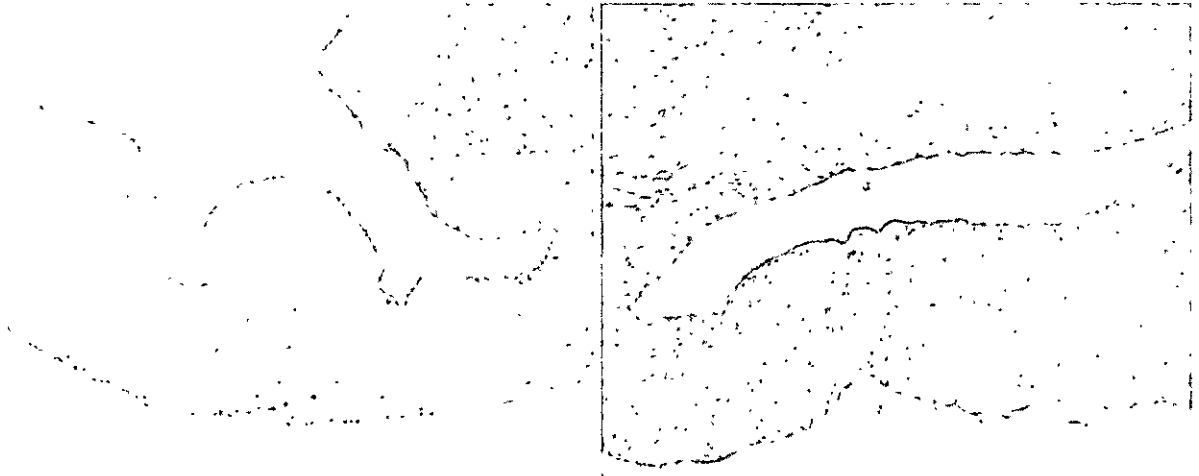


図4. 自己細胞組込脱細胞化肺動脈弁の自己組織化 (左: 1ヶ月、右: 3ヶ月移植後)

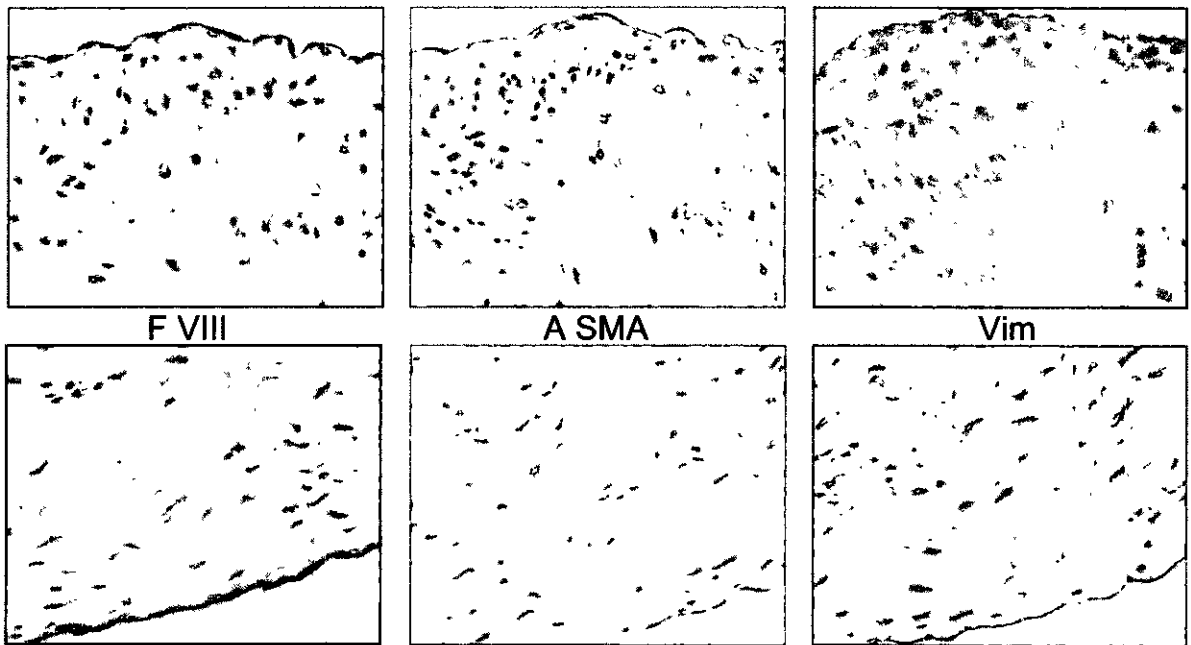


図4. 自己細胞組込脱細胞化肺動脈弁の自己組織化 (上: 弁葉内、下: 基部)

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

脱細胞化処理弁への自己細胞の組み込み

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 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。ローターを用いた回転培養によって均一に細胞を播種することができた。さらに、遠心型循環培養によって細胞を均一に増殖させることができた。脱細胞化心臓弁組織に適用したところ、血管壁面のみならず弁葉表面へも均一に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に解凍し、脱細胞化処理した後、培養ヒト血管内皮細胞あるいはミニブタ血管内皮細胞を播種した。

B. 研究方法

Scaffold: 脱細胞化したミニブタ心臓弁、あるいはモデル実験として濃硫酸で洗浄した内径3mmのガラス管を用いた。脱細胞化心臓弁は以下の如く作製した。NIBS系ミニブタ（日本農産工業㈱）から清潔下にてブタ心臓を摘出し、肺動脈弁を採取した。プログラムフリーザーを用いた徐冷凍結後、液体窒素中に保存した。1ヶ月後に解凍し、

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、0.2mg/ml及び0.02%含む1%トリトンX-100溶液に浸漬し、37°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°CのPBS溶液にて3週間洗浄した。

細胞分離: 培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（三光純薬㈱）あるいはミニブタ大腿動脈血管内皮細胞を用いた。ミニブタ血管内皮細胞の分離は以下の如く行った。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（スイスロシュ社製リペラーゼブレンザイム2）を注入し、37°Cにて20分間静置した。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（三光純薬㈱製EBM2）にて培養した。

細胞播種: モデル実験として内径4mmのガラス管内に培養ヒト血管内皮細胞分散液を封入し、37°Cにて静置、血液ポンプにて循環培養、あるいはローター装置（アズワン製BR-2）上にて回転させることで細胞を播種した。同様に脱細胞化心臓弁を、内径2cmのアクリル製チャンパー内にミニブタ血管内皮細胞分散液とともに封入し、37度にて血液流出側を上方に静置、拍動型バイオリアクター装置にて循環培養、あるいはローター装置上にて回転させることで細胞を播種した。2時間経過後、続けてインキュベータ内で静置培養あ

るいは遠心型血液ポンプにて循環培養を行った（図1）。付着細胞はトルイジンブルー染色あるいはHE染色後、光学顕微鏡にて観察した。

（倫理面への配慮）

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、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、規定に則り十分に払っており、文部科学省及び実験動物学会等の指針に沿って処理した。

C. 研究結果

ミニブタ血管内皮細胞はヒト血管内皮細胞と同様、容易に培養、エクスパンド可能であった。昨年度報告したように、心臓弁scaffoldの血液流出側を上方に配置した静置培養では、細胞を均一に播種することが困難であり、また、培地中の酸素濃度等による問題のため、7日間の培養後でも細胞の増殖は見られなかった。血液ポンプを用いたガラス管への循環培養播種では、試料を垂直に設置して上方に循環させた場合、低流速では比較的均一に播種することができたが、付着数は多くなかった。試料を傾斜させて設置した場合は付着数が多かったが、均一ではなく下方部分により多くの細胞接着が認められた（図2）。これに対して、ローターを用いた回転培養では均一に播種することができ、また、循環培養と比較して細胞浮遊液が少量で済むため、効率的に細胞を播種することができた。さらに続けて5日間、静置及び循環培養したところ、循環培養では全面に渡りコンフルエントになったが、静置培養では試料下部のみコンフルエントであった（図3）。ローターを用いた回転培養によって脱細胞化心臓弁組織へ細胞を播種したところ、血管壁面のみならず弁葉表面へも均一に細胞を播種することができた（図4）。

D. 考察

昨年度は脱細胞心臓弁組織の弁葉内側のみを標的領域として血管内皮細胞を播種していたが、本年度は組織全面を対象とした細胞播種方法について検討した。ガラス管を用いたモデル実験からローターを用いた回転培養播種が適切であると考え、脱細胞化心臓弁組織に適用したところ、scaffold全表面に均一に細胞を播種することができた。現在、清潔下で施行できる長期循環培養

装置を開発中である。また、組織内部への線維芽細胞等の組み込み方法についても検討している。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。現在、末梢血細胞からプロジェニター細胞を単離し、培養後における形質発現等について検討している。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ため、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

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。その結果、ローターを用いた循環培養によって効率的かつ均一に細胞を播種することができた。さらに、遠心型循環培養によって細胞を均一に増殖させることができた。脱細胞化心臓弁組織に適用したところ、血管壁面のみならず弁葉表面へも均一に細胞を播種することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Niwaya K, Numata S, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Experimental Evaluation of tissue engineering heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Heart Surg Forum. 2002; 6(1): 1.

2) Numata S, Niwaya K, Fujisato T, Funamoto S, Yagihara T, Nakatani T, Kitamura S. Decellularized allograft valve for tissue engineering: experimental study. Heart Surg Forum. 2002; 6(1): 2.

3) 北村惣一郎、中谷武嗣、小林順二郎、花谷彰久、庭屋和夫、板東 興、田鎖 治、八木原俊克、由谷親夫、宮武邦夫、妙中義之、高野久輝. わが国における心臓移植と問題点. 移植 2002; 37(4): 147.

2. 学会発表

- 1) 庭屋和夫、藤里俊哉、沼田 智、加賀重亜喜、富田伸司、香河清一、菅 理晴、八木原俊克、中谷武嗣、北村惣一郎. 同種心臓弁組織を利用した Tissue engineering心臓弁の開発. 第102回日本外科学会定期学術集会 (シンポジウム). 2002年4月11~13日、京都.
- 2) 沼田 智、庭屋和夫、藤里俊哉、船本誠一、富田伸司、八木原俊克、中谷武嗣、北村惣一郎. 無細胞化+自己内皮細胞播種肺動脈グラフトによる実験的検討. 第1回日本再生医療学会総会. 2002年4月18~19日、京都.
- 3) Nakatani T, Niwaya K, Tomita S, Fujisato T, Fukuhara S, Yuyani C, Numata S, Ishida M, Yagihara T, Kitamura S, Nishigami K, Morisaki T. Application of tissue-engineering and regenerative medicine to heart and heart-valve diseases. 第66回日本循環器学会総会 (シンポジウム). 2002年4月24~27日、札幌.
- 4) 藤里俊哉、沼田 智、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、山田和彦、北村惣一郎. 再生医療用 scaffoldとしての生体組織の脱細胞化と自己細胞化. 第40回日本人工臓器学会大会 (ワークショップ). 2002年10月2~4日、札幌.
- 5) Numata S, Niwaya K, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Decellularized allograft valve for tissue engineering: experimental study of heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Cardiac Bio Intervention 2002. 2002年10月4~5日、サンフランシスコ (米) .
- 6) Niwaya K, Numata S, Fujisato T, Funamoto S, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Experimental evaluation of tissue engineering heart valves using decellularized cryopreserved allografts. Cardiac Bio Intervention 2002. 2002年10月4~5日、サンフランシスコ (米) .
- 7) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Hasegawa M, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Decellularized Xenograft Valve by Newly Developed Physical Method and Its Autologous Cell Incorporation. 3rd Smith & Nephew International Symposium. 2002年10月13~16日、アトランタ (米) .
- 8) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Hasegawa M, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Recellularization of Tissue Engineered Bioscaffold for Heart Valve Replacement. International Congress on Biological and Medical Engineering. 2002年12月4~7日、シンガポール.
- 9) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Yamada K, Kitamura S. Recellularization of Decellularized Bioscaffold for Heart Valve Transplantation. 5th International Meeting of the Tissue Engineering Society international. 2002年12月8~10日、神戸.

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。) なし

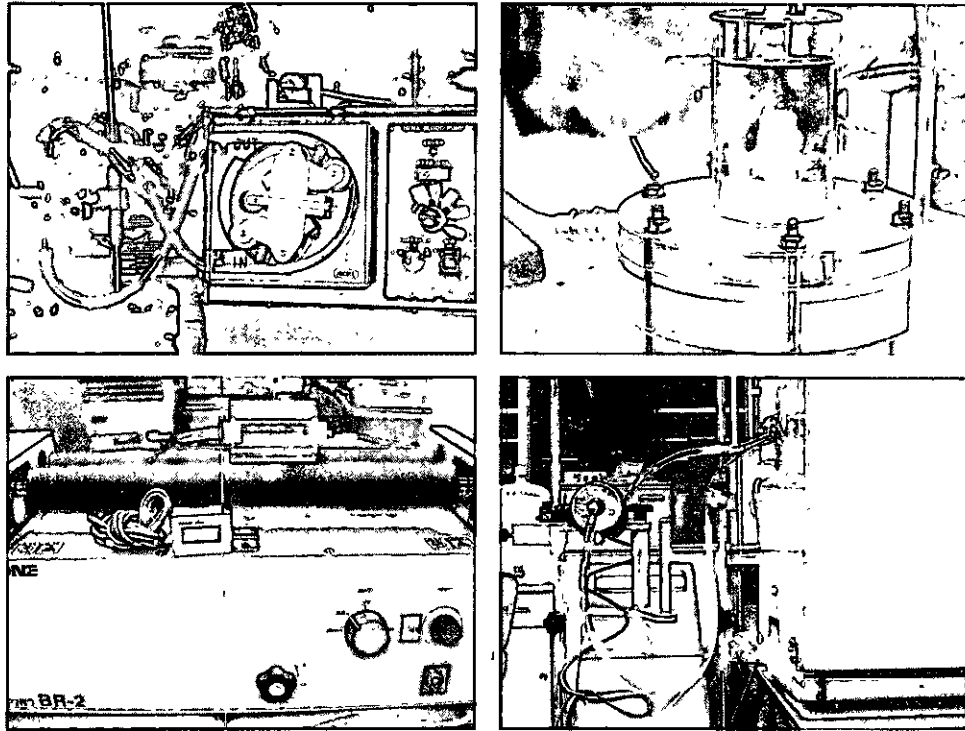


図1. 種々の細胞播種・培養法（上左：血液ポンプによる循環培養、上右：拍動型バイオリクター装置による循環培養、下左：ローラーによる回転培養、下右：遠心型血液ポンプによる循環培養）

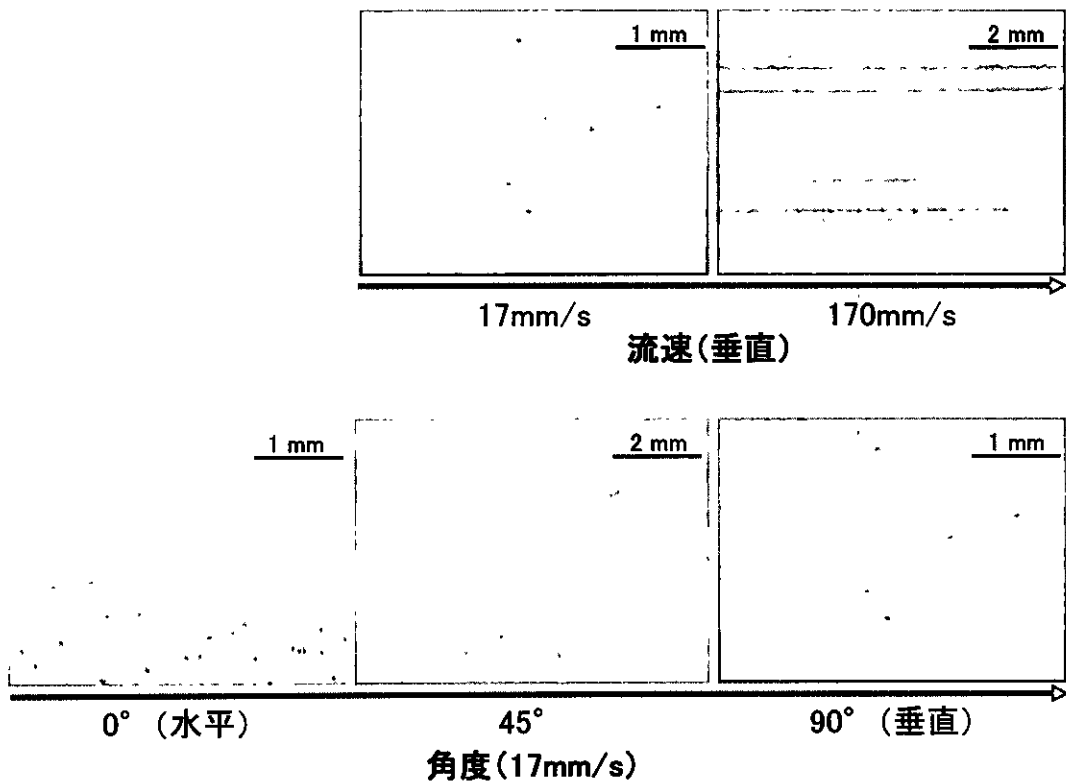


図2. 血液ポンプによる循環培養によるガラス管への細胞播種