

図3. ガラス管への細胞播種と培養（左：ローターによる回転培養播種直後、中：播種後5日間の静置培養後、右：播種後5日間の遠心型ポンプによる循環培養後）

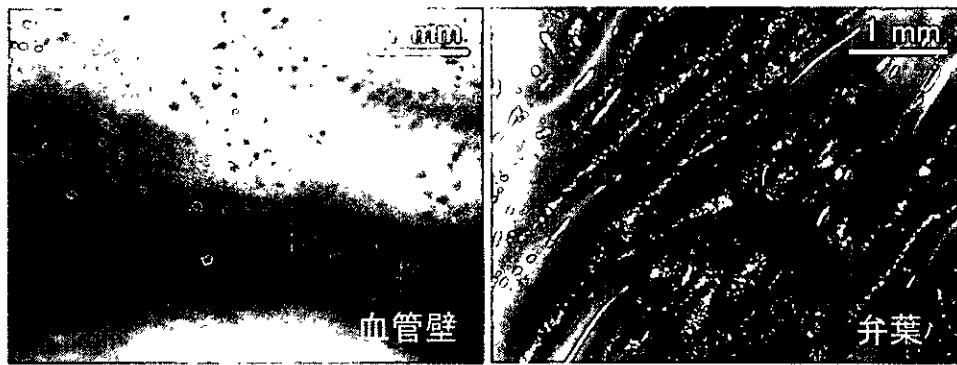


図4. ローターによる回転培養による脱細胞化心臓弁組織への細胞播種

脱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員

研究要旨 トリトンX-100処理に代わる、超高静水圧印加及びマイクロ波照射による新規な脱細胞化方法を開発した。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。

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した。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。昨年度までの研究成果として、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、これらの諸問題を解決するために、超高静水圧印加及びマイクロ波照射による新規な細胞除去方法を開発した。昨年度までの界面活性剤による脱

細胞化処理法と比較検討した。

B. 研究方法

脱細胞化処理：食用ブタ繁殖場（㈱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、ハンクス液で洗浄した。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PBS溶液にて洗浄除去した。昨年度までに報告したトリトンX-100溶液による界面活性剤処理及びトリプシン溶液による酵素処理を対照とした。界面活性剤処理は、RNase A、DNase I及びEDTA2Naをそれぞれ20 µg/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%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で24時間攪拌した。酵素処理は、EDTA2Naを0.02%含む0.1%トリプシンのPBS溶液に浸漬し、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で24時間攪拌した。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染色により顕微鏡観察するとともに、表面を走査電顕（SEM）にて観察した。なお、トリトンX-100のPBS溶液中への溶出量は、サイズ排除クロマトグラフィー法（使用カラム：TSKgel α-M、東ソー㈱）にて測定した。また、常在菌によってあらかじめ汚染した処理組織を、脱細胞化処理後に1日間培

養することで、脱細胞化処理による滅菌効果について検討した。

**力学特性評価：**脱細胞化処理した心臓弁葉を、辺縁方向を $0^\circ$ 、法線方向を $90^\circ$ として角度 $0^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $90^\circ$ における幅3mm、長さ約15mmの短冊状に切り取り、力学試験機（株式会社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。

（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

**脱細胞化処理：**昨年度までに報告したトリトンX-100溶液による界面活性剤浸漬処理では、厚さ数百 $\mu\text{m}$ 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以遠では染色されており、トリトンX溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた。また、トリプシン処理においても組織深部の細胞は残存しており、組織のルーズニングも見られた（図1）。これに対して、10,000気圧、10分間の超高静水圧印加及び24時間マイクロ波低温照射下処理では、組織深部まで完全に細胞を除去することができた（図2）。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、常在菌にて予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、5,000気圧以上の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）。また、マイクロ波照射によるトリトンX-100の除去効果について検討したところ、マイクロ波照射によって約1/10の洗浄時間で除去できることが明らかとなった（図4）。

**力学特性評価：**昨年度までに報告したトリトンX-100溶液による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、超高静水圧印加処理では、力学特性への影響が見られなかった（図5）。

### 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。昨年度までの研究結果から、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、超高静水圧印加及びマイクロ波照射処理について細胞除去効果を検討した。その結果、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ことが確認された。本加圧処理は冷間等方圧加圧であるため、生体力学特性もほとんど未処理のものと同等であり、組織の変形等も全く見られなかった。また、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った。現在、処理後の残存ウイルスの定量実験を継続している。本処理法を適用することによって、同種心臓弁のみならず、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が示唆された。

### E. 結論

トリトンX-100処理に代わる、超高静水圧印加及びマイクロ波照射による新規な脱細胞化方法を開発した。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。さらに滅菌効果も併せ持つことが確認された。これにより、高度な安全性を有した再生医療用生体由来組織の開発が可能であると考えられる。

### 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) 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.

## 2. 学会発表

1) 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.

2) 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) .

3) 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.

4) 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.

5) 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) .

6) 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.

7) 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) .

8) 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.

9) 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.

10) 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) .

11) 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.

12) 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) .

13) 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.

14) 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.

15) 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. 超高压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方法. 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.

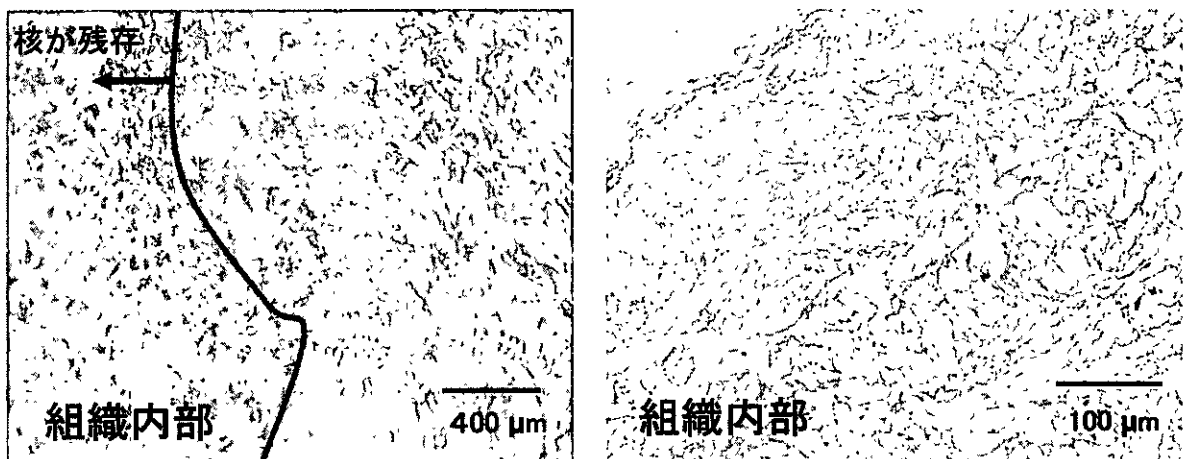


図1. 従来法による脱細胞化処理（左：トリトンX-100、右：トリプシン）

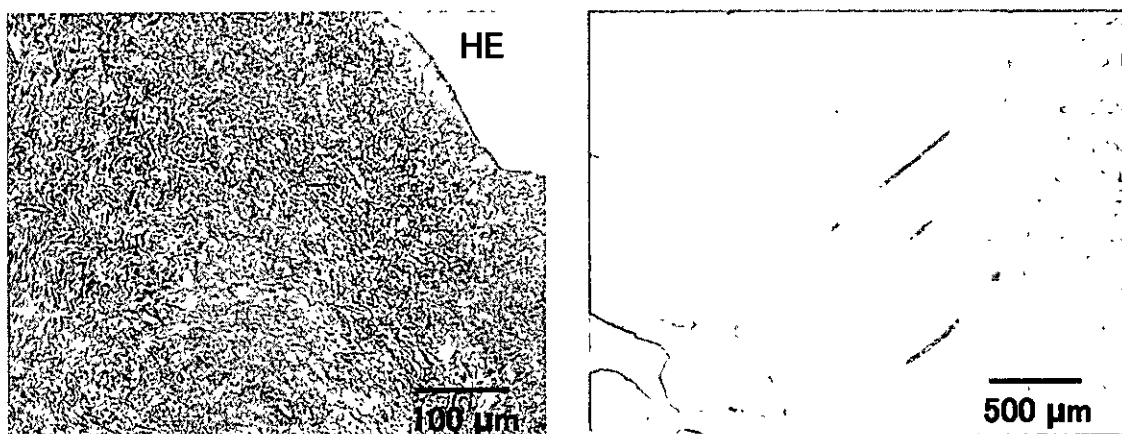


図2. 新規法による脱細胞化処理（左：弁葉、右：血管壁）

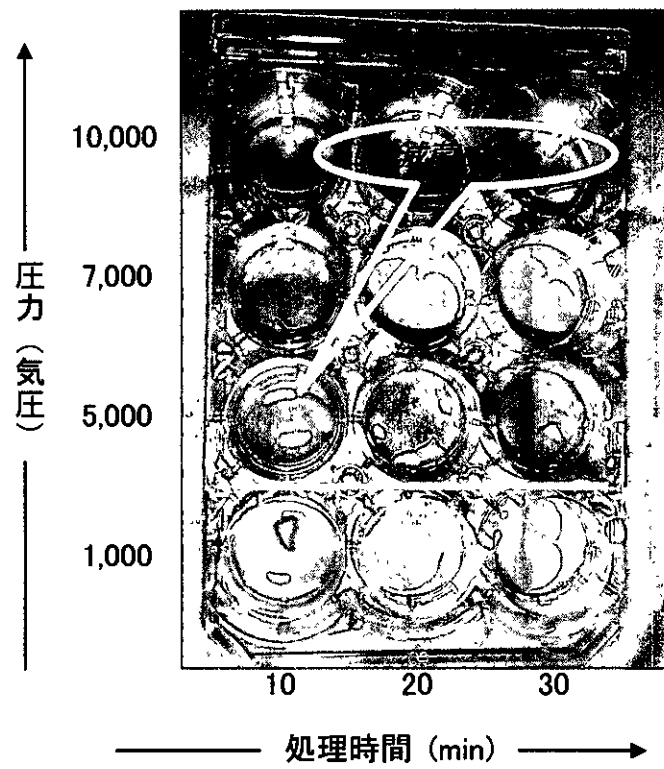


図3. 新規法による滅菌効果

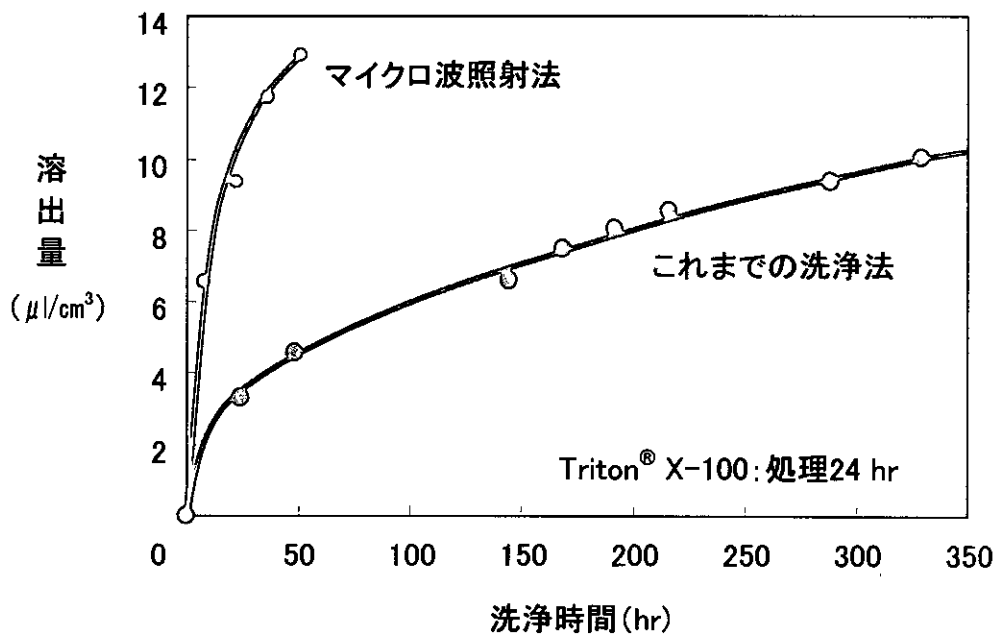


図4. マイクロ波照射による洗浄効果

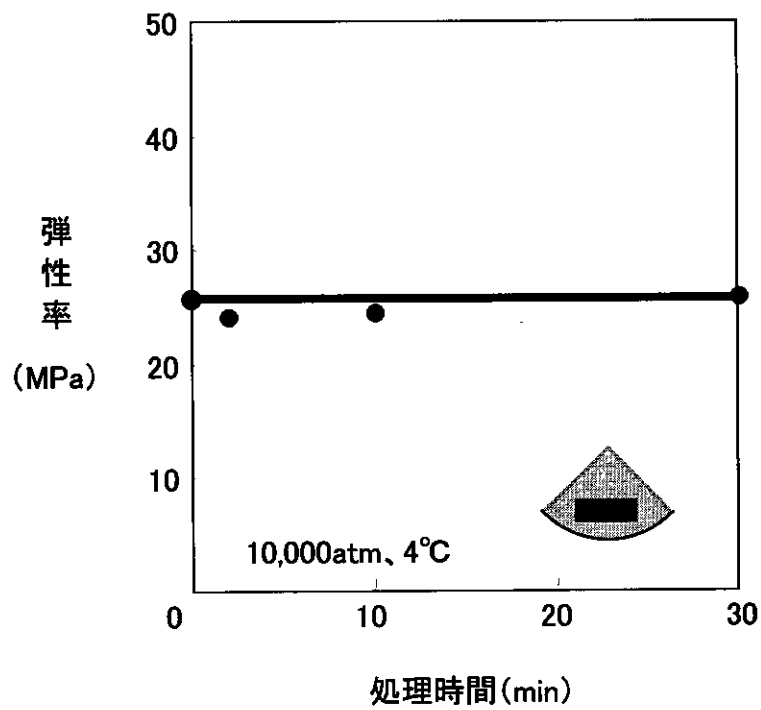
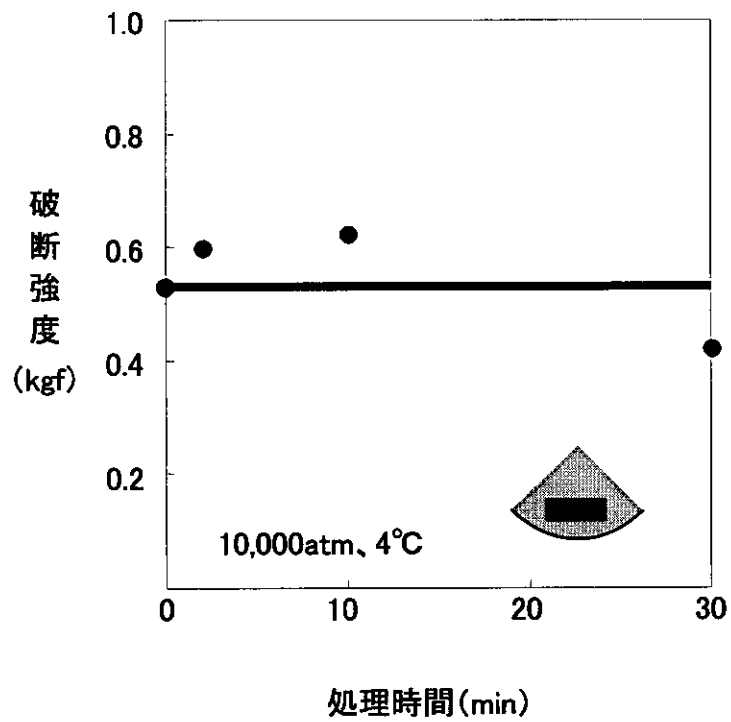


図5. 新規処理法の力学特性への影響

## 別添 6

## 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
藤里俊哉 北村惣一郎	心臓弁	筏 義人	再生医療工学 の最先端	シーエムシー 出版	東京	2002	

## 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
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	6(1)	1	2002
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	6(1)	2	2002
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	6(1)	2	2002
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	34(7)	2720	2002
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	34(1)	54	2002
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	69	10	2002
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—	39	32	2002
中谷武嗣、富田伸司	心筋再生療法	呼吸と循環	50	1015	2002



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、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	37(4)	147	2002
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	4(4)	483	2002
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	57(1)	63	2002
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 学会定期学術集会			2002
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
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
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
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			2002
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 生物医学学会総会			2002
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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处理	第18回日本ライフサポート学会大会			2002
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
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
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			2002
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
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
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
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处理-脱細胞化处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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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
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
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
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
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			2002
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	超高压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			2002

20020467

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.29-P.32の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。