

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

凍結保存同種あるいは異種弁移植の質の向上に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村惣一郎

平成16年(2004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あるいは異種弁移植の質の向上に関する研究 .....	1
北村惣一郎	
II. 分担研究報告書	
1. 再生医療型心臓弁の評価 .....	17
中谷武嗣	
2. 再生医療型心臓弁への細胞播種 .....	27
岸田晶夫	
3. 再生医療型心臓弁の動物実験 .....	39
庭屋和夫	
4. 再生医療型心臓弁の開発 .....	49
藤里俊哉	
5. 異種心臓弁採取動物の安全性 .....	57
吉田光敏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	65

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あるいは異種弁移植の質の向上に関する研究

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 昨年度までに開発した、超高静水圧印加及びマイクロ波照射下洗浄による脱細胞化方法を用いた移植用心臓弁について、脱細胞化効果、異種由来組織の安全性、異種移植による生体適合性評価、及び同種移植による有効性を検討した。また、患者自己細胞を播種したテーラーメイド型組織移植を目指し、清潔環境下で細胞を播種・培養するためのバイオリクター及び細胞注入装置について検討した。さらに、心臓弁採取動物の安全について、外因性微生物のモニタリングを実施した。

分担研究者

中谷武嗣  
国立循環器病センター臓器移植部長  
岸田晶夫  
国立循環器病センター生体工学部長  
庭屋和夫  
国立循環器病センター心臓血管外科医師  
藤里俊哉  
国立循環器病センター再生医療部室長  
吉田光敏  
鹿児島大学農学部教授

5～10年程度の耐久性しか有せず、米国のガイドラインでは65歳以上の高齢者に使用が奨励されている。近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、死体から提供された凍結保存同種心臓弁が臨床で使用されつつあり、良好な成績が報告されている。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、我が国では凍結保存同種弁の供給が絶対的に不足しており、限られた施設でのみ施行されているのが現状である。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及び血管の開発が試みられている。我々は、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ャフォールドとして利用するアプローチを採用しており、ヒトあるいは動物から採取した心臓弁から、細胞成分や細菌、ウイルス、DNAを完全に除去あるいは不活化することで、現在の生体弁では不可能である再生型の組織置換を目指している。現在の異種生体弁では移植後も体内では異物として存在し、自己化されない。し

A. 研究目的

我が国では年間約9千件、米国では約2万件、世界中では約30万件の心臓弁置換術が施行されている。代用心臓弁としては機械弁の他に、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁があり、機械弁とは異なって抗凝固剤の服用が不必要であるというQOL上の利点から、米国では約半数に使用され、我が国でも現在は約3割であるが、その割合は徐々に増加している。しかし、グルタルアルデヒドによって化学的に処理され、組織が固定化されているがゆえ、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15～20年程度の耐久性を有するが、若年者では

かし再生型組織では、固定化されておらず、かつ細胞成分が除去されているため、移植後に自己細胞が侵入することでリモデリングされ、自己組織化される。さらに、この脱細胞化したスキャフォールドに、*in vitro*において患者の自己細胞を播種し、自己組織と同等の組織構築を行った後で移植するテラーメード移植によって、より移植後早期の自己化を獲得できると考えられる(図1)。これにより、現在では自己組織移植以外では不可能な、小児患者においても移植後に成長する移植組織が作出し得ると考えられる。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。

本年度は、前年度までに開発した、超高静水圧印加及びマイクロ波照射下洗浄による脱細胞化方法(図2)を用いた移植用心臓弁について、脱細胞化効果、異種由来組織の安全性、異種移植による生体適合性評価、及び同種移植による有効性を検討した。また、患者自己細胞を播種したテラーメード型組織移植を目指し、清潔環境下で細胞を播種・培養するためのバイオリアクター及び細胞注入装置について検討した。さらに、心臓弁採取動物の安全について、外因性微生物のモニタリングを実施した。

## B. 研究方法

**脱細胞化処理**: クラウン系ミニブタ(株)ジャパンファーム)から清潔下にてブタ心臓を摘出し、心臓弁及び心筋を採取した。また、気管、肺、大動脈、及び肝臓を摘出した。各組織・臓器の摘出における温阻血時間は20分以下とした。生理食塩水で洗浄後、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)によってドナー細胞を破壊し、マイクロ波照射下(株)東屋医科機械製MI-33)にてPBS溶液にて洗浄除去した。トリトンX-100による脱細胞化を対照とした。処理後の組織は、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡を用いた組織学的観察によって、脱細胞化を評価した。また、処理組織からDNAを抽出し、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)のDNAを増幅後、PCR産物を電気泳動することで組織内のPERVを測

定した。

**異種移植試験**: 採取したミニブタ大動脈及び脱細胞化処理したミニブタ大動脈を、1cm×1cmにカットし、ラット皮下にそれぞれ埋植した。経時的に取り出し、組織染色を行い光学顕微鏡により観察した。

**同種移植実験**: クラウン系ミニブタを用い、左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術にて、脱細胞化同種大動脈弁導管による大動脈置換手術を行った。術後1ヶ月及び3ヶ月において、移植組織を摘出し、HE染色、抗vWF(血管内皮細胞)、抗 $\alpha$ -SMA(平滑筋細胞)、抗ビメンチン(間質細胞)、抗CD3(T細胞)、及び抗CD68(マクロファージ)免疫染色、並びに走査型電子顕微鏡によって組織学的所見を検討した。脱細胞化していない凍結保存同種弁を対照とした。凍結保存は、採取した肺動脈弁を、プログラムフリーザー(フタバメディカル社製CryoMED)による1℃/minの徐冷凍結後、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、動物実験に供した。

**細胞播種**: 脱細胞化処理したミニブタ大動脈内腔面を、新たに作製した回転培養装置を用いて血管内皮細胞播種を行った。1軸あるいは2軸回転によって細胞が均一に播種される条件を探索した。また、細胞播種後のマトリックスを長期培養し生体外での組織構築をある程度実現するためのバイオリアクターも作製した。また、脱細胞化組織内部への細胞移植を実現するために、細胞注入するシステムおよび媒体について検討を行い、自動注入装置の導入、及び媒体としてコラーゲン並びに生分解性高分子の応用について検討を行った。

**採取ブタの外因性微生物モニタリング**: 鹿児島大学農学部付属農場飼育棟において飼養管理されていたクラウン系ミニブタを用いた。供試ミニブタの頸静脈より無菌的に血液を採取し、分離した血清サンプルについて、オーエスキー病(AD)、ブタ繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)、ブタ流行性下痢症(PED)、ブタ胸膜肺炎(APP)、及びマイコプラズマ性肺炎(MPS)の感染状況を検査した。

**卵子の外因性微生物モニタリング**: PRRSウイルス(PRRSV)抗体陽性の産業雌ブタより卵丘細胞・卵子複合体(COC)を採取した。総

RNAを抽出し、PRRSV特異的プライマー対によりPCRを行った。また、食肉センター由来の産業雌ブタ卵巣よりランダムに採取したCOCからPRRSV検出状況を調べた。

(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 Consent)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

**心臓弁の脱細胞化:** HE染色後の光学顕微鏡観察では、処理後の組織内では細胞核は全く染色されなかった。また、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離していた。しかしながら、トルイジンブルー染色後の光学顕微鏡観察並びに透過型電子顕微鏡による観察では、組織内では平滑筋細胞の残渣物が認められ、また、コラーゲン繊維及びエラスチン繊維には若干の走行の乱れが認められた(図3)。一方、脱細胞化処理後の組織内からは、組織内で最も量の多いタンパク質であるβ-アクチンが全く検出されなかったことから、細胞残渣は存在しても、細胞内タンパク質は除去あるいは完全に変性していると思われる。また、組織内のPERVは、超高静水圧処理の場合、いずれの組織試料からも全く検出されなかった。これらに対し、トリトンX-100溶液内への浸漬による脱細胞化では、処理後でもβ-アクチン並びにPERVが検出された(図4)。

**種々の組織の脱細胞化:** 肺や肝臓、腎臓などの毛細血管の発達した組織、あるいは心膜や大動脈、気管において、高い脱細胞化が達成できた。一方、心筋と皮膚については、完全な脱細胞化が困難であり、生体適合性評価に用いるためには条件の最適化が必要であった(図5)。

**異種移植実験:** ミニブタ大動脈の細切片をラット皮下に埋植し、1及び4週間後に取り出して観察した。1週間後の組織反応について、コントロ

ールである脱細胞化処理を行っていない組織では周辺に大量の炎症細胞が観察されたが、脱細胞化組織周辺では炎症も程度も軽く、重篤な反応は見られなかった。また、脱細胞化組織内に浸潤細胞像が観察されたことから、一般的な脱細胞化組織によく観察される界面活性剤残渣による毒性もないことがわかった(図6)。また、4週間後の組織反応を同様に観察すると、コントロールでは巨核球の存在が観察され、また炎症が継続していることがわかった。一方、脱細胞化組織の場合には組織内への細胞の浸潤が進行し、組織と生体との界面が不明瞭になっていた。

**同種移植実験:** 術後に移植組織の破断等による異常所見は見られなかった。移植1ヶ月後の一部症例においては若干の血栓が認められたが、3ヶ月後においては認められなかった。血管内腔面は、移植1ヶ月後においてもほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後では完全に覆われていた(図7)。これは、HE染色、並びに坑vWFによる免疫染色の結果からも、確認された。また、坑α-SMA及び抗ビメンチン免疫染色の結果から、組織内には内腔側から平滑筋細胞及び線維芽細胞の浸潤が認められた。坑CD3及び坑CD68免疫染色の結果から、移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3ヶ月後では完全に消失していること確認された。これに対し、脱細胞化していない凍結保存同種弁組織では、脱細胞化組織と比較して、より顕著な炎症反応が見られた。

**脱細胞化組織表面への細胞播種:** 新たに開発した回転培養装置を用い、1軸回転もしくは2軸回転による播種の検討を行った。血管を用いた場合には1軸回転で均一に播種することが可能であった。播種する細胞密度が高くなるほど接着数は増加した。また、回転速度についても、低速では細胞が下方に沈殿し、また、あまりに高速すぎると生存率が低下した。心臓弁への細胞播種では、1軸回転では内部の弁葉の複雑な形状面への均一な播種が困難であったが、2軸回転型装置を用いることで、均一に細胞を播種することができた。さらに、循環培養装置を用いることで、内皮細胞の伸展が認められた(図8)。

**細胞内部への細胞播種:** 汎用ディスペンサ装置を用いた場合、微量注入は可能であったが、使用した細胞浮遊液の大部分が組織内からあふれ出てしまい、効率が非常に低かった。コラーゲン溶

液を用いたところ、微量注入装置での定量的注入が困難であったが、組織内部に塊状に細胞が存在していることが確認された(図9)。

採取ブタの外因性微生物モニタリング: ウイルス性感染症であるAD、PRRS、及びPEDは全ての検査個体で陰性であった。しかし、細菌性及びマイコプラズマ性感染症であるAPP及びMPSの陽性率は、それぞれ63%及び76%と高かった。

卵子の外因性微生物モニタリング: PRRSV抗体陽性産雌ブタからの卵丘細胞及び卵子においては、PRRSV遺伝子やPRRSV遺伝子転写産物は検出されなかった。食肉センター由来の雌ブタ卵巣より回収した卵丘細胞および卵子においても、全サンプルでPRRSV遺伝子やPRRSV遺伝子転写産物は検出されなかった。

#### D. 考察

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。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ラーメード移植を目指している。欠損した心臓弁に対する置換再生型医療素材では生体吸収性材料を用いたアプローチが主流である。しかし、ポリ乳酸などの生体吸収性材料では心臓弁のような形状を造形することが容易でなく、生体よりも硬いという欠点がある。また、高圧に耐える必要のある左心系では分解吸収速度の制御も容易ではない。我々のアプローチである生体由来組織ではこれらの欠点はないが、ドナー由来の抗原性を減弱する必要があり、動物由来の場合は未知の感染性や、移植後のヒトへの感染が懸念されている内在性レトロウイルスの除去が必須である。

脱細胞化の手法としては、界面活性剤や酵素による処理法が報告されているが、昨年度までの報告で示したように、組織深部の細胞除去は容易でない。我々の開発した超高静水圧引加による処理

法では、組織深部まで細胞核は染色されず、PERVもまったく検出されなかった。超高静水圧引加によっては、組織内の細菌やウイルス、異常プリオンの不活化されることが報告されており、本方法は極めて高い安全性が確保できると考えられる。

テラーメード組織移植では、移植前に患者の自己細胞をスキファールドに組み込む必要がある。血管内皮細胞については、回転細胞播種及び循環培養装置によって、高い細胞播種率を達成することができた。また、平滑筋細胞の組織内部への組み込み法として、汎用3次元注入装置を用いた細胞注入について検討を行った。コラーゲンゲル等の細胞の媒体については、もう少しの検討を要する状況である。

昨年度までの研究から、トリトンX-100にて脱細胞化した同種肺動脈弁移植によって、移植後3ヶ月で、レシピエントの細胞浸潤が見られることを報告した。本年度は、超高静水圧印加による脱細胞化について検討した。また、肺動脈弁よりも高い血圧の加わる左心系である大動脈弁について検討した。移植組織の破断等の異常所見も見られず、同種移植後3ヶ月で、レシピエントの細胞の浸潤が確認された。本年度では、ミニブタからミニブタへの動物実験であり、同種移植のモデルとなるが、来年度は、異種移植のモデル実験を実施する予定である。また、浸潤した細胞の性状、石灰化、及び成長性について検討する必要がある。

異種組織を用いる場合は、採取動物の安全性も重要となる。本年度は、この点にも注目し、採取動物として想定しているクラウン系ミニブタの外因性ウイルスのモニタリングを実施した。各個体における外因性ウイルスの感染は認められず良好な状態であることが示された。さらに、産雌ブタ卵子からの外因性ウイルス伝播のリスクは極めて小さいことが示唆された。

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ている。

#### E. 結論

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

アクター装置により、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。数年以内の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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 岸田晶夫. IV. 細胞足場材料、再生医療 ティッシュエンジニアリング&生体材料最前線、田中順三・四宮謙一監修. 再生医療技術開発懇話会編. 日刊工業新聞社、東京、104-10、2003.
- 2) 岸田晶夫. 第5章解説、人工臓器はいま、日本人工臓器学会編. はる書房、東京、345-50、2003.
- 3) Bando K, Kobayashi J, Hirata M, Satoh T, Niwaya K, Tagusari O, Nakatani S, Yagihara T, Kitamura S. Early and late stroke after mitral valve replacement with a mechanical prosthesis: Risk factor analysis of a 24-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126 (2), 358-64, 2003.
- 4) Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, Morisaki T, Yuatani C, Kitamura S and Nakatani T. Direct cell-cell interaction of cardiomyocyte is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 (6), 1470-80, 2003
- 5) Hamamoto M, Bando K, Kobayashi J, Satoh T, Sasako Y, Niwaya K, Tagusari O, Yagihara T, Kitamura S. Durability and outcome of aortic valve replacement with mitral valve repair versus double valve replacement. *Ann Thorac Surg*, 75 (1), 28, 2003.
- 6) Yasuda H, Nakatani S, Stugaard M, Tsujiya-Kurida Y, Bando K, Kobayashi J, Yamagishi M, Kitakaze M, Kitamura S, Miyatake K. Failure to prevent progress dilation of ascending aorta by aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve: comparison with tricuspid aortic valve. *Circulation*, 108 (10), 11291-4, 2003.
- 7) 北村惣一郎、中谷武嗣、花谷彰久. 本邦における心臓移植と問題点. *Annual Review 循環器* 2003, 263-71, 2003.
- 8) 中谷武嗣、北村惣一郎. 日本の心臓移植の現状. *移植*, 38 (4), 253-7, 2003.
- 9) 中谷武嗣. 心不全治療としての心臓移植の現状. *今月の治療*, 11 (2), 87-92, 2003.
- 10) 中谷武嗣. 心不全の外科的治療-補助循環・左室形成術・心臓移植. 第122回日本医学会シンポジウム記録集:心不全診療の最前線, 79-85, 2003.
- 11) 中谷武嗣、富田伸司、藤里俊哉. 心臓および心臓弁における組織工学・再生医療技術の応用. *Ischemic Heart Disease (IHD) Frontier*, 4 (4), 88-92, 2003.
- 12) 中谷武嗣、高野久輝. 補助人工心臓の進歩とポンプ失調の治療動向. *日本臨牀*, 61 (5), 472-7, 2003.
- 13) 中谷武嗣. レーザー心筋内血行再建術. *内科*, 91 (6), 1190, 2003.
- 14) 中谷武嗣. 虚血性心疾患における心臓移植の動向と問題点. *日本臨牀*, 61 (5), 478-83, 2003.
- 15) 富田伸司、中谷武嗣. 心筋細胞との共培養による骨髄細胞の心筋分化. *再生医療*, 2 (1), 65-9, 2003.
- 16) 富田伸司、中谷武嗣. 骨髄由来外因性および内因性幹細胞による心筋分化. *最新医学*, 58, 641-6, 2003.
- 17) 富田伸司、中谷武嗣、福原慎也、大津義徳、石田理子、濱本正樹、久 容輔、藤里俊哉、由谷親夫、山田和彦、北村惣一郎. 骨盤細胞を用いた心筋再生研究. 第15回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 269-70, 2003.
- 18) Serizawa T, Yamaguchi M, Kishida A, Akashi M. Alternating gene expression in fibroblasts adhering to multilayers of chitosan and dextran sulfate. *J Biomed Mater Res*. 67A, 1060-3, 2003.
- 19) Sakuma S, Sudo R, Suzuki N, Kikuchi H, Takamori H, Sato T, Minamitake Y, Hayashi Y, Sugita O, Hiwatari K, Kishida A, Akashi M. Human Calcitonin delivered orally by means of nanoparticles composed of novel

- graft copolymers. *J Dispe Sci Tech*, 24, 623-32, 2003.
- 20) Shimozuru T, Kamezawa T, Kuratsu J, Sakai N, Nagata I, Kishida A, Akashi M, Matsusaki M. Hydroxyapatite and bFGF coating of detachable coils for endovascular occlusion of experimental aneurysm. *Interventional Neuroradiology*, 9 (Suppl. 1), 29-33, 2003.
- 21) Furuzono T, Kishida A, Tanaka J. Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite I. Coating of sintered hydroxyapatite particles on poly( $\gamma$ -methacryloxypropyl trimethoxysilane)-grafted silk fibroin fibers through chemical bonding. *J Mater Sci Mater Med*, 14, 1-5, 2003.
- 22) Korematsu A, Furuzono T, Kishida A. Synthesis of a novel block copolymer containing aromatic polyamide and fluoroethylene segments. *J Biomater Sci Polym Chem*, 41, 2840-5, 2003.
- 23) Matsuda A, Furuzono T, Walsh D, Kishida A, Tanaka J. Surface modification of a porous hydroxyapatite to promote bonded polymer coatings. *J Mater Sci Mater Med*, 14, 973-8, 2003.
- 24) Matsusaki M, Kamezawa T, Shimozuru T, Kuratsu J, Kishida A, Akashi M. Novel Guglielmi Detachable Coils (GDCs) for the Treatment of Brain Aneurysms. In Vitro study of Hydroxyapatite Coating on Pt Plate as GDCs Model. *J Biomed Mater Res Part B, Appl Biomater*. 66B, 429-38, 2003.
- 25) Furuzono T, Wang P-L, Korematsu A, Miyazaki K, Oido-Mori M, Kowashi Y, Ohura K, Tanaka J, Kishida A. Physical and biological Evaluations of Sintered Hydroxyapatite/Silicone Composite with Covalent Bonding for a Percutaneous Implant Material. *J Biomed Mater Res Part B, Appl Biomater*. 65B, 217-26, 2003.
- 26) 岸田晶夫. ESCAの測定法と接着. 接着の技術. 23 (2), 21-5, 2003.
- 27) Kishida A. A site-specific polymeric drug carrier for renal disease treatment. *Trends in Pharmaceutical Science*. 24 (12), 611-3, 2003.
- 28) 庭屋和夫, 北村惣一郎. 心臓弁の凍結保存 [臓器保存シリーズ23]. *Organ Biology*, 10 (3), 199-204, 2003.
- 29) 藤里俊哉, 北村惣一郎. 生物組織スキャフォールドを用いたテーラーメイド心臓弁. 循環器病研究の進歩, 24 (1), 65-71, 2003.
- 30) 庭屋和夫, 沼田 智, 藤里俊哉, 小林順二郎, 板東 興, 田鎖 治, 中嶋博之, 八木原俊克, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 同種弁無細胞化と自己血管内皮細胞播種による Tissue Engineering Valve研究の展開. *日本心臓血管外科学会雑誌*, 32 (Suppl), 132, 2003.
- 31) 沼田 智, 庭屋和夫, 藤里俊哉, 小林順二郎, 板東 興, 田鎖 治, 中嶋博之, 八木原俊克, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 凍結保存allograftを用いたTissue engineering valveの実験的検討. *日本心臓血管外科学会雑誌*, 32 (Suppl), 439, 2003.
- 32) 藤里俊哉, 岩澤伸明, 小越拓郎, 菅 裕亮, 西岡 宏, 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レシピエント自己細胞化. *Organ Biol*, 10 (2), 172, 2003.
- 33) 藤里俊哉, 岸田晶夫, 庭屋和夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 新しい物理処理による再生医療用バイオスキャフォールドの開発. *生体医工学*, 41 (Suppl 1), 39, 2003.
- 34) 藤里俊哉, 小越拓郎, 菅 裕亮, 岸田晶夫, 大場謙吉, 山田和彦, 北村惣一郎. 回転及び循環培養装置を用いた三次元scaffold表面への細胞播種. *生体医工学*, 41 (Suppl 1), 407, 2003.
- 35) Fujisato T, Nishioka H, Kamata W, Yamahigashi N, Yoshida K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular Wall Cell Injection and Endothelial Cell Seeding to Decellularized Tissue Scaffold. *Intl J Artif Organs*, 26 (9), 824, 2003.
- 36) Kishida A, Fujisato T, Funamoto S, Nishioka H, Yoshida K, Kamata W, Yamahigashi N, Suga M, Kimura T, Miyazaki



K, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Various Decellularized Tissues for Tissue Engineering Scaffold Prepared by New Technology. Intl J Artif Organs, 26 (9), 864, 2003.

- 37) 藤里俊哉、西岡 宏、沼田 智、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体弁の脱細胞化とin vitroでのレシピエント自己細胞化. 移植, 38 (Suppl), 142, 2003.
- 38) 藤里俊哉、岸田晶夫、菅 理晴、船本誠一、西岡 宏、吉田謙一、鎌田和加子、山東奈津子、木村 剛、宮崎幸造、古菌 勉、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療用scaffoldのための新規技術による種々の生体組織の脱細胞化. Jpn J Artif Organs, 32 (2), S-68, 2003.
- 39) 藤里俊哉、鎌田和加子、山東奈津子、吉田謙一、西岡 宏、船本誠一、庭屋和夫、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生医療用生体scaffoldのin vitro自己細胞化. Jpn J Artif Organs, 32 (2), S-73, 2003.
- 40) 藤里俊哉、西岡 宏、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高压処理による安全な生体スキャフォールドの開発とそのレシピエント細胞化. 第16回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 435-6, 2004.

#### 学会発表

- 1) Fujisato T, Kishida A, Hasegawa M, Numata S, Niwaya K, Nakatani T, Yamada K, Kitamura S. A Novel Decellularized Technology for Preparing a Tissue Engineering Scaffold. 2003 Japan-Taiwan Symposium on Stem Cell and Tissue Engineering, 口頭, 2003年3月8日、京都.
- 2) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Yamada K, Kitamura S. Endothelial Cell Seeding and Expansion on Three-Dimensional Biological Scaffold. 29th Annual Meeting of Society for Biomaterials, 口頭, 2003年4月24~27日、レノ (米).
- 3) 庭屋和夫、沼田 智、藤里俊哉、小林順二郎、板東 興、田鎖 治、中嶋博之、八木原俊克、

中谷武嗣、北村惣一郎. 同種弁無細胞化と自己血管内皮細胞播種によるTissue Engineering Valve研究の展開. 第34回日本心臓血管外科学会学術総会、口頭、2003年5月14~16日、札幌.

- 4) 沼田 智、庭屋和夫、藤里俊哉、小林順二郎、板東 興、田鎖 治、中嶋博之、八木原俊克、中谷武嗣、北村惣一郎. 凍結保存allograftを用いたTissue engineering valveの実験的検討. 第34回日本心臓血管外科学会学術総会、口頭、2003年5月14~16日、札幌.
- 5) 藤里俊哉、西岡 宏、沼田 智、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 心臓弁組織の脱細胞化とそのレシピエント細胞化. 第2回再生心臓血管外科治療研究会、口頭、2003年5月16日、札幌.
- 6) 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. 循環培養による生体scaffoldへの血管内皮細胞播種. 生活支援工学系学会連合大会、口頭、2003年5月16~17日、愛知県東浦町.
- 7) 奥野 暁、大内辰郎、大矢裕一、岸田晶夫、古菌 勉、宮崎幸造、吉澤秀和、北村吉朗、六雄伸吾. 超高压処理によるDNAとポリビニルアルコール (PVA) の相互作用評価. 第52回高分子年次大会、口頭、2003年5月28~30日.
- 8) 松崎典弥、芹澤 武、岸田晶夫、明石 満. スルホン化ポリ ( $\gamma$ -グルタミン酸) によるサイトカインリリース. 第52回高分子年次大会、口頭、2003年5月28~30日.
- 9) 古菌 勉、是松 新、岸田晶夫. アミノ酸化チタンナノ粒子・シリコーン複合体の開発. 第52回高分子年次大会、口頭、2003年5月28~30日.
- 10) 古菌 勉、安田昌司、田中順三、岸田晶夫. ブロックドイソシアネートによるアパタイトナノ単結晶体の高分子繊維表面への固定化. 第52回高分子年次大会、口頭、2003年5月28~30日.
- 11) 有村英俊、大矢裕一、大内辰郎、岸田晶夫. 荷電表面を有するポリ乳酸ミクロスフェアと多糖類とのポリイオンコンプレックス形成から成る生分解性マトリックスの生医学材料としての検討. 第52回高分子年次大会、口

- 頭、2003年5月28～30日。
- 12) 二宮正紀、大矢裕一、大内辰郎、岸田晶夫、古菌 勉 リシノール酸とL-乳酸から成る新規な生分解性共重合体の合成およびその特性評価。第52回高分子年次大会、口頭、2003年5月28～30日。
  - 13) 是松 新、古菌 勉、岸田晶夫、フルオロエチレン・アラミドブロック共重合体の合成とその特性解析。第52回高分子年次大会、口頭、2003年5月28～30日。
  - 14) 藤里俊哉、岸田晶夫、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎。新しい物理処理による再生医療用バイオスキャフォールドの開発。第42回日本エム・イー学会大会、口頭（シンポジウム）、2003年6月3～5日、札幌。
  - 15) 藤里俊哉、小越拓郎、菅 裕亮、岸田晶夫、大場謙吉、山田和彦、北村惣一郎。回転及び循環培養装置を用いた三次元scaffold表面への細胞播種。第42回日本エム・イー学会大会、口頭、2003年6月3～5日、札幌。
  - 16) 藤里俊哉、西岡 宏、岸田晶夫、中谷武嗣、山田和彦、北村惣一郎。複雑な表面を有するスキャフォールドへの細胞組込。平成15年度繊維学会年次大会、口頭、2003年6月11～13日、京都。
  - 17) 藤里俊哉、沼田 智、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎。生体組織の脱細胞化及び自己細胞化によるテーラード型心臓弁移植。第6回日本組織工学会、口頭（シンポジウム）、2003年6月12～13日、東京。
  - 18) Fujisato T, Numata S, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Yamada K, Kitamura S. In Vitro Endothelial Cell Seeding and Expansion on Decellularized 3D Valve Scaffold. The Society for Heart Valve Disease 2nd Biennial Meeting、口頭、2003年6月28日～7月1日、パリ。
  - 19) Numata S, Niwaya K, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: comparing with cryopreserved allograft. The Society for Heart Valve Disease 2nd Biennial Meeting、ポスター、2003年6月28日～7月1日、パリ。
  - 20) 奥野 暁、大矢裕一、大内辰郎、宮崎幸造、古菌 勉、岸田晶夫、六雄伸吾、北村吉朗、吉澤秀和。超高压処理によるDNAとポリビニルアルコール (PVA) の複合体形成評価。第13回バイオ・高分子シンポジウム、口頭、2003年7月31日～8月1日、東京。
  - 21) 松崎典弥、芹澤 武、明石 満、岸田晶夫。スルホン化ポリ(γ-グルタミン酸)ハイドロゲルの組織工学材料への応用展開。第32回医用高分子シンポジウム、口頭、2003年7月31日～8月1日、東京。
  - 22) 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。テーラード型組織移植を目的とした循環器系組織のin vitro再構築。日本機械学会2002年度年次大会、口頭、2003年8月5～8日、徳島。
  - 23) 藤里俊哉、西岡 宏、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎。異種組織の脱細胞化による安全な異種組織移植技術の開発。第2回日本組織移植学会大会、口頭、2003年8月9日、神戸。
  - 24) 古菌 勉、安田昌司、田中順三、岸田晶夫。ナノセラミクスハイブリッド：細菌感染防止デバイスを目指して。第52回高分子討論会、口頭、2003年9月24～26日、山口。
  - 25) 木村 剛、古菌 勉、宮崎幸造、奥野 暁、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、北村吉朗、吉澤秀和、岸田晶夫。超高压処理によって形成したPVA粒子のDDSへの応用。第52回高分子討論会、口頭、2003年9月24～26日、山口。
  - 26) 是松 新、古菌 勉、岸田晶夫。アラミド鎖長制御によるフルオロエチレン-アラミドブロック共重合体の合成。第52回高分子討論会、口頭、2003年9月24～26日、山口。
  - 27) 奥野 暁、大矢裕一、大内辰郎、木村 剛、宮崎幸造、古菌 勉、岸田晶夫、六雄伸吾、北村吉朗、吉澤秀和。超高压処理による水素結合性の相互作用を利用したDNA-PVA複合体の形成評価。第52回高分子討論会、口頭、2003年9月24～26日、山口。
  - 28) 二宮正紀、大矢裕一、大内辰郎、古菌 勉、岸田晶夫。リシノール酸とL-乳酸から成る新規な生分解性共重合体の合成および生医学材料としての特性評価。第52回高分子討論会、口頭、2003年9月24～26日、山口。

- 29) 遊木靖人、三好和陸、大石勝昭、吉田光敏。除核法の違いがミニブタ体細胞核移植胚の作出効率に及ぼす影響。日本畜産学会第102回大会、口頭、2003年9月26～29日、岐阜。
- 30) A. Kishida. Application of Organic and Inorganic Nanoparticle for cardiovascular tissue engineering. US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advance Therapy and diagnosis (第2回NSF-文部科学省合同シンポジウム)、口頭、2003年10月～11日、横浜。
- 31) Kimura T, Furuzono T, Miyazaki K, Okuno A, Ohya Y, Ohuchi T, Mutsuo S, Kitamura S, Yoshizawa H, Kishida A. Preparation of PVA nano-particles using ultra-high pressure technology for drug carrier. US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advance Therapy and diagnosis (第2回NSF-文部科学省合同シンポジウム)、口頭、2003年10月～11日、横浜。
- 32) Furuzono T, Yasuda S, Tanaka J, Kishida A. Nano-ceramics hybrid: Development of hydroxyapatite-silk fibroin composite and its properties for a percutaneous device. US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advance Therapy and diagnosis (第2回NSF-文部科学省合同シンポジウム)、口頭、2003年10月～11日、横浜。
- 33) 吉田光敏、橋本紘子、坂下満明、黒川 知、矢原芳博。卵細胞を介した豚生殖器・呼吸症候群ウイルス (PRRSV) 伝播の可能性に関する研究。第52回九州地区獣医師大会。口頭、2003年10月19日、宮崎。
- 34) Fujisato T, Nishioka H, Kamata W, Yamahigashi N, Yoshida K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular Wall Cell Injection and Endothelial Cell Seeding to Decellularized Tissue Scaffold. 1st World Congress on Regenerative Medicine. 口頭、2003年10月22～24日、ライプチヒ。
- 35) Kishida A, Fujisato T, Funamoto S, Nishioka H, Yoshida K, Kamata W, Yamahigashi N, Suga M, Kimura T, Miyazaki K, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Various Decellularized Tissues for Tissue Engineering Scaffold Prepared by New Technology. 1st World Congress on Regenerative Medicine. 口頭、2003年10月22～24日、ライプチヒ。
- 36) 藤里俊哉、西岡 宏、沼田 智、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎。生体弁の脱細胞化とin vitroでのレシピエント自己細胞化。第39回日本移植学会総会、口頭、2003年10月26～28日、大阪。
- 37) 藤里俊哉、岸田晶夫、菅 理晴、船本誠一、西岡 宏、吉田謙一、鎌田和加子、山東奈津子、木村 剛、宮崎幸造、古籾 勉、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎。再生医療用 scaffoldのための新規技術による種々の生体組織の脱細胞化。第41回日本人工臓器学会大会、口頭 (オリジナル賞候補)、2003年10月30日～11月1日、仙台。
- 38) 藤里俊哉、鎌田和加子、山東奈津子、吉田謙一、西岡 宏、船本誠一、庭屋和夫、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎。再生医療用生体 scaffoldのin vitro自己細胞化。第41回日本人工臓器学会大会、口頭、2003年10月30日～11月1日、仙台。
- 39) 田中咲子、馬越純子、三好和陸、森崎隆幸、吉田光敏。体外で作出したブタ胚への外来遺伝子導入に関する研究。第54回西日本畜産学会。2003年10月30日～11月1日、沖縄。
- 40) 宮崎 直、田中咲子、遊木靖人、三好和陸、吉田光敏。ブタ性成熟雌由来卵子の細胞質内物質を注入した未性成熟雌由来卵子における単為発生能の改善。第54回西日本畜産学会。2003年10月30日～11月1日、沖縄。
- 41) Kawaguchi A, Kishida A, Yamaoka T, Satoh M. Static Cardiomyoplasty Suppresses Left Ventricular Dilatation and Dysfunction Early and Late After Myocardial Infarction in the Rat. 5th International Symposium on Less Invasive Volume Reduction Procedures. 口頭、2003年11月22日、東京。
- 42) Fujisato T, Nishioka H, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. In Vitro Vascular Cell Seeding and Expansion of Decellularized Valve Scaffold. 6th International Meeting of the Tissue

- Engineering Society international、口頭、2003年12月10～13日、オランダ。
- 43) 古籾 勉、安田昌司、田中順三、岸田晶夫. ナノスケールハイドロキシアパタイト単結晶体を固定化した無機・有機複合体の開発. 第25回日本バイオマテリアル学会大会、口頭、2003年12月16～17日、大阪。
- 44) 古籾 勉、安田昌司、岸田晶夫、Walsh D、佐藤公康、田中順三. 界面複合化を目的とした新規な多孔板状リン酸カルシウムの開発. 第25回日本バイオマテリアル学会大会、口頭、2003年12月16～17日、大阪。
- 45) 古籾 勉、安田昌司、田中順三、岸田晶夫. ナノスケールハイドロキシアパタイト単結晶体が自己集合した新規な球状微粒子の開発. 第25回日本バイオマテリアル学会大会、口頭、2003年12月16～17日、大阪。
- 46) 是松 新、古籾 勉、安田昌司、岸田晶夫. 新しい医用材料としての含フッ素アラミド共重合体の開発. 第25回日本バイオマテリアル学会大会、口頭、2003年12月16～17日、大阪。
- 47) 山東奈津子、西岡 宏、藤里俊哉、菅 理晴、庭屋和夫、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 動物実験によるバイオスキャフォールドの評価. 第25回日本バイオマテリアル学会大会、ポスター、2003年12月16～17日、大阪。
- 48) 吉田謙一、西岡 宏、藤里俊哉、菅 理晴、庭屋和夫、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. バイオスキャフォールドのin vitro再細胞化. 第25回日本バイオマテリアル学会大会、ポスター、2003年12月16～17日、大阪。
- 49) 鎌田和加子、西岡 宏、藤里俊哉、菅 理晴、庭屋和夫、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体組織の脱細胞によるバイオスキャフォールドの作製. 第25回日本バイオマテリアル学会大会、ポスター、2003年12月16～17日、大阪。
- 50) 藤里俊哉、西岡 宏、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高圧処理による安全な生体スキャフォールドの開発とそのレシピエント細胞化. 第16回バイオエンジニアリング講演会、口頭、2004年1月22～23日、北九州。
- 51) 西岡 宏、鎌田和加子、船本誠一、藤里俊哉、湊谷謙司、庭屋和夫、菅 理晴、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. テーラーメイド型組織移植のための安全な生体スキャフォールドの開発. 第3回日本再生医療学会大会、ポスター、2004年3月23～25日、千葉。
- 52) 吉田謙一、山東奈津子、船本誠一、藤里俊哉、湊谷謙司、庭屋和夫、菅 理晴、岸田晶夫、森反俊幸、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体スキャフォールドへのレシピエント細胞の播種と移植による評価. 第3回日本再生医療学会大会、ポスター、2004年3月23～25日、千葉。
- 53) 宮崎 直、吉田光敏、三好和睦. 成熟雌ブタ卵子に由来する胚発生能促進因子に関する研究. 日本畜産学会第103回大会. 口頭、2004年3月29～31日、東京。
- 54) 峰 尚美・糸井史陽・宮村元晴・浜野晴三・村山嘉延・尾股定夫・吉田光敏. 体外成熟・体外受精・体外発生に伴うウシ卵透明帯の硬度変化について. 日本畜産学会第103回大会. 口頭、2004年3月29～31日、東京。
- 55) 日高知保、吉田光敏. PCRチューブを用いたブタ卵子の体外成熟・体外受精について. 日本畜産学会第103回大会. 口頭、2004年3月29～31日、東京。
- 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. PCT/JP03/11529、2003年9月9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. PCT/JP2003/015914、2003年12月11日。
- 3) 藤里俊哉、岸田晶夫、北村惣一郎. 生体組織への細胞注入方法および装置. 特許出願2003-191778. 2003年7月4日。
- 4) 藤里俊哉、小越拓郎、菅 裕介、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 立体表面への均一な細胞播種装置及び方法. 特許出願2003-294766. 2003年8月19日。

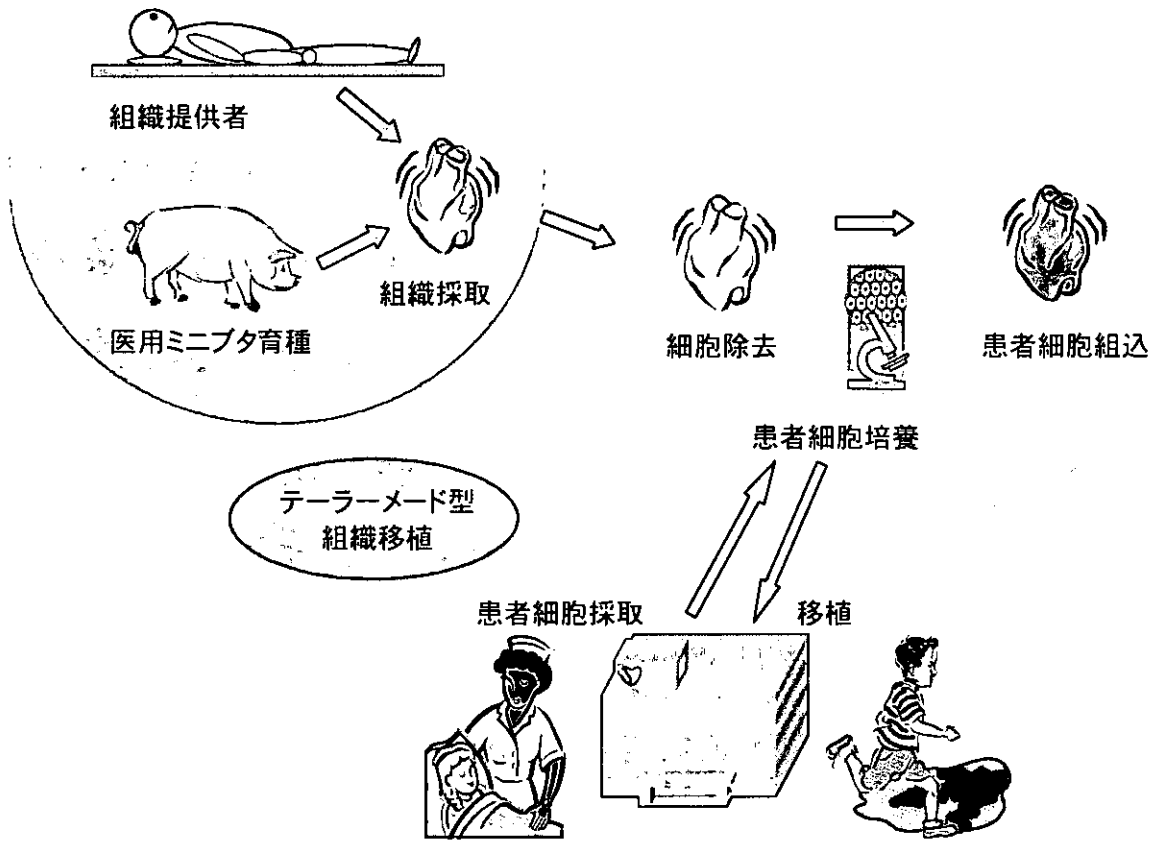


図1. テラーメード型組織移植

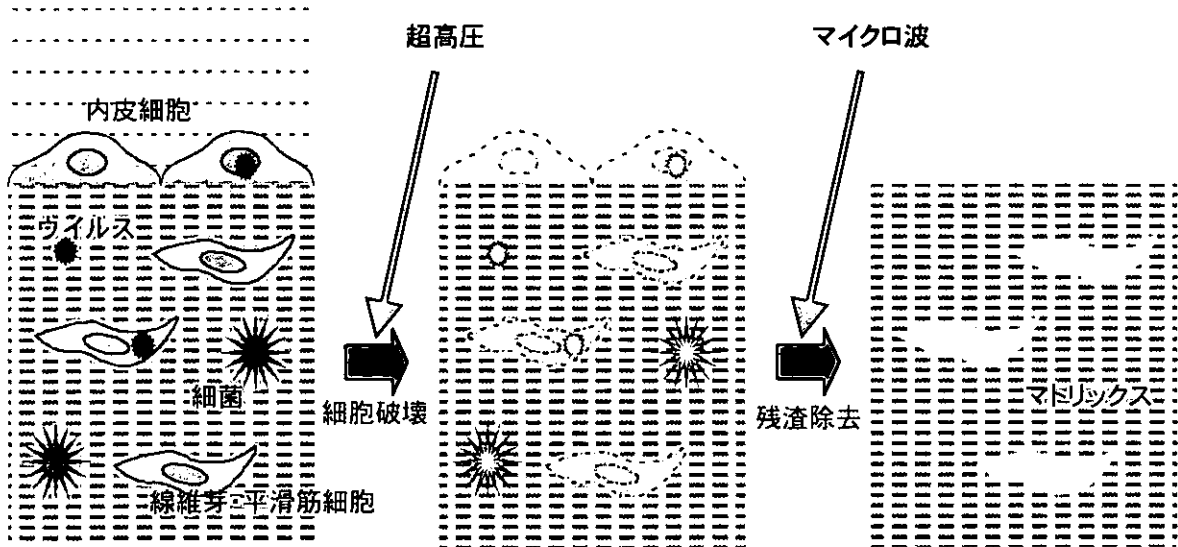


図2. 我々が開発した超高静水圧印加及びマイクロ波照射下洗浄による脱細胞化

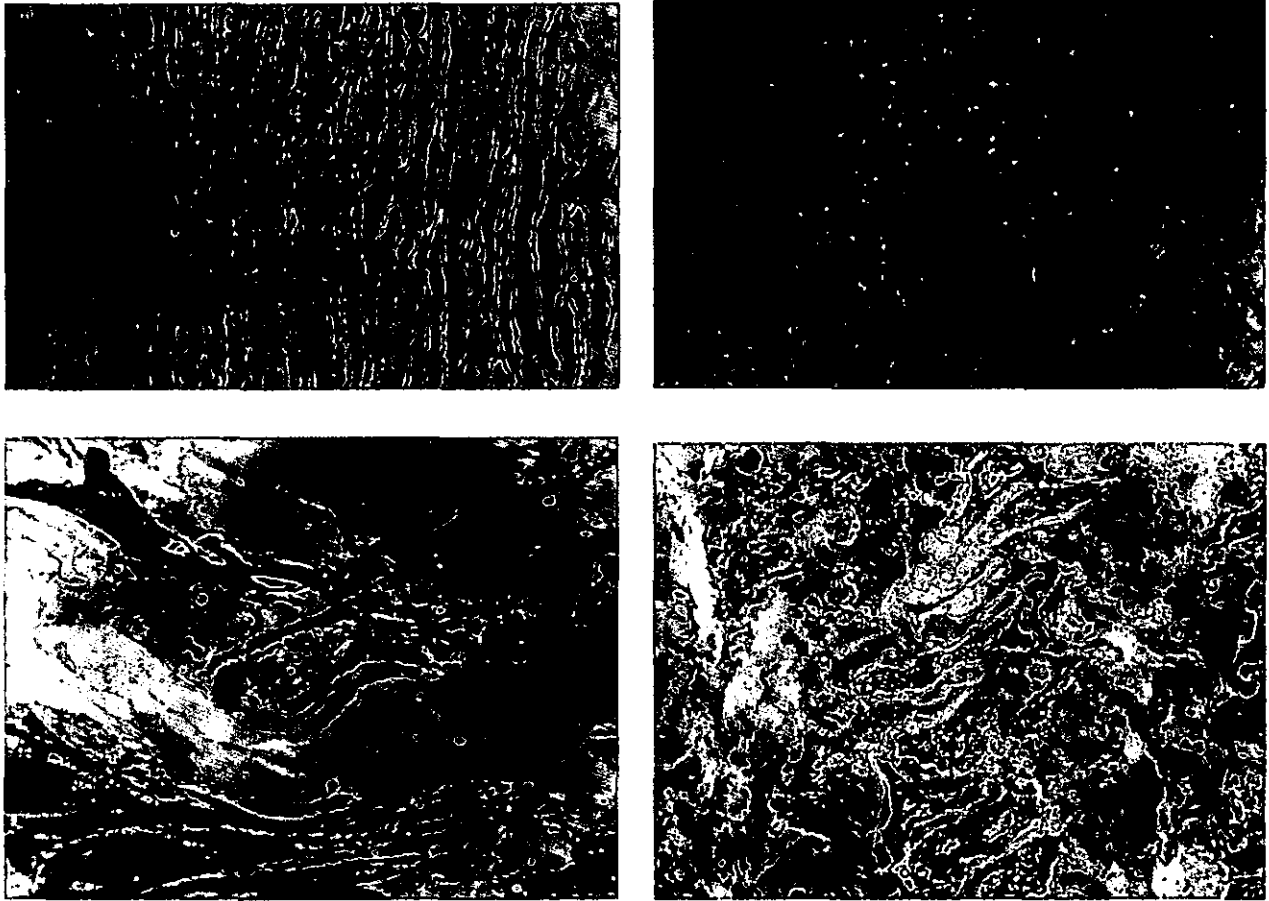


図3. ミニブタ組織の脱細胞処理（上：トルイジンブルー染色、下：透過電子顕微鏡、左：コントロール、右：脱細胞化処理後）

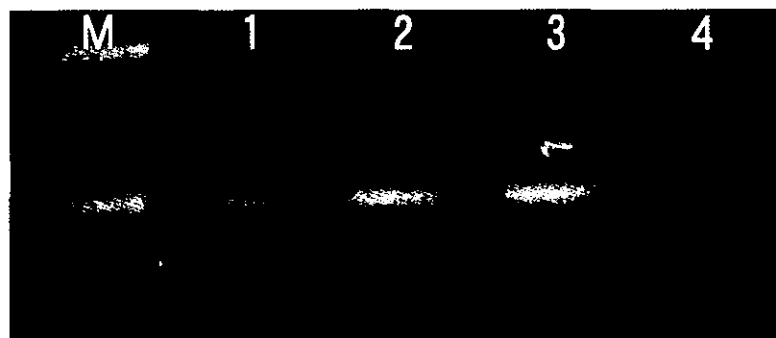


図4. ミニブタ血管組織内のブタ内在性レトロウイルスのPCR産物（M：マーカ、1：コントロール、2：トリトンX-100による脱細胞化、3：トリトンX-100による脱細胞化後洗浄、4：超高静水圧による脱細胞化）

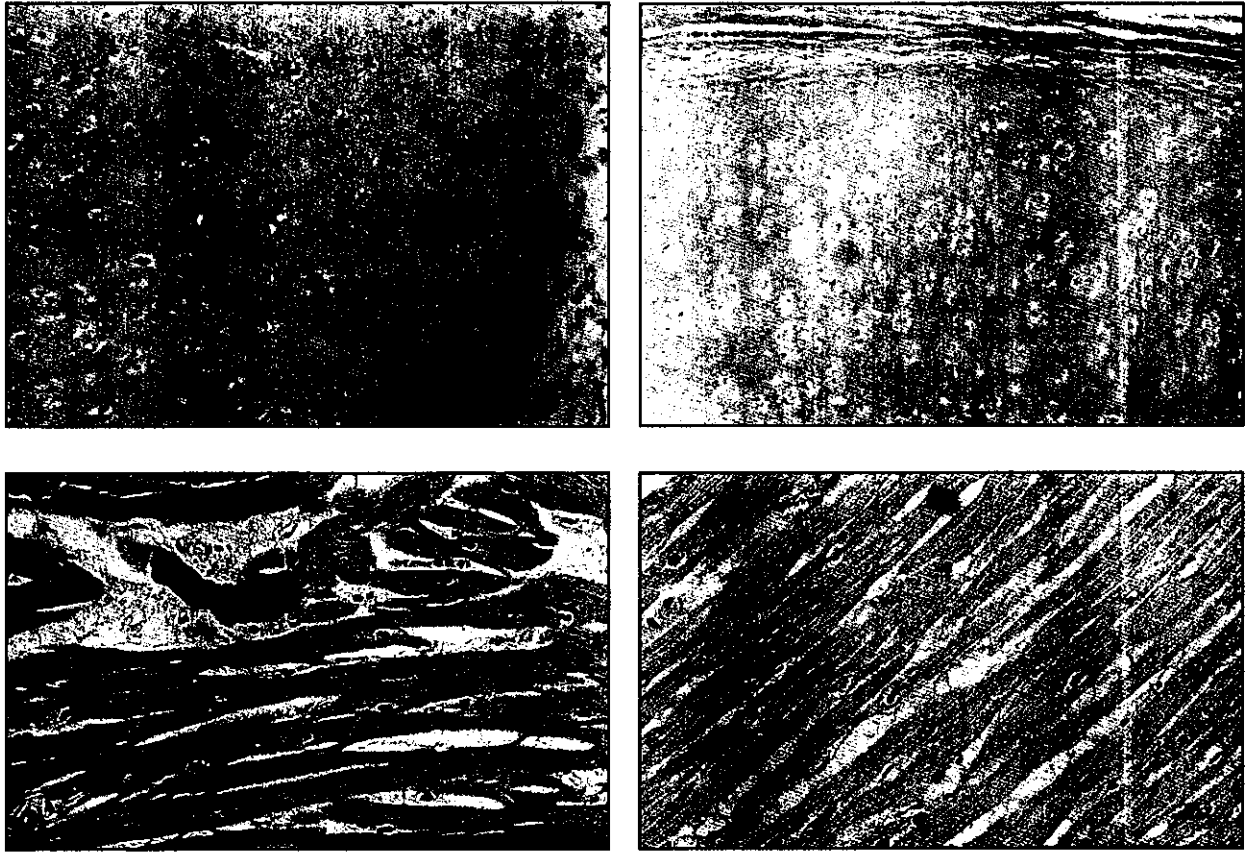


図5. ミニブタ組織の脱細胞処理（上：気管、下：心筋、左：コントロール、右：脱細胞化処理後）

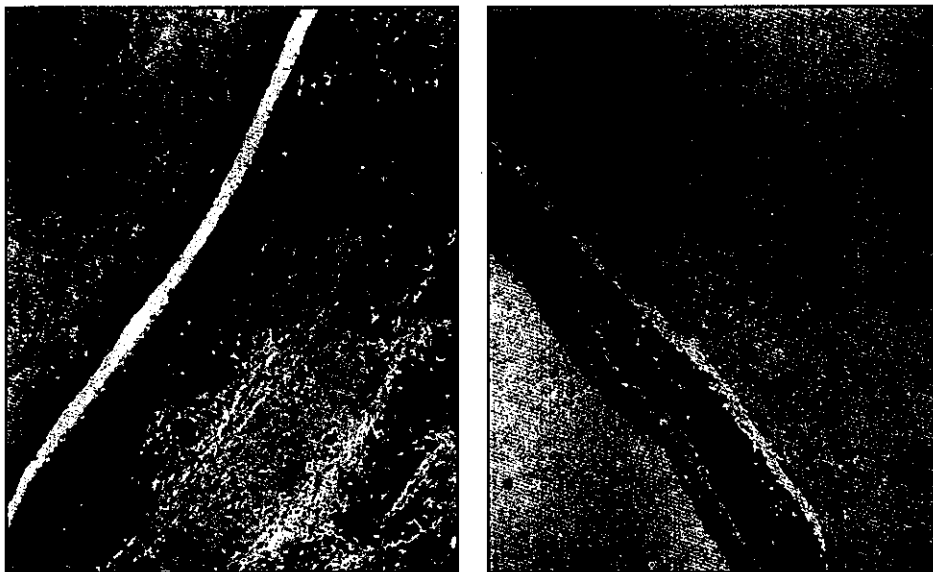


図6. ラット皮下に1週間移植した脱細胞化ミニブタ血管組織断面（左：非脱細胞化組織、右：脱細胞化組織）

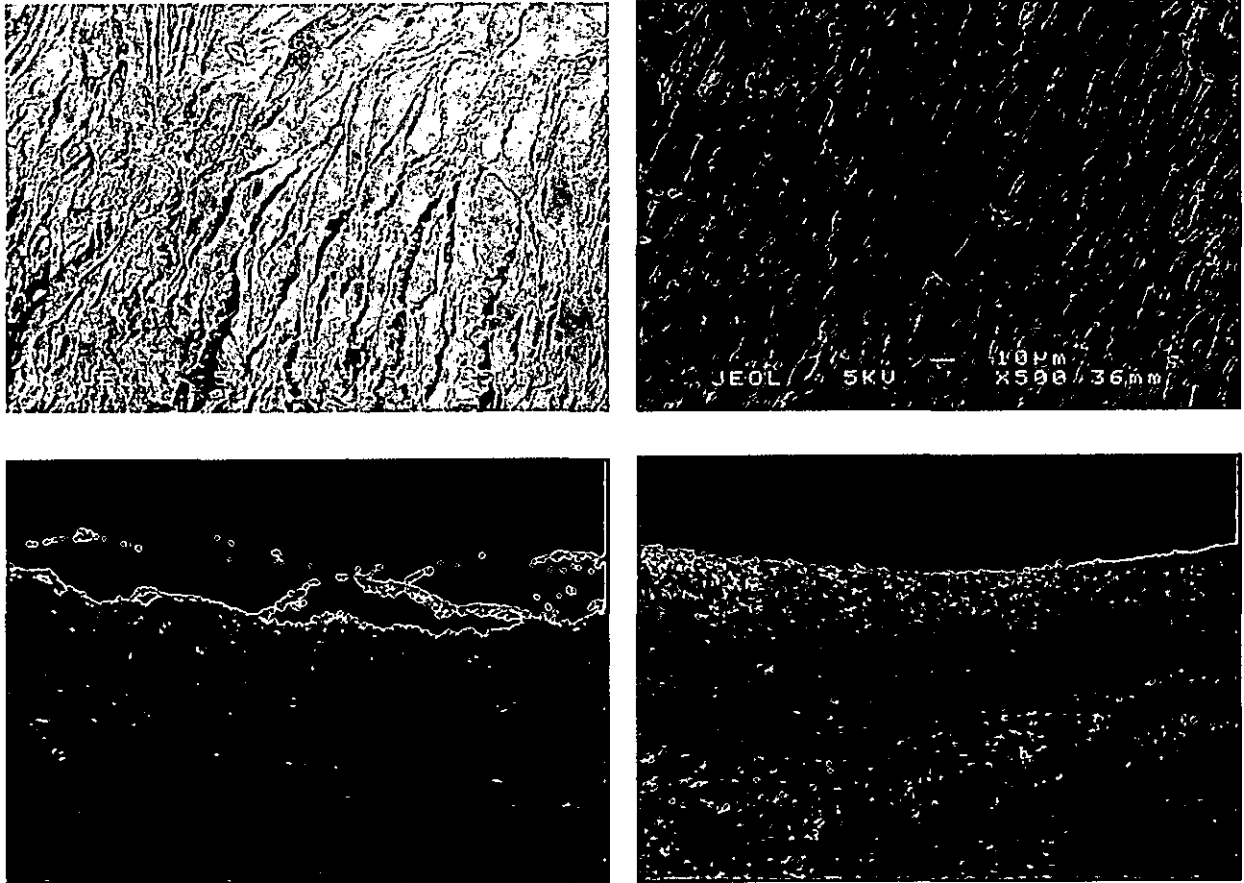


図7. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化ミニブタ大動脈導管部（左：移植1ヶ月、右：移植3ヶ月、下図中のスケールバーは100  $\mu$  m)

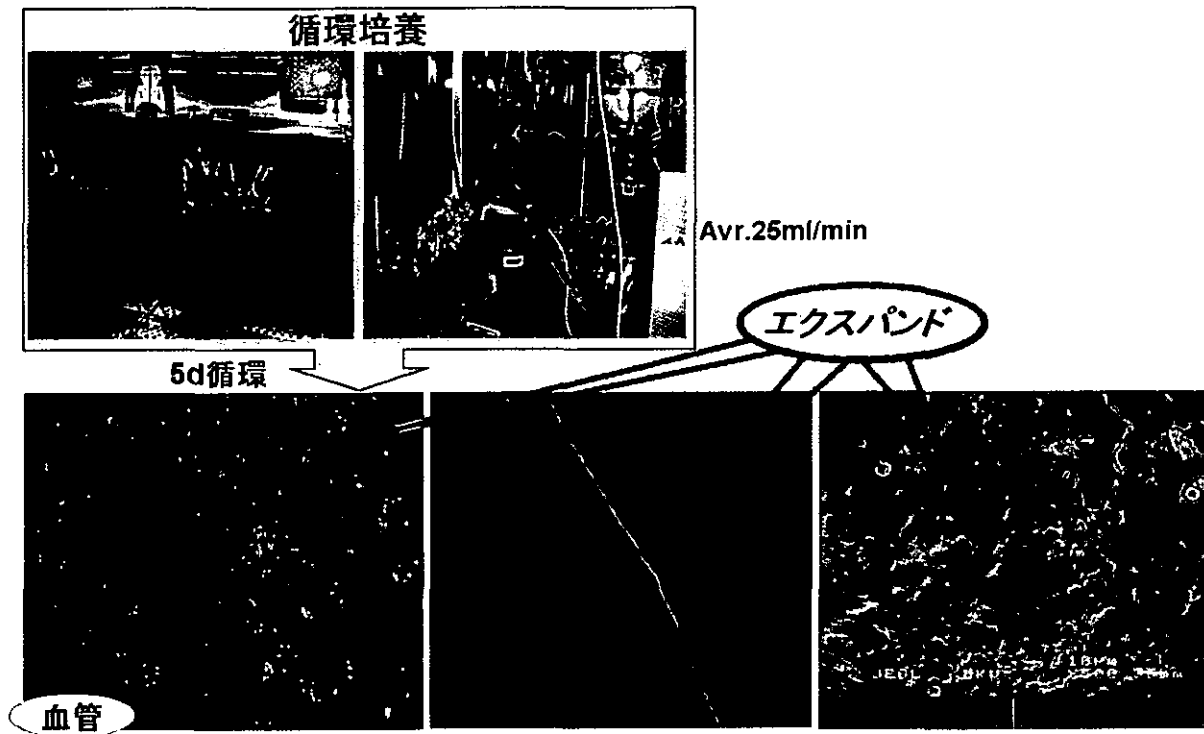


図8. 血管内皮細胞播種後の循環培養と培養5日後の内腔面





図9. コラーゲンゲルを用いた細胞注入と培養後3日後の組織内部

表1. ミニブタにおける外因性微生物モニタリング

検査項目	検査頭数	陽性個体数 (%)
オーエスキー病	41	0 (0)
ブタ繁殖・呼吸障害症候群	41	0 (0)
ブタ流行性下痢症	11	0 (0)
ブタ胸膜肺炎	41	26 (63.4)
マイコプラズマ性肺炎	41	31 (75.6)



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

再生医療型心臓弁の評価

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター臓器移植部長

**研究要旨** 新規に開発した超高静水圧印加及びマイクロ波照射下洗浄による脱細胞化方法を用いた移植用生体組織の開発研究として、異種移植による生体適合性評価、および種々の生体組織の脱細胞化について検討した。脱細胞化組織は高い生体適合性を有し、本技術の広範な応用可能性が確認できた。脱細胞化異種生体組織を用いた新しい心臓弁作製と、その応用に期待できる。

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足場（スキャフォールド）が欠かせない。現在、スキャフォールド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。我々は、生体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スキャフォールドとして利用する新しい技術を開発した。本研究では、本技術で作製した脱細胞化ブタ心臓弁の臨床応用を目的とした研究の一環として、異種組織反応の検討を行うための基礎的な検討を行った。

本技術では、組織内の細胞を完全に破壊し、構造マトリックスのみからなるスキャフォールドを得ることができる。従来の異種組織移植や異種臓器移植と比較して、抗原となる細胞が存在しないため大幅な抗原性の減弱が期待できる。一方、破壊された細胞の残渣の存在を確認することは、現在の分析技術では不可能であるため、脱細胞化組織の機能評価のためには、異種動物を用いた検討が必要である。このために、ここでは脱細胞化ブタ組織を異種動物であるラットに埋植し、その組織反応について検討を行った。また、詳細な抗原性の検討のためのモデル組織の探索のために、

種々のブタ組織の脱細胞化について検討を行った。

B. 研究方法

**脱細胞化処理**: クラウン系ミニブタを犠牲死させ、清潔下にて各臓器・組織を摘出した。心臓摘出時における温阻血時間は20分以下とした。各組織を生理食塩水で洗浄後、適当な大きさに分割し、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。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染色により顕微鏡観察した。

**ラット埋植試験**: 採取したミニブタ大動脈及び脱細胞化処理したミニブタ大動脈を1cm×1cmにカットし、ラット皮下にそれぞれ埋植した。経時的に取り出し、組織染色を行い顕微鏡観察した。（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

**異種組織移植評価**: ミニブタ大動脈の細切片を

ラット皮下に埋植し、1及び4週間後に取り出して観察した。1週間後の所見を図1に示す。図より、1週間後の組織反応について、コントロールである脱細胞化処理を行っていない元の組織では周辺に大量の炎症細胞が観察されたが、脱細胞化組織周辺では炎症も程度も軽く、重篤な反応は見られなかった。また、脱細胞化組織内に浸潤細胞像が観察されたことから、一般的な脱細胞化組織によく観察される界面活性剤残渣による毒性もないことがわかった。また、4週間後の組織反応を同様に観察すると、コントロールでは巨核球の存在が観察され、また炎症が継続していることがわかった。一方、脱細胞化組織の場合には組織内への細胞の浸潤が進行し、組織と生体との界面が不明瞭になっていた。

**種々の組織の脱細胞化処理:** 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いものの、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、これはトリトンX-100溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた。ここで検討する組織は、心筋、肺など塊状のものもあり、トリトンX-100処理では深内部の脱細胞化は非常に困難であると予想され、超高压処理の有効性が実証されることが期待される。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の心臓弁の脱細胞化条件を適用し、肺、肝臓、心筋などの組織の脱細胞化を行った。その結果、肺(図2)、肝臓(図3)、腎臓などの毛細血管の発達した組織、あるいは心膜、心臓弁、大動脈(図4)において、高い脱細胞化が達成できた。これらの組織は、異種動物に移植しても、宿主細胞の早期の浸潤が期待でき、生体適合性評価に相当と考えられた。一方、心筋(図5)と皮膚については、完全な脱細胞化が困難であり、生体適合性評価に用いるためには条件の最適化が必要であった。超高压処理による脱細胞化では物性の変化は見られず、繊維性組織の構造が保存されていると考えられた。

#### D. 考察

異種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

すと考えられる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明らかになり、これを解決するために、新たに超高静水圧印加及びマイクロ波照射処理による脱細胞化技術を開発した。脱細胞化後の組織の生体適合性について評価を行うために、ミニプタからラットへの異種組織移植のモデル実験を行った。その結果、我々が開発した脱細胞化技術でドナー由来細胞を除去すると、炎症反応が抑制され、宿主細胞の早期の浸潤・組織再構築が進行することが明らかとなった。

また、免疫反応の解析や処理技術の確立のために、他の生体組織の脱細胞化について検討した。高い脱細胞化が可能であった組織は毛細血管網が存在する、あるいは体積あたりの表面積の比較的大きいものであった。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い。従来法である、界面活性剤等の洗浄剤を用いた方法と比較して、上記の原理より組織内の細胞等に組織の内外差なく処理することが可能であった。本技術によって、心臓弁のみならず、異種組織全体を脱細胞化処理することで、ドナー不足等の問題を解決した、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によって調製した組織の生体適合性を評価した。また、種々の生体組織からの脱細胞化についても適応が可能であった。本方法では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。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