

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 中谷武嗣、北村惣一郎. 日本の心臓移植の現況. *移植*, 38 (4), 253-7, 2003.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 中谷武嗣. レーザー心筋内血行再建術. *内科*, 91 (6), 1190, 2003.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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,
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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、古藺 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.

- 22) 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.
- 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. 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) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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. テーラメ

- 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.
- 14) 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.
 - 15) 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、ライブチヒ.
 - 16) 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、ライブチヒ.
 - 17) 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.
 - 18) 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. 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 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、口頭、2004年1月22～23日、北九州.
 - 25) 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.
 - 26) 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.

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.

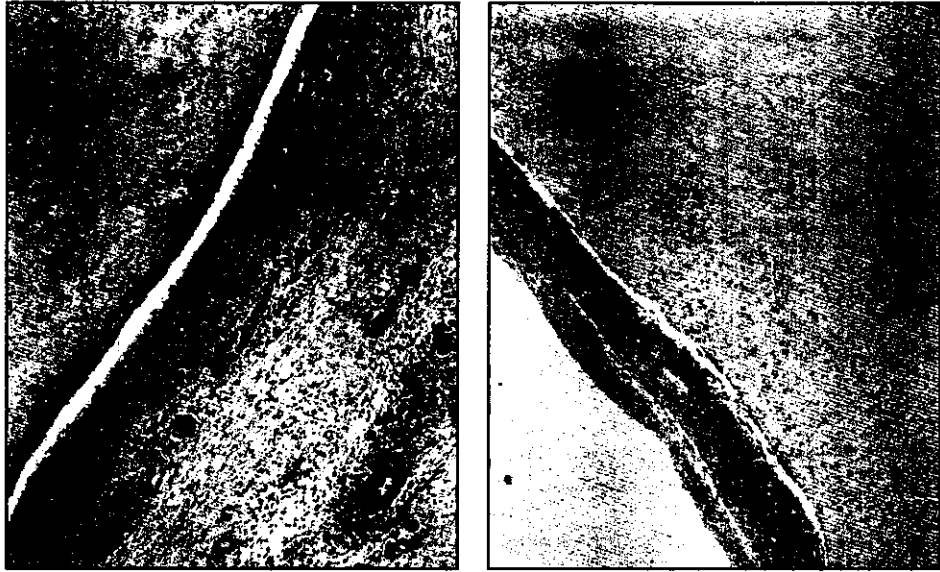


図1. 脱細胞化ミニプタ血管組織をラット皮下に埋植後1週間後の組織切片図。(左:脱細胞化組織、右:コントロールの非脱細胞化ミニプタ血管組織)

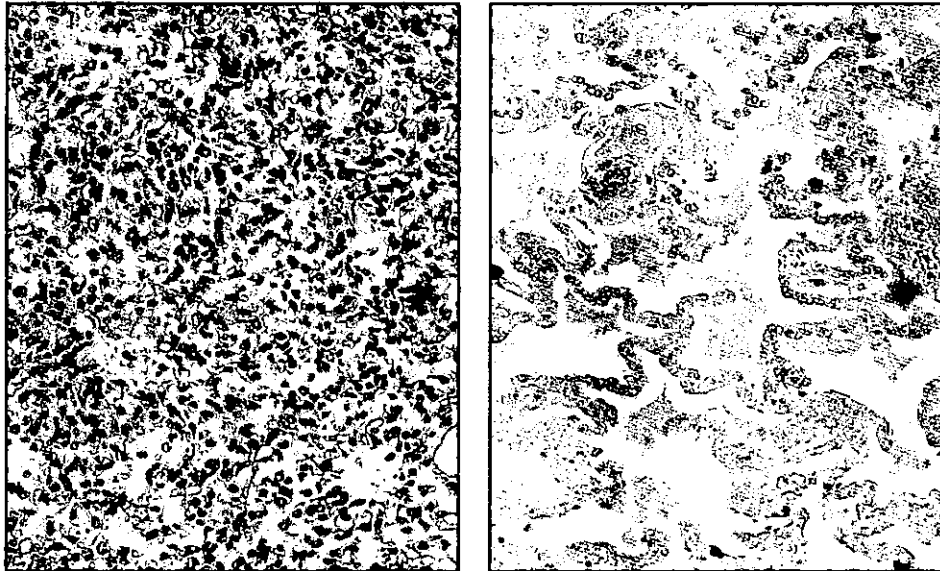


図2. ミニプタ肺の脱細胞処理の結果 (左:コントロール、右:脱細胞化処理後:400倍)

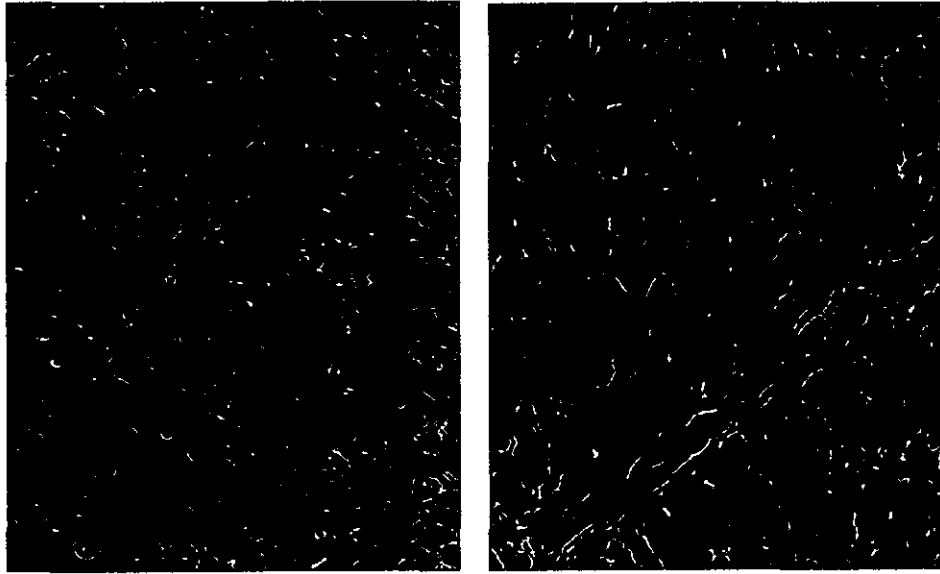


図3. ミニブタ肝臓の脱細胞処理の結果（左：コントロール、右：脱細胞化処理後：400倍）

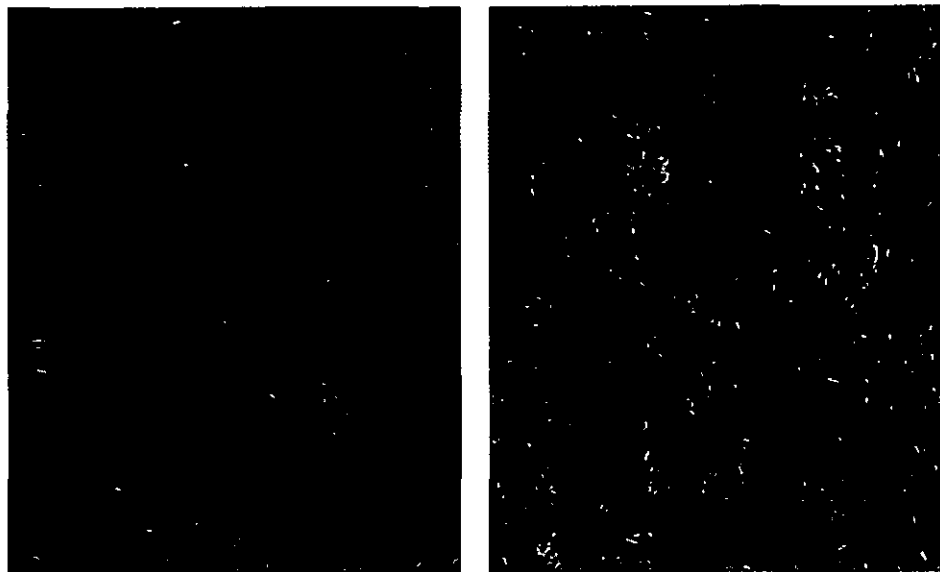


図4. ミニブタ大動脈の脱細胞処理の結果（左：コントロール、右：脱細胞化処理後：400倍）

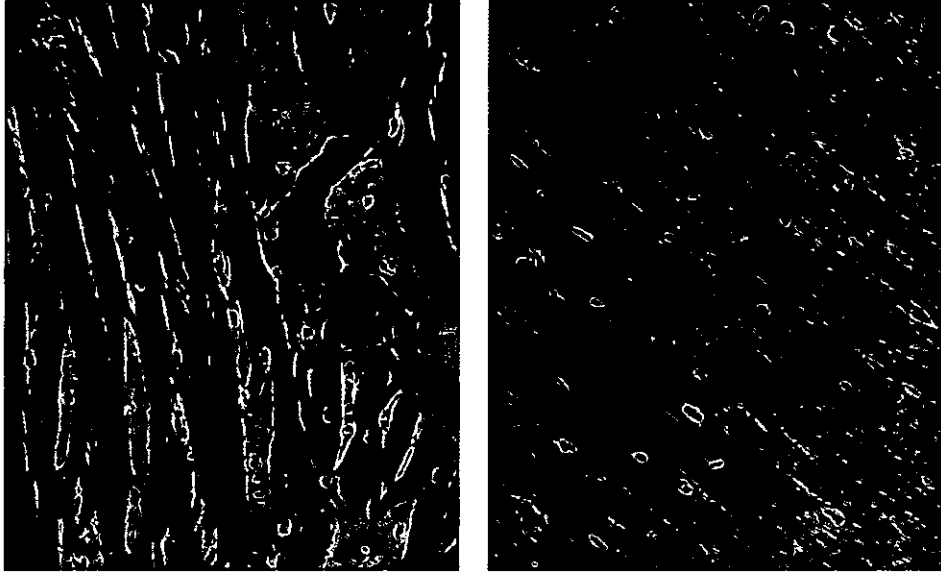


図5. ミニプタ心筋の脱細胞処理の結果（左：コントロール、右：脱細胞化処理後：400倍）

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

再生医療型心臓弁への細胞播種

分担研究者 岸田晶夫 国立循環器病センター生体工学部長

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による新規な脱細胞化方法を用いた移植用生体組織への細胞移植法について、新たな装置の開発および素材の開発により検討を行った。清潔環境下で細胞を播種・培養するための新しいバイオリアクターを試作し、また脱細胞化組織内部への細胞移植のための注入装置および補助材料の合成を検討した。

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。

一方、早期の組織再生を実現するためには、スキャフォールドの消失とともに重要な点は、組織再生を担当する細胞の進入と組織再構築および機能発現である。心臓弁については、それぞれの部分、例えば弁葉、弁基部、血管部などについて、再構築される組織が異なり、さらに再構築を担当する細胞種も異なることが考えられる。弁葉は非常に薄く（>1 mm以下厚）柔らかい組織であるが、詳細に観察すると、内部には線維芽細胞、平滑筋様細胞、表面には内皮細胞がそれぞれ部位特異的に存在している。また、心臓本体と接合する部分では心筋細胞と線維芽細胞が混在し、強固な結合を実現している。このような細胞の部位特異的配置は、再生した組織には一部確認されるものの、現時点での他の研究者の報告をみても、スキャフォールドの消失に伴う組織再生を担当する細胞

の由来については不明なものが多い。もし、埋め込んだスキャフォールドに異所性に細胞が存在した場合、正常な組織再生および機能発現が進行しないことも考えられる。

このような観点から、スキャフォールドにあらかじめ細胞を組み込んで移植する方法論が提案され、実際に組織再生について、効果があるとの報告もある。本研究では、我々が開発した新しいスキャフォールドへの細胞組み込み法について検討を行った。

細胞の組み込み法は、スキャフォールド表面への細胞播種と内部への細胞注入の2種に分類できる。また、組み込んだ細胞を生着させるために、*in vitro*で培養するバイオリアクターが必要となる。ポリ乳酸などの生分解性合成高分子で作製されたスキャフォールドと異なり、我々のスキャフォールドは生物組織の物性をそのまま保持しているため、細胞組み込み法には工夫が必要である。臨床応用を想定すると、人が実施することによる製品間の差異をなくすため、できるだけ自動化することを念頭に検討を行った。

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、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。

細胞播種試験：脱細胞化処理したミニブタ大動脈表面（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および媒体としてコラーゲングルおよび生分解性高分子の応用について検討を行った。

（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

脱細胞化組織表面への播種：まず、ミニブタ血管より内皮細胞を分離した。大腿動脈を採取し、洗浄後、内腔面にコラーゲナーゼ溶液を注入し、リンスすることによって血管内皮細胞を得た。約2週間の培養を行い、以下の実験に必要な細胞数を確保した（図1）。また、細胞播種およびバイオリクターによる組織構築をシステム化するために、クリーンブース（簡易無塵室）を用いた環境構築を行った（図2）。それ以前の検討では、細胞播種およびバイオリクターでの培養時に、感染が頻発したため、臨床応用を想定した環境整備の一貫として実施した。限られたクリーンブース内における一連の装置の配置および実験者（作業員）の動線について、将来のGMP基準設備設置のための基本データを得た。

細胞播種を実施するため脱細胞化ミニブタ大動脈を用いて、内腔面への血管内皮細胞の播種を試みた。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（図3）。播種する細胞密度は高くなるほど接着数は増加するが、用意

する細胞数の増加は、採取してから、播種および病変組織へのインプラントまでの時間が長くなり、生産性の観点からは最適値が存在することがわかった。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の低下を招くため、最適値の存在することがわかった。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ため、2軸回転装置を考案し作製した（図4）。知的所有権の関係で図4に詳細は示していないが、図中のようにXおよびYの2軸に対してそれぞれ同時に回転を行う。同様の装置は国内外でも考案され、一部市販されているものもあるが、ここで開発したものは、細胞播種に特化しており、簡便な操作で清潔度を保持したまま処理が行えることが特徴である。この2軸回転型装置を用いることで、心臓弁の弁葉にも均一に細胞を播種することができた。1軸回転の場合と同様に、細胞濃度、および回転速度には最適値が存在した。

細胞内部への細胞移植：心臓弁の基部や大動脈壁など、外部から早期の細胞の浸潤が困難と思われる箇所には、あらかじめ細胞を注入する方法論の開発が必要である。本研究では汎用ディスペンサ装置を用いて、実施者の個人差無く組織内部へ細胞を注入する方法を検討した。極微量注入（ナノリットルレベル）が可能で、さらに3次元位置制御機能が装備された汎用ディスペンサ装置をクリーンブース内に設置し、培養液に分散させた細胞を大動脈血管壁に注入し、条件設定を行った（図6）。その結果、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。これを改良するために、細胞浮遊液の粘性を変化させることを考案し、コラーゲングル作成用溶液に細胞を分散させて同様に注入を試みた。しかし、コラーゲン溶液では粘性が高すぎるために微量注入装置での定量的注入が困難であった。そのため、今回は手作業にて注入し、組織内への移植法としての検討の観点から評価を行った。注入後3日後に取り出し、組織切片を作製して観察したところ、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7）。今回の方法では、注入時の組織外部への細胞の漏出もほとんど起こらず、粘性を調節した分散液を用いることで定量的な注入

が可能であると考えられた。

D. 考察

脱細胞化組織の臨床応用を想定した場合、組織をそのまま移植する場合と、生体外で患者の自己細胞あるいは他者由来の幹細胞等を組み込んでから移植する場合が考えられる。循環器病領域では、血液に接触する組織への適用が中心となるため、抗血栓性の確保の意味から、血液接触面への血管内皮細胞の播種の必要性が高いと考えられる。また、循環器病患者については、治療能力が衰えている場合も多い。このため、移植組織が早期に機能を発揮するために、あらかじめ細胞を組み込んでおく必要性がでてくる。本研究では、脱細胞化組織の高機能化の一環として、生体外での細胞組み込みについて検討を行い、1軸回転細胞播種、2軸回転細胞播種、および循環培養装置（バイオリアクター）の試作を行った。ここで開発した装置は、簡便で取り扱いが容易であり、条件を最適化することによって、高い細胞播種率を達成することができた。長期のバイオリアクターでの培養によって、細胞を播種した脱細胞化組織の機能に差異があるかについては、現在検討中であるが、血管内皮細胞については、比較的安定に組み込むことができ、臨床への応用にも耐えうる性能を有していることが期待できる。

また、組織表面だけでなく細胞内部への細胞組み込み法として、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。細胞分散液の粘性の調節が重要であることが明らかになった。今回の検討ではコラーゲン溶液を使用したのが、コラーゲン溶液は通常、pHが強酸性であり、使用時に中性に調製する必要がある。しかし、一端pHを中性にするとコラーゲン溶液はゲル化を開始するため、安定な粘性を得ることが困難である。このような点を克服できる人工材料を探索したが、現時点で要求を満たすものは存在していない。そのため、従来の生分解性高分子を改質した細胞送達のための新しい高分子材料の合成も本研究の目的完遂のための目標となる。合成のアイデアについては図8に示すように、非常に物性が硬い生分解性材料であるポリ乳酸に長鎖アルキル鎖を有する第2成分を導入することで、固体ではなく粘性が高くかつ分解性を制御できる材料の開発が可能であると考えられる。

E. 結論

超高静水圧印加及びマイクロ波照射による新規な方法によって調製した脱細胞化組織への細胞移植法について検討を行った。細胞播種装置および培養装置（バイオリアクター）を作製し、均一な細胞播種の条件を決定した。また、組織内部への細胞注入法について検討し、細胞分散液の粘性の設定が重要な因子であることを見出した。新しい細胞播種用の材料の物性について提案を行った。これらを総合し、定量的および位置特異的に細胞を播種する方法論の開発について重要な知見を得た。

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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Furuzono T, Kishida A, Tanaka J. Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite I. Coating of sintered

- hydroxyapatite particles on poly(γ -methacryloxypropyl trimethoxysilane)-grafted silk fibroin fibers through chemical bonding. *J Mater Sci Mater Med*, 14, 1-5, 2003.
- 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 岸田晶夫. ESCAの測定法と接着. 接着の技術. 23 (2), 21-5, 2003.
 - 12) Kishida A. A site-specific polymeric drug carrier for renal disease treatment. *Trends in Pharmaceutical Science*. 24 (12), 611-3, 2003.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 松崎典弥、芹澤 武、岸田晶夫、明石 満. スルホン化ポリ(γ-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.
 - 7) 古菌 勉、是松 新、岸田晶夫. アミノ酸化化チタンナノ粒子・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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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メイド型心臓弁移植. 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.

- 19) 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. テーラメ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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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. 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.
- 33) 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.
- 24) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 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.

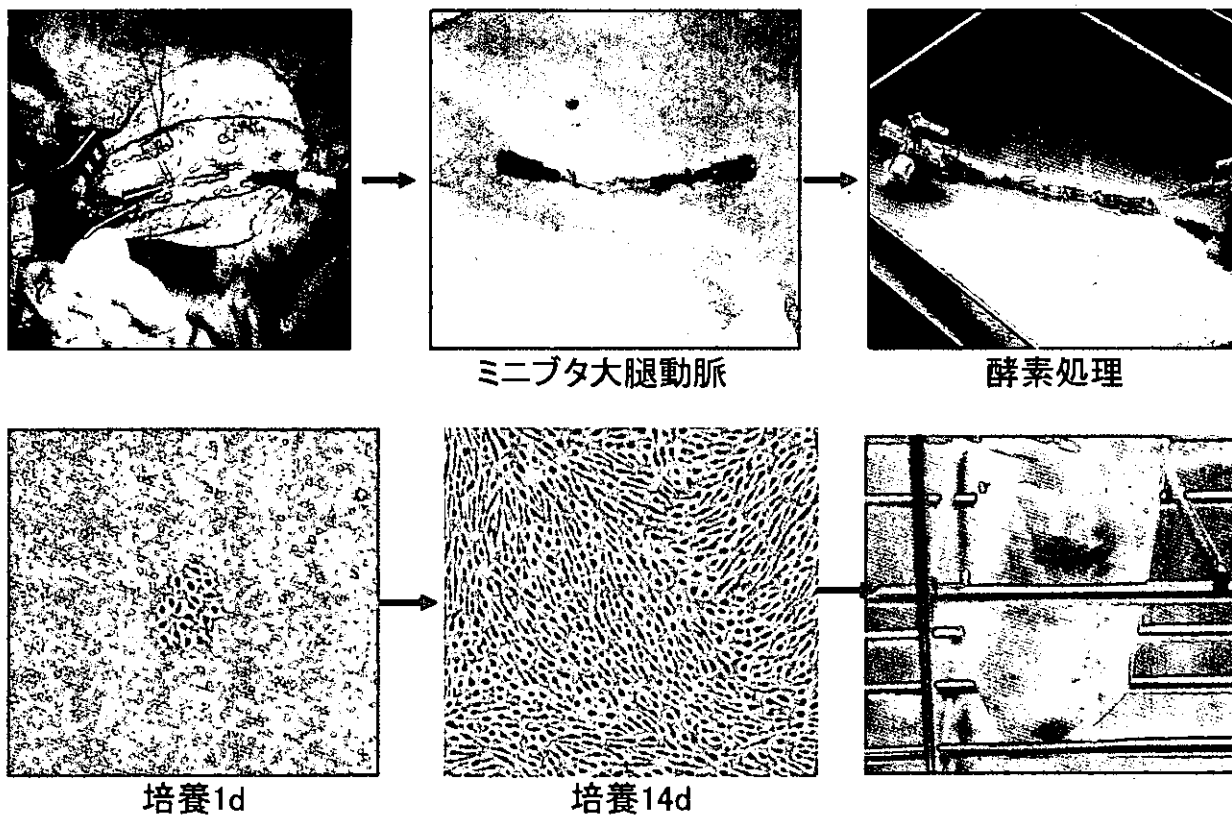


図1. ミニプタ血管組織からの血管内皮細胞採取および静置播種法

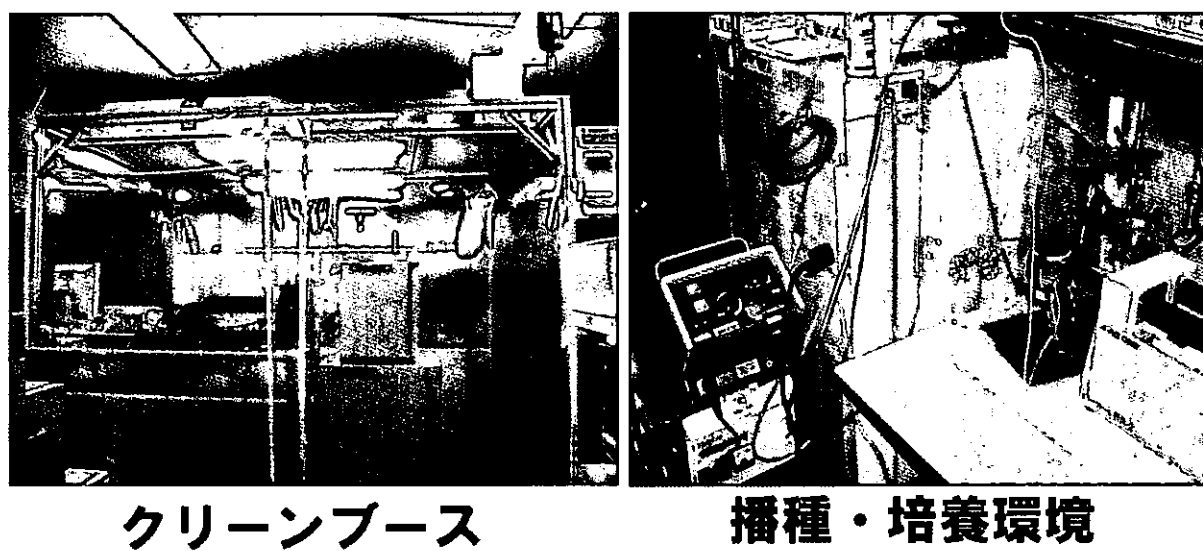


図2. 細胞播種施設概観

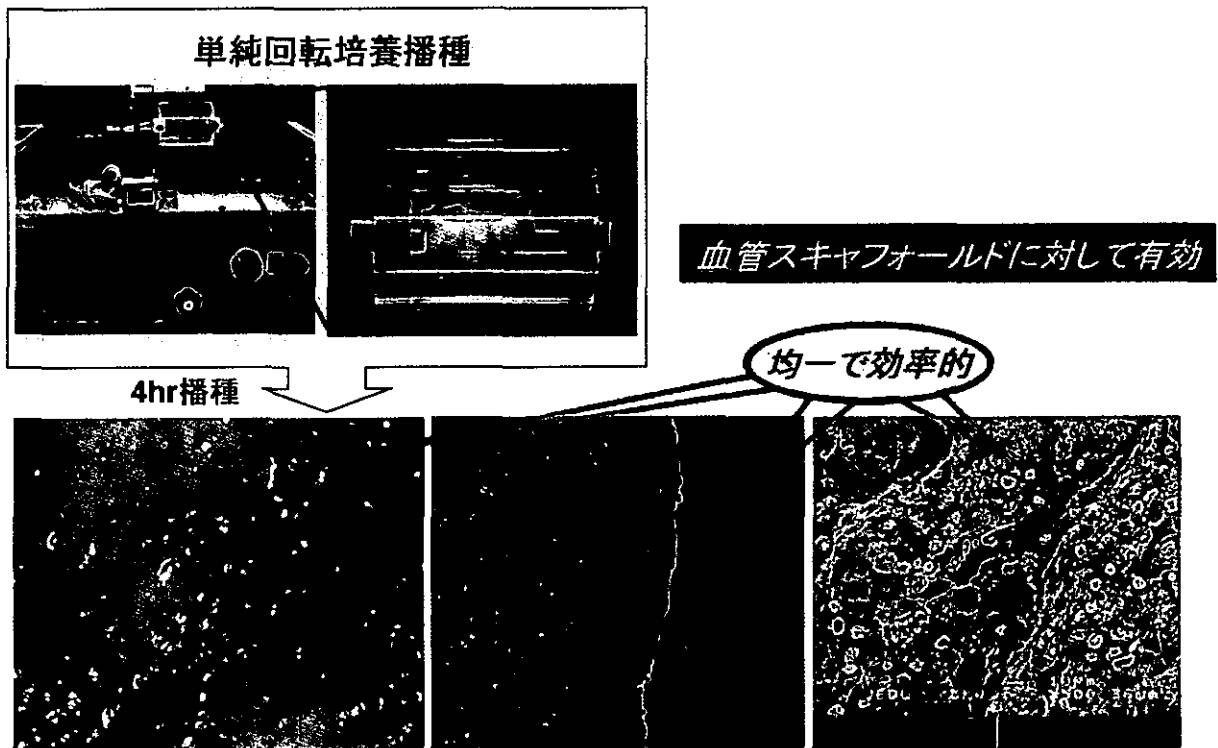


図3. 脱細胞化血管への単純回転培養播種法

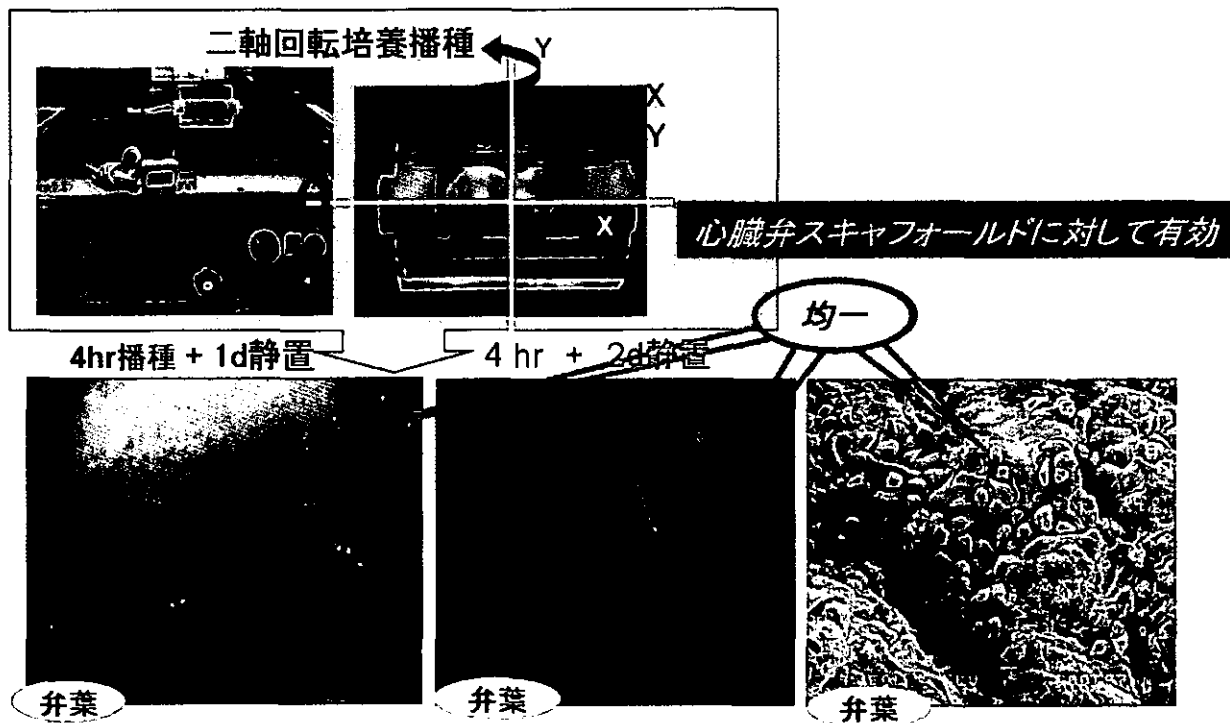


図4. 脱細胞化血管への二軸回転培養播種法

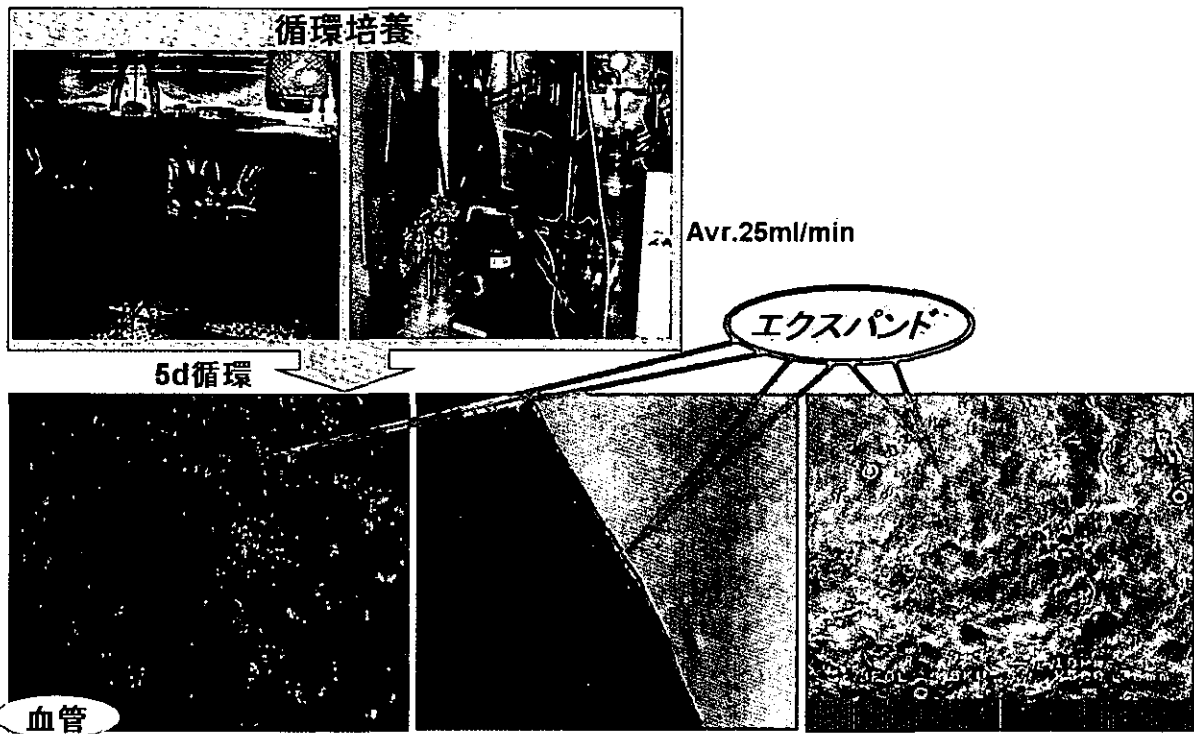


図5. 細胞播種後の循環培養設備と培養5日後の結果

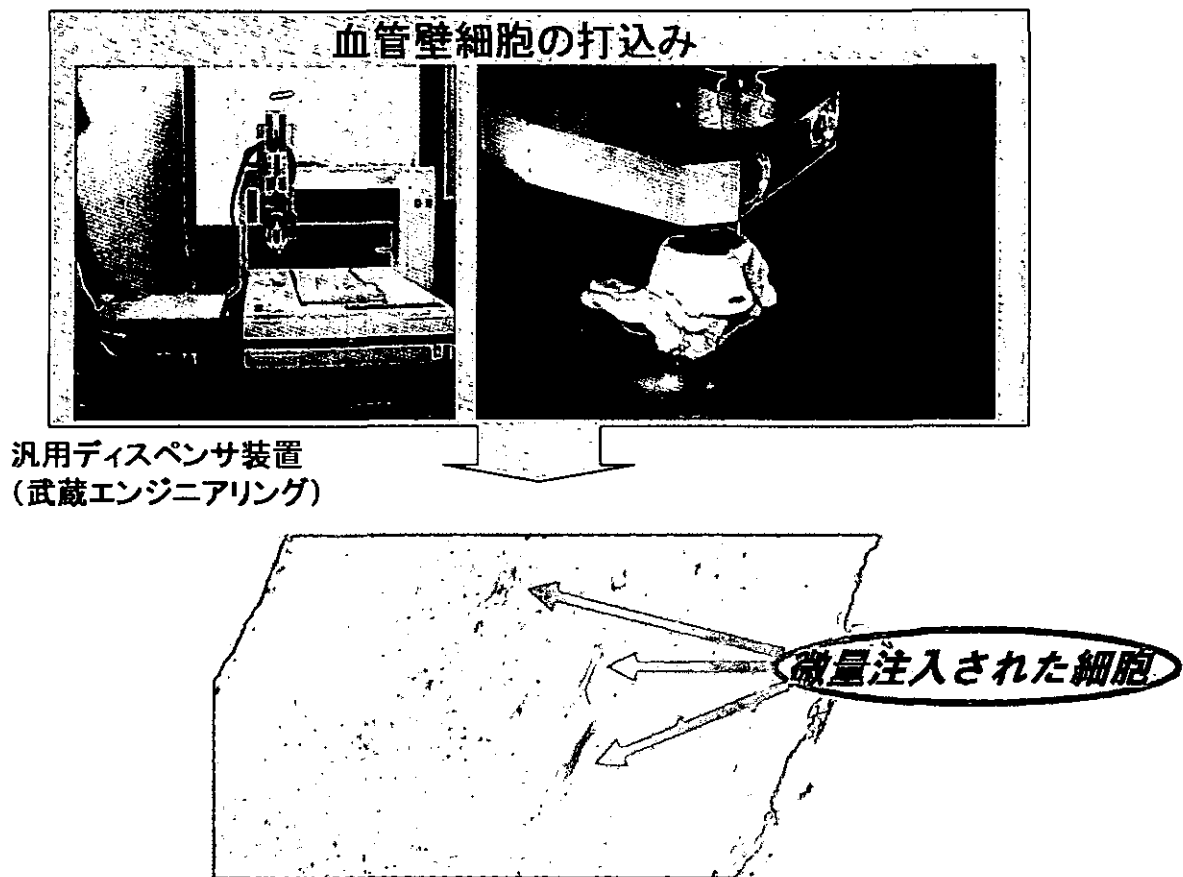


図6. 脱細胞化組織内部への細胞注入システム

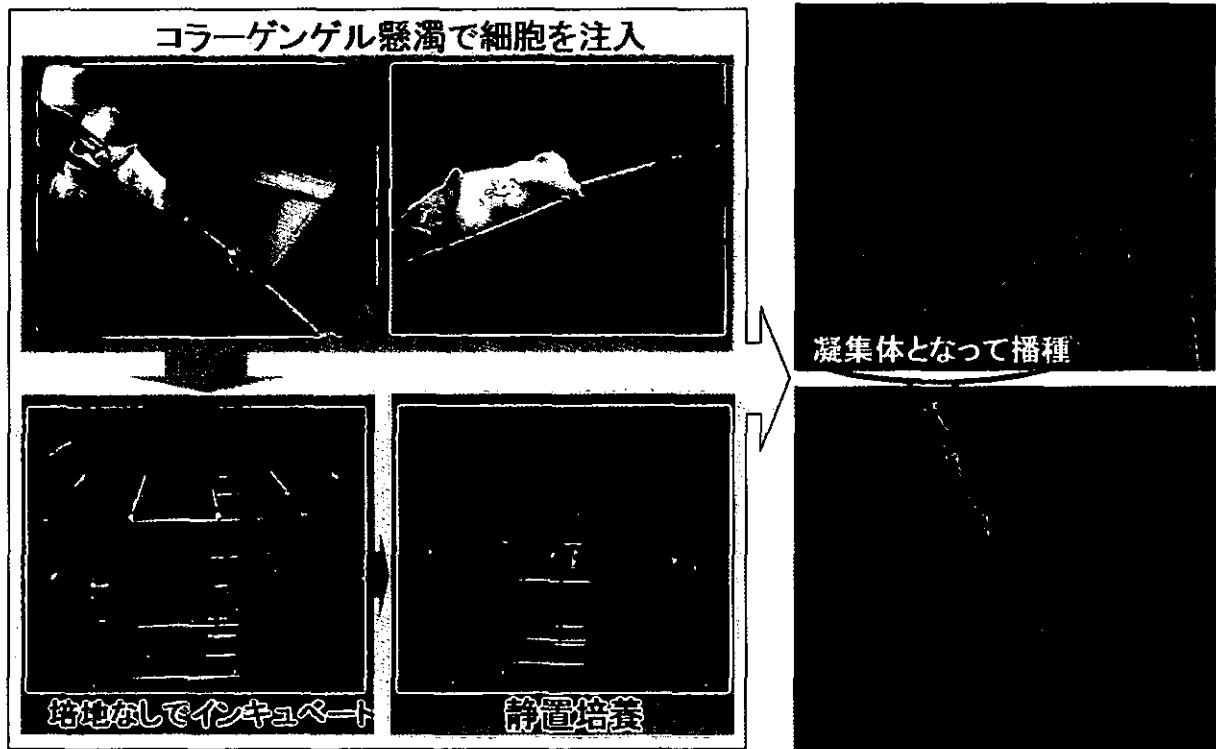
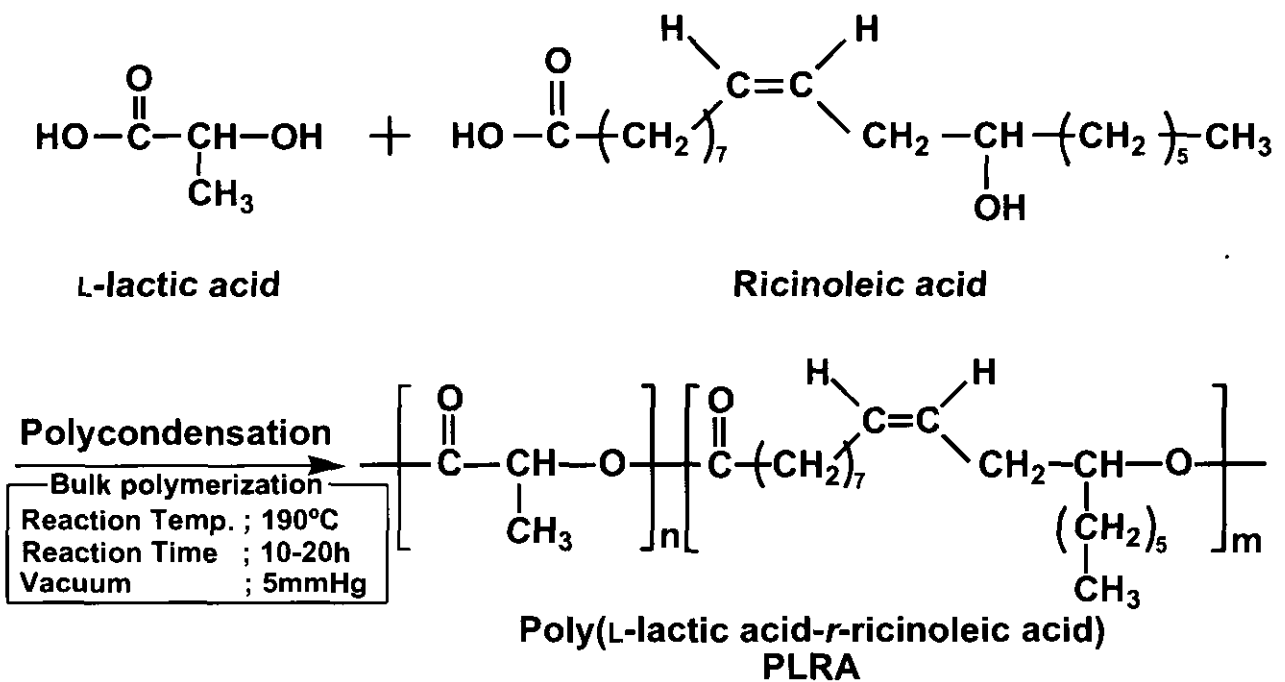


図7 コラーゲンゲルを用いた細胞注入法と培養後3日後の結果



Scheme 1. Synthesis of Poly(L-lactic acid-*r*-ricinoleic acid).

図8 細胞移植マトリクス用の新しい生分解性材料のコンセプト図