

再生医療型心臓弁の動物実験

分担研究者 庭屋和夫 国立循環器病センター心臓血管外科医師

研究要旨 超高圧処理によって無細胞化したミニブタ大動脈弁導管部を同種ミニブタの下行大動脈に置換移植した。移植された大動脈導管には破断等の異常所見は認められなかった。組織学的に検討したところ、炎症反応もなく、良好な細胞浸潤が確認された。

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。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することで、あるいは無細胞処理後に細胞増殖因子を組み込むことで、移植後にレシピエント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している。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、超高静水圧及びマイクロ波照射下洗浄によって無細胞化した大動脈弁導管を、同種ミニブタの下行大動脈と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。

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、大動脈弁を採取した。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

用いた低温下超高圧印加処理（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）にてPBS溶液にて洗浄除去した。

**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、図1に示すように、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。

（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

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。図2に示すように、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。図3の走査型電子顕微鏡写真が示すように、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。これは、図4に示すように、HE染色、並びに抗

vWFによる免疫染色の結果からも、確認された。また、図5に示すように、坑 $\alpha$ -SMA及び抗ピ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。図6に示すように、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、図7に示すように、坑CD3及び坑CD68免疫染色の結果から、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。

#### D. 考察

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、より脱細胞化効率が高く、処理後組織の安全性も高い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。動物移植実験の行い易さから、今年度は大動脈弁導管部を用いた下行大動脈置換術を実施した。その結果、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。吸収性人工材料製のスキヤフォールドを用いた再生型血管の臨床応用を実施している東京女子医科大学の新岡らは、静脈系では極めて有効であるが、動脈系ではスキヤフォールドの分解速度等の問題から、容易でないと報告している。また、我々と同様の生体スキヤフォールドについても、動脈系では破断等の異常所見が報告されている。特に、市販されている米国CryoLife社のブタ組織を脱細胞化したSynerGraft弁では、大動脈弁に用いた症例で死亡事故も報告されており、同社は当該製品を製造中止にしている。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。その際、よりヒトに近いモデルとするために、霊長類の使用を検討する必要があると考えられる。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。

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BSEなど感染症への懸念から否定的な意見もある。超高静水圧印加による本方法では、抗原性及び感染症の原因となる細胞やウイルスを完全に除去し、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。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、超高静水圧印加処理にて無細胞化した大動脈導管部を同種置換移植した。移植された大動脈導管には破断等の異常所見は認められず、炎症反応もなく、良好なレシピエント細胞の浸潤が確認された。

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

- 6) 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.
- 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. *生体医工学*, 41 (Suppl 1), 39, 2003.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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、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.
- 7) 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.
- 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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、古蘭 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.
  - 15) 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.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
  - 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、口頭、2004年1月22～23

日、北九州。

- 21) 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。
- 22) 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。）  
なし



図1. 脱細胞化したミニブタ大動脈導管部の同種ミニブタ大動脈への置換移植

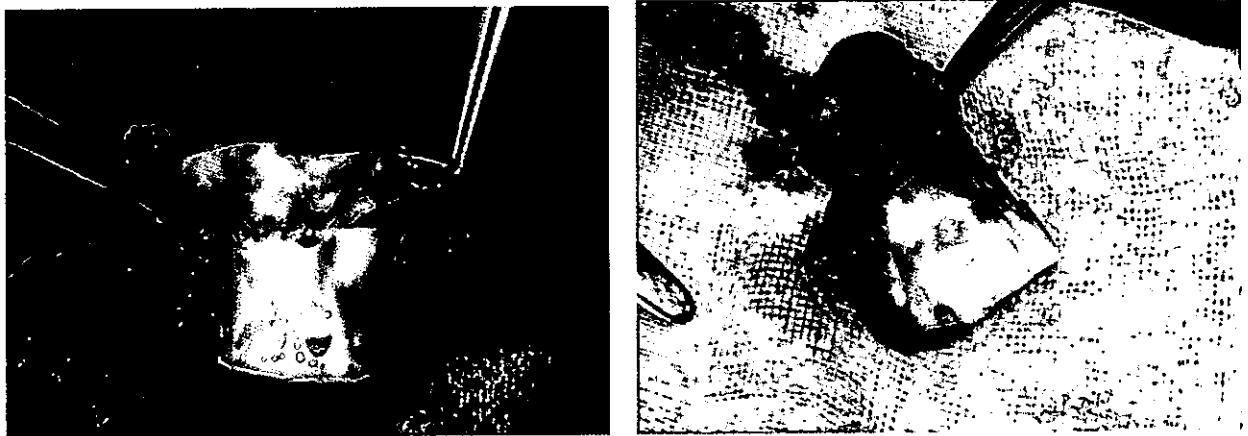


図2. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化ミニブタ大動脈導管部（左：移植1ヶ月、右：移植3ヶ月）

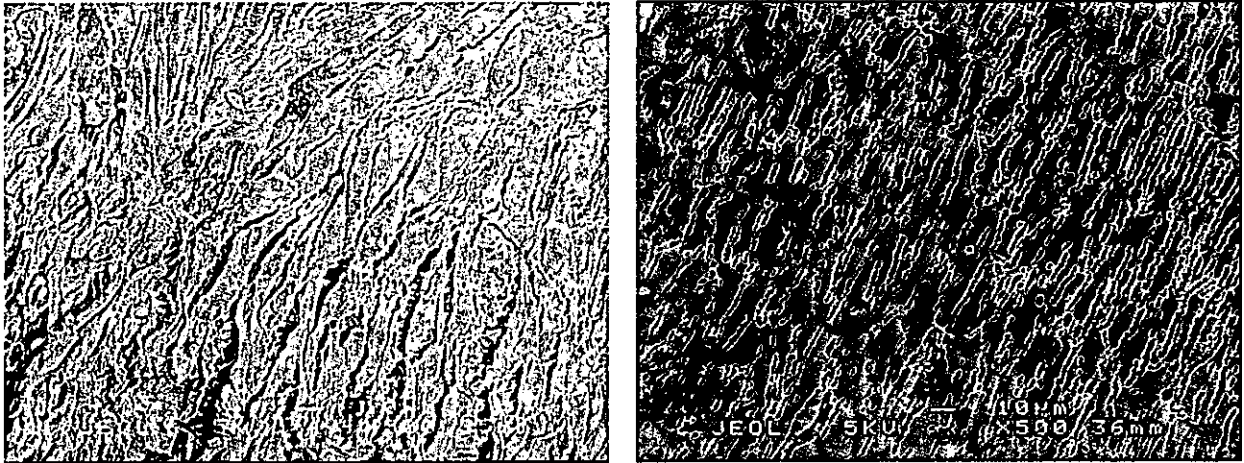


図3. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化ミニブタ大動脈導管部内腔面（左：移植1ヶ月、右：移植3ヶ月）

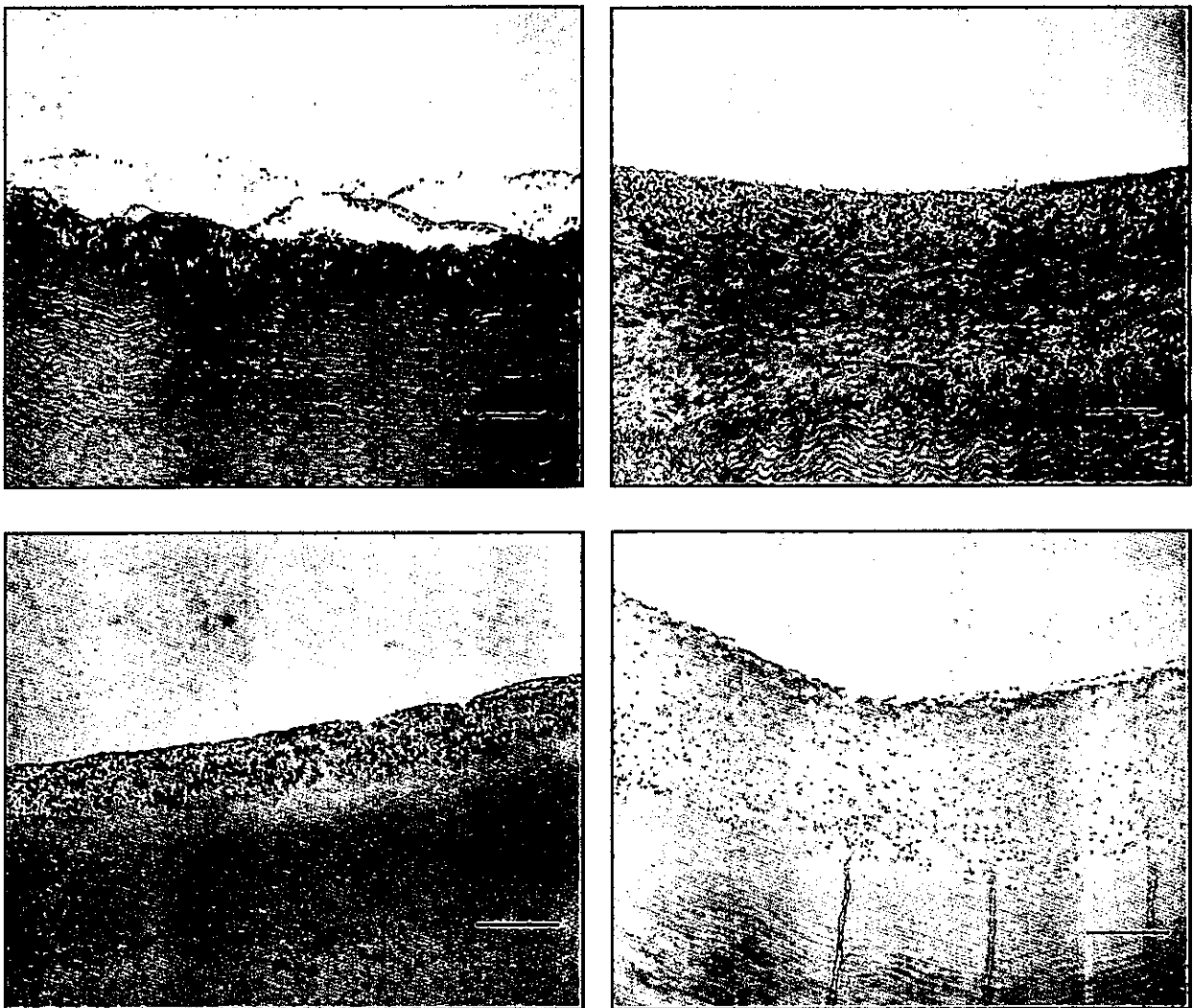


図4. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化ミニブタ大動脈導管部断面（上：HE染色、下：坑vWF免疫染色、左：移植1ヶ月、右：移植3ヶ月、図中のスケールバーは100 $\mu$ m）

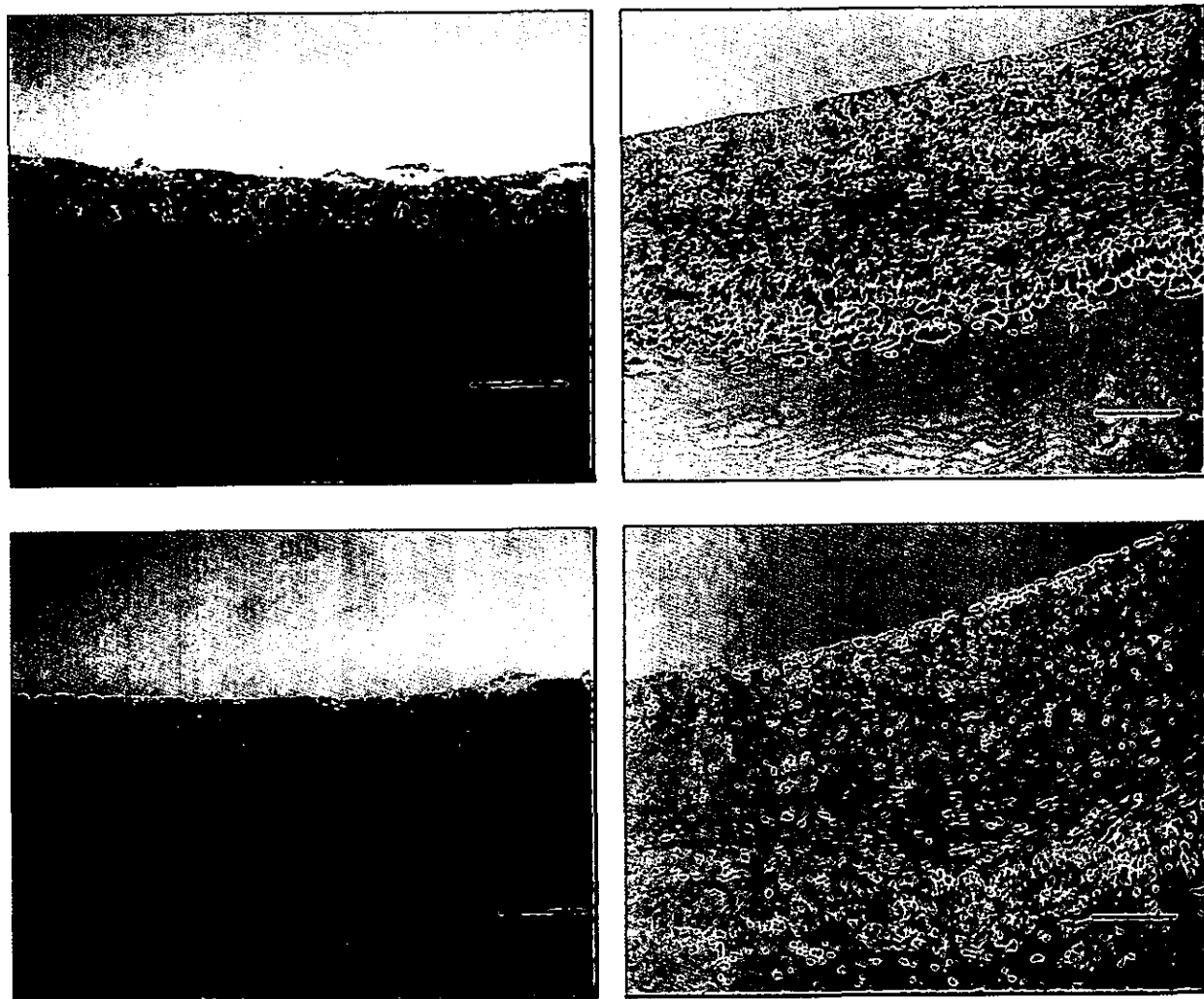


図5. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化ミニブタ大動脈導管部断面（上：抗 $\alpha$ -SMA免疫染色、下：抗ビメンチン免疫染色、左：移植1ヶ月、右：移植3ヶ月、図中のスケールバーは100 $\mu$ m）



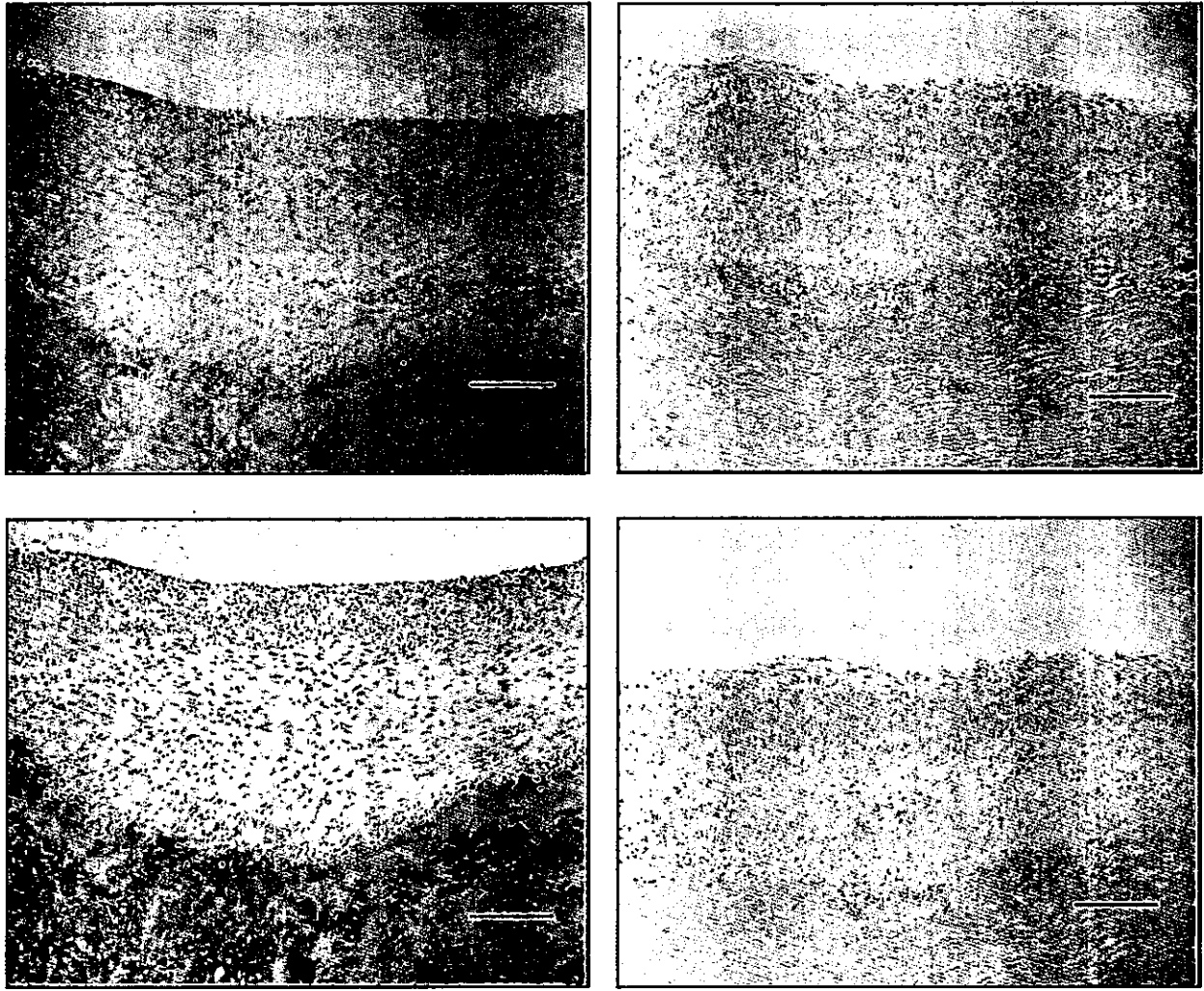


図6. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化ミニブタ大動脈導管部断面（上：坑CD3免疫染色、下：坑CD68免疫染色、左：移植1ヶ月、右：移植3ヶ月、図中のスケールバーは100 $\mu$ m）

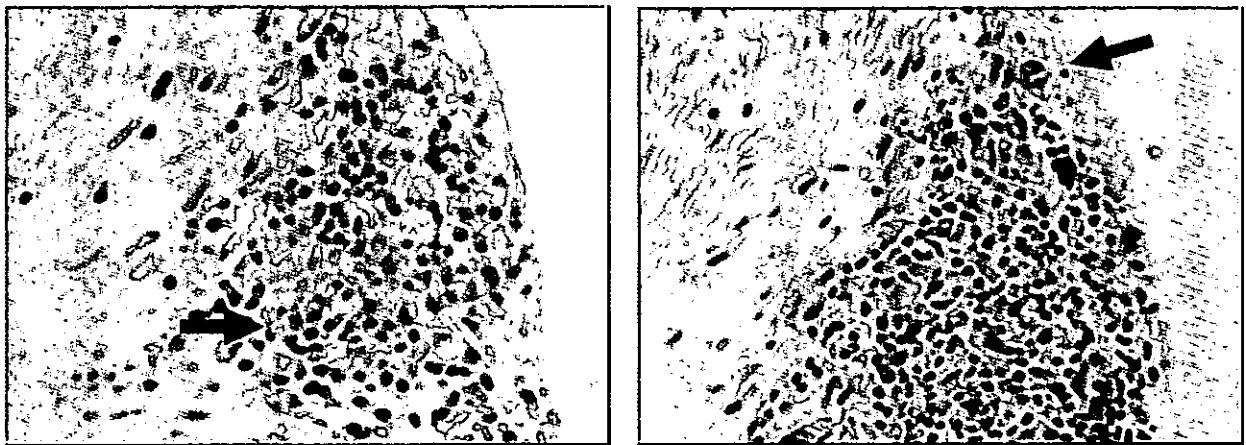


図7. 同種ミニブタへ1ヶ月移植後の凍結保存肺動脈弁断面（左：坑CD3免疫染色、右：坑CD68免疫染色）



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開発

分担研究者 藤里俊哉 国立循環器病センター再生医療部室長

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法について、その脱細胞化効果及び異種由来組織における安全性について検討した。組織内のブタ内在性レトロウイルスが完全に除去されていることが確認された。

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。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。本報では、超高静水圧処理及びマイクロ波照射下洗浄による細胞除去を施行したミニブタ組織の有効性及び安全性について報告する。

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、心臓弁及び気管を採取した。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）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。

処理組織の評価: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。

(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

図1に示すように、HE染色後の光学顕微鏡観察では、処理後の組織内では血管壁内、気管組織内、及び気管軟骨内を問わず細胞核は全く染色されなかった。また、図2に示すように、走査型電子顕微鏡観察から、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、図3に示すように、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。一方、図4に示すように、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 $\beta$ -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、図5に示すように、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 $\beta$ -アクチン並びにPERVが検出された。

### 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脱細胞化処理法では、気管軟骨組織内を含めて組織深部まで細胞核は染色されなかった。また、電子顕微鏡観察から、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離し、組織内では平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失、核の変性が確認された。また、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。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が、力学特性に大きな変化は見られていない。各繊維は完全なネイティブ状態ではないと思われるが、移植後に自己組織と置換されるのであれば、力学的な強度や特性が十分であれば、大きな影響はないと考えている。

### E. 結論

超高静水圧印加処理によって脱細胞化処理することで、細胞のみならず、組織内の内在性レトロウイルスも完全に除去された安全な生体組織由来心臓弁スキャフォールドが作製できた。

#### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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ド心臓弁. 循環器病研究の進歩, 24 (1), 65-71, 2003.
- 4) 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.
  - 5) 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.
  - 6) 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.
  - 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. 生体医工学, 41 (Suppl 1), 39, 2003.
  - 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. 生体医工学, 41 (Suppl 1), 407, 2003.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 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. 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、ライプチヒ.
  - 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、ライプチヒ.
  - 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.
- 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.
- 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.

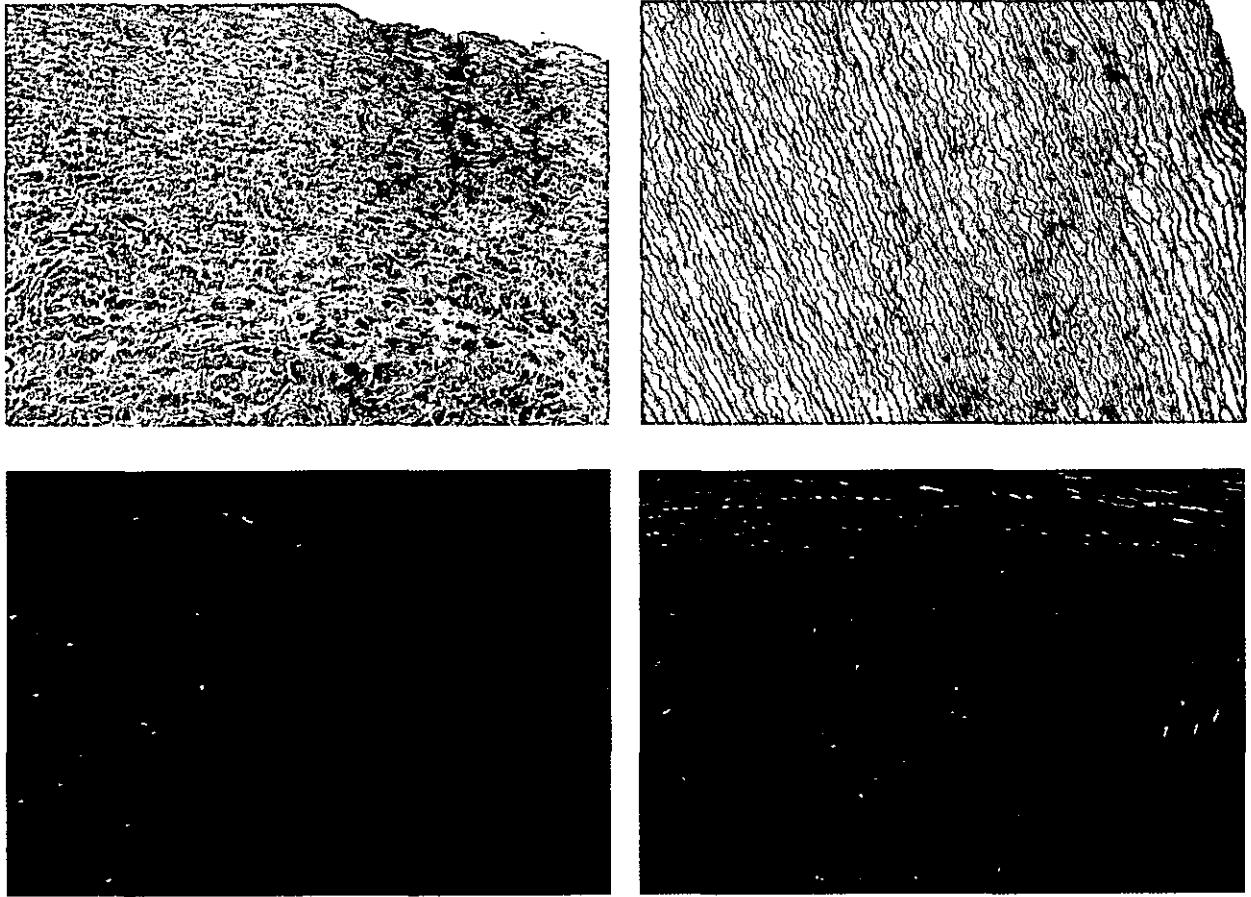


図1. ミニプタ組織の脱細胞処理（上：大動脈弁導管部、下：気管、左：コントロール、右：脱細胞化処理後）

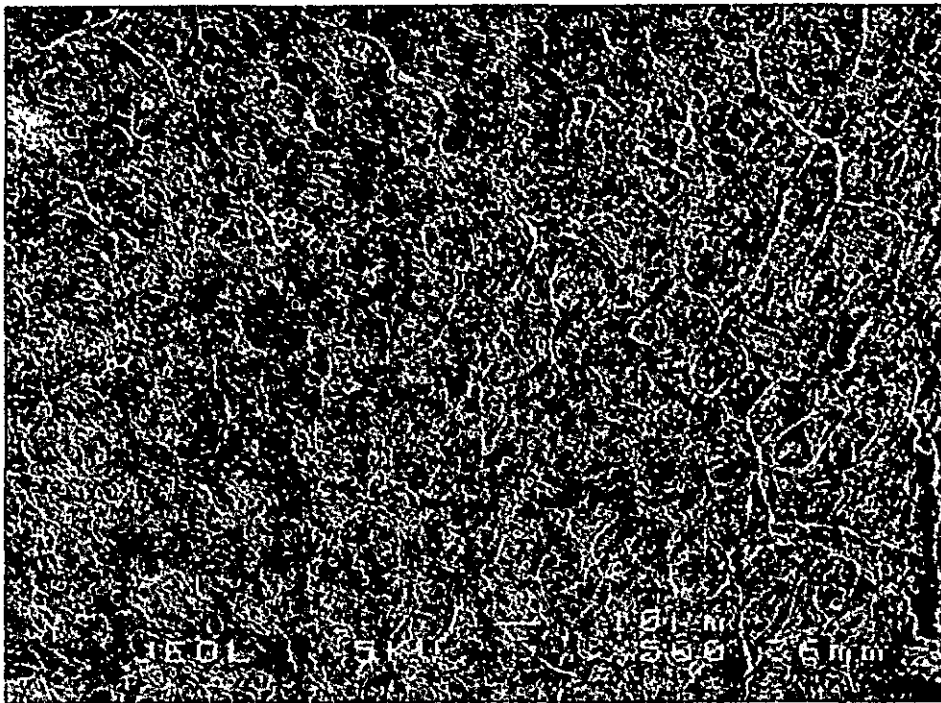


図2. 脱細胞化処理後のミニプタ大動脈弁導管部



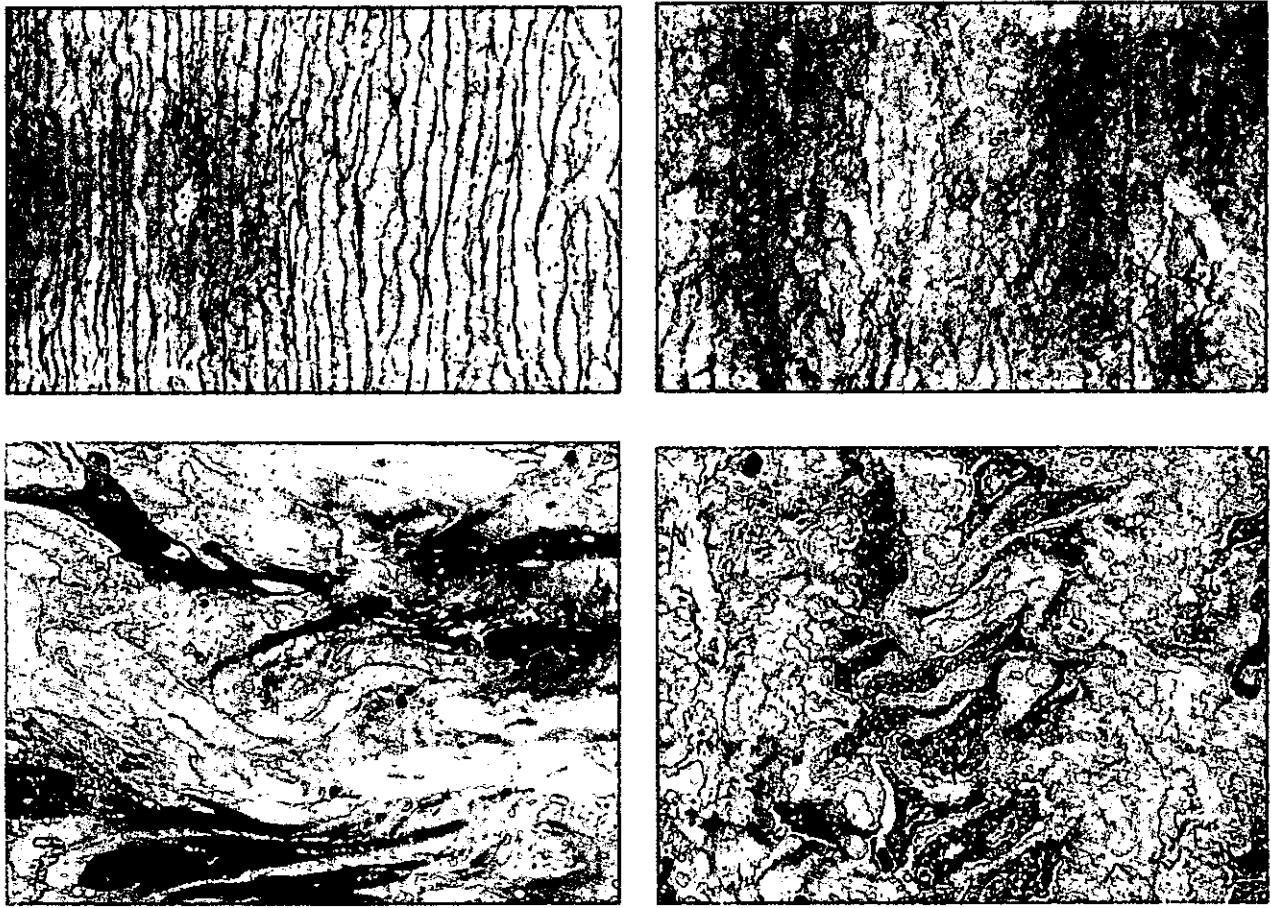


図3. ミニプタ組織の脱細胞処理（上：トルイジンブルー染色、下：透過電子顕微鏡、左：コントロール、右：脱細胞化処理後）

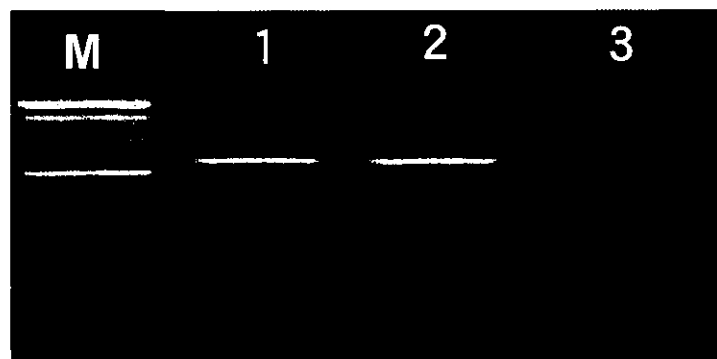


図4. ミニプタ組織内の $\beta$ -アクチンのPCR産物（M：マーカ、1：コントロール、2：トリトンX-100による脱細胞化、3：超高静水圧による脱細胞化）

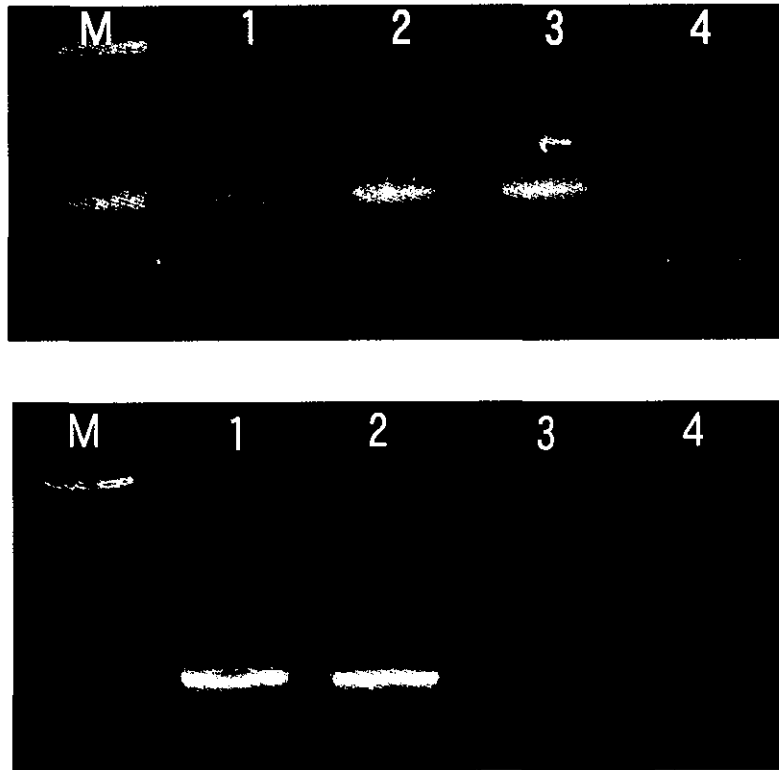


図5. ミニブタ組織内のブタ内在性レトロウイルスのPCR産物 (上: 血管、M: マーカ、1: コントロール、2: トリトンX-100による脱細胞化、3: トリトンX-100による脱細胞化後洗浄、4: 超高静水圧による脱細胞化、及び、下: 気管、M: マーカ、1: コントロール、2: トリトンX-100による脱細胞化後洗浄、3: 超高静水圧による脱細胞化、4: 超高静水圧による脱細胞化)

異種心臓弁採取動物の安全性

分担研究者 吉田光敏 鹿児島大学農学部教授

**研究要旨** 鹿児島大学農学部において閉鎖集団飼育されているクラウン系ミニブタ個体と核移植・体外受精等に用いるブタ卵子における外因性微生物のモニタリングを実施した。その結果、ミニブタ個体における生産に重大な障害をもたらす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、産業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。

A. 研究目的

ミニブタはヒトと類似した心臓血管系や臓器・組織を持ち、体型的にもヒトと近く実験動物やヒト疾患モデル、ヒトへの臓器および組織用の異種移植ドナーとして好適である。本研究は、鹿児島大学農学部で開発されたクラウン系ミニブタの育種・繁殖における外因性および内因性微生物のモニタリングおよびそれらの制御に必要な発生日工学的技術の高度化を検討し、安全に異種心臓弁採取ミニブタを供給するシステムの確立を目的として、本年度は以下に掲げた項目について実験を行った。1) 鹿児島大学農学部において閉鎖集団飼育されているクラウン系ミニブタにおける外因性微生物のモニタリング、および2) 体細胞クローンや体外受精に用いるブタ卵子における外因性微生物のモニタリング。

B. 研究方法

**供試ミニブタ**: ミニブタは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41頭を用いた。クラウン系ミニブタは、[オーミニ×ゲッチングン]と[大ヨークシャー×ランドレース]の交配により作出された。1978年から本学内において閉鎖集団で確立されたもので、性成熟時体重15kg、1歳時生体重が36kgと小型である。

**微生物感染状況のモニタリング**: 供試ミニブタの頸静脈より無菌的に血液を採取し、遠心処理し

て血清を分離した。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)の感染状況を以下の方法で検査した。AD: IDEXX社ADウイルス(S)エリーザキットを使用し酵素抗体法により抗体を検出。PRRS: PRRSウイルス北米株精製不活化抗原およびPRRSウイルスLelysted株遺伝子組換え蛋白抗原を用いたIDEXX社PRRSエリーザキットによる酵素抗体法で検出。PED: PEDウイルスNK94P6, Tr(-)株感染Vero細胞を用い、マイクロプレート法により中和試験を実施し、抗体価2倍以上を陽性とした。APP: 日研アグテックAP2を使用し、ラテックス凝集反応により抗体を検出。また、各血清型参照株から血清型別抗原を自家調製し、それらを用いて間接赤血球凝集反応による測定を実施した。MPS: SEP・CF抗原「ゼンノウ」を使用したマイクロプレート法により補体結合反応を実施し、抗体を測定した。

**ブタ卵子におけるPRRSウイルス(PRRSV)モニタリング**: PRRSV抗体陽性の産業雌ブタ12頭(5-6ヶ月齢)より、個体別に卵丘細胞・卵子複合体(COC)を採取した。COCは体外培養後、卵丘細胞と卵子を分離、それぞれ総RNAを抽出し、総RNAより逆転写(RT)反応後、cDNAの作成を行い、PRRSV特異的

プライマー対によりPCRを行った。さらに、RT-PCR産物は前記プライマー対により増幅されるPRRSV塩基配列内側領域をターゲットとしたプライマー対によりNested PCRを行った。Nested PCR産物は電気泳動し、標的バンドの検出状況を調べた。さらに、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を体外培養後、卵丘細胞と卵子を分離、それぞれ総RNAを抽出し、PRRSV検出状況を調べた。

### C. 研究結果

クラウン系ミニブタにおける外因性微生物のモニタリング：結果は表1に示した。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、細菌性およびマイコプラズマ性感染症であるAPP及びMPSの陽性率は63%及び76%と高かった。

ブタ卵子におけるPRRSVモニタリング：PRRSV抗体陽性産業雌ブタ12頭からの卵丘細胞および卵子におけるPRRSV遺伝子の有無を調べた結果、PRRSV遺伝子やPRRSV遺伝子転写産物は検出されなかった。さらに、食肉センター由来の産業雌ブタ卵巣より回収した卵丘細胞および卵子からRNAを抽出し、PRRSV遺伝子の有無を調べた結果、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

本研究の結果から、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るクラウン系ミニブタ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、産業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。

AD、PRRS、及びPEDはいずれもブタの生産性に重大な障害をもたらす伝播力が強いウイルス性感染症であり、ADは子ブタの死亡、繁殖ブタの死産等を、PRRSは死産や早産などの異常産と子ブタの肺炎を、及びPEDは子ブタ下痢や母ブタの下痢・泌乳停止を引き起こす。本研究ではこれらのウイルス性感染症は全ての検査個体で陰性であり、清浄化が維持されていることが確認された。一方、慢性疾病として生産性を阻

害する要因であるAPP（アクチノバシラス・ブルロニューモニエが原因菌）やMPSの陽性率は高かった。従って、今後、抗生物質などの薬剤の投与、ワクチン接種および早期離乳隔離飼育等の方法を用いて清浄化対策を進める必要がある。

現在行われている体外受精および体細胞クローン等の発生工学的実験では、病原体の伝播の可能性は汚染した取り扱い者、器具・機材、卵子、及び精液等の生殖細胞、培地や還流液などが考えられる。生殖細胞以外は滅菌済みのものを購入するか自家滅菌をすることで病原体フリーの清浄化対策を実行できる。一方、卵子については食肉センターで安価でかつ大量に採取可能な産業雌ブタ由来のもの広く用いられてきた。しかし、産業雌ブタの生前の外因性微生物感染状況は不明であり、感染症伝播のリスクが大きい。本研究では伝播力が強い感染症であるPRRSVを標的として卵子におけるPRRSV遺伝子の有無を調べた結果、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。おそらく、卵子自体のPRRSVに対する非感受性や透明帯の存在によるPRRSV感染防御の機能が働いていたと考えられた。

今後、内因性ウイルスのモニタリング及びそれらの制御に必要な発生工学的技術の開発を検討し、より安全に異種心臓弁採取ミニブタを供給するシステムの確立を目指したい。

### E. 結論

異種移植ドナーとして好適なミニブタ個体における生産に重大な障害をもたらす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、産業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く、体細胞クローン等への同卵子利用の可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 学会発表

- 1) 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。2003年9月26～29日、岐阜。
- 2) 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