

200406082A

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村 惣一郎

平成17年（2005年）4月



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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村 惣一郎

平成17年（2005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開発（脱細胞化の評価と放射線照射の影響） ..... 15

藤里 俊哉

2. 再生医療型心臓弁の開発（細胞組込） ..... 23

岸田 晶夫

3. 再生医療型心臓弁の動物実験 ..... 31

庭屋 和夫

4. 再生医療型心臓弁の臨床応用（大動物における前臨床試験） ..... 39

中谷 武嗣

5. 異種心臓弁採取動物の安全性 ..... 45

吉田 光敏

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 53

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 55

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、脱細胞化方法の改良、細胞の組込、及び同種移植による有効性を検討した。また、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。その結果、脱細胞化同種肺動脈弁については、移植6ヶ月までであるが有望な結果を得、早期の臨床応用の可能性が示唆された。

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  
東京医科歯科大学教授  
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

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

A. 研究目的

我が国では年間1万件以上、米国では約3万件、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

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、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(図2)を用いた移植用心臓弁について、脱細胞化処理法の改良と細胞組込、及び同種移植実験について検討した。また、心臓弁採取動物の安全について、検討した。

## 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)より採取した心臓弁及び血管組織を、10,000気圧、4℃で処理を行ったのち、攪拌振盪下にて洗浄を行った。処理後の組織を組織学的に観察するとともに、組織内のDNAを定量した。

**放射線照射:** 未処理のブタ血管組織を、コバルト60を使用したガンマ線照射施設(日本原子力研究所高崎研究所)にて、通常の医療用具の滅菌に使用される線量を含む範囲で照射した。照射後の組織について、力学試験機にて引張り試験を行い、その力学特性を測定した。

**細胞組込:** ブタ骨髄細胞を定法により採集し、数週間の培養によるエクスパンド後、組織表面および内部に播種した。さらに、数週間の培養にて組織再構築を行った。

**肺動脈弁移植:** クラウン系ミニブタを用い、右心バイパス下にて、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。所定期間経過後、超音波診断装置を用いて弁機能を観察するとともに、移植組織を摘出し、組織学的所見を検討した。

**大動脈弁導管部移植:** 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部による大動脈置換手術を行った。所定期間経過後、移植組織を摘出し、組織学的所見を検討した。

**組織採取動物のモニタリング:** ブタ生殖細胞系におけるPERV-env領域遺伝子DNAおよびRNAのモニタリングを行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、上記法律及び基準に則った国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。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して「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:** 昨年度まではマイクロ波照射下にて洗浄を行っていたが、装置の制約から、同時に多試料を処理することが容易でなかった。本年度は、マイクロ波照射装置を使用せずに、低温攪拌振盪下での洗浄について検討した。その結果、超高圧印加処理後の組織内のDNA量は、洗浄期間の増加とともに減少し、14日以降は未処理の10分の1以下になることが確認された(図3)。

**放射線照射:** ガンマ線照射量を20~100kGyに変化させ、その力学特性を検討した。その結果、未処理の組織と比較して大きな差は見られなかった(図4)。

**細胞組込:** 表面から細胞を播種し、内部への細胞の浸潤を期待する方法と、表面へは同じように播種し、内部へはシリンジ等を用いて直接注入する方法の2種を比較した(図5)。表層から播種した場合、組織表面に細胞は接着し、水平方向に広がりながら増殖する。そのため、細胞が増殖し

ていることがわかる。一方、内部に直接注入のみした場合、細胞が減少・増殖どちらもしていない事が示唆された(図6)。

**肺動脈弁移植:**移植組織の破断等の所見は見られなかった。移植6ヶ月後の超音波診断装置による観察から、弁機能は良好であることが確認された。移植組織を摘出したところ、血栓の付着は見られず、3枚の弁葉は正常な状態及び形態を保ち、閉鎖等の機能も良好であった(図7)。

摘出組織を免疫組織学的に観察したところ、弁葉の先端部分を除き、組織内への細胞浸潤が認められた。血管内皮細胞は、先端部分でも完全に内腔面を覆っていた。組織内では平滑筋細胞や線維芽細胞の豊富な浸潤が認められた(図8)。

**大動脈弁導管部移植:**移植後の破断や膨潤等の所見は見られなかった。細胞浸潤は良好であったが、大動脈弁導管部中心部で細胞の見られない領域があった。また、内腔面に新たな内膜が肥厚化している所見も見られた(図9)が、肺動脈では見られなかった。また、大動脈弁導管部では石灰化も見られた。特に前述の組織中心部に顕著で、その形態はエラスチン線維の走行に並行しているように思われた。これに対して、肺動脈弁では、弁葉部及び導管部ともに石灰化は全く認められなかった(図10)。

**組織採取動物のモニタリング:**卵子、卵丘細胞および精子におけるすべての検査材料において、A、B、C型3種のPERV-env領域遺伝子の内、1種以上が検出され、PERV-freeのものは見られなかった。特に、パークシャー種雄4個体、ミニブタ種雄2個体および卵丘細胞材料すべてでは、A、B、C型3種のPERV-env領域遺伝子が存在した(表1、2)。また、卵子および卵丘細胞において、PERV-env領域遺伝子発現が観察され、特に、卵丘細胞材料では、A、B、C型3種のPERV-env領域遺伝子発現がすべて高かった。

#### 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、完全な細胞除去は容易でない。これに対して、昨年度の報告で示したように、我々の開発した超高静水圧引加による処理法では、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ャフォ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ているが、平滑筋細胞の組織内部への組み込みは容易でない。細胞注入によって、ある程度達成できている段階であるが、まだ改良の必要がある。

本年度は、弁機能の維持についても検討するため、脱細胞化した同種肺動脈弁の移植実験を行った。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6ヶ月で、弁機能は良好に維持されており、また、レシピエントの細胞の豊富な浸潤が確認された。浸潤細胞は、正常組織と同様に、主として平滑筋細胞と線維芽細胞であり、未熟ながらも正常組織と同様の層構造も見られている。同種肺動脈弁に関しては、臨床的には問題が無く、より長期の動物実験による検証後、早期の臨床応用が可能であると考えられる。

これに対して、大動脈弁移植では、破断や膨潤は見られなかったが、組織学的に検討したところ、

大動脈では内膜肥厚の所見あるいは一部において狭窄傾向が見られ、石灰化も認められた。これらは肺動脈では見られず、その違いの理由は不明である。エラスチンの変性や細胞膜成分の残存が考えられるが、今後の検討課題であり、より詳細な検討を行いたい。

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PERVウイルスのモニタリングを実施した。PERVフリーの個体は存在しなかったが、脱細胞化処理によって除去できるため、問題はない。しかし、より高い安全性を目指して、遺伝子組換技術を用いた改良を続けていく予定である。

既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、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。これは脱細胞化が不十分であったのではないかと推測されている。一方、独国フンボルト大学のKonertz教授らのグループは、脱細胞化に薬液処理のみを行っているが、用いる界面活性剤等を工夫することで、臨床でも優れた成績を報告している。我々も早期の臨床応用を実施し、我が国発の再生型組織移植技術を確認する必要がある。

#### 研究協力者

小林泰彦 日本原子力研究所高崎研究所  
イオンビーム生物応用研究部  
山崎祥子 国立循環器病センター心臓血管外科  
殷 猛 国立循環器病センター臓器移植部  
西岡 宏 ヒューマンサイエンス振興財団  
吉田謙一 先端医療振興財団

#### E. 結論

我々が開発した超高静水圧印加処理によって脱細胞化したミニブタ心臓弁について、同種移植実験にて有効性を検討したところ、肺動脈弁では狭窄や石灰化等の病変は見られず、良好な結果が得られた。より長期の動物実験による有効性の確認後、早期に臨床応用へと移行したい。同種大動脈弁及び異種心臓弁については、引き続いた検討を行っていききたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishida M, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Fukushima S, Kitamura S. Comparison of off-pump coronary artery bypass grafting in midterm results. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 52 (5): 240-6.
- 2) Lee H, Tsukiya T, Homma A, Kamimura T, Takewa Y, Nishinaka T, Tatsumi E, Taenaka Y, Takeno H, Kitamura S. Observation of cavitation in a mechanical heart valve in a total artificial heart. *ASAIO J* 2004; 50: 205-10.
- 3) Matsuura K, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Yagihara T, Kitamura S. Rationale for off-pump coronary revascularization to small branches - angiographic study of 1,283 anastomoses in 408 patients. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1530-4.
- 4) Tagusari O, Ogino H, Kobayashi J, Bando K, Minatoya K, Sasaki H, Niwaya K, Okita Y, Ando M, Yagihara T, Kitamura S. Should the transverse aortic arch be replaced simultaneously with aortic root replacement for annuloaortic ectasia in marfan syndrome? *J Thoracic & Cardiovasc Surg* 2004; 127 (5): 1373-80.
- 5) Tagusari O, Kobayashi J, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Nakatani T, Yagihara T, Kitamura S. Total arterial off-pump coronary artery bypass grafting for revascularization of the total coronary system: Clinical outcome and angiographic evaluation. *Ann Thorac Surg* 2004; 78 (4): 1304-11.
- 6) 永井良三、堀 正二、三田村秀雄、高野照夫編集。細田嵯一、篠山重威、北村惣一郎監修。心臓病：診断と治療の最前線。先端医療技術研究所、東京、2004。
- 7) 北村惣一郎。巻頭言。田中秀治、篠崎尚史編集。日本組織移植学会監修。移植コーディネーター概論。へるす出版、東京、2004。
- 8) 中谷武嗣。補助循環と心臓移植。CURRENT



- THERAPY 2004; 22: 175-80.
- 9) 中谷武嗣. 人工心臓の現状と将来. 赤阪隆史、吉川純一、笠貫 宏、土師一夫、別府慎太郎、松崎益徳編. 新・心臓病診療プラクティス 2. 心疾患の手術適応と至適時期. 文光堂、東京、2004; 358-90.
  - 10) 中谷武嗣. 体外設置式補助人工心臓. *Clinical Engineering* 2004; 15: 480-6.
  - 11) 中谷武嗣、工藤龍彦. 人工肺・体外循環 2. *人工臓器* 2004; 33: 76-7.
  - 12) 中谷武嗣、富田伸司. 骨髄幹細胞の心筋細胞への分化. *生体の科学* 2004; 55: 334-7.
  - 13) 中谷武嗣. ここまで進んだ補助人工心臓. *NHK きょうの健康* 2004; 197(8月号): 102-4.
  - 14) 中谷武嗣、花谷彰久. 補助人工心臓、心臓移植時の Brain attack. *Cardiovascular Med-Surg* 2004; 6: 499-502.
  - 15) Ishida M, Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Hamamoto M, Nagaya N, Ohtsu Y, Suga M, Yutani C, Yagihara T, Yamada K, Kitamura S. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 436-45.
  - 16) Hisashi Y, Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Yutani C, Kitamura S. Granulocyte-colony stimulating factor enhanced the recruitment of bone marrow cells into the heart: Time course evaluation of phenotypic differentiation in the doxorubicin-induced cardiomyopathic model. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 52: 451-5.
  - 17) Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Yamashiro S, Sueda T, Yagihara T, Kitamura S. Granulocyte-colony stimulating factor directly enhances proliferation of human troponin I-positive cells derived from idiopathic dilated cardiomyopathy through specific receptors. *J Heart Lung Transplant*. 2004; 23: 1430-7.
  - 18) Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A. Novel PVA-DNA nanoparticle prepared by ultra high pressure technology for gene delivery. *Mater Sci Eng C*. 2004; 24: 797-801.
  - 19) Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Yin M, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Preparation and recellularization of tissue engineered bioscaffold for heart valve replacement. In Mori H, Matsuda H. ed. *Cardiovascular regeneration therapies using tissue engineering approaches*. Springer-Verlag, Tokyo. 2004; 83-94.
  - 20) Numata S, Fujisato T, Niwaya K, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Kitamura S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved allograft. *J Heart Valve Dis* 2004; 13 (5): 984-90.
  - 21) Yoshida M, Miyazaki N, Matsuba J, Yamanouchi T. Why does developmental potential differ between oocytes from prepubertal and adult pig? *Proc 2nd Intl Symp "Present and Future of Transgenic Cloned Pig Research"* 2004; 39-44.
  - 22) Miyoshi K, Yuki Y, Yoshida M. *J Reprod Dev* in press.
2. 学会発表
- 1) 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. 超高压技術を用いた水素結合性高分子-薬物集合体の開発. 第20回日本DDS学会、東京.
  - 2) 古菌 勉、岡田正弘、安田昌司、田中順三、岸田晶夫. ナノセラミックス複合化によるポタン型経皮デバイスの開発. 第42回日本人工臓器学会大会、東京.
  - 3) 岡田正弘、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、古菌 勉. 界面複合化を目指したリン酸カルシウム微粒子の形態制御. *JST H16年度シンポジウム*、東京
  - 4) 岸田晶夫. 医療用材料の動向と新技術. 第13

- 回ポリマー材料フォーラム、名古屋。
- 5) 岡田正弘、芹澤 武、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、古菌 勉. 基板上でのナノアパタイト単結晶を用いた界面複合化法の精密制御. 日本バイオマテリアルシンポジウム2004、つくば.
  - 6) Fujisato T, Funamoto S, 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 tissue scaffold acellularized by cold isostatic pressing. 7th World Biomaterials Congress, 口頭, 2004年5月17~21日、シドニー.
  - 7) 藤里俊哉、西岡 宏、吉田謙一、湊谷謙司、庭屋和夫、菅 理晴、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体組織の脱細胞化処理による再生型移植組織の開発. 第11回日本臓器生物医学会総会、口頭. 2004年5月21~22日、広島.
  - 8) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、湊谷謙司、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体組織の脱細胞化による安全な生物由来繊維素材の開発. 平成16年度繊維学会年次大会、口頭. 2004年6月9~11日、東京.
  - 9) 岸田晶夫、木村 剛、古菌 勉、藤里俊哉、奥野 暁、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和. 超高压処理による高分子複合体形成とその医用材料としての応用. 平成16年度繊維学会年次大会、口頭. 2004年6月9~11日、東京.
  - 10) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 超圧処理による安全な再生型移植組織. 第7回日本組織工学会、口頭. 2004年7月1~2日、東京.
  - 11) Fujisato T, Yoshida K, Nishioka H, Yamazaki S, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Novel tissue processing for xenograft valve transplantation secure from xenogeneic rejection and unknown animal related infection: PowerGraft. Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves, ポスター. 2004年9月15~18日、フィレンツェ.
  - 12) Minatoya K, Fujisato T, Yamazaki S, Yin M, Yoshida K, Nishioka H, Niwaya K, Ogino H, Ishibashi-Ueda H, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. A tissue engineered aorta and aortic root in a porcine model: novel tissue processing of acellularization by ultrahigh pressure treatment. Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves, ポスター. 2004年9月15~18日、フィレンツェ.
  - 13) 吉田謙一、西岡 宏、澤田和也、藤里俊哉、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 細胞を除去した生物組織由来繊維素材による再生型組織移植. 2004年度繊維学会秋季研究発表会、ポスター. 2004年9月30~10月1日、熊本.
  - 14) 澤田和也、野木千賀子、吉田謙一、西岡 宏、殷 猛、山崎祥子、藤里俊哉、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体組織における細胞膜リン脂質の評価. 2004年度繊維学会秋季研究発表会、口頭. 2004年9月30~10月1日、熊本.
  - 15) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡宏、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高压による脱細胞化生体組織. 第42回日本人工臓器学会大会、口頭. 2004年10月5~7日、東京.
  - 16) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、沼田 智、湊谷謙司、庭屋和夫、菅 理晴、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 基材として脱細胞化組織を用いたハイブリッド血管・心臓弁. 第42回日本人工臓器学会大会、パネルディスカッション. 2004年10月5~7日、東京.
  - 17) 岸田晶夫、藤里俊哉、吉田謙一、西岡 宏、沼田 智、湊谷謙司、庭屋和夫、菅 理晴、中谷武嗣、北村惣一郎. 血行再建における人工臓器と再生医療. 第42回日本人工臓器学会大会. シンポジウム. 2004年10月5~7日、東京.
  - 18) 木村 剛、古菌 勉、奥野 暁、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫. 水素結合性複合体の生医学応用における超高压印加効果. 第42回日本人工臓器学会大会、口頭. 2004年10月5~7日、東京.
  - 19) Fujisato T, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular tissue

- regeneration using bioscaffold acellularized by ultrahigh pressure treatment. Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society, ポスター. 2004年10月10~13日、ローザンヌ.
- 20) kishida A, Kimura T, Furuzono T, Fujisato T, Masuzawa T. Acceleraration of cell proliferation by nano-vibration stimulation. Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society, ポスター. 2004年10月10~13日、ローザンヌ.
- 21) 野木千賀子, 西岡 宏, 澤田和也, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 森反俊幸, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高压処理による再生型組織移植を目的とした生体組織の脱細胞化. 第18回日本エム・イー学会秋季大会, ポスター. 2004年11月4~6日、松山.
- 22) 舘 義人, 吉田謙一, 殷 猛, 山崎祥子, 藤里俊哉, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 森反俊幸, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化生体組織による再生型同種組織移植. 第18回日本エム・イー学会秋季大会, ポスター. 2004年11月4~6日、松山.
- 23) 角田卓哉, 西岡 宏, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 菅 理晴. 異種気管移植を目指した気管Scaffoldの開発-超高压処理による脱細胞化-. 第18回日本エム・イー学会秋季大会, ポスター. 2004年11月4~6日、松山.
- 24) 藤里俊哉, 吉田謙一, 西岡 宏, 殷 猛, 山崎祥子, 澤田和也, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 菅理晴, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高压処理による脱細胞化生体組織: パワーグラフト. 日本バイオマテリアルシンポジウム2004, シンポジウム. 2004年11月15~16日、つくば.
- 25) 藤里俊哉, 沼田 智, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生医工学技術を用いた生体組織の再生. 第9回関西大学先端科学シンポジウム, 招待講演. 2005年1月17~18日、吹田.
- 26) 藤里俊哉, 吉田謙一, 西岡 宏, 山崎祥子, 殷 猛, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化生体スキャフ
- ールドを用いた組織再生. 第17回バイオエンジニアリング講演会. 2005年1月22~23日、名古屋.
- 27) 殷 猛, 山崎祥子, 湊谷謙司, 吉田謙一, 西岡 宏, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 高野久輝. コラーゲン製人工血管のミニブタ大動脈への置換移植. 第4回日本再生医療学会総会, ポスター. 2005年3月1~2日、大阪.
- 28) 須崎智之, 森反俊幸, 西岡 宏, 吉田謙一, 木村 剛, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 心筋バイオスキャフールドの作製と細胞播種法の開発. 第4回日本再生医療学会総会, ポスター. 2005年3月1~2日、大阪.
- 29) 岩井彩夏, 森反俊幸, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 木村 剛, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压誘起PVA/DNA/ハイドロゲルの調製とDNA徐放解析. 第4回日本再生医療学会総会, ポスター. 2005年3月1~2日、大阪.
- 30) 湊谷謙司, 藤里俊哉, 山崎祥子, 殷 猛, 吉田謙一, 西岡 宏, 荻野 均, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 新しい脱細胞化処理を施したブタの大動脈弁同種移植実験の検討. 第4回日本再生医療学会総会, ポスター. 2005年3月1~2日、大阪.
- 31) 植木光樹, 岡田正弘, 須崎智之, 安田昌司, 藤里俊哉, 古菌 勉. 早期創傷治癒効果を発現するハイブリッド型経皮デバイスの検討. 第4回日本再生医療学会総会, ポスター. 2005年3月1~2日、大阪.
- 32) 澤田和也, 野木千賀子, 平工香織, 殷 猛, 山崎祥子, 藤里俊哉, 森反俊幸, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. バイオスキャフールド調製を目的とする脱細胞化手法の評価. 第4回日本再生医療学会総会, ワークショップ. 2005年3月1~2日、大阪.
- 33) 殷 猛, 庭屋和夫, 山崎祥子, 吉田謙一, 西岡 宏, 藤里俊哉, 湊谷謙司, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化心臓弁による組織再生. 第3回再生心臓血管外科治療研究会, 口頭. 005年2月23日、浜松.
- 34) Kishida A, Kimura T, Miyazaki K, Ishimaru M, Uetake M, Kusakari N, Masuzawa T, Okuno A, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H,

- Furuzono T, Fujisato T. Cellular and Tissue Engineering with Nanotechnology. Artificial Organs and Biomaterials with Nanotechnology. 口頭. 2005年3月4日, 東京.
- 35) 遊木靖人、三好和睦、吉田光敏. ミニブタ体細胞クローン胚の作製に用いる融合および活性化培地中のカルシウム濃度の最適化. 日本繁殖生物学会第97回大会. 2004年.
  - 36) 佐藤啓介、三好和睦、吉田光敏. 超音波を用いたブタ卵子の活性化. 日本繁殖生物学会第97回大会. 2004年.
  - 37) 渡邊弘樹、窪田 力、三好和睦、吉田光敏. Flow-FISH法を用いたウシ精子DNAのテロメア長検出技術の開発. 日本繁殖生物学会第97回大会. 2004年.
  - 38) 日巻武裕、糸井史陽、三好和睦、吉田光敏. ウシ卵子の成熟・受精・発生過程におけるプリオンタンパク質遺伝子発現. 日本畜産学会第104回大会. 2005年.
  - 39) 佐藤啓介、三好和睦、吉田光敏. 超音波により活性化したミニブタ体細胞クローン胚の体外発生. 日本畜産学会第104回大会. 2005年.
- 3) Fujisato T, Kishida A, Funamoto S, Nakatani T, Kitamura S. Method of treating biological tissue for transplantation by applying ultrahigh hydrostatic pressure. 米国. 2005年3月9日
  - 4) Fujisato T, Kishida A, Funamoto S, Nakatani T, Kitamura S. Method of treating biological tissue for transplantation by applying ultrahigh hydrostatic pressure. カナダ. 2005年3月9日
  - 5) Fujisato T, Kishida A, Funamoto S, Nakatani T, Kitamura S. Method of treating biological tissue for transplantation by applying ultrahigh hydrostatic pressure. EU. 2005年3月9日
  - 6) 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. 韓国. 2005年3月9日.
  - 7) 藤里俊哉、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎. 細胞送達法. 日本. 出願手続き中.

### 3. 新聞報道等

- 1) ブタ大動脈弁の脱細胞化に成功 ヒトへの異種移植に前進. 日経バイオビジネス 2004年8月号 p21.
- 2) 心臓弁・血管再生 動物の組織活用. 日本経済新聞 2004年11月22日 p19.
- 3) 創造主義宣言 超テク国への道. 日経産業新聞 2004年12月28日 p1.

### G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

- 1) Fujisato T, Kishida A, Funamoto S, Nakatani T, Kitamura S. Method of treating biological tissue for transplantation by applying ultrahigh hydrostatic pressure. オーストラリア, 出願番号2003262030. 2005年3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. 超高静水圧印加による生体組織の処理方法. 中国, 出願番号038214849. 2005年3月9日.

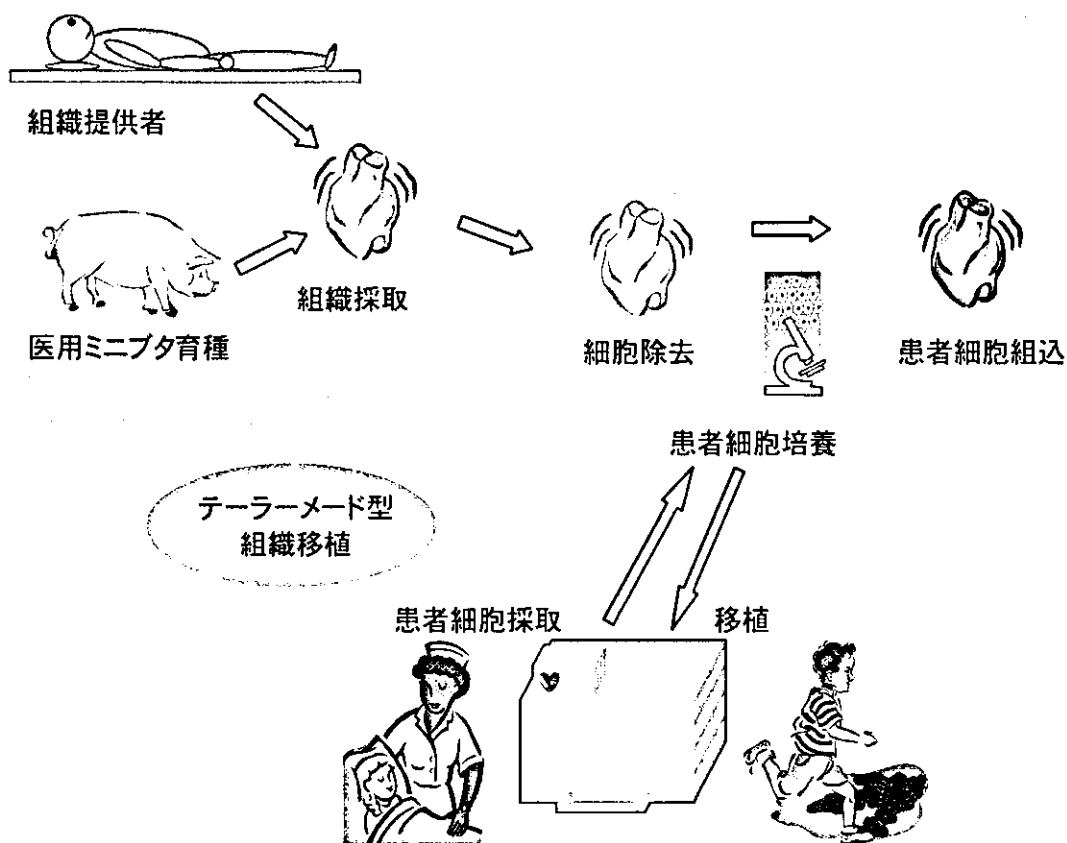


図1. テーラーメイド型組織移植

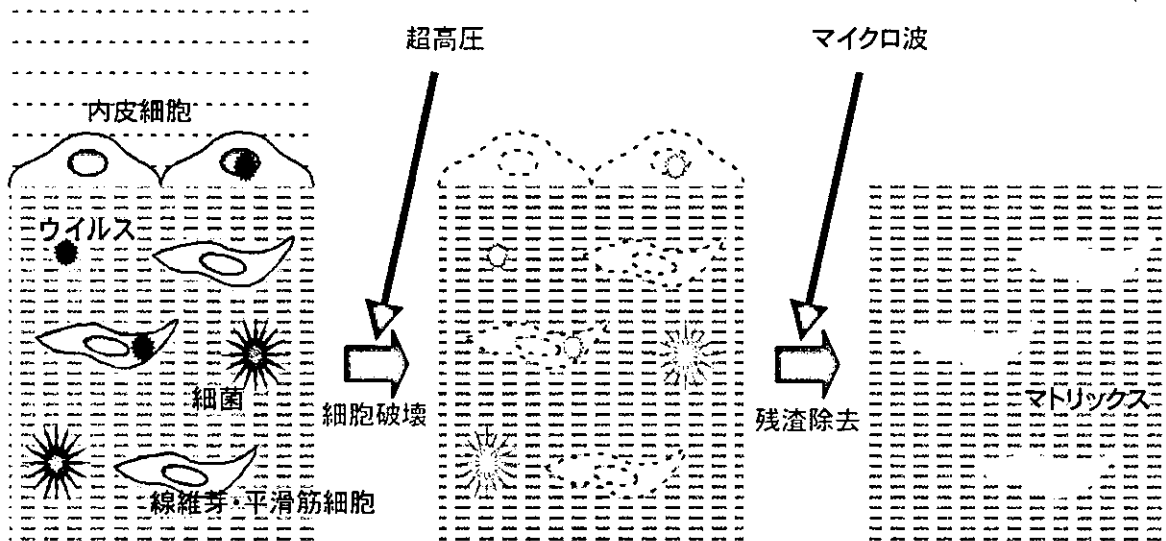


図2. 我々が開発した超高静水圧印加及びマイクロ波照射下洗浄による脱細胞化

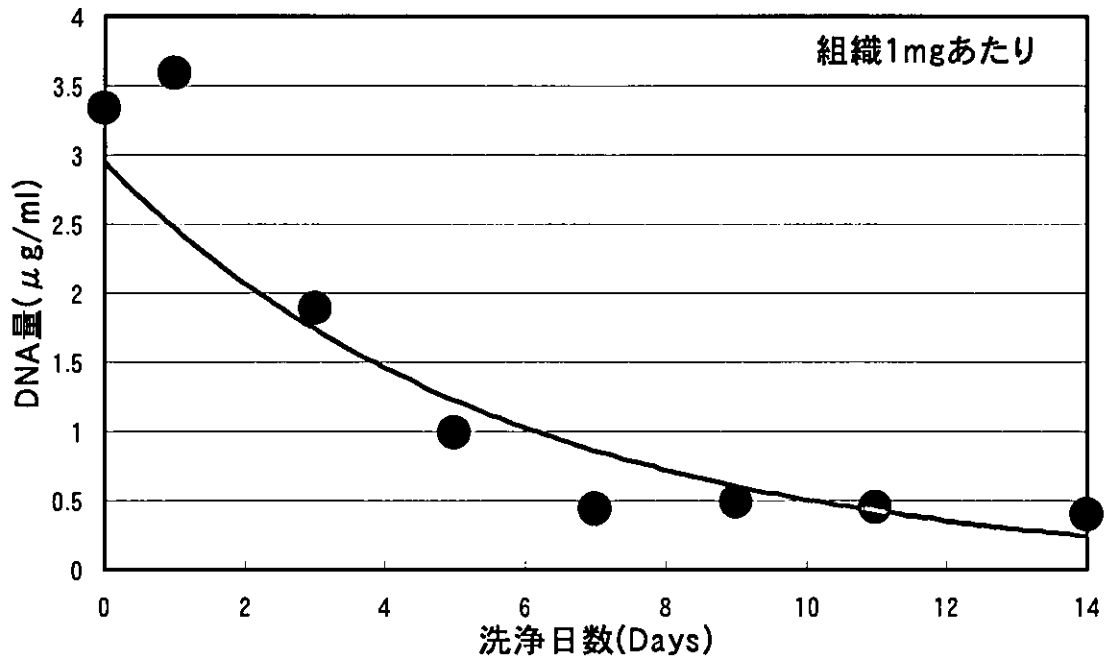


図3. 超高静水圧印加後のブタ組織の攪拌振盪洗浄による組織内DNA残存量

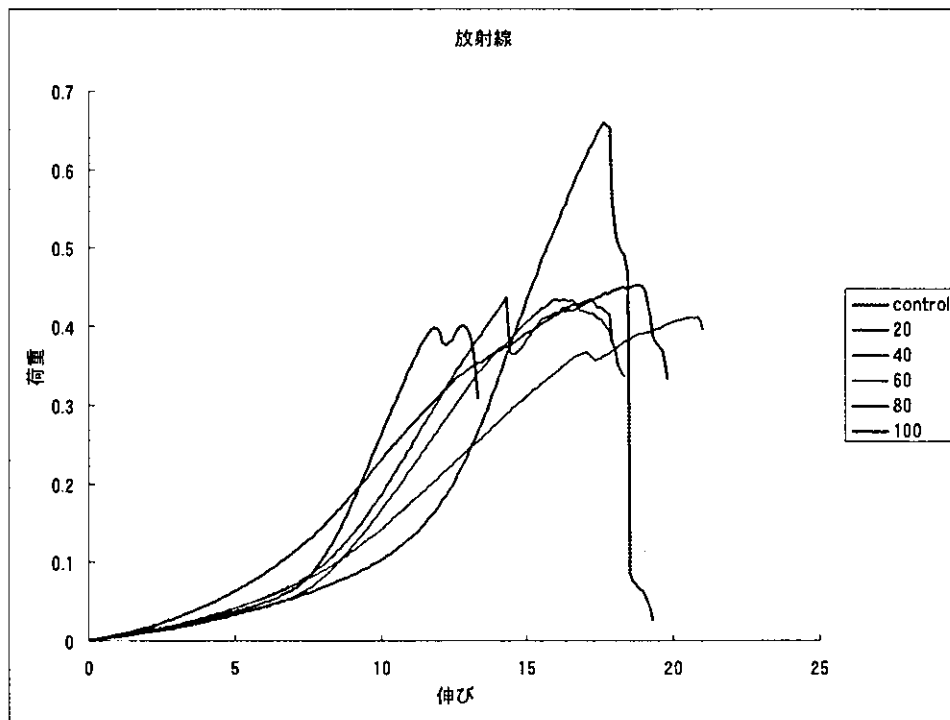


図4. ガンマ線照射後のブタ血管組織の力学特性

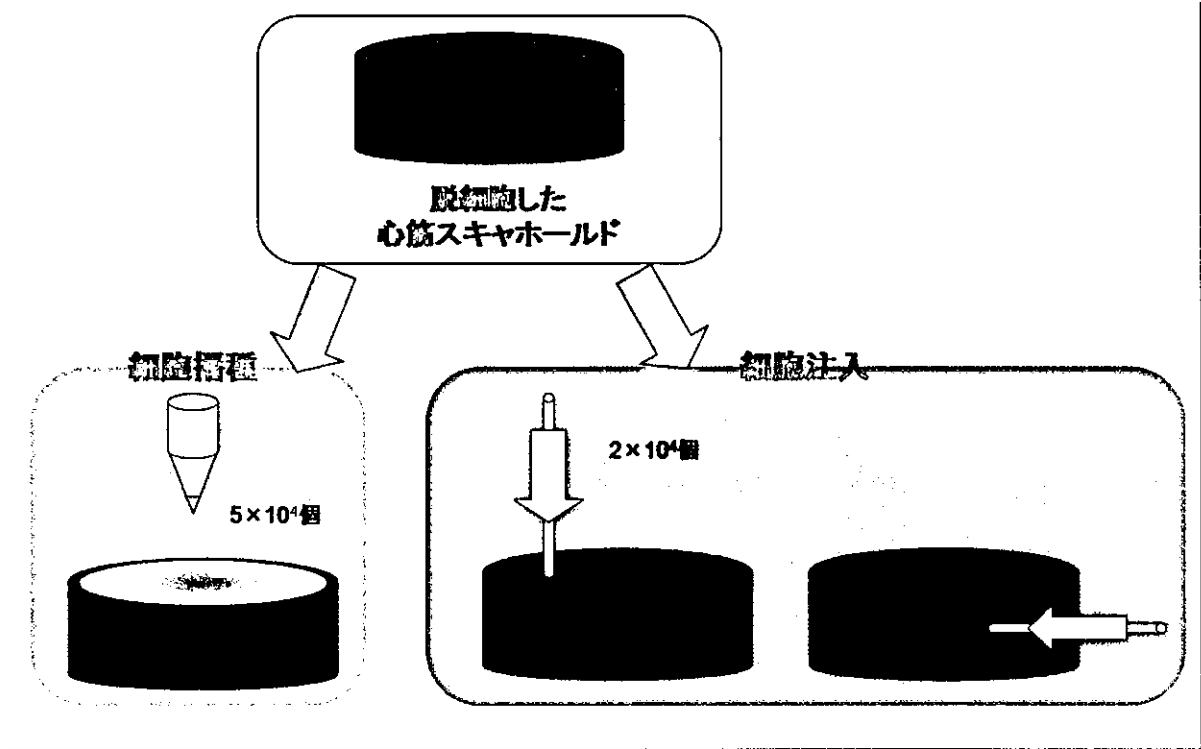


図5. 脱細胞化心筋組織への細胞播種法

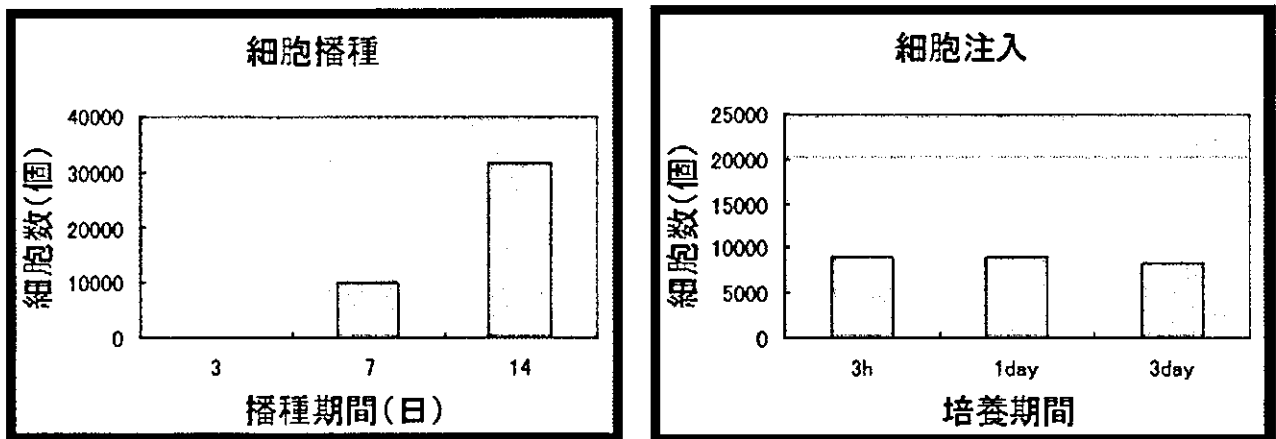


図6. 細胞播種および注入後の細胞増殖挙動



図7. 移植6ヶ月後摘出時の脱細胞化肺動脈弁の所見

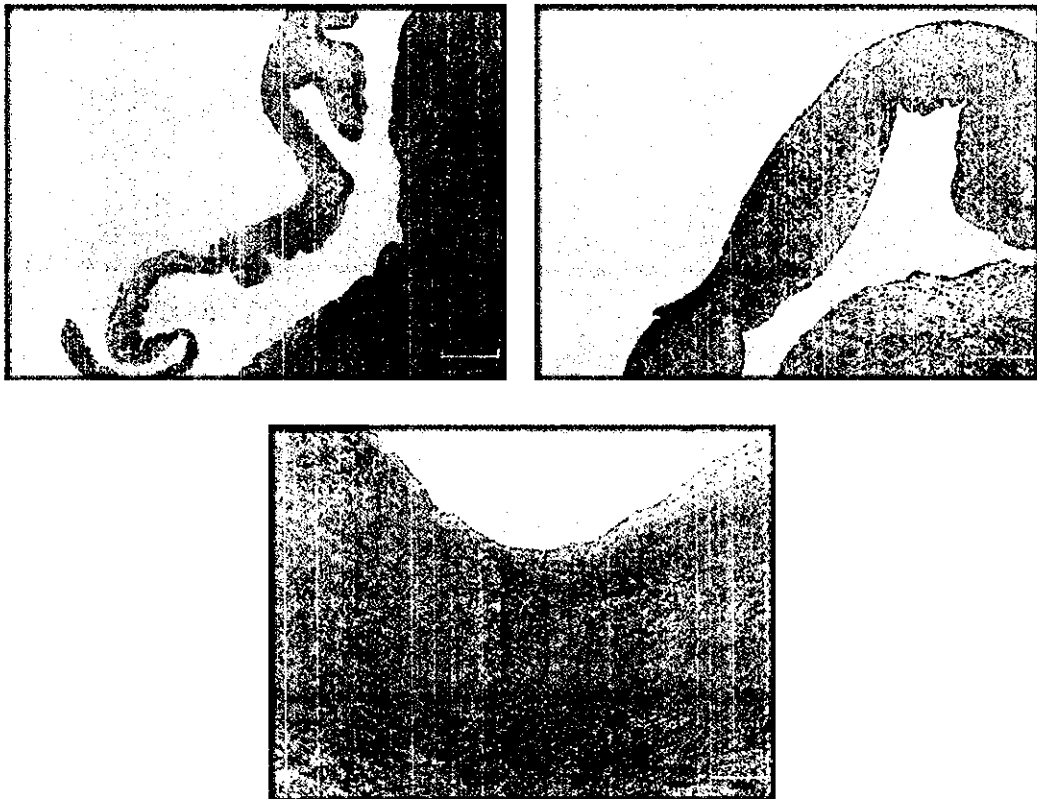


図8. 移植6ヶ月後の脱細胞化肺動脈弁の組織像（左上：弁葉先端、右上：弁葉基部、下：導管部）



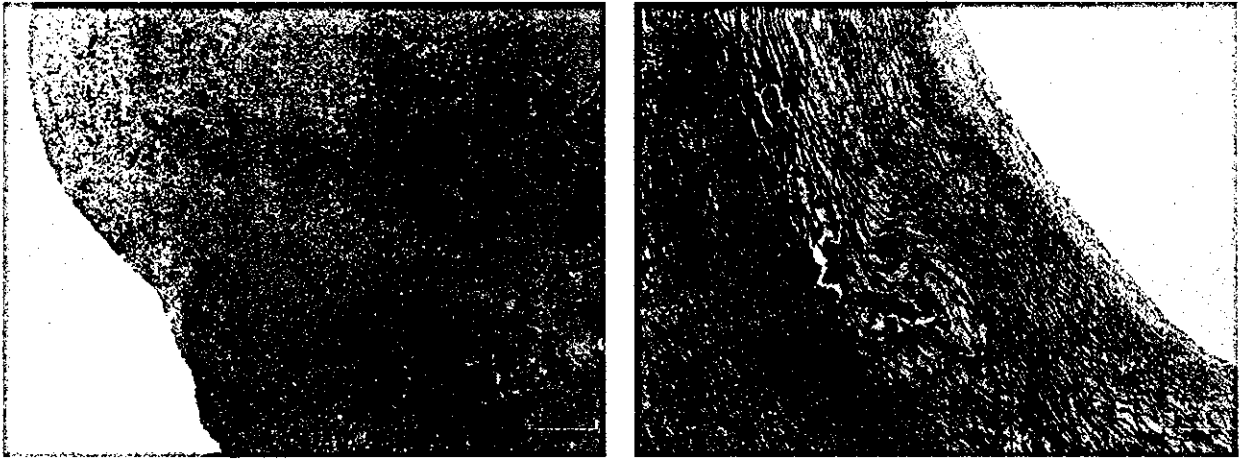


図9. 移植6ヶ月後の脱細胞化組織（左：肺動脈弁、右：大動脈弁導管部）

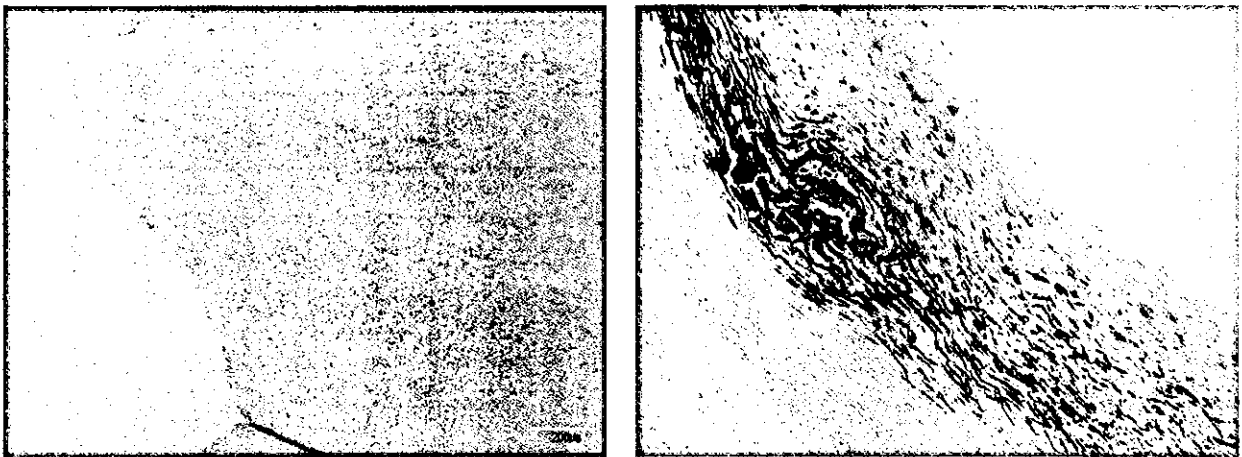


図10. 移植6ヶ月後の脱細胞化組織の石灰化（左：肺動脈弁、右：大動脈弁導管部）

表1. PCRによる雌性生殖細胞における PERV 外被領域遺伝子の検出結果

検査材料	検体数	PERV 外被領域 (env) 遺伝子の種類と DNA 検出状況 (%)		
		env-A	env-B	env-C
卵丘細胞	4	4 (100)	4 (100)	4 (100)
GV 卵子	3	2 (66.7)	2 (66.7)	3 (100)
MII 卵子	3	1 (33.3)	1 (33.3)	3 (100)

\* GV;卵核胞期, MII :第2 減数分裂中期

表2. PCRによるブタ精子における PERV 外被領域遺伝子の検出結果

個体 No.	品種	PERV 外被 (env) 領域遺伝子の種類と DNA 検出状況		
		env-A	env-B	env-C
1	パークシャー	+	+	+
2	パークシャー	-	+	+
3	パークシャー	+	+	+
4	パークシャー	+	+	+
5	パークシャー	+	-	+
6	パークシャー	+	+	+
7	クラウン系 ミニブタ	+	+	+
8	クラウン系 ミニブタ	+	+	+

\* + : 検出可、- : 検出不可

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（脱細胞化の評価と放射線照射の影響）

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による脱細胞化法について、その脱細胞化効果について検討した。洗浄を14日以上行うことで、組織内のDNAが除去できることが分かった。また、ガンマ線照射が、臨床応用に際しての滅菌方法として利用できることが示唆された。

#### A. 研究目的

我が国では年間約1万件、米国では2万件以上、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ヤ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。本年度は、脱細胞化組織について詳細に検討するとともに、臨床応用に向けて、放射線滅菌の影響を検討した。

#### B. 研究方法

脱細胞化処理: ミニブタより採取した心臓弁及び血管組織を、10,000気圧、4℃で処理を行ったのち、攪拌振盪下にて洗浄を行った。処理後の組織を組織学的に観察するとともに、組織内のDNAを抽出し、260nmにおける吸光度から定量した。

放射線照射: 未処理のブタ血管組織を、コバルト60を使用したガンマ線照射施設（日本原子力研究所高崎研究所）にて、通常の医療用具の滅菌に使用される線量を含む範囲で照射した。照射後の

組織について、血流方向の長さ20mm、巾5mmの試験片を作成し、力学試験機にて引張り試験を行い、その力学特性を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、上記法律及び基準に則った国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。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して「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:** 昨年度まではマイクロ波照射下にて洗浄を行っていたが、装置の制約から、同時に多試料を処理することが容易でなかった。本年度は、マイクロ波照射装置を使用せずに、低温攪拌振盪下での洗浄について検討した。その結果、超高圧印加処理後の組織内のDNA量は、洗浄期間の増加とともに減少し、14日以降は未処理の10分の1以下になることが確認された(図1)。また、HE染色による組織標本観察から、組織内には全く細胞核は認められなかった(図2)。

**放射線照射:** ガンマ線照射量を20~100kGyに変化させ、その力学特性を検討した。その結果、未処理の組織と比較して大きな差は見られなかった(図3, 4)。

### 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。欧米では界面活性剤や酵素を用いた脱細胞化によって、臨床応用の報告もなされているが、組織深部の細胞除去は容易でなく、移植直後の急性拒絶反応による不全例も報告されている。超高静水圧印加によっては、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。本年度は、マイクロ波照射装置を用いない洗浄方法について検討したが、洗浄時間は延びるものの、同等の脱細胞化が達成できることが明らかとなった。脱細胞化組織内でのDNA量の残存の他、本報告では触れないが、リン脂質の残存についても検討しており、ともに有効に除去できることが明らかとなっている。

臨床使用における滅菌方法として、前述の欧米のグループはガンマ線照射を行っている。生物試料へのガンマ線照射の影響については、構成繊維の架橋や分解反応が考えられる。我々の脱細胞化処理法は、超高静水圧を印加していることから、処理自体が滅菌を兼ねているとも思われるが、より安全性を高めるため、ガンマ線照射の力学特性に与える影響を検討した。通常の医療用具では、20~30kGyの線量を使用される。本研究の結果からは、大きな変化は認められず、最終製品の滅菌手段として、ガンマ線照射が有効であると考えられた。

本研究事業は本年度にて終了であるが、来年度以降も検討を重ね、数年以内の臨床応用を目指したい。

### E. 結論

昨年度までに開発した超高静水圧印加による脱細胞化法について、その脱細胞化効果について検討した。マイクロ波照射を併用しなくても、攪拌振盪による洗浄を14日以上行うことで、組織内