

のDNAが除去できることが分かった。また、コバルト60を用いたガンマ線照射が、臨床応用の際しての滅菌方法として利用できることが示唆された。

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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。
- 9) 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。
 - 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。
超高圧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。
 - 11) 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。
 - 12) 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。
 - 13) 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
における超高圧印加効果。第42回日本人工臓器
学会大会、口頭。2004年10月5～7日、東京。
 - 14) 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。
 - 15) kishia A, Kimura T, Furuzono T, Fujisato
T, Masuzawa T. Acceleration 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。
 - 16) 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。
超高圧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。
 - 17) 館 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。
 - 18) 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—超高圧処理による
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。
 - 19) 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
高圧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。
 - 20) 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。
 - 21) 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
ォ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。
 - 22) 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プタ大
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。
 - 23) 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
ォ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。
 - 24) 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。

- 25) 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。
- 26) 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。
- 27) 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。バイオスキャフォ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。
- 28) 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。
- 29) 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。

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。
- 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。

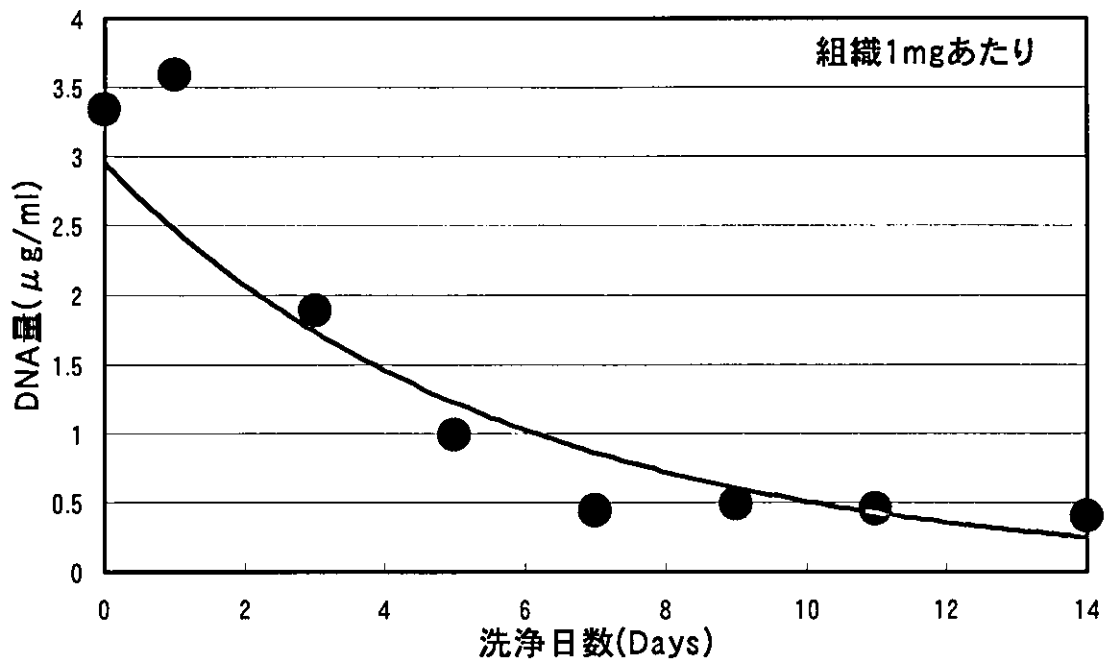


図1. 超高静水圧印加後のブタ組織の攪拌振盪洗浄による組織内DNA残存量

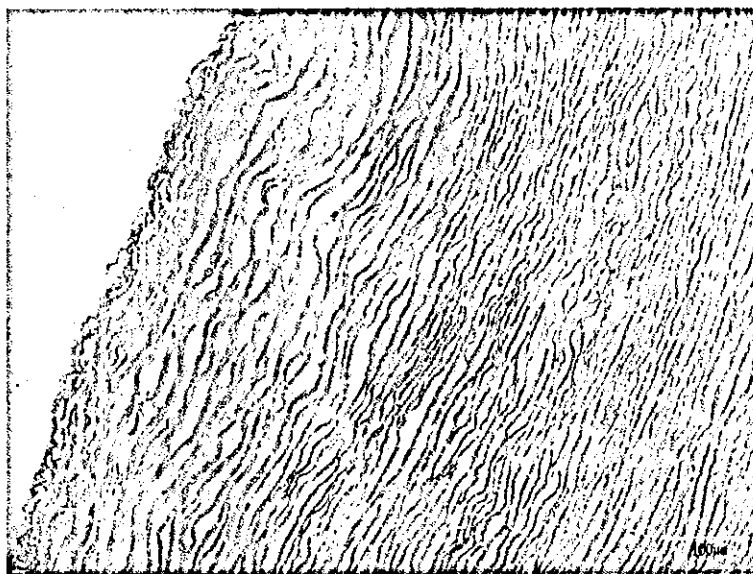


図2. 攪拌振盪洗浄による脱細胞化処理後のブタ血管組織断面

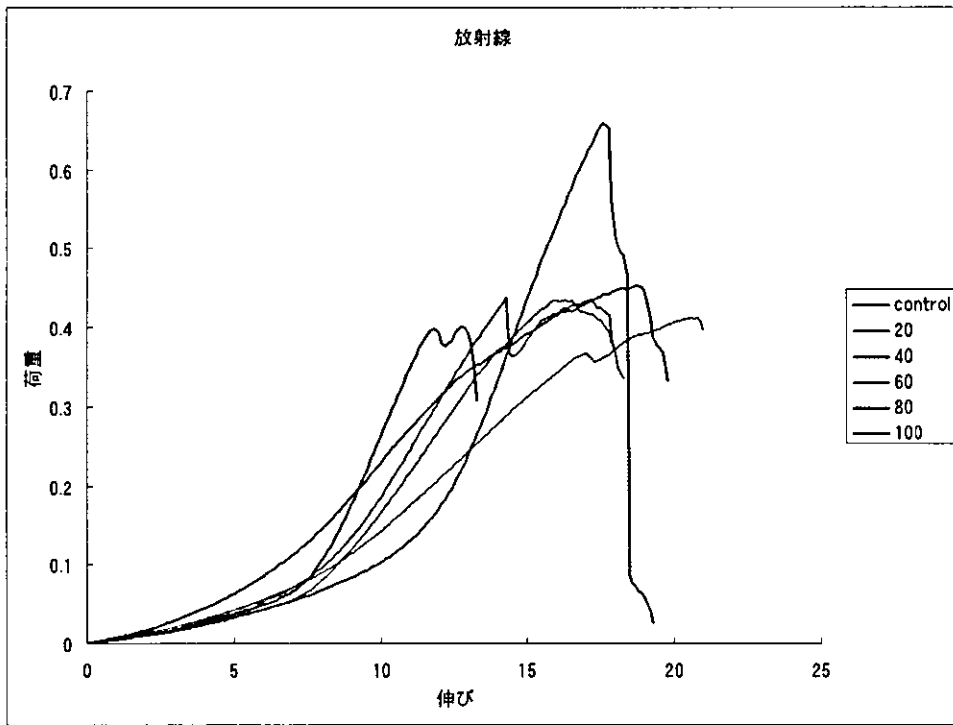


図3. ガンマ線照射後のブタ血管組織の力学特性

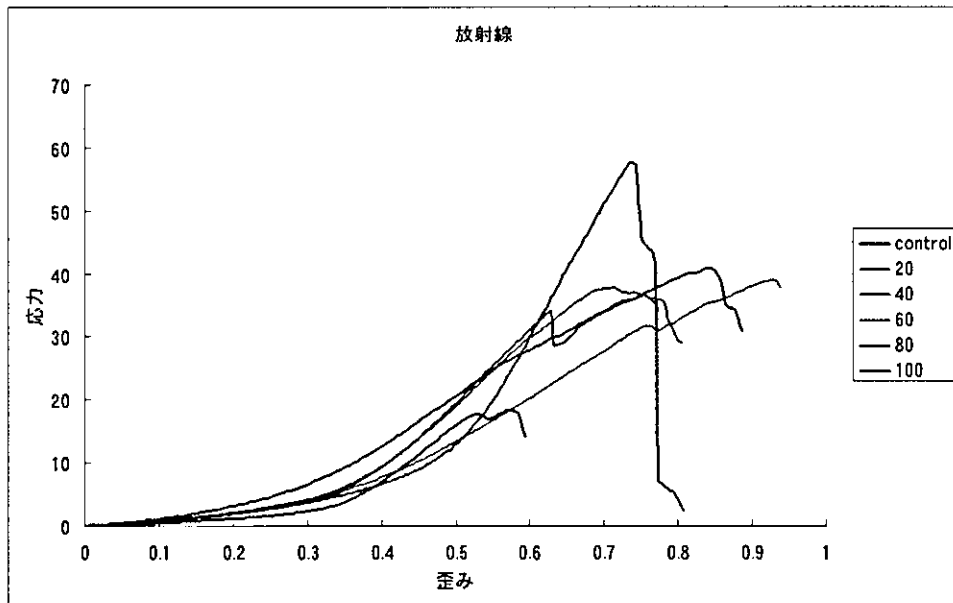


図4. ガンマ線照射後のブタ血管組織の応力-歪み曲線

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（細胞組込）

分担研究者 岸田晶夫 東京医科歯科大学生体材料工学研究センター教授

研究要旨 生物素材から新しい処理法によって脱細胞化してさせ医療用Scaffoldとして用いる。In vitroにおいて自己細胞を播種することによって、移植後の早期の機能発現が期待できる。脱細胞化組織への細胞播種法について検討を行った。

A. 研究目的

我々は、異種組織から細胞・ウイルスを除去し、患者の自己細胞を組み込むことによって、高度の安全性を確保しつつ、かつ小児患者への適用も可能な自己組織に匹敵する移植組織が作出できると考えている。本研究では、ミニブタから取り出した心臓弁や血管からドナー細胞を除去して作成した脱細胞化生体組織（バイオスキャフォールド）に、細胞を播種するための方法について検討を行った。

ここで対象とする組織として心筋を選択した。この理由として、本研究プロジェクトの目的は心臓弁、血管系の再生であるが、細胞播種の検討において、基準となる生体組織（体積、表面積一定）を得るためには、心臓弁と血管では採取できる量的な問題があった。そこで、基準の形に成型しやすく、かつ大量に入手可能な組織としてしんきんを選択した。いっぽう、再生医療研究の観点からは、心筋組織再生については、これまでに細胞移植による研究が行われている。これはシリンジを用いて術者が術野において注入する方法であり、定量性、再現性、安定性についての議論はほとんどされていない。本研究で検討する、細胞播種の方法論がこれらの細胞移植技術に優れた知見を与えることも期待できる。

B. 方法

心筋組織の脱細胞化を行った。ミニブタより採取した心臓を種々の厚みを有する直径約1 cmの組織に調整した。冷間等方圧加圧装置（Dr. CHEF；

（株）神戸製鋼所）を用いて所定時間の低温下超高压印加処理（10℃、10,000気圧）によってドナー細胞を破壊し、組成の異なる種々の培養液にて洗浄除去した。処理標本の組織断面をヘマトキシリン-エオジン（HE）染色により光学顕微鏡観察するとともに、表面を走査型電子顕微鏡にて観察した。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。

C. 結果と考察

図1に脱細胞化心筋写真を示す。心筋組織はスライサーを用いて一定の厚さに切断することが可能であり、また切断されたシート状の組織を一定面積に切り取ることで、一定の形状に成型することが可能であった。これを脱細胞化処理すると、色調は変化するが、サイズや変形は観察されなかった。

脱細胞は超高压処理と洗浄処理の二つの工程からなる。このうち超高压処理については、等方的に圧力がかかるため、処理される組織の大きさによらずどの部位でも同じ処理効果が得られる。一方、洗浄工程については、超高压処理によって破壊された細胞組織の残骸を外部の洗浄液のよって洗い流すため、処理される組織の大きさや厚みによって、効果はことなる。これまでは心臓弁および血管系など厚さの小さい組織を対象とした条件設定を行ってきたため、今回、厚さの影響を明らかにするために、スライサーを用いて1-3

mm厚のシートに切り出し、脱細胞化処理の条件について検討した。その結果、厚さが3mmまではこれまでの処理条件で脱細胞化が可能であったが、5mm以上では内部に残存細胞組織が多数観察され、条件の再設定が必要であった。これは洗浄期間を延長することによって可能であるが、品質管理の点からは長期の洗浄工程は好ましくなく、何らかの新しい技術の導入が必要であると考えられた。図2に脱細胞処理の洗浄期間の違いを示す。1日後では残存細胞が観察されるが2週間後では、それらは消失している。また図3に心筋組織の表面を走査型電子顕微鏡で観察した結果を示す。図より、表面にある細胞は本技術によって完全に除去され、繊維性の組織像のみが観察される。このことから、表層近くにある細胞は比較的容易に脱細胞可能であることがわかる。心筋組織は、他の生体組織と比較すると密度が高く、細胞残渣の除去ではもっとも困難な組織のひとつと考えられる。心筋組織においても脱細胞化が可能であることが示唆されたことから、超高压を用いた脱細胞化処理技術（パワーグラフト法）の有用性が示された。

図4に、脱細胞化心筋組織への細胞の導入法について図示した。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にそれぞれの導入後の細胞数についてDNA定量による計測結果を示す。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、DNA量も増加し、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、DNA量は時間変化しても変化がなく、細胞が減少・増殖どちらもしていない事が示唆された。培養後の組織から切片を作成し観察したところ、播種した場合には組織表面に細胞が一面に観察され、表面での増殖が確認できた。しかしながら内部への細胞の浸潤は観察されず、表面から播種するだけでは3次元的な組織体の再構築は困難であると考えられた。一方、注入した場合の切片増を図6に示す。図より明らかなように、組織内に細胞が塊状となって観察され、形態的には内部で生存していることがわかった。しかしながら、増殖している様子は観察されず、酸素、栄養などの環境因子の不足もしくは、増殖に必要な空間が確保できな

いために、増殖できずにいるのではないかと推測された。

上でも述べたように心筋組織は密度が高く、脱細胞化を行っても空隙はほとんど生じない。これは血管などの繊維性組織でも同様であり、今後、細胞をin vitroで播種し、自己化したのちに患者に埋め込む方法論の実現のためには、組織内部での細胞の浸潤・再配置・増殖・機能発現を制御する技術が必要であることが明らかとなった。

E. 結論

種々の形状の心筋スキャフォールドを調製できた。心筋スキャフォールドは、超高压静水圧印加処理と2週間の洗浄によって完全脱細胞化された。脱細胞化は洗浄期間に依存し、心筋が厚いほど洗浄期間を要した。細胞播種では、心筋スキャフォールド表面への細胞の生着が確認できた。また、培養期間の増大に伴う細胞の増殖が示された。しかしながら、心筋スキャフォールド内への細胞の浸潤は認められなかった。細胞注入では、心筋スキャフォールド内部での細胞の生着は確認できたが、細胞の増殖は示されなかった。今後、心筋スキャフォールド内部への細胞浸潤あるいは内部での細胞増殖が達成される、新たな培養法が課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

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ボ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、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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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。
- 17) 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。
- 18) Kishida A, Kimura T, Furuzono T, Fujisato T, Masuzawa T. Acceleration 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。
- 19) 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。
- 20) 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。
- 21) 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。
- 22) 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。
- 23) 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。
- 24) 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ォ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。
- 25) 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プ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。
- 26) 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ォ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。
- 27) 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。
- 28) 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プ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。
- 29) 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。2005年2月23日、浜松。
- 30) 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。

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.
- 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.

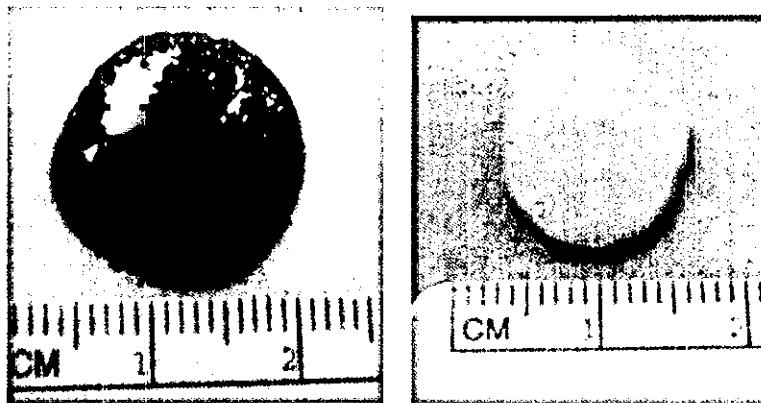


図1. 脱細胞化心筋組織のマクロ像
(左：脱細胞化前、右：脱細胞化後)

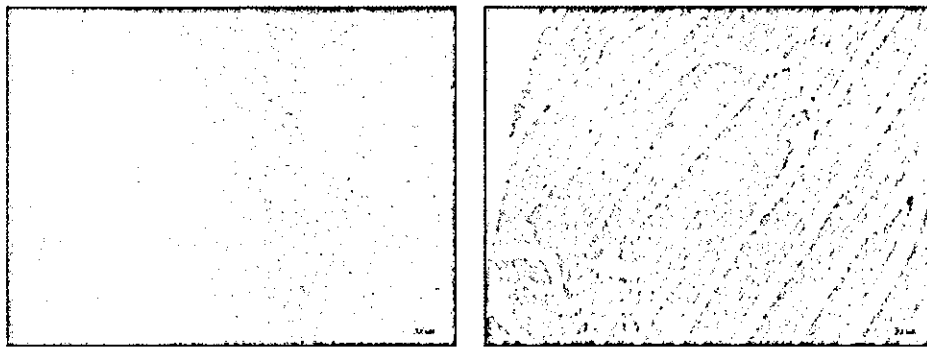


図2. 脱細胞化組織像
(左：洗浄1日目、右：洗浄14日目)

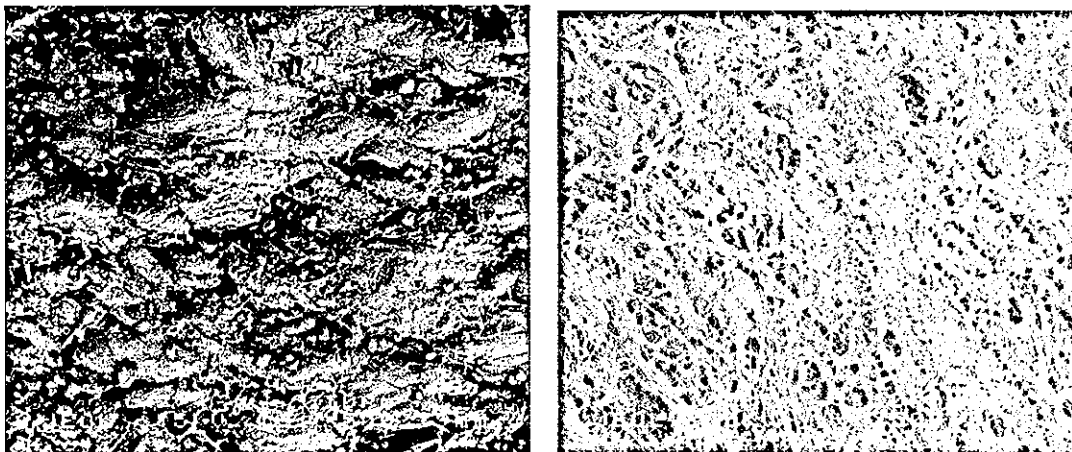


図3. 脱細胞化組織の走査電子顕微鏡写真像 (左：脱細胞化前、右：脱細胞化後)

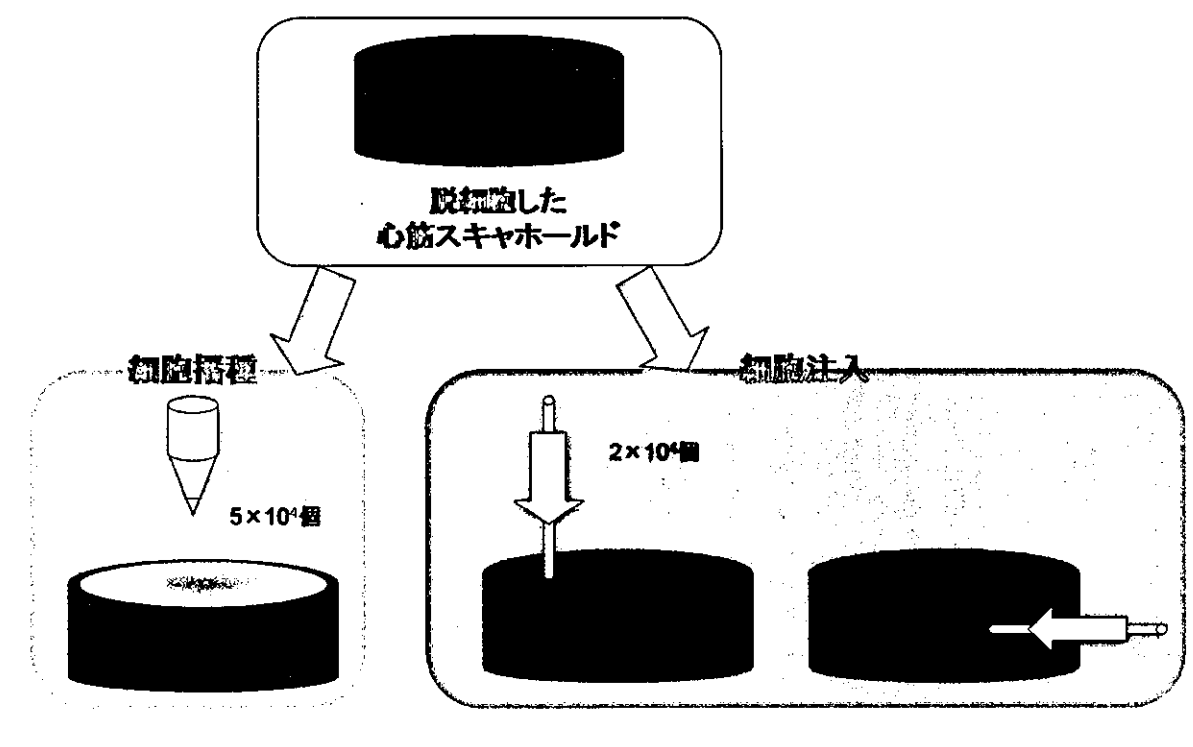


図4. 脱細胞化心筋組織への細胞播種法

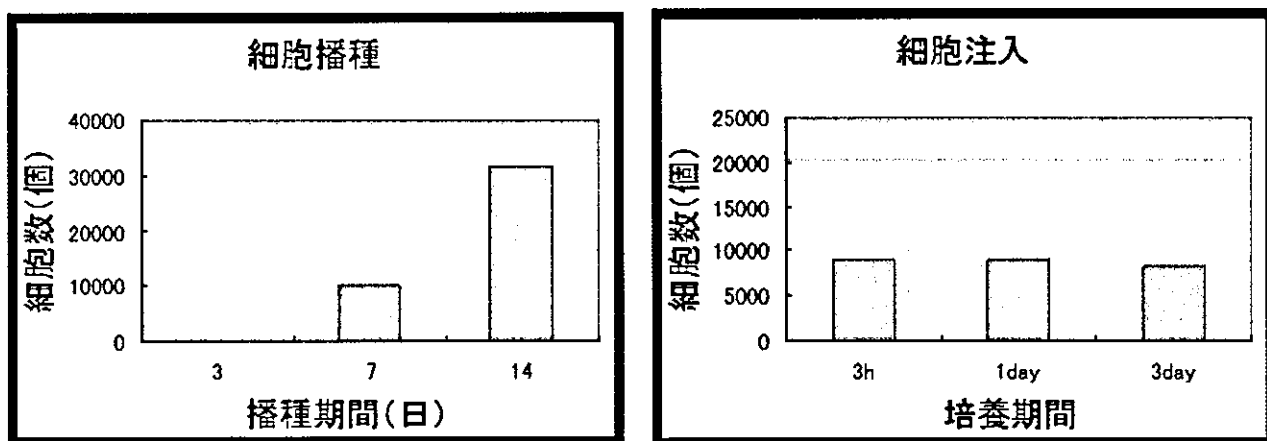


図5. 細胞播種および注入後の細胞増殖挙動

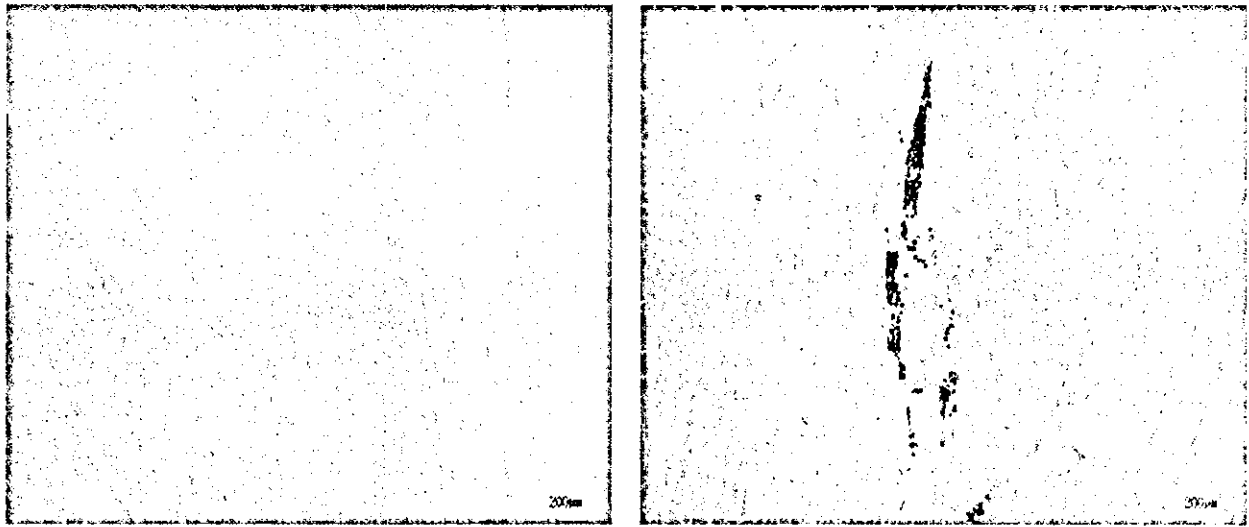


図6．心筋内に注入された細胞の組織像（左：注入前、右：注入後3日間）

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 超高压処理によって脱細胞化したミニブタ肺動脈弁を、同種ミニブタに同所性に移植した。移植した肺動脈弁には破断等の所見は見られず、移植6ヶ月後でも弁機能は良好であった。組織学的に検討したところ、弁葉の先端部を除いて豊富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、超高压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肺動脈弁を、同種ミニブタに同所性に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、肺動脈弁を採取した。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。

移植実験：クラウン系ミニブタ9頭を用い、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。術後1ヶ月、3ヶ月、及び6ヶ月において、超音波診断装置を用いて弁機能を観察するとともに、それぞれ3頭ずつから移植組織を摘出し、HE染色、抗vWF（血管内皮細胞）、抗 α -SMA（平滑筋細胞）、抗ビメンチン（間質細胞）免疫染色によって組織学的所見を検討した。

（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

全例において、移植組織の破断等の所見は見られなかった。図1に示すように、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、図2に示すように、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。

摘出組織を免疫組織学的に観察したところ、図3に示すように、移植6ヶ月後では、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。また、図4に示すように、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。また、図5及び6に示すように、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。

D. 考察

昨年度は、大動脈弁導管部を用いた同種移植実験を行い、その有効性を検討した。左心系であっても破断等の所見もなく、我々が開発した脱細胞化処理の有効性が示された。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。実験手技の難度やコストの要因を考慮し、大動脈弁移植実験ではなく肺動脈弁移植実験を選択した。

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。

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。早期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

脱細胞化ミニブタ肺動脈弁を同種ミニブタへ同所性に移植したところ、移植6ヶ月後でも弁機能の維持は良好で、豊富な自己細胞の浸潤を確認した。

研究協力者

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

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) 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.
- 3) 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 annuloarortic ectasia in marfan syndrome? *J Thoracic & Cardiovasc Surg* 2004; 127 (5): 1373-80.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.

学会発表

- 1) 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.
- 2) 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学会総会, 口頭. 2004年5月21~22日, 広島.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

- 11) 館 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。
- 12) 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。
- 13) 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。
- 14) 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ォ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。
- 15) 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。
- 16) 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。2005年2月23日、浜松。

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）
なし

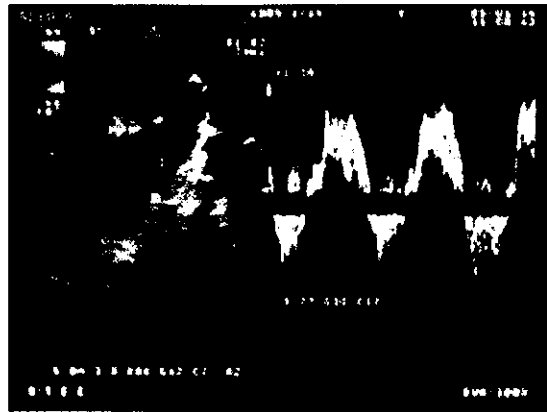


図1. 移植6ヶ月後の脱細胞化肺動脈弁の超音波診断所見



図2. 移植6ヶ月後摘出時の脱細胞化肺動脈弁の所見

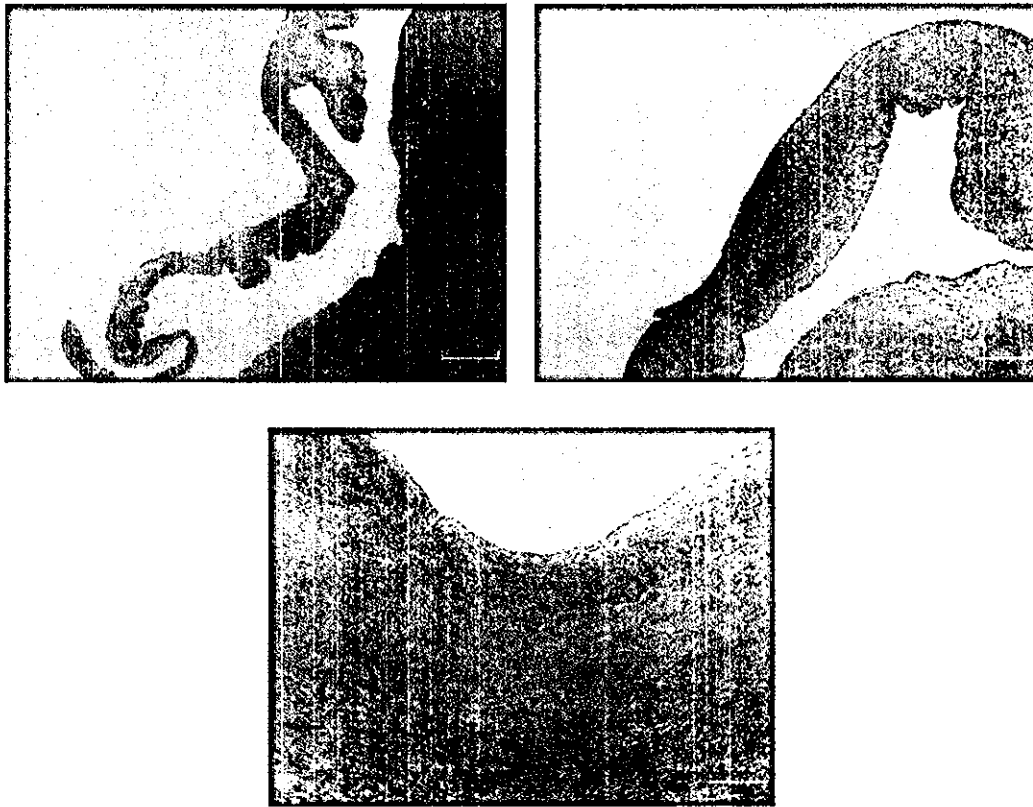


図3. 移植6ヶ月後の脱細胞化肺動脈弁の組織像（左上：弁葉先端、右上：弁葉基部、下：導管部）

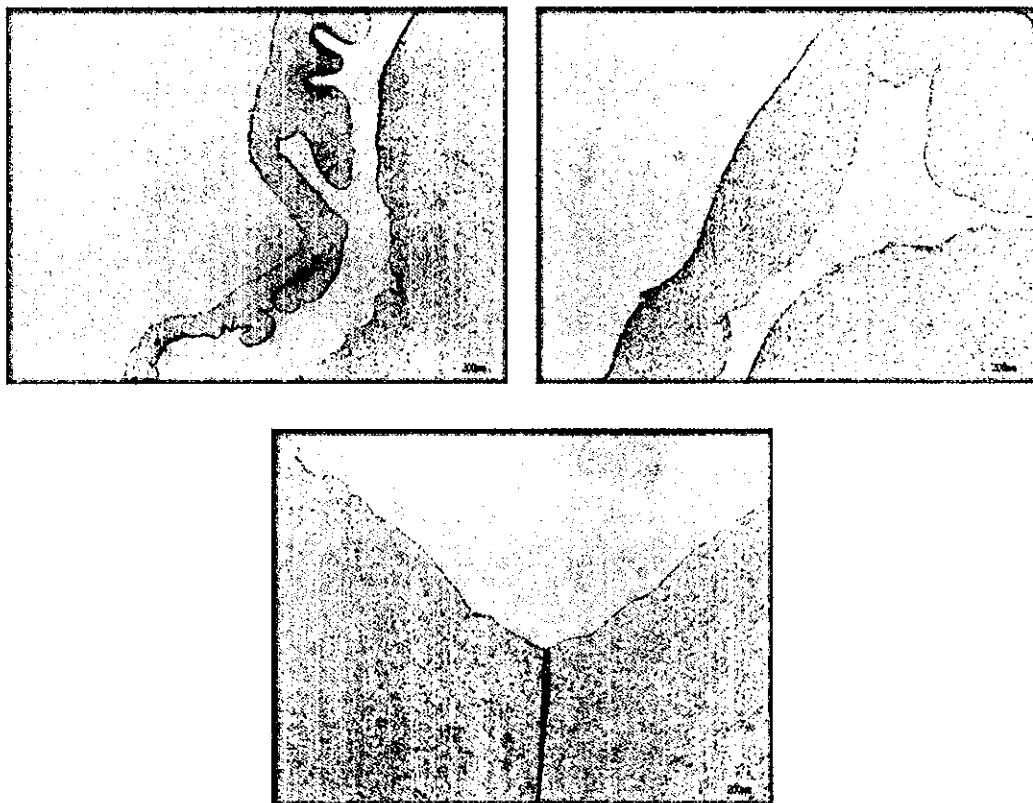


図4. 移植6ヶ月後の脱細胞化肺動脈弁の内皮細胞（左上：弁葉先端、右上：弁葉基部、下：導管部）

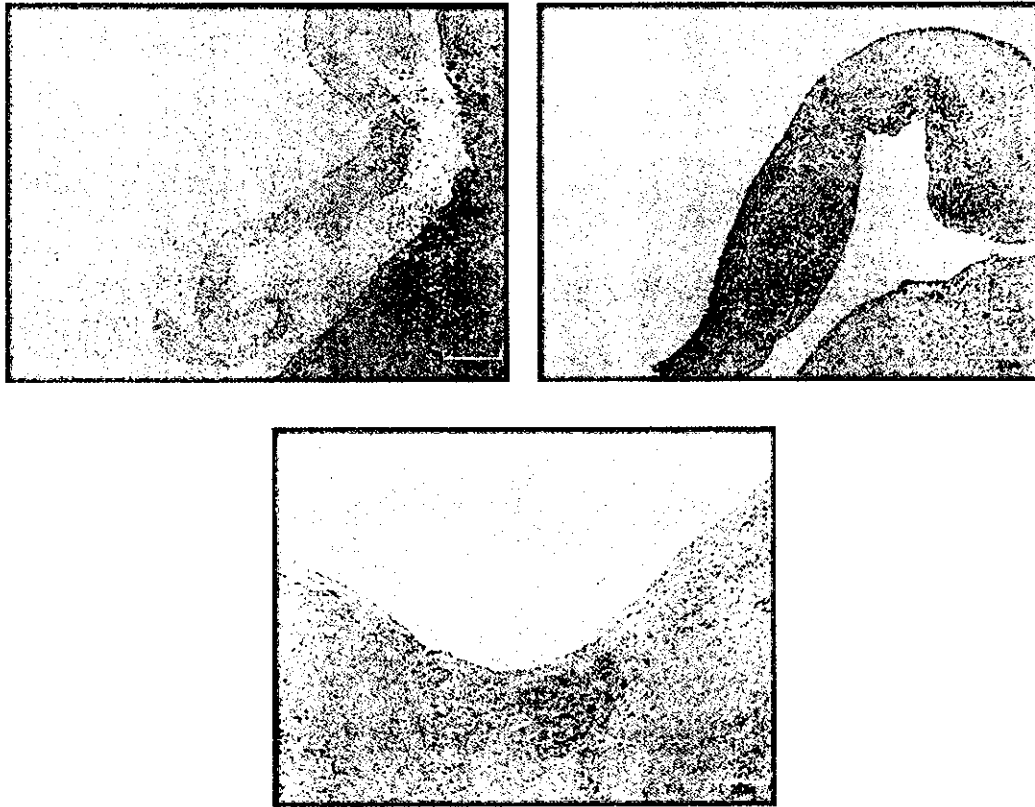


図5. 移植6ヶ月後の脱細胞化肺動脈弁の平滑筋細胞
 (左上：弁葉先端、右上：弁葉基部、下：導管部)

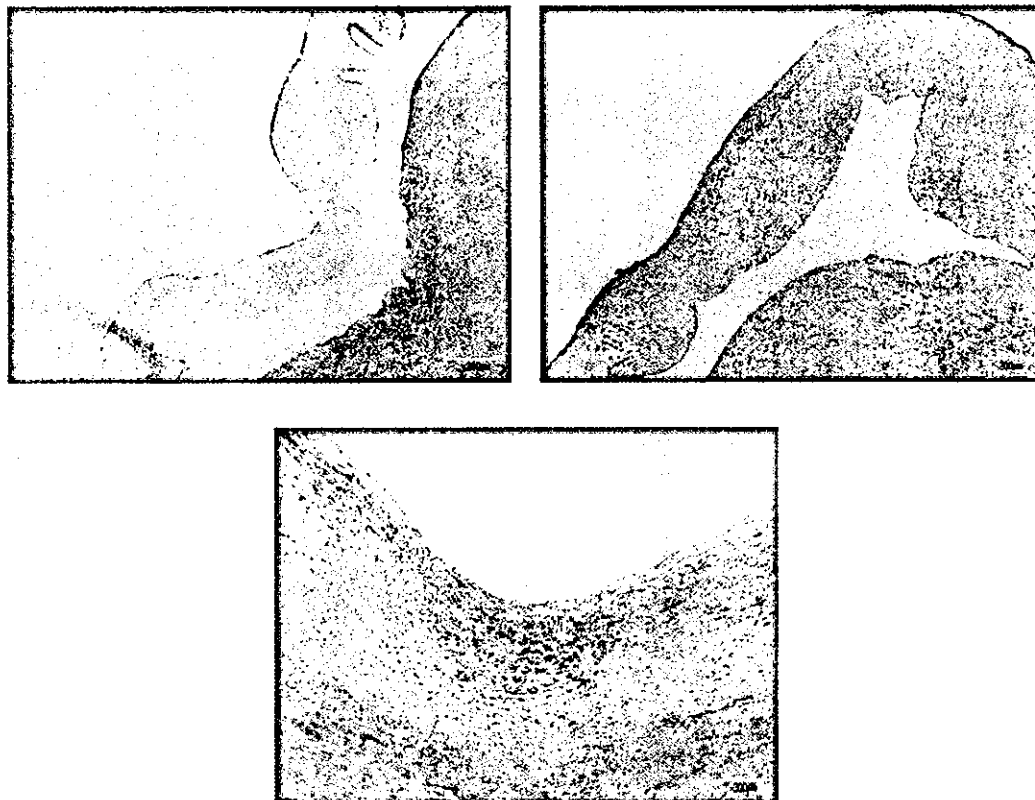


図6. 移植6ヶ月後の脱細胞化肺動脈弁の間質細胞 (左上：弁葉先端、右上：弁葉基部、下：導管部)