

200400238A

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

再生医療技術を応用した
テーラーメイド型代用血管・心臓弁の臨床応用に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中谷 武嗣

平成17年（2005年）4月

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

再生医療技術を応用した

テーラーメイド型代用血管・心臓弁の臨床応用に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中谷 武嗣

平成17年（2005年）4月

目 次

I. 総括研究報告	
再生医療技術を応用したテーラーメイド型代用血管・心臓弁の臨床応用に関する研究 ……	1
中谷 武嗣	
II. 分担研究報告書	
1. 再生医療型血管・心臓弁の開発（脱細胞化の評価） ……	13
藤里 俊哉	
2. 再生医療型血管・心臓弁の開発（機能性の付与） ……	21
岸田 晶夫	
3. 再生医療型血管の動物実験 ……	27
湊谷 謙司	
4. 再生医療型心臓弁の動物実験 ……	35
庭屋 和夫	
5. 臨床応用における倫理面の評価（霊長類を用いた前臨床試験） ……	41
北村 惣一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……	49

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
総括研究報告書

再生医療技術を応用したテーラーメイド型代用血管・心臓弁の臨床応用に関する研究

主任研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター臓器移植部長

研究要旨 これまでに開発した超高静水圧印加を基盤とした処理方法によって脱細胞化した大動脈及び大動脈弁を同種移植した。この結果、移植後の良好な細胞浸潤、自己組織化が見られた。しかしながら、石灰化や、異種移植の場合では拒絶反応の所見も見られたため、より効果的な細胞成分除去方法を検討し、組織内の細胞やウイルス、リン脂質等をより有効に除去する方法を開発した。この新規処理法を適用した移植実験を実施し、早期の臨床応用を目指す予定である。

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
岸田晶夫
東京医科歯科大学教授
湊谷謙司
国立循環器病センター心臓血管外科医師
庭屋和夫
国立循環器病センター心臓血管外科医師
北村惣一郎
国立循環器病センター総長

A. 研究目的

我が国では年間約2万件、米国では約50万件的冠動脈バイパス術が施行されている。また、閉塞性血栓血管炎や閉塞性動脈硬化症によって、我が国では年間約5千人、米国では約15万人が下肢切断を余儀なくされており、我が国では年間1万件弱、米国では年間8万件余りの末梢血管再建術が施行されている。不全あるいは傷害をうけた血管組織を置換するための第一選択肢は、患者の自己組織の使用である。しかしながら、糖尿病患者のように、しばしば自己組織の使用が不可能な場合があり、その場合は人工血管あるいは同種凍結保存血管の使用が次選択肢となる。小口径の場合で

は人工血管は閉塞の危険があり、同種組織が好ましい。また、中大口径の場合でも人工血管は感染に弱く、一旦生じた細菌病巣は抗生剤による治療も有効でないため、感染部位では同種組織の使用が適当である。同様に、移植された人工血管が感染した場合も、同種組織による再建が第一選択肢となっている。

また、我が国では年間1万件、米国では3万件以上の心臓弁置換術が施行されている。代用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した異種生体弁があり、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、年々増加している。しかし、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15年、若年者では5年程度の耐久性しか有せず、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、提供された同種血管や心臓弁が使用されつつあり、良好な成績が報告されている。不全の大動脈弁位に自己肺動脈弁を、肺動脈弁位に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、患者の成長に伴う成長性を有しているため、特に小児患者で有効である。しかし、我が国では同種血管・弁の提供数が絶対的に不足しており、急激な増加は望めない現状にある。

我々は、同種あるいは異種組織から細胞成分を消失させた脱細胞化組織に、患者の細胞を組み込んだテーラーメイド型組織移植を目指している（図1）。現在の異種生体弁は異物として存在し、自己化されないが、この組織移植では、固定化されておらず細胞も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、移植後に成長する移植組織が作出し得ると考えられる。既に、これまでの研究から、超高压印加並びにマイクロ波照射下での洗浄を組み合わせた脱細胞化処理によって、効果的に細胞を除去する基本技術を開発している（図2）。本研究ではこの基本技術を生かし、血管及び心臓弁を対象組織として臨床応用することを目標とする。

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）から麻酔清潔下にて大動脈及び心臓弁を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置（株）神戸製鋼所）を用いた超高压印加処理、続けて洗浄処理を行うことで細胞成分を除去した（パワーグラフト処理と命名）。処理後の組織を、組織学的に観察するとともに、リン脂質やDNA量等の細胞成分の測定を行うことで脱細胞化を評価した。また、DNAを抽出後、ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のPCR産物を電気泳動することで、組織内PERVを測定した。

血管移植実験: クラウン系ミニブタ9頭を用い、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による下行大動脈置換手術を行った。術後1ヶ月、3ヶ月及び6ヶ月において、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）、及びvon Kossa染色（石灰化）によって組織学的所見を検討した。

大動脈弁移植実験: クラウン系ミニブタ6頭を用い、左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術にて、脱細胞化同種大動脈弁導管による大動脈置換手術を行った。術後1ヶ月及び3ヶ月において、それぞれ3頭ずつから移植組織を摘出し、HE染色、抗vWF、及びvon Kossa染色によって組織学的所見を検討した。

異種移植実験: カニクイサル5頭を用い、ミニブタと同様に下行大動脈に置換移植した。移植組織を摘出し、HE染色によって組織学的所見を

検討した。

脱細胞化処理の改良: ミニブタより採取した血管組織を、10,000気圧、4℃で処理を行ったのち、洗浄を行った。続けて、新たなリン脂質除去用溶媒に浸漬して洗浄した。処理組織をホモジナイザーによって粉碎し、抽出したリン脂質を臨床検査キット（和光純薬）にて定量した。また、その微細構造を透過型電子顕微鏡（TEM）にて観察した。

機能性分子の複合化: 複合化する機能性分子として、抗血栓性付与のためにリン脂質ポリマーの複合化について検討した。

（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

脱細胞化処理: パワーグラフト処理後の組織内では細胞核は全く染色されず、内皮細胞は完全に剥離していた。組織内のβアクチン及びPERVは全く検出されなかった（図3）。

血管移植実験: 術後に移植組織の破断等の所見は見られず、移植直後の形状を保っていた。内腔面も平滑で血栓等の付着も認められなかった（図4）。また、組織内への細胞浸潤は良好で、移植6ヶ月後には大部分が自己組織化されていた。細胞浸潤は周囲及び内腔側から見られ、周囲側の方が顕著であった。移植1ヶ月後には、ほぼ全域に渡って内腔面は血管内皮細胞によって覆われてい

た。しかしながら、組織内部には石灰化の所見も見られた(図5)。

大動脈弁移植実験:術後に移植組織の破断等の所見は見られなかった。移植1ヶ月後では大動脈弁葉は正常所見を示していたが、移植3ヶ月後では弁葉は吸収され、縮退していた。内腔面は血管内皮細胞によって完全に覆われていた。移植1ヶ月後で内腔及び周囲からの細胞浸潤が見られた(図6)。また、導管部の組織内部では点状の石灰化所見が見られた。

異種移植実験:ミニブタの場合とは異なり、レシピエントの体格による手術手技の難しさもあり、術後の生存は5頭中1頭であった。生存した1頭も術後の回復が不良であり、3週間で失った。移植組織を摘出して観察したところ、多数の免疫細胞の浸潤が認められた(図7)。

脱細胞化処理の改良:前述のように、パワーグラフト処理後の血管壁内では、細胞核は染色されず、PERVも検出されなかった。しかしながら、リン脂質は処理後でも検出された(図8)。リン脂質は移植後の石灰化の要因となり得るため、新規洗浄液にて除去することを試みた。新洗浄液を用いることで残存リン脂質量は3分の1以下に減少させることができた(図9)。また、TEM観察より、核および細胞質の密度が低下していることが確認できた。

機能性分子の複合化:生体適合性高分子としてリン脂質ポリマーである2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ユニットを有するPoly(MPC-co-methacrylic acid)(PMA)を使用し、コラーゲンとの架橋を行ったところ(図10)、非常に強いゲルが形成できた。

D. 考察

米国では凍結保存した同種組織移植が商業化されており、例えば代表的企業であるクライオリフ社(ジョージア州)では、1年間に心臓弁を2,800個、血管を3,200本も出荷し、30億円以上を売り上げている(2003年、同社年次報告)。それでもなお提供数が足りないとして、同社は抗原性除去処理(SynerGraft®処理)したブタ組織を商品化している。しかしながら、感染事故を契機とした処理方法の安全性への疑念から、米国食品医薬品局の指導によって現在は製造中止状態にある。再生型血管としては、既に生体内分解吸収性

材料を基材とし、東京女子医科大学大学院の新岡教授らが小児患者の静脈再建において優れた臨床結果を報告している。しかし、臨床現場で使用できる吸収性材料は限られており、かつ加水分解によって非生物学的に分解するため、分解速度の制御が容易でなく、動脈を対象とした場合では分解に伴う強度不足による破断の恐れがあり、臨床応用は未だ為されていない。我々が用いている脱細胞化組織は、移植後に浸潤してきた細胞によって分解・置換されると考えられるため、吸収性材料とは異なり、自己組織化が達成される以前の強度低下が抑制される。

本年度は、これまでに開発した脱細胞化処理法を用い、下行大動脈並びに大動脈の同種及び異種移植実験を行った。同種移植実験の結果からは、細胞の浸潤は良好で、特に内腔面は移植1ヶ月でほぼ全面が血管内皮細胞で覆われており、血栓の付着も認められなかった。また、組織内部も移植6ヶ月で多くの部分に細胞浸潤が認められた。しかしながら、血管壁組織内部で石灰化の所見が認められ、一部例では狭窄傾向も認められた。これらは、移植後の細胞浸潤過程の制御が必要であることを示唆しており、脱細胞化組織に対して何らかの機能性分子の複合化が必要であると思われる。本年度は、抗血栓性を主眼としてMPC分子の複合化について検討したが、次年度以降は、組織内部への導入も検討したい。ただ、機能性分子及びその導入過程の安全性確保の問題もあり、臨床応用に際しては必要最小限に抑制する必要があると考えている。

異種移植実験の結果からは、用いた動物が体重3kg以下とミニブタに比較して小さく、手技が容易でないという問題が明らかとなった。また、移植後の組織内では拒絶反応と思われる多数の免疫細胞の浸潤が見られ、抗原性の残存が疑われた。そのため、パワーグラフト処理後の組織内細胞膜成分の残存を測定したところ、リン脂質成分が検出された。リン脂質は拒絶反応だけでなく石灰化の起点となる可能性もある。そこで、従来法の特徴を損なわず、リン脂質の除去を効率的に行う新しい方法について検討した。その結果、生体に安全で、従来法の特徴を変化させない洗浄液を見出し、リン脂質を減少させることができた。しかし、完全なリン脂質除去に向けて、もう少しの条件至適化が必要な状況である。

欧米では脱細胞化に薬液を用いた方法で、既に数グループが臨床応用を開始しているが、不十分な脱細胞化が原因と思われる移植後早期の不全例も報告されている。超高圧印加処理では、細菌やウイルスの不活化が既に報告されているため、パワーグラフト処理は高い安全性が確保できると考えている。早期の臨床応用を目指したい。

E. 結論

超高静水圧印加を基盤とした処理方法によって脱細胞化した大動脈及び大動脈弁を同種移植したところ、良好な細胞浸潤、自己組織化が見られた。しかしながら、石灰化や、異種移植の場合では拒絶反応の所見も見られたため、より効果的な細胞成分除去方法を開発した。これにより、組織内の細胞やウイルス、リン脂質等をより有効に除去することができた。次年度は、この新規処理法を適用した移植実験を実施し、早期の臨床応用を目指す予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中谷武嗣. 補助循環と心臓移植. CURRENT THERAPY 2004; 22: 175-80.
- 2) 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.
- 3) 中谷武嗣. 体外設置式補助人工心臓. Clinical Engineering 2004; 15: 480-6.
- 4) 中谷武嗣、工藤龍彦. 人工肺・体外循環 2. 人工臓器 2004; 33: 76-7.
- 5) 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.
- 6) 中谷武嗣. ここまで進んだ補助人工心臓. N H K きょうの健康 2004; 197(8月号): 102-4.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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 annuloarortotic ectasia in marfan syndrome? J Thoracic & Cardiovasc Surg 2004; 127 (5) : 1373-80.

- 15) 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.
- 16) 永井良三、掘 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.
- 17) 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.
- 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.

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. J S T 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. 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.
 - 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。
- 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。
- 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。
- 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。
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 pl。
- 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.
- 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.

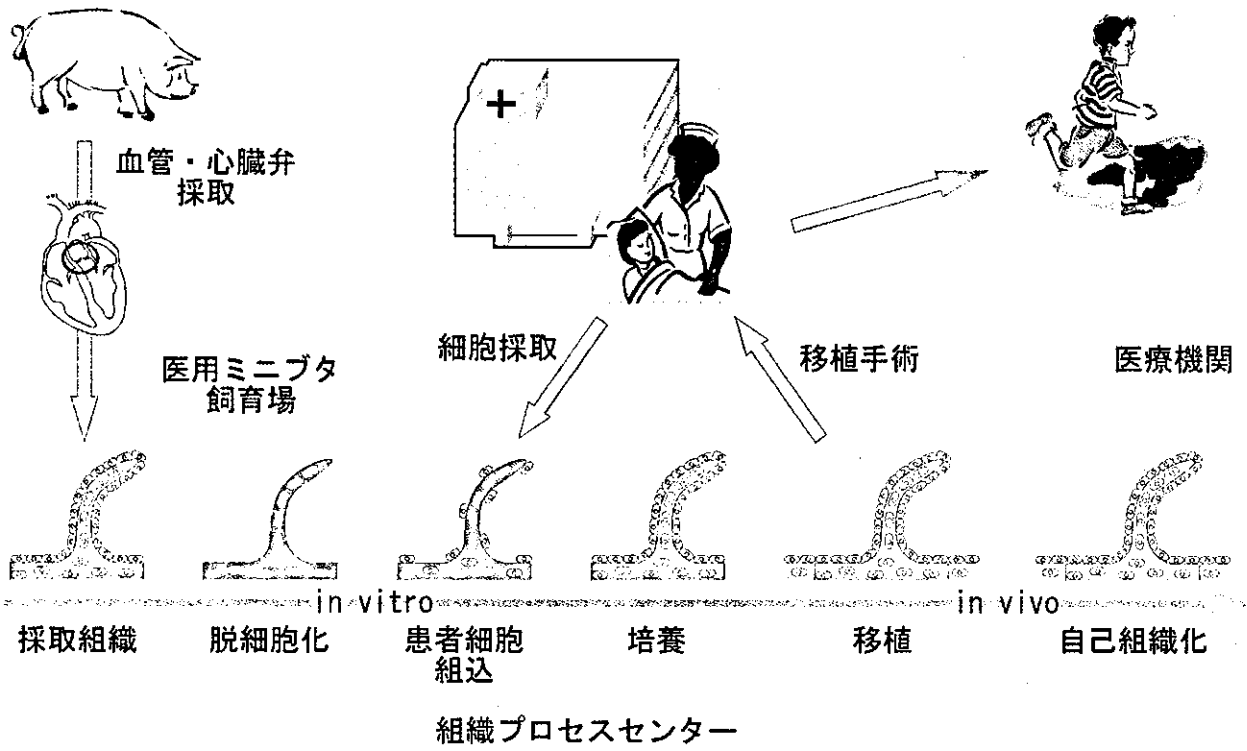


図1. テーラーメイド型血管・心臓弁移植

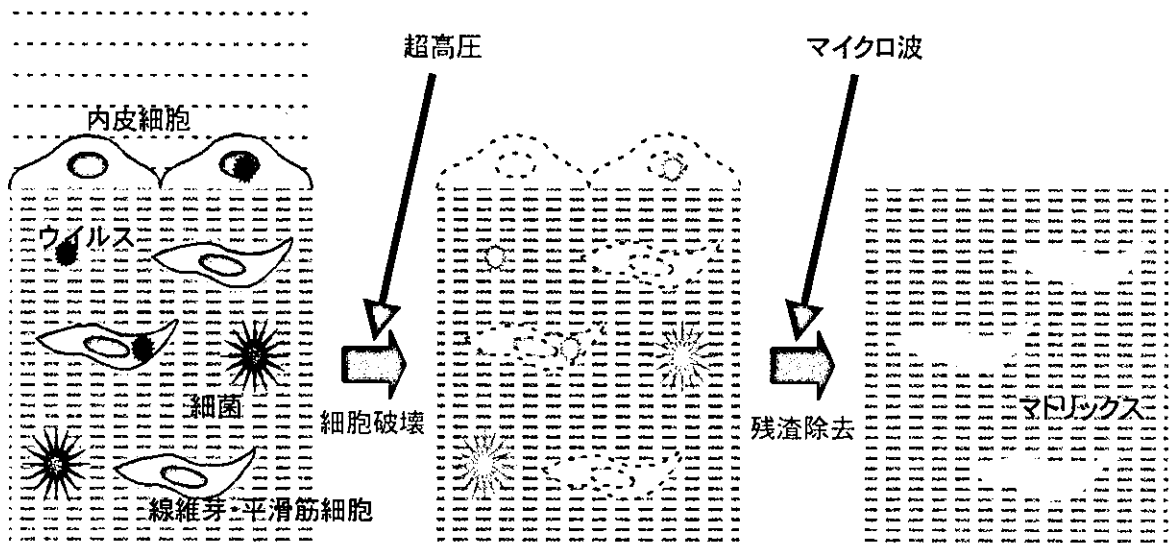


図2. 我々が新規に開発した細胞除去方法 (基本特許出願済)

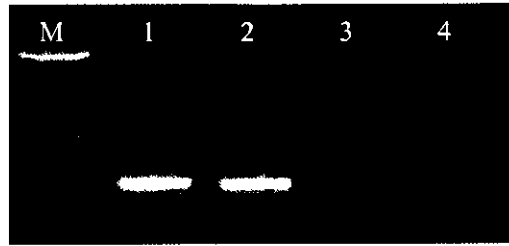


図3. 脱細胞化組織内のPERVによるPCR産物（1：未処理、2：界面活性剤処理、3，4：パワージェラフト処理）

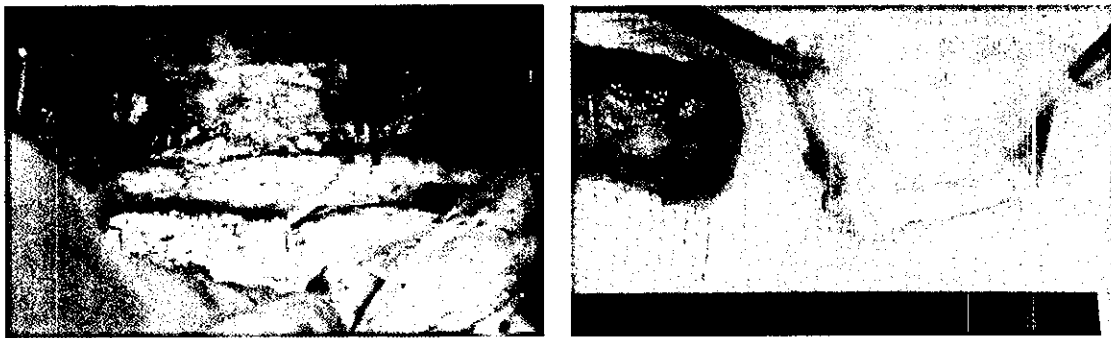


図4. 脱細胞化ミニブタ大動脈の同種移植6ヶ月後所見



図5. 脱細胞化ミニブタ大動脈の同種移植6ヶ月後組織像（左：HE、右：von Kossa）

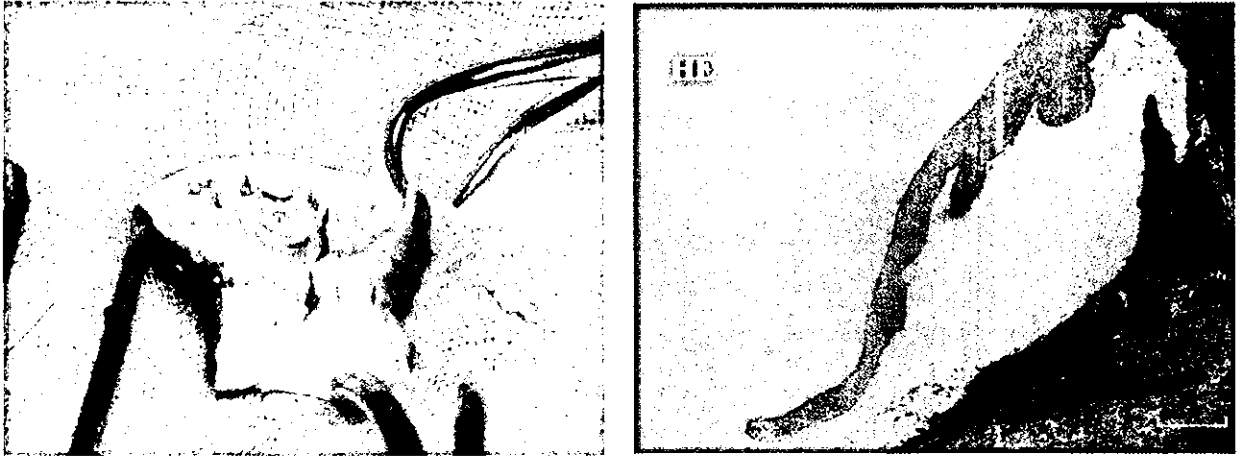


図 6. 脱細胞化ミニブタ大動脈弁の同種移植 1 ヶ月後

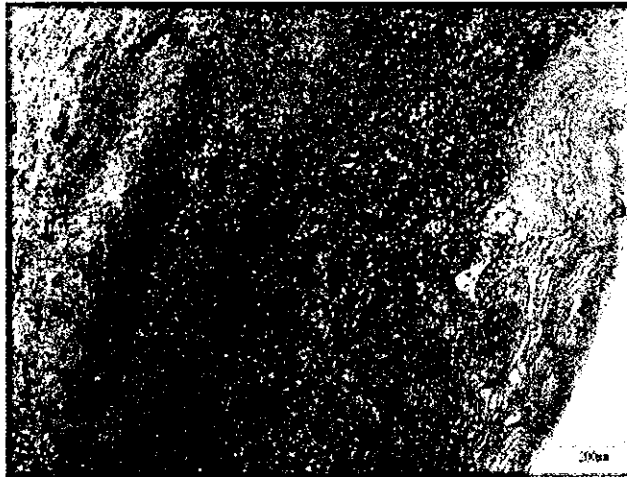


図 7. 脱細胞化ミニブタ大動脈の異種移植 1 ヶ月後

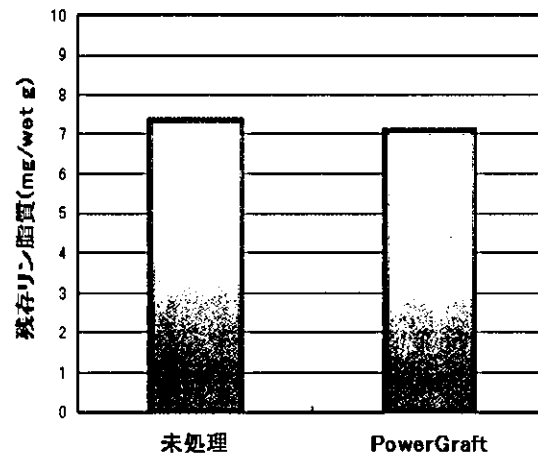


図 8. 脱細胞化組織内の残存リン脂質

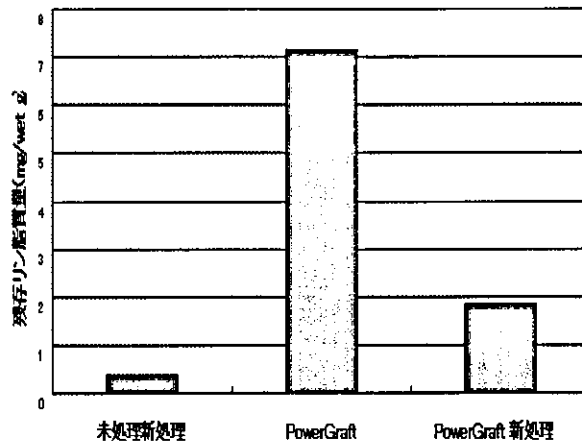


図9. リン脂質洗浄液処理後の残存リン脂質

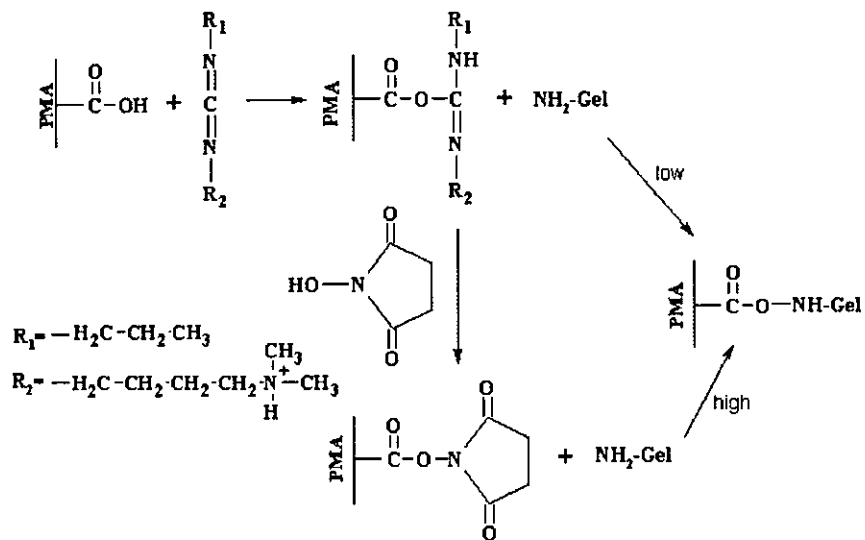


図10. 機能性分子の導入反応

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

再生医療型血管・心臓弁の開発（脱細胞化の評価）

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 ミニブタ組織を脱細胞化し、再生型血管及び心臓弁のスキャフォールドとして用いる。脱細胞化処理方法について、細胞成分であるリン脂質の残存量について検討を行うことで、脱細胞化を評価した。その結果、従来の処理後にリン脂質除去溶液で洗浄することにより、効果的にリン脂質を除去できることがわかった。

A. 研究目的

心臓弁膜症の治療として、我が国では年間3千件以上の異種生体弁が使用されている。しかし、ウシ海綿状脳症（BSE）及びクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）問題等によって我が国のGMP基準が厳しくなったことで使用が制限される方向にある。また、異種生体弁は血液適合性に優れているが、耐久性に乏しく、患者の成長に伴ってサイズが大きくなることもない。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、さらに細菌・ウイルスを除去することによって、高度な安全性を有した異種組織の移植技術を確立する。本年度は、我々が独自に開発した超高压処理による脱細胞化における有効性を検討するため、細胞膜成分である脂質分子の除去について検討した。

組織移植は、臓器移植と異なり細胞の機能保持の問題がないために、例えば異種由来であっても比較的容易に応用が可能であると考えられる。現在臨床応用されている異種組織は、高度な化学処理が施されており、生体組織特有の力学的特性を喪失している。近年、これを改良し、より生体に近い物性を保った組織の開発が試みられている。この新しい移植用組織については、長期の生体適合性や拒絶反応の有無については未だ詳細な報告

がない。ここでは脱細胞化組織の石灰化および免疫反応の起点となる可能性のある、細胞膜リン脂質の除去法を検討し、脱細胞化異種組織の生体適合性向上のための、新しい脱細胞化技術について検討を行った。

B. 研究方法

脱細胞化処理：ミニブタより採取した血管組織を、10,000気圧、4℃で処理を行ったのち、洗浄を行った（従来法）。続けて、新たなリン脂質除去用溶媒に浸漬して洗浄した（新法）。

リン脂質の定量：クロロホルム：メタノール混合溶媒中で、ホモジナイザーによって組織を粉碎し、リン脂質を抽出した。これをリン脂質C-テストワコー（和光純薬）を含む水溶液と混合し、比色定量によって定量した。

微細構造の検討：未処理組織、未処理組織をリン脂質除去用溶媒で洗浄した組織、並びに新法を適用した組織を、それぞれ常法によって脱水固定後、透過型電子顕微鏡（TEM）にて観察した。

（倫理面への配慮）

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、「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 Consent）により文書での同意を得ることで、施設内倫理委員会から承認を得た。

C. 研究結果

リン脂質の定量：まず、従来法と未処理の血管とを残存リン脂質量について比較したところ、いずれの試料中のリン脂質量にも顕著な差は見られなかった（図1）。次に、洗浄日数（14日）に伴う血管の残存リン脂質の定量を行った。結果を図2に示す。これにより、従来法では洗浄日数が増加しても細胞膜に由来するリン脂質量は減少しないことがわかった。一方、新法を適用した場合の残存リン脂質量を図3に示す。図より明らかなように、新法によって残存リン脂質量は3分の1以下に減少させることができた。条件を最適化することにより、さらに残存量を減少させることも期待できる。

微細構造の検討：未処理組織のTEM像を図4に、未処理組織からリン脂質除去のみ行った組織のTEM像を図5に、そして新法を適用した組織のTEM像を図6に示す。図6と図4を比較すると明らかなように、新法では核および細胞質の密度が低下しており、脱細胞の効果が観察できる。しかしながら、図5と図6を比較すると、未処理組織では核の内容物および細胞質が除去されているのに比較して、新法では大部分の核および細胞質の内容物が残存していることが分かる。

D. 考察

従来法では脱細胞化組織中のリン脂質は除去されないことが明らかとなり、長期の埋入に際して石灰化の起点となる可能性あり、さらに異種組織による拒絶反応を惹起する可能性も考えられた。そこで、従来法の特徴を損なわず、リン脂質の除去を効率的に行う新しい方法について検討した。新しい洗浄液を用いることで、リン脂質の選択的除去が可能であると予想し、種々の洗浄液を用い

て、残存リン脂質量を指標に検討した。その結果、生体に安全で、従来法の特性を変化させない洗浄液を見出した。この結果、新法によってリン脂質は減少できたが、未処理血管を処理した試料と比較するとリン脂質の除去量に差がみられた。これは処理過程で超高压を印加することにより、リン脂質とタンパク質との相互作用が増加した可能性が挙げられる。また、超高压処理によって、リン脂質分子同士が複雑に交差して絡み合い、溶解に対する耐性が上がることも報告されている。このような効果から、洗浄の効果が低減しているものと考えられた。そこで、TEMにて微細構造を観察した。新法を適用した組織を詳しく観察すると、細胞膜は連続性を保っておらず、超高压処理によって破壊されているものと考えられた。しかしながら、一部の部位では完全に細胞の内容物が除去されている箇所も見受けられることから、超高压印加や洗浄液の条件をより詳細に検討することで、細胞成分の完全除去が出来るのではないかと考えられる。

E. 結論

新法によって超高压処理による脱細胞化組織の物性変化を起こさず、残存リン脂質量を減少させる技術を開発した。これを用いることによって、石灰化だけでなく異種反応の制御も可能であると期待される。次年度に動物を用いて検討する予定である。

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.

- 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.

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.
- 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。
- 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) 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。
- 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。
- 17) 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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.

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. E U. 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.