

図1. 従来法 (PowerGraft処理) による残存リン脂質量の比較

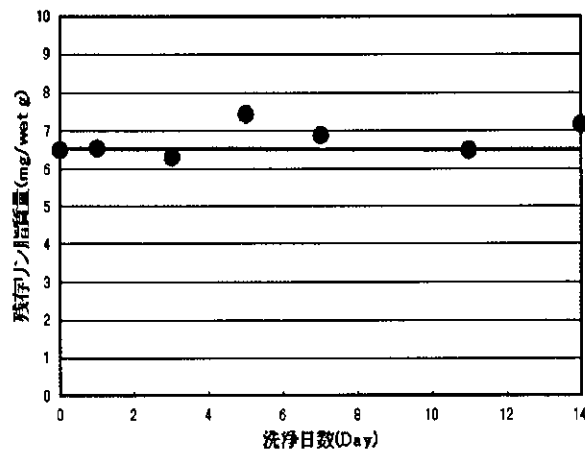


図2. 従来法の洗浄時間変化による残存脂質量の変化

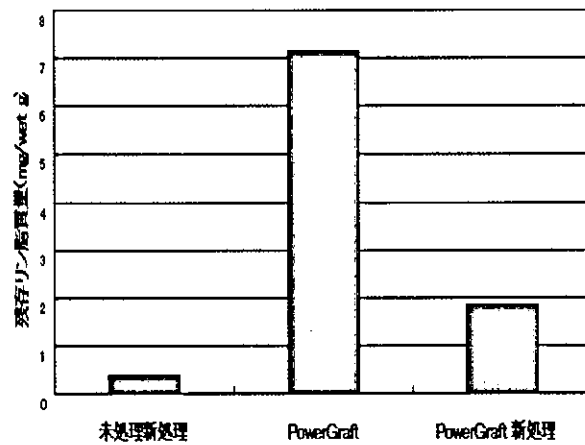


図3. 新洗浄法による残存脂質量の変化

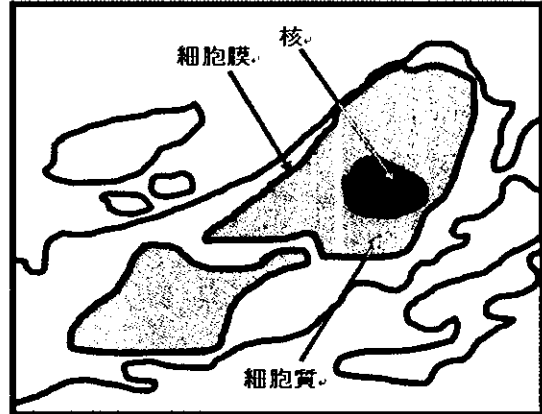


図4. 未処理組織のTEM像

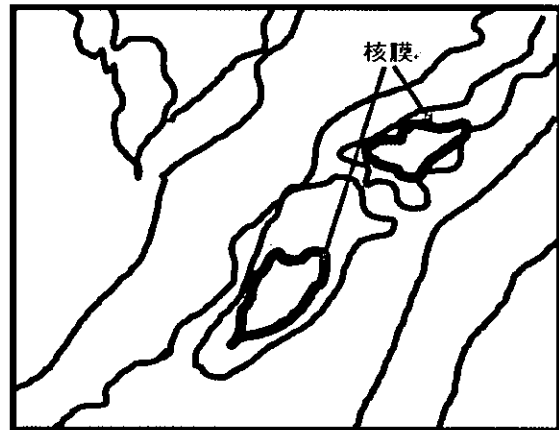
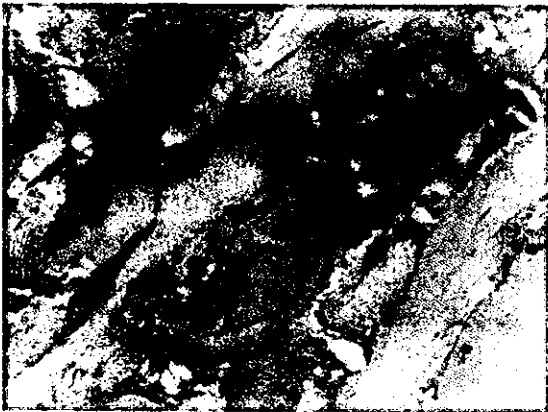


図5. 脂質除去を行った未処理組織のTEM像

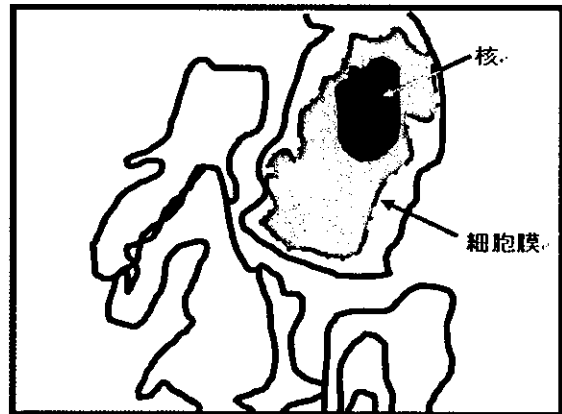


図6. 新法を適用した組織のTEM像

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（機能性の付与）

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 新しい処理法によって得られた脱細胞化生物組織およびコラーゲンなどの優れた力学特性を有する生物由来組織を再生医療用基盤材料として応用するため、新しい加工法および修飾法による高機能化を実現するための検討を行った。

A. 研究目的

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い心臓弁、小口径血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料として生体内分解吸収性の合成材料が多く用いられている。しかし、これらの材料は加工が困難で、物性が生体のものとは大きく異なる。これらを解決するために、我々は新しい処理法による脱細胞化生物組織および生物素材の積極的な応用を試みている。本研究では、優れた力学特性を有する生物由来組織の高機能化を実現するための、新しい加工法について検討を行う。具体的には、脱細胞化組織あるいはそれを構成しているタンパク質であるコラーゲンをモデル物質として選択し、これに生体適合性材料であるリン脂質ポリマーやハイドロキシアパタイトを結合させたり、合成高分子を高密度に表面に集積させる分子ブラシ表面を創出する技術を用いて、細胞接着性あるいは抗血栓性などの機能を付与する。コラーゲンは組織再生の足場材料として優れた特性は有しているものの、血液凝固性であり、また組織再生に必要な増殖因子等の外部から供給も必要であったりなど、万能の素材ではない。人工血管としての抗血栓性の確保、組織再生スキャフォールドとしての再生促進を導入する機能に設定し、血液適合性材料（ヘパリン、ポリエチレングリコール等）、タンパク質、遺伝子お

よびハイドロキシアパタイト等の複合化について検討を行う。従来、これらの機能性分子を単純に混合するのみでは、早期に機能消失してしまうため効果的な発現ができず、化学的に結合すると安定化するが、副生成物や未反応物の除去あるいは分解後の安全性の担保など多くの課題を抱えることになる。本研究では、これらの問題点を克服するための要素技術について検討を行った。

B. 研究方法

生物由来スキャフォールドへの機能性分子の複合化について検討する。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、デキストラン、ポリエチレングリコール、およびヘパリン、また細胞接着性のために血清タンパク質、ハイドロキシアパタイト、さらに遺伝子発現のためにプラスミドベクターが候補物質なるが、本年度は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

脱細胞化組織・生物由来材料を修飾するための方法論には二つの考え方がある。一つは血液凝固を抑制するために抗血液凝固性を有する物質で修飾する方法、もう一つは細胞接着性および血液凝固性物質で修飾するものである。ここでは、前者の考え方に基づいた修飾法について検討した。

コラーゲングルや脱細胞化組織の表面は細胞接着性であり、また血液凝固性である。これらで小口径人工血管を実現するためには、なんらかの抗凝固的な因子を組み込む必要がある。またコラーゲングルは脆弱であるため、血圧のかかる部位に用いる血管を作製するためには架橋が必要である。これは脱細胞化組織にも適用される事柄であり、これまでに種々の架橋剤を用いて血管や心臓弁が作製されているが、その多くは架橋剤の疎水性のために、長期の埋植に於いて石灰化が生じることが問題となっている。これに対処し得る新しい架橋法として、生体適合性高分子であるリン脂質ポリマーを一成分とする水溶性高分子を介してコラーゲンを架橋する方法論を開発した。

コラーゲンの架橋方法には様々な方法があるものの、細胞脱着用バイオマトリクスの構築はいまだ困難である。これまでの架橋方法は有機溶媒を使い、3日以上洗浄処理が必要である。架橋剤を直接コラーゲンに加えた時、架橋剤の特有の毒性の問題もあり、大部分の架橋は実際にスキャフォールドや薬物送達システムに適用されたため、十分な機械的物性が得られない。

ここでは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) ユニットの有する Poly (MPC-co-methacrylic acid) (PMA) を使用し、コラーゲンとの架橋を行った (Figure 1)。MPC コポリマーは優秀な生体適合性を持っているため、人工臓器用材料と細胞培養用マトリクスとし

て使われている。PMAには多くのカルボキシル基が含まれているので、カルボキシル基とコラーゲンのアミン基を結合させ、PMA-コラーゲングルを調整するのが可能である。架橋剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-1-カルボジイミド塩酸 (EDC) とN-ヒドロキシスシニルイミド酸 (NHS) を使用した。EDCとNHSは無毒性であり、これらの役割はカルボキシル基の活性化である。活性化されたカルボキシル基とコラーゲンのアミン基を反応させ、ゲル化を行った。

まず、PMA、EDC、NHSをMES緩衝溶液 (C6H13NO4S・H2O; 0.05mol, pH9.0) 2 mLにPMAのCOOH基:EDC:NHSの比率は1:7:2で調節して3分間40°Cで反応させ、活性化した。そしてコラーゲンは0.5wt%のコラーゲン水溶液 (10mL) と混ぜ、40°Cで16時間ゆっくり混ぜながら反応させた。ゲル化した後、ゲルをNa2HPO4水溶液で2時間洗浄し、すぐ蒸留水で洗浄して未反応物質と塩を除去した (Figure 2)。この方法で出来上がったPMA-コラーゲングルの機械的な物性は非常に弱く、一般的なコラーゲングルとあまり変わらなかった。またコラーゲンをMES緩衝溶液と混ぜる時に、ゲル形成を妨害する効果が出た。

ここで、コラーゲン水溶液に変わってコラーゲンフィルムを作り、活性化されたPMAのMES緩衝溶液に入れ、16時間反応させてPMA-コラーゲングルを調整した。そして、PMA-コラーゲングルをNa2HPO4水溶液で2時間洗浄し、すぐ蒸留水で洗浄して未反応物質と塩を除去した。フィルムを架橋してゲル化する方法はYoshizatoら、Olde Daminkらにより導入されたが、水の条件でポリマーと架橋した前例は始めてである。ゲル化中、pHは反応が始まると下がり始め、反応が終わる時のpHは約6.0になった。出来上がったPMA-コラーゲングルは水を吸収し、膨潤する。コラーゲンフィルムを水に入れたらすぐ溶けるが、PMA-コラーゲングルは水に溶けなかった。そして、半透明なコラーゲンフィルムと違って透明で、溶液のpHを変えても安定性を維持し、非常に強いゲルが形成された (Figure 3)。ゲル化効率は架橋剤の比率によって変わるものの、カルボキシル基に対して架橋剤が増えるともっと硬いPMA-コラーゲングルが出来た。今後、フィルムから出来上がったPMA-コラーゲングルを使い、コラーゲナーゼに対する溶解実験、細胞接着実験、抗血全実験、in vivo実

験を行う予定である。

D. 考察

生物由来材料や高分子とアパタイトの複合化は、いずれの場合でもナノレベルでの考察が必要である。特に無機結晶と材料の分子レベルでの相互作用や結合法がマクロレベルでの特性に大きな影響を与える。再生医療用スキャフォールドとして、アパタイト複合体の研究は今後ますます重要性を増してゆくと思われる。

E. 結論

細胞非接着性物質による脱細胞化組織の修飾について、モデル物質を用いて検討を行った。ここで提案した新しい方法で、埋植材料に必要な安全性、非毒性を念頭に置いた実験系を構築し、当初の目的の反応生成物が得られた。この技術を用いて、非接着性や抗血栓性が必要な場合には非接着性分子を複合化して用いることが可能である。動物を用いた検討に於いて、これらの有効性を今後、検証してゆく。

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.

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. 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.
- 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.

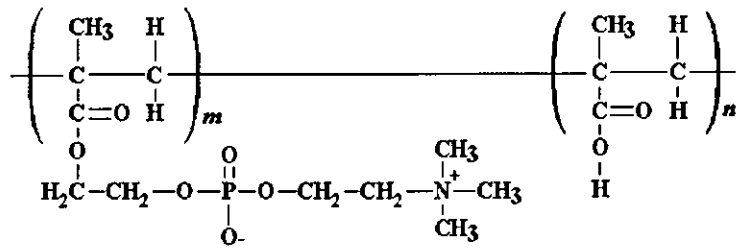


図1. MPCポリマーの構造図

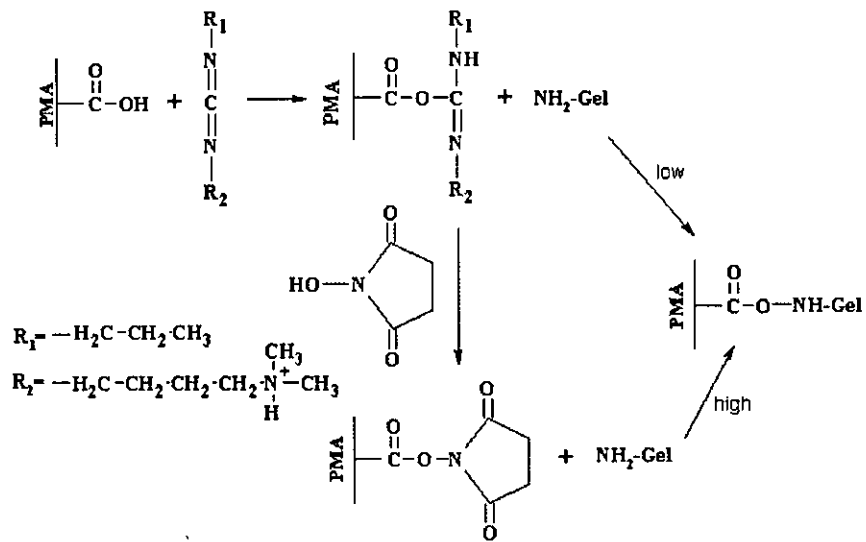


図2. 架橋反応経路

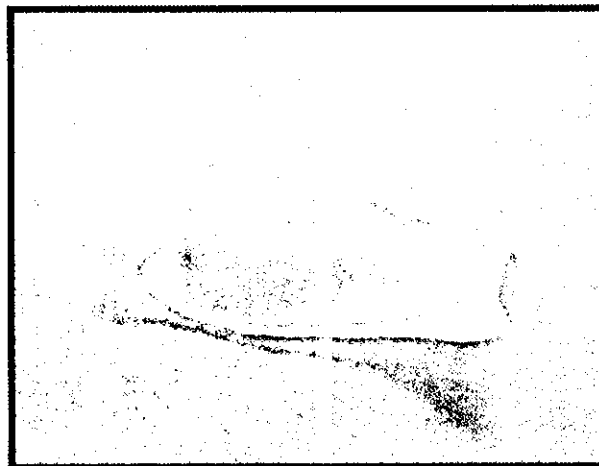


図3. 作製した架橋コラーゲンゲル

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

再生医療型血管の動物実験

分担研究者 湊谷謙司 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脱細胞化したミニブタ大動脈を、同種ミニブタに同所に置換移植した。移植された大動脈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が、石灰化も見られた。

A. 研究目的

人工血管は、内径4mm以上の中大口径のものに限れば既に完成された技術であり、我が国では年間約5万本が使用されている。しかし、移植後も異物のままであり、自己細胞の浸潤による自己組織化が達成されないため、移植後の成長性がなく、感染に対しても非常に弱い。近年、我が国においても組織バンクネットワークが整備され、脳死あるいは心停止者から提供された血管や心臓弁、皮膚等組織の臨床使用が開始された。提供された同種動脈は、人工血管感染における大動脈・動脈の再建や、感染性大動脈瘤における大動脈・動脈の再建、あるいは生体肝移植等の臓器移植時における動脈再建などに使用される。また、冠動脈や末梢血管等で小口径の場合では、人工血管が使用できないため、自己血管を用いたバイパス術や同種血管の使用が第一選択肢となっている。しかしながら、米国では組織バンクが商業ベースで行われており、年間数千件以上の提供組織が臨床使用されているのに対し、我が国では年間数十件に留まっており、圧倒的に提供数が不足している。本研究では同種動脈の不足を補うべく、再生型素材を用いた再生型血管移植技術を開発する。本年度は、脱細胞化大動脈を用いた同種移植実験をミニブタを用いて実施し、その有効性を検討した。

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）9頭から清潔下にて下行大動脈

を摘出した。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。（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

図1に示すように、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。図2に示すように、内腔面も平滑で血栓等の付着も認められなかった。また、図3に示すように、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。図4に示すように、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、図5に示すように、組織内部には石灰化の所見も見られた。

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。国内外を含め、種々の吸収性材料の研究が行われているが、臨床使用できる新規材料はほとんど開発されていないのが現状である。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。しかも、自己組織化が達成された後は、体の成長と共に移植組織も成長することが見込まれる。

本年度は、脱細胞化下行大動脈の同種同所性移植実験を行った。自己細胞の浸潤は良好であったが、石灰化の所見も求められた。石灰化の機序は未だ不明な点が多いが、組織内のエラスチンを開始点とする報告もあり、エラスチンの変性等について検討したい。また、リン脂質の残存が開始点となる可能性もあるが、これに関しては既に解決法が明らかになっており、次年度の動物実験で有効性を検討する予定である。

E. 結論

脱細胞化ミニブタ下行大動脈を同種ミニブタへ同所性に置換移植した。左心系への移植でも破断は見られなかった。また、自己細胞の浸潤は良好で、内皮の進展も順調であった。

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) 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.
- 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.

学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
 - 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、
 - 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) 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.

- 16) 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.

- 17) 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.

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）
なし

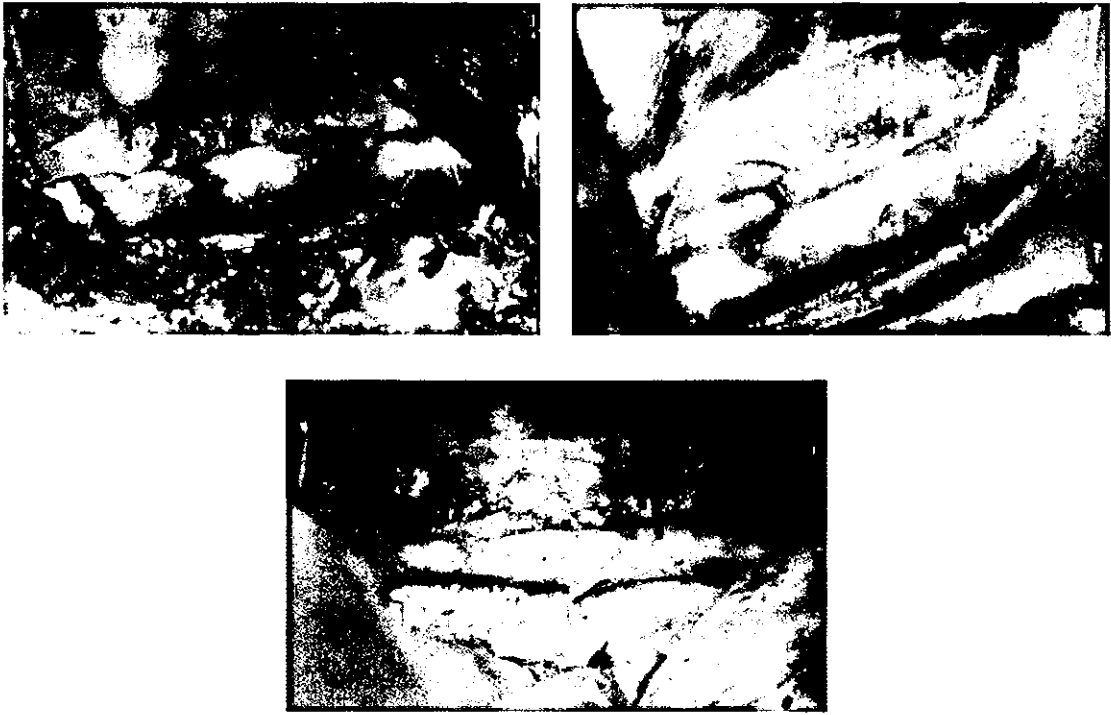


図1. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植後摘出時所見（上左：1ヶ月、上右：3ヶ月、下：6ヶ月）

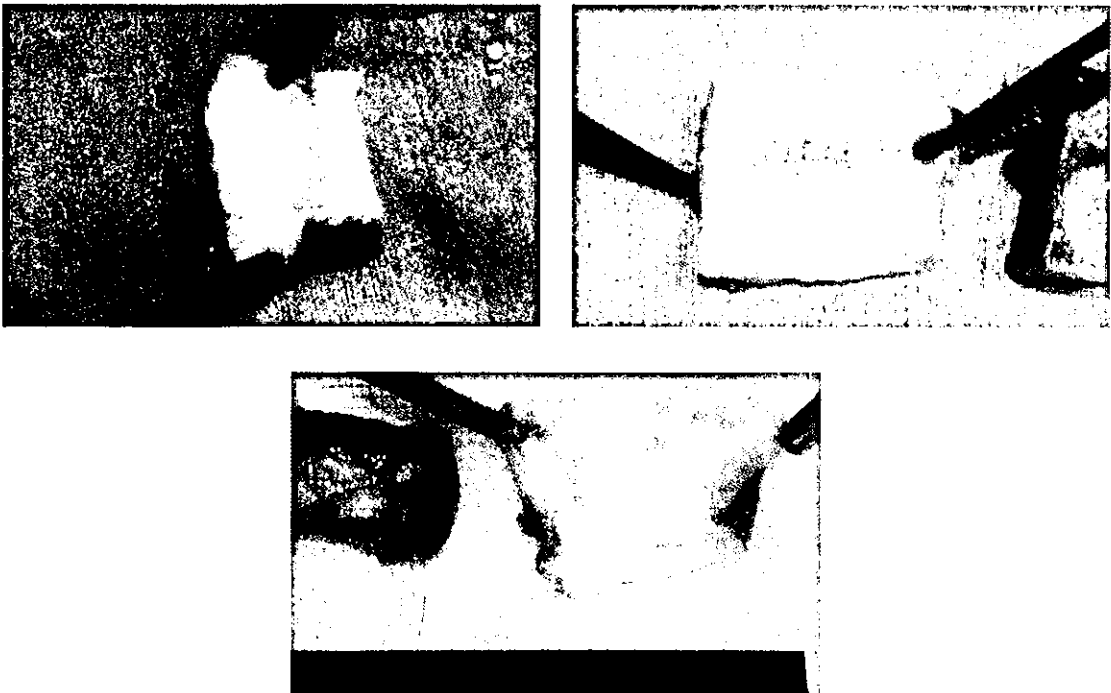


図2. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植後摘出時内腔面（上左：1ヶ月、上右：3ヶ月、下：6ヶ月）

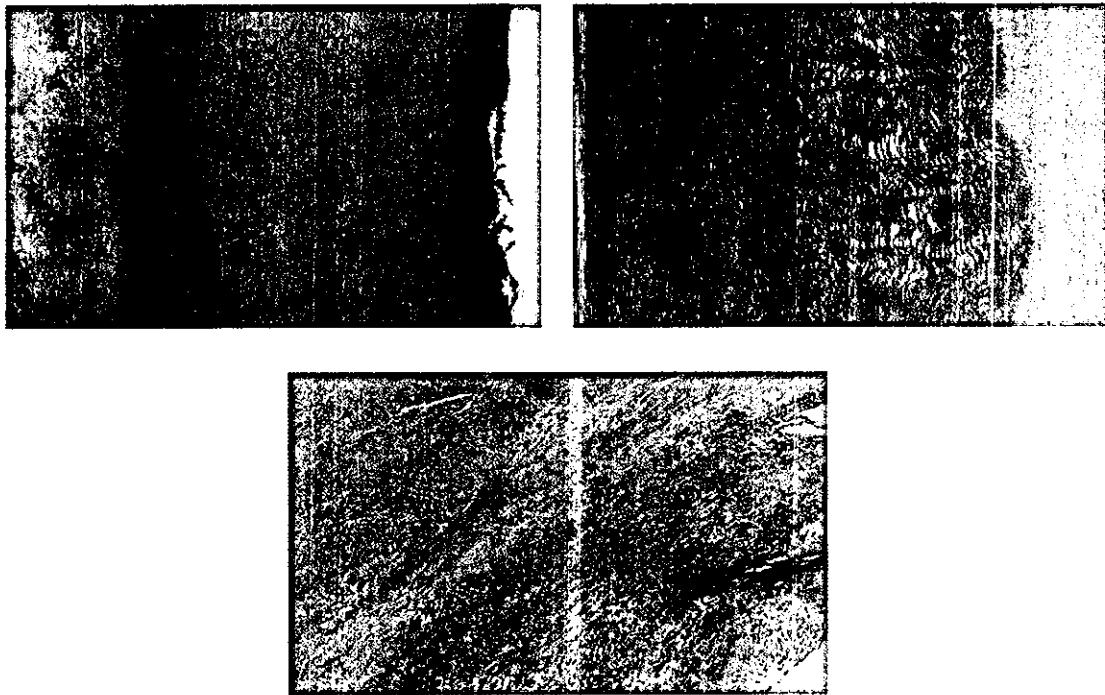


図3. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植後組織像（上左：1ヶ月、上右：3ヶ月、下：6ヶ月、左側が外周側、右側が内腔側）

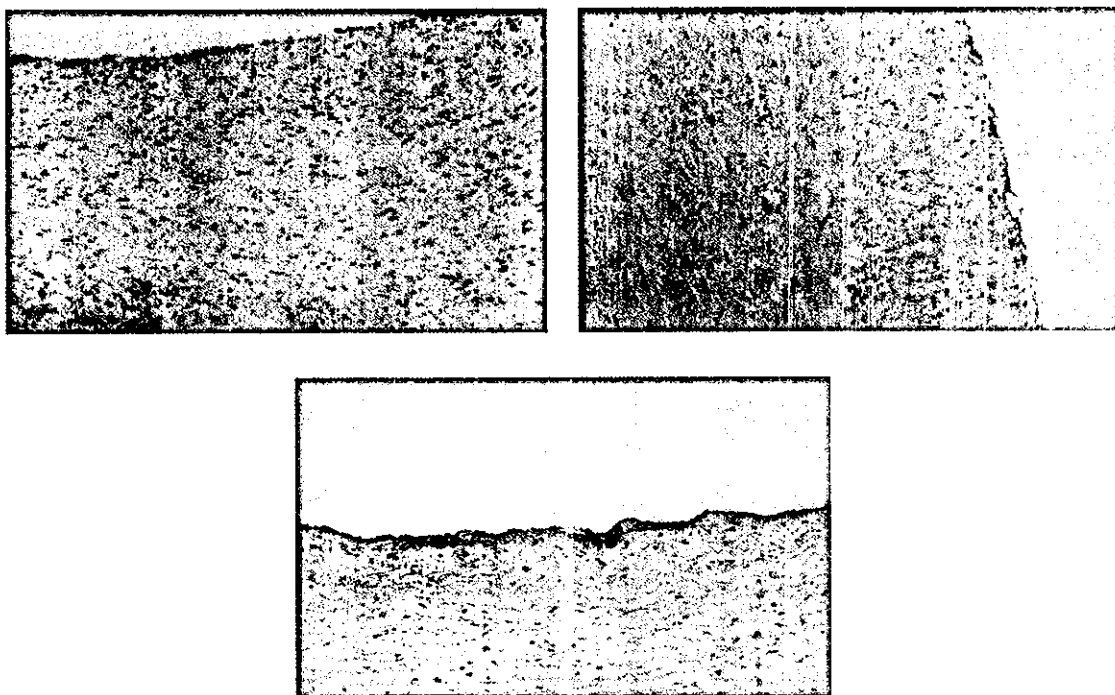


図4. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植後の内皮細胞（上左：1ヶ月、上右：3ヶ月、下：6ヶ月）

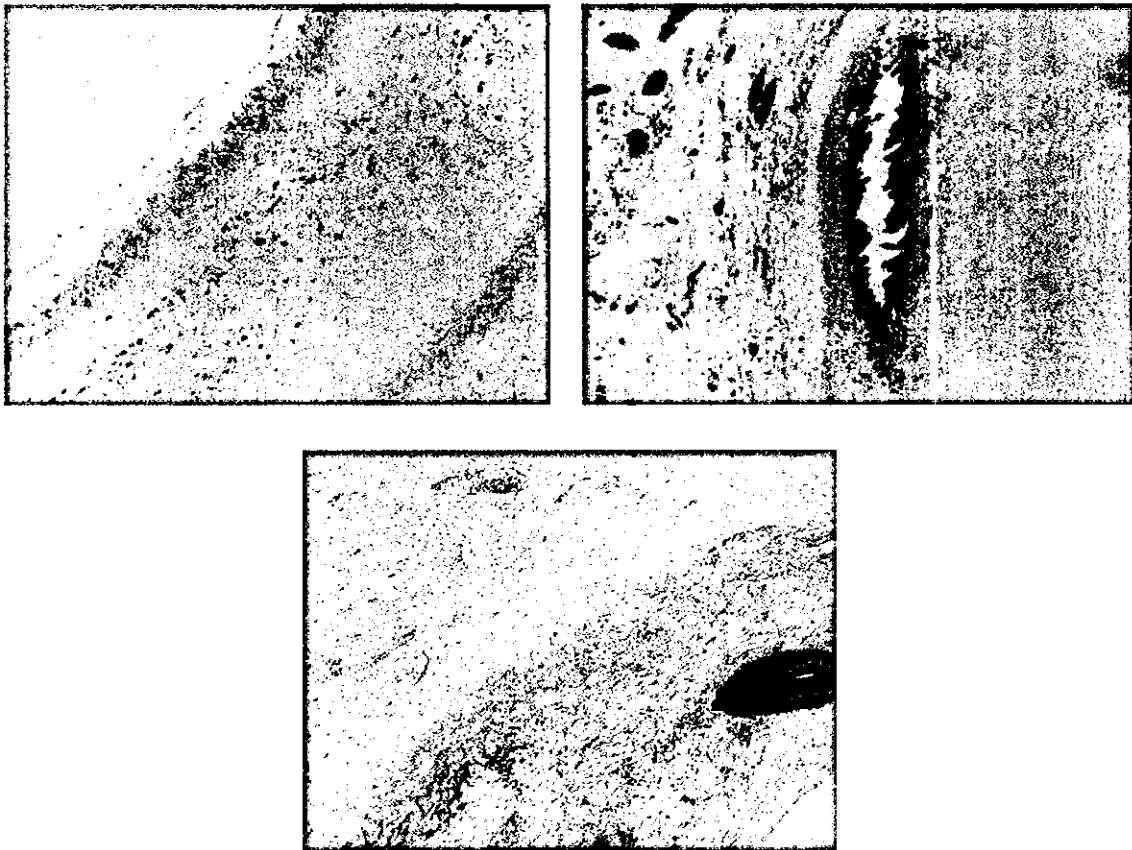


図5. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植後の石灰化（上左：1ヶ月、上右：3ヶ月、下：6ヶ月）

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）
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 超高圧処理によって脱細胞化したミニブタ大動脈弁を、同種ミニブタ大動脈弁下流の胸部大動脈部位に移植した。移植した大動脈弁には破断等の所見は見られなかった。組織学的に検討したところ、良好な細胞浸潤が確認されたが、移植3ヶ月後では弁葉は縮退しており、血管部の石灰化も見られた。

A. 研究目的

組織バンクの整備により、我が国でも漸く組織移植が実施され始めた。国立循環器病センターでも平成11年には組織バンクを、平成16年には西日本組織移植ネットワークを設立し、主として心臓弁や血管等の循環器系組織の移植を実施している。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な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）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（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。

（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

術後に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1ヶ月後では大動脈弁葉は正常所見を示していたが、図2に示すように、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。図3に示すように、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。また、図4に示すように、導管部の組織内部では点状の石灰化所見が見られた。

D. 考察

吸収性人工材料製のスキャ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大学院の新岡教授らは、静脈系では極めて有効であるが、動脈系ではスキャ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ャ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。我々の脱細胞化心臓弁では、左心系への移植でも全ての移植例で組織の破断等の所見は見られなかった。また、組織内への細胞浸潤も良好であった。しかしながら、組織内では石灰化の所見も見られており、これは次年度以降の課題である。なお、本年度の他分担研究者による脱細胞化方法の改良により、組織内のリン脂質を除去することが可能となっており、次年度は動物実験にて石灰化等への影響を検討する予定である。また、一部の例においては導管部の狭窄も見られているが、この点に関しても次年度以降に検討したい。

弁葉に関しては、移植3ヶ月後には縮退していたが、これは実験モデルの影響であって、組織由

来のものではないと考えている。すなわち、同所性の肺動脈弁置換術とは異なり、自己の大動脈弁葉を温存したまま異所性に移植しているため、移植した弁葉が機能せず、次第に退縮したものと考えている。大動脈弁の場合、同所性の置換術は容易でなく、このような実験モデルとなったが、次年度以降はカテーテルを用いた自己弁葉の除去等の方策についても検討したい。

E. 結論

脱細胞化ミニブタ大動脈弁を同種ミニブタへ異所性に移植したところ、破断等も見られずに自己細胞の浸潤を確認した。実験モデルを改良しつつ、長期の動物実験による有効性の確認後、臨床応用へと移行したい。

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.
- 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.

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.
- 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