

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. 再生医療型素材の開発（脱細胞化組織） ……	17
藤里 俊哉	
2. 再生医療型素材の開発（機能性の付与） ……	25
岸田 晶夫	
3. 再生医療型素材への細胞組込 ……	35
山岡 哲二	
4. 再生医療型血管の動物実験 ……	43
湊谷 謙司	
5. 再生医療型心臓弁の動物実験 ……	47
庭屋 和夫	
6. 再生医療型素材の動物実験（生体適合性評価） ……	51
北村 惣一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……	69

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肺動脈を同種移植した。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。昨年度の問題であった石灰化も、新たにリン脂質除去処理を導入することによって、顕著に抑制することが可能であった。昨年度に良好な成績を得た脱細胞化肺動脈の大動脈位への移植も含めて、早期の臨床応用を目指し、より長期の動物移植実験を実施していく。

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

山岡哲二

国立循環器病センター生体工学部長

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

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プ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

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

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）から清潔下にて下行大動脈を摘出した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置（神戸製鋼所製Dr. CHEF）を用いた10分間の低温下超高压印加処理（4℃、980MPa）によってドナー細胞を破壊し、PBSをベースとする洗浄液及びエタノールで2週間攪拌洗浄した。

生体適合性評価：種々の処理条件によって脱細胞化処理したブタ大動脈組織をラットに皮下移植し、その組織反応を組織学的に評価した。

血管移植実験：クラウン系ミニブタに、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ヶ月及び3ヶ月において、移植組織を摘出し、HE染色、抗vWF（血管内皮細胞）、抗SMA染色（平滑筋細胞）、及びvon Kossa染色（石灰化）によって組織学的所見を検討した。

脱細胞化処理の改良：グルタルアルデヒド（GA）水溶液により、種々の条件下において固定化処理を施したブタ大動脈（株）ジャパンファーム）を、エタスターゼ（エラスチン分解酵素、3.85 u/mg、フナコシ）のトリスバッファー溶液中に浸漬処理し、エラスチンを分解除去した。得られた試料に対して、組織学的観察、力学試験などを行った。

機能性分子の複合化：リン脂質ポリマー複合化

コラーゲンの詳細な物性解析を行い、得られた知見を複合化条件にフィードバックし、さらなる高機能化材料の創出への検討を行った。リン脂質ポリマー複合化スキャフォールドの機能については、培養細胞を用いたin vitroでの評価およびラットを用いたin vivoでの評価を行った。

細胞播種方法の検討：様々な濃度の細胞懸濁液（ $0.05 \sim 2.0 \times 10^6$ cells/ml）を、 $4.5 \text{ mL/cm}^2 \cdot \text{min}$ の灌流速度にてスキャフォールドへ送液した。24時間後に、接着細胞数を評価し、さらに、スキャフォールド内の接着細胞の分布状態を評価した。コントロールとしての静置播種では、細胞懸濁液をスキャフォールド内腔に封入して両端を閉じて培養を行った。また、細胞をスキャフォールドへ灌流播種後、静置、または、灌流で培養を7日間行い、細胞増殖率を比較した。培養液は24時間ごとに交換し、養分、酸素供給を行った。また、スキャフォールド内部での細胞分布状態を観察することで、細胞増殖挙動を検討した。

（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

生体適合性評価：埋植時間の経過に従って炎症層の領域が小さくなった。初期の炎症過程は2週間程度であり、4週間後には組織修復過程に入っているためと考えられる。未処理の組織と比較して、脱細胞組織では炎症反応が総じて低下してい

た。一方、脱細胞化処理の各条件での比較では、それぞれの試料について差はなく、脱細胞化組織の組織像の違い、今回の場合には繊維組織の構造変化である、が炎症反応には影響しないことが明らかとなった。これにより、炎症反応に直接的に影響する要因は、脱細胞化処理であり、そのプロセスの違いには寄らないことが分かった(図3)。

脱細胞化肺動脈弁の大動脈位置換移植:ミニブタ脱細胞化肺動脈を、同種ミニブタの下行大動脈位に移植した。術後に移植組織の異常な膨張や破断等の所見は見られなかった。移植3ヶ月後において、ほぼ完全に細胞が浸潤しており、石灰化もほとんど認められなかった(図4)。

リン脂質除去大動脈移植:脱細胞化処理工程にアルコール処理を導入した新処理によって、昨年度の旧処理に比べて残存リン脂質量を顕著に減少させることができた。ミニブタ同種移植実験の3ヶ月後の結果からは、昨年度の旧処理と同様に、新処理においても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。また、内腔面も平滑で血栓等の付着も認められず、血管内皮細胞で完全に覆われていた。組織内への平滑筋細胞の浸潤も、旧処理と同様に、良好であった。移植3ヶ月後でも、内膜付近に僅かにカルシウムの沈着を認めるものの、石灰化は顕著に抑制されていた(図5)。

エラスチンの除去:GA濃度が0.07%、エラストーゼ処理72時間の条件で、肺動脈程度の力学特性を保持したまま、大動脈組織内のエラスチンを除去できることがわかった(図6)。

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、細胞接着の有意な抑制が示された(図7)。

細胞播種:灌流条件および静置条件においても接着細胞数は、播種細胞数の80%程度であった。接着した細胞の分布を見ると、灌流播種では、スキファールド全体にほぼ均一に細胞が播種できた。その後、さらに7日間培養を続けると、静置培養の場合には、培養3日目で細胞数の増殖が停止したが、灌流培養では細胞は増殖し、7日後には約14倍に達した(図8)。

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、患者の死亡事故や、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。

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。肺動脈弁では弁機能を含め、特に問題が認められなかったが、大動脈組織では石灰化が認められた。本年度は、肺動脈と大動脈における石灰化の相違について検討するため、脱細胞化肺動脈の大動脈位への置換移植実験を行った。その結果、大動脈組織に比較して、細胞の浸潤は良好で、内膜肥厚や石灰化もほとんど認められなかった。この原因として、詳細は不明であるが、両組織の組成や厚みの相違が大きいのではないかと考えている。すなわち、肺動脈組織では、厚みが少ないためエラスチン含有量も少なく、また細胞浸潤が早いため、カルシウムの沈着を防いでいると考えられる。肺動脈組織では、大動脈組織に比べて、力学特性が弱いため、移植後の破断等の恐れもあるが、既に臨床では小児のロス手術として、自己肺動脈弁を大動脈位に自家移植しており、脱細胞化肺動脈弁を大動脈位に移植することは十分可能であると考えられる。

一方、昨年度の結果から、脱細胞化組織内にリン脂質が残存していることが判明したため、その除去処理を行った大動脈移植実験も実施した。その結果、石灰化を顕著に抑制することが可能となった。

循環器組織の石灰化については、リン脂質の他、エラスチンを開始点とする報告もある。本年度は、また、脱細胞化組織からのエラスチンの除去について検討した。前処理として軽微な架橋を施した後、エラスターゼ処理することによって、力学特性を有効に維持したまま、エラスチンをほぼ完全に除去することが可能となった。架橋剤としては、既に臨床に使用されているものとしてGAを選択したが、GA自体が石灰化の原因であるという報告もあるため、現在、その他の架橋剤についても検討している。

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。超高压印加処理では、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肺動脈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。昨年度の問題であった石灰化も、リン脂質除去処理によって顕著に抑制することが可能であった。次年度は、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) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Fujisato T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, Kitamura S. Bone marrow cell-seeded biodegradable polymeric scaffold enhances angiogenesis and improves function of the infarcted heart. *Circ J* 2005; 69 (9): 850-7.
- 2) 岸田晶夫、藤里俊哉. 再生医療用材料. *日本再生医療学会誌* 2005; 4 (4): 546-53.
- 3) 菅 理晴、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣. ブタ組織の脱細胞化. *移植* 2005; 40 (5):

441-4.

- 4) Fujiwara T, Yamaoka T, Kimura Y, Wynne KJ. Poly(lactide) Swelling and Melting Behavior in Supercritical Carbon Dioxide and Post-Venting Porous Material. *Biomacromolecules* 2005; 6: 2370-3.
- 5) Sakamoto T, Mahara A, Iwase R, Yamaoka T, Murakami M. Analytical method for estimation of kinetics of oligonucleotide/RNA hybridization using fluorescence depolarization spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 2005; 340: 369-72.
- 6) Kitagawa T, Iwase R, Ishihara K, Yamaoka T, Murakami A. Facilitated Disassembly of Polyplexes Composed of Self-Assembling Amphiphilic Polycations Enhances the Gene Transfer Efficacy. *Chemistry Letters* 2005; 34 (11): 1478-9.
- 7) Hashimoto T, Kobori A, Murakami A, Yamaoka T. The destabilization of polyplexes facilitates intranuclear transcription deficiency. *Nucl Acids Symposium Series* 2005; 49: 365-6.
- 8) Sakamoto T, Mahara A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Luminescence anisotropy-based detection of nucleic acids and proteins using long-lifetime Ru(II) complex as a luminescent label. *Nucl Acids Symposium Series* 2005; 49: 203-4.
- 9) Higuchi M, Yamayoshi A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis and properties of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralen-conjugated adenosine. *Nucl Acids Symposium Series* 2005; 49: 331-2.
- 10) Iwase R, Fukui U, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis of antisense oligonucleotides containing a photocleavable protecting group on a guanine base and their photoinduced duplex formation. *Nucl Acids Symposium Series* 2005; 49: 151-2.
- 11) EL-Salmawy A, Kitagawa T, Ko IK, Murakami

- A, Kimura Y, Yamaoka T, Iwata H. Preparation and properties of Pro Nectin F-coated biodegradable hollow fibers. *J Artif Organs* 2005; 8: 245-51.
- 12) Sakamoto T, Mahara A, Yamagata K, Iwase R, Yamaoka T, Murakami A. Evaluation of dynamic feature of Escherichia coli 16S ribosomal RNA in homogeneous physiological solution. *Biophys J* 2005; 89: 4122-8.
- 13) Hashimoto T, Yamaoka T, Polymeric Gene Carriers, In Taira K, Kataoka K, Niidome T eds. *Non-viral Gene Therapy*. Springer-Verlag 2005; pp35-50.
- 14) 山岡哲二. バイオエンジニアリング. *日本機械学会誌* 2005; 108(1041): 609-10.
- 15) Korematsu A, Furuzono T, Kishida A. Synthesis of block copolymers containing chain-controlled aramid and fluorethylene segments. *Macromol Mater Eng* 2005; 290: 66-71.
- 16) Furuzono T, Walsh D, Yasuda S, Tanaka J, Kishida A. Preparation of plated β -tricalcium phosphate containing of hydroxyapatite for use in bonded inorganic-organic composites. *J. Mater Sci Lett* 2005; 40(9-10): 2595-7.
- 17) 岸田晶夫. 生体適合性評価法. In 樋口重紺編 *医療用マテリアルと機能膜*. シーエムシー出版, 東京. 2005; 51-60.
- 18) 岸田晶夫. 人工心臓膜. In 樋口重紺編 *医療用マテリアルと機能膜*. シーエムシー出版, 東京. 2005; 82-8.
- 19) 古菌勉, 岸田晶夫. 再生医療 ナノアパタイト. *Bio Industry* 2005; 22(5): 54-9.
- 20) 岸田晶夫. 生体材料の遺伝子発現による評価. *材料の化学と工学* 2005; 42(4): 18-22.
- 21) 岸田晶夫. 再生医療のための脱細胞化生物組織 (バイオスキャフォールド). *生体材料工学研究所年報* 2005; 39: 9-12.
- 22) 中谷武嗣, 永谷憲歳, 富田伸司. 心筋再生. *総合臨牀* 2005; 54: 91-7.
- 23) 中谷武嗣. 心不全の外科治療. *Heart View* 2005; 9: 239-45.
- 24) 中谷武嗣. 治療の進歩 補助人工心臓. *日本内科学会雑誌* 2005; 94: 111-8.
- 25) 中谷武嗣, 花谷彰久. 補助人工心臓. *ICUとCCU* 2005; 29: 265-73.
- 26) 白倉亮太, 越後茂之, 中谷武嗣, 福寫教偉, 宮本裕治. 心臓移植の課題. *今日の移植* 2005; 18: 325-37.
- 27) 中谷武嗣. 心不全の外科治療. In 監修 住吉徹哉, 編集 櫻田春水, 平沢邦彦, 後藤葉一. *循環器3大疾患の病棟管理 不整脈 急性心筋梗塞 心不全*. メディカ出版, 大阪. 2005; pp241-51.
- 28) 中谷武嗣. 人工心臓. 体外循環と補助循環. 第21回教育セミナー 2005; 145-53.
- 29) 中谷武嗣, 富田伸司, 永谷憲歳. 重症心不全に対する幹細胞による心筋再生療法の開発. *再生医療* 2005; 4: 399-403.
- 30) 中谷武嗣, 川西秀樹. 第42回日本人工臓器学会大会座長報告 ハイブリッド人工臓器の現状と未来. *人工臓器* 2005; 34: 39-40.
- 31) Adachi I, Yagihara T, Kagisaki K, Hagino I, Ishizaka T, Koh M, Uemura H, Kitamura S. Fontan operation with a viable and growing conduit using pedicled autologous pericardial roll: Serial changes in conduit geometry. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1517-22.
- 32) Fukushima S, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Kitamura S. Early results of off-pump coronary artery bypass grafting for patients on chronic renal dialysis. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 53: 186-92.
- 33) Goto T, Kobayashi J, Nakajima H, Niwaya K, Tagusari O and Kitamura S. Mitral valve repair and cryo-Maze procedure in Ehlers-Danlos syndrome. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2005; 13: 181-3.
- 34) Itoh A, Kobayashi J, Tagusari O and Kitamura S. Aortic valve replacement concomitant with multiple extra-anatomical bypasses for a patient with aortic valve insufficiency having Takayasu's arteritis. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 2005; 27: 1114.
- 35) Kitamura S. Does the internal thoracic

- artery graft have self-reparative ability? J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 130: 1494-5.
- 36) Koh M, Yagihara T, Uemura H, Kagisaki K, Hagino I, Ishizaka T, Kitamura S. Long-term outcome of right ventricular outflow tract reconstruction using a handmade tri-leaflet conduit. Eur J Cardio-Thorac Surg 2005; 27: 807-14.
- 37) Matsuda H, Ogino H, Sasaki H., Minatoya K., Yagihara T, Kitamura S. Successful in situ graft replacement and omentopexy for abdominal aortic stent graft infection after repeated placement for endoleak. EJVES Extra 2005; 9: 116-7.
- 38) 中嶋博之, 小林順二郎, 田鎖 治, 北村惣一郎. 冠動脈バイパス手術の進歩. 外科治療 2005; 92 (4) : 447-52.
2. 学会発表
- 1) 藤里俊哉, 笹山典久, 西岡 宏, 吉田謙一, 澤田和也, 殷 猛, 山崎祥子, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 森反俊幸, 中谷武嗣, 高野久輝, 服部博行, 北村惣一郎. 循環器組織再生のためのスキヤフォールド材料. 第44回日本生体医工学学会大会. つくば. 2005年4月25~27日. 生体医工学 2005; 43 (suppl 1) : 269.
- 2) Fujisato T, Minatoya K, Yin M, Yamazaki S, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular Tissue Regeneration Using Acellular Scaffold In Porcine Model. Society For Biomaterials 30th Annual Meeting, Memphis, USA. Apr 27-30, 2005. Transactions of the 30th Annual Meeting 2005; 376.
- 3) Kishida A, Kimura T, Okuno A, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshikawa H, Miyazaki K, Fujisato T, Furuzono T. Preparation Of DNA-polymer Composite Using Ultra-High Pressure And Application Of The CompositeAs Gene Carrier. Society For Biomaterials 30th Annual Meeting, Memphis, USA. Apr 27-30, 2005. Transactions of the 30th Annual Meeting 2005; 471.
- 4) 木村 剛, 南 広祐, 岩井彩夏, 森反俊幸, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压処理により形成したPVA/DNAハイドロゲルからのDNA徐放解析. 第54回高分子学会年次大会. 横浜. 2005年5月25~27日. Polymer Preprints, Japan 2005; 2140.
- 5) 岸田晶夫, 木村 剛, 草間 淳, 石丸正臣, 増澤 徹, 藤里俊哉. 微小振動による細胞の接着制御の検討. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60 (2) : 41.
- 6) 藤里俊哉, 澤田和也, 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. 生体素材を用いた組織再生. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60 (2) : 42.
- 7) 澤田和也, 野木千賀子, 西岡 宏, 吉田謙一, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体由来繊維からの脱細胞化手法の開発. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60 (2) : 43.
- 8) 藤里俊哉, 澤田和也, 寺田堂彦, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生型組織移植のための脱細胞化処理法の開発. 第4回日本組織移植学会・学術集会. 大阪. 2005年8月27日. 日本組織移植学会雑誌 2005; 4 (1) : 33.
- 9) Kishida A, Kimura T, Furuzono T, Fujisato T, Masuzawa T. NANO-VIBRATING CELL CULTURE SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING. 4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY. Munich, Germany. Aug 31-Sep 3, 2005. Final Programme 2005; LII.
- 10) Fujisato T, Sasayama N, Yin M, Yamazaki S, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Takano H, Hattori H. Regeneratibe vascular graft made of collagen fiber. 4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY. Munich, Germany. Aug 31-Sep 3, 2005. Final Programme 2005; XX.
- 11) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎,

- 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古園 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用. 第49回日本学術会議材料研究連合講演会. 京都. 2005年9月15~16日.
- 12) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 木村 剛, 中谷武嗣, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 北村惣一郎. 脱細胞化生体組織の再生医療用スキャフォールドとしての応用. 第49回日本学術会議材料研究連合講演会. 京都. 2005年9月15~16日.
- 13) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体素材を用いた再生型人工心臓弁. 高分子学会討論会. 山形. 2005年9月20~22日. *Polymer Preprints, Japan* 2005; 54(2): 5012.
- 14) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古園 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压法によるナノ無機粒子/高分子コンポジットの調整と遺伝子キャリアーへの応用. 第54回高分子討論会. 山形. 2005年9月20~22日. *Polymer Preprints, Japan* 2005; 54(2): 5201-2.
- 15) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古園 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. ナノ無機粒子を内包した超高压誘起PVA/DNA複合体による細胞への遺伝子導入. 第54回高分子討論会. 山形. 2005年9月20~22日. *Polymer Preprints, Japan* 2005; 54(2): 5199-200.
- 16) Fujisato T, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Host cell infiltration to transplant acellular allografts in porcine model. The 8th TESI Annual Meeting. Shanghai, China. Oct 22-25, 2005. Final Program and Abstract Book 2005; 345.
- 17) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 永谷憲歳, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高静水圧印加処理による生体組織からの細胞除去と再生医療への応用. 第46回高压討論会. 室蘭. 2005年10月29~31日. *The Review of High Pressure Science and Technology* 2005; 15(special): 45.
- 18) 木村 剛, 南 広祐, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高静水圧処理による分子集合体の開発. 第46回高压討論会. 室蘭. 2005年10月29~31日. *The Review of High Pressure Science and Technology* 2005; 15(special): 141.
- 19) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 岸田晶夫, 船本誠一, 藤里俊哉, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. バイオスキャフォールド調製に向けた生体由来組織の超臨界流体処理. 第46回高压討論会. 室蘭. 2005年10月29~31日. *The Review of High Pressure Science and Technology* 2005; 15(special): 191.
- 20) 木村 剛, 南 広祐, 三浦義之, 栗田公夫, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古園 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製. 第14回ポリマー材料フォーラム. 東京. 2005年11月15~16日. *Polymer Preprints, Japan* 2005; 171.
- 21) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生医療用バイオスキャフォールド作製のための構造タンパク加工. 第27回バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28~29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 158.
- 22) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化したミニプタ血管の同種移植. 第27回日本バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28~29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 194.
- 23) 木村 剛, 南 広祐, 三浦義之, 栗田公夫, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古園 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調整と生医学材料としての応用. 第27回日本バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28~29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 227.
- 24) 岸田晶夫, 南 広祐, 木村 剛, 藤里俊哉, 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への化学修飾法の検討. 第43回日本人工臓器学会大会. 東京. 2005年11

- 月30日～12月2日. 人工臓器 2005; S-152.
- 25) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 藤里俊哉. 超高静水圧印加処理を用いる脱細胞化スキャフォールドの開発. 第43回日本人工臓器学会大会. 東京. 2005年11月30日～12月2日. 人工臓器 2005; S-152.
- 26) Suga M, Fujisato T, Nakanani T. Availability of Ultra-High Pressure Method for the Preparation of Decellularized Tracheal Grafts. The 12th International Conference on Biomaterial Engineering. Singapore. Dec 7-10, 2005. IFMBE Proceedings 2005; 12: 151.
- 27) Fujisato T, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Hashimoto S, Nakatani T, Kitamura S. PowerGraft: A virus-free acellular scaffold by detergent-free treatment. The 12th International Conference on Biomaterial Engineering, Singapore. Dec 7-10, 2005. IFMBE Proceedings 2005; 12: 152.
- 28) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 構造タンパクの酵素処理によるバイオスキャフォールド調整. 第21回ライフサポート学会大会. 三重. 2005年12月8～9日. 第3回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2005; 98.
- 29) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 船本誠一, 西岡 宏, 吉田謙一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 村越彩子, 木村 剛, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化生体組織(バイオスキャフォールド)の再細胞化. 第21回ライフサポート学会大会. 三重. 2005年12月8～9日. 第3回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2005; 99.
- 30) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 岸田晶夫, 船本誠一, 藤里俊哉, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超臨界技術を利用した再生医療用スキャフォールド調整. 日本機械学会第18回バイオエンジニアリング講演会. 新潟. 2006年1月13～14日. 第18回日本バイオエンジニアリング講演会論文集 2005; 95-6.
- 31) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 藤里俊哉. 脱細胞組織のエタノール処理による力学特性への影響. 日本機械学会第18回バイオエンジニアリング講演会. 新潟. 2006年1月13～14日. 第18回日本バイオエンジニアリング講演会論文集 2005; 97-8.
- 32) 鳴海敏行, 黒岩貴文, 湊谷謙司, 吉田謙一, 船本誠一, 寺田堂彦, 森反俊幸, 永谷憲歳, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣. ミニブタへの同種脱細胞化動脈の移植における残存リン脂質の影響. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 128.
- 33) 村越彩子, 大富美智子, 吉田謙一, 船本誠一, 南 広祐, 木村 剛, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高静水圧処理法によるバイオスキャフォールドの調整における圧力印加条件の検討. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 128.
- 34) 澤田和也, 寺田堂彦, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超臨界流体抽出による生体組織の脱細胞化. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 202.
- 35) 緒方裕之, 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 非石灰化を目指したエラストチン除去バイオスキャフォールドの作製. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 203.
- 36) 船本誠一, 吉田謙一, 菊池正博, 小林泰彦, 藤里俊哉, 山岡哲二, 岸田晶夫, 中谷武嗣. 放射線照射を前処理とした生体組織の脱細胞化処理. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 204.
- 37) 黒岩貴文, 鳴海敏行, 笹山典久, 湊谷謙司, 吉田謙一, 船本誠一, 森反俊幸, 白数昭雄, 永谷憲歳, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 高野久輝. ミニブタ置換移植におけるコラーゲン製人工血管への細胞浸潤. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 204.

- 38) 橋本良秀, 川喜田 正夫, 吉田謙一, 船本誠一, 木村 剛, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高静水圧処理法による脱細胞化骨・骨髄組織の調整と組織再構築の検討. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 218.
- 39) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 藤里俊哉. 再生型筋組織の構築を目的とした脱細胞化筋スキャフォールドの作製. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 204.
- 40) Kawaguchi AT, Kishida A, Yamaoka T. Statitic cardiomyoplasty with synthetic elastic net suppresses ventricular dilation and dysfunction after myocardial infarction in the Rat. The International Society for Heart and Lung Trantation 25th Anniversary Meeting and Scientific Sessions. 2005年4月6~9日, フィラデルフィア.
- 41) 山岡哲二, 橋本朋子, 北川達哉, 村上 章. ポリプレックスによる遺伝子導入機構. 遺伝子デリバリー研究会. 東京. 2005年5月20~21日.
- 42) 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. In Vitro組織再生を目的としたスキャホールド内細胞への遺伝子導入. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25~27日. 横浜.
- 43) 橋本朋子, 小林由美子, 松田 修, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. カチオン性/疎水性両親媒性ミセルによる遺伝子導入. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25~27日. 横浜.
- 44) 中村友亮, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. Hap複合化吸収性ハイドロゲルの軟組織再生能の評価. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25~27日. 横浜.
- 45) 大矢裕一, 金平光司, 有村英俊, 大内辰郎, 橋本朋子, 山岡哲二. ポリリシン-ポリ乳酸ABブロック共重合体ミセルとプラスミドDNAとの相互作用. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25~27日. 横浜.
- 46) 岩瀬礼子, 福井宇内, 小堀哲生, 山岡哲二, 村上 章. 光切断性保護基をグアニン塩基に持つアンチセンス核酸の合成とその二重鎖形成能の光誘導. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25~27日. 横浜.
- 47) 務中達也, 叶井正樹, 阿部浩久, 中西博昭, 庄子習一, 山岡哲二, 坂本 隆, 小堀哲生, 村上 章. 細胞機能解析チップの開発 (II) 微小空間における細胞の刺激応答解析. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25~27日. 横浜.
- 48) 樋口麻衣子, 小堀哲生, 岩瀬礼子, 山岡哲二, 村上 章. 新規光架橋型アンチセンス核酸の開発 (II) 糖環2'位ソラレン修飾型アンチセンス核酸の合成とその機能. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25~27日. 横浜.
- 49) Yamaoka T, Hashimoto T, Kitagawa T, Murakami A. Intracellular Disassembly and Transcription Efficiency of Polyplexes Delivered into Cdfells Using Novel Self-Assembling Gene Carriers. ASGT 8th Annual Meeting. 2005年6月1~5日. セントルイス.
- 50) 山岡哲二, 樋上智一, 内田 翔, 村上 章. 幹細胞特異的スキャホールドの評価. 第7回生命工学材料とバイオテクノロジー. 2005年6月8~10日. 岐阜.
- 51) 内田 翔, 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. ポリ乳酸スキャホールドの表面修飾による細胞接着亢進. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 52) 樋口麻衣子, 青木幸一, 小堀哲生, 山岡哲二, 村上 章. 糖環2'位に光架橋性基を持つアンチセンス核酸によるRNA結合能の評価. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 53) 近藤千晶, 北川達哉, 橋本朋子, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. ガラクトース修飾ポリマーの構造最適化による導入遺伝子発現効率の向上. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 54) 小林由美子, 橋本朋子, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. 両親媒性ペプチド系キャリアーの遺伝子導入効率に関する考察. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.

- 55) 村上 章, 繁澤麻紗子, 坂本 隆, 小堀哲生, 山岡哲二. シチジンの2'位にピレンを持つ蛍光核酸プローブによるRNAの検出. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 56) 坂本 隆, 藤原伸行, 小堀哲生, 山岡哲二, 村上 章. ピレンを含む長寿命蛍光剤を用いた生体高分子間相互作用検出法の開発. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 57) 橋本朋子, 小林由美子, 近藤千晶, 小堀哲生, 村上 章, 松田 修, 山岡哲二. ポリプレックス被転写効率を亢進する遺伝子キャリアーの分子設計. 第34回医用高分子-第15回バイオ・高分子シンポジウム, 2005年8月1~2日. 東京.
- 58) 村上 章, 樋口麻衣子, 中澤智子, 小堀哲生, 山吉麻子, 加藤聖子, 和気徳夫, 山岡哲二. 新規アンチセンス核酸のデザインと遺伝子制御効果. 第34回医用高分子-第15回バイオ・高分子シンポジウム. 2005年8月1~2日. 東京.
- 59) 中村友亮, 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. Hap複合化吸収性ハイドロゲルの軟組織再生. 第34回医用高分子-第15回バイオ・高分子シンポジウム. 2005年8月1~2日. 東京.
- 60) Yamaoka T, Higuchi T, Uchida S, Murakami A, Matsumura G, Shin'oka T. Specific adhesion of CD34+ cells on PLLA porous scaffolds. 4th Annual Meeting of EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY (ETES). 2005年8月31~9月3日. ミュンヘン.
- 61) Hashimoto T, Kobori A, Murakami A, Yamaoka T. The destabilization of polyplexes facilitates intranuclear transcription efficiency. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 62) Sakamoto T, Mahara A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Luminescence Anisotropy-based Detection of Nucleic Acids and Protein Using Long-lifetime Ru(II) Complex as a Luminescent Label. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 63) Higuchi M, Yamayoshi A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis and properties of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralen-conjugated adenosine. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 64) Iwase R, Fukui U, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis of antisense oligonucleotides containing a photocleavable protecting group on a guanine base and their photoinduced duplex formation. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 65) 山岡哲二, 北川達哉, 橋本朋子, 小林由美子, 村上 章, 馬原 淳. ポリカチオンミセルによる遺伝子導入効率向上の機構解析. 第54回高分子討論会. 2005年9月20~22日. 山形.
- 66) 馬原 淳, 樋上智一, 村上 章, 山岡哲二. 幹細胞特異的表面の構築と組織再生. 第54回高分子討論会. 2005年9月20~22日. 山形.
- 67) 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. In vitro血管組織再構築を目指したスキャホールド内細胞への遺伝子導入. 第27回バイオマテリアル学会大会. 2005年11月28~29日. 京都.
- 68) 小林由美子, 橋本朋子, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. ポリメリック遺伝子キャリアーの分子特性とポリプレックス被転写効率. 第27回バイオマテリアル学会大会. 2005年11月28~29日. 京都.
- 69) 山岡哲二, 中野順子, 藤原知子, 藤里俊哉, 木村良晴. 完全生体吸収性ゲル化材料による細胞注入システムの開発. 第43回人工臓器学会大会. 2005年11月30日~12月2日. 東京.
- 70) 馬原 淳, 樋上智一, 松村剛毅, 新岡俊治, 山岡哲二. 幹細胞分離基材による組織再生材料の構築. 第43回人工臓器学会大会. 2005年11月30日~12月2日. 東京.
- 71) 馬原 淳, 北川達哉, 筏 義人, 山岡哲二. 灌流システム下での多孔質スキャホールドへの特異的細胞播種. 第43回人工臓器学会

- 大会. 2005年11月30日～12月2日. 東京.
- 72) Hashimoto T, Mazda O, Murakami A, Yamaoka T. Molecular design of non-viral gene carriers aiming at facilitated transcription efficiency. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 73) Nakamura Y, Mahara A, Murakami A, Yamaoka T. Soft tissue regeneration using novel biodegradable hydrogel/HAP composite materials. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 74) Yamaoka T, Uchida S, Higami T, Murakami A. Immobilization of bioactive molecules onto PLLA porous matrices for tissue regeneration. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 75) Kitagawa T, Murakami A, Yamaoka T. In vivo vascular regeneration using biodegradable scaffold in the perfusion bioreactor. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 76) Sakamoto T, Mahara A, Munaka T, Kobori A, Yamaoka T. Long-lifetime Ru(II) complex-labeled probes for the evaluation of the dynamic feature of biomolecule. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 77) Higuchi M, Yamayoshi A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Development of novel photo-sensitive antisense oligonucleotides. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 78) Murakami A, Mahara A, Sakamoto T, Shimada N, Yamaoka T. Bispyrene-conjugated 2'-O-methyloligoribonucleotide as a highly specific RNA-recognition probe and its application to RNA-bio-imaging. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 79) Iwase R, Namie Y, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis and properties of fluorescent-labeled oligonucleotides containing an amide internucleoside linkage at the 3'-site of 2'-pyrene-modified uridine. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15～20日. ホノルル.
- 80) 山岡哲二, 松村剛毅, 馬原 淳, 村上 章, 新岡俊治. 造血幹細胞特異的スキャホルドの評価. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8～9日. 岡山.
- 81) 馬原 淳, 山岡哲二. 抗体固定カラムを用いた幹細胞分離システムの開発. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8～9日. 岡山.
- 82) 橋本朋子, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. 両親媒性遺伝子キャリアーのナノ構造と遺伝子導入効率. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8～9日. 岡山.
- 83) 中村友亮, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. 軟組織再生を目的としたHAP複合化ハイドロゲルの in vivo生体吸収性・組織適合性の評価. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8～9日. 岡山.
- 84) Furuzono T, Okada M, Kishida A, Tanaka J, Yasuda S. Fabrication And Cell Adhesion Of 3d Scaffold Made Of Composite Material With A Silk Fibroin Substrate A Percutaneous Device. Society for Biomaterial 2005 Annual Meeting. 2005.
- 85) 木村 剛, 岸田晶夫. リン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲンゲルの作製とin vitroでの評価. 第34回医用高分子シンポジウム. 2005.
- 86) 石原一彦, 岸田晶夫. 精密バイオインターフェイスポリマー. 第54回高分子討論会. 2005.
- 87) 古園 勉, 安田昌司, 木村 剛, 京谷晋吾, 田中順三, 岸田晶夫. Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite IV. Fabrication and cell adhesion properties of a three-dimensional scaffold made of composite material with a silk fibroin substrate to develop a percutaneous device. 第43回日本人工臓器学会. 2005.
- 88) 岸田晶夫. 細胞デリバリー. 第56回医用高分子研究会. 2006.
- 89) 岸田晶夫, 木村 剛, 古園 勉, 吉澤秀和. 新しい分子間相互作用の制御法を駆使したバイオマテリアル創製. 日本金属学会 2006年春期(第138回)大会. 2006.

3. 新聞報道等

- 1) 超テク誕生 日本の現場. 日本経済新聞社.
- 2) 日刊工業新聞. 2005年9月9日号.
- 3) 日経ナノテクノロジー. 2005年9月11日号.
- 4) 日刊工業新聞. 2006年2月13日号.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

- 1) 藤里俊哉, 山岡哲二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体組織マトリックスへの細胞播種方法. 特許出願2005-180344. 2005年6月21日.
- 2) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 澤田和也, 中谷武嗣. 超臨界二酸化炭素による移植用生体組織の脱細胞化处理. 特許出願2005-296067. 2005年10月21日.
- 3) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 澤田和也, 中谷武嗣. 生物由来スキャフォールドの作製方法. 特許出願2005-299590. 2005年11月19日.
- 4) 山岡哲二, 馬原 淳, 北村惣一郎. 細胞の分取方法及び当該方法に用いる基材. 特許出願2005-324162.
- 5) Yamaoka T, Tokiwa Y, Kitagawa M. Carrier for nucleic acid molecule delivery. 米国特許出願.

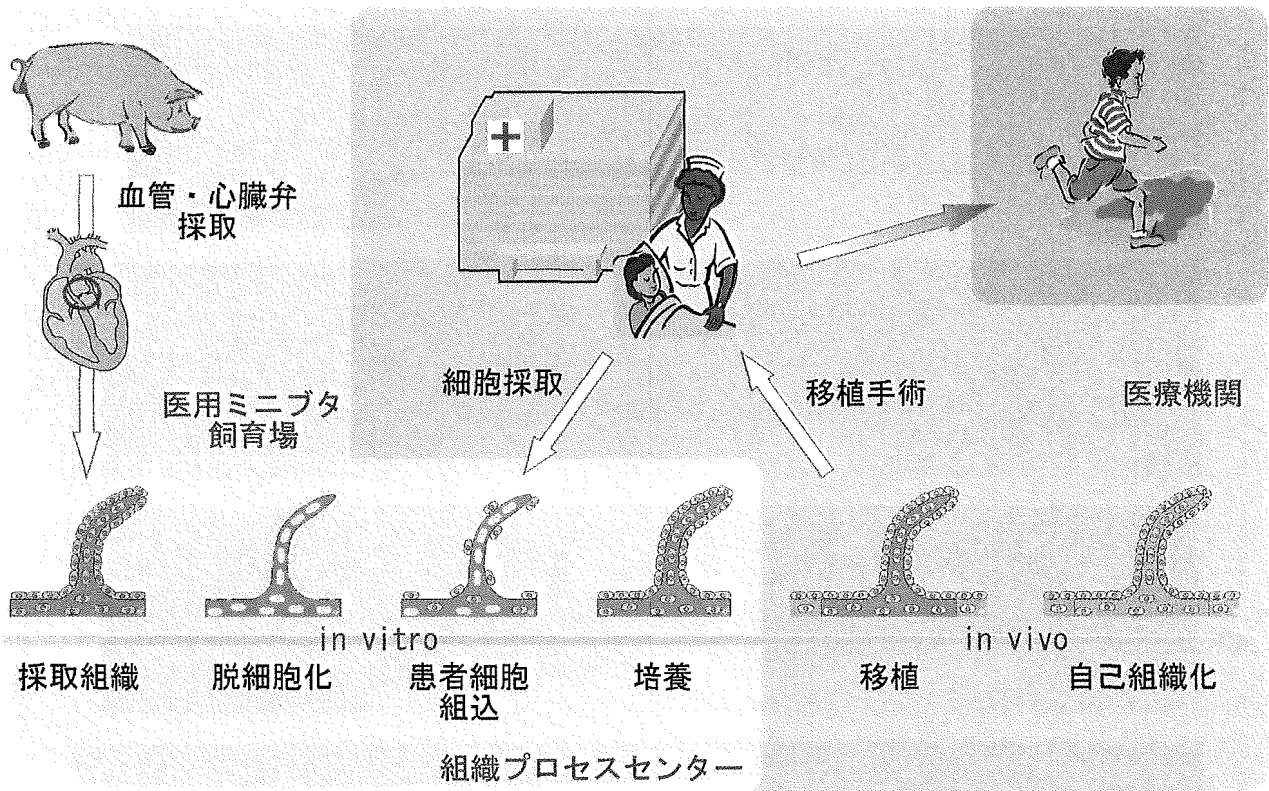


図1. テーラーメイド型血管・心臓弁移植

界面活性剤処理・酵素処理(欧米のグループ)

- ×細胞除去は組織への薬液の浸透に依存
- ×薬液は毒性を有する



冷間等方圧加圧(CIP)処理

- 均一に処理
- 6000気圧以上で細菌・ウイルスが不活化
- 短時間(10分)

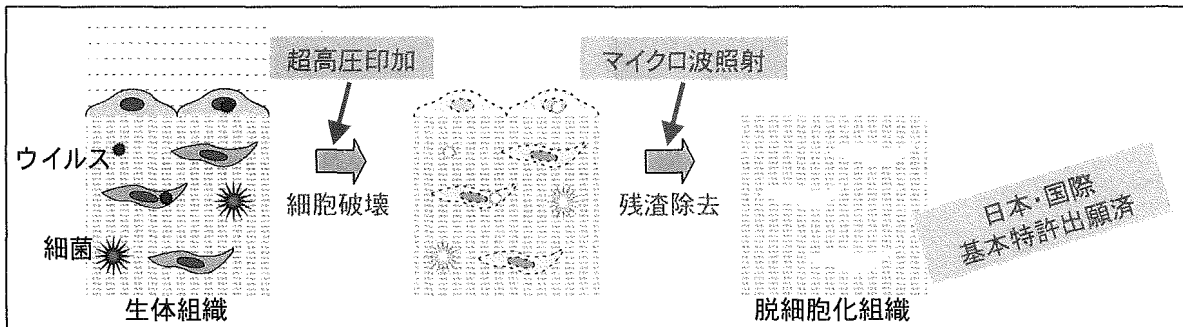
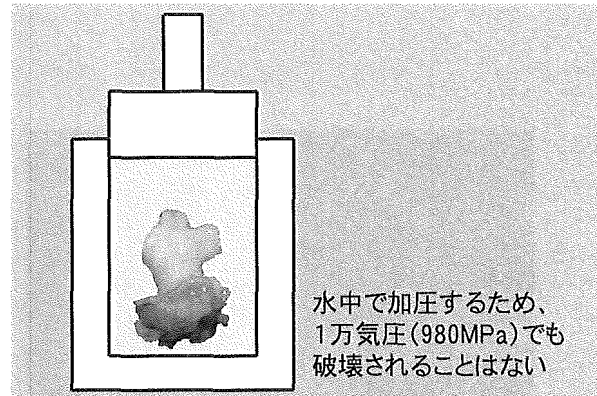


図2. 我々の脱細胞化方法

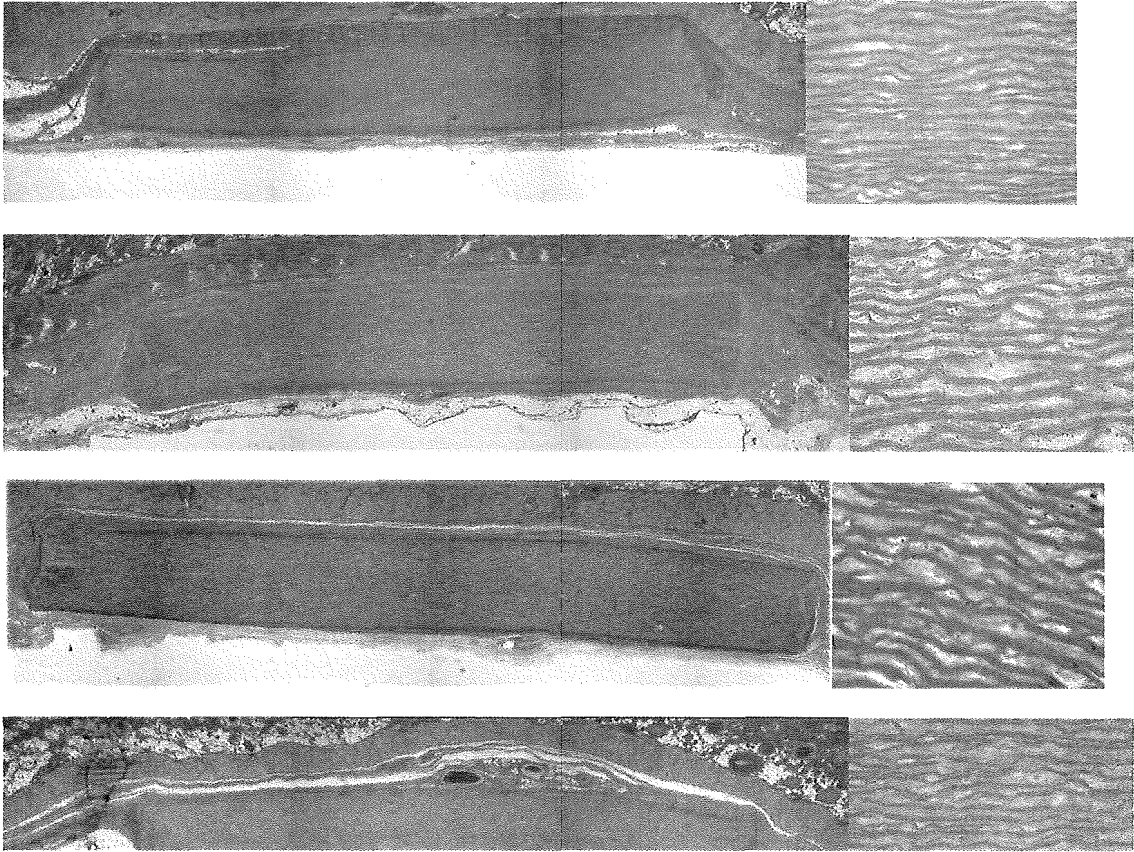


図3. プタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験結果（4週間、洗浄8日）

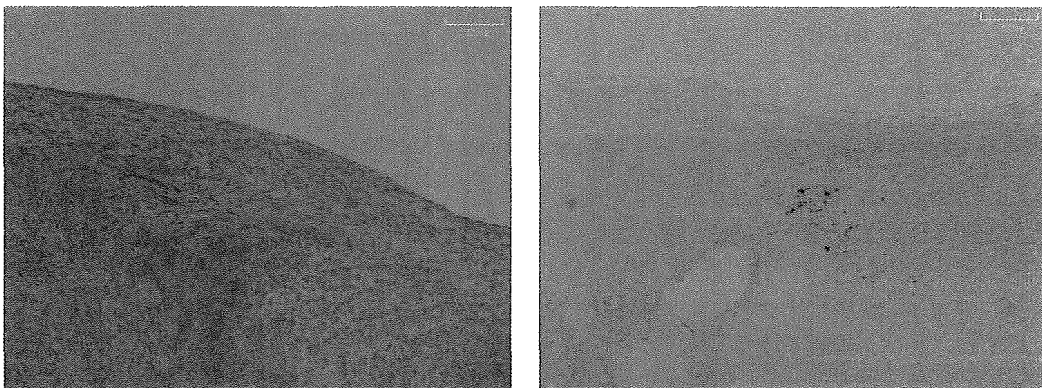


図4. 脱細胞化ミニブタ肺動脈の同種大動脈移植3ヶ月後の組織標本
（左：H&E、右：von Kossa）

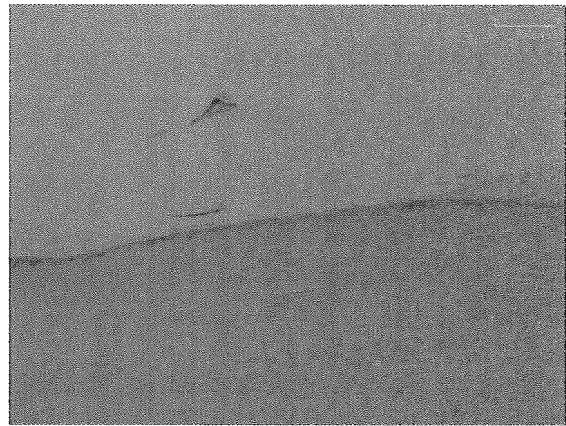
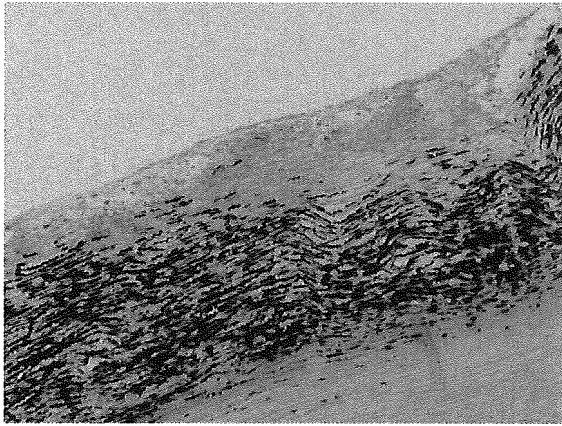


図5. 脱細胞化ミニブタ大動脈の3ヶ月間同種移植後における組織内の石灰化
(左：旧処理、右：新処理)

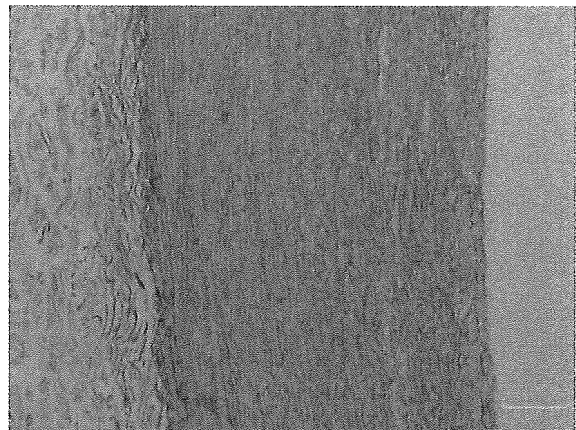
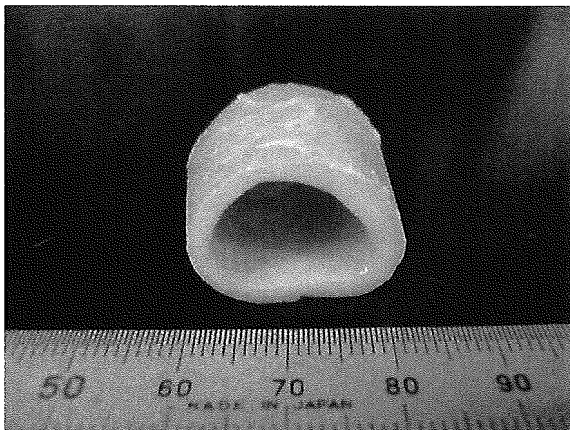


図6. 至適条件下における架橋ブタ大動脈組織のエラスターゼ処理
(GA0.07%、エラスターゼ72時間処理)

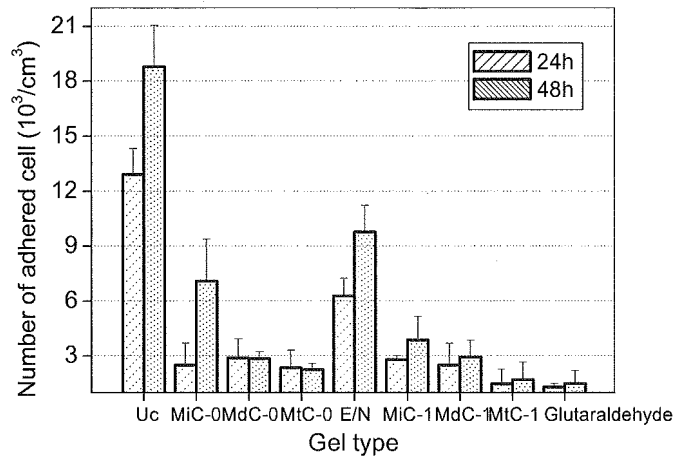


図7. 機能化表面への細胞接着実験

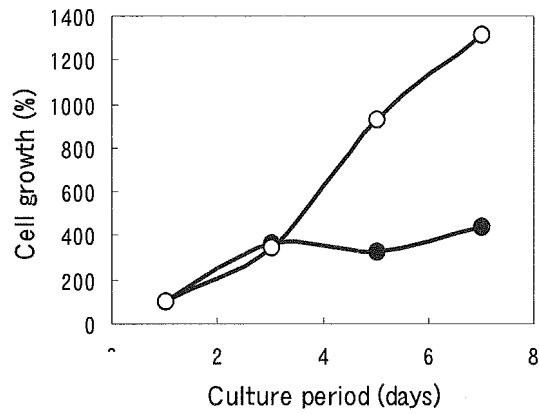


Fig 8. Growth of cells on the PLLA porous scaffolds under the static(●) and perfusion culture at the perfusion rate of 4.5ml/cm²·min (○).

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

再生医療型素材の開発（脱細胞化組織）

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 昨年度に問題となった石灰化を抑制するために、脱細胞化組織内のエラスチンを除去する方法について検討した。その結果、適度な架橋処理後にエラスチン分解酵素で処理することによって、力学特性を有効に保持したまま、エラスチンをほぼ完全に除去することが可能であった。現在、動物移植実験を実施中である。

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。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。昨年度までの脱細胞化大動脈を用いた同種移植実験では、移植後組織内の石灰化が認められた。その原因として、組織内に残存したリン脂質や、エラスチンの変性が考えられる。既に、リン脂質の残存については、脱細胞化過程にアルコール処理を導入することで大幅に減少できることを報告しているため、本年度は、コラーゲン成分や生体力学特性を保持したまま、エラスチンを除去する方法について検討した。

B. 研究方法

グルタルアルデヒド（GA）水溶液により、種々の条件下において固定化処理を施したブタ大動脈（株）ジャパンファーム）を、エタスターゼ（エラスチン分解酵素、3.85 u/mg、フナコシ）のトリスバッファー溶液中に浸漬処理し、エラスチンを分解除去した。得られた試料に対して、組織学的観察、力学試験などを行った。

（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

ブタ大動脈のエラスターゼ処理：まず、エラスターゼによって、組織内のエラスチンが除去できるかどうかについて検討した。図1に示すように、エラスターゼ12時間処理によって、組織内のエラスチンが完全に除去できないにもかかわらず、形状が保たれなく程までに力学特性が低下した。

GAによる架橋後のエラスターゼ処理：このため、エラスターゼ処理前に、架橋処理を導入することとした。架橋剤としては、医療用に既に使用されているGAを選択した。その結果、図2に示すように、GA濃度を上げすぎると、形状は保持されるがエラスチンが完全に除去できないことがわかった。したがって、GA濃度を適度を選択することによって、力学特性を維持しつつエラスチンを完全に除去できる可能性が示唆された。

エラスターゼ処理時間の影響：GA濃度を0.07%に固定し、エラスターゼ処理時間の影響について検討したところ、図3に示すように、72時間の処理によって、完全に除去できることがわかった。

GA濃度の影響：エラスターゼ処理時間を72時間に固定し、GA濃度の影響について検討したところ、図4に示すように、GA濃度が0.05～0.07%の範囲で、肺動脈程度の力学特性を保持できることがわかった。既に、ロス手術では自己肺動脈弁を大動脈弁位に移植している他、肺動脈を大動脈位に移植する動物実験からも、強度的には低下するものの、破断等の異常は認められていないため、少なくとも肺動脈以上の強度を有すれば臨床に使用可能と考えられる。

以上の検討から、図5に示すように、至適条件として、GA濃度0.07%24時間、エラスターゼ72時間処理を選択し、現在、同種動物実験に供出している。

D. 考察

循環器組織の石灰化については、リン脂質やエラスチンを開始点とする報告がある。昨年度に報告した移植後の石灰化については、大動脈では顕著であったが、肺動脈では全く認められなかった。この原因として、両組織の組成や厚み、及び血圧や血液成分の相違等の血行動態などの影響の他、組成や厚みに伴う脱細胞化の程度への影響が考え

られた。既に、昨年度の検討において、組織内にリン脂質の残存を認めたため、脱細胞化過程において新たにアルコール処理を導入することでリン脂質の残存を顕著に減少させることが可能となり、動物移植実験の結果からも、その有効性が示されている（分担研究者湊谷報告）。一方、旧処理による脱細胞化肺動脈組織を大動脈位に移植する動物実験からも、石灰化が顕著に抑制されていたことから、血液成分や血圧の影響は少なく、両組織の相違によるものと推定される（分担研究者庭屋報告）。この相違は、単純に組織の厚みの相違による細胞浸潤のしやすさの相違の他、エラスチン含有量の相違も推定される。本年度は、脱細胞化組織からのエラスチンの除去について検討したところ、前処理として軽微な架橋を施した後、エラスターゼ処理することによって、力学特性を有効に維持したまま、エラスチンをほぼ完全に除去することが可能となった。架橋剤としては、既に臨床に使用されているものとしてGAを選択したが、GA自体が石灰化の原因であるという報告もあるため、現在、その他の架橋剤についても検討している。

E. 結論

石灰化の原因であると推定されるエラスチンを除去する方法について検討したところ、架橋処理後にエラスターゼ処理することで、組織内のエラスチンを完全に除去することが可能であった。現在、動物移植実験を実施中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Fujisato T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, Kitamura S. Bone marrow cell-seeded biodegradable polymeric scaffold enhances angiogenesis and improves function of the infarcted heart. *Circ J* 2005; 69 (9) : 850-7.
- 2) 岸田晶夫, 藤里俊哉. 再生医療用材料. 日本再生医療学会誌 2005; 4 (4) : 546-53.
- 3) 菅 理晴, 藤里俊哉, 永谷憲歳, 中谷武嗣. ブタ組織の脱細胞化. 移植 2005; 40 (5) : 441-4.