

取方法及び当該方法に用いる基材. 特許出願2005-324162.

- 3) Yamaoka T, Tokiwa Y, Kitagawa M. Carrier for nucleic acid molecule delivery. 米国特許出願.

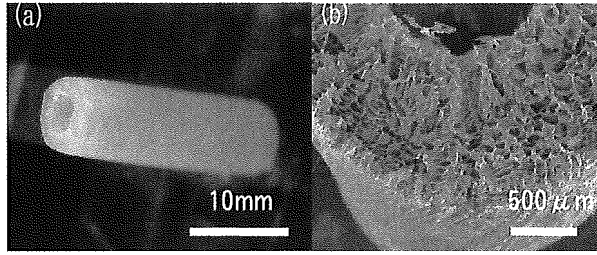


Fig 1. Gross picture (a) and SEM observation (b) of a PLLA porous scaffold.

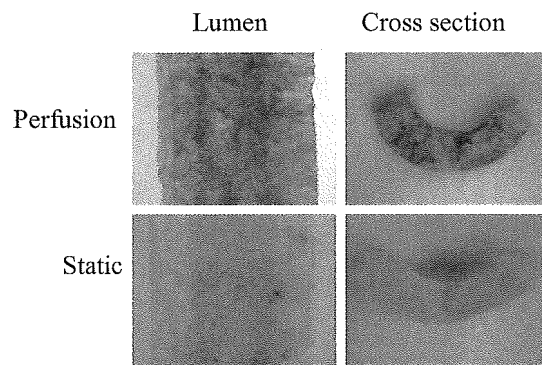


Fig 2. Distribution of cells seeded under the perfusion and static culture.

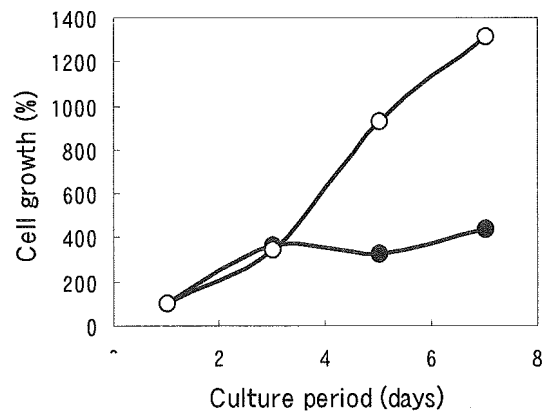


Fig 3. Growth of cells on the PLLA porous scaffolds under the static(●) and perfusion culture at the perfusion rate of $4.5\text{ml}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$ (○).

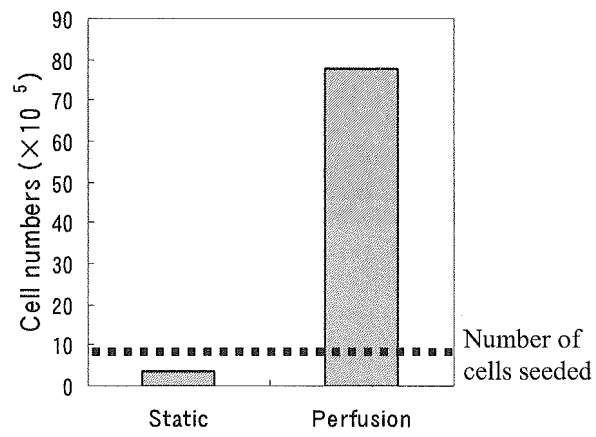


Fig 4. Growth of cells pre-seeded inside the PLLA porous scaffold under the static or perfusion culture conditions.

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 超高压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性に置換移植した。昨年度に認められた移植後組織内の石灰化は、脱細胞化処理にリン脂質除去処理を加えることで、顕著に抑制することができた。

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。ミニブタ脱細胞化大動脈を用いた同種移植による昨年度までの研究から、移植後の石灰化が問題となっていた。その原因として、リン脂質の残存が考えられ、脱細胞化処理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できた。本年度は、アルコール処理を導入した脱細胞化大動脈を用いたミニブタ同種移

植実験について検討した。

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。

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。

（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。

C. 研究結果

図1に示すように、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、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。図3に示すように、移植3ヶ月後でも、内腔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。

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た。しかしながら、移植された小児患者の早期不全死亡例が報告され、現在は製造中止状態にある。抗原性除去処理が不十分であった可能性が指摘されている。

再生型血管としては、小児患者の静脈再建において、東京女子医科大学大学院の新岡教授らが生体内分解吸収性材料を基材とした人工血管を用い、既に約50例の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。

昨年度は、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、石灰化の所見も認められた。石灰化の機序は未だ不明な点が多いが、リン脂質の他、組織内のエラスチンを開始点とする報告がある。本年度は、昨年までの脱細胞化処理に加えて、リン脂質除去処理を行った脱細胞化組織について同種移植実験を行った。その結果、石灰化を顕著に抑制することが可能となった。現在、長期の移植実験を継続中である。また、エラスチン除去処理を行った脱細胞化組織の移植実験についても計画している。

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。組織内のリン脂質除去処理を加えることで、昨年度に報告した移植後組織内の石灰化を顕著に抑制することが可能であった。

研究協力者

吉田謙一（財）先端医療振興財団派遣研究員

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

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) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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回高圧討論会. 室蘭. 2005年10月29~31日. The Review of High Pressure Science and Technology 2005; 15 (special): 45.
 - 10) 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. 脱細胞化したミニブタ血管の同種移植. 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)
なし

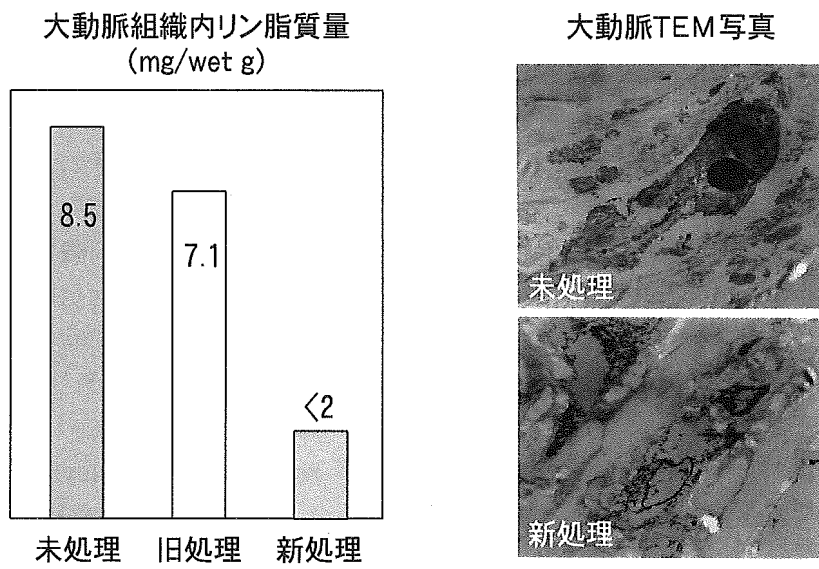


図1. 新規処理によるリン脂質除去

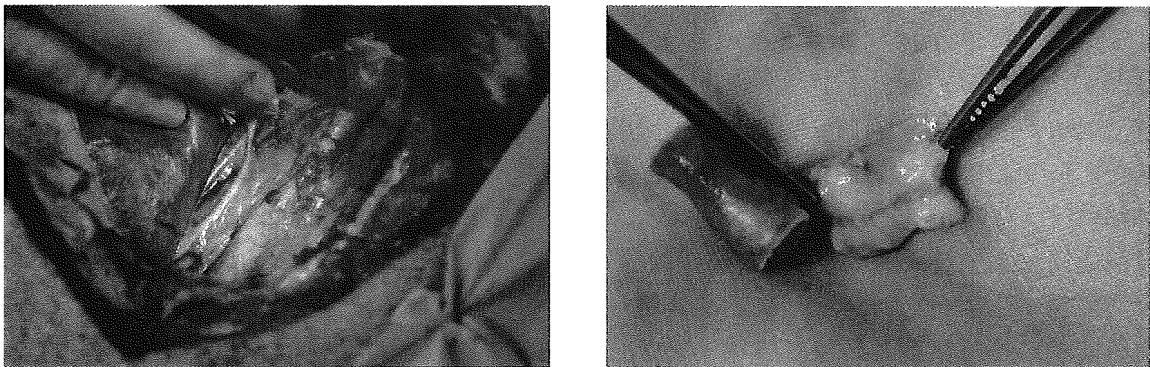


図2. 脱細胞化ミニブタ大動脈の3ヶ月間同種移植後の摘出時所見

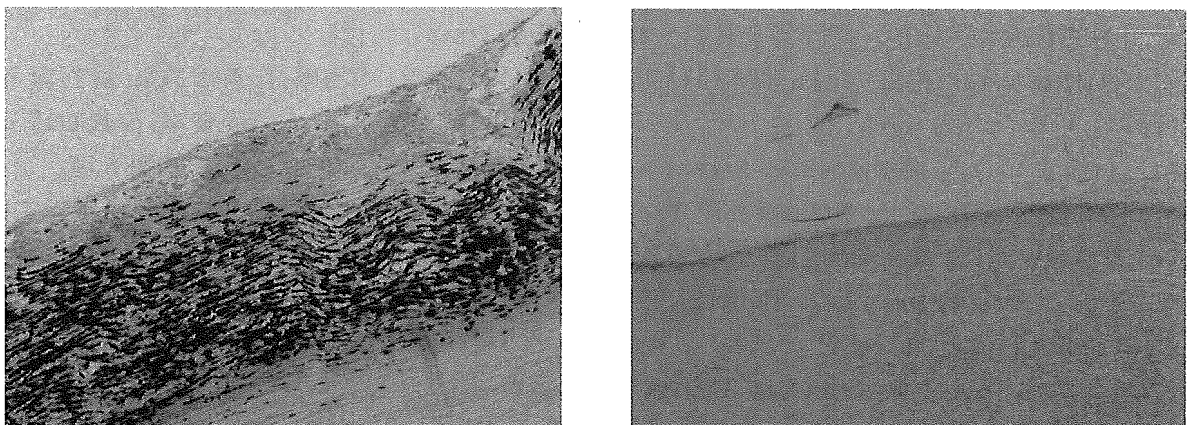


図3. 脱細胞化ミニブタ大動脈の3ヶ月間同種移植後における組織内の石灰化 (左: 旧処理、右: 新処理)

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を、同種ミニブタの胸部大動脈部位に移植した。移植した肺動脈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、昨年度行った大動脈組織では石灰化が認められたが、肺動脈組織では良好な細胞浸潤が確認され、石灰化もほとんど認められなかった。

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、無細胞化した心臓弁の有効性を検討する。昨年度は、無細胞化した肺動脈弁及び大動脈弁導管を、同種ミニブタ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検討した。その結果、肺動脈弁では特に問題は認められなかったが、大動脈弁導管では移植後の石灰化が認められた。本年度は、肺動脈導管を大動脈位に移植することで、その差異を検討した。

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）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压印加処理（4℃、10,000気圧）によってドナー細胞を破壊し、PBS溶液にて洗浄除去した。

移植実験：クラウン系ミニブタを用い、右心バイパス下にて、脱細胞化同種肺動脈弁による肺動脈弁置換手術を行った（図1）。術後3ヶ月で移植組織を摘出し、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、及びvon Kossa（石灰化）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。

C. 研究結果

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。図2に示すように、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。

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福岡教授らは、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。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。

E. 結論

脱細胞化ミニブタ肺動脈を同種ミニブタ大動脈位へ異所性に移植したところ、破断等も見られず、良好な自己細胞の浸潤を確認した。また、石灰化もほとんど認められなかった。臨床応用に有効な方法であると考えられる。

研究協力者

吉田謙一 (財)先端医療振興財団派遣研究員

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

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ャフォールド材料. 第44回日本生体医工学会大会. 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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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回高圧討論会. 室蘭. 2005年10月29～31日. The Review of High Pressure Science and Technology 2005; 15 (special) : 45.
- 9) 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. 脱細胞化したミニブタ血管の同種移植. 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む.)
なし

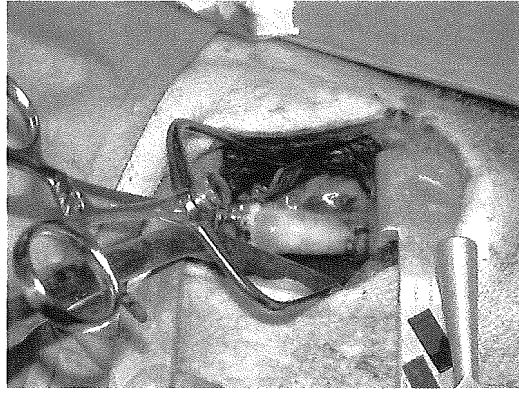


図1. 脱細胞化ミニブタ肺動脈の同種大動脈移植

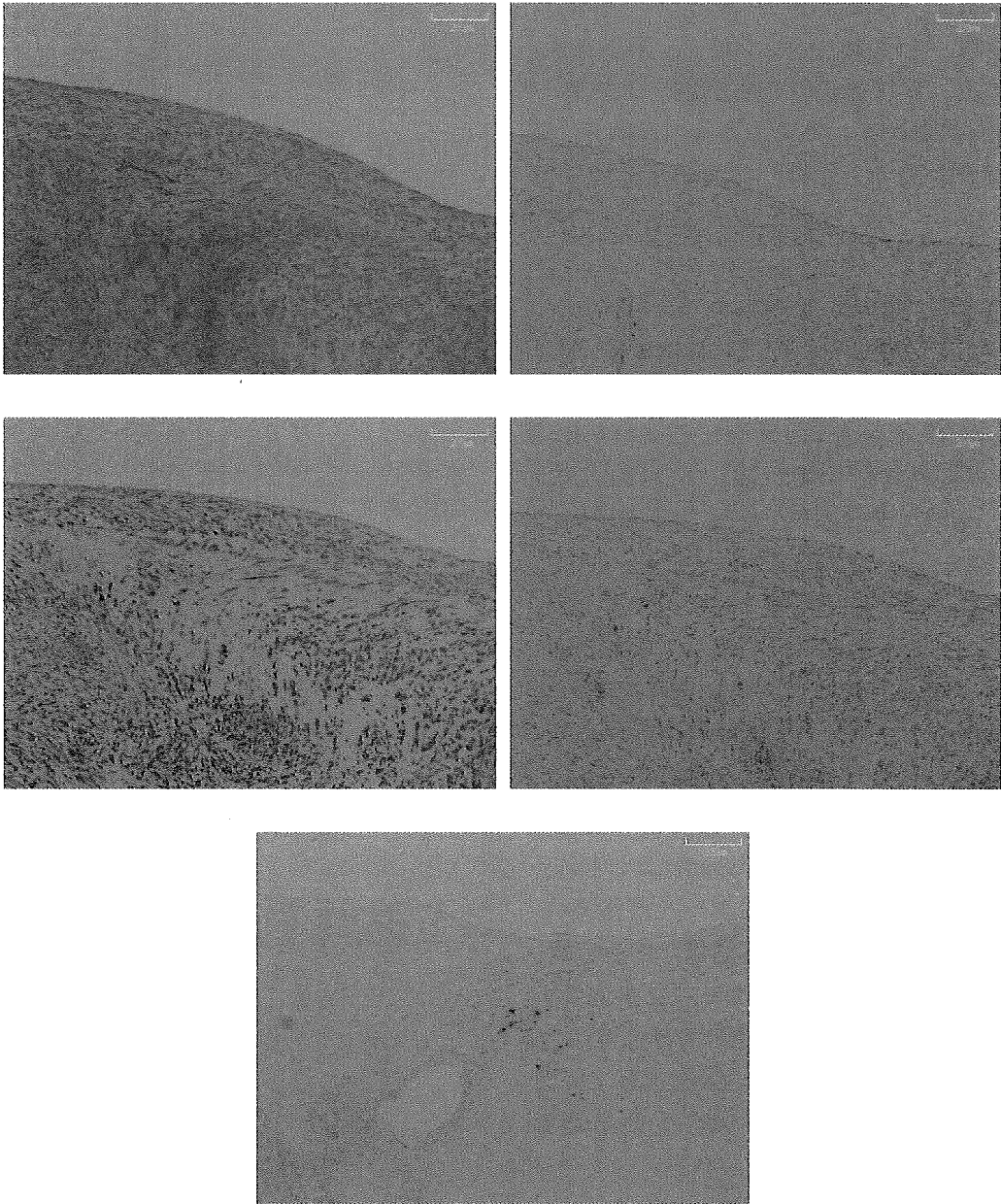


図2. 脱細胞化ミニブタ肺動脈の同種大動脈移植3ヶ月後の組織標本
(左上: HE、右上: vWF、左中: SMA、右中: ビメンチン、下: von Kossa)

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

再生医療型素材の動物実験（生体適合性評価）

分担研究者 北村惣一郎 国立循環器病センター総長

研究要旨 脱細胞条件の違いによる炎症反応について、ラットを用いた異種組織移植実験にて検討した。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、そのプロセスの相違には大きな影響を受けなかった。

A. 研究目的

代替臓器の移植治療は、現在の医学で重要な分野となっている。医用材料工学においても、人工臓器の作製の活発な研究が進められている。ティッシュ・エンジニアリングにより作製される人工臓器の最終目的は、ヒトへの臨床応用であるが、移植片に対する免疫反応は、移植の最大の関門である。今日の臓器移植の成功の要因となっているのは、組織の適合性ではなく免疫抑制剤の進歩が大きい。

移植手術による拒絶反応は、同種移植片でも超急性な拒絶反応が引き起こされる。同種移植での拒絶は、移植片の同種抗原に対する免疫応答によって起こる。この同種抗原は同一種内でも、個体ごとに異なる抗原性をもつタンパクであるため、レシピエントにとっては外来抗原として認識される。最も歴史があり現在でも最も広く行われている輸血は、主要な血液型は4種類のABO式と2種類のRh式血液型しかないので、比較的容易にドナー・レシピエント間の一致をさせることが可能である。しかし、有核細胞を含む組織を移植する場合は、高度に多型性をもつMHC分子に対するT細胞の反応がほぼ確実に起こり、移植された組織に対する拒絶反応が引き起こされる。ドナーとレシピエントのMHCの型が一致すれば、移植片の生着率は上がるが、完全な一致はドナーとレシピエントに血縁関係がある場合にほぼ限られ、更に、この場合ですら、他の遺伝子対の違いが拒絶の引き金になる。

移植臓器拒絶は、3段階の機序からなる。拒絶反応の最たる原因となり、分単位で急速に始まる

最初の反応が、超急性移植片拒絶反応である。血液型抗原や多型性MHC抗原に対する補体依存性の反応で、同種間の移植ですら、同種抗体に対して起こる。異種移植の場合、極めて嚴重な注意が必要とされる。次に、週から月単位で生じる、急性拒絶反応である。この反応では、細胞外骨格へのリンパ球・マクロファージの浸潤、実質細胞の壊死が起きる。主にT細胞を介する反応で、MHC I・II抗原の認識によって生じる。異種移植の研究では、超急性反応を逃れても、急性拒絶反応を回避することが非常に困難とされている。最後の反応が月から年単位で起きる、慢性拒絶反応である。移植片は脱落、激しい炎症がない限りは、レシピエント体内に永続的にあり続けるので、慢性拒絶反応を起こさないようにすることも、人工臓器研究の課題であるといえる。

ブタは解剖学的にヒトに類似しており、家畜として入手が容易なことから、異種臓器移植の候補として研究に多用されている。しかし、大部分のヒトや霊長類が、ブタや他哺乳類の血管内皮に対する抗体を持っている。ブタの異種移植片がヒトに移植された場合、この抗体が血管内皮抗原に反応して補体や凝固系が活性化され、超急性移植片拒絶が起きる。CD59、DAF (CD55)、MCP (CD46)のような補体制御タンパクは極めて種特異性が高いので、異種移植片の補体制御タンパクは、ヒトの補体の攻撃から移植片を守ることができない。結果として、凝血によって移植片の血管が塞がれてしまい、血液の漏洩、移植片への出血、鬱血、最終的に非酸素化血のためにチアノーゼが起きる。最近、DAFの遺伝子導入ブタが開発され、この補

体制御タンパクの問題の解決策として実験されているが、このブタを用いた成功例も十分な免疫抑制を行った上で行われた例である。異種臓器移植のヒトへの臨床適応には、まだまだ改善すべき点が多い。

本研究では、これまでに有限数の候補条件から選出した最適化条件で脱細胞化を行った組織サンプルをラットの皮下に埋入する、ブタ-ラット間の異種埋植試験を行った。同種動物間での移植片の埋入試験では、同種組織の移植時に一般的に用いられる、冷凍保存法で処理した組織よりも、脱細胞化組織のほうが、炎症反応の誘起が少なく、正常値の範囲内に収まった（ラット：最大埋入期間16週間、ヒト：最大埋入期間12ヶ月）という報告がある。しかし、脱細胞化組織を用いた異種動物間の埋入試験では、長期間の埋植での改善が必要とされている（ブタ-ラット間：8週間で脱落）。本法による脱細胞化処理によって、超急性移植片拒絶反応が抑制されるかどうか、血管新生が行われるかどうかについて検討を行った。埋植期間を1週間/4週間の2通りで行い、時間の経過に伴う免疫反応の変遷について検討した。

B. 研究方法

B-1. 異なる脱細胞化プロトコルでの脱細胞化大動脈サンプルの調製

ブタ大動脈サンプルの調製

ブタ大動脈付き心臓を芝浦臓器（株）から購入した。購入してすぐ、サンプルの作製を行った。大動脈を心臓から切り取り、血管外膜を覆っている脂肪組織を切除して、トリミングを行った。滅菌カップに注いだ抗生剤添加PBS (-)（ペニシリン及びストレプトマイシン（Invitrogen）を1,000U/mlになるように添加）約200mlにて大動脈を洗浄した。洗浄した大動脈をサンプルサイズ1cm×1cmに作製した後、再度、抗生剤添加PBS (-)にて洗浄し、脱細胞化用サンプルとした。

前処理操作

TX溶液を用いた。構成成分をPBS (-)で溶解した後、濾過滅菌を行った。処理は、ブタ大動脈サンプル（約1cm×1cm）をTX溶液に、4℃下で30時間浸漬させて行った。

超高压印加処理

超高压印加条件は5種類を設定して行った（表1）。超高压維持は、10,000気圧で10分間行った。

表1. 超高压印加条件

Protocol No.	Start Temp. (°C)	Pres. Rate (atm./min)
8	10	2000
9	25	2000
10	10	666
11	25	666

洗浄処理

洗浄液は、これまで用いているPBSをベースとしたものを用いた。洗浄期間は0日間及び8日間の2種類を設けた。洗浄操作は、37℃下で連続振盪させながら洗浄を行った。サンプルを洗浄液に浸漬後、1日おきに洗浄液の交換を行った。交換の際、サンプルを抗生剤添加PBS (-)で洗浄した。

B-2. 埋植手順

実験動物と埋植区分

1回の埋入試験で、ウィスターラット（オス、7週令、250g）9匹に、調製した脱細胞化組織サンプルの埋植を行った。埋植期間は1週間及び4週間の2種類を設定した。

埋植したサンプルの種類は、未処理・前処理のみ施行・脱細胞化組織（圧力印加条件と洗浄期間の組み合わせにより計8種類のサンプル条件）の、合計10種類のサンプルについて行った。各条件のサンプルについて3個ずつ行った（n=3）。

サンプルのラットへの埋植の仕方は次の通りである。

グループ①（未処理・前処理のみ施行）

グループ②（各脱細胞化/洗浄期間0日間）

グループ③（各脱細胞化/洗浄期間8日間）

埋植手順

ラットを麻酔処理した後、術部に横方向に切開した。表皮と真皮をハサミを使って剥離し、ポケット状の空間を作った。空間の大きさはサンプルサイズよりかなり大きめに作り、ここにサンプルを入れた。表皮を縫合し、ケージに戻した。

所定の埋入期間後、尾骨付近を切開し、背骨に沿って尾骨から頸骨まで、縦に皮膚を切開した。さらに側部まで横に皮膚を切開し、ハサミで表皮と真皮を剥離した。サンプルは表皮側に接着して、全てのサンプルが確認できるまで剥離を行った。表皮を開き、術部を顕微鏡にした。サンプル

はラットの表皮ごと、サンプルの周囲約5mmずつ大きめに摘出した。サンプルはすぐに、10%中性緩衝ホルマリン溶液（和光純薬工業（株））で固定した。

（倫理面への配慮）

動物実験に対する動物愛護上の配慮は、「動物の保護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日法律第105号）及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日総理府告示第6号）に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、上記法律及び基準に則った国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。

C. 研究結果

C-1. 埋入1週間の脱細胞化ブタ大動脈の組織染色評価

ブタ大動脈組織に脱細胞化処理を施したサンプルを、ラットに1週間埋植した。以下、HE染色標本の結果を示す（図1～図3）。

コントロールとして埋植した未処理サンプル、前処理のみ施行したサンプルは、ブタ組織サンプルの周辺に大量の免疫系細胞が存在した。前処理のみ施行したサンプルは、未処理サンプルより免疫系細胞の量が若干少なかった。組織末端のコラーゲン線維の端から、免疫系細胞の浸潤が確認された。組織構造の緩みが大きいほど、この浸潤の程度が大きかった。また、組織中の損傷や亀裂が生じていた部分には、大量の免疫系細胞が集まっていた。血管新生もよくなされていて、サンプル周辺に沢山の微小血管が観察された。組織の境界部でブタ組織のコラーゲン線維が溶解されていた。境界部の細胞骨格は、損傷が激しく、線維が損傷していた。

両方のサンプルで埋植の有無により、決定的に違ったことがあった。埋植しないサンプルでは両方とも組織中に細胞が充填していたのに対して、埋植したサンプルでは、大量の細胞が脱離していた。未処理サンプルには、僅かに細胞の残渣が存在していたが、前処理のみ施行したサンプルでは、ほぼ全ての細胞残渣まで除去されていた（図

1）。おそらく、未処理・前処理のみ施行したサンプルは、他サンプルを脱細胞化処理している期間中、PBS（-）溶液で保存していたためだと考えられる。

脱細胞化を行ったサンプルでは、洗浄期間の有無に関わらず、未処理サンプル、前処理のみ施行したサンプルと比較して、免疫系細胞の量が明らかに少なかった。しかし、組織に損傷、亀裂が生じた部分には、コントロールと同様、大量の免疫系細胞が集まっていた。脱細胞化組織間での比較は、顕微鏡観察では差異はなかった。血管新生の程度も、コントロールと比較すると、若干少なかった。組織末端はコントロールと同様に、損傷が激しかった。また、埋植の有無によるブタ組織内の細胞量の違いは、脱細胞化組織でも顕著だった。埋植をしないサンプルのうち、洗浄期間を設けないサンプルは、組織末端の細胞が僅かにしか除去されない。だが、埋植したサンプルは、ほぼ全ての細胞が除去されていた（図2）。

脱細胞化サンプルについて、洗浄期間の有無によって、組織周辺に集まる免疫系細胞の量の差はなかった。ブタ組織中の細胞の量も同様にほぼ全て除去されていた。埋植しない洗浄期間8日間のサンプルは、組織末端のコラーゲン線維に緩みが生じていたが、埋植すると緩みが軽減されていた（図3）。

C-2. 埋入4週間の脱細胞化ブタ大動脈の組織染色評価

埋植4週間のHE染色標本サンプルを以下に示す（図4～図6）。

全てのサンプルにおいて、免疫系細胞がブタ脱細胞化組織によく集積されていた。埋植1週間のサンプルと比較すると、免疫系細胞の集積の広がりには狭くなっていた。免疫系細胞の量は同程度で、密に組織に集まっているのが観察された。また、組織末端の緩みの大きい箇所から、免疫系細胞がよく浸潤しており、浸潤の程度は1週間のサンプルより、より深部近くまで到達していた。

未処理・前処理のみ施行したサンプルは、両方とも血管新生の程度が増していた。新生した血管も埋植1週間のサンプルより口径が大きくなっていた（図4）。

脱細胞化を行ったサンプルは、埋入1週間のサンプルと比較して、免疫系細胞の量が減少してい

た。最適ではない超高压印加条件で行った脱細胞化組織でも、埋植期間に組織末端の緩みが軽減されていたのが観察された。軽減の程度は同程度であった。ブタ由来の細胞はほぼ完全に除去されていた。また、埋入1週間のサンプルよりコラーゲン線維の損傷が激しく、亀裂が沢山入っていた(図5)。

洗浄期間で比較すると、免疫系細胞の量・血管新生の程度も同程度だった。ブタ組織サンプルの洗浄期間で生じる緩みもかなり軽減されていた。最適でない超高压印加条件で処理を行うと、コラーゲン線維間の緩みが大きくなったが、埋植期間後、末端から深部にかけて生じるはずの隙間がなく、線維間が密になっていた。免疫系細胞の浸潤は、有意差があり、洗浄8日間のサンプルの組織では、0日間のサンプルよりも中央部での浸潤の程度が大きかった。この浸潤のために、洗浄8日間のサンプルでは、ブタ組織の中央部が割れているものが多かった(図6)。

これらの結果を組織切片像より、埋植組織面積と炎症細胞層の比として、組織の生体適合性を評価した。結果を図7に示す。

D. 考察

図7より、埋植時間の経過に従って炎症層の領域が小さくなるのが分かる。初期の炎症過程は2週間程度であり、4週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いことが分かる。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。

E. 結論

脱細胞条件の違いによる炎症反応について検討した。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。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Kitamura S. Does the internal thoracic artery graft have self-reparative ability? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1494-5.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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, 森俊俊幸, 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ャフォールド材料. 第44回日本生体医工学会大会. 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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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. 脱細胞化したミニブタ血管の同種移植. 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 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) 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.

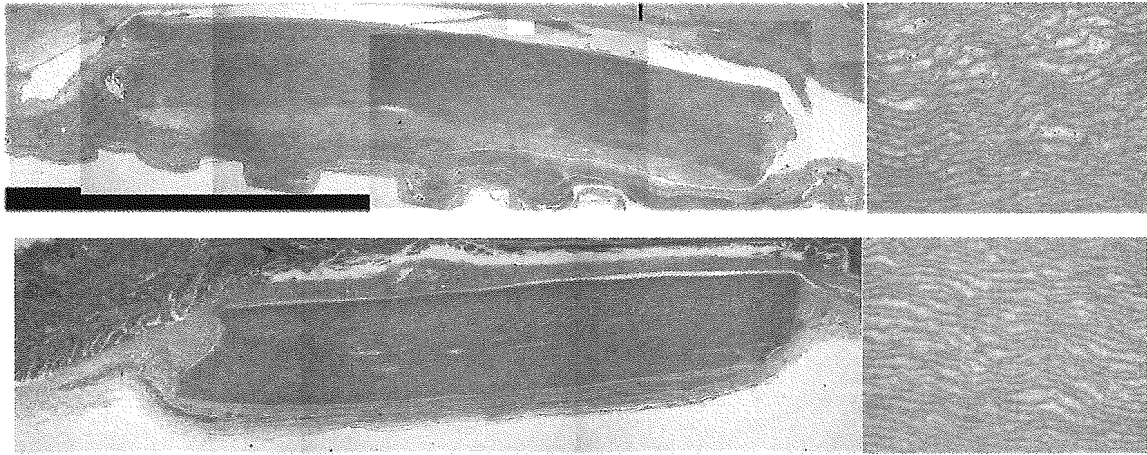


図1. プタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験結果（1週間）
（上：未処理、下：前処理のみ、左：20倍、右：200倍）

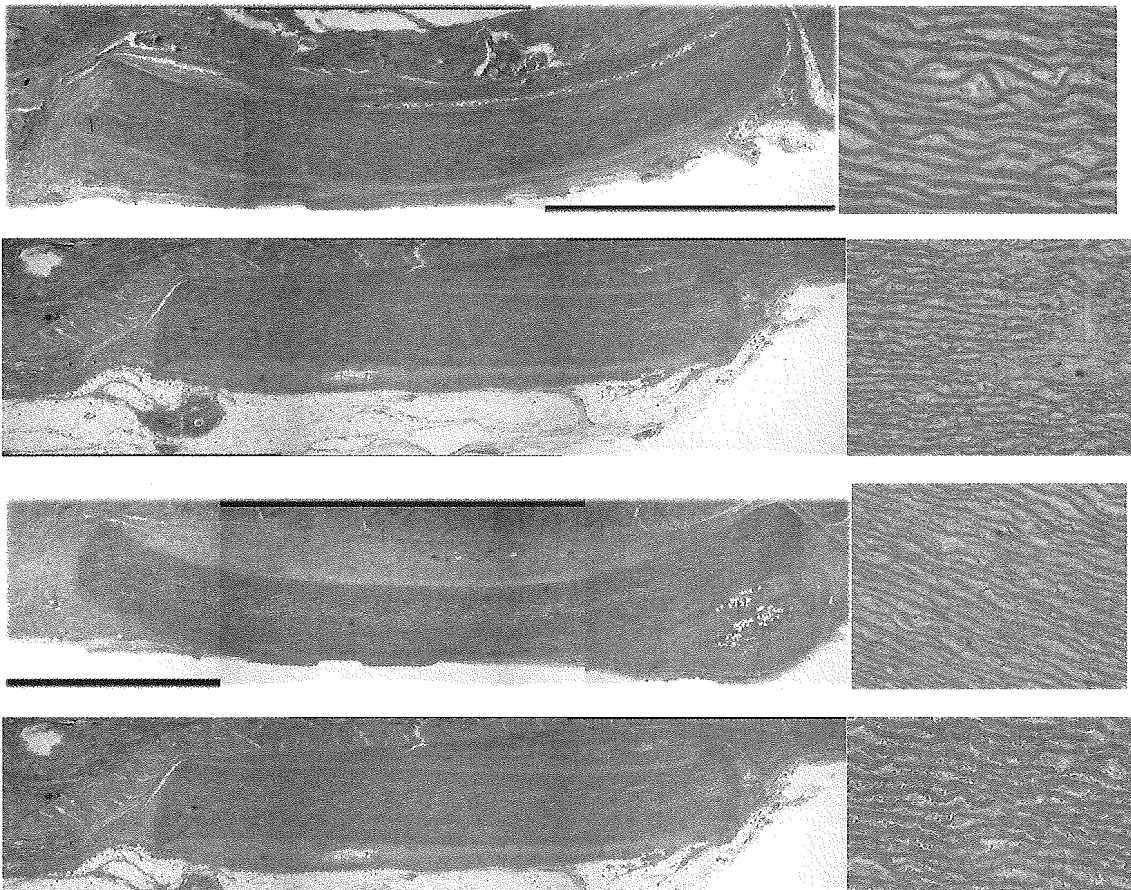


図2. プタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験結果（1週間、洗浄0日）
（上からプロトコル8，9，10，11、左：20倍、右：200倍）

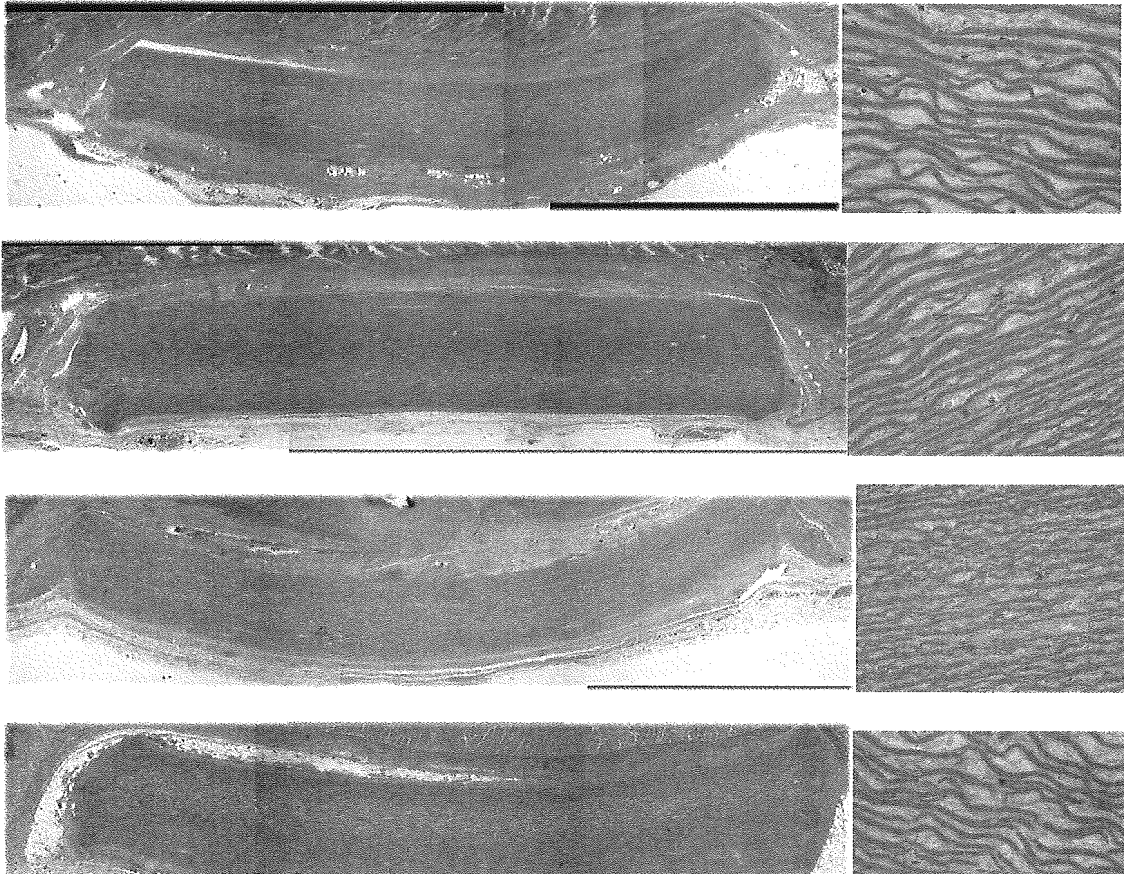


図3. プタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験結果（1週間、洗浄8日）
（上からプロトコル8，9，10，11、左：20倍、右：200倍）

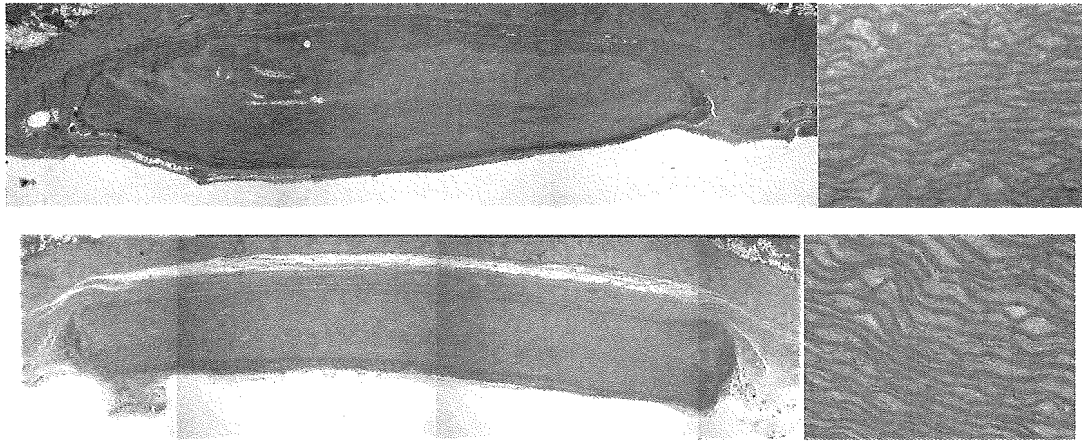


図4. プタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験結果（4週間）
（上：未処理、下：前処理のみ、左：20倍、右：200倍）

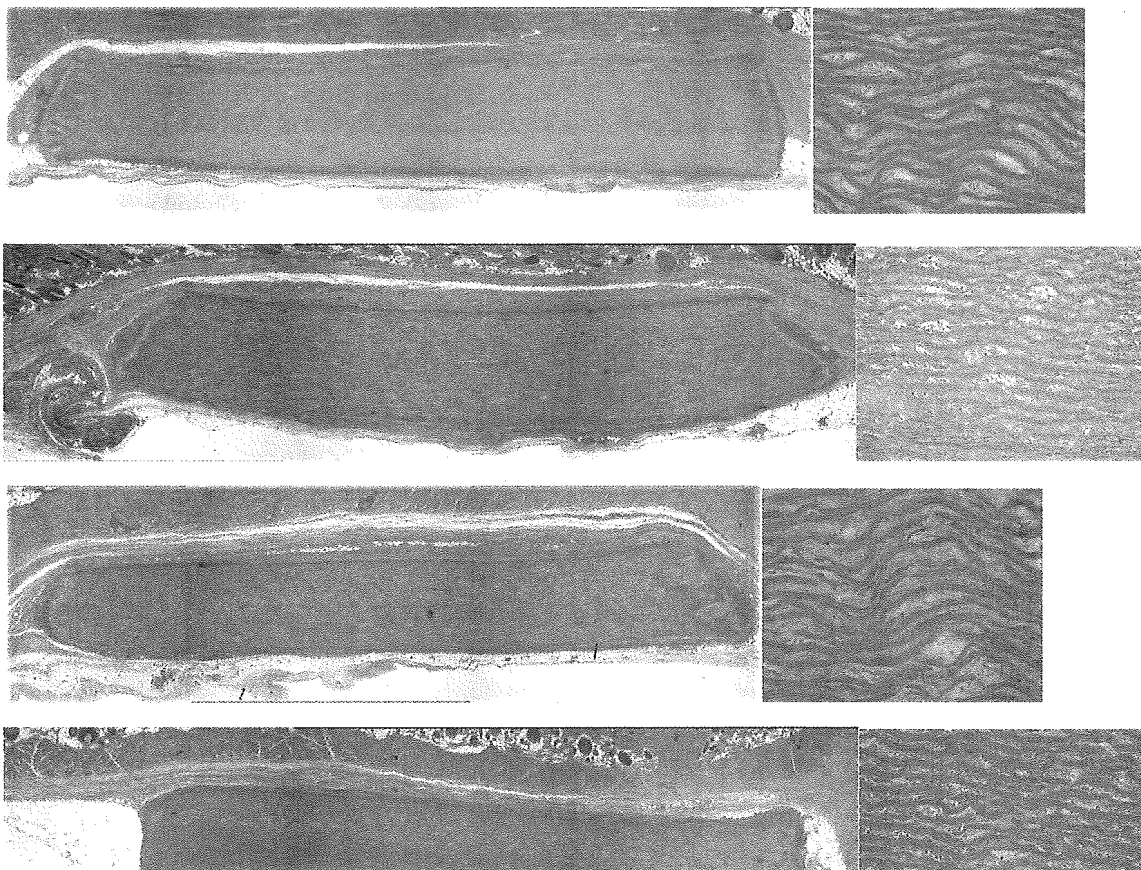


図5. プタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験結果（4週間、洗浄0日）
（上からプロトコル8，9，10，11、左：20倍、右：200倍）