

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 ……	437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 ……	442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 ……	466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 ……	471
第6分野			
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 ……	516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 ……	524
第7分野			
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 ……	548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究



## 新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発

所 属 東京医科歯科大学生体材料工学研究所  
研究者 岸田 晶夫

研究要旨 生物由来素材を再生医療用 Scaffold として用いるために、新しい脱細胞技術、および新しい加工法・修飾法に関して検討を行い、さらに動物実験を用いた評価を還元することによって、詳細な検討を行った。

### 分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学生体材料工学研究所  
岸田晶夫
- (2) 国立循環器病センター研究所  
藤里俊哉
- (3) ニプロ株式会社総合研究所  
白数昭雄

### 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は、生体内分解吸収性の合成材料が用いられている。しかし、既存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、申請者ら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。これにより、複雑な構造でも造形する必要がなく、あるいは生体と同等の力学特性を有する再生医療用素材を、特別な化学薬品を用いることなく高機能化することができる。新規な再生医療用素材として広範な応用が期待できる。

本研究は、①既存の生体素材を高度に機能化できる、②国産化あるいは輸出も可能な高度な処理法、③既存の製品と比較して大幅な低価格化が可能、④新規な再生医療用 Scaffold の提供、⑤移植医療の普及による医療費の圧縮が可能、などが必要性および期待される成果として挙げられる。このうち、製品

化に関しては、国内に生物素材を加工できる企業がなく、採取動物の管理、GMP 対応の製造プラント設計から品質管理まで幅広い検討が必要である。このため、それぞれの分野で高い技術を有するニプロ株式会社と共同体制をとり、ベンチャー企業設立を視野に入れた研究開発を行う。これにより、わが国に高機能生物由来材料を取り扱う拠点を形成し、欧米にはライセンス化、東南アジアには技術供与をもって、国際的な医療技術向上に貢献することを目標としている。

### B. 研究方法

#### 基盤の生体組織スキャフォールド作製

1) 我々が新規に開発した超高静水圧印加及び低温マイクロ波照射法による細胞除去技術の処理条件の最適化を行った。ミニブタの種々の組織を用いて、それぞれの組織からの脱細胞化についての最適条件を検索した。特に、超高静水圧印加法でのプロトコルの最適化を行った。また、エラスターゼなどの酵素との組み合わせによる新たなスキャフォールドの作製についても検討した。対象とする組織は、心筋、心臓弁、血管、気管、心膜、皮膚、軟骨、骨、靭帯、腱などの組織と、肺、肝、腎、脾などの臓器である。特に心臓弁、血管に注目し、動物実験を行って、その有用性を検証した。

2) 生物由来素材を用いたスキャフォールドの作製を目的とする。前年度、分解性と力学特性を考慮して、コラーゲン素材を中心に作製したマトリクスを用いて、in vitro、in vivo での評価を行った。具体的な目的は、内径 1-2mm の小口径人工血管の開発である。サイズ、物性などについて最適化について検討した。

#### 機能性分子複合化技術の検討

1) 上記の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した。複合化する機能性分子として

は、抗血栓性付与のためにデキストラン、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、ヒ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である。複合化の条件について、物理化学的な評価を行い、物性、安定性、再現性について検討した。

2) 機能性分子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。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は、「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。当該実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤を用い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、不必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に努めた。

### C. 研究結果

我々が開発した超高静水圧印加法の最適条件について検討した。本研究の脱細胞化法は、以下3つのプロセスからなる。(1) 生体組織を前処理液に4℃、24時間浸漬させる。(2) 一定の圧力印加速度処理・処理温度で超高静水圧印加処理を行う。(3) 洗浄液に浸漬し、一定期間連続振盪により細胞残渣を除去する。である。

まず、圧力印加法の検討を行った。超高圧処理装置(Dr. CHEF; 株神戸製鋼所)を用いて行った。圧力印加速度と処理開始時の試料槽内の温度設定が重要であり、圧力変動時の温度変化は、昇圧に伴い上昇し、降圧に伴い低下する。加圧完了時に最高温度、減圧完了時に最低温度になる。圧力印加速度が早いほど、温度上昇、温度低下の変化量が大きくなった。また、処理開始時の温度設定の影響も見られ、開始時の設定温度が高いと、加圧完了時の温度が生体組織の熱変性温度となった。また、低いと、減圧完了時の温度が氷点下になり、組織内の水分が凝結を起こし、組織構造が損傷されると考えられた。そこで、印加中の温度変化が組織サンプルに損傷を与えないように、最適条件の検討を検討した。まず始めに、超高圧処理装置について圧力印加処理時の操作条件の最適化を行った。圧力印加速度と処理開始温度それぞれについて、いくつかの候補条件を設定し、その組み合わせで行い、温度プロフィールを検討した。更に、試料槽内に入れるサンプルの総体積が温度変化に影響についても検討した。

開始温度として10、15、20、25℃を、圧

力印加速度を毎分当たり、666、1000、2000 atmで行った。圧力印加速度666 atm/分、1,000 atm/分の速度条件は、一次的な温度変化を見せ、最高温度は加圧完了時の温度であった。これに対して、2,000 atm/分では、約850気圧の時に最高温度に至り、その後、僅かではあるが温度が下がった。最低温度は3条件とも全て減圧終了時の温度であった。圧力印加速度が速いほど温度上昇速度・下降速度ともに速くなり、その結果、最高温度が高く、最低温度が低くなった。また、処理開始温度を変化させても温度変化の勾配が変わることはなく、開始温度が高いほど、最高温度が高く、処理開始温度が低いほど、最低温度も低かった。サンプル数の違いによる温度変化の違いは、サンプル数1個の条件で、4個の条件より温度変化が大きくなった。この違いは、圧力印加速度が早い程顕著に見られた。

以上の結果をまとめると、超高圧印加装置(Dr. CHEF)を用いた超高静水圧印加処理では、処理開始温度・圧力印加速度・試料槽内に入れる固体サンプルの総体積量が、料槽内の温度変化に影響することが分かった。

上記の現象について、生体組織を用いて検証するためブタ大動脈を用いた検討した。処理時の温度プロフィールの最適条件探索の指標として以下3つの項目を挙げた。(1) 圧力変動時、および、超高圧維持時、全ての処理時において、各圧力条件下の水の氷点を下回らないこと、(2) 最高温度が生体組織を熱変性させる温度にまで上昇しないこと、本実験では、40℃以上にならないことが目安とする、(3) 圧力変動時の温度変化が急激にならないことである。生体組織を構成するタンパク質やリン脂質の中には、融点が室温程度の分子があり、それらの分子が急激な液化や固化を起こして、組織構造に構造異常を生じさせるためである。

上記の条件を常に満たしていたのは、処理開始温度10/15/20/25℃の中では、処理開始温度25℃/圧力印加速度2,000 atm/分で行った時の試料槽上層部の温度プロフィールだけだった。さらに、圧力印加速度666 atm/分の条件は、圧力変動時の温度変化が緩やかだったので、圧力印加速度は変えず、処理開始温度のみを30℃に変更した。25℃の条件より、圧力変動時の温度変化もほとんど見られなかった。

したがって、

- ①処理開始温度：30℃ 圧力印加速度：666 atm/分
  - ②超高圧維持：10,000気圧/10分間
- で行う条件が最適条件であると結論した。

次に、前処理について検討した。前処理液、浸漬期間についての種々の組み合わせについて、比較検討を行った。前処理では、生体組織の滅菌効果をも加味した細胞洗浄操作を目的とし、超高圧処理後の

洗浄操作は、超高静水圧印加処理により細胞が破壊されて、断片化した核酸成分や、露出した細胞質など、残渣を組織外に流出させることを目的としている。ブタ大動脈をサンプルとした。前処理液には、PBS(-)、1%PEG3300 溶液、1%PEG8000 溶液、TX 溶液(界面活性剤・核酸分解酵素を含む)を用いた。また、超高压処理後の洗浄液による洗浄期間を1/8/10/15 日間で設けて、洗浄期間が細胞除去への影響を検討した。ヘマトシキリン・エオジン(以下、HE)染色標本を作製し、評価を行った。評価としては、青紫色の細胞核成分が存在しないときを完全な脱細胞化(評価A)として、以下順に、細胞除去率を、A~Eの5段階(A:completely eliminated B:almost all eliminated C:most debris in the middle remained D:only few in the edge eliminated E:almost all remained)で評価した。洗浄期間1日間では、各条件ともに、ほとんど全ての細胞が残存していた(評価E)。期間が長くなるほど細胞除去率に前処理液の影響が現れた。PBS(-)では、洗浄期間が長くなるほど細胞除去がよくなされた。8、10日間では、組織末端の細胞がほぼ全て除去されていたが、深部の細胞はほとんど全て残っていた。15日間では、深部の細胞がやや除去されていたが、完全除去には至らなかった。PEG3300の条件では、PBS(-)よりも細胞除去率が悪かった。8、10日間では、PBS(-)の条件と同じく組織末端の細胞はよく除去され、深部の細胞は少し除去されていた。15日間でも、深部の細胞はほとんど残っていた。PEG8000の条件は、PEG3300の条件よりも更に細胞除去率が劣っていた。8、10日間でも組織末端の細胞が少し残っていて、深部の細胞はほとんど除去されていなかった。15日間でも、深部の細胞の残存率が高かった。以上のことから、いずれの洗浄液も、洗浄期間の延長に伴う除去効果は上昇されたが、完全な脱細胞化には至らなかった。一方、TX溶液の細胞除去率が最も高かった。8日間で、組織深部の細胞がほぼ完全に除去され、10日間以上で、細胞が完全に除去されていたのが確認できた。

次に、超高压印加プロトコールと洗浄機関の影響を検討した。評価はHE染色にて行った。コントロールとして、ブタ大動脈サンプルに全く処理を加えない未処理サンプルと、超高压処理を行ったサンプルと同じく前処理のみ施行したサンプルを用意した。未処理サンプルは細胞が充填しており、また細胞骨格成分であるコラーゲン線維が密に並んでいるのが観察された。前処理のみ施行したサンプルでは、組織末端の細胞が抜けており、前処理だけでも細胞除去がされていた。コラーゲン線維は未処理サンプルに比べ、緩みが生じているのが観察された。緩みが大きい箇所ほど、よく細胞が除去されていた。これ

を受けて、各条件に関して細胞除去率と、組織変性度に焦点を中てて観察、評価を行った。細胞除去率について、完全な脱細胞化を評価Aとして、以下順に、細胞除去率を、A~Eの5段階(A:completely eliminated B:almost all eliminated C:most debris in the middle remained D:only few in the edge eliminated E:almost all remained)で評価し、また、組織変性度について、未処理サンプルと同程度に構造を保持していたものを評価++++として、以下順に、5段階(++++: retained native completely ++++: retained mostly ++: denatured frequently ++: denatured mostly +: denatured intensely)で評価した。超高压処理を行ったHE標本について、各圧力処理条件による脱細胞化率の違いは見られなかった。サンプルによっては組織深部に僅かな細胞の残渣が存在したが、多くのサンプルでは、洗浄期間8日間で完全な細胞除去がなされていた。この細胞除去率の違いに圧力条件による効果は観察できず、個体差によるものだと思われた。しかし、細胞骨格の変性について、各圧力条件で違いが観察された。特に、コラーゲン線維の変性と損傷は顕著な違いがあった。洗浄期間が長いほど、組織変性度が高く、特にコラーゲン線維の緩みが大きくなっていった。処理開始温度10°C/圧力印加速度2,000 atm/分による組織変性度は、各条件の中で、組織構造の変化と損傷が最も大きかった。コラーゲン線維の三重らせん構造に緩みが生じて、穴のように開いた箇所が点在した。組織末端ほど緩みが大きかった。さらに、線維一本一本に亀裂が生じ、線維が切断されている箇所、線維がぼろぼろになっている箇所が沢山存在した。処理開始温度25°C/圧力印加速度2,000 atm/分による組織変性度は、上述と同程度で、コラーゲン線維間の緩みが大きく、組織末端は更に緩みが大きかった。しかし、コラーゲン線維一本一本については、はかなりぼろぼろだったが、亀裂はやや少なかった。処理開始温度10°C/圧力印加速度1,000 atm/分による組織変性度は、構造の緩みは上述の条件よりもやや穏やかだった。コラーゲン線維は、ぼろぼろになっている程度が穏やかで、亀裂も少なかった。処理開始温度25°C/圧力印加速度1,000 atm/分による組織変性度は、上記と同程度だった。このサンプルは、コラーゲン線維の亀裂が多く、損傷が大きかった。処理開始温度10°C/圧力印加速度666 atm/分による組織変性度は、明らかに構造の緩みが小さく、深部の線維は密に並んでいた。コラーゲン線維の亀裂も少なく、ぼろぼろになっている程度も小さかった。処理開始温度25°C/圧力印加速度666 atm/分による組織変性度は、10°Cと同様に構造の緩みが小さく、組織末端の緩みは深部よりも僅かに緩んでいる程度だった。コラーゲン線維の亀裂は僅かであった。処

理開始温度 30℃/圧力印加速度 666 atm/分は、最も組織維持が良かった。組織変性はほとんどなく、構造の緩みも僅かしか生じておらず、穴のように開いた箇所がほとんどなく、コラーゲン線維間の構造が良く保持されていた。組織末端と深部を比較してもほとんど違いがなかった。コラーゲン線維の亀裂はほとんどなく、ぼろぼろになっている程度も僅かで、一番穏やかだった。以上をまとめると、30℃で開始し、緩やかな圧力変化の条件がコラーゲン構造維持に最適であることが分かった。

さらに新洗浄法として、洗浄液 I、II、III の 3 種類の溶液を用いて、リン脂質の除去を目指し、種々の期間の洗浄を行った。洗浄 0 日間(旧 洗浄 0 日間/新 I-0 日間・II-3 日間・III-3 日間)では、組織変性度に違いは見られなかった。細胞除去率は旧洗浄法では組織末端の細胞が僅かに除去されていた。洗浄 3 日間(旧 洗浄 3 日間/新 I-3 日間・II-3 日間・III-3 日間)では、細胞除去率・組織変性度に違いが観察され、細胞除去率については、旧洗浄法では組織末端の細胞しか除去されていなかったのに対して、新洗浄法では、組織末端の細胞は全て除去されていた。また、深部の細胞も、細胞骨格に僅かに細胞残渣の付着が観察されたが、ほとんどの細胞の除去が確認できた。組織変性度についても、旧洗浄法も、組織骨格の保持がよくなされていたが、新洗浄法のほうがコラーゲン線維の緩みもほとんどなく、骨格保持の程度がより高かった。また、合計洗浄期間が近い場合、すなわち、旧洗浄法の 8 日間の洗浄と、新洗浄法の 9 日間の場合では、新洗浄法の細胞除去率が旧洗浄法より高かった。洗浄 14 日間でも、細胞除去率・組織変性度に違いが観察された。細胞除去率は、旧洗浄法では、組織深部に僅かに細胞残渣が観察された。新洗浄法では、組織深部に至るまで、全ての細胞の除去を確認できた。組織変性度は、旧・新洗浄法ともに、細胞骨格の保持が極めて高くされていたが、新洗浄法の組織末端に僅かに緩みが生じていた。旧洗浄法よりも長い洗浄期間が影響したと考えられる。以上の実験により、各処理において、有限数の候補からの最適化を行うことはできた。

次に、組織適合性試験として、ラット背部皮下へのインプラント実験を行った。種々のプロトコールにて処理したブタ大動脈をサンプルとして用いた。

1 週間の結果では、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、線維がぼろぼろになっていた。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、大量の細胞が抜けていた。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。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、損傷が激しく、ぼろぼろだった。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。

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。

次に 4 週後の結果では、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も狭くなっていた。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。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、亀裂が沢山入り、線維自体もひどくぼろぼろだった。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。

以上の結果をまとめると、最適化した超高压印加条件は、生体組織に対し、物理学的・組織学的に影響が少ないことを証明した。本実験では、同条件が免疫学的にも良い効果をもたらすかについて検証した。ブタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験を行った結果、脱細胞化組織で、有意な炎症反応の軽減が観察された。通常、異種動物間の置換移植は、超急性な免疫応答により、激しい拒絶反応を起こして、移植片が脱落してしまう。だが、本実験では、免疫系細胞が組織周辺に集積する程度の穏やかな免疫応答で、埋入期間4週間経過後も組織が脱落せず、むしろ、よく生着していた。脱細胞化処理の免疫応答抑制の効果が高いことが示唆された。ただし、未処理サンプル、前処理サンプルについては、免疫応答が予想よりずっと低かったことが問題として残る。特に、未処理サンプルは予想に反して脱落されなかった。原因として、ラットへの皮下埋植試験を脱細胞化組織と同時に行うため、脱細胞化処理期間中、未処理サンプル・前処理のみ施行したサンプルは約10日間PBS(-)溶液に浸漬させていたためだと考えられる。浸漬期間の間に、PBS(-)溶液の洗浄効果が組織に作用したのではないかと推測される。

埋入試験によって観察されたこととして注目すべき点が3つあった。まず、埋植によって、異種移植片中の細胞が除去された。次に、脱細胞化処理によって生じた組織骨格の緩みが、ラットへの埋入期間に軽減された。さらに、洗浄期間を設けたサンプルのほうが、免疫系細胞の浸潤度が高かった。埋植による移植片中の細胞が除去される現象は、前述のように、埋植試験を行うまでの保存期間、PBS(-)溶液に浸漬させていたことが原因の一つだと考えられる。PBS(-)溶液を前処理液に用いたところ、有意な細胞除去効果が認められた結果からも推測される。また、同種間で埋植試験を行ったところ、移植片組織内の

細胞がレシピエント組織内でアポトーシスを起こした、という報告がある。このとき、マクロファージとT細胞が関与し、移植組織由来の細胞がアポトーシスを起こすようである。本実験の結果にも関係があると推測される。洗浄期間を設けたサンプルのほうが免疫系細胞の浸潤度が高かったのは、洗浄期間により組織強度が弱くなったことが考えられる。酵素溶液・界面活性剤を用いた脱細胞化法では、長く浸漬時間を取ると細胞骨格の変性を引き起こす、という報告がある。特に、細胞外マトリックスの主要成分である、エラスチンとコラーゲンに損傷が大きく、損傷による組織への影響も高い。エラスチンが損傷を受けることにより、組織の伸縮性が低下し、堅さが上昇し、コラーゲン線維が延びてしまう。この変性によりコラーゲン線維が損傷を起こし、結果として炎症反応を誘起させる。洗浄期間が20日間の新洗浄法で行ったサンプルで、超高压印加条件の違いが組織への影響に大きく現れたことから推測される。今回は異種動物間の埋植試験を行ったが、脱細胞化処理が免疫反応を有意に抑制することが確認できた。脱細胞化組織の*in vivo*での評価において、MHC I・II抗原を除去したことで免疫性の低下が見られるのではないかと、リン脂質・コレステロールの除去が、免疫反応(石灰化)の抑制に対して更なる効果を示すという報告もある。また、コラーゲンやエラスチンを始めとする細胞骨格成分の損傷・変性が免疫反応を誘起するとも言われている。今後、本法を用いた脱細胞化組織がヒトへの臨床材料として適用されるよう、免疫応答の抑制、組織構造の保持について更なる検討を行う。

次に、食用ブタ心臓の心室筋を厚さ1.6mmの板状にスライスし、超高压水圧印加処理を行い、組織内の細胞を破壊した。圧処理後、組織に残存した細胞成分を除去するために洗浄を行った後、HE染色を行って組織学的に脱細胞されているかを観察した。さらに引張り試験を行って、作製したスキャフォールドの力学特性を未処理の生体組織と比較した。細胞処理した組織のHE染色では、いずれの処理条件においても組織内の細胞核は染色されず、細胞は残留していないことが確認された。また、組織内の空隙率も比較的高いことがわかった。引張り試験を行った結果、超高压印加時にエタノールを用いた場合には、施圧直後の破断荷重はコントロールやPBS(-)を用いた場合の2倍以上に上昇したが、洗浄処理後はいずれもほぼ同等の値であった。施圧直後の弾性率は、施圧時にエタノールを用いた場合にコントロールやPBS(-)を用いたものより4倍以上高かったにもかかわらず、洗浄処理後は、施圧時に80%エタノールを用いたものが、コントロールとほぼ同等の値を示した。施圧後の組織洗浄におけるエタノール

処理条件による弾性率への影響については、エタノール処理の有無にかかわらず、施圧直後の弾性率よりも3倍以上高い値を示し、未処理の組織よりも上昇していることがわかった。

以上の結果から、作製したスキャフォールドは未処理の組織よりも弾性率が上昇する傾向が見られたものの、高い空隙率を保持していることや生体内での引張りにも耐えうる十分な強度を維持していることから、再生型筋組織を構築するための細胞の足場として利用できる可能性が示唆された。

当初の想定では、出来る限り生体に類似する組織が必要であろうと考え、脱細胞化処理の条件をマイルドなものに設定していた。しかし、昨年度までの動物移植実験の結果から、残存するリン脂質によって石灰化の生じる症例が、特に大動脈組織で顕著に認められ、脱細胞化処理条件の見直しが迫られた。本年度からは、超高压印加処理に、リン脂質を溶解するアルコール処理を加えて、リン脂質の除去を行っている。アルコール処理によって、生体力学特性の変化が憂慮されたが、本研究から、移植には影響ない程度であろうと考えられる。今後、これらのスキャフォールドを用いて実際にいくつかの種類の細胞を三次元培養し、生体外での筋組織の構築を目指す予定である。

一方、コラーゲン材料への機能性分子の付与として、細胞非接着性架橋について検討した。コラーゲンゲ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、コラーゲンゲ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日以上以上の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。MPC コポリマーは良好な生体適合性を持っており、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おり、製品化もなされている。PMA は、多くのカルボキシル基を有しており、コラーゲンのアミン基と結合させ、PMA-コラーゲンゲルを調整することができる。EDS/NHS に活性化した PMA をコラーゲン溶液中にて反応させたところ、得られた PMA-コラーゲンゲルの機械的な物性は非常に弱く、一般的なコラーゲンゲルとあまり変化がなかった。

そこで、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、EDS/NHS にて活性化された PMA と MES 緩衝溶液に入れて PMA-コラーゲンゲル (PMA0 ゲル) を調整した。また、未架橋ゲルを EDC と NHS にて架橋した E/N ゲルも作製し、さらに、E/N ゲルに活性化した PMA と反応させた PMA ゲル (PMA1 ゲル) を得た。未架橋ゲルでは水中で容易に溶解したが、得られた PMA 複合化ゲルは溶解せず、膨潤した。また、未架橋ゲルは半透明であったが PMA0 ゲル、PMA1 ゲルは透明であり、溶液の pH 変化に対しても安定性が維持された非常に強いゲルであった。これらの物性評価を種々の解析法にて行った。まず、X 線光電子分光解析法を使って PMA の複合化を確認した。リン由来のピークは PMA0 ゲル、PMA1 ゲルにて認められたが、未架橋ゲルと E/N ゲルでは認められず、PMA が複合化されていると考えられる。走査電子顕微鏡でゲルの表面観察した結果、未架橋ゲルでは凸凹が見られ、E/N ゲル、PMA0 ゲル、PMA1 ゲルでは平らな表面であった。PMA0 ゲル、PMA1 ゲルの断面では、内部に多孔性構造を有し、外部に緻密構造を有した層分離構造であったことから PMA がコラーゲンゲルの表面に複合化されていることが明らかとなった。PMA 導入による物性の変化を引張り実験にて検討を行った。E/N ゲルの場合、コラーゲン繊維はネットワークを形成し、ゲルの物性が増加された。しかしながら、コラーゲンを構成している  $\alpha$ -ヘリックス間の架橋でしかないため、力学的物性の増加には限界があると考えられる。PMA を固定化した場合には PMA 鎖によってコラーゲン繊維間の架橋が形成されるためさらなる強度のゲルが得られた。また、引張強度は PMA1 ゲルの場合、未架橋ゲルに比べ約 1.2 - 1.8 倍であった。

コラゲナーゼによる生分解性を調べた結果、架橋度が上がると共に分解が遅くなった。コラゲナーゼはヘリックスを切断する。PMA の固定化は水の吸収を抑制し、コラゲナーゼの浸透を防ぐ効果があると考えられ、コラゲナーゼが吸収されてヘリックスが分解された場合でも PMA とコラーゲンの間の結合が維持され、分解速度は遅くなると考えられる。これは低い膨潤度と緻密なネットワーク形成により、コ

ラゲナーゼがゲル中に浸透し難いからであること意味する。細胞接着実験について検討した結果、PMAゲルの場合に細胞接着の有意な抑制が見られた。以上の結果より、非細胞接着性表面を有するコラーゲン材料が得られた。今後、本手法の脱細胞化組織への応用を行う。

次に、ハイドロキシアパタイト (HAp) 複合化について基礎検討を行った。柔軟性を有する生体由来材料や高分子材料と HAp を複合化することによって、HAp の高い細胞接着性と生体に近い物性の二つの特性を同時に実現できると考えられる。HAp の生体材料としてのすぐれた特性を生体内で維持するためには容易に溶解しない高い結晶化度が必要であり、安定した性能を発揮するためには材料表面に表出する結晶面の制御も重要である。このような課題を克服する方法として、昨年度は、HAp 結晶の微粒子を材料表面に結合することを発案した。具体的には、高分子基材にシルク繊維を用い、アルコキシシリル基およびイソシアネート基を末端に有するモノマーをグラフト重合し、そのグラフト鎖を足場に HAp ナノ粒子を固定化する。HAp ナノ粒子の表面被覆状態は、単一粒子から数個の粒子が凝集した状態で結合している。これは HAp ナノ粒子が単結晶体であり、一粒子内に陰性および陽性の面を有して凝集しやすい性質のためである。複合体の生物学的特性は、線維芽細胞を用いた培養試験およびラット皮下への埋植試験により調査した。その結果、マウス線維芽細胞 (L929 細胞) を HAp 複合シルク繊維上に播種し、培養後の未処理シルク繊維との違いを SEM 観察した。HAp 複合化シルク繊維上では、十分な細胞接着性が認められている。さらに、高倍率で観察すると HAp ナノ粒子上に細胞から微小突起が伸び接着している様子も確認できている。具体的な医療材料の応用として、生体の内外を連絡する経皮デバイスを想定して実験を行っている。HAp 複合化シルク繊維を、あらかじめ中心静脈カテーテル用に設計したシリコンラバー製ボタンの表面に植毛することにより、セラミック経皮ボタンを作製した。製造された経皮ボタンは、白色状で表面特性はセラミックスそのものでありながら、しなやかさを有していた。また、この経皮ボタンを 3 カ月、ウサギ背部に経皮的にインプラントしたが、皮膚組織は隙間なくボタンに密着し、外観からは大きな炎症は認められず、優れた成績をあげている。

上記の結果から HAp と高分子材料との複合化の有用性が示されたことから、新たな高分子材料との複合化を行った。高分子材料としては生体適合性に優れた高分子であるポリビニルアルコール (PVA) を用いた。PVA は水素結合を介してハイドロゲルが作製される。本研究で脱細胞化に用いている超高静水圧

印加法は、ハイドロゲル作製においても利用できる。そこで、超高静水圧法を用いてハイドロゲルと HAp との複合化を行った。種々の濃度の PVA 水溶液と HAp 溶液を混合し、超高圧処理を行うことで、PVA-HAp ハイドロゲルを得た。まず、PVA 単独の結果である。高濃度 PVA 溶液 (5%以上) への超高圧処理においては白色のハイドロゲルが得られ、PVA 溶液の濃度上昇に伴うハイドロゲルの力学的強度の向上が示された。これは、濃度上昇に伴う PVA 分子の増加により架橋領域が増加したためと考えられる。次に、HAp との複合化である。PVA 単独の場合と同様に、白色のハイドロゲルが得られ、濃度上昇に伴う力学的強度の向上も示された。得られたハイドロゲルを SEM 観察した結果、その表面での HAp の存在が確認され、また、ハイドロゲルの切断面の観察から、内部での HAp の存在が確認できた。生体適合性を検討するため、得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を検討した。細胞としては、ラット骨髄細胞を用いた。細胞播種 5 時間後では、ナノ HAp 粒子を含有しない PVA ハイドロゲルに比べ、HAp/PVA ハイドロゲルでの接着細胞数の有意な増加が認められた。また、後者においては、48 時間培養後で十分な細胞の伸展が認められた。上述の HAp 複合化シルク繊維と同様に、HAp 複合化による高機能性の獲得が示された。

また、さらなる高機能化として、DNA の複合化を行った。PVA と DNA の混合系においても超高静水圧処理を施した結果、PVA ハイドロゲルと同様に白色のハイドロゲルが得られた。DNA の複合化を確認するため、青色の DNA 染色剤で得られたハイドロゲルを染色した。その結果、PVA/DNA ハイドロゲルでは、青色に染色されたハイドロゲルが得られ、PVA ハイドロゲルの場合にはほとんど染色されなかったことから、DNA が複合化されたハイドロゲルが得られたと言える。

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。

架橋コラーゲンを基材とした再生型人工血管に、抗血栓性を担持するためにヘパリンを含浸し、ミニブタの下行大動脈に移植し、左心系大血管での有効性について検討した。具体的には、ブタ皮膚コラーゲン溶液から作製したコラーゲン繊維を不織布に加工した。熱架橋後、ヘパリン (640IU/cm<sup>3</sup>) を含有するコラーゲン溶液を含浸させながら管状に加工することで、長さ約 2.5cm、内径約 7mm の架橋コラーゲ

ン製人工血管を作製した。作製した血管を、生後3ヶ月(体重約5kg)のクラウン系ミニブタ(株ジャパンファーム)下行大動脈に、左側開胸、単純遮断下にて置換移植した。ヘパリン含有した人工血管と、含有しない人工血管とで比較検討した。所定期間経過後、移植した人工血管を摘出し、大きさ等の所見を調べた後、組織切片を作製した。HE染色の他、抗vWF免疫化学染色によって血管内皮細胞を、抗 $\alpha$ SMA免疫化学染色によって平滑筋細胞を染色した。石灰化はvon Kossa染色によって評価した。

いずれの群とも経過は良好で、死亡例はなかった。移植1ヶ月後に試料を摘出したところ、ヘパリン含有群では、人工血管周囲に瘤が認められたが、ヘパリン非含有群では認められなかった。これは吻合部等から滲み出た血液が凝固せずに滞留したためであると考えられた。移植3ヶ月後では、ヘパリン含有群でも瘤は縮小していた。組織学的に観察したところ、瘤内には赤血球成分にて満たされており、血腫であることがわかった。ヘパリン非含有人工血管では、移植3ヶ月後では内腔は血管内皮細胞で覆われ、組織内部には平滑筋細胞の浸潤が認められた。これより、少なくとも6mm程度の口径であれば、ヘパリンの含浸は不要であると思われる。石灰化は、全く認められなかった。しかしながら、人工血管中央部では狭窄傾向が認められ、内径が縮小していた。これらの結果から、より小口径では、初期の凝固による閉塞を防止するために、ヘパリンの含有は有効である可能性があり、今後の検討課題である。

## E. 結果

本研究で開発した生物由来材料の生体適合性などについて詳細に検討した結果、*in vitro*、*in vivo*において良好な結果であった。これらは、生物組織由来であることから、物性的に優れて性質を有しており、また宿主の細胞が内部に入り込んで、再構築を行うことにより、欠損部位にて血管内皮細胞や線維芽細胞などの血管細胞の再生を促進する効果が優れていると期待できる。脱細胞化組織とコラーゲン製材料の2種の基盤材料をもとに、今後も機能分子の複合化および動物実験などの結果を踏まえて、臨床応用可能な再生医療用 Scaffold としての応用について検討する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Korematsu, T. Furuzono, A. Kishida, Synthesis of block copolymers containing chain-controlled aramid and fluorethylene segments, *Macromol Mater Eng*, 290, pp. 66-71,

2005.

- 2) T. Furuzono, D. Walsh, S. Yasuda, J. Tanaka, A. Kishida, Preparation of plated  $\beta$ -tricalcium phosphate containing of hydroxyapatite for use in bonded inorganic-organic composites, *J. Mater. Sci. Lett.*, 40(9-10), 2595-2597, 2005
  - 3) T. Furuzono, S. Yasuda, J. Tanaka, A. Kishida, Unique preparation method of self-assembled spherical particles consisting of hydroxyapatite nanocrystals modified by amino groups, *J. Mater. Sci. Lett.*, 40(9-10), 2627-2629, 2005
  - 4) 岸田晶夫、生体適合性評価法、樋口亜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
  - 5) 岸田晶夫、人工心臓膜、樋口亜紺編 医療用マテリアルと機能膜、シーエムシー出版；東京：2005、82-88
  - 6) 古藪勉、岸田晶夫、再生医療：ナノアパタイト、*Bio Industry*, 22 (5)、54-59、2005
  - 7) 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、日本材料学会、42(4)、18-22、2005
  - 8) 岸田晶夫、藤里俊哉、再生医療用材料、再生医療-日本再生医療学会雑誌、4(4)、70-77、2005
  - 9) 岸田晶夫、再生医療のための脱細胞化生物組織(バイオスキヤフォールド)、生体材料工学研究所年報、39、9-12、2005
  - 10) 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.
  - 11) 菅 理晴、藤里俊哉、永谷憲哉、中谷武嗣。ブタ組織の脱細胞化。移植 2005; 40(5): 441-4
2. 学会発表
- 12) 藤里俊哉、澤田和也、西岡宏、湊谷謙司、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎、岸田晶夫、吉田謙一、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、60(2)、42、2005
  - 13) 木村剛、岸田晶夫、リン脂質ポリマーハイブリ



- ッドコラーゲンの作製と *in vitro* での評価、第 3 4 回医用高分子シンポジウム、31-32、2005
- 14) 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、409-410、2005
  - 15) 藤里俊哉、吉田謙一、船本誠一、湊谷謙司、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎、岸田晶夫、生体素材を用いた再生型人工心臓弁、第 54 回高分子討論会、54(2)、5012、2005
  - 16) 木村剛、岸田晶夫、構造制御したコラーゲン／リン脂質ポリマーハイブリッドゲルの物性解析と細胞との相互作用、第 54 回高分子討論会、54(2)、5203-5204、2005
  - 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、中谷武嗣、北村惣一郎、岸田晶夫、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、15、45、2005
  - 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、15、141、2005
  - 19) 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、超高压印加印法による多成分系ポリマー構造体の調整、第 14 回ポリマー材料フォーラム、171、2005
  - 20) 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、194、2005
  - 21) 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、227、2005
  - 22) 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 3 回生活支援工学系学会連合大会、99、2005
  - 23) 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製における圧力印加条件の検討、日本再生医療学会総会、5(19)、128、2006
  - 24) T. Fujisato, K. Minatoya, M. Yin, S. Yamazaki, K. Niwaya, A. Kishida, T. Nakatani, S. Kitamura, Vascular Tissue Regeneration Using Acellular Scaffold In Porcine Model, Society for Biomaterial, 2005 Annual Meeting, 376-377, 2005
  - 25) T. Furuzono, M. Okada, A. Kishida, J. Tanaka, S. Yasuda, 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, 167-168, 2005
  - 26) A. Kishida, T. Kimura, A. Okuno, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, K. Miyazaki, T. Fujisato, T. Furuzono, Preparation Of Dna-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier, Society for Biomaterial 2005 Annual Meeting, 471-472, 2005
  - 27) 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整と生医学応用、第 49 回日本学術会議 材料研究連合講演会、341-342、2005
  - 28) 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、54(2)、5128、2005
  - 29) T. Fujisato, M. Yin, K. Minatoya, K. Niwaya, A. Kishida, T. Nakatani, S. Kitamura, Host cell infiltration to transplanted acellular allografts in porcine model, The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International, 345-346、2005

- 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、バイオスキャフォールド調整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、15、191、2005
- 31) 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成のための構造タンパク加工、第 27 回日本バイオマテリアル学会、158、2005
- 32) 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 4 3 回日本人工臓器学会、34(2)、90、2005
- 33) 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 4 3 回日本人工臓器学会、34(2)、152、2005
- 34) 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、超高压処理を用いる脱細胞化スキャフォールドの開発、第 4 3 回日本人工臓器学会、34(2)、152、2005
- 35) 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 3 回生活支援工学系学会連合大会、98、2005
- 36) 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、ミニプ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、日本再生医療学会総会、5(19)、128、2006
- 37) 橋本良秀、川喜多正夫、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・骨髄組織の調製と組織再構築の検討、日本再生医療学会総会、5(19)、218、2006
- 38) 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、日本再生医療学会総会、5(19)、218、2006
- 39) 岸田晶夫、細胞デリバリー、第 5 6 回医用高分子研究会、7-8、2006
- 40) 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、100、2006
- 41) 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 回日本生体医工学学会大会、生体医工学 2005; 43(suppl 1): 269
- 42) 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、Fiber Preprints, Japan 2005; 60(2): 43.
- 43) 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、日本組織移植学会雑誌 2005; 4(1): 33
- 44) FUJISATO T, SASAYAMA N, YIN M, YAMAZAKI S, MINATOYA K, KISHIDA A, NAKATANI T, TAKANO H, HATTORI H. REGENERATIVE VASCULAR GRAFT MADE OF COLLAGEN FIBER. 4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY. Final Programme, XX
- 45) 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、IFMBE Proceedings 2005; 12: 151.
- 46) 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, IFMBE Proceedings 2005; 12: 152.

- 47) 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、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.
- 48) 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、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.
- 49) 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、再生医療 2005; 5(suppl): 202.
- 50) 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、再生医療 2005; 5(suppl): 203
- 51) 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、再生医療 2005; 5(suppl): 204

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 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) 岸田晶夫、木村剛、南広祐. ゲル及び該ゲルからなる医療用材料. 特許出願 2005-222296. 平成 17 年 7 月 29 日
- 3) 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処理. 特許出願 2005-296067. 2005 年 10 月 21 日.
- 4) 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.

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社