

200615003A

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中谷 武嗣

平成19年（2007年）4月

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

再生医療技術を応用した

テーラーメイド型代用血管・心臓弁の臨床応用に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中谷 武嗣

平成19年（2007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. 再生医療型素材の動物実験（脱細胞化組織の長期移植） ……	15
北村 惣一郎	
2. 再生医療型素材の開発（脱細胞化条件の最適化） ……	21
藤里 俊哉	
3. 再生医療型素材の開発（脱細胞化組織の保存） ……	31
岸田 晶夫	
4. 再生医療型素材への細胞組込 ……	39
山岡 哲二	
5. 再生医療型素材の動物実験（ヒト組織の脱細胞化） ……	45
庭屋 和夫	
6. 再生医療型血管の動物実験（細胞・エラスチン除去組織の移植） ……	53
湊谷 謙司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	59
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……	63

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脱細胞化処理方法を改良して作成した脱細胞化下行大動脈を、同種同所性に12ヶ月間移植した。この結果、移植後の良好な細胞浸潤、自己組織化が見られ、昨年度までに認められた石灰化を顕著に抑制することができた。移植片は周囲組織の成長に追隨してサイズが拡大していた。臨床応用へ向けて、脱細胞化組織の保存方法の検討を行うとともに、ヒト組織の脱細胞化も取り組んだ。同種脱細胞化組織移植の早期の臨床応用を目指したいと考えている。

分担研究者

北村惣一郎  
国立循環器病センター総長  
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  
東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授  
山岡哲二  
国立循環器病センター生体工学部長  
庭屋和夫  
国立循環器病センター心臓血管外科医師  
湊谷謙司  
国立循環器病センター心臓血管外科医師

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

また、我が国では年間1万件、米国では3万件以上の心臓弁置換術が施行されている。代用弁としては機械弁の他にブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定した異種生体弁があり、抗凝固剤の服用が不必要であるというQOL上の利点から、米国では約半数に使用され、我が国でも現在は約3割であるが、年々増加している。しかし、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15年、若年者では5年程度の耐久性しか有せず、65歳以上の高齢者に使用が奨励されている。

近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、提供された同種血管や心臓弁が使用されつつあり、良好な成績が報告されている。不全の大動脈弁位に自己肺動脈弁を、肺動脈弁位に同種弁を移植するロスと呼ばれる術式も優れた成績を上げている。自己肺動脈弁は抗原性を有さず、患者の成長に伴う成長性を有しているため、特に小児患者で有効である。しかし、我が国では同種

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、超高圧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（パワーグラフト処理法）を開発した（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している。本年度は、昨年度に引き続いて、パワーグラフト処理法によって脱細胞化した下行大動脈の長期動物実験を実施した。また、移植後の長期成績の向上を目指してパワーグラフト処理の最適化を行うとともに、製品化に必要な保存法、およびテーラーメイド型で必要となる *in vitro*での細胞組込について検討した。また、再生型同種組織移植の臨床応用を目指してヒト組織におけるパワーグラフト処理法の有効性を検討するとともに、移植後の石灰化を抑制するための新規処理法についても検討した。

## 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）から麻酔清潔下にて大動脈及び心臓弁を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置（株）神戸製鋼所）を用いた超高圧印加処理、続けてPBSをベースとする洗浄液による洗浄処理、アルコールによるリン脂質除去処理を行うことで細胞成分を完全に除去した（パワーグラフト処理）。

**血管移植実験**：クラウン系ミニブタを用い、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12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）、及びvon Kossa染色（石灰化）等によって組織学的所見を検討した。

**脱細胞化処理の最適化**：クラウン系ミニブタから各臓器・組織を摘出した。パワーグラフト処理における超高圧処理条件として、圧力の上昇・降下速度を急速および緩徐の2種の条件で行った。処理後の組織をHE染色、DNA定量試験、および力学試験により評価した。

**脱細胞化組織の保存**：パワーグラフト処理によって脱細胞化した血管組織を、発泡スチロール容器中にて徐冷凍結後に凍結乾燥するか、液体窒素中にて急速凍結後に凍結乾燥するか、あるいは常温にてデシケーター内でシリカゲルを用いて乾燥させた。作成した各組織を組織学および生体力学的に評価した。

**脱細胞化スキューフォールドへの細胞播種と培養**：回転培養装置を用い、脱細胞化血管および心臓弁組織内腔面に血管内皮細胞を播種した。1日間の静置培養後、閉鎖回路を用いた循環型バイオリアクターで培養を継続した。血管スキューフォールドは定常流にて、心臓弁スキューフォールドは拍動流にて培養した。播種した血管内皮細胞を光学顕微鏡にて観察した。

**ヒト組織の脱細胞化**：国立循環器病センター組織保存バンクにて凍結保存された移植用ヒト心臓弁組織の中から、細菌感染によって移植に適さないと判定された組織の提供を受けた。臨床で使用される場合と同じ手順で解凍し、パワーグラフト処理にて脱細胞化した。処理後の組織を組織学および生体力学的に評価した。また、細菌培養試験による細菌学的検査も行った。

**脱細胞化処理の改良**：クラウン系ミニブタから大動脈弁を採取した。凍結乾燥後、真空オーブン内で120℃にて熱架橋処理を施した。続けてエラストマーゼ溶液中で振盪処理することによって、エラスチンを分解除去した。得られた大動脈を組織学および生体力学的に評価した。また、同種ミニブタへの血管移植実験にて、細胞の浸潤や石灰化について検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験における動物愛護上の配慮は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（平成17年6月22日公布）及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示）、実験動物の適正な実施に向けたガイドライン（平成18年6月1日日本学術会議）等に基づき、当施設の実験動物委員

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に努めた。

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の使用に関して「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。さらに、今回本研究に用いるヒト組織では、提供時に「医学的問題で移植に使用することができない組織は、組織移植医療推進のための教育・研究にも用いられることを併せて承諾します」とされている組織について、日本組織移植学会の「ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン」（平成18年7月29日改訂）に沿って倫理委員会の承認を得て、使用した。

### C. 研究結果

脱細胞化血管の長期移植：ミニプタ下行大動脈組織をパワーグラフト処理によって脱細胞化し、同種同所性に12ヶ月間移植した。図3に示したように、脱細胞化処理過程においてアルコール処理を導入しない場合では移植周囲組織の成長に追従しなかったが、アルコール処理を導入してリン脂質成分を除去した場合は、周囲組織の成長に追従していた。リン脂質成分を除去することで、石灰化をほとんど生じることなく細胞が浸潤し、半年後にはほぼ全ての領域で再細胞化されていた。このため、移植半年以降は浸潤細胞の増殖等によって周囲組織の成長に追従したものと考えられる。組織学的に評価したところ、図4に示したように、内腔面は血管内皮細胞によって完全に覆われて、組織内は平滑筋細胞および線維芽細胞によって完全に再細胞化されていた。また、組織内部の石灰化は軽微であった。

脱細胞化処理の最適化：加圧速度の違いによる超高圧印加処理槽内の温度変化を、図5に示した。加圧速度が666atm/minの場合、開始温度が30℃であっても最高で37℃程度までしか上昇せず、生体組織に対して温和であると考えられた。

一方、2000atm/minの場合では、最高温度を37℃以下とするためには、開始温度を10℃に設定しなければならず、この条件では、降圧時に氷点以下となる可能性がある。組織学的に観察したところ、図6に示したように、いずれの加圧速度の場合でも、細胞の除去は高効率で行われているが、加圧速度2,000atm/minの場合には、線維組織間に間隙の拡大が観察された。加圧速度を落とし、666atm/minにすると、線維組織の構造変化も少なく未処理のものと同様な像が得られた。適切な超高圧処理によって、高効率での細胞除去および組織の力学的特性の保持などを達成できることが確認できた。

脱細胞化組織の保存：徐冷凍結・真空乾燥を行った群では、コラーゲン線維間に氷晶の跡が見られた。凍結温度が低い方が、氷晶の跡が大きかった。しかし、コラーゲン線維の走向の乱れは見られなかった。急速凍結・真空乾燥させた群では、氷晶の跡はほとんど見られなかったが、コラーゲン線維間の空隙数の増加とコラーゲンの走向の乱れが観察された。一方、常温乾燥させた群では、未処理とほぼ同様の組織像であった。初期弾性率と破断歪率に関しては、いずれも未処理に対して有意な差はみられなかった。しかし、後期弾性率に関しては、-80℃まで徐冷凍結後真空乾燥させたもの以外で未処理に対して有意な低下が見られた。さらに、破断応力に関しては、図7に示したように、-20℃まで急速凍結後真空乾燥させたものと常温乾燥させたものでも有意な低下が見られた。

脱細胞化スキャフォールドへの細胞播種と培養：脱細胞化心臓弁スキャフォールドに、血管内皮細胞を播種し、閉鎖回路を用いて、培地を循環させながら10日間培養した実験の結果を、図8に示した。バイオリアクターにて培地を循環させながら培養可能なことが確認できた。しかし、流れに接している弁葉など、部位によっては細胞の数が少ない領域も認められた。これは、拍動流による弁の開閉の影響や、流れによる剪断応力が影響していると考えられた。

ヒト組織の脱細胞化：ヒト心臓弁組織をパワーグラフト処理にて脱細胞化し、その前後における組織から抽出した溶液の吸収スペクトルを、図9に示した。解凍直後の組織から抽出した溶液のスペクトルには、明らかにDNAの吸収が認められ

るのに対して、パワーグラフト処理後にはDNAの吸収は認められなかった。表1に、細菌培養検査結果を示した。パワーグラフト処理前において、組織小片、ホモジナイズ試料ともに細菌(Streptococcus constellatus)が検出されたのに対し、パワーグラフト処理後にはいずれの場合も細菌は検出されなかった。

脱細胞化処理の改良：図10に示したように、エラスチン除去処理を施したブタ大動脈組織内では、エラスチン繊維が完全に除去され、コラーゲン繊維のみが残存していた。これに伴って組織内の空隙の増加も観察された。組織内の残存DNA及びリン脂質量は、いずれも未処理組織の10%以下であった。ミニブタ大動脈から作成したエラスチン除去血管を同種同所性に6ヶ月間置換移植したところ、図11に示したように、全ての領域が再細胞化されていた。昨年度までの脱細胞化組織と比べて、より早期の細胞浸潤が認められ、石灰化も顕著に軽微であった。

#### 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福岡教授(現米国エール大学)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・置換されることが考えられるため、吸収性材料とは異なり、自己組織化が達成される以前の強度低下が抑制される。

本年度は、昨年度までに改良した脱細胞化処理

法を用い、下行大動脈の長期同種移植実験を行った。移植12ヶ月後に摘出したところ、内腔面は全面が血管内皮細胞で覆われ、組織内部も全領域が再細胞化されており、石灰化も顕著に抑制されていた。計測した一例では、体重5kgの移植時における長さ25mm、内径8mmの移植片は、体重30kgの摘出時には長さ35mm、内径14mmとなっており、周囲組織の成長に追従していた。

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

#### E. 結論

超高静水圧印加を基盤とした処理方法によって脱細胞化した大動脈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。昨年度までに認められた石灰化も顕著に抑制することができ、移植12ヶ月後では周囲組織の成長に追従していた。早期の臨床応用を目指したいと考えている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 山岡哲二、木村良晴、藤里俊哉. 医療用バイオベースマテリアル. バイオベースマテリアルの新展開, 187-97, シーエムシー出版, 東京, 2007
- 2) 藤里俊哉、北村惣一郎. 心臓弁. 再生医療工学の技術, 142-7, シーエムシー出版, 東京, 2007
- 3) 澤田和也、寺田堂彦、藤里俊哉. 繊維と線維(生体繊維の洗浄と再生医療への展開). 繊維と工業, 2007; 63(5): 120-4.
- 4) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. High Press Biosci Biotech 2007; 1(1): 161-5.

- 5) Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam K, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of poly(vinyl alcohol)/DNA hydrogels via hydrogen bonds formed on ultra-high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery. *J Artif Organs* 2006; 10 (2) : 104-8.
2. 学会発表
- 1) Fujiasto T, Sasayama N, Minatoya K, Yoshida K, Funamoto S, Kishida A, Shirasu A, Nakatani T, Takano H, Hattori H. Host Cell Infiltration to Implanted Vascular Grafts Made of Collagen Fibers in Porcine Model. *Society For Biomaterials 2006 Annual Meeting, Pittsburgh, USA. Apr26-29, 2006.*
- 2) 藤里俊哉、岸田晶夫、湊谷謙司、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生物組織の再生医療への応用. 第45回日本生体医工学会大会、福岡、5月15-17日、2006年.
- 3) 戸川祐一、江橋 具、吉田謙一、船本誠一、西岡 宏、大場謙吉、藤里俊哉、中谷武嗣. バイオリアクターを用いた脱細胞化ブタ大動脈血管への細胞播種. 第45回日本生体医工学会大会、福岡、5月15-17日、2006年.
- 4) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、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. 生体由来コラーゲン製人工血管の開発. 第45回日本生体医工学会大会、福岡、5月15-17日、2006年.
- 5) 藤里俊哉、船本誠一、吉田謙一、山岡哲二、中谷武嗣、菊池正博、小林泰彦、木村 剛、岸田晶夫.  $\gamma$ 線照射による移植用生体組織の開発. 第55回高分子学会年次大会、名古屋、5月24-26日、2006年.
- 6) 木村 剛、南 広祐、六雄伸吾、古澤秀和、岡田正弘、古菌 勉、藤里俊哉、岸田晶夫. 遺伝子導入能を有する超高压誘起ナノ無機粒子/高分子/DNA複合体の調整. 第55回高分子学会年次大会、名古屋、5月24-26日、2006年.
- 7) 仁部洋一、木村 剛、南 広祐、六雄伸吾、吉沢秀和、岡田正弘、古菌 勉、藤里俊哉、岸田晶夫. エンドソーム遊離促進を目指したナノHap/PVA/DNA複合体による遺伝子導入. 第55回高分子学会年次大会、名古屋、5月24-26日、2006年.
- 8) 三浦義之、栗田公夫、木村 剛、南 広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌 勉、藤里俊哉、岸田晶夫. PEG/多糖の水性二相系への超高压処理による新規構造体の調整. 第55回高分子学会年次大会、名古屋、5月24-26日、2006年.
- 9) 寺田堂彦、澤田和也、吉田謙一、岸田晶夫、緒方裕之、船本誠一、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体由来組織を用いた再生型人工血管の開発. 第55回高分子学会年次大会、名古屋、5月24-26日、2006年.
- 10) 澤田和也、寺田堂彦、緒方裕之、吉田謙一、藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体由来組織の超臨界流体処理. 平成18年度繊維学会年次大会、東京、6月12-14日、2006年.
- 11) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、吉田謙一、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、永谷憲歳、中谷武嗣. コラーゲン構造を保存した生体由来スキャフォールドの作製. 第35回医用高分子シンポジウム、東京、8月1-2日、2006年.
- 12) 藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司、吉田謙一、庭屋和夫、永谷憲歳、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 脱細胞化組織を用いた再生型動脈移植における石灰化抑制の試み. 第5回日本組織移植学会総会・学術集会、東京、8月26日、2006年.
- 13) 橋本良秀、木村 剛、南 広祐、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫. 三次元細胞培養担体としての脱細胞化骨の作製とin vitro評価. 第9回日本組織工学会、京都、9月7-8日、2006年.
- 14) 村越彩子、木村 剛、南 広祐、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫. 脱細胞化血管調製における超静水圧印加処理の最適条件の検討. 第9回日本組織工学会、京都、9月7-8日、2006年.
- 15) 伊藤由樹子、木村 剛、南 広祐、加藤綾子、増澤 徹、岸田晶夫. 細胞分化への機械的振動刺激の影響に関する検討. 第9回日本組織工学会、京都、9月7-8日、2006年.



- 16) 田頭保彰、木村 剛、南 広祐、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫. 生体スキャフォールドの保存に関する研究. 第9回日本組織工学会、京都、9月7-8日、2006年.
- 17) 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. 生体由来組織の脱細胞化のための超臨界流体抽出. 日本機械学会2006年度年次大会、熊本、9月18-22日、2006年.
- 18) 藤里俊哉、寺田堂彦、吉田謙一、湊谷謙司、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎、木村 剛、岸田晶夫、澤田和也. 生体組織構造を利用した再生型人工血管. 第55回高分子討論会、富山、9月20-22日、2006年.
- 19) 木村 剛、南 広祐、六雄伸吾、吉沢秀和、古菌 勉、藤里俊哉、岸田晶夫. DNA/RNA構造制御を目指した超高压印加処理とその応用. 第55回 高分子討論会、富山、9月20-22日、2006年.
- 20) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of antigenicity and risk of infection in regenerative tissue transplantation by cold isostatic pressing. The Fourth International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, AIST, Tsukuba, Japan, Sept. 25-29, 2006.
- 21) 菅 理晴、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣. 再生型気管移植法の開発－間葉系幹細胞導入による脱細胞化気管グラフトの再細胞化－. 第59回日本胸部外科学会定期学術集会、東京、10月1-4日、2006年.
- 22) 湊谷謙司、藤里俊哉、吉田謙一、船本誠一、荻野 均、中谷武嗣、北村惣一郎. 脱細胞化処理した下行大動脈並びに肺動脈同種移植実験の検討. 第59回日本胸部外科学会定期学術集会、東京、10月1-4日、2006年.
- 23) Ehashi T, Kamata W, Funamoto S, Yoshida K, Kishida A, Nagaya N, Fujisato T. Preparation of a decellularized tissue as a scaffold for reconstructing skeletal muscle in vitro. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006, Rotterdam, The Netherlands, Oct. 8-11, 2006.
- 24) Terada D, Sawada K, Ogata H, Yoshida K, Funamoto S, Fujisato T, Kishida A, Nagaya N, Nakatani T, Kitamura S. Development of bioscaffold preserving collagenic structure in biological tissue. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006, Rotterdam, The Netherlands, Oct. 8-11, 2006.
- 25) Kimura T, Ito Y, Fujisato T, Masuzawa T, Kishida A. Influence of nano-vibration stimuli on cell differentiation for tissue engineering. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006, Rotterdam, The Netherlands, Oct. 8-11, 2006.
- 26) Yamaoka T, Kitagawa T, Fujisato T. Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006, Rotterdam, The Netherlands, Oct. 8-11, 2006.
- 27) Fujisato T, Yoshida K, Terada D, Sawada K, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Residual phospholipids may cause calcification in acellular aortic tissue transplantation. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006, Rotterdam, The Netherlands, Oct. 8-11, 2006.
- 28) 村越彩子、木村 剛、南 広祐、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫. 種々の超静水圧印加条件にて調製した脱細胞化血管の特性検討. 第44回日本人工臓器学会大会、横浜、10月31日-11月2日、2006年.
- 29) 南 広祐、木村 剛、村越彩子、藤里俊哉、岸田晶夫. リン脂質ポリマーで修飾した脱細胞化血管組織作製. 第44回日本人工臓器学会大会、横浜、10月31日-11月2日、2006年.
- 30) 船本誠一、江橋 具、菊池正博、小林泰彦、山岡哲二、岸田晶夫、藤里俊哉、中谷武嗣.

- コバルト60による $\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理. 第44回日本人工臓器学会大会、横浜、10月31日-11月2日、2006年.
- 31) 江橋 具、鎌田和加子、船本誠一、吉田謙一、岸田晶夫、中谷武嗣、永谷憲歳、藤里俊哉. 脱細胞化筋スキヤフォールドを用いる筋芽細胞の伸長培養. 第44回日本人工臓器学会大会、横浜、10月31日-11月2日、2006年.
- 32) 湊谷謙司、藤里俊哉、吉田謙一、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎. 脱細胞化による新しい動脈グラフトの開発; プタ同種移植実験における石灰化軽減のための方策. 第44回日本人工臓器学会大会、横浜、10月31日-11月2日、2006年.
- 33) 寺田堂彦、澤田和也、吉田謙一、岸田晶夫、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎. 高圧流体下における生体由来組織からの細胞抽出. 第47回高圧討論会、熊本、11月9-11日、2006年.
- 34) 戸川祐一、江橋 具、吉田謙一、藤里俊哉、大場謙吉、中谷武嗣. バイオリアクターを用いた血管scaffoldへの細胞播種. 第17回バイオフロンティア講演会、上田、11月11-12日、2006年.
- 35) 江橋 具、鎌田和加子、船本誠一、吉田謙一、岸田晶夫、永谷憲歳、中谷武嗣、藤里俊哉. 再生骨格筋作製を目的とした間葉系幹細胞の伸長培養. 第28回日本バイオマテリアル学会、東京、11月27-28日、2006年.
- 36) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、吉田謙一、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、永谷憲歳、中谷武嗣. 生体組織内コラーゲン構造を利用したバイオスキヤフォールドの開発. 第28回日本バイオマテリアル学会、東京、11月27-28日、2006年.
- 37) 澤田和也、寺田堂彦、江橋 具、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎. バイオサーファクタントを用いた生体由来スキヤフォールド調製. 第28回日本バイオマテリアル学会、東京、11月27-28日、2006年.
- 38) 木村 剛、小粥康充、岡田正弘、古菌 勉、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫. 超高圧誘起PVA/DNA遺伝子ベクターへの無機塩付加による遺伝子導入促進. 第28回日本バイオマテリアル学会、東京、11月27-28日、2006年.
- 39) 橋本良秀、船本誠一、木村 剛、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫. 超高圧印加法を用いた脱細胞化角膜の作製と物性解析. 第28回日本バイオマテリアル学会、東京、11月27-28日、2006年.
- 40) 山田康貴、木村 剛、藤里俊哉、坂根正孝、宮川俊平、岸田晶夫、植村寿公. 高圧印加処理による脱細胞化組織を用いた膝関節再建術用の新しいScaffoldの検討. 第28回日本バイオマテリアル学会、東京、11月27-28日、2006年.
- 41) 斉藤由紀、比企拓哉、藤里俊哉、山田 宏、木村 剛、岸田晶夫、高久田和夫. 脱細胞血管スキヤフォールドによる小口径血管の再建. 第19回バイオエンジニアリング講演会、仙台、1月7-8日、2007年.
- 42) Wang L, Fujisato T, Terada D, Nakatani T. Regenerative small-diameter vascular graft using acellular tissue. 第6回再生心臓血管外科治療研究会(第37回日本心臓血管外科学会学術総会)、東京、2月21日、2006年.
- 43) 江橋 具、染川将太、藤里俊哉. 注射器を用いる新規細胞播種法の開発. ライフサポート学会専門研究会 第2回細胞制御工学研究会、東京、2月28日、2006年.
- 44) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、木村 剛、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫. プタ脱細胞化角膜による角膜移植用組織の開発とin vitro評価. 第10回日本異種移植研究会、東京、3月10日、2007.
- 45) 江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉. 骨格筋再生を目指した骨髄由来間葉系幹細胞の静的伸長培養. 第6回日本再生医療学会総会、横浜、3月13-14日、2007.
- 46) 玉井克明、染川将太、湊谷謙司、吉田謙一、藤里俊哉、森反俊幸、永谷憲歳、岸田晶夫、中谷武嗣. 脱細胞化大動脈組織内の残存リン脂質除去によるミニプタ同種移植での効果. 第6回日本再生医療学会総会、横浜、3月13-14日、2007.
- 47) 戸川祐一、江橋 具、吉田謙一、藤里俊哉、大場謙吉、中谷武嗣. バイオリアクターを用

いた脱細胞化scaffoldへの細胞播種と培養。  
第6回日本再生医療学会総会、横浜、3月  
13-14日、2007。

- 48) 田頭保彰、木村 剛、南 広祐、船本誠一、  
藤里俊哉、岸田晶夫。生体スキャフォールド  
の保存に関する検討。第6回日本再生医療学  
会総会、横浜、3月13-14日、2007。
- 49) 船本誠一、橋本良秀、南 広祐、藤里俊哉、  
木村 剛、岸田晶夫。超高压処理法により作  
製された脱細胞化骨の細胞培養担体への応  
用。第6回日本再生医療学会総会、横浜、3  
月13-14日、2007。
- 50) 高瀬 潤、江橋 具、藤里俊哉、橋本成広。  
筋芽細胞に対する磁場の影響。第6回日本再  
生医療学会総会、横浜、3月13-14日、2007。
- 51) 木村 剛、堀内可奈、栗田公夫、南 広祐、  
六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫。  
高压凝縮DNAの構造・機能解析と遺伝子導入  
への応用。第6回日本再生医療学会総会、横  
浜、3月13-14日、2007。
- 52) 染川将太、江橋 具、森反俊幸、藤里俊哉。  
スキャフォールドへの新規細胞播種方法の  
検討。第6回日本再生医療学会総会、横浜、  
3月13-14日、2007。

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

- 1) 生物由来スキャフォールドの作製方法。特許  
出願2006-207384。
- 2) 人工血管。特許出願2006-215239。
- 3) 無針注射器を用いた細胞播種法。特許出願  
2007-47829。
- 4) 超高压技術を用いた移植用角膜の創製。特許  
出願2007。
- 5) 脱細胞処理液、脱細胞化組織の調製方法、移  
植片、及び培養部材。特許出願2007。

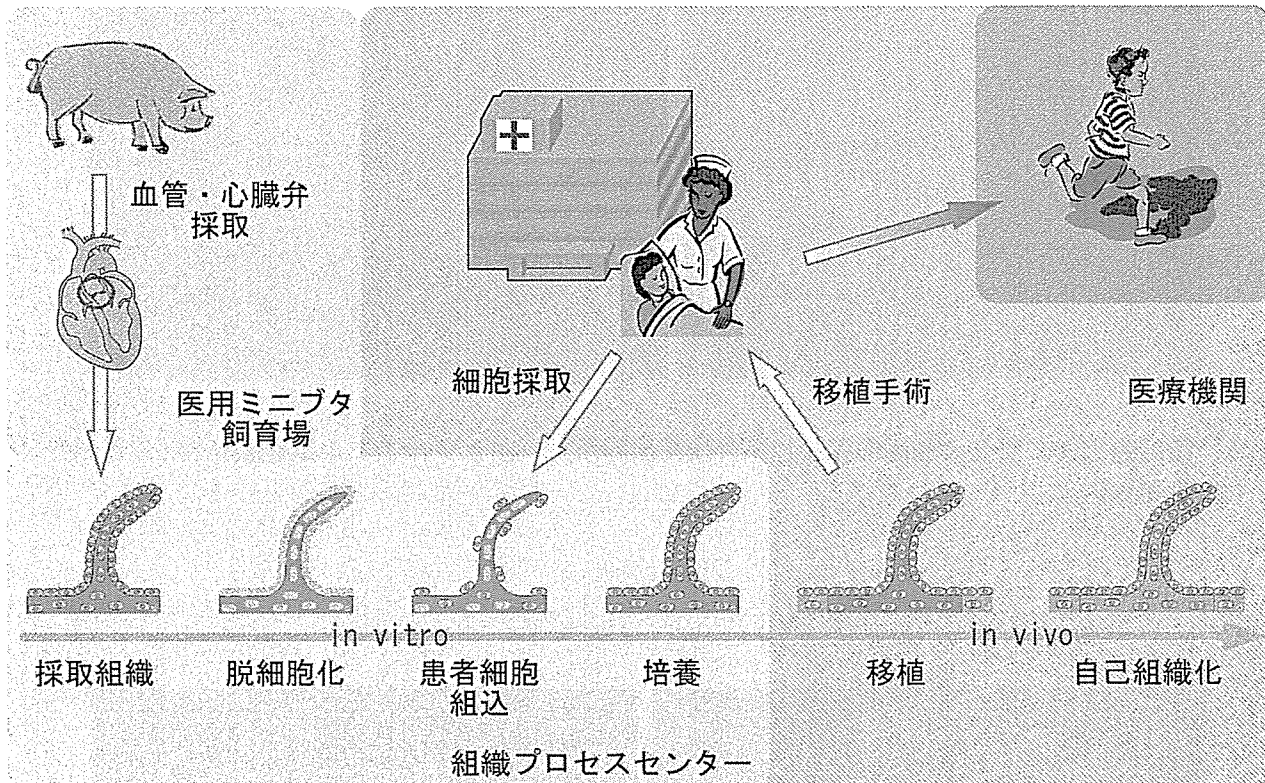


図1. テーラーメイド型血管・心臓弁移植

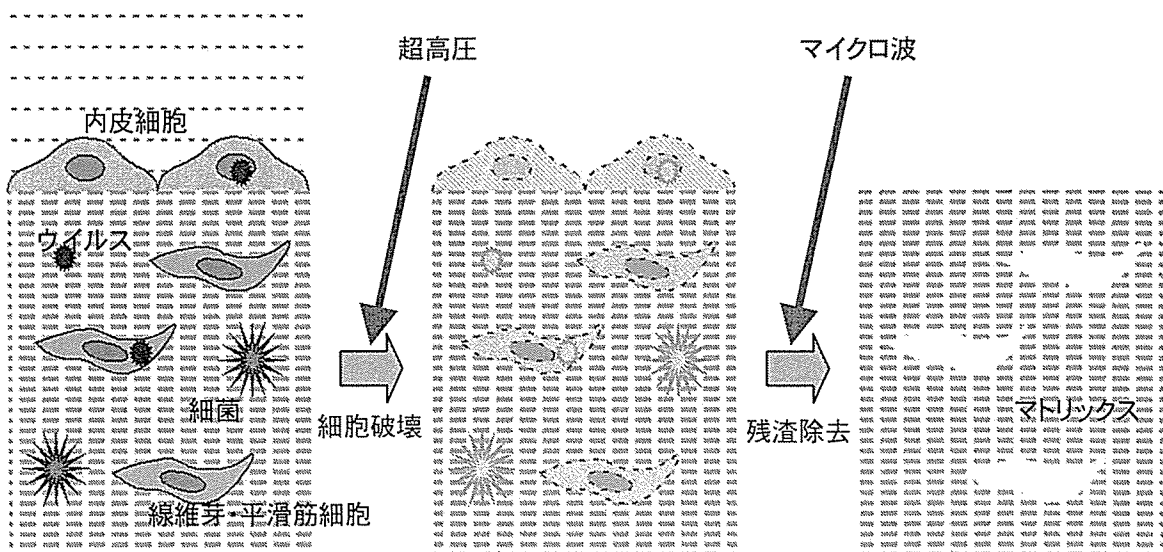


図2. パワーグラフト処理による脱細胞化 (国際特許出願済)



図3. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植12ヶ月後摘出時所見（左：アルコール処理無、右：アルコール処理有）

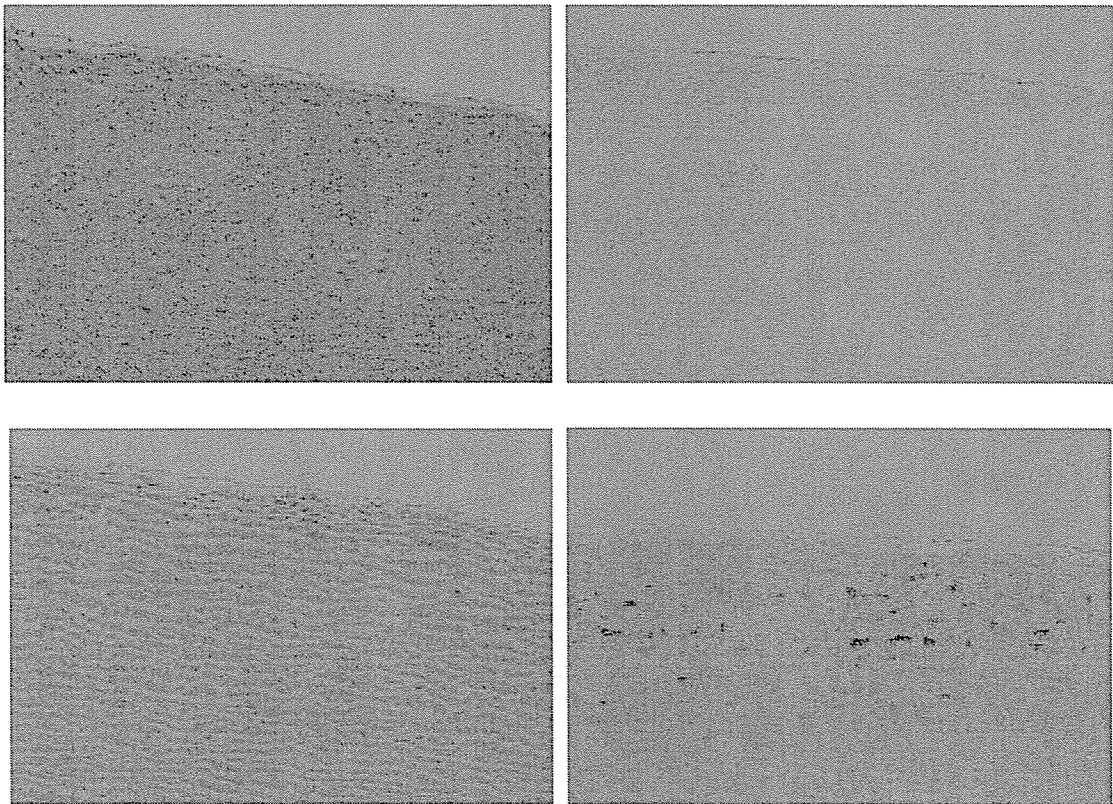


図4. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植12ヶ月後組織像（左上：HE、右上：抗vWF（血管内皮細胞）、左下：抗SMA（平滑筋細胞）、右下：von Kossa（石灰化））

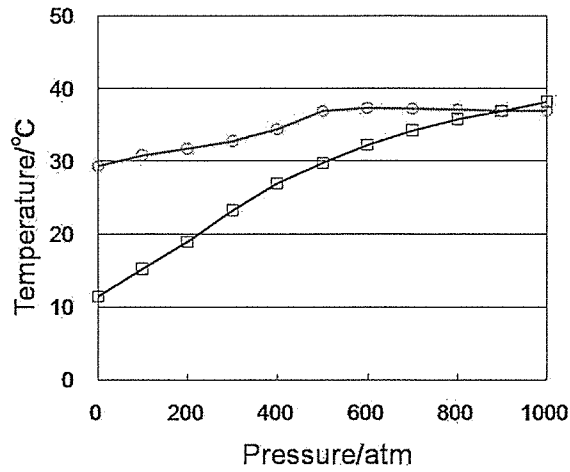


図 5. 加圧速度の違いによる系内の温度変化  
 開始温度(○) 30°C, (□) 10°C,  
 加圧速度(○) 666 atm/min, (□) 2000 atm/min.

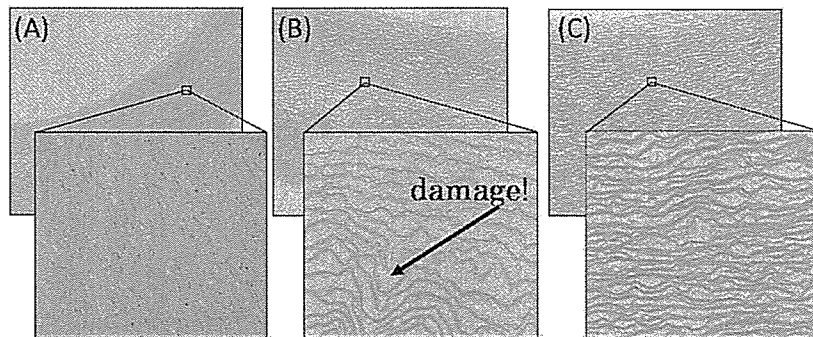


図 6. ブタ大動脈の組織切片 (HE染色)

(A)未処理

(B)超高圧処理(加圧速度2,000atm/min), 10 °C, for 10 min.

(C)超高圧処理(加圧速度 666atm/min), 10 °C, for 10 min.

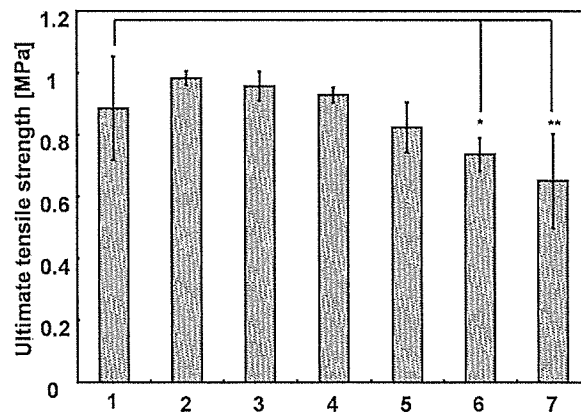


図 7. 種々の方法で乾燥したブタ大動脈の破断強度 (1 : 未処理、2 : -80°Cまで徐冷、3 : -20°Cまで徐冷、4 : -196°Cまで急冷、5 : -80°Cまで急冷、6 : -20°Cまで急冷、7 : 乾燥空気中で風乾、2~6の試料は凍結後、凍結乾燥を実施)

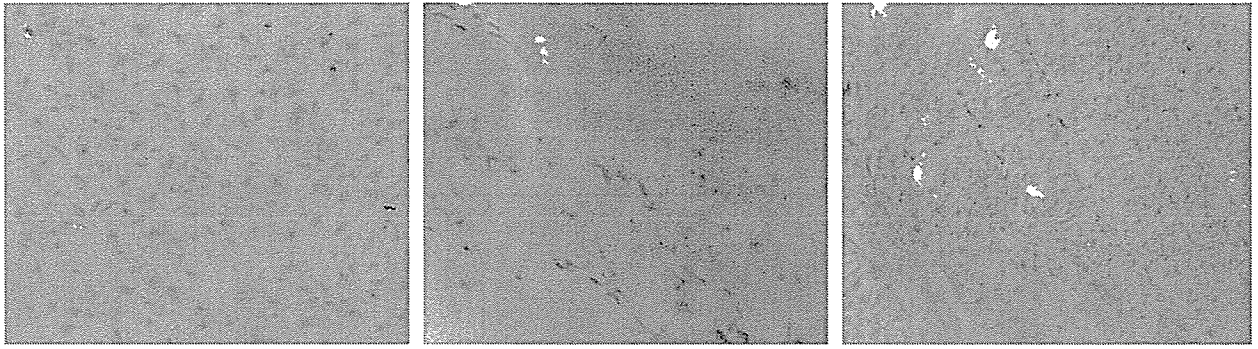


図8. 大動脈弁表面（左：導管部、中：弁膜上部、右：弁膜下部）

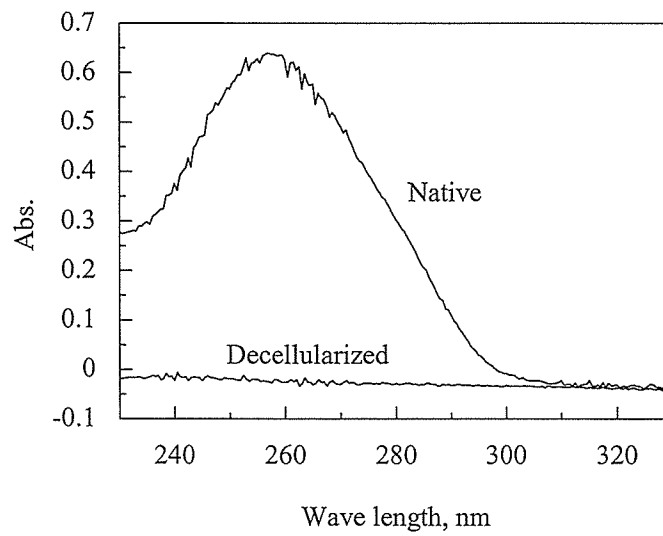


図9. 組織抽出液の吸収スペクトル

表1. 細菌培養検査結果

<i>Streptococcus constellatus</i>		
	fragment sample	homogenized sample
Native tissue	(+)	2+
Decellularized tissue	not isolated	not isolated

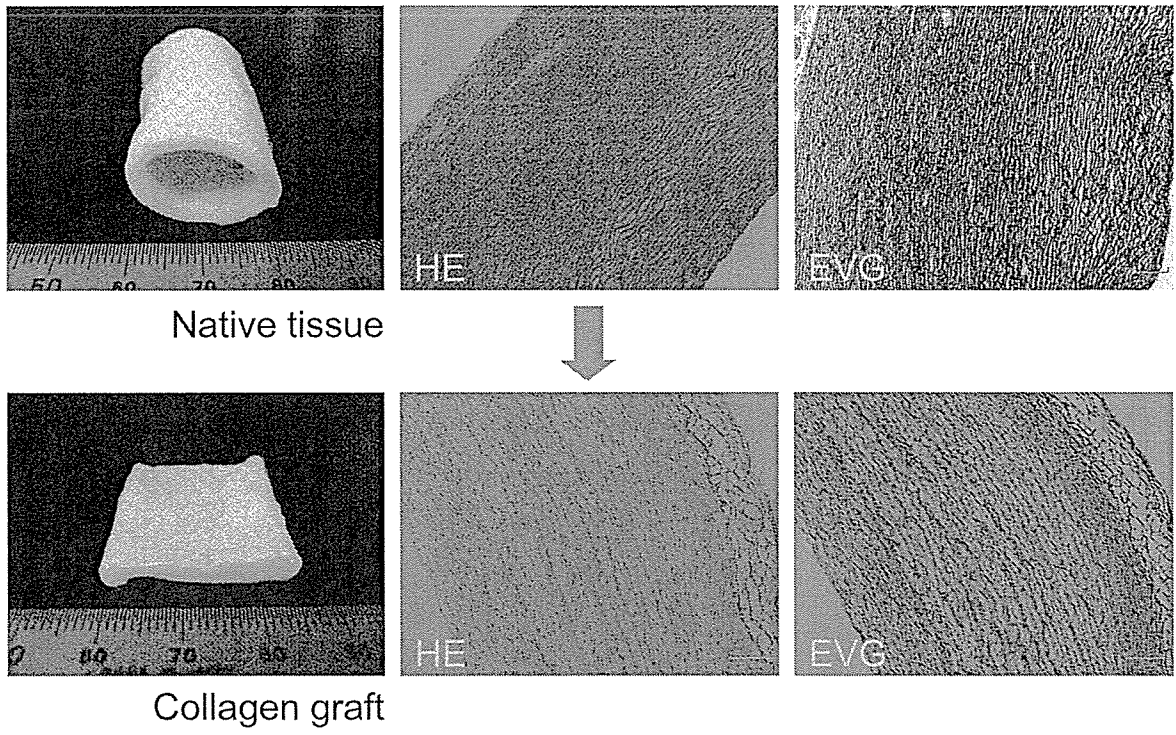


図10. 細胞・エラスチン除去大動脈

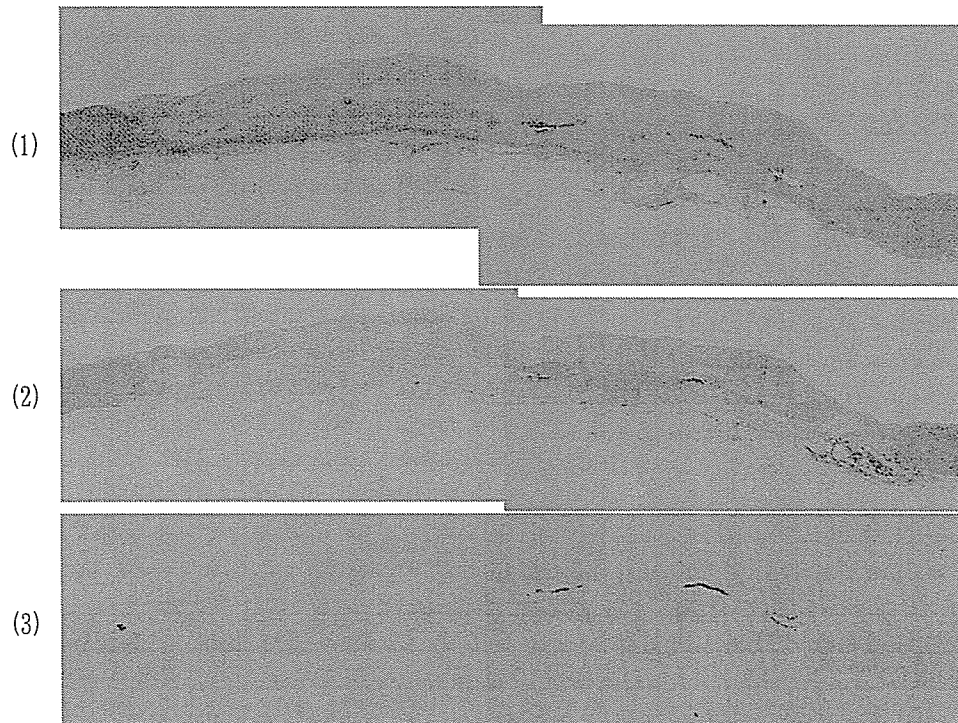


図11. 同種移植6ヶ月後の細胞・エラスチン除去大動脈の組織像（1：HE、2：抗SMA、3：von Kossa）



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（脱細胞化組織の長期移植）

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** 超高压を用いた脱細胞化処理過程にアルコール処理を導入することで作成したミニブタ脱細胞化大動脈を、同種ミニブタに同所性に置換移植した。組織内の石灰化を顕著に抑制することができ、移植12ヶ月後では、移植片は周囲組織の成長に追隨していた。

A. 研究目的

組織バンクの整備により、我が国でも組織移植が実施され始め、その有効性が報告されつつある。国立循環器病センターでは平成11年に組織バンクを、平成16年に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、同種血管並びに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血管並びに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血管並びに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血管並びに心臓弁が開発できると考えられる。本年度は、昨年度に引き続いて脱細胞化大動脈を用いた長期間の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）4頭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（株）神戸製鋼所製Dr. CHEF）を用いた低温下超高压印加処理（4℃、980MPa、10分）によってドナー細胞を破壊し、PBSをベースとする洗浄液にて2週間洗浄した。続けて、リン脂質成分を除去するためにアルコールで3日間洗浄した。

**移植実験**：クラウン系ミニブタ4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12ヶ月に移植組織を摘出し、HE染色、抗 $\alpha$ WF（血管内皮細胞）、及びvon Kossa染色（石灰化）等によって組織学的所見を検討した。（倫理面への配慮）

動物実験における動物愛護上の配慮は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（平成17年6月22日公布）及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示）、実験動物の適正な実施に向けたガイドライン（平成18年6月1日日本学会会議）等に基づき、当施設の実験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に努めた。

## C. 研究結果

全例において、術後の破断や膨化等は認めず、死亡例もなかった。図1に示したように、移植12ヶ月後に摘出したところ、脱細胞化処理過程において、昨年度までのアルコール処理を導入しない場合では移植周囲組織の成長に追随しなかった。しかし、アルコール処理を導入してリン脂質成分を除去した場合は、周囲組織の成長に追随していた。昨年度までの結果から、アルコール処理を導入しない場合では残存リン脂質成分によって石灰化を生じ、周囲細胞の浸潤にも影響を与えていた。リン脂質成分を除去することで、石灰化をほとんど生じることなく細胞が浸潤し、半年後にはほぼ全ての領域で再細胞化されていた。このため、移植半年以降は浸潤細胞の増殖等によって周囲組織の成長に追随したものと考えられる。計測した一例では、移植時体重5kgのミニブタに移植した長さ25mm、内径8mmの移植片は、12ヶ月後の体重30kg時には長さ35mm、内径14mmとなっていた。また、図2に示したように、内腔面は平滑で血栓等の付着も認められなかった。

組織学的に評価したところ、図3、4に示したように、組織内への細胞浸潤は良好で、内腔面は血管内皮細胞によって完全に覆われていた。組織内は平滑筋細胞および線維芽細胞によって完全に再細胞化されていた。組織内部の石灰化は軽微であった。

## 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新岡教授(現米国エール大学教授)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。

我々の脱細胞化血管では、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。昨年度までの結果から、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。これらの原因として、リン脂質の残存が関与していると考えられたため、アルコール処理を導入した。本年度は、その長期移植結果について検討した。その結果、石灰化が有意に減少し、移植片は周囲組織の成長に追随していた。同種移植の臨床応用へ向けて有用な結果だと考える。

## 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。脱細胞化処理の過程にアルコール処理を導入することで、石灰化を顕著に抑制し、良好な細胞浸潤を得ることができた。移植12ヶ月後では、移植片は周囲組織の成長に追随していた。

### 研究協力者

湊谷謙司 国立循環器病センター心臓血管外科  
汪 黎明 国立循環器病センター臓器移植部  
吉田謙一 (財)先端医療振興財団  
玉井克明 鈴鹿医療科学大学  
染川将太 鈴鹿医療科学大学

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 藤里俊哉、北村惣一郎. 心臓弁. 再生医療工学の技術, 142-7, シーエムシー出版, 東京, 2007
- 2) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. High Press Biosci Biotech 2007;1(1): 161-5.

### 2. 学会発表

- 1) 藤里俊哉、岸田晶夫、湊谷謙司、庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 生物組織の再生医療への応用. 第45回日本生体医工学会大会、福岡、5月15-17日、2006年.
- 2) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、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. 生体由来コラーゲン製人工血管の開発. 第45回日本生体医工学会

- 大会、福岡、5月15-17日、2006年。
- 3) 寺田堂彦、澤田和也、吉田謙一、岸田晶夫、緒方裕之、船本誠一、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎。生体由来組織を用いた再生型人工血管の開発。第55回高分子学会年次大会、名古屋、5月24-26日、2006年。
  - 4) 澤田和也、寺田堂彦、緒方裕之、吉田謙一、藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎。生体由来組織の超臨界流体処理。平成18年度繊維学会年次大会、東京、6月12-14日、2006年。
  - 5) 藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司、吉田謙一、庭屋和夫、永谷憲歳、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎。脱細胞化組織を用いた再生型動脈移植における石灰化抑制の試み。第5回日本組織移植学会総会・学術集会、東京、8月26日、2006年。
  - 6) 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。生体由来組織の脱細胞化のための超臨界流体抽出。日本機械学会2006年度年次大会、熊本、9月18-22日、2006年。
  - 7) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of antigenicity and risk of infection in regenerative tissue transplantation by cold isostatic pressing. The Fourth International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, AIST, Tsukuba, Japan, Sept. 25-29, 2006.
  - 8) 湊谷謙司、藤里俊哉、吉田謙一、船本誠一、荻野均、中谷武嗣、北村惣一郎。脱細胞化処理した下行大動脈並びに肺動脈同種移植実験の検討。第59回日本胸部外科学会定期学術集会、東京、10月1-4日、2006年。
  - 9) Terada D, Sawada K, Ogata H, Yoshida K, Funamoto S, Fujisato T, Kishida A, Nagaya N, Nakatani T, Kitamura S. Development of bioscaffold preserving collagenic structure in biological tissue. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006, Rotterdam, The Netherlands, Oct. 8-11, 2006.
  - 10) Fujisato T, Yoshida K, Terada D, Sawada K, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Residual phospholipids may cause calcification in acellular aortic tissue transplantation. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006, Rotterdam, The Netherlands, Oct. 8-11, 2006.
  - 11) 寺田堂彦、澤田和也、吉田謙一、岸田晶夫、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎。高圧流体下における生体由来組織からの細胞抽出。第47回高圧討論会、熊本、11月9-11日、2006年。
  - 12) 澤田和也、寺田堂彦、江橋具、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎。バイオサーファクタントを用いた生体由来スキャフォールド調製。第28回日本バイオマテリアル学会、東京、11月27-28日、2006年。

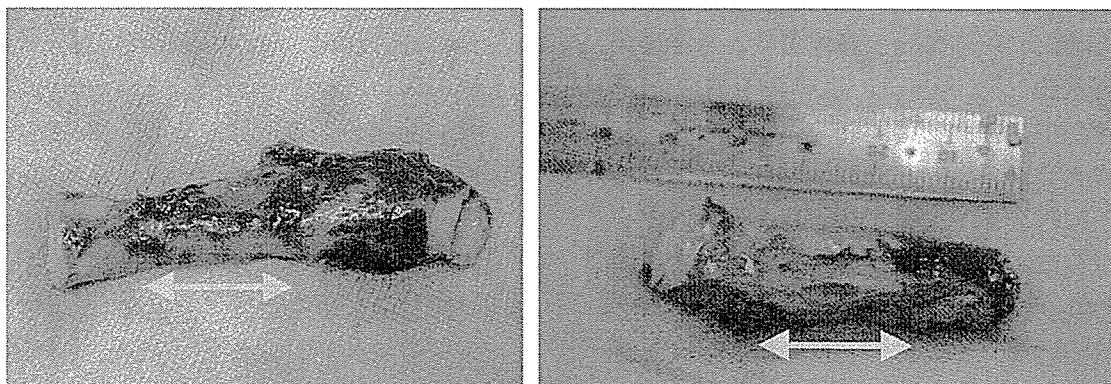


図1. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植12ヶ月後摘出時所見（左：アルコール処理無、右：アルコール処理有）



図2. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植12ヶ月後摘出時内腔面

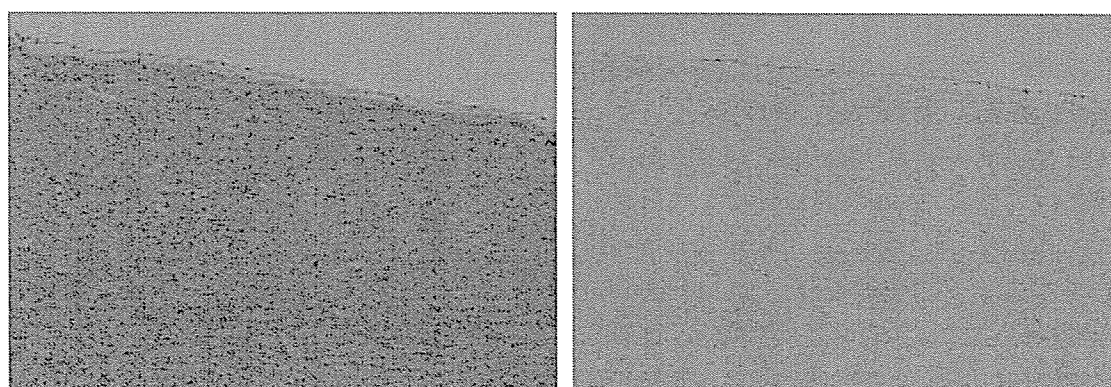


図3. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植12ヶ月後組織像（左：HE染色、右：抗vWF染色（血管内皮細胞））