

図4. 脱細胞化ミニブタ大動脈の移植12ヶ月後組織像（上：抗SMA（平滑筋細胞）、中：抗v i m（線維芽細胞）、下：von Kossa（石灰化））

再生医療型血管・心臓弁の開発（脱細胞化条件の最適化）

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 脱細胞化組織の作成条件について詳細に検討した。超高压処理の加圧速度の違いにより、処理槽内の温度変化プロフィールが異なり、これによって、処理組織内に氷塊が形成され、脱細胞化は達成されるものの、繊維間隙の拡大が確認され、力学的特性も変化することが示された。

A. 研究目的

循環器系疾患は、先進国における死の最たる原因疾患の1つである。我が国における三大死因である悪性新生物、心疾患、脳血管疾患の占める割合は、それぞれ31.0%、15.5%、13.3%であり（平成15年人口動態統計）、循環器系疾患全体の患者数は1,324千人で、悪性新生物の4倍である。今後、生活習慣、高齢化を考慮すると、循環器系疾患の患者数は増加すると考えられる。循環器系疾患に対する治療としては、心臓弁置換術、血管修復術やステントグラフト内挿術が代表的である。このうち、心臓弁や血管修復術については、再発が少なく成長性を実現できる再生医療への期待が高まっている。

広範な欠損部を有する場合の再生医療には、細胞が組織再構築をするための足場材料（スキャフォールド）が欠かせない。現在、スキャフォールド材料としてはポリ乳酸などの生体吸収性人工材料が用いられており、生体よりも硬い人工材料であるために、複雑な形状を造形するのが難しい、生体と同等の力学特性を持たせるのが難しい、などの問題がある。我々は、生体組織から細胞成分や抗原性部位のみを除去し、コラーゲン線維や弾性線維、基底膜などの構造マトリックスのみを用いて生体組織由来スキャフォールドとして利用する新しい技術を開発した。

異種組織移植については、細胞の機能保持の問題がないために、比較的容易に応用が可能であると考えられるが、現実に臨床応用されている異種組織は高度な化学処理が施されており、生体組織

特有の力学的特性を喪失している場合も多い。我々の開発した技術はこれらの問題点については克服が可能であると考えているが、この新しい移植用組織については、長期の生体適合性、拒絶反応の有無に影響する基本的な脱細胞化条件については不明である。昨年度までの同種動物実験では石灰化や狭窄の生じる場合があったが、脱細胞化処理方法の改良によって解決してきた。本研究ではより安定した脱細胞化異種組織の生産を目指して、脱細胞化技術の最適化について、より詳細な検討を行った。

B. 研究方法

クラウン系ミニブタ（株）ジャパンファーム）を犠牲死させ、各臓器・組織を摘出した。心臓摘出時における温阻血時間は20分以下とした。各組織を生理食塩水で洗浄後、適当な大きさに分割し、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浸漬することで細胞成分を洗浄除去した。超高压処理条件として、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。従来法との比較として、報告されている論文に基づいて Triton X-100、SDS、およびコール酸ナトリウムの3種類について脱細胞化を行った。これらの処理法を行った後、HE染色、DNA定量試験、および力学試験により検討を行った。

（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。

C. 研究結果

2種の加圧速度を用いた場合の、処理槽内の温度変化について図1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、10,000atm到達後に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る。一方、2000atm/minの場合には、10,000atm到達後に37℃付近を保持するためには、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。氷点以下となると、組織内に氷塊が形成され、組織の力学的特性に影響を及ぼすことが考えられる。これを確認するために、2種の条件で脱細胞化した組織の構造を、組織切片を作成して観察した。図2にその結果を示した。図より、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変わらない像が得られた。線維組織間の間隙の増大は、組織再生過程において細胞の浸潤を促進する可能性も考えられるが、大動脈に用いる場合には、血圧への耐性が必要であり、強度が減弱する可能性は排除するほうが好ましいと考える。また、線維組織の間隙が増大していることは、タンパク質成分の変性の可能性も考えられ、これは内膜肥厚や狭窄の原因となることも考えられる。このため、現時点では、生体組織の力学的特性を保持する処理条件が最適であると考えている。

これらの違いを定量的に評価するために、物理

的特性評価を行った。血管を切り開いて、円周方向と長軸円周方向のそれぞれに引張試験を行ったときの各脱細胞化条件の違いによる変化についての検討を行った。結果を図3、4に示した。比較のために、従来から報告されている界面活性剤を用いた脱細胞化法についても実施し、物理特性変化について比較検討した。その結果、円周方向および長軸方向のいずれについても、加圧速度666atm/minで処理を行った超高压脱細胞化組織が未処理の血管と同等の力学的特性を保持しており、適切な処理条件であると考えられる。界面活性剤を用いた場合では、細胞の除去効率もあまり高くないうえに、力学的特性も減弱することが明らかであった。これらより、界面活性剤を用いた脱細胞化では、脱細胞効率、力学的特性変化、残存界面活性剤の細胞毒性、およびそれを阻止するために必要な長時間の洗浄時間が問題となることがわかった。また、エラスチンおよびコラーゲン線維の弾性率に有意な変化がなかったことから、超高压法では生体組織と同等の力学特性が保たれるといえる。我々の開発した超高压処理法の優位性を再確認することができたといえる。

さらに、脱細胞化の確認として、組織中に残存するDNAについて定量試験を行った。界面活性剤を用いる3種の洗浄法では、組織深部への薬剤の浸透が困難なため、細胞除去が完全でなく、そのため、未処理と変わらない量のDNA量が検出された。一方、超高压処理法では、DNAの残存量は非常に低く、超高压後の洗浄によりほとんど除去できることが明らかとなった。適切な超高压処理によって、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で、極めて優れた結果を得た。

D. 考察

脱細胞化処理については、超高压の到達圧力や処理温度が、脱細胞の効率に影響を与えることが予想されたが、実際には、加圧速度の違い、出発時の温度等により、高压下での氷塊形成も、脱細胞だけでなく、処理組織の力学的特性に大きな影響を与えることが明らかとなった。これは、処理槽内に投入する対象組織の量も影響することを示しており、実際に産業化する場合には、処理装置の設計に留意する必要があることを示している。本研究では、従来より報告されている界面活

性剤を用いた脱細胞化技術との比較も行った。その結果、界面活性剤を利用すると力学的特性の変化が大きく、タンパク質の構造変化等も惹起している可能性が示された。組織再生のための足場材料としては、迅速な細胞の浸潤と機能発現が必要であり、この観点からは、組織の間隙が拡大することは、再細胞浸潤のためには有利に働くが、循環器系組織では、血流、血圧など力学的因子が大きな影響をもつため、初期強度の変化は、長期的には血管壁の破裂や動脈硬化などの病変を引き起こす可能性もある。このため、現時点では、生体により近い特性を有した足場材料の有用性を確認することが、循環器系再生医療用材料（特に動脈系）の開発に重要であると考えている。

E. 結論

超高压処理条件を最適化することによって、生体組織の力学特性を損なわずに脱細胞が可能な条件を見出した。この条件で脱細胞下組織は、力学的特性の保持に加え、高効率での脱細胞も可能であり、今後の超高压処理の標準プロトコールとなる可能性が高い。本研究成果により、新しい脱細胞化生体組織を用いた循環器系再生医療の実現が可能になると考える。また、超高压処理による生体組織への影響について、超高压系の相図を用いて安全な領域を見積もることができることが示された。

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. γ 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微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. 種々の超高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 γ 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. 脱細胞化筋スキャ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ャフォールドの開発. 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.
- 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. 超高压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. 超高压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. 脱細胞血管スキャ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. 超高压凝縮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.

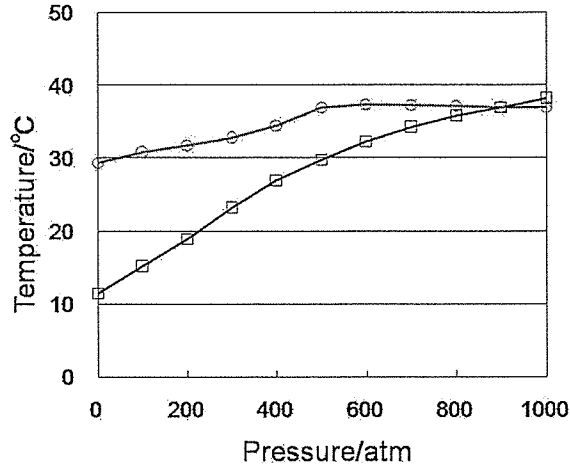


図1. 加圧速度の違いによる系内の温度変化
 開始温度(○) 30°C, (□) 10°C,
 加圧速度(○) 666 atm/min, (□) 2000 atm/min.

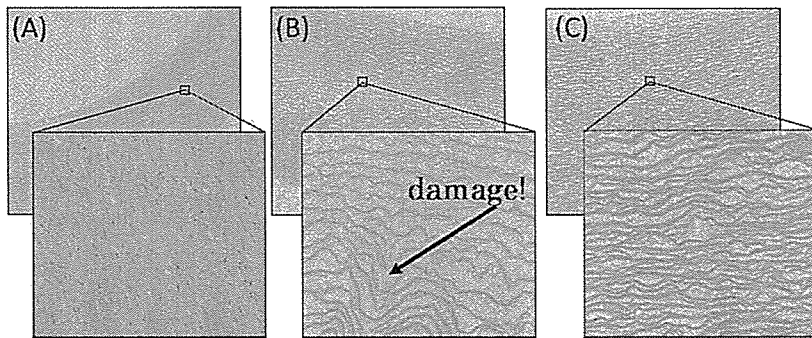


図2. ブタ大動脈の組織切片 (HE染色)

(A)未処理

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

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

円周方向

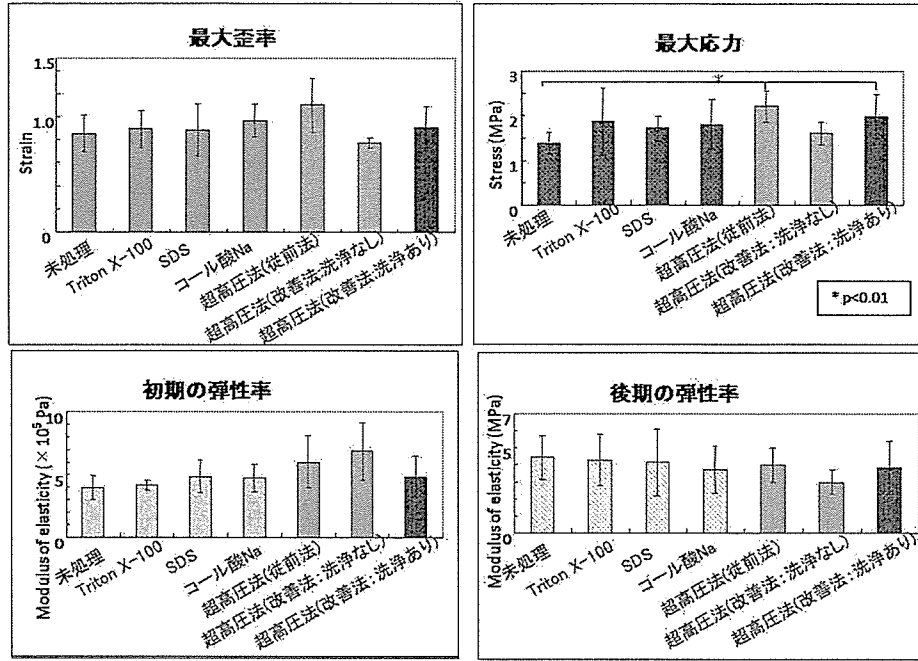


図3. 脱細胞化組織の力学特性 (円周方向)

長軸方向

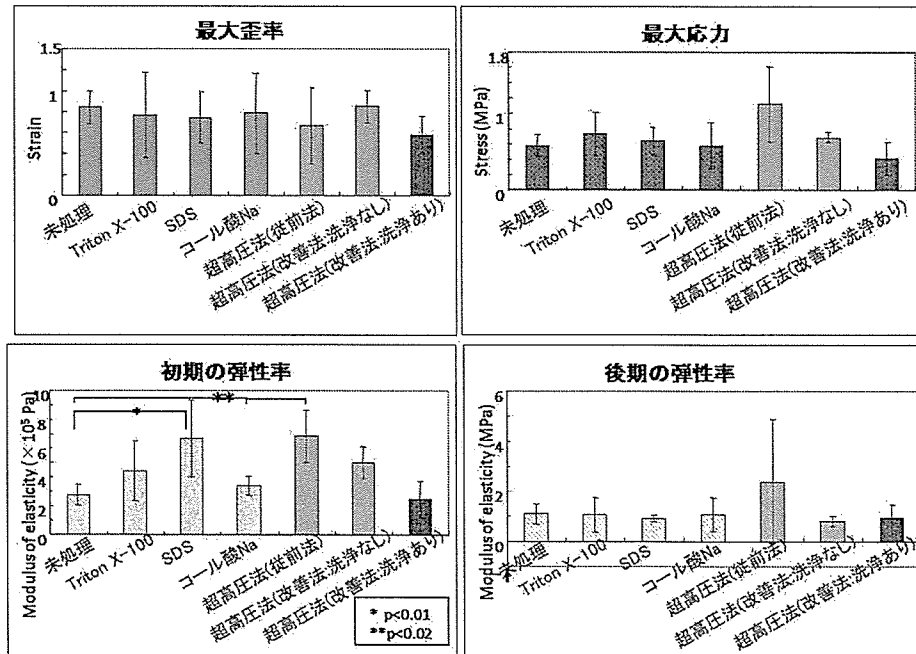


図4. 脱細胞化組織の力学特性 (長軸方向)

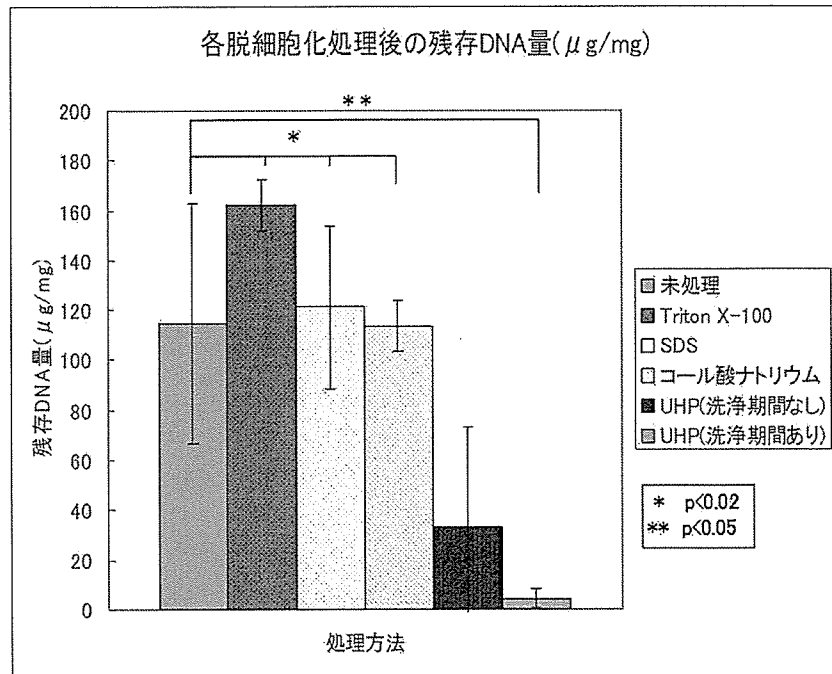


図5. 脱細胞化組織の残存DNA量

再生医療型素材の開発（脱細胞化組織の保存）

分担研究者 岸田晶夫 東京医科歯科大学生体材料工学研究センター教授

研究要旨 脱細胞化組織を臨床応用するためには、患者の血管および心臓弁のサイズに合わせた組織の採取が必要となる。実際には、ブタより採取した組織を保存し、適合するサイズの組織を使用することが望ましい。そのためには、脱細胞化生体組織の最適な保存法を見いだす必要がある。常温保存可能な保存法の開発を目指して、凍結乾燥による保存法について検討を行った。

A. 研究目的

従来の治療法での完治が見込めない疾患に対して、臓器移植による治療が行われている。しかし、圧倒的な移植臓器不足により、我が国の移植医療は進んでいない状況にある。この問題に対して、我々は、超高压印加法による脱細胞法を用いた血管や角膜の移植用組織の研究・開発を行っている。脱細胞法による移植用組織の特徴の1つは、生体由来の組織構造を維持する点であり、これを広範に利用するためには生体物性（構造）を損なわずに保存する必要がある。しかしながら、生体組織保存法に関する研究報告は少ない。生体組織の保存方法は、組織バンクなどで決められているが、現在の凍結保存法には何点かの問題点がある。1点目はコンタミネーションの危険性があること、2点目は保存や輸送に費用がかかること、3点目は解凍時の扱いが難しいことである。そこで本研究では、食品の長期保存に使用されている凍結乾燥（フリーズドライ）法に着目した。さらに、凍結法として従来使用されているプログラムフリーザーを使用せずに扱いやすく経済的な方法として、保冷箱（発泡スチロール）を使用した凍結方法を考えた。復元後の移植用組織の生体物性（構造）の変化に対する凍結乾燥の影響に関する検討を行った。

B. 研究方法

血管の採取：食用ブタから大動脈を採取し、脂肪などを除去・洗浄後、約50mmの長さに細切し、

乾燥を防ぐためにPBSに浸漬した。

凍結乾燥：3つの方法を行った。第1群は、保冷容器として使用されている発泡スチロールの中に、PBSからとりだした血管を置き、しっかりとふたをしてから、 -80°C あるいは -20°C の冷凍庫にて凍結させた。この方法を徐冷凍結法と称した。第2群は、試料をそのまま液体窒素、 -80°C の冷凍庫、あるいは -20°C の冷凍庫に入れて急速に凍結させた。この方法を急速凍結法と称した。各方法で十分に凍結させた血管は、凍結乾燥機にて2日間凍結乾燥した。第3群は、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。また、プログラムフリーザーで凍結後、凍結乾燥させた血管を、マクロ観察と組織染色での比較対象とした。

肉眼観察：乾燥後、肉眼にて亀裂などの損傷の有無と変形の程度を観察した。同時に色調の変化も観察した。また、PBSに浸漬した後の復元後に元の状態に戻るかどうか観察した。

組織観察：水に浸漬して復元後、適当なサイズに血管を切断し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定、パラフィンにて包埋、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。コラーゲン線維の走向や空隙の有無などを観察した。

力学試験：新鮮な血管と乾燥後復元した血管から、ダンベル状試験片7号（高分子計器株式会社）にて試験片を作成し、破断試験を行った。試験方向は円周方向とした。記録されたデータから応力を計算した。

(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、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

マクロ観察: 結果を図1に示した。 -80°C 、 -20°C に徐々に凍結した血管とそれぞれ同じ温度で急速凍結した血管では、色調、大きさ、亀裂に関して大きな変化は見られなかった。しかし、 -196°C まで急速凍結した血管では亀裂がみられた。これは過度の急速冷却が原因であると考えられた。また、常温乾燥した血管では色調と大きさの変化が見られた。色調は、黄白色から黄色で透明になっていた。さらにプログラムフリーザーで凍結後凍結乾燥させた血管でも色調の変化が見られた。水に戻した後について、凍結乾燥した血管については、乾燥する前と同じであった。一方、常温乾燥させた血管については、色調はもとに戻ったが、厚みの収縮が見られ、もとの状態までは復元しなかった。プログラムフリーザーで凍結後、真空乾燥させた血管については、色調が紫に変わった。

組織染色: 徐冷凍結・真空乾燥を行った第1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。 -80°C の場合は氷晶の跡が 10μ から 50μ であったが、 -20°C 場合は 50μ 以上の氷晶の跡が見られた。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・真空乾燥させた第2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、常温乾燥させた第3群では、未処理とほぼ同様の組織像であった。また、コントロール群でも、未処理と比較して大きな変化は見られなかった。

力学試験: 結果を図2、3に示した。初期弾性

率と破断歪率に関しては、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°C 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、 -20°C 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。

D. 考察

常温乾燥させた血管で色調が変化した原因は不明であるが、水の蒸発が関与していると考えられる。凍結乾燥と常温乾燥には大きな違いがあり、凍結乾燥は昇華であるが、常温乾燥は蒸発という水の状態変化により乾燥を行っている。凍結乾燥したものは、形状、成分の変化がなく、中心から十分に乾燥され、多孔質であるため十分な復元がみられる。しかし、常温乾燥したものは、厚みの減少、表面の硬化、表面に濃縮層ができるために深部の乾燥が困難となり、十分に乾燥が行えないため腐敗する。

-196°C に急速凍結後真空乾燥させた血管の亀裂に関しては、その原因は超低温まで急激に冷却し氷晶が急激に大きくなったためと考えられる。 -80°C と -20°C では亀裂は見られなかった。液体窒素を使用した急速な凍結は生体組織に多大な影響を与えている。

徐冷凍結した血管では、氷晶の跡が見られたが、急速凍結した血管では氷晶の跡は見られなかった。このことから、徐冷と氷晶に関係のあることがわかった。また、温度低下速度が小さいほど氷晶のサイズが大きくなることもわかった。一方、急速凍結した血管では、コラーゲンの走向の乱れやコラーゲン間の空隙数の増加がみられたが、徐冷した血管では見られなかった。このことから、急速凍結とコラーゲンの走向の乱れと空隙数の増加とは関係のあることが示唆された。常温乾燥した血管では、未処理とほぼ同じ組織像であったが、徐冷も急速凍結も行っていないからと考えられた。

初期弾性率に関しては、処理による有意な差は見られなかった。凍結乾燥による影響は、エラスチンにはほとんどないと考えられる。しかし、温度の低下速度はコラーゲンに大きな影響を与えるため、温度低下速度の調節が重要である。一方、凍結乾燥という行程は、生体物性に影響を与えて

いないことが示唆される。このことから凍結保存が生体組織の保存に適用できると考えられる。プログラムフリーザーの温度低下に比べて、保冷箱内の試料の温度低下は非常に大きい。しかし、物性の変化に有意な差が見られないことから、保冷箱は凍結手段として使用できる。もし、保冷箱を使った凍結法が使用されれば、従来に比べて安価に凍結が行えると考えられる。

E. 結論

現在の保存法に変わる新しい保存法について検討した。保冷箱を使用し、 -80°C まで徐冷凍結後に凍結乾燥を行うことで、力学特性や線維を有効に維持したまま、腐敗の問題なく保存できることがわかった。使用時には、水に浸けるのみで復元でき、保存や輸送費用が削減を図ることができ、コンタミネーションの恐れも低下すると考えられる。今後、長期保存を行った後の生体物性の変化の検証、長軸方向の力学試験の実施、保冷容器の最適化を検討したい。また、滅菌行程について、乾燥前、乾燥後、もしくは再浸潤後のいずれの段階で実施するのが適当かについて、検討を加える必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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) 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.
- 4) 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. γ 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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高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.
 - 14) 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微小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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 村越彩子、木村 剛、南 広祐、船本誠一、

- 藤里俊哉、岸田晶夫. 種々の超高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.
- 25) 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.
- 26) 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 γ 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 木村 剛、小粥康充、岡田正弘、古藺 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 田頭保彰、木村 剛、南 広祐、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫. 生体スキヤ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.
- 39) 船本誠一、橋本良秀、南 広祐、藤里俊哉、木村 剛、岸田晶夫. 超高圧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.
- 40) 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. 高圧凝縮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.
- G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）
- 1) 超高圧技術を用いた移植用角膜の創製. 特許

出願2007.

- 2) 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.

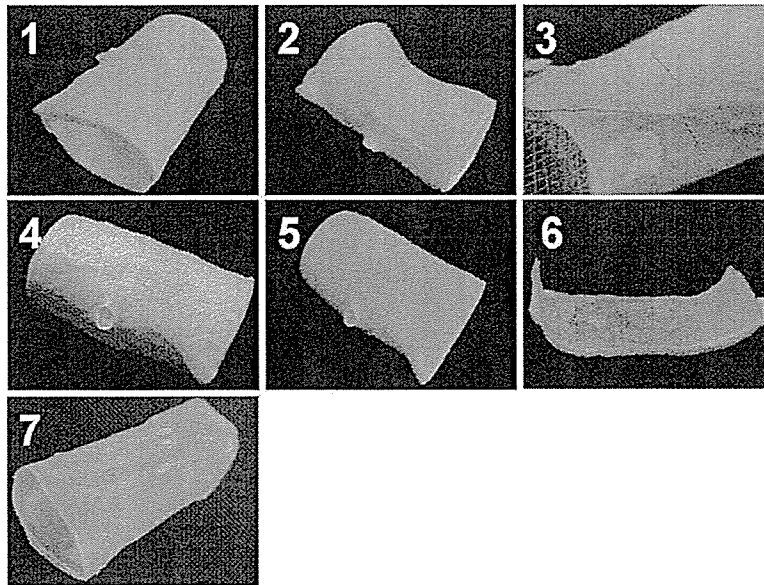


図1. 種々の方法で乾燥したブタ大動脈（1：-80℃まで徐冷、2：-20℃まで徐冷、3：-196℃まで急冷、4：-80℃まで急冷、5：-20℃まで急冷、6：-90℃まで毎分1℃ずつ徐冷、7：乾燥空气中で風乾、1～6の試料は凍結後、凍結乾燥を実施）

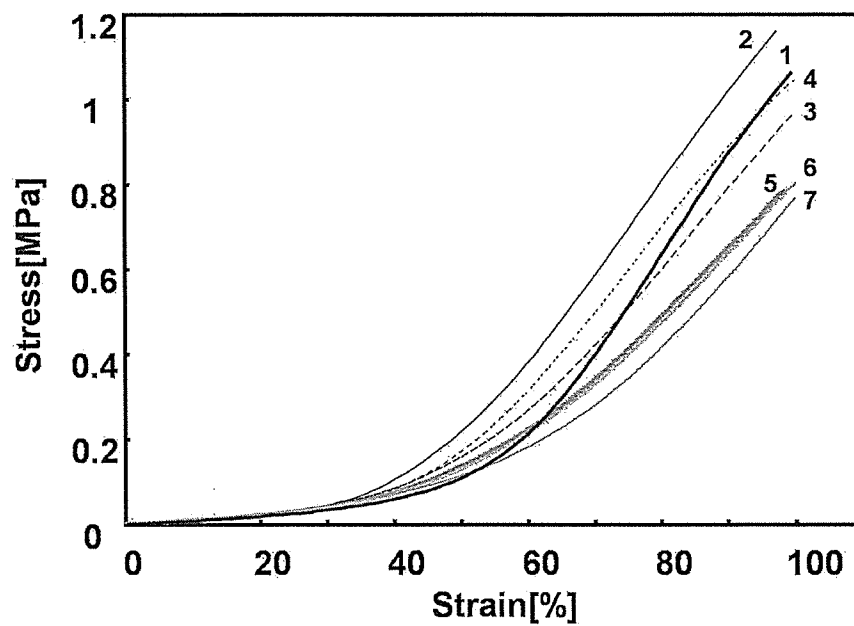


図2. 種々の方法で乾燥したブタ大動脈の力学特性（1：未処理、2：-80℃まで徐冷、3：-20℃まで徐冷、4：-196℃まで急冷、5：-80℃まで急冷、6：-20℃まで急冷、7：乾燥空气中で風乾、2～6の試料は凍結後、凍結乾燥を実施）

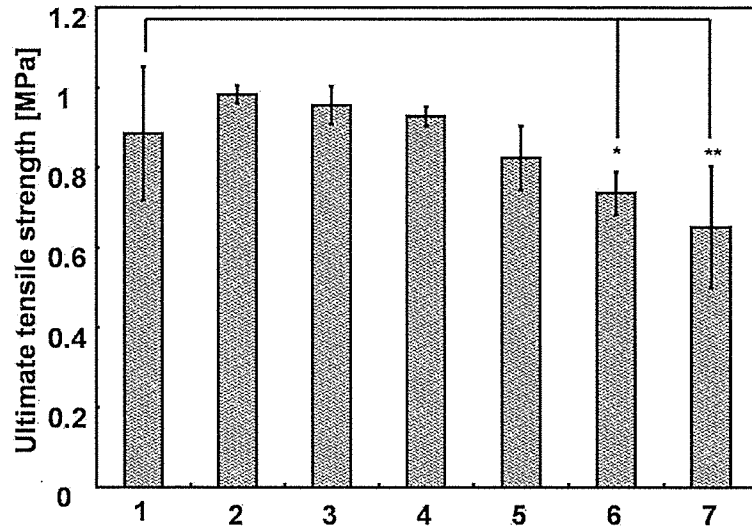


図3. 種々の方法で乾燥したブタ大動脈の破断強度（1：未処理、2：-80℃まで徐冷、3：-20℃まで徐冷、4：-196℃まで急冷、5：-80℃まで急冷、6：-20℃まで急冷、7：乾燥空気中で風乾、2～6の試料は凍結後、凍結乾燥を実施）

再生医療型素材への細胞組込

分担研究者 山岡哲二 国立循環器病センター生体工学部長

研究要旨 テーラーメイド型組織移植技術の確立のため、脱細胞化血管および心臓弁スキヤフォールドへの血管内皮細胞の播種と長期培養について検討した。循環培養バイオリアクターを用いることで、血管内皮細胞を良好に維持することが可能であった。

A. 研究目的

我々は、心臓弁や血管、気管等の再生型組織移植を目指している。現在の異種生体弁は移植後も異物として存在し、自己化されず、いずれ石灰化等によって再不全化する。これに対し、同種あるいは異種組織から細胞を除去した組織をスキヤフォールドとして用いる自己再生型組織移植では、固定化されておらず細胞も除去されているため、移植後に組織内に患者の細胞が浸潤することでリモデリングされ、自己化されると期待される。さらに、脱細胞化スキヤフォールドに移植前に患者の細胞を組み込んでおくテーラーメイド型組織移植では、移植後の自己化がさらに促進されると考えられる。本研究では、自己組織化のための脱細胞化スキヤフォールドへの細胞播種と培養方法について検討した。

B. 研究方法

脱細胞化スキヤフォールド: クラウン系ミニブタ（株）ジャパンファーム）から大動脈、肺動脈弁を摘出し、超高静水圧印加処理（株）神戸製鋼所）を行った後、PBSベースの洗浄液処理にてドナー細胞を除去した組織をスキヤフォールドとして用いた。

細胞培養: スキヤフォールド表面への播種と培養を目的とする実験では、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）あるいはミニブタよりコラゲナーゼ処理にて分離・培養した内皮細胞を用いた。培養にはEndothelial Cell Basal Medium-2（EBM）に2% FBSおよび添加因子を加えた培養液

を用いた。

脱細胞化スキヤフォールド表面への細胞播種と培養: アクリルで作製したモジュール内に細胞懸濁液と脱細胞化スキヤフォールドを入れて密閉し、血管スキヤフォールドは20分毎に90度回転させることで、弁スキヤフォールドは図1に示す回転型播種装置を用い、縦回転と横回転を同時に行うことで細胞を播種した。その後、細胞を播種したスキヤフォールドを、ガス交換能を有するカルチャーバッグに入れ、1日間静置状態で培養し、さらに図2に示す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。このとき、血管スキヤフォールドは二つに切り、静置培養を継続したものとの比較を行った。循環型バイオリアクターはローラーポンプを使用しており、血管スキヤフォールドに対しては流量15ml/min（定常流）、培地量は300mlで実験を行った。弁スキヤフォールドに対しては平均流量7ml/min（拍動流）、拍動周波数は0.03Hz、培地量は300mlで実験を行った。循環培養後、スキヤフォールドをトルイジンブルー染色し、実体顕微鏡で観察した。さらに、Calcein-AMとPropidium Iodide (PI) で生細胞と死細胞を同時に染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてスキヤフォールド表面の細胞が生存しているかどうかの確認を行った。

（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。

C. 研究結果

図3に、4日間循環培養した後の脱細胞化血管スキャフォールド内壁表面のトルイジンブルー染色画像を示した。HUVECを播種した血管スキャフォールドを4日間循環培養しても、血管スキャフォールド内壁表面の細胞が剥がれ落ちることなく培養することができた。

図4に、循環培養4日間後の血管スキャフォールド内壁表面をCalcein-AMとPIとで生細胞と死細胞を同時に染色した画像を示した。これらの画像より、内膜表面に付着した細胞が生存していることが確認された。

図5に、血管壁内膜表面に播種したHUVECの静置培養と循環培養後の配向を、流れ方向を0度として表示した。循環培養では流れ方向に配向している傾向が認められた。

図6に、脱細胞化弁スキャフォールドに播種した細胞を、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示した。培地を循環させながら培養可能ことが確認できた。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る。

ここには示さなかったが、脱細胞化血管スキャフォールド内部への細胞組み込みの実験では、細胞懸濁液を単純に滴下しただけでは細胞は組織内に浸潤しなかった。

D. 考察

スキャフォールドを用いた再生型組織移植では、細胞を播種せずに移植して生体内での再細胞化を期待するin vivo型と、予め細胞を播種するin vitro型(テーラーメイド型)とがある。吸収性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のグルー

プでは、患者から採取した細胞を予め播種している。脱細胞化組織を用いた再生型心臓弁の臨床応用を実施している独国ハノーバー医科大学のグループもin vitro型である。しかしながら、in vitro型では患者細胞の培養のために、セルプロセッシングセンター等の設備が必要であり、再生医療を広範に普及させるためには大きな障害となる。したがって、基本的な細胞播種および培養条件を得た後の次の段階として、自動的に患者細胞を播種するための装置の開発が必要と考えられる。

E. 結論

超高静水圧印加処理によって作成した脱細胞化血管および心臓弁スキャフォールド表面に、血管内皮細胞を播種することができた。さらに循環型バイオリアクターを用いて長期間培養することが可能であった。これらの基礎的技術を用い、テーラーメイド型の再生型組織移植を容易に実施するための自動細胞播種・培養装置の開発に取り組みたい。

研究協力者

江橋 具 国立循環器病センター再生医療部
戸川祐一 関西大学工学部

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. 学会発表

- 1) 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. γ 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.
- 2) 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