

Novel tissue processing for xenograft valve transplantation secure from xenogeneic rejection and unknown animal related infection

Toshia Fujisato, Kenji Minatoya, Kazuo Niwaya*, Akio Kishida#, Takeshi Nakatani§, Soichiro Kitamura*.*

Regenerative Medicine & Tissue Engineering, *Cardiovascular Surgery, #Biomedical Engineering, §Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan.

Introduction: Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogeneic matrices have been widely studied to have more durability with growth potential and less immunogenicity than the current bioprostheses. Whereas they have still several problems to be solved such as degradation control of biodegradable polymeric scaffolds and transfer of unknown animal related infectious diseases. Our novel tissue processing of acellularization by ultrahigh pressure treatment for the safe valve transplantation was reported.

Methods: Porcine tissues of heart valves, blood vessel, and trachea were isolated under sterile condition and treated by a cold isostatic pressing (CIP) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C for acellularization of donor cells. They were then washed with PBS under microwave irradiation at 4°C and subjected to histological study by the light and electron microscopy, detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement. Porcine endothelial cells were isolated from the femoral artery of a future recipient by enzyme digestion. The cells were expanded for about 3 weeks and then seeded onto the acellular biological scaffold using a roller culture bioreactor for 2 hrs. The seeded cells were then expanded in a pulsatile flow culture bioreactor for 4 days. The results were compared with those of acellularization by a detergent incubation by Triton X-100.

Results: The tissues including tracheal cartilage were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min. There was no PERV detected from the tissue. It has been reported that viruses are mostly inactivated by CIP more than 600 MPa. The TEM study showed that collagen and elastin fibers were maintained in the acellular tissue. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the tissues treated. From the in vitro incubation test, the tissue was disinfected when the CIP was applied to the tissues contaminated by normal bacteria floras. The autologous endothelial cells were uniformly well seeded onto the surface of acellular vascular tissue by the roller culture bioreactor. However, the cells were still remaining deep inside of the tissue and PERV was detected when the tissues were immersed for 24 hr in 1% Triton X-100 for cell removal.

Conclusion: Porcine cells and PERV were removed completely in a short period by the CIP of 980 MPa without changing the biomechanical property. This processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue transplantation.

A tissue engineered aorta and aortic root in a porcine model: novel tissue processing of acellularization by ultrahigh pressure treatment

*Kenji Minatoya**, *Toshiya Fujisato*, *Kazuo Niwaya**, *Ken-ichi Yoshida*, *Akio Kishida#*, *Hitoshi Ogino**, *Takeshi Nakatani§*, *Soichiro Kitamura**.

Regenerative Medicine & Tissue Engineering, *Cardiovascular Surgery, #Biomedical Engineering, §Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan.

Introduction: Several decellularization protocols were reported for tissue engineered grafts based on acellular matrices. Ultrahigh pressure was applied for the acellularization in our novel tissue processing. The aim of this study was to evaluate morphological and histological change of the tissue engineered aorta and aortic root by our novel acellularization protocol after the implantation in a porcine model.

Methods: Porcine descending aorta and aortic root were harvested under sterile condition and treated by a cold isostatic pressing (CIP) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C for acellularization of donor cells. They were then washed with PBS under microwave irradiation at 4°C and subjected to histological study by the light and electron microscopy, detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement. The acellularized porcine aorta or aortic root was implanted at descending aorta in pigs through left thoracotomy. Surgery was carried out with single clamp technique. The animals were sacrificed at 4 weeks and 12 weeks after the implantation. The explanted grafts were examined histologically and biochemically.

Results: The tissues were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min. There was no PERV detected from the tissue. It has been reported that viruses are mostly inactivated by CIP more than 600 MPa. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the tissues treated. The tissues were disinfected in vitro incubation test. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality including its anastomosis. The inner surfaces of the aorta were completely covered with endothelial cells at 12 weeks after implantation. Smooth muscle cells were also observed into the acellular aortic tissue. The valve leaflets were functioning in descending aorta and showed endothelial cells at 4 weeks.

Conclusions: The results of these unique scaffolds in porcine model were encouraging. The novel tissue processing using ultrahigh pressure could be a breakthrough to produce durable and safe bioscaffold for the tissue engineered aorta and aortic root.

PD01 細胞を除去した生物組織由来繊維素材による再生型組織移植

(国立循環器病センター) ○吉田謙一、西岡 宏、澤田和也、藤里俊哉、湊谷謙司
庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎
(東京医科歯科大学) 岸田晶夫

1. 緒言

我が国では年間約1万件の心臓弁置換術が施行されており、約7割に機械弁、3割に異種生体弁が使用されている。しかし、機械弁は生体適合性、生体弁は耐久性の問題を抱えたまま使用されているのが現状である。最近、欧米では同種弁から細胞を除去した再生型同種弁の臨床応用が始まり、機械弁や生体弁に優る物として、注目されている。移植後に自己組織と置換される再生型移植では、現在では不可能な、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う移植組織の成長が期待できる。我々は、超高压処理によって生体組織から細胞成分を除去し、残存したコラーゲン繊維を主体とする生体素材をスキャフォールドとし、レシピエントの自己細胞を播種した再生型組織移植技術の開発を行っている。本報では、ミニブタを用いた脱細胞化大動脈及び肺動脈弁の同種移植実験について報告する。

2. 方法

清潔下にてクラウン系ミニブタ(㈱ジャパンファーム)から心臓弁、下行大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理(㈱神戸製鋼所)及び洗浄処理にて組織内の細胞を除去した。レシピエントとなるミニブタから酵素処理によって採取した血管内皮細胞、平滑筋細胞を増殖させた後、回転並びに循環型バイオリクター装置を用いて脱細胞化組織に細胞を播種した。得られた再生型組織をミニブタに同所性に移植した。

3. 結果と考察

欧米で臨床化されている再生型同種弁では、トリトンX等の界面活性剤やトリプシン等の酵素などを用いた薬液処理によって脱細胞化している。しかし、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や、比較的高圧に耐える必要のある左心系の大動脈弁では破断等の事故報告もある。我々の超高压処理は、組織深部までの完全な脱細胞化が達成されるとともに、組織内のウイルスや細胞内遺伝子に組み込まれた内在性ウイルスも除去あるいは不活化することのできる高い安全性が特徴である。ミニブタを用いた同種移植実験において、左心系である下行大動脈置換術においても、破断等の異常所見は全く認められなかった。細胞を未播種の場合について免疫組織学的に検討したところ、血管内腔面は移植1ヶ月後においてほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後では完全に覆われていた。また、組織内には内腔及び外周部側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3ヶ月後ではほとんど見られなかった。移植後6ヶ月においては、内腔は血栓の付着もなく良好な細胞浸潤を示していた(図1)が、一部領域において若干の石灰化が認められた。現在、より長期の同種並びに異種移植実験によって、安全性や成長性、耐久性を検討しており、数年以内の臨床応用を目指している。

4. 謝辞

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

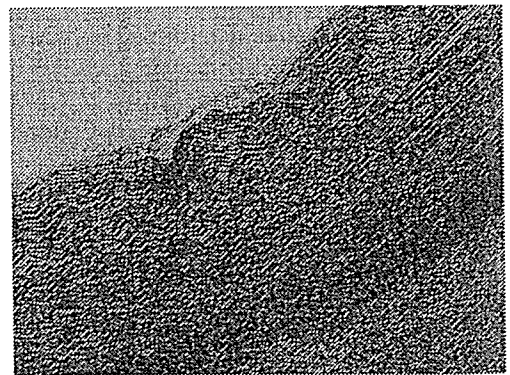


図1. 移植後6ヶ月の下行大動脈壁

Regenerative Tissue Transplantation using Acellular Fibrous Tissue. Ken'ichi YOSHIDA^{1,2}, Hiroshi NISHIOKA^{1,3}, Kazuya SAWADA¹, Toshia FUJISATO¹, Kenji MINATOYA¹, Kazuo NIWAYA¹, Akio KISHIDA⁴, Takeshi NAKATANI¹, Soichiro KITAMURA¹. ¹National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 Email: fujisato@ri.ncvc.go.jp, ²Foundation for Biomedical Research and Innovation, ³Japan Health Sciences Foundation, ⁴Tokyo Medical and Dental University

1D01 生体組織における細胞膜リン脂質の評価

(国立循環器病セ) ○澤田和也、野木千賀子、殷猛、山崎祥子、藤里俊哉
中谷武嗣、北村惣一郎

(ヒューマンサイエンス振興財団) 西岡宏 (先端医療振興財団) 吉田謙一

[緒言]

わが国では、現在年間 9000 件を超える心臓弁置換術が行われている。そのうち、7 割は機械弁による置換であるが、継続した抗凝固剤の服用など QOL 上の問題を抱えている。一方、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁は、化学的に処理されているため、種々の構造的劣化の問題が指摘されている。近年、凍結保存による組織バンクも整備されたが、わが国においては提供数が絶対的に不足しているという問題も残されている。

これらの諸問題を解決するため、我々は以前より組織工学および再生医療技術を駆使し、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスをスキャフォールドとして利用する検討を行ってきた。その結果、我々が開発した生体組織への超高压処理法を適用することにより、細胞成分や細菌・ウイルス等の除去あるいは、不活性化が可能となり、現在の生体弁では不可能な再生型の組織置換が期待できる。今後それらの応用化に向け、脱細胞組織のより詳細な評価や、移植後の自己細胞によるリモデリングの促進の検討等が必要である。中でも、移植後の石灰化に大きく関連するとされる、残存リン脂質の評価については、いまだ詳細な検討がなされていない。そこで本報では、生体由来組織の脱細胞評価をより詳細に行うことを目的として、生体組織中に残存するリン脂質の定量法について検討を行った結果について報告する。

[実験]

用いた試料は、ブタ大動脈 ((株) ジャパンファーム) であり、冷間等方圧加圧 (4°C、10,000 気圧) 処理により細胞破壊を行った後所定時間の洗浄を行った。chloroform : methanol (5:1) 溶液中にてホモジナイザーによって組織を粉碎 (10,000rpm 20 分) することでリン脂質を抽出した。粉碎された血管組織はフィルター濾過により除去し、濾液の溶媒を減圧下で蒸発させ固体のリン脂質を得た。得られた固体リン脂質は、所定量の tetrahydrofuran に再溶解させ、リン脂質 C-テストワコー (和光純薬社製) を含む水溶液と混合し、多段階の酵素反応に続く縮合反応によって生成する色素を比色定量した。

[結果および考察]

本検討では、本来水不溶性のリン脂質を水溶液中において比色定量するため、補助溶媒として tetrahydrofuran を用いた。そこで、予め濃度既知のレシチンにより本条件下での比色定量の有効性を確かめた。その結果、得られた色素の吸収スペクトルは、その最大吸収波長が通常の水系に比べ短波長シフトするものの、吸光度とレシチン量との間には高濃度領域まで良好な直線関係が確認された。さらに、種々の重量のブタ血管から本法により抽出したリン脂質量と試料重量との間にも良好な直線関係が得られ、本法による生体組織からのリン脂質抽出法および定量分析の信頼性が確認された。そこで、本法により種々の条件で脱細胞化処理を行ったブタ血管の残存リン脂質評価を行ったところ、脱細胞評価として一般に用いられる、ヘマトキシリン-エオシン染色結果と相違が生じることが判明した。これらの結果は、主として細胞膜に含まれるリン脂質の除去と、細胞核の除去機構を同一視出来ないことを示唆するものであり、本発表ではそれら細胞成分の除去や評価法を中心に述べる。

Colorimetric Determination of Phospholipid in Tissue: Kazuya Sawada: Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Tel 06-6833-5012, Fax 06-6835-5496, e-mail sawada@ri.ncvc.go.jp

(14)-1 超高压処理による脱細胞化生体組織
-3

国立循環器病センター¹、東京医科歯科大学²、先端医療振興財団³、ヒューマンサイエンス振興財団⁴
藤里 俊哉¹、吉田 謙一³、西岡 宏⁴、湊谷 謙司¹、
庭屋 和夫¹、岸田 晶夫²、中谷 武嗣¹、北村 惣一郎¹

【目的】組織再生用の足場には生体内分解吸収性人工素材を用いたアプローチが主流となっているが、多くは生体組織よりも硬く、複雑な形状に成形加工することが容易でない。また、左心系組織では、破断等の致命的障害を避けるための分解速度の制御も容易でない。我々は、生体組織から細胞成分を除去し、残存した構造マトリックスを足場基材として利用するアプローチを採用している。脱細胞化により抗原性が減弱されるとともに、固定化等の処理を行っていないため、移植後に自己組織化され、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると考えられる。【方法】クラウン系ミニブタの大動脈、心臓弁、及び気管を清潔麻酔下にて採取し、4℃にて10,000気圧の超高压静水圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を除去した。光学顕微鏡並びに電子顕微鏡を用いた組織学的観察によって、脱細胞化を評価した。また、処理組織からDNAを抽出し、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)のDNAを増幅後、PCR産物を電気泳動することで組織内のPERVを測定した。【結果と考察】脱細胞化の手法としては、界面活性剤や酵素による処理法が報告されているが、組織深部の細胞除去は容易でなかった。超高压による脱細胞化処理法では、気管軟骨組織内を含めて組織深部まで細胞核は染色されなかった。また、電子顕微鏡観察から、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離し、組織内では平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失が確認された。また、PERVもまったく検出されなかった。異種組織を素材として使用する場合は、PERVや未知の感染性物質を完全に除去することが必要である。超高压によって、組織内の細菌やウイルスの不活化されることが報告されており、本方法は極めて高い安全性が確保できると考えられる。コラーゲン繊維及びエラスチン繊維には若干の走行の乱れが認められたが、力学特性に大きな変化は見られなかった。移植後に自己組織と置換されるため、力学的な強度や特性が十分であれば、大きな影響はないと考えている。【謝辞】本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

(14)-1 人工血管への応用を目指したポリ乳酸筒
-4

産業技術総合研究所 バイオニクス研究センター¹、産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門²、産業技術総合研究所 物質プロセス研究部門³、泉工医科工業株式会社⁴
山口 麻奈絵¹、中村 和彦²、小高 正人²、新保 外志夫³、金森 敏幸¹、平河 公一郎⁴、神谷 勝弘⁴、
加来 永一⁴

【目的】我々はTissue Engineeringによる血管や神経軸索などの小口径管状組織の再生を目指し、生体吸収性ポリマーを用いて足場の開発を行っている。これまでポリL-乳酸(PLLA)を材料として相転換法により多孔質管状足場を試作し、in vitroでの細胞培養実験で良好な結果を得ている。しかしながら、相転換法で作製した足場は非常に硬くもろいため、血管との縫合が困難であると考えられた。そこでPLLA縫合糸(240デニール)を筒状に織ることにより足場を作製した。この筒織り足場には継ぎ目がなく、さらに枝分かれした足場を作製することも可能である。この足場を用いて正常ヒト血管内皮細胞(HUVEC)の培養を行ったので、その結果について報告する。【方法】内径3mm、長さ10mmのPLLA筒織り足場に、プラズマ後重合法によってGRGDSペプチドを修飾した。5×10⁵cells/mLのHUVEC細胞懸濁液中にペプチド修飾をしたPLLA筒織り足場を浸せきし、37℃において振とう培養を10分間行い、細胞を均等に播種した。その後足場を洗浄し、新鮮な培地中で1日おきに培地交換を行いながら培養を続けた。培地はすべて10%ウシ血清(FBS)を含んでいるものを用いた。筒織り足場に接着した細胞は顕微鏡(Keyence VH-8000)およびSEMを用いて観察した。【結果および考察】10分間の振とう培養後において、ペプチド修飾をした筒織り足場では多くのHUVEC細胞が接着していた。3日後には細胞が良好に伸展している様子が観察され、9日後にはサブコンプレントに達した。細胞と筒織り足場の繊維との接着面をSEMにより詳しく観察したところ、多くの細胞が繊維に沿って伸展しており、繊維と繊維の間をまたいで伸展している細胞も観察された。今回使用した筒織り足場は従来の相転換法により作製した足場に比べて柔軟なため、体内の血管などとの縫合が容易であること、また多孔性が高いためガス交換や物質交換がスムーズであることから、非常に有効な人工血管材料になると考えられる。

国立循環器病センター¹⁾ 再生医療部²⁾、心臓血管外科³⁾、臓器移植部⁴⁾

東京医科歯科大学⁵⁾、先端医療振興財団⁶⁾、ヒューマンサイエンス振興財団⁷⁾

藤里俊哉²⁾、吉田謙一⁶⁾、西岡 宏⁷⁾、沼田 智³⁾、湊谷謙司³⁾、庭屋和夫⁴⁾、菅 理晴²⁾、岸田晶夫⁵⁾、中谷武嗣⁴⁾、北村惣一郎¹⁾

ハイブリッド人工臓器は、人工物のみでは達成し得ない生体機能を生細胞で補完するという概念から、主に肝臓や脾臓といった代謝系の臓器を対象として古くから研究が行われてきた。また、小口径人工血管や人工心臓では、人工基材に血管内皮細胞を播種することで抗血栓性を獲得する研究が同様に進行してきた。しかし、最近の組織工学技術の発展から、特に血管や軟骨のような組織を対象としたものでは、基材に生体内分解吸収性材料を用いることが主流となり、再生医療の主要な柱となっている。我々は、基材として人工の吸収性材料ではなく、脱細胞化した生体組織を用い、患者各個人の細胞をハイブリッド化するテーラーメイド型の組織移植を目指している。脱細胞化組織基材は、移植後、自己細胞の浸潤に伴って自己組織と置換されることが期待される。

クラウン系ミニブタの大動脈及び心臓弁を清潔下に採取し、超高静水圧印加¹⁾に続けて洗浄処理することで組織内の細胞を除去した（パワーグラフト法）。一方、レシピエントとなるミニブタから血管内皮細胞を酵素処理にて分離し、増殖させた。得られた脱細胞化基材に、回転及び循環培養バイオリクター装置を用いて血管内皮細胞を播種した。

生体組織を基材として用いる場合、その安全性の確保が極めて重要である。パワーグラフト法では、超高静水圧の印加¹⁾によって組織内の細菌やウイルスが不活化されることを利用しており、完全な脱細胞化に加えて高い安全性も確保される。ブタ組織を使用する際に問題となる内在性レトロウイルスも、全く検出されない。この脱細胞化した血管及び心臓弁基材内腔面には、回転培養バイオリクターを用いることで血管内皮細胞を均一に播種することが可能であり、さらに、循環培養を続けることで、播種した細胞のエクспанションも可能であった。ミニブタへの同種移植実験からは、動脈組織であっても破断等の異常所見は認められず、6ヶ月後には、組織内部の過半領域への平滑筋細胞の浸潤が認められた。数年以内の臨床応用を目指して動物実験を継続中である。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

東京医科歯科大学¹⁾、国立循環器病センター²⁾、再生医療部³⁾、心臓血管外科⁴⁾
臓器移植部⁵⁾、先端医療振興財団⁶⁾、ヒューマンサイエンス振興財団⁷⁾

岸田晶夫、藤里俊哉³⁾、吉田謙一⁶⁾、西岡 宏⁷⁾、沼田 智⁴⁾、湊谷謙司⁴⁾、庭屋和夫⁵⁾、
菅 理晴³⁾、中谷武嗣⁵⁾、北村惣一郎²⁾

現在、人工血管、人工弁は広く用いられており、最も成功した人工臓器のひとつである。これらの血行再建に関わる人工臓器の今日の問題点は、①より高い血液適合性、②成長性、③より高い安全性、信頼性などが上げられる。これは、小口径人工血管など未だ実用化されていないものの開発の他に、開発当初の人工臓器に要求された「救命」という目的から「QOLの改善」に目的が広がっていることによる。これらの問題点の解決法として、新しい技術である再生医学が取り入れられている。すでに、新潟らによって小児への肺動脈系血行路への再生医学を駆使した人工血管が臨床応用されており、優れた成績と成長性が期待されている。このように再生医療は今後、ますます応用の範囲が広がると期待されている。

我々も、小口径人工血管、心臓弁あるいは成長性を有する大動脈系血行路再建を目指した再生医学に取り組んでいる。我々の方法論は、人工の吸収性材料ではなく、脱細胞化した生体組織を基材として用いるものである。広義の再生医療では、細胞移植ならびに足場材料のみを用いた組織再生から、患者自身の細胞をハイブリッド化するテーラーメイド型の組織移植、あるいは心、肝、腎などの臓器再生などが含まれるが、血行再建においては形質的機能不全を早期に治療する必要性が高いため、まず出来るだけ単純でかつ効果の高い技術の開発に挑戦している。異種組織移植を視野に入れ、ブタの大動脈及び心臓弁を、超高静水圧にて処理し、さらに洗浄処理して組織内の細胞を除去する（パワーグラフト法）。ミニブタへの同種移植実験では、6ヶ月経過後で良好な結果が得られている。

再生医学の場合、足場が分解する、移植細胞が減少する、移動する、など、人工物にあった「恒久性」の概念がなく、それ故に信頼性を確保するまでに、時間が必要である。これまでの人工物を主体とした技術の長所である「耐久性」と、再生医学の長所である「高機能」を上手に組み合わせることによって、新しい治療技術の開発のヒントが得られるかもしれないと期待している。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

(16)-1 超音波により人工心肺回路で検出された
-135 不活化細菌塊で生じた微小栓子シグナル
(HITS/MES)

新潟大学 大学院呼吸循環外科¹、テルモ株式会社²
榛沢 和彦¹、渡辺 弘¹、林 純一¹、山田 真義²

超音波により血管内の微小な血栓や気泡を反映するシグナルが検出される。このシグナルは「ピュッ」という短時間音を伴うことから High intensity transient signals(HITS) または単に Micro-embolic signals(MES)と呼ばれる。HITS は経頭蓋超音波(TCD)によって心内膜炎患者で検出されることが知られている。そこで心内膜炎患者で検出された HITS が抗生物質で減少した例を提示し、さらに人工心肺を用いたモック回路を用いて不活化した細菌を回路内に注入して HITS を検出し得たので報告する。症例 1 : 47 才女性、不明熱傾向の心エコーで僧帽弁に尤贅を認め直ちに TCD にを行ったところ 11 個/30 分の比較的高調音の HITS が検出された。抗生剤投与により HITS は減少したが発熱傾向が続いたため僧帽弁置換術施行した。術後に HITS は検出されなかった。症例 2 : 44 才男性、僧帽弁置換後心内膜炎を併発し再弁置換術後を行ったが術後に HITS は認めていなかった。術後半年後に徐脈性不整脈を合併しペースメーカー挿入し退院した。退院時に HITS は認めなかったが倦怠感を訴え来院し TCD 施行したところ高調音の HITS を 20 個/30 分検出、入院精査したところ血行性肺炎を認めペースメーカー感染と考えられた。再入院後ペースメーカー除去し術後直後に HITS は 5 個/30 分となり抗生剤投与後 1 ヶ月後に 0/30 分となった。実験検討 : (方法) 人工心肺回路に遠心ポンプでモック回路を作成、血液 200ml とリンゲル液 1000ml でプライミングし 2000ml/分で駆動した。HITS は TC2020 を用いて 2.0MHz パルスドプラプローブを特殊固定装置でチューブに装着した。ホルマリンで不活化したブドウ球菌を 10×10^{10} を生理食塩水 10ml に溶解して 2ml ずつリザーバーに注入した。作成したブドウ球菌塊は顕微鏡では 20μ 程度と確認された。(結果) 生理食塩水注入では HITS は検出されず、細菌塊を注入したところ比較的高調音の HITS が検出された。(考察) 心内膜炎では高調音の HITS が検出されることが少なくない。本実験でも高調音の HITS が検出されたが、細菌には細胞壁があり硬度が高いことによるものと考えられた。本報告は世界で初めて細菌塊で HITS が生じることを直接証明したものと考えられた。

(16)-1 水素結合性複合体の生医学応用における
-136 超高压印加効果

国立循環器病センター研究所 生体工学部¹、関西大学工学部²、岡山大学 環境理工学部³、国立循環器病センター研究所 再生医療部⁴、東京医科歯科大学 生体材料工学研究所⁵

木村 剛¹、古藤 勉¹、奥野 暁²、大矢 裕一²、大内辰郎²、六雄 伸吾³、吉澤 秀和³、藤里 俊哉⁴、岸田 晶夫⁵

[緒言]我々は 6000 気圧を超える超高压下では水素結合性が強調されることに注目し、超高压印加による水素結合性構造体の形成について検討している。これまで、水素結合性合成高分子であるポリビニルアルコール(PVA)への超高压印加により、ゲルあるいはナノ・マイクロ微粒子が形成された。また、天然の水素結合性高分子である DNA との混合系においても PVA-DNA 複合体が形成され、従来の静電相互作用や疎水性相互作用を介した非ウイルスベクターとは異なる新規遺伝子ベクターとなり得る可能性を有する。本研究では、遺伝子と種々の水素結合性高分子との混合系における超高压印加による複合体形成について検討した。[実験] 分子量および酸化度の異なる PVA を用いた。これらはクラレ(株)より提供していただいた。DNA としては、プラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー-DNA を用いた。PVA 溶液と DNA 溶液を混合し、超高压処理装置(Dr. CHEF ; (株)神戸製鋼所)を用いて様々な気圧下で所定時間印加した。得られた超高压処理溶液を目視および顕微鏡下で観察した。PVA-DNA 複合体形成については、CD スペクトル測定、ゲル電気泳動により検討した。また、種々の水素結合性高分子と DNA との複合体形成についても同様に検討した。さらに、様々な培養細胞を用いて、複合体の細胞による取り込みを検討した。[結果と考察] PVA と DNA の混合溶液を 8000 気圧以上で圧力印加した場合、高分子量の PVA では、濃度上昇に伴い透明溶液から白濁溶液に変化し、約 $1 \mu\text{m}$ 以下の球状粒子とそれらの集合体が観察された。透明溶液の SEM 観察では、約 200nm の粒子が見られた。DNA が粒子内に含まれているかを確認するため、遠心操作により粒子および上清を分離、回収し、加熱融解した後、アガロースゲル電気泳動を行った。粒子画分においても DNA が認められ、PVA-DNA 複合体の形成が明らかとなった。一方、低分子量の PVA では、若干の白濁が高濃度で認められたが、低濃度では透明な溶液のままであった。用いる PVA の分子量および濃度をコントロールすることで粒子サイズを制御できた。

VASCULAR TISSUE REGENERATION USING BIOSCAFFOLD ACELLULARIZED BY ULTRAHIGH PRESSURE TREATMENT

Toshia Fujisato, Kenji Minatoya, Kazuo Niwaya, Akio Kishida, Takeshi Nakatani, and Soichiro Kitamura

Presenting Author: Toshia Fujisato
National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

Tissue engineered grafts based on acellular matrices have been studied to have more durability with growth potential and less immunogenicity than the current bioprostheses. In this paper, tissue regeneration of the aorta and heart valve using a bioscaffold acellularized by an ultrahigh pressure treatment is reported.

Porcine tissues of the heart valves, aorta, and trachea were isolated under sterile condition. They were treated immediately by a cold isostatic pressing (CIP) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C. They were then washed and subjected to histological study by the light and electron microscopy, detection of porcine endogeneous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement. The acellular bioscaffolds were transplanted to allogeneic minipigs orthotopically. They were explanted 1, 3 and 6 months after transplantation and examined histologically.

The tissues including tracheal cartilage were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min. There was no PERV detected from the tissue treated. It has been reported that viruses are mostly inactivated by CIP more than 600 MPa. The collagen and elastin fibers were well maintained in the acellular tissue and there were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. The grafts of aorta and pulmonary valve were well functioning and mainly recellularized by the endothelial and smooth muscle cells after 6 month transplantation.

Porcine cells and PERV were removed completely in a short period by the CIP. The acellular grafts were well recellularized in the allogeneic transplantation.

ACCELERATION OF CELL PROLIFERATION BY NANO-VIBRATION STIMULATION

Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato,
Tooru Masuzawa

Presenting Author: Akio Kishida
Tokyo Dental and Medical University, Tokyo, Japan

One of key factors affecting the effective application of tissue engineering is the handlings of cells. Especially, for securing of the large amount of cell, many approaches have been studied. Physical stress and stimuli, such as 2-D stretch, static pressure and shear stress, have been extensively studied for controlling cell function for example, adhesion, proliferation and secretion of useful proteins. In this study, we studies the effect of a novel physical stimulation on the cell function (cell adhesion and proliferation). Here, we adopted nano-vibration stimulation system as a novel physical stimulation method. The equipment was assembled using piezo-electric actuator and set to apply micrometer- to nanometer- amplitude. To investigate the effect of nano-vibration, HUVECs, L929 and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were used as model cells. Adhesion and proliferation of those cells were investigated. In case of initial-adhesion, the cell adhesion was emphasized by nano-vibration to become 1.3 times higher adhered cell number in 1 hour incubation. The effective frequency was different according to the cell. In case of nano-vibrating the adhered cells, the proliferation of HUVECs was promoted at different frequency, respectively. The most drastic effect of nano-vibration was observed in the case of MEF adhesion and proliferation. It may show that primary cells rather than transformed cells suffer the vibration stimulation.

超高压処理による再生型組織移植を目的とした生体組織の脱細胞化

○野木千賀子^{1, 2} 西岡 宏³ 澤田和也¹ 藤里俊哉¹ 岸田晶夫⁴ 森反俊幸²
中谷武嗣¹ 北村惣一郎¹

¹国立循環器病センター ²鈴鹿医療科学大学 ³ヒューマンサイエンス振興財団
⁴東京医科歯科大学

**Acellular tissue for regenerative tissue transplantation
processed by ultrahigh pressure treatment**

C.NOGI^{1,2}, H.NISHIOKA¹, K.SAWADA¹, T.FUJISATO¹, A.KISHIDA¹, T.MORITANI¹
T.NAKATANI¹, S.KITAMURA¹

¹National Cardiovascular Center, ²Suzuka University of Medical Science, ³Japan Health Sciences Foundation,
⁴Tokyo Medical and Dental University

1. 緒言

血管や心臓弁等の修復のために、凍結保存バンクを利用した組織移植が実施されている。しかし、年間約1万件の心臓弁置換術に足る組織の提供は望み得ない。この解決策として、スキヤフォールドを用いた組織の再生が模索されている。生体吸収性材料からなるスキヤフォールドの開発には、複雑な形状の造形、生体と同等の力学特性の付与、吸収速度の制御、といった問題点がある。我々は、同種並びに異種の心臓弁や血管、気管組織から細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスを用いた生体スキヤフォールドの技術開発を行っている。脱細胞化生体スキヤフォールドに、*in vitro*にて患者の自己細胞を組織内に組み込むことで、あるいは細胞誘導因子等を組み込むことで、現在では不可能な、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う移植組織の成長性が期待できる。

2. 方法

ドナーとなるクラウン系ミニブタから麻酔清潔下にて大動脈、心臓弁、及び気管を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた超高压印加処理、続けて洗浄処理を行うことで細胞成分を除去した。処理後の組織を、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡で組織学的に観察するとともに、リン脂質やDNA量等の細胞成分の測定を行うことで脱細胞化を評価した。また、DNAを抽出後、ブタ内在性レトロウイルス (PERV) のPCR産物を電気泳動することで、組織内PERVを測定した。

3. 結果と考察

処理後の組織内では細胞核は全く染色されず、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離していた。透過電顕の所見からも、平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失が確認された。コラーゲン繊維及びエラスチン繊維には若干の走行の乱れが認められたが、力学的な強度には問題なかった。組織内のβ

アクチン及びPERVは全く検出されなかった(図1)。しかし、リン脂質は処理後でも検出された。リン脂質は移植後の石灰化の要因となり得るため、洗浄処理の最適化を検討中である。

欧米では、脱細胞化に薬液を用いた方法で、既に臨床応用が実施されている。しかし、不十分な脱細胞化が原因と思われる移植後早期の不全例も報告されている。超高压印加処理によって、完全な脱細胞化が達成されるとともに、細菌やウイルスの不活化されることが既に報告されているため、異種組織を使用した場合でも、本方法は極めて高い安全性が確保できると考えている。動物移植実験の結果を基に、脱細胞条件の最適化を図り、今後数年以内の臨床応用を目標としている。

4. 謝辞

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

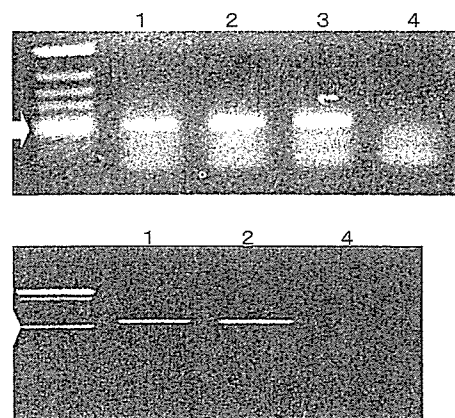


図1. 未処理 (1)、薬液処理 (2, 3)、及び超高压処理 (4) 組織内のPERV (上) 及びβアクチン (下)。

脱細胞化生体組織による再生型同種組織移植

○ 舘 義人^{1, 2} 吉田謙一³ 殷 猛¹ 山崎祥子¹ 藤里俊哉¹ 湊谷謙司¹ 庭屋和夫¹
岸田晶夫⁴ 森反俊幸² 中谷武嗣¹ 北村惣一郎¹

¹国立循環器病センター ²鈴鹿医療科学大学 ³先端医療振興財団
⁴東京医科歯科大学

Regenerative tissue transplantation using acellular tissue scaffold

Y.TACHI^{1,2}, K.YOSHIDA¹, M.YIN¹, S.YAMAZAKI¹, T.FUJISATO¹, K.MINATOYA¹, K.NIWAYA¹
A.KISHIDA¹, T.MORITAN¹, T.NAKATANI¹, S.KITAMURA¹

¹National Cardiovascular Center, ²Suzuka University of Medical Science

³Foundation for Biomedical Research and Innovation, ⁴Tokyo Medical and Dental University

1. 緒言

我が国では年間約1万件の心臓弁置換術が施行されている。最近、欧米では同種弁から細胞を除去した再生型同種弁の臨床応用が始まり、現在使用されている機械弁や異種生体弁に優る物として、注目されている。移植後に自己組織と置換される再生型移植では、現在では不可能な、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う移植組織の成長が期待できる。しかし、比較的高圧に耐える必要のある左心系の大動脈弁では破断等の報告もある。我々は、超高圧処理によって生体組織からドナー由来の細胞成分を除去した生体スキャフォールドに、レシピエントの自己細胞を播種した再生型組織移植技術の開発を行っている。本報では、ミニブタを用いた脱細胞化大動脈及び肺動脈弁の同種移植実験について報告する。

2. 実験

清潔下にてクラウン系ミニブタから心臓弁、下行大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理及び洗浄処理にてドナー由来細胞を除去した。レシピエントとなるミニブタから採取した血管内皮細胞、平滑筋細胞を増殖させた後、回転型並びに循環型バイオリクター装置を用いて脱細胞化組織に細胞を播種した。得られた再生型組織をミニブタに同所性に移植した。

3. 結果と考察

欧米で臨床化されている組織は、界面活性剤や酵素等の薬液処理によって脱細胞化されているが、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。我々の超高圧処理は、組織深部までの完全な脱細胞化と高い安全性が特徴である。左心系である下行大動脈置換術においても、破断等の異常所見は全く認められなかった。細胞を未播種の場合について免疫組織学的に検討したところ、血管内腔面は移植1ヶ月後においてほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後では完全に覆われていた。また、組織内には内腔及び外周

部側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3ヶ月後では完全に消失していた(図1)。移植後6ヶ月においては、内腔は血栓の付着もなく良好な開存性及び自己細胞浸潤を示していた(図2)が、若干の石灰化の所見が認められた。現在、より長期の同種移植実験並びに異種動物実験によって、成長性や耐久性を検討しており、数年以内の臨床応用を目指している。

4. 謝辞

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。



図1. 脱細胞化大動脈移植後のT細胞の浸潤(左: 1ヶ月、右: 3ヶ月)。

図2. 脱細胞化大動脈移植6ヶ月後のレシピエント細胞の浸潤(左: 内皮細胞、右: 平滑筋細胞)。

異種気管移植を目指した気管 Scaffold の開発 —超高压処理による脱細胞化—

角田卓哉, 西岡 宏, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫¹, 菅 理晴
国立循環器病センター研究所 再生医療部, ¹生体工学部

Development of tracheal scaffold aiming clinical tracheal zeno-transplantation -decellularization with ultrahigh pressure treatment-

Takuya Tsunoda, Hiroshi Nishioka, Seiichi Funamoto, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Michiharu Suga
Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, and ¹Biomedical Engineering
National Cardiovascular Center Research Institute

【研究背景と目的】

悪性腫瘍や良性疾患による気管狭窄は致死的病態であるが気管の long segment を切除するとそのままでは再建は不可能で、補填が必要となる。現在まで臨床化された人工気管はなく、実現可能性の面から組織工学を応用した移植用気管の開発が期待されている。今回我々は、異種気管を scaffold (足場) として移植利用する目的で、超高压処理による気管脱細胞化の有用性を検討した。

【方法】

1. Brown-Norway ラットの気管を使い、①新鮮気管、②凍結気管 (-80℃で4週間保存)、③Triton X (T-X) 処理気管 (24時間浸漬後4週間PBS洗浄)、④超高压処理 (10,000気圧、10分、4℃) 気管 (処理後PBS中で4週間保存) の病理組織像および力学特性を検討し、更に Lewis ラットの皮下に1週間移植して病理学的検討を行った。

2. ブタ気管を使い、①新鮮気管、②T-X処理気管、③超高压処理気管、④T-X+超高压処理気管の病理組織像とブタ内在性レトロウイルス (PERV) の残存を検討した。

【結果】

ラット気管の検討: 凍結保存気管では細胞成分がほぼ完全に残存したが、T-X処理および超高压処理を行うことで深部 (軟骨部) を除き除去された。気管組織最大張力はT-X処理により新鮮気管の約65%に低下したが、凍結、超高压処理ではそれぞれ75%、90%維持された (図1)。また、皮下移植後に新鮮気管で著しい組織反応を示したのに対し、T-X処理、高压処理、凍結処理を行った気管では組織反応は軽度であった。更に、T-X処理気管では軟骨の著明な破壊と内腔の完全な閉塞を認めたが、超高压処理気管、凍結気管では軟骨破壊は軽度で管腔構造も保持された。

ブタ気管の検討: T-X処理および超高压処理で認められる深部細胞成分の残存は、T-X+高压処理を行うことで完全に除去された (図2)。PERV-DNAの残存に関しては、PCR検査にて、高压処理を行った気管のみ除去された。

【考察と結論】

異種気管を移植利用する場合、抗原性やウイル

ス感染の危険性などの観点から、新鮮気管よりも脱細胞化した Scaffold として用いる方法が考えられる。ただし気管 Scaffold が移植利用されるためには、管腔構造を保持できる組織強度と再細胞化を促進する組織特性が同時に求められる。

今回のラットおよびブタ気管の検討から、超高压処理による脱細胞化は、細胞除去、組織強度の保持、PERV除去などの点で優れた方法と考えられ、異種気管の移植用 Scaffold 作製に有用であると思われた。将来的な臨床化に向けて、今後脱細胞化を更に徹底する方法の開発や再細胞化の検討を行っていく必要があると考える。

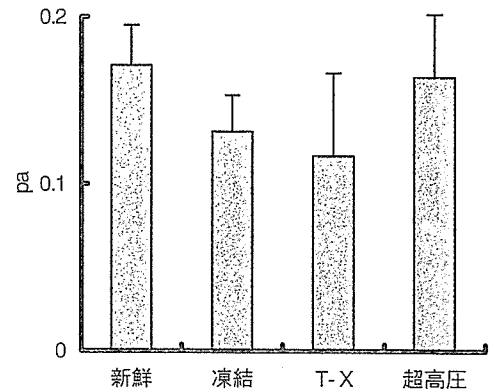


図1. ラット気管の最大組織張力

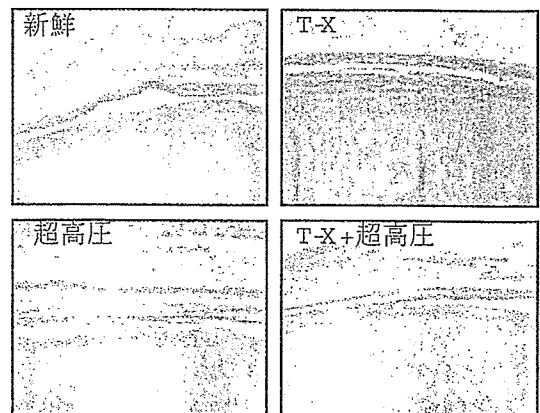


図2. ブタ気管の組織像

超高压処理による脱細胞化生体組織：パワーグラフト

○藤里俊哉、吉田謙一¹⁾、西岡 宏²⁾、殷 猛、山崎祥子、澤田和也
 湊谷謙司、庭屋和夫、菅 理晴、岸田晶夫³⁾、中谷武嗣、北村惣一郎
 国立循環器病センター、¹⁾先端医療振興財団
²⁾ヒューマンサイエンス振興財団、³⁾東京医科歯科大学

1. 緒言

心臓弁置換術では、抗血栓性や耐久性に問題を有しながらも機械弁や異種生体弁が使用されている。近年、より優れた代用弁として、凍結保存同種弁を用いた組織移植も実施されているが、年間約1万件の心臓弁置換に足る組織の提供は望み得ない。このため、組織工学技術による弁組織の再生が模索されており、最近、欧米では同種及び異種弁から細胞を除去した再生型弁移植の臨床応用が始まった。我々も、同種並びに異種心臓弁の他、血管や気管組織から細胞を除去するための技術開発を行っている。脱細胞化組織に患者の自己細胞を組み込むことで、あるいは細胞増殖因子等を組み込むことで、生物学的な自己修復能や患者の成長に伴う成長性を有した組織再生が期待できる。

2. 方法

ドナーとなるクラウン系ミニブタから麻酔清潔下にて大動脈、心臓弁、及び気管を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた超高压印加処理、続けて洗浄処理を行うパワーグラフト処理にて細胞を除去した。光学顕微鏡並びに電子顕微鏡で組織学的に観察するとともに、リン脂質やDNA量等の細胞成分の測定を行うことで脱細胞化を評価した。また、DNAを抽出後、ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のPCR産物を電気泳動することで、組織内PERVを測定した。レシピエントとなるミニブタから採取した血管内皮細胞、平滑筋細胞を増殖させた後、バイオリクターを用いて脱細胞化組織に細胞を播種した。得られた再生型組織をミニブタに同所性に移植した。

3. 結果と考察

欧米で臨床化されている組織は、界面活性剤や酵素等の薬液処理によって脱細胞化されているが、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。パワーグラフト処理では、組織内の細胞核は全く染色されず、内皮細胞も完全に剥離していた。透過電顕の所見からも、平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失が確認された。コラーゲン及びエラスチンは若干の走行の乱れが認められたが、力学的な強度には問題なかった。組織内のPERVは全く検出されなかった。しかし、リン脂質は処理後でも検出された。超高压を印加することで、細菌やウイルスの不活化されることが他の研究者らによって既に報告されているため、異種組織を使用した場合でも、本方法は極めて高い安全性が確保できると考えている。下行大動脈の同種移植実験において、細胞未播種の場合について検討したところ、血管内腔面は移植1ヶ月後ではほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後で完全に覆われていた。組織内には平滑筋細胞の浸潤が認められた。移植後6ヶ月では、血栓の付着もなく良好な開存性及び自己細胞浸潤を示していたが、若干の石灰化の所見が認められた。現在、より長期の同種並びに異種移植実験によって成長性や耐久性を検討しており、数年以内の臨床応用を目指している。

4. 謝辞

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、文部科学研究費、及び科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

Acellular tissue scaffold processed by ultrahigh pressure treatment: Powergraft

Toshia Fujisato, Kenichi Yoshida¹⁾, Hiroshi Nishioka²⁾, Meng Yin, Sachiko Yamazaki, Kazuya Sawada, Kenji Minatoya, Kazuo Niwaya, Michiharu Suga, Akio Kishida³⁾, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura

National Cardiovascular Center, ¹⁾Foundation for Biomedical Research and Innovation

²⁾Japan Health Sciences Foundation, ³⁾Tokyo Medical and Dental University

再生医工学技術を用いた生体組織の再生

藤里俊哉、沼田 智^{1,4)}、湊谷謙司¹⁾、庭屋和夫¹⁾、岸田晶夫^{2,5)}、中谷武嗣³⁾、北村惣一郎¹⁾

国立循環器病センター再生医療部、¹⁾心臓血管外科、²⁾生体工学部、³⁾臓器移植部

⁴⁾現 シンガポール国立病院胸部外科、⁵⁾現 東京医科歯科大学生体材料工学研究所

Abstract : Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogeneic matrices have been studied to have more biocompatibility and durability with growth potential than the current artificial devices. In this study, our novel tissue processing of decellularization named PowerGraft by ultra-high pressure for the safe tissue regeneration was reported. Porcine heart valves and aortic tissue were isolated and treated by a cold isostatic pressing at 4°C for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out in saline under microwave irradiation at 4°C. The tissues were completely cell free when they were pressed to 980 MPa for 10 min and rinsed. There was no porcine endogenous retrovirus detected and there were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus in the tissue treated. The endothelial cells were well seeded on the acellular bioscaffold by the roller and circulation culture systems sequentially. This PowerGraft processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue regeneration.

1. 緒言

我が国では年間約1万件、米国では約8万件、世界中では約30万件の心臓弁置換術が施行されている。代用心臓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化した異種生体弁があり、機械弁とは異なって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7割に使用され、我が国でも現在は約3割であるが、その割合は徐々に増加している。しかし、グルタルアルデヒドによって化学的に処理され、組織が固定化されているがゆえ、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5～10年程度の耐久性しか有せず、米国のガイドラインでは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、死体から提供された凍結保存同種心臓弁が臨床で使用されつつあり、良好な成績が報告されている。凍結保存同種弁は機械弁に比べ

て抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っているとされる。また、不全の大動脈弁位に自己肺動脈弁を、肺動脈弁位に凍結保存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、かつ患者の成長に伴ってサイズが大きくなる成長性を有しているため、特に小児患者で有効とされている。しかし、我が国では凍結保存同種弁の供給が絶対的に不足しており、限られた施設でのみ施行されているのが現状である。これらの諸問題を解決するために、組織工学及び再生医療技術を応用した代用弁及び血管の開発が試みられている。我々は、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスを足場材料(スキャフォールド)として利用するアプローチを採用しており、ヒトあるいは動物から採取した心臓弁から、細胞成分や細菌、ウイルス、DNAを完全に除去あるいは不活化することで、現在

の生体弁では不可能である再生型の組織置換を目指している。現在の異種生体弁では移植後も体内では異物として存在し、自己化されない。しかし再生型組織では、固定化されておらず、かつ細胞成分が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。さらに、この脱細胞化したスキヤフォールドに、*in vitro*において患者の自己細胞を播種し、自己組織と同等の組織構築を行った後で移植するテラーメード移植によって、より移植後早期の自己化を獲得できると考えられる(図1)。これにより、現在では自己組織移植以外では不可能な、小児患者においても移植後に成長する移植組織が作出し得ると考えられる。現在、ドナーから摘出された同種弁は10%から30%の割合で、摘出時の細菌感染等によって臨床使用が不可能になる。本研究は、それら廃棄される凍結保存同種弁組織の新たな臨床使用の可能性を開き、社会資本としての提供組織の有効利用にも結びつく。

2. 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、心臓弁及び心筋を採取した。また、気管、肺、大動脈、及び肝臓を摘出した。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、マイクロ波照射下((株)東屋医科機械製MI-33)にてPBS溶液にて洗浄除去した(パワーグラフト処理と命名)。トリトンX-100による脱細胞化を対照とした¹⁾。処理後の組織は、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡を用いた組織学的観察によって、脱細胞化を評価した。また、処理組織からDNAを抽出し、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)のDNAを増幅後、PCR産物を電気泳動することで組織内のPERVを測定した。

同種移植実験: 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弁導管による大動脈置換手術を行った。術後1、3及び6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 α -SMA(平滑筋細胞)、抗ビメンチン(間質細胞)、抗CD3(T細胞)、及び

抗CD68(マクロファージ)免疫染色、並びに走査型電子顕微鏡によって組織学的所見を検討した。脱細胞化していない凍結保存同種弁を対照とした。凍結保存は、採取した肺動脈弁を、プログラムフリーザー(フタバメディカル社製CryoMED)による1℃/minの徐冷凍結後、液体窒素中に保存した。1ヶ月後に解凍し、ハンクス液で洗浄後、動物実験に供した。

細胞播種: 脱細胞化処理したミニブタ大動脈内腔面を、新たに作製した回転培養装置を用いて血管内皮細胞播種を行った。1軸あるいは2軸回転によって細胞が均一に播種される条件を探索した。また、細胞播種後のマトリックスを長期培養し生体外での組織構築をある程度実現するためのバイオリクターも作製した。また、脱細胞化組織内部への細胞移植を実現するために、細胞注入するシステムおよび媒体について検討を行い、自動注入装置の導入、及び媒体としてコラーゲン並びに生分解性高分子の応用についても検討を行った。

なお、動物実験に対する動物愛護上の配慮は、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案など、規定に則り十分に払っており、文部科学省及び実験動物学会等の指針に沿って処理した。

3. 結果

心臓弁の脱細胞化: HE染色後の光学顕微鏡観察では、パワーグラフト処理後の組織内では細胞核は全く染色されず(図2)、血管内腔面でも内皮細胞が完全に剥離していた。細胞内タンパク質である β -アクチンも全く検出されなかった。また、組織内のPERVも、いずれの組織試料からも全く検出されなかった。これらに対し、トリトンX-100溶液内への浸漬による脱細胞化では、処理後でも β -アクチン並びにPERVが検出された(図3)。

種々の組織の脱細胞化: 肺や肝臓、腎臓などの毛細血管の発達した組織、あるいは心膜や大動脈、気管において、高い脱細胞化が達成できた。一方、心筋と皮膚については、条件の最適化が必要であった。

同種移植実験: 術後に移植組織の破断等による異常所見は見られなかった。移植1ヶ月後の一部症例においては若干の血栓が認められたが、3、6ヶ月後においては認められなかった。血

管内腔面は、移植1ヶ月後においてもほぼ内皮細胞で覆われており、3、6ヶ月後では完全に覆われていた(図4)。これは、HE染色、並びに抗vWFによる免疫染色の結果からも、確認された。また、抗 α -SMA及び抗ビメンチン免疫染色の結果から、組織内には内腔側から平滑筋細胞及び線維芽細胞の浸潤が認められた(図5)。抗CD3及び抗CD68免疫染色の結果から、移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3、6ヶ月後では完全に消失していること確認された。これに対し、脱細胞化していない凍結保存同種弁組織では、脱細胞化組織と比較して、より顕著な炎症反応が見られた。

脱細胞化組織表面への細胞播種：新たに開発した回転培養装置を用い、1軸回転もしくは2軸回転による播種の検討を行った。血管を用いた場合には1軸回転で均一に播種することが可能であった。播種する細胞密度が高くなるほど接着数は増加した。また、回転速度についても、低速では細胞が下方に沈殿し、また、あまりに高速すぎると生存率が低下した。心臓弁への細胞播種では、1軸回転では内部の弁葉の複雑な形状面への均一な播種が困難であったが、2軸回転型装置を用いることで、均一に細胞を播種することができた。さらに、循環培養装置を用いることで、内皮細胞の伸展が認められた(図6)。

細胞内部への細胞播種：汎用ディスペンサ装置を用いた場合、微量注入は可能であったが、使用した細胞浮遊液の溢れが認められ、効率が低かった。コラーゲン溶液を用いたところ、組織内部に塊状に細胞が存在していることが確認された(図7)。

4. 考察

未だ長期間に渡って満足できる性能を発揮する人工臓器や組織は開発されておらず、また、患者の成長に伴って人工臓器に成長性を与えることはほとんど不可能である。一方、ブタやウシ等の生体由来の医療用素材も古くから使用されてきたが、最近のBSE及びCJD問題を契機として、我が国においては新GMP基準が策定され、使用が制限あるいは禁止されつつある。我々は、再生医療の一つのアプローチとして、*in vitro*において患者の自己組織と同等の組織構築を行った後で移植するテーラーメイド移植

を目指している。欠損した心臓弁に対する置換再生型医療素材では生体吸収性材料を用いたアプローチが主流である²⁾。しかし、ポリ乳酸などの生体吸収性材料では心臓弁のような形状を造形することが容易でなく、生体よりも硬いという欠点がある。また、高圧に耐える必要のある左心系では分解吸収速度の制御も容易ではない。我々のアプローチである生体由来組織ではこれらの欠点はないが、ドナー由来の抗原性を減弱する必要があり、動物由来の場合は未知の感染性や、移植後のヒトへの感染が懸念されている内在性レトロウイルスの除去が必須である。

脱細胞化の手法としては、界面活性剤や酵素による処理法が報告されている^{1,3-5)}が、その浸透性の限界のため、組織深部の細胞除去は容易でない。我々の開発したパワーグラフト処理では、組織深部まで細胞核は染色されず、PERVもまったく検出されなかった。超高静水圧印加によっては、組織内の細菌やウイルス⁶⁾、異常プリオンの不活化されることが報告されており、本方法は極めて高い安全性が確保できると考えられる。

テーラーメイド組織移植では、移植前に患者の自己細胞をスキュフォールドに組み込む必要がある^{7,8)}。血管内皮細胞については、回転細胞播種及び循環培養装置によって、高い細胞播種率を達成することができた。また、平滑筋細胞の組織内部への組み込み法として、汎用3次元注入装置を用いた細胞注入について検討を行った。コラーゲンゲル等の細胞の媒体については、もう少しの検討を要する状況である。

これらの条件を至適化しつつ、数年以内の臨床応用を目指し、より長期の動物実験を進めている。

5. 結論

超高静水圧印加及びマイクロ波照射処理により、ミニブタ心臓弁組織から力学特性を有効に維持したままドナー由来細胞を除去することができた。さらに、回転培養バイオリクター装置により、細胞除去組織スキュフォールドに患者細胞を均一に播種することができた。数年以内の臨床応用へ向けた有効性及び安全性の検討を続けている。

6. 謝辞

本研究は、厚生労働省厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、文部科学省科学研究費、及び科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

文献

(1) Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. Euro J Cardio-Thorac Surg 1998; 14: 279-84.
 (2) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered heart valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. Circulation 1996; 94(9 Suppl): II164-8.
 (3) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS,

Clarke DR, O'brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2001; 13(4 Suppl 1): 87-92.

(4) Korossis SA, Fisher J, Ingham E. Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. Biomed Mater Eng 2000; 10(2): 83-124.

(5) Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. Ann Thorac Surg. 2002; 74(5): 1438-42.

(6) 鈴木敦士, 林 力丸編. 高圧生物科学と高圧技術. 1997; さんえい出版 京都.

(7) Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. Tissue Eng 2001; 7(1): 9-22.

(8) Laube HR, Matthaus M. A new semi-automatic endothelial cell seeding technique for biological prosthetic heart valves. Int J Artif Organs. 2001; 24(4):243-6.

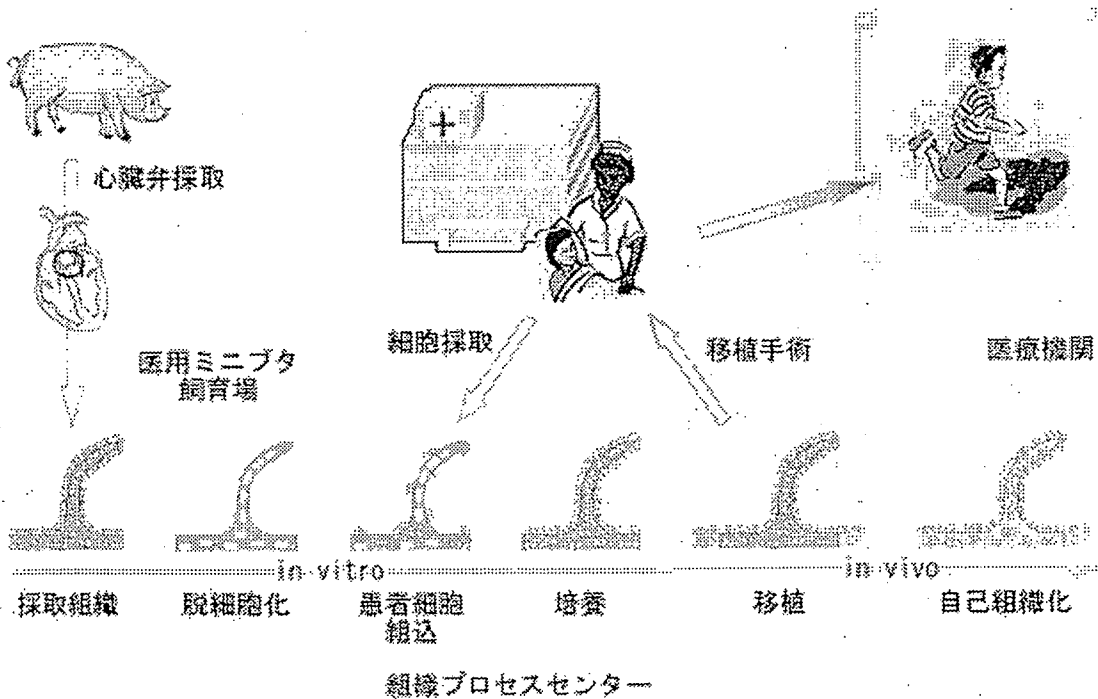


図1. テーラーメイド型組織移植

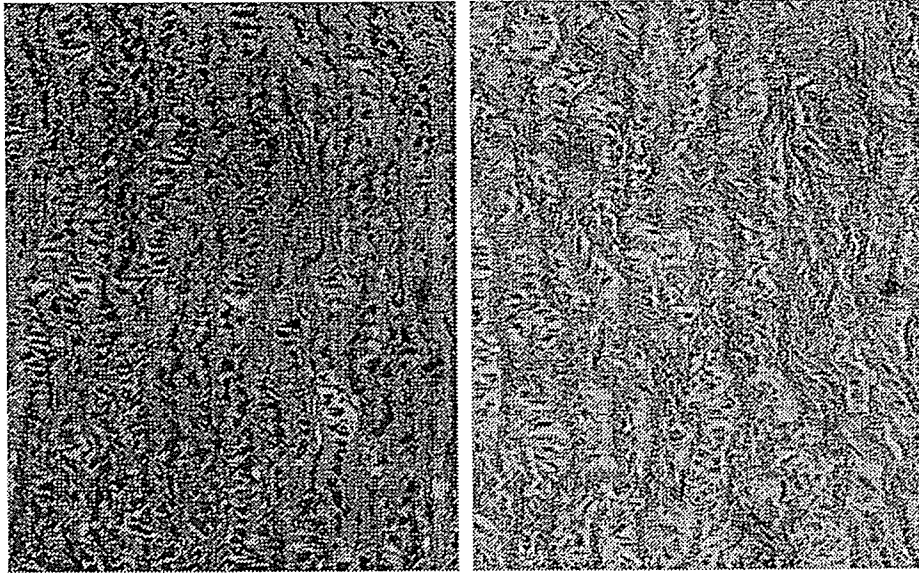


図2. 脱細胞ミニブタ大動脈弁導管部 (左: 未処理、右: 脱細胞化処理後: 400倍)

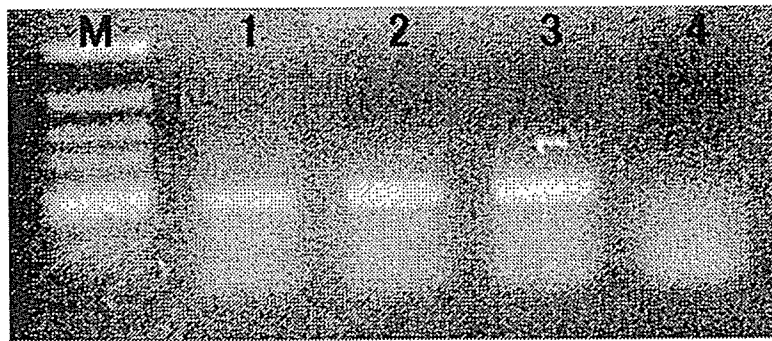


図3. ミニブタ血管組織内PERVのPCR産物 (M: マーカ、1: 未処理、2, 3: トリトン処理、4: パワーグラフト処理)

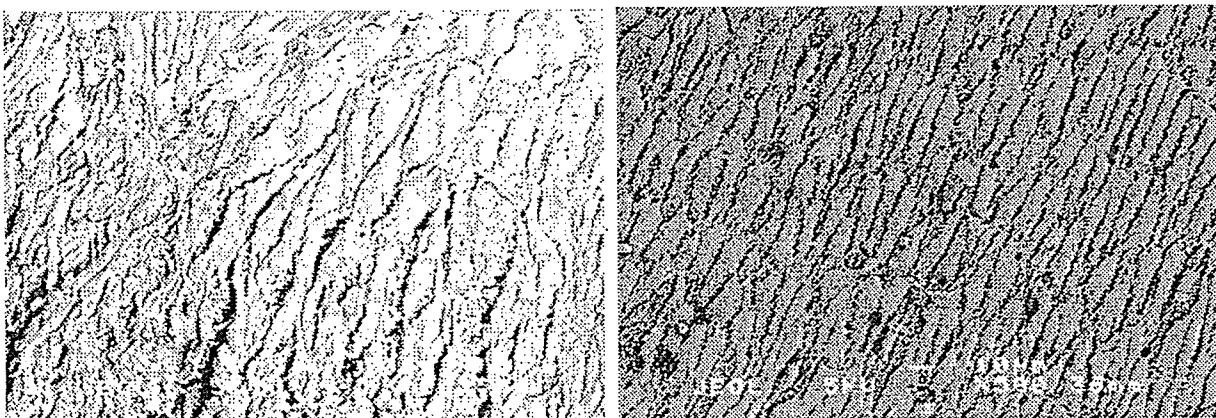


図4. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化大動脈内腔面 (左: 移植1ヶ月、右: 移植3ヶ月)

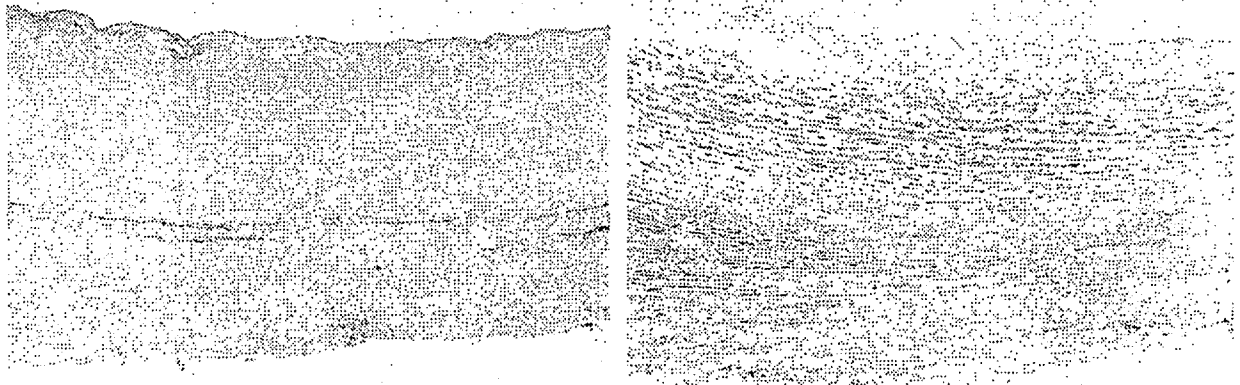


図5. 脱細胞化大動脈移植6ヶ月後のレシピエント細胞の浸潤（左：内皮細胞、右：平滑筋細胞）。

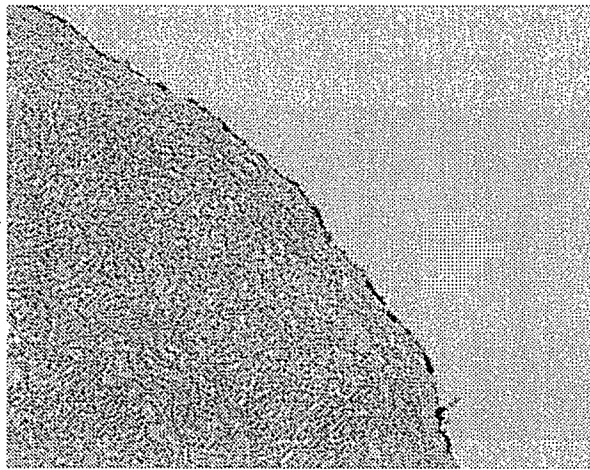


図6. 脱細胞化大動脈内腔面への血管内細胞の播種

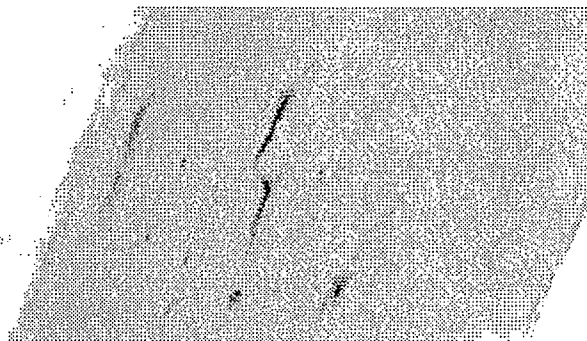


図7. 脱細胞化大動脈内への線維芽細胞の播種