

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岸田 晶夫

平成20年（2008年）4月

目 次

I. 総括研究報告	
脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用	1
岸田 晶夫	
II. 分担研究報告書	
1. 循環器系再生型組織の作製	13
藤里 俊哉	
2. 循環器系再生型組織のin vitro評価	21
山岡 哲二	
3. 再生型組織の臨床応用への倫理面の検討	29
北村 惣一郎	
4. 循環器系再生型組織のin vivo評価	37
湊谷 謙司	
5. 脱細胞化組織の滅菌	43
白数 昭雄	
6. 再生型角膜の物性・in vitro評価	47
小林 尚俊	
7. 再生型角膜のin vivo評価	55
佐々木 秀次	
8. 再生型角膜の作製	59
木村 剛	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	69
IV. 研究成果の刊行物・別刷	75

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
総括研究報告書

脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用

主任研究者 岸田晶夫 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

研究要旨 再生医療技術のうち、足場材料のみを用いて生体内再生を行う技術は、早期の臨床応用が可能である。本研究では、循環器系組織および角膜組織に対象を絞り、有効性・安全性の評価とともに製品化のための基礎研究を含めた検討を行う。循環器系組織については、処理法の条件変化によって、力学的強度が変化することが明らかとなった。角膜については、脱細胞化前と変わらない物性を有していることを確認した。脱細胞化処理後の透明性の劣化についても、浸透圧の調整によって回復可能であり、これはブタ角膜組織のウサギ眼への異種組織移植実験を行って確認した。

分担研究者

藤里俊哉
大阪工業大学工学部教授
山岡哲二
国立循環器病センター生体工学部長
北村惣一郎
国立循環器病センター総長
湊谷謙司
国立循環器病センター心臓血管外科医長
白数昭雄
ニプロ株式会社総合研究所部長
小林 尚俊
物質・材料研究機構生体材料センターグループリーダー
佐々木秀次
東京都立広尾病院眼科医長
木村 剛
東京医科歯科大学生体材料工学研究所助教

療では、慢性的な移植組織の不足から、解剖学的にヒト組織に類似するブタ組織を移植組織とする研究が行われてきた。異種移植の超急性拒絶反応を回避するためグルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いてエピトープを固定化して移植されているが、組織の硬化や長期埋入での石灰化が大きな問題となっている。そこで、新たな拒絶反応回避策として、免疫源となる細胞を除去し、残存する細胞外マトリックス(ECM)からなる組織(脱細胞化組織:バイオスキャホールド)を移植組織として用いる方法が提案されている。本手法は、人工材料では再現が困難な生体組織特有の複雑な三次元構造を有する点を特徴とし、生体由来であることから、細胞の浸潤を許容することで成長可能な組織として期待されている。脱細胞化組織の調製法としては、酵素や界面活性剤を用いる化学的処理法が主流であるが、残存物質による細胞毒性、ECMの変性、力学特性への影響が懸念されている。このことから我々は、新規脱細胞化法として圧力印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高压処理法を考案し、脱細胞化組織の調製を検討している。これまで、本手法により調製した脱細胞化血管を用いた同種移植試験では、早期の内皮化および内膜肥厚抑制が示された。しかしながら、超高压処理法の処理条件の最適化はなされておらず、また、タンパク質の

A. 研究目的

再生医療の要素技術の一つであるスキャフォールドに関する研究は、従来、材料工学的にはスポンジ状あるいは繊維集合体に加工した生体吸収性材料の開発が進められている。また、組織移植医療の側面からのスキャフォールドの開発研究も進められている。その背景として組織移植医

圧力変性も報告されている。本年度は、種々の超高压処理条件での脱細胞化について、より詳細に検討するとともに、循環器系組織や角膜組織等の早期の臨床応用を図るべく、動物移植実験にて検討した。また、ヒト組織の利用についても検討した。

B. 研究方法

B-1. 循環器系組織

脱細胞化処理: 食用ブタあるいはミニブタ大動脈を冷間等方加圧装置Dr. CHEF((株)神戸製鋼所)を用いて、10,000気圧下10分間の超高压処理を行った。その後、DNase I含有EGM-2(FBS非添加)を用いた振盪洗浄にて2週間、エタノール溶液にて3日間、PBSにて3日間、計20日間振盪洗浄を行い、細胞残渣を除去した。

動物移植用試料は、凍結乾燥後、真空オーブン内で120℃にて24時間静置することで熱架橋処理を施し、続けてエラスターゼ溶液中で37℃にて振盪処理することによって、エラスチンを分解除去した。洗浄後、さらに80%エタノール水溶液中で37℃にて振盪処理することによって、リン脂質を抽出除去した。

また、小口径血管を作成するための抗血栓性改善策として、ヘパリン化の検討も行った。超高压脱細胞化大動脈を1晩凍結乾燥させ、ヘパリン溶液に48時間浸漬した。

さらに、組織バンクに提供されながら医学的理由にて臨床応用できないヒト組織の利用について検討した。

得られた試料は組織学的に観察するとともに、生化学的評価ならびに力学的評価に供した。

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、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SMA(平滑筋細胞)、及びKOS SA染色(石灰化)等によって組織学的所見を検討した。

滅菌試験: -80℃にて凍結させた大動脈を凍結乾燥して用いた。その後、25kGyおよび50kGyのγ線照射を行った。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に浸漬し復元後に元の状態に戻るかどうか検討した。

B-2. 角膜組織

脱細胞化処理: 成体ブタ眼球は東京芝浦臓器株式会社より入手した。冷間等方加圧装置, Dr. CHEF((株)神戸製鋼所)を用い、10℃または30℃にて10,000気圧の超高压印加処理を10分間行った後、直ちにDextranおよびDNase Iを含むEGM-2培地(DEX/EBM)による振盪洗浄を37℃、5%CO₂下にて72時間行い、細胞残渣を除去した。

循環器系組織と同様に、組織学的に観察するとともに、生化学的評価ならびに力学的評価に供した。また、透明性の回復試験として、グリセロールによる浸透圧の調節を行い、透過性を評価した。

移植実験: ブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植実験を行った。日本白色家兎の角膜を一部切開し、角膜実質層に約4mm辺のポケットを作製し、直径約2mm×厚み0.16mmの脱細胞化角膜を挿入した。比較対象としては、未処理のブタ角膜を用いた。

B-3. 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、各研究者所属施設の実験動物委員会等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。

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、各研究者所属施設の倫理委員会等から承認を得た。さらに、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

C-1. 循環器系組織

脱細胞化処理:種々の施圧条件にて超高压脱細胞化処理を行った大動脈組織片をHE染色した。いずれの施圧条件においても、細胞核は観察されなかったが、ECM構造に差異が認められ、昇・減圧速度2,000気圧/分では、開始温度に依らず、組織中央部のコラーゲン線維間の間隙が拡がり、開始温度5、20℃、昇・減圧速度666気圧/分でも線維間は広く、開始温度30℃、昇・減圧速度666気圧/分のみにて、中央部の間隙が維持された(図1)。

異なる施圧条件にて超高压脱細胞化処理を行った大動脈の力学特性を検討した。超高压処理時の開始温度が低い程、エラスチン、コラーゲンの弾性率に昇・減圧速度が影響する傾向が見られた。

超高压脱細胞化大動脈へのヘパリンの含浸と徐放については、ヘパリン溶液含浸後の重量と乾燥重量の差とヘパリン溶液濃度から大動脈の含有ヘパリン量を求めた。溶出試験開始後6~8時間後で、ヘパリン含浸大動脈、ヘパリン含浸後再び超高压印加処理した大動脈ともに約3.0mg以上のヘパリンが溶出した。その後は溶出量の増加が見られなかった(図2)。

脱細胞化処理におけるヒト組織の細菌培養試験を検討した。いずれの組織も、ドナーから摘出された時点で細菌感染が確認されたため、臨床使用に適さないと判断された。解凍直後に採取した小片から細菌が検出された試料を含む組織に対して、超高静水压印加処理を施し、脱細胞化処理が完了した後に再び細菌検査を行った結果、いずれの試料からも細菌は検出されなかった。超高静水压印加処理によって感染細菌類が不活化され、続く洗浄過程で組織外部へ除去されたものと考えられた(表1)。

移植実験:ミニプタ大動脈に置換移植した再生型血管は、移植12ヶ月後には移植組織全域が再細胞化されていることが確認された。しかし、正常部位に比較して明瞭な層構造は認めなかった。石灰化はほとんど認めなかった(図3)。

滅菌試験:組織学的評価について、凍結乾燥処理を施さない大動脈へのγ線照射群においては、照

射による組織間隙の若干の拡大が示された。組織間隙は、25kGy照射大動脈に比べ50kGy照射大動脈にて拡大傾向にあった。乾燥した大動脈へのγ線照射群においては組織間隙の拡大は顕著であり、25kGy照射においても組織損傷が強く示された(図4)。

C-2. 角膜組織

脱細胞化処理:

国内外における脱細胞化組織研究の主流は、界面活性剤やタンパク質分解酵素等の薬液処理による脱細胞化法である。Toriton X-100、コール酸ナトリウムでは、角膜実質層、上皮層のいずれの層においても青色に染色された細胞核が確認され、ほとんどの細胞が除去されていないことが明らかとなった。SDSの場合、上皮層部のほとんどの細胞は除去されていたが、実質層では細胞の残存が示された。また、コラーゲン繊維の配向は大きく乱れ、コラーゲン繊維の切断および空隙の拡大が観察された。これらに対して、超高压処理法では細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れも観察されなかった(図5)。

グリセロールによる透明性の回復について検討したところ、超高压脱細胞化角膜は、移植時における透明性回復の可能性を示した(図6)。

脱細胞化角膜は、未処理角膜に比して若干の弾性率の低下が認められたが、グリセロール浸漬後の脱細胞化角膜では、未処理角膜とほぼ同程度の弾性率を示した。

移植実験:移植直後および1週間後では、脱細胞化角膜は白濁しており、未処理角膜は透明であった。移植4週間後には、脱細胞化角膜は透明になっていたが、移植部周辺にて若干の炎症が認められた。一方の未処理角膜では強い炎症による浮腫と血管の遊走が認められた。さらに、移植8週間後では、脱細胞化角膜の透明状態は維持されており、移植部周辺の炎症反応認められなかった。一方、未処理角膜では強い免疫応答が続いており、炎症に伴う血管の遊走が認められた(図7)。

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本も出荷している(2003年度、同社年次報告)。しかしながら、それでも提供数は不足している状態にある。これらの解決のために、異種組織を用いた組織再生の研究が行われている。再生型心臓弁移植では、組織内の細胞成分を界面活性剤にて除去したブタ脱細胞化肺動脈弁の臨床応用例が、ドイツ・フンボルト大学のグループにて、既に100例以上報告されている。しかし、動脈組織での成功例は未だ報告されていない。

我々は、特に動脈組織を対象として脱細胞化循環器系組織の開発を行ってきた。これまでの超高静水圧処理にて脱細胞化処理した心臓弁や血管のミニブタ同種移植実験の結果から、肺動脈組織では優れた成績を認めたものの、大動脈組織では移植後の石灰化を認めた。この原因については未だ詳細は不明であるが、不適切な脱細胞化処理条件による組織の損傷や変性の可能性が考えられた。

本年度は、超高压処理法における処理条件の脱細胞化率、組織構造及び力学特性への影響について詳細に検討するとともに、エラスチン繊維を除去した血管の動物移植実験を行った。その結果、処理条件によっては、組織への損傷や力学特性の変化をもたらすことがわかった。今後は、最も正常組織の特性を保存している処理条件を適用する予定である。一方、エラスチンを除去した組織は、速やかに自己組織化される優れた再生能を示した。これについても、早期の臨床応用を図りたいと考えている。

前述のようにドイツでは異種組織の臨床応用が行われている。本研究では、まず、ヒト組織の利用を想定している。組織バンクでは、細菌感染を理由に移植適応外と判断された組織が存在しており、さらには、感染しているにも関わらず検出されなかった細菌類が、移植後に不全の原因となった事例も報告されている。我々の開発した処理方法によって、細菌感染組織を滅菌することが可能であり、高い安全性を確保することが可能であると考えられた。このため、再生型置換弁として臨床応用出来る可能性は高いと示唆された。

本年度は、さらに、脱細胞化技術の角膜組織への展開を図っている。超高压処理法にて角膜を脱細胞化した結果、ほぼ完全な細胞除去と生体角膜に類似する力学特性を有する脱細胞化角膜が得

られた。ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植試験では、約8週間後においても炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。今後、長期間の移植を検討し、早期の臨床応用を展開したいと考えている。

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循環器系組織ならびに角膜組織は、完全な脱細胞化を達成するとともに、優れた力学特性を維持していた。また、動物移植実験からは、炎症を抑え、速やかな自己組織化を示していた。いずれの組織とも、早期の臨床応用を目指したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤里俊哉、北村惣一郎、心臓弁、後 義人監修、再生医療工学の技術、シーエムシー出版、2007; 142-7.
- 2) Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam K, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery. *J Artif Organs* 2007; 10: 104-8.
- 3) Nam K, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials* 2007; 28: 3153-62.
- 4) Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization. *Control Rel Soc Newslet* 2007; 24(2): 10-1.
- 5) Nam K, Kimura T, Kishida A. Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents. *Macromol Biosci* 2008; 8: 32-7.
- 6) 木村 剛、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月 學、岸田晶夫、小林尚俊。脱細胞化角膜の特性とin vivo生体適合性評価。東京医科歯

- 科大学生体材料工学研究所年報 2008; 41: 15-7.
- 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. High Press Biosci Biotech 2007; 1(1): 161-5.
- 8) 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.
2. 学会発表
- 1) Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Cross-linking and polymer immobilization of decellularized blood vessel for bioscaffold application. Transactions of the 32nd Annual Meeting of Society for Biomaterials 2007; 817.
- 2) Fujisato T, Funamoto S, Yoshida K, Yamaoka T, Kimura T, Kikuchi M, Kobayashi Y, Kishida A, Nakatani T. Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation. Transactions of the 32nd Annual Meeting of Society for Biomaterials 2007; 860.
- 3) 江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉. 脱細胞化筋スキャフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導. 生体医工学 2007; 45(Suppl 1): 108.
- 4) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、永谷憲歳、岸田晶夫、藤里俊哉、中谷武嗣. 生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発. 生体医工学 2007; 45(Suppl 1): 191.
- 5) 寺田堂彦、澤田和也、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、永谷憲歳、藤里俊哉、中谷武嗣、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫. 生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発. Polymer Preprints, Japan 2007; 56(1): 2111.
- 6) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki Y, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
- 7) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the vascular graft having an in situ repopulation. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
- 8) Ehashi T, Nagaya N, Hashimoto S, Fujisato T. Effect of stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
- 9) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model. Abstract book of The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting 2007; 323.
- 10) 寺田堂彦、藤里俊哉. 移植用生体弁の力学評価. Fiber Preprints, Japan 2007; 62(2 Symposia): 15.
- 11) 藤里俊哉、菊地正博、坂下哲哉、舟山知夫、小林泰彦、船本誠一、木村 剛、岸田晶夫、山岡哲二. 放射線照射による脱細胞バイオスキャフォールドの調製. 第2回高崎量子応用研究シンポジウム要旨集 2007; 185.
- 12) 藤里俊哉、寺田堂彦、吉田謙一、澤田和也、湊谷謙司、江橋 具、庭屋和夫、永谷憲歳、山岡哲二、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生型組織移植用の脱細胞化スキャフォールドの開発. 第6回日本組織移植学会雑誌 2007; 6(1): 62.
- 13) Ito Y, Kimura T, Higami T, Fujisato T, Kato A, Masuzawa T, Kishida A. Cell Culture on Nano-Vibrating Surface for Controlling Cell Function. Tissue Eng 2007; 13(7): 1648-9.
- 14) Kimura T, Okada M, Furuzono T, Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A. Cellular Delivery of DNA-Polymer Complex Encapsulating Inorganic Nanoparticles Prepared by Ultra High Pressurization. Tissue Eng 2007; 13(7): 1652.
- 15) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the Regenerative Vascular

- Graft having in In vivo Repopulationality. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1673.
- 16) Murakoshi A, Kimura T, Funamoto S, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kishida A. Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue Using Ultra High Hydrostatic Pressurization. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1680.
 - 17) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kishida A. Implantation of porcine cornea decellularized by ultra high pressurization to rabbit cornea. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1709-10.
 - 18) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel cell seeding method for the tissue-derived acellular scaffolds. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1735.
 - 19) Miskon A, Terada D, Ehashi T, Fujisato T, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T. Preliminary Study of In Vitro Niche Effect on Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cell to Cardiomyocytes-Like Cells. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1746.
 - 20) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Preparation and characterization of cornea decellularized by ultra high pressurization. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1746-7.
 - 21) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、南 広祐、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. 第15回生物関連高压研究会 20周年記念シンポジウム要旨集 2007; P-1.
 - 22) 寺田堂彦、藤里俊哉、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生型生体弁の特性評価. 日本機械学会2007年度年次大会講演論文集 2007; 5: 291-2.
 - 23) 大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. 筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化. 抄録CD.
 - 24) 林 宏行、山崎健一、小林裕之、宇戸禎仁、江橋 具、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御. 第5回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2007; 103.
 - 25) 山崎健一、林 宏行、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御. 第18回バイオフロンティア講演会講演論文集 2007; 23-4.
 - 26) 近藤英雄、北 孝之、山崎健一、寺田堂彦、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた骨格筋の評価. 第18回バイオフロンティア講演会講演論文集 2007; 29-30.
 - 27) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds by Detergent-Free Treatment. *J Artif Organs* 2007; 36(2): S-14.
 - 28) Yamasaki K, Hayashi H, Uto S, Ehashi T, Hashimoto S, Tsutsui H, Mochizuki S, Kondo H, Yoshiura M, Fujisato T. Control of skeletal muscle cell contraction by electrical pulse. *J Artif Organs* 2007; 36(2): S-37.
 - 29) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Acellular porcine cornea via ultra-high pressurization as a scaffold for regeneration of cornea. *J Artif Organs* 2007; 36(2): S-86.
 - 30) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel Method for Interspersed Cell Inoculation into the Tissue-derived Scaffold. *Artif Organs* 2007; 36(2): S-99.
 - 31) 山崎健一、寺田堂彦、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養. 第10回日本組織工学会抄録集 2007; 62.
 - 32) 船本誠一、橋本良秀、南 広祐、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 組織工学的手法による人工角膜の開発. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 126.
 - 33) 近藤英雄、北 孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 286.
 - 34) 佐々木 愛、柿木佐知朗、馬原 淳、中谷武嗣、

- 山岡哲二. 高親水性高分子を用いた人工血管用
スキュフォールドの作製と評価. 第29回日本バ
イオマテリアル学会大会予稿集 2007; 327.
- 35) 奈良雅尚, 山崎健一, 寺田堂彦, 澤田和也, 近
藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. ポリプロピレン
繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第29回日
本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007;
335.
- 36) 西垣戸麻美, 江橋 具, 山岡哲二, 藤里俊哉.
超高静水圧印加処理による脱細胞神経グラフ
トの作製. 第29回日本バイオマテリアル学会大
会予稿集 2007; 339.
- 37) Fujisato T, Yoshida K, Terada D, Niwaya K,
Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura
S. Tissue-derived Scaffold for Aortic Root
Reconstruction. TERMIS-AP 2007 Program &
Abstract 2007; 124.
- 38) Kimura T, Horiuchi K, Kurata K, Ono T,
Yoshizawa H, Furuzono T, Nam KW, Fujisato T,
Kishida A. Preparation of Condensal Plasmid
DNA Using High Pressure Technology for Gene
Delivery. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract
2007; 138.
- 39) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S,
Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T,
Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A.
Characterization of acellular porcine
cornea by ultra-high pressurization as
artificial cornea. TERMIS-AP 2007 Program &
Abstract 2007; 149.
- 40) Fujisato T, Terada D, Sawada K, Yoshida K,
Kishida A, Miyamoto K, Niwaya K, Nakatani T,
Kitamura S. Evaluation of Acellular
Scaffolds for Heart Valve Regeneration. 1st
Asiam Biomaterials Congress Abstract, 2007;
112.
- 41) Saitoh Y, Katanoda M, Yamada H, Fujisato T,
Kimura T, Kishida A, Takakuda K.
Reconstruction of small diameter arteries
using acellular vessel scaffold. 1st Asiam
Biomaterials Congress Abstract 2007; 250.
- 42) Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki
M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H,
Kishida A. Development of Acellular Cornea
as an Artificial Cornea. 1st Asiam
Biomaterials Congress Abstract 2007; 263.
- 43) Ehashi T, Hashimoto S, Fujisato T. Acellular
Skeletal Muscle Scaffold as an Inducer of
Muscular Differentiation. 1st Asiam
Biomaterials Congress Abstract 2007; 264.
- 44) Kimura T, Horiuchi K, Kurita K, Ono T,
Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A. DNA
condensation using hydrostatic
pressurization for gene delivery. 1st Asiam
Biomaterials Congress Abstract 2007; 302.
- 45) 近藤英雄, 北 孝之, 山崎健一, 寺田堂彦, 橋
本成広, 藤里俊哉. 電気インピーダンス法によ
る骨格筋損傷度の評価の試み. 第20回バイオエ
ンジニアリング講演会講演論文集 2008;
No. 07-49: 173-4.
- 46) 林 宏行, 山崎健一, 宇戸禎仁, 小林裕之, 江
橋 具, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 培養
筋管細胞の収縮動態の定量評価. 第20回バイオ
エンジニアリング講演会講演論文集 2008;
No. 07-49: 297-8.
- 47) 山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 橋本成広, 藤
里俊哉. 無細胞生体由来組織を基材としたバイ
オアクチュエータの開発. 第20回バイオエンジ
ニアリング講演会講演論文集 2008;
No. 07-49: 313-4.
- 48) Fujisato T, Terada D, Funamoto S, Minatoya
K, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T,
Kitamura S. Tissue Regeneration by
Decellularized Biological Scaffold
Prepared by Detergent-free Treatment.
Biologic Scaffold for Regenerative
Medicine, 5th Symposium 2008; 12.
- 49) Kishida A, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto
Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kobayashi H,
Fujisato T. Preparation and
Characterization of Decellularized Porcine
Corenea for the Corneal Tissue Engineering.
Biologic Scaffold for Regenerative
Medicine, 5th Symposium 2008; 63.
- 50) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 湊谷謙司, 山崎健一, 林
宏行, 江橋 具, 小林尚俊, 岸田晶夫, 山岡哲
二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 異種組織をテンプ
レートとする組織再生技術の開発. 第11回異種
移植研究会プログラム・抄録集 2008; 19.
- 51) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 湊谷謙司, 山崎健一, 林

- 宏行、近藤英雄、江橋 具、小林尚俊、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎。生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生。第36回人工心臓と補助循環懇話会プログラム・抄録集 2008; 78.
- 52) 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫。脱細胞化角膜の組織適合性評価。日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 260.
- 53) 村越彩子、木村 剛、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫。力学特性の制御を目指した脱細胞化血管の調製。日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 280.
- 54) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣。脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生。日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 280.
- 55) 玉井克明、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二。血管組織の新規脱細胞化処理法の検討。日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 280.
- 56) 北 孝之、近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉。電気インピーダンス法を用いた培養筋成熟度の評価の試み。日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.
- 57) 奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉。ポリプロピレン繊維-コラーゲンゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養。日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.
- 58) 山崎健一、寺田堂彦、奈良雅尚、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉。脱エラスチン組織-コラーゲンゲル複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養。日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.
- 59) 赤土和也、山崎健一、出谷 耕、中尾 誠、吉浦昌彦、藤里俊哉、筒井博司。骨格筋培養のための機械刺激負荷装置の開発。日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.
- 60) 林 宏行、山崎健一、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉。電界に対する培養筋管細胞の異方性。日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.
- 61) 西山慶子、川北悠介、林 宏行、山崎健一、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉。細胞への電気刺激を目的とした電位分布の測定。日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.
- 62) 近藤英雄、北 孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉。生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の検討。日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 291.
- G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)
- 1) 岸田晶夫、藤里俊哉、木村 剛、船本誠一。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2007-217099、2007年8月23日。
- 2) 岸田晶夫、木村 剛、南 広祐、藤里俊哉。機能性DNAの製造方法、形質転換体及び疾患治療剤。特許出願2007-263704、2007年10月9日。
- 3) 藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎。超高静水圧印加による移植用生体組織の処理方法。特許第4092397号、2008年3月14日。

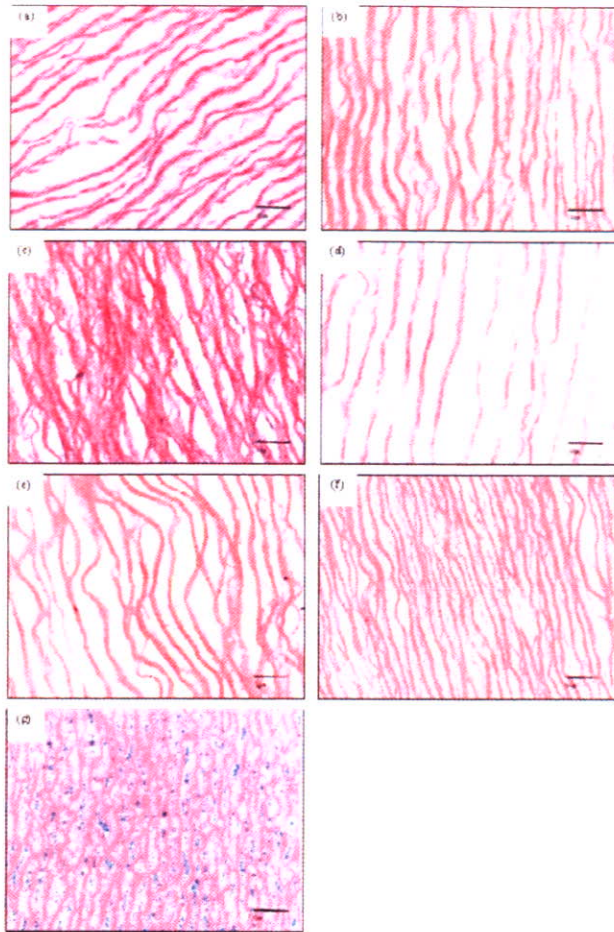


図1. 超高压印加条件によるブタ大動脈組織への影響
 開始温度5℃ : (a) 2,000, (b) 666気圧/分、開始温度20℃ : (c) 2,000, (d) 666気圧/分、
 開始温度30℃ : (e) 2,000, (f) 666気圧/分、(g) 未処理、スケールバー : 50μm

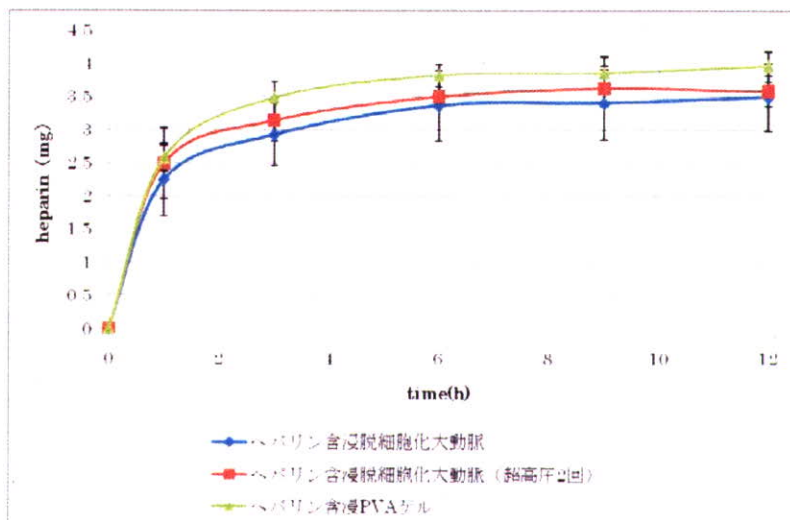


図2. ヘパリン含浸脱細胞化大動脈とヘパリン含浸PVAゲルの溶出試験

表 1. 細菌検査結果

Sample code	Condition	Bacterial examination		
		Before freezed	Defrosted sample	
			Homogenized	Bulk
1	Native	+	-	-
	Decellularized	/	-	-
2	Native	+	+	+
	Decellularized	/	-	-
3	Native	+	-	-
	Decellularized	/	-	-

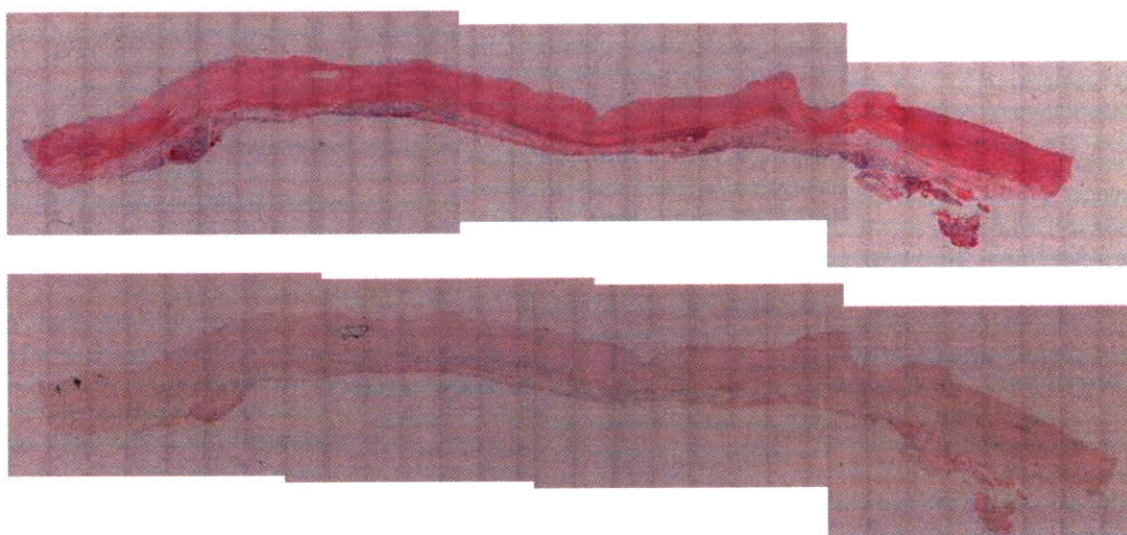


図 3. 移植 12ヶ月後の染色像 (上: HE、下: KOSSA)

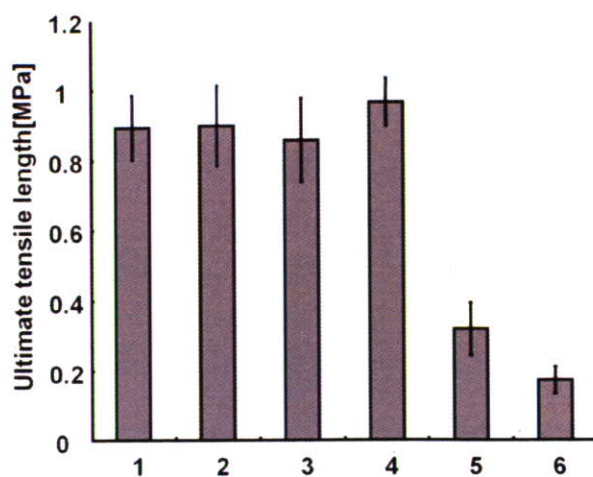


図 4. γ 線照射後のブタ大動脈の破断応力

1) 未処理、2) 25kGy、3) 50kGy、4) 凍結乾燥、5) 凍結乾燥後25kGy、6) 凍結乾燥後50kGy

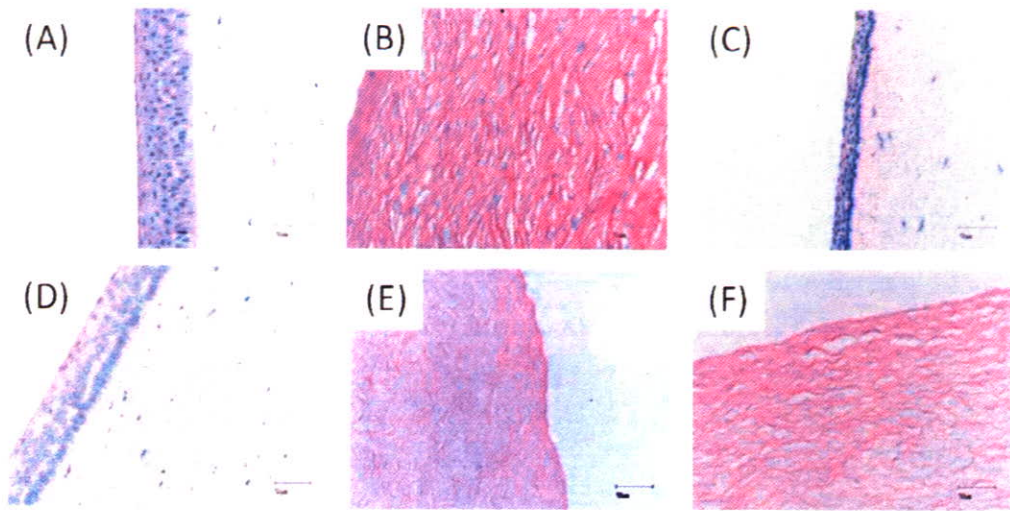


図5. 種々の脱細胞化処理法脱細胞化したブタ角膜のHE染色
 (A) 未処理, (B) SDS, (C) Triton X-100, (D) コール酸ナトリウム, (E) 4000気圧, (F) 10,000気圧

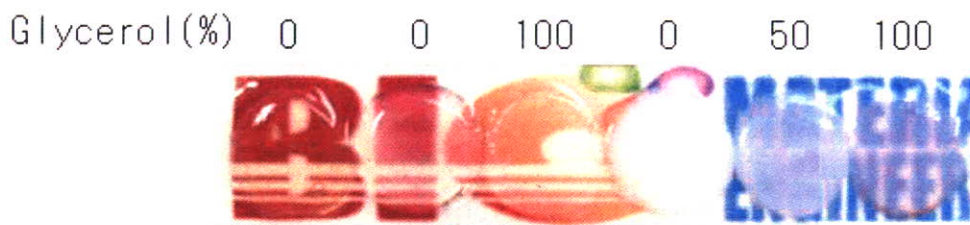


図6. グリセロールによる透明性回復試験

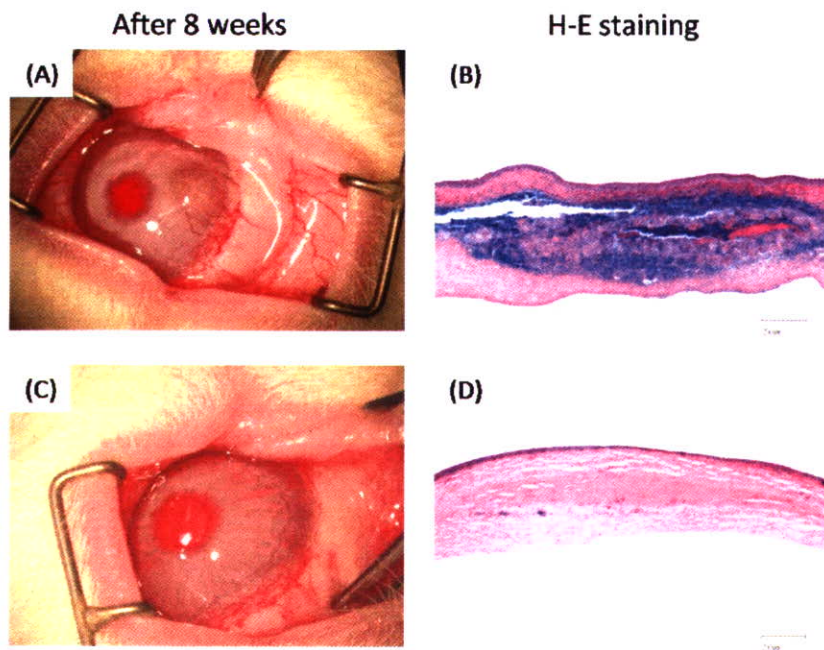


図7. ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植結果(8週間後).
 (A, B) 未処理ブタ角膜, (C, D) 超高压脱細胞化角膜

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

循環器系再生型組織の作製

分担研究者 藤里俊哉 大阪工業大学工学部教授

研究要旨 超高压処理による脱細胞化について詳細に検討した。組織学的評価および力学的評価によって、超高压処理条件による組織への影響を検討した。その結果、組織内部のECM繊維間の間隙を制御することによって、目的に応じた調製が可能であると考えられた。また、新たな非破壊的評価方法として電気インピーダンスによる測定を検討したところ、脱細胞化や組織再生の過程が定量的に評価可能であることが示唆された。

A. 研究目的

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、コラーゲン繊維や弾性繊維、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。これまでにを行った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。本分担研究では、動脈血管からの脱細胞化、そして石灰化抑制のためのエラスチン除去について検討した。

B. 研究方法

脱細胞化処理: 試料として食用ブタの大動脈を用いた。冷間等方加圧装置Dr. CHEF((株)神戸製鋼所)を用いて、10,000気圧下10分間の超高压処理を行った。この時、開始温度(5、10、15、20、25、30℃)、及び、昇・減圧速度(666、1,000、2,000、5,000気圧/分)を種々に組合せて、超高压処理を行った。その後、0.2mg/ml DNase I 含有EGM-2(FBS非添加)を用いた振盪洗浄にて2週間、80%(w/v)エタノール溶液にて3日間、1%(w/v) Penicillin-Streptomycin含有PBS(-)にて3日間、計20日間振盪洗浄を行い、細胞残渣を除去した。

組織学的評価: 未処理、超高压処理後の大動脈の脱細胞化評価を光学顕微鏡観察、透過型顕微鏡(TEM)観察にて行った。光学顕微鏡観察の組織標本は、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行った。また、TEM標本は四酸化オスミウム法にて染色し、TEM観察した。

生化学的評価: 脱細胞化大動脈100mg(湿重量)を、0.1mg/ml プロテナーゼK含有組織溶解液(50mM トリス塩酸塩(pH8.0)、0.5% SDS、0.1M 塩化ナトリウム、1mM EDTA-2Na)にて、55℃下1晩反応させた。フェノール/クロロホルムによるDNA抽出を行い、3M酢酸ナトリウム、3 μ l Ethachinmate(NIPPON GENE)を添加後、イソプロパノールにてDNAを沈殿させた後、70%エタノールにより精製、TE緩衝液に溶解させた。260nm波長での吸光度を測定し、残存DNA量を算出した。

力学的評価: ダンベル型に調製した大動脈サンプルを用いて、力学試験機(クリープメータ RE2-33005B; 株式会社山電)にて単軸引張試験を行った。軸方向は、大動脈の走行方向に対して平行な長軸方向、垂直な円周方向の2軸について行った。破断するまで1mm/秒の速度で引張を行った後、応力-歪曲線を作成し、弾性率、最大破断応力、および最大歪率を計算した。

電気計測評価: 試料を、10×25×5 mmの板状に成形した。試験片を自作のアクリルブロックに設置し、φ0.5のステンレス電極を試験片に刺入した。電圧検出電極両端の電圧を10 mVrms一定のもと、4 Hzから1 MHzの交流電流を与えて各周波数における電気インピーダンスを、ケミカルインピーダンスメータ(3532-80、HIOKI)にて測定した。得られた測定データをPCに保存した後、データ解析を行った。測定は室温環境下(25±1℃)で行った。

C. 研究結果

種々の開始温度、昇圧・減圧速度における超高压処理時の圧力-温度を測定した(図1)。開始温度5、10、15、20℃では、いずれの昇・減圧速度でも、圧力変動時、及び、10,000気圧保持時での温度が氷点を下回った(図1. a-d)。また、開始温度25℃、昇・減圧速度666気圧/分では、10,000気圧保持時に氷点を下回ったが、2,000気圧/分では、昇圧時に過度に加温された(図1. e)。開始温度30℃では、2,000気圧/分の速度で過度な加温が見られたものの、666気圧/分、及び、1,000気圧/分においては、昇圧時の過度の温度上昇も、超高压処理時中に各気圧の氷点を下回ることもなく、常に液相の温度を維持した(図1. g)。

上述の各施圧条件にて超高压脱細胞化処理を行った大動脈組織片をHE染色した(図2)。いずれの施圧条件においても、細胞核は観察されなかった。これはTEM観察でも確認された(図3)。しかし、ECM構造に差異が認められ、昇・減圧速度2,000気圧/分では、開始温度に依らず、組織中央部のコラーゲン線維間の間隙が拡がり(図2. a, c, e)、開始温度5、20℃、昇・減圧速度666気圧/分でも線維間は広く(図2. b, d)、開始温度30℃、昇・減圧速度666気圧/分のみにて、中央部の間隙が維持された(図2. f)。

異なる施圧条件にて超高压脱細胞化処理を行

った大動脈の力学特性を検討した(図4)。開始温度5℃は、応力・歪率への影響は小さかったが、エラスチン、コラーゲンに昇・減圧速度が強く影響し、コラーゲンの硬化が見られた。開始温度20℃では、昇・減圧速度2,000気圧/分は、コラーゲンの弾性率が大きく減少し、応力が減少し、歪率が増加した。666気圧/分では、弾性率に有意差はないが、応力が増加し、歪率が減少した。開始温度30℃では、昇・減圧速度1,000気圧/分は、エラスチンの弾性率が増加し、コラーゲンの弾性率が減少し、応力・歪率が減少した。2,000気圧/分は、エラスチンの弾性率が減少したが、応力・歪率への影響は小さかった。以上の結果から、超高压処理時の開始温度が低い程、エラスチン、コラーゲンの弾性率に昇・減圧速度が影響する傾向が見られた。

新たな非破壊的評価方法として電気インピーダンスによる測定を検討した。1 kHz時の電気インピーダンスを測定したところ、未処理組織(Native)に比べて、超高压処理による脱細胞化組織(Powergraft)では低い値を示した。(図5)。

D. 考察

本研究では、超高压処理法における処理条件の脱細胞化率、組織構造及び力学特性への影響について詳細に検討した。処理条件の開始温度(5-30℃)、及び、昇・減圧速度(666, 1000, 2000気圧/分)を種々に組合せてブタ大動脈の脱細胞化処理を施した。HE染色による組織学的評価、及び、残存DNA定量では、いずれの条件においても十分な脱細胞化が達成されていることが明らかとなった(図2)。特に、これまでに報告されている界面活性剤を用いた洗浄法では薬剤の浸透率が脱細胞化に強く影響し、組織深部での脱細胞化率・再現性の低下が問題となっているが、本超高压処理法においては組織深部での高い脱細胞化率・再現性が得られ、本手法の有用性が示された。また、コラーゲン繊維の間隙は、超高压処理条件に強く影響されることが示された(図2)。超高压処理では昇圧時には昇温、減圧時には降温し、また、氷点は圧力により変化するため、施圧時の温度変化がコラーゲン繊維間隙に影響すると仮定し、上述の各超高压処理条件での圧力-温度変化を調査した。開始温度20℃以下では昇・減圧速度に依らず超高压時に氷点を下回り、25℃以上では氷

点を下回らないものの高い昇圧速度ではタンパク質変性温度以上になることが示された。施圧時に氷点以下となる処理条件ではコラーゲン繊維間隙は拡大し、氷点以上、変性温度以下を維持する開始温度30℃、昇・減圧速度666気圧/分にてコラーゲン繊維間隙に変化が示されないことから、超高压処理条件とコラーゲン繊維間隙との相関傾向が示された。これは、対象移植組織の目的に応じたスキャフォールドを作製できる点で有用な知見と考えられる。次に、超高压処理条件の力学特性への影響について検討した(図4)。エラスチン及びコラーゲンの弾性率は、いずれの昇・減圧速度においても、開始温度5、20℃の超高压処理にて著しい変化が示されたが、開始温度30℃ではその変化は小さいものであった。特に、666気圧/分の昇・減圧速度の施圧では弾性率・最大破断応力・歪率とも未処理大動脈と同程度であり、図2のHE染色所見と一致した。超高压処理の減圧時に氷点以下になることでタンパク質が変性する可能性が報告されており、本研究においても同様の傾向が示された。しかしながら、エラスチン及びコラーゲンの弾性率の増減が処理条件により異なることから、施圧条件によるタンパク質変性の詳細な検討が必要である。

本研究では、脱細胞化の新たな評価法として、電気インピーダンス測定について検討した。一般的に、生体組織においては組織内の水分量が高くなるにつれて電気インピーダンスが低くなると報告されている。脱細胞化が進むにつれ、重量が減少し、含水率が上昇するため、未処理組織に比べて脱細胞化組織のインピーダンスは低下したと考えられる。よって、電気インピーダンスの測定によって脱細胞化組織の水分状態を推測し、組織構造の変化を定量的に評価することが可能であると考えられる。また、生体外あるいは移植後の再生過程は、脱細胞化処理とは逆過程であるため、電気インピーダンス測定は組織再生の評価にも使用できる可能性がある。

E. 結論

超高压処理による脱細胞化は、大動脈のような弾性組織においても、完全な脱細胞化が可能であることが示された。加えて、超高压処理条件を変えることで、組織内部のECM繊維間の間隙を制御することが可能であることも示された。目的に応

じた調製が可能であると考えられる。また、脱細胞化組織の電気インピーダンスを測定した結果、脱細胞化によって電気インピーダンスは低下することがわかった。電気インピーダンスは基質構造の変化に伴う水分状態の変化を捉えていることが示唆され、電気インピーダンス法により脱細胞化および組織再生過程を非破壊的に評価可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤里俊哉、北村惣一郎、心臓弁、篠 義人監修、再生医療工学の技術、シーエムシー出版、2007; 142-7.
- 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.
- 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.

2. 学会発表

- 1) Fujisato T, Funamoto S, Yoshida K, Yamaoka T, Kimura T, Kikuchi M, Kobayashi Y, Kishida A, Nakatani T. Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation. Transactions of the 32nd Annual Meeting of Society for Biomaterials 2007; 860.
- 2) 江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉. 脱細胞化筋スキャフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導. 生体医工学 2007; 45(Suppl 1): 108.
- 3) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、永谷憲歳、岸田晶夫、藤里俊哉、中谷武嗣. 生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発. 生体医工学 2007; 45(Suppl 1): 191.
- 4) 寺田堂彦、澤田和也、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、永谷憲歳、藤里俊哉、中谷武嗣、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫. 生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発. Polymer

- Preprints, Japan 2007; 56(1): 2111.
- 5) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the vascular graft having an in situ repopulationality. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
 - 6) Ehashi T, Nagaya N, Hashimoto S, Fujisato T. Effect of stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
 - 7) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model. Abstract book of The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting 2007; 323.
 - 8) 寺田堂彦、藤里俊哉. 移植用生体弁の力学評価. Fiber Preprints, Japan 2007; 62(2 Symposia): 15.
 - 9) 藤里俊哉、寺田堂彦、吉田謙一、澤田和也、湊谷謙司、江橋 具、庭屋和夫、永谷憲歳、山岡哲二、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生型組織移植用の脱細胞化スキャフォールドの開発. 第6回日本組織移植学会雑誌 2007; 6(1): 62.
 - 10) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T. Development of the Regenerative Vascular Graft having in In vivo Repopulationality. Tissue Eng 2007;
 - 11) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel cell seeding method for the tissue-derived acellular scaffolds. Tissue Eng 2007; 13(7): 1735.
 - 12) 寺田堂彦、藤里俊哉、中谷武嗣、北村惣一郎. 再生型生体弁の特性評価. 日本機械学会2007年度年次大会講演論文集 2007; 5: 291-2.
 - 13) 大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. 筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化. 抄録CD.
 - 14) 林 宏行、山崎健一、小林裕之、宇戸禎仁、江橋 具、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御. 第5回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2007; 103.
 - 15) 山崎健一、林 宏行、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御. 第18回バイオフィロンティア講演会講演論文集 2007; 23-4.
 - 16) 近藤英雄、北 孝之、山崎健一、寺田堂彦、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた骨格筋の評価. 第18回バイオフィロンティア講演会講演論文集 2007; 29-30.
 - 17) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds by Detergent-Free Treatment. J Artif Organs 2007; 36(2): S-14.
 - 18) Yamasaki K, Hayashi H, Uto S, Ehashi T, Hashimoto S, Tsutsui H, Mochizuki S, Kondo H, Yoshiura M, Fujisato T. Control of skeletal muscle cell contraction by electrical pulse. J Artif Organs 2007; 36(2): S-37.
 - 19) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T. Novel Method for Interspersed Cell Inoculation into the Tissue-derived Scaffold. Artif Organs 2007; 36(2): S-99.
 - 20) 山崎健一、寺田堂彦、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養. 第10回日本組織工学会抄録集 2007; 62.
 - 21) 近藤英雄、北 孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 286.
 - 22) 奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 335.
 - 23) Fujisato T, Yoshida K, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue-derived Scaffold for Aortic Root Reconstruction. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract 2007; 124.
 - 24) Fujisato T, Terada D, Sawada K, Yoshida K,

- Kishida A, Miyamoto K, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration. 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract, 2007; 112.
- 25) Ehashi T, Hashimoto S, Fujisato T. Acellular Skeletal Muscle Scaffold as an Inducer of Muscular Differentiation. 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract 2007; 264.
- 26) 近藤英雄、北 孝之、山崎健一、寺田堂彦、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法による骨格筋損傷度の評価の試み. 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 2008; No. 07-49: 173-4.
- 27) 林 宏行、山崎健一、宇戸禎仁、小林裕之、江橋 具、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 培養筋管細胞の収縮動態の定量評価. 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 2008; No. 07-49: 297-8.
- 28) 山崎健一、寺田堂彦、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を基材としたバイオアクチュエータの開発. 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 2008; No. 07-49: 313-4.
- 29) Fujisato T, Terada D, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Decellularized Biological Scaffold Prepared by Detergent-free Treatment. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium 2008; 12.
- 30) 藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司、山崎健一、林宏行、江橋 具、小林尚俊、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎. 異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発. 第11回異種移植研究会プログラム・抄録集 2008; 19.
- 31) 藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司、山崎健一、林宏行、近藤英雄、江橋 具、小林尚俊、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎. 生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生. 第36回人工心臓と補助循環懇話会プログラム・抄録集 2008; 78.
- 32) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣. 脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生. 日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 280.
- 33) 北 孝之、近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた培養筋成熟度の評価の試み. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.
- 34) 奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. ポリプロピレン繊維-コラーゲンゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.
- 35) 山崎健一、寺田堂彦、奈良雅尚、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 脱エラスチン組織-コラーゲンゲル複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 285.
- 36) 赤土和也、山崎健一、出谷 耕、中尾 誠、吉浦昌彦、藤里俊哉、筒井博司. 骨格筋培養のための機械刺激負荷装置の開発. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.
- 37) 林 宏行、山崎健一、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 電界に対する培養筋管細胞の異方性. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.
- 38) 西山慶子、川北悠介、林 宏行、山崎健一、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 細胞への電気刺激を目的とした電位分布の測定. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.
- 39) 近藤英雄、北 孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の検討. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 291.
- G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)
- 1) 藤里俊哉、岸田晶夫、船本誠一、中谷武嗣、北村惣一郎. 超高静水圧印加による移植用生体組織の処理方法. 特許第4092397号、2008年3月14日.

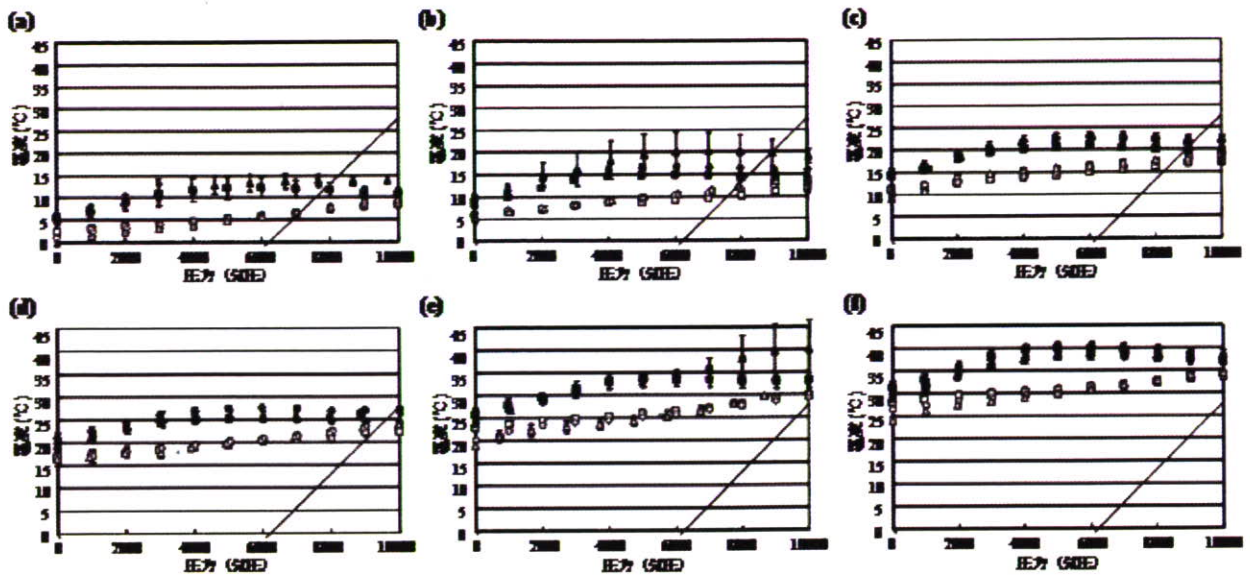


図1 各開始温度ごとの超高压印加処理中の温度変化と氷点との比較
 (a) 開始温度5°C (b) 開始温度10°C (c) 開始温度15°C (d) 開始温度20°C (e) 開始温度25°C (f) 開始温度30°C
 ■-666気圧/分(加圧時) ◆-1,000気圧/分(加圧時) ▲-2,000気圧/分(昇圧時) —水の氷点
 □-666気圧/分(減圧時) ◇-1,000気圧/分(減圧時) △-2,000気圧/分(減圧時)

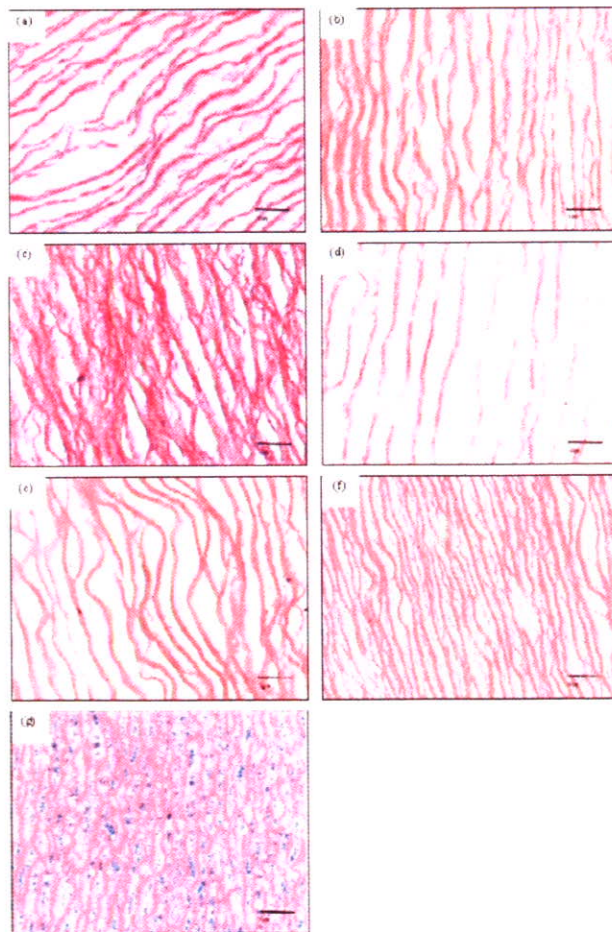


図2. 超高压印加条件によるブタ大動脈組織への影響
 開始温度5°C : (a) 2,000, (b) 666気圧/分、開始温度20°C : (c) 2,000, (d) 666気圧/分、
 開始温度30°C : (e) 2,000, (f) 666気圧/分、(g) 未処理、スケールバー : 50μm

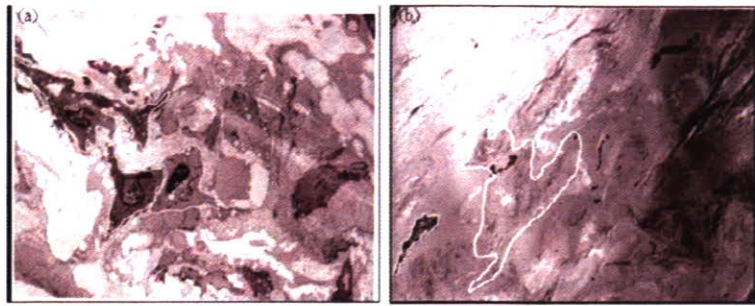


図3. 脱細胞化処理ブタ大動脈の組織構造 (TEM: 2000倍)

(a)未処理、(b)超高压処理

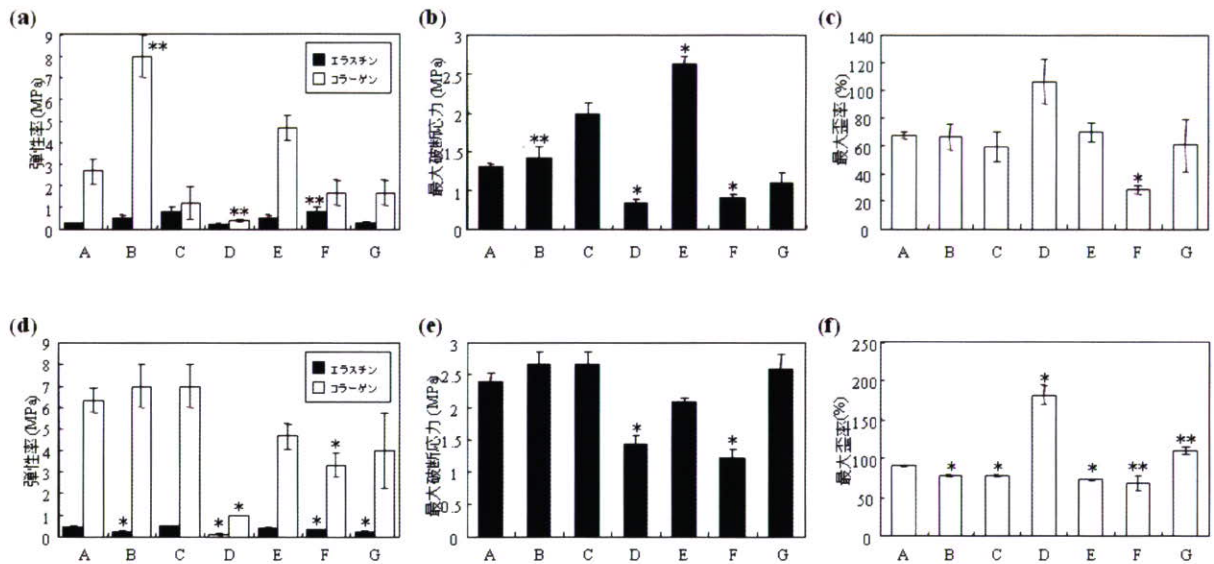


図4. 超高压印加処理の違いによるブタ大動脈の力学特性の変化

(a)弾性率 (長軸方向), (b)最大破断応力 (長軸方向), (c)最大歪率 (長軸方向)

(d)弾性率 (短軸方向), (e)最大破断応力 (短軸方向), (f)最大歪率 (短軸方向)

A:未処理、B:超高压処理 (5°C, 2000気圧/分)、C:超高压処理 (5°C, 666気圧/分)、

D:超高压処理 (20°C, 2000気圧/分)、E:超高压処理 (20°C, 666気圧/分)、

F:超高压処理 (30°C, 2000気圧/分)、G:超高压処理 (30°C, 666気圧/分)、* $P < 0.01$, ** $0.01 < P < 0.05$