

図5. インピーダンス測定結果

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in vitro評価

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 超高压処理法にて得られた脱細胞化血管の新しい加工法について検討を行った。これにより、複雑な構造でも造形する必要がなく、あるいは生体と同等の力学特性を有する再生医療用素材を高機能化することができると考えられる。本年度は、血液適合性の向上を目的に、代表的な血液凝固抑制剤であるヘパリンの応用について詳細に検討した。ヘパリン徐放に関する基礎的検討を行うため、PVAゲルをモデルとして選択した。ヘパリン含有PVAゲルからのヘパリン溶出において、重合度が強く影響し、高重合度のPVAゲルにてヘパリン溶出の遅延が示された。重合度1700以上のPVAゲルにおいては、凍結融解ゲルと比較して超高压誘起PVAゲルのヘパリン溶出遅延が示された。また、脱細胞化大動脈にヘパリンを含浸することで、脱細胞化大動脈からのヘパリン溶出を約6時間継続することが可能であった。

A. 研究目的

循環器系疾患の代表的な治療法に血管修復術があり、冠動脈バイパス術は年間約2万件実施されている（米国では50万件）。現在血管修復術に用いられている代替血管には、異所性の自家血管、同種血管および合成人工血管である。

最も一般的に行われているのは自家血管の代替である。自家血管は、免疫系を活性化せずに高い開存性を示す特徴をもち、現在、自家内胸動脈、自家静脈が多く用いられている。しかし、自家血管にはサイズ、数の適用制限がある。同種血管は比較的感染に耐性があり、血栓塞栓性合併症が最小限に抑えられ、抗凝固処理を必要としない。同種血管としては、同種静脈グラフト、ヒト臍帯静脈がよく使用され、自家細胞を静脈に播種する方法も検討されている。しかし、石灰化、動脈瘤膨張、耐久性、提供不足が問題である。免疫抑制剤を用いた炎症反応と血栓形成の抑制により、開存性を保つことが問題として残っている。

合成高分子人工血管は、1952年にボーヒースらがVinylonを用いて初めて臨床での人工血管移植を行って以来、種々の合成高分子人工血管が開発

されている。現在では、ePTFEの布製人工血管が用いられ、大口径血管の開存性、耐久性に関しては、臨床レベルでほぼ満足できる状況にある。しかし、小口径においては、自家血管を越える人工血管は開発に至っておらず、また、内膜肥厚、長期埋入による石灰化、劣化、再狭窄の発症、長期耐久性不足、および小口径部位での早期の塞栓形成等がいずれの口径においても大きな問題として残っている。

これらの問題に対して、近年では、再生医療技術による人工血管の開発が検討されている。上述の既製の合成高分子人工血管を用いる非分解性人工血管によるアプローチと、分解性材料を細胞足場（スキャホールド）として細胞浸潤により血管を再構築する再生型人工血管によるアプローチに大別できる。前者は、人工血管への自家細胞の播種や体内への埋入による偽内膜形成化人工血管が検討されるが、現在の研究開発の主流は、後者の再生型人工血管である。使用される分解性材料では、ポリグリコール酸（PGA）、ポリジオキサン、ポリラクチドが生体吸収性材料としてFDA（Food and Drug Administration）に認可さ

れている。PGAは最も一般的に使用されている生分解性ポリマーであり、高い空隙率を持つために栄養の拡散、血管新生を容易にし、さまざまな形状に操作することが可能だという長所がある。PGAの欠点は6~8週間の早さで生体に吸収されてしまうことと、組織の圧力に耐えられないことが挙げられる。これらの欠点克服を目的としてポリヒドロキシアルカノエート (PHA)、ポリ-4-ヒドロキシ酪酸塩 (P4HB)、ポリ-L-乳酸 (PLLA)、ポリエチレングリコール (PEG) などが共重合体として用いられている。生分解性材料を用いた人工血管の最初の臨床応用はShin'okaらによって2001年に報告された。編みこみPGAで強化されたポリカプロラクトンとポリ乳酸の共重合体チューブに末梢静脈から採取した細胞を播種した。そのグラフトを4歳児の閉塞した肺動脈置換使用し、移植7ヶ月後でもグラフトの閉塞や動脈瘤形成は認められなかった。

また、生体由来タンパク質であるフィブリン、コラーゲン、ゼラチン等により形成されるゲルがスキャフォールドとしての応用が検討されている。しかし、血圧に耐え得る力学特性を有するスキャフォールドは開発されていない。

上述の生分解性ポリマーおよび生体由来タンパク質からのビルドアップによるスキャフォールドは、それらの構造が生体組織と大きく異なり、生体組織特有の弾性や進展性等の力学特性が再現されない。このことから、生体組織の利用が検討されている。異種血管は、動脈瘤形成 (3~29%)、感染 (3~6%) や、高頻度で血栓症が起きるために、長期間使用には向いていない。生体組織に含まれる細胞成分が免疫源となることから、細胞の不活化あるいは除去が必要となる。従来から、グルタルアルデヒドを用いた細胞の固定化により不活化した心臓弁が臨床で用いられているが、石灰化などによる構造的劣化に加え、その5~10年の低い耐久性が問題になっている。このことから、最近では、細胞を除去し、残存する細胞外マトリックス (ECM) のみを利用する脱細胞化組織に関する研究が精力的に進められている。

最も一般的に使用されている脱細胞化手法は、界面活性剤を使用した化学処理法と物理処理と化学処理の組み合わせである。界面活性剤を使用した化学処理法には、デオキシコール酸、SDS、

TritonX-100が利用される。界面活性剤による細胞膜の破壊、細胞成分の洗浄、免疫原の除去が可能だと考えられている。しかし、界面活性剤は細胞毒性を有し、コラーゲン線維などの細胞骨格の立体構造変化を引き起こす。そのため、界面活性剤の完全な洗浄も必要となる。組織が厚い場合には、界面活性剤が組織深部まで浸透しないことがあり使用できる組織に制限がある。物理処理としては攪拌、超音波処理、機械的マッサージや圧力、凍結融解などがあげられる。これらの物理処理は細胞膜を破壊して細胞内容物を放出させ、ECMからの細胞内容物の除去と洗浄を促進する。しかし、物理処理だけでは完全な脱細胞化には至らないため化学処理との組み合わせが行われる。トリプシンのような酵素処理、界面活性剤などによる化学処理は細胞膜を破壊し、細胞間と細胞外結合の切断を引き起こす。脱細胞化の過程でECMは細胞が試薬に十分にさらされるために分離することが必要であり、組織から細胞成分が取り除かれるための通路を提供しなければならない。ECMの組成、生物学的活性と機械的完全性への不利な影響を最小限にして、すべての細胞、核酸を効果的に除去することが脱細胞化の最終目標である。

我々は、新しい脱細胞化手法として、高圧印加により細胞を破壊し、洗浄によりその残渣を除去する超高压処理法を開発・検討している。超高压印加法は、組織を超高静水压下 (10,000atm) に置くことで脱細胞化することを目的とした物理処理である。静水压条件下で超高压印加が行われるために、生体組織にたいして均等に圧力がかかり組織の立体構造変化が少なく、超高压印加法は既存の脱細胞化手法と比較して組織全体の変性が少ないと考えられている。さらに、組織内の細胞外マトリクス間の水素結合、疎水性相互作用が強固となり、組織の機械的強度が保持されると考えられている。これまで、心臓弁、角膜、骨および大口径血管を対象組織とした脱細胞化を報告しており、心臓弁および大口径血管においては良好な移植成績を収めている。

本研究では、超高压処理法にて得られた脱細胞化血管の新しい加工法について検討を行った。これにより、複雑な構造でも造形する必要がなく、あるいは生体と同等の力学特性を有する再生医療用素材を高機能化することができる。本年度は、血液適合性の向上を目的に、代表的な血液凝

固抑制剤であるヘパリンの応用について詳細に検討した。

B. 研究方法

ヘパリン検量線の作製はtoluidine blue O methodを用いて行った。ヘパリンナトリウムを超純水に溶解し、種々の濃度(0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1mg/ml)のヘパリン溶液を作製した。各濃度のヘパリン溶液200 μ lにtoluidine blue O溶液(toluidine blue O:8.3mg, 0.01N HCl:1ml, 0.2% NaCl:499ml)を2ml添加、ボルテックスによる攪拌後にn-ヘキサンを2ml加え、再び攪拌した。水層とヘキサン層に分離した溶液の水層200 μ lをUV測定し、631nmにおける検量線を作製した。

超高压誘起ヘパリン含有PVA水素ゲルの調製は、各重合度(1000, 1700, 2400, 4000)のPVA1mgを10mlの超純水に溶解したPVA溶液を用いて行った。各PVA溶液にヘパリンナトリウム30mgを加え、攪拌した。十分攪拌すると白濁した層と透明な層に分離した。白濁した層をアクリル製の型(10 \times 10 \times 1.5mm)に封入し、個々の型をユニパックに密閉した。密閉した型を水で満たしたユニパックに入れ、ユニパックをシーリングし、超高压印加処理を行った。超高压印加処理は加圧時間5分、圧力保持時間10分、減圧時間5分、10,000atmで行い、10 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ Cの開始温度を用いて開始温度による溶出挙動変化の検討を行った。

凍結融解法によるヘパリン含有PVA水素ゲルの調製は、超高压誘起PVA水素ゲルと同一のPVA溶液を使用して行った。凍結(-28 $^{\circ}$ C)2時間、融解(23 $^{\circ}$ C)30分を1サイクルとし、8サイクルの凍結-融解を行い、ゲルを調整した。

ヘパリン含有PVA水素ゲルからのヘパリンの徐放は、調整した各重合度(1000, 1700, 2400, 4000)、各条件を用いて行った。SV-50にPVAゲルを10 \times 10mmの面が底につくように入れ、PBS30mlを添加し、37 $^{\circ}$ C振盪下で溶出試験を行った。所定の時間に溶液200 μ lを採取し、採取後にPBS200 μ lを加えた。採取した溶液をtoluidine blue O methodを用いてUV測定し、検量線からヘパリン量を求めた。

超高压脱細胞化大動脈の調製は、ブタ大動脈を使用して行った。ブタ大動脈から脂肪組織を除去し、10 \times 10mmに成形した。成形したブタ大動脈をPBSで満たしたユニパックに封入し、超高压印加

処理を行った。超高压印加処理は加圧時間15分、圧力保持時間10分、減圧時間15分、10,000atm、開始温度30 $^{\circ}$ Cで行った。超高压印加処理後、サンプルを酵素含有EBMで37 $^{\circ}$ C、14日間振盪洗浄し、PBS-エタノールで3日間振盪洗浄した。

超高压脱細胞化大動脈へのヘパリンの含浸とヘパリンの徐放は、脱細胞化大動脈を凍結乾燥し、ヘパリン溶液を吸収させて行った。超高压脱細胞化大動脈を1晩凍結乾燥させ25mg/mlヘパリン溶液に48時間浸漬した。ヘパリン浸漬後に再び超高压印加処理したサンプルも用意した。ヘパリンを含浸させた脱細胞化大動脈をSV-50に10 \times 10mmの面が底につくように入れ、PBS40mlを添加し、37 $^{\circ}$ C振盪下で溶出試験を行った。所定の時間に溶液200 μ lを採取し、採取後にPBS200 μ lを加えた。採取した溶液をtoluidine blue O methodを用いてUV測定し、検量線からヘパリン量を求めた。

PVA水素ゲルへのヘパリンの含浸とヘパリンの徐放は、PVA-HC(重合度1700)1mgを超純水10mlに融解し、型(10 \times 10 \times 1.5mm)に封入後、超高压印加処理(加圧時間5分、圧力保持時間10分、減圧時間5分、10,000atm、25 $^{\circ}$ C)したPVAゲルを用いて行った。PVAゲルを脱細胞化大動脈と同様に凍結乾燥し、40mg/mlヘパリン溶液に48時間浸漬した。ヘパリン含浸PVAゲルをSV-50に10 \times 10mmの面が底につくように入れ、PBS40mlを添加し、37 $^{\circ}$ C振盪下で溶出試験を行った。脱細胞化大動脈と同じ時間に溶液200 μ lを採取し、採取後にPBS200 μ lを加えた。採取した溶液をtoluidine blue O methodを用いてUV測定し、検量線からヘパリン量を求めた。

(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

ヘパリン検量線の作製については、ヘパリンの高濃度溶液ほどUV吸収が減少するため、右下がりの検量線 ($R^2=0.983$) が得られた (図1)。

超高压誘起ヘパリン含有PVA水ドロゲルの調製については、各重合度 (1000、1700、2400、4000)、各条件 (超高压印加処理開始温度10℃、25℃、50℃、凍結融解) の16種類全てでゲル化が確認できた。見た目での差異はほとんどなく、超高压印加処理の開始温度が高いほど柔らかいゲルが得られた (図2)。

凍結融解法によるヘパリン含有PVA水ドロゲルの調製については、各重合度のゲル全てがゲル化した。しかし、透明な層の部分はゲル化していなかった。超高压誘起ヘパリン含有PVA水ドロゲルより白濁したゲルが得られた (図2)。

ヘパリン含有PVA水ドロゲルからのヘパリンの徐放は、溶出開始1時間後～72時間後において、各重合度、各条件によるヘパリン溶出挙動の差が示された (図3～6)。重合度1000のPVAゲルでは溶出開始1時間後までに3mg以上のヘパリンが溶出され、それ以降の溶出はほとんど確認されなかった (図3)。各条件による溶出挙動の差は示されなかった。重合度1700、2400のPVAゲルはほぼ同一の溶出挙動を示した (図4, 5)。凍結融解ゲルの含有ヘパリンのほとんどが24時間までに溶出し、それ以降の溶出は確認されなかった。超高压誘起ゲルは、超高压印加処理開始温度が低くなるにつれて溶出速度が速くなることが示された。重合度4000のPVAゲルは、その他の重合度のPVAゲルと比較してヘパリン溶出の遅延がみられた (図6)。重合度1700、2400のPVAゲルのような超高压印加処理開始温度による溶出挙動変化は確認できなかった。しかし、凍結融解ゲルと超高压誘起ゲル間では溶出挙動の差が確認でき、超高压印加処理によるヘパリン溶出の遅延が確認できた。

超高压脱細胞化大動脈の調製については、超高压印加処理前とサイズがほぼ同一のサンプルが得られた。超高压脱細胞化大動脈へのヘパリンの含浸 (図7A) とヘパリンの徐放については、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 (25mg/ml) から大動脈の含有ヘパリン量を求めた (図8)。含有ヘパリン量は約3.5～4mgであり、含浸後は凍結乾燥前とサイズにほ

んど差がなかった。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。

PVA水ドロゲルへのヘパリンの含浸 (図7B) とヘパリンの徐放については、脱細胞化大動脈と同様に含有ヘパリン量を求めた (図8)。PVAゲルのヘパリン含有量は約4mgでヘパリン含有脱細胞化大動脈とほぼ等量だった。ヘパリン含浸前、含浸後のサイズに差は見られなかった。溶出挙動もヘパリン含浸脱細胞化大動脈と同様、溶出開始6～8時間後までに約3.5mg以上の溶出が見られ、それ以降は溶出量増加が起きなかった。

D. 考察

ヘパリン含有PVA水ドロゲルからのヘパリンの徐放より、以下のことが示された。

- 1) 10%PVA溶液にヘパリンを添加し攪拌すると、白濁層と透明層に分離する
- 2) 白濁層は超高压印加処理によりゲル化するが、透明層はゲル化しない
- 3) ヘパリン含有PVAゲルからのヘパリン溶出では、高重合度のPVAゲルほど溶出を遅延させることが可能である
- 4) 特定の重合度 (1700、2400) のヘパリン含有PVAゲルにおいて、超高压印加処理開始温度が高温なほどヘパリン溶出を遅延させることが可能である
- 5) 重合度4000のヘパリン含有PVAゲルでは、凍結融解に比べ、超高压誘起PVAゲルによるヘパリンの溶出遅延が起きる

上記1) は、PVAの濁点が関係していると考えられる。白濁した層は溶液が高温なほど白濁し、溶液が低温になるにつれて透明に近づいた。この現象が4) に関係していると考えられる。

ヘパリン含浸超高压脱細胞化大動脈とヘパリン含浸PVA水ドロゲルの溶出試験より、以下のことが示された。

- 1) 脱細胞化大動脈へのヘパリン含浸が可能である
- 2) ヘパリン含浸脱細胞化大動脈からのヘパリン徐放は約6時間継続する
- 3) ヘパリン含浸後に再び超高压印加処理を行っても溶出挙動に変化はない

4) 同一サイズのヘパリン含浸脱細胞化大動脈とヘパリン含浸PVAゲルでは、ヘパリン溶出挙動に差はない。

E. 結論

抗血栓薬剤であるヘパリンの徐放制御、脱細胞化大動脈からのヘパリン徐放のために、本研究では、PVAゲルの作製条件、PVAの重合度、ヘパリン含浸の検討を行い、以下の結果を得た。

ヘパリン含有PVAゲルのヘパリン溶出には重合度が大きく関係し、高重合度のPVAゲルほどヘパリン溶出の遅延が示された。重合度1700以上のPVAゲルにおいては、凍結融解ゲルと比較して超高压誘起PVAゲルのヘパリン溶出遅延が示された。長期ヘパリン溶出のためには高重合度超高压誘起PVAゲルを用いるべきである。

脱細胞化大動脈にヘパリンを含浸することで、脱細胞化大動脈からのヘパリン溶出を約6時間継続することが可能だった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

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
- 2) 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 Scaffold 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.
- 3) 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 Scaffold の開発. 第6回日本組織移植学会雑誌 2007; 6(1): 62.
- 4) 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.

- 5) 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 Scaffold 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.
- 6) 西垣戸麻美、江橋 具、山岡哲二、藤里俊哉. 超高静水压印加処理による脱細胞神経 Scaffold 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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 Scaffold を用いた臓器組織再生. 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.
- 10) 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 Scaffold 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.
- 11) 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.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)なし

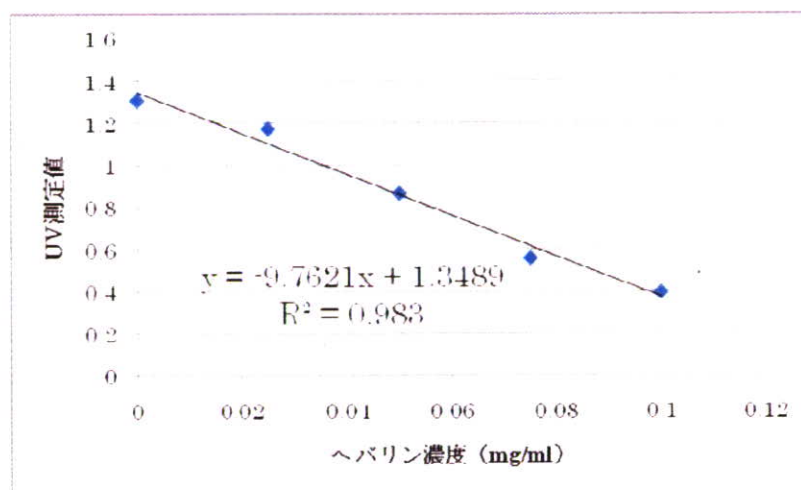


図1. ヘパリンの検量線

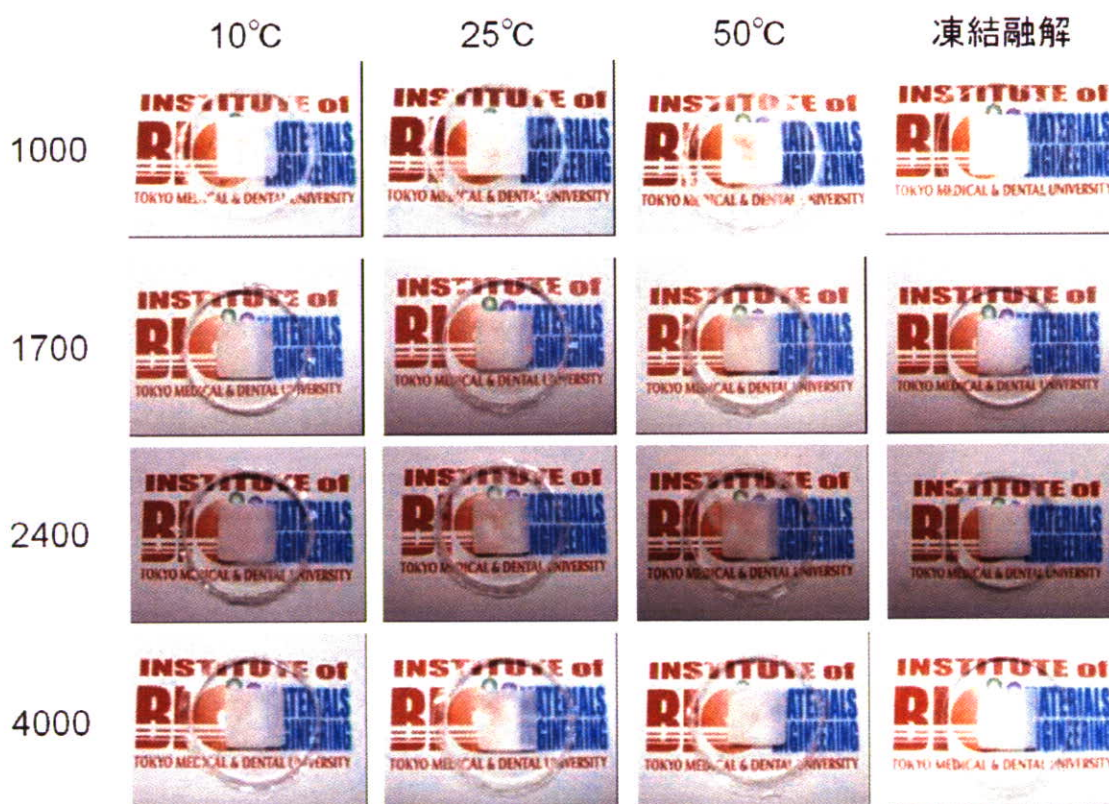


図2. 超高压印加法および凍結融解法にて作製したPVAゲル

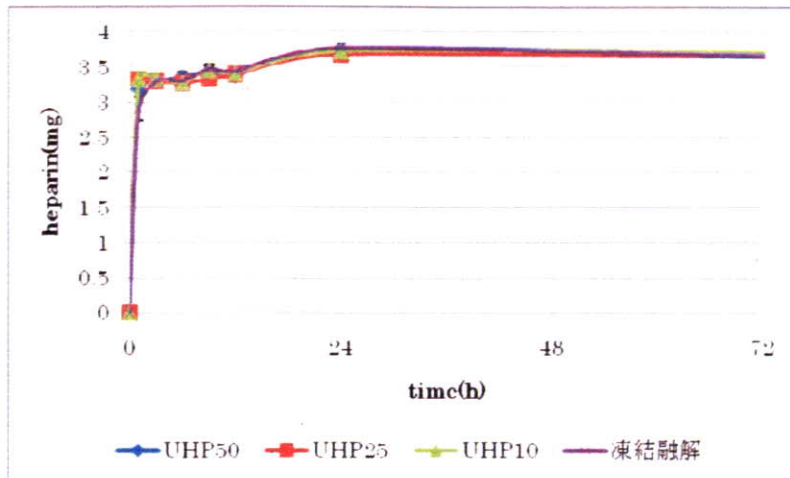


図3. 重合度1000のヘパリン含有ゲルの溶出試験

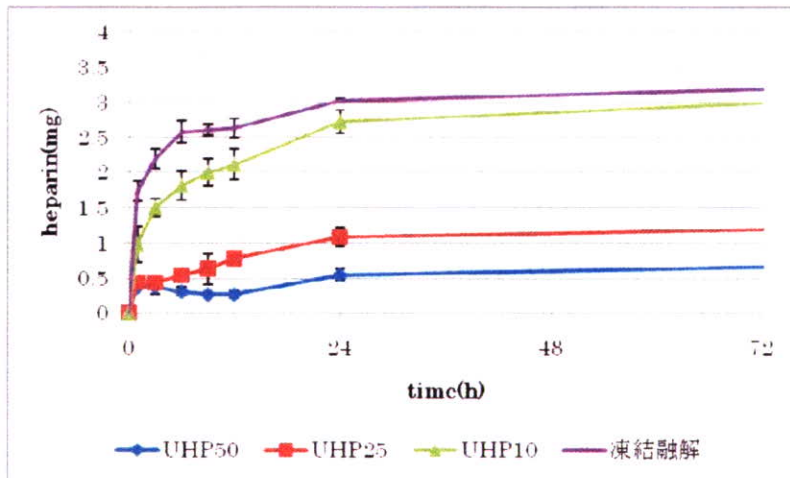


図4. 重合度1700のヘパリン含有ゲルの溶出試験

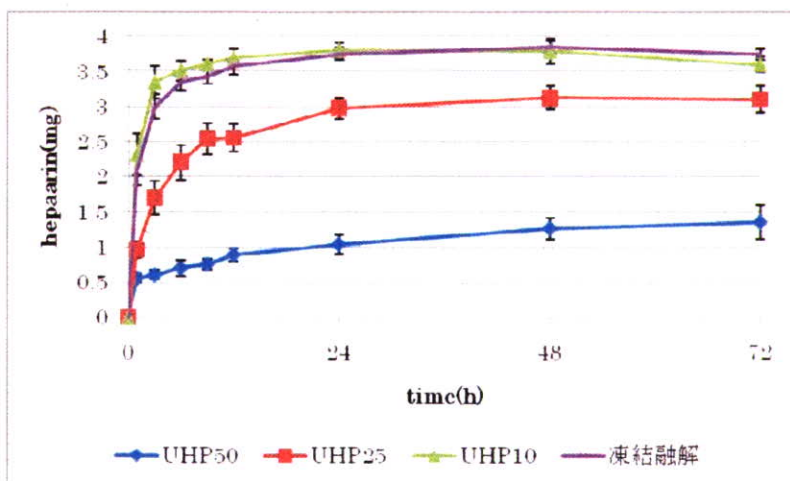


図5. 重合度2400のヘパリン含有ゲルの溶出試験

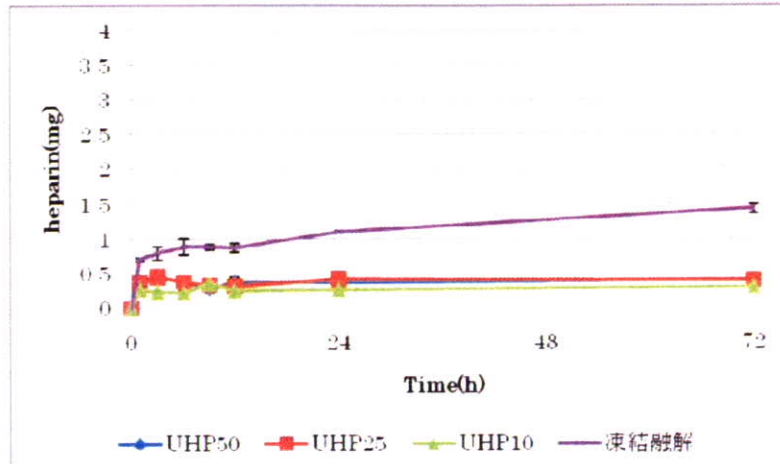


図6. 重合度4000のヘパリン含有ゲルの溶出試験

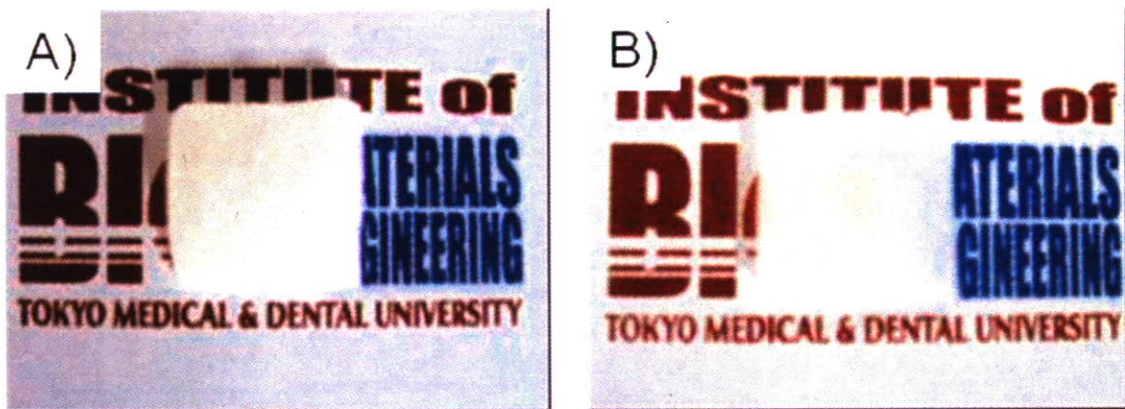


図7. A)ヘパリン含浸脱細胞化大動脈とB)ヘパリン含浸PVAゲル

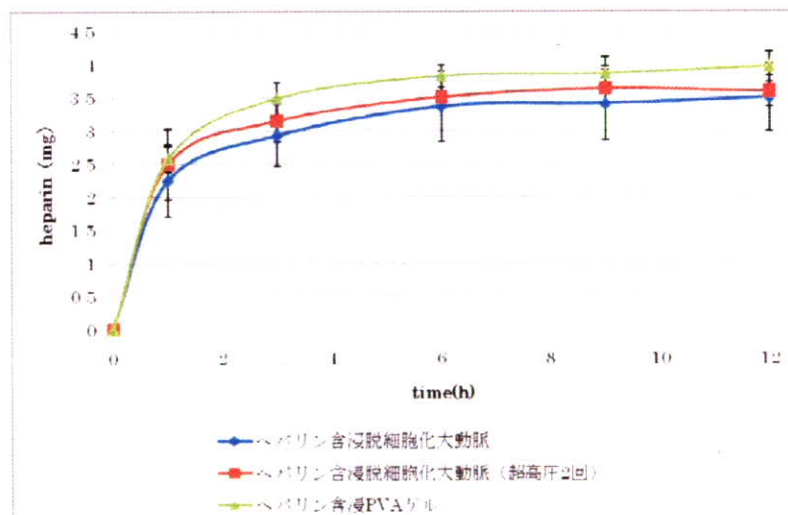


図8. ヘパリン含浸脱細胞化大動脈とヘパリン含浸PVAゲルの溶出試験

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

再生型組織の臨床応用への倫理面の検討（ヒト組織バンクから提供された心臓弁の利用）

分担研究者 北村惣一郎 国立循環器病センター総長

研究要旨 これまでの研究にて開発した脱細胞化処理条件をヒト組織に適用し、ブタ組織と同様に脱細胞化できるかどうかを検討した。その結果、ブタ組織と同様に力学特性を維持しつつ、完全に脱細胞化できることが確認できた。また、細菌感染によって移植に適さないとされた組織であっても、脱細胞化処理過程において細菌を除去できることがわかった。

A. 研究目的

我が国では年間約1万件以上の心臓弁置換術が施行されている。代用弁に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、抗凝固剤が不必要であるというQOL上の利点から、使用割合が徐々に増加している（現在4割弱）。しかし、石灰化等による構造劣化の問題を抱え、高齢者では15年、若年者では5年程度の耐久性しか有していない。近年の組織バンクの整備によって、凍結保存同種弁が臨床で使用され始め、生体適合性や抗感染性で既存の人工弁よりも優れていることから欧米では広く使用されている。特に、小児患者を対象としたロス手術では、不全の大動脈弁を自己肺動脈弁で置換し、空位の肺動脈弁位に同種弁を移植するが、自己肺動脈弁には患者の発育に伴う成長性を有する特徴がある。現在の人工弁の問題を解決し、さらに自己弁に匹敵する成長性を有する次世代型代用弁の開発を目指して、組織工学技術を用いた再生型心臓弁の開発が行われている。我々は、脱細胞化組織を用いた再生型心臓弁の開発を行っている。現在の異種生体弁では全く、また同種弁でも移植後に完全に自己化されることはないが、脱細胞した再生型心臓弁では自己細胞が侵入することでリモデリングされ、自己組織化されると考えられる。これにより、現在では自己弁以外では不可能な、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。本方法では、現在の移植使用基準に適合しない組織でも使用でき

るため、現在では廃棄されている提供心臓弁の有効利用にもなる。

本研究では、ミニブタ組織にて用いている脱細胞化条件を、提供された同種弁に適用し、その有効性を組織学的及び生体力学的に評価した。

B.. 研究方法

使用組織: 国立循環器病センター組織保存バンクより提供された凍結保存ヒト大動脈弁組織を3件用いた。

脱細胞化処理: ヒト組織をPBS中に浸漬し、超高静水圧印加処理（10°C, 980 MPa, 10 min.）を施した。PBSをベースとした洗浄液中で振盪洗浄（37°C, 14日）を行い、80 wt%エタノール水溶液処理（37°C, 3日）を施した後、PBS置換（37°C, 3日）したものを実験に供した。

組織観察: ヘマトキシリン・エオジン染色による組織観察を行った。

DNA定量: 各試料より約20 mgの血管壁小片を採取し、DNA定量キット（DNeasy Tissue Kit, Qiagen）を用いて、分光光度法により組織内DNA量の定量測定を行った。

リン脂質定量: 各試料より約1 gの血管壁小片を採取し、クロロホルム/メタノール混合溶媒中で粉碎してリン脂質を溶媒中に溶解した後、エバポレータを用いて濾液からリン脂質を回収した。テトラヒドロフランで再溶解し、リン脂質定量キット（リン脂質C-テスト, WAKO）を用いて、分光光度法により組織内リン脂質量の定量測定を行っ

た。定量化のための検量線の作成には、レシチン (Lecithin granule, MW=750, Acros organics) を用いた。

細菌検査: 解凍直後の組織および脱細胞化組織から組織小片を採取し、シェドラー培地に接種して増菌培養試験を行った。また、組織小片を滅菌生理食塩水中でホモジナイズし、血液寒天培地 (CO₂ 培養)、チョコレート寒天培地 (CO₂ 培養)、ブルセラHK培地 (嫌気培養)、シェドラー培地にそれぞれ接種し培養試験を行った。

引張試験: 各弁尖の円周方向および半径方向に対して引張試験 (オリエンテック万能試験機, RTC-1150A) を行った。試験片幅は3 mm、クロスヘッドスピードは20 mm/min、チャック圧は150 g/mm²、初期荷重は0 Nとし、試験片-チャック間には滑り防止のために耐水ペーパー (#1,000) を使用した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織は、国立循環器病センター組織保存バンクの規定に従って提供され、凍結保存を行っている同種組織で医学的問題により臨床応用できず、提供時に承諾書で「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、あるいは「摘出後、組織が移植に適さないことが判明した際には、研究に利用させていただきます」を選択されている組織を用いた。日本組織移植学会が作成している「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)」では、このような組織の研究機関および企業等における研究・教育・研修への利用およびその他の利用について、VII-A. において、「ヒト組織を移植に用いることができない場合又は家族の希望がある事例において、家族の承諾が別途承諾書によって得られた場合には当該ヒト組織を研究機関および一般研究者 (企業を含む) における研究・教育・研修等への利用目的のために提供できるものとする」としており、VII-C. において、「組織バンクが、採取したヒト組織を移植医療に関する研究機関あるいは研究目的で企業に提供する際には、VIII-H. に定める倫理委員会等において当該研究の妥当性について確認し、適用の可否を判断すると共に、その判断の過程を明確にすること」としている。本研究では、これに則り、

倫理委員会にて承諾を得た。

C. 研究結果

使用組織所見: 解凍直後と脱細胞化処理後の組織外観写真を図1に示した。脱細胞化された組織は、洗浄工程を経ているためにネイティブ組織と比較して白変してはいるが、それ以外の外観の変化は認めなかった。また、弁尖に破断や亀裂は認めなかった。

組織観察: 図2に、弁尖の半径方向断面の組織染色写真を示した。ネイティブ組織には無数に細胞核が認められるのに対して、脱細胞化組織に細胞核は認めなかった。一方、配向したコラーゲン線維の形態は、処理前後で保たれていた。

DNA定量: 図3左に、DNA抽出溶液の紫外線吸収スペクトルを示した。ネイティブ組織から抽出されたDNA溶液では、波長260 nmをピークとした大きな吸収を認めた。一方、脱細胞化組織からの抽出溶液では吸収を認めなかった。DNA量を吸光度から換算した結果を表1に示した。いずれの試料においても、脱細胞化処理によってDNAは完全に除去されていた。

リン脂質定量: 図3右に、リン脂質抽出溶液の可視光線吸収スペクトルを示した。波長593 nmの吸光度から、レシチン量に換算した場合の定量結果を表1に示した。いずれの試料においても、脱細胞化処理によってリン脂質量が大幅に低下していた。

細菌検査: 実験に供した組織の細菌培養試験の結果を表2に示した。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、臨床使用に適しないと判断された。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、超高静水圧印加処理を施し、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。超高静水圧印加処理 (10°C, 980 MPa, 10 min.) 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。

引張試験: ネイティブ弁尖組織の円周方向および半径方向における応力歪み曲線を図4に示した。円周方向の曲線は、低歪み領域から急激に曲線が立ち上がり、歪み0.5程度で破断に至った。また、応力1.3~2.2 MPaの範囲で脆性的に破断に至った。一方、半径方向の曲線は、歪み0.2程度まで

の範囲にかけて無荷重変形を示した後、緩やかに立ち上がり、歪み1.4程度まで徐々に応力が増加して破断した。破断応力は0.2~0.7の範囲であるが、破断に至る以前に繰返し微小破壊が生じていた。ネイティブ弁尖組織は、円周方向には変形しにくく、破断応力は大きい、半径方向には大きく変形して、破断応力は小さかった。

脱細胞化弁尖組織の円周方向および半径方向における応力歪み曲線を図5に示した。円周方向の曲線は、ネイティブ組織の場合よりも急激に立ち上がり、歪み0.3程度で脆性的に破断に至った。破断応力1.5~4.2 MPaの範囲であった。半径方向の曲線は低歪み領域から急激に立ち上がり、ネイティブ組織の場合に見られたような無荷重変形領域が消失した。応力は破断応力0.5~1.3 MPaに至るまで直線的に増加し、脆性的な破断を示した。破断歪みは0.4~0.7の範囲に低下した。脱細胞化弁尖組織は、円周方向と半径方向のいずれの方向についても破断応力は増加し、破断歪みは低下する傾向を示した。これは、脱細胞化処理の過程において、弁尖組織内のグルコサミノグリカン含有量が低下したためと考えられた。グルコサミノグリカンはその保水能により、弁尖組織の厚みの維持と変形性に大きく寄与している。しかしながら、グルコサミノグリカンは分解を受けやすく、脱細胞化処理工程でその含有量が低下したために、応力歪み曲線の傾きは上昇したものと考えられた。さらには、グルコサミノグリカンの損失は弁尖組織の断面積を減少させるため、見かけの破断応力の増加として現れたと考えられた。

D. 考察

米国では凍結保存した同種組織移植が商業化されており、例えば代表的企業であるクライオリフ社（ジョージア州）では、1年間に心臓弁を2,800個、血管を3,200本も出荷し、30億円以上を売り上げている（2003年度、同社年次報告）。それでもなお提供数が足りないとして、同社は抗原性除去処理（SynerGraft®処理）したブタ組織を商品化した。しかし、患者の死亡事故や処理方法の安全性への疑念から、米国食品医薬品局の指導によって現在は製造中止状態にある。再生血管としては、既に生体内分解吸収性材料を基材とし、東京女子医科大学大学院の新岡教授（現、米国エール大学教授）らが小児患者の静脈再建において

優れた臨床結果を報告している。しかし、臨床現場で使用できる吸収性材料は限られており、かつ加水分解によって非生物学的に分解するため、分解速度の制御が容易ではなく、動脈を対象とした場合では分解に伴う強度不足による破断の恐れがあり、臨床応用は未だに為されていない。我々が用いている脱細胞化組織は、移植後に浸潤してきた細胞によって分解・置換されると考えられるため、吸収性材料とは異なり、自己組織化が達成される以前の強度低下が抑制される。

本年度は、我々の開発した脱細胞化処理をヒト組織に対して適用した。そして、得られた脱細胞化ヒト大動脈組織の材料物性試験、および安全性試験として細菌学的検査を行った。その結果、脱細胞化ブタ大動脈組織は、引張り特性から判断してヒト大動脈位への移植に耐えうるだけの物性を有していると考えられた。さらに、細菌への感染が認められる組織を、脱細胞化処理によって滅菌出来得ることを確認した。

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。さらに、脱細胞化ブタ大動脈弁組織と同様に、移植に耐えうる物性を保持出来ていることから、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。

E. 結論

我々の開発した再生型心臓弁は移植に耐えうる強度を有していると判断できた。再生型心臓弁を臨床試験へ進めるため、さらに疲労耐久試験など他の試験も検討中である。

研究協力者

寺田堂彦 大阪工業大学工学部研究員

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤里俊哉、北村惣一郎. 心臓弁. 筏 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. 学会発表

- 1) 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.
 - 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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;
 - 7) 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 &
 - 8) 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.
 - 9) 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 Asian Biomaterials Congress Abstract, 2007; 112.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
- 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。

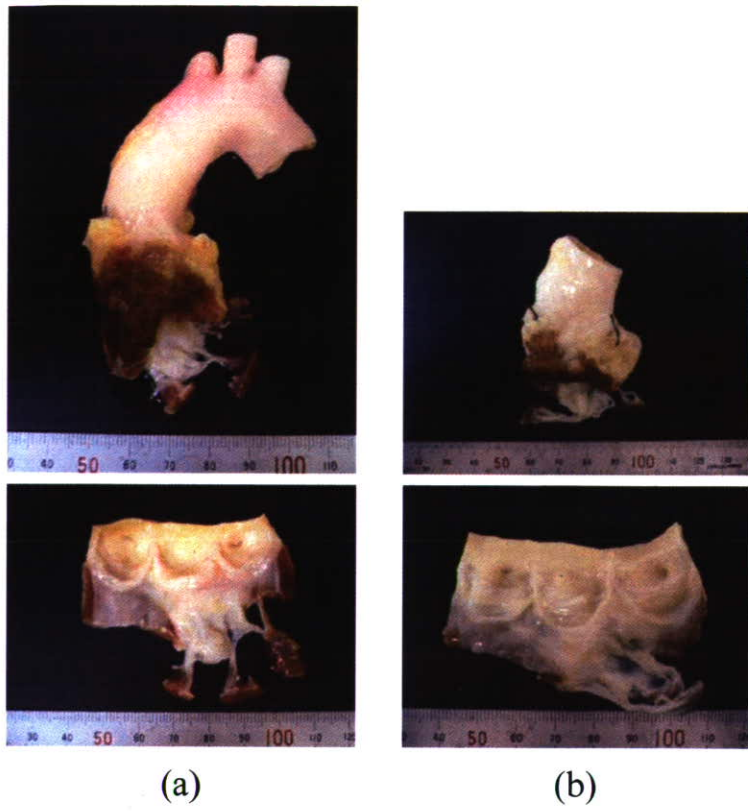


図1. ヒト組織所見 (a : 解凍後、b : 脱細胞後)

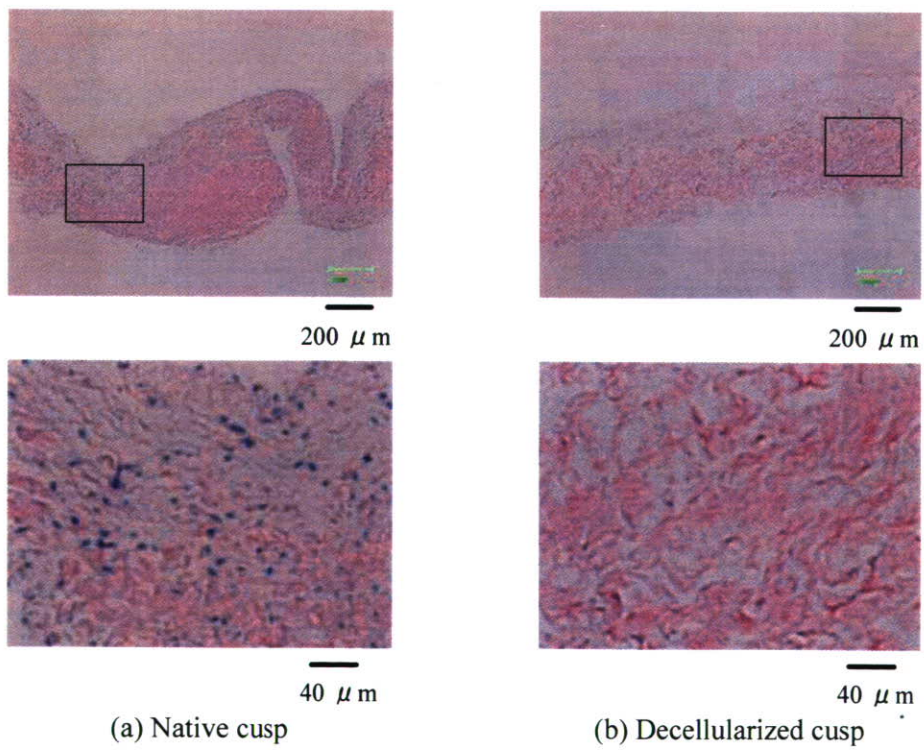


図2. ヒト心臓弁組織像 (a : 解凍後、b : 脱細胞後)

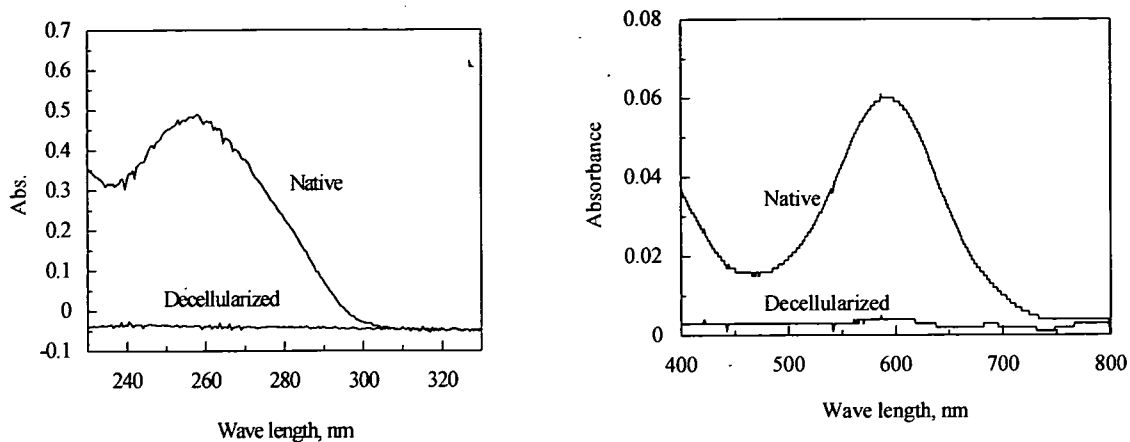


図3. 脱細胞化後の生化学評価 (左: DNA、右: リン脂質)

表1. 脱細胞化後の生化学評価

Sample code	Condition	DNA, $\mu\text{g/g}$	Phospholipid, mg/g
1	Native	0.42	7.19
	Decellularized	-0.03	
2	Native	0.42	5.82
	Decellularized	-0.03	-7.12
3	Native	0.54	12.61
	Decellularized	-0.03	-8.95

表2. 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	/	-	-

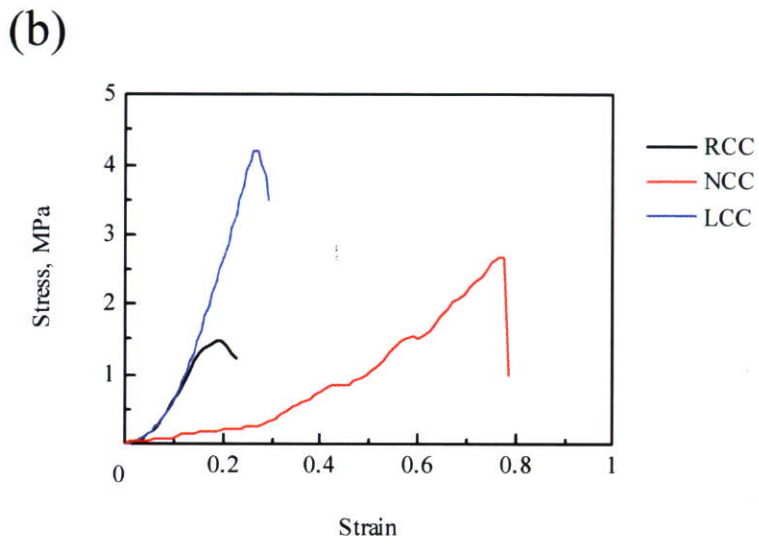
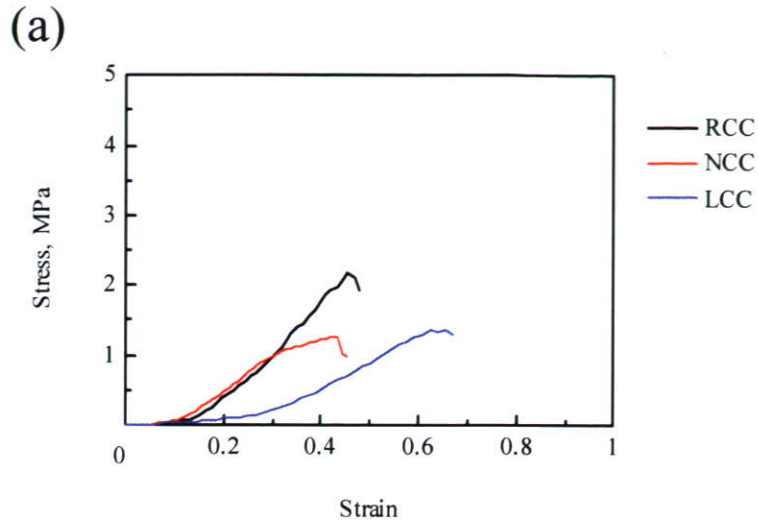


図4. 解凍組織の力学特性 (a : 円周方向、b : 半径方向)

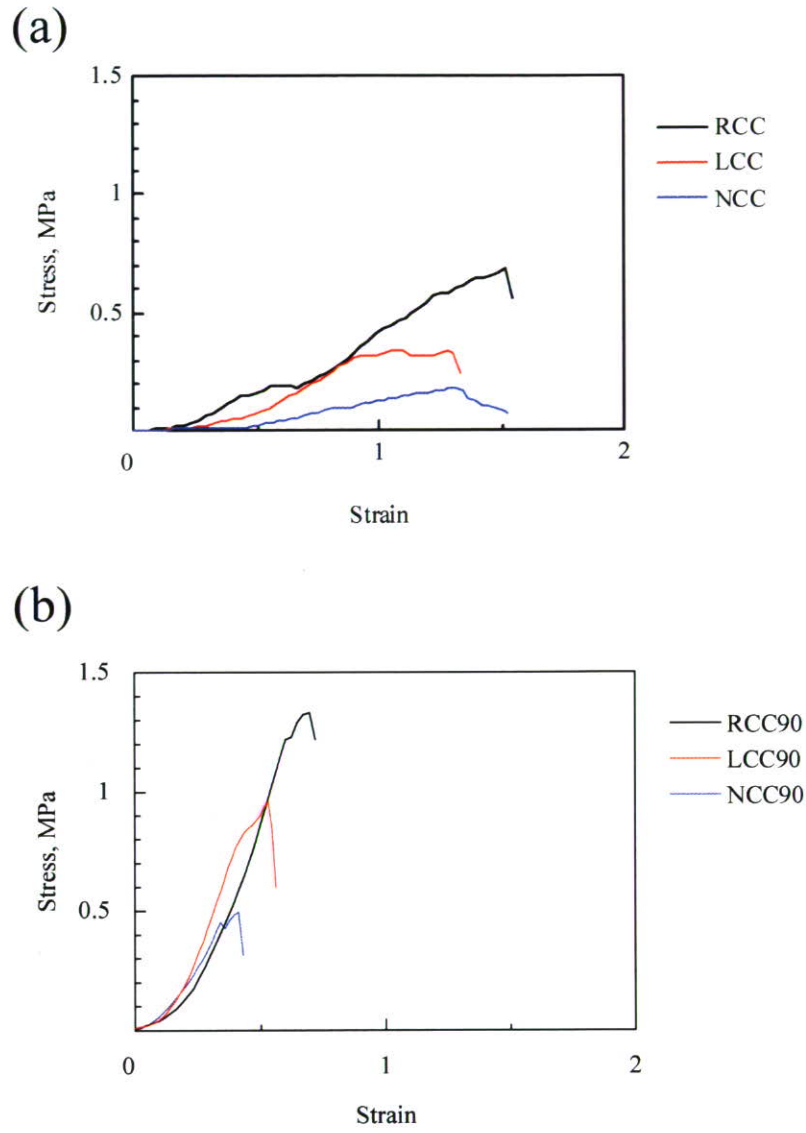


図5. 脱細胞化組織の力学特性 (a : 円周方向、b : 半径方向)

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in vivo評価

分担研究者 湊谷謙司 国立循環器病センター心臓血管外科医長

研究要旨 これまでに開発してきた真空熱架橋と酵素処理を組み合わせることによって作製した再生型脱細胞化血管の長期大動物移植実験を行った。ミニブタ下行大動脈に同所性に12ヶ月間置換移植したところ、移植後の速やかな再細胞化を達成し、狭窄や石灰化も抑制できた。しかし、エラスチン線維の再生は本移植期間では認められなかった。

A. 研究目的

人工血管は、内径4mm以上の中大口径のものに限れば既に完成された技術であり、我が国では年間約5万本が使用されている。しかし、移植後も異物のままであり、自己細胞の浸潤による自己組織化が達成されないため、移植後の成長性がなく、感染に対しても非常に弱い。近年、我が国においても組織バンクネットワークが整備され、脳死あるいは心停止者から提供された血管や心臓弁、皮膚等組織の臨床使用が開始された。提供された同種動脈は、人工血管感染における大動脈・動脈の再建や、感染性大動脈瘤における大動脈・動脈の再建、あるいは生体肝移植等の臓器移植時における動脈再建などに使用される。また、冠動脈や末梢血管等で小口径の場合では、人工血管が使用できないため、自己血管を用いたバイパス術や同種血管の使用が第一選択肢となっている。しかしながら、米国では組織バンクが商業ベースで行われており、年間数千件以上の提供組織が臨床使用されているのに対し、我が国では年間数十件に留まっており、圧倒的に提供数が不足している。本研究では同種動脈の不足を補うべく、再生型素材を用いた再生型血管移植技術を開発する。本分担研究では、ミニブタを用いた動物実験によって、無細胞化した下行大動脈を、同種ミニブタの下行大動脈と置換手術をすることによって、移植後の自己組織化について検討する。これまでの研究において実施した同種移植実験では、移植後組織内の石灰化が認められ、その原因として組織

内に残存したリン脂質や、エラスチンの変性が考えられた。これを解決すべく、これまでにコラーゲンや生体力学特性を保持したまま、エラスチンを除去する方法について検討してきた。本年度は、細胞およびエラスチンを除去した下行大動脈の大動物長期移植実験の結果について報告する。

B. 研究方法

脱細胞化処理：クラウン系ミニブタ（(株)ジャパンファーム）から清潔下にてブタ心臓を摘出し、大動脈弁を採取した。凍結乾燥後、真空オーブン内で120℃にて24時間静置することで熱架橋処理を施した。続けてエラスターゼ溶液（0.57 μg/ml、pH8）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。

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KOSSA染色（石灰化）等によって組織学的所見を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験における動物愛護上の配慮は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（平成17年6月22日公布）及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示）、実験動物の適正な実

施に向けたガイドライン（平成18年6月1日日本学術会議）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

これまでの研究から、本処理を施したブタ大動脈組織内では、エラスチン繊維が完全に除去され、コラーゲン繊維のみが残存することを確認している。また、これに伴って組織内の空隙の増加も観察している。空隙の増加は、移植後の細胞浸潤及び自己組織化を促進することが期待できる。

一方、エラスチンの除去によって破断強度は未処理大動脈よりも低下したが、未処理肺動脈よりは大きかった。弁膜症患者で施行されるロス手術では肺動脈弁を大動脈位に移植するが、肺動脈導管の破断等は認められないため、肺動脈以上の強度を有していれば、移植用組織として用いることができると考えられた。

ミニブタ大動脈から作成した再生型血管を同所性に置換移植したミニブタは、全例で死亡を認めなかった。また、膨化や狭窄も認めず、移植12ヶ月後の摘出時の所見から内腔面は、スムーズで血栓の付着も認めなかった。摘出した移植組織の染色像を図1～5に示した。図1に示したHE染色像から、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。また、図2に示したエラスチンを染色するEVG染色像からは、太いエラスチン繊維の再生は認められなかった。図3に示した平滑筋細胞を染色する抗SMA染色像からは、組織内へ浸潤した細胞は多くが平滑筋細胞であることが確認された。図4に示したカルシウム沈着を染色するKOS SA染色像からは、ほとんど石灰化を認めなかった。また、図5に示したT細胞を染色する抗CD3染色像からは、T細胞の浸潤を全く認めなかった。

D. 考察

生体組織を用いた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。我々も、これまでの研究から、超高静水圧処理にて脱細胞化処理した心臓弁や血管の動物実験を行ってきた。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。この原因について検討したところ、脱細胞化処理後のリン脂質の残存及びエラスチン繊維の変性の可能性が考えられた。本研究では、脱細胞化処理に加えてエラスチン線維を除去した生体組織について検討した。これまで、酵素処理の前段階としてグルタルアルデヒドによる架橋を実施したが、グルタルアルデヒド自体が石灰化を誘発する因子との報告もある。そこで本年度は、前段階として真空熱架橋を実施した。その結果、グルタルアルデヒドと同様に、適切な条件を選択することによって、生体力学特性を有効に維持したまま、組織内のエラスチンを除去することができた。得られた移植片を同種移植したところ、移植後の石灰化を顕著に抑制していた。しかし、エラスチンは血管組織の力学特性を担う重要な成分であり、移植後の早期の再生が望まれる。本年度の移植実験結果からは、移植後12ヶ月を経過してもエラスチン線維の再生は確認できなかったが、吸収性材料をスキャフォールドとする他の研究グループからは、エラスチンの再生も報告されている。石灰化抑制および再細胞化の促進の目的のためには、細胞およびエラスチンを除去した血管組織は極めて有効であると考えられる。

E. 結論

石灰化の原因であると推定されたエラスチンを除去する方法について検討したところ、真空熱架橋処理後にエラスターゼ処理することで、組織内のエラスチンを完全に除去することが可能であった。12ヶ月間に渡る同種同所性移植の結果から、石灰化を抑制しうるということがわかった。

研究協力者

寺田堂彦 大阪工業大学工学部研究員

玉井克明 国立循環器病センター研究員

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) 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.
- 8) 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.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

なし