

200806005A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療等実用化研究事業

脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岸田 晶夫

平成21年（2009）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等実用化研究事業

脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岸田 晶夫

平成21年(2009)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	
1. 循環器系再生型組織の作製	11
藤里 俊哉	
2. 循環器系再生型組織のin vitro評価	17
山岡 哲二	
3. 再生型組織の臨床応用への倫理面の検討	23
北村 惣一郎	
4. 循環器系再生型組織のin vivo評価	35
湊谷 謙司	
5. 脱細胞化生体組織の滅菌	47
白数 昭雄	
6. 再生型角膜の物性・in vitro評価	51
小林 尚俊	
7. 再生型角膜のin vivo評価	59
佐々木 秀次	
8. 再生型角膜の作製	67
木村 剛	
III. 研究成果の観光に関する一覧表	71
IV. 研究成果の刊行物・印刷	77

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を対象を絞り、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、心臓弁の長期移植にて良好な結果が得られた。血管については、石灰化抑制のための脱細胞化法の目処が付き、長期移植での検証を行っている。角膜については、異種移植試験にて脱細胞化角膜の高い生体適合性が示され、上皮欠損モデル実験にて、脱細胞化角膜上での上皮再生が示された。

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研究所先進医工学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生体工学部
湊谷謙司
国立循環器病センター心臓血管外科
白数昭雄
ニプロ株式会社総合研究所部長代理
小林尚俊
物質・材料研究機構生体センターバイオポリマーグループリーダー
佐々木秀次
都立広尾病院眼科長
木村剛
東京医科歯科大学生体材料工学研究所助教

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、残存するマトリクス（ECM）からなる組織（脱細胞化組織：バイオスキャフォールド）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。対象としては、早期の臨床応用を目的とし、循環器系組織である心臓弁、血管と角膜に絞って検討している。これまで、循環器系組織については、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、石灰化が問題となっており、本年度は、石灰化抑制のための石灰化要素の検討と脱細胞化プロトコルの検討を行った。また、心臓弁については、

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療では、慢性的な移植組織の不足から、解剖学的に

1 年間の長期移植の評価を行った。一方の角膜については、昨年度に角膜の脱細胞化プロトコルを確定し、今年度は、異種移植実験による脱細胞化角膜の長期の生体適合性および角膜再生について検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 循環器系組織

脱細胞化処理

心臓弁：等方静水压印加処理を利用したブタ脱細胞化心臓弁の作製では、およそ 30 kg のクラウン系ブタ心臓（ジャパンファーム、鹿児島）の肺動脈弁を利用した。摘出した弁を PBS (-) を満たしたビニールバックに入れて、密閉した。これを超高圧印加装置（Dr. Chef 神戸製鋼、兵庫）の圧力印加チャンパー内に入れて、980 MPa の圧力を 10 分間加えた。このとき、急激な圧力印加によるチャンパー内の温度上昇を防ぐため、チャンパー全体を 10°C に維持した。圧力印加後、組織をビニールバックから取り出し、2 週間、所定の洗浄液に浸して振盪し、破壊された細胞の破片を除去した。さらに、細胞膜に多く含まれるリン脂質が石灰化の原因であるともいわれることから、このリン脂質を除去するために、80% エタノールに浸漬して 3 日間洗浄した。エタノールは、移植後にレシピエント動物の体液となじみにくいため、最後に PBS (-) による 3 日間の洗浄を経て、移植用組織片とした。

血管（脱エラスチン血管）：およそ 30 kg のクラウン系ミニブタのブタ下行大動脈を用いた。摘出した血管は、エラスターゼ溶液内に浸漬し、37°C にて 72 時間振盪した。その後、酵素反応を停止させ、組織に残留したエラスターゼを除去するために PBS (-) を用いて洗浄した。予備実験から、ここまでの処理で、血管壁の強度が急激に弱くなることがわかったため、真空熱架橋処理を施し、これと同時に、移植組織の滅菌も行なった。最後に、再び PBS (-) に浸漬し、脱エラスチン血管とした。

血管（異種移植モデル用）：食用ブタの大動脈血管を購入し、神経と同様の工程で脱細胞化した組織と、市販の動物由来移植用組織でも利用されている、0.1% グルタルアルデヒド架橋処理した血管を作製した。架橋方法は、血管壁を一辺 5 mm 程度の大きさにそろえて細切し、架橋溶液に浸漬した。

動物移植実験

心臓弁、脱エラスチン血管においては、クラウン系ミニブタを用いた同種移植を行い、作製した移植組織による心臓弁や血管の再生の可能性を評価した。移植実験では、ドナー動物と同程度の体重のレシピエント動物を用い、脱細胞化肺動脈弁の場合には、体外循環装置下で大動脈弁の脱細胞化肺動脈弁による置換手術を行なった。これまで、ミニブタを用いた大動脈置換手術は困難で、成功率が低かったことから、本年度は成功率の向上を目指し、並行して移植時の条件検討も行った。脱エラスチン血管の場合には、人工呼吸下で開胸し、下行大動脈部位の置換移植を行った。各々の移植が成功した場合には、3 ヶ月後以降 12 ヶ月までの間に摘出して、組織学的評価を行なった。

異種移植実験では、食用ブタ脱細胞化血管、グルタルアルデヒド架橋血管と未処理の血管を、Wistar ラットの背中に皮下移植し、1 から 4 週間後の間で移植片を摘出した。摘出時には、移植片周辺組織の新生血管の様子を観察し、その後 HE 染色や免疫染色を行った。免疫染色では、好中球と、細胞障害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞、ナチュラルキラー T 細胞の染色を行なった。

移植片の組織学的評価

脱細胞化心臓弁は、摘出後、ヘマトキシリン-エオジン染色、von Kossa 染色、Elastica van Gieson 染色、免疫染色（von Willebrand Factor、alpha-smooth muscle actin、vimentin）により評価した。脱エラスチン血管移植実験では、脱エラスチンによる石灰化抑制効果を調べるため、小動物用 CT スキャン装置にて、摘出した移植片全体の石灰化の分布を調べた。

B-2. 角膜組織

脱細胞化処理

超高圧印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する超高圧処理法を用いて角膜の脱細胞化を行った。具体的には、10°C、10000 気圧、10 分間の超高静水压を施圧した後、浸透圧調整のためにデキストランを含有した生理的食塩水中で 72 時間の浸透洗浄を行った。

動物移植実験

超高圧処理法にて得られたブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への in vivo 異種移植試験は、以下の 2 種の方法にて行った。

ポケット式移植術：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。

上皮欠損モデル移植術：ウサギ角膜の角膜輪部の外側約2～3mmを切開し、そこからへら状スパーテルを角膜実質層に挿入し、直径約4～6mm剥離した。その後、スパーテルを挿入した状態で、上皮層側から直径2mmの生検トレビンにて打ち抜き、欠損を作製した。剥離した角膜実質層間にブタ脱細胞化角膜を挿入し、脱細胞化角膜周辺を縫合し固定した。術後は、抗生剤を点眼にて処置した。経過確認は、目視観察、フルオレセインによる上皮欠損・再生観察を行った（1週間、2週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月）。

移植片の組織学的評価

1)1年後に、2)6ヶ月後にウサギを擬死させ、ヘマトキシリン-エオジン染色、マッソントリクローム染色、免疫染色（CD68）を行った。

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、「動物の保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等に関する基準」（昭和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）、「厚生労働省の所管する実施機関動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年6月1日厚生労働省施行）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。

研究に使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「屍体からのヒト組織採取・保存・利用に関する取扱基準」に従い、組織提供の差異の説明（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の承認を得た。さらに、提供時に「医学的問題で移植に使用することが出来ない組織は、組織移植医療推進のための教育・研究に用いられることを併せて承認します」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

心臓弁：脱細胞化心臓弁移植実験は、移植12ヶ月後の評価のための摘出が1件、新たに移植するための実験を4件行なった。移植12ヶ月後の肺動脈弁を移植した動物は前年度に既に移植が成功しており、その後の成長も順調で特に目立った体調不良は認められなかった。摘出時の外観も美しく、切り開いた内側の観察でも、血栓の形成や目立った内膜肥厚も観察されなかった。摘出した移植片の、心臓と縫合してあった筋組織部分（基部）と血管部分から組織を切り出し、組織中のDNA量を測定して、本来の血管組織のDNA量と比較した。定量の結果、移植12ヶ月後の脱細胞化組織には、通常組織と同等の細胞が浸潤していることが確認された。摘出した移植片のHE染色結果から、脱細胞化心臓弁の弁葉だけでなく、血管壁や心筋部分にも細胞が侵入していることがわかった。多くの心・血管系移植の問題点である石灰化に関しては、組織のどの部分をみても認められなかった。免疫染色の結果、弁葉の表面や血管壁の内腔側には血管内皮細胞が1層に接着していることが確認された。また、筋組織内にも、組織を栄養するための細い血管が多数存在していた。正常な組織の場合、血管壁の中膜部分に多く生存する平滑筋細胞も、脱細胞化組織の血管壁部分に良好に再生し、そのほかの細胞である線維芽細胞などの細胞も血管壁を埋め尽くすように生存していた。したがって、血管壁部分は完全に再構築されていることが考えられた。また、脱細胞化心臓弁の筋組織部内部にも多数の細胞が生存しており、筋細胞か否かについては不確定ではあるものの、大動脈の血圧に耐えうる組織を形成していることがわかった。脱細胞化心臓弁の移植実験を行なった例数は合計4頭であった。しかしながら、いずれの場合も手術中の動物の死亡により、データを取得することはできなかった。手術中の循環呼吸器系の機能を人工心肺装置に移行する際や、移植片の縫合後の人工心肺装置からの離脱時の、動物の管理が困難であることが問題であった。各手術において、条件や使用する器具の検点を重ね、手術成功率の向上を目指している。

脱エラスチン血管：本年度は、移植12ヶ月後の

摘出が2件行った。体重10kgの時点で移植したものの、そのうち1頭目は摘出時体重が30kgしかなく、2頭目は54kgのまで成長していた。摘出した移植片は、いずれも激しく石灰化しており、さらに完全に血管内腔が狭窄していた。これまでの組織学的評価やカルシウム量の測定に加え、本年度より、X線CT画像から骨塩量を測定して石灰化の程度として示す試みと、移植片における石灰化部分の検討を開始した。1頭目では、主に血管壁部分に石灰化が観察され、2頭目では狭窄部に激しい石灰化が認められた。組織染色を行なった結果、CT画像にて検出された石灰化部分は、von Kossa染色と一致していた。しかし、組織内の細かい石灰化部分に関しては、von Kossa染色で検出されていても、CT撮影では検出できないこともわかった。Elastica van Gieson染色の結果、血管の内腔が保たれていた部分の血管壁には良好にエラスチン繊維が再生していたのに対し、狭窄部にはほとんど存在していないことがわかった。狭窄部のほとんどは線維化組織と石灰化であった。免疫染色によりT細胞の指標であるCD3陽性細胞は、いずれの箇所にも確認されなかったことから、移植片は宿主動物の免疫活性を惹起しない、抗原性の低い組織であることがわかった。血管内皮細胞、平滑筋細胞と線維芽細胞の染色の結果、石灰化の周辺には、平滑筋細胞や線維芽細胞がランダムに混在し、狭窄部でない血管壁でも内腔側に血管内皮細胞は存在していなかった。

血管（異種移植モデル用）：異種移植実験では、未処理ブタ血管、脱細胞化血管とグルタールアルデヒド架橋した血管（架橋血管）の三種類を、ラット背部皮下に移植した。移植2週間後の摘出時の目視観察においては、移植片周辺に細かく蛇行する新生血管の集合が観察された。血管数は三種類の移植片間で大きな違いはなく、実体顕微鏡下で観察では、他の2種類の移植片と比して未処理血管周辺の新生血管数は少なかった。脱細胞化血管と架橋処理血管の比較では、脱細胞化血管周辺には、多分岐の細い血管が多く、架橋処理した血管では、分岐の少ない太い血管が集合していた。

移植1週間後に移植片を摘出し、HE染色を行った。未処理血管および脱細胞化血管周辺には多数の細胞集合がみられ、カプセル化層に覆われていた。移植片と組織の境界部では、移植片に向かって、リンパ球やマクロファージ様の血球系細胞が多数確認された。さらに、移植片の端から組織内部に侵入した細胞は、未処理の血管にて実質細胞が多く、脱細胞化血管では、ほとんどが血球系

細胞であった。さらに、免疫染色により好中球やTリンパ球を観察した。ヘルパーT細胞に関しては、いずれの移植片でも、内部と周辺組織にほとんど細胞は存在していなかった。一方、細胞障害性T細胞は、未処理血管にて脱細胞化血管よりも多く、移植片のごく近傍に集合しつつあることが観察された。さらに、好中球に関しては、未処理血管では少なく、脱細胞化血管周辺組織に多数観察された。各移植片近傍の組織におけるマクロファージ分極化を表すサイトカイン発現パターンを調べるため、摘出した組織からM1タイプとM2タイプを特徴付けるIL-1b、IL-6、IL-10、TGFbの4種類のサイトカイン発現量をPCRにて定量化した。サイトカイン発現量を、移植1、2、3週間目で測定した。架橋処理血管については、IL-1bとIL-10のみ発現量を測定した。通常のラット皮下組織における各サイトカイン発現量は、測定可能域以下であった。移植後1週間目では、いずれの組織片においてもサイトカインの発現が認められ、特に炎症を促進するIL-1bやIL-6の発現量が高かった。治癒を誘導するM2タイプサイトカインのIL-10は、脱細胞化血管のみ発現量が高く、他の二つの移植片でも、わずかではあるが発現していることがわかった。しかし、未処理血管と架橋血管は、M1タイプのサイトカイン発現が亢進していた。移植2週間目になると、未処理血管周辺では、着目する4種類のサイトカインについてはほとんど発現が認められず、他の2種類の移植片でも1週間目と比較すると、全て低下していることがわかった。脱細胞化血管では、依然としてM1タイプサイトカインの発現が高い傾向であった。架橋処理血管では、2週間目になると、IL-1bとIL-10の相反する機能を持つサイトカインの発現が、ほぼ同等に認められた。本研究で用いた移植片のそれぞれに対し、どのようなサイトカイン発現パターンが理想的な組織再生を示すかについては、未解決であるが、マクロファージの分極化は異なるパターンを示すことがわかった。

C-2. 角膜組織

ポケット式移植：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2-3週間後においては、脱細胞化角膜が透明状態に変化した。また、一部の移植片においては、若干の微小血管の誘導がみられた。一方の未処理角膜では、炎症反応が示され若干の浮腫が認められるとともに血管の誘導が示され、

移植片の白濁化が示された。移植 4-5 週間後には、脱細胞化角膜は透明化しており、移植片周辺の誘導血管が消失した。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。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。移植後 1 年では、免疫反応は認められず、移植片の透明化も維持されていた。試料標本のヘマトキシリン-エオジン染色では、移植片内部への細胞の浸潤は認められなかった。マッソントリクローム染色では、移植片の残存が確認でき、埋入時に比べ若干の厚みの減少が認められたものの、移植片の融解、変性等は認められず、ほぼ完全な状態で存在していた。免疫染色では、マクロファージの存在は確認できず、良好な生体適合性が示された。

上皮欠損モデル移植：移植直後では、白濁した脱細胞化角膜が固定され、瞬目時においても脱細胞化角膜のズレ等は見られなかった。移植後 1 週間では、フルオレセイン蛍光発色による上皮再生観察を行ったが、欠損部位において蛍光が発光し、上皮再生は認められなかった。一方、角膜実質層間に埋入した白濁の脱細胞化角膜は、若干透明性が増していた。移植後 2 週間では、欠損部位の周囲から上皮の再生が認められた。また、角膜実質層間に埋入した脱細胞化角膜の透明性の更なる増加が確認できた。血管新生については、3 羽中 2 羽において血管新生は観察されなかった。1 羽については、結膜からの血管新生が欠損部位の一部で観察されたが、血管新生部分の縫合糸を抜糸することで、新生した血管の消退が見られた。移植後 1 ヶ月では、欠損部位全面において、フルオレセイン蛍光発光が見られず、上皮の再生が確認された。また、角膜実質層間に埋入した脱細胞化角膜のほぼ完全な透明化が認められ、さらに、欠損部の脱細胞化角膜においても、透明化が認められた。移植後 3 ヶ月では、欠損部位の全面にわたる上皮再生状態の維持が確認されていた。移植後 6 ヶ月では、フルオレセインの蛍光発色は見られず、欠損部位の上皮再生は良好であった。また、目視観察においても、欠損部位の凹凸は見られず、透明状態が維持されており、上皮層の再生が確認できた。組織学的評価として、ヘマトキシリン-エオジン染色にて角膜組織を観察したところ、上皮層の再生が確認できた。

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ライフ社(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に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プ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プ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には不明であるが、その原因候補の一つとしてエラスチンが挙げられ、脱エラスチン血管のプロトタイプを開発した。移植実験では、移植半年以内の初期における石灰化が激しく、12 ヶ月まで観察すると、程度が緩和されたものの、作製条件の最適化が必要と考えられたため、本年度は等方静水圧印加処理を除き、脱エラスチン処理とその後のバッファーによる洗浄のみで作製した脱エラスチン血管の移植実験を試みた。これまでに合計 10 頭の移植実験を行ない、3 ヶ月から 12 ヶ月までの間にて移植片を評価してきたが、そのうち 4 例が石灰化を形成する結果となった。原因は特定できないものの、一般的に石灰化の形成に関してエラスチン繊維が原因であるという考え方は、必ずしも適当ではない可能性が示唆された。脱エラスチン処理後の移植片保存溶媒にこれまでリン酸緩衝液を用いてきたため、この溶液に含まれるリン酸塩が石灰化を招く可能性も考えられる。今後の改良点として、臨床の場合でも利用されている生理食塩水など、必要最低限の塩しか含まれない水溶液中に保存することが、石灰化の低減に大きく貢献できると考えられた。脱細胞化心臓弁に関しては、移植成功例が極めて少ないものの、これまでに移植 12 ヶ月後の結果が 2 頭分、得られている。いずれの場合にも、心臓弁としての機能を十分果たしており、動物も健常であった。移植前と移植後の弁から遠位側の血管部分の内径および長さも成長が認められ、弁葉 3 枚とも、ネイティブの弁葉と同様に大きさが異なる、健常

の心臓弁と変わらない成果を得られた。組織学的検討からも、ネイティブと同等の組織を再構築しており、石灰化も認められず、良好な結果を得ているため、今後、移植性効率の向上を目指すことが課題として残っている。また、本研究は、低圧力環境である、肺動脈弁で検討している。石灰化は高圧化により誘導されやすいといわれていることから、手術の成功率とともに、大動脈弁置換術の検討を進めていく必要がある。

角膜組織については、ブタ脱細胞化角膜をウサギ角膜に埋入し、長期の生体適合性を検討した。初期の炎症反応も認められず、約2-3週後に移植片は透明状態となった。その後良好な組織適合性を維持し、約1年間後においても、炎症反応は認められず、透明性が維持されていた。組織学的評価にて、移植片の残存が確認され、移植片への細胞浸潤は示されなかった。これらの結果は、脱細胞化角膜の良好な生体適合性と高機能性を示している。また、レシピエント角膜の上皮部を欠損させた後に脱細胞化角膜を移植モデルを検討した。初期炎症過程は、検体により違いみられ、新生血管が誘導された場合もあった。新生血管誘導が認められた場合でも、抜糸後に血管の消退がみられ、それに伴い角膜の透明化が認められた。血管誘導のない場合は、速やかな透明化が見られた。また、同時期に、上皮再生がフルオレスセンス観察にて確認された。このことから、血管新生によらず、透明化には上皮再生が必要であることが推察される。血管誘導については、手技的な要素があり、移植時の縫合時の糸のテンション等、あるいは、上皮欠損作成時間が影響すると考えられる。これらについて、詳細な検討と手技の確立が必要と考えられる。特に、レシピエント角膜組織への浸襲が強度であった場合に、血管誘導される場合が多く、血管誘導した場合において、縫合糸の抜糸後に良好に血管が縮退し消失したことも一致し、これについては早期の検討が必要と考えられる。今後、上述の検討課題への解法を早期に確立し、長期間の移植実験にて得られたデータをもとに臨床応用への展開を図る。

E. まとめ

超高压印加を基盤とした処理方法で脱細胞化した循環器系組織ならびに角膜にて、完全な脱細胞化が達成された。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た。循環器系においては更なる石灰化抑制が必要であるが、石灰化の原因要素とそれに対する改良型の脱細

胞化プロトコールに目処が付き、動物実験による改良型脱細胞化循環器系組織の検証を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). 岸田晶夫, 藤里俊哉, 第1章6 バイオ材料としての脱細胞化生体組織, 新材料・新素材シリーズ 次世代医療のための高分子材料工学 監修: 秋吉一成 岸田晶夫, シーエムシー出版, 2008
- 2). 岸田晶夫, 第4章 生体用高分子材料, 材料学シリーズ No.33 バイオマテリアル 材料と生体の相互作用, 田中順三 角田方衛 立石哲也 編, 内田老鶴圃, 2008
- 3). Kwangwoo Nam, Ayako Murakoshi, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, Soichiro Kitamura, Akio Kishida, Study on the physical properties of tissue-engineered blood vessels made by chemical cross-linking and polymer-tissue cross-linking, *Journal of Artificial Organs*, 12, 47-54, 2009
- 4). Shingo Mutsuo, Kazuya Yamamoto, Tsutomu Furuzono, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Ono, Akio Kishida. Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 46(7), 743-750, 2008
- 5). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents. *Macromolecular Bioscience*, 8, 32-37, 2008
- 6). Kazuya Sawada, Dohiko Terada, Tetsuji Yamaoka, Soichiro Kitamura, Toshiya Fujisato. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 83, 943-9, 2008
- 7). Mano A, Nakatani T, Oda N, Kato T, Niwaya K, Tagusari O, Nakajima H, Funatsu T, Hashimoto K, Komamura K, Hanatani A, Ueda H, Kitakaze M, Kobayashi J, Yagihara T and Kitamura S. Which factors predict the recovery of national heart function after insertion of a left ventricular assist system?, *J Heart Lung Transplant*, 27, 869-74, 2008
- 8). Minatoya K, Ogino H, Matsuda H, Sasaki H, Yagihara T and Kitamura S. Replacement of the descending aorta: recent outcomes of open

- surgery performed with partial cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 136(2), 431-5, 2008
- 9). Nakanishi C, Yamagishi M, Hagino I, Mori H, Sawa Y, Yagihara T, Kitamura S and Nagaya N. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(1)11-6, 2008
 - 10). Tsuda E, Fujita H, Yagihara T, Yamada O, Echigo S and Kitamura S. Competition between native flow and graft flow after coronary artery bypass grafting. Impact on indications for coronary artery bypass grafting for localized stenosis with giant aneurysms due to Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol*, 29, 266-70, 2008
 - 11). Kawamura M, Ogino H, Sasaki H, Matsuda H, Minatoya K, Tanaka H and Kitamura S. Spinal cord malperfusion caused by using the segmental clamp technique during descending aortic repair for chronic type B aortic dissection. *Interactive Cardiovasc & Thorac Surg*, 7(1), 146-8, 2008
 - 12). Nakamura Y, Ogino H, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H and Kitamura S. Hemolytic anemia after operation for aortic dissection using teflon felt strips. *Ann Thorac Surg*, 85, 1784-7, 2008
 - 13). Ogino H, Sasaki H, Minatoya K, Matsuda H, Tanaka H, Watanuki H, Ando M and Kitamura S.. Evolving arch surgery using integrated antegrade selective cerebral perfusion: Impact of axillary artery perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 136, 641-9, 2008
 - 14). Tsunekawa T, Ogino H, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H, Kobayashi J, Yagihara T and Kitamura S. Composite valve graft replacement of the aortic root: Twenty-seven years of experience at one Japanese center., *Ann Thorac Surg*, 86, 1510-7, 2008
 - 15). Watanuki H, Ogino H, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H, Fukuda T and Kitamura S. Dilation of the aneurysmal sac after total arch replacement., *Ann Thorac Surg*, 85, 639-41, 2008
 - 16). 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、服部晋也、本田貴子、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成と評価、*高压バイオサイエンスとバイオテクノロジー*, 2, 138-144, 2008
 - 17). 寺田堂彦、木村剛、岸田晶夫、藤里俊哉、バイオスカフールド、*バイオマテリアル*, 26(4), pp309-319, 2008
2. 学会発表
 - 1). Kobayashi H. Research activities of biofunctional materials group. Workshop nanomaterials for tissue engineering, Warsaw, Poland, April, 2008
 - 2). Kobayashi H. Top down and bottom up approaches to develop reliable artificial cornea. 6th NIMS-MPI workshop, Aioi, Japan, May, 2008
 - 3). Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Mochizuki M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Novel decellularization technique of the cornea using ultra high hydrostatic pressure. 8th WBC, Netherlands, May, 2008.
 - 4). Hattori S, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam K, Fujisato T, Kitamura S, Kishida A, Honda T, Kobayashi H, Ultra-structure analysis of decellularization of cornea using ultra-high hydrostatic pressure treatment. 8th WBC, Netherlands, May, 2008.
 - 5). K Nam, T Kimura, A Kishida, Preparation and Characterization of Collagen Gel Designed for Tissue Membrane, Netherlands, May, 2008.
 - 6). S Funamoto, Y Hashimoto, T Kimura, K Nam, T Fujisato, A Kishida, Preparation of Decellularized Bone using Ultra-High Hydrostatic Pressure for Scaffold of Tissue Regeneration, Netherlands, May, 2008
 - 7). Kobayashi H, Hattori S, Yoshilawa C, Honda T. Surface modified Poly(vinyl alcohol) nanofibers for regeneration of corneal stroma. 8th WBC, Netherlands, May, 2008.
 - 8). K Nam, A Murakoshi, T Kimura, T Fujisato, A Kishida, Controlling Cross-linking Rate of Decellularized Blood Vessel using Collagen Coupling Reaction Technique, 8th WBC,

Netherlands, May, 2008.

- 9). A Murakoshi, S Funamoto, T Fujisato, T Nakatani, S Kitamura, T Kimura, A Kishida, Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue using Ultra High Pressurization, 8th WBC, Netherlands, May, 2008.
- 10). 南広祐、木村剛、岸田晶夫、組織膜を目指したコラーゲングルの作製と生物学的特性検討Ⅲ、第37回医用高分子シンポジウム、東京、2008年7月。
- 11). 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、本田貴子、服部晋也、望月學、藤里俊哉、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫。脱細胞化角膜を用いた眼科用足場材料の研究。第37回医用高分子シンポジウム、東京、2008年7月。
- 12). 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月學、服部晋也、藤里俊哉、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫。角膜再生用スキャホルドの開発と機能評価。第57回高分子討論会、大阪、2008年9月。
- 13). 服部晋也、木村剛、吉川千晶、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月學、南広祐、藤里俊哉、北村総一郎、岸田晶夫、本田貴子、小林尚俊。脱細胞化処理による角膜実質の微細線維構造の変化に関する研究。第57回高分子討論会、大阪、2008年9月。
- 14). 南広祐、木村剛、岸田晶夫、コラーゲングルの構造特性による物理・生物学的特性評価、第57回高分子討論会、大阪、2008年9月。
- 15). Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Hattori S, Mochizuki M, Honda T, Fujisato T, Kishida A. Structure evaluation of porcine cornea decellularized by ultra high hydrostatic pressurization. E-MRS, Warsaw, Poland, September, 2008.
- 16). Hattori S, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Honda T, Kishida A, Kobayashi H. Structural features of decellularized cornea using ultra high hydrostatic pressurization method. TERMIS-AP, Taipei, Taiwan, November, 2008.
- 17). Honda T, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Fujisato T, Hattori S, Kishida A, Kobayashi H. Evaluation of decellularized cornea made by ultra high hydrostatic pressurization method as a scaffold for corneal stroma. TERMIS-AP, Taipei, Taiwan, November, 2008
- 18). 服部晋也、本田貴子、木村剛、船本誠一、橋本良秀、岸田晶夫、佐々木秀次、望月學、藤里俊哉、吉川千晶、小林尚俊。高圧印加処理を用いた脱細胞化による人工角膜開発の試み。日本バイオマテリアルシンポジウム、東京、2008年11月。
- 19). 根岸淳、木村剛、南広祐、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压を利用したPVA-ヘパリン複合体の調製と評価、日本バイオマテリアルシンポジウム、東京、2008年11月。
- 20). 本田貴子、服部晋也、吉川千晶、小林尚俊。ナノファイバーを用いた人工角膜開発の試み。日本バイオマテリアルシンポジウム、東京、2008年11月
- 21). Kobayashi H. Challenge to develop reliable corneal stroma through tissue engineering approaches. BTEB-2008, India, November, 2008
- 22). 船本誠一、佐々木秀次、橋本良秀、服部晋也、本田貴子、望月學、藤里俊哉、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫、移植用角膜組織作製のための脱細胞化処理方法の検討とin vivo評価、第46回日本人工臓器学会大会、東京、2008年11月
- 23). Akio Kishida, Tuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Kwangwoo Nam, Syuji Sasaki, Manabu Mochizuki, Toshiya Fujisato, Hisatoshi Kobayashi, Decellularization of Porcine Cornea by Ultra-high Pressurization and In Vivo Study, The TERMIS-NA 2008 Annual Conference & Exposition, December, 2008
- 24). 服部晋也、木村剛、船本誠一、橋本良秀、佐々

木秀次、望月學、藤里俊哉、本田貴子、岸田晶夫、小林尚俊、高圧印加処理を用いての脱細胞化角膜の構造解析、つくば医工連携フォーラム、つくば、2009年1月

25). 本田貴子、服部晋也、吉川千晶、小林尚俊、高分子ファイバーを用いた人工角膜開発の試み、つくば医工連携フォーラム、つくば、2009年1月

26). 船本誠一、佐々木秀次、橋本良秀、服部晋也、本田貴子、望月学、藤里俊哉、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫、脱細胞化技術を用いた移植・再生医療用角膜の開発、第8回日本再生医療学会総会、東京、2009年3月

27). 根岸淳、船本誠一、木村剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫、超高圧を利用した脱細胞化小口径血管グラフトの作製と評価、第8回日

本再生医療学会総会、東京、2009年3月

28). 船本誠一、佐々木秀次、橋本良秀、服部晋也、本田貴子、藤里俊哉、望月学、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫、脱細胞化技術を用いた異種角膜組織からの移植・再生医療用角膜の開発、第12回日本異種移植研究会、2009年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
出願準備中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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 昨年度までに開発した超高压処理による脱細胞化と酵素処理によるエラスチン線維除去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、狭窄は認めなかったものの、無視できない石灰化を経験した。世界的には細胞を組み込んだin vivo再生型の研究例が多い。次年度は、細胞組込について検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

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、代用弁として、パイロライトカーボンを用いた機械弁あるいはブタ由来の生体弁が使用される。機械弁は抗凝固が必要であり、生体弁はグルタルアルデヒドで細胞および細胞間マトリックスを架橋処理することによって抗原性を減弱しているものの、残存している細胞片や異種抗原が石灰化を誘発すると考えられている。機械弁はもとより、生体弁も前述の架橋処理によってレシピエントの生体反応による分解を阻止しているため、いずれも”非生体”であり、レシピエントの組織に置換されることはない。一方、我が国では極めて数少ないものの、世界的には凍結保存同種弁（ホモグラフト）も数多く使用されている。ホモグラフトは他家組織であるが架橋等の化学処理は行われておらず、部分的にはレシピエント組織の浸潤が期待される。しかし、抗原性や凍結保存時の組織損傷による劣化や石灰化が指摘されており、長期的な成績では生体弁より少し良い程度ではないかと思われる。これらに対し、再生型心臓弁では、レシピエント細胞の浸潤によるリモデリングと再生を経て、いずれ組織全体が完全に自己化されることを目論んでいる。

組織工学による再生医療では、“細胞”、“増殖因子”、“足場”が三要素とされるが、心臓弁や大動脈などではコラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスが力学的特性を担っており、特に足場が重要である。再生型弁の足場とし

ては、脱細胞化組織あるいは生体吸収性材料が使用される。生体吸収性材料の場合は、吸収性縫合糸と同様の材料を用いて弁形状を作成するものであり、形状安定性や量産性といった製造面では優位である。一方、脱細胞化組織の場合は、同種あるいは異種心臓弁から細胞成分を除去するものであり、形状を作成する必要がなく、力学特性も比較的保存されるという優位点がある。

前述のように、ホモグラフトは架橋処理されていないものの、完全には自己化されない。脱細胞化再生型弁では架橋処理を行わず、ドナー細胞成分を除去することによって抗原性を除去するとともにドナー組織の分解性を保持することで、レシピエントによる完全な自己化を達成する。多くの場合、細胞成分の除去は、界面活性剤や酵素、低張液を組み合わせることで、界面活性剤や細胞残渣を洗浄除去することによって行われる。界面活性剤にはSDS (sodium dodecylsulfate) や Triton X-100、デオキシコール酸ナトリウムなどが、酵素にはトリプシンやDNase、RNaseなどが用いられる。どの処理剤が最適かについては様々な報告があるが、様々なグループが個々のレシピを使用しているのが現状である。界面活性剤は細胞毒性を有するので、その除去は重要である。

我々は、界面活性剤を用いない脱細胞化処理法について検討を重ね、超高压印加法と酵素による脱エラスチン線維法を開発している。本年度は、これらの処理法を組み合わせ、ミニブタ下行大動脈に同所性に移植した。

B. 研究方法

脱細胞化処理: クラウン系ミニブタ ((株) ジャパンファーム) から清潔下にてブタ心臓を摘出し、大動脈弁を採取した。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。その後、0.2mg/ml DNase I 含有EGM-2を用いた振盪洗浄にて2週間、80%エタノール溶液にて3日間振盪洗浄を行い、細胞残渣を除去した。続いて組織を凍結乾燥し、真空オープン内で120℃にて24時間静置することで熱架橋処理を施した。処理後、エラストナーゼ溶液 (0.57 μ g/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。

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。

(倫理面への配慮)

動物実験における動物愛護上の配慮は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成17年6月22日公布)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示)、実験動物の適正な実施に向けたガイドライン(平成18年6月1日日本学会会議)等に基づき、当施設の実験動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、上記法律及び基準に則った国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するように努めた。

C. 研究結果

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(図1)。しかし、Kossa染色の結果より、無視できない石灰化が3例中2例で認められた(図6)。摘出した移植組織の染色像を図2~6に示した。

D. 考察

本年、CryoLife社のヒト組織を脱細胞化した再生型肺動脈弁がFDAの認可を受け、市販が開始された。これに先立つほぼ8年前、2000年10月に同社のブタ組織を脱細胞化した再生型弁 SynerGraftが欧州CEマークの認証を受け、臨床使用が開始された。しかし、その成績は惨憺たるもので、オーストリアで2001年から行われた小児患者4例に対する右室流出路再建では、1週間後の1例を含めて1年以内に3例が死亡し、これに伴って1例は術後2日で摘出を余儀なくされた。いずれも残存した異種抗原による炎症反応が原因であると考えられている。その後、同社はヒト組織を脱細胞化した再生型肺動脈弁CryoValve SGの開発を続け、FDAの認可を得ることに成功した。脱細胞化には低張液と酵素の組み合わせを使用している。成人ロス手術での肺動脈弁移植23例における4年間のフォローアップでは、徐々に圧較差が上昇したもののホモグラフトと比較して有意差はなかったと報告されている。同社ウェブサイトによると、2000年からの臨床使用実績は1,800例を超えており、399例の4年間のフォローアップでは弁に起因する死亡率は2%以下、小児患者での圧較差は平均24mmHgであった。

一方、独ベルリン医大のKonertzらは、脱細胞化したブタあるいはヒト肺動脈弁に、前もって伏在静脈から採取した自己内皮細胞を播種し、ロス手術での肺動脈弁移植に用いている。脱細胞化には界面活性剤を使用している。2000年から行われた23例の5年間の中期成績では、再手術1例、死亡1例を除く21例について、正常な弁機能を報告している。また、移植後6年の患者から血管壁の一部を採取し、内腔面が内皮細胞層に覆われていることと血管壁深部までの自己細胞化を報告している。ベンチャー企業のAutoTissue社を設立し、Matrix Pと命名された再生型肺動脈弁は、ウェブサイトによると既に臨床使用実績が1,000例を超えている。

ロス手術は手技が複雑であるものの、代用大動脈弁として自己組織に勝るものはない。古いデータであるが、ロス手術後20年間のフォローアップによると、肺動脈弁位のホモグラフトに起因する再手術例が2割程度ある。現在、臨床使用されている上記再生型弁はいずれも肺動脈弁であり、主にロス手術における肺動脈弁位に使用することを

目的としている。最も必要である再生大動脈弁は未だ安定した成績が報告されておらず、大規模な臨床例はない。

ホモグラフトの供給を考えると、ドナーはブタが適当である。ヒトと旧世界サル以外のほ乳類がもつ α -Galエピトープは超急性拒絶反応を引き起こすことが知られている。また、ブタ内在性レトロウイルスのヒトへの感染が以前から危惧されてきたが、現在では大きな心配はないと思われる。これらは、脱細胞化過程における除去が必須であるが、将来的にはドナーブタの遺伝的改良も図られるであろう。脱細胞化の評価は一般に組織染色とDNA定量によって行われるが、臨床での安全性を確保するための統一的な評価項目、評価方法、評価基準の確立のため、ISOへの提案が検討されている。

移植前に患者細胞を播種する必要があるのかないのかは明確な結論が得られていない。報告を見る限りでは、細胞を播種しているグループの方が多くに思われる。広く扱われる製品とするためには細胞を播種しない、いわゆる*in vivo*再生型の方が適していると考えられるが、長期成績を左右するのであれば、*in vitro*再生型もやむを得ないであろう。この場合、患者から得たiPS細胞が細胞プロセス施設にて使用されることになると思われる。

本年度は、超高压脱細胞化とエラスチン線維除去を組み合わせ処理した再生型血管の長期動物実験を行った。しかしながら、無視できない石灰化を認めた。明確な原因は不明である。次年度は、他のグループが検討しているような、細胞を播種した再生型組織の検討を行う予定である。

E. 結論

現在の生体弁は耐久性向上のための改良もあって、弁膜症例の9割を占める高齢患者において15~20年間は使用可能である。これはホモグラフトと比べても遜色なく、代用弁としてあまり問題のない状況である。しかし、先天性小児患者からは再置換を必要としない再生型心臓弁・血管が強く望まれている。現在のところ、再生型肺動脈弁は臨床使用に耐えうるものが開発されたといえるが、再生型大動脈弁は未だ開発途上である。我々の再生型大動脈弁もあと一歩改良が必要だと感じている。いずれ開発された再生型大動脈弁

はまず小児患者を中心に使用され、その耐久性が証明されることによって、いずれ全患者にとっての第一選択肢となるであろう。

研究協力者

湊谷謙司 国立循環器病センター
心臓血管外科医長

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) 澤田和也、寺田堂彦、藤里俊哉. 超臨界流体抽出を応用したバイオスキャフォールド調製. Jasco Report 超臨界特集9, 111-6. ジャスコレポート社、東京、2007.
- 2) 岸田晶夫、藤里俊哉. バイオ材料としての脱細胞化生体組織. 秋吉一成、岸田晶夫監修. 次世代医療のための高分子材料工学, 55-65. シーエムシー出版、東京、2008.
- 3) 寺田堂彦、木村 剛、岸田晶夫、藤里俊哉. バイオスキャフォールド. バイオマテリアル 2008; 26(4): 309-19.
- 6) Sawada K, Terada D, Yamaoka T, Kitamura S, Fujisato T. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. J Chem Technol Biotechnol 2008; 83: 943- 9.
- 7) Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kitamura S, Kishida A. Study on the physical properties of tissue-engineered blood vessels made by chemical cross-linking and polymer- tissue cross-linking. J Artif Organs 2009; 12: 47-54.

2. 学会発表

- 1) 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、松本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣. バイオスキャフォールドを用いた動脈系血管組織再生. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8~10日
- 2) 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実験的検討. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8~10日

- 3) Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Controlling Cross-linking Rate of Decellularized Blood Vessel using Collagen Coupling Reaction Technique. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 4) Murakoshi A, Funamoto S, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kimura T, Kishida A. Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue using Ultra High Pressurization. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 5) 寺田堂彦、山崎健一、林 宏行、橋本成広、藤里俊哉. 一軸配向性三次元培養のためのコラーゲンスポンジの開発. 平成20年度繊維学会年次大会、東京、2008年6月18～20日
 - 6) 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分光法を用いた生体高分子ゲルの特性評価. 日本バイオマテリアル学会 第3回関西若手研究発表会、吹田、2008年8月7日
 - 7) Terada D, Sawada K, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Funamoto S, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S, Fujisato T. Regenerative arterial graft made of biological tissue. TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, Nov 6-8, 2008
 - 8) 寺田堂彦、藤里俊哉、中谷武嗣、北村惣一郎、増谷有紀. 再生型同種移植弁開発のための脱細胞化ヒト心臓弁の基礎的評価. 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会、東京、2008年11月22～3日
 - 9) 佐合 満、江橋 具、玉井克明、藤里俊哉、森反俊幸、山岡哲二. 生体反応を利用した脱細胞化血管の作製. 第46回日本人工臓器学会大会、東京、2008年11月27～29日
 - 10) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Kishida A, Yamaoka T, Fujisato T, Nakatani T. Regeneration of Artery by using Biological Grafts Derived From Aortic Tissue. TERMIS-NA, San Diego, CA, USA, Dec 7-10, 2008
 - 11) 近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた脱細胞化血管組織の特性評価. 再生医療学会、東京、2009年3月5～6日
 - 12) 寺田堂彦、林 宏行、橋本成広、藤里俊哉. 一軸配向性組織の三次元培養用スキャフォールド. 再生医療学会、東京、2009年3月5～6日
 - 13) 根岸 淳、船本誠一、木村 剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫. 超高压を利用した脱細胞化小口径血管グラフトの作製と評価. 再生医療学会、東京、2009年3月5～6日
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)
なし

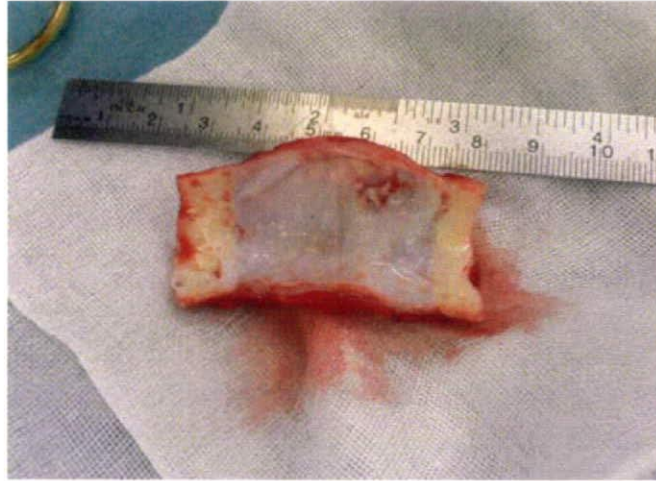


図1. 12ヶ月移植後の摘出時所見

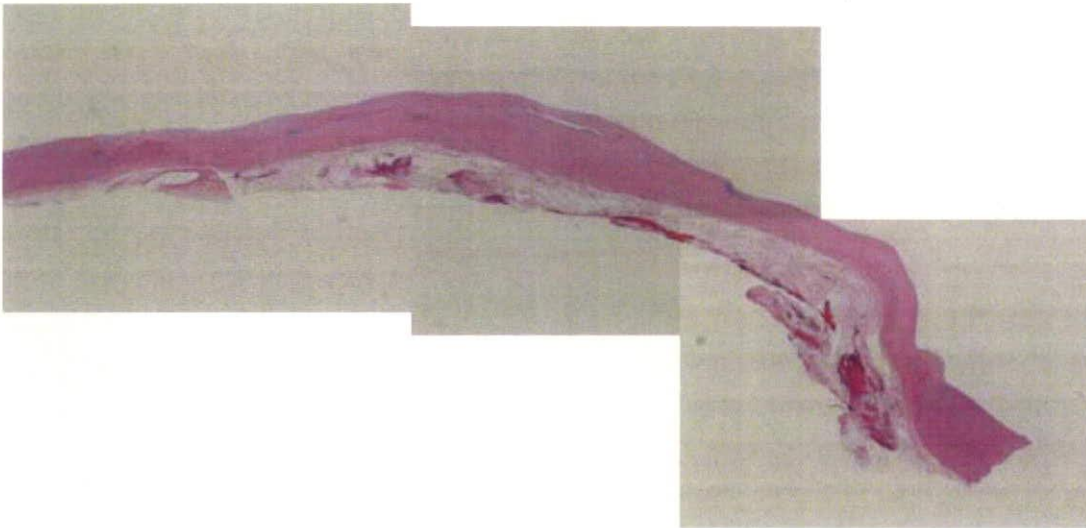


図2. 12ヶ月移植後のHE染色像

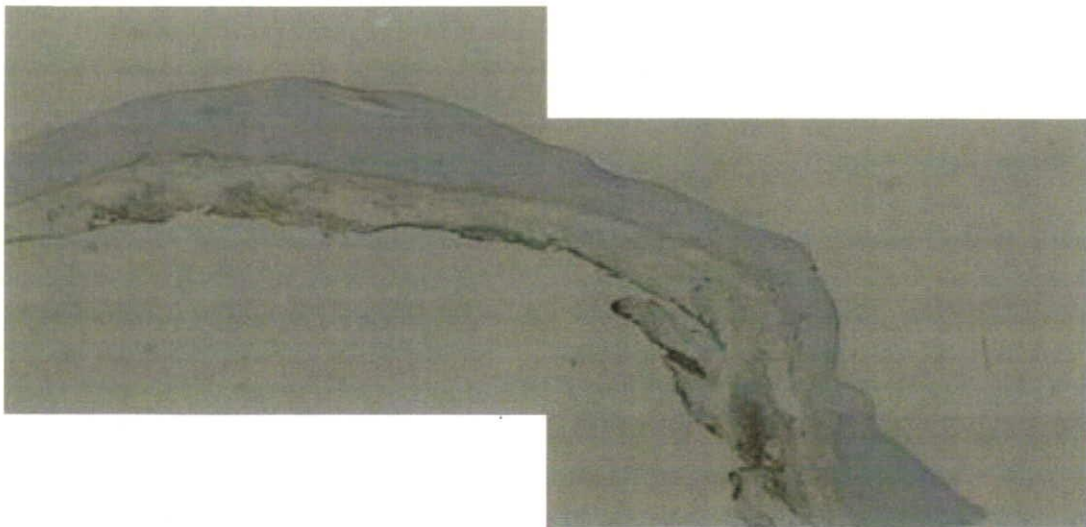


図3. 12ヶ月移植後の抗vWF染色像 (内皮細胞)

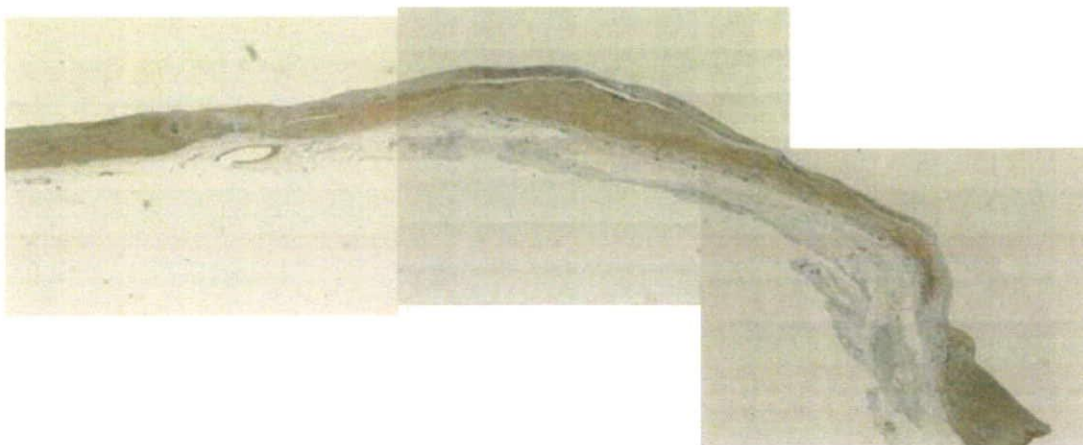


図4. 12ヶ月移植後の抗SMA染色像（平滑筋細胞）

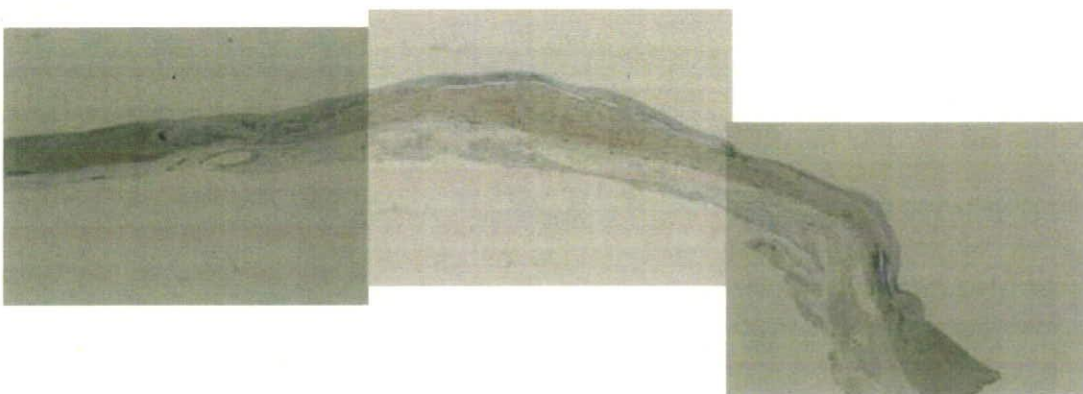


図5. 12ヶ月移植後の抗Vim染色像（線維芽細胞、内皮細胞）



図6. 12ヶ月移植後のKossa染色像（石灰化）

循環器系再生型組織の *in vitro* 評価に関する研究

分担研究者 山岡 哲二 国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部長

研究要旨 脱細胞化循環器系組織への機能分子の複合化を目的に、超高压印加法にて調製したヘパリン含有 PVA ゲルからのヘパリン徐放について検討を行っている。本年度は、ヘパリン徐放能向上を目的に、ゲル調製法や抗血栓性評価、ゲル構造について検討した。高重合度、高鹼化度 PVA を用いて作製したヘパリン含有 PVA ゲルではヘパリン溶出遅延が示された。超高压印加法、凍結融解法ゲル作製過程の処理によるヘパリン ATIII 活性の低下はなく、本研究で得られたゲルから溶出したヘパリンは抗血栓性を有していることが認められ、Lee-White 試験でもヘパリン含有 PVA ゲルの抗血栓性が確認された。SEM を用いたゲル構造評価により、超高压印誘起ヘパリン含有 PVA ゲルは均一なヘパリン分布を有していることが示された。

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 年にポーヒースらが VinylonN 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ホ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ホ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ホールドは、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。

以上の背景から、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組織としての理想的状態と考えられる。

一方、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圧処理法を開発・検討している。超高圧印加法は、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圧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、超高圧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ックス間の水素結合、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、超高圧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期待できる。昨年度は、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検討した。具体的には、脱細胞化血管へのヘパリンの浸漬含有を検討し、また、ヘパリンの徐放については、モデル人工血管として PVA ゲル人工血管を検討した。本年度は、ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管からのヘパリン徐放ならびに抗血栓性については詳細に検討した。

B. 研究方法

ヘパリン含有 PVA ゲル調製は 10%PVA 溶液を使用して行った。Water bath (90°C) 内で 10%PVA 溶液にヘパリンナトリウムを 30mg/ml の濃度になるように添加した。PVA-ヘパリン混合溶液を 3 分間攪拌し、アクリル製の型 (10×10×1.5mm) に混合溶液を流し込み、超高圧印加法、凍結融解法によりゲルを作製した。本研究では、PVA-HC (重