

合度 1750・鹼化度 99.8%)、PVA140 (重合度 4000・鹼化度 98.5%) と PVA117 (重合度 1750・鹼化度 98.5%) を使用した。

超高压印加法は、開始温度 10・25・50℃の 3 条件を用いてゲルを作製した。加圧時間 5 分、圧力保持時間 10 分、減圧時間 5 分、10,000 atm の処理し、超高压誘起ヘパリン含有 PVA ゲルを作製した。凍結融解法は、-20℃で凍結 2 時間、23℃での融解を 1 サイクルとし、8 サイクル処理して凍結融解ゲルを作製した。

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。ヘパリン溶出試験は、溶出液に PBS を使用し、37℃、振盪条件下で行い、溶液中ヘパリン濃度は検量線を用いて測定した。

PVA140 からの溶出試験及び、PVA ヘパリン混合溶液攪拌時間によるヘパリン溶出挙動変化検討のため、混合溶液攪拌時間 3 分、30 分、60 分の超高压誘起ヘパリン含有 PVA117 を作製し、溶出試験を行った。

ヘパリン含有 PVA ゲル抗血栓性評価として ATIII 活性測定と Lec-White 試験を行った。ゲル作製に使用した処理 (超高压、凍結融解、熱処理: 100℃・5 分、オートクレーブ処理: 121℃・20 分) を 4mg/ml ヘパリン溶液に施し、テストチーム[®]2 キット (CHROMOGENIX) を用いて ATIII 活性を測定した。Positive control として未処理ヘパリン溶液、Negative control として精製水を使用した。Lec-White 試験はヘパリン含有 PVA ゲル (10% PVA-140、120mg/ml ヘパリン (IU130/mg)) 及び PVA ゲル (10% PVA-140) をとガラス (カバーガラス 24mm×18mm) とテフロン (直径 22mm) を使用して行った。各サンプルに 10ml シリンジでブタ血液を 1 滴ずつ素早く滴下し、滴下後、一定時間 (1 分、3 分、4 分 30 秒、6 分、7 分 30 秒、9、12、15、18、24、30 分) 後に 1 サンプルずつ 10ml の生理食塩水に 10 回出し入れすることにより洗浄し、ブロックの表面の性状及び、洗浄に用いた生理食塩水の色の変化を観察した。洗浄後のブロックの表面に血栓が付着しているときに、その時間

を凝固時間とした。

ゲル構造評価には SEM/EDX を使用し、ヘパリン含有 PVA-HC ゲルの断面構造を観察した。ヘパリンの指標として硫黄元素 (S) を用い、硫黄元素のスペクトルからヘパリン分布を評価した。

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)。

PVA ゲルからのヘパリン溶出は、超高压誘起ゲルでは凍結融解ゲルと比較して溶出速度が抑えられることが認められた。PVA-140 では、超高压印誘起ゲルは凍結融解ゲルよりもヘパリン溶出を抑制し、超高压誘起ゲルでは約 3 ヶ月間のヘパリン徐放が確認された (図 2)。PVA ヘパリン混合溶液の攪拌時間による溶出挙動変化において、攪拌時間 3 分と 30・60 分では溶出速度に差があることが示された。攪拌時間 3 分の PVA ゲルでは溶出量が多くなることが確認された (図 3)。

ゲル作製に用いた処理を行ったヘパリン溶液の ATIII 活性測定では、ゲル化処理をした溶液全てで positive control と同等の ATIII 活性が維持されていることが確認された。Lec-White 試験の結果、PVA ゲル (3 分)、ガラス (4 分 30 秒)、テフロン (6 分) で凝固が観察されたが、ヘパリン含有 PVA ゲルでは実験時間中 (30 分) の凝固は見られなかった (図 4)。

SEM/EDX を用いたゲル構造観察において、ゲル内でヘパリン高含有部位が丸く存在していることが示された超高压誘起ゲルでは小さいヘパリン含有部位がゲル内に均一に存在していることが確認された。凍結融解ゲルにおいては、超高压誘起ゲルに比べ大型の円状ヘパリン含有部位がゲル表面に局在していた (図 5)。

D. 考察

ヘパリン含有 PVA ハイ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-140 とヘパリン混合溶液を超高压法によりゲルを作製することでヘパリン溶出を 3 か月維持することが可能である。
- 2) PVA とヘパリンの混合溶液を 30 分以上攪拌するとゲルからのヘパリン溶出量が低下する。
- 3) 本研究で用いたゲル化処理ではヘパリンの ATIII 活性は低下せず、超高压誘起ゲル・凍結融解ゲルから徐放されたヘパリンは抗血栓性を維持していると考えられる。

4) 超高压誘起ゲルはヘパリンが均一に分散しているのに対し、凍結融解ゲルではヘパリン分布が不均一であった。

5) 超高压法ではゲル作製時間が10分と短く、簡便にゲルを作製することが可能である。

4) には相分離とゲル化時間が関係していると考えられる。ゲル化時間が短い超高压法ではPVAとヘパリンが相分離している途中でゲル化させることができ、ヘパリンの徐放が可能になると考えられる。

E. まとめ

抗血栓薬剤であるヘパリンの徐放制御ために、本研究では、PVAゲルの作製条件、PVAの重合度抗血栓性とゲル構造の検討を行い、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。ゲル化処理によるATIII活性の低下は見られず、作製したゲルも抗血栓性を有していた。超高压印加法により、均一にヘパリンが分布したゲルの作製が可能だった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). K. Sawada, D. Terada, T. Fujisato, T. Yamaoka, and S. Kitamura, Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008, 83, 943-949
- 2). S. Kakinoki, A. Panitch, D. A. Tirrell, and T. Yamaoka, Fundamental Studies on Genetically Engineered Elastin Model Peptides for Biomaterials, *The Japanese Peptide Society*, 427-428 (2008)

2. 学会発表

- 1). 江橋 具、西垣戸麻美、藤里俊哉、森反俊幸、山岡哲二、生体由来スキヤフォールド移植による神経の機能再生、第57回高分子討論会、大阪、2008年9月。
- 2). 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。

- 3). 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、第8回日本再生医療学会総会、東京、2009年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

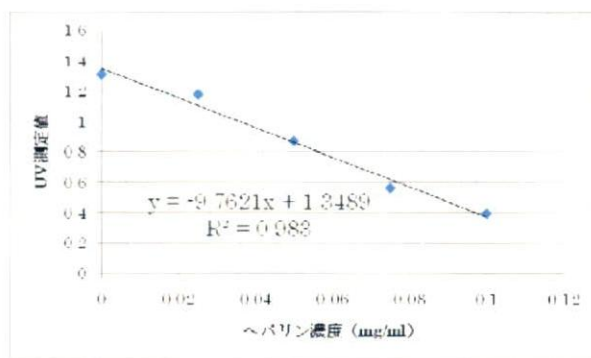


図 1. ヘパリンの検量線

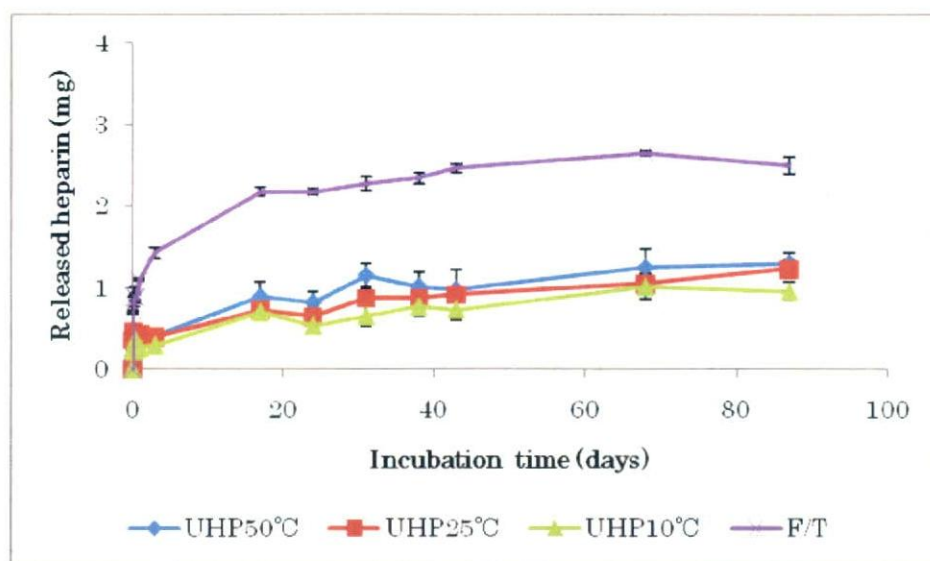


図 2. PVA-140 のヘパリン溶出試験

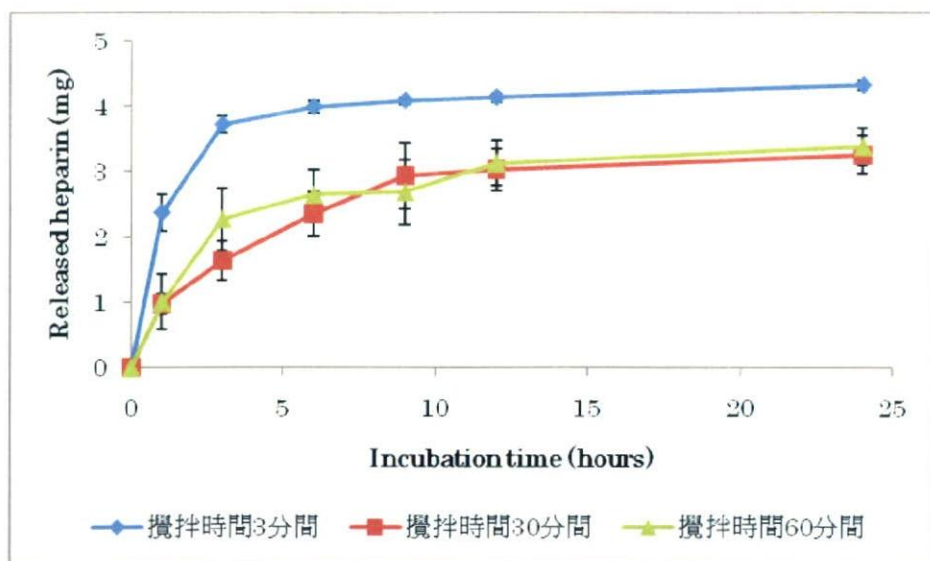


図 3. 混合溶液攪拌時間によるヘパリン溶出挙動比較

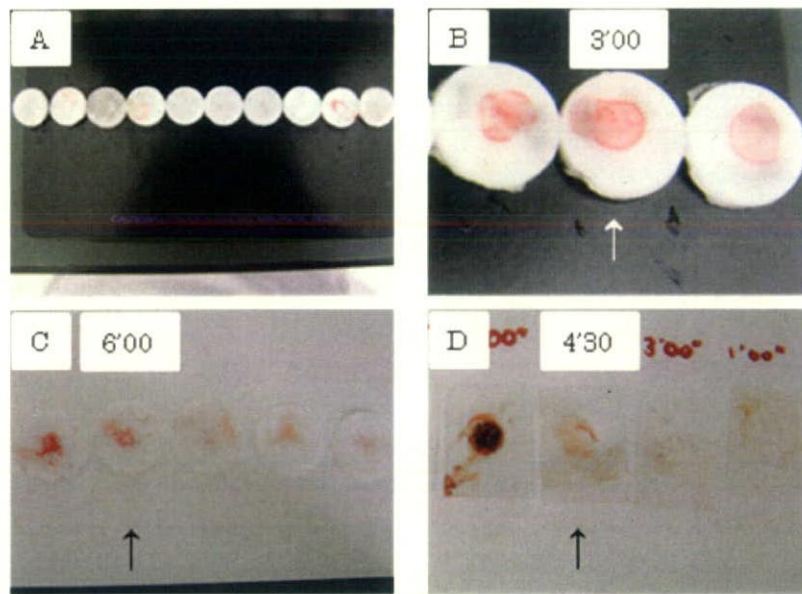


図 4. Lee-White 試験の血栓評価。(A) ヘパリン含有 PVA ゲル、(B) PVA ゲル、(C) テフロン、(D) ガラス。↑は血液凝固時間と認めたサンプル。

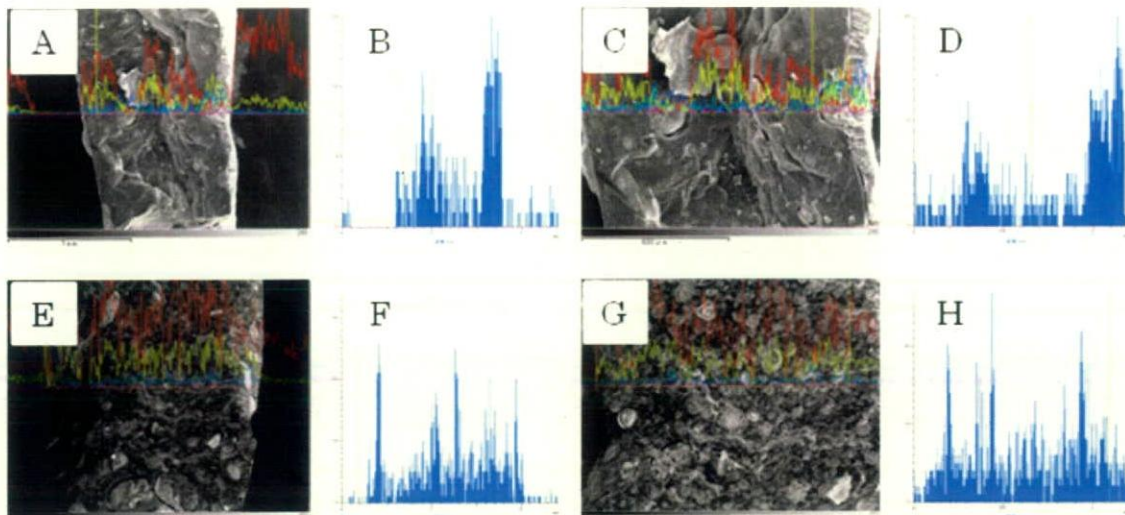


図 5. SEM/EDX によるゲル構造観察。(A-D) 凍結融解ゲル、(E-F) 超高压誘起ゲル (B, D, F, H) 各画像に対する硫黄スペクトル

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

分担研究者 北村 惣一郎

国立循環器病センター研究所 生体工学部

研究要旨

再生型組織の同種異系移植では、慢性的なドナー不足が問題となっている。そこでわれわれは、異種動物から作製した再生型組織の移植を検討している。本研究では、実際に異種動物由来再生型組織を移植した場合に、レシピエントの生体反応がいかにか起こるかを解明し、より再生能の高い組織の作製に貢献することを目的とした。同種異系統あるいは異種移植を行なった場合に、マクロファージや血管新生に違いが認められ、これらが再生効率に関与することが示唆された。

A. 目的

国内では1997年から臓器移植法が施行されて以降、わずかではあるが、臓器提供者数が増加している。しかし、2008年では年間わずか109件と、極めて少数であるのが現状である。また、国内臓器移植では、小児患者は対象として含まれていないため、高額な資金を集めて海外で手術を行なう場合もある。このようなドナー不足および小児患者への適用が改善されない限り、臓器移植提供を待つ患者数は増大し、また、移植をされないまま死亡することも免れないであろう。

これらの問題の改善策の一つとして、異種動物由来組織の移植が挙げられる。細胞の機能が早急に求められる疾患の場合には、現時点では臓器移植に頼ること以外に可能性は低い。心臓弁や血管など、一時的に人工材料と投薬でまかなうことが可能な組織では、

異種動物組織を加工して移植片として利用することが、世界的に検討されている。

例えば心臓弁に関しては、欧米でブタやウシの心臓弁や心膜をグルタルアルデヒド架橋して抗原性を低下させることにより、移植片として市販されている。しかしこれらの組織は、架橋されることにより、移植後の再細胞化が大幅に低下するため、小児患者のような、体の成長とともに組織の大きさも変化するような場合には適切ではない。そこで、移植後、患者の組織と置換され、組織の成長とともに大きくなることが可能な移植片材料として、生体由来脱細胞化組織が期待されている。

脱細胞化組織をスキャフォールドとして用いる組織再生の研究は、血管や心臓弁などの循環器系組織、軟骨、腱や靭帯などの運動器、膀胱膜や心膜といった薄い膜組織、さら

には運動神経にも及ぶ。これらの組織の脱細胞化方法や細胞毒性、動物の同種移植実験時に、組織の再生やリンパ球細胞などの免疫細胞の応答が主に組織染色により調べられているが、同種異系統移植や異種動物移植による詳細な検討はあまり報告されていない。

われわれは、等方静水圧印加処理法を利用した心臓弁や血管の脱細胞化組織の作製を検討してきた。これまでに、ブタ脱細胞化血管を同種移植後、12ヶ月までの期間で評価し、血管内腔開存を認めるなどの良好な結果が得られている。しかし、慢性的なドナー不足の解消など、数々の移植問題を打開するためには、異種動物の脱細胞化組織を臨床応用することが課題であり、異種移植モデル動物を利用した検討が必須である。

本研究では、同種異系統移植モデルまたは異種動物移植モデル使用し、皮下移植や神経移植における各移植片に対する生体応答を調べることを目的とした。

B. 実験方法

本研究は、同種異系統モデル実験として、脱細胞化神経移植を、また、異種移植モデル実験には皮下移植実験の、2通りの検討を行なった。

B-1. 移植片の作製

神経移植実験では、Lewis ラットまたはSD ラットの坐骨神経を摘出し、等方静水圧印加処理による脱細胞化処理を行なった。摘

出した神経をリン酸緩衝溶液とともに密閉し、980 MPa にて 10 分間施圧して細胞を破壊、その後の洗浄工程で細胞残渣を除去して、脱細胞化神経とした。

異種移植モデル実験では、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。

B-2. 同種異系統移植実験

われわれの研究グループで開発した処理法で作製した脱細胞化組織に対する生体反応を調べるため、皮下移植実験を行なった。脱細胞化した Lewis ラットおよび SD ラットの坐骨神経を長さ 10 mm に切り、Lewis ラットまたは SD ラットの背中の皮下に移植した。対照として、脱細胞化処理をしていない、未処理神経も移植した。移植 4 週間後、移植片の接着している皮膚を切り取り、組織学検討として HE 染色と免疫染色を行なった。免疫染色は、マクロファージを検出できる CD68 と、血管内皮細胞を検出できる von Willebrand Factor を染色対象とした。

B-3. 異種移植実験

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。

B-4. 倫理面への配慮

本研究において、動物実験を取り扱った際は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号)、また、厚生労働省による「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)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤および鎮痛剤を用いて、動物の苦痛の軽減に努めるとともに、綿密な実験計画を練ることで、不要な動物実験を避けて必要最低限の利用量とした。

C. 研究結果

C-1. 同種異系統移植実験の結果

ラット脱細胞化坐骨神経作製後、HE 染色および末梢神経のグリア細胞である、Schwann 細胞のマーカーである glial fibrillary acidic protein の免疫染色を行なっ

た。その結果、未処理の神経と比較すると、Schwann 細胞を含むすべての細胞が良好に除去されていることがわかった(図 1)。

次に、これらの神経をラット背部皮下に移植し、4 週間後に周辺組織とともに摘出して HE 染色した(図 2)。ドナーやレシピエントの系統に関わらず、未処理の神経を移植した場合には、細胞核が移植片の全体に存在している様子が観察され、脱細胞化処理をした移植片の場合には核が丸く大きな細胞が、移植片の辺縁部分に数多く侵入していることが確認された。さらに詳しく観察すると、未処理神経の内部にはゆるい結合組織の塊の全体にわたって、細胞が存在していた。これに対して、脱細胞化組織では、中心部分は密な結合組織で、その辺縁部にのみ細胞が大量に集合しているのが確認された。

マクロファージの指標である CD68 抗原を免疫染色した結果、脱細胞化神経のほうが未処理神経よりもマクロファージの遊走が激しいことがわかった(図 3)。HE 染色した結果と比べると、未処理の神経では、集合していた細胞の一部がマクロファージであったが、脱細胞化神経では、集合した細胞のほとんどがマクロファージであることが明らかとなった。Lewis ラットの組織を SD ラットの皮下に移植した場合の移植片内部への全浸潤細胞数とマクロファージ数を測定した結果を図 4 に示す。いずれの移植片でも、浸潤細胞の数はほぼ同等であったが、マクロファージの数は、脱細胞化神経のほうが

3倍以上も多いことがわかった。さらに、同系統移植の未処理神経の場合には、ほとんどマクロファージが存在していなかったのに対し、異系統移植した場合には、組織の全体がマクロファージであった。脱細胞化神経については、同種・異種に関わらず、同程度にマクロファージが侵入していることがわかった。

本研究では、2種類のラットを使用し、それぞれ、レシピエントとドナー動物の系統を逆にした移植も試みた。すると、レシピエント動物に Lewis ラットを使用し、SD ラットの未処理神経を移植すると、逆行性に動物を使用した場合よりも、マクロファージの遊走数は少ない様子が観察された。

血管内皮細胞の染色により、移植片内部と周辺組織における新生血管の様子を観察した。その結果、未処理神経を移植した場合には、移植物の内部にたくさんの血管が侵入していたのに対し、脱細胞化神経を移植した場合には、移植片の周辺に血管が形成されており、移植片の特性により、新生血管の分布にも違いがあることがわかった。

C-2. 異種移植実験の結果

異種移植実験では、未処理ブタ血管壁、脱細胞化血管壁とグルタルアルデヒド架橋した血管壁の三種類を、ラット背部皮下に移植した。

移植初期の生体応答を観察するため、全ての実験は移植1週間目と2週間目に評価を行

った。

移植2週間後の摘出時に、移植片周辺に対する新生血管を肉眼あるいは実体顕微鏡下で観察した結果を図5に示す。全ての移植片周辺には、他の皮下組織とは異なり、細かく蛇行する新生血管が集合しているのがわかった。しかし、血管の数は三種類の移植片間で大きな違いは認められなかった。移植片部分の皮膚外表面側から強い光を投射し、皮下組織内部の血管が可視化できるようにしたうえで、実体顕微鏡下で観察すると、未処理血管周辺では、他の2種類の移植片と比較して新生血管数が少ないことがわかった。これに対し、脱細胞化血管や架橋処理血管では、多くの毛細血管が集合していた。脱細胞化血管と架橋処理血管を比較すると、脱細胞化血管周辺には、細く、細かく分岐した血管が多く、これと比較すると、架橋処理した血管では太く、分岐の少ない血管が集合していた。

次に、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数多くの細胞が集合しており、両方ともコラーゲンを主とするカプセル化層に覆われていた(図6)。移植片と組織の境界部に注目すると、移植片に向かって、リンパ球やマクロファージのような血球系細胞が多く遊走している様子がわかった。さらに、移植片の端から組織内に侵入しようとしている細胞を見てみると、未処理の血管では、細長い核を持つ、実質細胞が多く、脱細胞化血管では、ほとんどが丸い核の血球系細

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 (図 7)。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、未処理血管のほうが脱細胞化血管よりも遊走細胞数が多く、移植片のごく近傍に集合しつつあることが確認された。さらに、好中球に関しては、未処理血管では少なかったものの、脱細胞化血管周辺組織に数多く観察された。

異物に対する生体応答の一つにマクロファージの分極化が報告されている。正常組織や血中にいる単球が異物により活性化されると、組織中に移動してマクロファージと呼ばれ、さらに M1 タイプと M2 タイプに分極化するといわれている。すなわち、M1 タイプとは、IL-1b や IL-6 など、いわゆる炎症性サイトカインを多く発現し、慢性炎症や組織の治癒を阻害する。これに対して M2 タイプは、コラーゲンの産生が向上、IL-10 や TGFb の発現が高まることにより、組織の治癒やリモデリングを誘導するといわれている。本研究では、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 RNA を抽出し、M1 タイプと M2 タイプを特徴付ける上記 4 種類のサイトカイン発現量を定量化した。

三種類の異種組織移植片周辺のサイトカイン発現量を、移植 1、2、3 週間目で測定し

た結果を図 8 に示す。なお、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。また、移植などの手術をしていない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、未処理血管と架橋処理血管は、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。

D. 考察

異物に対する生体応答の一つに、炎症反応

がある。炎症反応は、損傷を受けた組織の治癒に欠かせない過程で、損傷部あるいは異物と認識された部位での、血流量の増加と血管新生が認められる。血管の新生に伴い、損傷組織や異物を排除するための貪食細胞が血流にのって運ばれ、血管外へ遊走して組織へと浸潤、食作用を開始すると共に損傷組織や移植片が、新たな組織を構築するための細胞へと置換される。

組織の損傷では、上記の過程が巧妙に調整されているため、組織は再生し、治癒していくが、異物である移植片を移植する場合には、何らかの因子が過大な炎症を引き起こすことにより、カプセル化に至ったり、組織が再生しないうちに全て貪食されてしまったりする。したがって、生体応答をいかに制御するかについては、多くのバイオマテリアル研究者が取り組む大きな課題である。

重篤な疾患治療のための移植組織の確保は、世界的に重要な課題である。しかし、幸運にも移植組織が提供されたとしても、レシピエントはドナー由来の細胞に対する免疫拒絶を抑制するため、免疫抑制剤の使用はかかすことができず、若い女性や小児には、このような投薬の必要のない移植片の開発が必須課題であろう。

本研究では、一般的な臓器移植である同種異系統移植において、われわれの用いる脱細胞化組織が、どのような生体反応を引き起こすかを検討した。脱細胞化組織は、未処理の組織と比較すると、移植後4週間の時点でマ

クロファージの浸潤や、組織内部の構造に大きな違いが認められた。未処理組織の場合には、ドナー由来の細胞が存在していることにより、宿主動物の非自己に対する免疫が強く作用している可能性が考えられた。これに対し脱細胞化組織では、異物に対する免疫が作用している、すなわち、種や系統間であまり保存されていないタンパク質などに対する反応と考えられる。または、脱細胞化処理により、構造タンパク質の不可逆的構造変化(変性)をおこしている可能性も考えられた。

一方、血管内皮細胞の染色により、移植片周囲の血管を観察したところ、未処理の血管では、移植片内部にまで多数の血管が侵入していた。これは、既に未処理組織内に生存していた細胞が除去され、新たな組織を再構築するために新たに大量に侵入した実質細胞を栄養するため、血管を引き込んだためと考えられる。一方、脱細胞化組織では、移植片に対する異物反応が発生し、マクロファージを大量に送り込むために、周辺部への血管新生が盛んである可能性が考えられた。

異種移植実験において、各移植片周辺の新生血管を観察すると、太さや分岐に関して異なる結果が得られた。腫瘍組織への血管新生の研究において、新生血管の数や太さ、血流速度と血管透過性などのパラメーターに関して数多くの報告が行なわれてきたものの、組織再生とこれらのパラメーターに関する報告はほとんどない。血管新生は組織の再生だけでなく、その後の成長性にも大きく影響

すると考えられる。すなわち、スキヤフォールド内部が線維化組織で埋め尽くされたならば、後の組織の成長は停止するであろう。元来の組織を構築する細胞が秩序正しく再生し、正常な血管が侵入することが必須項目であろう。

また、移植片に応答したマクロファージの分極化に関しても、元来の正常組織を再構築する上では、どのように関与しているかは課題が残る。炎症を誘導しなかったとしても、線維化組織を形成しては、組織の再生とはいえない。しかしながら、ある程度の炎症反応により、血管新生が起こったり、周辺組織の細胞が活性化されたりすることは、結果として組織の再生を誘導することにも関連するだろう。

E. 結論

慢性的なドナー不足の解消や、小児患者への適用も可能な成長性のあるスキヤフォールドの開発には、異種動物の脱細胞化技術が着目されているが、それ自身がレシピエントの急死を招く可能性も非常に高い。しかし、異種移植や同種異系移植に関して、モデル動物を利用した細かな生体応答の調査はほとんど行なわれていないのが現状だ。本研究から、モデル動物を用いる血管新生や各種サイトカインの発現が、同種異系統動物移植や異種動物移植における各種処理法により異なることがわかった。今後、脱細胞化組織のスキヤフォールドによる置換術を伴わない、評

価法の確立を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S and Nagaya N. Effect of typhoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells* 2007;25(5):1166-77.

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* 2008;27:869-74.

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* 2008;136(2):431-5.

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 Rese*

Arch Communications 2008;374(1):11-6.

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

o Kawasaki disease. Pediatr Cardiol 2008;29:266-70.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

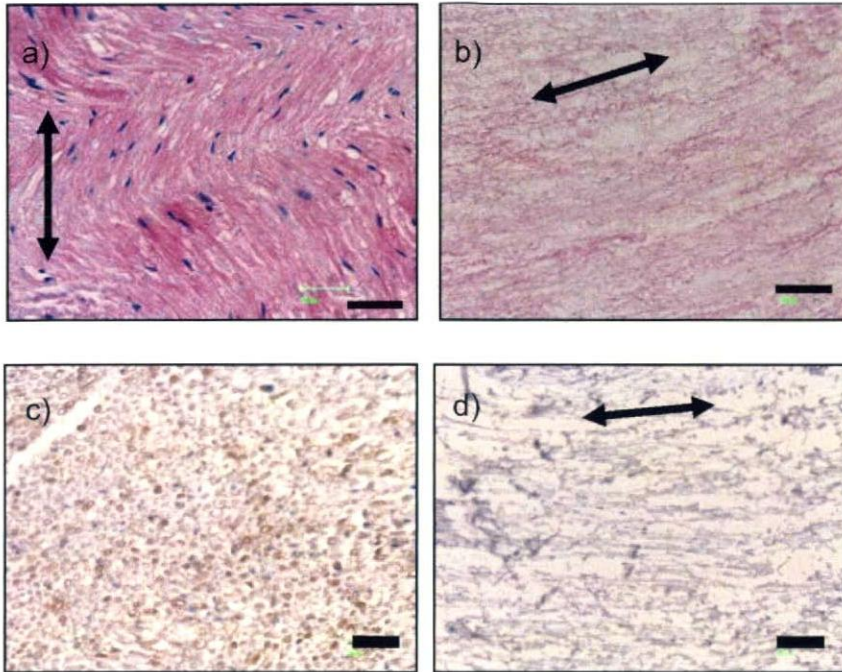


Fig. 1. HE staining (a, b) and anti-GFAP staining (c, d) of fresh (a, c) and acellular nerve (b, d). Bars; 50 μ m.

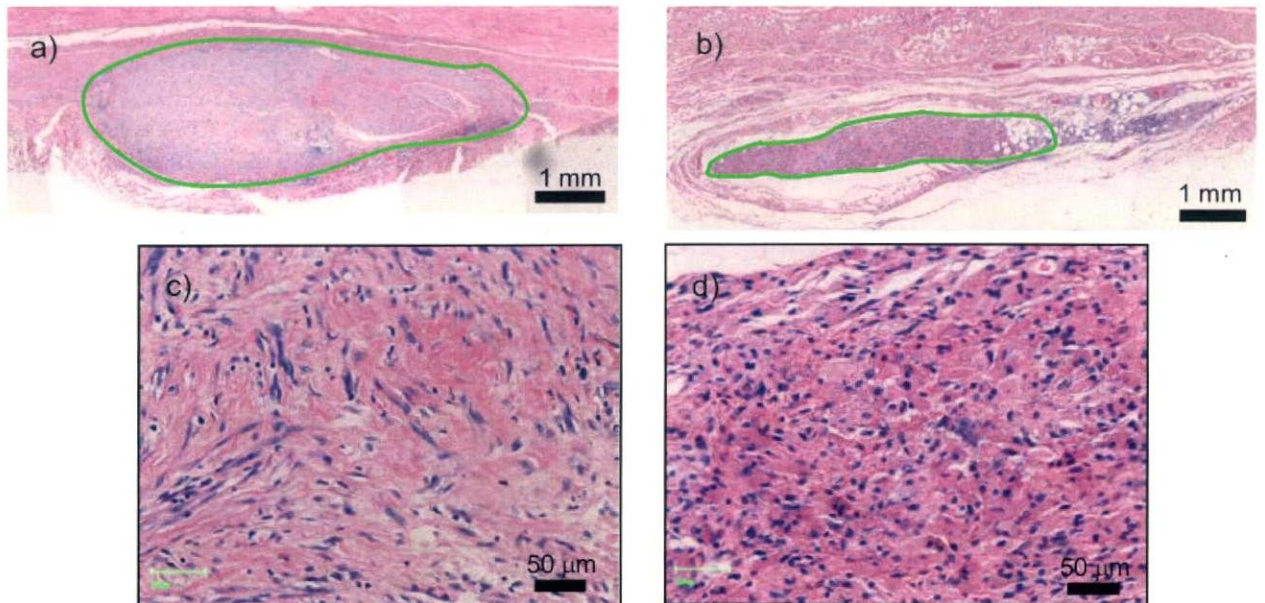


Fig. 2. HE staining of subcutaneously implanted fresh (a and c) and acellular (b and d) nerves (1 month-post implantation). C and d shows magnified fields of a and b, respectively.

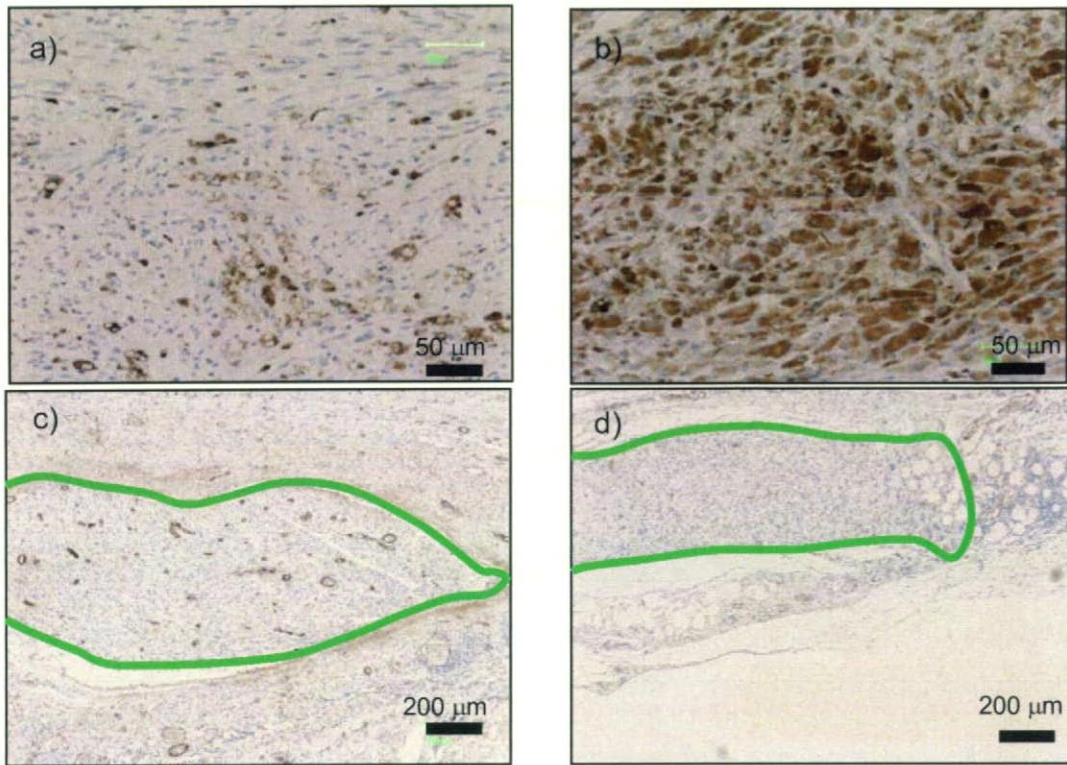


Fig. 3. Immunostaining for CD68 (a and b) and vWF (c and d) in subcutaneously implanted fresh (a and c) and acellular (b and d) nerves.

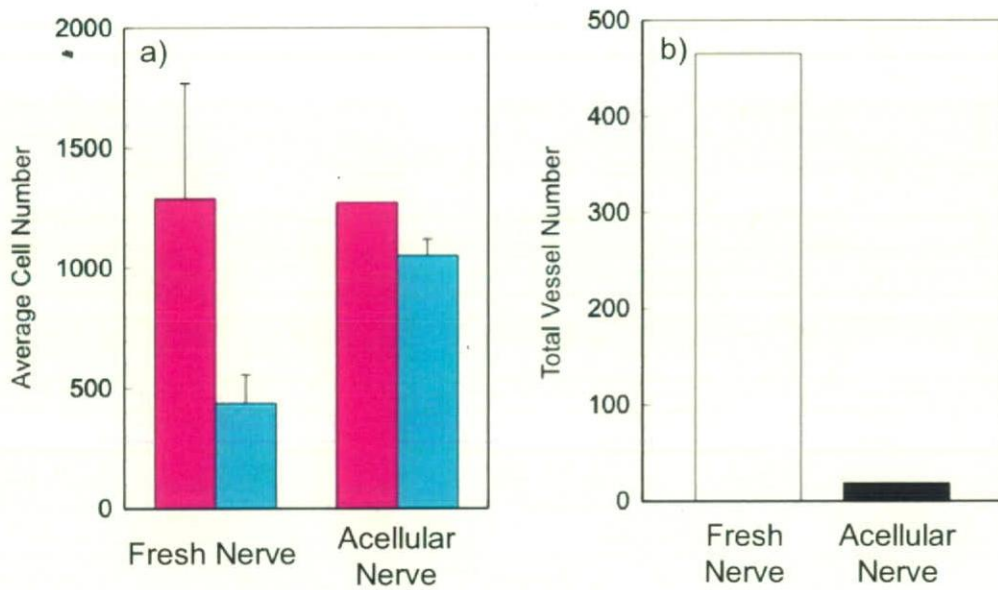


Fig. 4. Numbers of filtered total cells (a, ■), macrophages (a, ■), and vessels (b) in the fresh and acellular nerves.

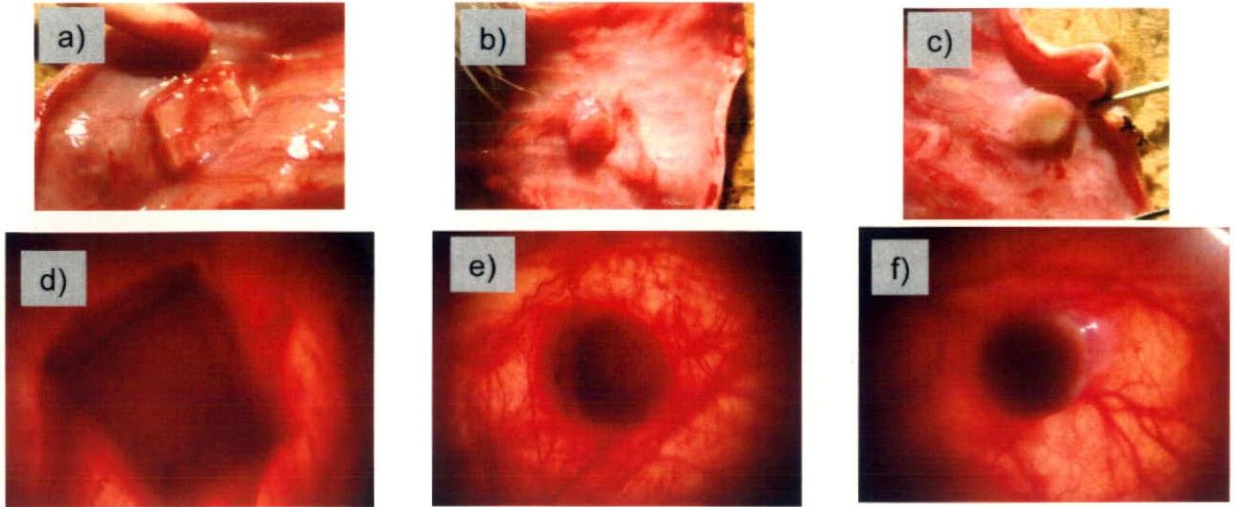


Fig. 5. Angiogenesis around subcutaneously implanted xenogeneic tissues 1 weeks posttransplantation. Native pig vessel (a and d), acellular pig vessel (b and e), and glutaraldehyde-fixed pig vessel (c and f).

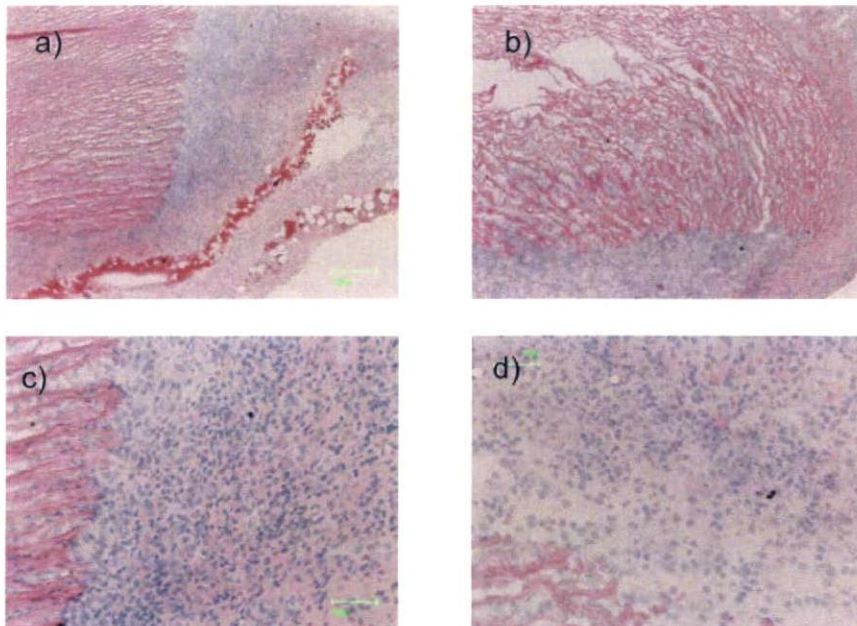


Fig. 6. HE staining of subcutaneously-implanted native pig vessel (a and c) and acellular pig vessel (b and d) in rats. C and d show as magnified observations of a and b, respectively.

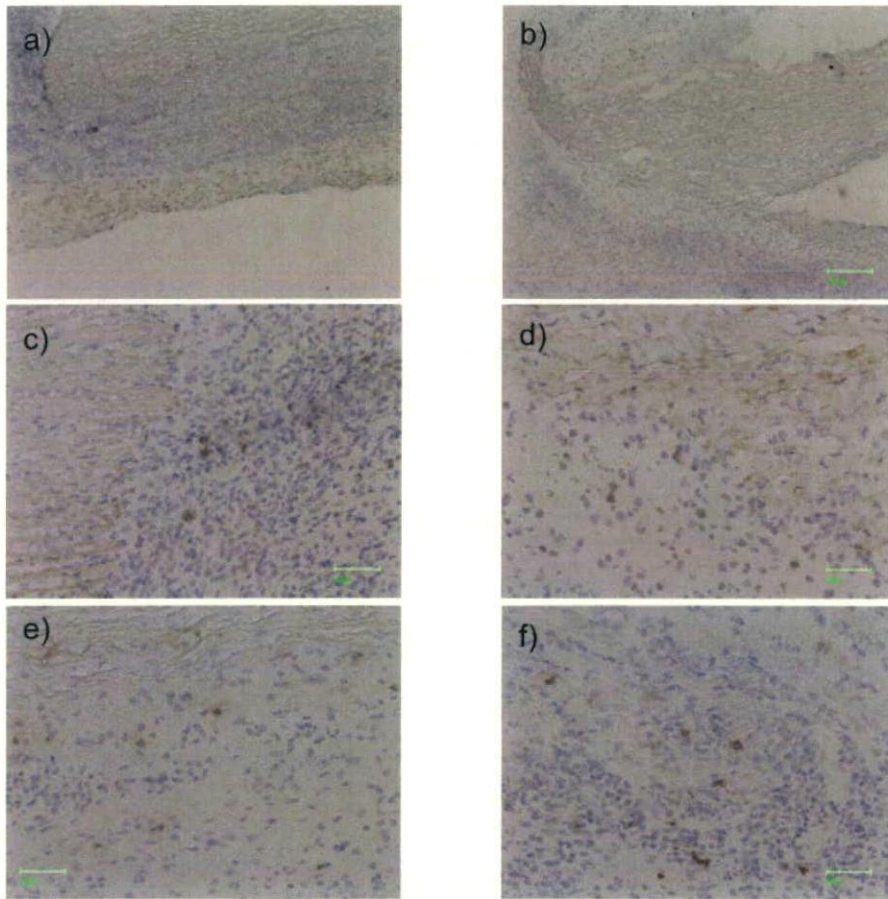


Fig. 7. Immunostaining for CD4 (a and b), CD8 (c and d), and MPO (e and f) of subcutaneously-implanted native pig vessels (a, c, and e) and acellular pig vessels (b, d, and f).

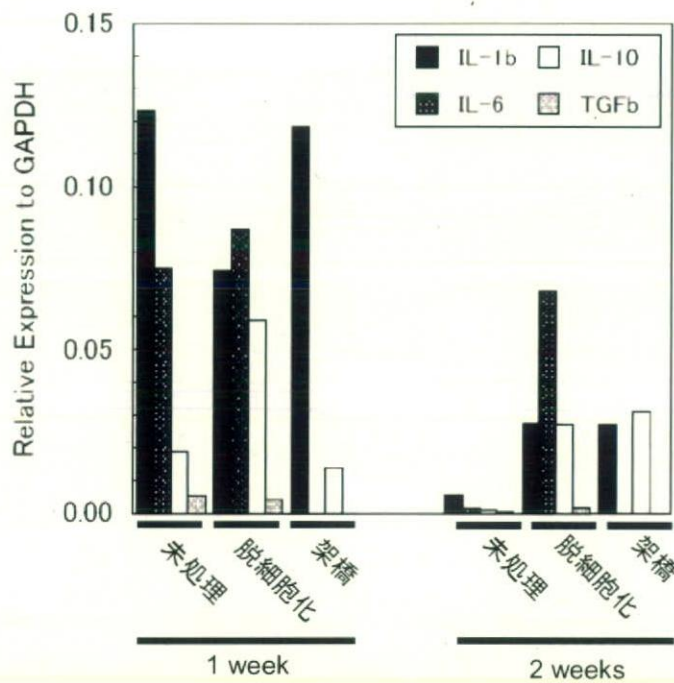


Fig. 8. Cytokine expressions relative to GAPDH in surrounding tissues of subcutaneously-implanted pig vessels.

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

研究要旨

重篤な心血管系の外科的手術には、人工材料による移植片が用いられてきたものの、小児患者では、体の成長に伴わないことから、複数回の手術が不可欠である。そこで、生体由来組織による再生型組織の開発が期待されている。本研究では、物理的手技や化学的処理により作製した循環器系脱細胞化組織を、ミニブタを用いた置換手術により、移植1年以内の組織再生や成長の可能性について検討した。その結果、脱細胞化肺動脈弁の移植で、1年後に良好な組織再構築が認められた。

A. 目的

動脈硬化症や心臓弁疾患などの外科的治療には、人工材料から作製された人工血管や人工弁への置換手術が行なわれてきた。これらの移植物は、生体の拒否反応を免れることが可能であっても、生体に吸収されないために、患者の組織として置換されることはない。また、長期間の使用により、血栓形成や狭窄といった機能不全が原因で、再移植の可能性もある。一方、小児患者においては、成長に伴って、移植物の大きさが移植部位組織と適合しなくなることから、複数回の移植が必須となっており、患者の *quality of life* にも大きく影響を及ぼしている。これに対し、国内では臓器移植法の施行以降、心臓移植が実施されるようになり、現在までに 64 例行なわれてきた。しかしながら、心臓移植の待機患者数は平成 21 年 3

月時点で 112 人と多く、慢性的なドナー不足が続いているのが現状である。

既存の人工血管や心臓弁では解決できない移植物の患者自身の組織との置換や、ドナー不足の解消を目指し、polyglycolic-acid メッシュなどの生体吸収性材料により作製した人工血管の開発も進められている。しかしながら、循環器系組織では、血圧や血流による圧力および張り応力など、さまざまな応力が複雑に働くため、人工材料では生体組織に特徴的な力学特性を再現することが困難である。一方、生体由来材料の利用も数多く検討されている。生体由来材料は、生体組織特有の力学特性を有すること、また、タンパク質の三次元的構造が、移植後の組織の再生を誘導しやすいといった点で、人工材料よりも有利と考えられている。

欧米では、グルタールアルデヒドにより

架橋処理を施した、ウシ心膜で作製した心臓弁やブタ心臓弁が市販されている。しかし、架橋処理は、生体由来材料の特徴である力学特性に影響を及ぼすことや、組織内に含まれるドナー動物由来細胞に対するレシピエントの免疫拒絶反応が問題として残る。架橋反応により、ドナー細胞の抗原性が低下するといわれるものの、レシピエントは、長期にわたる免疫抑制剤の使用を免れない。さらに、グルタルアルデヒドにより、細胞の接着が抑制されてしまうため、体内での組織再生速度の亢進のために、あらかじめ生体外で内皮細胞などの細胞を播種・培養することも困難であり、新しい心臓弁や血管の作製が必要とされている。

現在、循環器系の組織を再生させるための生体由来材料による移植片の作製は、異種動物の組織を脱細胞化し、そのまま移植、あるいは血管内皮細胞などを接着させた後に移植する方法が検討されている。

これまで、われわれの研究グループでは、等方静水圧印加処理を利用した、組織の脱細胞化を行ってきた。これは、ブタから摘出した大動脈血管や心臓弁を、水溶液に浸漬し、1万気圧という高い圧力を加えることで組織内の細胞を破壊、その後の洗浄工程を経て、細胞破片を取り除いて作製される。この手法により、生体組織特有の力学的特性も保存されたまま、組織中のドナー由来細胞を除去できることが確認できている。この技術を用いて作製したブタの同種大動

脈置換手術では、わずかな石灰化の問題が残るものの、移植片内に血管の構造が再構築される、良好な結果が得られている。

この技術に加え、組織内の石灰化を抑制するための努力も行ってきた。石灰化の原因の一つとして、血管壁を構築するマトリックスのうちのエラスチンが注目されている。そこで、摘出した血管を酵素処理することで、エラスチンを除去、その際にドナー組織中の細胞も除去できることを見出した。本研究では、等方静水圧印加またはエラスチン除去による脱細胞化処理を施したブタ心臓弁やブタ大動脈の置換手術を施行し、これらの移植片の有用性を示すことを目的とした。

B. 実験方法

B-1. 脱細胞化心臓弁の作製

等方静水圧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パックに入れて、密閉した。これを超高压印加装置（Dr. Chef 神戸製鋼、兵庫）の圧力印加チャンバー内に入れて、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バー内の温度上昇を防ぐため、チャンバー全体を10°Cに維持した。

圧力印加後、組織をビニールパックから取り出し、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。

B-2. 脱エラスチン血管の作製

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。

B-3. 動物移植実験

本研究では、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。

B-4. 移植片の組織学的評価

脱細胞化心臓弁は、摘出後、通常の HE 染色や化学染色と、免疫染色により、脱細胞化組織の内部にどのような細胞が侵入し、組織を再構築しているかを評価した。染色は、石灰化を調べるための von Kossa 染色、エラスチンやコラーゲンといった構造タンパク質の染色のための Elastica van Gieson 染色、さらに血管内皮細胞の von Willebrand Factor、血管平滑筋細胞の alpha-smooth muscle actin と主に線維芽細胞を調べるために vimentin の免疫染色を行なった。

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の効果を調べるため、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-5. 倫理面への配慮

本研究において、ブタやラットなどの動物実験を取り扱った際は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)及びこの法律を受けた「実験

動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)、また、厚生労働省による「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)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤および鎮痛剤を用いて、動物の苦痛の軽減に努めるとともに、綿密な実験計画を練ることで、不要な動物実験を避けて必要最低限の利用量とした。

C. 研究結果

C-1. 脱細胞化心臓弁移植実験

平成20年度における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5件行なった。移植のための実験では、弁置換の有無に関わらず、全ての動物が術中死する結果となった。死亡の原因として、実験初期では、ブタの心臓から人工心肺装置へ脱血する際や、移植後に人工心肺装置の離脱の際に最も困難な点が多く、対策として、使用する器具の改良や動物の体調を示す血圧などの情報モニターの種類を増加させることで、失敗の原因を探り、今後の手術時に生かせるよう、記録した。

移植12ヵ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(図1)。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量と比較した結果を図2に示す。摘出組織は、レシピエントの心臓と縫合してあった部分の筋組織と弁葉よりも遠位側の血管部分の2ヶ所の組織からDNAを抽出した。定量的結果、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。

そこで次に、脱細胞化組織が、生体の心臓弁と同様の組織を再構築しているかを調べるために通常のHE染色と各種免疫染色を行なった(図3から図6)。

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(図3)。多くの心・血管系移植の問題点である石灰化に関しては、組織のどの部分を見ても認められなかった(図4)。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(図5)。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