

は、より臨床応用を想定して、角膜欠損モデルを用いて、脱細胞化角膜の異種移植実験を実施した。

B. 研究方法

超高压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压処理法を用いて角膜の脱細胞化を行った。具体的には、10℃、10000 気圧、10 分間の超高静水压を施した後、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。

超高压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、下記の方法にて行った。まず、ウサギに深麻酔処置を施し、ウサギ角膜の角膜輪部の外側約 2~3mm を切開し、そこからヘラ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(図 1)。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(図 2)。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(図 3)。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)。6 ヶ月後にウサギを擬死させ、組織学的評価として、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。

(倫理面への配慮)

動物実験は「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)に基づき、各省庁および当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。当該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努めた。

C. 研究結果

超高压処理法にて得られたブタ脱細胞化角膜は、白濁状態であり、移植までの保存液への浸漬においても、白濁度、膜厚等に変化は無かった。

H-E 染色所見では、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は観察されなかった。

移植直後(図 4)の観察では、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(図 5)。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(図 6)。

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(図 7)。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(図 8)。

一般的に、移植後 1~2 週間に免疫反応に惹起される血管新生が起こるが、3 羽中 2 羽においては、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 1 部で観察されたが、血管新生部分の縫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(図 9)。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(図 10)。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(図 11)。また、目視観察においても(図 12)、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(図 13)。

D. 考察

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セイン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

生体組織から細胞を除去したブタ脱細胞化角膜を超高压処理法により調製し、ウサギへの移植試験を行った結果、炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。いくつかの検討課題が挙げられ、次年度の早期に解法を確立し、臨床応用への展開を図る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). 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. 第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム, 横浜, 2008年7月.

2. 学会発表

- 1). 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.
- 2). 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 pressurization treatment.

8th WBC, Netherlands, May, 2008.

- 3). Kobayashi H, Hattori S, Yoshilawa C, Honda T. Surface modified Poly(vinyl alcohol) nanofibers for regeneration of corneal stroma. 8th WBC, Netherlands, May, 2008.
- 4). 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.
- 5). 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.
- 6). 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.
- 7). 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.
- 8). 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.
- 9). 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

- 10). 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.
- 11). 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, 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
- 12). 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
- 13). 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

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

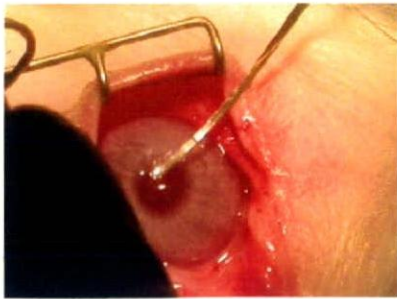


図1.脱細胞化角膜移植

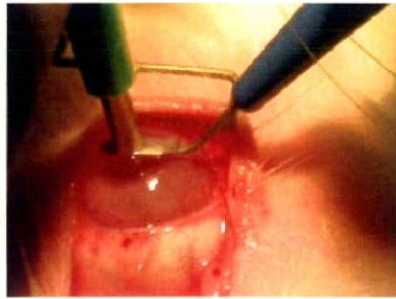


図2.脱細胞化角膜移植

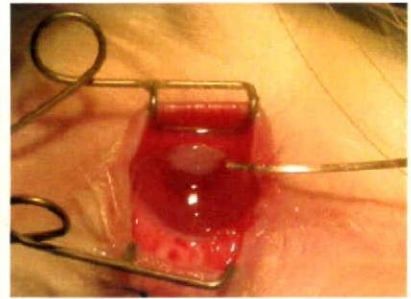


図3.脱細胞化角膜移植



図4.移植直後

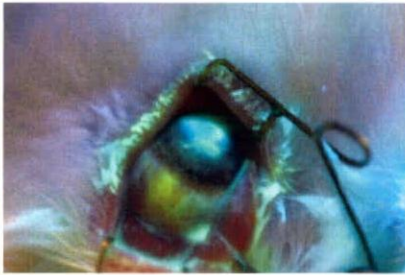


図5.移植1週間



図6.移植1週間

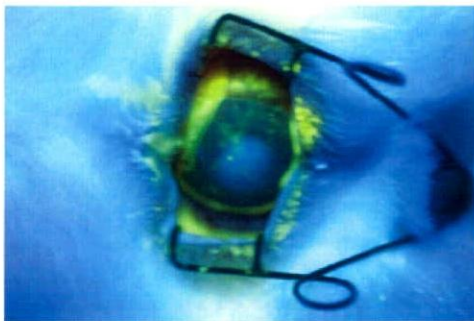


図7.移植2週間

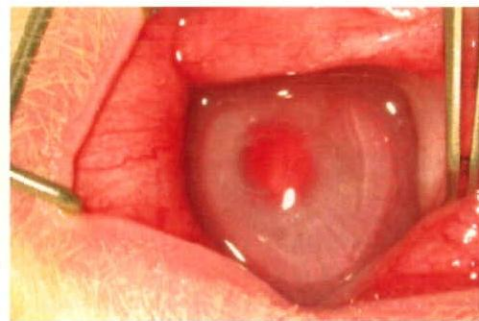


図8.移植2週間

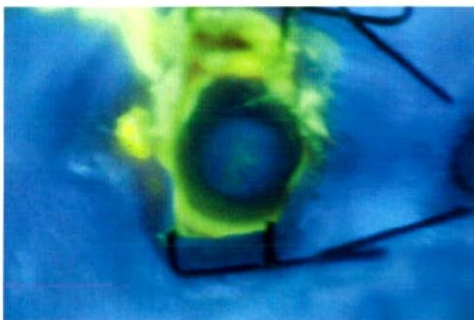


図9.移植1ヶ月



図10.移植1ヶ月

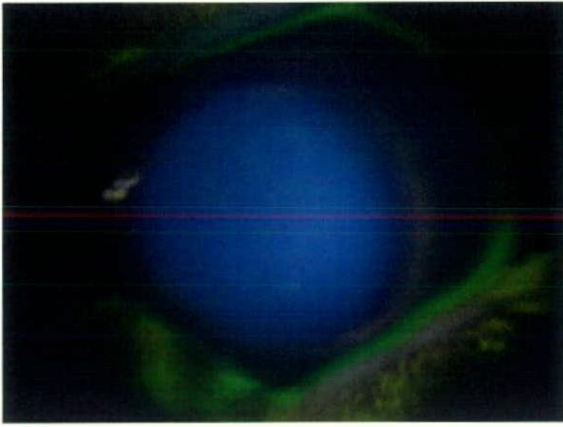


图11.移植6个月



图12.移植6个月

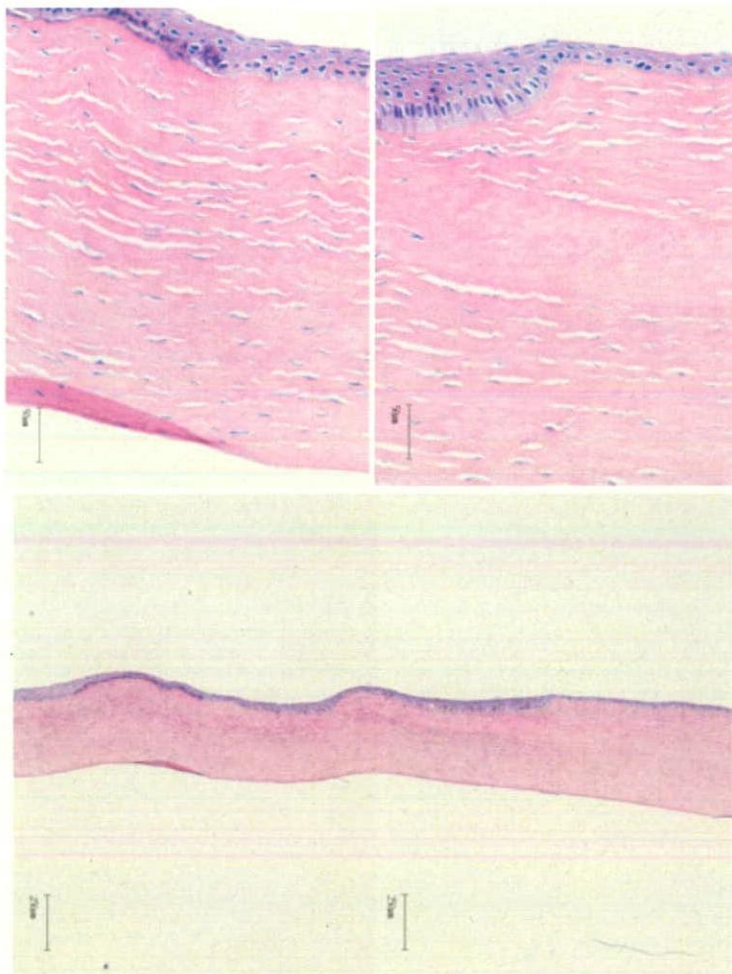


图13.移植6个月(HE染色)

再生型角膜の作製

分担研究者 木村 剛 東京医科歯科大学生体材料工学研究所助教

研究要旨 本研究では、超高压処理法により得られた脱細胞化角膜の *in vivo* 異種移植実験を行い、人工角膜としての有効性について検討した。ブタ脱細胞化角膜を超高压処理法により調製し、ウサギ角膜内に移植後に、長期間の経過観察と組織学的評価により脱細胞化角膜の生体適合性を検討した。移植後の早期においても、顕著な免疫反応は認められず、埋入 2-3 週間後には透明状態となり、さらに約 1 年後でも透明性は維持されていた。組織学的評価から、埋入組織はほぼ完全な状態で存在し、埋入組織へのレシピエント細胞の浸潤は認められなかった。以上の結果から、脱細胞化角膜の生体由来人工角膜としての応用が期待できる。

A. 研究目的

角膜移植は、角膜白斑、角膜変性や水疱性角膜症などの角膜混濁や高度の角膜乱視を示す重篤な角膜疾患における効果的な治療法の一つである。現在、角膜移植術を要する患者は、世界中で 1000 万人以上と推定されているが、実際に角膜移植を受けている患者数は年間 12 万人足らずであり、また、日本国内では年間 2 万人以上の患者が待機しているが、角膜移植が行われるのは 1600 人程度であり、多くの国で提供角膜不足が大きな問題となっている。また、現在の角膜移植医療では、他人の角膜を移植する同種移植であるため、全層角膜移植の約 30% で拒絶反応が惹起され、そのうち 5-7% が機能不全に至ることが報告されている。

このような状況を打開するために、人工角膜あるいは再生医療技術による角膜再生が強く望まれている。透明な高分子系材料を用いた人工角膜の研究としては、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) やポリビニルアルコール (PVA) など) が試みられている。現状では、移植に応用可能な人工角膜は未だ開発されておらず、いくつかの問題点が挙げられている。その一つとして、人工角膜と生体角膜の適合性が不十分であることが原因と考えられている。すなわち、生体角膜と人工角膜との物性の相違により、レシピエント細胞の人工角膜基材上へのマイグレーションが十分でなく、結果として、人工角膜との接合部での組織融解に伴う脱落や感染症など引き起こされる。

最近では、再生医療の側面からの研究が行われ

ている。再生医療技術によって、角膜上皮および角膜内皮が臨床応用されており、再生医療技術の角膜再生への有効性が示され、角膜全層の再生が期待されている。しかしながら、角膜上皮および角膜内皮の再生は、細胞のみを用いた細胞シートや羊膜を用いた基本的には細胞層のみの再生であり、角膜のほぼ 90% を占める実質部分の再生に関しては、未だ臨床応用にいたる再生技術は開発されていない。角膜実質部は、コラーゲン線維が格子状に高次に配列した構造を有しており、これにより角膜特有の透明性が維持されている。従って、再生型角膜実質部としては高次の組織構造が要求されるが、これまでは、コラーゲンゲル・スポンジを用いた研究が大部分であり、組織構造、強度などの物性は生体組織に類似しておらず、実用化には至っていない。

そこで我々は、生体組織の物性に類似する人工角膜として、脱細胞化角膜の調製・応用について検討している。脱細胞化組織とは、異種組織から細胞を除去し、残存する生体支持組織を指す。脱細胞化組織の調製法としては、界面活性剤やタンパク質分解酵素などの薬液による化学的手法と、最近我々が開発した物理的手法である超高压処理法がある。後者は、超高压印加により細胞を破壊し、細胞残渣を洗浄により除去する手法である。これまで、血管、心臓弁、靭帯、骨などの種々の組織における脱細胞化に成功している。

昨年度は、界面活性剤法および超高压処理法による脱細胞化角膜の調製に関する詳細な検討を行った。界面活性剤法では、十分な脱細胞化がなされず、また、組織構造が変性した。一方の超高

圧処理法では、完全な脱細胞化と組織構造の維持が確認できた。さらに、得られた脱細胞化角膜の *in vivo* 異種移植実験として、ウサギ角膜にブタ脱細胞化角膜を埋入（ポケット式）し、人工角膜としての有効性について検討した。

本年度は、ブタ脱細胞化角膜の長期間の生体適合性を検討するため、上記の術式でのブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植試験を行い、人工角膜としての有効性について検討した。

B. 研究方法

超高压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压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 分間の超高压静圧を施した後、細胞培養液中での 72 時間の浸透洗浄により行った。得られた脱細胞化角膜の細胞除去を確認するため、組織切片のヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色による組織学的観察および DNA 残存量を検討した。

ブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植実験は以下の手順で行った。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。その後、目視観察、組織学的評価を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は「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）に基づき、各省庁および当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。当該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努めた。

C. 研究結果

超高压処理法にて得られた脱細胞化角膜の H-E 染色所見では、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は観察されなかった。DNA 残存量の定量では検出限界程度の DNA が定量され、破壊された細胞の残渣がほとん

ど除去された。これらの結果より、ほぼ完全な脱細胞化が達成されたと考えられる。

ブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植実験を行った。比較対象としては、未処理のブタ角膜を用いた。各移植期間での目視観察結果を図 1 にまとめて示す。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（図 1）。組織学的評価としてヘマトキシリン-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（図 2）。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。

D. 考察

超高压処理法にて調製した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。今後、より長期間の移植を検討し、臨床応用に展開する。

E. まとめ

生体組織から細胞を除去した脱細胞化角膜を超高圧処理法により調製し、in vivo 異種移植試験により生体適合性について検討した。これらにより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。また、ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植試験では、炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。以上の結果から、生体由来人工角膜としての応用が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). 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
- 2). 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
- 3). 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
- 4). 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、超高圧処理技術を応用した人工角膜の作成と評価、*高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー*, 2, 138-144, 2008
- 5). 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
- 6). 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.
- 7). 南広祐、木村剛、岸田晶夫、組織膜を目指したコラーゲンゲ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。
- 8). 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。
- 9). 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月學、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.
- 2). 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.
- 3). K Nam, T Kimura, A Kishida, Preparation and Characterization of Collagen Gel Designed for Tissue Membrane, Netherlands, May, 2008.
- 4). 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
- 5). 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.

2. 学会発表

- 1). Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Mochizuki
- 9). 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。角膜再生用スキヤ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。
- 10). 服部晋也、木村剛、吉川千晶、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月学、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。
- 11). 南広祐、木村剛、岸田晶夫、コラーゲンゲ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。
- 12). 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.
- 13). 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.
- 14). 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
- 15). 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、望月学、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。
- 16). 根岸淳、木村剛、南広祐、藤里俊哉、岸田晶夫、超高圧を利用した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。
- 17). 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、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
- 18). 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
- 19). 服部晋也、木村剛、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月学、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た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
- 20). 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
- 21). 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
- 22). 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

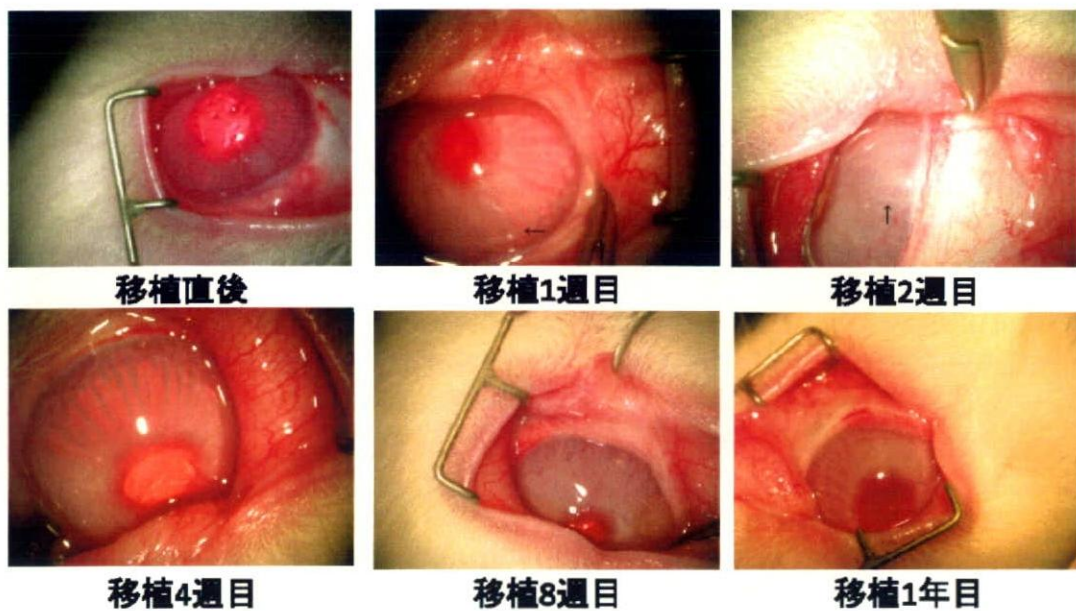


図1. 脱細胞化角膜の移植経過

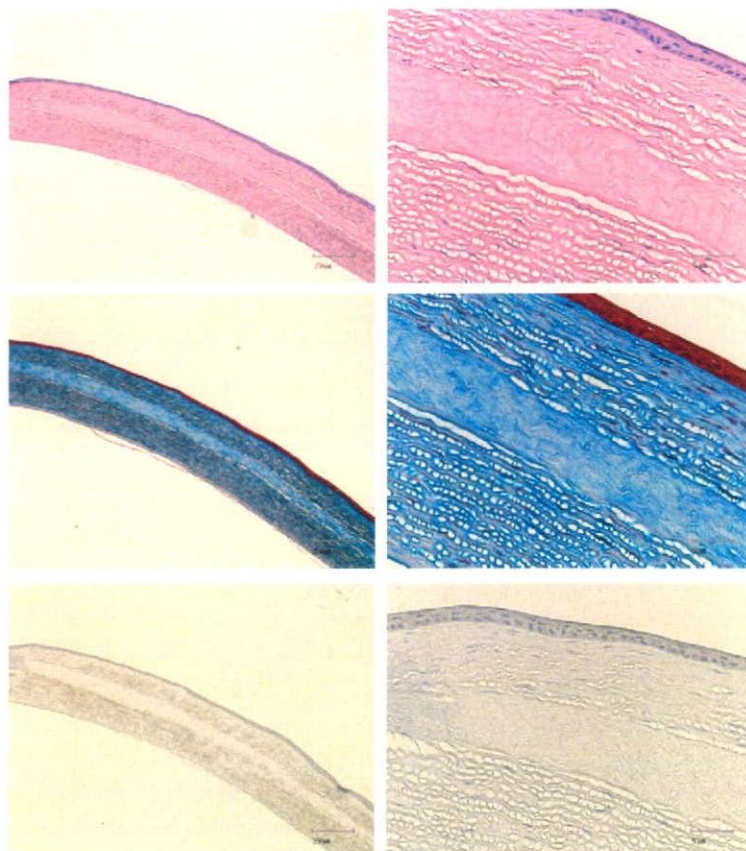


図2. 移植1年後の組織片
 上段:HE染色 中段:マツソントリクローム染色 下段:CD68染色

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|---------------|-------------------|---------------------------|---------------------------------|----------|-----|------|---------|
| 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 | 監修：秋吉一成 岸田晶夫 | 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 | シーエムシー出版 | 東京 | 2008 | 55-65 |
| 岸田晶夫 | 生体用高分子材料 | 田中順三 角田方衛 立石哲也 編 | 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 | 内田老鶴圃 | 東京 | 2008 | 131-172 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|--|-------|---------|------|
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| Masashi Kawamura, Hiroyuki Nakajima, Junjiro Kobayashi, Toshihiro Funatsu, Yoritaka Otsuka, Toshikatsu Yagihara, Soichiro Kitamura | Patency rate of the internal thoracic artery to the left anterior descending artery bypass is reduced by competitive flow from the concomitant saphenous vein graft in the left coronary artery | European Journal of Cardio-thoracic surgery | 34 | 833-838 | 2008 |

| | | | | | |
|--|--|---|--------|--------|------|
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| Watanuki H, Ogino H, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H, Fukuda T and Kitamura S. | Dilatation of the aneurysmal sac after total arch replacement. | Ann Thorac Surg | 85 | 639-41 | 2008 |

| | | | | | |
|--|---|----------------------|-------|---------|------|
| 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 | | 138-144 | 2008 |
| 寺田堂彦、木村剛、岸田晶夫、藤里俊哉 | バイオスカフォールド | バイオマテリアル | 26(4) | 309-319 | 2008 |
| Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida | Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using | 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所年報 | 42 | 12-16 | 2008 |

学会

| | | | | | |
|---|--|--|--|------|------|
| Kobayashi H. | Research activities of bio functional materials group. | Workshop nano materials for tissue engineering | | | 2008 |
| Kobayashi H. | Top down and bottom up approaches to develop reliable artificial cornea. | Workshop nano materials for tissue engineering | | 30 | 2008 |
| 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 | | 846 | 2008 |
| 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 | | 2411 | 2008 |
| K Nam, T Kimura, A Kishida | Preparation and Characterization of Collagen Gel Designed for Tissue Membrane | 8th WBC | | 511 | 2008 |
| 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 | 8th WBC | | 1356 | 2008 |
| Kobayashi H, Hattori S, Yoshilawa C, Honda T. | Surface modified Poly(vinyl alcohol) nanofibers for regeneration of corneal stroma. | 8th WBC | | 199 | 2008 |
| 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 | | 510 | 2008 |

| | | | | | |
|--|--|--------------------|----|-----------|------|
| 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 | | 1313 | 2008 |
| Hisatoshi Kobayashi, Takako Honda, Chiaki Yoshikawa, Shinya Hattori | Surface-modified Poly(vinyl alcohol) nanofibers for regeneration of corneal stroma | 8th WBC | | | 2008 |
| 南広祐、木村剛、岸田晶夫 | 組織膜を目指したコラーゲン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予稿集 | | 27-28 | |
| 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予稿集 | | 29-30 | 2008 |
| 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ールドの開発と機能評価 | 第57回高分子討論会予稿集 | 57 | 5150-5151 | 2008 |
| 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回高分子討論会予稿集 | 57 | 4790 | 2008 |
| 南広祐、木村剛、岸田晶夫 | コラーゲンの構造特性による物理・生物学的特性評価 | 第57回高分子討論会予稿集 | 57 | 5036-5037 | 2008 |
| 江橋 具、西垣戸麻美、藤里俊哉、森反俊幸、山岡哲二 | 生体由来スキャフォールド移植による神経の機能再生 | 第57回高分子討論会予稿集 | 57 | 5148-5149 | 2008 |
| 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 | | 271-272 | 2008 |
| 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 | | 83 | 2008 |
| 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 | | 84 | 2008 |

| | | | | | |
|---|--|---------------------------|----------|------|------|
| 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学会シンポジウム2008予稿集 | | 374 | 2008 |
| 根岸淳、木村剛、南広祐、藤里俊哉、岸田晶夫 | 超高圧を利用したPVA-ヘパリン複合体の調製と評価 | 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008予稿集 | | 298 | 2008 |
| 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学会シンポジウム2008予稿集 | | 375 | 2008 |
| Kobayashi H | Challenge to develop reliable corneal stroma through tissue engineering approaches | BTEB-2008, | | 14 | 2008 |
| 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 | 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 | 37 | S-83 | 2008 |
| Kishida A, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Nam K, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H | Decellularization of Porcine Cornea by Ultra-high Pressurization and In Vivo Study | TERMIS-NA | | | 2008 |
| 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講演予稿集 | | 74 | 2009 |
| 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講演予稿集 | | 75 | 2009 |
| 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、 | 再生医療 | 8(suppl) | 132 | 2009 |
| 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 | 再生医療 | 8(suppl) | 241 | 2009 |
| 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プログラム・抄録集 | | 15 | 2009 |
| | | | | | |

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

*Polymeric Biomaterial Engineering for
Future Medicine*

監修：秋吉一成，岸田晶夫

Supervisor : Kazunari Akiyoshi, Akio Kishida

HIGH TECHNOLOGY
INFORMATION

シーエムシー出版

6 バイオ材料としての脱細胞化生体組織

岸田晶夫*¹、藤里俊哉*²

6.1 はじめに

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い心臓弁、小口径血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料は、生体内分解吸収性の合成高分子材料を用いて研究されている。しかし、これら既存の材料は例えば3次元加工が困難である、物性が生体のものとは大きく異なるなどの欠点が指摘されている。これらを解決するための方法として、生体組織から免疫反応の主体となる細胞成分を除去し、残存したコラーゲンを主成分とする組織を医用材料として用いる新しい試みが報告されている。ここでは、筆者らがやっている新しい処理法を用いた脱細胞化生体組織の調整法及び応用について紹介する。

6.2 研究の背景

新しいバイオ材料、特に再生医療に関わる材料の開発については、その必然性や位置づけについて十分に考慮する必要がある。その主たる理由は、再生医療が適用となる疾患の治療法には、すでに既存の技術が適用されていることが多く、新しく開発される再生医療技術は、これらの場合あるいは共存する必要があるためである。具体的な例として、筆者らがやっている心臓弁の再生医療とそれに用いる脱細胞化生体組織に関して紹介する。

わが国では年間約9000件の心臓弁置換術が施行されており、代用弁としてハイロライトカーボン製の機械弁が80%、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20%使用されている¹⁾。世界中では年間約30万件的置換術が施行されており、その市場規模は約1000億円に達する。置換術による死亡率は、術前診断や術中の体外循環技術の向上等もあって、再置換術を含めても2%程度であり、比較的安定した成績となっている。このように、最も臨床的に使用される人工臓器の一つとして確立した感のある人工弁ではあるが、未だ種々の問題点が存在する。

機械弁は1960年代初頭の実用化以来、形状や材質の改良が重ねられ、現在使用されているものは一生の使用に耐えられる物理的強度を有している。従来、弁座部分の構造上、弁前後の圧較差が大きく、心機能や予後に影響を与えるとされてきたが、改良によって有効弁口面積を広くし

*1 Akio Kishida 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

*2 Toshiya Fujisato 大阪工業大学 工学部 教授

たものが開発されている。しかし、機械弁では依然として抗血栓性の問題が解決されていない。抗凝固のため、生涯にわたり厳重なワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症を来す頻度も高くなる。また、ワーファリンが催奇形性を有することから、妊娠を希望する若年女性には使用できない。

異種生体弁も1960年代後半の登場以来、抗凝固剤の服用が不必要であるというQOL上の利点から、特に最近では使用例が増えている。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされていたが、近年、ステントを用いないステントレス異種生体弁が導入されている。しかし、異種生体弁は依然、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15～20年程度の耐久性を有するが、若年者では5～10年程度の耐久性しか有せず、米国心臓病学会及び心臓病協会のガイドラインでは65歳以上の高齢者に使用が奨励されている。

欧米では1980年代半ばから、わが国でも近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、死体から提供された凍結保存同種弁が臨床で使用されつつある。機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして両者に対して抗感染性が優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者に有効とされるRoss手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存同種弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存同種弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が多い。

以上のようなことから、自己弁と同等の抗凝固性、耐久性、成長性などを兼ね備えた次世代型の代用弁の開発が求められており、この目的に沿って再生型の心臓弁の研究が行われている。また社会的な要請として、機械弁、異種生体弁ともほぼ全量が輸入品であり、BSE問題を契機とした厚生労働省のGMP基準の改定に伴い、生体弁の輸入が一時停止するといった事態も生じている。わが国の医療における安全保障の観点からも、わが国発の技術開発によるわが国製の安全な代用弁の登場が望まれている。

6.3 テーラーメイド生体組織による再生医療—心臓弁を例に—

再生医療の成功例として報告されることの多い血管再生療法では、患部に血管新生因子等の薬物あるいは細胞を直接注入する。しかし、代用心臓弁は組織置換であるため、自己組織再生の足場となるべき土台（スキヤフォールド）が必要となる。現在、心臓弁に関して研究されているスキヤフォールド材料としては、吸収性縫合糸等で利用されているポリグリコール酸やポリ乳酸等の生体内分解吸収性人工材料と、同種あるいは異種心臓弁組織からドナー由来細胞を除去した脱

細胞化マトリックスとがある

人工材料製スキュフォールドを用いた代表例として新岡らの報告がある。ヒツジを用いた実験で、ポリグリコール酸製のシート状メッシュスキュフォールドに末梢血管壁の細切によって得た血管内皮細胞、平滑筋細胞、及び線維芽細胞を、まず線維芽細胞と平滑筋細胞を、続けて1週間後に血管内皮細胞を挿種することで、再生型心臓弁葉を作成した。ヒツジの肺動脈弁の一葉を再生医療心臓弁葉と置換したところ、6週後には正常組織と同様の組織が再生し、9週以降は力学特性も正常組織と同等であったと報告している²。

脱細胞化生体組織を用いた先駆例としては、米国CryoLife社によるSynerGraft心臓弁がある。1999年から脱細胞化ブタ大動脈弁の臨床使用を開始し、2001年には世界初の再生型心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数カ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告している³が、移植後に破断の生じた例も報告されている。ドイツ・ハノーバー医科大学のHaverichらは、1998年より異種生体弁から動物由来細胞を除去し、代わりにレシピエントの自己血管内皮細胞を挿種する動物実験を行っている。彼らは界面活性剤であるTriton X-100やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている⁴。英国リーズ大学のInghamらは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDSが最も細胞除去に適していると報告している⁵。また、ドイツ・フンボルト大学のKonertzらはヒツジを用いた6カ月間の実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を挿種することで弁の変形や石灰化も見られなかったと報告しており、臨床使用も開始している⁶。彼らの開発した心臓弁は、ドイツのベンチャー企業AutoTissue社から2006年に市販が開始され、これまでに400例以上の治療を実施したと報告されている。

筆者らは2000年から、脱細胞化した生体弁に患者自身の細胞を組み込むテララーメード心臓弁の開発を開始した。生物組織を選んだのは、以前から凍結保存同種弁の臨床使用に取り組んできたことと、心臓弁の複雑な形状を人工材料で造形することが容易でないこと、及び人工材料は生体よりも硬いために生体と同等の力学特性を持たせるのが難しいと考えたためである。免疫反応の主因を成すドナー由来細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスからなる脱細胞化スキュフォールドに患者の自己細胞を組み込むことで、生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する代用弁が創製できると期待できる(図1)。このためには、完全な脱細胞化処理法の開発が重要である。

6.4 脱細胞化法の検討

前述のように、ほとんどのグループは界面活性剤やタンパク分解酵素等の薬液処理によって細胞を除去している。筆者らは当初、Triton X-100溶液による界面活性剤浸漬処理を検討した。その結果、厚さ数百 μm の弁葉内においては処理6時間後には細胞核は染色されなくなったが、

弁葉基部の組織内細胞の核は処理24時間後でも表面から1mm以遠の組織深部では染色されており、界面活性剤溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた(図3中)。また、細胞毒性を示すTriton X-100を洗浄除去するために数週間以上の時間を要し、その間における生体力学特性の変化や汚染の危険性についても注意が必要であった。そこで我々は、より完全な細胞除去法について検討し、液体を圧力媒体として等方圧力を加える冷間等方圧加圧法による超高压印加処理法を開発した(図2)。

6.5 高压処理について

自然界における状態変換因子は「圧力」と「熱」の2つであり、それぞれ独立に物質の状態を変化させることができる。ブリッリマン(1882-1961)が高压物理学を開拓して以来、無機・有

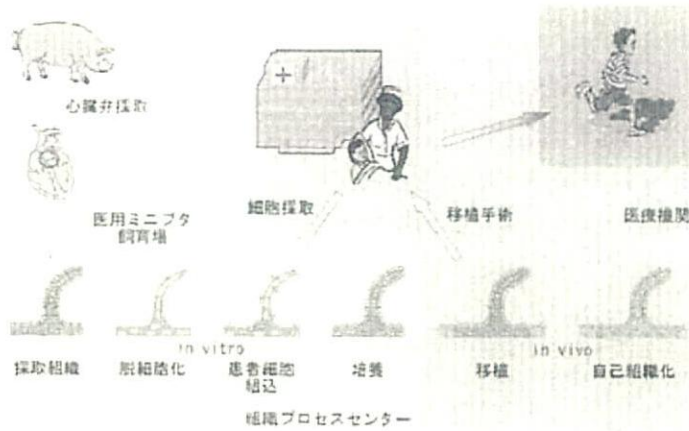


図1 生物組織スキャフォールドを用いたテーラーメイド心臓弁

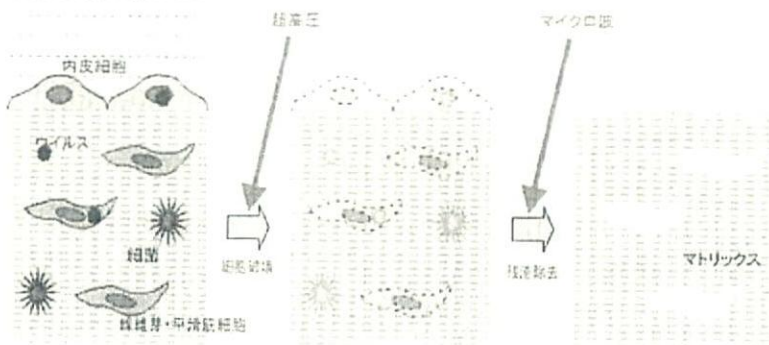


図2 超高压処理を用いた脱細胞化処理法