

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、組織を超高静水圧下(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。静水圧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。一昨年度は、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。昨年度は、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。本年度は、ヘパリン含有PVAゲル人工血管のin vivo移植実験を行い、生体適合性を検討した。

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。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。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(図1)。本研究では、PVA-HC(重合度1750・鹼化度99.8%)、PVA140(重合度4000・鹼

化度 98.5%) と PVA117 (重合度 1750・鹸化度 98.5%) を使用した。

超高压印加は、25℃、10 分間、10,000 atm の条件で行い、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。

ヘパリン含有 PVA ゲル抗血栓性評価として、ATIII 活性を測定した。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。

得られたヘパリン含有 PVA ゲル人工血管については、破断強度試験を行い、ラット頸動脈への移植試験を行った (図 2)。

(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

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 (図 3)。これより PVA ゲルより溶出したヘパリンは抗血栓性を維持していると考えられる。

SEM 観察では、PVA とヘパリンの相分離は確認されず、ダクロンとの密着も確認できた (図 4)。破裂試験では 750mmHg の耐圧を示し、ダクロンを加えることにより、力学的強度が向上した (図 5)。超高压技術の導入により、生体組織に近い力学的強度を有した 3 層構造 PVA 人工血管作製が可能であった。

In vivo ラット頸動脈への移植試験では、カフ法を用いることにより、作製した人工血管をラット

頸動脈に移植したところ、脱離・破裂はみられなかった。ラット頸動脈移植後 1 週間評価において、人工血管は開存し内腔の血栓形成もみられなかった (図 6)。

D. 考察

ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管では、含有したヘパリンの活性が維持されることが明らかとなった。活性が維持されたヘパリンの溶出により抗血栓性が維持されたと考えられる。PVA ゲルの一般的な作成法である凍結融解法では、ヘパリン含有時に PVA とヘパリンが相分離するが、本法では相分離は確認されず、このためヘパリンの徐放が可能であったと考えられる。力学強度試験において、得られた人工血管は生体組織に類似する強度を示し、ヘパリンと PVA の相分離を抑制した結果と考えられる。動物への移植試験においても比較的良好な結果が得られ、ヘパリン含有効果であると考えられる。

E. まとめ

抗血栓薬剤であるヘパリンを含有する PVA ゲルの人工血管としての応用を検討した。超高压印加法を用いることで、ヘパリン含有 PVA ゲルが得られた。ダクロン繊維で補強することで生体組織に類似した力学強度を示し、溶出したヘパリンの活性の維持が確認され、動物への移植実験においても良好な成績が得られた。ヘパリン含有 PVA ゲルの人工血管としての可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, *Journal of Artificial Organs*, 12, 111-117 (2009)
- 2). D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata, In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers, *Biomacromolecules*, 10(2), 237-242 (2009)
- 3). S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, and T. Yamaoka, Modification of PLA Scaffolds

Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates, The Japanese Peptide Society, 449-450 (2009)

- 4). S. Kakinoki and T. Yamaoka, Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence, *Acta Biomater*, 6, 1925-1930, 2010
- 5). A. Miskon, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins, *Tissue Engineering*, in press (2010)
- 6). T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, T. Moritan, and T. Yamaoka, Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve, *J. Biomater. Sci. Pol. Ed.*, in press (2010)

2. 学会発表

- 1). 江橋 具、西垣戸麻美、森反俊幸、藤里俊哉、山岡哲二、脱細胞化神経を用いた損傷神経の再生, 第48回日本生体医工学会大会, 2009/4/23
- 2). 江橋 具、佐合 満、森反俊幸、湊谷健司、岸田晶夫、藤里俊哉、山岡哲二、北村惣一郎、石灰化軽減を目指した脱細胞化血管作製法の改良, 第48回日本生体医工学会大会, 2009/4/24
- 3). Tomo EHASHI, Tetsuji YAMAOKA, Analysis of Host Response against Different Surface Materials for Tissue Regeneration, 国際シンポジウム "Immune Regulation: Present and Future", 2009/5/25
- 4). Tomo EHASHI, Tetsuji YAMAOKA, Different Host Responses To Hydrophobic or Hydrophilic Scaffolds For Tissue Engineering, TERMIS-WC 2009, 2009/9/2
- 5). SachiroKakinoki, Sho Uchida, TomoEhashi, Akira Murakami and Tetsuji Yamaoka, Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat, 第46回ペプチド討論会, 2009/11/5
- 6). 江橋 具、白井 航、多嶋佑介、神村共住、山岡哲二、パターン化された有孔材料に対する生体応答の解析, 第47回日本人工臓器学会大会, 2009/11/13
- 7). 江橋 具、竹村太郎、箕輪貴司、花方信孝、小林尚俊、山岡哲二、スキュフォールド材料に対する生体応答の遺伝子網羅的解析, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009/11/16
- 8). 山口晴加、鈴木彩香、佐合 満、朝本康太、江橋 具、森反俊幸、藤里俊哉、山岡哲二、脱細胞大動脈に対する石灰化反応の経時的低侵襲評価, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009/11/17

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

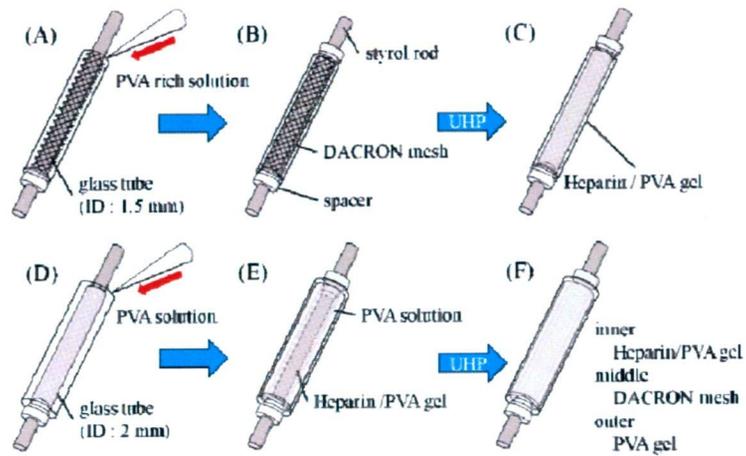


図 1. ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管の調製

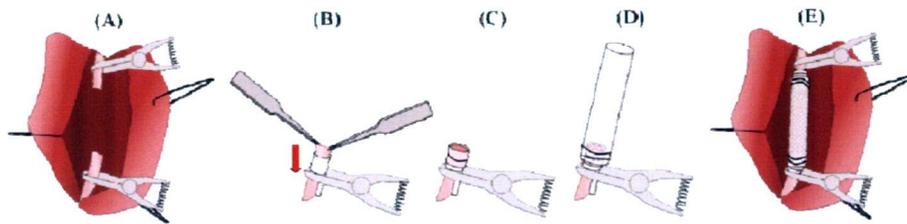


図 2. ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管のラット頸動脈移植

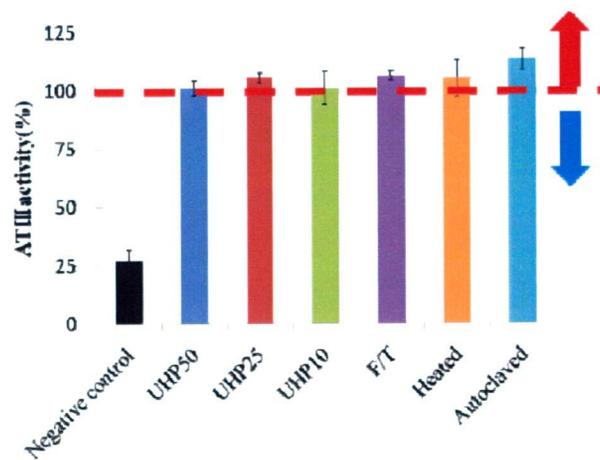


図 3. AT III 活性試験

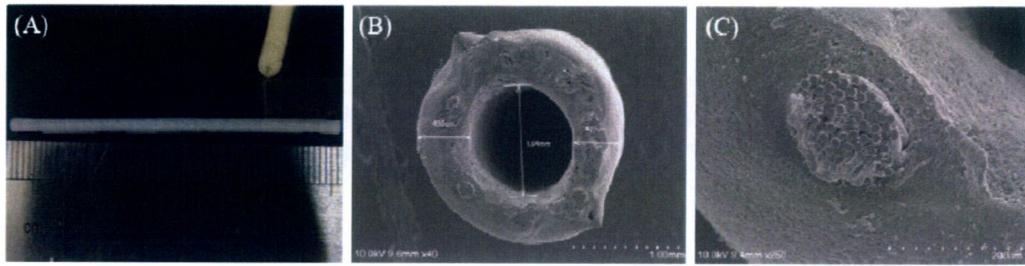


図 4. ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管

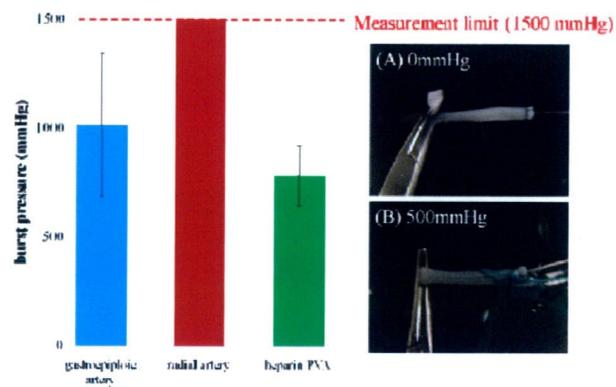


図 5. ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管の力学強度試験

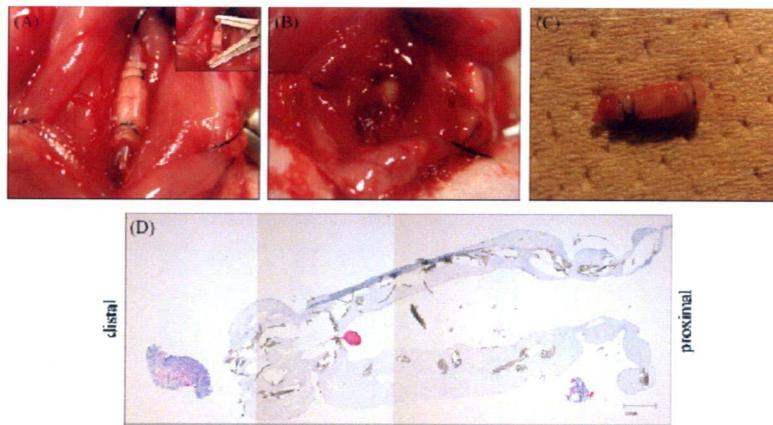


図 6. ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管のラット頸動脈移植結果

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。異種移植を行なった場合に、リンパ球や繊維芽細胞の集積に違いが認められ、これらが脱細胞化組織の再生効率に関与することが示唆された。

A. 研究目的

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が、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の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ヤ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。昨年度まで、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、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て検討を行った。

本年度は、詳細な免疫応答を検討するため、超高压脱細胞化大動脈のブタマウス間、ブタラット間の背部皮下への異種異所性移植を行い、その免疫応答の違いを比較することにより、異種脱細胞化組織の移植時における生体内反応を病理学的・免疫学的観点から検討した。

B. 研究方法

[移植大動脈片の調製]

食用ブタ大動脈から直径 6 mm の円盤状に大動脈片をトレパンで打ち抜き使用した。

[脱細胞化大動脈の調製]

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大動脈の脱細胞化を行った。具体的には、30℃、10000 気圧、10 分間の超高压静水圧を施した後、大動脈用洗浄培地で 14 日間振盪洗浄を行った。

[未処理組織の作製]

未処理組織に対しても高压印加 (30℃、5000 気圧、5 分間) することにより滅菌処理を施した。

[移植手術]

移植実験には 6 週齢の C57BL/6J マウス (雄)、及び Wistar ラットを用いた。ネンブタール原液を生理食塩水で 10 倍希釈し、10%ネンブタール溶液を調製した。10%ネンブタール溶液を腹腔内注射して麻酔し、背側頸部に長さ 1 cm 程度の切開線を入れた。その後尾側に向かって皮下組織を長さ 3cm ほど剥離して進み、そこへ移植片を 1 匹につき 1 個留置し、切開線を 2 針縫合した。

[HE 染色]

マウスへの移植では、移植 3 時間・2 日・7 日後に、10%ネンブタール溶液 0.4ml で麻酔後に移植片を皮膚とともに摘出し、パラフィン固定後切片を HE 染色した。ラットへの移植では、移植 3 週間後に移植片を皮膚とともに摘出し、パラフィン固定後切片を HE 染色した。また、凍結切片より、 α SMA、ビメンチン、CD68 で免疫染色を行った。

[リンパ節サイズの比較]

移植片摘出と同時に腋下リンパ節を摘出した。炎症反応の程度を観察するために、脱細胞化大動脈移植群と未処理大動脈移植群のリンパ節サイズを比較した。

(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) 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。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

[HE 染色]

脱細胞化ブタ大動脈のマウス皮下への異種異所性移植を行った。移植後 3 時間、7 日の移植片周辺の HE 染色結果を図 1 に示す。炎症性細胞のリンパ球・好酸球・マクロファージ、非炎症性細胞の線維芽細胞を観察した。移植後 3 時間では、未処理大動脈、脱細胞化大動脈ともに、移植片周辺に集積するリンパ球、線維芽細胞が同程度に認められた (図 1 A,C)。移植後 7 日後では、未処理大動脈移植片の周辺ならびに内部へのリンパ球および好酸球等の炎症性細胞の遊走・浸潤が多数認められた (図 1 D)。一方の脱細胞化大動脈では、周辺部に若干の炎症性細胞の遊走が認められるものの未処理大動脈に比して軽微であり、また、脱細胞化大動脈内部への線維芽細胞の浸潤が認められ、組織再生が進行していることが示唆された (図 1 C)。

脱細胞化ブタ大動脈のラット皮下への異種異所性移植を行った。移植後 3 週間の移植片周辺の HE 染色、結果を図 2 に示す。脱細胞化大動脈では、細胞は ECM 線維間への浸潤は少なく、組織周囲に多くの細胞が集積していた。また、大動脈特有の線維組織の層構造が各所で分断され、このことより ECM 線維の破壊が生じていると考えられ、破壊された部位から細胞が内部に浸潤していた。血管新生は組織の周囲に多く生じ、組織内部ではあまり観察されなかった。 α -SMA、ビメンチン、CD68 で移植組織を免疫染色し、移植組織内の平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージの観察を行った。ECM 内に存在している細胞はほとんどが線維芽細胞であった。ほぼ同じ分布でマクロファージも観察された。平滑筋細胞は血管新生部位にのみ存在していた。

[リンパ節サイズの比較]

未処理大動脈、脱細胞化大動脈のマウス背部皮下移植後、3 時間・2 日・7 日のリンパ節サイズを検

討した (図 3)。未処理大動脈、脱細胞化大動脈のいずれの場合においても、移植後のリンパ節サイズは通常に比べ増大していた。しかしながら、いずれの移植期間においても、未処理大動脈に比べ脱細胞化大動脈の場合にその程度は低いものであった (図 2)。

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よって運ばれ、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。

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、異種動物由来の脱細胞化組織の異所性移植において、どのような生体反応が引き起こされるかについて、ブターマウス、ブターラット異所性異種実験にて検討した。脱細胞化ブタ大動脈のマウス皮下への異種異所性移植では、移植後 3 時間では、未処理大動脈、脱細胞化大動脈の間に大きな差異は認められず、移植後 7 日後では、未処理大動脈移植片の周辺での強い炎症が示されたのに対し、脱細胞化大動脈では、軽微な炎症にとどまり、脱細胞化大動脈内部への繊維芽細胞の浸潤が認められ、組織再生が進行していることが示唆された。

脱細胞化ブタ大動脈のラット皮下への異種異所性移植では、炎症の程度はマウスと大きな違いは認められなかった。組織再生 (細胞浸潤) について HE 染色、免疫染色組織の観察にて検討した。レシピエント細胞は、初期には線維間への浸潤は

少なく組織周囲に集積し、大動脈線維の層構造が分断された部位から細胞が内部に浸潤したと推察された。免疫染色では、ECM 内に存在している細胞のほとんどが繊維芽細胞であり、ほぼ同じ分布でマクロファージも観察された。マクロファージによる ECM 破壊に続く繊維芽細胞の浸潤による組織再生と再構築と考えられる。

E. まとめ

生体組織から細胞を除去した脱細胞化大動脈の異所性異種時の生体反応を検討した。脱細胞化による炎症反応の抑制が示され、また、細胞浸潤による組織再生が示された。細胞浸潤のメカニズムとしては、マクロファージによる ECM 破壊に続く繊維芽細胞の浸潤と推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Seiichi Funamoto, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Ayako Murakoshi, Yoshihide Hashimoto, Kazuo Niwaya, Soichiro Kitamura, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, *Biomaterials*, 31, 3590-3595, 2010.

2. 学会発表

- 1).

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

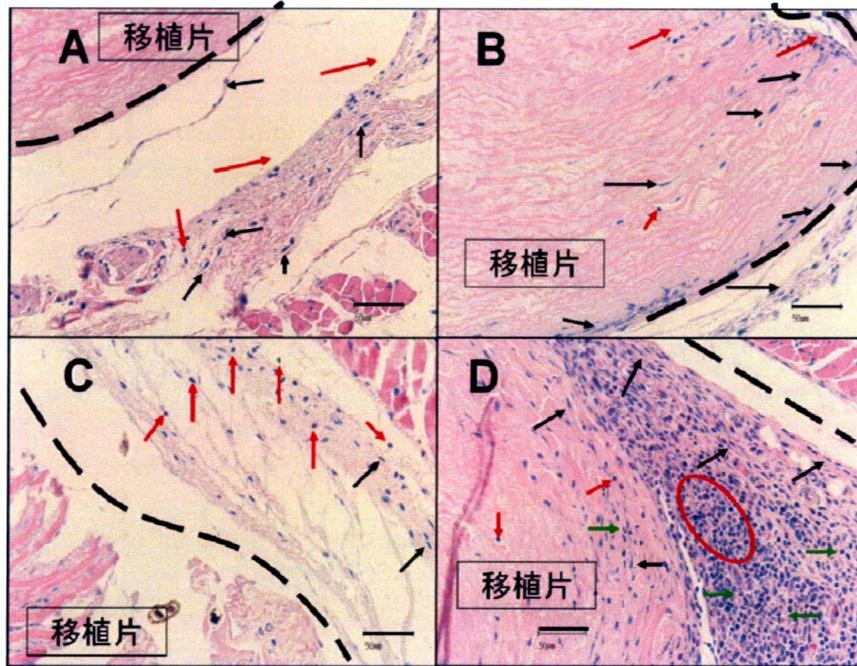


図 1. 脱細胞化大動脈、未処理大動脈移植後の HE 染色写真 (×200)
 A: 脱細胞化角膜移植後 3 時間 B: 脱細胞化角膜移植後 7 日
 C: 未処理角膜移植後 3 時間 D: 未処理角膜移植後 7 日

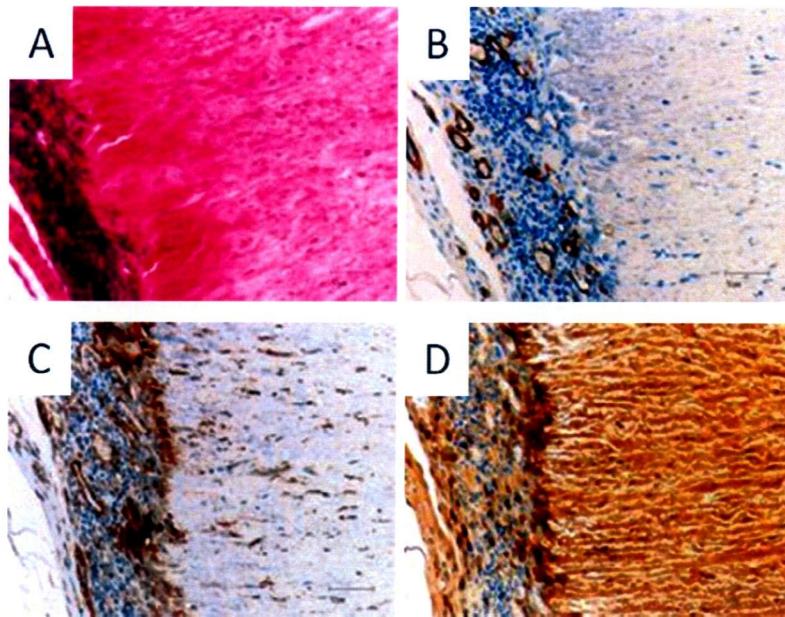


図 2. 脱細胞化大動脈のラット背部皮下移植
 A: HE 染色 B: α -SMA C: ビメンチン D: CD68

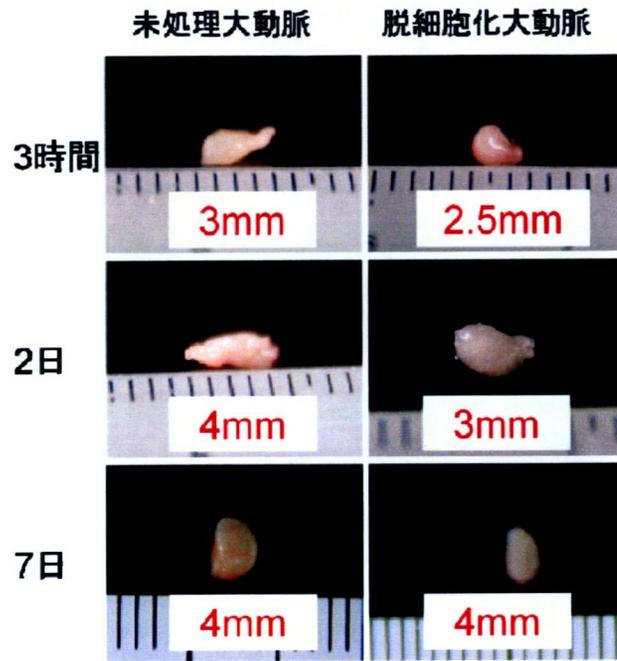


図 3. 大動脈皮下移植後のリンパ節腫

脱細胞大動脈の石灰化抑制

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が、近年、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、物理的手技と化学的処理を組み合わせ作成した脱細胞血管組織に対する、石灰化の抑制を目指して、ラット皮下埋入実験によるスクリーニング研究を遂行するとともに、ミニブタを用いた下行大動脈置換手術による石灰化の検討により、脱細胞処理液の組成の最適化で石灰化が大きく抑制できることが明らかとなった。

A. 目的

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て、欧米では、グルタ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。

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、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一方で、未だ石灰化の問題が残っている。特に昨年度は、マイクロCT技術を導入して長期間埋入したグラフト内の石灰化の様子を画像化するとともに科学分析法によるCa定量によりその問題がさらに明らかとなった。多くのグラフトには石灰化はほとんど認められず、ごく一部の埋入グラフトに起こる現象であり、さらに、そのトリガーも明らかではないが、出来る限り抑制する必要があることには変わりない。本年度は、石灰化が比較的起こり易い系としてラット皮下埋入試験によりグラフトの特性を評価するとともに、最適化されたグラフト材料のブタ下行大動脈置換実験を実施した。

B. 実験方法

B-1. ブタ下行大動脈の脱細胞処理

ブタの大動脈血管壁を8mm角に細切して、施圧液と共に袋に入れて密封し、980MPaの圧力を30℃温度下で10分間印加した。次に、圧力処理により破壊された細胞を除去するため、DNase Iを0、4、40、400 unit/mLの濃度で添加した洗浄液で3、

7、14日間洗浄した。洗浄後、リン脂質除去を目的として80%エタノール中での振盪と、エタノール除去のための生理食塩水への置換を行ったのち、保存液に置換して実験に供した。各溶液を用いて作製した脱細胞化血管のHE染色により、脱細胞化の有無や組織の構造変化を比較した。さらに、溶存タンパク質の定量のために、タンパク質の抽出後SDS-PAGE分析を行った。

B-2. ラット皮下への埋入試験

脱細胞化処理に用いた各溶液が組織の石灰化に及ぼす影響を調べるため、ラット背部への皮下移植を行い、移植後1ヶ月目と3ヶ月目にX線CTでの撮像から骨塩量を測定した。さらに、3ヶ月目には組織を摘出し、原子吸光度計を用いて、組織内の含有カルシウム量を定量した。

B-3. ミニブタ下行大動脈置換実験

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、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。移植切片を、3、6、12ヶ月後に摘出し、マイクロCTによる石灰化の分析、Ca定量を行なった。

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。

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. 脱細胞化効率

HE染色の結果、培地を用いて脱細胞した場合には、いずれのDNase I濃度においても、良好に細胞が除去されていることが確認された(図1)。一方、生理食塩水では、洗浄3日ではすべての条件で脱細胞化されなかったが、洗浄7日/DNase400 unit/mL、洗浄14日/DNase 40・400 unit/mLの条件では良好な脱細胞が確認された(図2)。

さらに、これらの条件で脱細胞したブタ下行大動脈血管壁に残存するタンパク質を定量した結果、いずれの場合にも洗浄期間とともに可溶タンパク成分が消失していくことが明確である(図3)。

C-2. ラット皮下埋入実験

移植実験で石灰化形成を評価した結果、移植1ヵ月後において、培地群では、洗浄14日/DNase 0~4unit/mLで石灰化が確認されたが、Salineでは石灰化は確認されなかった(図4)。

さらに詳細に検討するために、移植3ヶ月後のサンプルを取り出し、それら自身のCT像を高解像条件下で測定しさらに骨円量も定量した。その結果、培地群では、DNaseの濃度に関係なく、激しい石灰化が確認された(図5)。生理食塩群では、洗浄14日/DNase 40~400unit/mLで若干の石灰化が確認されたものの、石灰化は大きく抑制されることが明らかとなった(図6)。

Ca沈着の評価をVon Kossa染色を用いて行ったところ培地群では全体的に、Caが沈着しており、生理食塩水群では、洗浄7日DNase 400unit/mL、洗浄14日/DNase 400unit/mLでCaの沈着していることが確認された(図7)。

さらに、培地群において洗浄期間が長くなるに

つれて石灰化が充進する傾向が明らかである。現在の所、詳細なメカニズムは明らかでないが、培地中に含まれるカルシウムイオンやリン酸イオンが時間とともに脱細胞組織に吸着（あるいは結晶化し）、それが核になって、その後の *in vivo* での石灰化を誘発しているのではないかと考えている。

C-3. ミニブタ下行大動脈置換実験

上記の研究成果を踏まえて、最適化された条件下で作成したブタ脱細胞下行大動脈を同種移植した。6か月後にグラフトを取り出し、その石灰化の様子を観察した。グラフトは周囲組織と癒着しており注意深く取り出してCT撮像した。

図8に示すように第1例では、石灰化は全く認められずその柔軟性も極めて高いものであった。全骨塩量は0.37mgとほぼ正常組織レベルであった。近位部において内膜肥厚が確認されているが血流は良好であった。

第2例では内膜肥厚は全く認められていない(図9)。図9の「1」と示した箇所では石灰化が認められたので詳細に検討した結果、縫合糸周囲に石灰化が認められた。縫合部での石灰化は頻繁に認められ、吸収性縫合糸の使用が有効かも知れない。

D. 結論

これまで、少数の同種ブタ大動脈置換実験を行い石灰化の程度を検討してきた。使用する動物数も莫大なものであり、必ずしも望ましいシステムではないと考える。今回、比較的石灰化が起り易いラット皮下に血管壁片を移植し、さらに、*in vivo* CT撮像することで経時的な追跡も可能となった。その結果得られた、石灰化抑制に有効な処理溶液を元に作成したグラフトは同種ブタ下行大動脈置換実験でも優れた結果を与えた。今後、例数を増加させて、新たな脱細胞血管の有用性を確かなものとしたい。

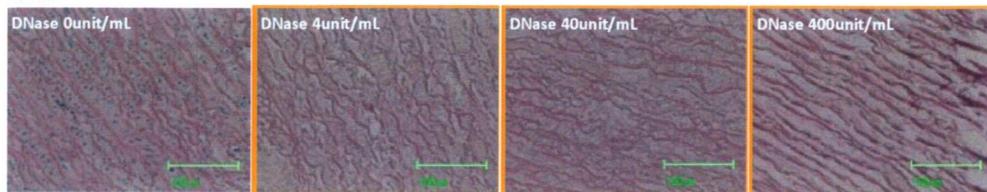
E. 論文発表

- 1). Minatoya, K., Ogino, H., Matsuda, H., Sasaki, H., Tanaka, H., Kobayashi, J., Yagihara, T., Kitamura, S., Is conventional aortic arch surgery justifiable in octogenarians? *J Thor Cardiovasc Sur* 139 (3), 641-645 (2010)
- 2). Matsuda, H., Fukuda, T., Iritani, O., Nakazawa, T., Tanaka, H., Sasaki, H., Minatoya, K., Ogino, H., Spinal Cord Injury is Not Negligible after TEVAR for Lower Descending Aorta, *Eur. J Vasc Endovasc Sur*, 39 (2), 179-186 (2010)
- 3). Morisaki, H., Akutsu, K., Ogino, H., Kondo, N., Yamanaka, I., Tsutsumi, Y., Yoshimuta, T., Morisaki, T., Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD), *Hum mutat*, 30 (10), 1406-1411 (2009)
- 4). Tanaka, H., Ogino, H., Matsuda, H., Minatoya, K., Sasaki, N., Long-term outcome of aortic valve sparing procedures in connective tissue disorders, *Jap J Thor Sur*, 62 (11), 978-981 (2009)
- 5). Kataoka, Y., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Higashi, M., Morii, I., Kawamura, A., Ishibashi-Ueda, H., Otsuka, Y., Oppression of left main trunk due to pseudoaneurysm with graft detachment in patients with behcet disease previously treated by bental procedure, *Circulation* 119 (21), 2858-2859 (2009)
- 6). Tochii, M., Ogino, H., Matsuda, H., Minatoya, K., Sasaki, H., Kitamura, S., Is prompt surgical treatment of an abdominal aortic aneurysm justified for someone in their eighties?, *Ann Thor Cardiovasc Sur*, 15 (1), 23-30 (2009).

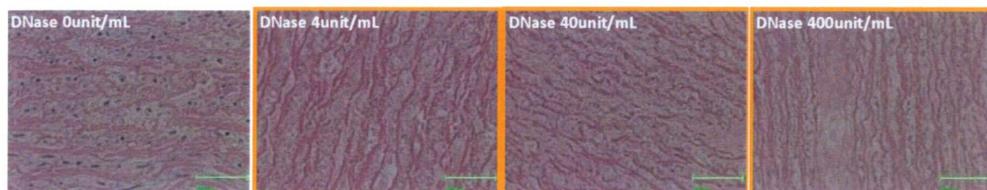
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

3日洗淨



7日洗淨

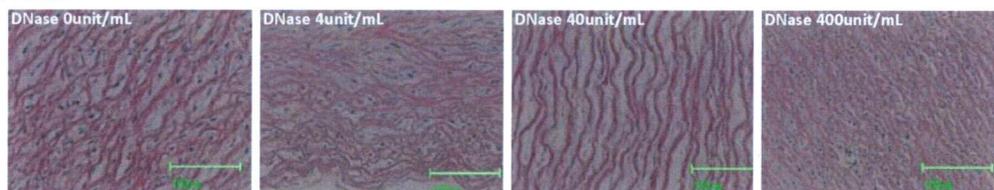


14日洗淨

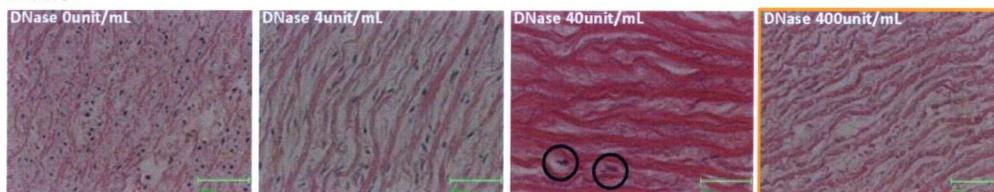


図1 通常培地を利用して脱細胞したブタ大動脈血管壁のHE染色像

3日洗淨



7日洗淨



14日洗淨

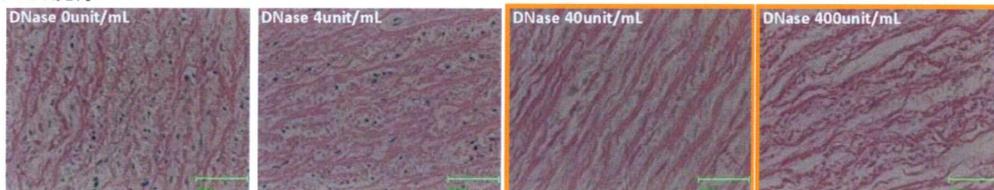
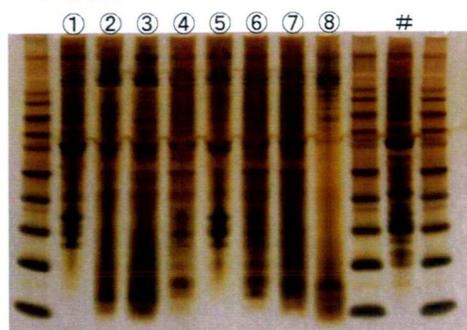
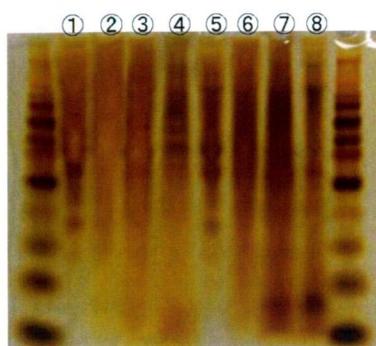


図2 生理食塩水を利用して脱細胞したブタ大動脈血管壁のHE染色像

3日洗浄



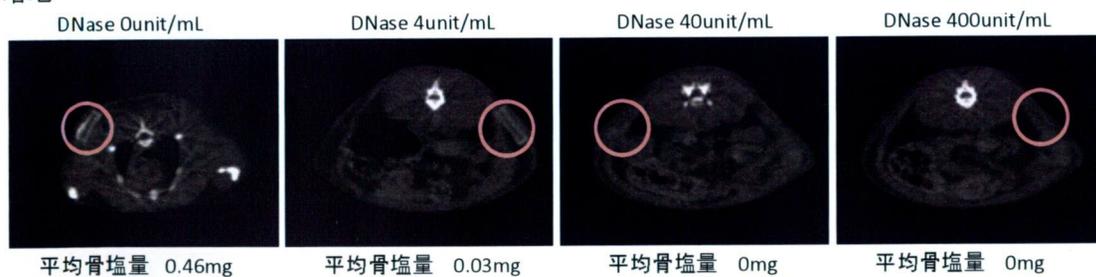
7日洗浄



- ① 生食/DNase 0unit/mL
- ② 生食/DNase 4unit/mL
- ③ 生食/DNase 40unit/mL
- ④ 生食/DNase 400unit/mL
- ⑤ 培地/DNase 0unit/mL
- ⑥ 培地/DNase 4unit/mL
- ⑦ 培地/DNase 40unit/mL
- ⑧ 培地/DNase 400unit/mL

図3 様々な溶液で脱細胞した後に残存するタンパク成分のSDS-PAGE分析

培地

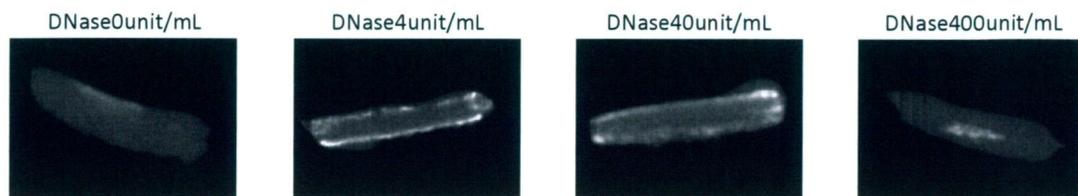


生食

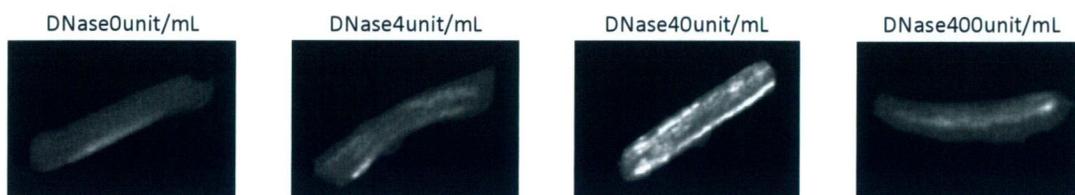


図4 培地あるいは生食で14日間洗浄した後に、ラット皮下に1か月埋入したサンプルのin vivo CT像

3日洗浄



7日洗浄



14日洗浄

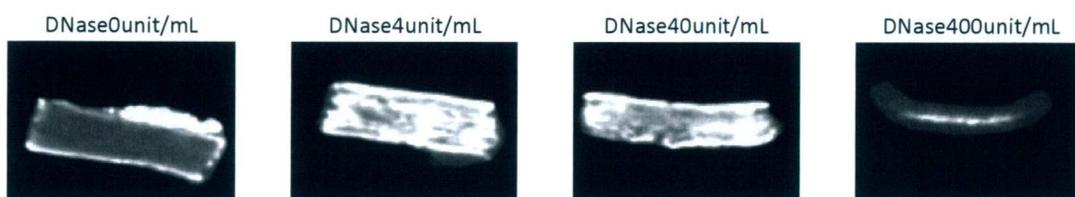
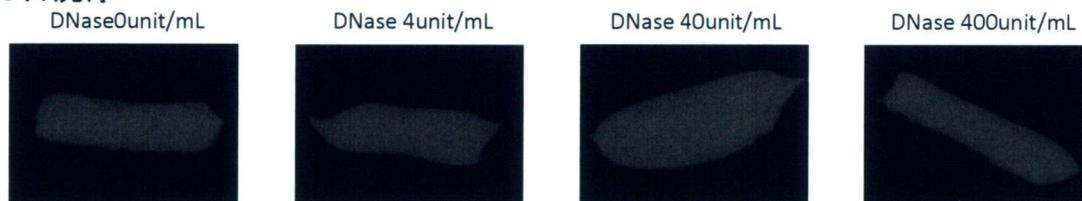
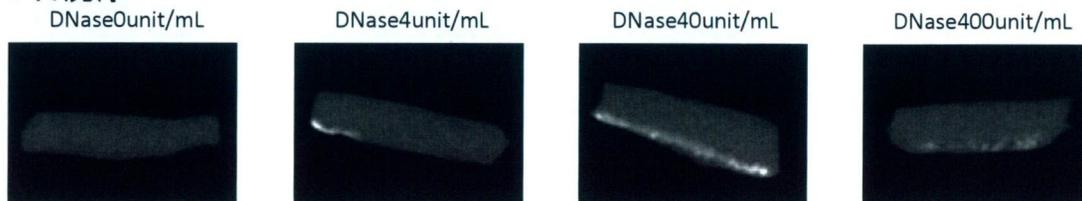


図5 培地で3～14日間洗浄した脱細胞血管のラット皮下埋入3か月後のCT像

3日洗浄



7日洗浄



14日洗浄

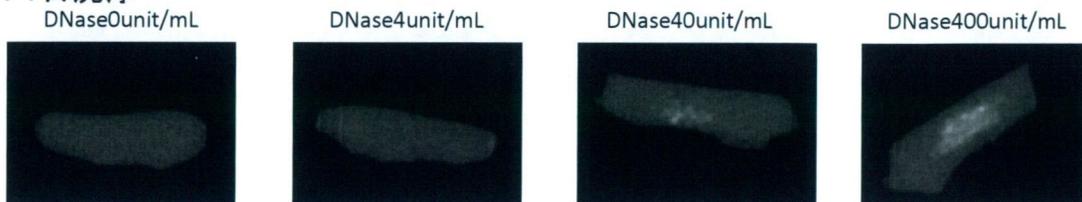


図6 生食培地で3～14日間洗浄した脱細胞血管のラット皮下埋入3か月後のCT像

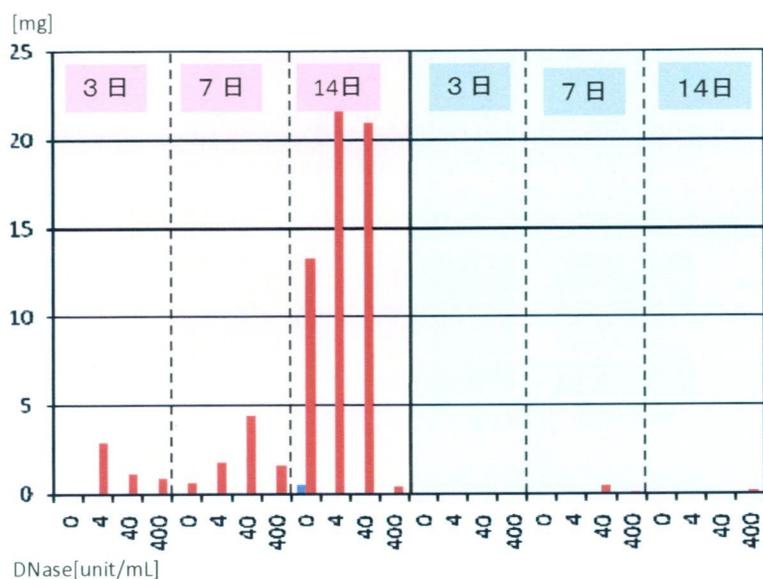


図7 所定期間洗浄した脱細胞組織のラット皮下埋入3か月後の骨塩量

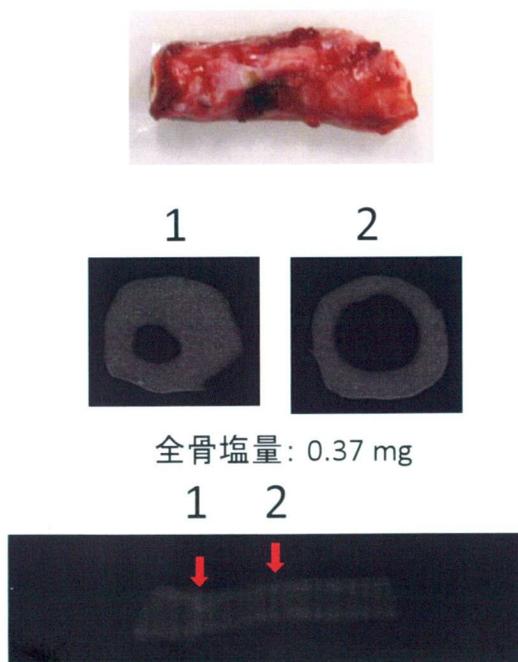


図8 最適化条件により作成した脱細胞化ブタ大動脈の同種移植6か月後の所見。良好な開存。石灰化は全く認めない。内膜肥厚が認められる(1)

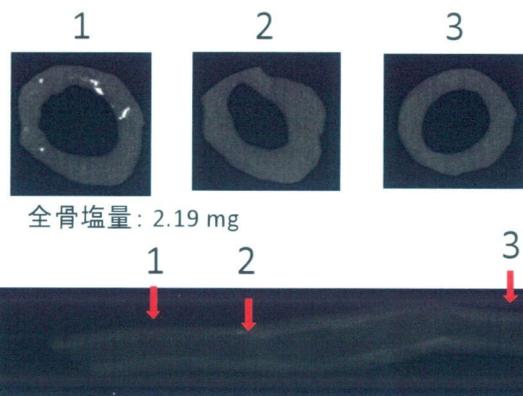


図9 最適化条件により作成した脱細胞化ブタ大動脈の同種移植6か月後の所見、良好な開存。肥厚化は認めない。縫合部に石灰化。

脱細胞化組織の滅菌に関する研究

分担研究者 白数 昭雄 ニプロ株式会社

研究要旨 本研究事業で開発する脱細胞化組織を用いた再生医療用生物由来素材の広範な応用のためには、脱細胞化組織の滅菌に関する検討が必要である。本年度は、脱細胞化組織の滅菌方法について、新たな方法として組織の脱細胞化時に使用する超高压を用いることで、超高压による滅菌の可能性について微生物を用いて検討した。バイオリジカルインジケータ（BI）を用いた実験では、10000気圧の超高压を低温で印加することにより BI に使用されている *Bacillus atrophaeus* の死滅が、圧力印加後の培養試験で確認された。また、圧力印加の時間増加により *Bacillus atrophaeus* の死滅効果が高まることが明らかとなった。低温で超高压を印加する場合においては、過度の加温を行わないため、組織構造・力学特性への影響は少なく滅菌することが可能であることから、超高压の印加条件を改良することで生体構造・物性を維持し、滅菌できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

循環器系疾患は、先進国における死の最たる原因疾患の1つである。我が国における三大死因である悪性新生物、心疾患、脳血管疾患の占める割合は、それぞれ31.0%、15.5%、13.3%（平成15年人口動態統計）、31.1%、15.5%、12.5%（平成16年人口動態統計）30.1%、16.0%、12.3%（平成17年人口動態統計）であり、循環器系疾患全体の患者数は悪性新生物の4倍である。今後、生活習慣、高齢化を考慮すると、循環器系疾患の患者数は増加すると考えられる。

循環器系疾患の重篤な場合において、従来の治療法での完治が見込めない疾患に対する治療法の一つとして組織移植による治療が行われている。しかしながら、圧倒的な移植不足により、我が国の移植医療は進んでいない状況にある。この問題に対して、我々は、超高压印加法による脱細胞法を用いた血管・角膜の移植用組織の研究・開発を行っている。脱細胞法による移植用組織の特徴の1つは生体由来の組織構造を維持する点であり、これを広範に利用するためには生体物性（構造）を損なわずに保存し、滅菌する必要がある。本研究では、新たな方法として組織の脱細胞化時に使用する超高压を用いることで、超高压による滅菌の可能性について微生物を用いて検討した。

B. 研究方法

バイオリジカルインジケータ（BI）*Bacillus atrophaeus* をPP製の容器に、上記BIをエンベロープより取り出しと蒸留水をともに入れ、空気が残らないようにヒートシールにより封入した。封入後、神戸製鋼社製のドクターシェフを使用し、10000気圧の超高压を昇圧時間5分と15分で圧力維持時間10分、60分と100分で減圧時間5分、と15分で圧力印加時の温度10℃、30℃及び37℃で圧力印加を行なった。処理条件毎にn=3とした。圧力印加後は、清潔下でPP製の容器内からBIを取り出しSCDB培地に投入し、35度下で1週間の培養を行なった。

C. 研究結果

BIの培養試験の結果について、昇圧時間5分と15分、圧力維持時間10分、減圧時間5分と15分で圧力印加時の温度10℃と30℃の条件で滅菌処理した群においては、圧力印加による滅菌の効果が培養試験では見られず、培地の観察結果では培地色が黄変した。しかし、昇圧時間5分と15分、圧力維持時間10分、60分と100分、減圧時間5分と15分で圧力印加時の温度10℃、30℃と37℃の条件で滅菌処理した群においては、昇圧時間5分、圧力維持時間60分と100分、減圧時間5分で圧力印加時の温度10℃の条件において1週間培

養後の培地の観察結果で、わずかな黄変が見られた。また、昇圧時間 15 分、圧力維持時間 60 分と 100 分、減圧時間 15 分で圧力印加時の温度 30℃と 37℃の条件では、1 週間培養後の培地の観察結果で培地の変色は見られなかった。

D. 考察

昇圧時間 5 分と 15 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分と 15 分で圧力印加時の温度 10℃と 30℃の条件の条件では、培地が黄変し、昇圧時間 5 分、圧力維持時間 60 分と 100 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 10℃の条件では、わずかな黄変が見られた結果から、圧力の印加時間を増加すると殺菌効果があることが確認された。さらに、昇圧時間 15 分、圧力維持時間 60 分と 100 分、減圧時間 15 分で圧力印加時の温度 30℃と 37℃の条件では、培地の変化は確認されなかったことから、圧力印加時の温度を上げることによっても殺菌滅菌効果が現れることが確認された。このことより、超高压を用いた滅菌についてさらなる検討が必要であると考えられる。

E. まとめ

超高压を用いた滅菌作用の効果について、BI を用いて、圧力印加後の培養試験により検討した。昇圧時間 5 分と 15 分、圧力維持時間 10 分、減圧時間 5 分と 15 分で圧力印加時の温度 10℃と 30℃の条件の条件では、滅菌の効果は得られなかったが、圧力印加時間を増加した昇圧時間 5 分、圧力維持時間 60 分と 100 分、減圧時間 5 分で圧力印加時の温度 10℃の条件では、殺菌効果が見られた。さらに、圧力印加時間と印加時の温度を上げた、昇圧時間 15 分、圧力維持時間 60 分と 100 分、減圧時間 15 分で圧力印加時の温度 30℃と 37℃の条件では、BI の *Bacillus atrophaeus* を死滅させたことから、圧力印加時の温度を上げることによっても殺菌滅菌効果が現れることが確認された。このことから超高压を用いた滅菌の可能性が確認された。

F. 研究発表

なし

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