

# 博 士 論 文

---

( 2014年 12月 1日 提出)

論文題目

---

臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究

---

指導教員 藤里 俊哉



大学院 工学研究科  
博士後期課程

生体医工学

専攻

申請者氏名

石野 直明



大阪工業大学大学院

# 目 次

## 概 要

第一章 諸 言 .....	1
1. 臓器移植と脱細胞化組織 .....	2
2. 本研究の動機(免疫反応による異種組織の脱細胞化) .....	4
3. 先行研究と本研究の位置付け .....	7
4. 本研究の期待される成果 .....	7
5. 人工臓器開発と生体適合性評価 .....	8
6. In vitro 抗血栓性評価法の開発 .....	9
研究倫理・生命倫理について .....	10
第二章 血清を用いた異種組織の脱細胞化 .....	11
1. 序 論 .....	12
2. 供試材料と実験方法 .....	13
2.1 血清の提供	
2.2 AHS* <sup>1</sup> の抽出法	
2.3 異種組織の提供	
2.4 血清を用いた脱細胞化処理法	
2.5 脱細胞効率の評価法	
2.6 血清の濃縮法	
2.7 血清濃縮効果の評価法	
2.8 濃縮血清の脱細胞化能	
2.9 浸透圧の影響	
2.10 脱細胞化処理条件の最適化	
2.11 非働化血清の脱細胞化能	
2.12 統計解析	
3. 実験結果と考察 .....	20
3.1 FBS* <sup>2</sup> および AHS の脱細胞化能	
3.2 濃縮血清の脱細胞化能	
3.3 処理条件の最適化	
3.4 浸透圧の影響	
3.5 非働化血清の脱細胞化能	
4. 要 約 .....	28

第三章 既存法(SDS 処理法)との比較 .....	29
1. 序 論 .....	30
2. 供試材料と実験方法 .....	31
2.1 SDS* <sup>3</sup> 処理法の検討	
2.2 血清処理法との比較	
3. 結果と考察 .....	32
3.1 SDS 処理工程	
3.2 血清処理法との比較	
4. 要 約 .....	39
第四章 レシピエント血清を用いて作製した脱細胞化組織の有効性 .....	41
1. 序 論 .....	42
2. 供試材料と実験方法 .....	43
2.1 ラット血清の提供	
2.2 ラット血清の脱細胞化能	
2.3 石灰化評価のための GA* <sup>4</sup> 処理法	
2.4 皮下移植試験	
2.5 評価方法	
3. 結果と考察 .....	44
3.1 ラット血清の脱細胞化能	
3.2 免疫反応による組織破壊	
3.3 石灰化の評価	
4. 要 約 .....	50
第五章 In vitro 抗血栓性評価法の検討 .....	51
1. 序 論 .....	52
2. 血小板凝集に基づく発光の原理 .....	53
3. 実験装置 .....	53
3.1 実験装置概要	
3.2 ダークカウントの測定	
4. 微弱発光の検出感度 .....	56
4.1 供試材料と実験方法	
4.2 実験結果と考察	
5. 新鮮血の提供と抗凝固 .....	58
6. 血栓形成と発光強度変化の関係 .....	58
6.1 供試材料と実験方法	
6.2 実験結果と考察	
7. 脱細胞化人工血管の抗血栓性評価 .....	63

7.1 供試材料と実験方法	
7.2 実験結果と考察	
8. 要 約 .....	68
第六章 総 括 .....	69
付 録 .....	71
1. H&E 染色の手順 .....	72
2. DNA 定量の手順 .....	73
3. 遠心分離機を用いた液状製品の濃縮方法 .....	75
4. 補体価(CH <sub>50</sub> )の測定手順 .....	76
5. pH が補体活性に与える影響 .....	77
6. Von-kossa 染色の手順 .....	79
7. ヘパリンとプロタミンの適正量の検証 .....	80
8. 用手法による血球算定法 .....	81
参考文献 .....	83
研究業績 .....	87
謝 辞 .....	89

#### \* 略 語

1. AHS : Adult human serum (ヒト成人血清)
2. FBS : Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
3. SDS : Sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
4. GA : Glutaraldehyde



# 第一章

## 諸 言

## 1. 臓器移植と脱細胞化組織

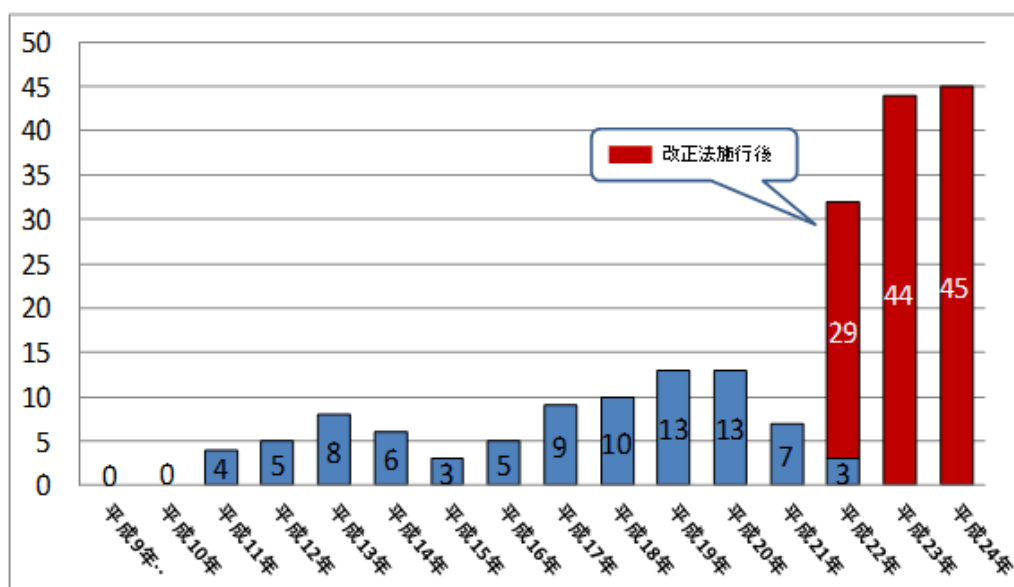
ヒトは、心臓や肺など、多くの臓器が正常に機能することによって、生命を維持することができる。病気あるいは事故によって、ある臓器が重度の機能不全に陥った場合、臓器移植を受けることが唯一の根治治療となるケースも少なくない。

臓器移植は、ヒトからヒトへの同種移植が一般的である。1900年代には、ウサギ、ブタ、ヤギなどをドナーとした、ヒトへの異種移植も行われていたが、これらの異種移植は、いずれも有効な結果は得られなかった[1]。未処理の異種臓器が、レシピエント体内で長期間生着することは皆無である。これは、レシピエントに備わった免疫系が、異種臓器(異種細胞)を排除しようとして働き、拒絶反応を起こすためである。ただし、一部の組織は、Glutaraldehydeなどの薬品で処理し、異種組織の抗原性を失活させることで、ヒトへの移植も可能となる。例えば、ブタ心臓弁を上述の薬品等で処理した生体弁は、ヒト心臓弁の代替組織として臨床使用されている[2]。しかし、現在使用されている生体弁は、移植後の石灰化や機能不全によって、数年から数十年後には、再手術を余儀なくされ、完全な代替組織とはいえない。また、心臓などの複雑な機能を有する臓器は、その機能を維持した状態で、抗原性のみを失活させることは困難である。

本邦では、1997年に施行された「臓器移植法」により、脳死後の心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、小腸などの提供が行われるようになった。その後、後述の臓器移植に関する法改正\*、あるいは医療技術の進歩によって、臓器提供を受ける患者数は年々増加している(図 1-1)[3]。しかし、依然として臓器移植を希望する患者数はドナ一件数を大きく上回っており、臓器移植を希望する患者の多くは、移植手術を受けるまで長期間の待機を強いられる。

### 脳死下での臓器提供者数の推移(年別)

(平成9年10月～平成24年12月31日現在)



法施行以降平成24年12月31日現在 累計204(脳死判定事例は205)  
改正法施行(平成22年7月17日)後 118例(うち家族承諾 96例)

図 1-1 脳死下での臓器提供者数の推移(年別)

参考文献[3]より転載

## \*臓器移植法の改正

2009年に臓器移植法の一部が改正され、2010年から施行された。法改正以前、脳死後の臓器提供には、本人の書面による意思表示と家族の承諾を必要とし、本人の意思表示は、15歳以上において可能であった。そのため、小さな臓器を必要とする小児期(15歳未満)の患者は、海外で渡航移植を受ける必要があった。2010年に「改正臓器移植法」が全面施行されたことにより、本人の意思が不明な場合には、家族の承諾で臓器提供が可能となった。また、15歳未満の脳死患者からの臓器提供が可能となった(参考文献[4]より引用)。

人工臓器の開発は、臓器移植の代替手段として、古くから多くの研究者が精力的に開発を進めている。人工弁や人工血管などは、有効な代替組織として、本邦において、年間数万例の移植手術に使用されている。しかし、生体に備わった機能を完全に代替可能な人工臓器は存在しない。例えば、人工心臓は、多くの場合、心臓移植までの待機期間中に、心機能を補助する目的で移植され、日常生活に多くの制限を受ける。人工腎臓は、植込み型は実用化されていない。慢性腎不全が進行した患者は、血液を体外循環させ、人工腎臓(透析器)に灌流させる人工透析治療を受けなければならない。このように、現在臨床使用されている人工臓器においても、完成された人工臓器とはいえない[5]。近年、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell:iPS細胞)などの幹細胞研究が盛んに行なわれ、臓器再生への応用が期待されている。しかし、ヒトへの移植を想定した、立体的な臓器を構築することは容易ではなく、実用化には至っていない。

脱細胞化組織の研究は、生体組織の複雑な立体構造と機能を完全に模倣した、人工臓器作製のための一つの戦略として注目されている[6, 7]。脱細胞化組織は、一般的に、界面活性剤や酵素を組み合わせた洗浄液によって、ヒトあるいは異種組織から細胞成分を除去することで作製される。レシピエントにとって、異種の細胞成分を除去することで、移植後の拒絶反応を回避することができる。更に、脱細胞化組織を足場にして、レシピエント細胞が浸潤することで、体内での自己組織化が期待できる。脱細胞化技術は、様々な臓器に応用することができる。2008年、Ottらは、脱細胞化したラットの心臓に心筋細胞を播種することで、拍動が再開したと報告し[8]、注目を集めた。脱細胞化組織は、海外では、2000年頃からヒトへの移植が開始され、臨床応用に至っている[9]。本邦においては、2014年10月に、第一例目の脱細胞化心臓弁の移植が、大阪大学医学部附属病院にて行われた。

脱細胞化組織の利点は、細胞外マトリクス(Extracellular matrix:ECM)構造を温存しつつ、細胞成分を除去することで、生体由来の複雑な立体構造を有する、レシピエント細胞の足場を提供できる点である[10-12]。これまでに、心臓[8]、肺[13]、血管[14, 15]、角膜[16]、神経[17]などに応用され、その有効性が報告された。しかし、脱細胞化組織の作製において、いくつかの問題点が指摘されている。多くの研究では、細胞成分の除去に、ドデシル硫酸ナトリウム(Sodium dodecyl sulfate:SDS)やTritonX-100などの界面活性剤を各種酵素と併用して使用している。ここで、脱細胞化処理後に残存する界面活性剤は、移植後に細胞毒性を示し、生体内でのリモデリングを妨げることが報告されている[18]。また、界面活性剤はECM構造への影響が強く、生体由来材料を用いる利点である組織の立体構造の破壊が危惧される[19]。このような脱細胞化組織作製における問題点を解決するための手段として、いくつかの研究グループでは、超高静水压印加法[15, 16]や凍結融解法[17]など、界面活性剤を用いない独自の手法を開発し、生体適合性に優れた人工臓器開発を目的に、精力的に研究が進められている。



## 2. 本研究の動機(免疫反応による異種組織の脱細胞化)

ある動物組織を、異種動物の体内に移植すると、数日以内にドナー由来の細胞が完全に除去される。図 1-2 は、ブタ頸動脈の切片をラット皮下に移植した際の、2 日毎の変化を H&E 染色によって観察した結果である。移植前に観察されるブタ由来細胞は、移植後 4 日間で完全に除去され、レシピエント由来の炎症性細胞(主にリンパ球)が浸潤する(浸潤細胞の同定は、株式会社アプライドメディカルリサーチに依頼した所見結果を参考に評価した)。

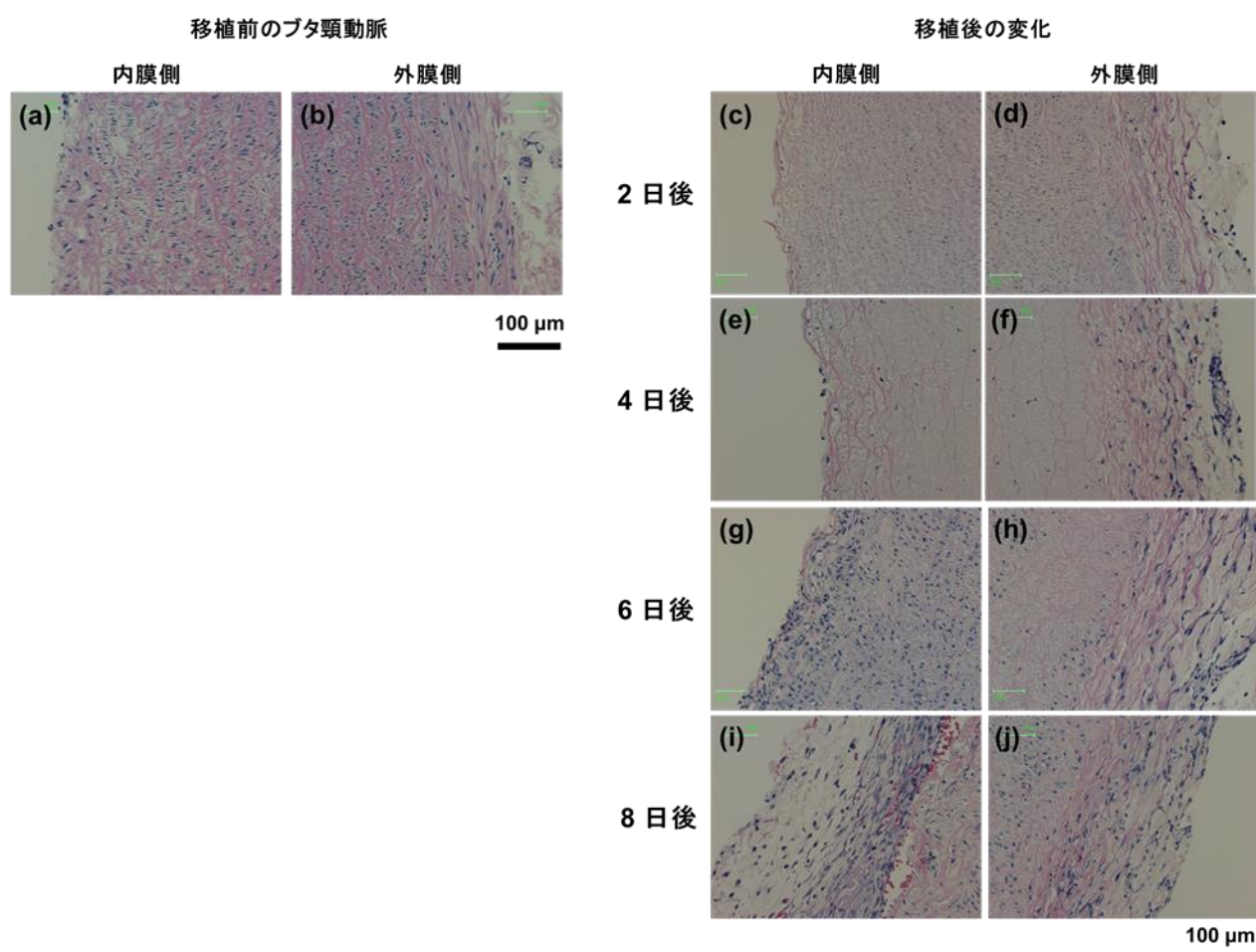


図 1-2 生体内の免疫反応による異種組織の脱細胞化と炎症性細胞の浸潤

移植前のブタ頸動脈にはドナー由来の細胞が確認できる(a, b)。移植後はレシピエント由来の炎症性細胞の浸潤が確認できる(c-j)。ドナー由来の細胞は、移植から4日後に除去されている(e, f)。

動物の生体には、その恒常性を維持するために複雑な免疫システムが備わっている。体内に侵入した非自己の微生物や細胞は、免疫システムによる攻撃を受け、排除される。異物を攻撃する分子は、異物認識機構を有し、自己、非自己を識別している。免疫システムに含まれる補体系は、このような異物認識機能を有している。補体系は、血液や組織中を循環する 20 種類以上のタンパク質から構成されており、体内に侵入した微生物を破壊、溶解する。補体とは、一群のタンパク質の総称であり、56°C、30 分の処理(非働化処理)で失活する易熱

性因子である。補体の英名は"Complement"であり、補体成分は、C1, C2, ..., C9 と命名されている。補体は、種特異的補体制御膜因子が存在する自己細胞に対しては反応が抑制されるが、同種の補体制御膜因子を持たない異種細胞に対しては連鎖反応を起こし、攻撃を仕掛ける。補体活性は、その最終段階である後期経路（溶解経路）において、膜侵襲複合体 (Membrane attack complex: MAC) を形成 (図 1-3) し、異種細胞を破壊、溶解する[20, 21]。ラット皮下移植でみられた細胞の除去 (図 1-2) は、このような補体系を含む免疫反応が機能した結果であると考えられる。

図 1-4 は、ラット皮下へブタ頸動脈を移植した際の代表的な組織内への炎症性細胞の遊走を示している。図 1-5 は、同じく、ラット皮下へ移植したブタ頸動脈の様子であるが、移植片の周囲は線維性組織で覆われ、血管新生がみられる。生体に拒絶された移植片は、このような変化がみられ、その後、徐々に分解され排除される。

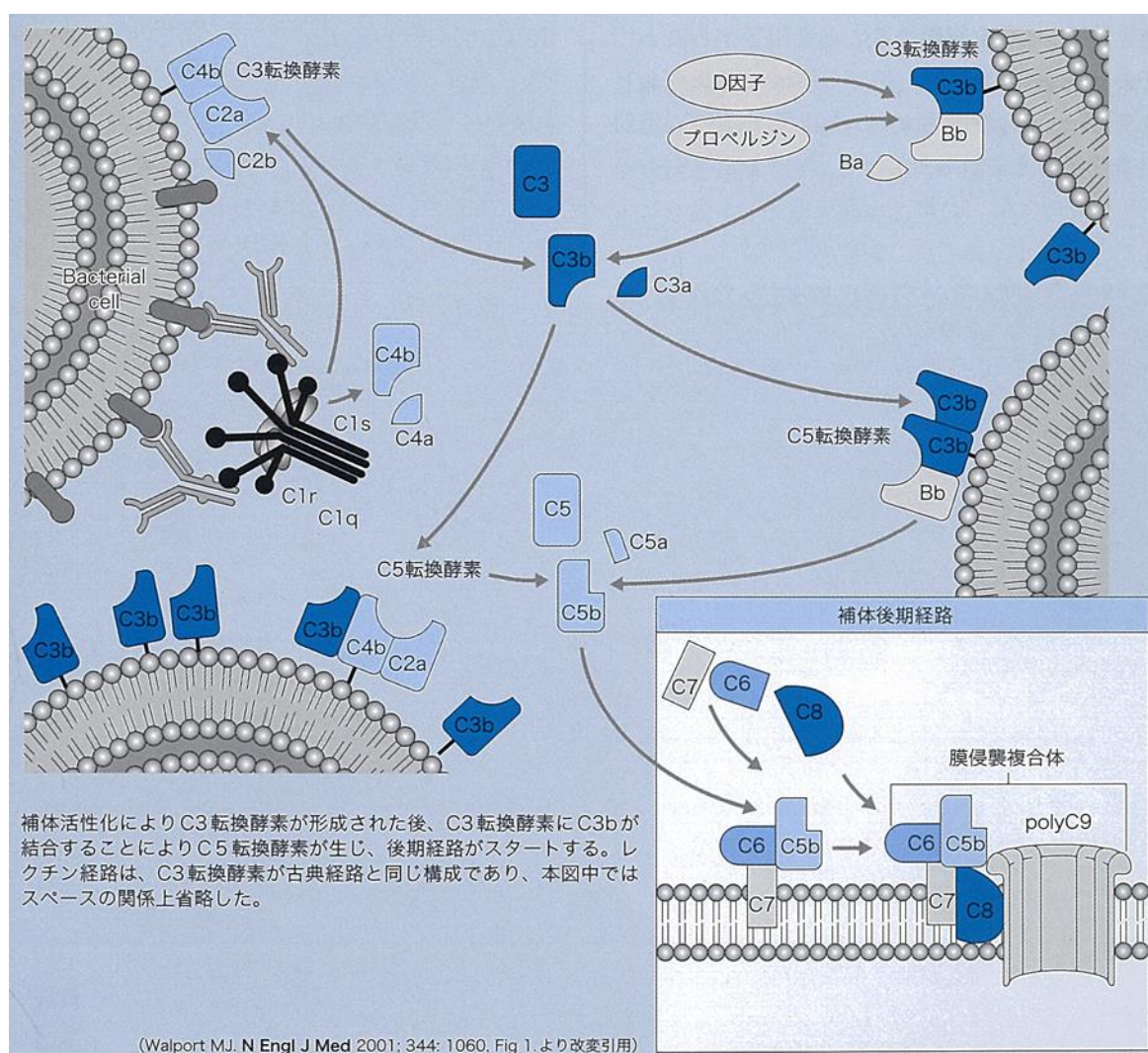


図 1-3 補体活性化と膜侵襲複合体の形成

(参考文献[21]より許可を得て転載)

図中に示された引用文献: Walport MJ. Complement. First of two parts. N Engl J Med. 344(14), pp. 1058-66. 2001.



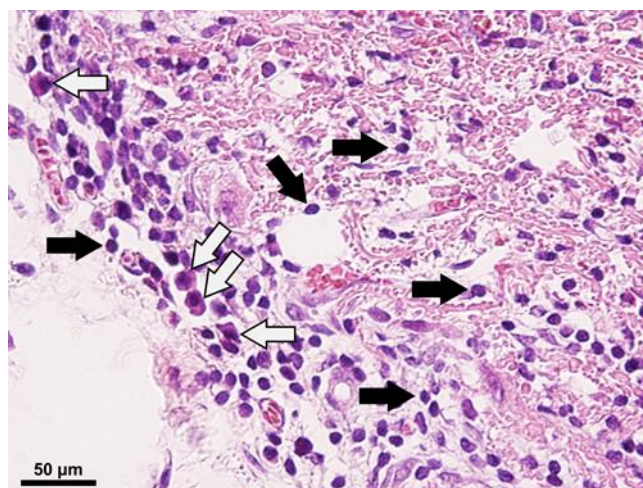


図 1-4 代表的な炎症性細胞の浸潤

T-cell (黒矢印) および B-cell (形質細胞) (白矢印)

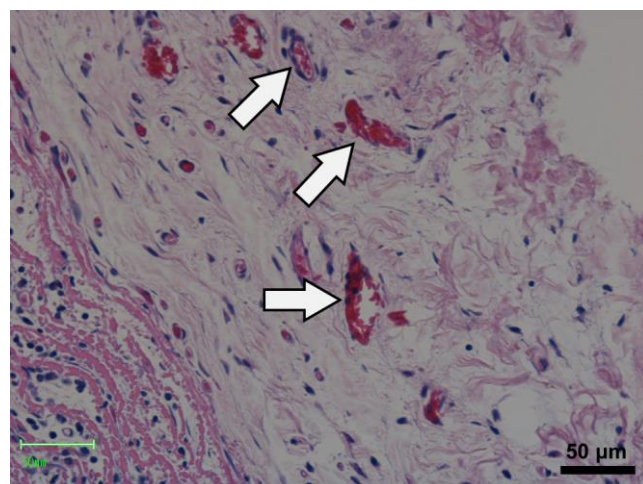


図 1-5 線維性被膜と血管新生

ブタ頸動脈をラット皮下に移植し、30 日後に形成された線維性被膜と血管新生 (白矢印)。

脱細胞化組織の作製において、界面活性剤や酵素などのレシピエントにとって非自己の成分を使用することは、少なからず移植後の副作用や、未知の感染が危惧される。そこで、著者は、レシピエントから採取した自己由来の成分で脱細胞組織を作製することが出来れば、生体適合性に優れた人工臓器を提供できるのではないかと考えた。本研究では、新たな脱細胞化組織作製のための一つの可能性として、レシピエントから採取した血清の脱細胞化能とその有効性を検証した。

血清中には、前述の補体系が存在する。補体系の反応は、異種組織の脱細胞化において有効に働くことが期待できる。更に、血清には、DNA の断片化に働く DNase が含まれており、細胞破壊後に残存する DNA の除去に効果的に働くことが期待できる。また、血清は組織への浸透性が高く、補体によって破壊された異種細胞残渣を効率よく除去できる可能性を有している。

### 3. 先行研究と本研究の位置付け

2009 年, 岸田らは, 動物由来の血清が, 脱細胞化処理液として有効であることを見出した(特開 2009-50297) [22]. この発明は, ブタ組織に, ウシ胎児血清(Fetal bovine serum:FBS)を含浸させることで, 5 日から 11 日間の処理でブタ組織から脱細胞成分を除去可能であることを示している. 発明者らは, 血清中に含まれるアルブミンやコラーゲンナトリウム, あるいは未知の成分の相乗作用によって, 脱細胞化能が得られたと推察している. さらに, 非働化した血清においても脱細胞化効果が得られたと報告している. 2010 年, 山岡らは, ラット腹腔内に, ラット血管を埋入させることで, 生体成分による脱細胞化組織の作製を試みている[23, 24]. 3 週間の腹腔内埋入によって, ラット大動脈から全ての細胞核が除去されたと報告している. 更に岸田らの検討と同様に, ラット大動脈を FBS に浸漬させることで, 90%以上の細胞除去率が得られたと報告している. ただし, 山岡らの実験では, 非働化した血清は, 異種組織に対する脱細胞化能は失われている. そして, 透析膜を用いた検証実験により, 分子量 5 万以上の血清成分が脱細胞化に関与していることを突き止め, 血清による脱細胞化において, 補体の関与を示唆した.

この 2 つの先行研究は, 非働化处理した血清の脱細胞化能に関しては, 相反する結果を得ているが, 生体成分を用いることで, 脱細胞化組織を作製することができることを示した, 優れた研究成果である. しかし, これら先行研究では, 血清の脱細胞化効果を報告するに止まり, 血清を用いて作製した脱細胞化組織の有効性については検討がなされていない.

本研究は, これら先行研究を参考に, ヒト血清による異種組織の脱細胞化处理条件を検討し, レシピエント血清で処理した脱細胞化組織の有効性を検証した.

### 4. 本研究の期待される成果

レシピエント血清で処理した脱細胞化組織は, 自己由来成分で処理するため, 移植後に細胞毒性を示さないと考えられる. そのため, 生体内での生着性が高く, 早期に自己細胞が浸潤し, 自己組織化することが期待できる. 本研究の成果は, 生体適合性に優れ, レシピエントと共に成長する人工臓器開発への応用が期待できる(図 1-6).

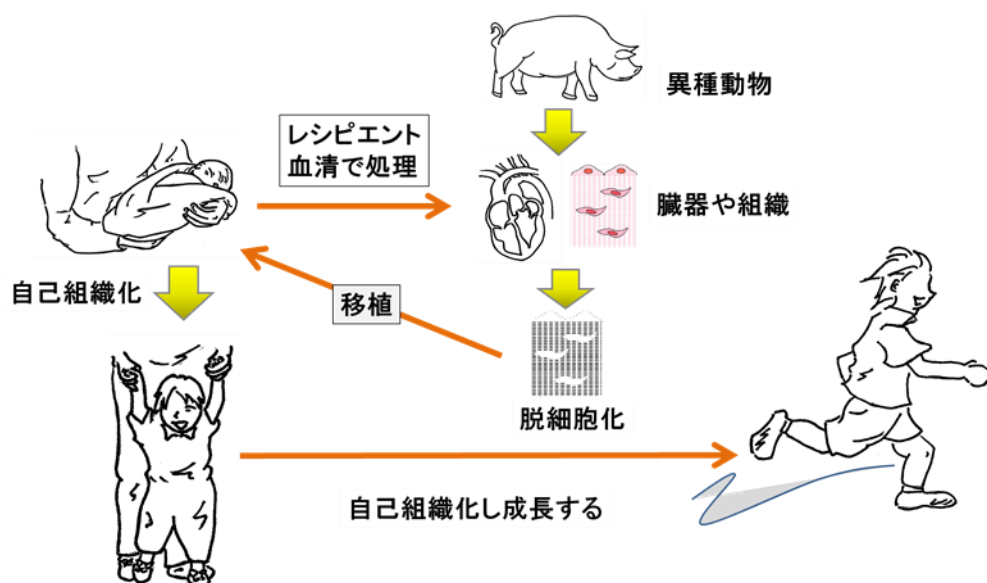


図 1-6 本研究の期待される成果

## 5. 人工臓器開発と生体適合性評価

図 1-7 は、人工臓器開発プロセスを示している。臨床現場からのニーズに答えるため、構想を練り、試行錯誤することで実用化へ向けた人工臓器が開発される。新しく開発された人工臓器は、ヒトへ移植することを想定する上で、その生体適合性を評価し、有効性と安全性を検証する特性試験を行わなければならない。安全性が保障されない人工臓器は、いくら優れた機能を有していたとしても、臨床応用には至らない。

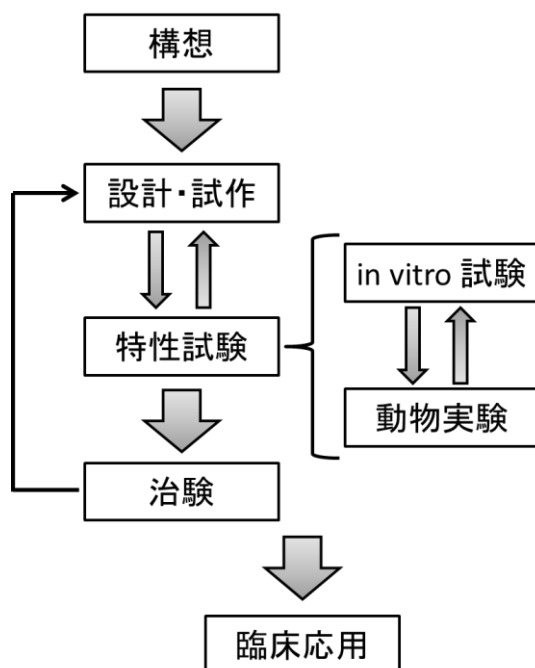


図 1-7 人工臓器開発プロセス

本研究の目的は、ヒト血清を用いた脱細胞化組織作製法の有効性を検証することである。この有効性を検証するためには、作製した脱細胞化組織の生体適合性を評価する必要がある。そして、生体適合性を評価するためには、その評価方法を検討しなければならない。一口に生体適合性と言っても、人工臓器の種類によって、要求される特性は異なる[5]。そこで、作製した脱細胞化組織は、循環器系の人工臓器への応用を想定し、生体適合性の評価を行った。

循環器系の人工臓器は、例えば、人工心臓、人工血管、人工弁などが臨床使用されている。これら循環器系で使用される人工臓器は、血液との接触により、常に血栓を形成する危険性がある。形成された血栓は、脳梗塞など重度の合併症を引き起こす危険因子となる。特に循環器系で使用される人工臓器には、優れた抗血栓性が求められる。新たに開発された人工臓器や、それに応用される生体材料の抗血栓性は、in vitro 試験および動物実験によって評価される(図 1-7)。抗血栓性評価のための in vitro 試験法としては、Lee-White 変法[25]や数値流体力学(Computational fluid dynamics:CFD)による解析法[26]が知られている。しかし、生体内における血栓は、Virchow's triad(血液成分、血流異常、血液接触表面の性状)の各要素が相互に作用して形成されるため[27, 28]、その発生機序は複雑であり、in vitro 試験のみで十分に抗血栓性を評価することは困難である。現状では、抗血栓性評価のための in vitro 標準試験法は確立されていない。そのため、開発者が独自に考案した方法を用いて、抗血栓性評価を行うこともある[29]。一方、動物実験においては、経時的な血栓形成を

実時間で観察することが困難である。そのため、抗血栓性評価は、*in vitro* 試験と動物実験を反復して行う必要があり、多くの実験動物に頼らざるを得ない。動物実験においては、1959 年、Russell と Burch によって、動物実験に関する「3R の原則」(3R: Replacement, Reduction, Refinement) が提唱され[30]、国際的な基本理念として普及、定着したことを背景に、実験動物使用数の削減に努めるとともに、有効な代替法の開発が求められている[31]。実験動物の削減に繋がる有効な *in vitro* 評価法の開発は、社会的責務であるといえる。そこで本研究では、人工臓器開発のための、新たな *in vitro* 抗血栓性評価法を開発し、本研究成果によって作製した脱細胞化組織の抗血栓性評価に応用した。

一方、脱細胞化組織を生体内に移植後、惹起される拒絶反応の機序は多岐にわたり、その全てを *in vitro* で評価することは困難である。人工臓器の生体適合性評価は、少なからず実験動物に頼らざるを得ない。本研究では、抗血栓性を *in vitro* 試験で評価し、移植後の炎症反応や石灰化などの拒絶反応を動物実験で評価した。

## 6. *In vitro* 抗血栓性評価法の開発

抗血栓性が要求される生体材料の多くは、合成高分子材料や生体由来材料が利用されている[32-36]。ここで、血液と接触するポリマー表面においては、吸着したタンパク質に血小板が粘着する[37, 38]。生体由来材料においては、露出したコラーゲンが血小板凝集を惹起する恐れがある。このように、血小板は、血栓形成に関与する重要な細胞の一つであり、血小板の粘着・凝集は、凝固カスケードの進行に寄与する[39, 40]。生体材料表面における血小板凝集を定量することができれば、抗血栓性評価のための一つの指標となる。

血小板は、凝集に伴い分泌顆粒内の機能分子を血中に放出し、血液凝固反応を加速させる機能が備わっている。分泌顆粒の一つである濃染顆粒は、ADP, ATP, セロトニン、ヒスタミン、カルシウムイオンなどを含んでおり、血小板の二次凝集時にこれらの機能分子を血中に放出する[41]。一方、ホタルの発光物質として知られる Luciferin-luciferase (L-L) は、ATP の存在下でピーク波長 560 nm 付近の発光を生じる。ATP 濃度と発光強度との関係は、両対数グラフにプロットすることで直線関係が得られることが知られている。つまり、発光強度から溶液中の ATP 濃度を知ることができる。L-L 発光試薬を投与した血中において、血小板の二次凝集が起こると、濃染顆粒から放出された ATP と発光試薬が反応し発光する。このときの発光強度は、血小板凝集の絶対量に応じて、経時的に変化する[42]。1977 年、Feinman らは、この L-L 反応を利用して、血小板から放出された ATP 濃度を測定する方法を報告した[43]。近年、この原理は、抗血小板薬の効果の検証[44, 45]や抗菌繊維評価試験などに利用されている[46]。

本研究では、血小板凝集に伴う発光を光電子増倍管 (photomultiplier tube: PMT) によって高感度に検出可能な実験装置を作製した。そして、ヒトの全血もしくは血小板濃度を調整した血漿を試験管内で凝固させることで、血液凝固と発光強度の関係を検証した。更に、*in vitro* 血液循環回路内で形成される血栓と発光強度の関係を検証することで、本評価系の有用性を検証した。そして、ヒト血清を用いて作製した、脱細胞化人工血管の抗血栓性評価を試した。*in vitro* 抗血栓性評価法の開発は、本論文第五章にまとめた。

尚、第五章の研究成果は、大阪工業大学の卒業生である、掛川竜馬氏の研究成果[47-49]を応用し、発展させた結果である。

## 研究倫理・生命倫理について

### 1. 人権の保護、法令の遵守および生命倫理に対する措置

著者は、本研究実施期間中、大阪工業大学および藍野大学に所属し、研究倫理・生命倫理に係る研究を藍野大学にて実施した。そのため、研究倫理審査および動物実験実施に関する審査は、藍野大学において申請した。

本研究は、研究者から採血してヒト血清を得るが、採血および採血後の血液の取り扱いに関しては、「藍野大学研究倫理委員会」の審査を受け、承認されている<sup>\*1</sup>。本倫理委員会は、「世界医師会ヘルシンキ宣言」に基づく倫理規定、研究等の対象となる者の人権の擁護並びに当該研究対象者等に対する肉体的、心理的及び社会的配慮の確保等のために必要な事項を定め、これに適合した研究活動であるかを審査される。

本研究における動物実験の実施は、「藍野大学動物実験委員会」の審査を受け、承認されている<sup>\*2</sup>。本委員会は、藍野大学において、動物実験を計画し、実施するにあたり、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に定めるもののほか、遵守すべき必要な事項を定め、科学的にはもとより動物福祉の観点からも適正な実験の実施を促すことを目的として、実験内容を審査される。また、動物の飼育、実験は、藍野大学が規定するガイドラインに従い、適正に行った。

\*<sup>1</sup> 倫理審査承認番号 : Aino2012-003, Aino2014-004

\*<sup>2</sup> 動物実験委員会承認番号 : 2012-2, 2013-4, 2014-10

### 2. 個人情報の取り扱いに対する処置

ヒト血液を採取し、実験に使用する場合、採取した血液は、実験に使用したのちに、速やかに感染性廃棄物として廃棄した。血液から何らかの個人情報を得ることは一切行っていない。また、研究者以外のヒトからの血液提供は受けていない。

### 3. 共同研究先の外部機関における実験、研究に対する処置

採血および血液の取り扱い、および動物実験を行う施設は、藍野大学に限定し、大阪工業大学を含め、倫理審査を受けた藍野大学以外の機関では一切行っていない。

## 第二章

### 血清を用いた異種組織の脱細胞化



### 1. 序 論

本章では、前述の岸田ら、および山岡らの先行研究を参考に、血清の脱細胞化能を検証した。血清は、FBS および成人から採取したヒト血清 (Adult human serum, 以下 AHS と略す) を用いた。

1954 年、火元らは、血清を凍結溶解することによる、血清中のタンパク質、電解質、および抗体価の濃縮効果について報告している[50]。同様に、血清中の脱細胞化のための有効成分が濃縮されるならば、濃縮血清を用いることで、脱細胞効率の向上を図ることができると考えられる。ここで、火元らは、血清を静置下で凍結融解することで濃縮している。本研究では、種々液状食品の濃縮法[51-53]を参考に、血清を簡便かつ清潔に濃縮できる方法を考案した。そして、濃縮血清の脱細胞能を検証した。

山岡らの先行研究では、血清による脱細胞化において、補体の関与を示唆している。そこで、補体系の活性化を促すことで、血清の脱細胞化能の向上を図った。補体系はアシデミアの環境下で活性化することが知られている[54, 55]。細胞培養用の CO<sub>2</sub> インキュベータを用いて、CO<sub>2</sub> 雰囲気中で血清 pH を調整した。pH を 7.4 以下に低下させ、補体活性と脱細胞化能の関係を検証した。

血漿中には、DNA の断片化に働く DNase が存在する。DNase は、Mg<sup>2+</sup> 存在下で活性化することが知られている[56]。そこで、血清に塩化マグネシウムを付加することで、血清 Mg<sup>2+</sup> 濃度を調整し、DNA 除去効率の向上を図った。

本章において、脱細胞化能は、多くの先行研究[14-16]と同様に、組織の H&E 染色および残存 DNA 定量によって評価した。脱細胞化組織は、その処理過程において、残存細胞の減少と共に細胞核が除去される。細胞核を染色する H&E 染色や単位組織重量当たりに残存する DNA 含量を定量することで、脱細胞化の進行を評価することができる。

## 2. 供試材料と実験方法

### 2.1 血清の提供

本研究では、以下の FBS および AHS を実験に使用した(図 2-1)。

#### (a) FBS

- ① biowest(BWT), Code S1820-100, Lot No. S08048S1820
- ② 株式会社ジャパン・バイオシーラム, Cat No. S1560-20, Lot No. JBS-011115

#### (b) AHS は、研究者から採取した(2.2 参照)。

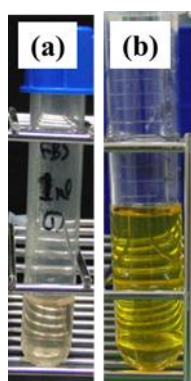


図 2-1 各種血清

(a) ウシ胎児血清(FBS)

(b) ヒト成人血清(AHS)

### 2.2 AHS の抽出法

研究者から採血した新鮮血(全血)を凝固因子除去のため凝固させ、遠心分離して血清を抽出した。その後、使用まで $-25^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。使用時は室温下にて解凍した。

採血針は21G翼状針(04-322-2, ニプロ)を使用した。採血管は、血清分離剤入採血管(VP-AS109K, テルモ)を使用した。採血管に新鮮血を注入し、5回の転倒混和後30分間静置し、凝固を促進した。遠心分離機は、株式会社トミー精工製のLC-121{スイングロータ(7115-08)}を用い、3000 rpm( $1270\times g$ ), 10分の条件で遠心分離した(図 2-2)。

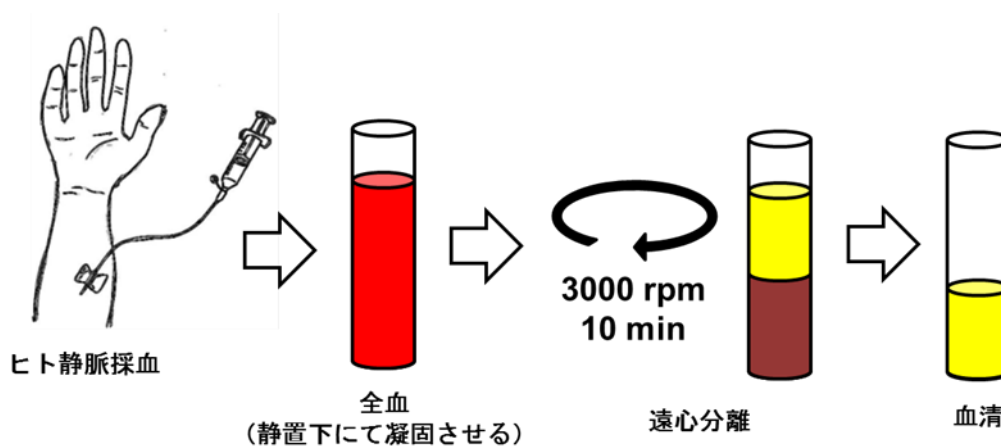


図 2-2 ヒト血清の抽出工程

### 2.3 異種組織の提供

異種組織は、ブタ頸動脈を使用した。ブタ組織は、既に人工弁置換術用の生体弁の材料に使用されるなど、臨床使用されており、適当な組織といえる。本実験では、食用ブタ(生後6月、体重約100 kg)から摘出された頸動脈を東京芝浦臓器株式会社から購入した(図 2-3a)。購入したブタ頸動脈は、生理食塩水で洗浄し、余分な組織を除去した後に適当な長さに切断した。その後、ポリエチレン製パック(E4, セイニチ)に入れ(図 2-3b)、使用まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。実験に使用する際は、生理食塩水中で解凍し、5 mmの長さに切断した(図 2-3c)。

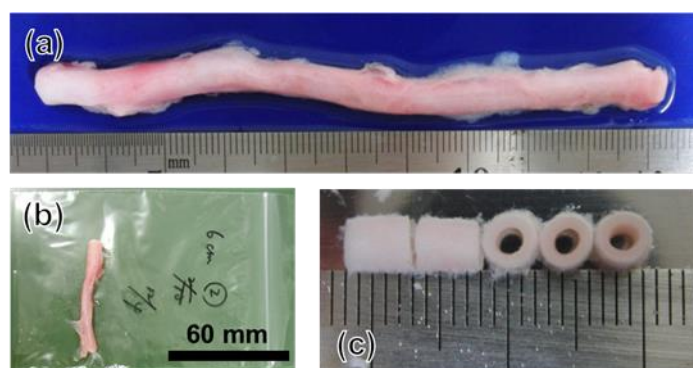


図 2-3 ブタ頸動脈

- (a) 購入したブタ頸動脈 (b) 60 mm 程度に切断し凍結保存した。  
(c) 解凍後 5 mm に切断し実験に使用した。

### 2.4 血清を用いた脱細胞化処理法

血清による脱細胞化処理時間(浸漬時間)は、岸田らの報告を参考に、5日および11日間とした。5日間の処理においては、洗浄1日および3日経過後に新たに解凍した血清に交換した。11日間の処理においては、洗浄1日、3、5、7日および9日経過後に新たに解凍した血清に交換した。

$-80^{\circ}\text{C}$ 下にて凍結保存されたブタ頸動脈は、生理食塩水中、室温下にて解凍した。解凍後、5 mm(厚さ約1 mm)に切断した。次に、1%抗生剤(A5955-20, Sigma)を含む生理食塩水中、室温下にて1時間以上、振盪洗浄した。一方、凍結保存した血清は、室温下で自然解凍し、解凍後に、よく混和した。試験管(14 mL ポリプロピレン製ラウンドチューブ)に5 mLの血清を入れ、一片のブタ頸動脈を浸漬した(図 2-4)。血清中には抗生剤を1%の濃度で添加した。その後、 $37^{\circ}\text{C}$ 下にて静置した。

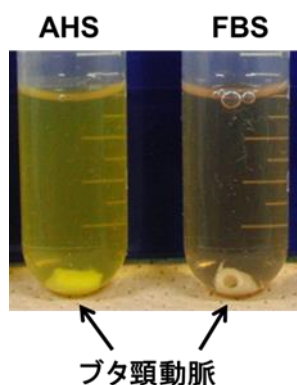


図 2-4 血清によるブタ頸動脈の脱細胞化処理

## 2.5 脱細胞効率の評価法

脱細胞化効率は、多くの研究で、H&E 染色および組織に残存する DNA 量を定量することによって評価される。本研究においても同様の方法で脱細胞化効率を評価した。H&E 染色は、細胞核を染色することで脱細胞化後の組織に残存する細胞数を観察することができる。また、組織に含まれる DNA 量は、細胞数と相関することが知られている。脱細胞化後の組織に残存する DNA を定量することで、残存細胞数を評価することができる。

本研究の H&E 染色および残存 DNA 定量の方法を以下に示す。

### (1) H&E 染色

サンプルは、室温下にて 10% 中性緩衝ホルマリン (062-01661, 和光純薬) に浸漬・振盪し、24 時間固定した。固定完了後、PBS (D8537, Sigma) に浸漬・振盪し、ホルマリンを洗い流した。続いて、エタノールで脱水し、キシレンで置換した後にパラフィン包埋した。包埋したサンプルは血管の長軸方向に厚さ 4  $\mu\text{m}$  で薄切し、H&E 染色を行った。染色した切片を光学顕微鏡にて観察した。詳細な手順を付録 1 に示す。

尚、本論文に掲載した H&E 染色像の一部は、染色結果を明解にするため、画像処理ソフト Image J (NIH) にて、明暗を調整した。

### (2) DNA 定量

DNA 抽出のためのサンプルは、ウェット重量で、10~20 mg に切り揃えた。サンプルは、凍結乾燥した後に DNA を抽出した。DNA の抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat. No. 69504, Qiagen) を用いて行った。このキットの DNA 抽出法は、シリカメンブレンによる DNA 吸着を利用したスピнкаラム法である (図 2-5)。DNA 抽出液の吸光度を分光光度計 (Ultrospec3300pro, GE Healthcare) にて測定した。得られた吸光度波形は、データ解析ソフト (Origin9.1, Origin Lab) を用いて DNA の吸収極大波長である 260 nm のピーク値を補正し、この値から DNA 濃度を求めた。詳細な手順を付録 2 に示す。

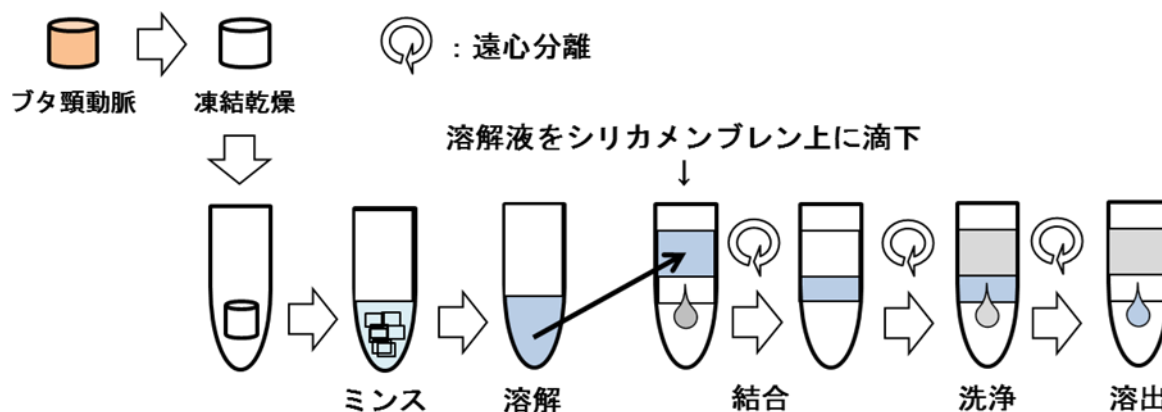


図 2-5 スピнкаラムを用いた DNA 抽出

## 2.6 血清の濃縮法

### (1) 静置濃縮法

1954 年、火元らは、試験管に入れた血清を静置下にて解凍することで、初期に解けだした濃縮血清が試験管下部に溜まり、濃縮血清を得ることを報告した。この報告によると、凍結融解を繰り返すことで、血清の比重が上昇し、電解質、タンパク質および抗体価が濃縮される。一度の凍結融解によって、タンパク質濃度は 2 倍、抗

体価は4倍になったと報告している。本項では、血清を濃縮することによって、補体価やDNaseなどの脱細胞化に寄与すると考えられる有効成分の濃縮を期待し、火元らの実験方法を参考にて得た濃縮血清を用いて、脱細胞効率の向上を図った。

試験管(5 mL ポリプロピレン製ラウンドチューブ)に血清を分注し、 $-25^{\circ}\text{C}$  下にて一晩以上凍結した。凍結した血清は、実験に使用する直前に、室温、静置下にて解凍した。解凍時に、濃縮された成分は試験管の下部に沈降する。下部 2.5 mL を濃縮血清、上部 2.5 mL を希釈血清とした。本手法は、以下、静置濃縮法と呼ぶ(図 2-6a)。

## (2) 凍結遠心濃縮法

液状食品の濃縮法を参考に、(1) 静置濃縮法よりも高濃度の血清を得る方法を検討した。試験管(15 mL ポリプロピレン製コニカルチューブ)に血清を分注し、 $-25^{\circ}\text{C}$  下にて一晩以上凍結した。凍結した血清は、実験に使用する直前に、室温下にて 500 rpm, 60 分の条件で遠心分離しながら解凍した。(1)と同様に、濃縮された成分は試験管の下部に沈降する。下部 2.5 mL を濃縮血清とした。本手法は、以下、遠心凍結濃縮法と呼ぶ(図 2-6b)。本手法の詳細を付録 3 に示す。

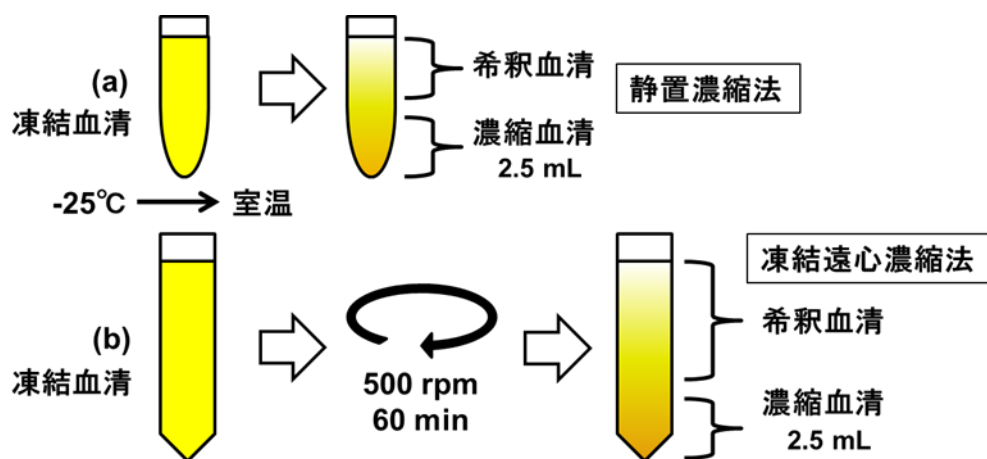


図 2-6 血清の濃縮法

(a) 静置濃縮法, (b) 凍結遠心濃縮法

## 2.7 血清濃縮効果の評価法

静置濃縮法で濃縮した血清の濃縮効果は、血清の比重、タンパク質濃度および補体価( $\text{CH}_{50}$ )によって評価した。ここで、 $\text{CH}_{50}$  は、補体活性化経路の 1 つである、古典経路の総合的な活性を示す指標である。凍結遠心濃縮法で濃縮した血清の濃縮効果は、タンパク質濃度、補体価( $\text{CH}_{50}$ )に加えて、電解質濃度を測定することで評価した。各項目の測定方法を以下に示す。

### (1) 比重測定

試験管の高さ方向の位置に対する比重の差から、血清の濃縮効率を評価した。比重は電子天秤によって測定した。日本人の血清の比重は、1.025~1.030 程度であるが、濃縮された血清は、濃縮度に比例して比重が大きくなる。濃縮血清の比重を測定することで、濃縮効率を定量することができる。

## (2) 血清タンパク質定量

280 nm の吸光度に基づいて、血清に含まれるタンパク質の濃度を定量した。吸光度は、10 mm 光路長の石英セルを用いて、分光光度計 (Ultrospec3300pro, GE Healthcare) によって測定した。吸光度 1 のときのタンパク質濃度を 1 mg/mL として換算した。

## (3) 補体価 (CH<sub>50</sub>) の測定

血清補体価は、CH<sub>50</sub> を測定し、定量した。血清を加えた緩衝液中に、感作ヒツジ赤血球を加え、37°C 下にて 60 分間振盪すると、血清中に含まれる補体成分の働きによって、赤血球が溶血する。氷浴槽に試験管を沈め、補体活性を抑制した後、サンプル溶液を 2000 rpm、10 分の条件で遠心分離すると、溶血を免れた赤血球が沈降する。ここで上澄み液の波長 541 nm (ヘモグロビンの吸収極大波長) における吸光度を測定し、補体価換算表と照らし合わせることで血清中の補体価を定量することができる (図 2-7)。

CH<sub>50</sub> は、ワンポイント CH50「生研」(400024, デンカ生研) を用いたワンポイント法によって測定した。測定手順は、添付文書に従った。詳細な手順を付録 4 に示す。

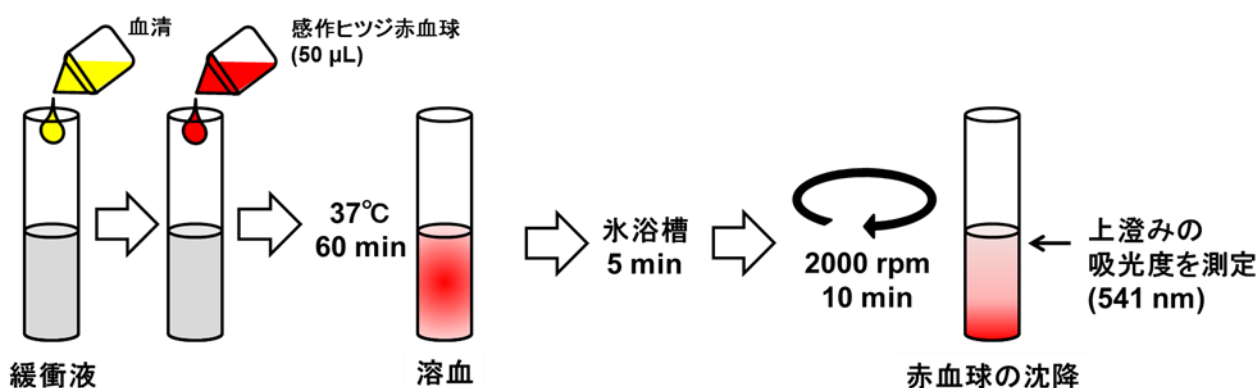


図 2-7 補体価 (CH<sub>50</sub>) の測定

## (4) 血液ガス分析

各電解質は、血液ガス分析装置 (GEM プレミア 3500, Instrumentation Laboratory) を用いて測定した。濃縮効果の評価は、ナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>)、カリウムイオン (K<sup>+</sup>)、カルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>)、およびグルコース (Glu) の値を用いた。各測定値が、分析装置の上限値を超える場合は、その血清サンプルを蒸留水で希釈後に測定し、得られた値に希釈倍率を掛けて濃度を算出した。

## 2.8 濃縮血清の脱細胞化能

2.6 (1) もしくは 2.6 (2) の方法で濃縮した血清 5 mL を使用し、2.4 の処理法と同様に、ブタ頸動脈を脱細胞化処理することで、濃縮血清の脱細胞化能を検証した。

## 2.9 浸透圧の影響

濃縮血清は、脱細胞化に働く有効成分が濃縮されることで、脱細胞化能の向上が期待できる。しかし、濃縮血清は、血清に含まれるタンパク質や電解質なども一様に濃縮されるため、血清浸透圧が同時に上昇する。2010 年、榊原らは、高張電解質溶液が脱細胞化組織作製に有効であることを明らかにしている (特開 2010-221012) [57]。つまり、濃縮血清の脱細胞化能は、血清浸透圧上昇による影響を考慮しなければならない。



凍結遠心濃縮した血清に、濃度を調整した塩化ナトリウム(191-01665, 和光純薬)水溶液を加えることで、1.5倍および6.0倍の浸透圧に調整した血清を作製した。この高張血清は、 $\text{Na}^+$ および $\text{Cl}^-$ を除く成分の濃度が通常血清と等しくなる。ここで、血清浸透圧値は、式 2-1 を用いて、近似値を算出した。

通常血清、1.5 倍および 6.0 倍に浸透圧を調整した高張血清を用いて、2.4 の処理法と同様に、ブタ頸動脈の脱細胞化処理を行った。5 日間、37°C の条件で処理を行った。

$$\text{血清浸透圧 } \Pi \approx 2 (\text{Na}^+ + \text{K}^+) + \frac{\text{Glu}^{*1}}{18} + \frac{\text{BUN}^{*2}}{2.8} \quad (2-1)$$

\*<sup>1</sup>Glu : Glucose (血糖値)

\*<sup>2</sup>BUN : blood urea nitrogen (血中尿素窒素)

## 2.10 脱細胞化処理条件の最適化

濃縮血清を用いた脱細胞化処理は、脱細胞化に寄与する有効成分が濃縮されることで、脱細胞効率の向上が期待できる。しかし、レシピエント血清を脱細胞化に使用することを想定すると、最小限の血清量で脱細胞化組織を得るために、処理条件の最適化を図ることは重要である。本項では、有効成分の一つと考えられる、補体や DNase の活性化を促すことで、脱細胞化能の向上を図った。補体系は、アシデミアの環境下で活性化することが知られている\*<sup>1</sup>。そこで、CO<sub>2</sub> インキュベータ{APC-30D, ASTEC(最大 CO<sub>2</sub> 濃度 19.9% ≈ 20%)}を用いて血清 pH を低下させ、補体活性を高めた。また、血漿中には、DNA の断片化に働く DNase が存在する。DNase は、Mg<sup>2+</sup>の存在下で活性化することが知られている。そこで、血清に塩化マグネシウムを付加することで、DNA 除去効率の向上を図った。

凍結保存されたブタ頸動脈を生理食塩水中で解凍し、5 mm×5 mm(厚さは約 1 mm)に切断した(図 2-8a)。そして、室温下にて、1% 抗生剤を含む生理食塩水中で 1 時間、振盪洗浄した。凍結保存した血清は、室温下で自然解凍し、解凍後に、よく混和した。その後、塩化マグネシウム(133-15051, 和光純薬)を加え Mg<sup>2+</sup>濃度を調製した血清 1 mL もしくは 2 mL を試験管(14 mL ポリプロピレン製ラウンドチューブ)に分注した。血清中には抗生剤を 1% の濃度で添加した。この血清中に、上記ブタ頸動脈を浸漬した。続いて、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に、試験管を静置し、血清 pH を調整した。インキュベータの設定温度は 37°C とした。マグネシウム濃度は、無付加\*<sup>2</sup>, 5, 10, 15, 20 mM に調製した。CO<sub>2</sub> 濃度は、大気濃度\*<sup>3</sup>, 5, 10, 15, 20% に設定した(図 2-8b)。処理日数は、1, 2, 3, 4 日および 5 日間とした。尚、処理中の血清交換は行っていない。処理後のサンプルの残存 DNA を 2.5(2)の方法で定量した。

ここで、試験管に入った血清を大気中に静置すると、血清中の CO<sub>2</sub> が放出され pH は 8.0 程度まで上昇する。CO<sub>2</sub> 雰囲気下で静置すると、pH は低下し、Henderson-Hasselbalch の式(式 2-2)より、5% CO<sub>2</sub> では pH ≈ 7.4, 20% CO<sub>2</sub> では pH ≈ 6.8 となる。CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置した血清の pH を pH メータ(MP 225, Mettler)で測定したところ、式 2-2 で算出した値と概ね一致した。

\*<sup>1</sup> ワンポイント CH<sub>50</sub>「生研」を用いて、pH が補体活性に与える影響についての予備実験を行った。実験内容および結果を付録 5 に示す。

\*<sup>2</sup> 通常血中のイオン化マグネシウム(Mg<sup>2+</sup>)の基準値 : 0.53~0.67 mM

\*<sup>3</sup> 乾燥大気中の二酸化炭素濃度 : 0.03~0.04%

$$\text{pH} = 6.1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{0.03 \times \text{PaCO}_2} \quad (2-2)$$

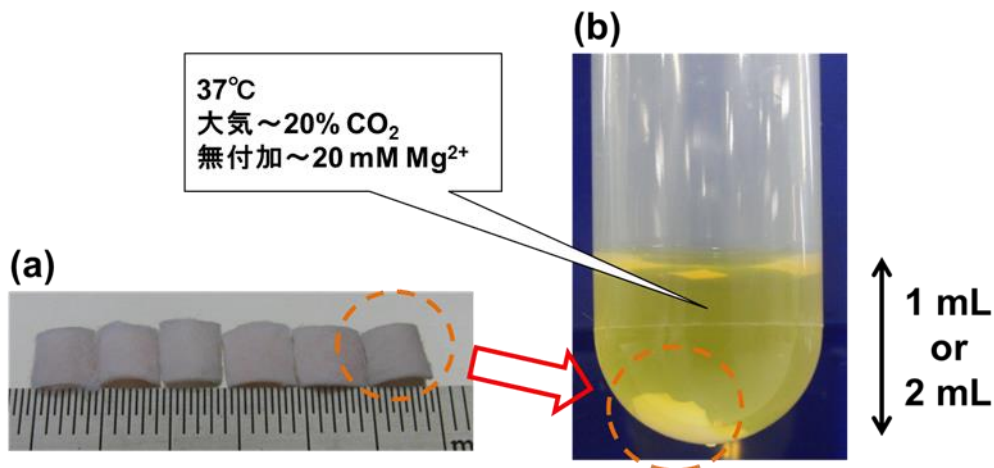


図 2-8 脱細胞化処理条件の最適化

5×5 mm に切断したブタ頸動脈 (a) を 1 mL もしくは 2 mL のマグネシウム濃度を調整した血清に浸漬し、CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37°C の条件で静置処理した (b)。

### 2.11 非働化血清の脱細胞化能

岸田ら、山岡らの 2 つの先行研究では、非働化血清の脱細胞化に関して、相反する結果を得ている。そこで、本実験系における、非働化血清の脱細胞化能を検証した。56°C、30 分の条件で、AHS を非働化処理した。20% CO<sub>2</sub> および 20 mM Mg<sup>2+</sup> を付加した非働化血清に、ブタ頸動脈を 5 日間、静置下にて浸漬処理した。また、非働化血清の補体価 (CH<sub>50</sub>) を 2.7 (3) の方法で測定した。

### 2.12 統計解析

2.10 の DNA 定量結果は、平均値±標準偏差を示した。サンプル間の有意差は、Welch's t-test により、危険率 5% 未満を有意差有として検定した (n = 5)。統計解析には、Microsoft Excel 2010 を使用した。



### 3. 実験結果と考察

#### 3.1 FBS および AHS の脱細胞化能

岸田らの先行研究では、異種組織を FBS に浸漬させると、5 日から 11 日間で脱細胞効果が得られたと報告している。しかし、FBS による 5 日および 11 日間の処理では、脱細胞化効果は乏しかった。H&E 染色所見において、FBS 処理後は、未処理組織と比較して、細胞核の減少はみられる（ヘマトキシリンによる核の染色性が希薄になっている）が、多くの細胞は残存しているようにみえた（図 2-9 c-f）。AHS による 5 日間の処理後は、内膜側において、わずかに脱細胞化されているようにみえるが（図 2-9 g, h）、やはり多くの細胞核が染色された。FBS の結果を加味すれば、AHS による洗浄時間を延長したとしても、脱細胞化は見込めない結果であった。

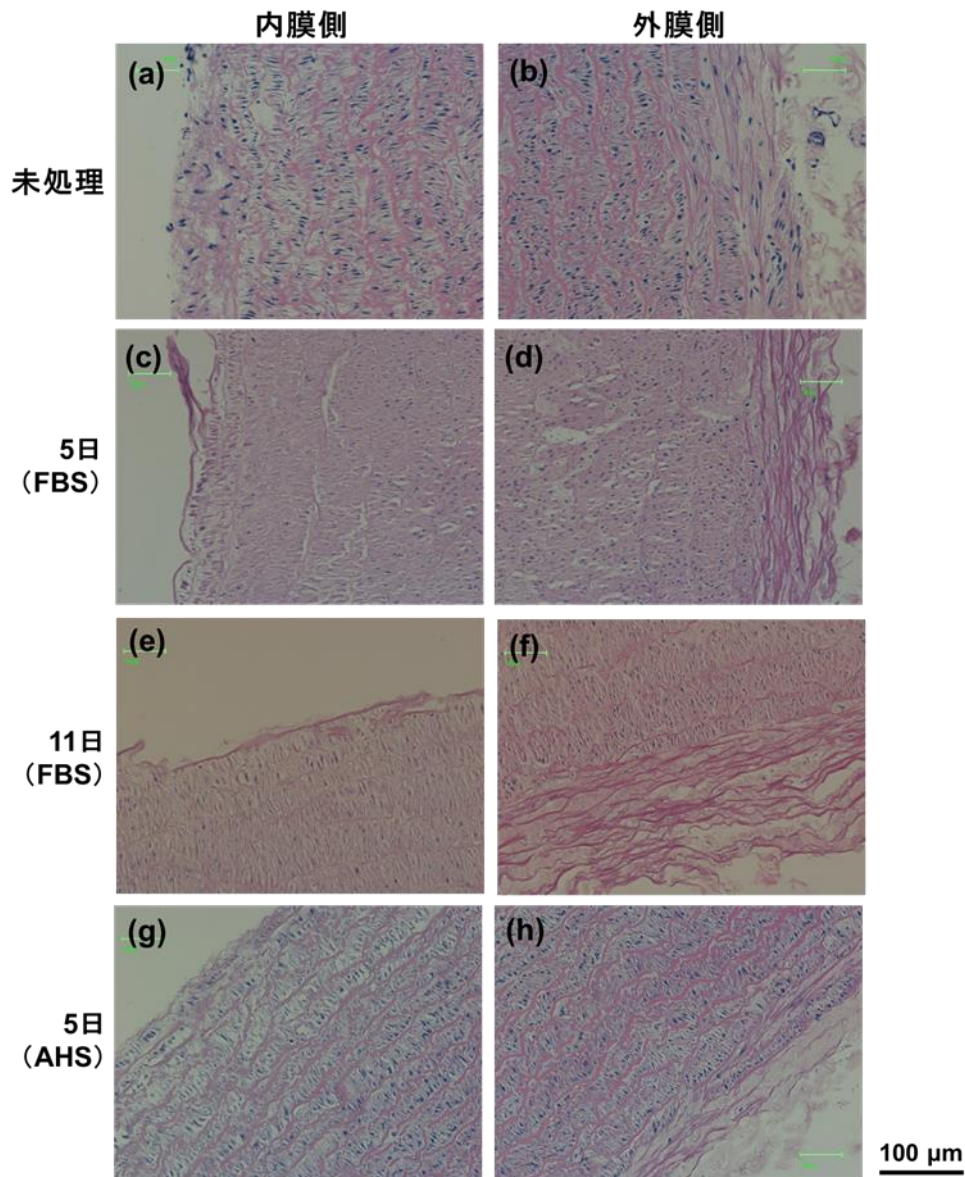


図 2-9 FBS および AHS の脱細胞化能

各血清処理後のブタ頸動脈内膜側および外膜側の H&E 染色像を示す。全てのサンプルで細胞核は残存している。

(a, b) 未処理のブタ頸動脈 (c, d) FBS で 5 日間処理 (e, f) FBS で 11 日間処理  
(g, h) AHS で 5 日間処理

### 3.2 濃縮血清の脱細胞化能

#### (1) 静置濃縮血清の脱細胞化能

火元らの報告を参考に静置濃縮した血清を図 2-10 に示す。試験管下部(濃縮部)の血清は、上部(希釈部)の血清と比較し、比重やタンパク質濃度が高く、濃縮されていた(図 2-11a, b)。通常血清の補体価は、凍結前で 49.0  $\text{CH}_{50}/\text{mL}$  であった。1 回の凍結融解後の補体価は、凍結前と変わらず 49.0  $\text{CH}_{50}/\text{mL}$  であり、濃縮効果は得られなかった。2 回の凍結融解によって、50.8  $\text{CH}_{50}/\text{mL}$  とわずかに上昇したが、その後は凍結融解を繰り返す毎に補体価は低下する傾向にあった。繰り返し凍結融解することのストレスによって、補体が失活してしまった可能性がある(図 2-11c)。ここで、血清補体価  $\text{CH}_{50}$  の参考正常値は、25~45  $\text{CH}_{50}/\text{mL}$  である。

得られた濃縮血清を用いて、5 日および 7 日間の脱細胞化处理を行った結果、H&E 染色の所見では、内膜側に残存する細胞核は僅かであった。外膜側においても細胞核の染色性は希薄であった。濃縮血清は、通常濃度の血清と比較して、脱細胞化能が向上しているようにみえた。5 日間と 7 日間の処理日数の違いでは脱細胞化能に違いはみられなかった(図 2-12)。静置濃縮法では、補体の濃縮効果は得られなかったが、その他の有効成分の濃縮によって、脱細胞化能が向上したものと考えられる。

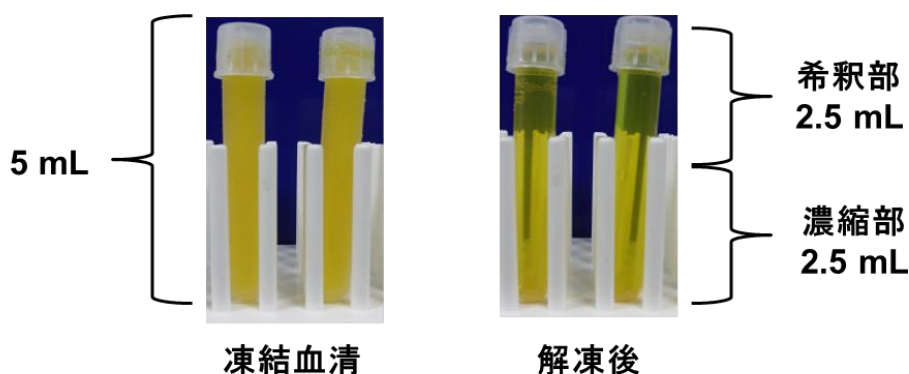


図 2-10 静置濃縮血清

#### (2) 凍結遠心濃縮血清の脱細胞化能

凍結遠心濃縮法によって濃縮した血清を図 2-13a に示す。試験管下部(濃縮部)の血清は、上部(希釈部)の血清と比較し、目視で濃縮されていることがわかる。タンパク質濃度は、静置濃縮法の約 2 倍の濃縮効果が得られた。補体価および各種電解質濃度、グルコース濃度についても、一様に濃縮されていた(図 2-13b, c)。

得られた濃縮血清を用いて、7 日間の脱細胞化处理を行った結果、H&E 染色の所見では、内膜側および外膜側において、わずかに細胞核の残存を認めた。静置濃縮血清と比較して、脱細胞効率が向上しているようにみえた(図 2-14)。残存 DNA 定量の結果、未処理組織 1 mg に含まれる DNA 量を 100%とすると、静置濃縮血清処理後は 71%、凍結遠心濃縮血清処理後は 34%まで、DNA が除去されていた。血清成分の濃縮は、脱細胞化能を向上させることが確認できた(図 2-15)。凍結遠心濃縮法は、静置濃縮法と比較して、補体価を高めることができ、この高まった補体価が細胞除去に有効に働いたと考えることができる。あるいは、岸田らが脱細胞化に寄与する有効成分として推察している、アルブミンなどの濃縮によって、脱細胞化能が向上したと考えることができる。

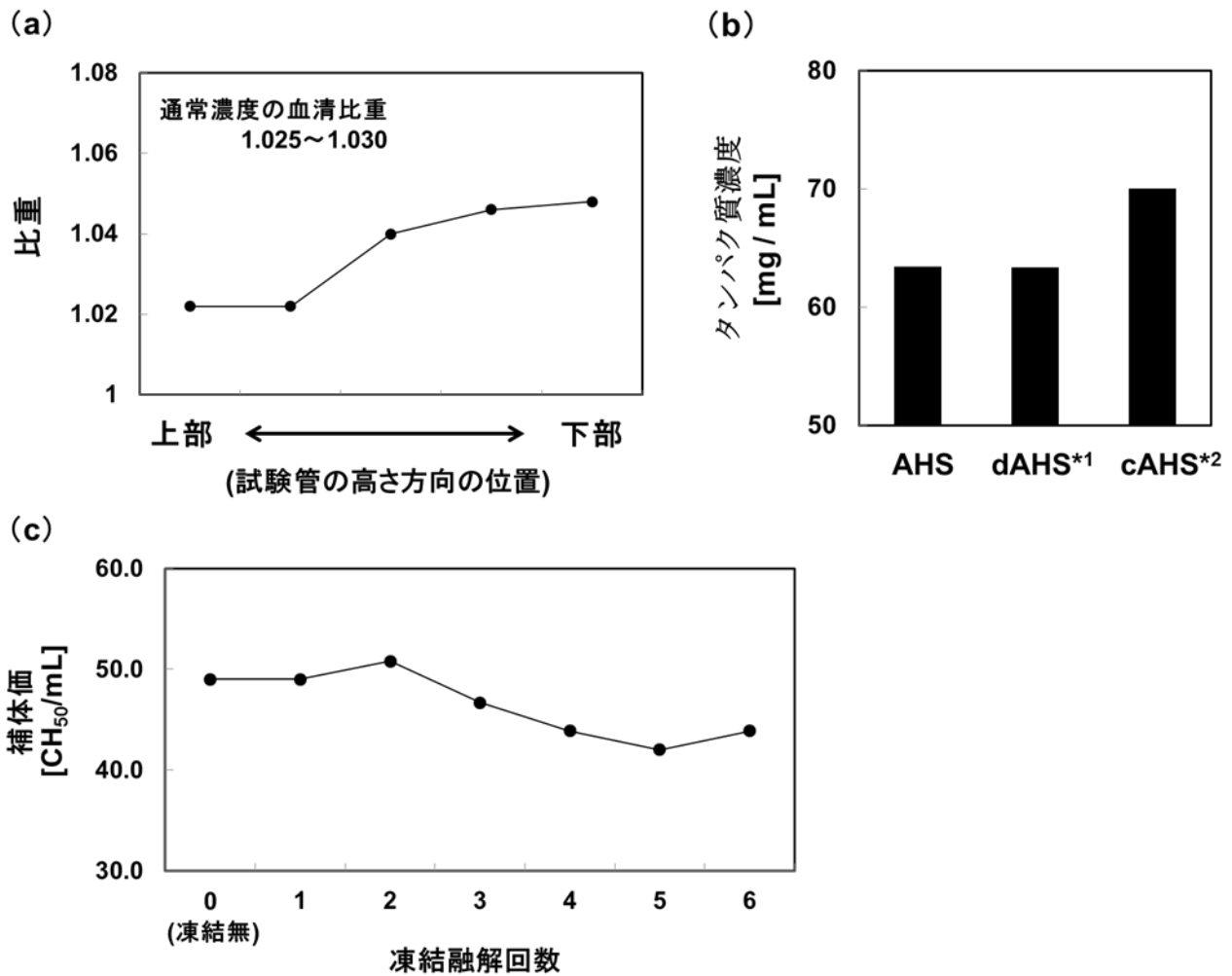


図 2-11 静置濃縮法の血清濃縮効果

(a) 試験管の位置に対する血清比重 (b) タンパク質の濃縮 (c) 繰り返し凍結融解後の補体価変化

\*<sup>1</sup> dAHS: 希釈したヒト成人血清 \*<sup>2</sup> cAHS: 濃縮したヒト成人血清

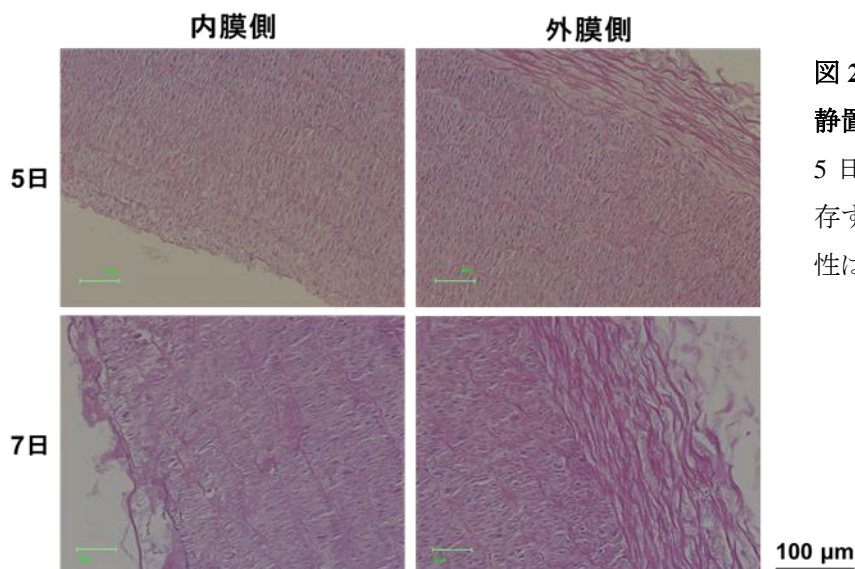


図 2-12

静置濃縮血清の脱細胞化能

5 日および 7 日間の処理後, 残存する細胞核を認めるが, 染色性は希薄である.

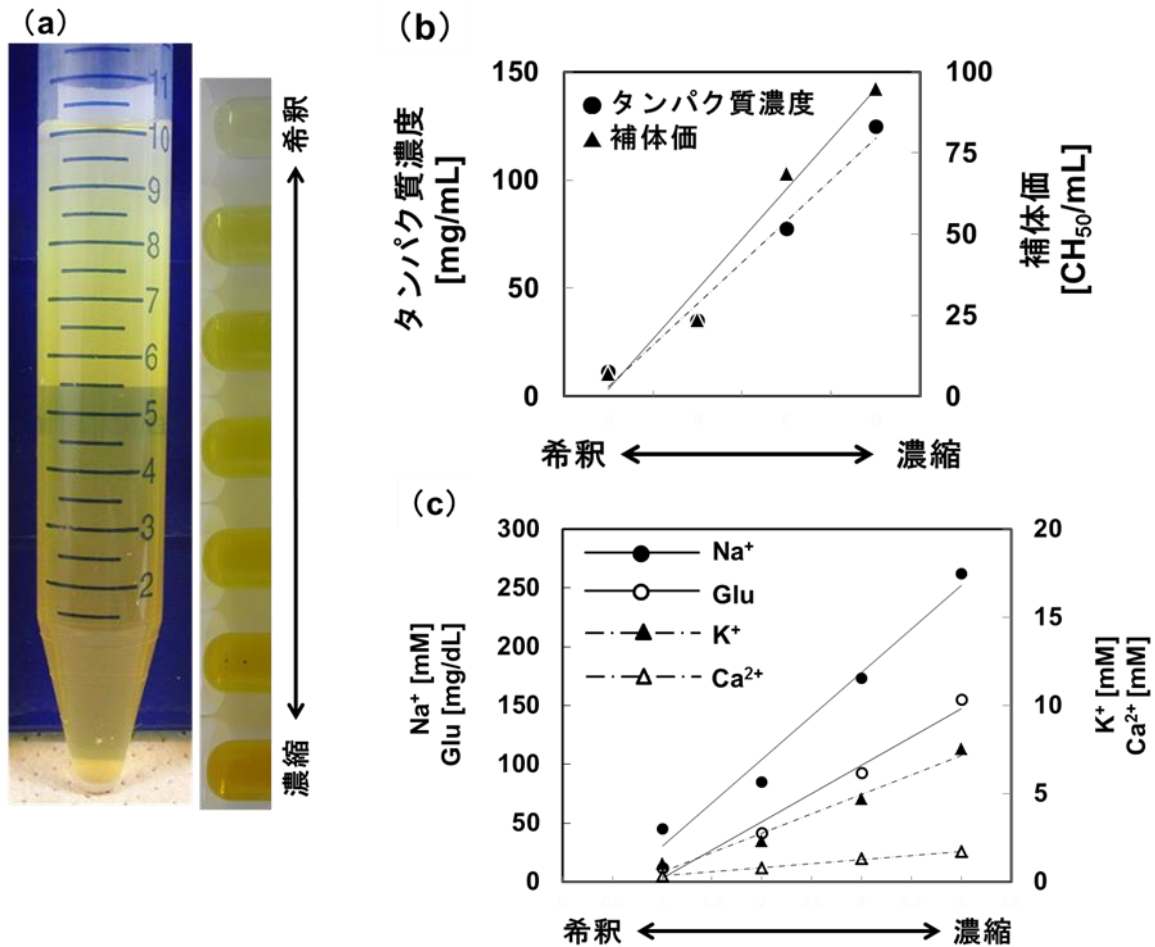


図 2-13 凍結遠心濃縮の濃縮効率

試験管下部に濃縮血清が沈降し(a), 血清タンパク質, 補体価, 各種電解質およびグルコースは一様に濃縮される(b, c).

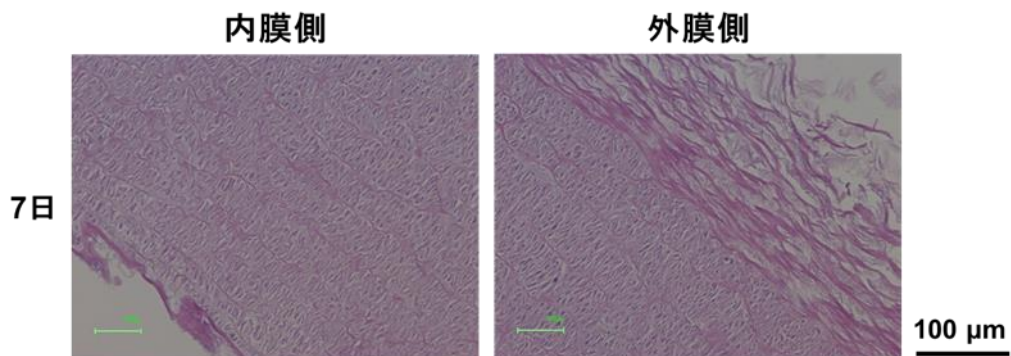


図 2-14 凍結遠心濃縮血清の脱細胞化能(H&amp;E 染色像)

7 日間の処理後, わずかに細胞核が染色されている. 静置濃縮血清を用いた 7 日間の処理後と比較すると, 脱細胞化能は向上しているように見える.



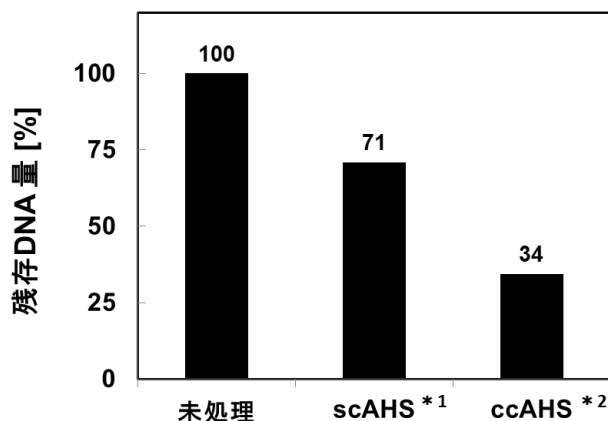


図 2-15

凍結遠心濃縮血清の脱細胞化能(残存 DNA 定量)

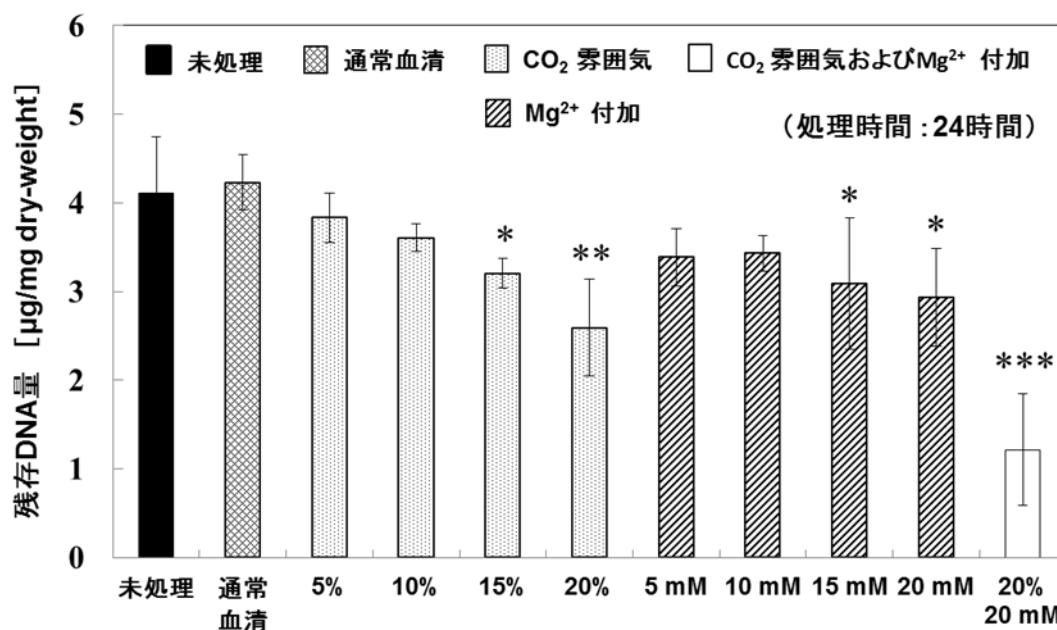
7 日間の処理後, 脱細胞化処理に使用した血清濃度が高いほど, 多くの DNA が除去されている.

\*1 scAHS: 静置濃縮したヒト血清

\*2 ccAHS: 凍結遠心濃縮したヒト血清

### 3.3 処理条件の最適化

図 2-16 は, CO<sub>2</sub>もしくはマグネシウム濃度を調整したヒト血清 1 mL に, ブタ頸動脈を 24 時間浸漬した後の残存 DNA 量を示している. 血清の CO<sub>2</sub> 濃度, もしくはマグネシウム濃度が高いほど, DNA 除去効率が向上する傾向がみられた. 更に両者を併用することで DNA 除去効率は顕著に向上した. 20% CO<sub>2</sub>もしくは 20 mM Mg<sup>2+</sup>の条件で, 24 時間処理したサンプルの残存 DNA 量は, 2.59±0.55 μg/mg および 2.93±0.55 μg/mg であった. 20% CO<sub>2</sub>および 20 mM Mg<sup>2+</sup>の条件で処理したサンプルの残存 DNA 量は, 1.22±0.63 μg/mg であった.

図 2-16 CO<sub>2</sub>雰囲気下およびマグネシウム付加による脱細胞化能の向上

各条件で 1 日間処理後の乾燥組織 1 mg に残存する DNA 量を示す. 通常血清で処理したサンプルに比べて, 血清への CO<sub>2</sub> もしくはマグネシウム付加濃度を高めることで DNA 除去効率は向上した.

平均±標準偏差 (n = 5), \*有意差有 : \*p < 0.05, \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.001 (未処理組織の DNA 含量に対する有意差検定)

図 2-17 は, 20% CO<sub>2</sub> 雰囲気下および 20 mM Mg<sup>2+</sup> に調整した, 1 mL もしくは 2 mL の AHS に, ブタ頸動脈を 1, 2, 3, 4 日および 5 日間浸漬した後の残存 DNA 量を示している. 処理日数を延長することで, 残存 DNA 量は

減少した。一方、各処理日数において、組織を浸漬する血清量は、DNA 除去効率に有意な影響を与えなかった。血清による脱細胞化は、使用する血清量よりも、処理条件と時間を最適化することが重要であることが示された。

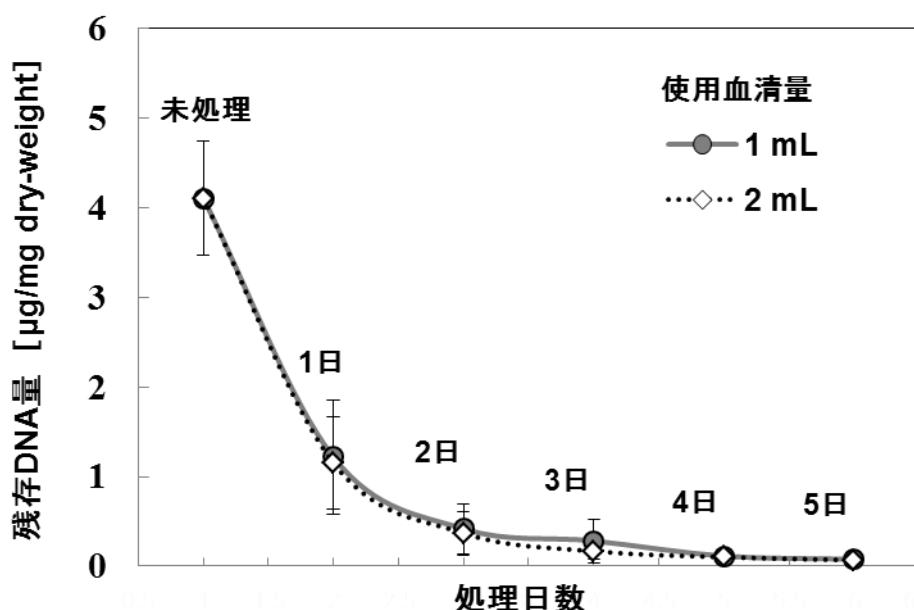


図 2-17 洗浄日数および血清量と DNA 除去効率

20% CO<sub>2</sub>および20 mM Mg<sup>2+</sup>付加条件下で血清処理後の経時的な残存 DNA 量を示す。5 日間の洗浄で大部分の DNA が除去された。1 mL と 2 mL の血清量の差異は、除去効率に有意な影響を与えない。(n=5)

### 3.4 浸透圧の影響

図 2-13 の結果より、凍結遠心濃縮法によって得られた濃縮血清(試験管下部 2.5 mL)の浸透圧は、式 2-1 より、約 460 mOsm/L と求めることができる。ヒト血清の浸透圧の基準値は、285～295 mOsm/L であるため、濃縮血清の浸透圧は、約 1.6 倍である。濃縮血清に塩化ナトリウム水溶液を加え、300 mOsm/L (1 倍)、450 mOsm/L (1.5 倍)、1800 mOsm/L (6 倍)に調整した高張血清を用いて、浸透圧の脱細胞化への影響を検討した。

結果、浸透圧 1 倍および 1.5 倍の血清は、脱細胞効果を得たが、浸透圧 6 倍の高張血清は、脱細胞効率がむしろ低下した(図 2-17)。濃縮血清の脱細胞化能の向上は、血清浸透圧の影響ではなく、血清中の脱細胞化に寄与する何かしらの分子が濃縮された結果であるといえる。

### 3.5 非働化血清の脱細胞化能

56°C, 30 分間非働化処理をした AHS は、感作ヒツジ赤血球を溶血させる能力が低下した(図 2-18b)。血清補体価(CH<sub>50</sub>)は、本研究で使用した測定キットの測定下限値以下(< 6.4 CH<sub>50</sub>/mL)であった。

図 2-19 は、20% CO<sub>2</sub>および20 mM Mg<sup>2+</sup>の条件に調整した AHS もしくは非働化血清(AHS)を用いて、5 日間の浸漬処理を行った結果である。H&E 染色所見において、通常血清に浸漬させた組織は細胞核が除去されているが、非働化血清に浸漬させた組織は、多くの細胞核が染色された。非働化血清は、脱細胞化能が著しく低下した。本研究における血清の脱細胞化は、山岡らの報告と同様に、補体の関与が示唆された。ただし、静

置濃縮血清は、濃縮前と補体価が変化していないにもかかわらず、脱細胞化能が向上した。このことから、岸田らが考察したように、血清中に含まれる、補体以外の有効成分の関与も否定できない。

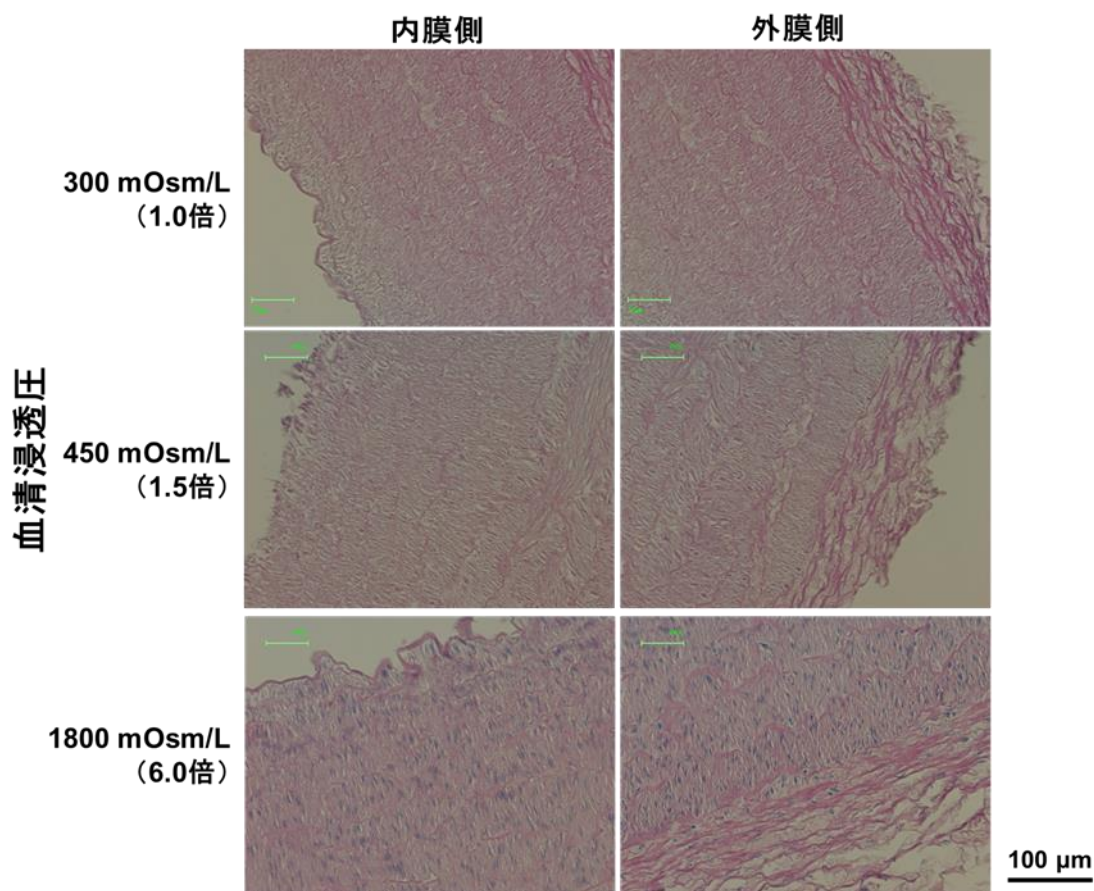


図 2-17 脱細胞化への浸透圧の影響

通常の血漿浸透圧と同等あるいは 1.5 倍の浸透圧では脱細胞効果を得た。  
6.0 倍の浸透圧では脱細胞効果は得られない。

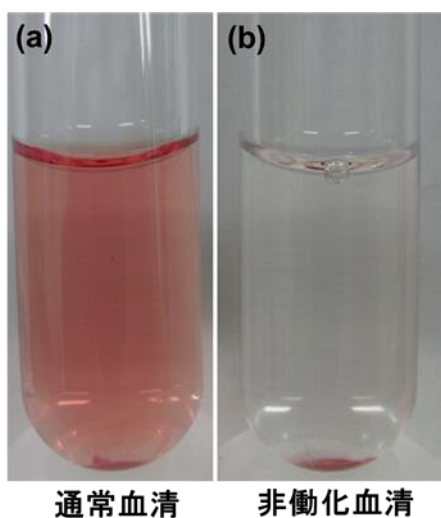


図 2-18

#### 非働化血清の補体価

通常血清（AHS）は赤血球を溶血させる（a）．  
非働化血清（AHS）は赤血球を溶血させる能力  
が失活する（b）．非働化によって補体価が低下  
したことを示す．

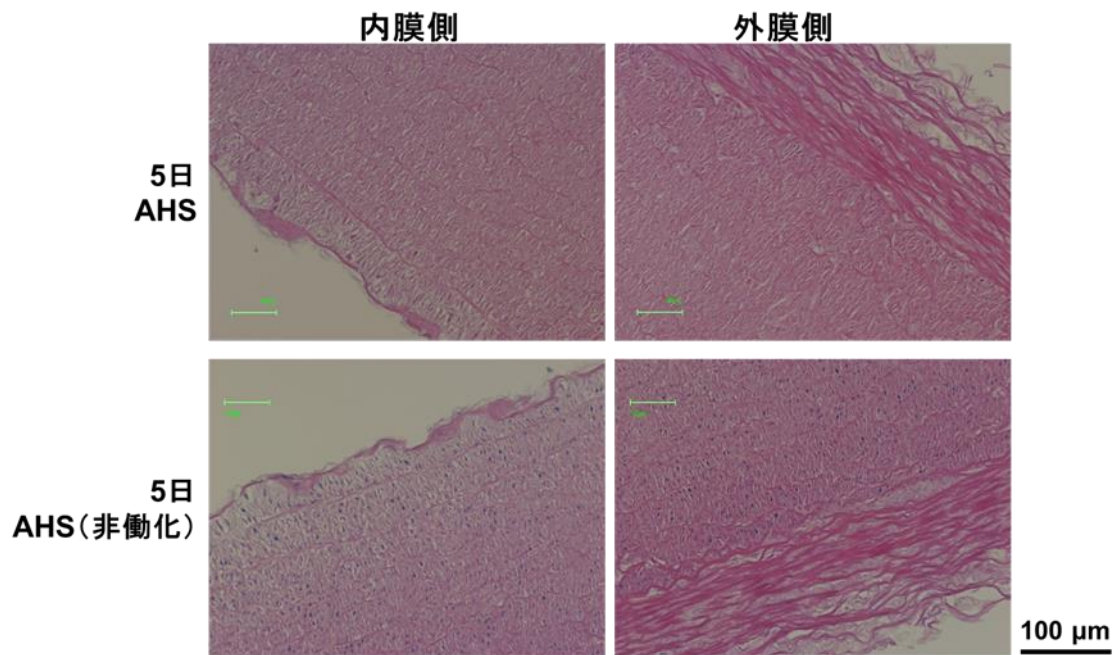


図 2-19 非働化血清の脱細胞化能

AHS は脱細胞化能を示すが(上段), 非働化した AHS で処理した組織は, 多くの細胞核が染色されている(下段).



#### 4. 要 約

FBS および AHS を用いて、ブタ頸動脈の脱細胞化を試みた。岸田らの先行研究とは異なり、5 日および 11 日間の浸漬処理では、脱細胞効果は得られなかった。

液状食品の濃縮に利用されている技術を参考に、ヒト血清を簡便かつ清潔に濃縮する方法を考案した。濃縮血清は、その濃縮率の向上に伴い、脱細胞化能が向上したが、H&E 染色および残存 DNA 定量の結果、十分な脱細胞化組織を得ることはできなかった。

アシデミアの環境は、補体を活性化させることが知られている。血清 pH を CO<sub>2</sub> 雰囲気下で調整し、更に、血清中の DNase を活性化させるために、血清に Mg<sup>2+</sup> を付加した。pH と Mg<sup>2+</sup> 濃度を調整した AHS を脱細胞化処理液に用いたところ、血清を濃縮することなく、5 日間の処理で大部分の DNA を除去することができた。H&E 染色所見においても、ほとんど全ての細胞核が除去されていた。

高張血清や非働化処理した AHS を用いた検証実験の結果、本手法による脱細胞化において、山岡らの先行研究の結果と同様に、血清中に存在する補体活性の関与が示唆された。

## 第三章

### 既存法(SDS 処理法)との比較

#### 1. 序 論

第二章では、AHS の脱細胞化能を検証し、血清に含まれる有効成分を活性化させることで、脱細胞化能を向上させることができた(AHS を用いた脱細胞化処理法を、以下、血清処理法と呼ぶ)。一方、SDS は、多くの研究チームが様々な臓器の脱細胞化に用いている界面活性剤である(SDS を用いた脱細胞化処理法を、以下、SDS 処理法と呼ぶ)。SDS 処理法は、最も良く知られた脱細胞化処理法の一つである。本章では、この SDS 処理法と血清処理法の脱細胞効率および、これらの方法によって作製した脱細胞化組織構造の比較を行い、血清処理法の有効性を検証した。ここで、脱細胞化組織の利点は、生体由来の ECM 構造を温存しつつ、拒絶反応の原因となる細胞成分を除去することで、複雑な立体構造を有する、レシピエント細胞の足場を提供できる点である。脱細胞化処理後の ECM 構造の変性・破壊が軽度なほど、優れた脱細胞化処理法であると考えられている[10-12]。

初めに、先行研究を参考に、SDS 処理法によって脱細胞化組織を得るための処理条件を検討した。脱細胞化のための SDS 濃度は、0.1～1%が有効であると報告されている[12]。高濃度の SDS は、脱細胞化能が優れている反面、組織の構造破壊が危惧される。また、脱細胞化処理後に、組織に残存した SDS が、レシピエント体内で細胞毒性を示すことが報告されている。そのため、SDS の濃度を最適化することは重要である。本研究では、0.1%もしくは1%の SDS を用い、脱細胞化能を検証した。SDS 処理法で作製した脱細胞化組織は、レシピエント細胞の浸潤性を向上させるために、残存 SDS の除去工程が必要である。本研究では、SDS の溶解性が高いエタノールを使用し、SDS を除去した。また、組織に残存する DNA の除去効率を向上させるために、DNase による処理工程を併用した。

## 2. 供試材料と実験方法

### 2.1 SDS 処理法の検討

#### (1) SDS 濃度の検討

脱細胞化のための SDS 濃度は、0.1～1%が有効であると報告されている。血清処理法との比較のために、0.1%もしくは 1% SDS (194-12841, 和光純薬)を用いて、ブタ頸動脈の脱細胞化に最適な、SDS 濃度を検証した。

凍結保存されたブタ頸動脈は、生理食塩水中で解凍し、5 mm×5 mm (厚さは約 1 mm)に切断した。そして、室温下にて 1%抗生剤を含む生理食塩水中で 1 時間振盪し殺菌した。その後、0.1%もしくは 1%SDS を含む PBS にて、37°C 下にて 24 時間、振盪処理を行った。SDS 処理後の脱細胞化能を H&E 染色によって評価した。

#### (2) 残存 SDS 除去工程

残存 SDS の除去は、SDS の溶解性が高いエタノールを使用した。(1)の処理後、80% (v/v%)エタノールにて 37°C 下にて 24 時間、振盪処理を行った。エタノール処理は、細胞膜成分であるリン脂質の除去にも効果的である。脱細胞化後に残存するリン脂質は、移植後の石灰化を誘起すると報告されている[58]。エタノールを用いた残存 SDS 除去は、石灰化を抑制する利点もあり、有効な方法である。

#### (3) DNase 処理工程の併用

後述する実験の結果、上記(1)、(2)の処理工程では、H&E 染色所見において、十分な脱細胞化組織を得ることができなかった。多くの研究では、脱細胞化処理に DNase や RNase を併用し、核酸の除去効率の向上を図っている。本研究においても、0.1%もしくは 1%SDS、80%エタノールに続き、DNase (DNase I recombinant, Cat.NO.04536282001, Roche)溶液による処理工程を追加した。上記(2)のエタノール処理後、10 unit/mL の DNase および 20 mM の  $Mg^{2+}$ を含む PBS にて 37°C 下にて 24 時間、振盪処理を行った。

### 2.2 血清処理法との比較

#### (1) 脱細胞効率の比較

第二章の血清処理法と、2.1 で検討した SDS 処理法の脱細胞効率を比較し、血清処理法の有効性を検証した。脱細胞効率は、H&E 染色、残存 DNA 定量および透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy : TEM)による残存細胞成分の観察によって評価した。H&E 染色および残存 DNA 定量は、組織に残存する細胞核や DNA 量を染色もしくは定量することで、脱細胞化の進行とその効率を評価することができる。しかし、細胞成分の全てが組織から除去されているかを評価することはできない。そこで、TEMによる細胞残渣の観察を行った。

TEM 観察のためのサンプルは、2.5% Glutaraldehyde-2.0% Paraformaldehyd-0.1 M Phosphate Buffer (pH 7.4)を用いて、4°C 下にて 8 時間、前固定した。前固定後、4°C の PBS に浸漬した。その後、四酸化オスミウム液による後固定、脱水、包埋、超薄切片、電子染色の各工程を株式会社アブライドメディカルリサーチに委託した。超薄切片は、血管の長軸方向の断面が観察できるように作製を依頼した(図 3-1)。グリッドに設置された標本を TEM (H-7650, 日立)にて観察した。

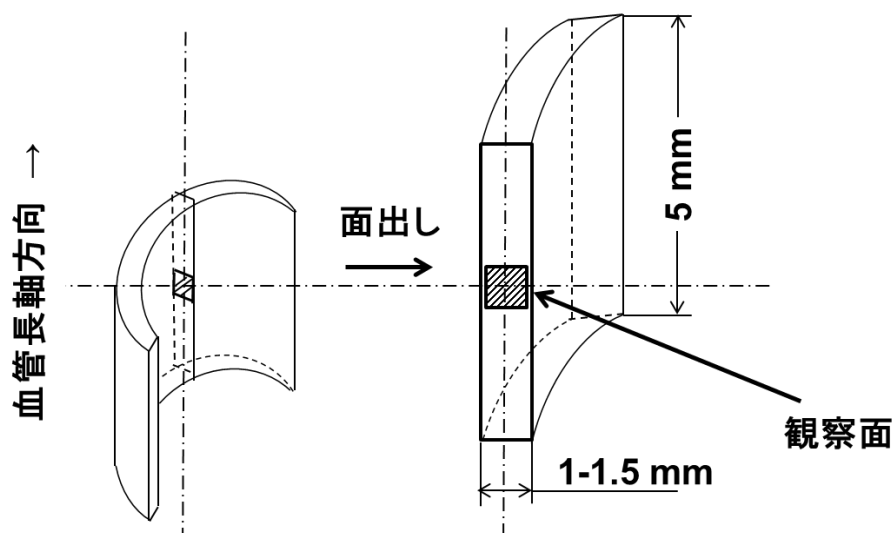


図 3-1 TEM 観察のための超薄切片切り出し位置

## (2) ECM 構造の比較

脱細胞化組織において、処理後に、生体由来の ECM 構造が温存されることは重要である。血清もしくは SDS 処理後の ECM 構造を比較した。ECM 構造は、肉眼的所見、走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscopy: SEM) 観察像によって評価した。

SEM 観察のためのサンプルは、2.5% Glutaraldehyde-0.1 M Phosphate Buffer (pH 7.4) にて、4°C 下にて 8 時間固定した。固定後、4°C の PBS で 2 回、各 30 分サンプルを洗浄した。続いて、50%, 70%, 90% および 99.5% のエタノールで、室温下にて各 30 分、段階的に脱水処理した。99.5% エタノール処理のみ 2 回行った。次に、t-Butyl Alcohol と 99.5% エタノールを 1:1 で混合した処理液に 30 分、100% t-Butyl Alcohol に 2 回、各 30 分、室温下にて処理した。t-Butyl Alcohol を浸透させたサンプルを 4°C で凍結させ、24 時間凍結乾燥した。凍結乾燥後のサンプル表面に白金コーティングを施し、SEM (JSM-6390LM, JEOL) にて観察した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 SDS 処理工程

0.1% および 1% SDS の単独処理では、いずれの濃度を用いても、脱細胞化組織を得ることはできなかった (図 3-2)。

0.1% もしくは 1% SDS 処理後、エタノールおよび DNase 処理を行った組織の H&E 染色像を図 3-3 に示す。0.1% SDS を用いて処理した組織は、エタノール処理の有無に関わらず、DNase 処理を行うことで、細胞核が除去された (a-d)。1% SDS を用いて処理した組織は、エタノール処理および DNase 処理を行うことで、細胞核が除去された (g, h)。一方、1% SDS 処理後、エタノール処理を行わなかったサンプルは、DNase 処理を行っても、多くの細胞核が残存していた (e, f)。この結果は、組織に残存した SDS が、DNase 活性に影響をもたらしたことが原因であると考えられる。

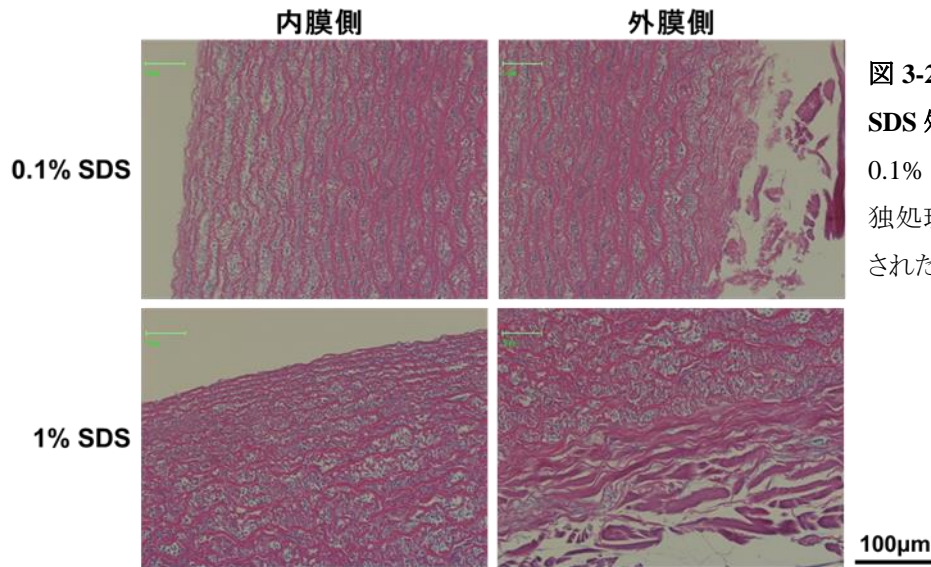


図 3-2

SDS 処理法の検討 (SDS 濃度)

0.1% SDS および 1% SDS の単独処理後、多くの細胞核が染色された。

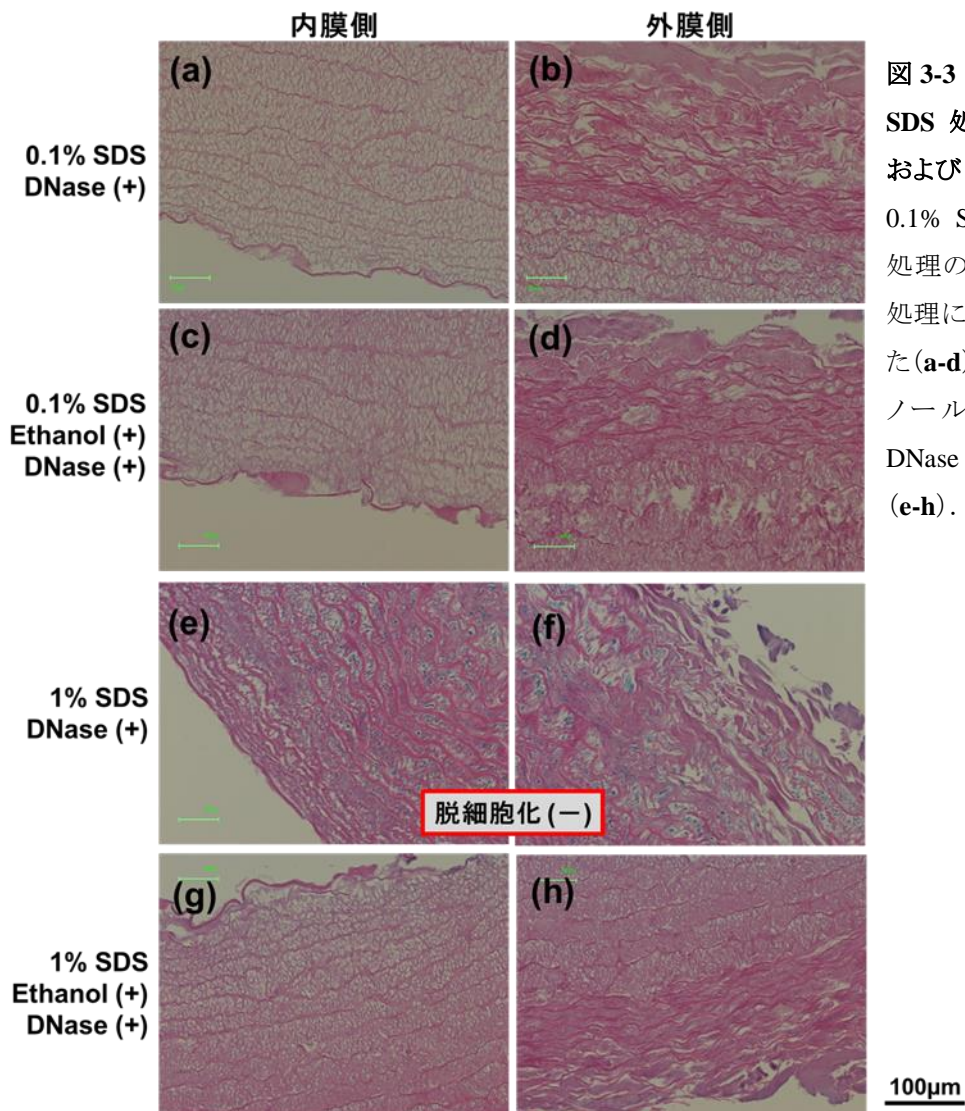


図 3-3

SDS 処理法の検討 (エタノールおよび DNase 処理)

0.1% SDS 処理後はエタノール処理の有無に関わらず DNase 処理によって細胞核は除去された (a-d). 1% SDS 処理後はエタノール処理を行わなければ DNase の処理効果が得られない (e-h).

脱細胞化組織に残存する SDS は、移植後、レシピエント細胞に毒性を示し、自己組織化を妨げる要因となる。脱細胞化処理液の SDS 濃度は、脱細胞化が達成される条件において、より低濃度であることが望ましい。そこで、本研究の SDS 処理法は、以下の工程で処理することにした。

0.1 % SDS を含む PBS にて 24 時間、80% エタノールにて 24 時間、10 unit/mL DNase と 20 mM  $Mg^{2+}$  を含む PBS にて 24 時間、全行程を 37°C 下にて振盪処理を行った(図 3-4)。

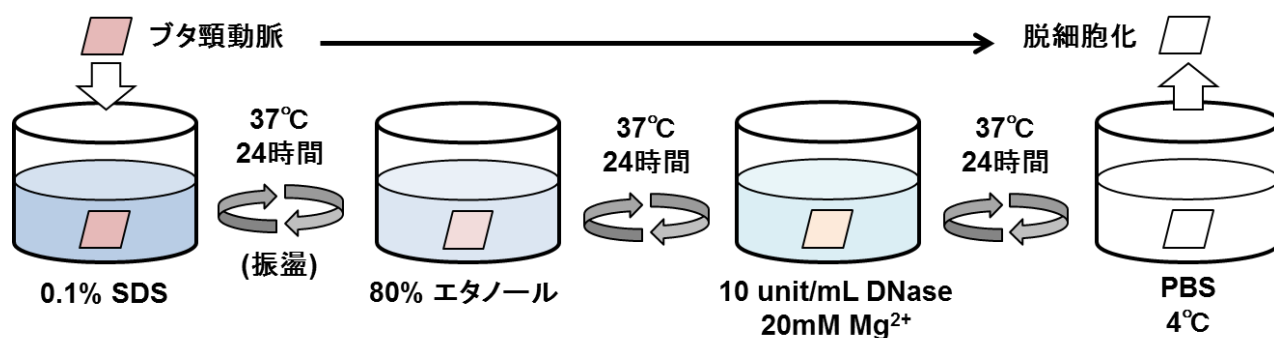


図 3-4 SDS 処理工程

### 3.2 血清処理法との比較

第二章の結果、pH およびマグネシウム濃度を調整した AHS 1mL に 24 時間、ブタ頸動脈を浸漬することで、DNA 除去効率は顕著に向上した。20%  $CO_2$  および 20 mM  $Mg^{2+}$  の条件に調整した AHS 1mL で 5 日間処理したサンプルの DNA 残量は、 $0.08 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$  であった。図 3-4 に示す SDS 処理後の DNA 残量は、 $0.02 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$  であった。未処理組織の DNA 含量( $4.10 \pm 0.64 \mu\text{g}/\text{mg}$ )に対する、5 日間の AHS 処理後の DNA 残量は、 $1.89 \pm 0.58\%$  であり、SDS 処理後の DNA 残量は  $0.51 \pm 0.15\%$  であった(表 3-1)。血清処理法の DNA 除去効率は、SDS 処理法に劣るものの、未処理組織の DNA 含量と比較すると、大部分の DNA を除去することができた。

表 3-1 残存 DNA 量の比較

	残存 DNA 量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry-weight)	残存 DNA 量 (%)
未処理	$4.10 \pm 0.64$	100
SDS 処理後	$0.02 \pm 0.01$	$0.51 \pm 0.15$
AHS 処理後	$0.08 \pm 0.02$	$1.89 \pm 0.58$

平均±標準偏差 (n = 5)

H&E 染色所見では、SDS および AHS で処理した組織は、細胞核が染色されておらず、脱細胞化されているようにみえた(図 3-5)。図 3-6 は、未処理組織、SDS 処理後および AHS 処理後のサンプルの TEM 観察像を示している。未処理組織は、その組織中に核を含む平滑筋細胞を確認した(a)。SDS 処理後は、平滑筋細胞を覆う基底膜を残して、ほぼ全ての細胞成分が除去されていた(b)。AHS 処理後は、細胞残渣を一部認めたが、



SDS 処理と同様に、基底膜を残して全ての細胞成分を除去する能力を有していた(c). SDS 処理法は、脱細胞化処理法の中でも、細胞除去効率に優れた方法である. 血清処理法は、SDS 処理法と比較すると、DNA 定量の結果と同様に、脱細胞効率は劣っていた. しかし、異種組織から、全ての細胞成分を除去する能力を有しており、脱細胞化組織作製に有効な方法であることが示された. ただし、残存する細胞成分は、移植後の副作用の要因となる. 実用化に向けては、更に処理条件を最適化し、脱細胞効率の向上を図らなければならない.

図 3-7 は、20% CO<sub>2</sub>および 20 mM Mg<sup>2+</sup>の条件に調整した AHS を用いて、ブタ頸動脈を 24 時間処理後の TEM 観察像である. 組織中央部分には、多くの核を有する細胞が残存していた(a). 一方、内膜側には、脱細胞化された所見(c)を確認した. 組織中央部分から内膜側に向けて観測点を移動させると、図 3-6(c) (灰矢印)と同様の、核および細胞成分の一部が除去された細胞を確認した(b). この結果は、血清による脱細胞化が、内膜側から徐々に組織中央部へ進行することを示している. ここで、第二章の H&E 染色所見においても、外膜側よりも内膜側の脱細胞効果が高いようにみえた. この結果は、本章の TEM 所見と一致している. 図 3-8 は、ラット皮下に移植したブタ頸動脈への炎症性細胞の遊走を H&E 染色で観察した結果である. 炎症性細胞の浸潤は、血管切断面の特に内膜側から浸潤していることが分かる. 炎症性細胞の遊走と血清の脱細胞化の進行過程がよく似ていることから、血清の脱細胞効果は、補体等の免疫システムが関与していると予想することができる.

また、24 時間の AHS 処理において、内膜側の一部ではあるが、細胞成分が除去されていた. 血清の組織への浸透性を向上させることができれば、より短期間で、全ての細胞を除去し、脱細胞化組織を作製することが可能であるといえる.

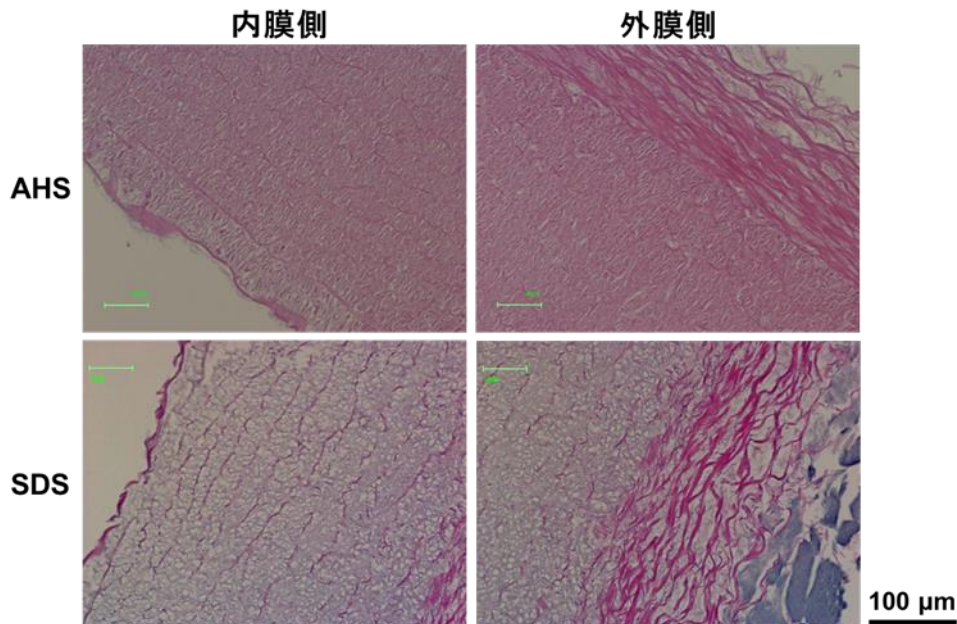


図 3-5 SDS 処理と AHS 処理の比較

SDS および AHS で処理した組織は、細胞核が染色されておらず、脱細胞化されているように見える.



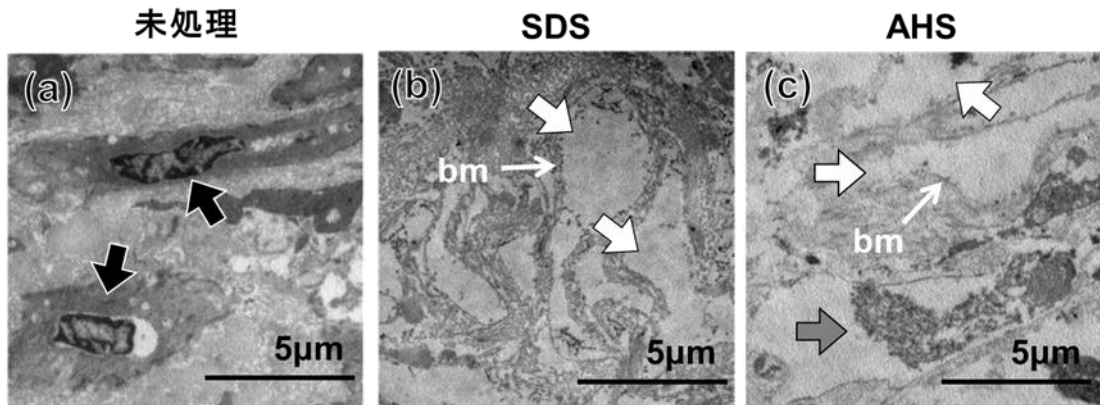


図 3-6 TEM による残存細胞成分の評価

未処理組織には, 平滑筋細胞 (黒矢印) が存在する (a). SDS および AHS 処理後は, 基底膜を残し細胞成分が除去 (白矢印) されている (b, c). AHS 処理後は, 細胞残渣 (灰矢印) を認める (c).  
bm (basement membrane): 基底膜

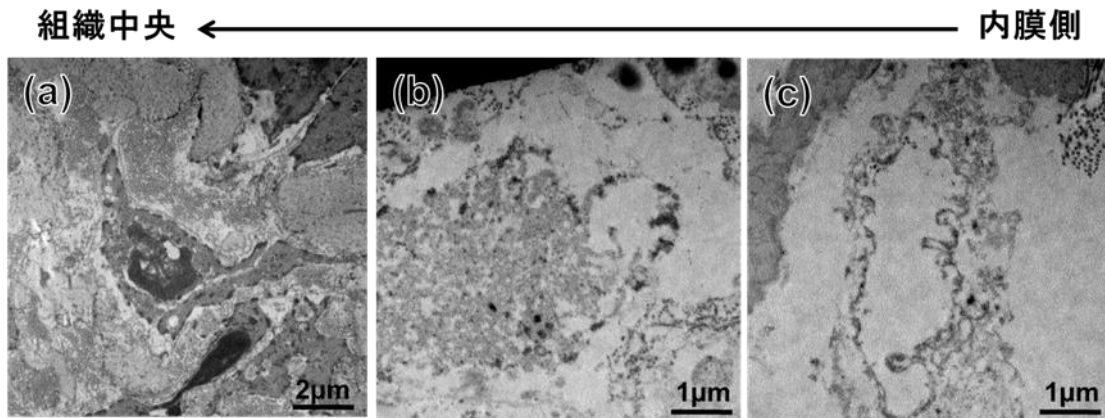


図 3-7 AHS にて 24 時間処理後のブタ頸動脈 (中膜)

組織の内膜側から組織中央に向かって脱細胞化されていく.

(a) 平滑筋細胞 (b) 除去されなかった細胞 (c) 脱細胞化後に残る基底膜

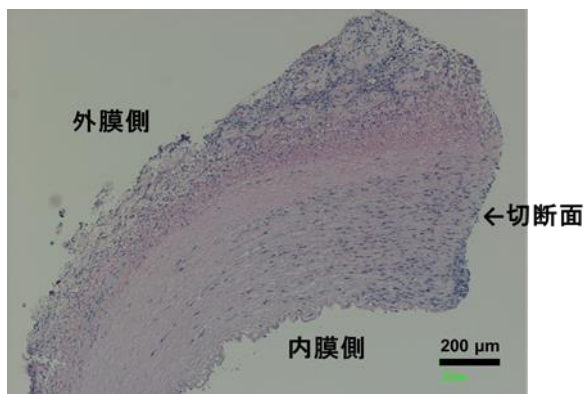


図 3-8

炎症性細胞の遊走と浸潤

炎症性細胞は, 血管切断面の内皮側から浸潤していることが分かる.

図 3-9 は、未処理組織および SDS もしくは AHS 処理後の、ブタ頸動脈外膜を観察した肉眼的所見および SEM 像である。ここで、AHS 処理は、20% CO<sub>2</sub>, 20 mM Mg<sup>2+</sup>の条件に調整した血清を用いて、5 日間処理したサンプルである。肉眼的所見において、各処理後の組織表面を未処理組織表面 (a) と比較すると、SDS 処理後の外膜表面は、粗面にみえる (b)。一方、AHS 処理後は、変化していないようにみえる (c)。SEM 観察像において、未処理組織は、外膜表面の繊維が滑らかにウェーブしている (d, g)。SDS 処理後は、繊維が伸長しており、ECM 構造に変化がみられた (e, h)。一方、AHS 処理後は、未処理組織の滑らかな繊維構造が温存されているようにみえた (f, i)。

図 3-10 は、未処理組織および SDS もしくは AHS 処理後の、ブタ頸動脈内部構造を観察した TEM 像である。ここで、AHS 処理は、20% CO<sub>2</sub>, 20 mM Mg<sup>2+</sup>の条件に調整した血清を用いて、5 日間処理したサンプルである。コラーゲン繊維の密集部を観察したところ、未処理組織および AHS 処理後は、コラーゲン繊維に特徴的な横紋模様を確認した (a, c)。一方、SDS 処理後は、横紋模様がわずかにしか確認できず (b)、コラーゲン繊維構造が破壊されているようにみえた。

脱細胞化組織の ECM 構造は、レシピエント細胞が浸潤する足場となる。そのため、脱細胞化処理によって、その構造が著しく変化しないことが望ましいと考えられている。脱細胞化に伴う組織の構造変化を評価することは重要である。多くの研究では、SDS などの界面活性剤処理後は、ECM 構造に変化がみられたと報告している。本研究においても、SDS 処理後は、肉眼的所見あるいは SEM および TEM 観察によって、ECM 構造の変化を確認した。一方、AHS 処理後は、未処理組織の ECM 構造を温存していた。この結果は、生体由来の複雑に構築された立体構造を利用する脱細胞組織にとって、大きな利点である。血清処理法は、心臓や肺などの、より複雑な機能と構造を有する臓器への応用に有利であると考えられる。

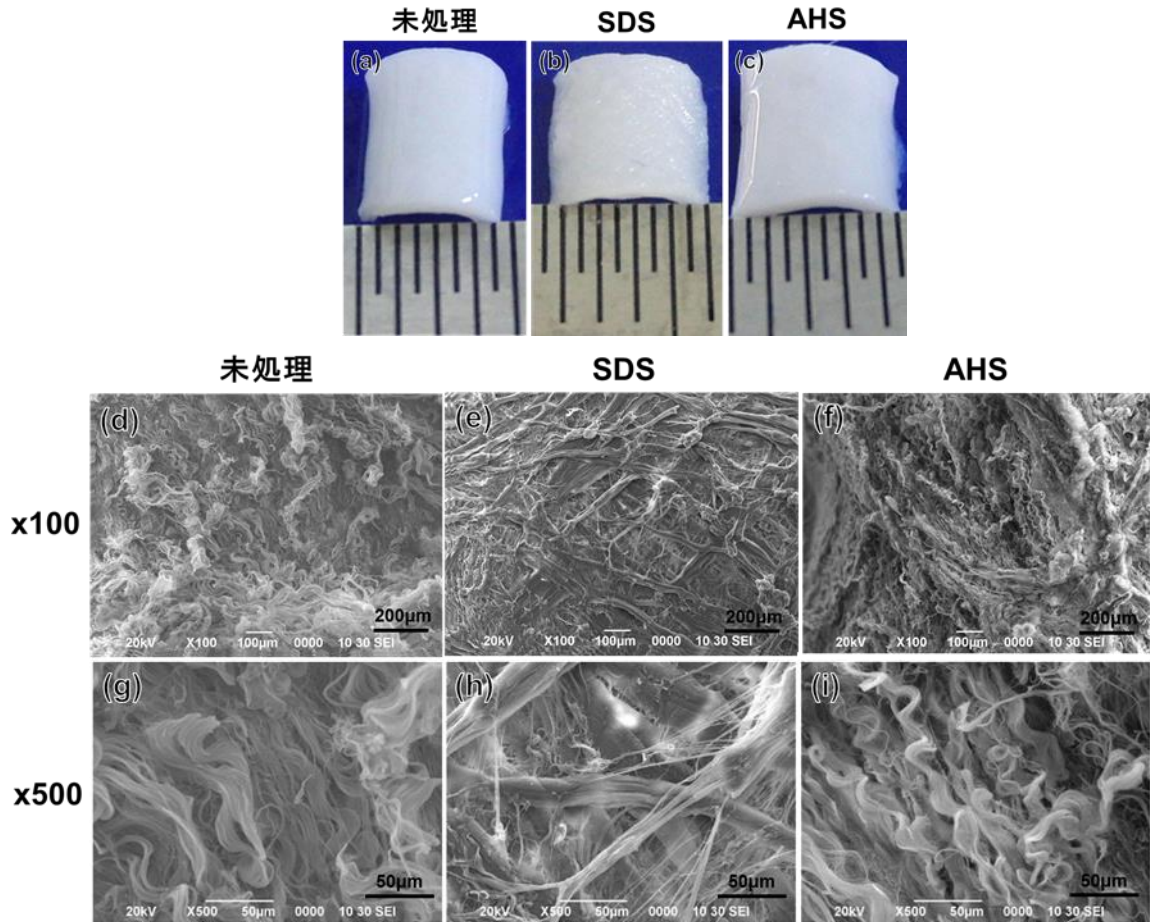


図 3-9 脱細胞化に伴う血管外膜の構造変化

未処理組織および各処理後のブタ頸動脈外膜の肉眼所見(a-c)および SEM 観察像(d-i)を示す。SDS 処理後の外膜は粗面にみえ(b), 繊維が伸長しているように見える(e, h)。AHS 処理後は, 未処理組織と比較して構造変化はみられない(c, f, i)。

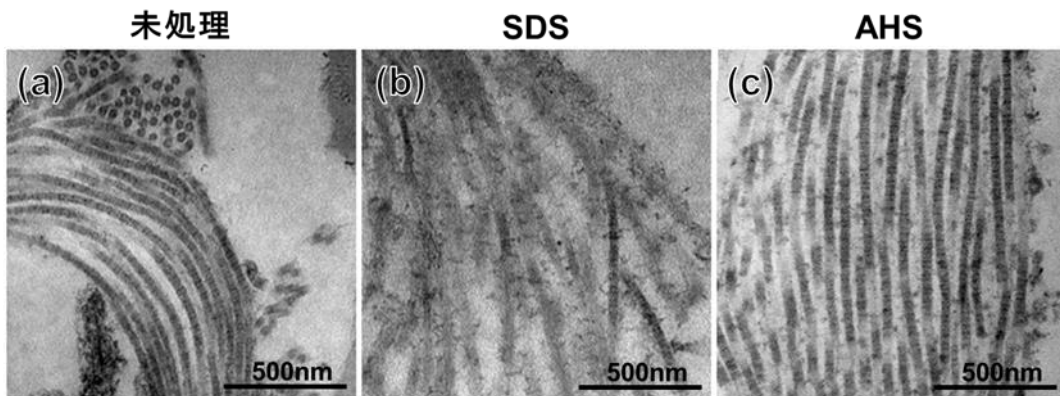


図 3-10 脱細胞化処理後のコラーゲン繊維

未処理組織および AHS 処理後組織に, コラーゲン繊維の横紋模様を確認した(a, c)。SDS 処理後組織は, コラーゲン繊維が破壊されているように見える(b)。

#### 4. 要 約

血清処理法の脱細胞化能を既存法である SDS 処理法と比較した. 本研究における SDS 処理は, 処理条件の検討を行い, 0.1% SDS, 80% エタノールおよび 10 unit/mL DNase を用いた三段階の処理工程によって施行した.

未処理組織 1 mg に含まれる DNA 量を 100% とすると, SDS 処理後の残存 DNA 量は,  $0.51 \pm 0.15\%$  であり, AHS 処理後の残存 DNA 量は,  $1.89 \pm 0.58\%$  であった. TEM 観察像において, SDS 処理後のブタ頸動脈からは, 全ての細胞成分が除去されていた. AHS 処理後は, 一部細胞残渣をみとめた. 残存 DNA 定量および TEM 観察像において, 血清処理法は, SDS 処理法と比較すると, 脱細胞効率は劣っていた. しかし, 異種組織から, 全ての細胞成分を除去する能力を有していることが明らかとなり, 脱細胞化組織作製に有効な方法であることが示された.

SEM および TEM 観察像において, SDS 処理後は, ECM 構造の変化を確認した. 一方, AHS 処理後は, 未処理組織の ECM 構造を温存していた. この結果は, 生体由来の複雑に構築された立体構造を利用する脱細胞組織にとって, 大きな利点である. 血清処理法は, 心臓や肺などの, より複雑な機能と構造を有する臓器への応用に有利であると考えられる.



## 第四章

レシピエント血清を用いて作製した脱細胞化組織の有効性



## 1. 序 論

レシピエント血清で処理した移植片の生体適合性を評価するために、近交系ラットの同種同系モデルによる皮下移植試験を行い、免疫拒絶反応および移植片の経時的な構造変化を評価した。ラット皮下移植試験は、移植後の炎症反応や石灰化を加速的に評価することができ、生体適合性試験として、一般的な方法である。また、近交系ラットを用いた同種同系移植試験は、自家移植モデルを模擬することができる。本研究では、Naganoらの膝蓋腱移植モデル[59]を参考に、近交系 Lewis ラットを用いた皮下移植試験を行った。

移植片の材料は、第二章、第三章と同様に、ブタ頸動脈を使用した。レシピエント血清で処理した移植片の生体適合性を検証するためには、Lewis ラット血清を用いて、ブタ頸動脈を脱細胞化する必要がある。本項では、初めに、Lewis ラット血清の脱細胞化能を確認した。

レシピエント血清を用いることの有効性は、未処理組織および SDS 処理法で脱細胞化した移植片の皮下移植試験結果と比較し、検証した(図 4-1)。

Glutaraldehyde (GA) は、生体弁の固定剤などに使用されている。GA 処理した組織は、短期間に強い石灰化を誘起することが知られている(臨床使用されている生体弁は、GA 処理に加えて、アルファアミノオレイン酸処理などの石灰化抑制処理が施されている[2]。)。レシピエント血清によって脱細胞化した移植片の移植後の石灰化を GA 処理した移植片と比較した。

## 2. 供試材料と実験方法

### 2.1 ラット血清の提供

ラット血清は、Lewis ラット(オス, 8 週齢, LEW/CrlCrIj)から採取したものと、日本チャールス・リバー株式会社から購入した血清(オス, 8 週齢, LEW/CrlCrIj から採取した血清)を使用した。ラットからの採血および血清抽出は、以下の要領で行った。

ラットからの採血は、2-4% イソフルラン(エスカイン, マイラン製薬)による全身麻酔下にて開腹し、腹部大動脈から行った。採血後のラットは、全身麻酔を維持し、致死量のペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル, 共立製薬)の投与によって安楽死させた。採血した血液からの血清抽出は、AHS と同様(第二章 2.2)に行った。血清は、使用まで $-25^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。一方、日本チャールス・リバー株式会社から購入した血清は、上記と同条件で採取した血清である。

### 2.2 ラット血清の脱細胞化能

凍結保存したラット血清は、室温下にて自然解凍し、解凍後よく混和した。ラット血清による脱細胞化処理は、AHS と同様に、20%  $\text{CO}_2$  および、20 mM  $\text{Mg}^{2+}$  を付加したラット血清 1 mL に、 $37^{\circ}\text{C}$  下にて 5 日間、ブタ頸動脈を浸漬して行った。ブタ頸動脈は、第二章 2.3 と同様に提供されたものを使用した。 $-80^{\circ}\text{C}$  下にて凍結保存されたブタ頸動脈は、生理食塩水中、室温下にて解凍した。解凍後、5 mm $\times$ 5 mm(厚さ約 1 mm)に切断した。次に、1% 抗生剤を含む生理食塩水中、室温下にて 1 時間以上、振盪洗浄した。1 mL のラット血清と一片のブラ頸動脈は、試験管(14 mL ポリプロピレン製ラウンドチューブ)に入れ、一片のブタ頸動脈を浸漬した。血清中には抗生剤を 1% の濃度で添加した。脱細胞化効率を H&E 染色で評価した。

### 2.3 石灰化評価のための GA 処理法

25% GA(079-00533, 和光純薬)を PBS および蒸留水で希釈し、0.2% GA(pH 7.4) 処理液を調製した。0.2% は、臨床使用されている生体弁(Medtronic Inc. のモザイク生体弁[2])などを固定化、保存する際の濃度である。前項 2.2 と同様に前処理したブタ頸動脈を、0.2% GA に浸漬し、 $4^{\circ}\text{C}$  下にて 24 時間処理した。

### 2.4 皮下移植試験

Lewis ラット(オス, 8 週齢, 238 $\pm$ 17 g, LEW/CrlCrIj)の背部皮膚を横方向に 4 ヵ所、5 mm の長さで切開し、皮下にポケットを作製した。このポケットに、同種同系 Lewis ラット血清で脱細胞化処理したブタ頸動脈を移植した。移植片移植後のポケットは、#5-0 Nylon 縫合糸(ND505, CROWNJUN)にて縫合した。手術は清潔下で行い、手術中は、2-4% イソフルランによる持続的な吸入麻酔を施した(図 4-2)。術後は、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のブプレノルフィン塩酸塩(レペタン注, 大塚製薬)を筋肉内に注射し、鎮痛処置を行った。対照群として、未処理のブタ頸動脈(1% 抗生剤を含む  $4^{\circ}\text{C}$  の生理食塩水に 24 時間浸漬し、殺菌処理した。), SDS 処理法(第三章 図 3-4)によって作製した脱細胞化組織、および前項 2.3 の GA 処理したブタ頸動脈を移植した。各移植片は、30 日および 90 日後に摘出した( $n=4$ )。

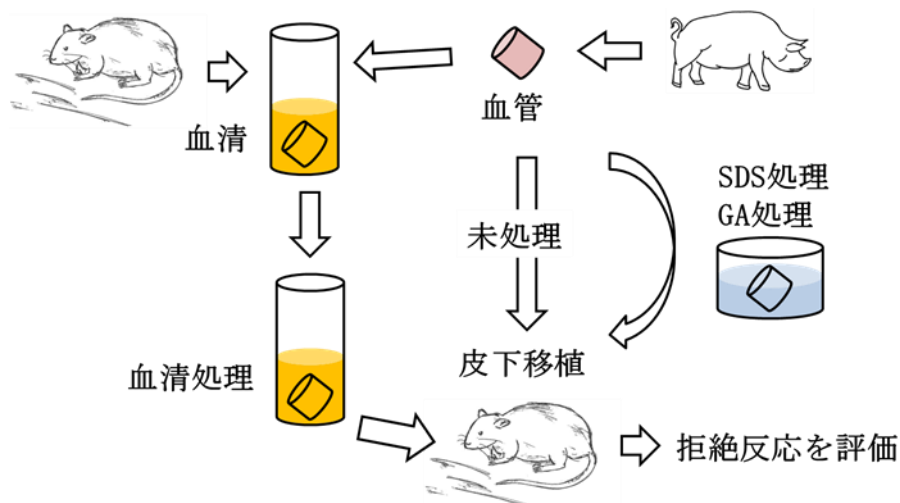


図 4-1 ラット皮下移植試験

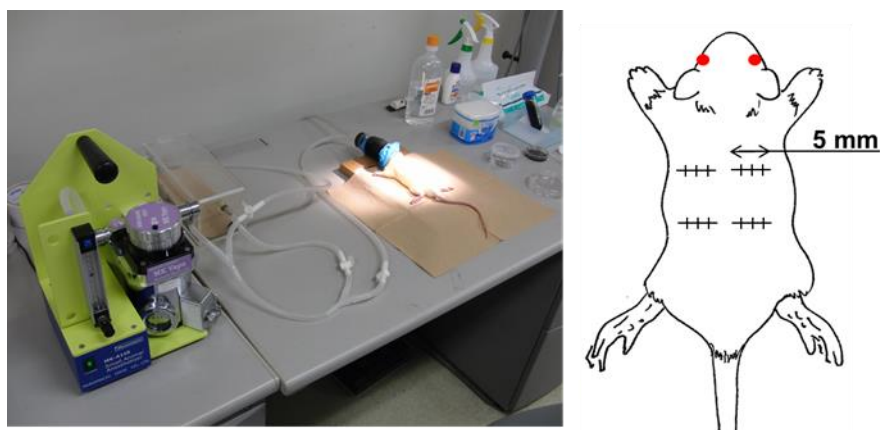


図 4-2 ラット皮下移植試験

## 2.5 評価方法

### (1) H&E 染色

皮下移植による拒絶反応を、免疫細胞の浸潤の様子から評価した。同時に組織の構造変化を評価した。

### (2) von-kossa 染色

皮下移植による石灰化を評価した。von-kossa 染色の詳細な手順を付録 6 に示す。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ラット血清の脱細胞化能

ラット血清処理は AHS と同様に、20% CO<sub>2</sub> および 20 mM Mg<sup>2+</sup> 付加の条件で 5 日間処理することで、ブタ頸動脈を脱細胞化できることを確認した(図 4-3)。

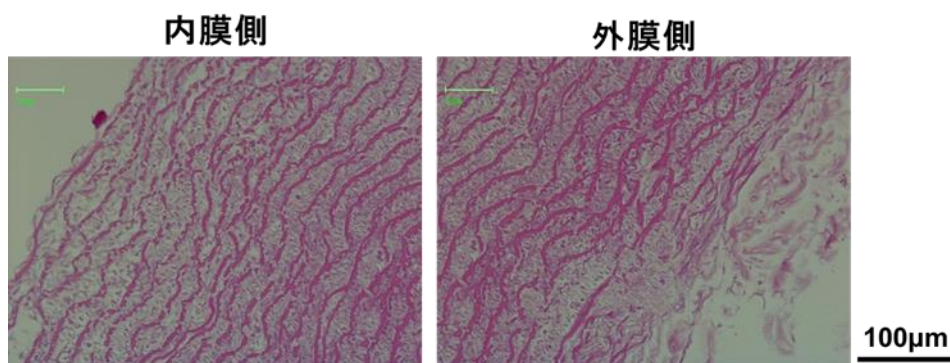


図 4-3 ラット血清の脱細胞化能

ラット血清は、AHS と同様の処理条件によって、異種組織を脱細胞化することができる。

### 3.2 免疫反応による組織破壊

各移植片の移植前、移植後 30 日および 90 日後に摘出した移植片の H&E 染色結果を図 4-4 に示す。移植前の未処理組織には、ドナー（ブタ）由来の細胞核が染色されている（a）。SDS およびラット血清処理組織は細胞核が除去されている（b, c）。移植 30 日後、全ての移植片で炎症性細胞の浸潤を認めた（d-f）。炎症性細胞は、その形状から、ほとんどがリンパ球（T cell および B cell）であると判断できる（第一章 図 1-4 参照）。炎症性細胞の浸潤は、未処理組織および SDS 処理組織で顕著であり（d, e）、ラット血清処理組織は、比較的軽度であった（f）。移植 90 日後、未処理組織および SDS 処理組織は、組織の構造が破壊され、分解されているようにみえる（g, h）。一方、ラット血清処理組織の構造は、比較的温存されていた（i）。

移植 90 日後、各種移植片への浸潤細胞は、全て炎症性細胞であった。そのため、本研究では、脱細胞化組織が自己組織化するために重要な、レシピエント細胞の浸潤性を検証することができなかった。しかし、同種同系ラット血清で処理した移植片は SDS 処理した移植片と比較して、移植後の免疫拒絶反応が軽減されていた。これは、レシピエント血清で処理した脱細胞化組織の有効性を示唆する結果である。

### 3.3 石灰化の評価

図 4-5 は、GA 処理組織の、移植後の各種染色所見である。GA 処理組織は、移植後 90 日が経過しても、固定化されたドナー（ブタ）由来の細胞核を確認することができる。また、組織構造は、ほとんど破壊されずに温存されている（b）。しかし、移植 30 日および 90 日後において、組織全体に強い石灰化を確認した（石灰化部分は、黒褐色に染まる）（c, d）。図 4-6 から図 4-10 および 図 4-12 は、未処理組織、SDS 処理組織およびラット血清処理（5 日間）組織を皮下移植し、移植 30 日および 90 日後の石灰化所見である。移植した全ての組織（n = 4）の Von-kossa 染色像を示した。未処理組織は、移植 30 日後から、弥漫性の石灰化がみられ（図 4-6b, d）、90 日後には、全ての移植片で石灰化を確認した（図 4-7）。特に、図 4-7b, d において、弾性繊維の走行に沿った強い石灰化を認めた。SDS 処理組織は、移植 30 日後、全ての移植片において、石灰化を認めなかった（図 4-8）。90 日後には、全ての移植片で弾性繊維の走行に沿った石灰化を認めたが、未処理組織移植時の石灰化と比較して、軽度であった（図 4-9）。SDS による脱細胞化および、エタノールによるリン脂質除去によって、移植片の石灰化が抑制されたと考えられる。



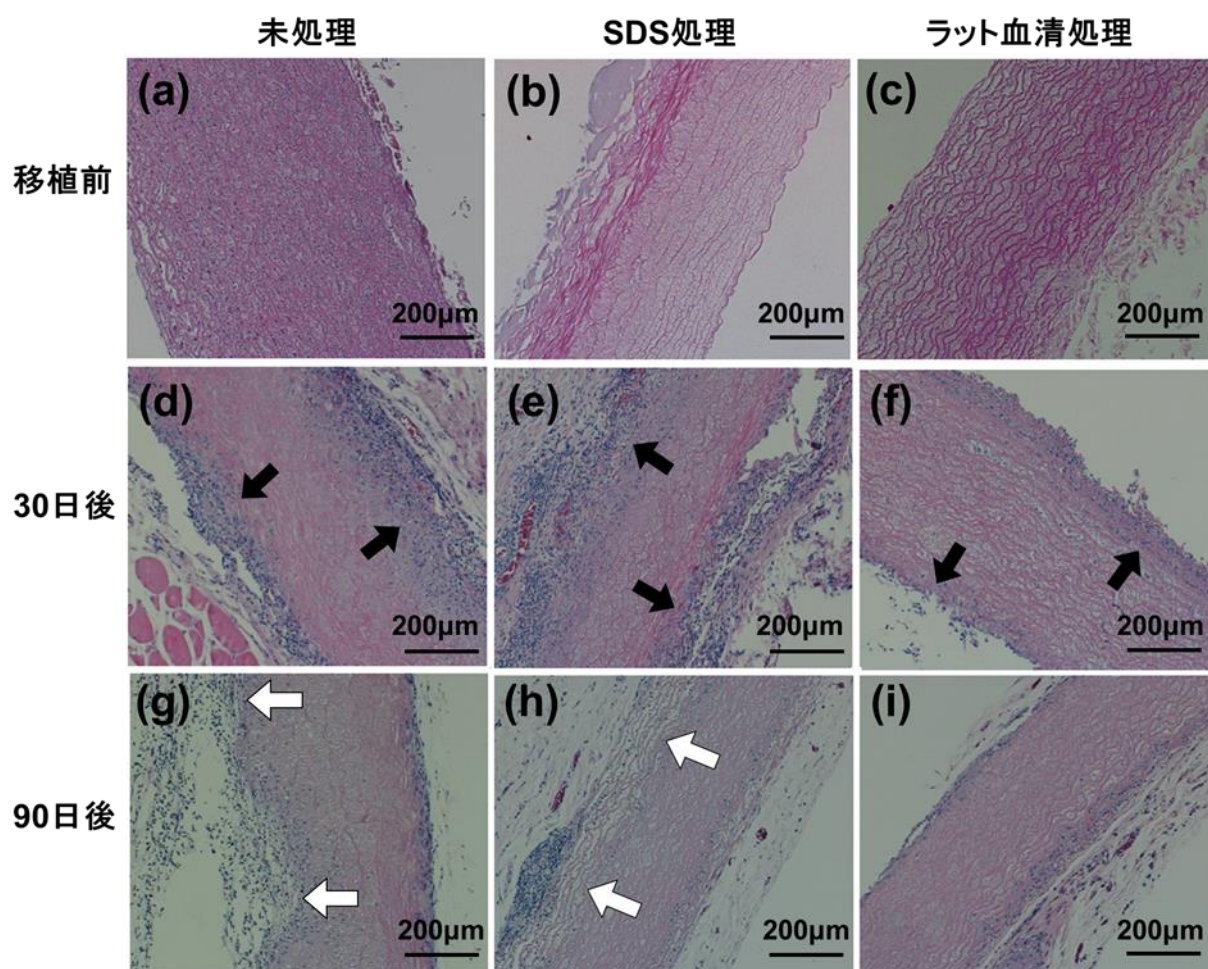


図 4-4 レシピエント血清で処理した移植片の生体適合性

(a-c) 移植前の各組織 (d-f) 移植後 30 日後 (g-i) 移植後 90 日後

未処理および SDS 処理組織は、リンパ球の浸潤（黒矢印）（d, e）と組織破壊（白矢印）（g, h）がみられる。血清処理組織は、リンパ球の浸潤はわずかで（f）、その後の組織破壊はみられない（i）。

ラット血清処理組織は、移植 30 日後、全ての移植片で石灰化を認め、特に、図 4-10b, d は、強い瀰漫性の石灰化を認めた。90 日後には、やはり全てのサンプルで石灰化を認め、図 4-12c, d は、著しく強い石灰化を認めた。ラット血清処理組織で認めた石灰化は、未処理組織の石灰化と比較しても、重度である。これは、移植片の細胞残渣の影響ではなく、血清で脱細胞化処理することによる、特有の副作用を示したと考えられる。血清処理法によって作製した脱細胞化組織は、エタノール処理等の石灰化抑制のための処理を併用することで、移植後の石灰化の問題を解決する必要がある。しかし、GA 処理組織は、全ての移植片において、強い石灰化を認めた（図 4-5c, d）が、ラット血清処理した移植片は、半数 (2/4) の移植片において、強い石灰化を免れている。血清処理における、石灰化抑制は、検討の余地が残されている。ここで、図 4-11 は、3 日間のラット血清処理を行った移植片の、移植 30 日後の Von-kossa 染色所見である。5 日間の処理において、移植 30 日後、全ての移植片で石灰化を認めたが、3 日間の処理では、一切石灰化の所見は認められない。このことから、血清処理組織に

生じる石灰化は、血清への浸漬時間が影響していると推測される。更に十分な検討を行う必要があるが、血清処理組織移植時の石灰化は、処理条件の更なる最適化によって改善が期待できる。

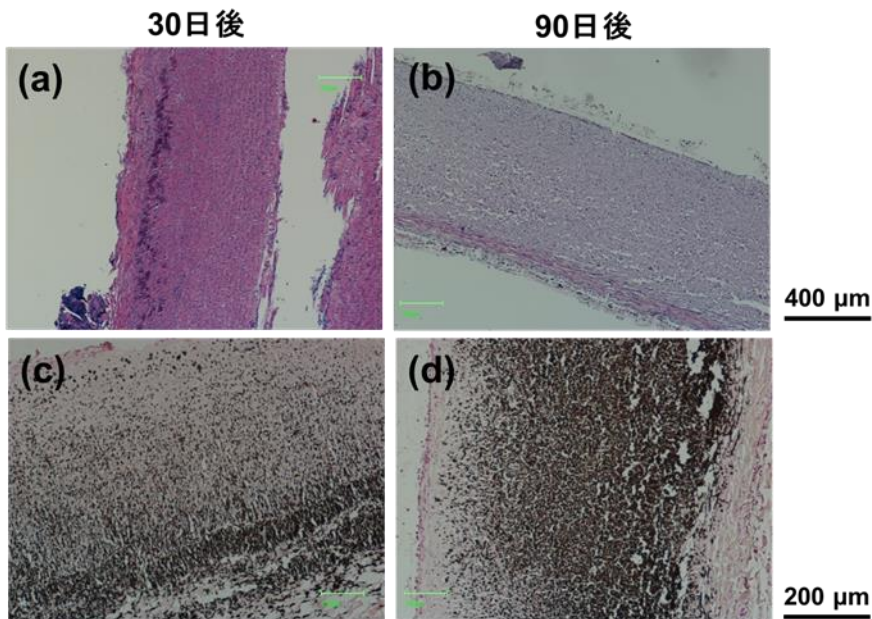


図 4-5

GA 処理組織の石灰化

(n = 4)

GA 処理組織の皮下移植 30 日後 (a, c) および 90 日後 (b, d) の H&E 染色 (a, b) および Von-kossa 染色 (c, d) 所見. 植込み日数によらず, 重度の石灰化を認める.

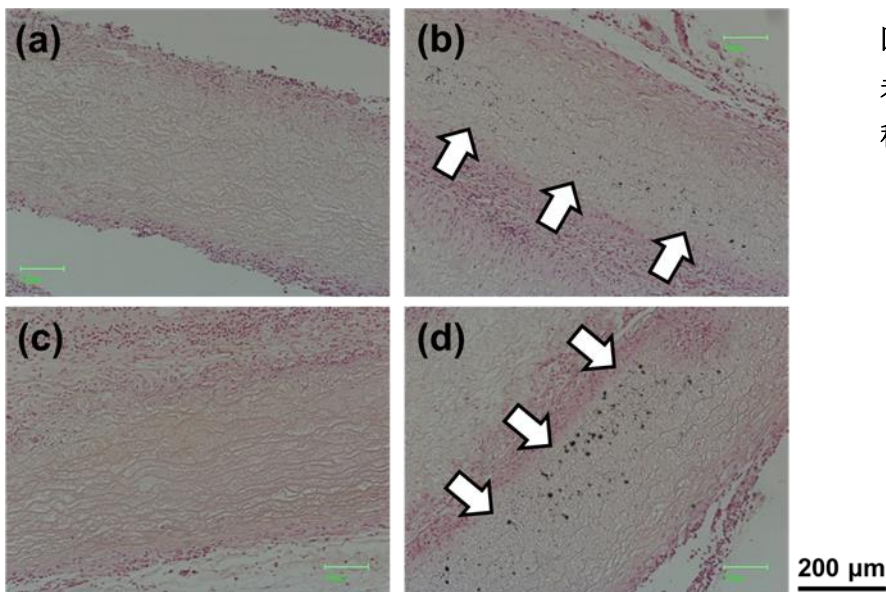


図 4-6

未処理組織の石灰化

移植 30 日後 (n = 4)



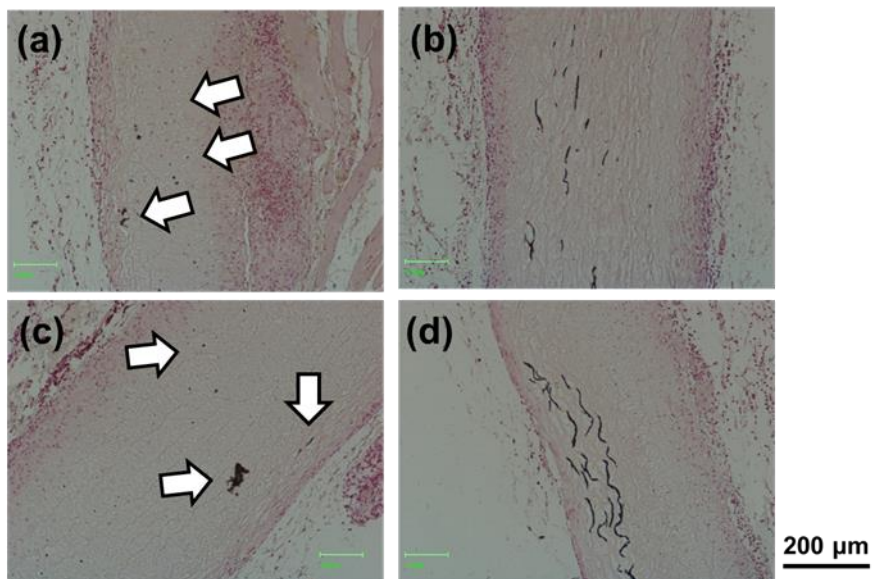


図 4-7  
未処理組織の石灰化  
移植 90 日後 (n = 4)

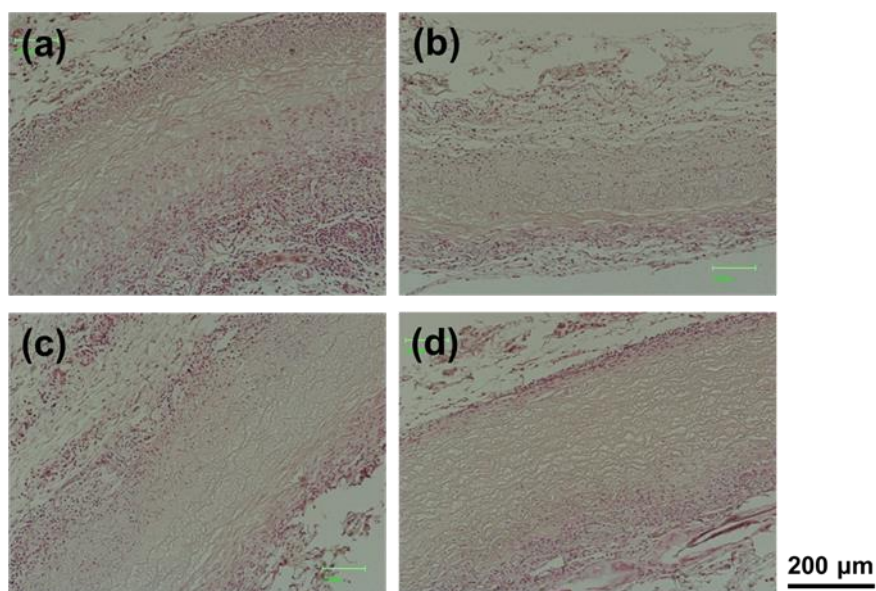


図 4-8  
SDS 処理組織の石灰化  
移植 30 日後 (n = 4)

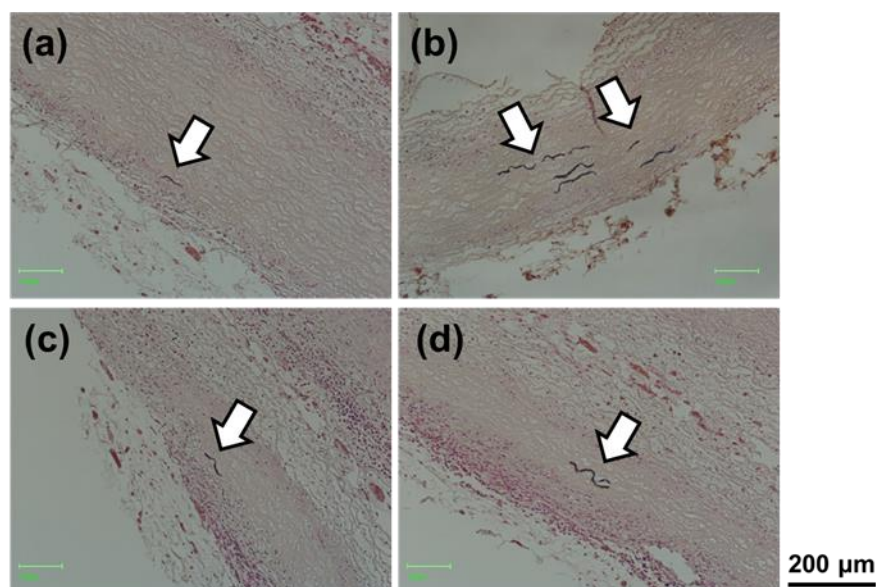


図 4-9  
SDS 処理組織の石灰化  
移植 90 日後 (n = 4)

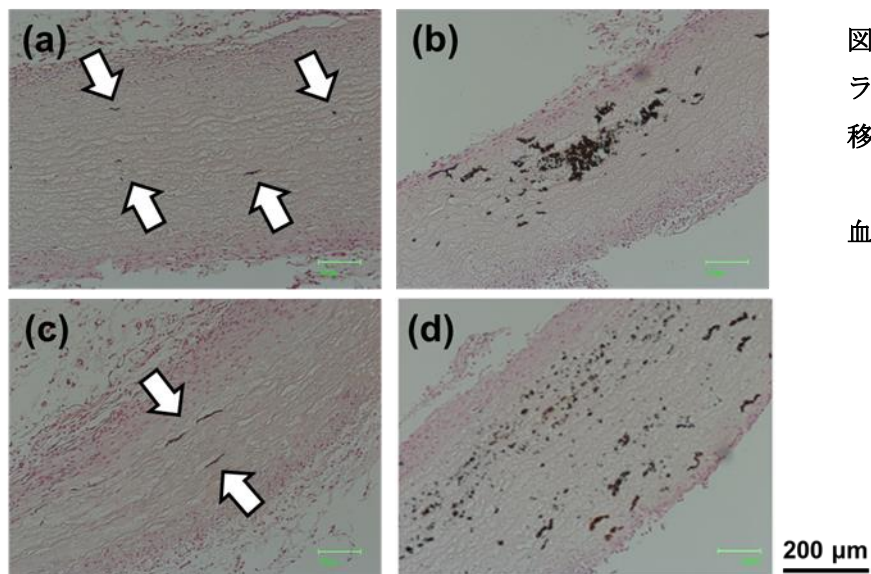


図 4-10  
ラット血清処理組織の石灰化  
移植 30 日後 (n = 4)

血清処理日数 : 5 日

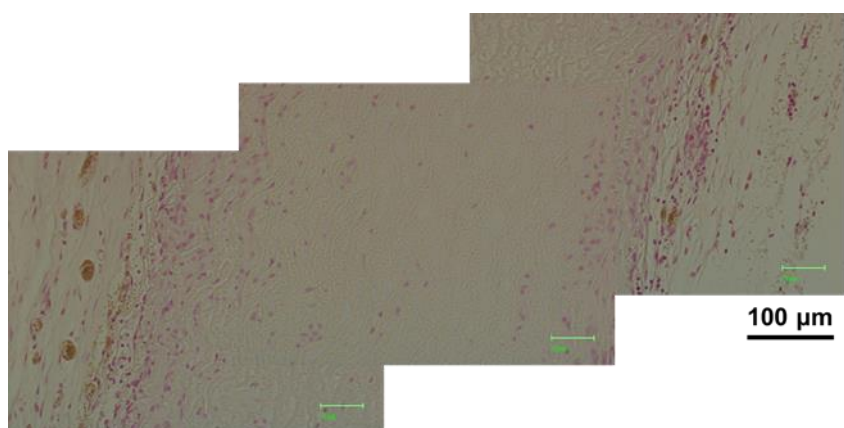


図 4-11  
ラット血清処理組織の石灰化  
移植 30 日後

血清処理日数 : 3 日

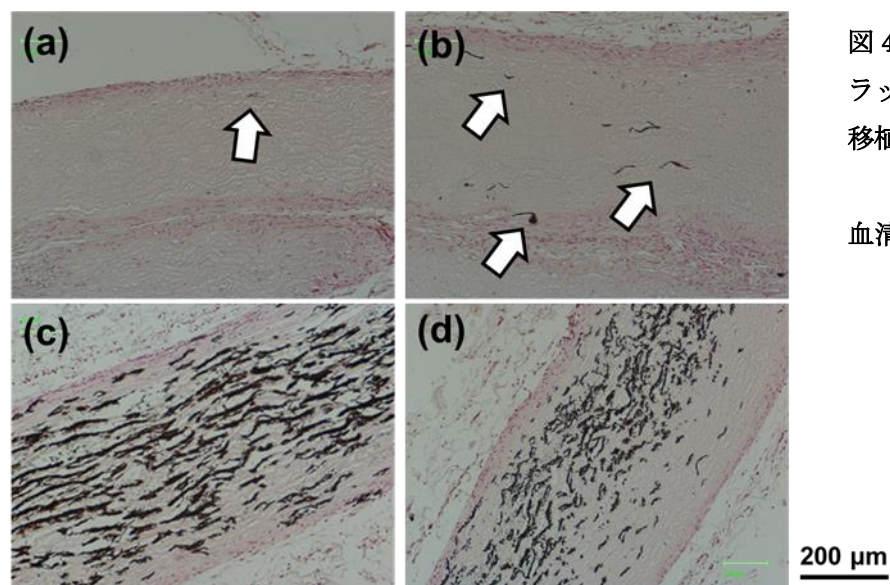


図 4-12  
ラット血清処理組織の石灰化  
移植 90 日後 (n = 4)

血清処理日数 : 5 日

#### 4. 要 約

本章では、レシピエント血清で脱細胞化した移植片の有効性を、ラット皮下移植試験によって検証した。von-kossa 染色の所見において、血清処理した移植片は、移植後 90 日が経過した時点で、半数 (2/4) の移植片において、重度の石灰化を認めた。これは、SDS で脱細胞化処理した移植片と比較して、明らかに強い石灰化であった。血清処理法によって作製した脱細胞化組織は、エタノール処理等の石灰化抑制のための処理を併用することで、移植後の石灰化の問題を解決する必要がある。あるいは、今後十分な検討を行う必要はあるが、血清処理日数を短縮することで、石灰化を回避できる可能性が示された。

一方、血清処理した脱細胞化組織は、SDS で脱細胞化処理した移植片と比較して、免疫拒絶反応を軽減し、生体内で長期間安定することを示した。

## 第五章

### **In vitro** 抗血栓性評価法の検討

## 1. 序 論

本章では、人工臓器の in vitro 抗血栓性評価法を開発し、血清処理法で作製した脱細胞化組織の抗血栓性を評価した。

人工弁や人工血管などの血液と接触する人工臓器は、常に血栓を形成する危険性がある。形成された血栓は、脳梗塞など重度の合併症を引き起こす危険因子となるため、特に循環器系で使用される人工臓器には優れた抗血栓性が求められる。

本研究では、血小板凝集に伴う発光を光電子増倍管 (photomultiplier tube:PMT) によって高感度に検出可能な実験装置を作製した。そして、ヒトの全血もしくは血小板濃度を調整した血漿を試験管内で凝固させることで、血液凝固と発光強度の関係を検証した。更に、in vitro 血液循環回路内で形成される血栓と発光強度の関係を検証することで、本評価系の有用性を検証した。最後に、人工血管を模擬したブタ頸動脈の抗血栓性評価を試み、本実験系の応用性を検証した。



## 2. 血小板凝集に基づく発光の原理

本研究では、ガラス製試験管内、もしくはポリ塩化ビニル(PVC)製血液循環回路内で惹起する血小板凝集の検出を試みた。試験管内で停滞している血液は、ガラスの陰性荷電面と接触することによって、凝固カスケードが進行し、トロンビンが生成される。生成されたトロンビンは、更に血小板を凝集させるとともにフィブリン網を作り、血栓が強化される。血液循環回路内を循環する血液は、血液循環直後に、回路表面に吸着したタンパク質(アルブミン、フィブリノゲン、 $\gamma$ -グロブリン)に血小板が粘着し、凝集が惹起される。Luciferin-luciferase(L-L)発光試薬を投与した血中において、血小板の二次凝集が起これば、濃染顆粒から放出されたATPと発光試薬が反応する。このとき生ずる発光強度は、血小板凝集量に比例すると考えられる(図 5-1)。

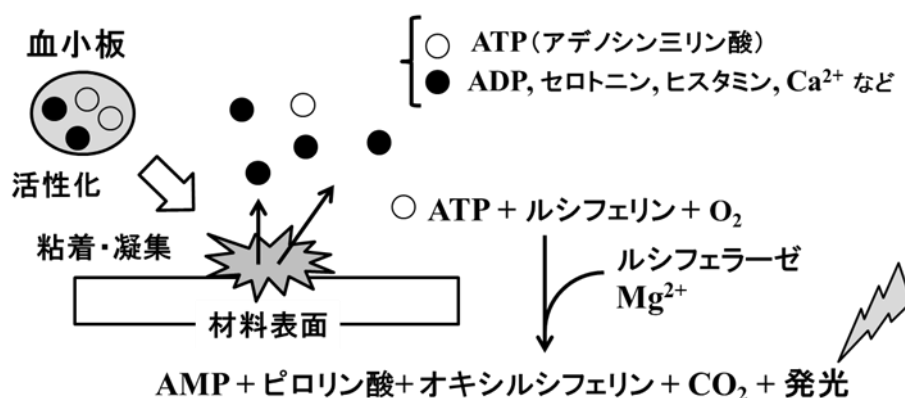


図 5-1 血小板凝集に基づく発光の原理

## 3. 実験装置

### 3.1 実験装置概要

本研究では、血液や生体材料を透過した、微弱発光を検出可能な測定装置が必要である。そこで、高感度かつ低ノイズで、時間応答特性に優れたPMT(H7360-01, 感度波長範囲 300~650 nm, 浜松ホトニクス)を受光器に使用し、光子計数法によって発光強度を検出した。PMTからの出力パルスは、ワンチップマイクロコンピュータ(Peripheral interface controller:PIC)を用いて作製したフォトンカウンタを用いて測定した(図 5-2)。このフォトンカウンタは、ファンクションジェネレータ(33500B series, Agilent)を用いた性能試験において、10 Hz~1 MHz のパルス信号を最大誤差 0.07%で検出することができる(図 5-3)。本実験では、フォトンカウンタのゲートタイムを 1 秒に統一した。つまり、PMTに入力された 1 秒間の光子数の和が発光強度として出力される。したがって、 $10 \sim 1 \times 10^6$  counts/s の範囲において、最大誤差 0.07%の精度が保障される。本章の実験で測定した血栓形成に伴う発光強度は、最大  $10^5$  counts/s のオーダーであり、フォトンカウンタは十分な精度を有している。

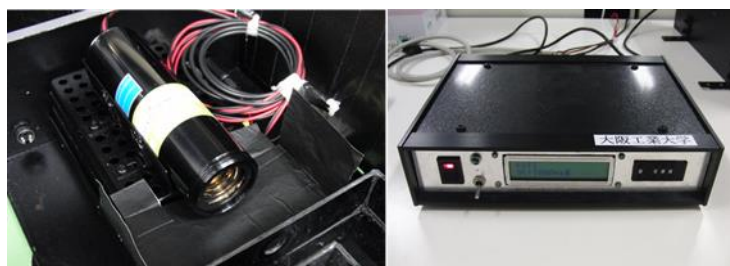


図 5-2

光電子増倍管 : H7360-01 (左)

フォトンカウンタ (右)



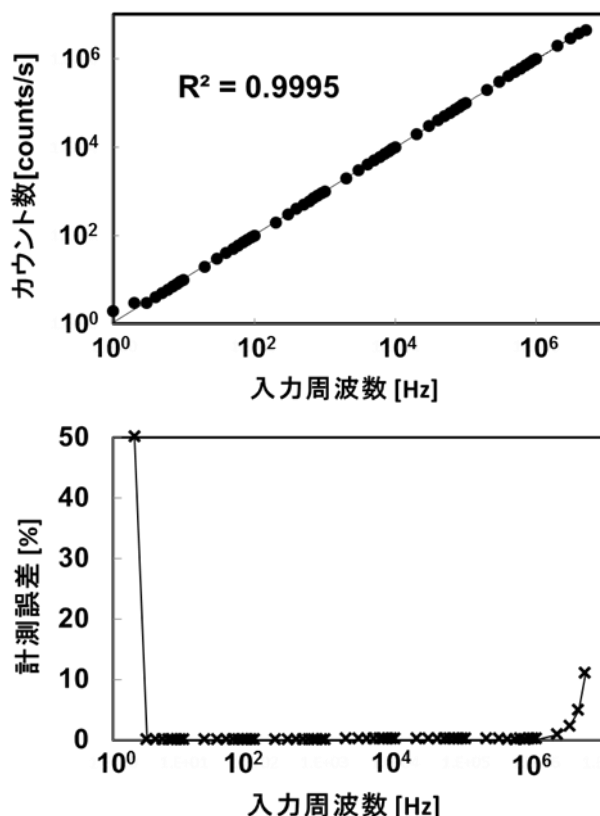


図 5-3 フォトンカウンタの検出精度

10 Hz～1 MHz のパルス信号を最大誤差 0.07% で検出可能

10 から  $1 \times 10^6$  counts/s の範囲において、最大誤差 0.07% の精度が保障される。

実験装置の概要を図 5-4 に示す。遮光箱内に PMT を固定し、光電面から 35 mm の位置にガラス製試験管 ( $\phi 12 \times 75$  mm) (a) もしくは血液循環回路 (b) を設置した。また、血液循環回路には、人工血管などの生体材料を接続することができる (M section)。M section は、生理食塩水を満たすことで、材料の乾燥を防ぐことができる。血液循環回路は、泉工医科工業から購入した PVC チューブ (内径 3.3 mm, 外径 5.0 mm, 長さ 93 cm)、三方活栓 (TS-TR1K, テルモ) 4 個、ロックコネクタ (TS-LC11, テルモ) 2 個、およびエクステンションチューブ (PF X1-L100, トップ) 2 本を使用して作製し、単回使用した。血液循環回路を図 5-5 に示す。総回路長は 115 mm, 充填液量は 13 mL である。2 本のエクステンションチューブは、後述の硫酸プロタミンおよび発光試薬を回路内に投与するライン (a) と、閉鎖回路内に試薬を投与するための脱血ライン (b) である。暗箱外からの操作で、試験管内もしくは血液循環回路内に、硫酸プロタミンや発光試薬を投与することができる。

PVC チューブは、抗凝固処理が施されていないもの (以下、N-PVC と呼ぶ) と、ヘパリンコーティングが施されたもの (以下、HC-PVC と呼ぶ) の 2 種類を使用した。血液流量は、ローラーポンプ (Model: 10-20-00, スタッカート) にて制御した。ノイズとなる入射光を遮断するために、光電面と試料との間に直径 10 mm のホールを開けた遮光板を設置した。PMT の出力パルス信号は、フォトンカウンタに入力され、試料からの発光強度を実時間で測定することができる。

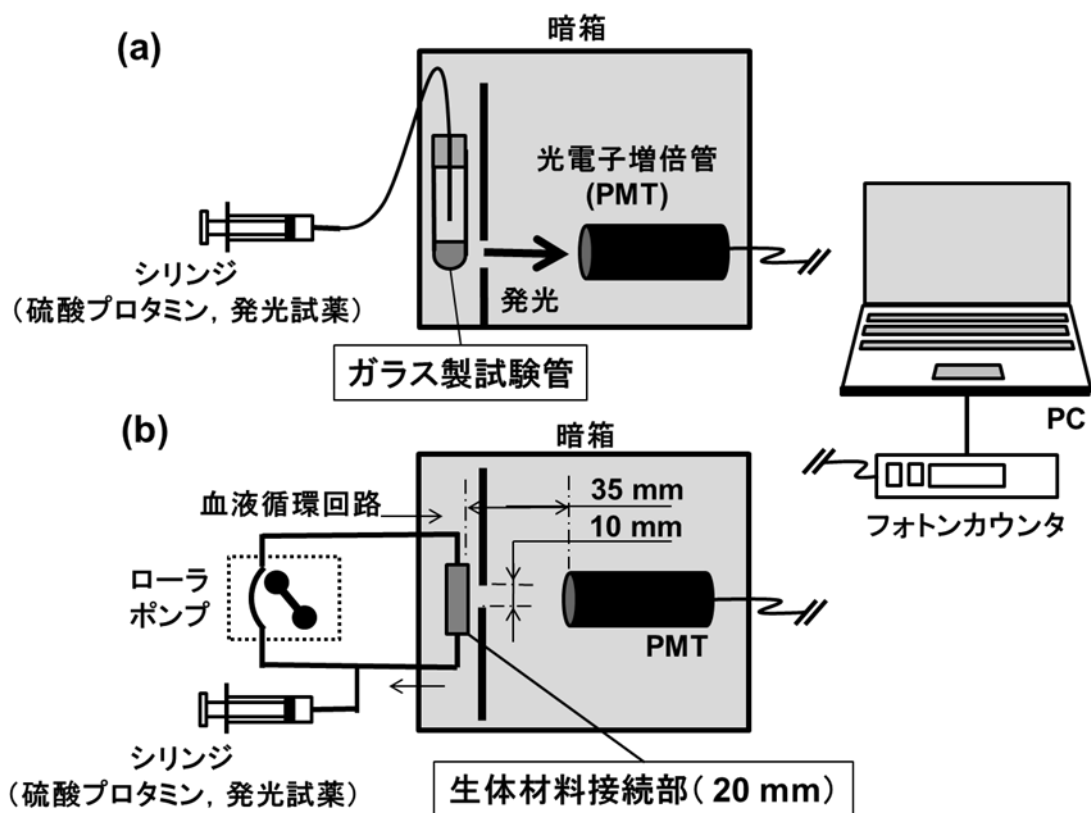


図 5-4 実験装置の概略図

(a) ガラス製試験管内からの発光を検出する

(b) 循環血液からの発光を検出する

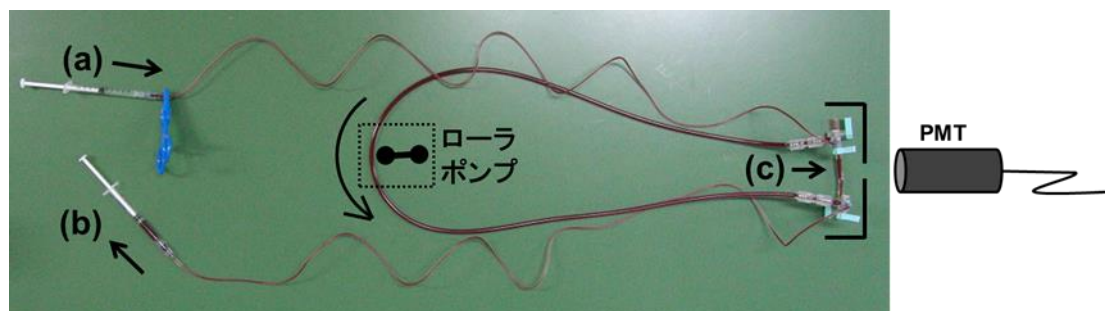


図 5-5 血液循環回路

回路長 115 mm, 充填液量 13 mL

### 3.2 ダークカウントの測定

本実験装置は、遮光箱に収納し遮光カーテンで覆うことで、蛍光灯下におけるダークカウントは、最大 5 counts/s 以下 (平均 0.8 counts/s) である (図 5-6)。

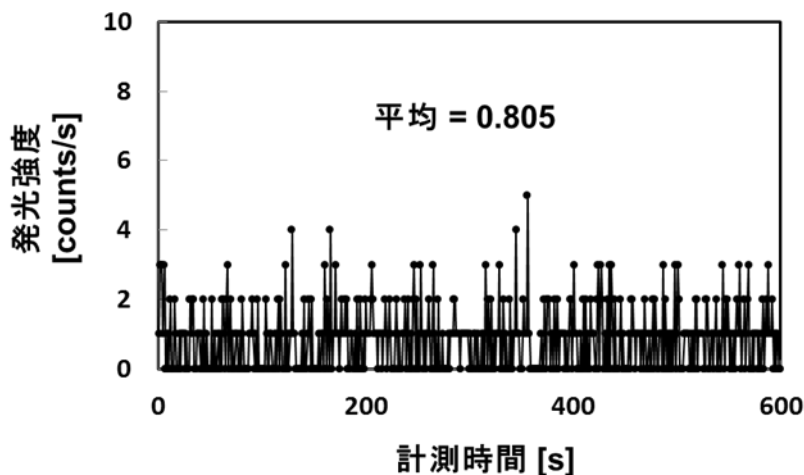


図 5-6 実験装置の遮光性 (ダークカウントの測定)

## 4. 微弱発光の検出感度

### 4.1 供試材料と実験方法

L-L 発光試薬は、Lucifer-250 (60311, キッコーマン) および Lucifer-HS (60315, キッコーマン) を使用した。Lucifer-HS は、ルシフェールの約 20 倍の発光強度が得られるように調整されている高感度タイプである (試薬の添付文書参照)。2 種類の発光試薬は同一の Luciferase が使用されており、いずれも発光時のピーク波長は 560 nm 付近を示す。Lucifer-250 は、試験管内 (図 5-4a) からの発光検出のために使用した。循環回路 (図 5-4b) においては、循環する血液の一部 (10 mm のホール前方を流れる血液) からの発光を検出する。そのため、Lucifer-250 よりも強い発光を得ることができる Lucifer-HS を使用した。

血小板凝集を定量化するためには、ATP 濃度に応じた微弱発光を高感度で検出する必要がある。そこで、本実験装置の ATP 検出感度試験を行った。ATP 標準試薬 (60260, キッコーマン) を用いて、2 種類の発光試薬の ATP 濃度に対する発光強度を測定した。図 5-4a の試験管内に、 $2 \times 10^{-11} \sim 2 \times 10^{-6}$  M に調製した ATP 標準試薬 200  $\mu$ L を充填し、発光試薬 100  $\mu$ L を投与した際の発光強度を測定した。ATP 濃度と発光強度の関係は、両対数グラフにプロットすることで直線関係が認められることが知られている。

### 4.2 実験結果と考察

図 5-7 は、ATP 溶液に L-L 発光試薬を投与した後の発光を 30 秒毎に撮影したものである。L-L 発光試薬を投与すると、数秒で最大発光を示し、その後、ATP 消費に伴い発光強度が減衰する。この発光を図 5-4a の実験装置で検出すると、図 5-8 のような波形が得られる。0 秒の時点で、L-L 発光試薬を投与した。いずれの発光試薬も、ATP 溶液に投与すると同時に、発光強度が上昇し、数秒後に最大発光強度 ( $E_M$ ) を示した。発光強度はその後徐々に減衰する。Lucifer-HS は Lucifer-250 と比較して  $21 \pm 6.2$  (平均  $\pm$  標準偏差) 倍の  $E_M$  を示し、早期

に減衰した。これは、Lucifer-HS が高感度に ATP を検出できるように調整されており、一定時間に消費する ATP 量が多いためである。Lucifer-250 および Lucifer-HS の各 ATP 濃度に対する  $E_M$  値を両対数グラフ上にプロットすることで、直線関係が得られた(図 5-9)。本実験装置は、溶液中の ATP 濃度に比例した発光を高感度に検出可能であることを確認した。

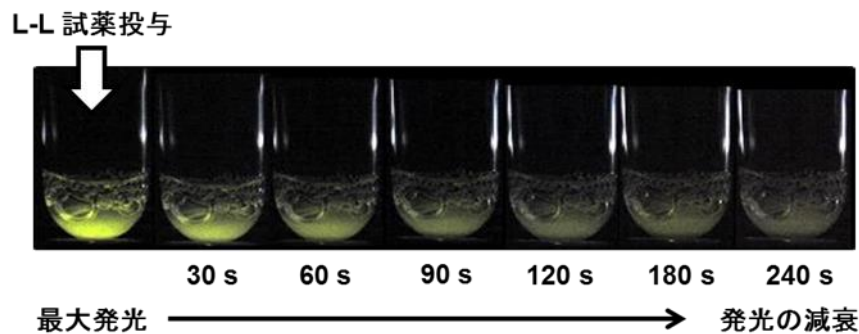


図 5-7 Luciferin-luciferase 反応による発光

ATP 溶液に Lucifer-HS を投与し、30 秒毎に発光の様子を撮影した。

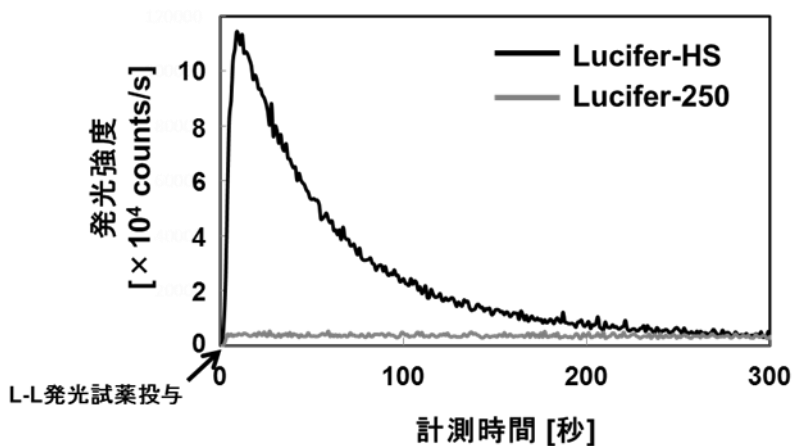


図 5-8

2 種類の発光試薬の代表的な経時的発光強度変化

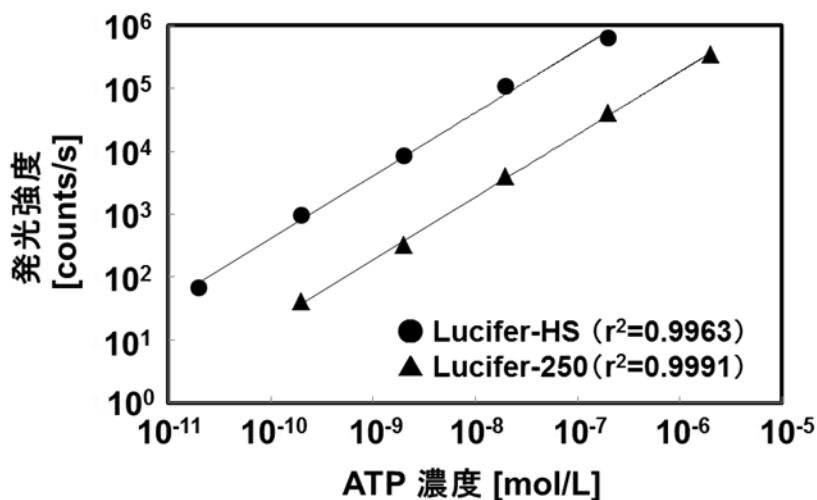


図 5-9

ATP 濃度と最大発光強度 ( $E_M$ ) の関係

## 5. 新鮮血の提供と抗凝固

血小板は、採血からの時間経過、温度変化によって凝集能が変化するため、正確な実験結果を得るためには、新鮮血を使用することが望ましい。そこで本研究では、実験直前に研究者から採血した血液を使用した。血液は、ヒト新鮮血(全血あるいは血漿)を使用した。抗凝固薬には、ヘパリン(ノボ・ヘパリン注、持田製薬)を使用した。ヘパリンは、人工心肺や人工透析治療の血液体外循環時に第一選択される抗凝固薬であり、本実験系の検証に適している。ヘパリンは、抗トロンビン作用によって凝固を阻害する。血小板に対しては粘着、凝集を抑制する。そして、硫酸プロタミンの投与によって速やかに中和される[60]。採血時に、血液 1 mL あたり 4 unit (4  $\mu$ L) のヘパリンを投与することで凝固を阻止した。図 5-4a の試験管内には 200  $\mu$ L のヘパリン加血を充填し、4  $\mu$ L の硫酸プロタミン(ノボ・硫酸プロタミン、持田製薬)および 100  $\mu$ L の発光試薬を投与した。図 5-4b では、循環回路に血液を充填した後、一定流量で循環させ、50  $\mu$ L のプロタミンおよび 500  $\mu$ L の発光試薬を投与することで、それぞれ凝固に伴う発光を誘起した。ヘパリンおよび硫酸プロタミンの濃度は、臨床で使用される用量[61]を参考に予備実験(付録 7)を行い、確実な抗凝固と迅速な中和ができる条件に決定した。実験は全て室温(25°C)下にて行った。

## 6. 血栓形成と発光強度変化の関係

### 6.1 供試材料と実験方法

#### (1) 試験管内血液の凝固と発光の検出

200  $\mu$ L の全血もしくは血小板濃度を調整した血漿を試験管内(図 5-4a)に充填した。4  $\mu$ L の硫酸プロタミンおよび 100  $\mu$ L の Lucifer-250 を投与し、血液の凝固を促すとともに発光強度を測定した。本実験で検出される発光が血小板凝集に基づく現象であることを検証するために、全血もしくは血漿を充填した試験管内に、Lucifer-250 のみを投与{硫酸プロタミン(-)}し、発光強度を測定した。

血小板濃度の調整は、以下の要領で行った。全血を 1000 rpm(190 $\times$ g)、5 分の条件で遠心分離し、その上澄みを多血小板血漿(platelet rich plasma:PRP)とした。PRP 採取後の血液を 3000 rpm(1750 $\times$ g)、10 分の条件で遠心分離し、その上澄みを乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma:PPP)とした。得られた PRP は、PPP と比較して白濁しており、血小板が濃縮されていることが分かる(図 5-10)。PRP と PPP の血小板数を算定し、両者を混合することで血漿中の血小板濃度を調製した。ここで、試験に使用した血液の赤血球や血小板濃度は、Burker-Turk 血球計算盤を用いた用手法によって算定した(算定方法の詳細を付録 8 に示す。)

全血および血小板濃度を調整した血漿の発光強度を比較し、血液成分の変化による血栓形成性を L-L の発光現象として検出した。試験管内における血栓形成は、血液と陰性荷電を有するガラス(試験管)表面との接触による、第 XII 因子の活性化(内因系凝固の開始)および、6.1 (2) で述べる停滞した血液の凝固活性によって惹起される。

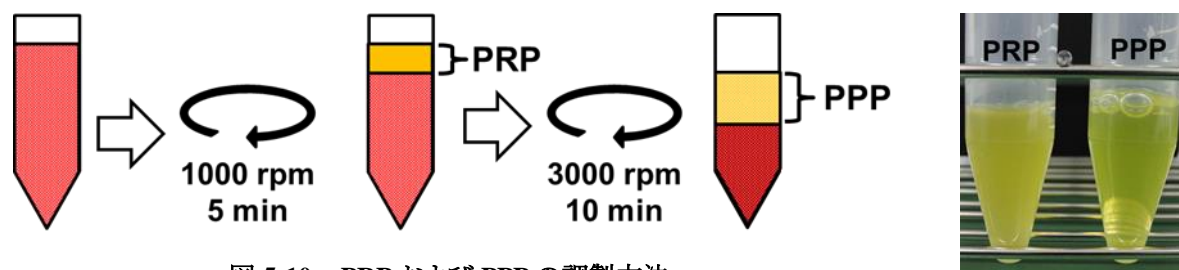


図 5-10 PRP および PPP の調製方法

PRP: platelet rich plasma, PPP: Platelet Poor Plasma

## (2) 循環血液の凝固と発光の検出

血管内を循環する血液は、流量異常やよどみなどによって血栓が形成されやすい状況になる。特に停滞した血液中の赤血球は、その膜上で第 IX 因子を活性化し、血栓形成のトリガーとなる。第 IX 因子の活性化は、トロンビンを生産し、血栓を形成する。トロンビンは血小板を活性化する作用をもち、更に凝固活性を促進させる。

N-PVC を用いて構成した循環回路(図 5-4b)に 13 mL の全血を充填し、一定流量で循環させた。50  $\mu$ L の硫酸プロタミンおよび 50  $\mu$ L の Lucifer-HS を投与し、血液の凝固を促すとともに発光強度を測定した。血流量は、20, 30, 50, 90 mL/min に設定した。試験後、回路内に形成された血栓は、生理食塩水で洗い流し、ろ紙上に回収した。回収した血栓は 40°C 下で一晩乾燥させ、その乾燥重量を測定した。

## (3) 生体材料の血栓形成性の検出

本実験系の抗血栓性評価法としての可能性を検証するために、未処理のブタ頸動脈および Glutaraldehyde (GA) で固定したブタ頸動脈を模擬人工血管とし、血栓形成試験をおこなった。ブタ頸動脈は、人工血管の材料として多くの研究に利用される生体由来材料である。ブタ頸動脈は、芝浦臓器から購入後、生理食塩水で洗浄した後に、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。使用時は、生理食塩水中、室温下で解凍した。GA による組織の固定は、 $4^{\circ}\text{C}$  下で 0.2% GA に 24 時間浸漬させて行った。ブタ頸動脈は、循環回路の M section(図 5-4b)に 20 mm の長さで接続した(接続のための余剰部を含めて、全長 50 mm の血管を使用した)(図 5-11)。ブタ頸動脈は、乾燥を防ぐために生理食塩水に浸漬させた状態で試験した。血流量は、50 mL/min に統一した。ここで、接続した材料の血栓形成性を評価するためには、M section 以外の回路の抗血栓性が評価対象よりも十分に優れている必要がある。そこで、M section 以外の循環回路には、HC-PVC を用いた。循環血液からの発光は、頸動脈を透過し、PMT に入力される。そのため、Lucifer-HS の発光波長に対するブタ頸動脈の透過率を予め求め、得られた発光強度の値を補正(測定値 / 材料の透過率)した。透過率は、既知濃度の ATP 標準試薬と Lucifer-HS を血管内で反応させ、透過光を PMT で測定することで求めた。比較のため、M section を含む循環回路全域を HC-PVC で構成した回路からの発光強度を測定した。

また、ブタ頸動脈の内腔を観察する為に、H&E 染色を行った。染色手順は、第二章 2.5(1)と同様である。

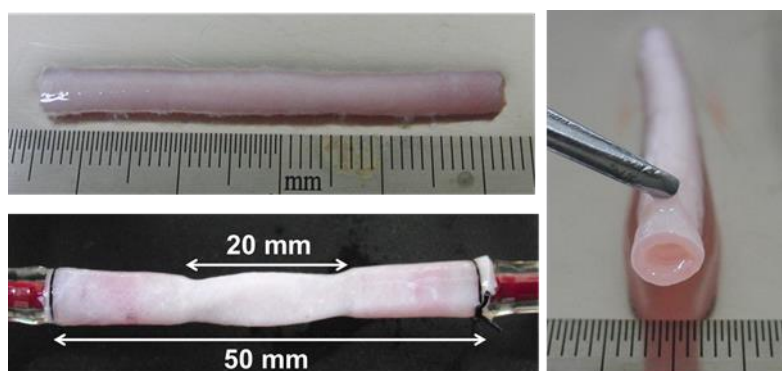


図 5-11 ブタ頸動脈の接続

## (4) 統計解析

ピアソンの相関係数を求め有意差を検定した。危険率 5%未満を有意差有として検定した。統計解析には、Microsoft Excel 2010 を使用した。



## 6.2 実験結果と考察

### (1) 試験管内血液の凝固と発光の検出

図 5-12a は、全血もしくは血漿を充填した試験管内に、試薬 (Lucifer-250 およびプロタミン) を投与した際の経時的な発光強度の変化を示す。試薬を投与した時間を 0 秒とした。ここで、全血の赤血球濃度は  $492 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 、血小板濃度は  $23 \times 10^4 / \mu\text{L}$  であった。血漿中に赤血球は含まれておらず、血小板濃度は  $28 \times 10^4 / \mu\text{L}$  であった。全血および血漿からの発光は、その強度が試薬の投与後に上昇し、 $E_M$  を示した後に減衰した。赤血球を含む全血は、血漿と比較して早期に強い  $E_M$  を示した。一方、Lucifer-250 のみを投与 {硫酸プロタミン(-)} した場合、発光強度の上昇は極僅かであった。また、硫酸プロタミンを投与した試験管においてのみ、全血を充填した場合には赤色血栓 (図 5-12b)、血漿を充填した場合には白色血栓 (図 5-12c) が形成されていた。つまり、発光強度の上昇は、硫酸プロタミン投与による凝固能の回復に起因すると考えられる。ここで、赤色血栓は、フィブリンと赤血球を主体とする血栓であり、白色血栓は、血小板を主体とする血栓である。

1995 年、Kawakami らは、停滞した血液中の赤血球が、その膜表面上で血液凝固因子の第 IX 因子を活性化し、赤血球を含まない血漿と比較して凝固時間が短縮されることを明らかにした [62]。本研究においては、赤血球を含む全血において早期に強い発光強度を検出し、この先行研究と一致する結果を得た。

図 5-13 において、血漿中の血小板濃度と  $E_M$  の関係は、有意な強い相関を認めた ( $r = 0.887$ ,  $p = 0.00001$ ,  $n = 15$ )。これは、血中の血小板凝集量に比例して  $E_M$  が上昇することを示している。

これらの結果から、本実験系は、経時的な血小板凝集の検出が可能であり、生体材料表面の血小板凝集性を定量化が可能であることを示している。

ここで、1984 年、林らは、血小板濃度と発光強度との関係は直線的な相関を示したと報告している。しかし、図 5-13 において、血小板濃度が  $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$  以下では、発光強度が低下する傾向がみられた。血小板は、血小板どうしの相互作用によって、より一層その活性化を促進させる。血小板濃度が低いと、この相互作用が働かず、発光強度が低下したのではないかと考えられる。

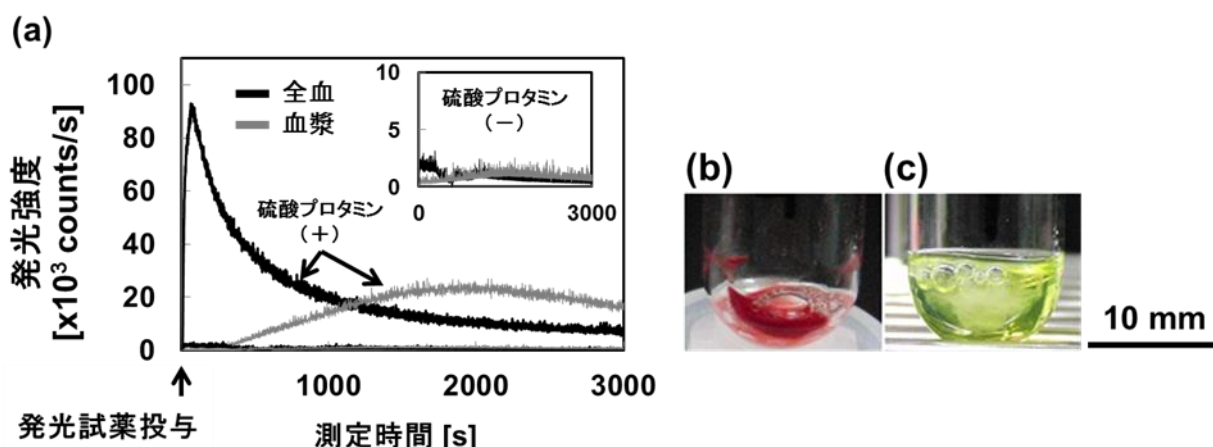
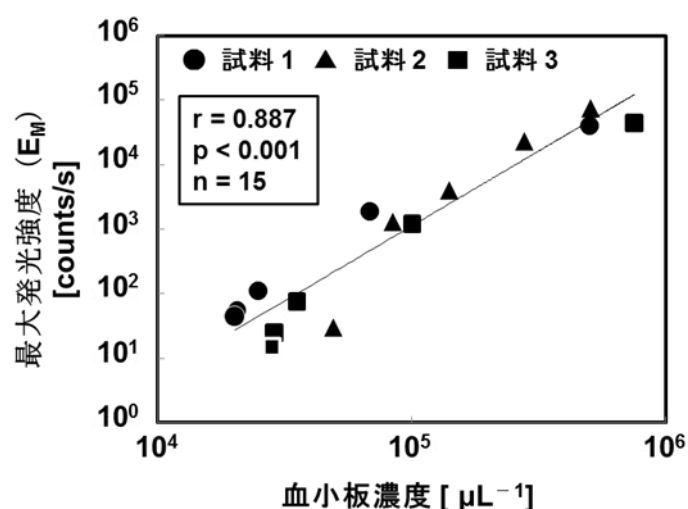


図 5-12 試験管内血液の凝固に伴う発光強度変化

(a) プロタミン投与の有無による全血および血漿からの発光強度 (b) 全血中に形成された赤色血栓 (c) 血漿中に形成された白色血栓

図 5-13 血小板濃度と最大発光強度( $E_M$ )の関係

血小板濃度と  $E_M$  は、有意な強い相関を認めた。

## (2) 血流の変化による血栓形成

図 5-14a は、同時期に採血した血液を用いて試験した場合の、血液流量 20, 30, 50, 90 mL/min における発光強度の経時変化を示している。発光強度は、試薬 (Lucifer-HS およびプロタミン) 投与直後に上昇し、その後徐々に減衰した。その後、 $668 \pm 124$  (平均  $\pm$  標準偏差) 秒後に再度上昇を始め、 $1,234 \pm 181$  (平均  $\pm$  標準偏差) 秒後に  $E_M$  を示した。血流量が低下するほど、 $E_M$  付近で特徴的な鋭い発光強度の上昇が検出された。ここで、 $E_M$  付近での発光強度が激しく増減したため、 $E_M$  値は移動平均値から求めた。また、試薬投与直後の発光強度の上昇は、血液に含まれる ATP と発光試薬の反応によるものと考えられる。発光強度が再上昇を示す点を  $T_L$  (Lag time) として、 $T_L$  から発光強度の最大値までの変移を  $E_M$  とした (図 5-14b)。

試験後に回路内を生理食塩水で洗い流したところ、全ての条件で目視できる血栓が形成されていた (図 5-15c)。血栓の乾燥重量および  $E_M$  は、血流量に対して有意な負相関を示した (図 5-15a, b)。そして、乾燥血栓重量と  $E_M$  は、有意な強い正相関を示した (図 5-15c)。

低流量による血液循環はよどみを生じ、一時的に血液が停滞することで血栓が形成されやすい状態になる。実験の結果、低流量下によって、より多くの血栓が形成され、同時に特徴的な発光強度の上昇を測定することができたと考えられる。

血栓は、様々な要因によって形成される。血小板凝集に伴う ATP 濃度の上昇が、最終的に形成される血栓量を反映することは自明ではない。そのため、全血の凝固に伴う発光強度の上昇と血栓形成との関係は、より詳細な検討が必要である。しかし、循環回路内に形成された血栓の乾燥重量と  $E_M$  の間には、有意な強い相関を認めた。この結果は、本実験系が、生体材料の抗血栓性評価に有用であることを示唆している。

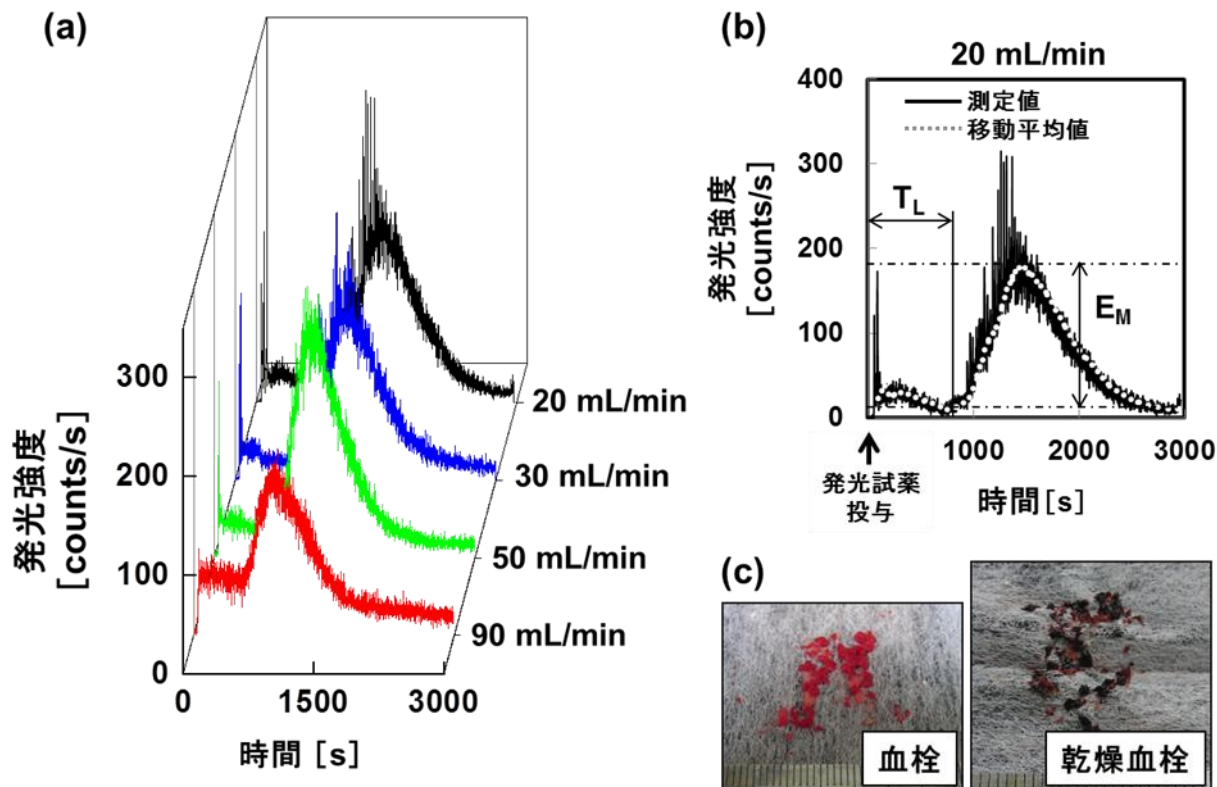


図 5-14 循環血流量と発光強度の変化  
 (a) 各血流量における代表的な発光強度変化 (b) 移動平均値による最大発光強度の定量  
 (c) 試験後に循環回路内から洗い流された血栓

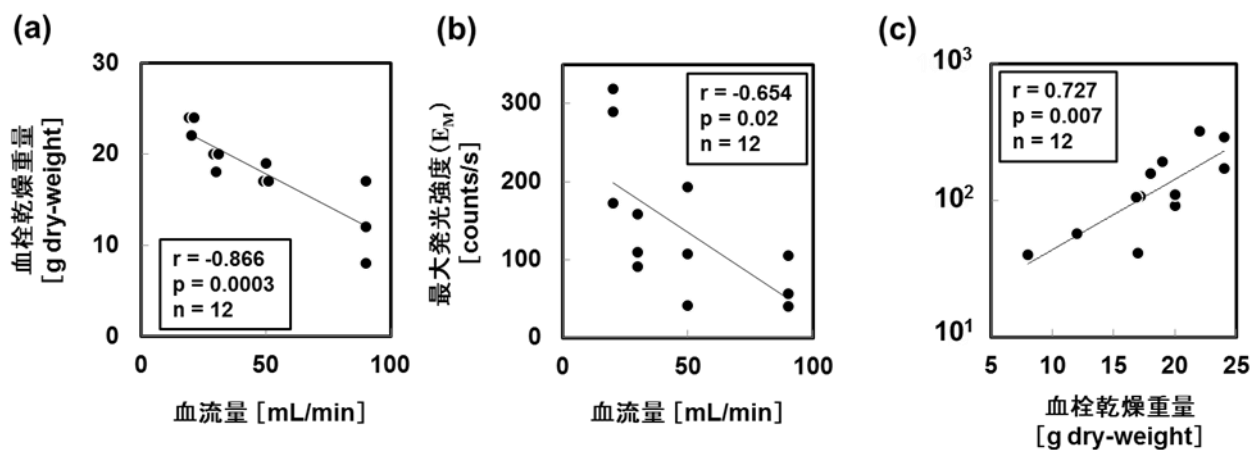


図 5-15 血栓乾燥重量と最大発光強度の関係

- (a) 血流量と乾燥血栓重量は有意な強い負相関を示す。  
 (b) 血流量と  $E_M$  は有意な負相関を示す。  
 (c) 乾燥血栓重量と  $E_M$  は有意な強い正相関を示す

### (3) 血液接触面の性状による血栓形成

循環試験による発光強度測定の結果, HC-PVC で構成した回路からは, 発光強度の上昇はみられなかった (図 5-16a). ブタ頸動脈を接続した回路からは, 発光強度の上昇を認めた (図 5-16b). 一方, GA で固定したブ

タ頸動脈を接続した回路からは、発光強度の上昇を認めなかった(図 5-16c). 図 5-16b, c は、ブタ頸動脈の透過率で補正した値である. HC-PVC の透過率を 1 とした場合、実験に使用したブタ頸動脈の透過率は、およそ 0.67 であった.

ここで、実験に使用したブタ頸動脈は、H&E 染色所見において、血管内皮細胞が一部脱落し、コラーゲン繊維が露出していた(図 5-16d). 試験後に回路内を生理食塩水で洗い流すと、未処理の頸動脈を接続した回路のみ、図 5-16b の写真のように、目視で確認できる大きさの血栓が形成されていた. コラーゲンは、血小板の凝集を誘起することが知られている. ここで形成された血栓は、コラーゲンによる血小板凝集に基づくものであると考えられる. GA で固定化されたコラーゲンは、血小板凝集能を失い、血小板の凝集は起こらない. 経時的な発光強度の変化は、これら生体材料の血小板凝集能を実時間で捉えることができたといえる.

また、本実験系は、血小板凝集に基づく血中 ATP 濃度の変化を実時間で検出するため、得られた発光強度は、血流によって生体材料表面から剥離した血栓量も反映すると考えられる. これは、動物実験の代替法として大きな利点である.

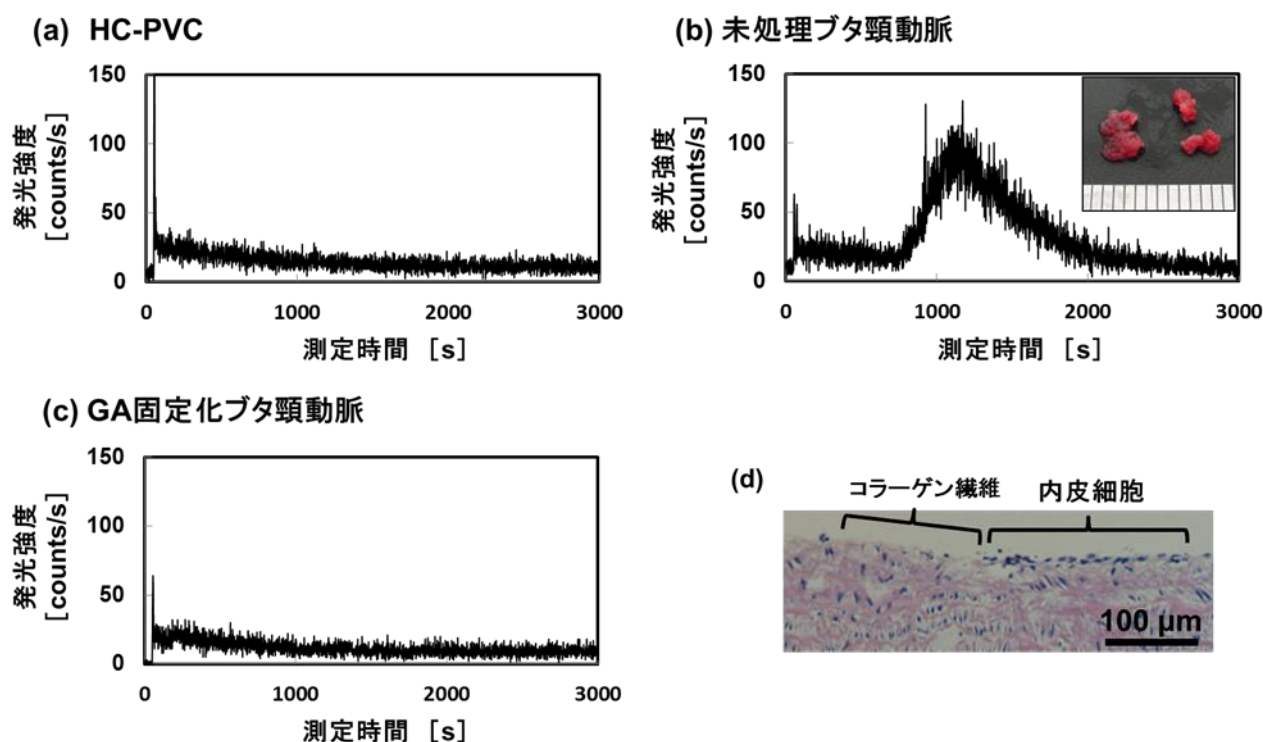


図 5-16 模擬人工血管の抗血栓性評価

(a) HC-PVC チューブを使用することで発光強度の上昇は起こらない. (b) ブタ頸動脈を接続すると発光強度が上昇する. (c) GA で固定したブタ頸動脈を接続しても発光強度は上昇しない. (d) ブタ頸動脈の内皮はコラーゲンが露出している.

## 7. 脱細胞化人工血管の抗血栓性評価

本項では、第二章から第四章にかけて検討を行った脱細胞化処理によって、人工血管を作製し、本章の血小板凝集に基づく L-L の発光検出によって、人工血管の抗血栓性評価を試みた.

## 7.1 供試材料と実験方法

人工血管の材料は、前章までと同様に、ブタ頸動脈を使用した。脱細胞化は、AHSを用いた血清処理法および SDS 処理法によって行った。脱細胞化組織と比較するため、0.2% GA 処理したブタ頸動脈の抗血栓性を評価した。抗血栓性評価は、図 5-4b の血液循環回路を用いて評価した。回路に充填する血液(全血)は、下記(1)に示す、脱細胞化組織作製のための AHS を提供した同一人物から採取した。

### (1) 血清処理法による人工血管の作製

血清は、ヒト血清を用いた。第一章に倣い、20% CO<sub>2</sub> および 20 mM Mg<sup>2+</sup> 付加の条件で、37°C 下、5 日間処理した。約 60 mm のブタ頸動脈を、1% 抗生剤を含む 10 mL の血清で処理した(図 5-17a)。

### (2) SDS 処理法による人工血管の作製

第三章 図 3-4 の処理工程に倣い、各工程 50 mL の処理液で、約 60 mm のブタ頸動脈を処理した(図 5-17b)。

### (3) 0.2% GA 固定

第四章 2.2.3 と同様に、0.2% GA (10 mL) を用いて、約 60 mm のブタ頸動脈を 4°C 下で 24 時間処理した(図 5-17c)。

上記(1)、(2)、(3)の処理後、生理食塩水中でブタ頸動脈の内腔に気泡を送り込み、血管分岐部の細孔の有無を確認した。細孔は、漏血を防ぐために、#5-0 ナイロン縫合糸で結紮した。各処理後の血管(図 5-17d-f)は、使用まで、0.1% 抗生剤を含む PBS に浸漬し、4°C 下で保存した。

また、上記(1)、(2)、(3)の処理によって作製した人工血管の一部を採取し、H&E 染色によって組織学的評価を行った。

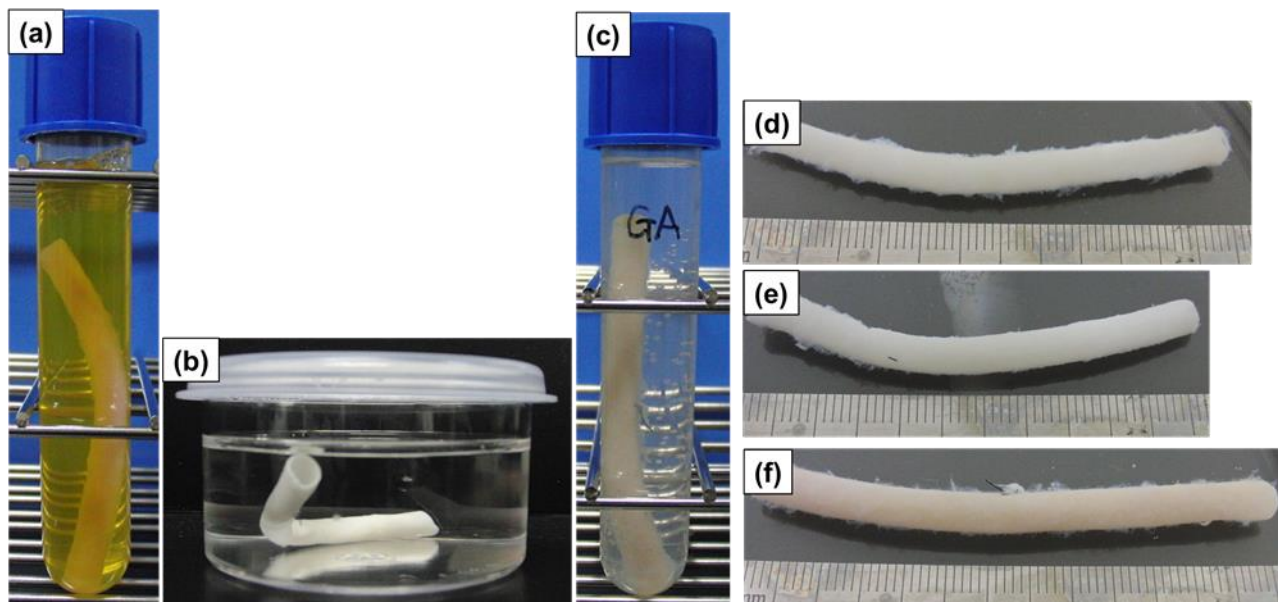


図 5-17 人工血管作製

(a) AHS 処理      (b) SDS 処理      (c) GA 処理  
(d) AHS 処理後    (e) SDS 処理後    (f) GA 処理後



抗血栓性評価は、図 5-4b の循環回路を用い、試験中は、人工血管を生理食塩水中に浸漬させた。6.1 (3) に倣い、循環回路チューブは HC-PVC を使用した。循環回路に上記 (1), (2), (3) で作製した人工血管を接続した。回路に血液 13 mL を充填し、50 mL/min の流量で循環させた。500 $\mu$ L の Lucifer-HS および 50  $\mu$ L の硫酸プロタミンを投与した。50 分 (3000 秒) 間の発光強度の変化を測定した。

## 7.2 実験結果と考察

### (1) 人工血管の組織学的評価

AHS, SDS および GA によって処理した人工血管の H&E 染色結果を図 5-18 に示す。AHS (a, d) および SDS (b, e) 処理後のブタ頸動脈は、細胞核が除去され、脱細胞化されているようにみえた。GA 処理後の組織は、ブタ由来の細胞が染色された (c, f)。

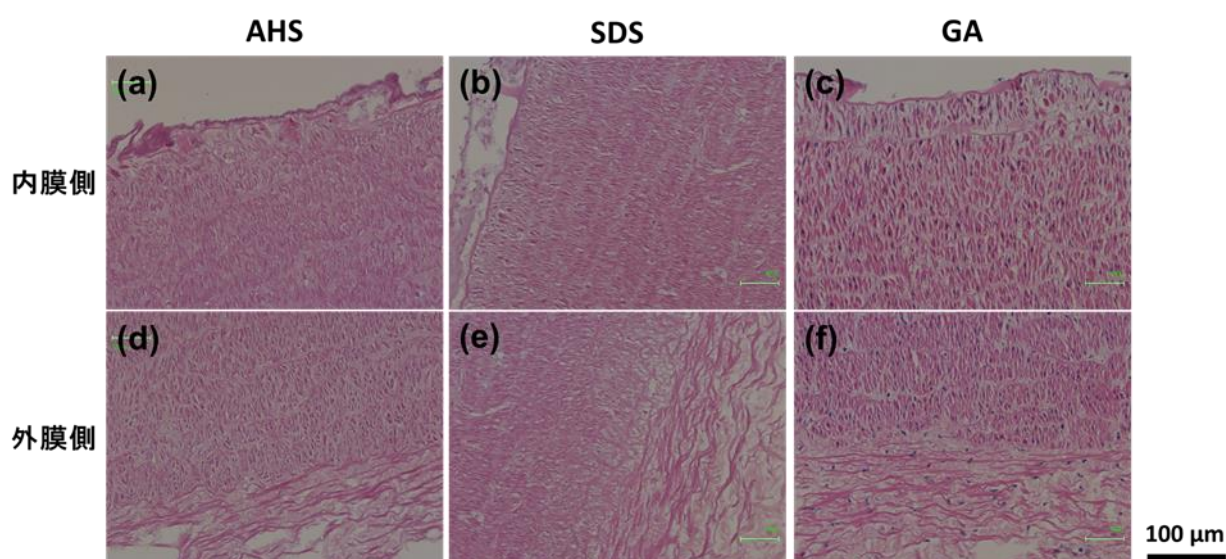


図 5-18 各種人工血管の組織学的評価

(a, d) AHS 処理後 (b, e) SDS 処理後 (c, f) GA 処理後

### (2) 人工血管の抗血栓性評価

図 5-19a は、図 5-16b (未処理血管の抗血栓性評価) の結果である。図 5-19b は、AHS 処理した人工血管、図 5-19c は、SDS 処理した人工血管、図 5-19d は、GA 処理した人工血管を、それぞれ循環回路に接続して発光強度を検出した結果である。各処理に使用したブタ頸動脈は、わずかに肉厚が異なる。また、各処理によって、血管が着色 (血清処理では淡黄色、GA 処理では黄褐色) されるため、図 5-19 の各発光強度の値は、6.2 (3) の検討に倣い、各サンプルの透過率による基線の補正を行っている。

図 5-19 において、AHS 処理した人工血管は、未処理血管 (a) と同様の発光強度の上昇がみられる。最大発光強度を示すまでの時間も、未処理組織と概ね一致する (b)。一方、SDS 処理および GA 処理した人工血管は、(a), (b) のような発光強度の上昇はみられない (c, d)。



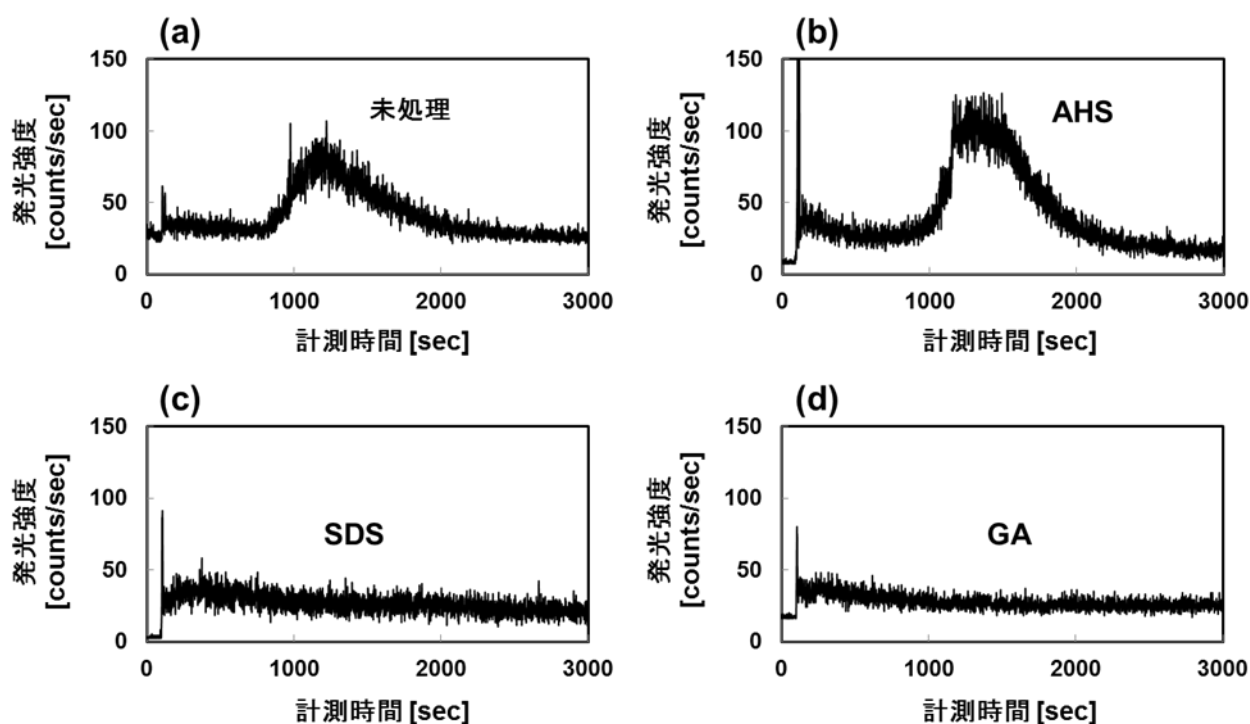


図 5-19 脱細胞化人工血管の抗血栓性評価

図 5-20 は、試験後の試験後の血管内腔(a-c)、循環回路(d-f)、および回路内血栓(g-i)を示す。血清処理した人工血管は、血管内腔に、直径 3 mm 程度の血栓塊が形成されていた(a)。この血栓は、血管内腔組織に強く接着されていた。循環回路の比較的血栓が形成されやすい三方活栓部分にも、多くの血栓を認めた(d)。試験後に、回路内を生理食塩水で洗い流したところ、回路内を循環する血栓は認めなかった(g)。SDS 処理および GA 処理した人工血管は、人工血管と回路との接続部の、血液が停滞しやすい個所に、赤みがかかった所見を認めるが、目視で確認できる程の血栓塊は形成されていない(b, c)。三方活栓部分の血栓も極わずかである(e, f)。回路内を循環する血栓も認めなかった(h, i)。

6.2(3)の結果は、ブタ頸動脈内腔に血栓が形成されていたが、それ以上に、試験後に、回路内を循環していた血栓が大量に洗い流された。血清処理した人工血管は、ブタ内皮細胞が除去されたことによって、ヒト血液がブタ由来のコラーゲンに接触し、このような大きな血栓塊が形成されたと考えられる。形成された血栓が、血管内皮に強く接着していたことも、同様の見解を得る。SDS 処理した脱細胞化組織は、第三章の実験結果から、繊維組織が伸長し、ECM 構造に変化を来した。SDS 処理による ECM への影響が、コラーゲンの血小板凝集能を失活させたと考えられる。脱細胞化組織作製においては、ECM 構造が温存される処理法が良いとされる。しかし、SDS 処理による組織の構造変化は、脱細胞化人工血管の抗血栓性を向上させた。GA 処理は、コラーゲン分子を架橋し、抗原性を失活させたことで、血小板凝集を抑制したと考えられる。

本章のいくつかの検討の結果、Luciferin の発光を利用した in vitro 抗血栓性評価法は、血小板凝集に基づく血栓形成を実時間で捉えることができ、人工臓器の抗血栓性を評価するために有効な試験方法であることが示された。しかし、本実験系によって評価した結果、血清処理法によって作製した脱細胞化組織は、強い血栓形

成性を示すことがわかった。脱細胞化人工血管の抗血栓性改善のための一つの手段として、2013年、山岡らは、内皮細胞接着性ペプチドを血管内皮に修飾することで抗血栓性を改善できることを報告している[63]。血清処理法は、人工血管作製への応用に際して、上記、山岡らの先行研究のように、抗血栓性向上のための処理を施す必要があることがわかった。

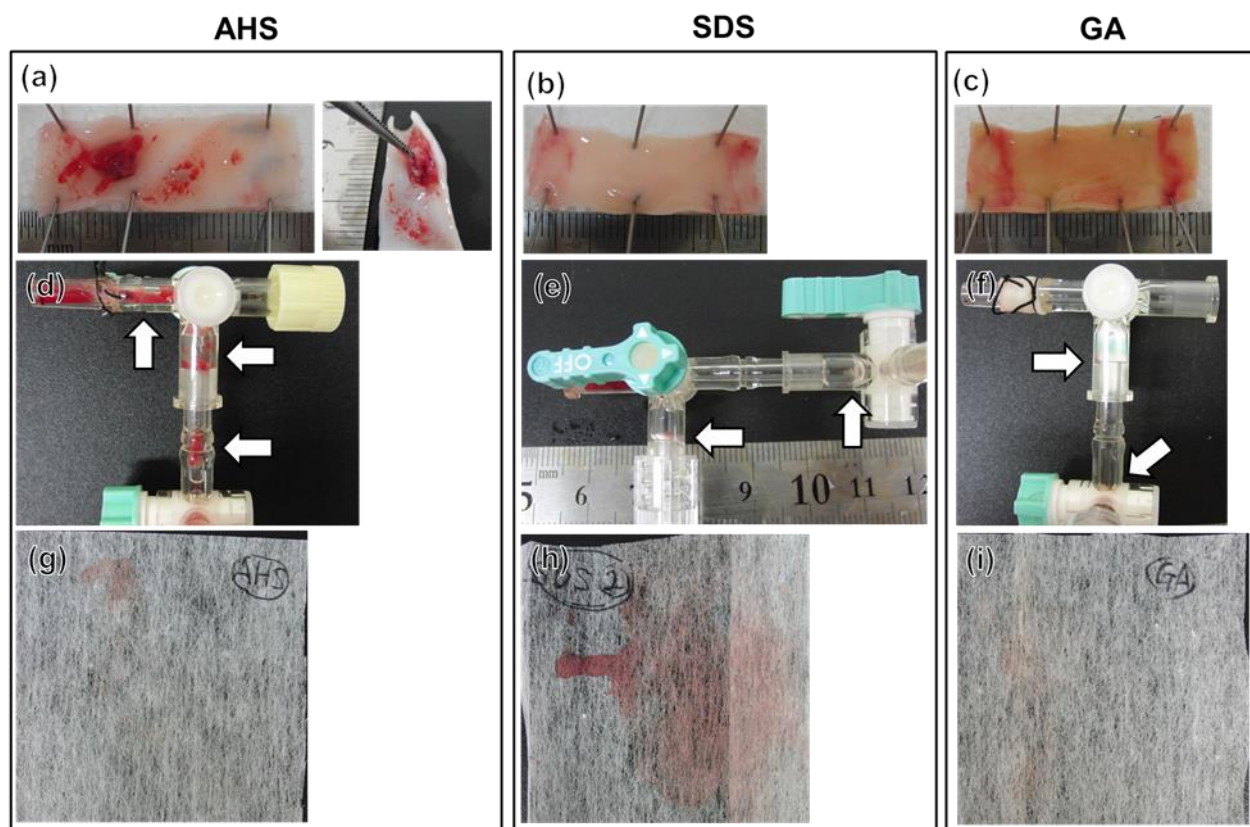


図 5-20 人工血管の抗血栓性評価

試験後の血管内腔(a-c) および循環回路(d-f)．試験後に洗い流した回路内血栓(g-i)

## 8. 要 約

本章では, L-L 反応を利用した, in vitro 抗血栓性評価法を開発し, 第二章で作製した血清処理法による脱細胞化組織の抗血栓性を評価した.

作製した実験装置は, 血小板凝集に基づく血栓形成を実時間で検出することができた. 血漿を充填した試験管内において, 血漿中の血小板濃度と発光強度は, 有意な強い正相関を示した. 全血を充填した模擬循環回路内において, 形成された血栓の乾燥重量と最大発光強度 ( $E_M$ ) は, 有意な強い正相関を示した. この結果は, 血小板凝集に伴う血中 ATP 濃度の変化が血栓形成量を反映することを示唆している.

本実験系を用い, 血清処理法で作製した脱細胞化組織の抗血栓性評価を試みた. 結果, 血栓形成性の問題点を浮き彫りにすることができた. 動物実験であれば, このような抗血栓性を, 移植後, 数日から数ヶ月かけて評価しなくてはならない. 生体材料表面における血小板凝集と血栓形成の関係, そして, 発光強度の経時的変化の解釈には, 更なる議論の余地が残されているが, 本章の研究成果は, 生体材料の抗血栓性評価への応用が期待でき, 動物実験の代替法としての有用性を示すことができたといえる.

## 第六章

### 総 括

本研究では、レシピエントから採取可能な成分である血清を用いて、脱細胞化組織の作製を試みた。ヒト血清は、脱細胞化処理条件を検討することで、異種組織から細胞成分を除去することができた。ラット血清も同様に脱細胞化能を有していることを確認した。

自家移植を模擬したラット皮下移植試験において、レシピエント血清で処理した脱細胞化組織は、SDS 処理法と比較して、免疫拒絶反応を軽減し、生体内で長期間安定することを示した。レシピエント血清を用いて作製した脱細胞化組織は、新たな人工臓器作製のための一つ的手段としての可能性が示された。

第五章では、血小板の二次凝集に伴い放出される ATP 濃度を Luciferin-luciferase 反応による発光現象を利用して定量し、血栓形成を *in vitro* において計測することを試みた。本実験系の有用性を検証するため、Virchow's triad に基づく血栓形成の検出を試みた。実験の結果、三要素に基づく血栓形成を特徴的な発光強度の変化として検出することができた。ポリ塩化ビニルチューブやブタ頸動脈を用いた血栓形成性試験では、異なる材料表面の抗血栓性によって、発光強度に変化がみられた。第二章および第三章で検討した、血清処理法および SDS 処理法によって作製した脱細胞化人工血管の抗血栓性評価試験に応用した結果、血清処理法で作製した脱細胞化組織の、血栓形成性に関する問題点を、発光強度の変化として捉えることができた。Luciferin を用いた *in vitro* 抗血栓性評価法は、生体材料の抗血栓性評価への高い有用性が示された。

血清を用いた脱細胞化は、石灰化の抑制や、抗血栓性の改善など、多くの解決すべき課題が浮き彫りになった。しかし、ラット皮下移植試験の結果において、レシピエント血清で処理した脱細胞化組織は、SDS 処理法と比較して、移植後の拒絶反応を抑制する効果を示した。今後、より一層の検討を行う必要があるが、本研究では、生体適合性に優れた人工臓器の開発において、一定の成果を上げることができたと考えられる。

## 付 録



## 付録 1. H&E 染色の手順

### 1. 供試材料

10%中性緩衝ホルマリン (062-01661, 和光純薬), 99.5%エタノール (054-00461, 和光純薬), キシレン (244-00081, 和光純薬), パラフィン (P3683, Sigma), ヘマトキシリン (8650, ティッシューテック), エオジン (8659, ティッシューテック), 封入剤 (1.07961.0100, Merck)

### 2. 手 順

#### 2.1. 切り出し

- ① 組織を乾燥させないように、2～3 mm 程度に薄く切る.

#### 2.2. 固 定

- ① 10%中性緩衝ホルマリンで 12～24 時間固定を行う.
- ② 染色性の向上のため, PBS に置換して, 残存するホルマリンを 1 時間以上洗浄する.

#### 2.3. 脱水と包埋

- ① 99.5%エタノールで脱水する (1 槽目 : 2 時間, 2 槽目 : 1 時間).
- ② キシレンでエタノールを置換する (1 槽目 : 1 時間, 2 槽目 : 1 時間).
- ③ パラフィンを浸透させる (1 槽目 : 2 時間, 2 槽目 : 1 時間, 63°C).
- ④ パラフィンブロックを作成する.

#### 2.4. 薄 切

- ① パラフィンブロックを適当な大きさに成形する.
- ② 30  $\mu\text{m}$  で切り出し, 組織面がでたら 4  $\mu\text{m}$  で切り出す.
- ③ 4  $\mu\text{m}$  の切片を 20%エタノールに数秒振盪させる.
- ④ 蒸留水 (45°C) で伸展させる.
- ⑤ 伸展台上 (45°C) で乾燥させる.

#### 2.5. 染 色

- ① 脱パラキシレン I (10 分)
- ② 脱パラキシレン II (10 分)
- ③ 脱パラ 99.5% エタノール (2 分)
- ④ 脱パラ 70% エタノール (2 分)
- ⑤ 流水 (2 分)
- ⑥ ヘマトキシリン (10 分)
- ⑦ 流水 (15 分)
- ⑧ エオジン (2 分)
- ⑨ 水洗 (10 秒)
- ⑩ エオジン封入用 70%エタノール (15 秒)
- ⑪ 99.5% エタノール (30 秒)
- ⑫ 封入用キシレン I (1 分)
- ⑬ 封入用キシレン II (2 分)
- ⑭ カバーガラスで封入する.

## 付録 2. DNA 定量の手順

### 1. 供試材料

DNA 定量キット (69504, QIAGEN), 分子生物学用 99.5%エタノール (054-07225, 和光純薬), 凍結乾燥機 (FDU-1200, EYELA), 電子天秤 (AUW120D, 島津製作所), 遠心分離機 (Himac CF15R, 日立), 分光光度計 (ultrospec3300pro, GE)

### 2. 手 順

#### 2.1 サンプルの準備

- ① ろ紙で余分な水分を除去する.
- ② 組織を 10~20 mg に調整する.

#### 2.2 凍結乾燥

- ① 液体窒素で前凍結する.
- ② 24 時間凍結乾燥する.

#### 2.3 乾燥重量の測定

- ① 乾燥組織を 1.5 mL マイクロチューブに入れ, ミンスする.
- ② マイクロチューブの重さを風袋重量として, 組織の乾燥重量を測定する.

#### 2.4 溶 解

- ① buffer ATL (180  $\mu$ L) を添加する.
- ② proteinase K (20 $\mu$ L) を添加する{ボルテックス (10 秒)}.
- ③ 56°C, 振盪し, インキュベート. 1~6 時間もしくは, オーバーナイト.

#### 2.5 スピнкаラムによる DNA 抽出

- ① 組織の溶解を確認し, インキュベート終了. ボルテックス (10 秒).
- ② buffer AL と 99.5%エタノールを各 200  $\mu$ L $\times$ サンプル数 = 400  $\mu$ L $\times$ サンプル数を分注し, 十分に混和する.
- ③ ①に②の調整液を 400  $\mu$ L 添加する. ボルテックス (10 秒).
- ④ ③の溶液をスピнкаラムに移す.
- ⑤ 遠心分離 (9,000 rpm, 60 秒, 25°C)
- ⑥ 濾液を捨て, buffer AW1 (500  $\mu$ L) を添加する.
- ⑦ 遠心分離 (9,000 rpm, 60 秒, 25°C)
- ⑧ 濾液を捨て, buffer AW2 (500  $\mu$ L) を添加する.
- ⑨ 遠心分離 (15,000 rpm, 5 分, 25°C)
- ⑩ 濾液を捨てる. DNA 抽出用のマイクロチューブをスピнкаラムに取り付ける.
- ⑪ スピнкаラムのメンブレン上に, 直接 buffer AE を添加する. インキュベート (室温, 1 分)
- ⑫ 遠心分離 (9,000 rpm, 60 秒, 25°C)  
(2 回目の溶出工程が必要な場合は, ⑪, ⑫を繰り返す.)
- ⑬ DNA 抽出用のマイクロチューブの重さを風袋重量として, DNA 抽出液の重量を測定する.

## 2.6 DNA 定量

- ① 分光光度計で吸光度（260 nm）を測定する.
- ② データ解析ソフト（Origin9.1, Origin Lab）を用いて 260 nm のピーク値を補正\*し, その値と 2.3 ② の乾燥重量から, 組織 1 mg 中に残存する DNA 量を定量する.

### \*Origin9.1 によるピーク値補正の一例

DNA 溶出に使用した緩衝液の吸光度で補正後, DNA の吸収による影響が及ばない 320 nm の吸光度を吸光度ゼロとして補正する. 320 nm から長波長側の基線の傾きを, Origin9.1 によって減算し補正する(図 7-1).

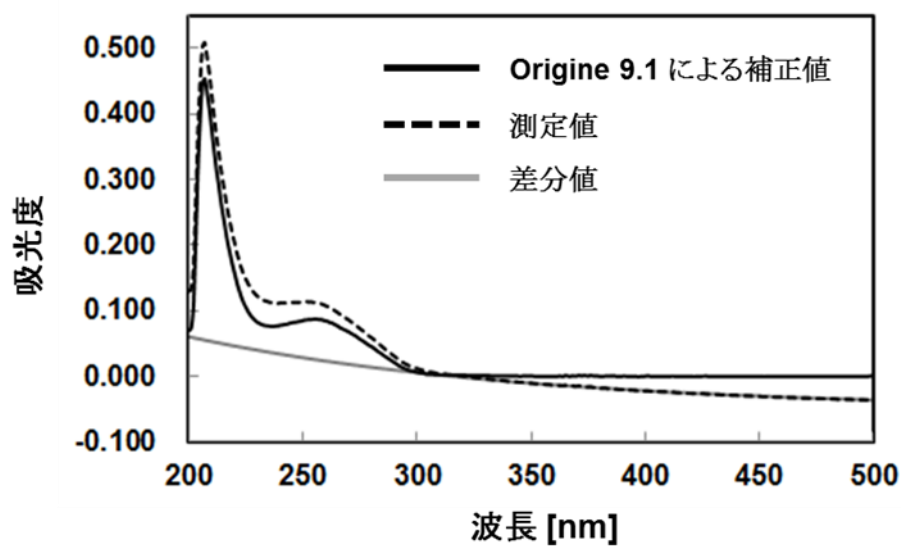


図 7-1 Origin9.1 による吸光度の補正

### 付録 3. 遠心分離機を用いた液状製品の濃縮方法

#### 1. 諸 言

液状食品の濃縮方法は、蒸発法、膜濃縮法、凍結濃縮法などが知られている。中でも凍結濃縮法は良品質な濃縮液を得られることから、ジュースや果汁エキスの濃縮など様々な液状食品の濃縮に利用されている。しかし、凍結濃縮法は設備コストが高い傾向にあり、普及が進まない要因の一つとなっている。また、既存のほとんどの濃縮設備は液状食品に濃縮システムの一部が直接接触するためメンテナンスや清掃には十分注意する必要がある、運用コストが高くなる。簡便な濃縮法として、凍結融解法が知られているが、融解に時間がかかるため生産性が低く、濃縮効率も比較的低いという欠点がある。

本研究では、血清を濃縮するが、そのための条件として、加熱などの血清成分に影響を与える操作は避けなければならない。また、生体材料の作製を目的にしているため、清潔操作で行う必要がある。そこで、凍結融解法の欠点を解決し簡便かつ清潔に濃縮液を抽出する方法として、遠心分離機を使用した濃縮法（凍結遠心濃縮法）を考案した。

#### 2. 濃縮原理

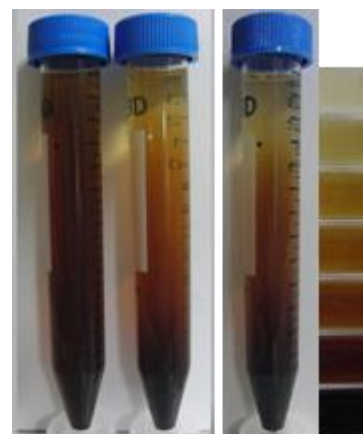
通常の凍結融解法では、凍らせた溶液を  $1\times g$  の重力下で解凍することによって、初期に解けだした濃縮液が、容器下部へ沈降する。この方法では、温度を上げて短時間に融解を行うと融解初期の濃度が低下してしまう欠点がある。一方、凍結遠心濃縮法では、 $1\times g$  以上の遠心力を容器に加えながら融解することで、室温程度の温度で短時間に融解を行った場合においても、融解初期に解けだした濃縮液が迅速に容器下部へ沈み、濃縮効率を上げることができる。

#### 3. 実 験

コーヒーを 15 ml の遠沈管に入れ、 $-25^{\circ}\text{C}$  で凍結した。解凍は遠心分離器 {MX-160, TOMY (TMA-27, アングルロータ)} を用いて室温下で解凍した。遠心分離器の回転数は 500 rpm (約  $160\times g$ )、3000 rpm (約  $5700\times g$ ) とした。

#### 4. 結 果

- ① 遠沈管の下部に濃縮液が溜まり、コーヒーが濃縮されていた。また、凍結を行わずに遠心分離したサンプルや従来の凍結融解法 ( $1\times g$ ) で濃縮したサンプルと比較して、濃縮効率が高いことを確認した。
- ② 遠心分離の回転数は 3000 rpm と 500 rpm とでは、濃縮効果に差はなかった (図 7-2)。血清などの機能分子を含む液体の濃縮は、高 G による負荷を軽減させるために、低回転での濃縮が望ましいと考えられる。また、融解温度、試験管の形状等の条件を変えることで、更に濃縮率を向上することも可能である。
- ③ 本法は簡便かつ清潔に液状製品を濃縮することが可能であり、本研究において、血清の濃縮に利用した。



(a) (b) (c)

図 7-2 凍結遠心濃縮効率

- (a) 静置 ( $1\times g$ )  
 (b) 500 rpm ( $160\times g$ )  
 (c) 3000 rpm ( $5700\times g$ )

#### 付録 4. 補体価 (CH<sub>50</sub>) の測定

##### 1. 供試材料

血清補体価 CH<sub>50</sub> 測定キット (ワンポイント CH<sub>50</sub>「生研」, 400024, デンカ生研), 氷浴槽, インキュベータ (Thermo minder SD mini, TAITEC), 遠心分離機 (LC-121, トミー精工), 分光光度計 (ultrospec3300pro, GE)

##### 2. 手 順

- ① マイクロピペットを用いて必要量の血清を付属の試験管 (緩衝液) へ入れ, 混和する.
  - ・ チップ外周の余分な血清は濾紙でふき取る.
  - ・ チップ内の血清を緩衝液で 3 回洗い流す.
- ② 付属の感作ヒツジ赤血球をよく混和する.
- ③ 感作ヒツジ血清を “一滴” (50  $\mu$ L) 試験管内へ滴下し, 混和する.
- ④ 37°C, 60 分間 インキュベートする. 赤血球が沈降しないように, 時折混和する.
- ⑤ 試験管を氷浴槽へ 5 分間入れ, 補体の反応を抑制する.
- ⑥ 20°C 下にて, 2,000 rpm, 10 分間遠心分離する.
- ⑦ 上澄み液の波長 541 nm の吸光度を測定する.
- ⑧ 付属の換算票から補体価を求める.

## 付録 5. pH が補体活性に与える影響

pH 低下による、補体活性の変化を検証するための簡易試験を行った。

### 1. 供試材料

生理食塩水（大塚生食注，大塚製薬），PBS {(pH 7.4,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  不含)，(D8537, Sigma)}，血清補体価  $CH_{50}$  測定キット（ワンポイント  $CH_{50}$  「生研」，デンカ生研），pH メータ {MP225, Mettler, InLab 410（ガラス電極）}，分光光度計（ultrospec 3300pro, GE）

### 2. 実験方法

- (1) pH メータで測定した，生理食塩水 (a) の pH は 6.75，PBS (b) の pH は 7.42 であった。
- (2) 図 7-3 の(a)，(b) 液を各試験管に 3 mL 入れる。
- (3) (a)，(b) の各試験管に，ヒト血清 10  $\mu$ L および感作ヒツジ赤血球 50  $\mu$ L を入れる。
- (4)  $CH_{50}$  測定キットの測定手順（図 7-3）に従い，赤血球を含まない上澄み液の吸光度によって溶血の程度を評価する。
- (5) ヘモグロビンは，416 nm，541 nm，576 nm に吸収極大を示す．3 点の吸光度の値から溶血度合いを評価した。

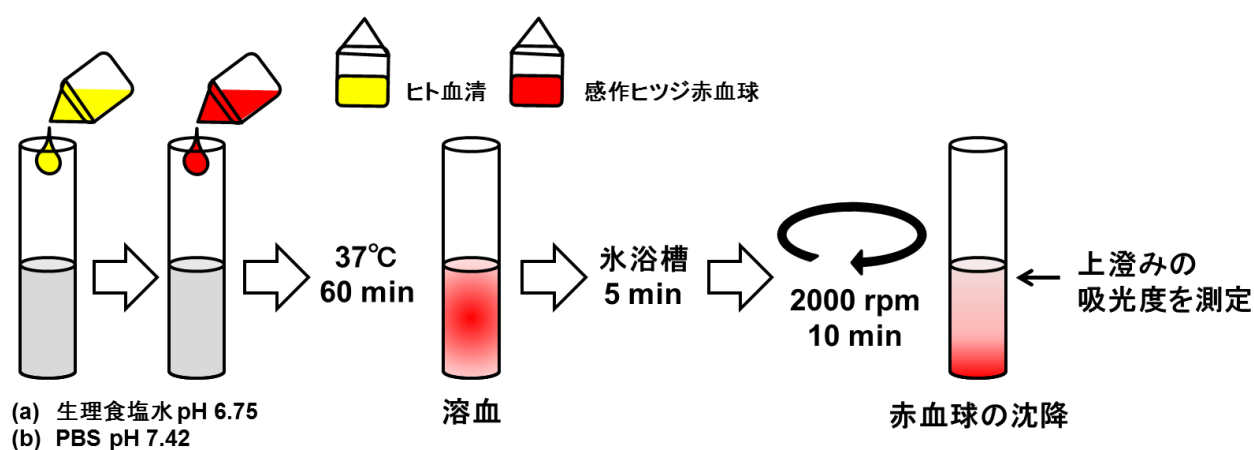


図 7-3 実験方法

### 3. 実験結果

- (1) 生理食塩水中の赤血球は，PBS 中の赤血球と比較して，強い溶血を示した（図 7-4a）。
- (2) ヘモグロビンの吸収極大である 3 点の吸光度は，いずれも生理食塩水中で反応させた方が高い値を示した（図 7-4b）。
- (3) アシドーシスにおける補体の活性化と一致する結果を得た。



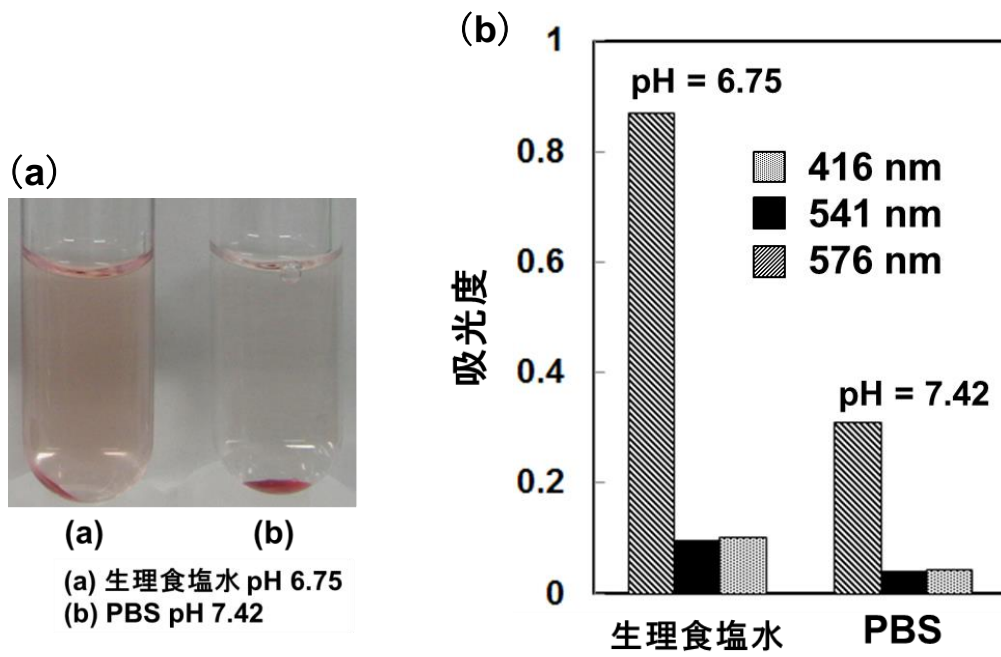


図 7-4 補体活性と溶血

## 付録 6. Von-kossa 染色の手順

### 1. 供試材料

5% 硝酸銀溶液 (28-1320-2-25G-J, sigma を用いて調製), チオ硫酸ナトリウム溶液 (28-4509-5-500G-J, sigma を用いて調製), ケルンエヒトロート液 (1.00121.0500, Merck), 100 W 白熱電球

### 2. 手 順

**2.1.** 固定から薄切までは, H&E 染色 (付録 3) と同様に行う.

#### 2.2. 染 色

- ① 脱パラキシレン I (10 分)
- ② 脱パラキシレン II (10 分)
- ③ 脱パラ 99.5% エタノール (2 分)
- ④ 脱パラ 70% エタノール (2 分)
- ⑤ 流水 (2 分)
- ⑥ 5% 硝酸銀溶液 (100 W 白熱電球光下で 2 時間)
- ⑦ 流水 (2 分)
- ⑧ チオ硫酸ナトリウム溶液 (3 分)
- ⑨ 流水 (5 分)
- ⑩ ケルンエヒトロート液 (5 分)
- ⑪ 流水 (5 分)
- ⑫ 70% エタノール (15 秒)
- ⑬ 99.5% エタノール (30 秒)
- ⑭ 封入用キシレン I (1 分)
- ⑮ 封入用キシレン II (2 分)
- ⑯ カバーガラスで封入する.

## 付録 7. ヘパリンと硫酸プロタミンの適正量の検証

### 1. 供試材料

ヘパリン（ノボ・ヘパリン，持田製薬），硫酸プロタミン（ノボ・硫酸プロタミン，持田製薬），ヒト血液，発光試薬 {Lucifer-250（60311，キッコーマン）}，ガラス試験管

### 2. 実験方法

血液体外循環時において，患者体重 1 kg あたり，2～3 mg (0.2～0.3 mL) のヘパリンが投与される．体重のおよそ 1/13 が血液量であるため，単純に計算すると，ヘパリン濃度は，血液 1 mL あたり，2.5～3.8  $\mu\text{L}$  となる．血液 1 mL あたり 4 unit (4  $\mu\text{L}$ ) のヘパリンを投与すれば十分な抗凝固作用が得られる．ヘパリンを中和するための，適切なプロタミン濃度は，通常，ヘパリン投与量の 1.5 倍程度とされている[61]．しかし，プロタミンは，過剰な投与によって抗凝固作用を示すことが知られているため，本実験装置内で，ヘパリンを中和できる最適なプロタミン濃度を検討する必要がある．200  $\mu\text{L}$  中に含まれるヘパリン量は，0.8  $\mu\text{L}$  であり，臨床上最適なプロタミン濃度は，その 1.5 倍の 1.6  $\mu\text{L}$  ということになる．この値を参考に，試験管内に充填した血液 200  $\mu\text{L}$  に，プロタミン 0, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{L}$  および発光試薬 100  $\mu\text{L}$  を加え，約 30 分間，静置した．試験管内に形成された血栓を確認することで，迅速にヘパリンが中和されるプロタミン濃度を検証した．実験は全て室温 (25°C) 下にて行った．

### 3. 実験結果

実験結果を図 7-7 に示す．0  $\mu\text{L}$  および 1  $\mu\text{L}$  のプロタミン濃度では，目視で確認できる血栓は形成されなかった．2  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$  および 8  $\mu\text{L}$  のプロタミン投与によって，血栓が形成された．プロタミン 4  $\mu\text{L}$  が最も大きな血栓が形成されていた．この予備試験の結果から，試験管内に投与するプロタミン量は，4  $\mu\text{L}$  とした．

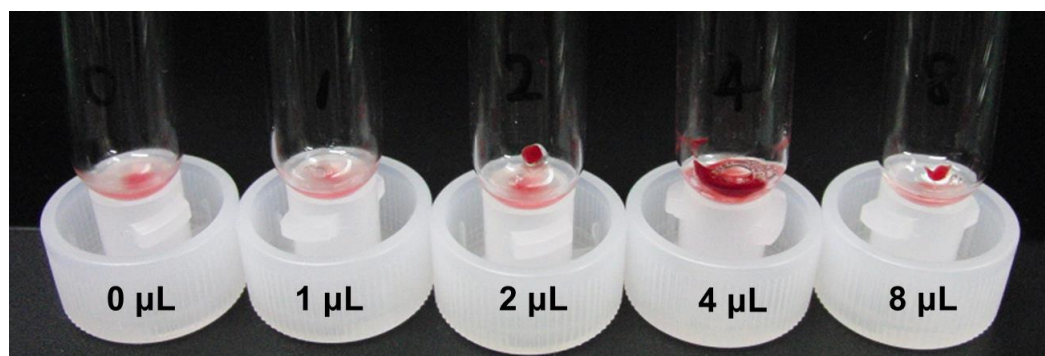


図 7-7 硫酸プロタミン投与量と血栓形成の大きさ

## 付録 8. 用手法による血球算定法

## 1. 供試材料

ハイエム氏液（13081，武藤化学），1% しゅう酸アンモニウム（86620，武藤化学）ビルケルチュルク血球計算板，顕微鏡（BX51，オリンパス）

## 2. 赤血球の算定

- (1) 1990  $\mu\text{L}$  のハイエム氏液に 10  $\mu\text{L}$  の全血を入れ，混和する（1/200 希釈）．
- (2) 顕微鏡下で，血球計算板の中央大区画（中区画 5 カ所）にみえる赤血球（図 7-5a，図 7-6a）を略式算定する．
- (3) 赤血球数 / 計算室容積  $\text{mm}^3$   $\{(1/5 \times 1/5 \text{ mm}^2 \times 5) \times \text{計算板の深さ (1/10 mm)}\} \times 200$ （希釈倍率）の式より，1  $\mu\text{L}$  あたりに含まれる赤血球数を算定した．

## 3. 血小板の算定

- (1) 990  $\mu\text{L}$  の 1% しゅう酸アンモニウムに 10  $\mu\text{L}$  の全血を入れ，混和する（1/100 希釈）．
- (2) 赤血球が溶血していることを確認し，顕微鏡下で，血球計算板の中央大区画（中区画 16 カ所）にみえる血小板（図 7-5b，図 7-6b）を算定する．
- (3) 血小板数 / 計算室容積  $\text{mm}^3$   $\{(1/5 \times 1/5 \text{ mm}^2 \times 16) \times \text{計算板の深さ (1/10 mm)}\} \times 100$ （希釈倍率）の式より，1  $\mu\text{L}$  あたりに含まれる血小板数を算定した．

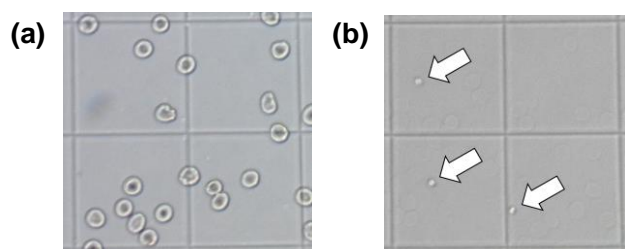


図 7-5 赤血球と血小板の算定(小区画×4カ所分)

(a) 赤血球 : 基準値 ♂ 400～520 万/ $\mu\text{L}$ , ♀ 350～490 万/ $\mu\text{L}$

(b) 血小板 : 基準値 11～38 万/ $\mu\text{L}$

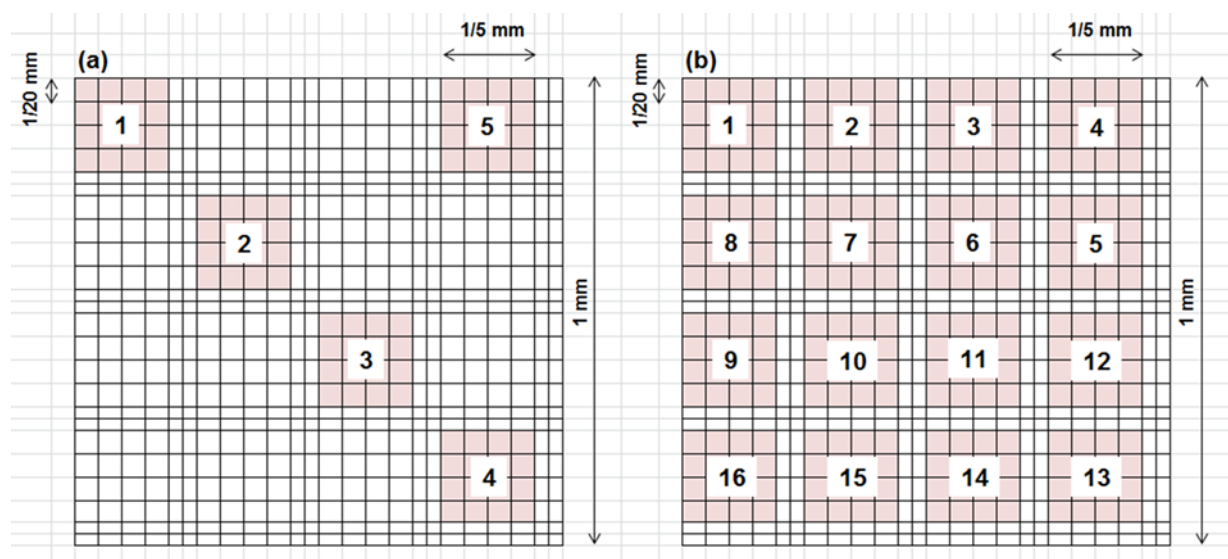


図 7-6 血球計数方法



## 参考文献

1. Shuji MIYAGAWA. Clinical xenotransplantation. *Japanese Journal of Clinical Immunology*. **30**(3), pp. 174-84. 2007.
2. Medtronic Inc. (米国). モザイク生体弁 (承認番号: 21100BZY00508000)の添付文書. 2009 年 10 月 15 日 改訂 (第 3 版).
3. 「厚生労働省」web ページ, [http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/zouki\\_ishoku/gaiyo\\_01.html](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/zouki_ishoku/gaiyo_01.html), 臓器移植の現状 (最終閲覧日: 2014 年 11 月 29 日).
4. 「(公社)日本臓器移植ネットワーク」web ページ, <http://www.jotnw.or.jp/index.html> (最終閲覧日: 2014 年 11 月 29 日).
5. 筏義人. 生体材料学 (基礎生体工学講座). 産業図書, 東京. ISBN: 4-7828-8001-4. 280p. 1994.
6. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. **21**(22), pp. 2215-31. 2000.
7. Hoshiba T, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. **10**(12), pp. 1717-28. 2010.
8. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. **14**(2), pp. 213-21. 2008.
9. Toshia Fujisato, Kenji Minatoya, Sachiko Yamazaki, Yin Meng, Kazuo Niwaya, Akio Kishida, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura. Preparation and Recellularization of Tissue Engineered Bioscaffold for Heart Valve Replacement. In: *Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches*. Springer, Tokyo. pp. 83-94. 2005.
10. Williams C, Liao J, Joyce EM, Wang B, Leach JB, Sacks MS, Wong JY. Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries. *Acta Biomater*. **5**(4), 993-1005. 2009.
11. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. **32**(12), 3233-43. 2011.
12. Hrebikova H, Diaz D, Mokry J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. doi: 10.5507/bp.2013.076. 2013.
13. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, Gavrilov K, Yi T, Zhuang ZW, Breuer C, Herzog E, Niklason LE. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. **30**, pp. 538-41. 2010.
14. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(22), pp. 9214-9. 2011.
15. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. **31**(13), pp. 3590-5. 2010.
16. Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S, Kobayashi H, Kishida A, Mochizuki M. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis*. **15**, pp. 2022-8. 2009.



17. Neubauer D, Graham JB, Muir D. Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts. *Exp Neurol*. **207**(1), pp. 163-70. 2007.
18. Liem PH, Morimoto N, Ito R, Kawai K, Suzuki S. Autologous skin reconstruction by combining epidermis and acellular dermal matrix tissue derived from the skin of giant congenital melanocytic nevi. *J Artif Organs*. **16**(3), pp. 332-42. 2013.
19. Gillies AR, Smith LR, Lieber RL, Varghese S. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes. *Tissue Eng Part C Methods*. **17**(4), pp. 383-9. 2011.
20. Norman Staines, Jonathan Brostoff, Keith James, 多田富雄 (監訳者). 免疫学への招待 (原書第2版). 株式会社南江堂, 東京. 163p. 1996.
21. 大井洋之, 木下タロウ, 松下操. 補体への招待. 株式会社メジカルビュー社, 東京. 231p. 2011.
22. 岸田晶夫, 藤里俊哉, 木村剛, 舩本誠一. 脱細胞処理液、脱細胞化組織化の調整方法、移植片、及び培養部材. 特開 2009-050297. 国立大学法人東京医科歯科大学. 2009.
23. 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. *人工臓器*(日本人工臓器学会). **37**(2), p.S.173. 2008.
24. 山岡哲二, 玉井克明, 馬原淳, 藤里俊哉. 補体活性を利用した脱細胞化法による再生型小口径人工血管の作成. *生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会講演論文集*(CD-ROM). **2010**, p. ROMBUNNO.2A2-2. 2010.
25. Imai Y, Nose Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials. *J Biomed Mater Res*. **6**(3), pp. 165-72. 1972.
26. Tamagawa M, Fukushima K, Hiramoto M. Prediction of thrombus formation in blood flow by CFD and its modeling. *Proc World Congress Med Physics Biomed Eng* 2006. **14**, pp. 3159-60. 2007.
27. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg*. **114**(2), pp. 275-85. 2012.
28. 浦野哲盟, 後藤信哉. 血栓形成と凝固・線溶. 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 231p. 2013.
29. 佐藤正喜, 柏原進, 田中秀典, 巽英介, 妙中義之, 高野久輝. 新しく開発したヘパリン化材料の抗血栓性評価. *人工臓器*. **28**(2), pp. 502-8. 1999.
30. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Methuen, London, p. 238. 1959.
31. 鍵山直子. 動物愛護管理法における 3 R 原則の明文化と実験動物の適正な飼養保管. *日本獣医師会雑誌*. **63**, pp. 395-8. 2010.
32. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery*. **126**(5), pp. 847-55. 1999.
33. Yin Z, Cheng C, Qin H, Nie C, He C, Zhao C. Hemocompatible polyethersulfone/polyurethane composite membrane for high-performance antifouling and antithrombotic dialyzer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. **103**(1), pp. 97-105. 2015.
34. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. **21**(22), 2215-31. 2000.
35. Sheridan WS, Duffy GP, Murphy BP. Optimum parameters for freeze-drying decellularized arterial scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. **19**(12), pp. 981-90. 2013.

36. Pellegata AF, Asnaghi MA, Stefani I, Maestroni A, Maestroni S, Dominioni T, Zonta S, Zerbini G, Mantero S. Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2013/918753. 2013.
37. Goodman SL, Simmons SR, Cooper SL, Albrecht RM. Preferential adsorption of plasma proteins onto apolar polyurethane microdomains. *J Colloid Interface Sci*. **139**(2), pp. 561–70. 1990.
38. Ishihara K, Oshida H, Endo Y, Ueda T, Watanabe A, Nakabayashi N. Hemocompatibility of human whole blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism. *J Biomed Mater Res*. **26**(12), pp. 1543–52. 1992.
39. Natarajan A, Zaman AG, Marshall SM. Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of antiplatelet agents. *Diab Vasc Dis Res*. **5**(2), pp. 138–44. 2008.
40. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*. **468**(7325), pp. 834–8. 2010.
41. Yamazaki H, Motomiya T, Watanabe C, Miyagawa N, Yahara Y, Okawa Y, Onozawa Y. Consumption of larger platelets with decrease in adenine nucleotide content in thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and postoperative state. *Thromb Res*. **18**(1–2), pp. 77–88. 1980.
42. 林雅敏, 斉藤幹, 尾崎喜一, 宮川昇, 有賀節子, 榊原千枝子, 田上憲次郎, 山崎博男. 血小板放出能と凝集能との関係 - Lumi-aggregometer による観察 -. *Blood & Vessel*. **15**, pp. 391–400. 1984.
43. Feinman RD, Lubowsky J, Charo I, Zabinski MP. The lumi-aggregometer. a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *J Lab Clin Med*. **90**(1), pp. 125–9. 1977.
44. 小林逸郎, 内山真一郎, 佐藤玲子, 長山隆, 丸山勝一. 虚血性脳血管障害における血小板 ATP 放出能と凝集能の亢進ならびに抗血小板剤の効果. *脳卒中*. **9**(1), pp. 91–5. 1987.
45. Liu X, Yan Y, Bao L, Chen B, Zhao Y, Qi R. Ginkgolide B inhibits platelet release by blocking Syk and p38 MAPK phosphorylation in thrombin-stimulated platelets. *Thromb Res*. **134**(5), pp. 1066–73. 2014.
46. International Organization for Standardization. ISO 20743, Determination of antibacterial activity of antibacterial finished products. <http://www.iso.org/iso/home.htm>. Accessed January 25, 2015.
47. 掛川竜馬, 藤里俊哉. 血小板凝集の測定を目的とした微弱発光の経時的計測装置の開発. 第 50 回日本生体医工学会大会プログラム・抄録集 (CD-ROM). 日本生体医工学会, 東京. 2011.
48. 掛川竜馬. 微弱発光現象を利用した血栓形成の検出に関する研究. 大阪工業大学 修士論文. 2012.
49. Kakegawa R, Fujisato T. Detection of platelet activation in blood tubing line by observing ultra-weak luminescence. *Proc 4th Int Confer Biomed Eng*. **40**, pp. 153–6. 2013.
50. 火元博, 小川忠人. 凍結融解による血清の濃縮. 低温科学研究所, 低温科学. 生物篇=Low temperature science. Ser. B, Biological science. **11**, pp. 47–60. 1954.
51. Akira Matsuda, Kenji Kawasaki, Hirohumi Kadota. Freeze Concentration with Supersonic Radiation under Constant Freezing Rate -Effect of Kind and Concentration of Solutes-. *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*. **32**(5), pp. 569–72. 1999.
52. 小谷幸敏, 山本宗幸. 濃縮液抽出方法. 特許第 4081514 号. 地方独立行政法人鳥取県産業技術センター. 2008.
53. 小谷幸敏, 山本宗幸. 簡易で効率的な凍結融解濃縮法. 特許第 4482697 号. 地方独立行政法人鳥取県産業技術センター. 2010.
54. Sonntag J, Emeis M, Strauss E, Obladen M. In vitro activation of complement and contact

- system by lactic acidosis. *Mediators Inflamm.* **7**(1), pp. 49-51. 1998.
55. Emeis M, Sonntag J, Willam C, Strauss E, Walka MM, Obladen M. Acidosis activates complement system in vitro. *Mediators Inflamm.* **7**(6), 417-20. 1998.
56. Campbell VW, Jackson DA. The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. *J Biol Chem.* **255**(8), 3726-35. 1980.
57. 榑原俊介, 橋川和信, 石田泰久, 寺師浩人, 田原真也. 高張電解質溶液による生体組織の脱細胞化処理方法. 特開 2010-221012. 国立大学法人神戸大学. 2010.
58. 澤田和也, 寺田堂彦, 藤里俊哉. 繊維と線維 (生体線維の洗浄と再生医療への展開) . 繊維学会誌. **63**(5), pp. 120-24. 2007.
59. Nagano J, Shino K, Maeda A, Nakata K, Horibe S. The remodelling process of allogeneic and autogenous patellar tendon grafts in rats: a radiochemical study. *Arch Orthop Trauma Surg.* **115**(1), 10-6. 1996.
60. Majerus PW, Broze GJ Jr, Miletich JP, Tollefsen DM. Anticoagulant, thrombolytic, and antiplatelet drugs. In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 8th ed. Pergamon Press, New York. pp. 1313-17. 1990.
61. 草川實. 体外循環の実際. 株式会社南江堂, 東京, pp.90-1. 1991.
62. Kawakami S, Kaibara M, Kawamoto Y, Yamanaka K. Rheological approach to the analysis of blood coagulation in endothelial cell-coated tubes: activation of the intrinsic reaction on the erythrocyte surface. *Biorheology.* **32**(5), pp. 521-36. 1995.
63. 山岡哲二. 人工血管—脱細胞組織をベースにした再生型小口径血管—. 人工臓器(日本人工臓器学会). 巻: 42, 号: 3, pp.184-187. 2013.

## 研究業績

### 学会発表

1. 石野直明, 姜貞勲, 馬原淳, 藤里俊哉, 山岡哲二. 小口径血管の超高压脱細胞処理における処理条件の最適化. 第 60 回 高分子学会 年次大会 (5. 2011).
2. 石野直明, 姜貞勲, 馬原淳, 山岡哲二, 藤里俊哉. 小口径血管に対する超高压脱細胞処理条件の最適化. 第 40 回 医用高分子シンポジウム (7. 2011).
3. 石野直明, 藤里俊哉. レシピエント自己血清を用いた脱細胞化組織の作製. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (11. 2012).
4. 石野直明, 藤里俊哉. ヒト血清を用いた脱細胞化組織の作製. 第 12 回日本再生医療学会総会 (3. 2013).
5. 石野直明, 藤里俊哉. レシピエント血清を用いた脱細胞化組織の作製. 第 13 回日本再生医療学会総会 (3. 2014).
6. 石野直明, 掛川竜馬, 藤里俊哉. ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光現象を利用した生体材料の抗血栓性評価. 生体医工学シンポジウム 2014 (9. 2014).
7. Naoaki Ishino, Ryoma Kakegawa, Toshia Fujisato. IN VITRO ANTI-THROMBOTIC EVALUATION OF BIOMATERIALS BY USING THE ATP-LUMINESCENCE METHOD. Internationa workshop on biomedical engineering at Osaka Institute of Technology (11. 2014).
8. 石野直明, 藤里俊哉. ATP 測定法を用いた生体材料の in vitro 抗血栓性評価. 日本動物実験代替法学会大会 (12. 2014).
9. 石野直明, 藤里俊哉. 血清を用いた脱細胞処理条件の検討と生体適合性評価. 第 12 回日本再生医療学会総会 (3. 2015).

### 学術論文 (副論文)

1. Ishino N, Fujisato T. Decellularization of porcine carotid by the recipient's serum and evaluation of its biocompatibility using a rat autograft model. Journal of Artificial Organs. **18**(2), 136-42. 2015.  
doi: 10.1007/s10047-015-0819-z
2. Ishino N, Kakegawa R, Fujisato T. Development of an Optical Method for Detecting Platelet Aggregation for In Vitro Antithrombogenicity Evaluation of Biomaterials. Advanced Biomedical Engineering. Accepted on June 26, 2015.



## 謝 辞

研究の遂行ならびに本論文の執筆において、懇切なるご指導と助言を賜りました、大阪工業大学 大学院 工学研究科 藤里俊哉 教授に心より感謝いたします。本論文をご精読頂き、適切な助言を賜りました、同大学 松村潔 教授、川原幸一 教授に深謝致します。

第五章の抗血栓性評価法に関する研究成果は、大阪工業大学の卒業生である、掛川竜馬氏の在学中の研究成果を発展させた結果であり、研究を遂行するにあたり、掛川氏からは、技術的なご指導を賜りました。その他、同大学 バイオマテリアル研究室の皆様方には、多くの助言を賜りました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

社会人として大阪工業大学での学位取得にご理解を下さった、佐藤俊輔 先生、研究を遂行するにあたり、適切な助言を賜りました、藍野大学 医療保健学部 臨床工学科 教員の皆様方、同大学 再生医療研究所 井出千束 教授、同研究所 教員の皆様方に深謝致します。

2015 年 8 月 31 日

石野直明



2014年 12月 1日

大阪工業大学長

井上正崇 殿

氏 名 石野 直明



## 論 文 目 録

### 主 論 文

題 目 臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究

1 篇 1 冊

### 副 論 文

1. Naoaki Ishino, Toshia Fujisato: Decellularization of porcine carotid by the recipient's serum and evaluation of its biocompatibility using a rat autograft model, Journal of Artificial Organs, Volume 18, Issue 2, pp 136-142, Springer Japan, June 2015.

2. Naoaki Ishino, Ryoma Kakegawa, Toshia Fujisato: Development of an Optical Method for Detecting Platelet Aggregation for In Vitro Antithrombogenicity Evaluation of Biomaterials, Advanced Biomedical Engineering, Japanese Society for Medical and Biological Engineering, accepted on June 26, 2015, to be published.

### 参 考 論 文

なし

# 博士論文の概要

( 2014年 12月 1日 提出)

## 論文題目

臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究

指導教員 藤里 俊哉 印

大学院 工学研究科  
博士後期課程 生体医工学 専攻

申請者氏名 石野 直明 印

大阪工業大学大学院

# 博士論文

( 2014年 12月 1日 提出)

## 論文題目

臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究

指導教員 藤里 俊哉 印

大学院 工学研究科  
博士後期課程 生体医工学 専攻

申請者氏名 石野 直明 印

大阪工業大学大学院

2014年 12月 1日

大阪工業大学長

井上正崇 殿

氏 名 石野 直明

㊟

## 論 文 目 録

### 主 論 文

題 目 臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究

1 篇 1 冊

### 副 論 文

1. Naoaki Ishino, Toshia Fujisato: Decellularization of porcine carotid by the recipient's serum and evaluation of its biocompatibility using a rat autograft model, Journal of Artificial Organs, Volume 18, Issue 2, pp 136-142, Springer Japan, June 2015.

2. Naoaki Ishino, Ryoma Kakegawa, Toshia Fujisato: Development of an Optical Method for Detecting Platelet Aggregation for In Vitro Antithrombogenicity Evaluation of Biomaterials, Advanced Biomedical Engineering, Japanese Society for Medical and Biological Engineering, accepted on June 26, 2015, to be published.

### 参 考 論 文

なし