

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390360  
 研究課題名（和文） 微生物クリアランスと汚染防止に着目した再生医工学技法による同種組織片の開発  
 研究課題名（英文） Tissue engineered allograft tissue to prevent contamination

研究代表者  
 本村 昇 (MOTOMURA NOBORU)  
 東京大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：40332580

研究成果の概要（和文）：凍結保存同種弁・血管を再生医療技術を用いて脱細胞化しこれの滅菌処理をガンマ線処理を用いて試みた。実験的に MRSA 懸濁液に対してガンマ線を 2kGy, 4kGy 照射させたところ細菌生存が未確認となった。臨床的に使用が簡便な X 線を用いたところ 100Gy という低線量でも計算通りの MRSA 滅菌効果が得られた。さらに 400Gy では計算上 16%にまで減少することが判明した。さらにこの線量においては培養平滑筋細胞増殖に悪影響を認めておらず、心臓弁・血管組織片に対して viability を損なうことなく滅菌処理することの可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Disinfection of cardiovascular tissues, like cardiac valve or vessels, by using radiation of gamma radiation was tried. Gamma radiation of 2kGy or 4kGy was applied to MRSA suspensions, resulting in no MRSA was detected. Then X-ray was used because X-ray is easier than gamma radiation in the usual hospitals. MRSA could be reduced with 100 Gy of X-ray, and MRSA could be reduced in 16% by 400 Gy of X-radiation. At 400 Gy X-radiation, growth of cultured smooth muscle cells was not deteriorated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科学、移植・再生医療、細胞・組織、微生物、放射線、外科

## 1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科領域において組織移植片（ホモグラフト）は感染性心内膜炎や人工弁感染といった致死的な感染性疾患において優れた成績を修めている<sup>1</sup>。本

邦においても臨床応用がわずかずつではあるが拡大し、2006年1月からは厚生労働省先進医療として認可され、正式な医用材料の一つとして認知されつつある。この組織移植片は凍結保存される

ため細胞レベルで半永久的に viable な状態で保存可能でありこの点で人工材料とは一線を画し、また viable であるという点において抗感染性を発揮する原因であろうといわれている。しかしながら組織の細胞が活着しているということは同時に、もしこの組織がコンタミネーションを来していた場合その感染物質も死滅することなく残存し、移植後にそのまま患者に感染することが予想される。凍結保存同種移植片を作成する際にコンタミネーションを回避することは最重要課題であり、そのために心臓弁・血管に関していえば遺体から摘出後 24～48 時間は抗生剤カクテル処理を加え滅菌化を施しコンタミネーション防止策と施行している。この抗生剤による滅菌化は本邦はもちろん海外の施設においても必須過程でありコンタミネーションをいかに防ぐかが組織バンクなどのホモグラフト作成施設の重要評価項目となっている<sup>2</sup>。様々な抗生剤カクテルによる滅菌処理がなされているが、細菌感染はゼロにはならず、特にウイルスによる感染は現状では絶滅不可能であると想定し厚生労働省ではウイルス感染が危惧される海外渡航者からの組織摘出を一部閉め出している<sup>3</sup>。このような現状がある一方で、コンタミネーションの危惧とは別の次元で再生医療の研究はめざましく進展し、弁膜症疾患治療においても脱細胞型代用弁の開発を中心に基礎的研究が盛んに行われている<sup>4</sup>。その代表的な目的は免疫反応・炎症反応を引き起こす原因となる細胞成分を取り除き弾性線維・膠原線維といった線維成分のみを残しこれを鋳型として利用するものである。この脱細胞代用組織を移植すると組織内部に患者細胞が侵入し自己組織化が獲得可能となる。一度自己化が獲得されると組織修復機転が働きその代用組織は自己組織として生涯にわたり障害を来すことなく機能することが期待される。しかしながら、ここでもコンタミネーションの危険性は凍結保存ホモグラフトと同様に存在する。細胞成分を除去したとしても残された鋳型部分に細菌やウイルスが残存すればいくら脱細胞技術がすばらしくともその存在意義は全く失われる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、微生物クリアランスと汚染防止に着目した再生医工学的技法による組織移植片の開発、特にガンマ線照射を取り入れた組織脱細胞技術の開発である。海外および本邦でも展開され

ている脱細胞心臓弁・血管組織開発を臨床使用が前提であると考えらるならば、現在既に先進医療まで獲得されている凍結保存ホモグラフトを利用することが現実的である。さらに、凍結保存ホモグラフトでコンタミネーションを来し discard せざるを得ないものに対しこの脱細胞処理を施して再利用するというのが臨床応用としての第一ステップとなるであろう。従って、現在進行している再生医療型脱細胞処理組織片開発がより現実的となるためには、効果的・効率的滅菌技術の導入が最重要課題といえるであろう。このような背景の下に、本研究では、現在世界中で研究されている脱細胞型組織片を作成する上でこのコンタミネーション予防、即ち、微生物クリアランスに最重点を置いた処理法を開発することを目的とする。この目的を遂行するための滅菌技術として我々はガンマ線照射に着目する。

## 3. 研究の方法

ガンマ線照射は現代の医用材料滅菌法の中でも確立された手法であり、滅菌効果と安全性が確立されている。これまで報告されている主な脱細胞処理法は detergent を用いるものであるが、これによる細菌やウイルス除去効果は医用材料滅菌法として確立されたものではない。一方でガンマ線滅菌法は医療現場の中で注射器や注射針などいわゆる清潔製品殆ど全ての滅菌法として全世界的に定着している。これを再生医療組織作成に導入することにより、効果的・安全にかつ効率的に微生物クリアランスが得られるものと期待される。一方、我々は脱細胞技術として detergent ではなく体内においても安全性が確立されているポリエチレングリコール(PEG)を用いる。これを組織に作用させることにより組織にもまた、移植後の体内においても極めて安全に脱細胞処理を施すことが可能となる。初年度はこの脱細胞処理法によりブタ心臓弁・大血管の脱細胞化が完成されることを示す。同時にこの脱細胞組織に対して現行で医療界一般で行われているガンマ線照射を行い、各組織の構造変化・力学的特性の変化を測定し、ガンマ線照射が脱細胞組織に及ぼす影響を観察する。標準となる照射量は

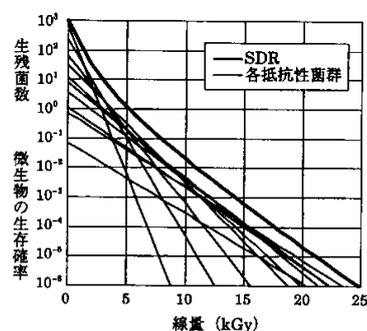


図 8.30 標準抵抗性分布 (SDR) と各抵抗性菌群の生残曲線の関係

図1より25kGyとする。その後ガンマ線照射のdose(照射量と照射時間)を変化させ組織変化を最小限とする最適照射条件を探索する。

「図1」

#### 4. 研究成果

ガンマ線による滅菌：〔概要と方法〕ガンマ線照射は照射設備を茨城県東海村に持つ日本照射サービス㈱に依頼することとし、輸送には冷蔵宅急便を用いた。発送から返送までは最短で7日間を要した。検体はMRSA懸濁液を用い、照射線量は2kGy、4kGyとした。これは施設の最低照射線量が1kGyであり2kGy以下では誤差も大きくなるためである。〔結果〕照射群・非照射群ともに想定以上に生存菌量が減少しており、照射群では全検体で細菌の生存が確認されなかった。原因として試験期間中の温度管理が不安定であることが考えられる。

X線による滅菌：〔概要と方法〕ガンマ線を使用する限り試験期間の短縮ができず温度管理も徹底できないことより、大学内で使用でき低線量を照射できるX線で組織の滅菌を試みることにし、試験期間は2日間に短縮された。検体は同じくMRSA懸濁液を用い、照射線量は10Gy、100Gyとした。〔結果〕生存菌数は予測される結果とほぼ同様に、100Gy照射で約6割に減少した。このことよりX線による低線量の照射でもほぼ計算通りの滅菌効率が得られることが確認された。

考察と今後の予定：S.aureusのD10値より400GyのX線照射では生存菌数が計算上は16%ほどに減少することが予測され、完全な滅菌は不可能なものの抗生剤処理と組み合わせることで抗生剤処理単独と比較して感染性が改善することが期待される。また、培養平滑筋細胞が400GyのX線照射で優位に減少しないことより、血管graftのViabilityも大きくは悪化しないことが期待された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計11件)

- ① Motomura N, Takamoto S, Miyata H, Tsukihara H, Okada M, Kiuchi T, Organization J.: The Risk Model of Thoracic Aortic Surgery in 4707 Cases from Single Race Nationwide Population, via Web-based Data Entry

System: a First Report of 30-day and Operative Outcome Risk Model on Thoracic Aortic Surgery. *Circulation.*, 118 (Suppl 1): S153-9, 2008 査読有

- ② Motomura N, Miyata H, Takamoto S, Okada M, Organization JCSD. Japan Adult Cardiovascular Surgery Database: First Report on 30-day and Operative Mortality Rates in Risk Models of Isolated CABG in Japanese. *Annals Thorac Surg.*, 86: 1866-72, 2008 査読有

- ③ Saito A, Motomura N, Kakimi K, Narui K, Noguchi N, Sasatsu M, Kubo K, Koezuka Y, Takai D, Ueha S, Takamoto S. Vascular Allografts are Resistant to Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Murine Model. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 136:159-67, 2008 査読有

- ④ Narui K, Noguchi N, Saito A, Kakimi K, Motomura N, Kubo K, Takamoto S, Sasatsu M. Anti-infectious activity of tryptophan metabolites in the L-tryptophan-L-kynurenine pathway. *Biol Pharm Bull* 32: 41-44, 2009 査読有

- ⑤ Miyata H, Motomura N, Ueda Y, Matsuda H, Takamoto S. Effect of Procedural Volume on Outcome of CABG Surgery in Japan: Implication toward minimal volume standards and public reporting. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 135: 1306-12, 2008 査読有

- ⑥ Ohno T, Takamoto S, Motomura N. Diabetic Retinopathy and Coronary Artery Disease. From the Cardiac Surgeon's Perspective. *Annals Thorac Surg.*, 85: 681-9, 2008 査読有

- ⑦ Miyata H, Motomura N, Kondo J, Fushimi K, Ishikawa B, Takamoto S. Toward quality improvement of cardiovascular surgery in Japan: An estimation of regionalization effects from a nationwide survey. *Health Policy*. 2008 査読有

- ⑧ Miyata H, Motomura N, Ueda Y, Tsukihara H, Tabayashi K, Takamoto S. Toward quality improvement of thoracic aortic surgery: estimating volume-outcome effect from national clinical database. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009 査読有

- ⑨ 本村昇、久保仁。ホモグラフトを用いた大動脈基部置換術と体外循環法

Clinical Engineering 18: 989-996, 2007  
査読無

- ⑩ 宮田裕章、本村昇、月原弘之、高本眞一。循環器疾患のリスク管理 心臓手術のリスク管理 呼吸と循環 56: 137-142, 2008 査読無
- ⑪ 本村昇。外科における先進医療と高度医療。3. 同種心臓弁・血管移植と先進医療。外科 71: 594-597, 2009 査読無

[学会発表] 国際学会のみ (計 4 件)

- ① Motomura N, Ono M, Yamauchi H, Masuzawa A, Karimov E, Ohtsubo A, Komiyama E, Takamoto S. Clinical results of valve and vascular allograft for cardiovascular diseases in the University of Tokyo. 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology Lake Louise, Canada July 29, 2007
- ② Motomura N, Ono M, Saito A, Yamauchi H, Masuzawa A, Karimov E, Ohtsubo A, Komiyama E, Takamoto S. Clinical results of valve and vascular allograft for cardiovascular diseases in the University of Tokyo. 15<sup>th</sup> Annual Meeting Asian Society for Cardiovascular Surgery. Beijing May 20, 2007
- ③ Motomura N, Saito A, Tamura S, et al. Trend in clinical application of cryopreserved heart valve and vascular allografts. American Association for Tissue Bank, Las Vegas, September 13, 2009
- ④ Motomura N, Saito A, Nawata K, Hisagi M, Kyo S, Ono M. Local delivery of antibiotics incorporated in fibrin glue. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of European Society for Cardiovascular Surgery, Izmir, Turkey, April 15, 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本村 昇 (MOTOMURA Noboru)  
東京大学・医学部附属病院  
研究者番号：40332580

(2) 研究分担者

村上 新 (MURAKAMI Arata)  
東京大学・医学部附属病院  
研究者番号：70190874

(3) 連携研究者

なし