

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業成果発表会

自治医大ピッグシンポジウム

—大型動物（ミニブタ）を用いた先進的医療技術実現化事業—

抄録集

平成24年6月11日

東京秋葉原コンベンションホール

共催 公益財団法人 東京財団

ご挨拶

自治医科大学 先端医療技術開発センター長 渡辺 英寿

本センターは2008年度の文部科学省の「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」により大動物専用飼育研究棟を軸として先端医療技術開発センター(CDAMTec : Center for Development of Advanced Medical Technology)として、2009年4月に開設されました。本センターは、学内の講座・研究部との共同研究や他大学や学外研究機関との共同研究のために施設提供と学内研究機関とのコーディネートにより有機的連帯を図り、実験用ミニブタを用いた先進的医療技術の研究開発や医学教育・研究の支援を行っています。更には2010年に設置されたヒト脳磁計を基軸に「レギュラトリー・センター」の中核として、「ブタからヒト」へと発展を目指しています。

本センターは実験ブタ専用の手術室、ヒト並みのICU機能、MRI, CT, X線C-アームを装備し、急性期から慢性期の実験ブタの管理のできる我が国でも有数の機能を誇っています。

この機能を活用し、実験用ブタを用いた医学生外科BSL、レジデント研修などの教育的活動とともに学内外の研究者の動物実験を幅広く支援しています。

また、本学ウイルス学部門の協力を得て、医学教育研究に使用する実験用ブタは、全てブタE型肝炎ウイルスフリーのブタを提供しているのも特徴です。

また、特筆すべきはアジアで唯一の米国外科学会救急処置トレーニングコースであるATOMの公式認定の動物実験施設となっており、日本における救急外傷トレーニング施設の中心的な役割を担っています。

本日は、このようなハイスペックのブタ専用実験設備の活用の実績をご報告する機会を設けました。どうかゆっくりとご検討頂き、皆様の奮ってのご活用を御願いたします。

参考までに次ページに本センターの概略と利用概要を掲載いたします。

参考資料

CDAMTec 設備概要：

建築面積：548.9m²、床面積 543.4m²（一階平屋建て）

①入退出管理：専用または登録済みの職員カードによる入退出管理システム、監視カメラシステム*清潔域入室：更衣室にて専用スクラブに着替えた後、エアシャワーにて塵埃を除去後に入室。

②手術室設備：HEPA フィルターユニット（処理風量 23.8 回/h、クリーン度：クラス 10000）、シーリングペンダント 5 台、可動式手術台（透視用スライド機構付）4 台、麻酔器 4 台、モニター 4 台、移動型アンギオ装置（AXION Artis U）、術野カメラシステム（フルスペックハイビジョン、220 万画素 1920×1080、限界解像度 1000 本、S/N56dB 高感度 20001x F8）、鏡視下手術システム（VISERA Pro システム）2 台 *ハイビジョン対応 CCD ビデオスコープ 硬性タイプ 1 本、先端フレキシブルタイプ 2 本、マイクロスコープ 2 台、超音波凝固切開装置（Autosonix）1 台、カラー超音波診断装置（ALOKA）、バイオハザード対策安全キャビネット 1 台

③大動物飼育室設備：飼育ゲージ 10 ゲージ、空調管理システム（処理風量 16.7 回/h）、床暖房、自動給水システム、自動照明時間切り替えシステム

④集中治療室設備：専用術後管理ゲージ 4 ゲージ、空調管理システム（処理風量 16.7 回/h）、自動照明時間切り替えシステム、テレモニターシステム（24 時間バイタル管理システム）

⑤MRI 装置：磁場強度 1.5T（MAGNETOM ESSENZA）（フルスペック、院内サーバスシステム I-PACS FS）（専任放射線技師による条件設定・撮影・情報管理）

⑥ヒト用脳磁計（MEG）

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

自治医大ピッグシンポジウム

—大型動物（ミニブタ）を用いた先進的医療技術実現化事業—

日時：平成24年6月11日（月）13:00～

場所：東京秋葉原コンベンションホール 5F 5B 会議室

共催：公益財団法人 東京財団

13:00-13:05 **開会の辞**： 高久 史麿 自治医科大学 名誉学長

13:05-13:10 **概要説明**： 小林 英司 自治医科大学 先端治療開発部門

13:10-14:10 **シンポジウム 第1部** 学内分担者発表

座長 渡辺 英寿 自治医科大学 先端医療技術開発センター長

ブタのiPS細胞 花園 豊（自治医科大学 再生医学研究）

E型肝炎ウイルスのブタ及びヒトへの感染予防に資する疫学的・基礎的研究

岡本 宏明（自治医科大学 ウイルス学）

Pigcenterにおける画像診断装置の運用体制

杉本 英治（自治医科大学 放射線医学）

低侵襲心臓手術技術習得

三澤 吉雄（自治医科大学 心臓血管外科学）

ミニブタを用いた脳機能のマップ作成

渡辺 英寿（自治医科大学 脳神経外科学）

難治性腰下肢痛に対する新たな低侵襲治療

五十嵐 孝（自治医科大学 麻酔科学部門）

自治医科大学における大型実験動物を用いた医療技術トレーニング

菱川 修司（自治医科大学トレーニング部門）

14:10-14:25 **休憩**

14:25-14:40 **シンポジウム 第2部** 学外分担者発表

マイクロミニピッグの保有するSLAハプロタイプと生物学的特徴

北川 均（岐阜大学）

豚肝切除モデルを用いた血小板増多による急性肝障害予防・再生促進効果に関する実験

大河内信弘（筑波大学）

滑膜間葉系幹細胞による低侵襲軟骨再生医療：ミニブタを用いた検討

関矢 一郎（東京医科歯科大学）

ミニブタを用いた脳の高次機能解析とヒト中枢神経メカニズム・病態解明への応用

齋藤 敏之（京都産業大学）

Yamaton K-2計画：完全ヒト化腎臓作製に向けて

長嶋比呂志（明治大学）

15:40-15:45 閉会の辞： 永井 良三 自治医科大学 学長

15:45-16:00 休憩

16:00-17:00 招待講演「自治医大ビッグセンターに期待する」

座長 西川 伸一 独立行政法人 理化学研究所

再生医療具現化に向けたブタ心臓への再生心筋移植モデルの確立

福田 恵一（慶應義塾大学）

重症心不全治療への挑戦—補助人工心臓、心臓移植そして再生医療—

澤 芳樹（大阪大学）

17:30-19:30 市民公開シンポジウム 「ブタは日本を救えるか？」

司会： 礒島 次郎 公益財団法人 東京財団

片平 清昭 福島県立医科大学 産学官連推進本部

笠井 憲雪 東北大学 附属動物実験施設

國田 智 自治医科大学 実験医学センター

同年4月先端医療技術開発センターとして、医療技術トレーニング部門、先端治療開発部門、脳機能研究部門を設置し、ミニブタを用いた先進的医療技術開発、さらに附属大学病院の医師の技術トレーニングや外部団体の医療技術支援を開始した。



さらに動物用MRI、CTとヒト用脳磁計を設置し、前臨床の段階からヒトの臨床治験と同等の評価ができるようレギュラトリー・サイアンスセンターとしてその充実が図られた。

CDAMTecフルオープン記念式(2009年7月14日)



現在、多くの学外研究機関にも開かれた大型実験動物施設として、実験専用ミニブタを用いて先進的医療技術の研究開発や医学教育・研究の質的向上を図っている。

資料 1：自治医科大学で使用される「実験専用ブタ」とは？

先端治療開発部門 小林英司

自治医大でこれまで使用されてきた実験用ブタは成熟時の体重により大きく 3 種類に分類される(下図)。

三元雑種とは、ヨークシャー、ランドレース等 3 種類の家畜豚をかけあわせ食用に作り上げられているもので、日本の食用豚肉はこれが出回っている。これらの豚の特徴は極めて成長が早いことである。3 カ月で約 30 kg 近くまでなり、6 カ月を過ぎると 100 kg を越え始める。食として確立しているので、後述する実験専用飼育されたブタに比し安い。現在、我が国で内視鏡手術等の技術トレーニングでは、この豚の 30 kg が使われているが、1 匹 2 - 3 万円前後である。食肉市場には雄は通常いない。男性ホルモンが肉質を固くして匂いも強くするので、生まれまもない雄豚は去勢される。実験動物の世界では医薬品はもともと性周期のある雌ではテストが性周期の時期によって影響を受けるので通常、雄を使う。この点で家畜豚では薬に開発が不向きである。また医療用機器の安全性は 6 カ月以上の長期観察が必要のところから、100 kg を越える豚の管理ができないので、「ブタを使った医薬・医療用機器開発」はこれらの家畜豚をベースにすることはできない。しかし、現実的には、日本のトレーニングラボでは、値段の安さからこの豚を使用されている。しかし、我々は「E 型肝炎」の問題があり、ピッグセンター内では通常使用していない(岡本ら)。家畜の豚は幼少期(3 - 4 カ月でトレーニングに使用されるころ)に E 型肝炎がはやる。豚ではめったに致死的に成らず、感染後抗体を持って大きくなり、肉として出荷される 6 カ月過ぎではウィルフリーとなる。しかし幼弱期の豚でトレーニング時にヒトが感染したと *Lancet* (2007) 誌にも報告されている。このようなブタの実験動物使用において感染対策は極めて重要であるが食肉管理とは異なる点での管理が必要である(北川ら)。しかし、我々の研究で、これら E 型肝炎の汚染家畜でも幼少期に隔離をしてその農場自体を E 型肝炎フリーにすることができることが明らかになった。

一方、成熟しても 100 kg を越えないのが、ミニブタとして分類される。当然のこと家畜豚のように大きくならないので肉がたくさん取れず食べるのに適する豚ではない。実験専用繁殖されること、出産が家畜(一回の分娩で 8 - 10 頭出産)の半分しか生まないこと、肥育に時間がかかることで生産コストが高い。現在、日本で実験専用ミニブタを安定供給しようとしている会社が数社あるが、1 頭 17 - 20 万円前後である。つまり体重を同等とした幼弱家畜の 10 倍する価格である。我々はこれら日本のミニブタを 4 - 5 種類使い分けそれぞれの特性生かし、卒前・卒後の外科手技トレーニング(菱川ら)、専門性の高い高度な手術技術(三澤・五十嵐ら)での有効性、さらに医薬(関

矢・大河内ら)、機器(山本ら)などの開発に使えることを報告してきた。特にヒトの治験で使用されるMRIやCTを設置して、ブタを用いた前臨床試験を行なう体制を取ってきた(杉本ら)。今後この「レギュラトリー・サイアンス」を展開するために、実験専用ブタでの画像診断撮影技術や得られた情報を体系化していく必要がある。ヒトとの対比情報収集のために脳機能のマッピングも行なっている(渡辺・斎藤ら)。また我々は家畜ブタとは異なり、遺伝子背景の明らかなミニブタが細胞治療の検証が必要な再生医療の検証系で適すると考え研究を進めている(花園ら)。さらに近年、マイクロミニという10kg前後の特殊な豚が日本で樹立された。注入細胞数がミニブタの四分の一で、培養液や培養シャーレが四分の一にできる。今後iPS等から誘導する細胞など極めて手間のかかる細胞に有効であるかの検証が必要である。

さらに遺伝子操作を行ないヒト疾患モデルブタやヒト幹細胞自体を受け入れるブタの作出を試みている(長嶋ら)。

我々は実験専用豚といってもその用途で使用する豚を分けることが重要である。動物実験の倫理からも「コスト&ベニフィット」が論じられるが、このような実験動物自身の特性を研究し、研究目的に最も適する実験用ブタを使用することが重要である。



10 kg

100 kg

抄録
学内分担者

ブタの iPS 細胞

再生医学研究部 花園 豊

マウスでは二種類の多能性幹細胞がある。ES 細胞とエピ幹細胞である。胚盤胞の内部細胞塊 (ICM) 由来の細胞が ES 細胞で、着床後のエピブラスト由来の細胞がエピ幹細胞である。ES 細胞もエピ幹細胞も三胚葉分化能をもち、免疫不全マウスに移植すれば奇形腫をつくる点は同じである。しかし、ES 細胞は、初期状態により近く、培養や遺伝子操作が容易で、キメラ動物を作製できる。一方、エピ幹細胞は、ES 細胞より少し分化が進んでいて、培養や遺伝子操作が容易ではなく、キメラを形成しない。ES 細胞の性質をナイーブ型、エピ幹細胞の性質をプライム型と呼ぶ。

ヒト ES 細胞の場合、マウス ES 細胞と同じく着床前の ICM 由来だから、本来、ナイーブ型になるはずである。ところが (ヒト ES 細胞のキメラ形成能は検証できないが、他の性質で見る限り)、ヒト ES 細胞はナイーブ型ではなく、どういうわけかエピ幹細胞のようなプライム型である。iPS 細胞の場合はどうか? マウス iPS 細胞はナイーブ型だが、ヒト iPS 細胞はプライム型である。マウス以外の動物 (サル、ブタ、ウサギなど) の iPS 細胞は、ヒトと同じようにプライム型になる。もし ES/iPS 細胞から遺伝子改変動物を作りたいなら、キメラ形成能をもつナイーブ型が必要である。マウス以外の動物でもナイーブ型の ES/iPS 細胞を作製できないであろうか? 我々は、初期状態により近く、扱いやすい、ナイーブ型の高品質 iPS 細胞の作製を試みてきた。本シンポジウムでは、ナイーブ型ブタ iPS 細胞の樹立を報告する。ブタを用いる研究の一助になればありがたい。

E型肝炎ウイルスのブタ及びヒトへの感染予防に資する疫学的・基礎的研究

ウイルス学部門 岡本 宏明

ウイルス学部門は、ピッグセンターでのミニブタを用いた研究を支援する立場で参画してきた。A型からE型までの5種類の肝炎ウイルスのなかで、E型肝炎ウイルス(HEV)は唯一、ヒトのみならず、ブタや野生イノシシ、シカなどの動物をも宿主としうるウイルスである。ミニブタは、HEVに感染している場合があり、感染したミニブタを実験に用いることで、術者が感染すると稀にE型劇症肝炎を発症し死亡することがある。

HEVの感染事故を未然に防ぐという視点から、搬入後のブタ及び搬入元(養豚場)ブタでのHEV感染検査を実施し、HEVフリーの状態を維持するためのサーベイを行うとともに、使用する実験用ブタの増加に伴い、供給養豚場の多元化にも協力してきた。実際に2箇所の供給養豚施設でのHEVフリー化に成功した。

ブタにおけるHEV感染を阻止し、効率的な清浄化に繋げるために、演者らが世界に先駆けて確立したHEVの感染培養系を駆使し、1) HEVの増殖機構の解明(特に、HEVが”non-enveloped” virusでありながら、enveloped virusと同様に、細胞膜成分に覆われて放出されるというユニークなHEV産生機構を明らかにし、それに重要な役割を演じているウイルス因子及び宿主因子を特定した)、2)ブタの糞便や血清、肝臓に含まれるHEVの感染性の証明(ヒト培養細胞であるPLC/PRF/5細胞やA549細胞に種の壁を越えて感染し、効率よく増殖しうることを明らかにした)、3)ワクチンの開発に向けたウイルス粒子の性状解析、量産方法及び不活化方法の検討、4)HEVに対する有効な抗ウイルス薬のスクリーニング等を行ってきた。5年間の本支援事業による研究によって、HEVのブタおよびヒトへの感染予防、並びにウイルス排除に資する成果が得られた。

Pigcenter における画像診断装置の運用体制

放射線医学 杉本 英治

Pig center における放射線医学部門の役割は、各部門の協力を得つつ、ブタでヒトと同等の画像診断を行うことで、そのために放射線診断装置を整備してきた。Pig center 開設前のシンポジウムにおいて、当施設の放射線装置として、動物実験用の放射線撮影装置ではなく、現在臨床に使われている装置を導入し、診療放射線技師が撮像、検査計画や読影は放射線科医がサポートするという構図を示した。今回は、開設後の放射線医学部門による研究者のサポート状況について、実運用で構築されたソフト面を中心に解説する。

Pig center での画像診断装置利用手順は、詳細なマニュアルにより研究者に公開されている。実験申し込み後、画像診断装置を利用する場合のプロセスは、画像撮影 ID の発行（ブタの個体管理と識別）、撮像手法・手順の事前打ち合わせ、利用・読影申し込み、という3段階で構成されている。

Pig center の検査予定は、学内受発信システム First class により全職員に公開されている。画像診断装置を利用した研究を計画する場合は、このシステムによりブタの購入、搬入計画をたてることができる。

Pig center では、画像診断装置を研究者の目的に合わせて稼働させるために、常時5〜6名の臨床放射線技師が撮影予定に合わせて、ローテーションを組んで撮影にあたっている。放射線科医は、研究目的に合致した撮像条件、造影剤の使用、画像診断部門の運用、画像の読影と解釈を、各研究者と協議して行っている。また、技師は単に撮影するだけでなく、放射線科医と協調して研究目的に合わせた撮影プロトコール決定にも参加している。このような体制により、Pig center を利用する研究者は、研究対象について常に安定した画像が取得できるようになっている。放射線部門は、撮像後の画像処理や PACS を介した画像配信にも対応しており、研究者の負担軽減に寄与している。

シンポジウムでは、研究の過程で得られた画像の一部を紹介しつつ、研究成果をブタから人へ translate するために、放射線部門の運用がどう行われているかを解説する。

低侵襲心臓手術技術習得

心臓血管外科学 三澤 吉雄

通常の開心術では胸骨上切痕から剣状突起までの胸骨正中切開により行われるが、本切開は十分な術野展開が可能などメリットも多いが、本切開に起因する出血量の増加・創部痛の遷延・術後縦隔炎の発生リスク増加などのデメリットもある。このデメリットを軽減する目的で、約 10cm の皮膚切開による右小開胸開心術(MICS)が行われている。MICS は従来型手術時と術野が異なり、使用する手術機器も異なるため、十分な準備が必要になる。2000 年前後に当施設を含めて全国において胸骨部分切開を含めた小切開開心術が行われたが、手術機器の未熟さや手技への不慣れ等から再開胸止血が必要になる症例・術中の心筋保護が不十分で術後心不全を来す症例などの合併症が出現し、小切開開心術は限定された一部の施設によって行われ、その間に MICS 用手術機器が開発されて来た。このような背景から我々は MICS 導入にあたり、看護師や臨床工学士などコメディカルを含めて、6 ヶ月にわたり MICS の先端的施設（榊原記念病院）見学やドライラボとしての機器使用や動物を用いたウェットラボ（於：本学ピッグセンターなど）でのシミュレーション、通常手術での MICS 用機器の使用など MICS 導入に向けて準備した。

当初の 2 例では榊原記念病院から指導医と臨床工学士を招聘して MICS を施行した。1 例目の僧帽弁形成術では、輸血を要したものの、その後の症例では合併症無く経過良好である。2011 年 4 月から MICS を導入し、2011 年には 8 例の僧帽弁手術と 1 例の心臓腫瘍切除を行った。今後は MICS 適応拡大の予定であるが、MICS ではは片肺換気が不可欠で、麻酔科医との連携が必須であるため、麻酔科医との意思疎通を図りながら適応の拡大に務めたい。

ミニブタを用いた脳機能のマップ作成

脳神経外科学 渡辺 英寿

サル代替動物としてのブタに注目が集まり、ヒトを念頭においた脳研究が進められている。

ミニブタの脳を前臨床研究に本格的に導入し、当該分野の研究を一層推進するためには定位的手法に基づいた脳機能地図が必須である。家畜ブタの脳地図はあるが、前臨床研究に利用できるミニブタの脳地図はない。そのため我々は、その基盤を整備するために、ニューロナビゲータによる画像支援技術で定位脳手術を行い、光トポグラフィーを主体とした脳イメージング、深部脳刺激による神経機能回復研究等に必要ミニブタの脳地図を構築中である。今回は現在までの実績を報告する。

ブタの外耳孔は傾斜しており、頭部の固定が不安定で、サルやネコなどで先行している定位枠を用いた脳地図の作成は不可能であることがわかった。そのため、外耳孔やナジオンなどの外部マーカーを指標として、ヒトの手術で用いられているニューロナビゲータを応用した定位的なアプローチを確立した。更に、MRI を撮影してブタの標準脳作成を計画中である。

方法：ミニブタを全身麻酔下で頭部を固定し、開頭した。その後、鼻を電気刺激して脳表上の感覚誘発電位 (SEP) を計測し、SEP マッピングを行ったところ、ほぼ安定した部位に SEP のピークが認められた。この部位をニューロナビゲータで三次元計測した。計測にはCT画像を基準画像として使い、基準点は両側外耳孔と眼窩上孔の midpoint、イニオンを用いた。

- 結果：1) 研究を進めていく過程で頭蓋内腔容積の個体差が小さい系統を見出した。このミニブタで、精度の高い脳地図の作製が可能と思われる。
- 2) この系統のミニブタを使い、ニューロナビゲータを用いることで、再現性の良い脳定位計測が進行中である。
- 3) 鼻の電気刺激による SEP をマップし、これをナビゲータで脳表上に定位できた。現在、1 報目の論文を製作中である。

難治性腰下肢痛に対する新たな低侵襲治療

麻酔科学部門 五十嵐孝、竹内護

腰下肢痛は多くの人が一生に1度は経験するが、その大部分は短期間に自然に治癒する予後の良い疾患群である。しかし、約1割の患者では重篤な基礎疾患が存在し、症状が長期化して難治性の腰下肢痛に発展する。高齢化社会の到来とともに腰痛あるいは坐骨神経痛を有する患者が増加し、現在までに様々な治療法が試みられてきた。

硬膜外腔内視鏡は、難治性腰下肢痛に対する新しい診断治療法である。これまでに、腰椎椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症、脊椎手術の既往を有する患者における臨床的な治療効果が報告されている。本法の特長は、(1)保存療法と観血療法の中間に位置する低侵襲治療であること、(2)直視下の灌流、洗浄、癒着剥離が行えること、硬膜外腔の肉眼的観察所見が得られること、(3)病変部位への確実な薬剤投与が期待できること、(4)本法施行後の硬膜外ブロックの十分な広がり期待できることである。

我々は、難治性腰痛のメカニズムの解明と新しい治療法の開発を目的として、(1)実験用ミニブタを用いて硬膜外腔内視鏡の安全性や有効性を検討し、(2)実験用ミニブタの腰痛疾患モデルの作成を試みた。腰痛疾患モデルは、硬膜外腔内視鏡の適応とされる腰椎椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症、腰椎手術後症候群を想定した。各々のモデルにおいて、レントゲン装置を用いた造影所見やMRI所見、内視鏡所見を解析し、硬膜外腔内視鏡に伴う薬液の投与速度について検討した。

今後、腰痛疾患モデルが確立することにより、難治性腰下肢痛に対する新たな低侵襲治療の安全性や有効性が評価できるようになると考える。

自治医科大学における大型実験動物を用いた医療技術トレーニング

医療技術トレーニング部門 菱川 修司

初めに：医療安全、卒後生涯教育の観点から、医療手技の向上を目指した医療技術トレーニングは今後さらに重要になる。現在欧米では、医療技術修練法とその効果についての研究やサージカルトレーニングセンターの整備が進んでいるが、本邦においては同トレーニング法について具体的な指針を出しているケースは乏しく、Dry Lab Training や On the Job Training を中心に、外科系各分野・各施設で個別にトレーニングを実施している場合がほとんどである。この様な状況の下、自治医科大学先端医療技術開発センター(Center for Development of Advanced Medical Technology)内の医療技術トレーニング部門は、「大型実験動物を用いた医療技術教育・医学研究または医療技術研修の支援」を主たる活動理念として設立された。

活動内容：現在我々は「患者さんに安全で高度な医療を提供できる優れた医療従事者を育てること」を目標に、基本的な手術手技から高度な専門医療技術に至る幅広いレベルの手術手技実習を実施している。新設された専用飼育研究棟内の手術室では、同時に4頭までの大型実験動物の全身麻酔管理・手術を実施することができ、また「鏡視下手術システム、外科手術用顕微鏡、超音波診断装置、移動型血管撮影装置」も装備されており、殆んど全ての外科系分野の手術操作が実施可能である。また検査室にはMRIならびにCT撮影装置が設置されており、撮影したデータを3D画像等に構築し医療教育に応用できる「画像支援ナビゲーションシステム」も取り入れている。今回その実習内容やその特徴を紹介する。

まとめ：当部門で行った動物実習・研修の参加者総数は、平成24年3月までの約2900名を超え、医師・医学生がそれぞれのレベル毎に立てた目標を達成すべくトレーニングに参加している。また同トレーニングの実施件数は当部門設立直後より急速に増加しており、最近の傾向として看護師等の医師以外の医療従事者も合同で参加する、チーム医療トレーニングを実施するケースが増えている。今後、医療技術教育の重要性はますます高くなると考えられ、ハード・ソフト両面における更なるシステム強化対策は、現代の医学界における緊急の課題であり、関係各処の協力理解が必須であると考えられる。

抄録
学外分担者

マイクロミニピッグの保有する SLA ハプロタイプと生物学的特徴

北川 均、安藤麻子、今枝紀明、高須正規、金子直樹

岐阜大学

実験専用ブタを確立するためには、その遺伝子背景を明確化することが必修である。我々はこれまでクラウン系ミニブタのブタ白血球抗原 (SLA) のタイピングを行って、本プロジェクトでの移植モデル確立を支援してきた。さらに世界最小となる実験専用ブタであるマイクロミニピッグの SLA ハプロタイプをマーカーとして選抜・育種を行うとともに、各ハプロタイプの生物学的特徴を検討し、実験専用ブタとしての特性を明らかにした。

SLA クラス II-DRB1、-DQB1 遺伝子の RT-PCR 産物の塩基配列決定によるタイピングの結果、マイクロミニピッグには、DRB1: 8 種類、DQB1: 6 種類のアレルが存在し、これらの DRB1、DQB1 アレルから構成される 8 種類の SLA クラス II ハプロタイプが存在することが明らかになった。このうち、Hp-0.16 と Hp-0.17 の 2 つはクラウンミニブタ、Hp-0.11 は Sinclair ミニブタ、Hp-0.13 は Hanford ミニブタと同一であり、さらに Lr-0.13 は SLA 固定デュロック種ブタに見出されるハプロタイプであった。ハプロタイプ出現頻度は、Hp-0.23 が最も多く (37.9%)、次いで Hp-0.37 (19.8%) であった。また、SLA ハプロタイプがホモである個体が見出されたのは Hp-0.23、Hp-0.11 および Hp-0.17 の 3 種類であったが、出現率が高いにもかかわらず、Hp-0.37 ホモの個体は見出されていない。このことは、Hp-0.37 ホモのブタの発生に問題があり、不妊モデルとしての可能性を示す。一方、マイクロミニピッグの体重は、6 か月齢で 9.0 ± 2.8 kg と既存のミニブタより著しく小さく、イヌ用施設で飼育可能なサイズである。マイクロミニピッグにおけるインスリン様成長因子 (IGF)-1 の血漿濃度は家畜ブタと比較して明らかに低く、成長ホルモン-IGF-1 軸の異常が矮小の原因である可能性を示した。また 24 か月齢の体重は、Hp-0.23 ホモのブタが最も小さく、Hp-0.23 以外のハプロタイプとの間に有意差が認められた。このことは、マイクロミニピッグが低身長症の疾患モデルとなる可能性を示すと同時に SLA ハプロタイプが低体重の指標として系統選抜に利用できることを示す。

マイクロミニピッグについては、遺伝子改変等の導入も計画しているが、これとは別に現在飼育している生体が保有する形質を解析し、それをそのまま利用することによって「繁殖および維持管理が容易なヒト疾患モデル」を作成することを目指している。

豚肝切除モデルを用いた血小板増多による急性肝障害予防・再生促進効果に関する実験

大河内信弘

筑波大学消化器外科・臓器移植外科

血小板は止血・凝固作用を有することが知られている。近年、血小板が含有する様々な増殖因子が解明されるにつれ、炎症反応の調節や創傷治癒に関わることが報告されている。これまで当研究室では血小板による肝再生促進効果について小動物による証明とそのメカニズムについて報告してきた。この現象を臨床応用するためには、大型動物を持いたトランスレーショナル・リサーチが必要である。本分担研究では肝切除後肝障害および肝再生における血小板の効果とそのメカニズムを、豚肝切除モデルを用いて解析した。方法：実験専用ミニブタ（自治医大にて）および家畜ブタ（他施設にて）を使用した。i)血小板正常群（正常群）：肝切除のみ施行，ii)血小板増加群（増加群）：血小板増加後に肝切除を施行，の2群に分け80%肝切除を施行した。増加群の作成にはミニブタでは血小板増多因子トロンボポエチンを肝切除5日前に行い（TPOモデル），家畜ブタでは脾臓摘出を肝切除1週間前に行った（脾摘モデル）。術後の肝障害を，血清AST，ALT，Alp，ビリルビンおよび肝組織標本（HE，電子顕微鏡）で，術後の肝再生を再生肝体重比，PCNA labeling indexで各々評価した。結果：血小板を増加させた群では肝機能の改善効果を認め、肝切除後の類洞内皮細胞の櫛板状構造の破壊やDisse腔の開大等の障害の所見も改善されていた。考察：TPO投与あるいは脾摘を行い血小板を増加させることで，過大肝切除後肝障害を軽減させることができたが，そのメカニズムとして，血小板が類洞内皮細胞の障害を抑制し，引き続く肝細胞壊死を軽減することが示唆された。マウスやラットを用いた実験は病態のメカニズムの解析には簡便であるが，豚を用いた実験はヒトへの前臨床試験として有用である。また家畜豚は発育が早く安価な面があるが，反面長期飼育に不向きである。同一体重でブタを選ぶ場合，年齢が大きく異なり，薬物反応の差も考慮する必要がある。

滑膜間葉系幹細胞による低侵襲軟骨再生医療：ミニブタを用いた検討

関矢一郎¹、中村智祐¹、小林英司²

1. 東京医科歯科大学 軟骨再生学、2. 自治医科大学 先端医療技術開発センター

私たちはこれまで、滑膜由来の間葉系幹細胞(MSCs)は軟骨分化能が高く、初代培養細胞を数多く確保できることから、軟骨再生の細胞源として有用であることを示している。また、軟骨欠損に対する低侵襲な細胞移植法を開発し、その有用性をウサギモデルで報告している。本分担研究では解剖学的構造がヒトにより近いミニブタを用いて、滑膜間葉系幹細胞による低侵襲軟骨再生医療の有用性を検討し、その修復過程を解析した。その際、レギュラトリー・サイエンスを実践するべく、臨床治験で考えられる関節鏡およびMRIをその評価項目に入れ行った。

ミニブタ(メキシカンヘアレスピッグ)の滑膜を採取し、酵素処理後低密度で培養すると、コロニー形成細胞は20回以上継代可能であった。培養条件を変えることにより、軟骨・骨・脂肪に分化し、多分化能を有し、ミニブタ滑膜由来のコロニー形成細胞はMSCsの特性を有した。また種々の間葉系組織由来のMSCsを調整し*in vitro*での軟骨分化能を比較すると、滑膜由来のものが最も大きな軟骨塊を形成し、軟骨分化能が最も高かった。

ミニブタの両膝大腿骨内顆荷重部に8×8×2mmの軟骨欠損を作製し、片膝に滑膜MSCsの浮遊液を10分間静置後、閉創した。GFPブタの滑膜MSC浮遊液を軟骨欠損部に10分静置した直後、灌流下においてもGFP細胞が十分接着していることを、蛍光関節鏡で確認した。DiIで標識した滑膜MSCsを用いて浮遊液を軟骨欠損部に10分静置したものは、1週後の組織所見で、軟骨欠損部にDiI陽性細胞が接着していることを確認した。また同一膝の1、2、3ヵ月時の関節鏡による観察で、コントロール側は軟骨欠損部が拡大していった一方、MSCs投与側は1ヶ月時に滑膜様組織で覆われ、2ヶ月時に薄い軟骨様組織で覆われ、3ヶ月時に再生軟骨組織が厚くなる経過を示した。3ヶ月後の関節鏡、肉眼、組織学的評価はコントロール側よりもいずれも有意に優れていた。また造影MRIでMSCs投与側の再生軟骨は正常により近いことが示された。

ミニブタの軟骨欠損に対し、滑膜由来MSCs浮遊液を10分間静置することにより、軟骨欠損部にMSCsが接着し、軟骨修復が促進されることが示された。私たちはこの治療法を用いて臨床研究を開始しており、ミニブタを使用した本研究は、方法の有用性と、修復機序を明らかにした点で、価値が高いものと考えられる。

ミニブタを用いた脳の高次機能解析とヒト中枢神経メカニズム・病態解明への応用

齋藤敏之¹、渡辺英寿²

1. 京都産業大学 2. 自治医科大学

脳の先進的医療技術を実現化するための基盤を形成するには、実験専用ブタの高次機能の解析が必要である。本分担研究は、ミニブタの脳を対象とした神経生理学的な脳地図を明らかにするとともに、ミニブタを用いた脳神経疾患、脳機能障害等の病態モデルや治療薬の研究等、人を念頭においた脳研究を促進することを主な目的としている。

これまでに行った「ミニブタの中枢機能解析とその応用に向けた展開」に関する研究の概略は以下の通りである。

(1) 神経生理学的な脳地図：フレームレス・ステレオタキシイ法を用いることで、ミニブタの一次体性感覚野における誘発電位マッピングが可能であった。また、脳の各部位における誘発電位マッピングデータや神経核の位置（座標）を照合するために必須なミニブタの定位脳図譜作製作業を進めた。頭蓋骨上あるいは脳の断層撮影像をもとに基準マーカ候補を既に選定しており、今後、定位脳図譜のデジタルデータベース構築へ向けた作業を展開する予定である。

(2) ブタの脳神経活動測定技術の評価：我々が開発したテレメトリー法で得られたデータを検証したところ、その95%以上は有線データとほぼ一致、特にシータ波以上の周波数帯域でデータの一致度が高かった。この測定技術は非拘束・覚醒状態で行うミニブタの脳の病態生理研究等に応用可能と考えている。

(3) 脳の病態モデルに関連する研究：家畜ブタで麻酔薬の過剰投与による実験心停止モデルを作製し、海馬のTimm陽性反応変化を組織学的に解析した。心停止後、Timm染色性が大幅に失われ、脳血流遮断に伴う海馬の神経変性の指標となることを確認した。これらの成果は、ミニブタを利用したヒト中枢神経メカニズム・病態解明に向けた研究の展開に大きく貢献すると考えられる。

Y a m a t o n K-2 計画：完全ヒト化腎臓作製に向けて

長嶋比呂志^{1,3}、松成ひとみ^{1,2,3}、横尾 隆^{3,4}、松本 啓⁴、横手伸也⁴、岩井聡美^{3,5}、
J. A. Medin⁶、渡邊将人^{1,3}、梅山一大^{1,3}、中野和明¹、金井貴博¹、小林英司^{3,7}

1. 明治大学農学部発生工学研究室 2. JST/ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト研究員
3. 明治大学バイオリソース研究国際クラスター 4. 東京慈恵会医科大学腎臓再生研究室
5. 北里大学獣医学部小動物第一外科学研究室 6. Division of Stem Cell and Developmental
Biology, Ontario Cancer Institute 7. 自治医科大学先端医療技術開発センター

現在、多能性幹細胞から臓器を *in vitro* で作製することは困難である。この問題を解決する代替策として、ブタなどの動物を利用し、ヒト臓器を再生させることが提唱されている。我々は、ブタ胎仔臓器の原基にヒトの幹細胞を注入し、これをヒトに移植・発育させる“異種再生移植医療”の実現に向けて検討を重ねている。しかしながら、この場合、異種由来細胞が含まれるキメラ化した再生臓器が構築される。すなわち、異種由来の成分を排除しなければ、完全な再生ヒト臓器を完成させることが出来ない。先に我々は、ラットマウス間の小動物でこの異種部分の排除に成功し、完全な自己化腎臓の一部組織を作り上げた。本分担研究では、これまで作出した薬剤誘導によるブタ由来組織の消去法に関する成果を報告する。

胎仔後腎を成体ブタの体内に移植した際の腎臓発達を解析した。ドナー後腎は、syngeneic な関係にあるクローンブタをレシピエントに用いることで、免疫拒絶の存在しない系でのグラフトの生着・発達状況の評価を行った。4頭のクローンブタの大網脂肪組織内に、胎齢 30 日の後腎(長径 2~3mm) 4-12 個/頭を移植した。3~5 週間後には、グラフトは腎盂・腎皮質構造を持った 5-20mm の組織に成長し、周囲組織からの血管の侵入、尿生成、糸球体の形成や尿管の伸長が認められた。ブタ後腎が成体レシピエントの大網内に生着し、腎臓組織構築に向けて発育することから、腎臓発生の scaffold として機能し得る可能性が示された。

次に scaffold として機能した後に消失する後腎、つまり自殺機構を持った後腎 scaffold の開発を試みた。変異型 thymidylate kinase (tmpk) 遺伝子を導入した Tg 胎仔を顕微授精法によって作出した。この Tg 胎仔から樹立した初代培養細胞を AZT 存在下で 4 日間培養した結果、0.5-5mM の条件下で Annexin V 陽性細胞が増加した。さらに、この Tg 細胞の体細胞核移植によって得られたクローン胎仔から後腎を採取した。これらを免疫抑制処理ラットの精巣上体周囲脂肪内に移植し、*in vivo* での自殺機構の発動について確認中である。

以上の結果より、ブタ胎仔腎臓原基が再生ヒト化腎臓構築の足掛かりになること、及び AZT による細胞死誘導型後腎 scaffold 開発の可能性が示された。

抄録
招待講演

再生医療具現化に向けたブタ心臓への再生心筋移植モデルの確立

慶應義塾大学医学部循環器内科 福田恵一

難治性心不全治療では、心臓移植以外には有効な手段がない。2006年京都大学の山中伸弥教授が皮膚線維芽細胞から多能性幹細胞であるiPS細胞を作出した。iPS細胞は受精卵を使用しないため倫理的問題がなく、免疫拒絶もないことから将来の再生医療のツールとして大きな期待が寄せられている。

従来のiPS細胞樹立法の問題点は、皮膚のバイオプシーが必要、樹立に時間が掛かる、ゲノムに挿入遺伝子が残存し、再活性化して腫瘍形成する可能性が有る等が挙げられていた。我々は血液中Tリンパ球とセンダイウイルスを用いて、0.1 mlの血液から1ヶ月でゲノムを損傷しないiPS細胞樹立法を開発した。これらのiPS細胞は*in vitro*でも心筋を含む3胚葉系に分化すること、残存ウイルスは完全に消滅すること、ゲノム染色体に異常のないこと、マウスに移植すると奇形腫を形成し、多分化能を有することを証明した。さらに、我々はマウス胎児胚の心臓予定領域に発現する液性因子をスクリーニングし、いくつかの心筋細胞分化過程に重要な働きを有する因子を同定した。これらの因子のうち、未分化幹細胞から前方中胚葉への誘導する過程にNogginが有効であること、前方中胚葉から心筋細胞への分化誘導因子としてWnt、早期心筋細胞の細胞分裂を誘導する因子としてG-CSFを見出した。これらを用いることにより、マウス、サル、ヒトのES細胞およびiPS細胞は効率的に心筋細胞を分化誘導可能であった。さらに、ミトコンドリアに特異的に取り込ませる色素を利用することにより心筋細胞と混在する未分化幹細胞および非心筋細胞と分離する方法、細胞シートを作成する方法、再生心筋細胞を壊死させずに効率的に移植する方法を開発した。

臨床応用の具現化を図るためにはブタを使用した再生心筋細胞の移植が必須であり、現在これを戦力的に行っている。本講演ではこれらのブタを用いた心臓再生医療の現状と治療戦略を報告する予定である。また、細胞移植法として心嚢内視鏡の開発に関しても最新の知見を紹介する。

重症心不全治療への挑戦—補助人工心臓、心臓移植そして再生医療—

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 澤 芳樹

内科的心不全治療が難しくなった重症心不全は、補助人工心臓か心臓移植しか治療法はなく、我々も本邦における臨床成績を報告し、その臨床的有用性を実証してきた。

最近 LVAD においては各種の植込み型 LVAD が承認され、LVAD による生存率は合併症の軽減、自宅待機による QOL 向上とともに進歩した。今後、各種 device の長所・短所を十分理解したうえでデバイスの選択・患者の選択・strategy の選択を行う必要がある。

また、2010 年 7 月の改正法施行後、わが国の心臓移植実施数が増加しつつあるが、世界的に心臓移植後には免疫抑制剤の使用やそれに関わる合併症など特有の諸問題があり、それらの把握と理解は非常に重要である。

一方、最近、重症心不全治療の解決策として、新しい再生型治療法である様々な自己細胞を用いた臨床応用が開始されている。我々は、重症心不全に対する再生治療の臨床応用を目指し、細胞シートによる再生治療法の開発を行ってきた。患者の足の筋肉から培養した自己筋芽細胞を、温度感応性培養皿を用いて自己筋芽細胞シートを作成。その臨床応用を開始し、第一例目の症例では心機能の回復が得られ、最終的に人工心臓からの離脱に成功、現在日常生活に復帰した。このように臨床応用が始まった心臓の再生治療法について、心不全に対する心臓移植や人工心臓、そして iPS 細胞の話題も交えて、重症心不全に対する近未来の治療戦略を紹介する。