

1 cells (42.3-53.6 cells) in the blastocysts among different concentrations of calcium.

2

3 *Experiment 4*

4 The percentages of fused embryos (62.7-77.3%) were not affected by the presence
5 or absence of calcium in the fusion medium and activation treatment (Table 4). The
6 cleavage rate (33.3%) of embryos that were fused in the absence of calcium without
7 activation was significantly ($P < 0.05$) lower than those (67.4-73.5%) of embryos in other
8 treatment groups. More embryos (28.9%) developed to the blastocyst stage (Fig. 1)
9 when they were fused in the absence of calcium and activated ($P < 0.05$). There were no
10 significant differences in the mean numbers of cells (48.4-61.0 cells) in the blastocysts
11 (Fig. 2) among different treatment groups.

Discussion

1
2 The results of the present study show that concentrations of calcium in fusion and
3 activation media affect the *in vitro* developmental competence of pig parthenogenetic
4 oocytes and cloned embryos derived from miniature pig somatic cells. The optimal
5 concentration of calcium in an activation medium for the development of pig oocytes is
6 0.1 mM under our experimental conditions. The highest blastocyst formation rate of
7 miniature pig cloned embryos is obtained when donor cells and recipient oocytes are
8 fused in the absence of calcium and the fused embryos are activated in the presence of
9 0.1 mM calcium.

10 Our results are inconsistent with those of the previous report [14] in which it was
11 indicated that an activation medium with 1.0 mM calcium is more favorable than that
12 with 0.1 mM calcium for the development of pig parthenogenetic oocytes. This
13 contradiction may be attributed to the presence or absence of cytochalasin B treatment
14 after activation. Oocytes were not treated with cytochalasin B after activation in the
15 previous report [14] in which 46.7% of oocytes activated in the presence of 1.0 mM
16 calcium were apparently diploid having two pronuclei, whereas 90.0% of oocytes
17 activated in the presence of 0.1 mM calcium were apparently haploid extruding one
18 pronucleus as a polar body. This difference might be responsible for the different
19 developmental potential after activation because the developmental capacity of
20 activated diploid oocytes is known to be superior to that of haploid oocytes in the mouse
21 [20]. In contrast, oocytes were treated with cytochalasin B after activation to prevent
22 extrusion of polar bodies in the present study in which 69.8-86.3% of oocytes were
23 apparently diploid regardless of calcium concentrations in the activation medium. It is
24 suggested that stimulation by 0.1 mM calcium is sufficient to induce activation of
25 porcine oocytes because most oocytes had pronuclei after applying electric pulses in the

1 presence of 0.1 mM calcium in both the previous report [14] and present study.
2 Additional stimulation by higher concentrations of calcium would be required to form
3 diploid oocytes by preventing extrusion of polar bodies after activation. When extrusion
4 of polar bodies is prevented by cytochalasin B, however, excessive stimulation by
5 higher concentrations of calcium may impair the development of porcine
6 parthenogenetic oocytes. In addition, it is possible that differences in oocyte quality,
7 activation media or equipments for applying electric pulses between the previous report
8 [14] and present study brought about the contradiction because there were no significant
9 differences in the rates of diploid oocytes and blastocyst formation between different
10 concentrations of calcium (0.1 and 1.0 mM) even when the oocytes were not treated
11 with cytochalasin B after activation in the present study.

12 The results of the present study demonstrated that removing calcium from a fusion
13 medium improves the development of embryos reconstituted with miniature pig somatic
14 cells when they are activated in the presence of 0.1 mM calcium after fusion. This
15 improvement may be attributed to increasing MPF activity in recipient oocytes after
16 fusion. Because MPF activity during oocyte maturation is maximal at metaphase of both
17 the first and second meiotic divisions, MPF activity remains high in oocytes arrested at
18 metaphase II [21]. Upon fertilization or activation, however, MPF activity declines
19 rapidly [22,23]. When donor bovine somatic cells, regardless of cell cycle stage, are
20 transferred into preactivated recipient oocytes, development of the resulting embryo is
21 limited because all embryos arrest at the 8-cell stage [16]. Because activation of the
22 embryonic genome of bovine embryos occurs between the 8- and 16-cell stages [24],
23 preactivated recipient oocytes may not reprogram somatic cell nuclei. In addition,
24 cloned mouse embryos reconstructed by injection of somatic cell nuclei into zygotes
25 after removal of both pronuclei exhibited abnormal chromosomes and did not develop

1 into blastocysts [15]. In contrast, when nuclei of differentiated cells are transferred into
2 unactivated recipients having high MPF activity, reconstructed embryos develop into
3 offspring in many species [2,25-30]. These data suggest that high levels of MPF activity
4 are required for reprogramming a donor nucleus from a differentiated cell. In the present
5 study, when cloned embryos were not activated after fusion, only 2.7% of them fused in
6 the absence of calcium developed to the blastocyst stage and the blastocyst formation
7 rate was enhanced by addition of calcium into the fusion medium. These results consist
8 with those of the previous report [7] in which 69% of porcine fetal fibroblast nuclear
9 transfer embryos that were fused in the presence of calcium and not receiving additional
10 activation stimulation cleaved compared with only 10% of their counterparts fused
11 under calcium-free conditions. The results suggest that it is difficult to induce
12 concurrent activation of porcine recipient oocytes by electric pulses for fusion in the
13 absence of calcium but the concurrent activation occurs when donor cells and recipient
14 oocytes were fused in the presence of calcium. Therefore, donor nuclei would be
15 exposed to high MPF activity for 2 h after fusion in the absence of calcium, which
16 would improve the development into blastocysts of cloned embryos in the present study.

17 In conclusion, we have shown that the optimal concentration of calcium in an
18 activation medium for the development of pig parthenogenetic oocytes is 0.1 mM when
19 they are treated with cytochalasin B after activation. In addition, it has been indicated
20 that removing calcium from a fusion medium improves the development of cloned
21 embryos derived from miniature pig somatic cells when they are activated in the
22 presence of 0.1 mM calcium after fusion.

Acknowledgements

1
2
3
4
5
6
7

The authors would like to express their gratitude to the staff of the Kagoshima Meat Inspection Office and Meat Center Kagoshima, Inc., Kagoshima for supplying porcine ovaries. The present study was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research to K.M. (No. 16688008) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan and Research Grant for Cardiovascular Diseases to M.Y. (No. 15A-1) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- 1
2 1. Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Child L, Eilertsen K, Enos J,
3 Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell
4 G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S,
5 Thompson S, Bishop M. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat*
6 *Biotech* 2000; 18: 1055-1059.
- 7 2. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H,
8 Perry ACF. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000;
9 289: 1188-1190.
- 10 3. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone
11 J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS. Cloned pigs produced by
12 nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407: 86-90.
- 13 4. Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, Costa C, Fodor W. Cloned pigs
14 generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic
15 boar. *Mol Reprod Dev* 2001; 60: 189-195.
- 16 5. Park KW, Cheong HT, Lai L, Im GS, Kuhholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieke
17 A, Day BN, Murohy CN, Carter DB, Prather RS. Production of nuclear
18 transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim*
19 *Biotech* 2001; 12: 173-181.
- 20 6. Park KW, Lai L, Cheong HT, Cabot R, Sun QY, Wu G, Rucker EB, Durtschi
21 D, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS.
22 Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of
23 cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol Reprod* 2002; 66:
24 1001-1005.
- 25 7. Boquest AC, Grupen CG, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, d'Apice

- 1 **AJF, Nottle MB.** Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells.
2 *Biol Reprod* 2002; 66: 1283-1287.
- 3 8. **Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst**
4 **PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A,**
5 **Polejaeva IA, Ayares DL.** Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase
6 gene in cloned pigs. *Nat Biotech* 2002; 20: 251-255.
- 7 9. **De Sausa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, Archibald AL, Ainslie A, Bosma W,**
8 **Bowering J, Bracken J, Ferrier PM, Fletcher J, Gasparrini B, Harkness L,**
9 **Johnston P, Ritchie M, Ritchie WA, Travers A, Albertini D, Dinnyes A, King**
10 **TJ, Wilmut I.** Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear
11 formation and integration with improved methods for activation and maintenance
12 of pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66: 642-650.
- 13 10. **Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS,**
14 **Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ,**
15 **Prather RS.** Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear
16 transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089-1092.
- 17 11. **Lai L, Park KW, Cheong HT, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke**
18 **A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS.** Transgenic pig expressing the
19 enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using
20 colchicines-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev* 2002; 62: 300-306.
- 21 12. **Walker SC, Shin T, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA, Bazer FW,**
22 **Piedrahita JA.** A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer
23 using *in vitro*-matured oocytes. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 105-112.
- 24 13. **Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM.** A comparison of
25 intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation.

- 1 *Development* 1992; 115: 947-956.
- 2 14. Cheong HT, Park KW, Im GS, Lai L, Sun QY, Day BN, Prather RS. Effect of
3 elevated Ca^{2+} concentration in fusion/activation medium on the fusion and
4 development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev*
5 2002; 61: 488-492.
- 6 15. Wakayama T, Tateno H, Mombaerts P, Yanagimachi R. Nuclear transfer into
7 mouse zygotes. *Nat Genet* 2000; 24: 108-109.
- 8 16. Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated
9 ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol*
10 *Reprod* 2001; 64: 324-330.
- 11 17. Abeydeera LR, Wang W, Prather RS, Day BN. Maturation in vitro of pig
12 oocytes in protein-free media: Fertilization and subsequent embryo development
13 in vitro. *Biol Reprod* 1998; 58: 1316-1320.
- 14 18. Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets
15 derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol*
16 *Reprod* 2002; 66: 112-119.
- 17 19. Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato
18 Y, Tsunoda Y. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically
19 assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod* 2002; 67: 442-446.
- 20 20. Henery CC, Kaufman MH. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic
21 mouse embryos during the preimplantation period. *Mol Reprod Dev* 1992; 31:
22 258-263.
- 23 21. Campbell KHS, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I. Cell cycle co-ordination in
24 embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* 1996; 1: 40-46.
- 25 22. Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I. Disappearance of maturation promoting

- 1 factor and the formation of pronuclei in electrically activated in vitro matured
2 bovine oocytes. *Theriogenology* 1993; 39: 199.
- 3 23. **Martinez Diaz MA, Ikeda K, Takahashi Y.** Effects of cycloheximide treatment
4 and interval between fusion and activation on *in vitro* development of pig nuclear
5 transfer embryos. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14: 191-197.
- 6 24. **Telford NA, Watson AJ, Schultz GA.** Transition from maternal to embryonic
7 control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol*
8 *Reprod Dev* 1990; 26: 90-100.
- 9 25. **Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring
10 derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
- 11 26. **Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H,**
12 **Tsunoda Y.** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*
13 1998; 282: 2095-2098.
- 14 27. **Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R.** Full-term
15 development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei.
16 *Nature* 1998; 394: 369-374.
- 17 28. **Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso**
18 **C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL,**
19 **Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG,**
20 **Overstrom EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer.
21 *Nat Biotech* 1999; 17: 456-461.
- 22 29. **Chesne P, Adenot PG, Vigilietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP.**
23 Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotech*
24 2002; 20: 366-369.
- 25 30. **Zhou Q, Renard JP, Fricc GL, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard**

- 1 A, Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation.
- 2 *Science* 2003; 302: 1179.

Figure Legends

1

2 **Fig. 1.** Blastocysts developed from cloned embryos produced by fusing miniature pig
3 somatic cells and enucleated oocytes in the absence of calcium and activating in the
4 presence of 0.1 mM calcium. Magnification 238×.

5

6 **Fig. 2.** Nuclei stained with Hoechst 33342 of a blastocyst developed from cloned
7 embryos produced by fusing miniature pig somatic cells and enucleated oocytes in the
8 absence of calcium and activating in the presence of 0.1 mM calcium. Magnification
9 300×.

1 **Table 1.** Activation of porcine oocytes applied electric pulses in the presence of 0.1 or 1.0 mM calcium with or without cytochalasin B

2 treatment^a

3

4	5	6	7	8	9	10	No. (%) ^b of activated oocytes with ^d				
							1PN	2PN	Total	2PB	
Calcium concentration (mM)	Cytochalasin B treatment	No. of oocytes examined	No. (%) ^b of oocytes activated	1PN	2PN	Total	2PB	IPN	2PN	Total	IPN
0.1	-	55	49 (89.1)	3 (6.1)	14 (28.6)	17 (34.7) ^e	32 (65.3) ^e				
1.0	+	59	51 (86.4)	5 (9.8)	39 (76.5)	44 (86.3) ^f	7 (13.7) ^f				
	-	56	52 (92.9)	4 (7.7)	21 (40.4)	25 (48.1) ^e	27 (51.9) ^e				
	+	62	52 (85.5)	9 (17.0)	28 (52.8)	37 (69.8) ^{ef}	16 (28.3) ^{ef}				

11 ^aExperiments were repeated five times.

12 ^bPercentage per oocytes examined.

13 ^cPercentage per oocytes activated.

14 ^dPB, polar body; PN, pronucleus.

15 ^{e,f}Values with different superscripts within each column are significantly different ($P < 0.05$).

1 Table 2. Development of porcine oocytes applied electric pulses in the presence of 0.1 or 1.0 mM calcium with or without cytochalasin

2 B treatment^a

3

4 Calcium concentration (mM)	5 Cytochalasin B treatment	6 No. of oocytes cultured	7 No. (%) ^b of oocytes developed to		8 Mean no. \pm SEM of cells in blastocysts
			9 ≥ 2 -Cell (2) ^c	10 Blastocyst (7) ^c	
11 0.1	12 -	13 136	14 108 (79.4)	15 22 (16.2) ^d	16 53.9 \pm 6.1
17 1.0	18 +	19 116	20 99 (85.3)	21 45 (38.8) ^e	22 53.5 \pm 4.6
	23 -	24 96	25 61 (63.5)	26 16 (16.7) ^d	27 63.8 \pm 5.0
	28 +	29 91	30 58 (63.7)	31 13 (14.3) ^d	32 52.2 \pm 5.2

33 ^aExperiments were repeated five times.

34 ^bPercentage per oocytes cultured.

35 ^cNumbers in parentheses indicate the time of examination (days of culture).

36 ^{d,e}Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

1 **Table 3.** Development of porcine oocytes applied electric pulses in the presence of calcium at various concentrations^a

2

3	Calcium	No. of	No. (%) ^b of oocytes developed to		Mean no. \pm SEM
4	concentration	oocytes	≥ 2 -Cell	Blastocyst	of cells in
5	(mM)	cultured	(2) ^c	(7) ^c	blastocysts
6	0	127	66 (52.0) ^d	14 (11.0) ^d	52.5 \pm 5.5
7	0.01	175	98 (56.0) ^{de}	21 (12.0) ^d	45.8 \pm 3.2
8	0.05	175	116 (66.3) ^{de}	32 (18.3) ^{de}	42.3 \pm 2.4
9	0.1	112	86 (76.8) ^e	32 (28.6) ^f	49.7 \pm 2.8
10	0.5	100	62 (62.0) ^{de}	23 (23.0) ^{ef}	53.6 \pm 3.4
11	1.0	112	78 (69.6) ^{de}	18 (16.1) ^{de}	47.9 \pm 6.3

12 ^aExperiments were repeated five times.

13 ^bPercentage per oocytes cultured.

14 ^cNumbers in parentheses indicate the time of examination (days of culture).

15 ^{d,e,f}Values with different superscripts within each column are significantly different ($P < 0.05$).

1 **Table 4.** Development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos fused in the presence or absence of calcium with or
 2 without activation
 3

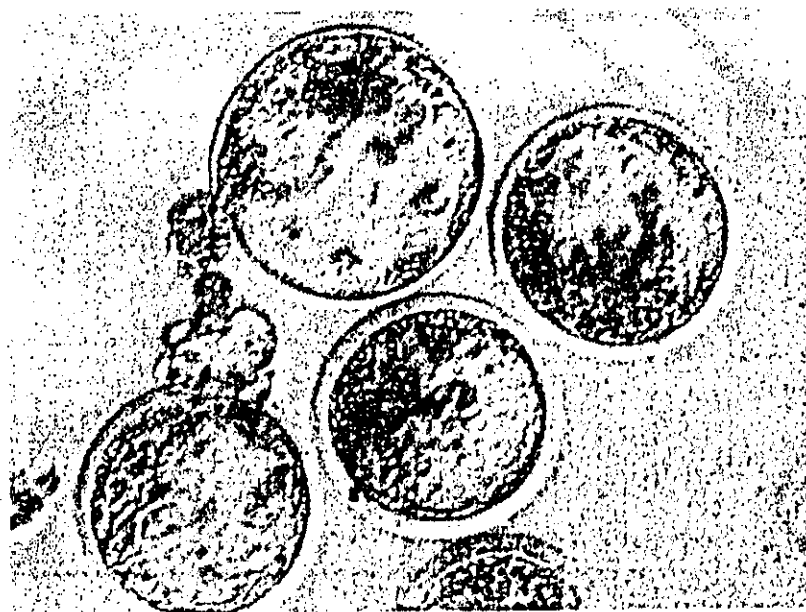
4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Calcium treatment	Activation	No. of trials	No. of complexes treated	No. (%) ^a of complexes fused	No. (%) ^b of embryos developed to ≥ 2 -Cell (2) ^c	Blastocyst (7) ^c	Mean no. \pm SEM of cells in blastocysts			
-	-	4	95	75 (77.3)	25 (33.3) ^d	2 (2.7) ^d	61.0 \pm 11.4			
+	-	4	142	89 (62.7)	60 (67.4) ^e	8 (9.0) ^e	51.0 \pm 12.0			
-	+	4	117	83 (70.9)	61 (73.5) ^e	24 (28.9) ^f	49.5 \pm 2.7			
+	+	5	187	133 (71.1)	94 (70.7) ^e	22 (16.5) ^g	48.4 \pm 2.9			

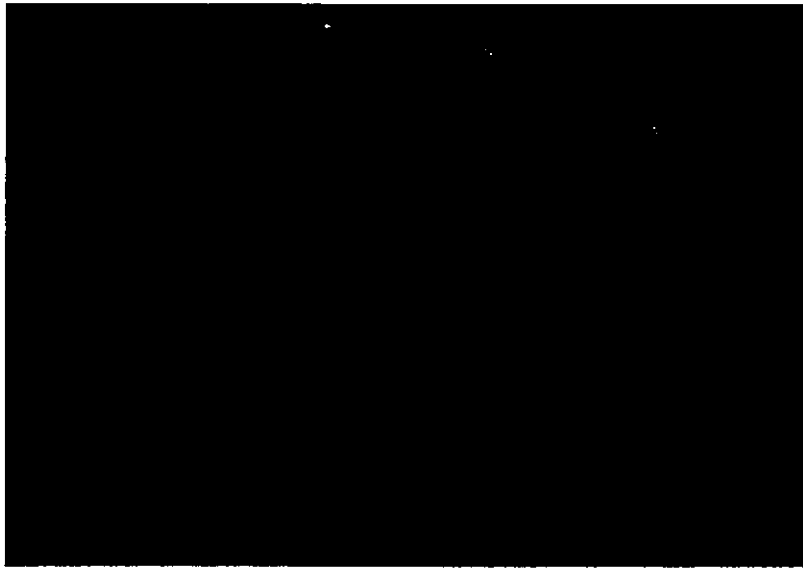
11 ^aPercentage per complexes treated.

12 ^bPercentage per complexes fused.

13 ^cNumbers in parentheses indicate the time of examination (days of culture).

14 ^{d,e,f,g}Values with different superscripts within each column are significantly different ($P < 0.05$).





骨髄細胞を使用する再生血管移植の臨床

東京女子医科大学付属日本心臓血管研究所¹, 鈴鹿医療
大学²

新岡 俊治¹, 篠 義人², 松村 剛毅¹,
日比野成俊¹, 渡辺 学¹, 小坂 由道¹,
小沼 武司¹, 坂本 貴彦¹, 磯松 幸尚¹,
青木 満¹, 岩田 裕輔¹, 内藤 裕次¹,
三宅 武史¹, 村田 明¹, 黒澤 博身¹

ティッシュエンジニアリング法で作製される再生血管には、“生きた”自己細胞が含まれ、最終的に異物が残存しないため、生物学的な成長、修復機能が見込まれ、長い耐久性や抗感染性が期待できる。移植後、血管内腔面も完全に内皮化されるため、長期間の抗凝固療法も必要とせず成長も期待できる。女子医大 IRB の承認下、我々は 2000 年より先天性心疾患患児の心内修復時に、家族からのインフォームドコンセントが得られた症例においてのみ、本方法の臨床で応用してきた。骨髄中に血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の前駆細胞が証明されたことより、自己の播種細胞の起源を末梢静脈の培養細胞から、手術当日に簡便に採取可能な骨髄単核球成分または CD34 陽性細胞に変更した。この方法での臨床使用は現在まで 19 例にその早期-中期の成績を報告する。対象と方法: 19 例の内訳は、右心系 (50mmHg 以下) において、従来の人工血管あるいは異種心臓等では将来再手術が懸念される末梢性肺動脈狭窄に対してパッチとして使用: 2 例。人工物使用により、血管狭窄が再発し再手術時に右室流出路パッチとして使用: 4 例。Ross 手術時の右心系再建に使用: 1 例。術後の抗凝固療法回避を目的として、extracardiac TCPC 術での下大静脈-肺動脈間の導管として使用: 12 例。手術当日、全身麻酔下に 4-5/kg の骨髄液を長骨より骨髄穿刺にて採取した。骨髄細胞の分離は通常の単核球成分分離法に準じて行った。生体吸収性ポリマーに播種後、外側面にフィブリン膜を塗抹し使用した。結果: 手術死亡なし。遠隔死亡なし。急性期 (約 3ヶ月間) には抗凝固療法を施行した。慎重な経過観察を行っているが、全例、生存しており、急性期、中期に問題となる合併症は現在まで認めていない (最長 1 年 10 ヶ月)。導管は現在まで全例で開存しているが、一例 SVC 閉塞に対するパッチ再建例では閉塞を認めた。まとめ: 1. 骨髄細胞による再生血管の早期-中期成績は満足できるものであった。この方法は、自己血管採取後の細胞培養を省略でき、より簡便に血管再生を達成できる可能性が高い。2. 今後の長期的な成績がより重要であり、慎重な経過観察を継続していく必要がある。3. ティッシュエンジニアリング法は小児心臓血管外科治療において有用な方法で、今後の外科治療法の選択技を広げると考える。

同種弁無細胞化と自己血管内皮細胞播種による Tissue Engineering Valve 研究の展開

国立循環器病センター 心臓血管外科¹, 国立循環器病
センター 再生医療部²

庭屋 和夫¹, 沼田 智¹, 藤里 俊哉²,
小林順二郎¹, 坂東 興¹, 田鎖 治¹,
中嶋 博之¹, 八木原俊克¹, 中谷 武嗣¹,
北村惣一郎¹

【目的】同種弁で中長期に発生する弁機能不全には、同種弁の細胞に対する免疫反応の関与が示唆されてきた。又、術後同種弁組織への宿主細胞の進展が確認され、比較的安定した同種弁の術後成績には、組織の remodeling の影響が推測される。そこで、同種弁組織を無細胞処理することで、自己修復と成長が期待し得る tissue engineering valve の scaffold として利用しようと考え、その可能性を実験的に検討した。【方法】同種弁無細胞化: 実験には NIBUS ミニブタ (日本農産、日本生物科学研究所) を使用した。ドナーブタから肺動脈弁を摘出、1% TRITON X 溶液による無細胞化を行った。自己血管内皮細胞播種: 肺動脈弁置換手術を予定されたミニブタの大腿動脈から血管内皮細胞を単離、培養した。培養自己血管内皮細胞を、無細胞化同種肺動脈弁に播種し 2 日間静置培養した。肺動脈弁置換手術: 右心バイパス下にレシビエントブタの肺動脈基部を切除し、同種肺動脈弁を導管として右室流出路の再建を行った。無細胞弁組織の生物物理学的特性を検討し、また術後 1、3ヶ月において、血行動態と摘出弁の組織学的所見を内皮細胞非播種モデルと比較検討した。【成績】TRITON X 無細胞化により弁尖組織の破断強度は増強した。血行動態検査では、内皮細胞播種群 (n=5) および非播種群 (n=4) とも明らかな弁機能不全を認めなかった。組織学的には、内皮細胞非播種モデルで、1ヶ月で血管内皮細胞の被覆が確認され、3ヶ月では部分的に間質への細胞進展が見られた。一方、内皮細胞播種モデルでは1ヶ月で部分的な、そして3ヶ月では間質への十分な細胞進展が確認できた。新しい無細胞化技術と細胞播種方法の導入: 超高压処理による細胞破壊を基本とした組織無細胞化法を導入した (特許申請中)。同法により弁尖組織の破断強度と進展性は無処理弁から変化することなく有効な無細胞化処理を行い得た。また、内皮細胞播種にバイオリクターを導入し、短時間で広範囲にわたる内皮細胞化を実現した。現在、これらの技術を導入した自己内皮細胞播種無細胞化同種弁による同系の実験を行っている。【結論】無細胞化同種肺動脈弁は、術後早期は良好な弁機能を維持し、宿主内での再内皮下及び間質細胞の誘導を受け入れる scaffold としての可能性が示された。自己内皮細胞播種により、より早期の自己細胞の間質への誘導が確認され、組織の remodeling を導く可能性が示された。

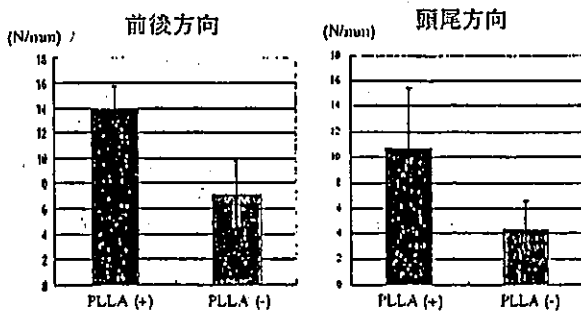
ポリ-L-乳酸 (PLLA) 胸骨ピンの術後の胸骨離断面のズレ予防効果に関する実験的研究

東北大学大学院医学系研究科 心臓血管外科学分野¹,
グンゼ株式会社研究開発部メディカル材料センター²

斎藤 武志¹, 井口 篤志¹, 安達みのり²,
西山 孝司², 田林 暁一¹

【目的】 胸骨ワイヤーによる胸骨外固定法は現在最も有効な胸骨閉鎖法の一つであり広く用いられているが、術後、胸骨の動揺等に起因する創痛や胸骨感染といった合併症の頻度が0.5～4%あると報告されている。また近年、胸骨部分切開が比較的簡単な開心術において標準術式となりつつあるが、胸骨部分切開は胸骨の離断面が増加するために術後に胸骨のズレを生じやすいという欠点がある。このため新たな胸骨閉鎖法の開発が必要とされているが、ポリ-L-乳酸 (PLLA) 胸骨ピンによる胸骨内固定法の併用が、術後の胸骨のズレ、動揺の予防に対して有効であるかを実験的に検討した。【方法】 体重14～16kgの幼弱ブタの胸骨を使用した。胸骨体を5cm長に切り出した後、正中で離断した。ワイヤー群は2本の小児用胸骨ワイヤーのみで胸骨を固定、ワイヤー+胸骨ピン群は、ワイヤー間の胸骨にΦ2.0mm穴(深さ8mm)をドリルであけ、1本の小児用胸骨ピン(2×2×15mm)を留置した。ワイヤーを締める強さは2.0kgf/cmとした。胸骨を固定した状態でロードセルで片側にせん断力を加えていき、前後方向、頭尾方向の荷重-変位関係を計測した(各群n=5)。試験装置は島津オートグラフAG5000を使用し、ロードセルのヘッドスピードは3mm/minとした。【結果】 ワイヤー+胸骨ピン群は、ワイヤー群と比較して前後方向、頭尾方向ともに弾性係数(N/mm)が高値であり、両方向とも統計学的有意差が認められた(前後方向:ワイヤー群:7.00±2.71, ワイヤー+胸骨ピン群:13.84±1.84, p<0.01、頭尾方向:ワイヤー群:4.38±2.12, ワイヤー+胸骨ピン群:10.61±4.88, p<0.05)(図1)。【結論】 PLLA 胸骨ピンによる胸骨内固定法の併用は、前後方向、頭尾方向ともに胸骨のズレ予防に有効であった。PLLA 胸骨ピンによる胸骨内固定法の併用は術後の胸骨のズレ、動揺を軽減させ、その結果術後の胸骨関連合併症の頻度を低下させると考えられた。

図1



凍結保存 allograft を用いた Tissue engineering valve の実験的検討

国立循環器病センター 心臓血管外科¹, 国立循環器病センター 再生医療部²

沼田 智¹, 庭屋 和夫¹, 藤里 俊哉²,
小林順二郎¹, 坂東 興¹, 田鎖 治¹,
中嶋 博之¹, 八木原俊克¹, 中谷 武嗣¹,
北村惣一郎¹

【目的】 Cryopreserved allograft は生理的な弁構造を持ち、抗感染性、抗血栓性に優れているが、長期遠隔期の durability には問題点を有している。組織の劣化には免疫学的機序や allograft 細胞の apoptosis などの原因が考えられるが、それらを cryopreserved allograft の無細胞化処理をにより改善し得るのではないかと考えた。Allograft の細胞を消失させ、細胞骨格のみすることで抗原性を減弱させ、recipient の細胞を導入することでより生理的な性質を有する graft を作成しようと思われる。今回 NIBS mini Pig を用いた実験で、無細胞化 cryopreserved allograft の早期成績を検討した。【方法】 体重25-30kgのNIBS mini Pigを使用。清潔操作下にはほぼ同体重のNIBS mini Pigから肺動脈弁下-分枝部までのallograftを採取した。採取後直ちにcryopreservationを行い、30日保存した。その後allograftを解冻し、ハンクス液で3回洗浄した後RNase A、DNase I、EDTA 2NAを含むTriton X溶液に浸漬し、無細胞化した。予めrecipientの大腿動脈から採取した血管内皮細胞を培養しておき、無細胞化後に内皮細胞を播種した群(n=2)、播種しなかった群(n=2)の2群に分けた手術は胸骨正中切開にて施行。上大静脈、下大静脈脱血、中心肺動脈送血の右心バイパスを確立。主肺動脈を離断し、allograftを吻合した。28日後に血行動態の評価を行なった後に犠死し、組織学的に検討した。【結果】 全例が生存した。Direct echo及びDirect pressure studyではgraft前後での圧較差を認めなかった。組織学的検討では弁表面と肺動脈壁にConfluentな細胞の配列を認めた。免疫組織学的検討ではFactor VIII因子陽性の細胞であった。これらの結果は内皮細胞を播種した群と播種しなかった群で差がなかった。【結論】 無細胞化 cryopreserved allograft は28日後までの血行動態は良好で、組織学的には再内皮下が認められた。さらに遠隔機の検討が必要であるが、recipient cell の進入によりより生理的な graft となる可能性がある。

再生医療を目的とした凍結保存同種弁のレシピエント自己細胞化

国立循環器病センター 1) 再生医療部 2)、臓器移植部 3)、心臓血管外科 4)
藤里俊哉 2)、岩澤伸明 2)、小越拓郎 2)、菅 裕亮 2)、西岡 宏 2)、
沼田 智 4)、庭屋和夫 4)、中谷武嗣 3)、北村惣一郎 1)

【目的】我々は、凍結保存同種弁からドナー由来の細胞成分や抗原性部位を除去し、コラーゲン線維や弾性線維、基底膜などの構造マトリックスのみを用いた再生医療用心臓弁組織の開発を行っている。この心臓弁組織へレシピエントの自己細胞を組み込むことで、自己修復性や成長性を有する組織工学弁が創製できると期待できる。昨年は、凍結保存した心臓弁組織を脱細胞化处理し、組織や力学特性への影響について報告した。本報では、脱細胞化处理した心臓弁組織へのレシピエント細胞の播種について検討した。

【方法】NIBS系ミニブタ(日本農産工業)の肺動脈弁を摘出し、プログラムフリーザーにて徐冷凍結後、液体窒素中で保存した。1ヶ月後に解凍し、4℃にて10,000気圧の超高圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を除去した。レシピエントとなるミニブタ大腿動脈から採取した血管内皮細胞を増殖した後、回転培養装置を用いて細胞を播種した。

【結果と考察】昨年報告したトリトンX-100を用いた界面活性剤浸漬処理においては組織深部の細胞除去が容易でなく、力学特性の変化も見られたが、超高圧印加処理においては組織深部まで完全に細胞を除去することができ、力学特性の変化も見られなかった。また、コラーゲン線維や弾性線維の密度、配列状態、弁葉の厚さにも変化は見られなかった。得られた脱細胞化心臓弁組織上に、新規に開発した回転及び循環培養装置によって、レシピエントの血管内皮細胞を均一に播種することができた。

【結論】凍結保存した心臓弁組織を脱細胞化处理することで、力学特性を有効に維持した再生医療用心臓弁組織が作成できた。その組織上へ、レシピエントの血管内皮細胞を回転培養によって均一に播種することができた。

【謝辞】本研究は厚生科学研究費ヒトゲノム・再生医療等研究事業の補助を受けて行われた。