

S5-4

新しい物理処理による再生医療用バイオスキャフォールドの開発

藤里俊哉² ○岸田晶夫³ 庭屋和夫⁴ 中谷武嗣⁵ 北村惣一郎¹¹ 国立循環器病センター ² 研究所・再生医療部 ³ 研究所・生体工学部⁴ 病院・心臓血管外科 ⁵ 病院・臓器移植部Development of Decellularized Regenerative Tissue using Novel Physiological Technique
Toshia Fujisato², Akio KISHIDA³, Kazuo NIWAYA⁴, Takeshi NAKATANI⁵, Soichiro KITAMUERA¹¹National Cardiovascular Center, ²Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, ³Department of Biomedical Engineering, ⁴Department of Cardiovascular Surgery, ⁵Department of Organ Transplantation

1. はじめに

複雑な形状および物性を有する組織を再生するための足場材料(scaffold)開発には、人工材料の造形が困難であること、あるいは生体と同等の力学特性を実現するのが困難であることなどの問題がある。われわれは循環器系の再生医療を目的とし、同種並びに異種の心臓弁や血管組織から細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスのみを用いた生体scaffold(バイオスキャフォールド)の技術開発を行っている。

2. 目的

新たに開発した超高压処理法とマイクロ波照射を組み合わせた脱細胞化処理法を用いて、ミニブタ組織を脱細胞化し、力学特性や感染性等について検討した。

3. 実験

NIBS系ミニブタ(日本農産工業)の心臓弁及び血管を摘出し、ドナー細胞除去処理を行った。細胞除去処理は、従来法であるトリトンX-100溶液による浸漬処理を対照とし、新たに開発した超高压およびマイクロ波照射による処理を行った。細胞除去組織をHE染色にて組織学的に観察するとともに、力学試験を行って生体力学特性について検討した。さらに、培養試験によって感染性の除去について調べた。

4. 結果

超高压処理については、低温下(4℃)において、10,000気圧、10分処理を基準とした。またマイクロ波照射による洗浄については、間欠照射を行うことによって系全体の温度を37℃に保持し、所定時間行った。

それぞれの細胞除去処理方法について組織学的に検討したところ、トリトンX-100による界面活性剤処理やトリプシンによる酵素処理では、組織表面近傍の細胞は染色されなくなるが、組織内深部の細胞は24時間処理後でも染色され、完全な除去が困難であった。一方、新規処理法では、組織深部まで完全に細胞を除去することができ、処

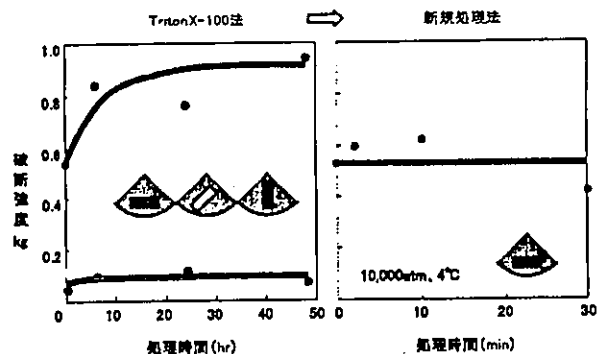


図1. 脱細胞化法による組織物性変化の比較

理時間も大幅に短縮することが出来た。また、界面活性剤処理では破断強度及び弾性率が増大し

(図1)、トリプシン処理では組織のルーゼンングが見られたが、新規処理法では力学特性への影響は見られなかった。新規処理法ではあらかじめ常在性細菌によって感染させた組織の感染性を除去することができた。トリトンX-100溶液による浸漬処理では、トリトンX-100が細胞障害性を示すため、2週間以上の洗浄除去が必要であるが、新規処理法ではその必要がないため、脱細胞化処理が短期間で可能であり、処理中における汚染等も減弱できると考えられる。

5. 結論

本研究のポイントは、動物組織から抗原性及び感染症の原因となる細胞を除去し、コラーゲンなどの構造素材のみを用いる点にある。さらに超高压処理に於いては細菌・一部ウイルスの死滅化が可能であり、滅菌工程としても優れている。現在、動物組織のヒトへの使用は感染症への懸念から否定的な意見もあるが、本法ではこの問題点を解決できると考えている。このscaffoldへレシピエントの自己細胞を組み込むことで生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると期待できる。現在、ミニブタを用いた移植実験を継続中である。

OR48-3

回転及び循環培養装置を用いた三次元 scaffold 表面への細胞播種

○藤里俊哉² 小越拓郎⁴ 菅 裕亮⁴ 岸田晶夫³ 大場謙吉⁴ 山田和彦² 北村惣一郎¹
¹ 国立循環器病センター ² 再生医療部 ³ 生体工学部
⁴ 関西大学工学部

Cell Seeding onto 3D Scaffolds by Roller and Circulation Culture System

Toshia FUJISATO², Takuro KOGOSHI⁴, Yusuke SUGA⁴, Akio KISHIDA³
 Kenkichi OHBA⁴, Kazuhiko YAMADA², Soichiro KITAMURA¹

Department of ²Regenerative Medicine & Tissue Engineering, ³Biomedical Engineering,
¹National Cardiovascular Center
⁴Faculty of Engineering, Kansai University

1. はじめに

我が国では年間約5千の大動脈弁置換術が施行されており、80%が機械弁、20%が異種生体弁である。しかしながら、機械弁では抗血栓性、異種生体弁では耐久性の問題が依然解決されていない。我々はこれらの問題を払拭し、さらに移植後の成長性を付与するため、再生医療型心臓弁の開発を行っている。その方法として、同種あるいは異種心臓弁組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスを scaffold とし、in vitro にて患者の自己細胞を組み込むアプローチを採用している。これにより、生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると期待できる。

2. 目的

本報では超高压印加及びマイクロ波照射によってドナー由来細胞を除去したミニブタ心臓弁 scaffold 表面に、効果的に血管内皮細胞を播種する方法について検討した。

3. 方法

Scaffold: NIBS系ミニブタ（日本農産工業）からブタ心臓を摘出し、肺動脈弁を採取した。ハンクス液で洗浄後、冷間等方圧加圧装置（神戸製鋼所）を用いた低温下超高压印加処理（4℃、10,000気圧、10分間）にてドナー細胞を破壊した。さらに、低温下マイクロ波照射（東屋医科機械）を用いてドナー細胞を洗浄除去した。

細胞播種: ミニブタから大腿動脈を5cm程度摘出し、酵素処理（ロシユ）によって血管内皮細胞を分離した。数週間の培養によるエクスパンド後、細胞を培地に分散した。図1のように、scaffold とともにチャンバー内に封入し、ローラーによって2時間回転させることで細胞を付着させた。さらに、血液ポンプを用いた循環培養によって付着細胞を1週間培養した。

4. 結果

超高压印加及びマイクロ波照射処理により、ドナー由来細胞を完全に除去した心臓弁 scaffold を得ることができた。細胞除去処理による力学特性への影響は見られなかった。ミニブタ血管内皮細胞



図1. 回転培養用チャンバー

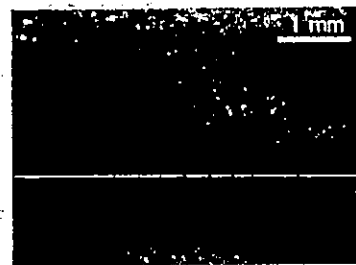


図2. 心臓弁 scaffold に付着した内皮細胞

はヒト血管内皮細胞と同様、容易に培養、エクスパンド可能であった。心臓弁 scaffold の血液流出側を上方に配置した静置培養では、細胞を均一に播種することが困難であり、また、培地中の酸素濃度等による問題のため、1週間の培養後でも細胞の増殖は見られなかった。これに対し回転培養では、図2に示すように、均一に播種することができた。さらに続けて1週間循環培養することにより、付着させた内皮細胞を増殖させることができた。

5. 結論

超高压印加処理及びマイクロ波照射によって細胞除去処理した心臓弁 scaffold 内表面に、回転培養及び循環培養によって血管内皮細胞を均一に播種することができた。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働省厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費及び文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

一般演題
 オールセッション

Abstracts: 1st World Congress on Regenerative Medicine

16

CAPILLARY-LIKE NETWORK FORMATION IN VESSEL EQUIVALENTS *IN VITRO*

B. FRIEDRICH, K. ZÜCKMANTEL, S. MÜLLER, A. HEMPRICH

Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Leipzig, Germany

Keywords: *Vessel substitute, Angiogenesis, Perfusion culture, Soft tissue engineering*

Introduction: A sufficient supply with nutritives and oxygen is mandatory for the engineering of metabolically active tissues of larger volume. Thus the demand arises for a vascular network or an alternative equivalent. Adipose tissue can serve as a very simple model for a tissue requiring vascularization because it cannot be transplanted freely and needs vascular supply. Among other approaches, one hypothetical way follows the principles of microsurgical transplantation. This comprises the inclusion of small diameter vessel substitutes into the artificial tissue which represents the connection to the tissue equivalents artificial capillary network. In an effort to establish a vessel-like substitute for the supply of tissue engineered transplants, different cultivation methods were compared.

Materials and Methods: Six tissue engineered small diameter vessel equivalents were fabricated from collagenous sponge scaffolds and seeded with human adipose tissue stromal cells and human umbilical vein endothelial cells. After initial growth the vessel equivalents were divided. One segment was exposed to pulsatile perfusion, the other segment was cultured in a rotating culture system as a control. Specimen harvested prior to the start of the experiments (start group) were compared with the specimen of the perfusion group and the rotating group with regard to lumen formation, number and maturation of capillary-like structures in the vicinity of the central lumen and rate of apoptotic cell death.

Results: Formation of the central lumen proved to be best in the perfusion group. Most capillary-like structures were found likewise in the perfusion group followed by the rotating group. The maturation of these capillary-like structures ascertained by the recruitment of α -actin-positive cells reached the highest degree in the luminal portion the perfusion group, also the number of apoptotic endothelial cells was significantly lower under perfusion than under rotating culture conditions.

Conclusion: The results show that pulsatile perfusion of vessel equivalents promotes the development of physiological vascular structures *in vitro* and indicate a potential for the supply of engineered tissue equivalents *in vivo* and *in vitro*.

17

VASCULAR WALL CELL INJECTION AND ENDOTHELIAL CELL SEEDING TO DECELLULARIZED TISSUE SCAFFOLD

T. FUJISATO, H. NISHIOKA, W. KAMATA, N. YAMAHIGASHI, K. YOSHIDA

National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka, Japan

Keywords: *Decellularization, Recellularization, Vascular tissue*

Decellularized xenograft tissue and its recellularization are widely studied to give more durability with potential growth and less immunogenicity to the currently used bioprostheses like xenograft heart valves. We are investigating efficient processes of decellularization and recellularization of the porcine vascular tissue as a biological scaffold with intact structure and biomechanical properties based on the native collagen and elastin. In this paper, our recent study on an *in vitro* recellularization method of a decellularized vascular tissue using a cell injector and a roller culture bioreactor was reported.

Porcine heart valves and vascular tissues were excised under clean condition and washed by PBS. They were then treated by a cold isostatic pressing of 10,000 atm at 4°C followed by washing with PBS under microwave irradiation for decellularization of the donor cells. They were subjected to histological study by the light and scanning electron microscopy and biomechanical study by the tensile strength measurement. Porcine endothelial cells were isolated from the femoral artery of a future recipient by collagenase digestion and vascular wall cells were isolated by mincing of its residual tissue. After 3 weeks expansion of the cells, the vascular wall cells were injected to the decellularized tissue scaffold by a cell injector and the endothelial cells were seeded on it by a roller culture bioreactor for 4 hrs. The cells were then expanded in pulsatile flow culture bioreactor for 5 days.

The valve leaflet and vascular wall were completely cell free when the tissues were treated by the cold isostatic pressing for 10 min and washing under microwave irradiation for 2 days. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the tissues treated. The elastica-van Gieson staining showed that collagen and elastin fibers were well maintained in the decellularized biological scaffold. From the *in vitro* incubation test, the tissue was deinfected when the pressing was applied to the tissue contaminated by normal bacteria floras. The autologous vascular wall cells and endothelial cells were well incorporated to the decellularized tissue by the cell injector and roller culture bioreactor.

The vascular tissues decellularized by the cold isostatic pressing and microwave irradiation may provide more durable and safe bioprostheses. The autologous cells were well incorporated to the three-dimensional biological scaffold by the cell injector and roller culture bioreactor.

This study was supported by the Research Grants from Ministry of Health, Labour and Welfare and Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Abstracts: 1st World Congress on Regenerative Medicine

P17

TESTING OF DIFFERENT BIOREACTOR SYSTEMS FOR EXPANSION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

M. KAMPRAD, S. WÜRKERT, E. YALCIN, F. EMMRICH
University of Leipzig, Institute of Clinical Immunology, Germany

Umbilical Cord Blood (UCB) represents, in addition to peripheral blood and bone marrow, a promising therapeutic approach of hematopoietic stem cells. However, clinical use of UCB is limited due to its reduced volume. Therefore, we have developed expansion protocols for stem cells with purpose of a later clinical application.

The aim of our study is the comparison of three different bioreactor systems concerning their suitability to expand hematopoietic stem cells obtaining their pluri-/multipotency.

We used a well established in-house cell expansion protocol for discontinuous cultures in 48 well plates in three flat membrane based bioreactors. The bioreactors were run in three different modes of operation - continuous perfusion mode (CPM), continuous diffusion mode (CDM) and fed batch diffusion mode (FDM) - and were compared to cultures in 48 Well Plates (WP).

UCB/MNC derived from healthy donors were separated using Ficoll followed by erythrocyte-lysis and cryopreserved. For each experiment at least two samples from different donors were pooled. The inoculation density was 3,6 E5 vital cells/cm². The cells were cultured in RPMI 1640 with supplements and a combination of cytokines (SCF, β NGF, IL-3, IL-6), Fibronectin and Chondroitin-Sulfate B was added. On days 0, 4, 7, 10 and 14 cell number and vitality was analysed by using trypan blue staining. The morphological, CD34 and CD45 characterisation was performed by flow cytometry.

Cell number: In general both diffusion reactors succeeded the perfusion reactor. On day 14 FDM was six fold better than CPM and even succeeded the well plate control. In general, on all days in all cultures the relative number of CD45+ cells was greater than 90%.

Morphology: Cultures from WP showed typically heterogeneous cell populations characterized microscopically and by different forward/sideward scatter patterns. Only cultures from FDM showed similar heterogeneous cell populations over the whole culture time. Cells from CDM showed this heterogeneous characteristic only till day four, whereas cells from CPM developed only into a homogenous cell population characterized by the low forward scatter. Therefore, the CD45+/CD34+ population was divided into two different subpopulations, one with low forward scatter/ low sideward scatter (Population A) and one with high forward scatter/ low sideward scatter (Population B). The relative number of Population A in both continuous reactors was on all days greater than in the discontinuous systems - on day 10 the growth rate (relative cell number) reached 7 in the CDM and 9 in the CPM. This fact did not show up in absolute cell counts. The highest expansion rate (CD34 absolute cell number) of the bioreactors was reached on day 14 by CDM (3.7 vs. 7.2 in WP). FDM and WP showed an increase of Population B-cells on day 4 either in relativ numbers and in absolute counts (growth rate: 10 in FDM, 4.4 in WP). Independent on culture system Population B decreased from day 4 on below the starting point.

In this study we could show that the tested bioreactors and the operation modes used supported different stem cell populations and growth kinetics, respectively. Depending on the intended key parameters in transferring lab protocols into clinical scale the evaluation for each application is necessary.

P18

VARIOUS DECELLULARIZED TISSUES FOR TISSUE ENGINEERING SCAFFOLD PREPARED BY NEW TECHNOLOGY

A. KISHIDA, T. FUJISATO, S. FUNAMOTO, H. NISHIKOKA, K. YOSHIDA, W. KAMATA, N. YAMAHIGASHI, M. SUGA, T. KIMURA,
K. MIYAZAKI, K. NIWAYA, T. NAKATANI, S. KITAMURA
National Cardiovascular Center, Research Institute, Osaka, Japan

Keywords: Decellularization, Ultra-high pressure, Microwave, Biological scaffold

Introduction: Biodegradable materials are widely studied as scaffolds for the cell transplantation, however they are generally harder than intact tissues and not easy to be given the same shape and structure as biological tissues. Decellularized tissues and those recellularization are currently studied to give more durability with potential growth and invisible immunogenicity to the conventional bioprotheses like glutaraldehyde-treated heart valves. We are investigating efficient processes of decellularization and recellularization of biological tissues to have bioscaffolds keeping intact structure and biomechanical properties. Our recent studies on newly developed decellularization and recellularization methods were reported.

Materials and methods: Porcine tissues were excised and treated by a newly developed method using ultrahigh pressure and microwave treatment at the room temperature. They were then washed with PBS and subjected to the histological studies. The results were compared with those by the decellularization using Triton X-100 detergent (1).

Results and discussion: The leaflet and the aorta were completely decellularized by our new method. The treatment time of ultra-high pressure was just 10 min. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the leaflets treated. On the other hand, the cells were still remaining inside an area of more than 1 mm depth in the tissue and both of the breaking strength and elastic modulus were increased when the tissue was immersed for 24 hr in 1% Triton X-100 for cell removal. The elastica-van Gieson staining showed that collagen and elastin fibers were well maintained in the decellularized tissue. From the *in vitro* incubation test, the tissue was deinfected when the new method was applied to the tissue contaminated by normal bacteria floras. This new treatment was effective for cell removing from other tissues, such as heart muscle, liver, kidney, skin, etc.

Conclusions: Biological tissues decellularized by our new method having intact structure and biomechanical properties may provide more durable and safe bioprotheses.

This study was supported by the Research Grants from The Ministry of Health, Labour and Welfare and The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References: Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Euro J Cardio Thorac Surg 1998; 14: 279-84.

R4-3

生体弁の脱細胞化とin vitroでのレシピエント自己細胞化

国立循環器病センター 再生医療部* 先端医療振興財団** 京都第一赤十字病院***
国立循環器病センター 心臓血管外科**** 国立循環器病センター 生体工学部*****
国立循環器病センター 臓器移植部***** 国立循環器病センター*****
○藤里俊哉* 西岡宏** 沼田智*** 庭屋和夫**** 岸田晶夫***** 中谷武嗣*****
北村惣一郎*****

【目的】我々は、生体弁からドナー由来の細胞を除去した組織マトリックスをscaffoldとし、レシピエント細胞を播種した再生型心臓弁移植技術の開発を行っている。レシピエントの自己細胞を組み込むことで、小児患者に適用可能な自己修復性や成長性を有する生体弁が創製できると期待できる。本報では、脱細胞化処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報告する。

【方法】ミニブタ肺動脈弁を摘出し、4℃にて10,000気圧の超高静水圧印加処理、続いて低温マイクロ波照射下洗浄を行い、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、回転及び循環培養装置を用いて細胞を播種した。

【成績】超高静水圧印加及びマイクロ波照射下洗浄処理により、生体弁組織から完全に細胞を除去することができた。この処理による力学特性、コラーゲン線維や弾性線維の密度、配列状態、弁葉の厚さには変化が見られなかった。また、滅菌も同時に達成することができた。得られた脱細胞化心臓弁組織上に、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】生体弁組織を脱細胞化処理することで、力学特性を有効に維持した再生医療用心臓弁scaffold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及び循環培養によって均一に播種することができた。

R4-4

移植・再生研究に有用なレポーター遺伝子トランスジェニックラットの開発

自治医科大学 臓器置換研究部* YSニューテクノロジー研究所**
○高橋将文* 袴田陽二* 武田真一* 佐藤友紀* 井上成一郎* 清水尚* 吉野浩之* 安食孝士*
藤代準* 竹野勇一* 五十嵐友香* 金子隆志* 村上孝* 高橋利一** 上田正次** 小林英司*

【目的】移植・再生研究においては、細胞をマーキングしてその遊走や分化を追跡・評価するシステムが必要である。細胞マーキング法としては蛍光色素とレポーター遺伝子を用いる2つの方法があるが、蛍光色素では細胞が分化・分裂した場合に蛍光輝度が低下するという欠点がある。一方、レポーター遺伝子では、そのトランスジェニック (Tg) マウスにおいて再生医学研究での有用性が報告されているが、マウスは体サイズがラットの1/10と小さく種々の移植・再生モデルの作製が困難である。先に私たちはレポーター遺伝子Tgラットを作製し、その移植・再生研究における有用性について検討してきた。これまで得られた結果を報告する。【方法と結果】CAGをプロモーターとしてGFP-TgおよびLacZ-Tgラットを作製した。これらラットでは、骨格筋、心筋、皮膚など広範囲の組織に発現が認められた。GFP-Tgラットの心臓、肝臓、膵/脾、小腸、四肢を移植して、移植モデルに特徴的なドナー細胞の遊走が検出できた。また、両Tgラットをドナーとして骨髄移植を行いさらに心筋傷害および骨格筋傷害を作製するモデルで、骨髄細胞から心筋および骨格筋の傷害部位への遊走や心筋細胞への分化の研究を可能とした。【結語】レポーター遺伝子Tgラットは移植・再生研究における細胞lineageを解析するための有用なモデル動物である。

O2-01 アキシタル方向支持型磁気浮上モータを使用した遠心血液ポンプの開発

¹茨城大学大学院理工学研究科、²茨城大学工学部機械工学科

小沼弘幸¹、加藤 勇¹、増澤 徹²

【目的】我々は、次世代型人工心臓として、遠心ポンプのインペラを磁気浮上させ、シールやベアリング等の機械的摺動部品を廃絶し、半永久的な機械的寿命を有する磁気浮上遠心血液ポンプの開発を行っている。本研究では、インペラをアキシタル方向に能動的に磁気支持し、ラジアル方向に静的永久磁石軸受けを設けた磁気浮上遠心ポンプを開発し、そのポンプ性能及び磁気浮上性能の評価を行った。【方法】開発したアキシタル型磁気浮上モータは上部ステータ、下部ステータ、そして両ステータ間で浮上回転させるロータの3つから構成される。ロータを上部ステータにより磁気支持すると共に、下部ステータにより回転制御も可能とした。上部ステータにはロータ傾き及びアキシタル方向の位置を制御する4個の独立した電磁石を配置した。上方向へのバイアス吸引力を得るため、上部ステータ側ロータ表面に円筒状の永久磁石を配置した。またロータの下部ステータ側表面には回転のための8個の薄型永久磁石を設置した。下部ステータには回転磁場を発生させる3相8極の電磁石を配置した。ロータのアキシタル方向の位置と傾きは4個の渦電流センサを用いて計測制御した。一方、ロータのラジアル方向の変位は一对の円筒状磁石の反発力を利用することにより支持した。設計において反発力の計算は磁石を表面電流に換算する方法を用いた。これにより本方式では3軸制御で磁気浮上させる構造となっている。本モータの大きさは外径74mm、高さ65mmである。本モータを用いて遠心ポンプを製作し、ポンプ性能及び磁気浮上性能の評価を行った。【結果及び考察】最高回転数2000rpm、最大圧力198mmHg、最大流量8.8L/minのポンプ性能を示した。そのときのロータ変動は、アキシタル方向の最大振動振幅は0.07mm、ラジアル方向の振動振幅は0.85mmであり、優れた磁気浮上性能を示した。ラジアル方向の振動を抑制することにより、より安定した磁気浮上が可能となった。開発したアキシタル型磁気浮上遠心血液ポンプは十分な磁気浮上性能と補助人工心臓に応用可能なポンプ性能を有していることを確認した。

O2-02 再生医療用 Scaffold のための新規技術による種々の生体組織の脱細胞化

¹ 国立循環器病センター

藤里俊哉¹、岸田晶夫¹、菅 理晴¹、船本誠一¹、西岡 宏¹、吉田謙一¹、鎌田和歌子¹、山東 奈津子¹、木村 剛¹、宮崎 幸造¹、古園 勉¹、庭屋 和夫¹、中谷武嗣¹、北村惣一郎¹

【目的】足場材料 (scaffold) と細胞を用いて生体内もしくは生体内で組織再構築を行わせる再生医療では、複雑な形状および物性を有する組織を再生するための scaffold 開発について、人工材料の造形が困難である、あるいは生体と同等の力学特性を実現するのが困難であるなどの問題がある。我々は循環器系の再生医療を目的とし、同種・異種の心臓弁や血管組織から細胞を除去し、コラーゲンなどの構造マトリックスのみを用いた生体 scaffold (バイオ Scaffold) の技術開発を行っている。本研究では、我々が開発した超高压処理とマイクロ波照射を組み合わせた脱細胞化処理法を用いて、ミニブタの種々の組織を脱細胞化し、その効果について検討を行った。

【方法】クラウン系ミニブタ (ジャパンファーム) より各種臓器・組織を摘出し、細胞除去処理を行った。従来法である TritonX-100 溶液による常圧での浸漬処理を対照とし、これと TritonX-100 浸漬したのちに超高压およびマイクロ波照射による処理を行ったものとを対比した。細胞除去組織を HE 染色にて組織学的に観察するとともに、一部組織については内在レトロウイルスの除去についても調べた。超高压処理は、4℃において、10,000 気圧、10 分処理を基準とした。またマイクロ波照射による洗浄では、間欠照射によって系全体の温度を 37℃以下に保持し、所定時間行った。

【結果】それぞれの細胞除去処理方法について組織学的に検討を行った。常圧での TritonX-100 処理では、脱細胞化される組織の厚みに限界があり、組織深部の細胞除去には困難あるいは相当長時間の処理が必要であることが示唆された。超高压およびマイクロ波照射による処理では、数ミリメートル程度の組織深部まで完全に細胞を除去することができ、処理時間も大幅に短縮することが出来た。組織ごとの違いについては現在、検討中である。

5 再生医療用生体 scaffold の in vitro 自己細胞化

¹ 国立循環器病センター、² 鈴鹿医療科学大学医学工学部、³ 先端医療振興財団、⁴ 信州大学医学部

藤里俊哉¹、鎌田和加子²、山東奈津子²、吉田謙一²、西岡 宏³、船本誠一⁴、庭屋和夫¹、岸田晶夫¹、森反俊幸²、中谷武嗣¹、北村惣一郎¹

【目的】我々は循環器系の再生医療を目的とし、同種・異種の心臓弁や血管組織から細胞成分を除去し、残存したコラーゲンやエラスチンなどの構造マトリックスを生体 scaffold として利用する技術開発を行っている。この生体 scaffold にレシピエントの自己細胞を人工的に組み込み、in vitro にて予め自己と類似した組織を構築した後で移植するテラーメード型組織移植によって、移植後早期に自己組織化させ、修復性や成長性を与えることが可能になると考えられる。本研究では、脱細胞化処理した心臓弁組織へのレシピエント自己細胞の組み込みについて検討した。【方法】クラウン系ミニブタ（ジャパンファーム）より摘出した心臓弁あるいは血管組織に対し、4℃にて10,000 気圧の超高压圧加処理を10分間行った後、低温マイクロ波照射下にて洗浄することで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及び血管壁細胞を増殖させた後、生体 scaffold 内に血管壁細胞を汎用ディスペンサ装置にて注入播種するとともに、内面に血管内皮細胞を回転培養装置にて播種した。【結果と考察】本方法によって脱細胞化処理した心臓弁及び血管壁組織は完全に脱細胞化され、力学特性に影響を与えることなく、滅菌も同時に達成することが出来た。汎用ディスペンサ装置にて、生体 scaffold 内に島状に血管壁細胞を注入播種することが出来た。また、回転培養装置にて、内腔表面に均一に血管内皮細胞を播種することが出来た。さらに、続いて循環培養することで、播種した細胞を増殖することも可能であった。【謝辞】本研究の一部は循環器病研究委託費及び文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

6 肝組織構築を目指した3次元肝細胞培養法（ラジアルフロー型バイオリアクター）の確立とその基礎的検討

¹ 昭和大学病院一般消化器外科

安田大輔¹、青木武士¹、金正鍋¹、華 魯純¹、泉田欣彦¹、古泉友丈¹、榎並延太¹、加藤博久¹、清水喜徳¹、草野満夫¹

【目的】ラジアルフロー型バイオリアクターは、リアクター内に培地を放射状に供給することにより、肝小葉に近い環境を目指すことが可能なである3次元細胞培養リアクターである。我々はこのリアクターを用いて肝組織構築を目指した3次元培養法の基礎的検討を行った。

【方法】生後8週のSDラットを用い2-step collagenase digestion 法により 5×10^7 個のラット肝細胞を分離。担体はPVA (Polyvinyl-alcohol) スポンジを用いた。リアクター内に細胞を充填し、1週間培養を行った。充填後1、3、5、7日目にサンプリングを行いAlb分泌能、アンモニア代謝能、尿素合成能について検討した。また、7日目にPVAを除去し、形態学的検討も行った。

【結果】培養後5日目にはアルブミン分泌能は最高値 ($1.8 \pm 0.05 \mu\text{g/l}$) に達し、その後7日まで維持されていた。また尿素合成能においても同様にその機能は培養7日まで維持されていた。HE染色において多くの肝細胞はPVA上でviableであり、担体の辺縁に有意にaggregateしていた。更にそれらの細胞はPAS、ALB染色においても陽性発現していた。

【結語】ラジアルフロー型バイオリアクターを用いることにより、担体(PVA)に肝細胞集塊を形成することが可能であった。今後、PVA担体へ生着した肝細胞を用いることにより、新たな人工臓器あるいは細胞移植への展開が期待されると思われた。

621 超高压処理による安全な生体スキャフォールドの開発とそのレシピエント細胞化
Autologous cell seeding of safe bioscaffold prepared by ultrahigh pressure treatment

○正 藤里俊哉 (国循・再生医療) 西岡 宏 (先端医療財団)
庭屋和夫 (国循・心臓外科) 正 岸田晶夫 (国循・生体工学)
中谷武嗣 (国循・臓器移植) 北村惣一郎 (国循・総長)

Toshia FUJISATO, Kazuo NIWAYA, Akio KISHIDA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA
National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka
Hiroshi NISHIOKA, The Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe

1. 緒言

我が国では年間約9千件、米国では約2万件、世界中では約30万件の心臓弁置換術が施行されている。代用心臓弁としては機械弁の他に、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁があり、機械弁とは異なって抗凝固剤の服用が不要であるというQOL上の利点から、米国では約半数に使用され、我が国でも現在は約2割であるが、その割合は徐々に増加している。しかし、グルタルアルデヒドによって化学的に処理され、組織が固定化されているがゆえ、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15～20年程度の耐久性を有するが、若年者では5～10年程度の耐久性しか有せず、米国のガイドラインでは65歳以上の高齢者に使用が奨励されている。近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、死体から提供された凍結保存同種心臓弁が臨床で使用されつつあり、良好な成績が報告されている。凍結保存同種弁は機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っているとされる。また、不全の大動脈弁位に自己肺動脈弁を、肺動脈弁位に凍結保存同種弁を移植するロスと呼ばれる術式も優れた成績を上げている。自己肺動脈弁は抗原性を有さず、かつ患者の成長に伴ってサイズが大きくなる成長性を有しているため、特に小児患者で有効とされている。しかし、我が国では凍結保存同種弁の供給が絶対的に不足しており、限られた施設でのみ施行されているのが現状である。これらの諸問題を解決するために、組織工学及び再生医療技術を応用した代用弁及び血管の開発が試みられている。我々は、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスをスキャフォールドとして利用するアプローチを採用しており、ヒトあるいは動物から採取した心臓弁から、細胞成分や細菌、ウイルス、DNAを完全に除去あるいは不活化することで、現在の生体弁では不可能である再生型の組織置換を目指している。現在の異種生体弁では移植後も体内では異物として存在し、自己化されない。しかし再

生型組織では、固定化されておらず、かつ細胞成分が除去されているため、移植後に自己細胞が侵入することでリモデリングされ、自己組織化される。これにより、現在では自己組織移植以外では不可能な、小児患者においても移植後に成長する移植組織が作出し得ると考えられる。本報では、超静水圧処理による細胞除去方法、及び得られたスキャフォールドのレシピエント細胞化について報告する。

2. 実験

脱細胞化処理：クラウン系ミニブタ（(株) ジャパンファーム）から清潔下にてブタ心臓を摘出し、肺動脈弁を採取した。ハンス液で洗浄後、冷間等方圧加圧装置（CIP、神戸製鋼所製）を用いた低温下超高压印加処理（4℃、10,000気圧）によってドナー細胞を破壊し、マイクロ波照射下（(株) 東屋医科機械製）にてPBS溶液にて洗浄除去した。トリトンX-100による浸漬処理を対照とした。

処理後の評価：脱細胞化は組織学的に評価した。処理標本の組織断面をHE染色及びEVG染色により顕微鏡観察するとともに、表面を走査電顕にて観察した。組織内の内在性レトロウイルス（PERV）はPCR法によって評価した。組織からDNAを抽出し、PERVのDNAを増幅後、PCR産物を電気泳動した。力学特性は引っ張り試験によって評価した。心臓弁葉を幅3mm、長さ約15mmの短冊状に切り取り、力学試験機（(株) オリエンテック）にて引っ張り試験を行い、破断までの張力を測定した。応力歪み特性から弾性率を計算した。

細胞播種：将来のレシピエントとなるミニブタから大腿動脈を5cm程度摘出し、酵素処理（ロシュ社製）によって血管内皮細胞、及び平滑筋細胞と線維芽細胞を含む血管壁細胞を分離した。数週間の培養によるエクスパンド後、ディスペンサを用いて血管壁細胞を血管壁内に注入播種すると共に、ローターを用いた回転培養にて血管内皮細胞を播種した。さらに、血液ポンプによる循環培養にて、in vitroにおける組織再構築を行った。

3. 結果

脱細胞化処理：トリトンX-100溶液による界面活性剤浸漬処理では、弁葉基部の深部組織内細胞の核は処理24時間後でも染色されており、処理溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた。これに対して、10分間の超高静水圧印加処理及び続く2日間のマイクロ波照射下洗浄処理では、組織深部まで完全に細胞を除去することができた。E V G染色したところ、超高圧処理後においても弁葉内のコラーゲン線維やエラスチン線維が保存されていることが認められた。また、常在菌にて予め感染させた試料を脱細胞化処理したところ、界面活性剤処理では感染が除去できなかったが、超高圧処理では脱細胞化に加えて滅菌効果も併せ持つことが確認された。さらに、組織内のPERVも完全に除去されていた(図1)。力学特性を検討したところ、超高静水圧印加処理による影響はほとんど認められなかった。

細胞播種：デイスベンサを用いた細胞注入播種によって、血管壁細胞を脱細胞組織内に島状に注入することが可能であった。また、静置培養では、血管内皮細胞を均一に播種することが困難であり、培養後も細胞の増殖は見られなかったが、ローラーを用いた回転培養では、効率的かつ均一的に播種することができた。さらに、血液ポンプを用いた循環培養を続けることで、血管内皮細胞の生着が認められた。

4. 考察

我々は、再生医療の一つのアプローチとして、in vitroにおいて患者の自己組織と同等の組織構築を行った後で移植するテラメード移植を目指している。欠損した心臓弁に対する置換再生型医療素材では生体吸収性材料を用いたアプローチが主流である。しかし、ポリ乳酸などの生体吸収性材料では心臓弁のような形状を造形することが容易でなく、生体よりも硬いという欠点がある。高圧に耐える必要のある左心系では分解吸収速度の制御も容易ではない。我々のアプローチである生体由来組織ではこれらの欠点はないが、ドナー由来の抗原性を減弱する必要があり、動物由来の場合は未知の感染性やレトロウイルス等の除去が必須である。生体組織由来スキャフォールドの作製については、新規に開発した超高静水圧印加処理により、ドナー細胞を完全に破壊し、滅菌でき、さらに内在性レトロウイルスも完全に除去した安全なスキャフォールドを得ることができた。心臓弁は主に血管内皮細胞と平滑筋細胞、線維芽細胞からなる。本研究においては、スキャフォールド表面への血管内皮細胞の播種について検討したとこ

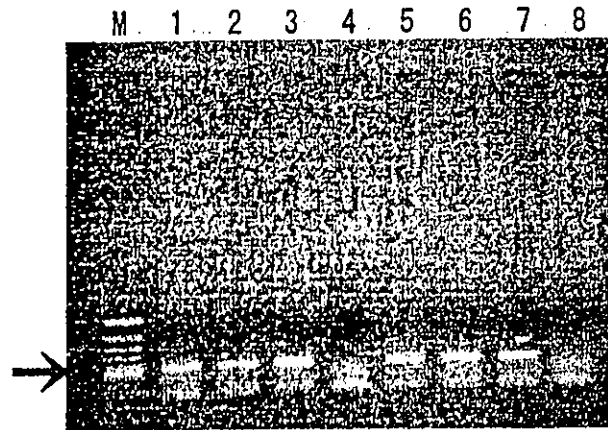


Figure 1. PCR product of PERV in the porcine vascular tissue. Lane 1&5: intact tissue, 2&6: Triton X-100, 3&7: Triton X-100 followed by washing, 4&8: CIP followed by washing.

ろ、回転培養法によって血管内皮細胞を血管壁面、弁葉表面にほぼ均一に播種することができた。また、スキャフォールド内面への血管壁細胞の播種については、デイスベンサを用いた細胞注入法によって、均一ではないものの播種することが可能であった。現在、得られたテラメード型心臓弁のミニプタを用いた大動物での移植実験を実施中である。さらに、血管や気管等の他組織への応用についても実施中であり、有効な結果を得つつある。

5. 結論

超高静水圧印加処理によって脱細胞化処理した安全な生体組織由来心臓弁スキャフォールド内表面に、回転培養法によって血管内皮細胞を均一に播種し、デイスベンサによって血管壁細胞を注入播種することができた。

6. 謝辞

本研究の一部は、厚生労働省厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費及び文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

7. 文献

- 1) Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Euro J Cardio-Thorac Surg* 1998; 14: 279-84.

A Novel Decellularized Technology for Preparing A Tissue Engineering Scaffold

T.Fujisato, A.Kishida, M.Hasegawa, S.Numata, K Niwaya,
T.Nakatani, K.Yamada, S.Kitamura

National Cardiovascular Centre, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan
e-mail: kishida@ri.ncvc.go.jp

Introduction

Decellularized tissues and those recellularization are widely studied to give more durability with potential growth and invisible immunogenicity to the conventional bioprotheses like glutaraldehyde-treated heart valves. Biodegradable materials are developed as scaffolds for the cell transplantation, however they are generally harder than intact tissues and not easy to be given the same shape and structure as biological tissues. We are investigating efficient processes of decellularization and recellularization of biological tissues to have bioscaffolds keeping intact structure and biomechanical properties. Our recent studies on newly developed decellularization and recellularization methods were reported.

Materials and Methods

Porcine pulmonary valves, aortas, and connective tissues were excised and treated by a newly developed method using ultrahigh pressure at the room temperature. They were then washed with PBS and subjected to the histological and biomechanical studies. Porcine vascular cells were isolated from the saphenous vein by collagenase digestion and expanded for about 3 weeks. The cells were then incorporated to the decellularized bioscaffold using a pulsatile flow bioreactor and a cell allocation system. The results were compared with those by the decellularization using Triton X-100 detergent¹⁾.

Results and Discussion

The leaflet and aorta were completely cell free when our new method was applied for 10 min. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the leaflets treated (Fig.1). However, the cells were still remaining inside an area of more than 1 mm depth in the tissue and both of the breaking strength and elastic modulus were increased when the tissue was immersed for 24hr in 1% Triton X-100 for cell removal. The elastica-van Gieson staining showed

that collagen and elastin fibers were well maintained

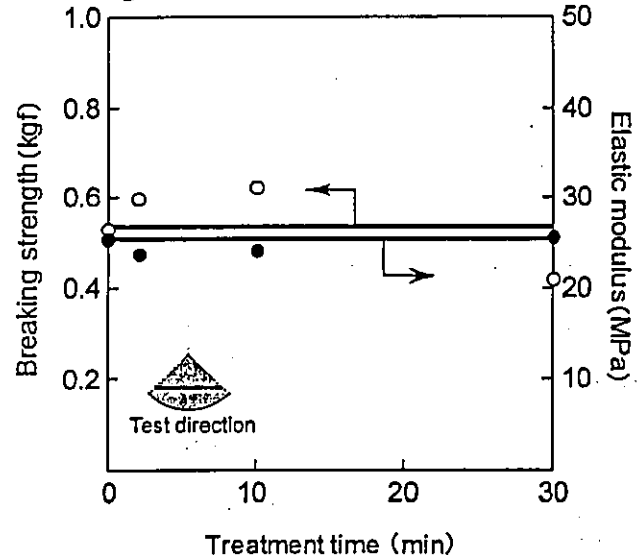


Figure1: Biomechanical Properties of the decellularized valve leaflets by the ultrahigh pressure treatment.

in the decellularized tissue. From the in vitro incubation test, the tissue was deinfected when the new method was applied to the tissue contaminated by normal bacteria floras. The vascular cells were well incorporated to the decellularized tissues.

Conclusions

Biological tissues decellularized by our new method having intact structure and biomechanical properties may provide more durable and safe bioprotheses.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Grants from The Ministry of Health, Labour and Welfare and The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

1. Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. (1998) Euro J Cardio-Thorac Surg. 14, 279-284.

Endothelial Cell Seeding and Expansion on Three-Dimensional Biological Scaffold

Toshia Fujisato, Satoshi Numata*, Kazuo Niwaya*, Akio Kishida[†],
 Takeshi Nakatani[‡], Kazuhiko Yamada, and Soichiro Kitamura
 Regenerative Medicine & Tissue Engineering, *Cardiovascular Surgery,
[†]Biomedical Engineering, and [‡]Organ Transplantation
 National Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, JAPAN

Decellularized xenograft tissue and its recellularization are widely studied to give more durability with potential growth and less immunogenicity to the current bioprostheses like xenograft heart valves. We are investigating efficient processes of decellularization and recellularization of the porcine heart valve as a biological scaffold with intact structure and biomechanical properties based on the native collagen, elastin, and basal membrane. In this paper, our recent study on newly developed decellularization and recellularization methods were reported.

Porcine hearts were isolated and stored at 4 °C immediately. The pulmonary valves were excised and treated by cold isostatic pressing of 10,000 atm at 4 °C for decellularization of donor cells. They were then washed with PBS and subjected to histological study by the light and scanning electron microscopy and biomechanical study by the tensile strength measurement. Porcine endothelial cells were isolated from the saphenous vein of a future recipient by collagenase digestion. The cells were expanded for about 3 weeks and then seeded onto the decellularized biological scaffold using a roller culture bioreactor for 2 hrs. The seeded cells were then expanded in pulsatile flow culture bioreactor. The results were compared with those of decellularization by a detergent incubation.

The leaflet and aorta were completely cell free when the porcine heart valve was treated by the cold isostatic pressing for 10 min (Figure 1a). There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the leaflets treated (Figure 2a). The elastica-van Gieson staining showed that collagen and elastin fibers were well maintained in the decellularized biological scaffold. From the in vitro incubation test, the tissue was deinfected when the pressing was applied to the valves contaminated by normal bacteria floras. The autologous endothelial cells were well seeded onto the surface of decellularized valves by the roller culture bioreactor (Figure 3). However, the cells were still remaining inside an area of more than 1 mm depth in the aortic tissue (Figure 1b) and both of the breaking strength and elastic modulus were increased (Figure 2b) when the valve was immersed for 24 hr in 1% Triton X-100 for cell removal.

Heart valves decellularized by the cold isostatic pressing may provide more durable and safe bioprostheses. The autologous cells were well incorporated using the roller culture and pulsatile flow culture bioreactors on the three-dimensional biological scaffold.

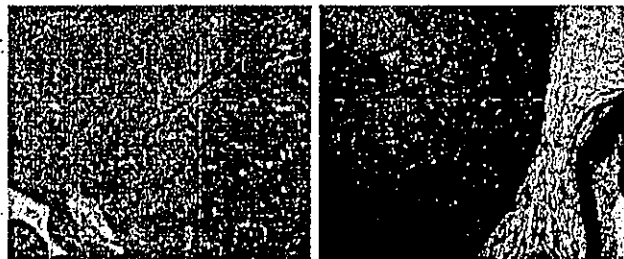


Figure 1. Porcine pulmonary valves treated with (a) cold isostatic pressing for 10 min and (b) 1% Triton X-100 for 24 hrs.

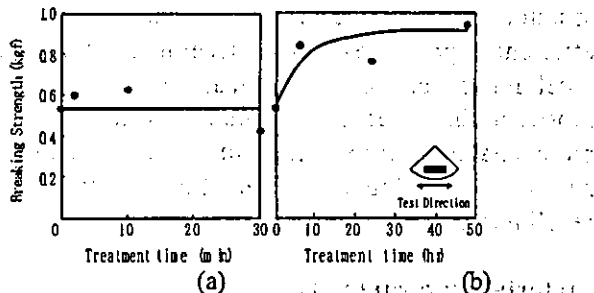


Figure 2. Breaking strength of porcine pulmonary valves treated with (a) cold isostatic pressing and (b) 1% Triton X-100.



Figure 3. Endothelial cells seeded onto (a) aortic wall and (b) leaflet surfaces by roller culture bioreactor.

This study was supported by the Research Grants from Ministry of Health, Labour and Welfare and Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

MS-3

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, 筏 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、修復機転が見込まれ、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網を塗抹し使用した。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 カ月)。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肢を広げると考える。

MS-4

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 として利用しうると考え、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し検討した。【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、短時間での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。

P-3-44

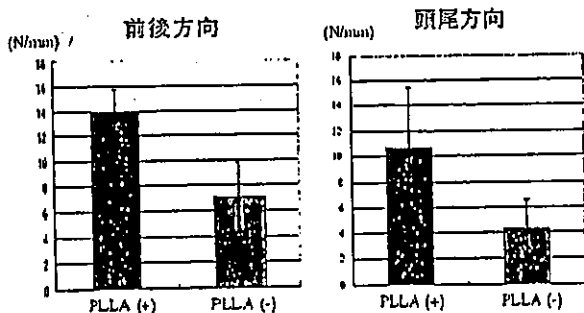
ポリ-L-乳酸 (PLLA) 胸骨ピンの術後の胸骨離断面のズレ予防効果に関する実験的研究

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



P-3-45

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、細胞骨格のみと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-分岐部までの 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 を解凍し、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】全例が生じた。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無かった。【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。さらに遠隔機能的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。

16. 心臓弁組織の脱細胞化とそのレシピエント細胞化

藤里俊哉²、西岡 宏^{2, 6}、沼田 智³、庭屋和夫³、岸田晶夫⁴、中谷武嗣⁵、北村惣一¹
国立循環器病センター¹再生医療部²、心臓血管外科³、生体工学部⁴、臓器移植部⁵
先端医療振興財団⁶

我々は自己弁に匹敵する特質を有した再生医療型代用弁の開発を、同種あるいは異種心臓弁からドナー由来細胞を除去した組織をscaffoldとして利用し、レシピエントの自己細胞を播種するアプローチにて進めている。

ドナーとなるミニブタから肺動脈弁を採取し、超高静水圧印加処理及び低温マイクロ波照射下洗浄処理することでドナー由来細胞を除去した。将来のレシピエントとなるミニブタから大腿動脈を摘出し、酵素処理によって血管内皮細胞を分離し、数週間の培養後、回転及び循環培養によって血管内皮細胞を播種した。

従来報告されている界面活性剤処理法では組織深部の細胞を除去することが容易でなかったが、本処理法では短時間にて組織深部まで完全に細胞を除去することができ、組織の滅菌も同時に可能であった。処理後においても破断強度や弾性率等の生体力学特性は未処理と同等であった。また、ミニブタ血管内皮細胞は回転及び循環培養によって脱細胞組織への均一な播種及び増殖が可能であった。

循環培養による生体 scaffold への血管内皮細胞播種

Endothelial cell seeding onto biological scaffolds by roller culture bioreactor

○藤里俊哉、*小越拓郎、*菅 裕亮、岸田晶夫、*大場謙吉、中谷武嗣、北村惣一郎

国立循環器病センター、*関西大学工学部

Toshia Fujisato, *Takuro Kogoshi, *Yusuke Suga, Akio Kishida, *Kenkichi Ohba,

Takeshi Nakatani, and Soichiro Kitamura

National Cardiovascular Center and *Kansai University

1. 緒言

我が国では年間約5千の大動脈弁置換術が施行されており、パーフルオロカーボン製の機械弁が80%、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁が20%使用されている。しかしながら、機械弁では催奇形性を有する抗凝固剤の毎日の服用、異種生体弁では10年程度しかない耐久性の問題が依然解決されていない。我々はこれらの問題を払拭し、さらに移植後の成長性を付与するため、再生医療型心臓弁の開発を行っている。その方法として、同種あるいは異種心臓弁組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスをscaffoldとし、in vitroにて患者の自己細胞を組み込むアプローチを採用している。これにより、生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると期待できる。本報では超高压印加及びマイクロ波照射によってドナー由来細胞を除去したミニブタ心臓弁scaffold表面に、循環培養によって効果的に血管内皮細胞を播種する方法について検討した。

2. 方法

Scaffold: NIBS系ミニブタ（日本農産工業）からブタ心臓を摘出し、肺動脈弁を採取した。ハンクス液で洗浄後、冷間等方圧加圧装置（神戸製鋼所製）を用いた低温下超高压印加処理（4℃、10,000気圧、10分間）にてドナー細胞破壊した。さらに、低温下マイクロ波照射装置（東屋医斗機械製）を用いてドナー細胞を洗浄除去した。

細胞播種: ミニブタから大腿動脈を5cm程度摘出し、酵処理（ロシュ社製）によって血管内皮細胞を分離した。週間の培養によるエキスバンド後、細胞を培地に分散し、Scaffoldとともに細胞分散液を循環培養チャンパー内へ封入し、ローラーによって2時間回転させることで細胞附着させた。その後、血液ポンプを用いた循環培養によって附着細胞を培養した。

3. 結果と考察

超高压印加及びマイクロ波照射処理により、組織内部のドナー由来細胞を完全に除去した心臓弁scaffoldを得ることができた。細胞除去処理による力学特性への影響は見られなかった。ミニブタ血管内皮細胞はヒト血管内皮細胞と同様、容易に培養、エキスバンド可能であった。心臓弁scaffoldに静置培養によって血管内皮細胞を播種した場合は、血管壁及び弁葉表面を含めて細胞を均一に播種することが困難であり、また、培地中の酸素濃度等による問題

のため、細胞の増殖は見られなかった。これに対し回転培養では、図1に示すように、細胞を均一に播種することができた。さらに、続けて血液ポンプを用いて循環培養することにより、附着させた内皮細胞を増殖させることができた。現在、これらの有効性をミニブタを用いた動物実験によって確認中である。

4. 結論

超高压印加処理及びマイクロ波照射によって細胞除去処理した心臓弁scaffold内表面に、回転培養及び循環培養によって血管内皮細胞を均一に播種することができた。患者の自己細胞を組み込んだ再生医療型的心臓弁移植の可能性が示唆された。

5. 謝辞

本研究の一部は、厚生労働省厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費及び文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

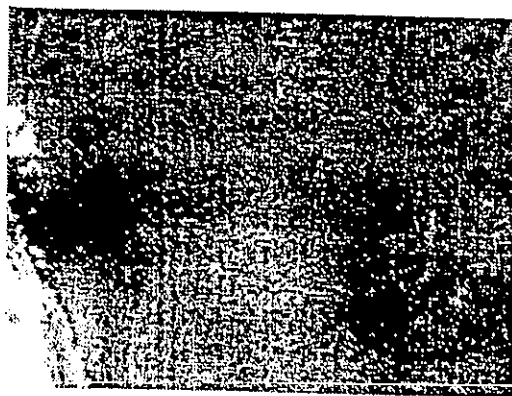
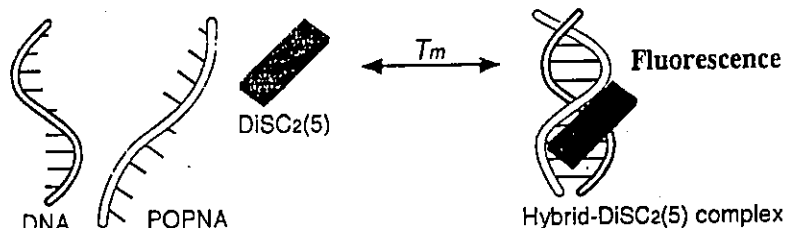


Figure 1. Surface of cell-seeded acellularized minipig valve by roller culture bioreactor.

【目的】我々はこれまでにピロリジン環を含むオキシペプチド核酸 (POPNA) が DNA と安定なハイブリッドを形成し、またこれらのハイブリッドの安定性は POPNA の立体構造異性体により異なることを明らかにしてきた。今回はこれら POPNA/DNA ハイブリッドが生体膜の蛍光プローブとして知られる



DiSC₂(5)と1:1で結合し、強く蛍光発光することがわかったので報告する。

【結果・考察】 *cis*-L-または *trans*-L-POPNA/DNA ハイブリッド (L-Hyb) と *cis*-D-または *trans*-D-POPNA/DNA ハイブリッド (D-Hyb) とは構造が異なることはすでに CD スペクトルから明らかとなっている。これらハイブリッドに DiSC₂(5) (D) を添加し、UV および CD スペクトルを検討したところ、D-Hyb ではほとんど変化が見られなかったが、L-Hyb では D に基づく UV の長波長シフトおよび誘起 CD が見られ、さらに L-Hyb に対し D を 1 等量以上添加すると飽和に達することがわかった。これらの結果により L-Hyb と D とは特異的にコンプレックス化していることがわかった。

次に、D は会合体を形成すると蛍光消光するが、この系では単量体で L-Hyb と結合するのでコンプレックス化した D からの蛍光発光が期待できる。そこで L-Hyb に D を添加し蛍光スペクトルを調べたところ、予想したように L-Hyb 非存在下の D の蛍光と比較して、著しい蛍光増強が見られた。また、L-Hyb が解離すると D からの蛍光発光はなくなり、コンプレックス化したときのみ D から蛍光発光がみられることがわかった。

1) M. KITAMATSU, M. SHIGEYASU, T. OKADA, T. NAKAI, M. SAITO and M. SISIDO, *Polym. Prep. Jpn.*, **51**, 3662 (2002).

Fluorescence Detection of Hybrids between Conformationally-Restricted OPNA (POPNA) and DNA

Mizuki KITAMATSU, Takashi NAKAI, Mamoru SAITOU and Masahiko SISIDO (Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Engineering, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700-8530, Japan)
Phone: 086-251-8219, Fax: 086-251-8219, e-mail: kitamatu@biotech.okayama-u.ac.jp

【目的】多くの非ウイルス性ベクターは DNA との静電的相互作用や疎水性相互作用によって複合化されている。これまで我々は超高压処理による水素結合性分子の相互作用を利用した集合体形成について検討してきた。超高压下では水素結合が強くなることが知られており、本手法では水素結合性の相互作用を利用した DNA-Polymer 複合体の形成が期待できる。モデル分子として水酸基を有するポリビニルアルコール(PVA)を用いて DNA-PVA 複合体の相互作用について検討を行った。

【実験・結果】DNA は分子量マーカー(1k bp)を用い、PVA 水溶液は 1~2×10⁻²% の濃度で調整し PVA 水溶液に DNA 水溶液を添加後、密封し、所定条件下で超高压処理した。Fig. 1 に重合度 4000(分子量 176000)の PVA 水溶液を用いたときの電気泳動の結果を示す。この結果より、超高压処理を行ったレーンにおいてのみ高分子量側にブロードなバンドがみられ、DNA-PVA 複合体の形成が確認された。また、DNA-PVA 複合体の T_m(融解温度)測定の結果、二種の T_m が確認された。一方は DNA 二重らせんの解離の T_m であり、他方は未知であり DNA-PVA 複合体の解離であると考えられる。以上の結果から、超高压処理によって DNA と PVA が水素結合性の相互作用によって複合体形成することが示された。

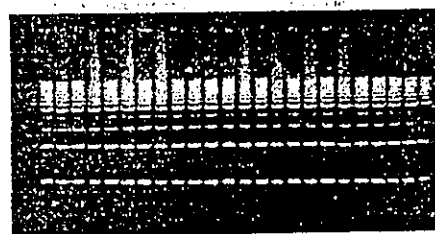


Figure 1. Electrophoresis results of DNA-PVA mixture of various concentration ratios.
Lane 13 1 kb DNA Ladder (Marker)
Lane 1,3,5,7,9,11,14,16,18,20,22,24 PVA+DNA+pressure
Lane 2,4,6,8,10,12,15,17,19,21,23,25 PVA+DNA(control)

Preparation of DNA-Polymer composites via hydrogen bond using ultra-high pressure

Akira Okuno¹, Tatsuro Ouchi¹, Yuichi Ohya¹, Akio Kishida², Tsutomu Furuzono², Kozo Miyazaki², Hidekazu Yoshizawa³, Yoshiro Kitamura³, Shingo Mutsuo³ (¹Faculty of Engineering, Kansai University 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan, ²National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ³Faculty of Environmental Science & Technology, Okayama University, Okayama 700-8530) TEL: 06-6833-5012(ext.2510), FAX: 06-6835-5476, e-mail: kishida@ri.ncvc.go.jp

鹿兒島大院理工¹⁾・CREST²⁾ ○東麻理子¹⁾・松崎典弥¹⁾・金子達雄¹⁾・明石 満^{1,2)}

【目的】近年、両親媒性高分子を用いた自己組織化の研究が盛んに行われている。ドラッグデリバリーシステムなどの医用材料を指向した生分解性の自己組織化ポリペプチドの研究も報告されているが、まだ報告は少ない。本研究では、生分解性や生体適合性を有した自己組織化ポリペプチドの合成を目的とし、生分解性高分子であるポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)の側鎖に疎水性アミノ酸誘導体であるL-フェニルアラニンエチルエステル(L-PAE)を導入した。このポリペプチドは、主鎖のγ-PGAによる親水性と側鎖のL-PAEの疎水性を制御することで、様々な形態の自己集合体を形成することが期待される。また、γ-PGAもL-PAEも生分解性及び生体適合性を有しているため、薬物を担持させることでドラッグデリバリー担体など医用材料としての応用が可能になると期待される。

【実験】γ-PGAにWSCを用いてL-PAEを導入した。また、WSCの量を変えることでL-PAEの導入率の制御を行った。透過型電子顕微鏡(TEM)によって自己集合体の形状を観察した。

【結果と考察】図1にTEM観察による共重合体の写真を示した。TEM観察から、Poly(γ-glutamic acid-g-L-Phenylalanine ethylester)(γ-PGA-g-L-PAE)の自己組織化による集合体の形成が観察され、L-PAEの導入率を変化させることでベシクルやロッド状、スフェアなど様々な形態をとることが確認された。スフェアの直径はTEM観察によりおよそ200~300 nmであることが確認された。この粒子は生分解性を有しているためドラッグデリバリーシステムなどへの応用が期待される。

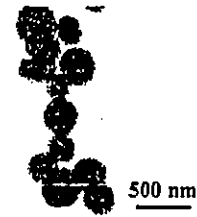


Figure 1 TEM image of 49% L-PAE introduced γ-PGA-g-L-PAE.

Preparation of Polypeptide Nanostructured by Controlling Hydrophilic-Hydrophobic Balance

Mariko HIGASHI¹⁾, Michiya MATSUSAKI¹⁾, Tatsuo KANEKO¹⁾ and Mitsuru AKASHI²⁾

Department of Nanostructured and Advanced Materials, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, JAPAN¹⁾, CREST, JST²⁾

Tel: 099-285-8323 Fax: 099-255-1229 e-mail: akashi@apc.kagoshima-u.ac.jp

鹿兒島大院理工 ○松崎典弥・芹澤 武・明石 満
国立循環器病センター 岸田晶夫

【目的】我々は、細胞増殖因子活性を有した組織工学用材料の構築を目的として、ヘパリンインスパイアードポリマーであるスルホン化ポリγ-グルタミン酸(γ-PGA-S)を合成し、γ-PGA-Sが高い塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)活性を有していることを報告してきた。また、γ-PGA-Sが酸や熱に対するbFGF保護活性を有していることも報告している。このγ-PGA-Sのハイドロゲルを調製することで、bFGFを変性させることなく担持、徐放可能なリリース担体が構築可能になると期待される。本会では、γ-PGA-Sハイドロゲルの調製及びbFGF徐放能等について報告する。

【実験】様々なスルホン化度のγ-PGA-Sを溶解させたNaHCO₃水溶液に、架橋剤としてエチレンジグリコールジグリシジルエーテル(EGDGE)を添加し、pH=5.0に調整後シリコンゴムを挟んだガラス板に流し込み48時間、40℃に加温することでシートゲルを作製した。直径1mmに打ち抜くことでディスクゲルを調製した。

【結果・考察】Figureに調製したγ-PGA-Sハイドロゲルの写真を示した。スルホン化度が30%以下のγ-PGA-Sはゲル化が起こったが、30%以上になるとゲル化しなかった。γ-PGA-Sの残存カルボキシル基を用いて架橋させているため、スルホン化度が上昇すると残存カルボキシル基の量が減少するためであると考えられる。これまでの結果より、スルホン化度70%のγ-PGA-S(γ-PGA-S70)が最も高いbFGF活性を有していたため、γ-PGAとγ-PGA-S70共存下で架橋させることでγ-PGA-S70ハイドロゲルを調製可能であった。調製したハイドロゲルのbFGF徐放活性等についても報告する予定である。

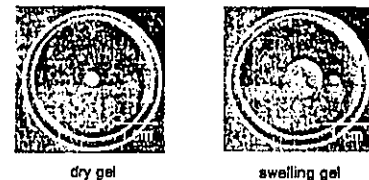


Figure The images of dry and swelling γ-PGA-S hydrogels.

Cytokine Release by Using Poly(γ-glutamic acid)-Sulfonate

Michiya MATSUSAKI, Takeshi SERIZAWA and Mitsuru AKASHI (Department of Nanostructured and Advanced Materials, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Kagoshima 890-0065),

Akio KISHIDA (Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 5-7-1 Fujishiro-dai Suita, Osaka 565-8565)

Tel: 099-285-8323 Fax: 099-255-1229 e-mail: akashi@apc.kagoshima-u.ac.jp

【目的】我々はこれまで、高分子基材上に無機セラミックス微粒子を共有結合にて固定化し、高分子基材の機械的物性を損なうことなく医療用材料としての無機・有機複合体の開発を進めてきた。今回、光触媒として抗菌効果に優れる酸化チタン(TiO₂)ナノ粒子と高分子基材(シリコンシート)を、共有結合を介して複合化させた新材料を開発したので報告する。

【結果・考察】アナターズ型 TiO₂ ナノ粒子(粒径 200~300 nm)を無水トルエン中にて γ -アミノプロピルトリエチルシランを 120°C で反応させ、アミノ化 TiO₂ 粒子を調製した。反応時間によってアミノ基の導入率が制御可能であった。シリコンラバー(膜厚 0.3mm)をコロナ放電処理した後アクリル酸をグラフト重合し、シリコン表面にカルボキシル基を導入した。調製したアミノ化 TiO₂ 粒子を水中で表面修飾したシリコンに吸着させ、180°C、6 時間、真空中で固相反応させた。得られた複合材料に線維芽細胞(L929 細胞)を播種後 1 昼夜培養し、走査型電子顕微鏡にて材料表面を観察した。図 1 に示すように、アミノ化 TiO₂ 粒子修飾シリコン上では高い細胞接着性が認められた。これは、超親水性 TiO₂ 粒子をアミノ基で修飾することにより、細胞接着性向上に適した表面改質がなされたことによると考察された。



Fig.1 Needlelike microspikes of the cells elongate to amino-modified TiO₂ nano-particles coated on silicone sheet.

Development of Amino-Modified Titanium Dioxide / Silicone Composite

T. Furuzono, S. Yasuda, A. Korematsu, A. Kisida (Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita Osaka 565-8565, Japan)

TEL: 06-6833-5012(ext.2438), FAX: 06-6835-5476, E-mail: furuzono@ri.ncvc.go.jp

【目的】我々はこれまで、高分子基材上にハイドロキシアパタイト(HAp)セラミックス微粒子を共有結合にて固定化し、高分子基材の機械的物性と HAp の生体活性を兼ね備えた無機・有機複合体の開発を進めてきた。今回、HAp 骨格の水酸基と反応するイソシアネート基を末端にもつポリマーをシルク繊維上にグラフト重合し、エマルジョン法にて合成した HAp ナノ粒子(単結晶)を共有結合で固定化した新規材料を開発したので報告する。

【結果・考察】ブロックドイソシアネートモノマーとしてメタクリル酸 2-(O-[1'-メチルプロピリデンアミノ]カルボキシルアミノ)エチル(MCEM)1.8 mmol, 開始剤としてペルオキシ二硫酸アンモニウム 0.18 mmol, 界面活性剤としてペンタエチレングリコールドデシルエーテル 0.18 mmol, 反応溶媒として水 6.0ml を混合した反応系に、シルク繊維(SF, 羽二重, 円形 1.5cmφ) 5 枚を加えて真空封緘後、50°C にて所定時間反応させた。グラフト重量増加は時間とともに増加し四時間で平衡に達した。反応後の SF に HAp ナノ粒子を吸着させた後、140°C、20 分、真空中でブロックドイソシアネート基からオキシムを脱ブロックさせ、HAp と反応させた。別途、HAp 粒子と MCEM とを同条件で反応させた生成物の赤外分光分析により、ウレタン結合に由来する C=O(1650cm⁻¹)および-NH-(1570cm⁻¹)の吸収が確認された。このことから、無機/有機物間に共有結合が存在していることが間接的に示唆された。これらに加えて、機械的強度試験および細胞との相互作用についても報告する。

Coating of Hydroxyapatite Nano-Single crystals on Polymer Fibers by Blocked Isocyanate

T. Furuzono*, S. Yasuda, J. Tanaka, A. Kisida (*Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita Osaka 565-8565, Japan and PRESTO, JST)

TEL: 06-6833-5012(ext.2438), FAX: 06-6835-5476, E-mail: furuzono@ri.ncvc.go.jp

III Pd154 荷電表面を有するポリ乳酸ミクロスフェアと多糖類とのポリイオンコンプレックス形成から成る生分解性マトリックスの生医学材料としての検討

関西大工 ○有村英俊・大矢裕一・大内辰郎；国立循環器病センター 岸田晶夫

[緒言] 我々はこれまでに、末端に4つのアミノ基を有する分岐ペプチド鎖末端ポリ乳酸とポリ乳酸(PLA)とのブレンド物から oil-in-water エマルジョン法を用いて表面に正電荷を有するポリ乳酸ミクロスフェア(MS⁺)を調製出来ることを報告した¹⁾。さらに、化学的架橋剤を用いない新たな生体適合性ヒドロゲルを調製することを目的として、MS⁺とアニオン性多糖であるヒアルロン酸ナトリウム(HA⁻)とのポリイオンコンプレックス(PIC)形成により、MS⁺が生分解性の架橋点として機能したヒドロゲル(HA/MS⁺)を調製することに成功した²⁾。本研究では、得られたヒドロゲルの *in vitro*での基礎的物性および *in vivo*における組織適合性に関して検討を加えた。

[実験・結果] ヒアルロン酸ナトリウム(HA⁻)は数平均分子量757,000のものを、MS⁺は平均粒径1.2μm、表面官能基量9.1μmol/gのものをそれぞれ使用した。Fig. 1に湿潤させた状態におけるPICマトリックスの引っ張りせん断試験の結果を示す。HA⁻に直鎖高分子電解質であるポリリシン(PK⁺; Mw=8,000)もしくは表面に負電荷を有するポリ乳酸ミクロスフェア[MS(PLA)]を添加して調製したマトリックスの場合、HA⁻と同等のせん断強度であった。これに対してMS⁺を添加した場合、添加量が増加するにつれてせん断強度が増大した。これは、MS⁺が多数のHA⁻とPICを形成し、MS⁺が架橋剤として機能したことによるものと考えられる。

1) H. ARIMURA, Y. OHYA, T. OUCHI and H. YAMADA, *Macromol. Biosci.*, 3, 18 (2003).

2) 有村英俊, 大矢裕一, 大内辰郎, 日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 24, 111 (2002).

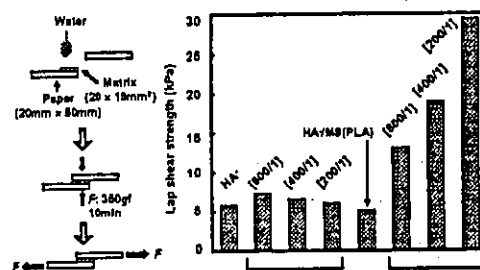


Fig. 1. Lap shear strength of HA⁻ and HA/MS⁺ PIC matrices (swelling ratio: 5). Rate of shear was 10mm/min.

Evaluation of Biodegradable Matrix Prepared through Polyion Complex Formation between Poly(lactide)-Based Microspheres Having Cationic Surfaces and Anionic Polysaccharides as Biomedical Material

Hidetoshi ARIMURA,¹ Yuichi OHYA,¹ Tatsuro OUCHI¹ and Akio KISHIDA² (¹Faculty of Engineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan and ²National Cardiovascular Research Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

Phone: 06-6368-0818, FAX: 06-6339-4026, e-mail: yohya@ipcku.kansai-u.ac.jp

III Pc155

アミノ末端ポリ乳酸を用いたポリ乳酸グラフト化多糖の合成とその物性評価

関西大工 ○三成哲司・大矢裕一・大内辰郎

[緒言] ポリ乳酸(PLA)は生分解性の医用材料としてすでに実用化されているが、通常の方法で合成されたPLAは反応性の高い官能基を有しておらず、化学修飾による機能賦与や、他の素材とのハイブリッド化は容易ではない。我々はこれまでに、PLAの片末端に一級アミノ基を有するアミノ末端ポリ乳酸(NH₂-PLA)の合成に成功している。このNH₂-PLAは末端アミノ基の高い反応性を利用して簡便な縮合反応でPLAと他の化合物とのハイブリッド化を可能にする新規な生分解性バイオマテリアル素材として非常に有用である。本研究では、NH₂-PLAと多糖類とのカップリング反応により、多糖類とポリ乳酸のグラフト共重合体を合成し、その共重合体の水溶液中での挙動などについて検討した。

[実験・結果] NH₂-PLAの合成は既報に従い合成した¹⁾。多糖としてプルラン(Pul)を選択し、その水酸基の反応性を高めるため、カルボキシメチル(CM)化しCM化Pul(CM-Pul)とした。DMF中CM-PulとNH₂-PLAとを縮合剤としてN-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline(EEDQ)を用いてカップリング反応を行うことでPLAグラフト化プルラン(Pul-g-PLA)を合成した。得られたPul-g-PLAの水溶液の光散乱(DLS)測定を行なったところグラフト共重合体が水中でナノメートルスケールの集合体を形成することを確認した。

1) 内田智之, 大矢裕一, 大内辰郎, 高分子学会予稿集, 50, 3682(2001).

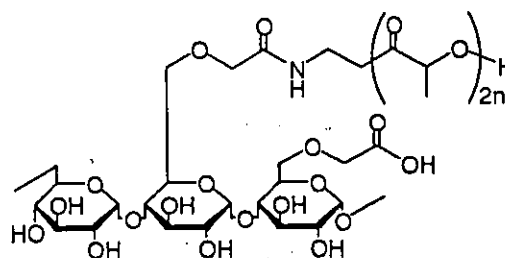


Figure 1. Chemical structure of Pul-g-PLA.

Synthesis of Poly(lactide)-grafted Polysaccharides Using Poly(lactide) with Terminal Amino Group and Their Properties

Tetsuji MINARI, Yuichi OHYA and Tatsuro OUCHI (*Faculty of Engineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan*)

Phone: 06-6368-0818, Fax: 06-6339-4026, e-mail: yohya@ipcku.kansai-u.ac.jp

【結言】 ポリ乳酸(PLA)およびその共重合体は、医療をはじめ幅広い分野に応用されている。より高い機能を付与するために、我々は、PLAに機能性分子の導入を試みている。本研究では、不飽和脂肪酸であるリシノール酸(RA)とL-乳酸(LA)を直接重合させることで新規な生分解性共重合体の合成について検討を行った。

【実験・結果】 RA-LAランダム共重合体の合成は、RAとLAを直接熔融重合させることにより行った。得られた生成物の同定を、 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 1)、 $^1\text{H-}^1\text{H}$ NMR, GPC, IRによって行った結果、主鎖中に二重結合を有するRA-LA乳酸ランダム共重合体が合成できていることが確認できた。得られた共重合体のRA分率の調整は、仕込み比を変えることにより容易に制御可能であった。また、 190°C 、24時間の重合で数平均分子量10000程度の共重合体を得られた。現在、この共重合体の物性測定と高分子量体の調製について検討している。

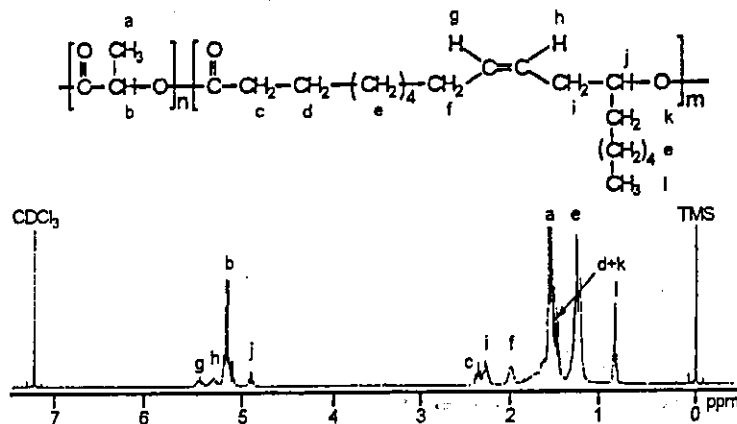


Fig. 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Poly(L-lactic acid-r-ricinoic acid) in CDCl_3

Synthesis and Characterization of Novel Biodegradable Copolymers Composed of Ricinoic Acid and L-Lactic Acid

Masaki NINOMIYA¹, Yuichi OHYA¹, Tatsuhiro OUCHI¹, Tsutomu FURUZONO², and Akio KISHIDA² (¹Faculty of Engineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan, ²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)
Phone: 06-6833-5004/5012(ext.2510), Fax: 06-6835-5476, E-mail: kishida@ri.ncvc.go.jp

【目的】 生分解性と生体吸収性を兼ね備えたポリ L-乳酸(PLLA)は、近年高い注目を集めている。本研究では、リパーゼに脂質を修飾した脂質修飾リパーゼ(LCL)を合成し、これを用いて穏和な条件下で PLLA の合成を行うことを目的とした。また、水酸アパタイトとのハイブリッド化について検討した。

【実験】 リパーゼ(*Rhizopus delemar*)を溶解した酢酸塩緩衝液(pH 5.6)に、脂質のアセトン溶液を 4°C で滴下した。混合溶液を24時間攪拌後、遠心分離し、得られた沈殿物を凍結乾燥してLCLを得た¹⁾。このLCLを用いて式に従い、反応日数、反応温度、溶媒を変化させ PLLA を合成した。重合の進行をTOF-MS、 $^1\text{H-NMR}$ で確認した。

【結果と考察】 LCLのUV-Vis、並びに蛍光スペクトルにおいて(図1)、リパーゼに起因する吸収(280 nm)、及び蛍光(330 nm)に加え、脂質に起因する蛍光(430 nm)を観察したことからLCLの合成を確認した。またUV-Vis スペクトルより求めた脂質含有率は89 wt.%であった。図2に、LCLを用い、異なる反応時間で合成した PLLA のTOF-MSを示した。モノマーの分子量である72間隔のピークが観られ、また、反応時間の増加と共に重合度の増加が確認された。より高分子量体の合成を目標とし、条件を変えて重合した結果、反応日数7日、反応温度 60°C 、溶媒にベンゼンを用いた際に、重量分子量 3.0×10^3 を得た。

【参考文献】 1) Y. Okahata, *J. Org. Chem.*, 60, 2244-2250 (1995)

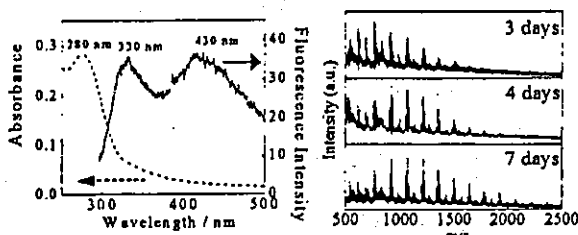
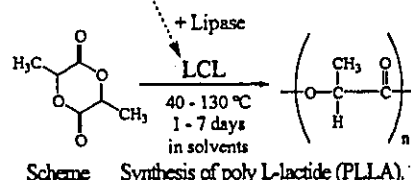
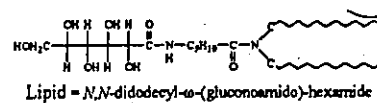


Fig.1 Fluorescence and Fig.2 TOF-MS of PLLA absorption spectra of LCL in polymerized in benzene at 80°C for various reaction times.

Synthesis of Biodegradable Polymers utilizing Enzyme - Amphiphilic Monomer Complex

Havato YOSHIKAWA, Yuko TAKEOKA, and Masahiro RIKUKAWA (Department of Chemistry, Sophia University, 7-1 Kioi-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8554, Japan) Tel: 03-3238-4250, Fax: 03-3238-4198, E-mail: m-rikuka@sophia.ac.jp