

1. 両親媒性トリブロックコポリマーを鋳型とし無機モノマーのゾルゲル重合によって、均一な細孔サイズをもつメソポーラス無機材料が得られる。トリブロックコポリマーの種類によりラメラ構造やヘキサゴナル構造をとることが明らかになっている。そこで、メソポーラス無機材料内への金属錯体の導入を目的とし両末端にターピリジン配位子を持つブロック高分子を合成した。

2. DMSO 中で粉末 KOH 存在下、ターピリジン配位子を両親媒性トリブロックコポリマー- $PO_x-EO_y-PO_x$ ($M_n=2000$) 末端の水酸基と反応させ、新規な末端にターピリジン配位子を持つ Tpy- $PO_x-EO_y-PO_x$ -Tpy を合成した。

3. 生成物である Tpy- $PO_x-EO_y-PO_x$ -Tpy の MALDI-TOF MS からターピリジン配位子の分子量に対応するピークのシフトが見られ、トリブロックコポリマーの末端にターピリジンが完全に導入されたことが明らかになった。また、Fe(II)を加えた UV-vis スペクトル測定を行ったところ、ターピリジン Fe 錯体特有の MLCT バンドが見られ、錯体の形成を示唆した。そして、Tpy- $PO_x-EO_y-PO_x$ -Tpy 存在下、アンモニアを触媒としテトラエトキシシラン (TEOS) のゾルゲル重合を行い、Tpy- $PO_x-EO_y-PO_x$ -Tpy を含む有機-無機複合体を形成させた。それを FT-IR, TGA などから確認した。X 線回折測定や TEM 観察によるこの有機-無機複合体の超分子構造について報告する。

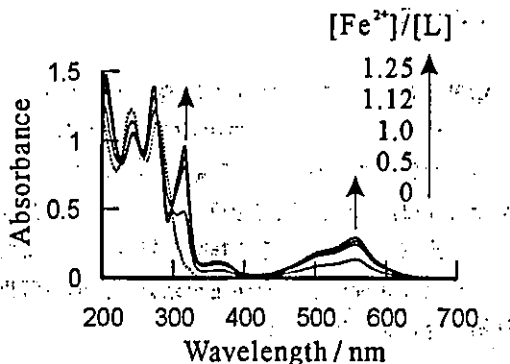
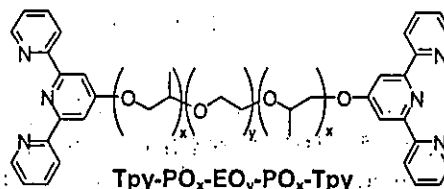


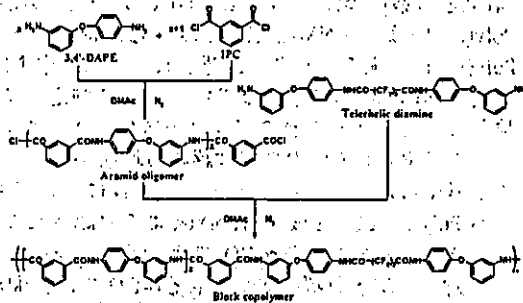
Fig. UV-Vis spectral change of Tpy- $PO_x-EO_y-PO_x$ -Tpy (L) by the addition of FeCl₂ in methanol.

Novel Organic-Inorganic Composites Templated by Amphiphilic Triblock Copolymer Possessing Terpyridine Terminate
 Yayoi IWASHIMA*, Mutsumi KIMURA*, Masahiro SUZUKI*, Kenji HANABUSA*, and Hirofusa SHIRAI* (*Department of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan and †PRESTO, JST Phone: 0268-21-5499, e-mail: mkimura@giptc.shinshu-u.ac.jp)

[緒言] ヒドロキシエチルメタクリレート・スチレン共重合体¹⁾、セグメント化ポリウレタン²⁾、アラムド・シリコン樹脂³⁾に代表される医療用ブロック共重合体は、マイクロ相分離構造を有することにより、優れた血液適合性や機械的特性などの高い機能性を発現することが知られている。我々は撥水撥油性を有し、かつ人工血管用材料に应用されている含フッ素高分子に着目し、それと比較して極性が大きく異なり、高強度・高弾性率の特性を有する芳香族ポリアミド(アラミド)とブロック共重合を行うことにより、高機能性を有する新規医療用材料を開発することを目指している。これまで、フッ素部分を有するジアミンモノマーを用いてのブロック共重合体の合成を発表した。今回、フルオロエチレンセグメント及びアラミドセグメントの鎖長を伸ばしたブロック共重合体の合成を行い、その検討を加えたので報告する。

[実験] テトラフルオロエチレンジカルボン酸(TFSA)またはドデカフルオロステリン酸(DFSA)と3,4'-ジアミノジフェニルエーテル(3,4'-DAPE、和歌山精化工業(株)からテレケリックジアミンを合成し、それを基にして重縮合法により目的の共重合体を得た。Scheme 1にその合成の一例を示す。

[結果・考察] テレケリックジアミンおよびブロック共重合体の同定はIR、¹H-NMRにて行った。アラミド鎖長延伸共重合体の場合、Scheme 1に示すように、3,4'-DAPEとイソフタル酸クロリド(IPC)を反応させてオリゴマーを作り、テレケリックジアミンを加えることで合成を行った。NMR及びGPCの結果より、フッ素導入量が減るにつれ、分子量は増加する傾向が見られた。これはポリマー内のアラミド部分の増減が分子量の増減、フッ素の導入量に寄与していることを示唆している。得られたポリマーの中には従来のアラミドでは不溶であった溶媒(テトラヒドロフラン等)に溶解または膨潤するものもあつた。これはフッ素原子の導入によりポリマー分子間のパッキングが緩んだからである。得られたポリマーは加工性に優れていることが示唆された。



Scheme 1 Synthesis of fluoroethylene-aramid block copolymer

1) T. Okano, et al., *J. Appl. Polym. Sci.*, 22, 369(1978). 2) J.-W. Boretos, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 5: 373(1971). 3) M. Akashi, et al., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 5, 89(1993). 4) A. Korematsu, et al., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, in contribution.

Synthesis and characterization of block copolymers having fluoroethylene and aromatic polyamide segments
 Arata Korematsu, Tsutomu Furuzono, and Akio Kishida (National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565-8565, Japan) Phone: 06-6833-5012 (ext. 2438), FAX: 06-6872-8090, e-mail: korematsu@ri.ncvc.go.jp

S5-4

新しい物理処理による再生医療用バイオ Scaffold 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¹

¹ 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 KITAMUERA¹

¹National 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 Scaffold)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

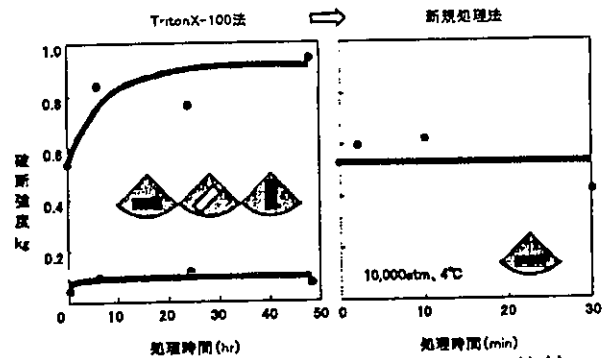


図1. 脱細胞化法による組織物性変化の比較

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ズニングが見られたが、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にて可能であり、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へレシピア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私試し、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(ロシュ)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

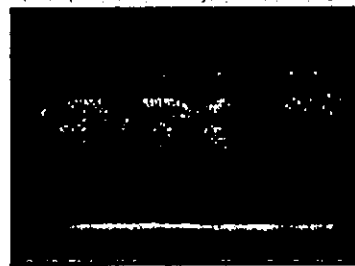


図1. 回転培養用チャンバー

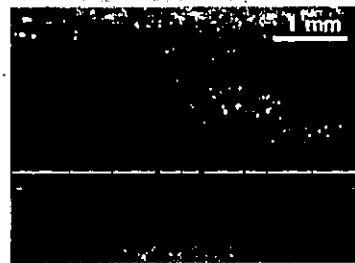


図2. 心臓弁 scaffold に付着した内皮細胞

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

(国立循環器病センター) 藤里俊哉、岸田晶夫、中谷武嗣、山田和彦、北村惣一郎
(先端医療振興財団) ○西岡 宏

1. 緒言

現在、人工心臓弁は我が国においても年間9,000人以上の患者に使用され、最も一般的に使用される人工組織の一つとなっている。しかしながら、機械弁は催奇形性のある抗凝固剤を毎日服用する必要があり、異種生体弁では10年程度の耐久性しかない。また、いずれもサイズが変わらないため、小児患者では複数回の移植手術が避けられない。そこで組織工学技術を用いることによって、自己心臓弁に匹敵する再生医療型代用弁の開発が模索されている。我々は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スキャフォールドとして利用し、そこへ患者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移植組織の創製を目指している。スキャフォールドが平面の場合は、静置することで容易に細胞を播種することが可能であるが、心臓弁のように複雑な三次元表面の場合は容易でない。本報では、回転及び循環培養による細胞播種について報告する。

2. 実験

モデル実験として内径4mmのガラス管内に培養ヒト血管内皮細胞分散液を封入し、37℃にて静置、血液ポンプにて循環培養、あるいはローター装置(アズワン製BR-2)上にて回転させることで細胞を播種した。同様に脱細胞化心臓弁を、内径2cmのアクリル製チャンバー内にミニプタ血管内皮細胞分散液とともに封入し、37度にて血液流出側を上方に静置、拍動型バイオリアクター装置にて循環培養、あるいはローター装置上にて回転させることで細胞を播種した。2時間経過後、続けてインキュベータ内で静置培養あるいは遠心型血液ポンプにて循環培養を行った。付着細胞はトルイジンブルー染色あるいはH&E染色後、光学顕微鏡にて観察した。

3. 結果と考察

心臓弁スキャフォールド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、5日間の培養後でも細胞の増殖は見られなかった。血液ポンプを用いたガラス管への循環培養播種では、試料を垂直に設置して上方に循環させた場合、低流速では比較的均一に播種することができたが、付着数は多くなかった。試料を傾斜させて設置した場合は付着数が多かったが、均一ではなく下方部分により多くの細胞接着が認められた。これに対して、ローターを用いた回転培養では均一に播種することができ、また、循環培養と比較して細胞浮遊液が少量で済むため、効率的に細胞を播種することができた。さらに続けて5日間、静置及び循環培養したところ、循環培養では全面に渡りコンフルエントになったが、静置培養では試料下部のみコンフルエントであった。ローターを用いた回転培養によって脱細胞化心臓弁組織へ細胞を播種したところ、血管壁面のみならず弁葉表面へも均一に細胞を播種することができた(図1)。

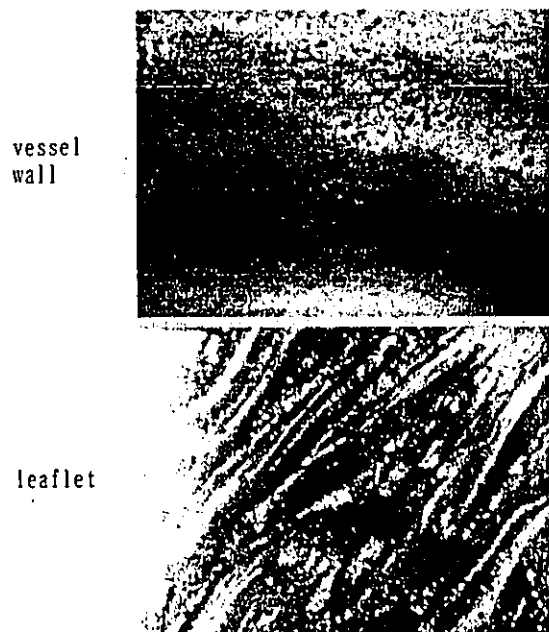


Figure 1. Endothelial cell seeding by roller incubation onto decellularized valve scaffold (toluidine blue stain).

生体組織の脱細胞化及び自己細胞化によるテーラーメイド型心臓弁移植

○藤里俊哉²、沼田 智³、庭屋和夫⁴
岸田晶夫⁵、中谷武嗣⁴、北村惣一郎¹

¹国立循環器病センター²再生医療部、
³心臓血管外科、⁴臓器移植部、⁵生体工学部

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%で機械弁、20%で異種生体弁が使用される。近年、凍結保存同種弁を提供する組織バンクが整備され、自己肺動脈弁を大動脈弁位に、肺動脈弁位に同種弁を移植するRoss手術を含め、米国では同種弁及び自己弁が5%程度に達している。自己弁は抗原性を有さず、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おり、特に小児患者で有効とされる。機械弁は抗血栓性、異種生体弁は耐久性が依然として解決されておらず、同種弁も提供数が絶対的に不足している。そのため、組織工学技術による自己弁に匹敵した再生医療型代用弁の開発が模索されている。そのアプローチには、生体吸収性人工材料のscaffoldを用いるものと、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マトリックスをscaffoldとして利用するものがあり、我々は後者を採用している。脱細胞化組織scaffoldに患者の自己細胞を組み込んだテーラーメイド型心臓弁移植によって、自己修復性や成長性を有する代用弁が創製できると期待できる。

ドナーとなるNIBS系ミニブタから肺動脈弁を採取し、冷間等方圧加圧装置を用いた低温下超高压印加処理を行い、続けて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。従来報告されているトリトンX-100溶液を用いた界面活性剤浸漬処理による脱細胞化を対照とし、組織学的及び生体力学的に評価した。次に、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、酵素処理によって血管内皮細胞を分離し、数週間の培養後、回転培養によって血管内皮細胞を播種した。数日間の循環培養後、レシピエントのミニブタに心補助下にて肺動脈弁置換術を施行した。免疫染色によって自己組織化を評価した。

界面活性剤浸漬処理では、厚さ数百 μm の弁葉内においては処理6時間後には細胞核は染色されなかったが、弁葉基部の心筋組織内細胞の核は処理24時間後でも表面から1mm以遠では染色されており、処理溶液の浸透性が悪いためであると考えられた。これに対し、超高压印加及びマイクロ波照射洗浄処理では、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た。また、常在菌にて予め感染させた試料を処理したところ、界面活性剤処理では感染が除去できなかったが、超高压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。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の保存が組織学的に認められ、破断強度や弾性率等の生体力学特性が未処理と同等であることから裏付けられた。ミニブタ血管内皮細胞は、静置培養ではscaffoldに細胞を均一に播種することが容易でなく、細胞の増殖も見られなかったが、回転培養及び循環培養では均一な播種及び増殖が可能であった。また、動物実験の結果から、自己細胞を播種しておくことにより、自己化の促進されることが認められた。

新規に開発した脱細胞化処理により、安全な生体組織scaffoldを得ることができた。動物実験によって成長性や耐久性を確認し、今後数年以内の臨床応用を目指した研究開発を進めている。

なお、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。

16. In Vitro Endothelial Cell Seeding and Expansion on 3d Decellularized Valve Scaffold

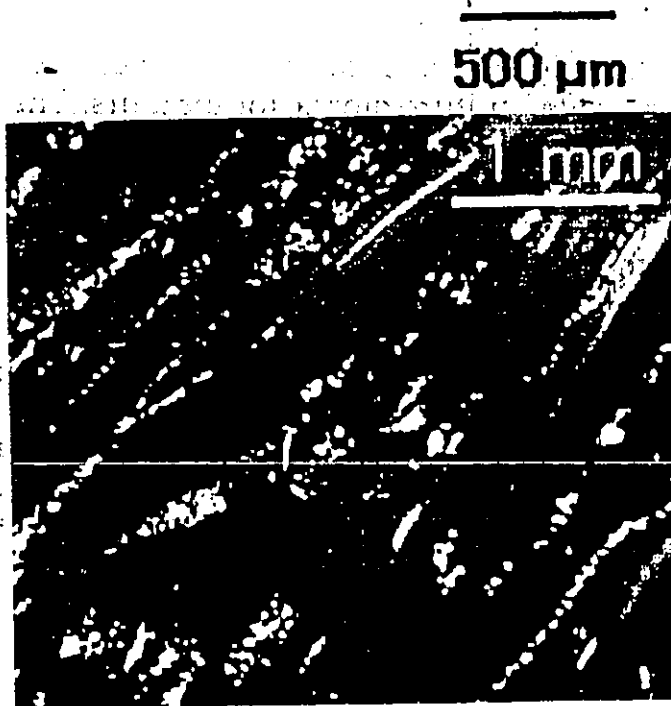
Toshia Fujisato, Satoshi Numata, Kazuo Niwaya, Akio Kishida, Kazuhiko Yamada, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura
National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

OBJECTIVES: Decellularized xenograft tissue and its recellularization are widely studied to give more durability with potential growth and less immunogenicity to the current bioprostheses. In this paper, our recent study on newly developed decellularization method using ultrahigh pressure treatment and recellularization method using roller culture bioreactor were reported.

METHODS: Porcine heart valves were excised and treated by cold isostatic pressure of 10,000 atm at 4 °C for decellularization. They were then washed with PBS under microwave irradiation and subjected to histological and biomechanical studies. Porcine endothelial cells were isolated from the femoral artery of a future recipient by collagenase digestion. The cells were expanded and then seeded onto the decellularized 3D scaffold using a roller culture bioreactor for 2 hrs. The seeded cells were then expanded in pulsatile flow culture bioreactor.

RESULTS: The leaflet and aorta were completely cell free when the porcine heart valve was treated by the cold isostatic pressing for 10 min (Fig.1 upper). There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the leaflets treated. From the in vitro incubation test, the tissue was disinfected 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 (Fig.2 lower).

CONCLUSIONS: Heart valves decellularized by the cold isostatic pressing may provide more durable and safe bioprostheses. The autologous cells were well incorporated using the roller and pulsatile flow culture bioreactors on the 3D biological scaffold.



P156. Immunological and Histological Evaluation of Decellularized Allograft in a Pig Model: Comparing with Cryopreserved Allograft

Satoshi Numata, Kazuo Niwaya, Tohsiya Fujisato, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura
National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

OBJECTIVES: Remodeling process of decellularized allograft after implantation is still unclear. We evaluated hemodynamics, recellularization and immunological reaction of the decellularized allograft 4 weeks after implantation comparing with cryopreserved allograft in a pig model.

METHODS: Six porcine pulmonary allografts were harvested from mini pigs. All the grafts were cryopreserved for 4 weeks. In 2 pigs, the graft were decellularized with Triton-X solution and static reseeding of the valve surface was performed with autologous endothelial cells which were harvested from leg artery. In other 2 pigs only decellularization was done and reseeding was not done. In other 2 pigs, reseeding and decellularization were not done as control group. Under right heart bypass, the right ventricular outflow tract was replaced in 6 mini pigs respectively. After 4 weeks the grafts were explanted. Analysis included direct pressure measurement, echocardiography, macroscopy, light microscopy with hematoxylin and eosin staining, and immunohistochemical studies to allow indication of macrophages, T lymphocytes, endothelial cells, fibroblasts, and myofibroblasts.

RESULTS: Hemodynamically and macroscopically there were no major differences between the three groups. Immunohistochemistry showed, only in the control group, influx of macrophages and T lymphocytes at the cusps. With decellularized group, confluent endothelial cell coverage was found, and interstitial part of the graft were found to be repopulated by fibroblast and myofibroblast. However, there were a few macrophages and T lymphocytes.

CONCLUSIONS: Decellularization of cryopreserved allograft could reduce inflammatory changes of the cusps. It may improve the durability of the allograft.

22 超高压処理による DNA とポリビニルアルコール(PVA)の複合体形成評価

関西大工 〇奥野 暁 大矢裕一 大内辰郎
国立循環器病センター 宮崎幸造 古菌 勉 岸田晶夫
岡山大環境理工 六雄伸吾 北村吉朗 吉澤秀和

e-mail: aokuno@ri.ncvc.go.jp

Tel: 06-6833-5012(ext. 2510), Fax: 06-6835-5476

【緒言】

多くの非ウイルス性ベクターは静電的相互作用や疎水性相互作用によって DNA と複合化されている。本研究では水素結合性の相互作用で DNA と複合化を行う。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高分子微粒子の新規な調製法や、構造体形成について検討を行ってきた。超高压下では水素結合が大きく変化することが知られており、水素結合性の相互作用を利用し分子集合体の構築を行ってきた。これは従来用いられていた温度や pH, 濃度などの外部環境ではなく圧力を用いた独創的な構築方法である。高分子として側鎖に水酸基を有するポリビニルアルコール(PVA)を用いた場合、高濃度領域(5~20w/v%)においては成形性の優れたハイドロゲルが得られ、ナノオーダーで網目構造を有する集合体の構築が確認された。また、低濃度領域(0.01~1w/v%)においてはナノ粒子の形成が確認された。これを応用し超高压処理による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。本研究では、モデル分子として PVA を用い、DNA-PVA 複合体の形成および特性について検討を行った(Fig. 1)。

【実験】調製

重合度が 500, 1700, 2400, 4000, 17900 の PVA と、電気泳動用の Marker(100 bp Ladder DNA, 1 kb Ladder DNA)およびプラスミド DNA(pEGFP-C1)を用いた。PVA 溶液を $1\sim 2 \times 10^{-5}\%$ の濃度で 12 種類調製し、DNA 溶液($2 \times 10^{-4}\%$)を添加後、密封し、所定の条件下で超高压処理した。得られた複合体はゲル電気泳動、融解温度(T_m)測定、CD スペクトルにより解析を行った。

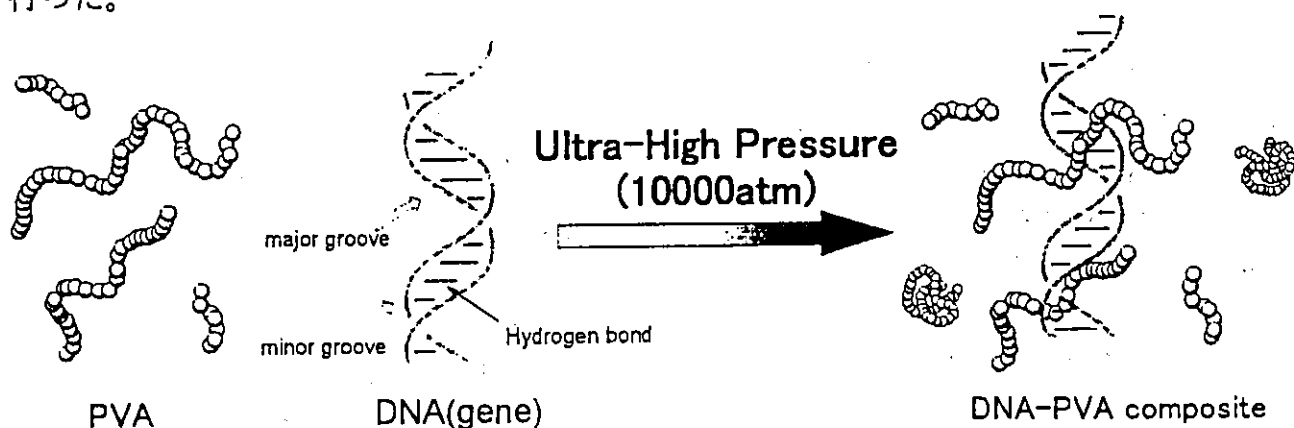


Fig. 1 Schematic illustration of DNA-PVA composite.

19) スルホン化ポリ(γ-グルタミン酸)ハイドロゲルの

組織工学材料への応用展開

(鹿児島大院理工) ○松崎典弥・芹澤 武・明石 満

(国立循環器病センター研究所) 岸田晶夫

電話: 099-285-8323 / Fax: 099-255-1229 / E-mail: akashi@apc.kagoshima-u.ac.jp

【緒言】近年、組織工学や再生医療の研究が世界中で盛んに行われており、細胞と材料、細胞増殖因子の制御が重要であると考えられている。損傷・移植部位に適した細胞を選択・採取し、その細胞や損傷部位に適した細胞増殖因子を選択し、選択した細胞増殖因子に対して高い活性を有した材料を用いて3次元マトリックスを形成する必要がある。

我々はこれまで、細胞増殖因子活性を有しているヘパリンに着目し、生分解性ヘパリンインスパイアードポリマーについて研究を行ってきた。ヘパリンは生体分子の中で最も高い塩基性を有している糖であり、様々な細胞増殖因子の活性を有していることが知られている。我々はヘパリンの電荷に着目し、ヘパリンのように硫酸基(強酸)とカルボキシル基(弱酸)を有した高分子を合成してその割合を制御することで、細胞増殖因子活性を有した新規な生分解性高分子が調製可能であると考え、側鎖にカルボキシル基を有しているポリ(γ-グルタミン酸)

(γ-PGA) にスルホン基を導入したスルホン化γ-PGA (γ-PGA-S) を合成し、その生理活性について報告してきた^{1,2)}。このγ-PGA-S は、スルホン基の導入率をコントロール可能であり、ヘパリンやデキストラン硫酸と比較してかなり低い抗血液凝固活性を有しているため、*in vivo* で用いた際にヘパリンのように出血の副作用の可能性が少ないことが期待される¹⁾。また、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)の活性について評価したところ、72%スルホン基を導入したγ-PGA-S72 が最も高いbFGF活性を有しており、その活性はヘパリンと同等であることを見出した²⁾。このγ-PGA-S72 のbFGF活性メカニズムに関しては現在詳細に検討中であるが、おそらくスルホン基とカルボキシル基の割合とポリペプチドの高い運動性に起因しているのではないかと考察される。

本会では、組織工学材料への応用を目的としてこのγ-PGA-Sのハイドロゲルを調製した。ハイドロゲルは、架橋剤としてエチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDGE)を用いて調製した。γ-PGA-Sのカルボキシル基をEGDGEで直接架橋させると、γ-PGA-Sのスルホン基とカルボキシル基の割合が変化するためγ-PGA-S72の高いbFGF活性を利用することができないことが予想される。そこで、スルホン基を導入していないγ-PGAとγ-PGA-S72のヘテロゲル(γ-PGA-net-γ-PGA-S72: S72-netgel)を調製することでこの問題を解決した。また、調製したS72-netgelの細胞接着性・増殖性、bFGF活性等について検討したので報告する。

【実験】<S72-netgelの調製>

γ-PGA 0.5 μmol (645 mg)を溶解させた3 wt%のNaHCO₃水溶液にγ-PGAに対してγ-PGA-S70を10、30、50、100%の割合で添加し、さらに架橋剤であるEGDGEをγ-PGAのカルボキシル基に対してエポキシ基が等量になるように添加してpH=5.0に調整した。その後、シリコンゴムを挟んだガラス板に流し込み、48時間、40℃に加熱することでシートゲルを作製した。3日間蒸留水で膨潤させることにより残存物を除去し、作成したシートゲルを直径1 mmに打ち抜くことでディスクゲルを調製し、様々な評価を行った。

<S72-netgelの細胞接着性試験>

γ-PGA-S70の割合が異なるS72-netgelと、比較サンプルとして様々なスルホン化度のγ-PGA-SをEGDGEで直接架橋させたハイドロゲル(γ-PGA-Sハイドロゲル)の細胞接着性について検討した。それぞれのハイドロゲルを、24 well プレートに設置し、ハイドロゲル上にL929マウス繊維芽細胞を1.0×10⁴ cells/ml播種し、血清・無血清培地中で24時間インキュベート後の細胞数とその形態を評価した。

Table 1 Preparation of γ -PGA and γ -PGA-S hydrogels, S72-netgels.¹⁾

Run		Sulfonate content (%)	γ -PGA-S (μ mol)	γ -PGA (μ mol)	Crosslinking agent concentration ²⁾ (mmol)	[epoxy] / [COOH]	Swelling ratio ³⁾
1	γ -PGA hydrogel	0		0.50	2.50		83.0
2		5.0			2.38		100
3		10			2.25		120
4		16			2.13		150
5	γ -PGA-S hydrogel	21	0.50		2.00	1.00	180
6		24			1.88		210
7		32			1.75		370
8		72			0.75		-
9		6.0	0.05				380
10	S72-netgel	16	0.15	0.50	2.50	1.00	310
11		22	0.25				44.0
12		35	0.50				40.0

1) Reaction time was 48 hr, reaction temperature was 40 °C, pH = 5.0.

γ -PGA hydrogel and S72-netgels conc. = 20 wt%, γ -PGA-S hydrogels conc. = 55 wt%.

2) EGDGE

3) Swelling ratio = $(W_s - W_d) / W_d$, W_s and W_d were the weight of the swollen and dried hydrogels, respectively.

【結果と考察】

Table 1 に種々のハイドロゲルの調製条件を示した。 γ -PGA に対する γ -PGA-S70 の割合が 10、30 % のハイドロゲル (S72-netgel-6、S72-netgel-16) の膨潤度はおよそ 300~400 程度と非常に高く、ゲルの強度も低かった。これに対して γ -PGA-S70 の割合が 50、100 % の条件で調製したハイドロゲル (S72-netgel-22、S72-netgel-35) の場合、膨潤度はどちらも 40 程度で、強度も高く操作性に優れていた。これは、スルホン基の効果であると考えられる。S72-netgel-22、35 の場合、スルホン基近傍でプロトン濃縮が起り、近くに存在するカルボキシルイオンがプロトン化されて COO⁻ が COOH (カルボキシル基) となり、カルボキシル基同士の水素結合による物理架橋が形成されたために低い膨潤度のゲルが形成されたと考えられる。S72-netgel-6、16 の場合は、 γ -PGA-S70 の量が少ないために水素結合が形成されなかったのではないかと考えられる。

Table 2 には、種々のハイドロゲルの細胞接着性を示した。 γ -PGA-S70 を直接架橋させたハイドロゲル (Run 2~7) と比較して S72-netgel-22、35 は高い細胞接着性を有していることが確認された。これは、S72-netgel-22、35 中に存在する γ -PGA-S70 が血清中に存在する接着タンパク質と静電相互作用することで、接着タンパク質がハイドロゲル表面に吸着したためであると考えられる。

本会では、細胞増殖性や bFGF 活性についても報告する予定である。

【引用文献】

- 1) M. Matsusaki et al., *Bioconjugate Chem.*, 13, 23 (2002).
- 2) M. Matsusaki et al., *Bioconjugate Chem.*, revised.
- 3) M. Kunou et al., *Biomacromolecules*, 1, 451 (2000).

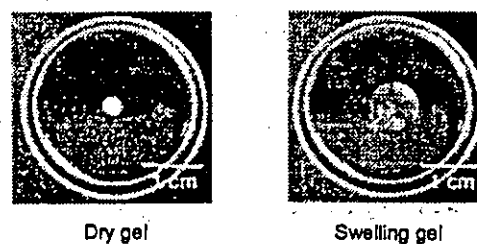


Figure 1 Dry and swelling S72-netgels.

Table 2 L929 cell adhesion activity on various hydrogels.¹⁾

Run	Sulfonate content (%)	L929 cell adhesion	
		Serum (+) (%)	Serum (-) (%)
	TCPS	100	100
1	γ -PGA hydrogel	20.7	15.2
2	5.0	52.8	33.1
3	10	62.4	29.9
4	γ -PGA-S hydrogel	60.3	28.7
5	21	65.9	32.9
6	24	69.4	30.8
7	32	23.7	19.1
8	6.0	42.8	20.2
9	S72-netgel	45.4	21.3
10	22	76.3	34.7
11	35	78.8	41.5

1) L929 cell was incubated on hydrogels in culture medium with or without serum for 24 hr at 37°C. The number of cells on TCPS was positive control (100 %).

テーラード型組織移植を目的とした循環器系組織の in vitro 再構築

In Vitro Regeneration of Cardiovascular Tissues for Custom-made Tissue Transplantation

○正 藤里俊哉 (国循) 西岡 宏 (国循・先端医療財団)
正 小越拓郎 (国循・関西大) 正 菅 裕亮 (国循・関西大)
正 岸田晶夫 (国循) 正 大場謙吉 (関西大)
中谷武嗣 (国循) 北村惣一郎 (国循)

Toshia FUJISATO, Akio KISHIDA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA

National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka

Hiroshi Nishioka, National Cardiovascular Center / Foundation for Biomedical Research and Innovation

Takuro KOGOSHI, Yusuke SUGA, National Cardiovascular Center / Kansai University

Kenkichi Ohba, Kansai University

Decellularized tissues and those recellularization are widely studied to give more durability and invisible immunogenicity to the conventional bioprostheses. We are investigating efficient processes of decellularization and recellularization of biological tissues. Our recent studies on biomechanical properties of decellularized tissues were reported. Porcine pulmonary valves and aortas were excised and treated for 10 min by a newly developed method using ultrahigh pressure of 10,000 atm. They were then washed by PBS under microwave irradiation for 2 days. The vascular cells isolated from the future minipig recipient were injected into the aortic tissue by a dispenser and the endothelial cells were seed onto the surface of the decellularized tissue by a roller culture bioreactor. The cusps and aorta were completely cell free when new method was applied. There were no significant changes in biomechanical properties. The endothelial cells were seeded uniformly and the vascular cells were well injected to the decellularized scaffold. Biological tissues decellularized and recellularized in vitro by our new methods may provide more durable and safe bioprostheses.

Key Words: Tissue engineering, scaffold, decellularization, cell seeding

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、代用心臓弁として80%に機械弁、20%に異種生体弁が使用されている。しかし、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。近年世界的に、自己肺動脈弁を大動脈弁位に、死体から提供された凍結保存同種弁を肺動脈弁位に移植するロス手術が有効な成績を上げている。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、ロス手術は、我が国では同種弁の提供数不足のため、限られた施設でのみ施行されているのが現状である。機械弁やグルタルアルデヒド等で固定された異種生体弁に成長性を付与することは困難であることから、組織工学技術を用いることによって、自己弁に匹敵する再生医療型組織弁の開発が模索されている。我々は、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 として利用するアプローチを採用しており、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスからなる脱細胞化組織 scaffold に、in vitro にて患者の

自己細胞を組み込んだテーラード型組織移植を行うことで、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。本報では脱細胞化処理したミニブタ心臓弁 scaffold への細胞播種について検討した。

2. 実験

脱細胞化処理: NIBS系ミニブタ(日本農産工業(株))あるいはクラウン系ミニブタ((株)ジャパンファーム)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、新規に開発した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。脱細胞化は組織学的に評価した。

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：昨年度報告したトリトン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の細胞を除去すること困難であったが、超高静水圧印加及び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。EVG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。また、力学特性への影響も見られなかった。

細胞播種：ディスペンサを用いた細胞注入播種によって、図1に示すように、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、ローターを用いた回転培養では、図2に示すように、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ーラメード型組織移植を目指している。生体組織由来scaffold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、かつ滅菌できることで、安全なscaffoldを得ることができた。血管や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。Scaffold表面への血管内皮細胞の播種については、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、scaffold内面への血管壁細胞の播種については、ディスペ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、循環培養法による長期間培養によって、播種した血管内皮細胞及び血管壁細胞のコンフルエント化、剪断応力による内皮細胞の形態変化等について検討している。



Figure 1. Vascular cells injected by a cell dispenser into the decellularized valve scaffold (HE stain).

HE



SEM



Figure 2. Endothelial cells seeded by roller incubation onto decellularized valve scaffold.

5. 結論

超高静水圧印加処理によって脱細胞化処理した生体組織由来心臓弁scaffold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、ディスペ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。

演題 5 異種組織の脱細胞化による安全な異種組織移植技術の開発

藤里 俊哉², 西岡 宏^{2,6}, 庭屋 和夫³, 岸田 晶夫⁴, 中谷 武嗣⁵, 北村惣一郎¹
¹国立循環器病センター ²再生医療部, ³心臓血管外科, ⁴生体工学部, ⁵臓器移植部,
⁶先端医療振興財団

我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心膜組織からドナー由来細胞及びウイルスを除去することによって、高度な安全性を有した異種組織移植技術の開発を行っている。脱細胞化組織はそのまま移植用組織として使用することの他、自己細胞や幹細胞等を組み込むための生体スキャフォールドとして利用することも可能である。

ミニブタ心臓弁及び血管を摘出し、4℃、10,000気圧の超高静水圧印加処理を10分間、続いて4℃マイクロ波照射下での洗浄を2日間行い、ドナー由来細胞を除去した。処理後の組織を組織学的、生体力学的及び生化学的に評価した。

本脱細胞化処理により、心臓弁及び血管組織から完全に細胞を除去することができた。生体力学特性、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。これに対し、既に報告のある界面活性剤処理では完全に細胞を除去することは困難で、生体力学特性の変化も見られた。

異種組織を本脱細胞化処理することによって、高度な安全性を有した異種移植組織が作出できると考えられる。

演題 6 In situでの自己化をめざした脱細胞化異種生体弁の開発

盤井 成光, 澤 芳樹, 竹谷 哲, Chris Coppin*, Mark Torrianni*, Yuichiro Ueda*,
松田 暉
大阪大学大学院医学系研究科 臓器制御外科, *Medtronic Heart Valves

【目的】心臓外科領域で従来使用されている生体弁の石灰化や耐久性という問題を解決するために、近年 tissue engineered valveが開発されつつあるが、それらは未だ脱細胞化の困難さ、移植前の再細胞化の必要性などの課題がある。これに対し我々は完全な脱細胞、細胞外matrixの温存、in situでの再細胞化を目標とした、異種脱細胞化弁の開発を進めているので報告する。

【方法】ブタ大動脈弁をdetergent処理し脱細胞化、ラット皮下に脱細胞弁組織を移植し、炎症細胞浸潤及び石灰沈着を評価した。また犬の肺動脈弁位に、人工心肺下に脱細胞弁を移植し組織学的評価を行った。

【結果】電顕で脱細胞弁の細胞外matrix構造の温存を認めた。ラット皮下実験では脱細胞弁はgraft内への細胞浸潤はなく、石灰沈着をほとんど認めなかった。肺動脈弁置換1ヶ月後にvWF染色で内腔側に内皮細胞を認めた。

【まとめ】異種脱細胞化弁は移植後1ヶ月で内皮細胞化を認め、免疫反応・石灰化においてもより生体適合性に優れた生体弁となる可能性が示唆された。

ナノセラミックスハイブリッド：細菌感染防止デバイスを目指して

国循セ・科技団さきがけ：○古菌 勉、国循セ：安田昌司

物材機構：田中順三、国循セ：岸田晶夫

【緒言】カテーテルを始めとする数多くの医療用具および人工臓器装着に不可欠な周辺用具である経皮デバイスは、体内と体外とを結ぶ唯一の接点でありながら、材料工学的に十分な処置を施すことなく用いられている。我々は硬組織および軟組織親和性に優れるハイドロキシアパタイト(HAp)微粒子と医療用高分子とを共有結合で複合化し、皮膚および皮下組織と直接密着し、細菌感染防止効果が期待できるデバイスを開発している。今回はナノスケールの HAp 微粒子と繊維状高分子とを複合化させた新規材料を開発したので、その開発工程と細胞接着性の結果を報告する。

【実験】ナノ HAp 粒子の調製：油相成分として dodecane と非イオン性界面活性剤として pentaethylene glycol dodecyl ether を混合した溶液中に、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液、次いで KH_2PO_4 水溶液を添加した。十分に攪拌後、温度を室温から 95°C まで上昇させ、24 時間反応させた。シルクフィブロイン(SF)繊維の表面修飾： γ -methacryloxypropyl triethoxysilane(MPTS)を SF 表面へグラフト重合した。MPTS モノマーと前述の非イオン性界面活性剤との混合溶液へ、ラジカル開始剤 ammonium peroxodisulfate

(APS)と蒸留水を添加した。脱気封緘後、反応温度 50°C にて所定時間反応させ、ポリマーの良溶媒で十分に洗浄し複合繊維を得た。ナノ HAp との複合化：ナノ HAp 分散溶液 (toluene/methanol) に複合繊維を浸漬し、ナノ

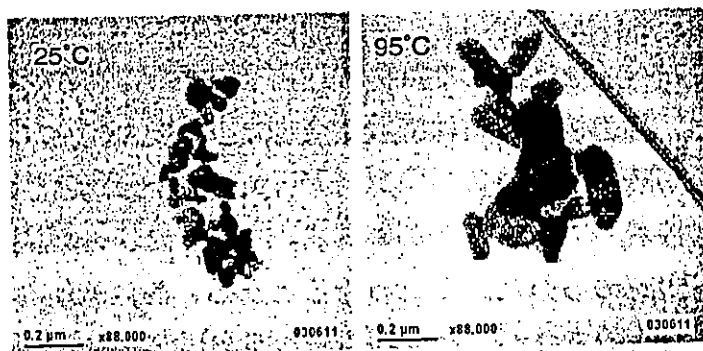


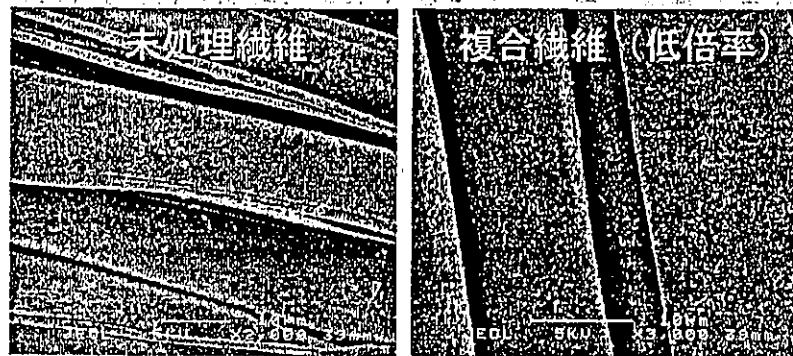
図1. 異なる反応温度で合成したナノ HAp の TEM 像

Nano-Ceramic-Hybrid: Development of a Novel Device of Prevent for Germ Infection
Tsutomu FURUZONO, Shoji YASUDA, Junzo TANAKA and Akio KISHIDA
(Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute,
Fujishiro-dai, Suita Osaka 565-8565) Tel: 06-6833-5012 (ext.2438), Fax: 06-6872-8090,
E-mail: furuzono@ri.ncvc.go.jp

HAp 微粒子を吸着させた。120℃減圧下1時間にてカップリング反応させ、未反応の HAp 微粒子を超音波洗浄にて除いた。細胞接着性試験：繊維芽細胞(L929細胞)を材料上に播種し24時間培養した。

【結果及び考察】図1に反応温度 25℃および 95℃におけるナノ HAp 微粒子の透過型電子顕微鏡(TEM)像を示す。反応温度 25℃においては球状もしくは不定形状の単結晶体(粒径：~50nm)が得られた。反応温度を上昇させることにより粒成長し、95℃にて板状もしくはロッド状の単結晶体(粒径：~300nm)が得られた。また、電子線回折による分析により、本単結晶体は c 軸方向に延伸していた。この粒成長は温度を上げることにより、界面活性剤が疎水化したためミセルの不安定化が生じ、HAp が本来有する c 軸への成長が発現された結果と推察した。得られた無機・有機複合繊維の走査型電子顕微鏡像(SEM)像を

図2に示す。ナノ HAp 微粒子はほぼ単層で分散して結合していた。未処理の SF に物理吸着させた HAp は超音波洗浄にてほぼ脱離することから、強い力で



結合していることが示唆された。我々は

図2. 未処理繊維に HAp を吸着させた後超音波洗浄した時の SEM 像と、複合繊維の SEM 像

既に間接的な方法にて無機/有機界面に共有結合が存在していることを推察している。細胞接着性試験での走査型電子顕微鏡観察により、繊維芽細胞から微小突起が繊維上に結合したナノ HAp 微粒子上へと延び、これらを足場として良好に接着していることが確認された。また、未処理繊維と比較して高い細胞接着性が認められた。これらのことから、高い軟組織接着性にて皮膚組織とデバイスを接着させることにより、外部からの細菌感染防止の可能性が示唆された。

【参考文献】1) T. Furuzono, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 56, 9-16(2001). 2) T. Furuzono, *et al.*, *J. Mater. Sci. Lett.*, 20, 1205-1212(2001). 3) K. Sonoda, T. Furuzono, *et al.*, *Solid State Ionics*, 151, 321-327 (2002). 4) T. Furuzono, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 65B, 217-226 (2003). 5) T. Furuzono, *et al.*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, in contribution. 6) A. Korematsu, T. Furuzono, *et al.*, *J. Mater. Sci. Lett.*, in contribution. 7) A. Korematsu, T. Furuzono, *et al.*, *J. Mater. Chem.*, in contribution.

II W10 超高压処理によって形成した PVA 粒子の DDS への応用

国循生体工 ○木村 剛・古菌 勉・宮崎 幸造・奥野 暁¹・大矢 裕一¹・大内 辰郎¹・

六雄 伸吾²・北村 吉朗²・吉澤 秀和²・岸田 晶夫

¹関大工、²岡山大環境理工

【緒言】

近年、疎水性相互作用、クーロン力、水素結合、ファンデルワールス力等の分子間に働く弱い相互作用が駆動力となり形成される構造体は、構成分子にない新たな性質（機能）を有することから注目されており、工学、医学分野などの幅広い利用を目的として研究展開されている。従来の溶液中における構造体形成は、温度、濃度、pH、また構成分子の構造の最適化によりなされてきた。物質の状態変化は、温度、体積および圧力により決定され、基本的に圧力も温度と同様に状態変化を左右するエネルギー量である。我々はこれまでに、6000 気圧を超える超高压下では水素結合性が強調されることに注目し、高压処理を用いた水素結合性構造体の形成に関する検討を行ってきた。本研究では水素結合性合成高分子であるポリビニルアルコール（PVA）を用い、分子間力として水素結合を駆動力とした構造体の調整と、他の水素結合性低分子・高分子との混合系における超高压条件下での複合体形成について検討した。また、それらの構造体の培養細胞への導入を検討したので合わせて報告する。

【実験】

分子量および鹸化度の異なる PVA を用いた（表 1）。これらはクラレ（株）より提供していただいた。所定濃度に調整した PVA 溶液(0.1、0.025、0.001 w/v%)を超高压処理装置 (Dr.CHEF; (株)神戸製鋼所) により 40°C、10000 気圧で所定時間加圧した。得られた PVA 溶液を目視および顕微鏡下で観察した。また、0.025w/v% トリパンプルー水溶液と PVA 溶液を混合し、上記と同様に超高压処理を行った。目視での観察後、5000rpm、10 分間の遠心分離を行い、上清中のトリパンプルー濃度を 595nm における吸光度測定により求めた。天然由来の水素結合性高分子として DNA（プラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー DNA マーカー）を選択し、種々の濃度の DNA-PVA 混合溶液を調整し、超高压処理を施した。PVA との構造体形成については、ゲル電気泳動によるパターン変化の観察等の検討を行って評価した。

Table 1. Various polyvinyl alcohol used.

PVA	D.P.* ¹	D.S.* ²	M.W.
PVA205	500	88	22000
PVA105	500	98.5	22000
PVA117H	1700	99.3	74800
PVA140	4000	99.8	176000

*1: D. P. → Degree of polymerization
*2: D. S. → Degree of saponification

Application of PVA particle formed by ultra-high pressure technique to DDS system
Tsuayoshi KIMURA, Tsutomu FURUZONO, Kozo MIYAZAKI, Akira OKUNO¹⁾, Yuichi OHYA¹⁾,
Tatsuro UUCHI¹⁾, Shingo MUTSUO²⁾, Yoshirou KITAMURA²⁾, Hidekazu YOSHIZAWA²⁾, Akio
KISHIDA

(Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1
Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, ¹⁾Kansai University, ²⁾Okayama University)
Tel: 06-6833-5012(ext. 2438), Fax: 06-6835-5476, e-mail: kimurat@ri.ncvc.go.jp

[結果と考察]

種々の PVA 溶液を超高圧処理した場合、高分子量の PVA140、PVA117H では透明な溶液から白濁溶液に変化し、その白濁傾向は濃度上昇に伴い強くなった。図 1 には、白濁溶液の顕微鏡写真を示した。1 μ m 以下の球状の粒子が観察され、また、それらの集合体も見られた。粒子数は濃度上昇に伴い増加した。一方、低分子量の PVA105、PVA205 では、0.1 w/v% の PVA105 溶液では若干の白濁が認められたが、他は透明な溶液のままであった。これらより、PVA 溶液を超高圧処理することで粒子が形成され、また、用いる PVA の分子量および濃度をコントロールすることで粒子形成を制御できることがわかった。

上記と同条件において、0.025w/v% のトリパンブルーを混合した場合にも、青色透明な溶液から青濁溶液に変化した。遠心操作 (5000rpm、10 分間) した場合、青色沈殿が観察され、上記の PVA 溶液の場合と同様、より高分子量の PVA の場合に青色沈殿が形成された (図 2)。各 PVA 濃度における上清中のトリパンブルー濃度を 595nm の吸光度測定により求めた結果を図 3 に示した。青濁溶液に変化した PVA140、PVA117H、PVA105 では、濃度上昇に伴い上清中のトリパンブルー濃度は減少した。一方、青色透明な溶液のままであった PVA205 では PVA 濃度には依存せずトリパンブルー濃度は一定であった。これらの結果より、PVA-トリパンブルー複合体が形成されていると考えられる。

サケ白子 DNA を混合した場合にも、高圧処理時間の延長によって上清中の DNA 濃度の減少が観察され、PVA 粒子中に取り込まれていることが示唆された。DNA マーカーを用いて電気泳動パターン変化を観察したところ、複合体形成に伴うスメアなバンドが観察された。用いる PVA の種類を変化させ、さらに混合条件について検討したところ、分子量依存性が観察されたものの、濃度については大きな影響は認められなかった。これらを顕微鏡観察では、上記の PVA 溶液と同様に粒子形態をとっていた。

以上の結果から、PVA と水素結合性低分子あるいは高分子との混合溶液は、超高圧処理によりそれらの複合体を形成することが明らかとなり、複合体は粒子状の形態をとっていることから、薬物 (遺伝子) 担体としての応用が期待できる。複合体の細胞への導入を試みたので、これに関しても合わせて報告する。

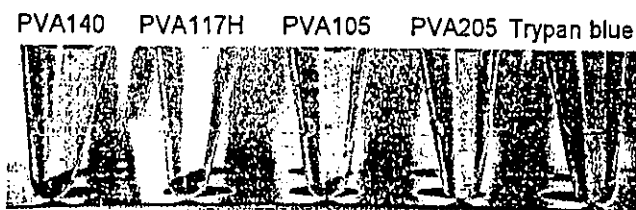


Figure 2. PVA-trypan blue composite prepared by ultra-high pressure treatment. PVA concentration: 0.1%

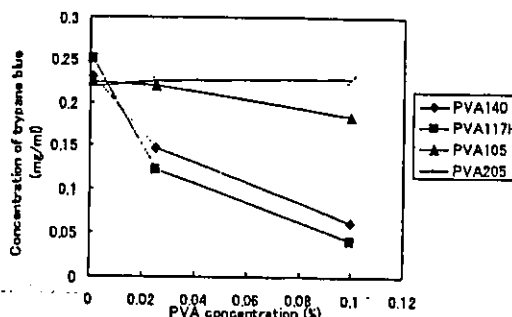


Figure 3. Concentration of trypan blue in supernatant of PVA-trypan blue mixtures treated with ultra-high pressure technique after centrifugation at 5000rpm for 10min.

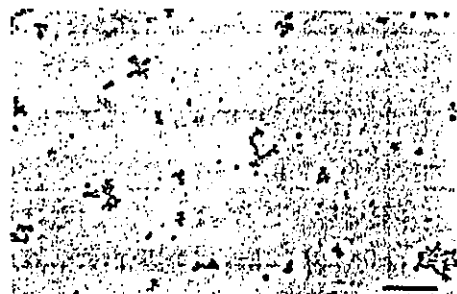


Figure 1. Light microphotograph of PVA particles prepared by ultra-high pressure treatment. The scale bar indicates 10 μ m.

アラミド鎖長制御によるフルオロエチレン-アラミドブロック共重合体の合成
 国立循環器病センター 〇是松 新・古菌 勉・安田昌司・岸田晶夫

〔緒言〕

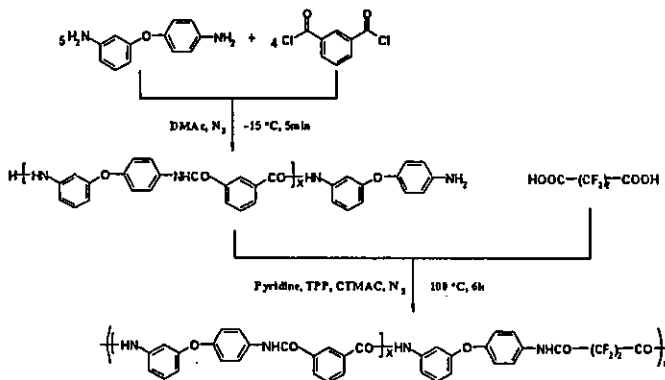
ブロック共重合体は、マイクロ相分離構造をとることから、優れた機械的特性等の高い機能性を発現することが知られている。中でも、ヒドロキシエチルメタクリレート・スチレン共重合体¹⁾、セグメント化ポリウレタン²⁾、アラミド・シリコン樹脂³⁾等の共重合体は血液適合性にも優れ、医用材料として応用されている。我々は人工血管用材料に適用されているポリテトラフルオロエチレンに代表される含フッ素高分子に着目し、それに比較して極性が大きく異なり、高強度・高弾性率の特性を有する芳香族ポリアミド(アラミド)とブロック共重合することにより、高機能性を有する新規医用材料を開発することを目指している。これまで、フッ素部分を有するテレケリックジアミンを合成し、それを基にしたフルオロエチレン-アラミドブロック共重合体の合成を発表した⁴⁾。今回、アラミドオリゴマーを先に合成することでアラミド部分が鎖長制御された新しいフルオロエチレン-アラミドブロック共重合体の合成に成功したので報告する。

〔実験〕

ブロック共重合体は二段階法により合成された(Scheme 1)。まず、3,4'-ジアミノジフェニルエーテル(3,4'-DAPE、和歌山精化工業㈱)とイソフタル酸クロリド(IPC)とを-15°C、5分間窒素雰囲気下で反応させ、両末端アミノ基のアラミドオリゴマーを合成した。次に、このアラミドオリゴマーと含フッ素ジカルボン酸の重縮合を、縮合剤として亜リン酸トリフェニル(TPP)/ピリジン、添加剤としてセチルトリメチルアンモニウムクロリド(CTMAC)を用いて行い、目的の共重合体を得た。

〔結果・考察〕

アラミドオリゴマーおよびブロック共重合体の同定は¹H-NMRにて行った。Scheme 1に示すように、まず3,4'-DAPEとIPCとを反応させて両末端にアミノ基を有するアラミドオリゴマーを調製した。この際、繰返し数(x)が2、4、8の3種類のオリゴマーが得られ、これらはゲル濾過クロマトグラフィー(Sephadex LH-20)によって分離された。これにより、ブロック共重合体内におけるアラミド鎖長の制御が可能となった。次に、x=4または8のオリゴマーを用いてテトラフルオロエチレン酸(TFSA)との重縮合を行い、得られた共重合体をGPCにより分子量を測定した。その結果、x=4の場合ではM_n=20,300、x=8の場合ではM_n=10,200と、オリゴマーの鎖長の短い方が得られる共重合体の分子量が大きかったことがわかった。これは、オリゴマーが小さいため運動性が大きく、その末端のアミノ基とTFSAのカルボキシル基の反応する確率が高くなり、そのため分子量も大きくなったと考えられる。さらにフルオロエチレン鎖長を変えた共重合体の調製を行い、材料特性についての評価を行っている。



Scheme 1. Synthesis of block copolymers containing aramid and fluoroethylene segments

1) T. Okano, et al., *J. Appl. Polym. Sci.*, **22**, 369(1978). 2) J. W. Boretos, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **5**, 373(1971). 3) M. Akashi, et al., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **5**, 89(1993). 4) A. Korematsu, et al., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Ed.*, in press.

Synthesis of block copolymers containing chain-controlled aramid and fluoroethylene segments

Arata KOREMATSU, Tsutomu FURUZONO, Shoji YASUDA, and Akio KISHIDA

(National Cardiovascular Center Research Institute, Suita Osaka, 565-8565)

Tel 06-6833-5012 (ext. 2438), Fax 06-6872-8090, e-mail: korematu@ri.ncvc.go.jp