

DNA-PVA 複合体の形成評価

関西大工

○奥野 暁 大矢裕一 大内辰郎

岡山大学環境理工

六雄伸吾 北村吉朗 吉澤秀和

国立循環器病センター

木村 剛 宮崎幸造 古菌 勉 岸田晶夫

【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】

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。

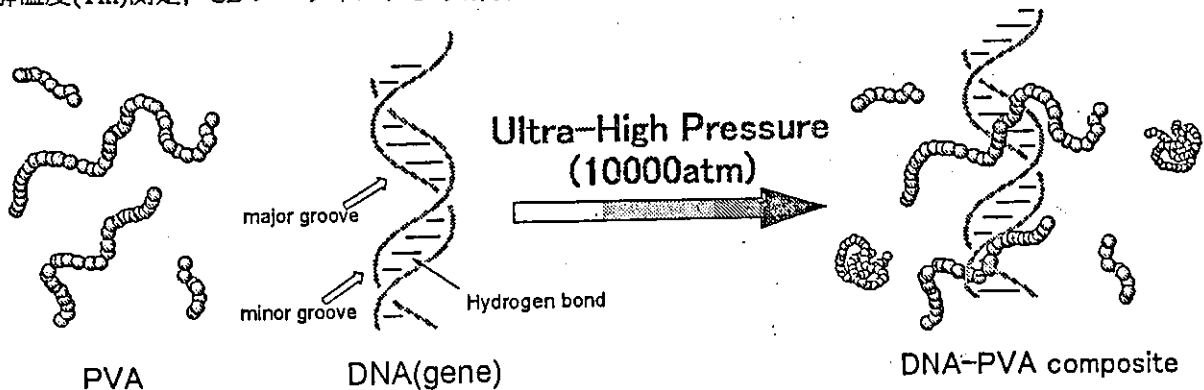


Fig. 1 Schematic illustration of DNA-PVA composite.

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

Akira Okuno¹, Yuichi Ohya¹, Tatsuro Ouchi¹, Shingo Mutsuo², Yoshiro Kitamura², Hidekazu Yoshizawa², Tsuyoshi Kimura³, Kozo Miyazaki³, Tsutomu Furuzono³, Akio Kishida³ (¹Faculty of Engineering, Kansai University 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan, ²Faculty of Environmental Science & Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, ³National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565-8565, Japan) TEL: 06-6833-5012(ext.2510), FAX: 06-6835-5476, e-mail: kishida@ri.ncvc.go.jp

成されてきた。しかしながら、近年、スズ系触媒を用いた脱水重縮合反応によって高分子量のPLAが重合できることが報告されている¹⁾。この縮合反応を利用することで、水酸基とカルボキシル基を持つ種々の化合物と共重合体を容易に合成できる可能性がある。そこで、RA-LAランダム共重合体の合成を塊状重縮合法および溶液重縮合法の2種類の合成法により行った(Fig. 1)。

塊状重縮合法はRAとLAを減圧・高温下で直接熔融重縮合させることで行い、溶液重縮合法は溶媒にデカリン、触媒にジスタノキサンを用いた系で行った。塊状重縮合法はRAとLAを減圧・高温下で直接熔融重縮合させることで行い、溶液重縮合法は溶媒にデカリン、触媒にジスタノキサンを用いた系で行った。得られた生成物の同定は¹H-NMR, GPC, FT-IRによって行った。¹H-NMR, FT-IRからリシノール酸ユニットが導入されていること、二重結合が反応過程で消失していない(触媒の使用が二重結合に影響を与えない)ことが確認され、またGPC溶出曲線が単峰性であることから得られた生成物が混合物ではなく主鎖中に二重結合を有するRA-LAランダム共重合であることが確認できた。溶液重縮合法は、塊状重縮合法と比較して著しい分子量の増加は見られなかったが、収率の向上は見られた。これは塊状重縮合法に比べ、溶液重縮合法の方が反応条件が穏やかであるためにPLAの環化反応(解重合反応)がある程度抑制されるからだと考えられる。

これより溶液重縮合法の方が塊状重縮合法より適した反応系であることが示唆された。

現在、この共重合体の高分子量体の調製法についてさらに検討を加えており、また得られた共重合体の物性(熱的性質、生分解性など)についても検討を加えている。

Table 1. Results of Bulk Polycondensation of L-Lactic Acid with Ricinoleic Acid

Run	Time (h)	Temp. (°C)	Vacuum (mmHg)	Yield (%)	RA-LA (mol)	RA content ^{a)} (mol%)	Mn ^{b)}	Mw ^{b)}	Mw/Mn ^{b)}	Shape
1	10	190	5	29.7	10:90	14	5500	8400	1.5	tackiness powder
2	20	190	5	26.8	10:90	12	9500	12700	1.3	tackiness powder
3	20	190	5	30.5	30:70	35	5200	8200	1.6	viscous liquid
4	20	190	5	46.8	50:50	55	4000	6100	1.5	viscous liquid

a) Estimated by ¹H-NMR spectrum.

b) Estimated by GPC(eluent; THF, standard; Polystyrene).

Table 2. Results of Distannoxane-catalyzed Polycondensation of L-Lactic Acid with Ricinoleic Acid in Dean-Stark Apparatus

Run	DCTD ^{a)} (mol%)	Solvent	Time (h)	Temp. (°C)	Yield (%)	RA-LA (mol)	RA content ^{b)} (mol%)	Mn ^{c)}	Mw ^{c)}	Mw/Mn ^{c)}	Shape
1	0.01	Decalin	24	195	55.1	10:90	10.2	11000	15000	1.4	tackiness powder
2	0.01	Decalin	72	195	52.1	10:90	11.1	12000	17000	1.4	tackiness powder
PLLA	0.01	Decalin	24	195	54.1	0:100	—	18500	33500	1.8	fibrous precipitant

a) DCTD = 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetrabutyl-distannoxane.

b) Estimated by ¹H-NMR spectrum.

c) Estimated by GPC(eluent; THF, standard; Polystyrene).

1) M. Ajioka, K. Enomoto, K. Suzuki, and A. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 2125 (1995).

2) M. Ishii, M. Okazaki, Y. Shibasaki, and M. Ueda, *Biomacromolecules*, 2, 1267 (2001).

【目的】一般に胚性幹細胞(ES細胞)や胚性生殖細胞(EG細胞)株の樹立には、未分化維持に重要な役割を果たしているフィーダー細胞、また因子としてLIFやSCF等が必要と考えられている。本研究では、フィーダー細胞としてのセルトリ細胞の有効性を明確にする為、培養日数の経過に伴うセルトリ細胞の形態変化とLIFおよびSCFの発現量を検討した。【方法】セルトリ細胞は出生後1日目のミニブタ精巣より採取した。培地には2, 200ng/ml FSH, 4mM hypoxanthine (HX) をそれぞれDMEM中に添加したものをを用い、培養期間を8日とした。セルトリ細胞のLIF, SCFの発現をRT-PCR法により測定した。【結果】播種した細胞は培養1日目にディッシュへ接着した。培養8日目において、FSHまたはHX添加培地で培養した細胞は接着時の形態を保持し続けたが、無添加区の細胞は培養2日目から線維芽状の形態へと変化した。LIFのmRNA発現量はすべての区においてほぼ一定であった。また、SCFのmRNA発現量は、HX, 低濃度FSH添加区において、8日目においても無添加区のものに比べて有意に高い量であった。以上の結果よりEG細胞の樹立においてフィーダー細胞としてのセルトリ細胞は有効であり、これにはセルトリ細胞の機能を維持させる為にcAMPが重要な役割を果たすことが明らかとなった。なお、現在PGCを用いた培養を検討中である。

IV 25-7 除核法の違いがミニブタ体細胞核移植胚の作出効率に及ぼす影響

○遊木 靖人¹・三好 和隆¹・大石 勝昭²・吉田 光敏¹

¹鹿大農・²駿河精機

animrep@bio2.agri.kagoshima-u.ac.jp

【目的】体細胞核移植において、卵に対して有害なヘキスト染色や紫外線照射を用いない除核法の確立は重要である。本実験ではミニブタ体細胞核移植胚の作出に適した除核法について検討した。【方法】実験1：手動顕微操作装置あるいはコンピューター制御顕微操作装置を用いて、ブタ体外成熟卵の染色体を透明帯の切開口から第1極体付近の細胞質と共に押し出す方法(押し出し法)あるいは0.5 μMデメコルシン処理により細胞質から突出させた後、スムーズインジェクション装置を用いて吸引する方法(吸引法)によって除去した。処理後、卵をヘキスト33342で染色し除核率を調べた。実験2：6～8代継代培養したクラウン系ミニブタ腎細胞を押し出し法あるいは吸引法により作出した除核卵の卵胞腔に挿入し電気的に融合させ、その後の発生状況を比較した。【結果】実験1：除核率は、コンピューター制御顕微操作装置と吸引法を用いた区(85.4%)で、手動顕微操作装置を用いた区(押し出し法：63.0%；吸引法：61.3%)と比べて有意に高くなった(P<0.05)。実験2：胚盤胞の平均細胞数は吸引法を用いた区(49.3個)で押し出し法を用いた区(37.1個)に比べて有意に増加した(P<0.01)。

【目的】ミニブタ精漿には精子受精能抑制因子その因子は精子細胞膜の流動性を変化させない精囊腺を除去したミニブタの精漿にその因子の存在を報告した。本実験では精囊腺排出管をブタから回収した精子を用いて、精囊腺液中の抑制因子の存在を確認するとともにその因子があるか否か検討した。【方法】<実験1>精囊のミニブタから回収し、使用するまで-80℃で精子は精囊腺排出管を切断したミニブタからの濃度の精囊腺液添加溶液に25℃で2hr保存し、培地で3hr加温し、先体反応の誘起率を調べた。加熱処理あるいはprotease処理を行った精囊腺液添加溶液で得られた精囊腺液のタンパクが精子の受精能に及ぼす影響を調べた。【結論】<実験1>種々の濃度の精囊腺液添加溶液に曝した精子の先体反応誘起率は減少し、80%以上の精囊腺液添加溶液(40mg/ml)において著しく低い値を示した。<実験2>精囊腺液の精子受精能抑制作用は加熱処理またはprotease処理により消失した。また、50%硫酸塩析によって精囊腺液のタンパクは2mg/ml以上において著しく減少した。これらの結果から、ミニブタ精囊腺液中の精子受精能抑制因子はタンパクで構成されていると考えられた。

IV 25-8 ブタ体外成熟・エイジング卵子に及ぼす精囊腺液の染色体凝縮

○岩元 正樹¹・菊地 和弘²・淵本 大一郎²・鈴木 聡²・田上 賢寛³・武田 久美子³・花田 卓²・大西 彰²

¹プライムテック・²生資研・³畜草研・⁴東農大
ptm@affrc.go.jp

【目的】レシピエント卵子として使用する体細胞核移植を制御できれば核移植の実施時間の短縮となる。エイジングの抑制に効果が報告されたカフェインを成熟培養液に添加してレシピエント卵の体細胞核注入後の染色体凝縮に及ぼす影響を調べた。【方法】ブタ卵巣より採取した卵子は、既報[岩元 et al, 1999]により酸素濃度5%で成熟培養した。通常の核移植の活性化時間である培養後48時間経過させて、その1-2時間、4-5時間、7-8時間、10-11時間核を注入し、染色体凝縮率を調べた。実験2では、開始36時間後から5mMカフェインを加えた(カフェイン区)、成熟培養後60時間後を固定時間として、同様に染色体凝縮率を調べた。【結果】実験1：カフェインの濃度による染色体凝縮率に差は見られなかった(60.8%)。実験2：1～2時間前に体細胞核を注入したカフェイン添加区における染色体凝縮率(57.5%)はコントロール区(25.0%)に比べて有意に高かった。カフェイン処理を行うことで注入核の染色体凝縮率の低下は両者間の差はなかった。エイジング卵子での染色体凝縮率を低下させることで注入核の染色体凝縮率の低下を抑制することによって核移植の成功率を向上させることが期待される。

Application of Organic and Inorganic Nanoparticle for Cardiovascular Tissue Engineering

Akio Kishida

National Cardiovascular Center Research Institute
5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Nanoparticles are extensively studied as a novel material for medical and biotechnological applications. Our group have been studying the preparation and application of organic and/or inorganic nanoparticles. Here some topics of our studies are introduced briefly.

Inorganic Nanoparticle: Hydroxyapatite(HAp) is a well-known biocompatible and bioactive material. One of the weak points of HAp is its physical property. In order to make the most of HAp advantage, HAp nano(crystal)particle was prepared and incorporated into polymer matrices. One application of the material is percutaneous devices which should have tissue adhesive activity and elastic property.

Organic(Polymeric) Nanoparticle: Various procedures for preparing polymeric nanoparticle have been reported. We introduced a novel process for obtaining a molecular composite via hydrogen bond. The process is ultra-high pressure treatment. In the ultra-high pressure condition (over 6,000 atm), it is well-known that hydrogen bond is strengthen. Using this characteristic, the ultra-high pressure has been used in order to elucidate the flexibility-structure-function of proteins. We have reported the molecular composite, such as hydrogels and nano-aggregate were easily obtained by the ultra-high pressure treatment. Here, the preparation of the molecular composite of DNA and synthetic polymer was prepared by using the ultra-high pressure treatment. The model polymer used was poly(vinyl alcohol)(PVA). Using 10,000atm treatment, nanoparticle of DNA-PVA was obtained that size was 200-300nm. The 3-D structure of DNA was preserved even after such high pressure when it was mixed with PVA. These molecular composite are expected to be applied to site-specific gene delivery matrices for treatment of cardiovascular disease.

Biography:

- 1979-1988 Kyoto University (Ph.D. Course)
- 1990-1992 Research staff at NCVC
- 1992-1999 Academic staff at Kagoshima University
- 1997 Visiting Scientist at Smith and Nephew GRC
- 1999-present Director of Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute



Preparation of PVA nano-particles using ultra-high pressure technology for drug carrier

Tsuyoshi Kimura¹, Tsutomu Furuzono¹, Kozo Miyazaki¹, Akira Okuno², Yuichi Ohya², Tatsuro Ouchi², Shingo Mutsuo³, Yoshirou Kitamura³, Hidekazu Yoshizawa³, Akio Kishida¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute,

²Kansai University, ³Okayama University

E-mail : Kimurat@ri.ncvc.go.jp

In recent year, significant efforts have been devoted to develop nanotechnology for drug delivery. Many researchers have focused on formulating therapeutic agents in biocompatible nanocomposites such as nanoparticles, nanoencapsules, micellar system, and conjugates. In this study, we have investigated the new class of nanoparticles formulated using hydrogen bonding polymers with a therapeutic agent for drug and macromolecular delivery by ultra-high pressure technology that empathies the hydrogen bonding interaction. Polyvinyl alcohol (PVA) was utilized as the model hydrogen bonding polymers. The PVA gels and particles were formed by ultra-high pressure treatment. The hydrogen bonding structures of PVA depended on the solution concentration, and formed the particle in the case of the low concentration. Trypan blue and DNA were used as the model hydrogen bonding compounds with low and high molecular weight. The formation of PVA composites with them were confirmed by gel electrophoresis, microscope and SEM observation. Their spherical particles with nano and micro sizes were observed by SEM. For transfection studies, COS7, L929 and Raw264 cells were used and incubated with the PVA-plasmid DNA encoding green fluorescence protein gene composites solution. The green fluorescent cells were observed under a fluorescent microscope, indicating the potential of the hydrogen bonding composites as carriers.



Biography:

Tsuyoshi Kimura

B.E., Polymer Science & Engineering, Kyoto Institute of Technology, 1997. Doctor of Engineering, Polymer Science & Engineering, Kyoto institute of Technology, 2003. Postdoctoral Research Associate, National Cardiovascular Center Research Institute, 2003.

Nano-ceramics hybrid: Development of hydroxyapatite-silk fibroin composite and its properties for a percutaneous device

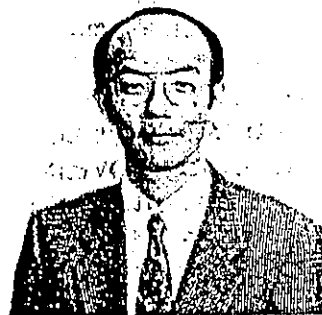
T. Furuzono^{1,2)}, S. Yasuda¹⁾, J. Tanaka³⁾, A. Kishida¹⁾

1)National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita Osaka 565-8565 Japan, 2) PRESTO, JST, 3) Independent Administrative Institution

We are developing the percutaneous device using hydroxyapatite (HAp) particle-biomedical polymer composite through covalent linkage. HAp has good biocompatibility for hard and soft tissue. It is expected that this device is adhered to the skin and subcutaneous tissue directly and can have the prevention effect of infection. We report the synthesis and properties of the novel composite material of nano-scaled HAp particles and fibrous polymer.

The rod-shaped HAp was synthesized by using the individual improved W/O microemulsion method. γ -Methacryloylpropyl triethoxysilane (MPTS) was grafted on the surface of SF. A poly(MPTS)-grafted SF was soaked in the HAp suspended solution to be adsorbed on the SF. This SF with HAp was heated at 120 °C in vacuum for coupling reaction.

The HAp particle size was growing by raising the reaction temperature. The plate or rod-shaped single crystal (particle size: ~300 nm) was obtained at 95 °C of reaction temperature. The HAp single-crystal elongated to the c-axis. HAp particles were adsorbed and bonded on the modified SF fiber by mono layers. It is suggested that the HAp particles were bonded by the strong linkage to the SF fiber, because HAp particles did not remove by ultrasonic washing. We have already proved indirectly the formation of the covalent linkage between HAp particles and SF fiber. From In the cell adhesion test, it was observed that the cells were adhered to the HAp particles on the SF fiber satisfactorily. It was confirmed that the cell adhesive property of HAp/SF composite was higher than that of original SF. From these results, it is suggested that this HAp/SF composite might be able to prevent the bacterial infection due to the high adhesive property of this composite for soft tissue.



Biography:

Hemodialysis Center of Konan Clinic (Kagoshima), 1984-1989
Kidney Center of Shira-ishi Hospital (Kagoshima), 1991-1996
JSPS Scholar, Japan Society for the Promotion of Science, 1994-1997
Visiting Scientist, Bioengineering Center, Washington University, 1996-1997
COE Scholar, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1997-1999
NEDO Researcher, National Institute for Research in Inorganic Materials, 1999-2000
Division Head, National Cardiovascular Center Research Institute, 2000-

演題番号: 3

演題名: 卵細胞を介した豚生殖器・呼吸症候群ウイルス(PRRSV)伝播の可能性に関する研究

発表者氏名: ○吉田光敏¹⁾、橋本絃子¹⁾、坂下満明²⁾、黒川 知²⁾、矢原芳博³⁾

発表者所属: 1) 鹿大、2) 明治製菓、3) 日清飼料

【目的】豚生殖器・呼吸症候群(PRRS)は死産等の異常産と子ブタの肺炎を主徴とした RNA ウイルス(V)病である。PRRSV は感染ブタとの間の直接的接触感染や垂直感染が主な伝播経路として知られている。我々は食肉センター由来ブタ卵細胞を素材として遺伝子改変ブタの作成に取り組んでいるが、しかし、卵細胞を介した PRRSV 伝播の可能性については未解明である。本研究では、逆転写(RT)-Nested PCR 法を用いて、まず PRRSV 抗体陽性雌ブタ由来の卵細胞について PRRSV 存在の有無を調べ、次いで食肉センター由来の卵細胞について同様に調べた。

【方法】実験1: PRRSV 感染初期の臨床症状を呈した3・4ヶ月齢のブタ5頭の血清より、総RNAを抽出し、総RNAよりRT反応後、cDNAの作成を行い、PRRSV 特異的プライマー対によりPCRを行った。さらに、RT-PCR産物は前記プライマー対により増幅される PRRSV 塩基配列内側領域をターゲットとしたプライマー対によりNested PCRを行った。Nested PCR産物は電気泳動し、標的バンドの検出状況を調べた。実験2: PRRSV 抗体陽性の5・6ヶ月齢雌ブタ12頭より、個体別に卵丘細胞・卵子複合体(COC)を採取した。COCは体外培養後、卵丘細胞と卵子を分離、それぞれ総RNAを抽出し、実験1に準じて PRRSV 検出状況を調べた。実験3: 食肉センター由来の雌ブタ卵巣よりランダムに採取した COC を体外培養後、卵丘細胞と卵子を分離、それぞれ総RNAを抽出し、実験1に準じて PRRSV 検出状況を調べた。

【結果】実験1の全ての検体から、標的バンドが検出され、検出手法の有効性が示された。一方、実験2のブタ群から回収した卵子RNAや卵丘細胞RNAからは、標的バンドは検出されなかった。さらに、食肉センター由来の卵子RNAおよび卵丘細胞RNAにおいても標的バンドは検出されなかった。以上の結果から、ブタ卵細胞を介した PRRSV 伝播の可能性は極めて低いことが示唆された。

演題番号: 4

演題名: 肥育豚に発生したオーエスキー病と清浄化への取り組み

発表者氏名: ○蔵菌光輝¹⁾、藤岡 舞²⁾、池田省吾¹⁾、堂下さつき³⁾、小濱博昭³⁾

発表者所属: 1) 鹿児島県鹿児島中央家保、2) 鹿児島県畜試、2) 鹿児島県南薩家保

1. はじめに: オーエスキー病(AD)は、若齢の子豚に神経症状、妊娠豚に死産を起す感染症であるが、肥育豚では一過性の症状や無症状のまま回復し、不顕性感染で経過するケースが多いとされる。今回、110日齢の肥育豚に神経症状、死亡がみられ、病性鑑定の結果、ADと診断された。その概要とADの清浄化にむけた取り組みを報告する。
2. 発生状況: 繁殖母豚270頭、肥育豚2600頭の一貫経営農場で、2002年2月、1豚舎内で神経症状を呈する肥育豚を散見、8頭が死亡した。発熱、てんかん様のけいれんや遊泳運動等の神経症状を呈し死亡した肥育豚について病性鑑定を実施した。
3. 材料および方法: 110日齢の肥育豚2頭を供試した。ウイルス学的検査(豚コレラFA、ウイルス分離)、病理組織学的検査(HE染色、免疫組織学的染色、透過電顕観察)、血清学的検査(AD、PRRS抗体検査)および細菌学的検査を常法に従い実施した。
4. 成績および考察: 剖検では、2頭に共通して肺の癒着、胃粘膜に出血、肥厚を認め、1頭の脳に充出血、肺に膿瘍形成、残り1頭に多発性漿膜炎が認められた。ウイルス学的検査では、No.1の扁桃、No.2の脳、扁桃からウイルスを分離。同分離ウイルスに対し抗ADV抗体を用いた間接蛍光抗体法を実施しADVと同定された。また、透過型電子顕微鏡による観察で、培養細胞の核内にADVが観察された。病理組織学的検査では、2頭に共通して脳、小脳、脳幹部、脊髄に顕著な囲管性細胞浸潤、グリア結節、神経細胞の変性・壊死および神経食現象を特徴とする非化膿性髄膜炎像が認められた。抗ADV抗体を用いた免疫組織学的染色では、側頭葉皮質病変部の神経細胞および扁桃の病変部に一致して陽性抗原が検出された。血清学的検査では、ADV野外株識別抗体検査が2頭共に陽性、中和抗体価はそれぞれ2倍、8倍であった。PRRSエライザは2頭共に陽性であったが、RT-PCRにおいて血清中にPRRSVは検出されなかった。以上の結果から本症例をADと診断した。

対策として、ワクチン未接種豚に対するADワクチン接種、30日齢でのADワクチン接種を70-80日齢に変更、農場内消毒およびADV抗体調査を実施した。その後、肥育豚の野外株抗体陽性率の低下が確認された。ADの事例の多くは、哺乳豚の神経症状、母豚の死産だが、今回、約4ヶ月齢の肥育豚にADが発生した。発生要因はワクチン未接種によるものと考えられる。また、清浄化対策を通して経時的な抗体調査により野外株陽性率の推移が確認でき、農場主に対しワクチン効果を示すことができた。

Abstracts: 1st World Congress on Regenerative Medicine

16

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

B. FRERICH, 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 hypothetic 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 relative numbers and in absolute counts (growth rate: 10 in FDM, 4.4 in WP). Undependent 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、脾/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 アキシア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、インペラをアキシア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】開発したアキシア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ア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。ロータのアキシア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對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、アキシア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。開発したアキシア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、古菌 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ーラーメイ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気圧の超高圧印加処理を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次元的肝細胞培養法（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のである。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次元的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。

○田中咲子¹・馬越純子¹・三好和陸¹・森崎隆幸²・吉田光敏¹ (1 鹿大農・2 国立循環器病センター)

(目的) トランスジェニック (Tg) ブタは有用生理活性物質生産、食糧生産効率の向上、さらには細胞、組織、臓器などの再生医療分野におけるドナー作出等において極めて大きな潜在力を秘めた動物である。しかし、Tg ブタの作出効率は大変低く、また時間、コスト、労力の面においても多大の負担を要する。これらの問題を改善するために、食肉センター由来の卵巣資源を用いた外来遺伝子導入胚の安定した作出や、Tg 胚を移植前に選抜する方法が確立できれば効果的である。本研究ではブタ体外受精由来 (IVF) 胚へのレポーター遺伝子とターゲット遺伝子との共導入の影響を調べると共に外来遺伝子導入状況を調べるための素材としてのブタ単為発生 (PA) 胚の有用性について検討した。

(方法) IVF 胚：食肉センター由来のブタ卵丘細胞・卵子複合体 (COC) を成熟培地で 42 時間体外培養後、卵丘細胞を一部剥離し、クラウン系ミニブタ雄より採取した濃厚部射出精子を媒精して作出した。PA 胚：COC を成熟培地で 42 時間体外培養後、極体放出卵子のみを選抜し電氣的活性化処理を行い、サイトカラシン B 中に 2 時間投入後発生培地に移し作出した。IVF 胚は媒精 12~14 時間後、PA 胚は活性化処理後 10~12 時間後に、遠心処理 (35℃、15,000rpm、15min) を施し脂肪顆粒を偏心させて前核期胚を選抜、遺伝子を顕微注入した。顕微注入後、胚は発生培地で培養を継続し、発生状況を観察すると共に遺伝子注入 7 日後に固定・染色

を行い、胚盤胞の細胞数やレポータータンパク質の発現状況を蛍光顕微鏡下で観察した。実験 1：レポーターとしてウミシイタケ由来 Green fluorescent protein (hrGFP) 遺伝子の LoxP 部位にネオマイシン耐性遺伝子カセットを組み込んだ neo-hrGFP 遺伝子 (5121bp) を、ターゲットとして心臓形態形成に関与する転写因子 Nkx2.5 (7200bp) 遺伝子を用いた IVF 胚へのレポーター遺伝子単独注入区およびレポーター+ターゲット遺伝子共注入区の 2 区を設定し、発生状況や hrGFP 発現状況を比較した。実験 2：レポーター [hrGFP 遺伝子 (3321bp)] およびターゲット (Nkx2.5 遺伝子) を IVF 胚または PA 胚へ共注入し、各胚における発生状況や hrGFP 発現状況を比較した。

(結果) 実験 1：単独注入区および共注入区間で、卵割率 (41.3% vs. 34.1%) や胚盤胞形成率 (14.4% vs. 13.7%) に差はなく、また、胚盤胞における hrGFP 発現状況に差はなかった。実験 2：IVF および PA 区間で卵割率、胚盤胞形成率、胚盤胞の細胞数 (36.4 個 vs. 45.2 個) に差は見られなかったさらに hrGFP 発現率は IVF 区で 87.5%、PA 区で 85.7% と差はなかった。

以上の結果より、レポーター遺伝子とターゲット遺伝子との共注入の有効性および電気刺激処理で作出した PA 胚は IVF 由来の胚と同様に外来遺伝子導入状況を調べるための素材として活用できることが示された。

○宮崎直・田中咲子・遊木靖人・三好和睦・吉田光敏（鹿大農）

(目的) ブタ性成熟雌由来卵子における体外受精後の胚盤胞形成率は、未性成熟雌由来卵子に比べて高い。体細胞核移植において除核後にレシピエントとして使用された場合にも同様の結果が得られたことから、性成熟雌由来卵子と未性成熟雌由来卵子との間に見られる発生能の差は、細胞質成熟レベルの違いに起因していると考えられる。これらの卵子は食肉センター由来の卵巣から採取し得るが、性成熟雌由来卵巣の数は少なく、大量に採取可能な未性成熟雌由来卵子が実験材料として広く用いられている。そこで本実験では、性成熟雌由来卵子の細胞質内物質を顕微注入することにより、未性成熟雌由来卵子における発生能の改善を試みた。

(方法) 性成熟雌及び未性成熟雌の卵巣から吸引採取した卵丘卵子複合体を修正 TLP 中で 42 時間成熟培養し、第 1 極体放出卵子のみを選抜した。性成熟雌由来卵子は、透明帯を 0.5% プロナーゼ添加 Hapes-TLP-PVA を用いて除去した後、Freezing Solution $3\mu\text{l}$ 及び Rnase Inhibitor $3\mu\text{l}$ が入ったチューブに 10 個ずつ投入し、 -85°C で急速凍結させることにより細胞質内物質を抽出した。未性成熟雌由来卵子は、

遠心処理 ($35^{\circ}\text{C} \cdot 15,000\text{rpm} \cdot 15\text{min}$) を施して脂肪顆粒を偏心させた。半数の卵子の細胞質内には、性成熟雌由来卵子の細胞質内物質を $5\mu\text{l}$ ずつ顕微注入した(注入区)。残りの半数には注入を施さず対照区とした。どちらの区の卵子も $100\text{V}/\text{mm} \cdot 50\mu\text{sec}$ の直流パルスを一回印加することにより、単為発生を誘起した。単為発生卵は修正 PZM3 中で培養する前に、 $2.2\mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシン B を添加した同培地中で 2 時間処理した。培養 2 日目に卵割率、7 日目に胚盤胞形成率及びその細胞数の観察を行った。

(結果) 両区において卵割率に差はなかったが(対照区:56.0% vs. 注入区:49.0%)、胚盤胞形成率は注入区で 37.5%(72/192)となり、対照区の 30.1%(58/193)に比べ有意に高くなった($P < 0.01$)。また、胚盤胞の平均細胞数も対照区(45.3 ± 1.5 個)より注入区(53.4 ± 1.7 個)の方が有意に高くなった($P < 0.01$)。以上の結果より、性成熟雌由来卵子の細胞質内物質を注入することにより未性成熟雌由来卵子の発生能を改善し得ることが明らかになった。このことから、性成熟雌由来卵子の細胞質には初期発生に必要な因子が含まれていることが示唆された。

Static Cardiomyoplasty Suppresses Left Ventricular Dilatation and Dysfunction Early and Late After Myocardial Infarction in the Rat

Akira T. Kawaguchi, *Tokai University*¹
Akio Kishida, *National Cardiovascular Center Research Institute*²
Tetsuji Yamaoka, *Kyoto Institute of Technology*³
Masaki Satoh, *Toyobo Co Ltd*⁴

Background. Dynamic cardiomyoplasty with own skeletal muscle was reported to reduce ventricular size and improve function. We tested the girdling effect of synthetic non-viable net in acute and chronic heart failure due to myocardial infarction (AMI).

Methods.

Acute Study Pressure-volume (PV) loops were successively analyzed before (PRE), net around the heart (NET), intravenous volume load (VL: saline 1% of body weight over 30 seconds), 10 minutes after AMI (MI-10), repeated volume load (MI-VL) and 40 minutes after AMI (MI-LT) in rats with (aNET+, n=10) and without a synthetic net around the heart (aNET-, n=10). End-diastolic and end-systolic pressure-volume relationships were defined and left ventricular size and function analyzed under standardized loading conditions so that ventricular function is compared by stroke volume (SV).

Chronic Study Pressure-volume loops were successively analyzed one week (1W), one month (1M) and 3 months (3M) after AMI with or without placement of net around the heart. For each occasion, PV relationships were analyzed before (PRE), after intravenous volume load (VL: saline 1% of body weight over 30 seconds), and 10 minutes after volume load in rats with (cNET+, n=3) and without a synthetic net around the heart (cNET-, n=3). End-diastolic and end-systolic PV relationships were defined and left ventricular size and function were compared among groups in the same way as in the acute studies.

Results. Ischemic increase in left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes were significantly suppressed in the same degree after AMI in aNET+ rats, resulting in preserved SV and improved ejection fraction (EF) after AMI. Presence or absence of net did not yield any difference in SV with improved EF immediately after AMI regardless of volume load. In chronic studies, a tendency toward suppressed LV dilatation and improved contractile function are observed in cNET+ animals.

Conclusion. Static cardiomyoplasty using synthetic non-viable net may suppress ventricular dilatation and contractile impairment early and late after AMI without significantly reducing ventricular performance in the rat. Net material, elasticity and tightness need to be further studied and adjusted for optimal girdling effect, i.e. greatest benefits with least functional compromise.

Session #11 - #15

Center for Laser Microscopy, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany²

Institute of Anatomy II, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany³

Institute of Ultrastructural Research, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany⁴

Introduction: Tissue engineering of heart valves utilizes biodegradable scaffolds for remodeling by seeded autologous cells. The aim of this study was to determine and compare extracellular matrix (ECM) formations, cellular phenotype and location of native and tissue engineered (TE) valve leaflets (VL).

Material and Methods: Ovine carotid arteries, porcine and ovine hearts were obtained from slaughterhouses. Endothelial cells and myofibroblasts were isolated from arteries and dissected porcine, ovine and TE VL. TE constructs were fabricated from decellularized porcine pulmonary valves, seeded ovine arterial cells and subsequent dynamic in vitro culture for 16 days using a pulsatile bioreactor. ECM of native and TE valves was studied by histology (hematoxylin-eosin, resorcin-fuchsin, Movat pentachrome stain) and multiphoton NIR femtosecond laser scanning microscopy. Identification and location of VL cells was demonstrated by immunohistochemistry.

Arterial and isolated VL cells were processed for immunocytochemistry and Western blotting.

Results: ECM analysis revealed characteristic and comparable structures in native and TE leaflets. Most cells in native leaflets stained strongly positive for vimentin. Cells positive to α -smooth muscle actin (α -SMA), myosin and calponin were only found at the ventricular (inflow) side of ovine aortic and porcine pulmonary valve leaflets. Cells from TE constructs had a strong expression of vimentin, α -SMA, myosin and calponin throughout the entire leaflet.

Conclusion: Comparable ECM formation as well as the presence and location of distinct cellular phenotypes in native and TE leaflets could be demonstrated. These results are essential for ongoing studies to create heart valves suitable for implantation into the systemic circulation.

"Steady Shear Stress Effects on Three Dimensional Valvular Cell Co-Culture Models for hearts Valve Tissue Engineering"

Jonathon Butcher, Georgia Institute of Technology

Authors: Butcher, Jonathan T.¹ and Nerem, Robert M.¹

Affiliations: ¹Woodruff School of Mechanical Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta GA 30332.

Tissue engineering technologies are essential to developing long-term viable tissue replacements that incorporate living cells to help grow and remodel according to biochemical and mechanical signals. This technology is particularly important for heart valve tissue engineering, because current prosthetics only provide limited-term functionality, especially in growing children and physically active adults (1, 2). Current tissue engineered valve studies have shown promising results in animal studies, but only limited studies have been conducted using the native cells of the heart valve (3, 4). Heart valve leaflets are populated with a unique interstitial cell phenotype, and lined with endothelial cells that exhibit some behaviors different from their vascular neighbors. This study has developed a valve leaflet co-culture model that can be incorporated into bioreactors for exposure to mechanical and/or biochemical conditioning. Porcine aortic valve endothelial cells (PAVECs) were isolated from excised leaflets by collagenase digestion followed by gentle scraping. Porcine aortic valve interstitial cells (PAVICs) were subsequently isolated by overnight collagenase digestion. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% of L-Glutamine and Penicillin/Streptomycin. Cells were split 1:3 upon confluence, and used in experiments between passages 5 through 8. Three dimensional collagen gel constructs were created using type I rat-tail collagen (2 mg/ml) and 1×10^6 PAVICs/ml. Gels were compacted around tubular mandrels for six days, before sectioned longitudinally to create rectangular tissue geometry. The luminal surface (precoated with dilute collagen I) of the constructs was then seeded with 50,000 PAVECs/cm², followed by another two days of culture. Co-cultures were then placed into a laminar flow bioreactor, which subjected the constructs to 20 dynes/cm² of steady shear stress for 24 or 48 hours, with unsheared constructs serving as control. Endothelial morphology in response to flow was evaluated with confocal microscopy using antibodies to vWF, and counterstained with rhodamine phalloidin and Hoechst. Co-culture ultrastructure was determined with confocal microscopy and histology. Co-culture ultrastructure revealed that the full thicknesses of the constructs were populated with PAVICs, lined with a confluent layer of PAVECs. PAVECs responded to flow by aligning perpendicular to the fluid flow environment, similar to what has been shown in monolayer studies. PAVECs also responded to underlying matrix alignment in a manner not observed with vascular co-culture models. These results show that this co-culture model provides a useful tool to investigate cell-cell and cell-matrix interactions for heart valve tissue engineering, and highlights some unique behaviors of the native cells that may be important for cell sourcing decisions in living valve substitutes.

References

1. M. W. Turrentine, M. Ruzmetov, P. Vijay, R. G. Bills, J. W. Brown, *Ann Thorac Surg* 71, S356-60 (May, 2001).
2. K. Hammermeister *et al.*, *J Am Coll Cardiol* 36, 1152-8 (Oct, 2000).
3. T. E. Perry *et al.*, *Ann Thorac Surg* 75, 761-7; discussion 767 (Mar, 2003).
4. M. Rothenburger *et al.*, *Asaio J* 48, 586-91 (Nov-Dec, 2002).

"In Vitro Vascular Cell Seeding and Expansion of Decellularized Valve Scaffold"

Toshia Fujisato, PhD, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka
 Toshia FUJISATO, Hiroshi NISHIOKA, Kazuo NIWAYA*, Akio KISHIDA†,
 Takeshi NAKATANI‡, 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. In this paper, our recent study on a newly developed decellularization method using an ultrahigh pressure treatment and a recellularization method using a roller culture bioreactor were reported. Porcine heart valves were

excised and treated by cold isostatic pressing 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 and vascular wall cells that include fibroblasts and smooth muscle cells were isolated from the femoral artery of a future recipient by collagenase digestion and mincing. The cells were expanded and then seeded onto the decellularized scaffold surface using a roller culture bioreactor and injected into the scaffold tissue by a dispenser in vitro. The seeded cells were then expanded in pulsatile flow culture bioreactor. The leaflet and aorta were completely cell free when the porcine heart valve was treated by the cold isostatic pressing for 10 min and microwave washing for 2 days. 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 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 (Fig.1) and the vascular wall cells were successfully injected into the scaffold tissue by the dispenser (Fig. 2). Heart valves decellularized by the cold isostatic pressing may provide more durable and safe bioprostheses. The autologous vascular cells were well incorporated using the roller culture bioreactor and the cell dispenser to the decellularized tissue scaffold. Fig.1 Endothelial cells seeded onto the decellularized scaffold. Fig.2 Vascular wall cells injected into the decellularized scaffold.

"Optimization of Biomechanical Properties in Sheet-Based Tissue Engineering"

Todd McAllister, PhD, Cytograft Tissue Engineering, Inc.

Kofidis, Theo, Dusserre, Nathalie, Konig, Gerhardt, Robbins, Robert C., McAllister, Todd L'Heureux, Nicolas

In 1998, we introduced a novel approach to building mechanically stable vascular tissues without the need for exogenous scaffolding or synthetic materials. This completely autologous approach, termed sheet-based tissue engineering (SBTE), is based on the idea of producing sheets of matrix-producing cells (fibroblasts, smooth muscle cells etc.) embedded in a thick network of their own extracellular matrix. These sheets are then assembled into more complex three-dimensional organs (skin, liver, heart valves, vascular patches or small diameter blood vessels etc.). Specialized cells (endothelial cells, hepatocytes, keratinocytes etc.) can also be incorporated into the tissues. Preliminary *in vivo* studies suggest that these vascular tissues are a clinically viable treatment option for patients lacking healthy native vessels. Using human cells extracted from bypass patients, we have demonstrated mid-term efficacy in a rat model (32 out of 33 grafts patent, 14 to 240 days). We have demonstrated short-term efficacy in a primate model, with no evidence of dilation, mechanical breakdown or thrombosis (35 days, study ongoing). We have also shown that patches built using the SBTE approach can hold arterial pressure in an acute porcine aorta reconstruction model and may be a viable substitute to synthetic or saphenous vein endarterectomy patches. Despite these promising results, little work has been done to characterize the biomechanical properties of these sheets. The objective of this study was to more accurately define the mechanical properties of the sheets and to understand the role of critical culture conditions on sheet production. We developed a puncture test device to determine the ultimate strength of a single sheet grown in 6 well plates. Six wells were used for each condition and each time point. Sheet thickness was also measured using a non-invasive optical system. After thickness measurements were made, sheets were detached and loaded into the test fixture. A 6 mm spherical platen, driven by a motor was lowered onto the sheet. Force was recorded as the platen was driven through the tissue at a constant rate of 1 mm/second until the sheet ruptured. Cell culture variables including serum concentration, ascorbic acid concentration, seeding density, and production time were explored. As expected, serum concentration had the most dramatic effect on sheet strength. 20% fetal bovine serum produced sheets 7.6 fold stronger than sheets produced with 10% serum. Ascorbic acid at a concentration of 500 μ M gave sheets on average 22% stronger than 250 μ M at time points ranging from 4 to 12 weeks. In the time course study, sheet strength and thickness increased linearly from 4 to 15 weeks. Prior studies have demonstrated that effective fusion between layered sheets is transport limited. This suggests that strength per unit thickness may be an important variable to optimize. No differences in sheet strength per unit thickness were noted as a function of seeding density. Time course studies, however, demonstrated an increase in sheet strength per unit thickness as a function of time. This suggests that older sheets may have more organized extracellular matrix which will allow stronger vessels to be produced within the limits of passive diffusion. We have incorporated these initial optimization studies into our assembly protocol to build vessels using human cells extracted from bypass patients with burst pressures over 5000 mmHg and with a compliance of 3-4% between 80 and 120 mmHg. These completely autologous and living human tissues have mechanical strengths greater than saphenous veins, and may address some of the long-term failure modes associated with synthetic or scaffold-based vascular graft technologies.

"Cell Micro-Encapsulation with Integrin Binding Proteins Prevents Anoikis: Implications for Cell Therapy"

Golnaz Karoubi, University of Toronto

golnaz.karoubi@utoronto.ca

Karoubi, Golnaz; Stewart, Duncan J.; Courtman, David W.
St. Michael's Hospital and the University of Toronto

Introduction: Administration of cells with the potential to differentiate to vascular lineages and regenerate damaged tissue represents a potentially powerful therapeutic tool. However, massive loss of cells has been observed after implantation resulting in low efficiency of organ engraftment. Methods to optimize the viability and differentiation state of adherent cells will likely increase the efficacy of cell therapy. We hypothesized that single-cell protective encapsulation incorporating appropriate integrin ligands will increase the viability of transplanted cells.

Methods: Micro-encapsulation in agarose was used to provide an engineered microenvironment optimized for integrin-extracellular matrix interactions to enhance the viability of rat fibroblasts in suspension culture. Cell viability was assessed by dual exclusion of Annexin V (binds to phosphatidylserine, an early event in apoptosis) and Propidium Iodide (nuclear stain) using flow cytometry.

Results: Fibroblasts in suspension culture exhibited reduced viability ($69.7 \pm 0.2\%$) consistent with anoikis (or rapid cell death induced by loss of matrix contact). Encapsulation of rat fibroblasts in the absence of integrin-binding ligands resulted in a similar decrease in cell viability after 24 hours ($67.9 \pm 1.94\%$), whereas fibroblasts cultured in plastic dishes under attached conditions exhibited much higher rates of survival ($95.9\% \pm 1.03$, $p < 0.003$). The incorporation of immobilized fibronectin and fibrinogen into the agarose microcapsule

ナノスケールハイドロキシアパタイト単結晶体を 固定化した無機・有機複合体の開発

○古菌 勉^{1,2)}、安田昌司¹⁾、田中順三³⁾、岸田晶夫¹⁾

- 1) 国立循環器病センター研究所, 2) 科技団さがけプログラム,
3) 物質・材料研究機構

1. 緒言 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報告する。

2. 実験 ナノ HAp 粒子の調製:W/O マイクロエマルジョン法を独自に改良することにより、ロッド状 HAp を合成した。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。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 HAp 微粒子を吸着させた。120°C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。

3. 結果と考察 ナノ HAp 微粒子の形態: 反応温度 25°Cにおいて球状もしくは不定形状の単結晶(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°Cにて板状もしくはロッド状の単結晶(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。無機・有機複合繊維: ナノ HAp 微粒子はほぼ単層で分散して繊維上に結合していた。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。

Development of an inorganic-organic composite immobilized nano-scaled hydroxyapatite single crystals. Tsutomu FURUZONO, Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita Osaka, 565-8565 Japan

ナノスケールハイドロキシアパタイト単結晶体が 自己集合した新規な球状微粒子の開発

○古菌 勉^{1,2)}、安田昌司¹⁾、田中順三³⁾、岸田晶夫¹⁾

1)国立循環器病センター研究所、2)科技団さきがけプログラム、
3)物質・材料研究機構

1. 緒言 近年、ナノテクノロジーを活用したナノドラッグ・デリバリー・システム(DDS)が、近未来の薬物療法として高い注目を浴びている。我々はこれまでナノスケールにてハイドロキシアパタイト(HAp)単結晶体の粒径を任意に制御できる技術を開発し、高分子複合材料として応用してきた。今回、本ナノスケール HAp 単結晶体を自己組織化的に集合化させ、新規な無機球状集合体を創出したので報告する。

2. 実験 W/O マイクロエマルジョン法にて反応温度を制御することにより、HAp 単結晶体を調製した。末端にアミノ基を有するシランカップリング剤をトルエン中にて120°C、6時間還流し、HAp にアミノ基を導入した。このアミノ化 HAp 単結晶体を混合溶媒(トルエン/メタノール=9/1)中に分散・静置し、集合体を調製した。

3. 結果と考察 HAp 単結晶体の表面を改質し有機混合溶媒中に分散することにより、HAp 球状集合体粒子を得られた(図1)。この HAp 単結晶体の球状形態への集積は、HAp 表面の官能基と混合溶媒の化学的相互作用によるものと推察される。走査型電子顕微鏡像から、粒子径は $1.93 \pm 0.35 \mu\text{m}$ であった。また、BET 法により集合体粒子の平均比表面積は 7.0 m/g^2 であった。粒径 $2.0 \mu\text{m}$ の理想球状緻密体の比表面積(0.95 m/g^2)に比較して高いことから、本集合体は多孔体構造を形成していることが推察された。

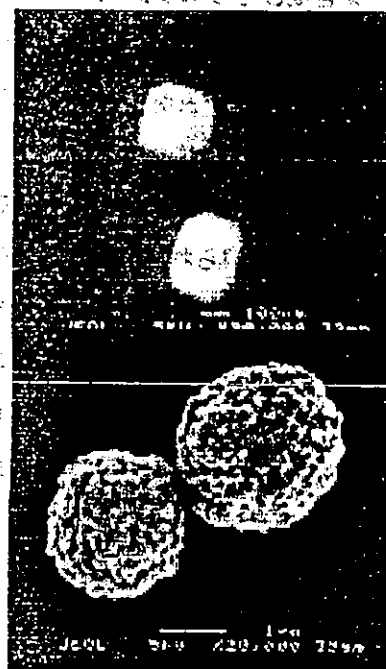


図1 ナノスケール HAp 単結晶体(上)と球状集合体(下)の SEM 像

Development of nano-scaled titanium dioxide-silicone composite expressing cell adhesiveness and photoreactivity, Tsutomu FURUZONO, Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita Osaka 565-8565 Japan

界面複合化を目的とした新規な多孔板状リン酸カルシウムの開発

○ 古菌 勉¹⁾, 安田昌司^{1,2)}, D. Walsh^{2,3)},
佐藤公康⁴⁾, 田中順三^{2,5)}, 岸田晶夫^{1,2)}

1)国立循環器病センター研究所, 2)科技団, CREST, 3)University of Bristol,
4)産業技術総合研究所中部センター, 5)物質・材料研究機構

1. 緒言 我々はこれまで、生体組織、特に軟組織に対して生体適合性を示すデバイスの開発を目指し、化学結合を介したリン酸カルシウム(CaP)と高分子基材からなる複合体の合成に関する研究を行ってきた。この複合体調製において、CaPが高分子基材表面に対して強固な化学結合を形成するためには、高分子基材の表面とCaPの接着面積をより広くすることが有効であると考えられる。今回我々は混合・乾燥・焼結工程により、新規な板状CaPを開発したので報告する。

2. 実験 【混合工程】炭酸カルシウム、ビス(リン酸二水素)カルシウムおよびテトラカルシウムホスフェイトモノオキシサイト(TCPM)を細碎・混合した後、反応促進剤であるリン酸二水素ナトリウム水溶液を添加した。【乾燥工程】上記混合物の水分蒸散速度を制御することにより、ブルシャイト(DCPD)とTCPMからなる板状構造体を調製した。【焼結工程】得られた板状構造体を一定昇温速度にて800°Cまで昇温後、同温度にて所定時間一定に保持した。

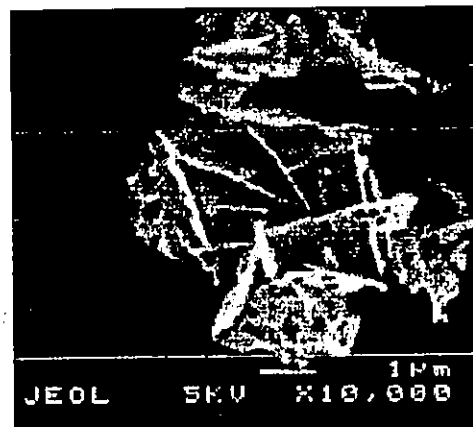


図1 板状リン酸カルシウムのSEM像

3. 結果と考察 得られたCaP(800°C, 60min処理)の走査型電子顕微鏡(SEM)像を図に示す。得られたCaPは孔を有する板状形態を示した。孔の存在は、焼結過程により結晶化が進行し体積減少が生じたことによると推察される。また、本CaPはハイドロキシアパタイト(HAp)とβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)から構成されていた。さらにX線解析法により、焼結時間の増加に伴いβ-TCP含有率が増加することが認められた。これらのことより、本板状CaPは高分子基材と共有結合できる活性基(水酸基)を有する機能性無機材料であることが明らかとなった。現在、高分子基材との複合化を進めている。

Development of nano-scaled titanium dioxide-silicone composite expressing cell adhesiveness and photoreactivity, Tsutomu FURUZONO, Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita Osaka 565-8565 Japan