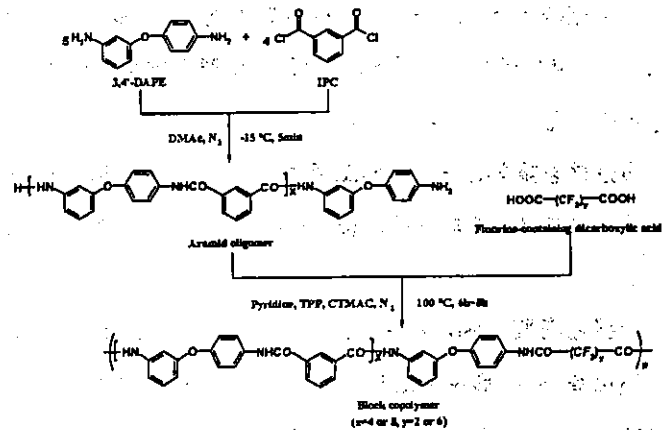


○是松 新、古菌 勉、安田昌司、岸田晶夫
(国立循環器病センター研究所)

1. 緒言 我々は人工血管用材料に応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。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¹⁾。

2. 実験 ブロック共重合体の合成法を Scheme 1 に示す。まず、3,4'-ジアミノジフェニルエーテル(3,4'-DAPE)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。

3. 結果と考察 Scheme 1 に示すように、まず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4,8の2種類のオリゴマーが得られ、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、アラミドオリゴマーと含フッ素ジカルボン酸(y=2 or 6)との重縮合を行い、得られた共重合体の



Scheme 1 Synthesis of block copolymer

の分子量を GPC により測定した。その結果、オリゴマー、ジカルボン酸ともに鎖長の短い方を用いた共重合体が、長い方を用いたものよりも分子量が大きいことがわかった(y=2 の場合、 $x=4 \cdots M_n=20,300$ 、 $x=8 \cdots M_n=10,200$)。これは、鎖長の短いほど運動性が高くなり、オリゴマーとジカルボン酸の両末端の反応する確率が高くなったからと考えられる。得られた共重合体の中には従来のアラミドでは不溶の溶媒(テトラヒドロフラン等)に溶解または膨潤するものもあった。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。さらに、これらの材料の特性、医用材料への応用の可能性についての評価を行っている。

1) A. Korematsu, et al., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, in press.

Development of novel block copolymers containing aramid and fluoroethylene segments as the biomedical material. Arata Korematsu (Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka, 565-8565 Japan)

鈴鹿医療科学大学
先端医療振興財団
信州大学医学部
国立循環器病センター

○山東奈津子、森反俊幸
西岡 宏
船本誠一
藤里俊哉、沼田 智、庭屋和夫
岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎

1. 緒言

われわれは、心臓弁組織からドナー由来の細胞成分を除去したバイオスキャフォールドに、レシピエントの自己細胞を *in vitro* にて組み込むことで、自己修復性や成長性を有した再生医療型心臓弁の開発を目指している。本報では、ミニブタを用いた動物実験において、肺動脈弁バイオスキャフォールドにレシピエントの自己血管内皮細胞を組み込み、肺動脈弁置換手術をすることによって移植後の自己組織化について評価した。また、凍結保存同種弁及び細胞未組込バイオスキャフォールドと比較検討した。

2. 実験

ミニブタを用い、右心バイパス下にてレシピエントのミニブタ自己血管内皮細胞を播種した同種心臓弁バイオスキャフォールドによる肺動脈弁置換手術を行った。術後1ヶ月及び3ヶ月において、心エコーと圧測定による血行動態の測定後、移植弁組織を摘出し、HE染色を行うとともに、抗vWF、抗 α -SMA、及び抗ビメンチン免疫染色、及び走査型電子顕微鏡によって組織学的所見を検討した。さらに、これらの結果を細胞の未播種群及び凍結保存同種弁移植群と比較した。

3. 結果と考察

レシピエントミニブタの自己血管内皮細胞を播種した同種バイオスキャフォールドでは、エコーによる血行動態並びに肉眼的所見から、一部の術後例にて弁葉に血栓の付着している場合も見られたが、術後1ヶ月及び3ヶ月においても良好な弁機能を示していた。移植組織前後の圧格差を測定したところ、術後3ヶ月においては若干の格差が認められた。犠牲死後に摘出した移植組織を組織学的に観察したところ、術後1ヶ月においては、移植されたバイオスキャフォールドの内腔面が一層の細胞層によって覆われるとともに、一部組織内への細胞浸潤が認められた。さらに術後3ヶ月においては、弁葉内を含む移植されたバイオスキャフォールド組織の大部分への細胞の浸潤が認められた。浸潤した細胞を免疫染色によって検討したところ、抗vWF染色より表面層は血管内皮細胞によって覆われ、抗 α -SMA及び抗ビメンチン染色より組織内には平滑筋細胞が乏しく、大部分が線維芽細胞であることが確認された。これに対して、自己細胞を未播種の同種バイオスキャフォールドでは、内腔表面上に血管内皮細胞の進展は認められたものの、組織内部への細胞浸潤はほとんど認められなかった。また、脱細胞化処理及び細胞播種を行わない凍結保存同種弁では、脱細胞化同種弁に比較して炎症細胞の浸潤が顕著であった。

Evaluation of acellularized tissue bioscaffold by minipig model.
Natsuko Yamahigashi¹, Hiroshi Nishioka², Seiichi Funamoto³, Toshia Fujisato⁴,
Satoshi Numata¹, Kazuo Niwaya¹, Akio Kishida¹, Toshiyuki Moritan¹, Takeshi
Nakatani¹, and Soichiro Kitamura¹
¹Suzuka University of Medical Science, ²Foundation for Biomedical Research and
Innovation, ³Shinsyu University, and ⁴National Cardiovascular Center

鈴鹿医療科学大学
先端医療振興財団
信州大学医学部
国立循環器病センター

○吉田謙一、森反俊幸
西岡 宏
船本誠一
藤里俊哉、菅 理晴、庭屋和夫
岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎

1. 緒言

心停止者から提供された凍結保存心臓弁は、機械弁より抗血栓性で、異種生体弁より耐久性で優れている。しかし、狭窄や石灰化によって移植早期に機能不全を起す例も報告されており、免疫反応の関与が示唆されている。われわれは、心臓弁組織からドナー由来の細胞成分を除去したバイオスキャフォールドに、レシピエントの自己細胞をin vitroにて組み込むことで、自己修復性や成長性を有した再生医療型心臓弁の開発を目指している。本報では、ミニブタ心臓弁バイオスキャフォールドへのレシピエント細胞の組み込みについて報告する。

2. 実験

ミニブタの心臓弁を摘出し、冷間当方加圧による超高压処理によってドナー細胞を除去することで、ミニブタ心臓弁バイオスキャフォールドを得た。ミニブタ大腿動脈からコラーゲナーゼ消化法によって、血管内皮細胞、及び平滑筋あるいは線維芽細胞を含む血管壁細胞を分離した。血管壁細胞を汎用ディスペンサ装置を用いてスキャフォールド内に微量注入した後、血管内皮細胞を回転培養装置にてスキャフォールド表面に播種した。

3. 結果と考察

血管スキャフォールドに対しては、断続的に回転させることで比較的容易に血管内皮細胞を播種することが可能である。しかし、心臓弁スキャフォールドでは、単純回転のみでは弁葉部分に均一に細胞を播種することができない。二軸回転型培養装置を用いることで、スキャフォールド表面に均一に血管内皮細胞を播種することが可能であった(図1)。また、ディスペンサ装置を用いることで、スキャフォールド内部に血管壁細胞を微量注入することが可能であった(図2)。あらかじめ移植手術前に、in vitroにてレシピエントの自己細胞を組み込むことで、移植後早期の段階にて移植組織が自己化されると期待できる。

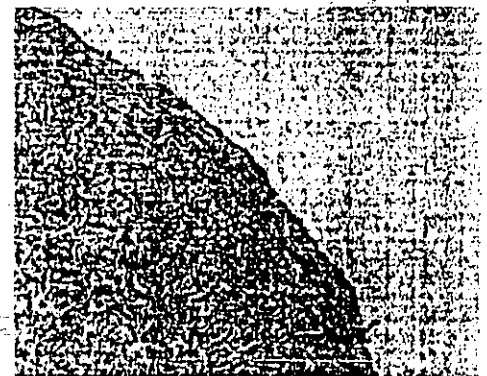


図1. 血管内皮細胞の表面播種

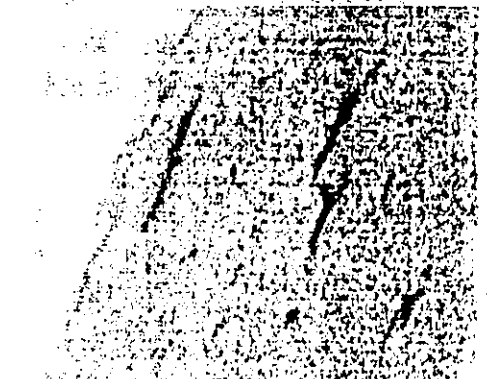


図2. 血管壁細胞の微量注入

In vitro recellularization of acellularized tissue bioscaffold.

Kenichi Yoshida¹, Hiroshi Nishioka², Seiichi Funamoto³, Toshia Fujisato⁴, Michiharu Suga⁴, Kazuo Niwaya¹, Akio Kishida¹, Toshiyuki Moritan⁴, Takeshi Nakatani⁴, and Soichiro Kitamura⁴

¹Suzuka University of Medical Science, ²Foundation for Biomedical Research and Innovation, ³Shinsyu University, and ⁴National Cardiovascular Center

鈴鹿医療科学大学
先端医療振興財団
信州大学医学部
国立循環器病センター

○鎌田和加子、森反俊幸
西岡 宏
船本誠一
藤里俊哉、菅 理晴、庭屋和夫
岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎

1. 緒言

生体吸収性材料からなるスキャフォールドの開発には、複雑な形状の造形、生体と同等の力学特性の付与、吸収速度の制御、といった問題点がある。われわれは胸部外科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、気管から細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスを用いたバイオスキャフォールドの技術開発を行っている。本報では、超高圧処理によるバイオスキャフォールドの作製について報告する。

2. 実験

ラットあるいはミニブタから清潔下にて心臓弁、血管及び気管を摘出した。冷間等方加圧処理装置（神戸製鋼所）により、1万気圧、10分間、4℃の条件にて超高圧処理した。処理組織を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、培養試験によって超高圧処理による滅菌性について調べた。

3. 結果と考察

以前報告したトリソルX-100を用いた界面活性剤による洗浄処理では、処理組織表面から1mm以上の深部組織内の細胞を除去することができなかったが、冷間当方加圧による超高圧処理では、組織深部まで完全に細胞を除去することができた（図1）。また、界面活性剤処理では破断強度及び弾性率が増大したが、超高圧処理では力学特性への影響は見られなかった。6千気圧以上の超高圧処理によって、細菌はもとより、ほとんどのウイルスが不活化されるとされている。あらかじめ常在性細菌によって感染させた組織を超高圧処理したところ、感染性の除去が確認された。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。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、本法ではクリアできると考えている。このスキャフォールド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。



図1. 超高圧処理後の心臓弁基部組織

Development of acellularized tissue bioscaffold.

Wakako Kamata¹, Hiroshi Nishioka², Seiichi Funamoto³, Toshia Fujisato⁴, Michiharu Suga⁴, Kazuo Niwaya⁴, Akio Kishida⁴, Toshiyuki Moritan⁴, Takeshi Nakatani⁴, and Soichiro Kitamura⁴

¹Suzuka University of Medical Science, ²Foundation for Biomedical Research and Innovation, ³Shinsyu University, and ⁴National Cardiovascular Center

621 超高圧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必要であるという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、超高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。ハンクス液で洗浄後、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圧印加処理(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染色により光顕観察するとともに、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、超高压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。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: ディスペ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。高压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

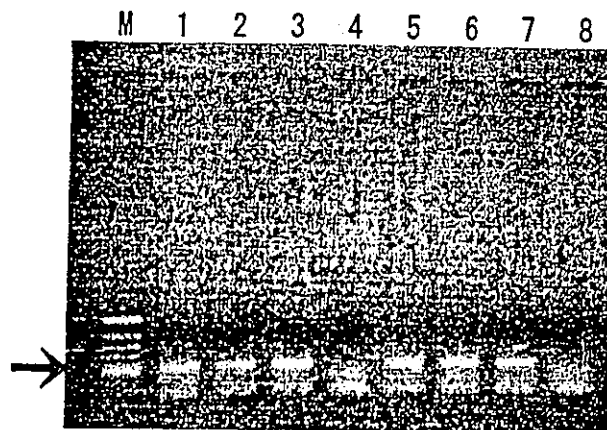


Figure 1. PCR product of PERV in the porcine vascular tissue. Lane 1&5: intact tissue, 2&6: Triton X-100, 3&7: Triton X-100 followed by washing, 4&8: CIP followed by washing.

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、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.

P-037 魚類由来コラーゲン線維ゲルを用いた細胞培養

北海道大学 大学院 工学研究科 分子化学専攻, 井原水産株式会社
永井展裕¹, 柚木俊二², 田島健次², 棟方正信², 鈴木 健²

【背景】狂牛病の発生以降, 家畜由来に代わる新規コラーゲン材料として天然魚類由来コラーゲンが注目されている。しかし, 変性温度が低く生体内温度 (37°C) では変性・溶解するので, バイオマテリアルとしての応用が制限されてきた。最近我々は, 架橋剤である水溶性カルボジイミドを用い, 変性温度が19°Cの鮭皮由来コラーゲン (井原水産株式会社製) から生体内温度でも安定なコラーゲン線維ゲル (以下SCゲル) を作成することに成功した。そこでSCゲルにおける細胞増殖性, 分化維持能を評価しバイオマテリアルとしての応用を検討した。

【方法】細胞はヒト歯周靭帯細胞を用いた。専用培地で2週間ゲル上培養し細胞数と分化維持能 (ALP活性) の経時変化を評価した。比較としてCellmatrix (豚皮由来コラーゲン, 新田ゼラチン製) を用いた。

【結果】増殖性, 分化維持能ともにSCゲルの方が高かった。SEM観察からSCゲルはCellmatrixゲルよりも緻密な繊維構造を持つことがわかった。また, SCゲルは架橋剤を用いているためにゲル強度がCellmatrixよりも大幅に高かった。これらが細胞培養におけるSCゲルの上記特性に寄与していると考察した。

【結論】SCゲルは従来のコラーゲン線維ゲルよりもゲル強度, 細胞増殖性が高いことからバイオマテリアルとしての応用が十分に期待できる。

P-038 水溶性カルボジイミドによる魚類由来コラーゲン線維ゲルの作成とその物性

北海道大学 大学院 工学研究科 分子化学専攻, 井原水産株式会社
柚木俊二¹, 永井展裕², 棟方正信², 高井光男², 鈴木 健²

【背景】天然魚類由来コラーゲンは家畜由来に代わる新規コラーゲン材料として注目されている。しかし, 変性温度が低く生体内温度 (37°C) では変性・溶解するので, そのバイオマテリアルへの応用が制限されてきた。本研究では, 架橋剤である水溶性カルボジイミドEDCとコラーゲンの線維化を組み合わせることで, 魚類由来コラーゲンゲルに高度な熱安定性を付与できることを報告する。

【方法】井原水産株式会社製の鮭皮由来アテロコラーゲン (変性温度19°C; 以下SC) の0.5% pH3希塩酸水溶液を調製した。pH6.8リン酸バッファーでEDC水溶液を調製した。4°CにおいてSC水溶液とEDC水溶液を容積比1:1で混合し, ゲルを作成した。

【結果】SC水溶液とEDC不含リン酸バッファーの混合により, SCは速やかに線維化した。SC水溶液に対しEDC水溶液を加えた場合, EDC濃度が高いほど線維化速度が低下した。EDC濃度が高いほどゲル強度は高くなったが, 熱安定性は終濃度50mMで極大となった。終濃度50mMで作成したゲル (以下SCゲル) は37°Cにおいて溶解せず, 牛由来コラーゲン線維ゲルに比べ歯周靭帯細胞が良く接着および増殖した。一方で, コラーゲン線維化の起こらない条件でEDCを作用させた場合, ゲルは37°Cで溶解した。

【結論】本方法を用いることで変性温度の低い魚類由来コラーゲンからも細胞培養用ゲルを作成できる。

P-039 カプセル化脾臓法による生体内異所性肝組織の構築

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科, 東レ株式会社 先端融合研究所
西尾玲士¹, 中山三由紀², 池北雅彦², 渡辺恵史²

【背景・目的】肝臓移植に代わる肝治療法の確立を目的とし, 細胞を用いた肝機能補助法が研究されている。本研究では肝細胞を移植し肝機能を補助する方法として, 摘出した脾臓を細胞移植のためのカプセルとして使用する新規の方法「カプセル化脾臓法」を考案し, その有用性について検討した。

【方法】マウス (メス) より摘出した脾臓に同系マウス (オス7週齢) より単離した初代培養肝細胞 4.0×10^6 cellsを注入した。この脾臓 (カプセル化脾臓) を同系マウス (メス) 腹腔内に挿入し, 臓器や腹膜に接着させた。移植塊内に残存する移植細胞数はY染色体量より推定した。

【結果】腹腔内に挿入したカプセル化脾臓は移植5日後までに宿主との血管系を自己形成し, 接着部位より血流が供給され始めていた。カプセル化脾臓内部のマウス初代培養肝細胞は移植1週間後に最大で移植細胞の35%の生存が確認され, Albumin, HNF4, CK18, Cyp1A2などの遺伝子発現を維持していた。

【結論】本研究で示したカプセル化脾臓法により腹腔内に血流の供給された新生臓器を形成し, 初代培養肝細胞を高い生存率をもって保持する事が出来た。この方法は細胞移植による肝機能補助法の確立に有効な手段となると考えられる。また *in vivo* における実験環境として肝臓以外の細胞を用いた様々な研究にも応用できる可能性がある。

P-040 テーラーメイド型組織移植のための安全な生体スキャフォールドの開発

国立循環器病センター
西岡 宏, 鎌田和加子, 船本誠一, 藤里俊哉, 湊谷謙司,
庭屋和夫, 菅 理晴, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎

我々は, ミニブタ心臓弁や血管, 心臓, 気管等の組織から細胞及びウイルス等のドナー由来成分を除去することによって, 高度な安全性を有した生体スキャフォールド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, テーラーメイド型として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が可能である。清潔操作下にてミニブタ心臓弁及び血管, 心臓, 気管を摘出し, 4°C, 10,000気圧の超高静水圧印加処理を10分間, 続いて4°C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。処理後の組織は組織学的, 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, 気管軟骨を含めて各組織から完全に細胞を除去することができた。組織の形状, 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るとともに, 組織内のブタ内在性レトロウイルスも除去されていた。異種組織に本脱細胞化処理を加えることによって, 高度な安全性を有した生体スキャフォールドが作出できると考えられる。

P-041 生体スキャフォールドへのレシピエント細胞の播種と移植による評価

国立循環器病センター

吉田謙一, 山東奈津子, 船本誠一, 藤里俊哉, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 菅 理晴, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎

我々は、生体組織からドナー由来の細胞成分を除去した生体スキャフォールドに、レシピエントの自己細胞を播種したテーラーメイド型組織移植技術の開発を行っている。レシピエント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移植組織が創製できると期待できる。清潔下にてミニブタ心臓弁, 血管, 気管を摘出し, 超高静水圧印加処理にて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から採取した血管内皮細胞, 血管壁細胞等を増殖した後, 汎用ディスペンサ装置にてスキャフォールド組織内に細胞を注入播種すると共に, 回転及び循環培養装置を用いて組織表面に細胞を播種した。得られた組織をミニブタに同所性に移植した。脱細胞化心臓弁及び血管スキャフォールド組織内に, 汎用ディスペンサ装置を用いて細胞を注入することができた。また, 回転及び循環培養装置によってレシピエントの内皮細胞を均一に播種することができた。さらに, 心臓弁及び血管, 気管について, ミニブタによる動物実験において有効性を検討した。

P-042 Computer-Aided-Tissue-Engineering のためのバイオインクジェットプリンティング

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ²セイコーエプソン(株), ³東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

中村真人¹, 渡辺昭彦¹, 高城富美男², 肥留間祐子³, 小林暁子¹, 岩崎泰彦¹, 森田育男³, 大内克洋¹, 高谷節雄¹

【目的】移植に使える臓器を細胞や生体材料を用いて作製することは, 再生医工学の重要な目標のひとつである。機械工学分野では, CAD, CAM により, 高度なモノ作りが可能となった。本研究では, Computer Aided Tissue Engineering (CATE) の概念と, そのための生体材料によるバイオインクジェットプリンティングを紹介する。

【方法・結果】CATEでは, 生体組織をコンピュータ上で細胞配置までデザインし, 生きた細胞, 細胞外マトリクス, ポリマーなどを用いて, 生体組織と同等な細胞配列をもつ生きた組織を人工的に再構成する。バイオインクジェットプリンティングは, インクジェットでそれらの生きた材料, 生体材料を高精細画像で2次元描画する手法である。我々は, 生体適合性静電駆動式インクジェット (SEAJet) ヘッドを用い, 実験用バイオインクジェット装置を組み上げ, 生きた血管内皮細胞, ポリマーなどを用いて, 2次元描画を試みた。細胞が, 生きたままダメージもなく, ドット, ライン状に Printing できることが確認できた。また, 細胞非接着性の 3-Methacryl-oxyethyl-phosphoryl-choline (MOPC) ポリマーのプリントにより, 細胞接着を制御することもできた。

【結論】Computer Aided Tissue Engineering (CATE) は, これからの Tissue Engineering の向かうべき方向である。バイオインクジェットは, CATE に有効な装置となると期待できる。

P-043 TGPゲルを用いた軟骨細胞の *In Vitro* 3次元培養

¹メビオール株式会社, ²Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School

吉岡 浩¹, 森 有一¹, 小島宏司², 安田鮎子², ティンスレイ ケビン², ヴァカンティ チャールズ²

【目的】再生医療を目指した細胞・組織の3次元培養担体としてコラーゲンゲルが広く利用されているが, 生物由来材料であるため異常プリオン混入等の危険性が排除できない。我々が開発した Thermoreversible Gelation Polymer (TGP: 商品名 メビオールジェル) は完全な合成高分子であり, その水溶液は低温で液状, 体温ではゲル状となる熱可逆性を有する。我々は TGPゲルを担体とする軟骨細胞の *In Vitro* 3次元培養について検討した。

【方法】メビオールジェル中の疎水性単量体組成を調整してゾル-ゲル転移温度 7°C の TGP を合成した。TGP を水冷下 Ham's F-12 medium に溶解して TGP 培地を調製し, 牛関節より採取した軟骨組織を collagenase 処理して得た軟骨細胞を水冷下で TGP 培地に分散させた。軟骨細胞を含有する TGP 培地を 37°C に昇温してゲル化させ, ゲル上に F-12 medium を 37°C で重層した状態で軟骨細胞を TGP ゲル中 16 週間 3 次元的に培養した。

【成績】経時的にサンプルを回収し, 生化学的分析 (GAG, Type 2 collagen, DNA) および組織学的検索 (HE 染色, Safranin-O 染色, collagen 染色, Von Kossa 染色) を行った結果, 軟骨細胞を TGP ゲル中で 3 次元培養することにより生体内と同様の軟骨組織が再生されることが確認された。

【結論】メビオールジェルは完全な合成素材で BSE 感染等の危険性が無く, 軟骨組織再生の担体として優れた特性を有する。今後, 再生医療の scaffold として臨床応用が期待される。

P-044 ラット胎児血由来未分化間葉系細胞の生物学的特性

北里大学 医学部 整形外科

相川 淳, 占部 憲, 成瀬康治, 向井田智之, 糸満盛憲

妊娠 15, 17, 19 日齢ラットの胎児血より採取した細胞を 10% FCS を含む α MEM 培地でそれぞれ継続培養した。RT-PCR を用いて骨及び軟骨細胞関連遺伝子発現を調べ, 適切な胎児血細胞の採取時期について検討した。また, 妊娠 19 日齢ラット胎児血より単離した付着性細胞を 3 週間継続培養した後, セルバンカーを用いて凍結保存した細胞の軟骨細胞関連遺伝子発現について検討した。ラット胎児血細胞の採取効率は妊娠 19 日齢ラットが最も高く 10.2 コロニー/10 胎児であった。凍結保存した胎児血細胞をさらに 2 週間継続培養した細胞は RT-PCR で COL I, COL II, COL X, Aggrecan の遺伝子発現を認めた。採取時期による採取効率の違いは, 従来報告されてきた臍帯血細胞が採取できない原因の一つである可能性が示唆された。また, ラット臍帯血細胞は凍結保存しても遺伝子発現が変化しないことから凍結保存が可能な細胞源で将来軟骨再生に利用し得る細胞であると考えられた。

VI29-5 カフェイン添加によるMPF活性の低下抑制およびドナー細胞の条件がミニブタ再構築胚の発生に及ぼす影響

○山中 賢一・川原 学・若井 拓哉・杉村 智史・佐々田 比呂志・佐藤 英明

東北大院農

k-yamanaka@bios.tohoku.ac.jp

【目的】これまで、我々は、ブタ卵子内の卵成熟促進因子(MPF)の活性が核注入時に低下することを明らかにした。そこで、MPF活性を維持するために操作時にカフェインを添加した培地を用い、ミニブタ再構築胚の核の染色体凝縮と発生に及ぼす影響を調べた。さらに、ドナー細胞の由来および継代数が再構築胚の発生に及ぼす影響について調べた。【方法】屠場由来卵巣より採取した卵丘卵子複合体を44時間体外成熟培養し得られた成熟卵子をレシピエントとした。実験1: カフェイン添加または無添加PB1を操作培地とし、核注入後3時間で再構築胚を固定染色し、移植核の変化を観察した。一方、胚を7日間培養し、胚盤胞期までの体外発生を調べた。実験2: ドナー細胞として、一腹由来の6頭のミニブタ胎子から採取した線維芽細胞を用い、由来および継代数(5,10,15,20,25,30)が再構築胚の体外発生に及ぼす影響を調べた。【結論】カフェイン添加区で染色体凝縮率(73.9vs37.2, $P<0.05$)、注入時のMPF活性および活性化後の胚盤胞形成率(10.3vs3.4, $P<0.05$)が無添加区と比較して有意に高かった。ドナー細胞による発生率では、6頭の胎子間で2細胞期への発生率に有意な差が見られ(57.5vs22.3, $P<0.05$)、継代数15代目で胚盤胞形成率が最も高かった(14.3vs4.7, $P<0.05$)。

VI29-6 hDAF/GnT-IIIダブルTgブタ細胞を用いた α 1,3ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウトブタの作製

○高萩 陽一¹・藤村 達也¹・河野 暁子¹・重久 保¹・宮川 周士²・村上 博¹

¹(株)日本動物工学研究所・²大阪大医

y.takahagi@nipponham.co.jp

【目的】我々は異種移植用ブタの開発に取り組んでおり、これまでにhDAFおよびN-アセチルグルコサミン転移酵素III(GnT-III)の両方を発現するダブルTgブタ(D/Gブタ)を作製した。このブタは異種糖鎖抗原量を半減しているが、拒絶反応を更に軽減するためにはブタ α 1,3ガラクトース転移酵素(GT)遺伝子をノックアウト(KO)する必要がある。そこで、D/Gブタ由来細胞を用いて、GT-KOブタの作製を試みた。【方法】D/Gブタ胎仔から採取した細胞にGT-KOベクターを遺伝子導入し、KO細胞を、薬剤耐性を指標に選択し、PCR及びサザンブロットで同定した。またKO細胞から核移植により初期胚を再構築し、性周期を同期化した雌ブタに移植した。【結果】(1)薬剤耐性細胞コロニー3062個からheterozygousにGT遺伝子がKOされた細胞コロニー17個を得た。(2)核移植胚964個を8頭の受胎雌に移植した。妊娠中に5頭を開腹したところ、1頭の受胎雌から5頭の胎仔が回収できた。DNA解析からそのうちの4頭がGT-KOブタであり、核型解析から1頭が正常な核型を示すことを確認した。残りの1頭は単為発生胚に由来していた。【結論】hDAF/GnT-IIIダブルTgブタ胎仔由来細胞を用いてGT-KO細胞を作製し、核移植によりGT-KOブタ胎仔を得た。

VI29-7 ブタ卵母細胞のGV置換と成熟

○山本 晃央¹・広瀬 正一¹・本多 泰明¹・松崎 隆¹・小川 英彦²・河野 友宏²

¹東農大院農・²東農大院農・生研機構

55020039@nodai.ac.jp

【目的】哺乳類の卵巣には数千から数十万もの卵母細胞が含まれているが、大部分は生殖に寄与することなく卵母細胞形成過程で退化してしまう。これらの潜在的な遺伝子資源を高度利用できれば、増殖手段の効率化に貢献できる。そこで、卵母細胞のGV置換法の検討を行った。【方法】採取した卵母細胞はdbcAMP添加TCM199+PVAで17時間前培養を行い、囲卵腔を形成させた。マイクロマニピュレーションにより卵母細胞からGV期核を取り出し、先に除核した未成熟卵母細胞の囲卵腔に注入することで連続的に置換した。置換後、DC25V・10usecの電気パルスをもとに融合処理を行った。融合処理1時間後、DC1.25kV/cm・80usecの単一電気パルスを与え、卵活性化を誘起した。体外成熟培養はスクロース添加TCM199+PVAで20時間行った。【結果】前培養におけるGV期停止率は94%であった。GV置換における除核率および融合率は、それぞれ90%および77%であった。再構築卵は、90%と高率に成熟した。一連の操作を通してのM2期卵作出効率は、60%とコントロールの成熟率(70%)に匹敵する値であった。また、作出したM2期卵の核を用いて、fg/fg雌核発生胚を作出することが可能であり、体外培養により胚盤胞まで発生可能なことを確認した。

VI29-8 成熟雌ブタ卵子に由来する胚発生能促進因子に関する研究

○宮崎 直・吉田 光敏・三好 和隆

鹿大農

naonao39@hotmail.com

【目的】本実験では、成熟雌ブタ卵子に由来する胚発生能促進因子の性状を明らかにする目的で、成熟雌由来卵子より抽出した細胞質成分やRNAを、未成熟雌卵子へ顕微注入により導入し、その後の発生能を単為発生法により検討した。【方法】食肉センター由来ブタ卵子を体外成熟後、極体放出卵子10個を一群として抽出液へ投入し、急速凍結して細胞質成分注入溶液の調製を行った。細胞質成分注入溶液からのRNAの抽出はRNeasy Total RNAキットを用いて行った。未成熟雌由来卵子を体外成熟後、極体放出卵子の細胞質へ卵1個当たり5 μ lずつ細胞質成分またはRNA溶液を顕微注入した。顕微注入卵子は、電気的活性化処理し、その後の発生状況を観察した。実験1: 性成熟状況の異なる卵子細胞質成分の卵子への顕微注入が発生状況に及ぼす影響を検討した。実験2: 成熟雌由来卵子RNAの卵子への顕微注入が発生状況に及ぼす影響を検討した。【結果】実験1: 胚盤胞形成率は無処理区および未成熟雌卵子由来の細胞質成分注入区に比べ成熟雌卵子由来の細胞質成分注入区で有意に増加した($P<0.05$)。実験2: 卵割率、胚盤胞形成率および胚盤胞の平均細胞数は成熟雌卵子由来のRNA注入区で対照区と比べて有意に増加した($P<0.05$ or $P<0.01$)。

VI30-13 体外成熟・体外受精・体外発生に伴うウシ卵透明帯の硬度変化について

○峰 尚美¹・糸井 史陽¹・宮村 元晴²・浜野 晴三²・村山 嘉延³・尾股 定夫³・吉田 光敏¹

¹鹿大農・²改良事業団バイオテック・³日大工

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

【目的】家畜卵を取り囲む外被(透明帯・細胞膜)に関する知見は形態学および生化学的分野に限られており、硬さを指標とした力学的特性については未解明の点が多い。本研究は、硬度測定用触覚センサを応用したマイクロバイオセンサを用いて、体外における成熟・受精・発生に伴うウシ卵透明帯の硬度変化を調べた。【方法】ピエゾ素子の先端に微細ガラス針を接続したマイクロバイオセンサを対象に接触させ、その接触状況による周波数変化量をパソコン計測プログラムを介してリアルタイムでディスプレイに表示し、測定データを記録した。測定対象：食肉センター由来のウシ卵巣より卵子を吸引採取し、採取直後の未成熟卵、成熟培養24時間後の体外成熟卵、媒精18~24時間後の雌雄前核形成卵および媒精7日後の拡張胚盤胞についてそれぞれの透明帯硬度を測定した。また、既知濃度ゼラチン試料の硬度測定を行い、検量線作成後、卵測定値はゼラチン濃度に換算した。【成績】卵透明帯硬度は、成熟過程で有意に減少、雌雄前核形成卵において、体外成熟卵と比べて有意に増加し、その後の発生過程で有意に減少した(P<0.01)。【結論】以上の成績から、ウシ卵は成熟・受精・発生に伴い透明帯硬度に変化の生じることが力学的視点から初めて示された。

VI30-15 ウシ二次卵胞の異種移植による発達とガラス化保存

○石井 恭輔¹・千本 正一郎¹・福見 善之²・浜崎 淳³・宮野 賢⁴

¹神戸大院自然・²徳島県農技セ畜産研・³家畜改良事業団・⁴神戸大農

027a001n@y02.kobe-u.ac.jp

【目的】ウシ卵巣内の発育途上の卵母細胞の利用を目的として、二次卵胞をSCID(重症複合免疫不全)マウスへ移植し、卵胞の発達と卵母細胞の発育を検討した。また、二次卵胞のガラス化保存を試みた。【方法】卵巣皮質から採取した直径140~200 μ mの二次卵胞を含む組織片を雌SCIDマウスへ6週あるいは8週間移植した。移植後に回収した卵胞から卵母細胞を採取し、成熟培養、体外受精を行った。また、二次卵胞をガラス化保存し、融解後の形態を組織学的に調べた。【結果】移植後に二次卵胞は胞状卵胞へと発達し、その平均直径は移植6週間後に約540 μ m、8週間後には約880 μ mに達した。卵胞回収2日前にマウスにPMSGを投与したところ、卵胞の発達はさらに促進された。移植前54 μ mであった卵母細胞の平均直径は、移植6週間後に107 \pm 11 μ m、8週間後に113 \pm 12 μ mに達した。回収した75個の卵母細胞を成熟培養後に体外受精したところ、2個は8細胞期まで発生した。二次卵胞をガラス化保存したところ、融解後の形態はガラス化前と同様であった。これらの二次卵胞をSCIDマウスへ移植したところ、一部の卵胞は8週間後に胞状卵胞へと発達した。

VI30-14 ヘルニア法によるバイオプシー凍結胚の融解後の生存率と胚移植成績

○菅 和寛¹・齋藤 朗子²・青柳 和重¹・齋藤 真希¹・小林 正人¹・新関 博夫¹

¹山形農研セ・²置賜総合支庁

kanka@pref.yamagata.jp

【目的】ウシ胚のバイオプシーは、栄養膜細胞の一部を刃で切断する手法が一般的である。本発表では、従来法に比べダメージが少ないと考えられる、ヘルニア法を用いたバイオプシー凍結胚の融解後の生存率と胚移植成績について報告する。【方法】ウシ体外受精胚を用い、媒精後6~7日目の桑実胚~胚盤胞の透明帯にスリットを入れた。その後1~3日培養し、スリット外側に形成されたヘルニア部分を切断した。内部細胞塊を含む胚側は、約24時間培養しダイレクト法で凍結した。融解後、胞胚腔を形成した胚を生存胚とした。胚移植には生体胚を用い、回収した桑実胚~胚盤胞を上記の方法でバイオプシーし、凍結した。性判別はLamp法で行った。凍結胚は融解して生存を確認後に、または農家の庭先で融解し、ホルスタイン種牛に移植した。生存率、胚移植成績は、従来法でバイオプシーしたダイレクト凍結胚と比較した。【結果】従来法及びヘルニア法の凍結融解後の生存率は、それぞれ培養24時間では94.4%及び85.3%、48時間では61.1%及び79.4%であった。胚移植成績は、それぞれ33.3% (1/3) 及び57.1% (4/7) の受胎率であった。なお、ヘルニア法で受胎した4頭のうち、2頭は正常に出産され、1頭は流産、1頭は死産であった。

VI30-16 水溶性プルランフィルムを用いたマウス2細胞期胚のガラス化保存

○清水 真由美・坂本 昌博・帆刈 優・木村 正紀・高木 優二

信州大農

a03a307@agrfs1.shinshu-u.ac.jp

【目的】我々は天然多糖類であるプルランをフィルム状に加工した水溶性プルランフィルム上で、マウス桑実胚をガラス化できることを報告した。本研究では、2細胞期胚を用いてプルランフィルム上でのガラス化条件について検討した。【方法】ガラス化液は、20%FCS含有D-PBS液に20%EG + 20%DMSO + 0.6M Sucroseを添加したEDS液を使用した。マウス2細胞期胚を、幅1mm、長さ5mm、厚さ20 μ mのプルランフィルム(林原商事)上にEDS液とともに載せ、液体窒素に浸漬した。融解は、D-PBS液 + 20%FCS + 0.3M Sucroseに直接フィルムを浸漬することにより行い、胚盤胞期胚への発生率および細胞数を計測した。実験1ではクライオルーブ法と比較した。実験2では、EDS液中のDMSOとEGの濃度について、実験3ではEDS液への浸漬時間(20秒、40秒、2分)について検討した。【結果】実験1において、融解後の発生率は、非ガラス化対照区、クライオルーブ区、プルランフィルム区間で差は無かった。実験2において、DMSOとEGの濃度がともに10%の場合に発生率が最も高かった。実験3において、EDS液への浸漬時間は短いほど発生率が高く、細胞数も多かった。以上、プルランフィルム上でのガラス化保存には、10%DMSO、10%EGを添加したEDS液で20秒間平衡した方法が最も適していることが明らかとなった。



VI31-17 PCRチューブを用いたブタ卵子の体外成熟・体外受精について

○日高 知保¹・吉田 光敏²

¹家畜改良セ宮崎牧場(現所属)・²鹿大農
c0hidaka@nlbc.go.jp

【目的】卵子の体外培養や体外受精には、シャーレを利用したマイクロドロップ法が広く用いられている。しかし、同法での培養はインキュベータの開閉による温度・気相等の影響が大きく、また、体外培養中の移動や回転培養も困難であり、培養容器の改善が望まれる。また、遺伝子改変胚や体細胞クローン胚作成など多量の卵子を培養する際、ランニングコストの削減も今後の課題となる。本研究ではシャーレに代わる体外培養容器として、シャーレよりも安価なPCRチューブを用いたブタ卵子の体外成熟・体外受精について検討した。【方法】食肉センター由来ブタ卵巣より卵丘細胞・卵子複合体を採取し、40~42時間培養後、体外受精に供した。体外受精にはミニブタ射出精子を用いた。実験区における体外成熟および体外受精の培養容器には200 μ l容量のPCRチューブを用いた。体外成熟では卵子50個を一群として培養を行い、体外受精では卵子100個を一群として媒精(2~5万匹/ml)した。そして、卵子の成熟、受精および発生状況を対照区(シャーレ培養)と比較した。【結果】体外成熟にPCRチューブを用いても、対照区と比べて卵子成熟率に差はなかった。同様に体外受精に用いても、対照区と比べて正常受精率や胚盤胞形成率に差はなかった。以上の結果から、PCRチューブを用いたブタ卵子の体外成熟・体外受精の有用性が示された。

VI31-19 ミニブタ精子の卵子活性化因子抽出に関する検討

○松浦 大創・寺田 隆登

広島大学大学院生物園科学
daizou@hiroshima-u.ac.jp

【目的】精子の卵子活性化因子(SF)を抽出し、卵子の活性化に利用すると、卵子をより正常に活性化できる可能性がある。そこで、ミニブタ精子のSF抽出を目的に、SFの卵子活性化有効量、その因子を抽出する際に必要とされる温度条件におけるSF活性の変化について調べた。【方法】ミニブタ精液をTL-Hepes Mediumで洗浄し、精子濃度 1×10^9 Sperm/mlに調製した。精子は、冷却しながら35分間ホモジネートし、得られた精子粗抽出物中のタンパク質濃度を測定した。種々のタンパク質濃度に調製した精子粗抽出液(0.03, 0.3, 0.8, 4.0mg/ml以上)を、48時間成熟培養したブタ卵身にピエゾ圧電素子を用い、内径4~6 μ mのピペットで5 μ l注入し、10%FCS添加TCM199で48時間発生培養し、前核形成率を調べた。【結果】タンパク質濃度0.3mg/ml精子粗抽出液(SE)の注入区では、他のSE濃度区に比べ有意に高い前核形成率が認められた。60 $^{\circ}$ C、30分間加熱すると卵子活性化能は失われた。30 $^{\circ}$ C、2時間、あるいは4 $^{\circ}$ C、48時間保存したSFの卵子活性化能には有意な変化は認められなかった。以上のことから、ミニブタ精子のSFは高温では速やかに失活するが、低温で保存すれば卵子活性化能はかなり長時間維持できることが明らかにされた。

VI31-18 PEP-PCRを利用したウシ体外受精由来胚の性別判定及び赤血球膜蛋白異常症の診断

○富永 敬一郎・岩木 史之・柴谷 増博

兵庫農総セ
tomi@nike.eonet.ne.jp

【目的】遺伝性疾患の診断には性別判定より多くの不純物の少ないDNAを必要とする。そこで、性と疾患の2種類の診断と実用的な利用のために、ウシ体外受精7日目胚盤胞を切断後、サンプルにprimer extension preamplification(PEP)-PCR法を応用した(繁殖生物学会, 2003)。【方法】赤血球膜蛋白異常症(Band3)をヘテロで保因する雄牛の精液と卵巣由来卵子(フリー)とを体外受精し、高品質の7日目胚盤胞を試験に供した。切断刃で胚の1/4~1/3切断しサンプルを洗浄後、10 μ l水に入れたサンプルを95 $^{\circ}$ C5分間熱処理してDNAを抽出し、15merランダムプライマー(OPERON)を用いたPEP-PCR法によりDNAを増幅し、SUPRECTM-PCRキット(TaKaRa)でPCR産物を精製後、性をXYセクター(伊藤ハム)で判定し、並行して、遺伝子型検査法(Inaba et al. 1996)でBand3保因の有無を調べた。さらに、受胎能と判定の正確さをみるために、サンプリング後GL-Tipガラス化保存法(Tominaga and Hamada, 2001)を用いて18日間超低温保存した1個のOPU由来胚を受胎牛に移植した。【結果】2種類の遺伝子判定が94.8%(73/77)の胚で可能であり、Band3保因:フリーは36:37とほぼ1:1であるが、♂:♀は46:27と雄が多くなる傾向があった(P=0.08)。♂でBand3フリーと判定した胚の移植により、判定どおりの子牛が誕生した。

VI31-20 cAMPによりブタ精子で誘起されるTyrP32の増加および先体崩壊におけるカルシウムの役割

○原山 洋¹・佐々木 清美²・三宅 正史¹

¹神戸大院自然・²神戸大農
harayama@ans.kobe-u.ac.jp

【目的】演者らは第96回繁殖生物学会において、ブタ精子チロシンリン酸化タンパク質TyrP32のcAMP依存的増加が新規の機序により制御されることを示唆し、またこの増加は先体の崩壊を伴うことを明らかにした。本研究では、この機序の詳細を究明する目的で、TyrP32の増加および先体崩壊に及ぼすカルシウムの影響について検討した。【方法】ブタ精子をcAMPアナログ(cBiMPS)添加mKRH-PVAに再浮遊させ、38.5 $^{\circ}$ Cで180分間インキュベートした。インキュベーションの前と後に試料の一部を回収してSDS-PAGE・ウエスタンブロッティングに供し、TyrP32を検出した。残りの試料をギムザ染色標本として先体の形態を観察した。【結果】cBiMPS存在下でインキュベートされた試料ではTyrP32のcAMP依存的な増加がみられ、同時に約半数の精子で先体の崩壊が観察された。しかし、培養液から塩化カルシウムを除去、または精子をBAPTA-AMで前処理して細胞内カルシウムをキレートした場合にはTyrP32の増加および先体の崩壊はともに抑制された。以上の結果から、cAMPにより誘起されるTyrP32の増加および先体崩壊にカルシウムが機能すると考えられる。

2-C-6

癌細胞を標的とした in vivo RNA 干渉による遺伝子発現抑制

○高橋有己¹,西川元也¹,宮岸真²,多比良和誠²,高倉喜信¹

(1 京都大学 大学院 薬学研究科 病態情報薬学分野,

2 東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻)

RNA 干渉(RNAi)は、配列特異的に特定の遺伝子発現を抑制可能であり、発癌遺伝子や癌の進行・増殖に関与する遺伝子を標的とすることで癌治療への応用が可能と考えられる。しかしながら、その実現には RNAi を起こす siRNA を標的細胞にデリバリーすることが必須である。そこで本研究では、siRNA および siRNA 発現プラスミド DNA(pDNA)をデリバリーすることによる、癌細胞を標的とした in vivo RNAi について検討した。2 種の luciferase を恒常的に発現するマウスメラノーマ B16-BL6 細胞を作製し、siRNA および siRNA 発現 pDNA 導入の効果について検討したところ、配列特異的な mRNA および luciferase 活性の減少が認められた。luciferase 発現癌細胞のマウス皮下あるいは門脈内投与により作製した癌組織での遺伝子発現は、標的部位への効率的なデリバリー技術を用いることにより有意に抑制可能であった。

2-C-7

超高压技術を用いた水素結合性高分子-薬物集合体の開発

○木村剛¹,古菌勉¹,宮崎幸造¹,奥野暁²,大矢裕一²,大内辰郎²,
六雄伸吾³,北村吉朗³,吉澤秀和³

(1 国立循環器病センター研究所 生体工学部, 2 関西大学 工学部 応用化学科, 3 岡山大学 環境理工学部 環境物質工学科)

我々は高压下で水素結合が強調されることに注目し、圧力印加による水素結合性ポリマーの分子集合体形成について検討してきた。水酸基を有するポリビニルアルコール(PVA)は、10000 気圧の超高压印加によりゲルおよび微粒子と様々なサイズの集合体を形成し、さらに、天然の水素結合性高分子である DNA と PVA-DNA 複合体を形成した。本研究では、PVA 微粒子および PVA-DNA 複合体の培養細胞への導入について検討した。PVA 水溶液あるいは PVA と赤色蛍光ラベル化プラスミド DNA の混合液を 10000 気圧の超高压で印加し、PVA 集合体および PVA-DNA 複合体を調整した。走査型電子顕微鏡観察では、約 200nm~1000nm の粒子状の集合体および PVA-DNA 複合体が確認できた。PVA-DNA 複合体を種々の細胞(RAW264、L929、COS7)に添加し、蛍光顕微鏡にて観察した結果、細胞内で赤色蛍光が認められ、DDS 担体としての有用性が示された。

¹国立循環器病センター研究所, ²国立循環器病センター研究所, ³物質・材料研究機構,
⁴東京医科歯科大学

古菌 勉¹, 岡田正弘¹, 安田昌司², 田中順三³, 岸田晶夫⁴

【はじめに】

現在、腹膜透析や人工呼吸器の経皮デバイスとして柔軟なシリコーンゴムなどが使われているが、生体と材料の界面での接着が悪いために細菌感染とそれに伴う病態悪化が大きな問題となっている。そのような中で我々は、ナノサイズの無機粒子を固定化した新規な高分子材料を創出することで柔軟でかつ皮膚組織と密着する経皮デバイスの開発に取り組んでいる。本演題では、シルク表面にハイドロキシアパタイト (HAp) を固定化させた複合材料の作製を試みた。さらにそれを用いてボタン型の経皮デバイスを試作し、その有用性について検討を行った。

【方法、結果および考察】

我々が独自に開発したマイクロエマルジョン法で調製したナノスケールのHAp単結晶をpoly(γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane)でグラフト化したシルク繊維表面に共有結合にて結合させた。本材料表面へ繊維芽細胞を播種し培養したところ、未処理繊維に比較して著しく細胞接着性が向上することが明らかとなった。次に実際に、ボタン型のシリコーン表面に作製した複合材料を接着させることで経皮デバイスを試作した。この経皮デバイスは元のシリコーンと同等の柔軟さを保っていた。作製した経皮デバイスの生体内への埋植試験を行ったところ、未処理シルクに比べて生体との密着性が向上した。以上のような新規経皮デバイスの特徴はその基材の表面においてのみHApの特徴を発現した結果であると考えられる。

【おわりに】

今回新規に開発した経皮デバイスは、補助人工心臓、腹膜透析、栄養療法など長期に渡って経皮的にカテーテルやチューブを使用している多くの患者のQOLを格段に向上させ、在宅治療の推進と医療費の削減に大きな効果が期待できる

界面複合化を目指したリン酸カルシウム微粒子の形態制御

○岡田正弘¹, 安田昌司¹, 田中順三², 岸田晶夫^{1,*}, 古菌 勉¹¹国立循環器病センター研究所, ²物質・材料研究機構

【はじめに】

これまで我々は、リン酸カルシウム (CaP) 焼結体微粒子を医用高分子材料表面に化学結合させた新規な無機/有機複合材料を開発し、軟組織適合材料としての有用性を評価してきた。ここで、CaP粒子を高分子基材表面へ強固に結合させるためには、媒体中に分散させた粒子の基材表面への吸着性および粒子/基材間の接着面積の制御が重要である。本報告では、以上の背景のもとに我々が独自に開発したCaP粒子の粒径および形態制御法についての報告を行う。

【実験方法】

球状およびロッド状ハイドロキシアパタイト (HAp) 粒子: ノニオン性界面活性剤としてpentaethyleneglycol dodecyl etherを溶解したdodecane中に、Ca(OH)₂水懸濁液およびKH₂PO₄水溶液を順に添加し、所定の温度にて24時間反応させた (エマルション法)。得られた粒子を洗浄後、乾燥させ、800°Cにて1時間仮焼を行った。また、反応系にHAp粒子間に融着防止剤として炭酸カルシウム等の塩を添加することにより、高分散性HAp微粒子を調製した。

板状CaP粒子: CaCO₃、Ca(H₂PO₄)₂、およびCa₄(PO₄)₂O (TCPM) を粉碎・混合した後、反応促進剤であるNaH₂PO₄水溶液を添加した。上記混合物からの水蒸発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。得られた板状構造体を800°Cにて所定の時間焼結した。

【結果および考察】

球状およびロッド状HAp粒子: エマルション法を反応温度25°Cにおいて行った場合、球状もしくは不定形の単結晶体 (粒径: ~50 nm) が得られ、反応温度の上昇に従って粒子はc軸方向に延伸し、95°Cにおいてロッド状の単結晶体 (粒径: ~300 nm) が得られた。これは、用いたノニオン性界面活性剤が反応温度の上昇によって疎水化したために、dodecane中の逆ミセルの構造が不安定化し、HApが本来有するc軸方向への成長が発現した結果と考えられる。また、仮焼時においてHAp粒子間に炭酸カルシウムを存在させた場合、熱処理による粒子間の融着を阻害した状態で結晶性を高めることができ、大部分の粒子が一次粒子の状態媒体中に分散可能なHAp仮焼体粒子の作製に成功した。

板状CaP粒子: 作製したCaP粒子は孔を有する板状形態を示した。孔の存在は、焼結過程において結晶化が進行し、体積減少が生じたことによると推察される。また、このCaPはHApとβリン酸三カルシウム (β-TCP) から構成されており、β-TCP含有率は焼結時間に伴って増加することが認められた。これは、反応仕込比がCa/P=1.5であることに起因すると推察される。

*現所属: 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所

医療用材料の動向と新技術

東医歯大生材研 ○岸田晶夫

1. はじめに

医療用材料を素材別に分けると、高分子材料とそれ以外の無機材料（金属・セラミクス）に分類できる。無機材料は主として、整形外科および歯科用インプラント材料として広く用いられている一方、循環器病治療の範疇で、動脈瘤塞栓用コイルやステントとしても用いられている。医療用材料表面と生体との関連について整理すると、大きく2種類に分類できる。一つは血液接触面であり、もう一つは血液非接触面である。医用材料研究が開始されて以来、血液との相互作用の制御については未だに研究途上である。ここでは、医療用材料開発のこれまでの流れと、これからを切り開く新技術について概観したい。

2. 血液接触材料（血液適合性）

血液接触型人工臓器に関しては、1980年代に精力的に研究が展開され、いくつかの高分子材料が開発され臨床応用に至った。人工心臓用セグメント化ポリウレタン、人工肺用多孔質中空糸、人工腎臓用ポリスルホン膜などである。しかしながら1990年前後頃から新規高分子の開発はスピードダウンし、研究のベクトルはより基礎的もしくは他分野への応用へと転換していった。これはいくつかの材料が臨床応用に至ったことによって研究が成熟したためとも考えられるが、筆者が考える要因はa) 主目的であった抗血栓性材料の開発の困難さ、b) 汎用工業製品の流用あるいは応用によって開発された材料の限界、c) 医用高分子に対する needs と seeds の不一致などがあげられる。

例えば、血液適合性の一つである抗血栓性の獲得については、当時提案された血液適合性材料開発の指針に基づいて、種々のポリマーが合成された。これらの中には短期の抗血栓性の獲得に成功したものもあったが、多くは臨床応用に結びつくほどの成果をあげられなかった。現在においても抗血栓性獲得のための努力は続けられており、後に紹介するように優れた成果をあげているものもある。しかし、抗血栓性獲得の困難さから研究のベクトルはいくつかに分散した。一つは理想的な高い抗血栓性を実現しようとするもの、また一つは減ヘパリンを実現できる程度の抗血栓性を実現するもの、そして抗血栓性に多少目をつぶり他の機能を格段に高めることを目的としたものである。短期の使用であれば3番目の考え方で十分であるし、中期の使用を目的とするならば2番目の減ヘパリンが有効である。言うまでもなく、最終的な目標はすべての血液接触ポリマーが高い抗血栓性を実現すべきであるが、臨床現場からの要請に少しでも答えようとする材料開発側の積極的対応の現れである。永久的な抗血栓性や生体適合性の獲得のために現時点で提案されているのは、生体血管の再構築を行うハイブリッドタイプのものである。小口径の人工血管などについて精力的な研究が続けられているが、人工心臓への適用の困難さや緊急の場合など課題も多い。

3. 血液非接触材料

人工臓器のうち血液非接触部分に要求される機能としては、組織接着性、あるいは生体不活性、また血液を凝固させることによる早期の組織修復実現などがあげられる。組織接着性が必要な例として

An Overview of Medical Polymers and New Technologies of Biomaterials., Akio Kishida, (Tokyo Med Dent Univ, Inst Biomat Bioeng, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, TEL:03-5280-8028, FAX:03-5280-8005, email:Kishida.fm@tmd.ac.jp

は、人工骨、人工歯根などの硬組織系インプラント材料の他に、人工腱および経皮デバイスなどがあげられる。生体不活性としては、癒着防止膜、創傷被覆材、眼内レンズなどがあげられる。また組織修復材料としては、ステント類、動脈瘤塞栓コイル、生体接着剤などがあげられる。これらのうち、無機材料とのハイブリッド材料は最近注目を集めている。

4. 新技術について

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調製の可能性について検討を行ってきた。この技術によるDNA-Polymer複合体の形成とその医用材料としての応用の可能性を検討したところ、良好な細胞内送達が可能であった(図1)。超高压状態では、常圧と異なり、水の水素結合が切断され、分子同士の結合の可能性が生じる。また、タンパク質や脂質膜などでは内部空間が圧縮されることにより構造変化が

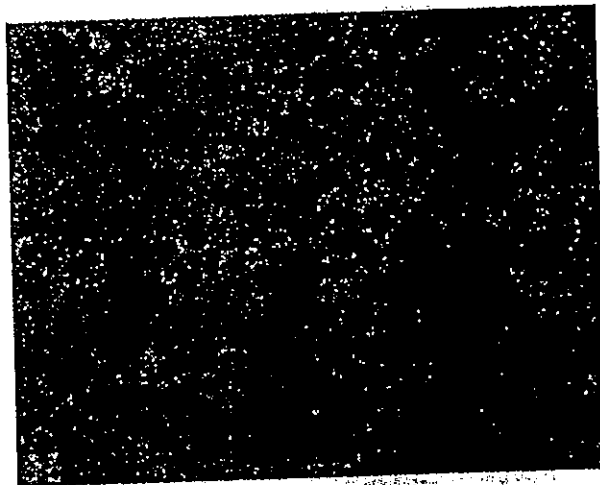


Figure 1. Uptake of PVA/rhodamine labeled plasmid DNA Composites by RAW cells.(After 24hr incubation)

誘起され、常圧でも安定な分子構造体が得られる。また、異種動物(ミニブタ)の組織を超高压処理することによって、組織内の細胞を効率よく除去し、新しい医療用素材としての応用を検討している。この技術は従来の人工物による人工臓器開発から、合目的的に素材を探求した結果に到達したもので、生体と人工物との比較、という観点からも興味深い。

5. おわりに

我が国で行われている医療材料研究は、新規分子開発に根ざしたオリジナリティの高いものがほとんどである。欧米においても医用材料研究は行われており、多くの成果が報告されている。ただし新しい治療法やシステム開発においては米国が先行している場合が多い。これは、新規材料が認可されるまでの行程があまりにも長く、投資から回収のサイクルの早い米国経済にフィットしないため、展開の早い既存の材料をもとに新しいシステムを組み上げて、医療現場に供給してゆくというシステムであることが一因となっている。このような考え方では、機能的に十分なものが開発する余裕がなく、新しい技術が芽生える基盤も脆弱となる。一方、我が国は化学産業のすそ野が広く多種多様な製品を作り出す能力に長けているが、しばしば指摘されるようにNEEDSを把握し、新しい医療システムを作り出す点で欧米に後れをとる場合が多い。また米国では数年前からバイオを産業振興の基盤と位置付けて政策展開をしており、多くの大学にBiomedical Engineeringを謳う学部・学科が設置されている。このような環境の相違を乗り越え普遍的な高機能医用材料の開発を目指すために、我が国の医用材料研究者はどうしても新規な材料開発にける必要が生じる。ここにあげた材料・技術は世界の最先端に位置する材料であり、臨床への応用を可能にするシステム作りを含めて、精力的に研究が進められている。10年前と比較し、医療用材料研究の出口は、人工臓器だけでなく、再生医療、診断機器、DDSなど大きく広がり、かつ多様化してきている。これらに応えるべく、新しい技術開発を絶えず続けることが重要である。

基板上でのナノアパタイト単結晶体を用いた 界面複合化法の精密制御

○岡田正弘^{1,2}, 芹澤武³, 安田昌司¹, 田中順三^{2,4}, 岸田晶夫^{1,2}, 古菌勉^{1,2}
(¹国立循環器病センター研究所 生体工学部; ²CREST, JST; ³東京大学 先端科学技術研究センター; ⁴独立行政法人物質・材料研究機構 生体材料研究センター)

1. 緒言 腹膜透析や栄養療法など長期に渡って経皮的にカテーテルを人体に挿入した状態が続く場合、細菌感染に伴う病態悪化が大きな問題点となっている。当研究室では、ロッド状に形態の制御されたハイドロキシアパタイト(HAp)ナノ結晶粒子を柔軟な高分子基板表面上に固定化させた新規な複合材料が経皮デバイスとして非常に有用であることを報告してきた。

本研究では、複合材料表面のHAp粒子による被覆率の制御を目的とし、粒子を吸着・結合させる際の媒体の種類が表面被覆率に及ぼす影響について検討を行った。

2. 実験 当研究室で開発したエマルジョン法にてHApナノ粒子を作製した。アルコキシシリル基を持つ高分子をシルク表面にグラフト化させた。HAp粒子を各種媒体に分散させた後、グラフト化シルクを分散媒に1時間浸漬することでシルク表面に粒子を吸着させ、減圧下、120°Cで反応させることで化学結合を介して粒子をシルク表面に固定化させた。

3. 結果と考察 Fig. 1には各種アルコールをHAp粒子の分散媒体として用いてシルク表面上に粒子を吸着・結合させた後のHAp/シルク複合体表面の走査型電子顕微鏡写真を示した。メタノールまたはエタノールを分散媒体とした場合、HAp粒子が高密度に被覆した複合体が得られた。また、プロパノール、ブタノールを用いた場合には粒子間距離が比較的広がった状態で被覆した。以上の結果より、HAp粒子の分散媒体によってHAp/シルク複合体の表面被覆率を制御できることが明らかとなった。

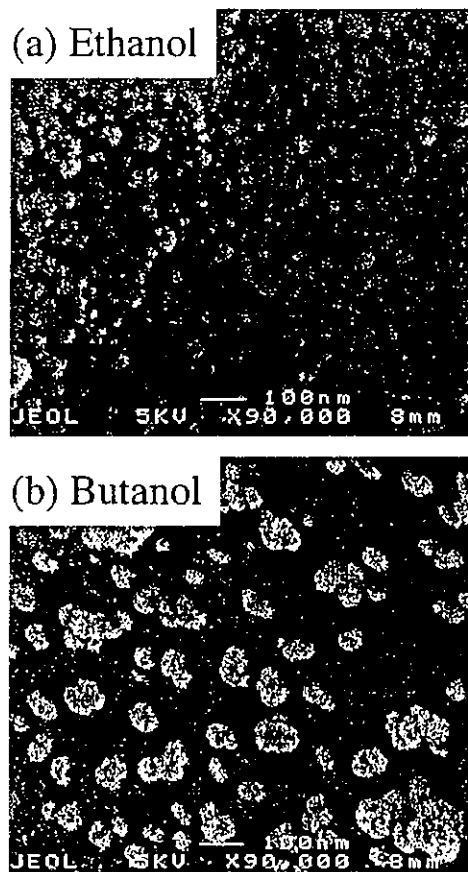


Fig. 1 SEM photographs of the surfaces of hydroxyapatite (HAp)/silk fibroin (SF) composites. The HAp particles were adsorbed onto SF fibers in (a) ethanol, (b) butanol.

Control of packing of hydroxyapatite nanocrystals on polymer substrates for development of percutaneous devices

Masahiro OKADA^{1,2}, Takeshi SERIZAWA³, Shoji YASUDA¹, Junzo TANAKA^{2,4}, Akio KISHIDA^{1,2}, Tsutomu FURUZONO^{1,2} (¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka 565-8565, Japan; ²CREST, JST; ³Department of Life Science, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo 153-8904 Japan; ⁴Biocomaterials Center, Independent Administrative Institution, National Institute for Materials Science, Ibaraki 305-0044, Japan)

Tel: +81-6-6833-5004 (ext. 2438), Fax: +81-6-6872-8090, E-mail: okada04@ri.ncvc.go.jp

Vascular Wall Cell Injection and Endothelial Cell Seeding To Tissue Scaffold Acellularized By Cold Isostatic Pressing

Fujisato, T¹, Funamoto, S², Nishioka, H³, Kamata, W⁴, Yamahigashi, N⁴, Yoshida, K⁴, Niwaya, K¹, Kishida, A¹, Nakatani, T¹, Kitamura, S¹

¹ National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

² Shinshu University, Matsumoto, Nagano, Japan

³ Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Hyogo, Japan

⁴ Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Mie, Japan

Acellularized 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 acellularization and in vitro 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 using a cell injector and a roller culture bioreactor of a vascular tissue scaffold acellularized by the cold isostatic pressing was reported.

Porcine hearts were isolated under clean condition and stored at 4 °C. Warm ischemia time of the isolation process was less than 20 min. The aortic and pulmonary valves with surrounding tissues were excised and freed from adherent fat. 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 acellularization 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 acellularized 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 (Fig. 1). 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 acellularized biological scaffold. From the in vitro incubation test, the tissue was disinfected when the pressing was applied to the tissue contaminated by normal bacteria floras. It has been reported that viruses in the tissues treated by the pressing of more than 6000 atm are mostly inactivated. The autologous vascular wall cells and endothelial cells were well incorporated to the acellularized tissue by the cell injector and roller culture bioreactor (Fig. 2). However, the cells were still remaining inside an area of more than 1 mm depth in the aortic 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 vascular tissues acellularized 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.

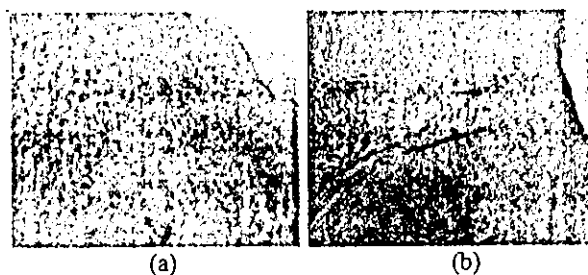


Figure 1. (a) Leaflet and (b) its base tissue of the porcine aortic valve treated by the cold isostatic pressing of 10,000 atm for 10 min.

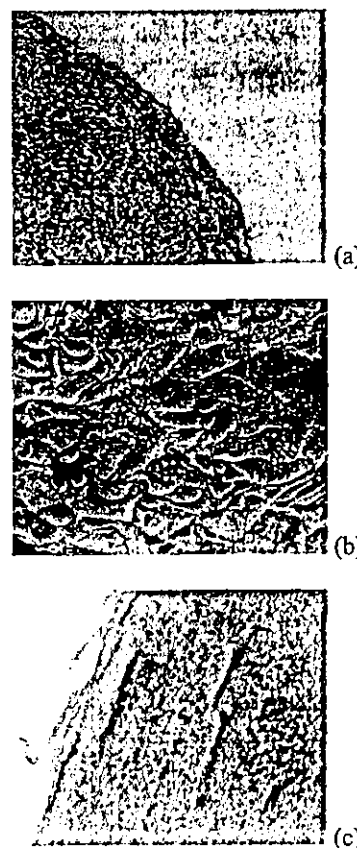


Figure 2. (a,b) Endothelial cells seeded onto the surface of the acellularized scaffold by roller culture bioreactor and (c) vascular wall cells into the scaffold by cell injector.

生体組織の脱細胞化処理による再生型移植組織の開発

国立循環器病センター¹、同再生医療部²、同臓器移植部³、同心臓血管外科⁴

ヒューマンサイエンス振興財団⁵

先端医療振興財団⁶

藤里俊哉²、西岡 宏⁵、吉田謙一⁶、湊屋謙司⁴、庭屋和夫⁴、菅 理晴²、中谷武嗣³

北村惣一郎¹

【目的】我々は、同種あるいは異種組織からドナー由来の細胞成分や抗原性部位を除去し、構造マトリックスのみを用いた再生型移植組織の開発を行っている。脱細胞化により抗原性が減弱されるとともに、固定化等の化学処理を行っていないため、移植後に自己組織化され、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると考えられる。本報では、ミニブタを用いた同種移植実験によって、その有効性を検討した。

【方法】クラウン系ミニブタ((株)ジャパンファーム)の大動脈、心臓弁及び気管を摘出し、4口にて10,000気圧の超高压印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を除去した。レシピエントとなるミニブタの下行大動脈を、脱細胞化処理した大動脈組織と置換移植した。所定期間経過後、移植組織を摘出して組織学的に検討した。

【結果と考察】超高压印加処理による脱細胞化処理においては、気管軟骨組織内を含めて組織深部まで完全に細胞を除去することができ、力学特性の変化も見られなかった。また、ブタ内在性レトロウイルスの残存をPCR法にて検査したが、まったく検出されなかった。超高压処理によっては組織内の細菌やウイルスも不活化されることが報告されており、極めて高い安全性が確保できると考えられる。この脱細胞化大動脈を3ヶ月同種移植したところ、移植組織の破断等も見られず、内腔面は内皮細胞で完全に覆われており、組織内部への自己細胞の浸潤も確認された。

【結論】超高压印加にて脱細胞化処理することで、力学特性を有効に維持した安全な再生型移植組織が作成できた。ミニブタに移植したところ、レシピエント細胞の浸潤によって自己組織化されることが確認された。

【謝辞】本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

3J05 生体組織の脱細胞化による安全な生物由来繊維素材の開発

(国立循環器病センター) ○藤里俊哉、湊谷謙司、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎
(先端医療振興財団) 吉田謙一
(ヒューマンサイエンス振興財団) 西岡 宏

1. 緒言

欠損した組織の再生医療には足場基材となる素材が欠かせない。ポリ乳酸等の生体内分解吸収性人工素材を用いたアプローチが主流となっているが、多くの素材は生体組織よりも硬く、複雑な形状に成形加工することも容易でない。また、大動脈等の左心系組織では高圧に耐える必要があり、破断等の致命的障害を避けるための分解速度の制御も容易でない。そこで我々は、生体組織から細胞成分や抗原性部位を除去し、残存したコラーゲン繊維やエラスチン繊維等の構造マトリックスを足場基材として利用するアプローチを採用している。脱細胞化により抗原性が減弱されるとともに、固定化等の化学処理を行っていないため、移植後に自己組織化され、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると考えられる。本報では、ミニブタを用いた同種移植実験によって、その有効性を検討した。

2. 方法

クラウン系ミニブタ（株）ジャパンファーム）の大動脈、心臓弁、及び気管を清潔麻酔下にて採取し、4℃にて10,000気圧の超高静水圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を除去した。光学顕微鏡並びに電子顕微鏡を用いた組織学的観察によって、脱細胞化を評価した。また、処理組織からDNAを抽出し、ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のDNAを増幅後、PCR産物を電気泳動することで組織内のPERVを測定した。左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術により、同種ミニブタの下行大動脈を、脱細胞化処理した大動脈組織と置換移植した。所定期間経過後、移植組織を摘出して組織学的に観察した。

3. 結果と考察

脱細胞化の手法としては、界面活性剤や酵素による処理法が報告されているが、組織深部の細胞除去は容易でなかった。我々の開発した超高静水圧引加による脱細胞化処理法では、気管軟骨組織内を含めて組織深部まで細胞核は染色されなかった。また、電子顕微鏡観察から、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離し、組織内では平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失、核の変性が確認された。また、PERVもまったく検出されなかった。異種生体組織を移植素材として使用する場合は、PERVや未知の感染性物質を完全に除去することが必要である。超高静水圧引加によっては、組織内の細菌やウイルスの不活化されることが報告されており、本方法は極めて高い安全性が確保できると考えられる。コラーゲン繊維及びエラスチン繊維には若干の走行の乱れが認められたが、力学特性に大きな変化は見られなかった。各繊維は完全なネイティブ状態ではないと思われるが、移植後に自己組織と置換されるのであれば、力学的な強度や特性が十分であれば、大きな影響はないと考えている。左心系である下行大動脈置換術においても、破断等の異常所見は全く認められなかった。血管内腔面は、移植1ヶ月後においてほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後では完全に覆われていた。また、組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3ヶ月後では完全に消失していた。

4. 結論

超高静水圧引加による脱細胞化によって、安全な移植素材が得られた。より長期の同種及び異種動物実験によって成長性や耐久性を確認し、数年以内の臨床応用を目指している。

5. 謝辞

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

Development of Safe Fibrous Material by Acellularization of Living Tissue. Toshia FUJISATO, Ken'ichi YOSHIDA*, Hiroshi NISHIOKA**, Kenji MINATOYA, Akio KISHIDA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA. National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 Email: fujisato@ri.ncvc.go.jp, *Foundation for Biomedical Research and Innovation, **Japan Health Sciences Foundation