

図2. 脱細胞ミニブタ大動脈弁導管部 (左: 未処理、右: 脱細胞化処理後: 400倍)

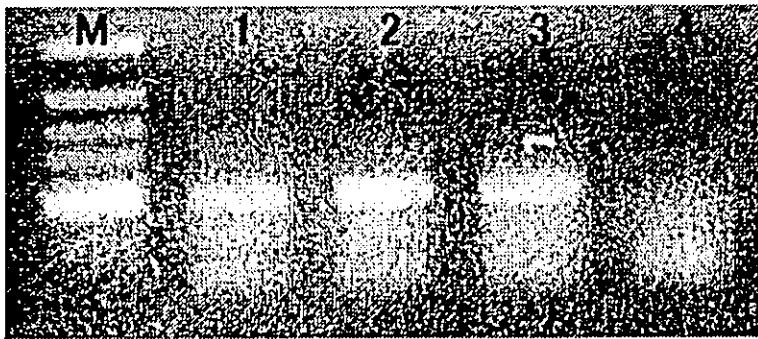


図3. ミニブタ血管組織内PERVのPCR産物 (M: マーカ、1: 未処理、2, 3: トリトン処理、4: パワーグラフト処理)

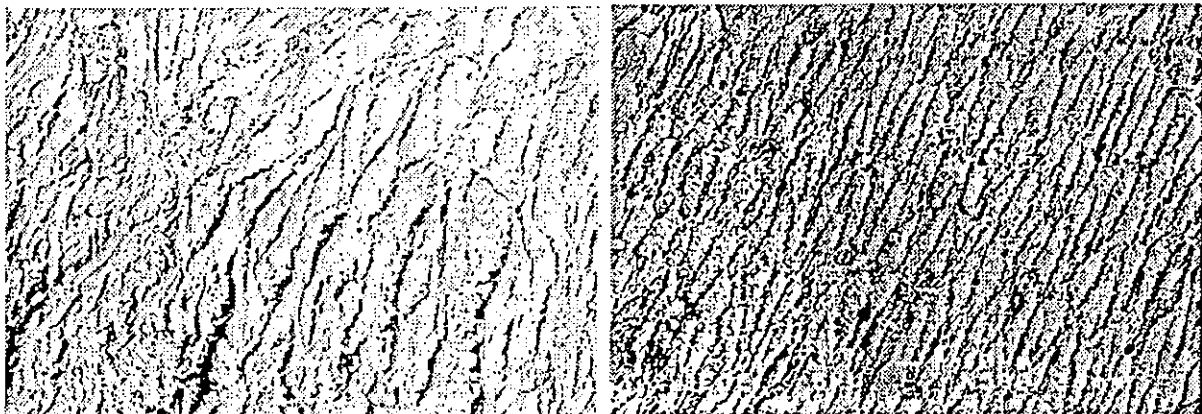


図4. 同種ミニブタへ移植後の脱細胞化大動脈内腔面 (左: 移植1ヶ月、右: 移植3ヶ月)

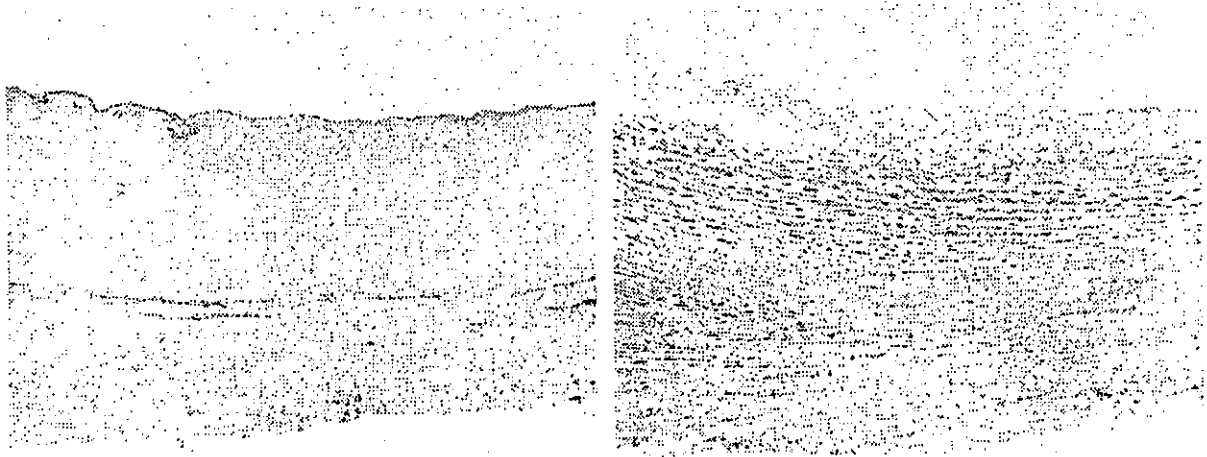


図5. 脱細胞化大動脈移植6ヶ月後のレシピエント細胞の浸潤(左:内皮細胞、右:平滑筋細胞)。

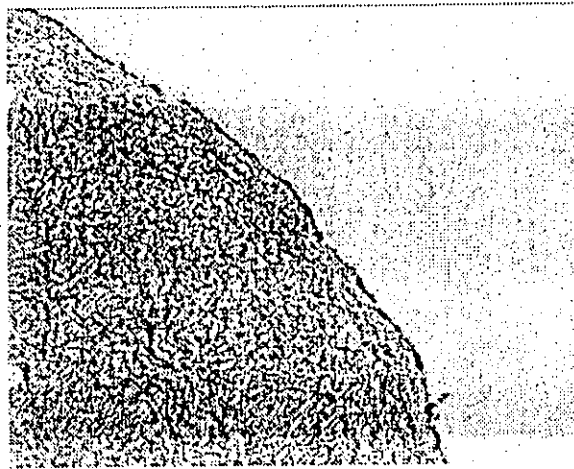


図6. 脱細胞化大動脈内腔面への血管内細胞の播種

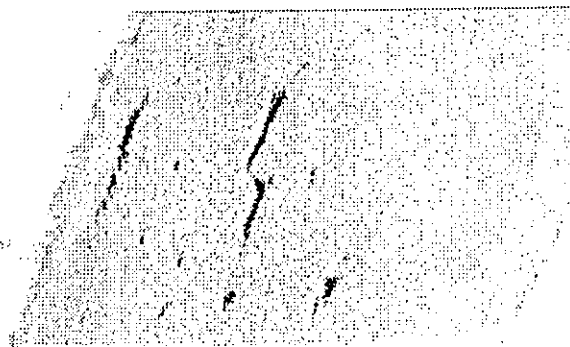


図7. 脱細胞化大動脈内への線維芽細胞の播種

220 脱細胞化生体スキャフォールドを用いた組織再生

Tissue Regeneration using Acellular Bioscaffold

- 正 藤里俊哉 (国循・再生医療) 吉田謙一 (先端医療財団)
西岡 宏 (ヒューマンサイエンス財団) 山崎祥子 (国循・心臓外科)
殷 猛 (国循・臓器移植) 湊谷謙司 (国循・心臓外科)
庭屋和夫 (国循・心臓外科) 正 岸田晶夫 (東医歯大・生体材料研)
中谷武嗣 (国循・臓器移植) 北村惣一郎 (国循・総長)

Toshia FUJISATO, Sachiko YAMAZAKI, YIN Meng, Kenji MINATOYA, Kazuo NIWAYA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA
National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka
Kenichi YOSHIDA, The Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe
Hiroshi NISHIOKA, Japan Health Sciences Foundation, Tokyo
Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University

【緒言】

我が国では年間約2万件、米国では約50万件の冠動脈バイパス術が施行されている。また、閉塞性血栓性血管炎や閉塞性動脈硬化症によって、我が国では年間約5千人、米国では約15万人が下肢切断を余儀なくされており、我が国では年間1万件弱、米国では年間8万件余りの末梢血管再建術が施行されている。このような不全あるいは傷害をうけた血管組織を置換するための第一選択肢は、患者の自己組織の使用である。しかしながら、糖尿病患者のように、しばしば自己組織の使用が不可能な場合があり、その場合は人工血管あるいは同種凍結保存血管の使用が次選択肢となる。小口径の場合では人工血管は閉塞の危険があり、同種組織が好ましい。また、中大口径の場合でも人工血管は感染に弱く、一旦生じた細菌病巣は抗生剤による治療もあまり有効でないため、感染部位では同種組織の使用が適当である。同様に、移植された人工血管が感染した場合も、同種組織による再建が第一選択肢となる。このように、同種組織移植の有用性は明らかで、米国では年間数千件の凍結保存同種組織が使用されている。しかしながら、我が国では年間数十件程度に留まっており、圧倒的に供給数が不足しているため、やむを得ず米国から個人輸入して使用する患者もいる状況にある。一方、先天性疾患を抱える小児患者の場合では、小児期に特徴的な早期の石灰化等に加え、成長に伴う移植組織の成長性欠如のため、人工血管に加え同種組織でさえも複数回の移植が避けられない。近年、これらの問題を解決するために、ポリ乳酸やポリグリコール酸等の生体内分解吸収性材料を用いた再生型人工血管移植が臨床応用され始めた¹⁾。しかし、左心系においては、分解に伴う強度低下が血圧に抗しきれず、動物実験では破断の報告もある。そこで我々は、血管等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組織から、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、現在では不可能である再生型の組織再生を目指している。

【方法】

脱細胞化処理: ドナーとなるクラウン系ミニブタ(㈱ジャパンファーム)から麻酔清潔下にて大動脈、心臓弁、及び気管を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置(㈱神戸製鋼所)を用いた超高压印加処理、続けて洗浄処理を行うことで細胞成分を除去した(パワーグラフト処理と命名)。処理後の組織を、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡で組織学的に観察するとともに、リン脂質やDNA量等の細胞成分の測定を行うことで脱細胞化を評価した。また、DNAを抽出後、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)のPCR産物を電気泳動することで、組織内PERVを測定した。

同種移植実験: クラウン系ミニブタを用い、左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術にて、脱細胞化同種大動脈弁導管による大動脈置換手術を行った。術後1、3及び6ヶ月において、移植組織を摘出し、HE染色、抗vWF(血管内皮細胞)、抗 α -SMA(平滑筋細胞)、抗ビメンチン(間質細胞)、抗CD3(T細胞)、及び抗CD68(マクロファージ)免疫染色、並びに走査型電子顕微鏡によって組織学的所見を検討した。脱細胞化していない凍結保存同種弁を対照とした。凍結保存は、採取した肺動脈弁を、プログラムフリーザー(フタバメディカル㈱)による1°C/minの徐冷凍結後、液体窒素中に保存した。1ヶ月後に解凍し、ハンクス液で洗浄後、動物実験に供した。なお、動物実験に対する動物愛護上の配慮は、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案など、規定に則り十分に払っており、文部科学省及び実験動物学会等の指針に沿って処理した。

【結果と考察】

パワーグラフト処理後の組織内では細胞核は全く染色されず、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離していた。透過電頭の所見からも、平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失が確認された。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、力学的な強度には問題なかった。組織内の β アクチン及びPERVは全く検出されなかった(図1)。しかし、リン脂質は処理後でも検出された。リン脂質は移植後の石灰化の要因となり得るため、洗浄処理の最適化を検討中である。

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。細胞を未播種の場合について免疫組織学的に検討したところ、血管内腔面は移植1ヶ月後においてはほぼ内皮細胞で覆われており、3, 6ヶ月後では完全に覆われていた(図2)。また、組織内には内腔及び外周部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, 6ヶ月後では完全に消失していた。移植後6ヶ月においては、内腔は血栓の付着もなく良好な開存性及び自己細胞浸潤を示していた(図3)が、若干の石灰化の所見が認められた。

欧米では、脱細胞化に薬液を用いた方法で、既に数グループによって臨床応用が実施されている。しかし、不十分な脱細胞化が原因と思われる移植後早期の不全例も報告されている²⁾。超高压印加によって、細菌やウイルスの不活化されることが既に報告されているため³⁾、異種組織を使用した場合でも、パワーグラフト処理は極めて高い安全性が確保できると考えている。動物移植実験の結果を基に脱細胞条件の至適化を図り、さらにより長期の同種移植実験並びに異種動物実験によって成長性や耐久性を検討し、数年以内の臨床応用を目指している。

【謝辞】

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、文部科学研究費、及び科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

【文献】

- 1) Shinoka T, et al. Clinical practice of transplantation of regenerated blood vessels using bone marrow cells. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2003; 92(9): 1776-80.
- 2) Simon P, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFTTM in pediatric patients. *Euro J Cardiothorac Surg* 2003; 23: 1002-6.
- 3) 鈴木敦士, 林 力丸編. 高压生物学と高压技術. 1997; さんえい出版 京都.

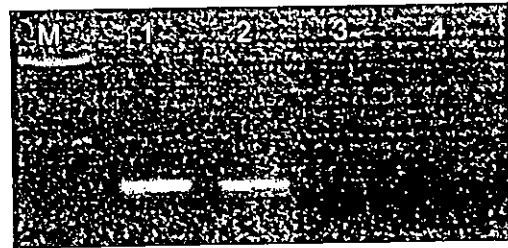


Figure 1. PERV assay in the decellularized porcine tracheae. (M: Marker, 1: Native, 2: 1% Triton® X-100 for 24 hrs, 3,4: PowerGraft of 980 MPa for 10 min)

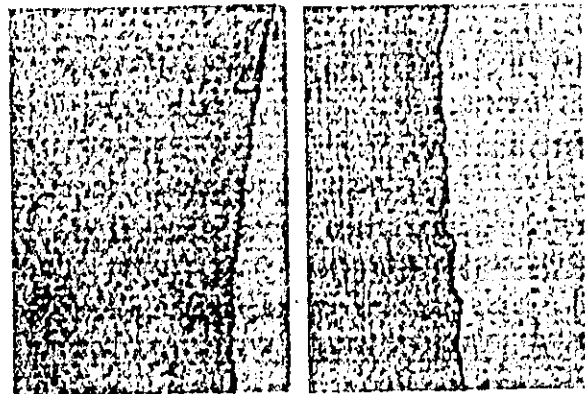


Figure 2. Endothelialization on acellular porcine aorta after congeneric transplantation. (L: 1M, R: 6M)

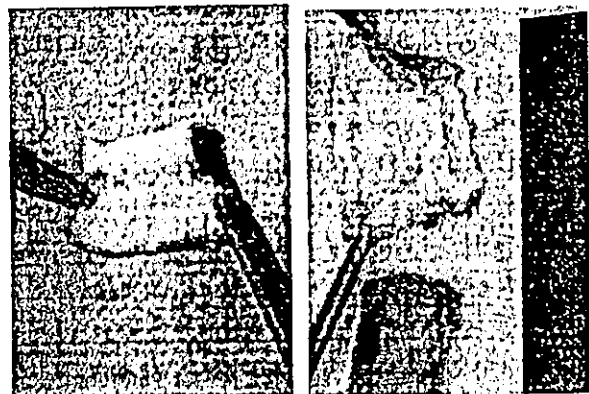


Figure 3. Explanted acellular porcine aorta after congeneric transplantation. (L: 1M, R: 6M)

P2-099 生体適合性の高い新規脱細胞化異種生体弁の開発

太田壮美¹, 澤 芳樹², 盤井成光², 松田 暉², 大北裕¹

¹神戸大学大学院医学系研究科 呼吸循環器外科学, ²大阪大学大学院医学系研究科 臓器制御外科

【緒言】今回我々は新しい脱細胞化による生体適合性の高い異種生体弁を開発し良好な結果を得たので報告する。【方法】脱細胞化のために細胞毒性がないPolyethylen Glycolを使用し、 γ 線照射とDNaseを併用してブタ大動脈弁に処理を行った。組織学的検索、DNA定量、可溶性蛋白定量により脱細胞化を評価し、強度引張り試験、ラット皮下移植実験にて炎症反応試験と石灰化試験を行った。また拒絶反応の原因糖鎖 α 1.3Galの免疫染色を行い評価した。【結果】光学顕微鏡像にてブタ大動脈弁は完全に脱細胞されていた。組織中のDNA定量は、ブタ生弁(F群)の弁尖、血管壁それぞれ $41.1 \pm 4.3 \mu\text{g/g}$ 、 $31.7 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$ に対し脱細胞弁(D群) $2.98 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ 、 $1.16 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ と有意($p < 0.0001$)に脱細胞弁で低く、可溶性蛋白定量においてもF群 4.68mg/ml 、D群 0.018mg/ml と有意に低下していた。引張り試験では最大破断点でF群 $10.7 \pm 3.3\text{N}$ 、D群 $8.7 \pm 1.2\text{N}$ で有意差を認めなかった。炎症反応試験では炎症細胞の浸潤を全く認めなかった。石灰化試験ではvon Kossa染色でほとんど石灰化を認めず、カルシウム定量にて対照 (Glutaraldehyde処理弁)の $80 \pm 45\text{mg/g}$ に対し $18 \pm 17\text{mg/g}$ と有意($p = 0.02$)に低値を示した。また、 α 1.3Gal染色は陰性であった。【まとめ】我々が開発した脱細胞化異種生体弁は、ブタ生弁とほぼ同等の強度を持ち、かつ抗原性が低く石灰化しにくい生体適合性の高い生体弁である可能性が示唆された。

P2-101 早期創傷治癒効果を発現するハイブリッド型経皮デバイスの検討

植木光樹¹, 岡田正弘¹, 須崎智之², 安田昌司¹, 藤里俊哉², 古菌 勉¹

¹国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部, ²国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 再生医療部, ³独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ

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、無機粒子を医用高分子表面にナノテクノロジーを用いて複合化した新規な材料を創出することで、柔軟かつ皮膚組織と密着可能な経皮デバイスの開発に取り組んでいる。本演題では、ナノサイズのハイドロキシアパタイト (HAp) 単結晶をシルク表面に複合化させることで新規な三次元構造体を構築し、その経皮デバイスとしての有用性について検討を行った。さらに再生医療学的見地から、ラットおよびうさぎから採取した線維芽細胞、骨髄細胞、歯根膜細胞などの細胞を、構築した三次元スcaffolds上にハイブリッド化させることによる早期創傷治癒効果について検討を行った。

P2-100 コラーゲン製人工血管のミニブタ大動脈への置換移植

殷 猛¹, 山崎祥子², 湊谷謙司², 笹山典久³, 吉田謙一⁴, 西岡 宏⁵, 藤里俊哉⁶, 岸田晶夫⁷, 白数昭雄⁸, 中谷武嗣¹, 服部博行³, 高野久輝⁸

¹国立循環器病センター 臓器移植部, ²国立循環器病センター 心臓血管外科, ³ニプロ株, ⁴先端医療振興財団, ⁵ヒューマンサイエンス振興財団, ⁶国立循環器病センター 研究所先進医工学センター 再生医療部, ⁷東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁸国立循環器病センター 研究所先進医工学センター

現在、臨床にて使用されている埋め込み型人工血管は、年間数万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小口径や感染部位では自家血管やホモグラフトが使用される他、小児患者では体に伴った成長性を得られないため、再生型人工血管の開発が望まれる。東京女子医科大学の新岡らは、吸収性人工材料からなる再生型人工血管の小児患者への臨床応用で、優れた成績を報告している。今回我々は、コラーゲン製の人工血管について、動物実験にて検討を行った。コラーゲン製人工血管は、単純な分解の他に、移植後に浸潤してきた線維芽細胞等による分解・置換を受け、吸収性人工材料とは異なった再生プロフィールを示すと考えられる。長さ約2.5cm、内径約6mmの架橋コラーゲン製人工血管を、クラウン系ミニブタ ((株) ジャパンファーム) の下行大動脈に置換移植した。所定期間経過後に摘出し、免疫染色やSEM観察等により組織学的に評価した。左心系への移植であるが、移植直後の破断等の異常所見は見られなかった。移植1ヶ月後に摘出したところ、移植時の形態をほぼ留めており、内腔面の血栓付着は見られなかった。吻合部から内皮の伸展が認められるとともに、外周の癒着組織からの細胞浸潤も見られた。

P2-102 バイオ人工肝臓装置内の酸素不足でも、機能持続可能な新規肝細胞株の樹立

垣外 梢¹, 寺田 聡¹, 大政健史²

¹福井大学 工学部 生物応用化学科, ²大阪大学

【緒言】肝移植は有効ではあるが、ドナー不足が深刻であるため、肝由来細胞を用いるバイオ人工肝臓の開発が期待されている。現在まで、多くの研究者により高い性能を有するバイオ人工肝臓が提案されているが、未だ運転期間が短く肝疾患の完治までの補助には至っていない。その原因として、装置内に封入された肝細胞の酸素供給不足による細胞死滅、および肝機能の低下があげられる。そこで、バイオ人工肝臓に封入される肝細胞に着目し、アポトーシス抑制遺伝子を導入することで、酸素供給不足でも細胞死滅に耐えうる肝細胞株の樹立を目指した。【方法及び結果】大量調達の容易なヒト由来肝細胞株HepG2を対象に、アポトーシス抑制遺伝子bcl-2, crmA, p35, bag-1をそれぞれ単独導入し、アポトーシス耐性株を樹立した。さらに、より高い細胞死耐性を有する細胞株の樹立を目指し、複数のアポトーシス経路の阻害が期待できる「bcl-2とbag-1」、「bcl-2とp35」の共発現株をも樹立した。これら樹立株を、バイオ人工肝臓装置内の酸素不足を模倣する目的で、通常の酸素分圧19%を酸素分圧2%にまで低下させて単層培養し、細胞生存や肝機能を測定した。期待通り、アポトーシス抑制遺伝子導入株では生存が改善されたが、その程度は導入遺伝子によって異なっていた。中でも、「bcl-2とp35」の共発現株が最も有効であった。

P2-107 間葉系幹細胞の増幅・分化に適した生分解性 Scaffold (ポリ乳酸系) の表面構造

山中克之¹, 山本克史², 坂井裕大¹, 金子 正², 辻紘一郎³, 加藤幸夫¹

¹広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 探索医科学講座 口腔生化学分野, ²株式会社ジーシー, ³株式会社ツーセル

【目的】再生医療においては、再生する組織に対して最も適切な Scaffold を選択することが必要である。したがって、Scaffold の表面性状が細胞に与える影響を把握する事は重要である。我々は間葉系幹細胞 (以下MSC) 移植に適した Scaffold を開発すべく、表面性状の異なるポリ乳酸系 Scaffold を設計し、MSC の接着・増殖・分化に与える影響を検討した。

【方法】MSC は患者の同意を得て採取した腸骨髄液から分離して bFGF と 10% FBS を含む DMEM 培地中で増殖させた (Tsutsumi.S et al BBRC 2001)。ポリ乳酸系 Scaffold は表面を研磨して塑像化させた 5 種類のフィルムと 1 種類のメッシュを使用した。また、48 穴プレートに適合するように加工して、その上に MSC を播種した。

【結果】表面粗さが小さくなると MSC の接着・増殖が促進された。一方、表面粗さが高くなると増殖は抑制されたが、骨分化が促進された。また、フィルムよりもメッシュの形状の方が増殖速度を低下させ、骨分化を促進した。一定の表面粗さであるかぎり、Scaffold の化学的組成は MSC の増殖に影響しなかったが、PLGA と PLC は PLLA よりも骨分化を促進した。

【考察・結語】Scaffold の表面粗さと形状を調節する事で、各症例に最適な MSC 担体を個別に提供できると考えられる。

P2-109 PLGA-コラーゲン複合メッシュを用いたヒト関節軟骨組織の再生

陳 国平¹, 田所美香², 大串 始², 幅田 孝³, 上松耕太³, 高倉義典³, 田中順三¹, 立石哲也¹

¹物質・材料研究機構 生体材料研究センター, ²産総所 セルエンジニアリング研究部門, ³奈良県立医大 整形外科

軟骨組織を再生するために軟骨細胞が均一に付着、増殖して組織化することを支持する多孔質基盤材料が必要である。本研究では、PLGA-コラーゲン複合メッシュを用いて、ヒト膝関節軟骨細胞を培養し、ヌードマウスの皮下におけるヒト膝関節軟骨組織の再生を検討した。変形性関節症で膝関節置換手術を受けた患者 (7例) の組織検体から分離した軟骨細胞を DMEM 血清培地で 3 回継代培養した後、複合メッシュに播種した。5ng/mL の TGF- β 3 を添加、及び添加していない DMEM 無血清培地で 1 週間培養した後、複合メッシュを 4 層重層し、ヌードマウスの背中の皮下に移植した。移植 4 週間後、検体を採取し、HE、safranin-O、トルイジンブルー染色を行った。ヒト膝関節軟骨細胞は PLGA-コラーゲン複合メッシュによく接着して増殖し、細胞外マトリックスを産生していることが分かった。全ての検体は表面が乳白色の光沢があったが、TGF- β 3 を含んだ培地で培養した細胞の検体は TGF- β 3 を添加していない培地での検体より大きかった。細胞は丸い形態を有し、Safranin-O 染色性細胞外マトリックスとトルイジンブルー染色によるメタクロマジーが認められたが、TGF- β 3 を含んだ培地で培養した場合は、染色性が強かったことが分かった。これらの結果より、PLGA-コラーゲン複合メッシュ上で培養したヒト軟骨細胞は軟骨様組織を形成し、複合メッシュがヒト膝関節軟骨組織再生の基盤材料として有効であると考えられる。

P2-108 心筋バイオスキャホールドの作製と細胞播種法の開発

須崎智之¹, 森反俊幸¹, 西岡 宏², 吉田謙一², 木村 剛³, 古菌 勉⁴, 藤里俊哉², 岸田晶夫³, 中谷武嗣⁵, 北村惣一郎⁵

¹鈴鹿医療科学大学 医用工学部, ²国立循環器病センター 研究所 再生医療部, ³東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁴国立循環器病センター 研究所 生体工学部, ⁵国立循環器病センター

【緒言】我々は、生体由来組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスを細胞足場としての利用するバイオスキャホールドの開発を行っている。これまで、超高静水圧処理による細胞除去法を考案した。本法は、細胞除去効率が高く、細菌、ドナー由来の内在性遺伝子も排除でき、生体力学特性も維持される。本研究では、合成高分子製細胞足場では難しいとされる動的組織の再建を目的とし、心筋バイオスキャホールドの作製と新たな細胞による心筋組織再構築法について検討した。**【実験】**成体ブタ (株) ジャパンファーム) の心臓を購入し、種々の厚みを有する直径約 1 cm の組織に調整した。冷間等方圧加圧装置 (株) 神戸製鋼所) を用いて低温下超高圧印加処理 (10℃、10,000 気圧) によってドナー細胞を破壊し、種々の培養液にて洗浄除去した。処理標本の組織断面を HE 染色により顕微鏡観察し、SEM にて表面を観察した。新たな細胞を組織に播種し、数週間の培養にて組織再構築を行った。**【結果と考察】**心筋組織からの細胞除去効率は組織表面付近で高く、深部ほど脱細胞化が困難であったが、約 1 mm 厚で完全細胞除去が達成された。本法で処理された心筋組織は、従来法のトリプシン処理法に比べ組織構造が保持され、界面活性剤による浸漬処理法を上回る細胞除去効率であった。これらの結果から、心筋組織においても本法の有用性が示された。脱細胞化心筋組織への細胞播種についてあわせて報告する。

P2-110 微細加工および高分子表面修飾技術を利用した肝細胞スフェロイドアレイの開発

福田淳二, 中澤浩二
北九州市立大学 国際環境工学部

【目的】創薬スクリーニング等への応用が期待される細胞チップの開発には、そのセンサー部を担う細胞自身の生存・機能を基板上で長期的に維持することが重要である。本研究では、均一な粒径のスフェロイドを規則的に高密度配列する方法について検討を行った。

【方法】機械加工装置を用いて、PMMA 平板上に直径 300 μ m の円柱状キャビティを約 1000 個/cm² の密度で規則的に形成した。次に、キャビティ内におけるスフェロイドの形成促進・脱落防止を目的として、キャビティ底面に接着/非接着高分子を修飾した。すなわち、マイクロコンタクトプリンティング法を用いて、キャビティ底面中央の直径 100 μ m の範囲へ RGD ペプチドを結合し、それ以外の部位に PEG を結合した。この基板にラット初代肝細胞を播種し、スフェロイドの形成および機能維持を評価した。

【結果】肝細胞は培養 24 時間でキャビティ底面中央にスフェロイドを形成した。スフェロイドの粒径は、その 86% が直径 160~180 μ m であり均一であった。アンモニア除去能およびアルブミン分泌能は、少なくとも評価を行った 2 週間は初期活性を維持した。また、本基板は光学的に透明であり、蛍光検出によってスフェロイド構成細胞の基本構造 (細胞骨格やミトコンドリア) や p-450 活性などを検出可能であった。以上より、本基板は、長期的な薬物スクリーニング試験などに応用可能であることが示唆された。

P1-089 AAV-HGFを用いた持続的遺伝子発現による線維肝遺伝子治療の検討

鈴木和夫, 平野公通, 孫 学炳, 飯室勇二, 藤元治朗
兵庫医科大学 第一外科

(背景と目的) 非代償性肝硬変に対する新しい治療として、肝細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子導入による治療効果を発表してきたが、これまではその遺伝子発現が一過性であり反復投与を必要とした。今回我々は長期間持続遺伝子発現を特徴とするAAV(Adeno-associated virus)ベクターに着目しAAV-HGFベクターを作製、マウス肝硬変モデルに投与を行い、検討を行った。(方法) BALB/cマウスにCC14を経口投与し肝硬変モデルを作製、経門脈的にAAV-HGFベクターを投与し、投与後3週、6週、9週、12週後の血清中および肝組織中の内因性・外因性HGF濃度、肝組織中の線維量をコントロールであるAAV-LacZベクター投与群と比較検討を行った。(結果) CC14投与後4週間で著明な線維肝が形成された。AAV-HGFベクター投与後3週、6週後の血清中および肝組織中の内因性・外因性HGF濃度、肝組織中線維量はAAV-LacZベクター投与群に比べ有意差はなかったが、9週、12週後の血清中および肝組織中の内因性・外因性HGF濃度はAAV-LacZベクター投与群に比べ有意に上昇しており、肝組織中線維量はAAV-HGFベクター投与群で有意に減少した。(結論) AAV-HGFベクターによるHGFの長期間発現が確認され、著明な肝線維化の改善を認めた。本法は肝硬変治療の新しい治療法となる可能性が示唆された。

P1-091 pH sensitive nanoapatite-a powerful and potential tool for gene delivery to mammalian cells for regenerative medicine

Ezharul Hoque Chowdhury, Toshihiro Akaike
Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

Ex vivo gene transfer to either a differentiated cell type or undifferentiated stem cells is an effective way for regulating and manipulating cell functions needed for development of regenerative medicine. However, although there are a good number of gene delivery systems including viral and non-viral ones, a safe, biodegradable and an efficient carrier as highly expected for regenerative medicine purpose, is absent. Here we report on the development of the simplest, but highly efficient gene delivery device based on generated carbonate apatite crystals having high affinity to DNA but fast dissolution kinetics for effective release of DNA during vesicular acidification and thus resulting in 5 to 100-fold higher transgene expression than the existing ones. Additionally, flexibility in modulating crystal dissolution kinetics enabled to control intracellular DNA release and an intermediate rate of DNA release enhanced survival of DNA and subsequent expression. Thus, considering the efficacy, biodegradability, safety and simplicity, this newly developed technology is highly promising for laboratory research and final implementation for regenerative medicine.

P1-090 超高压誘起 PVA/DNAハイドロゲルの調整とDNA徐放解析

岩井彩夏¹, 森反俊幸¹, 大矢裕一², 大内辰郎², 六雄伸吾³, 吉澤秀和³, 木村 剛⁴, 古菌 勉⁵, 藤里俊哉⁶, 岸田晶夫³
¹鈴鹿医療科学大学 医用工学部, ²関西大学 工学部, ³岡山大学 環境理工学部, ⁴東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁵国立循環器病センター 研究所 生体工学部, ⁶国立循環器病センター 研究所 再生医療部

[緒言]我々は、6000気圧を超える圧力(超高压)印加にて誘起される水素結合性構造体について検討している。これまで、超高压印加法によりポリビニルアルコール(PVA)のゲルあるいは微粒子が形成され、DNAとの混合系ではPVA-DNA複合体が形成されることを報告した。本研究では、PVAとDNAからなる新規ハイドロゲルの調整とDNAの徐放について検討した。従来のハイドロゲルとは異なる構造体形成と徐放挙動を示す可能性を有する。[実験]分子量および酸化度の異なるPVAはクラレ(株)より提供して頂いた。DNAとしては、プラスミドDNA、サケ白子由来DNAを用いた。種々の濃度のPVA溶液およびDNA溶液を調整し、超高压処理装置((株)神戸製鋼所)を用いて様々な圧力下で所定時間印加した。得られたPVA/DNAハイドロゲルの物性解析を力学強度測定、DSC測定により行った。PBS溶液に浸漬し、所定時間ごとのDNA濃度の測定により、DNAの徐放解析を行った。[結果と考察]低分子量のPVAでは、超高压印加による変化はほとんどなく、PVA-DNA複合体は認められなかった。一方、高分子量のPVAでは、低濃度でPVA-DNA複合体が形成され、更なる高濃度で白色の懸濁液から粘調な溶液に変化し、ハイドロゲルが形成された。ハイドロゲルを洗浄し、洗浄液中のDNA量を測定した結果、DNAが含まれていることが明らかとなり、新規なPVA/DNAハイドロゲルの形成が示された。

P1-092 マウス精原幹細胞株の樹立とin vitro精子形成の検討

小川毅彦¹, 喜夢かおる¹, 谷口英樹², 窪田吉信¹, 野瀬俊明³
¹横浜市立大学 大学院医学研究科 泌尿器病態学, ²横浜市立大学 大学院医学研究科 臓器再生医学, ³三菱化成生命科学研究所

【目的】新生児マウス精巣から採取した雄性生殖細胞を培養条件下で増殖させる技術が開発され報告された。GS細胞と名づけられたこの細胞は精細管内に移植すると精子形成を再生し、産仔を得ることができる。よって、GS細胞は精子形成能を維持しつつ、培養下で増殖できる細胞である。今回我々は、精原幹細胞からGS細胞の樹立を試みるとともに、GS細胞からのin vitro精子形成について検討した。【方法】DBA/2成熟マウス精巣から採取した精巣細胞をFeeder細胞(MEF)上で、4種類の成長因子(GDNF, LIF, bFGF, EGF)を加えた培地内で培養した。また幼若マウス精巣から樹立したGS細胞の移植、GS細胞再樹立実験を行った。さらにGS細胞を15P-1(セルトリ細胞株)の上で培養し、精子形成への分化を検討した。【結果】9週齢DBA/2マウス精巣から精原幹細胞株の樹立に成功した。またGS細胞をWマウスに移植し、精子形成の確認をするとともに、その精巣から再びGS細胞の樹立に成功した。15P-1上での培養後、1週間後には減数分裂に特異的な遺伝子発現がRT-PCRによって認められた。【結論】培養細胞であるGS細胞と組織幹細胞である精原幹細胞とは機能的に同一細胞であるか、もしくはお互いに転換できることが示唆された。さらにGS細胞(精原幹細胞)を出発点とするin vitro精子形成の可能性が示された。

P2-095 マウス胎仔心臓からの幹細胞樹立

玉川朝治¹, 石渡 勇¹, 木口一成², 佐藤嘉兵³, 石川 博⁴
¹石渡産婦人科病院, ²聖マリアンナ医大・産婦人科, ³日大・生物資源動物細胞, ⁴慈恵医科大学解剖第2講座

【目的】臓器移植法が制定されてからも、臓器移植医療ではドナー不足が深刻な問題である。臓器移植に代わる細胞・組織移植による再生医療が期待されている。細胞移植による再生医療の資源として、胚性幹細胞(ES細胞)・胎児幹細胞・生体幹細胞がある。ES細胞は多分化能を有し、資源として優れているが、拒絶反応も避けられないので未だ臨床への応用は難しい。一方、流産胎児からの臓器移植や幹細胞による細胞移植再生医療が期待されている。我々はマウス胎児の心筋幹細胞の樹立を試みた。【方法】マウス胎児の心拍動部位をピンセットで摘出し、はさみで細切後、600FU/ml dispaseで37°C、30分間酵素処理し、細胞分散後、300 XGで10分間遠沈し、沈渣を10ng/ml Leukemia inhibitory factor(LIF)とembryo tropic factor(ETP)、10%FBS含有 α MEMで培養した。培養が安定した時点(継代約5代)以降は10%FBS含有 α MEMで培養維持している。【成績】初代培養から6ヶ月で42回の継代に成功している。細胞は小型円形・楕円形で、単層に増殖する、倍化時間は約32時間、継代することなく長期に培養維持していると、一部の細胞に拍動を観察することができる。【結論】心筋幹細胞の分離継代培養に成功した。今後、ヒト心筋幹細胞樹立への期待が高い。

P2-097 ヒト不死化間葉系幹細胞による造血前駆細胞の効率的な増幅

北原ななえ¹, 藤田 聡², 辻 孝¹, 戸口田淳也², 井田憲司³, 杉並 洋³, 岩田博夫²

¹東京理科大学 基礎工学研究科, ²京都大学 再生医学研究所, ³独立行政法人 国立病院機構 京都医療センター

【目的】臍帯血は、造血幹・前駆細胞(HSPC)の供給源として注目されている。しかし採取できる細胞数が少ないため、HSPCの効率的な増幅方法の確立が望まれている。これまでに、HSPCの増幅に有効な支持細胞としてマウス細胞株HESS-5が報告されているが、異種細胞であるため臨床利用への障害となっている。近年、造血幹細胞は骨髄中において骨芽細胞との相互作用で自己複製するという報告がある。そこで本研究ではヒト間葉系幹細胞(MSC)に着目し、ヒトパピローマウイルスE6/E7遺伝子およびヒトテロメラーゼ遺伝子hTERTにより樹立されたMSC株の造血支持能を評価してきた。今回新たにLTC-IC assayを行ったのでこれを報告する。

【方法】磁気ビーズカラムを用いて採取したヒト臍帯血CD34陽性細胞を、TPO、FL、SCFを含む無血清培地で不死化MSC株と7日間共培養し、細胞数およびコロニー形成細胞数を定量した。

【結果】支持細胞を使用しなかった場合と比較して、7日間の培養後のCD34陽性細胞数は10倍、CD34陽性CD38陰性細胞数は12倍、CFU-GEMMは23倍、HPP-CFCは18倍に増加し、LTC-ICが維持されていた。さらに、有効な造血支持能が見出されたMSC株の培養上清を用いてHSPCの培養を行ったところ、HSPCは効率的に増幅された。

【結論】不死化ヒトMSC株の造血支持能およびその培養上清の有効性を示した。本結果はHSPCの効率的な増幅のみならず、HSPCの未分化維持機構の解明にも寄与できると考えられる。

P2-096 スフィンゴシン1-リン酸受容体活性化による造血幹細胞のホーミング促進効果

木村貴文¹, Robert Möehle², Lothar Kanz², 園田精昭³

¹京都府立医科大学 大学院医学研究科 分子標的癌予防医学, ²チュービンゲン大学 血液内科, ³関西医科大学 衛生学

免疫抑制剤FTY720はスフィンゴシン1-リン酸受容体(S1PR)アゴニストとして作用し、T細胞の二次リンパ組織へのホーミングを増強することで強力な免疫抑制効果を発揮する。われわれは、ヒト末梢血由来CD34⁺細胞を用いてFTY720の造血幹細胞のホーミングへの影響について検討した。CD34⁺細胞はS1PR mRNA(S1P₁-S1P₃)を発現しているものの、CD34⁺CD38⁺およびCD34⁺CD38⁻分画ではアインフォームの発現パターンがまったく異なることが明らかとなった。FTY720による前処理は、SDF-1刺激によるCD34⁺細胞内カルシウム遊離とアクチン重合を有意に遷延化させ、結果的に造血前駆細胞(CFCあるいはLTC-IC)のin vitro transwell migrationを有意に促進した。また、NOD/SCIDマウス骨髄へのCD34⁺CD38⁻細胞の速やかなホーミングを有意に促進し、移植後8-10週後でのヒト血球生着率を有意に高めた。いっぽう、これらの作用は造血前駆細胞の増殖促進やCXCR4の発現上昇によるものではないことも同時に確認した。したがって、FTY720は造血幹細胞の増殖・分化に影響を及ぼすことなく、CXCR4を介するホーミング・シグナルを有意に増強することが明らかとなった。以上より、S1PRを介するシグナルが、造血幹細胞のホーミング促進に应用可能であり、造血環境において恒常的にSDF-1の作用を調節している可能性が示唆された。

P2-098 新しい脱細胞化処理を施したブタの大動脈弁同種移植実験の検討

湊谷謙司¹, 藤里俊哉¹, 山崎祥子¹, 殷 猛¹, 吉田謙一¹, 西岡 宏¹, 荻野 均¹, 岸田晶夫², 中谷武嗣¹, 北村惣一郎¹

¹国立循環器病センター, ²東京医科歯科大学

【目的】我々は、脱細胞化生体スキャフォールドを用いた再生型移植組織の開発を行っている。本報では、超高压処理によって脱細胞化処理したミニブタ組織の大動脈弁移植実験について検討した。【方法】ドナーとなるクラウン系ブタから麻酔清潔下にて大動脈基部を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた超高压加圧処理を行うことでドナー由来細胞を除去した。同種ミニブタをレシピエントとして用い、左側臥位第4肋間開胸、下行大動脈単純遮断下に、脱細胞化した大動脈基部を移植した。移植1ヶ月後、3ヶ月後に移植組織を摘出し、肉眼的、組織学的に評価した。【結果】処理後の組織内では細胞核は全く染色されず、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離していた。透過電顕の所見からも、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。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。移植一ヶ月後では超音波検査において、弁尖の動きが観察可能であった。摘出標本において、弁尖は移植1ヶ月後で内皮細胞で覆われていたが、全体として退縮傾向にあり、弁尖付着部には血栓を認めた。移植3ヶ月後では弁尖は完全に消失していた。【結論】脱細胞化処理された大動脈弁は有望である。しかしながら、下行大動脈への移植は短期の観察のみ可能であり、より長期の観察のためには同所性移植が必要であろう。

P2-099 生体適合性の高い新規脱細胞化異種生体弁の開発

太田杜美¹, 澤 芳樹², 盤井成光², 松田 暉², 大北裕¹

¹神戸大学大学院医学系研究科 呼吸循環器外科学, ²大阪大学大学院医学系研究科 臓器制御外科

【緒言】今回我々は新しい脱細胞化による生体適合性の高い異種生体弁を開発し良好な結果を得たので報告する。【方法】脱細胞化のために細胞毒性がないPolyethylen Glycolを使用し、 γ 線照射とDNaseを併用してブタ大動脈弁に処理を行った。組織学的検索、DNA定量、可溶性蛋白定量により脱細胞化を評価し、強度引張り試験、ラット皮下移植実験にて炎症反応試験と石灰化試験を行った。また拒絶反応の原因糖鎖 α 1.3Galの免疫染色を行い評価した。【結果】光学顕微鏡像にてブタ大動脈弁は完全に脱細胞されていた。組織中のDNA定量は、ブタ生弁(F群)の弁尖、血管壁それぞれ $41.1 \pm 4.3 \mu\text{g/g}$ 、 $31.7 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$ に対し脱細胞弁(D群) $2.98 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ 、 $1.16 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ と有意($p < 0.0001$)に脱細胞弁で低く、可溶性蛋白定量においてもF群 4.68mg/ml 、D群 0.018mg/ml と有意に低下していた。引張り試験では最大破断点でF群 $10.7 \pm 3.3\text{N}$ 、D群 $8.7 \pm 1.2\text{N}$ で有意差を認めなかった。炎症反応試験では炎症細胞の浸潤を全く認めなかった。石灰化試験ではvon Kossa染色でほとんど石灰化を認めず、カルシウム定量にて対照 (Glutaraldehyde処理弁)の $80 \pm 45\text{mg/g}$ に対し $18 \pm 17\text{mg/g}$ と有意($p = 0.02$)に低値を示した。また、 α 1.3Gal染色は陰性であった。【まとめ】我々が開発した脱細胞化異種生体弁は、ブタ生弁とほぼ同等の強度を持ち、かつ抗原性が低く石灰化しにくい生体適合性の高い生体弁である可能性が示唆された。

P2-101 早期創傷治癒効果を発現するハイブリッド型経皮デバイスの検討

植木光樹¹, 岡田正弘¹, 須崎智之², 安田昌司¹, 藤里俊哉², 古菌 勉¹

¹国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部, ²国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 再生医療部, ³独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ

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、無機粒子を医用高分子表面にナノテクノロジーを用いて複合化した新規な材料を創出することで、柔軟かつ皮膚組織と密着可能な経皮デバイスの開発に取り組んでいる。本演題では、ナノサイズのハイドロキシアパタイト (HAp) 単結晶をシルク表面に複合化させることで新規な三次元構造体を構築し、その経皮デバイスとしての有用性について検討を行った。さらに再生医学的見地から、ラットおよびうさぎから採取した線維芽細胞、骨髄細胞、歯根膜細胞などの細胞を、構築した三次元スカフォールド上にハイブリッド化させることによる早期創傷治癒効果について検討を行った。

P2-100 コラーゲン製人工血管のミニブタ大動脈への置換移植

殷 猛¹, 山崎祥子², 湊谷謙司², 笹山典久³, 吉田謙一⁴, 西岡 宏⁵, 藤里俊哉⁶, 岸田晶夫⁷, 白数昭雄³, 中谷武嗣¹, 服部博行³, 高野久輝³

¹国立循環器病センター 臓器移植部, ²国立循環器病センター 心臓血管外科, ³ニプロ(株), ⁴先端医療振興財団, ⁵ヒューマンサイエンス振興財団, ⁶国立循環器病センター 研究所先進医工学センター 再生医療部, ⁷東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁸国立循環器病センター 研究所先進医工学センター

現在、臨床にて使用されている埋め込み型人工血管は、年間数万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小口径や感染部位では自家血管やホモグラフトが使用される他、小児患者では体に伴った成長性を得られないため、再生型人工血管の開発が望まれる。東京女子医科大学の新岡らは、吸収性人工材料からなる再生型人工血管の小児患者への臨床応用で、優れた成績を報告している。今回我々は、コラーゲン製の人工血管について、動物実験にて検討を行った。コラーゲン製人工血管は、単純な分解の他に、移植後に浸潤してきた線維芽細胞等による分解・置換を受け、吸収性人工材料とは異なった再生プロファイルを示すと考えられる。長さ約2.5cm、内径約6mmの架橋コラーゲン製人工血管を、クラウン系ミニブタ ((株) ジャパンファーム) の下行大動脈に置換移植した。所定期間経過後に摘出し、免疫染色やSEM観察等により組織学的に評価した。左心系への移植であるが、移植直後の破断等の異常所見は見られなかった。移植1ヶ月後に摘出したところ、移植時の形態をほぼ留めており、内腔面の血栓付着は見られなかった。吻合部から内皮の伸展が認められるとともに、外周の癒着組織からの細胞浸潤も見られた。

P2-102 バイオ人工肝臓装置内の酸素不足でも、機能持続可能な新規肝細胞株の樹立

垣外 梢¹, 寺田 聡¹, 大政健史²

¹福井大学 工学部 生物応用化学科, ²大阪大学

【緒言】肝移植は有効ではあるが、ドナー不足が深刻であるため、肝由来細胞を用いるバイオ人工肝臓の開発が期待されている。現在まで、多くの研究者により高い性能を有するバイオ人工肝臓が提案されているが、未だ運転期間が短く肝疾患の完治までの補助には至っていない。その原因として、装置内に封入された肝細胞の酸素供給不足による細胞死滅、および肝機能の低下があげられる。そこで、バイオ人工肝臓に封入される肝細胞に着目し、アポトーシス抑制遺伝子を導入することで、酸素供給不足でも細胞死滅に耐えうる肝細胞株の樹立を目指した。【方法及び結果】 大量調達の容易なヒト由来肝細胞株HepG2を対象に、アポトーシス抑制遺伝子bcl-2, crmA, p35, bag-1をそれぞれ単独導入し、アポトーシス耐性株を樹立した。さらに、より高い細胞死耐性を有する細胞株の樹立を目指し、複数のアポトーシス経路の阻害が期待できる「bcl-2とbag-1」、「bcl-2とp35」の共発現株をも樹立した。これら樹立株を、バイオ人工肝臓装置内の酸素不足を模倣する目的で、通常酸素分圧19%を酸素分圧2%にまで低下させて単層培養し、細胞生存や肝機能を測定した。期待通り、アポトーシス抑制遺伝子導入株では生存が改善されたが、その程度は導入遺伝子によって異なっていた。中でも、「bcl-2とp35」の共発現株が最も有効であった。

WS-16-3 生体吸収性人工靭帯の開発研究

奥田貴俊¹, 黒澤 尚¹, 金 勝乾¹, 玄 丞然²

¹順天堂大学 医学部 整形外科, ²京都大学再生医科学研究所

【目的】膝前十字靭帯(以下ACL)損傷に対し、生体吸収性人工靭帯による治療を可能にすることを目的とし、preliminaryな実験を行った。ポリ-L-乳酸(以下PLLA)人工靭帯埋植後の靭帯の早期過程を解析し、さらに細胞が被覆浸潤しやすい環境を得るため、最適なPLLAコーティングを探る。【方法】日本白色家兎のACLを切除し、3ミリ幅の特製PLLA人工靭帯2本を埋植した。1)コーティングを行わないnormal群、2)プラズマ処理をした群、3)プラズマ処理+I型コラーゲンコートした群、4)プラズマ処理+ヒアルロン酸コートした群、5)プラズマ処理+I型コラーゲンコート+ヒアルロン酸コートした群、6)プラズマ処理した靭帯周囲を大腿筋膜で覆った群、の6種類の靭帯を使用した。4週、6週後に屠殺し、人工靭帯のHE染色を行い組織学的に観察した。また免疫組織学染色による人工靭帯周囲のtypeI, IIIcollagenの定性を行った。【成績】normal群では6週で全て断裂を認めたが、それ以外の群ではどの群も一部に細胞被覆を認め、typeI, IIIcollagenの発現も認めた。【結論】PLLAに親水処理やI型コラーゲンをコートさせることは、PLLAをACL細胞の足場(靭帯のscaffold)として利用するのに有効と考えられたが、今後更なる最適条件の探求が必要と思われた。

WS-16-5 バイオスキャフォールド調製を目的とする脱細胞化手法の評価

澤田和也¹, 野木千賀子², 平工香織¹, 殷 猛³, 山崎祥子⁴, 藤里俊哉¹, 森反俊幸², 岸田晶夫³, 中谷武嗣³, 北村惣一郎⁴

¹国立循環器病センター 研究所先進医工学センター 再生医療部, ²鈴鹿医療科学大学 医用工学部, ³国立循環器病センター 臓器移植部, ⁴国立循環器病センター 心臓血管外科, ⁵東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

わが国では、現在年間1万件を超える心臓弁置換術が行われている。そのうち、約7割は機械弁による置換であるが、継続した抗凝固剤の服用などQOL上の問題を抱えている。一方、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は、化学的に処理されているため、種々の構造的劣化の問題が指摘されている。近年、凍結保存による組織バンクも整備されたが、わが国においては提供数が絶対的に不足しているという問題も残されている。これらの諸問題を解決するため、我々は以前より組織工学および再生医療技術を用い、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去した脱細胞化マトリックスをスキャフォールドとして利用する検討を行ってきた。その結果、我々が開発した生体組織への超高压印加法を適用することにより、細胞成分や細菌・ウイルス等の除去あるいは、不活性化が可能となり、現在の生体弁では不可能な再生型の組織置換が期待される。今回は、細胞内DNA量や細胞膜成分量を測定することによって、超高压印加法による脱細胞化を評価した結果について報告する。

WS-16-4 インクジェット式Direct Tissue Engineering

中村真人¹, 小林暁子², 高城富美男³, 森田育男², 高谷節雄¹

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

【目的】Tissue Engineeringでの三次元組織の作製には、通常、Scaffold法、細胞シート積層法が行われている。均一組織や層状組織では有効であるが、1種類の細胞を一面にばら撒く細胞播種に基づいており、何種類もの異なる細胞を二次元、三次元で人為的に適材適所配置して構築することは難しい。そこで、本研究では、Direct Tissue Engineering & Manufacturingという全く異なった生体組織構築のアプローチを検討した。本法では、機械の手により個々の細胞、生体材料を積層して、直接3次元生体組織を作製する。【方法】候補として、インクジェット技術に着目した。生きた血管内皮細胞を用いて、生細胞インクジェットの細胞への影響を検討した。さらに、ダメージを減らす方法として吐出細胞をゲル内に包埋する方法を考案し、ゲルによる3次元化にもチャレンジした。【結果】トリパンブルー染色では、生存細胞は8割以上であったが、最も大きく影響するのが乾燥と考えられた。そこでアルギン酸を利用し、吐出細胞をアルギン酸ゲル内に包埋した。1~2個の生きた細胞を含むマイクロゲル、太さ50μmの細胞封入ファイバー、さらに3次元格子化に成功した。【結論】生細胞インクジェットによるDirect Tissue Engineeringの可能性が示された。Tissue Engineeringの新しい有力な手法となることが期待できる。

WS-16-6 積層化心筋細胞シートの電気生理学的解析

原口裕次, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫
東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

【目的】我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いシート状の心筋細胞(心筋シート)の作製に成功している。この心筋シートの重層化による心筋組織の再構築、さらに重症心不全への治療を目指し研究を展開している。積層した心筋シートは電気的に結合し、同期して拍動する。そこで今回、積層化心筋シートの電気的性質に注目し、2層の心筋シートが電気的に結合するまでの時間を測定するとともに、この結合メカニズムを解析することを目的に実験を行った。【方法及び結果】新生仔ラット由来の心筋細胞を温度応答性培養皿に播種し、数日間培養後、低温処理して心筋シートを得た。重層した心筋シートが電気的に結合するまでの時間を、多点細胞電位記録システムで測定した。2枚の心筋シートは重層後34±2分(n=24)で電気的に結合した。この96%の例で、心筋シートの電気活動は速く拍動するシートに同期し、さらにすべての例で不整脈は起こらなかった。次に心筋細胞の電気的結合に関係するギャップ結合(GJ)が、2枚の心筋シート間に形成されるまでの時間を、低分子蛍光物質カルセインを用い調べ、30分以内にGJが形成されることを確認した。【考察】2枚の心筋シートは重層後、極めて早期にGJを形成し、不整脈を起こすことなく電気的に結合した。この結果は、不全心に移植しても、心筋シートは不整脈を起こすことなく速やかに宿主心に結合する可能性を示唆する。

脱細胞化心臓弁による組織再生

殷 猛、庭屋和夫、山崎祥子、吉田謙一¹、西岡 宏²、藤里俊哉、湊谷謙司、岸田晶夫³、中谷武嗣、北村惣一郎

国立循環器病センター、¹先端医療振興財団、²ヒューマンサイエンス振興財団、³東京医科歯科大学

心臓疾患手術に際し、同種弁組織（ホモグラフト）の臨床意義は大きいですが、中長期に発生する弁機能不全には同種弁に存在する細胞への免疫反応の関与が示唆されている。我々は、同種あるいは異種組織を脱細胞化処理することでホモグラフトの欠点を克服しうると考え、その臨床使用を目指している。本研究では、脱細胞化したミニブタ組織の同種移植について報告する。

クラウン系ミニブタ（(株) ジャパンファーム）の肺動脈弁及び大動脈弁を採取し、超高静水圧印加（パワーグラフト）法によって脱細胞化した。同種ミニブタに、肺動脈弁は同所性に、大動脈弁は下行動脈位に移植した。所定期間経過後、超音波にて観察するとともに、摘出組織を免疫染色やSEM観察にて組織学的に評価した。

両組織とも移植血管の破裂等は認めなかった。肺動脈弁では、移植3及び6ヶ月後での超音波観察で、弁の機能不全は認めなかった。内腔は完全に内皮化しており、組織内への細胞浸潤も顕著であった。また、石灰化も全く認めなかった。これに対し、大動脈弁では、移植1ヶ月後において、弁葉内には石灰化は認めなかったが、導管部には石灰化を認めた。また、3ヶ月後では、弁葉は縮退しており、導管部の石灰化も顕著であった。

Lecture 1

Cellular and Tissue Engineering with Nanotechnology

Akio Kishida¹, Tsuyosi Kimura¹, Kozo Miyazaki¹, Masaomi Ishimaru²,
Masahiro Uetake², Noriyuki Kusakari², Tooru Matsuzawa², A. Okuno³, Y.
Ohya³, T. Ouchi³, S. Mutsuo⁴, H. Yoshizawa⁴, Tsutomu Furuzono⁵,
Toshiya Fujisato¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental
University, ²Ibaraki University, ³Kansai University, ⁴Okayama University,
⁵National Cardiovascular Center Research Institute



Prof. Akio Kishida

Department of Applied Functional Molecules,
Division of Biofunctional Molecules,
Institute of Biomaterials and Bioengineering,
Tokyo Medical and Dental University
2-3-10, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo
101-0062, JAPAN
TEL +81-3-5280-8028, FAX +81-3-5280-8005
Email: kishida.fm@tmd.ac.jp

Abstract

1. Nano-vibration as the mechanical signal for controlling cell function.

One of key factors affecting the effective application of tissue engineering is the handling of cells. Especially, for securing of the large amount of cell, many approaches have been studied. Physical stress and stimuli, such as 2-D stretch, static pressure and shear stress, have been extensively studied for controlling cell function for example, adhesion, proliferation and secretion of useful proteins. In this study, we studied the effect of a novel physical stimulation on the cell function (cell adhesion and proliferation). Here, we adopted nano-vibration stimulation system as a novel physical stimulation method.

The equipment was assembled using piezo-electric actuator and set to apply micrometer- to nanometer- amplitude. To investigate the effect of nano-vibration, HUVECs, L929 and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were used as model cells. Adhesion and proliferation of those cells were investigated. In case of initial-adhesion, the cell adhesion was emphasized by nano-vibration to become 1.3 times higher adhered cell number in 1 hour incubation. The effective frequency was different according to the cell. In case of nano-vibrating the adhered cells, the proliferation of HUVECs was promoted at different frequency, respectively. The most drastic effect of nano-vibration was observed in the case of MEF adhesion and proliferation. It may show that primary cells rather than transformed cells suffer the vibration stimulation.

2. Nano-assembly prepared by Ultra-high pressure technology as a novel gene delivery system

Most of non-viral gene carrier uses either of electrostatic interaction or hydrophobic interaction for associating with DNA. Here we introduce a new process for obtaining DNA-Polymer molecular composite via hydrogen bond. In the ultra-high pressure condition (over 6,000 atm), it is well-known that hydrogen bond is strengthened. Using this characteristic, the ultra-high pressure have been used in order to elucidate the flexibility-structure-function of proteins¹. We have reported the molecular composite, such as hydrogels and nano-aggregate were easily obtained by the ultra-high pressure treatment². In this study, the preparation of the molecular composite of DNA and synthetic polymer was attempted by using the ultra-high pressure treatment. The model polymer used was poly(vinyl alcohol)(PVA). Electrophoresis experiment was revealed that DNA-PVA composite formation was observed only when the mixture was pressurized. CD spectra analysis showed that no DNA stereo-structure deformation was occurred after pressurization. These results suggest that the interaction formed between the bases of DNA and hydroxyl group of PVA is hydrogen bond and possible association region of DNA is major groove of B-type structure. Using ultra-high pressure (over 10000atm), DNA-PVA composite was obtained. This composite is one candidate for preparing non-viral gene carrier.

ミニブタ体細胞クローン胚の作製に用いる融合および活性化培地中のカルシウム濃度の最適化

○遊木靖人, 三好和暁, 吉田光敏 (鹿大院農)

【目的】体細胞クローン動物の作出において、クローン胚を活性化するタイミングは成否にかかわる重要な要因のひとつと考えられている。活性化には培地中のカルシウム (Ca) が関与しているため、本実験では、融合および活性化培地中のCa濃度がブタ卵子およびミニブタ体細胞クローン胚の活性化とその後の発生に及ぼす影響について検討した。【方法】実験1：ブタ体外成熟卵を0.1あるいは1.0 mMのCaを含む活性化培地中に移し、電気刺激により活性化した。一部の卵子は、活性化後に2.2 μ g/mlのサイトカラシンB (CB) で2時間処理した。実験2：成熟卵を0-1.0 mMのCaを含む培地中で活性化した後にCBで処理した。実験3：除核した成熟卵の囲卵腔にクラウン系ミニブタ腎臓由来細胞を挿入し、0あるいは0.1 mMのCaを含む融合培地中で電気刺激により融合した後、CBで2時間処理した。一部の融合胚には、融合処理2時間後に0.1 mMのCaを含む培地中での活性化およびCB処理を施した。処理後の卵子および胚における前核と極体の形成状況 (実験1) および体外発生状況 (実験1-3) を調べた。【結果】実験1：前核形成率はすべての区で高かった (85.5-92.9%)。第2極体形成率は、CBで処理しなかった区ではCa濃度にかかわらず高かった (0.1 mM: 65.3%; 1.0 mM: 51.9%) が、0.1 mMの培地中で活性化した後にCBで処理した区では有意に低下した (13.7%; $P < 0.05$)。同区の胚盤胞形成率 (38.8%) は、他の区 (14.3-16.7%) より有意に高かった ($P < 0.05$)。実験2：0.1 mM区において得られた胚盤胞形成率 (28.6%) は、0.5 mM区 (23.0%) と比較して差はなかったが、0-0.05 および1.0 mM区 (11.0-18.3%) より有意に高かった ($P < 0.05$)。実験3：融合率 (62.7-77.3%) は、Ca濃度の影響を受けなかった。Ca不在下で融合した後に活性化およびCB処理を施した区 (28.9%) において、他の区 (2.7-16.5%) より有意に高い胚盤胞形成率が得られた ($P < 0.05$)。

33 超音波を用いたブタ卵子の活性化

○佐藤啓介, 三好和睦, 吉田光敏 (鹿大院農)

【目的】効率的な卵子活性化法の開発は、顕微授精や核移植等の発生工学的手法を用いて作出された胚の発生率を改善するために重要である。ブタにおいては、卵子に直流パルスを印加する電氣的活性化法が広く用いられているが、本実験では、超音波照射の有効性について検討した。【方法】ブタ体外成熟卵を4穴培養皿中の活性化培地に移し、攪拌しながら1 MHz, 2 W/cm²の超音波を30秒間照射した。活性化処理後の卵子は、2.2 μg/ml サイトカラシンBで2時間処理してから培養した。実験1: Hepes-TLP-PVAおよびソルビトール液を活性化培地として、20%超音波造影剤添加の影響を調べた。超音波のduty比は50%に調整した。実験2: ソルビトール液を活性化培地として、duty比10%あるいは50%の超音波を照射した。実験3: ソルビトール液中でduty比10%の超音波を照射し、直流パルス(100 V/mm, 50 μsec)を30分間隔で2回印加した場合と比較した。培養後の卵子における前核と極体の形成状況(実験3)および体外発生状況(実験1-3)を調べた。【結果】実験1: ソルビトール液における胚盤胞形成率(33.8%)は、Hepes-TLP-PVA(超音波造影剤添加区: 0%; 無添加区: 1.4%)および超音波造影剤添加ソルビトール液(8.5%)における値より有意に高かった(P<0.01)。実験2: 胚盤胞形成率はduty比の違いに影響を受けなかった(duty比10%区: 23.3%; 50%区: 22.2%)。しかし、得られた胚盤胞の細胞数は、duty比10%区(52.2 ± 5.1)の方が50%区(43.0 ± 3.2)より有意に多かった(P<0.05)。実験3: 前核形成率(超音波区: 78.6%; 電気区: 72.0%)および第2極体形成率(超音波区: 6.8%; 電気区: 19.4%)は、活性化法の違いに影響を受けなかった。胚盤胞形成率においても差はみられなかった(超音波区: 30.0%; 電気区: 20.6%)が、得られた胚盤胞の細胞数は、超音波区(63.7 ± 5.7)の方が電気区(40.8 ± 2.7)より有意に多かった(P<0.05)。

44 Flow-FISH法を用いたウシ精子DNAのテロメア長検出技術の開発

○渡邊弘樹, 窪田 力¹, 三好和睦, 吉田光敏 (鹿大農,¹鹿児島県肉改研)

【目的】テロメア長の検出は細胞の寿命を推定する一つの指標として重要である。近年、検体を迅速に解析できるフローサイトメーター (FCM) を用いた Flow-Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法がヒト体細胞のテロメア長の解析に利用されつつあるが、家畜への応用例は少なく、特に繁殖領域における生殖細胞のテロメア長解析への応用は皆無である。そこで、本研究ではFlow-FISH法を用いたウシ精子DNAのテロメア長検出技術の確立について検討した。【方法】実験には黒毛和種雄ウシ由来の凍結保存精液を用いた。実験1：ヒト体細胞用に開発されたテロメアDNA特異的 peptide nucleic acid (PNA) プローブを用いて、精子核の脱凝縮処理がFlow-FISH法によるウシ精子テロメアDNA検出に及ぼす影響を調べた。ヘパリンナトリウムとジチオスレイトールにより脱凝縮処理した精子と脱凝縮無処理精子をFITC標識テロメア特異的PNAプローブとハイブリダイズし、両区の精子のテロメア蛍光検出状況を蛍光顕微鏡およびFCMで比較した。実験2：年齢の異なる5頭のウシ精子 (2歳:2頭, 10歳:1頭, 11歳:1頭, 17歳:1頭) について、実験1の結果に準じて精子核を脱凝縮処理後、テロメア特異的PNAプローブとハイブリダイズし、FCMによりテロメア蛍光の検出状況を比較解析した。【結果】実験1：脱凝縮処理精子区ではテロメア特異的PNAプローブからの蛍光発光が検出され、無処理区では蛍光発光が検出できなかった。実験2：すべての個体由来の精子にテロメア特異的PNAプローブからの蛍光発光が検出された。年齢に係わらず精子集団内でテロメア蛍光強度にバラツキが見られたが、10歳以上の雄ウシ個体由来の精子では2歳の個体よりも蛍光強度の低い精子集団の割合が有意に増加した ($P < 0.05$)。

VI27-18 ウシ卵子の成熟・受精・発生過程におけるプリオンタンパク質遺伝子発現

○日巻 武裕・糸井 史陽・三好 和睦・吉田 光敏

鹿大農

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

【目的】哺乳動物においてプリオンタンパク質(Prp)は神経系細胞に多く存在するとされるが、卵子における同遺伝子の発現動態は未解明である。本研究では、ウシ卵子の成熟、受精および発生過程におけるPrp遺伝子発現状況について調べた。【方法】食肉センター由来のウシ卵巣より卵子を吸引採取し体外培養した。体外培養(20~22時間)後に体外受精を行い、6時間後にCR1aa培地へ移動して、発生培養した。この一連の過程で、採卵直後の未成熟卵子、体外培養後の体外成熟卵子、媒精14~16時間後の雌雄前核形成卵、媒精30~32時間後の2細胞期卵、媒精54~56時間後の8細胞期卵、および媒精7日後の胚盤胞、計6区で卵RNAを個別に調製した。そして、各区におけるPrp遺伝子発現状況をRT-PCR法により定性および定量的(ABI PRISM 7700 Sequence Detector)に調べた。【結果】Prp遺伝子発現はすべての過程で観察できたが、供試卵あたりの発現率は発生過程で成熟・受精過程と比べて有意に高かった($P < 0.05$)。一方、Prp遺伝子発現量も成熟・受精過程と比べて発生過程で有意に増加($P < 0.05$)し、胚盤胞期で最も高かった。

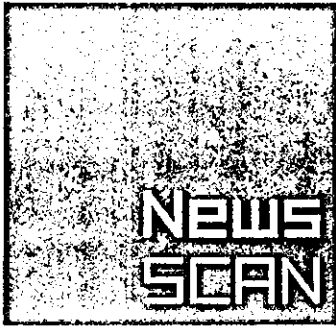
VI27-34 超音波により活性化したミニブタ体細胞クローン胚の体外発生

○佐藤 啓介・三好 和隆・吉田 光敏

鹿大農

arst1@bio2.agri.kagoshima-u.ac.jp

【目的】我々は、超音波の照射によるブタ卵子の活性化誘起が可能であり、その結果得られた胚盤胞の細胞数は、電気活性化法を用いた場合と比較して有意に増加することを明らかにした。本実験では、超音波照射法をミニブタ体細胞クローン胚の活性化に応用した。【方法】ブタ体外成熟卵子を除核後、クラウン系ミニブタ皮膚由来細胞を電気刺激により融合した。得られたクローン胚をソルビトール液中に移し、超音波 (1 MHz, 2 W/cm², duty比10%) を30秒間照射あるいは直流パルス (100 V/mm, 50 μsec) を30分間隔で2回印加することにより活性化した。それぞれの方法で活性化したクローン胚を2.2 μg/mlのサイトカリンBで2時間処理後に培養し、活性化状況および体外発生状況について比較した。【結果】活性化法の違いは、活性化率 (92.3% vs. 90.0%)、卵割率 (36.3% vs. 26.3%)および胚盤胞形成率 (18.7% vs. 16.2%)に影響を及ぼさなかった。しかし胚盤胞の細胞数は、超音波照射法 (59.1±3.9)の方が電気活性化法 (43.3±2.4)より有意に高くなった (P<0.05)。以上の結果から、ミニブタ体細胞クローン胚の活性化における超音波照射法の有効性が示された。



ブタ大動脈弁の脱細胞化に成功 ヒトへの異種移植に前進

工学の技術を生かしてブタの心臓の大動脈弁¹から細胞だけを取り除き、ヒトへの異種移植に利用しようという研究が進んでいる。

先天的に、または動脈硬化などが原因で、開閉に支障がある大動脈弁を取り換える手術は、国内で年間約1万件行われている。現在その置換手術に使われているのは、カーボン製の機械弁や、ブタ大動脈弁などの異種弁だ。しかし、患者の体は両者とも異物と認識するため、様々な不都合が生じる。機械弁は表面に血栓ができやすく、それを防ぐ抗凝固薬を一生飲み続けなければならない²。ブタ大動脈弁を移植する場合には、生細胞が残っていると免疫反応で拒絶してしまうので消毒液で処理するのだが、このため弁は移植後徐々に硬化し、15年ほどで再手術が必要になる。

そこで、ブタ大動脈弁からブタの細胞をいったん完全に除去しコラーゲン線維などの支持体だけにして、そこへ患者の細胞を植え付ければ、抗凝固薬が不要で、かつ硬化する心配のない弁ができるのでは、というのが脱細胞化のアイデアだ。このほど、国内の2グループがこれを相次いで成功させた。

早稲田大学大学院機械工学専攻の岩崎清隆講師らは、ブタ大動脈弁から界面活性剤で細胞を洗い流す際にマイクロ波を照射し、同時に心臓と同じ拍動を与えた。すると、「電子レンジの原理でマイクロ波で細胞が振動しているところへ拍動による圧力が加わり、細胞が完全に抜けた。周囲の構造と強度には影響はなかった」（岩崎講師）という（右写真）。

その後、患者の内皮細胞を弁の表面に付着させてから移植する。そうすると、「3カ月で隣接する自分の組織から細胞が抜けた部分に細胞が入り込むことが、肺動脈弁の移植実験から期待できる」と岩崎講師と共同研究している東邦大学医学部心臓血管外科の尾崎重

之助教授は言う³。「耐用年数を20年に伸ばしたい」（尾崎助教授）と目標は控えめだが、現在の消毒液で処理した異種弁よりかなり長く使うことも期待できそう。ヒツジにブタの弁を移植する実験が間もなく始まる。

高圧処理法にはウイルス滅菌効果 気管、軟骨、骨への応用にも期待

同様の研究を国立循環器病センター研究所再生医療部の藤里俊哉・機能再生研究室長も進めている。こちらは特殊な装置で1万気圧に加圧し脱細胞化した⁴。「異種移植ではブタ内在性レトロウイルスや未知のウイルスに患者が感染する懸念がある。高圧処理なら脱細胞化と同時に滅菌できる」と藤里室長は言う。高圧下では周囲の繊維質にも変化がないか気になるが、「形状は少し変化したが強度には問題ない」（藤里室長）。

ブタにブタの弁を移植する6カ月の実験を成功裏に終え、今月はサルにブタの弁を移植する予定だ。他の組織にも技術を応用したいと考える藤里室長は気管で既に成功させ、軟骨や骨も視野に入れている。（大屋奈緒子）

¹大動脈弁

心臓の左心室から大動脈へと血液が流れる出口で開閉するのが大動脈弁。その開きが悪くなると、心臓に余分な負担がかかり痛みや呼吸困難につながる

²血栓を防ぐ抗凝固薬を一生飲み続ける

ワーファリンという薬を服用しているときには、その効果を落とさないように、ビタミンKを多く含む食品（納豆、青汁など）を摂取してはいけない。また、胎児への影響が考えられるため妊娠できないなどの問題がある

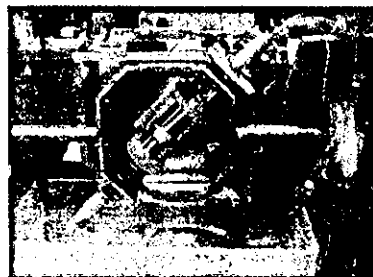
³同様の肺動脈弁の実験から期待

尾崎助教授はドイツの大学との共同研究で肺動脈弁の脱細胞化を成功させた。現在臨床試験が進められている

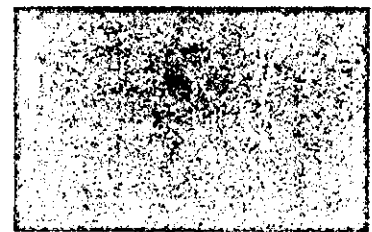
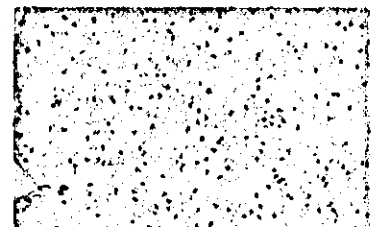
⁴特殊な装置で1万気圧に加圧

1万気圧に加圧すると、殺菌できると同時に、たんぱく質の立体構造が崩れて加熱したのと同じ現象がおきる。食品メーカーではジャムの製造などにこの技術を使っているところがある

脱細胞化装置で処理したブタの大動脈弁



岩崎講師らが開発した脱細胞化装置（写真上）。中央の筒状部分に弁を入れ回転させ、マイクロ波を後ろから照射する。弁を浸した界面活性剤には拍動を与えつつ循環させる。大動脈弁の処理前（写真右上）には黒い点で示された細胞が、処理後（写真右下）にはなくなっている。周囲の繊維質に変化は見えない



心臓弁・血管再生 動物の組織活用

早大や循環器病センター

移植、拒絶反応少なく

心臓弁や血管などはコラーゲンというたんぱく質などから、土台ができており、周りを細胞が覆っている。移植したときの拒絶反応は細胞の表面にある物質によって起きる。研究チームは細胞をきざって土台だけを利用すれば、拒絶反応が起こりにくいことに着目。人の臓器と大きさが似たブタの組織から心臓弁などを作った。

早大の岩崎清隆講師と梅津光生教授らが開発したのは、ブタの心臓弁の土台だけをむきだしにして、患者自身の血管の細胞で覆う技術。取り出したブタの心臓弁を薬剤に浸し、電子レンジなどで同じ周波数帯のマイクロ波を当てると、細胞を完全に除去できた。

実験では人の細胞の代

わりにヒツジの細胞を用いた。弁の土台に少量の細胞を付け、体内と同じ環境を再現すると、細胞が増殖して弁の表面をびっしりと覆った。これをヒツジに移植したところ、拒絶反応が起こらず、短時間で定着した。三年後に臨床試験を計画している。

循環器病センター研究所の藤里俊哉・再生医療

部室長らもブタの心臓の太い血管を取り出し、周囲の細胞を安全に除去する手法を開発した。約一万年気圧という高圧を加えて細胞を壊し、マイクロ波で除去。土台部分を患部に移植し、体内の細胞が自然に付着するのを待つ。

心臓血管をブタに移植する実験では機能をよくする半年間保てた。ただ、細胞が土台に付くのに時間がかかるため、早大チームと同様、体外で細胞を付着させる方法を検討

している。

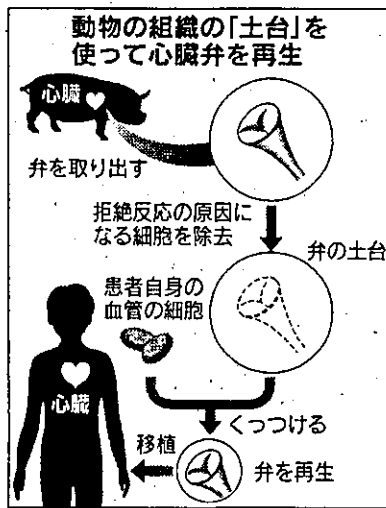
心臓弁膜症などで症状が進んだ場合、人工弁や動物由来の弁の移植が必要になり、世界で年間約三千万人が移植を受けている。

ただ人工弁では血栓ができやすいほか、動物由来の弁では拒絶反応を防ぐため薬品処理が必要になるなど、手間やコストがかかっていた。

度による物質は初めてという。絶縁体なので電子回路などに組み込むのも容易。湿度センサーなどに応用できるとみている。

コバルト、マンガン、クロムなどでできた「パールシアンブルー磁性体」という化合物で、湿度を

動物の組織を材料に、患者に移植しても拒絶反応が起こりにくい心臓弁や血管を再生する技術を早稲田大学と国立循環器病センターがそれぞれ開発した。ブタなどの組織の土台に当たる部分を取り出し、患者自身の細胞をくっつけて体になじみやすくした。いずれも三―五年後の臨床応用を目指す。肝臓などの臓器や器官を作れる可能性もあり、再生医療の手法として注目される。



臓器丸ごと作れる可能性も

病気やけがで傷んだ臓器を修復する再生医療では、患者自身の細胞を骨髄などから取り出し移植する手法の臨床応用が先行した。この方法は心臓の筋肉や血管などに対象が限られるが、早大

解説

病気やけがで傷んだ臓器を修復する再生医療では、患者自身の細胞を骨髄などから取り出し移植する手法の臨床応用が先行した。この方法は心臓の筋肉や血管などに対象が限られるが、早大

心筋などの再生医療はいわば壁を修復する方法。重症の患者など、「鉄筋」が折れてしまった場合には限界がある。

新手法は折れた鉄筋を交換してほぼ元通りにするのが狙い。当面は弁などが対象だが、将来は気

管や心臓の壁、肝臓などに応用が期待できる。本来、体内で働いていた土台を利用するため、形が複雑な臓器でも再生できる可能性がある。

課題は動物組織を使うため、感染症の危険性を否定できないこと。そのリスクを見極めながら臨床応用を進めれば、実現性は高そうだ。