

cells were also present around these cells (Table II; Fig. 3). No polymorphonuclear neutrophil leukocytes were observed in the valve tissue of either of these pigs.

Discussion

The preservation, clinical application, and long-term outcome of cryopreserved homografts have been evaluated previously (9-11). It has also been shown that fibroblast viability persists in cryopreserved allografts after implantation, and that these cells express the genes for fibroblast growth factor and procollagen (12), which can maintain the structure of the tissue. It has also been demonstrated that collagen synthesis of the cryopreserved allograft was relatively well maintained (13). However, fibroblasts in the donor allograft were unable to survive for long, because of apoptosis (14). The durability of the homograft valve is related to the viability of the fibroblasts that maintain the valve matrix (15), and therefore the loss of fibroblasts may result in a loss in homograft durability.

Endothelial cells exhibit strong antigenicity, but cannot survive under ischemic conditions. Moreover, during the cryopreservation process endothelial cells lose their ability to proliferate (16,17). This raises the possibility that homograft durability is related to the extent of endothelial cell denudation. Thus, the homograft will lose its endothelial cells and fibroblasts, and eventually become a non-viable tissue.

The fate of implanted cryopreserved homografts has been demonstrated in previous clinical and pathological studies (18,19). After implantation, the homograft loses its endothelium, cellularity, and the layered architecture, after which calcified deposits and hematoma/mural thrombi are seen to form. The homograft cusps become flattened and thinned, with obliteration of the usual corrugated pattern. These investigators concluded that the cryopreserved allograft is morphologically non-viable, and also suggested that the early influx of macrophages and T lymphocytes was limited after implantation. Over the longer term, inflammatory cells were not found, and thus the degeneration could not be attributed to immunological responses.

The results of previous studies have indicated that, after allograft implantation, donor cells disappear rapidly and are then replaced by recipient endothelial and interstitial cells (20-22). It would be expected that influx of the recipient cells would progress into the allograft and maintain valvular function. Thus, the present authors speculated that if valvular tissue were to be decellularized prior to implantation, then the recipient cells would readily repopulate and proliferate upon this substrate.

In the present study in a mini-pig model, right ventricular outflow tract replacement was performed with

a cryopreserved and decellularized allograft and an 'only-cryopreserved' allograft, and the short-term results evaluated. In the decellularized group, H&E staining revealed that the surfaces of the graft were repopulated by endothelial cells for up to one month. By contrast, in the only-cryopreserved group, endothelial cells were almost completely lost, the trilaminar tissue architecture had disappeared, and macrophages and T-lymphocytes were found in the valve. Endothelialization of the decellularized cusps occurred more densely than in the only-cryopreserved cusps. Furthermore, in the decellularized group, inflammatory cells infiltrated less than in the only-cryopreserved cusps. Decellularization may precede repopulation of the recipient cells.

In the present study, no significant differences were observed between the cell-seeded and non-cell-seeded groups. The endothelial cells play an important role in preservation of the subendothelial cellular and matrix components (23), and this influence may become apparent after implantation. With the static seeding approach used in the present investigation, the endothelial cells were seeded heterogeneously.

Steinhoff et al. (7) reported that with only static reseeding, complete recellularization with endothelial cells and myofibroblasts occurred, at four and 12 weeks after implantation, although the unseeded group recellularized only with endothelial cells. The duration of reseeding used by these authors was longer (8 days) than was used in the present study (2 days). Furthermore, these other investigators performed the reseeding with myofibroblasts for six days and with endothelial cells for two days, whereas only endothelial cells were used for seeding in the present study. For further evaluation of these procedures, the duration of static reseeding and the type of reseeding cells used are important. It is possible that confluent endothelial cell coverage before implantation might be preferable, and if the grafts were to be seeded using a bioreactor (24,25), then confluent cell coverage might be established.

Several points regarding this graft procedure remain unclear. The first is thrombogenicity - the evaluation of which is difficult because the operative procedure itself is associated with thrombus formation. In addition, in the present study neither anticoagulation nor anti-platelet therapy were initiated, and a limited period of anticoagulation therapy may indeed be necessary with this graft procedure. Furthermore, at the microscopic level the surface of the graft was found to be rough, and this may provide a suitable substrate for the thrombus formation observed in the present study. If confluent coverage of the graft surface with endothelial cells were to be established before implantation, then thrombus formation may be reduced.

In conclusion, a decellularized allograft was recellu-

larized with endothelial cells for up to four weeks. In comparison with the cryopreserved allograft, the inflammatory response was reduced by decellularization.

References

1. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, et al. Tissue engineering heart valves: Valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg* 1995;60(6 Suppl.):S513-S516
2. Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, et al. Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 1996;94(9 Suppl.):III164-III168
3. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, et al. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 2000;102(19 Suppl.3):III22-III29
4. Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg* 2001;7(5 Suppl.):S428-S432
5. Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: Advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1962-1969
6. Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves: Human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;14:279-284
7. Steinhoff G, Stock U, Karim N, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: In vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 2000;102(19 Suppl.3):III50-III55
8. Shinoka T, Imai Y, Ikeda Y. Transplantation of a tissue engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001;344:532-533
9. Niwaya K, Knott-Craig CJ, Santangelo K, Lane MM, Chandrasekara K, Elkins RC. Advantage of autograft and homograft valve replacement for complex aortic valve endocarditis. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1603-1608
10. Niwaya K, Knott-Craig CJ, Lane MM, Chandrasekara K, Overholt ED, Elkins RC. Cryopreserved homograft valves in the pulmonary position: Risk analysis for intermediate-term failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:141-147
11. Niwaya K, Sakaguchi H, Kawachi K, Kitamura S. Effect of warm ischemia and cryopreservation on cell viability of human allograft valves. *Ann Thorac Surg* 1995;60:S114-S117
12. Song YC, Yao LY, Kneebone JM, Lupinetti FM. Effect of cryopreservation and histocompatibility on type I procollagen gene in aortic valve graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:421-427
13. Kano M, Masuda Y, Tominaga T, et al. Collagen synthesis and collagenase activity of cryopreserved heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:706-711
14. Hibert SL, Luna RE, Zhang J, et al. Allograft heart valves: The role of apoptosis-mediated cell loss. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:454-462
15. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, Pohler PG, McGriffin DC. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:812-823
16. Yankah AC, Wottge HU, Muller-Hermelink HK, et al. Transplantation of aortic and pulmonary allografts, enhanced viability of endothelial cells by cryopreservation, importance of histocompatibility. *J Card Surg* 1987;1(Suppl.):209-220
17. Lang SJ, Giordano MS, Cardon-Cardo C, Summers BD, Staiano-Coico L, Hajjar DP. Biochemical and cellular characterization of cardiac valve tissue after cryopreservation or antibiotic preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:63-67
18. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology of explanted cryopreserved allograft heart valve: Comparison with aortic valves from orthotopic heart transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:118-128
19. Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Structure-function correlations in cryopreserved allograft valves. *Ann Thorac Surg* 1995;60:S108-S113
20. Braun J, Hazekamp MG, Koolbergen DR, Sugihara H, Goffin YA, Huysmans HA. Identification of host and donor cells in porcine homograft heart valve explants by fluorescence in situ hybridization. *J Pathol* 1997;183:99-104
21. Koolbergen DR, Hazekamp MG, Kurver M, et al. Tissue chimerism in human cryopreserved homograft valve explants demonstrated by in situ hybridization. *Ann Thorac Surg* 1998;66(6 Suppl.):S225-S232
22. Koolbergen DR, Hazekamp MG, de Heer E, et al. The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: An analysis of forty explanted homograft valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:689-697
23. Walluscheck KP, Steinhoff G, Haverich A. Endothelial cell seeding of native vascular surfaces. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11:290-303
24. Zeltinger J, Landeen LK, Alexande HG, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valve. *Tissue Eng* 2001;7:9-22
25. Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng* 2001;6:75-79

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、シルク表面にヒ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¹

¹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 (エマルジョン法)。得られた粒子を洗浄後、乾燥させ、800℃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) を粉砕・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℃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：エマルジョン法を反応温度25℃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℃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で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實現するもの、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實現するべきであるが、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實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誘起され、常圧でも安定な分子構造体を得られる。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。この技術は従来的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。

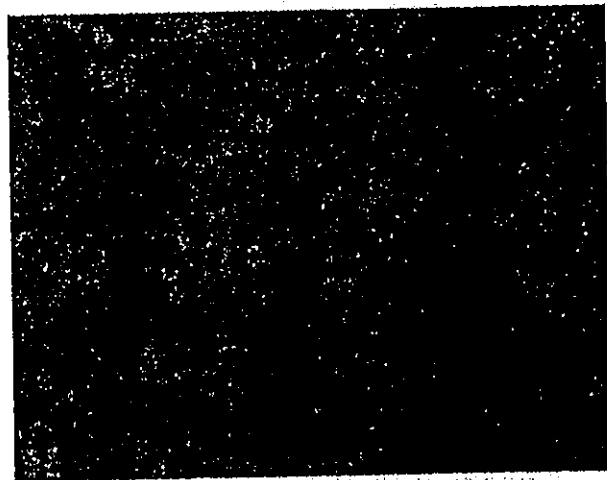


Figure 1. Uptake of PVA/rhodamine labeled plasmid DNA Composites by RAW cells.(After 24hr incubation)

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づ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。

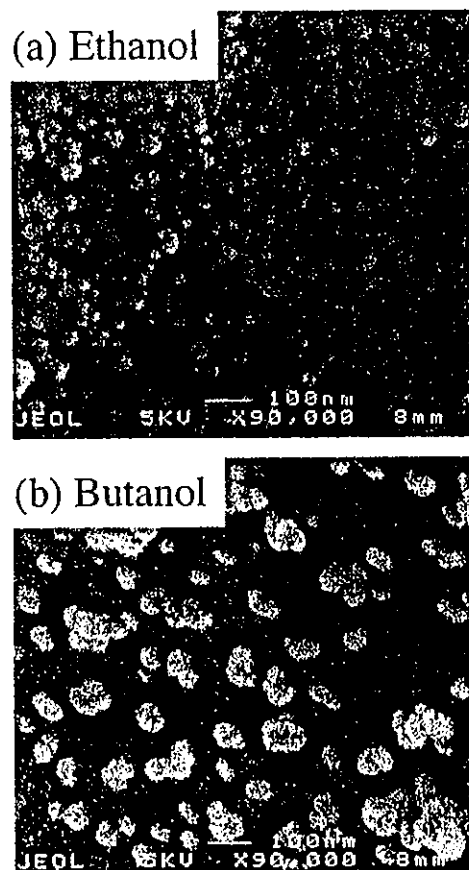


Fig. 1 SEM photographs of the surfaces of hydroxyapatite (HAp)/silk fibroin (SF) composites. The HAp particles were adsorbed onto SF fibers in (a) ethanol, (b) butanol.

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; ⁴Biocmaterials 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

¹National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

²Shinshu University, Matsumoto, Nagano, Japan

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

⁴Suzuka 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.

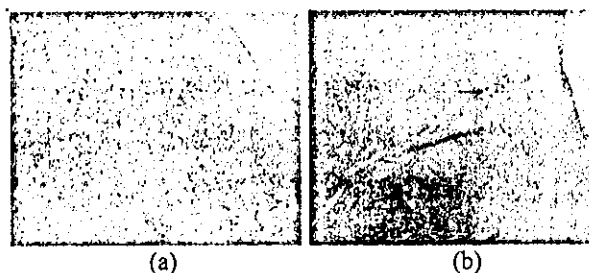


Figure 1. (a) Leaflet and (b) its base tissue of the porcine aortic valve treated by the cold isostatic pressing of 10,000 atm for 10 min.

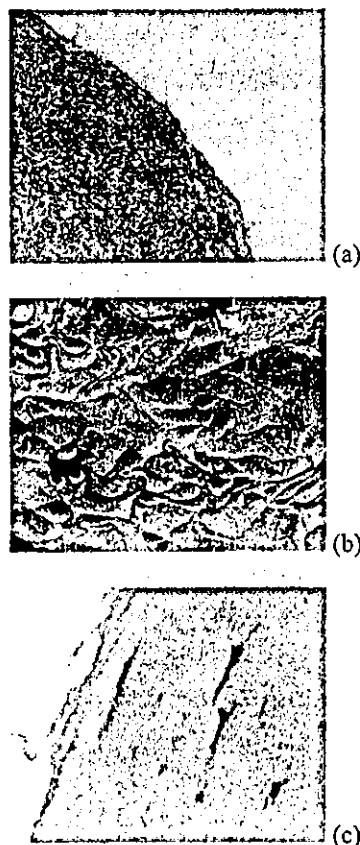


Figure 2. (a,b) Endothelial cells seeded onto the surface of the acellularized scaffold by roller culture bioreactor and (c) vascular wall cells into the scaffold by cell injector.

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

3J07 超高压処理による高分子複合体形成とその医用材料としての応用

(国立循環器病センター研究所・生体工学部)

○岸田晶夫・木村 剛・古菌 勉・藤里俊哉

(関西大学・工学部) 奥野 暁、大矢裕一、大内辰郎

(岡山大学・環境理工学部) 六雄伸吾、吉澤秀和

1. 緒言

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。本研究では主としてポリビニルアルコール(PVA)を用い、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。

2. 実験

所定量の PVA を秤量し、1, 5, 10, 20 w/v% 溶液を調製した。これに単独で、あるいは種々の濃度で調製したサイズマーカー用 DNA および GFP 遺伝子を組み込んだプラスミド溶液を添加し、PE 製ポリ袋で密封し、超高压処理装置 (Dr. CHFF ; (株) 神戸製鋼所) により所定条件(圧力、時間)で加圧した。PVA の 構造体形成については顕微鏡観察、DNA との複合体形成についてはゲル電気泳動によるパターン変化の観察等の検討を行って評価した。また、プラスミドとの複合体については、遺伝子導入のモデル実験を行った。

3. 結果と考察

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

DNA マーカーを用いて電気泳動パターン変化を観察したところ、複合体形成に伴うスミアなバンドが観察された。用いる PVA の種類を変化させ、さらに混合条件について検討したところ、分子量依存性が観察されたものの、濃度については大きな影響は認められなかった。これらを顕微鏡観察では、上記の PVA 溶液と同様に粒子形態をとっていた。プラスミド DNA との複合体形成も同様に観察され、これを RAW 細胞に添加したところ、粒子形成が観察された PVA との組み合わせの場合に、細胞内への取り込みが観察された (Fig.1)。この結果から、超高压処理による高分子-遺伝子複合体は、粒子状の形態をとる場合には、遺伝子デリバリー担体としての応用が期待されることが明らかとなった。

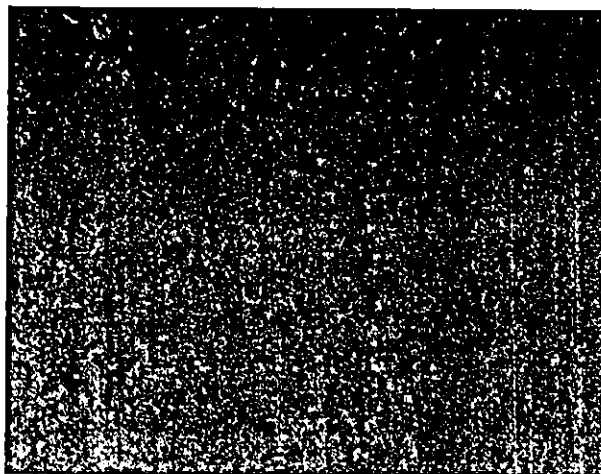


Figure 1. Uptake of PVA/rhodamine labeled plasmid DNA Composites by RAW cells.(After 24hr incubation)

Preparation of DNA-Polymer Composite using Ultra-High Pressure Technique and Their Application as Medical Materials, Akio Kishida, Tsuyosi Kimura, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato (Natl Cardiovasc Center Res Inst), Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ohuchi (Kansai University), Shingo Mutuso, Hidekazu Yoshizawa (Okayama University), 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, TEL:06-6833-5012, FAX:06-6833-5476, email:kishida@ri.ncvc.go.jp

0A6-2 超高压処理による安全な再生型移植組織

○藤里 俊哉¹、吉田 謙一²、西岡 宏³、湊谷 謙司⁴、庭屋 和夫⁴、
岸田 晶夫⁵、中谷 武嗣⁶、北村 惣一郎⁷

¹国立循環器病センター再生医療部 ²先端医療振興財団

³ヒューマンサイエンス振興財団 ⁴国立循環器病センター心臓血管外科

⁵国立循環器病センター生体工学部 ⁶国立循環器病センター臓器移植部

⁷国立循環器病センター

我々は、同種あるいは異種生体組織からドナー由来細胞を除去した脱細胞化生体スキャフォールドに、*in vitro*にて患者の自己細胞を組織内に組み込むことで、あるいは細胞誘導因子等を組み込むことで、再生型移植組織の開発を行っている。移植後に自己組織と置換される再生型移植では、現在では不可能な、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う移植組織の成長が期待できる。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同種移植実験について検討した。

ドナーとなるクラウン系ミニブタ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を用いた超高压印加処理を行うことでドナー由来細胞を除去した。処理後の組織を、組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。また、組織を細切してDNAを抽出後、ブタ内在性レトロウイルス (PERV) のDNAを増幅し、PCR産物を電気泳動することで、組織内PERVを測定した。さらに、同種ミニブタを用い、左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術により、脱細胞化した下行大動脈と置換した。移植1及び3ヶ月後に移植組織を摘出し、組織学的に評価した。

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。組織内のPERVは全く検出されなかった。左心系である下行大動脈置換術においても破断等の所見は認められなかった。コラーゲン繊維等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。血管内腔面は、移植1ヶ月後においても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。

超高压処理による脱細胞化によって、安全な移植組織が得られた。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。なお、本研究の一部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。

Novel tissue processing for xenograft valve transplantation secure from xenogeneic rejection and unknown animal related infection

Toshia Fujisato, Kenji Minatoya*, Kazuo Niwaya*, Akio Kishida#, Takeshi Nakatani§, Soichiro Kitamura*.

Regenerative Medicine & Tissue Engineering, *Cardiovascular Surgery, #Biomedical Engineering, §Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan.

Introduction: Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogeneic matrices have been widely studied to have more durability with growth potential and less immunogenicity than the current bioprostheses. Whereas they have still several problems to be solved such as degradation control of biodegradable polymeric scaffolds and transfer of unknown animal related infectious diseases. Our novel tissue processing of acellularization by ultrahigh pressure treatment for the safe valve transplantation was reported.

Methods: Porcine tissues of heart valves, blood vessel, and trachea were isolated under sterile condition and treated by a cold isostatic pressing (CIP) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C for acellularization of donor cells. They were then washed with PBS under microwave irradiation at 4°C and subjected to histological study by the light and electron microscopy, detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement. Porcine endothelial cells were isolated from the femoral artery of a future recipient by enzyme digestion. The cells were expanded for about 3 weeks and then seeded onto the acellular biological scaffold using a roller culture bioreactor for 2 hrs. The seeded cells were then expanded in a pulsatile flow culture bioreactor for 4 days. The results were compared with those of acellularization by a detergent incubation by Triton X-100.

Results: The tissues including tracheal cartilage were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min. There was no PERV detected from the tissue. It has been reported that viruses are mostly inactivated by CIP more than 600 MPa. The TEM study showed that collagen and elastin fibers were maintained in the acellular tissue. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the tissues treated. From the in vitro incubation test, the tissue was disinfected when the CIP was applied to the tissues contaminated by normal bacteria floras. The autologous endothelial cells were uniformly well seeded onto the surface of acellular vascular tissue by the roller culture bioreactor. However, the cells were still remaining deep inside of the tissue and PERV was detected when the tissues were immersed for 24 hr in 1% Triton X-100 for cell removal.

Conclusion: Porcine cells and PERV were removed completely in a short period by the CIP of 980 MPa without changing the biomechanical property. This processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue transplantation.

A tissue engineered aorta and aortic root in a porcine model: novel tissue processing of acellularization by ultrahigh pressure treatment

Kenji Minatoya*, Toshiya Fujisato, Kazuo Niwaya*, Ken-ichi Yoshida, Akio Kishida#, Hitoshi Ogino*, Takeshi Nakatani[§], Soichiro Kitamura*.

Regenerative Medicine & Tissue Engineering, *Cardiovascular Surgery, #Biomedical Engineering, [§]Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan.

Introduction: Several decellularization protocols were reported for tissue engineered grafts based on acellular matrices. Ultrahigh pressure was applied for the acellularization in our novel tissue processing. The aim of this study was to evaluate morphological and histological change of the tissue engineered aorta and aortic root by our novel acellularization protocol after the implantation in a porcine model.

Methods: Porcine descending aorta and aortic root were harvested under sterile condition and treated by a cold isostatic pressing (CIP) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C for acellularization of donor cells. They were then washed with PBS under microwave irradiation at 4°C and subjected to histological study by the light and electron microscopy, detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement. The acellularized porcine aorta or aortic root was implanted at descending aorta in pigs through left thoracotomy. Surgery was carried out with single clamp technique. The animals were sacrificed at 4 weeks and 12 weeks after the implantation. The explanted grafts were examined histologically and biochemically.

Results: The tissues were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min. There was no PERV detected from the tissue. It has been reported that viruses are mostly inactivated by CIP more than 600 MPa. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the tissues treated. The tissues were disinfected in vitro incubation test. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality including its anastomosis. The inner surfaces of the aorta were completely covered with endothelial cells at 12 weeks after implantation. Smooth muscle cells were also observed into the acellular aortic tissue. The valve leaflets were functioning in descending aorta and showed endothelial cells at 4 weeks.

Conclusions: The results of these unique scaffolds in porcine model were encouraging. The novel tissue processing using ultrahigh pressure could be a breakthrough to produce durable and safe bioscaffold for the tissue engineered aorta and aortic root.

PD01 細胞を除去した生物組織由来繊維素材による再生型組織移植

(国立循環器病センター) ○吉田謙一、西岡 宏、澤田和也、藤里俊哉、湊谷謙司
庭屋和夫、中谷武嗣、北村惣一郎
(東京医科歯科大学) 岸田晶夫

1. 緒言

我が国では年間約1万件の心臓弁置換術が施行されており、約7割に機械弁、3割に異種生体弁が使用されている。しかし、機械弁は生体適合性、生体弁は耐久性の問題を抱えたまま使用されているのが現状である。最近、欧米では同種弁から細胞を除去した再生型同種弁の臨床応用が始まり、機械弁や生体弁に優る物として、注目されている。移植後に自己組織と置換される再生型移植では、現在では不可能な、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う移植組織の成長が期待できる。我々は、超高压処理によって生体組織から細胞成分を除去し、残存したコラーゲン繊維を主体とする生体素材をスキヤフォールドとし、レシピエントの自己細胞を播種した再生型組織移植技術の開発を行っている。本報では、ミニブタを用いた脱細胞化大動脈及び肺動脈弁の同種移植実験について報告する。

2. 方法

清潔下にてクラウン系ミニブタ(㈱ジャパンファーム)から心臓弁、下行大動脈を摘出し、超高压静水圧印加処理(㈱神戸製鋼所)及び洗浄処理にて組織内の細胞を除去した。レシピエントとなるミニブタから酵素処理によって採取した血管内皮細胞、平滑筋細胞を増殖させた後、回転並びに循環型バイオリアクター装置を用いて脱細胞化組織に細胞を播種した。得られた再生型組織をミニブタに同所性に移植した。

3. 結果と考察

欧米で臨床化されている再生型同種弁では、トリトンX等の界面活性剤やトリプシン等の酵素などを用いた薬液処理によって脱細胞化している。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や、比較的高圧に耐える必要のある左心系の大動脈弁では破断等の事故報告もある。我々の超高压処理は、組織深部までの完全な脱細胞化が達成されるとともに、組織内のウイルスや細胞内遺伝子に組み込まれた内在性ウイルスも除去あるいは不活化することのできる高い安全性が特徴である。ミニブタを用いた同種移植実験において、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ヶ月後ではほとんど見られなかった。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細胞浸潤を示していた(図1)が、一部領域において若干の石灰化が認められた。現在、より長期の同種並びに異種移植実験によって、安全性や成長性、耐久性を検討しており、数年以内の臨床応用を目指している。

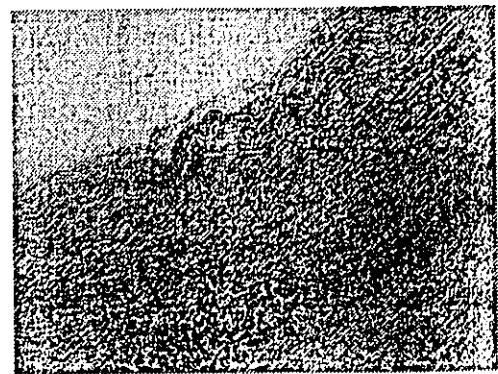


図1. 移植後6ヶ月の下行大動脈壁

4. 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。

Regenerative Tissue Transplantation using Acellular Fibrous Tissue. Ken'ichi YOSHIDA^{1,2}, Hiroshi NISHIOKA^{1,3}, Kazuya SAWADA¹, Toshia FUJISATO¹, Kenji MINATOYA¹, Kazuo NIWAYA¹, Akio KISHIDA⁴, Takeshi NAKATANI¹, Soichiro KITAMURA¹. ¹National 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, ²Foundation for Biomedical Research and Innovation, ³Japan Health Sciences Foundation, ⁴Tokyo Medical and Dental University

1D01

生体組織における細胞膜リン脂質の評価

(国立循環器病セ) ○澤田和也、野木千賀子、殷猛、山崎祥子、藤里俊哉
中谷武嗣、北村惣一郎

(ヒューマンサイエンス振興財団) 西岡宏 (先端医療振興財団) 吉田謙一

[緒言]

わが国では、現在年間 9000 件を超える心臓弁置換術が行われている。そのうち、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駆使し、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圧処理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できる。今後それらの応用化に向け、脱細胞組織のより詳細な評価や、移植後の自己細胞によるリモデリングの促進の検討等が必要である。中でも、移植後の石灰化に大きく関連するとされる、残存リン脂質の評価については、いまだ詳細な検討がなされていない。そこで本報では、生体由来組織の脱細胞評価をより詳細に行うことを目的として、生体組織中に残存するリン脂質の定量法について検討を行った結果について報告する。

[実験]

用いた試料は、ブタ大動脈 ((株) ジャパンファーム) であり、冷間等方圧加圧 (4°C、10,000 気圧) 処理により細胞破壊を行った後所定時間の洗浄を行った。chloroform : methanol (5:1) 溶液中にてホモジナイザーによって組織を粉砕 (10,000rpm 20 分) することでリン脂質を抽出した。粉砕された血管組織はフィルター濾過により除去し、濾液の溶媒を減圧下で蒸発させ固体のリン脂質を得た。得られた固体リン脂質は、所定量の tetrahydrofuran に再溶解させ、リン脂質 C-テストワコー (和光純薬社製) を含む水溶液と混合し、多段階の酵素反応に続く縮合反応によって生成する色素を比色定量した。

[結果および考察]

本検討では、本来水不溶性のリン脂質を水溶液中において比色定量するため、補助溶媒として tetrahydrofuran を用いた。そこで、予め濃度既知のレシチンにより本条件下での比色定量の有効性を確かめた。その結果、得られた色素の吸収スペクトルは、その最大吸収波長が通常の水系に比べ短波長シフトするものの、吸光度とレシチン量との間には高濃度領域まで良好な直線関係が確認された。さらに、種々の重量のブタ血管から本法により抽出したリン脂質量と試料重量との間にも良好な直線関係が得られ、本法による生体組織からのリン脂質抽出法および定量分析の信頼性が確認された。そこで、本法により種々の条件で脱細胞化処理を行ったブタ血管の残存リン脂質評価を行ったところ、脱細胞評価として一般に用いられる、ヘマトキシリン-エオシン染色結果と相違が生じることが判明した。これらの結果は、主として細胞膜に含まれるリン脂質の除去と、細胞核の除去機構を同一視出来ないことを示唆するものであり、本発表ではそれら細胞成分の除去や評価法を中心に述べる。

Colorimetric Determination of Phospholipid in Tissue: Kazuya Sawada: Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Tel 06-6833-5012, Fax 06-6835-5496, e-mail sawada@ri.ncvc.go.jp

(14)-1 超高压処理による脱細胞化生体組織

-3

国立循環器病センター¹、東京医科歯科大学²、先端医療振興財団³、ヒューマンサイエンス振興財団⁴
藤里 俊哉¹、吉田 謙一³、西岡 宏¹、浅谷 謙司¹、
庭屋 和夫¹、岸田 晶夫²、中谷 武嗣¹、北村 惣一
郎¹

【目的】組織再生用の足場には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、多くは生体組織よりも硬く、複雑な形状に成形加工することが容易でない。また、左心系組織では、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。我々は、生体組織から細胞成分を除去し、残存した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。【方法】クラウン系ミニブタの大動脈、心臓弁、及び気管を清潔麻酔下にて採取し、4℃にて10,000気圧の超高压水圧印加処理を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。【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。超高压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が確認された。また、PERVもまったく検出されなかった。異種組織を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。超高压によって、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。移植後に自己組織と置換されるため、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。【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。

(14)-1 人工血管への応用を目指したポリ乳酸筒織り足場での血管内皮細胞培養検討

-4

産業技術総合研究所 バイオニクス研究センター¹、産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門²、産業技術総合研究所 物質プロセス研究部門³、泉工医科工業株式会社⁴
山口 麻奈絵¹、中村 和彦²、小高 正人²、新保 外志夫³、金森 敏幸¹、平河 公一郎⁴、神谷 勝弘⁴、
加来 永一⁴

【目的】我々はTissue Engineeringによる血管や神経軸索などの小口径管状組織の再生を目指し、生体吸収性ポリマーを用いて足場の開発を行っている。これまでポリ-L-乳酸(PLLA)を材料として相転換法により多孔質管状足場を試作し、in vitroでの細胞培養実験で良好な結果を得ている。しかしながら、相転換法で作製した足場は非常に硬くもろいため、血管との縫合が困難であると考えられた。そこでPLLA縫合糸(240デニール)を筒状に織ることにより足場を作製した。この筒織り足場には継ぎ目がなく、さらに枝分かれした足場を作製することも可能である。この足場を用いて正常ヒト血管内皮細胞(HUVEC)の培養を行ったので、その結果について報告する。【方法】内径3mm、長さ10mmのPLLA筒織り足場に、プラズマ後重合法によってGRGDSペプチドを修飾した。5×10⁵cells/mlのHUVEC細胞懸濁液中にペプチド修飾したPLLA筒織り足場を浸せきし、37℃において振とう培養を10分間行い、細胞を均等に播種した。その後足場を洗浄し、新鮮な培地中で1日おきに培地交換を行いながら培養を続けた。培地はすべて10%ウシ血清(FBS)を含んでいるものを用いた。筒織り足場に接着した細胞は顕微鏡(Keyence VH-8000)およびSEMを用いて観察した。【結果および考察】10分間の振とう培養後において、ペプチド修飾した筒織り足場では多くのHUVEC細胞が接着していた。3日後には細胞が良好に伸展している様子が観察され、9日後にはサブコン플レントに達した。細胞と筒織り足場の繊維との接着面をSEMにより詳しく観察したところ、多くの細胞が繊維に沿って伸展しており、繊維と繊維の間をまたいで伸展している細胞も観察された。今回使用した筒織り足場は従来の相転換法により作製した足場に比べて柔軟なため、体内の血管などとの縫合が容易であること、また多孔性が高いためガス交換や物質交換がスムーズであることから、非常に有効な人工血管材料になると考えられる。

国立循環器病センター¹⁾ 再生医療部²⁾、心臓血管外科³⁾、臓器移植部⁴⁾

東京医科歯科大学⁵⁾、先端医療振興財団⁶⁾、ヒューマンサイエンス振興財団⁷⁾

藤里俊哉²⁾、吉田謙一⁶⁾、西岡 宏⁷⁾、沼田 智³⁾、湊谷謙司³⁾、庭屋和夫⁴⁾、菅 理晴²⁾、岸田晶夫⁵⁾、中谷武嗣⁴⁾、北村惣一郎¹⁾

ハイブリッド人工臓器は、人工物のみでは達成し得ない生体機能を生細胞で補充するという概念から、主に肝臓や腎臓といった代謝系の臓器を対象として古くから研究が行われてきた。また、小口径人工血管や人工心臓では、人工基材に血管内皮細胞を播種することで抗血栓性を獲得する研究が同様に進行してきた。しかし、最近の組織工学技術の発展から、特に血管や軟骨のような組織を対象としたものでは、基材に生体内分解吸収性材料を用いることが主流となり、再生医療の主要な柱となっている。我々は、基材として人工の吸収性材料ではなく、脱細胞化した生体組織を用い、患者各個人の細胞をハイブリッド化するテーラーメイド型の組織移植を目指している。脱細胞化組織基材は、移植後、自己細胞の浸潤に伴って自己組織と置換されることが期待される。

クラウン系ミニブタの大動脈及び心臓弁を清潔下に採取し、超高静水圧印加に続けて洗浄処理することで組織内の細胞を除去した（パワーグラフト法）。一方、レシピエントとなるミニブタから血管内皮細胞を酵素処理にて分離し、増殖させた。得られた脱細胞化基材に、回転及び循環培養バイオリクター装置を用いて血管内皮細胞を播種した。

生体組織を基材として用いる場合、その安全性の確保が極めて重要である。パワーグラフト法では、超高静水圧の印加によって組織内の細菌やウイルスが不活化されることを利用しており、完全な脱細胞化に加えて高い安全性も確保される。ブタ組織を使用する際に問題となる内在性レトロウイルスも、全く検出されない。この脱細胞化した血管及び心臓弁基材内腔面には、回転培養バイオリクターを用いることで血管内皮細胞を均一に播種することが可能であり、さらに、循環培養を続けることで、播種した細胞のエクспанションも可能であった。ミニブタへの同種移植実験からは、動脈組織であっても破断等の異常所見は認められず、6ヶ月後には、組織内部の過半領域への平滑筋細胞の浸潤が認められた。数年以内の臨床応用を目指して動物実験を継続中である。

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。

東京医科歯科大学¹⁾、国立循環器病センター²⁾、再生医療部³⁾、心臓血管外科⁴⁾
臓器移植部⁵⁾、先端医療振興財団⁶⁾、ヒューマンサイエンス振興財団⁷⁾

岸田晶夫、藤里俊哉³⁾、吉田謙一⁶⁾、西岡 宏⁷⁾、沼田 智⁴⁾、湊谷謙司⁴⁾、庭屋和夫⁵⁾、
菅 理晴³⁾、中谷武嗣⁵⁾、北村惣一郎²⁾

現在、人工血管、人工弁は広く用いられており、最も成功した人工臓器のひとつである。これらの血行再建に関わる人工臓器の今日の問題点は、①より高い血液適合性、②成長性、③より高い安全性、信頼性などが上げられる。これは、小口径人工血管など未だ実用化されていないものの開発の他に、開発当初の人工臓器に要求された「救命」という目的から「QOLの改善」に目的が広がっていることによる。これらの問題点の解決法として、新しい技術である再生医学が取り入れられている。すでに、新岡らによって小児への肺動脈系血行路への再生医学を駆使した人工血管が臨床応用されており、優れた成績と成長性が期待されている。このように再生医療は今後、ますます応用の範囲が広がると期待されている。

我々も、小口径人工血管、心臓弁あるいは成長性を有する大動脈系血行路再建を目指した再生医学に取り組んでいる。我々の方法論は、人工の吸収性材料ではなく、脱細胞化した生体組織を基材として用いるものである。広義の再生医療では、細胞移植ならびに足場材料のみを用いた組織再生から、患者自身の細胞をハイブリッド化するテーラーメイド型の組織移植、あるいは心、肝、腎などの臓器再生などが含まれるが、血行再建においては形質的機能不全を早期に治療する必要性が高いため、まず出来るだけ単純でかつ効果の高い技術の開発に挑戦している。異種組織移植を視野に入れ、ブタの大動脈及び心臓弁を、超高静水圧にて処理し、さらに洗浄処理して組織内の細胞を除去する（パワーグラフト法）。ミニブタへの同種移植実験では、6ヶ月経過後で良好な結果が得られている。

再生医学の場合、足場が分解する、移植細胞が減少する、移動する、など、人工物にあった「恒久性」の概念がなく、それ故に信頼性を確保するまでに、時間が必要である。これまでの人工物を主体とした技術の長所である「耐久性」と、再生医学の長所である「高機能」を上手に組み合わせることによって、新しい治療技術の開発のヒントが得られるかもしれないと期待している。

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。