

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 丞休²

¹順天堂大学 医学部 整形外科, ²京都大学再生医学研究所

【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、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 大学院医歯学総合研究科, 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-16-5 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⁵, 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圧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、超高圧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-16-6 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处理することでホモグラフトの欠点を克服しようと考え、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 has 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.

NEWS
SCAN

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

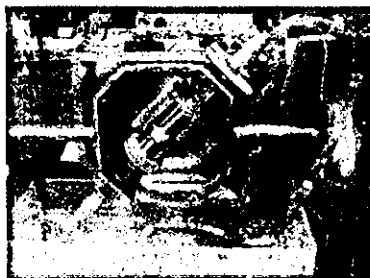
3) 同様の肺動脈弁の実験から期待

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

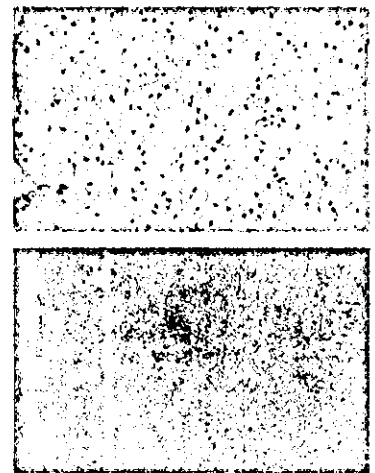
4) 特殊な装置で1万気圧に加圧

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ばきと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、電子レンジなどと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利用。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。約一万年庄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そ半年間保てた。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

湿度で磁力の向き変わる金属
東大が発見

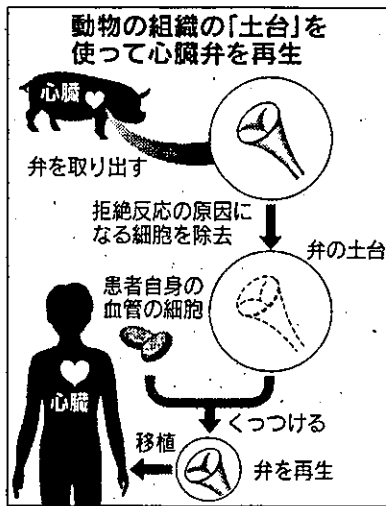
東京大学の太越慎一・助教教授らは湿度により磁力や磁界の向きが変わる金属材料を発見した。温度によって磁力が変化する物質はあったが、湿

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「ブルシアンプル」磁性体という化合物で、湿度を

している。ただ人工弁では血栓がでやすいほか、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。

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、再生医療の新たな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

などの新手法は肝臓や器官などもっと複雑な組織の再生に有望。将来は臓器を丸ごとつくれる可能性もある。

臓器や組織を建物に例えると、構造を支える鉄筋コンクリートと外側の壁の部分に分けられる。

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。

