

## 2. 学会発表

- 1) 藤里俊哉, 笹山典久, 西岡 宏, 吉田謙一, 澤田和也, 殷 猛, 山崎祥子, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 森反俊幸, 中谷武嗣, 高野久輝, 服部博行, 北村惣一郎. 循環器組織再生のためのスキャフォールド材料. 第44回日本生体医工学会大会. つくば. 2005年4月25~27日. 生体医工学 2005; 43 (suppl 1): 269.
- 2) Fujisato T, Minatoya K, Yin M, Yamazaki S, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular Tissue Regeneration Using Acellular Scaffold In Porcine Model. Society For Biomaterials 30th Annual Meeting, Memphis, USA. Apr 27-30, 2005. Transactions of the 30th Annual Meeting 2005; 376.
- 3) Kishida A, Kimura T, Okuno A, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshikawa H, Miyazaki K, Fujisato T, Furuzono T. Preparation Of DNA-polymer Composite Using Ultra-High Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier. Society For Biomaterials 30th Annual Meeting, Memphis, USA. Apr 27-30, 2005. Transactions of the 30th Annual Meeting 2005; 471.
- 4) 木村 剛, 南 広祐, 岩井彩夏, 森反俊幸, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压処理により形成したPVA/DNAハイドロゲルからのDNA徐放解析. 第54回高分子学会年次大会. 横浜. 2005年5月25~27日. Polymer Preprints, Japan 2005; 2140.
- 5) 岸田晶夫, 木村 剛, 草間 淳, 石丸正臣, 増澤 徹, 藤里俊哉. 微小振動による細胞の接着制御の検討. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60 (2): 41.
- 6) 藤里俊哉, 澤田和也, 吉田謙一, 西岡 宏, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体素材を用いた組織再生. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60 (2): 42.
- 7) 澤田和也, 野木千賀子, 西岡 宏, 吉田謙一, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体由来繊維からの脱細胞化手法の開発. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60 (2): 43.
- 8) 藤里俊哉, 澤田和也, 寺田堂彦, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生型組織移植のための脱細胞化処理法の開発. 第4回日本組織移植学会・学術集会. 大阪. 2005年8月27日. 日本組織移植学会雑誌 2005; 4 (1): 33.
- 9) Kishida A, Kimura T, Furuzono T, Fujisato T, Masuzawa T. NANO-VIBRATING CELL CULTURE SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING. 4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY. Munich, Germany. Aug 31-Sep 3, 2005. Final Programme 2005; LII.
- 10) Fujisato T, Sasayama N, Yin M, Yamazaki S, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Takano H, Hattori H. Regeneratibe vascular graft made of collagen fiber. 4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY. Munich, Germany. Aug 31-Sep 3, 2005. Final Programme 2005; XX.
- 11) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用. 第49回日本学術会議材料研究連合講演会. 京都. 2005年9月15~16日.
- 12) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 木村 剛, 中谷武嗣, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 北村惣一郎. 脱細胞化生体組織の再生医療用スキャフォールドとしての応用. 第49回日本学術会議材料研究連合講演会. 京都. 2005年9月15~16日.
- 13) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体素材を用いた再生型人工心臓弁. 高分子学会討論会. 山形. 2005年9月20~22日. Polymer Preprints, Japan 2005; 54 (2): 5012.
- 14) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压法によるナノ無

- 機粒子／高分子コンポジットの調整と遺伝子キャリアーへの応用. 第54回高分子討論会. 山形. 2005年9月20～22日. *Polymer Preprints, Japan* 2005; 54 (2): 5201-2.
- 15) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. ナノ無機粒子を内包した超高压誘起PVA/DNA複合体による細胞への遺伝子導入. 第54回高分子討論会. 山形. 2005年9月20～22日. *Polymer Preprints, Japan* 2005; 54 (2): 5199-200.
  - 16) Fujisato T, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Host cell infiltration to transplant acellular allografts in porcine model. The 8th TESI Annual Meeting. Shanghai, China. Oct 22-25, 2005. Final Program and Abstract Book 2005; 345.
  - 17) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 永谷憲歳, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高压静水压印加処理による生体組織からの細胞除去と再生医療への応用. 第46回高压討論会. 室蘭. 2005年10月29～31日. *The Review of High Pressure Science and Technology* 2005; 15 (special): 45.
  - 18) 木村 剛, 南 広祐, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压静水压処理による分子集合体の開発. 第46回高压討論会. 室蘭. 2005年10月29～31日. *The Review of High Pressure Science and Technology* 2005; 15 (special): 141.
  - 19) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 岸田晶夫, 船本誠一, 藤里俊哉, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. バイオスキャフォールド調製に向けた生体由来組織の超臨界流体処理. 第46回高压討論会. 室蘭. 2005年10月29～31日. *The Review of High Pressure Science and Technology* 2005; 15 (special): 191.
  - 20) 木村 剛, 南 広祐, 三浦義之, 栗田公夫, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製. 第14回ポリマー材料フォーラム. 東京. 2005年11月15～16日. *Polymer Preprints, Japan* 2005; 171.
  - 21) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生医療用バイオスキャフォールド作製のための構造タンパク加工. 第27回バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28～29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 158.
  - 22) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化したミニブタ血管の同種移植. 第27回日本バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28～29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 194.
  - 23) 木村 剛, 南 広祐, 三浦義之, 栗田公夫, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調整と生医学材料としての応用. 第27回日本バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28～29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 227.
  - 24) 岸田晶夫, 南 広祐, 木村 剛, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高压処理による脱細胞化生体組織への化学修飾法の検討. 第43回日本人工臓器学会大会. 東京. 2005年11月30日～12月2日. *人工臓器* 2005; S-152.
  - 25) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 藤里俊哉. 超高压静水压印加処理を用いる脱細胞化スキャフォールドの開発. 第43回日本人工臓器学会大会. 東京. 2005年11月30日～12月2日. *人工臓器* 2005; S-152.
  - 26) Suga M, Fujisato T, Nakanani T. Availability of Ultra-High Pressure Method for the Preparation of Decellularized Tracheal Grafts. The 12th International Conference on Biomaterial Engineering. Singapore. Dec 7-10, 2005. *IFMBE Proceedings* 2005; 12: 151.
  - 27) Fujisato T, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Hashimoto S, Nakatani T, Kitamura S. PowerGraft: A virus-free acellular scaffold by detergent-free treatment. The 12th International Conference on

- Biomaterial Engineering, Singapore. Dec 7-10, 2005. IFMBE Proceedings 2005; 12: 152.
- 28) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 構造タンパクの酵素処理によるバイオスキャフォールド調整. 第21回ライフサポート学会大会. 三重. 2005年12月8~9日. 第3回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2005; 98.
- 29) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 船本誠一, 西岡 宏, 吉田謙一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 村越彩子, 木村 剛, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化生体組織 (バイオスキャフォールド) の再細胞化. 第21回ライフサポート学会大会. 三重. 2005年12月8~9日. 第3回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2005; 99.
- 30) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 岸田晶夫, 船本誠一, 藤里俊哉, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超臨界技術を利用した再生医療用スキャフォールド調整. 日本機械学会第18回バイオエンジニアリング講演会. 新潟. 2006年1月13~14日. 第18回日本バイオエンジニアリング講演会論文集 2005; 95-6.
- 31) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 藤里俊哉. 脱細胞組織のエタノール処理による力学特性への影響. 日本機械学会第18回バイオエンジニアリング講演会. 新潟. 2006年1月13~14日. 第18回日本バイオエンジニアリング講演会論文集 2005; 97-8.
- 32) 鳴海敏行, 黒岩貴文, 湊谷謙司, 吉田謙一, 船本誠一, 寺田堂彦, 森反俊幸, 永谷憲歳, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣. ミニブタへの同種脱細胞化動脈の移植における残存リン脂質の影響. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 128.
- 33) 村越彩子, 大富美智子, 吉田謙一, 船本誠一, 南 広祐, 木村 剛, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高静水圧処理法によるバイオスキャフォールドの調整における圧力印加条件の検討. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 128.
- 34) 澤田和也, 寺田堂彦, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超臨界流体抽出による生体組織の脱細胞化. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 202.
- 35) 緒方裕之, 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 非石灰化を目指したエラスチン除去バイオスキャフォールドの作製. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 203.
- 36) 船本誠一, 吉田謙一, 菊池正博, 小林泰彦, 藤里俊哉, 山岡哲二, 岸田晶夫, 中谷武嗣. 放射線照射を前処理とした生体組織の脱細胞化処理. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 204.
- 37) 黒岩貴文, 鳴海敏行, 笹山典久, 湊谷謙司, 吉田謙一, 船本誠一, 森反俊幸, 白数昭雄, 永谷憲歳, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 高野久輝. ミニブタ置換移植におけるコラーゲン製人工血管への細胞浸潤. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 204.
- 38) 橋本良秀, 川喜田 正夫, 吉田謙一, 船本誠一, 木村 剛, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高静水圧処理法による脱細胞化骨・骨髄組織の調整と組織再構築の検討. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 218.
- 39) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 藤里俊哉. 再生型筋組織の構築を目的とした脱細胞化筋スキャフォールドの作製. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8~9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 204.
- 40) 山岡哲二, 中野順子, 藤原知子, 藤里俊哉, 木村良晴. 完全生体吸収性ゲル化材料による細胞注入システムの開発. 第43回人工臓器学会大会. 2005年11月30日~12月2日. 東京.

3. 新聞報道等

- 1) 超テク誕生 日本の現場. 日本経済新聞社.
- 2) 日刊工業新聞. 2005年9月9日号.
- 3) 日経ナノテクノロジー. 2005年9月11日号.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

- 1) 藤里俊哉, 山岡哲二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体組織マトリックスへの細胞播種方法. 特許出願2005-180344. 2005年6月21日.
- 2) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 澤田和也, 中谷武嗣. 超臨界二酸化炭素による移植用生体組織の脱細胞化处理. 特許出願2005-296067. 2005年10月21日.
- 3) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 澤田和也, 中谷武嗣. 生物由来スキャフォールドの作製方法. 特許出願2005-299590. 2005年11月19日.

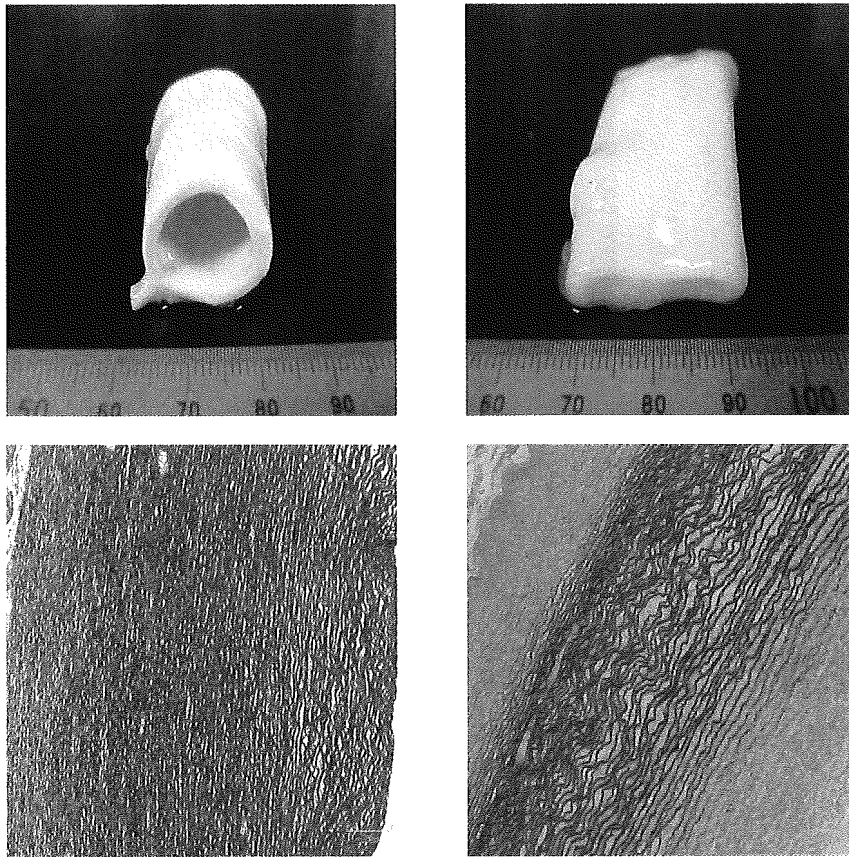


図1. ブタ大動脈組織のエラスターゼ処理  
 (上：外観、下：EVR染色、左：未処理、右：エラスターゼ12時間処理)

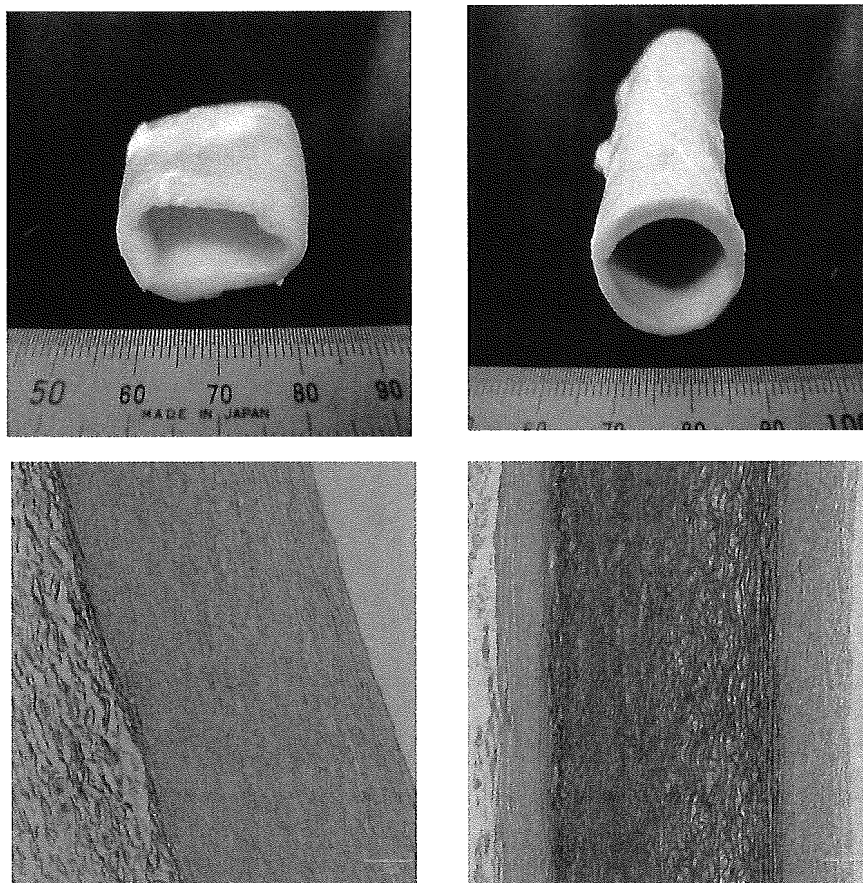


図2. 架橋ブタ大動脈組織のエラスターゼ処理 (エラスターゼ12時間処理)  
 (上：外観、下：EVR染色、左：GA0.01%24時間、右：GA1%24時間)

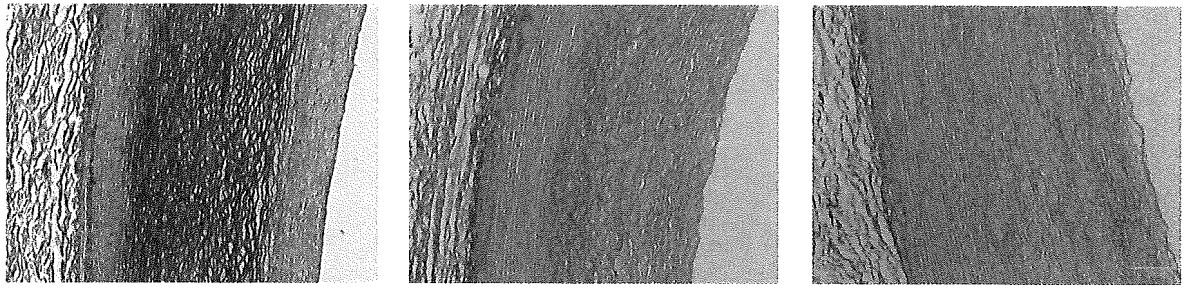


図3. 架橋ブタ大動脈組織のエラスターゼ処理 (GA0.07%)  
(左: エラスターゼ24時間、中: 48時間、右: 72時間処理)

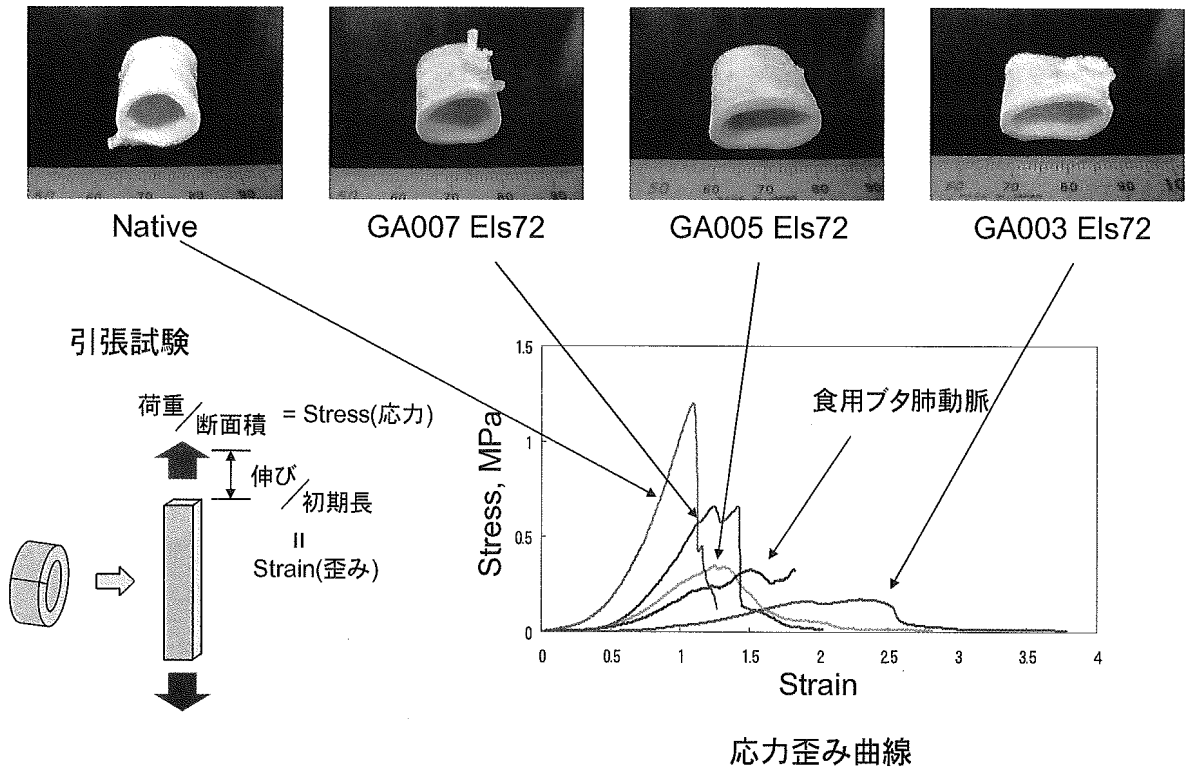


図4. 架橋ブタ大動脈組織のエラスターゼ処理による力学特性への影響

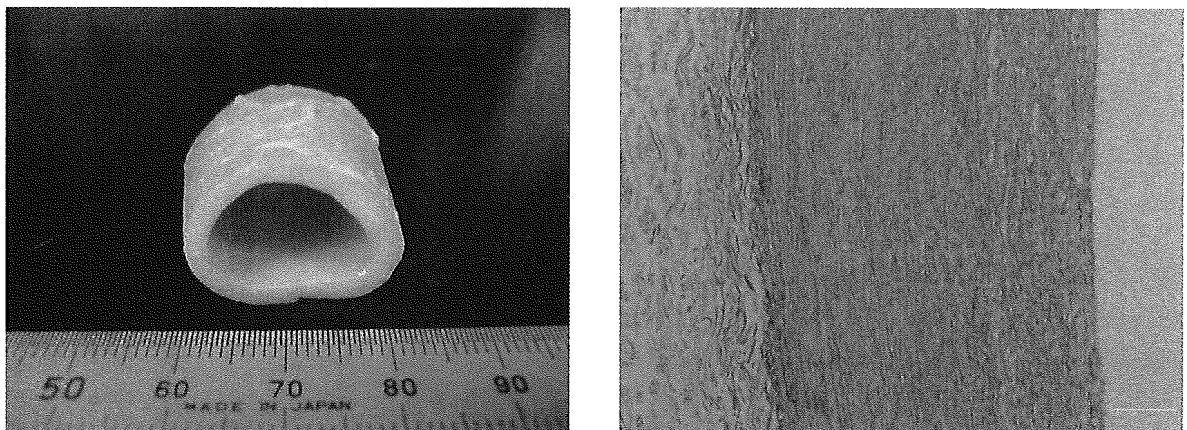


図5. 至適条件下における架橋ブタ大動脈組織のエラスターゼ処理  
(GA0.07%、エラスターゼ72時間処理)

再生医療型素材の開発（機能性の付与）

分担研究者 岸田晶夫 東京医科歯科大学生体材料工学研究センター教授

研究要旨 超高静水圧印加法によって得られた脱細胞化生物組織およびコラーゲンなどの優れた力学特性を有する生物由来組織を再生医療用基盤材料として応用するため、新しい加工法および修飾法による高機能化を実現するための検討を行った。

A. 研究目的

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い心臓弁、小口径血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料として生体内分解吸収性の合成材料が多く用いられている。しかし、これらの材料は加工が困難で、物性が生体のものとは大きくことなる。これらを解決するために、我々は新しい処理法による脱細胞化生物組織および生物素材の積極的な応用を試みている。本研究では、優れた力学特性を有する生物由来組織の高機能化を実現するための、新しい加工法について検討を行った。具体的には、脱細胞化組織あるいはそれを構成しているタンパク質であるコラーゲンをモデル物質として選択し、これを生体適合性材料であるリン脂質ポリマーなどを結合させたり、合成高分子を高密度の表面に集積させる分子ブラシ表面を創出する技術を用いて、細胞接着性あるいは抗血栓性などの機能を付与する。コラーゲンは組織再生の足場材料として優れた特性を有しているものの、血液凝固性であり、また、組織再生に必要な増殖因子等の外部からの供給も必要であり、万能の素材ではない。人工血管としての抗血栓性の確保、組織再生スキャフォールドとしての再生促進を導入する機能に設定し、血液適合性材料（ヘパリン、ポリエチレングリコールなど）、タンパク質、遺伝子およびハイドロキシアパタイト

ト等の複合化について検討を行う。従来、これらの機能分子を単純に混合するのみでは、早期に機能消失してしまうため効果的な機能発現ができず、化学的に結合すると安定化するが、副生成物や未反応物の除去あるいは分解後の安全性の担保など多くの問題を抱えることとなる。本研究では、これらの問題点の克服のための要素技術について検討を行った。

B. 研究方法

生体由来スキャフォールドへの機能性分子の複合化について検討した。複合化する機能性分子として、抗血栓性付与のためにリン脂質ポリマーデキストラン、ポリエチレングリコール、およびヘパリン、また細胞接着性のために血清タンパク質、ハイドロキシアパタイト、さらに遺伝子発現のためにプラスミドベクターが候補物質となる。昨年度は、リン脂質ポリマーのコラーゲンへの複合化を行った。本年度は、リン脂質ポリマー複合化コラーゲンの詳細な物性解析を行い、得られた知見を複合化条件にフィードバックし、さらなる高機能化材料の創出への検討を行った。リン脂質ポリマー複合化スキャフォールドの機能については、培養細胞を用いたin vitroでの評価およびラットを用いたin vivoでの評価を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日法律第105号）、及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日総理府告示第6号）に

基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤を用い動物の苦痛の軽減に努め、また、実験計画を綿密に練ることにより、不必要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するように努めた。

### C. 研究結果

脱細胞化組織やコラーゲン表面改質として、生体適合性高分子であるリン脂質ポリマーを組み込む方法を検討した。これにより、コラーゲンの表面物性である細胞接着性、血液凝固性を抗凝固的表面に改質されると考えられる。リン脂質ポリマーとしては、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ユニットを有する Poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) を使用し、コラーゲンとの架橋を行った。具体的には、図1に示すように、PMAのカルボキシル基を無毒性の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-1-カルボジイミド塩酸 (EDC) とN-ヒドロキシスシニルイミド酸 (NHS) にて活性化し、コラーゲンのアミン基と反応させた。このようにポリマーを架橋させることで、血圧のかかる部位の血管における利用が可能になると考えられる。本手法は、脱細胞化組織にも適用されると考えられる。またEDCとNHSは、コラーゲンと反応させるとコラーゲン自身のカルボキシル基とアミン基が反応し、コラーゲンゲル (E/Nゲル) が得られる。このことから、以下の2つの方法にてPMA架橋化コラーゲンを作製した。まず、コラーゲンゲル (Ucゲル) とEDC/NHSにて活性化したPMAを反応させ、PMA架橋化ゲルを得た。これをMiC-0ゲルとする。再びPMAを反応させたゲルをMdC-0ゲルとし、三度PMAを反応させたゲルをMtC-0ゲルとした。一方、コラーゲンゲル自身をEDC/NHSにて架橋したE/NゲルとEDC/NHSにて活性化したPMAとを反応させてPMA架橋化ゲルを得た。これをMiC-1ゲルとする。再びPMAを反応させたゲルをMdC-1ゲルとし、三度PMAを反応させたゲルをMtC-1ゲルとした。これらを表1にまとめた。

表1. 作製した PMA 架橋化コラーゲンゲル

Ucゲル	未架橋コラーゲンゲル
MiC-0	UcゲルへのPMA架橋 (1回)
MdC-0	UcゲルへのPMA架橋 (2回)
MtC-0	UcゲルへのPMA架橋 (3回)
E/Nゲル	EDC/NHS架橋コラーゲンゲル
MiC-1	E/NゲルへのPMA架橋 (1回)
MdC-1	E/NゲルへのPMA架橋 (2回)
MtC-1	E/NゲルへのPMA架橋 (3回)

これらのPMA架橋化コラーゲンゲルの詳細な物性検討を種々の方法により行った。まず、X線光電子分光解析法を使ってPMAの固定化を確認した。134eVリン由来のピークがPMA架橋化ゲルのみで認められたが、Uc-ゲルとE/Nゲルでは認められなかった。走査電子顕微鏡を用いたゲルの表面と断面の観察結果を図2、3に示す。Uc-ゲル、E/N-ゲルでは凸凹を有する表面であり、PMA架橋ゲルでは平らであり、PMA架橋回数の増加にともない平らな表面となった。また、断面は多孔性構造の内部と緻密な構造の外部の層分離されていることが分かった。PMA架橋回数の増加により、外部の緻密な層が厚くなっていったことからPMAはコラーゲンゲルの表面に固定化されていることが明らかとなった。次に、接触角測定を行った結果、PMA導入による接触角の減少が認められ、PMA架橋回数によりさらに接触角の減少が示された (図4)。この結果においてもゲル表面でのPMAの固定化が示された。膨潤実験の結果、全てのゲルにおいて酸性条件での膨潤度が高く、中性条件での膨潤度が低く、また、ゲルが架橋されると酸性条件と中性条件とも膨潤度が低かった (図5)。これは、未反応のアミン基の存在を示しており、PMAの架橋密度が向上し膨潤度が低くなったと考えられる。コラーゲナーゼによる生分解性を調べた結果、架橋度が上がると共に分解が遅くなった (図6)。具体的には、PMA架橋回数の増加に伴う分解速度の減少が示され、また、UcゲルへのPMA架橋に比べ、E/NゲルへのPMA架橋の場合で分解抑制が示された。コラーゲナーゼはヘリックスを切断する酵素であり、PMAの固定化は水の吸収を抑制し、コラーゲナーゼの浸透を防ぐ効果があると考えられ、コラーゲナーゼが吸収されてヘリックスが分解された場合でもPMAとコラーゲンの間の結合が維持され、分解速度は遅くなると考えられる。これは低い膨潤度と緻密なネットワーク形成に



より、コラゲナーゼがゲル中に浸透し難いためであると考えられる。細胞接着実験の結果を図7に示す。PMA架橋により、細胞接着の有意な抑制が示された。以上の結果から、PMAゲルの有用性がしめされ、今後、脱細胞化組織への適用を行う。

#### D. 考察

生物従来製の架橋剤の多くは疎水性のために長期の埋植にて石灰化が生じることが問題となっているが、本法で用いた活性化剤であるEDCとNHSは毒性であるため、本架橋法では低減されると考えられる。得られた反応生成物の物性検討では、微小構造の物性への影響が示され、ナノレベルの考察の必要性が示唆された。特に、分子レベルでの相互作用や結合法がマクロレベルでの特性に大きな影響を与える。再生医療用スキャフォールドとして、複合体の研究が今後ますます重要性をましていくと考えられる。

#### E. 結論

細胞非接着性物質による脱細胞化組織の修飾について、モデル物質を用いて検討を行った。ここで提案した新しい方法で、埋植材料に必要な安全性、非毒性を念頭においた実験系を構築し、得られた修飾体の物性を詳細に検討した結果、有用性が示され、当初の目的の反応生成物が得られた。この技術を用いて、非接着性や抗血栓性などが必要な場合には非接着性分子を複合化して用いることが可能となる。今後、動物を用いた検討において、これらの有用性を今後検討していく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Korematsu A, Furuzono T, Kishida A. Synthesis of block copolymers containing chain-controlled aramid and fluorethylene segments. *Macromol Mater Eng* 2005; 290: 66-71.
- 2) Furuzono T, Walsh D, Yasuda S, Tanaka J, Kishida A. Preparation of plated  $\beta$ -tricalcium phosphate containing of hydroxyapatite for use in bonded inorganic-organic composites. *J. Mater Sci Lett* 2005; 40 (9-10): 2595-7.
- 3) 岸田晶夫. 生体適合性評価法. In 樋口亜紺

編 医療用マテリアルと機能膜. シーエムシー出版, 東京. 2005; 51-60.

- 4) 岸田晶夫. 人工心臓膜. In 樋口亜紺編 医療用マテリアルと機能膜. シーエムシー出版, 東京. 2005: 82-8.
- 5) 古菌勉, 岸田晶夫. 再生医療 ナノアパタイト. *Bio Industry* 2005; 22 (5): 54-9.
- 6) 岸田晶夫. 生体材料の遺伝子発現による評価. *材料の化学と工学* 2005; 42 (4): 18-22.
- 7) 岸田晶夫, 藤里俊哉. 再生医療用材料. *再生医療* 2005; 4 (4): 70-7.
- 8) 岸田晶夫. 再生医療のための脱細胞化生物組織 (バイオスキャフォールド). *生体材料工学研究所年報* 2005; 39: 9-12.

#### 学会発表

- 1) 藤里俊哉, 笹山典久, 西岡 宏, 吉田謙一, 澤田和也, 殷 猛, 山崎祥子, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 森反俊幸, 中谷武嗣, 高野久輝, 服部博行, 北村惣一郎. 循環器組織再生のためのスキャフォールド材料. 第44回日本生体医工学会大会. つくば. 2005年4月25~27日. *生体医工学* 2005; 43 (suppl 1): 269.
- 2) Fujisato T, Minatoya K, Yin M, Yamazaki S, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Vascular Tissue Regeneration Using Acellular Scaffold In Porcine Model. Society For Biomaterials 30th Annual Meeting, Memphis, USA. Apr 27-30, 2005. *Transactions of the 30th Annual Meeting* 2005; 376.
- 3) Kishida A, Kimura T, Okuno A, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshikawa H, Miyazaki K, Fujisato T, Furuzono T. Preparation Of DNA-polymer Composite Using Ultra-High Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier. Society For Biomaterials 30th Annual Meeting, Memphis, USA. Apr 27-30, 2005. *Transactions of the 30th Annual Meeting* 2005; 471.
- 4) 木村 剛, 南 広祐, 岩井彩夏, 森反俊幸, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压処理

- により形成したPVA/DNAハイドロゲルからのDNA徐放解析. 第54回高分子学会年次大会. 横浜. 2005年5月25~27日. Polymer Preprints, Japan 2005; 2140.
- 5) 岸田晶夫, 木村 剛, 草間 淳, 石丸正臣, 増澤 徹, 藤里俊哉. 微小振動による細胞の接着制御の検討. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60(2): 41.
  - 6) 藤里俊哉, 澤田和也, 吉田謙一, 西岡 宏, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体素材を用いた組織再生. 平成17年度繊維学会年次大会. 岐阜. 2005年6月8~10日. Fiber Preprints, Japan 2005; 60(2): 42.
  - 7) 藤里俊哉, 澤田和也, 寺田堂彦, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生型組織移植のための脱細胞化処理法の開発. 第4回日本組織移植学会・学術集会. 大阪. 2005年8月27日. 日本組織移植学会雑誌 2005; 4(1): 33.
  - 8) Kishida A, Kimura T, Furuzono T, Fujisato T, Masuzawa T. NANO-VIBRATING CELL CULTURE SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING. 4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY. Munich, Germany. Aug 31-Sep 3, 2005. Final Programme 2005; LII.
  - 9) Fujisato T, Sasayama N, Yin M, Yamazaki S, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Takano H, Hattori H. Regeneratibe vascular graft made of collagen fiber. 4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY. Munich, Germany. Aug 31-Sep 3, 2005. Final Programme 2005; XX.
  - 10) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用. 第49回日本学術会議材料研究連合講演会. 京都. 2005年9月15~16日.
  - 11) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 木村 剛, 中谷武嗣, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 北村惣一郎. 脱細胞化生体組織の再生医療用スキャフォールドとしての応用. 第49回日本学術会議材料研究連合講演会. 京都. 2005年9月15~16日.
  - 12) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体素材を用いた再生型人工心臓弁. 高分子学会討論会. 山形. 2005年9月20~22日. Polymer Preprints, Japan 2005; 54(2): 5012.
  - 13) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压法によるナノ無機粒子/高分子コンポジットの調整と遺伝子キャリアーへの応用. 第54回高分子討論会. 山形. 2005年9月20~22日. Polymer Preprints, Japan 2005; 54(2): 5201-2.
  - 14) 木村 剛, 南 広祐, 大矢裕一, 大内辰郎, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古菌 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. ナノ無機粒子を内包した超高压誘起PVA/DNA複合体による細胞への遺伝子導入. 第54回高分子討論会. 山形. 2005年9月20~22日. Polymer Preprints, Japan 2005; 54(2): 5199-200.
  - 15) Fujisato T, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Host cell infiltration to transplant acellular allografts in porcine model. The 8th TESI Annual Meeting. Shanghai, China. Oct 22-25, 2005. Final Program and Abstract Book 2005; 345.
  - 16) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 永谷憲歳, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高静水圧印加処理による生体組織からの細胞除去と再生医療への応用. 第46回高圧討論会. 室蘭. 2005年10月29~31日. The Review of High Pressure Science and Technology 2005; 15(special): 45.
  - 17) 木村 剛, 南 広祐, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高静水圧処理による分子集合体の開発. 第46回高圧討論会. 室蘭. 2005年10月29~31日. The Review of High Pressure Science and Technology 2005; 15(special): 141.
  - 18) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 岸田晶夫, 船本誠一, 藤里俊哉, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. バイオスキャフォールド調製に向けた生体由来組織の超臨界流体処理. 第46回高圧討論会. 室蘭. 2005年10月29~31

- 日. The Review of High Pressure Science and Technology 2005; 15 (special): 191.
- 19) 木村 剛, 南 広祐, 三浦義之, 栗田公夫, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古園 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製. 第14回ポリマー材料フォーラム. 東京. 2005年11月15～16日. Polymer Preprints, Japan 2005; 171.
- 20) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生医療用バイオスキャフォールド作製のための構造タンパク加工. 第27回バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28～29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 158.
- 21) 藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化したミニブタ血管の同種移植. 第27回日本バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28～29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 194.
- 22) 木村 剛, 南 広祐, 三浦義之, 栗田公夫, 六雄伸吾, 吉澤秀和, 岡田正弘, 古園 勉, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調整と生医学材料としての応用. 第27回日本バイオマテリアル学会大会. 京都. 2005年11月28～29日. 第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2005; 227.
- 23) 岸田晶夫, 南 広祐, 木村 剛, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高压処理による脱細胞化生体組織への化学修飾法の検討. 第43回日本人工臓器学会大会. 東京. 2005年11月30日～12月2日. 人工臓器 2005; S-152.
- 24) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 藤里俊哉. 超高压静水圧印加処理を用いる脱細胞化スキャフォールドの開発. 第43回日本人工臓器学会大会. 東京. 2005年11月30日～12月2日. 人工臓器 2005; S-152.
- 25) Fujisato T, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Hashimoto S, Nakatani T, Kitamura S. PowerGraft: A virus-free acellular scaffold by detergent-free treatment. The 12th International Conference on Biomaterial Engineering, Singapore. Dec 7-10, 2005. IFMBE Proceedings 2005; 12: 152.
- 26) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 構造タンパクの酵素処理によるバイオスキャフォールド調整. 第21回ライフサポート学会大会. 三重. 2005年12月8～9日. 第3回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2005; 98.
- 27) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 船本誠一, 西岡 宏, 吉田謙一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 村越彩子, 木村 剛, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 脱細胞化生体組織 (バイオスキャフォールド) の再細胞化. 第21回ライフサポート学会大会. 三重. 2005年12月8～9日. 第3回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集 2005; 99.
- 28) 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 岸田晶夫, 船本誠一, 藤里俊哉, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超臨界技術を利用した再生医療用スキャフォールド調整. 日本機械学会第18回バイオエンジニアリング講演会. 新潟. 2006年1月13～14日. 第18回日本バイオエンジニアリング講演会論文集 2005; 95-6.
- 29) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 藤里俊哉. 脱細胞組織のエタノール処理による力学特性への影響. 日本機械学会第18回バイオエンジニアリング講演会. 新潟. 2006年1月13～14日. 第18回日本バイオエンジニアリング講演会論文集 2005; 97-8.
- 30) 鳴海敏行, 黒岩貴文, 湊谷謙司, 吉田謙一, 船本誠一, 寺田堂彦, 森反俊幸, 永谷憲歳, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣. ミニブタへの同種脱細胞化動脈の移植における残存リン脂質の影響. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5 (suppl): 128.
- 31) 村越彩子, 大富美智子, 吉田謙一, 船本誠一, 南 広祐, 木村 剛, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高压静水圧処理法によるバイオスキャフォールドの調整に

- における圧力印加条件の検討. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 128.
- 32) 澤田和也, 寺田堂彦, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超臨界流体抽出による生体組織の脱細胞化. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 202.
- 33) 緒方裕之, 寺田堂彦, 澤田和也, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 非石灰化を目指したエラスチン除去バイオスキャフォールドの作製. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 203.
- 34) 船本誠一, 吉田謙一, 菊池正博, 小林泰彦, 藤里俊哉, 山岡哲二, 岸田晶夫, 中谷武嗣. 放射線照射を前処理とした生体組織の脱細胞化処理. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 204.
- 35) 橋本良秀, 川喜田正夫, 吉田謙一, 船本誠一, 木村 剛, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 超高静水圧処理法による脱細胞化骨・骨髄組織の調整と組織再構築の検討. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 218.
- 36) 江橋 具, 船本誠一, 吉田謙一, 岸田晶夫, 永谷憲歳, 藤里俊哉. 再生型筋組織の構築を目的とした脱細胞化筋スキャフォールドの作製. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 2006年3月8～9日. 再生医療 2005; 5(suppl): 204.
- 37) Kawaguchi AT, Kishida A, Yamaoka T. Statitic cardiomyoplasty with synthetic elastic net supppresses ventricular dilation and dysfunction after myocardial infarction in the Rat. The International Society for Heart and Lung Trantation 25th Anniversary Meeting and Scientific Sessions. 2005年4月6～9日, フィラデルフィア.
- 38) Furuzono T, Okada M, Kishida A, Tanaka J, Yasuda S. Fabrication And Cell Adhesion Of 3d Scaffold Made Of Composite Material With A Silk Fibroin Substrate A Percutaneous Device. Society for Biomaterial 2005 Annual Meeting. 2005.
- 39) 木村 剛, 岸田晶夫. リン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲンゲルの作製とin vitroでの評価. 第34回医用高分子シンポジウム. 2005.
- 40) 石原一彦, 岸田晶夫. 精密バイオインターフェイスポリマー. 第54回高分子討論会. 2005.
- 41) 古園 勉, 安田昌司, 木村 剛, 京谷晋吾, 田中順三, 岸田晶夫. Nano-scaled hydroxyapatote/polymer composite IV. Fabrication and cell adhesion properties of a three-dimensional scaffold made of composite material with a silk fibroin subetrate to develop a percutaneous device. 第43回日本人工臓器学会. 2005.
- 42) 岸田晶夫. 細胞デリバリー. 第56回医用高分子研究会. 2006.
- 43) 岸田晶夫, 木村 剛, 古園 勉, 吉澤秀和. 新しい分子間相互作用の制御法を駆使したバイオマテリアル創製. 日本金属学会 2006年春期(第138回)大会. 2006.
3. 新聞報道等
- 1) 日刊工業新聞. 2005年9月9日号.
  - 2) 日経ナノテクノロジー. 2005年9月11日号.
  - 3) 日刊工業新聞. 2006年2月13日号.
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む.)  
なし

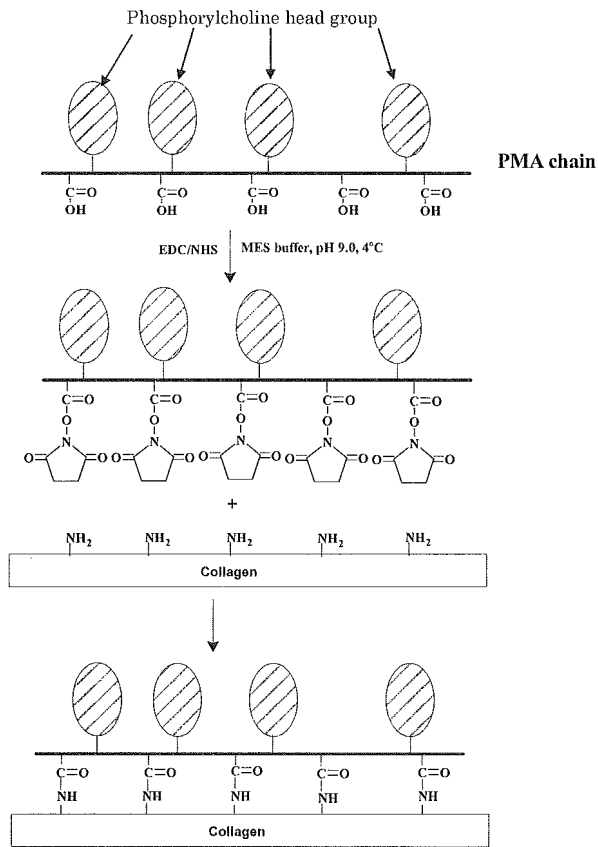


図1. 反応スキーム

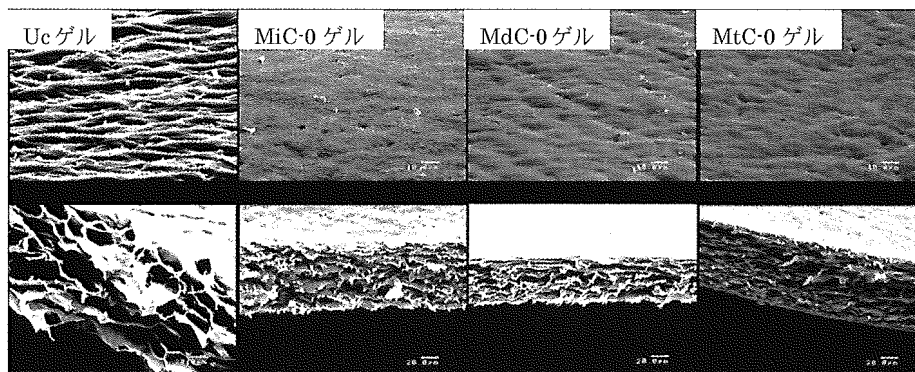


図2. SEM観察

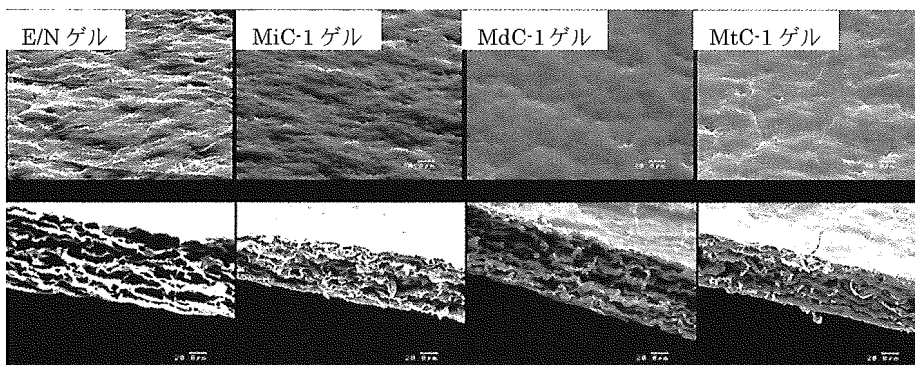


図3. SEM観察

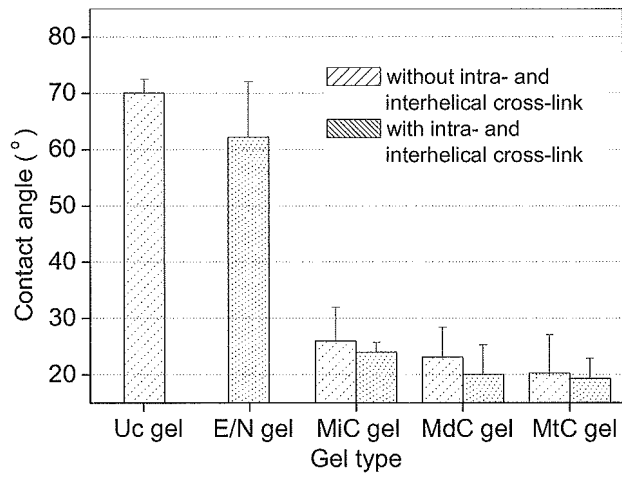


図4. 接触角測定

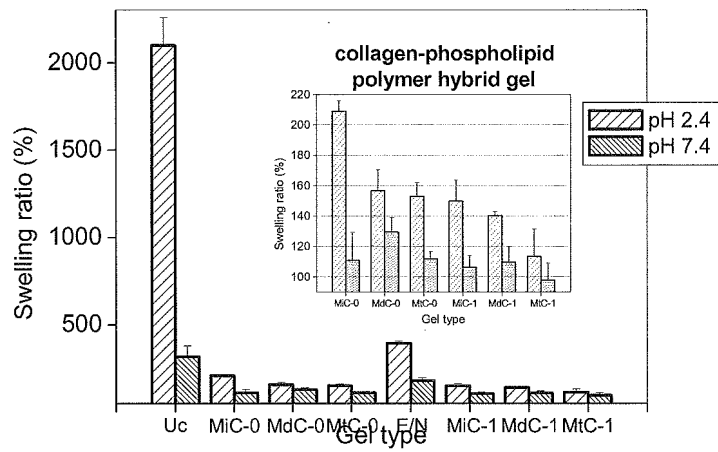


図5. 膨潤率測定

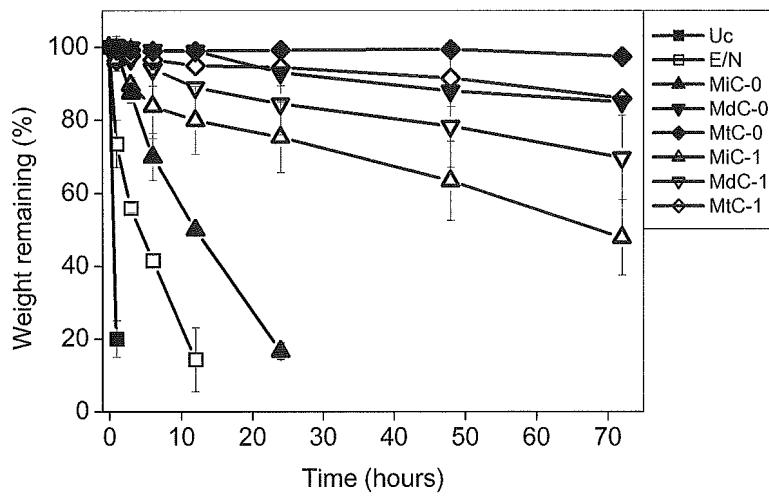


図6. コラゲナーゼ分解測定

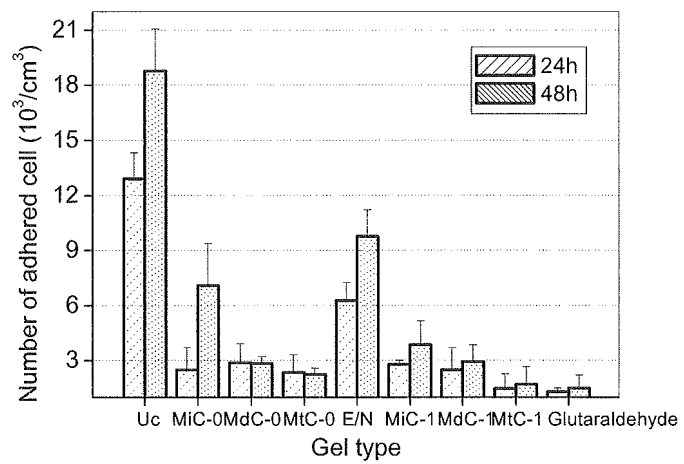


図7. 細胞接着実験

再生医療型素材への細胞組込

分担研究者 山岡哲二 国立循環器病センター研究所生体工学部部長

**研究要旨** 再生型血管のスキヤフォールドに対して、血管内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞などの機能細胞を効率よく、また三次元制御的に播種する技術の開発を進めた。独自に設計開発した灌流型リアクターを利用して、多孔質スキヤフォールド内部への平滑筋細胞の動的播種、内腔表面への内皮細胞の単層播種、および、それら的高密度培養が可能となった。

A. 研究目的

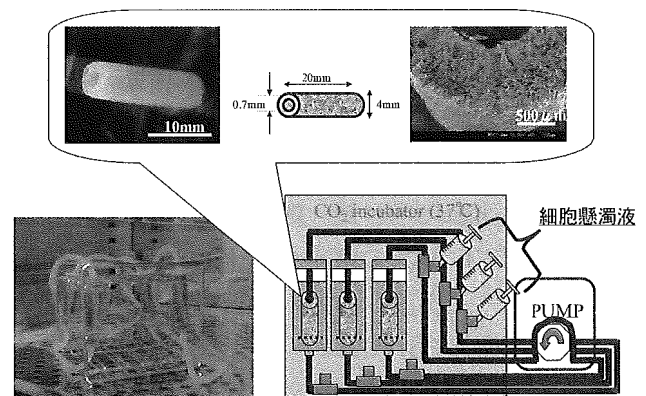
In vitro組織再生において、養分や酸素供給の不足によるスキヤフォールド内部での細胞死が問題点として挙げられ、現在までに様々な培養システムが考案されている。本研究では、近年活発に検討されている灌流培養法に着目し、ポリ乳酸多孔質スキヤフォールドを用いた組織再生における三次元細胞培養条件について検討した。一般的には、静置培養下で細胞をスキヤフォールドに播種した後に、灌流培養に移行する手法が選択されているが、静置培養によるスキヤフォールド全体への均一な細胞播種は容易ではない。そこで、灌流条件下で細胞を直接播種し、連続して培養を続けるシステムを目指し、特に、スキヤフォールド深部への細胞播種とその増殖挙動に及ぼす灌流条件の最適化を進めた。

B. 研究方法

スキヤフォールド：ポリ-L-乳酸（PLLA； $M_w=130,000$ ）の1,4-ジオキサラン溶液（2%）をポリプロピレン鋳型（外径4mm、内径0.7mm）中で凍結乾燥することで、多孔質の中空スキヤフォールドを製作した。長さ20mmに切断したスキヤフォールドをエタノール滅菌後、培地で置換して実験に用いた。灌流培養では、一方を盲端にしたスキヤフォールドの開放端より細胞懸濁液を送液し、壁面を通過して外部へ流れ出るシステムとした。以下の実験では、NIH-3T3を用い、所定時間培養後にLDH法により細胞数を計数、さらに、細胞の分布状態

はギムザ染色後の断面観察により評価した。

灌流による細胞の剥離： $2.0 \times 10^6$ の細胞をスキヤフォールド内腔に注入し、24時間静置培養することでスキヤフォールド内腔表面に細胞を播種した。これを灌流培養装置にセットし、さまざまな灌流速度（ $0 \sim 47 \text{ mL/cm}^2 \cdot \text{min}$ ）で5日間培養した。24時間毎にスキヤフォールドから剥離し流出した細胞をヘモサイトメータで計数した。



設計した灌流型バイオリアクター

灌流下での直接細胞播種：様々な濃度の細胞懸濁液（ $0.05 \sim 2.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ ）を、 $4.5 \text{ mL/cm}^2 \cdot \text{min}$ の灌流速度にてスキヤフォールドへ送液した。24時間後に、接着細胞数を評価し、さらに、スキヤフォールド内の接着細胞の分布状態を評価した。コントロールとしての静置播種では、細胞懸濁液をスキヤフォールド内腔に封入して両端を閉じて培養を行った。



細胞増殖実験:細胞をスキャフォールドへ灌流播種後、静置、または、灌流で培養を7日間行い、細胞増殖率を比較した。培養液は24時間ごとに交換し、養分、酸素供給を行った。また、スキャフォールド内部での細胞分布状態を観察することで、細胞増殖挙動を検討した。

### C. 研究結果

作成したスキャフォールドは、平均孔径約30  $\mu\text{m}$ の均一な多孔質構造を有した。

細胞剥離試験においては、スキャフォールドの内腔表面に接着させた細胞が、灌流速度の上昇に伴って培地中に流出したが、 $4.8\text{mL}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$ という低い灌流速度では顕著な剥離は認められず、静置培養時とほぼ同じレベルに抑えられることがわかった。

図2に、灌流条件および静置条件において $2.0 \times 10^6$ 個の細胞を播種したスキャフォールドの内腔面および断面の様子を示した。いずれの場合も接着細胞数は、播種細胞数の80%程度であった。接着した細胞の分布を見ると、静置播種では、スキャフォールド内腔の表面部から約70 $\mu\text{m}$ 程度の深さまでしか細胞が認められないのに対して、灌流播種では、スキャフォールド全体にほぼ均一に細胞が播種できている。すなわち、 $4.5\text{mL}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$ の灌流速度により、スキャフォールドの深部まで細胞を送達することが可能であり、さらに、播種細胞のほぼ全てを接着させることができる。

その後、さらに7日間培養を続けた場合の細胞増殖曲線を図3に示した。静置培養の場合には、培養3日目で細胞数の増殖が停止した。細胞のスキャフォールド深部への遊走も認められず、内腔表面での細胞密度が約 $2.0 \times 10^7/\text{cm}^2$ に達していることから、接触障害がかかったためであると考えられる。一方、灌流培養では細胞は増殖し、7日後には約14倍に達している。

図4には、スキャフォールド深部に存在する細胞の増殖に与える灌流培養の影響を検討した結果を示した。灌流培養7日後には、細胞は播種数の約10倍にまで増殖し、またスキャフォールド全体にほぼ均一に増殖していることが確認された。それに比較して、静置培養では、培養後の細胞数が初期播種数を下回る結果となった。静置培養では、壁厚が1.6mmで十分な連通孔を有するスキャ

フォールドの場合でさえ、深部の細胞への養分および酸素の供給が不十分であり、細胞死に至ることを示している。

### D. 結論

多孔質チューブ状スキャフォールドの、多孔質構造内、および、表面に対して、それぞれ、平滑筋細胞と内皮細胞を直接播種・培養できる灌流型バイオリクターを開発した。スキャフォールド材料表面構造の最適化、灌流速度、および灌流時間を最適化することで、播種効率の飛躍的な向上と、高密度培養を可能にした。現在、他の細胞種を用いて条件の一般化を図るとともに、灌流速度とスキャフォールド表面特性の影響についても検討を進めている。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Fujiwara T, Yamaoka T, Kimura Y, Wynne KJ. Poly(lactide) Swelling and Melting Behavior in Supercritical Carbon Dioxide and Post-Venting Porous Material. *Biomacromolecules* 2005; 6: 2370-3.
- 2) Sakamoto T, Mahara A, Iwase R, Yamaoka T, Murakami M. Analytical method for estimation of kinetics of oligonucleotide/RNA hybridization using fluorescence depolarization spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 2005; 340: 369-72.
- 3) Kitagawa T, Iwase R, Ishihara K, Yamaoka T, Murakami A. Facilitated Disassembly of Polyplexes Composed of Self-Assembling Amphiphilic Polycations Enhances the Gene Transfer Efficacy. *Chemistry Letters* 2005; 34(11): 1478-9.
- 4) Hashimoto T, Kobori A, Murakami A, Yamaoka T. The destabilization of polyplexes facilitates intranuclear transcription deficiency. *Nucl Acids Symposium Series* 2005; 49: 365-6.
- 5) Sakamoto T, Mahara A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Luminescence anisotropy-based detection of nucleic acids and proteins using long-lifetime

- Ru(II) complex as a luminescent label. Nucl Acids Symposium Series 2005; 49: 203-4.
- 6) Higuchi M, Yamayoshi A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis and properties of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralen-conjugated adenosine. Nucl Acids Symposium Series 2005; 49: 331-2.
  - 7) Iwase R, Fukui U, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis of antisense oligonucleotides containing a photocleavable protecting group on a guanine base and their photoinduced duplex formation. Nucl Acids Symposium Series 2005; 49: 151-2.
  - 8) EL-Salmawy A, Kitagawa T, Ko IK, Murakami A, Kimura Y, Yamaoka T, Iwata H. Preparation and properties of Pro Nectin F-coated biodegradable hollow fibers. J Artif Organs 2005; 8: 245-51.
  - 9) Sakamoto T, Mahara A, Yamagata K, Iwase R, Yamaoka T, Murakami A. Evaluation of dynamic feature of Escherichia coli 16S ribosomal RNA in homogeneous physiological solution. Biophys J 2005; 89: 4122-8.
  - 10) Hashimoto T, Yamaoka T. Polymeric Gene Carriers. In Taira K, Kataoka K, Niidome T eds. Non-viral Gene Therapy. Springer-Verlag 2005; pp35-50.
  - 11) 山岡哲二. バイオエンジニアリング. 日本機械学会誌 2005; 108(1041): 609-10.
- ## 2. 学会発表
- 1) Kawaguchi AT, Kishida A, Yamaoka T. Statitic cardiomyoplasty with synthetic elastic net suppresses ventricular dilation and dysfunction after myocardial infarction in the Rat. The International Society for Heart and Lung Trantation 25th Anniversary Meeting and Scientific Sessions. 2005年4月6～9日, フィラデルフィア.
  - 2) 山岡哲二, 橋本朋子, 北川達哉, 村上 章. ポリプレックスによる遺伝子導入機構. 遺伝子デリバリー研究会. 東京. 2005年5月20～21日.
  - 3) 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. In Vitro組織再生を目的としたスキャホルド内細胞への遺伝子導入. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25～27日. 横浜.
  - 4) 橋本朋子, 小林由美子, 松田 修, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. カチオン性/疎水性両親媒性ミセルによる遺伝子導入. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25～27日. 横浜.
  - 5) 中村友亮, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. Hap複合化吸収性ハイドロゲルの軟組織再生能の評価. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25～27日. 横浜.
  - 6) 大矢裕一, 金平光司, 有村英俊, 大内辰郎, 橋本朋子, 山岡哲二. ポリリシン-ポリ乳酸ABブロック共重合体ミセルとプラスミドDNAとの相互作用. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25～27日. 横浜.
  - 7) 岩瀬礼子, 福井宇内, 小堀哲生, 山岡哲二, 村上 章. 光切断性保護基をグアニン塩基に持つアンチセンス核酸の合成とその二重鎖形成能の光誘導. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25～27日. 横浜.
  - 8) 務中達也, 叶井正樹, 阿部浩久, 中西博昭, 庄子習一, 山岡哲二, 坂本 隆, 小堀哲生, 村上 章. 細胞機能解析チップの開発(II) 微小空間における細胞の刺激応答解析. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25～27日. 横浜.
  - 9) 樋口麻衣子, 小堀哲生, 岩瀬礼子, 山岡哲二, 村上 章. 新規光架橋型アンチセンス核酸の開発(II) 糖環2'位ソラレン修飾型アンチセンス核酸の合成とその機能. 第54回高分子学会年次大会. 2005年5月25～27日. 横浜.
  - 10) Yamaoka T, Hashimoto T, Kitagawa T, Murakami A. Intracellular Disassembly and Transcription Efficiency of Polyplexes Delivered into Cells Using Novel Self-Assembling Gene Carriers. ASGT 8th Annual Meeting. 2005年6月1～5日. セントルイス.

- 11) 山岡哲二, 樋上智一, 内田 翔, 村上 章. 幹細胞特異的スキャホールドの評価. 第7回生命工学材料とバイオテクノロジー. 2005年6月8~10日. 岐阜.
- 12) 内田 翔, 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. ポリ乳酸スキャホールドの表面修飾による細胞接着亢進. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 13) 樋口麻衣子, 青木幸一, 小堀哲生, 山岡哲二, 村上 章. 糖環2'位に光架橋性基を持つアンチセンス核酸によるRNA結合能の評価. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 14) 近藤千晶, 北川達哉, 橋本朋子, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. ガラクトース修飾ポリマーの構造最適化による導入遺伝子発現効率の向上. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 15) 小林由美子, 橋本朋子, 小堀哲生, 村上章, 山岡哲二. 両親媒性ペプチド系キャリアーの遺伝子導入効率に関する考察. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 16) 村上 章, 繁澤麻紗子, 坂本 隆, 小堀哲生, 山岡哲二. シチジンの2'位にピレンを持つ蛍光核酸プローブによるRNAの検出. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 17) 坂本 隆, 藤原伸行, 小堀哲生, 山岡哲二, 村上 章. ピレンを含む長寿命蛍光剤を用いた生体高分子間相互作用検出法の開発. 第51回高分子研究発表会. 2005年7月22日. 神戸.
- 18) 橋本朋子, 小林由美子, 近藤千晶, 小堀哲生, 村上 章, 松田 修, 山岡哲二. ポリプレックス被転写効率を亢進する遺伝子キャリアーの分子設計. 第34回医用高分子-第15回バイオ・高分子シンポジウム, 2005年8月1~2日. 東京.
- 19) 村上 章, 樋口麻衣子, 中澤智子, 小堀哲生, 山吉麻子, 加藤聖子, 和気徳夫, 山岡哲二. 新規アンチセンス核酸のデザインと遺伝子制御効果. 第34回医用高分子-第15回バイオ・高分子シンポジウム. 2005年8月1~2日. 東京.
- 20) 中村友亮, 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. Hap複合化吸収性ハイドロゲルの軟組織再生. 第34回医用高分子-第15回バイオ・高分子シンポジウム. 2005年8月1~2日. 東京.
- 21) Yamaoka T, Higuchi T, Uchida S, Murakami A, Matsumura G, Shin'oka T. Specific adhesion of CD34+ cells on PLLA porous scaffolds. 4th Annual Meeting of EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY (ETES). 2005年8月31~9月3日. ミュンヘン.
- 22) Hashimoto T, Kobori A, Murakami A, Yamaoka T. The destabilization of polyplexes facilitates intranuclear transcription efficiency. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 23) Sakamoto T, Mahara A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Luminescence Anisotropy-based Detection of Nucleic Acids and Protein Using Long-lifetime Ru(II) Complex as a Luminescent Label. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 24) Higuchi M, Yamayoshi A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis and properties of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralen-conjugated adenosine. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 25) Iwase R, Fukui U, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis of antisense oligonucleotides containing a photocleavable protecting group on a guanine base and their photoinduced duplex formation. 第4回国際核酸科学シンポジウム. 2005年9月20~22日. 群馬.
- 26) 山岡哲二, 北川達哉, 橋本朋子, 小林由美子, 村上 章, 馬原 淳. ポリカチオンミセルによる遺伝子導入効率向上の機構解析. 第54回高分子討論会. 2005年9月20~22日. 山形.
- 27) 馬原 淳, 樋上智一, 村上 章, 山岡哲二. 幹細胞特異的表面の構築と組織再生. 第54回高分子討論会. 2005年9月20~22日. 山形.

- 28) 北川達哉, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. In vitro血管組織再構築を目指したスキャホールド内細胞への遺伝子導入. 第27回バイオマテリアル学会大会. 2005年11月28~29日. 京都.
- 29) 小林由美子, 橋本朋子, 小堀哲生, 村上章, 山岡哲二. ポリメリック遺伝子キャリアーの分子特性とポリプレックス被転写効率. 第27回バイオマテリアル学会大会. 2005年11月28~29日. 京都.
- 30) 山岡哲二, 中野順子, 藤原知子, 藤里俊哉, 木村良晴. 完全生体吸収性ゲル化材料による細胞注入システムの開発. 第43回人工臓器学会大会. 2005年11月30日~12月2日. 東京.
- 31) 馬原 淳, 樋上智一, 松村剛毅, 新岡俊治, 山岡哲二. 幹細胞分離基材による組織再生材料の構築. 第43回人工臓器学会大会. 2005年11月30日~12月2日. 東京.
- 32) 馬原 淳, 北川達哉, 筏 義人, 山岡哲二. 灌流システム下での多孔質スキャホールドへの特異的細胞播種. 第43回人工臓器学会大会. 2005年11月30日~12月2日. 東京.
- 33) Hashimoto T, Mazda O, Murakami A, Yamaoka T. Molecular design of non-viral gene carriers aiming at facilitated transcription efficiency. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 34) Nakamura Y, Mahara A, Murakami A, Yamaoka T. Soft tissue regeneration using novel biodegradable hydrogel/HAp composite materials. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 35) Yamaoka T, Uchida S, Higami T, Murakami A. Immobilization of bioactive molecules onto PLLA porous matrices for tissue regeneration. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 36) Kitagawa T, Murakami A, Yamaoka T. In vivo vascular regeneration using biodegradable scaffold in the perfusion bioreactor. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 37) Sakamoto T, Mahara A, Munaka T, Kobori A, Yamaoka T. Long-ifetime Ru(II) complex-labeled probes for the evaluation of the dynamic feature of biomolecule. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 38) Higuchi M, Yamayoshi A, Kobori A, Yamaoka T, Murakami A. Development of novel photo-sensitive antisense oligonucleotides. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 39) Murakami A, Mahara A, Sakamoto T, Shimada N, Yamaoka T. Bispyrene-conjugated 2'-O-methyloligoribonucleotide as a highly specific RNA-recognition probe and its application to RNA-bio-imaging. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 40) Iwase R, Namie Y, Yamaoka T, Murakami A. Synthesis and properties of fluorescent-labeled oligonucleotides containing an amide internucleoside linkage at the 3'-site of 2'-pyrene-modified uridine. PACIFICHEM 2005. 2005年12月15~20日. ホノルル.
- 41) 山岡哲二, 松村剛毅, 馬原 淳, 村上 章, 新岡俊治. 造血幹細胞特異的スキャホールドの評価. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8~9日. 岡山.
- 42) 馬原 淳, 山岡哲二. 抗体固定カラムを用いた幹細胞分離システムの開発. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8~9日. 岡山.
- 43) 橋本朋子, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. 両親媒性遺伝子キャリアーのナノ構造と遺伝子導入効率. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8~9日. 岡山.
- 44) 中村友亮, 小堀哲生, 村上 章, 山岡哲二. 軟組織再生を目的としたHAP複合化ハイドロゲルの in vivo生体吸収性・組織適合性の評価. 第5回再生医療学会総会. 2006年3月8~9日. 岡山.
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む.)
- 1) 藤里俊哉, 山岡哲二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体組織マトリックスへの細胞播種方法. 特許出願2005-180344. 2005年6月21日.
- 2) 山岡哲二, 馬原 淳, 北村惣一郎. 細胞の分