

- angiographic study in 1283 anastomoses in 408 patients. *Ann Thorac Surg* in press.
- 3) Ishida M, Kobayashi J, Tagusari O, et al: Perioperative advantages of off-pump coronary bypass grafting. *Circ J* 66 : 795-799, 2002.
  - 4) Puskas JD, Thourani VH, Marshall JJ, et al: Clinical outcomes, angiographic patency, and resource utilization in 200 consecutive off-pump coronary bypass patients. *Ann Thorac Surg* 71 : 1477-1483, 2001.
  - 5) Dogan S, Aybek T, Andressen E, et al: Totally endoscopic coronary artery bypass grafting on cardiopulmonary bypass with robotically enhanced telemanipulation: Report of forty-two cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 : 1125-1131, 2002.
  - 6) Al-Ruzzeh S, Ambler G, Asimakopoulos G, et al: Off-pump coronary artery bypass (OPCAB) surgery reduces risk-stratified morbidity and mortality: a United Kingdom multi-center comparative analysis of early clinical outcome. *Circulation* 108(Suppl II): II-1-II-8, 2003.
  - 7) Puskas JD, Williams WH, Duke PG, et al: Off-pump coronary artery bypass grafting provides complete revascularization with reduced myocardial injury, transfusion requirements, and length of stay: a prospective randomized comparison of two hundred unselected patients undergoing off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 359 : 1194-1199, 2003.
  - 8) Van Dijk D, Nierich AP, Jansen E, et al: Early outcome after off-pump versus on-pump coronary bypass surgery: results from a randomized study. *Circulation* 104 : 1761-1766, 2001.
  - 9) Hoff SJ, Ball SK, Coltharp WM, et al: Coronary artery bypass in patients 80 years and over: is off-pump the operation of choice? *Ann Thorac Surg* 74 : S1340-S134, 2002.
  - 10) Legave JF, Buth KJ, King S, et al: Coronary bypass surgery performed off pump does not result in lower in-hospital morbidity than coronary artery bypass grafting performed on pump. *Circulation* 109 : 887-892, 2004.
  - 11) Khan NE, De Souza A, Mister R, et al: A randomized comparison of off-pump and on-pump multivessel coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 350 : 21-28, 2004.
  - 12) Kitamura S, Kawachi K, Taniguchi S, et al: Long-term benefits of internal thoracic artery-coronary artery bypass in Japanese patients. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 46 : 1-10, 1998.
  - 13) Seki T, Kitamura S, Kawachi K, et al: A quantitative study of postoperative luminal narrowing of the internal thoracic artery graft in coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 104 : 1532-1538, 1992.
  - 14) Muneretto C, Bislei G, Nagri A, et al: Left internal thoracic artery-radial artery composite grafts as the technique of choice for myocardial revascularization in elderly patients: A prospective randomized evaluation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127 : 179-184, 2004.
  - 15) Weinschelbaum EE, Gabe ED, Macchia A, et al: Total myocardial revascularization with arterial conduits: radial artery combined with internal thoracic arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114 : 911-916, 1997.
  - 16) Muneretto C, Negri A, Manfredi J, et al: Safety and usefulness of composite grafts for total arterial myocardial revascularization: A prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 : 826-835, 2003.
  - 17) Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari O, et al: Competitive flow in arterial composite grafts and effect of graft arrangement in Off-Pump coronary revascularization. *Ann Thorac Surg* Aug 78(2): 481-486, 2004.
  - 18) Mann MJ, Whittlemore AD, Donaldson MC, et al: Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomized, controlled trial. *Lancet* 354 : 1493-1498, 1999.
  - 19) Mack MJ, Acuff T, Osborne J: Minimally invasive direct coronary artery bypass: technical considerations and instrumentation. *J Cardiac Surg* 13 : 290-296, 1998.
  - 20) Kappert U, Schneider J, Cichon R, et al: Development of robotic enhanced endoscopic surgery for the treatment of coronary artery disease. *Circulation* 104[suppl I]: I-102-I-107, 2001.
  - 21) Vassiliades TA, Rogers EW, Nielsen JL, et al: Minimally invasive direct coronary artery bypass grafting: intermediate-term results. *Ann Thorac Surg* 70 : 1063-1065, 2002.
  - 22) Bucerius J, Metz S, Walther T, et al: Endoscopic internal thoracic artery dissection leads to significant reduction of pain after minimally invasive direct coronary artery bypass graft surgery. *Ann Thorac Surg* 73 : 1180-1184, 2002.
  - 23) Damiano RJ, Tabie HA, Mack MJ, et al: Initial prospective multicenter clinical trial of robotically-assisted coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 72 : 1263-1269, 2001.
  - 24) Prasad SM, Ducko CT, Stephenson ER, et al: Prospective Clinical trial of robotically assisted endoscopic coronary grafting with 1-year follow-up. *Ann Surg* 233 : 725-732, 2001.
  - 25) Kappert U, Cichon R, Schneider J, et al: Technique of closed chest coronary artery surgery on the beating heart. *Eur J Cardiothorac Surg* 20 : 765-769, 2001.
  - 26) Kappert U, Schneider J, Cichon R, et al: Wrist-enhanced Instrumentation: moving toward totally endoscopic coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 70 : 1105-1108, 2000.
  - 27) Kappert U, Schneider J, Cichon R, et al: Wrist-enhanced Instrumentation: moving toward totally endoscopic coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 70 : 1105-1108, 2000.
  - 28) Dogan S, Aybek T, Andressen E, et al: Totally endoscopic coronary artery bypass grafting on cardiopulmonary bypass with robotically enhanced telemanipulation: Report of forty-five cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 : 1125-1131, 2003.
  - 29) Falk V, Diegeler A, Walther T, et al: Total endoscopic computer enhanced coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 17 : 38-45, 2000.
  - 30) Tagusari O, Kobayashi J, Bando K, et al: Total arterial off-pump coronary bypass grafting for revascularization of total coronary system: clinical outcome and angiographic evaluation. *Ann Thorac Surg* 78 : 1304-1311, 2004.

## 循環器組織再生のためのスキャフォールド材料

○藤里俊哉, 笹山典久<sup>1</sup>, 西岡 宏<sup>2</sup>, 吉田謙一<sup>3</sup>, 澤田和也<sup>4</sup>, 殷猛, 山崎祥子, 湊谷謙司  
庭屋和夫, 岸田晶夫<sup>5</sup>, 森反俊幸<sup>6</sup>, 中谷武嗣, 高野久輝, 服部博行<sup>1</sup>, 北村惣一郎  
国立循環器病センター, <sup>1</sup>ニプロ(株), <sup>2</sup>ヒューマンサイエンス振興財団, <sup>3</sup>先端医療振興財団  
<sup>4</sup>医療機器センター, <sup>5</sup>東京医科歯科大学, <sup>6</sup>鈴鹿医療科学大学

## Scaffold materials for regeneration of cardiovascular tissues

T.Fujisato, N.Sasayama<sup>1</sup>, H.Nishioka<sup>2</sup>, K.Yoshida<sup>3</sup>, K.Sawada<sup>4</sup>, M.Yin, S.Yamazaki, K.Minatoya  
K.Niwaya, A.Kishida<sup>5</sup>, T.Morita<sup>6</sup>, T.Nakatani, H.Takano, H.Hattori, S.Kitamura

National Cardiovascular Center, <sup>1</sup>Nipro Corporation, <sup>2</sup>Japan Health Sciences Foundation

<sup>3</sup>Foundation for Biomedical Research and Innovation, <sup>4</sup>Japan Association for the Advancement of Medical Equipment

<sup>5</sup>Tokyo Medical and Dental University, <sup>6</sup>Suzuka University of Medical Science

## 1. 緒言

我が国では年間約 2 万件の冠動脈バイパス術、約 1 万件の心臓弁置換術が施行されている。また、閉塞性血栓血管炎等によって、約 5 千人が下肢切断を余儀なくされており、1 万件弱の末梢血管再建術が施行されている。不全あるいは傷害をうけた組織を置換するためには、自己組織や凍結保存同種組織の使用が好まれ、米国では年間数千件もの同種組織が使用されている。しかし我が国では、同種組織の提供は年間数十件程度に留まっており、圧倒的に不足している。一方、先天性疾患を抱える小児患者では、早期の石灰化に加え、移植組織の成長性欠如のため、同種組織でも複数回の移植が避けられない。これらの問題を解決するため、生体吸収性材料を用いた再生型血管や、脱細胞化組織を用いた再生型心臓弁の臨床応用が始まりつつある。しかし、動脈系では血圧に抗しきれず、動物実験では早期破断の報告もある。我々は、架橋コラーゲン繊維を主体とした再生型血管、並びに超高压印加処理によって脱細胞化した再生型血管・心臓弁組織を開発している。本報では、ミニブタを用いた移植実験の結果について報告する。

## 2. 実験

コラーゲンを真空高温下にて熱架橋することで、長さ約 2.5cm、内径約 6mm の人工血管を作成した。また、清潔下にてクラウン系ミニブタから心臓弁、下行大動脈を摘出し、超静水圧印加処理及び洗浄処理にてドナー由来細胞を除去することで、脱細胞化血管・心臓弁を作成した。作成した各組織をクラウン系ミニブタの下行大動脈あるいは肺動脈弁部位に移植した。所定期間経過後に摘出し、免疫染色等により組織学的に評価した。

## 3. 結果と考察

いずれの材料・組織でも、移植後の破断や拡張等の異常所見は認められなかった。脱細胞化心臓弁では移植 6 ヶ月後のエコーによる観察でも良好

な弁機能を示していた。また、内腔面には血栓等の付着は見られず、移植 3 ヶ月後ではほぼ完全に内皮細胞で覆われていた。組織内には平滑筋細胞及び線維芽細胞の浸潤が認められたが、脱細胞化組織の方が架橋コラーゲン組織よりも細胞浸潤は早かった。移植後 6 ヶ月では、下行大動脈組織では狭窄並びに石灰化の所見が認められた。6 ヶ月の移植期間にミニブタの体重は倍増するため、移植組織の成長が個体の成長に間に合わなかったと推測される。移植組織内への細胞浸潤が完成してから移植組織の成長が開始すると考えられるため、細胞浸潤の期間を見越した大きさの移植組織を選択する必要があると思われる。しかし、肺動脈弁では狭窄は見られなかったため、部位による影響も否定できない。

吸収性材料を基材とした血管移植では、東京女子医大の新岡教授らが小児患者の静脈再建において優れた臨床結果を報告している。我々が用いている架橋コラーゲンは、主として移植後に浸潤してきた細胞によって分解・置換されるため、吸収性材料とは異なった分解プロフィールを持つと考えられる。また、欧米で臨床化されている脱細胞化組織は、界面活性剤や酵素等の薬液処理によって脱細胞化されているが、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。我々の脱細胞化処理は、組織深部までの完全な脱細胞化とウイルス等の不活化が特徴であり、高い安全性が確保できると考えている。現在、より長期の同種及び異種移植実験によって、成長性や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。

## 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、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。

Transaction: 454

Citation: Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, page 376

### Vascular Tissue Regeneration Using Acellular Scaffold In Porcine Model

T. Fujisato<sup>1</sup>, K. Minatoya<sup>1</sup>, M. Yin<sup>1</sup>, S. Yamazaki<sup>1</sup>, K. Niwaya<sup>1</sup>, A. Kishida<sup>2</sup>, T. Nakatani<sup>1</sup>, S. Kitamura<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Cardiovascular Center, Suita, Japan, <sup>2</sup> Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

#### Introduction

The artificial heart valve is a one of the most clinically used implantable medical devices applied to about 300,000 patients in a year worldwide. The xenograft valves made of the chemically crosslinked porcine valve or bovine pericardium have good biocompatibility, hemodynamics, and resistant to infections compared with the mechanical valves. Their usage is on the increase because they do not require any daily administration of anti-coagulant drug. However, the durability of the xenograft valve is relatively short in about 15 to 20 years in elderly and 5 to 10 years in pediatric patients by the calcification of the glutaraldehyde-fixed animal tissue. The regeneration of heart valves using polymeric or acellular xenogeneic scaffolds has been studied to have more durability with growth potential. Whereas they have still several problems to be solved such as degradation control of biodegradable polymeric matrices and transfer of unknown animal related infectious diseases. Our novel tissue processing for decellularization by ultrahigh pressure treatment for the safe valvular and aortic tissue transplantation was reported in porcine arterial model.

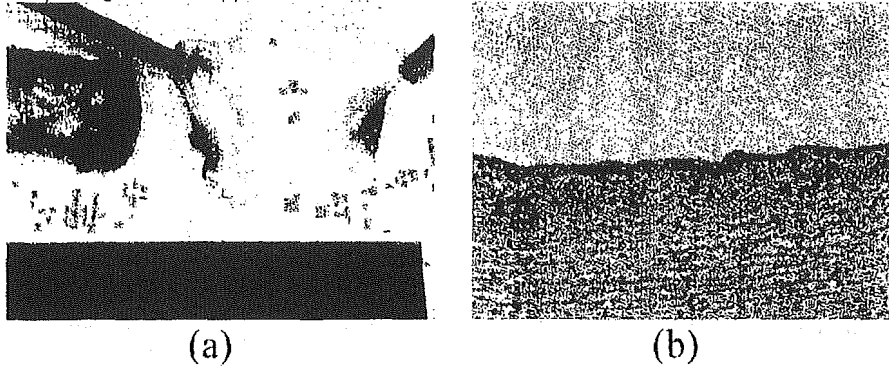
#### Materials and Methods

Porcine tissues of heart valves, aorta, and trachea were isolated under the sterile condition from the Clawn miniature pigs (Japan Farm Co., Ltd.). They are then decellularized by our PowerGraft technology. Briefly, the tissues were treated by a cold isostatic pressing (CIP) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C for demolition of the cells inside followed by washing in the washing medium under microwave irradiation at 4°C. The tissues treated were subjected to histological study by the light and electron microscopy, detection of porcine endogeneous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement. The acellular scaffolds were transplanted into the allogeneic miniature pigs. The aorta or aortic root was implanted at descending aorta through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. They were explanted 4, 12, and 24 weeks after the transplantation and examined histologically. All animals were carefully reared in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised in 1985).

#### Results and Discussion

The tissues including tracheal cartilage were cell free by the PowerGraft technology. There was no PERV detected from the tissue treated. It has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP more than 600 MPa<sup>1)</sup>. The TEM study showed that collagen and elastin fibers were well maintained in the acellular tissue. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis (Fig. 1a). The inner surface was smooth and had no thrombus formation. Cell infiltration was identified at 4 weeks, and intimal thickening was observed at 12 and 24 weeks after the implantation. The luminal surfaces of the aorta and aortic root were completely covered with endothelial cells at 4 weeks (Fig. 1b). Calcium deposits were observed slightly at 4 weeks

and the calcification increased at 12 and 24 weeks. Recently, Prof. Konertz and his group in Germany has reported excellent clinical results of acellular porcine pulmonary heart valves<sup>2)</sup>. We are planning a clinical application of acellular aortic valves in a few years.



**Fig.1 (a) Explanted aorta and (b) its inner surface stained with anti-vWF after 24 week transplantation.**

Figure 1. (a) Explanted aorta and (b) its inner surface stained with anti-vWF after 24-week transplantation.

#### **Conclusions**

Porcine cells and PERVs were removed from the tissue without changing its biomechanical property in a short time by the PowerGraft technology. The results in porcine model were encouraging to have durable and safe acellular scaffolds for the vascular tissue regeneration.

#### **References**

1. Hayashi R. High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595(1-2): 397-9.
2. Konertz W. Decellularised xenogenic heart valves are ready for clinical use. presented in the *Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves*. Sep 15-18, 2004. Florence, Italy.

#### **Acknowledgements**

This study was supported by the Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Transaction: 644

Citation: Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, page 471

### Preparation Of Dna-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier

A. Kishida<sup>1</sup>, T. Kimura<sup>1</sup>, A. Okuno<sup>2</sup>, Y. Ohya<sup>2</sup>, T. Ouchi<sup>2</sup>, S. Mutsuo<sup>3</sup>, H. Yoshizawa<sup>3</sup>, K. Miyazaki<sup>4</sup>, T. Fujisato<sup>4</sup>, T. Furuzono<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Japan, <sup>2</sup> Kansai University, Suita, Japan, <sup>3</sup> Okayama University, Okayama, Japan, <sup>4</sup> National Cardiovascular Center, Suita, Japan

#### Introduction

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 proteins<sup>1</sup>. We have reported the molecular composite, such as hydrogels and nano-aggregate were easily obtained by the ultra-high pressure treatment<sup>2</sup>. In this study, the preparation of the molecular composite of DNA and synthetic polymer by using the ultra-high pressure treatment and the application of the composite as gene carrier was studied. The model polymer used was poly(vinyl alcohol) (PVA).

#### Materials and Method

Electrophoresis molecular marker (100 bp Ladder DNA, and 1 kbp ladder DNA; TaKaRa) was used as model DNA. Aqueous solutions of PVA (1 to  $2 \times 10^{-5}$  w/v%) were prepared by using supplied PVA (Kuraray Co. Ltd. Mw=22,000, 74,800, 176,000, 787,600). The PVA and DNA mixed solution was sealed in the plastic bag, and pressurized with the ultra-high pressure apparatus (Dr. Chef; Kobe Steel, Co Ltd.) under a prescribed condition (pressure and time). After the treatment, the formation of composite was confirmed by gel electrophoresis. The DNA (pEGFG)-PVA composite was added into culture medium to transfect pEGFP gene into RAW264 cells.

#### Results and Discussion

From the result of gel electrophoresis of DNA-PVA mixture solutions with various mixing conditions. It was clear that DNA-PVA composite formation was observed only when the mixture was treated under ultra-high pressure (10,000 atm). When urea was added to the mixture solution, the formation of DNA-PVA composite was obstructed even at ultra-high pressure condition. To evaluate uptake of PVA/DNA composites by mammalian cells, fluorescence Rhodamine labeled DNA (Rh-DNA) complexed with PVA were mixed with various species of cells. The PVA/Rh-DNA composites internalized into cells were observed under fluorescence microscope (Fig.2). It was clear almost of all cells were coloured red. It meant that Raw264 cells uptake PVA-Rh-DNA composite with high efficiency. These results indicate the possibility of new type of non-viral vector.

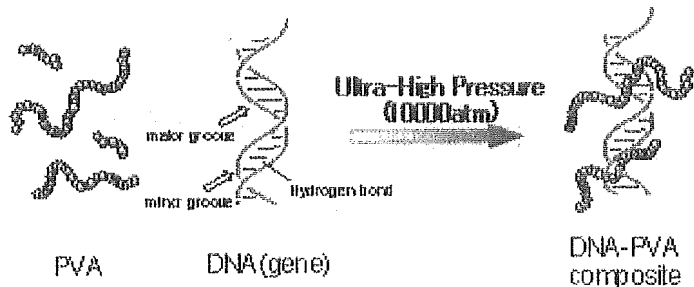


Fig. 1 Schematic illustration of DNA-PVA composite

Figure 1. Schematic illustration of DNA-PVA composite.

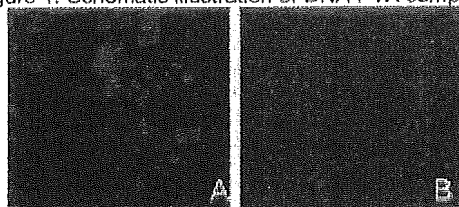


Fig 2 . Uptake of PVA/Rhodamine labeled pEGFP (Rh-pEGFP) composites by Raw 264 cells. (A)PVA117H (0.5%) (B) Rh-pEGFP.

Figure 2. Uptake of PVA/Rhodamine labeled pEGFP (Rh-pEGFP) composite by Raw 264 cells. (A) PVA117H (0.5%), (B) Rh-pEGFP.

#### Conclusion

Using ultra-high pressure (over 10000atm), DNA-PVA composite was obtained. This composite is one candidate for preparing non-viral gene carrier.

#### References

1. P.W.Bridgman, J.Biol. Chem., 19, 511 (1914)
2. A.Okuno, et al. Polym. Prep. Japan., 52(5), 1036 (2003)

## 1Pe175

## 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

(東医歯大生研)木村剛, 南広祐, (鈴鹿医科)岩井彩夏, 森屋俊幸, (関西大)大矢裕一, 大内辰郎, (岡山)  
六雄伸吾, 吉澤秀和, (国循七研)古蘭勉, 藤里 俊哉, (東医歯大生研)岸田晶夫

**[緒言]** 我々は、超高压 (6000 気圧以上) 条件下において、水素結合が強調されることに着目し、超高压印加法を用いた分子集合体の創製に関して研究している。これまで、水素結合性高分子であるポリビニルアルコール (PVA) を用いて、PVA 水溶液への超高压印加により、PVA 濃度に依存して粒子あるいはハイドロゲルが得られることを報告した。また、DNA との混合溶液においては PVA/DNA 複合体が作製され、細胞による取り込みが確認されたことから、遺伝子デリバリーへの応用を示した。本研究では、PVA と DNA からなる新規ハイドロゲルの調製と DNA の放出について検討を行った。

**[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。さらに、放出された DNA をアガロース電気泳動により解析した。

**[結果と考察]** PVA/DNA ハイドロゲルの成形性は、用いる PVA の濃度に依存し、低濃度では脆弱なゲルであったが、高濃度の場合に弾性のある強固なゲルが得られた (Fig)。PVA/DNA ハイドロゲルを PBS 溶液に浸漬し、上清の PBS 溶液を DNA 測定した結果、十分な DNA の含有が確認できた。また、種々の PVA 濃度の PVA/DNA ハイドロゲルを用いて DNA 放出を検討した結果、高濃度の PVA の場合に緩やかな DNA の放出が示されたことから、長期の徐放の可能性が示唆された。以上より、新規 PVA/DNA ハイドロゲルの形成および DNA 徐放が示され、長期徐放型の遺伝子導入への可能性が示唆された。

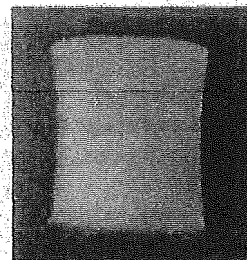


Fig. PVA/DNA hydrogel.

## DNA release from PVA/DNA hydrogels prepared by ultra high pressure technology

Tsuyoshi Kimura<sup>1)</sup>, Kwangwoo Nam<sup>1)</sup>, Sayaka Iwai<sup>2)</sup>, Toshiyuki Moritan<sup>2)</sup>, Yuichi Ohya<sup>3)</sup>, Tatsuro Ouchi<sup>4)</sup>, Shingo Mutsuo<sup>4)</sup>, Hidekazu Yoshizawa<sup>4)</sup>, Tsutomu Furuzono<sup>5)</sup>, Toshiya Fujisato<sup>5)</sup> and Akiyo Kishida<sup>1)</sup>

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

TEL&FAX: +81-3-5280-8029

Key words: Hydrogel, Polyvinyl alcohol, Gene delivery, DNA

We have studied the hydrogen bonding structures formed by ultra high pressure (UHP) technology because of hydrogen bonding interaction emphasized under UHP condition. Previously, we reported the formation of PVA hydrogels and PVA/DNA particles uptaken by cells. In this study, we studied that the formation of PVA/DNA hydrogels using UHP technology and DNA release from that. Various PVA/DNA hydrogels were formed at different PVA concentration by UHP treatment (Fig). With lower PVA conc., fast release of DNA were observed, but slow DNA release were achieved using higher PVA conc.. These results incitated the application fo PVA/DNA hydrogels for gene delivery.

## 2C11

## 微小振動による細胞の接着制御の検討

(東医歯大・生材研) ○岸田晶夫, 木村 剛  
 (茨城大・工) 草間 淳, 石丸正臣, 増澤 徹  
 (国立循環器病セ・研究所) 藤里俊哉

## 1) 目的

人工材料と細胞との相互作用については、種々の視点からの検討が行われている。我々は材料表面の分子運動の影響を考える基礎研究として、微小振動表面上での細胞の機能変化を検討している。これにより、分子運動性の生物刺激機能の評価を行うとともに、物理刺激による細胞の機能制御法の開発を目指している。現在、特に注目しているのは、再生医療などへの応用が期待されている幹細胞類である。本研究では自作の水平方向振動負荷装置を用いて、微小振動の機能細胞への影響について検討を行った。

## 2) 実験

細胞としてマウス胎児線維芽細胞 (MEF)、骨髄幹細胞 (PMB3) を用いた。接着性および増殖性への影響の検討として、細胞播種後に一定時間の振動を付加し、その後の接着数あるいは細胞数の増加を測定して比較した。微小振動付加時間は、60 分間とした。振動周波数は 0Hz (control), 10Hz, 100Hz, 1kHz, 10kHz の 5 種類に設定した。細胞を播種する基材としてプラズマ処理した treated 基材と、プラズマ処理していない non-treated 基材を用いた。一定期間経過後に細胞数をカウントし、接着・増殖性の評価とした。

## 3) 結果

図1および2は、それぞれ MEF 細胞を Non-treated 基材上で1時間培養した位相差顕微鏡写真である。1は静置培養 (0Hz) および2は 10kHz で水平振動を行っている。図より明らかに、2の振動刺激を付加した方が、細胞の進展が良好である。元来、Non-Treated 基材上では細胞は

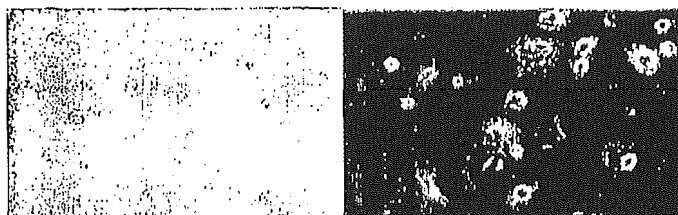


図1 静置培養

図2 振動培養

接着し難いことが知られており、1の

0Hz での結果は従来と同じ結果が得られている。2では、水平振動を付加するだけで、細胞の偽足の進展や接着面積の増大が観察され、微小振動が接着機能に影響を与えていることが明確にわかる。

## 4) まとめ

細胞膜は固定されたものでなく、常時流動しており、またそこにはめ込まれている膜タンパク質も同様に流動している。これらの分子を特異的に刺激することにより、細胞のシグナル経路を活性化し、細胞機能を制御できる可能性がある。本研究で試みた振動刺激では 10kHz という比較的低周波 (分子の運動と比較して) 領域に於いて接着現象に影響を与えることが示された。今後、より広範囲の振動、波形、付加時間および細胞種について検討することにより、有用細胞の機械的刺激による機能制御法が開発されると期待される。

Study of the effect of nano-vibration on cell functions., Akio Kishida, Tsuyosi Kimura (Tokyo Medical and Dental University), Jun Kusama, Masaomi Ishimaru, Tohru Masuzawa (Ibaragi University), Toshiya Fujisato (Natl Cardiovasc Center Res Inst), 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. TEL:03-5280-8028, FAX:03-5280-8005, email: kishida.fm@tmd.ac.jp



## 2C12 生体素材を用いた組織再生

(国立循環器病センター) ○藤里俊哉、澤田和也\*、西岡 宏、湊谷謙司、庭屋和夫  
中谷武嗣、北村惣一郎 \*現大阪成蹊短大  
(東京医科歯科大学) 岸田晶夫  
(先端医療振興財団) 吉田謙一

## 1. 緒言

欠損した組織の再建には基材となる素材が欠かせない。現在、我が国において人工心臓弁は年間1万2千個、人工血管は年間5万本が販売されている。いずれの組織とも移植後でも生体にとっては異物であり続け、自己組織と置き換わることはないため、細菌感染に弱く、心臓弁膜では石灰化等によって機能不全に至ることも多い。また、小児患者においては体の生育に伴った基材の成長性が欠如しているという欠点もある。近年、移植後に自己組織と置き換わる素材を用いた組織再建が臨床応用され始め、東京女子医大グループによる生体吸収性材料を用いた血管再生や、ドイツ・ウンボルト大学グループによる脱細胞化ブタ組織を用いた心臓弁再生等が報告されている。我々は、脱細胞化組織を用いた種々の組織再生を目指している。本報では、ミニブタを用いた同種心臓弁移植実験の結果について報告する。

## 2. 方法

クラウン系ミニブタ(株)ジャパンファーム)の心臓弁を清潔麻酔下にて採取し、4℃にて980MPa(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(パワーグラフト処理)。同種ミニブタに、肺動脈弁は心補助下にて同所性に、大動脈弁は非補助下にて自己弁を有したまま下流域の下行動脈位に移植した。所定期間経過後に、超音波にて弁機能を評価した後、移植組織を摘出して免疫染色やSEM観察にて組織学的に評価した。

## 3. 結果と考察

再生型の循環器系組織移植では、特に、高い血圧に抗する必要がある動脈系への適用が問題となっている。我々の脱細胞化組織移植では、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、弁の機能不全も認めなかった。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、移植期間が長くなるほど顕著であった。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。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。

本報告で用いた脱細胞化処理は、後の分析からリン脂質の残存が認められ(別講演にて報告)、大動脈弁組織での石灰化の要因となっている可能性がある。しかし、肺動脈組織では石灰化が認められなかったため、組織の厚みなどとの複合要因の可能性もある。現在は、リン脂質等の細胞成分をより取り除いた組織の移植実験を進めており、早期の臨床応用を目指している。

## 4. 結論

生体組織を脱細胞化することによって、移植後に細胞が浸潤し、自己組織と置換される再生型組織移植の行えることが示唆された。

## 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、文部科学研究費、科学技術振興調整費、及びヒューマンサイエンス振興財団の補助を受けて行われた。

Tissue Regeneration by Acellular Tissue Scaffold. Toshia FUJISATO, Ken'ichi YOSHIDA\*, Hiroshi NISHIOKA, Kazuya SAWADA, Kenji MINATOYA, Kazuo NIWAYA, 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, \*\*Tokyo Medical and Dental University

## 2C13

## 生体由来繊維からの脱細胞化手法の開発

(国立循環器病センター・研究所) ○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 \*現大阪成蹊短大

## [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ュ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される。しかしながら、我々の最近の研究により、それら従来の脱細胞化手法では細胞膜など一部の細胞成分について完全除去が困難であることが明らかとなった。また、それらの成分の残存が移植後の石灰化や拒絶反応と関連することも明らかとなりつつある。そこで本報では、生体由来組織の完全脱細胞化を目指し、その改良手法や新たな評価法の開発についての検討結果を報告する。

## [実験]

川いた試料は、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℃、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。脱細胞化の評価は、残存する核の定量および主として細胞膜に起因するリン脂質のそれぞれを定量することにより行った。残存核の定量は、組織染色法と直接定量法を併用し評価した。組織染色においては、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、単位面積当たりの残存核数を未処理試料と比較することによる相対評価を行った。また、直接定量においては、試料を溶解させた溶液をQIAGEN社製のDNeasyを用いて精製し、紫外部での吸光度変化から常法によりDNAの定量を行った。また、リン脂質の定量は、既報<sup>1)</sup>に準じて行った。

## [結果および考察]

ブタ大動脈を上記手法により脱細胞化処理を施し、残存する核について評価法間の比較を行った。その結果、ヘマトキシリン-エオシン染色によると、洗浄開始後およそ3日で核の残存は見られず、効果的にDNAを含む細胞核が洗浄除去されていると判定された。一方、吸光度測定により残存するDNAの定量を行った結果、洗浄開始後約1週間までは残存DNA量は減少を続け、その後定常状態になった。しかしながら、DNAは完全に除去されず僅かに残存した状態で定常状態になるという結果が得られた。これらの結果は、簡便な組織染色法のみで脱核を判定することが不十分であることを示唆している。今後、紫外吸収法による定量評価を含め、より正確な評価法の確立が必要である。また、残存するリン脂質量の定量においては、既に報告<sup>1)</sup>したように、核の除去とは異なる機構により除去されることが確認された。本発表では、上記脱細胞化法にさらに改良を加え、脱リン脂質を目指し行った検討結果を中心に報告する。

1) 澤田和也ら、平成17年度繊維学会秋季研究発表会要旨集、p51

The methods for decellularization of 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

## 演題1. 再生型組織移植のための脱細胞化処理法の開発

藤里 俊哉<sup>1)</sup>、澤田 和也<sup>2)</sup>、寺田 堂彦<sup>1)</sup>、吉田 謙一<sup>3)</sup>、船本 誠一<sup>1)</sup>、湊谷 謙司<sup>1)</sup>、  
庭屋 和夫<sup>1)</sup>、岸田 晶夫<sup>4)</sup>、中谷 武嗣<sup>1)</sup>、北村惣一郎<sup>1)</sup>  
国立循環器病センター<sup>1)</sup>、大阪成蹊短大<sup>2)</sup>、先端医療振興財団<sup>3)</sup>、東京医科歯科大学<sup>4)</sup>

脱細胞化組織を用いた再生型組織移植では、移植後に患者細胞が浸潤することで、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。既に、米国企業やヨーロッパ諸国の研究グループによって、脱細胞化同種あるいは異種心臓弁・血管組織の臨床例が報告されつつある。しかしながら、移植後早期の不全例も明らかとなっており、不十分な脱細胞化処理が原因ではないかとの指摘も行われている。我々は、独自技術による脱細胞化処理法（パワーグラフト法）を開発し、動物実験によってその有効性を検討している。

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及び心臓弁を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた10,000気圧の超高压圧加処理、続いて残渣除去処理を行うことで、組織内細胞を除去した。処理後の組織について、通常の組織学的観察の他、組織内のDNA並びに他の細胞成分の分析を行った。

昨年度のミニブタを用いた同種移植実験においては、肺動脈弁置換移植では有効な成績が得られたが、下行大動脈置換移植では石灰化や狭窄の所見が認められた。この理由については明らかではないが、両組織では厚みや構造タンパク質の組成、血圧等の血行動態に違いがある。また、石灰化については、組織内のエラスチンやリン脂質成分が起点となる可能性が報告されている。そこで、脱細胞化処理後の細胞内成分の残存について検討したところ、組織内のDNA量は1割以下に低下していたが、リン脂質成分は殆どが残存していた。この点について改良を行い、残渣除去処理における媒体を変えることで、リン脂質成分が除去できることを確認した。また、エラスチンの部分的な除去についても検討を行った。脱細胞化肺動脈弁はロス手術のホモグラフトの代替としての有用性はあるが、再生型大動脈弁組織がより求められている。これらについて動物実験を進めることで、数年以内の臨床応用を目指したい。

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

抄録

4<sup>th</sup> Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY (ETES)  
Munich, Germany Aug. 31<sup>st</sup> – Sep. 3<sup>rd</sup> 2005

*In-situ regeneration*

198

**NANO-VIBRATING CELL CULTURE SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING**

Akin Kikuchi, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Toru Masuzawa  
Faculty of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University  
2-3-10 Kanda 5-chome Chiyoda-ku 101-8362, JAPAN

One of key factors affecting the effective application of tissue engineering is the handling of cells. Especially, providing the large amount of cell is one of the major concern. 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 report the effect of 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. As basic study to use this system to stem cell culture, porcine bone marrow cell (PBMC) was cultured on this equipment. The same kind of effect on PBMC was observed. These findings may lead to a novel cell culture systems to proliferate and control stem cells.

*Vascular Engineering*

074

**REGENERATIVE VASCULAR GRAFT MADE OF COLLAGEN FIBER**

Toshin FUJISATO, Norihisa SASAYAMA, Meng YIN, Sachiko YAMAZAKI, Kenji MINATOYA, Akie KISHIDA, Takushi NAKATANI, Hisateru TAKANO, Hiroyuki HATTORI  
National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-1, Suita, Osaka, JAPAN

Regenerative grafts have been widely studied to be applied to pediatric patients by their growth potential after the implantation. A regenerative profile of a novel collagen graft was studied in a porcine model. The collagen graft may be digested by infiltrated cells and show a different profile from artificial biodegradable materials.

The regenerative collagen grafts of 2.5 cm in length and 6 mm in diameter were made of cross-linked porcine collagen fibers and were implanted at the descending aorta in miniature pigs. The pigs were then sacrificed at 4 and 8 weeks after the implantation and the grafts were examined by histologically.

There was no dilatation, no aneurysmal change, and no thrombus formation observed after the implantation. The vessel wall was newly reconstructed with parallel alignment of smooth muscle cells and elastin and collagen fibers. There was no calcification detected in the explanted tissue. The inner surface of the grafts was completely covered with endothelial cells after 8 weeks.

The novel regenerative collagen graft may be used in the aortic system and applied to pediatric patients.

## 341 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

東医歯大 ○木村 剛 東医歯大 南 広祐 関西大 大矢 裕一  
 関西大 大内 辰郎 岡山大 六雄 伸吾 岡山大 吉澤 秀和  
 国循セ研 岡田 正弘 国循セ研 古菌 勉 国循セ研 藤里 俊哉  
 東医歯大 岸田 晶夫

### [緒言]

超高压技術は、無機・有機科学、医療、食品分野等で幅広く利用されており、例えば、人工ダイヤモンドの合成や食品の加工、滅菌に用いられている。また学術的研究のひとつとしては、タンパク質の変性に関する熱力学パラメータの一つとして圧力が検討されている。クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などを介して様々な構造と機能を有するタンパク質は、圧力印加によりそれらの相互作用の変化により変性し、高压下においては、疎水性相互作用が弱まり、水素結合が強調されることが報告されている[1, 2]。そこで、我々は、この水素結合性の強調に着目し、水素結合性高分子への圧力印加による新規構造体の創出について検討している。これまで、水酸基を有する合成高分子であるポリビニルアルコール (PVA) への圧力印加により、水素結合を介したナノ粒子、微粒子、ゲルなどの様々な構造体を得られることを報告した。また、これらの構造体のドラッグデリバリーシステムへの利用を目的とし、天然由来の水素結合高分子であるDNAとPVAとの混合系へ超高压を印加した結果、PVA/DNA複合体を得られ、細胞への遺伝子導入が達成された[3]。

本研究では、構造体へのさらなる機能付与を目的とし、無機粒子と水素結合性高分子の混合系への超高压印加により、新規な無機粒子／水素結合性高分子複合体の創製に関して検討した。無機粒子としては、ハイドロキシアパタイト (HAP) を選択した。HAPは、リン酸カルシウムの結晶体であり、骨の成分であることから生体適合性が高く、従来よりバイオマテリアルとして用いられている。これまでに我々は、新しいHAPのナノ粒子化法を開発し、種々の高分子との複合材を創出してきた。複合材は、細胞への高い親和性を示し、また、高分子の物性を損なわないことを報告してきた[4]。

### [実験]

水素結合性高分子としては、PVA、デキストラン (DEX)、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた (表1)。用いたHAPは、マイクロエマルジョン法により調整し、形態の制御された種々のスケール (50~400nm) のナノHAP粒子を得た。また、異なる結晶化度のナノHAP粒子も調整した。まず、ナノ粒子を含有したPVA粒子を作製するため、低濃度PVA水溶液(0.

01~1%)とナノHAP粒子(0.01~10mg/ml)を種々の割合で混合し、超高压処理装置(Dr.CHEF;(株)神戸製鋼所)にて40℃、10000気圧で所定時間加圧した(超高压処理)。得られた混合液を目視および顕微鏡下で観察し、SEM観察、AFM観察、FT-IR測定により物性解析を行った。次に、HAP含有ハイドロゲルを作製するため、高濃度PVA水溶液(5%以上)とナノHAP粒子(0.01~10mg/ml)を種々の割合で混合し、超高压処理を施した。さらに、天然由来の水素結合性高分子として種々のDNA(プラスミドDNA、サケ白子DNA、1kbラダーDNAマーカー)を選択し、DNA水溶液を上記のPVA、ナノHAP混合液と混合し、超高压処理を施し、三成分系の粒子、ハイドロゲルを作製した。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、DNA染色法等の検討により評価した。上記複合材の細胞親和性、細胞への遺伝子導入を検討するため、マウス由来の繊維芽細胞(L929)、マクロファージ(RAW264)、ラット骨髄細胞を用いた。ラット骨髄細胞は、ラット大腿骨より採集し、培養シャーレ播種後、接着した細胞を使用した。

Table 1. Various hydrogen bonding polymers used.

PVA	D.P.*1	D.S.*2	M.W.
PVA105	500	98.5	22000
PVA117H	1700	99.3	74800
PVA140	4000	99.8	176000
PEG	400	—	8000
Dextran	—	—	15000

\*1: D. P. → Degree of polymerization

\*2: D. S. → Degree of saponification

### [結果と考察]

種々の分子量のPVA水溶液とナノHAP粒子を混合し、超高压処理を施した。高分子量のPVA(PVA117H、PVA140)を低濃度(1%以下)で用いた場合、PVA溶液と同様にナノ粒子、微粒子が濃度依存的に得られた。一方、低分子量のPVA105では、ナノ粒子、微粒子は得られなかった。これらより、用いたPVAの分子量をコントロールすることで複合体形成

を制御できること明らかとなった。また、DNAを混合した場合においても、ナノ粒子、微粒子（PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体）が得られ、種々の細胞への遺伝子導入を行った。マウスマクロファージ様細胞であるRAW264細胞の場合、DNA単独では全く遺伝子発現が認められなかったが、PVA/DNA複合体およびPVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体で遺伝子発現が認められた。一方、ラット骨髄細胞においては、PVA/DNA複合体では遺伝子発現が認められず、PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体で有意な遺伝子発現が示された。これらの結果は、RAW264細胞は貪食能が高いため、両方で遺伝子発現が示されたが、一方のラット骨髄細胞は、比較的低い貪食能であるためPVA/DNA複合体では発現が認められず、PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体では、HA p の高い細胞親和性とエンドサイトーシス経路でのpH低下によるHA p の溶解に伴うエンドソーム破壊のために有意な遺伝子発現が認められたと考察している。

高濃度PVA溶液（5%以上）への超高压処理においては白色のハイドロゲルが得られ、PVA溶液の濃度上昇に伴うハイドロゲルの力学的強度の向上が示された。また、DNAの混合系においても白色のハイドロゲルが得られ、青色のDNA染色剤で得られたハイドロゲルを染色した結果、青色に染色されたハイドロゲルが得られた。PVAハイドロゲルの場合にはほとんど染色されなかったことから、DNAを含有したハイドロゲルが得られたと考えられる。これらの結果は、超高压技術を用いることで、無機・有機ハイブリッド材料を容易に作製できることを示している。得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を検討した。5、48時間培養後のラット骨髄細胞の接着結果を図1に示す。5時間後では、ナノHA p 粒子を含有しないPVAハイドロゲル（図1（A））に比べ、ナノHA p 粒子/PVAハイドロゲル（図1（B））での接着細胞数の有意な増加が認められた。また、後者においては、48時間培養後で十分な細胞の伸展が認められた（図1（C））。これら結果より、ナノHA p 粒子の複合化による機能性の付与と生医学領域

#### 【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

#### 【参考文献】

- 1) E. Doi, A. Shimizu and N. Kitabatake, in: R. Hayashi (Ed.), High Pressure Bioscience and Food Science. Sanei Press, 171(1993)
- 2) E. Doi, A. Shimizu and N. Kitabatake, Food Hydrocol. 5, 409(1991)
- 3) T. Kimura, A. Okuno, K. Miyazaki, T. Furuzono, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, Y. Kitamura,

T. Fujisato and A. Kishida, Mater. Sci. Eng C, 24, 797(2004)

4) T. Furuzono, S. Yasuda, T. Kimura, J. Tanaka and A. Kishida, J. Artifi. Org., 7, 137(2004)

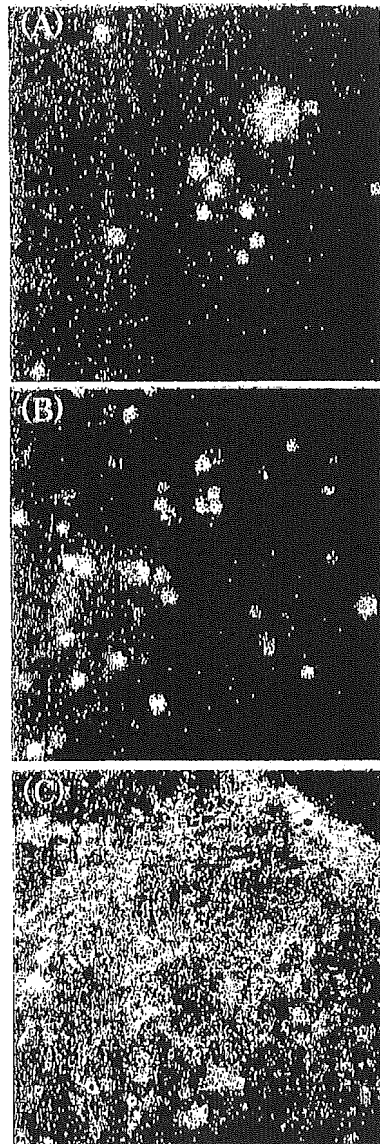


Fig1. Fluorescent images of the adhesion of rBMC cells stained by calcein-AM on nano-HAp/PVA composite hydrogel after (A)5h and (B) 48h incubation.

## 459 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

東医歯大 ○岸田晶夫 国循セ研 藤里俊哉 東医歯大 木村剛  
 国循セ 中谷武嗣 国循セ 湊谷謙司 国循セ 庭屋和夫  
 国循セ 北村惣一郎

## 〔緒言〕

細胞を積極的に用いる再生医療においては、重要な基盤技術のひとつとして細胞の足場（スキャフォールド）材料の開発がある。合成高分子であるポリ乳酸やその誘導体が用いられているが、成形性の低さや力学特性により、複雑な構造の組織、軟組織、動的組織への利用は困難と考えられる。生体由来の高分子であるコラーゲンは、優れた細胞接着性等の生理活性を有することから研究が盛んになされているが、その低い力学強度の改善が課題となっている。無機材料であるハイドロキシアパタイトは骨の成分であることから骨再生足場として用いられているが、成形加工の難しさや硬くて脆い物性から用途の制限などのいくつかの問題点を残している。最近では上記のような成分のビルドアップによる組織構築ではなく、生体組織そのものを用いる試みがなされている。ブタ、ウシ等の動物の組織から細胞を除去（脱細胞化）し、構造組織だけに用いる方法である。この方法では、生体組織そのものといつてよいような、しなやかさと強さを有しており、複雑な形態の組織や高機能な組織への適用が可能と考えられる。また、生体の組織構造を保持している点で組織の早期再生が期待できる。脱細胞化法としては、界面活性剤や酵素を用いる方法が試みられているが、組織深部の脱細胞化が困難であり、脱細胞中のコンタミ、力学強度の低下など解決すべき問題が残る。我々は、このような諸問題をふまえて、超高压技術を用いた新しい脱細胞化法の開発を行っている。生体組織に超高压処理を施すことで、細胞を破壊し、マイクロ波照射により細胞残渣を洗浄する手法である。本手法では、従来の界面活性剤や酵素を用いた方法と比較し、力学特性を保持した状態での脱細胞化が可能であり、また、細胞だけでなく菌、ウイルスを除去可能であり、高い滅菌性を示す。本研究では、超高压処理法により得られた脱細胞化

生体組織の再生医療用スキャフォールドとしての応用について、種々の組織を用いて検討した。

## 〔実験〕

成体ブタの心筋、血管、大腿骨を購入し、各組織を所定のサイズに調整した。冷間等方圧加圧装置（（株）神戸製鋼所）を用いて、種々の温度で10000気圧、10分間印加した（超高压印加処理）。この時、10000気圧への昇圧速度を変化させ、昇圧による温度上昇を制御した。その後、各組織を種々の培養液に浸漬し、種々の振とう洗浄により細胞成分の残渣を除去した。得られた脱細胞化組織標本の組織断面をヘマトキシリン-エオジン染色（HE染色）により顕微鏡観察し、SEM観察にて表面構造を解析することで脱細胞化を評価した。また、処理組織よりDNAを抽出し、定量することで脱細胞化率を算出した。さらに、抽出DNAを用いて、ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のDNAをPCR反応にて増幅後、PCR産物の電気泳動を行うことで、処理組織内のPERVを測定した。脱細胞化組織の組織再構築を目的とし、新しい細胞を組織表面あるいは組織内に播種した。

## 〔結果と考察〕

超高压印加処理における昇圧速度の系内温度への影響は大きく、急激な昇圧による急激な温度上昇による組織の構造変化への影響が考えられる。そこで、様々な昇圧速度で加圧し、系内温度の変化を調査した。比較的穏和な昇圧速度で各組織への超高压印加処理を施した結果、急激な温度上昇は認められず、安定した温度条件下での組織への超高压印加が可能であった。次に、洗浄期間の脱細胞化への影響を検討するため、種々の洗浄期間の組織標本をHE染色し、光学顕微鏡観察およびDNAの定量にて評価し

た。脱細胞化処理後の組織内の細胞核数は、洗浄期間に依存し、洗浄初期では染色された細胞核が観察されたが、長期間の洗浄により細胞核は全く確認されなくなった(図1-C)。DNA定量においても同様の傾向が示された。また、洗浄初期では組織表面の付近の脱細胞化が観察され、洗浄期間の延長に伴い深部での脱細胞化が達成された(図1-A, B, C)。完全脱細胞化組織のPERVのDNAは検出されなかった。これまでに報告されている酵素(トリプシン)処理法にて完全脱細胞化した組織では、組織構造の大きな変化が認められるのに対し、本手法では細胞化組織構造の保持が示された。上記の結果は、心筋、血管においてほぼ同様の結果であり、また、大腿骨、肺、肝臓においても本手法により完全脱細胞化が達成された。

脱細胞化組織を再生医療用スキャフォールドとして用いるためには、新しい細胞が脱細胞化組織に生着する必要がある。そこで、新しい細胞による脱細胞化組織の再構築を試みた。脱細胞化組織上に細胞を播種し、所定期間培養後、生着細胞数の計測とDNA定量を行った。また、マイクロシリンジを用いて脱細胞化組織への細胞注入を行い、上記と同様に評価した。細胞播種法では、培養期間の延長に伴う生着細胞数の増加が示されたが、細胞注入法では、有意な細胞数の増加は認められなかった。これは、細胞表面に比べ組織内での栄養、酸素等の十分な供給がなされなかったと考えられ、今後の課題として効率的な培養装置の開発の検討が必要である。

#### [謝辞]

本研究は、厚生労働省科学研究費ならびにヒューマンサイエンス振興財団研究費の補助を受けて行われた。

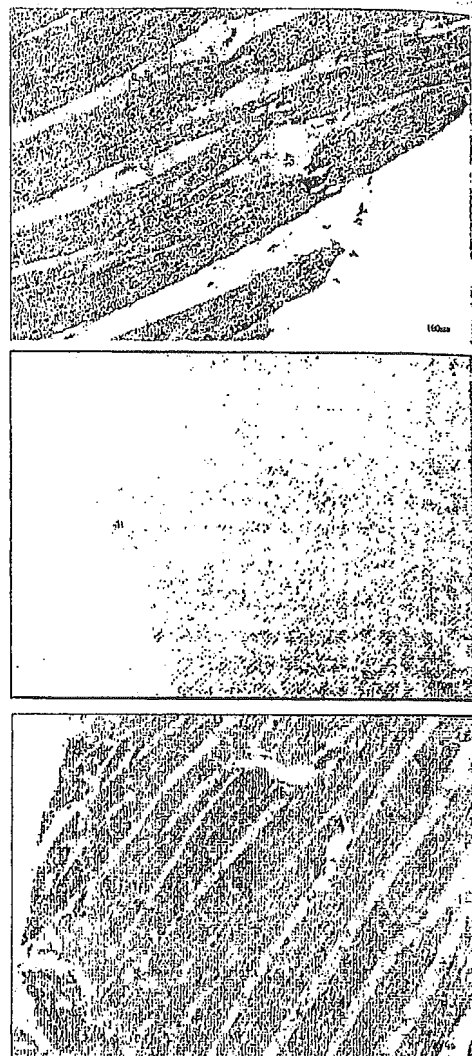


図1. 心筋組織のHE染色標本。(A) 未処理、(B) 超高压処理後、洗浄3日間、(C) 超高压処理後、洗浄14日間



## 生体素材を用いた再生型人工心臓弁

国循セ ○藤里俊哉・吉田謙一・船本誠一・湊谷謙司・庭屋和夫  
中谷武嗣・北村惣一郎

東医歯大 岸田晶夫

## 【緒言】

現在、我が国において人工大動脈弁は年間1万2千個が輸入販売されている。パイロライトカーボン製の機械弁とブタ心臓弁を架橋処理した生体弁とがあるが、いずれも生体にとっては異物であり、自己組織と置き換わることはない。このため、細菌感染に弱く、機械弁では血栓付着、生体弁では石灰化によって機能不全に至ることも多い。また、小児患者においては体の生育に伴った成長性が欠如しているという欠点もある。近年、移植後に自己組織と置換される素材を用いた組織再建が臨床応用され始め、東京女子医大グループによる再生型血管や、ドイツ・フンボルト大学グループによる再生型心臓弁が報告されている。我々は、細胞を除去した生体組織を用いた再生型心臓弁の開発を目指している。

## 【実験】

クラウン系ミニブタ（株）ジャパンファームの心臓弁を清潔麻酔下にて採取し、4℃にて980MPaの超高静水圧印加処理を10分間行い、組織内細胞を除去した。同種ミニブタに、肺動脈弁は心補助下にて同所性に、大動脈弁は非補助下にて自己弁を有したまま下流域の下行動脈位に移植した。所定期間経過後に、超音波診断装置にて弁機能を評価した後、移植組織を摘出して免疫染色やSEM観察にて組織学的に評価した。

## 【結果と考察】

再生型組織移植では、高い血圧に抗する必要がある動脈系への適用が問題となっている。本脱細胞化心臓弁では、移植後の破裂等は認めなかった。移植6ヶ月後、肺動脈弁では弁の機能不全は認められず、内腔面は血管内皮細胞で完全に覆われていた。組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。炎症反応や石灰化は全く認められなかった。これに対し、大動脈弁では弁葉の縮退が認められた。これは移植後に弁葉が有効に機能していないためと考えられた。内腔面は血管内皮細胞で完全に覆われていたが、組織内部には石灰化が認められ、炎症細胞の浸潤も認められた。移植後に判明したことであるが、本細胞除去処理ではリン脂質の残存が認められ、大動脈弁組織での石灰化の要因となった可能性がある。しかし、肺動脈組織では石灰化が認められなかったため、組織の厚みなどの複合要因の可能性も考えられる。臨床現場では、肺動脈弁よりも大動脈弁をより必要としている。現在、リン脂質等の細胞成分をより除去した大動脈弁の移植実験を進めており、早期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、科学技術振興調整費、及びヒューマンサイエンス振興財団の補助を受けて行われた。

**Regenerative Heart Valve using Acellular Tissue.**

Toshia FUJISATO, Kenichi YOSHIDA, Seiichi FUNAMOTO, Kenji MINATOYA, Kazuo NIWAYA, Akio KISHIDA\*, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA

(National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. \*Tokyo Medical and Dental University) Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

**Key Word:** tissue engineering / acellular tissue / heart valve /

**Abstract:** Aortic and pulmonary heart valves were isolated from miniature pigs under the sterile condition. They were washed immediately and treated by cold isostatic pressing of 980 MPa followed by washing at 4°C for cell disruption and removal. The acellular tissues were transplanted to allogenic miniature pigs. The grafts were explanted and subject to the histological study after 6 months. The grafts were completely cell free after the tissue treatment. There was no dilatation, no aneurysmal change, and no thrombus formation observed in all cases of the both tissues after transplantation. In the pulmonary valve study, the inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by cells from both sides of endothelium and outer tissue. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells mainly by smooth muscle cells. There was no inflammation and calcification observed in the tissue. In the aortic valve study, the endothelium and cell infiltration was same as the pulmonary valve study, however intimal proliferation was notable and calcification was observed along to elastic fibrils in a middle area of the acellular graft. Acellular heart valves processed by cold isostatic pressing were well infiltrated by host cells after transplantation. However, remodeling process may be different in between aortic and pulmonary tissues.

## 3X01

超高压法によるナノ無機粒子/高分子コンポジットの調製と  
遺伝子キャリアーへの応用

(東医歯大 生材研) ○木村 剛、南 広祐  
(関西大 工) 大矢 裕一、大内 辰郎  
(岡山大 環境理工) 六雄 伸吾、吉澤 秀和  
(国循セ研) 岡田 正弘、古籾 勉、藤里 俊哉  
(東医歯大 生材研) 岸田 晶夫

## 【緒言】

我々は、超高压下 (6000 気圧以上) における物質の水素結合の強調性に注目し、超高压法による水素結合を介した分子集合体の形成に関して検討している。これまで、種々の水素結合性高分子への超高压印加により、ナノ粒子、微粒子、そしてハイドロゲルが形成されることを明らかにした。本研究では、水素結合性分子集合体への新たな機能性の付与を目的として、ナノスケールのハイドロキシアパタイト (HAp) 焼結体と水素結合性高分子とのコンポジットの調整について検討した。ナノ HAp との複合化による細胞親和性、力学特性等の向上が期待できる。また、天然の水素結合性高分子である DNA を用い、ナノ HAp と水素結合性高分子からなる三成分系コンポジットの調整、さらに、それらのコンポジットの細胞親和性および細胞への遺伝子送達を検討したので合わせて報告する。

## 【実験】

水素結合性高分子のモデルとしてポリビニルアルコール (PVA) を選択し、種々の分子量、酸化度の PVA を用いた (表 1)。これらはクラレ (株) より提供していただいた。ナノ HAp は、マイクロエマルジョン法により調整し、形態の制御された種々のスケール (50~400nm) のナノ HAp 粒子を得た。また、異なる結晶化度のナノ

Table 1. Various polyvinyl alcohol used.

PVA	D.P.*1	D.S.*2	M.W.
PVA105	500	98.5	22000
PVA117H	1700	99.3	74800
PVA140	4000	99.8	176000

\*1 : D. P. → Degree of polymerization

\*2 : D. S. → Degree of saponification

## Preparation of inorganic nanoparticles/polymer composite for gene carrier

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, Yuichi OHYA<sup>1)</sup>, Tatsuro OUCHI<sup>1)</sup>, Shingo MUTSUO<sup>2)</sup>, Hidekazu YOSHIZAWA<sup>3)</sup>, Tsutomu FURUZONO<sup>3)</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>3)</sup>, Akio KISHIDA

(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. <sup>1)</sup>Kansai University, <sup>2)</sup>Okayama University, <sup>3)</sup>National Cardiovascular Center Research Institute)

Tel&Fax: 03-5280-8029, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

**Key word:** ultra high pressure / inorganic nano-particles / hydroxyl apatite / hydrogen bond / composite / gene carrier

**Abstract:** In order to form inorganic particles/polymers composites, nano-scaled hydroxyl apatite (HAp) and polyvinyl alcohol (PVA) having various molecular weights were mixed at different concentration and treated by ultra high pressure processing. In the case of higher PVA concentration, hydro gels containing nano-HAp particles were obtained. The good cell adhesion on the hydro gel was showed. At lower PVA concentration, the particles of the nano-HAp particles/PVA composites or nano-HAp/PVA/DNA composites were formed, which also showed effective DNA delivery.

HAp 粒子も調整した。PVA 水溶液とナノ HAp 粒子を様々な割合で混合し、超高压処理装置 (Dr. CHEF : (株)神戸製鋼所) にて 40°C、10000 気圧で所定時間加圧した (超高压処理)。得られた混合液を目視および顕微鏡下で観察し、SEM 観察、FT-IR 測定により物性解析を行った。また、天然由来の水素結合性高分子として DNA (プラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー DNA マーカー) を選択し、種々の濃度で DNA 水溶液、PVA 水溶液およびナノ HAp を混合し、超高压処理を施した。DNA との構造体形成については、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。さらに、マウス由来の繊維芽細胞 (L929)、マクロファージ (RAW264)、ラット骨髄細胞 (rBMC) を用いて、HAp/PVA コンポジットおよび HAp/PVA/DNA コンポジットへの細胞接着性と遺伝子導入について検討した。

#### [結果と考察]

種々の分子量の PVA 水溶液とナノ HAp を様々な割合で混合し、超高压処理した。高分子量の PVA (PVA117H、PVA140) を高濃度 (5%以上) で用いた場合、ハイドロゲルが得られ、低濃度 (1%以下) では、ナノ粒子、微粒子が得られた。一方、低分子量の PVA105 においては、ハイドロゲル、粒子は作製されなかった。これらより、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構造体形成を制御できることがわかった。上記で得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を調査した。5 時間培養後の rBMC の接着結果を図 1 に示す。ナノ HAp を含有しない PVA ハイドロゲル (図 1(A)) に比べ、ナノ HAp/PVA ハイドロゲル (図 1(B)) において有意な接着細胞数の増加が認められた。また、後者においては細胞の伸展も認められ、これらより、ナノ HAp による機能性の付与が示された。

次に、PVA/HAp 水溶液に、DNA を混合し超高压処理を施した。上記と同様に、高分子量 PVA の場合に、高濃度でハイドロゲルが、低濃度で粒子が得られた。DNA の含有は、ハイドロゲルでは染色法を、粒子では熱融解後の溶液のアガロースゲル電気泳動により確認した。ハイドロゲルでは、DNA の十分な染色が示され、また、アガロースゲル電気泳動においても DNA のバンドが確認できた。これらより、ナノ HAp/PVA/DNA から成る三成分系コンポジットの形成が示された。発表では、培養細胞を用いた遺伝子導入について詳細に報告する。

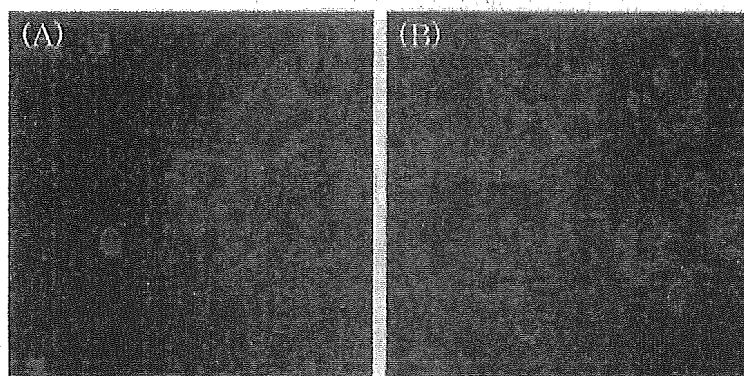


Fig1. Fluorescent images of the adhesion of rBMC cells stained by calcein-AM on (A) PVA hydro gel and (B) nano-HAp/PVA composite hydro gel.

## 2X18

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

(東医歯大 生材研) ○木村 剛、南 広祐  
(関西大 工) 大矢 裕一、大内 辰郎  
(岡山大 環境理工) 六雄 伸吾、吉澤 秀和  
(国循セ研) 岡田 正弘、古籔 勉、藤里 俊哉  
(東医歯大 生材研) 岸田 晶夫

## 【緒言】

培養細胞への遺伝子送達法の一つであるリン酸カルシウム法は、安価かつ簡便であるため従来から用いられている。しかしながら、高い凝集性およびその制御の困難さによる低い再現性が問題として挙げられている。これまで、片岡等は、ポリエチレングリコールとポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体を用いて、DNA とリン酸カルシウム微結晶を内包する単分散な高分子ナノミセルを開発し、オリゴ DNA、siRNA の細胞内送達に成功している。本研究では、リン酸カルシウムの物性制御による遺伝子導入効率の向上を目的とし、結晶化度、サイズが精密に制御されたハイドロキシアパタイト (HAp) 単結晶粒子を用いて、超高压印加法による HAp 粒子を内包した PVA/DNA 複合体の調整について検討した。また、培養細胞への遺伝子導入についても検討したので報告する。

## 【実験】

分子量および酸化度の異なる PVA を用いた。これらはクラレ (株) より提供していただいた。マイクロエマルジョン法により、形態、結晶化度、サイズが制御された HAp 粒子を調整した。DNA としてプラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー DNA マーカーを用いた。種々の濃度に調整した PVA 溶液に HAp 粒子を混合し、超音波処理を施すことで HAp 粒子を分散させた。さらに、所定濃度の DNA 水溶液を混合し、超高压処理装置 (Dr. CHEF ; (株) 神戸製鋼所) を用いて 37℃、10000 気圧、10 分間の超高压処理

**Gene transfection into mammalian cells using PVA/DNA complexes encapsulating inorganic nanoparticles**

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoon NAM, Yuichi OHYA<sup>1)</sup>, Tatsuro OUCHI<sup>1)</sup>, Shingo MUTSUO<sup>2)</sup>, Hidekazu YOSHIZAWA<sup>3)</sup>, Tsutomu FURUZONO<sup>3)</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>3)</sup>, Akio KISHIDA

(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, <sup>1)</sup>Kansai University, <sup>2)</sup>Okayama University, <sup>3)</sup>National Cardiovascular Center Research Institute)

Tel&Fax: 03-5280-8029, e-mail: kimurat.f.m@tmd.ac.jp

**Key word:** ultra high pressure / inorganic nano-particles / hydroxyl apatite / hydrogen bond / nano-composite / gene delivery

**Abstract:** Polyvinyl alcohol (PVA)/DNA complexes encapsulating nano-scaled hydroxyl apatite (HAp) particles were formed by ultra high pressure processing. The good dispersiveness of them was showed comparison with the nano-HAp particles/DNA complexes. Using fluorescent labeled DNA molecules, the cellular uptake of the PVA/DNA complexes encapsulating nano-HAP was investigated. The intracellular distribution of them was observed by fluorescent microscope. The high transfection efficiency was achieved using PVA/DNA complexes encapsulating nano-HAP, suggesting the effective DNA release from endocytosis.