

を施した (図 1)。得られた混合溶液を目視、顕微鏡、SEM により観察した。複合体形成をゲル電気泳動にて確認した。マウス由来の繊維芽細胞 (L929)、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264)、ラット骨髄細胞 (rBMC) を用いて、複合体の細胞による取り込みおよび遺伝子発現を検討した。

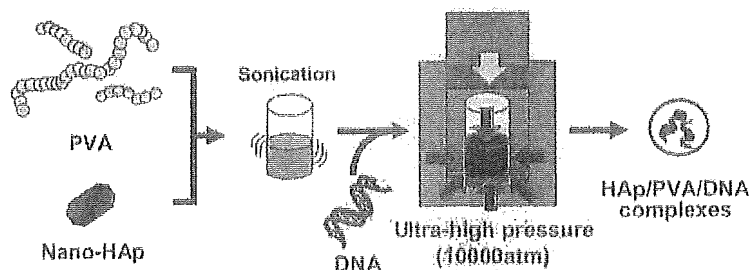


Fig1. Preparation of PVA/DNA complexes encapsulating HAp particles

【結果と考察】

ナノ HAp 粒子単独あるいは DNA の混合系では、若干のナノ HAp の凝集が観察された。一方、PVA 水溶液へのナノ HAp の混合、超音波処理により、ナノ HAp の安定した分散が達成され、さらに DNA の混合においても凝集、沈殿は認められなかった。これより、PVA による凝集抑制効果が示された。ナノ HAp、PVA、DNA 混合溶液を超高圧処理した結果、1w/v%PVA 溶液では約 $1\mu\text{m}$ の微粒子が、0.1w/v%では、約 200nm のナノ粒子が作製された。蛍光色素でラベルした DNA (FITC-DNA) を用いて、細胞による DNA の取り込みを調査した。コントロールであるリン酸カルシウム法では、リン酸カルシウムの凝集、沈殿が観察された。一方、複合体では、凝集は認められず、細胞表面への吸着と取り込みが示された。また、蛍光タンパク質遺伝子をコードしたプラスミド DNA を用いて、遺伝子発現効率を検討した。その結果を図 2 に示す。DNA のみの場合は発現は認められず (図 1(A))、また、ナノ HAp/PVA/DNA の混合液においても遺伝子発現は示されなかった (図 1(B))。一方、超高圧処理により作製したナノ HAp/PVA/DNA 複合体においては有意な遺伝子発現が示され (図 1(C))、遺伝子導入効率の良い Lipofectamine2000 と同程度であった。

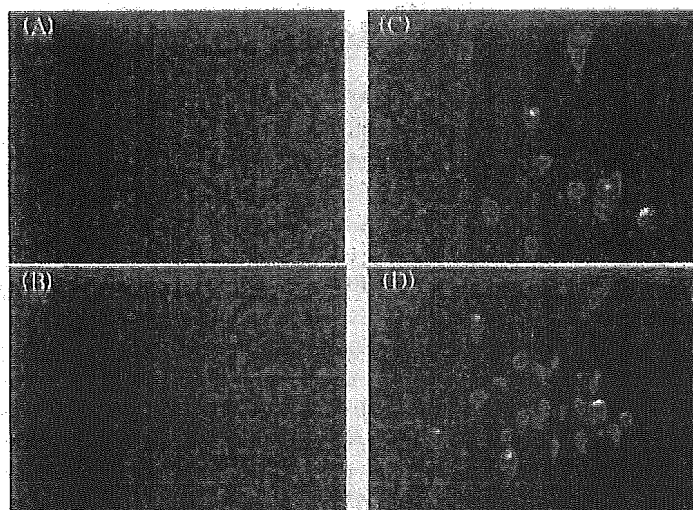


Fig2. Gene expression in cells transfected by (A) DNA, (B) nano-HAp/PVA/DNA mixture, (C) nano-HAp/PVA/DNA complex and (D) Lipofectamine2000.

No.534

Exhibition Area-I (3F)

24rd

Host cell infiltration to transplanted acellular allografts in porcine model*Toshia Fujisato^{1*}, Meng Yin^{2,3}, Kenji Minatoya¹, Kazuo Niwaya¹,**Akio Kishida⁴, Takeshi Nakatani², Soichiro Kitamura³**¹Regenerative Medicine&Tissue Engineering, ²Organ**Transplantation, ³Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular**Center, Osaka 565-8565, Japan, ⁴Institute of Biomaterials and**Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-**0062, Japan**¹Current Institution: Shanghai Children's Medical Center,**Shanghai Second Medical University***Email:fujisato@ri.ncvc.go.jp*

Objectives: Although acellular graft transplantation is a promising therapy for repairing damaged tissue especially for pediatric patients for its growth potential, it is still unclear of a process in tissue remodeling after its transplantation. We examined cell infiltration to the transplanted acellular grafts and its difference between aortic and pulmonary tissues.

Methods: Descending aortas and pulmonary heart valves were isolated from miniature pigs under the sterile condition. They were treated by cold isostatic pressing of 980 MPa followed by washing at 4°C for cell removal (PowerGraft technology). There was no detergent used in the process. Each of the acellular tissue was transplanted to allogeneic miniature pig orthotopically. The animals transplanted were sacrificed after 3 or 6 months. The explanted grafts were subject to the histological study for determination of the host cell infiltration.

Results: The grafts applied to PowerGraft technology were completely cell free. There was no dilatation, no aneurysmal change observed in all cases after transplantation. In the pulmonary valve study, the inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by the host cells after 3 months. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells after 6 months, mainly by smooth muscle cells. In the descending aorta study, the endothelium and cell infiltration was nearly same as the pulmonary valve after 3 months, however calcification was observed along to elastic fibrils in a middle area of the acellular graft after 6 months.

Conclusions: Acellular grafts processed by cold isostatic pressing were well infiltrated by host cells after transplantation. However, remodeling process may be different between aortic and pulmonary tissues.

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

○藤里俊哉, 吉田謙一, 船本誠一, 湊谷謙司, 庭屋和夫, 永谷憲哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎 (国立循環器病センター)
岸田晶夫 (東京医科歯科大学)

Decellularization of biological tissue by ultrahigh pressure treatment and its application to regenerative tissue transplantation

Toshiya FUJISATO, Ken'ichi YOSHIDA, Seichiro FUNAMOTO, Kenji MATOYA, Kazuo NIWAYA, Noritoshi NAGAYA,

Takeshi NAKATANI, Seichiro KITAMURA (National Cardiovascular Center)

Akiyoshi KISHIDA (Tokyo Medical and Dental University)

1. はじめに

欠損した生物組織の再建には基材となる素材が欠かれない。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。このため、細菌感染に弱く、人工心臓弁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。最近、移植後に自己組織と置き換わる素材を用いた再生型の組織再建法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・フンボルト大学グループによる脱細胞化肺組織を用いた心臓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建を目指している。生物組織の脱細胞化方法としては、界面活性剤や酵素、低あるいは高張液等を用いた薬液への浸漬処理が報告されている。我々は、超高静水圧印加によって生物組織内の細胞やウイルスを破壊し、続けて洗浄処理によって細胞を除去する方法を開発した。本報では、ミニブタ組織の脱細胞化処理と、その心臓弁および血管を用いた同種移植実験の結果について報告する。

2. 実験方法

クラウン系ミニブタ (体重5~10kg, (株) ジャパンファーム) の肺動脈弁および下行大動脈 (長さ3cm) を清潔麻酔下にて採取し、生理食塩水を満たしたプラスチックバッグ内に密封した。冷間等方圧加圧装置 ((株) 神戸製鋼所) を用い、4℃にて980MPaの超高静水圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を破壊した。続けて、生理食塩水をベースとする洗浄液にて2週間攪拌洗浄した。同種ミニブタに、脱細胞化肺動脈弁は心補助下にて、脱細胞化下行大動脈は非補助下にて同所性に移植した。所定期間経過後に、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

薬液処理による脱細胞化では、処理液の組織内への浸透が律速となり、組織深部や硬組織の脱細胞化は容易でない。このため、残存成分による拒絶反応と思われる移植後早期の不全例も報告されている。一方、超高静水圧印加処理による脱細胞化では、組織内部まで処理が及ぶとともに、既に日本大学大学院林教授らによって報告されているように、細菌やウイルスの不活化によって、同時に高い安全性も達成できる。

既に臨床応用が開始されている組織再生では、静脈系および右心系組織が対象であり、より高い血圧に抗する必要のある左心系組織への適用は未だ十分な成功例が報告されていない。我々の脱細胞化組織では、右心系である肺動脈弁はもとより、左心系である下行大動脈でも移植組織の破裂等は認めなかった。肺動脈弁では、弁の機能不全も認めなかった。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、組織内には周囲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。石灰化も全く認めなかった。これに対し、下行大動脈では細胞の浸潤は肺動脈弁と同程度であったが、移植1ヶ月後においてスポット状の石灰化を認めた。また、3および6ヶ月後では、石灰化もより顕著であった。

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、大動脈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、組織の厚みなどの複合要因の可能性もある。現在、石灰化の原因と推定されるリン脂質やエラスチン繊維を取り除いた脱細胞化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。

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、およ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。

2003

超高静水圧処理による分子集合体の開発

○ 木村剛, 南広祐 (東医歯大生材研), 六雄伸悟, 吉澤秀和 (岡山大環境理工),
藤里俊哉 (国循七研), 岸田晶夫 (東医歯大生材研)

Development of molecular assembly by ultra high pressure technology

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, (Tokyo Med. Dent. Univ.) Shingo MUTSUO, Hidekazu YOSHIKAWA (Okayama Univ.)
Toshiya FUJISATO (National Cardio. Center Res. Inst.), Akio KISHIDA (Tokyo Med. Dent. Univ.)

1. はじめに

近年、ファンデルワールスカ、クーロン力、水素結合など比較的弱い分子間相互作用によって形成される分子集合体に関する研究が活発に行われている。そのほとんどは、精密な分子設計に基づき合成された分子が、熱、塩濃度、pHなどの条件の最適化された環境において集合化がなされる。我々は、新たな分子集合体法として、高圧条件下において物質の相互作用のうち水素結合が強調されること^{1,2)}に着目し、水素結合性高分子への超高静水圧処理による分子集合体の形成について検討している。本研究では、汎用的な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を用いて、さまざまな条件下での高分子集合体形成に関して検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

水素結合性高分子のモデルとして、分子量の異なるポリビニルアルコール (PVA)、ポリエチレングリコール (DEX)、デキストラン (DEX) を用いた。0.1、1.0、10%水溶液調整し、単独あるいは混合したのちに、圧力印加装置 (Dr. cheif, (株) 神戸製鋼所) を用いて、種々の圧力下にて静水圧処理を行った。目視観察、SEM観察、DLS測定にて分子集合体の解析を行った。

3. 結果と考察

まず、圧力の影響を調べるため、10% PVA溶液にさまざまな圧力で静水圧処理を行った。印加圧力の上昇に伴い粘濁な溶液と変化し、6000 気圧以上で脆弱なハイドロゲルが得られ、10000 気圧においては成形性の良い白色のハイドロゲルが得られた。これらを100℃にて加温した結果、透明溶液になったことから、水素結合を介した分子集合体であることが示された。次に、種々の濃度のPVA水溶液に超高静水圧処理 (10000 気圧) を行った。濃度により異なる溶液変化が見られ、1.0%では白濁溶液が得られたが、0.1%では透明溶液のままであった。これらをSEM観察した結

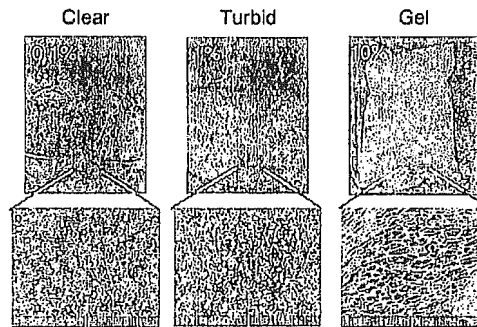


Fig1. Ultra-high pressure treatment of PVA solutions at various concentrations

果、それぞれ約 200nm の粒子と、その凝集体が形成されていた (図 1)。また、印加圧力を調整することで粒子径の制御が可能であった。

一方、PEG、DEXにおいては、単独溶液では超高静水圧処理による溶液の変化は目視では観察されず、いずれも透明溶液のままであった。一方、PEG/DEX混合液への超高静水圧処理では、水性二相が形成された。一般に、高分子量にPEG、DEXの場合での水性二相形成が知られているが、今回我々の用いた分子量では、混合のみでは水性二相は形成されなかった。このことから、この現象は超高压によるDEX、あるいはPEG/DEXの集合体形成に伴う見かけの分子量の増加により水性二相が形成されたと考えられる。以上より、超高静水圧処理法は、新たな分子集合体法といえる。

本研究は、厚生労働科学研究費、ヒューマンサイエンス総合研究事業および日本学術振興会研究補助金に依った。

参考文献

- [1] E. Doi, A. Shimizu, N. Kitabatake, in: R. Hayashi (Ed.), High Pressure Bioscience and Food Science, Sanei Press, 1993, p. 171.
- [2] E. Doi, A. Shimizu, N. Kitabatake, Food Hydrocoll. 5 (1991) 409.

バイオスキャフォールド調整に向けた生体由来組織の超臨界流体処理

寺田堂彦 (医療機器センター) ○澤田和也 (大阪成蹊短大) 吉田謙一 (先端医療振興財団) 岸田晶夫 (東京医科歯科大) 船本誠一, 藤里俊哉, 永谷憲哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎 (国立循環器病センター)

Preparation of bio-scaffold utilizing supercritical fluid extraction method

Dobiko TEDARA(JAAME) Kazuya SAWADA(Osaka Seikei College) Kenichi YOSHIDA(FBRI) Akio KISHIDA(Tokyo Med Dent Univ) Seichi FUNAMOTO, Toshiya FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA (NCVC)

1. はじめに

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、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。一方、これらの諸問題を解決する新たな手段として、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去(脱細胞化)したマトリックスをスキャフォールドとして利用する試みが注目を集めている。脱細胞化手法として最も代表的なものは、界面活性剤水溶液や酵素活性を利用し、細胞成分を洗浄除去する方法である。しかしながら、細胞毒性を有する界面活性剤の残存や、細胞成分の完全除去については未だ多くの問題点が残されている。

そこで本研究では、従来の脱細胞化手法に代わる新たな手段として、超臨界流体抽出法の適応を検討した。本手法では、二酸化炭素を媒体として用いることにより、移植時に問題となる化学物質の組織内残存を無視することが可能になる。さらに、処理における抽出物の分析が、組織を破壊することなく個々に実施可能になるため、個体差の大きな生体組織の脱細胞化度を、移植前に個別に評価可能となる。その結果、移植における組織片のレシピエントに対する安全性も大きく向上することが期待出来る。本発表では、二酸化炭素系ヘントレーナを共存させ、処理条件を変化させた場合の脱細胞化効果について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

生体由来試料として用いた組織は、ブタ大動脈(株)ジャパンファーム)である。脱細胞化評価は、移植後の免疫反応や石灰化と密接に関連すると考えられる、DNAおよびリン脂質の残存により評価した。DNA残存は組織染色法により行い、組織内残存リン脂質の評価は既報[1]に準じて化学分析を行った。超臨界流体処理は、定容高圧容器を用い、所定の振とう条件下にて、圧力および温度を変化させを行った。また、脱細胞化に対するエントレーナ効果を調べるため、エタノールを所定量共存させ処理を行った。

3. 結果と考察

図1は、処理圧力を変化させ一定時間の超臨界二酸

化炭素処理を行った際の、組織内残存リン脂質量変化を示している。図から明らかなように、処理圧力の増加に伴い、残存リン脂質量は大きく減少している。また、およそ15MPa程度の処理圧力以上では、脱リン脂質効果に大きな差が見られない。これらの結果より、用いた試料に含有される疎水性のリン脂質は、圧力15MPa程度に相当する二酸化炭素密度にて、十分に溶解和され溶解除去されることを示している。一方、これらの試料について、ヘマトキシリン-エオシン染色による評価を行ったところ、核の残存も認められなかった。これらの結果は、細胞膜や核膜を形成するリン脂質の二酸化炭素系への溶解により、親水性の核成分であっても同系において物理的な洗浄要因により除去可能なことを示唆している。また、処理時間を変化させ同様の検討を行ったところ、極めて短時間で脱細胞化が可能なることも確認された。

本発表では、その他超臨界二酸化炭素系での脱細胞化作用機構や、処理条件の差による影響等を検討した結果について紹介する。

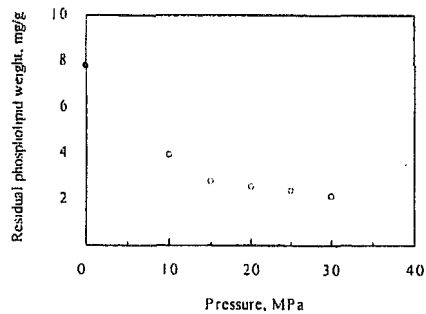


Figure 1 The dependence of residual phospholipid weight on the supercritical fluid pressure in extraction process (the treatment time and the temperature are constant, 60 min and 37 respectively). The solid circle means the control value.

参考文献

[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

2PA02

超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製

東医歯大生材研 ○木村剛・南広祐、日大理工 三浦義之・栗田公夫、
岡大環理工 六雄伸吾・吉澤秀和、国循セ研 岡田正弘・古園勉・藤里俊哉、
東医歯大生材研 岸田晶夫

1. 緒言

我々は、超高压技術を用いた新規ポリマー構造体の創製について研究を行っている。これまで、超高压 (10000 気圧) 印加により、ポリビニルアルコール (PVA) が水素結合によってナノ・ミクロ粒子、ハイドロゲルが形成されること、また、DNA との混合系にて PVA/DNA ヘテロ構造体が形成されることを報告した。本研究では、種々の水素結合性高分子を用いて、超高压印加法による新規な多成分系ポリマー構造体の調製について検討した。

2. 実験

種々の分子量のポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン (DEX) を用いた (表 1)。また、小麦、馬鈴薯、サツマイモ、トウモロコシに由来するデンプンを用いた。各々の 10% (w/v) 水溶液を調製し、1:1 の割合で混合した後、超高压 (10000 気圧、10 分間、25°C) により処理した。超高压処理液を、目視による

Table 1. Various polymers used

No	Polymers	Mw
1	PEG	6,000
2	PEG	8,000
3	Dextran	32,000 ~45,000
4	Dextarn	60,000 ~90,000
5	Dextarn	100,000 ~200,000

観察、動的光散乱 (DLS) 測定、粘度測定、示差走査熱量 (DSC) 測定にて構造体の物性解析を行った。

3. 結果と考察

超高压印加処理による PEG、DEX の単成分溶液の変化は目視では観察されず、いずれも透明溶液のままであった。一方、PEG と DEX を混合により溶液は青白色に変化し、高分子量の DEX を用いた場合にこの現象は顕著に観察された。一般に、高分子量の PEG と DEX との混合液では、水性二相が形成されることが知られているが、今回用いた PEG、DEX は低分子量であるためマクロな二相は形成されず、エマルションが形成され、その散乱により青白色を呈したと考えられている。

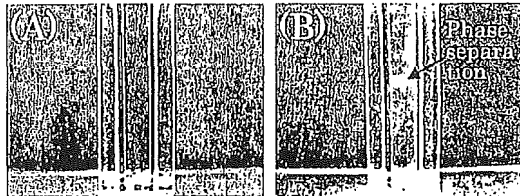


Fig1. Photographs of the mixtures of PEG (No.1) and dextran (No.5) (A) without or (B) with ultra high pressure treatment.

さらに PEG/DEX 混合液への超高压印加処理では、高分子量の DEX (No.4, 5) を用いた場合に水性二相を形成し、下相 (DEX 相) が青白色を呈した (図 1)。より高い分子量の DEX (Mw=500,000) を用いると、超高压を印加しない場合でも分子量 6,000 と 8,000 の PEG とで水性二相を形成することから、この現象は超高压による DEX 単独あるいは PEG との多成分構造体の形成に伴う見かけの分子量の増加による水性二相形成と考えられる。DLS 測定を行った結果、いずれの場合も粒子径の増加が観察され、超高压印加による新規多成分構造体が形成したと考えられる。この他に、PEG/DEX 構造体の詳細な解析、デンプンへの超高压印加による構造体形成の検討について報告する。

本研究は、厚生労働科学研究費、ヒューマンサイエンス総合研究事業および日本学術振興会研究補助金に依った。

"Preparation of novel multicomponent polymer structures by ultra high pressure technology."

Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Yoshiyuki MIURA², Kimio KURITA², Shingo MUTSUO³, Hidekazu YOSHIZAWA³, Masahiro OKADA⁴, Tsutomu FURUZONO⁴, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA¹

(¹Tokyo Medical and Dental Univ., 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²Nihon Univ.,

³Okayama Univ. ⁴National Cardiovascular Center Research Institute)

¹TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

C-407

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

寺田堂彦^{*1}、○澤田和也^{*2}、吉田謙一^{*3}、船本誠一^{*4}、藤里俊哉^{*4}
岸田晶夫^{*5}、永谷憲歳^{*4}、中谷武嗣^{*4}、北村惣一郎^{*4}

(^{*1} (財)医療機器センター, ^{*2} 大阪成形短期大学, ^{*3} 先端医療振興財団,
^{*4} 国立循環器病センター, ^{*5} 東京医科歯科大学)

1. 緒言

我国では、現在年間1万件を越える心臓弁置換術が行われているが、同種移植弁の提供数は絶対的に不足しており、その約7割は機械弁による置換である。しかしながら、機械弁置換後には継続した抗凝固剤の服用が必要であるなど、QOL上の問題を抱えている。残り3割は、ブタアウシ組織をグルタルアルデヒド(GA)で固定化した異種生体弁であるが、石灰化などによって15年程度の耐久性しかない。この異種生体弁移植後に発生する石灰化現象について、その原因や機構は未だ解明されていないのが現状であるが、様々な研究報告から、一部では生体組織内の構造タンパク成分であるエラスチンが関与すると考えられている。そこで本報では、ブタ大動脈組織内部から酵素的手法によりエラスチンを選択的に除去した、バイオスキャフォールドの作製について検討した。

2. 実験

GA水溶液により種々条件において固定化処理を施したブタ大動脈(株ジャパンファーム)を、エタスターゼ(エラスチン分解酵素、3.85 u/mg、フナコシ)のトリสบッファー溶液中に浸漬処理し、エラスチンを分解除去した。得られた試料に対して、組織学的観察、力学試験などを行った。

3. 結果と考察

一般にGAによって固定化処理された移植組織は体内で分解されず、移植後に自己組織が再構築されることを目的とした再生医療には不適である。しかしながら、比較的高圧力に耐える必要のある左心系の大動脈弁では、破断等を防ぐために生体組織の適度な安定化処理は必要不可欠である。そこで、GAの低濃度水溶液もしくは短時間処理による、所謂、部分固定化処理により生体組織を適度に安定化させ、エラスチン酵素分解後の様子を組織学的に観察した。その結果、10 wt%のGA水溶液による1hの固定化処理ではエラスチンは安定化され、酵素分解後も組織内に残留している様子が観察されたが、処理条件を1 wt%、1hにまで低下させるとエラスチンは酵素処理によりほぼ完全に除去可能であった。さらに、0.1 wt%、1hまで処理条件を低下させると、エラスチンの分解により組織構造全体が弛緩し、ドナー由来細胞の脱核も観察された。しかしながら、0.1 wt%以下のGA水溶液による部分固定化処理では、酵素分解処理後、血管形状を維持出来なかった。

部分固定化処理された試料の生体内における被酵素分解性を確認するために、コラゲナーゼ(コラーゲン分解酵素、228 u/mg、和光)のトリสบッファー溶液に浸漬処理し、分解溶液を分光学的に分析した結果、280 nm付近に芳香族アミノ酸に起因する吸収が観察された。すなわち、部分固定化処理された生体組織は体内で酵素分解を受け得ると推察され、さらには、組織構造の適度な弛緩は細胞の浸潤を助長するため、部分固定化処理後にエラスチンを除去した血管組織は再生医療用スキャフォールドとして利用可能であると考えられる。

Processing of Structural Proteins for Regenerative Medical Bio-scaffold. (Japan Association for the Advancement of Medical Equipment) Dohiko TERADA, (Osaka Seikei College) Kazuya SAWADA, (Foundation for biomedical Research and innovation) Ken'ichi Yoshida, (Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute) Seiichi HUNAMOTO, Toshiya FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI and Soichiro KITAMURA, (Tokyo Medical and Dental University) Akio KISHIDA.

P-108

脱細胞化したミニブタ血管の同種移植

○藤里俊哉、吉田謙一¹⁾、船本誠一、湊谷謙司、庭屋和夫
岸田晶夫³⁾、永谷憲歳、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⁾東京医科歯科大学

1. 緒言

人工血管は、中大口径のものに限れば既に完成された技術であり、我が国では年間約5万本が使用されている。しかし、移植後も異物のままであり、細胞の浸潤による自己化が達成されないため、移植後の成長性がなく、感染に対しても弱い。近年、組織バンクネットワークが整備され、脳死あるいは心停止者から提供された血管の臨床使用が開始されている。提供された同種動脈は、人工血管感染や感染性大動脈瘤における大動脈・動脈の再建、あるいは生体肝移植等の臓器移植時における動脈再建などに使用される。また、冠動脈や末梢血管等で小口径の場合では、人工血管が使用できないため、自己血管を用いたバイパス術や同種血管の使用が第一選択肢となっている。このように同種血管の有用性は明らかであるが、我が国では提供数が年間数十件に留まっており、圧倒的に不足している。この不足を補うものとして、我々は脱細胞化したミニブタ血管の利用を目指しており、まず同種移植にて有効性を検討した。

2. 方法

ドナーとなる体重5~10kgのクラウン系ミニブタから下行大動脈を清潔麻酔下にて採取し、生理食塩水を満たしたプラスチックバッグ内に密封した。冷間等方圧加圧装置を用い、4℃にて980MPaの超高静水圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を破壊した。続けて、生理食塩水をベースとする洗浄液にて2週間攪拌洗浄した(パワーグラフト法)。同種ミニブタに、脱細胞化下行大動脈を同所性に移植した。所定期間経過後に移植組織を摘出し、免疫染色やSEM観察によって組織学的に評価した。

3. 結果と考察

既に、界面活性剤や低あるいは高張液、酵素を用いた脱細胞化手法が報告されているが、我々のパワーグラフト法では有害な界面活性剤を用いず、より完全で安全な脱細胞化組織を得ることが出来る。また、エラスチンやコラーゲン等の構造たんぱく質は、よく維持されている。血管や心臓弁の再生として、幾つかのグループが臨床応用を開始しているが、静脈系および右心系組織が対象であり、より高い血圧に抗する必要がある左心系組織への適用は未だ十分な成功例が報告されていない。我々の脱細胞化大動脈では、左心系でも移植組織の破裂や瘤化は認めなかった。内腔側は、移植1ヶ月後では、吻合部から新規な内膜層が増生するとともに、ほぼ内皮細胞で覆われていた。3ヶ月以降では、内皮細胞によって完全に覆われていた。組織内は、主として周囲側から平滑筋細胞および線維芽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。しかし、移植1ヶ月後においてスポット状のカルシウム沈着を認め、3および6ヶ月後ではより顕著であった。この原因として、脱細胞化後組織内でのリン脂質の残存が疑われたため、洗浄方法を改良し、リン脂質をほぼ完全に除去した脱細胞化大動脈について検討した。その結果、カルシウム沈着をほとんど抑制することが可能であった。現在、異種移植の検討を進めており、早期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、科学技術振興調整費、ヒューマンサイエンス振興財団、及びニプロ(株)の補助を受けて行われた。

Allogeneic transplantation of acellular aorta in porcine model

Toshia Fujisato, Ken'ichi Yoshida¹⁾, Seiichi Funamoto, Kenji Minatoya, Kazuo Niwaya, Noritoshi Nagaya, Akio Kishida²⁾, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura

National Cardiovascular Center, ¹⁾Foundation for Biomedical Research and Innovation, ²⁾Tokyo Medical and Dental University

P-143

超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調製と
生医学材料としての応用

○木村剛¹⁾, 南広祐¹⁾, 三浦義之²⁾, 栗田公夫²⁾, 六雄伸吾³⁾,
吉澤秀和³⁾, 岡田正弘⁴⁾, 古菌勉⁴⁾, 藤里俊哉⁵⁾, 岸田晶夫¹⁾

1)東医歯大 生材研, 2)日本大 理工, 3)岡山大 環理工,
4)国循セ研 生体工, 5)国循セ研 再生医療

1. 緒言

我々は、超高压技術を用いた新規高分子構造体の創製に関して検討している。これまで、ポリビニルアルコール (PVA) 水溶液への超高压 (10000 気圧) 印加により、水素結合によってナノ・マイクロ粒子、ハイドロゲルが得られること、また、DNA との混合系にて PVA/DNA ヘテロ構造体が形成されることを報告した。本研究では、超高压印加による新規な多成分系ポリマー構造体の調製について検討した。生医学応用を目指し、素材として医療用途に用いられている高分子および生物由来高分子を用いた。

2. 実験

種々の分子量のポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン (DEX) を用いた (表 1)。また、小麦、馬鈴薯、サツマイモ、トウモロコシに由来するデンプンを用いた。各々の 10%(w/v)水溶液を調製し、1:1の割合で混合した後、超高压印加処理 (10000 気圧、10 分間、25℃) を施した。超高压処理液を、目視による観察、動的光散乱 (DLS) 測定、粘度測定、示差走査熱量 (DSC) 測定にて構造体の物性解析を行った。

Table 1. Various polymers used

No	Polymers	Mw
1	PEG	6,000
2	PEG	8,000
3	Dextran	32,000 ~45,000
4	Dextarn	60,000 ~90,000
5	Dextarn	100,000 ~200,000

3. 結果と考察

PEG、DEX の単成分溶液では、超高压印加による溶液の変化は目視では観察されず、いずれも透明溶液のままであった。一方、PEG と DEX を混合すると溶液は青白色に変化し、この現象は高分子量の DEX を用いた場合に顕著であった。高分子量の PEG と DEX を混合液すると水性二相が形成することが知られている。今回用いた PEG、DEX は低分子量のため、マクロな二相は形成されず、エマルジョンが形成されたため、その散乱で青白色を呈したと考えている。

さらに PEG/DEX 混合液への超高压印加では、高分子量の DEX を用いた場合に水性二相を形成し、下相 (DEX 相) が青白色を呈した。より高い分子量の DEX (500,000) を用いると、超高压を印加しない場合でも分子量 6,000 と 8,000 の PEG とで水性二相を形成することから、この現象は超高压による DEX の構造体形成に伴う見かけの分子量の増加による水性二相形成と考えられる。DLS 測定を行った結果、いずれの場合も粒子径の増加が観察され、超高压印加による新規多成分構造体が形成したと考えられる。この他に、PEG/DEX 構造体の詳細な解析、デンプンへの超高压印加による構造体形成、およびこれらの生医学応用に関する検討について報告する。

本研究は、厚生労働科学研究費、ヒューマンサイエンス総合研究事業および日本学術振興会研究補助金に依った。

“Preparation of novel multicomponent polymer structures using ultra high pressure technology for biomedical application.” Tsuyoshi Kimura¹⁾, Kwangwoo Nam¹⁾, Yoshiyuki Miura²⁾, Kimio Kurita²⁾, Shingo Mutsuo³⁾, Hidekazu Yoshizawa³⁾, Masahiro Okada⁴⁾, Tsutomu Furuzono⁴⁾, Toshiya Fujisato⁵⁾, Akio Kishida¹⁾

1) Tokyo Medical and Dental Univ., 2) Nihon Univ., 3) Okayama Univ. 4), 5) National Cardiovascular Center Research Institute

P103 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

東京医科歯科大学生体材料工学研究所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³⁾

岸田 晶夫¹⁾、南 広祐¹⁾, 木村 剛¹⁾, 藤里 俊哉²⁾, 中谷 武嗣³⁾, 北村 惣一郎³⁾

【緒言】我々は、生体由来組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスを細胞足場として利用するバイオスキャフォールドの開発を行っている。これまで、超静水圧印加法による脱細胞化生体組織について検討してきた。本手法では、細胞成分除去効率が高く、細胞成分や細菌・ウイルス等の除去が可能であり、生体力学特性も維持される。本研究では、脱細胞化生体組織への更なる機能化を行うための化学修飾について検討した。まず、生体組織の構成成分の一つであるコラーゲンへの修飾法について報告する。(方法)コラーゲンフィルムを1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC)とN-hydroxysuccinimide (NHS)とを反応させ、架橋コラーゲンゲル(E/Nゲル)を得た。さらに、poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA)をEDCとNHSと反応させ後、E/Nゲルを加え、MPCと架橋したコラーゲンゲル(MPC-immobilized collagen gel: MiCゲル)を得た。コラーゲンゲルの化学的特性と物性を表面分析、膨潤実験、生体分解性等により検討し、架橋及びPMAの固定化によるコラーゲンゲルの特性を評価した。(結果と考察)示差走査熱量計を用いてコラーゲンハイブリッドゲルの収縮温度を測定し、架橋及びPMA導入による物性への影響を検討した。コラーゲンゲルに比べ、E/Nゲルの収縮温度 T_s は上昇し、さらにPMAの固定化により更なる上昇が示された。これは、EDC/NHS架橋のみの場合でも、コラーゲン繊維のネットワーク形成がなされ、PMAを固定化した場合にはPMA鎖によってコラーゲン繊維間の架橋が形成されたため、高強度のゲルが得られたと考えられる。PMAの導入による分子間架橋の形成と、PMAと架橋剤による緻密なネットワークが形成されたことを示している。コラーゲナーゼによる生分解性は、架橋度の上昇に伴う分解の遅延が示され、PMAハイブリッド化により、更なる分解抑制が示された。

P104 超静水圧印加法を用いる脱細胞化スキャフォールドの開発

国立循環器病センター¹⁾, 先端医療振興財団²⁾, 東京医科歯科大学³⁾

江橋 具¹⁾, 船本 誠一¹⁾, 吉田 謙一²⁾, 岸田 晶夫³⁾, 水谷 憲成³⁾, 中谷 武嗣¹⁾, 藤里 俊哉¹⁾

【目的】重篤な心不全を治療するために心臓移植手術が行われているものの、絶対的なドナー不足は解消されていない。最近では新たな治療法として、骨髄由来細胞などの細胞浮遊液を患部に直接注入する方法や、細胞を播種したスキャフォールドや心筋細胞シートによって三次元組織を構築した後に移植する方法などが報告されている。本研究は、我々が開発した超静水圧印加法により脱細胞化心筋スキャフォールドを作成することを目的としている。リン脂質を除去するためにエタノール処理を行っているが、これにより力学特性が変化する。そこで、エタノール処理のタイミングによる脱細胞化心筋スキャフォールドの力学特性への影響を調べた。【方法】食用ブタ繁殖場からブタ心臓を購入し、心室筋を自己作製したスライサーで厚さ約1.6 mmにスライスした。超静水圧印加法によって組織内の細胞を破壊した後、洗浄処理した。エタノール処理は、超高压印加時、あるいは洗浄処理後に行った。処理後の組織を幅5 mmの短冊状に切り取り、力学試験機にて引っ張り試験を行って破断までの張力を測定した。さらに、測定結果から歪み-応力特性を求めて弾性率を算出した。【結果と考察】処理後の試料をHE染色したところ、組織内の細胞核は全く染色されなかった。これまで報告している血管壁とは異なり、心筋組織では体積の減少が見られた。これは、組織を構成する成分の違いによると思われる。超静水圧印加処理時の媒体としてエタノールを用いた場合、未処理の組織と比較して弾性率がわずかに低下する傾向が見られた。媒体にPBS(-)を用いた場合にも同様の結果が得られた。一方、洗浄処理後にエタノール処理を行った場合には、未処理の心筋組織と比較して弾性率が3倍以上増加する傾向が見られた。エタノール処理のタイミングは超静水圧印加時が適当であると考えられた。【結論】超静水圧印加法によって脱細胞化心筋スキャフォールドを作成することができ、培養細胞の足場として利用できる可能性が示唆された。



Day 3 – Technical Programme

3A2 - Tissue Engineering (II) & Biosignal Processing (IV)

Date: Friday, 9 Dec 2005

Time: 1320 - 1530

Venue: Meeting Rm 202

3A2-02

Availability of Ultra-High Pressure Method for the Preparation of Decellularized Tracheal Grafts

M. Suga, T. Fujisato and T. Nakatani

Decellularized tracheal grafts are expected to be applied for the treatment of extensive tracheal defects. Here, we tried to elucidate the availability of ultra-high pressure method for the cell-exclusion of tracheal grafts. B-N rat tracheae were decellularized by cryopreservation (CR), Triton X-100 (TX) or ultra-high pressure (980 MPa for 10 min at 4 °C, UHP). Fresh (FR) or treated each trachea was transplanted in the subcutaneous space of the Lewis rat. Decellularized porcine tracheae by CR, TX or UHP were served for the pathological study, compression test or PCR assay for porcine endogenous retrovirus (PERV) DNA. Although FR and CR tracheae remained cells in the entire area, cellular contents in TX and UHP tracheae were almost excluded except in deep cartilage. Severe wall thickness with marked cell infiltration was observed in rat FR tracheae 4 weeks after allo-transplantation, whereas rat CR, TX and UHP tracheae showed minimum allo-rejection. Structural strength of porcine TX tracheae declined by about 60 % compared with those of porcine CR or UHP tracheae. PERV-DNA was detected in porcine CR and TX tracheae but not in UHP tracheae. UHP seems to be a promising method for the preparation of allogeneic or xenogeneic decellularized tracheal grafts.

AVAILABILITY OF ULTRA-HIGH PRESSURE METHOD FOR THE PREPARATION OF DECELLULARIZED TRACHEAL GRAFTS

Michiharu Suga, MD, PhD^{*,**}, Toshiya Fujisato, PhD^{*} and Takeshi Nakatani, MD, PhD^{**}

^{*}Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering
National Cardiovascular Center Research Institute

^{**}Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center Hospital
National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan

msuga@ri.ncvc.go.jp

Abstract: Decellularized tracheal grafts are expected to be applied for the treatment of extensive tracheal defects. Here, we tried to elucidate the availability of ultra-high pressure method for the cell-exclusion of tracheal grafts. B-N rat tracheae were decellularized by cryopreservation (CR), Triton X-100 (TX) or ultra-high pressure (980 MPa for 10 min at 4 °C, UHP). Fresh (FR) or treated each trachea was transplanted in the subcutaneous space of the Lewis rat. Decellularized porcine tracheae by CR, TX or UHP were served for the pathological study, compression test or PCR assay for porcine endogenous retrovirus (PERV) DNA. Although FR and CR tracheae remained cells in the entire area, cellular contents in TX and UHP tracheae were almost excluded except in deep cartilage. Severe wall thickness with marked cell infiltration was observed in rat FR tracheae 4 weeks after allo-transplantation, whereas rat CR, TX and UHP tracheae showed minimum allo-rejection. Structural strength of porcine TX tracheae declined by about 60 % compared with those of porcine CR or UHP tracheae. PERV-DNA was detected in porcine CR and TX tracheae but not in UHP tracheae. UHP seems to be a promising method for the preparation of allogeneic or xenogeneic decellularized tracheal grafts.

Introduction

It is well known that decellularization highly reduces immunogenicity of allogeneic or xenogeneic graft tissues because almost all of the major histocompatibility antigens are existed on the surface of donor cells.

There are plenty of studies that demonstrated the graftability of acellular foreign bio-tissues without any immunosuppressive therapies [1, 2, 3], and Clinical usefulness of allogeneic or xenogeneic decellularized graft tissues has also been reported recently [4, 5, 6]. Several modalities have been considered for cell removal or destruction from animal tissues, such as rapid freeze-and-thaw, detergents and proteases. However, practical use of these methods are limited due to incomplete decellularization, existence of survived microorganisms including virus, change in mechanical

characteristics, toxicity of additives used or cost for storage and transportation.

This study was designed to elucidate the availability of ultra-high pressure method for the preparation of decellularized tracheal grafts.

Materials and Methods

Animals: Male Brown-Norway (B-N) and Lewis rats, and CLAWN miniature pigs were used. All animal care was based on guidelines published in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 85-23, revised 1985). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan.

Ultra-high pressure method: Tracheal segments served for ultra-high pressure method were placed in a chamber, which was filled with phosphate buffered saline (PBS)-based solution, of an ultra-high pressure apparatus with thermo control unit (Dr. Chef, Kobe Steel Ltd., Hyogo, Japan). The chamber was subjected to the pressure of 980 MPa for 10 min and maintained at 4 °C during the processing.

Experimental design: Exp 1 (rodent study): Tracheal 5-ring-segments of B-N rats were divided into 4 groups by the type of treatments as follows. CR: decellularization by immersion in liquid nitrogen, followed by cryopreservation C for 4 weeks at -80°, TX: decellularization by immersion in for 1 % Triton X-100 solution for 24 hr and subsequent rinsing with PBS for 2weeks, followed by storage in PBS for 2 weeks at 4 °C, UHP: decellularization by the ultra-high pressure method and subsequent rinsing with PBS for 2weeks, followed by storage in PBS for 2 weeks at 4 °C, FR: no treatment (fresh trachea). Each trachea was implanted in the subcutaneous space of the Lewis rat and extracted 4 weeks later. Exp 2 (porcine study): Tracheae of CLAWN miniature pigs were cut into 1cm segments. Each Sample was decellularized and preserved by CR, TX or UHP.

Pathological study: Tracheal samples were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, cut into 5 µm section and stained with hematoxylin and eosin for pathological examination.

Compression test of the tracheae: Structural strength of porcine tracheal segments was analyzed using a universal testing machine (TENSILON RTC-1150A, Orientec Corporation, Tokyo, Japan). After the placement and height adjustment of each tracheal sample, contraction stress was determined when the width was shortened by 5 mm.

Measurement of porcine endogenous retrovirus-DNA: The expression of porcine endogenous retrovirus (PERV)-DNA in porcine tracheal samples was measured by polymerase chain reaction assay. Briefly, template DNA purified from each tracheal tissue was amplified using specific primer pairs of F : 5'-GCTACAACCAATTAGGAAAACCTAAAAAG-3' and R : 5'-AACCCAGGAC'TGTATATCTTGA'TCAG-3'. The products were blotted onto nylon membrane after electrophoresis on an agarose gel.

Statistical analysis: All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparison among groups was carried out using analysis of variance (ANOVA). When ANOVA showed a significant difference among the groups, Fisher PLSD post-hoc test was utilized to determine which group difference accounted for the significant p value. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Pathology of decellularized tracheae: In both rodent and porcine studies, cellular contents in TX and UHP tracheae were almost excluded except in deep region of cartilage, whereas FR and CR tracheae remained cells in their entire area.

Pathology of transplanted rat tracheae: Severe wall thickening and fibrous obliteration with marked cell infiltration was observed in rat FR tracheae 4 weeks after allo-transplantation. On the other hand, rat CR, TX and UHP tracheae showed very slight allo-rejection. In addition, TX tracheae became collapsed until the lumen disappeared.

Structural strength of porcine tracheae: Mean contraction stress of porcine TX tracheae declined by about 60 % compared with those of porcine CR or UHP tracheae (CR: 592 ± 124 gf, TX: 343 ± 83 gf, UHP: 606 ± 110 gf; TX vs. CR or UHP: $p < 0.05$).

PERV-DNA in porcine tracheae: The DNA band of PERV was undetectable in porcine UHP tracheae, while those in porcine TX and CR tracheae were sharply confirmed.

Discussion

In the current study, we clearly demonstrated that ultra-high pressure method is able to exclude most of cells, maintain structural strength and diminish PERV-DNA of rodent and/or porcine tracheae.

Freeze-and-thaw is one of the most simple and popular methods for cell destruction of bio-tissues. Most of cell components, however, still remained in the tissues at the time of transplantation. Furthermore, pathogenic bacteria and virus possibly exist as well. Another issue of this treatment is a cost for storage and

transportation because deep freezers are necessary to carry out.

Triton X-100 is also widely used to remove cells from a variety of animal tissues. Our observations that rodent TX tracheae could not maintain the lumen and porcine TX tracheae showed significantly reduced contraction stress compared to CR and UHP tracheae indicate that the mechanical strength of tracheae weakened when triton X-100 is utilized for cell exclusion. Also, the toxicity of triton X-100 must be considered. Fujisato et al. have recently reported that triton X-100 still remains in porcine heart valves after the treatment with this chemical and subsequent rinsing for 2 weeks [7].

The risk of PERV infection is an always brought subject when pig-to-human xenotransplantation is discussed. In this study, only porcine UHP tracheae showed undetectable range of PERV-DNA among three treatment groups. In addition, UHP inactivate prion infectivity in processed meat in the literature [8].

Further investigation will be needed to elucidate the feasibility of clinical allogenic or xenogenic tracheal transplantation with this method.

Conclusions

Ultra-high pressure method seems to be a promising option for the preparation of allogenic or xenogenic decellularized tracheal grafts in terms of cell removal, maintenance of structural strength and sterilization including PERV.

References

- [1] INUTSUKA K., KAWAHARA K., TAKACHI T., OKABAYASHI K., SHIRAIISHI T., SHIRAKUSA T. (1996): 'Reconstruction of trachea and carina with immediate or cryopreserved allografts in dogs'. *Ann. Thorac. Surg.*, **62**, pp. 1480-4
- [2] LIU Y., NAKAMURA T., YAMAMOTO Y., MATSUMOTO K., SEKINE T., UEDA H., SHIMIZU Y. (2000): 'Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea: The antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment'. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **120**, pp. 108-14
- [3] MURAKAWA T., NAKAJIMA J., MOTOMURA N., MURAKAMI A., TAKAMOTO S. (2002): 'Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates'. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **123**, pp. 153-60
- [4] LAUB W., MURALIDHARAN S., CLANCY R., ELDREDGE J., CHEN C., ADKINS S., FERNANDEZ J., ANDERSON A., MCGRATH B. (1992): 'Cryopreserved allograft veins as alternative coronary artery bypass conduits: early phase results'. *Ann. Thorac. Surg.*, **54**, pp. 826-31
- [5] KIRKLIN K., SMITH D., NOVICK W., NAFTEL C., KIRKLIN W., PACIFICO D., NANDA C., HELMCKE R., BOURGE C. (1993): 'Long-term function of cryopreserved aortic homografts. A ten-year study'. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **106**, pp. 154-65

- [6] BECHTEL F., MÜLLER-STENHARDT M., SCHMIDTKE C., BRUNSWIK A., STIERLE U., SIEVERS H. (2003): 'Evaluation of the decellularized pulmonary valve homografts (SynerGraft)', *J. Heart. Valve. Dis.*, **12**, pp. 734-9
- [7] FUJISATO T., KITAMURA S. (2003): 'Custom-made heart valve using biological tissue scaffold', *Junkankihyo-no-shinpo*, **43**, pp. 65-71
- [8] BROWN P., MEYER R., CARDONE F., POCCHIARI M. (2003): 'Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: A practical method to prevent human infection', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, pp. 6093-7

3A2-07

PowerGraft: A virus-free acellular scaffold by detergent-free treatment

T. Fujisato, K. Minatoya, K. Niwaya, A. Kishida, S. Hashimoto, T. Nakatani and S. Kitamura

Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogeneic matrices have been widely studied to have more durability and functionality with growth potential and less immunogenicity. 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. In this paper, our novel tissue processing for decellularization named PowerGraft using ultrahigh pressure for the safe tissue transplantation was reported. Porcine cardiac and vascular tissues were isolated and treated by a cold isostatic pressing at 4°C for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out in PBS-based washing solution under microwave irradiation at 4°C. The tissues treated were completely cell free when they were applied to 980 MPa for 10 min. There was no porcine endogenous retrovirus detected. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. The acellular grafts of aortas and pulmonary valves were transplanted to allogeneic miniature pigs. The explanted grafts showed well cell infiltration and endothelialization. This PowerGraft processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue transplantation.

PowerGraft: A virus-free acellular scaffold by detergent-free treatment

T Fujisato*, K Minatoya*, K Niwaya*, A Kishida**, S Hashimoto***,
T Nakatani* and S Kitamura*

* National Cardiovascular Center, Suita, Japan

** Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

*** Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

fujisato@ri.ncvc.go.jp

Abstract: Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogenic matrices have been widely studied to have more durability and functionality with growth potential and less immunogenicity. 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. In this paper, our novel tissue processing for decellularization named PowerGraft using ultrahigh pressure for the safe tissue transplantation was reported. Porcine cardiac and vascular tissues were isolated and treated by a cold isostatic pressing at 4°C for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out in PBS-based washing solution under microwave irradiation at 4°C. The tissues treated were completely cell free when they were applied to 980 MPa for 10 min. There was no porcine endogenous retrovirus detected. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. The acellular grafts of aortas and pulmonary valves were transplanted to allogeneic miniature pigs. The explanted grafts showed well cell infiltration and endothelialization. This PowerGraft processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue transplantation.

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 heart 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 valves is relatively short in about 15 to 20 years in elderly and 5 to 10 years in paediatric patients by the calcification of the glutaraldehyde-fixed animal tissues. Recently, the cryopreserved homograft (allograft) valves have been clinically applied thanks to the establishment of a tissue banking system worldwide. However, since they are donated from the cadavers, the supply is very limited. In addition to the above issues, all the grafts lack the

growth potential and they may be replaced through the patients' growth process.

The reconstruction of heart valves using polymeric or acellular xenogenic scaffolds has been studied to have more durability with growth potential which applicable to paediatric patients. 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. Most of the groups developing acellular scaffolds have been using detergents and/or enzymes as decellularization media such as Triton[®] X-100, sodium dodecyl sulfate, deoxy-cholate, trypsin, DNase, and RNase. Since the detergents are generally cytotoxic and it takes time for their removal before the transplantation, it may lead denature of biological properties and contamination in the process. Recent BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) and vCJD (variant Creutzfeldt-Jakob disease) issues have been affecting to the tissue transplantation from the point of view of safety. We have been developing a novel tissue processing for preparation of acellular grafts by ultrahigh pressure treatment named PowerGraft for the safe valvular and aortic tissue transplantation. This process does not include any detergent and may be applicable to large tissues.

Materials and Methods

The porcine tissues of heart valves and aortas were isolated from 4 month-old Clawn miniature pigs (Japan Farm Co. Ltd, Kagoshima, Japan) weighing about 10 kg under the sterile condition. The harvested tissues were decellularized by our PowerGraft technology. Briefly, the tissues were packed in sterile bags filled with PBS. The packed tissues were treated by ultrahigh pressure of 980 MPa at 4 °C using a cold isostatic pressing (CIP) apparatus (Fig. 1; Kobe steel LTD, Kobe, Japan) for cell demolition. They were then rinsed by PBS-based washing solution under microwave irradiation at 4 °C (Fig. 2; Azumaya Medical Devices Inc., Tokyo, Japan) for removal of the residues of the broken cells. The tissues treated were 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.

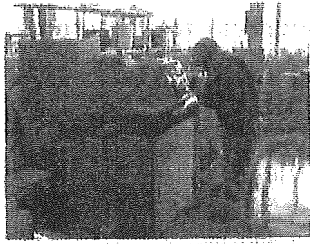


Figure 1: CIP apparatus for PowerGraft.

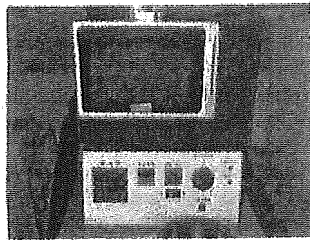


Figure 2: Microwave apparatus for PowerGraft.

The acellular scaffolds were transplanted into the allogeneic miniature pigs. The aortas were transplanted at descending aorta through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. The pulmonary valves were transplanted at right ventricular outflow tract through a median sternotomy with extracorporeal circulation without blood oxygenation¹⁷. In both cases, postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 4, 12, and 24 weeks after the transplantation and examined histologically and immunohistologically. 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

The tissues were completely cell free when the CIP of 970 MPa was applied for 10 min and washed under the microwave irradiation for 5 days from the H-E staining (Fig. 3). There was no PERV products detected in PCR assay from the tissues applied by the CIP whereas still detected in the tissue treated by Triton[®] X-100 of 24 hr incubation. The tissues pre-contaminated by the normal bacteria floras were decontaminated when treated at more than 485 MPa. 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 of the leaflets treated at 970 MPa for 10 min (Fig. 4).

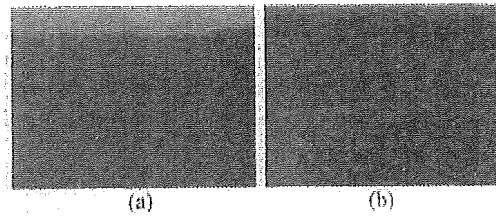


Figure 3: Decellularization of porcine aorta. (a: native b: PowerGraft)

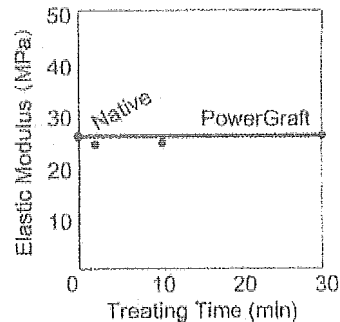


Figure 4: Elastic modulus of decellularized leaflet of porcine pulmonary valves by PowerGraft technology of 970 MPa.

The animals survived after the transplantation in the all cases. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis. 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 after 12 weeks. It was dominant in the latter. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells after 24 weeks, mainly by smooth muscle cells (Fig. 5). There was no inflammation and calcification observed in the tissue. In the descending aorta study, the endothelium and cell infiltration was same as the pulmonary valve study after 12 weeks, however intimal proliferation was notable and calcification was observed along to elastic fibrils in a middle area of the acellular graft after 24 weeks (Fig. 5).

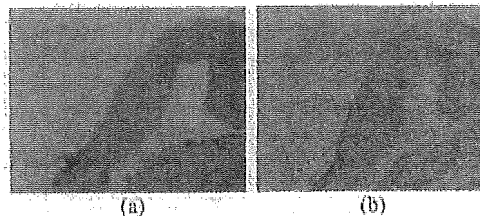


Figure 5: Explanted acellular pulmonary valve 24 weeks after the transplantation. (a: H-E, b: anti-aSMA staining)

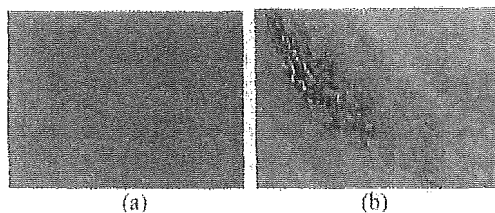


Figure 5: Explanted acellular grafts 24 weeks after the transplantation in von-Kossa staining. (a: pulmonary valve, b: aorta)

Discussion

Most of the groups have been using detergents and/or enzymes for decellularization. Since the decellularization depends on the permeation of the agent through the tissue, it may not be applicable to large and hard tissues like cartilage. The PowerGraft technology utilizes the CIP that presses throughout the tissue by Pascal's principle. We have already found that this technology could be successfully applied to cartilage tissues for decellularization. More effectively, it has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP more than 600 MPa²¹. This means the treatment is able to sterilize the tissue in addition to the decellularization. The effect of the microwave irradiation is the same as the appliance of conventional microwave oven using the vibration of water molecules at 2,450 MHz. The principle of acceleration of the washing time by microwave irradiation is still unclear but supposed that it courses high-speed motion of water molecules and enhancement of the permeation in the tissues. It is not necessary to use the microwave for washing after the CIP treatment, however it make washing time about one tenth compared to the conventional incubation.

We have chosen the Clawn miniature pig as a donor animal since its size adapts human tissues well and its genome has been well studied in order to develop a human gene induced transgenic animal for the organ transplantation. The explanted grafts showed host cell infiltration especially in the pulmonary valves. Whereas there is still a problem of calcification in the aorta study and currently we are investigating its mechanism. Recently, Prof. Konertz and his group in Germany have reported excellent clinical results of acellular porcine pulmonary heart valves²¹. We are planing a clinical application of the acellular grafts in the near future.

Conclusions

There have been developed a lot of medical devices whereas still required of innovation in many areas and it is unable to give growth activity to the current artificial devices. Our novel decellularization method of PowerGraft was developed to have a safe bioscaffold by ultrahigh pressure treatment of the CIP and washing under the microwave irradiation. Porcine cells and

PERV were removed completely from the animal tissues in a short period without changing the biomechanical property. These findings suggest the tissues applied by the CIP could be used as the safe bioscaffold even based on the xenogenic tissues that have risks of unknown animal related diseases.

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.

References

- [1] NUMATA S., FUJISATO T., NIWAYA K., ISHIBASHI-UEDA H., NAKATANI T., KITAMURA S. (2004): 'Immunological and Histological Evaluation of Decellularized Allograft in a Pig Model: Comparison with Cryopreserved Allograft', *J. Heart Valve Dis.*, **13**, pp. 984-90
- [2] HAYASHI R. (2002): 'High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value', *Biochem Biophys Acta*, **1595**, pp. 397-9
- [3] KONERTZ W., DOHMEN P., BEHOLZ S., LIU J., DUSHE S., ERDBRUGGER W. (2004): 'Are decellularized xenogenic heart valves ready for clinical use?', *Proc. Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves*, Florence, Italy, 2004, p. 37

1A1-C3 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製 Enzymatic Processing of Structural Proteins for Bio-Scaffold Preparation

○寺田彦彦*, 澤田和也**, 吉田謙一***, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫****, 永谷憲蔵, 中谷武嗣, 北村惣一郎
*医療機器センター, **大阪成蹊短大, ***先端医療振興財団, ****東京医科歯科大, 国立循環器病センター
□Dohiko Terada*, Kazuya Sawada**, Kenichi Yoshida***, Seiichi Funamoto, Toshiya Fujisato,
Akio Kishida****, Noritoshi Nagaya, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura.
*JAAME, **Osaka Seikei College, ***FBRI, ****Tokyo Med. Dent. Univ., NCVC.

1. 緒言

我国では、現年間1万件を越える心臓弁置換術が行われているが、同種移植弁の提供数は絶対的に不足しており、その約7割は機械弁による置換である。しかしながら、機械弁置換後には継続した抗凝固剤の服用が必要であるなど、QOL上の問題を抱えている。残り3割は、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒド(GA)で固定化した異種生体弁であるが、石灰化などによって15年程度の耐久性しかない。この異種生体弁移植後に発生する石灰化現象について、その原因や機構は未だ解明されていないのが現状であるが、様々な研究報告から、一部では生体組織内の構造タンパク成分であるエラスチンが関与すると考えられている。そこで本報では、ブタ大動脈組織内部から酵素的手法によりエラスチンを選択的に除去した、バイオスキャフォールドの作製について検討した。

2. 実験

GA水溶液により種々条件において固定化処理を施したブタ大動脈(株ジャパンファーム)を、エラスターゼ(エラスチン分解酵素, 3.85 u/mg, フナコシ)のトリスバッファー溶液中に浸漬処理し、エラスチンを分解除去した。得られた試料に対して、組織学的観察、力学試験などを行った。

3. 結果と考察

一般にGAによって固定化処理された移植組織は体内で分解されず、移植後に自己組織が再構築されることを目的とした再生医療には不適である。しかしながら、比較的高圧力に耐える必要のある左心系の大動脈弁では、破断等を防ぐために生体組織の適度な安定化処理は必要不可欠である。そこで、GAの低濃度水溶液もしくは短時間処理による、所謂、部分固定化処理により生体組織を適度に安定化させ、エラスチン酵素分解後の様子を組織学的に観察した。その結果、10 wt%のGA水溶液による1hの固定化処理ではエラスチンは安定化され、酵素分解後も組織内に残留している様子が観察されたが、処理条件を1 wt%、1hにまで低下させるとエラスチンは酵素処理によりほぼ完全に除去可能であった(図1)。さらに、0.1 wt%、1hまで処理条件を低下させると、エラスチンの分解により組織構造全体が弛緩し、ドナー由来細胞の脱核も観察された(図2)。しかしながら、0.1 wt%以下のGA水溶液による部分固定化処理では、酵素分解処理後、血管形状を維持出来なかった。

部分固定化処理された試料の生体内における被酵素分解性を確認するために、コラゲナーゼ(コラーゲン分解酵素, 228

u/mg, 和光)のトリスバッファー溶液に浸漬処理し、分解溶液を分光学的に分析した結果、280 nm付近に芳香族アミノ酸に起因する吸収が観察された。すなわち、部分固定化処理された生体組織は体内で酵素分解を受け得ると推察され、さらには、組織構造の適度な弛緩は細胞の浸潤を助長するため、部分固定化処理後にエラスチンを除去した血管組織は再生医療用スキャフォールドとして利用可能であると考えられる。



Fig. 1 Elastica van Gieson stain of the porcine aorta that was processed as followed. The tissue was partially fixed in 1 wt% glutaraldehyde(GA) solution for 1 h at room temperature and then subjected to elastase digestion for 4 days at 37 °C. The bar is corresponding to 200 μm.

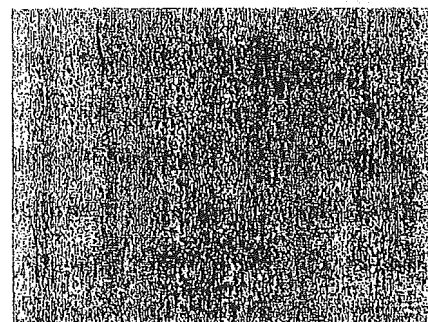


Fig. 2 Hematoxylin and eosin stain of the processed aorta. First, partial fixation was performed in 0.1 wt% GA solution for 1 h at room temperature. Then the tissue was treated in elastase solution to degrade elastic fibers for 4days at 37 °C. The bar is corresponding to 200 μm.

1A1-C4 脱細胞化生体組織（バイオスキャフォールド）の再細胞化

Re-cellularization of Acellularized Biological Tissue

○岸田晶夫、藤里俊哉*、船本誠一*、西岡 宏*、吉田謙一*、湊谷謙司*、庭谷和夫*、村越彩子、
木村 剛、中谷武嗣*、北村惣一郎*

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

*国立循環器病センター

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

National Cardiovascular Center Research Institute

我々は、生体組織からドナー由来の細胞成分を除去した生体スキャフォールドを用いた再生医療について研究を行っている。これまでに、脱細胞化組織を移植した場合と、レシピエントの自己細胞を播種したテーラーメイド型組織移植を行った場合のそれぞれについて検討を行ってきた。前者については、緊急時の対応、輸送・保存時の安定性、広範な応用に対応し、後者については、レシピエント細胞を組み込むことで、小児患者に適用可能な自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると期待できる。いずれの場合においても、脱細胞化組織内部への細胞の侵入と組織再構築の過程が必要であり、それぞれの応用については、未解決の部分が多い。本講演では、脱細胞化組織の再細胞化の観点から、我々の研究について紹介する。

清潔下にてミニブタ大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理にてドナー由来細胞を除去した。これを、そのままミニブタに同種移植を行う場合と、レシピエントとなるミニブタから採取した血管内皮細胞、血管壁細胞等を増殖した後、これをスキャフォールドに種々の方法で播種し、*in vitro* で再細胞化した後にミニブタに移植する場合の2例について検討を行った。

脱細胞化スキャフォールドをそのまま移植した場合、移植1~6ヶ月において良好な開存性を示した。組織切片観察より、血管内腔面と外面から細胞が徐々に浸潤してくる様子が観察された。免疫染色の結果、血管内腔面はすみやかに血管内皮細胞様細胞に覆われることが明らかとなった。血管壁部分は、平滑筋細胞様細胞と繊維芽細胞の混合した細胞集団が存在し、6ヶ月後においても大きな変化は見られなかった。炎症性細胞については、3ヶ月までに消失していた。これにより、脱細胞化組織そのままでも、高い組織適合性を有し、組

織再生が可能であることが示唆されたと考えている。しかし、血管壁部分の再構築に時間がかかること、および繊維芽細胞の混合が見られることから長期の観察が必要である。

一方、*in vitro* で再細胞化する場合には、細胞の播種法にいくつかの手法を用いた。単純に基材上に設置した組織に細胞分散液を播種しても、組織への細胞の接着はほとんど起こらない。そのため、汎用ディスペンサ装置にてスキャフォールド組織内に細胞を注入播種する方法、および回転及び循環培養装置を用いて組織表面に細胞を播種する方法を考案し、比較検討した。

脱細胞化心臓弁及び血管スキャフォールド組織内に、汎用ディスペンサ装置を用いて細胞を注入することができた。しかし、均一性および定量性の向上のために装置の改良が必要であることが示唆された。また、回転及び循環培養装置によってレシピエントの内皮細胞を均一に播種することができた。接着と培養液の循環条件を精緻に制御する必要があり、こちらについても装置の改良によって、より確実に、簡便に播種することが期待される。さらに、心臓弁及び血管について、ミニブタによる動物実験において有効性を検討した。細胞播種された組織においては、血流にさらされても脱落することなく存在していた。*In vitro* 再細胞化の有効性については、現在、長期埋入実験により、経過観察中である。

脱細胞化組織の再細胞化については、*insitu* および *in vitro* で可能であった。長期観察により、差異について検討する予定である。

本研究は、厚生労働科学研究費補助金、科学技術振興調整費、日本学術振興会科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス総合研究事業によって行われた。

第33回生活支援工学系学会連合大会 (2005年12月、三重)