

コラーゲン線維
エラスチン線維 コラーゲン線維のみ コラーゲン線維のみ

図8 線維組織と形状変化
(左: native 中: エラスチン除去
右: 形態安定加工+エラスチン除去)

もちろん、力学強度測定を行うと、それが著しく低下する。そこで、コラーゲン線維のみでも形態を維持することが出来るよう、組織に対し形態安定加工を施す。衣類の形態安定加工は古くから行われているが、同様のことを生体組織に行うわけである。医用応用であること、および生体吸収性を考慮すれば、用いる薬剤や手法に工夫が必要であるが、原理は衣用と同じである。図7右の写真は、エラスチン線維が除去された血管の EVG 染色結果である。同図左の写真と比較し、エラスチン線維が染色されていない。一方、残されたコラーゲン線維はそのまま維持されており、エラスチン線維のみが分解除去されている。また、図8右の写真は形態安定加工が施されたコラーゲン線維からなる血管である。コラーゲン線維のみであるにもかかわらず、血管の立体構造が維持されている。このコラーゲン線維血管の力学強度を評価した結果、破断強度に関しては native のそれと大差がないことも確認された。この様に、エラスチン線維を除去し、かつ力学強度を維持した構造体を形成することが出来た。そこで、この組織の石灰化抑制効果を評価するため、一定期間ラットの皮下へ組織を移植し、評価を行った。図9は、皮下移植した組織を12週間後に取り出し、石灰化評価のための von Kossa 染色を行った結果を示している。左写真は、native 血管をそのまま皮下移植した場合であり、明らかな石灰化が認められる。それに対し、右写真が示すように、エラスチン線維を除去した血管では

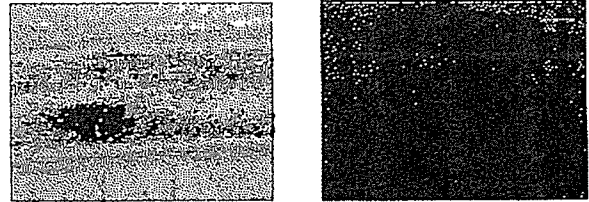


図9 ラットの皮下へ移植した血管組織の von Kossa 染色写真(12週)
(左: native 組織 右: 脱エラスチン組織)

石灰化が認められない。同様に行った他の組織の一部で軽度の石灰化が認められた例もあるが、native に比べ明らかな有効性が確かめられた。上記のように、石灰化は複数の要因が重なることで生じると考えられ、今後さらに夫々の要因を詳細に評価していくことが必要となる。

7. おわりに

生体内の線維と衣料用の繊維は全く異なるものとするのが通常であろう。実際、コラーゲン線維やエラスチン線維を、衣料用品に應用するという発想はない。“細くて長い”という表現で共通しているだけかも知れないが、実際に病理で評価される組織染色と繊維の染色は同じ原理である。また、本稿で述べた洗浄や加工についても、原理は何れも共通である。素材が共通していれば、結果的に加工技術の原理も共通するに至って当然かも知れない。しかし、全く内容の異なる分野でそれぞれ独自に開発されてきた技術が、結果的に基本原理が共通であったという点で筆者は興味深さを覚えている。本稿で紹介した内容については、欧米では既に臨床治験に入っている例もある。極めて優れた繊維科学の技術を有する我が国において、両分野の技術融合を加速させれば、技術開発の大きな飛躍に繋がるのではないだろうか。“医療の線維”と“衣料の繊維”、語呂合わせのように見えるかも知れないが、その根底概念が共通していることを最後に強調したい。

第21回キチン・キトサンシンポジウム

主催：日本キチン・キトサン学会
共催：日本化学会、日本生化学会、日本生物工学会
協賛：(社)繊維学会ほか
日時：平成19年7月26日(木)～27日(金)
場所：神戸国際会議場(神戸市中央区港島中町6-9-1)
<http://www.kcva.or.jp/kcc/icck/>
詳細は、下記にお問い合わせ下さい。
〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31
産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門バイオ
ベースポリマーグループ(相羽誠一)
TEL: 072-751-9522 FAX: 072-751-9628
E-mail: chitin@ma.aist.go.jp <http://www.jscc.jp/>

第55回レオロジー討論会

主催：日本レオロジー学会、日本バイオレオロジー学会
共催：金沢大学、日本材料学会、プラスチック成形加工学会
協賛：(社)繊維学会ほか
日時：平成19年11月1日(木)～3日(土)
場所：金沢大学角間キャンパス南地区 自然科学本館
(〒920-1192 金沢市角間町)
<http://www.kanazawa-u.ac.jp/university/access/images/kakumal.pdf>
講演申込締切：平成19年8月10日(金)
要旨集原稿提出締切：平成19年10月1日(日)
詳細は、下記にお問い合わせ下さい。
〒600-8815 京都市下京区中堂寺粟田町93番地
京都リサーチパーク内 (社)日本レオロジー学会
TEL: 075-315-8687 FAX: 075-315-8688
E-mail: member@srj.or.jp

Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing

Toshia Fujisato^{*1}, Kazuo Niwaya², Kenji Minatoya², Akio Kishida⁵, Takeshi Nakatani³, and Soichiro Kitamura¹

¹Regenerative Medicine & Tissue Engineering, ²Cardiovascular Surgery, ³Organ Transplantation

⁴National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

⁵Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kandasugadai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan

*E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

Received 4 December 2006/Accepted 11 December 2006

Abstract

Tissue engineered heart valves based on acellular tissue have been studied to have more durability and bio-functionality with growth potential and less immunogenicity. Whereas they have still several problems to be solved such as complete cell removal and transfer of unknown animal related infectious diseases. In this paper, our novel tissue processing for decellularization using ultrahigh pressure for the safe tissue transplantation was reported. Porcine cardiac tissues were isolated and treated by a cold isostatic pressing for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out by washing solution 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 pulmonary valve were transplanted to allogeneic miniature pigs. The explanted grafts showed remarkable cell infiltration and endothelialization. This processing may provide more durable and safe scaffold for the regenerative tissue transplantation.

Keywords: tissue engineering, tissue transplantation, acellular, scaffold

1. Introduction

The implantable cardiovascular medical devices have been clinically used for more than 30 years as substitution for the patient's deficient tissues. The artificial heart valve is one of the most clinically used medical devices applied to about 300,000 patients per year worldwide. There are two kinds of artificial heart valves currently used. A xenograft heart valve is made of the chemically crosslinked porcine valve or bovine pericardium to reduce antigenicity of the xenogeneic tissue. A mechanical heart valve is made of pyrolytic carbon or titanium. The former has good biocompatibility, hemodynamics, and resistant to infections compared with the latter. However, the durability of the xenograft valve is relatively short especially in pediatric patients for about 5-10 years by the calcification of the glutaraldehyde-fixed animal tissue. Recent establishment of the human tissue bank has made it easy to use allogeneic tissues for the transplantation that are superior to the current artificial devices. However, since they are donated from the cadavers, the supply is very limited and some donated tissues may not be applicable due to infection. In addition to the above issues, all the devices and tissues lack the growth potential and they may be replaced repeatedly through the patients' growth process.

All of the current medical devices remain as foreign bodies even after the implantation. If a device accepts host cell impregnation and is replaced by the host tissue after the implantation,

it may acquire perfect biocompatibility and growth ability. An ideal candidate for such a regenerative scaffold is a decellularized allogeneic or xenogeneic tissue since it does not require tissue fixation for removal of antigenicity. Detergents and/or enzymes such as Triton® X-100, sodium dodecyl sulphate, deoxycholate, trypsin, DNase, and RNase have been commonly used for the cell removal media from the tissue [1-4]. However, the decellularization depends on their permeation in the tissue and may not be achieved completely in large or hard tissues. And furthermore, since the detergents are generally cytotoxic and it takes time for their removal, 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. In this paper, a cold isostatic pressing (CIP) was applied for removal of the cells and inactivation of viruses in the cardiovascular tissues to have scaffold for the safe regenerative tissue transplantation.

2. Material and methods

The porcine heart valves 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 packed immediately in sterile bags filled with phosphate buffered saline (PBS) and treated by ultrahigh pressure of 980 MPa for 10 min using a CIP apparatus (Dr. Chef, Kobe Steel Ltd, Kobe, Japan) for cell demolition (Fig. 1). The range of temperature in the process is about 5 to 30°C. They were then rinsed by PBS for 2 weeks under gentle stirring at 4°C for removal of the residues of the broken cells. They were subjected to the histological observation by the light and electron microscopy, DNA and phospholipids assay, detection of porcine endogeneous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement.

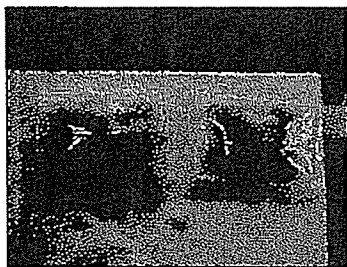


Fig. 1 Packed porcine heart valves for CIP treatment.

The acellular tissues were transplanted orthotopically into nine allogeneic miniature pigs. The pulmonary valves were transplanted at right ventricular outflow tract through a median sternotomy with extracorporeal circulation without blood oxygenation [5]. The postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 4, 12, and 24 weeks (n=3) 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).

3. Results and discussion

The tissues were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min followed by washing for 2 weeks from the H-E staining (Fig. 2). The amount of DNA and phospholipids were lower than 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.5 mg/wet g, respectively and those were less than 10% in the native tissue (Fig. 3).

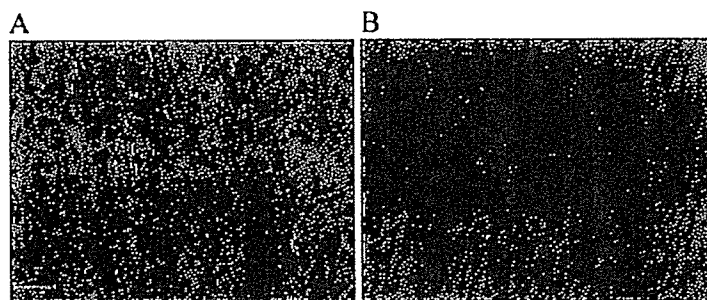


Fig. 2 Cross sections of (A) native and (B) treated tissues (H-E staining).

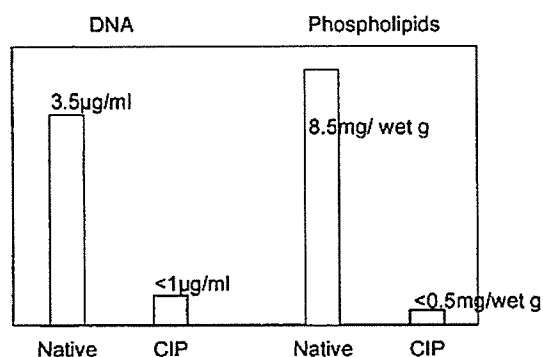


Fig. 3 Residual amounts of DNA and phospholipids in native and treated tissues.

The collagen and elastin fibers were well maintained in the acellular tissue and there were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. We have already found that this process could be successfully applied to cartilage tissues for decellularization (not shown). More effectively, it has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP only of more than 600 MPa without washing [6]. This means the treatment is able to sterilize the tissue in addition to the decellularization. The Clawn miniature pig was chosen 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. There was no PERV detected in PCR assay from the tissue treated (Fig. 4).

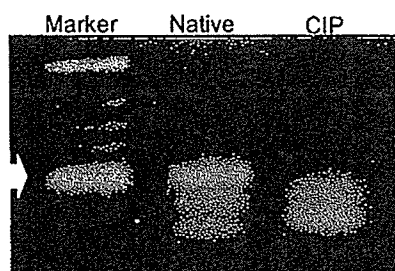


Fig. 4 PCR products of PERV (arrow) in native and treated tissues.

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. 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 at 24 weeks, mainly by smooth muscle cells (Fig. 5). There was no inflammation and calcification observed in the tissue.

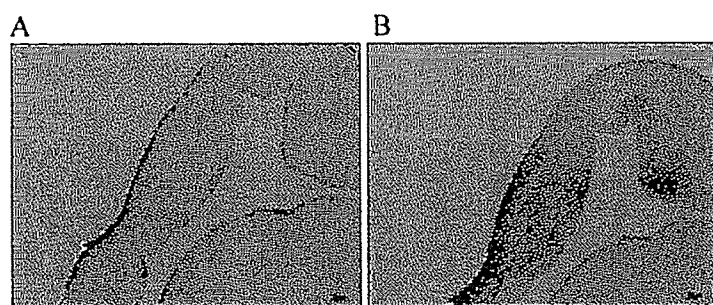


Fig. 5 Cross sections of (A) anti-vWF (endothelial cells) and (B) anti- α SMA (smooth muscle cells) immunostained treated tissues 24 weeks after the transplantation.

Recently, some groups have reported excellent clinical results of acellular pulmonary heart valve transplantation [7-9]. We are planning a clinical application of the acellular grafts made by this process in the near future.

4. Conclusion

Porcine cells and PERV were removed completely by the CIP treatment without using any detergents. The acellular grafts showed remarkable ability in repopulation after the transplantation. This CIP treatment may have more secure acellular graft for the regenerative tissue transplantation.

5. Acknowledgement

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.

6. References

- [1] Bader, A., Schilling, T., Teebken, O.E., Brandes, G., Herden, T., Steinhoff, G., and Haverich, A. (1998) Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur. J. Cardiothorac Surg.* 14 (3), 279-284.
- [2] O'Brien, M.F., Goldstein, S., Walsh, S., Black, K.S., Elkins, R., and Clarke, D. (1999) The SynerGraft valve: a new acellular (nongluteraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 11 (4 Suppl 1), 194-200.
- [3] Steinhoff, G., Stock, U., Karim, N., Mertsching, H., Timke, A., Meliss, R.R., Pethig, K., Haverich, A., and Bader, A. (2000) Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 102 (19 Suppl 3), III50-55.
- [4] Booth, C., Korossis, S.A., Wilcox, H.E., Watterson, K.G., Kearney, J.N., Fisher, J., and Ingham, E. (2002) Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J. Heart Valve Dis.* 11 (4), 457-462.

- [5] Numata, S., Fujisato, T., Niwaya, K., Ishibashi, U.H., Nakatani, T., and Kitamura, S. (2004) Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved Allograft. *J. Heart Valve Dis.* 13, 984-990.
- [6] Hatashi, R. (2002) High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value. *Biochem Biophys Acta* 1595, 397-399.
- [7] Tavakkol, Z., Gelehrter, S., Goldberg, C.S., Bove, E.L., Devaney, E.J., and Ohye, R.G. (2005) Superior durability of SynerGraft pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann. Thorac. Surg.* 80 (5), 1610-1614.
- [8] Cebotari, S., Lichtenberg, A., Tudorache, I., Hilfiker, A., Mertsching, H., Leyh, R., Breymann, T., Kallenbach, K., Maniuc, L., Batrinac, A., Repin, O., Maliga, O., Ciubotaru, A., and Haverich, A. (2006) Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 114 (1 Suppl), 1132-1137.
- [9] Erdbrugger, W., Konertz, W., Dohmen, P.M., Posner, S., Ellerbrok, H., Brodde, O.E., Robenek, H., Modersohn, D., Pruss, A., Holinski, S., Stein-Konertz, M., and Pauli, G. (2006) Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. *Tissue Eng.* 12 (8), 2059-2068.

Host Cell Infiltration to Implanted Vascular Grafts Made of Collagen Fibers in Porcine Model

Toshia Fujisato¹, Norihisa Sasayama⁵, Kenji Minatoya², Kenichi Yoshida¹, Seiichi Funamoto¹, Akio Kishida³, Akio Shirasu⁵, Takeshi Nakatani³, Hisateru Takano⁵ and Hiroyuki Hattori⁵

¹Regenerative Medicine & Tissue Engineering, ²Cardiovascular Surgery, and ³Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

⁴Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

⁵Research & Development Laboratory, Nipro Corporation, Shiga, Japan

Statement of Purpose: The artificial synthetic vascular grafts have been clinically established for large diameter vessels but not for small diameter less than 4 mm because of thrombosis. The allografts or homografts which are donated from the cadavers are useful especially in the infected area, however the supply is limited. The regenerative vascular grafts which may be replaced by the host tissue after the implantation may have growth potential and be applicable to the pediatric patients. Prof. Shin'oka (Tokyo Women's Medical Univ.) has already applied PGCL vein graft (pulmonary artery) to about 50 pediatric patients and reported good clinical results. However, the biodegradable graft may not be applicable to the artery because of its rupture due to biodegradation. We are developing vascular grafts made of collagen fibers. The collagen grafts may be digested by infiltrated cells and show a different degradation profile from that of the biodegradable materials which are hydrolyzed even out of the living body. In this presentation, a regenerative profile of our collagen graft was studied in a porcine model.

Methods: Porcine skin collagen solution was extruded in ethanol to form collagen fibers. They were then collected and pressed to have non-woven fabrics sheets. The obtained collagen sheets were rolled and immersed in collagen solution followed by crosslinking in a vacuum oven. The inner diameter and length of the grafts were about 7 mm and about 2.5 cm, respectively. The collagen vascular grafts were implanted at descending aorta of the 6 Clawn miniature pigs (Japan Farm Co., Ltd.) through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. They were then explanted at 4 or 8 weeks after the implantation 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 / Discussion

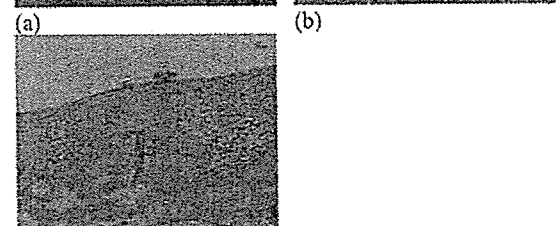
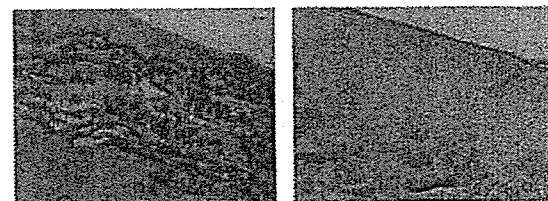
The treated animals survived after the implantation in all cases. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis (Fig. 1a) at 4 and 8 weeks after the implantation. The inner surfaces were smooth and had no thrombus formation (Fig. 1b). Cell infiltration of smooth muscle cells and fibroblasts was identified at 4 weeks, and intimal thickening was observed at 8 weeks after the implantation (Fig. 2a,2c). The luminal surfaces of the aorta were partly covered with endothelial cells (Fig. 2b). There was no calcification detected in the

explanted tissues. However, stenosis was observed in the middle region of the graft due to the intimal thickening by the smooth muscle cells in the region at 8 weeks.

Conclusions: The novel regenerative collagen graft may be useful in the aortic system. The graft was easily infiltrated by the host cells and may be substituted by the host collagen and elastin. After the completion of the host tissue substitution, the graft may have growth potential and be applied to the pediatric patients. We are now investigating the mechanism of intimal thickening of the grafts.



(a) (b)
Fig.1 (a) The explanted vascular graft and (b) the SEM photograph of its inner surface near the anastomosis at 8 weeks after the implantation.



(a) (b) (c)
Fig.1 (a) HE, (b) anti-vWF and (c) anti-aSMA stainings of the explanted vascular graft at 8 weeks after the implantation.

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.

生物組織の再生医療への応用

藤里 俊哉¹・岸田 晶夫²・湊谷 謙司³・庭谷 和夫³・中谷 武嗣³・北村 惣一郎³
 国立循環器病センター研究所 再生医療部¹
 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所²
 国立循環器病センター³

Application of biological tissues as tissue engineering scaffolds

Toshiya Fujisato¹, Akio Kishida², Kenji Minatoya³, Kazuo Niwaya³, Takeshi Nakatani³, Soichiro Kitamura³

Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center Research Institute¹

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University²

National Cardiovascular Center³

再生医療の3要素である細胞、増殖因子、足場材料のうち、足場材料 (Scaffold: スキャフォールド) については工学技術に依存するところが大きい。これまでに、ポリ乳酸系ポリマーをはじめとする生分解性高分子材料によって種々のスキャフォールドが開発されている。また、コラーゲン、ゼラチンなどの天然高分子もその生理活性を目的に応用されている。再生医療用スキャフォールドを直接、患部に埋め込んで組織再生を誘導する、いわゆる *in situ* 型の再生医療は、置換後ただちに機能が発揮されるため、望ましい再生医療の典型である。これに用いられるスキャフォールドは周辺組織と調和する物性と細胞増殖性および分解性を兼ね備える必要がある。合成あるいは天然の高分子材料では、生体組織との物理的特性が一致せず、また、心臓弁などの強靱性を達成することは困難である。我々は、*in situ* 型の再生医療の早期実現のために、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。

脱細胞化組織の調製には、一般的に、界面活性剤を用いて細胞成分を可溶化し、その後大量の洗浄液で洗浄し、残渣を除去する。この場合、界面活性剤の深部への浸潤が困難である、界面活性剤の残存が問題となる、滅菌が困難なためすべての行程を清潔環境で行う必要がある、などの問題点がある。我々はこれらを解決する新しい工学技術として、超高静水圧処理を用いた方法を開発した。以下に研究の一例を示す。

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、ミニブタに同種移植を行い、組織再生を検討した。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。このように、血管や心臓弁などの循環器系の繊維性組織を基盤とする組織再生については、優れた成果があげられている。

超高圧処理による脱細胞化法は、物質の拡散に依存せず全体を一括して処理できるため、種々の組織に応用が可能である。その例として、大腿骨、関節軟骨、腱、および靱帯の脱細胞化にも成功している。この場合には、血管組織とは異なり、圧力や洗浄の条件を最適化する必要があるが、いずれの場合にも、高い効率で細胞除去が可能であった。

脱細胞化組織を用いた再生医療を支える工学技術には、超高圧処理の他に、洗浄の効率を高めるマイクロ波照射洗浄法、細胞成分をより高率に除去するための超臨界流体を用いた洗浄法、再細胞化を行うための細胞ディスペンス装置、および再細胞化を *in vitro* で完成させるためのバイオリクターなどがあげられる。これらの技術を総合化することにより、安全性の高い再生医療が可能となる。我々は、我が国発の生物組織を用いた再生医療技術の確立を目指しており、この目的の達成のためには幅広い工学技術の結集が必要である。多くの研究者の御協力をお願いする。

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。

バイオリアクターを用いた脱細胞化ブタ大動脈血管への細胞播種

戸川 祐一¹, 江橋 具², 吉田 謙一², 船本 誠一², 西岡 宏²,
大場 謙吉¹, 藤里 俊哉², 中谷 武嗣²
関西大学¹, 国立循環器病センター²

Cell seeding onto acellular porcine aorta using bioreactor

Yuichi Togawa¹, Tomo Ehashi², Ken'ichi Yoshida², Seiichi Funamoto², Hiroshi Nishioka²,
Kenkichi Oba¹, Toshia Fujisato², Takeshi Nakatani²
Kansai University¹
National Cardiovascular Center²

1. 緒言

組織工学的手法を用いた生体組織の再生において、近年様々な種類の細胞の足場となる scaffold が開発されている。我々はブタの大動脈から採取した血管を、超高静水圧印加処理を行うことで脱細胞したものを scaffold として、同種移植を行っている。しかし、一部症例においては狭窄や、石灰化が見られることがあり、それらを解決するためには移植前にレシピエントの血管内皮細胞を播種することが有効と考えられる。その際、バイオリアクターを用いて循環させながら培養することで生体内に近い環境で培養することができると考えられる。本報告では、回転型バイオリアクターによって脱細胞化血管 scaffold への血管内皮細胞の播種について検討するとともに、循環バイオリアクターによる長期培養についても検討した。

2. 実験

クラウン系ミニブタ (ジャパンファーム) から大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理 (神戸製鋼) を行うことで、ドナー細胞を除去した組織を scaffold として用いた。ミニブタの末梢血管からコラゲナーゼ処理にて単離・培養した血管内皮細胞を、scaffold に回転型バイオリアクターによって、播種した。その後、1 日静置状態で培養し、さらに閉鎖回路を用いた循環バイオリアクターで培養を続けた。以前報告した回路では、長期間使用すると回路内に気泡が発生し、遠心ポンプ

の流れを妨げるなどの様々な問題があったため、今回は、エアトラップを組み込む等によって、回路に改良を加えた。

3. 結果と考察

図 1 に回転播種後の大動脈 scaffold のトルイジン染色画像を示した。ミニブタから単離・培養した血管内皮細胞を大動脈に 4 時間回転播種することで、内壁に播種することができた。

図 2 に今回作製した循環バイオリアクターの写真を示した。エアトラップを用いることで、長期間の使用においても、回路内の気泡を除去することができた。現在、長期の培養についても検討している。



Figure 1. Porcine aorta scaffold endocellularized by rotation bioreactor.

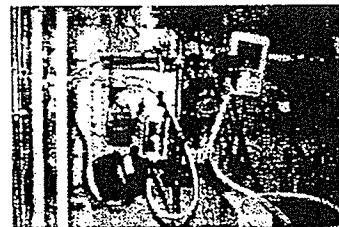


Figure 2. Circulation bioreactor for cell-seeded vascular scaffold.

生体由来コラーゲン製人工血管の開発

寺田 堂彦^{1,2}・澤田 和也³・緒方 裕之²・吉田 謙一⁴・船本 誠一²
 藤里 俊哉²・岸田 晶夫⁵・永谷 憲歳²・中谷 武嗣²・北村 惣一郎²
 医療機器センター¹・国立循環器病センター²
 大阪成蹊短期大学³・先端医療振興財団⁴・東京医科歯科大学⁵

Development of artificial vascular grafts made of biological tissue.

Dohiko Terada^{1,2}, Kazuya Sawada³, Hiroyuki Ogata², Ken'ichi Yoshida⁴, Seiichi Funamoto²,
 Toshia Fujisato², Akio Kishida⁵, Noritoshi Nagaya², Takeshi Nakatani², Soichiro Kitamura²

Japan Association for the Advancement of Medical Equipment¹, National Cardiovascular Center²,

Osaka Seikei College³, Foundation for Biomedical Research and Innovation⁴, Tokyo Medical Dental University⁵

緒言

現在、臨床において人工血管は年間約5万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小児患者では成長性を得られないため、再生型人工血管の開発が望まれる。再生型人工血管として吸収性材料を用いる研究が行なわれているが、その分解機構は単なる加水分解であるために、持続的に血圧に抗しなければならない動脈系への適応は難しい。また、生体組織特有の柔軟性に欠け、複雑な形状部位への適応も困難である。これらを解決するために、生体血管組織を利用した再生型人工血管の開発について検討を行なった。

実験

架橋剤あるいは熱架橋によって固定化処理を施したブタ大動脈（株式会社ジャパンファーム）を、エラスターゼ（エラスチン分解酵素）のトリスバッファー溶液中に浸漬することで、血管組織からエラスチンを分解除去した。得られた試料を、組織学的観察及び力学試験によって評価した。

結果と考察

グルタルアルデヒド（GA）によって固定化された血管組織から、エラスターゼ処理によりエラスチンを除去することが可能であった（図1）。同様に、熱架橋処理された試料からも、エラスチンを除去することが可能であった。いずれの固定化処理も、主にコラーゲン分子同士を架橋して安定化させるが、エラスチン分子にはほとんど作用しないためと考えられる。

GA 固定化処理においては、比較的緩やかな条件で固定化処理された血管組織からは、エラスターゼ処理による組織内細胞の脱核も確認された。熱架橋試処理においてもエラスターゼ処理による脱核が認められた。

エラスチンの除去に伴って力学特性は低下したが、固定化処理条件を適切に設定することによって、血管組織として必要な力学特性を保持することが可能であった（図2）。

得られた人工血管は、生体由来コラーゲンを利用するために良好な生体適合性を有し、かつ、血管組織の形状をそ

のままの状態を利用して、複雑な形状部位でも作製可能である。本方法によって、再生型人工血管を作製できる可能性が示唆された。

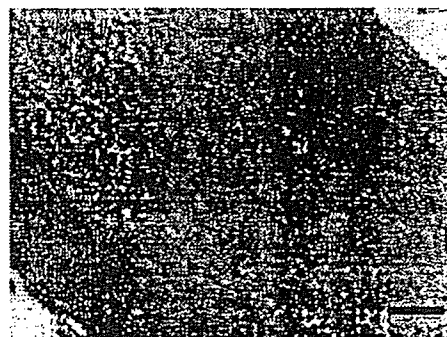


Fig. 1 Elastic von Gieson staining for the treated aorta fixed in glutaraldehyde solution (0.01 wt%, 25 °C, 24 h) followed by enzymatic digestion in elastase solution (570 u/L, 37 °C, 12 h). The bar in the figure is corresponding to 200 μm.

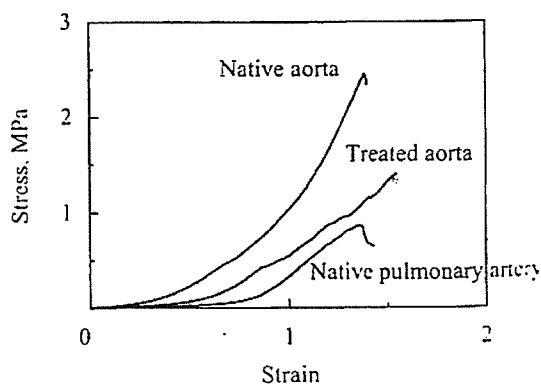


Fig. 2 Stress-strain curves of the native aorta and pulmonary artery and the treated aorta fixed in glutaraldehyde solution (0.01 wt%, 25 °C, 24 h) followed by enzymatic digestion in elastase solution (570 u/L, 37 °C, 12h).

γ線照射による移植用生体組織の開発

国循セ ○藤里俊哉・松本誠一・吉田謙一・山岡哲二・中谷武嗣
 原子力機構 菊池正博・小林泰彦
 東医歯大 木村 剛・岸田晶夫 *先端医療振興財団

【緒言】

現在、我が国において人工心臓弁は年間1万個、人工血管は5万本が使用されている。屍体から提供されるヒト心臓弁や血管も組織バンクを通じて臨床使用されているが、年間数十件程度に過ぎない。米国では商業利用によって、年間数千件のヒト組織が使用されている。人工素材から作成される移植用組織は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。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移植用組織の開発を行っている。

【実験】

マウスやラット、ブタの血管や心臓弁、肺等組織を摘出し、PBS中にてコバルト60を線源とするγ線照射を行った。γ線照射量は、10、30、100、300、1000Gy、吸収線量率は、それぞれ100、300、100、300、1000Gy/hである。照射後、PBSをベースとする洗浄液にて洗浄した。処理後の組織を、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡で組織学的に観察するとともに、組織を細切後、組織内に残存しているDNA量を測定することで、細胞除去を評価した。また、力学試験機にて引っ張り試験を行い、破断までの張力を測定することで生体力学特性を評価した。

【結果と考察】

ガンマ線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存が見られたが、照射線量が増えるにつれて洗浄後組織内の核の残存が減少していた。また、残存DNAを測定したところ、100あるいは300Gy以上の照射では大幅に減少する傾向が見られた。力学特性は、破断強度並びに弾性率とも大きな影響は見られなかった。すなわち、300Gy以上のガンマ線を照射後、洗浄処理することによって、組織内の細胞はほぼ完全に除去できると思われる。細胞除去組織を用いた再生型組織移植技術の臨床応用で先行するドイツや米国のグループは、界面活性剤や酵素液、または低あるいは高張液への浸漬処理によって細胞を除去している。この場合、細胞除去の効率は処理液による浸透性に依存しており、組織深部での細胞除去が困難であると考えられる。また、動物組織由来の場合では、残存成分による拒絶反応の他、動物由来感染症の危険も払拭できない。実際、動物組織由来の米国社製品を移植された患者が死亡する事例も報告されており、細胞除去が不十分であった可能性が指摘されている。これに対し、既に我々が報告している超高静水圧印加や、本報告におけるガンマ線照射による細胞除去では、組織深部への透過性はもちろん、骨や軟骨などの硬組織においても適用可能であると考えられる。

【謝辞】

本研究は文部科学省原子力試験研究費の補助を受けて行われた。

Regenerative tissue scaffolds prepared by gamma ray irradiation.

Toshia FUJISATO¹, Seiichi FUNAMOTO¹, Kenichi YOSHIDA^{1,2}, Tetsuji YAMAOKA¹, Tsuyoshi KIMURA⁴, Masahiro KIKUCHI³, Yasuhiko KOBAYASHI³, Akio KISHIDA⁴, and Takeshi NAKATANI¹ (¹National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2, Minatojima Minamimachi, Chuo. Kobe 650-0047, Japan, ³Japan Atomic Energy Agency, 1233 Watanuki-machi, Takasaki, Gunma 370-1292, Japan, ⁴Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan)

¹Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

Key Word: tissue engineering / scaffold / γ-ray

Abstract: Tissue-engineered grafts may have the advantage of growth potential and anti-infection compared with the current artificial grafts. Detergents are commonly used for removal of the cells, whereas the decellularization depends on their permeation in the tissue. Novel decellularization process has been developed by a pretreatment of the γ-ray irradiation.

Mouse, rat, and porcine vascular tissues were isolated and irradiated by the γ-ray of 10 to 1000Gy, followed by immersing into PBS-based washing solution. They were then subjected to the histological observation, DNA assay, and biomechanical study.

There were no cells observed in the tissues treated by the γ-ray more than 300Gy. The amount of DNA in the tissue treated was lower than 10% of that in the native tissue. There were no major changes in biomechanical properties after the treatment. This process may be useful for safe acellular grafts for the vascular tissue regeneration.

遺伝子導入能を有する超高压誘起 ナノ無機粒子/高分子/DNA 複合体の調製

東医歯大生材研 ○木村剛・南広祐 岡山大環埜理工 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

<緒言>

我々は超高压状態における物質の水素結合の強調性に着目し、種々の水素結合性高分子を用いた超高压誘起水素結合性高分子集合体による細胞への遺伝子導入について検討している。これまで、ポリビニルアルコール (PVA) /DNA 複合体、および、ハイドロキシアパタイト (HAp) を含有する HAp/PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入を報告してきた。また、高濃度 PVA への超高压印加によりハイドロゲルが形成されることから、PVA/DNA ゲルからの DNA の徐放についても取り組んでいる。本研究では、PVA/DNA ゲルに HAp を含有させることで細胞接着性を付与し、接着する細胞への効率的な遺伝子導入について検討した。

<実験>

重合度 1700、酸化度 99.3%の PVA を用いた。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 HAp を得た。また、異なる結晶化度の HAp も調整した。遺伝子としては、蛍光タンパク質遺伝子を有する pEGFP プラスミド DNA、サケ白子 DNA を用いた。5、7.5、10w/v% の PVA 水溶液を調製し、0.01~10mg/ml の HAp 溶液、DNA 溶液と種々の割合で混合し、10000 気圧、10 分間加圧した (超高压処理)。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)、マウス骨髄細胞を用いた。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。

<結果・考察>

PVA/HAp/DNA 混合液への超高压処理により白色のハイドロゲルが得られた。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。SEM 観察では、ハイドロゲル表面に HAp が観察され、また、DNA 染色法により DNA の含有が確認された。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。PVA ゲル上では細胞接着は観察されず、HAp 含有 PVA ゲルにおいて有意な細胞接着が認められた。遺伝子導入についても報告する。

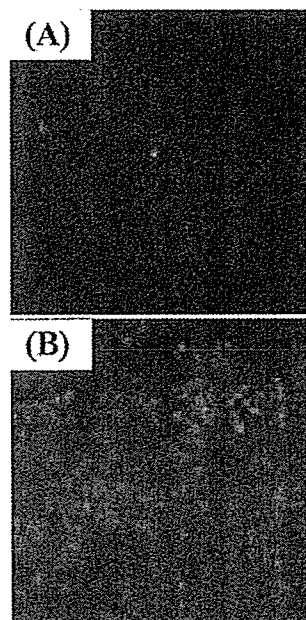


Fig. Adhesion of L929 cells on (A) PVA/DNA and (B) PVA/HAp/DNA hydrogels.

Preparation of nano-inorganic particle/polymer/DNA composites by ultra high pressure technology for gene transfection

Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIZAWA², Masahiro OKADA³, Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISAO³, Akio KISHIDA¹ (¹ Tokyo Medical and Dental Univ., 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, ²Okayama Univ., ³National Cardiovascular Center Reserch Institute)

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

Key Word: ultra high pressure treatment / hydrogel / transfection / hydroxy apatite

Abstract: We have performed the development of nano-inorganic particle/polymer/DNA composites by ultra high pressure technology for gene transfection. Nano scaled hydroxy apatite (HAp) was used as nano-inorganic particle. Polyvinyl alcohol (PVA, 5, 7.5, 10w/v%) aqueous solution mixed with HAp(0.01-10mg/ml) and DNA, then treated by ultra high pressure at 10,000 atm for 10min. HAp/PVA/DNA hydrogel was obtained. By SEM observation, HAp particles on the surface of the hydrogel were observed. By DNA staining, the including of DNA in the hydrogel was confirmed. In order to investigate the cell affinity of the hydrogel, various cell lines were added on the hydrogels. In the case of PVA/DNA hydrogel, almost all of cells were not adhered. On the other hand, the effective cell adhesion was observed on HAp/PVA/DNA hydrogel.

エンドソーム遊離促進を目指した
ナノHAp/PVA/DNA複合体による遺伝子導入

東医歯大生材研 ○仁部洋一・木村剛・南広祐 岡山大環境理工 六雄伸吾・吉澤秀和
国循セ研 岡田正弘・古菌勉・藤里俊哉 東医歯大生材研 岸田晶夫

【緒言】我々は、超高压処理により調製したポリビニルアルコール (PVA) と DNA の複合体を用いた細胞への遺伝子導入を検討している。PVA/DNA 複合体の細胞内送達は達成されたが、十分な遺伝子発現は認められなかった。そこで、エンドソームの遊離促進を目指し、低 pH で溶解されるハイドロキシアパタイトのナノ粒子を含有するナノ HAp/PVA/DNA 複合体を考案し、遺伝子導入効率の向上が示された。本研究では、更なるエンドソーム遊離促進と遺伝子導入効率の向上を目指し、物性の異なる HAp を用いた HAp/PVA/DNA 複合体による遺伝子送達について検討した。

【実験】形状および酸溶解性の異なる HAp を用いた。HAp 濃度、分散処理条件の最適化を行い、超高压処理装置 (Dr.CHEF; (株)神戸製鋼所) を用いて 37°C、10000atm の超高压処理を施し、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体を得た。得られた複合体の物性を光学・電子顕微鏡観察、DSC 測定にて解析した。COS 7 細胞への遺伝子送達について、蛍光ラベル化したプラスミド DNA を用いて検討した。

【結果と考察】超音波処理を 20 分した後、高濃度 DNA 溶液に混合した場合に高分散性複合体が得られることが明らかとなった。得られた DNA/PVA/HAp 複合体の SEM 観察では、表面および内部への HAp 含有が確認された。蛍光ラベル化 DNA を用いた細胞内送達では、添加後 1 時間において HAp を含有しない PVA/DNA 複合体、リン酸カルシウム/DNA 複合体に比べ、HAp/PVA/DNA 複合体の場合に有意な細胞内導入が達成された。24 時間後においても導入遺伝子は確認された (図)。これらの結果より、HAp による早期の細胞内送達を示された。

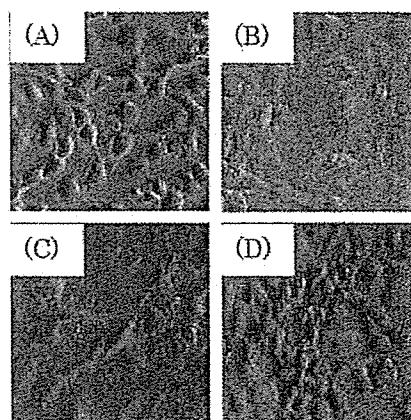


Fig. Gene delivery into COS7 cells using (A) DNA, (B) nano-PVA/DNA (C) nano-HAp/PVA/DNA complex and (D) calcium phosphate/DNA complex.

Gene delivery using nano-HAP/PVA/DNA complexes promoting endosomal escape

Yoichi NIBE¹, Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIZAWA², Masahiro Okada³, Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISATO³, Akio KISHIDA¹
(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ²Okayama University, ³National Cardiovascular Center Research Institute)

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

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

Abstract: We have researched gene transfection using hydrogen bonding polymer/DNA complex prepared by ultra high pressure technology. In this study, for effective gene transfection, we investigated the preparation of nano-hydroxyl apatite (HAp)/PVA/DNA complex including nano-scaled HAp particles promoting endosomal escape. Gene transfection was carried out using fluorescent labeled plasmid DNA molecules. After 1hour incubation, the effective cellular uptake of HAp/PVA/DNA complexes comparison with PVA/DNA complex and DNA was observed by fluorescent microscope, and then high transfection efficiency was achieved using HAp/PVA/DNA complexes. These results indicate the effective DNA release from endocytosis.

PEG/多糖の水性二相系への超高压処理による新規構造体の調製

日大理工 ○三浦義之・栗田公夫 東医歯大生材研 木村剛・南広祐、
 岡山大環境理工 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

<緒言>

我々は超高压技術を用いた新規構造体の創製について研究を行っている。超高压条件下では、水素結合が強調されることに着目し、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)への超高压印加により、ナノ・マイクロ粒子、ハイドロゲルが形成されることを報告した。本研究では、種々の分子量のPEG/多糖水性二相系の高分子混合液への超高压処理による、新しい多成分系ポリマー構造体の調製について検討した。

<実験>

種々の分子量のポリエチレングリコール(PEG、Mw:6000、8000)、デキストラン(DEX、Mw:60,000~90,000、50,000)、プルランを用いた。各々10%(w/v)水溶液を調製し、1:1の割合で混合した後、25°Cで10,000気圧、10分間超高压印加処理した。処理液を、目視による観察、動的光散乱(DLS)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。

<結果・考察>

各単成分溶液への超高压処理では、目視による変化が確認できなかった。一方、PEG/DEX混合溶液では、溶液を調製した段階で溶液が青白色を呈した。これは、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を混合することにより水性二相分離が形成されることが知られている。今回用いたPEG、DEXは低分子量であることから二相は形成されず、エマルジョンな状態となったことで散乱が生じ、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処理では、高分子量のDEXを用いた場合に水性二相を形成し、下相では青白色を呈した(図1)。より高分子量のDEX(Mw=500,000)を用いると、超高压を印加しない場合でも水性二相を形成するが、処理後では変化は確認できなかった。従って、この現象は超高压によるPEGとDEXから成る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。生じた二相分離の下相部の溶液のDLS測定(25°C)では、いずれの場合も粒子径の増加が観察された。また、50°CにおけるDLS測定では粒子径の減少が示されたから、PEG/DEXのエマルジョンへの超高压印加処理により、水素結合を介した新規多成分構造体が形成されたと考えられる。また、PEG/プルラン混合系においても、同様の結果が得られた。PEG/DEX構造体の詳細な解析、および超高压処理によるその他のPEG/多糖構造体についても報告する。厚生労働省科学研究費ならびに文部科学研究費の補助を受けて行われた。

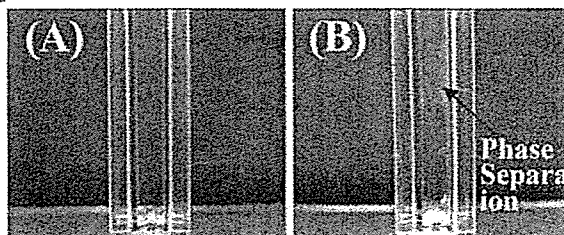


Fig1. Photographs of the mixtures of PEG(6,000) and DEX(60,000~90,000).

(A) without or (B) with ultra high pressure treatment.

Preparation of novel structures by ultra high pressure treatment for aqueous PEG/polysaccharides two-phase system

Yoshiyuki MIURA¹, Kimio KURITA¹, Tsuyoshi KIMURA², Kwangwoo NAM², Shingo MUTSUO³, Hidekazu YOSHIZAWA⁴, Masahiro OKADA⁴, Tsutomu FURUZONO⁴, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA³ (Nihon Univ., 1-8-14 Kanda -surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan,²Tokyo Medical and Dental Univ.,³Okayama Univ.,⁴National Cardiovascular Center Reserch Institute)

² TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra high pressure treatment / aqueous two-phase system

Abstract: In this study, the preparation of novel structures by ultra high pressure (UHP) treatment for aqueous PEG/polysaccharides two-phase system was investigated. For polyethylene glycol (PEG) or dextran (DEX) solutions, the clear solutions were maintained after UHP treatment. On the other hand, when PEG (Mw: 6,000 or 8,000) were mixed with DEX (Mw:60,000-90,000) or pullulan, the solution with light scattering was obtained. After UHP treatment, aqueous two-phase separation having light scattering in lower phase was obtained for all cases, suggesting that apparent molecular weight was increased by the formation of PEG/ polysaccharides complex. DLS measurement of them before/after UHP treatment was carried out. The particle size was increased by UHP treatment, then decreased by heat treatment at 50 degrees, indicating the formation of novel hydrogen bonding structures.

生体由来組織を用いた再生型人工血管の開発

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

<緒言>

現在、我が国において年間約 5 万本の人工血管が臨床で使用されており、既にその技術は完成段階にある。しかしながら、その成長性の欠如から小児患者では成長に合わせた再移植が必要であるなどの問題点は残されたままであり、自己組織の再構築を目的とする再生型スキャフォールドとしての人工血管の開発が望まれる。ポリ乳酸などの吸収性材料から人工血管を成形する研究も行なわれているが、生体特有の柔軟性に欠ける他、分解性制御の問題から動脈への適応が難しいといった問題もある。我々は、生体血管組織を利用した再生型人工血管の開発を行なっている。

<実験>

血管組織試料としてブタ大動脈（株ジャパンファーム）を用いた。架橋方法として、25 °C、pH 7.4 のグルタルアルデヒド (GA) 希薄溶液への浸漬処理、あるいは、真空乾燥機を用いて 120 °C、24 時間の熱脱水架橋 (Dehydrothermal treatment, DHT) を行なった。エラスチン分解酵素として、エラストナーゼ (キング化学、4.11u/mg) を用いた。作製された試料に対し、組織学的観察、引張試験、DNA 定量、リン脂質定量、コラーゲン分解酵素を用いた分解試験などを行なった。

<結果・考察>

GA 架橋処理によってコラーゲンは安定化し、その被酵素分解性は低下する。一方、GA はエラスチンにはほとんど作用しないため、GA 架橋処理を施された血管組織から酵素的手法によってエラスチンを完全に除去することが出来た (図 1)。エラスチンの分解に伴って力学特性は低下するが、適度に架橋することによって、血管組織として必要な力学特性を保持することが可能であった。得られた人工血管は、生体由来コラーゲンを利用するために良好な生体適合性を有し、かつ、血管組織の形状をそのままの状態でも利用するため、複雑な形状部位でも作製可能である。本方法によって、再生型の人工血管を作製できる可能性が示唆された。

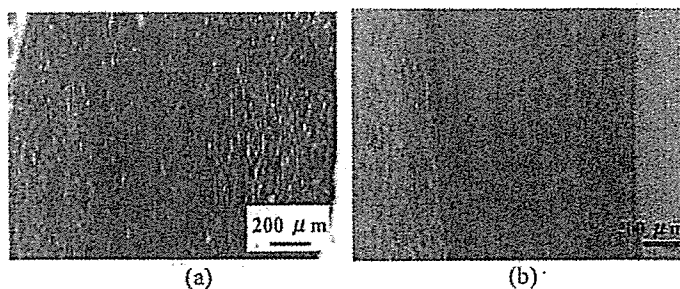


Fig. 1 Elastica-van Gieson staining of (a) native porcine aorta and (b) collagenous graft (0.05 wt%, 25°C, 24 h GA and 0.57 u/ml, 37 °C, 72 h elastase).

Development of Regenerative Vascular Grafts made of Biological Tissue

Dohiko TERADA¹, Kazuya Sawada², Hiroyuki OGATA³, Ken'ichi YOSHIDA⁴, Seiichi FUNAMOTO¹, Toshia FUJISATO³, Akio KISHIDA⁵, Noritoshi NAGAYA³, Takeshi NAKATANI², Soichiro KITAMURA³ (¹Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, 3-42-6 Hongo, Bunkyo-ku Tokyo 113-0033, Japan ²Osaka seikei college, 3-10-62 Aikawa, Higashiyodogawa-ku Osaka 533-0007, Japan ⁴Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2 Minatojimaminami, Chuo-ku Hyogo 650-0047, Japan ⁵Tokyo Dental and Medical university, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan ³National cardiovascular center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita Osaka 565-8565, Japan

¹Tel: +81-6-6833-5004 (ext 2362), Fax: +81-6-6835-5496, E-mail: terada@ri.ncvc.go.jp

Key Word:

Vascular graft, collagen, scaffold, regenerative medicine

Abstract: An artificial vascular graft for regenerative medicine was developed from a porcine aortic tissue. A porcine aortic tissue was cross-linked in glutaraldehyde (GA)/PBS solution with appropriate concentration and then digested in elastase/tris buffer solution. Elastin fibers were digested enzymatically even after their GA treatment, however. Collagenous fibers were not and remained. The collagenous tissue maintained their original shape and mechanical properties required for aortic grafts when the cross-linking reaction was suitable. The collagenous vascular graft may be adapted to a vascular tissue regeneration.

3F07

生体由来組織の超臨界流体処理

(大阪成蹊短大) ○澤田和也、(医療機器セ) 寺田堂彦、(国循病セ) 緒方裕之、(先端医療振興財団) 吉田謙一、(国循病セ) 藤里俊哉、(東医歯大) 岸田晶夫、船本誠一 (国循病セ) 永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎

[緒言]

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おり、約7割は機械弁による置換である。しかし、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、種々の構造的劣化の問題が指摘されている。これらの諸問題を解決する手段として、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ュフォールドとして利用する試みが注目されている。脱細胞化手法として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が一般的であるが、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、本研究ではそれらの諸問題を解決することのできる新規な脱細胞化手法として、“超臨界流体抽出法”の応用化について検討を行った。

超臨界流体とは、各物質固有の臨界点を越える領域で存在する非凝集性の流体として定義される。その特性は、液体に相当する溶媒力が得られるにも関わらず、気体に相当する拡散係数を有している。さらに、圧力制御により媒体としての特性を任意に制御できる特性も有している。現在、これらの特性を利用し、医薬品開発や食品加工において、目的成分の選択的抽出が可能になっている。一方、本研究ではこれらの特性を利用し、生体由来組織から細胞成分を選択的に抽出除去しようとするものである。

本研究では、媒体として二酸化炭素をはじめ、常温・常圧で気体の媒体を利用し検討を進めた。これにより、媒体は処理後に自然拡散し組織内に残存することは無く、生体に安全なスキュフォールド調製が期待出来る。本発表では、処理条件を変化させ検討を行った際の脱細胞化効果について報告する。

[実験]

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、定容高压容器を用い、所定の振とう条件下にて、圧力および温度を変化させ行った。

[結果と考察]

超臨界流体処理を行う場合、処理後の組織は乾燥又は、準乾燥状態として得られる。そこで、予備試験として絶乾状態を経て再度湿潤状態にした血管組織の、処理前後の力学強度評価を行った。その結果、乾燥状態を経ることによる組織の強度変化は見られないことが確認された。これらの結果をうけ、パッチタイプの処理槽内において二酸化炭素を媒体として、所定時間、所定の媒体密度で処理を行った。その結果、二酸化炭素単独では処理前後の細胞成分について変化は見られなかったが、エントレーナとしてエタノールを少量混合させた場合に顕著な変化が見られた。図1は、処理前後の血管組織のヘマトキシリン-エオシン染色の結果を示している。図から明らかなように、10分間の超臨界二酸化炭素処理で細胞核が除去されているのが分かる。高い拡散係数を有する流体が短時間で組織内部へ効果的に浸透していることを示唆している。一方、同処理後の組織内残存リン脂質を評価した結果、約10%を残存し除去されることが明らかとなった。今後、パッチタイプの抽出装置を改変することにより、更なる効果が期待される。本発表では、その他の媒体を用いた場合の結果も含め、抽出効果を報告する。

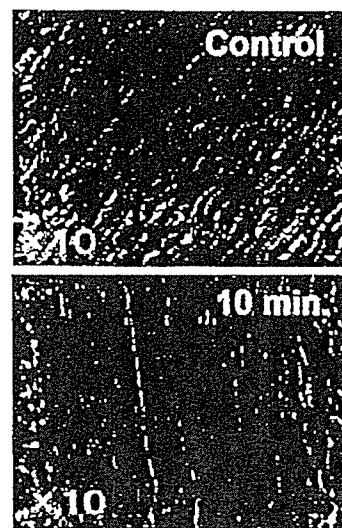


図1 超臨界二酸化炭素処理前後のHE写真(35MPa)

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

Supercritical Fluid Processing of Tissue. Kazuya SAWADA, Dohiko TERADA, Hiroyuki OGATA, Kenichi YOSHIDA, Seiich FUNAMOTO, Toshiya FUJISATO, Akio KISHIDA, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Souichiro KITAMURA, Dept. Integrated Life, Osaka Seikei College, 3-10-62 Aikawa Higashiyodogawa-ku Osaka 533-0007, Tel 06-6829-2561, Fax 06-6829-2579, e-mail sawada-k@osaka-seikei.ac.jp

33) コラーゲン構造を保存した生体由来スキャフォールドの作製

(医療機器センター・国立循環器病センター研究所) 寺田堂彦
[澤田和也・大阪成蹊短期大学、緒方裕之・国立循環器病センター研究所、
吉田謙一・先端医療振興財団、船本誠一・国立循環器病センター研究所、
藤里俊哉・国立循環器病センター研究所、岸田晶夫・東京医科歯科大学、
永谷憲歳・国立循環器病センター研究所、中谷武嗣・国立循環器病センター]

E-mail terada@ri.ncvc.go.jp

電話 06-6833-5004(内線 2362) FAX 06-6835-5496

結 言

現在、臨床において人工血管は年間約5万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、その成長性の欠如から小児患者では成長に合わせた再移植が必要であるなどの問題は残されたままであり、再生型人工血管の開発が望まれる。

再生型人工血管に関する研究において、ポリ乳酸などの吸収性材料で成型した人工血管は、静脈系の置換術において優れた成果が報告されている。しかしながら、その分解機構は単純な加水分解によるため、持続的に血圧に抗しなければならない動脈系への適応は難しい。また、生体組織特有の柔軟性に欠け、複雑な形状部位への適応も困難である。一方、脱細胞化した生体組織を自己組織再生の足場として利用する、バイオスキャフォールドに関しても精力的な研究が行なわれている。我々は以前から、超高静水圧印加法による動脈組織や心臓弁組織の脱細胞化手法についての研究を行なっている。同手法によって脱細胞化したブタ肺動脈の同種同所性、あるいは大動脈位への異所性移植では、顕著な石灰化に起因する狭窄や機能不全は認められず、共に良好な結果が得られているのに対し、脱細胞化した大動脈組織の同所性移植では顕著な石灰化の生じる例を確認している。この移植結果の違いは、大動脈組織と肺動脈組織とのエラスチン含有量の差に起因するものと考えられる。移植用組織内に残留している細胞残渣と同様に、エラスチンはカルシウム沈着の起点であると考えられているため、バイオスキャフォールドを脱エラスチン化することは石灰化抑制効果に繋がると期待される。

以上のことから、生体血管組織の脱エラスチン化手法を開発し、その組織の石灰化抑制効果について検討を行った。

実 験

血管組織試料としてブタ大動脈(㈱ジャパンファーム)を用いた。グルタルアルデヒド(GA)処理(0.05 wt%, 37 °C, 24 h)した血管組織を、エラスターゼ/トリス緩衝溶液(elastase, 0.57 μg/ml; CaCl₂, 10 mM; NaN₃, 0.02%; pH 8)中に浸漬し、37 °Cで72時間振盪処理することによってエラスチンを分解除去した。その後、80 v%エタノールに浸漬し37°Cで72時間振盪処理することによってリン脂質を抽出除去した。また、120 °C、24時間の熱脱水架橋(Dehydrothermal treatment, DHT)を施した血管組織に対しても、同様のエラスターゼ処理およびエタノール処理を施した。作製された試料に対し、組織学的観察、引張試験、DNA定量、リン脂質定量、コラーゲナーゼ分解性試験、ラット皮下移植実験を行なった。

演題 19. 脱細胞化組織を用いた再生型動脈移植における石灰化抑制の試み

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⁾

藤里俊哉¹⁾、寺田堂彦¹⁾、湊谷謙司¹⁾、吉田謙一¹⁾²⁾、庭屋和夫¹⁾、永谷憲歳¹⁾、岸田晶夫³⁾、
中谷武嗣¹⁾、北村惣一郎¹⁾

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、米国企業やドイツ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。ミニブタを用いた同種移植実験から、肺動脈弁では良好な成績を得たが、大動脈では移植後の石灰化を認めた。本研究では、脱細胞化大動脈組織の石灰化抑制について検討した結果を報告する。

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を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた 1 万気圧の超高压印加処理及び残渣除去処理を行うことで組織内細胞を除去した。続けて、真空熱架橋後、エラストーゼによって組織内エラスチンを除去することで、脱細胞・エラスチン化大動脈を得た。ミニブタを用いた同種同所性移植によって、有効性を検討した。

脱細胞化組織を用いた同種下行大動脈置換移植における石灰化や狭窄の理由については明らかではないが、組織内のリン脂質やエラスチンが起点となる可能性が報告されている。昨年度は、残渣除去処理工程中にアルコール処理を導入することで、残存リン脂質成分が除去できることを報告した。本年度は、エラスチンの除去について検討した。エラストーゼによってエラスチンを除去すると、力学特性が低下したが、予め真空熱架橋を導入することで、力学特性の低下を抑制することが可能であった。得られた脱細胞・エラスチン大動脈を用いた同種移植の 3 ヶ月後の結果では、石灰化所見は認めなかった。現在、より長期の移植実験を継続中である。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、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。

P1-11 三次元細胞培養担体としての脱細胞化骨の作製とin vitro評価

○橋本 良秀¹、木村 剛¹、南 広祐¹、船本 誠一¹、藤里 俊哉²、岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所、²国立循環器病センター研究所再生医療部

<緒言>生体組織を構成する細胞外マトリックスは、生体組織の構造を支持するだけでなく、細胞の足場として細胞の増殖、分化などに影響を及ぼすことが知られている。このことから、近年、単層培養とは異なる細胞足場を用いた三次元の細胞培養についての研究が活発になされている。当研究室では、超高静水圧処理により生体組織から細胞を除去した脱細胞化組織の細胞足場としての利用を検討しており、本研究では、三次元細胞培養担体としての脱細胞化骨の調製とin vitro細胞培養について検討した。<方法>成体ブタの大腿骨を購入し、骨幹、骨頭（海綿骨を含む）部位を用いた。それぞれ、直径10mm×厚み3mmに調製した。超高圧印加装置を用い、10,000気圧の超高圧印加を10分間行い、細胞を破壊した。その後、組成の異なる洗浄液にて組織内の細胞残渣を除去した。処理後の組織を組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。得られた脱細胞化骨に骨芽細胞を播種し、数日の培養を行った後に、細胞の接着、増殖を走査型電子顕微鏡（SEM）にて観察した。<結果と考察>超高圧処理を施した骨の目視観察では顕著な変化は認められず、骨髓腔内においても組織構造は維持されていた。ヘマトキシリン-エオジン染色した結果、海綿骨、骨髓腔内の細胞の除去が示された。骨髓腔内では、繊維性組織のネットワーク構造の縮小と変性が若干認められた。脱細胞化骨への細胞の播種においては、細胞の生着が確認できた。以上より、骨組織の脱細胞化と三次元細胞培養担体としての可能性が示唆された。本研究は、厚生労働省科学研究費ならびに科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

P1-12 β -TCPと自己骨髓由来間葉系細胞を利用した 組織工学的犬頭蓋骨再生

○梅田 裕生¹、金丸 眞一¹、山下 勝¹、田村 芳寛¹、岸本 正直¹、中村 達雄²、
大森 孝一³、伊藤 壽一¹

¹京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科、

²京都大学 再生医学研究所 再生医学応用研究部門 臓器再建応用分野、

³福島県立医科大学 医学部 耳鼻咽喉科

組織工学は、細胞を適切な細胞構築の場（足場）と細胞分化に必要な調節因子を提供できる環境におくことで、生体組織を再生させることを指す。さらにin situ tissue engineeringという概念に基づいた再生も試みられている。これは、生体内では、細胞、足場、調節因子のすべてを用意しなくとも、その一部の要素を提供するだけで、その他を局所で調達できるため組織再生が可能となる事を指す。我々はこのin situ tissue engineeringの手法を用い、頭頸部領域での再生を行い良好な結果をあげてきた。我々は、開頭術に準じた頭蓋骨の再生を行ったので報告する。頭蓋骨は扁平骨に分類され、組織学的には長管骨に比べて再生能力に乏しいと言われている。実験はビーグル犬の頭頂～側頭部に、実際臨床で行われている開頭術と同様の手技で一辺2cm大の四角の欠損を作製し、穿頭、骨切りによって生じた欠損部を再生させることを試みた。足場として自家骨置換型の骨再建材料である β -TCPと細胞誘導を促すコラーゲンを混合した素材を用い、併せて骨切りの際に採取した骨粉を加えてパテ状とし、骨欠損部を充填しフィブリン糊で固定した。さらに、自己骨髓由来間葉系細胞を併用したものについても検討を加えた。この際プレートなどによる固定は行わなかった。コントロールとして、こういった足場を用いないモデルをつくり、両者を頭蓋骨CTと、摘出頭蓋骨標本の組織学的検査によって比較検討した。

P1-29 急性心筋梗塞における超音波を用いた新しい血栓溶解療法の確立

○川田 啓之¹、竹本 康宏¹、納谷 憲幸¹、藤本 眞一²、山下 篤³、浅田 祐士郎³、齋藤 能彦¹

¹奈良県立医科大学 循環器内科、²奈良県立医科大学 総合診療科、³宮崎大学 医学部 第1病理学

急性心筋梗塞(AMI)の初期治療において、慢性期の心機能保持および予後改善のためには、早期再灌流が重要である。早期再灌流を目的として、これまで超音波を用いた血栓溶解療法が実験的に検討されてきたが、AMIで認められる血小板に富む血栓に対する超音波の効果は最良の動物モデルが確立されておらず、検討されていない。今回我々は、AMI類似血小板血栓によるウサギ大腿動脈閉塞モデル作成法を確立し、同モデルを用いて血栓溶解に対する超音波の効果を検討した。【方法】20羽の日本白色雄性ウサギを用いて、右大腿動脈内皮を冠動脈形成術用バルーンにより傷害し、4週後に再度同部にバルーン傷害を加えることにより、血小板に富む急性動脈閉塞性血栓を惹起させた。右大腿動脈閉塞を血管造影により確認し、全例に対して2時間後に27,500単位/kgの組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)を耳静脈より投与し、血栓溶解を開始した。対象をtPA単独群(10羽)と超音波併用群(10羽)の2群に分け、超音波併用群ではtPA投与と同時に血栓閉塞部位に対して経皮的超音波照射(1MHz、0.75W/cm²)を開始した。血栓溶解の効果は、血管造影、最大血流速度、および組織学的検討により評価した。【結果】血栓溶解療法開始1時間後の血管造影でTIMI 3の完全再灌流率は、超音波併用群で10例中9例(90%)、tPA単独群では10例中1例(10%)であり、超音波併用群で有意に高かった(p<0.01)。正常側左大腿動脈に対する患側右大腿動脈の最大血流速度比は、超音波併用群で98.6±0.7%、tPA単独群で75.6±1.2%であり、超音波併用群で有意に高かった(p<0.01)。さらに、組織学的検討においても、超音波併用群では右大腿動脈内腔に血栓は認められなかったが、tPA単独群では多量の残存血栓が確認された。【結論】超音波併用による血栓溶解療法は血小板に富むAMI類似血栓においても有用である。

P1-30 脱細胞化血管調製における超高静水圧印加処理の最適条件の検討

○村越 彩子¹、木村 剛¹、南 広祐¹、船本 誠一¹、藤里 俊哉²、岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所、²国立循環器病センター研究所再生医療部

<緒言>細胞足場素材の主流は生体内分解吸収性材料であるが、近年、生体組織から細胞を除去し、残存するマトリックスを足場とする方法が検討されている。これまで我々は、脱細胞法として高圧技術を用いた超高静水圧処理法を開発し、血管の脱細胞化について検討してきた。本研究では、超高静水圧処理法による脱細胞化血管組織の調製における最適条件について検討した。<方法>成体ブタ大動脈片(10×10mm)を作製し、超高圧処理装置を用いて、種々の圧力印加速度(666、1000、2000気圧/分)、処理温度(10、15、20、25、30℃)にて超高静水圧印加を10分間施した。洗浄液に浸漬し、異なる期間の連続振盪にて細胞残渣を除去した。得られた脱細胞化血管について、ヘマトキシリン-エオジン染色、TEM観察などの組織学的評価、引張試験による力学的評価、ラット皮下埋入試験による生体適合性評価を行った。<結果と考察>脱細胞化血管の組織構造変性は、圧力印加条件により異なり、10℃、2000気圧/分の条件に比べ、25℃、666気圧/分の場合に構造維持が示された。圧力印加速度の緩和により、圧力変化に伴う温度変化が緩和され、組織内水分の急激な凝固・融解が抑制されたと考えられる。脱細胞化率は、洗浄期間に依存し、長期間の洗浄によりほぼ完全な脱細胞が達成された。引張試験においては、界面活性剤や酵素を利用した洗浄法に比して未処理の血管の弾性率に近似していた。ラット皮下埋入試験においては、脱細胞血管の有意な炎症反応抑制が示された。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の補助を受けて行われた。