

OA19-5 細胞分化への機械的微小振動刺激の影響に関する検討

○伊藤 由樹子¹、木村 剛¹、南 広祐¹、加藤 綾子²、増澤 徹²、岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学学生体材料工学研究所、²茨城大学工学部

＜緒言＞細胞機能の制御には、成長因子やサイトカインなどの液性因子、シユアストレスや静水圧などの物理的因子が重要である。当研究室では、細胞に機械的な微小振動を与え、膜タンパク質や細胞骨格を刺激し、細胞機能を制御する方法を考案した。これまで、微小振動付加により、細胞の接着・増殖が促進されることを見出した。本研究では、細胞分化における微小振動の影響について詳細に検討した。＜方法＞ piezo電圧アクチュエータを振動子とする周波数可変的な振動を発生する微小振動装置を作製した。神経モデル細胞であるラット副腎褐色細胞腫由来細胞PC12を用いた。所定数のPC12を6ウェル培養プレートに播種し、神経分化誘導剤である神経成長因子（NGF）を添加し、10kHzの微小振動を1時間、24時間毎に5日間加振した。神経突起が細胞体径以上の細胞を分化細胞と定義し、突起長および突起数をNIHイメージソフトにて計測し、分化細胞数を全細胞数で除した細胞分化率を算出した。＜結果と考察＞NGF無添加系では、微小振動の有無に依らず、細胞の分化は示されなかった。一方、NGF添加系では、細胞の分化が観察され、特に、加振した場合において、培養初期の細胞分化率の上昇が示された。培養後期においては、振動の有無に依らずほぼ同等の細胞分化率であった。以上の結果より、微小振動刺激は、細胞の分化を誘導する直接的な要因ではないが、分化のシグナル伝達経路のいずれかに影響すると考えられる。本研究は、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

704 生体由来組織の脱細胞化のための超臨界流体抽出

Supercritical fluid extraction for decellularization of biological tissue

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

Kazuya SAWADA, Osaka Seikei College, 3-10-62Aikawa, Higashiyodogawa-ku, Osaka
Dohiko TERADA, Japan Association for the Advancement of Medical Equipment
Kenichi YOSHIDA, Foundation for Biomedical Research and Innovation
Seiichi FUNAMOTO, Tokyo Medical and Dental University
Toshiya FUJISATO, National Cardiovascular Center
Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University
Noritoshi NAGAYA, National Cardiovascular Center
Takeshi, NAGAYA, National Cardiovascular Center
Souichiro KITAMURA, National Cardiovascular Center

Decellularization of biological tissue has been investigated using supercritical fluid extraction method. Carbon dioxide and fluoroform which have gentle critical conditions were applied as extraction media under various experimental conditions. Decellularization was evaluated by means of HE-stain and chemical quantitative analysis of DNA and phospholipids. Supercritical carbon dioxide that contained small amount of entrainer had a potential to extract phospholipids and nucleus without losing mechanical strength of tissue. In addition, decellularization with carbon dioxide could be attained within 30 minutes treatments. On the other hand, treatments with supercritical fluoroform alone caused slight hardening of tissue.

Key Words: Decellularization, Scaffold, Supercritical Fluid, Extraction

[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いる。そのうち、機械弁による置換が約7割を占めており、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ヤ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、二酸化炭素およびフルオロホルム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、二酸化炭素系または、フルオロホルム系へ必要に応じエ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。

[実験] 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。また、脱細胞化に対するエントレーナ効果として、エタノールを所定量共存させ処理を行った。

【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潤滑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、バ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。

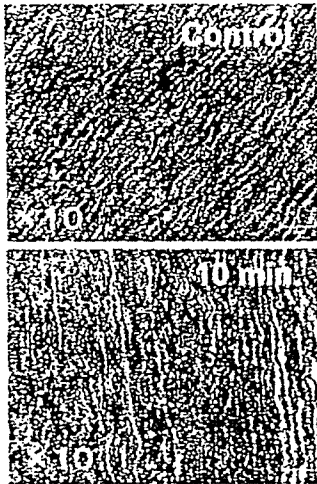


Fig. 1 Microscopic Images of HE stain treated in supercritical carbon dioxide at 35MPa

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。細胞核自体の純二酸化炭素への溶解性は無いことから、エントレーナである、エタノールによる系全体の極性が細胞核の溶解に適した状態に達していると考えられる。

一方、同処理後の組織内残存リン脂質を評価した結果を図2に示す。図2上は処理圧力の影響、図2下は処理時間の効果を示している。図から明らかなように、処理圧力の増加と共にリン脂質の組織内残存量が減少（抽出量の増加）していることが分かる。本系において、圧力の増加は二酸化炭素密度の増加を意味しており、エントレーナとして共存するエタノールの二酸化炭素への溶解性が増加すると考えられる。その結果、系全体の極性が上昇し、極性の高いリン脂質類の溶解性が増加したものと考えられる。そして、およそ20MPa以上でリン脂質が溶解するのに十分な極性が得られ、その結果抽出効果が一定になると考えられる。一方、処理時間の変化によるリン脂質残量変化は、およそ30分で一定になっている。上記の結果より、30MPaの条件下ではリン脂質の系への十分な溶解力が確認されていることから、短時間での抽出が可能に

なったのであろう。何れの結果も、残存リン脂質量がゼロに達していないが、抽出装置がバッチタイプであることに起因していると考えられる。今後、流体の連続フロー型式の流路を設けることにより完全抽出が予測される。

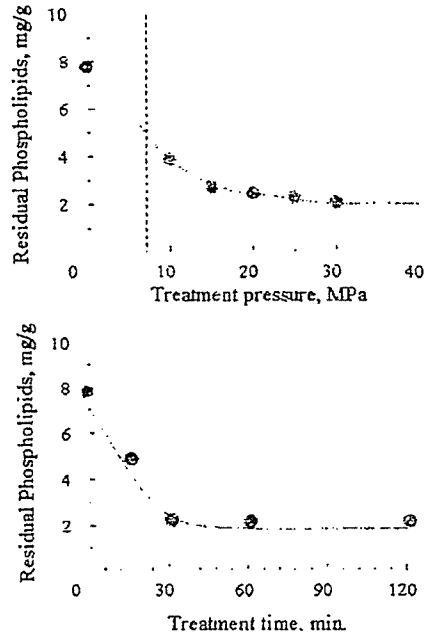


Fig. 2 Residual phospholipid in tissue treated in supercritical carbon dioxide upper: effect of pressure, lower: effect of time

一方、図3が示すように、フルオロホルムを抽出媒体として用いた場合、処理圧力が増加するに従い、組織の硬化が僅かに認められる結果となった。前記のように、乾燥を経ることによる影響は見られなかったことから、フルオロホルム自体の構造タンパクへの影響が考えられる。さらに、フルオロホルム単独で処理を行った場合、リン脂質や細胞核の除去が困難であるという結果も得られた。フルオロホルムは、二酸化炭素と比較し、圧力変化による誘電率変化が極めて大きいことから、今後エントレーナ共存等による力学強度の安定化や、抽出効果の向上が課題である。

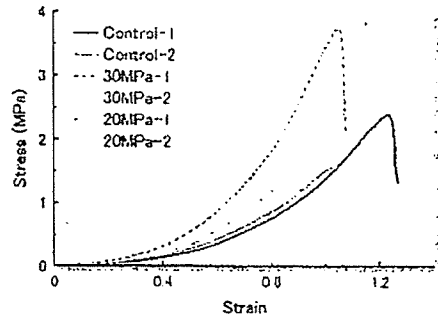


Fig. 3 Stress-strain curve of aorta treated in super critical fluoroform

生体組織構造を利用した再生型人工血管

園循セ ○藤里俊哉、寺田堂彦、吉田謙一、湊谷謙司、庭屋和夫
 中谷武嗣、北村惣一郎
 東医歯大 木村 剛、岸田晶夫
 大成蹊短大 澤田和也

【緒言】人工血管は、内径4mm以上の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5万本が使用される。しかし、移植後も異物のままであり、自己細胞の浸潤による自己組織化が達成されないため、移植後の成長性がなく、感染に対しても非常に弱い。近年、我が国においても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や心臓弁、皮膚等組織の臨床使用が開始された。提供された同種動脈は、人工血管感染における大動脈・動脈の再建や、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。米国では組織バンクが商業ベースで行われており、年間数千件以上の提供組織が臨床使用されている。しかし、我が国では年間数十件に留まっており、圧倒的に提供数が不足している。本研究では同種動脈の不足を補うべく、生物由来素材を用いた再生型組織移植技術を開発する (Figure 1)。

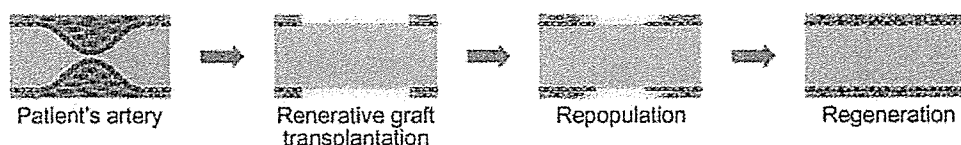


Figure 1. Regenerative vascular graft transplantation.

【実験】食用ブタの下行大動脈 (㈱ジャパンファーム) を凍結乾燥し、真空オーブン内で120℃にて24時間静置することで熱架橋処理を施した。続けてエラスターゼ溶液 (0.57 μg/ml, pH8) 中で37℃にて振盪処理することによって、エラスチンを分解除去した。洗浄後、さらに80%エタノール水溶液中で37℃にて振盪処理することによって、リン脂質を抽出除去した。得られた大動脈を組織学的に観察するとともに、組織内の残存DNA量及びリン脂質量を定量した。また、引張試験によって生体力学特性を検討した。

清潔下で摘出したミニブタ下行大動脈 (内径約6mm、長さ約4cm) に同様の処理を施すことで得られた再生型人工血管を、同種ミニブタに同所性に置換移植した。所定期間経過後に摘出し、免疫染色やSEM観察にて組織学的に評価した。

Regenerative vascular graft derived from living tissue.

Toshiya FUJISATO, Dohiko TERADA, Kenichi YOSHIDA, Kazuya SAWADA**, Kenji MINATOYA, Kazuo NIWAYA, Tsuyoshi KIMURA*, Akio KISHIDA*, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA (National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, *Tokyo Medical and Dental University, **Osaka Seikei College) Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

Key Word: tissue engineering / vascular graft / tissue regeneration

Abstract: Tissue-engineered vascular grafts may have the advantage of growth potential and anti-infection compared with the current artificial grafts. Biodegradable materials such as polylactide and/or polyglycolide are commonly used for the regenerative scaffolds and some have already been applied for the clinical use. However, since these materials are degraded by a simple hydrolysis, they may not be applicable to the arterial scaffolds necessary to have mechanical strength until their recellularization. Regenerative vascular grafts made of collagenous tissue have been developed by an elimination of elastin and cellular components from living tissues.

Porcine vascular tissues were isolated and washed by PBS. They were crosslinked in a vacuum oven followed by elastase digestion. They were then subjected to the histological observation, DNA and phospholipids assay, and biomechanical study.

There were no cells and elastin fibers observed in the tissues treated. The amounts of DNA and phospholipids were lower than 10% of the native tissue. Both the breaking strength and elastic modulus of the treated aortic graft were lower than those of the native aorta but higher than of the native pulmonary artery. The residual phospholipids and denatured elastin fibers may cause the calcification after the graft transplantation. This process eliminates these substances and may be useful for having regenerative scaffolds for the vascular tissue regeneration.

【結果と考察】本処理を施したブタ大動脈組織内では、エラスチン繊維が完全に除去され、コラーゲン繊維のみが残存していた。これに伴って組織内の空隙の増加も観察された (Figure 2)。空隙の増加は、移植後の細胞浸潤及び自己組織化を促進することが期待できる。また、組織内の残存DNA及びリン脂質量は、いずれも未処理組織の10%以下であった。

一方、エラスチンの分解に伴って破断強度は未処理大動脈よりも低下したが、未処理肺動脈よりは大きかった (Figure 3)。弁膜症患者で施行されるロス手術では肺動脈弁を大動脈位に移植するが、肺動脈導管の破断等は認められないため、肺動脈以上の強度を有していれば、移植用組織として用いることができると考えられる。

ミニブタ大動脈から作成した再生型人工血管を同所性に置換移植したミニブタは、全例で死亡を認めなかった。移植3ヶ月後に摘出したところ、組織の拡張や瘤化の所見を認めず、内腔面にも血栓は認めなかった。また、石灰化の所見も認めなかった (Figure 4)。

生体組織を用いた再生型組織移植では、組織内の細胞成分を界面活性剤にて除去した脱細胞化組織の臨床応用例が海外のグループにて既に報告されている。我々も、超高静水圧処理にて脱細胞化処理した心臓弁や血管の動物実験を行ってきた。ミニブタ同種移植実験の結果から、肺動脈組織では優れた成績を認めたものの、大動脈組織では移植後の石灰化を認めた。この原因について検討したところ、脱細胞化処理後のリン脂質の残存及びエラスチン繊維の変性の可能性が考えられた。本研究では、生体組織内からのエラスチン繊維の除去について検討した。その結果、生体力学特性を有効に維持したまま、組織内のエラスチンを除去することができた。また、移植後の石灰化を抑制できる可能性が示唆された。現在、より長期の動物実験を継続中であり、移植後の成長性や耐久性を検討し、早期の臨床応用を目指している。

【謝辞】本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、文部科学研究費、科学技術振興調整費、及びヒューマンサイエンス振興財団の補助を受けて行われた。

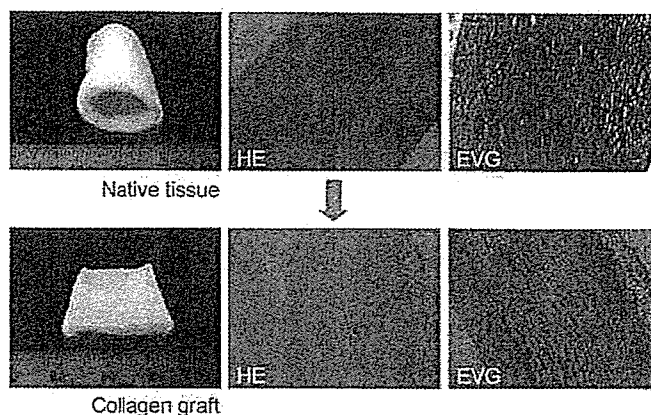


Figure 2. Regenerative collagen graft

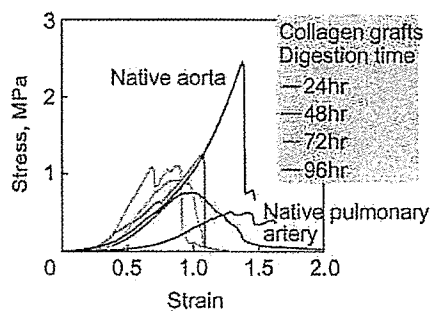


Figure 3. Biomechanical property of the regenerative collagen grafts.

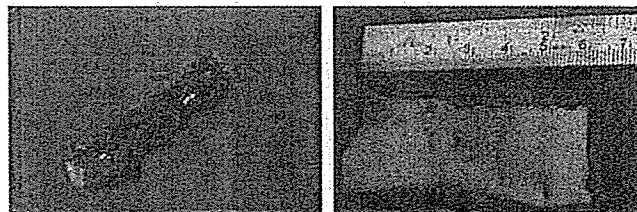


Figure 4. Explanted graft after 3 months of transplantation.

DNA/RNA 構造制御を目指した超高压印加処理とその応用

東医歯大生材研 ○木村 剛、南 広祐、岡大環境理工 六雄 伸吾、吉澤 秀和
 国循セ研 古菌 勉、藤里 俊哉、東医歯大生材研 岸田 晶夫

【緒言】

無機・有機科学、医療、食品分野などの幅広い分野で高压技術が利用されている。例えば、人工ダイヤモンド合成や食品加工・滅菌などで実用されている。また、学術的研究の一つとして、圧力の熱力学パラメータとしての点から圧力印加によるタンパク質の変性に関する検討がなされている。タンパク質は、クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などの相互作用が複雑に介して様々な構造と機能を有しており、圧力印加による相互作用の変化により変性されると考えられている。高压下では、一般的に疎水性相互作用が弱まり、水素結合が強調されることが報告されている。そこで我々は、この水素結合性の強調に着目し、水素結合性高分子への圧力印加による水素結合を介する新規構造体の創出について検討している。これまで、水酸基を有する合成高分子であるポリビニルアルコール (PVA) への圧力印加により、水素結合を介したナノ粒子、微粒子、ゲルなどの様々な構造体が得られることを報告した。本研究では、天然の水素結合性高分子である DNA および RNA を用い、DNA および RNA の高次構造に及ぼす圧力印加の影響とそれらの機能解析について詳細に検討した。DNA と PVA の混合系への超高压印加によるヘテロ構造体の形成とそれらの細胞への遺伝子導入についてはすでに報告している。

【実験】

DNA としては、プラスミド DNA、1kb ラダー DNA を用いた。それぞれ、TE 溶液に溶解し、種々の濃度に調製した。高压処理装置 (Dr.CHEF; (株)神戸製鋼所) を用いて、温度を 10、25、37℃、圧力を 3,000、6,000、8,000、10,000 気圧、時間を 1、5、10 分の異なる条件にて高压処理を行った。処理液を、UV 測定、T_m 測定、CD 測定、アガロースゲル電気泳動、AFM 観察にて構造解析を行った。また、高压処理による DNA の機能解析として、ウサギ網状赤血球を用いた無細胞系転写・翻訳、

Ultra high pressure technology for controlling the structure of DNA/RNA

Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo Nam¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIZAWA², Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISATO³ and Akio KISHIDA¹. (¹ Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan, ² Okayama University, ³ National Cardiovascular Center Institute Research)

Tel: 03-5280-8029, Fax: 03-5280-8028, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra high pressure / DNA / RNA / structure

Abstract: High pressure technology has been utilized for various fields, such as inorganic, organic science, bio and food science. Pressure is one of thermodynamic parameters, and interactions, such as van der Waals, Coulomb, hydrophobic interaction and hydrogen bond, are varied under pressure condition. Previously, we reported that structuring of polyvinyl alcohol, which is one of the hydrogen bonding polymers, was induced by ultra high pressure treatment. In this study, we investigated the changing of structure of DNA and RNA by ultra high pressure to controlling the functions of them by ultra high pressure for biomedical application. It is important to control the structure of DNA and RNA for the function expression.

核酸分解酵素を用いた分解性試験により検討した。

【結果と考察】

図1には、1kb ラダーDNA の T_m 測定の結果を示す。超高压未処理の DNA では、約 57°C 付近に、DNA の二重鎖の解離による吸光度の上昇が示された。一方、10,000 気圧、10 分間の超高压処理を施した場合、63°C 付近で T_m が観察され、圧力印加による T_m 上昇が示された。また、CD 測定では、1kb ラダーDNA に超高压印加処理した場合にスペクトルの形状が変化し、280nm、250nm 付近のピークトップのシフトが見られた (図 2)。これらの結果は、超高压印加による DNA の構造変化を示しており、 T_m 測定の結果から新たな水素結合の形成を示唆している。また、核酸分解酵素による分解試験では、超高压印加処理した DNA での分解耐性の向上が示され、超高压印加による機能付与と考えられる。

次に、プラスミド DNA に超高压処理を施した。プラスミド DNA の場合、ラダーDNA に比して顕著な CD スペクトル変化は見られなかった。しかし、10%FBS 存在下にてプラスミド DNA をインキュベートし、その後、無細胞系転写・翻訳システムにて発現するルシフェラーゼ活性を測定した結果、超高压印加処理を施したプラスミド DNA の場合に、ルシフェラーゼ活性の低下は抑制された (図 3)。これは、構造変化に伴う核酸分解酵素耐性の向上と考えられる。これらの結果について、ラダーDNA の場合は低分子量の DNA の構造変化が検出され、高分子量のプラスミド DNA では十分に検出されなかったと考えている。発表では、上記の結果について詳細に報告する。

【謝辞】

本研究は、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。

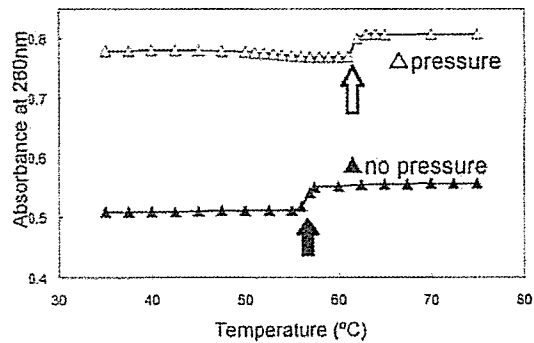


Fig1. T_m measurement of DNA with pressurization at 10,000 atm for 10 min.

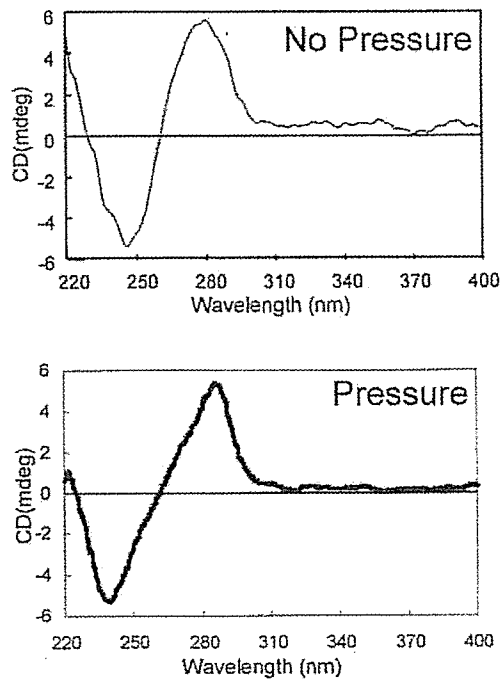


Fig2. CD measurement of DNA with pressurization at 10,000 atm for 10 min.

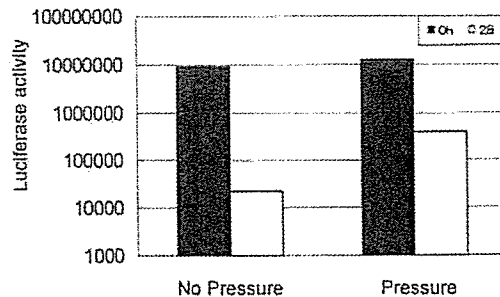


Fig3. Luciferase activity of DNA with pressurization incubated in culture medium with 10% FBS for 0, 20 hours in in vitro transcription/translation system.

Reduction of antigenicity and risk of infection in regenerative tissue transplantation by cold isostatic pressing

Toshi Fujisato¹, Kazuo Niwaya², Kenji Minatoya², Akio Kishida⁵,
Takeshi Nakatani³, Soichiro Kitamura⁴

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, Kandasugudai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan

fujisato@ri.ncvc.go.jp

OBJECTIVES

Artificial vascular grafts and heart valves have been clinically used for more than 30 years, whereas they have still several problems should be solved such as poor biocompatibility and/or durability. Recent establishment of the human tissue bank has made it easy to use allogeneic tissues for the transplantation that is superior to the implantation of the current artificial devices. However, even the allogeneic tissues in addition to artificial devices have no growth potential and the pediatric patients must have multiple operations through their lives.

Many attempts have already been made to have biocompatibility, antigenicity, and growth potential in the tissue transplantation and one of the most promising ways is the application of decellularized allogeneic or xenogeneic tissues. Detergents have been commonly used for washing off the cells, whereas the decellularization depends on their permeation in the tissue and may not be achieved completely in large or hard tissues. In this paper, the cold isostatic pressing (CIP) was applied for removal of the cells and inactivation of viruses in the vascular and tracheal tissues.

METHODS

Heart valves, aorta, and trachea were isolated from the Clawn miniature pigs (Japan Farm Co., Ltd.) under sterile condition. They were treated immediately by CIP of 980 MPa (Kobe Steel, Ltd) followed by washing by phosphate buffered saline (PBS) and ethanol under gentle stirring at 4°C. They were then subjected to histological study, porcine endogenous retrovirus (PERV) assay, DNA assay, phospholipids assay, and biomechanical study.

The acellular grafts were transplanted orthotopically in allogeneic miniature pigs. They were then explanted at 1, 3 or 6 months 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.

RESULTS

The tissues including tracheal cartilage were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min at 20°C followed by washing for 2 weeks. There was no PERV detected from the tissue treated. It has been reported that viruses are mostly inactivated by the CIP more than 600 MPa. The amount of DNA and phospholipids were lower than 1 µg/ml and 0.5 mg/wet g, respectively and those were less than 10% in the native tissue. The collagen and elastin fibers were well maintained in the acellular tissue and there were no significant changes in biomechanical properties.

All of the transplanted animals survived and there was no dilatation, no aneurysmal change, and no thrombus formation observed in the grafts. In the heart 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 3 months. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells after 6 months mainly by the smooth muscle cells.

CONCLUSIONS

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

LP3-19 成長因子徐放ゼラチンスポンジを用いた気管軟骨再生— b-FGF単独徐放とb-FGF / BMP-2共徐放との比較 —

Tracheal Cartilage Regeneration by Slow Release of Growth Factors from Gelatin Sponge - the Comparison between Single Release of b-FGF and Synchronous Release of b-FGF / BMP-2 -

香川大学医学部 呼吸器・乳腺内分泌外科¹、
京都大学再生医科学研究所²
井貝 仁(いがいひとし)¹、張 性洙¹、後藤 正司¹、
山本 泰通¹、山本 雅哉²、田畑 泰彦²、横見瀬 裕保¹
Department of General Thoracic, Breast and Endocrinological
Surgery, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa, Japan
Hitoshi IGAI

【目的】 basic fibroblast growth factor (b-FGF) 徐放ゼラチンスポンジを単独で、あるいはb-FGF 徐放ゼラチンスポンジと bone morphogenetic protein (BMP)-2 徐放ゼラチンスポンジを同時に気管軟骨切除部位に移植し、軟骨再生を組織学的に比較する。【対象と方法】 第4から13の10本のイヌ頸部気管軟骨輪の腹側中央をそれぞれ幅1cmにわたり切除した。コントロール群は軟骨欠損部をそのままとした(n=4)。ゼラチンスポンジ群は軟骨欠損部にゼラチンスポンジのみを移植した(n=4)。b-FGF群は軟骨欠損部に100 μ gのb-FGFを徐放するゼラチンスポンジを移植した(n=4)。b-FGF/BMP-2群は軟骨欠損部に100 μ gのb-FGFを徐放するゼラチンスポンジを外側に、100 μ gのBMP-2を徐放するゼラチンスポンジを内側に重ねて移植した(n=3)。コントロール群、ゼラチンスポンジ群、b-FGF群の3群では移植1、3、6、12ヶ月後に、b-FGF/BMP-2移植群では移植1、2、3ヶ月後にそれぞれ1頭ずつ気管を摘出し移植部位を組織学的に検討した。【結果】 b-FGF群では4頭すべてに軟骨切除断端から欠損部中央に向かう再生軟骨が認められた。1、3、6、12ヶ月の軟骨切除断端間の最短距離はそれぞれ10、7.7、6.8、8.7mmであり、一方の再生軟骨の先端から他方の再生軟骨の先端までの最短距離は9.2、1.7、0.93、1.6mmであった。b-FGF/BMP-2群では3頭すべてに、両軟骨切除断端と連続性を有し軟骨欠損部を完全に補填する再生軟骨が認められた。1、2、3ヶ月の軟骨切除断端間の最短距離はそれぞれ5.8、4.8、5.1mmであった。再生軟骨はアルシアンブルー染色陽性の基質に膠原線維を有する線維軟骨であり、軟骨膜に覆われていた。コントロール群とゼラチンスポンジ移植群では4頭すべてに再生軟骨を認めなかった。【まとめ】 イヌ気管軟骨部分欠損部において、b-FGF群、b-FGF/BMP-2群ともに線維軟骨の再生を誘導した。b-FGF群では軟骨欠損部が残ったが、b-FGF/BMP-2移植群では再生軟骨が欠損部を完全に補填し、共徐放による影響が示唆された。

LP3-20 再生型気管移植法の開発—間葉系幹細胞導入による脱細胞化気管グラフトの再細胞化—

Development of Regenerative Tracheal Transplantation -Recellularization of Acellular Tracheal Grafts with Mesenchymal Stem Cells-

国立循環器病センター 再生医療部¹、同 臓器移植部²
菅 理晴(すがみちはる)¹、藤里 俊哉¹、永谷 憲威¹、
中谷 武嗣²
Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,
National Cardiovascular Center, Osaka, Japan
Michiharu SUGA

【緒言】 脱細胞化した気管グラフトを scaffold として利用し、そこに自己や同系の細胞により気管構造を再構築できれば新たな再生型の気管移植法となりえる。我々はこれまで、気管グラフトの脱細胞化法として超高压処理法が細胞除去、強度保持、最近やウイルスの除去などの点で優れていることを報告してきた。更に本法にて処理した同種気管移植片を同所性に移植したラットモデルで、移植片の内腔は比較的早期に気道上皮が被覆する一方、軟骨部は再生(再細胞化)が遅延することを明らかにした。今回、脱細胞化気管グラフト軟骨部の再生を早期に誘導する目的で、間葉系幹細胞の移植時の導入方法とその効果を検討した。【方法】 実験1: 1) 間葉系幹細胞(1x10⁶個)を直径2cmの円形生体吸収性シートへ播種し24時間培養した。2) 間葉系幹細胞(2x10⁶個)をフィブリン糊スプレーにより培養皿へ散布し一週間培養した。実験2: B-Nラットの気管6リングを超高压処理(10,000気圧、4℃、10分間)により脱細胞化し、Lewisラットへ同所性に移植した。実験群は1) 対照群: 無処置、2) シート群: 移植時に同系間葉系幹細胞を播種した生体吸収性シートで気管グラフトを被覆、3) スプレー群: 移植時に同系間葉系幹細胞をフィブリン糊スプレーにより気管グラフトへ散布、の3群を設定し、4週間後に気管移植片を摘出した。【結果】 実験1: 1) シートをトルイジンブルーで染色すると密に付着する間葉系幹細胞が確認された。2) 間葉系幹細胞は培養皿底に比較的均一に分布・付着し、培養液中で順調に生育した。実験2: 摘出した気管グラフトの病理所見で、3群とも気管の内面は気道上皮に覆われ、再上皮化は良好であった。軟骨部に関しては、対照群とシート群では内部に新たな軟骨細胞の再生をほとんど認めなかったのに対し、スプレー群では軟骨内に細胞新生を認めた。【結論】 今回の検討から、脱細胞化気管の移植時に自己あるいは同系の間葉系幹細胞を適切に導入することより、軟骨を含めたグラフトの早期再細胞化を誘導できる可能性が示唆された。

HP4-65 Feasibility of Biodegradable Polymeric Nanoparticle Technology for Intracellular Drug Delivery as a Novel Treatment of Vein Graft Disease

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan¹,
Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan²
Satoshi KIMURA¹, Kensuke EGASHIRA², Ryuji TOMINAGA³

Background Clinical outcome of surgical revascularization using autologous vein graft is limited by vein graft failure due to neointimal formation. Platelet-derived growth factor (PDGF), expressed by vascular smooth muscle cells (SMCs) and monocytes, plays a central role in the pathogenesis of restenosis and atherosclerotic vascular diseases in experimental animals. However, recent clinical studies reported no beneficial effects of systemic administration of PDGF blockers against restenosis. Therefore, the development of a novel drug delivery system with nanoparticle technology enables us to overcome these problems. **Methods and Results** We prepared poly-ethylene-glycol (PEG)-modified poly-lactide-glycolide copolymer (PLGA) nanoparticles (mean diameter: 50 nm) by the emulsion solvent diffusion method. Incubation of fluorescence-incorporated nanoparticles with human or rat arterial SMCs resulted in rapid and efficient uptake by the SMCs. The nanoparticles enter into almost all cells with no toxicity. Fluorescence was localized in peri-nuclear lesion with some punctuated particles around the nucleus, suggesting that the fluorescence was protected in the cytoplasm until the nanoparticles reached the peri-nuclear region. Incubation of nanoparticles *ex vivo* with excised jugular vein from rabbits showed high uptake rate (> 90% SMCs in the media) within 30 min. To evaluate clinical significance of this carrier system, the nanoparticle-introduced vein was grafted into the carotid artery. Interestingly, many fluorescence-positive cells were noted in the media of the graft until 7 days. **Conclusions** The present data provide evidence suggesting that effective local intracellular delivery with nanoparticle to SMCs and vein graft is feasible. This nanotechnology can be a novel therapeutic strategy for vein graft disease.

HP4-66 脱細胞化処理した下行大動脈並びに肺動脈同種移植実験の検討

A Tissue Engineered Aorta with Novel Tissue Processing of Acellularization in a Porcine Model

国立循環器病センター 心臓血管外科¹,
国立循環器病センター研究所²
湊谷 諒司(みなとやけんじ)¹, 藤三 俊哉², 吉田 謙一²,
松本 誠一², 狹野 均¹, 中谷 武嗣², 北村 惣一郎¹
Department of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan
Kenji MINATOYA

【目的】移植後に自己組織と置換される再生型移植では、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う移植組織の成長が期待できる。我々は同種あるいは異種生体組織からドナー由来細胞を除去した、脱細胞化生体スキャフォールドを用いた再生型移植組織の開発を行ってきた。これまで脱細胞した下行大動脈の同所同種移植を行ってきたが、スキャフォールドへの自己細胞の浸潤を認めるものの、数ヶ月後に石灰化の所見を認めた。石灰化の原因として脱細胞化過程の問題とスキャフォールドの壁厚が考えられた。そこで本報では、1) 洗浄処理法を変えて脱細胞化処理したミニブタ組織を使用 2) 肺動脈を下行大動脈位に移植した実験について検討した。**【方法】**ドナーとなるクラウン系ミニブタから麻酔清潔下に下行大動脈、肺動脈を採取した。冷間等圧圧加圧装置を用いた超高压印加処理を行い、以前に使用していた界面活性剤を中止しエタノールを加えた洗浄処理を行うことでドナー由来細胞を除去した。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。同種ミニブタをレシピエントとして用い、左側臥位第4肋間開胸、下行大動脈単純遠断下に、脱細胞化した下行大動脈と肺動脈を移植した。移植3ヶ月後に移植組織を摘出し、肉眼的、組織学的に評価した。**【結果】**処理後の組織内では細胞核は全く染色されず、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離していた。透過電顕の所見からも、平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失、核の変性が確認された。コラーゲン繊維及びエラスチン繊維には若干の走行の乱れが認められたが、左心系である下行大動脈置換術においても破断等の所見は認められなかった。移植されたグラフトに肉眼的には異常は認められず、吻合部にも問題は認められなかった。血管内腔面は、内皮細胞で完全に覆われていた。また、組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。以前の処理法では認められた石灰化は改善しており、特に肺動脈の下行大動脈移植において、著明に軽減していた。**【結論】**超高压処理による脱細胞化されたグラフトは有望である。洗浄処理を変えたことで、石灰化を軽減せしめた。石灰化の理由として、スキャフォールドの壁厚が影響している可能性が示唆された。

Preparation of a decellularized tissue as a scaffold for reconstructing skeletal muscle in vitro

TE Ehashi¹, W Kamata¹, S Funamoto², K Yoshida³, A Kishida², N Nagaya¹, T Fujisato¹

¹National Cardiovascular Center, OSAKA, Japan

²Tokyo Medical & Dental Univ, TOKYO, Japan

³Found for Biomed Res & Innovation, KOBE, Japan

The reconstruction of the skeletal muscles has gain special interest recently. The loss of muscle tissue and function is caused of traumatic injuries, tumor resection or muscular dysfunction due to myopathies. These can be treated partly with genetic therapy or transplantation of the native cells or tissues, whereas these therapies have some limitations in restoring the normal function completely. To overcome these limitations, the tissue engineering techniques for reconstructing the skeletal muscle tissues have been studied recently. However, the engineering of skeletal muscle tissue is still challenging due to the complex relationship among muscle cells, micro-vessels and neurons. In this study, the decellularized porcine femoral skeletal muscle tissues were prepared as scaffolds and immature muscle cells were cultured to reconstruct the skeletal muscle tissue in vitro.

The scaffolds were prepared by isostatic ultra-high pressure of 980 MPa at 10°C followed by washing with PBS. Myoblasts were isolated from porcine femoral skeletal muscle tissue by trypsinization, and inoculated in the scaffolds. Cell inoculation was performed by either injecting with collagen gel with needle or centrifugation with medium. To stimulate the cell proliferation and differentiation into the muscle fiber, the scaffolds with cells were stretched up to 110% of original length and relaxed continuously at a frequency of a range from 10 to 100Hz.

The microscopic observation of the decellularized tissue stained with hematoxylin and eosin showed no nucleated cells in the tissue. Furthermore, the amount of DNA in the scaffold dramatically decreased. The mechanical properties of the scaffold were changed in part, but the elastic modulus calculated from the elastic region of its strain-stress curve was almost the same as the native skeletal muscle. The cells cultured both inside and on the surface of the scaffolds in the stretch-and-relax state showed more extended morphologies compared with the cells cultured in the static state.

In conclusion, the skeletal muscle cells that inoculated in and on the decellularized muscle tissue scaffold in the stretch-and-relax condition showed good expansive ability. This culture technique with the decellularized scaffold may have a possibility to reconstruct the skeletal muscle tissue in vitro.

Differentiation of normal human bronchial epithelial cells from explant-outgrowth culture in bilayer co-culture with human foetal lung fibroblasts

MI Hermanns, S Fuchs, M Bock, C Pohl, CJ Kirkpatrick
University of Mainz, MAINZ, Germany

Epithelium-fibroblast interactions have been suggested to play a crucial role in the course of lung epithelial repair and differentiation. To study interactions of lung epithelial cells and fibroblasts, we developed an in vitro co-culture model based on a high-throughput-screening (HTS) 24-well Transwell filter plate. This could be useful for tissue engineering (TE) of upper airways.

After an explant-outgrowth culture of epithelial cells from small bronchi (diameter < 5mm) pure populations of primary isolated normal human bronchial epithelial cells (NHBE) were used to study interactions with a normal human foetal lung fibroblast cell line (Wi-38). To constitute a differentiated phenotype, the epithelial cells were cultivated on an extracellular matrix (collagen type I) and maintained at an air-liquid interface (ALI). Therefore the cells were grown in contact with air by feeding basolaterally with medium. Normal human bronchial epithelial cells were cultured alone, on a permeable filter over fibroblasts, and in bilayer co-culture with fibroblasts. Barrier properties and morphological phenotype were compared for the different culture conditions.

On 24-well Transwell filter plates at the air-liquid interface the NHBE formed confluent layers, expressing the tight junction (TJ) proteins occludin and ZO-1 in continuous circumferential patterns suggestive of functional TJs. This interpretation was supported by the development of a corresponding transepithelial electrical resistance (TER). Maximum TER-values that averaged $1000 \pm 223 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ were found after 14 to 20 days and persisted for up to 28 days in bilayer co-culture with Wi-38. Furthermore, mucus production and cilia formation reappeared in NHBE dependent on the individual donors after 21 to 28 days at ALI in bilayer co-culture. In monoculture or exposed to fibroblast supernatants (growth on permeable filter over Wi-38) the NHBE were less differentiated. These results suggest that fibroblast-secreted factors and air-liquid interface culture promote epithelial growth and differentiation.

In summary, human bronchial epithelial cells from explant-outgrowth culture of small bronchi grown in co-culture with the foetal lung fibroblast cell line Wi-38 at the air-liquid interface mimic the structure of native polarized bronchiolar epithelium. This model could be useful to study cell interactions with suitable biomaterials for TE of the proximal airways.

Development of bioscaffold preserving collagenic structure in biological tissue

DT Terada¹, K Sawada², H Ogata¹, K Yoshida³, S Funamoto⁴, T Fujisato¹, A Kishida⁴, N Nagaya¹, T Nakatani⁴, S Kitamura¹

¹National cardiovascular center, SUITA-CITY OSAKA, Japan

²Osaka Seikei College, OSAKA, Japan

³Found for Biomed Res & Innovation, KOBE, Japan

⁴Tokyo Medical & Dental Univ, TOKYO, Japan

The development of regenerative vascular grafts is strongly desired especially for the pediatric patients. There are many research works related to artificial grafts made of biodegradable synthetic materials. However, it is still difficult to control the biodegradability due to their hydrolysis, adapt the mechanical properties required in the artery, and reproduce complex shape such as aortic arch. In this study, a regenerative collagenic vascular graft was developed from porcine aorta by removing cells and structural proteins other than collagen from the tissue.

Porcine aorta was isolated from the Claw miniature pig (Japan Farm, Co. Ltd.). The tissue was placed in a vacuum oven at 120°C to cross-link collagen fibers. Elastin fibers were then taken away from the tissue by enzymatic digestion using elastase of 0.56 u/ml in tris buffer solution including CaCl₂ of 10 mM and Na₃N of 0.02% at 37°C with gentle stir. The obtained tissue was subjected to histological and biomechanical studies.

The mechanism of cross-linking by the dehydrate heat treatment in vacuum atmosphere may be attributed to condensation reaction between a carboxyl or hydroxyl group and an amino group of the protein. However, the elastic fibers were digested enzymatically even after the treatment and it was confirmed histologically that the obtained tissue has no elastic fiber and cellular components inside. The collagen fibers remaining in the tissue were also degraded completely by collagenase. The tensile strength certainly decreased after the enzymatic treatment, however an appropriate cross-linking could reduce the decline in tensile strength. The tensile strengths of the obtained vascular graft, a porcine native aorta, and pulmonary artery were 1.09, 2.45, and 0.87 MPa, respectively. The graft may be applicable not only to the pulmonary artery but to the other arteries. Also, the graft may have better ability to promote cell infiltration and tissue remodeling compared with the acellular tissue without elastin digestion since the tissue may have more porous structure. The original structure was well preserved all through the process.

The collagenous grafts were prepared by the cross-linking followed by elastin digestion of the porcine vascular tissue. This may be adapted to the vascular tissue regeneration.

Myogenic Pre-Differentiation of Bone-Marrow Human Mesenchymal Stem Cells By in Vitro Electrostimulation

A Genovese¹, R Giamboni², O Schussler², A Patel¹, T Ravikumar¹, E Laurel², A Carpentier², JC Chachques²

¹University of Pittsburgh Medical Center, PITTSBURGH, United States of America

²Pompidou Hospital, University of Paris., PARIS, France

Objective

Cell therapy using bone marrow stem cells (BMSCs) is emerging as a potential new therapy for myocardial regeneration. These cells could be capable of proliferation and differentiation into cardiomyocytes; however the differentiation of BMSCs into fibroblasts after implantation into an infarct area may increase the risk of ventricular tachyarrhythmia. The cytological differences between bone-marrow stem cells and muscle cells could be a limitation for graft success and a reason for the initial reduction of implanted cells. We investigated the effects of cell preconditioning with bipolar 'ex vivo' electrostimulation of human bone-marrow mesenchymal stem cells (HMSC).

Methods

HMSC cells were collected from patients undergoing CABG procedures or purchased (Poietics. hMSC, Cambrex BSR, Inc.). In the first case, four ml of sternal bone marrow were collected after sternotomy and HMSC selected and purified. Cell cultures were divided in two groups, one without stimulation and one electro stimulated during 3 weeks using two electrodes submerged into the cell culture medium and connected to a pulse generator delivering 9Volts, 0.54 ms pulses at a rate of 120 ppm, similar to fetal cardiac frequency. After each week, cell differentiation was evaluated by changes in cell morphology and with desmin, connexin43 and troponin I-C antibodies.

Results

The electrostimulation of HMSC resulted in myogenic morphologic and immunologic modifications with positive anti-desmin, anti-troponin stain, and changes in the expression and distribution of connexin 43. Cell multiplication was increased in the long-term electrostimulated cultures.

Conclusions

Electrostimulation was investigated for driving the conditioning process of HMSC towards myogenic cells. We observed an increase in cell multiplication, improved cell organization, and primary myogenic pre-differentiation. This method might be used to precondition stem cells or a matrix (grafted with cells) before implant in the ischemic heart with potential benefits in graft survival and therapeutic effects.

P1

Influence of nano-vibration stimuli on cell differentiation for tissue engineering

TK Kimura¹, Yi Ito¹, TF Fujisato², TM Masuzawa³, AK Kishida¹

¹Tokyo Medical and Dental University, TOKYO, Japan

²National Cardiovascular Center Res. Ins, OSAKA, Japan

³Ibaraki University, HITACHI, Japan

The handling of cells is one of important factors for tissue engineering. Recently, physical stress and stimuli, such as 2-D stretch, hydrostatic pressure and shear stress, have been extensively studied for controlling cell function. In this study, we report the influence of nano-vibration stimuli as physical stress on cell differentiation. Here, we adopted nano-vibration stimulation system as a novel physical stimulation method. The piezo-electric actuator is employed to apply micrometer- to nanometer amplitude. To investigate the influence of nano-vibration on cell differentiation, PC12 cells were used as model cell and stimulated using nano-vibrator. The cells were seeded on multi culture plate and then nerve growth factor (NGF) was added at final concentration of 50 ng/ml. The cell culture plate was set on nano-vibrator and shaken at various frequencies for 1 hour from day to day. The morphology of live cells was observed by light microscope for 4 days. The cells having at least one neurite with a length equal to the cell body diameter were defined as differentiated cells. The degree of cell differentiation was expressed as a percentage of the total cells. In the case of no addition of NGF, the cells were hardly differentiated with and without nano-vibration stimuli. On the other hand, with NGF, the cell differentiation was observed and promoted with nano-vibration in the initial stages. The length and number of neurite per a cell were investigated using NIH image. The no different in number and length of neurite was observed with or without nano-vibration stimuli. These findings may lead to novel cell culture systems controlling cell differentiation of some of stem and progenitor cells.

P2

Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor

TY Yamaoka¹, T Kitagawa², T Fujisato¹

¹National Cardiovascular Center Res Inst, SUITA, Japan

²Kyoto Institute of Technology, KYOTO, Japan

Tissue engineering has been developed as a new approach in regenerating tissues and organs using cells and scaffolds. One of the most important factors in the successful tissue engineering in vitro is a suitable bioreactor system. In general, two types of bioreactors have been used for cell seeding and culturing on polymer scaffolds, namely spinner flasks and rotating vessels. The flow in a spinner flask is turbulent and generates an uneven distribution of shear stress over the surface of the constructs, which may cause cell damage and induce the formation of fibrous capsules at the construct surfaces. In the rotating vessel system, the constructs are freely suspended in a medium as a result of the balance between centrifugal, gravitational, and viscous drag forces. Gas exchange is performed through an inner cylinder.

In the present study, radial-flow perfusion bioreactor systems have been designed and evaluated to enable direct cell seeding into a three-dimensional porous scaffold and subsequent cell culture for in vitro tissue reconstruction. Tubular poly-L-lactic acid (PLLA) porous scaffolds with an optimized pore size and porosity were prepared by lyophilization method.

The medium flowed radially from the lumen toward the periphery of the tubular scaffolds. It was found that the optimized medium flow rates for cell seeding and the subsequent cell growth were greatly different. At this optimal rate, the increase in seeded cells in the perfusion culture over a period of 5 days was 7.3-fold greater than that by static culture over the same period. The perfusion cell seeding resulted in a uniform distribution of cells throughout the scaffold. Subsequently, the perfusion of medium and hence the provision of nutrients and oxygen permitted growth and maintenance of the tissue throughout the scaffold. The perfusion seeding/culture system was a much more effective strategy than the conventional system in which cells are seeded under a static condition and cultured in a bioreactor such as a spinner flask.

P1

Influence of nano-vibration stimuli on cell differentiation for tissue engineering

TK Kimura¹, Yi Ito¹, TF Fujisato², TM Masuzawa³, AK Kishida¹

¹Tokyo Medical and Dental University, TOKYO, Japan

²National Cardiovascular Center Res. Ins, OSAKA, Japan

³Ibaraki University, HITACHI, Japan

The handling of cells is one of important factors for tissue engineering. Recently, physical stress and stimuli, such as 2-D stretch, hydrostatic pressure and shear stress, have been extensively studied for controlling cell function. In this study, we report the influence of nano-vibration stimuli as physical stress on cell differentiation. Here, we adopted nano-vibration stimulation system as a novel physical stimulation method. The piezo-electric actuator is employed to apply micrometer- to nanometer amplitude. To investigate the influence of nano-vibration on cell differentiation, PC12 cells were used as model cell and stimulated using nano-vibrator. The cells were seeded on multi culture plate and then nerve growth factor (NGF) was added at final concentration of 50 ng/ml. The cell culture plate was set on nano-vibrator and shaken at various frequencies for 1 hour from day to day. The morphology of live cells was observed by light microscope for 4 days. The cells having at least one neurite with a length equal to the cell body diameter were defined as differentiated cells. The degree of cell differentiation was expressed as a percentage of the total cells. In the case of no addition of NGF, the cells were hardly differentiated with and without nano-vibration stimuli. On the other hand, with NGF, the cell differentiation was observed and promoted with nano-vibration in the initial stages. The length and number of neurite per a cell were investigated using NIH image. The no different in number and length of neurite was observed with or without nano-vibration stimuli. These findings may lead to novel cell culture systems controlling cell differentiation of some of stem and progenitor cells.

P2

Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor

TY Yamaoka¹, T Kitagawa², T Fujisato¹

¹National Cardiovascular Center Res Inst, SUITA, Japan

²Kyoto Institute of Technology, KYOTO, Japan

Tissue engineering has been developed as a new approach in regenerating tissues and organs using cells and scaffolds. One of the most important factors in the successful tissue engineering in vitro is a suitable bioreactor system. In general, two types of bioreactors have been used for cell seeding and culturing on polymer scaffolds, namely spinner flasks and rotating vessels. The flow in a spinner flask is turbulent and generates an uneven distribution of shear stress over the surface of the constructs, which may cause cell damage and induce the formation of fibrous capsules at the construct surfaces. In the rotating vessel system, the constructs are freely suspended in a medium as a result of the balance between centrifugal, gravitational, and viscous drag forces. Gas exchange is performed through an inner cylinder.

In the present study, radial-flow perfusion bioreactor systems have been designed and evaluated to enable direct cell seeding into a three-dimensional porous scaffold and subsequent cell culture for in vitro tissue reconstruction. Tubular poly-L-lactic acid (PLLA) porous scaffolds with an optimized pore size and porosity were prepared by lyophilization method.

The medium flowed radially from the lumen toward the periphery of the tubular scaffolds. It was found that the optimized medium flow rates for cell seeding and the subsequent cell growth were greatly different. At this optimal rate, the increase in seeded cells in the perfusion culture over a period of 5 days was 7.3-fold greater than that by static culture over the same period. The perfusion cell seeding resulted in a uniform distribution of cells throughout the scaffold. Subsequently, the perfusion of medium and hence the provision of nutrients and oxygen permitted growth and maintenance of the tissue throughout the scaffold. The perfusion seeding/culture system was a much more effective strategy than the conventional system in which cells are seeded under a static condition and cultured in a bioreactor such as a spinner flask.

Here we investigated how different culture configurations would affect the differentiation process and discovered that culture in a shallow cell multi-layer on a porous circular membrane (Transwell) resulted in more robust and uniform chondrogenesis of MSCs.

Human bone marrow MSCs cultured in chondrogenic conditions as shallow discs in Transwells demonstrated major improvements in the chondrogenic response compared to aggregate cultures. After 14 days of culture, discs were translucent, flexible structures with a uniform thickness of ~0.8 mm. MSCs grown in Transwells had enhanced collagen II (more than two fold) and aggrecan mRNA expression compared to pellet cultures, whereas expression of collagen I was similar. Analysis of sGAG showed that discs accumulated more than 50% greater GAG/DNA than pellets. In addition, more of the total sGAG produced was retained in the matrix of the discs than in the pellets. Collagen type II was evenly distributed throughout the Transwell construct, whereas deposition in the central region of pellet cultures was faint. Collagen I localisation in discs was sparse with none of the strong zonal differences observed in pellet sections.

Other methods for producing larger scale cartilaginous constructs with MSCs have used hydrogels or porous scaffolds to provide a tissue framework. With the Transwell system we have produced constructs of uniform thickness (1 mm), and up to 12 mm in diameter without recourse to an integrated scaffold. In this study we retained the initial close cellular contact required for efficient chondrogenesis whilst the dimensions of the culture and the permeable support appeared to provide more optimal culture conditions for the differentiation process. This method thus provides a more efficient test of chondrogenesis and can generate scaffold-free constructs of clinically useful dimensions from MSCs. It also forms a valuable experimental system to further explore the biological and physical signals that modulate the differentiation process.

P167

Development of a co-culture system for tissue engineered vascular grafts

M. Crouchley, V. Barron, M. Punched, E. O'Ceirbhail, T. Smith

NUI Galway, Galway, Ireland

Surgical replacement or bypass surgery is the most common treatment for coronary and peripheral atherosclerotic diseases, with over 28,000 bypass cases performed each year in the UK. However, many patients do not have appropriate blood vessels for use as replacements and the development of tissue engineered vascular grafts (TEVG) offers a possible solution to this problem. Smooth muscle cells (SMC) and endothelial cells (EC) exist within close proximity to each other within the blood vessel interacting in a variety of ways which regulate the normal function of both cell types. Therefore establishing a stable co-culture system is vital for the development of a TEVG. For a TEVG to be fully functional it must be able to withstand the variety of mechanical stresses present in the dynamic vascular environment. These physical cues also provide signals regulating the development of the vessel. The mechanical stresses *in vivo* are extremely complex, but can be approximated by use of a bioreactor system *in vitro*.

In order to develop a tubular co-culture system of SMC and EC that can be used within a coronary artery bioreactor system a series of steps are being investigated. First, a well-established 2D porous membrane system was developed, which confirmed that co-culture with our cell types was possible, and growth curves were carried out to determine a media suitable for both cell types. The next stage was to establish a direct co-culture where the EC were seeded directly onto a confluent monolayer of SMC on tissue culture plastic. Upon optimisation of this static co-culture, a method for seeding SMC on a tubular scaffold was determined. Subsequently SMC-seeded constructs were exposed to mechanical stimulation in a bioreactor using a pressure of 120/80 mmHg and a shear stress of 40 dyn/cm² for 6 hours. Initial results reveal that following the application of these combined mechanical forces, the SMC realign circumferentially, as is seen *in vivo*. In summary, a co-culture method was developed under static conditions and SMC were successfully grown on a tubular scaffold. Further work is ongoing to develop a direct co-culture of SMC and EC on the tubular scaffold.

P168

Residual phospholipids may cause calcification in acellular aortic tissue transplantation

T.F. Fujisato¹, K. Yoshida², D. Terada¹, K. Sawada³, S. Funamoto⁴, K. Minatoya¹, A. Kishida⁴, T. Nakatani¹, S. Kitamura¹

¹*National Cardiovascular Center, Osaka, Japan*

²*Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan*

³*Osaka Seikei College, Osaka, Japan*

⁴*Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

Tissue-engineered vascular grafts may have the advantage of growth potential and anti-infection compared with the current artificial grafts. Biodegradable artificial grafts have already been applied for the clinical use. However, it is not easy to control their biodegradation and to keep enough mechanical strength until their substitution to the biological tissue especially for the arterial tissue. Acellular scaffolds may be degraded by infiltrated cells and have a different degradation and regeneration profiles. Our previous study showed that acellular pulmonary arteries had effective tissue regeneration but aortae had calcium deposits in the allogeneic transplantation in porcine model. In this study, the influence of residual phospholipids in the acellular aortic scaffolds on calcification was examined.

Descending aortae were isolated from miniature pigs under the sterile condition. They were treated by the cold isostatic pressing of 980 MPa for 10 min followed by rinsing at 4°C with gentle stirring in an aqueous solution for 2 weeks. The tissues were then rinsed in an alcoholic solution to remove phospholipids for 2 days. There was no detergent used in the process.

Each of the acellular aortae with and without alcohol treatment was transplanted to the allogeneic miniature pig orthotopically. The animals transplanted were sacrificed after 3 or 6 months and the explanted grafts were subject to the histological study for determination of the host cell infiltration and calcification.

The amounts of phospholipids were 8.5, 7.1, and less than 0.5 mg/wet g in the native aorta, acellular aorta without alcohol treatment, and acellular aorta with alcohol treatment, respectively. The grafts treated were completely cell free in HE staining. There was no dilatation and no aneurysmal change observed in all cases after the transplantation. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by the host cells after 3 months in both cases. There were several calcium deposits observed along to elastic fibrils in a middle region of the acellular graft without alcohol treatment after 6 months. However, there were few deposits observed in the graft with alcohol treatment. The residual phospholipids may cause calcification in acellular aortic transplantation.

P169

Isolation and characterization of goat endothelial progenitor cells

R.T. Haverslag, N.E. Federovich, J. Alblas, W.J.A. Dhert

University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

The limited diffusion of nutrients and waste products impairs current development of large bone constructs. Encapsulation of endothelial progenitor cells (EPCs) in tissue engineered constructs is opted as a promising approach to significantly enhance vascularization and thus graft survival (Wu et al., 2004). The goat is an important animal model in bone tissue engineering and the encapsulation of goat EPCs could be decisive in the construction of vascularized bone scaffolds. Therefore we isolated and characterized goat EPCs peripheral blood and bone marrow.

The mononuclear cell fractions of both peripheral blood and bone marrow were isolated using a Ficoll density gradient and subsequently cultured in M199 medium or in EGM-2 medium, supplemented with 5 or 20 % fetal bovine serum (Rumpold et al., 2004). Early or late outgrowth cells were analyzed by immunocytochemistry for several endothelial markers: uptake of acetylated LDL; binding of isolectin B4 and anti-von Willebrand Factor (vWF). PECAM-1 (CD31) expression was analyzed using Western Blot and FACS analysis. Tubule formation was evaluated using an in vitro angiogenesis assay.

Peripheral blood-derived EPCs did not proliferate substantially when cultured in M199 whereas bone marrow-derived EPCs did. Both peripheral blood- and bone marrow-derived EPCs were positive for uptake of acetylated LDL and binding of Isolectin B4 after 4 days. After 35 days of culture in M199, only a fraction of the bone marrow-derived EPCs were positive for vWF and PECAM-1. Also, bone marrow-derived EPCs migrated to form cell clusters in the angiogenesis assay.

When peripheral blood-derived EPCs were cultured in EGM-2, they did show efficient outgrowth and they were positive for uptake of acetylated LDL, isolectin B4 binding and PECAM-1 expression.

In conclusion, we could highly efficiently isolate goat EPCs from peripheral blood in culture medium already optimized for endothelial cell propagation (EGM-2). These late outgrowth cells appeared frequently, proliferated fast and showed endothelial markers as early as 7 days after isolation. The late endothelial marker PECAM-1 could be detected after 14 days of culture. EPCs cultured in M199 or isolated from bone marrow were less frequently found but also showed expression of endothelial markers, as well as formation of cell clusters in Matrigel.

We will use these EPCs in co-culture studies with goat mesenchymal stem cells in order to evaluate their effect on osteoblast differentiation.

References:

- Wu et al., (2004). *Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287: H480H487.
Rumpold et al. (2004). *Endothelial progenitor cells: A source for therapeutic vasculogenesis?* *J. Cell. Mol. Med.* 8:509-518.

P170

Micromechanical modeling of the scaffold-new formed bone systems

W. Swieszkowski¹, C. Hellmich², V.S. Komlev³, F. Rustichelli³, R. Cancedda⁴, K.J. Kurzydowski¹

¹Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

²Vienna University of Technology, Vienna, Austria

³Politecnico Universitri della Marche, Ancona, Italy

⁴Universitri di Genova, Genova, Italy

The challenge of bone-tissue engineering is to design a cell seeded scaffold allowing for the new tissue formation in vivo. Calcium phosphate-based materials have been widely investigated for use as bone scaffold materials. In the present study, the two bone scaffolds with 60 % porosity have been made of synthetic hydroxyapatite (Fin-Ceramica, Italy), then loaded with in vitro-expanded BMSCs and subcutaneously implanted in immunodeficient mice. The scaffolds were harvested after 8 and 24 weeks and examined using X-ray computed microtomography at the ESRF - synchrotron radiation facility in Grenoble.

再生医療・脱細胞

G-099 マイクロ波と拍動循環を駆使した無細胞化技術による再生促進型大動脈弁

早稲田大学生命医療工学研究所¹⁾, Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School²⁾, 東邦大学大橋病院心臓血管外科³⁾, 早稲田大学大学院生命理工学専攻⁴⁾

岩崎 清隆^{1), 2)}, 尾崎 重之³⁾, 川井 貴裕⁴⁾, 山口 晋平⁴⁾, 江藤 元治⁴⁾, 大庭 幸裕⁴⁾, 大関 泰宏³⁾, 島ノ内 正起³⁾, 梅津 光生⁴⁾

【緒言】我々はマイクロ波と拍動循環技術を駆使して、組織及び臓器から拒絶反応を呈す細胞を除去する装置を開発し、大動脈弁、動脈血管の脱細胞化に成功している。既に、我々の処理ではこれまで困難であった大動脈弁・血管といった弾性繊維が密な組織からも細胞核を除去できることを組織染色像から示し、かつ細胞外マトリクスの形態は保存されることを報告している。また、弾性率や破断強度に影響を与えず、強度、耐久性が要求される左心系組織への応用には有望な結果を得ており、昨年には、ブタからヒトへの異種移植で大きな課題である強烈な超急性拒絶反応を引き起こす α 1,3ガラクトース抗原を除去できることを証明した。ここでは、脱細胞化した大動脈弁について組織安全性などを詳細に調べ、また動物実験の現況について報告する。【方法】2.45GHzのマイクロ波を照射し拍動させながら脱細胞化を行う独自開発装置により、ブタ大動脈弁等を処理した。組織残存DNA量、及びブタ内在性レトロウイルスの有無の検討を行い、合わせてブタ下行大動脈への移植実験も行った。【結果及び考察】組織中の残存DNA量を調べた結果、処理した大動脈弁、動脈血管、肺動脈弁、心臓からはDNAが全く検出されなかった。さらに、PCR法によりブタ内在性レトロウイルスの有無を調べた結果、レトロウイルスは検出されなかった。DNAが無く、糖鎖抗原も無く、レトロウイルスも無い組織を創生する我々の処理技術は、再生医療用足場としてブタ由来組織を使うことを視野に入れる際の大きな課題であった安全性という問題に対して、1つのブレークスルーを行えたと考えられた。下行大動脈への移植実験から、無細胞化した大動脈弁は6ヶ月間問題なく機能し、無細胞化した弁はin vivoでレシビエントの細胞で高度に再構築・再生されることが明らかとなった。【結語】これまで、他の研究報告や臨床応用されている肺動脈弁でもDNAが処理後に数%残ることが報告されており、DNAの無い完全無細胞化弁の報告はない。我々の処理法は、この点で世界で初めて完全に無細胞化を行い、大動脈弁の下行大動脈への6ヶ月の移植データから自己細胞で再構築・再生されることが確認された。

G-100 種々の超高静水圧印加条件にて調製した脱細胞化血管の特性検討

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先進医工学センター再生医療部²⁾

村越 彩子¹⁾, 木村 剛¹⁾, 南 広祐¹⁾, 松本 誠一¹⁾, 藤里 俊哉²⁾, 岸田 晶夫¹⁾

【緒言】再生医療における細胞の足場材料として、生分解性高分子、セラミックス、生体由来材料などが用いられている。これらに加えて、最近、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(脱細胞化組織)の導入が検討されている。細胞除去法としては、界面活性剤や酵素などの化学的処理が主流であるが、化合物の残存が問題として残る。そこで我々は、物理的な脱細胞化法として超高静水圧処理法を開発し、血管・弁の脱細胞化について検討してきた。本研究では、種々の超高静水圧処理条件により得られる脱細胞化血管の特性について検討した。【方法】成体ブタ大動脈片(10×10mm)を作製し、超高压処理装置を用いて、種々の圧力印加条件にて超高静水圧印加処理を施した。具体的には、処理温度を10、15、20、25、30℃とし、666、1000、2000気圧/分の昇圧速度にて昇圧後、10,000気圧下で10分間保持し、同速度にて減圧した。種々の期間の洗浄操作により細胞残渣を除去した。ヘマトキシリン-エオジン染色、TEM観察、DNA定量にて脱細胞化を検討し、引張試験、ラット皮下埋入試験等の物理的物性、生体適合性などの脱細胞化血管の特性を評価した。【結果と考察】血管の脱細胞化は洗浄期間に依存し、長時間の洗浄によりほぼ完全な脱細胞が達成された。血管の構造変性は圧力印加条件により異なり、10℃、2000気圧/分の場合にはコラーゲン繊維間の拡張が観察されたが、666気圧/分の場合には構造の維持が示された。前者の場合には圧力印加時に系内温度が約30℃変化するに対して、後者は約7℃の変化に留まる。この圧力変化に伴う温度変化の抑制により、組織内水分の急激な凝固・融解が抑制されたため、構造維持がなされたと考えられる。脱細胞化血管の物性は、未処理の血管に近似し、界面活性剤(TritonX100)を用いた脱細胞法とは異なる結果であった。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。

一般演題 口演

再生医療・Scaffold

G-101 リン脂質ポリマーで修飾した脱細胞化血管組織作製

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⁾

南広祐^{1,2)}, 木村剛¹⁾, 村越彩子¹⁾, 藤里俊哉²⁾, 岸田晶夫^{1,2)}

【目的】コラーゲンをバイオマテリアルとして生体に利用するため、コラーゲンの架橋による物性や生物的特性の改善に関する研究が行われている。本研究では優れた血液適合性を示す2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを脱細胞化血管組織に直接固定化したリン脂質ポリマー修飾血管組織を作製し、組織再生用ポリマーマトリックスとしての可能性を検討した。【実験】超高压で脱細胞化した血管組織をcarbodiimide(EDC)とN-hydroxysuccinimideを含有するバッファー中に浸漬し、架橋させ、EDC/NHS架橋血管組織を得た(EVat)。MPCポリマーをEN血管と架橋させるため、poly(MPC-co-methacrylic acid)(PMA)選択し、EVatを加え48時間反応させMPCと架橋されたMPC修飾血管組織(MiVat)を得た。さらにPMAの固定化過程を再度行いMPCの含有率の高いMPC修飾血管組織(MdVat)を得た。脱細胞化した血管組織、EVat、MiVat、MdVatの物理的特性を検討し、PMAの固定による血管組織の特性変化を評価した。さらに、フィブリノゲンの吸着実験と細胞接着実験により生物的特性を検討した。【成績】膨潤実験の結果、架橋により膨潤度の減少が確認された。その結果、MPC修飾より強度増加が観察された。これはPMAによってコラーゲン繊維間の架橋により、力学的物性が増加と考えられる。コラーゲナーゼによる分解は架橋により抑制されることが分かった。接触角測定の結果、架橋による接触角の低下が確認された。これはPMAの導入による表面の親水性化を示している。PMA濃度の増加とともに接着したフィブリノゲンと細胞の数が減少した。これは表面でのMPCの密度の増加により表面が親水性化し、フィブリノゲンと細胞の接着を抑制したと考えられる。【結論】PMAとコラーゲン間架橋技術を使い、たんぱく質と細胞の接着を抑制する強いPMA固定化血管組織を作製に成功した。【謝辞】本研究の一部は、創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業費(KH6106)、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

G-102 エレクトロスピンニング法を用いたセグメント化ポリウレタンScaffoldの作製

東京電機大学大学院理工学研究科電子情報工学専攻¹⁾, 東京電機大学理工学部電子情報工学科²⁾, 東京電機大学フロンティア共同研究センター³⁾, 杏林大学保健学部臨床工学科⁴⁾, 津田沼中央総合病院⁵⁾, 横浜市立大学⁶⁾

野中一洋¹⁾, 矢口俊之²⁾, 舟久保昭夫²⁾, 岩瀬惣一郎¹⁾, 住倉博仁³⁾, 福長一義⁴⁾, 大越隆文⁵⁾, 野一色泰晴⁶⁾, 福井康裕²⁾

【目的】高分子材料を用いたScaffold(足場)は組織工学、再生医療の分野に広く応用されている。細胞はナノ、マイクロスケールの微細な構造物に寄り添うようにして移動、分裂増殖する接触走性と呼ばれる本能的性質を備えており、最適なScaffold構造を明らかにするためには、繊維直径、空隙率などに対する細胞挙動の詳細な評価が重要である。微細繊維を作製する方法として高分子溶液に高電圧を印加し、電気的に繊維を紡糸するエレクトロスピンニング法が挙げられる。本研究ではセグメント化ポリウレタン(Segmented Polyurethane: SPU)を用いて繊維性Scaffoldを作製し、試作条件と繊維径形成の関連性について検討を行った。【方法】SPUをテトラヒドロフラン(Tetrahydrofuran: THF)とN,N-ジメチルホルムアミド(N,N-dimethylformamide: DMF)の溶媒を用いて溶解し、混合比(THF/DMF, 80/20(v/v))の割合でSPU溶液を調合した。エレクトロスピンニング法により、溶液濃度14.5[w%], 印加電圧12.5[kV], 噴射距離12[cm]一定の条件下でシリンジポンプ押し出し速度を0.02~0.3[mm/min]の範囲内で変化させScaffoldシートを作製した。Scaffoldシートは走査型電子顕微鏡(Scanning electron microscope: SEM)を用いて表面の画像を取得し、無作為に35箇所の繊維径を測定し、その平均値と標準偏差値を算出した。【結果】シリンジポンプ押し出し速度が0.02, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3[mm/min]の条件において繊維径 $1.56 \pm 0.24, 2.38 \pm 0.28, 3.67 \pm 0.60, 4.49 \pm 0.44, 5.18 \pm 0.50[\mu\text{m}]$ のほぼ均一な繊維径が得られた。また作製したScaffoldの断面画像をSEMにより観察した結果、繊維が3次元的に積層していることが確認された。【結論】噴射溶液流量が増加するに従い、繊維径が大きくなる傾向が確認された。このことより、シリンジポンプ押し出し速度を制御することにより、任意の繊維径を備えたScaffoldの作製が可能であると示唆された。

再生医療・マトリックス

G-115 コバルト60による γ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理

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²⁾, 日本原子力研究開発機構³⁾

船本 誠一¹⁾, 江橋 具²⁾, 菊池 正博³⁾, 小林 泰彦³⁾, 山岡 哲二²⁾, 岸田 晶夫¹⁾, 藤里 俊哉²⁾, 中谷 武嗣³⁾

【緒言】我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心膜、気管、軟骨等組織から細胞及びウイルス等のドナー由来成分を除去した脱細胞化組織の開発を行ってきた。脱細胞化組織は、臨床で不足している移植用組織や、テーラーメイド型医療において幹細胞等の患者由来細胞を組み込むための生体スキャフォールドとしての利用が考えられる。これまで、独自技術として超高压印加処理を用いた脱細胞化方法について報告を行ってきた。超高压処理技術が食品加工技術である一方、食品保存に使用されている γ 線照射は、線量により組織破壊を伴わない滅菌やウイルスの破壊も行うことできる。そこで細胞への傷害も期待できるものとして、 γ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理を検討した。【実験方法】脱細胞化処理方法は、脱細胞化組織として摘出してきた食用ブタあるいはミニブタ大動脈をPBSに浸漬し、10 Gyから1000 Gyの範囲で γ 線を照射した。続けて、PBSをベースとする洗浄液にて2週間洗浄した。照射直後と洗浄後の処理組織をHE染色で観察するとともに、組織内残留DNA量の測定を行った。また、照射線量による組織の力学特性への影響を、力学試験機を用いて調べた。さらに、処理後の脱細胞化組織をラット皮下に移植し、2週間後に取り出してHE染色やCD68抗体を用いた免疫染色により組織学的に検討した。【結果・考察】HE染色の結果、 γ 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、組織の γ 線照射線量が増えるにつれて組織内の核の数が減少していた。組織内残存DNA量も、100 Gy以上では大幅に減少する傾向が見られた。また、 γ 線を用いた脱細胞化組織の力学特性には変化は見られなかった。さらに、移植後2週間の組織のCD68染色の結果、未処理組織では組織内部にCD68陽性細胞が多く見られたのに対し、脱細胞化組織においてはCD68陽性細胞が減少しており特に300 Gyと1000 Gyのものでは組織内部の炎症が大幅に抑制されていた。これらのことからコバルト60による γ 線を用いた脱細胞化処理方法は生体スキャフォールド作製に有効であると示唆された。

G-116 生体内に酷似したバイオリアクターシステムによる強度のある3層血管の創生

Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School¹⁾, 早稲田大学生命医療工学研究所²⁾, 早稲田大学大学院生命理工学専攻³⁾

岩崎 清隆^{1), 2)}, 小島 宏司¹⁾, 小玉 正太¹⁾, Paz Christina¹⁾, 海津 光生³⁾, Vacanti Charles¹⁾

【緒言】血管のTissue Engineeringについては世界的に多くの研究がなされているが、動脈系に長期耐えうる臨床用組織工学血管は開発されていない。我々は、生体内と酷似した血圧・血流及びpHや炭酸ガス濃度を調整可能な生理的拍動バイオリアクターシステムを開発し、細胞、分解吸収性高分子、及びバイオリアクターを駆使し、冠動脈バイパスやシャント用等に適用可能な血管の創生を目指している。【方法】ウシ動脈血管から内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞をそれぞれ採取・初代培養した。Non-wovenポリグリコール酸及びポリエーカプロラクタンの平面状分解吸収性高分子に平滑筋細胞を播種して2日～1週間の平面培養後、外径6mmのチューブに巻き付けさらに2～4週間振盪培養した。その後、線維芽細胞を播種して2日間培養した平面状ポリグリコール酸を外側に巻き付けチューブからはずして血管マウントチャンバに取り付け、内腔に血管内皮細胞混濁培養液を注入し12時間インキュベータで静置した。そして、開発した拍動バイオリアクターシステムに組み込み、1週間～19日間、pH7.4、炭酸ガス濃度5%、拍動数70BPM、平均圧力20, 70, 100mmHgで脈圧が ± 20 mmHg程度、流量0.4～0.6L/minのような生体代替環境で拍動培養を行った。【結果及び考察】創った血管を走査型電子顕微鏡で観察した結果、全腔が内皮細胞で覆われていた。また、組織染色像から、平滑筋細胞層が観察され、3層血管が創生できていることが明らかとなった。また引張試験を行った結果、足場の分解性高分子のみでは血管とは異なる応力-ひずみ特性であったが、バイオリアクターを使って創ったEngineered血管はすべて本来の血管と同様の応力-ひずみ特性へ変化することが判明した。さらに、19日間動脈環境で拍動培養した血管の弾性率及び破断強度はウシの動脈血管とほぼ同程度の強度特性を有するまでになることが明らかとなった。【結語】生理的圧力、流量、pH及び炭酸ガス濃度の環境下で拍動培養可能なバイオリアクターシステムを駆使し、動脈血管と同程度の機械的特性を有する血管をin vitroで創生することに成功した。今後、動物実験により、長期耐久性を検討していく。

G-117 脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長培養

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²⁾, 先端医療振興財団³⁾, 国立循環器病センター臓器移植部⁴⁾

江橋 具¹⁾, 鎌田 和加子¹⁾, 松本 誠一²⁾, 吉田 謙一³⁾, 岸田 晶夫²⁾, 中谷 武嗣⁴⁾, 永谷 憲哉¹⁾, 藤里 俊哉³⁾

【緒言】腫瘍切除や事故による組織の損失や、筋ジストロフィー症などの筋疾患による、筋組織の退縮・機能低下に対する外科的治療として、患者自身の健常組織の移植や細胞移植などが行われている。しかし、これらの治療法を用いても筋組織機能の完全な回復は困難で、患者のQOLも著しく低下する。そこで本研究は、移植用の筋組織を生体外で再構築することを目的として、脱細胞化筋スキャフォールドを用いた再生型筋組織の作製の基礎的検討を行った。【実験方法】組織構築のための細胞の足場となる脱細胞化筋スキャフォールドは、食用ブタの骨格筋組織から、超高静水圧印加法を含む脱細胞化処理により作製した。細胞は、未成熟筋細胞である筋芽細胞あるいは骨髄由来間葉系幹細胞を用い、これらの細胞を、遠心操作や注射器を用いた方法で脱細胞化筋スキャフォールドに播種したのち、三次元培養を行った。このとき、通常の静置培養に加えて、細胞を播種したスキャフォールドを伸長培養装置に装着し、全体を20%まで伸長させる、あるいは伸長-弛緩を繰り返す培養を行い、三次元培養やスキャフォールドの伸長が、細胞の増殖や筋細胞への分化に及ぼす影響について検討した。【結果と考察】作製した脱細胞化筋スキャフォールドの組織学的観察とDNA量の計測から、スキャフォールド内の細胞核は完全に脱化されていることが確認された。脱細胞化筋スキャフォールドへの細胞の播種では、遠心操作や注射器を用いるいずれの方法でも、細胞をスキャフォールド内部にまで播種することができた。細胞播種後24時間静置して細胞を接着させたのち、スキャフォールドを伸長のみ、あるいは伸長-弛緩を一定周期で繰り返す培養を3日間行った結果、細胞の形態は通常の静置培養を行った場合よりも、伸長方向に細長く伸展していたことから、増殖や分化活性が高まる可能性が考えられた。以上の結果から、脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長あるいは伸長-弛緩培養により未成熟な細胞を増殖・分化させて、生体外における再生型筋組織構築の可能性が示唆された。

G-118 組織再生用スキャフォールドのための生分解性薄膜からなる人工毛細血管デバイスの開発

名古屋大学大学院工学研究科

池内 真志, 生田 幸士

【目的】生体外で厚い組織を再生するには、スキャフォールド内部の微小循環が不可欠である。この問題に対し、我々は「人工毛細血管デバイス」を用いた新たなスキャフォールド構造を提案している。人工毛細血管デバイスとは、生分解性樹脂の薄膜で作製されたシート状の微小流路ネットワークである。流路壁の厚さは数 μm で、表面には多数の $1\mu\text{m}$ オーダーの微細孔を有する。そのため、細胞は流路壁面に保持されるが、ガスや培地成分は流路内外を透過できる。この人工毛細血管デバイスと、細胞の層を交互に重ねることにより、スキャフォールド内部の微小循環系を構築し、従来、不可能であった厚い組織を再生することを目指している。本研究では、新たに開発した微細加工法を用いて、人工毛細血管デバイスを作製し、その機能を検証した。

【方法及び結果】人工毛細血管デバイスを作製するために、新原理の微細加工法MeME(Membrane Micro Embossing)を開発した。この手法では、薄膜からなる自由な立体構造を数 μm の分解能で作製することができる。デバイスの材料として、直径 $1\mu\text{m}$ 程度の微細孔を有する多孔質ポリ乳酸薄膜(厚さ $5\mu\text{m}$)を相分離法により作製した。MeME法を用いて、この多孔質ポリ乳酸薄膜からなる、内径 $50\mu\text{m}$ の微小流路のネットワークを作製することに成功した。流路壁の透過性を検証するため、直径 $0.1\sim 15\mu\text{m}$ のビーズの懸濁液を流路外側から滴下した。その結果、 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子は流路壁を透過し、それ以上の直径を持つ粒子は、流路壁の表面で保持されることを確認した。これは、流路壁上に細胞が保持され、かつ、培地成分は流路壁を透過することを示している。さらに、この流路表面をコーラゲンで修飾した後、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を培養した結果、一般的な培養容器と同等の細胞密度と増殖率を得た。

【結論】本研究では、新原理のMeME法を用いて、人工毛細血管デバイスの作製が可能であることを示した。さらに、作製したデバイスが、スキャフォールド内の微小循環系に求められるサイズ選択的透過性と細胞培養適合性を有することを実証した。今後、この人工毛細血管デバイスを積層し、厚い組織の培養への有効性を検証する。

一般演題 口演