

図2 下行大動脈をモデルとした生体線維による再生医療

また、サイズが永久に不変なため、小児患者では成長と共に再手術が避けられない。一方、ヒトから提供される心臓弁であれば、機能面では好都合である。しかし、ドナーの絶対的な不足は今後も解消の見込みが無い。そこで近年、置換代替物として動物由来の心臓弁を利用するという、両者の中間に位置する検討が進められている。図2は、それらの概念図であり、簡略のため心臓弁ではなく下行大動脈をモデルとして示した(a)。欠損した組織を医療用動物由来のものと同置換するが、その際に動物由来細胞を除去(脱細胞)し、移植の足場となる線維組織のみの構造体(スキャフォールド)を作成する(b)。次に、患者から採取した細胞を生体外にてスキャフォールドへ播種・培養させる(c)。この際、細胞のスキャフォールドに対する親和性・接着性を高めるため、必要に応じスキャフォールドに対し表面加工を行う。この過程においては繊維表面加工の技術が活かされている。その後、外科的にスキャフォールドの移植を行うが、患者自身の細胞を含む組織であるので、拒絶反応は大幅に低減される。一方、スキャフォールドである線維組織そのものは、異種由来であることから、移植後長年をかけて徐々に分解され、替わりにヒト由来の線維組織が再生する(d)。最終的には患者自身の組織で置換され自己組織化が完了する。

織化が完了する。

この概念では、血管はもちろん、心臓弁や気管など多くの組織に適応可能なことから応用性が高い。さらに、極めて複雑な構造の生体組織を造形する必要が無い。一方、異種由来組織を用いる場合、前記のように免疫反応を無くするためにドナー由来細胞を除去し、線維組織のみにすることが必須となる。換言すれば、摘出組織から細胞という不純物を洗浄除去することになる。興味深いことに、この操作は、衣類の洗浄と同様、界面活性剤による洗浄が一般的である。本稿では血管組織を例として、洗浄により細胞を洗い流し、スキャフォールドを得るための手段について、筆者らの研究成果も交えて紹介する。

3. 生体線維の洗浄手法

— 界面活性剤/酵素併用による洗浄法 —

この手法は、現在最も一般的に行われる手法であり、図3にその概略を示した。界面活性剤水溶液による洗浄効果をも高めるため、ビルダーとして酵素を添加する場合もあり、衣料の洗浄と原理は全く同じである。ただ、使用される界面活性剤はSDSやTritonX-100が主であり、最適洗浄効果考えた界面活性剤のスクリーニングは皆無に近い。また、

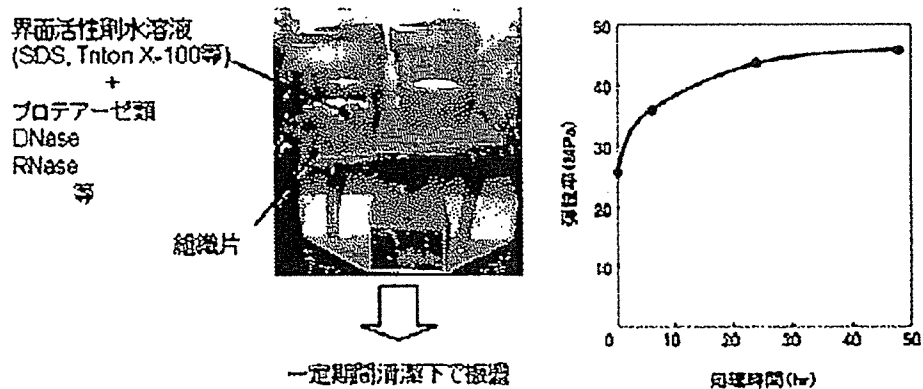


図3 界面活性剤による脱細胞化 (左: 洗浄手法 右: 処理前後の力学特性変化)

酵素には線維組織を加水分解し、細胞を除去し易くするため、プロテアーゼを用いることもある。しかし、これも実際にはトリプシンやキモトリプシンの利用が通例であり、それ以上の工夫は殆どない。衣料洗浄と異なる点は、DNAやRNAの分解を目的として、DNaseやRNaseを添加するケースがあることである。この様な洗浄により、組織中の細胞が洗い流され、最終的にコラーゲン線維やエラスチン線維のみが維持される。この手法では、一連の操作に要する時間がおおよそ数日間とされる。これは、界面活性剤除去(すすぎ洗い)のための十分な時間も必要なためであり、この点においては衣料の洗浄と大きく異なる。しかしながら、十分な“すすぎ洗い”をしたとしても、線維に吸着した界面活性剤の全量を除去することは困難である。さらに、これらの界面活性剤は何れも細胞毒性を示すことから、僅かな組織内残存も好ましくない。また、同図右に示すように、界面活性剤処理により線維組織の力学特性が変化することも知られている。さらに、強度維持のためアルデヒドを用いた架橋処理が施されるのが通例であるが、生体吸収性の低下や後述する石灰化との関連が指摘されている。これらを総合的に考えると、同法による脱細胞化では、強度や毒性などの生体への安全性問題が残されていると結論せざるを得ない。現在、これらの欠点を補うため、電離活性線照射の併用等、種々の工夫も試みられている。

次に紹介する例は、これに替わる新たな手法として著者らの研究チームが開発している例である。

4. 超高静水圧印加法

界面活性剤による洗浄は、細胞を洗い流すという観点において大変優れた手法である。しかし、線維組織の硬化や、界面活性剤の残存が大きな問題である。そこで、その欠点を克服する手段として、超高静水圧印加処理を考案した。これは、試料に対しおおよそ10000気圧を等方的に10分間印加し、その後緩衝溶液下で洗浄するものである(図4上段)。この操作では、超高圧印加により細胞が破壊され、その後の水溶液洗浄で容易に細胞除去が可能になる。化学薬剤を用いない物理的手法であり、毒性面における生体へ

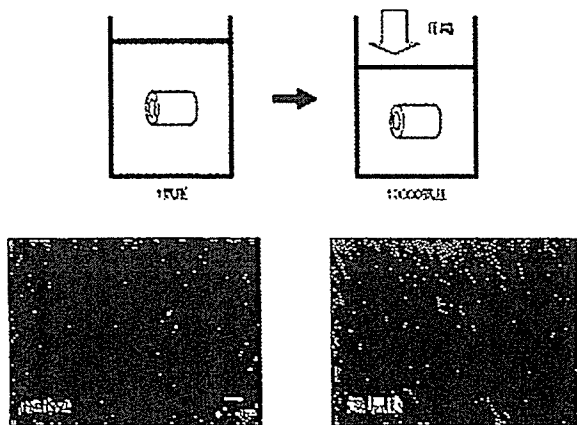


図4 超高圧印加処理と脱細胞化評価

の安全性が極めて高い。図4下段は同法で洗浄を行った結果であり、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行った写真である。尚、本稿における組織染色写真は、全て血管の断面部である。同写真左において native の血管では粒状に細胞が染色されているのに対し、処理後の写真では染色されておらず、効果的に脱細胞が行われている。また、コラーゲンやエラスチンの線維組織はそのまま維持されていることもわかる。又、内在性レトロウイルス(PERV)の残存もPCR法で評価を行ったが、それらが不活化されたことも確認している。次に、除去が困難とされる細胞膜リン脂質の残存を評価した結果を図5に示した。リン脂質は、移植後の石灰化の要因の一つとして問題視される物質であり、細胞除去の際に併せて評価すべき要因の一つである。図5上段の定量分析結果によると、超高圧印加処理のみではリン脂質が除去されていない。下段のTEM観察結果も同様の結果を示している。濃い黒に写っている部分がリン脂質であり、細胞膜及び核膜部分に集中している。本法は界面活性剤を用いない点で優れているが、逆に疎水性の高いリン脂質を単純に除去しにくいことも示している。しかし、この問題は比較的容易に解決可能であり、施圧後にアルコール浸漬することにより除去可能になる。同図の定量分析結果からも明らかな様に、殆どのリン脂質がアルコール処理により除去されている。しかし、極めて僅かな残存も確認される。TEM観察の結果では、核膜に起因するリン脂質の一部が残存している。極めて僅かな残存が生体にどのような影響を与えるかについては現段階では不明であるが、現在大動物を用いた長期移植経過観察中であり、今後の検討項目になるであろう。

5. 超臨界流体抽出法

超高圧印加法は、物理的手法であり界面活性剤処理やアルデヒド処理を含む工程に比べ、高い安全性が確保できる有効な手段である。しかし、リン脂質除去のために多段階工程が必要なこと、そして長期間(約3週間)の処理が必要という点で問題が残る。そこで、これらを改善する手法として研究を進めているのが、超臨界流体抽出法である。超

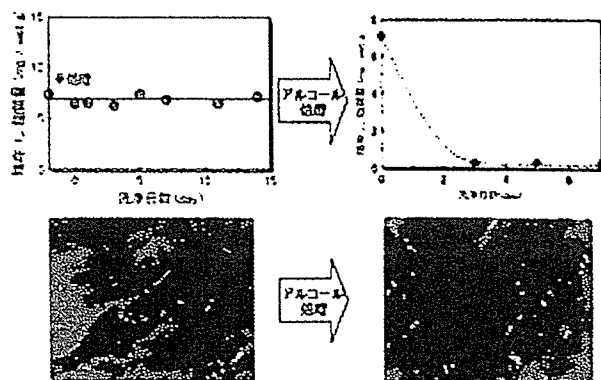


図5 脱細胞処理血管のリン脂質量変化 (上段: 定量分析結果 下段: TEM 観察結果)

臨界流体抽出は、既に製薬・食品分野で広く実用化されており、今も新たな応用化分野が広がっている。超臨界流体の最大の特徴は、圧力制御により媒体の誘電率を連続的に変化させることが可能な点である。つまり、単一媒体にもかかわらず、圧力変化のみで複数の溶媒特性を引き出すことが可能になる。誘電率変化の程度は媒体により異なるが、適切な媒体選択により複数の目的物質を選択的に抽出することが可能になる。現在、抽出において最も実用化例の多い媒体はCO₂である。本研究チームにおいてもCO₂を媒体の有候補として検討している。超臨界CO₂の脱細胞化への利用における利点は幾つかある。その一つは、高い安全性である。脱細胞処理後、大気圧下に戻すことにより、CO₂は自然拡散し、組織内に残存することは無い。従って、毒性等の生体への危険性は無視出来る。もちろん、CO₂以外にも気体又は揮発性の高い液体を用いた場合でも同様である。また、CO₂に限っては臨界条件が温和なため、蛋白質が変性し難い条件で処理可能である。さらに、処理後の組織は、半乾燥または絶乾状態で得られ、長期保存が可能になる。次に、超臨界流体の持つ高い拡散性は、液体に比べ組織深部への浸透をはるかに容易にする。従って、溶液洗浄に比べ処理時間を著しく短縮出来る可能性を有する。以上より、同法での細胞抽出が可能であれば、従来法を凌駕する優れた脱細胞化手法と成り得る。

図6は、実際に超臨界CO₂を用いて処理を行った組織の処理前後のHE染色結果を示している。同図が示すように、CO₂単独では如何なる圧力領域でも効果的な細胞抽出は出来ていない。CO₂の場合、圧力変化に伴う誘電率変化の割合は比較的小さいことから、極性の高い細胞成分を溶解抽出することが困難なようである。しかしながら、極性を上げるためのエントレナーを少量添加した場合、抽出効果の大きな改善が見られる。エントレナーの存在により、混合流体は細胞抽出可能な溶媒特性へと変化している。特筆すべきは処理時間の短縮であり、この写真は15分処理の効果を示している。脱細胞効果を得るため、超超圧印加法では3週間、界面活性剤溶液洗浄でも数日間という期間を要したが、本法での15分間という時間は画期的な短縮である。一方、リン脂質の除去については完全除去には至っていないが、ある程度高い効果が得られることを確認している。現在、単一工程での完全除去を達成するための検討を進めている。

ここで紹介した結果は、CO₂とエントレナーの系であるが、現在他の媒体を単独を用いた場合の効果も検討している。今後、動物実験へ向けての最適媒体及び処理条件の決

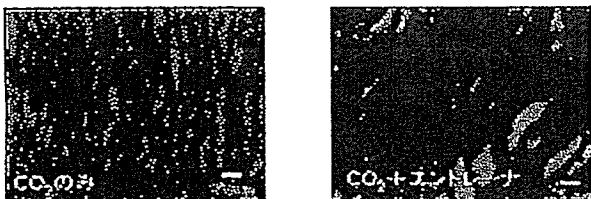


図6 超臨界二酸化炭素処理血管のHE染色比較

定が待たれる。

6. 防石灰化手段と血管の形態安定加工

ここまでは、脱細胞化手段についての紹介を行った。脱細胞化は、移植後急性の免疫反応を抑制することと密接に関連している。一方、実際の症例においては、移植後長期での移植組織の石灰化問題が存在する。残念ながら、石灰化の明確な機序については、現在も不明である。しかし、様々な要因が報告されており、その一つが上述の細胞膜リン脂質の残存である。他方、線維組織であるエラスチンの変性に起因するという報告も多い。本研究チームでも以前よりその機序について詳細な検討を重ねて来た。その結果、それらの単一要因ではなく、複合されて石灰化に繋がるという考えを持っている。従って、石灰化を誘引する可能性全てを消去することが、結果的に問題解決の近道であると考えている。そこで、脱細胞とは別要因である、エラスチン線維の変性に着目した検討結果を合わせて紹介する。

本研究手法を含め、組織に対し人為的(化学的又は物理的)処理を行えば、不可逆的にそれらの立体構造にミクロな歪みが生じる。我々も、機器分析により線維の立体構造に変性が生じることを確認している。エラスチン線維の変性を指摘する研究者は、このミクロな歪みを挙げている。実際、石灰化部位はエラスチン線維に沿って生じる例が多い。ここで、同じ線維組織であるコラーゲンの変性が、石灰化と無関係とは断言出来ない。しかし、興味深いことに、実際の症例ではコラーゲン線維に沿った石灰化は殆ど見られない。さて、線維組織の変性であるが、現実問題として多少の変性無くして人為的処理を施すことは不可能である。そこで、単純な発想であるが、要因であるエラスチン線維を除去しコラーゲン線維のみの構造体にすれば、石灰化を抑制出来るかも知れない。

図7は、コラーゲン線維とエラスチン線維を区別するため、血管組織にElastica van Gieson(EVG)染色を行った例を示している。左図で濃く染色された線維がエラスチン、薄く写っている線維がコラーゲンである。エラスチン線維はコラーゲン線維と異なり、弾性に富み著しい伸張性を有する。その結果、常にストレスのかかる生体組織を柔軟に変形させ、耐久性を維持している。既に、エラスチン線維のみを選択的に除去する技術は幾つか報告されている。しかし、単純にそれを行うと別の問題が生じる。図8中央はエラスチンを除去した血管組織を示しているが、弾性の無くなった組織は、その構造が維持できない程度に変形する。

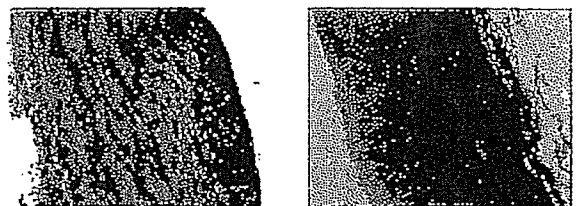
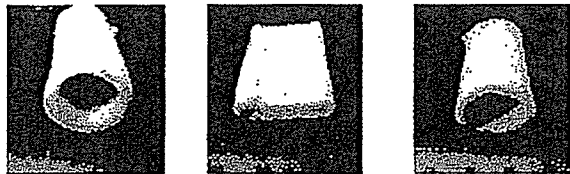


図7 血管組織のEVG染色写真
(左: native組織 右: エラスチン除去組織)



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

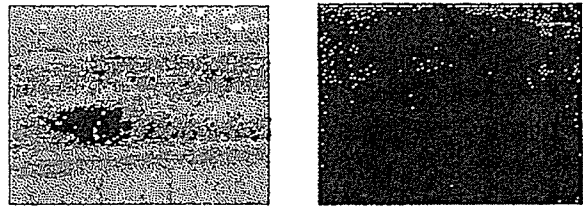


図9 ラットの皮下へ移植した血管組織の von Kossa 染色写真(12週)
(左: native 組織 右: 脱エラスチン組織)

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、衣料用品に応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@m.aist.go.jp <http://www.jsec.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(明)
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 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, Kandasugugadai, 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.

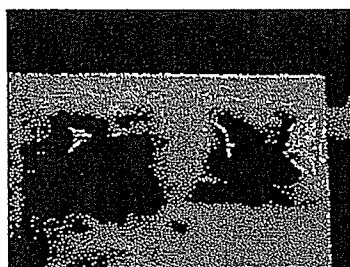


Fig. 1 Packed porcine heart valves for CIP treatment.

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).

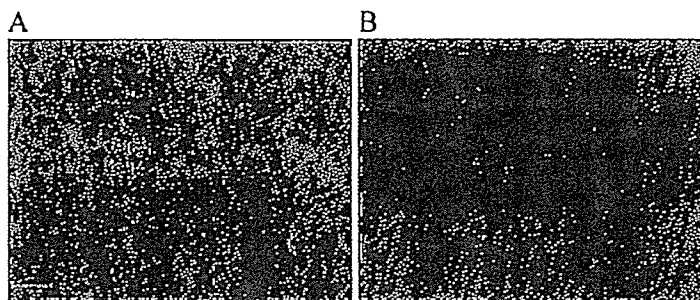


Fig. 2 Cross sections of (A) native and (B) treated tissues (H-E staining).

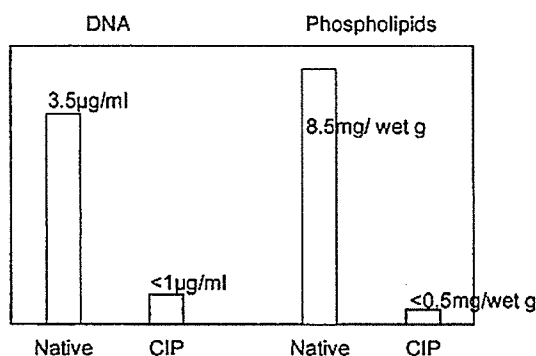


Fig. 3 Residual amounts of DNA and phospholipids in native and treated tissues.

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 Claw 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).

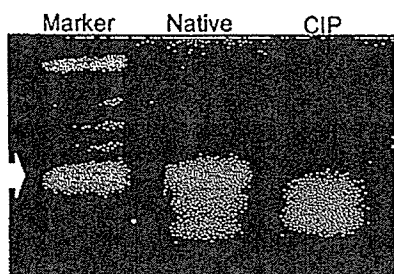


Fig. 4 PCR products of PERV (arrow) in native and treated tissues.

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.

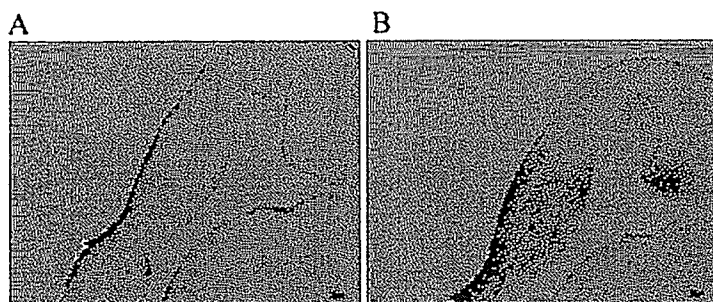


Fig. 5 Cross sections of (A) anti-vWF (endothelial cells) and (B) anti- α SMA (smooth muscle cells) immunostained treated tissues 24 weeks after the transplantation.

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.

2-C-6

癌細胞を標的とした in vivo RNA 干渉による遺伝子発現抑制

○高橋有己¹, 西川元也¹, 宮岸真², 多比良和誠², 高倉喜信¹
(1 京都大学 大学院 薬学研究科 病態情報薬学分野,
2 東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻)

RNA 干渉(RNAi)は、配列特異的に特定の遺伝子発現を抑制可能であり、発癌遺伝子や癌の進行・増殖に関与する遺伝子を標的とすることで癌治療への応用が可能と考えられる。しかしながら、その実現には RNAi を起こす siRNA を標的細胞にデリバリーすることが必須である。そこで本研究では、siRNA および siRNA 発現プラスミド DNA(pDNA)をデリバリーすることによる、癌細胞を標的とした in vivo RNAi について検討した。2 種の luciferase を恒常的に発現するマウスメラノーマ B16-BL6 細胞を作製し、siRNA および siRNA 発現 pDNA 導入の効果について検討したところ、配列特異的な mRNA および luciferase 活性の減少が認められた。luciferase 発現癌細胞のマウス皮下あるいは門脈内投与により作製した癌組織での遺伝子発現は、標的部位への効率的なデリバリー技術を用いることにより有意に抑制可能であった。

2-C-7

超高压技術を用いた水素結合性高分子-薬物集合体の開発

○木村剛¹, 古菌勉¹, 宮崎幸造¹, 奥野暁², 大矢裕一², 大内辰郎²,
六雄伸吾³, 北村吉朗³, 吉澤秀和³
(1 国立循環器病センター研究所 生体工学部, 2 関西大学 工学部 応用化学科, 3 岡山大学 環境理工学部 環境物質工学科)

我々は高压下で水素結合が強調されることに注目し、圧力印加による水素結合性ポリマーの分子集合体形成について検討してきた。水酸基を有するポリビニルアルコール(PVA)は、10000 気圧の超高压印加によりゲルおよび微粒子と様々なサイズの集合体を形成し、さらに、天然の水素結合性高分子である DNA と PVA-DNA 複合体を形成した。本研究では、PVA 微粒子および PVA-DNA 複合体の培養細胞への導入について検討した。PVA 水溶液あるいは PVA と赤色蛍光ラベル化プラスミド DNA の混合液を 10000 気圧の超高压で印加し、PVA 集合体および PVA-DNA 複合体を調整した。走査型電子顕微鏡観察では、約 200nm~1000nm の粒子状の集合体および PVA-DNA 複合体が確認できた。PVA-DNA 複合体を種々の細胞(RAW264、L929、COS7)に添加し、蛍光顕微鏡にて観察した結果、細胞内で赤色蛍光が認められ、DDS 担体としての有用性が示された。

¹国立循環器病センター研究所, ²国立循環器病センター研究所, ³物質・材料研究機構,

⁴東京医科歯科大学

古藺 勉¹, 岡田正弘¹, 安田昌司², 田中順三³, 岸田晶夫⁴

【はじめに】

現在、腹膜透析や人工呼吸器の経皮デバイスとして柔軟なシリコーンゴムなどが使われているが、生体と材料の界面での接着が悪いために細菌感染とそれに伴う病態悪化が大きな問題となっている。そのような中で我々は、ナノサイズの無機粒子を固定化した新規な高分子材料を創出することで柔軟でかつ皮膚組織と密着する経皮デバイスの開発に取り組んでいる。本演題では、シルク表面にハイドロキシアパタイト (HAp) を固定化させた複合材料の作製を試みた。さらにそれを用いてボタン型の経皮デバイスを試作し、その有用性について検討を行った。

【方法、結果および考察】

我々が独自に開発したマイクロエマルジョン法で調製したナノスケールのHAp単結晶をpoly(γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane)でグラフト化したシルク繊維表面に共有結合にて結合させた。本材料表面へ繊維芽細胞を播種し培養したところ、未処理繊維に比較して著しく細胞接着性が向上することが明らかとなった。次に実際に、ボタン型のシリコーン表面に作製した複合材料を接着させることで経皮デバイスを試作した。この経皮デバイスは元のシリコーンと同等の柔軟さを保っていた。作製した経皮デバイスの生体内への埋植試験を行ったところ、未処理シルクに比べて生体との密着性が向上した。以上のような新規経皮デバイスの特徴はその基材の表面においてのみHApの特徴を発現した結果であると考えられる。

【おわりに】

今回新規に開発した経皮デバイスは、補助人工心臓、腹膜透析、栄養療法など長期に渡って経皮的にカテーテルやチューブを使用している多くの患者のQOLを格段に向上させ、在宅治療の推進と医療費の削減に大きな効果が期待できる

界面複合化を目指したリン酸カルシウム微粒子の形態制御

○岡田正弘¹, 安田昌司¹, 田中順三², 岸田晶夫^{1,*}, 古菌 勉¹¹国立循環器病センター研究所, ²物質・材料研究機構

【はじめに】

これまで我々は、リン酸カルシウム (CaP) 焼結体微粒子を医用高分子材料表面に化学結合させた新規な無機/有機複合材料を開発し、軟組織適合材料としての有用性を評価してきた。ここで、CaP粒子を高分子基材表面へ強固に結合させるためには、媒体中に分散させた粒子の基材表面への吸着性および粒子/基材間の接着面積の制御が重要である。本報告では、以上の背景のもとに我々が独自に開発したCaP粒子の粒径および形態制御法についての報告を行う。

【実験方法】

球状およびロッド状ハイドロキシアパタイト (HAp) 粒子: ノニオン性界面活性剤として pentaethyleneglycol dodecyl ether を溶解した dodecane 中に、Ca(OH)₂ 水懸濁液および KH₂PO₄ 水溶液を順に添加し、所定の温度にて 24 時間反応させた (エマルション法)。得られた粒子を洗浄後、乾燥させ、800°C にて 1 時間仮焼を行った。また、反応系に HAp 粒子間に融着防止剤として炭酸カルシウム等の塩を添加することにより、高分散性 HAp 微粒子を調製した。

板状 CaP 粒子: CaCO₃、Ca(H₂PO₄)₂、および Ca₄(PO₄)₂O (TCPM) を粉碎・混合した後、反応促進剤である NaH₂PO₄ 水溶液を添加した。上記混合物からの水蒸発速度を制御することにより、ブルシャイト (DCPD) と TCPM からなる板状構造体を調製した。得られた板状構造体を 800°C にて所定の時間焼結した。

【結果および考察】

球状およびロッド状 HAp 粒子: エマルション法を反応温度 25°C において行った場合、球状もしくは不定形の単結晶体 (粒径: ~50 nm) が得られ、反応温度の上昇に従って粒子は c 軸方向に延伸し、95°C においてロッド状の単結晶体 (粒径: ~300 nm) が得られた。これは、用いたノニオン性界面活性剤が反応温度の上昇によって疎水化したために、dodecane 中の逆ミセルの構造が不安定化し、HAp が本来有する c 軸方向への成長が発現した結果と考えられる。また、仮焼時において HAp 粒子間に炭酸カルシウムを存在させた場合、熱処理による粒子間の融着を阻害した状態で結晶性を高めることができ、大部分の粒子が一次粒子の状態で媒体中に分散可能な HAp 仮焼体粒子の作製に成功した。

板状 CaP 粒子: 作製した CaP 粒子は孔を有する板状形態を示した。孔の存在は、焼結過程において結晶化が進行し、体積減少が生じたことによると推察される。また、この CaP は HAp と β-リン酸三カルシウム (β-TCP) から構成されており、β-TCP 含有率は焼結時間に伴って増加することが認められた。これは、反応仕込比が Ca/P=1.5 であることに起因すると推察される。

*現所属: 東京医科歯科大学 学生体材料工学研究所

医療用材料の動向と新技術

東医歯大生材研 ○岸田晶夫

1. はじめに

医療用材料を素材別に分けると、高分子材料とそれ以外の無機材料（金属・セラミクス）に分類できる。無機材料は主として、整形外科および歯科用インプラント材料として広く用いられている一方、循環器病治療の範疇で、動脈瘤塞栓用コイルやステントとしても用いられている。医療用材料表面と生体との関連について整理すると、大きく2種類に分類できる。一つは血液接触面であり、もう一つは血液非接触面である。医用材料研究が開始されて以来、血液との相互作用の制御については未だに研究途上である。ここでは、医療用材料開発のこれまでの流れと、これからを切り開く新技術について概観したい。

2. 血液接触材料（血液適合性）

血液接触型人工臓器に関しては、1980年代に精力的に研究が展開され、いくつかの高分子材料が開発され臨床応用に至った。人工心臓用セグメント化ポリウレタン、人工肺用多孔質中空糸、人工腎臓用ポリスルホン膜などである。しかしながら1990年前後頃から新規高分子の開発はスピードダウンし、研究のベクトルはより基礎的もしくは他分野への応用へと転換していった。これはいくつかの材料が臨床応用に至ったことによって研究が成熟したためとも考えられるが、筆者が考える要因はa) 主目的であった抗血栓性材料の開発の困難さ、b) 汎用工業製品の流用あるいは応用によって開発された材料の限界、c) 医用高分子に対する needs と seeds の不一致などがあげられる。

例えば、血液適合性の一つである抗血栓性の獲得については、当時提案された血液適合性材料開発の指針に基づいて、種々のポリマーが合成された。これらの中には短期の抗血栓性の獲得に成功したものもあったが、多くは臨床応用に結びつくほどの成果をあげられなかった。現在においても抗血栓性獲得のための努力は続けられており、後に紹介するように優れた成果をあげているものもある。しかし、抗血栓性獲得の困難さから研究のベクトルはいくつかに分散した。一つは理想的な高い抗血栓性を実現しようとするもの、また一つは減ヘパリンを実現できる程度の抗血栓性を実現するもの、そして抗血栓性に多少目をつぶり他の機能を格段に高めることを目的としたものである。短期の使用であれば3番目の考え方で十分であるし、中期の使用を目的とするならば2番目の減ヘパリンが有効である。言うまでもなく、最終的な目標はすべての血液接触ポリマーが高い抗血栓性を実現すべきであるが、臨床現場からの要請に少しでも答えようとする材料開発側の積極的対応の現れである。永久的な抗血栓性や生体適合性の獲得のために現時点で提案されているのは、生体血管の再構築を行うハイブリッドタイプのものである。小口径の人工血管などについて精力的な研究が続けられているが、人工心臓への適用の困難さや緊急の場合など課題も多い。

3. 血液非接触材料

人工臓器のうち血液非接触部分に要求される機能としては、組織接着性、あるいは生体不活性、また血液を凝固させることによる早期の組織修復実現などがあげられる。組織接着性が必要な例として

An Overview of Medical Polymers and New Technologies of Biomaterials., Akio Kishida, (Tokyo Med Dent Univ, Inst Biomat Bioeng, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, TEL:03-5280-8028, FAX:03-5280-8005, email:Kishida.fm@tmd.ac.jp

は、人工骨、人工歯根などの硬組織系インプラント材料の他に、人工腱および経皮デバイスなどがあげられる。生体不活性としては、癒着防止膜、創傷被覆材、眼内レンズなどがあげられる。また組織修復材料としては、ステント類、動脈瘤塞栓コイル、生体接着剤などがあげられる。これらのうち、無機材料とのハイブリッド材料は最近注目を集めている。

4. 新技術について

我々はこれまでに、6000気圧を超える超高压下では水素結合性が強調されることに注目し、高压処理を用いた水素結合性構造体の調製の可能性について検討を行ってきた。この技術によるDNA-Polymer複合体の形成とその医用材料としての応用の可能性を検討したところ、良好な細胞内送達が可能であった(図1)。超高压状態では、常圧と異なり、水の水素結合が切断され、分子同士の結合の可能性が生じる。また、タンパク質や脂質膜などでは内部空間が圧縮されることにより構造変化が誘起され、常圧でも安定な分子構造体を得られる。また、異種動物(ミニブタ)の組織を超高压処理することによって、組織内の細胞を効率よく除去し、新しい医療用素材としての応用を検討している。この技術は従来の人工物による人工臓器開発から、合目的に素材を探求した結果に到達したもので、生体と人工物との比較、という観点からも興味深い。

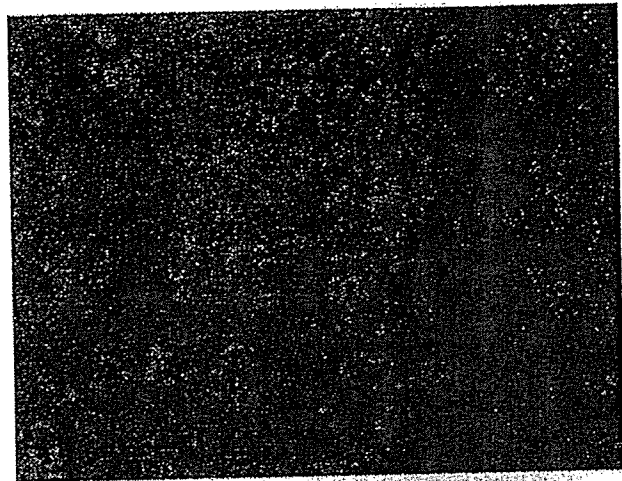


Figure 1. Uptake of PVA/rhodamine-labeled plasmid DNA Composites by RAW cells.(After 24hr incubation)

5. おわりに

我が国で行われている医療材料研究は、新規分子開発に根ざしたオリジナリティの高いものがほとんどである。欧米においても医用材料研究は行われており、多くの成果が報告されている。ただし新しい治療法やシステム開発においては米国が先行している場合が多い。これは、新規材料が認可されるまでの行程があまりにも長く、投資から回収のサイクルの早い米国経済にフィットしないため、展開の早い既存の材料をもとに新しいシステムを組み上げて、医療現場に供給してゆくというシステムであることが一因となっている。このような考え方では、機能的に十分なものが開発する余裕がなく、新しい技術が芽生える基盤も脆弱となる。一方、我が国は化学産業のすそ野が広く多種多様な製品を作り出す能力に長けているが、しばしば指摘されるようにNEEDSを把握し、新しい医療システムを作り出す点で欧米に後れをとる場合が多い。また米国では数年前からバイオを産業振興の基盤と位置付けて政策展開をしており、多くの大学にBiomedical Engineeringを謳う学部・学科が設置されている。このような環境の相違を乗り越え普遍的な高機能医用材料の開発を目指すために、我が国の医用材料研究者はどうしても新規な材料開発にける必要が生じる。ここにあげた材料・技術は世界の最先端に位置する材料であり、臨床への応用を可能にするシステム作りを含めて、精力的に研究が進められている。10年前と比較し、医療用材料研究の出口は、人工臓器だけでなく、再生医療、診断機器、DDSなど大きく広がり、かつ多様化してきている。これらに応えるべく、新しい技術開発を絶えず続けることが重要である。

基板上でのナノアパタイト単結晶を用いた 界面複合化法の精密制御

○岡田正弘^{1,2}, 芹澤武³, 安田昌司¹, 田中順三^{2,4}, 岸田晶夫^{1,2}, 古菌勉^{1,2}
(¹国立循環器病センター研究所 生体工学部; ²CREST, JST; ³東京大学 先端科学技術研究センター; ⁴独立行政法人物質・材料研究機構 生体材料研究センター)

1. 緒言 腹膜透析や栄養療法など長期に渡って経皮的にカテーテルを人体に挿入した状態が続く場合、細菌感染に伴う病態悪化が大きな問題点となっている。当研究室では、ロッド状に形態の制御されたハイドロキシアパタイト(HAp)ナノ結晶粒子を柔軟な高分子基板表面上に固定化させた新規な複合材料が経皮デバイスとして非常に有用であることを報告してきた。

本研究では、複合材料表面の HAp 粒子による被覆率の制御を目的とし、粒子を吸着・結合させる際の媒体の種類が表面被覆率に及ぼす影響について検討を行った。

2. 実験 当研究室で開発したエマルジョン法にて HAp ナノ粒子を作製した。アルコキシシリル基を持つ高分子をシルク表面にグラフト化させた。HAp 粒子を各種媒体に分散させた後、グラフト化シルクを分散媒に 1 時間浸漬することでシルク表面に粒子を吸着させ、減圧下、120°C で反応させることで化学結合を介して粒子をシルク表面に固定化させた。

3. 結果と考察 Fig. 1 には各種アルコールを HAp 粒子の分散媒体として用いてシルク表面上に粒子を吸着・結合させた後の HAp/シルク複合体表面の走査型電子顕微鏡写真を示した。メタノールまたはエタノールを分散媒体とした場合、HAp 粒子が高密度に被覆した複合体が得られた。また、プロパノール、ブタノールを用いた場合には粒子間距離が比較的広がった状態で被覆した。以上の結果より、HAp 粒子の分散媒体によって HAp/シルク複合体の表面被覆率を制御できることが明らかとなった。

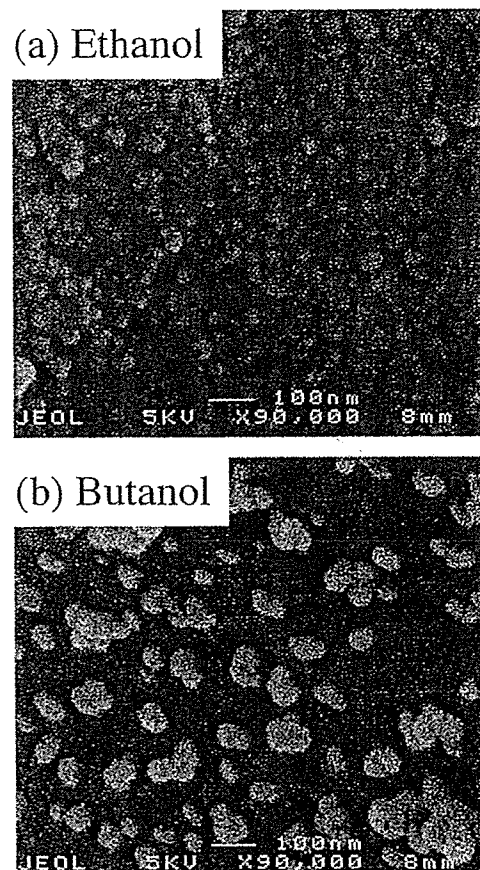


Fig. 1 SEM photographs of the surfaces of hydroxyapatite (HAp)/silk fibroin (SF) composites. The HAp particles were adsorbed onto SF fibers in (a) ethanol, (b) butanol.

Control of packing of hydroxyapatite nanocrystals on polymer substrates for development of percutaneous devices

Masahiro OKADA^{1,2}, Takeshi SERIZAWA³, Shoji YASUDA¹, Junzo TANAKA^{2,4}, Akio KISHIDA^{1,2}, Tsutomu FURUZONO^{1,2} (¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka 565-8565, Japan; ²CREST, JST; ³Department of Life Science, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo 153-8904 Japan; ⁴Biocmaterials Center, Independent Administrative Institution, National Institute for Materials Science, Ibaraki 305-0044, Japan)

Tel: +81-6-6833-5004 (ext. 2438), Fax: +81-6-6872-8090, E-mail: okada04@ri.ncvc.go.jp

Vascular Wall Cell Injection and Endothelial Cell Seeding To Tissue Scaffold Acellularized By Cold Isostatic Pressing

Fujisato, T¹, Funamoto, S², Nishioka, H³, Kamata, W⁴, Yamahigashi, N⁴, Yoshida, K⁴,

Niwaya, K¹, Kishida, A¹, Nakatani, T¹, Kitamura, S¹

¹National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

²Shinshu University, Matsumoto, Nagano, Japan

³Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Hyogo, Japan

⁴Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Mie, Japan

Acellularized xenograft tissue and its recellularization are widely studied to give more durability with potential growth and less immunogenicity to the currently used bioprostheses like xenograft heart valves. We are investigating efficient processes of acellularization and in vitro recellularization of the porcine vascular tissue as a biological scaffold with intact structure and biomechanical properties based on the native collagen and elastin. In this paper, our recent study on an in vitro recellularization method using a cell injector and a roller culture bioreactor of a vascular tissue scaffold acellularized by the cold isostatic pressing was reported.

Porcine hearts were isolated under clean condition and stored at 4 °C. Warm ischemia time of the isolation process was less than 20 min. The aortic and pulmonary valves with surrounding tissues were excised and freed from adherent fat. They were then treated by a cold isostatic pressing of 10,000 atm at 4 °C followed by washing with PBS under microwave irradiation for acellularization of the donor cells. They were subjected to histological study by the light and scanning electron microscopy and biomechanical study by the tensile strength measurement. Porcine endothelial cells were isolated from the femoral artery of a future recipient by collagenase digestion and vascular wall cells were isolated by mincing of its residual tissue. After 3 weeks expansion of the cells, the vascular wall cells were injected to the acellularized tissue scaffold by a cell injector and the endothelial cells were seeded on it by a roller culture bioreactor for 4 hrs. The cells were then expanded in pulsatile flow culture bioreactor for 5 days.

The valve leaflet and vascular wall were completely cell free when the tissues were treated by the cold isostatic pressing for 10 min and washing under microwave irradiation for 2 days (Fig. 1). There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the tissues treated. The elastica-van Gieson staining showed that collagen and elastin fibers were well maintained in the acellularized biological scaffold. From the in vitro incubation test, the tissue was disinfected when the pressing was applied to the tissue contaminated by normal bacteria floras. It has been reported that viruses in the tissues treated by the pressing of more than 6000 atm are mostly inactivated. The autologous vascular wall cells and endothelial cells were well incorporated to the acellularized tissue by the cell injector and roller culture bioreactor (Fig. 2). However, the cells were still remaining inside an area of more than 1 mm depth in the aortic tissue and both of the breaking strength and elastic modulus were increased when the tissue was immersed for 24 hr in 1% Triton X-100 for cell removal.

The vascular tissues acellularized by the cold isostatic pressing and microwave irradiation may provide more durable and safe bioprostheses. The autologous cells were

well incorporated to the three-dimensional biological scaffold by the cell injector and roller culture bioreactor.

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

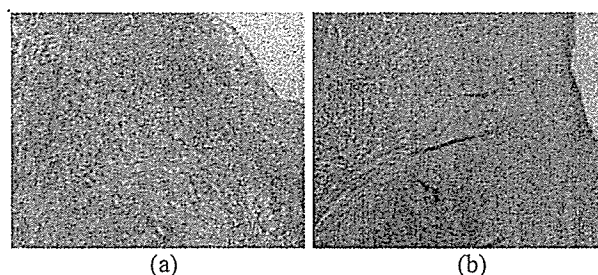


Figure 1. (a) Leaflet and (b) its base tissue of the porcine aortic valve treated by the cold isostatic pressing of 10,000 atm for 10 min.

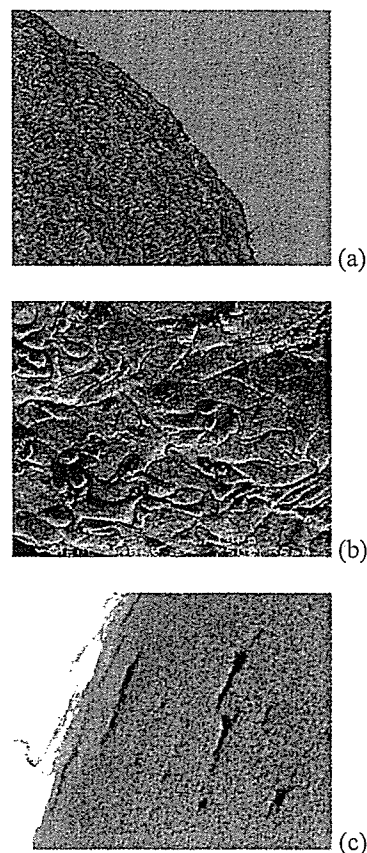


Figure 2. (a,b) Endothelial cells seeded onto the surface of the acellularized scaffold by roller culture bioreactor and (c) vascular wall cells into the scaffold by cell injector.

生体組織の脱細胞化処理による再生型移植組織の開発

国立循環器病センター¹、同再生医療部²、同臓器移植部³、同心臓血管外科⁴

ヒューマンサイエンス振興財団⁵

先端医療振興財団⁶

藤里俊哉²、西岡 宏⁵、吉田謙一⁶、湊屋謙司⁴、庭屋和夫⁴、菅 理晴²、中谷武嗣³

北村惣一郎¹

【目的】我々は、同種あるいは異種組織からドナー由来の細胞成分や抗原性部位を除去し、構造マトリックスのみを用いた再生型移植組織の開発を行っている。脱細胞化により抗原性が減弱されるとともに、固定化等の化学処理を行っていないため、移植後に自己組織化され、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると考えられる。本報では、ミニブタを用いた同種移植実験によって、その有効性を検討した。

【方法】クラウン系ミニブタ((株)ジャパンファーム)の大動脈、心臓弁及び気管を摘出し、4℃にて10,000気圧の超高圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を除去した。レシピエントとなるミニブタの下行大動脈を、脱細胞化処理した大動脈組織と置換移植した。所定期間経過後、移植組織を摘出して組織学的に検討した。

【結果と考察】超高圧印加処理による脱細胞化処理においては、気管軟骨組織内を含めて組織深部まで完全に細胞を除去することができ、力学特性の変化も見られなかった。また、ブタ内在性レトロウイルスの残存をPCR法にて検査したが、まったく検出されなかった。超高圧処理によつては組織内の細菌やウイルスも不活化されることが報告されており、極めて高い安全性が確保できると考えられる。この脱細胞化大動脈を3ヶ月同種移植したところ、移植組織の破断等も見られず、内腔面は内皮細胞で完全に覆われており、組織内部への自己細胞の浸潤も確認された。

【結論】超高圧印加にて脱細胞化処理することで、力学特性を有効に維持した安全な再生型移植組織が作成できた。ミニブタに移植したところ、レシピエント細胞の浸潤によって自己組織化されることが確認された。

【謝辞】本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。

3J05 生体組織の脱細胞化による安全な生物由来繊維素材の開発

(国立循環器病センター) ○藤里俊哉、湊谷謙司、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎
(先端医療振興財団) 吉田謙一
(ヒューマンサイエンス振興財団) 西岡 宏

1. 緒言

欠損した組織の再生医療には足場基材となる素材が欠かせない。ポリ乳酸等の生体内分解吸収性人工素材を用いたアプローチが主流となっているが、多くの素材は生体組織よりも硬く、複雑な形状に成形加工することも容易でない。また、大動脈等の左心系組織では高圧に耐える必要があり、破断等の致命的障害を避けるための分解速度の制御も容易でない。そこで我々は、生体組織から細胞成分や抗原性部位を除去し、残存したコラーゲン繊維やエラスチン繊維等の構造マトリックスを足場基材として利用するアプローチを採用している。脱細胞化により抗原性が減弱されるとともに、固定化等の化学処理を行っていないため、移植後に自己組織化され、自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると考えられる。本報では、ミニブタを用いた同種移植実験によって、その有効性を検討した。

2. 方法

クラウン系ミニブタ（(株) ジャパンファーム）の大動脈、心臓弁、及び気管を清潔麻酔下にて採取し、4℃にて10,000気圧の超高静水圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を除去した。光学顕微鏡並びに電子顕微鏡を用いた組織学的観察によって、脱細胞化を評価した。また、処理組織からDNAを抽出し、ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のDNAを増幅後、PCR産物を電気泳動することで組織内のPERVを測定した。左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術により、同種ミニブタの下行大動脈を、脱細胞化処理した大動脈組織と置換移植した。所定期間経過後、移植組織を摘出して組織学的に観察した。

3. 結果と考察

脱細胞化の手法としては、界面活性剤や酵素による処理法が報告されているが、組織深部の細胞除去は容易でなかった。我々の開発した超高静水圧引加による脱細胞化処理法では、気管軟骨組織内を含めて組織深部まで細胞核は染色されなかった。また、電子顕微鏡観察から、血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離し、組織内では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。また、PERVもまったく検出されなかった。異種生体組織を移植素材として使用する場合は、PERVや未知の感染性物質を完全に除去することが必要である。超高静水圧引加によっては、組織内の細菌やウイルスの不活化されることが報告されており、本方法は極めて高い安全性が確保できると考えられる。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、力学特性に大きな変化は見られなかった。各繊維は完全なネイティブ状態ではないと思われるが、移植後に自己組織と置換されるのであれば、力学的な強度や特性が十分であれば、大きな影響はないと考えている。左心系である下行大動脈置換術においても、破断等の異常所見は全く認められなかった。血管内腔面は、移植1ヶ月後においてほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後では完全に覆われていた。また、組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3ヶ月後では完全に消失していた。

4. 結論

超高静水圧引加による脱細胞化によって、安全な移植素材が得られた。より長期の同種及び異種動物実験によって成長性や耐久性を確認し、数年以内の臨床応用を目指している。

5. 謝辞

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

Development of Safe Fibrous Material by Acellularization of Living Tissue. Toshia FUJISATO, Ken'ichi YOSHIDA*, Hiroshi NISHIOKA**, Kenji MINATOYA, Akio KISHIDA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA. National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 Email: fujisato@ri.ncvc.go.jp, *Foundation for Biomedical Research and Innovation, **Japan Health Sciences Foundation

3J07 超高压処理による高分子複合体形成とその医用材料としての応用

(国立循環器病センター研究所・生体工学部)

○岸田晶夫・木村 剛・古菌 勉・藤里俊哉

(関西大学・工学部) 奥野 暁、大矢裕一、大内辰郎

(岡山大学・環境理工学部) 六雄伸吾、吉澤秀和

1. 緒言

我々はこれまでに、6000 気圧を超える超高压下では水素結合性が強調されることに注目し、高压処理を用いた水素結合性構造体の調製の可能性について検討を行ってきた。本研究では主としてポリビニルアルコール(PVA)を用い、DNA-Polymer 複合体の形成とその医用材料としての応用の可能性を検討した。

2. 実験

所定量の PVA を秤量し、1, 5, 10, 20 w/v% 溶液を調製した。これに単独で、あるいは種々の濃度で調製したサイズマーカー用 DNA および GFP 遺伝子を組み込んだプラスミド溶液を添加し、PE 製ポリ袋で密封し、超高压処理装置 (Dr. CHFF ; (株) 神戸製鋼所) により所定条件(圧力、時間)で加圧した。PVA の 構造体形成については顕微鏡観察、DNA との複合体形成についてはゲル電気泳動によるパターン変化の観察等の検討を行って評価した。また、プラスミドとの複合体については、遺伝子導入のモデル実験を行った。

3. 結果と考察

種々の PVA 溶液を超高压処理した場合、高分子量の PVA140、PVA117H では透明な溶液から白濁溶液に変化し、その白濁傾向は濃度上昇に伴い強くなった。顕微鏡観察では $1\mu\text{m}$ 以下の球状の粒子が観察され、また、それらの集合体も見られた。粒子数は濃度上昇に伴い増加した。一方、低分子量の PVA105、PVA205 では、0.1 w/v% の PVA105 溶液では若干の白濁が認められたが、他は透明な溶液のままであった。これらより、PVA 溶液を超高压処理することで粒子が形成され、また、用いる PVA の分子量および濃度をコントロールすることで粒子形成を制御できることがわかった。

DNA マーカーを用いて電気泳動パターン変化を観察したところ、複合体形成に伴うスミアなバンドが観察された。用いる PVA の種類を変化させ、さらに混合条件について検討したところ、分子量依存性が観察されたものの、濃度については大きな影響は認められなかった。これらを顕微鏡観察では、上記の PVA 溶液と同様に粒子形態をとっていた。プラスミド DNA との複合体形成も同様に観察され、これを RAW 細胞に添加したところ、粒子形成が観察された PVA との組み合わせの場合に、細胞内への取り込みが観察された (Fig.1)。この結果から、超高压処理による高分子-遺伝子複合体は、粒子状の形態をとる場合には、遺伝子デリバリー担体としての応用が期待されることが明らかとなった。

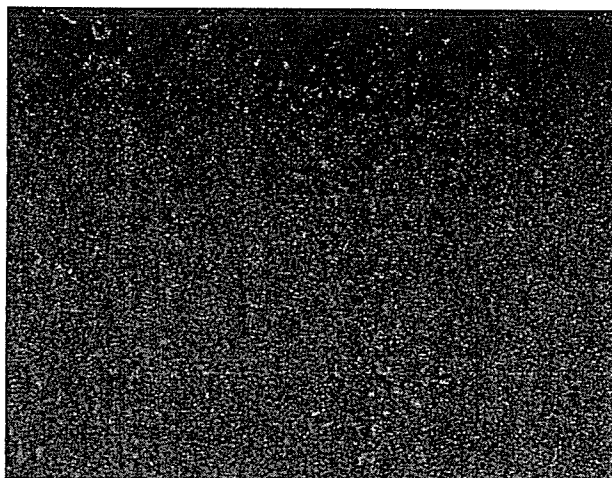


Figure 1. Uptake of PVA/rhodamine labeled plasmid DNA Composites by RAW cells.(After 24hr incubation)

Preparation of DNA-Polymer Composite using Ultra-High Pressure Technique and Their Application as Medical Materials, Akio Kishida, Tsuyosi Kimura, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato (Natl Cardiovasc Center Res Inst), Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ohuchi (Kansai University), Shingo Mutuso, Hidekazu Yoshizawa (Okayama University), 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, TEL:06-6833-5012, FAX:06-6833-5476, email:kishida@ri.ncvc.go.jp

OA6-2 超高压処理による安全な再生型移植組織

○藤里 俊哉¹、吉田 謙一²、西岡 宏³、湊谷 謙司⁴、庭屋 和夫⁴、
岸田 晶夫⁵、中谷 武嗣⁶、北村 惣一郎⁷

¹国立循環器病センター再生医療部 ²先端医療振興財団

³ヒューマンサイエンス振興財団 ⁴国立循環器病センター心臓血管外科

⁵国立循環器病センター生体工学部 ⁶国立循環器病センター臓器移植部

⁷国立循環器病センター

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に、*in vitro*にて患者の自己細胞を組織内に組み込むことで、あるいは細胞誘導因子等を組み込むことで、再生型移植組織の開発を行っている。移植後に自己組織と置換される再生型移植では、現在では不可能な、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。本報では、超高压処理によって脱細胞化処理したミニブタ組織の同種移植実験について検討した。

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、心臓弁、及び気管を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた超高压印加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。また、組織を細切してDNAを抽出後、ブタ内在性レトロウイルス (PERV) のDNAを増幅し、PCR産物を電気泳動することで、組織内PERVを測定した。さらに、同種ミニブタを用い、左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術により、脱細胞化した下行大動脈と置換した。移植1及び3ヶ月後に移植組織を摘出し、組織学的に評価した。

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。組織内のPERVは全く検出されなかった。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。コラーゲン繊維等は完全なネイティブ状態ではないと思われるが、移植後に自己組織と置換されるのであれば、力学的な強度や特性が十分であれば、大きな影響はないと考えている。血管内腔面は、移植1ヶ月後においてもほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後では完全に覆われていた。また、組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3ヶ月後では完全に消失していた。

超高压処理による脱細胞化によって、安全な移植組織が得られた。より長期の同種及び異種動物実験によって成長性や耐久性を確認し、数年以内の臨床応用を目指している。なお、本研究の一部は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、及び文部科学研究費の補助を受けて行われた。