

220 脱細胞化生体スキャフォールドを用いた組織再生

Tissue Regeneration using Acellular Bioscaffold

- | | |
|---------------------|---------------------|
| ○正 藤里俊哉 (国循・再生医療) | 吉田謙一 (先端医療財団) |
| 西岡 宏 (ヒューマンサイエンス財団) | 山崎祥子 (国循・心臓外科) |
| 殷 猛 (国循・臓器移植) | 湊谷謙司 (国循・心臓外科) |
| 庭屋和夫 (国循・心臓外科) | 正 岸田晶夫 (東医歯大・生体材料研) |
| 中谷武嗣 (国循・臓器移植) | 北村惣一郎 (国循・総長) |

Toshia FUJISATO, Sachiko YAMAZAKI, YIN Meng, Kenji MINATOYA, Kazuo NIWAYA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA
National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka
Kenichi YOSHIDA, The Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe
Hiroshi NISHIOKA, Japan Health Sciences Foundation, Tokyo
Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University

【緒言】

我が国では年間約2万件、米国では約50万件的冠動脈バイパス術が施行されている。また、閉塞性血栓血管炎や閉塞性動脈硬化症によって、我が国では年間約5千人、米国では約15万人が下肢切断を余儀なくされており、我が国では年間1万件弱、米国では年間8万件余りの末梢血管再建術が施行されている。このような不全あるいは傷害をうけた血管組織を置換するための第一選択肢は、患者の自己組織の使用である。しかしながら、糖尿病患者のように、しばしば自己組織の使用が不可能な場合があり、その場合は人工血管あるいは同種凍結保存血管の使用が次選択肢となる。小口径の場合では人工血管は閉塞の危険があり、同種組織が好ましい。また、中大口径の場合でも人工血管は感染に弱く、一旦生じた細菌病巣は抗生剤による治療もあまり有効でないため、感染部位では同種組織の使用が適当である。同様に、移植された人工血管が感染した場合も、同種組織による再建が第一選択肢となる。このように、同種組織移植の有用性は明らかで、米国では年間数千件の凍結保存同種組織が使用されている。しかしながら、我が国では年間数十件程度に留まっており、圧倒的に供給数が不足しているため、やむを得ず米国から個人輸入して使用する患者もいる状況にある。一方、先天性疾患を抱える小児患者の場合では、小児期に特徴的な早期の石灰化等に加え、成長に伴う移植組織の成長性欠如のため、人工血管に加え同種組織でさえも複数回の移植が避けられない。近年、これらの問題を解決するために、ポリ乳酸やポリグリコール酸等の生体内分解吸収性材料を用いた再生型人工血管移植が臨床応用され始めた¹⁾。しかし、左心系においては、分解に伴う強度低下が血圧に抗しきれず、動物実験では破断の報告もある。そこで我々は、血管等組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスをスキャフォールドとして利用するアプローチを採用し

ており、ヒトあるいは動物から採取した組織から、細胞成分や細菌、ウイルス、DNAを完全に除去あるいは不活化することで、現在では不可能である再生型の組織再生を目指している。

【方法】

脱細胞化処理:ドナーとなるクラウン系ミニブタ(㈱ジャパンファーム)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(㈱神戸製鋼所)を用いた超高压印加処理、続けて洗浄処理を行うことで細胞成分を除去した(パワーグRAFT処理と命名)。処理後の組織を、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡で組織学的に観察するとともに、リン脂質やDNA量等の細胞成分の測定を行うことで脱細胞化を評価した。また、DNAを抽出後、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)のPCR産物を電気泳動することで、組織内PERVを測定した。

同種移植実験:クラウン系ミニブタを用い、左側臥位第4肋間開胸下行大動脈置換術にて、脱細胞化同種大動脈弁導管による大動脈置換手術を行った。術後1、3及び6ヶ月において、移植組織を摘出し、HE染色、抗vWF(血管内皮細胞)、抗 α -SMA(平滑筋細胞)、抗ビメンチン(間質細胞)、抗CD3(T細胞)、及び抗CD68(マクロファージ)免疫染色、並びに走査型電子顕微鏡によって組織学的所見を検討した。脱細胞化していない凍結保存同種弁を対照とした。凍結保存は、採取した肺動脈弁を、プログラムフリーザー(フタバメディカル㈱)による1°C/minの徐冷凍結後、液体窒素中に保存した。1ヶ月後に解凍し、ハンクス液で洗浄後、動物実験に供した。なお、動物実験に対する動物愛護上の配慮は、麻酔や鎮痛剤の使用、最小使用数となるような実験計画の立案など、規定に則り十分に払っており、文部科学省及び実験動物学会等の指針に沿って処理した。

【結果と考察】

パワーグラフト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、力学的な強度には問題なかった。組織内の β アクチン及びPERVは全く検出されなかった(図1)。しかし、リン脂質は処理後でも検出された。リン脂質は移植後の石灰化の要因となり得るため、洗浄処理の最適化を検討中である。

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。細胞を未播種の場合について免疫組織学的に検討したところ、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、6ヶ月後では完全に覆われていた(図2)。また、組織内には内腔及び外周部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、6ヶ月後では完全に消失していた。移植後6ヶ月においては、内腔は血栓の付着もなく良好な開存性及び自己細胞浸潤を示していた(図3)が、若干の石灰化の所見が認められた。

欧米では、脱細胞化に薬液を用いた方法で、既に数グループによって臨床応用が実施されている。しかし、不十分な脱細胞化が原因と思われる移植後早期の不全例も報告されている²⁾。超高圧印加によって、細菌やウイルスの不活化されることが既に報告されているため³⁾、異種組織を使用した場合でも、パワーグラフト処理は極めて高い安全性が確保できると考えている。動物移植実験の結果を基に脱細胞条件の最適化を図り、さらにより長期の同種移植実験並びに異種動物実験によって成長性及び耐久性を検討し、数年以内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、及び科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

【文献】

- 1) Shinoka T, et al. Clinical practice of transplantation of regenerated blood vessels using bone marrow cells. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2003; 92(9): 1776-80.
- 2) Simon P, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients. *Euro J Cardiothorac Surg* 2003; 23: 1002-6.
- 3) 鈴木敦士, 林 力丸編. 高圧生物科学と高圧技術. 1997; さんえい出版 京都.

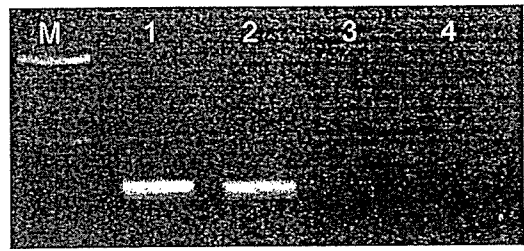


Figure 1. PERV assay in the decellularized porcine tracheae. (M: Marker, 1: Native, 2: 1% Triton@ X-100 for 24 hrs, 3,4: PowerGraft of 980 MPa for 10 min)

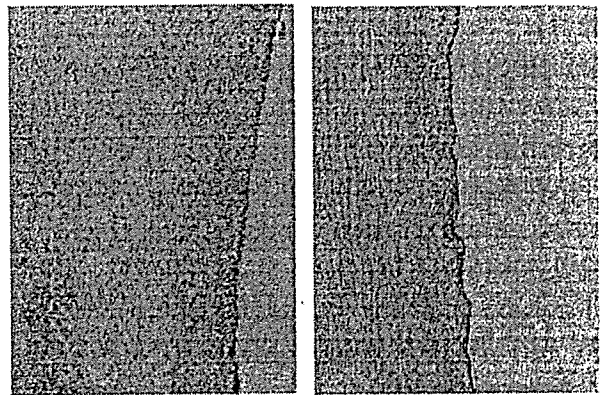


Figure 2. Endothelialization on acellular porcine aorta after congeneric transplantation. (L: 1M, R: 6M)

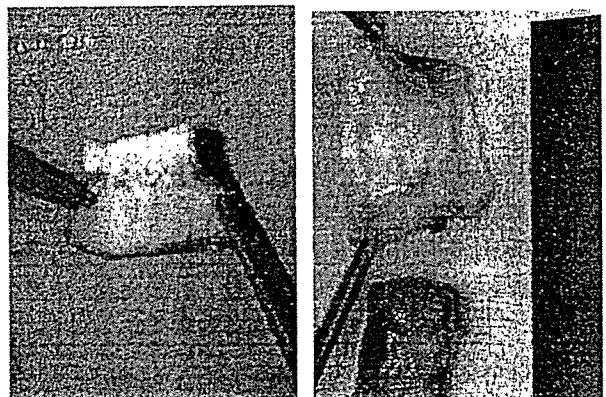


Figure 3. Explanted acellular porcine aorta after congeneric transplantation. (L: 1M, R: 6M)

P2-099 生体適合性の高い新規脱細胞化異種生体弁の開発

太田壮美¹, 澤 芳樹², 盤井成光², 松田 暉², 大北裕¹

¹神戸大学大学院医学系研究科 呼吸循環器外科, ²大阪大学大学院医学系研究科 臓器制御外科

【緒言】今回我々は新しい脱細胞化による生体適合性の高い異種生体弁を開発し良好な結果を得たので報告する。【方法】脱細胞化のために細胞毒性がないPolyethylen Glycolを使用し、 γ 線照射とDNaseを併用してブタ大動脈弁に処理を行った。組織学的検索、DNA定量、可溶性蛋白定量により脱細胞化を評価し、強度引張り試験、ラット皮下移植実験にて炎症反応試験と石灰化試験を行った。また拒絶反応の原因糖鎖 α 1.3Galの免疫染色を行い評価した。【結果】光学顕微鏡像にてブタ大動脈弁は完全に脱細胞化されていた。組織中のDNA定量は、ブタ生弁(F群)の弁尖、血管壁それぞれ $41.1 \pm 4.3 \mu\text{g/g}$ 、 $31.7 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$ に対し脱細胞弁(D群) $2.98 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ 、 $1.16 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ と有意($p < 0.0001$)に脱細胞弁で低く、可溶性蛋白定量においてもF群 4.68mg/ml 、D群 0.018mg/ml と有意に低下していた。引張り試験では最大破断点でF群 $10.7 \pm 3.3\text{N}$ 、D群 $8.7 \pm 1.2\text{N}$ で有意差を認めなかった。炎症反応試験では炎症細胞の浸潤を全く認めなかった。石灰化試験ではvon Kossa染色でほとんど石灰化を認めず、カルシウム定量にて対照(Glutaraldehyde処理弁)の $80 \pm 45\text{mg/g}$ に対し $18 \pm 17\text{mg/g}$ と有意($p = 0.02$)に低値を示した。また、 α 1.3Gal染色は陰性であった。【まとめ】我々が開発した脱細胞化異種生体弁は、ブタ生弁とほぼ同等の強度を持ち、かつ抗原性が低く石灰化しにくい生体適合性の高い生体弁である可能性が示唆された。

P2-101 早期創傷治癒効果を発現するハイブリッド型経皮デバイスの検討

植木光樹¹, 岡田正弘¹, 須崎智之², 安田昌司¹, 藤里俊哉², 古菌 勉¹

¹国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部, ²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, ³独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ

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、無機粒子を医用高分子表面にナノテクノロジーを用いて複合化した新規な材料を創出することで、柔軟かつ皮膚組織と密着可能な経皮デバイスの開発に取り組んでいる。本演題では、ナノサイズのハイドロキシアパタイト(HAp)単結晶をシルク表面に複合化させることで新規な三次元構造体を構築し、その経皮デバイスとしての有用性について検討を行った。さらに再生医学的見地から、ラットおよびうさぎから採取した線維芽細胞、骨髄細胞、歯根膜細胞などの細胞を、構築した三次元スcaffolds上にハイブリッド化させることによる早期創傷治癒効果について検討を行った。

P2-100 コラーゲン製人工血管のミニブタ大動脈への置換移植

殷 猛¹, 山崎祥子², 湊谷謙司², 笹山典久³, 吉田謙一⁴, 西岡 宏⁵, 藤里俊哉⁶, 岸田晶夫⁷, 白数昭雄³, 中谷武嗣¹, 服部博行³, 高野久輝⁸

¹国立循環器病センター 臓器移植部, ²国立循環器病センター 心臓血管外科, ³ニプロ(株), ⁴先端医療振興財団, ⁵ヒューマンサイエンス振興財団, ⁶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, ⁷東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁸国立循環器病センター 研究所先進医工学センター

現在、臨床にて使用されている埋め込み型人工血管は、年間数万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小口径や感染部位では自家血管やホモグラフトが使用される他、小児患者では体に伴った成長性を得られないため、再生型人工血管の開発が望まれる。東京女子医科大学の新岡らは、吸収性人工材料からなる再生型人工血管の小児患者への臨床応用で、優れた成績を報告している。今回我々は、コラーゲン製の人工血管について、動物実験にて検討を行った。コラーゲン製人工血管は、単純な分解の他に、移植後に浸潤してきた線維芽細胞等による分解・置換を受け、吸収性人工材料とは異なった再生プロフィールを示すと考えられる。長さ約2.5cm、内径約6mmの架橋コラーゲン製人工血管を、クラウン系ミニブタ((株)ジャパンファーム)の下行大動脈に置換移植した。所定期間経過後に摘出し、免疫染色やSEM観察等により組織学的に評価した。左心系への移植であるが、移植直後の破断等の異常所見は見られなかった。移植1ヶ月後に摘出したところ、移植時の形態をほぼ留めており、内腔面の血栓付着は見られなかった。吻合部から内皮の伸展が認められるとともに、外周の癒着組織からの細胞浸潤も見られた。

P2-102 バイオ人工肝臓装置内の酸素不足でも、機能持続可能な新規肝細胞株の樹立

垣外 梢¹, 寺田 聡¹, 大政健史²

¹福井大学 工学部 生物応用化学科, ²大阪大学

【緒言】肝移植は有効ではあるが、ドナー不足が深刻であるため、肝由来細胞を用いるバイオ人工肝臓の開発が期待されている。現在まで、多くの研究者により高い性能を有するバイオ人工肝臓が提案されているが、未だ運転期間が短く肝疾患の完治までの補助には至っていない。その原因として、装置内に封入された肝細胞の酸素供給不足による細胞死滅、および肝機能の低下があげられる。そこで、バイオ人工肝臓に封入される肝細胞に着目し、アポトーシス抑制遺伝子を導入することで、酸素供給不足でも細胞死滅に耐えうる肝細胞株の樹立を目指した。【方法及び結果】大量調達の容易なヒト由来肝細胞株HepG2を対象に、アポトーシス抑制遺伝子bcl-2, crmA, p35, bag-1をそれぞれ単独導入し、アポトーシス耐性株を樹立した。さらに、より高い細胞死耐性を有する細胞株の樹立を目指し、複数のアポトーシス経路の阻害が期待できる「bcl-2とbag-1」、「bcl-2とp35」の共発現株をも樹立した。これら樹立株を、バイオ人工肝臓装置内の酸素不足を模倣する目的で、通常酸素分圧19%を酸素分圧2%にまで低下させて単層培養し、細胞生存や肝機能を測定した。期待通り、アポトーシス抑制遺伝子導入株では生存が改善されたが、その程度は導入遺伝子によって異なっていた。中でも、「bcl-2とp35」の共発現株が最も有効であった。

P2-107 間葉系幹細胞の増幅・分化に適した生分解性 Scaffold (ポリ乳酸系) の表面構造

山中克之¹, 山本克史², 坂井裕大¹, 金子 正², 辻紘一郎³, 加藤幸夫¹

¹広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 探索医科学講座 口腔生物学分野, ²株式会社ジーシー, ³株式会社ソーセル

【目的】再生医療においては, 再生する組織に対して最も適切な Scaffold を選択することが必要である。したがって, Scaffold の表面性状が細胞に与える影響を把握する事は重要である。我々は間葉系幹細胞 (以下MSC) 移植に適した Scaffold を開発すべく, 表面性状の異なるポリ乳酸系 Scaffold を設計し, MSC の接着・増殖・分化に与える影響を検討した。

【方法】MSC は患者の同意を得て採取した腸骨髄液から分離して bFGF と 10% FBS を含む DMEM 培地中で増殖させた (Tsutsumi.S et al BBRC 2001)。ポリ乳酸系 Scaffold は表面を研磨して塑像化させた5種類のフィルムと1種類のメッシュを使用した。また, 48穴プレートに適合するように加工して, その上に MSC を播種した。

【結果】表面粗さが小さくなると MSC の接着・増殖が促進された。一方, 表面粗さが高くなると増殖は抑制されたが, 骨分化が促進された。また, フィルムよりもメッシュの形状の方が増殖速度を低下させ, 骨分化を促進した。一定の表面粗さであるかぎり, Scaffold の化学的組成は MSC の増殖に影響しなかったが, PLGA と PLC は PLLA よりも骨分化を促進した。

【考察・結語】Scaffold の表面粗さと形状を調節する事で, 各症例に最適な MSC 担体を個別に提供できると考えられる。

P2-109 PLGA-コラーゲン複合メッシュを用いたヒト関節軟骨組織の再生

陳 國平¹, 田所美香², 大串 始², 幅田 孝³, 上松耕太³, 高倉義典³, 田中順三¹, 立石哲也¹

¹物質・材料研究機構 生体材料研究センター, ²産総所 セルエンジニアリング研究部門, ³奈良県立医大 整形外科

軟骨組織を再生するために軟骨細胞が均一に付着, 増殖して組織化することを支持する多孔質基盤材料が必要である。本研究では, PLGA-コラーゲン複合メッシュを用いて, ヒト関節軟骨細胞を培養し, ノードマウスの皮下におけるヒト関節軟骨組織の再生を検討した。変形性関節症で膝関節置換手術を受けた患者 (7例) の組織検体から分離した軟骨細胞を DMEM 血清培地で3回継代培養した後, 複合メッシュに播種した。5ng/mL の TGF-β3 を添加, 及び添加していない DMEM 無血清培地で1週間培養した後, 複合メッシュを4層重層し, ノードマウスの背中の皮下に移植した。移植4週間後, 検体を採取し, HE, safranin-O, トリジンブルー染色を行った。ヒト関節軟骨細胞は PLGA-コラーゲン複合メッシュによく接着して増殖し, 細胞外マトリックスを産生していることが分かった。全ての検体は表面が乳白色の光沢があったが, TGF-β3 を含んだ培地で培養した細胞の検体は TGF-β3 を添加していない培地での検体より大きかった。細胞は丸い形態を有し, Safranin-O 染色性細胞外マトリックスとトリジンブルー染色によるメタクロマジーが認められたが, TGF-β3 を含んだ培地で培養した場合は, 染色性が強かったことが分かった。これらの結果より, PLGA-コラーゲン複合メッシュ上で培養したヒト軟骨細胞は軟骨様組織を形成し, 複合メッシュがヒト関節軟骨組織再生の基盤材料として有効であると考えられる。

P2-108 心筋バイオスキャホールドの作製と細胞播種法の開発

須崎智之¹, 森反俊幸¹, 西岡 宏², 吉田謙一², 木村 剛³, 古菌 勉⁴, 藤里俊哉², 岸田晶夫³, 中谷武嗣⁵, 北村惣一郎⁵

¹鈴鹿医療科学大学 医用工学部, ²国立循環器病センター研究所 再生医療部, ³東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁴国立循環器病センター研究所 生体工学部, ⁵国立循環器病センター

【緒言】我々は, 生体由来組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスを細胞足場としての利用するバイオスキャホールドの開発を行っている。これまで, 超高静水圧処理による細胞除去法を考案した。本法は, 細胞除去効率が高く, 細菌, ドナー由来の内在性遺伝子も排除でき, 生体力学特性も維持される。本研究では, 合成高分子製細胞足場では難しいとされる動的組織の再建を目的とし, 心筋バイオスキャホールドの作製と新たな細胞による心筋組織再構築法について検討した。**【実験】**成体ブタ ((株) ジャパンファーム) の心臓を購入し, 種々の厚みを有する直径約 1 cm の組織に調整した。冷間等方圧加圧装置 ((株) 神戸製鋼所) を用いて低温下超高压印加処理 (10℃, 10,000 気圧) によってドナー細胞を破壊し, 種々の培養液にて洗浄除去した。処理標本の組織断面を HE 染色により光顕観察し, SEM にて表面を観察した。新たな細胞を組織に播種し, 数週間の培養にて組織再構築を行った。**【結果と考察】**心筋組織からの細胞除去効率は組織表面付近で高く, 深部ほど脱細胞化が困難であったが, 約 1 mm 厚で完全細胞除去が達成された。本法で処理された心筋組織は, 従来法のトリプシン処理法に比べ組織構造が保持され, 界面活性剤による浸漬処理法を上回る細胞除去効率であった。これらの結果から, 心筋組織においても本法の有用性が示された。脱細胞化心筋組織への細胞播種についてあわせて報告する。

P2-110 微細加工および高分子表面修飾技術を利用した肝細胞スフェロイドアレイの開発

福田淳二, 中澤浩二
北九州市立大学 国際環境工学部

【目的】創薬スクリーニング等への応用が期待される細胞チップの開発には, そのセンサー部を担う細胞自身の生存・機能を基板上で長期的に維持することが重要である。本研究では, 均一な粒径のスフェロイドを規則的に高密度配列する方法について検討を行った。

【方法】機械加工装置を用いて, PMMA 平板上に直径 300 μm の円柱状キャビティを約 1000 個/cm² の密度で規則的に形成した。次に, キャビティ内におけるスフェロイドの形成促進・脱落防止を目的として, キャビティ底面に接着/非接着高分子を修飾した。すなわち, マイクロコンタクトプリンティング法を用いて, キャビティ底面中央の直径 100 μm の範囲へ RGD ペプチドを結合し, それ以外の部位に PEG を結合した。この基板にラット初代肝細胞を播種し, スフェロイドの形成および機能維持を評価した。

【結果】肝細胞は培養 24 時間でキャビティ底面中央にスフェロイドを形成した。スフェロイドの粒径は, その 86% が直径 160 ~ 180 μm であり均一であった。アンモニア除去能およびアルブミン分泌能は, 少なくとも評価を行った 2 週間は初期活性を維持した。また, 本基板は光学的に透明であり, 蛍光検出によってスフェロイド構成細胞の基本構造 (細胞骨格やミトコンドリア) や P-450 活性などを検出可能であった。以上より, 本基板は, 長期的な薬物スクリーニング試験などに応用可能であることが示唆された。

P1-089 AAV-HGFを用いた持続的遺伝子発現による線維肝遺伝子治療の検討

鈴村和夫, 平野公通, 孫 学炳, 飯室勇二, 藤元治朗
兵庫医科大学 第一外科

(背景と目的) 非代償性肝硬変に対する新しい治療として、肝細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子導入による治療効果を発表してきたが、これまではその遺伝子発現が一過性であり反復投与を必要とした。今回我々は長期間持続遺伝子発現を特徴とするAAV(Adeno-associated virus)ベクターに着目しAAV-HGFベクターを作製、マウス肝硬変モデルに投与を行い、検討を行った。(方法) BALB/cマウスにCC14を経口投与し肝硬変モデルを作製、経門脈的にAAV-HGFベクターを投与し、投与後3週、6週、9週、12週後の血清中および肝組織中の内因性・外因性HGF濃度、肝組織中の線維量をコントロールであるAAV-LacZベクター投与群と比較検討を行った。(結果) CC14投与後4週間で著明な線維肝が形成された。AAV-HGFベクター投与後3週、6週後の血清中および肝組織中の内因性・外因性HGF濃度、肝組織中線維量はAAV-LacZベクター投与群に比べ有意差はなかったが、9週、12週後の血清中および肝組織中の内因性・外因性HGF濃度はAAV-LacZベクター投与群に比べ有意に上昇しており、肝組織中線維量はAAV-HGFベクター投与群で有意に減少した。(結論) AAV-HGFベクターによるHGFの長期間発現が確認され、著明な肝線維化の改善を認めた。本法は肝硬変治療の新しい治療法となる可能性が示唆された。

P1-091 pH sensitive nanoapatite-a powerful and potential tool for gene delivery to mammalian cells for regenerative medicine

Exzharul Hoque Chowdhury, Toshihiro Akaike

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

Ex vivo gene transfer to either a differentiated cell type or undifferentiated stem cells is an effective way for regulating and manipulating cell functions needed for development of regenerative medicine. However, although there are a good number of gene delivery systems including viral and non-viral ones, a safe, biodegradable and an efficient carrier as highly expected for regenerative medicine purpose, is absent. Here we report on the development of the simplest, but highly efficient gene delivery device based on generated carbonate apatite crystals having high affinity to DNA but fast dissolution kinetics for effective release of DNA during vesicular acidification and thus resulting in 5 to 100-fold higher transgene expression than the existing ones. Additionally, flexibility in modulating crystal dissolution kinetics enabled to control intracellular DNA release and an intermediate rate of DNA release enhanced survival of DNA and subsequent expression. Thus, considering the efficacy, biodegradability, safety and simplicity, this newly developed technology is highly promising for laboratory research and final implementation for regenerative medicine.

P1-090 超高压誘起 PVA/DNAハイドロゲルの調整とDNA徐放解析

岩井彩夏¹, 森反俊幸¹, 大矢裕一², 大内辰郎², 六雄伸吾³, 吉澤秀利³, 木村 剛⁴, 古菌 勉⁵, 藤里俊哉⁶, 岸田晶夫³

¹鈴鹿医療科学大学 医用工学部, ²関西大学 工学部, ³岡山大学 環境理工学部, ⁴東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁵国立循環器病センター研究所 生体工学部, ⁶国立循環器病センター研究所 再生医療部

[緒言]我々は、6000気圧を超える圧力(超高压)印加にて誘起される水素結合性構造体について検討している。これまで、超高压印加法によりポリビニルアルコール (PVA) のゲルあるいは微粒子が形成され、DNAとの混合系ではPVA-DNA複合体が形成されることを報告した。本研究では、PVAとDNAからなる新規ハイドロゲルの調整とDNAの徐放について検討した。従来のハイドロゲルとは異なる構造体形成と徐放挙動を示す可能性を有する。[実験] 分子量および酸化度の異なるPVAはクラレ(株)より提供して頂いた。DNAとしては、プラスミドDNA、サケ白子由来DNAを用いた。種々の濃度のPVA溶液およびDNA溶液を調整し、超高压処理装置((株)神戸製鋼所)を用いて様々な圧力下で所定時間印加した。得られたPVA/DNAハイドロゲルの物性解析を力学強度測定、DSC測定により行った。PBS溶液に浸漬し、所定時間ごとのDNA濃度の測定により、DNAの徐放解析を行った。[結果と考察]低分子量のPVAでは、超高压印加による変化はほとんどなく、PVA-DNA複合体は認められなかった。一方、高分子量のPVAでは、低濃度でPVA-DNA複合体が形成され、更なる高濃度で白色の懸濁液から粘質な溶液に変化し、ハイドロゲルが形成された。ハイドロゲルを洗浄し、洗浄液中のDNA量を測定した結果、DNAが含有されていることが明らかとなり、新規なPVA/DNAハイドロゲルの形成が示された。

P1-092 マウス精原幹細胞株の樹立とin vitro精子形成の検討

小川毅彦¹, 喜寿かおる¹, 谷口英樹², 窪田吉信¹, 野瀬俊明³

¹横浜市立大学 大学院医学研究科 泌尿器病態学, ²横浜市立大学 大学院医学研究科 臓器再生医学, ³三菱化成生命科学研究所

【目的】新生児マウス精巣から採取した雄性生殖細胞を培養条件下で増殖させる技術が開発され報告された。GS細胞と名づけられたこの細胞は精細管内に移植すると精子形成を再生し、産仔を得ることができる。よって、GS細胞は精子形成能を維持しつつ、培養下で増殖できる細胞である。今回我々は、精原幹細胞からGS細胞の樹立を試みるとともに、GS細胞からのin vitro精子形成について検討した。【方法】DBA/2成熟マウス精巣から採取した精巣細胞をFeeder細胞 (MEF) 上で、4種類の成長因子 (GDNF, LIF, bFGF, EGF) を加えた培地内で培養した。また幼若マウス精巣から樹立したGS細胞の移植、GS細胞再樹立実験を行った。さらにGS細胞を15P-1 (セルトリ細胞株) の上で培養し、精子形成への分化を検討した。【結果】9週齢DBA/2マウス精巣から精原幹細胞株の樹立に成功した。またGS細胞をWマウスに移植し、精子形成の確認をするとともに、その精巣から再びGS細胞の樹立に成功した。15P-1上での培養後、1週間後には減数分裂に特異的な遺伝子発現がRT-PCRによって認められた。【結論】培養細胞であるGS細胞と組織幹細胞である精原幹細胞とは機能的に同一細胞であるか、もしくはお互いに転換できることが示唆された。さらにGS細胞(精原幹細胞)を出発点とするin vitro精子形成の可能性が示された。

P2-095 マウス胎仔心臓からの幹細胞樹立

玉川朝治¹, 石渡 勇¹, 木口一成², 佐藤嘉兵³, 石川 博⁴¹石渡産婦人科病院, ²聖マリアンナ医大・産婦人科, ³日大・生物資源動物細胞, ⁴慈恵医科大学解剖第2講座

[目的]臓器移植法が制定されてからも、臓器移植医療ではドナー不足が深刻な問題である。臓器移植に代わる細胞・組織移植による再生医療が期待されている。細胞移植による再生医療の資源として、胚性幹細胞(ES細胞)・胎児幹細胞・生体幹細胞がある。ES細胞は多分化能を有し、資源として優れているが、拒絶反応も避けられないので未だ臨床への応用は厳しい。一方、流産胎児からの臓器移植や幹細胞による細胞移植再生医療が期待されている。我々はマウス胎児の心筋幹細胞の樹立を試みた。

[方法]マウス胎児の心拍動部位をピンセットで摘出し、はさみで細切後、600PU/ml dispaseで37℃、30分間酵素処理し、細胞分散後、300 XGで10分間遠沈し、沈渣を10ng/ml Leukemia inhibitory factor(LIF)と embryo tropic factor(ETF)、10%FBS含有 α MEMで培養した。培養が安定した時点(継代約5代)以降は10%FBS含有 α MEMで培養維持している。[成績]初代培養から6ヶ月で42回の継代に成功している。細胞は小型円形・楕円形で、単層に増殖する、倍化時間は約32時間、継代することなく長期に培養維持していると、一部の細胞に拍動を観察することができる。

[結論]心筋幹細胞の分離継代培養に成功した。今後、ヒト心筋幹細胞樹立への期待が高い。

P2-097 ヒト不死化間葉系幹細胞による造血前駆細胞の効率的な増幅

北原ななえ¹, 藤田 聡², 辻 孝¹, 戸口田淳也², 井田憲司³, 杉並 洋³, 岩田博夫²¹東京理科大学 基礎工学研究科, ²京都大学 再生医学研究所, ³独立行政法人 国立病院機構 京都医療センター

[目的]臍帯血は、造血幹・前駆細胞(HSPC)の供給源として注目されている。しかし採取できる細胞数が少ないため、HSPCの効率的な増幅方法の確立が望まれている。これまでに、HSPCの増幅に有効な支持細胞としてマウス細胞株HESS-5が報告されているが、異種細胞であるため臨床利用への障害となっている。近年、造血幹細胞は骨髄中において骨芽細胞との相互作用で自己複製するという報告がある。そこで本研究ではヒト間葉系幹細胞(MSC)に着目し、ヒトパピローウイルスE6/E7遺伝子およびヒトテロメラーゼ遺伝子hTERTにより樹立されたMSC株の造血支持能を評価してきた。今回新たにLTC-IC assayを行ったのでこれを報告する。

[方法]磁気ビーズカラムを用いて採取したヒト臍帯血CD34陽性細胞を、TPO、FL、SCFを含む無血清培地で不死化MSC株と7日間共培養し、細胞数およびコロニー形成細胞数を定量した。

[結果]支持細胞を使用しなかった場合と比較して、7日間の培養後のCD34陽性細胞数は10倍、CD34陽性CD38陰性細胞数は12倍、CFU-GEMMは23倍、HPP-CFCは18倍に増加し、LTC-ICが維持されていた。さらに、有効な造血支持能が見出されたMSC株の培養上清を用いてHSPCの培養を行ったところ、HSPCは効率的に増幅された。

[結論]不死化ヒトMSC株の造血支持能およびその培養上清の有効性を示した。本結果はHSPCの効率的な増幅のみならず、HSPCの未分化維持機構の解明にも寄与できると考えられる。

P2-096 スフィンゴシン1-リン酸受容体活性化による造血幹細胞のホーミング促進効果

木村貴文¹, Robert Möchle², Lothar Kanz², 藪田精昭³¹京都府立医科大学 大学院医学研究科 分子標的癌予防医学, ²チュービンゲン大学 血液内科, ³関西医科大学 衛生学

免疫抑制剤FTY720はスフィンゴシン1-リン酸受容体(S1PR)アゴニストとして作用し、T細胞の二次リンパ組織へのホーミングを増強することで強力な免疫抑制効果を発揮する。われわれは、ヒト末梢血由来CD34⁺細胞を用いてFTY720の造血幹細胞のホーミングへの影響について検討した。CD34⁺細胞はS1PR mRNA(S1P₁-S1P₃)を発現しているものの、CD34⁺CD38⁺およびCD34⁺CD38⁺分画ではアインフォームの発現パターンがまったく異なることが明らかとなった。FTY720による前処理は、SDF-1刺激によるCD34⁺細胞内カルシウム遊離とアクチン重合を有意に遅延化させ、結果的に造血前駆細胞(CFCあるいはLTC-IC)のin vitro transwell migrationを有意に促進した。また、NOD/SCIDマウス骨髄へのCD34⁺CD38⁺細胞の速やかなホーミングを有意に促進し、移植後8-10週後でのヒト血球生着率を有意に高めた。いっぽう、これらの作用は造血前駆細胞の増殖促進やCXCR4の発現上昇によるものではないことも同時に確認した。したがって、FTY720は造血幹細胞の増殖・分化に影響を及ぼすことなく、CXCR4を介するホーミング・シグナルを有意に増強することが明らかとなった。以上より、S1PRを介するシグナルが、造血幹細胞のホーミング促進に应用可能であり、造血環境において恒常的にSDF-1の作用を調節している可能性が示唆された。

P2-098 新しい脱細胞化処理を施したブタの大動脈弁同種移植実験の検討

湊谷謙司¹, 藤里俊哉¹, 山崎祥子¹, 殷 猛¹, 吉田謙一¹, 西岡 宏¹, 荻野 均¹, 岸田晶夫², 中谷武嗣¹, 北村惣一郎¹¹国立循環器病センター, ²東京医科歯科大学

[目的]我々は、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いる。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大動脈弁移植実験について検討した。【方法】ドナーとなるクラウン系ブタから麻酔清潔下に大動脈基部を採取した。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。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、下行大動脈単断下にて、脱細胞化した大動脈基部を移植した。移植1ヶ月後、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。移植一ヶ月後では超音波検査において、弁尖の動きが観察可能であった。摘出標本において、弁尖は移植1ヶ月後で内皮細胞で覆われていたが、全体として退縮傾向にあり、弁尖付着部には血栓を認めた。移植3ヶ月後では弁尖は完全に消失していた。【結論】脱細胞化処理された大動脈弁は有望である。しかしながら、下行大動脈への移植は短期の観察のみ可能であり、より長期の観察のためには同所性移植が必要であろう。

P2-099 生体適合性の高い新規脱細胞化異種生体弁の開発

太田壮美¹, 澤 芳樹², 盤井成光², 松田 暉², 大北裕¹

¹神戸大学大学院医学系研究科 呼吸循環器外科学, ²大阪大学大学院医学系研究科 臓器制御外科

【緒言】今回我々は新しい脱細胞化による生体適合性の高い異種生体弁を開発し良好な結果を得たので報告する。【方法】脱細胞化のために細胞毒性がないPolyethylen Glycolを使用し、 γ 線照射とDNaseを併用してブタ大動脈弁に処理を行った。組織学的検索、DNA定量、可溶性蛋白定量により脱細胞化を評価し、強度引っ張り試験、ラット皮下移植実験にて炎症反応試験と石灰化試験を行った。また拒絶反応の原因糖鎖 α 1.3Galの免疫染色を行い評価した。【結果】光学顕微鏡像にてブタ大動脈弁は完全に脱細胞されていた。組織中のDNA定量は、ブタ生弁(F群)の弁尖、血管壁それぞれ $41.1 \pm 4.3 \mu\text{g/g}$ 、 $31.7 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$ に対し脱細胞弁(D群) $2.98 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ 、 $1.16 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ と有意($p < 0.0001$)に脱細胞弁で低く、可溶性蛋白定量においてもF群 4.68mg/ml 、D群 0.018mg/ml と有意に低下していた。引っ張り試験では最大破断点でF群 $10.7 \pm 3.3 \text{N}$ 、D群 $8.7 \pm 1.2 \text{N}$ で有意差を認めなかった。炎症反応試験では炎症細胞の浸潤を全く認めなかった。石灰化試験ではvon Kossa染色でほとんど石灰化を認めず、カルシウム定量にて対照 (Glutaraldehyde処理弁)の $80 \pm 45 \text{mg/g}$ に対し $18 \pm 17 \text{mg/g}$ と有意($p = 0.02$)に低値を示した。また、 α 1.3Gal染色は陰性であった。【まとめ】我々が開発した脱細胞化異種生体弁は、ブタ生弁とほぼ同等の強度を持ち、かつ抗原性が低く石灰化しにくい生体適合性の高い生体弁である可能性が示唆された。

P2-101 早期創傷治癒効果を発現するハイブリッド型経皮デバイスの検討

植木光樹¹, 岡田正弘¹, 須崎智之², 安田昌司¹, 藤里俊哉², 古菌 勉¹

¹国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部, ²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, ³独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ

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、無機粒子を医用高分子表面にナノテクノロジーを用いて複合化した新規な材料を創出することで、柔軟かつ皮膚組織と密着可能な経皮デバイスの開発に取り組んでいる。本演題では、ナノサイズのハイドロキシアパタイト (HAp) 単結晶体をシルク表面に複合化させることで新規な三次元構造体を構築し、その経皮デバイスとしての有用性について検討を行った。さらに再生医学的見地から、ラットおよびうさぎから採取した線維芽細胞、骨髄細胞、歯根膜細胞などの細胞を、構築した三次元スカフォールド上にハイブリッド化させることによる早期創傷治癒効果について検討を行った。

P2-100 コラーゲン製人工血管のミニブタ大動脈への置換移植

殷 猛¹, 山崎祥子², 湊谷謙司², 笹山典久³, 吉田謙一⁴, 西岡 宏⁵, 藤里俊哉⁶, 岸田晶夫⁷, 白数昭雄³, 中谷武嗣¹, 服部博行³, 高野久輝⁸

¹国立循環器病センター 臓器移植部, ²国立循環器病センター 心臓血管外科, ³ニプロ(株), ⁴先端医療振興財団, ⁵ヒューマンサイエンス振興財団, ⁶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, ⁷東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁸国立循環器病センター 研究所先進医工学センター

現在、臨床にて使用されている埋め込み型人工血管は、年間数万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小口径や感染部位では自家血管やホモグラフトが使用される他、小児患者では体に伴った成長性を得られないため、再生型人工血管の開発が望まれる。東京女子医科大学の新岡らは、吸収性人工材料からなる再生型人工血管の小児患者への臨床応用で、優れた成績を報告している。今回我々は、コラーゲン製の人工血管について、動物実験にて検討を行った。コラーゲン製人工血管は、単純な分解の他に、移植後に浸潤してきた線維芽細胞等による分解・置換を受け、吸収性人工材料とは異なった再生プロフィールを示すと考えられる。長さ約2.5cm、内径約6mmの架橋コラーゲン製人工血管を、クラウン系ミニブタ(株)ジャパンファーム)の下行大動脈に置換移植した。所定期間経過後に摘出し、免疫染色やSEM観察等により組織学的に評価した。左心系への移植であるが、移植直後の破断等の異常所見は見られなかった。移植1ヶ月後に摘出したところ、移植時の形態をほぼ留めており、内腔面の血栓付着は見られなかった。吻合部から内皮の伸展が認められるとともに、外周の癒着組織からの細胞浸潤も見られた。

P2-102 バイオ人工肝臓装置内の酸素不足でも、機能持続可能な新規肝細胞株の樹立

垣外 梢¹, 寺田 聡¹, 大政健史²

¹福井大学工学部 生物応用化学科, ²大阪大学

【緒言】肝移植は有効ではあるが、ドナー不足が深刻であるため、肝由来細胞を用いるバイオ人工肝臓の開発が期待されている。現在まで、多くの研究者により高い性能を有するバイオ人工肝臓が提案されているが、未だ運転期間が短く肝疾患の完治までの補助には至っていない。その原因として、装置内に封入された肝細胞の酸素供給不足による細胞死滅、および肝機能の低下があげられる。そこで、バイオ人工肝臓に封入される肝細胞に着目し、アポトーシス抑制遺伝子を導入することで、酸素供給不足でも細胞死滅に耐えうる肝細胞株の樹立を目指した。【方法及び結果】大量調達の容易なヒト由来肝細胞株HepG2を対象に、アポトーシス抑制遺伝子bcl-2, crmA, p35, bag-1をそれぞれ単独導入し、アポトーシス耐性株を樹立した。さらに、より高い細胞死耐性を有する細胞株の樹立を目指し、複数のアポトーシス経路の阻害が期待できる「bcl-2とbag-1」、「bcl-2とp35」の共発現株をも樹立した。これら樹立株を、バイオ人工肝臓装置内の酸素不足を模倣する目的で、通常の酸素分圧19%を酸素分圧2%にまで低下させて単層培養し、細胞生存や肝機能を測定した。期待通り、アポトーシス抑制遺伝子導入株では生存が改善されたが、その程度は導入遺伝子によって異なっていた。中でも、「bcl-2とp35」の共発現株が最も有効であった。

WS-16-3 生体吸収性人工靭帯の開発研究

奥田貴俊¹, 黒澤 尚¹, 金 勝乾¹, 玄 丞休²

¹順天堂大学 医学部 整形外科, ²京都大学再生医科学研究所

【目的】膝前十字靭帯(以下ACL)損傷に対し、生体吸収性人工靭帯による治療を可能にすることを目的とし、preliminaryな実験を行った。ポリ-L-乳酸(以下PLLA)人工靭帯埋植後の靭帯の早期過程を解析し、さらに細胞が被覆浸潤しやすい環境を得るため、最適なPLLAコーティングを探る。【方法】日本白色家兔のACLを切除し、3ミリ幅の特製PLLA人工靭帯2本を埋植した。1)コーティングを行わないnormal群、2)プラズマ処理をした群、3)プラズマ処理+I型コラーゲンコートした群、4)プラズマ処理+ヒアルロン酸コートした群、5)プラズマ処理+I型コラーゲンコート+ヒアルロン酸コートした群、6)プラズマ処理した靭帯周囲を大腿筋膜で覆った群、の6種類の靭帯を使用した。4週、6週後に屠殺し、人工靭帯のHE染色を行い組織学的に観察した。また免疫組織学染色による人工靭帯周囲のtypeI、IIIcollagenの定性を行った。【成績】normal群では6週で全て断裂を認めたと、それ以外の群ではどの群も一部に細胞被覆を認め、typeI、IIIcollagenの発現も認めた。【結論】PLLAに親水処理やI型コラーゲンをコートさせることは、PLLAをACL細胞の足場(靭帯のscaffold)として利用するのに有効と考えられたが、今後更なる最適条件の探求が必要と思われた。

WS-16-5 バイオスキャフォールド調製を目的とする脱細胞化手法の評価

澤田和也¹, 野木千賀子², 平工香織¹, 殷 猛³, 山崎祥子⁴, 藤原俊哉¹, 森反俊幸², 岸田晶夫⁵, 中谷武嗣³, 北村惣一郎⁴

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鈴鹿医療科学大学 医工学部, ³国立循環器病センター 臓器移植部, ⁴国立循環器病センター 心臓血管外科, ⁵東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

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、約7割は機械弁による置換であるが、継続した抗凝固剤の服用などQOL上の問題を抱えている。一方、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁は、化学的に処理されているため、種々の構造的劣化の問題が指摘されている。近年、凍結保存による組織バンクも整備されたが、わが国においては提供数が絶対的に不足しているという問題も残されている。これらの諸問題を解決するため、我々は以前より組織工学および再生医療技術を用い、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去した脱細胞化マトリックスをスキャフォールドとして利用する検討を行ってきた。その結果、我々が開発した生体組織への超高压印加法を適用することにより、細胞成分や細菌・ウイルス等の除去あるいは、不活性化が可能となり、現在の生体弁では不可能な再生型の組織置換が期待される。今回は、細胞内DNA量や細胞膜成分量を測定することによって、超高压印加法による脱細胞化を評価した結果について報告する。

WS-16-4 インクジェット式Direct Tissue Engineering

中村真人¹, 小林暁子², 高城富美男³, 森田育男², 高谷節雄¹

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科, ³セイコーエプソン(株)

【目的】Tissue Engineeringでの三次元組織の作製には、通常、Scaffold法、細胞シート積層法が行われている。均一組織や層状組織では有効であるが、1種類の細胞を一面にばら撒く細胞播種に基づいており、何種類もの異なる細胞を二次元、三次元で人為的に適材適所配置して構築することは難しい。そこで、本研究では、Direct Tissue Engineering & Manufacturingという全く異なった生体組織構築のアプローチを検討した。本法では、機械の手により個々の細胞、生体材料を積層して、直接3次元生体組織を作製する。【方法】候補として、インクジェット技術に着目した。生きた血管内皮細胞を用いて、生細胞インクジェットの細胞への影響を検討した。さらに、ダメージを減らす方法として吐出細胞をゲル内に包埋する方法を考案し、ゲルによる3次元化にもチャレンジした。【結果】トリパンブルー染色では、生存細胞は8割以上であったが、最も大きく影響するのが乾燥と考えられた。そこでアルギン酸を利用し、吐出細胞をアルギン酸ゲル内に包埋した。1~2個の生きた細胞を含むマイクロゲル、太さ50μmの細胞封入ファイバー、さらに3次元格子化に成功した。【結論】生細胞インクジェットによるDirect Tissue Engineeringの可能性が示された。Tissue Engineeringの新しい有力な手法となることが期待できる。

WS-16-6 積層化心筋細胞シートの電気生理学的解析

原口裕次, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫
東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

【目的】我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いシート状の心筋細胞(心筋シート)の作製に成功している。この心筋シートの重層化による心筋組織の再構築、さらに重症心不全への治療を目指し研究を展開している。積層した心筋シートは電気的に結合し、同期して拍動する。そこで今回、積層化心筋シートの電気的性質に注目し、2層の心筋シートが電気的に結合するまでの時間を測定するとともに、この結合メカニズムを解析することを目的に実験を行った。【方法及び結果】新生仔ラット由来の心筋細胞を温度応答性培養皿に播種し、数日間培養後、低温処理して心筋シートを得た。重層した心筋シートが電気的に結合するまでの時間を、多点細胞電位記録システムで測定した。2枚の心筋シートは重層後34±2分(n=24)で電気的に結合した。この96%の例で、心筋シートの電気活動は速く拍動するシートに同期し、さらにすべての例で不整脈は起こらなかった。次に心筋細胞の電気的結合に関係するギャップ結合(GJ)が、2枚の心筋シート間に形成されるまでの時間を、低分子蛍光物質カルセインを用い調べ、30分以内にGJが形成されることを確認した。【考察】2枚の心筋シートは重層後、極めて早期にGJを形成し、不整脈を起こすことなく電気的に結合した。この結果は、不全心に移植しても、心筋シートは不整脈を起こすことなく速やかに宿主心に結合する可能性を示唆する。

脱細胞化心臓弁による組織再生

殷 猛、庭屋和夫、山崎祥子、吉田謙一¹、西岡 宏²、藤里俊哉、湊谷謙司、岸田晶夫³、中谷武嗣、北村惣一郎

国立循環器病センター、¹先端医療振興財団、²ヒューマンサイエンス振興財団、³東京医科歯科大学

心臓疾患手術に際し、同種弁組織（ホモグラフト）の臨床意義は大きいですが、中長期に発生する弁機能不全には同種弁に存在する細胞への免疫反応の関与が示唆されている。我々は、同種あるいは異種組織を脱細胞化処理することでホモグラフトの欠点を克服しうると考え、その臨床使用を目指している。本研究では、脱細胞化したミニブタ組織の同種移植について報告する。

クラウン系ミニブタ（(株) ジャパンファーム）の肺動脈弁及び大動脈弁を採取し、超高静水圧印加（パワーグラフト）法によって脱細胞化した。同種ミニブタに、肺動脈弁は同所性に、大動脈弁は下行動脈位に移植した。所定期間経過後、超音波にて観察するとともに、摘出組織を免疫染色やSEM観察にて組織学的に評価した。

両組織とも移植血管の破裂等は認めなかった。肺動脈弁では、移植3及び6ヶ月後での超音波観察で、弁の機能不全は認めなかった。内腔は完全に内皮化しており、組織内への細胞浸潤も顕著であった。また、石灰化も全く認めなかった。これに対し、大動脈弁では、移植1ヶ月後において、弁葉内には石灰化は認めなかったが、導管部には石灰化を認めた。また、3ヶ月後では、弁葉は縮退しており、導管部の石灰化も顕著であった。

Lecture 1

Cellular and Tissue Engineering with Nanotechnology

Akio Kishida¹, Tsuyosi Kimura¹, Kozo Miyazaki¹, Masaomi Ishimaru²,
Masahiro Uetake², Noriyuki Kusakari², Tooru Matsuzawa², A. Okuno³, Y.
Ohya³, T. Ouchi³, S. Mutsuo⁴, H. Yoshizawa⁴, Tsutomu Furuzono⁵,
Toshiya Fujisato¹

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



Prof. Akio Kishida

Department of Applied Functional Molecules,
Division of Biofunctional Molecules,
Institute of Biomaterials and Bioengineering,
Tokyo Medical and Dental University
2-3-10, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo
101-0062, JAPAN
TEL +81-3-5280-8028, FAX +81-3-5280-8005
Email: kishida.fm@tmd.ac.jp

Abstract

1. Nano-vibration as the mechanical signal for controlling cell function.

One of key factors affecting the effective application of tissue engineering is the handling of cells. Especially, for securing of the large amount of cell, many approaches have been studied. Physical stress and stimuli, such as 2-D stretch, static pressure and shear stress, have been extensively studied for controlling cell function for example, adhesion, proliferation and secretion of useful proteins. In this study, we studied the effect of a novel physical stimulation on the cell function (cell adhesion and proliferation). Here, we adopted nano-vibration stimulation system as a novel physical stimulation method.

The equipment was assembled using piezo-electric actuator and set to apply micrometer- to nanometer- amplitude. To investigate the effect of nano-vibration, HUVECs, L929 and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were used as model cells. Adhesion and proliferation of those cells were investigated. In case of initial-adhesion, the cell adhesion was emphasized by nano-vibration to become 1.3 times higher adhered cell number in 1 hour incubation. The effective frequency was different according to the cell. In case of nano-vibrating the adhered cells, the proliferation of HUVECs was promoted at different frequency, respectively. The most drastic effect of nano-vibration was observed in the case of MEF adhesion and proliferation. It may show that primary cells rather than transformed cells suffer the vibration stimulation.

2. Nano-assembly prepared by Ultra-high pressure technology as a novel gene delivery system

Most of non-viral gene carrier uses either of electrostatic interaction or hydrophobic interaction for associating with DNA. Here we introduce a new process for obtaining DNA-Polymer molecular composite via hydrogen bond. In the ultra-high pressure condition (over 6,000 atm), it is well-known that hydrogen bond is strengthened. Using this characteristic, the ultra-high pressure has been used in order to elucidate the flexibility-structure-function of proteins¹. We have reported the molecular composite, such as hydrogels and nano-aggregate were easily obtained by the ultra-high pressure treatment². In this study, the preparation of the molecular composite of DNA and synthetic polymer was attempted by using the ultra-high pressure treatment. The model polymer used was poly(vinyl alcohol)(PVA). Electrophoresis experiment revealed that DNA-PVA composite formation was observed only when the mixture was pressurized. CD spectra analysis showed that no DNA stereo-structure deformation was occurred after pressurization. These results suggest that the interaction formed between the bases of DNA and hydroxyl group of PVA is hydrogen bond and possible association region of DNA is major groove of B-type structure. Using ultra-high pressure (over 10000 atm), DNA-PVA composite was obtained. This composite is one candidate for preparing non-viral gene carrier.

循環器組織再生のためのスキャフォールド材料

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

Scaffold materials for regeneration of cardiovascular tissues

T. Fujisato, N. Sasayama¹, H. Nishioka², K. Yoshida³, K. Sawada⁴, M. Yin, S. Yamazaki, K. Minatoya
 K. Niwaya, A. Kishida⁵, T. Moritan⁶, T. Nakatani, H. Takano, H. Hattori, S. Kitamura

National Cardiovascular Center, ¹Nipro Corporation, ²Japan Health Sciences Foundation

³Foundation for Biomedical Research and Innovation, ⁴Japan Association for the Advancement of Medical Equipment
⁵Tokyo Medical and Dental University, ⁶Suzuka University of Medical Science

1. 緒言

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

2. 実験

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

3. 結果と考察

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

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

吸収性材料を基材とした血管移植では、東京女子医大の新岡教授らが小児患者の静脈再建において優れた臨床結果を報告している。我々が用いている架橋コラーゲンは、主として移植後に浸潤してきた細胞によって分解・置換されるため、吸収性材料とは異なった分解プロフィールを持つと考えられる。また、欧米で臨床化されている脱細胞化組織は、界面活性剤や酵素等の薬液処理によって脱細胞化されているが、不十分な脱細胞化が原因と思われる移植後早期の不全例も報告されている。我々の脱細胞化処理は、組織深部までの完全な脱細胞化とウイルス等の不活化が特徴であり、高い安全性が確保できると考えている。現在、より長期の同種及び異種移植実験によって、成長性や耐久性を検討しており、数年以内の臨床応用を目指している。

4. 謝辞

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

Transaction: 454

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

Vascular Tissue Regeneration Using Acellular Scaffold In Porcine Model

T. Fujisato¹, K. Minatoya¹, M. Yin¹, S. Yamazaki¹, K. Niwaya¹, A. Kishida², T. Nakatani¹, S. Kitamura¹

¹ National Cardiovascular Center, Suita, Japan, ² Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results and Discussion

The tissues including tracheal cartilage were cell free by the PowerGraft technology. There was no PERV detected from the tissue treated. It has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP more than 600 MPa¹). The TEM study showed that collagen and elastin fibers were well maintained in the acellular tissue. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis (Fig.1a). The inner surface was smooth and had no thrombus formation. Cell infiltration was identified at 4 weeks, and intimal thickening was observed at 12 and 24 weeks after the implantation. The luminal surfaces of the aorta and aortic root were completely covered with endothelial cells at 4 weeks (Fig.1b). Calcium deposits were observed slightly at 4 weeks

and the calcification increased at 12 and 24 weeks. Recently, Prof. Konertz and his group in Germany has reported excellent clinical results of acellular porcine pulmonary heart valves²). We are planning a clinical application of acellular aortic valves in a few years.

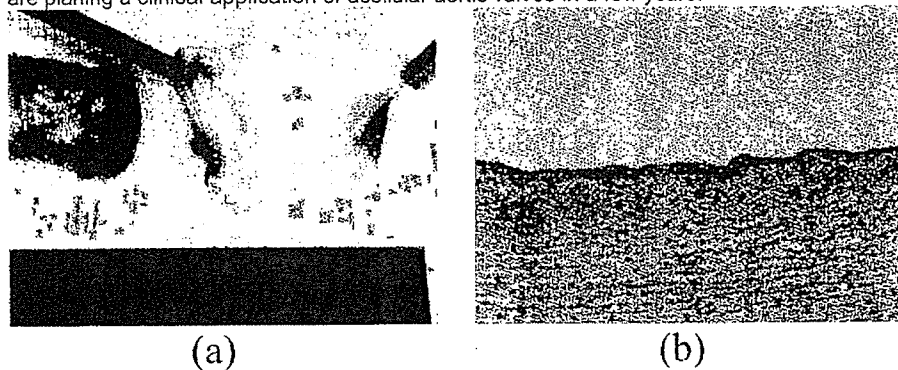


Fig.1 (a) Explanted aorta and (b) its inner surface stained with anti-vWF after 24 week transplantation.

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

Conclusions

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

References

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

Acknowledgements

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

Transaction: 644

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

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

A. Kishida¹, T. Kimura¹, A. Okuno², Y. Ohya², T. Ouchi², S. Mutsuo³, H. Yoshizawa³, K. Miyazaki⁴, T. Fujisato⁴, T. Furuzono⁴

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

Introduction

Most of non-viral gene carrier uses either of electrostatic interaction or hydrophobic interaction for associating with DNA. Here we introduce a new process for obtaining DNA-Polymer molecular composite via hydrogen bond. In the ultra-high pressure condition (over 6,000 atm), it is well-known that hydrogen bond is strengthened. Using this characteristic, the ultra-high pressure have been used in order to elucidate the flexibility-structure-function of proteins¹. We have reported the molecular composite, such as hydrogels and nano-aggregate were easily obtained by the ultra-high pressure treatment². In this study, the preparation of the molecular composite of DNA and synthetic polymer by using the ultra-high pressure treatment and the application of the composite as gene carrier was studied. The model polymer used was poly(vinyl alcohol) (PVA).

Materials and Method

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

Results and Discussion

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

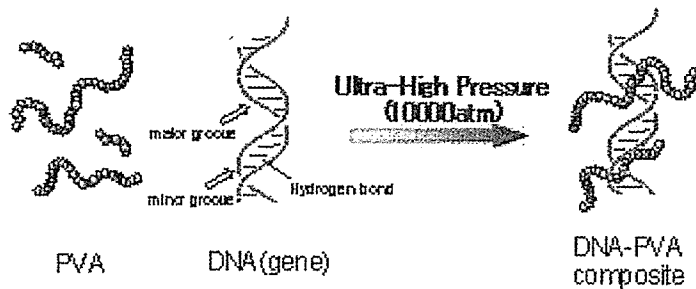


Fig. 1 Schematic illustration of DNA-PVA composite

Figure 1. Schematic illustration of DNA-PVA composite.

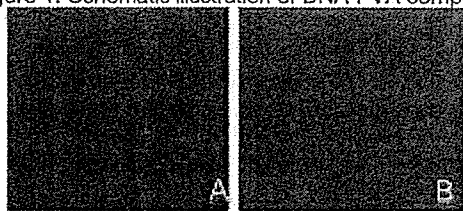


Fig 2 . Uptake of PVA/Rhodamine labeled pEGFP (Rh-pEGFP) composites by Raw 264 cells. (A)PVA117H (0.5%) (B) Rh-pEGFP.

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

Conclusion

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

References

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

1Pe175

超高压処理により形成した PVA/DNA ハイドロゲルからの DNA 徐放解析

(東医歯大生研)木村剛, 南広祐, (鈴鹿医科)岩井彩夏, 森反俊幸, (関西大)大矢裕一, 大内辰郎, (岡山) 六雄伸吾, 吉澤秀和, (国循セ研)古菌勉, 藤里 俊哉, (東医歯大生研)岸田晶夫

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

【実験】 分子量および酸化度の異なる PVA はクラレ (株) より提供して頂いた。DNA としては、プラスミド DNA、サケ白子由来 DNA を用いた。種々の濃度の PVA 溶液および DNA 溶液を調整し、超高压処理装置 ((株)神戸製鋼所) を用いて様々な圧力下で所定時間印加した。得られた PVA/DNA ハイドロゲルの物性解析を力学強度測定、DSC 測定により行った。PBS 溶液に浸漬し、所定時間ごとの DNA 濃度の測定により、DNA の徐放解析を行った。さらに、放出された DNA をアガロース電気泳動により解析した。

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

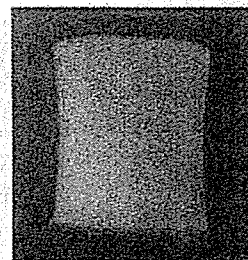


Fig. PVA/DNA hydrogel.

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

Tsuyoshi Kimura¹⁾, Kwangwoo Nam¹⁾, Sayaka Iwai²⁾, Toshiyuki Moritan³⁾, Yuichi Ohya³⁾, Tatsuro Ouchi³⁾, Shingo Mutsuo⁴⁾, Hidekazu Yoshizawa⁴⁾, Tsutomu Furuzono⁵⁾, Toshiya Fujisato⁵⁾ and Akio Kishida¹⁾

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

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

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

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

2C11

微小振動による細胞の接着制御の検討

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

1) 目的

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

2) 実験

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

3) 結果

図 1 および 2 は、それぞれ MEF 細胞を Non-treated 基材上で 1 時間培養した位相差顕微鏡写真である。1 は静置培養 (0Hz) および 2 は 10kHz で水平振動を行っている。図より明らかなように、2 の振動刺激を付加した方が、細胞の進展が良好である。元来、Non-Treated 基材上では細胞は接着し難いことが知られており、1 の 0Hz での結果は従来と同じ結果が得られている。2 では、水平振動を付加するだけで、細胞の偽足の進展や接着面積の増大が観察され、微小振動が接着機能に影響を与えていることが明確にわかる。

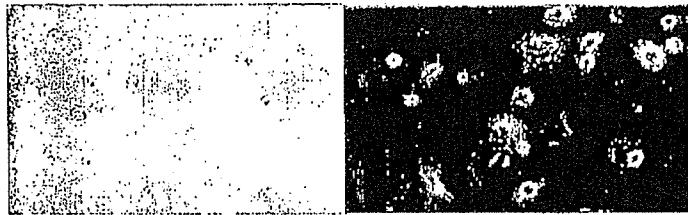


図 1 静置培養

図 2 振動培養

4) まとめ

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

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

2C12 生体素材を用いた組織再生

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

1. 緒言

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

2. 方法

クラウン系ミニブタ(株)ジャパンファーム)の心臓弁を清潔麻酔下にて採取し、4℃にて980MPa(10,000気圧)の超高静水圧印加処理を10分間行い、ドナー由来細胞を除去した(パワーグラフト処理)。同種ミニブタに、肺動脈弁は心補助下にて同所性に、大動脈弁は非補助下にて自己弁を有したまま下流域の下行動脈位に移植した。所定期間経過後に、超音波にて弁機能を評価した後、移植組織を摘出して免疫染色やSEM観察にて組織学的に評価した。

3. 結果と考察

再生型の循環器系組織移植では、特に、高い血圧に抗する必要がある動脈系への適用が問題となっている。我々の脱細胞化組織移植では、両組織とも移植血管の破裂等は認めなかった。肺動脈弁では、移植3及び6ヶ月後での超音波観察で、弁の機能不全も認めなかった。血管内腔面は、移植1ヶ月後においてほぼ内皮細胞で覆われており、3ヶ月後では完全に覆われていた。また、組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められ、移植期間が長くなるほど顕著であった。移植1ヶ月後では軽微な炎症反応が認められたが、3ヶ月後では完全に消失していた。また、石灰化も全く認めなかった。これに対し大動脈弁では、移植1ヶ月後において、弁葉内には石灰化は認めなかったが、導管部には石灰化を認めた。また、3ヶ月後では、弁葉は縮退しており、導管部の石灰化も顕著であった。

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

4. 結論

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

5. 謝辞

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

Tissue Regeneration by Acellular Tissue Scaffold. Toshia FUJISATO, Ken'ichi YOSHIDA*, Hiroshi NISHIOKA, Kazuya SAWADA, Kenji MINATOYA, Kazuo NIWAYA, Akio KISHIDA**, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA. National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 Email: fujisato@ri.ncvc.go.jp, *Foundation for Biomedical Research and Innovation, **Tokyo Medical and Dental University

2C13

生体由来繊維からの脱細胞化手法の開発

(国立循環器病センター・研究所) ○澤田和也*, 野木千賀子, 西岡 宏, 吉田謙一藤里俊哉,
中谷武嗣, 北村惣一郎 *現大阪成蹊短大

[緒言]

わが国では、現在年間9000件を超える心臓弁置換術が行われている。そのうち、7割は機械弁による置換であるが、継続した抗凝固剤の服用などQOL上の問題を抱えている。一方、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁は、化学的に処理されているため、種々の構造的劣化の問題が指摘されている。近年、凍結保存による組織バンクも整備されたが、わが国においては提供数が絶対的に不足しているという問題も残されている。

これらの諸問題を解決するため、我々は以前より組織工学および再生医療技術を駆使し、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去したマトリックスをスキファールドとして利用する検討を行ってきた。その結果、我々が開発した生体組織への超高压処理法を適用することにより、細胞成分や細菌・ウイルス等の除去あるいは、不活性化が可能となり、現在の生体弁では不可能な再生型の組織置換が期待される。しかしながら、我々の最近の研究により、それら従来の脱細胞化手法では細胞膜など一部の細胞成分について完全除去が困難であることが明らかとなった。また、それらの成分の残存が移植後の石灰化や拒絶反応と関連することも明らかとなりつつある。そこで本報では、生体由来組織の完全脱細胞化を目指し、その改良手法や新たな評価法の開発についての検討結果を報告する。

[実験]

川いた試料は、ブタ大動脈((株) ジャパンファーム)であり、冷間等方圧加圧(4℃、10,000気圧)処理により細胞破壊を行った後、所定時間の洗浄を行った。脱細胞化の評価は、残存する核の定量および主として細胞膜に起因するリン脂質のそれぞれを定量することにより行った。残存核の定量は、組織染色法と直接定量法を併用し評価した。組織染色においては、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、単位面積当たりの残存核数を未処理試料と比較することによる相対評価を行った。また、直接定量においては、試料を溶解させた溶液をQIAGEN社製のDNeasyを用いて精製し、紫外部での吸光度変化から常法によりDNAの定量を行った。また、リン脂質の定量は、既報¹⁾に準じて行った。

[結果および考察]

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

1) 澤田和也ら、平成17年度繊維学会秋季研究発表会要旨集、p51

The methods for decellularization of tissue, Kazuya Sawada: Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565. Tel 06-6833-5012, Fax 06-6835-5496, e-mail sawada@ri.ncvc.go.jp