

演題 1. 再生型組織移植のための脱細胞化処理法の開発

藤里 俊哉¹⁾、澤田 和也²⁾、寺田 堂彦¹⁾、吉田 謙一³⁾、船本 誠一¹⁾、湊谷 謙司¹⁾、
庭屋 和夫¹⁾、岸田 晶夫¹⁾、中谷 武嗣¹⁾、北村惣一郎¹⁾
国立循環器病センター¹⁾、大阪成蹊短大²⁾、先端医療振興財団³⁾、東京医科歯科大学⁴⁾

脱細胞化組織を用いた再生型組織移植では、移植後に患者細胞が浸潤することで、生物学的な自己修復の機転や患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。既に、米国企業やヨーロッパ諸国の研究グループによって、脱細胞化同種あるいは異種心臓弁・血管組織の臨床例が報告されつつある。しかしながら、移植後早期の不全例も明らかとなっており、不十分な脱細胞化処理が原因ではないかとの指摘も行われている。我々は、独自技術による脱細胞化処理法（パワーグラフト法）を開発し、動物実験によってその有効性を検討している。

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及び心臓弁を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた10,000気圧の超高压印加処理、続いて残渣除去処理を行うことで、組織内細胞を除去した。処理後の組織について、通常の組織学的観察の他、組織内のDNA並びに他の細胞成分の分析を行った。

昨年度のミニブタを用いた同種移植実験においては、肺動脈弁置換移植では有効な成績が得られたが、下行大動脈置換移植では石灰化や狭窄の所見が認められた。この理由については明らかではないが、両組織では厚みや構造タンパク質の組成、血圧等の血行動態に違いがある。また、石灰化については、組織内のエラスチンやリン脂質成分が起点となる可能性が報告されている。そこで、脱細胞化処理後の細胞内成分の残存について検討したところ、組織内のDNA量は1割以下に低下していたが、リン脂質成分は殆どが残存していた。この点について改良を行い、残渣除去処理における媒体を変えることで、リン脂質成分が除去できることを確認した。また、エラスチンの部分的な除去についても検討を行った。脱細胞化肺動脈弁はロス手術のホモグラフトの代替としての有用性はあるが、再生型大動脈弁組織がより求められている。これらについて動物実験を進めることで、数年以内の臨床応用を目指したい。

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

4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY (ETES)
Munich, Germany Aug. 31st – Sep. 3rd 2005

In-situ regeneration

198

NANO-VIBRATING CELL CULTURE SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING

Akin Kishida, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Toru Masuzawa
Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
2-3-18 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, JAPAN

One of key factors affecting the effective application of tissue engineering is the handlings of cells. Especially, providing the large amount of cell is one of the major concern. 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 report the effect of 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. As basic study to use this system to stem cell culture, porcine bone marrow cell (PBMC) was cultured on this equipment. The same kind of effect on PBMC was observed. These findings may lead to a novel cell culture systems to proliferate and control stem cells.

Vascular Engineering

074

REGENERATIVE VASCULAR GRAFT MADE OF COLLAGEN FIBER

Toshin FUJISATO, Norihisa SASAYAMA, Meng YIN, Sachiko YAMAZAKI, Kenji MINATOYA, Akiro KISHIDA, Takeshi NAKATANI, Hisateru TAKANO, Hiroyuki HATTORI
National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-1, Suita, Osaka, JAPAN

Regenerative grafts have been widely studied to be applied to pediatric patients by their growth potential after the implantation. A regenerative profile of a novel collagen graft was studied in a porcine model. The collagen graft may be digested by infiltrated cells and show a different profile from artificial biodegradable materials.

The regenerative collagen grafts of 2.5 cm in length and 6 mm in diameter were made of cross-linked porcine collagen fibers and were implanted at the descending aorta in miniature pigs. The pigs were then sacrificed at 4 and 8 weeks after the implantation and the grafts were examined by histologically.

There was no dilatation, no aneurysmal change, and no thrombus formation observed after the implantation. The vessel wall was newly reconstructed with parallel alignment of smooth muscle cells and elastin and collagen fibers. There was no calcification detected in the explanted tissue. The inner surface of the grafts was completely covered with endothelial cells after 8 weeks.

The novel regenerative collagen graft may be used in the aortic system and applied to pediatric patients

341 超高压技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用

東医歯大 ○木村 剛 東医歯大 南 広祐 関西大 大矢 裕一
 関西大 大内 辰郎 岡山大 六雄 伸吾 岡山大 吉澤 秀和
 国循セ研 岡田 正弘 国循セ研 古菌 勉 国循セ研 藤里 俊哉
 東医歯大 岸田 晶夫

[緒言]

超高压技術は、無機・有機科学、医療、食品分野等で幅広く利用されており、例えば、人工ダイヤモンドの合成や食品の加工、滅菌に用いられている。また学術的研究のひとつとしては、タンパク質の変性に関する熱力学パラメータの一つとして圧力が検討されている。クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などを介して様々な構造と機能を有するタンパク質は、圧力印加によりそれらの相互作用の変化により変性し、高圧下においては、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[1, 2]。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を得られることを報告した。また、これらの構造体のドラッグデリバリーシステムへの利用を目的とし、天然由来の水素結合高分子であるDNAとPVAとの混合系へ超高压を印加した結果、PVA/DNA複合体を得られ、細胞への遺伝子導入が達成された[3]。

本研究では、構造体へのさらなる機能付与を目的とし、無機粒子と水素結合性高分子の混合系への超高压印加により、新規な無機粒子/水素結合性高分子複合体の創製に関して検討した。無機粒子としては、ハイドロキシアパタイト (HAP) を選択した。HAPは、リン酸カルシウムの結晶体であり、骨の成分であることから生体適合性が高く、従来よりバイオマテリアルとして用いられている。これまでに我々は、新しいHAPのナノ粒子化法を開発し、種々の高分子との複合材を創出してきた。複合材は、細胞への高い親和性を示し、また、高分子の物性を損なわないことを報告してきた[4]。

[実験]

水素結合性高分子としては、PVA、デキストラン (DEX)、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた (表1)。用いたHAPは、マイクロエマルジョン法により調整し、形態の制御された種々のスケール (50~400 nm) のナノHAP粒子を得た。また、異なる結晶化度のナノHAP粒子も調整した。まず、ナノ粒子を含有したPVA粒子を作製するため、低濃度PVA水溶液(0.

01~1%) とナノHAP粒子 (0.01~10 mg/ml) を種々の割合で混合し、超高压処理装置 (Dr. CHEF; (株) 神戸製鋼所) にて40℃、10000気圧で所定時間加圧した (超高压処理)。得られた混合液を目視および顕微鏡下で観察し、SEM観察、AFM観察、FT-IR測定により物性解析を行った。次に、HAP含有ハイドロゲルを作製のため、高濃度PVA水溶液 (5%以上) とナノHAP粒子 (0.01~10 mg/ml) を種々の割合で混合し、超高压処理を施した。さらに、天然由来の水素結合性高分子として種々のDNA (プラスミドDNA、サケ白子DNA、1kb ラダーDNAマーカー) を選択し、DNA水溶液を上記のPVA、ナノHAP混合液と混合し、超高压処理を施し、三成分系の粒子、ハイドロゲルを作製した。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、DNA染色法等の検討により評価した。上記複合材の細胞親和性、細胞への遺伝子導入を検討するため、マウス由来の繊維芽細胞 (L929)、マクロファージ (RAW264)、ラット骨髄細胞を用いた。ラット骨髄細胞は、ラット大腿骨より採集し、培養シャーレ播種後、接着した細胞を使用した。

Table 1. Various hydrogen bonding polymers used.

PVA	D.P.*1	D.S.*2	M.W.
PVA105	500	98.5	22000
PVA117H	1700	99.3	74800
PVA140	4000	99.8	176000
PEG	400	—	8000
Dextran	—	—	15000

*1 : D. P. → Degree of polymerization

*2 : D. S. → Degree of saponification

[結果と考察]

種々の分子量のPVA水溶液とナノHAP粒子を混合し、超高压処理を施した。高分子量のPVA (PVA117H、PVA140) を低濃度 (1%以下) で用いた場合、PVA溶液と同様にナノ粒子、微粒子が濃度依存的に得られた。一方、低分子量のPVA105では、ナノ粒子、微粒子は得られなかった。これらより、用いるPVAの分子量をコントロールすることで複合体形成

を制御できること明らかとなった。また、DNAを混合した場合においても、ナノ粒子、微粒子（PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体）が得られ、種々の細胞への遺伝子導入を行った。マウスマクロファージ様細胞であるRAW264細胞の場合、DNA単独では全く遺伝子発現が認められなかったが、PVA/DNA複合体およびPVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体で遺伝子発現が認められた。一方、ラット骨髄細胞においては、PVA/DNA複合体では遺伝子発現が認められず、PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体で有意な遺伝子発現が示された。これらの結果は、RAW264細胞は貪食能が高いため、両方で遺伝子発現が示されたが、一方のラット骨髄細胞は、比較的低い貪食能であるためPVA/DNA複合体では発現が認められず、PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体では、HA p の高い細胞親和性とエンドサイトーシス経路でのpH低下によるHA p の溶解に伴うエンドソーム破壊のために有意な遺伝子発現が認められたと考察している。

高濃度PVA溶液（5%以上）への超高压処理においては白色のハイドロゲルが得られ、PVA溶液の濃度上昇に伴うハイドロゲルの力学的強度の向上が示された。また、DNAの混合系においても白色のハイドロゲルが得られ、青色のDNA染色剤で得られたハイドロゲルを染色した結果、青色に染色されたハイドロゲルが得られた。PVAハイドロゲルの場合にはほとんど染色されなかったことから、DNAを含有したハイドロゲルが得られたと考えられる。これらの結果は、超高压技術を用いることで、無機・有機ハイブリッド材料を容易に作製できることを示している。得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を検討した。5、48時間培養後のラット骨髄細胞の接着結果を図1に示す。5時間後では、ナノHA p 粒子を含有しないPVAハイドロゲル（図1(A))に比べ、ナノHA p 粒子/PVAハイドロゲル（図1(B))での接着細胞数の有意な増加が認められた。また、後者においては、48時間培養後で十分な細胞の伸展が認められた（図1(C))。これら結果より、ナノHA p 粒子の複合化による機能性の付与と生医学領域

【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

【参考文献】

- 1) E. Doi, A. Shimizu and N. Kitabatake, in: R. Hayashi (Ed.), High Pressure Bioscience and Food Science, Sanei Press, 171(1993)
- 2) E. Doi, A. Shimizu and N. Kitabatake, Food Hydrocol. 5, 409(1991)
- 3) T. Kimura, A. Okuno, K. Miyazaki, I. Furuzono, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, Y. Kitamura,

T. Fujisato and A. Kishida, Mater. Sci. Eng. C, 24, 797(2004)

4) T. Furuzono, S. Yasuda, T. Kimura, J. Tanaka and A. Kishida, J. Artifi. Org., 7, 137(2004)

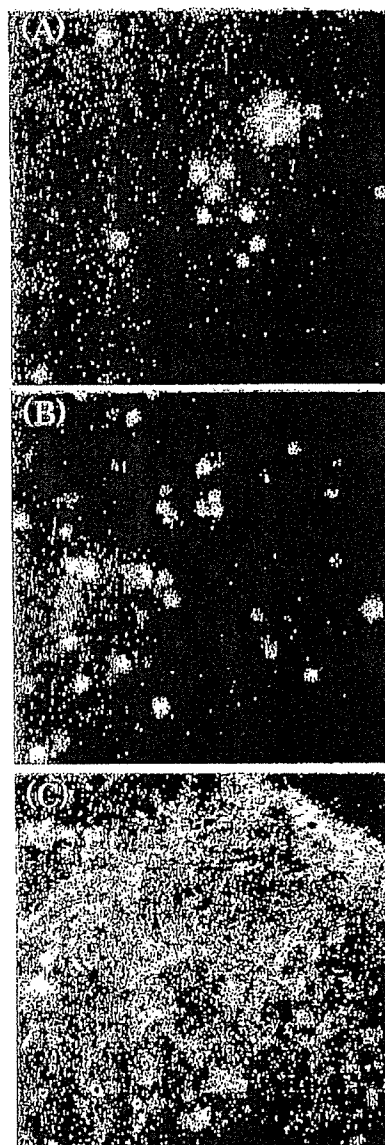


Fig1. Fluorescent images of the adhesion of rBMC cells stained by calcein-AM on nano-HAp/PVA composite hydrogel after (A)5h and (B) 48h incubation.

459 脱細胞化生体組織の再生医療用スキャフォールドとしての応用

東医歯大 ○岸田晶夫 国循セ研 藤里俊哉 東医歯大 木村剛
 国循セ 中谷武嗣 国循セ 湊谷謙司 国循セ 庭屋和夫
 国循セ 北村惣一郎

〔緒言〕

細胞を積極的に用いる再生医療においては、重要な基盤技術のひとつとして細胞の足場（スキャフォールド）材料の開発がある。合成高分子であるポリ乳酸やその誘導体を用いられているが、成形性の低さや力学特性により、複雑な構造の組織、軟組織、動的組織への利用は困難と考えられる。生体由来の高分子であるコラーゲンは、優れた細胞接着性等の生理活性を有することから研究が盛んになされているが、その低い力学強度の改善が課題となっている。無機材料であるハイドロキシアパタイトは骨の成分であることから骨再生足場として用いられているが、成形加工の難しさや硬くて脆い物性から用途の制限などのいくつかの問題点を残している。最近では上記のような成分のビルドアップによる組織構築ではなく、生体組織そのものを用いる試みがなされている。ブタ、ウシ等の動物の組織から細胞を除去（脱細胞化）し、構造組織だけにして用いる方法である。この方法では、生体組織そのものといってよいような、しなやかさと強さを有しており、複雑な形態の組織や高機能な組織への適用が可能と考えられる。また、生体の組織構造を保持している点で組織の早期再生が期待できる。脱細胞化法としては、界面活性剤や酵素を用いる方法が試みられているが、組織深部の脱細胞化が困難であり、脱細胞中のコンタミ、力学強度の低下など解決すべき問題が残る。我々は、このような諸問題をふまえて、超高压技術を用いた新しい脱細胞化法の開発を行っている。生体組織に超高压処理を施すことで、細胞を破壊し、マイクロ波照射により細胞残渣を洗浄する手法である。本手法では、従来の界面活性剤や酵素を用いた方法と比較し、力学特性を保持した状態での脱細胞化が可能であり、また、細胞だけでなく菌、ウイルスを除去可能であり、高い滅菌性を示す。本研究では、超高压処理法により得られた脱細胞化

生体組織の再生医療用スキャフォールドとしての応用について、種々の組織を用いて検討した。

〔実験〕

成体ブタの心筋、血管、大腿骨を購入し、各組織を所定のサイズに調整した。冷間等方圧加圧装置（（株）神戸製鋼所）を用いて、種々の温度で10000気圧、10分間印加した（超高压印加処理）。この時、10000気圧への昇圧速度を変化させ、昇圧による温度上昇を制御した。その後、各組織を種々の培養液に浸漬し、種々の振とう洗浄により細胞成分の残渣を除去した。得られた脱細胞化組織標本の組織断面をヘマトキシリン-エオジン染色（HE染色）により顕微鏡観察し、SEM観察にて表面構造を解析することで脱細胞化を評価した。また、処理組織よりDNAを抽出し、定量することで脱細胞化率を算出した。さらに、抽出DNAを用いて、ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のDNAをPCR反応にて増幅後、PCR産物の電気泳動を行うことで、処理組織内のPERVを測定した。脱細胞化組織の組織再構築を目的とし、新しい細胞を組織表面あるいは組織内に播種した。

〔結果と考察〕

超高压印加処理における昇圧速度の系内温度への影響は大きく、急激な昇圧による急激な温度上昇による組織の構造変化への影響が考えられる。そこで、様々な昇圧速度で加圧し、系内温度の変化を調査した。比較的穏和な昇圧速度で各組織への超高压印加処理を施した結果、急激な温度上昇は認められず、安定した温度条件での組織への超高压印加が可能であった。次に、洗浄期間の脱細胞化への影響を検討するため、種々の洗浄期間の組織標本をHE染色し、光学顕微鏡観察およびDNAの定量にて評価し

た。脱細胞化処理後の組織内の細胞核数は、洗浄期間に依存し、洗浄初期では染色された細胞核が観察されたが、長期間の洗浄により細胞核は全く確認されなくなった（図1-C）。DNA定量においても同様の傾向が示された。また、洗浄初期では組織表面の付近の脱細胞が観察され、洗浄期間の延長に伴い深部での脱細胞化が達成された（図1-A, B, C）。完全脱細胞化組織のPERVのDNAは検出されなかった。これまでに報告されている酵素（トリプシン）処理法にて完全脱細胞化した組織では、組織構造の大きな変化が認められるのに対し、本手法では細胞化組織構造の保持が示された。上記の結果は、心筋、血管においてほぼ同様の結果であり、また、大腿骨、肺、肝臓においても本手法により完全脱細胞化が達成された。

脱細胞化組織を再生医療用スキャフォールドとして用いるためには、新しい細胞が脱細胞化組織に生着する必要がある。そこで、新しい細胞による脱細胞化組織の再構築を試みた。脱細胞化組織上に細胞を播種し、所定期間培養後、生着細胞数の計測とDNA定量を行った。また、マイクロリングを用いて脱細胞化組織への細胞注入を行い、上記と同様に評価した。細胞播種法では、培養期間の延長に伴う生着細胞数の増加が示されたが、細胞注入法では、有意な細胞数の増加は認められなかった。これは、細胞表面に比べ組織内での栄養、酸素等の十分な供給がなされなかったと考えられ、今後の課題として効率的な培養装置の開発の検討が必要である。

[謝辞]

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研究費の補助を受けて行われた。

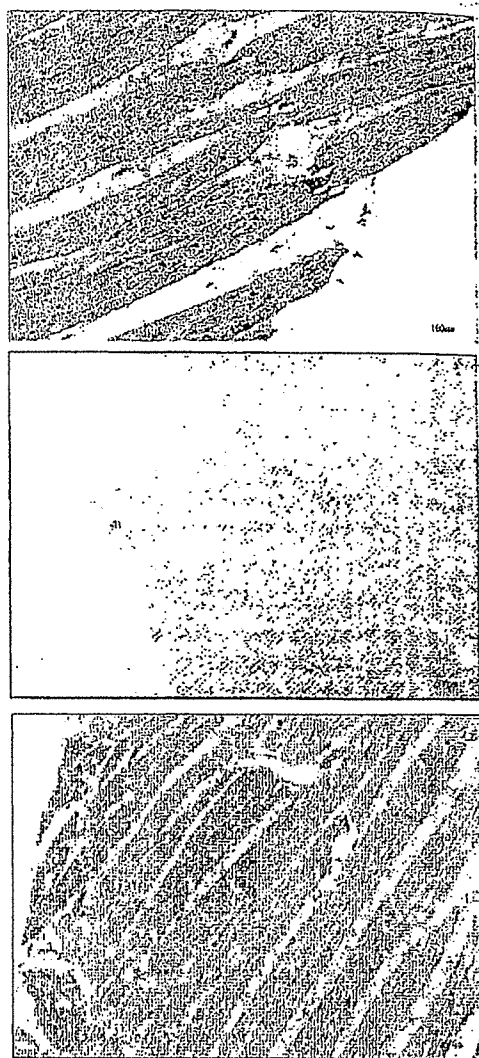


図1. 心筋組織のHE染色標本。(A) 未処理、(B) 超高压処理後、洗浄3日間、(C) 超高压処理後、洗浄14日

生体素材を用いた再生型人工心臓弁

国循セ ○藤里俊哉・吉田謙一・船本誠一・湊谷謙司・庭屋和夫
中谷武嗣・北村惣一郎
東医歯大 岸田晶夫

【緒言】

現在、我が国において人工大動脈弁は年間1万2千個が輸入販売されている。パイロライトカーボン製の機械弁とブタ心臓弁を架橋処理した生体弁とがあるが、いずれも生体にとっては異物であり、自己組織と置き換わることはない。このため、細菌感染に弱く、機械弁では血栓付着、生体弁では石灰化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成長性が欠如しているという欠点もある。近年、移植後に自己組織と置換される素材を用いた組織再建が臨床応用され始め、東京女子医大グループによる再生型血管や、ドイツ・フンボルト大学グループによる再生型心臓弁が報告されている。我々は、細胞を除去した生体組織を用いた再生型心臓弁の開発を目指している。

【実験】

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の超静水圧印加処理を10分間行い、組織内細胞を除去した。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、超音波診断装置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。

【結果と考察】

再生型組織移植では、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。本脱細胞化心臓弁では、移植後の破裂等は認めなかった。移植6ヶ月後、肺動脈弁では弁の機能不全は認められず、内腔面は血管内皮細胞で完全に覆われていた。組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。炎症反応や石灰化は全く認められなかった。これに対し、大動脈弁では弁葉の縮退が認められた。これは移植後に弁葉が有効に機能していないためと考えられた。内腔面は血管内皮細胞で完全に覆われていたが、組織内部には石灰化が認められ、炎症細胞の浸潤も認められた。移植後に判明したことであるが、本細胞除去処理ではリン脂質の残存が認められ、大動脈弁組織での石灰化の要因となった可能性がある。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考えられる。臨床現場では、肺動脈弁よりも大動脈弁をより必要としている。現在、リン脂質等の細胞成分をより除去した大動脈弁の移植実験を進めており、早期の臨床応用を目指している。

【謝辞】

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、文部科学研究費、科学技術振興調整費、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。

Regenerative Heart Valve using Acellular Tissue.

Toshia FUJISATO, Kenichi YOSHIDA, Seiichi FUNAMOTO, Kenji MINATOYA, Kazuo NIWAYA, Akio KISHIDA*, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA

(National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. *Tokyo Medical and Dental University) Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

Key Word: tissue engineering / acellular tissue / heart valve /

Abstract: Aortic and pulmonary heart valves were isolated from miniature pigs under the sterile condition. They were washed immediately and treated by cold isostatic pressing of 980 MPa followed by washing at 4°C for cell disruption and removal. The acellular tissues were transplanted to allogenic miniature pigs. The grafts were explanted and subject to the histological study after 6 months. The grafts were completely cell free after the tissue treatment. There was no dilatation, no aneurysmal change, and no thrombus formation observed in all cases of the both tissues after transplantation. In the pulmonary valve study, the inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by cells from both sides of endothelium and outer tissue. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells mainly by smooth muscle cells. There was no inflammation and calcification observed in the tissue. In the aortic valve study, the endothelium and cell infiltration was same as the pulmonary valve study, however intimal proliferation was notable and calcification was observed along to elastic fibrils in a middle area of the acellular graft. Acellular heart valves processed by cold isostatic pressing were well infiltrated by host cells after transplantation. However, remodeling process may be different in between aortic and pulmonary tissues.

3X01

超高压法によるナノ無機粒子/高分子コンポジットの調製と 遺伝子キャリアーへの応用

(東医歯大 生材研) ○木村 剛、南 広祐
(関西大 工) 大矢 裕一、大内 辰郎
(岡山大 環境理工) 六雄 伸吾、吉澤 秀和
(国循七研) 岡田 正弘、古籔 勉、藤里 俊哉
(東医歯大 生材研) 岸田 晶夫

【緒言】

我々は、超高压下（6000 気圧以上）における物質の水素結合の強調性に注目し、超高压法による水素結合を介した分子集合体の形成に関して検討している。これまで、種々の水素結合性高分子への超高压印加により、ナノ粒子、微粒子、そしてハイドロゲルが形成されることを明らかにした。本研究では、水素結合性分子集合体への新たな機能性の付与を目的として、ナノスケールのハイドロキシアパタイト (HAp) 焼結体と水素結合性高分子とのコンポジットの調整について検討した。ナノ HAp との複合化による細胞親和性、力学特性等の向上が期待できる。また、天然の水素結合性高分子である DNA を用い、ナノ HAp と水素結合性高分子からなる三成分系コンポジットの調整、さらに、それらのコンポジットの細胞親和性および細胞への遺伝子送達を検討したので合わせて報告する。

【実験】

水素結合性高分子のモデルとしてポリビニルアルコール (PVA) を選択し、種々の分子量、酸化度の PVA を用いた (表 1)。これらはクラレ (株) より提供していただいた。ナノ HAp は、マイクロエマルジョン法により調整し、形態の制御された種々のスケール (50~400nm) のナノ HAp 粒子を得た。また、異なる結晶化度のナノ

Table 1. Various polyvinyl alcohol used.

PVA	D.P.*1	D.S.*2	M.W.
PVA105	500	98.5	22000
PVA117H	1700	99.3	74800
PVA140	4000	99.8	176000

*1 : D. P. → Degree of polymerization

*2 : D. S. → Degree of saponification

Preparation of inorganic nanoparticles/polymer composite for gene carrier

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, Yuichi OHYA¹⁾, Tatsuro OUCHI¹⁾, Shingo MUTSUO²⁾, Hidekazu YOSHIZAWA³⁾, Tsutomu FURUZONO³⁾, Toshiya FUJISATO³⁾, Akio KISHIDA

(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ¹⁾Kansai University, ²⁾Okayama University, ³⁾National Cardiovascular Center Research Institute)

Tel&Fax: 03-5280-8029, e-mail: kimurat_fm@tmd.ac.jp

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

Abstract: In order to form inorganic particles/polymers composites, nano-scaled hydroxyl apatite (HAp) and polyvinyl alcohol (PVA) having various molecular weights were mixed at different concentration and treated by ultra high pressure processing. In the case of higher PVA concentration, hydro gels containing nano-HAp particles were obtained. The good cell adhesion on the hydro gel was showed. At lower PVA concentration, the particles of the nano-HAp particles/PVA composites or nano-HAp/PVA/DNA composites were formed, which also showed effective DNA delivery.

HAp 粒子も調整した。PVA 水溶液とナノ HAp 粒子を様々な割合で混合し、超高压処理装置 (Dr. CHEF : (株) 神戸製鋼所) にて 40°C、10000 気圧で所定時間加圧した (超高压処理)。得られた混合液を目視および顕微鏡下で観察し、SEM 観察、FT-IR 測定により物性解析を行った。また、天然由来の水素結合性高分子として DNA (プラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー DNA マーカー) を選択し、種々の濃度で DNA 水溶液、PVA 水溶液およびナノ HAp を混合し、超高压処理を施した。DNA との構造体形成については、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。さらに、マウス由来の繊維芽細胞 (L929)、マクロファージ (RAW264)、ラット骨髄細胞 (rBMC) を用いて、HAp/PVA コンポジットおよび HAp/PVA/DNA コンポジットへの細胞接着性と遺伝子導入について検討した。

[結果と考察]

種々の分子量の PVA 水溶液とナノ HAp を様々な割合で混合し、超高压処理した。高分子量の PVA (PVA117H、PVA140) を高濃度 (5%以上) で用いた場合、ハイドロゲルが得られ、低濃度 (1%以下) では、ナノ粒子、微粒子が得られた。一方、低分子量の PVA105 においては、ハイドロゲル、粒子は作製されなかった。これらより、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構造体形成を制御できることがわかった。上記で得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を調査した。5時間培養後の rBMC の接着結果を図 1 に示す。ナノ HAp を含有しない PVA ハイドロゲル (図 1(A)) に比べ、ナノ HAp/PVA ハイドロゲル (図 1(B)) において有意な接着細胞数の増加が認められた。また、後者においては細胞の伸展も認められ、これらより、ナノ HAp による機能性の付与が示された。

次に、PVA/HAp 水溶液に、DNA を混合し超高压処理を施した。上記と同様に、高分子量 PVA の場合に、高濃度でハイドロゲルが、低濃度で粒子が得られた。DNA の含有は、ハイドロゲルでは染色法を、粒子では熱融解後の溶液のアガロースゲル電気泳動により確認した。ハイドロゲルでは、DNA の十分な染色が示され、また、アガロースゲル電気泳動においても DNA のバンドが確認できた。これらより、ナノ HAp/PVA/DNA から成る三成分系コンポジットの形成が示された。発表では、培養細胞を用いた遺伝子導入について詳細に報告する。

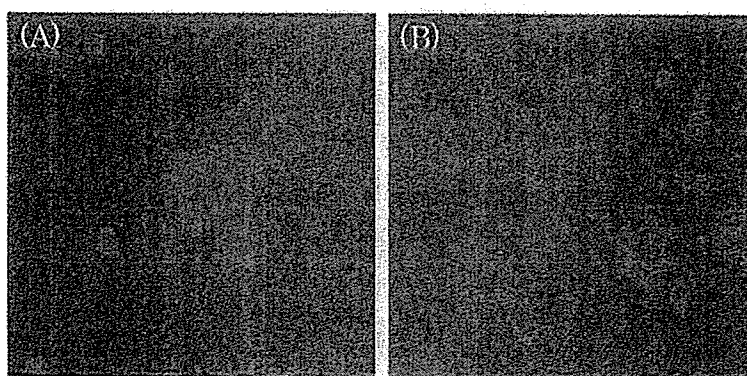


Fig1. Fluorescent images of the adhesion of rBMC cells stained by calcein-AM on (A) PVA hydro gel and (B) nano-HAp/PVA composite hydro gel.

2X18

ナノ無機粒子を内包した超高压誘起PVA/DNA複合体による
細胞への遺伝子導入

(東医歯大 生材研) ○木村 剛、南 広祐
 (関西大 工) 大矢 裕一、大内 辰郎
 (岡山大 環境理工) 六雄 伸吾、吉澤 秀和
 (国循セ研) 岡田 正弘、古藺 勉、藤里 俊哉
 (東医歯大 生材研) 岸田 晶夫

【緒言】

培養細胞への遺伝子送達法の一つであるリン酸カルシウム法は、安価かつ簡便であるため従来から用いられている。しかしながら、高い凝集性およびその制御の困難さによる低い再現性が問題として挙げられている。これまで、片岡等は、ポリエチレングリコールとポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体を用いて、DNA とリン酸カルシウム微結晶を内包する単分散な高分子ナノミセルを開発し、オリゴDNA、siRNA の細胞内送達に成功している。本研究では、リン酸カルシウムの物性制御による遺伝子導入効率の向上を目的とし、結晶化度、サイズが精密に制御されたハイドロキシアパタイト (HAp) 単結晶粒子を用いて、超高压印加法による HAp 粒子を内包した PVA/DNA 複合体の調整について検討した。また、培養細胞への遺伝子導入についても検討したので報告する。

【実験】

分子量および酸化度の異なる PVA を用いた。これらはクラレ (株) より提供していただいた。マイクロエマルジョン法により、形態、結晶化度、サイズが制御された HAp 粒子を調整した。DNA としてプラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー DNA マーカーを用いた。種々の濃度に調整した PVA 溶液に HAp 粒子を混合し、超音波処理を施すことで HAp 粒子を分散させた。さらに、所定濃度の DNA 水溶液を混合し、超高压処理装置 (Dr. CHEF ; (株) 神戸製鋼所) を用いて 37°C、10000 気圧、10 分間の超高压処理

Gene transfection into mammalian cells using PVA/DNA complexes encapsulating inorganic nanoparticles

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, Yuichi OHYA¹⁾, Tatsuro OUCHI¹⁾, Shingo MUTSUO²⁾, Hidekazu YOSHIKAWA³⁾, Tsutomu FURUZONO³⁾, Toshiya FUJISATO³⁾, Akio KISHIDA

(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ¹⁾Kansai University, ²⁾Okayama University, ³⁾National Cardiovascular Center Research Institute)

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

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

Abstract: Polyvinyl alcohol (PVA)/DNA complexes encapsulating nano-scaled hydroxyl apatite (HAp) particles were formed by ultra high pressure processing. The good dispersiveness of them was showed comparison with the nano-HAp particles/DNA complexes. Using fluorescent labeled DNA molecules, the cellular uptake of the PVA/DNA complexes encapsulating nano-HAP was investigated. The intracellular distribution of them was observed by fluorescent microscope. The high transfection efficiency was achieved using PVA/DNA complexes encapsulating nano-HAP, suggesting the effective DNA release from endocytosis.

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

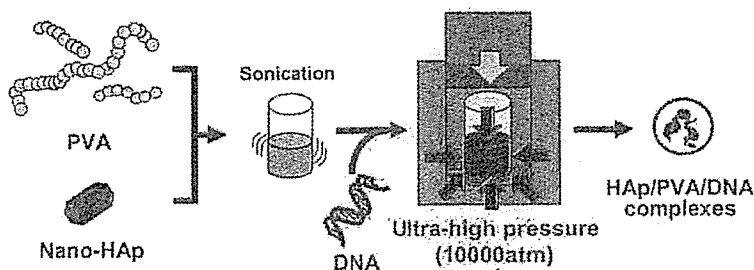


Fig1. Preparation of PVA/DNA complexes encapsulating HAp particles

【結果と考察】

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

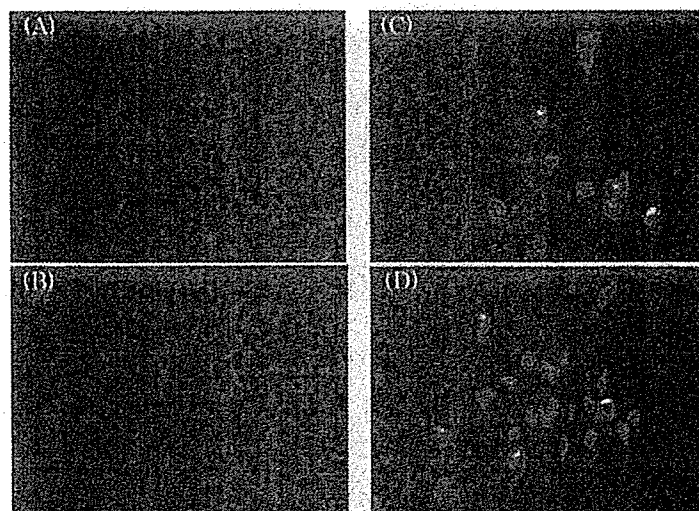


Fig2. Gene expression in cells transfected by (A) DNA, (B) nano-HAp/PVA/DNA mixture, (C) nano-HAp/PVA/DNA complex and (D) Lipofectamine2000.

No.534

Exhibition Area-I (3F)

24rd

Host cell infiltration to transplanted acellular allografts in porcine model

Toshia Fujisato^{1*}, Meng Yin^{2,3}, Kenji Minatoya¹, Kazuo Niwaya¹,
Akio Kishida⁴, Takeshi Nakatani², Soichiro Kitamura¹

¹Regenerative Medicine&Tissue Engineering, ²Organ Transplantation, ³Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, Osaka 565-8565, Japan, ⁴Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-0052, Japan

⁵Current Institution: Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Second Medical University

*Email:fujisato@ri.ncvc.go.jp

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

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

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

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

超高静水圧印加処理による生体組織からの細胞除去と再生医療への応用

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

Decellularization of biological tissue by ultrahigh pressure treatment and its application to regenerative tissue transplantation
Toshio FUJISATO, Ken'ichi YOSHIDA, Seichi FUNAMOTO, Kenji MATOYA, Kazuo NIWAYA, Noritoshinaga YA,
Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA (National Cardiovascular Center)
Akio KISHIDA (Tokyo Medical and Dental University)

1. はじめに

欠損した生物組織の再建には基材となる素材が欠かせない。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。このため、細菌感染に弱く、人工心臓弁では石灰化等によって機能不全に至ることも多い。また、小児患者においては体の生育に伴った基材の成長性が欠如しているという欠点もある。最近、移植後に自己組織と置き換わる素材を用いた再生型の組織再建法が臨床応用され始め、東京女子医大グループによる生体吸収性材料を用いた血管再生や、ドイツ・フンボルト大学グループによる脱細胞化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建を目指している。生物組織の脱細胞化方法としては、界面活性剤や酵素、低あるいは高張液等を用いた薬液への浸漬処理が報告されている。我々は、超高静水圧印加によって生物組織内の細胞やウイルスを破壊し、続けて洗浄処理によって細胞を除去する方法を開発した。本報では、ミニブタ組織の脱細胞化処理と、その心臓弁および血管を用いた同種移植実験の結果について報告する。

2. 実験方法

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

3. 結果と考察

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

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

本報告で用いた脱細胞化処理は、後の分析からリン脂質の残存が認められ、大動脈組織での石灰化の要因となっている可能性がある。しかし、肺動脈組織では石灰化が認められなかったため、組織の厚みなどの複合要因の可能性もある。現在、石灰化の原因と推定されるリン脂質やエラスチン繊維を取り除いた脱細胞化組織の移植実験を進めており、早期の臨床応用を目指している。

謝辞

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

2003

超高静水圧処理による分子集合体の開発

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

Development of molecular assembly by ultra high pressure technology

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, (Tokyo Med. Dent. Univ.) Shingo MUTSUO, Hidekazu YOSHIZAWA (Okayama Univ.)

Toshiya FUJISATO (National Cardio. Center Res. Inst.), Akio KISHIDA (Tokyo Med. Dent. Univ.)

1. はじめに

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

2. 実験方法

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

3. 結果と考察

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

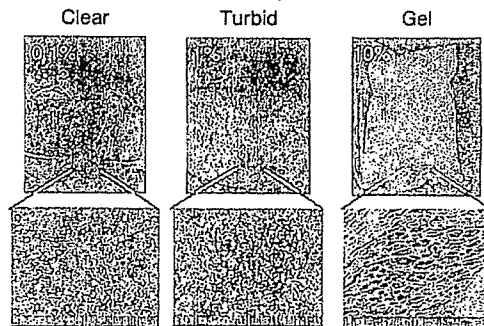


Fig1. Ultra-high pressure treatment of PVA solutions at various concentrations

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

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

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

参考文献

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

バイオスキャフォールド調整に向けた生体由来組織の超臨界流体処理

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

Preparation of bio-scaffold utilizing supercritical fluid extraction method

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

1. はじめに

わが国では、現在年間1万件を超える心臓弁置換術が行われている。そのうち、7割は機械弁による置換であるが、継続した抗凝固剤の服用などQOL上の問題を抱えている。一方、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁は、化学的に処理されているため、種々の構造的劣化の問題が指摘されている。一方、これらの諸問題を解決する新たな手段として、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去(脱細胞化)したマトリックスをスキャフォールドとして利用する試みが注目を集めている。脱細胞化手法として最も代表的なものは、界面活性剤水溶液や酵素活性を利用し、細胞毒性を有する界面活性剤の残存や、細胞成分の完全除去については未だ多くの問題点が残されている。

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

2. 実験方法

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

3. 結果と考察

図1は、処理圧力を変化させ一定時間の超臨界二酸

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

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

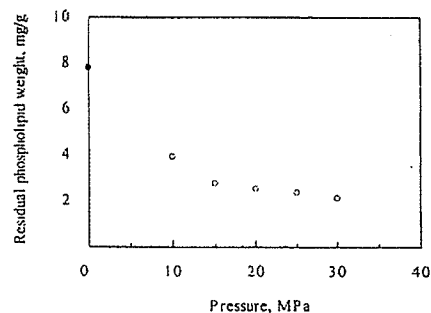


Figure 1 The dependence of residual phospholipid weight on the supercritical fluid pressure in extraction process (the treatment time and the temperature are constant, 60 min and 37 °C respectively). The solid circle means the control value.

参考文献

[1] 澤田和也ら、平成17年度繊維学会秋季研究発表会要旨集

2PA02

超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製

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

1. 緒言

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

2. 実験

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

Table 1. Various polymers used

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

3. 結果と考察

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

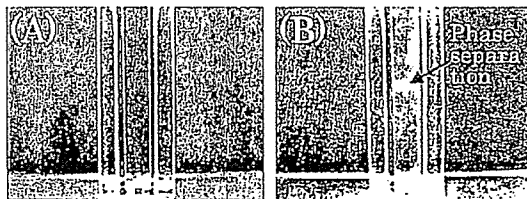


Fig1. Photographs of the mixtures of PEG (No.1) and dextran (No5) (A) without or (B) with ultra high pressure treatment.

さらに PEG/DEX 混合液への超高压印加処理では、高分子量の DEX (No4, 5) を用いた場合に水性二相を形成し、下相 (DEX 相) が青白色を呈した (図 1)。より高い分子量の DEX (Mw=500,000) を用いると、超高压を印加しない場合でも分子量 6,000 と 8,000 の PEG とで水性二相を形成することから、この現象は超高压による DEX 単独あるいは PEG との多成分構造体の形成に伴う見かけの分子量の増加による水性二相形成と考えられる。DLS 測定を行った結果、いずれの場合も粒子径の増加が観察され、超高压印加による新規多成分構造体が形成したと考えられる。この他に、PEG/DEX 構造体の詳細な解析、デンプンへの超高压印加による構造体形成の検討について報告する。

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

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

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

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

³Okayama Univ. ⁴National Cardiovascular Center Research Institute)

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

C-407

再生医療用バイオスキャフォールド作製のための構造タンパク加工

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

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

1. 緒言

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

2. 実験

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

3. 結果と考察

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

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

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

P-108

脱細胞化したミニブタ血管の同種移植

○藤里俊哉、吉田謙一¹⁾、船本誠一、湊谷謙司、庭屋和夫
岸田晶夫³⁾、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎
国立循環器病センター、¹⁾先端医療振興財団
²⁾東京医科歯科大学

1. 緒言

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

2. 方法

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

3. 結果と考察

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

4. 謝辞

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

Allogeneic transplantation of acellular aorta in porcine model
Toshia Fujisato, Ken'ichi Yoshida¹⁾, Seiichi Funamoto, Kenji Minatoya, Kazuo Niwaya, Noritoshi Nagaya, Akio Kishida²⁾, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura
National Cardiovascular Center, ¹⁾Foundation for Biomedical Research and Innovation, ²⁾Tokyo Medical and Dental University

P-143

超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調製と 生医学材料としての応用

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

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

1. 緒言

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

2. 実験

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

Table 1. Various polymers used

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

3. 結果と考察

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

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

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

"Preparation of novel multicomponent polymer structures using ultra high pressure technology for biomedical application." Tsuyoshi Kimura¹⁾, Kwangwoo Nam¹⁾, Yoshiyuki Miura²⁾, Kimio Kurita³⁾, Shingo Mutsuo³⁾, Hidekazu Yoshizawa³⁾, Masahiro Okada⁴⁾, Tsutomu Furuzono⁴⁾, Toshiya Fujisato⁵⁾, Akio Kishida¹⁾

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

P103 超高压処理による脱細胞化生体組織への化学修飾法の検討

東京医科歯科大学生体材料工学研究所¹⁾, 国立循環器病センター研究所²⁾, 国立循環器病センター³⁾

岸田 晶夫^{1)~3)}, 南 広祐¹⁾, 木村 剛¹⁾, 藤里 俊哉²⁾, 中谷 武嗣³⁾, 北村 惣一郎³⁾

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

P104 超静水圧印加法を用いる脱細胞化スキャフォールドの開発

国立循環器病センター¹⁾, 先端医療振興財団²⁾, 東京医科歯科大学³⁾

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

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

